

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248030

研究課題名（和文）農作物の組織・細胞レベルにおけるオゾン防御機構の解明

研究課題名（英文）Protection mechanisms against ozone damages in crop species

研究代表者

小林和彦（KAZUHIKO KOBAYASHI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10354044

研究成果の概要(和文):地表オゾン濃度の上昇は、農作物生産に大きく影響すると予測される。本研究は、農作物のオゾン防御機構の解明により、影響の予測精度向上と影響緩和策の策定に資することを目的として行った。研究の結果、オゾンの影響程度が生育時期や品種で異なること、影響の違いが抗酸化物質と関連する場合のあること、その一方でオゾン自体よりもオゾンへの植物の応答で生じた余剰エネルギーや酸化性物質の影響が大きいことなどが分かった。

研究成果の概要(英文): It is projected that the increasing concentration of surface ozone will have large negative impacts on crop production. This study was conducted to elucidate protection mechanisms in crop species against ozone stress, and, thereby, to contribute to improved prediction of and mitigation options against the ozone impacts. The findings include difference in the ozone impacts between crop varieties and growth stages, the relationship between the ozone impacts and anti-oxidative substances in plant tissues. It was also found that the damage to the plant tissues could be due mostly to extra energy and oxidants resulted from the plant responses to ozone than the increased ozone per se.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	18,200,000	5,460,000	23,660,000
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2011年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
年度			
年度			
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業環境工学

キーワード：オゾン、イネ、コムギ、アポプラスト、光合成

1. 研究開始当初の背景

オゾンが農作物の光合成や成長に及ぼす影響を定量的に評価する際、植物の防御機構を明示的に考慮することはほとんど無い。影響評価の第一近似としてはやむを得ないが、品種間の差などを利用した影響緩和策の効果を評価するためには、防御機構の定量的な解

明が必要不可欠となっていた。オゾンに対する植物の防御機構としては、気孔の閉鎖、アポプラストにおける抗酸化活性、そして葉緑体をはじめとする細胞内の抗酸化作用が知られていた。

2. 研究の目的

本研究は、農作物に備わっているオゾン防御

機構を複数の角度から解明し、影響評価の精度向上と影響緩和策の策定に役立てようとして行ったものである。

3. 研究の方法

防御機構について、気孔の環境応答の基礎的メカニズム、オゾン濃度上昇への初期応答、光合成の応答、そして成長と収量の応答の4つに分けて、それぞれ解明を図った。

(1) 気孔の応答

ガス組成を制御し高湿度を保つことが可能なマイクロチェンバーを構築し、剥離表皮の気孔を顕微鏡で観察した。表皮を適切なイオン組成をもつ緩衝液を含むゲルに表皮を載せると長期にわたる観察が可能となった。剥離表皮をふたたび葉肉に載せること、剥離表皮と葉肉の間にポリエチレンやセロハンの薄膜を挟む事などが可能な実験系を構築した(図1)。



図1. ガス組成と湿度制御下で気孔開度を観察するシステムの全景

(2) オゾンに対する初期応答の解明

実験試料には、自然光温室で8週間栽培された、日本稲コシヒカリを用いた。オゾン曝露は人工気象室内で、150 ppb、6時間の条件で行なった。光強度は最上位展開葉あたりで400 μmol とした。その後、オゾン処理区とコントロール区からサンプリングした葉を用いて、qRT-PCRによる遺伝子発現の定量、DABを用いた生体内 H_2O_2 の検出、TBAを用いた過酸化脂質の定量、ウエスタンブロットによるタンパク質の定量を行なった。

(3) 光合成への影響

オゾン濃度計測制御装置を設置した温室内で、イネに対するオゾン処理(150 ppb)が、葉内のエネルギーバランスに及ぼす影響を、播種後8週目の個体を用いて調べた。3時間曝露、6時間曝露の曝露直後、および翌日に最上位展開葉において、光合成、気孔開度、クロロフィル蛍光を測定

し、実効量子収率、光合成・光呼吸で消費されたエネルギー量(J_e (光合成+光呼吸))、光化学系IIで変換されたエネルギー量($J_e(\text{PS II})$)を算出し、対照区(非曝露個体)と比較した。

(4) 成長と収量への影響

オゾン濃度計測制御装置を設置した温室内でイネに対してオゾン処理(150 ppb)を行った。用いた品種は、日本稲のコシヒカリと日本晴、インド稲のIR72とタカナリである。分けつ期、幼穂形成期、出穂期に連続6日間、毎日7時間オゾン曝露を行い、出穂期、収穫期に乾物重、収量(一株穂重)を測定し、対照区(非曝露区)と比較した。

