

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：21510085

研究課題名（和文）木本植物を用いた重金属汚染土壌のファイトレメディエーション法の開発

研究課題名（英文）Establishment of phytoremediation technologies of contaminated soils using heavy metal accumulating woody plants

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

研究成果の概要（和文）：重金属集積性の樹木であるヤナギ類を用い、汚染環境の植物による浄化（ファイトレメディエーション）を遂行するための基礎的研究を行った。本申請では、物理化学的手法と、分子生物学的手法を融合させた手法を用いた。植物体内での金属の分布と化学形態を放射光蛍光 X 線分析で調べ、金属の蓄積や解毒に関連すると考えられる遺伝子の同定および特徴づけを行った。鉱山跡地での野外調査を行い、環境中での元素の動態に関してヤナギがどのように寄与しているかを考察した。

研究成果の概要（英文）：Willow (*Salix* sp.) plants have the capability to take up high levels of toxic metals. In this work, I have investigated the phytoremediation potential of the willow plants to clean up the metal pollution in the environment. Several accumulation sites in the plant body and speciation of the endogenous metals were identified by using physicochemical evidences including synchrotron-radiation based X-ray microanalyses. Tissue specific cDNA libraries were constructed to identify the genes for metal accumulation and detoxification. Willow plants growing near an old mining site was also examined to evaluate the metal accumulating ability of this plant in the field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：環境技術・環境材料

科研費の分科・細目：環境修復技術

キーワード：カドミウム、ファイトレメディエーション、ヤナギ、放射光分析、植物、樹木、環境浄化、蛍光 X 線分析

1. 研究開始当初の背景

カドミウムなどの有害重金属による汚染は古くて新しい環境問題である。従来の物理化学的処理のみでは対応が困難であった広範囲の汚染物質除去には、植物を用いたファイトレメディエーション法が適しているとされ、近年その技術開発および理論構築が望まれている。この手法は、植物が根から水分や養分を吸収する能力を利用しているため、低コストで環境に対する負荷が少ない。重金属集積性の植物はこのような用途に有用と考えられ、欧米では植物の同定や金属集積機構の解明について盛んに研究が進められて

いた。一方日本では研究の歴史が浅く、どの植物が重金属蓄積能を持ち、どこに分布しているのか、などの基礎的な情報も十分ではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ファイトレメディエーションの材料としてこれまであまり研究されていない、重金属集積性の樹木を用いて、金属蓄積機構を解明し、土壌の浄化技術を開発することを目的とした。バイオマスが大きな木本植物は土壌中の重金属を効率的に回収することが期待されている。しかし、木本植物の

体内での金属の動態や、金属耐性や蓄積性、輸送をつかさどっている遺伝子の研究などは、現在のところ草本植物ほど進んでいない。本研究において得られる基礎的な知見は、有用な樹木の分子育種や、将来形質転換体を用いてファイトレメディエーションを遂行する際にも有用な情報になると考えられた。

3. 研究の方法

本申請では、物理化学的手法、分子生物学的手法を用いた研究を並行して行い、その結果を融合させることによりヤナギの重金属蓄積機構を多角的に解明するという手法をとった。浄化の対象となる有害重金属のうち、特にカドミウムに注目して研究を行なった。まず、西日本に生育しているヤナギ6種を水耕栽培の系でスクリーニングし、カドミウム集積能力の高いヤナギ種を選抜した。SPring-8でシンクロトロン放射光を用いた蛍光X線分析を行うことにより、植物体内に蓄積されている元素を可視化した。ここで判明した金属の高集積部位を考慮し、植物において重金属集積性に関連する遺伝子の探索を試みた。さらに、野外の汚染土壌で生育しているヤナギを採集し、実際の汚染土壌で重金属集積性を示しているかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) 重金属蓄積種のスクリーニングおよび植物体内における蓄積部位の調査

野生のヤナギ類の鑑定は非常に難しく、また、自然条件でも容易に交雑することから、まず実験材料として、京大大学生態学センターで維持・栽培されている、種の鑑定が確実な6種のヤナギを用いた(図1)。



