

# 日本の重金属超集積性植物の研究と植物栄養学への応用

水野 隆文

三重大学大学院生物資源学研究科

## Investigations on the metal hyperaccumulator plants and their application for plant nutrition study

Takafumi MIZUNO

Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie, 514-8507 Japan

### Abstract

Hyperaccumulators are plants with an extreme tolerance to specific heavy metals that accumulate in their aerial parts in concentrations greatly exceeding 'normal' thresholds of toxicity. Hyperaccumulation by plants is a rare phenomenon that has potential practical benefits such as phytoremediation and phytomining, and that gives us various keywords of plant nutrition study. In this paper, I would like to introduce about our series studies on the two metal hyperaccumulators, *Chengiopanax sciadophylloides* and *Thlaspi japonicum*, which inhabiting in Japan and accumulate Mn and Ni, respectively, and show our visions of these studies for development of plant nutrition study.

**Key Words:** *Chengiopanax sciadophylloides*, metal hyperaccumulator, Plant Nutrition, phytoremediation, *Thlaspi japonicum*

### 1. はじめに

植物の地上部では光合成をはじめとする様々な生命活動が営まれており、それらの活動を支える各種反応は地下部からの各種元素の供給に依存している。しかし、重金属類などの特定の元素が細胞内に過剰に供給、蓄積した場合、多くの酵素反応が阻害される。そのため、通常植物は過剰に吸収した金属元素を細胞外や液胞に排出・隔離する機能を有し、地上部の細胞内濃度を一定に保つメカニズムを有している。多量必須元素であるカルシウムやマグネシウムを除き、特定の金属が乾燥重量あたり 0.1% (1,000 mg kg<sup>-1</sup>) を超えて集積されることはほとんど無い。しかしながら鉱山周辺やその跡地、高濃度のニッケルを含む蛇紋岩性土壌(超塩基性土壌)などにおいて、通常植物が過剰症により毒性を示すレベル、もしくはそれ

を大幅に上回る濃度の金属や有害元素を地上部に集積する植物が世界各地で発見されている。Brooks らはこれらの特殊な植物群を超集積性植物(hyperaccumulator)と命名し、植物研究の新たな一分野として活発な研究活動を行った<sup>1-3)</sup>。超集積性植物の多くは重金属を集積し、Brooks らの定義では、自然界に自生する植物で地上部における乾燥重量あたりの集積量がニッケルで乾燥重量あたり 1,000 mg kg<sup>-1</sup> 以上、カドミウムで 100 mg kg<sup>-1</sup> 以上、亜鉛で 10,000 mg kg<sup>-1</sup> 以上、マンガンで 10,000 mg kg<sup>-1</sup> 以上などの植物とされている。現在までに約 450 種が報告されており、その内の約 4 分の 3 が蛇紋岩性土壌に自生するニッケル超集積性植物とされている<sup>3)</sup>。近年まで超集積性植物の研究はその特殊な金属集積性が対象とされていたが、植物の遺伝子解析技術を普遍的なものとしたモデル植物のゲノム解析が完了して以降、

超集積性植物は重金属耐性や金属輸送を担うタンパク質をコードする遺伝子探索源として、分子生物学的にも研究が進められるようになった。

超集積が見つかった元素の中には、植物が生命活動に必須とする金属類も含まれる。植物が必要とする9種類の金属のうち、生体内に少ない6種類が微量必須金属元素 (essential microelements) と定義されている。このなかで鉄の獲得機構についてはイネ科以外の Strategy-I とイネ科植物の Strategy-II にまとめられており<sup>4)</sup>、また亜鉛についても、土壌からの鉄吸収に関与する ZIP などの輸送膜タンパク質の多くが亜鉛も輸送することが報告され、その獲得機構が明らかになりつつある<sup>5, 6)</sup>。一方、他の必須微量元素 (マンガン、銅、ニッケル、モリブデン) については、シロイヌナズナなどのモデル植物で数種類のトランスポーターが輸送能力を有することが報告されているが、本来植物体内における含有量が非常に少ないために、土壌からの養分獲得に直接機能している確証が得られていない。そのため、これらの金属については、植物による土壌からの獲得機構が解明されているとは未だ言い難い状況にある。

以前より日本在来の重金属超集積性植物の研究をすすめていた筆者らのグループは、モデル植物や他の生物で見いだされた微量金属元素トランスポーターのホモログ遺伝子を超集積性植物から単離し、その金属輸送能力や発現レベルを検証することで、土壌からの吸収や細胞内濃度調整への関与を明らかにできるとの着想を得た。これまでに鉄・亜鉛以外の必須微量元素の内、モリブデンを除くマンガン、ニッケルおよび銅についてはこれらの金属を高濃度に集積する植物が見つかり<sup>7)</sup>、マンガンをニッケルについては日本にも自生種が発見されている<sup>8-10)</sup>。筆者らのグループはこれら日本在来の植物を用い、現在植物におけるマンガンおよびニッケルの吸収や輸送および生体内濃度調節 (homeostasis) についての研究を数年来行ってきた。今回、日本原産の植物でマンガンを大量に集積するコシアブラと、ニッケル超集積性植物のタカネゲンバイについて、関連する研究成果とその植物栄養学的意義について報告する。

