NIES RESEARCH BOOKLET



December 2017

## 五月月 月 月

国立環境研究所の研究情報誌







## 環境儀

国立環境研究所の研究情報誌



一般的にはあまり知られていませんが、光化学オキシダント(光化学スモッグ)の主成分であるオゾンは、ヒトを含む生物に対する毒性が高く、植物に対しても、農作物の生育被害や森林衰退の原因になっています。今後予想されるグローバルな人口増加に対する食糧確保や気候変動下での環境保全にとって、オゾンの植物に及ぼす影響とそのメカニズムの解明はたいへん重要な研究課題です。

国立環境研究所では、設立以来約40年に渡ってこの 課題に取り組み、様々な施設や手法を用いて研究してきました。初期の生理・生化学的研究から得られた知見を基に、オゾンによる活性酸素生成やその作用による障害の仮説を提案し、遺伝子レベルで検証しました。また、オゾンによる障害に植物ホルモンの一つであるエチレンが関与していることに注目し、遺伝子組換えによりオゾンに強い植物を開発することにも成功しました。さらに、今世紀初めから急速に進展してきたモデル植物の網羅的な遺伝子分析から得られた知見を利用した分子遺伝学的研究により、植物のオゾン応答に関与する遺伝子について新たな知見を次々と明らかにしてきました。

本号ではこれらの遺伝子レベルの研究を紹介し、その 有効性や難しさ、おもしろさなどをお伝えします。

## CONTENTS

## 遺伝子から植物のストレスにせまる

オゾンに対する植物の応答機構の解明

- 研究をめぐって植物のオゾン応答研究の動向 --- p12 ~ 13
- 国立環境研究所における 「オゾン等大気汚染物質に対する 植物の応答に関与する遺伝子と その機能に関する研究」のあゆみ ------ p14

# nterview 研究者に聞く



生物・生態系環境研究センター上級主席研究員 佐治 光



同(環境ストレス機構研究室) 室長 青野光子

# オゾンが 植物に及ぼす 影響を 明らかにする

## 遺伝子レベルの研究に取り組む

Q:研究を始めたきっかけは何ですか。

佐治: 私は1985年に入所してからずっと植物のオゾン障害についての研究を続けています。国立環境研究所では大気汚染物質を研究してきましたが、その一環としてオゾンの研究に力をいれることになり、担当することになったのがきっかけです。ちょうど遺伝子の研究が盛んになりはじめたころで、研究所でも遺伝子レベルの研究に取り組むことになり、青野さんや久保明弘さん(故人)にも加わってもらいました。

中嶋:遺伝子レベルの研究をするためには遺伝子組換えをした植物をつくることになります。そこで私や玉置さんは、遺伝子操作をした植物の安全性評価を中心に研究を進めてきました。

Q:オゾンは植物にどんな影響を与えるのですか。

青野:オゾンは光化学スモッグの原因である光化学オキシダントの主成分で、排気ガス中の窒素酸化物など

## コラム● 対流圏オゾンの増加─良いオゾンと悪いオゾン─

地球をとりまく大気は複数の層から成り、地上から高度約15kmまでの層を対流圏、その上の約50kmまでの層を成層圏と呼びます。成層圏で太陽からの紫外線(波長240nm以下)が酸素に吸収されて発生するオゾン層は生物にとって有害な紫外線(波長240-315nm)を吸収する働きがあることから、私たちが生きていくために必要な「良い」オゾンといえます。一方、対流圏で発生するオゾンは、生物にダメージを与える「悪い」オゾンです。このように、同じオゾンでも、存在する高度により、良いものと悪いものの二面性を持っているのです(図1A)。

対流圏でオゾンが発生する仕組みは、工場や車から出る 二酸化窒素に紫外線が当たると一酸化窒素と酸素原子に分 解され、この酸素原子が酸素分子に結合して、酸素原子3 個からなるオゾンができると考えられています。さらに、 ここに炭化水素があると、過酸化ラジカルが生成します。 すると、もう1つの生成物である一酸化窒素が酸化されて 二酸化窒素になる反応が進むため、これに紫外線が当たると最初に述べた反応が起こります。このように二酸化窒素、炭化水素、紫外線の間で反応が繰り返されることにより、オゾンが爆発的に生成し続けることになります(図1B)。

オゾンを含む光化学オキシダントは、濃度が短時間で変化するため、その濃度の表し方として1時間ごとの平均値(1時間値)が用いられます。光化学オキシダントの環境基準は1時間値が0.06 ppm以下であることと定められていますが、達成率は平成27年度で0%と極めて低い状況です。1日で最も高かった1時間値の年平均値は、全国で観測の始まった1976年から1980年頃にかけていったん低下したものの増加に転じ、その後もゆっくりと増加し続けています(図1C)。その原因は完全に明らかになっていませんが、アジア大陸からの越境汚染の影響が原因の1つとして考えられています。詳しくは環境儀第33号「越境大気汚染の日本への影響」を参照ください。

オゾンというと成層圏で太陽からの有害な紫外線を防いでくれるオゾン層が思い浮かぶかもしれません。 実は、私たちの身近な対流圏(地表付近)では、自動車の排気ガスなどからオゾンがつくられ、光化学スモッグの原因物質になっています。地表付近のオゾンは、人に対して有害なばかりでなく、植物にも悪影響を及ぼします。生物・生態系環境研究センターの佐治光さん、青野光子さん、中嶋信美さん、福島支部の玉置雅紀さんは、オゾンにより植物に生じる障害について長年研究しています。

に紫外線があたると光化学反応で生成します。オゾンは有害物質で、植物にも悪影響を与えます。たとえば、アサガオやサトイモの葉の表面に斑点が出ているのを見たことはありませんか。それはオゾンの影響によるものが多いです。オゾンなどの大気汚染物質の濃度が低ければ植物は耐性があるのですが、濃度が高くなると植物自身に障害が生じ、葉が枯れたり、落ちたりします。

## 光化学オキシダントの問題は 解決していない

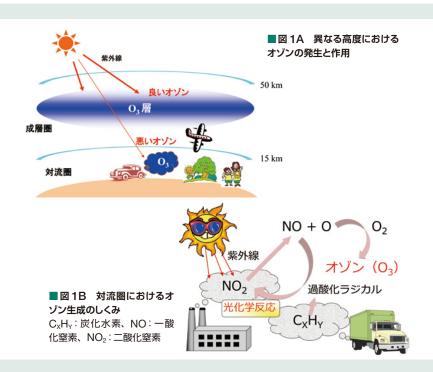
Q:大気中のオゾンの濃度は増加しているのですか。 青野:アジア諸国では特に大都市周辺地域でオゾン濃度が増加しています。日本では埼玉県など東京の郊外で大気中のオゾン濃度が高く、光化学スモッグ注意報がよく出されています。ただ、都心ではオゾン濃度はそれほど高くありません。大気中に反応する物質がた

