

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00595

研究課題名(和文)水生植物の元素集積に影響する環境要因の解明および水圏からの金属回収法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the environmental factors that affect the element accumulation of aquatic plants : Development of metal recovery method from the hydrosphere

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖水圏で生育するオオカナダモ(*Egeria densa*)では、しばしば高濃度のMnが検出されるが、これは葉の表面に付着した酸化型Mnに由来していた。植物から12株の付着微生物を単離し、遺伝子配列を利用して種の判別を行った。Acidovorax属と判別される菌株などが酸化Mnを産生していた。Mn酸化細菌と水生植物との相互作用が見いだされた。

生育形の異なる水生植物の放射性Cs濃度は、水を介した葉面吸収の寄与が大きい沈水植物及び浮葉植物で高く、経根吸収が主経路の抽水植物で低かった。安定Csと放射性Csの環境動態を比較したところ、放射性Csの環境動態は平衡に達していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Egeria densa plants often efficiently accumulated environmental Mn in Lake Biwa basin. The elevated Mn levels have resulted from the production of biogenic Mn oxide in biofilms on the epidermis. Twelve strains of epiphytic bacteria were isolated from E. densa plants, including those of the genera Acidovorax, found to have Mn-oxidizing activity. These findings provide new insights into Mn oxidizing bacteria that affect metal accumulation in aquatic plants. The results of radiocesium (^{137}Cs) concentrations in aquatic macrophytes showed that the ^{137}Cs concentrations of submerged and floating-leaved plants were an order magnitude higher than the values for emergent plants, which suggests that the foliar uptake of Cs led to the elevations of ^{137}Cs concentrations. The comparison of ^{137}Cs and ^{133}Cs using distribution coefficient and concentration ratio value indicated that the mobility of Fukushima accident derived ^{137}Cs was not in steady state after the radiocesium fallout occurred.

研究分野：Environmental Science

キーワード：安定セシウム オオカナダモ 水生植物 濃縮係数 バイオフィーム 付着微生物 放射性セシウム
マンガン

1. 研究開始当初の背景

(1) 水生植物の機能と有効利用の可能性
水生植物は水環境中での元素の動態において、重要な役割を果たしている。一般的に環境悪化の指標生物とされる場合が多いが、水中の富栄養物質や汚染物質を吸収し、水の浄化に寄与しているとも考えられている。水生植物の生態や分布、水環境中の元素集積性を調査することで、ファイトレメディエーション法(植物を用いた環境浄化法)や、ファイトマイニング法(植物を用いた有用金属の回収法)の技術開発を進めるために有益な情報が得られる。水生植物は植物体の全体もしくは一部が常に水中にあることから、陸生植物とは異なる光合成系・ストレス応答・栄養吸収機構を備えていることがこれまでに示されており、植物生理学的にも興味を持たれている。さらに、湖沼の水生植物は、多くの場合、自治体が回収し産業廃棄物として処分しているが、多額の費用がかかる。循環型社会の構築という観点からも、廃棄物をできるだけ減らし、資源を効率的に利用することが求められている。未利用バイオマスの一つとしての水生植物の有効利用法を開発する必要がある。水生植物の元素集積性に関する研究は陸生植物と比較すると発展途上であり、日本国内では特に研究例が少ない。

(2) 研究組織のこれまでの研究

これまでに、水生の単子葉植物オオカナダモ(*Egeria densa*)に着目し、淡水中の水生植物の元素集積が環境に与える影響や、水生植物による環境浄化および有用金属の回収法に関する研究を進めてきた。オオカナダモは沈水植物に属し、植物体全体が水と接するため、水中の元素の吸収が効率的に行われると考えられる。南アメリカ原産の外来種で、日本では栄養繁殖により効率的に増殖する。琵琶湖水圏で採集した数種の水生植物の元素集積量を比較したところ、陸生の超集積植物に匹敵する量の、18,000 ppm にのぼるマンガン(Mn)がオオカナダモ植物体から検出された。また、福島第一原子力発電所(FDNPP)事故後に飛散した放射性セシウム(Cs)の水圏での挙動に水生植物が寄与していることを想定し、野外調査および放射性元素の分析を行った。その結果、オオカナダモは水圏の放射性Csの動態に大きな役割を果たしていることが示された。野外調査の結果に基づき、実験室内での栽培系を用いて、元素の集積機構を詳しく調べた。その結果、オオカナダモは通常の陸生植物とは異なり、シュートと根の双方からの無機栄養を効率的に吸収していた。また、放射光蛍光X線分析法を用いた元素イメージングにより、葉の無機イオンは主に細胞壁もしくはアポプラスト領域に局在していることが判明した。

