

応用研究論文

グルタチオンを利用して，植物体内の重金属動態を制御する

安全な農作物の栽培方法の確立を目指して

中村進一¹

¹ 東京農業大学 生命科学部

食の安全を脅かす問題のひとつに有害重金属元素であるカドミウム (Cd) の農作物への蓄積がある。Cd 含量の低い，安全な農作物を栽培する技術を確立することを目指して，植物体内における Cd 動態を制御する目的でこれまでも様々な研究が行われてきた。我々は生理活性ペプチドの一種であるグルタチオンをアブラナの根に部位特異的に施用することによって，植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制する現象を見出すことができた。この現象に関与する分子メカニズムを調べたところ，アブラナの根に与えたグルタチオンが植物根からの Cd 排出を活性化することや根における Cd の保持能力を高めることなどが明らかになった。将来的にはこれらの研究成果を応用することで遺伝子組み換え技術を利用しない新たな栽培技術を確立することが期待できる。

キーワード：カドミウム，グルタチオン，アブラナ，篩管，ポジトロンイメージング，導管

はじめに

近年，食の安全に関して様々な問題が生じている。食の安全を脅かす問題の一つに有害重金属元素であるカドミウム (Cd) の農作物への蓄積がある。Cd は電池の電極や合金の原料など様々な用途で利用される重金属元素であるが，日本四大公害病のひとつイタイイタイ病の原因物質としても知られる生物全般にとって有害な重金属元素である。環境中に放出された Cd は農作物に取り込まれ，我々の健康を脅かす存在となり得る。これまでも農作物の Cd 含量を低減するために様々な対策が取られてきた。客土，土壌洗浄，植物を利用した環境浄化方法（ファイトレメディエーション）などである。様々な農作物には Cd 含量の国際的な基準値が定められている。現在の日本では，主な農作物で Cd 含量の基準値があるのはコメのみである。そして，コメに関しては Cd 低吸収イネが創出されたこともあり，その問題は解決されつつある。その一方でコメを除く農作物に関しては Cd 対策は十分とはいえない。今後，コメ

以外の様々な農作物に対しても Cd 含量の基準値が設定される可能性がある。そのため，農作物（特に畑作物）に蓄積する Cd 量を低減する技術を確立することは急務といえる。我々の研究では実験植物として，アブラナを用いている。アブラナはアブラナ科に属する植物である。キャベツ，ハクサイなど多くの葉物野菜がアブラナ科に属している。そのため，アブラナで得られた研究成果は多くの葉物野菜に応用することが可能である。そして，アブラナ科植物は比較的強い Cd 耐性を持ち，植物体内に高濃度にカドミウムを蓄積する能力を持つことが報告されている（参考文献 1）。また，モデル植物の一種であるアラビドプシスはアブラナ科植物である。そのため，アブラナを用いた研究ではアラビドプシスで確立されている遺伝情報のデータベースを利用することができ，分子生物学的なアプローチで研究を行う場合には都合が良い。安全な農作物を持続的に生産するためには植物体内における Cd 動態を制御する新たな栽培方法の確立が考えられる。農作物における Cd 含量の低減という社会的なニーズを実用化技術に結

