

報告 (Note)

ブナ葉における遺伝子発現解析手法の検討  
及びオゾン曝露による遺伝子発現変化

武田麻由子, 十河孝夫\*  
(調査研究部, \*温泉地学研究所)

Examination of gene expression analysis in beech leaves and  
changes in gene expression due to ozone exposure

Mayuko TAKEDA, Takao SOGO\*  
(Research Division, \*Hot Springs Research Institute of Kanagawa Prefecture)

キーワード: 日本ブナ, *Fagus crenata*, mRNA, リアルタイム PCR

1 はじめに

ブナ林はわが国の冷温帯を代表する森林であり、北海道南部から九州まで広範囲に分布している。自然性の高い極相林として存続している森林も多く、また生物多様性豊かな地域として保全されている地域も多い。しかし、近年、各地でブナ林の衰退が報告されている<sup>1,2)</sup>。

神奈川県北西部に位置する丹沢山地では、1970～1980年頃にブナの枯損が始まり、現在も進行中である。特に檜洞丸(標高1600m)の稜線部の南斜面でブナ林の衰退や枯損が著しい<sup>1)</sup>。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、樹木衰退現象の要因は外的ストレス(オゾンをはじめとする大気汚染、乾燥化、動物及び食葉昆虫による食害等)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た<sup>3)</sup>。著者らも、丹沢山中に研究局として設置している西丹沢犬越路測定局(山北町中川、標高920m)においてオープントップチャンバー実験を実施し、丹沢山地の現状濃度のオゾンにより、ブナの葉の単位面積あたりのクロフィル量(SPAD値)が低下し、落葉が促進され、生長が阻害されていることを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。それを受けて、丹沢山や檜洞丸などの山頂におけるオゾン濃度のモニタリングや気象観測、衰退原因の解明に向けた検討等が実施されているところである<sup>5)</sup>。

丹沢大山総合調査に基づき実施されている丹沢大山自然再生計画は現在第3期(2017～2021

年度)を迎え、ブナ林の再生を特定課題として上げている。効果的なブナ林再生のためには、地域ごとにブナが受けているストレスを特定し、ストレスごとに最適な対策を施す必要がある。

生物、特にストレスに対し回避行動をとれない植物は、ストレスに対する様々な防御機構を有している。ストレスを認知すると、ストレスに対応した防御関連遺伝子の遺伝情報がメッセンジャーRNA(mRNA)へ転写され、タンパク質へ翻訳され、ストレスに対応した防御応答が起こる。様々なストレスと、そのストレスに対応するmRNAの発現量との関係については、モデル植物であるシロイヌナズナや草本植物を用いた様々な既往研究があり、特にオゾンをはじめとする酸化ストレスについては、シロイヌナズナ<sup>6)</sup>、トマト<sup>7)</sup>、ジャガイモ<sup>8)</sup>、ヨーロッパブナ<sup>9,10)</sup>など多くの研究があるが、日本ブナについての報告はほとんどない。また、山間地でオゾン濃度を多地点で測定することは、電源や測定機器を必要とするため困難を極めるが、葉のmRNA発現量を解析することにより、ブナへのオゾン等酸化ストレスの影響の有無を把握することができれば、地域ごとのブナのストレス把握に貢献できる可能性がある。

そこで、今回、ブナ葉における遺伝子発現解析手法を検討するとともに、オゾン曝露したブナ葉における遺伝子発現量変化を検討したので、その結果を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 日本ブナ (*Fagus crenata*) の mRNA 塩基配列の部分同定

GenBank-today<sup>11)</sup>で検索した日本ブナ、近縁種のヨーロッパブナ (*Fagus sylvatica*)、日本グリ (*Castanea crenata*)、ヨーロッパグリ (*Castanea sativa*) の mRNA の塩基配列から、細胞壁 (セルロース) 合成酵素など、明らかにストレス応答に関与しないものを除外し、残りの mRNA について検討を行った。それぞれの mRNA について、200 bp 程度の部分配列を増幅できる特異的プライマーセットを設計した。特異的プライマーセットの設計にはオンラインソフト Primer3WEB<sup>12)</sup>を使用した。

