

放射性物質の植物への移行と影響に関する研究

(放射性物質のシロイヌナズナへの移行と影響に関する研究)

——先行基礎工学分野に関する共同研究——

2000年5月

核燃料サイクル開発機構

人形峠環境技術センター

本資料の全部または一部を複写・複製・転載する場合は、下記にお問い合わせ下さい。

〒708-0698 岡山県苫田郡上齋原村1550番地
核燃料サイクル開発機構 人形峠環境技術センター
施設管理部 管理課

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to :

Co-ordination Section, Facility Management Division,
Ningyo-Toge Environmental Engineering Center,
Japan Nuclear Cycle Development Institute,
1550 Kamisaibara-son, Tomada-gun, okayama-ken, 708-0698,
Japan

© 核燃料サイクル開発機構 (Japan Nuclear Cycle Development Institute)
2000

放射性物質の植物への移行と影響に関する研究
(放射性物質のシロイヌナズナへの移行と影響に関する研究)
－先行基礎工学分野に関する共同研究－

鶴留浩二*, 時澤孝之*, 山田哲治**, 長柄収一***

要　旨

本研究では、放射性物質及びその放射線による植物への影響調査を目的として、植物の遺伝的影響調査及び植物体中の放射線強度分布の測定手法の検討を行った。本研究では遺伝子研究のモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて室内実験を行った。尚、本研究は先行基礎工学研究分野に関する研究テーマとして、平成9年度から11年度の3年間、岡山大学農学部応用遺伝子工学研究室の山田哲治教授と共同研究で実施したものである（平成9年度は客員研究員）。

(1) *A. thaliana* の遺伝子影響は、鉛さい土壌で生育させた *A. thaliana* から DNA を抽出し、カルコン合成遺伝子及びトランスクロマトフィン遺伝子についてシーケンス解析した結果、解析範囲内での遺伝子変異は認められなかった。

(2) 放射線強度分布の測定手法の検討は、鉛さい土壌で生育させた *A. thaliana* について、X線フィルムとイメージングプレート (IP) を用いて解析した結果、2 手法ともに植物中の放射性物質濃集部位を確認できなかった。

本研究により、今後の植物影響評価の基礎となる遺伝子解析操作に関わる一連の手法を習得することができた。

* 核燃料サイクル開発機構 人形峠環境技術センター 環境研究グループ

** 岡山大学 農学部 応用遺伝子工学研究室 教授

*** 検査開発株式会社 人形峠事業所

目 次

1. 緒 論	1
2. 研究開発の方法	3
2.1 放射性物質及びその放射線による植物遺伝子への影響調査	3
2.1.1 植物生育～DNA抽出操作	3
(1) 植物の生育	3
(2) DNA の抽出	4
2.1.2 DNA 増幅～シークエンス解析	5
(1) PCR を用いた DNA 断片の増幅	5
(2) PCR 産物のベクターへのクローニング	6
(3) 大腸菌からのプラスミド DNA の回収法	7
(4) シークエンス解析（カルコン合成酵素遺伝子）	8
(5) シークエンス解析（トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子）	9
2.2 放射性物質の植物体への濃集に関する調査	9
2.2.1 IP による調査	10
2.2.2 X線フィルムによる調査	10
2.3 堆積場に生育する植物の遺伝子変異に関する文献調査	10
3. 研究開発の結果	12
3.1 放射性物質及びその放射線による植物遺伝子への影響調査	12
3.1.1 植物生育～DNA抽出操作	12
(1) 植物の生育	12
(2) DNA の抽出	12
3.1.2 DNA 増幅～シークエンス解析	13
(1) PCR を用いた DNA 断片の増幅	13
(2) シークエンス解析（カルコン合成酵素遺伝子）	13
(3) シークエンス解析（トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子）	13
3.2 放射性物質の植物体への濃集に関する調査	14
3.3 堆積場に生育する植物の遺伝子変異に関する文献調査	14
4. 結 論	19
5. 謝 辞	20
6. 参考文献	21

表・図・写真目次

表 3.1	実験土壌のウラン分析, 放射線測定結果	22
表 3.2	鉱さいダム土壌の含有・溶出試験結果	22
図 2.1	DNA 迅速単離法のフロー図	23
図 2.2	フェニルプロパノイド合成経路上の主要な代謝産物	24
図 2.3	カルコン合成酵素遺伝子の塩基配列	25
図 2.4	トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列	26
図 3.1	DNA 抽出サンプルのアガロースゲル電気泳動写真	27
図 3.2	PCR 産物のアガロースゲル電気泳動写真	28
図 3.3	カルコン合成酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (鉱さいダム土壌+バ'-ミキュライト混合土壌生育植物由来)	29
図 3.4	カルコン合成酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (鉱さいダム土壌由来)	30
図 3.5	カルコン合成酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (人形-開発試験棟側土壌由来)	31
図 3.6	カルコン合成酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (岡山大学圃場土壌由来)	32
図 3.7	トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (鉱さいダム土壌+バ'-ミキュライト混合土壌生育植物由来)	33
図 3.8	トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (鉱さいダム土壌由来)	34
図 3.9	トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (人形-開発試験棟側土壌由来)	35
図 3.10	トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索 (岡山大学圃場土壌由来)	36
図 3.10	鉱さいダム土壌生育植物の IP 解析結果	37
図 3.11	岡山大学圃場土壌生育植物の IP 解析結果	37
写真 3.1	植物生育状況 (鉱さいダム土壌+バ'-ミキュライト混合土壌)	38
写真 3.2	植物生育状況 (鉱さいダム土壌)	38
写真 3.3	植物生育状況 (人形-開発試験棟側土壌)	39
写真 3.4	植物生育状況 (岡山大学圃場土壌)	39

1. 緒 論

ウラン鉱山の跡措置での安全評価を行う上で、埋設された鉱さいから発生する放射線による植物への諸影響や地下水などを介して移行する放射性物質による影響などについて評価する必要がある。

放射線の生物に対する影響は、直接的影響と遺伝的影響に分けられる。直接的影響は、線量が大きく被ばく後に比較的短期間に現れる急性障害と線量が比較的小さく数ヶ月～数年経て現れる晩発障害とがある。遺伝的影響は、染色体の構造及び数の変化に由来する染色体異常（染色体突然変異）と染色体上にある遺伝子1個の変化による遺伝子突然変異（点突然変異）とがあるが、低線量のときには染色体異常が稀にしか起こらなく、高線量により染色体異常を起こした細胞は死滅することが多いために遺伝子的影響として現われにくい¹⁾。埋設された鉱さいから発生する放射線量は、環境放射線レベルかまたはそれに近い低線量が長期間に渡るために、跡措置場に生育した植物には晩発影響や遺伝子突然変異による次世代への影響が考えられる。また埋設された鉱さいからの影響は外部放射線の他に、放射性物質が植物体内に取り込まれることによる内部被ばくによるもの、放射性物質そのものの持つ化学的毒性によるものなども考えられる。よって鉱さい中の放射性物質が植物体に取り込まれることによる諸影響についても充分把握しておく必要がある。

植物体の遺伝的影響を調査するための植物は、分子生物学的アプローチをとりやすいということが重要な条件となる。この条件として 1) 実験室での環境で栽培しやすいこと、2) 植物体が小さいこと、3) 世代時間が短いこと（6～8週間）、4) ゲノムサイズが小さいこと、5) 染色体の分子マップが完備していること、6) 情報ネットワークが整っていること等が挙げられる。これらモデル植物の条件を全て満たす植物は『シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)』（以下 *A. thaliana* という）であり、ゲノム解析など多くの植物科学の領域で *A. thaliana* を用いた研究は世界中で活発となっている²⁾。このことから本研究の植物への遺伝子影響に関する調査には *A. thaliana* が最も適しており、さらに数多くの遺伝子から放射性物質及びその放射線に対して変異を受けやすい部分に絞り込むことで、遺伝子変異の影響を限定出来るものと考える。

以上のことから、本研究では鉱山跡措置に係る安全評価に反映させるために植物遺伝子の基礎的な解析操作の習得を主に、放射性物質及びその放射線による*A. thaliana* の遺伝子的影響調査及び放射性物質の植物体への移行・吸収について、植物体の放射線強度分布の測定手法の検討を行った。

本研究は先行基礎工学分野に関する研究協力テーマとして、平成9年度から11年度の3年間、サイクル機構人形峠環境技術センター環境研究グループと岡山大学農学部応用遺伝子工学研究室の山田哲治教授と共同研究で実施したものである（平成9年度は客員研究員）。

2. 研究開発の方法

2.1 放射性物質及びその放射線による植物遺伝子への影響調査

植物の遺伝子影響調査は、放射性物質及びその放射線に対して変異の起こる可能性のある遺伝子を対象に、放射性物質及びその放射線の存在する環境下で生育させた植物の遺伝子変異の有無について解析を行った。解析手順としては、放射性物質を含まない土壌及び放射性物質の土壌で植物を生育させ、生長した植物からDNA抽出し、抽出サンプルから目的とする遺伝子の増幅、シークエンス解析を行った。

なお共同研究の役割分担として、植物生育～DNA抽出の操作はサイクル機構で実施し、DNA増幅～シークエンス解析の操作は岡山大学で実施した。

2.1.1 植物生育～DNA抽出

(1) 植物の生育

植物生育は植物の最適条件で行うために、室内環境下で温度・湿度・照度コントロールが可能なグロースチャンバーを使用した。生育に使用した土壌は、岡山大学圃場土壌と放射性物質を含む土壌として鉱さいダムのものを使用した。また鉱さいダム土壌は水分を多く含む泥質であったため、バーミキュライト（土壌改良材）を混合して土質改善を図ったものも実験に使用した。下記に生育実験条件を示す。

<生育条件>

対象植物：*A. thaliana*

生育条件：温度 22℃、湿度 50%RH、照度 3,000lx、12hr 明期-12hr 暗期

土壌試験区：鉱さいダム+バーミキュライト（土壌改良材）の混合（1 + 1）、鉱さいダム（人形峠）、開発試験棟側（人形峠）、

岡山大学圃場の 4 土壌

（各土壌には土壌：乾燥牛糞 = 7 : 3 の割合で肥料を混入）

生育期間：約 4 ~ 8 週間

<使用機器・器具>

- ・ EYELA 製 グロースチャンバー FLI-301NH
- ・ 苗木用ポット（直径 10cm）
- ・ バット（40×25×5 cm）

(2) DNA 抽出

1) DNA の抽出

DNA の抽出及び精製で最も基本的な操作はフェノール抽出、もしくはクロロホルム抽出であるが、再現性よく DNA 増幅を行うためのサンプルを調整するためには、質（純度、DNA サイズ）と効率（サンプル数/単位時間）の両方が要求される。図 2.1 に示す尿素/フェノール法をもとに改良した迅速単離法は、バッファーによる DNA の抽出とフェノール/クロロホルムによる精製を 1 つのステップとすることにより、フェノール/クロロホルム精製を省略した簡便法と比べ、手間を増やさずに短時間で多数のサンプルから質のよい DNA が精製できる³⁾。本実験では図 2.1 の DNA 迅速単離法に従い、各土壌試験区で生育させた *A. thaliana* 葉組織から 5 サンプルずつ計 20 サンプル調整を行った。以下に DNA の抽出操作に使用した試薬及び機器を示す。

＜使用試薬＞¹⁾

- ・ 2 × 抽出バッファー（室温保存、保存期間約 1 ヶ月）

0.6M NaCl

0.1M Tris-HCl (pH7.5)

40mM EDTA

1 % SDS

- ・ 1 × 抽出バッファー（使用時に調整）

2 × 抽出バッファー 1 Vol.