## 2. コシアブラのマンガン獲得メカニズムと超集積性

### 1) コシアブラのマンガン超集積性の特徴

コシアブラは日本各地の山野に普遍的に見られるウコギ科の高木であり、新芽が高級山菜として食用とされる植物である (Fig. 1)。Memon らはコシアブラの葉に  $8,000 \text{ mg kg}^{-1}$  ものマンガンを集積していることを報告しており<sup>8)</sup>、その多くがシュウ酸複合体として液胞に集積していることなどを明らかにしている<sup>11)</sup>。マンガン超集積性の基準は乾燥重量あたり  $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$  とされていることから、これまでコシアブラは超集積性植物ではなく一段集積能力が低い強集積性植物 (strong accumulator) として扱われていたが、日本山野に自生する植物の葉中金属含量を網羅的に調査した高田らの報告によれば<sup>12)</sup>、複数の地域において乾燥重量あたり  $20,000 \text{ mg kg}^{-1}$  (2%) を超えるマンガン集積が認められていた<sup>13)</sup>。さらに朝比奈による三重県山野の植物における各種金属集積量の調査においても、コシアブラ葉におけるマンガン集積量は著しく高い値を示していた。さらに細野の調査によって、コシアブラ葉におけるマンガン濃度は生育年数に依存し、2 m に達しない若木では  $3,000 \sim 8,000 \text{ mg kg}^{-1}$  程度であるのに対し、7-10 m の高木では葉の乾燥重量あたり  $12,000 \text{ mg kg}^{-1}$  以上、最高で  $23,000 \text{ mg kg}^{-1}$  のマンガンを集積されることや、春の出葉から晩秋の落葉にかけてマンガン濃度が2倍にまで増加することが明らかとなった (Fig. 2)<sup>14)</sup>。この結果から、コシアブラ葉に含まれるマンガン濃度は樹齢と共に増加し、一定年度の生育を経てマンガン超集積性を示すことが確認された。また、若いコシアブラの部位別マ



Fig. 1. コシアブラ (写真中央)

マンガンを調べた結果、マンガンの濃度が一番高いのは葉であるものの、総量としては幹に多くのマンガンを蓄積されていることが判明しており、幹部分へのマンガンの蓄積が樹齢に伴う葉中マンガンの濃度増加の一因であると考えられた<sup>15)</sup>。

マンガンの超集積性植物は現在 15 種類発見されており、ヤマゴボウ (*Phytolacca acinosa* Roxb.)<sup>16)</sup> を除いてはいずれも木本植物である。また、コシアブラとヤマゴボウを除いた Apocyanaceae, Celastraceae, Clusiaceae, Myrtaceae, Proteaceae などのマンガンの超集積性植物はいずれもニューカレドニアもしくはオーストラリアの高濃度マンガンを含有する超塩基性岩土壌で見出されており<sup>17-19)</sup>、先述のヤマゴボウも中国のマンガンの鉱山周辺で発見されている。これらの植物とは対照的に、Memon ら、高田ら、朝比奈、細野の研究で報告されたコシアブラはいずれも特異な土壌条件（高

マンガンを含有する土壌）で採取されたものではなく、通常の山野（大学演習林を含む）に自生するコシアブラを用いていた。また、三重県山中のコシアブラについて他の金属元素集積を分析した結果、興味深いことにコシアブラはマンガンの超集積性以外の金属にはまったく集積性を示さないことが判明した (Table 1)。以上の研究から、コシアブラは他のマンガンの超集積性植物とは異なり、積極的にマンガンのみを通常土壌から吸収し、葉中へのマンガンの超集積を可能とする体内輸送システムを有しており、またその機構は他の金属と共有されていないことが明らかとなった<sup>15)</sup>。筆者らはコシアブラが持つこの特性が唯一無二のものであり、植物のマンガンの獲得機構解明に最も適したモデルであると判断し、以降コシアブラ根圏でのマンガンの吸収機構、および輸送に関わる膜タンパク質群の解析に着手した。

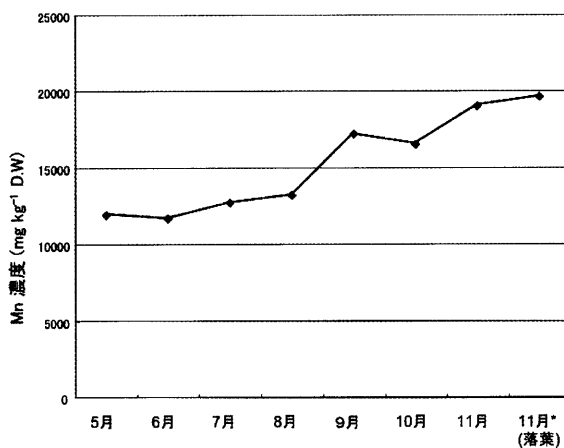


Fig. 2. 成熟コシアブラ木葉中マンガンの推移

## 2) コシアブラ根圏でのマンガンの可溶化と集積

通常土壌中のマンガンはほとんどが植物が吸収できない 4 価の酸化物 ( $MnO_2$ ) で存在し、土壌微生物の働きや湛水条件となることで土壌の還元が進み、2 価のイオン ( $Mn^{2+}$ ) となることで植物による吸収が可能となる<sup>20)</sup>。このため、コシアブラが土壌中のマンガンをどのように可溶化し、獲得しているかを解明することが、コシアブラのマンガンの超集積性を解明する第 1 の鍵と考え、その手始めとして研究材料として用いる幼植物体の獲得を試みた。

成熟したコシアブラ木は晩秋に紫色の実をつけ

Table 1. 日本の陸生植物とコシアブラの金属含量の比較

	Concentration (mg kg <sup>-1</sup> D.W.)				
	Mn	K	Mg	Ca	Fe
①コシアブラ (若木葉)	8,730	12,500	1,850	4,200	60
②日本に自生する植物の平均値*	546	14,200	3,650	16,500	116
③比率 (①/②)	16.0	0.88	0.51	0.25	0.52
	Zn	Ni	Cu	Co	Cd
①コシアブラ (若木葉)	20.2	1.74	6.05	0.00	0.00
②日本に自生する植物の平均値*	46.1	1.93	97.8	2.91	4.80
③比率 (①/②)	0.43	0.90	0.06	—	—

分析した植物サンプル数; Mn: 635, K: 649, Mg: 565, Fe: 539, Zn: 647, Ni: 48, Cu: 22, Co: 482, Cd: 46

\*参照: 高田ら (1994), 鉱山地帯を含む。



る。筆者らのグループはこれまでに回収した成熟種子を周辺の土壤に播き、人工的発芽を試みたが、発芽苗を得るには至らなかった。このため筆者らは林木育種センターの谷口亨氏よりコシアブラの培養細胞（カルス）の譲渡を受け、個々の細胞から再分化によって幼植物体を作成し、研究資材として利用する方法を用いることにした。