犬越路測定局で生育した丹沢産の日本ブナの葉を液体窒素中で粉砕し、50 mg 程度の凍結粉砕試料を 2 ml マイクロチューブに移した。OMEGA Bio-tek 社製 E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plant RNA Kit を用い、user Manual に従い凍結粉砕試料中のすべての RNA (Total RNA) を抽出した。続いてタカラバイオ社製 PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA Synthesis Kit を用い、Total RNA 中の mRNA を選択的に相補的 DNA (cDNA) に逆転写した。

先に設計した特異的プライマーセット及びタカラバイオ社製 EX Taq Hotstart version を用い、サーマルサイクラー (日本ジェネティックス社製 LifeEco) により cDNA を増幅させた。増幅させた cDNA はアガロースゲル電気泳動により切り出し、精製処理をし、塩基配列を決定した。この塩基配列が元の mRNA の塩基配列と概ね同様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 が選択的に増幅されていることを確認した。

### 2.2 オゾン曝露したブナ葉における mRNA 発現量の相対定量

#### 2.2.1 検量線作成

2.1 で元の塩基配列と概ね同様であることが確認できた mRNA 及びその後追加で塩基配列情報を入手できた mRNA (塩基配列は未確認) について、塩基配列確認用の特異的プライマーセットではリアルタイム PCR 解析に適さないため、新たにリアルタイム PCR 用に 100 bp 程度の部分配列を増幅できる特異的プライマーセットを設計した。

2.1 で示した方法により、検量線作成用に犬越路測定局で生育した日本ブナの葉から抽出した Total RNA 中の mRNA を cDNA に逆転写した。std0 として当倍量の cDNA、std1~4 として 5<sup>n</sup> (n=1~4) 倍希釈した cDNA を準備し、アプライドバイオシステムズ社製 Fast SYBR Green Master Mix 及び特異的プライマーを用い、リアルタイム PCR (アプライドバイオシステムズ社製 StepOnePlus) により増幅させ、それらの増幅曲線を得た。鋳型となる cDNA 量が多い、すなわち希釈倍率が小さいほど一定量 (Threshold) まで増幅するのに必要な PCR サイクル数は小さくなることから、希釈倍率 (n=0~4) を横軸に、Threshold まで増幅するのにかかった PCR サイクル数を縦軸にとり、検量線を作成した。

#### 2.2.2 オゾン曝露

ブナ葉に対するオゾン曝露は、東京農工大学内の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) を用いて行った。オゾン曝露は 9 時~17 時までとし、オゾン濃度は丹沢山地のブナ着葉期の平均オゾン濃度<sup>13)</sup>に近い 50 ppb とした (オゾン区)。また、前室でオゾンと  $\alpha$ -ピネンを光化学反応させて過酸化水素を発生させ、オゾンに加えて過酸化水素を添加することにより、より酸化ストレスを増大させた処理区も作成した (オゾン+過酸化水素区)。対照区は活性炭フィルターを用い、オゾン等大気汚染物質を除去した清浄な空気を通気した。

#### 2.2.3 cDNA の調整及び相対定量

オゾン等を曝露したブナ苗について、各区における平均サイズのブナ苗を 2 本選定し、それぞれから平均サイズの葉を 2 枚採取して、チャック付きビニール袋に入れ、RNAlater で満たして mRNA を固定し、分析まで冷凍保存した。

2.1 で示した方法により、葉から抽出した Total RNA 中の mRNA を cDNA に逆転写した。1 枚の葉につき 2 サンプル逆転写し、各区 8 サンプル (葉 4 枚×2) とした。

各サンプルにつき 3 回繰り返し分析を行い、Threshold まで増幅するのにかかった PCR サ

イクル数の平均値を求め、検量線から希釈倍率 (n) を導出し、cDNA 相対量を算出した。それぞれの mRNA の発現量は、ストレスによる発現量変化が比較的小さいハウスキーピング遺伝子で標準化した相対発現量として評価した。ハウスキーピング遺伝子は、一般的によく使用されている伸長因子 *ELF1α* (elongation factor 1 alpha-like protein) を用いた。有意差検定は、統計ソフト SPSS を用い、一元配置分散分析を行ったあと、Turkey の多重比較を行った。

