

(59) カドミウムによるシロイヌナズナの 病害抵抗性への影響と その毒性評価指標としての検討

山本 研一朗¹・山本 奈々絵^{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: 7-yamamoto@risk.env.kyoto-u.ac.jp

これまで重金属汚染が人の健康に与える影響については盛んに研究が行われてきたが、土壌汚染における生活環境や生態系への影響についての研究は未だ十分とは言えず、生態系への影響評価手法の確立が急がれている。そこで本研究では、高等植物におけるクロロフィル量および病害抵抗性を、重金属汚染に対する新たな生態毒性評価指標として提案することを目的とした。病害抵抗性としては、高等植物の持つ抗菌作用と植物体中の抗菌活性物質を定量することで指標として用いることの有用性を検討した。

カドミウムを曝露したシロイヌナズナのクロロフィル量を測定した結果、低濃度のカドミウム曝露に対して鋭敏な応答が見られ、クロロフィル量の指標としての有用性が示された。また、抗菌活性試験の結果からは、1 μ M以上のカドミウム曝露によって植物体中の抗菌作用が低下したことが確認された。カドミウムの曝露に加え *A. brassicicola* の接種を行ったシロイヌナズナでは、アブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸の3種の抗菌活性物質で増加が確認された。特に低濃度域でも鋭敏な反応を示したのはジャスモン酸量で、*A. brassicicola* を接種することで重金属による影響がより明確に示された。

本研究の成果によって、ジャスモン酸量を生態毒性指標として用いることの有用性が示された。ジャスモン酸はカドミウム曝露濃度が低い範囲でも応答が鋭敏であり、かつカドミウム曝露濃度依存的な変化が見られたことから、重金属が植物へ与える影響を予見的に評価できる可能性が考えられる。

Key Words : Cd, *Arabidopsis thaliana*, phytohormones, abscisic acid, jasmonic acid, salicylic acid, LC/MS

1. 序論

近年、有害物質による人への影響に注目が集まり、産業廃棄物や排水等による環境問題が懸念されている。なかでも土壌汚染は、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、蓄積性が高いことなど、大きな問題点を抱えている¹⁾。特に企業の工場跡地等の再開発等に伴い、これまで潜在的に存在していた重金属・揮発性有機化合物等による土壌汚染が顕在化し、新たな社会問題となっている。

日本のカドミウム汚染は農用地、特に水田に多く見られ、非汚染米中カドミウム濃度も高いため、日本人のカドミウム摂取量は非常に多い。このため、カドミウムの人の健康への影響は盛んに研究され、そのリスクの評価についても十分な検討がなされてきた。一方で、土壌汚染における生活環境や生態系

への影響については未だ十分とは言えず、生態系への影響評価手法の確立が急がれる。

有効なリスク評価方法を確立するには、指標生物と評価指標の選定が不可欠であるが、まず土壌生態系の中から代表的な生物種を特定し、生態系という多様なシステムから指標生物を選定することが重要である。さらに、土壌環境の変化による影響を評価するためのエンドポイントすなわち評価指標を決定せねばならない。エンドポイントとして、鋭敏なバイオマーカーを選定することが、土壌生態系のリスクを予見的に評価するためには重要である。現段階においては、未だ選定可能なエンドポイントやその定量的評価方法の検討から始めなければならない状況にあり、基礎的研究の蓄積が望まれている。

本研究では、生態系における生産者である高等植物を指標生物とした。また、バイオマーカーとして

分子生物学的な指標であるクロロフィル量および病害抵抗性に着目し、その指標としての有用性を検討することとした。クロロフィル(Chlorophyll)は、植物が光からエネルギーを産生するために必須の生体分子であり、植物の正常な成長の指標となりうる物質である²⁾。また植物が生物ストレスに対して防御機構を誘導する際に用いられるシグナルに、アブシジン酸(Abscisic acid)、ジャスモン酸(Jasmonic acid)、サリチル酸(Salicylic acid)などの抗菌活性物質が存在する。これらは高等植物に普遍的に存在しており、ある種の環境ストレス条件下によって生成、活性化され植物の病害抵抗性に関与することが知られている³⁾。

本研究の研究目的を以下の通りに設定した。

1. カドミウムを曝露したシロイヌナズナ中のクロロフィル量の変化を調査し、生態毒性評価指標としての有用性を検討する。
2. カドミウムをシロイヌナズナに曝露し、植物の持つ抗菌作用に及ぼされる影響を把握する。
3. 重金属が植物の生物ストレスに対する防御機構に及ぼす影響を定量化する手法を、抗菌活性物質の分析によって検討し、重金属汚染に対する新たな生態毒性評価指標として提案する。

2. 実験手法

(1) シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナは寒天培地に播種し、約2週間の栽培の後パーミキュライトを詰めたポットへ植え替え、栽培を行った。

寒天培地の作成は以下の手順で行った。表1に示した植物培養培地ムラシゲ・スクグ培地用混合塩類、スクロース、2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate(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。

表1 ムラシゲ・スクグ培地用混合塩類組成

成分	mg/L	成分	mg/L
KNO ₃	1900	MnSO ₄ ・4H ₂ O	22.3
NH ₄ NO ₃	1650	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	8.6
CaCl ₂ ・2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6.2
MgSO ₄ ・7H ₂ O	370	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.25
Na ₂ ・EDTA	37.3	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ・7H ₂ O	27.8	CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.025

60℃程度まで冷ましたところで、酢酸カドミウム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枚につき種子約25個を均等に播いた。

