

(44) カドミウムによる次世代影響を含めた 土壌生態系影響の評価方法の検討

山本研一朗*・加賀井匡・中山亜紀・米田稔・森澤眞輔

京都大学大学院工学研究科 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂4)

* E-mail:yamamoto@risk.env.kyoto-u.ac.jp

近年、重金属による土壌汚染が顕在化しているにもかかわらず、未だ土壌環境リスクの定量的な評価手法は確立されていない。本研究では指標生物として一次生産者である植物に着目し、シロイヌナズナ、カドミウムを用いて、発芽率、生育阻害、ストレスタンパク発現量などの測定を行い、土壌生態系への影響の評価指標を検討した。

カドミウムを曝露したシロイヌナズナを二世代育成した結果、各世代ごとにカドミウム曝露による生育阻害が見られた。また、植物体中のカドミウム蓄積量においても曝露濃度に依存した増加傾向が見られたことから、各世代におけるカドミウムの曝露・蓄積による生育への影響が確認された。次世代影響の評価指標としてストレスタンパクの発現量を検討したが、有意な結果は得られなかった。一方、発芽率の測定では高濃度曝露をした子世代の発芽の遅れが見られ、次世代影響が確認された。このことから、カドミウムによる親世代からの影響が種子の発芽に大きく関与していると考えられ、次世代影響を含めた生態系への影響を評価する上では、発芽率が50%に達するのに要する時間であるTg50など、発芽率の遅れを示す指標が有効となる可能性が示唆された。

Key Words : *Arabidopsis thaliana*, HSP70, Ecological risk, Biological effect, Cd

1. 序論

日本では、1950年代の高度経済成長の時期に水俣病、イタイイタイ病、四日市喘息等の公害問題が表面化し大きな社会問題となった。これら諸問題への取り組みとして公害対策基本法(1967年制定)、大気汚染防止法(1968年制定)、水質汚濁防止法(1970年制定)等の整備が進められ、平行して対策技術も進展してきた¹⁾。

しかしながら、土壌汚染については汚染の深刻さが表面化しにくいといった理由から、環境負荷の認識や法制定までに時間がかかり、ようやく2002年5月22日に土壌汚染対策法が成立し、29日に公布された(2003年2月施行)。「土壌汚染の状況を把握し、国民の健康被害を防止する対策を実施する」ことを目的とし、土壌に含まれることに起因して健康被害を生ずる恐れがある物質が指定され、それぞれの環境基準値が定められた。このように人の健康被害を未然に防止するための対策が整えられてきた一方、人以外の動植物に対する対策はこれまで十分に検討されてこなかった。しかし近年になって、企業の工場跡地等の再開発等に伴い、これまで明らかになることが少

なかった重金属、揮発性有機化合物等による土壌汚染が顕在化してきたことから、土壌汚染対策法の附帯事項にあるように、「土壌汚染による生活環境や生態系への影響」に対する懸念が高まっている。

土壌汚染制度への取り組みに先進的なオランダやアメリカなどでは、1990年代に各国の実情に応じて土壌生態リスク評価指標及び土壌保全に関わる法制度の枠組みが確立されたが、その中では土壌生態系は評価対象となっており、土壌生態系保全の概念が明確に位置付けられている。しかし一方で、わが国の土壌汚染に関わる法制度は、人への健康影響という観点から構築されており、現時点では土壌生態系保全の概念や基本理念については位置付けられておらず、土壌汚染による生態系への影響の実情を把握するための早急な科学的知見の集積が求められている²⁾。

有害物質等による土壌汚染が及ぼすリスクを評価する試みが、先行している欧米諸国においても、なお基礎的情報や評価手法の適用事例を集積する段階にある。わが国においては土壌生態系を構成する代表的な生物種(土壌細菌、バクテリア、土壌動物、植物、動物等)を、

土壌生態系の主要構成種として特定することができる状況にはなく、生態系という複雑なシステムをモデル化することが困難である。それぞれの系について代表生物種を特定し、影響を評価するためのエンドポイントを定めることが重要である。現段階においては選定可能なエンドポイントやその定量的評価法の検討から始めなければならない状況にある。

現在は、モグラやミズなどの地中動物を指標生物とした重金属土壌汚染の生態リスク評価が行われていることが一般的であるが³⁾、一次生産者である高等植物に着目する評価系は例がない。指標生物として高等植物は、試験法の簡便さ等の点においても、ミズ等の土壌動物より優位であり、わが国の土壌生態系の主要構成要素の一つでもある。土壌汚染の影響を評価するための指標生物として植物に注目することには十分な根拠を付与することができる。

