

重金属環境のドクゼリ (*Cicuta virosa* L.) における  
内生細菌の関与した Zn 吸収促進機構の解明

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

持続環境学専攻

博士 (環境学) 学位論文

2014 年 1 月

長田 賢志

## 目次

## 略語

|   |    |
|---|----|
| 第1章 緒論  | 1  |
| 1-1 重金属による土壌汚染                                  | 1  |
| 1-2 植物を利用した重金属汚染土壌の修復                           | 3  |
| 1-3 根圏及び内生細菌                                    | 4  |
| 1-4 日立鉱山沼の優占種・ドクゼリ ( <i>Cicuta virosa</i> )     | 6  |
| 1-5 本研究の目的                                      | 7  |
| 第2章 ドクゼリ実生への内生細菌の接種試験                           | 11 |
| 2-1 目的  | 11 |
| 2-2 材料及び方法                                      | 11 |
| 2-2-1 滅菌ドクゼリの作製                                 | 11 |
| 2-2-2 滅菌土壌の作製                                   | 11 |
| 2-2-3 接種試験                                      | 12 |
| 2-2-4 IAA 産生能力試験                                | 13 |
| 2-2-5 統計解析                                      | 14 |
| 2-3 結果  | 14 |
| 2-3-1 <i>P. putida</i> 接種におけるドクゼリ実生への影響         | 14 |
| 2-3-2 <i>Rhodopseudomonas</i> sp.接種におけるドクゼリへの影響 | 15 |
| 2-4 考察  | 15 |
| 2-5 要約  | 18 |

|  |    |
|--|----|
| 第3章 <i>Pseudomonas putida</i> の産生する不溶性 Zn 可溶化物質の単離と同定            | 26 |
| 3-1 目的   | 26 |
| 3-2 材料及び方法   | 26 |
| 3-2-1 使用した試薬   | 26 |
| 3-2-2 <i>Pseudomonas putida</i> 培養濾液の作製                          | 26 |
| 3-2-3 酢酸エチルによる抽出   | 27 |
| 3-2-4 アンバーライト XAD-4 による分画  | 27 |
| 3-2-5 強陰イオン交換樹脂アンバーライト IRA 400J による分画                            | 28 |
| 3-2-6 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分取                                | 29 |
| 3-2-7 Zn 可溶化試験   | 30 |
| 3-2-8 ガスクロマトグラフィー (GC/MS) を用いた分析                                 | 30 |
| 3-2-9 核磁気共鳴分光分析 (NMR)  | 31 |
| 3-2-10 Electrospray ionization time-of-flight 型質量分析 (ESI-TOF-MS) | 32 |
| 3-3 結果   | 32 |
| 3-4 考察   | 35 |
| 3-5 要約   | 39 |
| 第4章 総合考察   | 49 |
| 摘要   | 62 |
| 引用文献   | 64 |
| 謝辞   | 75 |

## 略語

|            |  |
|------------|--|
| ACCD       | Amino cyclopropane carboxylate deaminase                   |
| ALA        | 5-aminolevulinic acid                                      |
| COSY       | Correlation spectroscopy                                   |
| DEPT       | Distorsionless enhancement by polarization transfer        |
| EI-MS      | Electron ionization mass spectrometry                      |
| ESI-TOF-MS | Electron spray ionization time of flight mass spectrometry |
| Fr.        | Fraction   |
| GC/MS      | Gas chromatography-mass spectrometry                       |
| HCl        | Hydrochloric acid  |
| HPLC       | High performance liquid chromatography                     |
| IAA        | Indole-3-acetic acid                                       |
| ICP        | Inductively coupled plasma emission spectrometry           |
| MeOH       | Methanol   |
| min.       | Minutes  |
| MSTFA      | 2,2,2- trifluoro-N-methyl-N- (trimethylsilyl) acetamide    |
| NB         | Nutrient broth   |
| NBA        | Nutrient broth agar  |
| nm         | Nanometer  |
| NMR        | Nuclear magnetic resonance spectrometry                    |
| PGPR       | Plant growth promoting rhizobacteria                       |
| PTFE       | Polytetrafluoroethylene                                    |
| RSM        | Rhizosphere medium   |
| TFA        | Trifluoroacetic acid                                       |
| TMS        | Trimethylsilyl   |
| YG         | Yeast glucose  |
| YGA        | Yeast glucose agar   |

## 第1章 緒言

### 1-1 重金属による土壤汚染

重金属とは比重が  $4\text{-}5\text{ g/cm}^3$  以上の金属の総称であり、精錬が比較的容易であるため古代より様々な道具素材として用いられてきた。現代においても多様な用途で用いられており、現代社会で必須の鉱物となっている。また、動物、植物、そしてヒトにおいても体内の恒常性の維持に必須である重金属が確認されている。一方で、重金属が過剰量で環境中に存在することで生物に対して様々な負の影響を及ぼすことが知られている (浅見 2010)。また、Cd や Pb のように必須元素ではなく体内に蓄積することで害を及ぼす重金属が存在することも知られていることから、環境中の過剰な重金属による人類及び生態系への悪影響は無視できない。

重金属による環境汚染は日本のみの問題ではなく、世界的な問題であることが知られている (畑 2008)。日本においては特に明治以降の工業化の時代に公害という形でヒトの生活に影響を及ぼしていることが知られている。重金属による公害として有名なものとしては栃木県足尾銅山周辺及び渡良瀬川流域で発生した足尾銅山鉱毒事件、または富山県神通川流域で発生したイタイイタイ病が挙げられる。足尾銅山は明治期において日本最大の銅鉱山であり、明治期の日本の鉱山産業に重きをなした存在であったが、同時に日本の公害の原点であることが知られている。足尾銅山より排出された排煙、排水、鉱滓などには高濃度の Cu や Cd を中心とした重金属が含まれており、鉱山周辺の農地や渡良瀬川の水資源に甚大な被害を与えたことが知られている (川名 1989)。また精錬の燃料にするために周辺の森林樹木を乱伐したため、鉱山周辺は完全な裸地となった。このような荒地にも Cu は極めて高濃度で存在しており、現在においても植生のない原因の一つとなっている。イタイイタイ病は鉱山の排煙及び精錬

排水が未処理で排出されたことによって土壌及び河川が Cd によって汚染され (柳沢 1984)、Cd による慢性中毒が引き起こされた (畑 2001)。こういった状況を鑑みて日本政府は公害対策基本法 (1968 年; 現 環境基本法に統合 1994 年)、「農用地の土壌の汚染防止等に関する法律」(1970 年)、土壌汚染対策法 (2003 年施行、2010 年改訂)などを制定し、土壌の洗浄や使用の制限などといった対策を行ってきた結果、農用地に関しては対処の必要な土壌は減少してきている。しかし、この対策は客土が中心であり、客土処理地や工場跡地といった土壌を中心に汚染地域は未だに存在しているのが現状である (畑 2001)。日本において盛んに行われている土壌浄化法は物理化学的方法である。この物理化学的方法には重金属の不溶化と土壌洗浄の二つが挙げられる (地盤環境技術研究会 2003)。土壌から重金属を除去する方法は土壌にフラッシング液を投入して重金属を除去する土壌洗浄であるが、大量処理が可能なことや複数の重金属に同時に対応可能である半面、土壌の性質に左右される、工程から発生する高濃度の重金属が含まれる土壌の処理が難しいなどの問題がある (吉村 2003)。また、環境省、水・大気環境局による土壌汚染対策法に基づいた「平成 22 年度 土壌汚染対策法の施行状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果」(環境省 水・大気環境局 2010 a, b)によると、土壌汚染として届け出のあるうち、重金属汚染は平成 22 年度届け出の 75 %、平成 14 年から 22 年までの累計届け出の 72 %を占め、その大半の事例において汚染原因が不明とされており、根深い問題であることが伺える。このような汚染土壌を修復する方法として客土や洗浄といった物理的、化学的な手法のみならず、近年はより環境負荷の少なく、低コストな方法として植物や微生物を用いた生物的手法に関する研究がなされている。こういった研究の進展により、さらに効率的な重金属汚染浄化手法の確立が期待される。

## 1-2 植物を利用した重金属汚染土壌の修復

重金属の中には植物にとっての必須金属元素が存在する。Fe, Cu, Zn, Mo, Ni, 及び Mn などの重金属は植物内での酵素やタンパク質の産生に関与しており、欠乏することによってクロロシスの発現など成長阻害を引き起こすが (間藤ら 2010)、過剰量の場合も植物に対して成長阻害など負の影響を及ぼす (Påhlson 1989)。一例として、Zn は一般作物では 20-100 µg/g (Fox and Guerinot 1998)、一般植物では 10- 400 µg/g (Larcher, 2003) の濃度で存在し、地上部において 300 µg/g を超えるとクロロシス及び成長阻害が生じることが知られている (Broadley *et al.* 2007)。また、重金属が誘導するストレスとして活性酸素種の産生の増加が報告されている (Schützendübel and Polle 2002)。

過剰量の重金属が引き起こす毒性に対して植物は無力なわけではなく、細胞壁での不動化、細胞膜透過性の減少、ポリペプチドとの錯体化、液胞への隔離、及び細胞外への能動的な排出といった方法を用いて、重金属の毒性から個体を防御していることが知られている (Hall 2002)。このような防御機構を有した植物の中には、過剰量の重金属を体内に蓄積させても正常に生育できる植物種が存在する (Macnair *et al.* 2000) が、そのような植物を利用して重金属汚染土壌を浄化する手法は **Phytoremediation** と定義される (Salt *et al.* 1998)。重金属を対象とした **Phytoremediation** には土壌中の重金属を植物内に吸収させる **Phytoextraction**、及び重金属耐性植物を生育させることで汚染土壌の流亡を防ぐ **Phytostabilization** が知られている (Charny *et al.* 1997)。特に、汚染土壌から植物体内へ重金属を移行・蓄積させた後植物を刈り取ることで、汚染土壌を直接浄化できる **Phytoextraction** は盛んに研究が行われているが、**Phytoextraction** は前述した物理化学的手法と比べて土壌中からの重金属の除去量が極めて低く、効率が悪いこ

とが知られている。従って、これらの方法を用いるためには、過剰量の重金属に対して耐性を有し、より重金属を蓄積する植物を用いることが必要である。特に着目されているのが、一般的な植物に含まれる各重金属濃度を超過して重金属を高濃度で植物体中に蓄積できる能力を有する植物 *Hyperaccumulator* である (McGrath and Zhao 2003; Rascio and Navari-izzo 2011)。Hyperaccumulator は植物の地上部に Zn 及び Ni を 10,000 µg/g 以上、Co, Cr, Cu, 及び Pb を 1,000 µg/g 以上、Cd を 100 µg/g 以上、そして Hg を 10 µg/g 以上蓄積させる植物と定義されている (Lasat 2002)。また、高濃度で重金属を蓄積できたとしても植物のバイオマス量が小さい場合、土壌中から吸収できる重金属総量は少量であることから、重金属耐性を有しつつバイオマス量の大きな植物を選抜することも必要であるという指摘もある (Bhargava *et al.* 2012)。

このように *Phytoremediation* は植物の能力に着目して研究が進められてきたが、植物の重金属耐性及び蓄積能は、根圏環境に生息する微生物の働きによって付与されることも知られている (Glick 2010)。根圏に生息する微生物は根圏微生物と定義され植物の生育に密接に関与していることが知られているが (Giller *et al.* 2009)、近年、根圏微生物の中でも植物根の内部に生息している内生菌という微生物に注目が集まっている (Doty 2008)。

### 1-3 根圏及び内生細菌

植物の根の周辺約 1-2 mm の領域は根圏 (*Rhizosphere*) と定義されている (Rovia and Bowen 1966; Pinton *et al.* 2001)。根圏は植物根より滲出される糖、アミノ酸やフェノール性物質などの影響を直接受けるため非根圏土壌とは化学的な環境が異なることが知られている (Brimecombe *et al.* 2001)。そのような特殊な根圏環境は、根圏土壌に生息する微生物の種や数 (Kroon and Visser 2003)、微

生物活性、及び有機物量（木村 1998）に影響を及ぼすことが知られており、その影響を根圏効果と言う（Curl and Truelove 1986）。

根圏効果を受けた細菌（根圏細菌）の中には植物の生育に有用な根圏細菌が存在していることが知られ、そのような根圏細菌は PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)と定義される (Ryan *et al.* 2008)。PGPR の植物に対する働きとして、1) 植物ホルモンの産生、2) siderophore の産生、3) 窒素固定能、4) 酵素及び低分子量物質の産生、及び 5) 無機化合物の可溶化が挙げられ (Glick 1995)、作物の生産の向上やストレス環境での生育改善といった影響があることが知られている (Sturz *et al.* 2000)。そういった根圏細菌の中でも、植物組織内部に生息する内生細菌は、植物ホルモンの産生、窒素固定能、そして栄養元素の吸収促進を誘導することで植物の環境ストレス耐性を誘導することが知られている (Vessey 2003)。また、内生細菌は、顕著に病原性や共生を示さず植物の組織内に生息する (木村 1998) ことで植物の防御機構を誘導し、結果として植物の環境ストレス耐性を増強させていると考えられる (Schulz and Boyle 2006)。こういった内生細菌の中には siderophore や有機酸といった低分子量の二次代謝産物を産生することで植物の重金属吸収促進に関与しているものも存在する (Ma *et al.* 2011)。

近年、Phytoremediation の研究において、重金属蓄積性を促進させるような内生細菌を接種し、植物の重金属吸収を促進させる研究が注目されている (Newman and Reynolds 2005)。内生細菌の Phytoremediation への利用は他の根圏微生物と比べて報告例は少ないが、植物に内生することが可能である内生細菌は根圏に定着することが容易であることから、Phytoremediation にとって有用である可能性が考えられる (Doty 2008)。近年、有用な内生細菌を発見するために鉱山の様な重金属濃度の高い地域に生息している Hyperaccumulator から内生細菌

菌を分離し、その植物の重金属吸収能力促進に内生細菌が関与しているかを検証した研究が行われている。例として Sheng *et al.* (2008) は Pb 汚染土壌に生息する Zn 及び Pb の Hyperaccumulator として有名な *Brassica napus* の根より分離した *Pseudomonas fluorescens* と *Microbacterium sp.* を非滅菌条件で *B. napus* に接種することで、地上部における Pb の蓄積が促進されたと報告している。また、Souza *et al.* (1999) は Se を含む土壌で生育させた *Brassica napus* の根より分離した内生細菌を滅菌した *B. napus* へ接種することで、Se の蓄積が高まったと報告している。以上のことから、実際の重金属環境で生育する植物の中には内生細菌の能力によって重金属蓄積が促進されている植物が存在している可能性が高いと考えられる。重金属環境で優占的に生息している植物には有用な内生菌が定着していることが推測される。

#### 1-4 日立鉱山沼の優占種・ドクゼリ (*Cicuta virosa* L.)

日立鉱山は日本有数の銅鉱山であり、日本の明治期から昭和期において大規模な採掘がおこなわれた (嘉屋 1952)。特に大規模に開発が始まったのは 1905 年以降で大量の銅を産出した (長島 1994)。しかし、開発が始まると同時に大量の排煙及び鉱毒を有する排水によって市街や田畑に大きな損害を与えた。特に精錬所から排出される排煙は鉱山周辺の森林に甚大な被害を与えた。森林を回復するためにクロマツ (3,648,000 本)、オオシマザクラ (725,000 本)、スギ (393,000 本)、クヌギ (120,000 本)、ヒノキ (120,000 本)、ナラ (10,000 本)、ヤシャブシ (59,000 本)、そして他の樹木 (2,000 本) が植林された (長島 1994)。こういった植林の努力によって現在では周辺の森林は回復したものの、土壌は排煙に含まれていた重金属によって高濃度に汚染されていることが知られている。久保田ら (1986) によると日立鉱山周辺の土壌は Cu, Ni, Zn, Cd, 及び Pb が

特に高濃度で存在していると報告している。また、神賀・田切 (2003) は宮田川の河川堆積物にも Cu, Zn, As, 及び Ni が高濃度で存在していると報告している。以上の報告から、日立鉱山は植林された木本以外の植物が侵入し生育するには厳しい環境であるといえる。

その一方で、近年、植栽植物以外も生育していることが確認されている。日立鉱山の中腹の沼の優占種であるドクゼリ (*Cicuta virosa*) もその一つである (長田 2008) (図 1.1)。ドクゼリはセリ科 (*Apiaceae*)、ドクゼリ属 (*Cicuta*) に属する多年生植物であり、最大では全長 2.5 m まで成長することが知られている (Schep *et al.* 2009)。日本においては中部地方以西では絶滅の危機にある植物として 15 の府県でレッドデータブックに掲載されている (上赤 2012)。ドクゼリは各部位に神経性の毒性物質を有することが知られているが、特に節状の根茎に高濃度で存在することが知られている (Jacobson 1915; Schep *et al.* 2009)。ドクゼリの根茎に含まれている主要な毒性物質はポリアセチルアルコール類とアリルヒドロキシル類であり、他にも *cicutoxin* と呼ばれる毒性物質を含むことが知られている (Wittstock *et al.* 1995; Schep *et al.* 2009)。以上のように、ドクゼリの薬効成分に関する報告は多いが、重金属汚染土壌におけるドクゼリの生態化学的研究に関する報告はない。

#### 1-5 本研究の目的

長田 (2008) はドクゼリが優占的に生息する日立鉱山沼の土壌に含まれる年間の含有重金属濃度 (最小値-最大値) を調べたところ、Cu は 760-993  $\mu\text{g/g dry weight (D.W.)}$ 、Ni は 20-26  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Zn は 273-454  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Cd は 16-27  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Pb は 670-798  $\mu\text{g/g D.W.}$  であり、特に Cu, Zn, 及び Pb が高濃度で含まれていることを明らかにした。He *et al.* (2005) は、一般的な非汚染土壌に含まれる重

