

(20) カドミウムが及ぼす シロイヌナズナの病原菌抵抗性への影響と その評価方法

山本 奈々絵*・山本 研一朗・加賀井 匡・中山 亜紀・米田 稔

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)

*Email: n-namamoto@riskenv.kyoto-u.ac.jp

近年重金風による土壤汚染が顕在化しているが、土壤汚染による生態リスク評価は人の健康リスク評価に比べ遅れている。本研究ではカドミウムがシロイヌナズナの病原菌抵抗性に及ぼす影響を検討した。カドミウム曝露されたシロイヌナズナへの病原菌接種後、壊死面積測定による病原菌抵抗性試験を行った結果、カドミウム曝露濃度の増加に伴い壊死面積の増加が見られた。この結果から病原菌抵抗性を定量的に評価するため、病原菌抵抗係数を定義、算出した結果、0.5 μ M、1 μ Mのカドミウムを曝露されたシロイヌナズナの病原菌に対する抵抗性は、カドミウム無処理群に比べ、それぞれ0.37倍、0.23倍に低下したことが確認された。

Key Words : Cd, *Arabidopsis thaliana*, *Alternaria brassicicola*, necrotic area, disease resistance

1. 序論

近年、有害物質による人や生態系への影響が懸念されており、世界各国で産業廃棄物や排水等による環境問題が発生している。日本では、昭和30年代以降、経済の飛躍的な発展により、大気汚染、水質汚染、土壤汚染、騒音、振動、悪臭及び地盤沈下といったいわゆる典型七公害をもたらし、社会問題となった。中でも土壤汚染は他の環境汚染に比べて汚染物質の移流、拡散が非常に遅く蓄積性が高いこと、また計測が困難で汚染発生から顕在化までの時間に隔たりがあること、修復にかかるコストが膨大であることが大きな問題点としてあげられる¹⁾。

2002年成立の土壤汚染対策法に関する附帯決議にあるように、「土壤汚染による生活環境や生態系への影響」に対する懸念も高まっている。しかし、人の健康リスクについての研究が進む一方で、日本においては生態系に対するリスク研究が遅れているのが現状である。現在日本では、モグラやミミズ等の地中動物を指標生物とした重金属土壌汚染の生態系リスク評価が一般的に行われている²⁾が、生態系は多様な種で構成されているため、評価の対象、エンドポイントの選定等考慮すべき事項は多

く存在する。

高等植物は、生産者として生態系の主要構成要素の一つであり、土壤環境の影響を評価する際の重要な評価対象であると言える。また、試験が簡便である点、ミミズなどの地中生物と比較して均一なものを用意しやすい点、モデル植物については多くの研究が行われ、幅広い知見が利用可能である点から、指標生物としては地中生物より高等植物の方が優れていると考えられる。本研究で指標生物として用いたシロイヌナズナ(学名: *Arabidopsis thaliana*)は、一世代が約2ヶ月と短く、多数の種子が取れるため、これまで高等植物の中でもモデル植物として多くの研究に利用されてきた。

土壌汚染の一因である重金風類の中で、カドミウムは日本において生産量は1934t、消費量は2016tと世界の中でも非常に多く³⁾、水田等広い面積の農地が汚染されている。カドミウムが基準値以上検出された地域は2008年までの累計で111件である⁴⁾。このため、カドミウムは日本の土壌重金属汚染を考える上で重要な元素であると言える。人体におけるカドミウムの影響は腎疾患に代表され、それにより体内のビタミンD活性やカルシウム吸収、コラーゲン代謝が阻害されて骨軟化症や骨

粗しょう症を引き起こす⁹⁾。また、カドミウムは植物の生長阻害の原因になるとされている。アブラナ科植物をカドミウム含有水を用いて水耕栽培して生長試験を行った結果、157 μM のカドミウム処理によりほぼ生長が停止したことが報告されている⁹⁾。424 mg/kg 乾土の濃度のカドミウムで汚染された土壌で育成したコマツナはカドミウムが 0.67 mg/kg 乾土含まれる下水汚泥コンポストで育成したもの比べ、乾燥重量が約 23%減少したという結果も示されている⁷⁾。

カドミウムを曝露したシロイヌナズナでの発芽率試験の結果、カドミウム無処理群と比べ、カドミウム 100 μM 曝露群では育成開始後 150 時間までの発芽率が低下することが分かっている⁹⁾。

