

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-8-'92

バイオテクノロジーによる大気環境指標植物の開発に関する研究

Studies on Development of Indicator Plants for Evaluation of
Atmospheric Environment by Biotechnology

昭和61年度～平成2年度

FY 1986~1990

NIES

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan
国立環境研究所特別研究報告

SR-8-'92

バイオテクノロジーによる大気環境指標植物の開発に関する研究

Studies on Development of Indicator Plants for Evaluation of
Atmospheric Environment by Biotechnology

昭和61年度～平成2年度

FY 1986~1990

環境庁 国立環境研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「バイオテクノロジーによる大気環境指標植物の開発に関する研究」

(期間 昭和61年度～平成2年度)

特別研究責任者：菅原 淳 生物環境部 部長

特別研究幹事：近藤 矩朗・古川 昭雄・大政 謙次

報告書編集担当：近藤 矩朗

序

工場や自動車からの排ガスによる大気汚染は、浄化技術の発達などによって軽減されたと考えられていますが、実際には二酸化窒素濃度はほぼ横ばいであり、光化学オキシダントによると思われる植物の被害は、必ずしも減少していません。特に、光化学オキシダントの主成分であるオゾンやペルオキシアセチルナイトレートは植物に対する毒性が高いため、それらによる汚染状況を常に監視し、被害を未然に防ぐことが必要です。

植物はその種類によって大気汚染物質に対する感受性が異なり、また、大気汚染物質の種類によっても感受性が異なります。したがって、特定の大気汚染物質にのみ感受性の高い植物を用いることによってその汚染物質をモニターすることが可能です。このような目的で使用される植物が指標植物であり、アサガオやペチュニア等が用いられています。しかし、結果の再現性や定量性に問題があり、指標植物の改良が求められてきました。そこで、本研究所では、昭和61年度より特別研究「バイオテクノロジーによる大気環境指標植物の開発に関する研究」を開始し、これまでの研究の成果を踏まえ、植物の大気汚染物質による被害の特徴を明らかにして、感受性植物を選抜し、これらの植物を用いて大気環境を評価するための手法の検討を行ってきました。さらに、大気汚染物質に対する感受性を支配する生化学的要因を明らかにし、関係する遺伝子を植物に導入することによって、大気汚染物質に対する感受性を改変する手法の確立を試みてきました。

本報告書は、これまでの研究によって明らかになった研究成果を総括することを目的としてまとめられたものです。本研究の成果を基礎として、今後は、有効な大気環境指標植物の開発のみならず環境保全に有用な植物の開発に向かって研究を進める所存です。本報告書が大気環境改善に向けた研究や施策を遂行する上で役に立ち、活用されることを期待しています。

本研究を推進する上で、多くの大学、試験研究機関の方々に多大なご協力とご助言をいただきました。ここに深く感謝致します。今後とも、皆様のご協力、ご叱責をお願いいたします。

平成4年3月

国立環境研究所生物圏環境部

部長 菅原 淳

目 次

1 研究の目的と経緯	1
2 研究の成果	5
2.1 大気汚染物質による植物障害の仕組み	5
2.1.1 大気汚染物質による植物の障害と防御機能	5
2.1.2 大気汚染物質による障害における活性酸素の関与	6
2.1.3 大気汚染物質の膜脂質に及ぼす影響	8
2.2 大気汚染物質感受性植物の選抜	9
2.2.1 大気汚染感受性と汚染ガス吸収速度	9
2.2.2 光化学オキシダントに対する植物の感受性の種・品種間差	13
2.2.3 光合成阻害を指標としたPAN感受性植物の選抜	17
2.2.4 種々の大気汚染物質に対する蘚苔類の感受性の検討	19
2.3 大気汚染抵抗性に関与する遺伝子の単離と遺伝子組換え	22
2.3.1 アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子の単離	22
2.3.2 大腸菌グルタチオンレダクターゼ遺伝子を用いた遺伝子組換えタバコ 作製と大気汚染抵抗性	29
2.4 PANの植物暴露装置の開発	35
2.5 画像計測による大気汚染被害の計測と診断	40
2.5.1 気孔反応診断のための非破壊顕微画像計測法	40
2.5.2 光合成機能診断のためのクロロフィル蛍光動画画像計測法	42
2.6 指標植物を用いた大気環境評価法の検討	45
2.6.1 ペチュニアを用いた大気環境評価	45
2.6.2 ペチュニア配置法による関東地域の光化学オキシダント (PAN) 汚染の検討	49
2.6.3 蘚苔類による野外大気環境評価の検討	52
2.6.4 遺伝子組換え植物を用いる野外の大気環境評価のための実験装置の開発	55
2.7 まとめ	62

[資 料]

I	研究の組織と研究課題の構成	65
1	研究の組織	65
2	研究課題と担当者	67
II	研究成果発表一覧	69
1	誌上发表	69
2	口頭発表	74

1 研究の目的と経緯

石油や石炭などの化石燃料の燃焼による大気汚染が社会問題となってほぼ半世紀が経つ。近年、我が国では環境基準値の設定、工場、自動車からの排ガス規制によって大気環境の悪化に歯止めが掛けられ、二酸化硫黄 (SO_2) の年平均濃度が1967年をピークに低下してきているのを始めとして、二酸化窒素濃度 (NO_2) も1974年以降ほぼ横ばいである。しかしながら、窒素酸化物の濃度は一向に減少する傾向がなく、一酸化窒素 (NO)、 NO_2 やヒドロカーボンより派生する光化学二次生成物であるオゾン (O_3) やペルオキシシアセチルナイトレート (PAN) などを主成分とする光化学オキシダント汚染は、ますます広域化の傾向が見られる。植物はこれらのオキシダントに対して感受性が高く、特にPANによる影響は甚大で、農作物被害は深刻である。事実、大阪、埼玉などの都市近郊では光化学オキシダント濃度の1時間値が注意報発令濃度 (0.12 ppm) を超える日が年間10日以上にもなり、光化学オキシダントによると思われる可視傷害が野外に生育している植物葉に発現している。これら光化学オキシダントによる環境汚染は植物のみならず人間や動物にも多大な影響を与え、自然生態系のかく乱をもたらす。また、近年、 SO_2 や NO_2 がエアロゾルや雨水中で酸性物質を生成し、酸性霧や酸性雨として地上の植物に被害を与えることが懸念されている。このような環境悪化を防止・改善するためには、自然環境を常に監視し、その変化を早期に検知する必要がある。

しかし、PANなどのモニタリング・ネットワークはなく、さらに、光化学二次汚染物質には未知の反応生成物も含まれており、その測定方法は確立していない。植物は、その生育場所での環境に敏感に反応するので、植物の環境反応性を把握することによって環境を評価することが可能である。すなわち、光化学二次汚染物質に対する反応性に富み、しかも汚染物質の種類による反応の選択性、特異性の高い植物を指標として用いることにより、環境中での光化学二次汚染物質の成分と量を評価することが可能であり、また未知物質による環境汚染を早期に検知することもできる。したがって、適切な指標植物を用いることにより、手軽に複合大気汚染環境をモニターすることができる。これまでも植物指標を用いた光化学オキシダントのモニター試験が行われてきたが、他の環境要因の影響や汚染環境接触の履歴などにより植物の感受性が変化したり、同一品種の植物でも遺伝的不均一性により感受性に株間差があるため、必ずしも満足できる結果が得られていない。特に、近年の環境汚染の低濃度複合化に対応するためには新たな指標植物の開発が望まれる。そのためには、それぞれの環境要因に敏感かつ反応が選択的もしくは特異的な植物を探索あるいは作出し、遺伝的に均一な株を得る必要がある。加えて、他の環境要因の影響を除くことができる影響評価法を確立する必要がある。

近年、細胞培養、細胞融合、遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーが発達し、植物の物質生産性の向上、遺伝的に均質な植物の安定供給等を目指した応用研究が活発になってきている。こ

れまでの一連の特別研究において、植物の大気汚染ガスに対する抵抗性や汚染ガス解毒機能に関して、分子レベルでの研究成果が蓄積してきており、これらの成果とバイオテクノロジーを組み合わせることにより上記の条件を備えた指標植物を作出することが可能である。これまでの特別研究では、 SO_2 、 NO_2 、 O_3 に対する植物反応の研究が中心であったが、野外での大気環境を正しく評価するためには、今後、PANなどの光化学二次汚染物質の影響の特徴及び機作を解明する必要がある。本特別研究では、光化学二次汚染物質の植物影響を解明すると共に、これらの成果や国内外の研究成果を活用し、バイオテクノロジーにより、大気汚染を評価するために有効な指標植物の開発手法を確立し、併せて、野外での大気環境評価法を確立することを目的としている。

これらの目的を達成するために以下の課題を設定し、研究を進めた。

(1) 光化学二次汚染物質に対する植物反応の指標性に関する研究

光化学オキシダントの作用機作については SO_2 などに比べて未知の部分が多い。また汚染地域に数種の汚染物質が複合して存在し、植物被害の原因物質の同定も容易でない。本課題では、これら光化学オキシダント（例えば、 O_3 、PANなど）の作用を単一ガス及びこれらの混合ガスにて、生理・生化学的、形態学的レベルで調べ、ある特定ガスに対して特異的に傷害を受ける反応、あるいは特異的に増大するような反応を検出選択し、ひいてはある汚染ガスの指標反応となるような反応を選択する。また、汚染ガスに対する感受性と汚染ガス解毒機能との関係を調べ、汚染ガスに対する反応の感受性・再現性の高い植物を選抜するための基礎資料とする。さらに、課題（2）における組換え用遺伝子を得るための基礎資料とする。

(2) バイオテクノロジーによる指標植物の作出法に関する研究

大気環境評価のための指標植物は、大気汚染物質に対する感受性、選択性あるいは特異性、再現性の3つの要素を満足するものでなくてはならない。しかし、自然界に存在する植物は遺伝的に不均一なものが多く、それらを指標として大気環境を定量的に評価するのは困難である。最近、大気環境汚染に対しての植物の感受性を支配する因子（酵素、植物ホルモン、生理活性物質等）に関する知見が集積するとともに、これらの因子を遺伝子レベルで制御できる手法“バイオテクノロジー”の発展がみられ、遺伝的に均一な植物を大量に作成したり、他の生理機能は同一でありながら、特定の大气環境条件に関してだけ感受性が異なる指標植物の作成が技術的に可能となってきた。ここでは、最新のバイオテクノロジーの技術及び課題（1）で得られた知見を利用し、遺伝子レベル、細胞レベル、個体レベルにおいて操作、選抜を行い、大気環境評価に適した指標植物を作成することを目的とする。

(3) 指標植物の探索と選抜に関する研究

本課題の目的は光化学オキシダントに対して高い感受性や選択性・特異性を示す遺伝的性質を持った植物を、栽培植物、野生植物あるいは人為的に作成した植物の中から選び出すとともに、野外で発生している植物被害の状況を調査し、どのような植物種が大気汚染に感受性が高く、指標植物として適当であるかを把握することにある。高等植物ばかりでなく蘚苔類なども調査対象とする。まず葉面可視傷害の発現を基準とした評価法を検討し、感受性の高いもの、選択性・特異性の高いものを探索・選抜する。また、汚染物質に対する生理・生化学的及び形態学的反応の中から、鋭敏かつ特異性の高い反応を基準とした探索も行う。さらに、感受性あるいは特異性の高さや汚染物質の吸収速度や解毒機能の大小などとの関係を調べ、高感受性植物の特性を明らかにする。

(4) 指標植物の系統保存と増殖に関する研究

指標植物による環境評価に際しては、用いる植物の指標性形質が環境に対して均一に反応すること、そして、同一形質を有する植物を常時、安定供給できることが重要である。そのために、まず指標性形質を有する植物個体あるいは細胞をクローン化（無性生殖により同一の遺伝形質を有する個体あるいは細胞を作出する）する技術を確認し、さらに、それらの系統保存方法を確立することを目的とする。

(5) 植物診断法の開発に関する研究

計測技術を用いた指標植物の客観的な診断法を開発することを目的とする。このため、生育環境下の植物から非破壊で生理情報を得るための画像計測及び電気計測の手法を開発する。また、植物群落の生育状態を評価するための遠隔計測法の開発を行う。そして、これらの計測技術や生理生化学的手法により得られた指標植物の大気汚染に対する反応を知識ベースとして整理し、環境診断システムを開発する。

(6) 環境調節装置の制御法に関する研究

本特別研究において行うPANなどの光化学二次汚染物質の植物影響実験の信頼性を確保するために、実験に用いる環境調節装置内でのこれらの物質の挙動を調べるとともに、その制御法について検討する。また、自然環境シミュレータを用いた群落実験の信頼性を高めるために、群落環境の制御法について検討する。

(7) 指標植物による大気環境評価に関する研究

指標植物を用いて大気環境を評価するために、これまでの装置（オープン・トップ・チャンバー等）とは異なった新しい装置を開発し、野外で使用するための、装置の諸条件や植物の栽培手法

の検討を行う。これを用いて指標植物の有効性を検討し、指標植物による大気環境評価手法の確立を最終目標とする。

2 研究の成果

2.1 大気汚染物質による植物障害の仕組み

2.1.1 大気汚染物質による植物の障害と防御機能

2.2.1項で述べるように、大気汚染ガスは主に植物葉の気孔を介して植物体内に取り込まれ、水あるいは生体膜に溶けて、生体物質あるいは細胞内構造に損傷を引き起こしたり、破壊する。その結果、植物は枯死したり、成長が阻害されることになる。水あるいは膜脂質に溶けた大気汚染ガスは様々な反応を通して、二次的にさらに毒性の高い物質を生成することがある。これらの代表的なものが、2.1.2項で述べる種々の活性酸素分子である。これまでの研究により明らかになった大気汚染による植物の障害について簡単に述べる。

通常、大気汚染による障害を、葉面の壊死（ネクロシス）、白化（クロロシス）など肉眼で容易に観察することができる可視傷害と、光合成活性阻害などの生理機能障害に分けて議論することが多い。ネクロシスは生体膜が破壊されて細胞構造が維持できなくなった結果であり、クロロシスはクロロフィル等の色素が破壊された結果と考えられるが、大気汚染物質による可視傷害をいずれかに区分けすることは難しい。生理機能障害のうち、光合成活性阻害が最もよく調べられており、気孔開度変化も知られている。呼吸活性は一般に余り影響を受けないか、むしろ増大する。また、生体膜の物質透過性の変化も調べられている。生理機能障害と可視傷害とは、その原因が同じであったりして、厳密に区別することは難しいが、生理機能障害の方が、可視傷害よりも早期に検出されたり、汚染ガス暴露を止めると生理機能障害は回復することがあるのに対して、可視傷害はほとんど回復しないなどの違いがある。また、汚染ガスによりしばしば気孔の閉鎖が観察されるが、気孔が閉鎖すれば汚染ガス吸収速度が低下して、可視傷害を免れることがある。したがって、汚染ガスによる気孔閉鎖は、大気汚染ガスによる障害を免れるための植物の一種の防御反応とみることもできる。

大気汚染物質による障害は、ガスの種類に応じた特徴がある。二酸化硫黄（ SO_2 ）に暴露されると光合成機能が速やかに阻害される。また、葉面に比較的大きな斑点が現れることが特徴である。光化学オキシダントの主成分であるオゾン（ O_3 ）による障害の特徴は、葉面に細かな斑点状の可視傷害が現れることと、可視傷害、光合成阻害とも、発現までに時間がかかることであり、必ずしも光合成阻害が早く出現するとはいえない。しかし、種々の酵素活性は O_3 暴露開始直後より速やかに変動することが知られている。また、2.1.3項でも述べるが、 O_3 暴露によりかなり早期に膜脂質の代謝変化が始まっており、そのメカニズムは興味あるところである。二酸化窒素（ NO_2 ）は、植物体内に取り込まれると植物の窒素代謝系に組み込まれてアミノ酸合成の材料になるため、 NO_2 単独ではほとんど植物に障害を与えないが、 O_3 や SO_2 とともに植物に吸収されると顕著な可視傷害を生じることがある。 NO_2 の毒性は、水に溶けたときに生じる亜

硝酸 (HNO_3)、あるいは膜脂質に溶けた NO_2 によると思われるが、 O_3 や SO_2 との混合暴露による傷害発現の仕組みは明らかでない。

植物は、大気汚染物質による障害を免れる機構を持っている。第一の防御系は既に述べた気孔閉鎖である。これは植物ホルモンのアブシジン酸に依存しており、高濃度の大気汚染物質による急性傷害を防ぐのに役立つ。気孔を通過して植物体内に取り込まれた汚染ガスや、二次的に生成した毒物は、植物の代謝により解毒される。植物の種や品種により解毒能力に差があり、その能力を超えて毒物が蓄積すると傷害が現れると考えられる。また、汚染ガス暴露により、解毒の代謝活性が増大したり (SO_2 、 O_3 の場合)、毒物生成系が抑制される (NO_2 の場合) ことも明らかにしてきた。

2.1.2 大気汚染物質による障害における活性酸素の関与

SO_2 、 O_3 、 NO_2 に接触した植物は、葉の脱色、枯死などの傷害を受ける。これらの可視傷害の発現には光、酸素が必要なこと、活性酸素消去物質が傷害を緩和することなどから大気汚染物質による傷害に活性酸素が関与すると考えられるようになった。活性酸素とは酸素分子が励起あるいは還元された分子種であり、スーパーオキシドラジカル、過酸化水素、一重項酸素、水酸ラジカル等を指す。活性酸素は通常の生物の生命維持活動において必然的に生成しているが、生物が本来備えている活性酸素解毒系物質により、無毒化されている。大気汚染による植物障害の発現は植物の活性酸素解毒能力を越えた活性酸素が植物体内に蓄積したことが原因になっていると思われる。植物の活性酸素毒性防御を考える上でスーパーオキシドラジカル、過酸化水素の効率的な消去が重要である。この2分子種が細胞内に共存すると最も強い毒性を持つ水酸ラジカルが容易に生成する。植物の水酸ラジカルの消去能力は低いので、その前駆物質であるスーパーオキシドラジカル、過酸化水素を解毒しなければ、植物障害が現れる。大気汚染接触時の植物障害発現における活性酸素と活性酸素防御物質の関係は図1に示されている。

O_3 抵抗性植物を遺伝子工学的に開発しようとするとき、どの酵素遺伝子に注目するかが成功の鍵を握ると思われる。タバコ品種を変えてオゾン感受性と活性酸素防御系酵素含量の関係を調べた。 O_3 に最も感受性の高い品種 Bel-W3 のグルタチオン還元酵素 (GR) の比活性が低いことが明らかになった。低濃度 O_3 に接触したハウレンソウにおいてGRとアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (AP) の活性増加が認められた (図2)。これは O_3 存在下で細胞内の活性酸素濃度が増加し、それを消去することにより自己防御しようとする植物の適応機構が働いたものと思われる。GRは過酸化水素の消去系に関与する酵素の中では最も比活性が低く、活性酸素解毒の律速酵素になっているといわれている。以上のことから、GR、AP遺伝子を強化された植物は O_3 等の大気汚染に対する抵抗性を獲得する可能性がある。最近、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 遺伝子に関する形質転換植物の開発が報告された。この植物は活性酸素を生成する除草剤に抵抗性を獲得することが示された。植物が大気汚染に対して強抵抗性を獲得するために

はスーパーオキシドラジカルと過酸化水素両者の効率的な解毒が重要であり、そのためには、SOD、GR及びAP遺伝子を複合して導入することがよい結果を与えると思われる。

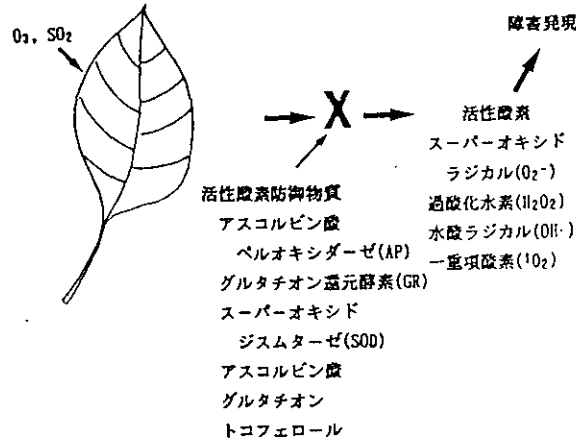


図1 オゾン、二酸化硫黄接触時の植物傷害発現における活性酸素と活性酸素防御物質の関係

オゾン、二酸化硫黄に接触した植物葉において活性酸素が生成蓄積し、傷害が発現する。しかし活性酸素解毒物質が多量に存在すると傷害が軽減される。

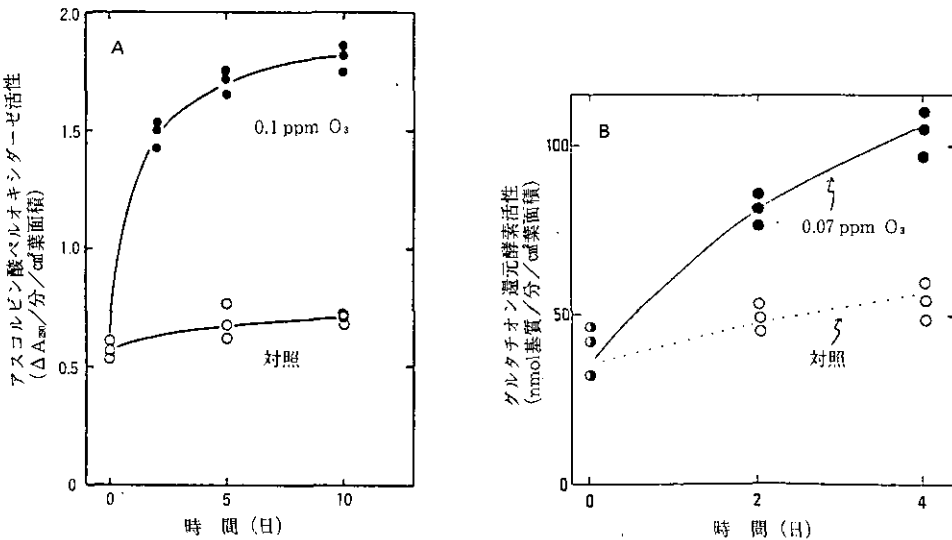


図2 低濃度O₃に接触したホウレンソウにおけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(A)、グルタチオン還元酵素(B)活性の変動

鉢植えホウレンソウを20℃、75%相対湿度、約30,000 luxの光照度の生育室で、(A)の場合0.1 ppm、(B)の場合、0.08 ppmのO₃に接触させ、経時的に葉を採取し、酵素活性を測定した。

2.1.3 大気汚染物質の膜脂質に及ぼす影響

(1) はじめに

光化学オキシダントに対する指標植物を作出するための基礎として、個々のオキシダント成分によって引き起こされる様々な生理的反応の中から、各々の成分に特異的な反応を明らかにすることが重要であろう。これまでの研究から、 SO_2 による植物の生理的影響については多くの知見が蓄積されているが、オキシダントの成分である O_3 、 NO_2 、ペルオキシアシルナイトレート (PANs) 等に関しては、植物に対する作用機構に不明の点が多い。そこで本研究では、光化学オキシダントの主成分である O_3 を取り上げ、植物の膜脂質に及ぼす影響を検討した。

(2) O_3 暴露による植物葉の膜脂質変化

植物を O_3 に連続的に暴露すると、一定時間が経過した後クロロフィル等の光合成色素の破壊が始まり、クロロシス等の可視傷害が生じるが、この傷害発現と平行して不飽和脂肪酸の過酸化分解が進行することを既に示している。また、この過程には活性酸素が関与していることも見いだしている。しかし、これらの現象は O_3 処理開始後かなり時間が経過した後に始まるものであり、二次的な O_3 傷害である可能性もある。そこで、より初期に何らかの脂質変化が見いだされないかと考え検討を行ったところ、 O_3 暴露開始直後から、葉の脂質組成が著しく変動することを見いだした。特に、葉緑体膜脂質のモノガラクト脂質 (MGDG) やジガラクト脂質 (DGDG) が大きく減少し、代わって中性脂質のトリアシルグリセロール (TG) が増加した。この事実は、 O_3 暴露初期に葉緑体膜の構造が崩壊していることを意味しており、植物細胞にとって致命的な影響であると考えられる。

葉緑体脂質の減少が O_3 の初期傷害である可能性をさらに検討するため、葉脂質を ^{14}C で標識した植物体を作成し、 O_3 に暴露した (図3)。含量測定の結果と一致して、MGDG、DGDGの ^{14}C が減少し、TGの ^{14}C が増加することを確認した。 ^{14}C によるトレーサー実験の結果は、上記の含量変化の結果をさらに裏付けるとともに、 O_3 が脂質クラス間の組替えを引き起こしていることを示しており、 O_3 が、正常葉では見られない脂質代謝を引き起こしていることが明らかになった。

(3) まとめ

O_3 による植物障害の初期過程において、葉の脂質組成、特に葉緑体膜の脂質が著しく減少することを見いだした。さらにこの現象は、 O_3 によって膜脂質が酵素的に代謝された結果であることが示された。したがって、この過程にかかわる酵素群を検討することで、指標植物作出の際、扱うべき酵素の知見が得られるものと思われる。また、 O_3 で見いだされたような脂質変化は、今のところ他の汚染ガスでは報告されておらず、 O_3 に特異的な反応である可能性が高いと考えられる。