金属量を、Cu は 20  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Ni は 10-150  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Zn は 40  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Cd は 0.06  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Pb は 10-150  $\mu\text{g/g D.W.}$ であると報告している。He *et al.* (2005) の報告による非汚染土壌と比較して、日立鉱山沼の土壌は Cu, Zn, そして Pb によって高濃度で汚染されていることが確認された。日立鉱山沼で生育しているドクゼリは 6 月から 8 月にかけて成長し、8 月に最大に達したが、9 月には虫害によって地上部が減退していることが明らかになった。また、成長が最大であった 8 月のドクゼリの節根においては、Zn 濃度 (7,542  $\mu\text{g/g}$ ) が最大となることが明らかとなった。この濃度は植物の成長阻害を起こす Zn 濃度であるにもかかわらず、ドクゼリは顕著な生育阻害を受けることなく成長を続けていたことが野外観察により確認された。また、Zn 濃度が最も高かった 8 月のドクゼリの節根から内生細菌を 1 % Nutrient broth agar (1 % NBA) 及び 1 % Yeast glucose agar 培地 (1 % YGA) で分離したところ 54 菌株が分離され、そのうち 20 菌株が土壌中の不溶態 Zn を可溶化させる能力を有することが明らかになった。これらの菌株は極端な pH 低下無しに土壌中の不溶態 Zn を可溶化していたことから、この Zn の可溶化はプロトン放出によるものではなく、菌株により産生された化学物質によるものである可能性が高いことが示唆された。以上のことから、ドクゼリにおける高濃度の Zn 吸収に内生細菌の産生する化学物質が関与している可能性が示唆された (長田 2008)。さらに、16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的分類の結果より、最も高い Zn 可溶化能力を示した株は *Pseudomonas putida* 及び *Rhodopseudomonas sp.*であることが確認された (加藤 2010)。

以上の結果を踏まえ本研究では、内生細菌の関与したドクゼリにおける Zn 吸収メカニズムを解明することを目的とした。最初に、高い Zn 可溶化能力を示した *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas sp.*をドクゼリの実生に接種することによって Zn の吸収促進が確認されるかを検証した。接種試験の結果、*P. putida* が土壌中

の交換態 Zn 量を増加させ、ドクゼリ実生における Zn 吸収を促進させたことが確認されたことから、次に、*P. putida* が産生する Zn 可溶化物質を単離・同定することで、内生細菌による Zn 可溶化機構を明らかにした。本研究で得られた基礎知見は、重金属汚染環境での植物及び内生細菌を利用した浄化手法の発展に資することができると考えられる。



図 1.1. 日立鉱山中腹の沼 (2012 年 7 月撮影)

## 第2章 ドクゼリ実生への内生細菌の接種試験

### 2-1 目的

長田 (2008) 及び加藤 (2010) の結果より、ドクゼリ節根より分離された内生細菌で土壌中の不溶態 Zn を最も可溶化させる能力を有していた内生細菌は *P. putida* と *Rhodopseudomonas sp.*であった。しかし、これらの内生細菌がドクゼリに対してどのような影響を及ぼしているかは明らかではない。本章では、これらの内生細菌を滅菌条件下においてドクゼリ実生に接種し現地の重金属土壌において生育させることで、実生の Zn 吸収における内生細菌の影響を明らかにすることを目的とした。

### 2-2 材料及び方法

#### 2-2-1 滅菌ドクゼリの作製

ドクゼリ種子は北海道・名寄市・智恵文沼（北緯：44°45′，東経：142°40′）より 2006 年 10 月 2 日に採取し、4°C で保存したものを医薬基盤総合センターより提供して頂き、使用した。種子を 15% 過酸化水素水に浸漬し、23°C、150 rpm で 6 時間振とうした後、オートクレーブ滅菌した脱塩水で 23°C、150 rpm で 30 分間振とう洗浄した。洗浄は滅菌水を新しく交換しながら 4 回行った。その後、滅菌種子を 1/3 Hoagland 培地の上に置き、25°C/20°C（昼/夜：14 時間/10 時間）で静置培養した。発芽直後の実生は新しい 1/3 Hoagland 培地の上に静置後、30 日生育させ、茎葉長が約 20 mm、本葉が 2 枚になるように生育させたものを試験に供した。

#### 2-2-2 滅菌土壌の作製

2008 年 7 月に日立鉾山の沼で無作為に選定した 20 箇所から表層のリターを除

いて合計 2,500 cm<sup>3</sup> の土壌を採取した。採取した土壌はプラスチックバットの上で混合した後風乾し、2 mm の篩いを通した。これらの土壌はオートクレーブ可能な熱耐性を有する袋に入れ、シーリングをした後、30 kGy の  $\gamma$  線を 2 度間欠照射（計 60 kGy）して滅菌を行った。  $\gamma$  線照射は日本照射サービス株式会社東海センターにおける  $\gamma$  線照射装置 JS10000HD (Nordion, Ottawa, Canada) を用いて行った。

### 2-2-3 接種試験

間欠滅菌したアグリポット(Kirin, Tokyo, Japan)に  $\gamma$  線滅菌した日立鉱山沼の土壌を 20 g 入れ、滅菌水を 17 ml 加えた。そこに、滅菌ドクゼリ実生を 1 ポット当たり 3 個体移植した。実生 1 個体の根圏に *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas* sp. の細菌液を 1 ml (10<sup>7</sup>/ml) 接種した。対照区として、実生 1 個体の根圏にオートクレーブした各細菌液 (死菌液) を 1 ml を接種した区、及び土壌のみの区を設定した。各処理区につき、4 反復準備した。各処理区は 25°C/20°C (昼/夜 : 14 時間/10 時間) (照度 50.38 ±0.58  $\mu\text{mol/s m}^2$  ; Model LI-250 Light meter, Li-Cor, Lincoln, NE, U.S.A.) で培養し、14 日及び 28 日に滅菌水を 10 ml ずつ加えた。40 日間生育させた後、実生及び土壌を回収した。

実生は葉の数、茎の分岐数、及び茎葉長を測定した後、地上部と地下部に分けて新鮮重量を測定した。植物試料は 80°C で 48 時間乾燥させた後粉碎し、地上部は 10 mg、地下部は 2 mg を試験管 (内径 10 mm x 75 mm x 1.0 mm) に入れ、硝酸 1 ml を加えて Dry Thermo unit DTU-2C (TAITEC, Saitama, Japan) によって 130°C で熱分解した。ICP 発光分光分析装置 (Optima 7300 DV, PerkinElmer, Waltham, U.S.A) によって分解液に含まれる重金属量 (Cu, Ni, Zn, Cd, 及び Pb) と栄養元素量 (P, Mg, K, Na, Ca, 及び Fe) を測定した。1 個体のみでは分析可能

な容量に達しなかったため、同じポット内の 2 個体を合わせて分析に供した。

各ポットの土壌は回収後、冷暗所にて風乾し以下の実験に供した。土壌 3 g に対し、0.05 M 硝酸カルシウム溶液を加え、30 °C、150 rpm で 24 時間振とうし、5B 濾紙(ADVANTEC, Tokyo, Japan) で濾過して Cu, Ni, Zn, 及び Cd の交換態を抽出した (土壌環境分析法編集委員会 1997) 。また、Pb の交換態は、土壌 2 g に対して 10%アンモニア水で pH 4.5 に調整した酢酸アンモニウム溶液を 20 ml 加えて室温 (25°C) 、150 rpm で 1 時間振とうし、5B 濾紙で濾過することで抽出した (土壌環境分析法編集委員会 1997) 。また、各ポットの土壌の pH は土壌と脱塩水を 1:4 で混和し測定した。各分析につき 4 反復行った。

#### 2-2-4 IAA 産生能力試験 (Gordon and Weber 1951)

*Pseudomonas putida* 及び *Rhodopseudomonas* sp. は 1 % NBA 培地、もしくは 1 % YGA 培地で 3 日間静置培養したものをコルクポラー (内径 5.5 mm) で打ち抜き、50 ml 三角フラスコに入れた 30 ml の NB 液体培地、もしくは YG 液体培地に接種し、23 °C、150 rpm、及び暗条件で一晩培養した。培養した各菌液 300 µl をトリプトファン濃度が 100 µg/ml になるように調製した 30 ml の NB 液体培地、もしくは YG 液体培地に接種し、23 °C、150 rpm、及び暗条件で 4 日間培養した。これらの培養液は 13,000 rpm で 30 分間遠心分離した後、0.2 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) フィルター (ADVANTEC, Tokyo, Japan) を用いて濾過を行い内生細菌を除去した。濾液 2 ml を 4 ml の鉄反応液 (1 ml の 0.5 M 塩化鉄水溶液を 35 % 過塩素酸を用いて 50 ml にメスアップした反応液) と混和し、Dry Thermo unit DTU-2C (Dry Thermo unit DTU-2C, Taitec, Saitama, Japan) を用いて 28 °C で 25 分間反応させた。この混合液を紫外可視分光光度計 (UV-visible spectrometer, SHIMADZU, Kyoto, Japan) を用いて 530 nm で測定し、IAA の産生

量を測定した。これらの測定は3反復で行った。

検量線は0, 1, 4, 8, 16, 及び32 mg/l に調製した IAA 水溶液 2 ml に 4 ml の上記の鉄反応液を混和し、Dry Thermo unit DTU-2C を用いて 28 °C で 25 分間反応させ、紫外可視分光光度計を用いて 530 nm で測定した。これらの検量線試料は3反復で行った。

#### 2-2-5 統計解析

葉の数、茎の分岐数、茎葉長、実生の地上部及び根部の新鮮重量、重金属濃度、栄養元素濃度、そして実生個体あたりの重金属量は Smirnov–Grubbs' outlier test によって検定し、はずれ値を除外した。実生の成長、重金属濃度、栄養元素濃度、及び実生個体あたりの重金属量は接種区と死菌接種区の結果を PASW Statistics Version 18 for Windows (IBM, Armonk, New York, U.S.A.) を用いて Student's *t*-test によって解析した。解析は 5% 有意水準で行った ( $P < 0.05$ ) 。

### 2-3 結果

#### 2-3-1 *P. putida* 接種におけるドクゼリ実生への影響

ドクゼリ実生は *P. putida* の接種によって地上部、及び根部の新鮮重量、葉の枚数、茎の分岐数、及び茎葉長の増加が死菌接種区と比較して有意に確認された (図 2.1 及び表 2.1) 。栄養元素濃度は地上部では K と Na が、根部では Mg の濃度が死菌接種区と比較して有意に増加した (表 2.2) 。IAA 産生試験の結果、*P. putida* は IAA 産生能力を有していることが確認された ( $1.53 \text{ mg/l} \pm 0.00$ ) 。実生の重金属濃度は *P. putida* の接種によって死菌接種区と比べて有意な増加は確認されなかったが (表 2.3) 、実生一個体当たりの重金属吸収量では全ての重金属で *P. putida* の接種によって根部における有意な増加が確認された (表 2.4) 。

また、*P. putida* の接種によって土壤中の交換態 Zn 及び Pb が有意な増加が確認されたが、pH の極端な変動は確認されなかった (表 2.5)

### 2-3-2 *Rhodopseudomonas* sp.接種におけるドクゼリへの影響

ドクゼリ実生は *Rhodopseudomonas* sp. の接種によって、根部の新鮮重量、葉の枚数、茎の分岐数、及び茎葉長の増加が対照区と比較して有意に確認されたが、地上部の新鮮重量の増加は確認されなかった (図 2.1 及び表 2.1)。また、栄養元素濃度においては根部における Mg の濃度が有意に増加したことが確認された (表 2.2)。IAA 産生試験の結果、*Rhodopseudomonas* sp.は IAA 産生能力を示すことが確認された (32.47 mg/l ± 1.11)。実生の重金属濃度は *Rhodopseudomonas* sp. の接種においても *P. putida* の接種と同様に死菌接種区と比較して有意な増加は確認されなかったが (表 2.3)、実生一個体当たりの吸収量では実生根部で Ni 及び Pb が *Rhodopseudomonas* sp.の接種によって有意に増加したことが確認された (表 2.4)。また、土壤中の交換態 Zn 及び Cd 量は *Rhodopseudomonas* sp.の接種によって有意に増加したことが確認されたが、pH の極端な変動は確認されなかった (表 2.5)。

### 2-4 考察

*Pseudomonas* 属細菌は PGPR としての影響を有する菌株が多数知られている (Ryan *et al.* 2008)。PGPR の能力の中で *P. putida* は重金属ストレス環境下で IAA 産生、ACCDD 活性、また siderophore 産生を示すことが知られている (Glick 2010)。Tripathi *et al.* (2005) は Cd 及び Pb 添加土壌で *P. putida* KNP9 を *Phaseolus vulgaris* へ接種したところ、IAA 産生、ACCDD 活性、及び siderophore の産生が確認されたと報告している。また、Rodriguez *et al.* (2008) は Ni 汚染土壌において *Brassica*

nups に *P. putida* HS-2 を接種したところ、IAA 産生、ACCD 活性、及び siderophore の産生が確認されたと報告している。本章において *P. putida* をドクゼリの実生に接種することによって、IAA 産生、地上部での K 及び地下部で Mg の吸収促進が生じた結果、実生の成長促進が有意に確認されたと考えられた (図 2.1, 表 2.1, 及び表 2.2)。

また、*P. putida* の接種によって土壌中の交換態 Zn 及び Pb が有意に増加したことが確認された (表 2.5)。重金属は一般的に pH が低下することによって可溶化することが知られている (Larcher 2003)。本研究において *P. putida* の接種によって土壌中の pH は有意な変動が確認されなかったにも拘らず、土壌中の Zn 及び Pb の交換態は増加したことが確認されたため、pH の低下以外の要因が交換態 Zn 及び Pb 量の有意な増加に関与したと考えられる。プロトン放出による pH の低下以外に土壌中の不溶態重金属を可溶化させる PGPR の能力としては siderophore の産生及び有機酸の産生が挙げられる (Lugtenberg and Kamilova 2009)。Siderophore や有機酸は重金属と錯体構造を形成することによって不溶態重金属を可溶化させ、植物が利用可能な形態にすることが知られている。本章においても、*P. putida* が産生した siderophore や有機酸が土壌中の不溶態重金属と錯体構造を形成することで、不溶態重金属が可溶化された可能性が示唆された。

*P. putida* の接種によって実生地上部及び根部の全重金属濃度の有意な増加は確認されなかったが (表 2.3)、実生個体あたりの重金属量では *P. putida* の接種によって実生根部の全重金属において有意な増加が確認された (表 2.4)。本研究で着目している Zn の濃度は一般的な作物では 20 - 100 µg/g (Fox and Guerinot, 1998)、陸上植物全般では 10 - 400 µg/g (Larcher, 2003) と報告されており、実生地上部及び根部の Zn 濃度は成長阻害を起こしうる濃度であることが確認された。

また、本章における死菌接種区の実生には強い成長阻害及びクロロシスが確認され、強い重金属ストレスを受けていることが目視において確認された (図 2.1)。また、実生個体あたりの Zn 量の有意な増加が確認されたことから (表 2.4)、*P. putida* による Zn の吸収促進は確認されたが、実生中の Zn 濃度に有意な差が確認されなかった理由として希釈効果が考えられた。希釈効果とは植物の生育が急速であるとき、植物中の無機元素濃度が減少する現象と定義される (Larcher 2003)。本章における *P. putida* を接種したドクゼリ実生は IAA の産生及び栄養元素吸収促進によって急速に生育したため、ドクゼリの各含有重金属濃度が希釈効果によって見掛け上希釈されることで、接種区と死菌接種区の実生の各含有重金属濃度には有意な差が確認されなかったと考えられた。

*Rhodopseudomonas* 属細菌は植物ホルモンを産生し、植物の生育を促進させることが報告されている。例として、*Rhodopseudomonas* sp. KL9 及び *Rhodopseudomonas* sp. BL6 は IAA 及び ALA を産生する細菌であることが報告されている (Koh and Song 2007)。また、*Rhodopseudomonas* sp. KL9 をトマトの苗に接種することで地上部及び根部において成長の促進が確認されたと報告されている (Lee *et al.* 2008)。本章においても *Rhodopseudomonas* sp. の接種によって実生根部の成長が有意に促進されたことが確認された (表 2.1)。また、地上部の新鮮重量には有意な増加は確認されなかったが、葉の数、茎の分岐数、及び茎葉長においては *Rhodopseudomonas* sp. の接種によって有意な増加が確認された (表 2.1)。この成長促進には *Rhodopseudomonas* sp. の接種による実生根部の Mg 吸収促進 (表 2.2)、及び IAA の産生が影響していると考えられた。

実生の地上部及び根部の含有重金属濃度は *P. putida* と同様に有意な増加は確認されず (表 2.3)、個体あたりの重金属量においては Ni 及び Pb 量の有意な増加が確認されたが、Zn 量は増加の傾向のみが確認された ( $p = 0.07$ ) (表 2.4)。

土壌中の pH の低下無しに交換態 Zn 及び Cd 量の有意な増加が確認されたことから (表 2.5) 、*Rhodopseudomonas* sp. の接種においても siderophore や有機酸の産生によって土壌中の交換態 Zn 量及び Cd 量が増加したことが示唆された。*Rhodopseudomonas* 属細菌は既存の研究において、土壌中の金属を可溶化させるような物質を産生するという報告はなく、土壌中の不溶態 Zn の可溶化についての知見は本研究が初であると考えられた。

本研究において *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas* sp. はドクゼリの実生に対して 2 種類の影響を示すことが確認された。一つは IAA 産生及び栄養元素の吸収促進することによる実生成長の促進への寄与であり (図 2.1 及び表 2.1) 、もう一つは土壌中の不溶態 Zn の可溶化による実生根部への Zn 吸収促進であった (表 2.5) 。日立鉱山に生息しているドクゼリはこのような内生細菌によって成長を促進させ、Zn を根部に蓄積させている可能性が本章の結果より明らかになった。本章で使用した内生菌の中で顕著な影響を示したのは *P. putida* であり、*P. putida* の産生する Zn 可溶化物質を明らかにすることで、内生菌の関与したドクゼリにおける Zn 吸収メカニズムを明らかにすることができると考えられた。

## 2-5 要約

ドクゼリ根部より分離された内生細菌で最も土壌中の不溶態 Zn を可溶化させる能力を有していた内生細菌 *P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp. を現地の重金属土壌条件下においてドクゼリの滅菌実生に接種し、実生の Zn 吸収における内生細菌の影響を明らかにすることを目的とした。

$\gamma$  線滅菌した風乾沼土壌に滅菌ドクゼリ実生を移植し *P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp. をそれぞれ接種したところ、ドクゼリ実生の成長は有意に増加した。特に *P. putida* を接種することによってドクゼリ実生の成長は大幅に

増加した。これらの成長促進は *P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.による IAA 産生及び栄養元素吸収促進が寄与することが示唆された。また、*P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.の接種によって土壌中の交換態 Zn 量の増加が有意に確認された。ドクゼリ実生の含有重金属濃度は *P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.の接種によって有意な差は確認されなかったが、*P. putida* の接種によって個体根部あたりの Zn 量では有意な増加が確認された。*Rhodopseudomonas* sp.の接種では増加の傾向が確認された。この現象は各菌株接種によるドクゼリ実生の成長促進が急激だったため生じた希釈効果に起因すると考えられた。

以上の結果より、*P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.のドクゼリ実生への影響は 1) IAA 産生及び一部の栄養元素吸収促進による成長促進、2) 土壌中の不溶態 Zn の可溶化による Zn の吸収促進であることが確認された。



+ *P. putida*

+ dead  
*P. putida*

+ *Rhodopseudomonas* sp.

