

[報文]

ケナフ及びローゼル生長に対する放射線照射の影響

松坂彰毅¹⁾, 奥山直輝¹⁾, 藤野秀樹^{1,2)}

¹⁾ 早稲田大学大学院先進理工学研究科生命理工学専攻 (〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1)

²⁾ 兵庫医療大学薬学部医療薬学科 (〒650-8530 兵庫県神戸市中央区港島 1-3-6)

Effect of gamma-irradiation to the embryos growth of kenaf and roselle

Matsuzaka Teruki¹⁾, Okuyama Naoki¹⁾ and Fujino Hideki^{1,2)}

¹⁾ Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University
3-4-1, Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555 Japan

²⁾ Department of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences
1-3-6, Minatojima Chuo-ku, Kobe 650-8530 Japan

Summary

Kenaf and roselle are widely cultivated in many countries and it has been used to produce several products or beverages. Also, these plants are recognized as an environmental friendly crop. The gamma-ray irradiation was commonly used to avoid the spoilage of several vegetables or to inhibit the emergence of larvae from seeds. Recently, radiation breeding was characterized for the creation of new varieties and the improvement of vegetative propagation. As of today, little studies have been reported regarding the radiation sensitivity of these plants. To gain a better understanding on the embryos growth of kenaf and roselle, gamma-ray irradiation was performed on these seeds using ⁶⁰Co irradiator. A statistically significant difference was observed on germination and embryo growth at irradiated kenaf seeds between control groups. In case of roselle, there was not statistically significant difference in the germination of irradiated seeds between control groups at the same doses. Moreover, the several truncated DNA forms were detected at the irradiated seeds and their embryos in electrophoresis assay. Based on these results, inhibitory effect on germination and embryo growth were closely related to the DNA damages. The present study demonstrates that remarkable difference on the radiation tolerance of seed was found between kenaf and roselle.

Key words: Kenaf, Roselle, Irradiation, Germination, embryo growth

はじめに

ガンマ線照射は農業分野においてジャガイモの発芽防止や種子の防虫法として広く利用されている¹⁾²⁾。特に育種学では放射線照射による突然変異を利用した品種改良が行われており、作物の新規形

質創出及び新品種育成に大きく貢献している³⁾⁴⁾。

ケナフ (*Hibiscus cannabinus* L.) はアオイ科ハイビスカス属の一年生草であり、成長に伴う温室効果ガスの固定量が高く、森林資源保護や地球温暖化対策に有効な植物であると期待されている⁵⁾。またケナフ皮は豊富な繊維質を有しており、紙や木材の

代替品として様々な工業製品に利用されている⁶⁾⁷⁾。一方、ケナフ亜種であるローゼル (*Hibiscus sabdariffa* L.) は主として熱帯で栽培されており、食用ケナフとしてハーブや飲料品などへ利用されている⁸⁾。既報⁹⁾において Shome らはケナフ及びローゼルへの X 線照射試験を実施しており、幼芽生育が著しく阻害されたものの、種子照射による発芽抑制は認められなかったと報告している。しかしながら、ケナフ類への放射線照射に関する研究は少なく、両者の放射線感受性を言及した報告は見受けられない。

本研究ではケナフ及びローゼルの品種改良研究の一環としてガンマ線照射による放射線感受性と影響について検討した。両植物の種子及びスプラウトへガンマ線を適宜照射し、発芽及び生長能力の欠損と DNA 鎖切断との関係について考察した。

実験方法

1. 供与種子

本研究では中国産ケナフ種子 (品種: 湘紀麻 1 号) 及びローゼル種子 (品種: 改塊麻 1 号) を試料とした。両種子をプラスチックチューブに充填した試料を実験に供した。

2. 照射処理

試料の照射処理は日本原子力開発研究機構高崎量子応用研究所にて実施した。⁶⁰Co 線源の線量率 (0.1kGy/h 及び 4kGy/h) 及び試料配置距離より照



Fig. 1 Irradiation of gamma-ray to kenaf and roselle seeds.

Each dose groups were arranged at the several distance form radiation source.

