

(19) 重金属汚染による植物影響指標としての 酸化了的DNA損傷に関する検討

加賀井 匡¹・山本 研一朗^{1*}・中山 亜紀¹・米田 稔¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540京都市西京区京都大学桂)

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

菌類や動物を対象とした研究においては、DNA中の8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)は酸化ストレスのマーカーとしてよく知られている。本研究では、重金属曝露による8-OHdGへの影響をHPLC-ECD法によって測定し、高等植物におけるバイオマーカーとしての8-OHdGの有用性を検討した。

実験室内にてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を栽培し、カドミウムと銅を曝露した結果、幼若期の葉において濃度依存的な8-OHdG量の増加が見られた。さらに銅を曝露したシロイヌナズナでは、葉の8-OHdG量と根長との相関が確認され、銅による植物への影響を評価する上で8-OHdGの測定が有用であることが示された。また、京都市域から採取した野生植物についても8-OHdGの測定を行った結果、ドクダミ(*Houttuynia cordata*)において銅と8-OHdG量に相関が確認された。以上より、植物中の8-OHdGは重金属に対する植物への影響を知るバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

Key Words : 8-OHdG, *Arabidopsis thaliana*, HPLC-ECD, biomarker, heavy metal

1. はじめに

近年、企業の工場跡地等の再開発等に伴い、重金属、揮発性有機化合物等による土壤汚染が顕在化してきており¹⁾、生活環境や生態系への影響が懸念されている。このような環境負荷による生態系へのリスクを評価するには、ハザードの同定が必要である。より簡便で迅速なハザードの同定、定量のために、代表生物種を特定し、影響を評価するためのバイオマーカーを定めることが求められている。

このような背景から、土壌重金属汚染による影響評価のための指標生物に、高等植物を利用する研究が行われている。中でも、シロイヌナズナは既に全ゲノムの解析が終了しているアブラナ科の植物であり、一世代の生育期間が約二カ月間と短いこと、栽培が容易であること等モデル生物として数多くの利点を持っており、植物遺伝学において多用されている。さらに、実験条件をコントロールしやすいことや遺伝的に均一な種が得られること、実験室でも実フィールドでも栽培可能であること等を考慮すると、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。重金属による植物への

影響としては、鉛、カドミウム、マンガンを曝露したシロイヌナズナで、発芽の遅れ、根の成長阻害が確認されている。また、中でもカドミウムを曝露されたシロイヌナズナでは、曝露濃度依存的に植物体内カドミウム濃度が上昇し、特に種子への高い移行が確認された²⁾。また、カドミウムを曝露しつづけたシロイヌナズナにおいて、種子への蓄積が顕著に進み、二世代目の発芽にも遅れが生じた³⁾。一方で、我々がこれまで行ってきた研究においては、10 μ Mまでのカドミウム曝露ではシロイヌナズナへの影響は外面的な要素においては確認できなかった。そのためカドミウムの影響を評価するためには、例えば蛋白質の発現やDNAの損傷といった分子生物学的な指標を用いる必要があると考えられる。

以上のような背景を受け、本研究では、シロイヌナズナを用いて、植物におけるカドミウムの影響をバイオマーカーから予測する手法の検討を行う。

植物が環境から受けるストレスには、多くの種類のものがあるが、その一つとして好気的条件下で生活する生物が必ず受ける不可避のストレスとして酸化ストレスが挙げられる。この原因として、紫外線や病原菌の感染、除草剤の使用や酸素不足、重金属や温度変化など、

多岐に渡る環境要因が知られている。エンドウに高レベルの塩ストレスを曝露したところ、葉中 H_2O_2 濃度が上昇した⁹⁾。また、塩ストレスによる植物体中 H_2O_2 濃度の上昇や抗酸化酵素の活性への影響が確認されたことで、塩ストレスが酸化ストレスを誘発しているという報告もある⁹⁾。重金属イオン(Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+})の存在下で栽培したヒマワリでは、その葉において活性酸素種の生成が確認され酸化的損傷が生じた。これは、カタラーゼや APX、GR といった抗酸化酵素の活性が活性酸素種によって抑制されたためだと考えられる⁹⁾。低温環境での育成では、トウモロコシ中の H_2O_2 や抗酸化酵素の濃度が上昇し酸化ストレスが確認され⁷⁾、水分量を不足させた環境での育成によっても、エンドウ中の抗酸化保護機能が抑制され酸化的損傷が生じたと報告されている⁹⁾。酸化ストレスによって、植物体内ではその代謝活動中に O_2 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ などの活性酸素種が生成され、過酸化脂質の発生や蛋白質の変性、炭水化物や核酸の損傷が活発化する。これら活性酸素種は、細胞の正常な活動を阻害し、遂には死に至らしめることもある⁹⁾。中でも重金属類による活性酸素種の発生はよく知られており¹⁰⁾、銅や鉄を触媒とした Haber-Weiss reaction や、遷移金属イオンによる H_2O_2 の還元(Fenton reaction)によって、より酸化力の高い活性酸素種が生成される。重金属曝露によるシロイヌナズナへの主要な影響の一つは活性酸素種による酸化ストレスであるという報告もある¹¹⁾。活性酸素種によって生体内の DNA 中ではさまざまな種類の損傷が生成するが、その修復が正常に行われなければ遺伝子に突然変異が生じ、正常な生命活動に影響を及ぼす。植物における重金属と活性酸素種との関係を対象とした研究は数多く行われているが、さらに進んで、酸化的 DNA 損傷について研究を行った例は少ない。本研究では、酸化的 DNA 損傷の中でも最もよく研究されている 8-OHdG に着目し、カドミウム曝露による影響のバイオマーカーとして、可能性を検討した。

8-OHdG は 8 位が酸化された構造の dG(deoxyguanosine) のことであり、ヒトにおいて疫学との接点から盛んに研究が行われている。ガンや動脈硬化、糖尿病患者において尿中の 8-OHdG 増加が確認され、これらの疾患に対するバイオマーカーとして考えられている¹²⁾。また急性白血病の子どもにおいて 8-OHdG の値が上昇したことが報告されている¹³⁾。その一方で、植物における 8-OHdG の研究は、個々のストレス因子との関係を明らかにしたものや細胞レベルでの研究に留まっており、生態影響との関連を考察した研究やバイオマーカーとしての研究などはあまり進んでいない。冷凍ストレスを与えたハナタネツケバナを用いて HPLC-ECD 法による 8-OHdG 量の測定を行った結果、コントロールに比べ 8-OHdG 量が増加し

