

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18710051

研究課題名 (和文) 土壌生態系の機能に対する放射線の影響

研究課題名 (英文) Effects of ionizing radiation on soil ecosystem functioning

研究代表者

石井 伸昌 (ISHII NOBUYOSHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：50392212

研究成果の概要：土壌には多種多様な微生物が生息しており、生態系における栄養塩や金属元素等の物質循環に重要な役割を果たしている。それ故、農耕地において作物が収穫できるのは、これら微生物の働きによるところが大きい。本研究では、水田土壌に生息する細菌群集に着目し、放射線に暴露された時の反応、そして土壌から溶出したイオンや元素量の変化について検討した。1 Gy/day の線量率で5日間ガンマ線に連続暴露された水田土壌では、微生物群集の種組成が変化すること、そして溶存鉄濃度が低くなる一方で、硫酸イオン濃度が高くなることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,700,000	0	2,700,000
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	120,000	3,720,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線、影響、生態系、機能、微生物、群集

1. 研究開始当初の背景

国際放射線防護委員会 (ICRP) の 1990 年勧告には、「ヒトが防護されていれば他の生物種も防護されるものと信ずる」との記載がある。この勧告以降、環境放射線防護に関する様々な議論がなされてきた。そして、ICRP2003 年第 91 報告書において、従来の考え方を変更しなければならないような証拠は存在しないとしつつ、「環境が十分に保護されていることを、十分な証拠に基づいて、

透明性の高い実証的プロセスによって明らかに示すことが不可欠」との主旨の文章が記載されるに至った。この記述は、別の見方をすれば、放射線による環境影響あるいは生態系影響に関する科学的知見がまだまだ少ないことを示唆している。

これまでもヒト以外の環境生物を対象とした放射線影響研究が数多く行われてきた。しかしながら、その多くは生物個体に対する放射線の生体影響研究、あるいは放射線抵抗性メカニズムを明らかにすることを目

的とした研究であり、生態系に対する影響評価を目的とした研究ではなかった。さらに、過去の研究の多くは分子レベルから個体レベルあるいは個体群レベルまでを対象とした研究であった。生態系に対する影響評価を行うためには、群集レベルの影響評価も必要である。

個体群レベルまでの影響評価は、群集影響評価における貴重な情報を提供してくれる。しかしながら、これらの研究からだけでは群集に対する影響を十分に理解することは難しい。例えば、水圏微生物生態系を模擬した微生物群集システムを用い、放射線影響における間接効果の重要性について述べた報告があるが、この研究の成果は決して単独生物個体群の研究からだけでは得られない結果であり、群集レベルでの研究の重要性と必要性を示唆している。このように、群集への影響はやはり群集を用いて評価すべきであるとの考えから、本研究の研究計画を立案した。

2. 研究の目的

土壌中には非常に多くの微生物が生息しており、生態系機能の一部を担っている。例えば、メタン生成、硫酸還元、および脱窒などを通じて炭素、硫黄、窒素循環に対し、微生物は重要な役割を担っている。さらに、栄養塩濃度や元素の化学形態変化にも関与している。化学形態は、物質の環境動態や植物の可給性に関わる重要な因子である。そのため、農耕地における作物生産は、これらの微生物の働きによって支えられていると言っても過言ではない。

我々の食物生産の場である土壌は、大気圏内核実験によるフォールアウトや原子力施設における偶発的な事故により、放射性物質や放射線にさらされてきた。今後も人為的な放射線に土壌が暴露される可能性を完全に否定することはできない。しかしながら、これらの土壌微生物生態系に対する放射線の影響評価は、十分に行われていないのが現状である。

環境生物に対する放射線の影響評価研究では、従来、生物個体に対する分子レベルおよび個体レベルの影響研究が中心であった。このような研究は、放射線に対する環境生物の影響メカニズムを理解する上で非常に重要である。一方、生態系は様々な生物間相互作用や生物-非生物間相互作用により成り立っている。そのため生物個体中心の影響研究だけでは、放射線に対する生態系への影響を十分に説明することは難しい。

そこで、本研究では、水田土壌に生息する細菌群集に着目し、放射線に暴露された時のこれら細菌群集の反応、そして土壌から溶出イオンや元素量の変化を明らかにすること

を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 照射実験：山梨県北巨摩郡（現、北杜市）の水田より採取した灰色低地度を風乾し、2 mm メッシュのふるいを通した土壌（4g）を井戸水（8 mL）で湛水した。この湛水土壌を1 Gy/dayの線量率のガンマ線（Cs-137線源）で5日間連続照射した。照射は暗条件で行い、照射期間中、温度は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ に調整した。対照となるコントロールサンプルは、照射サンプルの横に鉛ブロックでガンマ線を遮蔽した領域を作成し、その中に設置した。コントロールにおける線量率は 0.8×10^{-3} Gy/day以下であった。