射線量を算出し、室温にてガンマ線照射した (Fig. 1)。試料への吸収線量は 10 ~ 200Gy (0.1kGy/h) 及び 0.3 ~ 4kGy (4kGy/h) とし、照射後の種子は速やかに冷却され、使用時まで -80 °C で凍結保存した。なお、ガンマ線照射を行わずに凍結保存した両者の種子をコントロールとして用いた。この他に播種後 3 日目のケナフ及びローゼルのスプラウトをプラスチックシャーレに充填し (n=25)、同様の条件にて 0.2 ~ 4kGy 照射した。

3. 発芽試験

発芽率に対する影響は既報¹⁰⁾に準じた量床試験により検討した。プラスチックシャーレ (内径 90mm) に直径 90mm のろ紙を敷き、15mL の精製水を注いだ。そこに 1% 次亜塩素酸溶液にて表面殺菌した種子を等間隔で 1 列 10 粒、合計 50 粒播種し、パラフィンフィルムで密封し、以後の精製水補充は行わなかった。これらのシャーレは 23 °C の暗条件下で 96 時間栽培し、24 時間毎に発芽数を計測した。発芽判定は 2mm 以上の新芽が認められた場合を陽性とした。なお、発芽試験における各照射群の例数は 6 例とした。

4. 生長試験及び栽培試験

発芽試験を終了した全てのスプラウトを回収し、植物表面の付着水を除去して総重量を計測した。その後 95 °C で 2 日間乾燥処理して秤量し、乾燥重量とした。なお、ケナフ及びローゼルスプラウトへ照射した際の生長量も同様の方法により検討した。

両植物の照射種子を市販品の有機土壌中に播種して栽培試験を行った。プランターを約 15cm 平方で仕切り、それぞれの領域に種子を 10 粒等間隔で播き、植物成長に伴う形態学的な変化を 10 週間まで観察した。

5. ケナフ及びローゼルの DNA 抽出

両者の種子またはスプラウトからの DNA 抽出は市販品抽出キット (DNeasy tissue kit, QIAGEN) を用いて実施した。すなわち試料に液体窒素を添加して機械的に破砕後、アルカリ処理により可溶化した。溶解試料を前処理カラムよりタンパク質及び多糖類を除去しライセートを得た。ライセートをシリカゲルメンブロンにて DNA を吸着させ、精製水によ

る溶出作業を経てDNA画分を回収した。なお、発芽試験により得られたケナフ及びローゼルスプラウトも同様のDNA抽出及び精製作業を行った。

6. ゲル電気泳動

前述の抽出方法により得られたDNA試料をアガロースゲル電気泳動により分離してガンマ線照射によるDNA損傷を検討した。1%アガロースゲルの各レーンにDNA試料を10 μ L注入し、40mM Tris-acetate 1mM EDTA (pH8.3)緩衝液を満たした電気泳動槽(Mupid, ADVANCE)にて100Vの条件で約20分間泳動した。泳動終了後はゲルをエチジウムブロマイドにて染色し、トランスイルミネーターにより紫外線照射下で泳動像を観察した。

7. 計算方法

ケナフ及びローゼルのスプラウト重量及び発芽数より各照射群の生長量 (embryo growth: EG) 並びに生長率 (EG ratio: EGR) を式(1)、式(2)より算出した。

$$\text{式(1) EG (mg)} = (\text{総重量} - \text{乾燥重量}) / \text{発芽数}$$

$$\text{式(2) EGR (\%)} = (\text{EG}_{\text{Irradiated}} / \text{EG}_{\text{Control}}) \times 100$$

有意差検定はStudent's t-検定により実施し、 $p < 0.05$ を示した場合は有意とした。この他に発芽率、胚生長率及びスプラウト生長率に対するガンマ線照射の阻害作用について見かけ上の阻害定数 (IC_{50}) を直線回帰にて算出した。全ての成績は4-6群の平均値 \pm 標準偏差で表記した。

実験結果および考察

1. ガンマ線照射による発芽率及び生長量への影響

ガンマ線照射によるケナフ及びローゼル発芽率の用量依存的変化を Fig. 2(A) に示す。両者のコントロール群 (0Gy) において発芽数は播種後48時間まで直線的に増加し、その後定常状態となった (data not shown)。コントロール群では播種後96時間までにケナフで $82 \pm 4\%$ 、ローゼルで $98 \pm 1\%$ の発芽率を示した。ケナフでは100Gyまでは放射線照射による顕著な発芽率変動は認められなかったが、200Gy以上では用量依存的な発芽率低下を示し、1500Gy照射群では $39 \pm 5\%$ 、4000Gy照射群では $16 \pm 4\%$ まで低下した。一方、ローゼルでは発芽率の