本研究が対象生物に選んだシロイヌナズナは、既にゲノム解析が終了しているアブラナ科の植物であり、栽培が容易で世代が短いため植物分子遺伝学において多用される植物である⁴⁾。わが国では北海道から九州と広範囲に分布しており、日本全国で土壌汚染の指標生物として利用することも可能である。シロイヌナズナは土壌生態系を構成する一構成要素にすぎないが、一次生産者であること、実験室でも実フィールドでも栽培可能であること等、メリットは多く、これを中心に生態系へと研究を応用できる可能性があると考えられる。

戒井は、マイクロアレイを用いてカドミウムによるシロイヌナズナの遺伝子発現の解析を行い、その結果カドミウムの曝露によって濃度依存的にmRNA発現量が増加する遺伝子を15種類確認したと報告している⁵⁾。その一つが分子量70kDaのheat shock protein 70(以下HSP70)である。HSP(Heat Shock Protein)は生物個体や細胞に熱や重金属などのストレスを与えた際に合成される一群のタンパク質で、細菌から高等動物まで広く生物界に存在する。熱による影響のみでなく、他の処理でも類似の現象が確認されることから、悪条件に対する生体の防御機構に関与すると考えられている。HSP70はHSPの一種で分子量が70kDaであるもので、多種の生物で様々な研究がなされている分子シャペロンの一環である。タンパク質は生化学反応において非常に重要であるが、HSP70は中でも、熱やその他のストレスによって高次構造が破壊されたタンパク質の修復、タンパク質変性の抑制機能を有するとされている⁶⁾。

そこで、本研究では重金属類の中でも汚染物質としてわが国の市街地土壌中にしばしば検出されるカドミウムに注目し、シロイヌナズナに与える経世代的な影響を評価することを試みる。

2. 実験方法

(1) 試薬

シロイヌナズナの栽培培地には、(株)日本製薬製の植物培養培地ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、(株)同仁化学研究所製のMES、(株)和光純薬工業製のスクロース、ゲランガム、寒天(粉末)、水酸化カリウムを使用した。

カドミウムの曝露には(株)ナカライテスク製の酢酸カドミウム二水和物(以下、酢酸カドミウム)を使用した。

植え替え後の培地には日東紡製の栽培用ロックファイバーミニポットM40T40を使用し、肥料として(株)旭化学工業製の液体肥料ハイフラワーを使用した。

40(w/v)%アクリルアミド/ビス混合液(37.5/1)、ペルオキシ二硫酸アンモニウム、テトラメチルエチレンジアミンはナカライテスクから購入した。HSP70のポジティブコントロールとしてabcamからHsp70 protein (Human Recombinant, E. coli)を購入した。また、一次抗体および二次抗体にはabcam製マウスモノクローナル抗体、ラビット抗マウスIgG抗体を使用した。ウェスタンブロッティングに用いたメンブレンはinvitrogen製ニトロセルローズメンブレン(ポアサイズ0.45 μ m)、BIO-RAD製Sequi-Blot PVDF Membrane(0.2 μ m)の二種類を使用した。

そのほか、特に記載のない限り、和光純薬工業の試薬を使用した。

(2) シロイヌナズナの播種、発芽

以下の手順で寒天培地の作成を行った。植物培養培地ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類6.45g、スクロース7.5g、MES0.75gを超純水500mLに溶かした後、水酸化カリウム水溶液を用いてpHを5.7に調整した。これを4本の三角フラスコに等量ずつわけ、それぞれにゲランガム1.0gを加えた。オートクレーブによる滅菌後、60℃程度まで冷ました後に、フィルター滅菌を行った酢酸カドミウム溶液を最終濃度が所定の濃度になるよう加えた⁷⁾。培地の最終濃度は0,10,100 μ Mである。これをシャーレ1枚(ϕ 100mm)あたり約30mLずつ分注し、クリーンベンチ内で30分乾燥させた。各濃度4枚ずつ12枚の培地を作成した後、使用するまでは4℃で保存した。

