

モエジマシダ胞子の発芽における砒素耐性および前葉体の砒素吸収能力に関する実験的研究

Arsenic tolerance and accumulation in the gametophytes of the fern *Pteris vittata* L.

榊原正幸^{1,2} 梅木育世^{3†}

佐野 栄⁴ 井上雅裕⁵

Masayuki Sakakibara^{1,2}, Ikuyo Umeki^{3†}, Sakae Sano⁴ and Masahiro Inouhe⁵

¹愛媛大学大学院理工学研究科数理物質科学専攻,

²防災情報研究センター

¹Department of Mathematics, Physics and Earth Sciences, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University,

²Center for Disaster Management Information Research, Regional disaster management system research division, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8577, Japan

³愛媛大学理学部地球科学科

Department of Earth Science, Faculty of Sciences, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8577, Japan

[†]現所属: いよてつ高島屋

Iyotetsu Takashimaya, 5-1-1 Minato-cho, Matsuyama 790-8587, Japan

⁴愛媛大学教育学部地学

Earth Science Laboratory, Faculty of Education, Ehime University, 3 Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8577, Japan

⁵愛媛大学大学院理工学研究科環境機能科学専攻

Department of Chemistry and Biology, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8577, Japan

Abstract

The sporophyte of the fern *Pteris vittata* is known to be a hyperaccumulator of arsenic in its fronds to >2.3% of its dry weight. However, very little has been stated about hyperaccumulation of arsenic by gametophytes of *P. vittata*. Here we report that gametophytes of *P. vittata* from Beppu City and Okinawa Island in western Japan hyperaccumulate arsenic in a similar manner to that observed in the sporophyte. The gametophytes from the Beppu City are able to grow in medium containing 10 mM arsenate and accumulate >1.8% of their dry weight as arsenic. The results suggest gametophytes of *P. vittata* also have a great potential to be used for phytoremediation and the relative ability of tolerance and accumulation show some local variation of their sources.

Key words : *Pteris vittata*, hyperaccumulation, arsenic, phytoremediation, gametophyte

はじめに

モエジマシダ (イノモトソウ科イノモトソウ属; *Pteris vittata* L.) は、最近発見された砒素の超集積植物 (ハイパーアキュムレーター) である (Ma *et al.*, 2001)。それはアジアやアメリカをはじめとして世界各地に分布し、日本はこの種の北限である。国内では鹿児島県、大分県、愛媛県や和歌山県等に自生する。このシダ植物は多量の砒素を土壌から吸収する (植物の乾燥重量にして2.3wt.%まで) だけでなく、地上部のバイオマス中に吸収した砒素の90%以上を蓄積する。この

能力が砒素汚染土壌のファイトレメディエーション (植物による環境浄化) を可能にした (Tu *et al.*, 2002; 近藤・阪本, 2003)。また、モエジマシダが砒素のハイパーアキュムレーターであることが発見されて以来、その砒素吸収および蓄積に関する植物生理学的研究が多数行われてきた (Ma *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Lombi *et al.*, 2002; Tu and Ma, 2002; Tu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002)。

シダ植物の環境応答には前葉体を用いた研究が多い (たとえば, Kamachi *et al.*, 2005; Gumaelius *et al.*,

2004 ; 榊原ほか, 2004, 2005)。これは以下のような2つの大きな利点に基づいている。

- ①全体の形態的特徴を実体顕微鏡下で観察・比較することが可能である。
- ②孢子から前葉体の発生過程において、培地環境がどのような影響を与えるのか、多数の個体に関して、発育状態およびその統計的検討が可能である。

さて、モエジマシダの前葉体の砒素吸収能力に関する先駆的な研究は、Gumaelius *et al.* (2004) による前葉体の砒素吸収・蓄積に関する実験であり、彼らはその超集積能力を確認した。榊原ほか (2004, 2005) では、Gumaelius *et al.* (2004) が行ったものよりも低濃度の培地で、モエジマシダの発芽・生育実験を行い、その孢子の発芽時および前葉体における砒素耐性および前葉体の砒素吸収・蓄積能力を検討した。榊原ほか (2004) は、砒素濃度が100mM以下の培地でのモエジマシダの発芽率を測定した結果、モエジマシダの発芽率は、砒素濃度が高くなるにつれてやや発芽率が低くなるものの、実験12日後にはコントロールとほとんど差がないことを明らかにした。また、砒酸培地の孢子よりも亜砒酸のそれが、やや発芽率が低いという傾向が認められた。