低下はいずれの照射線量においても認められず、最高照射群 (4000Gy) での発芽率は $93 \pm 6\%$ であった。なお、ケナフ発芽率については50Gy以上の照射にてコントロール群との有意差を示したが、ローゼルでは有意な低下は認められなかった。両者の発芽率に対する阻害定数 (IC_{50}) はそれぞれ、ケナフで1045Gy、ローゼルで4000Gy以上であり、顕著な差異が認められた (Table 1)。

Fig. 2(B) にケナフ及びローゼルの生長量を示す。両者の播種後96時間におけるコントロール群の生長量はケナフで $74 \pm 13\text{mg}$ 、ローゼルで $138 \pm 25\text{mg}$ であった。ケナフでは200Gy以上、ローゼルでは300Gy以上の照射において有意な抑制効果を示し、吸収線量依存的な生長阻害が認められた。4000Gy照射群における生長量はケナフで $34 \pm 4\text{mg}$ 、ローゼルで $68 \pm 6\text{mg}$ まで低下した。両者の生長率 (EGR) に対する IC_{50} はケナフで2848Gy、ローゼ

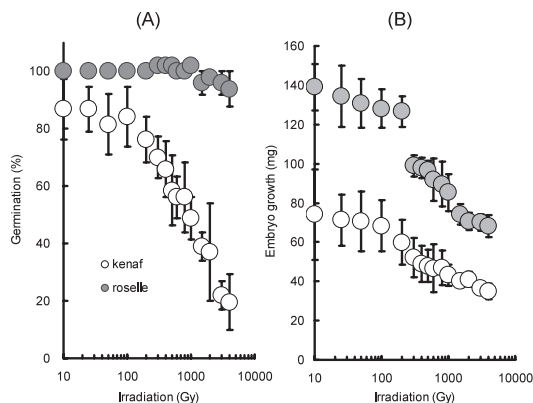


Fig. 2 Inhibitory effect on germination (A) and embryo growth (B) after gamma-irradiation to kenaf and roselle seeds.

Each point represents the mean and S.D. of six groups.

Table 1 Inhibitory constants (IC_{50}) on the several stages on growth of kenaf and roselle

(IC_{50} : Gy)	kenaf	roselle
germination	1045 \pm 208	>4000
embryo growth	2848 \pm 80	3469 \pm 654
sprout growth	2917 \pm 1251	>4000

Each values represent the mean and S.D. of four-six groups.

ルで 3469Gy であり、ケナフでは発芽率の約 3 倍高い IC₅₀ を示した。

この他に播種後 3 日目のスプラウトへガンマ線照射した際の生長率への影響も検討したが、両者共に同様の成績を示した (Table 1)。

2. ケナフ及びローゼルの形態学的変化

Fig. 3 に播種後 96 時間の各照射群におけるケナフ及びローゼルスプラウトの形態学的変化を示す。コントロールと比較して、両者のスプラウトは用量依存的な生長阻害を示した。特にケナフでは 800Gy 以上、ローゼルでは 1500Gy 以上の照射群において根幹伸長が著しく阻害されていた。これらの成績は前述の生長阻害に根幹の伸長抑制が大きく関与することを支持する内容であった。

3. DNA の電気泳動解析

Fig. 4 にケナフ及びローゼル全 DNA 試料の電気泳動像を示す。ケナフ種子の DNA 試料において用量依存的な DNA 崩壊像が観察されたが、ローゼル

種子では DNA 損傷を示唆する泳動像の変化は見出されなかった (Fig. 4 upper)。一方、ケナフスプラウトにおいて 1kbp 付近に損傷 DNA 由来と推定される DNA 断片が認められた。これらの断片は吸収線量増加との相関性を示したが、ローゼルでは DNA 断片に相当する泳動像は検出されなかった (Fig. 4 lower)。

4. 照射種子の栽培試験

ケナフ及びローゼルの照射種子を播種し、10 週間栽培して形態学的変化を観察した。ケナフでは 400Gy 以下、ローゼルでは 600Gy 以下の照射群で顕著な形態学的変化は観察されなかった (data not shown)。しかしながら、800Gy 及び 1000Gy のケナフ照射群において茎部伸長の分岐または湾曲等の異常所見が複数例検出された (Fig. 5 A, B)。またローゼルでは 1000Gy 以上の照射群にて頸部の形態学的異常が多く認められた (Fig. 5 C)。これら異常所見を示した植物の多くで不稔性が観察された。なお、1500Gy 以上の照射群では両植物の胚生長は停止し、