+ dead  
*Rhodopseudomonas* sp.

図 2.1 接種試験におけるドクゼリ実生

+ *P. putida* 及び+ *Rhodopseudomonas* sp.は各菌株の接種した区 (接種区) を表す。 + dead *P. putida* 及び+ dead *Rhodopseudomonas* sp.は各菌株をオートクレーブを行ったものを接種した区 (死菌接種区) を示す。実験は + *P. putida* 区 は n = 9、+ dead *P. putida*, + *Rhodopseudomonas* sp., 及び+ dead *Rhodopseudomonas* sp.は n=12 で行った。図中の棒線は 50 mm を示す。

表 2.1 接種試験におけるドクゼリ実生の成長

|           | <i>Pseudomonas putida</i> |            | <i>Rhodopseudomonas sp.</i> |            |
|-----------|---------------------------|------------|-----------------------------|------------|
|           | + bac                     | + dead bac | + bac                       | + dead bac |
| 葉の枚数      | 13±1***                   | 6±1        | 9±1*                        | 6±1        |
| 茎の分岐数     | 4±0***                    | 2±0        | 3±0*                        | 2±0        |
| 茎葉長       | 62.9±6.1**                | 25.7±3.5   | 37.2±3.8**                  | 22.4±2.7   |
| 地上部の F.W. | 73.4±11.5***              | 19.7±2.8   | 46.7±7.1                    | 31.6±3.3   |
| 根部の F.W.  | 52.6±9.4***               | 9.6±2.5    | 31.6±3.3***                 | 6.8±2.7    |

+ bac は各菌株の接種した区(接種区)を表す。 + dead bac は各菌株をオートクレーブを行ったものを接種した区(死菌区)を表す。 . 茎高長は mm 表す。地上部と根部の新鮮重量 (F.W.)は mg で表す。結果中の±は標準誤差を表す。実験は *P. putida* (+ bac) 区、*P.putida* (+ dead bac), *Rhodopseudomonas sp.* (+ bac), 及び *Rhodopseudomonas sp.* (+ dead bac) は n=4 で行った。各値は Student t-test を用いて+ bac と + dead bac を解析した (\*: p <0.05, \*\*: p <0.01, \*\*\*: p <0.001)。

表 2.2 接種試験におけるドクゼリ実生の栄養元素濃度

| <i>Pseudomonas putida</i> |                    |                   |                  |                   |
|---------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                           | 地上部                |                   | 根部               |                   |
|                           | + bac              | + dead bac        | + bac            | + dead bac        |
| P                         | 10526.98±1075.42   | 19334.86±969.75** | 11386.74±403.00  | 14821.02±532.72*  |
| Mg                        | 2647.31±244.06     | 2644.15±136.83    | 3596.17±178.55*  | 2076.06±276.00    |
| K                         | 24831.75±2028.36** | 7794.57±1296.78   | 18992.55±3478.94 | 10102.37±2888.41  |
| Na                        | 7113.61±698.59*    | 4095.89±214.03    | 14466.64±1819.82 | 12042.84±3134.89  |
| Ca                        | 8328.75±807.88     | 10644.82±3151.18  | 6208.79±675.63   | 15939.30±2458.31* |
| Fe                        | 136.70±26.28       | 556.89±194.05     | 1271.65±199.41   | 1831.17±330.66    |

| <i>Rhodopseudomonas sp.</i> |                  |                  |                  |                  |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                             | 地上部              |                  | 根部               |                  |
|                             | + bac            | + dead bac       | + bac            | + dead bac       |
| P                           | 13790.90±1756.66 | 19702.03±4148.15 | 14851.71±1713.16 | 14328.00±1159.75 |
| Mg                          | 2685.24±204.85   | 3106.30±295.50   | 2704.28±171.01*  | 2186.67±28.06    |
| K                           | 11581.19±3988.45 | 11677.37±1167.01 | 17004.28±5624.15 | 9761.66±3491.02  |
| Na                          | 4492.23±1172.47  | 4865.15±866.07   | 13068.55±3321.96 | 10330.14±1791.40 |
| Ca                          | 7536.61±1368.86  | 8906.40±1202.42  | 8423.42±1029.18  | 14188.59±5789.18 |
| Fe                          | 182.86±55.42     | 375.66±139.22    | 842.90±104.13    | 1790.98±700.85   |

全ての値は  $\mu\text{g/g}$  を示す。結果中の $\pm$ は標準誤差を表す。実験は *P. putida* (+ bac) 区、*P. putida* (+ dead bac), *Rhodopseudomonas sp.* (+ bac), 及び *Rhodopseudomonas sp.* (+ dead bac) は n=4 で行った。各値は Student t-test を用いて + bac と + dead bac を解析した (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ )。

表 2.3 接種試験におけるドクゼリ実生の含有重金属濃度

| <i>Pseudomonas putida</i> |              |               |              |                |
|---------------------------|--------------|---------------|--------------|----------------|
|                           | 地上部          |               | 根部           |                |
|                           | +bac         | + dead bac    | + bac        | + dead bac     |
| Cu                        | N.D.         | 42.98±37.24   | 219.50±42.08 | 293.78±124.82  |
| Ni                        | 230.42±7.50  | 488.12±69.92* | 311.32±17.89 | 413.94±89.29   |
| Zn                        | 64.51±8.96   | 165.39±73.48  | 503.32±89.44 | 736.04±128.99  |
| Cd                        | 1.68±0.00    | 24.62±8.15*   | 80.54±16.99  | 114.30±45.06   |
| Pb                        | 499.27±42.57 | 961.78±96.00* | 738.03±59.07 | 1000.21±263.59 |

| <i>Rhodopseudomonas sp.</i> |              |              |               |                |
|-----------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
|                             | 地上部          |              | 根部            |                |
|                             | + bac        | + dead bac   | + bac         | + dead bac     |
| Cu                          | 4.08±2.06    | 28.56±18.03  | 152.30±48.03  | 133.70±14.98   |
| Ni                          | 470.44±21.61 | 432.71±41.89 | 523.73±23.98  | 564.71±137.17  |
| Zn                          | 111.53±8.07  | 157.73±21.40 | 554.06±184.16 | 359.40±13.50   |
| Cd                          | 25.84±6.97   | 3.55±4.54    | 56.77±25.52   | 19.92±9.99     |
| Pb                          | 890.32±35.67 | 818.05±65.14 | 1053.30±22.31 | 1140.53±255.31 |

全ての値は  $\mu\text{g/g}$  を示す。結果中の $\pm$ は標準誤差を表す。実験は *P. putida* (+ bac) 区、*P. putida* (+ dead bac) , *Rhodopseudomonas sp.* (+ bac) , 及び *Rhodopseudomonas sp.* (+ dead bac) は n=4 で行った。各値は Student t-test を用いて+ bac と + dead bac を解析した (\*: p <0.05, \*\*: p <0.01, \*\*\*: p <0.001) 。N.D. は ICP 分析における検出限界未満を示す ( Cu < 5.4 ppb, Ni < 15 ppb, Zn < 1.8 ppb, Cd < 3.4 ppb, Pb < 42 ppb) 。

表 2.4 接種試験におけるドクゼリ実生の個体あたりの重金属量

| <i>Pseudomonas putida</i> |            |            |             |            |
|---------------------------|------------|------------|-------------|------------|
|                           | 地上部        |            | 根部          |            |
|                           | +bac       | + dead bac | +bac        | + dead bac |
| Cu                        | N.D.       | 0.15±0.13  | 2.56±0.40** | 0.43±0.09  |
| Ni                        | 4.77±0.81  | 2.28±0.52  | 3.70±0.39** | 0.66±0.02  |
| Zn                        | 1.38±0.36  | 0.66±0.20  | 6.05±1.37*  | 1.21±0.12  |
| Cd                        | 0.03±0.01  | 0.12±0.04  | 0.94±0.17*  | 0.17±0.03  |
| Pb                        | 10.47±2.16 | 4.48±0.90  | 8.74±0.84** | 1.57±0.04  |

| <i>Rhodopseudomonas sp.</i> |            |            |            |            |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                             | 地上部        |            | 根部         |            |
|                             | +bac       | + dead bac | +bac       | + dead bac |
| Cu                          | 0.03±0.04  | 0.28±0.13  | 1.25±0.58  | 0.28±0.09  |
| Ni                          | 5.68±1.28  | 3.21±0.09  | 3.98±0.70* | 1.03±0.01  |
| Zn                          | 1.34±0.33  | 1.17±0.12  | 4.71±2.19  | 0.74±0.18  |
| Cd                          | 0.33±0.13  | 0.02±0.03  | 0.48±0.28  | 0.05±0.03  |
| Pb                          | 10.72±2.35 | 6.08±0.11  | 8.10±1.58* | 2.09±0.06  |

全ての値は  $\mu\text{g 個体}^{-1}$  を示す。結果中のエラーバーは標準誤差を表す。実験は *P. putida* (+ bac) 区、*P. putida* (+ dead bac) , *Rhodopseudomonas sp.* (+ bac) , 及び *Rhodopseudomonas sp.* (+ dead bac) は n=4 で行った。各値は Student t-test を用いて + bac と + dead bac を解析した (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001) 。N.D. は ICP 分析における検出限界未満を示す ( Cu < 5.4 ppb, Ni < 15 ppb, Zn < 1.8 ppb, Cd < 3.4 ppb, Pb < 42 ppb) 。

表 2.5 接種試験における土壌中の交換態重金属及び pH

|    | 滅菌土壌        | <i>Pseudomonas putida</i> |             | <i>Rhodopseudomonas sp.</i> |             |
|----|-------------|---------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
|    |             | + bac                     | + dead bac  | + bac                       | + dead bac  |
| Cu | 2.71±0.07   | 2.88±0.08                 | 2.57±0.05   | 2.53±0.09                   | 2.31±0.05   |
| Ni | 3.59±0.21   | 4.47±0.08                 | 4.73±0.07*  | 6.19±0.07                   | 6.35±0.14   |
| Zn | 31.61±0.43  | 34.64±0.56**              | 30.10±0.21  | 33.21±1.06**                | 28.63±0.46  |
| Cd | 3.38±0.10   | 3.08±0.06                 | 2.99±0.13   | 3.14±0.11*                  | 2.70±0.10   |
| Pb | 140.09±2.58 | 144.72±4.52*              | 123.07±5.31 | 140.96±7.37                 | 133.87±7.66 |
| pH | 5.45±0.01   | 5.52±0.01                 | 5.58±0.08   | 5.61±0.01                   | 5.62±0.05   |

全ての値は $\mu\text{g/g}$ を示す。結果中の $\pm$ は標準誤差を表す。実験は*P. putida* (+ bac) 区、*P. putida* (+ dead bac) , *Rhodopseudomonas sp.* (+ bac) , 及び *Rhodopseudomonas sp.* (+ dead bac) は n=4で行った。各値はStudent t-testを用いて+ bac と + dead bac を解析した (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ) 。

## 第3章 *Pseudomonas putida* の産生する不溶態 Zn 可溶化物質の単離と同定

### 3-1 目的

第2章の接種試験によって *P. putida* は土壌中の不溶態 Zn を可溶化させたことが確認された。*P. putida* の接種によって土壌中の pH は低下しなかったにも拘らず、土壌中の交換態 Zn 量には有意な増加が確認されたことから、*P. putida* は何らかの Zn 可溶化物質を産生することによって土壌中の交換態 Zn 量を増加させた可能性が示唆された。また、可溶化した Zn はドクゼリに吸収されることによって、ドクゼリの含有 Zn 量が増加したと考えられた。以上の結果を踏まえ本章では、*P. putida* の産生する土壌中の不溶態 Zn の可溶化物質を単離・同定することで、どのような化学物質が土壌中の Zn の可溶化メカニズムに関与しているのかを明らかにすることを目的とする。

### 3-2 材料及び方法

#### 3-2-1 使用した試薬

メタノール (特級)、アセトニトリル (特級)、酢酸エチル (特級)、無水硫酸ナトリウム (特級)、重水 (NMR 用)、トリフルオロ酢酸 (TFA) (特級)、L-leucine (特級) は和光純薬 (大阪) から、N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.) から、重トリフルオロ酢酸 (重 TFA) 及び Urocanic acid (98%) は東京化成 (東京) から購入した。

#### 3-2-2 *Pseudomonas putida* 培養濾液の作製

*Pseudomonas putida* は 1% NBA 培地にて 5 日間静置培養したものをコルクポーター (内径 5.5 mm) で 3 ヶ所打ち抜き、50 ml 三角フラスコに入れた 30 ml の NB 液体培地に接種して 23 °C、150 rpm、暗条件で一晩振とう培養した。この前培養

液 300  $\mu$ l を 500 ml 三角フラスコに入れた 300 ml の RSM 液体培地に接種し、23  $^{\circ}$ C、150 rpm、暗条件で 2 日間振とう培養した。培養液は遠心機 (Hi-mac CR22E, Hitachi, 東京) を用いて 13,000 rpm で 30 分間遠心分離し、得られた上清を 0.2  $\mu$ m polytetrafluoroethylene (PTFE) フィルターを用いて濾過することで培養濾液を得た。培養濾液はロータリーエバポレーター (REN-1000, Iwaki, 千葉) を用いて 35-40  $^{\circ}$ C で減圧乾固し、乾燥重量を測定した後、-20  $^{\circ}$ C で保存した。培養濾液は Zn 可溶化物質の分画スキーム (図 3-1) に基づき、処理した。

### 3-2-3 酢酸エチルによる抽出

300 ml の分液漏斗を使用し、3-2-2 で得られた培養濾液 100 ml を 120 ml の酢酸エチルを用いて酢酸エチル層と水層に分液した。酢酸エチルによる抽出は 40 ml ずつ、計 3 回行った。得られた水層はロータリーエバポレーターを用いて 35-40 $^{\circ}$ C で減圧乾固を行い、乾燥重量を測定した後、脱塩水 30 ml で溶解し、-20 $^{\circ}$ C で保存した (3.3 倍濃縮液)。酢酸エチル層は分液漏斗を使用し、120 ml の飽和食塩水を用いて脱水を行った。飽和食塩水は 40 ml ずつ、計 3 回行った。脱水後、無水硫酸マグネシウムを加え一晩暗所で保存し、脱水した。脱水後、綿栓濾過を行い、硫酸マグネシウムを除去した。その後、ロータリーエバポレーターを用いて 30 $^{\circ}$ C で減圧乾固を行い、乾燥重量を測定した後、脱塩水 30 ml で溶解し、-20 $^{\circ}$ C で保存した

### 3-2-4 アンバーライト XAD-4 による分画

3-2-3 で得られた水層をアンバーライト XAD-4 (XAD-4; Dow Chemical, Midland, U.S.A.) を用いて分画した。XAD-4 を充填したガラスカラム (i.d. 30 x 280 mm) を、メタノール 400 ml、アセトニトリル 400 ml、酢酸エチル 400 ml で

洗浄した。その後、再度、メタノール 400 ml で洗浄し、最終的には脱塩水で置換した。そこへ、3-2-3 で得られた水層濃縮液 28 ml をチャージし、600 ml の脱塩水を約 0.1 ml/秒の流速で通液した。ここで得られた画分を XAD-4 通過画分とし、ロータリーエバポレーターを用いて 35-40 °C で減圧乾固を行い、乾燥重量を測定した後、脱塩水 28 ml で溶解し、-20 °C で保存した (3.3 倍濃縮液)。さらに、600 ml のメタノールで XAD-4 吸着成分を溶出することで得られた画分を XAD-4 吸着画分とし、ロータリーエバポレーターを用いて 30°C で減圧乾固を行い、乾燥重量を測定した後、脱塩水 28 ml で溶解し、-20 °C で保存した (3.3 倍濃縮液)。

### 3-2-5 強陰イオン交換樹脂アンバーライト IRA 400J による分画

3-2-4 で得られた XAD-4 通過画分をアンバーライト IRA 400J (IRA 400J; Dow Chemical, Midland, U.S.A.) を用いて分画した。脱塩水に一晩浸漬した IRA 400J を充填したガラスカラム (i.d. 30 x 280 mm) を 2,000 ml の 1 M 水酸化ナトリウムで平衡化し、OH型 IRA 400J として再生した。最終的には、IRA 400J は十分な脱塩水で置換した。そこへ、3-2-4 で得られた XAD-4 通過画分濃縮液 26 ml をチャージし、600 ml の脱塩水で通液することで得られた画分を IRA 400J 通過画分とした。ロータリーエバポレーターを用いて 30°C で減圧乾固を行い、乾燥重量を測定した後、脱塩水 26 ml で溶解し、-20 °C で保存した (3.3 倍濃縮液)。脱塩水で通液後、1 M 塩酸 600 ml で IRA 400J 吸着成分を溶出することで得られた画分を IRA400J 吸着画分とし、ロータリーエバポレーターを用いて 30°C で減圧乾固を行い乾燥重量を測定した後、脱塩水 26 ml で溶解し、-20 °C で保存した (3.3 倍濃縮液)。

### 3-2-6 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用いた分取

3-2-5 で得られた IRA 400J 吸着画分を、下記の条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及び分取カラムを用いて精製を行った。

分析システム：高速液体クロマトグラフィー; LC-10 AVP series (島津製作所, 京都)

分取カラム：Mightysil RP-18 GP 250-20 ; 粒径 5  $\mu\text{m}$ 、20 x 250 mm (関東化学, 東京)

カラムオープン温度：30  $^{\circ}\text{C}$

検出器：フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (SPD-M 10AVP 島津製作所, 京都)

検出波長 : 200- 400 nm

移動相 : 0.1% トリフルオロ酢酸 (0.1 % TFA)

