

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340033

研究課題名(和文)植物のオゾン応答における光呼吸の役割の解明

研究課題名(英文)Clarification of role of photorespiration in plant response to ozone

研究代表者

佐治 光(SAJI, Hikaru)

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・上級主席研究員

研究者番号：00178683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物のオゾン応答機構についての知見を得るため、単離したシロイヌナズナのオゾン感受性突然変異体の遺伝生理学的解析を行った。その結果、この突然変異体のオゾン感受性の原因となった遺伝子は光呼吸系酵素グリコール酸オキシダーゼをコードしており、この酵素の活性低下がオゾン感受性の原因であることが確認できた。この突然変異体は二酸化硫黄や長期的強光処理に対しても高感受性であり、他の光呼吸系酵素を欠損する突然変異体2系統もオゾン感受性を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to get information on the mechanism of plant tolerance to ozone, we carried out genetic and physiological analyses on the isolated Arabidopsis ozone-sensitive mutant. We obtained results that the gene responsible for the mutant's ozone sensitivity encodes a photorespiratory enzyme, glycolate oxidase, and the ozone sensitivity was due to the reduced enzyme activity. This mutant also exhibited high sensitivity against sulfur dioxide and a long-term high-intensity light. Two mutant lines that have defects in other photorespiratory enzymes also exhibited high ozone sensitivities. These results suggest that intact photorespiratory flow is necessary for the plant tolerance to ozone as well as other stress factors.

研究分野：植物生理学

キーワード：オゾン 光呼吸 遺伝子 シロイヌナズナ グリコール酸オキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

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、現在大気中に存在する化学物質としては最も広範囲で大きな影響を農業や生態系にもたらしているものの一つである。オゾンは植物体内に取り込まれると活性酸素(ROS)を生じ、ROSは種々の生体物質を酸化・失活させるとともにシグナル伝達や遺伝子発現にも影響を及ぼし、光合成や生長を抑制したり、クロロシス(白斑)やネクロシス(壊死)といった可視障害を葉に引き起こしたりする。オゾンの濃度はアジア地域等で増加傾向にあり、今後その影響も増加すると予想されている(Giles 2005)。いっぽう植物にはオゾンやROSに対する様々な応答・耐性機構が備わっていて、おそらくその程度の違いによりオゾン感受性に植物種・系統間差が存在する。したがって、オゾンによる障害の仕組みや植物の応答・耐性機構を解明し、その対策を講じることが将来の食糧確保や環境保全上非常に重要な課題となっている。

植物のオゾンに対する応答・耐性機構を解明するために、モデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のオゾン感受性突然変異体が、我々やその他の研究グループにより単離・解析されてきた。これらの突然変異体は原因遺伝子の機能に基づき3つのグループ(1. 気孔開度の調節機能に欠陥があるもの(Saji et al. 2008)、2. 抗酸化系に欠陥があるもの(Conklin et al. 1999)、3. 情報伝達系が変化したもの(Overmyer et al. 2000))に分類される。

このような状況下において、今回、我々が単離したオゾン感受性突然変異体のなかに、光呼吸系酵素に原因があるものが見つかった。光呼吸は、細胞内の還元的エネルギーの過剰蓄積の解消によりストレスを緩和する機能があるとされているが、それをはっきりと示す実験結果はまだ少ない。本変異体の解析により、まだ知られていないオゾン応答機構が発見できる可能性があり、植物の酸化的ストレス反応の新たな機構の解明につながることを期待された。

2. 研究の目的

単離した光呼吸系に欠損のあるシロイヌナズナの突然変異体等の解析により、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- オゾン処理または非処理下の突然変異体と野生型植物の間で、光呼吸系酵素や基質の量にどのような違いがみられるか?
- オゾン処理または非処理下の突然変異体および野生型植物における光合成や気孔開度にどのような違いがみられるか?
- オゾン感受性突然変異体はオゾン以外の酸化的ストレス因子に対しても感受性を示すか?
- 他の光呼吸系突然変異体はオゾン感受性を示すか?

