

## 重金属汚染環境下における植物と微生物の相互作用

### Plant-microbe Interaction under the Environment of Heavy Metal Pollution

市橋 明大<sup>1</sup>, 大嶋 俊介<sup>1</sup>, 長田 賢志<sup>1</sup>, 山路 恵子<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>2\*</sup>  
AKIHIRO ICHIHASHI<sup>1</sup>, SHUNSUKE OSHIMA<sup>1</sup>, SATOSHI NAGATA<sup>1</sup>, KEIKO YAMAJI<sup>2</sup> and NOBUHIKO NOMURA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

<sup>2</sup> 筑波大学生命環境系 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

\* TEL: 029-853-6627 FAX: 029-853-6627

\* E-mail: nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

<sup>1</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,  
Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

<sup>2</sup> Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: ファイトレメディエーション, 重金属, 内生細菌

Key words: phytoremediation, heavy metal, PGPR, endophytic bacteria

(原稿受付 2013年11月29日/原稿受理 2013年12月6日)

#### 1. はじめに

近年, 地球温暖化や大気汚染など様々な環境問題に対して人々は注目しており, その中で, 重金属による土壤汚染に関しても人々の関心は高まってきている。日本においては, 今まで足尾銅山や神岡鉱山など, 重金属により汚染された土壤から重金属が河川等に流出した事により招かれた公害などが報告されており, このように重金属による土壤汚染は人々の生活及び健康と密に関係しており重要な問題である事は歴史的背景からも明らかである。そのため, 重金属汚染土壤による被害拡大を抑え, かつ重金属を土壤から除去する手法開発が求められている。その手法としては, 土壤の掘削や良質土との置換の他, 化学的に不溶化し重金属の地下水等への流出を防ぐ方法が挙げられる。また, 近年注目されている手法として, 植物の物質吸収能を利用し重金属の吸着, 固定化及び除去を行う Phytoremediation が挙げられる<sup>5,13)</sup>。Phytoremediation を行うにあたり植物の重金属に対する挙

動を理解する事は重要である。

近年, 重金属汚染土壤の Phytoremediation は植物のみで行われているのではなく, 微生物が関わっているとされる報告がある<sup>1,2)</sup>。Phytoremediation を行うにあたって, 植物と微生物の挙動を理解する事は重要である。本稿では, 茨城県北部に位置する重金属汚染地である日立鉱山に群生していたセリ科植物ドクゼリ (*Cicuta virosa* L.) とその内生細菌の事例を交えつつ重金属汚染環境下における植物と微生物の相互作用について論じた。

#### 2. 植物と重金属

環境浄化及び修復を行う方法として期待される Phytoremediation には表 1 のように数種類の機能を有する事が知られている<sup>4)</sup>。重金属汚染土壤での Phytoremediation においては, 特に汚染土壤から植物体内へ重金属を移行, 蓄積後に植物を回収する事で, 汚染土壤を直接浄化できる Phytoextraction や根等の地下組織で重金属を

表 1. Phytoremediation の機能の種類

名称	機能
Phytoextraction	根から汚染物質を吸収し植物体内に蓄積する機能
Phytofiltration	植物体内による地下水中から汚染物質の分離・抽出
Phytostabilization	根等の地下組織で重金属等の汚染物質を固定・吸着・沈殿する機能
Phytotransformation	植物体内で汚染物質の分解もしくは転換を行い無害化する機能
Rhizodegradation	根圏微生物の増殖・活性化を促す事により汚染物質を分解する機能