種子は、培地に播種する前に以下のような手順で滅菌した。適量の種子を1.5mLチューブに入れ、滅菌水を700 μ L、次亜塩素酸ナトリウムを300 μ L、Polyoxyethylene(10)Octylphenyl Ethelを10 μ L加え、マイクロチューブローターを用いて、7分間攪拌した。その後軽く遠心し、上清を取り除いた後、滅菌水1mLで種子

を洗浄した。この洗浄作業は5回繰り返した。

滅菌した種子は遠心により回収し、0.1%アガロースを1 mL加えることで、播種液とした。寒天培地に、クリーンベンチ内で0.1%アガロースを2mL重層し、マイクロピペッターを用いてシャーレ1枚につき種子を16個ずつ均等に播いた。アガロースが固化し、種子が培地上に固定できたところで、サージカルテープでシャーレのふたを固定した。その後4℃で2日間休眠打破を行った後、人工気象器または恒温恒湿室の育成棚にて、湿度60%、16時間明期、8時間暗期の条件で栽培した。

(3) 植え替え

発芽後約14日目に、24本の苗を無作為に選択し、40mm×40mmのロックファイバーミニポットへそれぞれ植え替えた。ロックファイバーは6×4のブロックに切り取り、十分に初期灌水を行ったうえで水切りし、1000倍希釈をした液体肥料ハイフラワーを含む、所定の濃度のカドミウム溶液1Lを添加した。それ以降は1日おきに重量を測定し、減少した重量分だけ超純水を与えた。同様に、1週間ごとに1000倍に希釈した液体肥料ハイフラワーを蒸発した水分量だけ与えた。

二世代目シロイヌナズナは一世代目で収穫した種子を用い、栽培方法は親世代と同様に行った。カドミウム曝露については、種子を収穫した親世代と同じ曝露濃度で栽培を行った。

(4) 生体試料の測定

a) 根長、葉面積

各条件で栽培したシロイヌナズナの根、葉を、各濃度につき無作為に選択した20個体から1サンプルずつ採取し、その根長、葉面積の平均値を求めた。葉および根の採取は各個体の中で最も大きい葉と最長根で行い、これをサンプルとした。サンプルは、OHPフィルムに挟んだものをスキャナーでデジタル画像として取り込み、グラフィックソフトウェアimageJ(NIH,U.S.A)を用いて数値化した。

b) 重量

各培地で栽培したシロイヌナズナ20個体を部位ごとに分け、まとめて湿重量を計量した後、100℃で2時間乾燥後、乾燥重量を計量した。重量は、個体数である20で割って1個体あたりの重量を平均値として求めた。

c) 葉中クロロフィル量

各培地で栽培したシロイヌナズナの葉を各濃度につき20サンプル採取し、N,N-ジメチルホルムアミド2mLに24時間浸してクロロフィルの抽出を行った。その後、Nano

Drop 1000(Thermo Scientific社製)を用いて220nm～748nmのスペクトルで測定を行い、647nm、664nm、748nmの値とPorraの式⁹⁾を参照に、以下を用いて抽出液中のクロロフィル量(クロロフィルa、クロロフィルb)を算定した。

抽出液中クロロフィル量 [nmol/mL]

$$[\text{クロロフィルa}] = 134.3(E_{664} - E_{748}) - 34.7(E_{647} - E_{748})$$

$$[\text{クロロフィルb}] = 229.0(E_{664} - E_{748}) - 53.8(E_{647} - E_{748})$$

(5) 植物体中重金属濃度の測定

a) 重金属の抽出

シロイヌナズナ中重金属抽出には、CEM corporation製湿式分解装置MARS5を用いて1N硝酸による湿式分解を行った。採取した植物体は葉、茎、種子の部位別に分け、100℃、2時間にて乾燥した後、硝酸を加えて加熱・加圧することで分解した。湿式分解の条件は、最大出力1200W、出力%50、圧力350psi、温度200℃、処理時間30分とした。ただし、最大出力での処理時間は10分とし、前後の10分間は出力の増加、減少に要する時間である。

