

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510038

研究課題名（和文） 環境ストレス・重金属無毒化機能に関わるメタロームの探索

研究課題名（英文） Search of the metalloam on heavy metal detoxication mechanism and environmental stresses.

研究代表者

澤邊 昭義（SAWABE AKIYOSHI）

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70257989

研究成果の概要（和文）：ボルタンメトリー法に基づく新規迅速重金属分析システムと原子吸光分析法を比較し、コメ・水稻調査に関するカドミウムの分析が有効かどうかを検討した。マイクロカートリッジ型重金属測定システムは、基準値である 10 ppb 未満で容易に測定可能であり、簡単に汚染物質を精度良く測定できた。また、重金属無毒化機構解明の足がかりとして、カボチャの Pb 暴露時のグルタチオン量の挙動を調査した。その結果、Mn 存在では、根茎葉間 Ca 配布に影響を及ぼした。加えて、Mn のない実験域は、顕著に葉領域で GSH/GSSG 比の上昇を示した。Pb 濃度（400 ppm）において、Mn のない実験領域で Mn 存在実験域と比較して、顕著に減少した。これらの結果から、Mn がグルタチオン関連の酵素の群の動作のために機能することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We compared the official method using AAS or with our new quick heavy metal measuring system based on voltammetry method. Then we considered whether analysis of cadmium on paddy-rice investigation was possible. As for the measurement of heavy metals by microcartridge type electrochemistry analysis machine, measurement was possible in lower than 10 ppb which was Japanese reference value easily, and manipulation was simple and easy. Also we examined the influence that we used a pumpkin as a clue of a heavy metal detoxication mechanism by this study, and Mn presence gave glutathione dosage in one of the defence materials in Pb accumulation dosage in Pb exposition and microelement and organism. As a result, Mn presence affected rhizoma interlobar Ca distribution. In addition, Mn free experiment area showed a rise of GSH/GSSG rate in leaf region conspicuously. In Pb concentration (400 ppm), it compared it with Mn presence experiment area in Mn free experiment area and decreased conspicuously. From these results, it was suggested that Mn functions for an action of a glutathione-related enzymatic group.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：環境影響評価・環境政策

科研費の分科・細目：

キーワード：環境ストレス、重金属、メタローム、カドミウム、マンガン、鉛、コメ、水稻、

## 1. 研究開始当初の背景

近年、工場跡地等の再開発に伴い重金属等による土壤汚染が顕著化し、2003年2月に「土壤汚染対策法」が施行されてから土壤汚染への関心が高まり、新たに判明した土壤汚染の事例数は高い水準で推移してきている。この法律では、カドミウム、鉛、ヒ素化合物など、重金属類を含む25種類の「特定有害物質」が指定され、土壤汚染は所有者もしくは汚染の起因者が除去することを義務付けている。特に農耕地の汚染は作物への濃縮を通じ人間の健康を害する恐れがあり、早急な対策が求められている。重金属類は有機化合物とは異なり生物学的・化学的に分解されず、環境中に半永久的に残留するため、人為的な汚染の浄化が必要である。通常これらの重金属汚染の除去には、汚染土を排出し客土する物理的処理や、薬剤を散布・添加することで汚染物を固定化・無毒化する化学的処理が行われているが、それらには土壤から他の無機成分を流出させる可能性や、地下水汚染を拡大する危険が伴い、また莫大なコストが必要となってくる。これらの問題を補った「ファイトレメディエーション (Phytoremediation)」が注目されている。ファイトレメディエーションは植物を利用し汚染物質を環境中から除去あるいは無害化する技術と定義される。欧米では実用化のレベルまで達している。汚染物質が重金属の場合は、汚染を取り除くだけでなく、濃縮した重金属を抽出・回収することが可能であり、その資源の再生利用が可能である。これらの浄化に用いられる植物は、*Hyperaccumulator* (超集積植物)や *accumulator* (集積植物)と呼ばれる通常の植物の数十倍から数百倍の濃度で地上部に重金属を集積することができる植物である。重金属が地上部へ集積する経路は、植物体の地下部(根)で吸収され導管・篩管を通り地上部へ運搬されると考えられている。超集積植物が重金属を地上部に高濃度で集積する機構は未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

植物の細胞内に重金属が入ると、根圏において有機酸などを滲出し金属キレート化することにより重金属を可溶化させ地上部へ輸送する経路や、地上部で重金属の無毒化・不動化させる機構があると考えられている。これらの機構にはグルタチオンやファイトケラチンといったペプチドやタンパク質が関与している。還元型グルタチオン(GSH)は重金属を捕捉・無毒化するファイトケラチンの前駆体である。また、生体内での活性酸素の消去等、環境ストレスからの防御機能に関与していると考えられている。このため、植