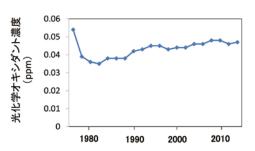


同(環境ゲノム科学研究推進室) 室長 中嶋信美



福島支部(環境影響評価研究室) 主席研究員 玉置雅紀





■図1C 日本の光化学オキシダント(昼間の日最高1時間値)の年平均値の推移

環境省、平成26年度大気汚染状況について(一般環境大気測定局、自動車排出ガス測定局の測定結果報告)に記載されたデータのうち、一般環境大気測定局1,189局で測定された濃度の平均値を表示。オゾンの濃度は時期や場所によって変動が大きく、それぞれの観測地点において1年間のうち1度でも高い濃度が観測されると基準を達成していないことになるのに対して、図1Cの結果は全ての地点と日々の観測値(最高値)の平均を示しています。

くさんあるのでオゾンはこわれてしまうようです。また九州では、黄砂などと同様に、大陸からの大気汚染物質の越境移動によってオゾンなど光化学オキシダントの濃度が高くなっています。これまで、排気ガス中の窒素酸化物を減らせば光化学オキシダントが減るとして対策がとられてきましたが、実際にはそうではありませんでした。大気中の揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds: VOC)などとの反応が、考えられていた以上に重要だったようです。

玉置:1970年代に光化学スモッグが深刻化し、その後沈静化しましたが、オゾンはずっと問題だったのです。いまだに解決していません。

Q:植物にオゾンの影響が出ているのでしょうか。

青野:関東では影響が出ています。あまり気が付かれていないのですが、たとえばアサガオなどの葉の斑点はあちらこちらで見られます。また、高濃度のオゾンはホウレンソウやサトイモなどの農作物に被害を与えています。

玉置:オゾンの影響でコメの収量が減ることが報告されています。葉に障害が出て光合成ができなくなるのが原因と考えられていましたが、私たちの研究で別のメカニズムが見つかりました。品種により差はあるのですが、「ハバタキ」というイネの品種では、オゾンの濃度を高くすると穂の枝分かれが少なくなったのです。枝分かれに関する遺伝子の働きがオゾンによって抑えられ、穂の枝分かれが減少した結果、もみの数が減って、収量が減ることがわかりました。

Q:それは食糧の供給に大きな影響を及ぼすのではないですか。



玉置:はい。オゾンによる影響で、今後20年で最大穀物の収量が20%減ると予測している研究もありますから、オゾンに耐性のある品種を開発することが必要です。また、温暖化の影響として知られるコメの白化もメカニズムは違いますが、オゾンにより起きることがわかってきています。解決する方法を考えなくてはいけません。

## オゾン耐性作物を作る

Q: どのように研究を進めてきましたか。

佐治: まずはモニタリング調査や暴露実験により、オゾンによる障害は急性のものと慢性のものがあることがわかりました。高濃度のオゾンに短期間さらされると葉が白くなるなど急性可視障害が起こり、低濃度で長期間さらされると慢性的な成長阻害が発生します。また、植物の種類によってオゾンに対する耐性が異なります。さらに、植物に目に見える変化がなくても、遺伝子レベルでは変化が起きていました。これまでの研究を振り返ると、1990年代から2000年代の前半では、オゾン耐性に関わる遺伝子を見つけ、それを植物に導入して遺伝子組換え体を作りました。オゾンによる障害には反応性の高い活性酸素や植物ホルモンで

## コラム② 植物のオゾン障害

オゾンにより植物に生じる障害には、大きく2種類のものがあります(図2)。一つは急性障害と呼ばれ、敏感な植物が高濃度(たとえば0.1ppmくらい)のオゾンと短期間(2、3時間くらい)接触したときに生じ、葉に白色や褐色の病斑(可視障害)が現れます。このような部位では細胞が死滅し、クロロフィル(葉緑素)は分解されています。もう一つは慢性障害で、可視障害が生じるよりも低い濃度のオゾンと長期間(2、3日間から数カ月間)接触することで生じ、成長が遅れたり老化が進んだりします。

これらの障害が蓄積することにより、最終的には農作物の収量や品質が低下したり、樹木が立ち枯れたりすると考えられます。また、これらの障害の生じやすさには周囲の環境条件がいろいろな影響を及ぼし、特に光の強さが大きく影響することがわかっています。



■図2 植物のオゾン障害の種類



あるエチレンが関わっていることが示唆されていたの で、それらの反応に関する遺伝子を見つけ、遺伝子組 換えによってオゾンに強い植物を作ろうとしました。

**青野**:植物が大気汚染物質など、環境ストレスを受け たときには、細胞内で活性酸素が発生します。この活 性酸素が障害の原因になるので、植物は活性酸素を消 去する「活性酸素消去系」、つまり有毒な活性酸素を 抗酸化酵素などによって無毒化する反応経路をもって います。そこで、まず活性酸素消去系の酵素の遺伝子 を探しました。さらにその遺伝子を導入して大気汚染 ガスの1つである二酸化硫黄に対して耐性を示す遺伝 子組換え植物を作りました。しかし、この遺伝子組換 え植物はオゾンには強くありませんでした。

中嶋:オゾン耐性の植物としては、植物ホルモンのエ チレンの生成を抑えた遺伝子組換え植物を作りまし た。エチレンはオゾン障害を促進することから、その 生成を抑えればオゾン障害を減らせると予想されまし た。実際にそのような遺伝子組換え植物を作ったとこ ろ、予想通りオゾンに強くなることがわかりました。

中嶋:遺伝子組換え作物は生物多様性に影響を与える

Q:オゾン耐性植物は実用化されたのですか。

ことが懸念されており、実験施設外には出せません。

安全性評価など実用化するまでにはたくさんのステッ プがあり難しいですね。他の研究所でもオゾン耐性ポ プラなどの開発例はありますが、やはり野外に植える までには至っていません。

## さらにメカニズム解明をめざす

Q:2000年代後半ではどんな研究をしましたか。

佐治:2000年代に入るとゲノム解析が進みました。 モデル植物の突然変異体を作り、そこから耐性に関わ る遺伝子を見つけることが可能になったので、オゾン 耐性メカニズムの解明を進めています。オゾン障害の 出やすいシロイヌナズナから気孔開閉やシグナル伝達 に関わる遺伝子の変異が見つかりました。