(2) 微生物群集構造の解析：供試土壌に存在する細菌群集の解析は、16S rDNA-クローンライブラリー法で行った。市販のDNA抽出キット、ISOIL for Beads Beating (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo)を用い、約0.5 gの供試土壌からDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型とし、細菌の16S rDNAのほぼ全長をEu10FおよびEu/Ar1500Rのプライマーを用いてPCR増幅した。得られたPCR産物はTOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen Japan K.K., Tokyo)を用いてクローニングした。16S rDNA挿入配列を決定するために、クローンライブラリーより100試料をランダムに採取した。16S rDNAの上流約500 bpの配列を決定するために518Rプライマーを用いてシークエンスを行った。シークエンスは株式会社グライナージャパンに依頼した。

ガンマ線を照射した水田土壌に生息する微生物群集の変化は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法で解析した。ガンマ線照射後、16S rDNA-クローンライブラリー法と同様の方法で土壌からDNAを抽出し、これを鋳型として16S rDNAの一部(約550 bp)をPCR増幅した。増幅した領域に高変異領域のV3からV5を含むよう、プライマーは341fと907rを使用した。ただし、341fの上流末端側には40 bpのGCクランプを付加した。PCR産物は変性剤(尿素とホルムアミド)を含むゲルを用い、 $1 \times \text{TAE}$ 緩衝液、 60°C 、70Vの条件下で20時間電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルはSYBR Gold核酸ゲル染色液で約20分間染色し、続いてMolecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo)でDGGEプロファイル画像を撮影した。

コントロールと照射サンプル間で変化のあったバンドに関しては、ゲルからバンドを切り出しGC-クランプを付加した341fと907rプライマーを用いてPCR増幅した。PCR産物を再度DGGE法による電気泳動を行い、目的のバンドが切り出されたことを確認し

た。続いて、この PCR 産物を 16S rDNA クローンライブラリー法と同様の手順で、TA クローニングし、プラスミドに挿入した DNA の配列を決定した。配列の決定は上流および下流の両側から行い、得られた配列を目視で精査した。最終的に決定した配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により、相同検索を行い、帰属分類の推定を行った。

(3) 元素およびイオンの分析：土壌から田面水に溶出した元素およびイオンの分析を行った。照射後、分析のために湛水水田土壌から田面水を回収し、0.2 μm 孔径のポリカーボネイト性メンブランフィルターで濾過し、これを分析に供した。

元素分析は、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES)、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) および、粒子線励起 X 線分光法 (PIXE) で多元素同時定量を行った。PIXE 分析では、微生物の実験と同様、ガンマ線照射 5 日目のサンプルを分析試料として用いた。一方、ICP-AES および ICP-MS による分析は、線照射 10 日目、20 日目、および 30 日目の試料について分析した。これらの分析に供した試料に関しては、試料容器への元素の吸着を防ぐために、試料 1 mL に対して 10 μL の硝酸を添加した。ところで、通常の PIXE 分析では試料を真空槽に入れて行うため、液体試料を分析する場合、前処理が必要となる。そして、この前処理の過程において試料中の元素が揮散する可能性が指摘されている。そこで、本研究では、放医研で開発された droplet-PIXE system を利用した。このシステムは液体試料を液体の状態で行える利点を有する。従って、本研究において PIXE 分析のための試料は、硝酸を添加した以外、特に前処理を行わなかった。

田面水中の Fe(II) イオンは、1, 10-フェナントロリン法による比色分析で定量した。その他の陽イオン (Li, Na, NH₄, K, Mg, Ca) および陰イオン (F, Cl, NO₂⁻, Br, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) は Dionex DX-300 Ion Chromatography system (Sunnyvale, CA, USA) で分析した。試料は、いずれもガンマ線照射 5 日目に採取し、採取後すぐに分析を行った。

4. 研究成果

(1) 細菌群集の種組成：土壌から抽出した DNA を用いて 16S rDNA-クローンライブラリーを作成し、水田土壌に生息する細菌群集の種組成を明らかにした (図 1)。使用した土壌では、Bacillales 目や Clostridiales 目を含む Firmicutes 門の細菌が優占種しており、全体の約 49% を占めていた。この門には芽胞