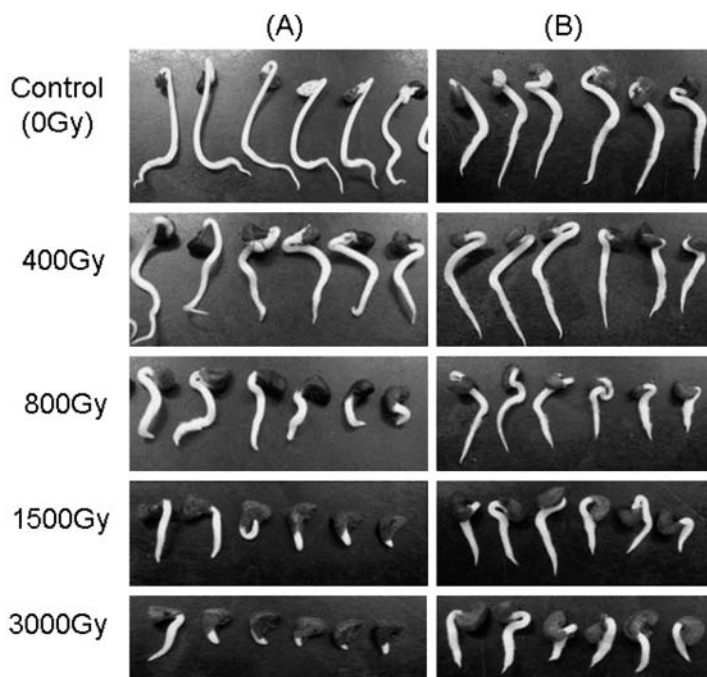


Fig. 3 Inhibitory effect of gamma-irradiation to the embryo growth of kenaf (A) and roselle (B) seeds.

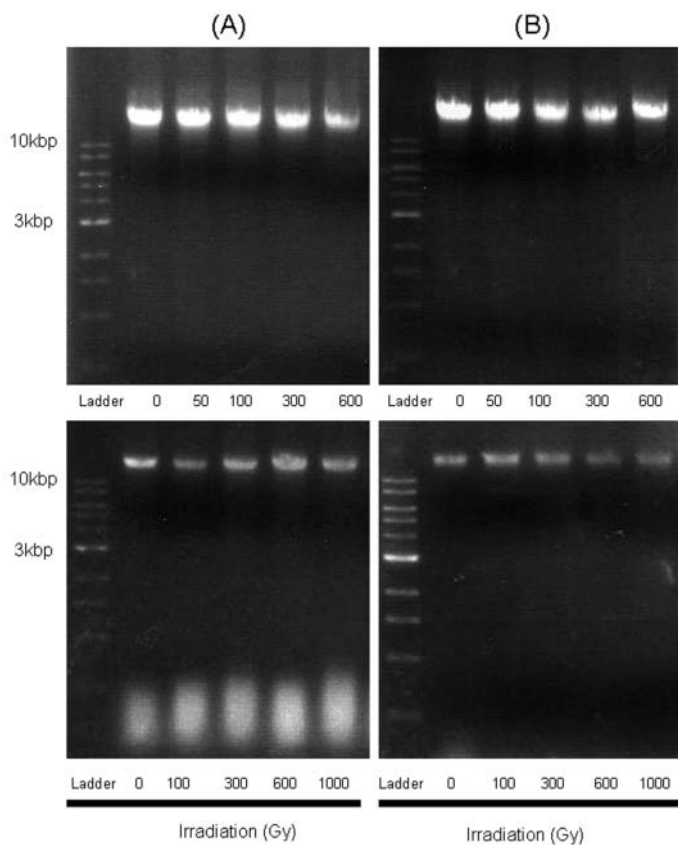


Fig. 4 Electrophoresis assay of gamma-irradiated seeds (upper) and embryos (lower).
(A): kenaf, (B): roselle
Ten seeds and five embryos were used for the extraction of each DNA samples.

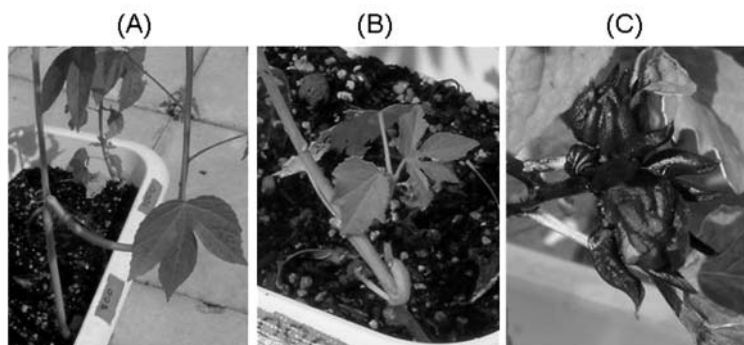


Fig. 5 Morphological abnormalities of kenaf (A and B) and roselle (C) following gamma-ray treatments of both seeds.