青野: モデル植物とは、実験に向いたタバコやトマト、 シロイヌナズナなどの植物です。遺伝子組換え実験が しやすい、ゲノムのサイズが小さいなどの特徴があり ます。

Q:オゾン障害に気孔が関わるのですか。

玉置:植物は葉の裏に多くある気孔を閉じることでオ ゾンの取り込みを防ごうとするのです。気孔の開閉を 制御することで有害物の取り込みを避けるという植物 がもつ生体防御機構です。

**青野**:植物は人間や他の動物と違って動くことができ ないので、環境が悪くなっても逃げることができませ ん。そのためいろいろな生体防御機構が発達したので しょう。ある種の遺伝子が変異すると、気孔は開きっ ぱなしになり、オゾンのほかにも二酸化硫黄の影響を 受けたり、乾燥に弱くなったりしてしまいます。

佐治:見つかった遺伝子から合成されるタンパク質は

## コラム❸ 生物環境調節実験施設(バイオトロン)

私たちの研究活動を支えるのが、大型施設である生物環 境調節実験施設(通称:バイオトロン)です。実験植物を栽 培するための環境制御可能な材料提供温室、環境要因と植 物の反応の相互関係を研究するための処理試験室(チャン バー)、一般実験室、低温室などからなる施設で、建物南 側の1、2階が材料提供温室、3階は自然光型チャンバーと なっています(図3)。チャンバーではオゾンなどの大気汚 染ガス暴露や高濃度CO₂処理が可能で、自然光型が4基、 人工光型は大気汚染ガス暴露タイプ3基と、それより小型 の乾燥・CO。暴露タイプ6基があります。オゾン暴露がで きるチャンバーは国内では他に数ヵ所しかなく、1975年 の建設以来、大事にメンテナンスして使っています。オゾ ンに対する植物の応答機構の解明に関する研究の他、マン グローブ植物の環境適応機能の解明に関する研究なども行 われており、私たちの研究に欠かせない施設です。



■図3 バイオトロン外観

細胞膜にあり、植物が刺激を受けて気孔を閉じる際に活性化されるトランスポーターの一種でした。この発見をきっかけに、気孔開閉のしくみの研究も大きく進みました。さらに気孔からオゾンを吸収すると、植物体内では活性酸素がつくられます。活性酸素は反応性の高い酸素でオゾンもその一種です。オゾンが取り込まれると、体内では様々な種類の活性酸素が作られ、オゾン障害に関わることが示されました。

## オゾンで細胞死が誘導される

Q:ほかにもオゾン障害の機構がわかりましたか。 佐治:さきほど中嶋さんが話されたように、植物がオゾンを取り込むとエチレンが発生し、障害を促します。そのときにエチレン合成を誘導する因子が見つかりました。それ以外にも、遺伝子の発現の変化によってオゾンに応答して情報を伝達する物質が次々に明らかになってきました。つまり、気孔からオゾンを吸収すると、植物体内で活性酸素が発生し、そのことにより細胞内に情報が伝達され(シグナル伝達)、細胞死が引き起こされるのです。その結果、葉に斑点ができます。このような遺伝子の発現の変化は他のストレスでも誘導され、これは植物が病原体に感染したときに誘導されるものとよく似ていました。そこで、可視障害は環境ストレスに対応して誘導される遺伝的にプログラムされた細胞死によるものと、考えられています。

中嶋:動物細胞でいうアポトーシスに似ています。

青野: 植物は葉や枝がなくなっても生きていけるので、細胞死が起こるのかもしれません。また、活性酸素は毒物というよりはシグナルとして作用していると



いう考えが主流になっています。

Q:環境ストレスに応答して植物の細胞死が誘導される理由は考えられていますか。

佐治: 2つの理由が考えられます。1つは病原体に感染したと間違って過剰に反応してしまうという説。もう1つは、ストレスの原因が何であれ、植物はある程度の強さまでのストレスに耐えようとしますが、耐えきれなくなると自ら死ぬことにより、それ以上ストレスの原因となるものを取り込まなくするという説です。私たちも、どちらの説が正しいのか検証しようとしています。

最近、光が強いとオゾン障害が起こりやすいことと 関連して、「光呼吸」と呼ばれる代謝系がオゾン応答 に関わることを明らかにしました。この代謝系が阻害 されると、葉緑体の中で活性酸素が発生します。これ と同時に、オゾンによって細胞内の別の場所で活性酸 素が発生すると、細胞死を引き起こす力が強くなるこ とがわかりました。

青野: オゾンがなくても、光が強ければ植物にとっては有害です。そこで植物は光が当たったときに発生する活性酸素を消去するシステムを持つことで、光のストレスを防御しています。進化の過程で獲得したこのシステムをオゾンにも使っているのでしょう。

## コラム モデル植物を利用した分子遺伝学的研究

シロイヌナズナやイネのようなモデル植物において、ゲ ノム解析が進展するとともにそれらの植物を用いた分子遺 伝学的研究が盛んに行われるようになりました。その流れ を示したのが図4です。まず、突然変異を誘発する薬剤な どで処理することにより、突然変異を誘発させた個体群の 中から、野生型と異なる形質(ここではオゾン感受性)を 示す変異体を選抜します。そして、目的の突然変異体が得 られれば、それについてその後二つの方向に解析を進めま す。一つは、突然変異体の形質(この場合にはオゾン感受 性)の原因となる遺伝子を突き止めることです。これには 突然変異が起きた場所を交配などにより遺伝的距離を求め 染色体上の位置を絞っていく方法と、予め導入してあった DNA (T-DNAなど) を目印にして遺伝子を単離・同定する (見つけ出して特定する) 方法があります。こうして原因 となる遺伝子を明らかにした後、種々のデータベースを基 にその構造や発現パターンからその遺伝子の機能を推定し

たり、遺伝子操作をしてさらに詳しく遺伝子の機能を調べたりすることができます。もう1つの方向として、突然変異体の生理学的解析を行います。オゾン感受性変異体の場合、オゾン以外のストレスに対する感受性や、これまでにオゾン耐性機構としてわかっている事柄について調べることにより、原因になる遺伝子の機能が推定され、得られた突然変異体がどうしてオゾン感受性になったのか、メカニズムを解明する手がかりが得られます。

オゾンによる植物の可視障害は、1.オゾンの取り込み、2.活性酸素の発生、3.細胞死の促進、の過程を経て発生します(図5のピンク部分)。一方で、植物はそれらに対する防御機構(図5の緑部分)があり、それが1.気孔開閉によるオゾンの取り込み制御、2.活性酸素の消去、3.植物ホルモンによる細胞死の抑制、にあたります。突然変異体を用いた研究から、各防御過程に様々な遺伝子(オレンジ文字)が関わっていることがわかりつつあります。