流速 : 9.0 ml/min

試料導入量：400  $\mu\text{l}$

時間 : 90 min

IRA 400J 吸着画分 26 ml (3.3 倍濃縮液) を用いて HPLC 分取カラムによる精製を行った。試料は 1 回当たり 400  $\mu\text{l}$  を導入し、その操作を 60 回 (培養濾液 200 ml 分) 行った。その結果、図 3.2 a, b, c のクロマトグラムにおいて、4 つの主要ピークを確認した。保持時間 7.74 min のピークを Fraction 1 (Fr. 1) , 保持時間 25.03 min のピークを Fr. 2, 保持時間 43.93 min のピークを Fr. 3, 保持時間 55.92 min のピークを Fr. 4 として分取した。また、これらの画分以外の全ての時間に溶出した成分についても分取し、Fr. 5 とした。これらの画分はロータリーエバポレーターを用いて 35-40  $^{\circ}\text{C}$  で減圧乾固を行い、乾燥重量を測定した後、脱塩水 26 ml で溶解し、-20  $^{\circ}\text{C}$  で保存した (3.3 倍濃縮液)。

### 3-2-7 Zn 可溶化試験

3-2-2 の培養濾液及び 3-2-3～3-2-6 で得られた各画分は、日立鉾山の風乾沼土壌を用いた Zn 可溶化試験に供した。各画分の濃縮液を通常の培養濾液濃度になるように脱塩水で希釈・調製した後、培養濾液の pH と同様になるように、1 M 水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液によって pH を 5.7 に調整した。その後、各画分 1 ml をプラスチックチューブ (1.5 ml) 内で 0.2 g の風乾沼土壌と混和し、2 時間、150 rpm で振とうした。振とう後、卓上遠心機 (CHIBITAN-R; 日立工機, 東京) を用いて 6, 200 rpm で遠心分離を行い、土壌を沈降させ上清を得た。対照区として、RSM 液体培地と風乾沼土壌を混和し同様に処理したものを設定した。上記の処理により得られた上清は ICP 発光分析装置 (ICP) を使用して Zn を定量し、可溶化した Zn 量を土壌の重量当りに換算し算出した。また、対照区における Zn 溶出量と比較することで、各画分に含まれる物質による Zn 可溶化活性を評価した。各画分につき 3 反復測定し、平均と標準誤差を算出した。また、各処理間における Zn 可溶化活性は PASW Statistics Version 18 for Windows (IBM, Armonk, New York, U.S.A.) を用いて、Tukey-Kramer 法によって解析を行った。解析は 5 % の有意水準で行った ( $P < 0.05$ )。

### 3-2-8 ガスクロマトグラフィー (GC/MS) を用いた分析

精製した Fr. 2、3、及び 4 (20  $\mu$ g) を、trimethylsilyl (TMS) 化剤である 50  $\mu$ l の N-methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) とマイクロ試験管中でそれぞれ溶解し、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応後、以下の GC/MS 条件で TMS 化した Fr. 2、3、及び 4 の EI-MS スペクトルを測定し、ライブラリー検索により化学構造を推定した。TMS 化した各画分及び試薬は-TMS を付けて示す (例;

Fr.2-TMS) 。Fr. 2 及び 3 の標準物質として urocanic acid 及び L-leucine (500 µg) を 200 µl の MSTFA とマイクロ試験管内でそれぞれ溶解し、37 °C で 30 分間反応させた。反応後、以下の GC/MS 条件で urocanic acid-TMS 及び L-leucine -TMS の保持時間及び Electron ionization mass spectrometry (EI-MS) スペクトルを Fr. 2-TMS 及び Fr. 3-TMS と比較した。

分析システム： SHIMADZU GC/MS-QP2010 (島津製作所, 京都)

カラム : Rtx®-5MS (内径 0.25 mm x 30 m) (島津製作所, 京都)

カラムオープン温度： 80 °C (2 分保持), -250 °C (昇温速度：5°C/分)

試料導入量：2.0 µl

キャリアーガス：He

カラム流量：1.77 ml/min.

気化室温度：250°C

スプリット比：25

イオン源温度：200 °C

検出器電圧：1.5 keV

分析時間：60 分

使用したライブラリー：Wiley Registry™ of Mass spectral library, 9th Edition (Wiley, Hoboken, U.S.A.)

### 3-2-9 核磁気共鳴分光分析 (NMR)

Fr. 4 の NMR 分析には図 3.1 に従い培養濾液 200 ml を処理し得られた 7.4 mg を使用した。Fr. 4 (7.4 mg) を 600 µl の重水に溶解させた後、パスツールピペットで約 1 滴の重 TFA を添加し pH を低下させ、NMR 試料管 (スタンダードチュ

ーブ 5 mm、草野科学、東京) に入れ、テフロンキャップで封入した。試料は核磁気共鳴装置 (Bruker AVANCE-600, Billerica, Massachusetts, U.S.A.) を用いて  $^1\text{H}$ -NMR (600.133 MHz)、 $^{13}\text{C}$ -NMR (150.90 MHz)、DEPT、二次元 NMR として  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、及び HMQC 測定を行った。化学シフトは溶媒のシグナルを基準として決定した。本実験で用いた器具は十分に乾燥し、水の混入を最小限にした。

### 3-2-10 Electrospray ionization time-of-flight 型質量分析 (ESI-TOF-MS)

3-2-9 で NMR 分析に用いた試料 (Fr. 4, 7.4 mg) を回収し、VD-250F FREEZE DRYER (TAITEC, 埼玉) を用いて凍結乾燥を行った後、5 ml の水に再溶解し、以下の条件で分析を行った。

分析システム : Waters Synapt G2 (Waters, Milford, Massachusetts, U.S.A.)

試料流量 : 10  $\mu\text{l}/\text{min}$

試料コーン電圧 : 40 V

分析時間 : 10 min

走査時間 : 1.0 second

イオン源温度 : 40  $^{\circ}\text{C}$

測定モード : ポジティブモード及びネガティブモード

測定分子領域 : 50- 1200  $m/z$

### 3-3 結果

酢酸エチルによる抽出の結果、Zn 可溶化活性は水層に移行したことが確認された (図 3.1 及び 3.3)。この水層を XAD-4 を用いて通過画分と吸着画分に分画した結果、Zn 可溶化活性は XAD-4 通過画分に移行したことが確認された (図

3.1 及び 3.3) 。XAD-4 の通過画分を IRA 400J を用いて通過画分と吸着画分に分画した結果、Zn 可溶化物質は IRA 400J 吸着画分に移行したことが確認された (図 3.1.及び 3.3) 。以上の結果より、Zn 可溶化活性は最終的に IRA 400J 吸着画分に移行したことから、高極性の酸性化合物であると考えられた (図 3.1 及び 図 3.3) 。HPLC 分取カラムを用いて IRA 400J 吸着画分を精製した結果、4 つの主要なピークが確認された (図 3.2) 。3-2-6 に示した方法に従い Fr. 1, 2, 3, 4, 及び 5 として分画し、Zn 可溶化試験に供したところ、Fr. 1, 2, 3, 4, 及び 5 単独では Zn 可溶化活性は確認されなかったが (図 3.4) 、Fr. 1, 2, 3, 4, 及び 5 を再度混和して Zn 可溶化試験に供したところ、Zn 可溶化活性が確認された (図 3.4) 。次に画分を一つずつ減らすことで、Zn 可溶化試験を行ったところ、Fr. 1, 2, 3, 及び 4 の混和区に Zn 可溶化活性が確認され、Fr. 2, 3, 及び 4 の混和区にも Zn 可溶化活性が確認された (図 3.4) 。次に Fr. 2 及び 3 を混和して Zn 可溶化試験を行ったところ、Zn 可溶化活性は消失した (図 3.4) 。また、Fr. 2 及び 4 を混和し Zn 可溶化試験を行ったところ、Zn 可溶化活性は消失した (図 3.4) 。以上の結果から、Fr. 2, 3, 及び 4 の 3 画分を混和するときのみ Zn 可溶化活性が示されることが明らかとなった (図 3.4) 。また、Fr. 2, 3, 及び 4 はそれぞれ異なる特徴的な UV スペクトルを示した (図 3.2 d, e, f) 。3-2-6 での精製の結果、100 ml の培養濾液から Fr. 2 は 2.2 mg、Fr. 3 は 6.5 mg、そして Fr. 4 は 4.3 mg を単離することができた。

3-2-8 における GC/MS 分析の結果、Fr.-2-TMS は保持時間 26.6 分に確認され (図 3.5 a) 、本ピークの EI-MS スペクトル (図 3.6 a) をライブラリー検索した結果、Fr. 2-TMS は urocanic acid-TMS と 90 % の類似性が確認された。Fr. 2-TMS の EI-MS スペクトルにおける各分子イオンピークの基準ピーク ( $m/z$ : 73.1) に対する%は 267.1 (58.3%), 282.1 (29.0%), 147.1 (27.5%), 193.1 (25.3%), 165.1 (18.5%), 180.1

(16.0%), 268.1 (13.4%), 及び 75.1 (10.5%) であつた。標品の urocanic acid を TMS 化し、GC/MS に供したところ、urocanic acid-TMS は保持時間 26.5 分に確認され (図 3.5 b) このピークの EI-MS (図 3.6 b) における各分子イオンピークの基準ピーク ( $m/z$  : 73.1) に対する割合は 267.1 (70.8%), 282.1 (35.3%), 147.1 (31.2%), 193.1 (29.7%), 165.1 (20.1%), 180.1 (17.7%), 268.1 (15.5%), 及び 75.1 (11.7%) であつた。保持時間及び EI-MS スペクトルの類似性より、Fr.-2-TMS は urocanic acid-TMS と同定された。

3-2-8 における GC/MS 分析の結果、Fr. 3-TMS は保持時間 10.2 分にピークが確認され (図 3.7 a) 、このピークの EI-MS スペクトル (図 3.8 a)をライブラリー検索した結果、Fr. 3-TMS は L-leucine-TMS と 95 %の類似性が確認された。Fr. 3-TMS のスペクトルにおける各分子イオンピークの基準ピーク ( $m/z$  : 158.1) に対する割合は 73.1 (31.3%), 159.1 (17.1%), 102.1 (6.9%), 及び 147.1 (6.8%)であつた。標品の L-leucine を TMS 化し、GC/MS に供したところ、L-leucine -TMS は保持時間 10.2 分に確認され (図 3.7.b.) 、このピークの EI-MS スペクトル (図 3.8 b) における各分子イオンピークの基準ピーク ( $m/z$  : 158.1) に対する%は 73.1 (31.1%), 159.1 (18.5%), 102.05 (7.2%), 及び 147.05 (6.8%)であつた。保持時間及び EI-MS スペクトルの類似性より、Fr. 3-TMS は L-leucine -TMS であると同定された。

Fraction 4 は GC/MS 装置の試料導入部で結晶化したため、GC/MS 分析での分析が不可能であつた。従つて、種々の NMR 分析及び ESI-TOF-MS を使用し構造解析を試みたが、構造決定には至らなかつた。しかしながら、各分析によつて部分構造の類推は可能となつた。ESI-TOF-MS 分析の結果、Fr. 4 の分子量は 260.13 と推定され、分子式  $C_{11}H_{20}N_2O_5$  の計算値 260.18 に最も近い値を示した。 $C_{11}H_{20}N_2O_5$  の不飽和度は 2 であつた。また、NMR 分析の結果 (表 3.1) より、 $^1H$ -NMR において 9.38 ppm にシングレット (s) のシグナルが確認された。また

$^1\text{H-NMR}$  より、6.58 ppm にダブルット(d)、6.81 ppm にダブルット (d)、7.11 ppm にダブルット (d)、及び 7.43 ppm にダブルット (d) のシグナルが確認された。 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  の結果及び  $^1\text{H-NMR}$  のカップリング定数より、6.58 ppm と 7.43 ppm、6.81 ppm と 7.11 ppm は隣接するカーボンに直結するプロトンであることが確認され、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMQC び DEPT の結果を踏まえると、2 重結合性のプロトンが存在することが考えられた。また  $^1\text{H-NMR}$  より、2.79 ppm にトリプルダブルット (td) 、2.97 ppm にダブルダブルット (dd) 、3.24 ppm にダブルトリプレット (dt) 、そして 3.46 ppm にダブルトリプレット (dt) のシグナルが確認された (表 3.1) 。また、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  の結果より、2.79 ppm と 2.97 ppm、3.24 ppm と 3.46 ppm は接したプロトンであることが確認され (表 3.1) 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$  及び DEPT の結果を踏まえると、単結合性の炭素鎖の存在が示唆された。他の 4.60 ppm、3.96 ppm のプロトンはシングレットであることから、構造内に炭素と窒素の直結した結合を有する可能性も示唆された。長距離の  $^{13}\text{C}$  と  $^1\text{H}$  の相関が確認できる Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) の分析を行うことで、さらなる構造解析が行えると考えられたが、分析量の不足のため HMBC は測定できなかった。また、Fr. 4 のシリカゲル薄層板にスポットし、0.2% ニンヒドリンエタノール溶液を噴霧し加熱たところ (Merck 株式会社, 2006) 、ニンヒドリン反応の呈色が確認されたことから、アミノ基の存在が確認された。以上の結果を総合すると、Fr. 4 は二重結合、単結合性の鎖状炭素、C-N 結合、およびアミノ基を有する物質であると考えられた。

#### 3-4 考察

*Pseudomonas putida* は複数の siderophore を産生することが知られている (Varma and Chincholkar 2007) 。 Siderophore とは微生物や植物が産生する不溶態

の Fe と錯体化し可溶化させる低分子量の化学物質の総称であるが、siderophore の中には pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) のように Fe 以外の元素と錯体化し可溶化させる物質も確認されている (Cornelis 2010)。一般的に、siderophore は Fe と 1 : 1、もしくは 2 : 1 の割合で結合すること知られている (Miethke and Marahiel 2007 ; Stolworthy *et al.* 2001)。例として、*Pseudomonas* 属細菌が産生する siderophore で最も有名なペプチド系化合物である pyoverdine は 1 : 1 で強固に Fe と錯体化することが知られている (Meyer 2000)。一方、PDTC は Fe とは 2 : 1 で錯体化するにもかかわらず、Zn とは 1 : 1、もしくは 2 : 1 で錯体化することが確認されている (Cortese *et al.* 2002)。また、単一の物質ではなく、複数の物質が錯体形成に関与している事例として cepabactin 及び pyochelin が挙げられる。Cepabactin は *Pseudomonas cepacia* が産生する siderophore であり (Meyer *et al.* 1989)、cepabactin 単独でも 3:1 の割合で Fe と錯体を形成する (Klumpp *et al.* 2005)。Pyochelin はサリチル酸由来の siderophore であり (Bultreys 2007)、*Pseudomonas* 属細菌では *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, 及び *P. cepacia* が産生することが知られている (Cox *et al.* 1981; Meyer *et al.* 1989)。Pyochelin は Fe と 1:1、もしくは 2:1 で錯体を形成する (Brandel *et al.* 2012)。このように cepabactin 及び pyochelin は単独でも Fe と錯体を形成することが報告されているが、Klumpp *et al.* (2005) は Fe、cepabactin、及び pyochelin は 1 : 1 : 1 で錯体を形成すると報告している。本章において Fr. 2、Fr. 3、及び Fr. 4 は其々単独では土壌中の Zn を可溶化させなかったが、3 種の化合物が混和することによって、初めて Zn の可溶化が確認された (図 3.4)。これら 3 種の物質は HPLC 分析の UV スペクトルの結果から、構造は異なることが確認された (図 3.1 e, f, g)。

Fraction 2はGC/MSの結果、urocanic acidであることが明らかになった。Urocanic acidはHistidineの異化代謝経路の代謝産物であり (Norval *et al.* 1989)、*P. putida*

においても産生することが知られている (Wheelis and Stanier 1970)。この urocanic acid は Zn と 1 : 1、もしくは 2 : 1 で結合することが報告されている (Okabe and Sasaki 1995)。

Fraction 3 は GC/MS の結果、L-leucine であることが明らかになった。一般的に  $\alpha$ -アミノ酸は自身の持つアミノ基やヒドロキシル基を用いて金属、特にアルカリ金属と弱い五員環錯体構造を形成することが知られている (Shimazaki *et al.* 2009)。例として Ca はアミノ酸 (glycine, alanine, valine, leucine, methionine, 及び proline) と 1:2 の割合で結合することが報告されている (Fox *et al.* 2007; Daniele *et al.* 2008)。また、アミノ酸単体で錯体形成するのみではなく、ペプチドとなることで Cu, Ni, 及び Zn といった重金属と結合することが知られている (Rajković *et al.* 2008)。例として、histidine-histidine-valine-glycine-asparagine のペプチドは Zn と結合することが報告されている (Kállay *et al.* 2007)。本章で明らかになった Fr. 3 の L-leucine は、Zn と 2 : 1 で結合することが知られている (Wargner and Baran 2009; Auld, 2001)。

Fraction 4 の構造決定はできなかったが、種々の解析の結果、分子量は 260、分子式は  $C_{11}H_{20}N_2O_5$  と推定され、部分構造として二重結合、単結合性の鎖状炭素、C-N 結合、およびアミノ基を有する物質であると考えられた。Fr. 4 の解析が困難であった理由として、類縁体の混在が考えられたが、このような現象に類似した低分子量物質としてアミノ酸系代謝産物である mugineic acid があげられる。mugineic acid は大麦の根の洗液より単離された強い Fe キレート能を有する物質であることが知られている (Takemoto *et al.* 1978)。また mugineic acid は Fe のみではなく、Zn, Cu, 及び Ni と錯体構造を形成することが知られており (Haydon and Cobbett 2007; Suzuki *et al.* 2006)、Al と錯体形成する可能性が指摘されている (Yoshimura *et al.* 2011)。Mugineic acid の一種であり、Co と錯体構造

を形成する 2'-deoxymugineic acid において類縁体は 5 種類存在する。(西丸 2006)。本研究においてもこのような類縁体の存在が NMR の結果に大きな影響を及ぼした可能性が示唆された。また、構造決定の解析が困難であったもう一つの理由として、K の混入の可能性が考えられる。Zn の可溶化試験において直前に pH 調整を行うが、その際に本研究では 1 M NaOH を使用した (3-2-7)。予備試験時に、1 M 水酸化カリウム (KOH) で pH 調整を試みたところ、Zn 可溶化活性が確認されるはずの IRA 400J 吸着画分においても Zn 可溶化活性が消失した。この現象は K と Zn の可溶化物質が強く結合することに起因すると推測された。本実験で使用した脱塩水は Elix UV 純水装置 (Elix UV3; Merck Millipore, Billerica, U.S.A.) により作製したが、この装置で作製される純水は超純水ではないため、分離操作の段階で使用した脱塩水に含まれていた微量の K が最終的に濃縮され、NMR の結果に影響を及ぼした可能性も考えられた。