固定・吸着・沈殿する **Phytostabilization** が有用である事が考えられている<sup>13)</sup>。また、植物による環境浄化及び修復を行うにあたり植物の重金属耐性は重要である。**Fe, Zn, Mo, Cu** 等いくつかの重金属は植物の生育に必須な金属元素である事が知られている。これらの重金属は多量及び微量必須元素として植物内での酵素等のタンパク質の産生に関与しており、欠乏状態に陥るとクロロシスの発現が促され成長阻害を引き起こす事が報告されている<sup>14)</sup>。また、過剰に重金属が存在する場合でも成長阻害が見られる事が知られている。植物の中には高濃度の重金属に耐性を有する種が存在しており、これらの植物は様々な機構により耐性を獲得している。現在までに明らかとなっている機構として、錯体化合物の産生による重金属の解毒、選択的に栄養元素を吸収することによる毒性元素の排除、根における重金属の不動態化と地上部への移行阻止、細胞壁での重金属の不動態化、液胞への重金属蓄積、細胞内における **Phytochelatin** などの金属結合化合物の産生増加、そして金属耐性酵素産生の促進などが挙げられている<sup>9)</sup>。重金属に対して耐性を有する植物の中には、超累積植物 (**Hyperaccumulator**) とよばれる植物体内で大量の重金属を蓄積する植物が存在しており、現在までに 400 種以上の植物の研究報告が存在する<sup>7)</sup>。**Hyperaccumulator** は植物の葉や茎等の地上部に **Zn** 及び **Ni** を 10,000  $\mu\text{g/g}$  以上、**Cd** を 100  $\mu\text{g/g}$  以上、**Co, Cu, Cr** 及び **Pb** を 1000  $\mu\text{g/g}$  以上、そして **Hg** を 10  $\mu\text{g/g}$  以上蓄積させる植物と定義されている<sup>15)</sup>。**Phytoremediation** の効率化を図るにあたり植物の重金属蓄積能は重要な因子となっている事から、**Hyperaccumulator** は重金属汚染地での **Phytoremediation** において大事な役割を担っている。また、重金属耐性及び蓄積能があったとしても、植物の **Biomass** 量が小さい場合、土壌中から吸収できる重金属の総量が少量である事が考えられる。そのため、高い重金属耐性及び蓄積能を有しつつ **Biomass** 量の大きい植物を選抜する事が重要であることが指摘されている<sup>16)</sup>。近年、**Phytoremediation** の研究において、重金属の除去効率を高めるために微生物を用いる研究が注目されてきている<sup>17)</sup>。

### 3. 植物と微生物の相互作用

植物に利益をもたらす微生物の中でも、特に根圏と呼ばれる領域には多くの有用微生物が存在する<sup>8-10)</sup>。根圏とは植物根を中心とした周囲 1~2 mm の領域を指し、この領域は根から分泌される糖、有機酸等の水溶性の物質が局在しており、微生物にとって栄養豊富な場である<sup>11)</sup>。そのような場に存在する微生物の中には **Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)** と位置づけられる微生物がいる<sup>12)</sup>。**PGPR** は植物に対して大きく分けて 3 つの有益な働きを持つことが知られている。1 つ目は **PGPR** が植物体の成長を促す事により栄養素の吸収効率を高める働きである。例としては、**PGPR** が植物ホルモンである **Indole-3-Acetic Acid (IAA)** の産生や **Ethylene** の前駆体物質である **1-Aminocyclopropanecarboxylic Acid (ACC)** の脱アミノ酸化により **Ethylene** の機能を阻害する結果、根の伸長を促し栄養吸収の促進に寄与する事等が知られている<sup>18,19)</sup>。2 つ目は **PGPR** が植物の生育に必

須な栄養素を直接的もしくは間接的に提供する事である。直接的な作用としては **PGPR** が **Vitamin** 等の植物の生育に必須な栄養素を産生し供給している事が報告されている<sup>19)</sup>。間接的な作用として、**Siderophore** の産生、窒素固定や有機及び無機リンの無機化及び可溶化等を行い、植物体の生育に必要な栄養素を植物体が利用、吸収できる形態に変換する事が知られている<sup>19)</sup>。最後に、**PGPR** が植物病原菌の生育の抑制や植物体の病原菌に対しての防御機構の誘導を行う事で植物体の生育に適した環境条件を保持する働きがある。**PGPR** はこれらの働きを行うと共に、植物体から糖や有機酸等の栄養素等を受け取り自身の生育を促している。このように、環境中において植物と微生物は互いに支え合いながら生息している。

### 4. 重金属汚染環境下における植物と内生細菌

重金属汚染環境下における **PGPR** は通常土壌中において不動態である重金属を可溶化し、植物の重金属蓄積に関わっている事が報告されている<sup>2)</sup>。このような **PGPR** は、土壌中において **Protons** や有機酸の放出、**Siderophore** 等で知られるキレート剤を産生する事で重金属に酸性化、キレート化等の反応を起こし可溶化していると考えられている<sup>1)</sup>。**PGPR** には根圏に生息する細菌と植物組織の細胞間隙や細胞内に内生する細菌が存在する。**Phytoremediation** にとって根圏及び植物体に定着が容易である事から内生細菌の方が有用である事が考えられるため、重金属汚染環境下での内生細菌の挙動を理解する事は重要である<sup>23)</sup>。