び付けるためには、植物栄養学的な研究のアプローチを駆使して研究シーズを見出しそれらを応用展開する必要がある。

グルタチオンへの着目

植物体に蓄積する Cd 量を低減するため、当初は植物の維管束組織における Cd の移行を制御することを目指して研究に取り組んできた。維管束組織の中でも篩管は物質をソース組織（物質生産（光合成）の場）からシンク組織（物質消費の場）に輸送する通導組織である。この篩管における Cd の動きを制御することで子実などのシンク組織に蓄積する Cd 量を制御することができると考えた。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの三つのアミノ酸から合成される生理活性ペプチドである。グルタチオンは活性酸素を除去すること（参考文献 2）、ファイトケラチンの前駆体であること（参考文献 3）、糖代謝を活性化すること（参考文献 4）など様々な生理的機能を持つ。このグルタチオンが重合して生成するファイトケラチンは植物体内の重金属動態に影響を及ぼすことも知られている（参考文献 5）。また、グルタチオンには還元型、酸化型と異なる化学形態が存在する。生体内では大部分のグルタチオンが還元型グルタチオンとして存在しているが、この還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの存在比の変化が生体内でシグナルとして機能しているという報告もある（参考文献 6）。篩管内には還元型グルタチオンが数 mM の濃度で存在していることがイネ篩管液の分析から報告されている（参考文献 7）。Cd 処理をしたアブラナから篩管液を採取し、篩管液グルタチオンの Cd に対する応答を調べた。コントロール植物から採取した篩管液のグルタチオン濃度は約 1 mM であった。一方、10 μ M の濃度で Cd 処理を行ったアブラナから採取した篩管液のグルタチオン濃度は Cd 処理に応答して、有意に増加していた（図 1）（参考文献 8）。このような、Cd 処理に応答した篩管におけるグルタチオン濃度の増加は、根などのシンク組織におけるグルタチオン要求性の高まりに応じた篩管へのグルタチオンの積み込みの活性化に起因すると考えられた。そこで、グルタチオンを植物

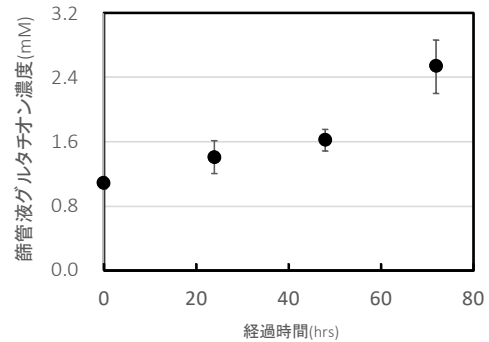


図1 カドミウム処理が篩管液グルタチオン濃度に及ぼす影響 (Nakamura et al. 2005)

の主なシンク組織である根、未展開葉（シンク葉）などに部位特異的に施用し、それらが植物体内における Cd の移行と蓄積に及ぼす影響を調べることにした。

部位特異的なグルタチオンの施用がアブラナの Cd 動態に及ぼす影響

水耕栽培をしたアブラナに部位特異的にグルタチオンを与えた。葉に部位特異的にグルタチオンを与える場合は、筆を用いてグルタチオン液を塗布した。根に部位特異的にグルタチオンを与える場合は、水耕液にグルタチオンを添加した。それぞれの処理を 2 日間行った植物を収穫し、各植物の地上部および地下部における Cd 含量を測定した。その結果、コントロール植物の地上部の Cd 含量は約 0.45 μ mol/gDW（サンプリングした部位の乾物重 1g 当たりのカドミウム含量）であった（図 2）。一方、水耕液にグル

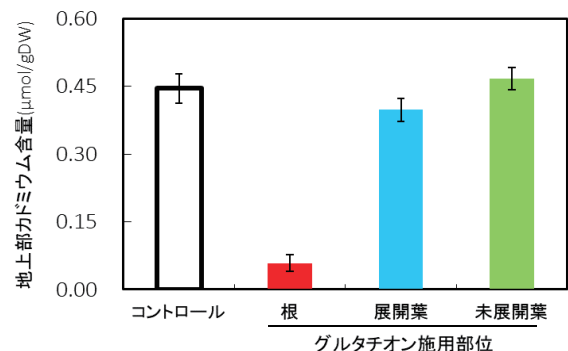


図2 部位特異的なグルタチオンの施用がアブラナのカドミウム動態に及ぼす影響 (Nakamura et al. 2013)