以上のことから、*P. putida* の産生する urocanic acid, L-leucine 及び未同定の Fr. 4 が協力的に作用することで Zn 可溶化活性が示されたことが明らかとなった。構造が明らかになった Fr. 2 の urocanic acid 及び Fr. 3 の L-leucine は単独で Zn と錯体構造を形成することが報告されている (Okabe and Sasaki 1995; Auld 2001) が、これらの物質と Zn の錯体形成についての実験で使用されている Zn は  $ZnCl_2$  や  $ZnSO_4$  といった可溶性の Zn であり不溶態 Zn ではない。一般的に知られている土壌中の Zn の形態は交換態 Zn が 1~2%、無機結合態が 2~3%、有機結合態が 5~10%、遊離酸化物吸蔵態が 10~30%、残差画分が 60~80% と言われ (Tessier *et al.* 1979 ; 定本 1994)、可溶性 Zn (交換態 Zn) の割合が圧倒的に低いことが知られているため、urocanic acid、L-leucine、未同定の Fr. 4 の関与した Zn の可溶化には既往の報告とは別のメカニズムが推測される。

### 3-5 要約

接種試験によって *P. putida* は土壌中の不溶態 Zn を可溶化させたことが確認された。*P. putida* の接種によって土壌中の pH は低下しなかったにも拘らず、土壌中の交換態 Zn 量には有意な増加が確認されたことから、*P. putida* は何らかの化学物質を産生することによって土壌中の不溶態 Zn を可溶化させたと考えられた。そこで、*P. putida* の産生する土壌中の不溶態 Zn の可溶化物質を培養液より単離・同定を試みた。

*P. putida* 培養濾液を酢酸エチル抽出、XAD-4、及び IRA 400J によって分画し、HPLC 分取カラムによって Zn 可溶化物質の精製を行ったところ、3 種の化学物質が単離された。これら 3 種の物質が同時に存在するときのみ Zn 可溶化活性が確認された。GC/MS 分析によって Fr. 2 は urocanic acid、Fr. 3 は L-leucine と同定された。Fr. 4 の構造を決定することはできなかったが、*P. putida* の関与するドクゼリの Zn 吸収メカニズムには、*P. putida* の産生する urocanic acid, L-leucine 及び未同定の Fr. 4 が関与していると考えられた。

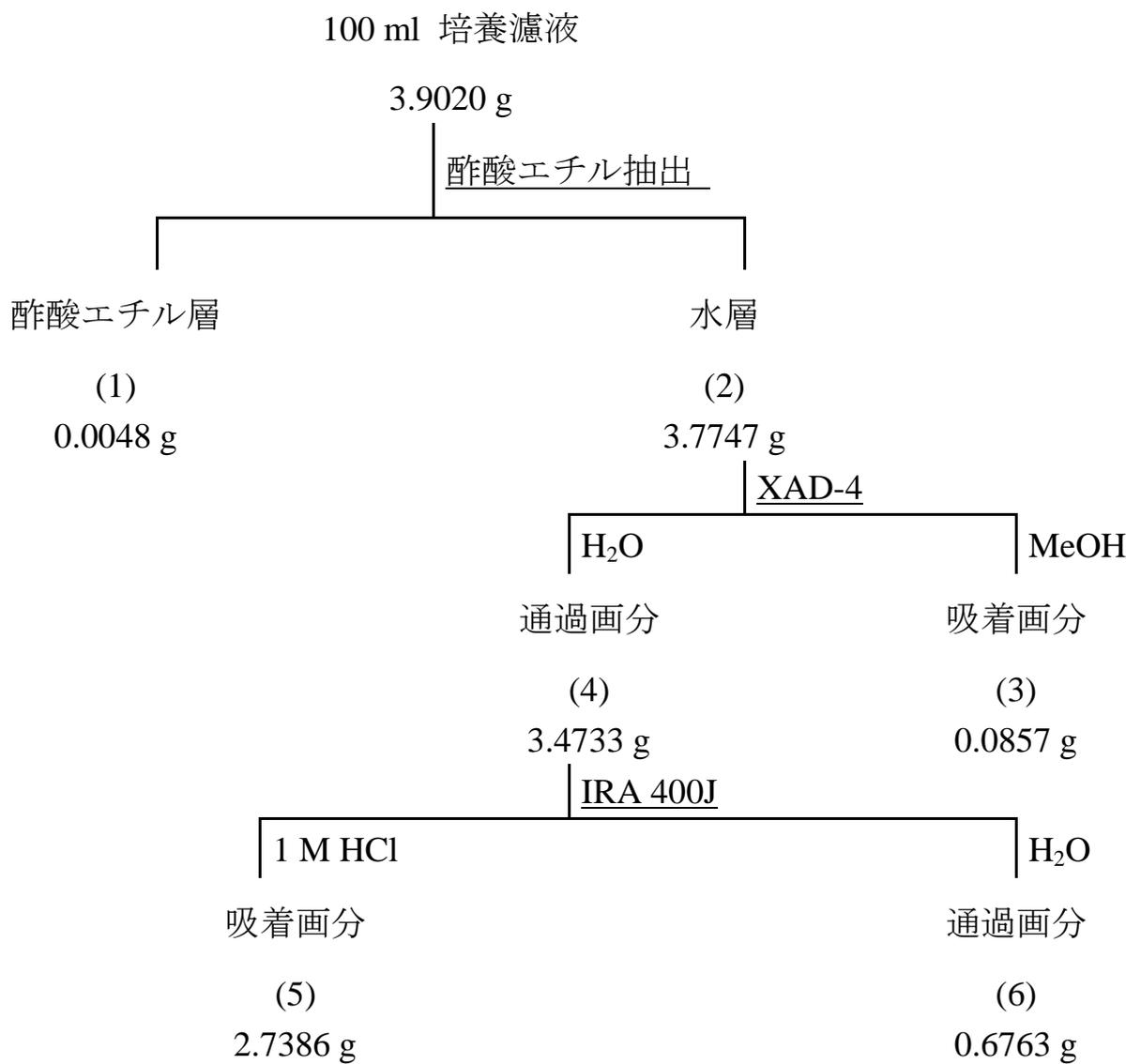


図 3.1 Zn 可溶化物質の分画スキーム

各画分は(1)-(6)で便宜上示す。数値は各画分の乾燥重量を示す。

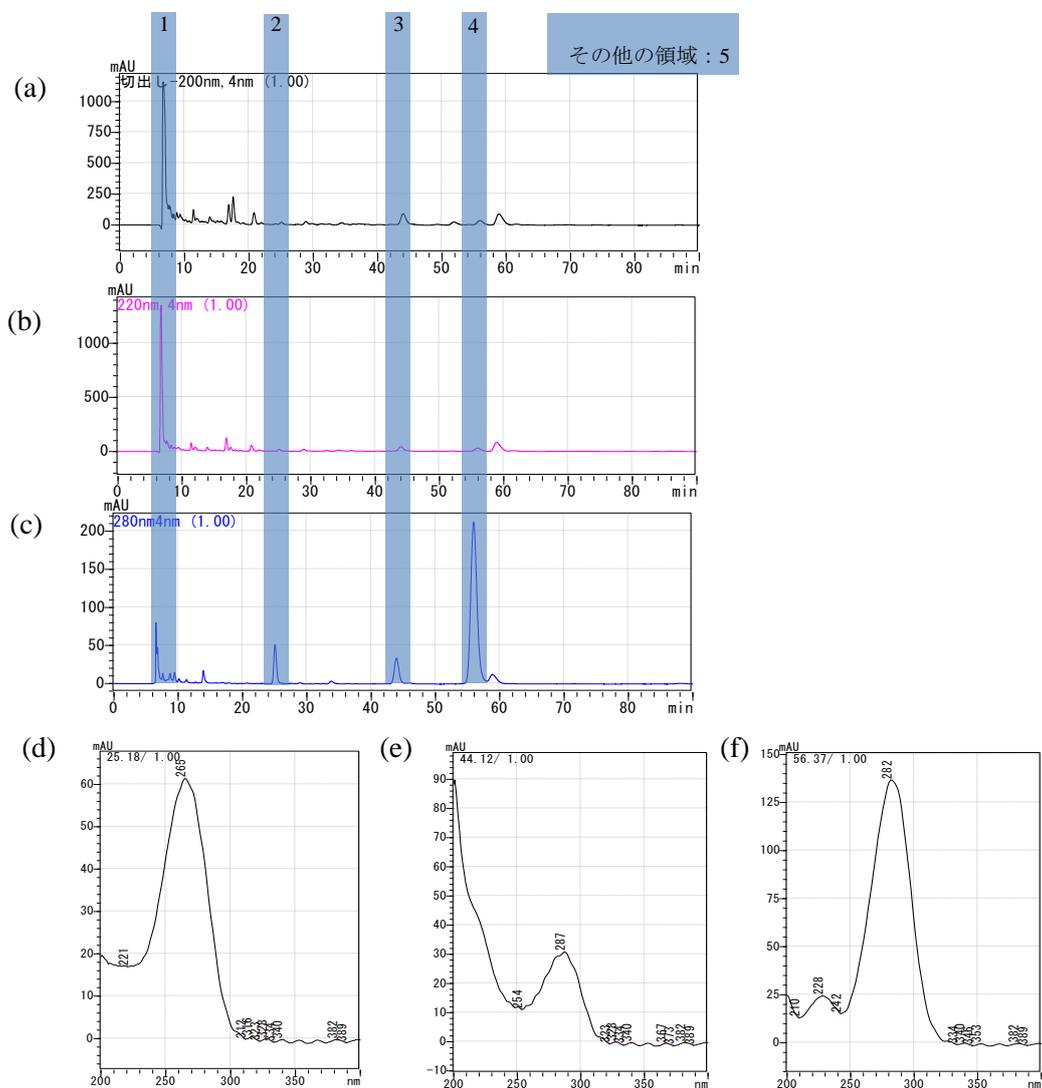


図 3.2 HPLC クロマトグラム及び Fr. 2, 3, 及び 4 の UV スペクトル  
HPLC クロマトグラム及び各ピークの UV スペクトルを示す。(a) は 200 nm のクロマトグラム、(b) は 220 nm のクロマトグラム、(c) は 280 nm のクロマトグラムを示す。主要な 4 つのピークを Fr. 1 (7.74 min) , Fr. 2 (25.03 min) , Fr. 3 (43.93 min) , 及び Fr. 4 (55.92 min) とし、それ以外のすべての溶出部を Fr. 5 とした。(d)は Fr.2、(e)は Fr.3、(f)は Fr.4 の UV スペクトルを示す。

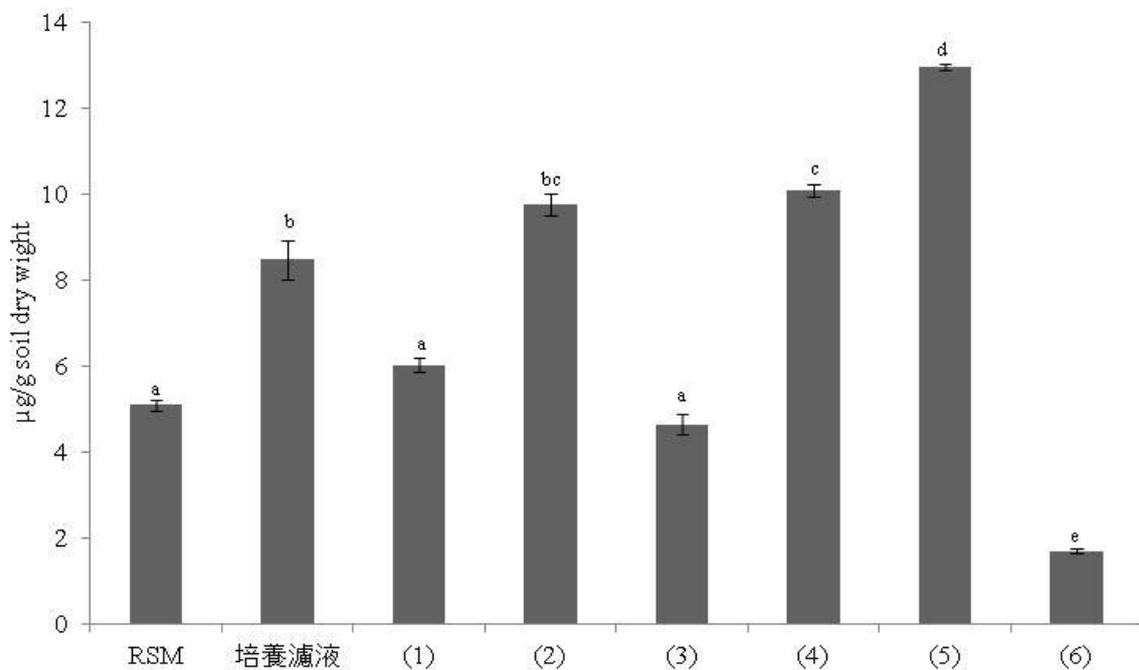


図 3.3 各画分の Zn 可溶化活性

図 3.1 の各画分の Zn 可溶化活性の結果を示す。RSM は RSM 液体培地のみの Zn 可溶化活性を対照区として示し、培養濾液は *P. putida* の培養液（分画前）の Zn 可溶化活性を示す。(1) から (6) の数字は図 3.1 の各画分を示す。棒グラフ上のアルファベットは、ANOVA post-hoc test (Tukey-Kramer method) による解析結果を示す ( $P < 0.05$ )。図中のエラーバーは標準誤差を示す。

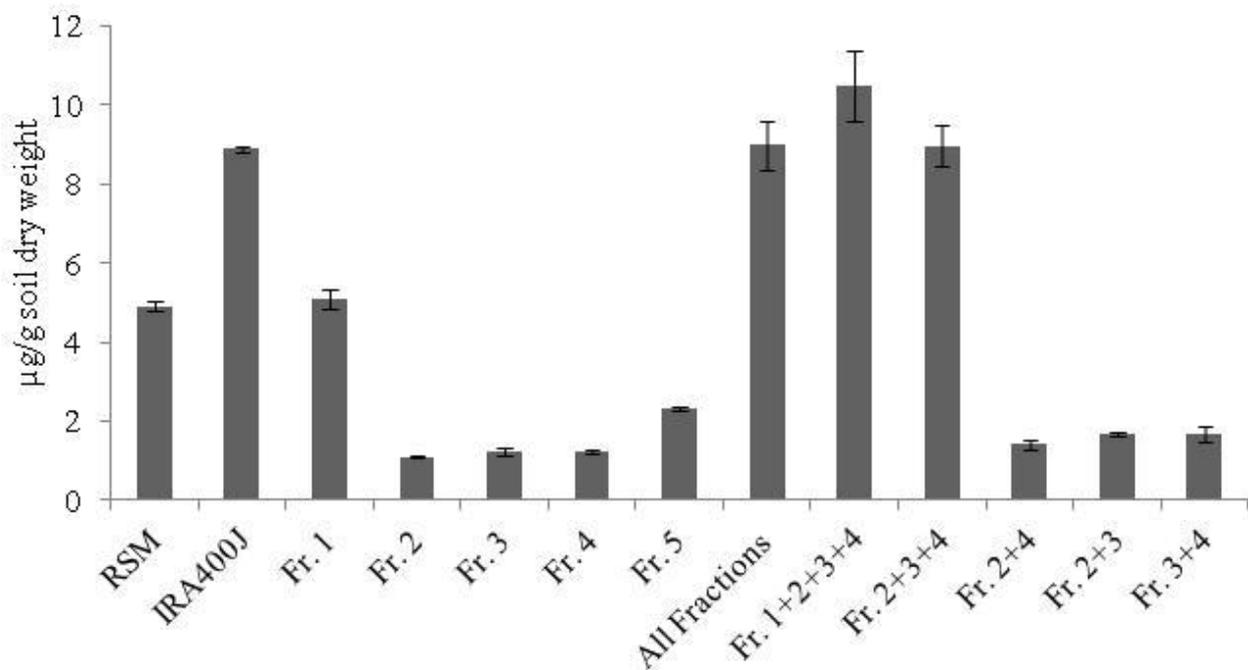


図 3.4 HPLC 分取カラムによって得られた各分画の Zn 可溶化活性  
 図 3.1 のスキームに従い、分離した各画分の Zn 可溶化活性を示す。RSM は RSM 液体培地のみでの Zn 可溶化活性を示す。IRA400J は IRA400J の吸着画分 (図 3.1 及び 3.2 における (5) に相当) の Zn 可溶化活性を示す。Fr. 1-5 は図 3.2 a, b, 及び c における Fr. 1 から 5 を示す。図中の All Fractions は Fr. 1 から 5 を再度混和したものを示す。図中のエラーバーは標準誤差を示す。

