

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510103

研究課題名(和文)水生植物における重金属の吸収機構と体内挙動の解明および水圏環境浄化への応用

研究課題名(英文)Elucidation of metal absorption and accumulation mechanism in aquatic plants  
-potential for phytoremediation of aquatic environment-

研究代表者

原田 英美子(Harada, Emiko)

滋賀県立大学・環境科学部・准教授

研究者番号：20232845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：水圏環境のファイトレメディエーションには水生の重金属集積植物の利用が有望視されている。本研究では、代表的な単子葉沈水植物であるオオカナダモに着目した。水生植物が水圏中の放射性セシウム(Cs)の動態に及ぼす影響を調べた。さらに、琵琶湖水圏で採集されたオオカナダモが高濃度のマンガン(Mn)を含んでいることを見出した。植物のMn濃度は再現性のある明確な季節変動をしていることから、水生植物のMn吸収に影響する可能性のある野外の環境要因の調査も併せて行った。

研究成果の概要(英文)：Here we report cesium (Cs) and manganese (Mn) accumulation of *Egeria densa* plants, potential biosorbents to extract toxic or valuable metals from the environment. Plants, waters, and sediments were collected in Fukushima Prefecture. The radiocesium was measured using a germanium semiconductor detector. The two-dimensional metal distribution of leaves showed the predominant localization of Cs in the cell wall or apoplasmic regions, suggesting the possible absorption mechanism of Cs in the plants. In order to investigate Mn accumulation in *E. densa*, plants were collected in a circular drainage canal in a settlement at the eastern side of Lake Biwa. The plants contained 18000 ppm of Mn, above the hyperaccumulation level as 10000 ppm. Mn contents in plants were remarkably higher between spring and summer than in autumn. The presence of Mn oxides on the leaves suggests that the epidermal bacterial flora affects the metal accumulation in aquatic plants.

研究分野：環境科学

キーワード：オオカナダモ 重金属集積植物 水生植物 セシウム ファイトマイニング ファイトレメディエーション 放射光蛍光X線分析 マンガン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 重金属汚染環境のファイトレメディエーション法の開発としてはこれまで主に、陸生の草本植物を用いた重金属集積機構の解明とその応用に関する研究が進められてきた。結果として、土壌の浄化法に関する技術開発は進んできている。しかし、水圏の浄化に関する研究は、水生植物の性質についての情報が乏しいことから、理論的の裏付けがほとんどなされていない。水生植物の利用により、土壌から水に至る広範囲の汚染を、植物を使い分けることにより除去できる可能性がある。2011年3月の福島第一原子力発電所の事故により、大量の放射性物質が飛散した。放射性物質は陸地だけでなく、湖沼や貯水池においても汚染を引き起こしている。

(2) 環境中の有用金属を濃縮することができる重金属集積植物を用いた研究成果は、レアメタルなどの有用金属の植物による濃縮、いわゆるファイトマイニング(植物採鉱)の手法に応用することも期待されている。本研究で着目したマンガン(Mn)はレアメタルの1種であり、産業上重要性が高いものの、現在はほぼ輸入に依存している。

(3) 水生植物はその生活形からいくつかに分類されている。植物体全体が水面下にあり、根は水底に固着しているものを沈水植物と呼ぶ。沈水植物は水圏の生態系に大きく影響を及ぼすと考えられ、日本の主な湖では比較的詳細な分布調査が行われている。オオカナダモ(*Egeria densa*)単子葉植物、トチカガミ科に属する南米原産の沈水植物である。栄養繁殖のみで効率よく増殖し、琵琶湖南湖の沈水植物の優先種の一つとなっている。水生植物は重要なバイオマスの一つであるが、現在その有効利用はごく限られている。

## 2. 研究の目的

植物を用いた環境浄化法であるファイトレメディエーションには、これまで主に陸生の植物の利用が想定されており、陸生の重金属集積植物は本法に用いる植物材料として有望視されている。水圏においてもこのような手法の適用は可能であると考えられるが、これまでは水生植物の性質に着目した研究例は少なく、水生植物を有効に利用するための理論構築が望まれている。本研究では、代表的な単子葉沈水植物であり重金属に耐性・蓄積性を持つことが報告されているオオカナダモを用いて重金属集積機構を解明し、水圏の環境浄化および有用金属の回収のための技術開発を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) オオカナダモ等の水生植物が水圏中の放射性セシウム(Cs)の動態に及ぼす影響