(3) 本研究を計画した意図

このように、オオカナダモは水中の無機元素を効率的に吸収する性質があると考えら

れた。その一方、研究の過程で、植物の元素吸収・集積能力は水圏の環境に大きく依存している可能性が示された。例えば、3年に渡る経年調査により、オオカナダモのMn含有量は季節変動していることが確かめられた。さらに、オオカナダモの高Mn集積性は、実験室内の栽培実験系では完全に再現することができなかった。このことから、植物の付着藻類の関与を含む何らかの環境要因がオオカナダモのMn集積に寄与していることが推定された。また、福島県内でオオカナダモを採集し、放射性セシウム(¹³⁴Cs、¹³⁷Cs)の経年変化を調べている。これまでに、採集地により経年的に上昇する場所と減少する場所がみられた。Cs集積についても化学的・生物学的な環境要因が何らかの影響を及ぼしていることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では野外調査と室内実験を併せて行い、水圏の生物学的・非生物学的な環境要因が水生植物の元素集積のおよぼす影響を解明することを目的とした。特に、水生植物における放射性セシウムと有用金属であるマンガンの水生植物における吸収・蓄積機構や環境中での元素の動態における植物の寄与に関して調べた。

Mnについては、植物の重金属集積機構を調査するとともに、水圏の浄化技術および有用金属の効率的な回収法の開発を試みた。

放射性Cs集積については、水生植物におけるFDNPP事故由来の放射性Csの集積レベルを明らかにすること及び安定Csとの挙動比較により水圏環境における放射性Csの環境動態の平衡の可否を評価することを目的として調査を行った。

3. 研究の方法

沈水植物オオカナダモのMn集積機構の解明

琵琶湖水圏の広範囲で水生植物を採集し、生育調査および含有元素の分析を行った。この際、水圏の環境要因の調査も併せて行うことで、非生物学的な環境要因の影響を考察した。

さらに、植物に付着している微生物の種の判別と機能を調べることにより、生物学的環境要因の植物の元素集積におよぼす影響を調べた。こ植物表面の微生物を限界希釈法を用いて単離して培養し、単一株を得て特徴づけを行った。rRNAの配列を利用した遺伝子バーコード等による分子生物学的手法を用いて種を判別した。

走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)、および表面元素分析装置(EDX)を用いて、金属元素の局在部位を調べた。

放射性 Cs の水生植物への移行に影響を及ぼす環境要因

福島県内における水生植物の放射性 Cs の集積状況を調査した。これまでの調査によると、オオカナダモの放射性 Cs は経年的に上昇または減少する地点が見られたことから、1 年毎に調査を実施した。オオカナダモの他、生育形の異なる水生植物も採取し、水生植物の形態と元素集積性の関係について調査した。水圏の生物的・非生物的環境要因を明らかにするため、環境水及び堆積物も併せて採取した。更に、これらの試料の安定 Cs (Cs-133) を測定し、土壌 - 土壌溶液間分配係数 (Kd) と生物 - 環境媒体濃縮係数 (水の濃縮係数 (CR_{wo-water})、堆積物の濃縮係数 (CR_{wo-sed})) を指標とし、放射性 Cs との環境動態を比較した。

4. 研究成果

沈水植物オオカナダモの Mn 集積機構の解明

彦根市の調査地に加え、北湖の調査地として長浜市、彦根市内の 3 か所、南湖の調査地として大津市の瀬田川洗堰付近の 1 か所を選び、オオカナダモを採集した。ICP-OES (誘導結合プラズマ発光分光分析装置) などを用いて元素の集積量を測定し、地域的・季節的な変動を調べたところ、オオカナダモの Mn 集積量に採取地や採集年で著しく差がみられた。

オオカナダモの元素集積におよぼす環境要因のうち、生物学的要因として、付着微生物の寄与について詳しく調べた。呈色試薬を用いて調べたところ、黒色のバイオフィームが観察されるオオカナダモ葉表面に水に不溶性の酸化型 Mn が大量に付着していることが確認された。オオカナダモにおける Mn 集積には付着微生物が関与していることが考えられた。

そこで、植物体表面の付着微生物を限界希釈法を用いて培養した。ゲノム DNA を調製し、rRNA の配列を増幅させて解析し、種の判別を行い、*Acidovorax* 属と判別される菌株など計 12 の単離株を得た (表 1)。そのうちの 8 つの菌株で酸化 Mn が検出された。この中には、既知の Mn 酸化細菌のグループには属さない菌株が含まれていた。