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℃、16時間明期、8時間暗期の条件で栽培した。

約2週間の栽培後、寒天培地から植え替えを行った。5000倍希釈した液体肥料ハイフラワー(高山園芸)と所定の濃度(0、0.1、0.5、1、5、10μM)の酢酸カドミウムを加えた超純水を用意し、これをパーミキュライト250gあたり1Lふくませてオートクレーブで滅菌処理した。十分に冷ました後、40mm×40mmのミニポットに約40gずつ入れ、これを植え替えに用いた。なお、パーミキュライトに加えたカドミウム溶液は寒天培地と同様に酢酸カドミウムを用いて酢酸イオン量の調整を行った。シロイヌナズナを植え替えた後のポットは、図1のようなアクリルケース内に入れ無菌条件で栽培した。空気交換及び水蒸気の透過が可能となるように、アクリルケースには上部6cmに開口部をもうけ、MILLI WRAP (MILLIPORE)でシールした。水やりは、シール部からミニポット底部に伸ばしたチューブに滅菌フィルターを取り付け、このフィルターを介して行った。なお栽培条件は寒天培地による栽培と同様とした。給水は4日に1回以上、蒸発によって減少した量の5000倍希釈した液体肥料ハイフラワーを箱ごとに与えた。

一定期間の栽培の後、植物体は葉と茎及び種に分けて採取した。条件ごとに採取した各部位は、以降の操作まで-80℃で保存した。

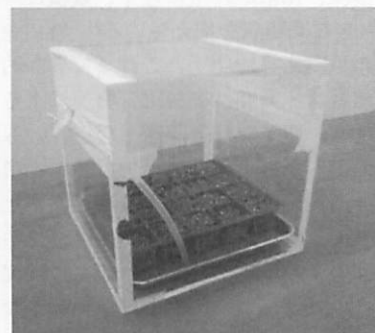


図1 無菌栽培ケース

(2) 土壌中カドミウム濃度の測定

a) JIS K0102 55による測定

土壌の汚染に係る環境基準に則り、JIS K0102 55 に準じた測定を行った。

シロイヌナズナの育成に用いた土壌は、風乾した後、非金属製の 2mm の目のふるいを通して得た土壌を十分混合し、2g ずつ秤量した。抽出溶媒には、純水に塩酸を加え pH5.8 以上 6.3 以下としたものを用意し、これを試料と重量比 10%の割合で混合し、常温常圧で 6 時間振とうした。振とう抽出後 30 分間静置し、800×g で 20 分間遠心分離をして上清を ADVANTEC 製 DISMIC(孔径 0.45μm)でろ過した。このろ液を検液とした。

検液 10mL に体積比 5%の硝酸を加え、ホットプレートを用いて静かに煮沸し、有機物の分解を行った。その後、超純水を加えて 10mL にした。これを 10 倍に希釈し、ICP-MS 分析用試料とした。

ICP-MS(HEWLETT PACKARD 製 HP4500)によるカドミウム濃度の定量には、内標準法と検量線法を併用して行った。まず、内標準物質として土壌や植物中にはほとんど存在しないインジウムを使用し、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インジウム標準液を添加した。これにより、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。検量線法に用いた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た。

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 3 つの測定結果から得られた標準偏差の 3 倍の値とした。

b) DGT法による測定

DGT (Diffusive Gradients in Thin-films) 法による測定は、永井ら(2007)⁴⁾、Hao Zhang et al.(2001)⁵⁾を参考に行った。シロイヌナズナの育成に用いた土壌からの重金属の抽出は、植物体の採取後すぐに行った。使用まで 4℃で密閉保存していた DGT サンプラーを、一定温度条件下で 24 時間土壌と接触させカドミウ

ムの抽出を行った。回収した DGT サンプラーからは、直ちに最下部の樹脂ゲル(resin gel)を採取し、チューブに移した。その後 1mL の 1M 硝酸を加え、24 時間以上静置した。一定時間後チューブから液体部分を回収し、10 倍に希釈して、ICP-MS 分析用試料とした。

ICP-MS によるカドミウム濃度の定量は前項と同様に行った。ICP-MS による定量で得られた濃度から、フィックの拡散の第一法則⁵⁾に従って土壌中の生物利用可能カドミウム濃度(DGT-labile 濃度: μg/L)を算出した。

(3) 生長量及びクロロフィル量の測定

シロイヌナズナを寒天培地に播種した後 10 日間、発芽率を観察した。本章(1)で述べたように育成したシロイヌナズナについては重量による生長量測定も行った。また、クロロフィル量の測定のために、寒天培地で 17 日間育成したものを各条件から 5 個体を無作為に選び、すべての葉を採取した。採取した葉は 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の抽出を行った。抽出液は Nano Drop 1000 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²⁾を参照して抽出液中のクロロフィル量を算定した。以下に算出式を示す。

抽出液中クロロフィル量 [nmol/mL]

$$\begin{aligned} [\text{クロロフィルa}] &= 13.4 \{ (E_{664} - E_{748}) - 3.47(E_{647} - E_{748}) \} \\ [\text{クロロフィルb}] &= 22.9 \{ (E_{647} - E_{748}) - 5.38(E_{664} - E_{748}) \} \end{aligned} \quad \dots (式1)$$

(4) 抗菌活性試験

採取後 -80℃で保存していたシロイヌナズナは凍結粉碎し、約 200mg ずつ 1.5mL チューブに取り、その重量を測定した。秤量を終えたチューブに酢酸エチル 1mL を加え、30 秒間隔で 1 分間の vortex を二回繰り返した。4℃、15000×g で 20 分間遠心分離を行い、上清を別のチューブに移した。さらに酢酸エチルを