現在、重金属が植物に与える影響の評価方法として、生長量測定他にはクロロフィル量測定がよく行われる⁹⁾が、これまでの当研究室の実験から、クロロフィル量や生長量は、植物の枯死に直接結びつく指標ではない⁹⁾ため、リスク評価の指標としては適切ではない。一方で、病原菌抵抗性の低下に伴う病原菌感染は植物の枯死を起こやすく、個体数の減少の原因となり得る。生産者であり、生態系での個体数が最も多い植物の減少は、生態系全体に大きな影響を及ぼす。よって、病原菌抵抗性という指標を用いることで生態リスク評価が可能になると考えられる。本研究で用いた病原菌はアブラナ科植物黒すす病菌(*Alternaria brassicicola*)である。この菌は、シロイヌナズナの属するアブラナ科の植物に主に感染し、キャベツやその他のアブラナ科植物に病斑をつくることがよく確認されるなど日本において非常に一般的な植物病原菌であるため、本研究に適した菌であると言える。

上述のような背景から、土壌の重金属汚染による生態系影響評価方法を検討するため、本研究では、カドミウムを曝露したシロイヌナズナにアブラナ科植物黒すす病菌を接種し、病原菌抵抗性試験を行うことによって、病原菌抵抗性への影響を評価するという目的を設定した。

2. 実験方法

(1) 試薬及び実験装置

シロイヌナズナの栽培培地には、(株)日本製薬株式会社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 2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate(以降 MES)、(株)和光純薬工業株式会社製のスクロース、グランガム、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)ナカライテスク株式会社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。

ラクトフェノールトリパンブルー染色には、(株)東京化成工業株式会社の抱水クロラルを使用した。以後、特に表記のない限り和光純薬工業の試薬を使用した。

(2) シロイヌナズナの栽培

寒天培地の作成は以下の通りに行った。植物培養培地ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 3.23 g、スクロース 3.75 g、MES 0.375 g を超純水 750 mL 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¹⁰⁾¹¹⁾。その後 125 mL ずつ、6 本の三角フラスコにわけ、それぞれにグランガムを 1.0 g ずつ加えた。

この培地は、121°C、20 分にてオートクレーブ滅菌した後、60°C 程度まで冷まし、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¹²⁾。これをシャーレ 1 枚あたり約 30 mL 分注し、クリーンベンチ内で 30 分乾燥させ、使用するまでは 4°C 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 15 mL チューブに入れ、滅菌水を 700 μL 、次亜塩素酸ナトリウムを 300 μL 、Polyoxyethylene (10)Octylphenyl Ether を 10 μL 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 1 mL で種子洗浄を 5 回繰り返した。

滅菌した種子に 0.1% アガーを 1 mL 加え、播種液とした。クリーンベンチ内で 0.1% アガーを寒天培地に 2 mL 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 16 個を均等に播いた。

アガーが固化し、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。ここでサージカルテープを用いるのは、シャーレ内の空気の入りを可能にするためである。その後 4°C で 48 時間、休眠打破を行った。栽培は 22°C の恒温恒湿室の育成棚で行い、湿度は 60%、照度は 15000 ルクス程度で 16 時間明期、8 時間暗期とした。

発芽開始後 10 日目に、前述の寒天培地と同様の組成のものをガラスボトルに 30 mL ずつ分注したものを用意し、植え替えを行った。クリーンベンチ内で 0.1% アガーを 300 μL 重層し、ピンセットを用いてボトル 1 本につき苗 1 本を置床した。その後、播種の時と同様にアガーが固化してからサージカルテープでボトルのふたを固定した。栽培はシャーレでの育成と同様の条件下でさらに 9 日間行った。

(3) 黒すす病菌の培養

本実験では、独立行政法人製品評価技術基盤機構より分譲されたアブラナ科黒すす病菌(*Alternaria brassicicola*)を用いた。この菌は無性生殖の方法として孢子を作るが、

黒すす病菌を含む不完全菌類の胞子は分生子と呼ばれるため、以降黒すす病菌の胞子のことを分生子と表記する。黒すす病菌の培養は以下に行った。乾燥標本に復水液(ポリペプトン 10 g、酵母エキス 2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、 dH_2O 1 L)を加えて懸濁液を作った。懸濁液は保存用寒天斜面培地(ポテトデキトース寒天培地 3.9 g、超純水 100 mL)上に塗りつけた後 22℃の暗黒下で 16 日間培養し、その後は 4℃の暗黒条件下で保存した。これ以降の実験では保存用寒天斜面培地から滅菌綿棒を用いてかき取った黒すす病菌の菌体を、ポテトデキトース寒天培地上に置床し、22℃、暗黒条件下で 9 日間培養した¹⁵⁾。