培地中の植物ホルモン（2, 4-D）の濃度を  $1 \text{ mg L}^{-1}$  から  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  にすることによりコシアブラカルスから不定胚形成を誘導し、さらに不定胚が緑と白の部分に二極化した段階で白色部分を下にして個別に栽培することにより、緑色部分から葉を、白色部分から根の形成を誘導した（Fig. 3）。得られた幼植物体を pH 指示薬と粉末状の二酸化マンガンを添加した培地で栽培し、不動態マンガンの溶解と吸収について解析を行った結果、コシアブラ根圏で急速な pH 低下と共に二酸化マンガンが可溶化し（Fig. 4A）、再分化体に吸収されていることが確認された（Fig. 4B）。これによ

り、コシアブラが土壤微生物の還元により可溶化したマンガンを吸収する以外にも、自らマンガンの可溶化を行っていることが明らかとなった<sup>21)</sup>。

### 3) マンガン輸送トランスポーターの探索

pH 低下はほとんどの金属種の溶解度を増加させることから、コシアブラ根圏の pH 低下だけではマンガン特異的な集積を説明できない。植物が可溶化（イオン化）した金属を体内に輸送するためには、根の表皮細胞における細胞内への取り込みが必要であり、コシアブラではこのステップにおいてマンガンの親和性の高い輸送タンパク質（トランスポーター）が関与していることが予想された。

シロイヌナズナでマンガン輸送トランスポーターファミリーの探索が進められた結果、これまで ZIP（Zrt1-Irt1 like protein）と NRAMP（natural resistance-associated macrophage protein）トランスポーターの一部が細胞膜や液胞膜でマンガン輸

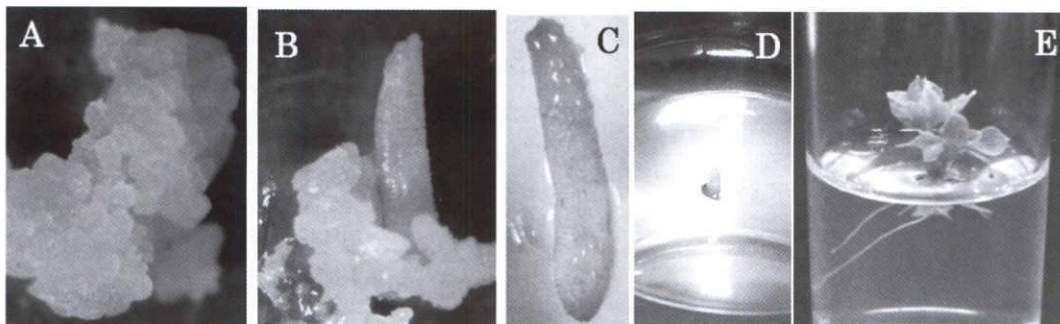


Fig. 3. コシアブラカルスからの再分化体誘導

コシアブラカルス（A）より不定胚（B）を誘導し、緑白に二極化した段階（C）で再分化体誘導培地に移植し（D）、根と葉を誘導する（E）

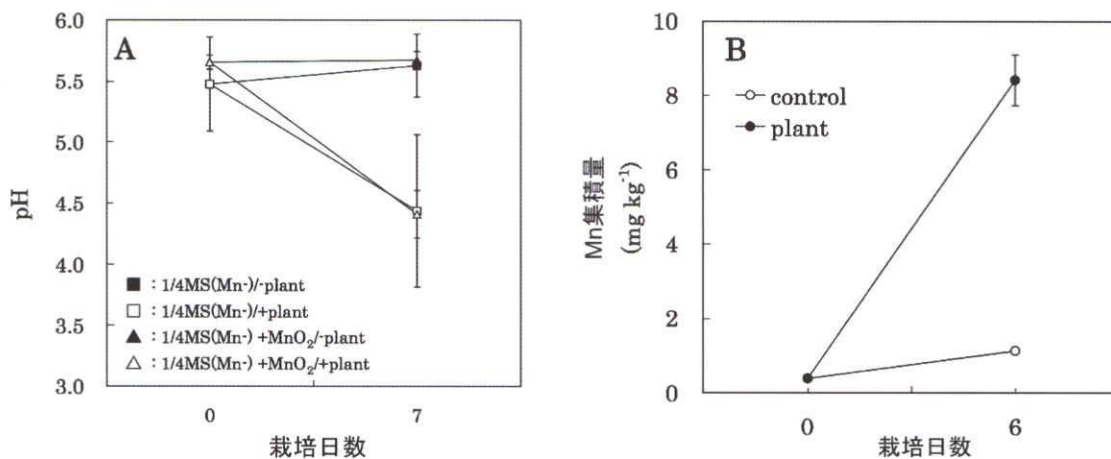


Fig. 4. コシアブラ再分化体根圏での pH 低下 (A) とマンガン可溶化 (B)

送に関わっている可能性が示唆されている<sup>22, 23)</sup>。これらのトランスポーターファミリーのホモログが、コシアブラのマンガン集積に参与している可能性を検証するため、シロイヌナズナ、イネ、出芽酵母などで報告されている ZIP・NRAMP トランスポーターでアミノ酸配列が高度に保存されている領域をそれぞれ同定し、それぞれの配列を元に作成したプライマーを用いて、RT-PCR 法によるホモログ遺伝子断片の増幅を試みた。その結果、コシアブラより ZIP 遺伝子の断片が 2 種類、NRAMP 遺伝子の断片が 1 種類増幅された。このうち、ZIP の 1 種類と NRAMP 遺伝子については RACE 法を用いて cDNA の全長配列が決定され、それぞれ *CsZIP1* および *CsNRAMP1* と命名した。