### 3 実験結果及び考察

#### 3.1 日本ブナ (*Fagus crenata*) の mRNA 塩基配列の部分同定結果

GenBank-today (2012 年当時) で検索し、ストレス応答に関与しないものを除外した日本ブナ、ヨーロッパブナ、日本グリ、ヨーロッパグリの mRNA 計 63 種について cDNA の増幅を試みたところ、60 種の mRNA の増幅が確認できた。さらにそのうちの 52 種について、増幅された 200 bp 程度の塩基配列が同定でき、元の mRNA の塩基配列と概ね同様であることを確認した。

#### 3.2 オゾン曝露したブナ葉における mRNA 発現量の相対定量結果

##### 3.2.1 検量線作成結果

その後追加で塩基配列情報を入手できたもの (塩基配列の確認は未実施) も含め、最終的に 84 種の mRNA のうち、43 種についてリアルタイム PCR により検量線を作成することができた。一例として、植物の光合成に関係する酵素である *rbcS* (リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ小サブユニット) の mRNA の増幅曲線及び検量線を図 1 及び図 2 に示す。これにより、43 種の mRNA については、ブナ葉における各 mRNA の相対発現量の定量が可能であることが示された。なお、タンパク質はブロック体、その設計図である mRNA はイタリック体で示すこととなっており、以下そのように記載する。

##### 3.2.2 オゾン曝露結果

図 3 に 3 生長期間の曝露終了後の各区の平均生長量を示す。生長量は、根元直径の二乗に樹

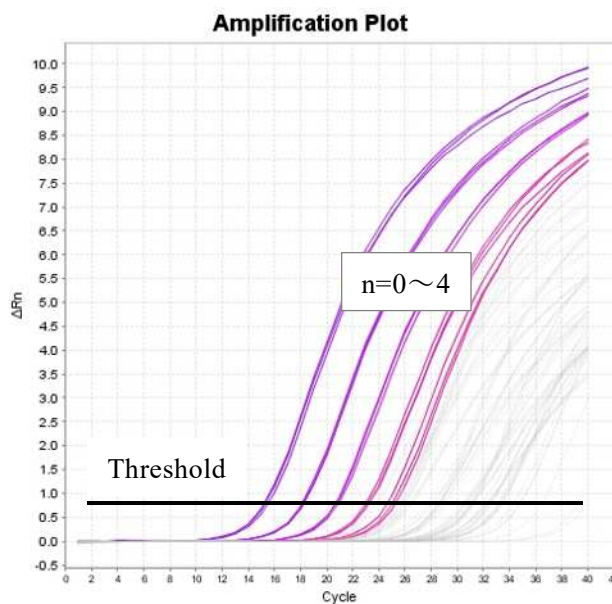


図 1 鋳型となる cDNA の希釈倍率 (n) を変化させた *rbcS* の増幅曲線

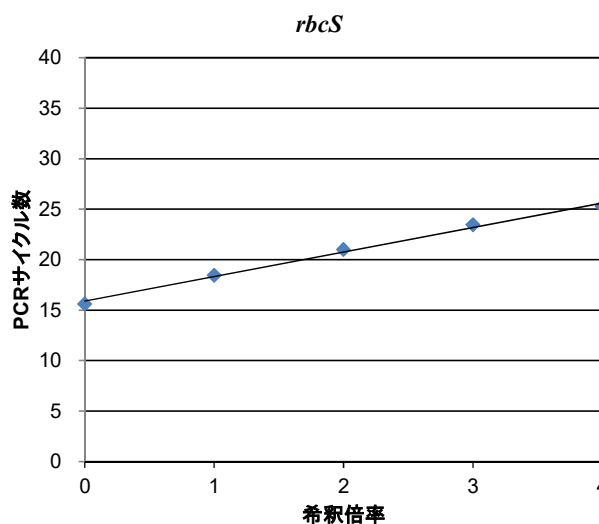


図 2 *rbcS* の検量線

高を乗じて算出した。その結果、生長量は、オゾン区では有意ではなかったものの対照区より小さく、オゾン+過酸化水素区では有意に小さくなった。より強い酸化ストレスによって生長低下率が大きくなっており、生長低下率と酸化ストレス強度に相関があることが示された。

##### 3.2.3 mRNA 発現量の相対定量結果

オゾンは反応性に富む活性酸素の一種であり、気孔から植物体内に吸収され、葉組織中の様々な物質を酸化する。そのため、植物体内に活性酸素種を消去するための反応系が存在する。その反応系に関わる酵素が SOD (スーパー

