

## C-062 東アジアの植生に対するオゾン濃度上昇のリスク評価と農作物への影響予測に関する研究

### (4) オゾン濃度上昇に対する農作物の生理生化学的応答の解明

国立大学法人東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 伊豆田 猛

平成18～20年度 合計予算額 (予定) 45,836千円

(うち、平成20年度予算額 12,568千円)

\*上記の合計金額には、間接経費10,577千円を含む

[要旨] オゾン濃度上昇に対する農作物の生理生化学的応答を解明するために、イネとコムギに60 ppbまたは100 ppbのオゾンを暴露し、葉の生理生化学的応答を調べた。イネ(コシヒカリ)の葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンスをオゾン暴露中に測定し、その測定値と測定時の光合成有効放射束密度、気温、大気飽差、時刻、出葉日からの日数またはオゾンのAOT0との関数を組み合わせて、水蒸気気孔拡散コンダクタンスの推定式を得た。この推定式を用いて算出したイネの葉の積算オゾン吸収量と純光合成速度との関係を解析した結果、オゾン吸収量の増加に伴って純光合成速度が低下することが明らかになった。一方、葉内の抗酸化物質のうち、アポプラスト中のアスコルビン酸の還元率は、積算オゾン吸収量の増加に伴って高くなることが明らかになった。しかしながら、1日のオゾン暴露によるイネの葉内細胞の膜脂質に対する害作用の程度は、オゾン暴露開始 1日目よりも32日目の方が著しかった。このことから、イネの葉において認められたオゾンによるアポプラスト中のアスコルビン酸の還元率の増加は、オゾンによる害作用を回避するには不十分であると考えられる。2品種(農林61号・シロガネコムギ)のコムギの葉のオゾンに対する生理生化学的応答を調べた結果、葉の純光合成速度、ルビスコ濃度・活性およびクロロフィル濃度がオゾンによって低下した。また、光合成におけるシロガネコムギのオゾン感受性は農林61号のそれよりも高く、その品種間差異には活性酸素消去能力の品種間差異が関係していることが明らかになった。特に、コムギの葉においては、CATおよびMDARが葉内で生成された活性酸素種を効率的に消去するために重要であることが明らかになった。以上の結果より、東アジアにおいて頻繁に観測されている比較的高濃度のオゾン条件下では、葉における活性酸素消去能力は純光合成速度、ルビスコ活性・濃度およびクロロフィル濃度の低下を回避するには不十分であることが明らかになった。

[キーワード] オゾン、イネ、コムギ、生理的応答、生化学的応答

#### 1. はじめに

光化学オキシダントの主成分であるオゾンの濃度が世界的に増加しつつある(Ashmore et al., 2006)。特に、東アジアにおいてはオゾン前駆物質の排出量が急速に増加しつつあり、地表面付近のオゾン濃度の上昇やその農作物に対する影響が懸念される。したがって、オゾン濃度上昇が農作物に及ぼす影響を予測し、予防対策をとることは、世界のどの地域よりも東アジアで重要である。日本は、東アジア地域にあって大気環境を共有しているので、オゾン濃度上昇のリスクを

早急に評価し、地域全体の大気環境保全を図るための政策目標を早急に設定する必要がある。

オゾン濃度上昇による東アジアの植生におけるリスクを評価・予測し、同地域における大気環境保全対策の必要性に科学的根拠を与えるためには、オゾン濃度上昇に伴う植生のオゾン吸収量の増加を評価・予測すると共に、オゾン濃度上昇がイネやコムギなどの主要農作物の収量に及ぼす影響を評価・予測する必要がある。

一般に、植物はその葉内にオゾンを解毒する機構を備えており、気孔を介した大気から葉内へのオゾン吸収から成長低下や収量低下に至る間に多くの生理生化学的プロセスが存在する(Smirnoff, 2000)。したがって、葉におけるオゾン吸収量だけでは、オゾンによる農作物の減収程度を正確に推定することができない。農作物の葉におけるオゾン吸収から減収に至る生理生化学的プロセスに対するオゾンの影響を明らかにすることは、東アジアにおける農作物の収量に対するオゾンの影響を正確に評価するために不可欠である。

## 2. 研究目的

本研究においては、オゾン濃度上昇に対する東アジアの代表的な農作物であるイネとコムギの葉の生理生化学的応答を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究方法

### (1) オゾンに対するイネの葉の生理生化学的応答

#### 1) 供試植物

供試植物として、イネ(*Oryza sativa* L.)のコシヒカリを用いた。供試土壌として黒ボク土(小林産業)を用いた。コンテナを用いた長期オゾン暴露実験では、供試土壌32.4 lを詰めたプラスチックコンテナ(B-45 ボックスコンテナ, アイリスオーヤマ, 46.6 cm × 30.8 cm × 29.6 cm, 容積42.5 l)に化成肥料(東菱高度化成444, アンモニア性窒素:可溶性りん酸:水溶性加里=14:14:14)を1 aあたり17.36 kgとなるように施肥し、代掻きを行った。2008年6月19日に、1株1本植えて、コンテナ当り6株(28.2株 m<sup>-2</sup>)で移植した。ポットを用いた短期オゾン暴露実験では、供試土壌 7 l をつめたプラスチックポット(直径22.5 cm × 深さ 27.0 cm, 容積8.8 l)に化成肥料(東菱高度化成444, アンモニア性窒素:可溶性りん酸:水溶性加里=14:14:14)を1 aあたり13.57 kgとなるように施肥し、代掻きを行った。2008年6月19日に、1株1本植えて、ポット当り3株(75.5株 m<sup>-2</sup>)で移植した。なお、いずれの実験においても、イネの育成期間中に追肥は行わなかった。

#### 2) ガス処理

東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センターのフィールドミュージアム多摩丘陵(標高 145 m)に設置した9棟のオゾン暴露チャンバーを用いた。オゾン暴露チャンバーは、ビニールハウス状のチャンバー(間口2.2 m × 奥行き3.6 m × 高さ2.0 m)と送風ボックスから構成されている。送風ボックスは、流量1.03 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>で空気を導入する換気扇(EF-40DTB1, 三菱電機)と換気扇ボックス、防塵フィルター、活性炭フィルターから成り、チャンバー内に導入される外気を活性炭フィルターで浄化した。オゾンを含む空気は、送風ボックスからチャンバー内に導入した。送風ボックス内に導入された空気は、チャンバー内を通過し、金網になっている戸の下の部分から外に排出した。

イネの育成期間におけるチャンバー内の気温と相対湿度は、温湿度記録計 (TR-72U, T&D) を用いて5分間隔で測定した。光合成有効放射束密度 (PPFD) は、チャンバー外に設置した小形セル日射センサー (IKS-37-30, 小糸製作所) で測定した。光量子センサーで同時刻にチャンバー内外のPPFDを測定し、チャンバーの光透過率を算出した結果、80.5%であった。

本研究では、活性炭フィルターによって浄化した空気を導入した浄化空気区 (CF区)、10:00~17:00のオゾン濃度を60 ppb ( $\text{nl l}^{-1}$ ) に制御した60 ppb  $\text{O}_3$ 区、同時刻のオゾン濃度を100 ppbに制御した100 ppb  $\text{O}_3$ 区を設定した。なお、1ガス処理区あたり3つの同型チャンバーを使用して、チャンバー反復を行った。コンテナを用いた長期オゾン暴露実験では、イネ苗の移植後、2008年6月30日まで、活性炭フィルターによって浄化した空気を導入したオゾン暴露チャンバー内にて育成を行い、7月1日から10月12日までの104日間にわたってガス処理を行った。ポットを用いた短期オゾン暴露実験では、イネ苗の移植後、出穂日である2008年8月26日まで活性炭フィルターによって浄化した空気を導入したオゾン暴露チャンバー内にて育成を行い、8月27日から9月27日までの32日間にわたってガス処理を行った。PSA酸素濃縮器 (S0-008S, 山陽電子工業) によって発生させた酸素をオゾン発生器 (OZC-05A, ダイレック) に供給してオゾンが発生させた。発生させたオゾンは、電磁弁で流量を制御し、活性炭フィルターを通した外気空気と混合した後、チャンバー内に供給した。オゾン濃度はオゾン計 (Model 1210, ダイレック) で測定し、データロガー (8421-50, HIOKI) で記録した。

### 3) 葉のガス交換速度の測定

コンテナ実験では2008年8月18~20日、9月9~10日および10月8~10日の9:00~15:00、ポット実験では2008年8月25日と26日および9月26日と27日の9:00~15:00に、各チャンバーから3個体を無作為に選び、イネの止葉の純光合成速度を測定した。純光合成速度の測定は、携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400, Li-cor Inc., Nebraska, U. S. A.) を用いて行った。葉を収容したリーフチャンバー内の気温、相対湿度および $\text{CO}_2$ 濃度はそれぞれ25.0°C、 $70 \pm 5\%$ および $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$ に制御し、葉の表面におけるPPFDは $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (青・赤LED冷光光源) に制御した。

### 4) 葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンス推定モデルの構築

イネの葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンス推定モデルを構築するために、葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンスを測定した。水蒸気気孔拡散コンダクタンスの測定にはスーパーポロメーター (LI-1600, Li-cor Inc., Nebraska, U. S. A.) を用いた。2008年8月1日、2日、3日、5日、6日および7日と9月5日、6日、9日、11日および23日に、各チャンバーから、コンテナ実験のイネ3個体を無作為に選び、各測定日において植物体の上位にある葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンスをオゾン暴露チャンバー内で測定した。測定時におけるオゾン暴露チャンバー内の気温、相対湿度および葉の表面における光合成有効放射束密度 (PPFD) を測定し、測定時刻を記録した。なお、気温と相対湿度は温湿度記録計 (TR-72U, T&D) を、葉の表面におけるPPFDはスーパーポロメーターに搭載されているLI-190S-1 Quantum Sensorを用いて測定した。また、植物体の観察によって記録した測定対象葉の出葉日から測定日までの日数 (出葉後の日数) と測定日までのオゾンのAOT0を算出した。水蒸気気孔拡散コンダクタンス推定モデルの構築は、Emberson *et al.* (2000) およびDanielsson *et al.* (2003) の方法に従って行った。

## 5) 葉のマロンジアルデヒド濃度、抗酸化物質濃度および活性酸素消去系酵素活性の測定

2008年8月27日の5:00~9:00と17:00~21:00および9月27日の5:00~9:00と17:00~21:00に、各チャンバーから、ポット実験のイネ3個体を無作為に選び、止葉のマロンジアルデヒド(MDA)濃度を測定した。MDA濃度は、Egerd and Tevini (2002)の方法に基づいて測定した。

2008年8月27日の5:00~9:00と17:00~21:00および9月27日の5:00~9:00と17:00~21:00に、各チャンバーから、ポット実験のイネ3個体を無作為に選び、止葉におけるアポプラスト中または全葉のアスコルビン酸濃度およびグルタチオン濃度を測定した(それぞれ(AA+DHA)<sub>Apoplast</sub>、(AA+DHA)<sub>Leaf</sub>および(GSH+GSSG)<sub>Leaf</sub>)。アポプラストのアスコルビン酸濃度の測定は、Luwe *et al.* (1993)の方法を基に、アポプラスト溶液の採取時における遠心力とアッセイ液のpHを変更して行った。全葉のアスコルビン酸濃度は、Luwe and Heber (1995)の方法を基に、アッセイ液のpHを変更して測定した。グルタチオン濃度は、Griffith (1980)の方法に基づいて測定した。なお、アポプラスト中または全葉のアスコルビン酸とグルタチオンの還元型濃度の、全濃度に対する比を還元率とした(それぞれ、AA/(AA+DHA)<sub>Apoplast</sub>、AA/(AA+DHA)<sub>Leaf</sub>およびGSH/(GSH+GSSG)<sub>Leaf</sub>)。