8 カ所の膜貫通領域を含む 475 アミノ酸残基からなる *CsZIP1* は、低マンガン条件で培養したコシアブラカルスで発現の誘導が確認された。しかし、マンガン輸送トランスポーターを欠損した出芽酵母で遺伝子を発現してもマンガン輸送能力の回復することはできず (Fig. 5A)、また遺伝子発現酵母でマンガン集積が認められなかったことより (Fig. 5B)、*CsZIP1* は現時点においてコシアブラのマンガン輸送の候補からは除外されている<sup>24)</sup>。また *CsNRAMP1* については、GFP 融合 *CsNRAMP1* が液胞に認められ、また発現酵母においてマンガン集積量の増加が認められたことから、コシアブラ葉細胞における液胞へのマンガン輸送に関わっている可能性が示唆された (投稿準備中)。しかしながら、*CsZIP1* と同様 *CsNRAMP1* もマンガン輸送能欠損酵母のマンガン輸送能を回復できなかったことから、今回検討したトランスポーターはいずれもコシアブラのマンガン吸収への寄与は認められなかった。シロイヌナズナやイネと同様、コシアブラにも最低 2 種類のホモログ遺伝子の存在が確認されているが、現時点では ZIP/NRAMP トランスポーターがコシアブラのマンガン超集積に参与している証拠は得られていない。今後は他のホモログ遺伝子の単離と機能解析が必要と考えられる。さらに、プロトンの放出と共役して物質輸送を行う ABC トランスポーターの探索も進めたいと考えている。

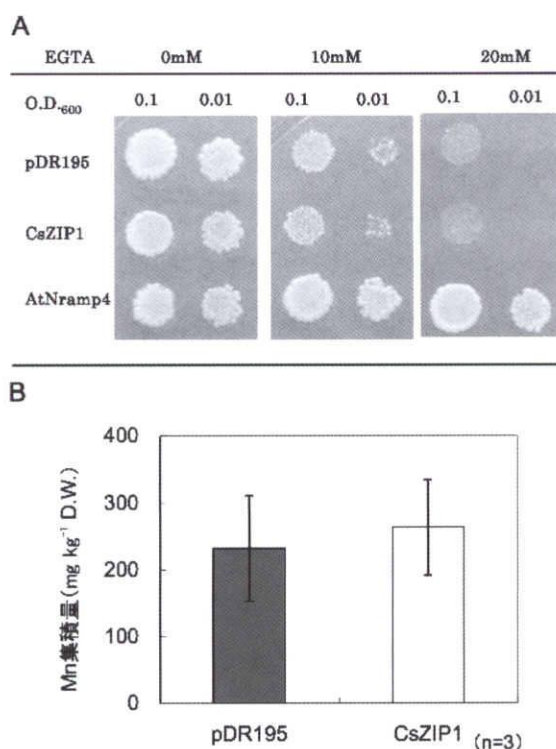


Fig. 5. コシアブラ ZIP トランスポーター (*CsZIP1*) によるマンガン輸送試験

pDR195; コントロールプラスミド。AtNramp4; ポジティブコントロールプラスミド。(A); マンガン輸送能欠損酵母  $\Delta smf1$  を用いた輸送試験。(B); *CsZIP1* 発現酵母のマンガン集積試験。

### 3. タカネグンバイのニッケル超集積性とニッケル耐性遺伝子の研究

#### 1) 日本におけるニッケル超集積性植物の発見

超塩基性岩土壌 (蛇紋岩土壌) は世界各地に分布する代表的な高重金属含有土壌の一つであり、高ニッケル、高マグネシウムのほか、クロムなどの重金属が含まれている<sup>25)</sup>。超塩基性岩土壌地帯では高濃度のニッケルによる毒性、およびリン、カリウムおよびカルシウムなどの生育に必須な元素量が少ないなどの理由から通常植物の生育は阻害され、その地域に成育可能な植物 (超塩基性岩土壌植物) によって通常とは異なる植生 (超塩基性岩土壌植生; ultramafic rock soil flora もしくは serpentine flora) が形成される<sup>26)</sup>。このような植生の中には乾燥重量あたり 1000 mg kg<sup>-1</sup> (0.1%) 以上のニッケルを含むニッケル超集積性植物や強ニッケル集積性植物 (100 - 1,000 mg kg<sup>-1</sup>) が見いだされることがあり、多くの研究がなされている<sup>27-31)</sup>。



日本にも北海道の脊稜部や三重県鳥羽など各地に超塩基性岩土地帯が分布しており、多様な超塩基性岩土地帯植物が多数存在することが世界的にも知られている<sup>32-36)</sup>。堀江の見解<sup>10)</sup>では、日本産の超塩基性岩土地帯植物として22科65分類群を挙げており、その内17科46分類群(70.8%)が北海道の超塩基性岩土地帯に自生すると報告している。日本産ニッケル超集積性植物の存在については、Reeves<sup>9)</sup>が世界各地の *Thlaspi* (ゲンバイナズナ属) を含む各種アブラナ科植物を収集し分析、北海道に自生するタカネゲンバイ (*Thlaspi japonicum*) のニッケル超集積性を初めて報告している。これについては北海道の超塩基性岩土地帯に生息する植物 {超塩基性岩土地帯に固有な植物37種、超塩基性岩土地帯以外にも分布する植物(草本33種、高木5種)} を収集・解析した堀江の研究においても、唯一タカネゲンバイのみが平均  $1,300 \text{ mg kg}^{-1}$  (最高値  $1955 \text{ mg kg}^{-1}$ ) のニッケルを含むニッケル超集積性植物として確認されており、現時点において唯一日本に自生するニッケル超集積性植物として確認されている<sup>10)</sup>。約60種あるとされるゲンバイナズナ属の多くが重金属超集積性を持つことが知られており、亜鉛超集積をするものはゲンバイナズナ (*T. caerulescens*) をはじめ11種、ニッケルについてもタカネゲンバイを含め15種程度見出されている<sup>10)</sup>。このことから、*Thlaspi* 属は代表的な重金属超集積性植物としてニッケル、亜鉛およびカドミウムの吸収や輸送・耐性に関わるメカニズム解明のためのモデルとして研究が進められている<sup>37-41)</sup>。筆者らのグループは日本産のニッケル超集積性植物であるタカネゲンバイを用いて、これまで植物のニッケル耐性や輸送メカニズム解明を進めており、これまでにその集積パターンやニッケル獲得能力について独自の検証を行った他、これまでにニッケル輸送に関わるトランスポーターの単離を行い、そのいくつかを論文として報告している。