## オゾン問題の解決に向けて

Q:研究でのエピソードを教えてください。

佐治: 気孔の開閉に重要な働きをする遺伝子を見つけたのと同じ時期にフィンランドの研究グループが同じ遺伝子についての論文を科学誌「Nature」に投稿しようとしていることを知りました。先に発表されると私たちの成果が認められなくなるので、あわてて論文を別の科学誌に投稿しました。なんとか間に合ったのですが、とても緊張しました。

**青野**:国際会議に出席して偶然それを知ったのです。 私も緊張しながら帰国し、伝えたことを覚えています。 さらにそのころ九州大学でも同じ遺伝子を研究してい たことが後でわかりました。

佐治: 研究者が限られた分野なのに、偶然にも同じ時期に3つの研究室が同じ遺伝子を研究していたのには驚きました。

Q:遺伝子実験を始めたときは大変でしたか。

**青野**: 今では当たり前の実験も、その当時はあまり行われておらず苦労しましたが、それだけに結果が出るのが楽しかったです。とくに大腸菌の遺伝子を植物に導入して新しい知見が得られたことは印象深いです。そのときの論文はいまだに引用されています。

中嶋:植物の遺伝子組換え実験は、研究所に来てから始めました。毎日、組換え体を作っていて、早くやらなければとプレッシャーがありました。現在は、ゲノム編集という新しい技術ができて、遺伝子導入をしなくても実験ができるようになりました。新たな波が来ていることを感じます。今後もアジア等の地域ではオゾン濃度が上昇するのは間違いないですし、食糧供給の問題もあるので、ぜひ若い人に研究に加わってもらい新しい技術で環境浄化するための方法を開発したいです。また、最近、蚊や蚊が媒介する伝染病を撲滅するために生物を改変する遺伝子ドライブという技術が開発されています。オゾンに強い遺伝子を使えば、環境を変えることができるかもしれませんから、挑戦してみたいですね。

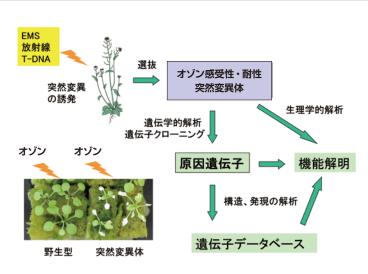
Q:最後に、今後に向けて一言ずつお願いします。

玉置:オゾンは重要な問題なのに、あまり認知されていません。もう少し理解されるようになるといいですね。

中嶋:研究で得た知見を他の分野で活用してもらいたいですね。また、これからは対策技術の研究も必要だと思います。

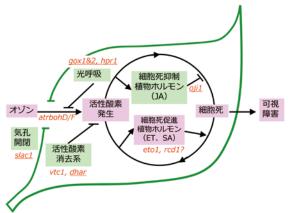
**青野**:遺伝子を使った実験は事務的な手続きも多いですし、植物の栽培施設や実験設備を維持するのも大変です。でも研究所として一次データを出していくために頑張っていきたいです。

佐治: 多くの人にこのような研究の重要性を理解していただくとともに、問題の解決に向けて一層の努力を続けていきたいです。



■図4 シロイヌナズナのオゾン感受性突然変異体を用いた分子遺伝 学的研究の流れ

EMS: エチルメタンスルホン酸、T-DNA: トランスファー DNA(ゲノム中に挿入されて突然変異を誘発する)



■図5 植物のオゾン障害・防御のしくみと各反応に関わる突然変 異体系統

イタリックの赤字は、各反応の関与を裏付ける突然変異体の系統名を示し、そのうち下線が引かれたものは、当研究所で解析されたものを示す。ET:エチレン、JA:ジャスモン酸、SA:サリチル酸



## オゾン等大気汚染物質に対する 植物の応答に関与する遺伝子と その機能の解明

国立環境研究所では、設立以来オゾン等の大気汚染物質の植物影響に関する研究を行ってきました。特に、ガス 暴露チャンバーを用いた実験により、植物のオゾン応答に関わる遺伝子とその機能を解明するための研究に取り組 んできました。これらの研究で得られた成果は、オゾンのみならず様々なストレス因子に対する植物の応答への理 解にもつながってきています。

## オゾンなど大気汚染物質応答に関与する 遺伝子の単離と遺伝子操作による 耐性植物の作出

私たちが国立公害研究所(現・国立環境研究所)に 着任した時点(1985-1990年)では、それまでに行わ れた生理・生化学的研究により、オゾン等のガス状大 気汚染物質によって植物に種々の障害が生じ、それに は活性酸素やエチレンなどの物質の関与が示唆されて いました。しかし、それらの反応に関与する遺伝子は 何ひとつ明らかにされておらず、障害を防ぐための有 効な手法も確立されていませんでした。そこで私たち は、まず活性酸素の消去系に関連する酵素の遺伝子と、 エチレン生成に関連する酵素の遺伝子を植物から単離 し、その構造を決定するとともに、それらの遺伝子の 発現がオゾンや二酸化硫黄により誘導されることを明 らかにしました。さらに、それらの遺伝子を操作する ことにより、オゾンや二酸化硫黄に強い植物(タバコ) を作出することに成功しました。これらの成果は、活 性酸素やエチレンが植物のオゾン障害に関与するとい

A wt slac1 B wt slac1 対照区 対照区 オゾン 処理区

う従来の仮説を裏付けるとともに、植物育種等の応用 面にもつながるものとなりました。

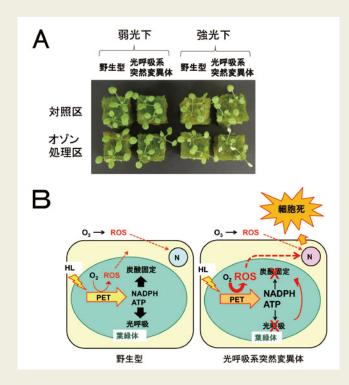
## 植物のオゾン感受性への 気孔開閉制御の関与の証明

2000年頃から国内外でシロイヌナズナやイネ等の モデル植物を中心に、網羅的に遺伝子を解読するゲノ ム解析が進み、その活用によりこれまで困難であった 生理反応の解明を遺伝子のレベルから効率良く行える ようになってきました。そこで私たちもその流れに 従って、シロイヌナズナの突然変異体を用いた分子遺 伝学的研究に取り組み(図4)、オゾン応答に関してこれまでに提案されていた仮説について、さらに裏付け る証拠やまだ知られていなかった新たな反応の関与を 示唆する結果を次々と得ることに成功しました。その 1つが気孔開閉の制御に関するものでした。