タチオンを添加した処理区では、地上部の Cd 含量は約 $0.1 \mu\text{mol/gDW}$ であり、地上部 Cd 含量が有意に減少していた (図 2)。また、葉にグルタチオンを部位特異的に施用した場合、植物体の地上部における Cd 含量にはグルタチオンの施用効果はほとんど見られなかった (図 2)。各植物の根における Cd 含量の測定結果にもグルタチオンの施用効果は見られなかった。これらの実験結果はアブラナの根に部位特異的に与えたグルタチオンは植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制していることを示している。植物の根では植物にとって必須な重金属元素を根の細胞内に取り込むための輸送タンパク質の働きによって、Cd は植物体内に取り込まれることが報告されている (参考文献 9)。そこで、鉄、マンガン、亜鉛などの重金属元素の植物体の地上部における含量にグルタチオン処理が及ぼす影響を調べた。その結果、鉄、マンガン、亜鉛のいずれの重金属元素も地上部における含量は有意に減少をしていなかった。このような実験結果は、根に与えたグルタチオンの効果は Cd に特異的であることを示している。2 週間という長期間の処理を行った場合にも同様の結果が得られた。さらに根における Cd 分布に対するグルタチオンの効果を調べたところ、根の細胞質に存在する Cd の濃度がグルタチオン処理によって、有意に減少していた。根の細胞質における Cd 濃度が減少したために導管に積み込まれる Cd の量が減少して、植物体の地上部に蓄積する Cd 量が減少したと考えられる。このようにして、植物の根に部位特異的に与えたグルタチオンが植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を特異的に抑制する現象を見出すことができた (参考文献 10)。

根に与えたグルタチオンの化学形態がアブラナの Cd 動態に及ぼす影響

グルタチオンには還元型、酸化型と異なる 2 つの化学形態が存在する。これらの化学形態が異なるグルタチオンは異なる生理的機能を持つことが知られている。植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制する現象にグルタチオンの化学形態が及ぼす影響を検証した。植物の根に還元型グルタチオン、酸化

型グルタチオンを与え、Cd 動態に及ぼす影響を調べた。実験では水耕液に還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンをそれぞれ 1mM の濃度で添加して Cd 処理を行った。収穫した植物は前述の方法に従って分析を行った。2 日間の各処理を行った植物のカドミウム含量を図 3 に示す。植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制する効果は還元型グルタチオンと同様に酸化型グルタチオンにも見られた。しかし、その抑制効果は還元型グルタチオンの方が大きかった。処理期間を 2 週間にすると水耕液に添加したそれぞれのグルタチオンが植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制する効果はほぼ同等となった。酸化型グルタチオンでもこのような Cd の移行と蓄積を抑制する効果が見られたことは、グルタチオンは植物の根において何らかの生理的な機能を制御することによって、植物体の地上部へのカドミウムの移行と蓄積を抑制していることを示唆している。

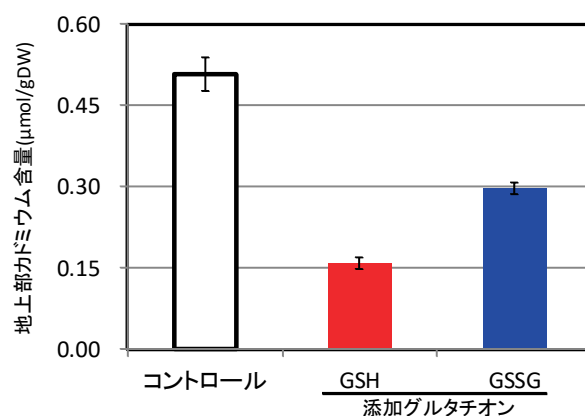


図 3 グルタチオンの化学形態が地上部カドミウム含量に及ぼす影響 (Nakamura et al. 2013)

ポジトロンイメージング技術によるアブラナの Cd 動態の可視化と解析

根への部位特異的なグルタチオン処理によって、植物体の地上部への Cd の移行と蓄積が抑制される現象の分子メカニズムを解明するためには、植物体内において Cd がどのような動態をとっているのかを知る必要がある。植物体内の Cd 動態を明らかにするためにポジトロンイメージング技術を用いた。この技術を用いることで植物体内のポジトロン放出

核種の動態を非侵襲的にリアルタイムでモニタリングすることができる(参考文献 11). 今回の Cd のポジトロンイメージング実験では Cd のポジトロン放出核種である ^{107}Cd (半減期: 6.5 時間) を用いることにした. このポジトロンイメージング技術を用いて, 植物による Cd の経根吸収を可視化し, 解析する実験系をイネを用いた実験で確立している. (参考文献 12). 今回はこの実験系をアブラナに応用することで, グルタチオンが植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制する現象の分子メカニズムを解明することを試みた.

