

A-0806 気温とオゾン濃度上昇が水稻の生産性におよぼす複合影響評価と適応方策に関する研究

(3) 高温・オゾン適応のための分子マーカーの探索とオゾンストレス診断アレイの開発

1) 高温・オゾン適応のための分子マーカーの探索とオゾンストレス診断アレイの開発

独立行政法人 国立環境研究所

生物圏環境研究領域	生理生態研究室	久保明弘
	生態遺伝研究室	玉置雅紀

<研究協力者>

独立行政法人 国立環境研究所	生物圏環境研究領域	Kyoungwon Cho
独立行政法人 農業生物資源研究所	基盤研究領域	菊池尚志・佐藤浩二
秋田県立大学	生物資源科学部	田母神 繁
昭和大学	医学部	Randeep Rakwal
財団法人 電力中央研究所	環境科学研究所 生物環境領域	河野吉久・松村英幸

平成20～22年度累計予算額：31,159千円（うち、平成22年度予算額：8,654千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 地球温暖化の進行に伴い、温度上昇とともに地表オゾン濃度の上昇が指摘されているが、これらの植物への複合影響について、分子レベルではほとんど調べられていない。本サブテーマでは、高温・オゾンに対する植物生体内物質（分子マーカー）の変化を検出することにより、分子マーカーを利用した新しい影響評価手法と、オゾンストレス診断のためのDNAアレイを開発した。様々なイネ品種の幼苗に高温とオゾンの単独及び複合処理を行い、葉の分子マーカーを探索した。その結果、画像解析で数値化したオゾンによる可視障害と関連する147個の遺伝子発現マーカーが明らかになり、その機能分類から可視障害の進行に伴う細胞機能が示唆された。また、様々な代謝産物を分析した結果、オゾンによる収量影響を受けにくい品種では、マロンジアルデヒド（脂質分解物）とサクラネチン（ファイトアレキシンの一種）の含量がオゾン暴露により顕著に増加することが明らかになり、オゾン耐性を判定する指標として利用できると考えられた。また、マイクロアレイで網羅的に遺伝子発現を調べた結果、多数の遺伝子の発現誘導と発現抑制が検出され、これらとサブテーマ(1)の暴露試験の結果との関係を調べたところ、高温、オゾン、及びこれらの複合ストレスによる収量やバイオマス影響と発現誘導レベルが相関している遺伝子マーカーが多数明らかになり、この相関関係を利用して分子マーカーを調べることにより幼苗の段階で簡便にイネ品種の高温とオゾンに対する感受性を評価する方法を開発した。

シロイヌナズナとイネの高温・オゾンストレス診断用DNAアレイを開発し、その有用性を確認した。さらに、イネのオゾンによる収量低下に関与する遺伝子座を同定する目的でQTL（量的形質遺伝子座）解析を行った結果、オゾン感受性イネ品種“ハバタキ”におけるオゾンによる収量の減少は、*APO1*遺伝子の働きが抑制されることによる一次枝梗数の減少を介して総精粒数（総穎花数）が減少することにより生じていることが示唆された。

[キーワード] オゾン、高温、分子マーカー、DNAアレイ、ストレス診断

1. はじめに

一般に、大気汚染物質の植物影響を評価するためには対象とするガスの濃度制御や環境調節等の機能を備えた大型の暴露試験設備が必要であり、成長や収量などに対する影響を評価するため長期間にわたる暴露試験を行う必要があり、多額の経費と時間、空間スペースを用意する必要がある。このため、欧米に比較するとわが国においてはこの分野の研究を実施している研究機関は限定される。ましてや開発途上にあるアジア諸国では経済的にもこの種の研究は非常に少なく、成果も限定される。このため、大型の研究設備に依存しない実験室レベルで影響評価が可能な新しい評価手法の開発が必要である。近年、分子生物学領域の研究が急速に展開され、様々な環境ストレスに対する分子・遺伝子レベルでの応答が解明されるようになってきた。そこで、高温やオゾンにさらされた植物体内の生体内物質（RNA、タンパク質、代謝産物など）の変化を分子マーカーとして利用した新しい影響評価手法が開発できれば、簡便・迅速な評価手法として有用だけでなく、高温・オゾンの複合影響メカニズムの解明や適応策のための栽培品種の選択・育種にも活用できる知見が得られると考えられる。しかし、塩類や重金属、水ストレスなどに係る分野と比較するとガス暴露試験設備を必要とする大気汚染物質の影響に係る分野の研究はまだ少ない。特に、温暖化条件下でのオゾンの複合影響について、分子レベルではほとんど調べられていない。

分子マーカーを利用して、以下の3つの展開が考えられる。すなわち、(1)分子マーカーを利用したイネの品種ごとの高温・オゾン感受性の簡便・迅速な評価手法の開発、(2)イネ品種間のオゾン感受性の差の原因遺伝子の量的形質遺伝子座（QTL）解析による解明、及び(3)分子マーカーを利用した野外の植物が受けている高温・オゾン影響の診断手法の開発である。本サブサブテーマでは、(1)においては、マイクロアレイで網羅的に調べることができ、かつ高温・オゾンで発現レベルが変化する遺伝子転写産物（RNA）を中心に様々な分子マーカーを分析し、各品種の収量やバイオマスに対する高温・オゾン影響と相関関係を示す分子マーカーを同定し、イネ品種の高温・オゾン感受性を分子マーカーで評価する手法を開発する。既に、イネのモデル品種である“日本晴”を用いた研究¹⁻³⁾により、オゾンに応答する多数の分子マーカー候補を得ている。(2)においては、オゾンによる収量影響に関して“ササニシキ”と“ハバタキ”の染色体断片置換系統群（CSSL系統）を用いたQTL解析を行う。(3)においては、シロイヌナズナのストレス診断用DNAアレイ^{4, 5)}のオープントップチャンバー（OTC）を用いた試験を実施するとともに、これを踏まえて、イネの高温・オゾンストレス診断用DNAアレイを開発する。

2. 研究目的

高温やオゾンにさらされた植物体内で発現が誘導される物質や抑制される物質を分子マーカーとして検出することにより、分子マーカーを利用したイネ品種の高温・オゾン感受性評価手法と、高温下でオゾンストレスを特異的に検出できるシロイヌナズナ及びイネのオゾンストレス診断用DNAアレイを開発するとともに、高温・オゾンの影響メカニズムの解明や高温・オゾンに対する耐性品種の選択・育種に活用できる知見を得ることを目的とする。

3. 研究方法

(1) イネ葉における高温・オゾン影響評価のための分子マーカーの探索

1) イネ幼苗の栽培

4種類の日本型品種（日本晴、コシヒカリ、きらら397、にこまる）と2種類のインド型品種（タカナリ及びKasalath（カサラス））を用いた。種子を滅菌してから25℃で暗所に3日間置いて発芽させた。発芽した芽生えをポットに植え、25℃または30℃、相対湿度は70%に設定したグロースキャビネット（蛍光灯による12時間日長、光強度は約 $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）内で約2週間まで育成した。生育中の草丈、最長葉の長さとして2週間後の地上部乾重量を測定した。いずれの品種においても25℃で10日間育てた植物体と30℃で8日間育てた植物体の生育段階がほぼ同じ（第3葉が成熟し、第4葉が現れている）であったので、この時点の植物体を6品種の比較実験に用いた。可視障害測定用の“日本晴”においては、25℃で2週間育成した。

2) イネ幼苗への高温、オゾン及び複合処理

30℃で8日間育成したイネ幼苗をオゾン暴露が可能なグロースキャビネットに入れ、150ppbのオゾンに6時間さらすことにより、高温とオゾンの複合処理とした。その際、オゾンの代わりに清浄空気中に置いたものを高温単独処理とした。25℃で10日間育成した植物体を用いて同様にオゾン暴露したものをオゾン単独処理とし、オゾンの代わりに清浄空気を与えたものを対照とした。相対湿度は70%に制御し、約 $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光をメタルハライドランプで照射した。オゾン暴露後、栽培に用いたグロースキャビネットに植物体を戻し、清浄空気中に24時間置いたものも分析し、オゾンの代わりに清浄空気と同様に処理したものを対照とした。可視障害測定用の“日本晴”においては、25℃で200ppbのオゾンに72時間までさらし、オゾンの代わりに清浄空気を与えたものを対照とした。

3) 全RNAの抽出

イネ第3葉を、30個体まとめて、液体窒素で凍結しながら乳鉢と乳棒で粉末にし、QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit（米国、キアゲン社）を用いて全RNAを抽出した。全RNAの収量および純度は分光光度計（米国、ナノドロップ社）で測定すると同時に、ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動を用いて目視で確認した。

4) RT-PCR法による遺伝子発現解析

全RNAをDNase（米国、ストラタジーン社）で処理してから、StrataScript RT-PCR Kit（ストラタジーン社）で逆転写反応を行った。TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（宝酒造社）を用いて、TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice、Model TP600でポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行い、電気泳動後、DNAのバンドの濃さを数値化した。

5) DNAマイクロアレイ解析

全RNAをLow RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit（米国、アジレント・テクノロジーズ社）を用いてCy3またはCy5で蛍光標識した。可視障害測定用の“日本晴”ではアジレント・テクノロジーズ社のrice 22K custom oligo DNA microarray、それ以外はアジレント社のrice 44K custom oligo DNA microarray（特注品）にハイブリダイズさせ、Agilent Microarray Scanner G2565BAで蛍光画像を取得した。アジレント社のFeature抽出ソフトウェアを用いて、各遺伝子の発現レベルを調べた。このデータをGeneSpring GX 10ソフトウェア（アジレント・テクノロジーズ社）を用いて解析した。フリップ・ラベリング（Cy3及びCy5色素による色素交換または逆ラベリング）を実施し、2種類のCy色素が処理区（T）または対照区（C）のcRNAに不均等に入ることに伴う色素の偏りを無効にした。

マイクロアレイ分析での生データを解析するために、2つの異なる段階の標準化を行った。まず、

順方向実験での各スポットの T^{Cy5} シグナルと C^{Cy3} シグナルとの比率値と、逆方向実験での C^{Cy5} シグナルと T^{Cy3} シグナルとの比率値を、LOWESS (局所重み付き直線回帰) 補正を用いて標準化した。次に、各スポットについてのlog比の値を、 $\log_2 F_{1st} = \log_2 [T^{Cy5}/C^{Cy3}]$ 及び $\log_2 F_{2nd} = \log_2 [C^{Cy5}/T^{Cy3}]$ のように計算した。最後に、残った遺伝子特異的な色素の偏りを修正するために、サンプル1個あたり色素を交換して2個のアレイを用いて、各遺伝子の平均倍率値 (M) を $M = 1/2 [\log_2 F_{1st} - \log_2 F_{2nd}]$ のように計算した。

6) ファイトアレキシンの抽出と定量

イネのファイトアレキシンであるサクラネチンとモミラクトンAを、凍結した葉の粉末を80%メタノールに懸濁・煮沸後、酢酸エチルで抽出し、Sep-Pak Light Silica Cartridge (米国、ウォーターズ社) とHPLCにセットしたXbridge C18 column (ウォーターズ社) を通した後、PE Scix API-2000 (米国、パーキンエルマー社) を用いて液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS) で分析した。