表 2 抗菌活性試験に用いた菌類

細菌	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
培地	ポリペプトン培地	ポリペプトン培地
培養温度	28℃	28℃
培養期間	2～3日	2～3日
糸状菌	<i>Alternaria brassicicola</i>	
培地	ポテトデキストロース寒天(PDA)培地	
培養温度	22℃	
培養期間	暗黒下で16日間	

表 3 LC/MS による抗菌活性物質測定条件

カラム	GL SCIENCE Inc., Inertsil® ODS-3分析カラム (5 μ m, 4.6 $\times$ 150mm)			
移動相	A : 0.05%ギ酸 B : アセトニトリル			
導入容量	10 μ L			
グラジエント	時間 (min)	A (%)	B (%)	流量 (mL/min)
	0	85	15	0.15
	3	85	15	0.2
	5	20	80	0.2
	20	20	80	0.15
	25	85	15	0.15

表 4 対象質量数とおおよその保持時間

対象化合物	質量数 (m/z)	保持時間 (min)
サリチル酸 (Salicylic acid)	137.11	11.31
ジャスモン酸 (Jasmonic acid)	209.26	11.74
アブシジン酸 (Absciscic acid)	263.31	11.48
サリチル酸-d4	141.15	11.31

1mL加えて10分間のvortexを行い、4℃、15000 $\times$ gで20分間の遠心分離によって回収した。二回の抽出操作で得られた上清を合わせて、ロータリーエバポレーターを用いて、乾燥するまで30℃での濃縮を行った。回収したチューブに、メタノールを抽出に用いた植物体重量当たり1mL/gとなるように加え、10分間vortexし、15000 $\times$ gで10分間遠心分離をした。これで得られた上清を用いて抗菌活性試験を行った。

抗菌活性試験には、表2中の3種類の細菌及び糸状菌を用いた。植物体からの抽出液は、メタノール最終濃度が10%となるように滅菌済みPBSで希釈した。所定の菌懸濁液を塗抹した平板培地の中央にペーパーディスクを置き、これに希釈した植物体からの抽出液を一定量浸み込ませ、それぞれの培養条件下で一定期間培養した。

培養が終わったシャーレは観察、撮影を行い、得られた画像はオープンソース画像処理ソフトGIMP 2.6.11(GNU Image Manipulation Program)⁶⁾を用いて画像解析を行った。

(5) 抗菌活性物質の定量分析

a) シロイヌナズナへの菌体の接種

シャーレで13日間、植え替え後9日間の栽培を行ったシロイヌナズナの各個体にアブラナ科植物黒すす病菌(*Alternaria brassicicola*)の接種を行った。シロイヌナズナへの病原菌接種は菌懸濁液を葉に2 μ L滴下することで行った。各個体につき接種葉は二枚とし、

どちらも本葉に接種を行った。また、接種はクリーンベンチ内で行い、接種後は植え替え後と同様のアクリル製の箱に入れ、外部との菌体の移動が無い条件下で栽培を行った。

アブラナ科植物黒すす病菌の接種から5日後、植物体を葉と茎及び種に分けて採取した。条件ごとに採取した各部位は、以降の操作まで-80℃で保存した。

b) 抗菌活性物質の抽出および測定

植物体からの抽出操作は次の通りに行った。採取後-80℃で保存していたシロイヌナズナは凍結粉碎し、約200mgずつ1.5mLチューブにとり、その重量を測定した。秤量を終えたチューブには、内標準物質としてサリチル酸-d4 100ngと酢酸エチル1mLを加えた。vortexミキサーを用いて1分間の攪拌を行い、30秒静置するという作業を二回繰り返し、4℃、15000 $\times$ gで20分間遠心分離をした。得られた上清を別のチューブに移した後、酢酸エチルを1mL加えて10分間vortexし、4℃、15000 $\times$ gで20分間の遠心分離によって回収した。ここで得られた上清は、一回目の抽出操作で得られた上清と合わせて、ロータリーエバポレーターを用いて、乾燥するまで30℃での濃縮を行った。乾固した抽出物は超純水1mLを加え、10分間vortexすることで再溶解し、固形物を取り除くため15000 $\times$ gで10分間遠心分離を行った。

得られた上清はさらに固相抽出法により精製を行った。固相抽出にはOasis HLB Extraction Cartridge (Waters)を用いた。6mLのメタノールを用いてコンディショニングを行い、続いて6mLの超純水を用いて平衡化を行ったHLBに、再溶解した抽出液から得られた上清をロードした。5%メタノールを用いてカラムの洗浄を行った後、100%メタノール2mLで溶出した。再度、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、メタノール500 μ Lを加え、10分間のvortexと、15000 $\times$ g、10分間の遠心分離によって回収した。得られた上清をLC/MS分析用試料とした。LC/MS分析

用試料は、測定直前までの間-80℃で保存した。

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)はMeadows Instrumentation Inc.製Waters 2695 HPLC Systemを用い、カラム、移動相、グラジエントなどは表3に示した条件で測定を行った。検出器にはSpectraLab Scientific Inc.製質量分析装置Micromass ZMDを用いた。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用い、negative modeでSIM分析を行った。分析対象はアブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸の3種の抗菌活性物質とし、それぞれの質量数とおおよその保持時間を表4に示した。

抽出液中抗菌活性物質の定量には、内標準法と検量線法を併用して行った。内標準物質には、サリチル酸の安定同位体であるサリチル酸-d4を用い、全測定サンプルと検量線サンプルに200ng/mLで均一に含まれるように添加した。