本論文では、産地の異なるモエジマシダの孢子を低～高濃度の砒素培地で培養し、モエジマシダの生息地の違いによる孢子の砒素耐性能力と砒素吸収・蓄積量の差異を見ることを目的とした。

実験方法

今回の実験に使用したモエジマシダの孢子は、大分県および沖縄県に自生する成体から採取した。前者は大分県別府市上原町周辺の石垣に自生していたものから孢子を採取した。後者は三重大学生物資源学部の水野隆文博士から提供していただいた沖縄本島産のモエジマシダの孢子を用いた。

発芽率測定実験

実験期間は3月23日～4月20日である。モエジマシダは発芽実験は以下の手順で行った。

- 1) 孢子を1.5mlエッペンドルフチューブに約7mg入れ、それに70%エタノールを入れ、5分間遠心分離機にかけた。エタノールを捨てた後、オートクレーブで滅菌した蒸留水を入れ攪拌後、再び遠心分離機に30秒かけた。その後UVを照射してチューブの表面をさらに滅菌した。
- 2) 純水1410mlおよびムラシゲ・スクーグ培地

(Murashige & Skoog Medium : MS 培地) を90ml混ぜ、それにヒ酸水素二ナトリウムを0mM, 0.5mM, 1mM, 5mM, 10mMとなるように計り入れた。

- 3) 2)の溶液に培地用寒天(フナコシ Code No BA-10)を入れ、0.8%寒天溶液を作成し、煮沸した。
- 4) 殺菌灯で滅菌したシャーレに、3)の寒天溶液を20mlずつ流し入れ、クリーンベンチ内で1時間UV照射後、1昼夜おいた。
- 5) シャーレの寒天培地に、1)で殺菌した孢子を入れた滅菌水を0.05 mlずつ蒔いた。
- 6) 5)の後、シャーレに蓋をし、回りにビニールテープを貼って密閉した。
- 7) シャーレは25℃、約30 luxの照明条件に設定した温度勾配器に入れ、1～5週間目まで毎週発芽率を実体顕微鏡で測定した。なお、シャーレは別府産と沖縄産はそれぞれの濃度につき3つずつとした。発芽率の測定は、1つのシャーレから無作為に50個の孢子を選び、その孢子が発芽しているか否かを調べた。それを全てのシャーレで行い、平均を出し、発芽率とした。

前葉体の砒素濃度測定実験

5週目の前葉体中の総砒素濃度の測定を行った。砒素の濃度測定は以下の手順で行った。

- 1) それぞれのシャーレを一つずつ開封、シャーレ内のすべての前葉体をエタノールで拭いたピンセットで摘出し、ガラス棒瓶にいれた。
- 2) エアバス(80℃)で24時間以上乾燥させ分析試料とした。
- 3) モエジマシダの前葉体の総砒素濃度は、愛媛大学総合研究支援センターに設置している誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS ; ELAN6000)で行った。測定方法および分析精度の検定については、佐野ほか(2005)に詳細に報告されている。

分析確度・精度の検定はNational Research Council Canada (NRCC)の環境標準試料NIES CRM No.1(リョウブ ; pepperbush)(保証値=2.3 ± 0.04 mg/kg-DW)を用いて行った。その結果、良好な結果が得られた。

実験結果

モエジマシダ孢子の発芽率および前葉体の発育状態
モエジマシダの孢子はすべての砒素の形態および濃度で発芽した。しかしながら、その形態および発芽率

は、明瞭に培地の砒素濃度の影響を受け、かなり変化している。

別府産のモエジマシダ胞子は3週目に発芽率のピークを迎え、沖縄本島産は2週目にピークを迎えた。その後4～5週目ともなると高濃度砒素培地(10mM)では一度発芽するものの、枯死する個体が多く見られた。

産地別にみると、別府産のモエジマシダ胞子は培地の砒素濃度が10mMのもの以外は発芽率90%前後と高いが、10mMでは60%程度である。一方、沖縄産のそれは10mM以外が発芽率90%以上と高いが、10mMは2週目以降には10%前後と低迷した(Fig. 2)。