3. 研究の方法

(1) 本突然変異体がオゾン感受性になっている原因を明らかにするため、突然変異体と野生型植物についてオゾン処理または非処理下の光呼吸系酵素の活性や基質量等を調べ、突然変異体と野生型の間で比較した。

(2) 突然変異体のオゾン応答に関わる光呼吸以外の反応についての知見を得るため、光合成や気孔開度等の性状についてオゾン処理後継時的に測定し、突然変異体と野生型植物の間で比較した。またオゾン感受性突然変異体のオゾン以外のストレス因子に対する感受性を明らかにするために、突然変異体および野生型植物を二酸化硫黄や強光で処理し、可視障害の程度等により感受性を比較した。

(3) 本突然変異体がオゾン感受性になっている原因についてさらに手掛かりを得るため、本突然変異体以外の光呼吸系突然変異体の種子を入手し、それらのオゾン感受性を調べた。

4. 研究成果

(1) 植物材料となる突然変異体は、T-DNA タギング系統群より、オゾン(0.2 ppm)処理により葉の可視障害が野生型よりも顕著に現れるものをスクリーニングすることにより得た。分子生物学的解析により、本突然変異体では光呼吸系酵素グリコール酸オキシダーゼ(GOX)の2つのアイソザイムに対応する遺伝子(*GOX1*と*GOX2*)が破壊されていることがわかり、この突然変異体を *gox1&2* と名付けた。この突然変異体では、*GOX1*、*GOX2* 遺伝子の発現がともに検出限界以下に、また葉のGOX活性は野生型の約60%のレベルに低下していた。

また、光呼吸は高濃度の二酸化炭素存在下で低下することが知られているので、高濃度(0.1%)二酸化炭素存在下でオゾン処理を行ったところ、予想通り *gox1&2* 突然変異体に生じる障害がかなり軽減されることが確認された。

gox1&2 突然変異体では、GOXの基質であるグリコール酸の増加とグリオキシル酸等の代謝産物の減少が予想されることから、それらの含量を測定したところ、葉におけるグリコール酸及びグリオキシル酸の含量は、ともに処理開始時点ですでに野生型よりも高く、強光下に移すことによりさらに増加した。これらの物質の増加はオゾンの有無にあまり影響されなかったことから、これらの代謝産物の蓄積のみが障害の原因になっているわけではないことが示唆された。

(2) *gox1&2* 突然変異体は、弱光下(100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で0.2 ppmのオゾン処理を行っても可視障害が現れないが、強光下(350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)でオゾン処理を行うと葉に顕著なクロロシスが生じる。クロロフィル蛍光計により光化学系の量子収率

(Y())を測定した結果、Y()値は、弱光下でオゾン処理した *gox1&2* 変異体で、処理後 4 時間目に少し低下したが、6 時間目には回復が見られた。いっぽう強光下では、オゾンが無い状態でも *gox1&2* 変異体の Y()値は 2 時間目に低下し、その後もほぼその値が維持された。それにオゾンが加わると、Y()値はさらに低下し 6 時間目には全く検出されなくなった。いっぽう野生型の植物では、光強度やオゾンの有無に関係なく、Y()値の低下は全く見られなかった。したがって、*gox1&2* 変異体では、弱光下から強光下に移されることにより、光合成電子伝達系に何らかのストレスが生じるが、可視障害に至るほどではない。しかしその状態でオゾンと接触すると強いストレスを生じ、組織破壊に至ることがわかった。

