

# 植物の重金属超集積機能の解析

香川大学農学部助教授 馬 建鋒

## 研究目的

鉱山や精錬所などからの鉱滓、排水と排煙、産業廃棄物の埋め立て、生活廃棄物の土壌への投与などによって多くの土壌が重金属に汚染されている。重金属は植物の生育に影響を与えるだけでなく、食物連鎖系を経て人間の健康にも影響する。従って、重金属汚染土壌の浄化は環境問題の最重要課題である。

重金属が土壌成分と強く結合しているため、自然浄化がほとんど不可能である。現在考えられる重金属除去技術としては客土の混入、酸などによる土壌の洗浄、電気化学的除去及び化学的除去などがあります。しかし、これらの技術はコストが高いだけでなく、土壌の生態系が破壊されるおそれもある。そこで、近年注目されているのは植物による重金属除去法（Phytoremediation）である。これは植物の重金属集積機能を利用して、土壌中の重金属を除去するアプローチである。自然界においてごく一部の植物は長い進化の過程において重金属を多量に集積、そして無毒化する戦略を獲得してきた。これらの植物の持っている重金属超集積機構を解明することは今後効率よく植物による土壌中の重金属の除去に寄与するだけでなく、有価金属の回収にも有益である。本研究は*Thlaspi caerulescens*を用いて、この植物による亜鉛とカドミウムの集積機能の解明を目的とする。

## 研究成果

### 1. コムギの生育に対する高濃度の亜鉛とカドミウム添加の影響

普通の植物の生育に対する重金属の毒性を示すために、作物であるコムギ（品種Atlas）を用いて調べた。図1と図2に示すように、12日間亜鉛（300 $\mu$ M）の添加によって地上部と根の生育とも50%阻害された。また100 $\mu$ Mのカドミウム処理で、地上部と根の生育が70%阻害された。処理開始後5日目に地上部にクロロシスが現れた（図2）。この結果は普通の植物に対する亜鉛とカドミウムの強い毒性を示している。

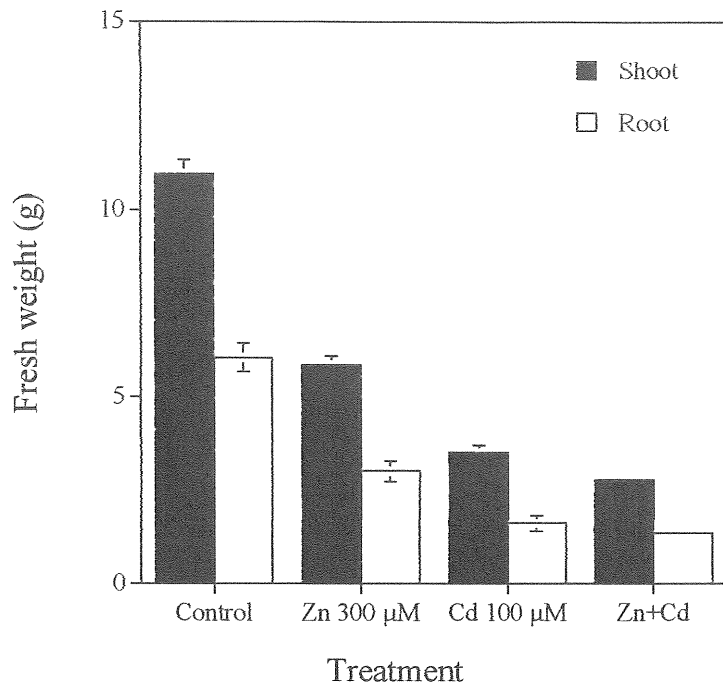


図1 コムギの生育に対する高濃度の亜鉛とカドミウム添加の影響



図2 12日間高濃度の亜鉛 (300μM) とカドミウム (100μM) に処理されたコムギの生育様子

## 2. *Thlaspi caerulescens*の生育に対する高濃度の亜鉛とカドミウムの影響

図3と図4は異なるカドミウム濃度で*Thlaspi caerulescens*を3週間処理した結果である。コムギとは異なり、100 $\mu$ Mのカドミウム処理で生育がほとんど影響されなかった。250 $\mu$ M Cd処理区でも生育の阻害は顕著ではなかった。このことは*Thlaspi caerulescens*がコムギとは異なり、カドミウムに対して強い耐性を持っていることが明らかとなった。