## 2) タカネゲンバイのニッケル超集積パターンおよび潜在的ニッケル獲得能力の検証

タカネゲンバイ (Fig. 6) は夕張岳の超塩基性岩土地帯の他、天狗岳(札幌)の石英安山岩土地帯や礼文島の堆積岩風化土壌でも自生が確認されており<sup>10)</sup>、超塩基性岩土地帯に特異的な植物ではない。

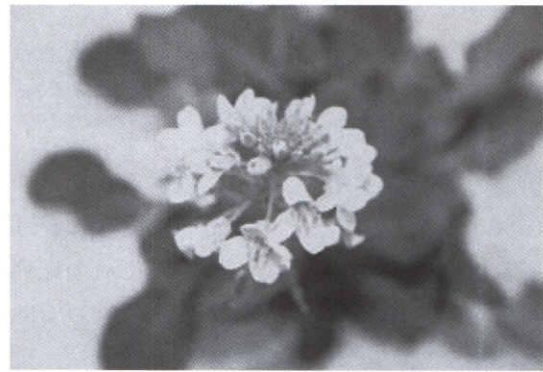


Fig. 6. タカネゲンバイ (*Thlaspi japonicum*)

しかしながら、これら天狗岳や礼文島のタカネゲンバイを超塩基性岩土地帯に移植すると、いずれもニッケルを超集積することが確認されている<sup>42)</sup>。このことから、タカネゲンバイは生育した土壌条件に依存するのではなく、本来の性質としてニッケル超集積性をもたらすメカニズムを有していることが推測された。ただし、天狗岳由来のタカネゲンバイについては超塩基性岩土地帯での栽培でニッケル過剰症と考えられる症状を示す場合があり、ニッケル耐性については必ずしも夕張岳原産のタカネゲンバイと同レベルではないと考えられている<sup>10)</sup>。

ニッケルを集積したタカネゲンバイをジメチルグリオキシムで染色し、顕微鏡で観察すると、ニッケルが結晶状に葉全体に分布しているのが確認され、下皮では気孔の周辺に集積しているのが確認された (Fig. 7)<sup>43)</sup>。このタカネゲンバイ葉を上表皮、下表皮、および葉肉部分に分離し、それぞれのニッケル濃度を測定したところ、下表皮において特に高濃度に集積しており (Table 2)、また葉辺においてもニッケルの集積が確認され、溢泌液(朝露)が分泌される導管の末端で強い染色が確認された<sup>44)</sup>。以上のことから、根から吸収されたニッケルは導管を通して地上部に輸送され、さらに蒸散に伴って気孔周辺などに蓄積されることが示唆された。また、溢泌液中にも高濃度のニッケルが含まれていたことから、タカネゲンバイは葉に溜まったニッケルを溢泌液と共に体外に排出するメカニズムを有していると考えられた。これらの葉におけるニッケルの結晶化と隔離、および体外への排出機構が、タカネゲンバイの高ニッケル土壌での生育を可能にしているものと考えられた。



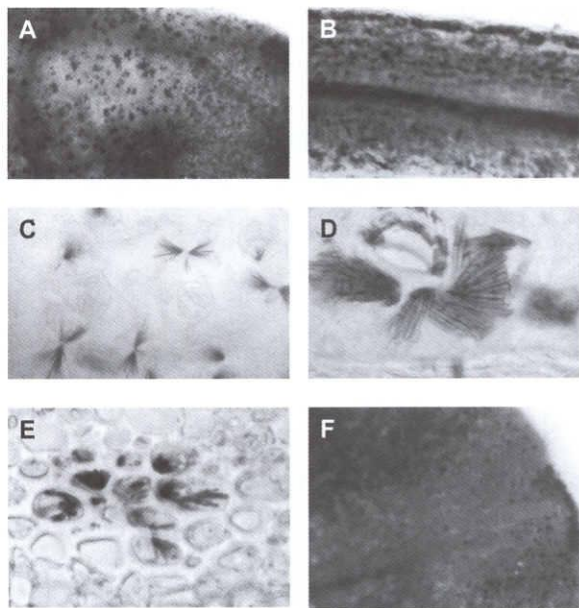


Fig. 7. ニッケルを集積したタカネグンバイにおけるニッケル結晶

葉はニッケルにより赤色を呈するジメチルグリオキシムで染色。(A) 葉を表面から観察 (B) 葉の横断面 (C) 下表皮のニッケル結晶 (D) 気孔周辺のニッケル結晶 (E) 茎の導管部分におけるニッケル結晶の蓄積 (F) 葉辺の溢泌液排出部位におけるニッケル集積

Table 2. タカネグンバイ葉におけるニッケル集積部位

部位名	乾燥重量 (mg)	Ni 濃度 (mg kg <sup>-1</sup> )	ニッケル含量 (mg)
葉全体	47.6±0.0	1,487±92	70.78
葉辺	7.2±0.5	2,495±66	17.96
上表皮	6.8±0.1	1,616±168	10.99
下表皮	4.9±0.3	3,424±522	16.78
葉肉細胞	28.7±0.7	873±59	25.05

サンプル数 n=4

### 3) タカネグンバイ由来ニッケルトランスポーターの解析

ニッケルは植物の必須微量元素元素の中でもモリブデンについて必要量が少なく、欠乏症が現れることはほとんどない。そのため植物のニッケル吸収や輸送、分配についての知見は乏しく、それらを担うトランスポーターの研究例も皆無に等しい。しかしながら、筆者らは南フランス原産でカドミウム・亜鉛超集積性を持つグンバイナズナで鉄・亜鉛輸送タンパク質 ZIP トランスポーター遺伝子の恒常的発現が確認されたことや<sup>45)</sup>、他種の亜鉛超集積性植物 (*Arabidopsis halleri*) のマイ

