

土壌中でのエストロゲン消失にシロツメクサが及ぼす影響と消失経路に関する検証

京大炉 ○櫻井 伸治 藤川 陽子 高橋 千太郎 京大農 梅田 幹雄
大阪産業大 川端 元気 松葉 武史 濱崎 竜英 菅原 正孝

1.はじめに これまでの研究でエストロゲンを添加・吸着させた黒ボク土にてシロツメクサを生育させ、この土壌から酢酸・メタノールで抽出されるエストロゲン画分量(吸着態エストロゲン量)を観測したところ、その量は1-3ヵ月間に当初の10%以下になった¹⁾。しかしシロツメクサを生育していない対照試験でも同様な結果が得られ、黒ボク土中では植物によるエストロゲン消失促進効果は認められなかった。対するにエストロゲンを溶解させた寒天で植物を生育させた場合、植物はエストロゲン消失を著しく促進し、その要因としてエストロゲンの経根吸収、植物由来の酵素によるエストロゲン分解等が考えられた。特に後者は水生植物による DDT²⁾やポリビスフェノールA³⁾分解の要因として報告されていることから、寒天からのエストロゲン消失にもシロツメクサ由来の酵素の寄与が推定された。寒天での試験と黒ボク土での植物生育試験でエストロゲンの挙動が大きく異なった理由として土壌根圏域では、植物のエストロゲン消失に、エストロゲンの経根吸収・酵素による分解、土壌微生物による分解、rhizodeposition に起因する微生物活性化、エストロゲンの土壌への固定化や無機化学的分解等の様々な要因が複合的かつ複雑に作用していることが想定される。個々の要因がエストロゲン消失に寄与する程度を基礎的に解明していくことで、様々なタイプの土壌生態系におけるエストロゲンの挙動の予測が可能になる。本研究では土壌微生物を含有した寒天を用いたシロツメクサ生育試験(以下、寒天植物生育試験)を行い、種々の要因のうち、特に土壌に生息している微生物と植物によるエストロゲン消失効果を明確にした。さらにシロツメクサ由来の酵素によるエストロゲン分解に注目して、植物酵素を抽出したリン酸溶液を用いた回分式のエストロゲン分解試験(以下、バッチ試験)を実施して、植物によるエストロゲン消失経路に植物由来の酵素が関与していることを示した。

2.実験方法 寒天植物生育試験 土壌浸透施設で浸透ろ材として使用された黒ボク土10g(湿重)に Milli-Q 水 100 mL を添加、1.5 時間振とう(160 rpm)後、一晚以上 25 °C の恒温で静置、孔径 2.0 μm のメンブレンフィルターでろ過して土壌微生物を含む抽出液(以下、土壌微生物液)を得た。なお、土壌微生物液中の ATP 濃度は当初 300 pmol/L であり、土壌微生物の存在が確認できた。土壌微生物液に Hoagland の培養液相当の栄養成分を添加し、さらにエストロン(以下、E1)を 10 または 100 μg/L、またはエストラジオール(以下、E2)を 100 μg/L になるように添加してエストロゲンと土壌微生物を含む 0.4% (w/w) の寒天を作成した。寒天固化後、植物の種子を 0.2g 直播種し、20-25 °C の実験室で 14 および 28 日生育させた。所定期間生育後、寒天中および植物体中エストロゲン濃度を GC-MS にて測定した。また、植物を生育させていない寒天の実験系も対照試験として用意した。**バッチ試験** 土壌微生物を添加していない寒天にて 14 または 28 日生育させたシロツメクサを採取、葉茎部と根部に分解した。植物体とリン酸ナトリウム緩衝液(100mM, pH 7.6)を混合、ホモジナイズした(固液比は葉茎部 1:20 (w/v) に、根部は 1:40 (w/v))。その後遠心分離し、上澄み液をポアサイズ 0.45μm のフィルターにてろ過して植物抽出液とした。また、植物根から酵素が浸出、寒天中に拡散している可能性を検討するため、植物生育後の寒天を遠心分離、上澄み液をポアサイズ 0.45μm のフィルターにてろ過して寒天抽出液を得た。植物および寒天抽出液各 4 mL にリン酸緩衝液および E1 または E2 (初期濃度: 100μg/L)を全量 10 mL になるように混合し、18 時間静置後溶液中エストロゲン濃度を GC-MS にて測定した。また、対照試験として熱処理(121°C, 30 分)した抽出液を添加した実験系も作成した。