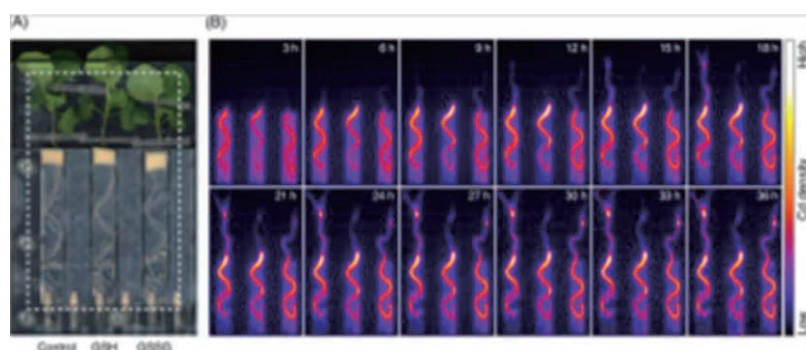


図4 ポジトロンイメージング技術を用いたアブラナにおけるカドミウム動態の可視化 (Nakamura et al., 2013)

ポジトロンイメージング技術によって, アブラナの Cd 動態を可視化することに成功した(図4). グルタチオンを水耕液に添加することで, 植物体の地上部への Cd の移行と蓄積が抑制されている様子を可視化することができた. ポジトロンイメージング技術を用いて撮像した画像データは視野内(図4(A); 白点線枠内)の特定の箇所に関心領域を設定することによって, その場所の ^{107}Cd のシグナルの経時変

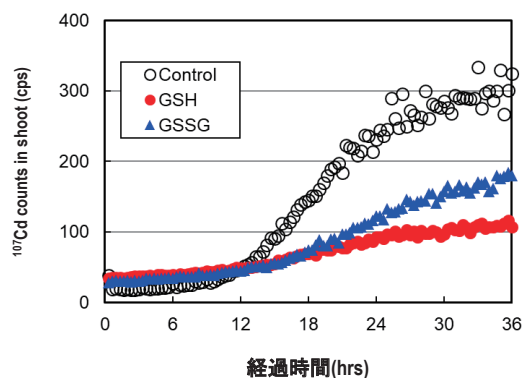


図5 植物体の地上部における ^{107}Cd シグナルの経時変化 (Nakamura et al. 2013)

化を調べることができる. 今回の実験では植物体の地上部, 地下部, 水耕液などに関心領域を設定して画像解析を行った. 根に与えたグルタチオンによって植物体の地上部への ^{107}Cd のシグナルの蓄積が抑制されている様子を ^{107}Cd シグナルの経時変化のグラフとして示すことができた(図5). また, Cd 吸収の初期段階では還元型グルタチオンの方が酸化型グルタチオンに比べて, Cd 動態に及ぼす影響が大きいことも確認できた(図5). 根における ^{107}Cd のシグナルの経時変化のパターンにはほとんど差がみられなかった. この結果は, 根における Cd 含量を測定した実験結果と一致している. 根における Cd 吸収は根への Cd の物理的な吸着と根細胞内への Cd の生理的な取り込みによって起こることが報告されている(参考文献 13). その中でも物理的な吸着は Cd 吸収の極めて初期の段階で起こることが明らかになっている. そこで Cd の吸収開始から1時間の根における ^{107}Cd のシグナルの経時変化のパターンをコントロールの植物, グルタチオン処理

を行った植物で比較した. その結果, 各植物の根に設定した関心領域から得られた ^{107}Cd のシグナルの経時変化のグラフのパターンに差は見られなかった. このことは水耕液に添加したグルタチオンは根表面への Cd の物理的な吸着には影響がないことを示している(参考文献 14). また, 水耕液に関心領域を設定した場合, グルタチオン処理を行った植物の水耕液から得られたグラフでは Cd 吸収実験の開始後