2週間以後は生育しなかった。

まとめ

本研究においてガンマ線照射によるケナフ発芽率及び生長の阻害が確認された。一方、ローゼルでは発芽率への影響はほとんど認められず、両者で放射線感受性が大きく異なることを見出した。Shomeはケナフ種子へのX線照射は発芽率低下を伴わないと報告しているが⁹⁾、我々の成績とは異なる内容であった。ゲル電気泳動試験においてもケナフでは種子及びスプラウトにてガンマ線照射によるDNA損傷が認められたが、ローゼルDNAでは顕著な変化は認められなかった。これらの成績より、発芽率及び生長阻害はDNA損傷と密接に関係しており、放射線感受性はDNA損傷と良好な相関性を示すと考えられた。

水分含量は様々な生物の放射線感受性に大きく影響する他¹¹⁾、クマムシの休眠期及び活動期における放射線耐性を変化させることが報告されている¹²⁾。本研究でもケナフ種子とスプラウトでIC₅₀値が大きく異なる成績を示し (Table 1), 根幹水分が放射線によるDNA損傷を軽減させたと推察される。一方、ローゼル種子重量はケナフ種子の約1.5倍であるが、含水率は非常に低く、放射線感受性差を説明するには不十分であると考えられる。

一般的に休眠中の種子が発芽や胚生長等へ移行する因子として水、酸素及び温度等が考えられる。本研究はいずれも同一条件にて暗所にて実施しており、これらの因子の影響は少ないと考えられる。本研究においてガンマ線照射は両植物の根部伸長を阻害しており (Fig. 3), 根幹を介した水分吸収力の低下が生長抑制に大きく寄与していると考えられる。

最後に、栽培試験においてガンマ線照射による形態学的異常や不稔性が高用量で認められたが、600Gy以下の照射群では両植物の種子を得ることができた。今後は次世代の影響について検討する予定である。これらの知見はケナフ類の放射線を用いた品種改良に有用な情報となりうると期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ケナフ及びローゼル

種子をご提供頂きましたユーエスエンジニアリング株式会社の坂本優蔵社長に深謝いたします。本研究の一部は平成20年度早稲田大学大学院異分野融合型PBL-自立創造的研究者養成研究助成金の支援を受けて行われたものである。

文 献

- 1) 梅田圭司．食品照射の実用化とその背景．*化学と生物*, **12**, p.532-538 (1974)．
- 2) Aldryhim, Y.N.; Adam, E.E. Efficacy of gamma irradiation against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.*, **35**, p.225-232 (1999)．
- 3) Bhaduri, P.N.; Shome, A. X-ray irradiation to dissected embryos of rice and their mutation spectrum. *Curr. Sci.*, **38**, p.297-298 (1969)．
- 4) Kusaba, M. Use of gamma-ray-induced mutations in the genome era in rice. *Gamma Field Symposia*, **44**, p.69-74 (2005)．
- 5) 稲垣 寛．ケナフ、環境と繊維資源植物として．*高分子*, **51**, p.597-602 (2002)．
- 6) 大西兼司 ほか．ケナフボードの開発とその経緯．*松下電工技報*, p. 58-63 (2003)．
- 7) Kitahara, T. et al. Development of kenaf board with sodium silicate and its bending strength. *J. Technol. Des.*, **13**, p.529-534 (2007)．
- 8) 細見和子 ほか．ケナフ乾燥粉末の食品への利用．*日本食生活学会誌*, **15**, p.54-60 (2004)．
- 9) Shome, A. X-ray irradiation of excised embryos of mesta. *Theor. Appl. Genet.*, **59**, p.11-15 (1981)．
- 10) Iriyama, Y. et al. Allelopathic activities among seeds of four hydrophytes. *J. Jpn. Soc. Reveget. Tech.*, **30**, p.169-174 (2004)．
- 11) Saito, T. Extremophile, The radioresistant mechanisms of the radioresistant bacteria. *Viva Origino*, **35**, p.85-92 (2007)．
- 12) Horikawa, D. et al. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, p.843-848 (2006)．

(2008年7月10日受理)