5M 尿素

10mM メルカプトエタノール

5 % (v/v) フェノール

+ DW 10 2 Vol.

- ・フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール=25：24：1
(冷蔵庫保存)
- ・99.5%，70%エタノール(冷蔵庫保存)
- ・TEバッファ(室温保存)
 - 10mM Tris-HCl (pH8.0)
 - 1 mM EDTA
- ・RNase A (10mg/ml) (-20°C保存)

＜使用機器＞

- ・コンパクトドリル(池田科学製 HOMOGENIZER S-205)
- ・小型遠心機(KURABO製 DISKBOY FB-8000)
- ・電気泳動装置(コスモバイオ製 Mupid-2)

2)抽出サンプルのDNA量測定

DNA抽出したサンプルは、次操作のDNA增幅(PCR)の反応溶液調整時に、
錆型となるDNAを一定量添加するため、予めサンプル中の核酸(DNA, RNA)
量を確認する必要がある。核酸の定量方法には、遺伝子工学実験でDNA,
RNA定量に最もよく用いられる迅速な方法の「光学的方法」を用いた。この
光学的方法の原理は、核酸に含まれる5種類の塩基は波長260nm付近に
強い吸収極大をもつてこの吸収を利用して定量する⁴⁾ものである。

DNA抽出したサンプルを滅菌水で希釈し(数倍～数百倍程度)，希釈サン
プルは分光光度計(島津製作所社製 UV-VIS-NIR Spectrophotometer UV-
3100PC)の波長260nm～300nm連続測定を行った。

2.1.2 DNA增幅操作～シークエンス解析操作

(1) PCRを用いたDNA断片の増幅

今回の実験では放射線及び放射性核種に対して変異の起こる可能性の
ある遺伝子として、*A. thaliana*のカルコン合成酵素遺伝子とトランス桂
皮酸水酸化酵素遺伝子を選び、解析を行った。これらの遺伝子から翻訳さ
れる産物は、フェニルプロパノイド合成経路上の主要な代謝産物の合成を

触媒する酵素である。図 2.2 にフェニルプロパノイド合成経路の主な反応を示す。図中では、カルコン合成酵素遺伝子を CHS, トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子を C4H と略して表記している。

まず最初にカルコン合成酵素遺伝子について解析を行った。この遺伝子は 2 つの exon と 1 つの intron から成り、本実験で PCR により増幅しシークエンス解析した領域は、第 2 の exon (2328-3322) のうち 2422-3170 までの 749bp である。

DNA 断片の増幅は PCR thermal cycler (TaKaRa Model TP240) により以下の条件で反応を行った。目的部位を増幅させるために新規にプライマーをデザインし (図 2.3), 前項の抽出法に従い調整した *A. thaliana* のゲノム DNA を鋳型として PCR で増幅した。

10×PCR buffer	5 μl
10×MgCl ₂ solution	5 μl
2mM dNTP	5 μl
primer 1 (10pmol/μl)	5 μl
primer 2 (10pmol/μl)	5 μl
Taq DNA polymerase	1.5 units
鋳型 DNA	250 ng
water	
Total	50 μl

Step 1 94°C 2 分間 × 1cycle
Step 2 94°C 1 分間
 52°C 30 秒間 × 25cycles
 72°C 1 分間
 4 °C

(2) PCR 産物のベクターへのクローニング

PCR 反応により得られた PCR 産物を, TOPO™ TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニングし, One Shot™ competent cell (Invitrogen) により形質転換体を得た。形質転換法は Invitrogen の指定方法に準じた。得られた PCR 産物をエタノール沈澱により脱塩し, 10ng/ μ l になるように滅菌水にて調整後, 以下の組成にてライゲーション反応させた。

PCR product	1 μ l
H ₂ O	3 μ l
PCR-TOP0 II vector	1 μ l

上記調整溶液を静かに混合し, 5 分間室温 (\sim 25 度) にて静置した。その間 One Shot™ competent cell を氷上で溶解し, 2 μ l の 0.5M β -mercaptoethanol をピペッティングしないように静かに混合し, 5 分間静置した。ライゲーション反応溶液 2 μ l を加え、氷上で 30 分間静置し, その後 42°C, 30 秒間のヒートショックを与え, 素早く氷上に戻し, 2 分間静置した。SOC 培地を 250 μ l 加え, 1 時間 37°C にて振とうしながらインキュベートした後, 予め 40 μ l の X-gal (40mg/ml) 及び 40 μ l の IPTG (100mM) をプレーティングしておいたアンピシリン (50 μ g/ml) を含む LB 培地プレートにプレーティングした。約 12-16 時間, 37°C にて一晩培養した後, 青白選択により形質転換体を得た。

(3) 大腸菌からのプラスミド DNA の回収法

上記の形質転換法で得られたシングルコロニーを取り, 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し, 37°C にて一晩振とう培養した。プラスミドの回収は GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham) を用いて行った。その方法を以下に示す。ちなみに以下の操作における遠心は, すべて室温にて行い, 細胞の溶解ではアングルローター遠心機にて 15,000 rpm, DNA の精製ではスウィングローター遠心機にて 12,000 rpm で行った。

1) 細胞の溶解

1～1.5ml の大腸菌培養液をエッペンドルフチューブに移し、30秒間遠心して上清を除去し、Solution I を 150μl 加え、ボルテックスを行い、よく懸濁した。これに Solution II を 150μl 加え、10～15回チューブを転回させて混合した。300μl の Solution III を加え、綿状の沈殿物が生じるまでチューブを転回させ（約20回）、5分間遠心した。

2) DNA の精製

1) 得られた上清を、できるだけ不純物を混入させないよう回収し、Collection Tube にセットした GFX Column に移し、室温にて1分間静置した後、30秒間遠心した。Collection tube 内の溶液を捨て、カラムに 400μl の Wash Buffer を加え、60秒間遠心を行った。この GFX Column を新しいエッペンドルフチューブに移し、ガラスファイバーを乾燥させるため、5～10分間室温にて放置した。100μl の滅菌水を加え、室温にて1分間静置した後、1分間遠心し、精製されたプラスミドDNAを回収した。

(4) シークエンス解析（カルコン合成酵素遺伝子）

シークエンスは ABI PRISM™ 310 BIGDye™ Terminator Cycle Sequencing kit による Dye Terminator シークエンス法に基づいて解析を行った。プライマーは、M13 Forward primer と M13 Reverse primer を 3.2pmol 使用し、4種類の蛍光標識した ddNTP、耐熱性ポリメラーゼを含むプレミックスを 8μl、及びテンプレート DNA 1 μg をそれぞれ混合し、滅菌水を加えて total 20μl としてサンプルチューブに分注し、サーマルサイクラーにセットした。サイクル条件は以下の通りである。

Step 1	96°C	2 分間	× 1 cycle
Step 2	96°C	10 秒間	
	50°C	5 秒間	× 25cycles
	60°C	4 分間	
	4 °C		

反応終了後、以下の方法でサンプルを精製した。反応液 20μl に対し、

3 M 酢酸ナトリウム 2 μ l と 95% エタノール 50 μ l を加え、室温で 10 分間放置した後、15,000 rpm, 20 分間遠心した。70% エタノール 250 μ l を加え、15,000 rpm で 5 分間遠心した後、バキュームポンプでペレットを乾燥させた。12 μ l の TSR (Template Suppression Reagent) を加え、ボルテックスミキサーで十分に混合し、必要であれば遠心機でスピンダウンした。これを沸騰水中で 2 分間加熱し、氷上にて急冷させた。サンプルを Genetic アナライザサンプルチューブに移し、チューブセプタで蓋をした後、サンプルトレイにセットし、オートシークエンサーによる自動解析を行った。

解析後得られたエレクトロフェログラムから塩基配列を決定し、DNA データベースを用いて、それぞれの土壌で生育させた *A. thaliana* 由来のカルコン合成酵素遺伝子の変異の有無を解析した。

(5) シークエンス解析（トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子）

次に、トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子について同様の解析を行った。この酵素は、フェニルプロパノイド合成経路上で、トランス桂皮酸から p-クマロ酸への水酸化を触媒する酵素であり、4つの exon と 3 つの intron から成る 5432 bp の遺伝子にコードされている。本実験で PCR により増幅した領域は、第 3 と第 4 の exon 中の 3881-4683 までの 794 bp である。トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子に関してもカルコン合成酵素遺伝子同様、各試験区ごとに 5 サンプルずつ計 20 サンプルのシークエンス解析を行った。今回の実験では、解析の簡便化を図るためにベクターへのサブクローニングは行わず、PCR 増幅断片をスピンカラムにより精製した後、オリジナルプライマー（図 2.4）を用いたダイレクトシークエンス法に基づいて、オートシークエンサーによる自動解析を行った。

2.2 放射性物質の植物体への濃集に関する調査

放射性物質を含有する土壌で生育した植物体について、放射性物質の移行部位の調査とその調査手法検討を目的として、植物が体内に吸収して濃集する放射性物質から発生する放射線強度の分布状態について調査を行った。

植物体の放射線検出の手法には、一般的によく用いられる「X線フィルム」と医療分野等で多く利用されている「イメージングプレート(以下 IP という)」の2手法で検討を行った。IP は写真フィルムに比べて検出感度が数十倍から千倍高く、X線に感度があるだけでなく、³H, ¹⁴C, ³²Pなどのβ線源、¹²⁵I, ^{99m}Tcなどのγ線やα線に対しても高い感度を有する¹⁾ことから、今回検討を行った。また本研究では植物体の放射線強度の分布を確認する他に、各フィルムへの感光時間について併せて検討した。また調査に用いる植物は、解析用フィルムサイズや取り扱い等を考慮して遺伝子解析と同様の *A. thaliana* を用いた。

なお共同研究の役割分担として、前処理、各フィルムへの感光操作はサイクル機構で実施して、IP 解析及びX線フィルム現像は岡山大学で実施した。

2.2.1 IP による調査

解析前処理として、鉱さいダム土壤及び岡山大学圃場土壤で生育させた *A. thaliana* の表面を純水で洗浄して、水分をティッシュ等で取り除き、植物全体をラップで挟んだ。この植物体と IP (FUJIFILM 製 BAS-IP MS2025, file size:20×25cm) を接触させて、3hr, 24hr 感光させた。IP 解析には、FUJIFILM 製 Fuji BAS2000 イメージアナライザーを用いた。