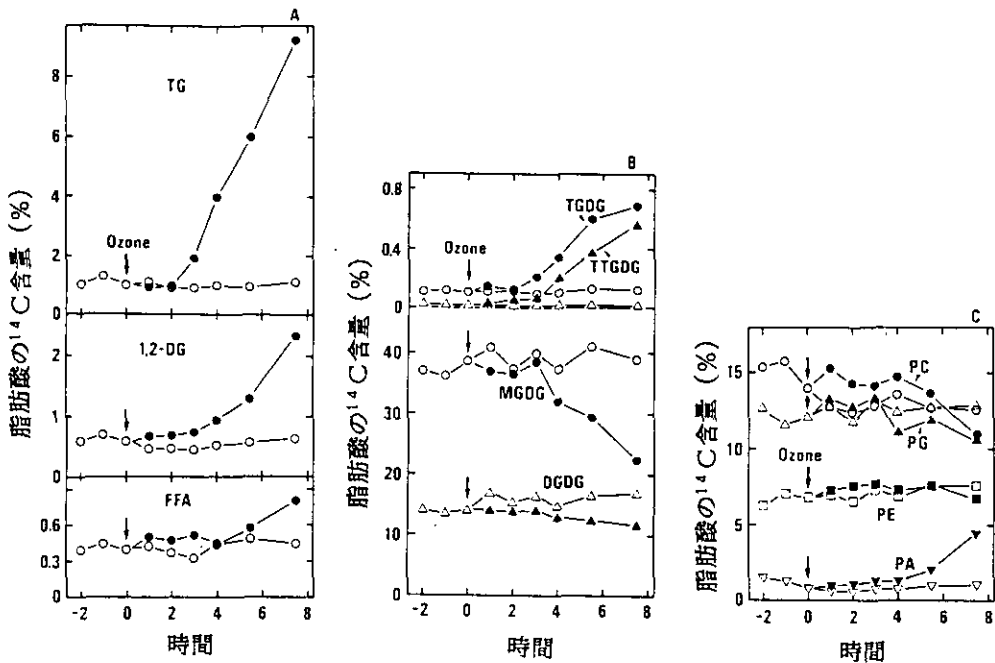


図3 O₃ (0.5 ppm) 暴露によるホウレンソウ葉脂質の放射能の変化

O₃: 暴露の2日前に、[1-¹⁴C] 酢酸を葉表面から取り込ませ、葉脂質を¹⁴Cで標識した。黒印はO₃に暴露した葉の脂質、白印は対照葉の脂質を示す。
 MGDG: モノガラクト脂質, DGDG: ジガラクト脂質, TGDG: トリガラクト脂質, TTGDG: テトラガラクト脂質, PC: フォスファチジルコリン, PG: フォスファチジルグリセロール, PE: フォスファチジルエタノールアミン, PA: フォスファチジン酸, TG: トリアシルグリセロール, DG: ジアシルグリセロール, FFA: 遊離脂肪酸。

2. 2 大気汚染物質感受性植物の選抜

2.2.1 大気汚染感受性と汚染ガス吸収速度

(1) はじめに

植物の大気汚染物質による障害の程度は、汚染物質の種類や、植物の種・品種の違い、さらには、環境条件によっても左右される。大気汚染物質が植物に被害を引き起こす際には、まず、汚染物質が植物に吸収・吸着される。したがって、植物の大気汚染物質感受性を支配する第一の要因は、植物による大気汚染物質の吸収・吸着である。大気汚染物質の一部は土壤に溶けて根から吸収されるものもあるが、植物に取り込まれた大気汚染物質の大部分は葉から吸収されたか、葉の表面に吸着したものである。

本項では、植物の大気汚染物質の吸収の機構について述べ、植物種によって吸収能力が異なる理由について考察する。また、大気汚染に対する感受性は、まず第一に大気汚染物質吸収量によっていると考えられるので、吸収と感受性との関連について述べる。

(2) 植物による大気汚染物質の吸収機構

植物は大気中の炭酸ガス (CO_2) を気孔から吸収して光合成作用によって糖類を合成し、それを用いて成長している。また、葉内の水分を気孔から大気中に蒸散作用によって放出して光による葉温の上昇を抑制している。そのため、古くから光合成や蒸散に対する気孔の作用、気孔の開閉機構などに関する数多くの研究がなされている。

気孔は、孔辺細胞、副細胞、呼吸腔から構成されている。通常、気孔は葉の表皮に分布している。また、葉の表裏両面に気孔が分布している両面気孔植物と、葉の片面にのみ分布する片面気孔植物がある。片面植物の多くは葉の裏面に気孔が分布している。一般に、両面気孔植物でも、気孔密度は裏面の方が表面よりも高く、気孔の大きさや気孔開度、環境に対する反応性も表面と裏面で異なる。

植物は大気中から CO_2 を吸収し水分を放出しているのと同時に、大気中の汚染物質をも気孔から葉内に取り込んでいる。 CO_2 や大気汚染物質などの大気中のガスは、大気と葉内におけるガスの濃度差にしたがって拡散によって葉内に吸収される。ガスの拡散は、次式によって表される。

$$J_{\text{gas}} = (C_{\text{air}} - C_{\text{leaf}}) / (1/g_{\text{air}} + 1/g_{\text{stm}})$$

この式において、 J_{gas} はガスの吸収速度、 C_{air} と C_{leaf} は、各々大気と葉内のガス濃度、 g_{air} と g_{stm} は、それぞれ葉面境界層と気孔でのガス拡散コンダクタンスである。上式からも明らかなように、ガスの吸収速度を律速する要因には、大気と葉内のガス濃度以外に、葉の表面で生じる葉面境界層コンダクタンス、気孔間隙を通過する際に生じる気孔コンダクタンスとがある。これらの要因は光、温度、水分、大気汚染物質などの環境要因及び齢、栄養状態、葉内構造などの植物側要因によって影響される。

(3) 単葉による大気汚染物質の吸収

植物のガス吸収能力は、大気汚染物質の種類によっても異なる。この違いを決めている要因として①大気汚染物質の種類による拡散係数の違い、②葉内の細胞を包んでいる水分への大気汚染物質の溶解度の違い、③植物細胞による大気汚染物質の代謝活性の違い、が考えられる。拡散係数が異なれば、吸収速度に差異が生ずる。また、水に対するガス溶解度が低ければ、大気と葉内の間に濃度落差が生じないため、植物によるガスの吸収速度は極めて低くなると考えられている。

近年、窒素酸化物による大気汚染が深刻な社会問題となっており、植物の大気浄化能力に期待が寄せられている。 NO_2 は気孔から吸収されたのち、細胞表面を覆っている水に溶解して硝酸と亜硝酸を生じる。こうして生じた硝酸と亜硝酸は、これらを代謝する酵素活性が植物体内で高いため、直ちに還元されてアンモニアからアミノ酸に代謝される。それゆえ、植物による NO_2 の吸収速度は非常に高い。気孔は環境条件の変化や大気汚染物質によってしばしば閉鎖するが、

かなりの高濃度 NO_2 処理によっても気孔の閉鎖は起らないため、植物による NO_2 吸収は長時間にわたって高い速度を維持している。一方、自動車から大量に放出されている一酸化窒素(NO)は水に対する溶解度が低く、植物の代謝活性も低いため、植物による NO の吸収速度は極めて低い。一酸化炭素(CO)も水に対する溶解度が低く、植物の代謝活性が低いため植物による CO 吸収速度は低い。このような汚染物質の溶解度とその代謝活性の差が大気汚染物質の植物に対する毒性の強弱を決めている一要因と考えられる。

(4) 大気汚染物質の吸収を支配する要因

一般に、植物個体もしくは植物群落によって生じる大気汚染ガス濃度の減衰の要因には、ガスの葉表面での吸着・崩壊と、気孔を通しての葉内への吸収とが考えられる。もし、ガスの吸収がもっぱら気孔を通して行われ葉面での吸着・崩壊がないか、もしくは一定であるならば、大気汚染物質の吸収速度と気孔コンダクタンスとの間に正の相関が期待される。しかし、わたしたちの研究によって明らかなように、植物の気孔開度は大気汚染物質によって変化するため、吸着と吸収の区別が困難である。そこで、多くのポプラの中から、大気汚染に対する気孔反応が鈍いポプラの一種を選抜し、同化箱法によって測定した SO_2 と O_3 の吸着(=吸着+吸収)速度の経時変化を測定した。その結果は既に報告しているが、結果を要約すると以下ようになる。 SO_2 吸着速度は、 SO_2 処理直後から急激に低下する。一方、 O_3 吸着速度は O_3 処理後2~3時間の間は一定であった。 O_3 を処理している間、気孔開度の変動が起らなかったことは気孔コンダクタンスが一定であったことから明らかである。すなわち、葉面への吸着は SO_2 で顕著であるのに対して、 O_3 では葉面での吸着はほとんど見られず、もっぱら気孔から葉内へ吸収されるものと思われる。しかし、葉面で O_3 の崩壊が起っているかどうかについては、この結果だけでは分からない。

種々の街路樹の O_3 吸収速度を調べた結果、 O_3 濃度が低く気孔開度の変化が起らない状態では、 O_3 濃度が上昇するにつれて O_3 吸着速度は直線的に増加した。上述のように、 O_3 は主として気孔から葉内に吸収され、葉面での吸着がないと思われる。また、9種類、11測定値の街路樹の単位 O_3 濃度当たりの O_3 吸着速度と気孔コンダクタンスとの間に直線関係が存在することからも、この推測が正しいものであることが裏付けられている。さらに、気孔コンダクタンスを0に外そうしたときの O_3 吸着速度がほぼ0になることより、葉面での吸着もしくは崩壊はほとんどないものと思われる。

樹種間での大気汚染物質吸収速度を比較すると、概して落葉樹の方が常緑樹よりも高く、落葉樹の中でもソメイヨシノの吸収速度が他の樹種よりも高かった。野外で生育している街路樹の気孔コンダクタンスの日変化を新宿、横浜、つくばで季節を変えて測定したところ、樹種による気孔コンダクタンスの違いは、上述の実験室での測定と同様の結果が得られた。また、常緑樹の冬期における気孔コンダクタンスは夏期のその10~20%にしかならなかった。すなわち、冬期

において大気汚染濃度が比較的高くても、植物の気孔コンダクタンスが低いために大気汚染物質を葉内に多量に吸収しない。そのため植物に障害が発現する確率は低いものと考えられる。これとは逆に、春期や夏期に大気汚染濃度が高いと植物は大気汚染物質を多量に葉内に取り込むため障害が発現が起りやすいものと考えられる。さらに、気孔コンダクタンスの大小から、落葉樹の方が常緑樹よりも大気汚染に対する抵抗性が低いものと考えられる。ただし、これらの抵抗性の大小は、葉内での大気汚染物質の解毒能力が樹種でほぼ一定とした場合であって、解毒能力が極端に低い樹種では低濃度の大気汚染物質によっても障害を受けるものと考えられる。

(5) 大気汚染物質吸収量と感受性

大気汚染濃度が高くても植物が大気汚染物質を葉内に吸収しなければ障害の発現は起こらないと考えられる。この考えの根拠は、大気汚染物質との単なる接触によってもたらされる障害は考慮に入れるほど大きいものではないからである。例えば、酸性雨による葉面可視傷害の発現は雨のpHが2.0以下にならないと起こらない。すなわち、接触によるだけでは大気汚染濃度が相当高くなければ障害の発現は起こらず、植物の葉面に散在する気孔から大気汚染物質を葉内に吸収して始めて障害が発現すると考えられる。それゆえ、大気汚染に対する感受性の植物種間差は大気汚染の吸収量に依存しているものと思われる。

29種の木本、草本植物の SO_2 に対する可視傷害の発現割合は SO_2 処理期間中の積算吸収量との間に正の相関関係があることを見てきており、 SO_2 に対する感受性の違いは気孔コンダクタンスの大小によってかなりの程度、説明できるものと思われる。 SO_2 による光合成阻害割合も積算 SO_2 吸収量との間に相関関係が見られた。これらの結果は SO_2 による障害発現には SO_2 吸収を支配する気孔コンダクタンスが重要な役割を担っていることを示唆している。しかし、 O_3 によって引き起こされる障害発現は、可視傷害の場合も光合成阻害の場合にも O_3 の吸収量との間に相関関係は見られず、葉内の解毒作用の強弱によっているものと考えられる。

(6) まとめ

以上述べたように、大気汚染物質に対する植物の感受性を決める要因として気孔コンダクタンスが重要で、気孔コンダクタンスの大きい植物を探索すれば感受性の高い植物を見つけだすことがある程度までは可能である。しかし、大気汚染物質の種類によっては気孔コンダクタンスのみを測定しただけでは感受性の高い植物を見つけだすことはできない。とりわけ、今日問題になっている光化学オキシダントの指標植物を探索するには他の要因を捜すべきであると考えられる。しかし、大気汚染物質の積算吸収量と感受性の間に明確な相関関係が見られないとしても、大気汚染物質が葉内に入らない限り障害は発現しないわけであるから、感受性の高い植物を探索するための第一段階としては気孔コンダクタンスの大小によって指標植物種としての有用性を検討すべきであろう。

2.2.2 光化学オキシダントに対する植物の感受性の種・品種間差

(1) はじめに

近年、PANによると思われる可視傷害が野外において様々な植物種に発現している。しかし、PANに対する感受性は植物種によって異なるばかりでなく、同一植物種であっても品種によって感受性が大きく異なることはよく知られている。指標植物を探索し選抜するためには、どのような植物種のどの品種が何の汚染物質に感受性が高いのかについて明らかにしておく必要がある。

ハツカダイコンは、これまでの研究結果からO₃に対して感受性が高いことが明らかになっており、ペチュニアはPANの指標植物として知られている。また、タバコの一品種 (Bel-W3) もO₃に対して高い感受性を有することが知られている。しかし、これらの植物種や品種がPANとO₃に対して、他の植物種、品種と比較した際にどの程度の感受性を示すのかについては明らかでない。そこで、光化学オキシダントの主成分であるO₃及びPANに対するペチュニア、タバコ等の9種の植物種の感受性の種間差、及びペチュニア、タバコ、ハツカダイコンの感受性の品種間差を調べた。なお、PANの処理は本特別研究によって開発した装置 (2.4節参照) を用いて行った。

(2) PAN及びO₃に対する感受性の植物種間差

PAN及びO₃に対する植物の感受性の種間差を調べるために、ペチュニア (ミッチェル)、タバコ (キサランチNC)、ハツカダイコン (コメット)、トマト (福寿2号)、ダイズ (早生-白鳥)、ハウレンソウ (ニューアジア)、ヒマワリ (ロシアンマンモス)、トウモロコシ (イエローデントコーン)、ラッカセイ (千葉半立) の9種の植物を用いて、PANあるいはO₃に5時間暴露し、可視傷害を観察した。低濃度のPANでは、多くの植物で葉裏面のブロンズ化、銀白化が見られ、高濃度では葉表面からも識別できるネクロシスが発現した。葉位別に見ると、展開中の若葉にPAN被害が集中した。一方、O₃による可視傷害は葉表面に白斑点が生じるのが特徴で、老化葉に被害が集中した。

植物を0.1 ppm PANあるいは0.2 ppm O₃に5時間暴露し、可視傷害を比較した (表1)。感受性が最も高かったのはペチュニアで、タバコとハツカダイコンがこれに続いた。トウモロコシとラッカセイは感受性が低かった。ペチュニアは0.05 ppm PAN暴露でもかなりの可視傷害が見られた。O₃に対しては、ハツカダイコン、トマトが感受性が高く、ペチュニア、ダイズ、ラッカセイは感受性が低く、PAN感受性とO₃感受性の間に相関関係は認められなかった。可視傷害発現の特徴の違いからも推測されるように、両者は全く異なるメカニズムで植物に作用していると思われる。

表1に同化箱法により植物のPAN吸収速度を測定した結果も示した。最も吸収速度が大きかったのは、感受性が中程度のヒマワリで、ハツカダイコン、トマトがこれに続いた。最も感受性が高かったペチュニアの吸収速度はヒマワリの約半分であった。しかし、タバコを除きPAN吸収

速度が低いトウモロコシ、ダイズ、ラッカセイはPAN感受性が比較的小さかった。PANの吸収もO₃と同様に気孔を経由して行われているが、以上の結果から、PAN感受性の植物種間差は吸収速度の違いのみによるのではなく、生理的な解毒能力の大小によって支配されていると考えられる。

表1 PANとO₃に対する植物の感受性の種間差及び植物のPAN吸収速度

植 物 種	被 害 度 ^{a)}		PAN吸収速度 ^{b)}
	0.1 ppm PAN	0.2 ppm O ₃	
ペチュニア (ミッチェル)	+++	-	6.7 ± 0.6
タバコ (キサンチNC)	++	+	3.3 ± 0.5
ハツカダイコン (コメット)	++	++	9.1 ± 1.0
トマト (福寿2号)	+	++	7.2 ± 0.5
ダイズ (早生・白鳥)	+	-	2.7 ± 0.7
ハウレンソウ (ニューアジア)	+	+	7.0 ± 0.5
ヒマワリ (ロシアンマンモス)	+	+	11.6 ± 1.0
トウモロコシ (イエローデントコーン)	-	+	1.3 ± 0.6
ラッカセイ (千葉半立)	-	-	3.8 ± 0.7

^{a)} ;被害度:強 (+++), 中 (++) , 弱 (+), 無 (-)

^{b)} ;吸収速度: $\times 10^{-5} \text{g PAN dm}^{-2} \text{h}^{-1}$

(3) PAN及びO₃に対する感受性の品種間差

PANとO₃処理によってペチュニア18品種に発現した可視傷害の程度を表2に示す。25 ppbのPAN処理によって可視傷害発現が顕著であったのは、ナナコンパクター系のホワイトであった。50 ppbのPAN処理では、ほかにホワイトエンサイン、タイタンレッド、タイタンホワイトに最も高い可視傷害の発現が見られた。この結果は、白花系統のペチュニアがPANに対する感受性が高いことを示している。タイタンレッドは赤花系統であるが、25 ppb PAN処理では可視傷害の発現は観察されなかったため、タイタン以外の白花系統よりもPAN感受性は低いものと思われる。一方、O₃に対する感受性は概して低く、ナナコンパクター系のサーモンに顕著な可視傷害が観察されただけであった。

タバコの8品種に対するPANとO₃の影響を調べた結果を表3に示す。PANに対してはブライトイエローとサムスンが、O₃に対しては、高感受性品種として有名なBel-W3が傷害を最も激しく受けた。O₃処理によって著しい可視傷害の発現が観察されたBel-W3でも、PAN処理による可視傷害の発現は見られず、同じ光化学オキシダントの成分であるPANとO₃の植物に対する作用機構は全く別であることが明らかになった。ハツカダイコンについても同様の調査

表2 PANとO₃による可視傷害発現のペチュニアの品種間差

品 種	P A N		O ₃
	25 ppb	50 ppb	200 ppb
ホワイトエンサイン	+	+++	-
タイタン系ローズ	±	++	+
タイタン系レッド	-	+++	-
タイタン系ブルー	-	+	+
タイタン系ホワイト	-	+++	-
リカバラ系ピンク	±	+	+
リカバラ系サーモン	-	+	+
ローズパラソル	+	+	-
レッド系チャンピオン	±	+	+
レッド系ピコッチー	±	+	-
ブルーフロスト	±	+	±
フルコンサーモン	±	+	+
ミッチェル	-	++	-
ナナコンバクタ系バイオレット	±	+	±
ナナコンバクタ系サーモン	±	+	++
ナナコンバクタ系ローズ	-	+	+
ナナコンバクタ系ホワイト	++	+++	±
ナナコンバクタ系スター	-	-	±

可視傷害の程度を5段階に分け、可視傷害の見られなかったものを-、可視傷害の最もひどかったものを+++とした。

表3 PANとO₃による可視傷害発現のタバコの品種間差

品 種	P A N			O ₃	
	100 ppb	150 ppb	200 ppb	100 ppb	200ppb
キサンチ	±	+	++	-	±
キサンチ NC	±	+	++	-	±
ブライトイエロー	++	++	+++	-	+
ホワイトパロー	-	-	+	+	++
Bel-W3	-	-	-	+++	+++
Bel-B	-	-	-	-	++
サムソン	+	++	+++	-	++
<i>Nicotiana glutinosa</i>	±	+	+	-	+++

可視傷害の程度を5段階に分け、可視傷害の見られなかったものを-、可視傷害の最もひどかったものを+++とした。

を行った(表4)。ハツカダイコン10品種のどの品種でもPANに対する感受性は低く、150ppb PAN処理によっても、4品種にわずかに可視傷害が発現したにすぎなかった。

指標植物としては、ある大気汚染物質に対して特異的に反応し、葉面に可視傷害が汚染物質の濃度に対応して発現するような植物種が適当である。表に示した結果からも、どの植物種のどの品種がPANやO₃の指標植物として適当かの判断は可能であるが、より分かりやすく比較するために、PAN処理によって発現した可視傷害の程度とO₃処理によって発現した傷害の程度との関係を図4に示した。図からも明らかなように、PANもしくはO₃のどちらかのみによって傷害が発現する植物種が汚染物質に特異的に反応していると考えられることから、PANの指標植物としてはペチュニアが、O₃のそれにはハツカダイコンが適していることになる。ペチュニアの中でも白花系統の品種がPANに対して感受性が高く、とりわけナナコンパクター系統の白花(ホワイト)がPANの指標植物に適しているものと考えられる。タバコの一品種であるBel-W3がO₃に極めて高い感受性を示すのに対してPAN処理によって全く傷害が発現しないため、O₃に対する指標性は高いが、実際に野外で栽培するには様々な制約があり、我が国で用いる指標植物としては不適当と思われる。ハツカダイコンの栽培は容易で、植物体が小さく、どこにでも配置できることから、'コメット'や'さくらんぼ'のような品種はO₃に対する指標植物として有効であるが、個体による傷害発現の程度に差があるので、個体差の少ない均一な個体を作成することが今後の課題である。

表4 PANとO₃による可視傷害発現のハツカダイコンの品種間差

品 種	PAN		O ₃
	100 ppb	150 ppb	200 ppb
コメット	—	—	+++
ホワイトチェリッシュ	—	—	—
フレンチブラックファースト	—	+	++
スパークラー	+	+	+
カラフルファイブ	—	—	+
紅白	±	—	+++
紅娘	±	—	++
さくらんぼ	—	—	+++
雪小町	±	+	++
大赤丸	±	+	+

可視傷害の程度を5段階に分け、可視傷害の見られなかったものを—、可視傷害の最もひどかったものを+++とした。

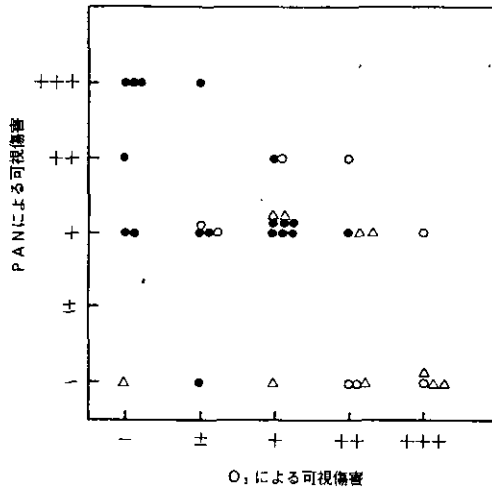


図4 PANとO₃処理によってペチュニア、タバコ、ハツカダイコンの種々の品種の葉面に発現した可視傷害の程度の関係
 ペチュニア (●), タバコ (○), ハツカダイコン (△)。可視傷害の程度を5段階に分け、可視傷害の見られなかったものを-, 可視傷害の最もひどかったものを+++とした。O₃濃度は200 ppb, PAN濃度はペチュニアで50 ppb, タバコとハツカダイコンで150 ppb。

(4) まとめ

9種の植物や、ペチュニア、タバコ、ハツカダイコンの様々な品種の光化学オキシダントに対する感受性を比較したところ、O₃に高感受性の植物とPANに高感受性の植物の間に相関関係が見られないこと、また、PANに対する感受性が植物のPAN吸収速度に必ずしも依存しないことが示された。ここで、調べた植物のうち、PANに対する指標植物として白花系統のペチュニア、O₃に対する指標植物としてハツカダイコンの‘コメット’、‘さくらんぼ’が優れていることが示唆された。しかしながら、これらの植物は大気汚染物質による傷害の程度に個体差があったり、被害の再現性にも問題があり、その原因を解明し、反応が均一で、傷害の再現性の高い指標植物を作成することが今後の課題である。

2.2.3 光合成阻害を指標としたPAN感受性植物の選抜

(1) はじめに

以前と異なり、近年の大気汚染物質は主に光化学オキシダントであり、その主な成分は道路脇などの発生源の近くではNO₂であるが、発生源から離れるに伴い、O₃とPANに変化することが知られている。これら汚染物質により植物に可視傷害が発現することが知られており、その植物種間・品種間差については2.2.2項で述べられている。一方、これら汚染物質は植物に可視傷害を発現させるばかりでなく、成長の低下等様々な障害を引き起こす。また、可視傷害の発現メ

カニズムと成長低下のメカニズムが異なるため、各々の障害について植物種間の感受性の順序が異なる可能性があるが、いまだ明確ではない。本報告では、成長のために必要な炭素の供給反応である光合成速度を指標として、PANに対する感受性の植物種間差を調べ、2.2.2項で示された可視傷害に対する感受性の順序と比較した。

(2) PAN暴露による光合成阻害の植物種間差

PAN暴露による植物の光合成阻害の植物種間差を調べるために、インゲン（新江戸川）、ペチュニア（タイタンホワイト）、トマト（福寿2号）、ナス（千両2号）、タバコ（キサランチ）の5種の植物に約0.2 ppmのPAN暴露処理を90分行い、処理前、処理時、処理終了後30分及び処理終了22時間後の光合成速度を測定し、表5にその結果を示した。なお、表に示した値は、各々処理前の値に対する相対値の2連の平均値で示した。

実験に用いたどの植物種も処理時及び処理終了後30分では、顕著な光合成速度の減少は認められなかった。しかし、処理終了22時間後で光合成速度が減少している植物種が認められた。光合成の低下を指標として、感受性が最も高い植物はインゲンであり、ペチュニア、ナス、トマト、タバコの順に小さくなった。

表5 PAN暴露による光合成阻害の植物種間差

	処 理 時	処理終了後30分	22時間後
インゲン	1.02	0.98	0.68
ペチュニア	1.06	1.02	0.86
ナス	0.98	0.97	0.86
トマト	1.01	0.97	0.94
タバコ	1.00	0.99	1.01