7) 葉のRGB画像解析

“日本晴”の第3葉の画像について、デジタルカメラで撮影し、Photoshop Elements 7 (アドビ社) を用いて、赤 (R) ・緑 (G) ・青 (B) の各色の平均の濃さ及び輝度 (L) を計測した。これらの値に基づいて、パラメーターG/R、G/L、(R-G)/(R+G)、R/(R+G+B)、G/(R+G+B)の値を求めた。

8) マロンジアルデヒド含量の測定

LPO Assay Kit、BIOXYTECH LPO-586 (米国、オキシス・インターナショナル社) と島津分光光度計UV-2500PCを用いて、第3葉のマロンジアルデヒド (MDA) の含量を比色法で測定した。

9) 代謝物質変動解析

6品種の比較のためにイネ幼苗へ高温、オゾンまたは複合処理したサンプルの内、12時間処理した“日本晴”の第3葉からイオン性の低分子を抽出し、Agilent CE-TOFMSシステム (アジレント・テクノロジーズ社) を用いて、陽イオン性及び陰イオン性の代謝物質を検出した。

(2) シロイヌナズナ診断アレイの半野外実験下で栽培した植物への適用

1) オゾンストレス診断に最適な遺伝子の選択

プロトタイプのおゾンストレス診断アレイに含まれる4種類の遺伝子のうち、どの遺伝子がオゾン診断の指標として適切かを判断するために様々な環境ストレス (オゾン、酸性雨、 SO_2 、紫外線、乾燥、低温、塩ストレス) に植物を6時間暴露してサンプルを得た。これを用いてプロトタイプのおゾンストレス診断アレイにおけるハイブリダイゼーションパターンを解析し、オゾンストレス診断に最適な遺伝子の絞り込みを行った。

2) オープントップチャンバーにおけるシロイヌナズナの生育

本研究に用いたシロイヌナズナは遺伝学・分子生物学の分野でモデル植物として使用されており、その栽培は環境が安定した室内の条件において行われている。したがって、半野外環境に曝されるサブテーマ(1)で使用している電力中央研究所赤城試験センター (群馬県前橋市苗ヶ島町) のOTCにおいてこの植物が正常に生育し、且つストレス診断に耐えうる質のサンプリングができるかどうかは分からない。そこで赤城試験センターOTCにおける植物の栽培条件が適切であったかどうかを判定するために、OTCにおいてシロイヌナズナを2週間生育させ、この植物を用いて強光・低温などのストレスで蓄積されるアントシアニン類の含量測定を行った。またアントシアニン類

の合成に関与する遺伝子の発現量を定量的RT-PCRにより解析した。

3) オープントップチャンバーにおけるオゾンストレス診断

オゾンストレス診断の検証に必要なシロイヌナズナは、2)の検証により赤城試験センターのOTCにおいて正常に生育させることができた植物体を用いた。オゾンストレス診断解析用のサンプルは播種後2週間目のシロイヌナズナに対して、9時間（急性影響）と1週間（慢性影響）のオゾン暴露処理を行うことにより得た。オゾン処理はOTCをCF（オゾン濃度ほぼゼロ）、×1（最大オゾン濃度60 ppb）、×2（最大オゾン濃度120 ppb）に設定し行った。同濃度のオゾン処理を加温区（栽培期間中の平均として1.8℃を付加）においても行った。したがってサンプリングは、オゾン処理区3点×温度処理区2点、の6処理区で行った。赤城試験センターにおける植物の栽培は、2008年6月6日～23日、7月2日～15日、11月11日～25日の3回行い、サンプルを得た。得られた植物体から全RNAを単離し、シロイヌナズナのオゾンストレス診断アレイを用いてハイブリダイゼーションパターンを取得した。さらに得られたハイブリダイゼーションシグナルを画像解析により数値化し、定量的なデータを得た。

(3) イネの高温・オゾンストレス診断用DNAアレイの開発

1) イネ・ストレス診断アレイに用いる遺伝子の探索

加温ストレス（30℃で8日間育成）、オゾンストレス（150 ppbのオゾンに6時間暴露）及び複合ストレス（30℃で8日間育成したイネを150 ppbのオゾンに6時間暴露）にさらした6品種のイネ幼苗のDNAマイクロアレイ解析の結果から、イネ・ストレス診断アレイに用いることのできる遺伝子の探索を行った。それぞれのストレス処理で2倍以上発現量が増加及び1/2以下に発現量が低下した遺伝子を選抜した。

2) イネ・ストレス診断アレイの作製

選抜した遺伝子182個のcDNAを独立行政法人農業生物資源研究所ジーンバンクより取り寄せた。それらの塩基配列を確認した後で、PCRによりcDNA断片を得た。こうして得られたPCR断片をMulti-pin Blotter 96（アトー社）を用いてナイロン膜上に載せることによりマクロアレイを作製した。

3) イネのサンプリング

オゾンストレス診断の検証に必要なイネは、赤城試験センターのOTCにおいて生育させた“日本晴”を用いた。イネの育苗・栽培条件はサブテーマ(1)に準じて行った。“日本晴”はサブテーマ(1)と同じ条件下においてCF区、×2.0区及び加温区にて栽培を行った。ポットに定植後、約1ヶ月経過したサンプル（2010年7月1日）より葉身のサンプリングを行った。

4) イネからの全RNAの抽出

サンプリングしたイネからの全RNAの抽出は、RNeasy Plant Mini kit（米国、キアゲン社）を用いて0.2 gの組織（葉身、生殖成長期頂端分裂組織、根など）から行った。抽出した全RNAは、-80℃のフリーザーにて保管した。

5) マクロアレイメンブレンのハイブリダイゼーション

マクロアレイメンブレンのハイブリダイゼーションはTamaoki ら（2004）に従って行った⁵⁾。以下に概略を示す。全RNAより一本鎖cDNAを合成する過程で、[α -³³P]dCTPにて標識し、これを作成したマクロアレイメンブレンと58℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを洗浄

後、バイオイメージングプレート（東京、富士フイルム）と一晚接触させた。その後、得られたイメージを高解像度スキャナーTyphoon9400（米国、GEヘルスケア）で読み取った。

（４）イネの収量に及ぼす遺伝子座のQTL解析による同定

1) イネの栽培

QTL解析に用いる“ササニシキ/ハバタキ”染色体断片置換系統群（CSSL系統）39系統、“ササニシキ”及び“ハバタキ”の種子は農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターより提供を受けた。これらのCSSL系統及び親系統である“ササニシキ”、“ハバタキ”、また“ハバタキ”の兄弟系統である“タカナリ”をサブテーマ(1)と同様な方法で育苗した。これらの栽培、オゾンの暴露試験は、2009年度および2010年度に2年間かけて2回繰り返した。育苗した苗は、2009年度は5月21日に、2010年度は6月8日に赤城試験センター内の標高540 m地点に設置されている2棟のガラス温室内にブロック配置したポットに定植を行うとともに、オゾンの暴露処理を開始した。実験に用いた用土は、構内で採取した黒ボク土を用い、ポットは白色の1/2000aのワグネルポット（土壌容量12 L）を用い、ポットあたり4個体を定植した。栽培管理、施肥量などはサブテーマ(1)に準じた。

イネの栽培を行った2棟のガラス温室の一方は外気を導入しているため、オゾン濃度は外気に準じる（以下NF区とする）。もう一方のガラス温室ではオゾンの影響を調べるため、人工的にオゾンを添加した。その際のオゾン濃度はNF区の2倍になるように調整を行った（以下×2区とする）。栽培期間中のオゾン濃度は2009年の12時間平均（午前6時～午後6時）では、NF区、×2区でそれぞれ32、76.5 ppb、24時間平均ではそれぞれ27.7、77.4 ppbであった。また2010年の12時間平均では、NF区、×2区でそれぞれ43.7、85.7 ppb、24時間平均ではそれぞれ39.6、81.6 ppbであった。イネの栽培は収穫を行うまで（2009年度は9月24、25日、2010年度は9月27、28日）上述した条件に設定したガラス温室内で行った。その間、2009年度7月20日～8月20日（2009年度）、2010年7月20日～8月10日（2010年度）にかけて出穂日、可視障害及び純光合成速度の測定等を行った。また、2009年8月27、28日には最大葉身長の測定を行った。なお、2010年度の最大葉身長の測定は刈り取り後に行った。

2) 葉の可視障害調査方法

葉の可視障害はイネの第2葉、3葉、4葉（展開途中）上の褐色斑およびクロロシスの徴候に数値（Leaf bronzing score、LBS）を当てはめることによって定量化した。LBSは0：障害なし、1：黄白色斑の発生程度の軽いもの、2：褐色斑の発生程度の軽いもの、3：葉の面積の10-20%に黄白色斑および褐色斑が発生、4：葉の20-40%に黄白色斑および褐色斑が発生、5：葉の40%以上に黄白色斑および褐色斑が発生、6：葉の40%以上に褐色斑にネクロシス症状が伴うもの、7：部分的に枯死した葉、とした。

3) 純光合成速度・気孔コンダクタンス等の測定

純光合成速度・気孔コンダクタンス等の測定は“ササニシキ”、“ハバタキ”及び“タカナリ”に対してのみ行った。測定は2009年7月29日及び8月4日に各温室からそれぞれの品種ごとに3ポットを選び、1ポットあたり2個体を対象に行った。測定は測定時における最上位完全展開葉（“ササニシキ”と“ハバタキ”は止葉、“タカナリ”は上位第2葉）を対象葉とした。ポットを温室から蛍光灯を備えた屋内（光合成有効光量子束密度：約 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）に移動させ、光合成蒸散測

定装置（LI-CORバイオサイエンス社、開放型光合成蒸散測定システムLI-6400P型）を用いて、葉身中央部を、LED冷光光源（同社、6400-02B型）を装着した3×2 cm（6 cm²）リーフチャンバーに挟んで測定した。測定後、リーフチャンバーに挟んだ葉身部を等脚台形（高さ2 cm）と仮定し、上底と下底にあたる葉身幅を測定して、挟んだ葉身部の面積を算出した。測定時において、リーフチャンバー内の気温は25.2±0.2℃、チャンバーに導入した入口空気のCO₂濃度および水蒸気濃度は380±0.5 μmol/molおよび22±0.5 mmol/mol（相対湿度63±4%）にそれぞれ制御した。また、チャンバー内の光合成有効光量子束密度（PPFD）は2,000±1 μmol/m²/secに制御した。測定の記録は、葉をチャンバーに挟み込んでから入口の空気中CO₂濃度や葉温等が安定した10～30分後に行った。純光合成速度等の値は、測定装置に内蔵されたソフトウェアを用いて算出した。

4) 植物体の測定

籾がほぼ黄色になった段階で、個体別に根本から地上部を刈り取り、地上部重量、桿長、桿数、を測定した。この測定の際に個体ごとに穂を切り取り約2～4週間自然乾燥させた後、一次枝梗数の計測後、籾の回収を行った。全籾は自動種子精選機（藤原製作所製FV-459A）を用いて個体別にシイナと稔実籾に選別し、それぞれをマルチオートカウンター（藤原製作所製KC-10M3）で計数した。計数後、稔実籾のみを個体ごとに集め、測定した重さを精籾重とした。

以上の測定結果を用いて、さらにイネの収量構成要素として、総精籾数・穂あたり籾数・登熟歩合・1000粒重を求めた。総籾数は総シイナ数と稔実籾数を合算する事で、穂あたり籾数は総精籾数を穂数で除算する事で、登熟歩合は総籾数に対する稔実籾数の百分率を求めることで、1000粒重は精籾重を稔実籾数で除算し、1000を乗じることにより求めた。なおここで得られた稔実籾数を本報告では精籾数として取り扱うこととする。