2.2.2 X線フィルムによる調査

解析前処理として、鉱さいダム土壤で生育させた *A. thaliana* の表面を純水で洗浄して、水分をティッシュ等で取り除き、植物全体をラップで挟んだ。この植物体と X線フィルム (Amersham LIFE SCIENCE 社製 Hyperfilm™ MP, film size:18×24cm) を X線フィルム専用カセットに入れて、3hr, 6hr, 24hr 感光させた。フィルム現像は RENDOL (X-レイフィルム用現像液) にて 4 分処理 (処理温度 20°C) した後に水洗浄し、RENFIX (X-レイフィルム用酸性硬質膜定着液) にて 5~10 分処理 (処理温度 20°C) を行った。

2.3 措置場に生育する植物の遺伝子変異に関する文献調査

措置堆積場には、やがて堆積場周辺に自生している植物が生育し、この植物

は堆積場から発生する放射線を恒久的に受け続けることで遺伝的影響を受ける可能性が考えられる。そこで堆積場からの放射性物質及びその放射線による植物への遺伝的影響に関する影響について、*A. thaliana*などを用いた実験事例に関する文献調査を行い、今後の植物影響研究の参考にしたいと考える。

3. 研究開発の結果及び考察

3.1 放射性物質及びその放射線による植物遺伝子への調査

3.1.1 植物の生育～DNA抽出

(1) 植物の生育

写真 3.1～3.4 に各土壤試験区での *A. thaliana* 生育状況（約 4 週目）を示す。写真から岡山大学圃場土壤及び試験棟土壤に生育させている *A. thaliana* に比べて、鉱さいダム土壤+バーミキュライト混合土壤及び鉱さいダム土壤生育の *A. thaliana* は若干生長が遅い結果となった。この生長速度の違いは、表 3.1 に示すように各土壤の放射性物質及びその放射線の違いによる影響によるもの、一般土壤と鉱さいダム土壤に含まれる植物の必須元素（窒素、リン酸、カリウム等）の違いによるものなどが原因として考えられる。

(2) DNA の抽出

図 3.1 に DNA 抽出サンプルの 0.8% アガロースゲル電気泳動した分画した結果を示す。図中の M は分子量 Marker (λ -*hind* III) で DNA の大きさ (bp) を示している。この電気泳動結果から 23,130bp～9,416bp 間の約 20kbp 付近に DNA 断片のバンドを検出できたので、植物から DNA を抽出できていると考えられる。

また、これら抽出したサンプルは DNA 抽出時に錆型 DNA として用いるため、分光光度計による連続測定し、下記の計算式により DNA 濃度測定及び DNA 純度の測定結果、DNA 抽出に使用出来るサンプルであることが確認できた。

$$\cdot \text{DNA 濃度} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \text{ 値} \times 50 \times \text{希釈率} \times 0.001$$

$$\cdot \text{DNA 純度} = \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = \text{約 } 2.0$$

3.1.2 DNA 増幅～シークエンス解析

(1) PCR を用いた DNA 断片の増幅

PCR 反応終了後、カルコン合成酵素遺伝子及びトランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の増幅を確認するための電気泳動解析を行った。図 3.2 に各土壌生育サンプル由来の DNA から増幅した PCR 産物を、0.7 % アガロースゲルで電気泳動し分画した結果を示す。約 800bp 付近に DNA 断片のバンドを検出できたので、目的とするカルコン合成酵素遺伝子及びトランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子が増幅されたと考えられた。その他のサンプルについても同様に DNA 断片の増幅を行うことができた。

(2) シークエンス解析（カルコン合成酵素遺伝子）

図 3.3～3.6 に各土壌生育サンプルの DNA 塩基配列解析で得られたエレクトロフェログラムを示す。ベースラインのノイズはほとんどなく 500bp 近い塩基配列解析が可能であった。得られた塩基配列は BLAST を用いて DNA データベース (Genbank) に対し相同性検索を行ったが、すでに報告されている *A. thaliana* カルコン合成酵素遺伝子と 2422-3170 の領域において 100% の相同性を示し、今回解析した領域においては遺伝子の変異は生じなかっことが判明した。解析は各試験区ごと 5 サンプルずつ計 20 サンプルについて行ったが、すべてのサンプルで遺伝子の変異は見られなかった。

(3) シークエンス解析（トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子）

図 3.7～3.10 に各土壌生育植物由来のトランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子のシークエンス解析で得られたエレクトロフェログラムの一例を示す。ダイレクトシークエンス法でもベースラインのノイズはほとんどなく、信頼性の高い塩基配列解析結果が得られた。各遺伝子の変異の有無は、前回同様 BLAST を用いて DNA データベースに対し相同性検索を行い解析したが、トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の 3880-4683 までの 794bp の領域において、すべてのサンプルが報告されている各遺伝子配列と 100% の相同性を示し、少なくともこの領域においては遺伝子の変異は見出されなかった。

3.2 放射性物質の植物体への濃集に関する調査

図 3.10 に鉱さいダム土壤生育植物の IP 解析結果、図 3.11 に岡山大学圃場土壤生育植物の IP 解析結果を示す。図左側に IP 解析に使用した植物写真、右側に IP 解析結果を示しており、今回実施した IP 解析では放射線の存在を示す部位が黒色になるよう設定している。この結果から、鉱さいダム土壤生育植物と岡山大学圃場土壤生育植物の両方の葉部分に放射線の存在を示す黒い画像が認められた。また X 線フィルムによる調査の結果、感光時間 3 条件とともに X 線フィルムに植物体の放射線は検出できなかった。

表 3.1 より実験に用いた各土壤中のウラン濃度は、鉱さいダム土壤 806 ppm、岡山大学圃場土壤 0.89 ppm で、2 土壤の放射性物質濃度差が約 1,000 倍あるにも関わらず、IP 画像に明確な差がないこと、X 線フィルムへの感光がみられないことから、植物体への放射性物質の濃集については、土壤中の放射性物質濃度差によるような顕著な差異はないことがわかった。表 3.2 に示すとおり今回は鉱さいダム土壤の溶出液の分析しか行っていないが、植物体への濃集は吸い上げる土壤中の水質に依存しているためと考えられ、鉱さい土壤からの多量な放射性物質の溶出がないことが推測される結果と言える。

図 3.10 から、感光時間 3 hr で IP 解析画像を確認でき、さらに感光時間を 24 hr にすることにより画像がぼやけることを確認した。この原因は、IP への感光から読み取り操作までの時間が長いと輝尽性発光強度が低下（室温 24 時間で約 6 割低下）するフェーディングと呼ばれる現象¹⁾が起きたものと推測され、IP の感光時間は 3 hr までが適当であると思われる。

3.3 措置場に生育する植物の遺伝子変異に関する文献調査

今後、放射線で汚染された土壤中で生育する植物に対する遺伝的影響を評価する上で、指標となる論文の概略を以下に示す。いずれもチェルノブイリ原発事故の放射線により、原生の植物にどのような影響が及ぼされたのかを評価するために、遺伝的変化の蓄積を比較している。長期に渡る放射線照射の影響はヒトや鳥ではかなり調査されているが、植物の遺伝子に対する効果はほとんど

研究・報告されていない。

(1) シロイヌナズナの個体群に対する放射線汚染の遺伝的影響

V. I. Abramov, O. M. Fedorenko and V. A. Shevchenko (1992)

The Science of the total environment 112 : 19-28

チェルノブイリの原発事故は1985年の4月26日に起こった。その後の1987年と1988年にシロイヌナズナの胚における致死変異体の出現頻度について解析を行った。用いたシロイヌナズナは、チェルノブイリ周辺の半径30kmの地域で育成され、放射性汚染のレベルが0.02から240mR/hとされたものである。初めに放射線照射を受けてから長期間経過した後も高レベルの放射線汚染が確認されたものは、変異が高頻度にみられる傾向にあり、照射後、短期間で汚染が減退した低レベルのものについては初期に高頻度でみられた変異が減少する傾向にあった。わずかな放射性汚染にさらした個体群では、変異体の出現頻度は増加せず、変異のレベルはコントロールと同程度であったと報告している。以下に実験方法を記載する。

(実験方法)

汚染地域に豊富に自生するシロイヌナズナを調査の対象とした。シロイヌナズナはアブラナ科の一年生植物であり、遺伝学の研究分野において最もよく用いられている。また、自家受粉を行い、早熟性であり、高い結実能を有する。しかし、シロイヌナズナはwinter form, spring formのいずれでも存在するため、研究は複雑であった。

チェルノブイリ事故は4月26日に起こり、シロイヌナズナはそれより前には種子を形成していなかった。筆者らはこの世代を最初の照射世代(M-1), M-1から得られた種子から育成した植物体を第二世代(M-2)とみなした。第二世代から分離した集団を解析することで、第三世代(M-3)における変異体を調べた。

結実能を低下させる全ての変異を遺伝的負荷とみなした。筆者らは葉緑体の変異頻度と同様に、個体群中の致死変異頻度を調べた。Mullerら

によって確立された embryo (胚) test とよばれる方法が用いられている。特定の生育段階にある莢を拡大鏡を用いて分離し、致死胚および葉緑体変異を有する胚を探索したのち、それらを数えることで、正常な個体と変異体を比較した。embryo test に基づいた変異源について調べるため、M-1 の植物体の変異頻度 (m-a), M-1 の実の変異頻度 (m-b), M-2 における変異頻度 (m-c) の三つを比較した。

それらの圃場上での解析に加え、温室内で育成したそれらの後代に対する遺伝的負荷についての研究もなされており、各個体群において 50 以上の植物体を解析に用いた。各植物につき、3 ~ 5 つの莢を用いている。

シロイヌナズナの遺伝構造に対する慢性的照射の影響についても研究されている。シロイヌナズナは自家受粉を行うので、遺伝子型頻度の偏差の有効性を確認するのに Hardy-Weinberg test を用いることはできない。それゆえ、筆者らは $G = Np/Ns$ (Np ; 多型座の数, Ns ; 座の数) に基づき、多型部位の割合を求めた。最も頻度の高い対立遺伝子の割合が 95% を超えない場合は遺伝子座は多型であるとみなされる。個体群間の多様性の指標である M も用いた (Zhivotovsky 1982)。この指標は多型座を計算したものであり、 $M = P_{10.5} + P_{20.5} + \dots + P_{n0.5}$, で表される。ちなみに P は対立遺伝子の頻度を表す。種々の M の値の平均値を求めた。解析したシロイヌナズナの個体群数は 16 である。電気泳動は 9.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行い、生育 4 週間のロゼット葉の酵素抽出液をロードした。平均値をとるため、各個体群につき 70 個体を解析した。抽出する際の抽出バッファーの組成は以下の通りである。

0.05 M	Tris
0.04 M	ascorbic acid
0.001 M	EDTA
0.005 M	cystein-HCl
	pH 7.2

電気泳動は一般的な手順 (Korochkin 1977) に従い、Tris-borate-EDTA バッファーを用い、pH 8.3, 200 V にて 2-2.5 h 行った。ゲルを 2 つにスラ