この硝酸抽出液を超純水で希釈し、ADVANTEC製DISMIC(孔径45μm)でろ過し分析用試料とした。

b) ICP-MSによる測定

抽出液中の重金属濃度の測定にはHEWLETT PACKARD製の誘導結合プラズマ質量分析装置ICP-MS(HP4500)を使用した。カドミウムの定量には、内標準法と検量線法を併用した。まず、内標準物質として培地や植物中での存在量が少ないインジウムを全測定サンプルと検量線サンプルに100ppbで均一に含まれるように添加し、そのカウント数の変動から全サンプル中の測定元素のカウント数を補正した。検量線法では標準液の濃度と測定カウント数との関係から検量線を求め、サンプルを測定して得られたカウント数からサンプル溶液中濃度を算出するが、標準液についても、内標準物質によるカウント数補正を行い、より精度の高い検量線を作成し、定量に用いた。検出限界は、サンプルと同様の処理を行ったBlank(空操作)サンプルの測定結果から得られた標準偏差の3倍の値とした。

(6) 免疫染色によるHSP70発現量の測定

a) タンパク質の抽出

シロイヌナズナは、採取後すぐに液体窒素を加え、乳棒によって粉末状になるまで凍結粉碎し、-80℃で保存して試料とした。

タンパク質の抽出には、細胞溶解液(尿素7M、チオ尿素2M、CHAPS 4% (w/v))を用いた。細胞溶解液200μLに試料を適量加え、30秒間超音波破碎装置にかけ、30秒以

上氷上に置いて冷やすという操作を5回繰り返すことで細胞壁を破碎し、タンパク質を抽出した。細胞の破片等は4℃、10000rpmで10分間遠心沈降させ、上清を回収し、抽出試料の総タンパク質の定量は、2-D Quant Kit(GE Healthcare Bioscience製)を用いた。

b) SDS-PAGE

タンパク質の分離にはSDS-PAGEを用いた。SDS-PAGEに用いた試料量は20μgとし、2×SDSサンプル処理バッファー(100mM Tris-HCl pH6.8、4%SDS、20%グリセロール、10%β-メルカプトエタノール)で2倍に希釈し、室温にてオーバーナイトインキュベートすることで立体構造を解いた後、凝集したタンパク質や不純物などを除去するために10000rpm遠心し、上清のみをSDS-PAGEに供した。電気泳動はBIO-RAD製のミニプロティアン3セルにより、200V定電圧条件で1時間程度で行った。

c) ウェスタンブロッティングによるタンパクの検出

電気泳動が終わったゲルは泳動バッファー(25mM Tris pH8.3、192mMグリシン、0.1%SDS)に浸して室温で10分振盪した後、miniVE Vertical Electrophoresis System(GE Healthcare Bioscience)を用いてタンパク質をウェスタンブロット用メンブレンにブロッティングした。ブロッティングの条件は、200mA/gel定電流条件で30分とした。ブロッティングが終了したメンブレンはPBS-T溶液(PBS,0.1%Tween20)に浸して2分間振盪し、さらに2%スキムミルクPBS-Tを用い、室温にて1時間処理することでブロッキングを施した。

その後、PBS-Tで50,000倍に希釈した一次抗体で一時間反応させ、PBS-Tで再度洗浄した後、PBS-Tで100,000倍に希釈した二次抗体を一時間振盪することで二次抗体反応を起こさせた。反応後はPBS-Tで過剰な二次抗体を洗浄した。洗浄後のメンブレンに、ECL Advance Western Blotting Detection Kit(GE Healthcare Bioscience製)の発色

試薬をかけ5分間放置した後、富士フイルム社製ルミノ・イメージアナライザー LAS-4000miniを用いて撮影した。撮影した画像は、Multi Gauge version 3.11(FUJIFILM)を用いてバックグラウンド補正を行い、その後さらにポジティブコントロールを基準にして補正を行った。

3. 実験結果

(1) 発芽率

カドミウム曝露を行ったシロイヌナズナの発芽率測定結果を図1、2に示す。測定は播種後10日間行い、発芽数から算出した。Mann Whitney検定を行い、コントロール(曝露濃度0μM)と有意な差が見られたものに*を付した。また、図中のnは各曝露濃度でのサンプル数を示す。

カドミウム曝露を行った一世代目のシロイヌナズナでは、曝露濃度による有意な差は確認できなかった。各世代で行った3度の再現性試験でも同様の結果が得られたことから、100μMのカドミウム曝露を一世代行うことでは、発芽率に有意な差は現れないことを確認した。

二世代目のシロイヌナズナでの結果では、カドミウム曝露による影響が確認された。二度の再現性試験を行ったが同様の結果が得られ、カドミウムによる経世代影響として、発芽率の遅れが有意な差を持って現れている。曝露濃度100μMで発芽率の遅れが生じ、90%以上になるまでに100～140時間を要している。また、有意差は見られないまでも、曝露濃度10μMにおいてもコントロールよりも発芽率の遅れが生じた。このことから、カドミウムの曝露は次世代種子の発芽率に大きく影響していると考えられる。

