

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510036

研究課題名(和文) オゾン応答遺伝子を用いた植物のオゾンストレス診断手法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for ozone-stress diagnosis in plant using ozone responsive genes

研究代表者

青野 光子 (Aono, Mitsuko)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号：10202491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：わが国では多くの大気汚染問題が改善されてきたが、光化学オキシダント(オゾン)については、逆に汚染の高濃度化、広域化が進んでおり、人間の健康はもとより、森林や農作物など植物への深刻な悪影響が強く懸念されている。植物が生育環境中のオゾンによって受ける影響を正確かつ迅速・簡便に把握するためのストレス診断手法の開発を目的とした。植物においてオゾンに反応して発現する遺伝子の情報を得て、実際の野外に生育している植物の影響評価に利用可能な、分子的機構に裏付けられしかも比較的安価に実施できる手法の確立を目指した。

研究成果の概要(英文)：Most of problems in air pollutants have been dissolved in Japan; however, only photochemical oxidant (ozone) remains as the pollutant with higher density in wider area. Its serious harmful effects on the plant including the forest and farm products are strongly concerned about, as well as human health. The objective of this study was development of a method for stress diagnosis by which the effect of ambient ozone on plants can correctly, speedily and easily be grasped. The establishment of a relatively inexpensive method underpinned by the molecular mechanism was aimed for the application in assessment of field-grown plants by obtaining the information of ozone-responsive gene expression in plants.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：オゾン ストレス診断 植物 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 光化学オキシダントの主成分であるオゾンは強い酸化力を持ち、人間や動植物に健康被害をもたらす。オゾンは森林衰退や農作物の減産の原因となるのみならず、植物の生産性低下による CO<sub>2</sub> の蓄積で間接的に地球温暖化の原因ともなることが示唆されていることから、単に地域に限定的な大気汚染ガスとしてだけではなく、地球規模の気候変動にも関わる、人類の生存基盤に対する深刻な脅威であると言える。

(2) 植物では、実際に野外で発生している程度の地上オゾン濃度で葉の傷害、光合成や生長の障害、老化促進等が起きる。オゾンは、都市域や周辺部の農作物の収量低下や、山岳地域の森林衰退の原因になっていることが強く懸念され、将来的に野生植物の生存に影響を与え、生態系の健全性を脅かす環境因子の一つとなると憂慮されるが、問題の深刻性にも関わらずわが国での社会的関心は高くない。植物に対するオゾンの脅威についての社会的な認識を深めるためには、オゾン濃度の機器による測定・監視にとどまらず、オゾンにより植物に引き起こされるストレスの実態調査を行ない、説得力の高いデータを得ることが急務である。

(3) 植物のオゾン応答の分子機構については、モデル植物のシロイヌナズナやタバコ・イネ等を中心として、我々を含め国内外でこれまでに多くの研究がある。オゾン暴露時の遺伝子発現解析や遺伝子組換え植物、オゾン感受性突然変異体を用いた研究により、オゾン応答の分子機構には、生体に有毒な活性酸素分子種の除去に関連する機構と、病原菌感染応答とも共通するプログラム細胞死に関連する機構、及び気孔の開閉に関わる機構があることが分かってきた。また、これらの機構が働くために、エチレン、サリチル酸、ジャスモン酸等の植物ホルモンを介した情報伝達が関与していることも明らかになってきた。多くのオゾン応答遺伝子も報告され、研究代表者を含む研究グループにより、その発現様式を用いたストレス診断のための予備的な研究も行われてきたが、ほとんどがモデル植物を用いた制御された環境条件下での実験レベルにとどまっている。

(4) 一方、野外の植物のオゾンによる被害実態については、国内外で農作物の被害や森林の衰退について多くの報告があるが、被害の調査には主として生長量測定や可視害の観察等の手法が用いられ、調査に年数を要する、原因の判断が難しい等の大きな問題点がある。

(5) そこで、実際のオゾンの植物影響に関する信頼性の高いデータを従来よりも短期間で得るために、これまでに得られてきたモ

デル植物を用いたオゾンに対する分子的応答機構の解析の成果を取り入れ、現実に野外でオゾン被害が出ている植物種を用いて、可視害の有無に関わらず、正確で迅速なオゾンストレス診断手法を開発するという着想に至った。また、遺伝子発現解析を簡便で比較的安価に行える手法を確立することが普及のためには重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

オゾン高感受性のアサガオやオゾンによる衰退が示唆されているブナ等の植物を用い、オゾン暴露時に特異的に発現する遺伝子や、オゾン濃度や暴露期間等といったオゾン暴露の強度と遺伝子発現量が相関する遺伝子等、野外でのオゾンストレス診断に用いるのに適切なオゾン応答遺伝子群を明らかにし、遺伝子発現パターンを用いてオゾンによる影響を受けていることを示す定性的な評価手法、及び遺伝子の発現量をオゾンによる影響の定量的な指標として用いた評価手法を開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) アサガオ、ブナにおいて、オゾンストレスのマーカーの候補となるオゾン応答遺伝子を選定し、それらの遺伝子の発現の調査を行なった。野外環境中で生育する上記植物種におけるオゾンストレス診断に最適なマーカー遺伝子を決定し、それらを用いた遺伝子発現によるオゾンストレス診断手法の開発を目指した。具体的には、野外環境中で生育する植物から RNA を調整し、逆転写 PCR によってマーカー遺伝子の発現の程度を調べることで、どのような遺伝子がどの程度発現しているかという情報を得て、植物がオゾンストレスを受けているかどうかの評価、及び受けている場合はその程度を評価する手法を開発した。特に、逆転写 PCR では、電気泳動画像のフリーソフトによる解析を用い、比較的安価に実施できる PCR 産物の定量方法を検討した。