図1 本研究で用いた6種のヤナギ。左から、タチヤナギ、カワヤナギ、コゴメヤナギ、マルバヤナギ、イヌコリヤナギ、ジャヤナギ。ポットに枝を挿し木後2か月の生育状況を示した。

ヤナギの枝を、ポットに入れた砂に挿し木して生育させ、バイオマス増加量を測定する

ことにより初期成長を比較した。その結果、カワヤナギ、ジャヤナギの初期成長速度が速く、イヌコリヤナギ、コゴメヤナギ、タチヤナギは中程度、マルバヤナギは成長が遅いことがわかった。次に、重金属集積性が既に報告されているイヌコリヤナギを比較対象として、カワヤナギ、ジャヤナギのカドミウム耐性を調べた。カワヤナギはイヌコリヤナギよりもカドミウム耐性が強く、葉でのカドミウム濃度も高いことがわかった。水耕栽培でカドミウム処理した植物体を部位別にサンプリングし、カドミウムの蓄積部位を調べた。誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)を用いて分析した結果、木化した枝の樹皮において、最もCd濃度が高かった。

(2) SPring-8の放射光を利用した蛍光X線分析による重金属の蓄積部位および化学形態の解析

重金属の蓄積部位とその化学形態をさらに詳しく調べるため、シンクロトロン放射光を用いた分析を行った。葉の μ -XRF(蛍光X線)イメージングを測定し解析したところ、鋸歯先端にCdが高濃度に蓄積していることが判明した(図2)。木化した枝での重金属分布を同様に μ -XRFイメージングで調べたところ、樹皮の Cork 皮層もしくは Cork 形成層にCdの蓄積が確認された。また、 μ -XANES(X線吸収端近傍構造)を測定して、この細胞でのCdの化学形態について検討したところ、Cdの解毒に働くと思われる硫黄化合物との結合で観察されるCd-Sのスペクトルとは一致せず、Cd-0もしくはイオン状態のCdと近いことが判明し、樹木に特異的な重金属解毒機構の存在が示唆された。

ヤナギ葉の鋸歯は一般的には分泌組織である。鋸歯の性質を放射光分析および低真空型SEM-エネルギー分散型X線分析法(VPSEM-EDX)を用いてさらに調べた。長期間重金属処理したヤナギ葉の鋸歯の内部および表面の元素分布を観察したところ、鋸歯の先端細胞は重金属を蓄積しているが、分泌はしていないことが判明した。このように、ヤナギ葉鋸歯の先端細胞は、高濃度の重金属濃度に耐性を持ち、重金属集積能があることが示された。

また、カドミウムは細胞内(シンプラスト)よりむしろ細胞間隙(アポプラスト)に蓄積されていた。 μ -XANES法でアポプラストの化学形態を測定したところ、Cd-0であったことから、ペクチンやリグニンなどの細胞壁成分とカドミウムが相互作用していることが考えられた。アポプラストの機能を有効に発揮させることで、より効率的な重金属除去技術の開発が可能であることも示された。

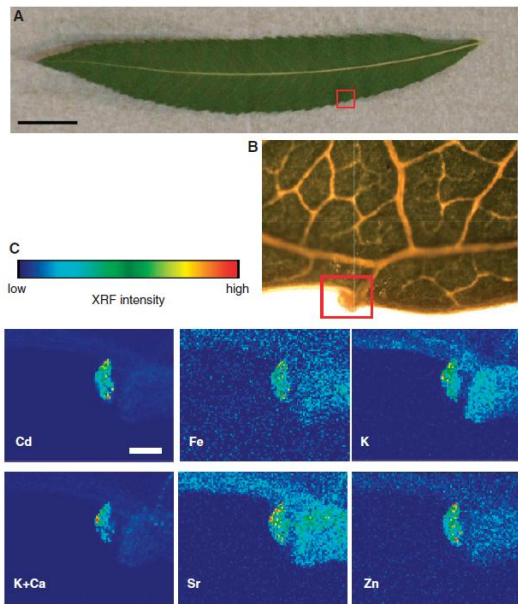


図2 放射光蛍光X線分析法を用いたカワヤナギ葉における元素分布の可視化（元素イメージング）。カドミウム処理した植物から葉を採取、液体窒素で冷却しながら測定した。A：カワヤナギの葉、縮尺バー=1cm。B：葉の側面の鋸歯。Aの赤色四角で示した領域を拡大した。C：カドミウム（Cd）、鉄（Fe）、カリウム（K）、カリウム+カルシウム（Ca）、ストロンチウム（Sr）、亜鉛（Zn）の二次元分布。蛍光X線の強度はカラースケールで示した。縮尺バー=0.1cm。
Harada *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 2010, 51, 848-853 より