2008年8月27日の5:00~9:00と17:00~21:00および9月27日の5:00~9:00と17:00~21:00に、各チャンバーから、ポット実験のイネ3個体を無作為に選び、止葉のスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)およびグルタチオンレダクターゼ(GR)の活性を測定した。SODの活性は、McCord and Fridovich (1969)の方法を基に測定した。CATの活性は、Aebi (1984)の測定方法を基に測定した。APXの活性は、Nakano and Asada (1981)の方法を基に測定した。MDARの活性は、Hossain *et al.* (1984)の方法を基に測定した。DHARの活性は、Hossain and Asada (1984)の方法を基に、アッセイ液のpHを変更して測定を行った。GRの活性は、Foyer and Halliwell (1976)の方法を基に、アッセイ液のpHを変更して測定を行った。

## 6) 統計処理

イネを用いた実験の各測定項目において、F-protected LSD test によって3チャンバー反復の平均値の差を5%レベルで検定した。なお、統計解析には、SPSS\*を用いた。

### (2) オゾンに対するコムギの葉の生理生化学的応答

#### 1) 供試植物

供試植物として、コムギ(*Triticum aestivum* L.)の農林61号とシロガネコムギの2品種を用いた。コムギの育成には、裏面部に穴を空けたプラスチックコンテナ(B-45 ボックスコンテナ, アイリスオーヤマ, 46.6 cm × 30.8 cm × 29.6 cm, 容積42.5 l)を用いた。供試土壌として、黒ボク土(小林産業)を用いた。プラスチックコンテナに供試土壌を32.4 lを詰め、1 ha当たり化成肥料(東菱高度化成444, アンモニア性窒素:可溶性りん酸:水溶性可里 = 14 : 14 : 14)を488 kg、消石灰を697 kgとなるように施肥した。2007年11月14日に、恒温器内にて20°Cで播種したコムギを、11月16日に1コンテナあたり6粒となるように等間隔で植え替えた。なお、2008年3月13日に、1 ha当たり2 kgとなるように硫酸アンモニウム溶液で施肥を行なった。

#### 2) ガス処理

本研究では、前記のオゾン暴露チャンバーを用いた。活性炭フィルターによって浄化した空気を導入した浄化空気区(CF区)、10:00~17:00のオゾン濃度を $60 \text{ nl l}^{-1}$  (ppb)に制御した $60 \text{ ppb O}_3$ 区、同時刻のオゾン濃度を $100 \text{ ppb}$ に制御した $100 \text{ ppb O}_3$ 区を設定した。なお、1ガス処理区あたり3つの同型チャンバーを使用してチャンバー反復を行った。コムギへのガス処理は、2008年3月13日から6月4日までの84日間にわたって行った。オゾン発生方法やオゾン濃度の測定方法などは、前記のイネの実験と同様である。

### 3) 葉のガス交換速度の測定

2008年4月12日~4月22日、4月27日~5月9日および5月13日~5月24日に、各チャンバーから3個体の農林61号およびシロガネコムギを無作為に選び、止葉の純光合成速度( $A_{380}$ )、蒸散速度( $E$ )、水蒸気気孔拡散コンダクタンス( $G_s$ )および葉内 $\text{CO}_2$ 濃度( $C_i$ )を測定した。なお、本研究においては、それぞれの測定日を4月15日、4月29日および5月13日と表記する。葉の $A_{380}$ の測定は、携帯式光合成・蒸散測定装置(LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, U. S. A.)を用いて行った。葉の表面における光合成有効放射束密度(PPFD)を $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ とし、 $\text{CO}_2$ 濃度は $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$ に制御した。また、葉を収容したリーフチャンバー内の気温と相対湿度は、それぞれ $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ および $70.0 \pm 5\%$ に制御した。

### 4) 葉のルビスコ濃度・活性、クロロフィル濃度およびMDA濃度の測定

2008年4月15日、4月29日および5月13日に、各チャンバーから3個体のシロガネコムギを無作為に選び、止葉のルビスコ活性・濃度およびクロロフィル濃度を測定した。また、2008年4月16日、4月30日および5月14日に、各チャンバーから3個体の農林61号を無作為に選び、止葉のルビスコ活性・濃度およびクロロフィル濃度を測定した。オゾン暴露前の5:00~9:30に、脱イオン水で洗浄した後、新鮮重で $100 \text{ mg}$  ( $\pm 5 \text{ mg}$ )の止葉を個体から採取し、面積計(LI-3100, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, U. S. A.)を用いて葉面積を測定した。その後、液体窒素で瞬間冷凍し、測定時まで $-80^\circ\text{C}$ に設定したフリーザー内に保存した。冷凍保存した葉を少量の石英砂と液体窒素を適宜加えながら乳鉢内で粉碎した後、抽出バッファ [ $100 \text{ mM HEPES-KOH}$  (pH 8.0),  $5 \text{ mM EDTA}$ ,  $1 \text{ mM dithiothreitol}$ ,  $1 \text{ mM PMSF}$ ]  $1 \text{ ml}$ とPVPP  $20 \text{ mg}$ を加えて磨砕抽出を行った。この磨砕液をクロロフィル濃度の測定に用いた。磨砕液をマイクロチューブに移し、冷却遠心( $16000 \text{ g} \times 10 \text{ min.}$ ,  $4^\circ\text{C}$ )をした後の上澄をルビスコ濃度の測定に用いた。また、上澄 $500 \mu\text{l}$ を抽出バッファを用いて $2.5 \text{ ml}$ に希釈した後、Sephadex G-25 (Amersham Biosciences製, PD-10)で脱塩を行った。脱塩後に得られた溶液をルビスコ活性の測定に用いた。

ルビスコ活性は、Tissue (1993)の方法を基に測定した。ルビスコ活性は、NADHの酸化による $340 \text{ nm}$ における吸光度の減少速度を測定することによって求めた。各溶液の作成には、アッセイ液 [ $50 \text{ mM HEPES-KOH}$  (pH 8.0),  $20 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $10 \text{ mM NaHCO}_3$ ,  $10 \text{ mM KCl}$ ,  $1 \text{ mM EDTA}$ ,  $5 \text{ mM DTT}$ ,  $0.2 \text{ mM NADH}$ ,  $2.5 \text{ mM ATP}$ ,  $5 \text{ mM phosphocreatine}$ ,  $6 \text{ unit ml}^{-1} \text{ PGK}$ ,  $20 \text{ unit ml}^{-1} \text{ PCK}$ ,  $6 \text{ unit ml}^{-1} \text{ GAP-DH}$ ]を用いた。セルに、 $30^\circ\text{C}$ に温めたアッセイ液  $880 \mu\text{l}$ , 脱塩後の溶液  $100 \mu\text{l}$ を加えた後、ブランクとして分光光度計(UV-1240, 島津製作所)で $340 \text{ nm}$ における吸光度を1分間にわたって測定した。その後、 $30 \text{ mM RuDP}$ を $20 \mu\text{l}$ 加え、 $340 \text{ nm}$ における吸光度を2分間にわたって測定し、初期ルビスコ活性(initial rubisco activity)の値とした。同様に、セルにアッセイ液  $880 \mu\text{l}$ と脱塩後の溶

液 100  $\mu$ lを加えた後、恒温器内で30°Cで15分間反応させた後、ブランクとして分光光度計で340 nmにおける吸光度を1分間にわたって測定した。その後、30 mM RuDPを20  $\mu$ l加え、340 nmにおける吸光度を2分間にわたって測定し、全ルビスコ活性(total rubisco activity)の値とした。また、初期ルビスコ活性と全ルビスコ活性の比であるルビスコ活性化割合(rubisco activation state)を算出した。ルビスコ活性の1単位(kat)は1秒間に1 molのNADHを酸化できる酵素量とし、葉の新鮮重あたりの値として算出した。

ルビスコ濃度は、Laemmli (1970)の方法を基に測定した。ルビスコ濃度は試料液中のタンパク質をSDS-PAGEによって分子量ごとに分離し、ルビスコのバンド(LSU, 約55 kDa; SSU, 約12 kDa)の濃度を読み取ることで定量した。マイクロチューブに抽出バッファ50  $\mu$ l、ラメリーバッファ[0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% (w/v) glycerol, 4% (w/v) sodium dodecylsulfate(SDS), 0.004% (w/v) bromophenol blue] 100  $\mu$ l, 2-mercaptoethanol 20  $\mu$ lおよび上澄50  $\mu$ lを加え、湯浴を用いて95°Cで5分間加熱したものをSDS-PAGEの試料液とした。13.5% (w/v)のポリアクリルアミドで試料液を電気泳動にかけ、泳動したゲルをcoomasie brilliant blue (CBB)で染色し、ゲル上の染色されたルビスコサブユニットのバンド濃度をデンストグラフ(AE-6920MF, ATTO)で読み取った。既知濃度の牛血清アルブミン(BSA)溶液を標準タンパク質として、サンプルと同様の操作を行い、デンストグラフで得られたバンド濃度とタンパク質量から検量線を作成し、試料液中のルビスコ濃度を算出した。なお、本研究においては、ルビスコ濃度を葉新鮮重あたりの値として算出した。

クロロフィル濃度の測定は、Barnes (1992)の方法を基に測定した。マイクロチューブにdimethyl sulfoxide 1350  $\mu$ lと磨砕液150 $\mu$ lを加え、湯浴を用い60°Cで1時間加熱した。その試料を遠心(16,000 g  $\times$  5 min, 20°C)した後、664.9 nmおよび648.2 nmにおける吸光度を分光光度計で測定し、試料液中のクロロフィル濃度を算出した。なお、本研究においては、クロロフィル濃度を葉の新鮮重あたりの値として算出した。

2008年4月15日、4月29日および5月13日に、各チャンバーから3個体のシロガネコムギを無作為に選び、止葉のマロンジアルデヒド(MDA)濃度を測定した。また、2008年4月16日、4月30日および5月14日に、各チャンバーから3個体の農林61号を無作為に選び、止葉のMDA濃度を測定した。MDA濃度は、Egerd and Tevini (2002)の方法を基に測定した。MDA濃度は、チオバルビツール酸反応生成物(TBARS)として定量した。

##### 5) 葉の抗酸化物質濃度および活性酸素消去系酵素活性

2008年4月15日、4月29日および5月13日に、各チャンバーから3個体のシロガネコムギを無作為に選び、止葉のアスコルビン酸とグルタチオンの濃度を測定した。また、2008年4月16日、4月30日および5月14日に、各チャンバーから3個体の農林61号を無作為に選び、止葉のアスコルビン酸とグルタチオンの濃度を測定した。なお、コムギの葉のアスコルビン酸濃度とグルタチオン濃度の測定方法は前記のイネの葉における測定方法と同様である。

2008年4月15日、4月29日および5月13日に、各チャンバーから3個体のシロガネコムギを無作為に選び、止葉のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンレダクターゼ(GR)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)およびデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)の活性を測定した。また、2008年4月16日、4月30日および5月14日に、各チャンバーから3個体の農林61号を無作為に選び、止葉のスーパー

ーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンレダクターゼ(GR)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)およびデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)の活性を測定した。なお、コムギの葉の活性酸素消去系酵素の活性の測定方法は、前記のイネの葉における測定方法と同様である。

#### 6) 統計処理

コムギを用いた実験の各測定項目においては、オゾン処理と品種を要因とした二元配置分散分析(Two-way ANOVA)を行った。オゾン処理と品種の有意な交互作用が認められた場合、Tukey's honestly significant difference (Tukey's HSD)を用い、各オゾン処理区間で危険率5%未満の有意差検定を行った。なお、統計解析には、SPSS®を用いた。

### 4. 結果・考察

#### (1) オゾンに対するイネの葉の生理生化学的応答

##### 1) イネ実験におけるオゾン暴露チャンバー内の気象条件

ポットを用いた短期オゾン暴露実験のオゾン暴露期間(2008年8月27日～9月27日)における日平均気温、日平均相対湿度および日平均放射強度は、それぞれ24.7℃、85.9%および126.0 W m<sup>-2</sup>であった。CF区、60 ppb O<sub>3</sub>区および100 ppb O<sub>3</sub>区におけるオゾン暴露期間中の7時間(10:00-17:00)平均オゾン濃度は、それぞれ10.1 ppb、63.0 ppbおよび99.9 ppbであった。40 ppbを超えたオゾンの積算ドーズであるAOT40は、60 ppb O<sub>3</sub>区においては3.7 ppm hであり、100 ppb O<sub>3</sub>区においては9.7 ppm hであった。また、8月27日および9月27日のオゾン暴露中(10:00-17:00)における平均気温はそれぞれ29.8℃および22.3℃、平均相対湿度はそれぞれ70.4%および56.1%、平均放射強度はそれぞれ420.1 W m<sup>-2</sup>および281.2 W m<sup>-2</sup>であった。CF区、60 ppb O<sub>3</sub>区および100 ppb O<sub>3</sub>区におけるオゾン暴露中(10:00-17:00)の平均オゾン濃度は、8月27日ではそれぞれ7.3 ppb、59.2 ppbおよび102.2 ppbであり、9月27日ではそれぞれ6.8 ppb、69.0 ppbおよび100.8 ppbであった。

##### 2) 葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンスの推定

育成期間中に測定した水蒸気気孔拡散コンダクタンス( $g_s$ )の最大値から5%目の値を $g_{max}$ とした(0.86 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)。  $g_{max}$ を1とした時の $g_s$ の相対値と、 $g_s$ の測定時におけるオゾン暴露チャンバー内のPPFD、出葉後の日数、大気飽差、気温、時刻およびオゾンのAOT0との単相関を調べ、境界層解析(Boundary layer analysis)によってそれぞれ $f_{light}$ 、 $f_{phen}$ 、 $f_{VPD}$ 、 $f_{Temp}$ 、 $f_{time}$ および $f_{AOT}$ を求めた(図1a-f)。  $g_s$ を推定するためのモデルは式(1)を用いた。

$$g_s = g_{max} \times \min \{f_{phen}, f_{AOT}\} \times f_{light} \times \max \{f_{min}, (f_{temp} \times f_{VPD})\} \times f_{time} \quad (1)$$

ただし、 $f_{min} = 0.01$

水蒸気気孔拡散コンダクタンスの推定値と実測値との関係を直線回帰分析によって調べた結果、両者の間に有意な正の相関が認められた(図2)。したがって、本研究で構築したモデルからイネの葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンスを推定することができる。

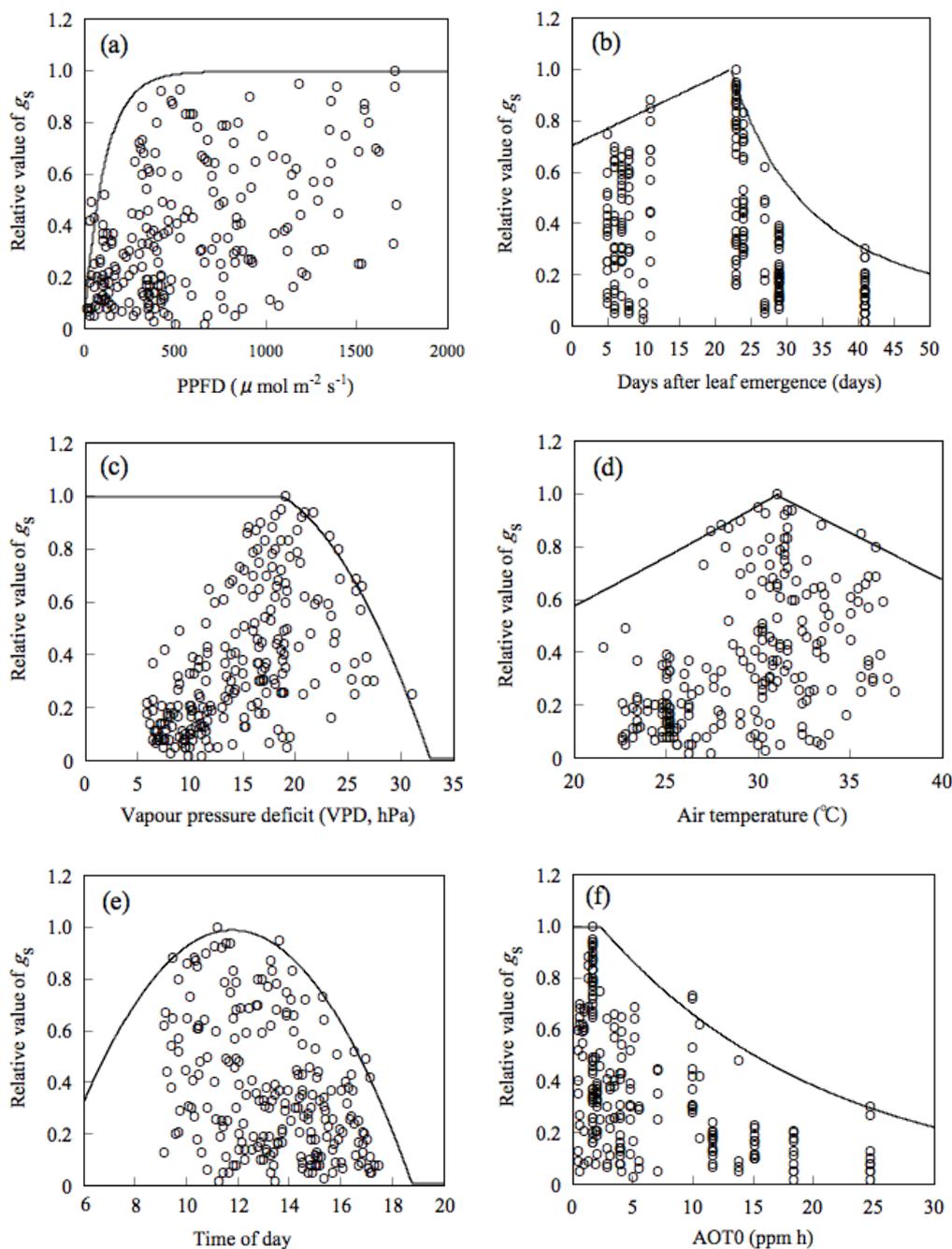


図1. イネの葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンス ( $g_s$ ) の相対値と光合成有効放射束密度 (PPFD, a)、出葉後の日数 (b)、大気飽差 (c)、気温 (d)、時刻 (e) またはオゾンの AOT0 (f) との関係. (a)  $f_{\text{light}} = 1 - \text{EXP}(-0.0088x)$ , (b) 出葉後の日数  $\leq 21$  日の時:  $f_{\text{phen}} = 0.0133x + 0.705$ , 出葉後の日数  $> 21$  日の時:  $f_{\text{phen}} = 442.63x^{-1.96}$ , (c) VPD  $\leq 18.9$  hPa の時:  $f_{\text{VPD}} = 1.0$ ,  $18.9$  hPa  $<$  VPD  $\leq 32.9$  hPa の時:  $f_{\text{VPD}} = -0.0033x^2 + 0.1x + 0.288$ , VPD  $\geq 32.9$  hPa の時:  $f_{\text{VPD}} = 0.01$ , (d) 気温  $\leq 31$  °C の時:  $f_{\text{temp}} = 0.0382x - 0.19$ , 気温  $> 31$  °C の時:  $f_{\text{temp}} = -0.0355x + 2.1$  (e)  $4:48 \geq$  時刻  $> 18:48$  の時:  $f_{\text{time}} = 0.01$ ,  $4:48 <$  時刻  $\leq 18:48$  の時:  $f_{\text{time}} = -0.00000556x^2 + 0.00788x - 1.8$ , (f) AOT0  $\leq 2.35$  ppm h の時:  $f_{\text{AOT}} = 1.0$ , AOT0  $> 2.35$  ppm h の時:  $f_{\text{AOT}} = 1.14 * \text{EXP}(-0.054x)$

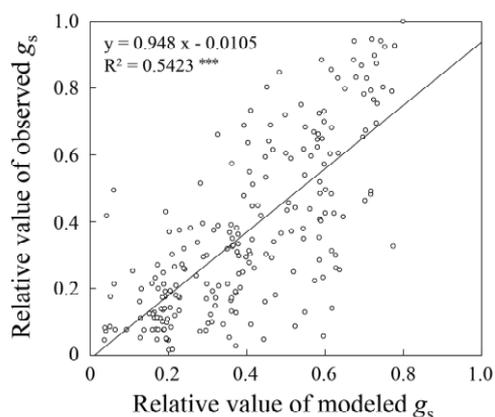


図2. イネの葉における水蒸気気孔拡散コンダクタンス ( $g_s$ ) の実測値 (相対値) と本研究で構築したモデルから算出した  $g_s$  との関係. 相対値:  $g_{\max}$  を1とした時の値 ( $g_{\max} = 0.86 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

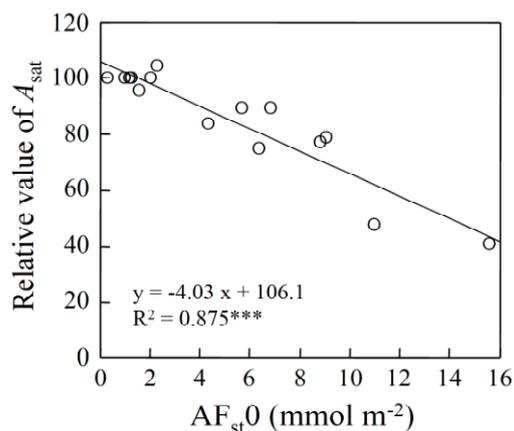


図3. イネの止葉における純光合成速度 ( $A_{\text{sat}}$ ) の相対値と積算オゾン吸収量 ( $AF_{\text{st}0}$ ) との関係. 相対値: CF区の値を100としたときの各ガス処理区の値 (%).