クロアレイ解析でも ZIP および NRAMP が高発現していることが確認されたことから<sup>46)</sup>、複数種の金属輸送能を有する ZIP および NRAMP ファミリーのトランスポーターの中にニッケルを輸送する種類が存在するのではないかと考えた。また、堀江は天狗岳や礼文島のタカネグンバイに亜鉛やマンガン、鉄なども高い濃度で蓄積されていることを報告しており<sup>10)</sup>、タカネグンバイにおけるニッケル獲得はこれらの他種金属輸送と共役している可能性が考えられた。以上を踏まえ、筆者らは植物におけるニッケル獲得機構についての知見獲得を目的として、タカネグンバイから ZIP および NRAMP ファミリートランスポーターのホモログ遺伝子を単離し、そのニッケル輸送能の検討を行った。

上述したコシアブラと同様に、タカネグンバイから ZIP および NRAMP トランスポーターのホモログ遺伝子の単離を試みた。その結果、二種類の ZIP トランスポーター遺伝子 (*TjZNT1*, *TjZNT2*) と、シロイヌナズナ *AtNRAMP4* と相同性を持つ一種類の NRAMP ホモログ (*TjNRAMP4*) が単離された<sup>47)</sup>。*TjZNT1* と 2 はいずれも 6 カ所の膜貫通領域を持ち、他の ZIP トランスポーターと同様膜貫通領域 III と IV の間に可変領域 (variant region) と呼ばれる相同性の低い領域を有していた。さらに *TjZNT1*・2 の可変領域にはヒスチジンを多く含む部位 (高ヒスチジン領域) が 2 カ所含まれており、ニッケルがヒスチジンと結合しやすい性質を有することから、当初ニッケルに対する輸送認識部位であることが考えられた。

*TjZNT1/2* 両トランスポーターの発現は高ニッケル条件で酵母の生育を改善し、酵母にニッケル耐性を付加することが明らかとなった (Fig. 8)。また、両トランスポーターにはマンガンおよびカドミウムについても輸送が確認されたが、亜鉛輸送能は *TjZNT1* のみが有していた<sup>47)</sup>。

*TjZNT1*・2 のニッケル発現が酵母にニッケル耐性をもたらすメカニズムについては、細胞外への排出や高ヒスチジン領域へのニッケル結合などが要因として考えられたが、これらの仮説は細胞からのニッケル排出速度の測定や高ヒスチジン領域を削除した *TjZNT1* 発現酵母を用いた試験により否定された<sup>48)</sup>。亜鉛など他の低毒性金属を積極的に細胞内に輸送することで細胞内へのニッケ

ル輸送が阻害されることが一要因として示唆されたが、現在までニッケル耐性メカニズムについては明らかにされていない。一方、TjNRAMP4は12箇所の膜貫通領域を持つ典型的なNRAMPファミリートランスポーターである。酵母での発現の結果、TjZNT1および2とは逆に高濃度ニッケル培地における酵母のニッケル感受性を増加させ、酵母細胞内におけるニッケル集積量を増加した (Fig. 9)。このことにより、少なくともTjNRAMP4は細胞内へのニッケル輸送能を有していることが示唆された。以上の研究により、植物由来ZIPおよびNRAMPトランスポーターのニッケル輸送

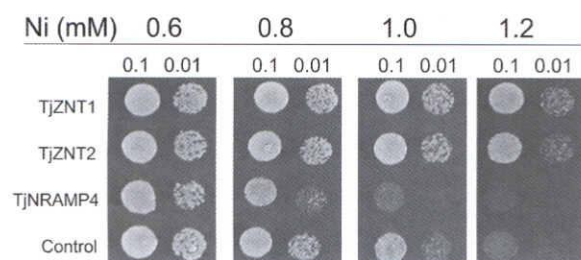
への関与が示唆される結果が得られたが、組み換え酵母での研究結果が必ずしも植物において反映されない場合が存在する。今回の研究結果を植物においても検証するため、現在これらのトランスポーター遺伝子によるシロイヌナズナ組換え体を作成し、植物のニッケル耐性における機能解析を進めている。

#### 4. おわりに

重金属超集積性植物は金属元素吸収と輸送、さらには耐性や集積における特殊事例の集合体であり、植物栄養学的な知見を検証する重要な研究材料である。植物研究における学術的重要性の他にも、強い毒性を持つカドミウム<sup>49, 50</sup>や鉛<sup>51</sup>、ヒ素<sup>52</sup>などを吸収する植物については実用的なファイトレメディエーション資材として利用されている他、今回紹介したコシアブラなど高濃度かつ大量に金属の回収が可能な植物については、それ自体を代用鉱石とする利用法 (phytomining) が考案されており<sup>53, 54</sup>、近未来において資源の枯渇が起こると考えられている各種金属を回収・利用するための研究が進められている<sup>55</sup>。これらの事例のように、重金属超集積性植物研究は現在環境浄化や効果的資源循環研究の一翼としても発展中であり、コシアブラやタカネグンバイをはじめとする日本在来の重金属集積性植物の研究も、植物栄養学から環境や分子生物育種の分野の研究に裾野を広げることによって、今後新たな展開を進めていきたいと考えている。

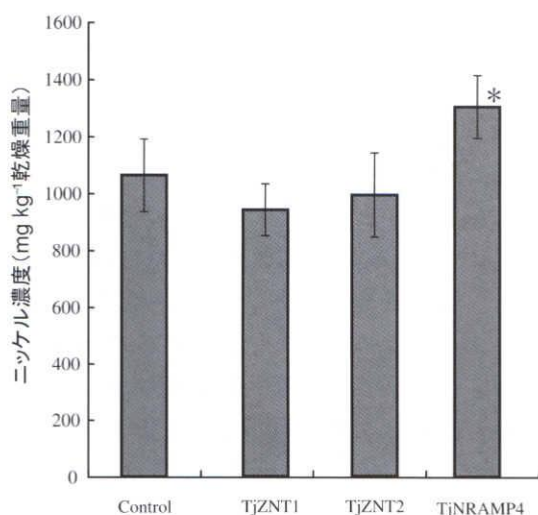
#### 謝 辞

今回報告した研究のなかで、コシアブラに関する研究は土壌圏生物機能学小畑 仁教授および筆者の指導の下、朝比奈 亮、細野篤子、平野賢司、加藤晋太各氏により行われた修士論文研究の成果をまとめたものである。また、タカネグンバイに関する研究は当研究室の園田豊治、白井弘児、海野孝至、西田 翔各氏の修士論文研究の他、酪農学園大学 水野直治博士、元愛知教育大学教授 野坂志朗博士、北邦植物園 堀江健二博士と行った共同研究をまとめたものである。関係者の皆様にこの場を借りて厚く謝意を呈するものである。



