

アナリティカルレポート

重金属集積植物セイヨウカラシナのカルスにおける
重金属の挙動山田 亮¹, 竹田 竜嗣¹, 津田 侑亮², 松本 貞義²,
米虫 節夫², 沢辺 昭義²Behavior of Heavy Metals in the Callus of *Brassica Juncea*, a
Heavy Metal Accumulation PlantToru YAMADA¹, Ryuji TAKEDA¹, Yusuke TSUDA², Sadayoshi MATSUMOTO²,
Sadao KOMEMUSHI² and Akiyoshi SAWABE²¹ Department of Applied Life Science and Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kinki University, 3327-204, Nakamachi, Nara-shi, Nara 631-8505² Laboratory of Environmental Biology and Chemistry, Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204, Nakamachi, Nara-shi, Nara 631-8505

(Received 14 April 2005, Accepted 19 July 2005)

To find a more efficient phytoremediation, the accumulation mechanism of elucidating heavy metals of a hyperaccumulator is important. We measured the behavior and glutathione quantity of the heavy metal accumulation level in calli using *Brassica juncea*, which is a hyperaccumulator of Pb and Cd. *Brassica juncea* from a seed was used to grow callus, which was for three months. Then, for two weeks, we conducted long-term exposure to a culture in heavy-metal component culture media (Cr, Cu, Zn, Cd, Pb, Co, Ni). Furthermore, we used a liquid culture medium; for Pb, we conducted a short-term exposure for five days. As for Cd and Pb, the absorbed dose was high, and the Cd, in particular, showed the absorbed dose to be high at a low concentration (10~100 μM), compared with other heavy-metal classes. There were many things that necrotized, in other heavy metals, the fastness was not found to influence the heavy metal. In the short-term exposure of Pb, the absorption level increased during the early phase. However, 96 hours later, according to the cell cycle, that absorption appeared to be promoted. In addition, in GSH, while a large difference was not recognized, a high concentration level was much contained it.

Keywords : phytoremediation ; Pb ; heavy metal ; hyperaccumulator ; *Brassica juncea*.

1 緒 言

重金属による汚染は世界各国で起きている。汚染には、人為的汚染がほとんどであるが、中には、自然由来の汚染もある。人為的汚染には、工場からの排水や廃液によるものなどが挙げられる。自然由来のものには、鉱床、母岩に起因するものが挙げられる。特に日本のような火山国で

は、土壌中のヒ素などの含有量が高い¹⁾²⁾。また、20世紀に急速に普及した自動車の排ガスや大量に作られた工業製品などの廃棄物投棄により、有害な重金属の流出が起きている。通常これらの重金属汚染の除去には化学的処理や物理的処理が施されるが、それらには膨大なコストが必要である。その代替手段として phytoremediation が欧米を中心に行われている。この phytoremediation は、phyto がギリシャ語で植物を意味し、remediation がラテン語で修復を意味することから直訳すれば、植物利用による環境修復の総称を意味する³⁾。これらは、その浄化対象物質によ

¹ 近畿大学大学院農学研究科応用生命化学専攻: 631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204² 近畿大学農学部農芸化学科: 631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

り、更にいくつかの呼び名があり、重金属を地下部からポンプのように吸い上げ、地上部に集積させることを特に phytoextraction と呼ぶ¹⁾。

phytoextraction に用いられる植物は、通常植物の数十倍から数百倍程度、重金属を地上部に集積することができることから、hyperaccumulator (超集積植物) と呼ばれている⁵⁾。このような植物は、現在約 400 種が発見されており、そのほとんどがアブラナ科である。例えば、Ni の超集積植物としてよく研究されている *Thlaspi japonicum*⁶⁾ や Zn と Cd の超集積植物である *Thlaspi caerulescens*⁷⁾ は、いずれもアブラナ科ゲンバイナズナ属で、よく知られている。また、セイヨウカラシナ (*Brassica juncea*) は、Pb, Cd の超集積植物⁸⁾として世界中で研究されている。超集積植物が、重金属を地上部に高濃度に集積する機構は、根圏において、有機酸などの金属キレート物質の放出などにより可溶化した重金属が地上部へ輸送されるが、輸送過程や、地上部での蓄積の際に無毒化、不動化させる機構があると考えられる。これらの機構は、glutathione (GSH, γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) や phytocheratin のような SH 化合物が重要な役割を果たしていることがよく知られている⁹⁾¹⁰⁾。特に GSH は、抗ストレス因子として、ほとんどの動植物で見られ、Cd や他の重金属の無毒化¹¹⁾¹³⁾、抗酸化作用などが知られている¹⁴⁾¹⁶⁾。