そこで、本稿では重金属汚染地である日立鉱山に自生していたドクゼリとその内生細菌に関して着目した。ドクゼリは、日本各地に生息するセリ科ドクゼリ属の多年草である。また、ドクウツギ、トリカブト等と並び日本三大有毒植物のうちの一つである。ドクゼリは通常水辺や湿原等に生息するが、先行研究において、このドクゼリが重金属汚染地である日立鉱山の沼地に群生している事が確認された。日立鉱山は茨城県北部に位置する日本を代表する銅鉱山の一つであり、過去には精錬所からの重金属を含有した煙害により田畑や周辺の森林に大きな被害を与えた事もある。クロマツ、オオシマザクラ、クヌギ、スギなどの植林に努めた結果、現在は鉱山周辺の森林は回復した。しかし、土壌は排煙等に含有していた重金属によって高濃度に汚染されている事が知られている。廃鉱後に植林されてきた植物とは違い、ドクゼリは重金属によって汚染された日立鉱山の沼地に侵入し定着した事から、ドクゼリは何らかのメカニズムによって重金属に対して耐性を有している可能性が考えられた。先行研究より、ドクゼリの地下組織である地下茎と細根に重金属が蓄積しており、特に **Zn** が最も多く蓄積されていたことが分かった<sup>21)</sup>。通常、**Zn** が植物体内中に存在する濃度は 15~20 mg/kg D.W. と報告されている<sup>3)</sup>。興味深い事にドクゼリの細根においてはこの濃度を遙かに上回る濃度が確認された。また、無菌的に生育させたドクゼリの実生は重金属汚染土壌下において生育する事が出来ない事も確認された事から、ドクゼリ内に生息する内生細菌が重金属耐性に関与する事が考えられた<sup>21)</sup>。そ

ここで先行研究において根部から内生細菌を単離した所、*Pseudomonas putida*, *Rhodopseudomonas* sp. 及び *Paenibacillus* sp. などいくつかの細菌が単離された。γ線滅菌した重金属汚染土壌に植えた無菌ドクゼリ実生に単離した *Paenibacillus* sp. を再感染させた所、ドクゼリの重金属汚染土壌下において生育が確認出来た (図1)。また、*P. putida*, *Rhodopseudomonas* sp. もドクゼリに再感染させた所、重金属汚染土壌下において生育が観察された<sup>21)</sup>。さらに、*Paenibacillus* sp. は宿主植物体の根において Zn の蓄積促進する事が分かった (図2)。この他に Cu, Pb, Ni, Cd においても同様の傾向が観察できた (data not shown)。この事から、ドクゼリの内生細菌は宿主植物に重金属耐性能及び蓄積能を付与する事が示された。内生細菌による宿主植物の重金属の蓄積促進は Pb 汚染土壌に生息する Pb 及び Zn の Hyperaccumulator として知られているセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) とその根から単離した内生細菌である

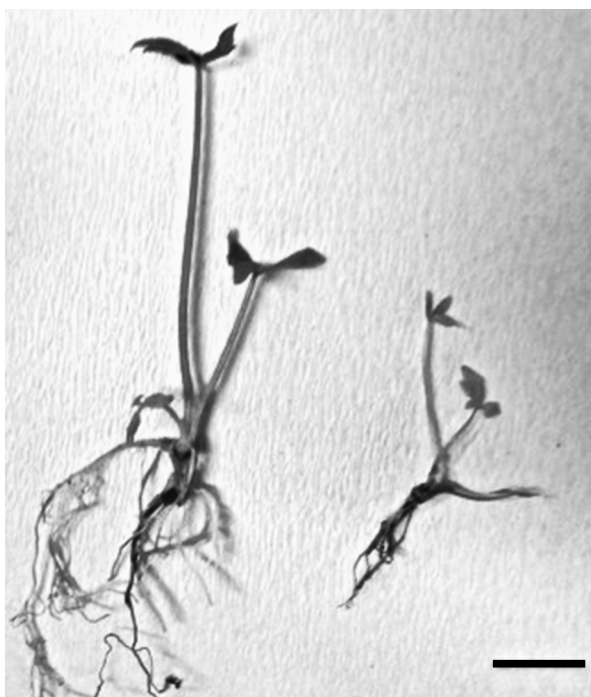


図1. 重金属汚染土壌下におけるドクゼリへの *Paenibacillus* sp. 接種試験 (左) 菌体接種区 (右) 菌体非接種区 (scale bar=1 cm)