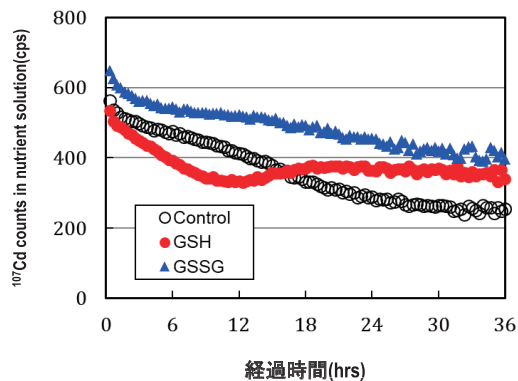


図6 水耕液における ^{107}Cd シグナルの経時変化 (Nakamura et al. 2013)

に約 10 時間で減少し続けた ^{107}Cd のシグナルが増加に転じた (図 6)。これは植物の根における Cd 吸収量よりも根からの Cd 排出量の方が多くなったためにこのような形のグラフが得られたと考えた。

根圏に存在するグルタチオンが根からの Cd 排出に及ぼす影響

ポジトロンイメージングの画像解析の結果から、根にグルタチオン処理を行った植物では根からの Cd の排出が活性化されていることが推測された。そこでアブラナを Cd で前処理し、根からの Cd 排出に対するグルタチオンの影響を調べた。図 7 に示すように植物根の細胞からの Cd の排出は根におけるグルタチオン処理によって活性化されていることが明らかになった。根からの Cd 排出の活性化は根の細胞質における Cd 濃度の低下につながる。この実験結果によって、植物体の地上部への Cd の移行と蓄積が抑制される現象の要因のひとつはグルタチオンによる根からの Cd 排出の活性化であることが明らかになった。

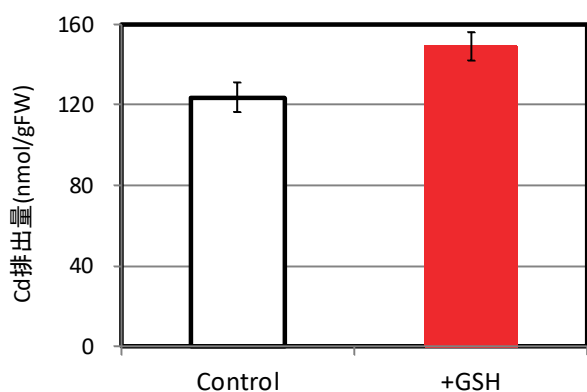


図 7 GSH 処理が根からの Cd 排出に及ぼす影響 (Nakamura et al. 2013)

根に与えた含硫化合物が Cd 動態に及ぼす影響

Cd 動態に影響を及ぼすグルタチオンの効果をさらに検証するために、グルタチオン合成に関与する物質やグルタチオンと同様に分子内にチオール基を持つ物質を水耕液に添加して、栽培実験を行った。今回の実験ではグルタチオン合成に関与する物質と

して、システインと硫酸カリウム (硫酸イオン) を分子内にチオール基を持つ物質としてジチオトレイトールを用いた。システインや硫酸イオン (硫酸カリウム) はグルタチオン生合成における中途産物、スタート物質である。単純な構造を持つ物質で同様の効果が得られれば、この研究シーズを実用化した場合にコストダウンにもつながる。栽培試験の結果、システインはグルタチオンほどではないものの植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制する効果がみられた (図 8)。また、硫酸イオンには抑制効果はほとんど見られなかった (図 8)。グルタチオンと同様に分子内にチオール基を持つ物質のジチオトレイトールはグルタチオンと同様の抑制効果を示した。しかし、ジチオトレイトール処理を行った植物では長期間 (2 週間) の処理を行うと生育に障害が発生することや処理後に収穫した植物体の地上部と地下部に蓄積した Cd 量から算出した地上部への Cd 移行率がグルタチオン処理を行った植物と比べて高いことなど、同じチオール物質であってもジチオトレイトールのアブラナの根への作用機作はグルタチオンとは異なることが推測された。グルタチオン処理、ジチオトレイトール処理を行った植物の Cd 動態をポジトロンイメージング技術を用いて、調べた。栽培実験の結果では根における Cd 含量はグルタチオン処理を行った植物とジチオトレイトール処理を行った植物では有意な差があった。しかし、ポジトロンイメージング実験の画像解析結果ではこのような差が見られなかった。この 2 つの実験における結果の差はアブラナの根における Cd 吸着の強度の差に起因すると考えられた。このような実験結果は植物

