

令和元年6月17日現在

機関番号：32629

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12834

研究課題名(和文)超蓄積植物ハクサンハタザオの植物内・根圏におけるCd・Zn動態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Cd and Zn dynamics in plants and rhizosphere of the hyperaccumulator, *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*

研究代表者

菅原 一輝 (Sugawara, Kazuki)

成蹊大学・理工学部・助教

研究者番号：60792405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： 重金属汚染環境の低コスト・低環境負荷の浄化手法として植物を用いた手法であるファイトレメディエーションが注目されているが、環境浄化に用いられる特定の重金属を高濃度で蓄積可能な植物における重金属吸収・蓄積メカニズムは明らかになっていない。本研究ではCd、Znの超蓄積植物であるハクサンハタザオを対象として環境からの重金属吸収および植物中における重金属の動態について検討を行った。ハクサンハタザオは根から重金属を可溶化する物質を分泌することで、環境中の重金属を積極的に取り込んでいく可能性が示唆され、吸収された重金属種により輸送速度、局在部位が異なることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重金属による環境汚染に起因する人々への健康被害は今なお世界規模の問題となっている。そのような汚染に対して、特定の重金属を高濃度で蓄積する植物を用いた低コスト・低環境負荷の浄化手法としてファイトレメディエーションが注目されているが、環境浄化に用いる植物がどのように重金属を吸収・蓄積するのかが明らかになっていなかった。本研究はその一端を明らかにし、植物単体による環境浄化が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)： Phytoremediation, a method using plants as a purification technique of low cost and low environmental load of heavy metal polluted environments, has attracted attention, but the mechanism of heavy metal absorption and storage in plants which can accumulate specific heavy metals used for environmental purification at high concentration has not been clarified. In this study, we examined the absorption of heavy metals from the environment and the dynamics of heavy metals in plants of *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*, which is a hyperaccumulating plant of Cd and Zn.

It was suggested that *A. halleri* ssp. *gemmifera* actively ingested heavy metals in the environment by secreting a substance that solubilizes heavy metals from the roots, and it was clarified that the transport rate and localization site differ depending on the heavy metal species absorbed.

研究分野：環境科学

キーワード：ファイトレメディエーション ハクサンハタザオ カドミウム 亜鉛 元素動態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重金属による環境汚染は自然由来・人為的な要因を問わず、世界各地で今なお問題となっている。特に東南アジア地域においては自然由来のヒ素による健康被害を受ける可能性のある人数は6000万人に及ぶと試算され(Argos et al., 2010, Lancet 376(9737): 252-258)、中国やタイではコメ中に含まれるカドミウム(Cd)が各国の基準値を超過している例が数多く報告されている(Zhao et al., 2015, Environ. Sci. Technol. 49: 750-759)。特にカドミウムに関しては各国の環境基準値が厳しく規制される傾向にあり、日本においても平成23年から水質汚濁に係る環境基準値が0.01 mg/Lから0.003 mg/Lに厳格化されている。このように環境基準値の厳格化に伴い環境浄化対策が必要になると考えられるが、土壌への主な浄化対策である掘削・客土法や水質浄化法である膜浄化法はコストが高く、適応できる事例および状況が限られているのが現状であり、低コストで持続可能な環境浄化手法が求められている。

植物を利用した環境中からの有害元素回収技術であるファイトレメディエーションは1960年代から提唱され、特に土壌汚染浄化に関して研究開発が進められてきた。ファイトレメディエーションに用いる植物は特定の有害重金属を選択的に高濃度で地上部に蓄積する特徴を持ち、これまでにヒ素を高濃度で蓄積するモエジマシダ(*Pteris vittata*)やカドミウムおよび亜鉛を選択的に高濃度で蓄積する植物であるアルプスグンバイナズナ(*Thlaspi caerulescens*)に関する研究報告が数多くなされている(Rascio N and Navari-Izzo F, 2011, Plant Sci, 180:169-181)。アルプスグンバイナズナと同じくカドミウムと亜鉛を高濃度で蓄積する植物として、東アジアが原産であるハクサンハタザオ(*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*)の研究が近年進められている。ハクサンハタザオは地上部の乾燥重量あたりカドミウムを約0.3%、亜鉛を5%と高濃度で蓄積することが知られており、申請者の研究グループではカドミウムおよび亜鉛の実汚染土壌にて吸収実験を行い(井上ら 2014, ケミカルエンジニアリング, 59: 57-61)、水耕栽培系においてカドミウムと亜鉛の吸収・蓄積経路に関する検討を行った結果、ハクサンハタザオは高濃度の亜鉛が存在している環境であっても、カドミウムの吸収が阻害されないことを示した(Sugawara et al., 2014, 11th IPC Abstracts)。