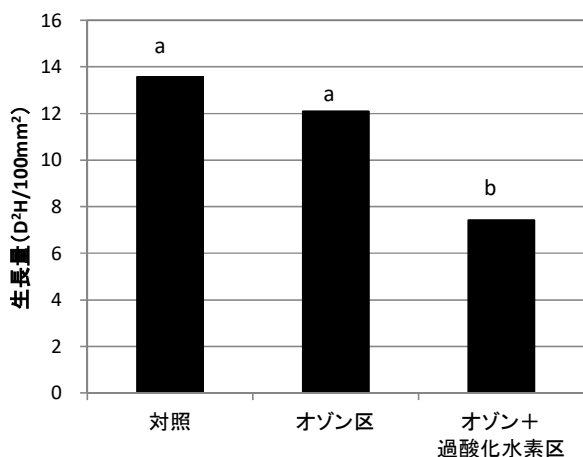


図3 3 生長期間曝露終了後の各区の平均生長量  
異なるアルファベットは有意に差があることを示す 以下同様

オキシドジスムターゼ) や APX (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ) などである。SOD は活性酸素の一種であるスーパーオキシドを消去する酵素であり、活性中心に銅イオンと亜鉛イオンを持つもの (Cu,Zn-SOD)、マンガンイオンを持つもの (Mn-SOD)、鉄イオンをもつもの (Fe-SOD) があり、それぞれ細胞質、ミトコンドリア、葉緑体に多く存在する<sup>14)</sup>。スーパーオキシドは SOD によって酸素と過酸化水素に変換され、過酸化水素は APX などによって水へと分解される。図4にブナ葉における Fe-SOD 及び APX の対照区を 1 とした相対発現量を示す。Fe-SOD は対照区、オゾン区及びオゾン+過酸化水素区のいずれの処理区間においても有意に差が見られ、酸化ストレスが大きくなるほど相対発現量が大きくなる傾向が見られた。一方 Cu,Zn-SOD は処理区による相対発現量の変化は見られず、Mn-SOD はオゾン+過酸化水素区において有意に低下していた (データ示さず)。すなわちブナ葉では、主に葉緑体において、Fe-SOD によるオゾン等酸化性物質の消去反応が起こっていることが示された。また、APX の相対発現量も、対照区、オゾン区及びオゾン+過酸化水素区のいずれの処理区間においても有意に差が見られ、Fe-SOD によって変換された過酸化水素が水へと分解される反応が起こっており、酸化ストレスの大きさに伴い、相対発現量が大きくなっていることが示された。