様々な重金属の集積機構の解明が試みられている。しかし、Pb を集積する植物は、5 種ほどしか知られていない⁵⁾。そこで、著者らは、Cd, Pb の集積植物として知られている *Brassica juncea* を用い、重金属集積機構解明の一助として、植物の未分化細胞の集まりであるカルスを材料に、Pb を中心とした重金属の植物細胞内での挙動と GSH の関係を調査した。

2 実験

2.1 材料及び試薬

セイヨウカラシナ (*Brassica juncea*) の種子は、京都府木津町の木津川河川敷より採集したものをを用いた。カルス、プロトプラスト培養には、MS (murashige and skoog) 培地¹⁷⁾の組成を基本に、重金属及び、微量成分を調整した。無機試薬は特級以上を用いた。試料の酸分解に用いる硝酸及び過酸化水素は原子吸光分析用 (和光純薬製) のものを用いた。酸分解は、マイクロウェーブ分解装置 (MWS-2 BERGHOF) を、重金属の測定には、原子吸光分析機 (日立製作所製 Z-6100) 及び誘導結合プラズマ (ICP) 分析装置 (島津製作所製 ICPS-7500) をを用いた。また、GSH の定量には、紫外可視域吸光光度計 (島津製作所製 UV mini 1240) をを用いた。

2.2 カルスの誘導

種子を MS 寒天培地 (MS 無機成分の他に sucrose 10 g, 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg, 6-benzyladenine (BA) 1 mg, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4D) 1 mg, casamino acid 100 mg を加え pH 5.6 に調整し 1000 ml に定容。) に無菌播種したものよりカルスを誘導した¹⁷⁾。誘導したカルスは 1 か月ごとに継代培養を行い約 3 か月間培養した。

2.3 重金属の暴露

前培養を行ったカルスは、Cr, Ni, Cu, Zn, Co を最終濃度で 1, 10, 50, 100, 500, 1000 μ M, Cd, Pb については、高濃度域での生育状態を確認するため、更に 2500, 5000, 10000 μ M になるよう各金属を MS 無機成分とともに添加した液体培地 (無機成分の他に sucrose 10 g を加え、pH 5.2 に調整し 1000 ml に定容。) 中で、2 週間培養した。培養後、カルスは重量測定後、300 mg の試料を測り取り、マイクロウェーブ分解用テフロン製容器に硝酸 2 ml, 過酸化水素 3 ml を加え密閉し、145 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 180 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 100 $^{\circ}$ C 10 min の条件でマイクロウェーブ分解した。マイクロウェーブ分解後、原子吸光分析機により、Cr, Cu, Zn, Ni, Pb を、更に ICP 分析装置により、Co, Cd を測定した。

また、Pb については、短期間での影響を調べるために 1, 10, 100, 1000 μ M の Pb 濃度区において、120 時間目まで、24 時間ごとに重金属濃度を測定した。両実験とも、24 $^{\circ}$ C 16 時間の明条件に設定した人工気象器内で培養した。実験は、すべて $n = 3$ で行った。

2.4 GSH の定量

Cd, Pb の暴露時の GSH の定量を行った。2 週間重金属暴露後のカルスを計量後、液体窒素で凍結させ、1 M の tris-HCl[tris(hydroxymethyl)aminomethane] buffer (pH 8.5) 1 ml と 300 μ M の 2-nitrobenzoic acid 100 μ l を加え、細胞破砕機 (トッケン製 SK-100) を用いて凍結破砕した。

その後、遠心分離器 (12000 g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) にかけて上澄みを回収し (2 回繰り返す)、GSH を抽出した。抽出試料は、測定波長 412 nm に合わせた紫外可視域吸光光度計を用いて検量線を作成し、定量を行った¹⁸⁾。実験は $n = 3$ で行った。