イスし、それぞれ異なる酵素システムに供するため染色した。以下の9つの酵素システムに従い個体群を比較した。

glutamateoxalatetransaminase (GOT)
isocytatedehydrogenase (IDH)
acid phosphatase (ACP)
leucine aminopeptidase (LAP)
esterase (EST)
peroxidase (PRX)
phosphoglucomutase (PGM)
xanthindehydrogenase (XDH)
 β -phosphogluconatedehydrogenase (β -PGD)

(2) トランスジェニック植物はチェルノブイリ原発事故によって引き起こされた放射線汚染に対する感度の高い生物指標となる。

Kovalchuk, O. Kovalchuk, A. Arkhipov, and B. Hohn (1998)

Nature Biotechnology 16: 1054-1059

さまざまな種類の放射線は、DNA の二重鎖を切断する。そして、非正統的組み換えまたは相同組みかえにより修復される。この論文では、チェルノブイリ周辺の放射線による植物への影響を調べるために β -glucuronidase (GUS) をマーカー遺伝子として導入したトランスジェニック *A. thaliana* を用いている。汚染レベルが 0.1-900 ci/km² の地域では、体細胞の染色体間相同組みかえの頻度が顕著に増加し、染色体異常の増加と一致していた。このトランスジェニック植物を用いる方法は簡便で感度の高い生物指標として利用価値が高いと思われる。

(実験方法)

1) 土壤のサンプリングと解析

チェルノブイリの原発事故中心地からさまざまな距離にある 8 地点を選び、汚染濃度を測定した。

2) 植物の生育条件

研究室内の実験では、 $5 \times 5 \times 5$ cm のポットに対照実験土壤および汚染土壤を入れ、16 h-light, 8 h-dark のサイクルで *A. thaliana* を 24°C で生育させた。野外実験では、1m² に約 200 植物を植えた。

3) 相同組みかえ実験

実験に用いたトランスジェニックの *A. thaliana* は機能しない短い β -glucuronidase (GUS) マーカー遺伝子を 1 コピー持ち、566bp のオーバーラップ領域がある。相同組みかえが起こり GUS 遺伝子が修復されるとヒストケミカル染色で検出できる。種蒔後 5 週目の植物を滅菌した染色バッファ中で真空により浸透させた。染色バッファの組成は以下の通りである。

10 mM	リン酸バッファ (pH7.0)
0.05 %	NaN3
0.1 %	Triton X-100
100 mg	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Glu)
Total	500ml

37°Cで 48 h インキュベート後、各植物ごとに染色されたポイントの数を数えた。各条件ごとに 200 植物をサンプリングして 6 回繰り返し実験をおこなった。

4) *A. cepa* の染色体異常観察

対照実験土壤および汚染土壤に種をまき、48-50 h 後に出た根が 1.5-2 cm になった時サンプリングした。根端は 70% エタノール:冰酢酸 = 3:1 溶液に 24 h 固定し 2% orcein 染色液で染色したのち、スライド上の 45% 酢酸中で押しつぶし顕微鏡観察した。1 つのスライド上に 500 細胞が存在するので、5 スライド分計 2500 細胞について観察を行った。すべての実験は 6 回繰り返して行った。染色体の fragment, sticky, vagrant, bridge 及び c-mitosis の頻度を観察し比較している。

4. 結 論

本研究では *A. thaliana* の放射性物質及びその放射線に対して変異の起こる可能性のあるカルコン合成酵素遺伝子及びトランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子について変異の有無について調査したが、少なくとも解析範囲での遺伝子変異は見られなかった。しかし解析した範囲は *A. thaliana* 遺伝子全体の 1 部分で、サンプル数も少ないとことから、本研究の実験結果だけで鉱さい土壌からの放射性物質及びその放射線による *A. thaliana* の遺伝子への影響は全くないと言い切れない。この遺伝子解析を通じて、植物から DNA を抽出し、シークエンス解析を行う遺伝子解析の基本的な操作を習得することができた。

また、植物体中の放射線強度の分布状態について、X線フィルム、IP を用いて定性的な調査を行ったが、2 手法とも植物体中の放射線を確認できなかった。植物体の放射性物質の吸収等を見るためには通常多量のサンプル量を用意して灰化等によって各部位のデータを求める事になるが、今回用いた *A. thaliana* は植物体の中でも小さいため、今後は実験対象とする植物の選定や使用する土壌中の放射性物質濃度等の実験条件見直し、または放射性同位元素を使ったトレーサー実験等の実験方法の検討が今後の課題と思われる。

今後は本研究で得られた植物の遺伝子解析操作や、堆積場に生息する植物遺伝子変異に関する文献調査内容を参考にして、ウラン鉱山跡措置に係る植物影響評価へ反映させたい。

5. 謝 辞

本研究は平成9年度より岡山大学農学部の山田哲治教授との共同研究として進めてきましたが、平成11年末より病のため御入院され、平成12年4月御逝去されました。ここに故人の御功績を偲び、謹んで哀悼の意を表するとともに、心からご冥福を申しあげます。また岡山大学農学部の一瀬勇規助教授に有益な助言と御指導を賜り、心から謝意を表します。

6. 参考文献

- 1) 石川友清：放射性概論－第1種放射線試験受験用テキスト－，通商産業研究社，(1996)
- 2) 島本功，岡田清孝：細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ4，モデル植物の実験プロトコール－イネ・シロイヌナズナ編－，秀潤社，P22～26(1996)
- 3) 島本功，佐々木卓治：細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ7，新版植物PCR実験プロトコール－核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解体法－，秀潤社，P41～43(1997)
- 4) 松村正實：ラボマニュアル遺伝子工学 第3版，丸善，P31～32(1996)

表3. 1 実験土壤のウラン分析、放射線測定結果

実験土壤	ウラン濃度(ppm)	$\beta\gamma$ 線量(cpm) ³⁾
鉱さいダム土壤+バーミキュライト	—	1.2k
鉱さいダム土壤	806 ¹⁾	1.8k
人形-開発試験棟側土壤	1.37 ²⁾	130
岡山大学圃場土壤	0.89 ²⁾	130

注)

- 1) γ 線スペクトル分析結果のTh-234より計算
- 2) U抽出後、 α 線スペクトル分析結果のU-238より計算
- 3) NaI(Tl)シンチレーション式サーベイメータによる表面測定
(バックグラウンド 130cpm)

表3. 2 鉱さいダム土壤の含有・溶出試験結果

分析項目	測定回数	含有試験(Bq/g乾土)		溶出試験(Bq/ml) ⁶⁾	
		測定値	平均値	測定値	平均値
全U ^{1,2)}	1	837	862 (μ g/g)	1.07	1.07 (μ g/ml)
	2	819		1.08	
	3	930		1.05	
全Ra ³⁾	1	1.6E+1±1.3%	1.6E+1±1.3%	2.0E-3±3.5%	2.0E-3±3.5%
	2	1.5E+1±1.3%		2.1E-3±3.4%	
	3	1.6E+1±1.3%		1.9E-3±3.6%	
全 α ⁴⁾	1	1.3E+2±1.8%	1.3E+2±1.8%	2.6E-2±2.7%	2.6E-2±2.7%
	2	1.3E+2±1.8%		2.6E-2±2.7%	
	3	1.3E+2±1.8%		2.6E-2±2.7%	
全 β ⁵⁾	1	1.8E+2±2.0%	1.8E+2±2.0%	8.2E-3±6.5%	8.5E-3±6.3%
	2	1.8E+2±2.0%		8.7E-3±6.1%	
	3	1.8E+2±2.0%		8.6E-3±6.2%	

注)

- 1) 全Uの単位は、含有試験では μ g/g乾土、溶出試験では μ g/ml。
- 2) 全U:酸分解後、ICPで測定した。
- 3) 全Ra:ラジウム分析法、科学技術庁放射能測定シリーズ19に準拠し実施した。
- 4) 全 α :酸分解後、鉄共沈法により測定試料を作成し、ZnS(硫化亜鉛シンチレータ)により α 線計測を実施した。
- 5) 全 β 放射能測定法、科学技術庁放射能測定シリーズ1に準拠し実施した。
- 6) 土壤溶出試験:環境庁告示13号に基づいた溶出試験:
土壤と純水を重量体積比10%の割合で混合し、振とう機を用いて6時間振とう後、その溶液を孔径1 μ mのグラスファイバーフィルターを用いて濾過した。

<操作方法>

- 1) 1.5mlチューブに植物の葉組織（約50mg）を入れて、 $100\mu l$ の1×抽出Bufferを加える。
↓
- 2) コンパクトドリルで葉組織を細かく碎く。
↓
- 3) $300\mu l$ の1×抽出Bufferと $300\mu l$ のフェノール/クロロホルムを加える。
↓
- 4) チューブを水平にして約20秒間ゆっくりと振る。
↓
- 5) 小型遠心機12,000rpmで、5分間遠心分離を行う。
↓
- 6) チューブ内の上清の約6割をマイクロピペットで別チューブに移し、 $300\mu l$ のエタノールを加えて、voltexする。
↓
- 7) 室温で約1分間放置後、小型遠心機12,000rpmで、5分間遠心分離を行う。
↓
- 8) ペレットを取らないようにアスピレーターで、エタノールをできるだけ取り除く。
↓
- 9) $500\mu l$ の70%エタノール（室温）を加えてvoltexし、ペレットをよく洗浄した後、小型遠心機12,000rpmで10分間遠心分離を行い、アスピレーターでエタノールを取り除く。
↓
- 10) 再度9)を行い、ペレットをよく洗浄する。
↓
- 11) ペレットをよく乾燥し、TE bufferに溶かす。
↓
- 12) $2\mu l$ のDNA溶液を0.8%アガロースゲル電気泳動でチェックする。
↓
- 13) DNA溶液のDNA量を測定する。