(3) まとめ

実験に用いた各植物種の品種が全く一致しているわけではないが、2.2.2項において示された可視傷害を指標とした感受性の植物種間差と本実験で得られて結果を比較すると、タバコを除き、概ね同様の傾向を示した。可視傷害を指標にした場合にはタバコは感受性の高い植物であったが、本実験結果ではタバコは実験植物種のうちで最も感受性の低い植物種であった。この違いはPAN暴露による可視傷害発現と光合成の低下のメカニズムが異なるためと考えられるが、その明確な解明は今後の問題であろう。また、本結果では、最もPAN感受性の高い植物種としてインゲンが選抜された。

2.2.4 種々の大気汚染物質に対する蘚苔類の感受性の検討

(1) はじめに

蘚苔類は陸上植物としては体制が単純であり、必要な養分を雨水や大気から得ていると考えられている。それゆえ大気成分の変動に対しては敏感に反応し、汚染が進むとその生存が著しく影響される可能性がある。これまで多くの野外調査などから、蘚苔類が大気汚染に対して敏感であることが指摘され、大気汚染の指標植物として利用することが検討されてきた。しかし、蘚苔類に及ぼす大気汚染の影響に関して、制御された環境条件のもとで大気汚染物質に暴露し、詳細な実験的検討を行った報告は少ない。そこで、当研究所に設置されている環境制御室を用いて、オゾン (O_3)、二酸化硫黄 (SO_2)、二酸化窒素 (NO_2) の暴露実験を行い、種々の蘚苔類の可視傷害や成長影響について検討するとともに、指標植物に適した種の検索を行った。

(2) O_3 感受性に関する蘚苔類の種間差

光化学オキシダントの主要成分である O_3 に対する感受性を検討するために、9属13種の蘚苔類を $0.1 \text{ ppm } O_3$ に暴露し、可視傷害や成長影響について検討した。野外で採集した種々の蘚苔類の茎葉体を十分洗浄した後、10%クノップ液を入れたプラスチックケース内で、気温： $5 \sim 15^\circ\text{C}$ 、12時間明期（照度： $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$ ）・12時間暗期の条件のもとで前培養した。新たに伸長したシュートを先端から $15 \sim 20 \text{ mm}$ 切り取り、実験材料とした。10%クノップ液の入った容器にシュートの基部 3 mm 程度が浸るように直立させて、気温： 20°C 、相対湿度： 100% 、12時間明期（照度： $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$ ）・12時間暗期、 CO_2 濃度： 400 ppm の条件に調節された人口光型環境制御室の中に設置した蘚苔類成長実験用装置を用い、10%クノップ液を連続的に供給しながら培養した。これらの種のシュートを上記条件下で $0.1 \text{ ppm } O_3$ に2週間暴露し、その可視傷害の程度やシュートの伸長量・新しく展開した葉の最大面積などを計測し、対照と比較した。

本研究に用いた蘚苔類13種を表6に示す。これらのいずれの種にも O_3 暴露による顕著な可視傷害は認められなかった。培養期間中の伸長量などの成長に関しては、① O_3 暴露の有無にかかわらずほとんど成長が認められなかった種、② シュートは成長するが O_3 暴露の影響はほとんど認められなかった種、③ 対照のシュートは成長するが O_3 暴露により成長が抑制された種に分類された。ツルチョウチンゴケ属の種は影響の程度に差があるものの、 O_3 暴露により成長抑制の傾向が認められ、 O_3 感受性が比較的高いと考えられた。

(3) ツルチョウチンゴケ属数種蘚苔類の SO_2 、 NO_2 、 O_3 及び $NO_2 + O_3$ に対する感受性

ツルチョウチンゴケ属の中で比較的均一な試料が多量に得られた、ツルチョウチンゴケ、コッポゴケ、アツパチョウチンゴケ、オオパチョウチンゴケの4種について、 SO_2 、 NO_2 、 O_3 の単独暴露、及び NO_2 と O_3 の複合暴露を行い、その可視傷害の程度やシュートの伸長量、生重量、乾重量、新しく展開した葉の最大葉面積、また側枝形成などについて計測し、これらの大気汚染

物質に対する感受性について検討した。実験方法は前記と同様であり、予めこれらの種の成長と光強度、大気の高湿度などとの関係を検討し、シュートの成長に適した培養条件 ($40 \mu\text{Em}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 気温: 20°C , 相対湿度: 100%) で実験を行い、対照と比較した。

0.1 ppm SO_2 の2週間連続暴露では、すべての種のシュートの先端部は脱色あるいは褐色化するなど顕著な可視傷害が発現した。 SO_2 暴露によって、シュートはほとんど伸長せず、新しい葉の展開は全く認められなかった。また、生重量や乾重量は暴露前よりもむしろ減少する場合もあった。莖頂部を切り取ったシュートに同様の処理をし、側枝や仮根の発生について検討したところ、 SO_2 暴露されたシュートでは側枝形成や仮根発生は全く認められなかった。0.05 ppm, さらに0.025 ppm に SO_2 濃度を下げて暴露したところ、0.1 ppm SO_2 ほどではないが、上部葉の脱色、先端部の褐色化など同様な可視傷害が認められた。 SO_2 暴露されたシュートでは伸長量、生重量、乾重量などの増加が認められたが、対照に比べると成長は顕著に抑制されていた。側枝形成はそれほど影響されなかったが、側枝の伸長量や仮根発生は、0.05 ppm, 0.025 ppm の SO_2 暴露でも顕著に抑制された。これらのツルチョウチンゴケ属の種は、 SO_2 に対して極めて高い感受性を有することが判明した。

表6 O_3 に対する蘚苔類の感受性¹

種名(和名)	学名	可視傷害	伸長	葉面積
オオヒモゴケ	<i>Aulacomnium palustre</i> (Hedw.) Schwaegr.	NS ²	—	—
タマゴケ	<i>Bartramia pomiformis</i> Hedw. var. <i>elongata</i> Turn.	NS	—	—
ケチョウチンゴケ	<i>Rhizomnium tuomikoskii</i> Kop.	NS	—	—
オオカサゴケ	<i>Rhodobryum giganteum</i> (Schwaegr.) Par.	NS	—	—
オオヒラツボゴケ	<i>Ectropothecium zollingeri</i> (C.Müll.) Jaeg.	NS	NS	—
ヒノキゴケ	<i>Pyrrhobryum dozyanum</i> (Lac.) Manuel.	NS	NS	—
コバノチョウチンゴケ	<i>Trachycystis microphylla</i> (Doz. et Molck.) Lindb.	NS	NS	—
ナメリチョウチンゴケ	<i>Mnium laevinerve</i> Card.	NS	NS	*
ツルチョウチンゴケ	<i>Plagiomnium maximoviczii</i> (Lindb.) Kop.	NS	NS	***
コツボゴケ	<i>Plagiomnium acutum</i> (Lindb.) Kop.	NS	*	***
ヤマトチョウチンゴケ	<i>Plagiomnium japonicum</i> (Lindb.) Kop.	NS	***	***
アツバチョウチンゴケ	<i>Plagiomnium succulentum</i> (Mitt.) Kop.	NS	***	*
オオバチョウチンゴケ	<i>Plagiomnium vesicatum</i> (Besch.) Kop.	NS	*	***

¹ シュート12本を0.1ppm O_3 に2週間暴露した後、各パラメーターを計測し、対照と比較した。

² * : 有意差5%, *** : 有意差0.1%, NS : 有意差なし, — : シュート伸長あるいは新葉展開ほとんどなし。

一方、これらの種を0.1 ppm NO₂に2週間連続暴露したところ、可視傷害は全く認められず、また伸長量、生重量、乾重量、葉面積、側枝形成などの成長量にも影響は認められなかった。多くの種子植物の場合と同様に、これらの藓苔類もNO₂に対する感受性は低いようである。0.1 ppm O₃の単独暴露では、可視傷害は4種とも発現しなかったが、前述とほぼ同様に成長への影響が確認された。O₃による成長抑制の程度はオオバチヨウチンゴケ、アツバチヨウチンゴケで大きかった。0.1 ppm O₃と0.1 ppm NO₂の複合暴露でも、可視傷害は発現しなかったが、シュートの伸長や葉面積などの成長抑制が認められた。しかし、複合暴露による成長抑制は0.1 ppm O₃単独暴露による成長抑制とそれほど大きな差はなかった。オオバチヨウチンゴケに対する種々の大気汚染物質の影響を表7に示す。

表7 SO₂, NO₂, O₃, NO₂+O₃がオオバチヨウチンゴケに及ぼす影響¹

汚染ガス (ppb)	SO ₂			NO ₂	O ₃	NO ₂ +O ₃
	(25)	(50)	(100)	(100)	(100)	(100)+(100)
可視傷害	*** ²	***	***	NS	NS	NS
伸長量	***	***	***	NS	*	**
生重量	**	***	***	NS	NS	NS
乾重量	*	*	***	NS	NS	NS
葉面積	***	***	***	NS	***	*
側枝形成	NS	NS	***	NS	NS	-

¹ シュート12本を0.1 ppm O₃に2週間暴露した後、各パラメーターを計測し、対照と比較した。

² * : 有意差5%, ** : 有意差1%, *** : 有意差0.1%, NS : 有意差なし, - : 実験していない。

(4) まとめ

これまで、野外調査などから藓苔類が大気汚染、特にSO₂に対して敏感であることが指摘されてきたが、低濃度の汚染物質暴露による実験的な検討はほとんど行われていなかった。本研究では、厳密に制御された環境条件のもとで0.1 ppm以下のO₃, SO₂, NO₂などの大気汚染物質に種々の藓苔類を暴露し、詳細な実験的検討を行った。その結果、①高等植物の場合と同様に藓苔類の種によって感受性に差があり、今回検討した種の中では、ツルチヨウチンゴケ属の種が比較的大気汚染物質に敏感であること、②藓苔類シュートに可視傷害が認められなくても、伸長量などの成長が抑制される場合のあること、③ツルチヨウチンゴケ属の種に対する大気汚染物質の毒性影響はSO₂>O₃>NO₂の順に大きいことなどが明らかとなった。これら大気汚染物質に対する藓苔類の感受性の種間差の原因については今後の課題であるが、ツルチヨウチンゴケ属内でも、オオバチヨウチンゴケやアツバチヨウチンゴケなど大型の種がSO₂やO₃に対する感受性が比較的高かったため、これらの種は大気汚染の指標植物として有効であろうと思われる。

今後、さらに種々の大気汚染物質に対して感受性の高い種を検索すると共に、その影響機作の解明に関する研究が必要であろう。また、2.6.3項に記されているように、オオバチョウチンゴケなど比較的大気汚染物質に感受性の高い種は、ブリオメーターなどの植物計（指標植物）に利用することができる。

2. 3 大気汚染抵抗性に関与する遺伝子の単離と遺伝子組換え

2.3.1 アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子の単離

(1) はじめに

2.1.2項で述べたように、大気汚染物質によって引き起こされる植物の傷害には活性酸素が関与している可能性が高い。したがって、植物の活性酸素解毒能を変えることにより大気汚染抵抗性を変化させることができると期待される。私たちは、植物においてその存在が知られているいくつかの活性酸素解毒酵素のうち、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（A P）遺伝子の単離を試み、また、グルタチオンレダクターゼ（G R）の遺伝子进行操作し、植物の大気汚染抵抗性が変化するかどうかを調べてきた。

G Rの遺伝子は既然大腸菌から単離されていたが、A Pの遺伝子はまだどの生物からも単離されていなかったため、遺伝子操作を行うためにはまずこの遺伝子を単離することから始めなければならなかった。私たちはホウレンソウからのA Pタンパク質の単離、精製に成功しているため、それに対する抗体を作製し、それを用いて植物からA Pの遺伝子をクローン化しようと考えた。

(2) ホウレンソウより単離した酵素に対する単クローン性抗体

一般に植物にはA P以外にも多くのアイソザイムからなる様々なペルオキシダーゼが存在し、それらの中にはA Pと類似の構造を有するものがある可能性がある。ここで用いる抗体は、A Pだけを特異的に認識するものである必要があるため、私たちは単一の構造を認識し、特異性に優れた単クローン性抗体を作製することにした。

ホウレンソウの緑葉から精製したA Pを抗原としてマウスに注射した後、リンパ球を骨髄腫細胞と融合させ、合計8つの抗A P単クローン性抗体を得た。これらの抗体の性質を表8、図5及び図6にまとめた。得られた標品の結合力（抗体力価）は互いに異なり、認識している構造（A Pのトリプシン処理産物との反応性）も同じではなかった（表8）。しかし、いずれもA Pと思われる分子量約3万のタンパク質に対する反応性について高い特異性を示した（図5）。また、これらの抗体の結合がA P活性に及ぼす影響を調べた結果、クローンによって様々な程度にA P活性を阻害することが分かった（表8、図6）。これらの結果は、得られた単クローン性抗体が確かにA Pに対するものであることを示唆している。特に、3つのクローン（A P 1、A P 3、A P 8）は、A P活性を顕著に阻害することからA Pの機能に重要な構造領域を認識している可能性が高い。

このように、得られた抗体はすべてハウレンソウのAPと特異的に結合すると考えられる。これらの抗体を用いてハウレンソウ以外の植物からAPの遺伝子を単離することも可能と思われるが、この場合には、これらの抗体と目的とする植物のAPとが結合する必要がある。そこで、これらの単クローン性抗体と7種の異なる植物のAPとの結合能をイムノプロットティングにより調べ、その結果を表8にまとめた。AP 2, AP 5, AP 7はハウレンソウのAPとのみ結合したが、それ以外のクローンのいずれかが、ほかの7種の植物のAPと結合し得ることが分かった。したがって、これらの単クローン性抗体は、植物からAP遺伝子を単離する際の優れたプローブとして使用できることが分かった。

表8 ハウレンソウAPに対する単クローン性抗体の性質

クローン	AP 1	2	3	4	5	6	7	8
Igサブクラス	G 1	G 1	G 1	G 1	G 1	G 1	G 1	G 1
抗体力価 ^a	500	40	400	100	10	200	20	400
酵素活性阻害 ^b	++	-	++	-	+	-	+	++
トリプシン処理により生じる 15kDaフラグメントとの反応性 ^c	-	+	-	-	+	+	+	-
異種の植物の同酵素 (30kDa) との反応性 ^c								
ハウレンソウ	+	+	+	+	+	+	+	+
フダンソウ	+	-	+	-	-	+	-	+
シロザ	+	-	+	-	-	+	-	+
タバコ	+	-	+	+	-	+	-	+
アサガオ	+	-	+	+	-	+	-	+
シロイヌナズナ	+	-	+	+	-	+	-	+
エンドウ	-	-	+	-	-	+	-	+
イネ	+	-	+	-	-	+	-	+

^a: 酵素免疫法による測定で抗体の結合量が1/2に減少するときの抗体産性細胞上澄み液の希釈率。

^b: -: 作用なし, +: 阻害, ++: 強く阻害。

^c: +: 結合, -: 無反応。

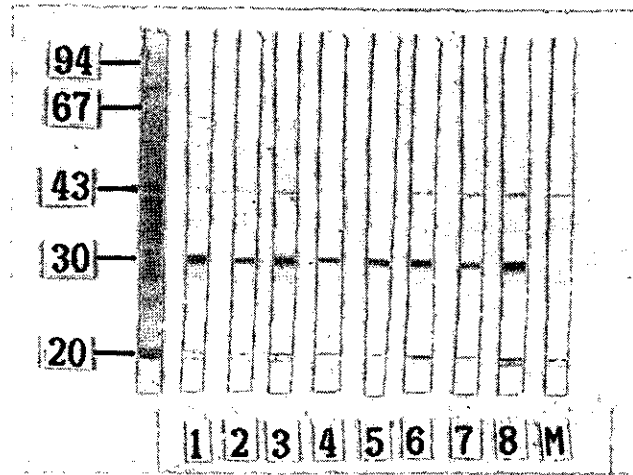


図5 ホウレンソウ葉タンパク質の単クローン性抗体によるイムノブロッティング
 ホウレンソウ緑葉の抽出液を12.5%ポリアクリルアミドゲル上でSDS電気泳動
 した後、各単クローン性抗体によりイムノブロッティングを行った。
 1~8, AP1~AP8; M, 細胞膜上にある未同定の糖タンパク質に対する抗
 体。左側の数値は分子量 (kDa)。

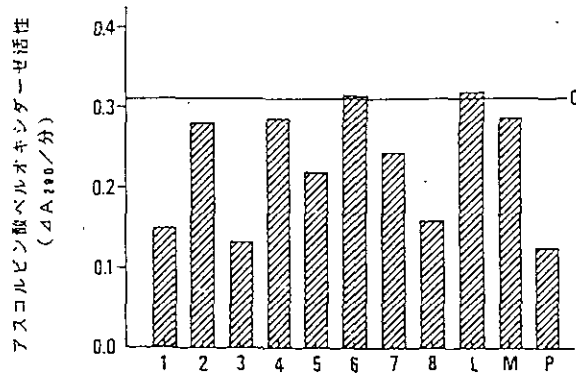


図6 AP活性に及ぼす単クローン性抗体の作用

ホウレンソウから部分精製されたAPを単クローン性抗体と混ぜ、0℃で2時間
 放置した後AP活性を測定した。横軸の数字または文字については図1参照。
 L: キュウリのクロロフィル a, b 結合タンパク質に対する単クローン性抗体,
 P: APに対するマウス抗血清, C: 対照 (抗体を全く加えなかったもの)。

(3) シロイヌナズナのアスコルビン酸ペルオキシダーゼ c DNA の単離

シロイヌナズナは、ゲノムサイズが小さいので、遺伝子の研究に適している。シロイヌナズナの AP の c DNA を得るために、種々の c DNA 断片を含む λ ファージの混合物である c DNA ライブラリーから、AP の c DNA を含む λ ファージを単離しようとした。そのため、c DNA 上の遺伝情報に基づいて AP タンパクを産生している λ ファージを、単クローン性抗体 AP 1 と AP 6 の混合物との反応性を指標にして探索した。8.5 × 10⁵ 個の組換え体 λ ファージをスクリーニングした結果、抗体と反応する λ ファージが 5 個得られた。これらに含まれる c DNA をプラスミドに移した後、制限酵素を用いて調べたところ、3 種類 (APm 1, 2, 3) であり、APm 2, 3 は最も長い APm 1 が切れたものであることが分かった。これらが AP の c DNA であることを確認するため、 λ ファージの産生するタンパク質とホウレンソウ AP に対する単クローン性抗体との反応性をドットプロット法で調べた (図 7)。3 種類の c DNA (APm 1, 2, 3) から作られたタンパク質をフィルターに固定した後 (gt11 は c DNA なしのコントロール)、それぞれの単クローン性抗体との反応を発色で調べた結果、シロイヌナズナ AP にも反応しうる 5 種の抗体 (AP 1, 3, 4, 6, 8) のうち、4 種の抗体 (AP 1, 3, 6, 8) が反応したことから、AP の c DNA が得られたことが確かめられた。

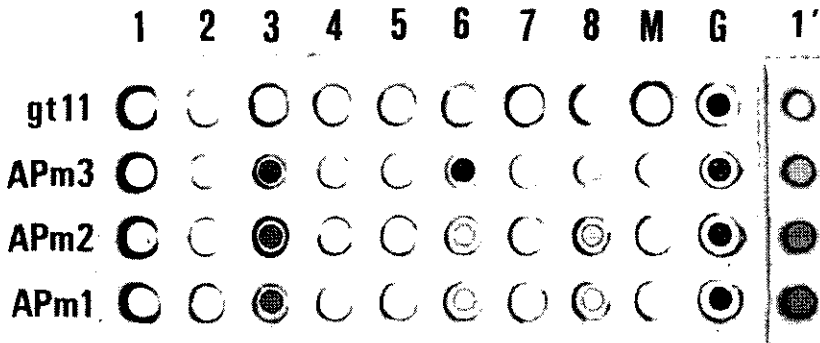


図 7 ホウレンソウ AP に対する単クローン性抗体の c DNA 由来タンパク質との反応
1' は 1 の抗体濃度を 10 倍にしたもの。M, G はそれぞれネガティブ及びポジティブコントロールの抗体。

得られた c DNA を植物に導入できるように操作するためには、まず、その構造を明らかにしなければならない。DNA は 4 種のヌクレオチド (A, C, G, T) がつながってできている。そこで、最も長い APm 1 のヌクレオチド配列 (塩基配列) を決定した (図 8)。ヌクレオチド 3 つでタンパク質のアミノ酸が 1 つ決まるので、ヌクレオチド配列が分かればタンパク質のアミノ酸配列を推定することができる。推定される AP のアミノ酸配列を図 8 のヌクレオチド配列の

下に一文字記号で示した。シロイヌナズナAPのN末端を決定するため、シロイヌナズナの葉から抗体を用いてAPを精製し、プロテインシーケンサによりアミノ酸配列を調べたところ、図4に下線で示したアミノ酸配列に完全に一致した。これにより、この酵素のN末端が決定されるとともに、このcDNAがシロイヌナズナのAPのcDNAであることが確認された。シロイヌナズナAPのN末端アミノ酸配列は、チャの葉緑体型APのN末端配列とは類似していなかったが、我々が明らかにしたホウレンソウの葉緑体型APのN末端配列とは非常によく類似していた(図9)。

```

GATTTTATTATCCTTCCTCGAAACAAGAGCTTAGCTAAGATGACGAAGAACTACCCAACC 60
D F I I L P R N K S L A K M T K N Y P T
GTGAGCGAAGATTACAAGAAGGCTGTTGAGAAGTGCAGGAGGAAGCTCAGAGGTTTGATC 120
V S E D Y K K A V E K C R R K L R G L I
GCTGAGAAGAACTGTGCACCCATCATGGTCCGACTCGCATGGCACTCTGCTGGAACITTT 180
A E K N C A P I M V R L A W H S A G T F
GATTGTCAATCAAGGACTGGAGGTCCATTCCGGAACAATGAGGTTTGACGCTGAGCAAGCT 240
D C Q S R T G G P F G T M R F D A E Q A
CATGGAGCCAACAGTGGTATCCACATGCTCTTAGGTTGTTGGACCCCATCAGGGAGCAA 300
H G A N S G I H I A L R L L D P I R E Q
TCCCTACCATCTCTTTTGCTGATTTCCATCAGCTTGCTGGTGTGTTGGCCGTTGAAGTT 360
F P T I S F A D F H Q L A G V V A V E V
ACTGGTGGCCCTGACATTCCTTTCCACCCTGGAAGAGAGGACAAGCCCCAACCCACCTCCA 420
T G G P D I P F H P G R E D K P Q P P P
GAGGGTCGCTTCCTGATGCTACCAAGGGTTGTGACCATTGAGAGATGCTTTGCTAAG 480
E G R L P D A T K G C D H L R D V F A K
CAGATGGGCTTATCTGACAAAGACATTGTGGCTTTATCTGGTGCCCACTCTGGGACGA 540
Q M G L S D K D I V A L S G A H T L G R
TGCCACAAGGATAGGTCTGGCTTCGAAGGTGCATGGACATCAAACCTCTAATCTTCGAC 600
C H K D R S G F E G A W T S N P L I F D
AACTCTTACTTCAAGGAACTCTTTGAGCGGAGAGAAGGAAGGCCTTCTTCTCAGCTTGTCTCT 660
N S Y F K E L L S G E K E G L L Q L V S
GACAAGCACTATTGGACGACCCCTGTTTTCCGTCCTTTGGTGGAGAAATACGGCTGTGAT 720
D K A L L D D P V F R P L V E K Y A A D
GAAGATGCCTTTTTCCGCTGATTACGCTGAGGCCACATGAAGCTTTCTGAGCTTGGGTTT 780
E D A F P F A D Y A E A H M K L S E L G F
GCTGATGCTTAAAGCTGTGACGTATGCTCTGTGTGTGTGTGTGTCTCCCGAGAGTCAT 840
A D A *
GGCTGTTTTTGGTTGGGGCTGGAGGGTGCATTGCATTTGAACTTTGTCATATGATTG 900
CTTAATGTACTCTCGGATTTACGTATCTGTTTTTTTCCGGTGGGTTGCGATTGAACACAT 960
CCGTGCGCTTTTGCTGCTTAGACACATTAATAAAAATAATTCTCTCGATAAAAAAAAAA 1020

```

AAA

図8 シロイヌナズナAP cDNAのヌクレオチド配列と推定されるアミノ酸配列

*印は翻訳終止暗号(TAA)を示す。箱で囲んだ配列は最後尾にあるポリ(A)をつけるシグナル。下線で示したヌクレオチド配列は特徴的なポリ(GT)配列。下線で示したアミノ酸配列はプロテインシーケンサで決定したN末端配列に一致する配列。


```

チヤ APX II      PASDPDELKSAREDIKELLNT---
               . *
シロイヌナズナ AP  TKNYPTVSEDYKKAVEKCRRK---
               *.*.*.* *.*.*.*
ホウレンソウ AP-II GKSYPVHENYQKXIEK---

```

図9 APのN末端アミノ酸配列の比較
 (*) 一致しているアミノ酸, (・) 性質の似ているアミノ酸。

ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列に基づき、シロイヌナズナAPは249個のアミノ酸からなり、分子量はプロトヘム1個を含めて28.0kDaと計算される。推定されるアミノ酸配列を既知の他のタンパク質のアミノ酸配列と比較したところ、シロイヌナズナAPは、植物で従来から知られているグアヤコールベルオキシダーゼより、酵母のシトクロムcベルオキシダーゼによく似ているという興味深い知見が得られた(図10)。