2.5 プロトプラストの発育影響調査

種子より発芽後、双葉がでるまで前培養したセイヨウカラシナの子葉を滅菌後、約 1 mm 幅に細断後、酵素液 (4% Cellulase Onozuka R-10, 1% Macerzyme R-10, 0.1% 4-morpholine-ethanesulfonic acid, 0.1% CaCl₂, 0.5 M D-mannitol, pH 5.6) に 17 時間浸し、CPW 塩液 (KH₂PO₄

Table 1 Variation of quantity of accumulation by a difference of heavy metal on callus of *brassica juncea*

Medium metal concentration (μM)	Concentration in callus of <i>brassica juncea</i> / $\mu\text{g g}^{-1}$						
	Cd	Pb	Cr	Zn	Cu	Ni	Co
1	55.2 \pm 1.3	196.7 \pm 10.7	ND	140.4 \pm 4.9	236.9 \pm 39.0	ND	ND
10	943.9 \pm 11.9	395.8 \pm 8.8	ND	158.5 \pm 1.7	363.6 \pm 10.9	ND	ND
50	3675.0 \pm 41.1	412.6 \pm 10.3	ND	1102.9 \pm 9.1	472.2 \pm 11.3	ND	ND
100	9624.6 \pm 99.5	663.3 \pm 11.9	ND	1180.0 \pm 21.6	811.5 \pm 17.5	219.0 \pm 9.8	ND
500	39877.2 \pm 131.1	750.0 \pm 14.4	65.2 \pm 2.6	2245.4 \pm 22.2	1437.0 \pm 21.3	1246.8 \pm 66.8	ND
1000	64146.2 \pm 159.4	905.4 \pm 8.4	102.9 \pm 1.7	3651.7 \pm 38.6	2700.0 \pm 35.2	3195.9 \pm 41.7	ND
2500	86493.5 \pm 107.9	16036.2 \pm 135.0	—	—	—	—	—
5000	86758.8 \pm 179.6	62158.3 \pm 148.1	—	—	—	—	—
10000	97936.9 \pm 150.6	103465.3 \pm 148.9	—	—	—	—	—

mean \pm S.D., ND: lower than detection limit (0.1 $\mu\text{g/g}$)

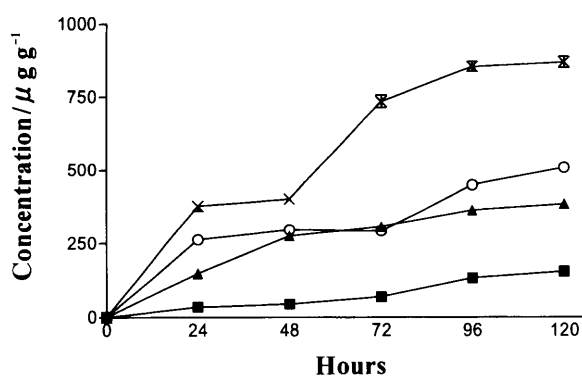


Fig. 1 Time-dependent action of Pb on callus of *brassica juncea*

■ 1 μM , ▲ 5 μM , ○ 100 μM , × 1000 μM . Error bar are shown of standard division.

27.2 mg, KNO_3 100 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1480 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246 mg, KI 0.16 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg, 13% D-mannitol を 1000 ml, pH 5.6 に調整) を用いて洗浄し, プロトプラストを得た. 単離したプロトプラストは, 細胞数を 1×10^3 個に調整し, 液体培地 (1/2 濃度の MS 無機成分, 1% sucrose, 5 μM ナフタレン酢酸, 1 μM カイネチン, 0.5 M D-mannitol, pH 5.6) に鉛濃度 0, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 μM になるよう添加し, 2, 5, 10 日目に細胞数の変化を測定した. 測定は, トーマ血球計数盤を用い, $n = 3$ で行った.

3 結果及び考察

3.1 重金属種の違いによる集積量の変化

Table 1 に, 2 週間後の重金属種の違いによる重金属含有量を示す. Cd, Pb においては, 培地中の濃度が低濃度であっても, 吸収がみられ特に Cd においては, 50, 100 μM といった低濃度域でも, 他の金属の十倍近い量を吸収していた. Co においてはすべての濃度区において検出下限を下回っていた. 2 週間暴露後の生長量に関しては, 生

育可能な濃度域においてどの重金属種でも対照区と比べ有意な差は認められなかった. しかし, 可視的な変化では, Pb の 5000 μM 以上の区で, Cr, Cu, Ni, Co は, 500 μM 以上の濃度区において, 培養期間の終盤あたりより, 褐色化するなど, 生育に影響が見られた. Cd については, 特に可視的な変化は認められなかった. この事実から, カルスのような未分化な状態においても Cd, Pb の吸収能力を保持していることが認められる.

