

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11673

研究課題名(和文) オゾン適応戦略としての植物の環境応答機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the environmental response mechanism of plants as an ozone adaptation strategy

研究代表者

青野 光子 (AONO, MITSUKO)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・副研究センター長

研究者番号：10202491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの完全長cDNA過剰発現系統からオゾン耐性系統を単離し、フィトシアニンの一種であるタンパク質Xがオゾン耐性の原因となっていることを見出した。このX過剰発現体の気孔コンダクタンスは、オゾン非存在下では野生型と同様だったが、野生型でみられるオゾンによる気孔の閉鎖は、X過剰発現体ではみられなかった。X過剰発現体では、気孔の閉鎖と葉の細胞死という2つのオゾンによる反応が抑制されている可能性がある。XとGFPの融合タンパク質を有する遺伝子組換え植物を作出し解析したところ、Xがアポプラストに存在していることが示され、Xの細胞壁代謝やストレス応答のシグナル伝達への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オゾンは光化学オキシダントの主成分であり、森林衰退や農作物被害の原因となっている。気候変動による気温の上昇等に伴い、今後地球規模で対流圏のオゾン濃度が上昇すると考えられ、特に大都市近郊における影響拡大が懸念されている。一方、植物は過酷な環境にも適応して生き延びるため環境応答機構を進化させてきた。これまでの研究により、植物がオゾンに適応するための環境応答機構(オゾン耐性機構)がある程度明らかになってきた。本研究課題では、シロイヌナズナ突然変異系統を用いてオゾン耐性機構に関与する新たな遺伝子を見出し、植物の高オゾン濃度への適応戦略として実際に機能している機構の一端を明らかにすることを目指した。

研究成果の概要(英文)：We isolated an ozone-tolerant plant from the Full-length cDNA overexpressor lines of *Arabidopsis thaliana*. This line contains a cDNA encoding a protein X that is a member of the phytocyanin group. We confirmed that X is responsible for the ozone tolerance by separately generating transgenic plants that overexpress this cDNA. The stomatal conductance of the X-overexpressing plant was similar to that of the wild-type plant in the absence of ozone, but the ozone-induced reduction in stomatal conductance observable in the wild-type plant was not observed in the X-overexpressing plant. Therefore, both of the two ozone-induced responses, stomatal closure and foliar cell death, can be suppressed in the X-overexpressing plant. Generations and analyses of transgenic plants that produce the fusion protein of X and a green-fluorescent protein indicate that X exists at the apoplastic region of plant cells where X may regulate cell-wall metabolism or a signaling involved in the stress response.

研究分野：植物の環境応答に関する植物生理学、分子生物学

キーワード：オゾン シロイヌナズナ 植物環境応答 環境適応戦略

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国での大気汚染ガスとしてのオゾンの社会的な認知度は高いとは言えないが、オゾンの主成分とする光化学オキシダントの環境基準(1時間値 0.06 ppm 以下)達成率は 2011 年から 2015 年の平均で 0.2%と極めて低く、未解決かつ重大な環境問題であることは論をまたない。オゾンは光化学反応によって生成するため、気温が高く日射が強い夏季に高濃度になる。今後起こりうる気候変動による気温の上昇等に伴い、対流圏のオゾン濃度は上昇すると考えられている (Giles 2005)。

(2) オゾンによる植物への急性影響は、例えば高感受性アサガオ品種では日最高値が約 0.08 ppm 以上で可視障害がみられる。一方、オゾンの慢性影響の指標として AOT40 (0.04 ppm を超えるオゾン濃度となった時間の積算値)がある。欧州では、ヨーロッパブナ (*Fagus sylvatica* L.) の成長を 10%低下させる AOT40 に基づき、森林生態系保護のためのオゾンのクリティカルレベルとして約 10 ppm・h が提案されている。また、我が国に生育する樹木に対するオゾンのクリティカルレベルは、AOT40 が 8~21 ppm・h の間にあることが指摘されている (伊豆田ら 2001)。

(3) 関東地方では、大都市(東京)近郊でオゾンによる植物への被害がみられ、特に神奈川県、埼玉県の間東山地ではブナ (*Fagus crenata* Blume) 林への影響が懸念されている。関東山地南部の神奈川県の丹沢山地では、既にブナ林が衰退しており、その一因にオゾンがあることが示唆されている。神奈川県の 2002 年から 2014 年までの断続的な調査では、丹沢山地犬越路におけるブナ成長期(4~9月)の AOT40 は 9~37 ppm・h と報告されている (武田ら 2016)。一方、関東山地の北部の埼玉県の秩父山地では、まだ衰退の兆候は観察されていないが、東京大学秩父演習林本作業所でのオゾン濃度計測によるとブナ成長期の AOT40 は 7~15 ppm・h となっており、オゾンの影響が懸念される (三輪 2017)。