(2) アサガオ (品種スカーレットオハラ) を温室内で約 1 か月生育させ、暴露チャンバー内で 6 時間までオゾン暴露 (濃度 200ppb) を行って葉を採取し、試料とした。オゾン濃度は我が国の環境中で測定される最高濃度と同程度の濃度とした。対照のアサガオは、オゾン暴露以外の条件は同様であるチャンバー内に静置し、オゾン暴露の経過時間と合わせて試料を採取した。試料から抽出した RNA を用いて逆転写反応を行い、ストレスマーカーの候補となる、オゾン応答性が他の植物で報告されている等の候補遺伝子の特異プライマーを用いて PCR を行なった。用いた遺伝子は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ 1 種類、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸合成酵素 2 種類、グルタチオン S-トランスフェラーゼ 12 種類、デヒドロアス

コルビン酸レダクターゼ2種類、スーパーオキシドジスムターゼ2種類、乾燥応答配列結合因子2種類であった。それぞれの遺伝子発現量をPCR産物の電気泳動により半定量的に評価した。その結果、当該品種のアサガオにおいてオゾンに应答して発現が上昇する遺伝子4種類が選定された。

(3) アサガオを毎年概ね5月中旬から8月末まで野外で生育させた。生育場所近傍のオゾン濃度の情報も記録した。6月頃、オゾン濃度が低い時期に、オゾンによる可視障害が出現する前の葉(IT: Intact) 7、8月にオゾン濃度が上昇し、オゾンによる可視障害が出現した直後(通常、概ね70ppb以上になった日の翌日)の葉(IJ: Injured) 及びその際に被害が出現しなかった葉(U: Uninjured) を採集し、試料とした。試料から抽出したRNAを用いて逆転写反応を行った後、(2)で選定した4種類のオゾン応答遺伝子、及び対照となるアクチンの各遺伝子の特異プライマーを用いてPCRを行い、それぞれの遺伝子発現を調べた。PCR産物を電気泳動した後、画像解析ソフトImage Jによる発現量の数値化を行い、アクチンに対する他の遺伝子の相対発現量の値を得た。

(4) ブナの2種類の生態型(日本海側型、太平洋側型)の実生(苗高およそ50cm)を用い、暴露チャンバー内で24時間までオゾン暴露(濃度200ppb)を行って葉を採取し、試料とした。対照の実生はオゾン暴露以外の条件は同様であるチャンバー内に静置し、オゾン暴露の経過時間と合わせて試料を採取した。また、野外に生育しているブナの葉も採取し、試料とした。試料から抽出したRNAを用いて逆転写反応を行った後、先行研究においてオゾン応答性が示唆された2種類のオゾン応答遺伝子、及び対照となる伸長因子(ELF)の各遺伝子の特異プライマーを用いてPCRを行い、それぞれの遺伝子発現を調べた。アサガオと同様にELFに対する他の遺伝子の相対発現量の値を得た。

#### 4. 研究成果

(1) アサガオにおける4種類の遺伝子の相対発現量と野外での葉の被害状況(3.(3)参照)との関係を調査年、生育場所ごとにまとめてみると、ITでの発現が低い一方、U、IJでの発現が高い傾向を示す遺伝子が3種類見出された。2種類(遺伝子3、4)は調査年や生育場所により発現誘導に変動があったが、1種類(遺伝子1)は調査年、生育場所によらず、特にUでの発現が有意に高く、遺伝子発現によるアサガオのオゾンストレス診断の有効性が示された。遺伝子1では、UよりもIJにおいて相対発現量が低い場合があったが、これはオゾン被害、すなわち葉の細胞死や組織の壊死の影響により、遺伝子発現が却って抑制されたと推察された。

また、遺伝子1のIT、Uにおける相対発現量と生育場所のオゾン濃度(試料採取直前の72時間の最高値)には、有意な正の相関( $P < 0.01$ )がみられたことから、遺伝子1の発現量を用いた定量的なストレス診断の可能性が示された。一方、4種類の遺伝子のうち1種類(遺伝子2)では、オゾン暴露チャンバーを用いた実験の結果とは異なり、野外においてはオゾンによる明確な発現誘導はみられなかった。この遺伝子や、オゾンによる発現誘導に調査年等の条件によるばらつきがみられた他の2種類の遺伝子では、野外におけるストレス診断に用いるにはオゾン以外の要因(虫害、乾燥等)も考慮する必要があると考えられた。