3.結果と考察 寒天植物生育試験 本試験では植物体中のエストロゲンは検出されなかった(検出下限 E1:0.29 μg/kg 乾重; E2:0.22 μg/kg 乾重)。試験開始 14, 28 日後における植物の有無の各条件下での寒天中エストロゲン濃度を表 1 に示す。これまでの研究から植物を生育させていない寒天ではエストロゲンは生育期間 1 ヶ月で初期濃度の約 60%以上までしか減少しないことが判っているが¹⁾、表 1 より植物を生育させていない寒天でエストロゲン濃度が初期濃度の 20-30%まで低下し、土壌微生物液添加がエストロゲン分解を促進したことが判った。

キーワード エストロゲン, エストロゲン消失経路, 寒天植物生育試験, 土壌微生物, 植物由来酵素

〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西 2-1010 京都大学原子炉実験所 放射線管理学 TEL 072-451-2300 (3232)

土壌微生物液添加条件下でも植物がある方が無い場合より生育開始 14 日後および 28 日後の寒天中エストロゲン濃度は小さくなった。土壌微生物存在下でも植物によるエストロゲン消失促進効果が作用することが判った。

土壌微生物の有無による生育 14, 28 日後の寒天中 E1 の残留率（初期添加濃度に対する試験終了時のエストロゲン濃度の割合）を図 1 に示す。土壌微生物存在下ではエストロゲン消失が促進されることが予測されたが、逆に土壌微生物が存在することで寒天中エストロゲン残留率が高くなり、植物によるエストロゲン消失効果が低下した。なお、土壌微生物を入れた寒天では、植物根の重量が土壌微生物を添加していない寒天で生育させた植物より小さく⁴⁾、植物生長は不良になった。土壌微生物添加時の植物根生育の低下がエストロゲンの経根吸収等の植物作用を低下させた可能性も考えられる。本研究では原因の特定までには至らなかったが、今後、植物生長が根圏域のエストロゲン消失に与える影響を詳細に検討する必要がある。

バッチ試験 試験期間中 E1 と E2 の酸化還元反応は見られ

なかった。植物酵素抽出液を添加したバッチ試験終了時（18 時間）の溶液中 E1 または E2 濃度を図 2 に示す。バッチ試験の結果から、葉茎部から抽出した酵素ではエストロゲンは分解されず、根部から抽出した酵素を添加した場合でエストロゲン濃度が低下した。さらに植物、寒天抽出液に熱処理（121℃, 30 分）を加えた対照試験では、溶液中のエストロゲン分解はほとんど見られなかった。ここからシロツメクサ由来の酵素によってエストロゲンが分解され、かつエストロゲン分解酵素はもっぱら植物根に局在化していることが判った。さらに、植物を 4 週間生育させた寒天抽出液を添加した場合はエストロゲン濃度の低下が見られたが、植物を 2 週間生育させた寒天抽出液を添加した場合、熱処理した寒天抽出液を添加した場合のエストロゲン濃度と大きな差は見られなかった。異なる生育期間の寒天抽出液添加後のエストロゲン分解を比較すると、熱処理した抽出液では両者に差がなく、熱処理しなければ 4 週間植物を生育させた寒天抽出液の方がよくエストロゲンを分解した。ここから寒天中には植物根由来のエストロゲン分解酵素が拡散していること、この酵素は加熱で不活化するが長期に植物を生育させるほど寒天中の濃度が高くなることが推察される。しかし、試験終了時の根部酵素添加溶液中のエストロゲン濃度値がばらついていることから、なお検討を要する。

