

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03839

研究課題名(和文) スギのオゾン耐性機構は極端現象にも有効に作用するか？

研究課題名(英文) Can high tolerance of *Cryptomeria japonica* to ozone function effectively to prolonged drought?

研究代表者

飛田 博順 (TOBITA, Hiroyuki)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：10353781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：スギのオゾン耐性機構の解明を目的として、スギ3系統を用いて野外でのオゾン暴露実験を行った。オゾン付加に対するモノテルペン生成量や抗酸化物質濃度の応答に系統間差が見られ、オゾン耐性機構に系統間差があることが明らかになった。オゾン暴露下での降雨遮断実験では、土壌乾燥による成長量の低下が、高オゾン下で緩和される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オゾン付加実験によりオゾン耐性機構の一つと考えられるモノテルペンの放出量にスギの系統間差があることを2本の論文により公表することができた。遺伝子情報の解析が進んでいる天然スギを材料に用いたことにより、これまで未確認であったオゾン付加によるストレス応答に関連する遺伝子発現の誘導を明らかにすることができた。本課題の成果は、将来の大気中のオゾン濃度変化に対するスギの成長反応を予測し、炭素固定量を予測する際に役立ち、農林水産省の地球温暖化対策に貢献する。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of elevated O₃ concentrations on photosynthesis, growth, monoterpene emission characteristics, activity of radical scavenging enzymes, the concentration of antioxidants, and gene expression of three major gene pools of *Cryptomeria japonica* clones in a free-air concentration enrichment system. The seedlings were exposed to ambient air (control) and elevated O₃ (double the control) for two growing seasons. Total plant biomass as well as biomass allocation to the roots exhibited no change by elevated O₃. The responses in monoterpene emission and the concentration of antioxidants to elevated O₃ showed significant difference among clones, seasons, and leaf ages. These results mean there are variations in tolerance mechanisms among three clones to elevated O₃. In the second experiment of O₃ exposure and drought by interception of rainfall, the suppression of growth in *C. japonica* seedlings by soil drought was suggested to be alleviated under elevated O₃.

研究分野：樹木生理

キーワード：対流圏オゾン 天然スギ バイオマス配分 モノテルペン 活性酸素消去系酵素活性 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オゾン濃度の上昇は光合成を阻害し、樹木の成長を抑制するため、対流圏オゾンの増加(Ashmore 2005)により森林のCO₂吸収量が抑えられ、温暖化がさらに加速する可能性が示唆されている(Sitch et al. 2007)。オゾンは葉の気孔を通して葉内に吸収された後、活性酸素となり細胞膜に障害を与える。気孔開度の調節機能がオゾンにより障害を受け、不活性化される(変化に対して鈍くなる)場合がある(Paoletti and Grulke 2010, Hoshika et al. 2015)。将来予測されている極端現象の一つの無降水期間の長期化により、樹木の受ける乾燥ストレスが激化する可能性がある。オゾン濃度上昇により生じる気孔の不活性化は、樹木の乾燥ストレスに対する応答と逆の反応となる可能性がある。コナラとミズナラの成長が、高CO₂環境下でオゾン付加により促進されるという興味深い結果が得られた(Kitao et al. 2015)。オゾン付加によりバイオマス配分が生じるメカニズムは未解明である。スギは、オゾンに対して強い耐性を持つ樹種として分類される(Yamaguchi et al. 2011)が、選抜育種された関東地域のスギ品種間でもオゾンに対する成長応答が大きく異なることが明らかとなった。しかし、そのメカニズムの理解までは至っていない。日本の天然スギの遺伝的背景は、日本海側を産地とするウラスギ系統、太平洋側を産地とするオモテスギ系統、屋久島を産地とする系統の大きく3つに分類されることが示された(Kimura et al. 2014)。遺伝的背景が異なる天然スギをオゾン付加実験の材料に用いることで、オゾン耐性に関わる発現遺伝子を特定することが可能となる。