たことが確認されている¹⁴⁾。また、ニンジン細胞に UV-C を照射した結果、コントロールと比べて H_2O_2 及び 8-OHdG の増加が確認されている¹⁵⁾。このように、8-OHdG は植物においてもストレスに対して反応することが示されているものの、未だ知見の集積段階にある。そのため、重金属ストレスに対する 8-OHdG 応答の研究は、この点においても非常に有意義であると言える。

実際の植物はカドミウム以外の土壤汚染に加え、気温、天候、日照など様々なストレス環境下にさらされており、室内実験で検出されるバイオマーカーが実環境においても測定されるという保証はない。そのため、種々のストレス要因が混在している実フィールドにおいても有効なバイオマーカーに影響評価に用いる必要がある。さらに、植物種によって重金属耐性は異なるため、重金属による汚染影響の評価を目的とする場合、より重金属の曝露に対して鋭敏に応答する種を評価に用いることも重要であると考えられる。これらのことから、本研究では、実フィールドにおける 8-OHdG のバイオマーカーとしての有用性と、影響評価に用いるべき指標植物の検討を行った。

以上より、具体的に次のような研究目的を設定し、検討を行った。

- 1) 室内実験においてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)にカドミウム及び銅を曝露し、その成長量等に受ける影響及び各部位中の 8-OHdG を分析する。
- 2) 実フィールドで野生植物及び土壌を採取し、その重金属濃度及び植物体中の 8-OHdG を分析する。

2. 実験手法

(1) シロイヌナズナの栽培及び成長試験

a) シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナは寒天培地上で19日間栽培し、その後ロックファイバーへ植え替えを行い15日間栽培した。

寒天培地の作成は以下の手順で行った¹⁶⁾¹⁷⁾。植物培養培地ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、スクロース、MESを最終濃度がそれぞれ4.3g/L、5.0g/L、0.5g/Lとなるように超純水に溶かし、水酸化カリウム水溶液を用いてpHを5.7に調整した。その後ゲランガム8.0g/Lを加え、121℃で20分オートクレーブした。60℃程度まで冷ましたところで、酢酸カドミウムまたは塩化銅二水和物を最終濃度が所定の濃度(0、0.1、0.5、1、5、10μM)となるよう加えた。シャーレ1枚あたり約30mLずつ分注し、クリーンベンチ内で30分以上乾燥させた。

滅菌した種子に0.1%アガーを1mL加え播種液とし、0.1%アガーを2mL重層した寒天培地上に、シャーレ1枚につき種子を25個ずつ、均等に播いた。

種子が培地上に固定された後、4℃で48時間以上保存し、休眠打破を行った。シャーレは人工気象器に移し、温度22℃、湿度60%、16時間明期、8時間暗期の条件で栽培した。

植え替えにはロックファイバーミニポットを用いた。5000倍希釈した液体肥料ハイフラワーを含む、所定の濃度の酢酸カドミウムまたは塩化銅溶液1Lを添加した後にシロイヌナズナを植え替えた。それ以降は2日に1回以上、減少した重量の分だけ5000倍希釈した液体肥料ハイフラワーを与えた。

サンプルの採取は2回行った。休眠打破後15日間寒天培地で栽培したシロイヌナズナは、幼若期の測定サンプルとして葉と根の部位別に採取した。植え替え後15日間栽培したシロイヌナズナは、成熟期のサンプルとして種、茎、葉の部位別に採取した。ただし、銅曝露を行ったシロイヌナズナに関しては、幼若期のサンプルのみの採取である。

採取した植物試料は-80℃で保存し、重金属濃度及び酸化損傷8-OHdGの測定に用いた。

b) 成長試験

成長試験として、葉面積、根長、茎長、乾燥重量、クロロフィル量の測定を行った。

葉面積は1個体の内最も大きな葉2枚を測定し、その平均値を測定値とした。根長は1個体の内最も長い根を測定した。葉面積、根長、茎長の測定は、OHPフィルムに挟んだサンプルをスキャナで取りこみ、グラフィックソフトウェアImage J(National institutes of Health, USA)を用いて行った。

乾燥重量は、部位別に分けたサンプルを105℃で2時間乾燥させた後測定した。

クロロフィル量は葉面積の測定に用いた葉2枚をN,N-ジメチルホルムアミドに24時間浸してクロロフィルを抽出し、Porraの式¹⁸⁾からクロロフィル量を算定し、葉面積当たりのクロロフィル量を求めた。

各試験項目は幼若期、成熟期のそれぞれに採取したサンプルで測定を行った。ただし、根長測定は幼若期、茎長測定は成熟期のサンプルのみで行った。

(2) 指標植物の調査及びサンプルの採取

サンプルの採取に先立って、対象とする植物を選定するために採取地点における野生植物の同定調査を行った。調査日は2009年5月21日、対象は京都市内鴨川沿いの9つの地点(上賀茂、御園橋、北大路、出町柳、荒神橋、丸

太町、御池、四条、五条)とした。調査の結果より、本研究では最も多くのポイントで生育が観察された植物種である、マメ科のシロツメクサ(*Trifolium repens*)、アブラナ科のマメグンバイナズナ(*Lepidium virginicum*)、カタバミ科のカタバミ(*Oxalis corniculata* L.)、ドクダミ科のドクダミ(*Houttuynia cordata*)の4種を対象植物とした(図1)。

サンプルの採取は、野生植物の同定調査を行った9地点に加え、さらに北上した雲ヶ畑、及び桂川沿い3地点(桂川松尾、桂川五条、桂川八条)の計13地点で行った。対象植物の採取は、鴨川沿いの10地点では2009年5月26日に、桂川沿いの3地点では2009年6月2日に行った。植物試料の採取は3~4個体から行い、部位別に混合し均一にし、これをサンプルとした。対象部位は土壌表層面以上の葉、茎、花とした。また、植物試料の採取と同時に同じ地点から土壌の採取も行った。土壌試料は、植物試料の採取地点付近から表層2~3cmの土壌を数か所採取、混合することで試料とした。