図2.1 DNA迅速単離法のフロー図

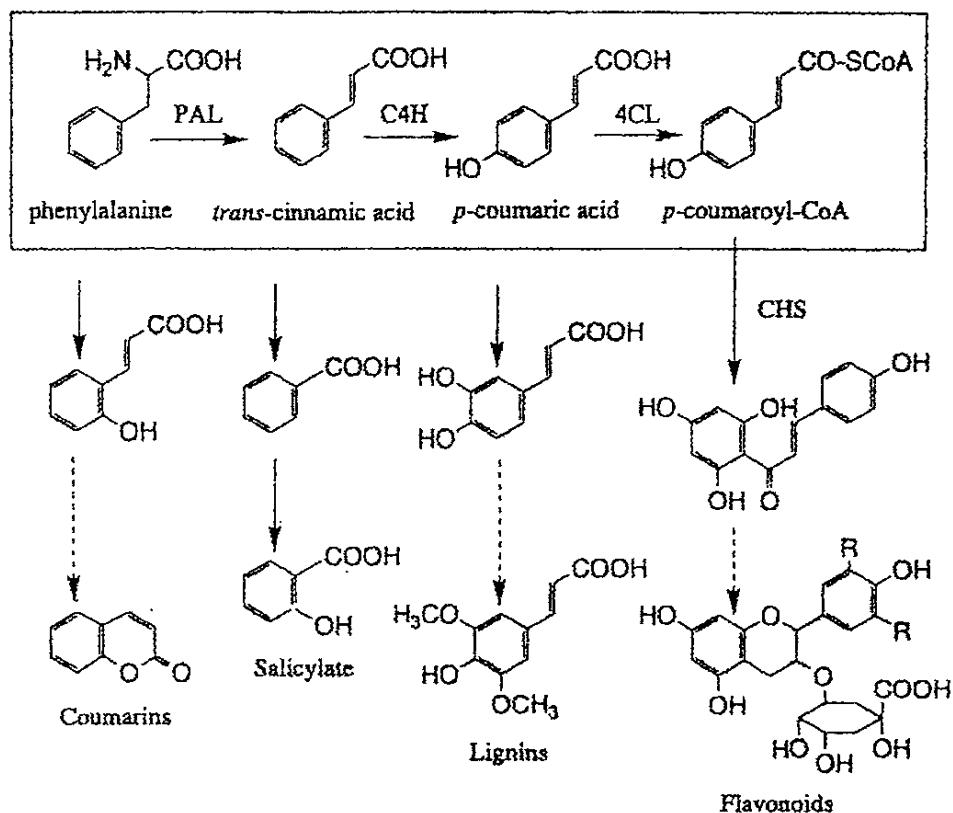


図2.2 フェニルプロパノイド合成経路上の主要な代謝産物

2049
 atactataatggatggctgggtcttcitccctggatgagatcagacaggctcagagagctatggacct
 M V M A G A S S L D E I R Q A Q R A D G P
 gcaggcatcttggctattggactgctaaccctgagaaccatgtgcttcaggcgagtatctactac
 A G I L A I G T A N P E N H V L Q A E Y P D Y Y
 2241
 ttccgcataccaaacagtgaacacatgaccgcacctcaaggagaagttcaagcgcatgttacgttattaa
 F R I T N S E H M T D L K E K F K R M C
 cttctactttcatttcatttggatataatcttcattcacatagtttagctaacaagtatattactatccacag
 2328
 gcgacaagtcgacaattcggauacgtcacatctgacggaggattccctcaagggaaaaccacatgt
 D K S T I R K R H M H L T E E F L K E N P H M C
 gtgcttacatggctccctcttggacaccagacaggacatctgtgtggtcgaaagtcccttaagctaggcaaag
 A Y M A P S L D T R Q D I V Y V E V P K L G K E
 primer 1
 aagcggcagtgaaggccatcaaggagtggggccagcccaagtcaagatcacatgtcgcttgcacta
 A A V K A I K E W G Q P K S K I T H V V F C T T
 cctccggcgtcgacatgcctgtgtactaccagctcaccuagcttctggctccgtcttccgtcaagc
 S G V D M P G A D Y Q L T K L L G L R P S V K .R
 gtctcatgttaccaggcaagggtgttgcggcggtactgtctccgtatcgctaaggatctggccgaga
 L M M Y Q Q G C F A G G T V L R I A K D L A E N
 acaaccgtggagcacgtgtccctgtgtctgtctgagatcacagccgttacccgtggccctctgaca
 N R G A R V L V V C S E I T A V T F R G P S D T
 cccacccctgactccctcgccgtcaggctttcagtgtggccgcgcactcattgtgggtccggacc
 H L D S L V G Q A L F S D G A A A L I V G S D P
 ctgacacatgtcgagagaacccatcttgagatgggtctcgccgtcagaccatccctccagactctg
 B T S V G E K P I F E M V S A A Q T I L P D S D
 atgggtccatagacggacatttgaggaaagtggctcacccatcttccatcttcaaggatgttcccggctca
 G A I D G H L R E V G L T F H L L K D V P G L I
 tctccaagaacattgtgaagagtctagacgaagcgtttaaacccctgggataagtactggaaactccctct
 S K N I V K S L D E A F K P L G I S D W N S L F
 tctggatagccccccctggagggtccagcgatctagaccagggtggagataaaagctaggactaaaggaaagaga
 W I A H P G G P A I L D Q V E I K L G L K E E K
 agatgaggggcgacacgtcacgttgttgcgcgtatggaaacatgtcgagcgcgtgcgtctcttcatactag
 M R A T R H V L S E Y G N M S S A C V L F I L D
 primer 2
 acgagatgaggaggaaagtcaaggatgggtggccacacaggagaagggtggagtggtttgttcttgc
 E M R R K S A K D G V A T T G E G L E W G V L F
 3322
 ttggtttcggaccaggctcaactgttgcggatcgatgttgcacagcgttccctcttaaacagaacgcttgc
 G F G P G L T V E T V V L H S V P L *
 cttctatctgcctacctacgtaaaacttaatcctgtcttatgtttatataatataatcattatatg
 tttacgcaataataggaa

primer 1
 5'-tggacaccagacaggacatcggt-3'
 primer 2
 5'-cgctcgacatgttccatactcg-3'

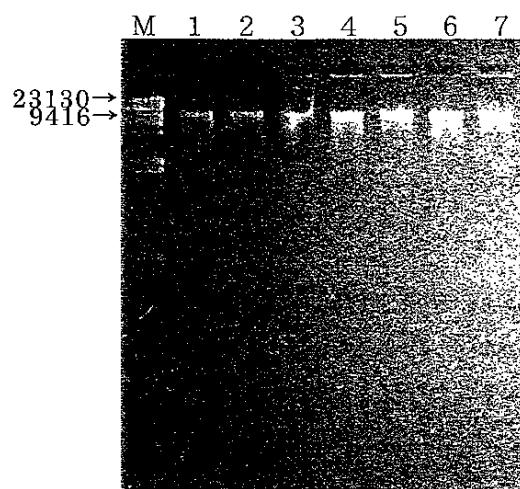
図2.3 カルコン合成酵素遺伝子の塩基配列

3822
 caaattgcgagttctaaggctacaggttgtgaaggattgaaatgtgccatgtcacatccttgaagctgag
 Q I A S S K P T G S E G L K C A I D H I L E A E
 primer 3 →
 3955
 cagaaggggagaaatcaacgaggacaatgttcttacatcgtagaacaatcaatgtcgccggtaacttcat
 Q K G E I N E D N V L Y I V E N I N V A
 ttcttacttgttaggatacgtaatcaatcctctagacgtctgtgtgcataaggaaattggacattagtgttt
 taagtgaatccatgaaaatccggaaattgttaaccataacaggaaattaggctatgttaggtgggttttggtc
 4176
 tccccctgaagaggctggattgtatatgggtttgtgaagctgatatctgtattctgtgtgaaacagcgattg
 A I E
 agacaacattgtggtctatcgagtgggaattgcagagctagtgaaccatcctgaaaatccagagtaagctaa
 T T L W S I E W G I A E L V N H P E I Q S K L R
 gacgaactcgacacgggttggaccgggtgtcaagtccggagctgatcttcacaaactccataccctt
 N E L D T V L G P G V Q V T E P D L H K L P Y L
 caagctgtggtaaggagactcttcgtctgagaatggcgattcccttcctcgccatgcacatggaaatccat
 Q A V V K E T L R L R M A I P L L V P H M N L H
 gatgcgaagactcgctggctacgatatcccagcagaaaaggcaatccctgttaatgcttggctagcaaac
 D A K L A G Y D I P A E S K I L V N A W W L A N
 aaccccaacagctggaaagaaggcctgaagagtttagaccagagggttttgaagaagaatcgcacgtggaa
 N P N S W K K P E E F R P E R F F E E S H V E
 gctaacggaaatgacttcaggatgtgccgttgggttgacgtagaagctgtccggattatattggca
 A N G N D F R Y V P F G V G R R S C P G I I L A
 ttacctatttgggatcaccattgttaggtatgtccagaaattcgtccggatccctccaggacagtct
 L P I L G I T I G R M V Q N F E L L P P P G Q S
 aaatggataactgtgagaagggtggacaattcgtccggatccctccaggacagtct
 K V D T S E K G G Q F S L H I L N H S I I V M K
 4774 ← primer 4
 ccaaggaaactgttaacttctgcacaaaaaaaaaggatgaagatgactttataaatgtttgtgaaatctgttg
 P R N C *
 aataattcccttgtttgtttgtgag

primer 3
5'-gcgagttctaaggctacaggttgt-

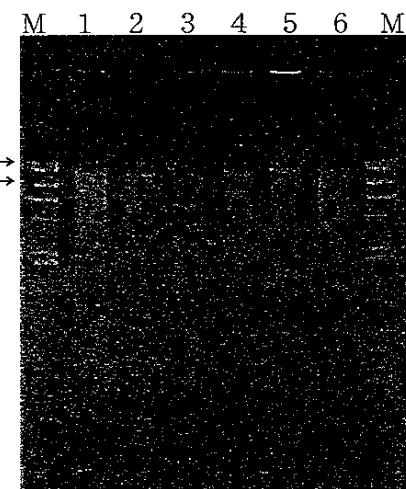
primer 4
5'-gatgtgcacatgtccacc-

図2.4 トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列



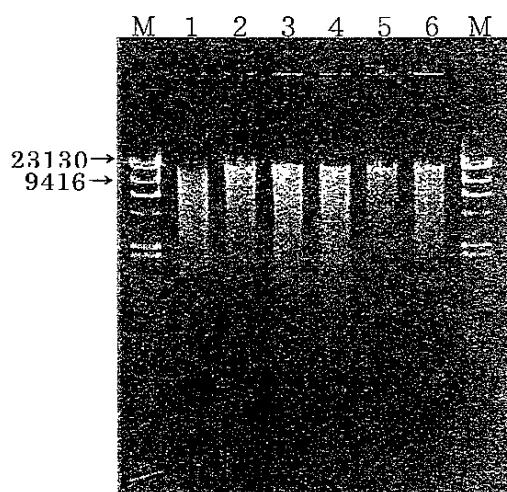
Lane1-7 : DNA サンプル
M : λ -Hind III Marker

鉛さいダム土壌+バーミキュライト混合
土壌生育植物より抽出した DNA サンプル



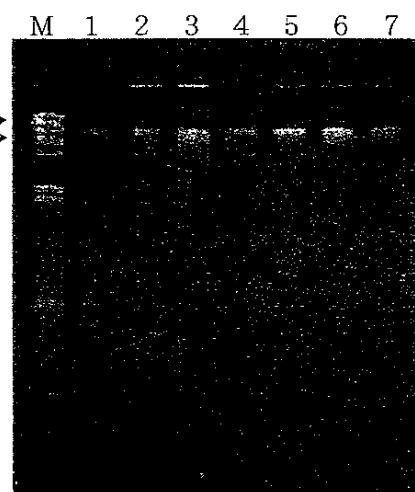
Lane1-6 : DNA サンプル
M : λ -Hind III Marker