2. 研究の目的

本課題では、スギのオゾン耐性機構を解明し、その機構が、極端現象の一つである無降水期間の長期化による乾燥に対しても有効に機能するのか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

遺伝的背景の異なる天然スギ(ウラスギ系統、オモテスギ系統、屋久島の系統)の中の典型的な産地の挿し木苗を材料に用い、野外で開放型オゾン暴露施設(写真1)を用いて、二つのオゾン付加実験を行う(実験1、2)。実験1では、オゾン処理のみを行い、オゾン付加に対する生理的応答と発現遺伝子の解析により、オゾン耐性に関わる発現遺伝子の探索を進める。実験2では、オゾン付加に加えて、極端現象の中の無降水期間の長期化を想定した降雨遮断による乾燥の複合処理を行い、実験1と併せてオゾン耐性機構の解明を行う。2つの実験を通じて、オゾン感受性の指標として気孔の反応を含む光合成応答と成長応答、オゾン耐性に関連する項目として、活性酸素消去系の発達と揮発性有機化合物の生成量を明らかにする。同時に発現遺伝子の解析を行うことで、オゾン耐性に関与する発現遺伝子を検出し、オゾンに対するスギの耐性機構を解明する。実験2で、高オゾン濃度環境下でのスギの乾燥応答を調べることで、オゾンに対する耐性機構が、乾燥ストレスに対してプラスに作用するのか、マイナスの効果を持つのか、それとも関連性は見られないのかを明らかにする。



写真1. 開放型オゾン暴露施設

初年度は、前年度から開放型オゾン暴露施設内に植栽し、オゾン付加処理を行っているスギ挿し木苗に、2年目のオゾン処理を行う(実験1)。当年生シュートを対象に、光合成機能、活性酸素消去系の酵素活性(スーパーオキシドデジスムターゼ(SOD)等)、抗酸化物質の濃度(アスコルビン酸)、揮発性有機化合物生成量(モノテルペン)の測定、および、発現遺伝子の解析を行う。以上のデータセットを用いて、トランスクリプトーム解析によりオゾン耐性に関与すると考えられる発現遺伝子候補を探索する。

次年度は、オゾン付加に加えて、極端現象の中の無降水期間の長期化を想定した降雨遮断による乾燥処理を行う(実験2)。前年度に、天然スギの各分類系統中の典型的なクローンを新たに選択し、挿し木苗を作成し、1年間育苗したものを材料に用いる。4月に開放型オゾン暴露施設内に植栽し、実験1と同様のオゾン付加処理を開始する。

最終年度は前年度に引き続き、高オゾン環境でスギ挿し木苗木を生育させ、8月に、極端現象の一つである無降水期間の長期化による乾燥ストレスをシミュレートするために、降雨遮断処理を約2ヶ月実施する。処理区は、コントロール区、乾燥区、オゾン区、オゾン+乾燥区の4つとなり、各処理3基設定する。処理後に開葉した葉に対して、実験1と同様の測定を実施する(実験2の2年目)。実験1と同様の測定を春から実施する。生育期間終了時には、苗木の全木掘り取り調査を行い、葉、枝、幹、根の乾物重量比を明らかにし、バイオマス配分の変化を調べる。

以上の2つの実験で得られたデータを総合し、オゾン耐性に関与する発現遺伝子を探索し、オゾンに対するスギの耐性機構を解明する。さらに、この耐性機構が、極端現象の一つである無降水期間の長期化による乾燥に対して有効に機能するのか解明する。

4. 研究成果

スギのオゾン耐性機構の解明を目的として、スギ3系統（ウラスギ系統（新潟県産のスギ、ドンデン562）、オモテスギ系統（静岡県産のスギ、河津8）、屋久島を産地とするスギ（屋久島4））の挿し木苗を開放型オゾン暴露施設内に植栽し、野外でのオゾン暴露実験を行った。