(2) 2011年に、3か所の生育場所において、高濃度オゾンが発生した翌日(ある特定の1日)に採取したアサガオ試料(U、IJ)を用い、4種類のオゾン応答遺伝子を用いてストレス診断を行った。3.(3)のとおりITはU、IJに先立って別途採取した。生育場所に関わらず、(1)の遺伝子1の相対発現量はUで高く、葉の受けたオゾンストレスが遺伝子1の発現量によって示された。1か所の例を図1に示す。

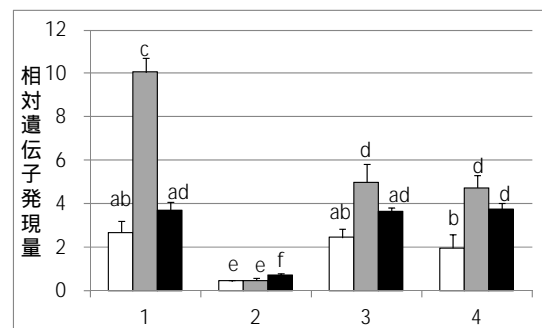


図1 野外アサガオ試料におけるオゾン応答遺伝子のアクチンに対する相対発現量。1から4、本文中に記載の遺伝子の番号。白、IT; 灰色、U; 黒、IJ。各々3試料のIT、U、IJを用いた。垂直線はSE。異なるアルファベットは有意差を示す( $P < 0.05$ )。

(3) ブナでは、チャンバー内でのオゾン暴露による発現誘導が本手法で確認できる遺伝子1種類が見出された。この遺伝子の発現誘導は2種類の生態型でみられたが、日本海側型でより顕著である傾向があった。また、この遺伝子は野外で生育したブナ(太平洋側型)から採取した試料でも発現が確認されたが、オゾンによる被害状況との関連は精査中である。

(4) 暴露チャンバー内でオゾン暴露した植物におけるオゾン応答遺伝子の発現解析と合わせ、野外で生育した植物から採取した試料の遺伝子発現解析を行い、野外におけるオ

ゾンストレスのマーカーとなりうる遺伝子を見出してオゾンストレスを評価した。主としてアサガオでストレス診断を行う手法を開発した。半定量的な逆転写 PCR と簡便な画像解析による比較的安価で容易な手法であるが、マーカー遺伝子を増やすことによる植物種の拡大とストレスのより定量的な評価が今後の課題である。

(5) ストレスの種類によりマーカーとなる遺伝子を適切に選定することで、この手法を用いた影響評価をオゾン以外のストレスの診断にも広く展開できると考えられる。その際、植物の環境応答の分子機構の知見に裏打ちされ、ストレス応答性が報告されている遺伝子でも、植物種によって、また実際の野外条件においてストレスマーカーとなり得るかどうかの調査が非常に重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

青野 光子、三輪 誠、岡崎 淳、小松 宏昭、武田 麻由子、岡村 祐里子、山神 真紀子、須田 隆一、古川 誠、渡邊 稔、玉置 雅紀、中嶋 信美、久保 明弘、佐治 光 (2013.9.18、新潟市) 植物に対する低線量環境放射線の影響 第 54 回大気環境学会年会、同講演要旨集、252

青野 光子、三輪 誠、岡崎 淳、武田 麻由子、小松 宏昭、久保 明弘、佐治 光 (2012.11.19、さいたま市) 植物のオゾン被害とストレス診断 アサガオで知る大気汚染、自然系調査研究機関連絡会議 第 15 回 平成 24 年度調査研究・活動事例発表会、同プログラム・講演要旨集

青野 光子、三輪 誠、岡崎 淳、武田 麻由子、小松 宏昭、山神 真紀子、中島 寛則、岡村 祐里子、須田 隆一、中村 朋史、古川 誠、柳沼 圭吾、渡邊 稔、横山 仁、久保 明弘、佐治 光 (2012.9.12、横浜市) 遺伝子発現による植物のストレス診断はどこまで出来るか? 第 53 回大気環境学会年会、同講演要旨集、277

青野 光子、岡崎 淳、三輪 誠、武田 麻由子、小松 宏昭、上野 千恵、山神 真紀子、中島 寛則、岡村 祐里子、福田 拓、中村 朋史、須田 隆一、光武 隆久、横山 仁、久保 明弘、佐治 光 (2012.6.30、静岡市) 植物のオゾン被害とストレス診断に関する研究 アサガオで知る大気汚染 . 大気環境学会植物分科会講演会 大気環境と植物 - 植物に迫る気候変動と大気汚染の脅威 -、同予稿集、36

青野 光子、岡崎 淳、三輪 誠、武田 麻

由子、小松 宏昭、上野 千恵、山神 真紀子、中島 寛則、福田 拓、中村 朋史、須田 隆一、光武 隆久、横山 仁、久保 明弘、佐治 光 (2011.9.14、長崎市) 植物のオゾン被害とストレス診断に関する研究 . 第 52 回大気環境学会年会、同講演要旨集、340

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青野 光子 (AONO, Mitsuko)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号：10202491