福島県内で採集したオオカナダモの放射

## 性Csの分析

水圏でのCsの挙動に関する情報を得るため、オオカナダモの放射性Csの蓄積を調査した。福島県内の4か所(伊達郡桑折町1か所、相馬市2か所、南相馬市1か所)において、2012年~2014年夏にオオカナダモ、水、底泥のサンプリングを行った。野外でサンプリングした植物、水、底泥は測定前処理として、植物体は破碎し、底泥は5日間風乾後、100ml容器に詰めた。放射性Csである<sup>137</sup>Csおよび<sup>134</sup>Csの濃度をGe半導体検出器を用いて測定した。

## 放射光蛍光X線分析を利用した元素イメージングによるCs集積部位の解明

実験室内での栽培系を用いて、Csの吸収、蓄積機構および植物体内での局在を調査した。実験室内で培養維持されたオオカナダモの節から形成された小植物体を切り離し、20μM安定同位体CsClを含むGaudet's medium中で3日間水耕栽培した。Cs処理した植物体から採取した葉について、SPring-8の放射光を利用した蛍光X線分析(micro X-ray fluorescence、μ-XRF)を行い、Csの局在と他の元素との相関を調査した(課題番号2012B1556)。蛍光線分析用のサンプル調製に関しては、葉をそのまま凍結させるか、あるいは凍結切片を作成してサンプルとした。

## オオカナダモの無機栄養吸収部位の解明

琵琶湖水圏で採集したオオカナダモを実験室で水耕栽培した。生育速度をそろえたシュートを栽培し、処理チャンバーに移した(図1)。このチャンバーは、シュートと根を異なる培地条件で処理できるように設計されたものである。この装置を用いて、オオカナダモの無機塩の吸収が、陸上の植物と同様根から行われているのか、あるいは葉の表面から吸収する能力があるのかを調べた。植物体を回収後、湿式分解を行い、Na、Ca、Mgを干渉抑制剤として添加し、AAS(Atomic Absorption Spectrometry、原子吸光分析法)でCsの分析を行った。



図1 オオカナダモの無機栄養の取り込み部位を組織別に調べるための処理チャンバー。

(2)琵琶湖水圏のオオカナダモのMn集積性

## 琵琶湖水圏の水生重金属集積植物のスクリーニング

2011 年秋に琵琶湖東岸の下石寺集落環濠でオオカナダモ等の水生植物を採集し、酸を用いた湿式分解ののち ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry、誘導結合プラズマ発光分光分析法) で金属の定量分析を行った。植物の生育環境から水および土壌も採集し金属濃度を測定することにより、濃縮係数を算出した。

### 琵琶湖水圏のオオカナダモの Mn 含有量の季節変動と関連する環境要因

集落環濠で 4 月から 10 月にかけて月に 1 度オオカナダモを採取した。重金属集積性に影響を与える可能性がある環境要因として、採集地の水深、水温、pH、流速、濁度、溶存酸素量、硝酸イオン濃度を測定した。

### オオカナダモにおける Mn の蓄積機構：付着微生物の影響

集落環濠よりオオカナダモを採集し、シアロバクテリアの培養に汎用される BG-11 培地を用いて付着微生物の混合培養を行った。培養した付着微生物の Mn 集積量を ICP-AES を用いて調べた。そこで、限界希釈法や画線分離法を用いて、付着微生物の単離培養を試みた。得られた株の 16S rRNA の配列を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) オオカナダモ等の水生植物が水圏中の放射性 Cs の動態に及ぼす影響

#### 福島県内で採集したオオカナダモの放射性セシウムの分析

2012 年夏に福島県内の 4 地点で採集した試料を測定した結果、植物および底泥では南相馬市のサンプルが最も高い値を検出した。いずれの地点も水の放射性 Cs は検出限界以下もしくは不検出であった。

#### 放射光蛍光 X 線分析を利用した元素イメージングによるセシウム集積部位の解明

マイクロビーム (0.7 μm 直径) を用いた細胞レベルでの元素イメージングにより、オルガネラレベル、特にシンプラストとアポプラストの金属の分布に関する情報が得られることが期待された。オオカナダモの葉は表面、裏面それぞれ 1 層の細胞から成っているので、切片を作成せず、凍結させた葉をそのまま測定することにより細胞レベルでの解析が可能であった。この結果、葉の細胞壁もしくはアポプラスト領域に Cs、K や他の金属が局在していることが判明した。ペクチン、セ