5) QTL解析

4)の結果より得られたデータを用いてQTL解析を行った。その際に全てのパラメーターに対してQTL解析を行うことはせずに、CSSL系統群の親系統である“ササニシキ”と“ハバタキ”においてオゾン暴露の有無による差が有意に見られたデータに対してのみ解析を行った。解析はQTL解析ソフトの一つであるJ-qt1 (<http://pga.jax.org/qt1/index.html>)を用いた。計算はEMアルゴリズム（最尤法）を用いて行い、計算回数は500回に設定した。各CSSL系統の遺伝子型はイネゲノムリソースセンターのデータベース (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/ineSHCSSL39.html>)より入手した。QTL解析により得られた波形のうちLODスコア（対数オッズスコア）が3以上のものを有意なQTLとして遺伝子座の抽出を行った。また有意な波形が得られなかった場合には同様な計算をQGene (<http://www.qgene.org/>)でも行い、各マーカーの寄与率が一番高い部分を有意なQTLとして抽出した。

6) イネにおける*AP01*遺伝子の発現解析

QTL解析により特定された*AP01* (Aberrant Panicle Organization 1) 遺伝子の“ササニシキ”及び“ハバタキ”の各器官における発現解析を行った。また、幼穂を用いて*AP01*遺伝子のオゾンによる発現変化について解析を行った。各器官のサンプリングは2010年8月4日に行った。また、幼穂のサンプリングは2010年7月22日（出穂前23日）及び2010年8月4日（出穂前10日）に行った。サンプルからの全RNAの抽出は（3）4)の方法に従った。*AP01*遺伝子の発現はリアルタイムPCR装置Lightcycler480（米国、ロシュ・ダイアグノスティック）を用いて行った。遺伝子発現の定量は相対定量法にて行い、*AP01*遺伝子の発現量は*OsTub*遺伝子の発現量の相対値として算出した。本

解析に使用したプライマー配列は、5'-CAGGTAAGGGCTCCGTTGGA-3'と5'-TGCGTAGCATGTTTTGCAGT-3' (APO1遺伝子)、5'-CATCGACATCAAGTTCGA-3'と5'-CCGAGTTCGACGATGGTGA-3' (OsTub遺伝子) である。

4. 結果・考察

(1) イネ葉における高温・オゾン影響評価のための分子マーカーの探索

1) オゾンによる可視障害発現と関係する分子マーカー

オゾンによる葉の可視障害の評価と網羅的遺伝子発現プロファイリングを組み合わせた方法で、2週間育成した“日本晴”の幼苗を200 ppbのオゾンに72時間までさらしたときの葉の可視障害発現に伴って発現する遺伝子を同定した。第3葉の可視障害の程度を目視で評価するとともに、RGB画像解析により数値化した結果、 $(R-G)/(R+G)$ が可視障害を定量的に評価するのに最も適したRGBパラメーターであることがわかった。相対 $(R-G)/(R+G)$ 値の経時変化を調べた結果、指数関数的に減少した(図-3-1-1)。この結果をマイクロアレイによる大規模な葉の転写産物解析(オゾン暴露1、12、24、48、72時間および浄化空気処理1、12、24時間)の結果と照合して、相関係数の絶対値が0.8以上で、可視障害に伴って誘導または抑制される遺伝子を探索したところ、146個の誘導される遺伝子と1個の抑制される遺伝子が見つかった。抑制される遺伝子の機能は不明であったが、誘導される遺伝子は機能分類で「代謝」、「トランスポーター」、「防御」、「翻訳後修飾・分解」等に分けられた。特に多かった「代謝」に分類される遺伝子の中には、光呼吸、二次代謝産物生合成、解毒に関連するものが含まれており、これらの細胞機能が可視障害発現に関係していることが示唆された。

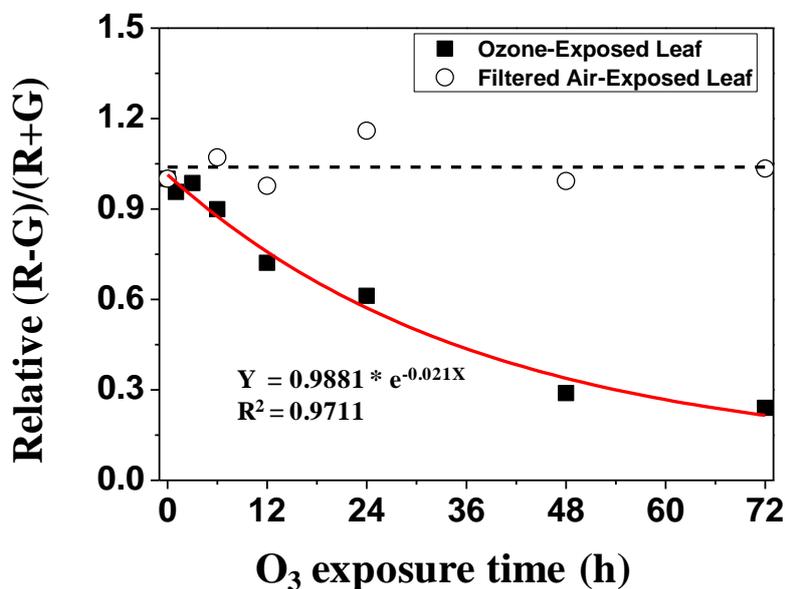


図-3-1-1 オゾン暴露によるイネ幼苗の可視障害の進行

2週間育成した“日本晴”に25℃で200 ppbのオゾン暴露を72時間まで行い、第3葉の色をRGB画像解析で数値化した。

2) オゾンにさらしたイネ幼苗における代謝産物プロファイリング

イネ幼苗における代謝物質マーカーについて調べるため、高温、オゾンまたは複合処理を12時間行った“日本晴”の第3葉を用いて、イオン性低分子物質をCE-TOFMSシステムで網羅的に分析し

たところ、105個の陽イオン性代謝物質と96個の陰イオン性代謝物質が検出された。これらの中には、対照区と各ストレス処理区で相対量が顕著に異なるものが多数含まれており、代謝物質マーカーとして利用できる可能性がある。

3) オゾン暴露によるイネ幼苗のマロンジアルデヒド含量の変動

サブテーマ(1)の結果から、“日本晴”、“コシヒカリ”、“にこまる”はオゾンによる収量減少が小さく、“きらら397”、“タカナリ”、“Kasalath”はオゾンによる収量減少が大きい品種である。これらの品種に、150 ppbのオゾン暴露を行い、その後、浄化空气中に置いたところ、オゾンによる収量減少が大きい品種ではオゾン暴露後のMDA含量の変動が少ないが、オゾンによる収量減少が小さい品種ではオゾン暴露後にMDA含量が増加することも明らかになった(図-3-1-2)。このことを利用して、オゾンによる収量影響が大きい品種かどうかを判定できる可能性がある。

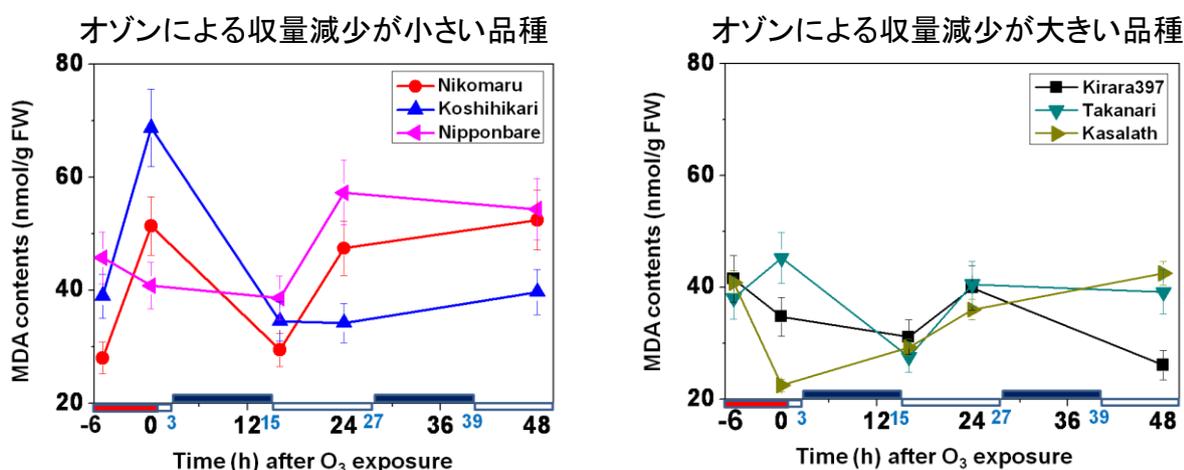


図-3-1-2 オゾン暴露後のMDA含量の変化

25℃で10日間育成した6品種のイネ幼苗に25℃で150 ppbのオゾン暴露を6時間行い、その後、浄化空气中に移した。第3葉のMDA含量を経時的に定量した。横軸の上側に出ている暗い線は暗期を示す。

4) オゾンによるファイトアレキシン含量の増加と分子マーカーとしての利用

オゾンにさらされた植物では病原体への防御反応と共通する反応が引き起こされることから³⁾、イネの主要なファイトアレキシン(抗菌性物質)であるサクラネチンとモミラクトンAを定量した。その結果、サクラネチンのオゾンによる誘導がオゾンにより減収になりやすい品種(Kasalath、タカナリ、きらら397)ではほとんど起こらないことが明らかになり(表-3-1-1)、サクラネチンがオゾンの防御に関与している可能性が考えられた。表-3-1-1より、30℃でのサクラネチンのオゾンによる蓄積と、収量影響に基づくイネ品種のオゾン耐性との間に対応関係があることから、この関係を利用したイネのオゾン影響評価方法を特許出願した。

5) RT-PCR法による遺伝子発現データとオゾンによる収量影響との関係

RT-PCR法でオゾン暴露時のイネ幼苗の遺伝子発現変化を、病原体への抵抗性に関与する*OsPR10a*遺伝子、光合成酵素の*RubisCO LSU*、*SSU*遺伝子及びシグナル伝達に関与する*OsSIPK*遺伝子につい

て調べた。その結果、赤城試験センターで行われたオゾンによる収量影響調査の結果に基づき、*OsPR10a*遺伝子の発現誘導の倍率が、オゾンによる減収の程度と正の相関を示すことが明らかになった。

6) DNAマイクロアレイによる遺伝子発現データを用いたイネの高温・オゾン影響評価法の開発

イネにおいて、オゾンの単独暴露により発現が変化する遺伝子を網羅的に明らかにしたが³⁾、高温とオゾンの複合により、遺伝子発現がどのように

変化するかは全くわかっていなかった。そこで、25℃と30℃で育てた6品種のイネ幼苗に人工光型オゾン暴露チャンバーで150 ppbのオゾン（または清浄空気）暴露を6時間行い、RNAを抽出し、アジレント・テクノロジーズ社のイネ・マイクロアレイを用いて、遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。また、6時間のオゾン暴露後、清浄空気中に24時間置いたものも調べた。イネ品種としては、収量影響に基づくオゾン感受性品種“きらら397”（北海道産），“タカナリ”（インド型品種）とオゾン耐性品種“日本晴”（基準品種），“コシヒカリ”（日本代表）、高温耐性品種“にこまる”、研究によく使われているインド型品種“Kasalath（カサラス）”の合計6品種を用いた。2008年度に実施したサブテーマ(1)の試験より、これらの品種のオゾンや高温による収量影響のデータが提供され、“にこまる”がオゾン耐性で“Kasalath”がオゾン感受性であることが新たに明らかにされた。また、サブテーマ(1)の試験により、“にこまる”は加温処理で収量が顕著に増加し、“きらら397”はオゾン暴露下で加温により収量が顕著に減少することも明らかにされた。