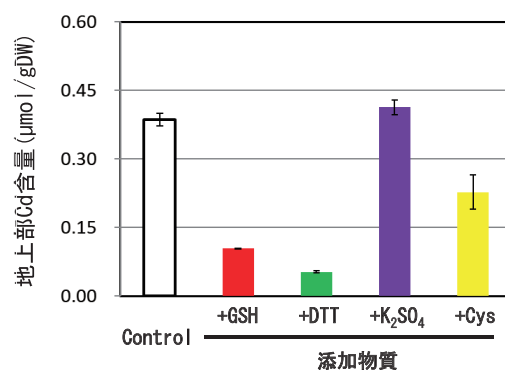


図 8 含硫化合物が植物体の地上部 Cd 含量に及ぼす影響 (Nakamura et al. 2016)

の根におけるグルタチオン処理が植物根における Cd 保持力を高めることに機能していることを示している (参考文献 14)。

根圏に存在するグルタチオンの濃度が植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制する効果に及ぼす影響

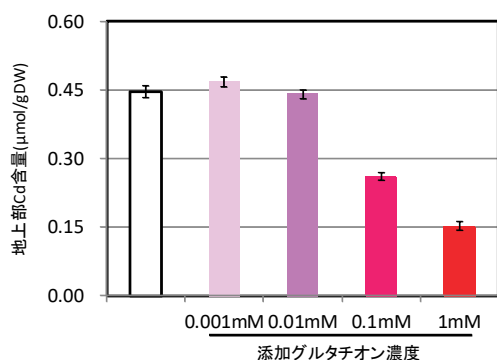


図9 水耕液に添加したグルタチオンの濃度が植物体の地上部 Cd 含量に及ぼす影響 (Nakamura et al. 2015)

この技術の実用化を考えた場合、植物に与えるグルタチオン量は栽培コストの重要な要因のひとつとなる。そこで、水耕液のグルタチオン濃度が Cd の移行と蓄積の抑制効果に及ぼす影響を、グルタチオン処理濃度を 0.001mM, 0.01 mM, 0.1mM, 1mM と変えて栽培実験を行い、検証した。植物体の地上部における Cd 含量を測定すると、植物に与えたグルタチオンの濃度が低くなるにつれてその抑制効果は失われていった。水耕液のグルタチオン濃度が 0.01mM になるとその効果はほとんど見られなくなった (図 9)。このような実験結果は植物体の地上部への Cd の移行と蓄積を抑制するためには根圏に一定量以上のグルタチオンが存在する必要があることを示している (参考文献 15)。

今後のために

本研究を通じて得ることができた研究シーズを実用化技術へと応用展開することができれば、遺伝子組換え技術を用いることなく、農作物に蓄積する Cd 量を低減することが可能な作物栽培技術となる。こ

のような栽培技術は市場にも容易に受け入れられる技術となりうる。水耕栽培で得られた実験結果を実際の栽培土壌を用いた試験で再現することが今後の重要な研究課題のひとつである。グルタチオンは 3 つのアミノ酸からなるペプチド分子である。そのため、土壌微生物による分解を受けやすいと考えられる。栽培期間を通じて、栽培作物の根圏においてグルタチオンの施用効果を持続させるグルタチオン施用方法を確立する必要がある。この現象の分子メカニズムにはまだ不明な点も多い。このメカニズムを解明することは、学術的に意義あることと同時にこの技術が実用化された場合の研究者による説明責任を果たすことにも直結している。分子メカニズム解明のための基礎研究と実用化を目指した実証試験を両輪にした研究推進が本研究シーズを実用化技術にまで応用展開していく可能性を最大限に高めることに繋がる。本稿で紹介した植物栄養学的なアプローチによって、農作物における重金属元素の動きを制御することが可能になれば、農作物の安全性を積極的にアピールすることができる。この技術の実用化は秋田県農業のさらなる発展に寄与することができるものと確信している。