ルロースなどの細胞壁の多糖類が金属類を吸着している可能性が考えられた。

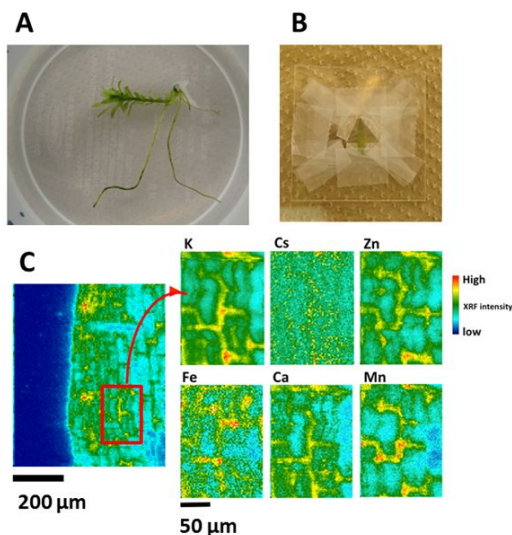


図 2 SPring-8 の高輝度放射光を利用し、オオカナダモ葉の μ-XRF による元素イメージングを行った (Kowata *et al.*, 2014)。(A)植物体は安定同位体の Cs ( $^{133}\text{CsCl}$ ) で実験室内で処理した。(B)葉を切り取り、ポリエステル製のフィルム (Mylar film) を用いてアクリル製ホルダー (4 x 4 cm) に装着し、液体窒素で冷却しながら分析を行った。(C)K、Cs、Zn、Fe、Ca、および Mn の分布を示した。

### オオカナダモの無機栄養吸収部位の解明

陸生植物とは異なり、シュートと根いづれからも同程度の効率で Cs を吸収していた。これらのことから、オオカナダモは植物体全体から、水中の放射性 Cs を効率的に吸収していることが推定された。

### (2) 琵琶湖水圏のオオカナダモのマンガン集積性

#### 琵琶湖水圏の水生重金属集積植物のスクリーニング

調査地では、沈水植物であるオオカナダモ、エビモ、ハゴロモモ、浮葉植物ヒシの生育が確認された。採集した植物体をそれぞれ洗浄し乾燥した後、硝酸および過酸化水素を用いて湿式分解を行い、金属分析を行った。その結果、オオカナダモに著しい Mn の集積が認められた。その最大濃度は、陸生の Mn 超集積植物に匹敵する 18,000 ppm という値であった。

#### 琵琶湖水圏のオオカナダモの Mn 含有量

## の季節変動と関連する環境要因

2012年 - 2014年の3年間の環濠での調査の結果、オオカナダモのMn集積量は再現性のある明確な季節変動をしていた。春先から夏にかけて濃度が高く、バイオマスが増加する秋にかけて減少する傾向が見られた。個体別最大蓄積量は56,000 mg/kgにも上った。環境要因がオオカナダモのMn集積量に及ぼす影響を調べるため、実験室内で人工的に栽培したオオカナダモを用いて実験を行った。異なるpH処理区を設け植物へのMn集積と培地pHについて調べたが、関連性は見られなかった。また、屋内で栽培したオオカナダモのMn濃度は野外最終物と比べて著しく低く、何らかの環境要因が水生植物のMn集積に影響を与えていることが考えられた。

### オオカナダモにおけるMnの蓄積機構： 付着微生物の影響

混合培養した付着微生物の金属含有量をICP-AESを用いて調べたところ、Mnを効率的に吸収していた。オオカナダモ葉表面より得られた微生物のrRNAの配列を調べ種の判別を行ったところ、糸状藻に分類されるシアノバクテリアが存在していることが判明した。呈色反応試薬ロイコベルリンブルーを用いて藻類およびオオカナダモ葉表面のMn酸化物の検出実験を行ったところ、3価もしくは4価の酸化型Mnの蓄積が確認された。このことからオオカナダモにおけるMn集積には、葉表面の付着藻類が関与するMn酸化物の生成が関連していることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Hikaru Kowata, Yoshiyasu Nagakawa, Noboru Sakurai, Akiko Hokura, Yasuko Terada, Hiroshi Hasegawa and Emiko Harada (2014) Radiocesium accumulation in *Egeria densa*, a submerged plant – possible mechanism of cesium absorption. J. Anal. At. Spectrom., 2014, 29, 868-874.  
DOI: 10.1039/C3JA50346A