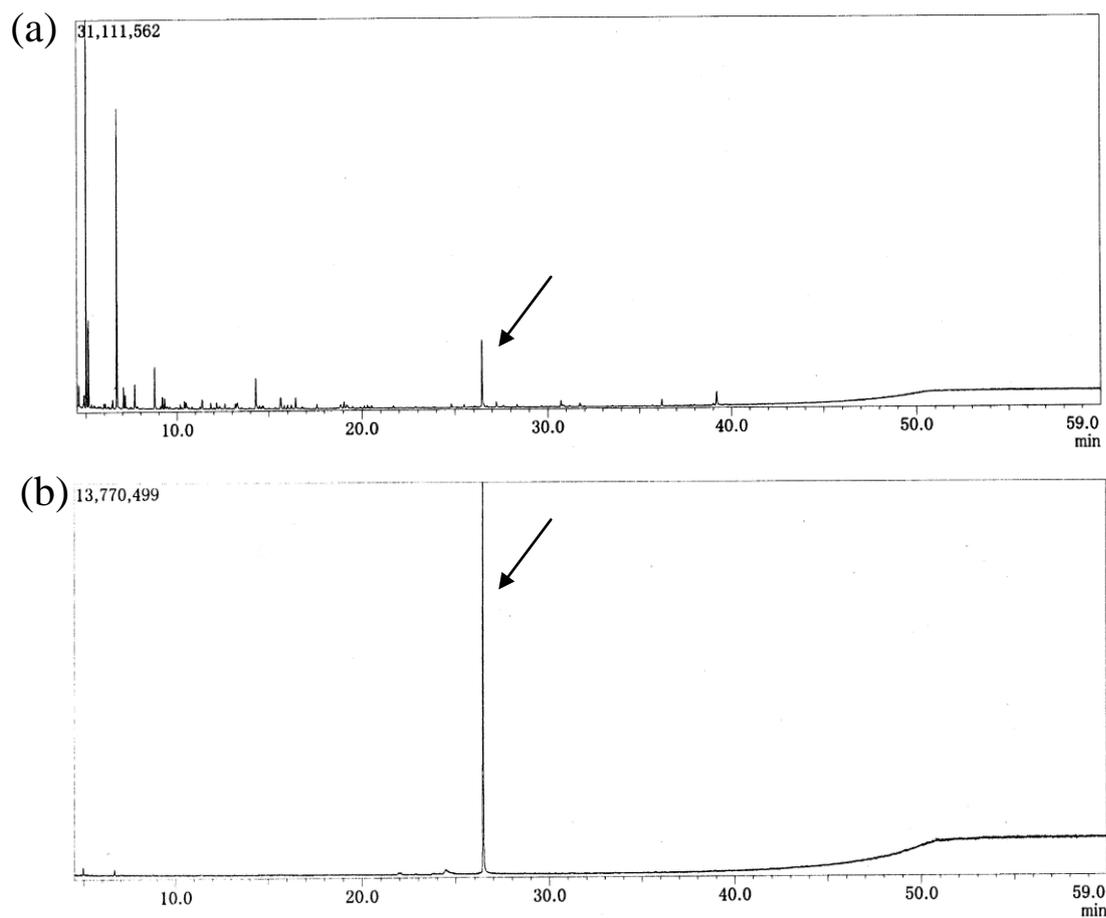


図 3.5 Fr. 2-TMS 及び urocanic acid-TMS の GC クロマトグラム

(a) は Fr. 2-TMS の GC クロマトグラム (矢印は Fr. 2-TMS のピーク、保持時間 26.6 min) を示し、(b) は urocanic acid-TMS の GC クロマトグラム (矢印は urocanic acid-TMS のピーク、保持時間 26.5 min) を示す。

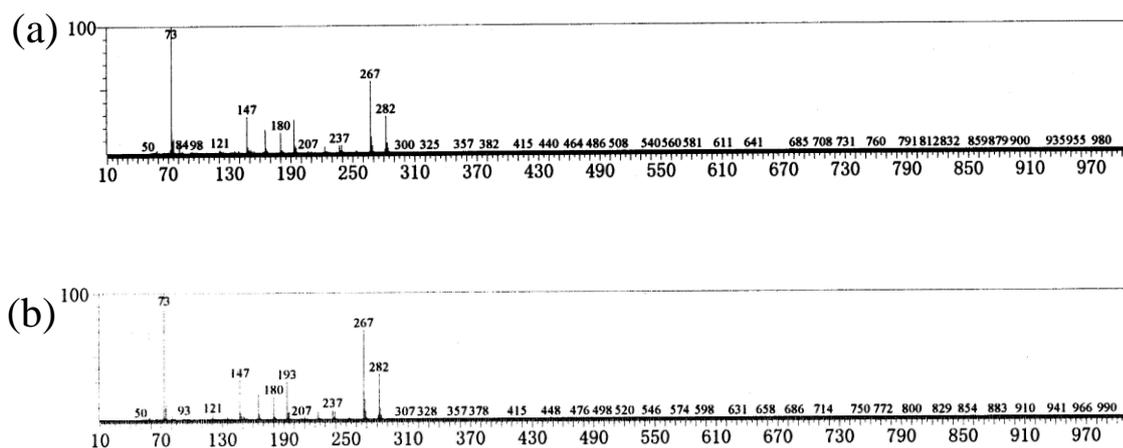


図 3.6 Fr. 2-TMS 及び urocanic acid-TMS の EI-MS スペクトル

(a) は Fr. 2-TMS の EI-MS スペクトルを示し、(b) は urocanic acid-TMS の EI-MS スペクトルを示す。

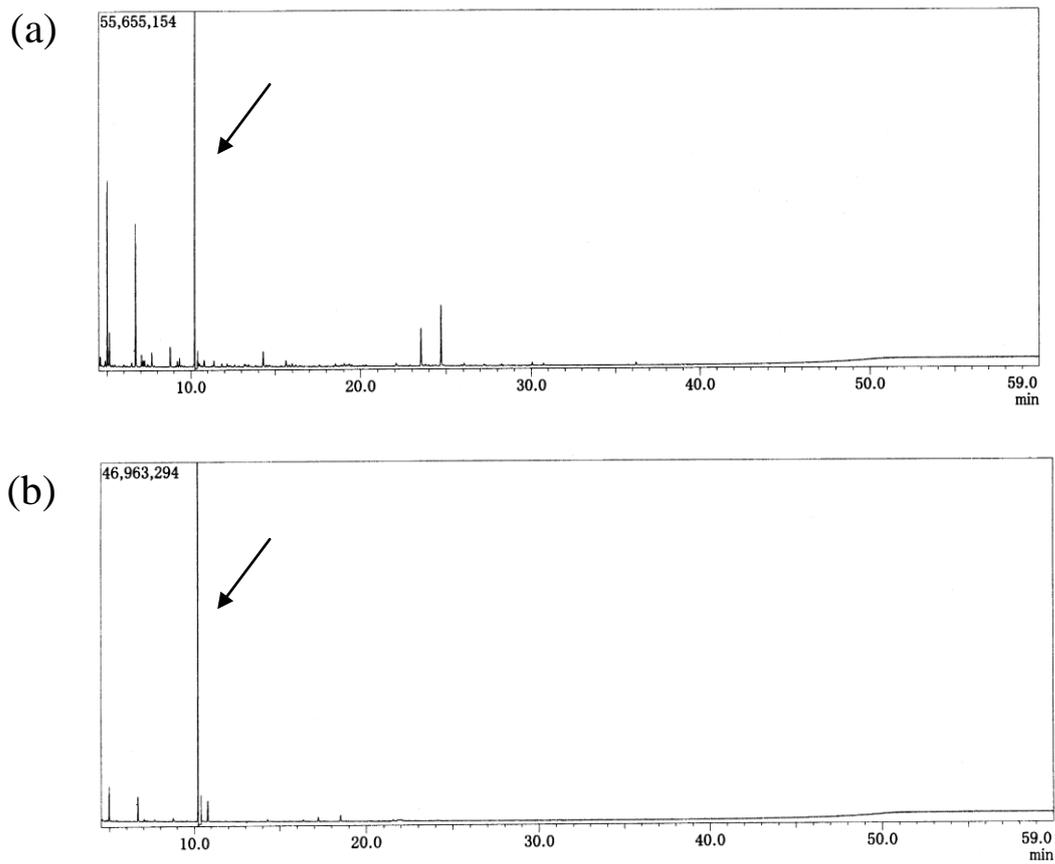


図 3.7 TMS 化した Fr. 3 及び L-leucine の GC スペクトル

(a) は Fr. 3-TMS の GC クロマトグラム (矢印は Fr. 3-TMS のピーク、保持時間 10.2 min) を示し、(b) は L-leucine-TMS の GC クロマトグラム (矢印は L-leucine-TMS のピーク、保持時間 10.2 min) を示す。

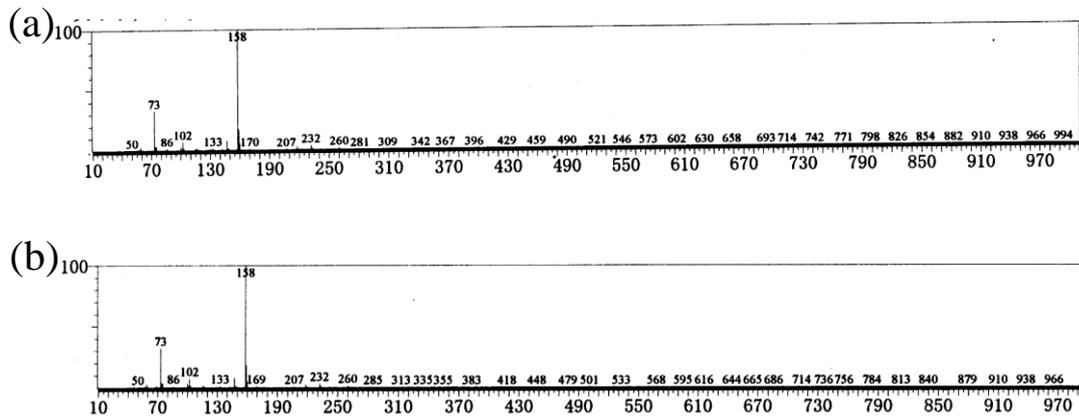


図 3.8 Fr. 3-TMS 及び L-leucine-TMS の EI-MS スペクトル

(a) は Fr. 3-TMS の EI-MS スペクトルを示し、(b) は L-leucine-TMS の EI-MS スペクトルを示す。

表 3.1. Fraction 4 の NMR データ (D<sub>2</sub>O + D-TFA)

|    | <sup>1</sup> H-NMR       | <sup>13</sup> C-NMR | DEPT            | <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY |
|----|--------------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------------|
| 1  | 9.36 (s)                 | 181.80              | CH              | —                                   |
| 2  | 7.43 (d, <i>J</i> = 3.7) | 128.09              | CH              | 6.58                                |
| 3  | 7.11 (d, <i>J</i> = 8.5) | 132.10              | CH              | 6.81                                |
| 4  | 6.81 (d, <i>J</i> = 8.5) | 117.22              | CH              | 7.11                                |
| 5  | 6.58 (d, <i>J</i> = 3.7) | 112.25              | CH              | 7.43                                |
| 6  | 4.60 (s)                 | 57.35               | CH <sub>2</sub> | —                                   |
| 7  | 3.96 (s)                 | 48.83               | CH <sub>2</sub> | —                                   |
| 8  | 3.91 (s)                 | 53.39               | CH              | 3.62                                |
| 9  | 3.62 (s)                 | 53.69               | CH              | 3.91                                |
| 10 | 3.46 (dt)*               | 44.49               | CH <sub>2</sub> | 3.24                                |
| 11 | 3.24 (dt)*               | 47.72               | CH <sub>2</sub> | 3.46                                |
| 12 | 2.97 (dd)*               | 44.49               | CH <sub>2</sub> | 2.79                                |
| 13 | 2.79 (td)*               | 44.49               | CH <sub>2</sub> | 2.97                                |
| 14 | 1.33 (d)*                | 20.49               | CH              | 4.30                                |

\*微小シグナルであり、重水中の分析であったため、シグナルがブロードとなった。そのため、カップリング定数については正確な値を示したとはいえなかったため、表からは割合した。

#### 第4章 総合考察

重金属による土壌汚染は日本のみの問題ではなく、世界的な問題である (畑 2008)。日本においても重金属汚染は平成 22 年度届け出の 75%、平成 14 年から 22 年までの特定有害物質別の要措置区域等指定件数累計届け出の 72%を占め、その大半の事例において汚染原因が不明とされており、根深い問題であることが伺える (環境省 水・大気環境局 2010a)。このような汚染土壌を修復する方法として客土の様な物理的な手法のみならず、近年はより環境負荷の少なく、低コストな方法として植物や微生物を用いた生物的手法について研究がなされている。一つの例として植物を利用した **phytoremediation** が挙げられる。重金属を対象とした **phytoremediation** として、土壌中の重金属を植物内に吸収させる **phytoextraction**、及び重金属耐性植物を生育させることで汚染土壌の流亡を防ぐ **phytostabilization** が定義されている (Charny *et al.* 1997)。中でも、汚染土壌から植物体内へ重金属を移行・蓄積させた後植物を刈り取ることで、汚染土壌を直接浄化できる **phytoextraction** は、盛んに研究が行われているが、**phytoextraction** は土壌中からの重金属の吸収量が極めて低く、効率が悪いとされるため、これを改善するために根圏に生息する微生物を利用する手法が探られている。

植物の根の周辺約 1-2 mm の領域は根圏 (**Rhizosphere**) と定義されている (Rovia and Bowen 1966; Pinton *et al.* 2001)。根圏は植物根より滲出される糖、アミノ酸やフェノール性物質などの影響を直接受けるため非根圏土壌とは化学的な環境が異なる (Brimecombe *et al.* 2001)。そのような特殊な根圏環境は、根圏土壌に生息する微生物の種や数 (Kroon and Visser 2003)、微生物活性、及び有機物量 (木村 1998) に影響を及ぼすことが報告されており、その影響を根圏効果と言う (Curl and Truelove 1986)。根圏効果を受けた細菌 (根圏細菌) の中には植物の生育に有用な根圏細菌が存在していること確認されており、そのような

根圏細菌は PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) と定義される (Ryan *et al.* 2008)。PGPR の植物に対する性の影響として、1) 植物ホルモンの産生、2) siderophore の産生、3) 窒素固定能、4) 酵素及び低分子量物質の産生、及び 5) 無機化合物の可溶化が挙げられ (Glick 1995)、作物の生産の向上やストレス環境での生育改善といった影響があることが知られている (Sturz *et al.* 2000)。そういった根圏細菌の中でも、植物組織内部に生息する内生細菌は、植物ホルモンの産生、窒素固定能、そして栄養元素の吸収促進を誘導することで植物の環境ストレス耐性を誘導することが知られている (Vessey *et al.* 2003)。また、内生細菌は、顕著に病原性や共生を示さず植物の組織内に生息する (木村 1998) ことで植物の防御機構を誘導し、結果として植物の環境ストレス耐性を増強させていると考えられる (Schulz and Boyle 2006)。こういった内生細菌の中には siderophore や有機酸といった低分子量の二次代謝産物を産生することで植物の重金属吸収促進に関与していることが知られている (Ma *et al.* 2011)。

実際の重金属環境で生育する植物の中には内生細菌の能力によって重金属蓄積が促進されている植物が存在している可能性が高いと考えられたことから、本研究ではこのような内生細菌を探索するために、重金属汚染環境である日立鉱山中腹の沼で優占的に生育しているドクゼリ着目した。長田 (2008) によると、ドクゼリが優占的に生息する日立鉱山沼の土壤に含まれる年間の有重金属濃度 (最小値-最大値) は Cu は 760-993  $\mu\text{g/g dry weight (D.W.)}$ 、Ni は 20-26  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Zn は 273-454  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Cd は 16-27  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Pb は 670-798  $\mu\text{g/g D.W.}$  であり、特に Cu, Zn, 及び Pb が高濃度で含まれていることを報告した。He *et al.* (2005) は、一般的な非汚染土壤に含まれる重金属量を、Cu は 20  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Ni は 10-150  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Zn は 40  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Cd は 0.06  $\mu\text{g/g D.W.}$ 、Pb は 10-150  $\mu\text{g/g D.W.}$  であると報告している。He *et al.* (2005) の報告による非汚染土壤と比較して、日立鉱山沼

の土壌は Cu, Zn, そして Pb によって高濃度で汚染されていることが確認された。日立鉾山沼で生育しているドクゼリは 6 月から 8 月にかけて生育を行い、8 月に成長は最大に達し、9 月に虫害によって生育が減退していることが明らかになった。また、成長が最大であった 8 月のドクゼリの節根においては、Zn 濃度 (7,542  $\mu\text{g/g}$ ) が最大となっていることが明らかとなった。この濃度は植物の成長阻害を起こす Zn 濃度であるにもかかわらず、ドクゼリは顕著な生育阻害を受けることなく生育を続けていたことが野外観察により確認された。また、Zn 濃度が最も高かった 8 月のドクゼリの節根から内生細菌を 1 % Nutrient broth agar 及び 1 % Yeast glucose agar 培地で分離したところ 54 菌株が分離され、そのうち 20 菌株が土壌中の不溶態 Zn を可溶化させる能力を有することが明らかになった。これらの菌株は極端な pH 低下無しに土壌中の不溶態 Zn を可溶化していたことから Zn の可溶化はプロトン放出によるものではなく、菌株により産生された化学物質によるものである可能性が高いことが示唆された。以上のことから、ドクゼリにおける高濃度の Zn 吸収にこれらの内生細菌の産生する化学物質が関与している可能性が示唆された (長田 2008)。さらに、16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的分類の結果より、最も高い Zn 可溶化能力を示した株は *Pseudomonas putida* 及び *Rhodopseudomonas sp.* であることが確認された (加藤 2010)。

以上の結果を踏まえ本研究では、内生細菌の関与したドクゼリにおける Zn 吸収メカニズムを解明することを目的とした。最初に、高い Zn 可溶化能力を示した *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas sp.* をドクゼリの実生に接種することによって Zn の吸収促進が起こるかを検証した。接種試験の結果、*P. putida* が土壌中の交換態 Zn 量を増加させ、ドクゼリ実生における Zn 吸収を促進させたことが確認されたことから、*P. putida* が産生する Zn 可溶化物質の単離・同定を行った。

本研究では第 2 章で *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas sp.* を滅菌条件下でドクゼ

りの滅菌実生に接種し、現地の重金属土壌において生育させることで滅菌実生の Zn 吸収における内生細菌の影響を明らかにすることを目的とした試験を行った。その結果、*P. putida* の接種によって実生の地上部及び根部の新鮮重量、葉の数、茎の分岐、及び茎長の有意な増加が確認された (図 2.1 及び表 2.1)。また、地上部において K、根部において Mg の有意な吸収促進 (表 2.2) 及び *P. putida* による IAA の産生が確認された。*Pseudomonas putida* を接種することで、実生地上部及び根部の全重金属濃度の有意な増加は確認されなかったが (表 2.3)、実生根部において Zn 量の有意な吸収促進が確認された (表 2.4)。また、接種によって土壌中の pH の変動なしに交換態 Zn 及び Pb 量が増加したため (表 2.5)、*P. putida* は土壌中の不溶態 Zn を可溶化することで実生の Zn 吸収を促進をすることが確認された。実生の Zn 濃度に有意な差が確認されなかった理由として、希釈効果が考えられた。希釈効果とは植物の生育が急速であるとき、植物中の無機元素濃度が減少する現象と定義される (Larcher 2003)。*Pseudomonas putida* を接種した実生は IAA 及び栄養元素吸収促進によって急速に生育したため、実生の各含有重金属濃度が希釈効果によって見掛け上希釈された結果、接種区と対照区の実生の含有 Zn 濃度には有意な差が確認されなかったと考えられた。