(4) 菌懸濁液の調製と病原菌の接種

培養後のシャーレに少量の滅菌水を加え、菌叢表面を乾熱滅菌した綿棒で軽く擦って分生子を懸濁させたあと、一層のキムワイプでろ過した。血球計算板を用いてろ液中の分生子数を計数した後、滅菌水で希釈して所定の濃度に調節し、黒すす病菌の接種源とした。シロイヌナズナの病原菌接種は、この菌懸濁液を本葉に 2 μL 滴下することで行った。また、無処理群として、2 μL の滅菌水を菌懸濁液と同様に滴下したものも用意した。滴下後再びボトルの蓋をサージカルテープで固定し、さらに 4 日間培養した。

(5) 染色および染色部位の面積測定

菌を接種してから 4 日間培養後、ラクトフェノールト

リバンブルー染色を行った。染色液(フェノール 10 g、トリバンブルー 10 mg、乳酸 10 mL、グリセリン 10 mL、 dH_2O 10 mL)1 mL に、各個体から採取した病原菌接種葉を 3 分間 95℃の条件下で浸漬した後、2.5 g/mL 水の抱水クロラール水溶液 1 mL に 30 分以上浸漬した¹⁶⁾。その後、それぞれの葉のプレパラートを作成し、顕微鏡での観察を行った。このプレパラートをスキャナーで撮り込み、画像解析ソフト Image J(National Institutes of Health, USA)を用いて葉の面積及び染色部位の面積を測定した。葉と染色部分の面積測定の際は撮影画像をそのまま用いた。葉や染色部位の輪郭は明確であるため、目視で確認された部分を手動で選択し、面積を測定した。

(6) クロロフィル量測定

染色のためのサンプルを採取した際、病原菌の接種をした葉とは別の葉を同時に採取してクロロフィル抽出を行い、クロロフィル量を測定した。葉はシロイヌナズナ 1 本につき 1 枚ずつ採取し、 N,N -ジメチルホルムアミドに 4℃、暗条件で 24 時間浸漬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 220 nm から 748 nm のスペクトルで吸光度測定を行った。647 nm、664 nm、748 nm での測定値を用い、Porra の式¹⁴⁾を参考に、以下の式を用いて、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。Nano Drop 1000 では測定光路が 10 分の 1 であるため、計算式の係数は 10 倍とした。

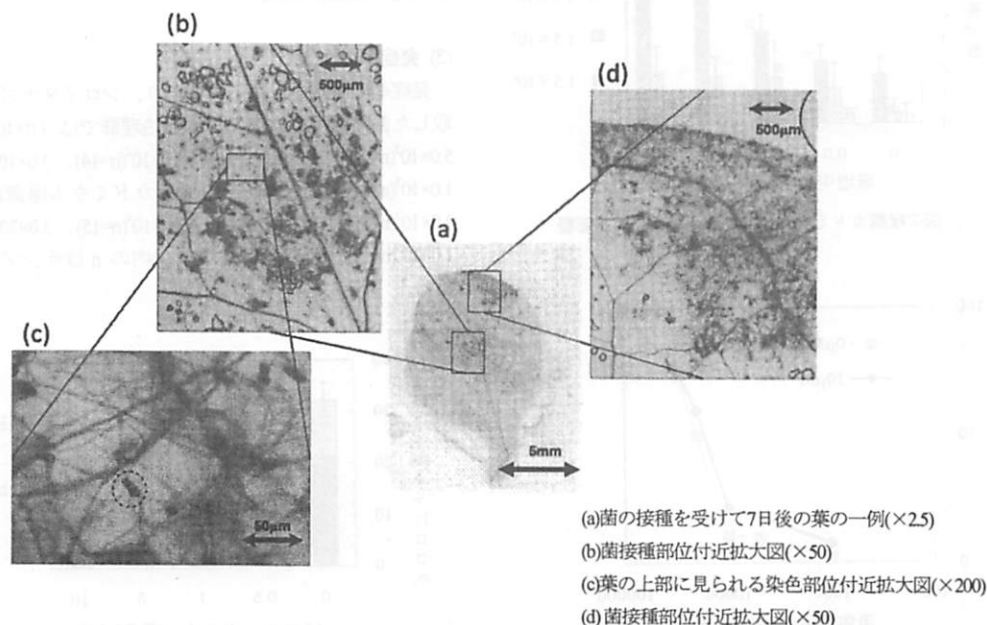


図-1 染色後の葉の全体像および顕微鏡写真

抽出液中クロロフィル量[nmol/mL]

[クロロフィル a] = $134.3(E_{664} - E_{748}) - 34.7(E_{647} - E_{748}) \cdots$ (式 1)

[クロロフィル b] = $229.0(E_{664} - E_{748}) - 53.8(E_{647} - E_{748}) \cdots$ (式 2)