### 3) 葉における積算オゾン吸収量と純光合成速度との関係

葉における積算オゾン吸収量は、オゾン吸収速度 ( $F_{\text{st}}$ ,  $\text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) をある一定期間積算したものである。そこで、オゾン吸収速度を式(2)によって求めた。

$$F_{\text{st}0} = g_s \times C \times 0.61 \quad (2)$$

ただし、

$g_s$ : 水蒸気気孔拡散コンダクタンス ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

$C$ : オゾン濃度 ( $\text{nmol mol}^{-1}$ )

0.61: 水の分子拡散係数に対するオゾンの分子拡散係数の比

式2の  $g_s$  には、本研究で構築した水蒸気気孔拡散コンダクタンス推定モデルから算出した値を代入した。算出した葉のオゾン吸収速度 ( $F_{\text{st}}$ ,  $\text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) を用いて、イネの葉の積算オゾン吸収量 ( $AF_{\text{st}0}$ ,  $\text{nmol m}^{-2}$ ) を算出した(式(3))。

$$AF_{\text{st}0} = \Sigma (F_{\text{st}} \text{の1時間値}) \quad (3)$$

長期オゾン暴露実験および短期オゾン暴露実験の期間中に測定した純光合成速度と測定対象葉の出葉日から純光合成速度の測定日までの積算オゾン吸収量との関係を調べた(図3)。その結果、両者の間に有意な負の相関が認められた。このことから、イネの葉の純光合成速度は、積算オゾン吸収量の増加に伴って低下することが明らかになった。

### 4) オゾン暴露による葉内の害作用の程度とオゾン吸収量

2008年8月27日の17:00および9月27日の5:00のMDA濃度には、各ガス処理区間における有意な差は認められなかった(図4)。これに対して、9月27日の17:00の100 ppb  $\text{O}_3$ 区におけるMDA濃度はCF

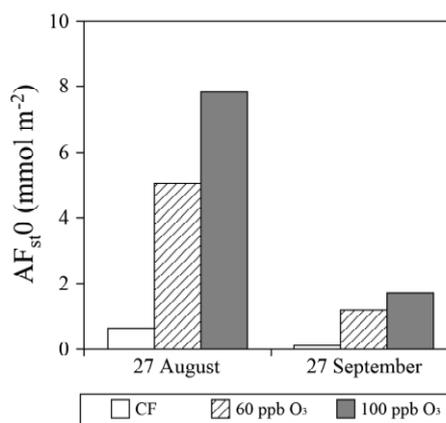
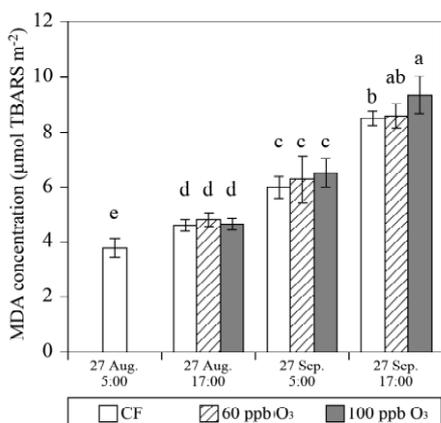


図4. イネの止葉におけるマロンジアルデヒド (MDA)濃度に対するオゾンの影響

図5. 2008年8月27日と9月27日における1日 (10:00～17:00)の積算オゾン吸収量 (AF<sub>st0</sub>).

区のそれと比較して有意に高かった(図4)。このことから、1日のオゾン暴露による葉内細胞の膜脂質に対するオゾンの害作用の程度は、オゾン暴露開始1日目よりも32日目の方が高いことが明らかになった。

オゾン暴露による害作用の程度を決める要因として、葉における積算オゾン吸収量と葉内に吸収されたオゾンの解毒能力が挙げられる (Musselman et al., 2006)。そこで、本研究で構築した水蒸気気孔拡散コンダクタンス推定式を用いて式2, 3より、8月27日および9月27日における1日 (10:00-17:00, 7時間)の積算オゾン吸収量を算出した(図5)。その結果、いずれのガス処理区においても、8月27日より9月27日の方が、1日の積算オゾン吸収量が著しく低い値であった。このことから、1日のオゾン暴露による葉内細胞の膜脂質に対する害作用の程度がオゾン暴露開始1日目よりも32日目の方が著しかった原因として、葉内に吸収されたオゾンの解毒能力が、葉の老化または長期間のオゾン暴露によって低下したことが考えられる。

5) 葉の抗酸化物質濃度および活性酸素消去系酵素活性に対するオゾンの影響

2008年9月27日の5:00における (AA+DHA)<sub>Apoplast</sub>、(AA+DHA)<sub>Leaf</sub>、(GSH+GSSG)<sub>Leaf</sub>とMDAR、DHAR、GR、SOD、CATおよびAPXの活性に、各ガス処理区間の有意な差は認められなかった(図6, 7, 8)。一方、9月27日の5:00の100 ppb O<sub>3</sub>区におけるAA/(AA+DHA)<sub>Apoplast</sub>およびAA/(AA+DHA)<sub>Leaf</sub>はCF区におけるそれらよりも有意に高く、100 ppb O<sub>3</sub>区および60 ppb O<sub>3</sub>区における

GSH/(GSH+GSSG)<sub>Leaf</sub>は、CF区のそれと比較して有意に高かった(図9)。このことから、長期間のオゾン暴露により、イネの葉における抗酸化物質の還元率が高くなることが明らかになった。そこで、抗酸化物質の還元率と積算オゾン吸

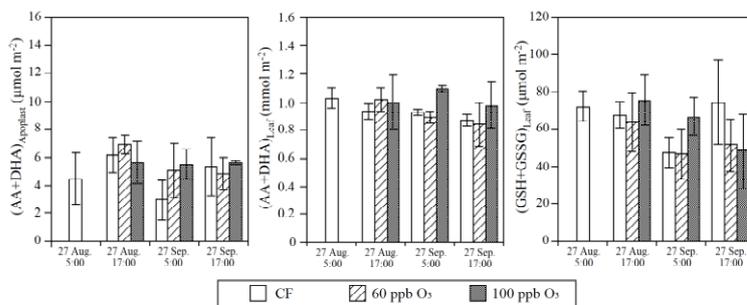


図6. イネの止葉のアポプラスト中または全葉のアスコルビン酸濃度とグルタチオン濃度に対するオゾンの影響。

収量との関係を調べた。その結果、積算オゾン吸収量と  $AA/(AA+DHA)_{Apoplast}$  との間に有意な正の相関が認められた(図10)。このことから、抗酸化物質であるアポプラスト中のアスコルビン酸の還元率は、積算オゾン吸収量の増加に伴って高くなることが明らかになった。サヤエンドウでは、アポプラスト中のアスコルビン酸の還元率が低い品種の方が、それが高い品種と比較して、オゾン感受性が高いことが報告されている (Burkey et al., 2003)。これに対して本研究では、オゾン暴露開始1日目におけるアポプラスト中のアスコルビン酸の還元率よりも、32日目の100 ppb  $O_3$ 区におけるその方が高かったにも関わらず、1日のオゾン暴露による葉内細胞の膜脂質に対する害作用の程度がオゾン暴露開始1日目よりも32日目の方が著しかった。そのため、イネの葉において認められたオゾンによるアポプラスト中のアスコルビン酸の還元率の増加は、オゾンによる害作用を回避するには不十分であると考えられる。

2008年9月27日の5:00のCF区における  $(AA+DHA)_{Apoplast}$ 、 $(AA+DHA)_{Leaf}$ 、 $(GSH+GSSG)_{Leaf}$ 、 $AA/(AA+DHA)_{Apoplast}$ 、 $AA/(AA+DHA)_{Leaf}$  およびCAT活性と、8月27日の5:00におけるそれらとの間に有意な差は認められなかった(図6, 8, 9)。一方、9月27日の5:00のMDAR、DHARおよびGRの活性は、いずれのガス処理区においても、8月27日の5:00におけるそれらよりも有意に高かった(図7)。これに対して、9月27日の5:00における  $GSH/(GSH+GSSG)_{Leaf}$  とSODおよびAPXの活性は、いずれのガス処理区においても、8月27日の5:00におけるそれらよりも有意に低かった(図8, 9)。SODおよびAPXはそれぞれ  $O_2^-$  および  $H_2O_2$  の消去反応を触媒する酵素であり、MDAR、DHARおよびGRはそれぞれモノデヒドロアスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸および酸化型グルタチオンの還元反応を触媒する酵素である (Asada, 2006)。本研究

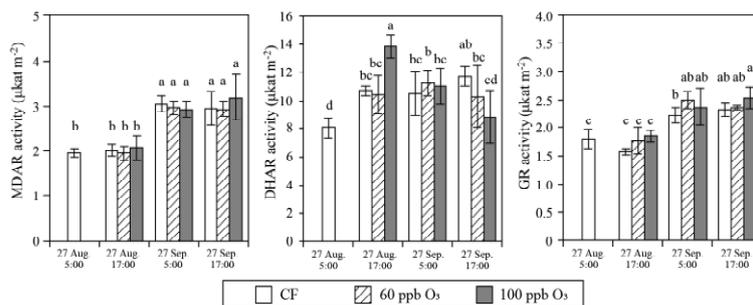


図7. イネの止葉のモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (MDAR)、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) およびグルタチオンレダクターゼ (GR) の活性に対するオゾンの影響。

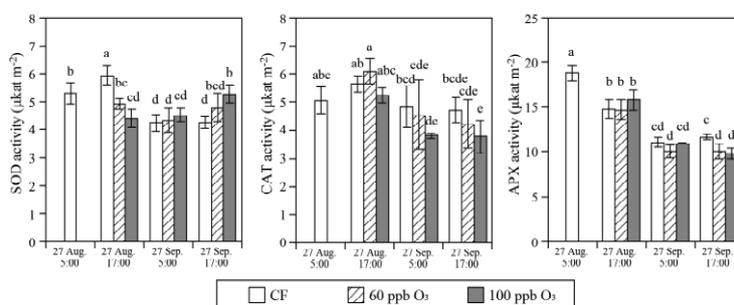


図8. イネの止葉のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の活性に対するオゾンの影響。

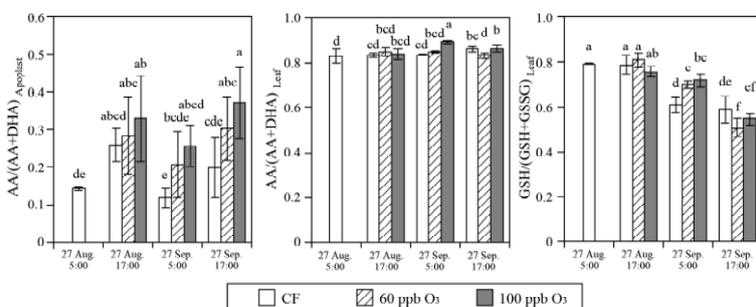


図9. イネの止葉のアポプラスト中または全葉のアスコルビン酸とグルタチオンの還元率に対するオゾンの影響。

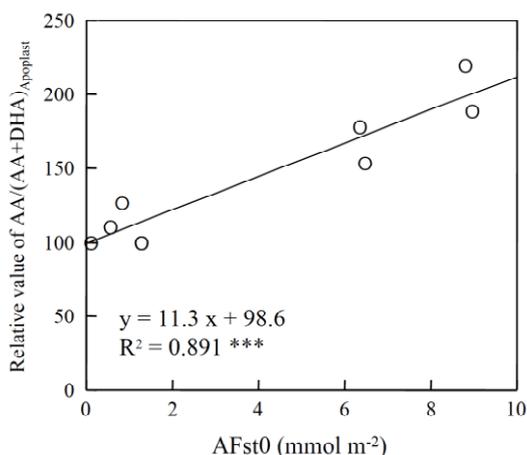


図10. イネの止葉におけるアポプラスト中のアスコルビン酸の還元率(AA/(AA+DHA)<sub>Apoplast</sub>)の相対値と積算オゾン吸収量(AFst0)との関係. 相対値: CF区を100としたときの各ガス処理区の値(%)