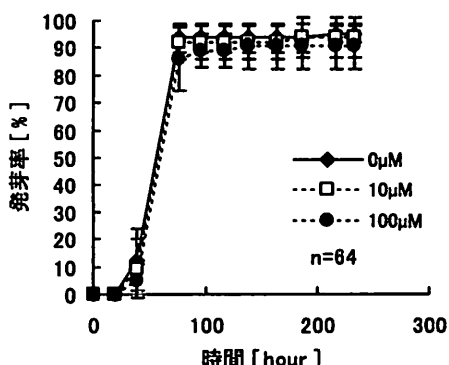


図1 第一世代シロイヌナズナの経時的な発芽率の変化

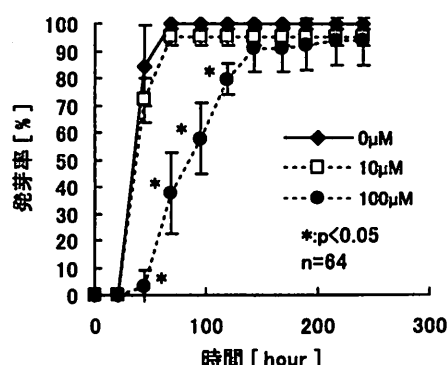


図2 第二世代シロイヌナズナの経時的な発芽率の変化

(2) 生育阻害

カドミウム曝露を行ったシロイヌナズナの生育阻害について、根長、葉面積、全体重量、葉中クロロフィル量の測定を行った。結果では、寒天培地で播種から二週間程度の栽培を行った「幼若期」とその後植え替えを行い種子が形成されるまで栽培を行った「成熟期」の二種類の成長段階を表記している。「幼若期」は測定可能な大きさまで育つ期間を、「成熟期」は完全に成長し種子が採取できるようになるまでの期間を考慮している。各図では固体ごとの標準偏差をエラーバーで表示し、Mann Whitney検定を行い、コントロール(曝露濃度0 μ M)と有意な差が見られたものに*を付した。図中のnは各曝露濃度でのサンプル数を示す。なお、二世代目におけるカドミウム曝露濃度100 μ Mのシロイヌナズナは、成熟期をむかえる前に枯死したため、成熟期における各試験の測定は行えなかった。また、各試験で2回以上の再現性試験を行ったが同様の結果が得られたため図示は省いた。

a) 根長、葉面積

測定結果を図3、4に示す。測定には播種後15日が経過した幼若期のシロイヌナズナを用いた。

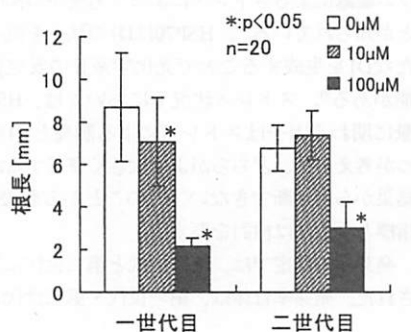


図3 カドミウムの根への生育影響

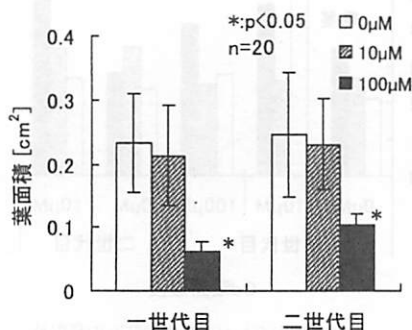


図4 カドミウムの葉への生育影響

根長、葉面積共に同世代内で曝露濃度に依存した減少傾向を確認したが、世代間での大きな違いは見られない。

b) 重量

測定結果を図5に示す。測定には播種後15日が経過した幼若期のシロイヌナズナを用いた。各個体の重量は非常に小さく、個別の測定は行えなかった。そのため、図中の値は20個体をまとめて測定し、その値を個体数20で割ったものであり、標準偏差の算出も行えなかった。