一方、*Rhodopseudomonas sp.* の接種によっては実生の根部の新鮮重量、葉の数、茎の分岐、及び茎長の有意な増加が確認されたが、地上部の新鮮重量では有意な増加は確認されなかった (図 2.1 及び表 2.1)。また、実生根部における Mg の有意な吸収増加 (表 2.2) 及び *Rhodopseudomonas sp.* による IAA の産生が確認された。*Rhodopseudomonas sp.* を接種することで、実生地上部及び根部の有意な増加は確認されず (表 2.3)、根部において Ni 及び Pb の重金属量の有意な吸収促進は確認された (表 2.4)。実生根部における Zn 量の有意な吸収増加は確認されなかった ( $p = 0.07$ )。また、接種によって土壌中の pH の変動なしに不溶態重金

属が可溶化され、交換態 Zn 及び Cd の増加が確認された (表 2.5)。交換態 Zn が増加しているのにもかかわらず、実生中の Zn 濃度に有意な差が確認されなかった理由として *P. putida* と同様に希釈効果が考えられた。

本研究において *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas* sp. はドクゼリの実生に対して2種類の影響を示すことが確認された。一つは IAA 産生及び栄養元素を吸収促進することによる実生成長の増加への寄与であり (図 2.1 及び表 2.1)、もう一つは土壌中の不溶態 Zn の可溶化による実生根部への Zn 吸収促進であった (表 2.5)。*Pseudomonas* 属細菌には PGPR としての機能を有する菌株が多数知られている (Ryan *et al.* 2008)。PGPR の機能として *P. putida* は重金属ストレス環境下で IAA 産生、ACCDe 活性、また Siderophore 産生を示すことが知られている (Glick 2010)。例として、Tripathi *et al.* (2005) は Cd 及び Pb 添加土壌で *P. putida* KNP9 を *Phaseolus vulgaris* へ接種したところ、IAA 産生、ACCDe 活性、及び Siderophore の産生が確認されたと報告している。また、Rodriguez *et al.* (2008) は Ni 汚染土壌において *Brassica napus* に *P. putida* HS-2 を接種したところ、IAA 産生、ACCDe 活性、及び Siderophore の産生が確認されたと報告している。*Rhodopseudomonas* 属細菌においては、*Rhodopseudomonas* sp. KL9 及び *Rhodopseudomonas* sp. BL6 が IAA 及び 5-aminolevulinic acid (ALA) を産生したことが報告されている (Koh and Song 2007)。また、*Rhodopseudomonas* sp. KL9 をトマトの苗に接種することで地上部及び根部において成長促進が確認されたと報告されている (Lee *et al.* 2008)。第 2 章においても、重金属土壌において生育するドクゼリ実生に *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas* sp. を接種した際に、PGPR としての能力によってドクゼリ実生の成長促進及び Zn 吸収量の増加が確認されたと考えられた。

第 2 章において、実生個体当たりの Zn 吸収量の増加は確認されたが、濃度の顕著な増加は確認されなかったことを希釈効果 (Larcher 2003) によって考察して

きた。重金属耐性の点から推測を含め考察すると、この希釈効果による実生体内のZn濃度の減少はZnの毒性低下に関与する可能性が高い。接種試験において実生の含有Zn濃度は503.32 µg/gであったが（表 2.3）、一般的な植物に対して毒性を示すZn濃度は20 - 100 µg/gであり（Fox and Guerinot 1998）、陸上植物全般では10 - 400 µg/g (Larcher 2003) であると報告されていることから、ドクゼリ実生におけるZn濃度の減少は間接的にZn耐性に寄与していると示唆された。一方、日立鉱山沼に生息する成熟個体のドクゼリの節根には7,542 µg/gという高濃度でZnが蓄積されていたが正常に生育していたことから（長田 2008）、成熟個体には高濃度のZn蓄積に対して植物自体が何らかの耐性機構を有する可能性が考えられる。一般的に幼植物は成熟個体に比べて重金属耐性が低いと言われているが（Li *et al.* 2005）、第2章で確認された内生細菌接種による実生成長の増加は、成熟個体の耐性機構を有していない実生にとって生残への大きな寄与となる可能性も考えられた。

また、一般的に植物の重金属耐性は細胞壁での不動態化、細胞膜透過性の減少、ポリペプチドとの錯体化、液胞への隔離、及び細胞外への能動的な排出といったメカニズムで、重金属の毒性から個体を防御していることが知られている（Hall 2002）。*Pseudomonas putida*の産生するurocanic acid及びL-leucineは可溶性Znとは錯体構造を形成することが報告されている（Okabe and Sasaki, 1995 ; Auld, 2001）。節根組織内に生息する*P. putida*がこれらの化合物を根から外に放出するだけではなく、組織内部へも放出する可能性があることから、組織内に蓄積したZnと錯体構造を形成することによる解毒効果も推測される。*Pseudomonas putida*の培養濾液にはZnやFeの可溶化活性のみならず、Cd及びPbの可溶化活性も確認されており（長田 2008）、*P. putida*が産生する化合物の中にはCdやPbとも錯体構造を形成するものの可能性も示唆されていることから、Cd及びPbの解毒効

果も推測される。第2章において確認された*P. putida*接種によるドクゼリ実生の重金属耐性には*P. putida*が産生する化合物の関与する解毒メカニズムの可能性が考えられた。

生態化学的見地からドクゼリ成熟個体がZnを高濃度で蓄積する利点を考察すると、Elemental defenseによる虫害や病害に対する耐性機構が考えられる。例えば、Hyperaccumulatorは植物体内に高濃度の重金属を吸収させることが知られているが、体内の重金属濃度を増加させることによって昆虫による摂食や病原菌感染を防除することが知られている (Poschenrieder *et al.* 2006)。ZnのHyperaccumulatorである*Thlaspi caerulescens*はZnを蓄積することによって*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*が引き起こすうどん粉病の病兆を抑制できたと報告している (Fones *et al.* 2010)。ドクゼリの節根に生息する内生細菌は根組織内の高濃度のZnに対して耐性を有することで、他の土壌糸状菌や細菌などの定着・感染を抑制し、生息領域を獲得している可能性も考えられた。

第2章でドクゼリのZn吸収に有意に関与していると考えられたのは*P. putida*であった。また*P. putida*は土壌中のpHの低下無しに不溶態Znを可溶化し、交換態Zn量を増加させていたことが確認された。プロトン放出によるpHの低下以外に土壌中の不溶態重金属を可溶化させるPGPRの能力としてはsiderophoreの産生及び有機酸の産生が挙げられる (Lugtenberg and Kamilova 2009)。Siderophoreや有機酸は不溶態重金属と錯体構造を形成することによって重金属を可溶化させ、植物が利用可能な形態にすることが知られている。第2章においても、*P. putida*が産生したsiderophoreや有機酸が土壌中の不溶態重金属と錯体構造を形成することで、不溶態重金属が可溶化されたことが示唆された。そこで第3章において、*P. putida*の産生する土壌中の不溶態Znの可溶化物質を単離・同定することで、どのような化学物質が土壌中のZnの可溶化メカニズムに

関与しているのかを検証した。

*Pseudomonas putida* 培養濾液を、酢酸エチル抽出、XAD-4、及び IRA400J によって分画した。その結果、Zn 可溶化物質は酢酸エチル抽出の水層、XAD-4 の通過画分、そして最終的に IRA400J の吸着画分に移行した (図 3.1 及び図 3.3)。最終的に IRA400J の吸着画分に移行したことが確認されたことから高極性の酸性化合物であると考えられた。IRA400J 吸着画分に含まれる Zn 可溶化物質を HPLC 分取カラムを用いて精製した結果、4 つの主要なピークが確認された (図 3.2)。これらのピークを Fr. 1, 2, 3, 4, 及びその他の溶出部を 5 として分画し、Zn 可溶化試験に供したところ、Fr. 1, 2, 3, 4, 及び 5 単独では Zn 可溶化活性は確認されなかったが、Fraction 2, 3, 及び 4 を混和した区にのみ Zn 可溶化活性が確認され、これらの 3 画分が同時に存在しないと Zn 可溶化活性は消失した (図 3.4)。HPLC 及び分取カラムによる精製の結果、100 ml の培養濾液から Fr. 2 は 2.2 mg、Fr. 3 は 6.5 mg、そして Fr. 4 は 4.3 mg を単離することができた。

*Pseudomonas putida* は様々な代謝産物を産生することが知られている細菌であるが、特に複数の siderophore を産生することが知られている (Varma and Chincholkar 2007)。Siderophore とは微生物や植物が産生する不溶態の Fe と錯体化し可溶化させる低分子量の化学物質の総称であるが、siderophore の中には pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) のように Fe 以外の元素と錯体化し可溶化させる物質も確認されている (Cornelis 2010)。一般的に、このような siderophore は Fe と 1 : 1、もしくは 2 : 1 の割合で結合すること知られている (Miethke and Marahiel 2007)。例として、*Pseudomonas* 属細菌が産生する siderophore で最も有名なペプチド系化合物である pyoverdine は 1 : 1 で強固に Fe と錯体化することが知られている (Meyer 2000)。一方、PDTC は Fe とは 2 : 1 で錯体化するにもかかわらず、Zn とは 1 : 1、もしくは 2 : 1 で錯体化することが

確認されている (Cortese *et al.* 2002)。しかし、本研究で Zn 可溶化活性を示した Fr. 2, 3, 及び 4 は HPLC 分析の UV スペクトルの結果から、構造は異なることが確認された (図 3.1 e, f, g)。複数の物質が siderophore として作用する事例として、Klumpp *et al.* (2005) は Fe、cepabactin、及び pyochelin は 1 : 1 : 1 で錯体を形成すると報告している。本研究においても、こういった事例と同様に 3 種の化学物質が Zn 可溶化に関与していると考えられた。

GC/MSの結果、Fr. 2はurocanic acidであることが明らかになった。Urocanic acidはHistidineの異化代謝経路の代謝産物であり (Norval *et al.* 1989)、*P. putida*においても産生することが知られている (Wheelis and Stanier 1970)。Urocanic acidはZnと1 : 1、もしくは2 : 1で結合することが報告されている (Okabe and Sasaki, 1995)。また、GC/MSの結果、Fr. 3はL-leucineであることが明らかになった。一般的に $\alpha$ -アミノ酸は自身の持つアミノ基やヒドロキシル基を用いて金属、特にアルカリ金属と弱い五員キレート環構造を形成することが知られている (Shimazaki *et al.* 2009)。例としてCaはアミノ酸 (glycine, alanine, valine, leucine, methionine, 及びproline) と1:2の割合で結合することが報告されている (Fox *et al.* 2007; Daniele *et al.* 2008)。また、アミノ酸単体で錯体形成するのみではなく、ペプチドとなることでCu, Ni, 及びZnといった重金属と結合することが知られている (Rajković *et al.* 2008)。例として histidine-histidine-valine-glycine-asparagineのペプチドはZnと結合することが報告されている (Kállay *et al.* 2007)。第3章で明らかになったFr. 3のL-leucineは、Znと2 : 1で結合することが知られている (Wagner and Baran 2009; Auld, 2001)。

Fraction 4 の構造決定はできなかったが、種々の解析の結果、分子量は 260、分子式は  $C_{11}H_{20}N_2O_5$  と推定され、部分構造として二重結合、単結合性の鎖状炭素、C-N 結合、およびアミノ基を有する物質であると考えられた。Fr. 4 の解析

が困難であった理由として、類縁体の混在が考えられたが、このような現象に類似した低分子量物質としてアミノ酸系代謝産物である mugineic acid あげられる。Mugineic acid の一種であり、Co と錯体構造を形成する 2'-deoxymugineic-acid において類縁体は 5 種類存在する (西丸 2006)。本研究においてもこのような類縁体の存在が NMR の結果に大きな影響を及ぼした可能性が示唆された。また、構造決定の解析が困難であったもう一つの理由として、K の混入の可能性が考えられる。Zn の可溶化試験において直前に pH 調整を行うが、その際に本研究では 1 M NaOH を使用した。予備試験時に、1 M 水酸化カリウム (KOH) で pH 調整を試みたところ、Zn 可溶化活性が確認されるはずの IRA 400J 吸着画分においても Zn 可溶化活性が消失した。この現象は K と Zn が可溶化物質と強く結合することに起因すると推測された。実験に供した脱塩水は超純水ではなかったため、分離操作の段階で使用した脱塩水に含まれていた微量の K が最終的に濃縮され、NMR の結果に影響を及ぼした可能性も考えられた。

Fr. 2 の urocanic acid 及び Fr. 3 の L-leucine は単独で Zn と錯体構造を形成することが報告されている (Okabe and Sasaki 1995; Auld 2001) が、これらの物質と Zn の錯体形成についての実験で使用されている Zn は  $ZnCl_2$  や  $ZnSO_4$  といった水溶性の Zn である。一般的に知られている土壌中の Zn の形態は交換態 Zn が 1~2%、無機結合態が 2~3%、有機結合態が 5~10%、遊離酸化物吸蔵態が 10~30%、残差画分が 60~80% であり (Tessier *et al.* 1979; 定本 1994)、可溶性 Zn (交換態 Zn) の割合が圧倒的に低い。Whiting *et al.* (2001) を参考に、第 3 章では日立鉾山沼土壌をそのまま用いた Zn の可溶化試験を行い urocanic acid、L-leucine、未同定の Fr. 4 を分離したが、これらの物質は土壌中の無機結合態 Zn の可溶化に関与していると考えられ、既往の報告とは別の可溶化メカニズムが推測される。不溶態 Zn であるリン酸亜鉛 [ $Zn_3(PO_4)_2$ ]、炭酸亜鉛 ( $ZnCO_3$ )、及び酸化亜鉛 (ZnO) を

用いた Zn 可溶化物質に関する研究も複数報告されており、不溶態 Zn の種類によっても同じ物質でも Zn の可溶化活性が異なるという結果が報告されている (Saravanan *et al.* 2007a ; Saravanan *et al.* 2007b ; Iqbal *et al.* 2010 ; Xinxian *et al.* 2011 )。

ドクゼリ節根の Zn 蓄積に関与していると考えられる *P. putida* が産生する Zn 可溶化物質は urocanic acid、L-leucine、及びアミノ酸系代謝産物と推察される Fr. 4 であり、これら 3 種類の物質が同時に存在することによって初めて Zn 可溶化活性を示すことが確認された (図 3.4)。このようなアミノ酸、もしくはペプチドと低分子量有機酸が協力的に作用することで重金属と錯体を形成する例として Pyoverdine が挙げられる (Meyer 2000)。Pyoverdine はキノリン骨格、6 から 12 個アミノ酸で構成されたペプチド鎖、及びアミノ側鎖から構成されている (Bultreys 2007)。キノリン骨格及びペプチド鎖由来のヒドロキシル基は Fe と結合することが知られ (Tappe *et al.* 1993)、本結合は高い親和性を示すことが報告されている (Bultreys 2007)。一方、アミノ酸やペプチド単体での Fe や重金属との親和性はとても低いことが報告されているため (Hirota and Yamauchi 2001)、個々の物質の Zn との親和性は低くとも、可溶化活性物質が複数存在することによって土壤中の Zn と強固な錯体形成を構築し、土壤中の不溶態 Zn を可溶化させている可能性が考えられる。第 3 章では *P. putida* に着目し Zn 可溶化能について考察したが、実際の根圏では他の内生細菌が産生する複数の可溶化物質との協力作用が存在する可能性もある。内生細菌間の可溶化物質を検討することで、新たな土壤中の Zn の可溶化メカニズムが確認されるかもしれない。また、単一の物質ではなく、複数の物質の関与によって土壤中の重金属が可溶化するという新たな知見は、他の様々な重金属の可溶化メカニズムに影響を与える意義深いものであると考えられる。

本研究では、内生細菌である *P. putida* が関与するドクゼリにおける Zn 蓄積メカニズムには、*P. putida* 産生する urocanic acid、L-leucine、及び Fr. 4 の 3 つの物質による不溶態 Zn の可溶化が寄与していることを解明した (図 4.1)。本研究の基礎的知見は、内生細菌を利用した Phytoremediation の発展という点において意義深いものであったと考えられる。植物と内生細菌の相互作用、内生細菌が及ぼす土壌中の重金属に対する影響、そして Phytoremediation などの諸研究に対する一つの知見として、本研究がそれらの一助になれば幸いである。

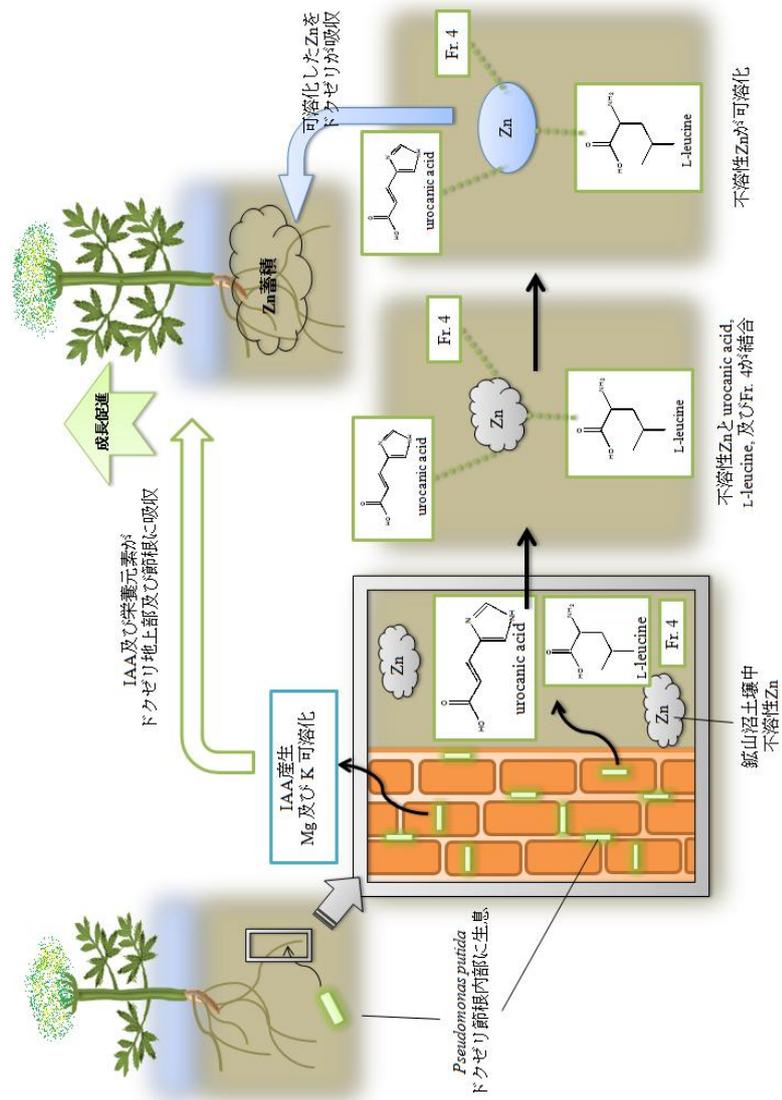


図4.1 日立鉍山沼における*P. putida*による不溶性Znの可溶化及びドクゼリのZn吸収概略図

## 摘要

植物を用いた重金属土壌汚染の修復方法のひとつとして、土壌の重金属を植物内に吸収させる **phytoextraction** がある。本修復手法は重金属の回収効率が低いことが指摘されており、これを改善するために植物組織内部に生息する機能的な内生細菌の利用が注目されている。既往報告により、重金属環境である日立鉱山に自生するドクゼリ (*Cicuta virosa* L.)は節根に高濃度の Zn (7,542 µg/g)を蓄積することが明らかとなっている。また節根より分離された複数の内生細菌のうち、高い Zn 可溶化能力を示した株は *Pseudomonas putida*、*Rhodopseudomonas* sp. と同定された。以上の結果を踏まえ本研究では、内生細菌 *P. putida*、*Rhodopseudomonas* sp.の関与したドクゼリにおける Zn 吸収メカニズムを解明することを目的とした。

