

遺伝子を用いたブナのストレス診断

○十河 孝夫 (神奈川県環境科学センター)
武田 麻由子 (神奈川県環境科学センター)
青野 光子 (国立環境研究所)

環境科学センターでは丹沢大山地域のブナ林衰退機構の解明に向けて、ブナの野外実験やブナ葉の遺伝子解析を行っている。ブナ林衰退地域に隣接する犬越路測定局では県内の都市部に比べオゾン濃度が高いこと、野外実験から現状のオゾン濃度がブナ苗の生育に悪影響を及ぼしていることが確認できた。ブナ林衰退は様々な要因によると指摘されているが、遺伝子発現解析により、実験的にオゾン曝露したブナ葉では、オゾン曝露により発生する活性酸素の消去(解毒)に関与する遺伝子の発現量が増加していることが確認され、遺伝子を用いたストレス診断の有用性が示唆された。

1 はじめに

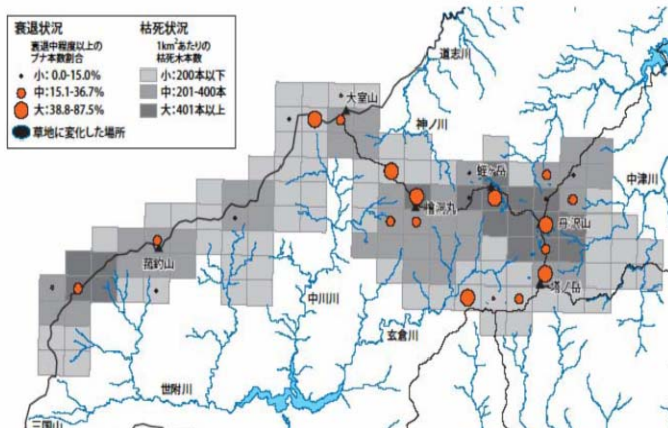


図1 丹沢山地におけるブナの衰退状況
山根ほか：丹沢大山総合調査学術報告書(2007)より引用

神奈川県北西部には標高 1500 m前後の山々が連なった丹沢大山地域がある。1962～1963 年度に行われた丹沢大山学術調査では丹沢山、蛭ヶ岳、檜洞丸等丹沢の主稜をつないだ海拔 1400m以上の山頂部を中心とした地域はブナの純林で覆われており、学術的にも非常に重要であることが確認された。しかし、1980 年頃から丹沢大山のブナ林をはじめ

とした樹木の立ち枯れが顕著になり、1993～1996 年度に実施された丹沢大山自然環境総合調査や 2004～2006 年度に実施された丹沢大山総合調査では、山地全体でブナ林の衰退が進行していることが示された(図1)。また、丹沢大山自然環境総合調査では、樹木衰退現象の要因は外的ストレス(大気汚染、乾燥化、雲霧発生頻度の減少、動物の食害等)や内的要因(老齢化等)が複合的に作用したものと推定されており、大気汚染物質濃度のモニタリングと衰退原因の解明に向けた検討が求められている。

2 研究目的

ブナ林の衰退機構の解明を目的として、樹木の衰退要因として指摘された大気汚染物質に着目し、丹沢山地における大気中濃度の把握、ブナの生育に及ぼす影響を把握することとした。

また、植物はストレスを受けると生体内でそのストレスに対抗するようなタンパク質を増産することが知られており、近年、遺伝子レベルでの研究アプローチが試みられている。植物体内ではストレスへの対抗物質を生産するためにDNAの転写、翻訳経路が活性化され、対応するメッセンジャーRNA (mRNA) の蓄積が予想される。そこで、人工的に大気汚染物質（オゾン）を曝露したブナ葉の遺伝子発現解析を実施することで、遺伝子を用いた衰退機構の解明とストレス診断に向けた基礎的な知見を得ることとした。

3 実験方法

3.1 犬越路測定局における大気汚染物質の解析

大気汚染物質の大気中濃度を把握するため 1995 年にブナ林衰退地に隣接する西丹沢犬越路隧道脇（山北町中川、北緯 35 度 29 分 16 秒、東経 139 度 5 分 6 秒、標高 920m）に設置された国設酸性雨測定所（以下、「犬越路測定局」という。2002 年より神奈川県の研究用測定局となっている）において、二酸化硫黄、窒素酸化物及び光化学オキシダント等の大気汚染物質の測定及び解析を実施した

3.2 犬越路測定局における野外実験

丹沢山地の大気汚染物質がブナに影響を及ぼすか確認するため、犬越路測定局において野外実験を実施した。活性炭フィルターでオゾン等を除去した浄化空気を導入した浄化区と、現地の大気をそのまま導入した環境大気区を設置し、その中に丹沢産の日本ブナ苗（2 年生実生苗）を定植した。両区でのブナ苗の生育状況を比較し、光化学オキシダントをはじめとする大気汚染物質の影響を評価した。2002 年 5～11 月（実験 1 年目）、2003 年 4～11 月（実験 2 年目）及び 2004 年 4～11 月（実験 3 年目）の間、2 週間毎にブナ苗の樹高、根元直径、葉数、クロロフィル含有量（SPAD 値）の測定及び目視観察による調査を実施した。