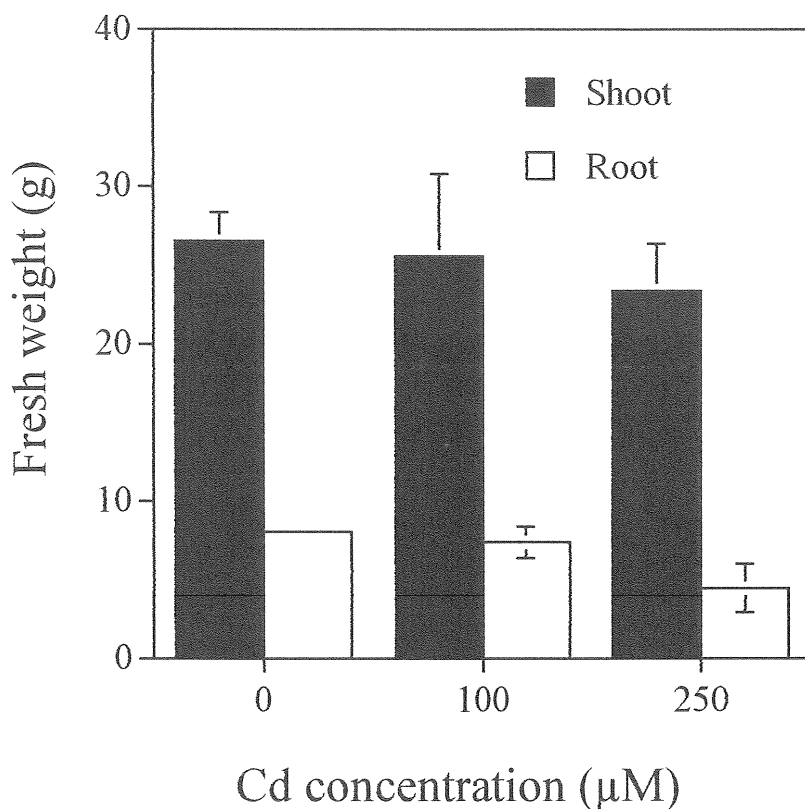


図3 *Thlaspi caerulescens*の生育に対する異なるカドミウム濃度の影響

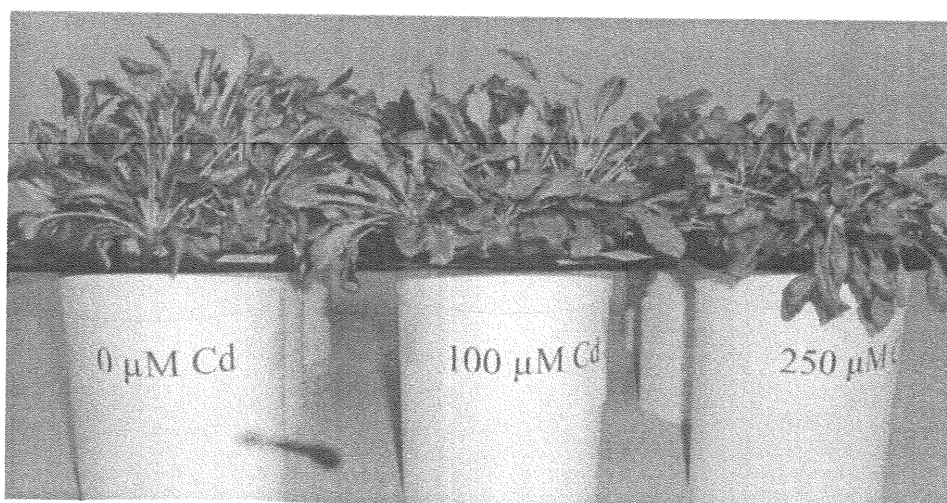


図4 3週間異なるカドミウム濃度で処理した*Thlaspi caerulescens*の生育様子

高濃度の亜鉛処理によっても生育の阻害が見られなかった（図5、6）。亜鉛は植物にとって微量元素であるが、普通の培養液中の亜鉛の濃度は $0.15\mu\text{M}$ である。亜鉛が高濃度になると、コムギで見られるように毒性が発現する。しかし、*Thlaspi caerulescens*では $500\mu\text{M}$ までの亜鉛の添加でも生育がほとんど正常であり、*Thlaspi caerulescens*の強い亜鉛耐性を示している。

