

ホテイアオイを用いた環境修復技術開発のための 基盤技術の開発

Basic study on development of the phytoremediation technology using water hyacinth

久松 伸, 其木茂則, 川上 泰, 森田重光

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shin Hisamatsu, Shigenori Sonoki, Yasushi Kawakami and Shigemitsu Morita

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract. To develop phytoremediation technology for hydrosphere, we decided to utilize water hyacinth and performed the basic research for the aseptic culture. First, when the relations to the fresh weight change of water hyacinth and the temperature in the field were examined, it was understood that fresh weight has increased by 2.5 % per day at 26 °C of field temperature. Therefore, it was thought that the culture temperature for aseptic water hyacinth in the growth cabinet was higher than 26 °C. Moreover, to obtain a big aseptic water hyacinth it was understood that it should be use the sterilization seat to improve ventilation. In addition, when elements concentration of the cultured medium was analyzed, it was suggested that the medium for water hyacinth should be modified the Fe, P, and Cu concentrations of the MS medium.

1. 目的

これまで、ヒトの活動により様々な化学物質が環境中に放出され、環境汚染が引き起こされている。これら有害な化学物質の排出や管理については、各種の法令により規制されるようになっており、国内においては環境汚染を未然に防ぐ効果が得られている。しかしながら、既に環境中に放出された化学物質については、その除去の必要性が叫ばれているものの、その処理には多大な労力と多額の費用がかかることから、必ずしも対応ができていないのが現状である。

ところで、近年、生物の力を利用して様々な化学物質に汚染された環境を修復しようとするバイオレメディエーション技術が注目されている。このバイオレメディエーションは、主に微生物を利用した技

術であるが、利用する生物が植物の場合はファイトレメディエーションと呼ばれている(1, 2)。利用する植物は、除去する対象物質やその物質が存在する地域によっても異なり、野生株ばかりでなく有用遺伝子を導入した遺伝子組換え植物も研究対象となっている(2)。このファイトレメディエーションは、その植物を汚染地域に播種すれば、汚染物質の吸着、吸収或いは分解が期待でき、その効果も長期間にわたって期待できる安価な環境修復技術である。

ところで、ファイトレメディエーションは主に土壌の汚染物質除去を中心に研究が行われている。湖沼や河川においては、野生型の水生植物を利用して富栄養化低減のための環境浄化の研究が主流となっていが、ダイオキシン類のような難分解性有機化合物などの除去が可能な植物が求められているものの、一般の野生型の植物では分解が困難と考えられる。

このようなことから我々は、河川や湖沼など、水圏の難分解性有機化合物などの除去を行うことができる遺伝子組換え水生植物の開発を目指し、研究を行っている。我々が利用しようとしている水生植物は、増殖能力が高く、湖沼の富栄養化低減にも利用されている単子葉水生植物ホテイアオイ (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) である。

このホテイアオイは熱帯性であるため、高温下で栽培する必要があるため、野外の池などで夏季の限定された期間でのみ実験が可能である。本研究の大きな目的は、有用遺伝子を組込んだトランスジェニックホテイアオイを作出することにあり、そのためには、無菌ホテイアオイの作出、組織培養技術の確立あるいはクローン化技術の確立など、様々な基盤技術を確立させる必要がある。これらを実現させるには、年間を通じて実験が可能になるよう、グロースキャビネット内で高温に保った状態で栽培させる必要があるが、光照射下かつ高温下での栽培を行うと微生物のコンタミネーションが起これ、長期間にわたる実験が不可能になる。現在我々は、既にホテイアオイの無菌化技術を確立しているが、グロースキャビネット内における最適栽培温度については検討を行っていない。そこで今回の課題では、ホテイアオイの栽培温度及び培地について実験を行うことにした。

2. 方法

1) 野外におけるホテイアオイの栽培

屋外におけるホテイアオイの栽培には、麻布大学3号館の北東にある糞尿処理施設の池を使用した。ホテイアオイは、冬の間研究室の日当たりのよい場所の水槽内に水を入れておいた市販のものをを用い、平成18年4月3日に池へ植栽した。このホテイアオイを11月末日まで経時的に気温、水温、直射日光の当たる場所における気温及びホテイアオイの湿重量を測定した。気温および水温は、午前9:00に測定し、ホテイアオイの湿重量は、ホテイアオイを池から出して、5分間放置することで根についた水分を落として測定を行った。

2) 室内におけるホテイアオイの無菌培養

室内におけるホテイアオイの無菌培養は、研究室で維持している無菌ホテイアオイの子株を、1%シ

ョ糖を加えたMS培地の入った培養瓶に入れて行った。培養瓶の大きさは300 mLのもの、2Lのものを使用した。ビンの開口部は、アルミホイルまたは滅菌シート (MILLIWRAP, Millipore社製) を使用して内部の無菌状態を保ち、30℃の恒温グロースキャビネット内で培養を行った。