今後は、このcDNAをベクターに連結し、植物に導入することにより、植物の大気汚染耐性が変化するかどうか調べる予定である。

```

AP)   TKNYPTVS-----10EDYKKAVEKCRRKLRGLIAEKN---30CAPIMVRLAWHSAGTFDCQ
      * * * * *
CCP)  TTPLVHVAVSEKGRSYEDFQKVYNAIALKLRDDEYDNYIGYGPVLRVLAWHISGTWDKH
      10      20      30      40      50↑↑      60

AP)   50SRTGGPF-60GTMRFDAEQAHGANSGIHIALRLLDPIREQFPTISFADFHQLAGVVAVEVTG
      * * * * *
CCP)  DNTGGSYGGTYRPFKKEFNDSNAGLQNGQFKFLEPIHKFEPWISSGDLFSLGGVTAVQEMQ
      70      80      90      100      110      120

AP)   110GFDIPFHPGREDKPQ--130PPPEGRLPDATKGCDDLDRDVFQKMGSLSDKDIVALSGAHTLGR
      * * * * *
CCP)  GPKIPWRCGRVDTPEDTTPDNGRLPDADKDGAVRVTFFQR-LNMNDREYVALMGHALGK
      130      140      150      160      170      ↑

AP)   170CHKDRSGFEGAWTSNPLIFDNSYFKELLS-----200GEKEGLLQLVSDKALL
      * * * * *
CCP)  THLKNSGYEGPWGAANNVFTNEFYLNLLNEDWKLEKNDANNEQWDSKSGYMMLPTDYSLI
      180      190↑      200      210      220      230      ↑

AP)   220DDPVFRPLVEKYAADEDAFFADYAEAHMKLSELGFA---240DA
      * * * * *
CCP)  QDPKYLSI VKEYANDQDKFFKDFSKAFKLENGITFPKDAPSPFIFKTLLEEQGL
      240      250      260      270      280      290

```

図10 シロイヌナズナAPと酵母シトクロムcベルオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性

AP: シロイヌナズナ・アスコルビン酸ベルオキシダーゼ, CCP: 酵母シトクロムcベルオキシダーゼ, (*) : 一致しているアミノ酸, (・) : 性質の似ているアミノ酸, (—) : 配列が最も一致するように入れたギャップ, (↑) : 酵母シトクロムcベルオキシダーゼの活性部位のアミノ酸。

(4) まとめ

活性酸素の解毒の最終段階である過酸化水素とアスコルビン酸との反応を触媒する酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼのcDNAのクローニングを試みた。そのため、ホウレンソウから単離したAPを用いて単クローン性抗体を作製した。この抗体を用いて、シロイヌナズナのcDNAライブラリーよりシロイヌナズナAPのcDNAを得ることができた。現在のところ、タバコのAPの遺伝子は単離されていないが、ここで得られたcDNAをタバコに導入することによってタバコのAP活性を高めるだけでなく、もし、シロイヌナズナのAP遺伝子とタバコのAP遺伝子の相同性が高ければ、タバコのAP活性を低下させることも可能と思われる。このようにして、タバコのAP活性を自由に改変することができれば、組換えタバコの大気汚染耐性と比較することにより、植物の大気汚染耐性・感受性とAPとの関係を明らかにすることができる。

2.1.2項で示したように、 O_3 暴露によりホウレンソウのAP活性が増大することが明らかになっている。現在、APのcDNAを用いて核のAP遺伝子の単離を試みているが、核のAP遺伝子の単離に成功すれば、その調節領域を調べることにより、 O_3 による遺伝子発現制御に関する知見を得ることも可能と思われる。

2.3.2 大腸菌グルタチオンレダクターゼ遺伝子を用いた遺伝子組換えタバコの作製と大気汚染抵抗性

(1) まえがき

活性酸素解毒酵素の1つであるグルタチオンレダクターゼ (GR) の遺伝子はまだ植物から単離されていないが、大腸菌からは単離され、その構造が決定されている。そこで、大腸菌のGR遺伝子を入手し、大腸菌GR酵素の性質を調べてこの酵素が植物体内でも活性を示し得ることを確認した後、このGR遺伝子を植物に導入し、得られた遺伝子組換えタバコの大气汚染抵抗性について調べた。遺伝子組換えタバコ作製の大まかな道筋を図11に示す。

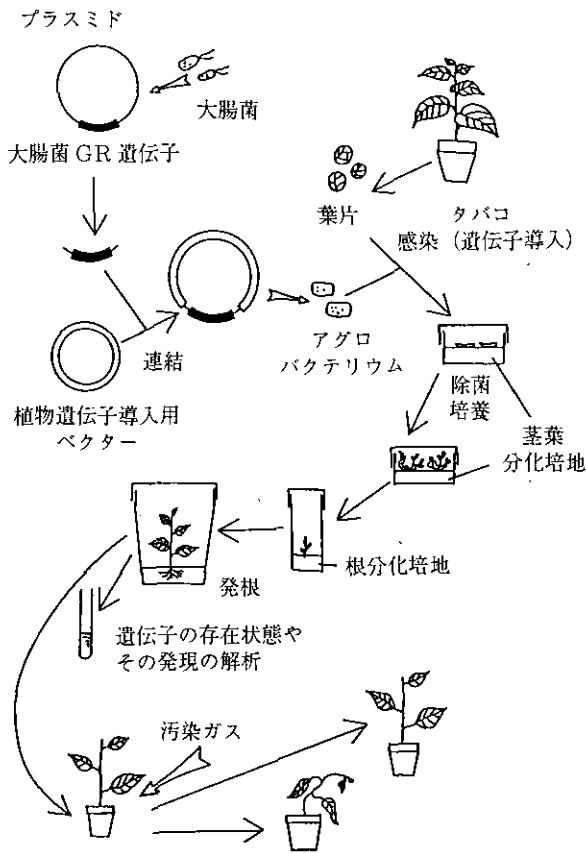


図11 大腸菌グルタチオンレダクターゼ遺伝子導入による大気汚染抵抗性タバコ作製の道筋

(2) 大腸菌GR遺伝子の調製とこの酵素の酵素化学的性質

R. N. Perham により大腸菌GR遺伝子がプラスミド上にクローニングされているので、このプラスミド (pGR) を譲り受けた。pGR 上のGR遺伝子は、直接には植物導入用のプラスミド・ベクターに結合できないため、制限酵素でpGRを切断してGR遺伝子を単離し、これをベクター pBluescript IIKS (+) に組み込み、大腸菌に導入した (図12参照)。こうして得られた大腸菌は、組換え前のもの比べて、約15倍のGR活性を示した。植物のGRは通常、葉緑体のストロマに存在して働いているので、大腸菌GRを植物に導入する前に、この酵素がストロマで働くことができるような性質であるかどうかを調べなければならない。大腸菌GRのpH依存性を調べた結果を図13に示す。葉緑体ストロマのpHは中性から弱アルカリ性領域にあるが、大腸菌GRは中性付近で高い活性を示しており、植物体内でも機能し得ることが示唆された。

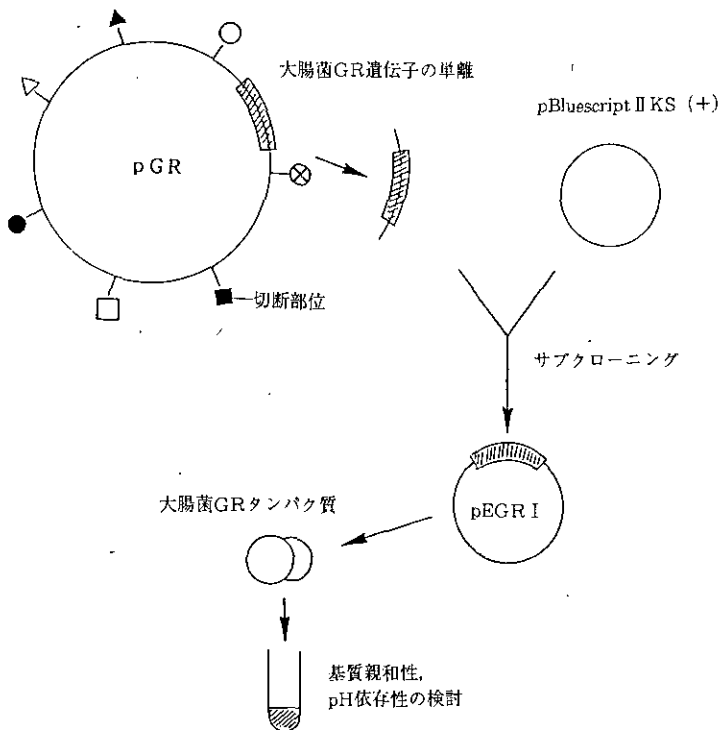


図12 大腸菌グルタチオンレダクターゼ遺伝子の調製の流れ図

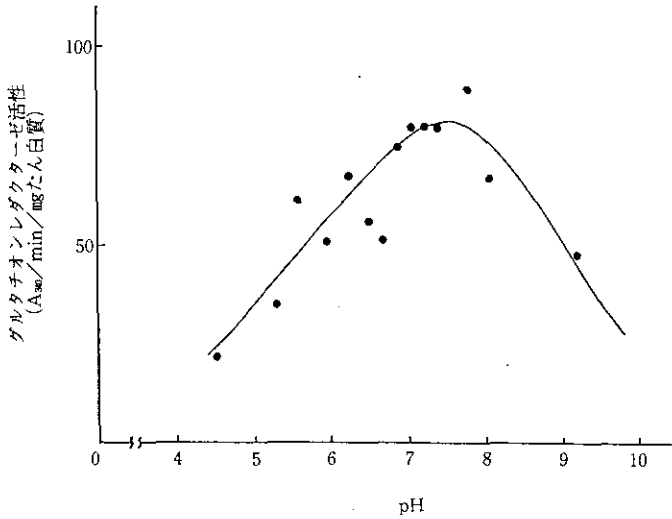


図13 大腸菌グルタチオンレダクターゼのpH依存性

(3) 大腸菌GR遺伝子のタバコへの導入

こうして得られたGR遺伝子の翻訳開始部位のDNA塩基配列を真核生物のリボソームによる翻訳に適したものに変わってから、TiプラスミドベクターpBI121 (Clontech, USA) に組み込んだ。こうしてできたプラスミドpEGR4の構造を図14に示す。GRは植物の細胞質だけでなく、葉緑体中にも存在することが知られている。そこで、大腸菌GRを葉緑体内に持つタバコをも作出するため、GR遺伝子の5'上流にマンテマのフェレドキシンの通過ペプチド（葉緑体包膜を通過するために必要なペプチド）の暗号を担っているDNA鎖をつないで同様にベクターに組み込み、プラスミドpEGR6を作製した。

作製したプラスミドpEGR4及びpEGR6を土壌菌 (*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^r/pGV2260) に導入し、さらにそれらの菌をタバコ (*Nicotiana tabacum* SR1) の葉片に感染させることにより、大腸菌GR遺伝子をタバコの細胞に導入した。また対照実験として、選択マーカーである大腸菌NPTII遺伝子（カナマイシン耐性を付与する）のみを同様の手法でタバコに導入した。これらの遺伝子を導入した後、カナマイシンを含む培地上で生育してきた組換えタバコをバーミキュライトの入ったポットで栽培し、種子を得て、3代目まで育てた。植物体内における大腸菌GRを検出するために、大腸菌GRを精製し、これに対する抗体を作製した。この大腸菌GRに対する抗体はタバコのGRとは反応しなかったため、タバコに導入した遺伝子の産物である大腸菌GRを免疫化学的に検出するのに利用できることが分かった。

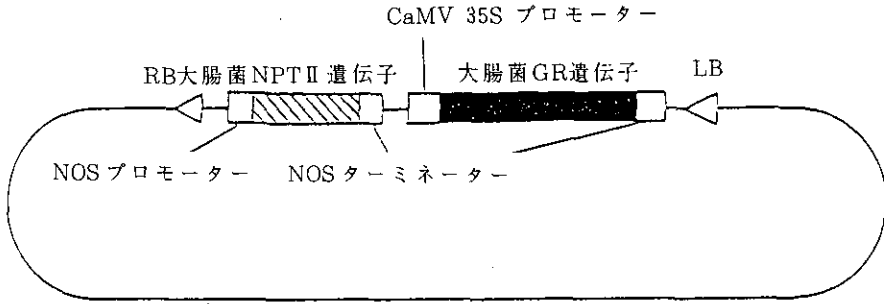


図14 プラスミド pEGR4 の構造

RB, LB: T-DNAの右側及び左側の境界領域。これらに挟まれたDNA鎖が植物細胞内に移される。NOS: 土壌菌ノバリン合成酵素。CaMV 35S: カリフラワーマザイクウイルスの35SRNA。NPTII: ネオマイシンホスフォトランスフェラーゼII。カナマイシン耐性を付与する酵素。このほか、CaMV 35Sプロモーターと大腸菌GR遺伝子の間にマンテマのフェレドキシンの通過ペプチド遺伝子を導入したもの (pEGR6) も作製した。

まず、プラスミド pEGR4 を使って遺伝子導入を行い、多くの遺伝子組換えタバコを得た。そのうち8個体の1世代目のタバコ葉の抽出液について、大腸菌GRに対する抗体によりイムノブロットングを行った結果、それらすべての個体の葉中に分子量49,000の大腸菌GRが存在していることが分かった。2世代目以降のタバコについても同様にGR遺伝子の葉中での発現が確認された (図15)。さらに酵素活性の測定により、GR遺伝子の発現量は個体ごとにかなり異なることが分かった (図16)。また、プラスミド pEGR6 を用いて遺伝子導入を行った場合にも同様に様々なGR活性を持った組換えタバコが得られた。導入したGR遺伝子の産物である大腸菌GR酵素が、タバコ葉の葉緑体中に存在するかどうかを明らかにするため、細胞分画を行ってそれぞれの画分についてイムノブロットングを行った結果、大腸菌GRが細胞内の葉緑体中に存在していることが分かった。なお、pEGR4 を用いて遺伝子導入を行った場合には、大腸菌GRは葉緑体中には検出されなかった。

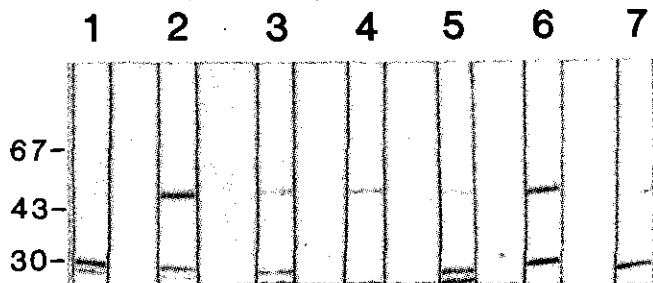


図15 pEGR4を用いて遺伝子導入を行ったタバコの葉抽出液における大腸菌GRのイムノブロットングによる検出

1: 大腸菌GR遺伝子を持たないタバコ (対照), 2: pEGR4を用いて遺伝子導入を行ったタバコ (1世代目), 3~7: pEGR4を用いて遺伝子導入を行ったタバコ (2世代目)。

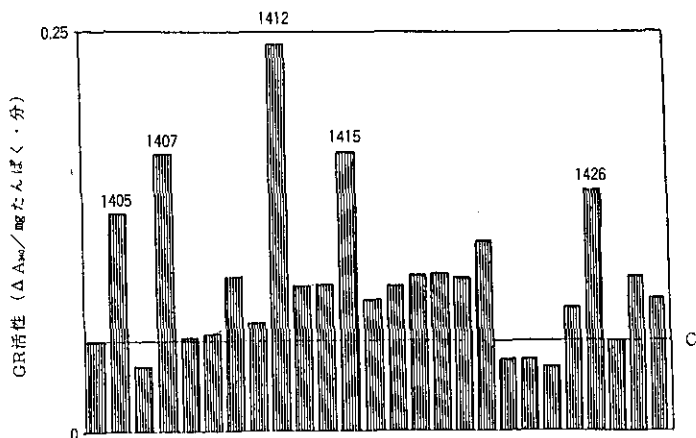


図16 pEGR4を用いて遺伝子導入を行ったタバコ（1世代目）の葉抽出液中のGR活性

C：大腸菌GR遺伝子を持たないタバコ（対照）のGR活性

（4）遺伝子組換えタバコの大气汚染抵抗性

除草剤のパラコートは、細胞内の活性酸素量を増加させることにより植物に傷害をもたらすと考えられている。そこで私たちはまず遺伝子組換えタバコの葉片のパラコートに対する抵抗性を調べた。葉から直径7mmのディスクを切り取り、様々な濃度のパラコート溶液に浮かべ、光照射下に放置し、可視傷害の程度を肉眼で調べた。その結果、パラコートの濃度が高いものほど速くクロロフィルの分解が起こりディスクが白色化した（図17）。この白色化の程度は、pEGR4とpEGR6のいずれを用いて遺伝子導入を行った場合でも、大腸菌GRを持った組換えタバコの葉片の方が対照のものより低く、したがってパラコートに対する抵抗性が高いことが分かった。以上の結果から、導入した遺伝子によって作られた大腸菌GRが、タバコの細胞内で有効に働き、その結果、細胞の持つ活性酸素の除去能が高まったと推定される。しかも、大腸菌GRが葉緑体内または葉緑体外のいずれにあっても細胞全体としての抵抗性が高まることから、活性酸素解毒系は葉緑体内外いずれの場所にも存在するか、または、グルタチオンなどのGRの基質が葉緑体の包膜を通り抜けて移動しやすいことが予測される。

次に、これらの遺伝子組換えタバコを大气汚染ガスの二酸化硫黄（SO₂）とオゾン（O₃）に接触させ、それらに対する抵抗性を調べた。ポットに植えられた植物体をガス暴露用チャンバーに移し、光照射下でSO₂またはO₃と接触させ、葉の傷害の程度を肉眼で調べた。その結果pEGR6を用いて遺伝子導入を行って得た組換えタバコは、対照と比べてSO₂に対し高い抵抗性を示した（図18）。しかし、O₃に対する抵抗性には、対照と比べ顕著な差が見られなかった。したがってSO₂によって引き起こされる傷害は葉緑体内の活性酸素と密接な関係があることが予想されるが、O₃による傷害にはそれ以外の要因が関与しているように思われる。また、

pEGR4によって得た組換えタバコの場合には、対照と比べて、 SO_2 に対しても O_3 に対しても抵抗性にはっきりとした差が認められなかった。

以上の結果から、まだ不明な点が多いが、遺伝子操作により植物の大気汚染ガス耐性を変化させることが可能であり、その際の操作の対象として活性酸素解毒酵素の遺伝子が有力な候補であることが分かった。

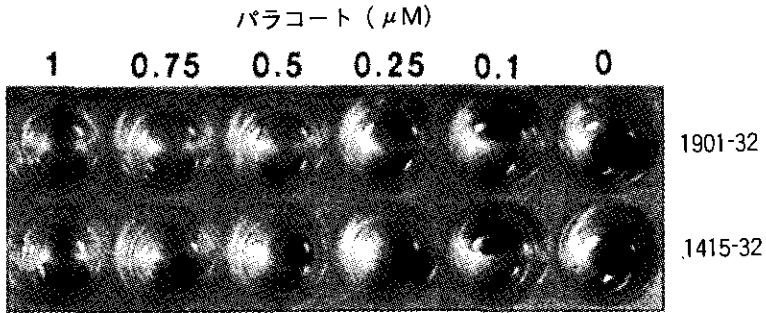


図17 pEGR4を用いて遺伝子導入を行ったタバコのパラコート抵抗性

葉のディスクを0.1%のTween 20と図中に示された濃度のパラコートを含む液に、葉の裏面を上にして浮かべ、 25°C で1時間暗所に放置してから $0.3 \text{ mEm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光照射下でさらに18時間放置した。1901-32：大腸菌G R遺伝子を持たないタバコの葉片、1415-32：大腸菌G R遺伝子を導入したタバコの葉片。



図18 pEGR6を用いて遺伝子導入を行ったタバコの SO_2 抵抗性

大腸菌G R遺伝子を導入したタバコ（左側の4個体）及び大腸菌G R遺伝子を持たないタバコ（右側の4個体）を温度 25°C 、湿度75%、 $0.2 \text{ mEm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光照射下で2 ppmの SO_2 と18時間接触させた。

(5) まとめ

活性酸素解毒系酵素であるGRをタバコに導入してGR活性が高いタバコを作製した。この遺伝子組換えタバコはパラコート及びSO₂に対する耐性が増大した。この結果は、予想通り、GRが活性酸素解毒に重要な役割を果たしていることを示すとともに、SO₂による傷害が活性酸素生成を介していることをも示唆している。しかしながら、次のような疑問点も浮かび上がった。すなわち、①GR活性が細胞質内で高くなった場合も、GRが葉緑体内に導入された場合と同様にパラコート耐性が高くなったことである。従来、パラコートは葉緑体内のスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)を増大させることによって殺草作用を示すと考えられており、現在のところ、今回の結果を十分に説明することはできない。また、②これまでの生理・生化学的研究により、O₃の植物毒性に活性酸素が関与していることが示唆されていたが、GR活性が高くなったタバコのO₃に対する耐性に変化が認められなかったことも予想外であった。これらの疑問点については、今後の研究課題として取り組む必要がある。

今回、GR遺伝子を導入することによって、パラコート及びSO₂に耐性のタバコを作製することに成功したが、これに、GRとともに活性酸素解毒に重要な役割を担っているスーパーオキシジスムターゼ(SOD)やAPを導入することによって、さらに耐性の高い植物を作製することができるかもしれない。これも、今後の検討課題である。

2.4 PANの植物暴露装置の開発

(1) はじめに

PANの植物影響を調べるための暴露実験に関しては現在までに多くの報告がなされている。しかし、これまでは純度の高いPANを合成することが困難であったうえにPANが分解しやすい物質であるため、暴露空気中に分解生成物等の不純物が混入するのを避けることができなかった。さらに、PAN濃度の測定に用いられる電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ(ECD-GC)は、間欠的に時間遅れを伴ってしか測定値を出力しないため、暴露実験時のPAN濃度の変動を的確に追跡できない。このために暴露実験時のガス濃度の変動に対応した速やかな制御操作を行うことができず、暴露濃度を高精度に制御することは困難であった。

そこで、我々は、本特別研究において精度の高いPANの植物暴露実験を効率よく行うことを可能とするために、PANの暴露方法の検討を行った。その結果、まず手動濃度制御方式の簡易型PAN暴露装置を開発した。この装置によりほとんど不純物を含まないPANを植物に暴露することが可能になった。ついで、この簡易型の装置に濃度の自動制御機構を付設し、濃度制御精度の改善を図った。

(2) PANの合成

PANの合成はGaffneyらの方法¹¹⁾によった。すなわち、約0℃に保ったn-トリデカン

($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$) 溶媒中で、硫酸触媒下に過酢酸を硝酸によりニトロ化することによって数 g/l の PAN の n-トリデカン溶液を合成し、この溶液中の未反応物質を冷水により抽出除去した。このように合成した PAN 溶液は低温下に凍結保存した。

この合成法では、合成時に副生成物が生成せず、未反応の原料物質は抽出操作によりほぼ完全に除去することができる¹¹⁾。またこの溶液の溶媒の n-トリデカンはきわめて揮発性が低いので、この溶液を空気等に接触させればほぼ選択的に PAN を気体中に取り出すことができる。溶液中 PAN は分解によりメチルナイトレイト (CH_3ONO_2) やメチルナイトライト (CH_3ONO) を生ずるが、凍結保存状態での PAN の分解は 6 か月の保存後にも 10% 以下に抑えられるとされている¹¹⁾。このことから、たとえば合成後 7 日間凍結保存した溶液中の分解物濃度は、PAN 濃度の約 0.4% と見積もられ十分小さく抑えられることが分かる。

(3) PAN の暴露

自動制御方式の装置の概要は図 19 に示すとおりである。実験時には凍結保存しておいた PAN 溶液を解凍し、バブラー (容量 20 ml) ③に入れた。この PAN 溶液中にポンベ①からの窒素ガスを通気することにより PAN の窒素希釈ガスを発生させた。この窒素希釈ガスをミキシングセル (容積 6.2 l) ⑦内で一定流量 (15~20 l/min) の換気空気中に混入し、0.05~0.5 $\mu\text{l/l}$

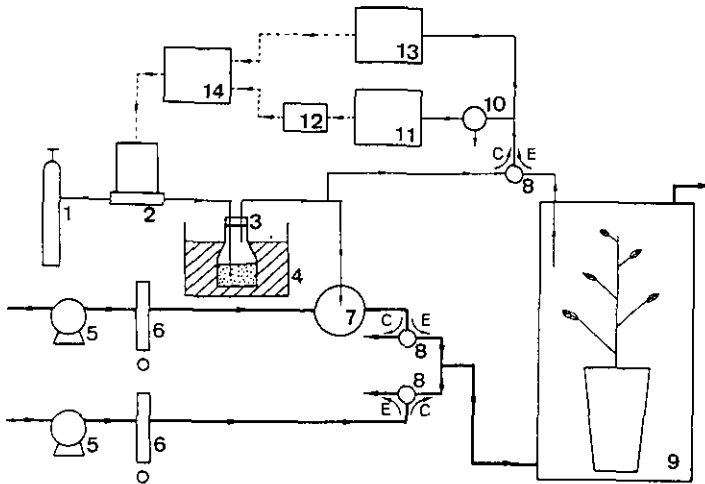


図19 自動制御方式の PAN の植物暴露装置

1 : 窒素ガスボンベ, 2 : マスフローコントローラー, 3 : PAN 溶液入りバブラー, 4 : 恒温槽, 5 : ポンプ, 6 : 流量計, 7 : ミキシングセル, 8 : 三方電磁弁, 9 : 暴露ボックス, 10 : 自動サンプリング弁, 11 : ECD-GC, 12 : データ処理装置, 13 : NO_x 計, 14 : 計算機。

——, ———— : ガスライン, - - - - - : 電気信号線。

E, C はそれぞれ、ガス暴露状態と清浄空気換気状態のガス流路を表す。

注 1) Gaffney, J.S. et al. (1984): Atmos. Environ., 18, 215-218.