※ E_x : スペクトル X nm で測定した吸光度

また本測定では抽出液を 2 mL とし、葉の面積あたりのクロロフィル量での評価を行った。葉の面積は、抽出を行う直前にスキャナーで画像を撮り込み、画像解析ソフト ImageJ で測定を行った。

3. 実験結果

(1) 壊死部位の観察

本実験では、ラクトフェノールトリパンブルー染色は、葉の壊死部位を染色するために行った。図-1 に、染色後に撮影した壊死部位付近の顕微鏡写真を示す。図中(a)は、菌の接種を受けて 7 日後の葉の一例である。(b)は、菌接種部位付近である葉の中央部の染色部位を、(c)は葉の上部に見られる染色部位付近を拡大したものである。(d)は、(b)をさらに拡大したものである。(b)では斑点状に染色された死細胞が確認できる。(c)では付近一面に広がっている色の濃い部分に菌糸の広がりがあり、(d)中の破線円内には分生子の一つが確認でき、他にも 10 個程度

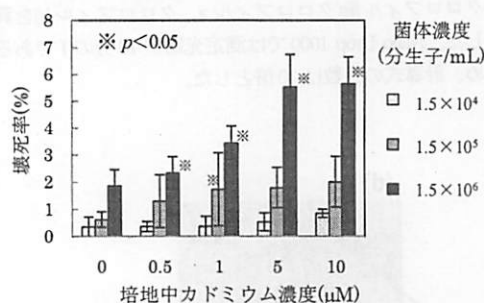


図2 曝露カドミウム濃度が壊死率に与える影響

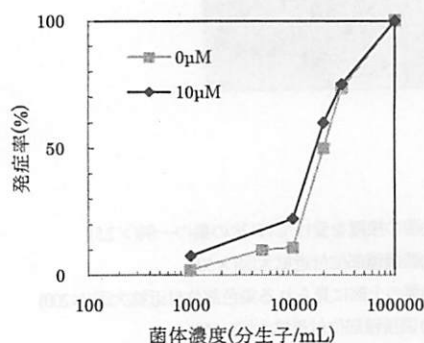


図3 接種した菌体濃度と発症率の関係

点在していることが確認できる。また、その周りに菌糸が取り囲んでいる様子も確認された。これらの形態は他のサンプルでも見られた。

(2) 壊死率の分析

壊死部位の面積が葉全体の面積に占める割合を壊死率 (%) と定義し、これを求めた結果を図-2 に示す。凡例は、接種した菌懸濁液の濃度(分生子/mL)を意味している。本実験では、牛島¹⁹⁾の手法を参考にして、菌体濃度は 1.5×10^4 , 1.5×10^5 , 1.5×10^6 分生子/mL とした。サンプル数は、各条件 9 本ずつである。

カドミウム曝露濃度別に見ると、各濃度で菌体濃度が大きくなるほど壊死率が高くなる傾向が見られ、各菌体濃度間での壊死率に有意な差 ($p < 0.05$) を確認した。図中のエラーバーはサンプル間での壊死率の標準偏差を示している。

1.5×10^6 分生子/mL では、カドミウム濃度の増加に伴って壊死率が増加する傾向が見られ、カドミウム無処理群と比べると全てのカドミウム濃度で壊死率に有意な差 ($p < 0.05$, 図中※印) が見られた。 1.5×10^5 分生子/mL ではカドミウム無処理群とカドミウム 1 μM 曝露群の間でのみ壊死率に有意差が確認された。 1.5×10^4 分生子/mL ではカドミウム無処理群と曝露群の間で壊死率の有意差は確認されなかった。

また、菌体を接種していないカドミウム曝露群の染色および観察も同様に行ったが、染色部分が肉眼で確認されたものはなかった。

(3) 発症率の測定

発症率の測定を求めるときにあたり、シロイヌナズナに摂取した菌体濃度はカドミウム無処理群では 1.0×10^3 (n=48), 5.0×10^3 (n=20), 1.0×10^4 (n=18), 2.0×10^4 (n=14), 3.0×10^4 (n=15), 1.0×10^5 (n=17) 分生子/mL, 10 μM カドミウム曝露群では 1.0×10^3 (n=26), 1.0×10^4 (n=18), 2.0×10^4 (n=15), 3.0×10^4 (n=12), 1.0×10^5 (n=7) 分生子/mL とした。() 内の n はサンプル数である。