オゾンは葉の表面にある気孔を通って植物体内に吸収されることから、気孔開閉の制御がオゾンに対する最初の防御機構として重要であると考えられていました。しかし、それをはっきりと示す証拠はまだ得られていませんでした。シロイヌナズナのオゾン感受性突然変異体をいくつか単離してその性質を調べたところ、気孔反応に異常を示すものがあることを発見しました。この変異体は野生型と比べて気孔開度が大きく(図6A, C)、ガス状汚染物質のオゾン(図6B)や二酸化硫黄の他、乾燥にも高い感受性を示しました。これ

### ■図6 気孔開度に異常を示すシロイヌナズナの突然変異体

A. 野生型(wt)と突然変異体(slac1)の葉面温度を示す熱画像。突然変異体では野生型よりも蒸散が盛んなために気化熱がより多く奪われ、葉面温度が低くなっています。B. 野生型(wt)と突然変異体(slac1)のオゾン感受性。オゾン処理した突然変異体の葉にのみ障害(クロロシス)が見られる。C. 野生型(wt)と突然変異体(slac1)の表皮の顕微鏡画像。気孔開度に差が見られます。



#### ■図7 光呼吸系酵素に異常のある突然変異体

A. 異なる光強度下での野生型と突然変異体のオゾン感受性。これらの植物を弱光(曇りの日の明るさ、写真の左半分)と強光(弱光の3.5倍の明るさ、写真の右半分)の下でオゾン処理した後、写真撮影した。強光下でオゾン処理した突然変異体の葉にのみ障害(クロロシス)が見られる。

B. 光呼吸に異常のある突然変異体がオゾン感受性になる理由についての仮説。野生型の植物では(左図)、強光下において光合成の電子伝達系により葉緑体内で作られるエネルギー物質(NADPH と ATP)が炭酸固定や光呼吸により消費され、過剰に蓄積されることはありません。ところが、光呼吸系突然変異体では(右図)、光呼吸や炭酸固定(カルビン回路の基質枯渇による)が阻害されるため、これらのエネルギー物質が十分消費されずに過剰蓄積します。その結果、電子伝達の流れが悪くなり、電子が酸素に受け渡されて活性酸素が多く発生します。この葉緑体における活性酸素生成とオゾンによる細胞外での活性酸素生成が同時に起こると、遺伝的プログラムにより細胞死が誘導されます。したがって、光呼吸は、強光下において、オゾン等のストレス因子に対する植物の耐性に大変重要な役割を担っていると考えられます。

HL: 強光、N: 核、 $O_3$ : オゾン、PET: 光合成電子伝達系、ROS: 活性酸素

により、植物のオゾン感受性への気孔開閉制御の関与がはっきりと示されました。さらに研究を進めた結果、この変異体の原因が、細胞膜上で物質の移動を制御するようなタンパク質の遺伝子が破壊され、機能しなくなったことによることがわかりました。

その後、ヘルシンキ大学のグループと九州大学のグループにより同様の変異体の単離と解析が行われ、この遺伝子(SLAC1と名付けられました)が、オゾン、乾燥、高濃度二酸化炭素条件下などにおいて、気孔が閉じる際に活性化される陰イオンチャンネルのものであることが示されました。さらにこれらの発見を契機として、気孔閉鎖メカニズムの研究が大きく進展し、今では、種々のシグナル伝達を介して気孔を取り囲む細胞膜上に存在するSLAC1やその他のタンパク質が次々に活性化されることで、気孔が閉じることが明らかになっています。

## 植物のオゾン応答における活性酸素の役割の詳細な解析

オゾンはそれ自身が反応性に富む活性酸素の一種であり、植物体内に吸収されると葉の組織中の水に溶け込み、細胞膜やその外側(アポプラスト)に存在する様々な物質を酸化すると考えられます。その初期反応に加え、種々の活性酸素種(ROS)が二次的に発生し、オゾン障害に関わることが示されてきました。中でも重要なのが、原形質膜上に存在するNADPHオキシダーゼ等によってアポプラストで産生されるROSと光照射下の葉緑体で光合成に伴って発生するROSです。前者は病原抵抗性反応の研究により見つけられ、

病原体感染を知覚した葉の細胞が種々のシグナルを介してNADPHオキシダーゼ等を活性化し、アポプラストにおいてROSを自ら生成します。このようなROS生成は、病原体感染時のみならず種々のストレス条件下で起こり、オゾンストレス下でも障害の発生に関与することが、欧米の研究グループにより示されてきました。

一方、後者の光合成に伴って発生するROS生成 は、オゾン障害が光照射下で生じやすいことから推論 されてきましたが、最近、私たちの解析したシロイヌ ナズナのオゾン感受性突然変異体(オゾン耐性の低い 突然変異体)の原因遺伝子が光呼吸という代謝系の酵 素のものであることがわかり、これを裏付ける証拠と なりました。この突然変異体は、光が強い場合にのみ 高いオゾン感受性を示します(図7A)。光呼吸は、強 光下において光合成の電子伝達系により葉緑体内で作 られるエネルギー物質 (NADPHとATP) を消費する ことにより、電子伝達をスムーズに進行させ、葉緑体 内でのROS生成を抑える方向に作用すると考えられ ています。この光呼吸系の突然変異体が強光下でオゾ ンに高い感受性を示すことから、オゾンによるアポ プラストにおけるROS生成と強光下の葉緑体内にお けるROS生成が同時に起こると細胞死が強く誘導さ れ、葉の可視障害が生じることが示唆されました(図 7B)。オゾン以外にも種々のストレス因子によりアポ プラストでROSが生成することや、強光下でストレ スの程度が増すことが知られていることから、この仮 説はオゾンのみならず他の多くのストレス応答にも適 用できると考えられます。

## 植物のオゾン応答研究の動向

オゾンやその他の大気汚染物質が植物に障害をもたらすことがわかってから、世界中でその影響とメカニズムを解明するための研究が数多く行われてきました。特に、遺伝子やゲノム解析技術の進展により、他のストレス因子に対する応答研究と歩調を合わせながら、複雑な仕組みが少しずつ解き明かされようとしています。