コムギについては、中国のイネ-ムギ地帯に設置した開放系オゾン曝露実験施設にて、オゾン濃度を外気の1.5倍を目標として増加させた中で栽培し、収量応答を評価した。

4. 研究成果

(1) 気孔の応答

ツククサの剥離表皮を用いて、気孔の光と CO_2 への応答を調べた結果、葉肉がアポプラストの液相連絡を介して気孔の開閉に作用することが示唆された。今後はこのシグナルの特定が課題となる。ABA合成能力を欠くタバコの変異体を乾燥条件にさらしても、気孔の開鎖がみられず、葉肉コンダクタンスも低下しなかったが、この変異体にABAを与えると、気孔が開鎖し、葉肉コンダクタンスも低下した。従って、ABAが葉肉コンダクタンスの制御にも関与しているものと考えられる。今後は、アポプラストのpHの影響などを調べる。

(2) 初期応答の解明

各細胞内小器官における、SOD(超酸化物不均化酵素)の遺伝子の発現量を定量した。SODは、強力な酸化力を持つ O_2^- を比較的弱い酸化力を持つ H_2O_2 に変える酵素であり、細胞質、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシソームなど、様々な器官に存在する。図2は、コントロール区に対するオゾン処理区の発現量の値を相対値で示したものである。

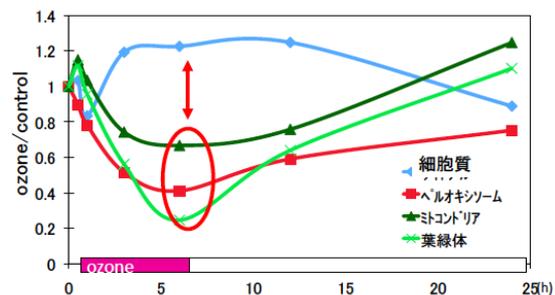


図2. SOD 遺伝子発現量の時間経過

細胞質では発現量の減少が見られないのに対し、ペルオキシソーム、葉緑体、ミトコンドリアではオゾンによっていずれも有意な発現量の減少が見られた。これらのことから、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシソームで H_2O_2 が発生しており、それがSODの発現量を減少させていると推測される。

次に、 H_2O_2 の発生を実際に確かめるために、DAB (diaminobenzidine)を用いて葉の H_2O_2 の組織化学的検出を行なった。その結果、オゾン曝露前と比べて曝露後のサンプルでは赤褐色の色素の沈着が見られた。これは、 H_2O_2 の発生を意味している。先ほどのSODの結果も考えると、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシソームで発生した H_2O_2 が細胞質に拡散し、それが検出されたものと考えられる。

さらに、細胞膜に与えるダメージとして、脂質の過酸化を定量したところ、過酸化脂質の値がオゾン曝露終了後に増加していた。従って、脂質過酸化の原因がオゾンそのものではなく、細胞内の代謝の変化に由来すると考えることができる。脂質の過酸化はヒドロキシルラジカルによって開始するとされているが、ヒドロキシルラジカルは H_2O_2 から生成する。おそらく、オゾンによって発生した H_2O_2 からヒドロキシルラジカルが生成し、それが脂質を過酸化したのと考えられる。

(3) 光合成への影響

植物体内に侵入したオゾンにより、第一に光化学系に障害が発生するが、光化学系は回復が早く、曝露翌日以降に障害は生じなかった。次に障害が発生するのが炭酸固定系で、曝露翌日以降にルビスコ（炭酸固定・酸化酵素）活性が低下した。光化学系、炭酸固定系で障害の発生時期に差があることから、曝露翌日に余剰エネルギーが増加し、様々な消去系や活性酸素除去酵素が働くにも関わらず、活性酸素種が生成され、障害を発生させると考えられる。

曝露終了後に発生する余剰エネルギー由来の活性酸素種生成量は、オゾン曝露中に植物体内に侵入したオゾン由来の活性酸素種生成量よりも多いと考えられ、一過性のオゾン濃度上昇であっても、オゾン曝露終了後も持続してオゾン障害が発生し、葉や個体に大きな影響を与えると考えられる。

(4) 生長と収量への影響

イネの個体光合成は、オゾン曝露によって低下するが生育ステージが早いほどその影響が大きかった。またどの水稻品種とも、幼穂形成期はオゾンによるバイオマスや収量への影響を受けやすく、その影響が大きいこと