gox1&2 変異体は、オゾンのみならず二酸化硫黄や長期間の強光処理に対しても高い感受性を示したが、気孔の大きさ、密度、開度等は野生型と同様であった。

(3) *gox1&2* 以外の光呼吸系突然変異体として、グルタミン酸：グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼの破壊株 *ggat1-1* とヒドロキシピルビン酸レダクターゼの破壊株 *hpr1* の種子を、其々味の素(株)とドイツのロストック大学より入手した。*gox1&2* は弱光下 ($100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で野生型と同様に生育したのに対し、*ggat1-1* と *hpr1* の生育はそれらと比べて悪く、体のサイズが小さかった。これらの植物を 0.2 ppm のオゾンで処理した結果、*gox1&2* と *hpr1* の葉には顕著なクロロシスが現れたのに対し、*ggat1-1* では葉のごく一部にクロロシスが観察されたにすぎず、野生型ではまったく可視障害がみられなかった。葉からのイオンリーク量においても、*gox1&2*、*hpr1*、*ggat1-1* の順に高いオゾン感受性を示した。したがって、光呼吸の全体的フローがオゾン耐性に重要であるが、それ以外にも感受性に作用するものが光呼吸系に存在する可能性が示唆された。

<引用文献>

Conklin, P.L., Norris, S.R., Wheeler, G.L., Williams, E.H., Smirnov, N., Last, R.L. (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *PNAS* 96, 4198-4203.
Giles, J. (2005) Hikes in surface ozone could suffocate crops. *Nature* 435, 7.
Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H. Jr., Kangasjärvi, J. (2000) The ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in

regulating superoxide-dependant cell death. *Plant Cell*. 12, 1849-1862.
Saji, S., Bathula, S., Kubo, A., Tamaoki, M., Kanna, M., Aono, M., Nakajima, N., Nakaji, T., Takeda, T., Asayama, M., Saji, H. (2008) Disruption of a gene encoding C₄-dicarboxylate transporter-like protein increases ozone sensitivity through deregulation of the stomatal response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 49, 2-10.

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1件)

S. Saji, S. Bathula, A. Kubo, M. Tamaoki, M. Aono, T. Sano, K. Tobe, S. Timm, H. Bauwe, N. Nakajima, H. Saji (2017) Ozone-sensitive *Arabidopsis* mutants with deficiencies in photorespiratory enzymes. *Plant Cell Physiol*. 58, 914-924、査読有 DOI:10.1093/pcp/pcp027

[学会発表](計5件)

佐治光, 佐治章子, Bathula S., 久保明弘, 玉置雅紀, 青野光子, 佐野友春, 戸部和夫, 中嶋信美, シロイヌナズナ光呼吸系欠損突然変異体のオゾン応答, 第57回大気環境学会年会, 2016年9月8日, 北海道大学工学部C棟(北海道・札幌市)
S. Saji, S. Bathula, A. Kubo, M. Tamaoki, M. Aono, T. Sano, K. Tobe, N. Nakajima, H. Saji, Isolation and characterization of an ozone-sensitive *Arabidopsis* mutant with deficiencies in glycolate oxidases, The 1st Asian Air Pollution Workshop, 2015年10月31日, 東京大学農学部7号館B棟(東京都)

佐治光, 佐治章子, Bathula S., 久保明弘, 玉置雅紀, 青野光子, 佐野友春, 戸部和夫, 中嶋信美, オゾン感受性を示すシロイヌナズナの光呼吸系突然変異体の性質, 第56回大気環境学会年会, 2015年9月15日, 早稲田大学西早稲田キャンパス52号館(東京都)

Saji S., Bathula S., Kubo A., Tamaoki M., Aono M., Sano T., Tobe K., Nakajima N., Saji H., An ozone-sensitive *Arabidopsis* mutant with deficiencies in glycolate oxidases, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16日, 東京農業大学世田谷キャンパス1号館(東京都)

佐治光, 佐治章子, Bathula S., 久保明弘, 玉置雅紀, 青野光子, 戸部和夫, 中

嶋信美，植物のオゾン耐性における光呼吸の関与，第 55 回大気環境学会年会，2014 年 9 月 17 日，愛媛大学城北キャンパス共通教育棟（愛媛県・松山市）

6．研究組織

(1)研究代表者

佐治 光 (SAJI, Hikaru)

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・上級主席研究員

研究者番号：00178683