(3) 分泌腺で発現する重金属集積性に関する遺伝子の探索

ヤナギ鋸歯細胞で機能している重金属集積に関する遺伝子の解明を試みたが、葉から鋸歯先端細胞のみを選択的に切り出すのは困難を極めた。そこで、葉表面に毛状の分泌組織（トライコーム）を持つ草本植物であるタバコに着目し、これをモデル系として用いることにした。タバコ葉表面のトライコームは、葉の表面に突き出した構造をしている。液体窒素で凍結させた葉の表面を細い針金で掻き取る手法により回収したトライコームを用いて、組織特異的遺伝子ライブラリを作成、トランスクリプトーム解析を行った。スコアの高い遺伝子について、RT-PCR法を用いてトライコームと葉全体で遺伝子発現量を比較した。その結果、病原応答性タンパク質である non-specific lipid transfer protein、metallocarboxypeptidase inhibitor などの、システイン含有量が高く比較的 low molecular weight のタンパク質をコードする遺伝子がトライコーム特異的に発現している

ことが判明した。また、組織内のグルタチオンを蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化、非破壊的に定量した。すると、トライコーム先端の細胞でグルタチオン濃度が高く、さらにグルタチオンペルオキシダーゼをコードする遺伝子の発現も高かった。これらの結果から、葉の分泌細胞における重金属解毒機構にはイオウ代謝系が関連している可能性があることが考えられた。

(4) 野外でのヤナギの重金属集積性調査

フィールドワークの手法を取り入れ、カドミウム、亜鉛、鉛、銅による複合汚染が確認されている鉱山跡地で生育しているカワヤナギ類縁種を採集し、重金属を集積しているかどうかを調べた。ヤナギが生育している土壌も同時に採取、重金属濃度を測定することにより、土壌の金属がどの程度植物に移行、濃縮されているかを示す濃縮係数（Enrichment Factor）を算出した（図3）。この結果、カドミウムと亜鉛が土壌からヤナギ植物体に効率よく濃縮されていた。特に、カドミウムの濃縮係数は高く、野外での土壌からの有害金属の除去にヤナギが利用できることを示した。

しかし、実験室内でヤナギを育て、土壌からの元素の収奪を調べたが、1年程度の短期間の処理では顕著な土壌カドミウム含有量の低下はみられなかった。このことから、木本植物を用いたファイトレメディエーションは、数年単位の時間を要することが示唆された。

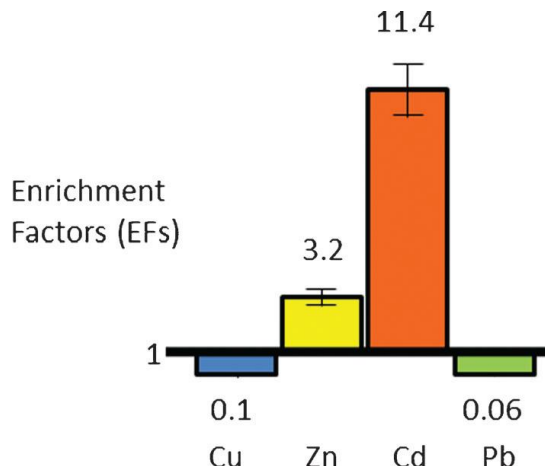


図3 土壌から植物への金属の移行のしやすさを示す濃縮係数（Enrichment Factor）を野外で採集したヤナギで算出した。
Harada *et al.*, *Metallomics*, 3: 1340-1346 より