このような特定の元素を高濃度で蓄積する植物の吸収・輸送・蓄積経路は一般的な植物とは異なることがこれまでの研究で示唆されているものの、その全容は未だに解明されていない。特に吸収に関しては、植物単体の機能の他に共存する微生物の作用によって吸収促進が起きる例がモエジマシダで報告されており、植物ごとに異なることが予想される。ハクサンハタザオの場合、有害元素であるカドミウムを環境中で共存している可能性が高い亜鉛存在下であっても吸収可能であることはこれまでに報告されていないため、そのメカニズム解明の学術的意義は非常に大きいと考えられる。また、環境中からのカドミウム吸収経路に関して、ハクサンハタザオ単体の作用で積極的な吸収が行われているのであれば、その機構の解明は環境浄化への応用のみならず、植物生理学的な視点からもインパクトは高いと思われる。

2. 研究の目的

本研究では、ハクサンハタザオにおける土壌環境からのカドミウム・亜鉛の吸収および植物体内での動態の解明を目的とし、2年間の研究期間でハクサンハタザオに対し、ポジトロンイメージング装置(PETIS)を用いた植物体内における元素動態の観察、レーザーアブレーション・誘導結合プラズマ質量分析装置(LA-ICP-MS)および薄膜拡散ゲル(DGT-gel)を用いた根圏重金属イオンのマッピング、多変量解析を用いた培養条件が及ぼす植物内元素への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)PETISを用いたハクサンハタザオ植物体内における元素動態の観察

実験に用いたハクサンハタザオは提供された種子を水耕栽培条件下において発芽、栽培したものを供した。植物の培養は近縁の植物であるシロイヌナズナの栽培条件に準じ、 $\times 1/5$ Hoagland培地を用い、人工気象機内において気温22℃、明期16時間、暗期8時間の長日条件で栽培を行った。

2ヶ月ほど栽培を行ったハクサンハタザオをPETIS用のセルに移し、 ^{65}Zn および ^{107}Cd を非放射性的のZnおよびCdと共に培地に添加し、36時間から45時間測定を行った。得られた測定データはImage Jを用いて解析を行い、測定時間内における植物体中のCdおよびZnの動態を時系列で可視化した。

(2)LA-ICP-MSおよびDGT-gelを用いたハクサンハタザオ根圏重金属イオンのマッピング

(1)で準備したハクサンハタザオ株を宮城県内で採取したカドミウム・亜鉛含有土壌を充填した片面が開閉可能なアクリル製容器に移植し、根が十分伸長するまで2ヶ月程度(1)と同条件で栽培を行った。十分根が伸長したことを確認後、アクリル容器の側面を取り外し、露出した根にDGT-gelを押し当て24時間固定した。また、同時にコントロールとして根圏範囲外の土にも同様にDGT-gelを押し当てた。その後、ゲルを取り外し、窒素雰囲気下のLA-ICP-MSにおいてゲルを直接分析することで、ハクサンハタザオ根圏における重金属分布の分析を行った。

(3)多変量解析を用いた栽培条件が及ぼす植物内元素への影響

(1)で準備したハクサンハタザオ株を宮城県内で採取したカドミウム・亜鉛含有土壌を充填した3号ポットに移植し、移植時の固形肥料の施肥の有無と土壌 pH6.0、6.5、7.0(全て施肥有り)の5条件で3ヶ月間栽培を行った。栽培は室内温度22℃、明期16時間、暗期8時間の長日条件とし、水は2日に一度適量を与えた。栽培後の植物は洗浄・乾燥させ、硝酸で分解後にICP-AESによってCdおよび植物の必須元素の測定を行った。また土壌に関しても水抽出、CaCl₂による交換態抽出、1N HClによる酸抽出を行い、各形態のCdおよびZn濃度の定量を行った。各条件について元素濃度をデータセットとし、統計解析ソフト“R”を用いて多変量解析を行い、栽培条件が植物中の元素濃度に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1)ハクサンハタザオ植物体内における元素動態の観察

⁶⁵Zn および ¹⁰⁷Cd を非放射性的な Zn および Cd と共に培地に添加し、Zn は45時間、Cd は36時間測定を行った。キャリアを加えない ⁶⁵Zn では実験開始後6時間で根から株元に輸送され、15時間後には葉脈に到達し、最終的に18時間後以降には葉肉にZnが到達している様子が観察された。一方で10 μMのキャリアZnを加えた場合では株元への到達時間は実験開始から9時間後とキャリア無しの場合に比べ速度の低下が見られ、さらに輸送量も少なくなる傾向にあった。葉脈への到達時間は21時間後となり、顕著な葉肉への移行は45時間の測定時間内では確認されなかった。

一方、¹⁰⁷Cdの場合はキャリアを加えなかった場合、株元に到達するまでに実験開始後から12時間を要した。さらに葉脈への輸送が確認されたのは36時間後であった。従って、ZnとCdでは根における吸収速度と植物体内における輸送速度に大きな差があることが明らかになった。

我々がこれまでに行った侵襲的な分析によるハクサンハタザオのZnとCdの吸収および輸送速度の検討について、Znに比べてCdは時間を要することが示唆されていたが、非侵襲的な本実験においてその仮説が実証され、ZnとCdの吸収・輸送速度は明らかな差があることが視的に示された。