採取した植物試料は-80℃で保存し、重金属濃度及び酸化損傷8-OHdGの測定に用いた。

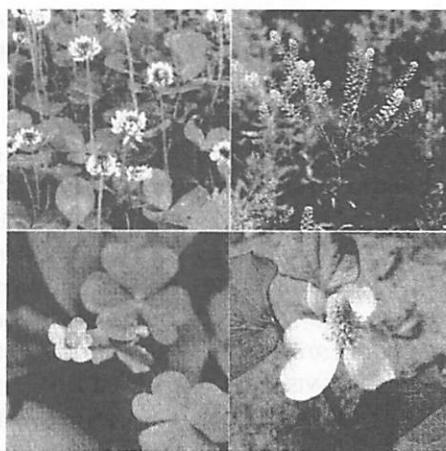


図1 対象植物(2009.5.21 京都市鴨川沿いにて筆者が撮影)

左上: *Trifolium repens*、右上: *Lepidium virginicum*
左下: *Oxalis corniculata* L.、右下: *Houttuynia cordata*

(3) 重金属濃度の測定

採取した植物体は、部位別に混合し均一にし、これをサンプルとした。サンプルは105℃にて2時間乾燥させた。土壌試料は105℃にて12時間乾燥させたものを、2mmのふるいにかけた後、0.50gを量り取りサンプルとした。その後、湿式分解装置(MDS-2000、CEM corporation)によって加熱・加圧することで、硝酸15mL

中に分解した。この硝酸抽出液を超純水で 20 倍に希釈し、ADVANTEC 製 DISMIC(孔径 0.45 μ m)でろ過し、これを ICP-MS 分析用試料とした。ICP-MS(HP4500、Hewlett Packard)による測定は内標準法と検量線法を併用した。内標準物質にはインジウムを使用し、サンプルの抽出、希釈処理後に加えた。ICP-MS の測定結果から求められる抽出液中濃度から植物乾燥重量あたり重金属濃度を求める際には、以下に示す計算式を用いた。

$$[\text{植物乾燥重量あたり重金属濃度}(\text{mg/g})] \\ = [\text{ICP-MS 測定濃度}(\text{mg/L})] \times [\text{希釈倍率}(-)] \\ \times [\text{抽出液量}(\text{L})] / [\text{乾燥重量}(\text{g})]$$

測定対象の元素は、Na, Mg, Al, Ca, Cr, Mn, ^{56}Fe , Cu, Co, Ni, Zn, Cd, Sb, Pb である。検出限界は、サンプルと同様の処理を行ったブランクサンプル 5 つの測定結果から得られた標準偏差の 3 倍の値とした。

(4) 酸化損傷 8-OHdG の測定

部位別に採取したシロイヌナズナは、液体窒素を用いて凍結粉砕し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。保存したサンプルは CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide)溶液を用いてタンパク質や多糖類などを不溶化、沈殿させることで除去し、DNA の抽出を行った^{19,20)}。その後、8-OHdG 測定前処理試薬セット(和光純薬工業)を用いて DNA の加水分解を行った。

8-OHdG 及び dG の測定は高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography: HPLC)を用いた²¹⁾。-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存しておいたサンプルは室内に出し、20 分後に逆相 HPLC カラム(Discovery C18, 5 μ m, 25cm $\times$ 4.6mm, Supelco または Wakosil-II 5C18HG, 4.0mm $\times$ 250mm, Wako)に注入した。8-OHdG の検出には ECD (Coulochem III, Guard Cell 5020, MODEL 50 analytical cell, ESA)を、dG の検出には UV-VIS 検出器(UV-VIS DETECTOR, SHIMADZU)を、移動相には 10mM NaH_2PO_4 , 0.13mM Na_2EDTA , 8% methanol を流量 1.0mL/min で用いた。DNA 中の 8-OHdG は dG 10^6 個あたりの値として算出した。

3. 結果及び考察

(1) シロイヌナズナを用いた分析

a) 成長試験による測定結果及び考察

成長試験の結果として、銅を曝露したシロイヌナズナにおける葉面積、根長、クロロフィル量の測定結果を図 2 に示す。各図では 1 サンプル毎の測定値の標準偏差をエラーバーとして付した。またデータは Mann-Whitney 検定

を行い、コントロール(培地中重金属濃度 0 μM)と有意な差がみられたものに*を付した。

カドミウム曝露による成長試験の結果では、全ての測定項目でカドミウム曝露に対して濃度依存的な現象は見られなかったため、図示は省略した。本研究における最高曝露濃度である 10 μM までのカドミウム曝露ではシロイヌナズナへの成長阻害を確認されなかった。そのため、低濃度のカドミウム曝露による影響を評価するためには分子生物学的な指標を用いる必要性が示された。

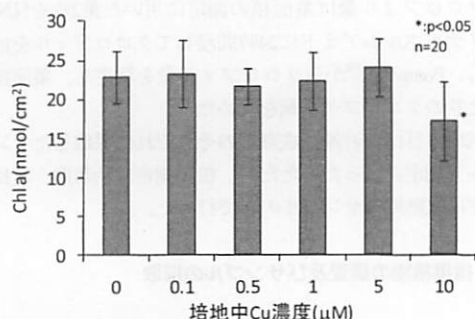
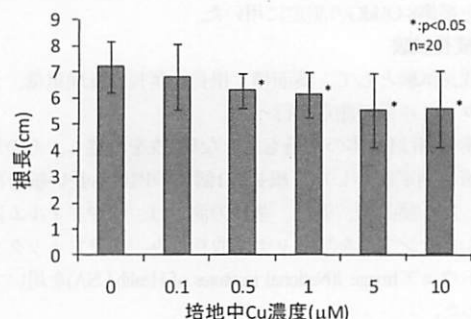
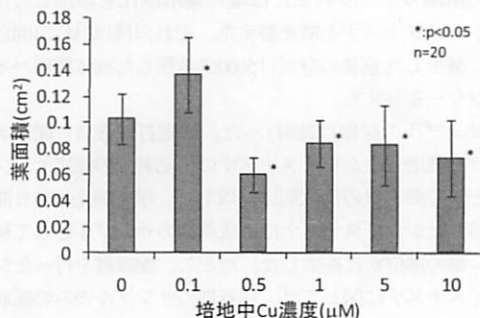


図2 銅曝露による成長への影響
(上から葉面積、根長、クロロフィルaの測定結果)