3.3 遺伝子発現解析

(1) 特異的プライマーセットの作成及び mRNA の同定

犬越路測定局で生育した丹沢産の日本ブナ葉より mRNA を抽出し、相補的 DNA (cDNA) に逆転写した。次に、Gen-Bank に登録されている日本ブナ、ヨーロッパブナ、日本グリ、ヨーロッパグリの mRNA の塩基配列から、それぞれの mRNA に対応した特異的プライマーセットを設計し、PCR により cDNA を増幅させた。増幅させた cDNA の塩基配列が元の mRNA の塩基配列と同じであることを確認し、作成した特異的プライマーにより目的の mRNA が選択されていることを確認した。

(2) オゾン曝露したブナ葉における遺伝子発現解析

東京農工大学内に設置してある自然光型ファイトトロン（湿度は 70%、気温は 9 時～17 時まで 25°C、17 時～翌 9 時まで 18°C に設定）を用い、対照区、オゾン区、オゾン及び過酸化水素区の 3 曝露区を設定した。オゾン区は 9 時～17 時まで、丹沢地域の日中の平均オゾン濃度に近い 50 ppb のオゾンを曝露し、オゾン及び過酸化水素区はオゾン 50 ppb に、同様に丹沢地域で観測される過酸化水素 2.7 ppb を添加して曝露

した。2009年3月に樹高約30cmの丹沢産ブナ苗を各15本設置し、2009～2011年の各5月初旬～9月初旬にそれぞれの汚染物質の曝露を実施した。

2011年8月に各曝露区より中程度の大きさのブナ苗を2本選定し、各苗から葉2枚を採取し、遺伝子発現解析に供した。ブナ葉から抽出したmRNAを逆転写したcDNAを鋳型として、3.3(1)で作成した特異的プライマーセットのうち、定常的に発現が見られる*ELF1* (elongation factor 1 alpha-like protein) を含む29種のプライマーセットを用いてより定量性の高いリアルタイムPCRを行い、それぞれの遺伝子の発現量を数値化した。*ELF1*はストレスによりその発現量が変化しないと考えられるため、各遺伝子の発現量は、*ELF1*に対する相対発現量として求めた。

4 結果及び考察

4.1 犬越路測定局における大気汚染物質の測定

1997～2014年度までの犬越路測定局における二酸化硫黄及びオゾン濃度の年平均値の経年変化を図2及び図3に示す。神奈川県内の一般環境大気測定局（以下、「一般局」という。）と比較すると、二酸化硫黄濃度（2012年度より休止）は、犬越路測定局が一般局に比べ非常に低い濃度で推移した。2000年に二酸化硫黄が上昇しているのは、三宅島火山の噴火の影響を受けたためである。一方、オゾン濃度は、犬越路測定局の方が高く推移した（2013年度除く）。犬越路測定局においてオゾン濃度が高くなる理由としては、都市部で排出された窒素酸化物や炭化水素から光化学反応により生成したオゾンが丹沢山中に移流すること、山岳地域では生成されたオゾンを分解する物質が少ないこと等が考えられる。

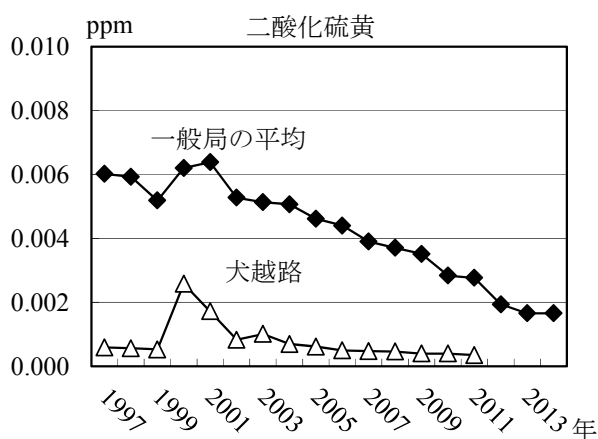


図2 犬越路測定局における二酸化硫黄濃度の経年変化

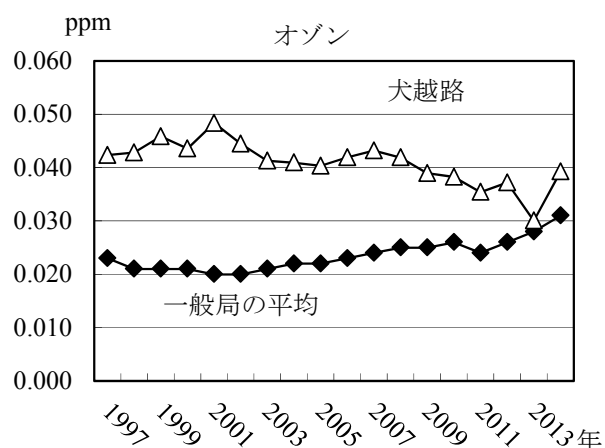


図3 犬越路測定局におけるオゾン濃度の経年変化

4.2 犬越路測定局における野外実験

実験1年目（2002年）は浄化区及び環境大気区のブナ苗に差異は見られなかった。しかし、実験2年目（2003年）の9月以降、葉のクロロフィル含有量が環境大気区で浄化区に比べて低くなった。これはオゾンによってクロロフィルが破壊されたためと考えられ、これにより光合成能が低下し、ブナの生育に悪影響を及ぼすことが考えら