物の GSH 含有量は光、酸素濃度、公害ガス、重金属等、環境要因に機敏に反応して増減することが知られている。本研究では、重金属無毒化機能に関わるメタローム(金属含有生体物質)の探索するために、1. 新規マイクロカートリッジ型重金属分析システムによる土壤および植物中重金属の微量分析 2. 重金属集積植物による環境修復システム・重金属輸送および無毒化機能の解明の研究を進めた。

(1) 土壤・コメ・水稻中のカドミウム、鉛について新規マイクロカートリッジ型重金属分析システムによる測定法を検討した。

(2) 導管液、篩管液が大量に採取できるウリ科植物に注目し、重金属無毒化機構解明の足がかりとして、カボチャの Pb 暴露時のグルタチオン量の挙動を調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規マイクロカートリッジ型重金属分析システムによる土壤および植物中重金属の微量分析

#### ① 標準溶液の測定

原子吸光測定用の Pb, Cd 標準液 (100ppm, WAKO) を適宜希釈し、1~50ppb となる標準希釈液を作成した。希釈には精製水を用いた。これらの標準希釈液をカートリッジに 5ml インジェクトし、装置本体にセットし測定を行った。

#### ② 土壤抽出液の測定

公定法(農用地の土壤汚染防止に関する法律)に定められた 0.1M HCl, 1時間振とう抽出法および、新規に提案する簡易抽出法(土壤 5g に 0.1M HCl 45ml を加え、手で 10 秒間振とう)により土壤抽出液を作成した。その後、メッシュ径 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過したものを検液とした。カートリッジへの注入は、前処理を行う必要がある。抽出液を pH 6~10 に合わせ、10 倍に希釈した。その後、濃縮膜にトラップされる銅のマスク剤を添加し、カートリッジへ 5ml インジェクションを行った。また土壤抽出液はクロスチェックのために AAS (FAAS) による測定を行い比較した。

#### ③ コメ・水稻の測定

1) 精米および玄米中のカドミウムの測定  
市販精米および環境標準試料 NIES CRM No. 10 玄米粉末 (low・mid・high) をマイクロウェーブ分解装置にて、硝酸、過酸化水素を用いて液化処理を行った。検液を ICP-MS、AAS および、Geo-REX<sup>TM</sup>にて測定を行い比較した。

2) カドミウム吸収水稻を用いた測定  
供試植物であるコメ(ヒノヒカリ)は、石英砂を敷いた栽培ポットに水道水を満たし発

芽させ4週間前培養した。その後、100、500  $\mu$ M Cd 溶液 50mL に5日間曝露 (25°C) し、Cd 吸収水稻を作成した。試料は80°Cで24時間乾燥させた後、前項の実験同様、マイクロウェーブ分解により液化処理を行い、ICP-MS、Geo-REX™ および AAS にて Cd を測定した。

## (2) 重金属集積植物による環境修復システム・重金属輸送および無毒化機能の解明

### ① 植物体の前培養

カボチャ (*Cucurbita moschata*, トーホク) は、種子を土壌 (赤玉土: パーミキュライト = 3: 2) に播種し、丈約 10 cm, 本葉の数が 5~7 枚になるまで生長させた (約 2 週間)。その後、水耕栽培に慣らすため、Hoagland 無機塩水溶液を用い水耕栽培へ移行し、一週間程度前栽培を行った。培養条件は 25 ± 1°C に設定し、明期 12 時間暗期 12 時間、光量約 4000lux とした。また、Mn 存在の影響を調べるため、生長過程から Mn を与えない Mn 無の区を設けた。Mn 無の実験区は石英砂にカボチャ種子を播種し、Mn 有実験区と同様に、本葉の数が 5~7 枚になるまで生長させ、塩化マンガンを含まない Hoagland 溶液へ移行した他は同条件で前培養を行った。