イネ幼苗の初期生長は、いずれの品種においても25℃より30℃で早かった。いずれの品種においても25℃で10日間育てた植物体と30℃で8日間育てた植物体の生育段階がほぼ同じであったので、この時点の植物体を実験に用いた。この時点で成熟している第3葉を分子マーカー分析用にサンプリングした。

マイクロアレイ解析の結果、オゾン暴露で多数の遺伝子の発現誘導と発現抑制が検出された(図-3-1-3)。オゾン暴露終了後24時間の時点では発現誘導や抑制される遺伝子数の減少が見られたが、特に抑制される遺伝子の減少が顕著であった。30℃と25℃での遺伝子発現の比較では、オゾン暴露の場合に比べて発現誘導や抑制される遺伝子数がかなり少なかった。30℃でオゾン暴露した複合影響の場合は、オゾン暴露単独の場合と変化する遺伝子数は似ているが、誘導される遺伝子数が概ね相加的なのに対し、抑制される遺伝子数はオゾン暴露単独の場合より少し減少した。以上の遺伝子発現の変化はどの品種にもほぼ当てはまるが、“Kasalath”では全体的に変化する遺伝子が他の品種に比べて少なかった。“Kasalath”で変化する遺伝子数が少なかった原因としては、“Kasalath”がマイクロアレイ作製に用いられている“日本晴”と系統的に遠く離れているために、検出できた遺伝子が少なかった可能性と、“Kasalath”の遺伝子発現変化が実際に少なかった可能性の両方が考えられた。そこで、通常の生育時の各品種の発現遺伝子を、“日本晴”

表-3-1-1 オゾンによるサクラネチン生成と収量影響との関係

品種	サクラネチン含量(μg/g生重量)			
	25℃		30℃	
	対照区	オゾン区	対照区	オゾン区
日本晴	0.00	7.23	0.00	2.17
コシヒカリ	0.00	6.97	0.00	3.65
にこまる	0.00	6.76	0.00	2.19
きらら397*	0.00	2.30	0.00	0.00
タカナリ*	0.00	0.00	0.00	0.00
カサラス*	0.00	0.00	0.00	0.00

イネ実生にオゾン暴露(150 ppb, 6 h)後、清浄空気中に24 h置き、第3葉からサクラネチンを抽出・定量した。対照区は清浄空気中に置いたもの。発芽直後から実験終了まで同じ温度(25℃または30℃)に置いた。*、オゾンにより減収になりやすい品種(サブテーマ(1)より)

を対照としてマイクロアレイで比較したデータを解析した。その結果、“Kasalath”では高温やオゾンで発現が変化する遺伝子が、他の品種に比べて少ないと結論した。

以上のようにイネ6品種の幼苗への6時間の高温、オゾンまたは複合処理により第3葉で発現量が変化する遺伝子をマイクロアレイで調べたところ、多数の誘導または抑制される遺伝子が明らかになったが、これらの遺伝子発現誘導量と収量影響との関連を調べるために、まず、収量影響を数値化した。サブテーマ(1)より提供された電力中央研究所赤城試験センターの大型OTCで行われた実験の収量データを用い、各品種のオゾンによる収量(玄米重量)への影響をオゾン濃度(ppb)と相対収量との関係の散布図にプロットし、近似直線の傾きをオゾン影響の大きさとした。加温処理区でのオゾン影響につい

ても同様に数値化した。また、各品種の加温区と対照区での収量の比を各品種への高温影響とした。バイオマス(地上部乾重量)への影響についても、収量の場合と同様に数値化した。

高温、オゾン、またはこれらの複合ストレスによる収量変化等の影響と緊密に関わる可能性がある候補遺伝子を見つけるために、3つの基準を満たす遺伝子を選択した。まず、発現レベルがイネ6品種における収量変化等の影響の違いと正または負の関連を持つ遺伝子のみを選択するために、各遺伝子に対して、相関テストを行った。この相関テストでは、エクセルプログラムを用いて、各遺伝子の転写誘導レベル(M値)と影響パラメーターとの間の相関係数(R)を計算し、相関係数の高い(≥ 0.8 または ≤ -0.8)遺伝子を選択した(第1基準)。次に、各品種間での収量変

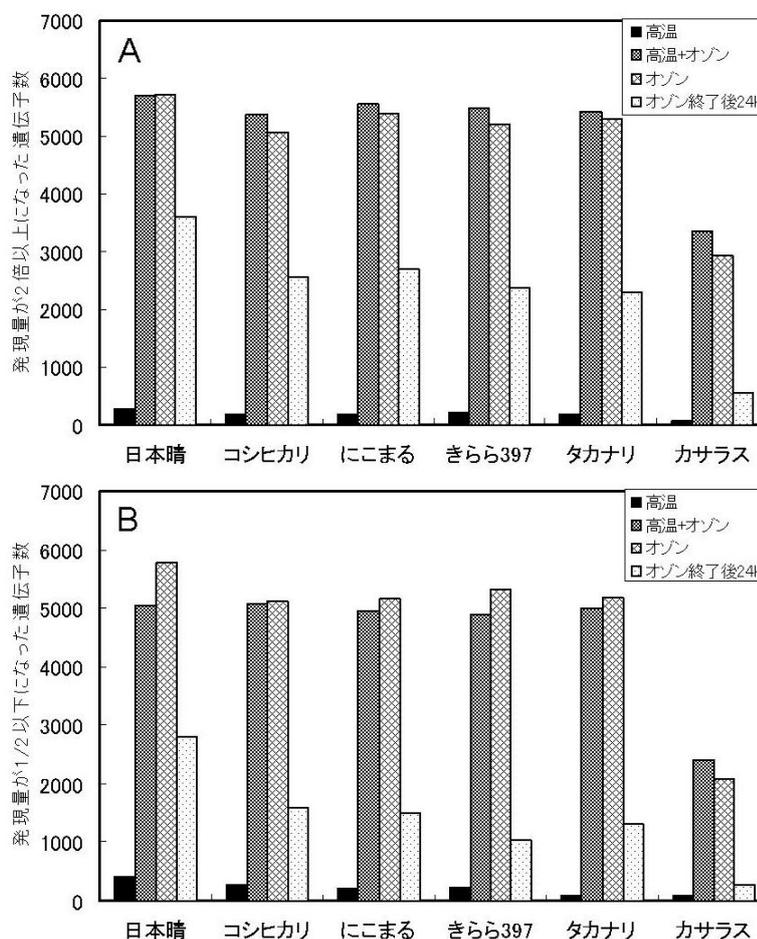


図-3-1-3 発現が誘導 (A図) または抑制 (B図) された遺伝子の個数
各イネ品種の幼苗を25°Cで清浄空気中に置いた対照に対して、高温(30°C)に置いたもの、高温でオゾン(150 ppb, 6h)暴露したもの、25°Cでオゾン暴露したもの、及び25°Cでオゾン暴露してから清浄空気中に24 h置いたものについて、第3葉からRNAを抽出し、発現量が2倍以上(A図)または1/2以下(B図)になった遺伝子をマイクロアレイで調べた。

化等の影響の有意差に対応して、M値においても有意差 ($p < 0.05$) のある遺伝子を選択した (第2基準)。第3基準では、M値の差を-1未満または+1超に設定した。

このようにして、高温、オゾン、または複合ストレスによる収量変化等の影響と緊密に関わる可能性があるイネ幼苗の候補遺伝子を選択したところ、高温、オゾン、及び複合ストレスによる収量影響と相関のある遺伝子として、それぞれ390、179、219個の遺伝子が選択され、その中で、それぞれ383、156、195個の遺伝子が各ストレスに特異的であった (図-3-1-4の左図)。また、高温、オゾン、及び複合ストレスによるバイオマスに対する影響と相関のある遺伝子として、それぞれ221、418、557個の遺伝子が選択され、その中で、それぞれ211、386、521個の遺伝子が各ストレスに特異的であった (図-3-1-4の右図)。

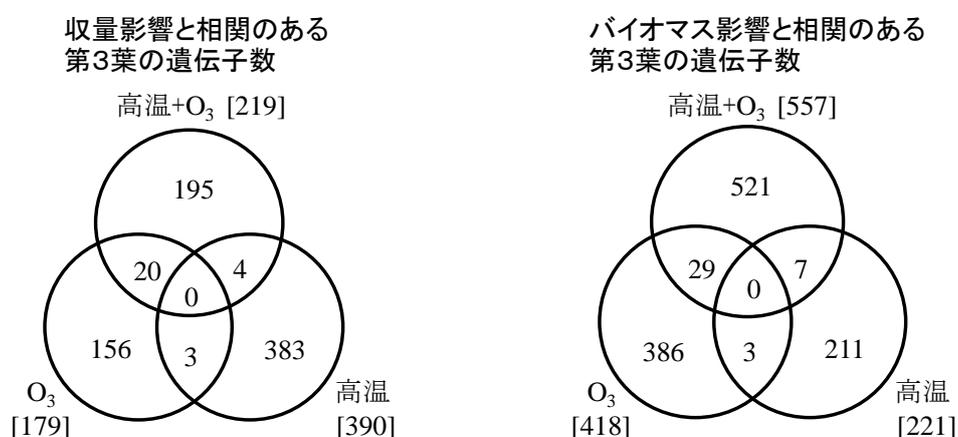


図-3-1-4 高温、オゾン、複合ストレスによる収量影響と相関のある第3葉の遺伝子数 (左図) 及びバイオマス影響と相関のある第3葉の遺伝子数 (右図)

高温、オゾン、またはそれらの複合により影響を受けるイネの収量、バイオマスと相関のある遺伝子発現マーカーが多数得られたが、その中でも特に良い相関を示し、また、発現誘導の品種間差が大きいものを選択した (図-3-1-5、6)。これらの相関関係を利用することにより、遺伝子の発現誘導を分子マーカーとして利用し、幼苗の段階の簡便な実験により、イネの収量やバイオマスへの高温、オゾン、または複合ストレスの影響評価を行うことが可能になった。