(2)ハクサンハタザオ根圏重金属イオンのマッピング

実汚染土壌でのハクサンハタザオの重金属吸収メカニズムを明らかにするために、根圏土壌における重金属イオンのマッピングをLA-ICP-MSおよびDGT-gelを用いて実施した。根が到達していないバルクの土壌をマッピングした場合、CdとZnの存在位置はほぼ一致していたのに対し、Feは全く異なる存在位置を示していた。

それに対して根圏土壌においては、Cd、ZnおよびFeの3種類でほぼ同じ存在分布を示していた。実際の根の位置と重金属イオンの存在場所を比較すると、根の先端部に位置する場所で重金属イオンが分布していることが明らかになった。

これまでに実施したハクサンハタザオの圃場実験において、ハクサンハタザオを植栽した土壌では植物が利用可能な形態のCdが常に一定割合で存在していることが示されていたが、本研究結果によってハクサンハタザオは根の分泌物によって土壌中の金属イオンを可溶化させ吸収・蓄積する機構を有していることが示唆された。

(3)多変量解析を用いた栽培条件が及ぼす植物内元素への影響

重金属の吸収や栽培条件がハクサンハタザオへ及ぼす影響を検討するため、施肥の有無と土壌pHをコントロールして栽培試験を行った。施肥をした場合、無施肥の場合と比べて有意にバイオマスおよび植物中のCd・Zn濃度が上昇した。多変量解析の結果、肥料に含まれる栄養成分が大きく影響していることが示唆された。また、土壌pHを変更した場合、土壌pHが低い方が土壌中からのCd・Zn溶出が望め植物体中の濃度が高くなることが予想されたが、pH6.0、6.5、7.0の3条件で有意な差は確認されなかった。さらに、pHが低い順にバイオマスが小さくなる傾向が見られ、土壌pHは重金属吸収よりも植物の生育自体に及ぼす影響の方が大きいことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Huang Y- Kohda T., Qian ZJ., Chien MF., Ikeda H., Yin Y.-G., Kawachi N., Sugawara K., Kitajima N., Suzui N., Watabe H., and Inoue C: Using Short Half-life Nuclide ¹⁰⁷Cd for Real-time Imaging and Analysis of Cadmium Dynamics in Cd-Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* ssp. *gemma* by PETIS System CYRIC Annual Report 2016-2017 (2019) 107-110

Akane HAYASHI, Kazuki SUGAWARA, Shigeru KATO, Seiichi SUZUKI: Acceleration of Cd accumulation by *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* using fertilization Proceeding for International Conference on Plant & Soil Science (2019) 30-34 査読有

菅原一輝、北島信行、鈴木誠一: 多変量解析によるヒ素超蓄積植物および非蓄積植物におけるヒ素蓄積に伴う必須元素挙動の解析, Journal of Environmental Biotechnology (2018) 73-80 査読有

SUGAWARA Kazuki and SUZUKI seiichi: Evaluation of Impact of Arsenic Accumulation on Behavior of Essential Elements in *Pteris vittata*, (2018) in press 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Akane HAYASHI, Kazuki SUGAWARA, Shigeru KATO, Seiichi SUZUKI: Acceleration of Cd accumulation by *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* using fertilization. International Conference on Plant & Soil Science (2019.3)

Kazuki SUGAWARA, Masaoki UNO, Chihiro INOUE, Seiichi SUZUKI: VISUALIZATION OF HEAVY METAL ELUTION BEHAVIOR OF RHIZOSPHERE OF *ARABIDOPSIS HALLERI* SSP. *GEMMIFERA* BY LA-ICP-MS USING DGT GEL. 15th International Phytotechnology Conference (2018.9)

菅原一輝、工藤宏史、横山俊、井上千弘: カドミウム超蓄積植物ハクサンハタザオ根分泌物の重金属溶出特性の検討. 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会 (2018.6)

林朱音、菅原一輝、鈴木誠一: 施肥による超蓄積植物ハクサンハタザオの重金属吸収促進効果の検討. 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会 (2018.6)

Kazuki Sugawara, Hiroshi Kudo, Seiichi Suzuki, Chihiro Inoue: Contribution of roots exudates of *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* for Cd and Zn elution in contaminated soil. 14th International Phytotechnologies Conference (2017.9)

Y. Huang, ZJ. Qian, MF. Chien, K. Sugawara, N. Suzui, YG. Yin, N. Kawachi, H. Watabe, N. Kitajima, C. Inoue: Visualization of Zinc translocation dynamic in hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* and non-accumulator *Arabidopsis thaliana*. 14th International Phytotechnologies Conference (2017.9)

北島 信行, 黄毅, 菅原一輝, 三浦貴生, 岨中真洋, 井上千弘: 超集積植物を活用した坑廃水中カドミウムの除去. 資源・素材&EARTH2017 (札幌) (2017.9)

菅原一輝, 鈴木誠一: 多変量解析による超蓄積植物モエジマシダにおけるヒ素蓄積に伴う必須元素挙動の解析. 第2回環境微生物合同大会2017 (2017.9)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。