オゾン付加実験（実験1）の結果、光合成機能の指標である光飽和時の電子伝達速度は、屋久島4の苗の下部の1年生針葉と当年生針葉でのみ、オゾン処理により低下する傾向を示したが、顕著な低下ではなく、苗の上部の当年生針葉や他の系統では明瞭な差が見られなかった。根系を含めた成長量やバイオマス配分に対するオゾン付加の効果は3系統とも見られなかった（図1）。以上の結果から用いたスギ3系統のオゾン感受性が低い（耐性が高い）ことが明らかになった。

スギのオゾン耐性に関する要因として、揮発性有機化合物の生成量と活性酸素消去系の酵素活性と抗酸化物質の濃度を調べた。揮発性有機化合物の生成は、オゾンに対する耐性機構として作用する可能性が考えられている。スギはモノテルペンの生成量が多い樹種である。安定的な室内実験手法の開発により、モノテルペン放出特性の系統間の比較が可能になった。8月と1月に通気法によりスギ針葉のモノテルペン放出量を測定した結果、モノテルペン生成量の応答は季節間・系統間差を示し、オゾン区で夏季に屋久島4、冬季にウラスギ系統のドンデン562で増加した（図2）。オモテスギ系統の河津8では、モノテルペンの組成がオゾン付加により変化した。

針葉の活性酸素消去系の酵素活性（スーパーオキシドデジスムターゼ（SOD）活性）と抗酸化物質の濃度（アスコルビン酸濃度）の測定を、8月と11月の当年葉と一年葉に対して行った結果、オゾン付加に対する応答は系統間・葉齢間差を示した。針葉細胞における活性酸素種の消去に関わるSOD活性は、8月の当年葉のみでオゾン処理の効果を示し、ドンデン562と屋久島4でオゾンにより増加し、河津8で低下する傾向を示した。アスコルビン酸濃度は、11月にオゾン処理の効果が見られ、当年葉では3品種ともオゾンにより低下し、一年葉では屋久島4と河津8でオゾンにより低下する傾向を示した。還元型アスコルビン酸濃度の低下は、気孔から葉内に取り込まれたオゾンにより生成された活性酸素種の消去に利用されたことを意味する。ドンデン562は、オゾン処理の比較的初期の段階の当年葉でSOD活性を高め、その後、アスコルビン酸濃度を保持することによりオゾンに対する高い抵抗性を保つ可能性が示唆された。

以上の結果から、オゾン付加に対するモノテルペン生成量や抗酸化物質濃度の応答に系統間差が見られ、オゾン耐性機構に系統間差があることが明らかになった。さらに、オゾン耐性に関与する発現遺伝子の解析を行った。遺伝子発現については、当年生および一年生の針葉を採取しRNAを抽出してRNA-Seq法で解析した。オゾン付加により発現量が変化した遺伝子数は、当年生および一年生ともに8月下旬に多かった。オゾン付加により発現が変動する遺伝子は当年生針葉で196個で、そのうち121個の遺伝子の発現が誘導され、残りの75個の発現は抑制された。一年生針葉では、116個の遺伝子の発現が変動し、110個の遺伝子の発現が誘導された一方、6個の遺伝子の発現が抑制された。オゾン付加により発現が誘導された遺伝子は、ヒートショックタンパク質やシャペロンのようなストレス応答に関連するものであった（図3）。一方、オゾン付加により発現が抑制された遺伝子は、細胞壁の構築に関連するものであった。以上のようにストレス応答に関与する発現遺伝子数の多さがスギのオゾン耐性に寄与していることが明らかになった。

降雨遮断実験により高オゾン濃度環境下でのスギの3系統の乾燥応答を調べた（実験2）。8月から11月まで降雨遮断を行い、実験1同様、成長量、光合成機能、モノテルペン生成量等の測定、抗酸化物質と遺伝子発現測定のサンプリングを行った。乾燥処理がモノテルペン放出量に与える影響は不明瞭であった。アスコルビン酸濃度は、高濃度オゾン区で乾燥処理によって増加する傾向を示した。土壤乾燥により成長量が低下したが、高オゾン下での降雨遮断では成長量の低下が見られなかったことから（図4）、土壤乾燥による成長量の低下が、高オゾン下で緩和される可能性が示唆された。課題は終了するが、今後、引き続き発現遺伝子の解析を行う。