(5) ヤナギによる放射性汚染物質除去法の開発に向けた基礎的研究

2011年3月に発生した東日本大震災の影響により起きた、福島第一原子力発電所の損傷のため、拡散した放射性元素の汚染が広がっている。このうち、放射性ストロンチウムは本研究で主に取り扱ってきたカドミウムと比較的性質に近いことから、ヤナギを用いたファイトレメディエーションが可能かどうか予備的検討を行った。その結果、培地や土壌からの植物へのストロンチウム移行はヤナギの種によって差がみられることが判明した。

(6) 学際シンポジウム開催

重金属集積植物研究者の学問領域を超えた交流を目指したシンポジウム「Metal hyperaccumulator-植物の金属集積機構の解明とその応用に向けて-」を企画、2010年1月に京都大学・宇治キャンパスで開催した(図4)。



図4 学際シンポジウムポスター

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4件)

1. Emiko Harada, Akiko Hokura, Izumi Nakai, Yasuko Terada, Kei'ichi Baba, Kazufumi Yazaki, Masamichi Shiono, Naoharu Mizuno, Takafumi Mizuno. (2011) Assessment of willow (*Salix* sp.) as a woody heavy metal accumulator: field survey and in vivo X-ray analyses. *Metallomics*, 3: 1340-1346. (査読有)
(doi: 10.1039/C1MT00102G)

2. Emiko Harada, Akiko Hokura, Saori Takada, Kei'ichi Baba, Yasuko Terada, Izumi Nakai, Kazufumi Yazaki. (2010) Characterization of cadmium accumulation in willow as a woody metal accumulator using synchrotron radiation-based X-ray microanalyses. *Plant and Cell Physiology*, 51: 848-853. (査読有)
(doi: 10.1093/pcp/pcq039)

3. Emiko Harada, Ji-Ah Kim, Andreas J. Meyer, Rüdiger Hell, Stephan Clemens, Yong-Eui Choi. (2010) The expression profiling the tobacco leaf trichomes identified of genes for chemical defense mechanism against biotic and abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology*, 51: 1627-1637. (査読有)
(doi: 10.1093/pcp/pcq118)

4. Emiko Harada, Akiko Hokura, Saori Takada, Kei'ichi Baba, Yasuko Terada, Izumi Nakai, Kazufumi Yazaki. (2009) Characterization of cadmium accumulation in woody metal accumulator willow (*Salix* sp.) using synchrotron-radiation based X-ray microanalyses (2009) The 9th International Conference of the East and Southeast Asia Federation of Soil Science Societies, Proceedings pp 77-78, Seoul, Korea, Oct 27-30, 2009. (査読無)
(<http://www.alfredhartemink.nl/PDF/2009%20-%20ESAFS9%20GlobalSoilMap.net.pdf>, Governmental publication registration number: 11-1390802-000107-01)

[学会発表] (計16件)

1. 原田英美子、金志娥、Andreas J. Meyer、Ruediger Hell、Stephan Clemens、崔龍義. タバコ葉トライコームのカドミウム蓄積および排出に関する遺伝子の探索、