れた。さらに、実験3年目(2004年)には、秋の黄葉及び落葉が、環境大気区のブナ苗で浄化区よりも早く観察された(図4参照)。これにより光合成を行える期間が短くなるため、ブナの生育に影響が出ると考えられた。

3年間の調査終了後、ブナ苗をすべて掘り上げ、乾燥重量を測定したところ、環境大気区のブナ苗は浄化区に比べ、約60%の乾燥重量の低下が見られた。

4.3 遺伝子発現解析

29種の遺伝子のうち、活性酸素消去系酵素であるFe-SOD及びAPX、エチレン合成過程の律速となる反応を触媒する酵素であるACS1等について、対照区のブナ葉に比べオゾン区、オゾン及び過酸化水素区において発現量が増加する傾向が見られた。このうち、Fe-SODの結果を図5に示す。オゾンは植物に対し強い毒性を有するが、ブナ葉においてもオゾンが過酸化水素に分解され、最終的には水に変換される経路が発現していることが示唆された。一方で光合成に係る酵素であるrbcSの結果は、

オゾン曝露実験によって発現量の増加は見られなかった(図6)。

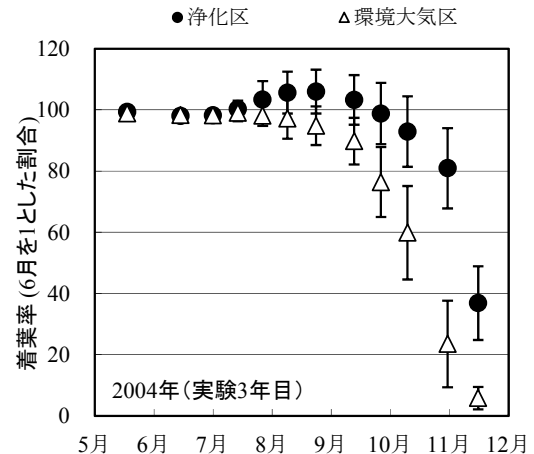


図4 実験3年目のブナの着葉率
縦棒は95%信頼区間を示す

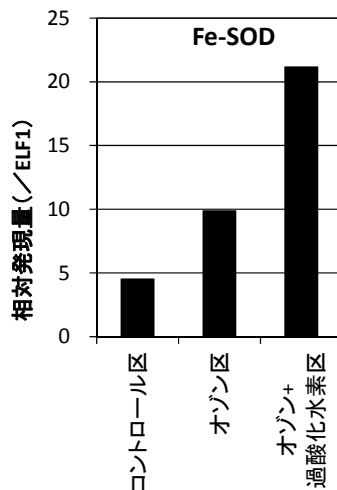


図5 各曝露区のブナ葉におけるFe-SODの相対発現量

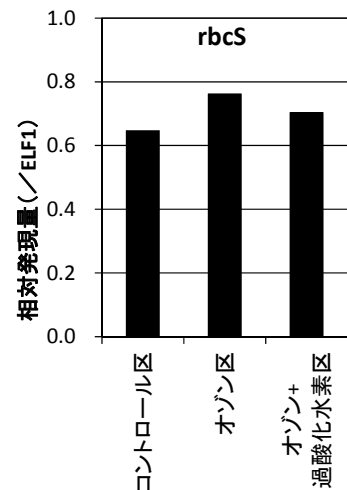


図6 各曝露区のブナ葉におけるrbcSの相対発現量

5 まとめ・展望

ブナ林衰退の原因究明のため、丹沢山地における大気汚染物質等の現状把握及びオゾンがブナ苗に及ぼす影響について遺伝子発現解析等により検討した。犬越路測定局では県内の都市部に比べオゾン濃度が高く、またオゾンによってブナの生育が阻害されることが確認された。さらに遺伝子発現解析の結果よりブナの生体内でもオゾン曝露により発生する活性酸素を分解する代謝経路が活発化していることが示唆された。

神奈川県では、失われた自然環境を取り戻すという「自然再生」の視点から丹沢大山自然再生計画を策定し、現在はブナ林再生に向けて具体的な対策を検討している。効率的にブナ林を再生するには、ブナが受けているストレスの種類を特定することが必要であり、今回報告した遺伝子発現解析は、オゾンストレスを診断する上で、有効な手法になると考えられる。