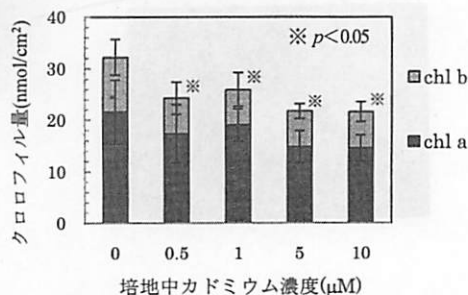


図4 カドミウムがクロロフィル量に与える影響

図-3 に発症率の結果を示す。ラクトフェノールトリバンブルー染色の結果、染色部位が目視で確認されたものを発症したものと判定し、その個体数を計数した。菌体濃度が大きくなるのに伴って発症率の増加が見られた。カドミウム無処理群で発症が確認された最小の菌体濃度は 1.0×10^3 分生子/mL で、発症率は 2.1% であった。 5.0×10^3 分生子/mL で 10%、 1.0×10^4 分生子/mL で 11%、 2.0×10^4 分生子/mL で 50%、 3.0×10^4 分生子/mL で 73 % と大きく増加し、 1.0×10^5 分生子/mL では 100% になった。カドミウム曝露群では、発症率は 1.0×10^3 分生子/mL で 7.7% であった。 1.0×10^4 分生子/mL で 22%、 2.0×10^4 分生子/mL で 60%、 3.0×10^4 分生子/mL で 75 %、 1.0×10^5 分生子/mL では 100% となった。カドミウム曝露群・無処理群共に菌懸濁液の代わりに滅菌水を接種したもので発症が認められたものはなかった。

(4) クロロフィル量

植物のストレス指標としてよく用いられるクロロフィルについて測定した結果を図-4 に示す。値は、各カドミウム曝露濃度での葉面積当たりのクロロフィル量である。測定に用いたサンプルは播種後 26 日栽培したものである。全てのカドミウム曝露濃度で無処理群のクロロフィル量との間に有意な差 ($p < 0.05$ 、図中※印) が見られた。図中のエラーバーはサンプル間でのクロロフィル量の標準偏差を示している。

(5) 菌体濃度と壊死率の用量反応関係

図-5 に各カドミウム曝露濃度での黒すす病菌の分

生子濃度と壊死率の用量反応関係および回帰式と相関係数を示す。図中の直線は、各菌体濃度における壊死率の平均値を対数近似したものである。①から⑤に示した式の x は菌体濃度(分生子/mL)、 y は壊死率(%)を意味し、相関係数は壊死率の平均値と対数関数の相関の大きさを意味する。図中のエラーバーはサンプル間での壊死率の標準偏差を示している。

4. 考察

(1) 黒すす病菌がシロイヌナズナに及ぼす影響

図-2 に示したように、すべてのカドミウム曝露条件下で、菌体濃度の増加に伴って壊死率の増加が見られた。壊死率の平均値の増加が対数関数とよく合うのは、菌類が対数的に増殖することを反映している為である可能性が考えられる。また、発症率を測定した結果、図-3 より菌体濃度が大きくなるのに伴って発症率の増加が見られた。このことより、接種する病原菌の菌体濃度が高いほどシロイヌナズナの葉が受ける損傷は大きいと考えられる。また、菌体を接種せず滅菌水のみ接種した葉で、肉眼で染色部分が観察されたものは無く、本研究の実験系において病原菌による影響以外壊死率に影響する因子はないと判断した。