- 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都女子大学、京都)、2012 年 3 月 24 日、講演番号: 3A30a08.
2. 原田英美子、保倉明子、中井泉、寺田靖子、馬場啓一、矢崎一史、水野直治、水野隆文. ヤナギ (*Salix* sp.) の重金属集積に関する研究: 野外調査および放射光蛍光 X 線分析法、日本植物細胞分子生物学会第 29 回年会 (九州大学、博多)、2011 年 9 月 6 日—8 日、要旨集 p175 (2Dp-09).
 3. 原田英美子. 植物の重金属集積機構に関する研究とその応用、近畿作物育種研究会第 71 回例会 (滋賀県立大学、彦根)、2011 年 7 月 9 日.
 4. Emiko Harada, Akiko Hokura, Izumi Nakai, Yasuko Terada, Kei'ichi Baba, Kazufumi Yazaki K, Naoharu Mizuno, Takafumi Mizuno. Assessment of heavy metal accumulation in a woody metal accumulator willow (*Salix* sp.): a field survey and in vivo X-ray analyses. 3rd International Symposium on Metallomics (Münster, Germany), June 15.-18. (2011), Abstract TGB04.
 5. 原田英美子. Elucidation of metal accumulation and homeostasis in plants using synchrotron-radiation based X-ray microanalyses、日本農芸化学会 2011 年度大会シンポジウム (京都女子大学、京都)、4SY12-5 (震災のため開催中止) .
 6. 原田英美子, Marie-Pierre Isaure, 金志娥, Geraldine Sarret, Andreas J. Meyer, Rüdiger Hell, Stephan Clemens, Alain Manceau, 崔龍義. タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) 葉トライコームのカドミウム蓄積および排出に関する遺伝子の探索、日本植物生理学会第 52 回大会 (東北大学、仙台)、講演予稿集 p221 (2aM07) (震災のため開催中止) .
 7. 原田英美子. 元素イメージングによる植物の重金属耐性・蓄積機構の解明、第 8 回 C-Bio セミナー (宇都宮大学、宇都宮)、2011 年 1 月 21 日.
 8. 原田英美子. 重金属集積植物の機構解明とその応用、総合生命科学部 第 11 回バイオフィォーラム 2010 (京都産業大学、京都)、2011 年 1 月 7 日.
 9. 原田英美子. 放射光で植物の重金属耐性メカニズムを観る、京都植物バイテク談話会 第 16 回 植物バイテクシンポジウム 植物機能を観る、見る、視る、診る、みる (京都府立大学、京都)、2010 年 6 月 17 日.
 10. 原田英美子、保倉明子、高田沙織、馬場啓一、寺田靖子、中井泉、矢崎一史. シンクロトロン放射光蛍光 X 線分析法によるヤナギの重金属蓄積機構の解明、日本植物生理学会第 51 回年会 (熊本大学、熊本)、2010 年 3 月 18 日—22 日、要旨集 p119 (1pE08).
 11. 原田英美子. 樹木を用いた重金属汚染土壌のファイトレメディエーション法の開発研究、第 142 回、143 回生存圏シンポジウム・生存圏ミッションシンポジウム (京都大学、宇治)、2010 年 3 月 11 日.
 12. 原田英美子. 放射光蛍光 X 線分析と分子生物学を併用した植物の重金属集積機構の解明、東京農業大学先端研究シンポジウム「植物の力を引き出す 2」(東京農業大学、東京)、2010 年 3 月 9 日.
 13. 原田英美子、保倉明子、高田沙織、馬場啓一、寺田靖子、中井泉、矢崎一史. 木本植物ヤナギのカドミウム蓄積機構の解明とその応用、第 147 回生存圏シンポジウム -Metal hyperaccumulator-植物の金属集積機構の解明とその応用に向けて- (京都大学、宇治)、2010 年 1 月 22 日、要旨集 p9-16.
 14. 原田英美子. 重金属集積植物のメカニズム解明とその応用、第 5 回 C-Bio セミナー (宇都宮大学、宇都宮)、2009 年 12 月 11 日.
 15. Emiko Harada, Akiko Hokura, Saori Takada, Kei'ichi Baba, Yasuko Terada, Izumi Nakai, Kazufumi Yazaki. Characterization of cadmium accumulation in woody metal accumulator willow (*Salix* sp.) using synchrotron-radiation based X-ray microanalyses. The 9th International Conference of the East and Southeast Asia Federation of Soil Science Societies, Proceedings pp 77-78, Seoul, Korea, Oct 27-30, 2009.
 16. 原田英美子, Ji-Ah Kim, Andreas J Meyer, Yong-Soo Kwon, Ruediger Hell, Stephan Clemens, Yong-Eui Choi. タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) 葉トライコーム

で発現する環境ストレス応答に関与する
遺伝子、日本植物細胞分子生物学会（日
本大学、藤沢）、2009年7月30-31日、
要旨集 p185(2Dp-09).

〔図書〕（計1件）

1. 第147回生存圏シンポジウム Metal
hyperaccumulator - 植物の金属集積機構
の解明とその応用に向けて-講演予稿集
（総ページ数74） 編：水野隆文、矢崎
一史、原田英美子. 2010年1月22日、京
都大学 生存圏研究所.

〔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://www.ses.usp.ac.jp/shigen/html/harada.html>（滋賀県立大学）

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 なし

(3) 連携研究者 なし