

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658187

研究課題名(和文) 灌漑水由来の栽培リスク早期検知手法の検討

研究課題名(英文) Early detection procedure of cultivation risk for irrigation water

研究代表者

颯田 尚哉 (SATTA, Naoya)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20196207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：灌漑水中には様々な物質が含まれ、植物栽培へのリスクを評価することは非常に難しい。本研究では、ほ乳類の酸化損傷の指標のひとつである8-ヒドロキシルデオキシグアノシン(8-OHdG)を、イネの指標として利用するため、臭素酸濃度と8-OHdGの関係について水耕栽培で検討した。臭素酸によるイネの成長阻害作用は、地上部にも地下部にも観察され、濃度の上昇に連れて大きくなった。HPLCによる8-OHdGとdGの同時分析法を可能にしたが、未知のピークが55分にあり分析間隔は60分とした。イネの根の8-OHdGのレベルと臭素酸の濃度に明確な相関関係はみられないが、収穫日に補正した数値は濃度につれて上昇した。

研究成果の概要(英文)：Irrigation water contains various harmful materials, so it is very difficult to estimate its risk for plant cultivation. The level of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine(8-OHdG) in DNA is one of biomarker for oxidative damage for mammalian. In this study, the availability as an indicator for rice plant was investigated by examining the relation between 8-OHdG level and bromate exposure using water culture. Growth inhibition of rice induced by bromate was observed in both shoot and root, getting stronger with its concentration. Simultaneously analysis method of HPLC for both 8-OHdG and dG(2-deoxyguanosine) was established detecting by ECD and UV absorption, respectively. Root sample injection interval was decided to 60 minutes, because unknown peak was detected in 55 minutes in ECD. It was not clearly found that 8-OHdG level in rice root was correlated with bromate concentration of irrigation water. Its value altered at harvest day increased with bromate concentration.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業土木学・農村計画学

キーワード：イネ 臭素酸 成長阻害 灌漑水 栽培リスク 遺伝子酸化損傷

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の構成成分であるデオキシグアノシン (dG) は体内で発生するラジカル類や化学物質によって酸化され8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)に変化する損傷を受ける。ほ乳動物では酸素による代謝が活発であることから、遺伝子の酸化損傷が生じやすく老化の指標として利用されている。植物については、尿のような代謝排泄機構と排泄物がないこと、細胞壁があり動物細胞より破壊しにくいことから、8-OH-dGの遺伝子の酸化損傷指標としての利用が遅れていた。一方、灌漑水については多様な物質が溶解しており、植物体内での動態は物質ごとに複雑でありそのリスク評価は困難である。

2. 研究の目的

本研究では、灌漑水中に含まれる物質が遺伝子を損傷させる程度を8-OH-dGとdGの比として評価し、リスク検知のための指標としての利用可能性を検討する。分析は、dG(紫外線検出器)と8-OH-dG(電気化学検出器)を液体クロマトグラフ(HPLC)で同時測定するシステムの確立を試みる。

遺伝子に酸化損傷を引き起こすモデル有害物質には、臭素酸を用い灌漑水中の濃度を变化させて植物の栽培実験を行い、栽培実験方法を確立する。また、イネ細胞遺伝子中の8-OH-dGを遺伝子の酸化損傷指標とすることで、灌漑水の異常を評価する可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1)分析システムの構築

高速液体クロマトグラフ(HPLC)によるdG、8-OH-dGの同時測定システムを構築する。dGの測定には、紫外吸光検出器が必要であり、また8-OH-dGを高感度に検出するECD(電気化学検出器)が必要である。これら2成分を分離カラムで分離し、直列につないだ2つの検出器で同時に検出する。分析には、カラムの種類、移動相、流速などの条件検討が必要である。dGと8-OH-dGの標準品を用いて、同時測定システムを確立することをめざす。検量線を作成し定量限界を考察する。

(2)分析条件の最適化

臭素酸に曝露させた農作物の植物細胞から遺伝子を抽出し、加水分解を行った実サンプルに、(1)で構築した分析システムを適用する場合、共存物質の影響を受ける。実サンプル中の共存物質の影響を受けない8-OH-dGとdGの分析条件を決定する必要がある。サンプルの保存温度、分析時間が分析値に及ぼす影響を検討する。実サンプルにはコマツナ地上部とイネの地下部を用いた。