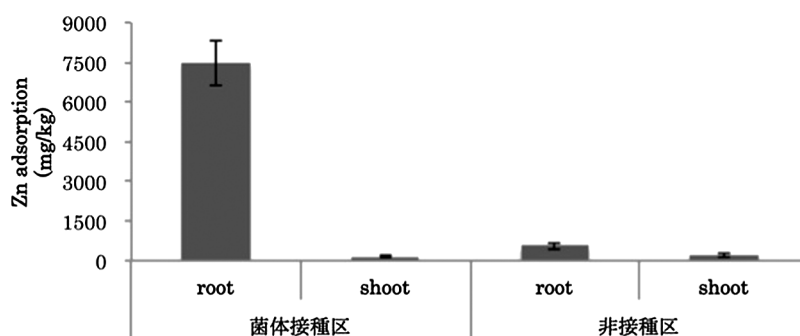


図2. 接種試験後のドクゼリ組織内の Zn 濃度の変化

*Pseudomonas fluorescens* と *Microbacteria* sp. を再感染させた場合においても報告がある<sup>20)</sup>。このことから、重金属汚染環境下で生息している植物内生細菌の多くは自身で重金属を吸着する、もしくは植物の重金属蓄積を制御する機構を有している事が推測された。

## 5. おわりに

重金属汚染を浄化する方法として Phytoremediation があり、重金属除去効率を増加させるために PGPR と植物の相互作用を用いる事が期待されており、現在まで分かっている相互作用をまとめると図3のようになる。Phytoremediation においては PGPR の中でも植物内生細菌が有用である事が考えられ、内生細菌は宿主植物に重金属耐性及び蓄積能を付与する事が分かった。しかし、詳しいメカニズムに関しては未だ明らかになっていない。今後、さらなる解析が進み植物内生細菌が具体的にどのようにして植物に重金属耐性及び蓄積能を与えているかが明らかになれば、重金属汚染環境下における Phytoremediation の更なる効率化への寄与が期待できるかもしれない。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省からの科学研究費補助、科学技術振興機構 (JST) 及び先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の補助を受けて行われました。この場を借りて感謝いたします。

## 文 献

- 1) Yang, X.O., Y. Feng, Z.L. He, and P.J. Stoffella. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace. Elem. Biol.* 18: 339-353.
- 2) Vamerali, T., M. Bandiera, and G. Mosca. 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environ. Chem. Lett.* 8: 1-17.
- 3) Broadley, M.R., P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, and A. Lux. 2007. Zinc in plants. *New Phytol.* 173: 677-702.
- 4) Raskin, I., R.D. Smith, and D.E. Salt. 1997. Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 221-226.
- 5) Kuiper, I., E.L. Lagendijk, G.V. Bloemberg, and B.J. Lugtenberg. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interaction.* 17: 6-15.
- 6) Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-