### ② 重金属の暴露および鉛、無機元素の測定

鉛は通常、硝酸態以外は全て不溶性の沈殿物となる。そのため、通常植物の水耕栽培に用いる Hoagland 溶液を避け、0.5mM CaCl<sub>2</sub> 溶液に硝酸鉛を完全に水溶化することで鉛を植物に曝露させた。鉛の濃度は、0, 100, 200, 300, 400ppm とし、96 時間前培養と同条件で培養した。全ての実験は n=5 で行った。暴露後、試料はよく蒸留水で洗い、根・茎・葉に切り分けた後、一部は、GSH, GSSG 測定用として直ちに -80°C の超低温フリーザーに保管した。残りの試料は鉛、無機元素の測定のため 80°C で 24 時間乾燥後、300mg 以内の試料と硝酸 2mL, 過酸化水素 3mL をマイクロウェーブ分解用テフロン製容器に密閉し、145°C 5min → 180°C 10min → 100°C 10min の条件でマイクロウェーブ分解を行った。分解液は定容後、原子吸光分析機にて、Pb, Ca, Mg を測定した。

### ③ GSH および GSSG の定量

GSH および GSSG を測定する方法には、DTNB を用いた方法や HPLC を用いた方法があるが、本研究では *o*-フタルアルデヒド (OPT) を用いた蛍光強度法を用いた。-80°C にて凍結保存しておいた植物試料 (200mg 以内) を 25% HPO<sub>3</sub> 溶液 (0.2ml) と 0.1M Sodium-phosphate-0.005M EDTA 溶液 (pH 8.0, 1.0ml) を加え、SK ミルにて破碎し、抽出液を得た。抽出液は遠心分離 (12000g, 20min, 4°C) により上澄みを回収し、GSH アッセイ・GSSG アッセイに沿って進めた。

## 4. 研究成果

### (1) 新規マイクロカートリッジ型重金属分

## 析システムによる土壌および植物中重金属の微量分析

### ① 標準溶液の測定

標準液測定のボルタモグラムを図 1 に示す。Pb, Cd の濃度が増加するに従ってピーク面積が増加する。1ppb~50ppb 間で再現性の良い結果を示した。また、測定に要する時間はカートリッジを本体にセットしてから 3 分間ほどであった。

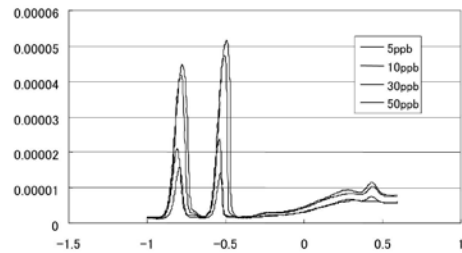
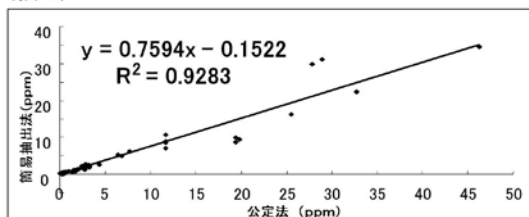


図 1 カドミウム (Cd) および鉛 (Pb) の標準液ボルタモグラム

### ② 土壌抽出液の測定

Cd および Pb のピークが夾雑の影響を受けることなく検出され、新規簡易抽出法と公定法の比較結果を示した (図 2)。新規簡易抽出法の Pb については、公定法の約 75% の抽出量で相関係数が 0.93 であった。また、Cd については、公定法の約 60% の抽出量で相関係数が 0.92 であり、ともに良好な結果であった。この結果より、新規簡易抽出法においても、公定法よりは溶出量が低い、数値を換算することで、オンサイトで迅速かつ大量の試料を容易にスクリーニングすることが可能である。

鉛 (Pb)



カドミウム (Cd)

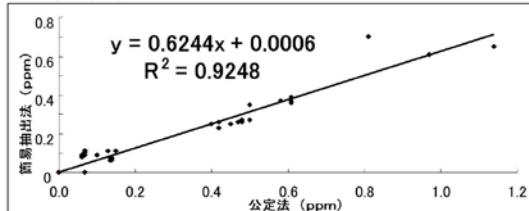


図 2 新規簡易抽出法と公定法における Pb, Cd 抽出量の比較

土壌抽出液は、腐植をはじめ、複雑なマトリックスを含んでいる。そのため、吸光分析

では多くのマトリックスにより感度や測定結果に影響を受ける。しかし、この分析法ではカートリッジに内蔵した濃縮膜により夾雑物質を取り除くことができ、電気化学分析では検出が困難である数 ppb といった範囲まで定量が可能となった。

環境庁告示第 46 号試験法、JISK0120 に定められた 6 時間水抽出法により土壌抽出液を調整し、抽出液の湿式分解処理にはマイクロウエーブ分解を用いた工業土壌において Geo-REX™ と AAS との相関は非常に良好であった。また、基準値を上回る値を示した土壌については、マイクロウエーブ分解により土壌抽出液を作成し、Geo-REX™ で測定することも可能である。