3. 結果および考察

(1) 土壤中可給態カドミウム量

0、0.1、0.5、1、5、10μMの濃度列の酢酸カドミウムを含む栄養液を添加した土壌について、公定法であるJIS K0102 55に準じた手法およびDGT法を用いてカドミウム濃度を測定した。栄養液中カドミウム濃度と、公定法、DGT法により得られた濃度の関係をそれぞれ求めた結果、両者とも線形関係を示した。この関係は公定法では6回、DGT法では2回の測定の平均値から求めたものであり、決定係数はそれぞれ0.92、0.95(n=6)であった。

本測定で使用したDGT法は生物が利用可能な形態の金属量を測定する際に用いられる。DGTサンプラーは、孔径0.22μmのニトロセルロースメンブレンフィルターと、15%アクリルアミドと0.3%クロスリンカーで構成される拡散ゲル(diffusive gel)層、Chelex-100樹脂の金属結合ゲル(resin gel)層との三層構造になっている。土壌中の金属は無機態もしくはは

有機態で存在しており、有機態金属の中でも不安定で解離の速度が速い(labile)錯体と安定で不活性な(inert)錯体に分けることができる。このうち、環境中で生物が利用する金属はinert錯体以外のものであると考えられる。DGTサンプラー最下部のChelex層には無機態のフリーイオンが吸着するが、中には抽出処理中にlabileな有機錯体から解離した金属イオンも含まれる。このため、DGT法によって抽出された無機態およびlabileな有機錯体から解離した金属イオンの二種類の形態の金属濃度を合わせた濃度をDGT-labileと定義し、生物利用可能な金属濃度と考える事ができる。本研究ではこの生物利用可能な金属濃度を、土壌中可給態カドミウム量と定義する。図2に示したように、本測定で得られた結果から、JIS K0102 55による測定結果とDGT法による測定結果の間に線形関係が見られたことから、土壌中カドミウム量とその内の土壌中可給態カドミウム濃度の間には線形の関係があることが示唆された。

我々は以前にカドミウムの曝露実験も行っており⁷⁾、このとき求めた栄養液中カドミウム濃度と植物体中カドミウム濃度の関係を、表5に示す。表5に示した結果と、今回測定した栄養液中カドミウム濃度とDGT-labile濃度との関係を合わせて、植物体中カドミウム濃度とDGT-labile濃度の関係を求めた結果を図3に示す。植物体中カドミウム濃度の計算値とDGT-labile濃度の測定値とは比較的良好な線形の関係が得られた。これを用いて土壌中カドミウムが植

表5 栄養溶液中カドミウム濃度と植物体中カドミウム濃度の関係

栄養溶液中 Cd 濃度(μM)	植物体中 Cd 濃度 (μg/g-dry)
0	0.188
0.1	0.848
0.5	2.93
1	6.90
5	50.5
10	77.3 (84.8)

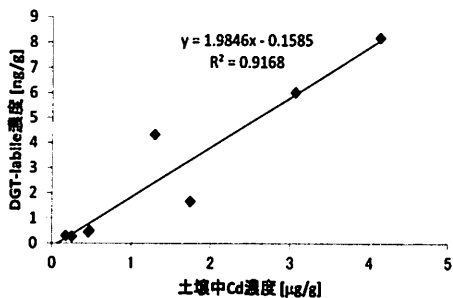


図2 土壌中カドミウム濃度とDGT-labile濃度の関係

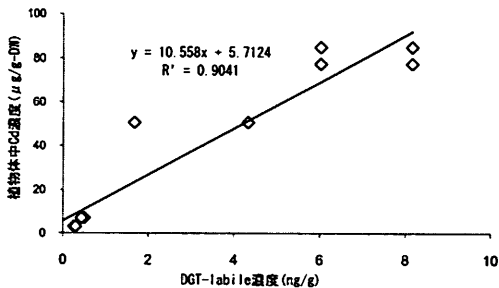


図3 植物体中カドミウム濃度とDGT-labile濃度の関係

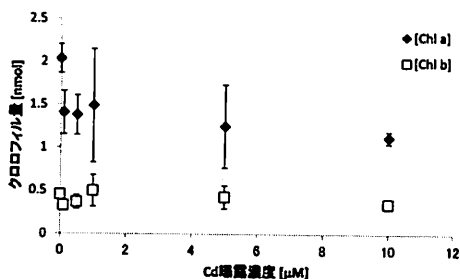


図4 カドミウムがクロロフィル量に及ぼす影響

表6 カドミウムが抗菌活性に及ぼす影響

植物サンプル 曝露条件	シャーレ番号		
	1	2	3
<i>Alternaria brassicicola</i>			
Control (MeOH)	+	+	+
Cd 0μM曝露	+	+	-
Cd 0.5μM曝露	+	-	+
Cd 1μM曝露	-	-	-
Cd 5μM曝露	-	-	+
Cd 10μM曝露	-	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>			
Control (MeOH)	-	+	-
Cd 0μM曝露	+	+	+
Cd 0.5μM曝露	+	-	+
Cd 1μM曝露	-	-	+
Cd 5μM曝露	+	-	-
Cd 10μM曝露	+	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>			
Control (MeOH)	-	-	+
Cd 0μM曝露	+	-	-
Cd 0.5μM曝露	-	-	-
Cd 1μM曝露	-	-	-
Cd 5μM曝露	-	+	-
Cd 10μM曝露	+	-	-