(2) カドミウムが発症率と壊死率に及ぼす影響

カドミウム $10 \mu\text{M}$ のものの発症率は菌体濃度 1.0×10^3 から 3.0×10^4 分生子/mL で、カドミウム無処理群の発症率

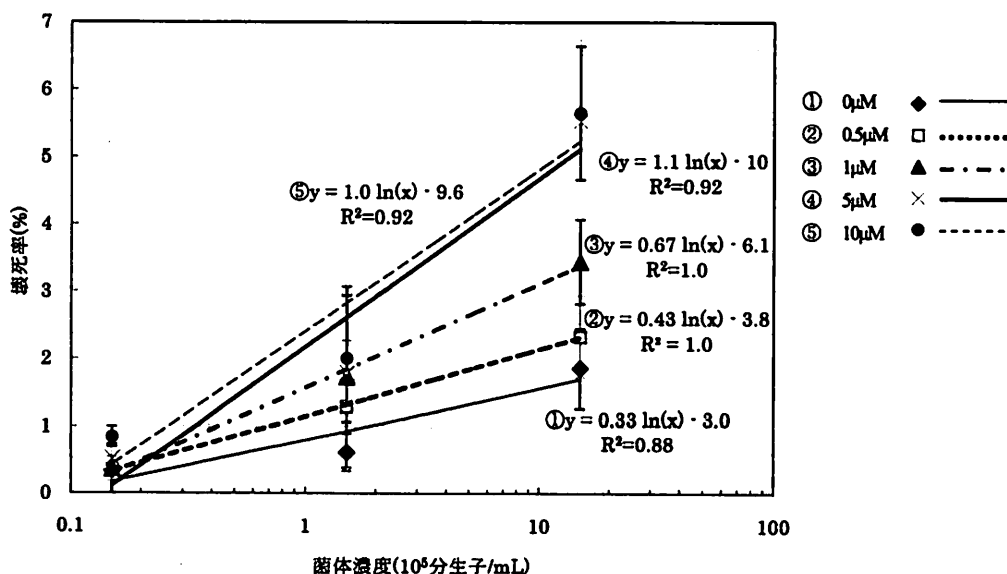


図-5 壊死率を用いたカドミウム濃度別黒すす病用量反応曲線

に比べ大きくなった。また、図-5 より、全てのカドミウム曝露濃度でカドミウム曝露濃度が大きくなるに従って菌体濃度の増加に対する壊死率の増加割合が大きくなる傾向が見られた。よって、本実験ではシロイヌナズナの黒すす病発症率および黒すす病による壊死率にカドミウムが影響を与えることが確認された。

そこで、壊死率がある値を示す際の菌体濃度を全てのカドミウム処理濃度について算出し、これを比較することにより、カドミウムと壊死率における用量反応関係を考察する。なお、 $a\%$ 壊死菌体濃度を壊死率 $a\%$ の時の菌体濃度と定義する。1%壊死菌体濃度及び 3%壊死菌体濃度をそれぞれ求め、その結果を表-1に示す。

カドミウム濃度が高くなるに従って、壊死菌体濃度は低くなる傾向にある。 $a\%$ 壊死菌体濃度の低下は病原菌抵抗性の低下を意味する。この変化率を定量的に評価するため、本研究では病原菌抵抗係数を定義した。1%壊死菌体濃度及び 3%壊死菌体濃度における、カドミウム無処理群の値に対する曝露群の値を求め、これをそれぞれ、1%病原菌抵抗係数、3%病原菌抵抗係数として、表-1及び図-6 (a)(b)に示す。病原菌抵抗係数が、カドミウム曝露群に比べて減少することは、病原菌抵抗性が低下したことを意味するため、植物の病原菌抵抗性を定量的に影響評価する手法として、病原菌抵抗係数の比較を提案する。

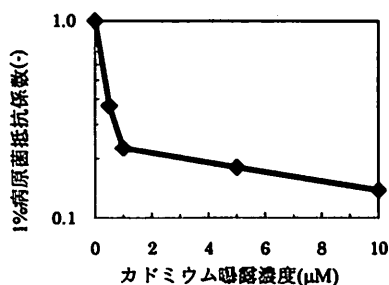
表-1 より、カドミウム曝露濃度 0.5 μM での 1%壊死濃度は 7.0×10^4 分生子/mL という値が得られた。カドミウム

無処理群の 1.9×10^5 分生子/mL に対する割合、すなわち 1%病原菌抵抗係数は表-1 および図-6 (a)にあるように 3.7×10^{-1} となり、大幅な低下が見られた。また、1 μM の 1%壊死濃度は 4.2×10^4 分生子/mL で、1%病原菌抵抗係数は 2.3×10^{-1} となった。このことより、カドミウム曝露濃度 0 μM から 0.5 μM 、1 μM の間で病原菌抵抗性が大幅に低下したと考えられる。一方、カドミウム曝露濃度 5 μM の 1%壊死濃度は 3.4×10^4 、10 μM では 2.6×10^4 分生子/mL であり、1%病原菌抵抗係数がそれぞれ 1.8×10^{-1} 、 1.4×10^{-1} となったことより、カドミウム曝露濃度 1 μM から 5 μM 、10 μM の間での病原菌抵抗性の低下は小さいと考えられる。一方で 3%病原菌抵抗係数に着目すると、表-1 より 3%壊死菌体濃度は 1 μM 曝露群で 8.4×10^3 分生子/mL、5 μM 、10 μM 曝露群では 2.1×10^3 、 1.8×10^3 分生子/mL となり、3%病原菌抵抗係数は 1 μM と 5 μM の間で 1.1×10^{-2} から 2.7×10^{-3} に大きく低下した。5 μM と 10 μM の間では、大きな低下は見られなかった。

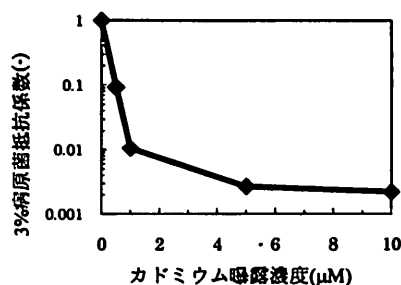
なお、カドミウム 0.5 μM 、1 μM の低濃度曝露群では、3%壊死濃度は、それぞれ 8.0×10^3 、 7.4×10^3 分生子/mL という値が算出されたが、実際接種試験に用いた菌体濃度は最も大きいもので 1.5×10^6 分生子/mL であり、3%壊死菌体濃度を用いた評価では、カドミウム低濃度曝露群の病原菌抵抗性を過大評価する可能性があると考えた。一方で、カドミウム高濃度曝露群における評価には適していると考えられ、1%壊死菌体濃度による評価を補完する役割を期待できる。1%壊死濃度、3%壊死濃度をもと

