

重金属汚染土壌の浄化と重金属資源の回収技術開発に関する研究

課題番号 15510073

平成15年度～18年度科学研究費補助金基盤研究C研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 小畑 仁 三重大学大学院生物資源学研究科 教授
研究分担者 水野隆文 三重大学大学院生物資源学研究科 助教授

重金属汚染土壌の浄化と重金属資源の回収技術開発に関する研究

はしがき	1
1. 緒論	2
(1) 重金属問題	
(2) ファイトレメディエーション	
(3) 本研究の目的	
2. 本論	5
(1) フィトケラチン合成酵素遺伝子の単離と機能解析	
(2) 遺伝子源であるタカネグンバイの分布とエコタイプ	
(3) タカネグンバイのトランスポーター遺伝子の単離と機能解析	
(4) コシアブラの Mn 溶解メカニズム	
3. おわりに	7
引用文献	7
本研究で実施した研究内容をまとめた又は含む学術論文の著者最終稿	8
1) Cloning and characterization of phytochelatin synthase from a nickel hyperaccumulator <i>Thlaspi japonicum</i> and its expression in yeast.	9
2) Comparison of Ni/Zn accumulation ability of <i>Thlaspi japonicum</i> from three different areas in Hokkaido.	28
3) Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant <i>Thlaspi japonicum</i> and their Ni ²⁺ -transport abilities.	52
4) Continual pH lowering and manganese dioxide solubilization in the rhizosphere of the Mn-hyperaccumulator plant <i>Chengiopanax sciadophylloides</i> .	79

はしがき

本研究は、重金属汚染のファイトレメディエーションによる回復と植物が集積した重金属の回収を最終目的として、応用可能と考えられる植物の遺伝子について、その単離と機能解析ならびに植物への導入による応用へのステップアップをねらいとして開始したものである。4年間の研究を終了するに当たりその成果をまとめ、今後の参考としたい。

研究組織

研究代表者 小畑 仁 (三重大学大学院 生物資源学研究科 教授)

研究分担者 水野隆文 (三重大学大学院 生物資源学研究科 助教授)

交付決定額 (金額単位：円； 直接経費のみの配分をうけた)

平成15年度	2,000,000 円
平成16年度	500,000 円
平成17年度	500,000 円
平成18年度	600,000 円
総計	3,600,000 円

研究発表

(1) 学会誌

- 1) Mizuno, T., Sonoda, T., Horie, K., Senoo, K., Tanaka, A., Mizuno, N. and Obata, H.: Cloning and characterization of phytochelatin synthase from a nickel hyperaccumulator *Thlaspi japonicum* and its expression in yeast. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 285-290, 2003
- 2) Mizuno, T., Obata, H., Horie, K., Nosaka, S. and Mizuno, N.: Comparison of Ni/Zn accumulation ability of *Thlaspi japonicum* from three different areas in Hokkaido. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 51, 589-594, 2005
- 3) Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N. and Obata, H.: Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 793-801, 2005
- 4) Mizuno, T., Hirano, K., Hosono, A., Kato, S. and Obata, H.: Continual pH lowering and manganese dioxide solubilization in the rhizosphere of the Mn-hyperaccumulator plant *Chengiopanax sciadophylloides*. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 726-733, 2006

(2) 口頭発表

- 1) 園田豊治・水野隆文・田中晶善・小畑 仁: Cd/Zn 集積性植物 *Thlaspi caerulescens* 由来フィトケラチン合成酵素遺伝子の機能解析、日本土壤肥料学会大会 49、76、2003