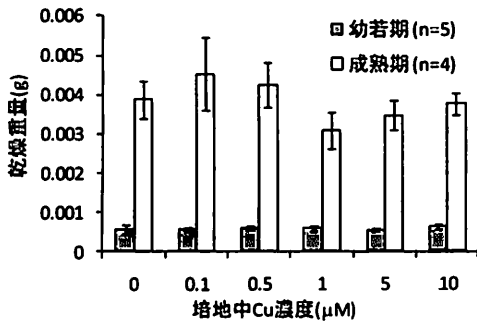


図3 生長による葉の重量変化

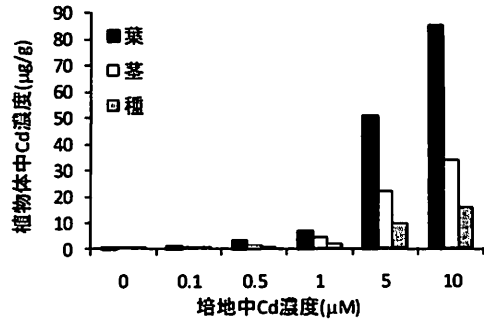


図5 成熟期シロイヌナズナにおけるカドミウム蓄積性の違い

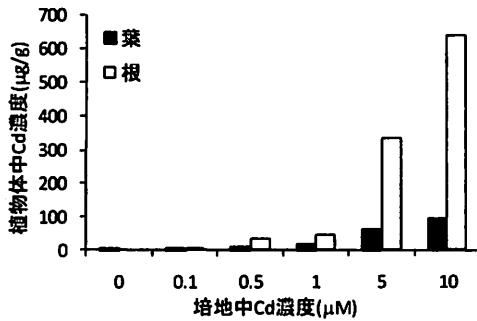


図4 幼若期シロイヌナズナにおけるカドミウム蓄積性の違い

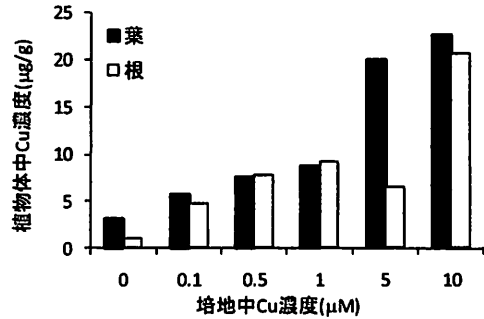


図6 幼若期シロイヌナズナにおける銅蓄積性の違い

銅曝露による成長試験の結果では、乾燥重量では影響が確認されなかったが、葉面積と根長では0.5μM以上の曝露濃度でコントロールに比較して有意な成長阻害が確認された。中でも根長は銅の曝露濃度に依存的な減少が見られ、銅による成長阻害の影響を顕著に受けることが分かった。クロロフィル量測定の結果からは、曝露濃度10μMで影響が確認された。植物にとって銅は低濃度で微量必須元素として働くが、高濃度で曝露されると成長阻害を引き起こすとされており、一般的な維管束植物中の乾燥重量あたりの濃度は数μg/gであるとされている²²⁾。図6に示す植物体中銅濃度の測定結果から、0.5μM以上の培地中重金属濃度で栽培したシロイヌナズナ中銅濃度が葉と根の両方でこのレベルの値となった。銅による影響は葉面積と根長では0.5μM以上の培地中重金属濃度で見られ、クロロフィル量では10μMで見られたことから、培地中銅濃度が0.5μM以上になるとシロイヌナズナ中の銅濃度が影響発現レベルを超え、葉面積や根長の減少といった成長阻害が引き起こされたと考えられる。中でも根長が銅曝露濃度に対して濃度依存的に減少することが分かった。

b) シロイヌナズナ中重金属濃度の測定結果及び考察

重金属濃度の結果を図 4～6 に示す。測定に用いた植物体は、幼若期で 20 本、成熟期で 10 本の苗を採取し、部位別に混合したもので、図は一個体あたりの換算値で示している。カドミウム曝露による結果では、全ての測定条件でカドミウムが曝露濃度に依存的に蓄積することが分かった。銅曝露による結果では、葉における重金属濃度は濃度依存的に増加し、根でも銅曝露濃度 5μM では値が小さくなったものの、全体的には同様の傾向が見られた。

また、これらの結果から各部位の重金属蓄積性を検討するため、培地中重金属濃度と植物体中部位別濃度の単位を統一し、線形回帰式の傾きを移行係数として求めた。それぞれの移行係数、線形回帰式のR²値を表1に示す。

カドミウムを曝露したサンプルでは、幼若期で根への蓄積性が高く、成熟期では葉への蓄積性が高いことが分かった。銅を曝露したサンプルにおける幼若期では、葉が30、根が22となり、銅の蓄積性は両部位で同程度であることが分かった。また、R²値は各条件で大きな値をとったが、銅を曝露したサンプルにおけるR²値はカドミウ

表1 部位別重金属濃度測定結果における線形回帰

曝露重金属	採取期	部位	回帰式	R ²
カドミウム	幼若期	葉	$y = 84x + 3.9$	0.98
		根	$y = 580x - 3.2$	1.00
	成熟期	葉	$y = 78x + 0.097$	0.99
		茎	$y = 31x + 0.65$	0.98
		種	$y = 14x + 0.24$	0.99
銅	幼若期	葉	$y = 30x + 6.1$	0.89
		根	$y = 22x + 4.4$	0.73

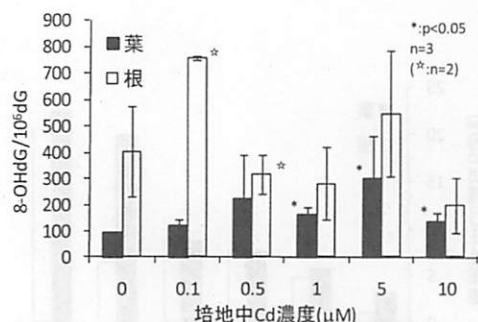


図7 カドミウムによる8-OHdGの発生量(幼若期)

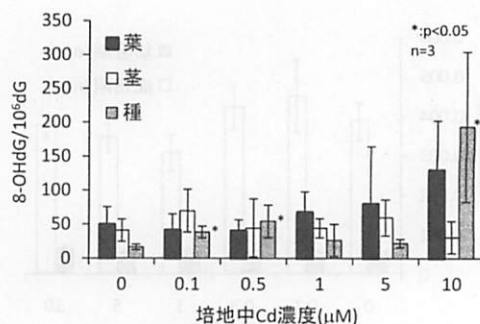


図8 カドミウムによる8-OHdG発生量(成熟期)