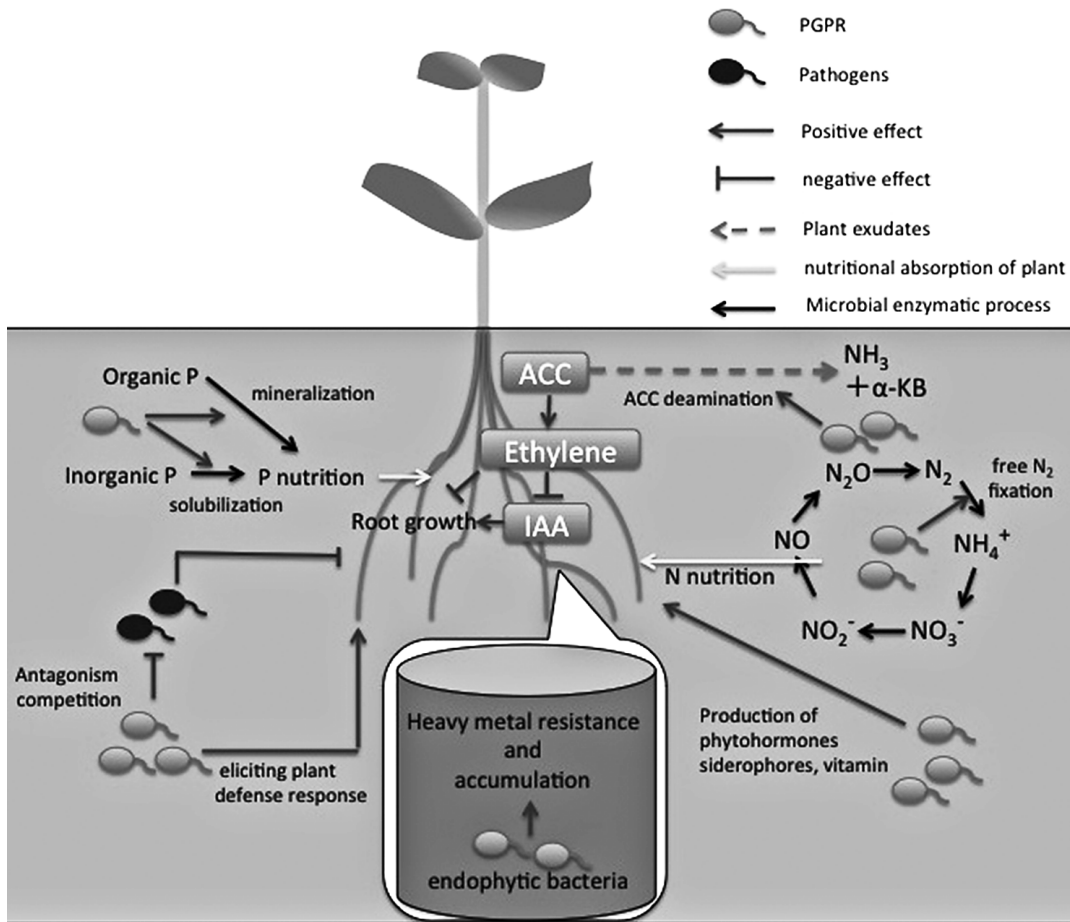


図3. PGPR と植物の相互作用のモデル図 (Modified after Richardson, 2009)

- living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.
- 7) Brooks, R.R., M.F. Chambers, L.J. Nicks, and B.H. Robinson. 1998. Phytomining. *Trends in Plant Sci.* 3: 359–362.
  - 8) Whippl, J.M. 1990. Carbon utilization. In: Lynch JM (ed). *The rhizosphere*. pp. 59–97. Chichester, UK: Wiley.
  - 9) Bayliss, C., E. Bent, D.E. Culham, S. Maclellan, A.J. Clarke, G.L. Brown, and J.M. Wood. 1997. Bacterial genetic loci implicated in the *Pseudomonas putida* GR12-2R3-canola mutualism: identification of an exudate- inducible sugar transporter. *Can. J. Microbiol.* 43: 809–818.
  - 10) Penrose, D.M. and B.R. Glick. 2001. Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbiol.* 47: 368–372.
  - 11) Walker, T.S., H.P. Bais, E. Grotewold, and J.M. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 44–51.
  - 12) Somers, R., J. Vanderleyden, and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacteria signaling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 205–240.
  - 13) 藤原 靖. 2002. 土壤汚染対策法と重金属汚染土壌の浄化技術の現状と課題. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 2: 117–126.
  - 14) 間藤 徹, 馬 建峰, 藤原 徹. 2010. 植物栄養学第2版. pp. 130–141. 文英堂出版.
  - 15) Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31: 109–120.
  - 16) Bhargava, A., F.F. Carmona, M. Bhargava, and S. Srivastava. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J. Environ. Manage.* 105: 103–120.
  - 17) Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.
  - 18) Newman, L.A. and C.M. Reynolds. 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plant. *Trends. Biotechnol.* 23: 6–8.
  - 19) Blaha, D., C. Prigent-Combaret, M.S. Mirza, and Y. Moënne-Loccoz. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 455–470.
  - 20) Sheng X.F., J.J. Xia, C.Y. Jiang, L.Y. He, and M. Qian. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Poll.* 156: 1164–1170.
  - 21) Nagata, S., K. Yamaji, N. Nomura, and H. Ishimoto. 2014. Root endophytes enhance stress-tolerance of *Cicuta virosa* L. growing in a mining pond of eastern Japan. *Plant Species Biology* (Submitted).
  - 22) Richardson A.E., J.M. Barea, A.M. McNeill, and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil.* 321: 305–339.
  - 23) Doty S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol.* 179: 318–333.