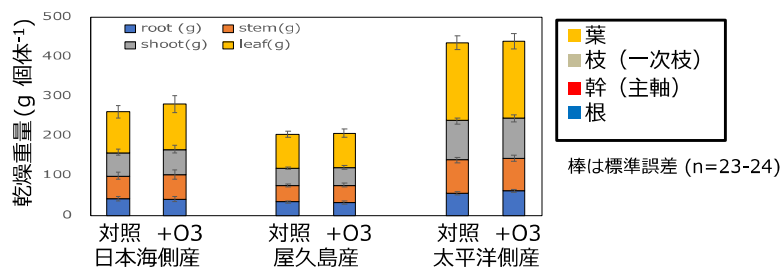


図1. 2年間のオゾン付加後のスギ植栽苗の個体重量と器官別重量

3系統ともオゾン付加による成長量の低下やバイオマス配分の変化は見られなかった

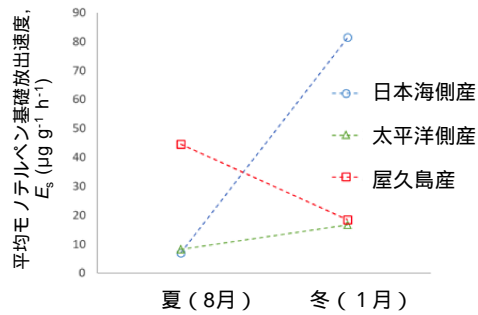


図2．オゾン付加によるモノテルペン放出量の季節変動特性とスギの系統の関係性を示す交互作用図。オゾン付加により日本海側産（ウラスギ系統）のスギは冬、屋久島産のスギは夏にモノテルペン放出量が大きく増加した。季節と産地の要因間に有意な相互作用が認められた（*： $p < 0.05$ ，分散分析）。

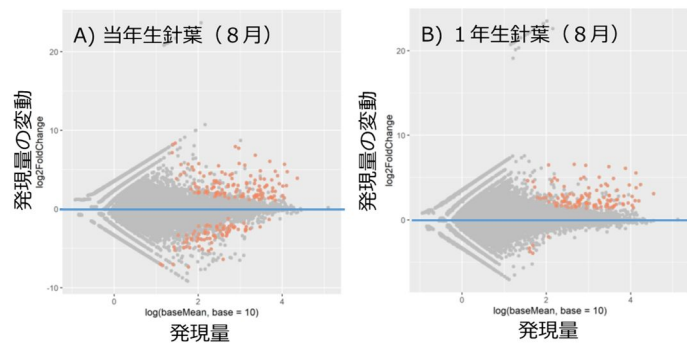


図3．オゾン付加によるスギ針葉の遺伝子発現の解析結果（MAプロット：各遺伝子の発現量と変動量のプロット）。橙色の遺伝子が発現変動遺伝子を表し、オゾン処理区で発現が誘導される遺伝子群は正の値を示す（水色のラインより上部に位置する）。オゾン付加により発現が変動する遺伝子は当年生針葉で196個が見いだされた（調整済 $p < 0.05$ ）。そのうち121個の遺伝子の発現が誘導され、残りの75個の発現は抑制された。一年生針葉では、116個の遺伝子の発現が変動し（調整済 $p < 0.05$ ）、110個の遺伝子の発現が誘導された一方、6個の遺伝子の発現が抑制された。