図-3-1-5および図-3-1-6に示した遺伝子発現マーカーの一覧を表-3-1-2に示した。これらの遺伝子は、耐性品種の育種に利用できる可能性がある。

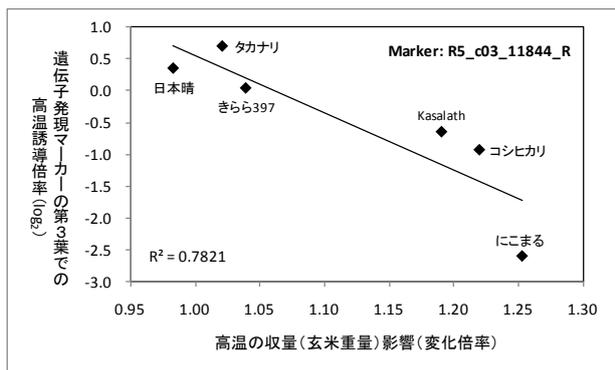
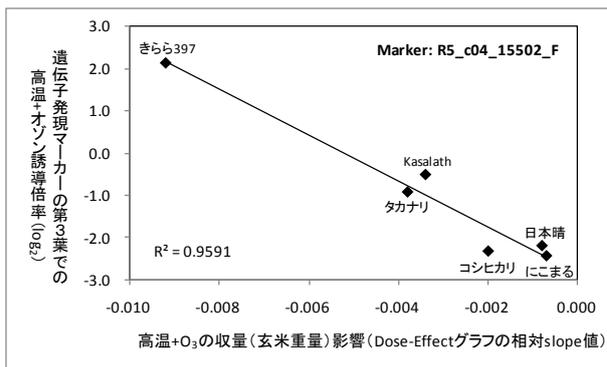
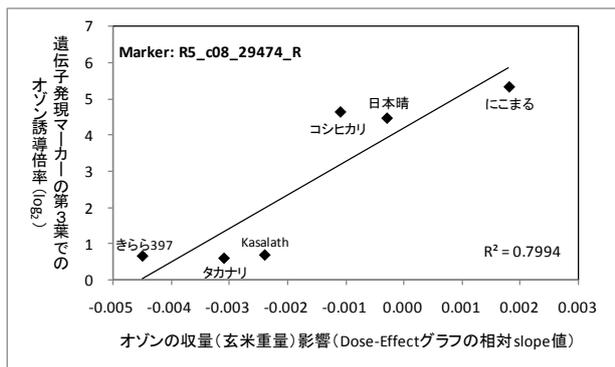


図-3-1-5 第3葉の遺伝子発現マーカーとオゾン（左上図）、高温（左下図）、高温+オゾン（右上図）の収量影響との相関

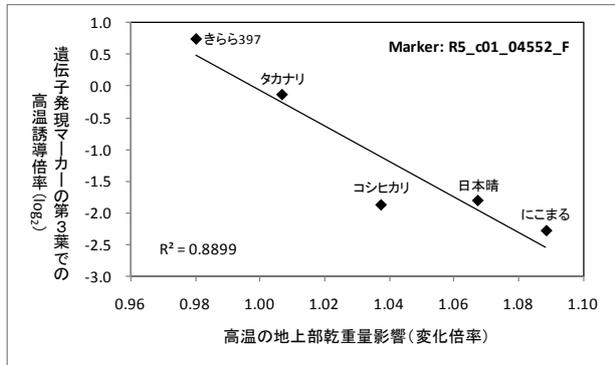
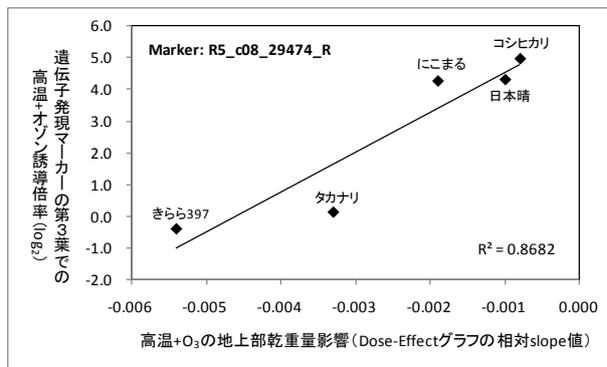
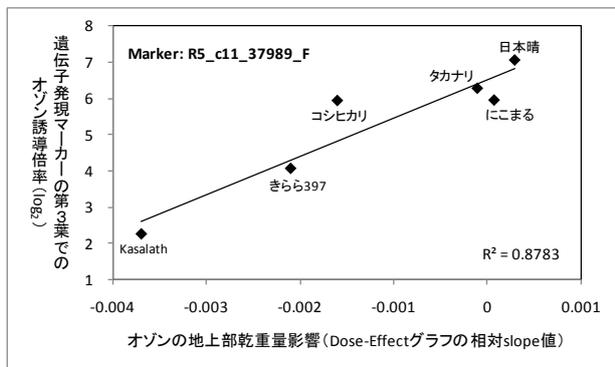


図-3-1-6 第3葉の遺伝子発現マーカーとオゾン（左上図）、高温（左下図）、高温+オゾン（右上図）のバイオマス（地上部乾重量）への影響との相関

表-3-1-2 影響評価に利用できる遺伝子発現マーカー

プローブ名	発現部位	ストレス	影響	注釈
R5_c03_11844_R	葉	高温	収量	Similar to Beta-glucosidase
R5_c08_29474_R	葉	オゾン	収量	Similar to Resistance protein candidate
R5_c04_15502_F	葉	高温+オゾン	収量	Conserved hypothetical protein
R5_c01_04552_F	葉	高温	バイオマス	RPP17-1
R5_c11_37989_F	葉	オゾン	バイオマス	Conserved hypothetical protein
R5_c08_29474_R	葉	高温+オゾン	バイオマス	Similar to Resistance protein candidate

(2) シロイヌナズナ診断アレイの半野外実験下で栽培した植物への適用

1) オゾンストレス診断に最適な遺伝子の選択

プロトタイプのアレイには4種類の遺伝子 (At1g34750、At1g70140、At2g17120、At3g21230) が載せられており、これらの遺伝子は酸性雨、SO₂、紫外線、オゾンストレスを与えた場合には、オゾン暴露にしか発現応答しないことが明らかになっている。

本研究では、これらのストレスに加えて乾燥、低温、塩ストレスに暴露した植物を用いてオゾンストレス診断アレイに供し、これらの遺伝子のオゾン暴露特異性について検証を行った。その結果、At1g34750、At1g70140はオゾンと乾燥ストレスに対して、またAt3g21230はオゾンと低温に対して発現応答することが明らかになった。一方、At2g17120はこれらのストレスには応答せず、オゾンに対してのみ特異的に発現誘導されることが明らかになった。

さらに、At2g17120 遺伝子はシロイヌナズナのマイクロアレイ解析データベース (Genevestigator; <https://3.met.genevestigator.com/at/>) で検索を行ったところ、環境ストレスではオゾンのみで発現誘導されることが明らかになった。

以上のことからオゾンストレス診断にはAt2g17120遺伝子を用いることが最適であると考えられた。

2) オープントップチャンバーにおけるシロイヌナズナの生育

赤城試験センターにおける植物の栽培は、2008年6月6日～23日 (1回目)、2008年7月2日～15日 (2回目)、2008年11月11日～25日 (3回目) の3回行った。このうち1回目及び3回目の栽培では植物の葉が赤みを帯びている、生育が悪い、等の症状が現れた。1回目及び3回目の栽培期間におけるOTCの条件を検証すると、1回目は平均光量 (午前6時～午後6時) が $495 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となっており、シロイヌナズナの栽培条件である $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と比べて明らかに強光条件となっ

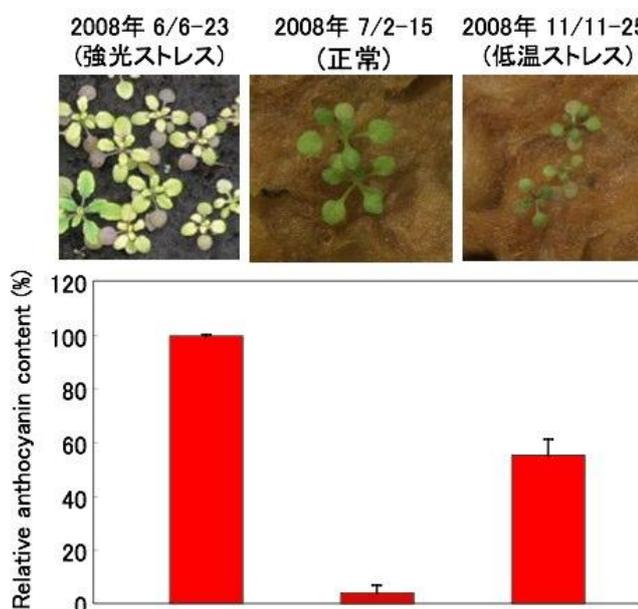


図-3-1-7 OTCにおけるシロイヌナズナの生育状態 (上図) OTCにおいて2週間栽培した時のシロイヌナズナ。(下図) 各栽培期間直後のシロイヌナズナにおけるアントシアニン含量。

ていた。また、3回目は平均光量（午前6時～午後6時）が $40.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と問題はないが、一日の平均気温が 10.6°C とシロイヌナズナの栽培条件である 24°C に比べて低くなっていた。つまり、1回目の栽培では植物に強光ストレスが、3回目の栽培では低温ストレスが与えられ、正常に生育していないことが考えられた。一方、2回目のサンプリング時には平均光量（午前6時～午後6時）が $63.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、一日の平均気温が 23.9°C と栽培に適正な条件であった。以上のことから2回目に栽培したサンプルを実験に用いることが適正であると示唆された。この事を検証するために強光・低温ストレスにより蓄積するアントシアニン類の定量を行った。その結果、2回目のサンプルに対し、1回目のサンプルでは25倍の、3回目のサンプルでは14倍のアントシアニン類が含まれていた（図-3-1-7）。また、アントシアニン類の合成に関与する遺伝子 *LDOX* 及び *UF3GT* の発現量も2回目のサンプルに対し、1回目のサンプルではそれぞれ21倍、2倍に、3回目のサンプルでは16倍、3倍になっていた。以上の結果から本研究におけるオゾンストレス診断には2回目に行ったサンプリングで得られた植物を用いることが適正であると考えられた。また、1回目のサンプルは強光ストレスによりアントシアニン類の蓄積が見られたものの、植物の生育は比較的良好であったため、強光ストレス下におけるオゾンストレス診断ができるかどうか検証するためのサンプルとして用いた。

3) オープントップチャンバーにおけるオゾンストレス診断

プロトタイプのアレイが野外で観測されるオゾン濃度の変化に対して使用できるかについての検証を行った。2008年7月2日～15日（2回目）にOTCで栽培し、7月16日の午前6時～午後3時の9時間オゾン暴露した植物をオゾンの急性影響評価に、7月16日～23日の1週間オゾン暴露したものをオゾンの慢性影響評価に使用した。急性影響評価に用いた植物は、オゾン濃度 $\times 2$ （最大オゾン濃度120 ppb）+加温区において9時間後に一部の植物で若干の葉の萎れが観察されたが、他の処理区では見た目は無処理区と変化はなかった。このような植物から単離したRNAを用いてオゾンストレス診断アレイに供した。その結果、オゾン暴露開始時（initial）及びオゾン無処理（CF）区に比べオゾン濃度 $\times 1$ +加温、 $\times 2$ 、及び $\times 2$ +加温処理区で *At2g17210* 遺伝子の発現が強く観察された（図3-1-8A）。さらに、この遺伝子の発現を定量的に見るために、オゾンにより発現変化がないことが確認されているシロイヌナズナの *Elongation factor 1 α* (*EF1 α*) の遺伝子発現を1000とした時の *At2g17210*

（initial）及びオゾン無処理（CF）区に比べオゾン濃度 $\times 1$ +加温、 $\times 2$ 、及び $\times 2$ +加温処理区で *At2g17210* 遺伝子の発現が強く観察された（図3-1-8A）。さらに、この遺伝子の発現を定量的に見るために、オゾンにより発現変化がないことが確認されているシロイヌナズナの *Elongation factor 1 α* (*EF1 α*) の遺伝子発現を1000とした時の *At2g17210*