まず、高い Zn 可溶化能力を示した *P. putida* 及び *Rhodopseudomonas* sp.をドクゼリ実生に接種することにより、本実生における Zn の吸収促進及び成長への影響を検証した。γ線滅菌した現地土壌に滅菌ドクゼリ実生を移植した後、*P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.をそれぞれ実生へ接種・培養後、実生の含有 Zn 濃度及び個体あたりの Zn 吸収量を分析した。その結果、実生の含有 Zn 濃度には両菌株の接種によって統計学的に有意な差は確認されなかったが、*P. putida* の接種によって個体根部にあたりの Zn 量に有意な増加が確認された。また、*P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.の接種によって土壌 pH が低下することなく、交換態 Zn 量の増加が有意に確認されたことから、特に *P. putida* においては本菌が産生する物質が土壌における交換態 Zn 量を増加させた結果、本実生の Zn 吸収増加に影響したと推測された。また、本実生の成長は両菌の接種により有意に増加した。特に *P. putida* を接種した場合、その増加は顕著であった。これらの成長促進は *P. putida* と *Rhodopseudomonas* sp.による植物ホルモン産生 (IAA 産生) 及び一部

の栄養元素吸収促進が関与したと示唆された。以上の結果より、内生細菌 *P. putida* と *Rhodopseudomonas sp.*の機能は、1) 土壌の不溶態 Zn を可溶化することによる、実生における Zn 吸収促進、2) IAA 産生及び一部の栄養元素吸収促進による実生の成長促進、であると示唆された。

次に、*P. putida* の産生する Zn と錯体形成する物質 (Zn 可溶化物質) の単離・同定を試みた。*P. putida* 培養濾液を酢酸エチル抽出した後、スチレンポリマー樹脂 (XAD-4)、弱陰イオン交換樹脂 (IRA 400J)、HPLC 逆相分取カラム (RpC18) によって Zn 可溶化物質の精製を行った。Zn 可溶化活性の確認された画分を TMS 化後、GC/MS 分析に供した結果、3 種の化学物質 (urocanic acid、L-leucine、未同定の物質) が確認された。これら 3 種の物質が同時に存在するときのみ Zn 可溶化活性が確認されたことから、複数の可溶化物質の関与した、土壌における不溶態 Zn 可溶化メカニズムが示唆された。

以上の結果から、本研究では、内生細菌、特に *P. putida* の関与したドクゼリにおける Zn 吸収メカニズムの一端が明らかとなった。本菌の産生する Zn 可溶化物質により土壌の不溶態 Zn が溶解され、植物が吸収可能な形態となった Zn がドクゼリに吸収されるメカニズムが示唆される一方、IAA 産生や栄養元素の吸収促進を行うことで本植物の成長を促進し重金属ストレス環境下において、共生的に本植物に寄与すると推測された。

## 引用文献

- Auld, D.S. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* 14 271-313.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., and Srivastava, S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J. Environ. Manage.* 105 103-120.
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L., and Albrecht-Gary, A.M. 2012. Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. 41 2820-2834.
- Brimecombe, M.J., De Lelj, F.A., and Lynch, J.M. 2001. The rhizosphere. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. (eds.) *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.* Marcel Dekker. New York, U.S.A. pp. 95-140.
- Broadley, M.R., White, P.J., Zelko, I., and Lux, A. 2007. Zinc in plants. *New Phytol.* 173 677-702.
- Bultreys, A. 2007. Siderotyping, a tool to characterize, classify and identify fluorescent *Pseudomonas*. in Varma, A. and Chincholkar, S. (eds.) *Microbial siderophores.* Springer. Berlin, Germany. pp. 67-90.
- Chaney, R.L., Malikz, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., and Baker, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 279-284.
- Cornelis, P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* 86 1637-1645.
- Cortese, M.S., Paszcynski, A., Lewis, T.A., Sebat, J.L., Borek, V., and Crawford, R.L.

2002. Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes. *Biometals* 15 103-120.
- Curl, E.A. and Truelove, B. 1986. The rhizosphere. Springer. Berlin, Germany.
- Cox, C.D., Rinehart, Jr, K.L., Moore, M.L., and Cook, Jr, J.C. 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. 78 4256-4260.
- Daniele, P.G., Foti, C., Gianguzza, A., Prenesti, E., and Sammartano, S. 2008. Weak alkali and alkaline earth metal complexes of low molecular weight ligands in aqueous solution. *Cood. Chem. Rev.* 252 1093-1107.
- Doty, S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol.* 179 318-333.
- Fones, H., Davis, C.A., Rico, A., Fang, F., Smith, J.A., and Preston, G.M. 2010. Metal hyperaccumulation armors plants against disease. *PLoS Pathog.* 6 1-13.
- Fox, S., Büsching, I., Barklage, W., and Strasdeit, H. 2007. Coordination of biologically important alpha-amino acids to calcium (II) at high pH: insights from crystal structures of calcium alpha-aminocarboxylates. *Inorg. Chem.* 46 818-824.
- Fox, T.C. and Guerinot, M.L. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 49 669-96.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol. Biochem.* 41 2031-2037.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41 109-117.
- Glick, B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28

367-374.

- Gordon, S.A. and Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* 26 192-195.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanism for heavy metals detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53 1-11.
- Haydon, M.J. and Cobbett, C.S. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174 499-506.
- He, Z.L., Yang, X.E., and Stoffella, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 19 125-140.
- Hirota, S. and Yamauchi, O. 2001. Weak interactions and molecular recognition in systems involving electron transfer proteins. *Chem. Rec.* 1 290-9.
- Iqbal, U., Jamil, N., and Ali, I., and Hasnain, S. 2010. Effect of zinc -phosphate -solubilizing bacterial isolates on growth of *Vigna radiata*. *Ann. Microbiol.* 60 243-248.
- Jacobson, C.A. 1915. Cicutoxin: The poisonous principle in water hemlock (*Cicuta*). *J. Am. Chem. Soc.* 37 916-934.
- Kállay, C., Ósz, K., Dávid, A., Valastyán, Z., Malandrinos, G., Hadjiliadis, N., and Sóvágó, I. 2007. Zinc(II) binding ability of tri-, tetra- and penta-peptides containing two or three histidyl residues. *Dalton Trans.* 28 4040-4047.
- Klumpp C., Burger A., Mislin G.L., and Abdallah M.A. 2005. From a total synthesis of cepabactin and its 3:1 ferric complex to the isolation of a 1:1:1 mixed complex between iron (III), cepabactin and pyochelin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 1721-1724.
- Koh, R.H. and Song, H.G. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on

- seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 1805-1810.
- Larcher, W. 2003. Physiological plant ecology. Springer. Berlin, Germany.
- Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31 109-120.
- Lee, K.H., Koh, R.H., and Song, H.G., 2008. Enhancement of growth and yield of tomato by *Rhodopseudomonas* sp. under greenhouse conditions. *J. Microbiol.* 46 641-646.
- Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S., and Kamiya, Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 46 45-50.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63 541-556.
- Ma, Y., Prasad, M.N., Rajkumar, M., and Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* 29 248-258.
- Macnair, M.R., Tilstone, G.H., and Smith, S.E. 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In Terry, N. and Banuelos, G. (eds.) Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC, Boca Raton, U.S.A. pp. 235-250.
- McGrath, S.P. and Zhao, F.J. 2003. Phytoremediation of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 277-282.
- Meyer, J.M., Hohnadel, D., and Hallé, F. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J Gen Microbiol.* 135 1479-1487.

- Meyer, J.M. 2000. Pyoverdine; pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species: Minireview. *Arch. Microbiol.* 174 135-142.
- Miethke, M. and Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control: Review. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 413-451.
- Newman, L.A. and Reynolds, C.M. 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends Biotechnol.* 23 6-8.
- Norval, M., Simpson, J., and Ross, A. 1989. Urocanic acid and immunosuppression. *Photochem. Photobiol.* 50 267-275.
- Okabe, N. and Sasaki, Y. 1995. Zinc(II) complex of urocanic acid. *Acta Cryst.* 51 5-67.
- Påhlsson, A.M.B. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Pollut.* 47 287-319.
- Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. 2001. The rhizosphere as a site of biochemical interactions amongs soil components, plants, and microorganisms. In: Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. (eds.) *The rhizosphere - Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker. New York, U.S.A.
- Poschenrieder, C., Tolrà, R., and Barcelò, J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11 288-294.
- Rajković, S., Kállay, C., Serényi, R., Malandrinos, G., Hadjiliadis, N. Sannad, D., and Sóvágó, I. 2008. Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides. *Dalton Trans.* 37 5059-5071.

- Rascio, N. and Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it ? and what makes them so interesting ? *Plant Sci.* 180 169-181.
- Rodriguez, H., Vessely, S., Shah, S., and Glick B.R. 2008. Effect of a Nickel tolerant ACC deaminase producing *Pseudomonas* strain on growth of nontransformed and transgenic Canola plants. *Curr. Microbiol.* 57 170-174.
- Rovira, A.D. and Bowen, G.D. 1966. The effects of microorganisms upon plant growth. *Plant Soil* 25 129-142.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., and Dowling, D.N. 2008 Bacterial endophytes : recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278 1-9.
- Salt, D.E., Smith, R.D., and Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 643-668.
- Saravanan, V.S., Kalaiarasan, P., Madhaiyan, M., and Thangaraju, M. 2007a. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion ( $Zn^{2+}$ ) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44 235-241.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., and Thangaraju, M. 2007b. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* 66 1794-1798.
- Schep, L.J., Slaughter, R.J., Becket, G., and Beasley, M.G. 2009. Poisoning due to water hemlock. *Clin. Toxicol.* 47 270-278.

- Schultz, B.J.E. and Boyle, C.J.C. 2006. What are endophytes ? In Schultz, B.J.E., Boyle, C.J.C., and Sieber, T.N. (eds.) Microbial root endophytes. Springer. Berlin, Germany.
- Schützendübel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53 1351-1365.
- Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y., and Qian, M. 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. Pollut.* 156 1164-1170.
- Shimazaki, Y., Takani, M., and Yamauchi, O. 2009. Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties. *Dalton Trans.* 38 7854-7869.
- Souza, M.P.D., Chu, D., Zhao, A.M., Ruzin, S.E., Schichnes, D., and Terry, N. 1999. Rhizosphere Bacteria Enhance Selenium Accumulation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiol.* 119 565-574.
- Stolworthy, J.C., Paszczyński, A., Korus, R., and Crawford, R.L. 2001. Metal binding by pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid), a biochelator produced by *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas putida*. *Biodegrad.* 12 411-418.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., and Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19 1-30.
- Suzuki, M., Takahashi, M., Tsukamoto, T., Watanabe, S., Matsushashi, S., Yazaki, J., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N.K. 2006.

- Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. *Plant J.* 48 85-97.
- Takemoto, T., Nomoto, K., Fushiya, S., Ouchi, R., Kusano, G., Hikino, H., Takagi, S., Matsuura, Y., and Kakudo, M. 1978. Structure of mugineic acid, a new amino acid possessing an iron-chelating activity from roots washings of water-cultured *Hordeum vulgare* L.. *Proc. Jpn. Acad.* 54 469-473.
- Tappe, R., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Meyer, J.M., and Lefevre, J.F. 1993. Structure elucidation of a pyoverdine produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *J. Prakt. Chem.* 335 83-87
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., and Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace elements. *Anal. Chem.* 51 844-851.
- Tripathi, M., Munot, H.P., Shouche, Y., Meyer, J.M., and Goel, R. 2005. Isolation and functional characterization of siderophore-producing Lead- and Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Curr. Microbiol.* 50 233-237.
- Varma, A. and Chincholkar, S. 2007 Microbial siderophore. Springer. Berlin, Germany.
- Vessey, K.V. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255 571-586.
- Wagner, C.C. and Baran, E.J. 2009. Vibrational spectra of Zn (II) complexes of the amino acids with hydrophobic residues. *Spectrochim. Acta Part A.* 72 936-940.
- Wheelis, M.L. and Stanier, R.Y. 1970. The genetic control of dissimilatory pathways in *Pseudomonas putida*. *Genetics* 66 245-266.
- Whiting, S.N., de Souza, M.P., and Terry, N. 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35 3144-3150.

- Wittstock, U., Hadacek, F., Wurz, G., Teuscher, E., and Greger, H. 1995. Polyacetylenes from water hemlock, *Cicuta virosa*. *Planta. Med.* 61 439-445.
- Xinxian, L., Xuemei, C., Yagang, C., Woon-Chung, W.J., Zebin, W., and Qitang, W. 2011. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27 1197-1207.
- Yoshimura, E., Kohdr, H., Mori, S., and Hider, R.C. 2011. The binding of aluminum to mugineic acid and related compounds as studied by potentiometric titration. *Biometals.* 24 723-727.
- 浅見輝男 2010. [改訂増補]—データで示す—日本土壌の有害金属汚染. アグネ技術センター (東京).
- 土壌環境分析法編集委員会 1997. 土壌環境分析法. 博友社 (東京).
- 畑昭郎 2001. 土壌・地下水汚染. 有斐閣選書 (東京).
- 畑昭郎, 田倉直彦 2008. アジアの土壌汚染. 世界思想社 (京都).
- 地盤環境技術研究会 2003. 土壌汚染対策技術. 日本科技連出版 (東京).
- 神賀誠, 田切美智雄 2003. 渡良瀬川流域および宮田川流域の河川堆積物と土壌の汚染の現状. *地質学会誌* 109 533-547.
- 上赤博文 2012. 佐賀平野に於けるドクゼリの分布~2009年ドクゼリ調査隊活動のまとめ~. *佐賀自然史研究* 17 1-8.
- 加藤大輔 2010. 日立鉱山に自生するドクゼリ (*Cicuta virosa* L.) の二次代謝産物が根部の内生細菌と内生糸状菌の生育に与える影響について. 修士論文. 筑波大学大学院生命環境科学研究科.
- 嘉屋実 1952. 日立鉱山史. 日立鉱業株式会社日立鉱業所 (日立).

川名英之 1989. ドキュメント日本の公害 第4巻 足尾, 水俣, ビキニ. 緑風出版 (東京).

環境省水・大気環境局 2010a. 平成22年度 土壤汚染対策法の施行状況及び土壤汚染調査・対策事例等に関する調査結果.

環境省水・大気環境局 2010b. 平成22年度 農用地土壤汚染防止法の施行状況.

木村真人. 1998. 根圏の微生物. 「根の辞典」. 根の辞典編集委員会 (編). 朝倉書店 (東京). pp. 299-302.

久保田正亜, 折笠清人, 浅見輝男 1986. 日立鉱山および日立土風変市町村の道路わき粉じんおよび土壤の重金属分布. 日本土壤肥料学会誌. 57 142-148.

森田茂樹, 田島亮介訳. 2003. 根の生態学. Kroon, H.D. and Visser, E.J.W. (原著) Springer. Berlin, Germany.

間藤徹, 馬建鋒, 藤原徹 2010. 植物栄養学 第2版. 文永堂出版 (東京).

Merck 株式会社 2006. 薄層クロマトグラフィー用 呈色試薬ガイドブック. (東京).

長田賢志 2008. 日立鉱山に自生するドクゼリとその重金属吸収に関与する根圏微生物. 修士論文. 筑波大学大学院生命環境科学研究科.

長島一成 1994. 大煙突の記録 -日立鉱山煙害対策史-. 株式会社ジャパンエナジー. (東京).

西丸貴弘 2006. 植物シデロフォアの一種ムギネ酸の構造活性相関に関する研究. 薬学雑誌 126 473-479.

定本裕明, 飯沼康二, 本名俊正, 山本定博 1994. 土壤中重金属の形態分別法の検討. 土壤肥料学会誌. 65 645-653.

柳沢宗男 1984. 神通川流域における重金属汚染の実態調査と土壤復元工法に関

する研究. 富山県農業試験場研究報告 15 1-110.

吉村隆 2003. 初歩から学ぶ土壌技術と浄化技術. (株) 土壌調査会 (東京).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究全般にわたって懇切丁寧なご指導頂いた上、様々な相談に乗って頂いた指導教官筑波大学生命環境科学研究科持続環境学専攻准教授の山路恵子先生に深く感謝致します。また、本論文を御校閲賜り有益な御助言を頂きました生命環境科学研究科生物機能科学専攻教授の松本宏先生、生命環境科学研究科持続環境学専攻教授の張振亜先生、及び同准教授の野村暢彦先生に深く感謝いたします。

本研究における GC/MS 分析による Fr. 2 及び Fr. 3 の解析を指導して頂きました独立行政法人森林総合研究所東北支所生物被害研究グループ市原優博士に心より感謝致します。博士研究及び論文執筆にあたり様々な御助言を頂きました三井化学アグロ株式会社石本洋博士に心より感謝致します。また、長きに渡る博士生活で相談に乗って頂き、激励を頂きました友人各位に心より感謝致します。

最後に、小生の博士進学を後押し頂き、研究をやり続ける機会を与えて頂いた両親に心から感謝致します。