(ppm) の PAN 含む換気空気を調製し、この換気空気を暴露ボックス⑨に導入した。この暴露ボックス内の PAN 濃度の制御は、マスフローコントローラ（流量 0 ~ 20 ml/min）②で PAN 溶液に通気する窒素ガスの流量を変化させることにより行った。また溶液中での PAN の分解を防ぐため、バブラーを恒温水槽④に浸して溶液温度を 0℃に保った。

この装置において、溶液中や配管内及びボックス内の PAN は、分解によりメチルナイトレイトやメチルナイトライトを生ずるが、8 時間の暴露実験を行った場合に暴露ボックス内に蓄積する分解物の濃度は PAN 濃度の 3% 以下となることが分かった。また PAN 溶液に由来する n-トリデカンのボックス内濃度は 0.003 $\mu\text{l/l}$ (ppm) 以下と見積もられ、十分小さい値に抑えられていることが確かめられた。

(4) PAN 濃度の測定及び制御

PAN 濃度の測定に用いられる ECD-GC は、間欠的に時間遅れを伴ってしか測定値を出力しないため、暴露実験時の PAN 濃度の変動を的確に追跡できない。一方、化学発光型 NO_x 計は、連続測定方式であり、NO_x のほか PAN や PAN の分解物のメチルナイトレイトやメチルナイトライト等の含窒素有機化合物を検出する性質がある。本装置での暴露空気の中には PAN 以外の不純物はほとんど含まれていないので、暴露空気を測定した場合の NO_x 計の測定出力値の変動はほぼ正確に PAN 濃度の変動に対応している。

そこで、本装置では、NO_x 計③により PAN 濃度のおよその変動傾向を連続的に追跡することにより、ECD-GC ⑩の測定法上の欠点を補った。ECD-GC の 1 回の測定に要する時間は約 6 分であった。ECD-GC のサンプリングは、タイマー駆動式の弁⑩を 7 分間隔で駆動して、一定量ずつの試料をカラムに注入することにより行った。測定の結果得られたクロマトグラムはクロマトグラム用データ処理装置⑫で処理し、PAN ピークの面積値をもとに PAN 濃度を求めた。PAN 濃度の自動制御は、これら 2 種類の分析計の測定値に応じて、計算機⑭で窒素ガスの流量を変化させることにより行った。具体的な手順は図 20 のフローチャートに示すとおりである。まず、NO_x 計の連続測定値 N をもとに PAN 溶液に通気する窒素ガスの流量 f を PID-制御し、暴露 PAN 濃度の NO_x 計測定値を一定値 N_s に保った。この N_s 値は、ECD-GC の測定値を基準として 7 分ごとに補正した。すなわち、ECD-GC から新たな測定値が入力するごとに、N_s 値の再設定を行うことにより、C を設定濃度 C_s に一致させることを最終的な目標とした。このような自動制御方式を採用することにより、濃度制御の精度と操作性が改善された。

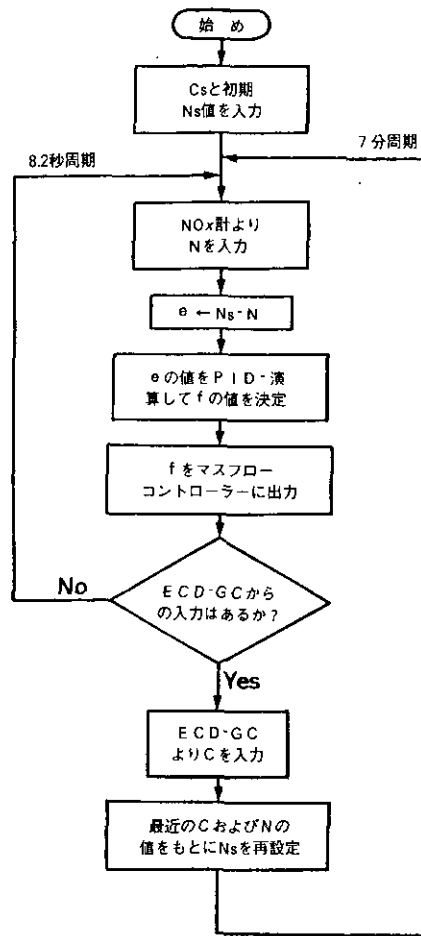


図20 PAN濃度の自動制御の手順

C_s : 設定濃度, N_s : NO_x 計応答値の目標値, C : ECD-GCの測定値, N : NO_x 計の応答値, e : 偏差 ($N - N_s$), f : PAN溶液への窒素ガスの通気流量。

(5) PAN暴露装置の性能

自動制御方式のPAN暴露装置を用いて、鉢植えのハウレンソウ（植物体の土壌面からの高さ約30 cm）1個体にPAN暴露を行った際の、PAN濃度とPAN溶液への窒素ガスの通気流量の経時変化を図21に示す。ここでは、設定濃度を $0.2 \mu\text{l}/\text{l}$ (ppm) とし、バブラーには 2.0 ml （通常の実験時の量の $1/10$ の量）のPAN溶液を入れた。

暴露ボックス内のPAN濃度が設定値近くまで上昇するのに要した時間は約30分であった。しかしその後は、ボックス内PAN濃度の設定値からのずれは設定濃度の $\pm 5\%$ 以内の範囲内に保たれていることが分かる。また時間の経過とともにPAN溶液への通気流量が増加している。

これは、溶液でのPANの消費により、溶液中のPAN濃度が減少してゆくことによる。この例では、バブラー内の溶液の量をあえて極端に少なくしたため、溶液への通気流量が急激に上昇した。しかし、PAN溶液の量をこの実験時の量の10倍にすれば、溶液中PAN濃度の減少速度はこの実験時の1/10に抑えることができるため、同一の条件下で40時間以上の実験の継続が可能であることが分かる。

また、この実験条件とほぼ同一の条件で別の実験を行い、暴露ボックス内のPANの濃度分布を調べた。その結果、ボックス内のPAN濃度は、植物による吸収のため、ボックス入口の配管内のPAN濃度の1/2程度となっていることが分かった。しかし、ファンによるかくはんのため、ボックス内濃度は換気空気吹き込み口周辺を除けばほぼ均一となっていることが確認できた。

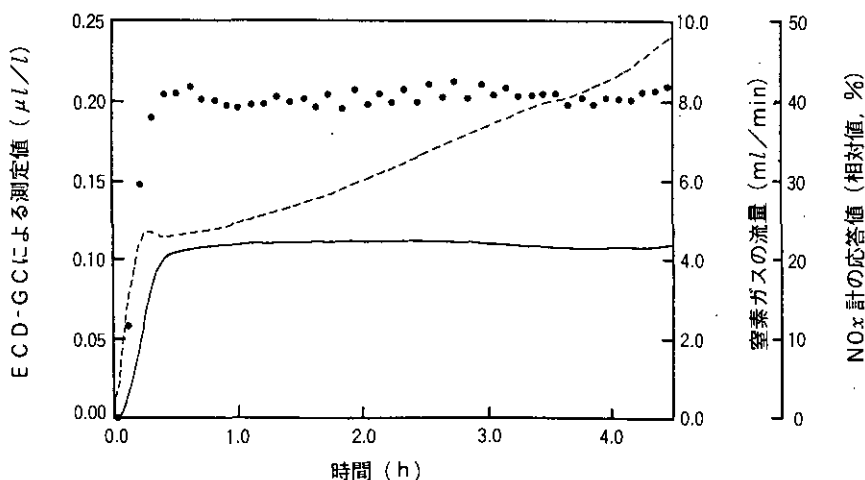


図21 実験時のPAN濃度とPAN溶液への通気流量の変化

● : ECD-GCの測定値, — : NO_x計の応答値, - - - : PAN溶液への窒素ガスの通気流量。

(6) まとめ

これまでは植物暴露実験に用いたPANの暴露空气中に不純物が混入するのを避けることができなかつたため、PANの植物に対する影響を他の共存不純物の植物に対する影響から明確に区別することはできなかつた。またPANの分析計のECD-GCの測定法上の欠点により、植物に暴露するPANの濃度を高精度に制御することは困難であった。

開発された装置では、Gaffneyらの方法により合成したPAN溶液から取り出したPANを用いることにより、ほとんど不純物を含まないPANを植物に暴露することができるようになった。また連続測定方式の化学発光型NO_x計を用いることによりECD-GCの測定法上の欠点を補償することができた。さらにPANの検出器としてNO_x計とECD-GCを相補的に用いるこ

とにより、PAN濃度を自動制御することが可能となった。本装置により、環境中のPAN濃度と植物の反応の間の相互関連性を、濃度の制御精度が高く、他の不純物による影響を排除した条件下で、効率よく調べることができるようになった。

2.5 画像計測による大気汚染被害の計測と診断

本研究は、計測技術を用いた指標植物の客観的な診断法を開発することを目的として行われた。指標植物を診断する場合、気孔反応や光合成反応が重要な指標となるので、ここでは、これらの生理反応を計測し、診断するのに用いる画像診断法の成果について述べる。

2.5.1 気孔反応診断のための非破壊顕微画像計測法

植物は、光合成や呼吸、体温調節のための蒸散などに関連して、大気とのあいだで気孔を介して、CO₂や水蒸気などのガスの交換を行っている。また、大気が汚染されていると汚染ガスが気孔を通して体内に侵入し、種々の障害をもたらす。これらのガスの通路である気孔は、環境や植物自身の状態によって複雑な反応をする。

植物の生育している状態での気孔反応を測定する手法としては、同化箱・ポロメータ法、重量法、微気象的測定法などがある。また、最近では、熱赤外画像計測法によって、葉温分布から気孔反応を画像として得る方法も開発されているが、これらの手法により得られる情報は、蒸散速度や気孔コンダクタンス（1/気孔拡散抵抗）といった気孔反応の間接的な情報であり、個々の気孔反応の動きを直接診断できるものではない。気孔反応診断には、蒸散速度や気孔コンダクタンスといった間接的な情報だけでなく、個々の気孔の直接観察による診断も必要となる。

図22は、個々の気孔の直接観察のための遠隔操作の光学顕微鏡システムである。このシステムでは、高倍率（対物レンズ50x+拡大レンズ3x+TV用アダプタレンズ）で広い作動距離（13mm）を持つ光学顕微鏡を用いた。気孔の観察記録は、高感度のSITカメラと高解像度で歪の少ないTVモニタ及びVTRにより行った。焦点、カメラ感度及び視野は、遠隔操作で調節できる。葉が置かれる光学顕微鏡のステージは、光透過性の良いアクリルで作成し、葉との接触面が少なく、葉の両面からのガス交換が可能な構造にした。気孔開度の測定精度は、モニタ観察の場合で1μm以内、画像処理を行えば0.3μm以内であった。

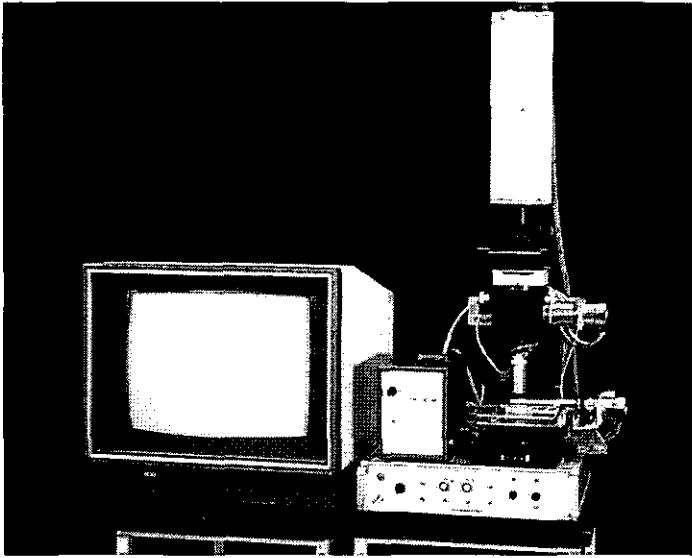


図22 気孔観察のための遠隔操作の光学顕微鏡システム

図 23 は、 O_3 に被暴したヒマワリ葉の気孔反応の例である。被暴により、孔辺細胞の周辺の細胞に水滲が発現した気孔と発現しなかった気孔では、反応に大きな差異が認められた。水滲が発現しなかった気孔では被暴に伴い急激に気孔が閉鎖したが、水滲が発現した気孔では、暴露直後の一時的な開口と、気孔の開閉運動が観察された。気孔の開閉運動は、表皮細胞の傷害と密接な関係がある。 O_3 に対するこの現象を推察すると、まず、 O_3 により孔辺細胞よりも先に周辺の細胞が傷害を受け、細胞内から水が流出し、水滲を引き起こす。その結果、孔辺細胞とその周辺の細胞の圧ポテンシャルの平行が崩れ、気孔が開くと考えられる。その後、生体防御のために、先に述べた気孔の閉口作用が働くが、開口作用も持続するので、気孔開度が大きく変動すると考えられる。

気孔の開閉運動は、汚染ガスに対する抵抗性と密接に関連している。顕微画像計測法は、個々の気孔開閉運動と傷害との関係を正確に把握でき、植物の汚染ガス抵抗性を診断するのに有用である。

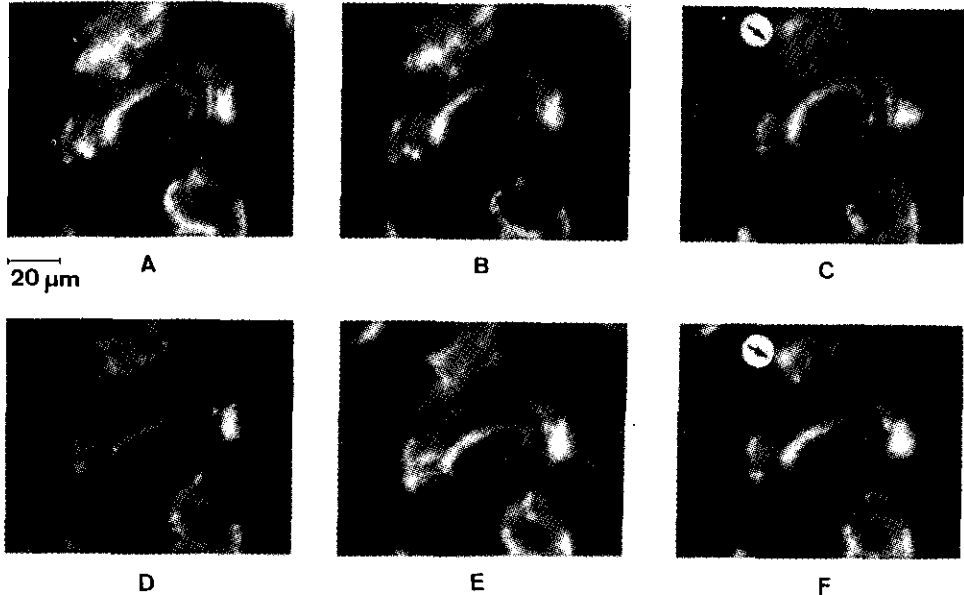
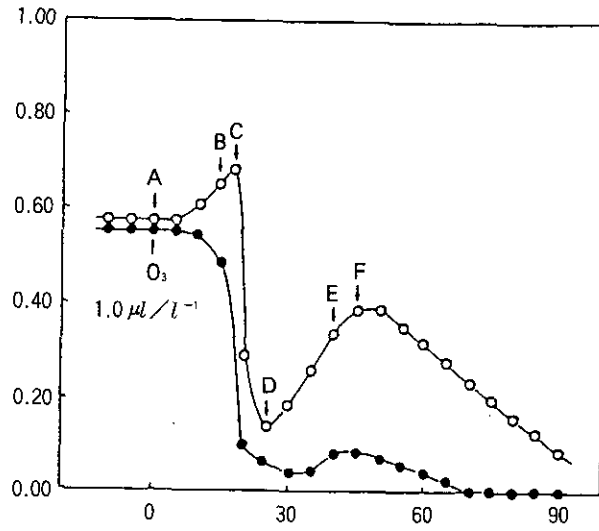


図23 O₃に被暴した気孔反応

○：水滲が発現した気孔、●：水滲が発現しなかった気孔。
 気孔の写真は、水滲が発現した気孔のA～Fの時点に対応している。

2.5.2 光合成機能診断のためのクロロフィル蛍光動画像計測法

植物に光を照射するとクロロフィルaから蛍光が発せられる。特に、暗所においた状態で急に光照射すると、その蛍光の強度が時間的に複雑な変動をする。この現象は、クロロフィルaの蛍光誘導期現象 (Kautsky 効果) と呼ばれ、光合成反応、特に光化学系IIの電子受容体Q_Aの酸化

還元状態を反映し、電子伝達反応や光リン酸化反応などの各光合成過程の反応に影響されることが知られている。そこで、まず、この誘導期現象を連続的に計測し、誘導期の OIDPSMT 過程と関連づけて解析することができる動画像計測システムを開発した。

図 24 に、画像計測システムの写真を示す。画像センサとしては、高感度で残像が少ない CCD 撮像素子を持つ TV カメラを改造し、使用した。蛍光の計測は、葉を 15 分程度暗条件下に置き、その後、青色光 ($0.4\sim 0.6\ \mu\text{m}$) を照射し、 $0.683\ \mu\text{m}$ の干渉フィルター (半値幅 $0.01\ \mu\text{m}$) を通して行った。このシステムでは、TV カメラの垂直同期信号と同期するシャッターを持つ光源装置、タイムコード読み取り書き込み機能を持った計算機制御の VTR、及び TV イメージプロセッサの組み合わせにより、 $1/60$ 秒ごとの蛍光動画像を計測解析することができる。光源としてキセノンランプを使用し、特製の多重 ND (neutral density) フィルターを装着することにより、照射光の強度の空間分布を均一にすることができた。光ディスク ($1.2\ \text{GB}$) は画像処理の高速化と画像データベースのために使用した。このシステムの特性について簡単に整理すると、CCD 撮像素子の感度は $10^{-4}\ \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$ で、残像は $30\ \text{ms}$ 後で 4% であった。また、蛍光画像のシェーディングとノイズは、タイムベースコレクタと TV イメージプロセッサによる処理で 1% 以内にする事ができた。その際の画像解像度は $280\ \text{lines}$ 程度であった。光源の光強度の空間分布は、 $20\ \text{cm}\ \phi$ で 5% 以内であった。

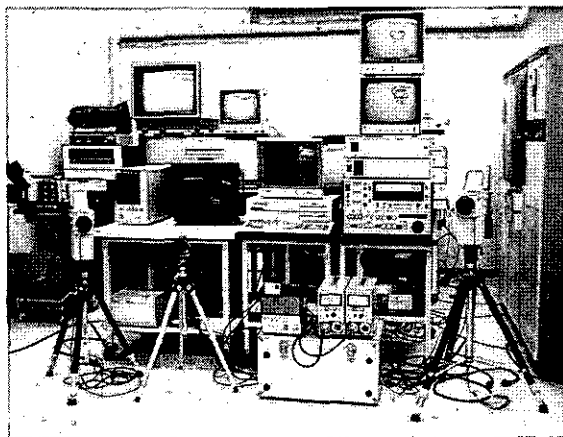


図24 光合成機能診断のためのクロロフィル蛍光動画像計測システム

図25は、ヒマワリ葉の局所部位に1.5 ppmのSO₂を30分間暴露した直後の蛍光強度の変化を示す。被暴しなかった部位では、蛍光誘導期の典型的なOIDPSMT変化を示したが、被暴部位では、その蛍光誘導に変化が見られた。蛍光解析の知見から、OIの過程は光化学系IIによる初期電子受容体Q_Aの光還元を、IDは光化学系IによるQ_Aの部分酸化を、DPは光化学系IIを介した水からの電子の流れによるQ_Aの還元を、またPSは光化学系Iの還元側の光活性化によるQ_Aの再酸化を反映している。一方、SMTは光リン酸化反応に関係したチラコイド膜を介した高エネルギー状態やマグネシウムなどのイオンによる色素間エネルギー転移効率の変化などに影響される。それゆえ、図23は、SO₂被暴によりこれらの光合成反応が阻害されたことを示している。

なお、この被暴葉には可視傷害が発現せず、暴露後6時間経過した時点では蛍光誘導が葉脈の周辺から正常な状態に回復することが確認できた。図26は、ペチュニア葉に0.06 ppmのPANを3時間暴露した後、酸素発生系が障害を受けたことを表す蛍光誘導期のPの時点での蛍光画像の経時変化である。この場合、葉の下半分に光を照射し続け、上半分には測定時だけ光を照射した。その結果、時間の経過とともに、光照射をし続けた葉の下半分においてのみ光合成阻害が進行した。このことは、障害の進行に光が必要であることを示している。また、気孔コンダクタンスや光合成速度の低下と比較したところ、蛍光強度の低下の方が早く始まることが分かった。

以上の結果から、クロロフィルa蛍光の動画像計測により、大気汚染ガスによる植物影響の早期診断が可能であることが分かった。また、今後、種々の環境ストレスに対する蛍光誘導期現象の変化をデータベース化することにより、光合成反応阻害の阻害反応の特定と、その原因の推定に有効に利用できることが示唆された。

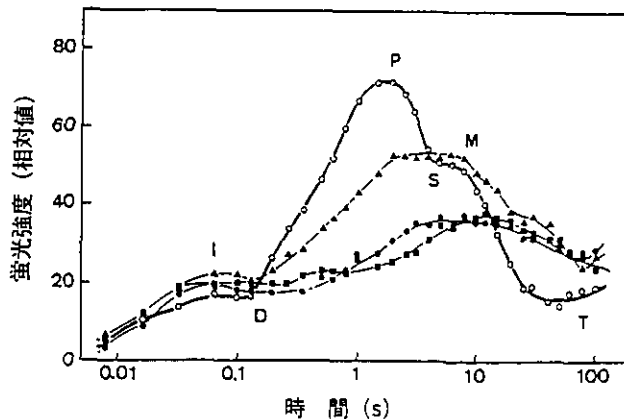


図25 SO₂に被暴したヒマワリ葉の蛍光強度の変化
●, ▲, ■: 被暴した部位, ○: 被暴しなかった部位。

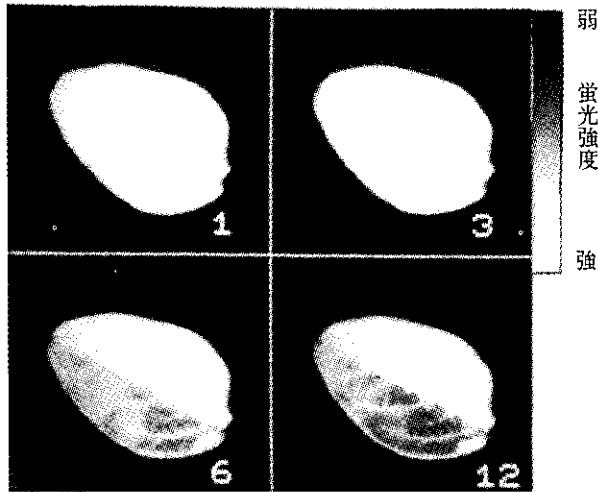


図26 ペチュニア葉のPANによる光合成障害の進行
数字は、PAN暴露後の経過時間。

2. 6 指標植物を用いた大気環境評価法の検討

2.6.1 ペチュニアを用いた大気環境評価

(1) はじめに

指標植物を用いた大気汚染の評価は、個々の大気汚染物質の理化学的な測定に比べて、設備、費用の面で手軽であり、総合的な大気汚染の状況を把握できるという利点がある。しかし、植物の大気汚染物質に対する反応は、個体の生育段階、季節、設置場所の物理的環境などにより影響を受け、精度が低いという問題点がある。指標植物の実用化を進めるためには、この変動要因の解析が不可欠である。本研究テーマでは、特に遺伝的な要因による植物の反応の変動に着目して野外実験を行った。また、近接する建物などによる影のために日照条件が変化して植物の感受性に影響する可能性についても調べ、指標植物の指標精度を向上させるためにどのような点を考慮する必要があるかを検討した。

(2) 野外実験 I

1) 実験材料

実験材料として、光化学オキシダントのうち特にPAN (peroxyacetyl nitrate) に対する感受性が高いといわれている園芸植物のペチュニアを用いた。ペチュニアの多くの品種のうち、タイタンホワイト、レッドチャンピオン及びナナコンパクター系の3品種(ホワイト、サーモン、ローズ)の計5品種を選び、各品種ごとに4個体の親植物を種子から育てた。さらに各親植物から挿し芽によって遺伝的に均一と考えられる同一クローンの9個体の娘植物を得た。娘植物は、最終的に国立環境研究所仕様の標準培土を入れた1/10,000アールプラスチックポットに1個体

ずつ移植した。植物の栽培は、すべて国立環境研究所の自然光型材料提供温室内（温度 25℃、湿度 70 %）で行った。

上記の実験材料は、遺伝的に 3 段階の変動要素を含む。すなわち、①品種間の比較的大きな変動、②同一品種内での個体ごとの変動、③同一クローン内の変動である。同一クローン内の遺伝的変動は、ほぼゼロとみなせる。

2) 調査方法

1987年7月26日に、鉢植えにしたベチュニアを東京農工大学構内にある実験圃場（東京都府中市）に配置した。同地域は、比較的高濃度の光化学オキシダントがしばしば観測されている場所である。日照条件の違いが植物の傷害発現に影響する可能性を検討するため、圃場に高さ1.8mの衝立を設置し、その西側、東側及び北側に植物を置いた。約4週間にわたって毎日葉の可視傷害調査を行った。調査期間中に伸びた脇芽はすべて取り去り、主茎のみについて調査を行った。

3) 調査結果

タイタンホワイトでは、大気中のオキシダント濃度が高い時期とほぼ対応してPAN型の可視傷害が観察された（図27）。ただし、配置後3週間目以後には比較的高濃度のオキシダントが観測された時期にも傷害は見られなくなった。原因としては、植物個体の加齢によるオキシダントに対する感受性の低下、長時間汚染物質にさらされたことによる植物の馴化、あるいはオキシダント濃度以外の環境条件の季節変化の影響などが考えられる。

品種間で非常に大きな感受性の差が見られた（表9）。タイタンホワイトは調査したすべての個体に可視傷害が認められたのに対して、ナナコンパクター系のホワイトで16.7%の個体に可視傷害が見られ、それ以外の3品種では可視傷害が全く現れなかった。

一方、品種内の遺伝的な不均一性（遺伝的な個体差）に起因する感受性の変動は小さかった。また、タイタンホワイトの1個体当たりの傷害葉数の変動は、異なる親植物の挿し芽由来の個体間（クローン間）と、同一親植物に由来する個体間（クローン内）とでほとんどかわらなかった。この結果は、同一品種内に見られる個体間の遺伝的な感受性の変動は、その他の要因による変動に比べて小さいことを意味している。また、衝立に対する位置関係により、傷害葉数に有意な差が認められる場合もあった。特に午後に日がかげの東向きの個体は、傷害が現れにくい傾向があった。したがって、実際の指標植物の配置に際しては、近くの建造物などとの位置関係にも留意することが望ましいと思われる。