また、SOD によるオゾン等酸化性物質の消去

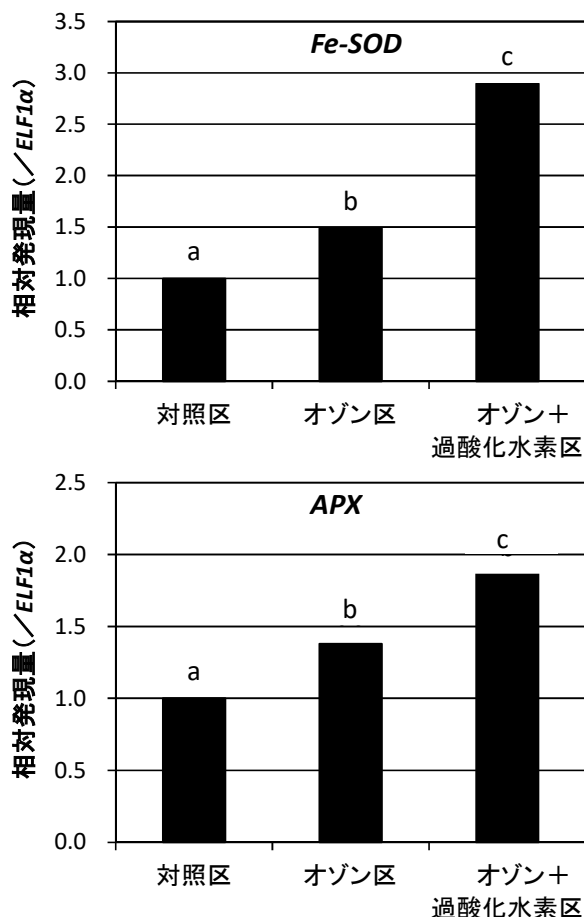


図4 Fe-SOD 及び APX の対照区を 1 とした相対発現量

反応により生成した過酸化水素が細胞内情報伝達物質となり、植物体内で様々な反応が起こることが知られている。その一つがエチレンの生成である。エチレンはメチオチンから S-アデノシルメチオニン (SAM)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を経て生成され、この反応系に関わる酵素が ACS ファミリー (ACC 合成酵素群) 及び ACO ファミリー (ACC 酸化酵素群) である。また、生成したエチレンがエチレン受容体 (ERS1 など) に結合することによって起こる EIN3 (Ethylene- Insensitive 3) の蓄積により、エチレン初期応答遺伝子群の転写が促進され、エチレン応答が開始する。この EIN3 が葉の老化を誘導する主要な転写因子として機能していることが明らかとなっている<sup>15)</sup>。図5にブナ葉における ACO ファミリーのひとつである ACO1 及び EIN3 と機能が重複している EIL1 (EIN3-Like1) の mRNA の対照区を 1 とした相対発現量を示す。いずれの酵素の

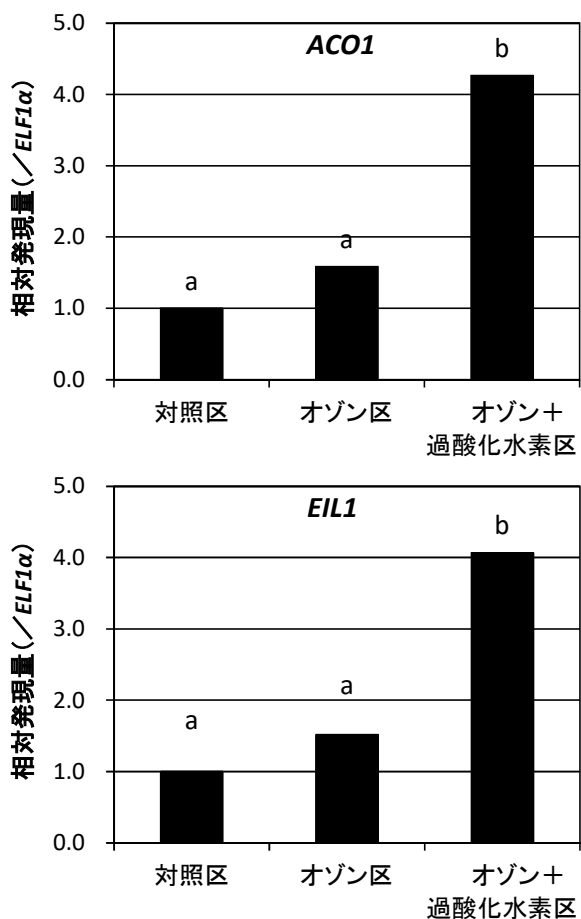


図5 ACO1及びEIL1の対照区を1とした相対発現量

mRNA も、オゾン区では有意な差はなかったものの対照区より大きく、オゾン+過酸化水素区では有意に大きくなっていった。ACSファミリーのひとつであるACS1やERS1など、これらの反応に係る一連の酵素群のmRNAも同様の相対発現量変化を示しており、ブナ葉において、オゾン+過酸化水素の曝露に起因するエチレン生成及びエチレン応答が起こっていることが明らかとなった。オゾン曝露に反応して速やかにエチレン生成が起こることは、トマト<sup>7)</sup>やヨーロッパブナ<sup>9)</sup>など様々な植物で観察されている。曝露されたオゾン濃度に応じてエチレン生成量が増加する<sup>7)</sup>ことも明らかとなっており、オゾン+過酸化水素区でオゾン区に比べてACO1等の発現量が大きかったことと矛盾しなかった。

また、今回の実験は苗木を用いたチャンバー実験であるが、成木ではオゾン曝露によるエチレン生成が確認されている<sup>9)</sup>。ヨーロッパブナ

の成木に環境濃度のオゾン及び2倍に増加したオゾンを曝露したところ、ACO1の発現量の上昇が確認され、枝に前駆物質であるACCを添加したところ、葉の細胞死が促進されたことから、エチレンが野外の成木の葉の細胞死の広がりに関与していることが示唆された<sup>9)</sup>。著者らの犬越路測定局における野外実験においても、丹沢山地の現状濃度のオゾンにより、紅葉や落葉といった葉の老化の早期化が起こっており<sup>3)</sup>、矛盾しない結果となった。

