

シロツメクサ由来酵素がエストロゲン消失に及ぼす影響の検討

大阪産業大学 学生会員 ○川端 元気, 京都大炉 正会員 櫻井 伸治, 藤川 陽子
大阪産業大学 正会員 菅原 正孝, 濱崎 竜英, 谷口 省吾, 尾崎 博明

1.はじめに

これまでの研究で, シロツメクサ(*Trifolium repens*)の根部からのリン酸抽出液, または植物を生育させた寒天の上澄み液(寒天抽出液)にエストロゲンを添加することで, 水溶液中のエストロゲンが分解される現象を見出した¹⁾. この結果から, エストロゲンを分解する酵素が植物根に局在化して存在し, 根から根圏域にむけて拡散している可能性が考えられた. ラッカーゼやホースラディッシュペルオキシダーゼによってエストロゲンが分解されることが報告^{2, 3)}されており, シロツメクサにも同様の機能を持った酵素が存在している可能性が大いに考えられる. しかしその後, 一定期間保存した植物根からの酵素を使用したところ, エストロゲンが分解されなかった. また, 熱処理を行い酵素不活性にした抽出液を使用したにも関わらずエストロゲンが分解される傾向を見出した. 本研究では, 植物の葉茎・根の採取後, 保存期間による酵素のエストロゲンの分解への影響, 熱処理を行い酵素を不活化したにも関わらずエストロゲン分解が起こった原因を明らかにすることを目的としている.

2.実験方法

Hoagland 培養液を滅菌済み寒天にて 28 日生育させたシロツメクサを採取し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 (g : mL), 根部は 1:40 (g : mL)). その後遠心分離し, 上澄み液をポアサイズ 0.45 μ m 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 0.45 μ m 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エストロン(E1)またはエストラジオール(E2) (初期濃度 : 100 μ g/L) を全量 10 mL になるように混合し 18 時間静置した. 静置後, エストロゲン分析のため 5 mL の溶液を分取して固相抽出直前にサロゲートとして 10mg/L の 17 β -エストラジオール 16, 16, 17-d3 (d 体 E2)メタノール標準液を 10 μ L 添加(d 体 E2, 0.1 μ g), 超純水にて 50mL にメスアップした. その後, C18 樹脂による固相抽出を経てガスクロマトグラフ質量分析計にて 5 点検量線法で定量した. また, 対照として植物抽出液および寒天抽出液を 121 $^{\circ}$ C, 30 分でオートクレーブ処理したものについて, 上記と同様の操作により d 体 E2 回収率を得た. シロツメクサを採取して 1 週間以内に静置試験を行ったものを試験 1, 静置試験までに 6 ヶ月間上の期間を要したものを試験 2 とした. 試験 2 で使用する葉茎, 根, 寒天については, ポット解体後, 4 $^{\circ}$ C で冷蔵保存したものを使用した.

3.結果と考察

試験 1 の E1 を添加したものの結果を図 1 に, E2 を添加したものを図 2 に示す. 採取後間もない根, 寒天からの抽出液を使用した試験 1 では熱処理を施したものに比べ施さない方が E1, E2 濃度が減少した. これは植物根由来の酵素や寒天中に拡散したエストロゲン分解酵素の働きである可能性が高い. ただし, 寒天抽出液に E2 を添加した試験では, 熱処理なしの方が減少が大きいものの, 熱処理したものでも E2 濃度が減少した. 次に試験 2 の E1 を添加の結果を図 3 に, E2 を添加の結果を図 4, 5 に示す. この試験では, 根からの抽出液を使用しても E1, E2 の分解が認められない試料もあった. 試験 1 と異なる傾向として, ばらつきがあるものの葉茎からの抽出液を使用した系で E1, E2 濃度の減少が見られた. 植物体を 6 か月間保存したことで E1, E2 を分解する何らかの腐朽物が葉茎中に出来た可能性がある. 熱処理済み寒天抽出液を使用した試験では E2

キーワード : エストロゲン, シロツメクサ, エストロゲン分解酵素, 不活化

〒574-8530 大阪府大東市中垣内 3-1-1 大阪産業大学新産業研究開発センター環境準備室 TEL072-875-3001(7824)

の濃度の減少が見られた。これは試験 1 と同様の結果である。また、E2 から E1 への酸化も確認できた。これらの結果から、新鮮な植物体使用時は、植物根中の酵素や根から寒天中に拡散した酵素により E1, E2 が分解されることが判った。また、葉茎からの抽出液を使用した試験では、新鮮な植物体を使用した場合 E1, E2 の分解は起こらず、6 ヶ月以上保存した植物体抽出液を使用した試験では E1, E2 の分解が起こった。このことから、葉茎には E1, E2 を分解する酵素は存在しないが、保存期間中に E1, E2 を分解する何らかの物質が生成されたことが考えられた。寒天抽出液を使用した試験では、保存期間、熱処理の有無に関わらず E2 の減少が見られた。寒天中の有機物の作用により E2 が分解された可能性が考えられるがメカニズムは不明である。今後の課題としては、今回の試験で使用したシロツメクサだけでなく他の植物からの抽出液を使用して試験を行い、エストロゲン分解酵素がどのような植物に存在するのかを明らかにする。また、今回の試験では酵素を不活化するために 121℃, 30 分間オートクレーブ処理を行ったが、より低温でも酵素の不活化を行えるため、それについても検討を行う。