3) 培地成分の分析

実験に用いたホテイアオイは、1%ショ糖を加えたMS培地を用いて無菌的に継代しているホテイアオイから得られる子株 (湿重量5~10 g) を使用した。子株は、1%ショ糖を加えたMS培地300 mlが入った500 mlセパラブルフラスコに移し、共栓付き一ツ口セパラブルカバーをして、明期16時間(29℃)、暗期8時間(25℃)に設定してあるグロースキャビネット内でインキュベーションした。この培養器の一ツ口から1 mlを経日的に分取し、テフロン容器に入れ、ICP-MS用高純度硝酸5 mlを加えた後、高周波分解装置を用いて灰化処理を行った。灰化処理を行った試料は、テフロン製メスフラスコに移し0.1N硝酸を用いて定容後、ICP-MS (Elan 6000, PerkinElmer社製) を用いて元素濃度を測定した。定量方法は、Beを用いた内部標準法で行った。

3. 結果と考察

今回の実験で用いた野外の1日の最高、平均及び最低気温は、海老名地域気象観測所の気象データを用いたが、麻布大学との気温差は、平均0.42℃ (標準偏差±1.764) となり、この観測所のデータは、麻布大でのデータと近似していることがわかった。従って、野外におけるホテイアオイの気温と湿重量の変化を調べる際の気温データは、海老名地域気象観測所のもので示した。

ホテイアオイの湿重量は、7月下旬まで緩やかな増加を示し、その後急速に増加することがわかった (Fig. 1)。また、半月ごとの平均気温と1日当たりの湿重量増加率を調べたところ、平均気温が20℃以上で1日当たり0.5%の湿重量が増加し、26℃で最大2.5%の湿重量増加が観察できた。その他、湿重量増加率と日長時間及び南中時日光照射角度を調べたところ、日長が短くなると湿重量増加率は減少し、また南中時日光照射角度が減少すると湿重量増加率も

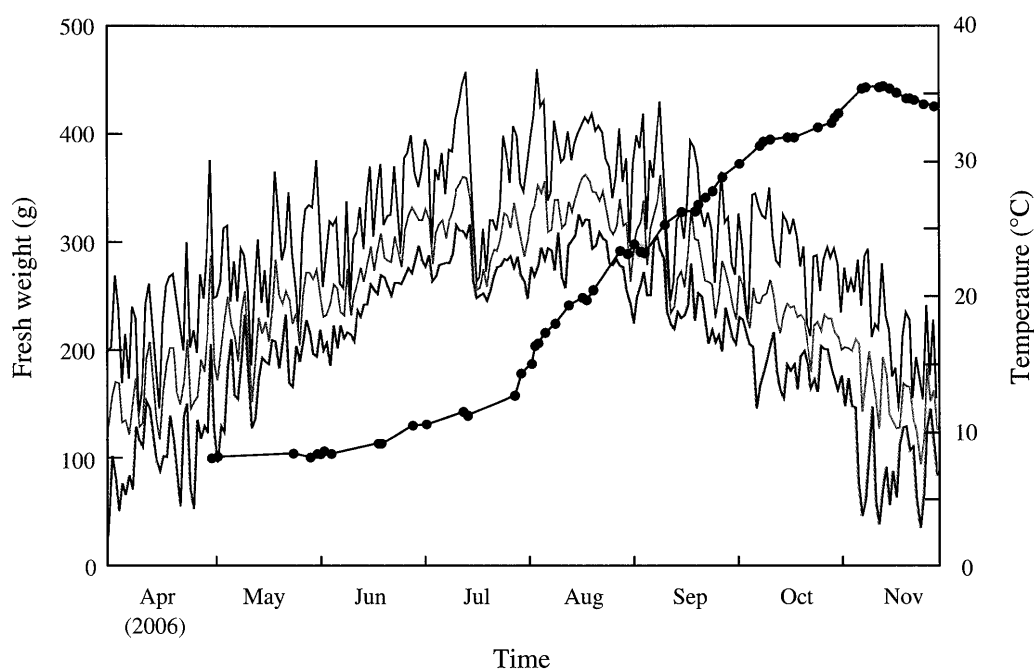


Fig. 1 Fresh weight of water hyacinth and temperature. Black line shows fresh weight. Red, green and blue lines show the highest, the average and the lowest temperature, respectively.