(3)植物栽培実験手法の構築

臭素酸に曝露させた農作物遺伝子中の8-OH-dGとdGを(1)で構築した分析システムで測定するためには、植物細胞から遺伝子を抽出するためのサンプルを栽培する必要が

ある。灌漑水を大量に使用し、また主食でもあるイネを対象に発芽条件、栽培条件を検討し、繰り返し実施が可能で再現性のある栽培実験方法を構築する。

4. 研究成果

(1)分析システムの構築

高速液体クロマトグラフ(HPLC)によるdG、8-OH-dGの同時測定システムを構築する。標準品により分析条件を検討した結果、分離カラム(CAPCELL PAC C18 4.6、25cm)、移動相(10mM 燐酸2水素1ナトリウム、8%メタノール)、流速0.7mL/h、UV検出器(dG検出、測定波長290nm)、ECD検出器(8-OH-dG検出、作用電極はグラファイト、印加電圧は500mV)、オープン温度40の条件において、dG、8-OH-dGを同時に25分以内で検出可能であった。

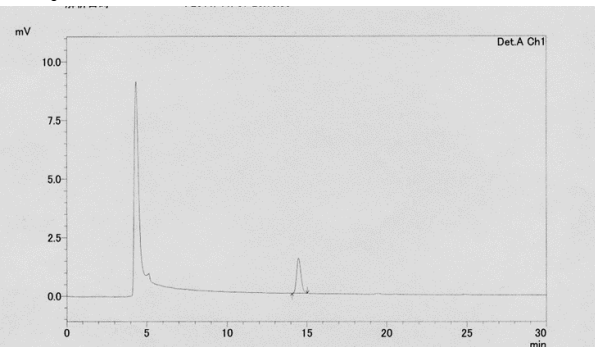


図1 dG濃度500mg/Lのクロマトグラム

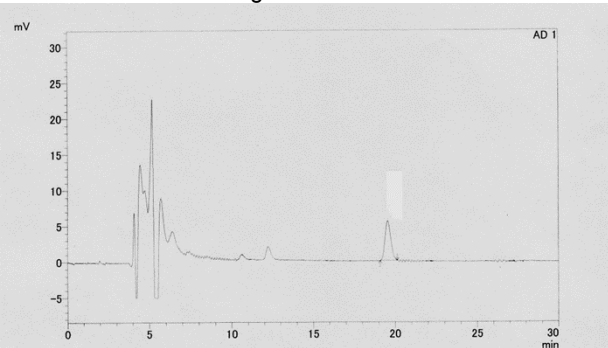


図2 8-OH-dG濃度10µg/Lのクロマトグラム

図1にdG濃度500mg/Lのクロマトグラムを示す。14分の位置にピークとして検出されていることがわかる。図2に8-OH-dG濃度10µg/Lのクロマトグラムを示す。19分の位置にピークとして検出されていることがわかる。この分析システムにより、同一サンプル中の2成分を同時に分離分析することが可能である。

サンプル注入量20µLの場合、dGは50mg/L、8-OH-dGは1µg/Lの濃度を問題なく検出することができた。変動係数はそれぞれ、3.6%と6.1%であり、実用上問題のない再現性を示した。dGは500mg/L、8-OH-dGは10µg/Lまで直線性を確認し、決定係数は1.00であった。検出下限について、40µL注入の場合dG 3.4mg/L、8-OH-dG 0.11µg/Lであった。

(2) 分析条件の最適化

臭素酸に曝露させた農作物の植物細胞から遺伝子を抽出し、遺伝子を加水分解した実サンプルに、(1)で構築した分析システムを適用した。植物由来の実サンプルでは、目的とする dG と 8-OH-dG 以外の物質も含有し、多数のピークを検出するため、共存する物質の影響を排除できる条件設定が必要である。コマツナの地上部の遺伝子加水分解サンプルでは、ECD クロマトグラム上の 150 分の位置に未知のピークが観測されたため、この未知ピークがシステムから排出されないと次のサンプルを分析できない。図3にイネの地下部について実サンプルの ECD クロマトグラムを示す。