3.2 Pb の短期間吸収量

Fig. 1 は, Pb 暴露 120 時間目までの吸収量を示している. どの濃度区においても, 暴露開始後, S 字曲線のような吸収量の増加を示している. また, このような傾向は, 濃度が上がるにつれより顕著なものになっている. このように細胞内における Pb 無毒化, 不動化は, 常に行われているのではなく様々な細胞内の代謝経路, 物質輸送経路がかかわり, 暴露直後は, 毒物として認識せずに細胞内に取り込んだものが, 培養時間が経つに連れて, いったん防御し, 細胞内での Pb 無毒化経路が働くようになってから, 再び取り込み始めるといったサイクルが考えられる.

3.3 Cd, Pb の GSH 量の差異

Fig. 2 は, Cd, Pb の暴露 2 週間後のカルス内の GSH の量を比較している. Control と比較して有意な差 ($p < 0.05$) は, 認められなかったものの, Cd, Pb とともに, ある一定濃度までは, GSH の量が Control に比べ多い傾向があった. これは, ある一定濃度以上では, GSH の生産量以上に, GSH が消費され, 結果的に減少していると考えられる.

3.4 プロトプラストの細胞数の変化

Fig. 3 は, プロトプラストの細胞数の変化を示している. Pb 濃度 125 μM 以上で増加に影響がでており, 250 μM 以上では, 増殖しなかった. これは, 土壌中の重金属は, 植

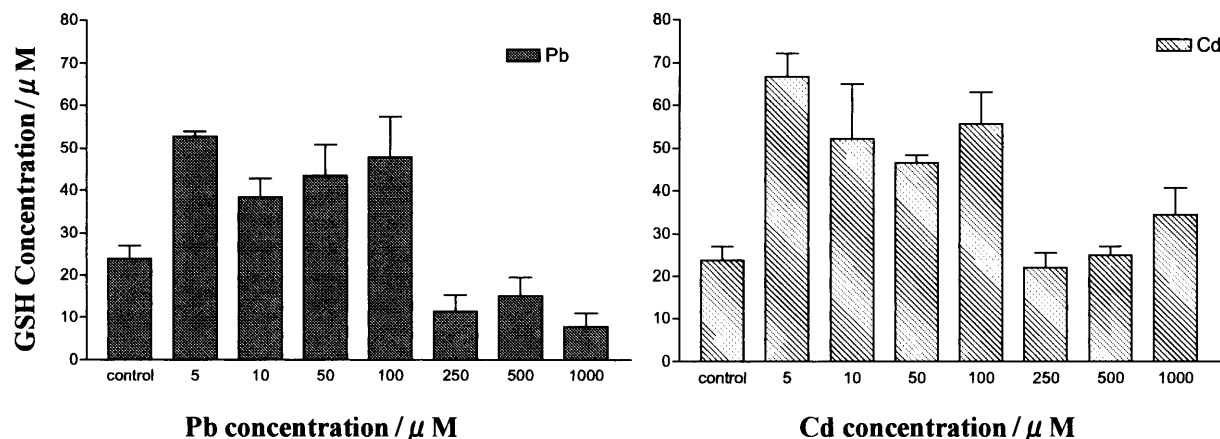


Fig. 2 Variation of GSH concentration by Pb or Cd on callus of *brassica juncea*
Error bar are shown of standard division.