鉛さいダム土壌生育植物より抽出した
DNA サンプル



Lane1-6 : DNA サンプル
M : λ -Hind III Marker

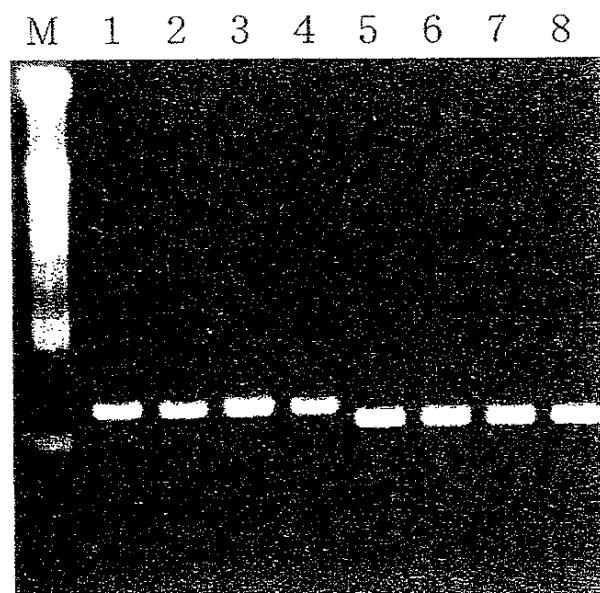
開発試験棟側土壌生育植物より抽出
した DNA サンプル



Lane1-7 : DNA サンプル
M : λ -Hind III Marker

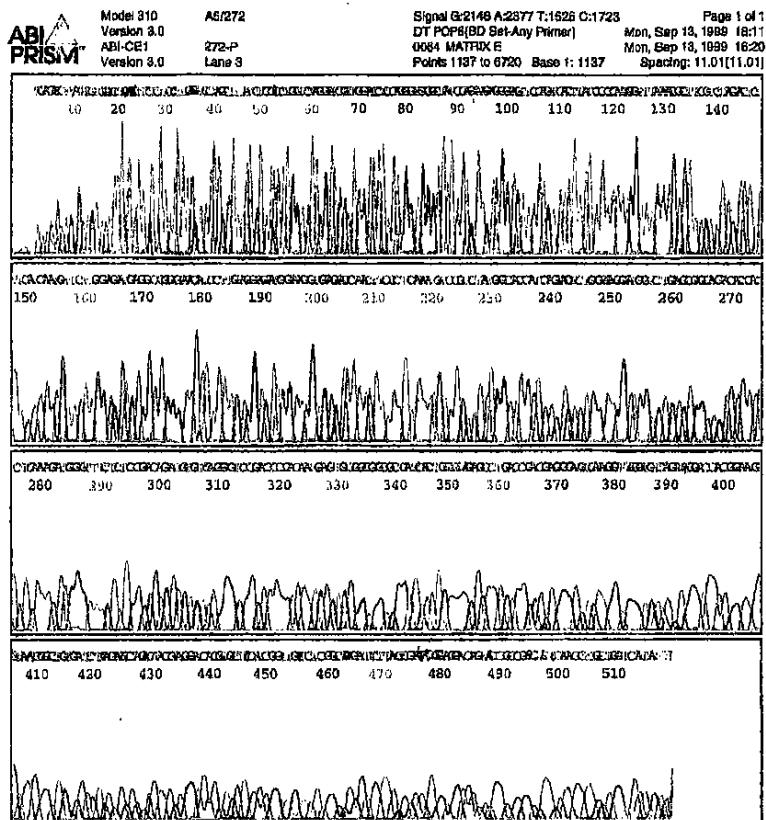
岡山大学圃場土壌生育植物より抽出
した DNA サンプル

図3. 1 DNA 抽出サンプルのアガロースゲル電気泳動写真



Lane 1 - 4 : トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子
5 - 8 : カルコン合成酵素遺伝子
M : λ -Hind III Marker

図3. 2 PCR 産物のアガロースゲル電気泳動写真



[Result of BLASTN] [Select Sequences]

BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= query
(516 letters)
Database: dbjpln.seq
90,682 sequences; 211,363,458 total letters
>NC_000981|ATHCHS A.thaliana chalcone synthase (CHS) gene, complete cds.
Length = 3864
Score = 1023 bits (516), Expect = 0.0
Identities = 516/516 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 acacgtgacgtgtcgccatcatttcttcttttagtcgtttatccacactgg6
Sbjct: 3143 acacgtgacgtgtcgccatcatttcttcttttagtcgtttatccacactgg6

Query: 61 ctagatcgctggaccctccagggtggctatccagaagggggatccagtcaattatc
Sbjct: 3083 ctagatcgctggaccctccagggtggctatccagaagggggatccagtcaattatc

Query: 121 ccnaagggtttaaacgtttcgcttagactttccaaatgtttttggatggggccggad
Sbjct: 3023 ccnaagggtttaaacgtttcgcttagactttccaaatgtttttggatggggccggad

Query: 181 catcccttgaggatggaaaggtagacccanctccctcaatgtccgtctatggcacca6
Sbjct: 2963 catcccttgaggatggaaaggtagacccanctccctcaatgtccgtctatggcacca6

Query: 241 cagagtctggaaaggatggttctggcgccagacaccatctaaaggatgggtttctccggd
Sbjct: 2903 cagagtctggaaaggatggttctggcgccagacaccatctaaaggatgggtttctccggd

Query: 301 cagatgttcagggtccgcacccacaaatgagtgcggcggccatcaactggaaagggcc6
Sbjct: 2843 cagatgttcagggtccgcacccacaaatgagtgcggcggccatcaactggaaagggcc6

Query: 361 gaccgacgaggaggatcaagggtgggtgtcaggaggguccacggaaaggtaacggctgtgatce
Sbjct: 2783 gaccgacgaggaggatcaagggtgggtgtcaggaggguccacggaaaggtaacggctgtgatce

Query: 421 cagagccacaacggggacacgtgtccacgggtttctcgccgogatccitacgtata6
Sbjct: 2723 cagagccacaacggggacacgtgtccacgggtttctcgccgogatccitacgtata6

Query: 481 ggaggacagtaccggccggcaoggcaaccctgtcggt516
Sbjct: 2663 ggaggacagtaccggccggcaoggcaaccctgtcggt2628

図3.4 カルコン合成遺伝子の塩基配列解析と相同性検索
(鉱さいダム土壌生育植物)

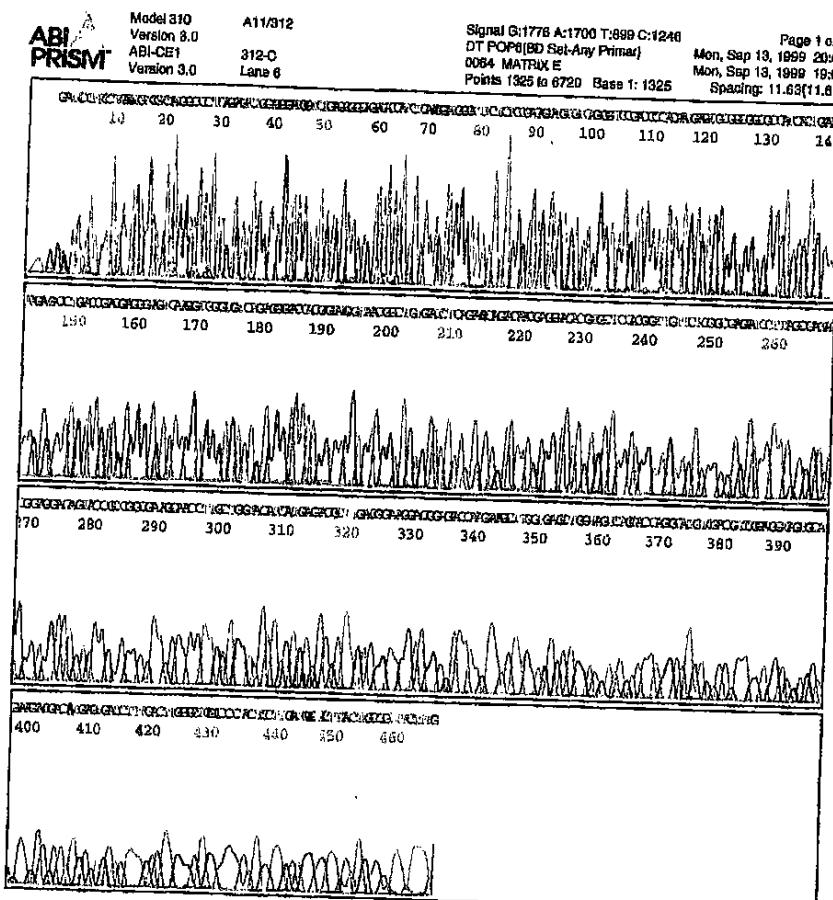


図3.5 カルコン合成遺伝子の塩基配列解析と相同性検索
(人形一試験棟側土壤生育植物)

[Result of BLAST] [Select Sequences]

BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= query
(439 letters)

Database: ddbjpln.seq
90,682 sequences; 211,363,458 total letters

>M20302|ATHCHS A.thaliana chalcone synthase (CHS) gene, complete cds.
Length = 3864

Score = 829 bits (418), Expect = 0.0
Identities = 418/418 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 tcagagtctggaaaggatggtctgagcggcggacaccatctcaaggatggtttcctccg@0
Sbjct: 2904 tcagagtctggaaaggatggtctgagcggcggacaccatctcaaggatggtttcctccg@845

Query: 61 acagatgtgtcgagggtccgaccccacaatgagtgcggccgcacactgaaaaagagcd20
Sbjct: 2844 acagatgtgtcgagggtccgaccccacaatgagtgcggccgcacactgaaaaagagc@2785

Query: 121 tgaccgacgaggaggactcaaggatgggtgtcagaggaccacggaaaggtaacggctgtatd80
Sbjct: 2784 tgaccgacgaggaggactcaaggatgggtgtcagaggaccacggaaaggtaacggctgtat@2725

Query: 181 tcagacgacgacaaacggggacacgtgtccacgggtttctcgccgatcccttagcgat@240
Sbjct: 2724 tcagacgacgacaaacggggacacgtgtccacgggtttctcgccgatcccttagcgat@665

Query: 241 cggaggacacgtaccggccggcgaaggacacctgtctggatcatcatgagacgcttgacgg@00
Sbjct: 2664 cggaggacacgtaccggccggcgaaggacacctgtctggatcatcatgagacgcttgacgg@2605

Query: 301 ggacggagacccaagaaggatgggtgagctggtagtgcgacccaggcatgtcgacggcg@60
Sbjct: 2604 ggacggagacccaagaaggatgggtgagctggtagtgcgacccaggcatgtcgacggcg@545

Query: 361 gtatgtcgacgacgacatgtgtatctttgacttggctggccccactccttgcgtgg@18
Sbjct: 2544 gtatgtcgacgacgacatgtgtatctttgacttggctggccccactccttgcgtgg@487