表-1 カドミウムが壊死濃度・病原菌抵抗係数に与える影響

カドミウム曝露濃度 (μM)	1%壊死菌体濃度 (10^4 分生子/mL)	1%病原菌抵抗係数(-)	3%壊死菌体濃度 (10^4 分生子/mL)	3%病原菌抵抗係数(-)
0	19	1	8.0×10^3	1
0.5	7.0	3.7×10^{-1}	7.4×10^3	9.3×10^{-2}
1	4.2	2.3×10^{-1}	84	1.1×10^{-2}
5	3.4	1.8×10^{-1}	21	2.7×10^{-3}
10	2.6	1.4×10^{-1}	18	2.2×10^{-3}



(a)



(b)

図-6 (a)カドミウム曝露濃度と 1%病原菌抵抗係数の関係、(b)カドミウム曝露濃度と 3%病原菌抵抗係数の関係

に算出する 1%病原菌抵抗係数と 3%病原菌抵抗係数を用いた比較では、係数の低下が大きくなる濃度域に違いが見られることより、カドミウム低濃度曝露群は 1%病原菌抵抗係数を用いて評価し、高濃度曝露群は 3%病原菌抵抗係数を用いて評価する手法を提案する。

本研究では壊死率の平均値をもとに病原菌抵抗係数に関して議論したが、壊死率のばらつきを考慮に入れて検討を行うことが望ましい。今後さらに実験を重ね、再現性および信頼区間の確認を行い、ばらつきを考慮した病原菌抵抗係数を算出することが今後の課題である。また、葉の壊死と植物の枯死の関係についても今後確認し、壊死率をもとにした病原菌抵抗性評価法の優位性を検討する必要がある。

(3) カドミウムが植物の病原菌抵抗性に及ぼす影響

黒すす病菌のように菌糸を持つ菌は、菌糸を伸長させ宿主の表面に侵入することにより栄養を得て、生命維持と増殖を行うとされる¹⁶⁾。図-1より、壊死細胞の周りには菌糸が確認された。本実験においても植物細胞の壊死は、菌糸の伸長に関連して引き起こされたと考えられる。カドミウム曝露群で病原菌抵抗性が低下したことより、カドミウム曝露群の葉はカドミウム無処理群に比べて黒すす病菌にとって増殖しやすい環境に変化した結果、壊死面積が大きくなったと考えられる。

カドミウム曝露群の葉がカドミウム無処理群に比べて黒すす病菌にとって増殖しやすい環境になったことに関しては、まず、カドミウム曝露による生長阻害の影響でシロイヌナズナの葉表面のクチクラ層など物理的障壁がカドミウム無処理群に比べて弱くなり、菌が侵入しやすくなったことが原因として考えられる¹⁷⁾。また、植物が重金属を取り込んだ際にフィトケラチンを用いた防御機構がはたらくが、その際活性酸素種が発生する。活性酸素種は生体にとって多すぎると有害であるため、消去するはたらきが活性化される。活性酸素種は一方で病原菌に対する防御機構において非常に重要な役割を果たすという側面もある¹⁸⁾が、重金属に対する防御機構の過程で活性化された活性酸素種消去反応が、病原菌に対する防御に必要な活性酸素種も消去・抑制したため、結果として病原菌抵抗性を低下させたということも原因のひとつとして考えられる。

ただし黒すす病菌へのカドミウムの影響については確認していないので、今後確認が必要である。

(4) カドミウムが葉のクロロフィル量に及ぼす影響

図-4より、カドミウム曝露を受けたシロイヌナズナの葉中クロロフィル量は、カドミウム無処理群と比べて減少傾向にあることが確認された。カドミウムはシロイヌナズナの多くの種類の遺伝子発現量に影響を及ぼすこ

とが報告されており、その中には、成長ホルモンにตอบสนองして誘導されるタンパクや代謝に関わるタンパクをコードする遺伝子も含まれる¹⁹⁾。これらの遺伝子発現量の変化が、カドミウム曝露群のクロロフィル量減少に影響を及ぼした可能性が示唆された。

5. 結論

ラクトフェノールトリバンブルーを用いた壊死細胞染色及び面積測定を行った結果、カドミウム曝露濃度の増加に伴って、シロイヌナズナの葉面積あたり壊死率の増加が見られた。このことより、ラクトフェノールトリバンブルー染色を用いた試験方法が、シロイヌナズナの病原菌抵抗性にカドミウムが及ぼす影響を定量的に評価する際に有効であることが分かった。

また、カドミウム曝露群の壊死菌体濃度を無処理群のそれで除した値である、病原菌抵抗係数を用いた評価法を提案した。1%病原菌抵抗係数を用いた評価を行った結果、カドミウム曝露濃度 0.5 μM で無処理群の 0.37 倍、1 μM で 0.23 倍に病原菌抵抗性が低下していることが確認された。

クロロフィル量はカドミウム濃度の増加に伴って減少した。また、カドミウム曝露濃度 10 μM での黒すす病発症率は、カドミウム無処理群の発症率に比べ大きくなった。このことから、カドミウム曝露は病原菌の植物への感染・罹患しやすさに影響を与えることが示唆されたが、詳しいメカニズムに関しては今後さらなる研究が必要である。

参考文献

- 1) 古市徹：土壌・地下水汚染 循環共生社会を目指した修復と再生、オーム社、2006
- 2) 金子信博：土壌系における生態系レベルでのリスク評価、2006
- 3) 財団法人金沢鉱山会：鉱山 8月号、2008
- 4) 環境省：土壌汚染対策法の施行状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果、2008
- 5) 浅見輝男：カドミウムと土とコメ、アグネ技術センター、2005
- 6) 王莉、東照雄、藤村達人：水耕栽培下でのアブラナ科 (*Brassica*) 植物によるカドミウムと無機養分の吸収特性、日本土壌肥科学雑誌 Vol.75, No.3, pp.329-337, 2004
- 7) 後藤茂子、林浩昭、米山忠克、茅野充男：カドミウム汚染土壌及び下水汚泥コンポスト連用土壌で栽培したコマツナ根圏でのカドミウム及び亜鉛の挙動-ライゾボックスを用いた一知見-、土壌肥科学雑誌 Vol.75, No.5, 601-603, 2004
- 8) 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 Vol.46,pp369-376,2009
- 9) O Kooten, JFH Snel: The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology, *Photosynthesis Research* Vol. 25,pp147-150, 1990.
- 10) Lorena Norambuena, Glenn R. Hicks, Natasha V. Raikhel:The Use of Chemical Genomics to Investigate Pathways Intersecting Auxin-Dependent Responses and Endomembrane Trafficking in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Hormones: Methods and Protocols* Vol.495,pp133-143,2008
- 11) Chitra Subramanian, Yao Xu, Carl Hirschie Johnson, and Albrecht G. von Amim :In Vivo Detection of Protein-Protein Interaction in Plant Cells Using BRET, *Signal Transduction Protocols*,Vol.284,pp271-286,2004
- 12) Tobias Sehr, Gabriele Voigt, Herwig G. Pareizke, Peter Schramel and Dieter Ernst : Caesium-effector gene expression in *Arabidopsis thaliana*,*New Phytologist* Vol.165,No.3 ,pp747-754 ,2005
- 13) Eckhard Koch and Alan Shurenkov *Arabidopsis* Is Susceptible to Infection by a Downy Mildew Fungus,*The Plant Cell* Vol. 2, pp437-445,1990
- 14) 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,pp149-156,2002
- 15) 牛島悠介「内生放線菌 *Streptomyces galbus* MBR-5 株が宿主植物に誘導する病害抵抗性の分子生物学的解析」三重大学大学院生物資源学研究科 修士論文2007
- 16) 国立科学博物館編「菌類の不思議」東海大学出版会(2008)
- 17) L.ティン, E.ザイガー「植物生理学 第3版」培風館,2004
- 18) 成井 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」京都大学大学院都市環境工学専攻 修士論文2007

(2010.5.21受付)

Cadmium effect on disease resistance of *Arabidopsis thaliana* by *Alternaria brassicicola* and the method of the assessment

Nanae YAMAMOTO, Kenichiro YAMAMOTO, Masashi KAGAI ,
Aki NAKAYAMA and Minoru YONEDA

Dept. of Engineering, Kyoto University

Recently, soil contamination by heavy metal is clearly existing. However, the risk assessment for ecology is behind that for human beings. In this study, we assessed the cadmium effect on pathogen resistance of *Arabidopsis thaliana*. In order to assess pathogen resistance, we measured necrotic area after inoculation into the cadmium-exposed plants. The necrotic area increased in a dose dependent manner. As a result of this experiments, we defined and calculated pathogen resistance factor in order to assess pathogen resistance quantitatively.