前葉体を大きさおよび各部分の形態から観察すると、翼および仮根の発育状態が培地の砒素濃度が増加するにつれて、悪くなっている。10mM以上の培地では、翼の異常な形態が目立つようになる(Fig. 1)。

モエジマシダの前葉体における砒素濃度

全体的に見ると沖縄産のモエジマシダの砒素吸収量が多い。しかし、別府産のモエジマシダは他の産地のモエジマシダが生育出来ない高砒素濃度培地でも生育出来るという特徴があった。

前葉体は全ての濃度の砒素培地において砒素を吸収していた。ただし、沖縄本島産の砒素培地10mMのものは枯死してしまったため、砒素濃度は測定できていない。

産地別に見ると、別府産のそれは培地の砒素濃度が0.5mM, 1mM, 5mMのもの間ではあまり砒素吸収量に差が無いが(それぞれ7695, 9182, 7306mg/kgで、特に培地砒素濃度0.5mMと培地砒素濃度5mMのものは±300mg/kg程度の差)、培地砒素濃度が10mMのものでは18678mg/kgと他のものに比べ2倍以上数値が上昇した。

沖縄産は全てにおいて10000mg/kg前後と、培地の

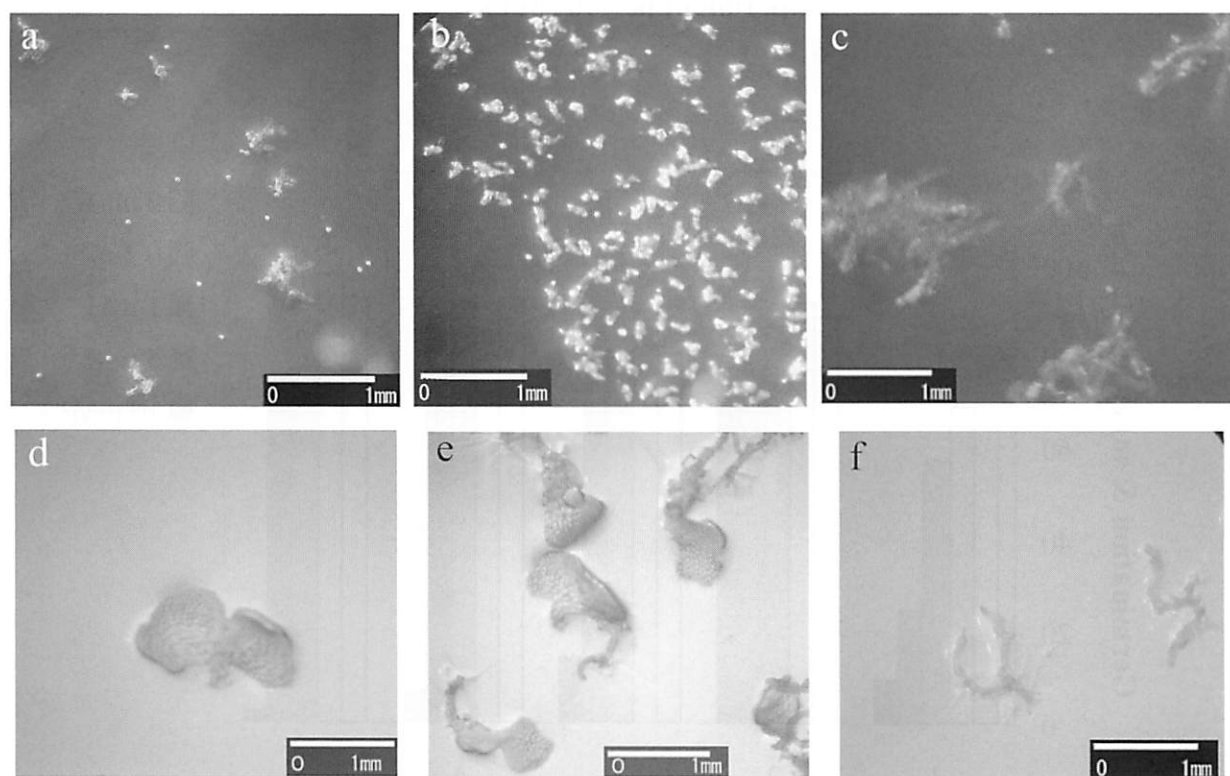


Fig. 1 Morphology of *P. vittata* grown in the presence of varying concentrations of arsenate.