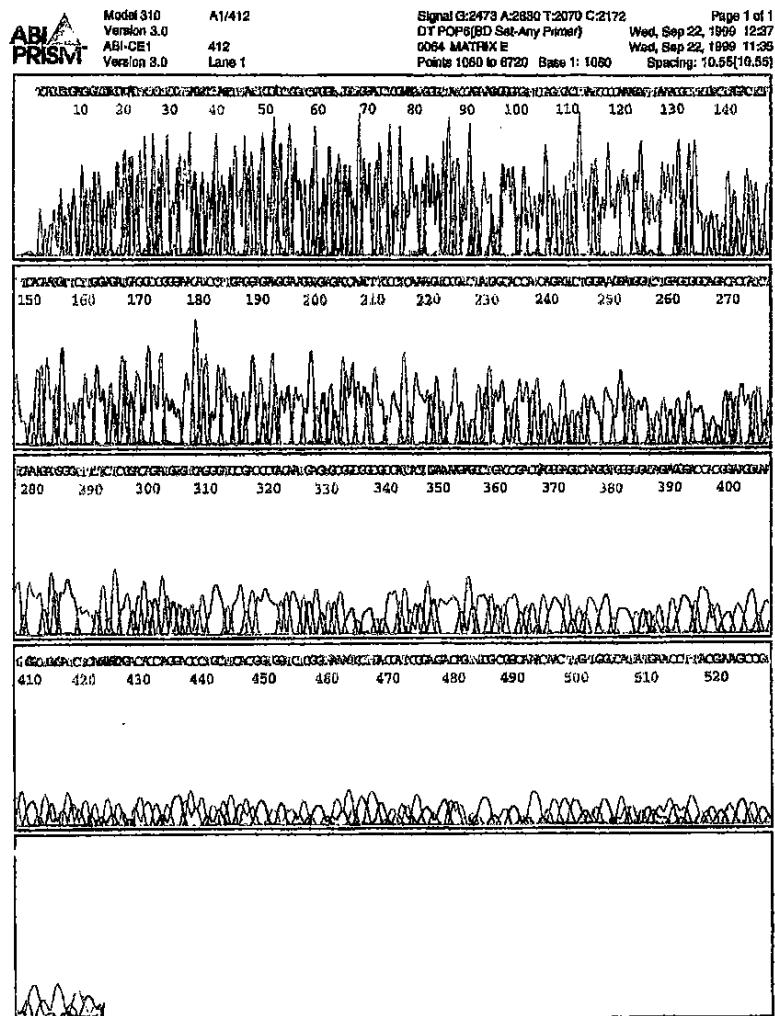


図3.6 カルコン合成遺伝子の塩基配列解析と相同性検索
(岡山大学圃場土壤生育植物)

[Result of BLAST] [Select Sequences]

BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= query
(516 letters)

Database: dbjpln.seq
90,682 sequences; 211,363,458 total letters
>M20308|ATHCHS A.thaliana chalcone synthase (CHS) gene, complete cds.
Length = 3864

Score = 1023 bits (516), Expect = 0.0
Identities = 516/516 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 acacgtgacgtgtgcgcctcattttcatttttagtcttagtttatccacctgg6
Sbjct: 3143 acacgtgacgtgtgcgcctcattttcatttttagtcttagtttatccacctgg6

Query: 61 cttagatcgctggacctccagggtgggtatccagaagaggagttccagtcaattatcd2
Sbjct: 3083 cttagatcgctggacctccagggtgggtatccagaagaggagttccagtcaattatcd2

Query: 121 ccaaagggttaaacgcttcgtcttagacttcacaatgtttggagatggccgggad1
Sbjct: 3023 ccaaagggttaaacgcttcgtcttagacttcacaatgtttggagatggccgggad1

Query: 181 catccttgaggagatggaaaggtagggatggaccacttccctcaaatgtccgttatggccacca2
Sbjct: 2963 catccttgaggagatggaaaggtagggatggaccacttccctcaaatgtccgttatggccacca2

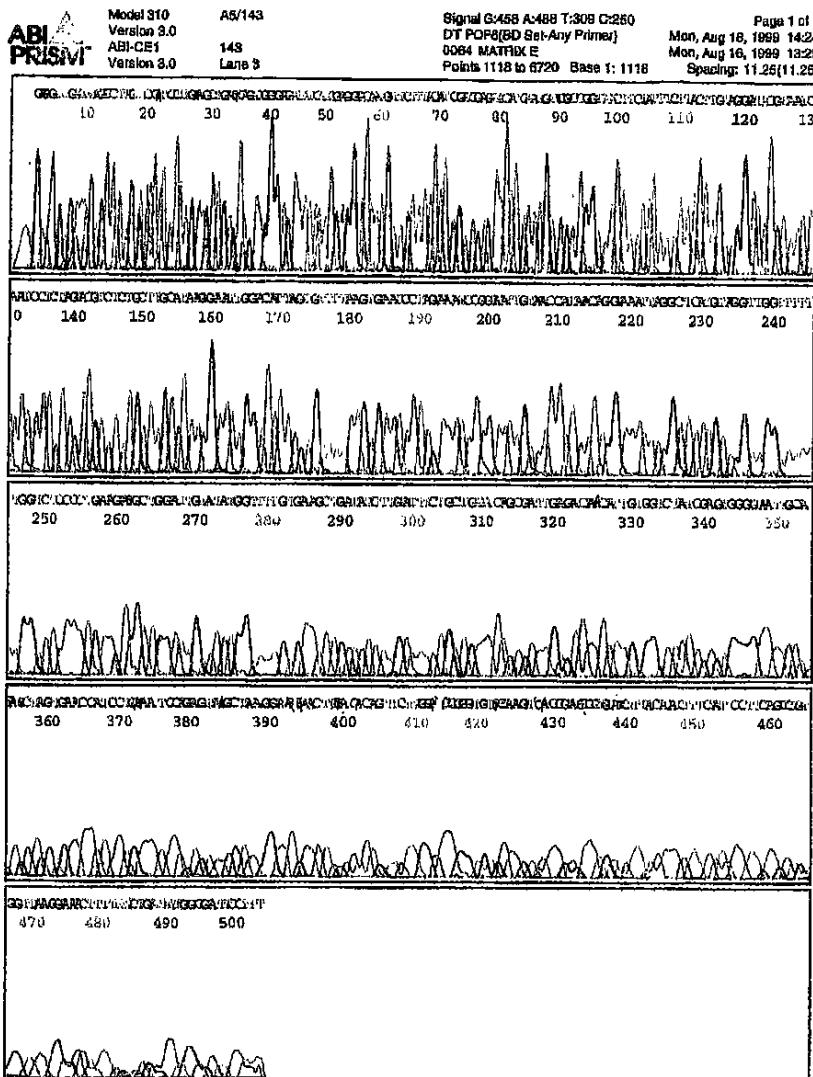
Query: 241 cagagtctggaggatgtctggaggccacatctcaaaatgtttttctccg6
Sbjct: 2903 cagagtctggaggatgtctggaggccacatctcaaaatgtttttctccg6

Query: 301 cagatgtgtcagggtccgcaccccaaatgaggtagtgcggccggccatcaatggaaaaagggcc6
Sbjct: 2843 cagatgtgtcagggtccgcaccccaaatgaggtagtgcggccggccatcaatggaaaaagggcc6

Query: 361 gaccgacgaggaggactaagggtgggttcagaggaccacggaaaggtaacggctgtatc6
Sbjct: 2783 gaccgacgaggaggactaagggtgggttcagaggaccacggaaaggtaacggctgtatc6

Query: 421 cagagcapacaaacgaggacacgtgtccacggttttctggcagatcccttagegata6
Sbjct: 2723 cagagcapacaaacgaggacacgtgtccacggttttctggcagatcccttagegata6

Query: 481 ggaggacagtaccgcggcgaaaggcaaccttgcgtgt516
Sbjct: 2663 ggaggacagtaccgcggcgaaaggcaaccttgcgtgt2628



[Result of BLAST] [Selected Sequences]

BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= query
(378 Letters)

Database: ddbjpln.seq
90,682 sequences; 211,363,458 total letters

>U71080|ATU71080 Arabidopsis thaliana cinnamate-4-hydroxylase (atC4H)
gene, complete cds.
Length = 5432

Score = 749 bits (378), Expect = 0.0
Identities = 378/378 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 catcccttgaaggctgagcagaaggagaaatcaacgaggacaatgttttacatcgatcgat0
Sbjct: 3879 catcccttgaaggctgagcagaaggagaaatcaacgaggacaatgttttacatcgatcgat938

Query: 61 gaacatcaatgtccggtaacttctatttttttacttggtaggatacgtaatcaatccct0
Sbjct: 3939 gaacatcaatgtccggtaacttctatttttttacttggtaggatacgtaatcaatccct6998

Query: 121 agacgtctctgttgcataaggaaattggacatttagtgttttaagtgtaatccatgtaaatcd80
Sbjct: 3999 agacgtctctgttgcataaggaaattggacatttagtgttttaagtgtaatccatgtaaatcd058

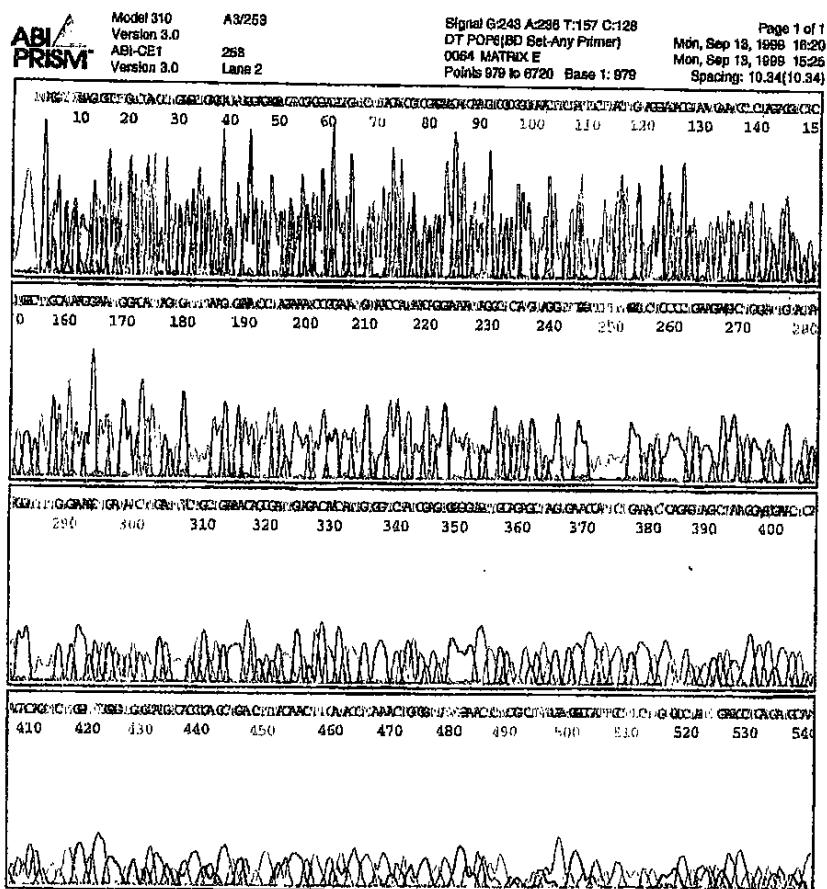
Query: 181 ggaaatgttaaccataacagggaaatttaggtctatgttagttggtttttggctcccccgt240
Sbjct: 4059 ggaaatgttaaccataacagggaaatttaggtctatgttagttggtttttggctcccccgt118