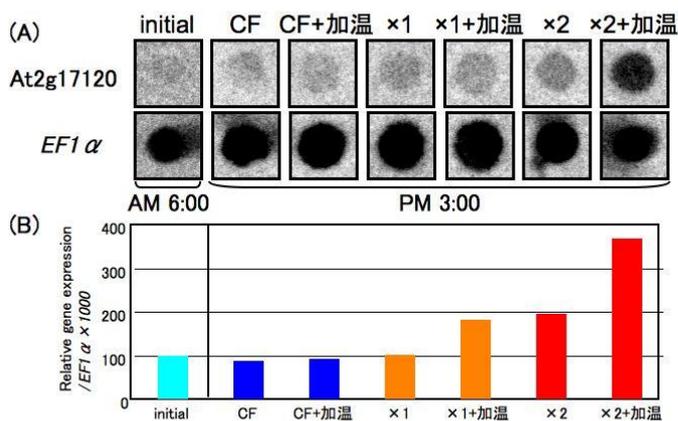


図-3-1-8 *At2g17210* 遺伝子による急性オゾンストレス影響評価

(A) 各オゾンストレス・加温区におけるマクロアレイ解析により得られた *At2g17210* 遺伝子（上）及び *EF1 α* 遺伝子（下）の発現様式。(B) 各オゾンストレス・加温区における *At2g17210* 遺伝子の発現量。値は *EF1 α* 遺伝子の発現量を1000としたときの相対値で示す。

遺伝子の相対発現量を求めた。その結果、At2g17210遺伝子の発現量はCF区、CF+加温区、及び×1区では変化が見られなかった（図3-1-8B）。一方、この遺伝子の発現量は×1+加温区及び×2区ではCF区の2倍、さらに×2+加温区ではCF区の4倍になっていた。以上の結果からAt2g17210遺伝子の発現量の増加を指標として、×2（最大オゾン濃度120 ppb）以上のオゾン濃度、及び×1（最大オゾン濃度60 ppb）のオゾン濃度では加温ストレスを与えた場合に、急性のオゾンストレスを検出できることが明らかになった。

次にオゾンの慢性影響について検証を行った。慢性影響評価に使用した植物は1週間オゾンに曝されていたため急性影響の実験に比べてより可視的な傷害が観察された。慢性影響評価に用いた植物のうち、×2及び×2+加温処理区においてそれぞれ75%、95%の植物体に顕著な可視障害（細胞死）の症状が観察された。しかしながら、その他の処理区では見た目は無処理区と変化はなかった。次に×2及び×2+加温処理区において観察された可視的な細胞死を定量的に解析するために、葉からの電解質の流出量を測定した。その結果、見た目と同様に×2及び×2+加温処理区のサンプルにおいて多量の電解質が葉から流出していることが明らかになった。一方、これ以外の処理区では葉からの電解質の流出が見られなかった。したがって、×2未満のオゾン濃度処理区ではオゾンによる植物への影響を見ただけでは判断できないことになる。このような植物から単離したRNAを用いてオゾンストレス診断アレイに供した。その結果、CF区及びCF+加温処理区ではAt2g17210遺伝子の発現量に大きな変化は見られなかったが、×1以上のオゾン処理区及び加温区でAt2g17210遺伝子の発現が強く観察された（図-3-1-9A）。またこの遺伝子の発現量は、オゾン濃度依存的に増加している傾向が観察された。次にこの遺伝子の発現を定量的に見るために、急性影響評価の場合と同様にシロイヌナズナの*EF1 α* の遺伝子発現を1000とした時のAt2g17210遺伝子の相対発現量を求めた。その結果、At2g17210遺伝子の発現量はCF区とCF+加温区であまり差がなかった（図-3-1-9B）が、×1及び×1+加温区ではCF区の約2倍、×2及び×2+加温区ではCF区の約4倍になっていた。以上の結果から、At2g17210遺伝子の発現量の増加を指標として、×1（最大オゾン濃度60 ppb）以上のオゾン濃度で慢性のオゾンストレスを検出することができることが明らかになった。また、急性影響の場合とは異なり、慢性影響評価を行う場合には加温によりこの遺伝子の発現量はほとんど影響されなかった。以上のように本サブサブテーマの研究ではシロイヌナズナにおいてオゾン及び地球温暖化に伴う気温の上昇による植物への影響を、植物に可視的な変化が現れる前にDNAマクロ

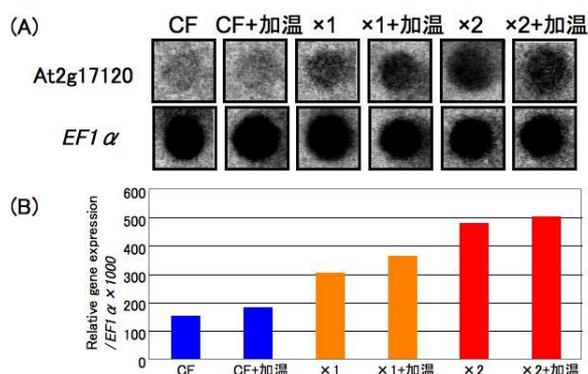


図-3-1-9 At2g17210遺伝子による慢性オゾンストレス影響評価

(A)各オゾンストレス・加温区におけるマクロアレイ解析により得られたAt2g17210遺伝子（上）及び*EF1 α* 遺伝子（下）の発現様式。(B)各オゾンストレス・加温区におけるAt2g17210遺伝子の発現量。値は*EF1 α* 遺伝子の発現量を1000としたときの相対値で示す。

アレイ解析によりAt2g17210という遺伝子の発現で見ること成功した。

次に、他のストレス条件下で植物がオゾンに曝されたとき、すなわちオゾンと他のストレス源の複合暴露条件に置いた場合においても本手法が有効であるかについて検証を行った。シロイヌナズナを2008年6月6日～23日にかけて生育させ、6月23日の午前6時～午後3時の9時間オゾン暴露したものをオゾンの急性影響評価に、6月23日～30日の1週間オゾン暴露したものをオゾンの慢性影響評価に使用した。上記の栽培期間中にはアントシアニン類の蓄積から強光ストレスを受けていたことが示唆されている（図-3-1-7）。さらに、栽培期間直後に採取したサンプルを用いたDNAアレイ解析によりこの植物では、強光条件下で発現誘導することが知られている*Early Light Inducible Protein 1* (At3g22840)及び*Early Light Inducible Protein 2* (At4g14690)の強い発現が確認された。したがってこの追試により、当該期間に栽培されたシロイヌナズナは強光ストレスを受けていたことが確認できた。このような条件に曝された植物を用いてオゾンストレス診断アレイによるオゾンの急性影響及び慢性影響の検出を行った。その結果、急性影響のサンプル間（CF区、×1区及び×2区）ではAt2g17210遺伝子の発現を指標としたオゾンによる影響を検出することができなかった。一方、慢性影響のサンプルでは×2処理区においてAt2g17210遺伝子の発現が2.5倍に増加していた。上述した健全に生育させたサンプルでは、急性影響は×2区、慢性影響では×1区以上のオゾン濃度の検出ができたことから、強光ストレス下において本手法によるオゾンストレス診断の感度が鈍ることが示された。この原因としてはAt2g17210遺伝子の発現がオゾン暴露前に強光ストレスにより1.5倍程度に増加していることが考えられる。すなわち強光ストレスによりAt2g17210遺伝子発現量のバックグラウンドが上昇した結果、オゾンによるこの遺伝子発現の増加率が低い処理区（急性影響の×1区、×2区及び慢性影響の×1区）においてオゾンによる発現上昇分がノイズに含まれてしまうことが考えられた。しかしながら、慢性影響の×2処理区では診断が可能であったことから、本手法により少なくとも強光ストレス下に置いたサンプルでも比較的高いオゾン濃度（最大オゾン濃度120 ppb）であれば影響評価ができることが明らかになった。

本研究ではシロイヌナズナのオゾンストレス診断アレイを用いて、半野外環境下でオゾンによる急性・慢性影響及び、急性影響の場合には加温の影響を見ることができた。また、感度は落ちるがオゾンの診断は他の環境ストレスに複合暴露されている場合にも適用可能であることが示唆された。

（3）イネの高温・オゾンストレス診断用DNAアレイの開発

1) イネ・ストレス診断アレイに用いる遺伝子の探索

本サブサブテーマで実施した前述のイネ・マイクロアレイを用いた研究結果を利用して、イネのストレス診断アレイに用いる遺伝子の候補を探索した。その結果、加温ストレスでは全ての品種において共通して発現増加する遺伝子を18個、共通して発現低下する遺伝子を24個見つけることができた。そこでこれらの遺伝子をストレス診断アレイの候補遺伝子とした。他のストレス処理（オゾン、オゾンと加温の複合暴露）では全ての品種で共通して発現変動する遺伝子が185～356個あったので、発現量の変動が大きい上位35個の遺伝子をそれぞれストレス診断アレイの候補遺伝子として単離することにした。これによりイネ・ストレス診断アレイの候補として182個の遺伝子を選抜した。

2) イネ・ストレス診断アレイの作製

1) で選抜した182個の遺伝子のcDNAクローンを独立行政法人農業生物資源研究所ジーンバンクより取り寄せ、塩基配列の確認後、イネ・ストレス診断アレイの作製に供した。また、遺伝子発現の定量化のためのコントロール遺伝子としてアクチン遺伝子及び18SリボソームRNA遺伝子を単離し、診断アレイの作製に供した。診断アレイの作製に際して同じ遺伝子を2回ずつナイロン膜上にスポットした。これによりナイロン膜上には368個のDNAがスポットされているもの（マクロアレイ）ができあがった。このようなイネ・ストレス診断アレイ用のナイロン膜を50枚作製した。

3) イネ・ストレス診断アレイの検証

マクロアレイメンブレンのハイブリダイゼーションの結果、前述のオゾン及び高温診断用の遺伝子のうちいくつかはこれらの診断に使うことが出来ることが明らかになった。その内訳は、オゾンストレスに特異的

に反応していた遺伝子が26種類、高温ストレスに特異的に反応していた遺伝子が20種類であった（図-3-1-10）。同様な結果が同じ実験を3回繰り返すことによって得られたため、実験の再現性は担保されている。以上のように、それぞれのストレスに特異的に応答する遺伝子がイネから単離できたことから、開発したイネのオゾン、高温ストレス診断アレイの有効性が示されたと考える。