a. *P. vittata* gametophytes from Moejima island in medium containing 10 mM arsenate at 3 weeks, b. *P. vittata* gametophytes from Okinawa island in medium containing 10 mM arsenate at 3 weeks, c. *P. vittata* gametophytes from Beppu City in medium containing 10 mM arsenate at 3 weeks, d. *P. vittata* gametophytes from Beppu City in medium containing 1 mM arsenate at 4 weeks, e. *P. vittata* gametophytes from Beppu City in medium containing 5 mM arsenate at 4 weeks, and f. *P. vittata* gametophytes from Beppu City in medium containing 10 mM arsenate at 4 weeks.

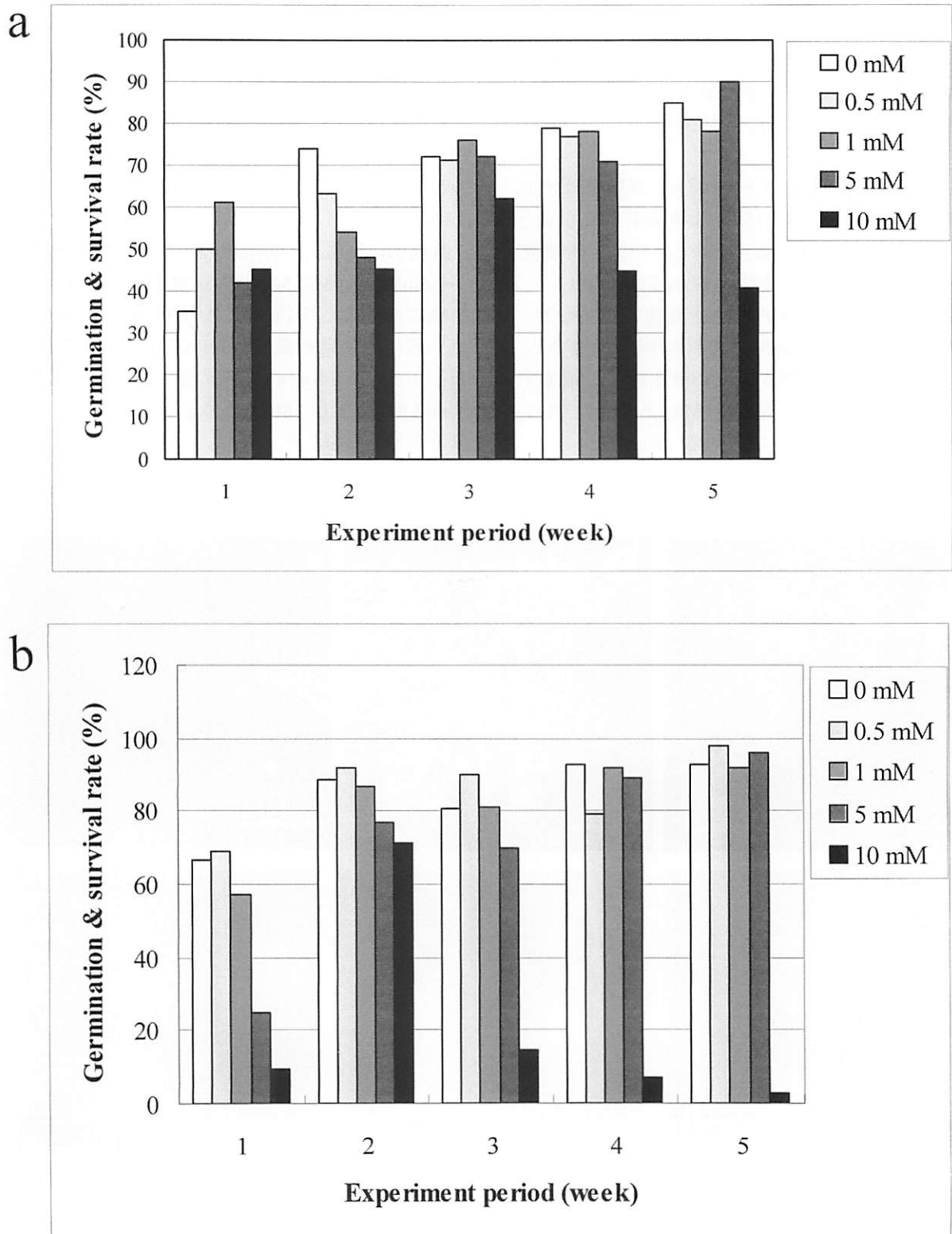


Fig. 2 Germination and survival rate of *P. vittata* grown in the presence of varying concentrations of arsenate. a. *P. vittata* from Beppu City, b. *P. vittata* from Okinawa island.