減少していることがわかった（データは示さない）。一方、1日の平均日光照射時間と湿重量増加率との間に相関は認められなかった（データは示さない）。以上のことから、ホテイアオイを無菌的に栽培する際には、平均気温が26℃が望ましいと推測されることから、グロースキャビネットを明期（16時間）32℃、暗期（8時間）22℃に設定し、無菌ホテイアオイを培養することにした。

ところで、一般的な植物の無菌培養は、培養器の開口部をアルミホイルで覆うことで無菌状態を保ちつつ通気を行っている。この場合、アルミホイル膜の微細な穴を通じて通気が行われるが、必ずしも十分なガス交換が行われるわけではない。ホテイアオイをこのような植物の一般的な培養方法で無菌培養を行った場合、葉柄は小さいまま子株を発生させて生長していた。本研究の延長には無菌状態を保ったまま開花・結実ができるような培養方法の開発がある。野外でのホテイアオイを観察すると、発生して間もない小さな子株からは開花・結実が行われていなかった。従って、開花・結実が行われるためには、十分大きく生長したホテイアオイ個体を得る必要があると考えられるため、培養器の通気性に着目して実験を行うことにした。今回の実験では、通気性を

改善させるために培養器の開口部をアルミホイルから滅菌シートに変えて生長を観察した。

その結果、滅菌シートを用いた方が、大きな個体に生長することがわかった。従って、無菌ホテイアオイの継代を続けた後、開花・結実の条件を調べる実験を行う際には、滅菌シートを用いることが良いと推測された。

一方、無菌ホテイアオイは、植物の組織培養に用いられる一般的な培地、すなわちMS培地を用いている。しかしながら、このMS培地がホテイアオイの培養に適している培地であるかは不明なため、どのような成分が消費されるかを把握しておく必要がある。ところで、MS培地を代表とする植物用の培地は、無機物質を主体とした培地であり組成が明らかになっている。従って、その組成表を元に、培養後の培地成分の元素分析を行えば、どの化合物が消費されたかを知ることができる。そこで、30日間における培地の元素組成変化を調べることにした。その結果、培地成分のMg, Mn, Ca及びKは、殆ど消費されておらず、Ba, Co及びMoについても20%程度の減少にとどまっていた。一方、Fe, P及びCuについては、30日間で70%以上減少しており、特にCuについては95%以上減少していた。これらの成

分は、ホテアオイが積極的に吸収する元素である可能性が高いことから、ホテアオイ専用の培地として、Fe, P及びCu含量を増やした組成が望ましいことが分かった。ところで、植物の生長に大きく関与する元素としては、N, P及びKが知られているが、ICP-MSではN量を測定することはできない。一般的な高等植物は、N源として硝酸イオンを最もよく利用するため、今後は、この硝酸イオン量の把握も行う必要があると考えられた。

このように今回の一連の実験では、無菌ホテアオイを継代するためには、どのような培養温度が適しているのか、或いは長期間にわたる培養でどのような成分が消費されるかなど、数々の重要な基礎データを得ることができた。ところで無菌ホテアオイを継代していく目的の一つに、年間を通じて実験に用いるホテアオイを供給することがある。この点については、今回の一連の実験で目処をつけることができた。一方、無菌ホテアオイを取り扱う他の目的に、遺伝子組換えホテアオイの開花・結実方法の確立がある。この開花・結実させることによって得られる種子は、遺伝子組換えホテアオイのクローニングに必要であり、また、得られたクローンが安定に供給できる利点もある。しかしながら、これまでの実験では無菌ホテアオイの開花・結実は観察されていない。今回の実験では、培養中の通気を考慮することで、大きなホテアオイ個体を得ることができたため、今後、開花・結実を促す様々な条件を更に検討していきたいと考えている。また、最近、陸上植物の開花に関する重要な遺伝子が発見

されたことから(3)、これらの知見も踏まえて研究を継続すると共に、遺伝子組換えホテアオイの実験にも取り組んで行きたいと考えている。

4. 要 約

ホテアオイを用いた水圏のファイトレメディエーション技術を開発するために、無菌ホテアオイの培養に関する基礎研究を行った。まず、野外に於けるホテアオイの湿重量変化と気温との関係を調べたところ、半月の平均気温が26℃の時、1日の湿重量が最大2.5%増加することがわかった。従って、無菌ホテアオイをグロースキャビネット内で培養する際には、平均気温を26℃に設定することが望ましいと考えられた。また、大きな無菌ホテアオイ個体を得るためには、通気性を良くするために培養器の開口部をアルミホイルで覆うのではなく、滅菌シートを利用した方が良いことがわかった。更に、無菌ホテアオイを培養している培地の元素分析を行ったところ、一般的な植物組織培養に用いられるMS培地のFe, P及びCu濃度を高めた方が良いことが示唆された。

5. 文 献

- 1) Macek, T., Mackova, M., and Kas, J., *Biotechnol. Adv.* 18: 23-24 (2000)
- 2) Pilon-Smits, E., *Annu. Rev. Plant Physiol.* 56: 15-40 (2005)
- 3) Tamaki S., Matsuo S., Wong H. L., Yokoi S., and Shimamoto K. *Science* 316: 1033-1036 (2007)