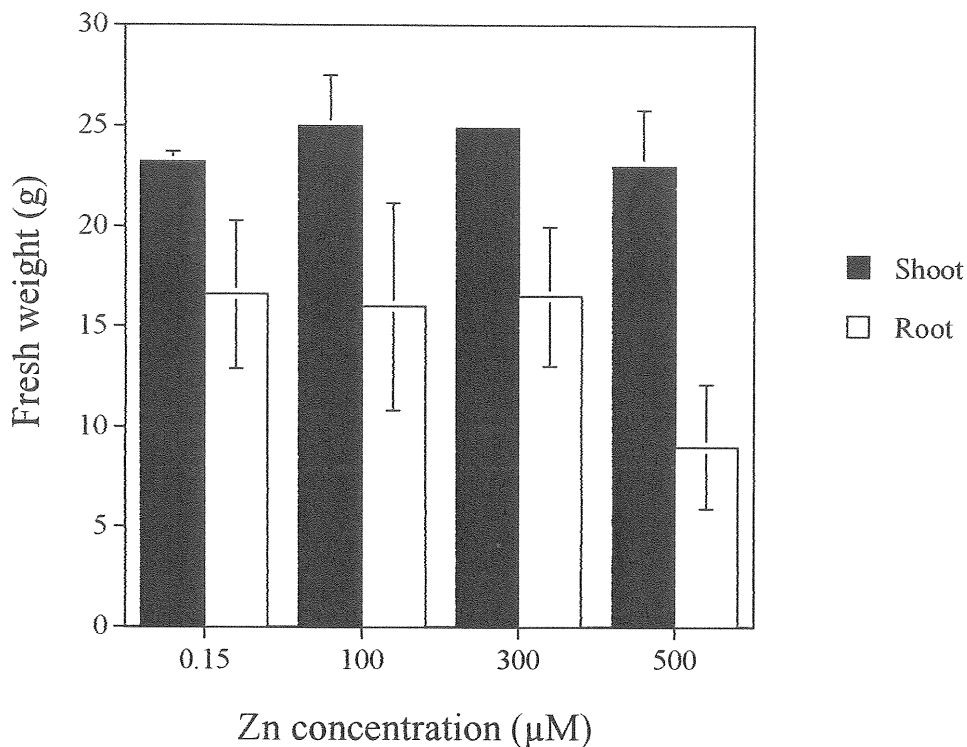


図5 *Thlaspi caerulescens*の生育に対する異なる亜鉛濃度の影響



図6 一ヶ月間異なる亜鉛濃度で処理した*Thlaspi caerulescens*の根と地上部の生育

### 3. *Thlaspi caerulescens*の亜鉛とカドミウムの集積機能の解析

重金属浄化に役立つ植物は重金属に強い耐性を持つだけではなく、重金属を地上部に集積させる機能を持たなければならない。そこで、*Thlaspi caerulescens*の亜鉛とカドミウムの集積能力について検討した。100 $\mu$ Mと250 $\mu$ Mのカドミウム処理で地上部のカドミウム濃度はそれぞれ38.7と75.3 $\mu$ mol/g DW（乾物重あたり4.35と8.46 mg/gに相当）に達し（表1）、普通の植物より100倍以上の集積能を示した。