物体中に移行する量を定量的に評価したところ、植物体中カドミウム濃度は土壌中の約21.6倍量蓄積することが示された。また、直線回帰式から、土壌中の生物利用可能なカドミウム量の約 1.63×10^4 倍の濃度のカドミウムが蓄積していることが示された。

(2) カドミウム曝露による生長量およびクロロフィル量への影響

発芽率・乾燥重量測定では、培地中カドミウム濃度および栄養液中カドミウム濃度を0、0.1、0.5、1、5、10、50、100μMとして実験を行ったが、本研究の測定結果からはカドミウムの曝露濃度や曝露期間などの条件に依存した発芽率・生長量への影響は見られなかった。

クロロフィル量の測定結果を図4に示す。今回の測定では全ての葉を対象としているため、図には1個体の葉に含まれる総クロロフィル量を示した。クロロフィルaで、全ての曝露群においてコントロール群に

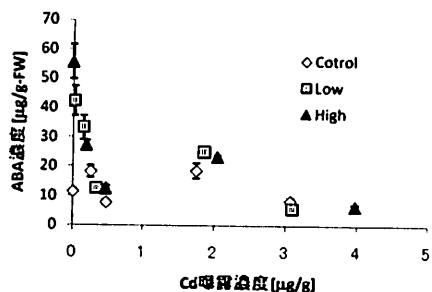


図5 カドミウムの植物体中 ABA 濃度への影響

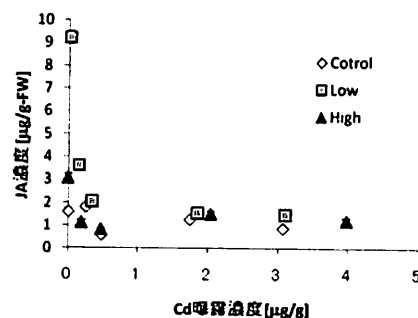


図6 カドミウムの植物体中 JA 濃度への影響

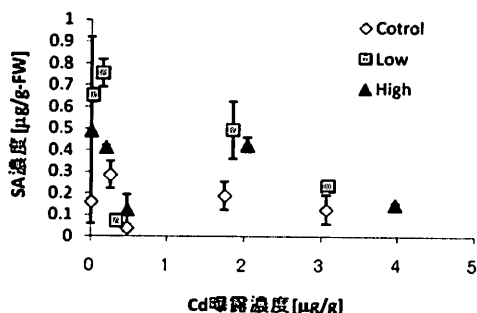


図7 カドミウムの植物体中 SA 濃度への影響

比べて減少が見られた。t検定を用いた有意差検定を行ったところ、コントロール群に対してカドミウム曝露濃度1μM以外の条件で5%有意差が確認された。特に0.1μMで0.5%有意、曝露濃度0.5μMでは0.1%有意、10μMで0.1%有意な減少が確認された。

植物体中のクロロフィル量は環境ストレスに対する影響指標としてしばしば用いられる。水の過不足や凍結、病虫害、オゾンなどのストレスによって多くの高等植物で植物体中のクロロフィル量が減少することが報告されている⁸⁾。サトウダイコン(*Beta vulgaris*)を用いて塩ストレスを与える実験を行ったところ、塩濃度に依存した生長量の減少と葉中クロロフィル量の減少が確認された⁹⁾。また、水分ストレスに曝されたタチナタマメ(*Canavalia ensiformis*)で、葉中クロロフィル量の減少が確認された¹⁰⁾。水分ストレスを受けた植物でクロロフィルの生成が阻害さ

れるのは、その合成に深く関与するプロトクロロフィルの生成能が減少したためだという報告もある¹¹⁾。カドミウムを含む溶液を用いて栽培したトウモロコシ(*Zea mays*)では、植物体乾燥重量あたりカドミウム濃度が上昇し、それに伴いクロロフィルaとクロロフィルbの両方で減少が確認されたと報告されている¹²⁾。以上のように、植物体中のクロロフィル量は植物が何らかの環境ストレスに曝されることで減少することが知られている。今回の実験においても、葉中クロロフィル量の減少はシロイヌナズナに与えられた重金属ストレスによるものであり、低濃度の曝露に対しても敏感に応答していることが確認された。このことから、クロロフィル量の変化は、重金属ストレスに対する生態毒性指標として有用である可能性が示唆された。

(3) カドミウムの曝露による抗菌活性への影響

カドミウムを曝露されたシロイヌナズナからの抽出物を用いた抗菌活性試験において、菌の繁殖が阻止された範囲(阻止円)が確認された。表6に阻止円の判定結果を示す。阻止円の判定は視認で行い、阻止円が在る場合(陽性)を+、阻止円が見られない場合(陰性)を-と表記した。表6より、曝露群ではコントロール群に比べ、陽性と判定されたシャーレの数が少なかった。*Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*を用いたシャーレではそれぞれの条件による違いはあまり観察されなかったものの、アブラナ科植物黒すす病菌と*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*では1 μ M以上のカドミウム曝露群で、コントロール群に比べて陽性を示したシャーレ数の減少が確認された。

山本¹³⁾はカドミウムを曝露したシロイヌナズナを用いて病害抵抗性試験を行い、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たところ、高濃度にカドミウムを曝露したシロイヌナズナにおいて、葉の病徴発生面積が増加したと報告している。また、この病徴への影響は0.5 μ Mといった低濃度のカドミウムを曝露されたシロイヌナズナでも確認されたとしている。これは今回の実験による結果とも合致する所であり、重金属ストレスにさらされたシロイヌナズナで病害抵抗性が低下することが確認された。