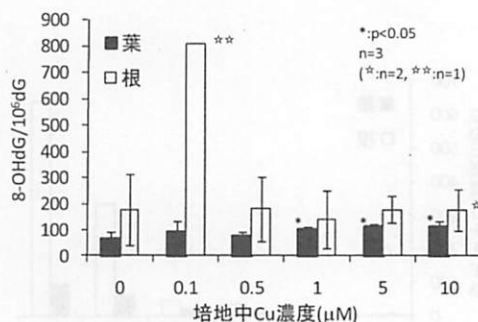


図9 銅による8-OHdG発生量(幼若期)

ムでのそれよりも小さい値となった。

イワデンダ科の植物ヘビノゴザなど、植物の根には細胞壁に重金属を捕捉して細胞内への影響を低減し、地上部への移行を防ぐ機能があるという報告がある¹¹⁾²⁴⁾。本実験の結果からも、根の細胞壁がカドミウムを捕捉、吸着し、地上部への移行を妨げられた可能性が示唆された。一方で、必須微量元素である銅に対してはこの機能が強く働かず、カドミウムに比較して根への蓄積性が低いのではないかと考えられる。

c) 酸化損傷8-OHdGの測定結果及び考察

結果を図7～9に示す。なお、実験は独立して3回行い、グラフの値は3回の測定による平均値とした。ただし根の測定値の内、カドミウムを濃度0.1、0.5μMで曝露したサンプル、銅を濃度10μMで曝露したサンプルは、量不足のため2回の測定による平均値となっている。また、根の測定値の内、銅を濃度0.1μMで曝露したサンプルも同様に、量不足のため1回の測定による値となっている。データはMann-Whitney検定を行い、コントロール(培地中重金属濃度0μM)と有意な差がみられたものには*を付した。

カドミウムを曝露したシロイヌナズナでの測定結果から、幼若期における葉、成熟期における種で曝露濃度

応じた増加が確認された。特に幼若期における葉での増加は曝露濃度1、5、10μMで見られている。このことから、8-OHdGが一般的なカドミウムの植物毒性に関する研究で用いられるような高濃度の曝露にだけでなく、実際の土壌におけるカドミウム濃度のような、低濃度の曝露に対しても敏感に反応する指標であると考えられる。さらに、それぞれの部位で植物中への蓄積は確認されている(図6)こと、成長試験で影響が確認されなかったことから、カドミウムの影響が見目に表れないような曝露濃度においても8-OHdGは有用である可能性が考えられる。成熟期の種での顕著な増加は曝露濃度10μMで見られ、他の部位とは異なる挙動が確認された。カドミウムによる酸化ストレスに対する抗酸化能力には部位ごとの差異があるという報告があり²⁵⁾、そのような機構が働いたことが考えられる。また、中でも種子はその形成においてDNA分裂が盛んに起きるため、他の部位に比べ8-OHdGが発生しやすい可能性も考えられる。ただし、本実験で得られた結果はエラーバーの大きなものとなった。8-OHdGはその性質上、抽出などの処理中にも酸化による発生が考えられ、これらの要素もデータの信頼性に大きく影響する。図9において曝露濃度0.1μMの根で大きな値をとったことも、測定回数の不足に加えて、このよ

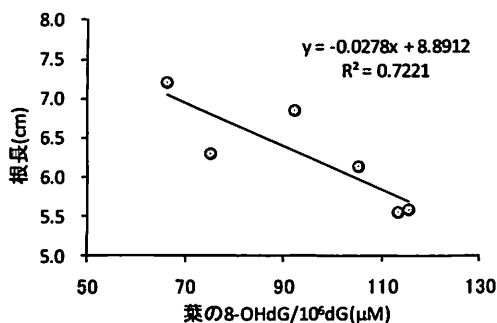


図10 8-OHdG発生量と根長の関係

うな処理もしくは測定段階での要因が考えられる。そのため、これらを含め、再現性を得るためにさらに検討を行う必要がある。

銅を曝露したシロイヌナズナでは、曝露濃度1μM以上の葉で8-OHdGが増加した。図2に示した成長試験において、根長が銅の曝露濃度に依存的に成長阻害を受けたことから、8-OHdGを用いて銅のシロイヌナズナの成長への影響を評価できる可能性が考えられる。例として、葉の8-OHdGの測定結果に対し根長の平均値をプロットした図を図10に示す。図10より、8-OHdGが増加するに従って線形的に根長が減少していることが分かる。また、線形回帰式のR²値は約0.72と、良好な相関が得られた。回帰式より、例えば8-OHdG/10⁶dGが36増加すると、根長が約1cm減少する。この関係を用いると、地上部の葉の8-OHdGを測定することで、地下部の根長の変化を評価することが可能である。根は水分及び栄養分の吸収を行う器官であり、根長や根の表面積はその重要な因子である。実際、イネにおいては根長や根長密度(単位体積当たりの土壌中の根長)と収穫量に相関があることが報告されている²⁰⁾。葉における8-OHdG量の測定は植物にとって侵襲性も低く、これにより根長の減少が予測できることは有効な植物の影響評価方法であると言える。

本実験では、期間不足及び設備の都合などから銅を曝露した成熟期でのシロイヌナズナの測定が行えなかった。現在実施を検討中ではあるが、8-OHdGの発生を考える上では、DNA複製の盛んな幼若期は高感度期での検討であると言え、充分な根拠を付与できるものと考えている。

以上の結果より、シロイヌナズナを用いた実験において、8-OHdGはカドミウムや銅の曝露による影響を評価する上で、バイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

(2) 野生植物を用いた分析

野生植物の採取及び測定結果の一例と、同時に採取した各地点での土壌中金属濃度を表2、3に示す。

重金属濃度測定の結果から、土壌中の重金属濃度に対して濃度依存的に蓄積量の増加する植物種及び重金属を探索するため、土壌中重金属濃度と植物中重金属濃度からピアソンの積率相関係数を求めた。その結果より、相関係数が0.5以上で土壌中重金属濃度に比較的高い相関の見られたものは、マメグンバイナズナ中の⁵⁵Fe及びSb、シロツメクサ中のCu、ドクダミ中のCu及びSb、カタバミ中のNa、Cr、Co及びZnであった。また、これらの中ではドクダミに対するCuの相関係数が0.76と最も大きな値をとった。