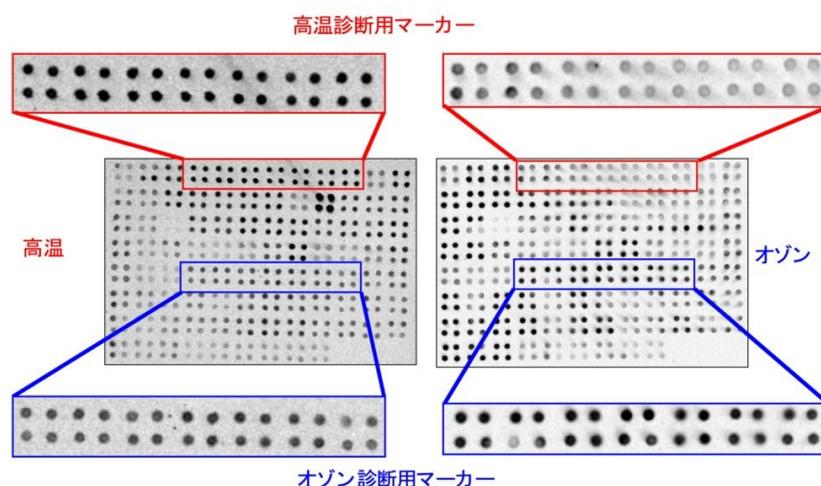


図-3-1-10 イネ・ストレス診断アレイによるオゾン、高温診断作成したストレス診断アレイを用いて、高温（左）、オゾン（右）で処理したサンプルから単離したRNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。このアレイの上半分には高温診断用の、下半分にはオゾン診断用マーカーが載せてある。

(4) イネの収量に及ぼす遺伝子座のQTL解析による同定

1) “ササニシキ”及び“ハバタキ”のオゾン感受性

CSSL系統群を用いたQTL解析に先だって、この系統群の親系統である“ササニシキ”及び“ハバタキ”において、オゾン暴露に対する反応の違いについて検証を行った。また“ハバタキ”の兄弟系統である“タカナリ”についても同様の検証を行った。大気中のオゾンは気孔を通して葉に取り込まれ、植物内で活性酸素種を発生させることが知られている。これまでの研究では、これらの活性酸素種により植物の葉の褐変（ネクロシス）や黄化（クロロシス）が引き起こされ、それに伴って光合成量の低下が起こることにより植物の生長や作物の収量を低下させると言われてきた。そこで、“ササニシキ”及び“ハバタキ”における葉の気孔コンダクタンス、蒸散速度、純光合成速度及び葉の可視障害の発現についての測定を行った。その結果、気孔コンダクタンス、

蒸散速度、純光合成速度共に“ササニシキ”よりも“ハバタキ”の方が高い値を示したが、それぞれの品種でオゾンの有無による違いは見られなかった（図-3-1-11）。また、オゾンによる葉の可視障害は、“ササニシキ”では観察されたが、“ハバタキ”では見ることが出来なかった（図-3-1-11）。以上のことから、葉の可視害という観点からは“ハバタキ”は“ササニシキ”よりもオゾン耐性であることが明らかになった。

次に栄養成長期の各パラメーターに与えるオゾン暴露の影響について調べた。2009年度に得られた結果では、“ササニシキ”、“ハバタキ”共に出穂日数、稈数、地上部新鮮重に対するオゾンの影響は見られなかった（図-3-1-12A）。また、最大葉身長はオゾン暴露により有意に低下したが、その影響は“ササニシキ”と“ハバタキ”の両品種で見ることが出来た。以上の傾向は2010年の調査でも観察することが出来た。2009年の調査において稈長は“ササニシキ”ではオゾンによる影響は見られなかったが、“ハバタキ”においてはオゾンによる稈長の有意な低下を確認することが出来た。しかしながら、2010年度の調査では両品種の間に明確な違いは見られなかった。以上の結果、栄養成長期におけるパラメーターでは“ササニシキ”、“ハバタキ”の間でオゾンによる明確な違いを観察することは出来なかった。

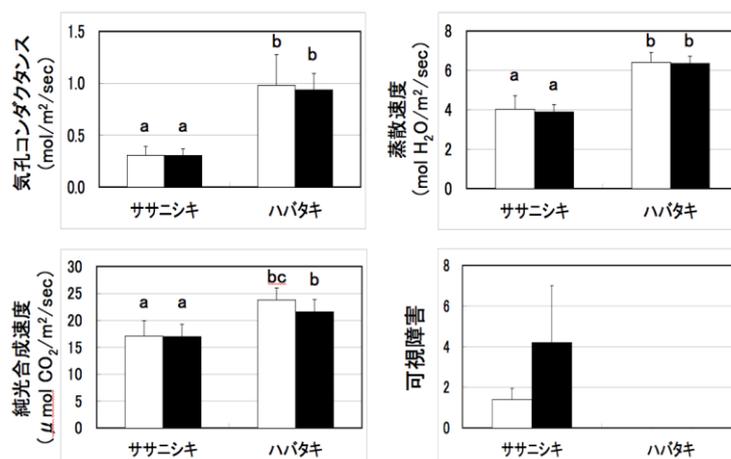


図-3-1-11 “ササニシキ”と“ハバタキ”のオゾン応答性
それぞれの品種をNF区（白抜き）、×2区（黒）で処理したときの気孔コンダクタンス、蒸散速度、純光合成速度、可視障害を示す。

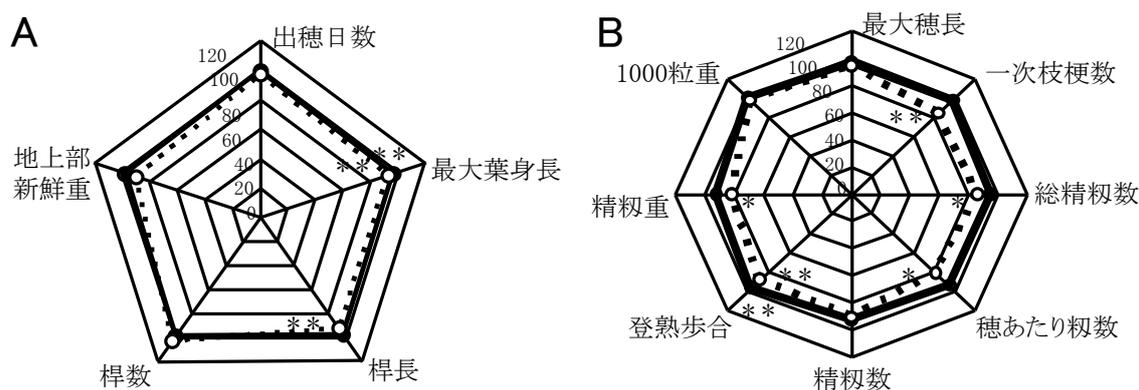


図-3-1-12 “ササニシキ”、“ハバタキ”に対するオゾンの栄養成長期 (A) 生殖成長期 (B) における影響

グラフはNF区で栽培した植物に対する×2区の植物の値の百分率で表している。実線（黒丸）が“ササニシキ”、点線（白抜き丸）が“ハバタキ”。* p <0.05、** p <0.01

次に生殖成長期における各パラメーターのうち、収量に与えるオゾン暴露の影響の品種間差について調べた。2009年度の調査ではオゾン暴露により“ササニシキ”の1株あたりの収量は約8%、“ハバタキ”の収量は約19%低下した（図-3-1-12B）。また、2010年度の調査ではオゾン暴露により“ササニシキ”の1株あたりの収量減少は観察されなかったが、“ハバタキ”の収量は約13%低下した。“ハバタキ”におけるオゾン暴露による収量低下は、統計学的に有意な水準であった（2009年度は $p < 0.01$ 、2010年度は $p < 0.1$ ）。

オゾンによる葉の可視障害の発現は“ササニシキ”でのみ観察されたことから、葉の可視障害の発現メカニズムとオゾンによる収量低下の間には違う作用メカニズムが働いていることが予想された。このように“ハバタキ”においてオゾンによる収量の低下が見られたことから次に収量構成要素に対するオゾン暴露の影響について調べた。その結果、登熟歩合について2009年度は“ササニシキ”、“ハバタキ”共にオゾン暴露による有意な低下が見られたが、2010年度の調査では“ササニシキ”における登熟歩合の低下は観察できなかった。一方で、2009年度の調査で一次枝梗数、総精籾数（総穎花数）、穂あたり籾数（穎花数）に対するオゾン暴露の影響は“ササニシキ”では見られなかったのに対して、“ハバタキ”ではこれらがオゾン暴露により有意に低下することが明らかになった。2010年度の調査でも、一次枝梗数、穂あたり籾数（穎花数）へのオゾンの影響が“ハバタキ”においてのみ観察することが出来た。以上の結果から、オゾンによる“ハバタキ”における収量の低下は、オゾン暴露により一次枝梗数が減少し、それに続いて穎花数の減少が引き起こされ、その結果として起こることが示唆された。

2) “ハバタキ”のオゾンによる収量低下に関与する遺伝子座のQTL解析による同定

CSSL系統群の親系統の解析結果から、オゾン暴露により“ハバタキ”において収量の低下が見られた。また同時に“ハバタキ”では桿長、一次枝梗数、総精籾数、穂あたり籾数のオゾンによる特異的な低下が見られたことから、これらの要素が“ハバタキ”におけるオゾンによる収量低下に関与していることが考えられた。そこでCSSL系統群を用いてこれらのパラメーターについてそれぞれQTL解析を行い、“ハバタキ”におけるオゾンによる収量低下に関与する遺伝子座の特定を行った。QTL解析には、NF区、×2区で栽培したCSSL系統群のデータ及びNF区のデータから×2区のデータを差し引いた値を用いた。

CSSL系統群の精籾重データを用いたQTL解析を行ったところ、染色体6のRM3430マーカー（107.6cM）～RM5463マーカー（124.4cM）の領域にNF区でLODスコアが3を超える有意な、かつ×2区でその有意差が見られなくなるQTLが見つかった（図-3-1-13）。また、染色体12にもNF区でLODスコアが3を超える有意なQTLが見つかったが、この領域は×2区でも有意であったため、オゾン特異的に収量に影響するQTLではないと考えられた。同様な結果は2010年度の調査でも得られた。同形質に対する寄与率を計算したところ、この領域にあるマーカーの内、RM3430において高い寄与率を示した（2009年度が43.4%、2010年度が20.5%）。次に、一次枝梗数によるQTL解析を行ったところ、染色体6のRM3430マーカー（107.6 cM）領域にNF区でLODスコアが3を超える有意なQTLが見つかった。同様な結果は2010年度の調査でも得られた。同形質に対する寄与率を計算したところ、この領域にあるマーカーの内、RM3430において高い寄与率を示した（2009年度が18.8%、2010年度が23.5%）。以上の結果からRM3430マーカー近傍に、“ハバタキ”における収量増加に関与し、かつオゾンによる収量低下に関与する遺伝子が存在することが示唆された。