他20

1. 緒論

ヒトの生活に利用されているさまざまな重金属は、それが組み込まれている製品の寿命がつかると、本体の一部として廃棄処理される。中でも充電式の電池を組み込んだ家電製品は数多くあり種類も多岐にわたり、そのまま処分場に最終処分されることが多い。また誤って消却されて灰となって、埋め立て材料に混入したりするため、再回収は困難である。現在は使われていないが、ガソリンにアンチノック剤として添加されていた鉛が排気ガスと共に排出され道路粉塵に集積した事実は、記憶に新しい。重金属等による汚染の事例はここ数年急激に増加しており、重金属では鉛や六価クロムの事例が多い。六価クロムによる汚染事故を引き起こしたフェロシルトは、つい最近の事例であり今も大きな社会問題となっている。

一方これら重金属は、今後も人間生活に必要な不可欠な貴重な資源であり、多くの地下資源の枯渇が懸念されている現在、このようにヒトの生活圏に拡散した重金属元素を回収する技術の開発が待たれている。ファイトレメディエーションはそのような技術の中で、特に期待されているものである。

(1) 重金属問題

重金属元素は、精錬すると硬い金属になり高い利用価値を有している。中でも鉄は古くから農耕用具、武器などとして利用され、また美しい金属光沢を持つ金、銅などは仏像などとしてまた祭祀用具などに用いられてきた。現代に入って科学技術の進展にともない、重金属元素が酸化還元に関与できる資材であることから電気を貯める蓄電池として、また電気の良導体であることから全ての電気器具に必用不可欠な資材として、生活の全てが電子化された現代の人間生活に欠かすことのできない存在となっている。また、複数の金属を混ぜ合わせ合金にすることにより性質の異なる素材を作ることが容易で、さまざまな場面できわめて広く利用されている。建築物や橋梁を作るために躯体を構成する資材としての需要もますます増えている。

金属元素は、酸化物や硫化物の形で、高濃度にそれを含有する鉱石の形で地下資源として存在するが、地下から掘り出されることにより、それまで隔離されていたものがヒトの生活圏に出て人との接触の機会が急激に増える。通常、化学的に還元することにより金属としての形状となり利用されるが、大気圏内は酸化的雰囲気のため、人為的に還元された金属は再度酸化されてイオンになりやすい。イオン化されると金属元素は水に可溶性となる。利用形態は上に述べたように多岐にわたるため、多くの金属元素は製品が廃棄される時再回収することが困難で、人の生活圏に広く薄い濃度で分散することになる。人為的に合成された有機系の化合物と異なり、重金属元素は分解して消し去ることはできず、循環利用する系に組み込むことによって真に制御でき、問題解決につなげることが可能となる。一方、重金属を含む地下資源は限りある資源であって、人の存在が地球の大きさに対して強大になりすぎた現在では、近い将来枯渇することが懸念されている。その点でも循

環利用は不可欠の技術である。

金属元素は、生物の生理的側面から見た場合二つの顔を持っている。ひとつは生理作用を営むために必用不可欠な必須元素としての側面であり、もう一つは細胞に有毒な物質としての側面である。金属元素を環境問題の面から考える場合には、有害物質として取り扱うことになる。金属として難溶性の物理的形態をとる場合には生物に対して害作用をもつ事はほとんどない。しかし、イオン化されて水に可溶性になると生物（細胞）に直接害作用をもつ場合がある。これは生物がその生理現象を行うための素材として金属イオンを利用していることにより、類似する元素が必須元素と置き換わって、必要な反応を妨げることにより起因することが多い。必須元素であっても濃度が高すぎる場合には、生体成分と無作別に結合することにより害作用をおよぼすことが知られている。

先に述べたように、水に可溶の有害な金属イオンが人と接触する機会が増えたことは、さまざまな問題を社会に与えてきた。人に健康被害を与えたカドミウムによるイタイイタイ病や水銀による水俣病など多くの疾病を引き起こし、植物に対しては、農作物に鉍毒事件として知られる銅過剰害などを引き起こし、収穫を激減させた。重金属元素は薄く広がった状態でも、プランクトンから小型魚類を経て大型魚類に至る食物連鎖や貝類で生物濃縮によって数万倍にも濃縮される場合が知られており、ヒトの健康への影響は今も小さくない。