表1 *Thlaspi caerulescens*における地上部のカドミウム濃度及び細胞内の分布

処理 ( $\mu$ M Cd)	濃度		
	トータル ( $\mu$ mol/g DW)	細胞液中 (mM)	細胞液中の割合 (%)
0	0.4 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	70.6 $\pm$ 7.4
100	38.7 $\pm$ 12.2	4.3 $\pm$ 0.6	53.5 $\pm$ 1.6
250	75.3 $\pm$ 1.9	8.4 $\pm$ 0.4	50.5 $\pm$ 3.0

亜鉛についても同様な検討を行った（表2）。100, 300, 500 $\mu$ Mの亜鉛で一ヶ月間処理した植物の地上部の亜鉛濃度はそれぞれ54.9, 114.3, 134.7 $\mu$ mol/g DW（乾物重あたり3.57, 7.43, 8.76 mg/gに相当）であった。普通の植物より100倍以上の亜鉛を集積していた。

表2 *Thlaspi caerulescens*における地上部の亜鉛濃度及び細胞内の分布

処理 ( $\mu$ M Zn)	濃度		
	トータル ( $\mu$ mol/g DW)	細胞液中 (mM)	細胞液中の割合 (%)
0	0.9 $\pm$ 0.2	0.17 $\pm$ 0.07	69.1 $\pm$ 7.7
100	54.9 $\pm$ 6.0	15.5 $\pm$ 2.0	97.6 $\pm$ 9.7
300	114.3 $\pm$ 5.2	32.6 $\pm$ 0.8	91.7 $\pm$ 7.6
500	134.7 $\pm$ 14.3	37.3 $\pm$ 3.3	92.4 $\pm$ 3.4

#### 4. *Thlaspi caerulescens*の体内における亜鉛とカドミウムの局在性

*Thlaspi caerulescens*の体内に集積した高濃度の亜鉛とカドミウムが細胞壁に局在しているのか、それとも細胞質に存在しているのかを明らかにするために、細胞液を採集し、亜鉛とカドミウムの濃度を分析した。カドミウム100と250 $\mu$ Mで処理した植物では、細胞内のカドミウム濃度がそれぞれ4.3と8.4mMであり、細胞内のカドミウムは全体の50%占めていた(表1)。また亜鉛の場合、亜鉛100、300、500 $\mu$ Mで処理した植物では、細胞内の亜鉛濃度はそれぞれ15.5、32.6、と37.3mMにも達し、全体の亜鉛の90%以上が細胞内に存在していることが明らかとなった(表2)。

細胞内に高濃度の亜鉛とカドミウムが存在していても毒性が全然発現しないことは *Thlaspi caerulescens*が細胞内に高濃度の亜鉛とカドミウムを無毒化する機構を持っていることを示唆している。そこで体内における亜鉛とカドミウムとの結合物質を明らかにするために、細胞液を採集し、亜鉛とカドミウムを含む画分を現在ゲルろ過クロマトグラフィを用いて精製しているところである。

#### 5. *Thlaspi caerulescens*における亜鉛とカドミウムの相互作用

*Thlaspi caerulescens*は亜鉛とカドミウムとも集積する機能を持っているので、吸収における亜鉛とカドミウムの相互作用について検討した。表3はカドミウム100 $\mu$ M、亜鉛300 $\mu$ M、あるいはカドミウム100 $\mu$ Mと亜鉛300 $\mu$ Mを一ヶ月間処理した結果である。カドミウムの吸収に対する亜鉛の影響、また亜鉛の吸収に対するカドミウムの影響が見られなかった。一般の植物において亜鉛とカドミウムの吸収拮抗作用が報告されているが、*Thlaspi caerulescens*では他の植物と異なる吸収機構を持っているようである。