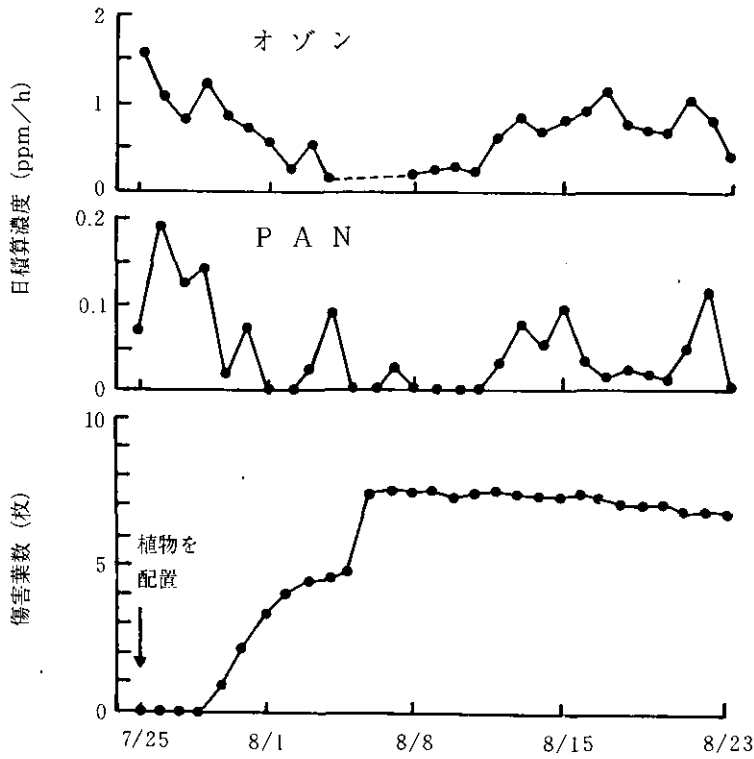


図27 ペチュニアの野外配置期間中の府中市内での日積算オゾン濃度（上図），江東区内での日積算PAN濃度（中図），及びペチュニア（タイタンホワイト）の傷害葉数（下図）

傷害葉数は、主茎についている葉に限って数えたもので、1個体当たりの平均値を示した。サンプル数は36個体である。

表9 ペチュニア5品種の可視傷害を受けた植物の頻度及び傷害葉の枚数（野外配置後14日目）

品 種	傷害個体の割合 (%)	個体当たり傷害葉数	
		平 均	標準偏差
タイタンホワイト	100.0	7.6	2.2
レッドチャンピオン	0	0	—
ナナコンパクター系			
ホワイト	16.7	0.5	1.4
サーモン	0	0	—
ローズ	0	0	—

(3) 野外実験Ⅱ

1) 調査方法

1987年の野外実験で用いたペチュニア5品種のうち、光化学オキシダントによる可視傷害が最も現れやすかったタイタンホワイトを実験材料に選んだ。供試植物を、国立環境研究所の自然光型材料提供温室で種子から栽培し、ポットに移植した後東京農工大学構内の実験圃場に配置した。1988年5～9月の約5か月間にわたり、齢（播種後の日数）及び配置期間の異なる個体を組み合わせて配置し、光化学オキシダントの感受性が植物の側のどのような要因と関係しているかを検討した。

2) 調査結果

週1回の調査を21回行ったが、そのうち12回の調査で葉の可視傷害が観察された。傷害の様子、及び比較的若齢の葉において傷害が観察されたことから、光化学オキシダントのうちでも特にPANに由来する傷害であると判断された。

植物体の齢（播種後の日数）、現地での配置期間の長さ、及び植物体の高さで可視傷害発現の程度との関係を調べたところ、現地での配置期間の長さで傷害発現の間にはほとんど相関が見られず、汚染大気に長期間さらされることによる大気汚染物質に対する耐性の獲得は認められなかった。

可視傷害発現の有無は、植物の齢及び高さで負の相関を示した。すなわち、齢が進んだもの、及び背の高いものは傷害を受けにくかった（表10）。偏相関係数を求めて検討したところ、傷害発現は植物の齢とは有意な相関を示したが、植物高とは相関を示さなかった。すなわち、植物高と傷害発現の間には直接的な関係はなく、植物高と強い正の相関を示す齢が傷害発現と相関しているため、見掛け上植物高と傷害発現が相関していたにすぎないと考えられる。

(4) まとめ

野外実験の結果、ペチュニアを指標植物に用いて大気汚染の程度を測定する場合は、品種の選定が重要であり、品種内の遺伝的変動は特に考慮しなくても差し支えないことが示された。また、植物の齢が進むとオキシダントに対する感受性が低下することが観察された。今回の調査では主茎の葉のみを観察したが、齢が進んだ個体で、主茎では可視傷害が認められないが、若い側枝の葉には傷害が認められる例がいくつか観察された。このことから、個体の齢よりもシュート（枝）の齢が可視傷害の感受性と関連していることが想像される。

表10 東京都府中市に配置したペチュニアにおいて観察された葉の可視傷害と、植物の齢、現地での配置期間及び高さとの相関関係

	傷 害 葉 数	傷害葉の有無
齢	-0.29	-0.38
*配置期間一定	-0.26	-0.35
*高さ一定	-0.18	-0.22
*配置期間・高さ一定	-0.27	-0.37
配置期間	-0.14	-0.16
*齢一定	-0.05	-0.04
*高さ一定	-0.16	-0.19
*齢・高さ一定	-0.05	-0.04
高 さ	-0.23	-0.32
*齢一定	-0.01	-0.02
*配置期間一定	-0.24	-0.34
*齢・配置期間一定	-0.01	-0.02

各要因との単相関係数及び他要因の影響を除いた場合の偏相関係数(*)を示した。

2.6.2 ペチュニア配置法による関東地域の光化学オキシダント(PAN)汚染の検討

(1) はじめに

大気汚染の指標植物を野外に配置して、その可視傷害や生育状態などから大気環境を評価する方法は一般に配置法と呼ばれ、かなり広域の大気環境を評価する方法として検討されている。ペチュニアは光化学オキシダントの中でも毒性の高いPANに特に感受性が高いことが、我々の暴露実験などでも確認されており、PAN汚染の指標植物として利用され得る。そこで、種子から均一に栽培したペチュニアを関東地域の各地に配置し、植物の葉面可視傷害の様子を定期的に観察することにより、関東地域の光化学オキシダント(PAN)汚染の実態を把握すると共に、指標植物を野外で使用する際の問題点などについて検討した。

(2) ペチュニアの育成と配置試験

ペチュニアには多くの品種があるが、白花系統の品種が比較的PAN感受性が高いことが知られている。これまで、指標植物としては、ホワイトエンサインがよく使われてきたが、種子の入手の問題などから最近ではタイタンホワイトが一般に使用されるようになっていた。本研究では、ペチュニアの中でも、最もPAN感受性の高い品種であるホワイトエンサインと同一品種であるとされる、ホワイトチャンピオンを種苗業者より入手し、実験材料とした。

気温：25 ± 2℃、相対湿度：70 ± 7%に制御された自然光型温室でペチュニア種子をピート

モス板上に播種した。ほぼ3週間後に植物を国立環境研究所標準培土を入れた1/10,000アールプラスチックポットに1株ずつ移植した。播種後6週間温室で育成した植物12個体を、1990年6月20日、6月27日、7月4日の3回、宅急便で関東地域の各研究協力者に送付した。6月22日、6月29日、7月6日から4週間ずつ野外に配置して、1週間ごとに葉面の可視傷害、成長量などを記録した。播種後調査終了まで、灌水は液肥（ハイポネックスの1,000倍液）を必要に応じて与えた。今回、ペチュニアを配置した場所は、前橋市（群馬県農業総合試験場）、浦和市（埼玉県公害センター）、つくば市（国立環境研究所）、府中市（東京農工大学農学部）、江東区（東京都環境科学研究所）、千葉市（千葉県農業試験場）、市原市（千葉県公害研究所）、平塚市（神奈川県公害センター湘南支所）の8か所である（図28）。

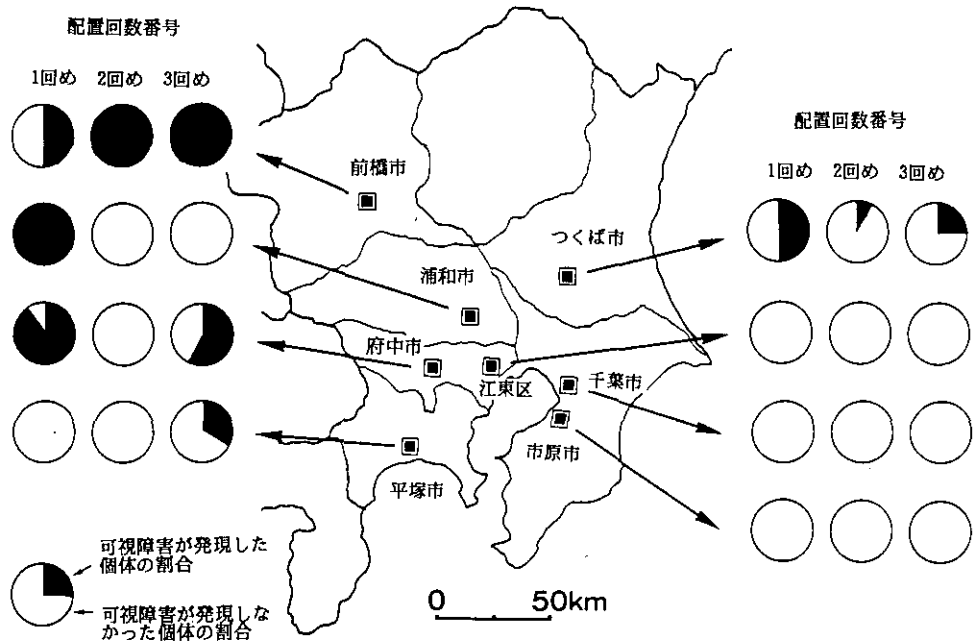


図28 ペチュニア配置法による関東地方のPAN汚染の実態調査

- 1回め配置：1981年6月22日～7月20日
- 2回め配置：1981年6月29日～7月27日
- 3回め配置：1981年7月6日～8月3日

配置試験の前に、人工光型環境制御室の中にPAN暴露チャンバーを設置し、ペチュニアを含む数種の植物を25～100ppbのPANに4時間ほど暴露した。また、0.1～0.5ppmのO₃、SO₂、NO₂に同様に暴露し、可視傷害の様子を比較観察した。ペチュニアは他の植物と比べて、PANに対して極めて高い感受性を示したが、一方、その他の大気汚染物質に対しては感受性が低いことが確認された。

配置した全地点においてペチュニアの成長はほぼ良好であった。しかし、いくつかの地点では配置後半、上位葉に過湿が原因と思われる症状が発現した個体も認められた。配置中の天候（晴天が少なかったこと）と共に、灌水の頻度なども影響しているように思われた。配置試験の地点でPAN濃度を計測したのは、つくば市、江東区、市原市の3地点だけであるが、オキシダントまたはO₃の濃度は全地点で計測した。つくば市ではPAN濃度が10 ppbを超えた後の観察で、ペチュニア葉面に可視傷害が発現した。他の地点でも例えばO₃濃度が0.1 ppm以上の高濃度を記録した後の観察で可視傷害を認めている。しかし、光化学オキシダントの濃度がかなり高いにもかかわらず、可視傷害が発現しない場合や、本試験と同時期に置いた地植えのペチュニアにのみ可視傷害が発現している場合もあり、他の環境条件や栽培法の違いなどが関係していそうである。

配置試験の結果、地域的に見ると、光化学オキシダント汚染が著しいとされる府中市、浦和市、前橋市で、ペチュニア葉面に典型的なPANによる可視傷害が認められた他、光化学オキシダント濃度が極めて高かった6月後半あるいは7月後半には、つくば市や平塚市でも葉面に可視傷害が認められた。江東区、千葉市、市原市では調査期間中には被害が認められなかった。この結果は、これまでティタンホワイトなどを用いた同様な配置法の試験結果とほぼ同様であり、関東地域では西部～北西部にかけてPAN汚染が進んでいるようである。

環境制御室を用いた実験結果と同様に、ペチュニア個体の上～中位の成熟葉にPANによると思われる可視傷害が認められた。葉の裏面が表面より被害が大きく発現した場合が多く、PANに特徴的であるとされる光沢化、銀白色化が葉の裏面で多く観察された。一方、葉の表裏とも同程度にクロロシス様の可視傷害が発現した場合もあり、このような症状の違いにはPAN以外の大気汚染物質や他の環境要因が関係していると思われる。3回の試験は時期が重なっているが、後に配置した植物の方が被害が大きいか何度か認められた。また、今回調査した主軸の葉には可視傷害が認められず、腋芽にのみ傷害が認められた場合もあり、葉の齢ばかりでなく、シュートや個体の齢も感受性に影響していそうである。なお、つくば市では同時にペチュニアのティタンホワイトも配置して調査したが、ホワイトチャンピオンに比べて感受性は低かった。同時に配置したアサガオやハツカダイコンではペチュニアにPAN被害が認められた時期にO₃被害が発現していた。PANやO₃などの大気汚染物質の計測結果からも、野外ではPANとO₃が同時に高濃度で存在することがしばしば認められており、野外での光化学オキシダントによる植物被害を解明するには、このような複合暴露の影響についても詳細な検討が必要となろう。

(3) まとめ

本研究からも、関東地域では東京都西部から埼玉県、群馬県にかけてPAN汚染が進んでいることが示唆されたが、茨城県や神奈川県にも汚染の影響が確認された。また、ペチュニアがPAN汚染を評価するための指標植物として適当であることが確認された。しかし、本試験では過湿的な症状を呈した個体も見受けられた。一方、灌水不足などで水ストレス状態になった植物では気

孔が閉じ、大気汚染物質の吸収が制限されるため、感受性が低下することも知られている。野外でペチュニアをPANの指標植物として配置試験を行う際には、灌水（液肥）を始めとする植物の栽培法をさらに検討する必要があると思われる。また、本試験中、暴風雨や虫害などにかなり気を配る必要もあり、今後このような諸点を十分に考慮して、配置法の研究を進める必要があろう。今回は種子から均一な栽培方法で育成した個体を用いたが、野外での反応にはかなりの個体差があった。細胞培養法などの研究が進み、大量のクローン植物が得られるようになれば、指標植物の遺伝的な不均一性の問題も解消し、感受性の高い品種の安定供給も実現するであろう。PAN感受性とペチュニアの葉齢との関係については2.6.1項において述べられているが、葉面の可視傷害の発現が、PANとO₃または他の大気汚染物質との複合でどのような影響を受けるか、また可視傷害と他の環境要因や植物の生育期との関係など、PANの指標植物としてのペチュニアの特性については、今後詳細に検討する必要がある。

2.6.3 蘚苔類による野外大気環境評価の検討

(1) はじめに

蘚苔類は古くから大気汚染に敏感に反応することが指摘されており、これまでも大気環境の指標植物として利用されてきた。野外の大気汚染度を評価する方法として、着生蘚苔類などの種類や量の分布を調査・解析する方法が考案されており、算出した空気清浄度指数（IAP）による、大気汚染状態の評価などが行われている。一方、空気浄化室と非浄化室における植物の成長の差などから大気環境を評価する方法も検討されており、空気浄化試験法（FAC法）として装置の開発、野外試験などが行われている。最近では、高等植物を用いた場合は、天蓋を開けたオープントップチャンバー（OTC）が検討されている。このFACに指標植物として蘚苔類を利用したブリオメーターが考案されているが、我々も小型二連式チャンバーを用いたブリオメーターの試験装置を開発し、その性能について検討した。また、試料としてオオバチヨウチンゴケのシュートを用いたブリオメーターを野外に設置して、浄化室・非浄化室のシュートの成長を比較し、大気汚染物質濃度などとの関係について検討した。

(2) ブリオメーター試験装置の開発とその性能の検討

本研究で用いたブリオメーターの試験装置を図29に示す。植物試料を入れる培養容器は、空気浄化室と非浄化室を一体化した透明アクリル製の小型二連式チャンバーである。従来の装置と比較して以下の点について改良を加えた。①空気を吸引することにより、野外大気がフィルター部を通るだけで直接植物と接触するようにした。②チャンバー内にファンを入れ、空気をかくはんすることにより、試料と大気汚染物質との接触頻度を増大させた。③除菌フィルターを通した培養液を常時滴下する方式により、雑菌等の混入を少なくした。④ファンの回転数やポンプの通気量を制御するための調節器を作成した。これは省エネルギー型のスイッチング方式であり、

12Vバッテリーを電源として、野外で試験装置を1～2週間連続使用することを可能にした。

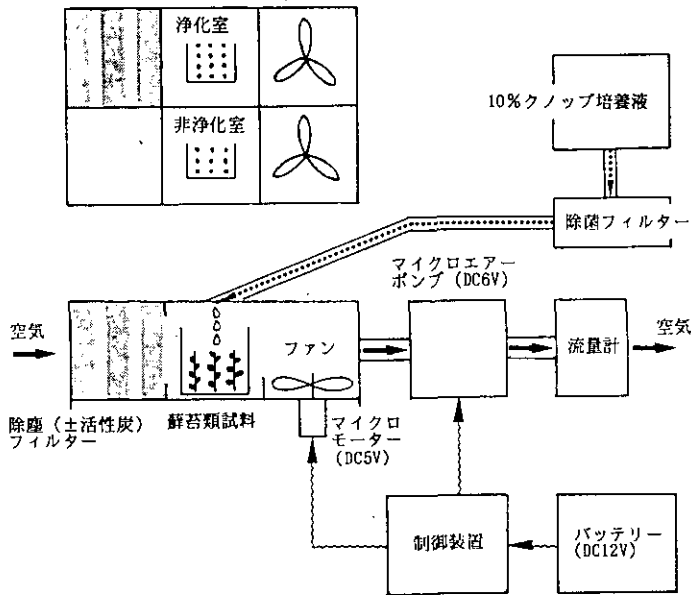


図29 本研究で用いたブリオメーターの試験装置のダイアグラム

本装置の性能について検討した結果を以下に記す。①チャンバー内のファンを1250 rpmで回転させた場合、風速は試料植物の位置で30～50 cm/secとなった。②人工光型環境制御室内でSO₂、NO₂、O₃各0.1 ppmに1週間暴露したところ、浄化室ではSO₂及びO₃はほぼ完全に除去されたが、NO₂は10～20%残存していた。一方、非浄化室ではNO₂濃度は外気とほぼ同様であったが、O₃濃度は外気の80～90%に低下しており、またSO₂濃度は外気の50～70%に低下した。③照度60 μEm⁻²sec⁻¹の環境制御室で、気温を10～30℃、相対湿度を40～90%に変化させたとき、浄化室及び非浄化室内の温湿度に大差はなかった。チャンバー内の温度はほぼ外気と同様であり、相対湿度はこの実験条件下ではほぼ100%を維持していた。

(3) 野外におけるブリオメーター試験

野外で採集したオオバチョウチンゴケ茎葉体を前培養した後、新たに伸長したシュートを莖頂より15 mmの長さになり切り、試料とした。これをホルダーに直立させて二連式チャンバーの各室に置き、野外で成長試験を行った。1985年の秋から1986年の冬にかけて広島市の大気汚染度の異なる3地点(皆実小学校、井口小学校、安佐南の各大気汚染測定局、図30)に、このブリオメーターを設置し、各2週間の伸長量、生重量などを調べた。皆実小学校で5回、井口小学校と安佐南では各3回の実験を行った。

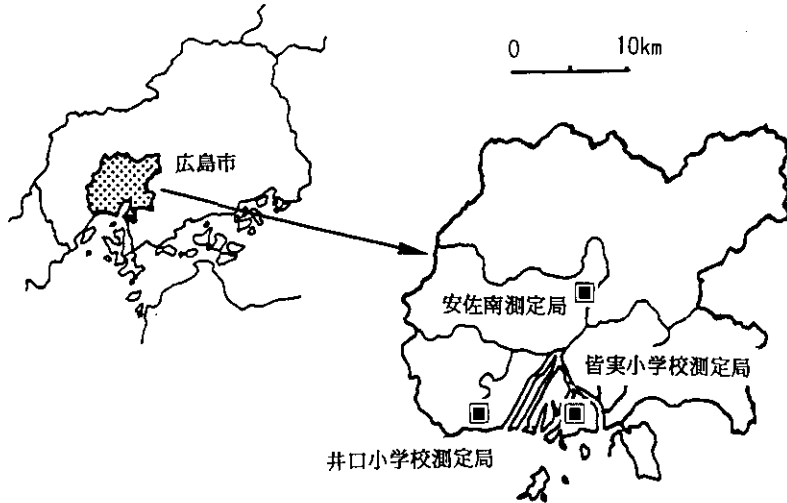


図30 野外でのブリオメーター試験の実施地点（広島市，1985年11月～1986年12月）

これらの試験期間中，空気浄化室，非浄化室のどちらのシュートもほとんど成長しない場合があった。環境要因との関係を検討したところ，このような生育不良は外気温がかなり高いとき，及び外気の相対湿度が著しく低いときに認められた。環境制御室を用いた成長実験などから，本試験に指標植物として用いたオオバチョウチンゴケの生育は，高温や低湿度によって影響されるためであろうと思われた。浄化室のシュートが十分に生育した場合のブリオメーター試験の結果を表11に示す。浄化室のシュートに比べて非浄化室のシュートの成長が抑制された場合が2回あり，このとき，試験期間中の大気中の SO_2 濃度が高く，同時に O_3 濃度も比較的高いことが認められた。環境制御室での大気汚染物質の暴露実験では，オオバチョウチンゴケは SO_2 や O_3 に感受性が高く，野外試験の結果と矛盾していない。

表11 野外におけるブリオメーター試験の結果と種々の大気汚染物質濃度

期 間 ¹	851119 ～1203	860118 ～0130	861211 ～1225	861211 ～1225	861211 ～1225
地 点	皆実小	皆実小	皆実小	井口小	安佐南
SO_2 濃度 (ppb) ²	24	33	26	17	17
NO_2 濃度 (ppb)	49	49	50	40	38
O_3 濃度 (ppb)	15	27	6	18	16
成 長 比 (%) ³	21	10	94	96	108

¹ 例えば851119は1985年11月19日のこと。

² 日最高濃度（1時間平均値）の試験期間中の平均値。

³ 試験期間中のシュートの伸長量の比（非浄化室／浄化室）。

(4) まとめ

野外の大気環境を蘚苔類の指標植物で評価するための、二連式チャンバーを用いた試験装置を開発し、環境制御室内でその性能などを検討した。この改良ブリオメーターを野外で使用したところ、外気の温湿度の影響を受けるものの、ある程度現在の大気環境を評価するのに有効であることが示唆された。また、今回試料に用いたオオバチョウチンゴケのシュートは、大気汚染物質としては SO_2 と O_3 の濃度が同時に高い場合に影響を受けることが示唆され、複合大気汚染評価のための指標植物として利用され得ると思われる。今後、二連式チャンバーの改良や、指標蘚苔類の選抜・開発、さらに、蘚苔類の大量培養法などについて検討することにより、野外大気環境評価に有効なブリオメーターの開発を進め、複合大気汚染環境の評価について検討するべきである。

2.6.4 遺伝子組換え植物を用いる野外の大気環境評価のための実験装置の開発

(1) はじめに

生物反応を通して環境を評価する「生物指標」は、機器による物理・化学的計測法と異なり、環境質自体を直接数値化して表現することができない。しかし、生活環境や自然環境の評価では、そこに生存する人間や動・植物に対してその環境質がどのような影響を与えるのかを評価することが最終目的であり、それには生物自身によって評価する「生物指標」による方法が適切である。特に、高等植物は生育する環境の影響を直接受け、生活様式もその環境に適応しており、優れた生物指標といえる。

この高等植物を用いた大気汚染環境評価並びに大気汚染の植物影響評価の手法には、指標植物を調査地点に直接配置して、その植物影響程度から環境評価する植物計 (Phytometer) や大気浄化の有無だけが異なる一対の野外配置型のチャンバーで植物を栽培し、チャンバー間の植物影響程度の違いから環境評価するフィルタード・エア・チャンバー (Filtered-Air Chamber) 法、さらにそれを発展させ、チャンバーの天蓋を除去したオープン・トップ・チャンバー (Open-Top Chamber) 法などがある。これらの手法では、野外条件下の複合環境から大気汚染環境の影響だけを抽出して評価しなければならないので、大気汚染環境に対して特異的に反応し、かつ、その感受性が高い指標植物を選択することが必要になる。

一方、大気汚染物質に対する植物の感受性・抵抗性は、気孔反応などに律速される汚染物質の吸収量や、吸収した汚染物質に対する植物体内の解毒活性などによって決定されている。植物による大気環境評価法の発展として、これらの酵素活性を増加・減少させ、汚染物質に対して感受性・抵抗性の異なる指標植物を人工的に開発し、利用することが考えられる。最近のバイオテクノロジーの進歩は著しく、本研究グループでも大腸菌のグルタチオン還元酵素やシロイヌナズナのアスコルビン酸ペルオキシダーゼの遺伝子を導入した組換えタバコを作出し、 O_3 や SO_2 に対する反応性について検討している。

これらの遺伝子組換え植物を大気汚染指標植物として野外利用するためには、現時点では生態系に影響を与えないような（例えば花粉を飛散させないような）野外利用の安全性を考慮した大気環境評価装置を開発する必要がある。しかし、現在使用されることが多いオープン・トップ・チャンバー法では、天蓋がなく、花粉などの飛散を防止することができない。そのために、本研究課題では排気部に除塵フィルターを取り付け、花粉などの飛散を防止する新しい型式のフィルタード・エア・チャンバーを開発したので、その概要を報告する。