人の生活圏に薄く広く広がった重金属元素を回収することは、前述のとおり、有限な資源を再利用することのできる形にすることと、人との接触を防止することにより人の健康を守るために必要な技術である。そのための技術として次に述べる植物を用いる方法「ファイトレメディエーション」が有望視されているが、我国においてはまだ研究段階にあり、応用技術としては萌芽期の段階にある。

(2) ファイトレメディエーション

ファイトレメディエーションは、「植物」を意味する phyto-と「修復」を意味する remediation を結びつけた言葉で、植物を利用した環境修復を意味する。Botanical bioremediation とよばれ、バイオレメディエーションに含まれる技術である。いくつか分類されているが、1) 有害物質を植物に吸収させ培地を浄化する phytoextraction、2) 植物を用いて土壤中の物質を揮発性物質に変え揮発させる phytovolatilization、3) 有害物質を植物の作用で不溶化して害作用を除く phytostabilization、4) 液状の培地から有害物質を取り除く rhizofiltration、などが主なものである。一方、植物に吸収させて当該物質を高濃度に含む植物体を回収しその物質を抽出して再利用する phytomining も、期待される技術として注目を集めている。それぞれ特徴があり、目的とする重金属の種類とそれが拡散している場（土壌であるのか水であるのかなど）の種類に応じて使い分けする必要がある。phytoextraction は、浄化に利用した植物を回収し回収した植物から高濃度に含まれる重金属元素を回収できれば、phytomining を行うことになり、一石二鳥の技術となる¹⁾。

本稿では phytoextraction のみをとりあげ、以後ファイトレメディエーションと述べることにする。

ファイトレメディエーションの具体的方法として着眼点を異にする2種類がある。まず1) バイオマスの大きいしかも生育の早い植物を栽培し、なるべく多くの金属を回収しようとする方法がある。我国においては、水田土壌を汚染したカドミウムを大型牧草ソルガムで浄化する試みが進められている。2) 重金属超集積性植物 (hyperaccumulator) を利用する方法が注目されている。これらの植物は、きわめて高濃度の重金属を蓄積することができるため、重金属を資源として回収する場合に好都合な方法であるが、これらの植物は栽培が困難であったり、植物体が小さく回収できる金属の全量が期待されるほど多くならない場合が多い。1) 2) とともに、収穫が容易であるのは地上部のため、吸収した重金属は地上部に運ばれる必要がある。目的とする金属元素が溶けにくい場合には、キレート剤を土壌に与えることが行われるが、可溶化され回収し切れなかった金属が溶出し環境に負荷を与える場合がある。

重金属超集積性植物は Brooks ら¹⁾によって定義されており、カドミウムでは乾物重あたり 100mg/kg 以上、ニッケル、コバルト、銅、鉛は 1,000mg/kg 以上、マンガン、亜鉛は 10,000mg/kg 以上含有する場合とされている。現在 400 種ほどが知られているが、ニッケル超集積性植物が最も多い。我国在来の植物には、後に述べるタカネグンバイ (*Thraspi japonicum*)²⁾ がニッケル超集積性植物として、コシアブラ (*Chengiopanax sciadophylloides*)³⁾ がマンガン超集積性植物として知られている。