砒素の濃度と吸収した総砒素量の間には明瞭な相関は認められない (Fig. 3)。

考 察

今回行ったモエジマシダの胞子の発芽実験の結果、別府産および沖縄本島産のモエジマシダはともに発芽過程において極めて強い砒素耐性能力を有することが明らかになった。榊原ほか (2004) で議論されたように、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は培地中の亜砒酸および砒酸による砒素濃度が 25 mM で、約 50% の生体に根や地上部に成長阻害が認められる (Lee *et al.*, 2003)。また、重金属集積植物として既に知られているシダ植物のヘビノネコザ (*Athyrium yokoscense*) に関しても、砒素濃度が 10~100mM の培地ではモエジマシダの方が胞子の発芽に関してより強い砒素耐性がある (Komori *et al.*, 2004)。これらの研究結果に基づくと、モエジマシダは成体だけでなく、胞子および前葉体も、他の砒素集積植物と比較して、砒素に対する耐性を有することを示唆している。

一方、Gumaelius *et al.* (2004) によるモエジマシダの胞子の発芽実験では、それらが 20mM の砒素培地でも発芽・生育しているが、今回の実験では別府産を除くモエジマシダは培地の砒素濃度が 10mM では枯死している。このことからモエジマシダの砒素耐性能力にはその生育地ごとに有意な差異があると予想される。また、培地の砒素濃度が 5mM を超えると、前葉体の

形状が変化していることがある。これは高濃度の砒素によってモエジマシダの成長が阻害された為ではないかと考えられる。

また、今回の実験において、その最高砒素濃度は Gumaelius *et al.* (2004) で報告されているそれとほぼ同程度であった。

以上の実験結果に基づくと、ファイトレメディエーションを行う際に、砒素汚染土壌に直接モエジマシダの胞子を蒔いて栽培・浄化することも可能であることを示唆している。榊原ほか (2004) の結果も合わせて考えると、汚染土壌の砒素濃度がかかなり低濃度 (<20 mg/kg-DW) である場合でも、前葉体の砒素吸収量は平均 1000 mg/kg-DW を超えると予想される。今後、従来の実験室内および温室などで発芽・生育した苗を汚染土壌に移植してファイトレメディエーションを行うという従来の多段階移植方式と胞子を直接汚染土壌に蒔いて栽培・浄化するという新たな方法との比較実験を行い、栽培プロセスとモエジマシダの総砒素吸収量の関係について検討する必要がある。

謝 辞

ICP-MS 分析に関しては、愛媛大学総合研究支援センターの倉本 誠博士にご協力いただいた。本研究で使用した沖縄本島産のモエジマシダの胞子は、三重大学生物資源学部の水野隆文博士にご恵与いただいた。以上の方々に深い感謝の意を表し、ここに記して謝辞とさせていただきます。本研究の研究費の一部は、平成