培養条件による Mn 酸化能の差を調べた結果、寒天平板培養時のみ Mn 酸化物の生産が確認された。細菌株はそれぞれ成長速度が大きく異なったが、高濃度の Mn を含む培地で生育することが確認された。これらの知見から、オオカナダモにおける Mn 集積には、葉表面の付着細菌による Mn 酸化物の生成が関連していると考えられた。Mn 酸化細菌は環境中の金属の動態に関与しているが、本研究により水生植物とも相互作用していることが明らかになった。

表 1 オオカナダモから得られた単離株

Ed_isolate	Gene annotation of the closest hit
01	<i>Rhizobium</i> sp. MSSRF QS100
02	<i>Acidovorax</i> sp. Z022
03	<i>Pseudomonas putida</i>
04	<i>Comamonas testosteroni</i>
05	<i>Rhizobium</i> sp. MSSRF QS100
06	<i>Acidovorax</i> sp. Z022
07	<i>Acidovorax</i> sp. Z022
08	<i>Micromonospora</i> sp. FXJ1.540
09	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
10	<i>Acidovorax</i> sp. Z022
11	<i>Bacillus</i> sp. SG3-2
12	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>

オオカナダモ植物体において付着微生物が関与する Mn の集積機構の解明を試みた。SEM-EDX 分析により、葉表面で微生物が付着している部位では、Ca 濃度が高いことが明らかになった。バイオフィームが目視で観察できる植物体を用いて菌叢解析を行ったところ、プロテオバクテリア綱に含まれる微生物が多いことが判明した。

これらの菌株を用いたバイオリクターの構築を試み、高分子ゲルに Mn 酸化細菌を埋め込むことに成功した。しかし、高分子ゲルなどの無生物材料を琵琶湖の環濠水に浸漬したところ、無生物材料の表面でも Mn 酸化反応は起こっているが、植物表面での反応の機構とは反応特性に差異がみられた。さらに、この現象がオオカナダモ特異的に起こるのかを調べるため、近縁の沈水植物に関する基礎的研究を行った。

放射性 Cs の水生植物への移行に影響を及ぼす環境要因

福島県 6 か所にて水生植物及び環境水、堆積物を採取した。各試料の放射性 Cs 濃度を、ゲルマニウム半導体検出器を用いて測定した。放射性 Cs の沈着量が多かった 2 地点 (南相馬市及び飯舘村) では、安定 Cs (Cs-133) も二重収束型 ICP 質量分析装置により測定し、Kd、CR_{wo-water} 及び CR_{wo-sed} を指標として、放射性 Cs (Cs-137) との挙動を比較した。

水生植物は沈水植物 5 種、沈水・抽水植物 1 種、浮葉植物 2 種、抽水植物 3 種の計 11 種を採取・同定した。これらの放射性 Cs の測定の結果、水生植物の生育形により Cs-137 濃度は大きく異なることが明らかとなった。水と葉面の接触面積の大きい沈水植物及び浮葉植物の Cs-137 濃度は 10² Bq/kg オーダーであったのに対し、葉面と水の接触面が少ない抽水植物は 10⁰–10¹ Bq/kg オーダーであった。これらの結果は、水生植物が葉面を介して水から放射性 Cs を吸収していることを示唆していた。先行研究では、オオカナダモが葉面を介して Cs を吸収することを室内実験で実証したことから (Kowata et al., 2014)、水圏環境中においても同様の現象が生じて

いと考察した。

Cs-137 及び Cs-133 の Kd を比較したところ、Cs-133 の Kd の幾何平均値は Cs-137 の Kd よりも約 4 倍高かったことから、Cs-137 は aging 効果により環境中の堆積物に固定されていく過程にあるものと考察された。

水生植物は水及び堆積物の両者から栄養塩を吸収していることから、水の濃縮係数 (CR_{wo-water}) 及び堆積物の CR (CR_{wo-sed}) を Cs-137 と 133Cs ついて比較した。CR_{wo-water} は Cs-137 及び Cs-133 の値で統計的有意差は見られなかった (n=18, p > 0.1)。水を介した葉面吸収は溶存態成分のみを吸収していることから、これら両者には差が見られなかったと考えられた。一方、CR_{wo-sed} は Cs-137 の値が Cs-133 よりも高い値を示した (n=18, p < 0.05)。本結果は Cs-137 が生物体に取り込まれやすい形態で堆積物中に存在していることを示唆していた。本評価は CR_{wo-water} と CR_{wo-sed} の分配比を考慮していないことから、分配比を明らかにすることにより CR をより正確に評価することが今後の課題である。