遺伝子組み替え技術を応用して、重金属超集積性植物から当該元素耐性ならびに集積性に関与する遺伝子を単離し、少しでもバイオマスの大きい、かつ栽培しやすい植物に組み込んで効率よくファイトレメディエーションを行おうとする試みが行われている。植物の重金属耐性メカニズムは、重金属を細胞壁の部分などに沈積させて細胞内に取り込まず耐性を示すものや、細胞内に入った重金属に結合できるキレーターを生体内で合成し解毒するもの、細胞内に入った重金属を液胞に隔離するものなどがある。このうち、キレーター生成については、カドミウムや鉛といったいわゆるソフトな金属の侵入に対しソフトな配位原子イオウをもつメタロチオネインを合成し、金属をイオンからキレート化合物に変えて解毒するメカニズムが広く研究されている。メタロチオネインは動物、植物、微生物いずれにも見出されているが、植物のメタロチオネインは分子量 1,000 程度のペプチドで、化合物の名称としてフィトケラチンと呼ばれている。フィトケラチンは構成アミノ酸のペプチド結合に一部γ結合を含んでおり、従って直接遺伝子上にコードされてはおらず、フィトケラチン合成酵素がグルタチオンを基質として生合成することが明らかにされた⁴⁾。一方集積性に関しては、重金属元素を膜を透過して細胞内に輸送するためのタンパクであるトランスポーターの研究が進められている。ZIP ファミリーと NRAMP ファミリー遺伝子が幾つかの植物から単離され、その機能が精力的に検討されている。

(3) 本研究の目的

上記の背景により、本研究担当者は、重金属汚染土壌を浄化しさらに植物体内に濃縮された重金属を回収する技術開発が21世紀の持続的発展を保証するためにぜひ必要であると考え、本研究の実施を申請し、研究費の配分を受け4年間の研究を実施した。

当初の研究目的は、ニッケル集積性植物タカネグンバイ (*Thlaspi japonicum*)、マンガン集積性植物コシアブラ (*Chengiopanax sciadophylloides*) およびカドミウム集積性植物ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*) を用いて、植物の遺伝子解析を行い、それぞれの重金属耐性・蓄積性に関与する遺伝子を解析することであった。その糸口として、重金属の解毒に関与することが証明されているフィトケラチンを合成する酵素の遺伝子を、シロイヌナズナの遺伝子の塩基配列を用いてタカネグンバイよりPCRで単離し、その機能解析を完成する。次いで得られた遺伝子を大腸菌または酵母に導入して機能解析を行う。また重金属蓄積性について検討するため、亜鉛とマンガンのトランスポーターとして知られている Zip および Nramp 遺伝子の塩基配列を上記の植物からPCRで単離し、機能解析を完成する。フィトケラチン合成酵素遺伝子とトランスポーター遺伝子をともに大腸菌または酵母に導入し、組み替え微生物の重金属に対する反応を明らかにする。以上の目的を掲げて本研究を行った。

本研究開始後、他の研究者によってヘビノネゴザの遺伝子解析が行われ、カルスの重金属耐性について論文⁵⁾が発表されたため、本研究では、タカネグンバイおよびコシアブラについて研究を進めることにした。

2. 本論

研究結果はすべて学術論文として発表したもので、巻末にその著者最終稿を掲げた。以下にその概要を述べる。

(1) フィトケラチン合成酵素遺伝子の単離と機能解析^{著者最終稿1)}

フィトケラチン合成酵素 (PCS) はこれまで *Arabidopsis thaliana* や *Thraspi aestivum* など重金属超集積性でない植物から単離され、機能解析が行われてきた。タカネグンバイからの単離を試みたところ、1,455塩基対、475アミノ酸残基のPCS遺伝子が得られ、これを *TjPCS* と命名した。この遺伝子は *A. thaliana* のPCSと90%の相同性を示した。この遺伝子を酵母に導入し機能を調べたところ、PCSが生成され、カドミウム耐性が付与された。この内容は、以下の論文としてまとめた。

Mizuno, T., Sonoda, T., Horie, K., Senoo, K., Tanaka, A., Mizuno, N. and Obata, H.: Cloning and characterization of phytochelatin synthase from a nickel hyperaccumulator *Thlaspi japonicum* and its expression in yeast. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 285-290, 2003