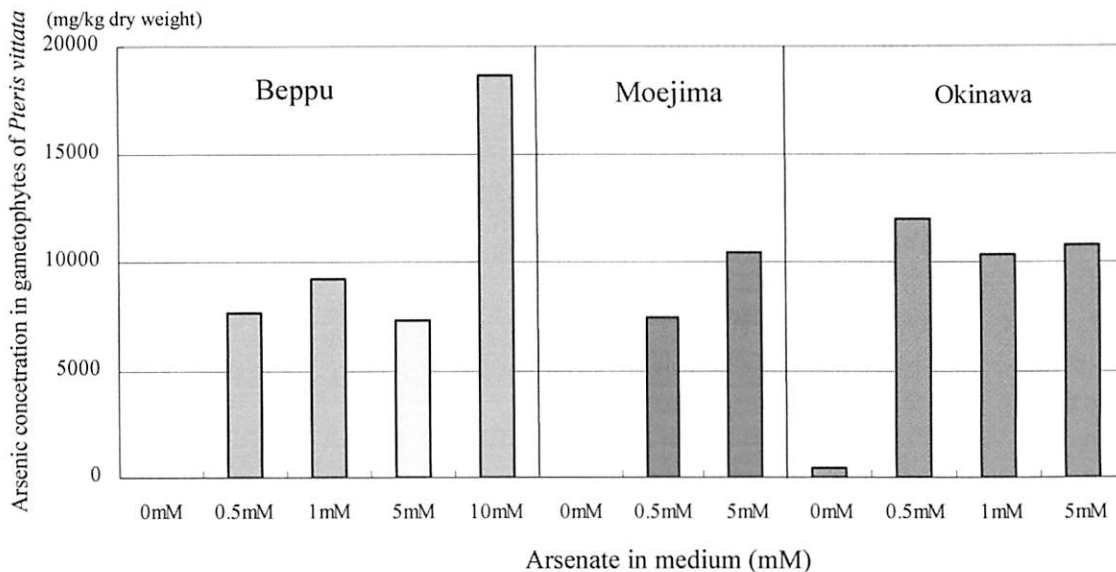


Fig. 3 As accumulation in *P. vittata* from each area.

17年度愛媛大学研究開発支援経費（特別推進研究）が使用された。

文 献

- Chen, T., Wei, C., Huang, Q., Lu, Q. and Fan, Z., 2002, Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chinese Science Bulletin*, **47**, 902-905.
- Gumaelius, L., Lahner, B., Salt, D. E. and Banks, J. A., 2004, Arsenic hyperaccumulation in Gametophytes of *Pteris vittata*. A new model system for analysis of arsenic hyperaccumulation. *Plant Physiology*, **136**, 3198-3208.
- Kamachi, H., Komori, I., Tamura, H., Sawa, Y., Karahara, I., Honma, Y. Wada, N., Kawabata, T., Matsuda, K., Ikeno, S., Noguchi, M., and Inoue, H., 2005, Lead tolerance and accumulation in the gametophytes of the fern *Athyrium yokoscense*. *Journal of Plant Research*, **118**, 137-145.
- Komori, I., Sawa, Y., Kamachi, H., Karahara, I., Honma, Y., Tamura, H. and Inoue, H., 2004, Heavy metal tolerance in gametophytes of the fern *Athyrium yokoscense*. *Plant Cell Physiol.*, **45**, s30.
- 近藤敏仁・阪本廣行, 2003, ファイトレメディエーション. 土木技術, **58**, 90-95.
- Lee, D. A., Chen, A. and Schroeder, J. I., 2003, *ars1*, and *Arabidopsis* mutant exhibiting increased tolerance to arsenate and increased phosphate uptake. *The Plant Journal*, **35**, 637-646.
- Lombi, E., Zhao, F-J., Fuhrman, M., Ma, L. and McGrath, S. P., 2002, Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.*, **156**, 195-203.
- Ma, L. Q., Komer, K. M. M., Tu, C., Zhang, W., Cai., Y. and Kenelley , E. D., 2001, A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, **409**, 579
- 榊原正幸・高木 梢・井上雅裕・久保田領志・堀 利栄・佐野 栄, 2004, 硫砒鉄鉱を含む変質安山岩のモエジマシダによるファイトレメディエーションに関する基礎的実験. 第14回環境地質シンポジウム論文集, 11-20.
- 榊原正幸・渡邊 彩・井上雅裕・佐野 栄, 2005, モエジマシダの胞子発芽時における砒素耐性および前葉体の砒素吸収能力. 愛媛大学理学部紀要, **11**, 7-11.
- 佐野 栄・榊原正幸・渡邊 彩, 2005, 放射化分析法および誘導結合プラズマ質量分析法による植物中の総ヒ素濃度の定量分析-モエジマシダによるファイトレメディエーション技術への適用-. 愛媛大学理学部紀要, **11**, 1-6.
- Tu, C. and Ma, L. Q., 2002, Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. *J. Environ. Qual.*, **31**, 641-647.
- Tu, C., Ma, L. Q. and Bondada, B., 2002, Arsenic accumulation in the hyperaccumulator chinese brake fern and its utilization potential for phytoremediation. *J. Environ. Qual.*, **31**, 1671-1675.
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C. and Ma, L. Q., 2002, Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *The Science of the Total Environment*, **300**, 167-177.