同様に、過酸化水素が細胞内情報伝達物質となり植物体内で起こる反応の一つとして、サリチル酸の生成がある。サリチル酸は、ホスホエノールピルビン酸から出発し、シキミ酸、コリスミ酸、フェニルアラニンなどを経て生成され、HPS (3-デオキシ-D-アラブノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ) や EPSPS (5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ)、CM (コリスミ酸ムターゼ)、Pal (フェニルアラニンアンモニアリアーゼ) など多くの酵素が関わる複

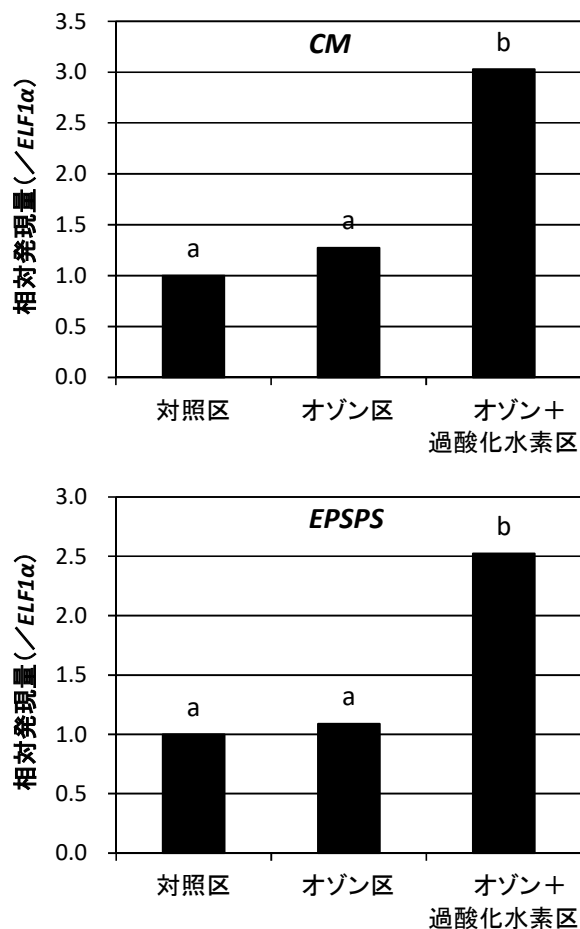


図6 CM及びEPSPSの対照区を1とした相対発現量

雑な生成経路である。生物にとって非常に重要な生成経路であるため、この経路にかかわる酵素群の遺伝子配列(部分配列を含む)はヨーロッパブナでもよく調べられており<sup>10)</sup>、今回日本ブナにおけるこれらの酵素群の遺伝子配列の一部を決定することができた。図6にブナ葉における*EPSPS*及び*CM*の対照区を1とした相対発現量を示す。いずれの酵素のmRNAも、オゾン区では有意な差はなかったものの、オゾン+過酸化水素区では有意に大きくなっていった。Betzら<sup>10)</sup>は、温室内のヨーロッパブナの苗木に300 ppbのオゾンを1日8時間、30日間曝露したところ、*HPS*、*EPSPS*及び*CM*などの発現量が増加していたと報告しており、本実験でも同様の結果が得られた。Betzらの実験では300 ppbという高濃度のオゾンを曝露しているが、エチレンと同様、本実験のような低濃度オゾンの長期間曝露でもサリチル酸生成の活性化を検知することができた。一方でBetzらは、ブナ成木ではこれら酵素の活性の上昇はわずかであったと報告していることから、日本ブナ成木での更なる検討が必要である。