各世代で曝露濃度に依存した減少傾向を確認した。また、乾燥重量における結果も同様の傾向が見られた。第二世代でのコントロールの値が第一世代に比べ大きくなっている。これは、種子の保存状態などの要因で、第一世代と第二世代で播種から発芽までの期間に差が生じていることが原因である可能性がある。測定は播種から同期間で行ったため、発芽後の育成期間に差が出たことが生長量に影響したと考えられる。

c) 葉中クロロフィル量

測定結果を図6に示す。縦軸は葉面積あたりのクロロフィル量を表わしている。測定には播種後41日が経過した成熟期のシロイヌナズナを用いた。なお、二世代目におけるカドミウム曝露濃度100 μ Mのシロイヌナズナは成

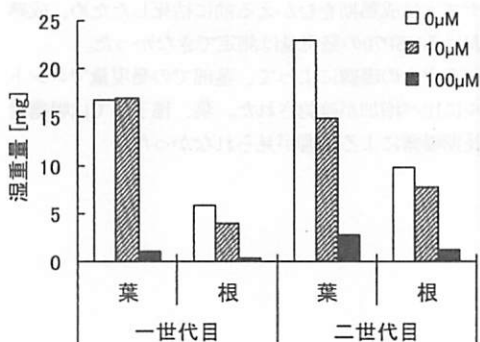


図5 幼若期シロイヌナズナの生育阻害

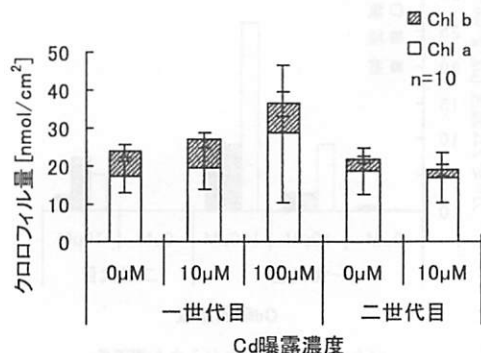


図6 葉面積あたりクロロフィル量の変化

成熟をむかえる前に枯死したため、成熟期における測定は行えなかった。

一世代目では曝露濃度に依存した上昇傾向が、二世代目ではコントロールに比べ減少が確認されたが、その差は有意なほどではなかった。

(3) 植物体中カドミウム濃度

測定結果を図7に示す。また、二世代目におけるカドミウム曝露濃度100 μ Mのシロイヌナズナは成熟期をむかえる前に枯死したため、成熟期における植物体中カドミウム濃度の測定はできなかった。

カドミウムの曝露によって各部位へのカドミウムの蓄積を確認した。データ数が少ないため単純な世代比較は困難だが、第一世代に比べ二世代での種子部への蓄積が顕著に現れた。

(4) HSP70発現量

測定結果を図8に示す。なお、HSP70発現量は、植物体から抽出されたタンパク量あたりの値で示している。また、二世代目におけるカドミウム曝露濃度100 μ Mのシロイヌナズナは成熟期をむかえる前に枯死したため、成熟期におけるHSP70の発現量は測定できなかった。

カドミウムの曝露によって、茎部での発現量でコントロールに比べ増加が確認された。葉、種子部では曝露濃度や長期曝露による影響が見られなかった。

4. 考察および結論

本研究では、カドミウムを曝露したシロイヌナズナについて、発芽率、生長量（根長・葉面積・重量）、葉中クロロフィル量、ストレスタンパクHSP70発現量などを測定し、経世代的な影響指標として有効なものを探索した。

生長量については、根長・葉面積・重量のいずれにおいてもカドミウム曝露の影響が確認された。しかし、これらの結果については、種子の保存状態などの要因から、単純な世代間の比較は困難であると考えられる。このため経世代的影響指標とはなりがたい。葉中クロロフィル量についても、カドミウム曝露の影響が示唆されたが、コントロールとの差が有意となるほどではなく、カドミウム蓄積量との相関についても同様であることから、本実験結果からは経世代的影響を示すことはできない。また、ストレスタンパク質HSP70の発現量についてもカドミウムの曝露濃度、蓄積量への依存性や世代間での違いは確認できなかった。

HSP70は光化学系IIにおける保護機能と再生機能を持っていると考えられている⁹⁾。光化学系IIの反応中心タンパクであるD1は多くのストレスに対して敏感で、特にカドミウム曝露によるストレスによっても発現が抑制されることが知られている¹⁰⁾。HSP70はD1の減少を阻止または新たなD1を生成することで光化学系IIの安定化を図る機能がある⁹⁾。ストレス状況下においては、HSP70の発現量に関わる因子はストレスによる誘発とD1の保護の二つが考えられ、どちらがより大きく寄与するかは今回の結果からは判断できない。このことからHSP70を評価指標とするには検討を要する。