の結果から、イネの葉において、抗酸化物質の還元反応に関わる酵素の活性は葉の老化に伴って増加するのに対し、グルタチオンの還元率とSODおよびAPXの活性は低下することが明らかになった。さらに、9月27日の5:00の100 ppb O<sub>3</sub>区におけるCAT活性は、8月27日の5:00におけるそれよりも有意に低かった(図8)。このことから、CAT活性は長期オゾン暴露と葉の老化によって低下することが明らかになった。

以上のことから、1日のオゾン暴露によるイネの葉内細胞の膜脂質に対する害作用の程度がオゾン暴露開始1日目よりも32日目の方が著しかった原因として、葉の老化と長期にわたるオゾン暴露によって葉内で生成された活性酸素の消去反応に関わる酵素の活性やグルタチオンの還元率が低下したことが考えられる。

#### 6)まとめ(イネ)

オゾン暴露中にイネの葉の水蒸気気孔拡散コンダクタンスを測定し、その測定値と測定時の光合成有効放射束密度、気温、大気飽差、時刻、出葉日からの日数またはオゾンのAOT0との関数を組み合わせ、水蒸気気孔拡散コンダクタンスの推定式を得た。この推定式を用いて算出した葉の積算オゾン吸収量と純光合成速度との関係を解析した結果、オゾン吸収量の増加に伴って純光合成速度が低下することが明らかになった。葉内の抗酸化物質のうち、アポプラスト中のアスコルビン酸の還元率は、積算オゾン吸収量の増加に伴って高くなることが明らかになった。しかしながら、1日のオゾン暴露によるイネの葉内細胞の膜脂質に対する害作用の程度は、オゾン暴露開始1日目よりも32日目の方が著しかった。その原因として、長期にわたるオゾン暴露と葉の老化によって、活性酸素の消去反応に関わる酵素であるSOD、CATおよびAPXの活性やグルタチオンの還元率が低下したことが考えられた。これらのことから、イネの葉において認められたオゾンによるアポプラスト中のアスコルビン酸の還元率の増加は、オゾンによる害作用を回避するには不十分であると考えられる。

## (2) オゾンに対するコムギの葉の生理生化学的応答

## 1) オゾン暴露チャンバー内の気象条件

オゾン暴露期間中(2008年3月13日～2008年6月4日)におけるチャンバー内の日平均気温は15.4℃であり、日平均相対湿度は77.3%であった。オゾン暴露期間中におけるオゾン濃度が60 ppbになるように制御したガス処理区(60 ppb O<sub>3</sub>区)とオゾン濃度が100 ppbになるように制御したガス処理区(100 ppb O<sub>3</sub>区)のオゾン暴露中(10:00-17:00)の平均オゾン濃度は、それぞれ62.0 ppbおよび100.5 ppbであった。また、野外における同時刻の7時間平均オゾン濃度は33.2 ppbであった。オゾン暴露期間中における60 ppb O<sub>3</sub>区および100 ppb O<sub>3</sub>区のAOT 40(40 ppbを超えたオゾンの積算ドース)は、それぞれ13.2 ppm hおよび35.9 ppm hであった。また、野外における同期間におけるAOT40は3.1 ppm hであった。

表1 コムギの止葉の純光合成速度( $A$ )、蒸散速度( $E$ )、水蒸気気孔拡散コンダクタンス( $G_s$ )および葉内CO<sub>2</sub>濃度( $C_i$ )に対するオゾンの影響。

Date	Cultivar	Treatment	$A$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$E$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$G_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )
15 April	Norin 61	CF	25.4 (0.4) ab	3.44 (0.09)	0.47 (0.02)	260.8 (9.4)
		60 ppb	24.6 (0.8) b	2.86 (0.48)	0.53 (0.10)	271.0 (9.1)
		100 ppb	24.0 (0.4) bc	2.68 (0.39)	0.46 (0.07)	263.7 (13.6)
	Shiroganekomugi	CF	27.8 (0.3) a	3.49 (0.35)	0.54 (0.04)	265.1 (2.1)
		60 ppb	26.5 (1.8) ab	3.53 (0.56)	0.51 (0.06)	263.9 (4.5)
		100 ppb	21.4 (1.5) c	3.05 (0.12)	0.48 (0.04)	279.6 (9.5)
	ANOVA	O <sub>3</sub>	***	n.s.	n.s.	n.s.
		Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		O <sub>3</sub> ×Cultivar	*	n.s.	n.s.	n.s.
29 April	Norin 61	CF	19.9 (1.2) a	2.90 (0.08)	0.38 (0.08)	265.6 (11.7)
		60 ppb O <sub>3</sub>	21.1 (1.3) a	3.51 (0.06)	0.45 (0.06)	266.1 (7.6)
		100 ppb O <sub>3</sub>	19.1 (0.3) a	3.10 (0.10)	0.43 (0.10)	277.0 (8.2)
	Shiroganekomugi	CF	19.3 (1.7) a	3.05 (0.10)	0.24 (0.10)	268.4 (9.5)
		60 ppb O <sub>3</sub>	20.8 (0.9) a	3.82 (0.07)	0.36 (0.07)	275.9 (5.9)
		100 ppb O <sub>3</sub>	14.2 (0.9) b	2.47 (0.04)	0.29 (0.04)	277.3 (4.6)
	ANOVA	O <sub>3</sub>	*	*	n.s.	n.s.
		Cultivar	**	n.s.	*	n.s.
		O <sub>3</sub> ×Cultivar	**	n.s.	n.s.	n.s.
13 May	Norin 61	CF	11.12 (0.58)	2.11 (0.35)	0.23 (0.02)	275.4 (12.9)
		60 ppb O <sub>3</sub>	12.02 (2.54)	1.86 (0.42)	0.23 (0.05)	284.0 (18.6)
		100 ppb O <sub>3</sub>	9.78 (0.24)	1.81 (0.24)	0.22 (0.03)	286.7 (10.8)
	Shiroganekomugi	CF	2.81 (2.04)	0.89 (0.62)	0.10 (0.07)	332.9 (46.9)
		60 ppb O <sub>3</sub>	2.92 (1.02)	0.83 (0.07)	0.08 (0.01)	274.5 (47.1)
		100 ppb O <sub>3</sub>	2.93 (0.54)	0.76 (0.42)	0.07 (0.02)	283.7 (9.6)
	ANOVA	O <sub>3</sub>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		Cultivar	***	**	***	n.s.
		O <sub>3</sub> ×Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	*

The plants were daily exposed to charcoal-filtered air (CF) or O<sub>3</sub> at 60 ppb or 100 ppb (10:00-17:00) from 13 March to 4 June 2008.

Each value is the mean of 3 chamber replicates, and the standard deviation is shown in parentheses.

Two-way ANOVA: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, n.s.=not significant

When significant interaction between O<sub>3</sub> and cultivar was detected, Tukey's HSD test was performed to identify significant differences among the 6 treatments.

Values with different letters are significantly different at  $p$ <0.05.

## 2) コムギの葉の光合成パラメータとMDA濃度に対するオゾンの影響

表1に、2008年4月15日、4月29日および5月13日におけるコムギの止葉の純光合成速度 ( $A_{380}$ )、蒸散速度 ( $E$ )、水蒸気気孔拡散コンダクタンス ( $G_s$ ) および葉内  $CO_2$  濃度 ( $C_i$ ) に対するオゾンの影響を示した。4月15日および4月29日に測定した純光合成速度にオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。農林61号の純光合成速度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、オゾンによってシロガネコムギの純光合成速度は有意に低下した。なお、その他の測定項目にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

表2に、2008年4月15日～16日、4月29日～30日および5月13日～14日におけるコムギの止葉のルビスコ活性・濃度、クロロフィル濃度およびマロンジアルデヒド (MDA) 濃度に対するオゾンの影響を示した。4月15～16日に測定した止葉の初期ルビスコ活性と全ルビスコ活性にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって初期ルビスコ活性と全ルビスコ活性は両品種とも有意に低下した。また、4月29～30日に測定した止葉の初期ルビスコ活性にオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。農林61号の初期ルビスコ活性にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギの初期ルビスコ活性はオゾンによって有意に低下した。また、両品種の全ルビスコ活性においてオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって全ルビスコ活性は有意に低下した。5月13～14日に測定した両品種の止葉の全ルビスコ活性にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって有意に低下した。なお、初期ルビスコ活性にはオゾンによる有意な影響は認められなかった。4月15～16日、29～30日および5月13～14日に測定した両品種の止葉のルビスコ濃度にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって有意に低下した。

2008年4月15～16日に測定した両品種の止葉のクロロフィル  $a$  濃度にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって有意に低下した。また、クロロフィル  $b$  とクロロフィル  $a+b$  濃度にオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。シロガネコムギのクロロフィル  $b$  とクロロフィル  $a+b$  濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、農林61号のクロロフィル  $b$  と  $a+b$  濃度はオゾンによって有意に低下した。4月29～30日に測定した両品種の止葉のクロロフィル  $a$ 、 $b$  および  $a+b$  濃度にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによってそれらは有意に低下した。5月13～14日に測定した両品種の止葉のクロロフィル  $a$  濃度にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって有意に低下した。また、クロロフィル  $a$ 、 $b$  および  $a+b$  濃度にオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。農林61号のクロロフィル  $a$ 、 $b$  および  $a+b$  濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギのそれらはオゾンによって有意に低下した。

2008年4月15～16日および4月29～30日に測定した止葉のMDA濃度にオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた (表2)。農林61号のMDA濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギのMDA濃度はオゾンによって有意に増加した。また、5月13～14日の両品種のMDA濃度にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって有意に増加した。

本研究においては、オゾン暴露7週間後の止葉の初期ルビスコ活性に対するオゾンの影響に有意な品種間差異が認められた (表2)。農林61号の初期ルビスコ活性にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギの初期ルビスコ活性はオゾンによって有意に低下した。また、

オゾン暴露9週間後の止葉のクロロフィル濃度に対するオゾンの影響に有意な品種間差異が認められた(表2)。農林61号のクロロフィル濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギのクロロフィル濃度はオゾンによって有意に低下した。オゾンによる葉のルビスコ活性やクロロフィル濃度の低下は、純光合成速度の低下原因のひとつであると報告されている(Dann & Pell, 1989)。したがって、光合成におけるオゾン感受性の品種間差異は、ルビスコ活性やクロロフィル濃度におけるオゾン感受性の品種間差異によって説明できると考えられる。以上のことから、コムギの光合成活性におけるオゾン感受性には品種間差異があり、シロガネコムギの光合成活性におけるオゾン感受性は農林61号のそれよりも高いことが明らかになった。

### 3) コムギの葉の抗酸化物質濃度および活性酸素消去系酵素活性に対するオゾンの影響

表3に、2008年4月15日～16日、4月29日～30日および5月13日～14日におけるコムギの止葉のアスコルビン酸濃度およびグルタチオン濃度に対するオゾンの影響を示した。4月15～16日に測定した止葉の還元型アスコルビン酸濃度にオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。農林61号の還元型アスコルビン酸濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギの還元型アスコルビン酸濃度はオゾンによって有意に低下した。酸化型アスコルビン酸濃度、全アスコルビン酸濃度および還元率にオゾンによる有意な影響は認められなかった。4月29～30日に測定した止葉のアスコルビン酸濃度には、オゾンによる有意な影響は認められなかった。また、5月13～14日に測定した止葉の還元型アスコルビン酸濃度、酸化型アスコルビン酸濃度および全アスコルビン酸濃度にオゾンによる有意な影響が認められた。オゾンによって還元型アスコルビン酸濃度と全アスコルビン酸濃度は有意に増加したが、酸化型アスコルビン酸濃度はオゾンによって有意に低下した。還元率にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

4月15～16日に測定した止葉の全グルタチオン濃度にオゾンによる有意な影響が認められ、オゾンによって全グルタチオン濃度は両品種とも有意に増加した。なお、酸化型グルタチオン濃度、還元型グルタチオン濃度および還元率にオゾンによる有意な影響は認められなかった。4月29～30日に測定した止葉の全グルタチオン濃度にオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。農林61号の全グルタチオン濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギの全グルタチオン濃度はオゾンによって有意に低下した。なお、酸化型グルタチオン濃度、還元型グルタチオン濃度および還元率にオゾンによる有意な影響は認められなかった。5月13～14日に測定した止葉のグルタチオン濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

表4に、2008年4月15日～16日、4月29日～30日および5月13日～14日におけるコムギの止葉の活性酸素消去系酵素の活性に対するオゾンの影響を示した。4月15～16日および4月29～30日に測定した両品種の止葉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性にオゾンによる有意な影響が認められ、オゾンによって有意に増加した。5月13日～14日に測定した止葉のAPX活性にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

4月15～16日および5月13～14日に測定した止葉のカタラーゼ(CAT)活性においてオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。農林61号のCAT活性にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギのCAT活性は、オゾンによって有意に低下した。4月29～30日に測定した両品種の止葉のCAT活性にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

表2 コムギの止葉のルビスコ活性・濃度、クロロフィル濃度およびマロンジアルデヒド(MDA)濃度に対するオゾンの影響.