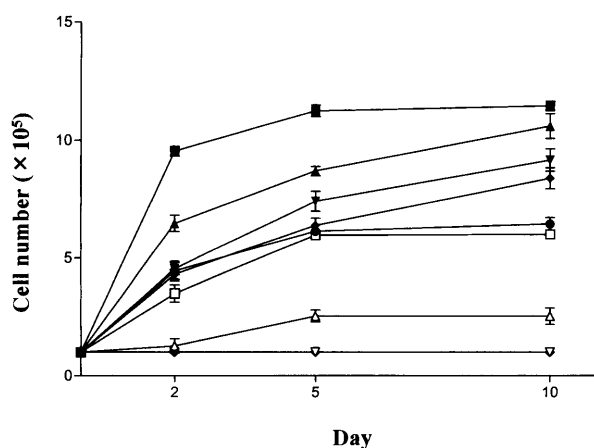


Fig. 3 Variation of protoplast cell number by Pb exposition
■ control, ▲ 5 μM, ▼ 10 μM, ◆ 25 μM, ● 50 μM, □ 100 μM, △ 125 μM, ▽ 250 μM, ◇ 500 μM. Error bar are shown of standard division.

物根のアポプラストを通り、細胞内に入る。しかし、細胞壁において、PbやHgは、侵入を阻まれることが分かっている¹⁹⁾²⁰⁾。つまり細胞壁のないプロトプラストにおいては、Pbの影響により生育が阻害されていることを示している。

4. まとめ

Cdの植物細胞内での無毒化は、GSHが、いくつも連なり phytocheratin (PCs) を形成し、Cd-PCs複合体を形成することにより液胞内へ蓄えられることが分かっている¹⁰⁾。しかしPbは、アポプラストである程度侵入を阻止されることから、地上部へ集積させる植物は、アポプラスト以外の場所でPbを別の形態へ変化させていることが考

えられる。本研究のようにカルス化した細胞塊においても、Pbの高濃度添加培地における吸収や、GSHの上昇傾向などが認められたことからPbの移動形態の解明にカルスを用いることは十分役立つと考えられる。

文 献

- 1) S. D. Fausto, O. M. Aly: "Chemistry of Natural Waters", (Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, Michigan.) (1981).
- 2) 丸茂克美: 粘土科学, **42**, 120 (2002).
- 3) S. D. Cunningham, T. A. Anderson, A. P. Schwab, F. C. Hsu: *Advances in Agronomy.*, **56**, 55 (1996).
- 4) A. L. Salido, K. L. Hasty, J-M. Lim, D. J. Butcher: *Int. J. Phytoremediation.*, **5**, 89 (2003).
- 5) A. J. M. Baker, S. P. McGrath, C. M. D. Sidori: *Resources Conservation and Recycling.*, **11**, 41 (1994).
- 6) 水野直治, 堀江健二, 水野隆文, 野坂志朗: 日本土壤肥科学雑誌, **74**, 529 (2001).
- 7) A. J. M. Baker, R. R. Brooks: *Biorecovery*, **1**, 81 (1989).
- 8) P. B. A. Kumar, V. Dushenkov, H. Motto, I. Raskin: *Env. Sci. Tech.*, **29**, 1232 (1995).
- 9) E. Grill, E-L. Winnacker, MH Zenk: *Science*, **230**, 674 (1985).
- 10) JC Steffens: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**, 553 (1986).
- 11) W. E. Rauser: *Plant Physiol.*, **109**, 1141 (1995).
- 12) Y. L. Zyu, E. A. H. Pilon-Smits, L. Jouanin, N. Terry: *Plant Physiol.*, **119**, 73 (1999).
- 13) Y. L. Zyu, E. A. H. Pilon-Smits, A. S. Tarun, S. Weber, L. Jouanin, N. Terry: *Plant Physiol.*, **121**, 1169 (1999).
- 14) C. H. Foyer, N. Soriau, S. Perret, M. Lelandais, K. J. Kunert, C. Pruvostand, L. Jouanin: *Plant Physiol.*, **109**, 1047 (1995).
- 15) G. Noctor, C. H. Foyer: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 249 (1998).
- 16) C. G. Flocco, S. D. Lindblom, A. H. Pilmon Smits: *Int. J. Phytoremediation*, **6**, 289 (2004).
- 17) T. Murashige, F. Skoog: *Physiol. Plant*, **15**, 473

(1962).

- 18) J. Hartley-Whitaker, G. Ainsworth, A. A. Meharg: *Plant, Cell Env.*, **24**, 713 (2001).
- 19) M. Wierzbicka: *Plant Sci.*, **133**, 105 (1998).
- 20) W. Beauford, J. Barber, A. R. Barringer: *Physiol. Plant*, **39**, 261 (1977).