## 世界では

オゾンが植物に被害をもたらすことは1950年代に アメリカで発見され、日本やヨーロッパでも1960~ 1970年代に確認されるようになりました。その後、 様々な環境条件をコントロールできる人工気象室内で 植物をオゾンに暴露してその影響やメカニズムが研究 されるようになり、オゾンによって植物に生じる障害 とそれに及ぼす光等の環境条件の影響が明らかにされ てきました。オゾン障害のメカニズムに関しては、オ ゾン自体が活性酸素の一種であることや植物に吸収さ れたオゾンが生体物質と反応して様々な活性酸素分子 種(ROS)を生じること、ROS生成と障害の発生に 関連がありそうなことなどの理由から、ROSとその 消去反応系に多くの研究者の目が向けられるようにな りました。また、欧米の研究者らによってオゾンと接 触した植物でエチレンが発生し、その発生量と障害の 程度の間に相関があることが示され、その発生と作用 のメカニズムにも関心が向けられるようになりまし た。

このような状況の下、1980年代に遺伝子解析や遺伝子組換えの技術が開発されると、私たちを含む世界中の研究グループが、ROSの消去やエチレン生成に関わる酵素などの遺伝子のクローニング、発現解析や遺伝子組換え実験を競って行うようになり、それらの物質がオゾン障害や防御に関わることが確認されました。2000年頃にはシロイヌナズナやイネなどのモデル植物の全ての遺伝子を対象とするゲノム解析が進展し、それにより得られる情報や試料を用いた分子遺伝学的研究が開始され、ROSやエチレンの関与がさらに確かめられるとともに、まだ知られていなかった多くの物質や反応がオゾン応答に関わっていることがわかってきました(図5)。

また、オゾン以外のストレス因子、例えば高低温、 乾燥、紫外線などに対する植物の応答研究が行われた 結果、オゾンに関与することが示唆された物質や反応 の多くが他のストレス因子に対する応答にも関わって いて、特に病原体の感染に対する応答との間で共通性 が高いことが明らかになってきました。

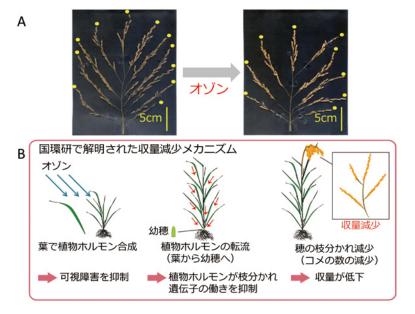
## 日本では

前述のように日本でも1970年頃から関東地方以南でタバコやイネなどの農作物にオゾンによる可視障害が観察されるようになり、当研究所のほか、農業環境技術研究所、電力中央研究所、東京農工大学、東京大学、地方自治体の研究機関などにおいて、オゾンが農作物や樹木に及ぼす影響とそのメカニズムに関する研究が行われてきました。その結果、多くの植物種・品種に対するオゾンの影響の実態が明らかになってきました。

たとえば、農業環境技術研究所により、1981~1985年におけるオゾンによる関東地方のイネの減収率は、地域により異なりますが、5年間平均で最大約7%に達すると推定されました。また、オゾンに対する感受性には植物の種や品種間で差があり、可視障害の程度と、成長や収量低下の程度との間には必ずしも相関が認められず、これらの被害は互いに異なるメカニズムにより生じる可能性が示唆されました。

## 国立環境研究所では

これまで当研究所で行われてきた研究の多くは、主 にモデル植物であるタバコやシロイヌナズナの若い植 物体に生じる、急性的可視障害のメカニズムの解明を 目的としたものでした。それに対し、最近はモデル植 物ではなく、身近でかつ重要な農作物であるイネにつ いても取り組んでいます。イネのゲノム情報に基づく 量的形質遺伝子座解析(\*)により、オゾンの長期暴露 によるイネの減収に関与する遺伝子の研究を行いまし た。これまでオゾンによる作物の収量低下は、葉に可 視障害が生じ、それにより光合成量が低下して起こる とされてきました。しかし、一部のイネ品種では葉の 可視障害の程度と収量低下の程度が必ずしも一致しな いため、オゾンによるイネの収量低下には、可視障害 による光合成能力の低下とは異なる機構があると予想 されていました。そこで、オゾンによる葉の可視障害 は起きないが収量が低下するハバタキというイネ品種 を用いて、検証した結果、この品種では高濃度オゾン により穂の枝分かれの数が減少し、収量低下を引き起

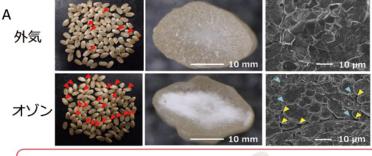


#### ■図8 オゾンによるイネの収量への影響

A. 外気(写真左)およびオゾン添加(写真右)で栽培されたイネ品種ハバタキの穂の外観形質。

オゾンにより穂の枝分かれの数が減少しているのがわかる。

B. 新規に解明されたオゾンによるイネの収量低下メカニズム。オゾンによって引き起こされる可視障害を軽減するために、ジャスモン酸やアブシジン酸といった植物ホルモンが合成される。これが転流により、幼穂に運ばれると、穂の枝分かれを抑制する。これにより花(コメ)の総数が減少し収量が低下する。





#### ■図9 オゾンによるコメ品質への影響

A. 外気およびオゾン添加で栽培されたコシヒカリ白米の外観品質(左)、割断面の実体顕微鏡写真(中)および走査型電子顕微鏡写真(右)

オゾンにより乳白粒 (赤矢印) の割合が増加した。これは小型のデンプン粒 (青矢印) の増加、およびデンプン粒間の空隙 (黄色矢印) が増加することによると考えられた。

B. 新規に解明されたオゾンによるコメ品質への影響。 オゾンによりデンブン合成酵素の働きが弱まり、デンプンを構成するアミロペクチンの長鎖が減少する。これにより、デンプン粒の小型化や空隙が生じ、乳白米が発生する。

こしていました(図8A)。また、この品種と他のイネ品種ササニシキとの比較による遺伝学的な解析から、この穂の枝分かれの数の減少は、オゾンにより穂の枝分かれを制御する遺伝子(APO1)の機能の低下により起きていることが明らかになりました。さらに、この遺伝子の機能低下の過程にはオゾンによる葉の可視障害軽減に働く植物ホルモン(ジャスモン酸やアブシジン酸)が関与していました(図8B)。これらの結果は、作物種あるいは品種によっては光合成の低下を防ぐために、植物ホルモンがイネの収量を低下させることもあることを示しています。