表2 桂川八条で採取した植物中金属濃度

	マメグンバイナズナ	シロツメクサ	ドクダミ	カタバミ	土壌	単位
Na	15 × 10 ²	19 × 10 ²	84 × 10	87 × 10 ²	16 × 10 ²	(Cu/g)
Mg	23 × 10 ²	14 × 10 ²	58 × 10 ²	51 × 10 ²	44 × 10 ²	(Cu/g)
Al	14 × 10 ²	11 × 10 ²	30 × 10	53 × 10	88 × 10 ²	(Cu/g)
Ca	90 × 10 ²	10 × 10 ²	16 × 10 ²	17 × 10 ²	31 × 10 ²	(Cu/g)
Cr	29 × 10 ²	27 × 10 ²	34 × 10 ²	72 × 10 ²	18 × 10	(Cu/g)
Mn	48 × 10	26 × 10	97 × 10 ²	82 × 10	24	(Cu/g)
Fe	30 × 10 ²	17 × 10 ²	29 × 10 ²	55 × 10 ²	11 × 10 ²	(Cu/g)
Co	70 × 10 ²	78 × 10 ²	43 × 10 ²	18 × 10 ²	66	(Cu/g)
Ni	11	35 × 10 ⁻¹	46	42	78	(Cu/g)
Cu	36	98	82	67	44 × 10	(Cu/g)
Zn	27 × 10	15 × 10	64 × 10	47 × 10	66 × 10	(Cu/g)
Cd	83 × 10 ⁻²	49 × 10 ⁻²	74 × 10 ⁻¹	73 × 10 ⁻²	33 × 10 ⁻¹	(Cu/g)
Sb	92 × 10 ⁻¹	25 × 10 ⁻²	10 × 10 ⁻²	87 × 10 ⁻¹	ND	(Cu/g)
Pb	13 × 10 ⁻¹	15 × 10 ⁻¹	25 × 10 ⁻¹	42 × 10 ⁻¹	30 × 10	(Cu/g)
8-OHdG	77 × 10	11 × 10 ²	55 × 10 ²	20 × 10 ²	(8-OHdG/10 ⁶ dG)	

表3 各サンプル地点における土壌中金属濃度

(μg/g)	霧ヶ峰	上質炭	御園橋	北大路	出町柳	荒神橋	丸太町	御池	四条	五条	桂川松尾	桂川五条	桂川八条
Na	1.1 × 10 ²	6.4 × 10	9.4 × 10	1.3 × 10 ²	1.0 × 10 ²	1.5 × 10 ²	9.5 × 10	1.7 × 10 ²	1.0 × 10 ²	1.3 × 10 ²	1.0 × 10 ²	7.8 × 10	1.5 × 10
Mg	4.5 × 10 ²	3.4 × 10 ²	3.8 × 10 ²	4.0 × 10 ²	3.7 × 10 ²	3.7 × 10 ²	4.0 × 10 ²	4.0 × 10 ²	4.3 × 10 ²	4.5 × 10 ²	3.8 × 10 ²	4.6 × 10 ²	4.4 × 10 ²
Al	8.1 × 10 ²	2.3 × 10 ²	3.6 × 10 ²	3.0 × 10 ²	4.0 × 10 ²	4.0 × 10 ²	8.6 × 10 ²	4.3 × 10 ²	7.2 × 10 ²	3.5 × 10 ²	0.6 × 10 ²	9.7 × 10 ²	8.8 × 10 ²
Ca	3.3 × 10 ²	2.9 × 10 ²	4.1 × 10 ²	4.1 × 10 ²	3.5 × 10 ²	3.5 × 10 ²	4.3 × 10 ²	3.1 × 10 ²	4.3 × 10 ²	3.2 × 10 ²	2.2 × 10 ²	3.1 × 10 ²	3.1 × 10 ²
Cr	1.4 × 10	7.2	1.2 × 10 ⁻¹	8.5	2.1 × 10	2.1	1.8 × 10	1.5 × 10	2.3 × 10	3.0 × 10	1.7 × 10	1.4 × 10	1.8 × 10 ⁻¹
Mn	2.1	1.4	1.8	1.7	2.2	2.2	2.0	1.7	1.4	1.8	3.7	1.4	2.4
Fe	9.8 × 10 ²	5.2 × 10 ²	5.7 × 10 ²	5.5 × 10 ²	5.8 × 10 ²	5.3 × 10 ²	1.1 × 10 ²	5.8 × 10 ²	8.3 × 10 ²	5.2 × 10 ²	1.1 × 10 ²	1.1 × 10 ²	1.1 × 10 ²
Co	5.1	5.9	8.5	5.6	8.6	8.6	5.5	7.2	7.2	7.1	1.1 × 10	1.2 × 10	6.6
Ni	3.7	1.4 × 10	1.6 × 10	8.4	1.4 × 10	1.7 × 10	9.2	1.5 × 10	1.7 × 10	3.0 × 10	2.1 × 10	2.2 × 10	7.8 × 10
Cu	2.1 × 10	1.9 × 10	2.1 × 10	4.3 × 10	5.3	1.2 × 10	5.1 × 10	6.6 × 10	3.2 × 10	5.3 × 10	2.6 × 10	2.4 × 10	4.4 × 10
Zn	5.3 × 10	8.8 × 10	1.5 × 10 ²	7.7 × 10	3.8 × 10	8.8 × 10	8.9 × 10	9.3 × 10	8.6 × 10 ²	1.1 × 10 ²	6.2 × 10 ²	8.8 × 10 ²	6.6 × 10 ²
Cd	3.7 × 10 ⁻¹	1.5 × 10 ⁻¹	2.6 × 10 ⁻¹	1.6 × 10 ⁻¹	8.9 × 10 ⁻²	3.0 × 10 ⁻¹	3.2 × 10 ⁻¹	1.7 × 10 ⁻¹	2.3 × 10 ⁻¹	1.4 × 10 ⁻¹	2.5 × 10 ⁻¹	4.4 × 10 ⁻¹	3.3 × 10 ⁻¹
Sb	2.5 × 10 ⁻²	N.D.	3.0 × 10 ⁻²	1.6 × 10 ⁻¹	N.D.	1.2 × 10 ⁻²	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Pb	1.5 × 10	2.7 × 10	3.2 × 10	3.3 × 10	1.7 × 10	2.9 × 10	3.1 × 10	3.0 × 10	2.5 × 10	3.9 × 10	3.0 × 10	1.8 × 10	3.0 × 10