一方、発芽率の測定では、第一世代と二世代に差異が確認された。発芽率自体は、第一世代・二世代とも

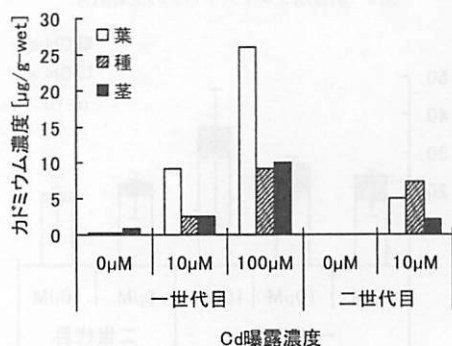


図7 植物体中のカドミウム蓄積量

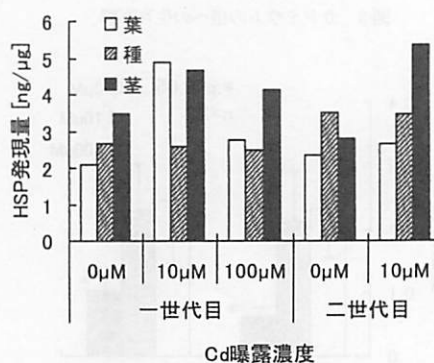


図8 抽出タンパク量中HSP70の発現量

に暴露濃度に関係なく90%以上を示したが、発芽率が50%に達するまでに要した時間は第二世代の暴露群で差異が確認された。図7からも、第一世代から得られた種子へのカドミウムの蓄積は認められる。発芽率の再現性試験で同様の結果が得られたことを考慮すると、種子の発芽に対する影響は、培地上に存在するカドミウムを吸収することなどによる影響よりも、親世代からの曝露による種子への蓄積の影響が大きく関わっていると考えられる。また、親世代における栄養状態は次世代の休眠期間や発芽の時期、発芽率などライフサイクルの初期段階に影響を及ぼすとされるが¹¹⁾¹²⁾、貧栄養土壌で生育させると、発芽が遅延する¹³⁾。一方で、カドミウムはシロイヌナズナにおける窒素の固定を減少させることが報告されている¹⁴⁾。さらに、窒素量の豊富な水を与えることで発芽率が上昇するという報告もあり¹⁵⁾、これらのことから、窒素の固定量が減少した親世代が残した種子が貧栄養状態であったことで発芽が遅れたという可能性も考えられる。しかしながら、種子に蓄積されたカドミウムが発芽に影響を与えるメカニズムや、カドミウム曝露を受けたシロイヌナズナから得られる種子の栄養状態などを明確にするには、データの蓄積、検時が十分ではなく、更なる研究が必要である。

陸生高等植物の生態影響試験法としてOECDが提案したテストガイドライン208では、単に発芽率の測定のみが指示されている。本研究においても第一世代、第二世代ともに、カドミウムの曝露濃度に関わらず、発芽率は最終的にはほぼ100%に達しており、個体数の大幅な減少（または増加）などは引き起こされていない。個体群の絶滅をもって評価する生態リスクの評価指標としては一見して不適とも考えられるが、遠藤らは試験群と対照群における50%の発芽に要した時間の差異Tg50を用いることを提案している¹⁶⁾。そこで、本研究においても50%の発芽に要した時間の差異Tg50を求めた。表1に、その結果を示す。Tg50は第一世代における発芽率50%時間の差異であり、Tg50は第二世代における発芽率50%時間の差異を意味する。表1に示されるように、カドミウム曝露100 μ Mでは第一世代と第二世代においてTg50に45.9時間の差異が確認できる。

発芽には、水分、酸素、温度などが安定していることが非常に重要であるが、諸条件をコントロールできる実

験室とは異なり、実環境では発芽に適した条件が長期間にわたって保たれるとは考えにくい。生物の個体同士が生息域、栄養素、光を求めて競争をしているのが実環境であり、発芽の遅れは、その個体の生育を左右する重大な事象であるとも考えられる。今後はより多くの世代において発芽率試験を行い、生態影響指標としての有効性の検討および生態リスク評価を行いたいと考える。