また、オゾンによる作物への影響は収量だけでなく、 品質にも関係します。これまでに高温により米の品質 が低化することは知られていましたが、オゾン濃度の 上昇が品質に与える影響はほとんど研究されてきませ んでした。そこで、日本の代表的なイネ品種コシヒカ リを用いて検証した結果、オゾン濃度の上昇がコシヒカリ玄米へのデンプン蓄積の異常を引き起こし、これが乳白粒の割合を増加させていました(図9A)。また、デンプンはグルコースが鎖状に結合したアミロースとアミロペクチンから構成されますが、オゾンによりアミロペクチンの鎖の伸長に関与するデンプン合成酵素遺伝子(SSIIIa)の働きが低下していました。これがアミロペクチンの伸長を抑制し、結果としてデンプン粒が充填不足になることが示唆されました(図9B)。

オゾンと高温による米の外観品質低下のメカニズム は異なっているため、今後、温暖化が進むとオゾンと 高温との複合影響により米の品質がさらに低下するこ とが懸念されます。

\*量的形質遺伝子座解析:収量など量的な形質に関わる遺伝子の染色体上での位置などを解析すること。

## 国立環境研究所における 「オゾン等大気汚染物質に対する植物の応答に関与する 遺伝子とその機能に関する研究」のあゆみ

国立環境研究所では、オゾンを始めとする大気汚染物質に対する植物の応答に関する研究を行っています。 ここでは、その中から、遺伝子レベルの研究に関するものについて、そのあゆみを紹介します。

<del></del>	細晒夕		
年度	課題名		
1990 ~ 199 <b>5</b>	新しい植物実験系開発のための基盤技術に関する研究*1		
1991 $\sim$ 1995	環境保全のためのバイオテクノロジーの活用とその環境影響評価に関する研究		
1996 ~ 2002	植物の環境応答と形態形成の相互調節ネットワークの解明に関する研究*1		
2004 ~ 2006	トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康・生物影響評価法の開発に関する研究		
2004 ~ 2006	マイクロアレイによる遺伝子発現パターンを指標とした環境影響モニタリング手 法の開発*2		
2006 ~ 2008	水稲葉枯症の発症要因の究明と軽減対策技術の開発* <sup>3</sup>		
2008 ~ 2010	気温とオゾン濃度上昇が水稲の生産性におよぼす複合影響と適応方策に関する研究*4		
2010 ~ 2012	遺伝子発現プロファイルに基づく植物のストレス診断と水稲葉枯症の原因究明*2		
2014 ~ 2016	植物のオゾン応答における光呼吸の役割の解明*2		
<b>2014</b> ~ <b>2016</b>	オゾンによるイネの不稔誘導遺伝子座の同定と新たな収量低下機構の解明* <sup>2</sup>		
2016~2020 (予定)	広域環境変動に関する生物・生態系応答機構解明と適応戦略		

- \*1 科学技術庁 科学技術振興調整費(分担)
- \*2 文部科学省(日本学術振興会)科学研究費補助金(代表)
- \*3 環境省 地球環境等保全試験研究費(分担)
- \*4 環境省 地球環境研究総合推進費(分担)

本号で紹介した研究は、以下の機関、スタッフにより実施されました(所属は当時、敬称略、順不同)。

## 〈研究担当者〉

国立環境研究所:佐治光、玉置雅紀、青野光子、中嶋信美、久保明弘、佐野友春,戸部和夫、清水英幸、近藤矩朗、佐治章子、

Srinivas Bathula、澤田寛子、塚原啓太、小川大輔、神名麻智、吉田征司、松山 崇、浅井尚子

産業技術総合開発機構: 高木優、永利友佳理

筑波大学:鎌田博 茨城大学:朝山宗彦

## ● 過 去 の 環 境 儀 か ら ●

これまでの環境儀から、大気環境に関するものを紹介します。

### No.40 VOC と地球環境 —大気中揮発性有機化合物の実態解明を目指して

地球を取り巻く大気圏には、さまざまな揮発性有機化合物 (VOC) が存在しています。フロンなど人為起源のもののほか、自然起源の VOC も少なくなく、それらはいずれも地球環境とも深く関わっています。本号では自然起源 VOC 研究への取り組みと、温室効果気体として近年、問題となっている代替フロン類の観測・解析研究について紹介しています。

### No.33 越境大気汚染の日本への影響 一光化学オキシダント増加の謎

国内の大気汚染物質の発生源対策が進み、窒素酸化物(NOx)と揮発性有機化合物(VOC)は減少しているのに、光化学オキシダント(Ox)は増加しています。なぜ原因物質が減少しているのに光化学 Ox が増加しているのか。なぜ発生源が近くにない地域でも光化学 Ox が増加しているのか。本号では、これらの原因の一つとして考えられるアジア大陸からの越境汚染の影響を紹介しています。

## No.26 成層圏オゾン層の行方 - 3次元化学モデルで見るオゾン層回復予測

1982年、世界で初めてオゾンホールが南極で観測されて以来、観測、理論、室内実験など多方面の研究が精力的に進められ、成層圏オゾン層破壊現象の詳細とそのメカニズムの解明が進みました。国立環境研究所では、東京大学気候システム研究センターと共同で3次元化学モデルを日本で初めて開発し、その研究成果は世界的にも評価されています。本号では、3次元化学モデル(化学輸送モデル、化学気候モデル)を使った成層圏オゾン層モデリング研究の概要と成果を紹介しています。

### No.12 東アジアの広域大気汚染 一国境を越える酸性雨

日本の酸性雨の原因の一つとして、アジア大陸から大気汚染物質が飛来することが考えられます。本号では、国立環境研究所が取り組んできた東アジアの広域大気汚染の解明研究から、東アジア地域の正確な大気汚染物質発生量を提供する発生源インベントリーの構築と、中国での航空機観測によるエアロゾル性状の空間分布測定を中心に紹介しています。

## No.5 VOC 一揮発性有機化合物による都市大気汚染

光化学大気汚染の主要原因物質でもある揮発性有機化合物(VOC)への関心が高まっています。本号では、国立環境研究所が取り組んできた、都市域における VOC の動態解明と大気質に及ぼす影響評価に関する研究の中から、VOC の発生源と自動車の寄与およびトンネル調査の結果を中心に紹介しています。

環境 儀 No.67 —国立環境研究所の研究情報誌—

2017年12月28日発行

編 集 国立環境研究所編集分科会

(担当 WG: 松崎慎一郎、佐治光、青野光子、中嶋信美、 玉置雅紀、石垣智基、遠嶋康徳、岩崎一弘、広兼克憲)