<引用文献>

Kowata H, Nagakawa Y, Sakurai N, Hokura A, Terada Y, Hasegawa H, Harada E. (2014) Radiocesium accumulation in *Egeria densa*, a submerged plant – possible mechanism of cesium absorption. *J Anal T. Spectrom.* 29: 868-874、査読あり

その他の活動

水生植物の生理学と有効利用に関する包括的な理解を目指し、日本植物学会第 81 回大会関連集会として、「拡がる水生植物の植物学～分野横断的研究のすすめと利活用の可能性～」(2017 年 9 月 8 日)を実施した。また、中学生・高校生にフィールドワークに基盤を置いた研究活動を紹介するため、2016 年と 2017 年に、滋賀県立大学でひらめきときめきサイエンスを実施した。

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 5 件)

永川栄泰、上本道久、黒沢高秀、首藤光太郎、長谷川博、櫻井昇、原田英美子 (2018) 水生植物における放射性 Cs のモニタリング及び非放射性 Cs との挙動の比較. *Proceedings of the 18th Workshop on Environmental Radioactivity*, 2017-6: 226-231、査読あり

辻康介、原田英美子 (2017) オオカナダモ付着微生物のマンガン酸化物生成機構の解明—生物材料と無生物材料の比較—*滋賀自然環境研究会誌* 15: 1-6、査読あり

Tsuji K, Asayama T, Shiraki N, Inoue S, Okuda E, Hayashi C, Nishida K, Hasegawa H, Harada E. (2017) Mn accumulation in a submerged plant *Egeria densa* (Hydrocharitaceae) is mediated by epiphytic bacteria. *Plant Cell Environ.*, 40: 1163-1173. DOI: 10.1111/pce.12910、査読あり

辻康介、浅山拓馬、西田和真、原田英美子 (2016) 琵琶湖水圏における水生植物の重金属集積. *海洋化学研究*, 29: 24-28、査読なし

Harada E, Nagakawa Y, Hokura A. (2016) Accumulation and distribution of cesium in *Egeria densa*, a submerged plant. *SPring-8 /SACLA Research Frontiers* 2015: 96-97、査読なし

〔学会発表〕(計 21 件)

原田英美子、吉崎翔平、市川義崇、辻康介・田辺(細井)祥子、沈水植物オオカナダモ (*Egeria densa*) の付着微生物の菌叢解析とマンガン酸化物の生成. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 15 日～18 日、名城大学(名古屋市).

永川栄泰、上本道久、黒沢高秀、首藤光太郎、長谷川博、櫻井昇、原田英美子、水生植物を指標とした放射性及び非放射性 Cs の動態—2015—2016 年の結果—第 19 回「環境放射能」研究会, 2018 年 3 月 13 日～15 日、高エネルギー加速器研究機構放射線科学センター(つくば市).
原田英美子 (2017) 水生植物オオカナダモの金属集積機構の解明と有効利用法の開発, 第 5 回メタロミクス研究フォーラム, 2017 年 11 月 25 日～26 日、京都薬科大学(京都市).

黒沢高秀、原田英美子、水生植物の現在・過去・未来. 日本植物学会第 81 回大会関連集会「拡がる水生植物の植物学～分野横断的研究のすすめと利活用の可能性～」, 2017 年 9 月 8 日、東京理科大学(野田市).

原田英美子、辻康介、浅山拓馬、長谷川博、沈水植物オオカナダモのマンガン集積性における付着微生物の寄与. 日本植物学会第 81 回大会関連集会「拡がる水生植物の植物学～分野横断的研究のすすめと利活用の可能性～」, 2017 年 9 月 8 日、東京理科大学(野田市).

永川栄泰、上本道久、黒沢高秀、首藤光太郎、長谷川博、櫻井昇、原田英美子、水生植物における放射性セシウムの蓄積状況及び吸収経路の解明. 日本植物学会第 81 回大会関連集会「拡がる水生植物の植物学～分野横断的研究のすすめと利活用の可能性～」, 2017 年 9 月 8 日、東京理科大学(野田市).

