

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 (Estimation of water quality from oxidative DNA damage in rice)

岩手大学農学部 ○颯田尚哉、立石貴浩、米澤彩子、宮野幸子

Satta Naoya, Tateishi Takahiro, Yonezawa Ayako, Miyano Sachiko

1. はじめに

水稻の栽培には、大量の灌漑水が必要である。灌漑水の水源は河川上流部に設置されることから、鉱山下流部などを除いて灌漑水の水質が問題視されることは少なかった。ところが青森・岩手県境不法投棄現場のように水源地の上流で水質汚染が生じる事案が生じている。そこでは発生する汚染水の高度浄化(促進酸化)処理により、水環境中で検出されることがない臭素酸が副生成し下流へ放出されている¹⁾。また、臭素酸はイネに対して成長阻害作用も知られている。灌漑水に含まれる可能性のある有害物質は多種多様であり、分析化学の手法によりすべての項目を評価するのは困難である。有害物質の一部は細胞内のDNAに酸化損傷を引き起こすことが知られており、DNA構成要素のひとつであるdGとそれが酸化された8-OH-dGの比は、尿や動物細胞で評価され老化の指標などに利用されているが、植物細胞では評価例や適用例²⁾が非常に少ない。本研究では、イネの根の細胞中のdGと8-OH-dGについて、HPLCを用いた同時分析法を確立するとともに、臭素酸をモデル有害物質としてイネの栽培実験を行い、成長への影響を観察するとともに、イネの根について8-OH-dGの評価を試みた。

2. 分析方法の検討

dGはDNA中の核酸塩基の一つであり、4種類の塩基中最も酸化還元電位が低いため、活性種による酸化を受けやすく、8-OH-dGを生成する。dGはHPLCによる分析が一般的であるが、8-OH-dGは、ELAZAキットによる方法やHPLCによる方法などがある。ELAZAキットによる方法は、試薬キットとウエルカウンタがあれば比較的容易に測定可能であるが、最終分析試料であるDNAの加水分解試料をdG測定と分ける必要があり、結果を得るまでにタイムラグが生じ、測定誤差の要因となる可能性がある。ここでは、HPLCによるdG(UV検出器)と8-OH-dG(ECD検出器)の同時測定システムを構築し、測定条件を把握した。

2.1 分析システムと分析条件

使用したHPLCのポンプやカラムオープン、制御装置は島津製作所製で一般的なものである。カラム、移動相、送液条件などを表1に示す。サンプルは、ガードカラム及び分離カラム(25cm)流出後にUV検出器、ECD(電気化学検出器)の順に通過するよう接続している。ECDはエイコム製で作用電極はグラファイト、印加電圧は500mVである。

2.2 標準品の分析

dG、8-OH-dGの標準品は、和光純薬製を用い、精製水に溶解した。所定濃度には使用直前に調整し、有効期間は24時間と確認した。表1の分析条件で、dGの保持時間は14.5分、8-OH-dGの保持時間は19.8分であった。表2に注入量20 μ Lの場合の標準溶液の測定結果を平均面積と相対標準偏差(RSD)で示す。繰返

表1 分析条件

Table 1 Analytical condition

分析対象	dG	8-OH-dG
カラム	CAPCELL PAC C18 ϕ 4.6	
移動相	10mM磷酸2水素1ナトリウム 8%メタノール	
流速	0.7 ml/min	
オープン温度	40℃	
検出	UV : 290nm	ECD

岩手大学 Iwate University 臭素酸 イネ DNA酸化損傷

回数は $n=3$ である。RSDは8-OH-dGの $1\mu\text{g/L}$ の場合で5%をわずかに超えるが、その他は5%以内でありよい再現性を示している。平均面積を用いた検量線の決定係数は非常に良いことがわかる。注入量 $40\mu\text{L}$ の場合、8-OH-dGの $1\mu\text{g/L}$ のRSDは5.7%と向上したため、実サンプルの定量では、注入量を $40\mu\text{L}$ とした。

表2 標準液の測定結果

Table 2 Results of standard solution

dG				8-OH-dG			
mg/L	面積	RSD(%)	決定係数	$\mu\text{g/L}$	面積	RSD(%)	決定係数
50	1410	3.6	1.00	1	4580	6.1	1.00
100	2840	2.5		5	26100	3.0	
500	14600	1.0		10	54800	3.5	

2.3 実サンプルの分析

イネなど植物を用いた現実の試料は、加賀井²⁾らの方法を用いてDNAの抽出と加水分解を行った。生体試料であるため、実試料には目的とする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。イネ地下部のDNA加水分解試料について、120分の測定を行ったところ、ECD検出器で55分に不明ピークが検出された。本研究の分析条件では実試料の測定間隔は60分とした。

3. 寒天培地で栽培したイネにおける臭素酸の影響

灌漑水中に含まれる臭素酸による曝露を想定して、寒天培地によるイネの栽培を室内で28日間行い、地下部についてdG、8-OH-dGの同時測定を行った。灌漑水はハイポネックスを 0.15g/L の濃度で加え、 NaBrO_3 をBr当たりで $0, 0.5, 1, 5, 10\text{mg/L}$ に調整した。灌漑水は当初 1mL とし給水後に 1mL 加えたが、気温の高い時期は湛水深 1cm で管理した。その結果、臭素酸濃度の増加に伴い成長が抑制されることを目視と草丈の測定より確認した。

地下部の8-OH-dGはdG 10^5 個当たりの値として評価した。図1に臭素酸の濃度と8-OH-dGを示す。2回の測定結果は非常によい再現性を示したが、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。

今後は栽培実験方法やサンプリング方法、サンプリング後の試料調整方法などを再検討する必要がある。

4. おわりに

本研究では、灌漑水の水質異常を早期に評価するために、酸化的DNA損傷指標であるdG、8-OH-dGの同時分析方法を検討し、イネの根にいて分析条件を決定した。寒天培地によるイネの栽培実験で、臭素酸による成長阻害を確認したが、臭素酸濃度と8-OH-dGの関連は明確でなく、今後もさらなる検討を要することがわかった。

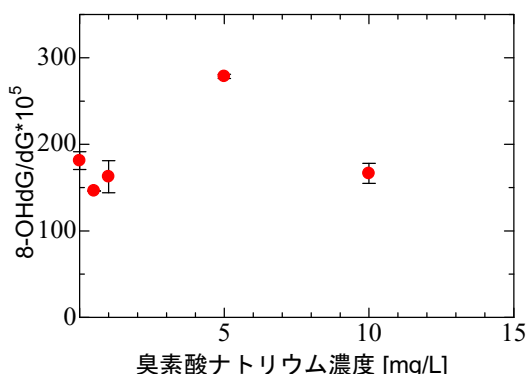


図1 イネ地下部の8-OH-dGの測定結果
(Fig.1 Result of 8-OH-dG in root of rice)

謝辞：本研究の一部は、科学研究費補助金(23658187)の助成を受けている。

参考文献

- 1) 颯田尚哉 他：大規模不法投棄現場東側における環境水中のハロゲン酸化物のモニタリング、第18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、Vol.18、(2012)
- 2) 加賀井匡 他：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、Vol.47、pp. 149-158、2010。