(4) カドミウムの曝露による抗菌活性物質質量への影響

抗菌活性物質の測定結果を図5-7に示す。LC/MSを用いた各測定は3回ずつ行っており、図中の値はその平均値である。接種した菌懸濁液の濃度は、5.02

$\times 10^5$ 分生子/mLと 3.39×10^6 分生子/mLの二種類で、凡例中では前者をLow、後者をHighとそれぞれ表記した。

それぞれの抗菌活性物質の測定結果で、カドミウム曝露濃度に依存した穏やかな減少が見られた。また、菌を接種したシロイヌナズナ中で菌非接種群と比較して抗菌活性物質量の増加が観察された。中でも図6に示したジャスモン酸の測定結果では、曝露カドミウム濃度0 μ Mの点で菌非接種群に対して接種菌体濃度Low群では約5.7倍の増加が見られた。しかし、それらの増加は菌の接種濃度には依存していなかった。生物ストレスによる抗菌活性物質への影響については多くの研究がなされており、アブシジン酸やサリチル酸が全身獲得抵抗性に深く関与しているとされている。全身獲得抵抗性とは1か所で病原体の感染が起これば、ある範囲の病原体に対して植物体全体の抵抗力が増加することであり、植物のもつ病害抵抗機構の一つである³⁾。*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*を感染させたシロイヌナズナ中のサリチル酸を測定したところ、12時間で増加傾向が見られ、1日後、2日後においてもさらなる増加が報告されている¹⁴⁾。苗立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)を感染させたキュウリ(*Cucumis sativus*)では、72時間後に葉中サリチル酸量がコントロールの2倍、ジャスモン酸量が13倍に増加した¹⁵⁾。J. Fan et al.¹⁶⁾が行った実験によると、*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*を感染させたシロイヌナズナを用いて葉中の抗菌活性物質を測定したところ、アブシジン酸量は菌接種後から50時間をかけて緩やかに増加、ジャスモン酸量は約25時間後から急激に増加、サリチル酸量は約10時間後まで増加しその後減少し、アブシジン酸とジャスモン酸の増加傾向に対してサリチル酸だけが異なる傾向を示すことを報告した。これについて著者らはサリチル酸とジャスモン酸の競合関係に言及し、アブシジン酸がジャスモン酸の蓄積や活性を促していると考えられている。同様に、*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*を感染させたシロイヌナズナの葉中抗菌活性物質の分析を行い、6時間後にアブシジン酸とジャスモン酸の増加を確認したという報告もある¹⁷⁾。このように、既往の研究からサリチル酸が生物ストレスに対する防御機構に大きな寄与を持っていることが知られている。

図5、6に示した他の二種類の抗菌活性物質がカドミウム非曝露群に対してカドミウム曝露群で急激に減少しているのに比べてサリチル酸ではカドミウム曝露の影響が鋭敏に検出されなかった。この要因としては、病害抵抗性(全身獲得抵抗性)と環境スト

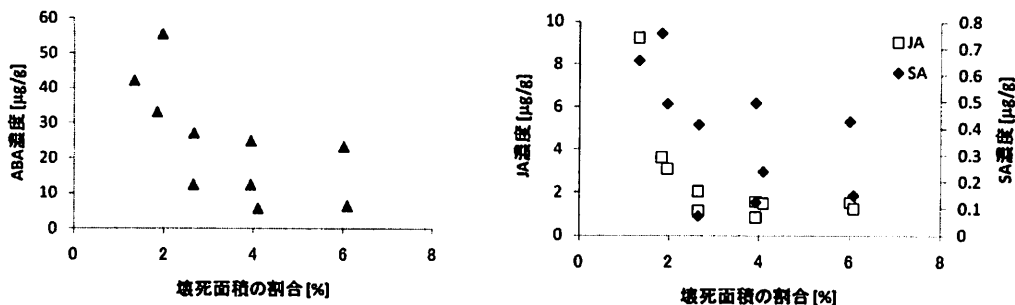


図8 葉の壊死面積と抗菌活性物質
(左図：アブシジン酸、右図：ジャスモン酸およびサリチル酸)

レスへの応答との拮抗関係が考えられる。ある報告では、全身獲得抵抗性が生物ストレス以外の環境ストレスによって弱められ、逆に全身獲得抵抗性を発現している植物体で環境ストレスへの応答が低下することが示されている¹⁸⁾。この報告によると、前もってアブシジン酸を処理したシロイヌナズナで、サリチル酸の合成に関わる遺伝子やサリチル酸の蓄積、サリチル酸が担うシグナル伝達における下流域などの要素全てが抑制され、全身獲得抵抗性が強く抑制されたとされる。アブシジン酸処理の代わりに塩ストレスを与えたシロイヌナズナにおいても同様の応答が見られ、逆に、アブシジン酸の誘導を抑えた植物体に環境ストレスを与えても全身獲得抵抗性誘導の抑制は起こらず、通常の植物体よりも強く発現している。このことから、植物中の環境ストレスに対する応答シグナルと生物ストレスに対する全身獲得抵抗性誘導シグナルとの間に拮抗的な相互作用があることが考えられ、植物の合理的な生存戦略として、状況に応じてより重要なストレスに対して応答することが報告された。今回の実験結果(図5~7)からはカドミウム曝露がアブシジン酸量に影響していることが示唆されている。このことから、本実験における条件ではアブシジン酸がサリチル酸を抑制していることが考えられ、これによってカドミウムによる影響が検出されにくかったものと推察される。重金属ストレスに対しては、植物体中に生じる活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)¹⁹⁻²¹⁾への対処としてサリチル酸自身が抗酸化作用を示すことが知られている²²⁾。また、ROSに対する抗酸化物質のバランスを取る役割を担っているという報告もある²³⁾。抗酸化酵素として知られるカタラーゼの活性は、サリチル酸と結合することで阻害される。これはROSの持つ抗菌性を利用した病害抵抗性の一つと考えられている²⁴⁾。今回の実験におけるストレス条件は、重金属ストレスと微生物ストレスの複合条件であり、重金属ストレスによって生成されたROSに対して、病