表3 *Thlaspi caerulescens*根の吸収における亜鉛とカドミウムの相互作用

処理 ( $\mu$ M)	新鮮重(g)		濃度 ( $\mu$ mol/g DW)	
	地上部	根	Cd	Zn
Cd 100	34.2 $\pm$ 5.0	10.7 $\pm$ 2.6	33.6 $\pm$ 12.8	14.4 $\pm$ 1.8
Zn 300	34.5 $\pm$ 3.5	8.6 $\pm$ 3.8	0 $\pm$ 0	102.4 $\pm$ 22.2
Cd+Zn	36.4 $\pm$ 9.1	8.2 $\pm$ 4.9	31.6 $\pm$ 12.2	92.5 $\pm$ 30.9

## 6. 亜鉛キレート活性を測定する方法の開発と根分泌液中の亜鉛キレート物質の単離

*Thlaspi caerulescens*のもう一つの特徴は根によって土壤中の亜鉛を可溶化する能力を持っているとされている。本研究は根から分泌される亜鉛キレート物質を探索するために、まず亜鉛のキレート活性を測定する方法を開発した。方法の概略は以下の通りである。まず濾紙に数マイクロリットルの溶液をスポットし、ドライヤで乾かす。次に、5mM塩化亜鉛溶液で濾紙を噴霧し、100mM炭酸ナトリウム溶液に3分間浸す。その後、水で余分な炭酸ナトリウム溶液を洗浄し、乾熱機で乾かす。最後に0.1%のジンコン溶液で濾紙を噴霧する。この方法を用いてアッセイすると、亜鉛とキレート活性を持つ物質が含まれている場合は、ブルーの背景に明瞭の白いスポットが現れる。ヒスチジンの溶液を用いてアッセイした結果、検出限界は10nmolで（図7）、高い検出感度である。

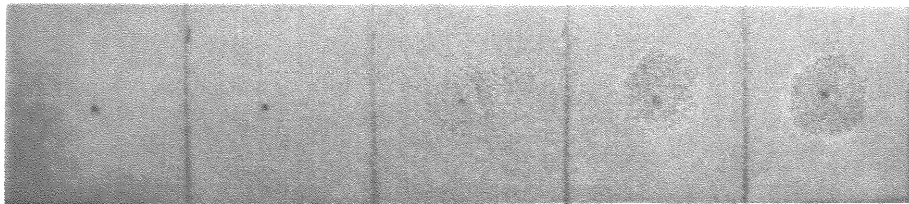
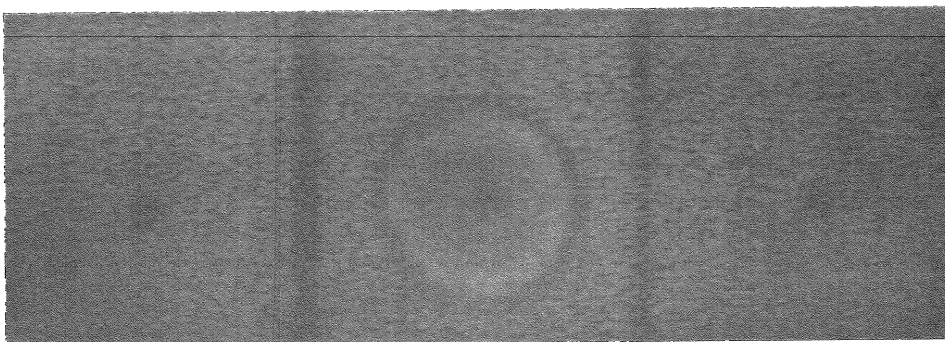


図7 亜鉛キレート能力アッセイ法（左から0.5、1、2、5、10mMのヒスチジンをそれぞれ5ulスポットした）

水耕栽培した*Thlaspi caerulescens*から根の分泌液を採取し、イオン交換樹脂により、カチオン画分、アニオン画分と中性画分に分け、上記のアッセイ法で亜鉛キレート能を測定した。その結果、カチオン画分と中性画分に亜鉛キレート活性が認められず、アニオン画分のみに亜鉛キレート活性が認められた（図8）。現在、活性画分について精製、同定を行っているところである。



カチオン画分

アニオン画分

中性画分

図8 *Thlaspi caerulescens*根の分泌液中の各画分の亜鉛キレート活性