**Fig. 8.** タカネグンバイ由来 ZIP トランスポーター (TjZNT1, TjZNT2) および NRAMP トランスポーター (TjNRAMP4) を発現する酵母のニッケル耐性

コントロールプラスミドには pKT10-HA-BS を使用。



**Fig. 9.** TjZNT1, TjZNT2 および TjNRAMP4 発現酵母におけるニッケル集積量

コントロールプラスミドには pKT10-HA-BS を使用。800  $\mu$ M の塩化ニッケルを含む培地で 36 時間培養した酵母での集積量を示す。N=5。グラフは平均値  $\pm$  標準誤差の値を示す。\* $p$  < 0.05。



## 和文要約

重金属超集積性植物は通常の植物が過剰障害を示す非常に高い濃度の重金属を地上部に集積する植物群である。現在それらの植物が持つ特殊能力を、土壌浄化や鉱物の代用として利用する研究が進められている他、これまで解明が困難だった植物における微量必須元素の吸収や輸送メカニズム解明のモデル植物として量が進められている。今回は日本在来の植物であるコシアブラとタカネゲンバイのマンガンおよびニッケル超集積性に関する研究についてまとめ、それらの植物栄養学における寄与と応用について報告する。

## 参考文献

- BROOKS RR, MORRISON RS, REEVES RD, DUDLEY TR, AKMANS Y (1979) Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum Linnaeus* (Cruciferae). *Proc Royal Soc London B* **203**: 387-403
- BAKER AJM (1981) Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutri* **3**: 643-654
- BAKER AJM, BROOKS RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126
- MARSCHNER H, RÖMHELD V (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* **165**: 261-274
- COLANGELO EP, GUERINOT ML (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants *Curr Opin Plant Biol* **9**: 322-330
- ISHIMARU Y, SUZUKI M, KOBAYASHI T, TAKAHASHI M, NAKANISHI H, MORI S, NISHIZAWA NK (2005) OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *J Exp Bot* **56**: 3207-3214
- BROOKS RR (1998) General Introduction. In: Brooks RR, (ed) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB International, Wallingford, UK, pp 1-14
- MEMON AR, ITO S, YATAZAWA M (1979) Absorption and accumulation of iron, manganese and copper in plants in the temperate forest of central Japan. *Soil Sci Plant Nutr* **25**: 611-620
- REEVES RD (1988), Nickel and zinc accumulation by species of *Thlaspi* L., *Cochlearia* L., and other genera of the *Brassicaceae*. *Taxon* **37**: 309-318
- 堀江健二 (2002) 北海道・超塩基性岩土壌植物の化学的特性に関する研究. *J Rakuno Gakuen Univ* **26**: 155-264
- MEMON AR, YATAZAWA M (1984) Nature of manganese complexes in manganese accumulator plant *Acanthopanax sciadophylloides*. *J Plant Nutr* **7**: 961-974
- 高田実弥 (1994) 機器的中性子放射化分析データ. 高田実弥, 高松武次郎, 佐竹研一, 佐瀬裕之編, 陸上植物葉の元素濃度—中性子放射化分析データ集 (1)—. 国立環境研究所, つくば市, 8-258
- 朝比奈亮 (1999) 高等植物による重金属集積に関する研究. 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文.
- 細野篤子 (2001) Mn 超集積性植物コシアブラのファイトレメディエーションへの応用. 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文.
- MIZUNO T, ASAHINA R, HOSONO A, TANAKA A, SENOO K, OBATA H (2008) Age-dependent manganese hyperaccumulation in *Chengioplanax sciadophylloides* (Araliaceae). *J Plant Nutr* **31**: 1811-1819
- XUE SG, CHEN YX, REEVES RD, BAKER AJM, LIN Q, FERNANDO DR (2004) Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Environ Pollut* **131**: 393-399
- BROOKS RR (1998) Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks RR, (ed) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB International, Wallingford, UK, pp 55-94
- REEVES RD, BAKER AJM (2000) Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds.) *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. John Wiley & Sons Inc, New York, pp193-229
- BIDWELL SD, WOODROW IE, BATIANOFF GN, SOMMER-KNUDSEN J (2002) Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwillii* (Myrtaceae) from Queensland, Australia. *Funct Plant Biol* **29**: 899-905
- RENGEL Z (1997) Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant Soil* **196**: 255-260
- MIZUNO T, HIRANO K, HOSONO A, KATO S, OBATA H (2006) Continual pH lowering and manganese dioxide solubilization in the rhizosphere of Mn-hyperaccumulator plant *Chengioplanax sciadophylloides*. *Soil Sci Plant Nutr* **52**: 726-733