また、重金属の蓄積に対して濃度依存的に8-OHdGが増加する植物種及び重金属を探索するため、植物中重金属濃度と植物中8-OHdGからピアソンの積率相関係数を求めた。その結果より、相関係数が0.5以上となり、植物中8-OHdGとの間に比較的高い相関の見られたものは、マメグンバイナズナとシロツメクサ中のNi、ドクダミ中のNa及びCu、カタバミ中のMnであった。また、これらの中ではドクダミ中のCuの相関係数が0.58と最も大きな値をとった。

この結果からドクダミと銅に注目すると、ドクダミでは土壤中の銅濃度に対して濃度依存的に植物中銅濃度が増加し、また植物中銅濃度に対して濃度依存的に植物中の8-OHdGが増加していることが分かる(図11)。実験環境で生育したドクダミにおいても、土壌由来の銅濃度増加に伴い、酸化損傷としての8-OHdGが増加することが確認された。銅は、植物に吸収される際、 Cu^{2+} の形態をとるとされている。 Cu^{2+} はその酸化還元特性から、ヒドロキシラジカルを生み出すHerber-Weiss reactionなどの、活性酸素種を生成する化学反応における触媒として重要な役割を担っており、脂質の過酸化などの酸化損傷を引き起こすと考えられている²⁷⁾。これらのことから、ドクダミ中で対象地域の土壌由来の銅によって活性酸素種が過剰生成され、その結果としてDNAの酸化損傷が発生した可能性が考えられる。

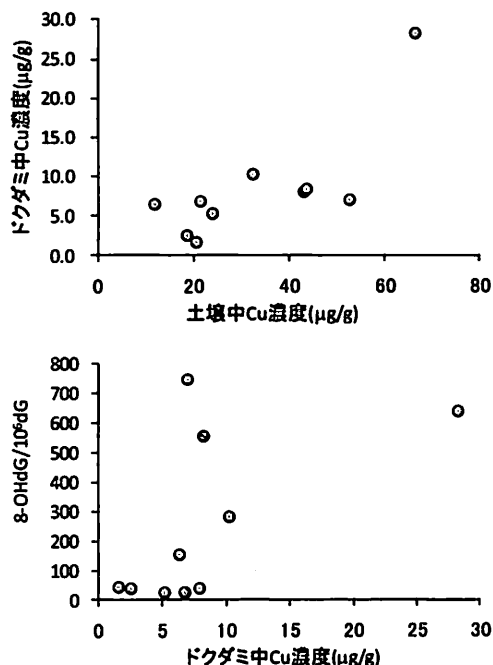


図11 土壌中の銅によるドクダミへの影響

実フィールドにおいて活性酸素種を増加させ、DNAの酸化損傷を誘発する因子は銅などの重金属以外にも様々な要素が複雑に絡んでいると考えられる。そのため他の要因についても調査を行う必要はあるが、ドクダミDNA中の8-OHdGは銅と相関が高く、植物体中の8-OHdGが実フィールドにおいて土壌汚染による植物への影響指標として利用できる可能性が示唆された。銅の場合は、植物体中に蓄積された銅濃度が影響発現を起こすレベルを超えていた試料が採取されたために、植物中の8-OHdGとの相関が確認された。その他の重金属については、土壌中重金属量、植物体中重金属量がともに低く影響発現レベルを超えていなかったために、8-OHdGとの相関を確認することができなかったと考える。

本調査においては、シロイヌナズナの花成時期を過ぎてしまったために同定が困難であり、採取を行うことができなかった。実験環境におけるシロイヌナズナのDNA中8-OHdGは、前述の結果を考慮すると、土壌中の重金属による生態影響評価として十分に利用可能であると考えられる。今後、土壌汚染地域などに拡大したフィールド調査を行うことで、その有用性の検討及び確認が重要であると考えられる。

4. 結論

シロイヌナズナを用いた実験より、8-OHdGにおいて銅やカドミウムによる曝露への応答が確認され、根長の減少などこれに対応する生体影響も確認された。このことから、8-OHdGをバイオマーカーとして利用することで、植物への重金属汚染の影響を予測できるという可能性が示された。

また、実フィールドから採取を行った植物種においては、ドクダミ中の8-OHdGで銅に対して鋭敏な反応が確認された。ドクダミは、シロイヌナズナに比べ、植物体も大きく、同定もより簡易な高等植物である。また、日本国内の広範囲に分布していること等を考慮すると、実環境中の銅による汚染影響を評価する指標植物として、より利用可能性があると考えられる。8-OHdGをバイオマーカーとして利用することを念頭においても、このようなストレスに対して敏感に応答する指標生物を選定することで、影響の予見的な調査が可能になると考えられる。また、これらによって、リスク評価に重要なハザードの調査もより簡便かつ迅速に行えるようになるだろう。

重金属汚染による影響評価に本研究で提案しているバイオマーカー、指標生物を用いるためには、さらに実験を進め、評価基準の設定等、行っていく必要があると考

える。また、銅やカドミウムによる影響を中心とした複合汚染に対しても、総合的な評価指標としての利用可能性が期待される。

本研究で得られた結論を以下にまとめる。

- 1) カドミウムを曝露したシロイヌナズナでは濃度依存的に部位別カドミウム濃度が上昇した。幼若期では根に多く、成熟期では葉に多く蓄積することが分かった。成長量等を測定した結果では、どの成長量においても変化は見られず、分子生物学的な指標の必要性が示された。各部位のDNAの酸化損傷8-OHdGを測定した結果より、シロイヌナズナの葉の8-OHdGは低濃度のカドミウム曝露に対するバイオマーカーとして有用である可能性が示された。また、特に種における8-OHdGはカドミウム曝露の鋭敏なバイオマーカーとして有用である可能性が示された。
銅を曝露したシロイヌナズナを用いて部位別銅濃度を測定した結果、濃度依存的に植物中銅濃度が上昇した。また、蓄積性は根と葉とで同程度であることが分かった。各部位のDNA中の8-OHdGを測定した結果と、根長が濃度依存的に減少したことから、葉の8-OHdGは銅によるシロイヌナズナへの生態影響を評価する上で有用なバイオマーカーである可能性が示された。特に、根長と葉の8-OHdG測定結果の関係から、根長を単位長さ当たり減少させるだけの8-OHdG/10⁶dG増加量を用いることで根長への影響が予測できた。
- 2) 実フィールドでの試料として鴨川沿い及び桂川沿いの13地点から土壌及び植物を採取し、試料中重金属濃度及び植物のDNA中の8-OHdGを測定した。土壌中重金属濃度測定結果と植物中重金属濃度の相関、及び植物中重金属濃度と8-OHdGの相関からドクダミとその8-OHdGは実フィールドにおける重金属に対する影響指標として有用である可能性が示された。