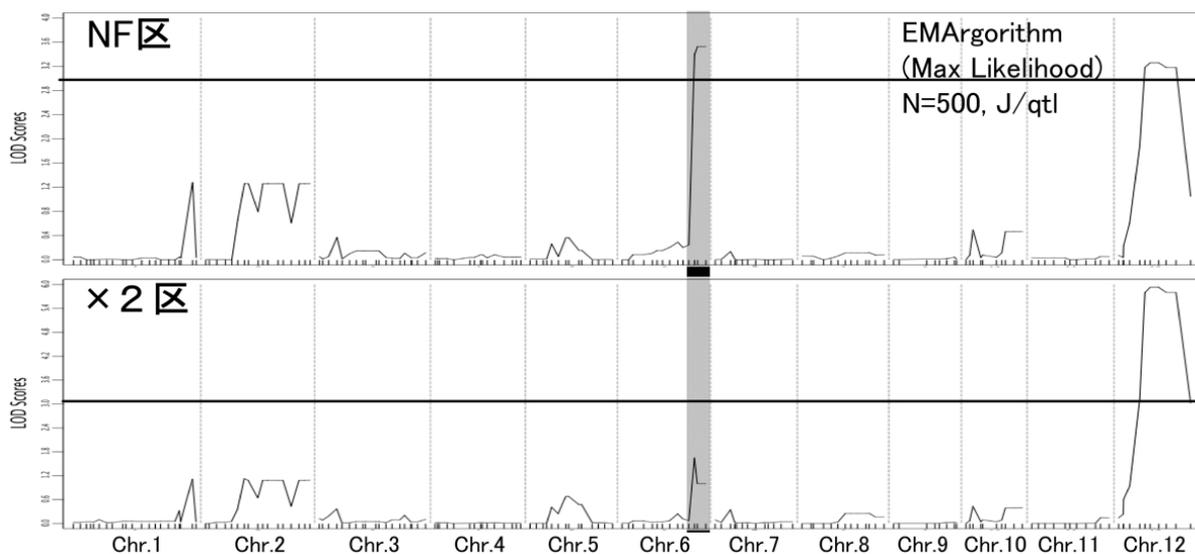


図-3-1-13 ササニシキ/ハバタキCSSL系統群を用いた収量のQTL解析
実線はLODスコア=3を表す。有意なQTL領域は斜線で囲んである

3) *AP01*遺伝子の発現解析

Teraoら(2010)⁶⁾による最近の研究から、このマーカー近傍にある*AP01*遺伝子の働きにより“ハバタキ”の総穎花数の増加が引き起こされ、それを通して収量の増加が起こることが示された。一方、我々の結果から“ハバタキ”におけるオゾンによる収量の減少は、一次枝梗数の減少を介して総精粒数(総穎花数)が減少することにより生じている可能性が示唆された。したがって、オゾンによる“ハバタキ”の収量の減少は*AP01*遺伝子の働きが抑制されることによって生じる可能性が示唆された。そこで*AP01*遺伝子の発現解析を行った。葉身、根、幼穂、穂における*AP01*遺伝子の発現量を調べたところ、この遺伝子の発現量は根、幼穂、穂において“ハバタキ”で“ササニシキ”よりも高いこと、また、各器官の中で幼穂における発現量が飛び抜けて高いことが示された(図-3-1-14)。したがって、オゾン暴露による*AP01*遺伝子の発現量の変化を幼穂及

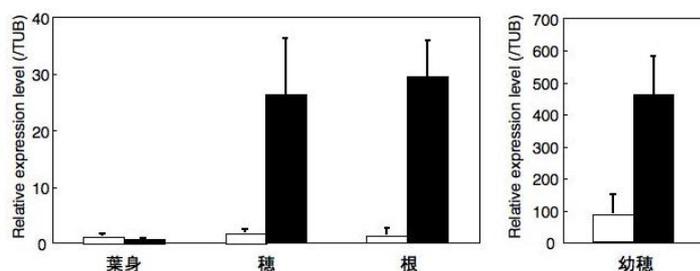


図-3-1-14 *AP01*遺伝子の各器官における発現量
“ササニシキ”は白抜き四角、“ハバタキ”は黒四角で示す。

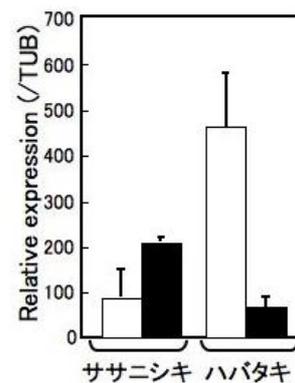


図-3-1-15 オゾンによる*AP01*遺伝子の発現変化
オゾン非暴露は白抜き四角で、オゾン暴露は黒四角で示す。

び穂において調べたところ、この遺伝子の発現は“ササニシキ”においてはオゾン暴露により誘導されるのに対し、“ハバタキ”では発現が減少していた（図-3-1-15）。*APOL*遺伝子の機能を欠失した突然変異体では一次枝梗数の減少が見られることから、この遺伝子は一次枝梗原基の分化に関与していることが示されている⁷⁾。したがって、“ハバタキ”におけるオゾン暴露による収量減少は、オゾン暴露により*APOL*遺伝子の発現が低下し、その結果、一次枝梗の分化が抑制され、総穎花数が減少することにより起こることが示された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究によって、初めて植物に対する高温とオゾンの複合影響が分子レベルで網羅的に明らかになってきた。また、高温、オゾン、及びそれらの複合ストレスによる収量影響に関連している遺伝子候補やオゾン感受性の品種間差に係る遺伝子座、さらにオゾン耐性と関連する代謝産物としてサクラネチンが見つかったことから、これらを用いたイネ品種の感受性評価が可能になったと同時に、高温・オゾン影響メカニズムの解明や耐性品種の選択・育種に繋がる成果が得られたと考える。また、シロイヌナズナ・ストレス診断アレイが野外条件下でも利用可能であるという結果を踏まえて、イネ・ストレス診断アレイを試作した。これが実用化されれば、植物ストレス診断用DNAアレイとして、世界初となる。

(2) 環境政策への貢献

イネ葉の分子マーカーを利用した新しい影響評価手法の開発により、温暖化時のオゾン影響評価の効率化が可能になった。また、ストレス診断アレイを実際の植物影響を把握（モニタリング）するツールとして完成させることができれば、東アジア酸性雨ネットワーク参加国等を中心にした植物影響の実態把握調査に有効な手法を提供することができると考える。また、適応策のための栽培品種の選択・育種に活用できる遺伝子情報が得られたことから、これらの情報を活用した効率的な育種や品種改良・選抜が的確に行え、アジア圏の食糧供給量の確保にわが国が先導的な役割を果たすことができると考える。

6. 引用文献

- 1) Agrawal, G. K., R. Rakwal, M. Yonekura, A. Kubo, and H. Saji (2002) Rapid induction of defense/stress-related proteins in leaves of rice (*Oryza sativa*) seedlings exposed to ozone is preceded by newly phosphorylated proteins and changes in a 66-kDa ERK-type MAPK. *J. Plant Physiol.* 159:361-369.
- 2) Agrawal, G. K., R. Rakwal, M. Yonekura, A. Kubo, and H. Saji (2002) Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics* 2:947-959.
- 3) Cho, K., J. Shibato, G. K. Agrawal, Y.-H. Jung, A. Kubo, N.-S. Jwa, S. Tamogami, K. Satoh, S. Kikuchi, T. Higashi, S. Kimura, H. Saki, Y. Tanaka, H. Iwahashi, Y. Masuo, and R. Rakwal (2008) Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. *J. Proteome Res.* 7:2980-2998.

- 4) Matsuyama, T., M. Tamaoki, N. Nakajima, M. Aono, A. Kubo, S. Moriya, T. Ichihara, O. Suzuki, and H. Saji (2002) cDNA microarray assessment for ozone-stressed *Arabidopsis thaliana*. Environ. Pollut. 117:191-194.
- 5) Tamaoki, M., T. Matsuyama, N. Nakajima, M. Aono, A. Kubo, and H. Saji (2004) A method for diagnosis of plant environmental stresses by gene expression profiling using a cDNA macroarray. Environ. Pollut. 131:137-145.
- 6) Terao, T., K. Nagata, K. Morino, and T. Hirose (2010) A gene controlling the number of primary rachis branches also controls the vascular bundle formation and hence is responsible to increase the harvest index and grain yield in rice. Theor. Appl. Genet. 120:875-893.
- 7) Ikeda, K., N. Nagasawa, and Y. Nagato (2005) *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* temporally regulates meristem identity in rice. Dev. Biol. 282:349-360.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Yoshida, S., M. Tamaoki, D. Ogawa, M. Aono, A. Kubo, H. Saji, and N. Nakajima (2009) Protective effects of ethylene and salicylic acid against ozone exposure in *Arabidopsis*. J. Jpn. Soc. Atmos. Environ. 44(1):9-15.
- 2) Yoshida, S., M. Tamaoki, M. Ioki, D. Ogawa, Y. Sato, M. Aono, A. Kubo, S. Saji, H. Saji, S. Satoh, and N. Nakajima (2009) Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone exposed *Arabidopsis*. Physiol. Plant. 136(3):284-298.
- 3) Cho, K., G. K. Agrawal, N.-S. Jwa, A. Kubo, and R. Rakwal (2009) Rice OsSIPK and its orthologs: A “central master switch” for stress responses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 379:649-653.
- 4) Cho, K., G. K. Agrawal, N.-S. Jwa, J. Shibato, N. L. Torres, A. Kubo, and R. Rakwal (2009) Rice OsSIPK: A central component of ozone-triggered physiological responses. Plant Signaling Behav. 4(5):448-450.
- 5) Cho, K., S. Tiwari, S. B. Agrawal, N. L. Torres, M. Agrawal, A. Sarkar, J. Shibato, G. K. Agrawal, A. Kubo, and R. Rakwal (2011) Tropospheric ozone and plants: Absorption, responses and consequences. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 212:61-111.

<査読付論文に準ずる成果発表>

なし

<その他誌上発表 (査読なし)>

- 1) 塚原啓太、佐治光、玉置雅紀 (2011) 植物への大気汚染ガストレスを遺伝子発現から診断する. 遺伝 65(2):51-57.

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) Cho, K., A. Kubo, J. Shibato, G. K. Agrawal, Y. Masuo, H. Saji, and R. Rakwal (2009) Biomarkers for ozone stress assessment in rice, Part I: Microarray-based approach to investigate ozone-induced visible injury in rice cv. Nipponbare (*japonica*) seedling model system. 第24回日本分子生物学会年会
- 2) Cho K., A. Kubo, J. Shibato, S. Tamogami, K. Satoh, S. Kikuchi, G. K. Agrawal, Y. Masuo, H. Saji, and R. Rakwal (2009) Biomarkers for ozone stress assessment in rice, Part II: Biochemical and global transcriptomics analyses for investigating injury-related biomarkers using 6 rice (*japonica* & *indica*) cultivars. 第24回日本分子生物学会年会
- 3) 玉置雅紀、松村秀幸、Nisar Ahmad Khan、澤田寛子、Kyoungwon Cho、久保明弘、河野吉久 (2010) ササニシキ/ハバタキ交配由来CSSLsを用いたオゾンによるイネの収量低下に関与する遺伝子座のQTL解析による同定. 第51回日本植物生理学会年会
- 4) 玉置雅紀、松村秀幸、澤田寛子、久保明弘、河野吉久 (2010) ササニシキ/ハバタキ交配由来染色体置換系統群を用いたオゾンによるイネの収量低下に関与する遺伝子座の同定. 第51回大気環境学会年会
- 5) 玉置雅紀 (2010) 大気汚染ガスオゾンによるイネの収量低下に関与する遺伝子座の同定. 国立遺伝学研究所シンポジウム「イネ分子遺伝学の展望」
- 6) 玉置雅紀 (2010) オゾンによるイネの収量減少はどのようなメカニズムで起きるのか?. 大気環境学会関東支部会植物影響部会講演会
- 7) 塚原啓太、玉置雅紀、澤田寛子、河野吉久、中嶋信美 (2011) オゾンに暴露されたイネにおける収量低下メカニズムの解明. 第52回日本植物生理学会年会

(3) 出願特許

- 1) 久保明弘, チョー キョンワン, ラクワール ランディープ, 河野吉久, 柴藤淳子「サクラネチンを利用したイネのオゾン影響評価方法」, 特願2009-181643, 平成21年8月4日

(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

なし

(6) その他

なし