一方で、オゾン曝露により発現量が減少傾向を示したmRNAも存在した。検量線の例を示した*rbcS*や*CHBP*(クロロフィル a,b 結合タンパク)のmRNAの結果を図7に示す。いずれのmRNAも、有意差はないもののオゾン区及びオゾン+過酸化水素区で発現量がやや減少していた。*rbcS*及び*CHBP*は光合成に関係する酵素であり、オゾンにより光合成が阻害されている可能性があるが、さらなる検証が必要である。Glickら<sup>8)</sup>の研究によれば、ジャガイモの葉におけるオゾン曝露による*rbcS*の発現量の低下は*ACS*の発現量の増加と相関しており、本実験の結果と相違なかった。また、Glickら<sup>8)</sup>はエチレン合成阻害剤(アミノオキシ酢酸)を添加する実験を行い、エチレン生成を阻害すると、*rbcS*の発現量低下が防止されたとしており、エチレンが*rbcS*の発現量低下に関与していることが示唆された。

#### 4 まとめ

ブナが受けているストレスを評価する手法として遺伝子発現解析を試みた。また、ストレスとしてオゾン及び過酸化水素を曝露したブナの葉の遺伝子発現変化を検討した。その結果、以

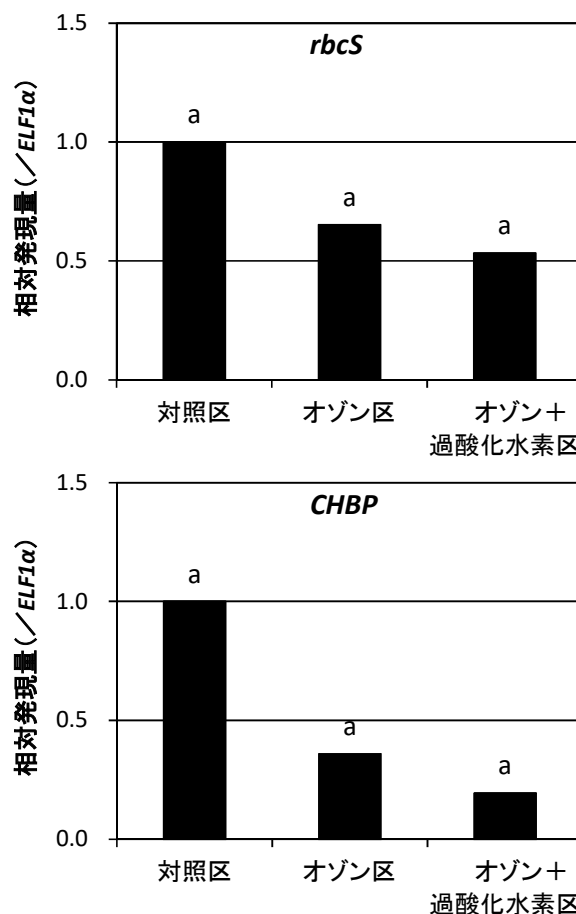


図7 *rbcS*及び*CHBP*の対照区を1とした相対発現量

下の知見を得た。

(1) 西丹沢犬越路測定局で生育した日本ブナの葉から抽出した43種のmRNAのcDNAについて、リアルタイムPCRにより検量線を作成することができ、ブナ葉中のmRNAの相対発現量の定量が可能となった。

(2) ブナ葉において、オゾン等の酸化性物質の曝露により活性酸素消去系のmRNA(例えば*Fe-SOD*, *APX*)の発現が活性化していた。また、オゾン+過酸化水素という、より強い酸化ストレス下では、その結果生成した過酸化水素を細胞内伝達物質として活性化されるエチレン生成(例えば*ACO1*)、エチレン応答(例えば*EIL1*)及びサリチル酸生成(例えば*CM*, *EPSPS*)に係る遺伝子群も活性化していた。

今回、オゾン単独曝露ではエチレン生成等の遺伝子群の有意な増加は見られなかった。その原因として、活性酸素消去系は直接的な影響のため発現がはっきり表れたものの、エチレン生

成等については活性酸素消去系の発現の結果活性化する二次的な生合成経路であるため、結果が見えにくかった可能性が考えられた。ただし、丹沢山地では、実験条件より濃度は低いものの過酸化水素が検出されており、犬越路測定局における野外実験の結果、有意な生長量低下がみられていることから、丹沢山地の大気はオゾン+過酸化水素区に近いと考えられる。そのため、丹沢山地におけるブナ葉の酸化ストレスの有無を評価する手法として、遺伝子発現解析は適用可能であると考えられる。今後は、同じくブナ林衰退の原因のひとつとされる乾燥ストレスについて同様の検討を行い、乾燥ストレスにより発現量に変化する遺伝子を明らかにする必要がある。効果的なブナ林再生のためには、それぞれのストレスに特異的に発現量に変化する遺伝子を解析することにより、ブナの葉が受けているストレスを特定できる手法を開発し、ブナ林再生の基礎資料とすることが望まれる。