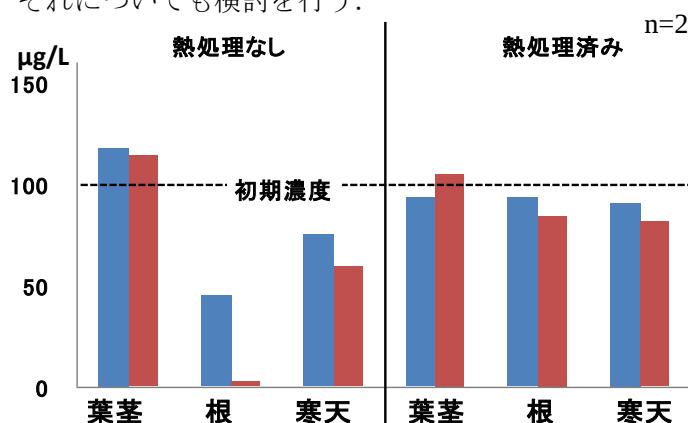


図 1 試験 1(E1 初期濃度 100μg/L)

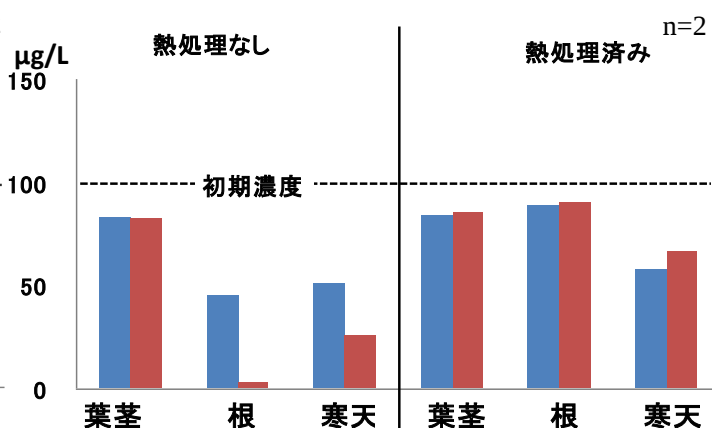


図 2 試験 1(E2 初期濃度 100μg/L)

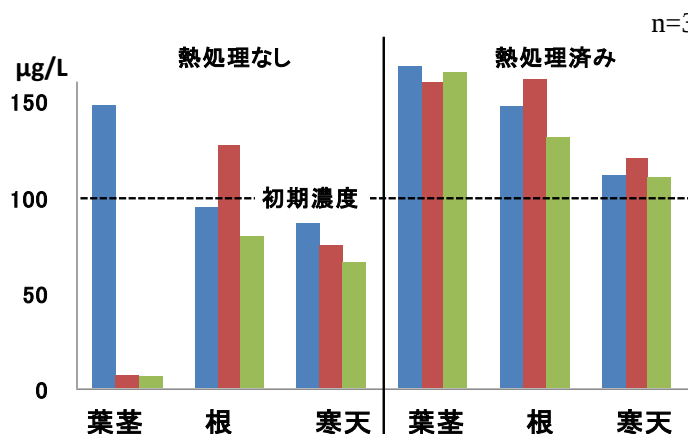


図 3 試験 2(E1 初期濃度 100μg/L)

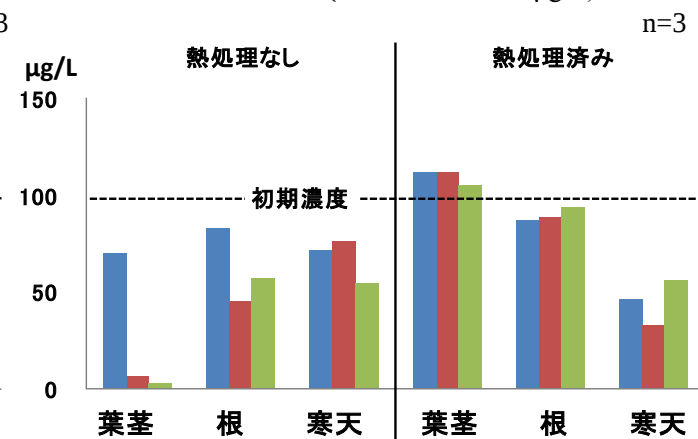


図 4 試験 2(E2 初期濃度 100μg/L)

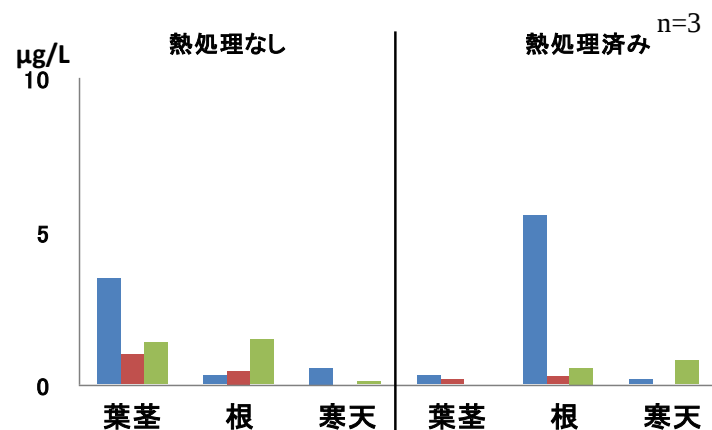


図 5 試験 2(E2 初期濃度 100μg/L)E1 濃度

参考文献

- 1) 櫻井ら, 第 64 回日本土木学会講演概要集, 407-408, 2009.
- 2) Auriol, M. et al., Water Res., 41 (15), 3281-3288, 2007.
- 3) Auriol, M. et al., Chemosphere, 68 (10), 1830-1837, 2007.