なお亜鉛、カドミウム集積性を示す *Thraspi caerulescens* から PCS の遺伝子を得て、ほぼ同様の性質を示すことを認めている (未発表)。

(2) 遺伝子源であるタカネグンバイの分布とエコタイプ^{著者最終稿2)}

北海道には生育場所ならびにエコタイプの異なる3種類のタカネグンバイ(礼文-T, 夕張-T, 天狗-T)が存在する。これらの生育する地帯には蛇紋岩地帯と非蛇紋岩地帯が含まれ、非蛇紋岩地帯から採取したタカネグンバイを、ニッケル高含有率の蛇紋岩土壌と亜鉛を集積した火山灰土壌に移植した場合、いずれも高濃度のニッケルと亜鉛集積能を示すことが認められた。高ニッケルの蛇紋岩土壌から得たタカネグンバイを、ニッケル濃度の低い土壌に移植すると、ニッケル濃度が顕著に低下し、薄いニッケルを高濃度に集積する能力は有しないものと考えられた。形態的に、礼文-Tは他の二つに比べて小型でバイオマスが小さいことが認められた。この内容は、以下の論文としてまとめた。

Mizuno, T., Obata, H., Horie, K., Nosaka, S. and Mizuno, N.: Comparison of Ni/Zn accumulation ability of *Thlaspi japonicum* from three different areas in Hokkaido. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 51, 589-594, 2005

(3) タカネグンバイのトランスポーター遺伝子の単離と機能解析^{著者最終稿3)}

重金属の膜透過に関与すると考えられる、ZIPファミリー2種、NRAMPファミリー1種のトランスポーター遺伝子をタカネグンバイから単離し、*TjZnt1*, *TjZnt2*, *TjNramp4*と命名した。それぞれを酵母に入れて機能解析を行ったところ、*TjZnt1*, *TjZnt2*を導入したものはニッケル耐性が付与され、*TjNramp4*を導入したものでは、ニッケル感受性になりかつニッケル濃度も増加した。*TjZnt1*は亜鉛、カドミウム、マンガン各イオンの輸送能があり、*TjZnt2*は亜鉛とマンガンの輸送能を持つことが認められた。一方 *TjNramp4*は、ニッケル輸送能は持つものの亜鉛、カドミウム、マンガン輸送能は持たなかった。

この内容は、以下の論文としてまとめた。

Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N. and Obata, H.: Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 793-801, 2005

(4) コシアブラのMn溶解メカニズム^{著者最終稿4)}

コシアブラカルスから再分化体を得て栽培し、培地のpH変化を調べたところ、pHの連続した低下を認め、それに伴うMnO₂の可溶化を認めた。あらかじめコシアブラを栽培した培養液から植物体を除いた残りの液が、MnO₂可溶化能を維持していることを明らかにした。コシアブラを栽培している培養液にH⁺-ATPase阻害剤を添加したところ、MnO₂可溶化能が失われた。これらのことより、コシアブラは培地にH⁺を放出してpHを下げ、溶液中に溶け出してきたMnO₂を吸収しているものと考えられたが、膜透過時のMnの化学型は不明で今後検討する必要がある。

この内容は、以下の論文としてまとめた。

Mizuno, T., Hirano, K., Hosono, A., Kato, S. and Obata, H.: Continual pH lowering and

manganese dioxide solubilization in the rhizosphere of the Mn-hyperaccumulator plant *Chengiopanax sciadophylloides*. Soil Sci. Plant Nutr., 52, 726-733, 2006

3. おわりに

以上のとおり本研究では、重金属耐性・蓄積性に関与する遺伝子をタカネグンバイから新たに単離し、酵母で発現させて、機能解析を進めた。またコシアブラのマンガン可溶化メカニズムについて明らかにした。本研究の成果を含む学術論文は4報発表できており、当初に目的として掲げた内容は明らかにできたものと考えられ、この方面の研究に貢献できたと考えている。

酵母と植物では遺伝子の発現状況も異なることが考えられるので、今後さらに *A. thaliana* などのモデル植物で発現させ、ついでバイオマスのより大きい植物を形質転換して、実用化に向けて研究を進める必要があるものと考えられる。さらに多くの超集積性植物を発見し、遺伝資源として利用することも求められよう。