Date	Cultivar	Treatment	Activity of Rubisco			Chlorophyll			Malondialdehyde		Rubisco
			Initial (nkat g <sup>-1</sup> FW)	Total (nkat g <sup>-1</sup> FW)	Activation State (%)	a (μg g <sup>-1</sup> FW)	b (μg g <sup>-1</sup> FW)	a+b (μg g <sup>-1</sup> FW)	(μmol g <sup>-1</sup> FW)	(mg g <sup>-1</sup> FW)	
15 April	Norin 61	CF	466.3 (53.5)	553.0 (45.1)	83.7 (1.6)	456.5 (6.3)	307.9 (4.7)	764.4 (7.2)	26.4 (1.7)	17.6 (0.3)	
		60 ppb O <sub>3</sub>	344.7 (15.0)	427.2 (10.5)	84.1 (9.2)	438.2 (5.6)	249.1 (2.2)	687.3 (4.9)	29.5 (4.0)	14.9 (0.2)	
		100 ppb O <sub>3</sub>	371.5 (32.0)	428.5 (31.6)	85.3 (3.7)	434.1 (6.0)	268.1 (3.9)	702.2 (9.7)	30.6 (2.3)	15.1 (0.6)	
		Shiroganekomugi	521.6 (17.7)	572.2 (5.9)	89.5 (6.9)	729.0 (8.6)	339.3 (6.6)	1068.3 (8.0)	33.1 (0.9)	17.0 (0.7)	
		60 ppb O <sub>3</sub>	458.3 (22.1)	522.6 (25.6)	87.6 (0.9)	713.1 (4.9)	334.5 (18.2)	1047.6 (18.3)	32.9 (1.5)	15.0 (0.0)	
		100 ppb O <sub>3</sub>	448.0 (21.0)	482.9 (17.4)	77.9 (8.0)	716.4 (9.5)	352.5 (5.4)	1068.9 (7.6)	43.0 (1.5)	15.0 (0.3)	
ANOVA	O <sub>3</sub>	**	***	n.s.	*	**	**	*	**		
	Cultivar	**	**	n.s.	***	***	***	***	n.s.		
	O <sub>3</sub> ×Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	*	n.s.		
29 April	Norin 61	CF	400.8 (18.4)	513.3 (13.9)	80.1 (9.1)	459.1 (12.6)	288.8 (0.9)	747.9 (13.5)	36.0 (2.7)	13.3 (0.4)	
		60 ppb O <sub>3</sub>	395.2 (51.4)	456.9 (58.4)	86.6 (1.6)	443.6 (0.8)	270.1 (16.4)	713.7 (17.1)	34.1 (1.8)	13.4 (0.9)	
		100 ppb O <sub>3</sub>	319.6 (43.2)	368.2 (56.0)	90.4 (12.0)	436.6 (11.6)	263.5 (35.7)	700.1 (47.2)	33.9 (3.2)	11.1 (1.5)	
		Shiroganekomugi	372.6 (24.8)	430.7 (26.9)	84.3 (4.5)	731.1 (5.8)	375.1 (11.6)	1106.2 (16.2)	51.1 (3.0)	11.1 (1.0)	
		60 ppb O <sub>3</sub>	244.5 (19.4)	287.5 (38.2)	85.1 (8.2)	677.1 (17.1)	287.5 (29.2)	964.6 (44.6)	59.4 (1.4)	8.5 (0.8)	
		100 ppb O <sub>3</sub>	257.6 (7.5)	300.9 (16.3)	85.8 (4.6)	678.3 (31.5)	317.0 (26.5)	995.2 (35.9)	67.3 (3.7)	7.5 (1.7)	
ANOVA	O <sub>3</sub>	**	**	n.s.	*	*	**	**	**		
	Cultivar	***	***	n.s.	***	**	***	***	**		
	O <sub>3</sub> ×Cultivar	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.		
13 May	Norin 61	CF	148.3 (39.0)	204.4 (70.4)	73.1 (8.4)	378.8 (4.9)	162.1 (17.8)	541.0 (22.5)	58.1 (3.0)	6.1 (1.0)	
		60 ppb O <sub>3</sub>	189.4 (41.5)	248.6 (74.5)	73.3 (9.1)	408.6 (14.5)	201.6 (13.8)	610.2 (26.3)	57.3 (10.2)	7.3 (1.8)	
		100 ppb O <sub>3</sub>	173.1 (69.5)	201.8 (79.6)	82.4 (3.9)	384.9 (46.3)	184.8 (47.9)	569.6 (93.5)	70.1 (6.7)	5.7 (1.7)	
		Shiroganekomugi	107.5 (25.7)	161.2 (42.0)	71.5 (21.1)	666.5 (64.5)	282.4 (65.5)	948.9 (127.4)	50.8 (2.9)	10.5 (1.2)	
		60 ppb O <sub>3</sub>	86.0 (2.2)	120.6 (6.0)	71.5 (4.1)	543.6 (18.5)	186.3 (9.4)	729.9 (14.3)	60.6 (13.3)	7.6 (0.4)	
		100 ppb O <sub>3</sub>	67.6 (6.2)	85.4 (7.0)	77.8 (5.9)	495.4 (19.6)	162.9 (10.2)	658.3 (29.8)	79.1 (9.4)	5.2 (1.2)	
ANOVA	O <sub>3</sub>	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	**		
	Cultivar	**	**	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	n.s.		
	O <sub>3</sub> ×Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.		

The plants were daily exposed to charcoal-filtered air (CF) or O<sub>3</sub> at 60 ppb or 100 ppb (10:00-17:00) from 13 March to 4 June 2008. Each value is the mean of 3 chamber replicates, and the standard deviation is shown in parentheses.

Two-way ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s.=not significant

When significant interaction between O<sub>3</sub> and cultivar was detected, Tukey's HSD test was performed to identify significant differences among the 6 treatments. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

表3 コムギの止葉のアスコルビン酸濃度およびグルタチオン濃度に対するオゾンの影響.

Date	Cultivar	Treatment	Ascorbate			Glutathione				
			AA ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )	DHA ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )	Total ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )	Redox state (%)	Total ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )	GSSG ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )	GSH ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )	Redox state (%)
15 April	Norin 61	CF	5.20 (0.07) c	0.44 (0.04)	5.68 (0.14)	92.3 (0.8)	0.339 (0.021)	0.031 (0.001)	0.308 (0.021)	90.9 (0.8)
		60 ppb O <sub>3</sub>	5.44 (0.15) c	0.38 (0.01)	5.82 (0.14)	93.4 (0.4)	0.314 (0.022)	0.034 (0.004)	0.291 (0.041)	92.5 (6.6)
		100 ppb O <sub>3</sub>	5.95 (0.21) c	0.39 (0.00)	6.34 (0.21)	93.8 (0.1)	0.477 (0.021)	0.039 (0.015)	0.438 (0.007)	92.0 (2.6)
Shiroganekomugi	CF	6.82 (0.44) a	0.39 (0.06)	7.21 (0.43)	94.6 (0.8)	0.525 (0.007)	0.065 (0.008)	0.460 (0.012)	87.6 (1.5)	
	60 ppb O <sub>3</sub>	6.78 (0.46) ab	0.43 (0.06)	7.21 (0.42)	94.0 (1.0)	0.534 (0.013)	0.081 (0.005)	0.453 (0.017)	84.8 (1.3)	
	100 ppb O <sub>3</sub>	6.00 (0.23) bc	0.40 (0.01)	6.60 (0.33)	94.0 (0.4)	0.666 (0.018)	0.093 (0.008)	0.574 (0.024)	86.1 (1.5)	
ANOVA	O <sub>3</sub>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	
	Cultivar	***	n.s.	**	n.s.	***	***	**	***	
	O <sub>3</sub> × Cultivar	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
29 April	Norin 61	CF	4.96 (0.06)	0.39 (0.02)	5.35 (0.05)	92.7 (0.4)	0.461 (0.010) ab	0.031 (0.001)	0.430 (0.010)	93.3 (0.2)
		60 ppb O <sub>3</sub>	4.77 (0.35)	0.35 (0.01)	5.12 (0.35)	93.2 (0.4)	0.426 (0.012) bc	0.034 (0.004)	0.403 (0.020)	94.7 (4.6)
		100 ppb O <sub>3</sub>	4.83 (0.41)	0.36 (0.01)	5.18 (0.41)	93.1 (0.6)	0.474 (0.024) ab	0.038 (0.014)	0.435 (0.033)	91.8 (3.2)
Shiroganekomugi	CF	5.64 (0.16)	0.37 (0.03)	6.01 (0.18)	93.8 (0.3)	0.538 (0.026) a	0.065 (0.008)	0.473 (0.019)	87.9 (1.0)	
	60 ppb O <sub>3</sub>	5.89 (0.24)	0.37 (0.01)	6.26 (0.24)	94.1 (0.3)	0.383 (0.029) c	0.081 (0.005)	0.301 (0.034)	78.6 (3.0)	
	100 ppb O <sub>3</sub>	5.76 (0.05)	0.37 (0.01)	6.12 (0.05)	94.0 (0.1)	0.429 (0.055) bc	0.093 (0.008)	0.337 (0.050)	78.3 (1.8)	
ANOVA	O <sub>3</sub>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	
	Cultivar	***	n.s.	*	**	n.s.	***	n.s.	**	
	O <sub>3</sub> × Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	
13 May	Norin 61	CF	3.61 (0.46)	0.26 (0.00)	3.87 (0.46)	93.1 (0.9)	0.306 (0.015)	0.021 (0.007)	0.285 (0.021)	93.1 (2.8)
		60 ppb O <sub>3</sub>	4.26 (0.17)	0.24 (0.00)	4.50 (0.17)	94.7 (0.1)	0.354 (0.050)	0.038 (0.023)	0.316 (0.060)	88.9 (6.5)
		100 ppb O <sub>3</sub>	3.87 (0.51)	0.20 (0.01)	4.06 (0.51)	95.0 (0.7)	0.414 (0.007)	0.056 (0.001)	0.358 (0.008)	86.4 (0.5)
Shiroganekomugi	CF	4.32 (0.16)	0.44 (0.03)	4.76 (0.14)	90.8 (0.8)	0.426 (0.086)	0.060 (0.004)	0.366 (0.081)	85.6 (2.1)	
	60 ppb O <sub>3</sub>	4.62 (0.02)	0.35 (0.06)	4.98 (0.06)	92.9 (1.1)	0.434 (0.059)	0.056 (0.004)	0.378 (0.055)	87.0 (0.8)	
	100 ppb O <sub>3</sub>	4.75 (0.22)	0.32 (0.02)	5.06 (0.24)	93.8 (0.2)	0.444 (0.005)	0.062 (0.001)	0.382 (0.004)	86.0 (0.1)	
ANOVA	O <sub>3</sub>	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	Cultivar	*	***	**	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	
	O <sub>3</sub> × Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

The plants were daily exposed to charcoal-filtered air (CF) or O<sub>3</sub> at 60 ppb or 100 ppb (10:00-17:00) from 13 March to 4 June 2008.