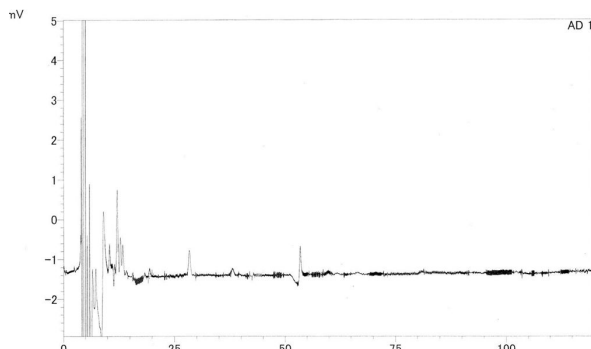


図3 イネの根の ECD クロマトグラム

8-OH-dG の小さなピークが19分に見られるが、その後28分と55分に未知の大きなピークが観察される。実サンプル中の共存物質の影響を受けないように 8-OH-dG と dG を検出するためには、分析時間は 60 分が妥当であることがわかった。

(3) 植物栽培実験手法の構築

植物細胞から遺伝子を抽出するためのサンプルを得る必要がある。そのためには、臭素酸に曝露させた農作物を栽培する必要がある。灌漑水を大量に使用し、また主食でもあるイネを対象に発芽条件、栽培条件を検討し、繰り返し実施が可能で再現性のある栽培方法を検討する。

土壌栽培

市販の栽培土壌を用いて濃度1条件につき3反復で実験を行った。条件は以下の通りである。

対象植物：イネ(品種：ヒノヒカリ)
 栽培容器：メスシリンダ(プラスチック製 100 mL 用)
 栽培土壌：パール培土 81.5g
 栽培期間：5.27~11.11(168日間)
 栽培場所：建屋内 1F 窓際
 室内温度：平均温度 29.0 (17.8~37.0)
 臭素酸濃度：臭素酸ナトリウムにより5条件を設定。コントロール(無し), 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg-Br/L
 移植：精製水で発芽後7日間育苗
 灌漑：移植後13日目まで精製水、その後収穫6日前まで各臭素酸濃度溶液を一定水位(3または6cm)になるよう供給

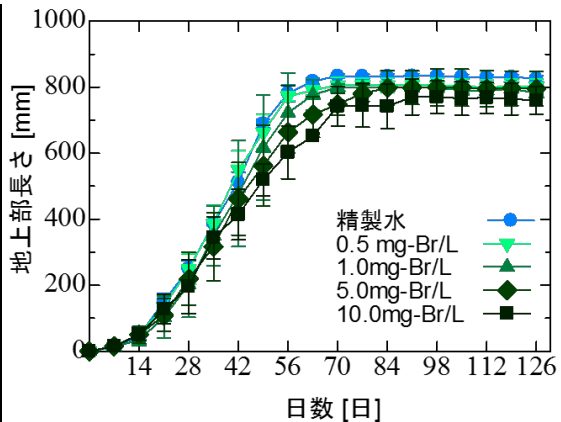


図4 土耕によるイネの地上部長さの変化

図4にイネの地上部長さの経時変化を示す。図より、イネの地上部長さは臭素酸濃度の上昇に連れてコントロールよりも小さくなることがわかったが、90日以降の差は小さく明確でなかった。成長差は56日目において最大であった。5.0, 10.0 mg-Br/L の濃度では1個体しか実験終了まで生育できなかった。これらより、臭素酸はイネに対して 5.0 mg-Br/L 以上の濃度で成長阻害作用を及ぼすと考えられた。

寒天培地栽培

により土耕栽培では、時間をかなり要するため、年に1度しか実験できないこと、地下部の収穫作業が煩雑であり、また根の成長も大きく、太くなりすぎるため細胞の破碎に支障となり、(1)の遺伝子酸化損傷の評価に適さないことがわかった。そこで寒天培地を用いた栽培実験を行った。