参考文献

1. Palmer C.E. et al. (2001). Brassicacea (Crucifae) family, plant biotechnology and phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* 3; 245-287.
2. Noctor G. and Foyer C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49; 249-279.
3. Rauser W.E. (1995). Phytochelatins and Related Peptides (Structure, Biosynthesis, and Function). *Plant Physiology* 109; 1141-1149.
4. Ito H. et al. (2003). The Sugar-Metabolic Enzymes Aldolase and Triose-Phosphate Isomerase are Targets of Glutathionylation in Arabidopsis thaliana: Detection using Biotinylated Glutathione. *Plant and Cell Physiology* 44; 655-660.

5. Gong J.-M. et al. (2003). Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100; 10118-10123.
6. Rouhier N. et al. (2015). Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850; 1479-1496.
7. Kuzuhara Y. et al. (2000). Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 46; 265-270.
8. Nakamura S. et al. (2005). Response of glutathione in the sieve tube of *Brassica napus* L. to cadmium treatment. In: Saito K, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, eds. *Sulfur transport and assimilation in plants in the Post Genomic Era.*: Leiden, NL: Backhuys Publishers, pp229-232.
9. Guerinot M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465; 190-198.
10. Nakamura S. et al. (2013). Application of glutathione to roots selectively inhibits cadmium transport from roots to shoots in oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 64; 1073-1081.
11. Fujimaki S. (2007). The Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS), a Most-advanced Imaging Tool for Plant Physiology. *ITE Letters on Batteries, New Technologies and Medicine* 8; 404-413.
12. Fujimaki S. et al. (2010). Tracing cadmium from culture to spikelet: non-invasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport and accumulation of cadmium in an intact rice plant. *Plant Physiology* 152; 1796-1806.
13. Yoshihara T. et al. (2013). A kinetic analysis of cadmium accumulation in a Cd hyper-accumulator fern, *Athyrium yokoscense* and tobacco plants. *Plant Cell Environ* 37; 1086-1096.
14. Nakamura S. et al. (2016). Application of glutathione and dithiothreitol to oil seed rape roots affects cadmium distribution in roots and inhibits Cd translocation to shoots. *Soil Science and Plant Nutrition* 62; 379-385.
15. Nakamura S. et al. (2015). Effects of Glutathione Concentration in the Root Zone and Glutathione Treatment Period on Cadmium Partitioning in Oilseed Rape Plants. In: De Kok LJ, Hawkesford MJ, Rennenberg H, Saito K, Schnug E (ed) *Molecular Physiology and Ecophysiology of Sulfur*, Springer International Publishing AG, Basel, pp253-259.

〔平成 29 年 11 月 30 日受付〕
〔平成 29 年 12 月 14 日受理〕

Control of heavy metal behaviors in plants by glutathione Trials for establishment of new cultivation methods to produce safe crops

Shin-ichi Nakamura¹

¹ *Department of Bioscience, Faculty of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture*

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal. Cd, which enters the food chain, causes humans serious health problems. To reduce Cd contents in crop plants, elucidating and controlling molecular mechanisms of Cd behaviors in these plants is necessary. We have shown that glutathione, applied specifically to the root site, selectively inhibits Cd translocation from roots to shoots. Glutathione, applied to roots, activated Cd efflux from root cells and enhanced abilities to keep Cd in roots' apoplast. Further studies will enable us to elucidate in more detail molecular mechanisms in which glutathione is involved. Understanding these mechanisms triggered by glutathione will lead us to establish novel cultivation methods without gene manipulation.

Keywords: Cadmium, Glutathione, Oilseed rape plant, phloem, Positron imaging, Xylem