表 1 添加条件別の寒天中エストロゲン濃度(μg/L) ()内の数値は植物なしの寒天中エストロゲン濃度

添加条件	エストロゲン	14日後	28日後
E1 10μg/L	E1	2.69 (5.64)	0.26 (2.18)
	E2	0.58 (0.72)	<0.25 (0.48)
E1 100μg/L	E1	13.39 (56.72)	2.06 (23.07)
	E2	2.2 (20.86)	<0.25 (2.93)
E2 100μg/L	E1	30.13 (44.87)	4.42 (28.13)
	E2	7.45 (24.80)	0.64 (2.61)

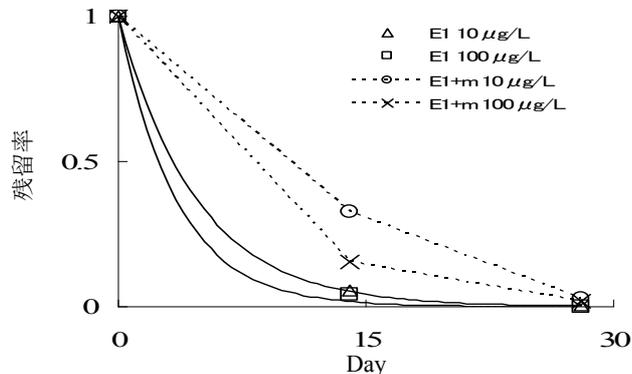


図 1 E1 添加条件別の初期濃度に対する寒天中 E1 残留率 (+m : 土壌微生物あり)

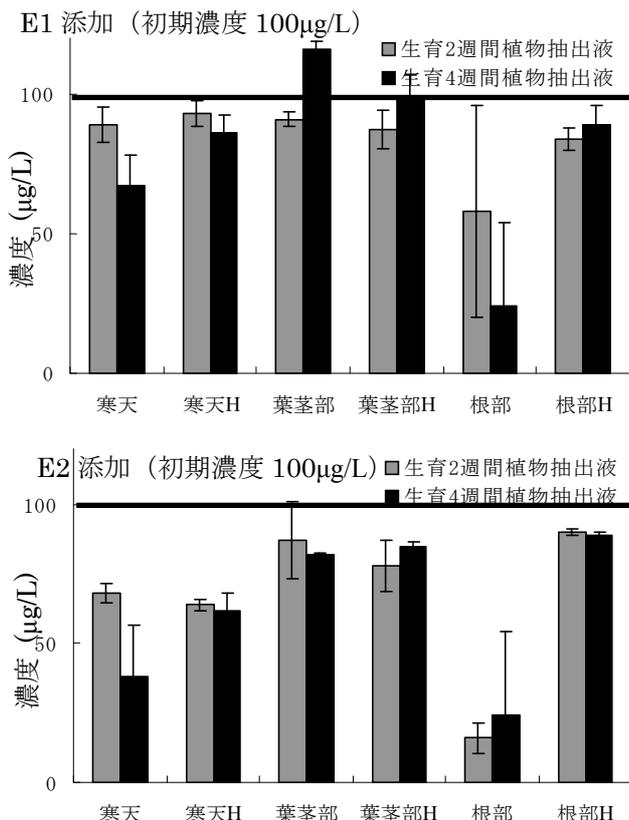


図 2 バッチ試験終了時の溶液中エストロゲン濃度 (H : 熱処理)

参考文献

1) S. Sakurai *et al.*, 2009, J. Environ. Sci. Health B. (in press); 2) B. Suresh *et al.* 2005, Chemosphere. 61, 1288-1292; 3) J. H. Kang and F. Kondo., 2006, Bull. Environ. Contam. Toxicol 77, 500-507. ;4) 川端他, 2009, 水環境学会要旨集, p283.