条件は以下の通りであり、市販の寒天試薬を用いて濃度1条件につき3反復で実験を行った。

対象植物：イネ(品種：ヒノヒカリ)
 栽培容器：培養試験管
 栽培期間：6.17~7.15(28日間)
 栽培場所：建屋内 2F 窓際
 室内温度：平均温度 31.2 (23.5~39.2)

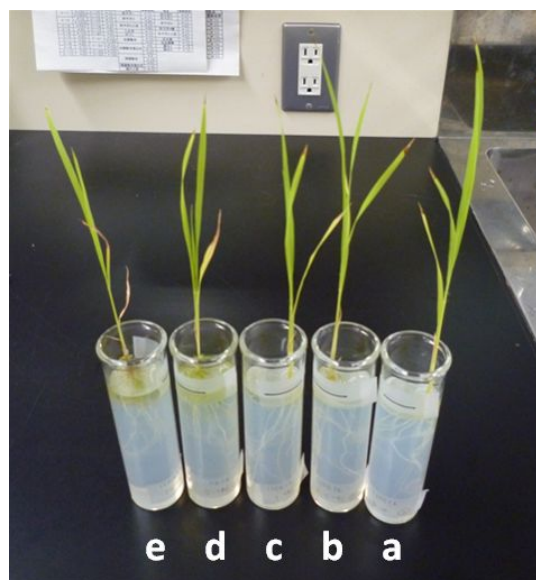


図5 寒天培地によるイネの生育状況

臭素酸濃度：臭素酸ナトリウムにより5条件を設定。コントロール(無し), 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg-Br/L、液肥としてハイポネクス0.15g/Lになるよう各液に添加した。

移植：精製水で発芽後7日間育苗

培地：寒天0.4g/50mL

灌漑：移植当初1mLとし給水後に1mL加えたが、気温の高い時期は湛水深1cmで管理

図5にイネの生育状況を示す。Aはコントロール、b:0.5 mg-Br/L、c:1.0 mg-Br/L、d:5.0 mg-Br/L、e:10.0 mg-Br/Lである。図より、目視により臭素酸濃度の上昇に連れてコントロールよりも成長が抑制されることがわかる。

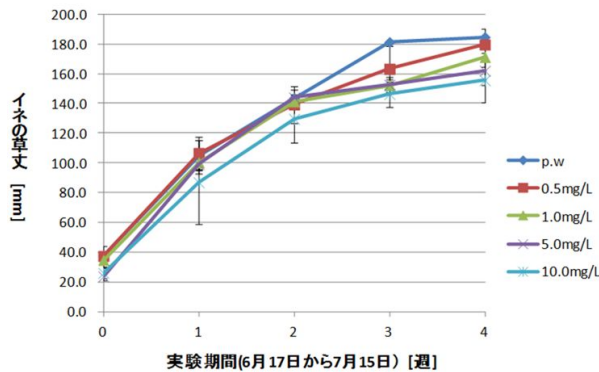


図6 寒天培地のイネの地上部長さの変化

図6に寒天培地におけるイネの地上部の生育長さを示す。図より、3週目以降コントロール(p.w.)が最大の長さでよく成長していること、10.0 mg-Br/Lでは常に成長が悪いことがわかる。臭素酸濃度の上昇に連れてコントロールよりも地上部の成長が抑制された。

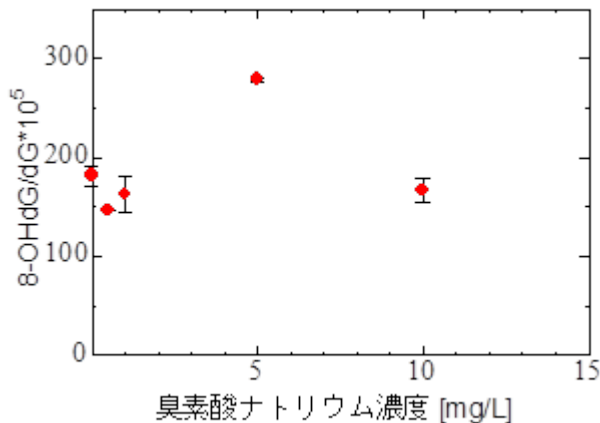


図7 寒天培地における遺伝子酸化損傷の程度と臭素酸濃度の関係

図7に遺伝子酸化損傷の結果を示す。縦軸は、寒天培地におけるイネの地下部遺伝子中の8-OH-dGを、dGに対して10⁵個当たりの値として評価した数値である。図より、本研究で構築し最適化した分析方法により、遺伝子の酸化損傷指標が評価できることがわかった。しかしながら、モデル有害物質である臭素酸濃度の増加と8-OH-dGの増加との関連は明確でなかった。