参考文献

- 1) 松下和夫：環境ガバナンス，岩波書店，2002.
- 2) 土壌環境センター：平成 17 年度市街地土壌環境基準等検討調査(土壌汚染による生態系生活得環境への影響等検討調査)報告書，2006.
- 3) 金子信博、大場広輔：文部科学省 21 世紀 COE プログラム「生物・生態環境リスクマネジメント」成果報告書，pp12-17，2006.
- 4) 佐々木卓治，田畑哲之，島本功：植物のゲノム研究プロトコール，秀潤社，2000.
- 5) 戎井伸吾：高等植物シロイヌナズナを用いた土壌重金属汚染の影響評価方法の検討，京都大学工学研究科修士論文，2007.
- 6) 中村研三，西村幹夫，長谷俊治，前島正義：植物のタンパク質実験プロトコール 遺伝子と組織から迫るタンパク質の機能と構造，秀潤社，1998.
- 7) Tobias Sahr, Gabriele Voigt, Herwig G. Paretzke, Peter Schramel and Dieter Ernst : Caesium-affecter gene expression in *Arabidopsis thaliana.*, New Phytologist, Vol. 165, Issue 3, pp.747-754, 2005.
- 8) Robert J. Porra : The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b, Photosynthesis Research, Vol. 73, No. 1-3, pp. 149-156, 2002
- 9) M. Schroda, J. Kropat, U. Oster, W. Rudiger, O. Vallon, F.-A. Wollman and C. F. Beck : Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II, Biochemical Society Transactions, Vol. 29, Pt. 4, pp.413-418, 2001.
- 10) E. Franco, S. Alessandrelli, J. Masojdek, A. Margonelli and M.T. Giardi : Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [³⁵S]methionine incorporation, Plant Science, Vol. 144, No. 2, pp.53-61, 1999.
- 11) S. L. Miao, F. A. Bazzaz and R. B. Primack : Persistence

表1 カドミウムによる発芽の遅れ

曝露濃度 (μ M)	Tg ₅₀ (hour)	Tg ₂₅₀ (hour)
0	0.0	0.0
10	1.1	2.5
100	3.5	49.4

- of Maternal Nutrient Effects in *Plantago Major*: The Third Generation, Ecology, Vol. 72, No. 5, pp.1634-1642, 1991.
- 12) Wulff and Bazzaz :Effect of the parental nutrient regime on growth of the progeny in *Abutilon theophrasti* (Malvaceae), American journal of botany, Vol. 79, No. 10, pp.1102-1107, 1992.
- 13) LW Aarssen, SM Burton :Maternal effects at four levels in *senecio vulgaris* (asteraceae) grown on a soil nutrient gradient, American journal of botany, Vol. 77, No. 9, pp.1231-1240, 1990.
- 14) Chiraz Chaffeil, Karine Pageaul, Akira Suzuki, Houda Gouia, Mohamed Habib Ghorbel and Céline Masclaux-Daubresse : Cadmium Toxicity Induced Changes in Nitrogen Management in *Lycopersicon esculentum* Leading to a Metabolic Safeguard Through an Amino Acid Storage Strategy, Plant and Cell Physiology, Vol. 45, No. 11, pp.1681-1693, 2004.
- 15) Henk W. M., Hilhorst and Cees M. Karssen : Dual Effect of Light on the Gibberellin- and Nitrate-Stimulated Seed Germination of *Sisymbrium officinale* and *Arabidopsis thaliana*, Plant Physiology, Vol. 86, 591-597, 1988.
- 16) 日本環境毒性学会：生態影響試験ハンドブック，朝倉書店，2003.

(2009.5.22受付)

Development of a method for assessment of over generation toxicity of Cd on plants

Kenichiro YAMAMOTO, Masashi KAGAI, Minoru YONEDA, Aki NAKAYAMA, Shinsuke MORISAWA

Dept. of Engineering, Kyoto University

Ecological soil risk assessment method has not yet been established although there is rising concern of public that the contaminated soils might effect ecosystem as well as human health. The biggest barrier that keeps risk assessment difficult is the lack of quantitative method to estimate the effect of soil contamination to the soil organisms. Since *Arabidopsis thaliana* is well studied plant and used as a model higher plant, *Arabidopsis thaliana* was chosen as an index organism. Using *Arabidopsis thaliana*, we examined some biological functions, e.g. germination rate, chlorophyll, and stress protein and found the delay of germination could be a suitable index to assess transgenerational toxicity of Cd.