参考文献

- 1) 環境省、土壌汚染対策法について
<http://www.env.go.jp/water/dojo/law.html> (Last Accessed 2010.8.10)
- 2) 鈴木陽子: シロイヌナズナにおける重金属吸収特性と生体影響に関する検討, 環境工学研究論文集 44, pp. 197-199, 2007.
- 3) 山本研一朗: 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, 環境工学研究論文集 46, pp. 369-376, 2009.
- 4) J. M. Gomez, J. A. Hernandez, A. Jimenez, L. A. del Rio and F. Sevilla: Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants, *Free Radical Res.* 31, pp. 11-18, 1999.
- 5) J. A. Hernandez, F. J. Corpas, M. Gomez, L. A. del Rio and F. Sevilla: Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria, *Physiol. Plant.* 89, pp. 103-110, 1993.
- 6) S. M. Gallego, M. P. Benavides and M. L. Tomaro: Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress, *Plant Science* 121 (2), pp. 151-159, 1996.
- 7) T. K. Prasad, M. D. Anderson, B. A. Martin and C. R. Stewart: Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide, *The Plant Cell* 6, pp. 65-74, 1994.
- 8) I. Iturbe-Ormaetxe, P. R. Escuredo, C. Arrese-Igor and M. Becana: Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat, *Plant Physiol.* 116, pp. 173-181, 1998.
- 9) O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt: Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Annals of Botany* 91, pp. 179-194, 2003.
- 10) 塩井祐三, 井上弘, 近藤矩朗: ベーシックマスター 植物生理学, オーム社, 2009.
- 11) 伊豆田猛: 植物と環境ストレス, コロナ社, 2006.
- 12) L. Wu, C. Chiou, P. Chang, J. Wu: Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes, *Clin Chim Acta* Jan 339 (1-2), pp. 1-9, 2004.
- 13) Y. You, T. Ying, Y. Chonghui, J. Xingming, T. Jingyan, S. Xiaoming: Determinants of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Chinese children with acute leukemia, *Environmental Toxicology* 24 (5), pp. 446-452, 2009.
- 14) K. Bialkowski, R. Olinski: Oxidative damage to plant DNA in relation to growth conditions, *Acta Biochimica Polonica* 46 (1), pp. 43-49, 1999.
- 15) A. Balestrazzi, S. Botti, S. Zelascio, S. Biondi, C. Franchin, P. Calligaris, M. Racchi, A. Turchi, G. Lingua, G. Berta, D. Carbonera: Expression of the PsMTA1 gene in white poplar engineered with the MAT system is associated with heavy metal tolerance and protection against 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated-DNA damage, *Plant Cell Reports* 28, pp. 1179-1192, 2009.
- 16) C. Subramanian, Y. Xu, C. H. Johnson and A. G. von Ammon: In vivo detection of protein-protein interaction in plant cells using BRET, *Method in Molecular Biology* 284, pp. 271-286, 2004.

- 17) L. Norambuena¹, G. R. Hicks¹ and N. V. Raikhel: The use of chemical genomics to investigate pathways intersecting auxin-dependent responses and endomembrane trafficking in *Arabidopsis Thaliana*, *Method in Molecular Biology* 495, pp. 133-143, 2008.
- 18) R. J. Porra: The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b, *Photosynthesis Research* 73, pp. 149-156, 2002.
- 19) Y. Tsumura, T. Kawahara, R. Wickneswari, K. Yoshimura: Molecular phylogeny of dipterocarpaceae in southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes, *Theor Appl Genet* 93, pp. 22-29, 1996.
- 20) 品本功, 岡田清孝, 田畑哲之: モデル植物の実験プロトコール シロイヌナズナ・ミヤコグサ編, 秀潤社, 2005.
- 21) H. Kasai: A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system, *J. Radiat. Res.* 44, pp. 185-189, 2003.
- 22) A. M. B. Pahlsson: Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants, *Water, Air, & Soil Pollution* 47, pp. 287-319, 1989.
- 23) D. E. Salt: Update on plant ionomics, *Plant Physiology* 136, pp. 2451-2456, 2004.
- 24) H. Nishizono, H. Ichikawa, S. Suzuki, F. Ishii: The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*, *Plant and Soil* 101, pp. 15-20, 1987.
- 25) H. Kasai: A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system, *J. Radiat. Res.* 44, pp. 185-189, 2003.
- 26) S. Morita, T. Suga, K. Yamazaki: The relationship between root length density and yield in rice plants, *Japan Jour Crop Sci* 57 (3), pp. 438-443, 1988.
- 27) H. Teisseire, V. Guy: Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*), *Plant Science* 153 (1), pp. 65-72, 2000.

(2010.5.21受付)

Oxidative DNA Damage as a Potential Biomarker for Heavy Metal Toxicity in Plants

Masashi KAGAI¹, Kenichiro YAMAMOTO¹, Aki NAKAYAMA¹
and Minoru YONEDA¹

¹Urban Environmental Engineering, Kyoto University

The level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) in DNA is a well known marker for oxidative stress for mammalian. Here, in this study, the availability as a biomarker for higher plants were investigated by examining the relationship between 8-OHdG level and heavy metal exposure using HPLC-ECD method. Cd and Cu treatment induced 8-OHdG level in leaves of young *Arabidopsis thaliana* in a dose-dependent manner. Additionally, in case of Cu, root length was found to be correlated with 8-OHdG level. Root length is important in the acquisition of water and nutrients. Therefore, it suggests that Cu toxicity to *Arabidopsis thaliana* can be estimated by measuring 8-OHdG in leaves. In mature *A. thaliana*, 10μM Cd induced extremely high 8-OHdG level in seeds DNA compared with leaves. This means that seeds are sensitive to Cd pollution.

The author also studied 8-OHdG level and heavy metals in wild plants collected from Kyoto city area and found the high relatively correlation between Cu level and 8-OHdG in *H. cordata*. In conclusion, it is demonstrated that 8-OHdG in plant is a possible biomarker for heavy metal toxicity.