水耕栽培

寒天培地実験により30日程度で成長阻害作用を示す成長状況が得られること、また繰り返し栽培実験が可能であること、臭素酸に直接曝露される地下部の収穫作業が容易になるように栽培手法を改良できた。しかしながら、寒天培地では寒天上の極薄い水面にしか灌漑水を配置できないこと、水面を維持する管理では曝露濃度は同じでも曝露量が変化してしまうことがわかった。そこで地下部全体を灌漑水で曝露して水耕栽培実験を行った。また水耕液を定期的に交換することで曝露させる濃度と量を管理した。

条件は以下の通りであり、灌漑水の濃度1条件につき3反復で実験を行い、これを3回繰り返した。

対象植物：イネ(品種：ヒノヒカリ1回、アキタコマチ2回)

栽培容器：培養試験管

栽培期間：8.16~9.8(24日間)、9.6~9.29(24日間)、9.13~10.6(24日間)

栽培場所：建屋内2F窓際

室内温度：平均22.9、19.4、18.3

臭素酸濃度：臭素酸ナトリウムにより5条件を設定。コントロール(無し), 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg-Br/L、液肥としてハイポネクス0.12g/Lになるよう各液に添加

移植：精製水で発芽後、フロート上に移植した。7日間精製水で育苗した。

灌漑：11日目に水耕液に入れ替え、15日目、20日目にも全て入れ替える。

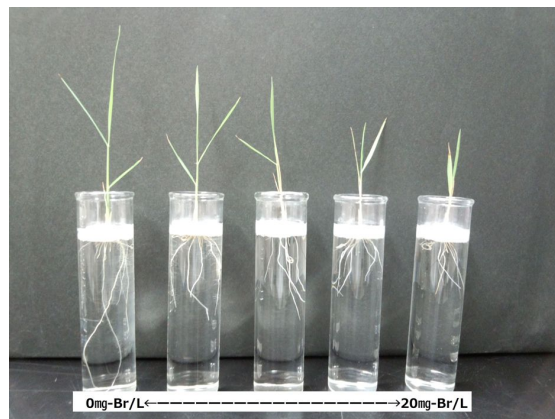


図8 水耕培地によるイネの生育状況

図8にイネの収穫直前の生育状況を示す。左から右に臭素酸濃度は増加している。臭素酸濃度の上昇に連れてコントロールよりも地上部も地下部も成長の長さが抑制されることが、目視により明瞭に観察された。寒天

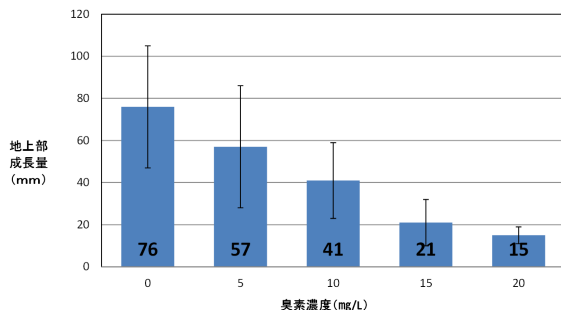


図9 水耕栽培のイネの地上部長さの変化

培地(図5)では地下部全体が臭素酸に曝露されないため、地下部の抑制作用は目視で明確でなかった。

図9に水耕栽培における収穫時のイネの地上部の生育長さを示す。図より、コントロールに比べてすべての臭素酸濃度条件で成長が悪く、また臭素酸濃度の上昇に連れて地上部の成長抑制作用は強まることがわかる。