(4) 一方、植物のオゾン耐性機構は、主にモデル植物において分子生物学的な手法を用いて明らかにされつつある。ブナ等の非モデル植物にも適用できる重要な知見が得られているものの、植物のオゾン適応戦略全容の理解、また環境影響評価への利用という観点からも、植物のオゾン耐性機構は十分に解明されたとは言えない状況である。

2. 研究の目的

オゾンは光化学オキシダントの主成分であり、森林衰退や農作物被害の原因となっている。気候変動による気温の上昇等に伴い、今後地球規模で対流圏のオゾン濃度が上昇すると考えられ、我が国では特に大都市近郊における影響拡大が懸念されている。一方、植物は過酷な環境にも適応して生き延びるため環境応答機構を進化させてきた。これまでモデル植物のシロイヌナズナ等を用いた研究により、オゾンに適応するための環境応答機構(オゾン耐性機構)がある程度明らかになってきた。本研究課題では、シロイヌナズナ突然変異系統を用いてオゾン耐性機構に関与する新たな遺伝子を見出し、当該機構のより深い理解を目指すとともに、植物の高オゾン濃度への適応戦略として実際に機能している機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) オゾン耐性シロイヌナズナ突然変異系統の解析を行い、オゾン耐性に関与する遺伝子を見出してその構造と機能を調べた。シロイヌナズナ Col-0 の完全長 cDNA 過剰発現系統(FOX 系統、理研 PSC の植物ゲノムプロジェクトによって開発され、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC から提供された)の種子、約 3,000 粒に由来するシロイヌナズナ植物の 2 週齢の実生を 420 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD の光照射下で 0.3ppm オゾンに 3 時間暴露し、翌日、葉の可視障害の程度でオゾン感受性を調べた。単離されたオゾン耐性植物から種子を得、1 系統のオゾン耐性候補系統を選抜した。この候補系統に導入された cDNA の塩基配列を決定して、この cDNA に対応する遺伝子 X を同定した。

(2) 戻し交配により突然変異系統を純化して確立した(オゾン耐性 FOX 系統)。35S プロモーター下流で遺伝子 X を過剰発現するシロイヌナズナ Col-0 および Ws-2 を新たに複数系統作成し、2 週齢の実生をオゾン暴露して、各系統の遺伝子 X の相対発現量とオゾン耐性を調べ、それらの相関の有無を明らかにした。また、オゾン耐性 FOX 系統における生理学的変化(オゾンによる気孔コンダクタンスの変化)についても調査した。オゾン耐性 FOX 系統と対照の植物を短日条件下(8 時間明期(100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD)、16 時間暗期)で 5 週間栽培し、リーフポロメーターによる気孔コンダクタンス測定に十分な大きさの葉を得た。この条件でのオゾン耐性の確認を行った上で、連続光(420 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD)照射下で 0.3 ppm オゾン暴露中及び新鮮空気中の気孔コンダクタンスを測定した。

(3) 遺伝子 X の産物であるタンパク質 X の細胞内局在を推定するために、遺伝子 X の N 末端分泌シグナルの下流に緑色蛍光タンパク質(GFP)を挿入したコンストラクトをシロイヌナズナ Col-0 に導入し、オゾン耐性遺伝子組換え植物を得た(GFP-X 系統)。この植物の葉組織を高浸透圧溶液で処理後、原形質分離した細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

- (1) オゾン耐性シロイヌナズナ突然変異系統に導入された cDNA に対応する遺伝子 X は、シロイヌナズナのフィトシアニンググループのメンバーであることが分かった。
- (2) オゾン耐性 FOX 系統、新規作成した遺伝子 X 過剰発現系統、及び野生型において、遺伝子 X の相対発現量が多い系統のみがオゾン耐性となっていることを確認した。これにより、遺伝子 X の産物であるタンパク質 X がオゾン耐性の原因となっていることが示唆された。また、オゾン耐性 FOX 系統では気孔のオゾン応答が野生型とは異なっていることが示された (図 1)。野生型ではオゾン暴露開始後 6 時間以降に気孔コンダクタンスの顕著な低下がみられたが、オゾン耐性 FOX 系統ではオゾンによる気孔コンダクタンスの有意な低下はみられなかった。