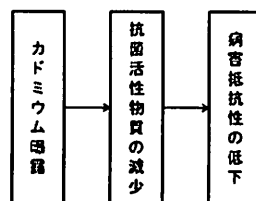


図9 カドミウム曝露が植物の病害抵抗性に及ぼす影響

害抵抗性として利用する働きと生体防御機構として抗酸化する働きの二つが拮抗していることが考えられる。このことから、植物体が曝露されたストレス条件を考慮すると、サリチル酸に現れる影響はより複雑であり、鋭敏な検出がされなかったと考えられる。アブシジン酸やジャスモン酸においてはカドミウム曝露の影響が見られ、特にジャスモン酸が鋭敏な反応を示した。このことから、アブラナ科黒すす病菌を接種すると、カドミウム非曝露群に比べてカドミウム曝露群で抗菌活性物質量が抑制されることが分かった。特に本実験では、カドミウムの曝露とアブラナ科植物黒すす病菌の接種を同時に進行し、微生物ストレスを与える前から長期的にカドミウムを曝露している。このことから、植物体が重金属ストレスに対する応答を優先し、そのために全身獲得抵抗性の発現を抑制していたのだと推察できる。カドミウムによる抗菌活性への影響は表6における結果からも示されている。

ところで、本論文の図2および3に示したように、土壤中カドミウム濃度と土壤中可給態カドミウム濃度、土壤中可給態カドミウム濃度と植物体中カドミウム濃度との間には線形の関係がみられる。すなわち土壤中のカドミウムのうちの一定量は可給態として存在し、植物体内へ移行すると考えられる。よって表6に示した抗菌活性の低下傾向および図5~7における抗菌活性物質量の減少は、土壤中カドミウムのうちの可給態がシロイヌナズナ体内に移行した影響によるものと考えられる。

前述の山本ら¹³⁾が求めたCd曝露濃度と黒すす病による壊死面積の関係と、本研究で求めた植物中アブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸濃度の結果を用いて、病徴の発現と抗菌活性物質の蓄積量との関係を図8に示した。図の横軸は、アブラナ科植物黒すす病菌の接種を行ったシロイヌナズナの葉をトリパンブルー染色し、染色された壊死細胞の面積が葉全体の面積に占める割合を算出した値である。この結果から、抗菌活性物質量が小さくなるにつれ、病徴である壊死部分の面積が大きくなっているのがわかる。特にジャスモン酸に強い傾向が見られ、サリチル酸では明らかな相関は見られなかった。逆に、抗菌活性物質獲得抵抗性が誘導されていることが示唆された。このことから、本研究で対象とした3種の抗菌活性物質の蓄積と全身獲得抵抗性の発現には強い関与があることが示された。

ジャスモン酸は病虫害ストレスに対するシグナル物質として誘導されることが知られているが、その機構については不明な点も多い。また、重金属ストレスへの応答としてのジャスモン酸の役割について言及している報告はあまりないが、今回の実験によって得られた結果から、ジャスモン酸の生合成過程に重金属ストレスが何らかの影響を及ぼすことが明らかになった。また図6の結果より、ジャスモン酸は低濃度のカドミウム曝露に鋭敏に反応することが確認された。本研究で設定したカドミウムの曝露濃度は、既往の研究と比較すると低濃度であり、しかも実際に汚染として起こりうるレベルである²⁵⁾。この点を踏まえると、低濃度域で鋭敏に影響を検出できるジャスモン酸は、実際の生態毒性を評価する際に有利であると考えられる。また前述の通り、環境ストレスが優位な条件下でさらに生物ストレスに曝された場合、単独のストレス曝露に比べ、抗菌活性物質合成が抑制されやすい(図9)。つまり、抗菌活性物質量を測定することで、複合的な環境ストレスの影響を予見的に評価できるとも言える。今後、青枯病や立枯病、葉腐病のような枯死を引き起こす毒性の強い菌を利用して抗菌活性物質の定量分析を行い、枯死と抗菌活性物質の関係を把握することで、環境ストレスによる枯死リスクを推定する指標として大いに利用可能であると考えられる。

4. 結論

本研究で得られた結論を以下にまとめる。

1. カドミウムをシロイヌナズナに曝露し、その1

個体あたり総クロロフィル量を測定した結果、生長量の測定では変化の現れなかった低濃度曝露に鋭敏な応答が確認された。このことから生態毒性評価指標としての有用性が示された。

2. カドミウムをシロイヌナズナに曝露し、抗菌活性試験を行った結果、抗菌活性が抑制されていること確認した。
3. カドミウムを曝露したシロイヌナズナ中の抗菌活性物質の分析を行ったところ、カドミウムを曝露していないものと比較して、特に*A. brassicicola*を接種した植物体におけるジャスモン酸量が顕著に減少した。低濃度域でのカドミウム曝露に対しても鋭敏な応答を示し、さらに、クロロフィル量とは異なり、カドミウム曝露濃度に依存した減少傾向も示した。カドミウムの曝露によりジャスモン酸が低下することは病原菌への感染リスクが高まることを意味しており、ジャスモン酸を指標とした生態毒性評価が重金属において有効であると考えられる。