(2) 遺伝子組換え植物用大気環境評価装置の構造

本装置は大気汚染環境の植物影響評価装置としての基本性能を有するとともに、次の開発目標に沿って考案された。

- ①装置内が閉鎖系であり、花粉などの外部への飛散がないこと。
- ②装置構成が単純、小型である。
- ③可搬式で設置場所の制約が少ない。
- ④メンテナンス・フリーである。

1) 装置の構造及び仕様

本装置の仕様、概略を表 12、図 31 に示す。本装置の構成は、大気浄化区・非浄化区の一対の植物育成用チャンバーと除塵フィルター・排気プロワー等が設置されている排気処理装置からなる。各ユニットごとに分割可能で、可搬式であり、最低 2 × 3 m の設置場所と家庭用電源（単相 100V, 10A）が確保できれば、どこでも設置可能である。チャンバーは、透明アクリル製のユニット構造であり、ユニットの積み上げによってチャンバーの高さが調節できる。チャンバーのベース部の大気取入口（装置下部のステンレスの枠）に粒子状物質のみを除去するプレフィルターを、あるいはさらにガス状汚染物質の除去フィルターを取り付けることにより、大気の前浄化区チャンバー、あるいは浄化区チャンバーとして用いる。天蓋（屋根）は片斜面であり、側面の最上部に排気ダクトを接続して空気を吸引する。この装置では空気は下より上方向に流れ、熱は効率よくチャンバー外に放出されるため、チャンバー内の気温の上昇を緩和できる。大気は図 31 に示すように、排気処理装置の排気プロワーで吸引すると、チャンバーからダクトを通り、除塵フィルターでろ過されてから排気されるので、花粉などの外部への飛散がなく、野外で遺伝子組換え植物の使用が可能である。なお、排気処理装置の除塵効率はフィルターの仕様を替えることによって、変えることが可能である。

表12 遺伝子組換え植物用の野外大気環境評価装置の仕様

植物育成用チャンバー	
本体	透明アクリル (3mm ^φ) 製, 47 ^L ×47 ^W ×50 ^H cm (1ユニット) ユニット積重ね式
ベース	ステンレス (1mm ^φ) 製, 47 ^L ×47 ^W ×15 ^H cm (1ユニット) 大気取入口; 10 ^L ×35 ^W cm×4方向, 大気浄化フィルター装着
大気浄化フィルター	活性炭フィルター (10mm ^φ ×2枚, 80g/㎡活性炭含有) +プレフィルター

排気処理装置	ステンレス (1mm ^φ) 製, 90 ^L ×60 ^W ×45 ^H cm
排気処理フィルター	高性能除塵フィルター (CP-9C, ケンブリッジ製) +プレフィルター
排気ブロワー	ターボファン式送風機 (SAP FORM-OBT FT-10, 400W, 松下製)

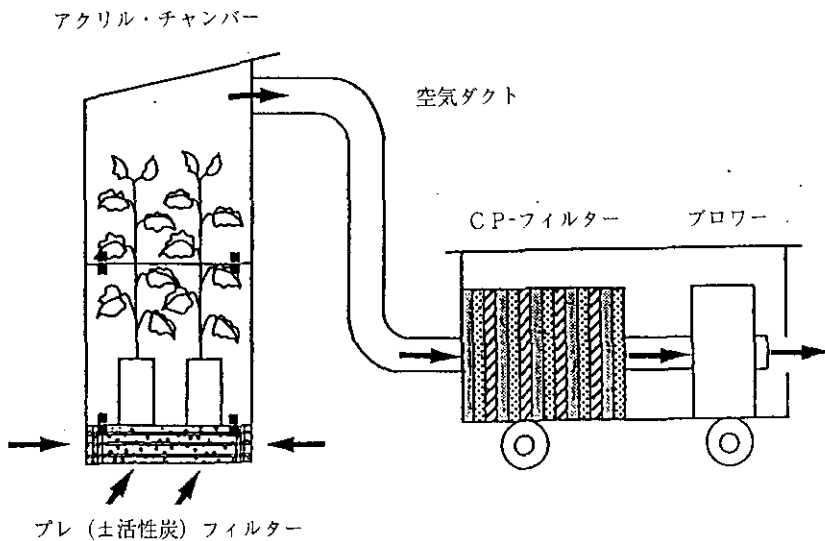


図31 遺伝子組換え植物用の野外大気環境評価装置の概念図

2) 汚染大気の浄化能力

現在、我が国における大気汚染による植物影響は、光化学オキシダントを主体としたものであり、その中でも O_3 によるものが懸念されている。そのため、本装置ではこの O_3 を除去することを開発仕様として、大気浄化フィルターには O_3 除去効率の高い活性炭を主成分としたものを選定した。活性炭フィルター（日本タフト製）は防塵フィルターの表面に微粉状の活性炭を浸漬処理しており、10 mm厚のフィルターに 80 g/m^2 の活性炭を含有している。本装置では、チャンバーのベースの4方向にある大気取入口に2枚積層して装着している。

このフィルターシステムの O_3 除去効率を表13に示した。環境制御室で O_3 を $0.05 \sim 0.2 \text{ ppm}$ に濃度制御し、チャンバー内の風速を変えて、チャンバー中央部での O_3 濃度を測定した。 O_3 濃度・風速を変えても、ほぼ90%以上の高い O_3 除去効果を示した。また、後述する植物を用いた O_3 暴露実験では、2週間後でも O_3 除去率の低下はほとんど認められず、野外使用にも耐えうるものと判断できた。なお、活性炭フィルターを装着せず、プレフィルターのみを装着した非浄化区では、チャンバー内の O_3 濃度は外気の95%内外であり、ほぼ野外の環境濃度とみなせる。

表13 フィルタード・エア・チャンバーの O_3 除去率

風速 $\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$	O_3 除去率 (%)		
	0.05ppm O_3	0.1ppm O_3	0.2ppm O_3
10	98	98	97
20	97	96	96
30	97	95	93
40	95	94	91
50	93	92	87
60	92	90	85

条件： $260 \mu \text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$, 25°C , 60%RH。

3) 通気量とチャンバーの換気率

チャンバー内の大気は、チャンバーのベースの4方向にある大気取入口からチャンバー上部端にある排気口に向けて垂直方向に流れ、排気処理装置に導入される。本装置の排気ブローはターボファン式であり、高い風圧・風量が得られる（最大静圧 200 mm aq 、最大流量 $8 \text{ m}^3/\text{min}$ ）。

チャンバーを2ユニットに増結して（ 100^{H}cm 、内容量 0.24 m^3 ）、チャンバーの換気率を調べた。チャンバー中央部の風速は、最大で 60 cm/sec 以上に達した。この風速は、排気ブローの排気口の開度を調節することにより可変できる。またこのとき、チャンバーの換気率は最大 30 回/min となり、報告されているオープン・トップ・チャンバー法の換気率が $5 \sim 8 \text{ 回/min}$ と比較して、高風量が得られる。

表14 フィルタード・エア・チャンバー内の温度

光強度 $\mu\text{E}/\text{cm}^2/\text{s}$	外気温 $^{\circ}\text{C}$	浄化区 $^{\circ}\text{C}$	非浄化区 $^{\circ}\text{C}$	温度差* $^{\circ}\text{C}$
263	20.4	21.2	21.7	1.1
0	24.8	25.0	25.1	0.3
30	24.8	25.1	25.2	0.4
128	24.9	25.3	25.5	0.5
263	25.0	25.8	26.0	0.9
263	28.2	29.0	29.3	1.0

条件：60%RH, 30cm/s。

*：温度差 = (浄化区 + 非浄化区) ÷ 2 - 外気温。

4) チャンバーの光透過・温度特性

チャンバーの被覆資材は、3mm厚の透明アクリル板を用いており、チャンバー内の中央部での光透過率は野外条件下で平均90%以上であった。

チャンバー内の気温は日射量の影響を大きく受ける。表14にチャンバーの設置環境の気温、光強度を変化させた場合のチャンバー内中央位置の気温を示した。室内実験の範囲では、チャンバー内気温の昇温は約1°C以内であった。また、後述する野外実験での観測値では、最大5°C程度の昇温が観測され、野外使用にも耐えうるものと判断できた。

(3) 非組換え指標植物を用いたO₃暴露試験

本装置の野外での実用化に際して、グロースキャビネット内でポプラを供試植物としたO₃暴露試験を実施し、本装置の運転特性、供試植物の成長影響を調査した。

人工光型グロースキャビネット内に本装置を設置し、温度25±0.5°C、湿度70±3%RH、光周期14/10時間(明期/暗期)、光強度260 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件でO₃暴露試験を実施した。O₃暴露条件は、最大濃度が0.1ppm、日ドースが500ppb/hrになるようにした(図32)。供試植物は1/10,000アールポットに挿し木したポプラ苗2種(I-45/51, FS-51)を用いた。ポプラは挿し木4週後に各チャンバーに5鉢ずつ配置し、2週間育成して植物への影響を調査した。

本装置の大気浄化用フィルターシステムのO₃除去効率は、O₃暴露を2週間継続しても、劣化せずに初期性能を維持し、浄化区チャンバー内のO₃濃度は外気の約10%以下であった。また、非浄化区チャンバーではほぼ外気の約90%以上の濃度であり、浄化区と非浄化区間ではO₃濃度だけが環境要因として異なり、両区間に生じる植物影響の相違を大気中のO₃に帰因できるものと判断した。

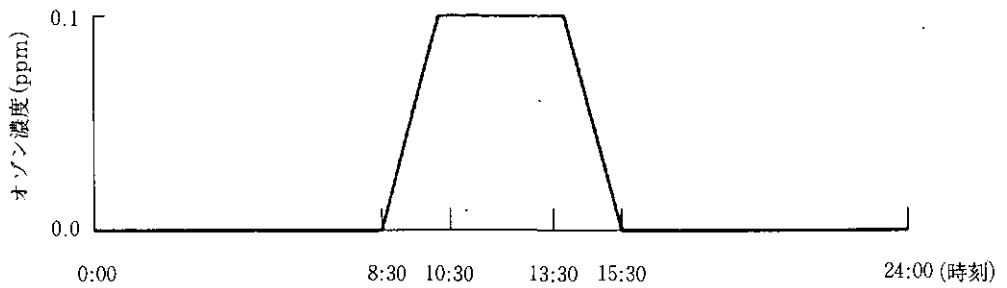


図32 O₃ 暴露実験におけるO₃ 濃度制御パターン

ポプラの成長影響を表15に示す。浄化区と非浄化区間の差異は、非浄化区の植物葉の傷害に顕著に生じた。浄化区の植物にはなんらの可視傷害が認められなかったのに対し、非浄化区の植物には白灰色の小斑 (I-45/51) や黒褐色の壊死斑 (Fs-51) などのO₃特有の可視傷害が認められ、落葉する葉もあった。この結果、葉の成長にかかわるパラメーター (葉面積、葉乾重など) に影響が顕著に反映された。このO₃暴露条件 (日ドース: 500 ppb/hr) は、関東地方の光化学オキシダント汚染の激しい地域で頻繁に観測されるものであり、本装置が大気汚染環境評価用として有効であると判断できた。

表15 O₃ 暴露実験におけるポプラの成長

項目	単位	I-45/51			Fs-51		
		浄化区(F)	非浄化区(NF)	NF/F(%)	浄化区(F)	非浄化区(NF)	NF/F(%)
樹高	cm	22.7	23.4	103	17.2	17.2	100
開葉数	枚	23.6	22.0	102	33.6	33.0	98
可視害葉数	枚	0.0	12.4	—***	0.0	13.4	—***
落葉数	枚	0.0	3.8	—***	0.0	2.8	—
葉面積	dm ²	8.5	6.4	75**	8.8	7.7	87
乾物重	g						
葉		2.6	1.8	71**	4.2	3.7	89
枝・樹幹		1.5	1.1	76**	2.0	1.9	94
根		0.3	0.3	79*	0.9	0.9	106
挿し穂		4.9	3.3	67	2.8	2.7	97

***, **はそれぞれ平均値の差が0.1, 1%で有意なものを示す (n=5)。

(4) 非組換え植物を用いた野外試験

グロースキャビネットで実施した O_3 暴露試験を踏まえて、ハツカダイコン（品種；コメット）を供試植物として野外での実証試験を行った。

本装置を芝生露場に配置し、植物を播種1週間から2週間育成し、植物への影響を調査した。植物は園芸培土を充てんしたプラスチック容器（ $30^L \times 30^W \times 10^H$ cm）に3粒ずつ16地点に播種し、1週後に1地点1株に間引きした。

本野外実験でも、グロースキャビネット内の O_3 暴露実験と同様に、装置の大気浄化能力は実験期間中、初期性能を維持していた。なお、この実験期間中には最大0.1 ppm 強の O_3 濃度も観測した。また、チャンパー内気温は、昼間の外気温が $30 \sim 35^\circ C$ の場合で、 $4 \sim 5^\circ C$ の昇温が認められたが、その昇温による植物の生育阻害は認められなかった。

ハツカダイコンの成長影響を表16に示す。浄化区と非浄化区間の差異は、乾物成長には認められなかったが、植物葉の可視傷害発現は認められた。浄化区の植物にはなんら可視傷害が認められなかったのに対し、非浄化区の植物には、 O_3 特有の白灰色の微小斑の可視傷害が認められた。

この野外実験や O_3 暴露実験の結果から、葉に発現する可視傷害が O_3 に対する有効な植物指標であると判断できるとともに、本装置が O_3 を主成分とする光化学オキシダントによる汚染環境の評価には十分に機能を果たすと判断できる。

表16 野外実験におけるハツカダイコンの成長

項 目	単 位	浄化区(F)	非浄化区(NF)	NF/F(%)
開 葉 数	枚	7.7	8.1	105
可視害葉数	枚	0.0	2.6	—***
葉 面 積	dm ²	2.0	1.8	94
乾 物 重	g			
葉		0.42	0.42	100
葉 柄		0.14	0.13	93
根		0.40	0.40	100

*** は平均値の差が0.1%で有意なものを示す (n=16)。

(5) まとめ

本プロジェクト研究ではバイオテクノロジーによって高大气汚染感受性の遺伝子組換え植物を創出し、それを大気汚染指標植物として活用することを主目的としていた。しかし、現時点では遺伝子組換え植物を野外利用するためには、生態系への安全性を考慮しなければならず、そのために本課題では、新たな大気環境評価装置の開発を試みたものである。

今回開発した装置は、遺伝子組換え植物用としての特異な構造であるが、大気汚染環境評価を

すること自体は、従来からのフィルタード・エア・チャンバーやオープン・トップ・チャンバーなどと同じ目的であり、十分にその機能を有するばかりか、能力的には優れていると判断できる。

今後、本装置を活用して指標植物を用いて大気環境評価をするためにも、供試植物の選択が調査結果の精度・信頼性を左右する重要なポイントになるであろう。

2.7 まとめ

大気汚染の状況を植物を用いてモニターすることは、誰でも手軽にできること、植物の被害を肉眼で観察できるために汚染を感覚的にとらえられることなどの理由により、これまでも広く行われてきた。しかし、大気汚染に対する植物の反応は、植物の遺伝的要因や周囲の環境要因などにより大きく変動するため、正確な環境モニタリングはできなかった。本特別研究では、このような問題点を解決するために、以下の目標を設定した。すなわち、①大気汚染に対する植物の感受性を支配する植物の遺伝的、生理的要因及び環境要因を明らかにする。②遺伝子組換えにより植物の大気汚染感受性を改変する手法を確立する。③遺伝子組換え指標植物を野外で用いるための装置を開発する。④大気汚染に対する植物の反応を画像計測・診断する方法を開発する。また、光化学オキシダントの一種であるPANは植物に多大な被害をもたらすことが知られているにもかかわらず、様々な制約により、その作用の仕組みは解明されていなかったため、本特別研究では、⑤PANの発生装置・暴露装置・測定法等の開発を行い、PANの植物への影響の解明、PAN感受性植物の選抜等も行った。

本特別研究で得られた成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) SO₂のほか、O₃による植物の障害にも活性酸素の関与が示唆された。特にO₃暴露により植物のAPやGR等の活性酸素代謝系酵素活性が増大したため、これらの酵素が植物のO₃感受性に密接にかかわっていることが推測された。
- (2) O₃により、暴露初期より脂質組成が変化することを見だし、この脂質代謝系を明らかにした。O₃暴露により、葉緑体膜を構成するガラクト脂質が減少し、不溶性の中性脂質が増大した。この脂質組成の変化はこの過程に関与する酵素活性の変化によることが示唆された。この代謝系は本研究により初めて明らかにされたものである。
- (3) 純粋なPANを植物に連続的に与えるために、PANの生成法、連続測定・制御法等を検討し、植物のPAN連続暴露装置を開発した。
- (4) 数種の植物、多くの品種を用いて、O₃及びPANに対する感受性を可視傷害により比較した。種によって感受性は異なったが、同じ種でも品種によって感受性は大きく変化した。ペチュニアは概してPANに対して感受性が高いが、とりわけ、白花系の品種が感受性が高く、赤花系、青花系のペチュニアは感受性が低いことが明らかになった。また、タバコはPANにもO₃にも感受性を示すものが多いが、Bel-W3はO₃に感受性が高く、PAN

には感受性が低いことが示された。さらに、ハツカダイコンの品種‘ comet ’と‘ さくらんぼ ’も O_3 に感受性が高く、PAN には感受性が低いことが示された。また、PAN による光合成阻害による感受性種の選抜も試みた。タバコは、可視傷害では、感受性が高かったものの、光合成阻害では感受性が低く、可視傷害による感受性の判断と光合成阻害による判断とは一致しなかった。しかし、概ね両者は平行関係にあり、光合成阻害によっても、感受性種・品種の選抜が可能であることが示された。

- (5) 数種の蘚苔類の大気汚染感受性を検討し、ツルチョウチンゴケ属が SO_2 、 O_3 などの大気汚染物質に感受性が高いことが明らかになった。蘚苔類を用いて野外で大気汚染状況を評価するための装置を作製し、ツルチョウチンゴケを用いて野外試験を行った結果、野外大気の SO_2 、 O_3 濃度が高い時に成長が阻害されることが明らかになり、蘚苔類を用いて野外大気環境を評価することができることが示された。
- (6) ベチュニアを用いた野外での大気環境評価について検討し、植物の葉齢のほか、光などの環境要因がベチュニアの PAN 感受性に影響することが示された。また、過湿や乾燥などが PAN 感受性に影響を与えている可能性が示され、灌水には特に注意する必要があることが示唆された。
- (7) 気孔開度の変化を非破壊で直接観察する顕微画像計測法を開発した。これにより、大気汚染ガス暴露時の個々の気孔の開度変化を測定することが可能になり、植物の汚染ガス抵抗性を診断する有効な手段となることが示された。また、クロロフィル蛍光動画画像計測法を開発し、大気汚染ガスによる光合成機能の変化を非破壊で測定した。これにより大気汚染ガスの光合成に対する作用部位を明らかにすることができた。
- (8) 植物の大気汚染感受性を支配していると思われる活性酸素解毒系酵素の 1 つであるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (AP) をハウレンソウから精製し、単クローン性抗体を作製して、シロイヌナズナの cDNA ライブラリーから AP の cDNA を単離し、塩基配列を決定した。(9) 大腸菌のグルタチオンレダクターゼ (GR) 遺伝子をタバコに導入して、組換えタバコを作製した。大腸菌 GR が発現して GR 活性が高まったタバコのパラコート耐性、大気汚染耐性について検討したところ、 O_3 に対する耐性には変化が認められなかったが、パラコートと SO_2 に対しては耐性が增大していることが示された。
- (10) 遺伝子組換え植物を指標植物として野外で利用するための装置を開発した。現時点では、遺伝子組換え体を開放系で利用することはできないため、アクリル製のチャンバーの排気口にフィルターを装着して花粉等の飛散を抑制した。これは外気をブローで強制的に吸引する装置であり、外気とチャンバー内の環境条件等を比較したところ、指標植物を用いて外気大気環境を評価するために十分利用できることが明らかとなった。

以上の成果により、指標植物として利用できる植物種や、指標植物を野外で用いる場合に留意すべき条件などを明らかにすることができた。また、大気汚染物質の影響の特徴を明らかにし、それを非破壊で計測するシステムを開発した。一方、大気汚染感受性に関与すると考えられる酵素系を明らかにし、その1つであるAP遺伝子を単離し、また、大腸菌のGR遺伝子を植物に導入して、SO₂耐性植物を作製することができた。したがって、これまでの生理学的・生化学的研究の結果を遺伝子組換えによる指標植物作製に応用できることが示された。さらに、遺伝子組換え植物を野外で用いるための装置を開発した。これらの成果が、新しい指標植物の開発や野外での評価法に活用されることが期待される。

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

生物環境部 部長	菅原 淳*1	(昭和61～平成元年度 特別研究責任者)
生理生化学研究室	近藤 矩朗*2	(昭和61～平成2年度 研究幹事)
	佐治 光*2	
	中嶋 信美*2	(平成2年度)
	田中 浄*3・榊 剛*3	(昭和61～平成元年度)
	久保 明弘*3	
	青野 光子*3	(昭和63～平成2年度)
	島崎研一郎*4	(昭和61～63年度)
	竹内 裕一*5	(昭和61～62年度)
陸生生物生態研究室	古川 昭雄*6	(昭和61～平成元年度 研究幹事)
	可知 直毅*6	(昭和61～平成元年度)
	名取 俊樹*7・清水 英幸*7	
	竹中 明夫*8	(昭和61～平成元年度)
	岡野 邦夫*9	(昭和61～62年度)
技術部 部長	相賀 一郎*10	(昭和61年度)
生物施設管理室	大政 謙次*7	(昭和61～平成2年度 研究幹事)
	藤沼 康実*7	
	安保 文彰・町田 孝*11	(昭和61～平成元年度)
	山口 武則*12	(昭和61～62年度)
	増田 啓子*13	(昭和63～平成元年度)
理工施設管理室	竹下 俊二*14	(昭和61～平成元年度)
	戸部 和夫*7	
	高木 博夫*15	(昭和61～平成元年度)

*1 現在 生物圏環境部長, *2 現在 地域環境研究グループ新生生物評価研究チーム, *3 現在 生物圏環境部分子生物学研究室, *4 現在 九州大学教養部, *5 現在 北海道東海大学工学部, *6 現在 地球環境研究グループ森林減少・砂漠化研究チーム, *7 現在 生物圏環境部環境植物研究室, *8 現在 地球環境研究グループ温暖化現象解明研究チーム, *9 現在 農林水産省野菜・茶業試験場, *10 現在 大阪府立大学農学部, *11 現在 総務部施設課, *12 現在 農林水産省農業環境技術研究所, *13 現在 地球環境研究グループ温暖化影響・対策研究チーム, *14 現在 地域環境研究グループ海域保全研究チーム, *15 現在 国立公衆衛生院衛生工学部

[B 客員研究員]

竹内 裕一	(北海道東海大学工学部)	(昭和63～平成2年度)
鈴木 隆	(山形大学教育学部)	(昭和61～平成2年度)
岩城 英夫	(筑波大学生物科学系)	(昭和61年度)
及川 武久	(筑波大学生物科学系)	(昭和61～平成元年度)
藤伊 正	(筑波大学生物科学系)	(昭和61～平成2年度)
内宮 博文	(筑波大学生物科学系, 現在, 東京大学応用微生物研究所)	(昭和61～平成元年度)
小川 和雄	(埼玉県公害センター)	(平成2年度)
岡崎 淳	(千葉県公害研究所)	(平成2年度)
高崎 強	(千葉県農業試験場)	(昭和61～平成2年度)
鈴木 彰	(千葉大学教育学部)	(昭和61～63年度)
滝本 道明	(東邦大学理学部)	(昭和61～63年度)
杉村 康知	(東邦大学理学部)	(昭和61年度)
佐藤 秋生	(電力中央研究所)	(昭和61年度)
網野 真一	(東京大学理学部)	(昭和61～62年度)
米田 好文	(東京大学遺伝子実験施設)	(昭和63～平成2年度)
鳥山 尚志	(東京大学応用微生物研究所)	(平成2年度)
山田 晃弘	(東京大学教養学部, 現在, 北海道東海大学工学部)	(昭和61～平成2年度)
庄野 邦彦	(東京大学教養学部)	(昭和61～平成2年度)
小関 良宏	(東京大学教養学部)	(昭和61～平成2年度)
大森 正之	(東京大学海洋研究所)	(昭和61～平成2年度)
桜井 英博	(早稲田大学教育学部)	(昭和61年度)
長野 敏英	(東京農業大学総合研究所)	(昭和61～平成2年度)
戸塚 績	(東京農工大学農学部)	(昭和61～平成2年度)
伊豆田 猛	(東京農工大学農学部)	(平成2年度)
三宅 博	(東京農工大学農学部, 現在, 名古屋大学農学部)	(昭和61年度)
和田 正三	(東京都立大学理学部)	(昭和61～平成2年度)
伊藤 繁	(基礎生物学研究所)	(昭和61～63年度)
長田 敏行	(基礎生物学研究所, 東京大学理学部)	(昭和61～平成2年度)
渡辺 昭	(名古屋大学農学部)	(昭和61～平成2年度)
平井 篤志	(名古屋大学農学部)	(平成2年度)

手塚 修文	(名古屋大学農学部)	(昭和61～平成2年度)
巽 二郎	(名古屋大学農学部)	(昭和61～62年度)
岡野 邦夫	(農林水産省野菜・茶業試験場)	(昭和63年度)
田中 國介	(京都府立大学農学部)	(昭和61～平成2年度)
竹葉 剛	(京都府立大学生活科学部)	(昭和63～平成2年度)
原藺 芳信	(大阪府立大学農学部, 現在, 農林水産省農業環境技術研究所)	(昭和61～62年度)
岩月善之助	(広島大学理学部)	(昭和61～平成2年度)
橋本 康	(愛媛大学農学部)	(昭和61～平成2年度)
佐藤 光	(九州大学農学部)	(昭和61年度)
小野 莞爾	(熊本大学理学部)	(昭和61～平成2年度)
丹羽 登	(千葉工業大学工学部)	(昭和61～平成2年度)
山崎 弘郎	(東京大学工学部)	(昭和61～平成2年度)
船田 周	(作新学院大学)	(昭和61～平成2年度)
山田 博章	(日本大学生産工学部)	(昭和61～平成2年度)
鹿野 快男	(東京農工大学工学部)	(昭和61～63年度)
高木 幹雄	(東京大学生産技術研究所)	(昭和61～平成2年度)
井上 多聞	(筑波大学物理工学系)	(昭和61～平成2年度)
茅野 充男	(東京大学農学部)	(平成元年～2年度)
内嶋善兵衛	(お茶の水大学)	(昭和61～平成2年度)
渡辺 定元	(東京大学農学部)	(平成元年～2年度)