Each value is the mean of 3 chamber replicates, and the standard deviation is shown in parentheses.

Two-way ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . n.s. = not significant

When significant interaction between O<sub>3</sub> and cultivar was detected, Tukey's HSD test was performed to identify significant differences among the 6 treatments. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

表4 コムギの止葉における活性酸素消去系酵素の活性に対するオゾンの影響.

Date	Cultivar	Treatment	APX (nkat g <sup>-1</sup> FW)	SOD (mkat g <sup>-1</sup> FW)	CAT (nkat g <sup>-1</sup> FW)	GR (nkat g <sup>-1</sup> FW)	MDAR (nkat g <sup>-1</sup> FW)	DHAR (nkat g <sup>-1</sup> FW)
15 April	Norin 61	CF	79.2 (1.3)	4.20 (0.30)	882.5 (32.2) a	32.2 (0.3)	10.30 (0.29) b	79.3 (7.2)
		60 ppb O <sub>3</sub>	80.1 (2.2)	4.72 (0.48)	800.2 (3.7) b	34.1 (1.1)	10.21 (0.18) b	73.0 (0.6)
		100 ppb O <sub>3</sub>	110.0 (5.4)	4.83 (0.18)	825.5 (15.4) ab	34.5 (1.4)	11.00 (0.19) a	64.9 (2.8)
Shiroganekomugi		CF	79.5 (3.1)	5.18 (0.03)	785.3 (10.8) b	29.5 (3.5)	9.05 (0.15) c	64.7 (3.5)
		60 ppb O <sub>3</sub>	77.2 (2.1)	5.48 (0.13)	786.9 (22.1) b	29.5 (0.7)	9.79 (0.32) b	66.5 (3.8)
		100 ppb O <sub>3</sub>	102.8 (6.5)	4.87 (0.14)	696.4 (40.0) c	29.7 (1.4)	7.83 (0.32) d	50.1 (11.9)
ANOVA		O <sub>3</sub>	***	n.s.	**	n.s.	**	*
		Cultivar	n.s.	**	**	**	***	**
		O <sub>3</sub> × Cultivar	n.s.	n.s.	*	n.s.	**	n.s.
29 April	Norin 61	CF	100.6 (5.6)	2.87 (0.06)	811.3 (20.5)	25.5 (0.6)	7.65 (0.25)	56.4 (12.7)
		60 ppb O <sub>3</sub>	100.0 (1.7)	3.04 (0.17)	772.5 (73.0)	24.1 (0.8)	6.96 (0.15)	62.0 (1.8)
		100 ppb O <sub>3</sub>	111.5 (5.8)	3.34 (0.19)	751.9 (15.4)	24.3 (1.1)	7.57 (0.02)	51.4 (1.2)
Shiroganekomugi		CF	105.4 (3.7)	5.76 (0.22)	912.0 (20.3)	24.1 (1.5)	6.94 (0.18)	63.3 (2.0)
		60 ppb O <sub>3</sub>	99.1 (1.5)	5.87 (0.11)	789.9 (19.9)	22.3 (0.8)	5.92 (0.12)	68.4 (9.8)
		100 ppb O <sub>3</sub>	106.2 (2.3)	6.37 (0.36)	707.0 (91.4)	22.8 (0.8)	6.51 (0.21)	55.2 (8.4)
ANOVA		O <sub>3</sub>	*	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.
		Cultivar	n.s.	***	n.s.	***	***	n.s.
		O <sub>3</sub> × Cultivar	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
13 May	Norin 61	CF	81.9 (13.0)	4.04 (0.08)	599.6 (6.8) b	17.4 (1.0) c	4.04 (0.29)	45.5 (1.1)
		60 ppb O <sub>3</sub>	87.7 (2.0)	3.81 (0.59)	653.4 (23.4) b	21.3 (0.3) a	4.75 (0.42)	61.4 (0.9)
		100 ppb O <sub>3</sub>	93.8 (1.3)	4.72 (0.29)	661.5 (66.6) b	21.7 (0.7) a	4.75 (0.85)	48.8 (7.4)
Shiroganekomugi		CF	78.5 (7.9)	3.60 (0.27)	869.2 (81.3) a	21.7 (0.8) a	4.80 (0.01)	71.9 (0.01)
		60 ppb O <sub>3</sub>	71.6 (1.0)	4.76 (0.32)	592.8 (27.9) b	20.5 (1.3) ab	3.49 (0.92)	48.9 (15.6)
		100 ppb O <sub>3</sub>	86.3 (2.0)	5.77 (1.44)	585.3 (70.3) b	18.5 (0.6) bc	3.91 (0.45)	38.5 (16.2)
ANOVA		O <sub>3</sub>	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
		Cultivar	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		O <sub>3</sub> × Cultivar	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	n.s.

The plants were daily exposed to charcoal-filtered air (CF) or O<sub>3</sub> at 60 ppb or 100 ppb (10:00-17:00) from 13 March to 4 June 2008.

Each value is the mean of 3 chamber replicates, and the standard deviation is shown in parentheses.

Two-way ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s.=not significant

When significant interaction between O<sub>3</sub> and cultivar was detected, Tukey's HSD test was performed to identify significant differences among the 6 treatments. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

いずれの測定日においても、2品種のコムギの葉のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性に、オゾンによる有意な影響は認められなかった。

5月13～14日に測定した止葉のグルタチオンレダクターゼ(GR)活性において、オゾンと品種の有意な交互作用が認められた。シロガネコムギのGR活性はオゾンによって有意に低下したが、農林61号のGR活性はオゾンによって有意に増加した。4月15日～16日および4月29日～30日に測定した両品種の止葉のGR活性にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

4月15～16日に測定した止葉のモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)活性にオゾンによる有意な単独影響およびオゾンと品種の有意な交互作用が認められた。シロガネコムギのMDAR活性はオゾンによって有意に低下したが、農林61号のMDAR活性はオゾンによって有意に増加した。また、4月29～30日に測定した両品種の止葉のMDAR活性にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって60 ppb 区のMDAR活性が有意に低下した。5月13～14日に測定した両品種の止葉のモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)活性にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

4月14～15日に測定した両品種の止葉のデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)活性にオゾンによる有意な単独影響が認められ、オゾンによって有意に低下した。4月29日～30日および5月13日～14日に測定した両品種の止葉のDHAR活性にオゾンによる有意な影響は認められなかった。

本研究においては、オゾン暴露5週間後の止葉のAPX活性は、両品種ともオゾンによって有意に増加した(表4)。一方、DHAR活性は両品種ともオゾンによって有意に低下した(表4)。シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の研究において、APX活性が増加するとDHAR活性が低下するという報告がなされており(Kubo et al., 1999)、本研究のコムギにおいても同様の結果が得られた。また、本研究においては、コムギのCAT活性、還元型アスコルビン酸濃度およびMDAR活性に対するオゾンの影響に有意な品種間差異が認められた(表3, 表4)。農林61号のCAT活性と還元型アスコルビン酸濃度にオゾンによる有意な影響は認められなかったが、シロガネコムギのそれらはオゾンによって有意に低下した。また、農林61号のMDAR活性はオゾンによって有意に増加したが、シロガネコムギのMDAR活性はオゾンによって有意に低下した(表4)。オゾン暴露によって過酸化水素が葉内に蓄積すると、CATが不活性化することが報告されている(Chen et al., 1993)。したがって、シロガネコムギでは葉内において過酸化水素の蓄積が起こったため、CAT活性が低下したと考えられる。MDARはモノデヒドロアスコルビン酸の還元を行い、還元型アスコルビン酸を生成する。そのため、MDAR活性がオゾンによって増加した農林61号では、モノデヒドロアスコルビン酸の還元が効率的に行われたため、還元型アスコルビン酸濃度の低下は認められなかったと考えられる。一方、シロガネコムギでは、オゾンによってモノデヒドロアスコルビン酸の還元能力が低下したため、還元型アスコルビン酸濃度が低下したと考えられる。MDARによってモノデヒドロアスコルビン酸の還元が効率的に行われれば、デヒドロアスコルビン酸は生成されないと考えられている(Kubo et al., 1999)。また、オゾンに暴露された葉では、DHAR活性が低下し、MDAR活性が増加することが報告されている(Kubo et al., 1995; Kubo et al., 1999)。そのため、オゾン暴露条件下において、活性酸素種を効率よく除去するためには、過酸化水素を還元するCATおよびモノデヒドロアスコルビン酸を還元するMDARの役割が重要であると考えられる。近年の研究においても、酸化ストレスに対するMDARの重要性が報告されている(Amin et al., 2007)。また、過去の研究において、葉内のアスコルビン酸は活性酸素種の消去に重要であり、アスコルビン酸が欠乏すると酸化ストレス

が増加することが報告されている (Cheng et al., 2007; Munne & Alegre, 2002)。本研究で用いた2品種のコムギの還元型アスコルビン酸濃度に品種間差異が認められた(表4)。シロガネコムギの還元型アスコルビン酸濃度は、農林61号の還元型アスコルビン酸濃度よりも有意に高かった。しかしながら、酸化傷害の指標となるMDA濃度のオゾンによる増加が、シロガネコムギにおいて認められた(表2)。そのため、活性酸素種を消去するためには、活性酸素種を直接的に消去するアスコルビン酸よりも、酸化されたアスコルビン酸を還元し、間接的に活性酸素種を消去するMDARの方が重要であると考えられる。以上のことから、活性酸素種を消去する能力には品種間差異があり、シロガネコムギの活性酸素消去系におけるオゾン感受性は農林61号のそれよりも高いことが明らかになった。この原因として、シロガネコムギのCAT活性とMDAR活性がオゾンによって低下し、活性酸素消去能力が低下したことが考えられる。したがって、光合成活性のオゾン感受性の品種間差異は、CAT活性とMDAR活性が関係していると考えられる。一方、オゾン暴露7週間後および9週間後の個体では、活性酸素消去能力に対するオゾンの影響に品種間差異は認められなかった(表4)。そのため、完全展開6週間後の止葉や完全展開8週間後の止葉では、完全展開4週間後の止葉で見られたようなオゾンによる抗酸化物質濃度や酵素活性への影響は認められず(表3, 表4)、葉齢の増加に伴って活性酸素消去系の能力は衰えていくことが明らかとなった。しかしながら、オゾン暴露7週間後の個体のMDA濃度とルビスコ活性に対するオゾンの影響に品種間差異が認められた(表2)。農林61号のMDA濃度とルビスコ活性にオゾンによる影響は認められなかったのに対し、シロガネコムギのMDA濃度にオゾンによる増加が、ルビスコ活性にオゾンによる低下が認められ、純光合成速度が低下した(表1)。以上のことから、オゾンによる害作用の程度を緩和するためには、止葉の成長初期における活性酸素消去能力の程度が重要であることが明らかとなった。