### ③ コメ・水稻の測定

#### 1) 精米および玄米中の Cd の測定

精米および玄米中の Cd 測定において、AAS と比較した数値とも相関が良好であった。また、環境標準試料 NIES CRM No. 10 玄米粉末 (low・mid・high) を Geo-REX™ および ICP-MS により測定した結果、保証値 (含有値) と同じ値が得られた (図 3)。ICP-MS と同様の非常に精度の高い値が得られたことから、この実験方法を用いて玄米試料を比較評価することができる。従来装置と比べてオンサイトとして利用でき、さらに場所などのスペースを必要としないことから、地方の農業施設等でも玄米の Cd のリスク管理が可能になると考えられる。

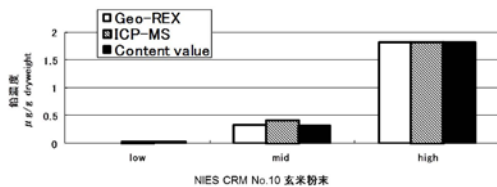
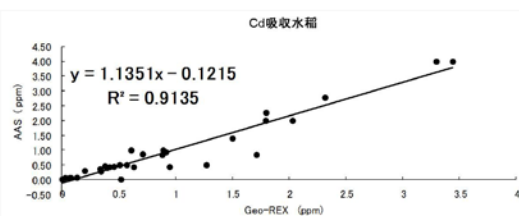


図 3 環境標準試料 NIES CRM No. 10 玄米粉末 (low・mid・high) の測定値の比較

#### 2) Cd 吸収水稻を用いた測定

Cd 吸収水稻における AAS と Geo-REX™ との相関は、 $y=1.1351x-0.1215$  とほぼ 1 : 1 であり、寄与率も 0.92 であることから良好な結果が得られた (図 4)。



果が得られた (図 4)。

図 4 Cd 吸収水稻における AAS と Geo-REX™ の相関図

### ④ まとめ

オンサイトにおける土壌分析を可能にするために我々は、水銀を全く使わない新しいタイプの電気化学重金属分析装置「Geo-REX™」を用いて、土壌抽出液中の重金属を測定した。その結果、土壌抽出液のようにマトリックスを多く含むサンプルにおいて数 ppb での測定が可能であった。定量下限値は 1ppb であり、検出限界は 0.1ppb である。さらに、複雑な前処理や熟練が必要な原子吸光、ICP-MS などと違って、簡単な前処理で測定可能な点は、現場での試料採取から測定が可能である。本研究では、コメ・水稻などの生体試料をマイクロウエーブ分解により液化を行い、Cd を検出した例においても良好な結果が得られた。

### (2) 重金属集積植物による環境修復システム・重金属輸送および無毒化機能の解明

#### ① 重金属および無機元素の集積量

暴露した鉛濃度が高くなるにつれて根、茎、葉の鉛の集積量が比例的に増加した。しかし Mn 有無の違いによる鉛集積量に有意な差はなかった。鉛暴露量による含有量の大きな変化は認められなかったが、Ca 含有量を Mn 有無で比較すると、Mn 有では、含有量が葉 > 茎 > 根というように、葉での含有量が高かった。しかし、Mn 無ではこの関係が崩れていた。コントロール区ではどの部位もほぼ同じ含有量であったが、鉛濃度が上がるにつれて葉の含有量だけは少しずつ増加している傾向が見られた。

#### ② GSH 変化

Mn 有実験区では GSH, GSSG とともに茎の含有量他の部位より多くなる傾向が鉛濃度の増加により顕著に見られた。一方、Mn 無実験区では GSSG 含有量が根に多くなる傾向が見られた。図 5 に GSH/GSSG 比 (酸化還元比) を示した。GSH は活性酸素 (スーパーオキシド、過酸化水素など) と反応して、安定なグルタチオンラジカルを形成し、2 量体化 (GSSG: 酸化型グルタチオン) に変化するが、これはさらに、グルタチオンレダクターゼ (GR) が NADPH からの電子を GSSG に転移して、GSH (還元型グルタチオン) に再生される。従って、数値が高いほど生体防御システムが活性化され、ストレスを低減していることを示している。Mn 有実験区ではコントロールおよび鉛濃度が低い場合どの部位においてもほぼ一定の比を保っていた。しかし、鉛濃度が上昇するにつれて徐々に葉部の比が上昇していた。それに対して Mn 無ではコントロールも含めて葉部の比が他の部位より高い傾向が見られた。これは、Mn 有では鉛濃度上昇により葉部での毒性緩和のために GR が活発に働き GSSG から GSH への再生が行われているが、Mn 無実験区では葉部での Mn 不