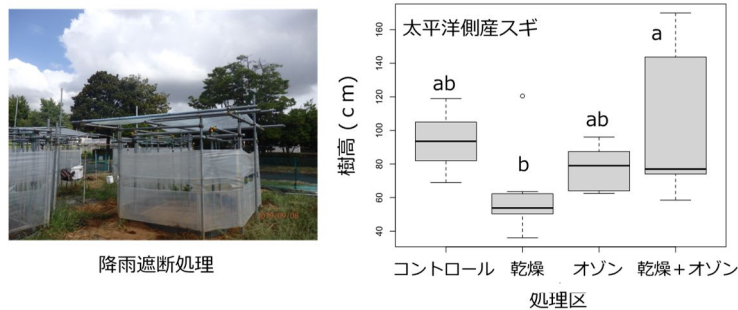


図4．降雨遮断の概況（左写真）とオゾン付加と降雨遮断処理（乾燥）がスギの樹高成長に及ぼす影響（右図：太平洋側産（オモテスギ系統）スギの結果）。乾燥処理とオゾン処理の間に交互効果が見られ（ $p = 0.003$ ）た。土壌乾燥により成長量が低下する傾向がみられたが、高オゾン下での降雨遮断では成長量の低下が見られなかったことから、高オゾン下では、土壌乾燥による成長量の低下が緩和される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyama Takafumi, Tobita Hiroyuki, Uchiyama Kentaro, Yazaki Kenichi, Ueno Saneyoshi, Saito Takami, Matsumoto Asako, Kitao Mitsutoshi, Izuta Takeshi	4. 巻 74(3)
2. 論文標題 Differences in monoterpene emission characteristics after ozone exposure based on the genetic structure of <i>Cryptomeria japonica</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural Meteorology	6. 最初と最後の頁 102-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2480/agrmet.D-17-00043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyama Takafumi, Tobita Hiroyuki, Uchiyama Kentaro, Yazaki Kenichi, Ueno Saneyoshi, Uemura Akira, Matsumoto Asako, Kitao Mitsutoshi, Izuta Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Seasonal changes in interclone variation following ozone exposure on three major gene pools: an analysis of <i>Cryptomeria japonica</i> clones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Atmosphere	6. 最初と最後の頁 643 ~ 643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/atmos10110643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 深山貴文、飛田博順
2. 発表標題 系統の異なるスギのモノテルペン放出特性
3. 学会等名 第129回日本森林学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深山貴文、飛田博順、内山憲太郎、矢崎健一、上野真義、齋藤隆実、松本麻子、北尾光俊、伊豆田猛(東京農工大)
2. 発表標題 遺伝子プールが異なるスギ3品種のモノテルペン放出特性への長期オゾン暴露影響の比較
3. 学会等名 日本農業気象学会2018年全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飛田博順、上野真義、深山貴文、伊豆田猛、矢崎健一、齋藤隆実、小笠真由美、内山憲太郎、松本麻子、北尾光俊
2. 発表標題 3産地のスギ挿し木苗の光合成活性とバイオマス配分に対するオゾン暴露の影響
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深山貴文、飛田博順、内山憲太郎、矢崎健一、上野真義、齋藤隆実、松本麻子、北尾光俊、伊豆田猛
2. 発表標題 スギの主要な遺伝子プールを代表する3クローンのオゾン暴露後のモノテルペン放出特性の違い
3. 学会等名 大気環境学会関東支部植物影響部会植物分科会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飛田博順、上野真義、深山貴文、伊豆田猛、矢崎健一、上村章、松本麻子、内山憲太郎、北尾光俊
2. 発表標題 高オゾン下における無降雨期間の長期化がスギの光合成・成長に及ぼす影響
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野真義、飛田博順、深山貴文、伊豆田猛、矢崎健一、内山憲太郎、松本麻子、北尾光俊
2. 発表標題 オゾン暴露スギ挿し木苗のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊豆田 猛 (IZUTA Takeshi) (20212946)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	矢崎 健一 (YAZAKI Kenichi) (30353890)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	深山 貴文 (MIYAMA Takafumi) (40353875)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	上野 真義 (UENO Saneyoshi) (40414479)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
連携研究者	内山 憲太郎 (UCHIYAMA Kentaro) (40501937)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
連携研究者	北尾 光俊 (KITAO Mitsutoshi) (60353661)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	