- 22) EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, GUERINOT ML (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5624-5628
- 23) LANQUAR V, LELIÈVRE F, BARBIER-BRYGOO H, THOMINE S (2004) Regulation and function of AtNRAMP4 metal transporter protein. *Soil Sci Plant Nutr* **50**: 1141-1150
- 24) MIZUNO T, HIRANO K, KATO S, OBATA H (2008) Cloning of ZIP family metal transporter genes from the manganese hyperaccumulator plant *Chengiopanax sciadophylloides*, and its metal transport and resistance abilities in yeast. *Soil Sci Plant Nutr* **54**: 86-94
- 25) 北村四郎 (1950) 蛇紋岩地帯の適応と隔離. *植物地理・分類研究* **12**: 178-184
- 26) RUNE O. (1953) Plant life on serpentine and related rocks in the north of Sweden. *Acta Phyto-geogr. Suec.* **31**: 1-139
- 27) COLE MM (1973) Geobotanical and biogeochemical investigations in the Sclerophyllous woodland and shrub associations of the Eastern Goldfields area of Western Australia, with particular reference to the role of *Hybanthus floribundus* (Lindl.) F. Muell. a nickel indicator and accumulator plant. *J Appl. Ecol.*, **10**: 269-320
- 28) BIDWELL SD, CRAWFORD SA, WOODROW IE, SOMMER-KNUDSEN J, MARSHALL AT (2004) Sub-cellular localization of Ni in the hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (Lindley) F. Muell. *Plant Cell Environ* **27**: 705-716
- 29) JAFFRÉ T, BROOKS RR, LEE J, REEVES RD, (1976) *Sebertia acuminata*: a nickel accumulating plant from New Caledonia. *Science* **193**: 579-580
- 30) REEVES RD, BROOKS RR, MACFARLANE RM (1981) Nickel uptake by Californian *Streptanthus* and *Caulanthus* with particular reference to the hyperaccumulator *S. polygaloides* Gray (Brassicaceae). *Am J Bot* **68**: 708-712
- 31) REEVES RD, MACFARLANE RM, BROOKS RR (1983) Accumulation of nickel and zinc by Western North American genera containing serpentine-tolerant species. *Am J Bot* **70**: 1297-1303
- 32) 北村四郎 (1993) 蛇紋岩地帯の植物. 日本の蛇紋岩植物相の研究 11. 植物の分布と分化. 北村四郎選集 V, 保育社, 大阪, pp 203-234
- 33) NOSAKA S, HORIE K (1993) Synoptic sketch of the serpentine flora of lowland areas in Hokkaido, Japan. *Bull Aichi Univ Educ* **42**: 13-25
- 34) NOSAKA S, HORIE K (1994) Synoptic sketch of the serpentine flora of lowland areas in Hokkaido, Japan (II). *Bull Aichi Univ Educ* **43**: 37-49
- 35) HORIE K, MIZUNO N, NOSAKA S (2000) Characteristics of nickel accumulation in native plants growing in ultramafic rock areas in Hokkaido. *Soil Sci Plant Nutr* **46**: 853-862
- 36) 堀江健二 (2000) 北海道・超塩基性岩植物の分布. *植物地理・分類研究* **48**: 79-85
- 37) KRÄMER U, SMITH RD, WENZEL WW, RASKIN I, SALT DE (1997) The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. *Plant Physiol* **115**: 1641-1650
- 38) KRÄMER U, PICKERING IJ, PRINCE RC, RASKIN I, SALT DE (2000) Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and nonaccumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol* **122**: 1343-1353
- 39) LASAT MM, BAKER AJM, KOCHIAN LV (1996) Physiological characterization of root Zn<sup>2+</sup> absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol* **112**: 1715-1722
- 40) LOMBI E, ZHAO FJ, DUNHAM SJ, MCGRATH SP (2000) Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol* **145**: 11-20
- 41) UENO D, ZHAO FJ, SHEN R, MA JF (2004) Cadmium and zinc accumulation by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* from soils enriched with insoluble metal compounds. *Soil Sci Plant Nutr* **50**: 511-515
- 42) MIZUNO T, OBATA H, HORIE K, NOSAKA S, MIZUNO N (2005) Comparison of Ni/Zn metal accumulation ability of *Thlaspi japonicum* from three different areas in Hokkaido. *Soil Sci Plant Nutr* **51**: 589-594
- 43) 水野直治, 堀江健二, 水野隆文, 野坂志朗 (2001) 超ニッケル集積植物“タカネゲンバイ *Thlaspi japonicum*”の化学組成とニッケル化合物の結晶. *土肥誌* **72**: 529-534
- 44) MIZUNO N, NOSAKA S, MIZUNO T, HORIE K, OBATA H (2003) Distribution of Ni and Zn in the leaves of *Thlaspi japonicum* growing on ultramafic soil. *Soil Sci Plant Nutr* **49**: 93-97
- 45) ASSUNÇÃO A, MARTINS P, DE FOLTER S, VOOIJS R, SCHAT H, AARTS MGM (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* **24**: 217-226
- 46) WEBER M, HARADA E, VESS C, ROEPENACK-



- LAHAYE E, CLEMENS S (2004) Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* **37**: 269-281
- 47) MIZUNO T, USUI K, HORIE K, NOSAKA S, MIZUNO N, OBATA H (2005) Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni<sup>2+</sup>-transport abilities. *Plant Physiol Biochem* **43**: 793-801
- 48) MIZUNO T, USUI K, NISHIDA S, UNNO T, OBATA H (2007) Investigation of the basis for Ni tolerance conferred by the expression of *TjZnt1* and *TjZnt2* in yeast strains. *Plant Physiol Biochem* **45**: 371-378
- 49) BAKER AJM, REEVES RD, HAJAR ASM (1994) Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol* **127**: 61-68
- 50) KUBOTA H, TAKENAKA C (2003) *Arabis gemmifera* is a hyperaccumulator of Cd and Zn. *Int J Phytorem* **5**: 197-201
- 51) TAMURA H, HONDA M, SATO T, KAMACH H (2005) Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J Plant Res* **118**: 355-359
- 52) MA LQ, KOMAR KM, TU C, ZHANG W, CAI Y, KENNELLEY ED (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* **409**: 579
- 53) BAKER AJM, McGRATH SP, REEVES RD, SMITH JAC (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Bañuelos G (eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publ. Boca Raton, Florida, pp.85-108
- 54) BROOKS RR, ROBINSON BH (1998) The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining. In: Brooks RR, (ed) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB International, Wallingford, UK, pp 327-356
- 55) CHANEY RL, ANGLE JS, BROADHURST CL, PETERS CA, TAPPERO RV, SPARKS DL (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J Environ Qual* **36**: 1429-1943