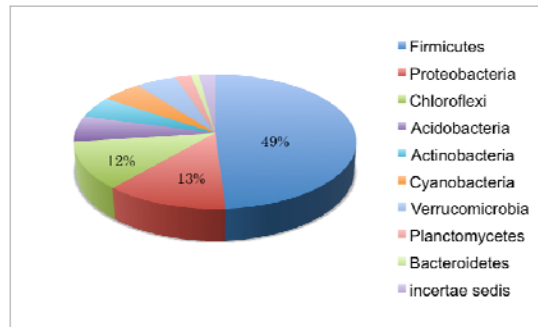


図 1 水田土壌における細菌群集の種組成。

を形成する能力を持つ細菌が多く含まれる。水田は落水により乾燥することが多く、その結果、この門に属する細菌種が優占していたと考えられる。Firmicutes に続いて、Proteobacteria および Chloroflexi に属する細菌が優占していた。いずれも 10% をわずかに超える程度であった。

(2) ガンマ線に対する細菌群集の反応：DGGE で得られたバンドパターンのクラスター解析を非加重結合法 (UPMGMA 法) で行ったところ、ガンマ線照射サンプルの DGGE パターンは明らかにコントロールのそれとは異なるクラスターを形成した。つまり、水田土壌の細菌群集構造 (種組成および各細菌種の相対量) は、約 5 Gy のガンマ線に暴露されることにより変化することが分かった。

そこで、ガンマ線暴露に反応した細菌の帰属分類を決定するために、DGGE バンドから DNA を回収し、配列を決定した。BLAST 検索の結果、*Helio bacterium* および *Clostridium* のある種に近縁な細菌は、ガンマ線の暴露により個体群が減少する傾向にあった。逆に、*Clostridium* 属や *Massilia* 属の細菌、それに Rhodospirillaceae 科のある細菌は増加することが分かった。

(3) 田面水の変化：土壌を覆う田面水に着目すると、ここではガンマ線による変化が目視で確認できた。ガンマ線照射 5 日目のマイクロコズムの写真を図 2 に示した。コントロールの田面水は、わずかに白濁した程度であったが、照射サンプルの田面水は明らかに褐色を呈した。田面水の色は溶存している物質を反映している。つまり、コントロールと照射サンプル間の田面水の色差は、土壌から溶出した物質の質と量の違いを反映していると考えられる。



図 2 ガンマ線照射後のマイクロコズム (左：コントロール、右：照射サンプル)。

(4) 溶存物質の網羅的解析：ICP-AES および ICP-MS を利用し、田面水の元素組成について網羅的に解析した。定量した元素は 43 元素であり、このうち Sc-45、Cs-133、および Gd-157 の濃度は、照射サンプルにおいて低くなった。濃度の差は有意では無かったが、Al-27、Fe、As-75、Zr-90、および Mo-95 も、ガンマ線照射により田面水中の濃度が低くなる傾向があった。

元素の一斉分析は droplet-PIXE system でも行った。この PIXE 分析の X 線蛍光スペクトラムでは、シャープな Fe のピークが確認できた。定量の結果、Fe の濃度はコントロールおよび照射サンプルにおいて、それぞれ $46.6 \pm 9.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $12.2 \pm 12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、両サンプル間で有意な差があった ($P < 0.01$)。ICP-AES 分析による Fe の定量では、コントロールと照射サンプル間で有意な差は得られなかった。これは、田面水サンプルを採取した時間が照射後 5 日目 (PIXE 分析) と 10 日目 (ICP 分析) と異なるためと考えられる。

比色分析により Fe(II) の定量を行った。Fe(II) の濃度はコントロールの田面水において $24.0 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、照射サンプルでは $4.5 \pm 4.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。PIXE 分析と同様に、これらの濃度の差は有意であった ($P < 0.01$)。ガンマ線には土壌からの Fe(II) 溶出を抑制する効果があると思われる。Fe(II) は、通常、酸化還元電位が低い土壌から溶出する。そこで、田面水の Eh を測定したところ、照射サンプルの Eh はコントロールの Eh と比較して有意に高いことが分かった。

イオンクロマトグラフィーによるイオン分析の結果、コントロールと照射サンプル間で濃度差が最も顕著であったのは硫酸イオンであった (図 3)。照射サンプルでは、硫酸イオンの増加に伴い pH の低下が予想されたが、pH は両サンプル間で差は無かった。

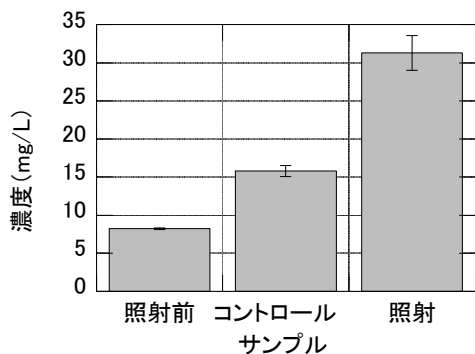


図 3 田面水中の硫酸イオン濃度。

以上の結果より、本実験の条件下において約 5 Gy のガンマ線に暴露された水田は、細菌群集構造が変化するだけでなく、田面水の鉄や硫酸の濃度も変化することが分かった。