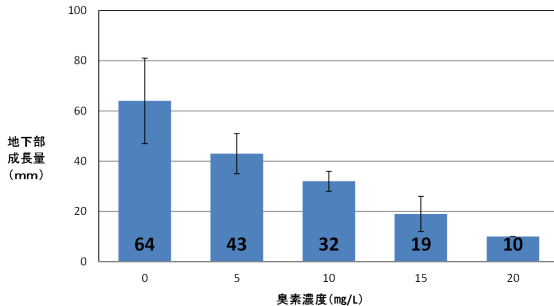


図10 水耕栽培のイネの地下部長さの変化

図10に水耕栽培における収穫時のイネの地下部の生育長さを示す。図より、コントロールに比べてすべての臭素酸濃度条件で成長が悪く、また臭素酸濃度の上昇に連れて地下部の成長抑制作用は強まることがわかる。

臭素酸によるイネの成長阻害作用は本研究により初めて明らかにされた成果であり、また本研究により再現性の高い栽培実験方法が国内外で初めて確立された。

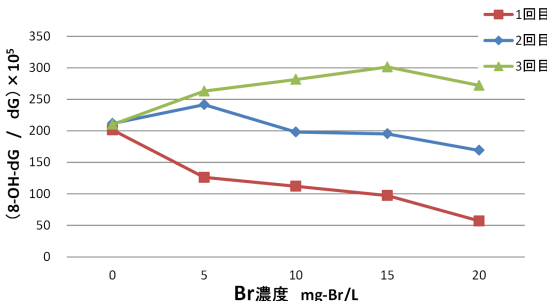


図11 水耕栽培における遺伝子酸化損傷の程度と臭素酸濃度の関係

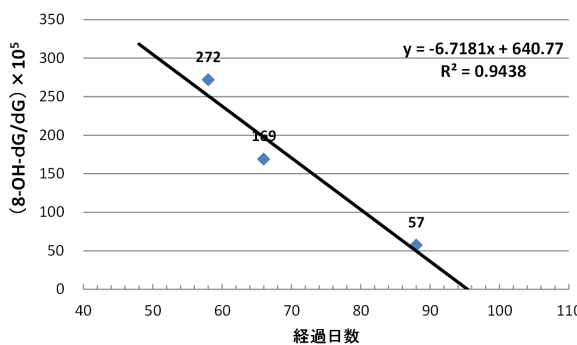


図12 水耕栽培における遺伝子酸化損傷の程度と冷凍保存期間の関係 (20mg-Br/L)

図11に水耕栽培における遺伝子酸化損傷の結果を示す。地下部の分析は1条件3つの試料を混合して1試料にとりまとめ、遺伝子の抽出と加水分解を行った。図より、水耕栽培によりコントロールの遺伝子酸化損傷の指標値は、ほぼ同等の値を示すことがわかる。しかしながら、モデル有害物質である臭素酸濃度の増加と8-OH-dGの増加との関連は明確

でなく、傾向は実験ごとに異なった。

図11に示した地下部サンプルの遺伝子酸化損傷の評価は、ほぼ同時に行ったため各実験の試料は冷凍保存期間(-60)が異なる。そこで酸化損傷指標と分析までの保存期間の関係を検討した。図12に臭素酸濃度が20mg-Br/Lのときの保存期間の影響を示す。経過日数と酸化損傷指標は非常に良い負の相関を示した。負の相関を示すことは、コントロールも含め他の臭素酸濃度の場合でも同じであった。しかしながら、回帰直線の傾きはコントロールが一番小さくなった。また、回帰直線のY切片は、収穫日の酸化損傷指標値の推定値を示すことがわかる。