足状態がストレスとなってコントロールでも葉部に GR 活性が集中し、他の部位における GR 活性が抑制されて、GSH 再生率が減っていると考えられる。また、Mn 無実験区の鉛 400ppm においては、Mn 不足と鉛の毒性により顕著に細胞がダメージを受けたため、GR が合成されていない可能性が示唆される。

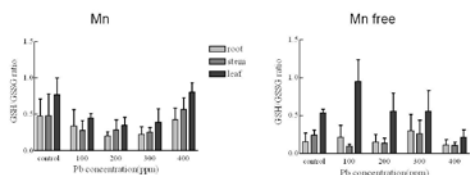


図5 カボチャの Mn および Pb 暴露における GSH/GSSG 比

### ③ まとめ

本研究により、鉛暴露による無機元素の変化および GSH, GSSG の変化が測定された。Mn の有無が GSH/GSSG 比に影響を与えることが示唆された。今後、鉛暴露時の Mn 有無における GR や GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、さらに GPX (グルタチオンペルオキシターゼ) といったグルタチオンに関連する酵素群を調べることが鉛集積時の Mn の役割をより明らかにできると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 澤邊昭義, 竹田竜嗣, 仲川一彰, 米虫節夫, 玉木聡史, 岩佐航一郎, コメ・水稲および土壌の重金属迅速測定法について, 環境管理技術, 査読無, 29 (5), 31-39 (2011).
- ② 澤邊昭義, クローン技術を用いた香料生産について — 植物毛状根から香りがする! —, 香料, 査読無, 250, 35-47 (2011).
- ③ 竹田竜嗣, 佐藤有希子, 米虫節夫, 澤邊昭義, カボチャの Pb 暴露における無機元素とグルタチオンの挙動, 環境管理技術, 査読無, 27 (4), 36-42 (2009).

[学会発表] (計 6 件)

- ① A. Sawabe, R. Takeda, K. Nakagawa, A. Iida, S. Komemushi, S. Tamaki and K. Iwasa, Rapid analysis assessment of the paddy-rice and soils, 243rd American Chemical Society National Meeting & Exposition (アメリカ), 2012 年 3 月 28 日.
- ② 澤邊昭義, クローン技術を用いた香料生

産について — 植物毛状根, 治験研究 —, 日本香料協会講演会 東京会場 (招待講演), 大阪薬業クラブ (大阪府), 2011 年 1 月 28 日.

- ③ 澤邊昭義, クローン技術を用いた香料生産について — 植物毛状根, 治験研究 —, 日本香料協会講演会 東京会場 (招待講演), 薬業健保会館 (東京都), 2011 年 1 月 26 日.
- ④ R. Takeda, M. Tomita, A. Iida and A. Sawabe, Heavy Metal Accumulation of *Phytolacca americana* Hairy Root, The 26th Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy, University of Massachusetts at Amherst (アメリカ), 2010 年 10 月 19 日.
- ⑤ 富田真人, 竹田竜嗣, 大久保智史, 山本むつみ, 渡邊泉, 飯田彰, 澤邊昭義, ヨウシュヤマゴボウ毛状根を用いた環境浄化の基礎的研究 その 2, 第 19 回環境浄化の基礎的研究 — その 2, 第 19 回環境浄化の基礎的研究 —, 中部大学 (名古屋), 2010 年 6 月 22 日.
- ⑥ 若林雄平, 仲川一彰, 竹田竜嗣, 飯田彰, 若月利之, 玉木聡史, 岩佐航一郎, 沢辺昭義, Geo-REX™ によるヒ素およびセレン含有土壌の迅速分析評価, 2009 年度 (第 105 回) 日本土壌肥料学会関西支部講演会・関西土壌肥料協議会講演会, 高知, 2009 年 12 月 11 日.

[図書] (計 1 件)

- ① 澤邊昭義, 竹田竜嗣 共著; 渡邊泉, 久野勝治編; 朝倉書店, 環境毒性学, 2011, 51-53, 126-131, 178-189.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤邊 昭義 (SAWABE AKIYOSHI)  
近畿大学・農学部・准教授  
研究者番号: 70257989

### (2) 研究分担者

竹田 竜嗣 (TAKEDA RYUJI)  
近畿大学・農学部・研究員  
研究者番号: 00449836