ファイトレメディエーションによる重金属元素回収と汚染された土壌の浄化は、以上のように植物を栽培し吸収させる技術が骨格となるため、必要な経費が安くすむものと試算されており、また処理した跡地土壌に悪い影響を全く残さない、いわゆる環境にやさしい利点を有している。そのため、ヒトの健康を考えた場合、家庭生活に密着する場たとえば住宅地などの土壌浄化にはきわめて優れた方法と考えられる。しかし植物栽培には時間がかかり、一度に除去できる重金属元素量も酸洗浄などの物理的な方法に比べて少ないため、浄化の完了には長時間が必要で、短時間に決着を求める現代の風潮にはそぐわない側面がある。また気候条件により栽培できる植物も限られる場合がある。しかし、薄く広く広がってしまった重金属を回収するためには、植物を栽培し回収する以外に方法がなく、環境に悪影響を残さない点からも21世紀にふさわしい技術と考えられる。栽培に関しては古くから農業で技術が積み重ねられており、それらは十分に利用可能である。しかし今のところ土壌汚染対策の具体的実施内容をみると、ファイトレメディエーションを含むバイオレメディエーション技術が現場での対策に用いられた事例は782件中わずかに2例で、今後技術の進展が待たれる⁶⁾。なお緒論で述べたとおり超集積性植物はバイオマスが小さい場合が多く、バイオマスの大きい植物は集積される金属濃度が低い場合が多い。両方を満足させる遺伝子組み換え技術が力を発揮できる場面であるが、これらの研究を実用化につなげるため、その安全性についての徹底した研究が強く望まれる所である。

引用文献

1) Brooks, R. R.: General introduction. *in* Plants that hyperaccumulate metals. Their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytominig, Ed. R. R. Brooks, p.1-14, CAB International: NY, 1998

- 2) Mizuno, N., Nosaka, S., Mizuno, T., Horie, K. and Obata, H.: Distribution of Ni and Zn in the leaves of *Thlaspi japonicum* growing on ultramafic soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 93-97, 2003
- 3) Memon, A. R., Ito, S. and Yatazawa, M.: Absorption and accumulation of iron, manganese and copper in plants in the temple forest of central Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 611-620, 1979
- 4) 小畑 仁: 植物のカドミウム耐性獲得とファイトレメディエーション、*化学と生物*、38、100-103、2000
- 5) Yoshihara, T., Tsunokawa, K., Miyano, Y., Arashima, Y., Hodoshima, H., Shoji, K., Shimada, H. and Goto, F.: Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation of its cadmium tolerance and accumulation capacity. *Plant Cell Rep.* 23, 579-585, 2005
- 6) 環境省 水・大気環境局: 平成 15 年度土壌汚染対策法の施工状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果の概要 (平成 17 年 12 月)、水・土壌・地盤環境の保全、<http://www.env.go.jp>

本研究で実施した研究内容をまとめた又は含む学術論文の著者最終稿

本文中で引用する場合には、著者最終稿 1) 等と表示した。

- 1) Mizuno, T., Sonoda, T., Horie, K., Senoo, K., Tanaka, A., Mizuno, N. and Obata, H.: Cloning and characterization of phytochelatase synthase from a nickel hyperaccumulator *Thlaspi japonicum* and its expression in yeast. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 285-290, 2003
- 2) Mizuno, T., Obata, H., Horie, K., Nosaka, S. and Mizuno, N.: Comparison of Ni/Zn accumulation ability of *Thlaspi japonicum* from three different areas in Hokkaido. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 51, 589-594, 2005
- 3) Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N. and Obata, H.: Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 793-801, 2005
- 4) Mizuno, T., Hirano, K., Hosono, A., Kato, S. and Obata, H.: Continual pH lowering and manganese dioxide solubilization in the rhizosphere of the Mn-hyperaccumulator plant *Chengiopanax sciadophylloides*. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 726-733, 2006