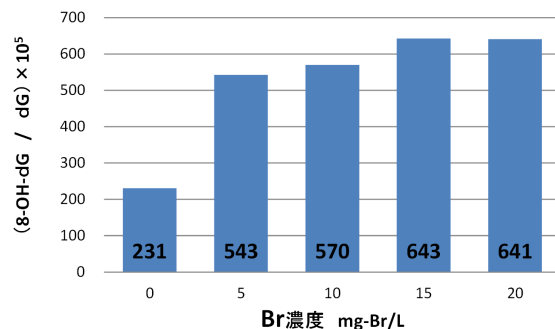


図13 灌漑水中の臭素酸濃度に対する収穫日におけるイネの酸化損傷指標の推定値

図13に収穫日におけるイネの地下部の酸化損傷指標の推定値と灌漑水中の臭素酸濃度の関係を示す。図より、臭素酸濃度の上昇に連れて、酸化損傷指標の推定値は増加することがわかる。現状では収穫後のサンプル保存期間が評価結果に及ぼす原因は不明であるが、収穫後早期に酸化損傷指標を分析・評価すれば、この指標により灌漑水の水質が遺伝子に及ぼす悪影響を検出できる可能性があることがわかった。図11に示すように収穫から分析・評価までの時間が最も短い3回目では臭素酸添加区は、コントロールよりも指標値は大きくなっている。遺伝子の酸化損傷指標によって灌漑水の水質異常を評価するためには、今後も詳細な検討が必要である。

(4) 土壌と臭素酸の反応特性

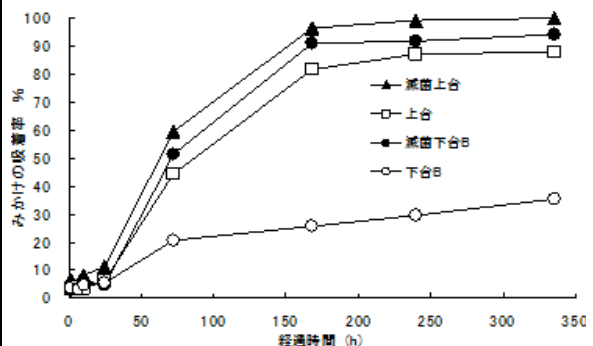


図14 大学構内土壌への臭素酸のみかけの吸着率

イネをはじめとする農作物のほとんどは露地栽培され、灌漑水と土壌が混合された状態で曝露される。にもかかわらず、臭素酸の土壌への反応特性はほとんど未解明なため、

バッチ吸着実験も行った。

図 14 に大学構内の下台土壌（農耕土）と上台土壌（雑草地）に対するみかけの吸着率を示す。1 日程度の接触時間ではあまり土壌に吸着しないが、その後みかけの吸着率は急上昇した。これは土壌表面への吸着の増加に加え、臭素酸から臭化物への形態変化も生じているためである。またオートクレーブ(滅菌)処理するとみかけの吸着率は上昇する。これは臭素酸の臭化物への還元率が増加したためである。水田土壌への吸着特性は未だに未解明であり、今後の検討を要する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

颯田尚哉、立石貴浩、草刈裕佳、宮野幸子、小林幹佳、臭素酸の土壌への吸着特性に関する基礎的検討、第 19 回地下水・土壌汚染とその防止策に関する研究集会講演集、査読無し、Vol.19、pp.186-190、2013 <http://www.gepcstore.com/>
米澤彩子、颯田尚哉、高木浩一、臭素酸イオンがイネの生育に与える影響、環境工学研究フォーラム講演集、査読無し、vol.48 pp.238-240、2011
<https://www.jsce.or.jp/library/open/proc/maglist2/00517/index.htm>

[学会発表](計 8 件)

颯田尚哉 立石貴浩 他、灌漑水の臭素酸がイネの成長に及ぼす影響、平成 26 年度農業農村工学会大会講演会、2014 年 8 月 28 日、朱鷺メッセ(新潟県)
颯田尚哉 立石貴浩 他、促進酸化処理による臭素酸の排出実態と生成特性に関する基礎的検討、第 20 回地下水・土壌汚染とその防止策に関する研究集会、2014 年 6 月 20 日、和歌山県民文化会館(和歌山県)
颯田尚哉 立石貴浩 他、イネの酸化的 DNA 損傷を指標とした灌漑水の水質異常評価の試み、平成 24 年度農業農村工学会大会講演会、2012 年 8 月 19 日、北海道大学(北海道)
立石貴浩、颯田尚哉 他、大規模不法投棄現場の廃棄物に起因する汚染物質が土壌微生物群集に及ぼす影響、日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会、2011 年 8 月 9 日、筑波大学(茨城県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

颯田 尚哉 (SATTA, Naoya)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：20196207

(2)研究分担者

立石 貴浩 (TATEISHI, Takahiro)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：00359499