原田英美子、セシウムとストロンチウムの植物における動態と農地の放射能汚染の除去、滋賀県立大学環境科学部年報、16:44-46.  
<http://www.ses.usp.ac.jp/nenpou/np16/02-10np16tokusyu.pdf>

[学会発表](計15件)

原田英美子、琵琶湖水圏における水生植

物の重金属集積とその有効利用、東京電機大学分析化学研究室特別セミナー、2015年3月24日、東京電機大学(東京都足立区)。

原田英美子、浅山拓馬、西田和真、辻康介、長谷川博、琵琶湖水圏の水生植物オオカナダモのMn蓄積性、第13回いしでらまちづくり勉強会、2015年3月22日、下石寺公民館(彦根市)。

原田英美子、浅山拓馬、西田和真、辻康介、長谷川博、琵琶湖水圏の水生植物オオカナダモのMn蓄積性、第12回いしでらまちづくり勉強会、2014年11月16日、下石寺公民館(彦根市)。

原田英美子、分光分析法を用いた水生植物の元素集積機構の解明—生物資源の有効利用に向けて—プラズマ分光分析研究会 第92回講演会、2014年10月10日、島津製作所九州支店(福岡市)。

浅山拓馬、白木望美、井上翔太、奥田絵里奈、原田英美子、長谷川博、沈水植物オオカナダモ(*Egeria densa*)のMn集積機構の解明、日本植物学会第78回大会、2014年9月12日-14日、明治大学(川崎市)。

原田英美子、木幡光、浅山拓馬、永川栄泰、櫻井昇、保倉明子、寺田靖子、長谷川博、沈水植物オオカナダモ(*Egeria densa*)のセシウム吸収—野外調査とセシウムの個体内分布のイメージング—、日本植物学会第78回大会、2014年9月12日、明治大学(川崎市)。

原田英美子、保倉明子、放射光X線で読み解く植物の重金属蓄積機構、第74回分析化学討論会、2014年5月24日、日本大学(郡山市)。

浅山拓馬、白木望美、井上翔太、奥田絵里奈、長谷川博、原田英美子、水生植物オオカナダモ(*Egeria densa*)のMn蓄積性、日本農芸化学会2014年度(平成26年度)大会、2014年3月27日~30日、明治大学(川崎市)。

浅山拓馬、白木望美、井上翔太、奥田絵里奈、長谷川博、原田英美子、水生植物オオカナダモのMn蓄積性に影響する環境要因の調査、第11回いしでらまちづくり勉強会、2014年3月16日、下石寺公民館(彦根市)。

林千鶴、原田英美子、オオカナダモ付着藻類の分子生物学的手法による解析、第11回いしでらまちづくり勉強会、2014年3月16日、下石寺公民館(彦根市)。

Hikaru Kowata, Yoshiyasu Nagakawa, Noboru Sakurai, Akiko Hokura, Yasuko Terada, Hiroshi Hasegawa and Emiko Harada. Mechanism of cesium absorption in a submerged plant, *Egeria densa*. 4th International Symposium on Metallomics 2013, July 8th ~ 11th, 2013, Oviedo

(Spain).

木幡光、永川栄泰、櫻井昇、保倉明子、寺田靖子、長谷川博、原田英美子、沈水植物オオカナダモ (*Egeria densa*) のセシウム吸収機構。日本農芸化学会 2013 年度(平成 25 年度)大会、2013 年 3 月 24 日～ 28 日、東北大学(仙台市)。

原田英美子、水生植物を用いた重金属汚染の浄化および有用金属の回収、滋賀県立大学シーズ発表会、2012 年 11 月 28 日、フェリエ南草津(草津市)。

原田英美子、植物におけるセシウムとストロンチウムの動態、分子ハープ研究所セミナー、2012 年 11 月 23 日、京都市国際交流会館(京都市)。

原田英美子、分子生物学と元素イメージングによる植物の重金属集積機構の解明、日本大学大学院生物資源科学研究科特別講義、2012 年 12 月 21 日、日本大学(藤沢市)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://db.spins.usp.ac.jp/html/seeds/ja/100000166/20012414/12harada.pdf>

(滋賀県立大学 知のリソース(研究者総覧)、植物の力を利用し地球環境問題を解決する、原田英美子)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 英美子(滋賀県立大学・環境科学部・准教授)

研究者番号：20232845

(2)研究分担者

長谷川 博(滋賀県立大学・環境科学部・名誉教授)

研究者番号：00090457

(3)連携研究者 なし