Harada E., Asayama T, Tsuji K, Hasegawa H. Hyperaccumulation of manganese in a submerged plant is mediated by epiphytic bacteria. 6th International Symposium on Metallomics 2017, 2017年8月14日~17日、ウィーン大学(オーストリア).
原田英美子、放射光蛍光X線分析を用いた植物の重金属集積機構の解明・高輝度放射光を利用した微量元素計測の最前線. 2017年7月29日、東北大学(仙台).
原田英美子、辻康介、沢田美由紀、長谷川博、沈水植物オオカナダモ (*Egeria densa*) のマンガン集積には付着微生物が関与している、日本農芸化学会 2017年度大会、2017年3月17日、京都女子大学(京都市).
永川栄泰、上本道久、黒沢高秀、首藤光太郎、長谷川博、櫻井昇、原田英美子、水生植物の放射性 Cs 濃度調査及び安定同位体 Cs との挙動の比較 2017、第18回「環境放射能」研究会、2017年3月14日、高エネルギー加速器研究機構放射線科学センター(つくば市)(発表奨励賞受賞).
Harada E. Metal accumulation in aquatic plants -utilization of biomass in Lake Biwa basin, The 2nd UST-USP symposium, 2017年2月28日、サントトマス大学(フィリピン).
辻康介、原田英美子、オオカナダモ (*Egeria densa*) に付着する細菌のマンガン(Mn)酸化、第17回いしでらまちづくり勉強会、2016年11月27日、ほほえみハウス(彦根市).
目片友貴、辻康介、原田英美子、琵琶湖水圏に生育するオオカナダモ、コカナダモおよびクロモの DNA バーコーディング法を用いた種の判別法の確立. 第17回いしでらまちづくり勉強会、2016年11月27日、ほほえみハウス(彦根市).
沢田美由紀、辻康介、原田英美子、オオカナダモ (*Egeria densa*) 付着性マンガン酸化細菌の有効利用、第17回いしでらまちづくり勉強会、2016年11月27日、ほほえみハウス(彦根市).
辻康介、浅山拓馬、西田和真、長谷川博、原田英美子、オオカナダモ (*Egeria densa*) 付着細菌のマンガン酸化能、日本植物学会第80回大会、2016年9月16日~19日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市).
辻康介、原田英美子、オオカナダモのマンガン集積と付着微生物の寄与、滋賀自然環境研究会第26回研究発表会、2016年7月30日、滋賀県立大学(彦根市).
辻康介、浅山拓馬、西田和真、長谷川博、原田英美子、オオカナダモ (*Egeria densa*) の Mn 集積性に及ぼす付着微生物の寄与、近畿作物・育種研究会第181

回講演会、2016年5月28日、滋賀県立大学(彦根市)(優秀発表賞).

辻康介、伊田翔平、谷本智史、廣川能嗣、原田英美子、下石寺集落環濠におけるファイトマイニングの可能性 - 生物材料と無生物材料の比較 -、地域資源の活用による雇用創出フォーラム&ワークショップ、2015年11月28日、ほほえみハウス(彦根市).

Harada E., Asayama T, Shiraki N, Inoue S, Okuda E, Nishida K, Tsuji K, Hasegawa H, Hyperaccumulation and seasonal change of manganese in a submerged plant *Egeria densa*. The 5th International Symposium on Metallomics, 2015年9月9日~12日 Beijing Xijiao Hotel (中国).

辻康介、浅山拓馬、西田和真、長谷川博、原田英美子、オオカナダモ (*Egeria densa*) 付着藻類の解析とマンガン集積性の検討、日本植物学会第79回大会、2015年9月6日~8日、新潟コンベンションセンター(新潟市).

- 21 原田英美子、琵琶湖水圏における水生植物の重金属集積、京都化学者クラブ第299回例会、2015年5月9日、京都大学(京都市).

〔図書〕(計 1件)

Hokura A., Harada E. (2017) Synchrotron Radiation X-Ray Analysis of Metal-Accumulating Plants. In: Ogra Y., Hirata T. (eds) in Metallomics -Recent Analytical Techniques and Applications, pp 125-145, Springer Japan. DOI: https://doi.org/10.1007/978-4-431-56463-8_6

〔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

2016年度

ひらめき ときめきサイエンス~ようこそ大学の研究室へ~KAKENHI HT28220 琵琶湖の水生植物の隠された能力をしらべよう <https://www.jsps.go.jp/hirameki/ht28000/ht28220.pdf>

2017年度

ひらめき ときめきサイエンス~ようこそ大学の研究室へ~KAKENHI HT29226 琵琶湖の水生植物の隠された能力をしらべよう2017 https://www.jsps.go.jp/hirameki/ht29000_ji

sshi/ht29226jisshi.pdf

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

櫻井 昇 (SAKURAI, Noboru)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター, その他部局等, 上席研究員

研究者番号 : 20215685

永川 栄泰 (NAGAKAWA, Yoshiyasu)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター, その他部局等, 副主任研究員

研究者番号 (30587415)

(3)連携研究者

なし