Query: 241 agaggctggattgttatgttttgtaaggctatatcttgattttctgtctgtaaacacgcg800
Sbjct: 4119 agaggctggattgttatgttttgtaaggctatatcttgattttctgtctgtaaacacgcg178

Query: 301 tttagacaaatcttggtctatcgatggggaaattgcagaggctatgtgtaaaccatctgtaa60
Sbjct: 4179 tttagacaaatcttggtctatcgatggggaaattgcagaggctatgtgtaaaccatctgtaa238

Query: 361 tccagatgtaaatcgatggaa378
Sbjct: 4239 tccagatgtaaatcgatggaa4256

図3.7 トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索
(鉱さいダム土壌十バー・ミキュライト混合土壌生育植物)



blastn [BLASTN] [Search Strategies]

BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= query (474 letters)
Database: ddbjpln.seq
90,682 sequences; 211,363,458 total letters

>U13180|ATU71080 Arabidopsis thaliana cinnamate-4-hydroxylase (atc4H) gene, complete cds.
Length = 5437

Score = 805 bits (406), Expect = 0.0
Identities = 406/406 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 catcccttguagctgagcagaaggagaaaatcaacgaggacatgtttttacatcgta 60
Sbjct: 3879 cttcccttggatctggcggaaagggaaatcaacggggcatgtttttacatcgta 3938

Query: 61 gaacatcatgtgcgggttcacttctatcttgtaggatcacgttaatcaatccct 120
Sbjct: 3939 gaacatcatgtgcgggttcacttctatctatcttgtaggatcacgttaatcaatccct 3998

Query: 121 agacgttcctgttcgtcaaggaaatggacattgtttttatggaaatccatggaaatcc 180
Sbjct: 3999 agacgttcctgttcgtcaaggaaatggacattgtttttatggaaatccatggaaatcc 4058

Query: 181 ggaaatgtttaccatatacngggaaattggcttcgttggatggtttttggttccctga 240
Sbjct: 4059 ggaaatgtttaccatatacggaaatttggcttcgttggatggtttttggttccctga 4118

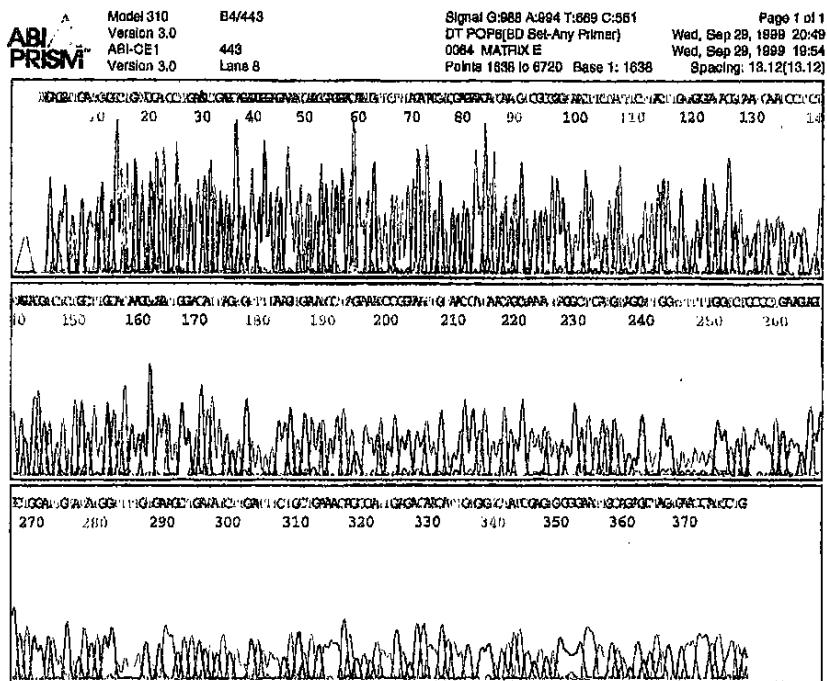
Query: 241 agagggtggatgttatgttttttggatggcttgcgtttatgtttttggatccctgaa 300
Sbjct: 4119 agagggtggatgttatgttttttggatggcttgcgtttatgtttttggatccctgaa 4178

Query: 301 ttggagacaacttgttgtttatcgagtggggatttcgttgcgtttatgtttttggatccctgaa 360
Sbjct: 4179 ttggagacaacttgttgtttatcgagtggggatttcgttgcgtttatgtttttggatccctgaa 4238

Query: 361 tccatggatgtttttgtttttttggatggacactcggttcccgatccctggaa 406
Sbjct: 4239 tccatggatgtttttgtttttggatggacactcggttcccgatccctggaa 4284

図3.8 トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索

(鉱さいダム土壌生育植物)



[Result of BLAST] [Select Sequences]

BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= query
(357 letters)

Database: ddbjpln.seq
90,682 sequences; 211,363,458 total letters

>U71080|ATU71080 Arabidopsis thaliana cinnamate-4-hydroxylase (atC4H)
gene, complete cds.
Length = 5432

Score = 708 bits (357), Expect = 0.0
Identities = 357/357 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 catccattggaaacctgagcagaaggggaaaatcaacgaggacaatgttctttacatcgctcg@0
Sbjct: 3879 catccattggaaacctgagcagaaggggaaaatcaacgaggacaatgttctttacatcgctcg@938

Query: 61 gaaacataatgtcgccggtaacttctatttctacttgttaggataacgttaatcatccctc@120
Sbjct: 3939 gaaacataatgtcgccggtaacttctatttctacttgttaggataacgttaatcatccctc@998

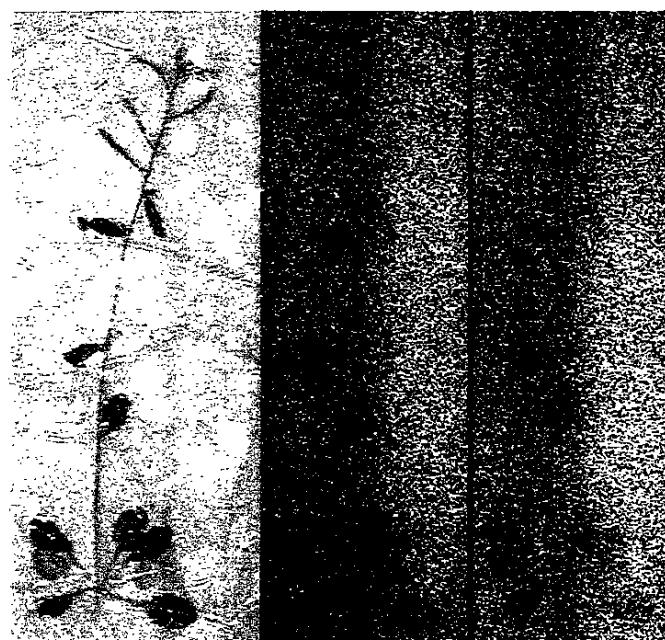
Query: 121 ogacgtctctgttgtgcataaggaaattggacattgtgttttagtgaatcttgcataatcd@80
Sbjct: 3999 ogacgtctctgttgtgcataaggaaattggacattgtgttttagtgaatcttgcataatcd@058

Query: 181 ggaattgttaaccataacaggaaattaggctatgttaggttggtttttgtctccccctg@240
Sbjct: 4059 ggaattgttaaccataacaggaaattaggctatgttaggttggtttttgtctccccctg@118

Query: 241 agaggtctggattgttatgttttgtaagctgatataatcttgcatttcgtgaaacagcg@000
Sbjct: 4119 agaggtctggattgttatgttttgtaagctgatataatcttgcatttcgtgaaacagcg@178

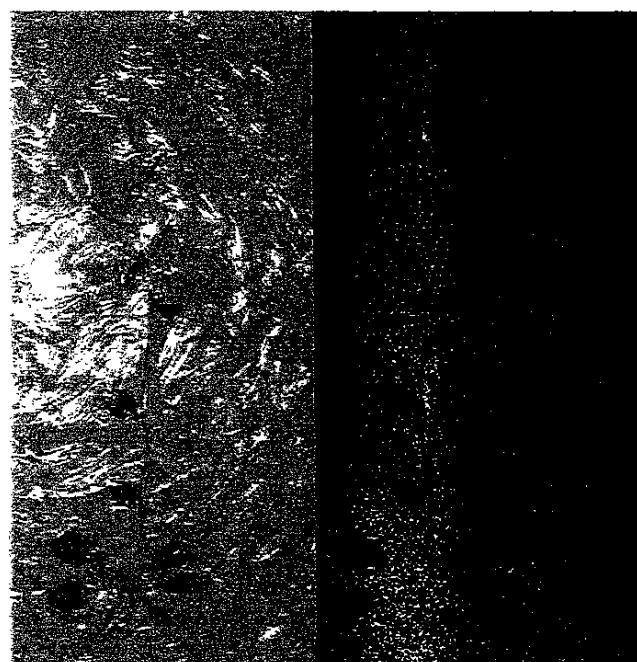
Query: 301 ttgagacaaacattgttgtctatcgagtggggaaattgcagagctgtgaaccatctg 357
Sbjct: 4179 ttgagacaaacattgttgtctatcgagtggggaaattgcagagctgtgaaccatctg 4235

図3.9 トランス桂皮酸水酸化酵素遺伝子の塩基配列解析と相同性検索
(岡山大学圃場土壤生育植物)



植物写真 IP 画像
 (感光時間 3hr) IP 画像
 (感光時間 24hr)

図3. 10 鉱さいダム土壤生育植物のIP解析結果



植物写真 IP 画像 (感光時間 3hr)

図3. 11 岡山大学圃場土壤生育植物のIP解析結果



写真3.1 植物生育状況

(鉱さいダム土壤+パーミキュライト混合土壤-4週目)

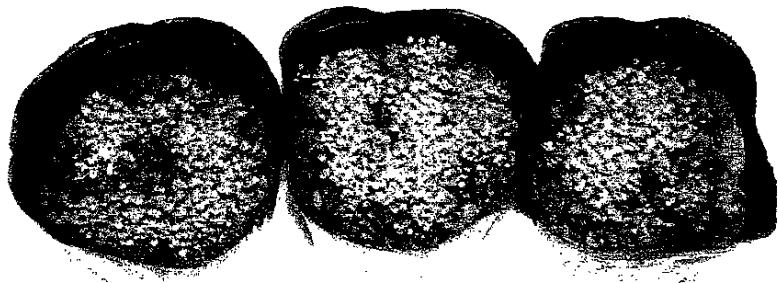


写真3.2 植物生育状況(鉱さいダム土壤-4週目)



写真3. 3 植物生育状況(人形-開発試験棟側土壤－4週目)



写真3. 4 植物生育状況(岡山大学圃場土壤－4週目)