発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

問合せ先 国立環境研究所情報企画室 pub@nies.go.jp 編集協力 有限会社サイテック・コミュニケーションズ

印刷製本 朝日印刷株式会社 つくば支社

#### 境 儀 既 刊 紹 介 環 の

<b>No.21</b> 2006年 7月	中国の都市大気汚染と健康影響	<b>No.44</b> 2012年 4月	試験管内生命で環境汚染を視る一環境毒性の in vitro バイオアッセイ
<b>No.22</b>	微小粒子の健康影響―アレルギーと循環機能	<b>No.45</b>	干潟の生き物のはたらきを探る一浅海域の環境
2006年10月		2012年 7月	変動が生物に及ぼす影響
<b>No.23</b> 2007年 1月	地球規模の海洋汚染一観測と実態	No.46 2012年 10月	ナノ粒子・ナノマテリアルの生体への影響―分子サイズにまで小さくなった超微小粒子と生体との反応
<b>No.24</b>	21世紀の廃棄物最終処分場―高規格最終処分	<b>No.47</b>	化学物質の形から毒性を予測する一計算化学に
2007年 4月	システムの研究	2013年 1月	よるアプローチ
<b>No.25</b>	環境知覚研究の勧め一好ましい環境をめざして	<b>No.48</b>	環境スペシメンバンキングー環境の今を封じ込め
2007年 7月		2013年 4月	未来に伝えるバトンリレー
<b>No.26</b> 2007年 10月	成層圏オゾン層の行方―3次元化学モデルで見るオゾン層回復予測	<b>No.49</b> 2013年 7月	東日本大震災一環境研究者はいかに取り組むか
<b>No.27</b>	アレルギー性疾患への環境化学物質の影響	<b>No.50</b>	環境多媒体モデル一大気・水・土壌をめぐる有害
2008年 1月		2013年10月	化学物質の可視化
<b>No.28</b>	森の息づかいを測る一森林生態系の CO₂ フラックス観測研究	<b>No.51</b>	旅客機を使って大気を測る一国際線で世界を力
2008年 4月		2014年 1月	バー
<b>No.29</b>	ライダーネットワークの展開―東アジア地域のエ	<b>No.52</b>	アオコの有毒物質を探る一構造解析と分析法の
2008年 7月	アロゾルの挙動解明を目指して	2014年 4月	開発
<b>No.30</b>	河川生態系への人為的影響に関する評価―より	<b>No.53</b>	サンゴ礁の過去・現在・未来一環境変化との関わりから保全へ
2008年10月	よい流域環境を未来に残す	2014年 6月	
<b>No.31</b>	有害廃棄物の処理―アスベスト、PCB 処理の―	<b>No.54</b>	環境と人々の健康との関わりを探る一環境疫学
2009年 1月	翼を担う分析研究	2014年 9月	
<b>No.32</b>	熱中症の原因を探る一救急搬送データから見る	<b>No.55</b>	未来につながる都市であるために一資源とエネ
2009年 4月	その実態と将来予測	2014年 12月	ルギーを有効利用するしくみ
<b>No.33</b>	越境大気汚染の日本への影響―光化学オキシダント増加の謎	<b>No.56</b>	大気環境中の化学物質の健康リスク評価一実験
2009年 7月		2015年 3月	研究を環境行政につなげる
<b>No.34</b>	セイリング型洋上風力発電システム構想―海を旅	<b>No.57</b>	使用済み電気製品の国際資源循環一日本とアジアで目指す E-waste の適正管理
2010年 3月	するウィンドファーム	2015年 6月	
<b>No.35</b>	環境負荷を低減する産業・生活排水の処理システム	<b>No.58</b>	被災地の環境再生をめざして一放射性物質による
2010年 1月	〜低濃度有機性排水処理の「省」「創」エネ化〜	2015年 9月	環境汚染からの回復研究
<b>No.36</b>	日本低炭素社会シナリオ研究― 2050 年温室効	<b>No.59</b>	未来に続く健康を守るために一環境化学物質の
2010年 4月	果ガス 70%削減への道筋	2015年12月	継世代影響とエピジェネティクス
<b>No.37</b>	科学の目で見る生物多様性一空の目とミクロの目	<b>No.60</b>	災害からの復興が未来の環境創造につながるまちづく
2010年 7月		2016年 3月	りを目指して一福島発の社会システムイノベーション
<b>No.38</b>	バイオアッセイによって環境をはかる一持続可能	<b>No.61</b>	「適応」で拓く新時代!一気候変動による影響
2010年10月	な生態系を目指して	2016年 6月	に備える
<b>No.39</b>	「シリカ欠損仮説」と海域生態系の変質―フェリー	<b>No.62</b>	地球環境 100 年モニタリング―波照間と落石岬
2011年 1月	を利用してそれらの因果関係を探る	2016年 9月	での大気質監視
<b>No.40</b>	VOC と地球環境一大気中揮発性有機化合物の	<b>No.63</b>	「世界の屋根」から地球温暖化を探る一青海・
2011年 3月	実態解明を目指して	2016年 12月	チベット草原の炭素収支
<b>No.41</b> 2011年 7月	宇宙から地球の息吹を探る一炭素循環の解明を目指して	No.64 2017年 3月	PM <sub>2.5</sub> の観測とシミュレーション一天気予報のように信頼できる予測を目指して
No.42	環境研究 for Asia/in Asia/with Asia 一持続可能なアジアに向けて	<b>No.65</b>	化学物質の正確なヒト健康への影響評価を目指
2011年 10月		2017年 6月	して一新しい発達神経毒性試験法の開発
<b>No.43</b>	藻類の系統保存―微細藻類と絶滅が危惧される	<b>No.66</b>	土壌は温暖化を加速するのか?―アジアの森林
2012年 1月	藻類	2017年 9月	土壌が握る膨大な炭素の将来

●環境儀のバックナンバーは、国立環境研究所のホームページでご覧になれます。 http://www.nies.go.jp/kanko/kankyogi/index.html

## 「環境儀」



地球儀が地球上の自分の位置を知るための道具であるように、「環境 儀』という命名には、われわれを取り巻く多様な環境問題の中で、わ れわれは今どこに位置するのか、どこに向かおうとしているのか、 それを明確に指し示すしるべとしたいという意図が込められていま す。『環境儀』に正確な地図・行路を書き込んでいくことが、環境研 究に携わる者の任務であると考えています。

2001年7月 合志 陽一 (環境儀第1号「発刊に当たって」より抜粋)



このロゴマークは国立環境研究所の英語文字 N.I.E.Sで構成されています。N=波(大気と水)、 |=木(生命)、ESで構成される○で地球(世界)を表現しています。ロゴマーク全体が風を切って左側に進もうとする動きは、研究所の躍動性・ 進歩・向上・発展を表現しています。