(5) 成果の位置付け：これまでの放射線環境影響研究は、生物個体に対する放射線の線量-効果関係を明らかにする研究が中心であり、群集に対する影響を評価した研究はごく限られていた。また、元素やイオンの分析に関しても放射性元素の環境挙動研究が中心であり、生態系の恒常的な物質の流れに対する放射線影響を評価した研究例はほとんど無い。本研究は、水田に生息する細菌群集を対象にその群集構造がガンマ線暴露により変化すること、放射線の暴露に対して反応した細菌の帰属分類を決定したこと、さらには土壌からの鉄や硫酸イオンの溶出量が増加することについて明らかにした。この研究成果は、細菌間の相互作用や細菌と物質間の相互作用を含む水田土壌マイクロコズムを用いた成果である。生態系は生物間の相互作用や生物と非生物間の相互作用により恒常的な物質循環が行われているシステムである。つまり、本研究で明らかにしたことは、水田生態系 (水田が水田として成り立っているシステム全体) に対する放射線の影響評価のきっかけとなる研究と言える。従って、本研究は、生態系に対する放射線の影響評価方法の指針を示す、国内外に先駆けた研究と言える。

また、一般的に細菌は放射線に対する感受性が低いと考えられている。本研究では、自然界に生息する細菌には約 5 Gy のガンマ線に対して反応する細菌が存在することを明らかにした。この研究成果が自然界の細菌に対する放射線の影響を考え直すきっかけとなることを期待する。

(6) 今後の展望：本研究において、ガンマ線に反応する細菌の帰属分類を絞り込むことができた。しかしながら、放射線がこれらの細菌に直接作用したのか、それとも間接的に作用したのかは分からない。つまり、これらの細菌の反応が純粋培養した細菌でも起こり得るのか、それとも群集だからこその反応なのか分からない。今後、放射線に反応した細菌を単離し、純粋培養における放射線の反応について検討する必要がある。

本研究の実験条件下では、ガンマ線に暴露された水田土壌から田面水へ溶出する Fe(II) 量は減少し、硫酸イオン量は増加することが分かった。これらの溶出量には細菌群集の寄与が考えられるが、そのメカニズムについては分からない。今後、微生物群集とこれら元素やイオンの関係について詳細に検討する必要がある。

最後に、細菌群集構造の変化や化学物質の量的変化に伴うコメの収量への影響について検討する必要がある。水田はコメを生産する場であり、コメの収量を最終的な影響指標のエンドポイントとすることは、国民の安全と安心につながると考えられる。

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)

- ① Ishii, N., S. Homma-Takeda, K. Tagami, S. Fuma, H. Takeda. Application of a droplet-PIXE system to study radiation effects on ecosystem functioning, International Journal of PIXE, 17, 161-167, 2007, 査読有り
- ② Ishii, N., T. Sakashita, H. Takeda, Y. Kubota, S. Fuma, M. Doi, S. Takahashi, Impact of gamma irradiation on the transformation efficiency for extracellular plasmid DNA, Journal of Environmental Radioactivity, 97, 159-167, 2007, 査読有り

[学会発表] (計6件)

- ① Nobuyoshi ISHII, Shoichi Fuma, Taizo Nakamori, Shino Homma-Takeda, Keiko Tagami, Satoshi Yoshida, Effects of ionizing-radiation on bacterial community, The 7th Japan-France Workshop on Radiation Biology, Chiba, 2008. 10.
- ② 石井伸昌, 細菌群集に対する放射線の影響, 第2回放医研放射線防護研究センターシンポジウム, 千葉, 2007年12月.
- ③ 石井伸昌, 府馬正一, 武田洋, 土壌細菌群集に対する放射線の影響評価, 日本放射線影響学会第50回大会, 千葉, 2007年11月.
- ④ Ishii, N., T. Sakashita, H. Takeda, Y. Kubota, S. Fuma, M. Doi, S. Takahashi, Effect of gamma irradiation on the transformation efficiency for extracellular plasmid DNA, Cheju, Korea, 2007. 10.
- ⑤ 石井伸昌, 武田志乃, 田上恵子, 府馬正一, 武田洋, 湛水土壤からの鉄溶出に対する放射線の影響, 日本陸水学会第72回大会, 水戸, 2007年9月.
- ⑥ Ishii, N., S. Homma-Takeda, K. Tagami, N. Ogiu, S. Fuma, H. Takeda, Effects of ionizing radiation on soil bacterial community and their functioning, Japan-Ukraine International meeting on Radioecology: 20 years after Chernobyl. What should be next?, Chiba, 2007. 2.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 伸昌 (ISHII NOBUYOSHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射

線防護研究センター・主任研究員
研究者番号：50392212