2 研究課題と担当者 (括弧内は客員研究員)

(1) 光化学二次汚染物質に対する植物反応の指標性に関する研究

島崎研一郎・榊 剛・菅原 淳・近藤矩朗・田中 浄・竹内裕一

(山田晃弘・滝本道明・藤伊 正・鈴木 隆・大森正之・巽 二郎・鳥山尚志)

(2) バイオテクノロジーによる指標植物の作出法に関する研究

田中 浄・近藤矩朗・竹内裕一・佐治 光・久保明弘・青野光子・清水英幸・藤沼康実・山口武則

(庄野邦彦・田中國介・長田敏行・小関良宏・内宮博文・米田好文・岩城英夫・小野莞爾・竹葉 剛・渡辺 昭・平井篤志)

(3) 指標植物の探索と選抜に関する研究

岡野邦夫・名取俊樹・古川昭雄・可知直毅・清水英幸・竹中明夫・大政謙次・藤沼康実

(戸塚 績・岩城英夫・岩月善之助・和田正三・佐藤秋生・三宅 博・佐藤 光)

(4) 指標植物の系統保存と増殖に関する研究

藤沼康実・山口武則・相賀一郎・町田 孝・大政謙次・清水英幸

(佐藤 光)

(5) 植物診断法の開発に関する研究

大政謙次・相賀一郎・山口武則・藤沼康実・町田 孝・戸部和夫・島崎研一郎

(丹羽 登・山崎弘郎・船田 周・山田博章・橋本 康・鹿野快男・高木幹雄・井上多聞・
高倉 直・茅野充男・内嶋善兵衛・渡辺定元)

(6) 環境調節装置の制御法に関する研究

大政謙次・相賀一郎・藤沼康実・町田 孝・安保文彰・増田啓子・竹下俊二・高木博夫・
戸部和夫

(長野敏英・原蘭芳信)

(7) 指標植物による大気環境評価装置に関する研究

古川昭雄・清水英幸・可知直毅・竹中明夫・藤沼康実・山口武則・町田 孝

(戸塚 績・岩月善之助・高崎 強・佐藤秋生・三宅 博・伊豆田猛・小川和夫・岡崎 淳)

II 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
[昭和61年度] O.Ito, K.Okano, T.Totsuka	Effects of NO ₂ and O ₃ exposure alone or in combination on kidney bean plants: Amino acid content and composition	Soil Sci. Plant Nitr.	32	351-363	1986
大政謙次	植物生理計測とデータ処理	CELLS 研究ワーク ショップ報告集		109-112	1986
大政謙次	環境汚染害	農業気象・環境学 (長 野敏英ら著, 朝倉書店)		131-134	1986
大政謙次	光合成機能診断のための画像 計測	宇宙利用シンポジウ ム報告集	3	112-115	1986
大政謙次	植物の反応をみる	計測と制御	25	1151	1986
大政謙次	湿度センサとトレーサビリティ	農業気象	42	149-151	1986
K.Omasa, M.Onoe, H.Yamada	NMR imaging for measuring root system and soil water content	Environ. Control Biol.	23	99-102	1986
岡野邦夫	大気汚染物質による光合成産 物の転流阻害と分配変化	Radioisotopes	35	65	1986
K.Okano, T.Totsuka	Absorption of nitrogen dioxide by sunflower plants grown at various levels of nitrate	New Phytol.	102	551-562	1986
佐治 光, 内宮博文	植物の遺伝子ベクターによる 形質導入	遺伝	40	154-159	1986
M.Wada, H.Shimizu, A.Kadota, H.Abe, N.Kondo	A model system to study the effect of SO ₂ on plant cells 1. Experimental conditions in the case of fern gametophytes	Environ. Control in Biol.	24	95-102	1986
[昭和62年度] 大政謙次	生体情報の画像処理	施設型農業生産にお ける技術革新の現状 と今後の展開		40-52	1987
K.Omasa, I.Aiga	Environmental measure- ment: image instrumenta- tion for evaluating pollu- tion effects on plants	Systems & Control Encyclopedia (ed. M.G. Singh, Pergamon Press)		1516- 1522	1987

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
K.Omasa, K.Shimazaki,I.Aiga, W.Larcher,M.Onoe	Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves	Plant Physiol.	84	748-752	1987
大政謙次, 高木博夫, 松本 茂	ガス濃度の測定	農業気象の測器と測定法 (日本農業気象学会関東支部編, 農業技術協会)		115-126	1987
島崎研一郎	気孔開閉と孔辺細胞の生理	化学と生物	24	645-654	1987
K.Shimazaki, N.Kondo	Plasma membrane H ⁺ -ATPase in guard-cell protoplasts from <i>Vicia faba</i> L.	Plant Cell Physiol.	28	893-900	1987
K.Shimazaki, E.Zeiger	Red light-dependent CO ₂ uptake and oxygen evolution in guard cell protoplasts of <i>Vicia faba</i> L.: Evidence for photosynthetic CO ₂ fixation	Plant Physiol.	84	7-9	1987
Y.Fujinuma, A.Furukawa, T.Totsuka,T.Tazaki	Uptake of O ₃ by various street trees	Environ. Control Biol.	25	31-39	1987
M.Wada, H.Shimizu, N.Kondo	A model system to study the effect of SO ₂ on plant cells II. Effect of sulfite on fern spore germination and rhizoid development	Bot. Mag. Tokyo	100	51-62	1987
E.Zeiger, M.Iino, K.Shimazaki, T.Ogawa	The blue-light response of stomata: Mechanism and function	Stomatal Function (Stanford Univ. Pr.)		209-227	1987
[昭和63年度] 大政謙次	画像計測とリモートセンシング	植物の計測と診断 (朝倉書店)		155-192	1988
K.Okano, T.Machida, T.Totsuka	Absorption of atmospheric NO ₂ by several herbaceous species: estimation by the ¹⁵ N dilution method	New Phytol.	109	203-210	1988
鹿野快男, 長谷部信也, 嶋村俊樹, 大政謙次	同期検波による植物生体内水分測定法	生物環境調節	26	41-42	1988

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
鹿野快男, 長谷部信也, 大政謙次	二重電極による植物表面電位 計測	生物環境調節	26	79-82	1988
島崎研一郎	クロロフィル蛍光の測定法	植物の計測と診断 (朝倉書店)		73-78	1988
島崎研一郎	遅延発光の測定法	植物の計測と診断 (朝倉書店)		78-81	1988
K. Shimazaki	Thylakoid membrane reactions to air pollutants	Air Pollution and Plant Metabolism (Elsevier Applied Science)		116-133	1988
清水英幸, 島崎研一郎	酸素電極による測定法	植物の計測と診断 (朝倉書店)		95-100	1988
清水英幸	生長速度の計測	植物の計測と診断 (朝倉書店)		124-130	1988
清水英幸, 清水 明 松本 茂, 戸塚 績	蘚苔類による大気環境評価法 の検討—二連式チャンバーを 用いた実験装置の開発と性能 の検討—	日本蘚苔類学会会報	4	155-161	1988
田中 浄	公害ガス	蛋白質・核酸・酵素 (臨時増刊—活性酸素)	33	2824- 2829	1988
K. Tanaka, I. Furusawa, N. Kondo, K. Tanaka	SO ₂ Tolerance of tobacco plants regenerated from paraquat-tolerant callus	Plant Cell Physiol.	29	743-746	1988
K. Tanaka, H. Saji, N. Kondo	Immunological properties of spinach glutathione reductase and inductive biosynthesis of enzyme with ozone	Plant Cell Physiol.	29	637-642	1988
T. Natori, T. Totsuka	Responses of dry weight growth under SO ₂ stress in an SO ₂ -tolerant plant, <i>Polygonum cuspidatum</i>	Ecol. Res.	3	1-8	1988
藤沼康実	植物指標による大気環境評価 —ハツカダイコンは大気汚染 のモニターになりうるか—	国立公害研究所研究 発表会予稿集		49-54	1988
藤沼康実, 古川昭雄	ガス交換の計測	植物の計測と診断 (朝倉書店)		105-114	1988

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
Y.Fujinuma, A.Furukawa, I.Aiga	Effects of ozone on stomatal conductance in sunflower leaves: Age-dependent inhibition	Environ. Control in Biol.	26	83-89	1988
S.Y.Li Li, K.Shimazaki	Response of spinach and kidney bean plants to nitrogen dioxide	Environ. Pollut.	55	1-13	1988
[平成元年度] 大政議次, 三森文行	生体情報の計測技術	ニューアグロバイオビジネス戦略実務資料集(サイエンスフォーラム)		277-283	1989
大政議次	植物のガス代謝機能と画像診断	CELSS 研究会誌	1	13-17	1989
近藤矩朗	エチレンはオゾンによる植物傷害を増感する。活性酸素生成の増大に協力して関与?	化学と生物	27	214-216	1989
近藤矩朗	気孔における信号の受容と伝達	遺伝	44(1)	30-34	1990
高木博夫, 戸部和夫, 竹下俊二, 大政議次	植物実験用PAN暴露装置の試作	農業気象	45	39-42	1989
藤沼康実, 大政議次	微小濃度のガスチャンバ	植物生産システム実用辞典(株)フジ・テクノシステム)		247-255	1989
H.Miyake, H.Matsumura, Y.Fujinuma, T.Totsuka	Effects of low concentrations of ozone on the fine structure of radish leaves	New Phytol.	111	187-195	1989
[平成2年度] 大政議次	非破壊顕微画像計測法による汚染ガスに対する気孔とその周辺細胞の反応の検討	農業気象	45	251-257	1990
近藤矩朗	光化学オキシダントを浄化する植物遺伝子	遺伝	44(12)	10-11	1990
T.Sakaki, K.Saito, A.Kawaguchi, N.Kondo, M.Yamada	Conversion of monogalactosyldiacylglycerols to triacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves	Plant Physiol.	94	766-772	1990

発 表 者	題 目	掲 載 誌	卷(号)	ページ	刊年
T.Sakaki, N.Kondo, M.Yamada	Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves	Plant Physiol.	94	773-780	1990
T.Sakaki, N.Kondo, M.Yamada	Free fatty acids regulate two galactosyltransferases in chloroplast envelope membranes isolated from spinach leaves	Plant Physiol.	94	781-787	1990
佐治 光	植物への新たな遺伝子導入法	化学と工業	43	1172-1173	1990
H.Saji, K.Tanaka, N.Kondo	Monoclonal antibodies to spinach ascorbate peroxidase and immunochemical detection of the enzyme in eight different plant species	Plant Sci.	69	1-9	1990
A.Furukawa, S.Park, Y.Fujinuma	Hybrid poplar stomata unresponsive to changes in environmental conditions	Trees	4	191-197	1990
A.Furukawa	Inhibition of photosynthesis of <i>Populus euramericana</i> and <i>Helianthus annuus</i> by SO ₂ , NO ₂ and O ₃	Ecol. Res.	6	79-86	1991
M.Wada, T.Murata, H.Shimizu, N.Kondo	A model system to study the effect of SO ₂ on plant cells. III. Effects of sulfite on the ultrastructure of fern protonemal cells	Bot. Mag. Tokyo	103	403-417	1990

2 口頭発表

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	刊年
[昭和61年度] 大政謙次	光合成機能診断のための画像計測	宇宙利用シンポジウム	東京	61. 7
大政謙次, 島崎研一郎, 相賀一郎, W.Larcher	植物診断のためのクロロフィル蛍光の 動画像計測	日本生物環境調節学 会第24回大会	松山	61. 8
大政謙次	大気汚染による植物影響の画像診断 (I) 大気汚染浄化能力について	第27回大気汚染学会	京都	61.11
大政謙次	植物の画像計測と診断	応用植物電気研究会 1986年度第2回例会	つくば	61.12
大屋俊英, 田中 浄, 近藤矩明	O ₃ 暴露の蛋白質合成系への影響— ホウレンソウ葉の蛋白質及びmRNA 組成の変化—	第27回大気汚染学会	京都	61.11
岡野邦夫, 戸塚 績, 巽 二郎	オゾンに暴露された水稻における物質 分配の変化	第181回日本作物学会	宇都宮	61. 4
岡野邦夫, 町田 孝, 戸塚 績	広葉樹種の大気NO ₂ 吸収能力 —15N希釈法による評価—	第23回理工学における 同位元素研究発表会	東京	61. 7
岡野邦夫, 町田 孝, 戸塚 績	木本植物の大気NO ₂ 吸収能力	第27回大気汚染学会	京都	61.11
清水英幸	蘚苔類の生理生態学的研究—湿生蘚苔 類の生長・光合成と環境要因—	蘚苔類研究会第9回 研究会	東京	61. 6
清水英幸	蘚苔類による大気環境の評価—ツイン チャンバーの検討—	日本蘚苔類学会第15回 大会	別府	61. 8
杉 二郎, 長野敏英, 大政謙次, 中村武久	BALOOON空中写真撮影によるタイ国 マングローブ生態調査について	日本生物環境調節学会 第24回大会	松山	61. 8
原衛芳信, 大政謙次, 古川昭雄, 戸塚 績, 矢吹万寿	自然環境シミュレータにおける模擬群 落内外の気流特性とガス吸収	日本生物環境調節学会 第24回大会	松山	61. 8
[昭和62年度] 大政謙次	気孔反応の直接観察の必要性について	昭和62年度日本農業 気象学会全国大会	藤沢	62. 4
大政謙次	植物の大気汚染浄化能力の画像診断	日本生物環境調節学会 第25回大会	京都	62. 8
大政謙次, 尾上守夫	画像計測による植物の生理機能の診断 —蛍光動画像計測(光合成)と NMR-CT(根系)を中心にして—	第4回センシングフ ォーラム	東京	62. 4

発 表 者	題 目	学 会 等 名 称	開 催 都 市 名	刊 年
岡野邦夫	植物による一酸化窒素 (NO) の吸収とその生長影響	第183回日本作物学会	つくば	62. 4
岡野邦夫	野外における植物のNO _x 吸収量の測定	第184回日本作物学会	岡 山	62.10
岡野邦夫	植物のNO _x 吸収量を指標とした大気NO _x 汚染度の評価の試み	第28回大気汚染学会	東 京	62.10
岡野邦夫	植物によるNO (一酸化窒素) の吸収とその生長影響	第28回大気汚染学会	東 京	62.10
今 斎, 山田博章, 大政謙次	自然環境シミュレーション装置における風速分布の自動制御システム	昭和63年電子情報通信学会春季全国大会	東 京	63. 3
榊 剛, 山田晃弘, 近藤矩朗	オゾン暴露によるハウレンソウ葉のトリアシルグリセロール生成と葉緑体における脂肪酸の遊離	日本植物生理学会 1988年度年会	大 阪	63. 3
榊 剛, 近藤矩朗, 山田晃弘	ハウレンソウ葉緑体の包膜におけるガラクトシルトランスフェラーゼ活性の遊離脂肪酸による調節	日本植物生理学会 1988年度年会	大 阪	63. 3
佐治 光, 笠毛邦弘, 近藤矩朗	ヤエナリ根細胞の原形質膜上に存在する抗原に対する単クローン性抗体の作製	日本植物生理学会 1988年度年会	大 阪	63. 3
清水英幸	数種藓苔類の生長に及ぼす低濃度SO ₂ 暴露の影響	第28回大気汚染学会	東 京	62.10
清水英幸, 須田隆一, 岩月善之助, 戸塚 績	オオバチョウチンゴケ茎葉体の生長に及ぼす低濃度大気汚染物質の影響 I O ₃ とNO ₂ の単独および混合暴露の影響	第34回日本生態学会 大会	沖 縄	62. 4
清水英幸, 須田隆一, 岩月善之助, 戸塚 績	種々の藓苔類の生長に及ぼすオゾン(O ₃)暴露の影響	第16回日本藓苔類学会	山 形	62. 8
須田隆一, 清水英幸, 岩月善之助	Plagiomnium (ツルチョウチンゴケ属) 数種の生長と湿度環境	第16回日本藓苔類学会	山 形	62. 8
須田隆一, 清水英幸, 岩月善之助, 戸塚 績	オオバチョウチンゴケ茎葉体の生長に及ぼす低濃度大気汚染物質の影響 I SO ₂ 暴露の影響	第34回日本生態学会 大会	沖 縄	62. 4
田中 浄, 久保井徹, 近藤矩朗	タバコ培養細胞の過酸化水素分解系	日本植物生理学会 1988年度年会	大 阪	63. 3
田中 浄, 竹内恵理子, 佐治 光, 近藤矩朗	ハウレンソウアスコルビン酸パーオキシダーゼの免疫学的性質	日本植物生理学会 1988年度年会	大 阪	63. 3
名取俊樹	イタドリの一酸化炭素-炭素バランスに及ぼすSO ₂ および栄養条件の影響	第34回日本生態学会 大会	沖 縄	62. 4

発 表 者	題 目	学 会 等 名 称	開 催 都 市 名	刊 年
藤沼康実, 相賀一郎	ハツカダイコンの物質生産に及ぼす最適光・湿度環境の検討	日本生物環境調節学会 第25回大会	京 都	62. 8
藤沼康実, 大政謙次, 相賀一郎	環境調節装置内で生じる植物の生育異常—床塗料に起因する生育異常—	昭和62年度日本農業 気象学会全国大会	藤 沢	62. 4
藤沼康実, 大政謙次, 相賀一郎	植物指標を用いた大気汚染環境評価法の開発—ハツカダイコンの大気汚染指標性の検討—	環境科学シンポジウム 1987	東 京	62.11
古川昭雄	種々の大気汚染質に対するポプラとヒマワリの光合成反応	第34回日本生態学会 大会	沖 縄	62. 4
古川昭雄, 藤沼康実	気孔閉鎖が鈍いポプラの気孔開閉運動	第34回日本生態学会 大会	沖 縄	62. 4
古川昭雄, 藤沼康実, 戸塚 績, 田崎忠良	種々の街路樹によるオゾンの吸収速度	第34回日本生態学会 大会	沖 縄	62. 4
[昭和63年度] 大政謙次	蛍光動画像計測による植物診断	昭和63年度日本農業 気象学会全国大会	那 覇	63. 4
大政謙次	レーザースキャナーを用いた植物の画像計測	日本生物環境調節学会 第26回年会	宇都宮	63. 8
大政謙次	光合成機能の画像診断	精密工学会	習志野	1. 3
N.Kondo, Y.Takeuchi	Changes in nitrate reductase activity in squash seedlings with NO ₂ fumigation	5th Int. Congr. Plant Pathol.	京 都	63. 8
榊 剛, 近藤矩朗	オゾン毒性の解毒系—葉緑体の糖脂質合成酵素による遊離脂肪酸の代謝—	第29回大気汚染学会	仙 台	63.11
榊 剛, 近藤矩朗	オゾン毒性発現の初期過程—オゾン暴露植物葉における脂肪酸の遊離と脂質組成の変動—	第29回大気汚染学会	仙 台	63.11
榊 剛, 近藤矩朗, 山田晃弘	大気汚染ガスによる葉緑体脂質の代謝変動	昭和63年度基礎生物学 研究所研究会植物 脂質の分子的アプローチ	岡 崎	1. 1
清水英幸	蘚苔類の生長に及ぼす大気汚染物質の影響	大気汚染学会関東支部 植物影響部会	東 京	1. 2
清水英幸	低濃度SO ₂ に暴露されたオオバチョウチンゴケの生長及び形態形成	第29回大気汚染学会	仙 台	63.11
K.Sugahara	Role of vegetation as a sink of air polutions	Int. Symp. on Bot. Gard.	Naiying	63. 9

発 表 者	題 目	学 会 等 名 称	開 催 都 市 名	刊 年
竹中明夫, 可知直毅, 古川昭雄	遺伝的要因は、植物指標の精度にどの程度影響を与えるか—ベチニアの場合—	第29回大気汚染学会	仙 台	63.11
田中 浄, 佐治 光, 近藤矩朗	オゾンによるホウレンソウ過酸化水素解毒系酵素タンパク質の増加について	第29回大気汚染学会	仙 台	63.11
藤沼康実	植物指標による大気環境評価—ハツカダイコンは大気汚染のモニターになりうるか—	国立公害研究所研究発表会	筑 波	63.6
[平成元年度] 青野光子, 久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	バイオテクノロジーによるオゾン指標植物作出の試み	第30回大気汚染学会	川 崎	1.11
大政謙次, 寺岡兎揚, 相賀一郎	クロロフィル蛍光動画像計測によるPANの光合成影響の診断	日本農業気象学会1989年度(平成元年度)大会・日本生物環境調節学会第27回集合同大会	つくば	1.7
大政謙次, 千葉慶一郎, 寺岡兎揚, 相賀一郎, 山田博章	クロロフィル蛍光動画像の自動解析	日本農業気象学会1989年度(平成元年度)大会・日本生物環境調節学会第27回集合同大会	つくば	1.7
久保明弘, 佐治 光, 田中 浄, 田中国介, 近藤矩朗	アスコルビン酸ペルオキシダーゼのcDNAクローニング	日本植物生理学会1990年度年会	東 京	2.3
今 齋, 山田博章, 大政謙次	自然環境シミュレータ内の風速分布の高収束自動制御システムの開発	日本農業気象学会1989年度(平成元年度)大会・日本生物環境調節学会第27回集合同大会	つくば	1.7
榊 剛, 近藤矩朗, 山田晃弘	オゾンガス暴露によるホウレンソウ葉の脂質代謝変動: ラベル実験による代謝経路の解析	日本植物生理学会1989年度年会	名古屋	1.4
榊 剛, 近藤矩朗 山田晃弘	葉緑体包膜のトリアシルグリセロール合成系	日本植物学会第54回大会	仙 台	1.9
榊 剛, 近藤矩朗	オゾンによる植物傷害と膜脂質の代謝変動: トレーサー実験による解析	第30回大気汚染学会	川 崎	1.11
榊 剛, 近藤矩朗 山田晃弘	大気汚染ガスによる植物傷害と膜脂質の代謝変化—代謝経路の解析とその生理的役割について—	平成元年度基礎生物学研究所研究会	岡 崎	2.1

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	刊年
T.Sakaki, N.Kondo, M.Yamada	Synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in spinach leaves upon exposure to ozone	The 24th NIBB Conf. Membrane Biol. & Temp. Acclim. Plants	岡 崎	2. 1
佐治 光, 田中 浄, 近藤矩朗	ホウレンソウアスコルビン酸ペルオキシダーゼに対する単クローン性抗体の作製とそれを用いた構造比較研究	日本植物生理学会1989年度年会	名古屋	1. 4
清水英幸, 近藤矩朗, 和田正三	大気汚染が植物細胞に及ぼす影響—ホウライシダの胞子発芽・配偶体生長に及ぼすSO ₂ の影響—	第30回大気汚染学会	川 崎	1.11
田中 浄, 佐治 光, 久保明弘, 近藤矩朗	ホウレンソウアスコルビン酸ペルオキシダーゼのアイソザイム	日本植物生理学会1989年度年会	名古屋	1. 4
戸部和夫, 高木博夫, 竹下俊二, 大政謙次	PAN 濃度自動制御システムの開発	日本農業気象学会1989年度(平成元年度)大会 ・日本生物環境調節学会第27回集会合同大会	つくば	1. 7
[平成2年度] 青野光子, 久保明弘, 佐治 光, 名取俊樹, 田中 浄, 近藤矩朗	大腸菌グルタチオンレダクターゼ遺伝子を導入したタバコの活性酸素ストレス耐性	日本植物生理学会1991年度年会	岡 山	3. 3
青野光子, 久保明弘, 佐治 光, 名取俊樹, 田中 浄, 近藤矩朗	バイオテクノロジーによるオゾン指標植物作出の試み	第31回大気汚染学会	金 沢	2.10
久保明弘, 大屋俊英, 近藤矩朗	オゾンによる植物葉のタンパク質組成変化	日本植物学会第55回大会	静 岡	2.10
T.Sakaki, N.Kondo, M.Yamada	A new pathway for triacylglycerol synthesis operates in spinach leaves exposed to ozone	9th Int. Symp. Plant Lipid Biochem. Struct. Util.	Kent	2. 7
榎 剛	オゾンによる植物障害とその解毒機構	平成2年度大気汚染学会 関東支部植物影響部会講演会	東 京	2.12
榎 剛, 田中 浄, 山田晃弘	大気汚染物質による植物傷害の種間差異と膜脂質の代謝変化	植物脂質シンポジウム	京 都	3. 3
清水英幸, 須田隆一	改良ブリオメーターによる野外大気環境評価の検討	第31回大気汚染学会	金 沢	2.10
名取俊樹, 大政謙次	SO ₂ 処理あるいは低栄養条件下におけるイタドリ葉・根乾重比と炭素・窒素含有比	日本農業気象学会1990年度 ・日本生物環境調節学会 第28回全国大会集会合同大会	札 幌	2. 8

平成2年度 編集小委員会

委員長	相馬光之	委員	須賀伸介
副委員長	高松武次郎	〃	岡本研
委員	渡邊和夫	〃	鈴木明
〃	中野安則	〃	泉克典
〃	中根英昭	〃	高村幸子
〃	高村健二	〃	井上文
〃	松本幸雄	事務局	松井文
〃	兜真徳		

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR-8-'92

平成4年3月30日発行

編集 国立環境研究所 編集小委員会
発行 環境庁 国立環境研究所
〒305 茨城県つくば市小野川16番2

印刷 株式会社 コームラ

〒500-91 岐阜市北一色8丁目7番28号

Published by the National Institute for Environmental Studies
Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan
March 1992