参考文献

- 1) 古市徹(2006)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
- 2) R. J. Porra(2002)The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b , Photosynthesis Research 73: 149-156
- 3) Lincoln Taiz, Eduardo Zetger(2002)PLANT PHYSIOLOGY Third Edition, 培風館
- 4) 永井孝志、恒見清孝、川本朱美(2007)河川水中における重金属のスペシエーション: Diffusive Gradient in Thin-films法による分析と化学平衡モデルによる推定、陸水学雑誌 68: 391-401
- 5) H. Zhang, F. Zhao, B. Sun, W. Davison, S. P. McGrath(2001)A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants , Environ. Sci. Technol. 35: 2602-2607
- 6) GNU General Public License: <http://www.gnu.org/licenses/gpl.html> (Last accessed 2011/5/24)
- 7) 加賀井匡、山本研一朗、中山亜紀、米田稔(2010)重金属汚染による植物影響指標としての酸化的DNA損傷に関する検討、環境工学研究論文集 47:149-158

- 8) Gregory A. Carter, Alan K. Knapp(2001)Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration, American Journal of Botany 88(4): 677-684
- 9) 松崎布菜、張経華、高尾雄二、下町多佳志、山崎奈直 (2003)好塩性植物ビートの塩ストレスに対する細胞内成分の変化、分析化学 52(9): 833-837
- 10) D. P. Bourque, A. W. Naylor(1971)Large Effects of Small Water Deficits on Chlorophyll Accumulation and Ribonucleic Acid Synthesis in Etiolated Leaves of Jack Bean (*Canavalia ensiformis* [L.] DC.), Plant Physiol, 47: 591-594
- 11) H. I. Virgin(1965)Chlorophyll Formation and Water Deficit, Physiologia Plantarum, 18(4): 994-1000
- 12) A. Lagriffoul, B. Mocquot, M. Mench, J. Vangronsveld(1998)Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.), Plant and Soil. 200: 241-250
- 13) 山本奈々絵、山本研一朗、加賀井匡、中山亜紀、米田稔(2010)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、環境工学研究論文集 47:159-166
- 14) A. D. Shapiroa, A. T. Gutsche (2003) Capillary electrophoresis-based profiling and quantitation of total salicylic acid and related phenolics for analysis of early signaling in *Arabidopsis* disease resistance, Analytical Biochemistry 320: 223-233
- 15) G. Segarra, O. Ja'uregui, E. Casanova, I. Trillas (2006) Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress, Phytochemistry 67: 395-401
- 16) J. Fan, L. Hill, C. Crooks, P. Doerner, C. Lamb (2009) Absciscic Acid Has a Key Role in Modulating Diverse Plant-Pathogen Interactions, Plant Physiology 150: 1750-1761
- 17) Silvia Forcat, Mark H Bennett, John W Mansfield and Murray R Grant (2008)A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress, Plant Methods, 4:16
- 18)M. Yasuda, A. Ishikawac, Y. Jikumaru, M. Sekie, T. Umezawa, T. Asami, A. Maruyama-Nakashita, T. Kudo, K. Shinozaki, S. Yoshida, H. Nakashita (2008) Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Absciscic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in *Arabidopsis* The Plant Cell 20:1678-1692
- 19)E. Skorzynska-Polit, M. Drazkiewicz, Z. Krupa (2003) The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. Biologia Plantarum 47 (1): 71-78
- 20)U. Cho, N. Seo (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Science 168: 113-120
- 21)M. Drazkiewicz, E. Skorzynska-Polit, Z. Krupa (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. BioMetals 17: 379-387
- 22)A. Kranteva, R. Yordanovaa, T. Jandab, G. Szalaib, L. Popovaa (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants, Journal of Plant Physiology 165: 920-931
- 23) L. P. Popova, L. T. Maslenkova, R. Y. Yordanova, A. P. Ivanova, A. P. Krantev, G. Szalai, T. Janda (2009) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings, Plant Physiology and Biochemistry 47: 224-231
- 24) 澤田寛子(2007)塩類ストレス条件下のイネにおけるサリチル酸の蓄積とストレス傷害への関与、筑波大学大学院生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻 博士(農学) 学位論文
- 25) 丸茂克美(2007)自然由来の重金属に起因する土壤汚染問題への地球化学的アプローチ、地学雑誌 116(6): 877-891

(2011.5.30 受付)

The effect of Cadmium on disease resistance in *Arabidopsis thaliana*
and the examination of its utility as a ecotoxicological assessment

Kenichiro YAMAMOTO¹, Nanae YAMAMOTO¹, Aki NAKAYAMA¹
and Minoru YONEDA¹

¹Urban Environmental Engineering, Kyoto University

This study is to examine the efficacy of biomarkers for assessing effect brought by heavy metal stress on the basis of the thing that the elicitation of Systemic Acquired Resistance (SAR) because it is known that SAR of plants is restrained due to expose to environmental stress. The author found that antibacterial activity was inhibited by 1 μ M to 10 μ M cadmium exposure whereas the weight of plant, the rate of germination were not affected at the same concentration. Phytohormones related to SAR were also examined. Absciscic acid (ABA), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) are quantified with LC/MS and they decrease cadmium-dose dependently. Especially, the jasmonic acid was very sensitive to cadmium exposure. The author also found the decrease of jasmonic acid and abscisic acid correlated with the area rate of necrosis formed on leaves by a plant pathogen, *Alternaria brassicola*. These results showed that Cd is capable of doing damage to the pathogen resistibility and phytohormones related to SAR could be useful biomarkers of ecotoxicology.