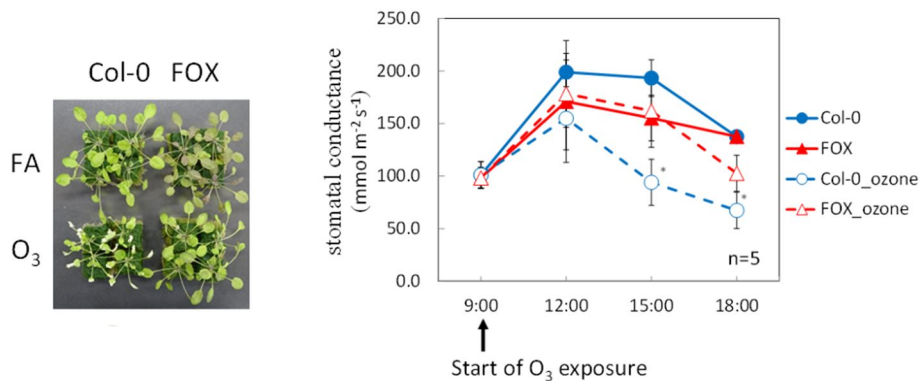


図 1 オゾン耐性 FOX 系統の気孔のオゾン応答。
 (a) オゾン耐性 FOX 系統 (FOX) と野生型 (Col-0) のオゾン暴露による可視障害。
 FA: 新鮮空気、O₃: 0.3ppm オゾン暴露。
 (b) オゾン暴露中のオゾン耐性 FOX 系統と野生型の気孔コンダクタンスの変化。
 *: P < 0.05

- (3) タンパク質 X の細胞内局在を調べるため、GFP-X 系統の原形質分離した葉肉細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、アポプラストマトリックスで蛍光が観察された (図 2)。

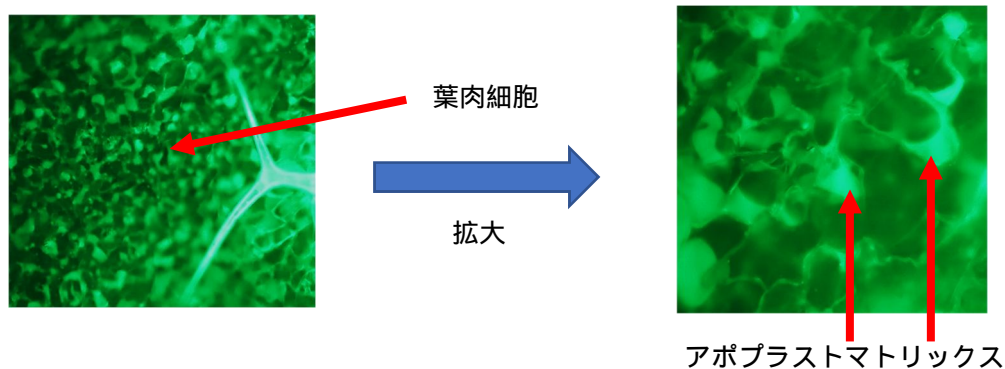


図 2 GFP-X 系統の原形質分離した葉肉細胞の蛍光観察画像。

- (4) オゾンは気孔を介して植物に吸収され、葉の細胞のアポプラスト液に溶解する。オゾン耐性 FOX 系統では、タンパク質 X がアポプラストに存在することから、X の機能として細胞壁代謝やストレス応答のシグナル伝達への関与が示唆され、オゾン暴露時における植物の反応である葉肉細胞の細胞死と気孔の閉鎖が抑制されている可能性が示された。

< 引用文献 >

Giles J. (2005) Hikes in surface ozone could suffocate crops. Nature 435:7
 伊豆田猛, 松村秀幸, 河野吉久, 清水英幸 (2001) 樹木に対するオゾンの影響に関する実験的研究. 大気環境学会誌, 36:60-77
 三輪誠 (2017) 埼玉県奥秩父における大気通オゾン濃度の測定と植物に対するオゾン影響. 第 58 回大気環境学会年会, 同講演要旨集, 419
 武田麻由子, 十河孝夫, 北見丘, 美濃口薫 (2016) 犬越路におけるオゾン濃度の経年変化及びブナ生育への影響評価. 神自環保セ報, 14:27-32

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐治章子, 佐治光, 小野公代, 小野道之, 中嶋信美, 井上智美, 青野光子
2. 発表標題 植物にオゾン耐性を付与する新規遺伝子の解析
3. 学会等名 第60回大気環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saji S., Saji H., Sage-Ono K., Ono M., Nakajima N., Inoue T., Aono M.
2. 発表標題 Analyses of a novel gene that enhances ozone tolerance of plants
3. 学会等名 The 61th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐治章子, 佐治光, 小野公代, 小野道之, 中嶋信美, 井上智美, 青野光子
2. 発表標題 植物にオゾン耐性を付与する新規遺伝子の解析 (2)
3. 学会等名 第61回大気環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saji S., Saji H., Sage-Ono K., Ono M., Nakajima N., Inoue T., Aono M.
2. 発表標題 Enhancement of ozone tolerance by overexpression of a gene encoding a phytocyanin in Arabidopsis.
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2021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	佐治 光 (SAJI HIKARU) (00178683)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・シニア研究員 (82101)	

	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 協力者	佐治 章子 (SAJI SHOKO)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------