#### 謝辞

オゾン曝露実験に関しては、東京農工大学の青木研究室（当時）の学生諸氏にご協力いただいた。mRNA塩基配列の部分同定に関しては、国立環境研究所と地方環境研究所等とのII型共同研究の一環として国立環境研究所青野光子氏にご協力いただいた。リアルタイムPCR装置は神奈川県農業技術センター所有の機器を借用した。ここに関係諸氏に謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) 越地正, 鈴木清, 須賀一夫: 丹沢山地における森林衰退の研究 (1) ブナ, モミ等の枯損実態, 神奈川県森林研究所報告, 22, 7-18(1996)
- 2) 猪上信義, 野田亮, 佐々木重行: 福岡県英彦山におけるブナ林の衰退現象と立地との関係, 九州森林研究, 55, 54-57(2002)
- 3) 山根正伸, 相原敬次, 鈴木透, 笹川裕史, 原慶太郎, 勝山輝男, 河野吉久, 山上明: ブナ林の再生に向けた総合解析, 丹沢大山総合調査学術報告書, 703-710(2007)
- 4) 武田麻由子, 相原敬次: 丹沢山地の大気中オゾンがブナ (*Fagus crenata*) 苗に及ぼす影響, 大気環境学会誌, 42(2), 107-117(2007)
- 5) 自然環境保全センター: 特集 丹沢山地のブナ林再生に向けて—衰退原因の解明と再生技術の開発—, 自然環境保全センター研究報告第14号(2016)
- 6) 佐治光: オゾン等の大気汚染物質に対する植物の応答に關与する遺伝子とその機能, 大気環境学会誌, 53(2), 36-44(2018)
- 7) Wolfgang M., Cornelius S.B., Airi A.T., Christian B., Jaana T., Merja U., Donald G., Heinrich S., Christian L., Jaakko K.: Ethylene Synthesis Regulated by Biphasic Induction of 1- Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase and 1-Aminocyclopropane-1- Carboxylic Acid Oxidase Genes Is Required for Hydrogen Peroxide Accumulation and Cell Death in Ozone- Exposed Tomato, *Plant Physiol.*, 130, 1918-1926 (2002)
- 8) Richard E. G., Carl D. S., Richard N. A., Eva J. P.: Ozone-Induced Ethylene Emission Accelerates the Loss of Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Nuclear-Encoded mRNAs in Senescing Potato Leaves, *Plant Physiology*, 109, 891-898(1995)
- 9) Angela J. N., Sabine A., Gunter B., Sabina S., Gabriele K., Harald K. S., Thorsten E. E. G., Karl-Heinz H., Rainer M., Günther B., Heinrich S., Christian L.: Role of ethylene in the regulation of cell death and leaf loss in ozone- exposed European beech, *Plant, Cell and Environment*, 28, 886-897(2005)
- 10) Gunter A. B., Claudia K., Catherine L., Maren O., Gerhard W., Christian L., Werner H., Heinrich S., Dieter E.: Ozone affects shikimate pathway transcripts and monomeric lignin composition in European beech (*Fagus sylvatica* L.), *European Journal of Forest Research*, 12(2), 109-116(2009)
- 11) DBGET Search-GenBank-today: [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind?genbank-today](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?genbank-today) (参照; 2019.8)
- 12) Primer3WEB: <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> (参照; 2019.8)
- 13) 武田麻由子, 小松宏昭, 岡敬一, 阿相敏明: 西丹沢における大気汚染物質及び酸性雨の状況 (1996~2011), 神奈川県環境科学センター研究報告, 36, 27-35(2013)
- 14) Ruth G. A., Neval E., Lenwood S. H.: Role of

superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331–1341(2002)

- 15) Zhonghai L., Jinying P., Xing W., Hongwei G.: ETHYLENE-INSENSITIVE3 Is a Senescence-Associated Gene That Accelerates Age-Dependent Leaf Senescence by Directly Repressing miR164 Transcription in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 25, 3311–3328(2013)