#### 4) まとめ(コムギ)

現在、東アジアにおいて頻繁に観測されている比較的高濃度のオゾン条件下では、今回用いた2品種(農林61号・シロガネコムギ)のコムギの葉における活性酸素消去能力は、純光合成速度、ルビスコ活性・濃度およびクロロフィル濃度の低下を回避するには不十分であることが明らかになった。また、光合成におけるシロガネコムギのオゾン感受性は農林61号のそれよりも高く、その品種間差異には活性酸素消去能力が関係していることが明らかになった。農林61号とシロガネコムギの結果から、活性酸素消去系におけるカタラーゼ活性およびモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ活性の役割が重要であることが明らかになった。

### 5. 本研究により得られた成果

#### (1) 科学的意義

農作物の収量に対するオゾンの影響を正確に評価するためには、葉におけるオゾン吸収量のみならず、葉内へのオゾン吸収から減収に至る様々な生理生化学的プロセスに対するオゾンの影響を明らかにする必要がある。しかしながら、これまでの欧米における農作物の収量に対するオゾンの影響に関する評価では主に葉におけるオゾン吸収量を考慮しているだけであり、その評価結果は正確さに欠ける。本研究においては、葉の純光合成速度はオゾンによって低下するが、葉の積算オゾン吸収量が同じでも暴露されたオゾンの濃度が高いと純光合成速度の低下程度が大きくなることが明らかになった。また、イネとコムギの葉の活性酸素消去系に対するオゾンの影響を

調べた結果、APX、MDARおよびGRのような活性酸素消去系酵素の活性はオゾンによって増加することが明らかになった。このように、東アジアの植生に対するオゾン濃度上昇のリスク評価や農作物への影響予測を行なう際には、葉におけるオゾン吸収量のみならず、オゾン濃度や葉内におけるオゾンの解毒能力も考慮に入れる必要があることが本研究によって初めて示されたことは、極めて科学的意義が大きい。

## (2) 地球環境政策への貢献

2007年5月28日にタイ国で開催されたCapacity Building Course for Officials and Experts in the Participating Countries of Acid Deposition Monitoring Network in East Asia (EANET) on Future Development of EANETにおける招待講演で、本研究の成果を紹介した。その結果、アジア各国から参加した環境政策決定者や環境科学者からオゾンの植物影響に関してかなりの反響があり、東アジアにおける大気環境保全に貢献できた。また、2008年2月29日に開催された環境省の酸性雨対策検討会(生態影響分科会)において、本研究成果である東アジアのオゾン濃度上昇の植物影響に関する結果に基づいて東アジア酸性雨モニタリングネットワーク(EANET)の観測地点等でオゾン濃度のモニタリングとその植物影響調査の必要性を提案した。その結果、今後、オゾン濃度のモニタリングや植物影響調査などを推進する方向で準備を開始することとなった。本研究の成果を学会や講演会で発表し、論文発表を通じて広報・普及に努めた。

## 6. 引用文献

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Amin E.E., Naoyoshi K., Ghazi H.B., Hironori K., Takeshi S., Toshiyuki S., Shinobu I., Kiyoshi T. (2007). Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225, 1255-1264.
- Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-396.
- Ashmore M.R., Toet S., Emberson L. (2006). Ozone – a significant threat to future world food production? *New Phytologist* 170, 201-204.
- Barnes J.D., Balaguer L., Manrique E., Elvira S., Davison A.W. (1992). A reappraisal of the use of DEMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32, 85-100.
- Burkey K.O., Eason G., Fiscus E. L. (2003). Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status. *Physiologia Plantarum* 117, 51-57.
- Chen Z., Silva H., Klessig D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883-1886.
- Cheng F.Y., Burkey K.O., Robinson J.M., Booker, F. L. (2007). Leaf extracellular ascorbate in relation to O<sub>3</sub> tolerance of two soybean cultivars. *Environmental Pollution* 150, 355-362.
- Danielsson H., Karlsson G.P., Karlsson P.E., Pleijel H. (2003). Ozone uptake modeling and flux-response relationships – an assessment of ozone-induced yield loss in spring wheat. *Atmospheric Environment* 37, 475-485.

- Dann M.S., Pell E.J. (1989). Decline of Activity and Quantity of Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Net Photosynthesis in Ozone-Treated Potato Foliage. *Plant Physiology* 91, 427-432.
- Egerd M., Tevini M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany* 48, 43-49.
- Emberson L.D., Ashmore M.R., Cambridge H.M., Simpson D., Tuovinen J.P. (2000). Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution* 109, 403-413.
- Foyer C.H., Halliwell B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Griffith O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106, 207-212.
- Hossain M.A., Asada K. (1984). Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology* 25, 85-92.
- Hossain M.A., Nakano Y., Asada K. (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* 25, 385-395.
- Kubo A., Aono M., Nakajima N., Saji H., Tanaka K., Kondo N. (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 112, 279-290.
- Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N. (1995). Expression of *arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology* 29, 479-489.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Luwe M., Heber U. (1995). Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197, 448-455.
- Luwe M., Takahama U., Heber U. (1993). Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* 101, 969-976.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein(hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- Munne B.S., Alegre L. (2002). Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters* 524, 145-148.
- Musselman R.C., Lefohn A.S., Massman W.J., Heath R.L. (2006). A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* 40, 1869-1888.
- Nakano Y., Asada K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880.
- Smirnoff N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 229-235.

Tissue D.T., Thomas R.B., Strain, B.R. (1993). Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrients on photosynthesis and rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant, Cell and Environment* 16, 859-865.

## 7. 国際共同研究等の状況

2008年3月21～22日に、山口県下関市において、中国側のカウンターパートである朱 建国博士（中国科学院南京土壤科学研究所）やアドバイザーであるProf. Steve Long（イリノイ大学，アメリカ合衆国）と2007年度の研究成果（イネに対するオゾンの影響）や今後の研究計画などを詳細に検討した。2009年3月21～22日に、中国科学院南京土壤科学研究所において、朱 建国博士や Dr. Donald Ort（イリノイ大学，アメリカ合衆国）と2008年度の研究成果を詳細に検討した。さらに、2009年3月24日に、東京大学において、Dr. Lisa Emberson（ヨーク大学，イギリス）と2008年度の研究成果を詳細に検討した。

## 8. 研究成果の発表状況

### （1）誌上発表<論文（査読あり）

Yamaguchi M., Inada H., Satoh R., Hoshino D., Nagasawa A., Negishi Y., Sasaki H., Nouchi I., Kobayashi K., Izuta T.(2008). Effects of ozone on growth, yield and leaf gas exchange rates of two Japanese cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural Meteorology*, 64, 131-141.

Inada H., Yamaguchi M., Satoh R., Hoshino D., Nagasawa A., Negishi Y., Nouchi I., Kobayashi K., Izuta T. (2008). Effects of ozone on photosynthetic components and radical scavenging system in leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural Meteorology*, 64, 243-255.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 伊豆田 猛：公害防止の技術と法規 編集委員会編、新・公害防止の技術と法規 2008 大気編I、（社）産業環境管理協会、158-168（2008）「植物に対する大気汚染物質の影響（執筆担当：伊豆田 猛）」

### （2）口頭発表（学会）

- 1) Izuta T. (2007). Effects of acid deposition and ozone on plants. *Capacity building course for officials and experts in the participating countries of Acid Deposition Monitoring Network in East Asia (EANET) on future development of EANET 2007*. United Nations Environment Programme, Pathumthani, Thailand.
- 2) Yamaguchi M., Inada H., Sato T., Hoshino D., Nagasawa A., Negishi Y., Sasaki H., Nouchi I., Kobayashi K., Izuta T. (2008). Effects of ozone on growth, yield and leaf gas exchange rates of two cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *International Symposium on Agricultural Meteorology 2008*. Shimonoseki, Japan.
- 3) Inada H., Yamaguchi M., R. Sato T., Hoshino D., Nagasawa A., Negishi Y., Sasaki H., Nouchi I., Kobayashi K., Izuta T. (2008). Effects of ozone on activity and concentration of rubisco and radical scavenging system in leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *International Symposium on Agricultural Meteorology 2008*. Shimonoseki, Japan.
- 4) 星野大起，佐藤亮平，山口真弘，稲田秀俊，長澤亜季，根岸 蓉，佐々木治人，野内 勇，小林和彦，伊豆田 猛（2008）．イネに対するオゾンの影響：I. 成長および収量．第49回大気

環境学会年会，金沢。

- 5) 佐藤亮平，星野大起，山口真弘，稲田秀俊，長澤亜季，根岸 蓉，佐々木治人，野内 勇，小林和彦，伊豆田 猛 (2008)．イネに対するオゾンの影響：II. 光合成および活性酸素消去系．第49回大気環境学会年会，金沢．

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞 「茶色い雲、越境」（2008年3月27日，全国版）
- 2) RKB毎日放送，今日感616，越境汚染 樹氷に潜む危機の予兆（2008年4月25日）
- 3) RKB毎日放送，JNN九州沖縄ドキュメント ムーブ「黒い樹氷，自然からの警告」（2008年4月28日，イネに対するオゾンの影響に関する実験風景や成果などを紹介）  
番組ホームページ([http://www.e-jnn.com/move/index\\_f.html](http://www.e-jnn.com/move/index_f.html))に、「東京農工大学の伊豆田 猛教授は、オゾンの影響で米や小麦などの収穫量はすでに数パーセント減少していて、今後さらに影響が大きくなると警告する。」と掲載された。
- 4) RKB毎日放送 JNN九州沖縄ドキュメント ムーブ「黒い樹氷，自然からの警告」（2008年12月30日，イネに対するオゾンの影響に関する実験風景や成果などを紹介）  
この番組は、第50回(平成21年度)科学技術映像祭で最高賞である内閣総理大臣賞を受賞した。番組では、環境省地球環境研究総合推進費で行なったイネとコムギに対するオゾンの影響に関する研究などが紹介され、オゾンなどの越境大気汚染物質が日本の植生に及ぼす影響が極めて深刻な環境問題であることなどを伊豆田がコメントした。
- 5) NHK教育「黒い樹氷，自然からの警告」（2009年5月23日，イネに対するオゾンの影響に関する実験風景や成果などを紹介）  
第50回(平成21年度)科学技術映像祭の内閣総理大臣賞の受賞作品として全国放送された。

(6) その他

- 1) 伊豆田 猛，酸性雨と大気汚染，府中市エコサマースクール(2007年7月24日，東京都府中市)
- 2) 伊豆田 猛，府中市の緑は元気か？ 府中市エコサマースクール(2007年8月20日，東京都府中市)
- 3) 伊豆田 猛，植物に対するオゾンの影響，埼玉県植物は元気か？ 開智高校(2007年10月13日)
- 4) 伊豆田 猛，府中市の緑は元気か？ 府中市エコサマースクール(2008年8月5日，東京都府中市)
- 5) 伊豆田 猛，植物に対するオゾンの影響，埼玉県植物は元気か？ 開智高校(2008年10月18日)