が示唆された。さらに収量減少程度には品種間で差があることも示された。

コムギにおいては、オゾン曝露によって葉の老化が早まること、それには品種間で明らかな差があることが分かった。収量については、品種間でオゾン応答に有意差は認められなかったが、収量応答の最大の要因である1粒重の低下にはあきらかな品種間差があり、それが葉の老化の品種間差と一致していたことから、品種によって収量応答に違いがあると考えられた。この品種間差が、アポプラストのアスコルビン酸含量と関連することも示された。

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 10 件)

- ① Feng Z, Tang H, Uddling J, Plaijel H, Kobayashi K, Zhu J, Oue H, Guo W. A stomatal ozone flux-response relationship to assess ozone-induced yield loss of winter wheat in subtropical China. *Environmental Pollution*, 164, 16-23, 2012. 査読有. DOI:10.1016/j.envpol.2012.01.014
- ② Tang H, Liu G, Han Y, Zhu J, Kobayashi K. A system for free-air ozone concentration elevation with rice and wheat: control performance and ozone exposure regime. *Atmospheric Environment* 45, 6276-6282, 2011. 査読有. DOI:10.1016/j.atmosenv.2011.08.059.
- ③ Okajima Y, Taneda H, Noguchi K, Terashima I. Optimum leaf size predicted by the leaf energy balance model incorporating dependencies of photosynthesis to light and temperature. *Ecological Research*, 27, 333-346. 2012. 査読有. DOI 10.1007/s11284-011-0905-5
- ④ Wang Y, Noguchi K, Terashima I. Photosynthesis-dependent and -independent responses of stomata to blue, red and green monochromatic lights: Differences between the normally oriented and inverted leaves of sunflower. *Plant and Cell Physiology*, 52, 479-489. 2011. 査読有. DOI 10.1093/pcp/pcr005
- ⑤ Feng Z, Pang J, Kobayashi K, Zhu J, Ort

DR. Differential responses in two varieties of winter wheat to elevated ozone concentration under fully open-air field conditions. *Global Change Biology*, 17, 580-591. 2011. 査読有 DOI

10.1111/j.1365-2486.2010.02184.x

- ⑥ Feng Z, Pang J, Nouchi I, Kobayashi K, Yamakawa T, Zhu J. Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environmental Pollution*, 158, 3539-3545. 2011. 査読有. DOI 10.1016/j.envpol.2010.08.019

[学会発表] (計 26 件)

- ① 藤田貴志, 野口航, 寺島一郎. 葉肉アポプラスト液が気孔の CO₂ 応答に及ぼす影響. 日本植物生理学会年会, 京都産業大学 (京都府) 2012 年 3 月 16-18 日.
- ② 溝上祐介, 野口航, 寺島一郎. 蒸散流の pH と ABA 濃度の変化が葉肉コンダクタンスに与える影響. 日本植物生理学会年会, 京都産業大学 (京都府) 2012 年 3 月 16-18 日.
- ③ 藤田貴志, 野口航, 寺島一郎. 気孔開度制御に関わる葉肉シグナルの生成に葉肉組織の光合成は必須か? -新規の気孔観察システム-. 日本植物生理学会第 52 回大会(仙台)2011 年 3 月 20 日~22 日.
- ④ 加藤由希子, 上原直子, 山川隆, 小林和彦, 佐々木治人. オゾン曝露がイネ葉エネルギーバランスに及ぼす影響. 日本農業気象学会2011年全国大会, 鹿児島大学農学部 (鹿児島県) 2011年3月17日
- ⑤ 市岡敦子, 岩間真智子, 上原直子, 山川隆, 佐々木治人, 小林和彦. 時期別のオゾン曝露が水稲の生長, 収量と光合成に及ぼす影響. 日本作物学会第230回講演会, 2010年9月4日, 北海道大学農学部.
- ⑥ 植田佳明, 石川小百合, 上原直子, 佐々木治人, 小林和彦, 山川隆. オゾンストレスによりイネ葉中で誘導される遺伝子の発現解析. 第28回日本植物細胞分子生物学会大会, 東北大学農学部 (宮城県) 2010年9月3日.
- ⑦ 小林和彦. Increasing surface ozone is likely to have from substantial to

devastating impacts on crop production in East Asia. ABC-Impacts workshop. アジア工科大学 (バンコク) 2009年7月6日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林和彦 (KAZUHIKO KOBAYASHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 10354044

(2) 研究分担者

寺島一郎 (ICHIRO TERASHIMA)
東京大学・理学系研究科・教授
研究者番号: 40211388
山川隆 (TAKASHI YAMAKAWA)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 20134520
佐々木治人 (HARUTO SASAKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 60225886

(3) 連携研究者

()
研究者番号: