

遺伝子発現解析手法を用いたブナのストレス評価

Stress evaluation of beech using gene expression analysis methods

武田 麻由子^{1*}・丸山 朋見¹・青野 光子²

Mayuko TAKEDA^{1*}, Tomomi MARUYAMA¹ and Mitsuko AONO²

¹ 神奈川県環境科学センター 調査研究部

² 国立研究開発法人 国立環境研究所 生物多様性領域

¹ Research Division, Kanagawa Environmental Research Center

² Biodiversity Division, National Institute for Environmental Studies

摘 要

神奈川県北西部に位置する丹沢山地において衰退が顕著となっている日本ブナについて、効果的な再生施策の実施のため、ブナが受けているストレスを評価することを目的に、ブナ葉を用いた遺伝子発現解析手法を検討した。酸化ストレス及び水ストレス（土壌乾燥化）を曝露した日本ブナの葉を用いて遺伝子発現解析を実施し、遺伝子発現の差異について検討した。酸化ストレスにより活性化される活性酸素消去系、エチレン生成系及びエチレン応答について、水ストレスでは一部を除き、これらの遺伝子の発現量は上昇しなかった。水ストレスにより活性化される遺伝子群について、ブナ以外の植物の遺伝子配列から相同性解析を実施した。その結果、ABA（アブジン酸）非依存性経路に係る *DREB2F* の特異的 primer セットの作成に成功し、水ストレスで発現量が上昇していることを明らかにした。

キーワード：オゾン、日本ブナ、水ストレス、メッセンジャー RNA、リアルタイム PCR

Key words：ozone, *Fagus crenata*, water stress, mRNA, realtime PCR

1. はじめに

ブナ林は我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。天然の極相林として存続している森林も多く、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。

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1,600 m）の稜線部の南斜面でブナ林の衰退や枯損が著しい（越地ほか、1996）。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、土壌乾燥化、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（山根ほか、2007）。著者らは、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920 m）において、ブナ生育に関わる気象状況（気温、湿度、風向風速、雨量）や大気汚染状況（オゾン、窒素

酸化物）を測定している。併せて同測定局の敷地内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（武田・相原、2007）。それらの結果を受けて、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（神奈川県自然環境保全センター、2016）。

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（2017～2022年度）であり、ブナ林の再生を特定課題として掲げている。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。山間地の多地点でオゾン濃度やブナ生育環境を測定することは、電源や測定機器及び人手を必要とするため困難を極めるが、遺伝子発現解析手法を用いれば、葉を採取するだけで地域ごとのブナのストレス状況を把握できる可能性がある。

生物、特にストレスに対し回避行動をとれない植

受付：2022年7月28日、受理：2022年11月28日

* 〒254-0014 神奈川県平塚市四之宮1-3-39, E-mail: takeda.kv4@pref.kanagawa.lg.jp

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、それがタンパク質へ翻訳されることにより、ストレスに対応した防御応答が生じる。様々なストレスと、そのストレスに対応する mRNA の発現(生体内での合成)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(佐治, 2018), トマト(Moeder *et al.*, 2002), ジャガイモ(Glick *et al.*, 1995), ヨーロッパブナ(Nunn *et al.*, 2005; Betz *et al.*, 2009)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。そこで、著者らは日本ブナの葉における遺伝子発現解析手法を検討し、リアルタイム PCR を用いた mRNA 発現量の定量方法を確立した。また、オゾン等酸化ストレスを曝露したブナ葉における遺伝子発現解析を実施し、葉内に発生したスーパーオキシドの無毒化、過酸化水素を情報伝達物質として促進されるエチレン生合成経路の発現などが活性化されていることを明らかにした(武田・十河, 2019)。

しかし、ブナのストレスを把握するためには、ブナ林衰退に寄与すると推定される土壤乾燥化(ここでは「水ストレス」という。)及び食葉昆虫(ブナハバチ)による食害についても検討する必要がある。酸化ストレス、水ストレス及び食用昆虫による食害ストレスそれぞれによる葉の遺伝子発現変化から、ブナのストレスを評価する手法を開発することを目的に、今回は、水ストレスを曝露して生育したブナ実生苗について葉の遺伝子発現変化を検討し、既報(武田・十河, 2019)で報告した酸化ストレスに対する遺伝子発現変化との比較を実施したので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 各種ストレス曝露及び試料採取

(1) 酸化ストレス

丹沢産日本ブナ(*Fagus crenata* Blume f. *grandifolia* (Nakai) Hayashi) 2年生実生苗に対する酸化ストレスの曝露は、東京農工大学(東京都府中市晴見町3丁目8-1)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℃, 17時~翌9時まで18℃に設定)を用いて行った。オゾン区では、丹沢山地のブナ着葉期の平均オゾン濃度(武田ら, 2013)に近い50 ppbのオゾンを9時~17時まで曝露した。また、前室でオゾンと α -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, 過酸化水素平均濃度約2.7 ppb)。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。

各区内で2年半生育したブナ実生苗について、8月に各区における平均サイズのブナ実生苗を2個体選定した。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、mRNAの分解を防止するため、RNAlater(Qiagen社製)で満たして4℃で一晩静置した後、分析まで-20℃で冷凍保存した。

(2) 水ストレス

京都府立大(京都府京都市左京区下鴨半木町1-5)のガラス室内(強制換気, 日照時間等無調整)において2年生ブナ実生苗を生育し、展葉後の5月より灌水を開始した。水ストレス区では、週1回灌水し、対照区では毎日灌水を行った。10月に各区内で生育したブナ実生苗について、各区における平均サイズのブナ実生苗を3個体選定し、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2.1(1)と同様にRNAlater中で分析まで冷凍保存した。

2.2 cDNA の調整

mRNAは非常に分解されやすく、実験上扱い難いため、mRNA情報を持ち、分解されにくい相補的DNA(cDNA)を合成する必要がある。それぞれの葉試料は液体窒素中で粉碎し、50 mg程度の凍結粉碎試料を2 ml マイクロチューブに移した。E.Z.N.A.™ Plant RNA Kit(OMEGA Bio-tek社製)を用い、製品に添付のマニュアルに従い凍結粉碎試料中のすべてのRNA(Total RNA)を抽出した。続いてPrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ社製)を用い、Total RNA中のmRNAを選択的にcDNAに逆転写した。

2.3 primer セットの設計

京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターが運営するDBGET Search<<https://www.genome.jp/dbget/>>で検索した日本ブナ、近縁種のヨーロッパブナ(*Fagus sylvatica* L.), 日本グリ(*Castanea crenata* Siebold et Zucc.), ヨーロッパグリ(*Castanea sativa* Mill.)のmRNAの塩基配列から、細胞壁(セルロース)合成酵素など、ストレス応答に関与しないと考えられるものを除外し、残りのmRNAについて検討を行った。それぞれのmRNAについて、100 bp程度の部分配列を増幅できる特異的primerセット(DNAを合成するのに必要な短いDNA断片1対)を設計した。特異的primerセットの設計はDBGET SearchのPick Primers機能あるいはオンラインソフトPrimer3<<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>>を使用した。

水ストレスの防御機構にかかわるmRNAについては、日本ブナの塩基配列が明らかとなっていないものがほとんどであるため、相同性解析を実施した。GenBank<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>

で水ストレスの防御機構にかかわる mRNA について塩基配列を検索し、植物種が異なっても塩基配列が保存されている部分をターゲットに特異的 primer セットを設計した。

2.4 相対定量

2.2 で示した方法により、検量線作成用にブナの葉から抽出した Total RNA 中の mRNA を cDNA に逆転写した。std-1 として 5 倍量の cDNA, std0 として当倍量の cDNA, std1~4 として 5ⁿ (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 2.3 で設計した特異的 primer セットを用い、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。希釈倍率 (n=1~4) を横軸に、Threshold まで増幅するのにかった PCR サイクル数を縦軸にとり、検量線を作成した。

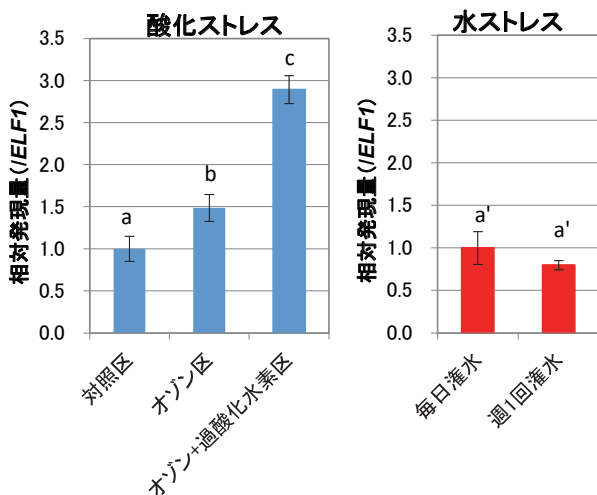
各葉試料につき 3 回繰り返し分析を行い、Threshold まで増幅するのにかった PCR サイクル数の平均値を求め、検量線から希釈倍率 (n) を導出し、cDNA 相対量を算出した。実験誤差の影響を小さくするため、ストレスによる発現量変化が比較的小さいハウスキーピング遺伝子についても同様に算出し、それぞれの mRNA の発現量はハウスキーピング遺伝子の発現量で除して使用した。ハウスキーピング遺伝子は、一般的によく使用されている伸長因子 *ELF1a* (elongation factor 1 alpha-like protein) を用いた。ストレスごとの有意差検定は、統計ソフト SPSS 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。なお、mRNA は *ELF1a* のようにイタリック体、翻訳されたタンパク質は *ELF1a* のようにブロ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. 実験結果及び考察

3.1 各ストレスを曝露したブナ葉における mRNA 発現量の相対定量結果

既報(武田・十河, 2019)で述べたとおり、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)、鉄イオンを持つもの (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 (Alscher *et al.*, 2002)。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 1 に各ストレスを曝露したブナ葉における *Fe-SOD* 及び *APX* の対照を 1 とした相対発現量を示す。酸化ストレスを曝露したブナ葉の *Fe-SOD* は、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対照区と比較して有意に発現量が上昇し、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。*Cu,Zn-SOD* や *Mn-SOD* は相対発現量の上昇は見られなかったことから(データ示さず)、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生じていることが示唆された。一方、水ストレス条件下のブナ葉では、いずれの SOD も相対発現量変化は見られなかった。*APX* の相対発現量も同様に、酸化ストレス処理では有意に発現量が上昇し、*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生

(a) *Fe-SOD*



(b) *APX*

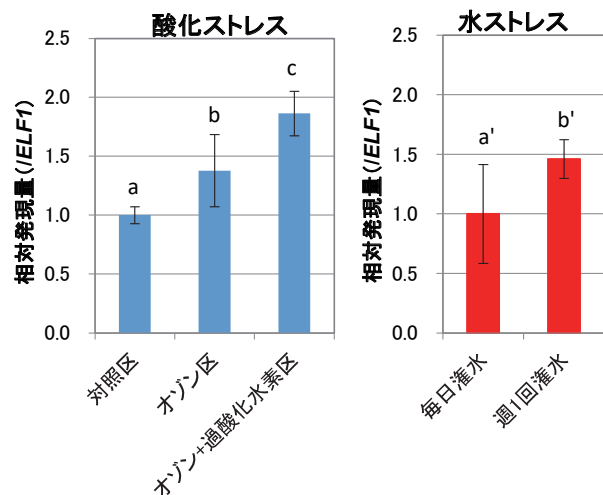


図 1 酸化ストレス及び水ストレス条件下のブナ葉の活性酸素消去系遺伝子発現変化。
(a) *Fe-SOD* (b) *APX*. バーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは有意に差があることを示す (p<0.05).

じており、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。水ストレスを与えたブナ葉でも、APXの相対発現量はオゾン区と同程度に上昇していた。

水不足は気孔閉鎖を引き起こし、細胞間二酸化炭素濃度を低下させ、光合成を阻害する。気孔閉鎖が長引くことによる二酸化炭素の制限は、光合成電子輸送成分の減少を招き、酸素分子を減少させて活性酸素種を生じさせ、光合成系にダメージを与える(Lawlor and Cornic, 2002)。Jiang *et al.* (2010)は、乾燥地域に生育する多年生植物プレーリージュングラスの水ストレス耐性及び水ストレス感受性の2つの遺伝型について、水ストレス条件下でCAT(カタラーゼ)及びCu,Zn-SODの発現量に変化はなかったとしている。また、両遺伝子型とも、APXの発現は上昇したとしており、今回の結果と矛盾しない。Naing *et al.* (2022)は、水ストレスによりペチュニアの葉においてCATの発現は有意に上昇し、SODの有意な変動は観察されなかったとしている。水ストレスに対する抗酸化酵素活性は、ストレス条件や植物種によって、上昇したり、減少したり、変化しない場合があり(Jiang *et al.*, 2010)、今回、水ストレスを与えたブナ葉では、一部を除き、ほとんどの抗酸化反応の活性化は示されなかった。

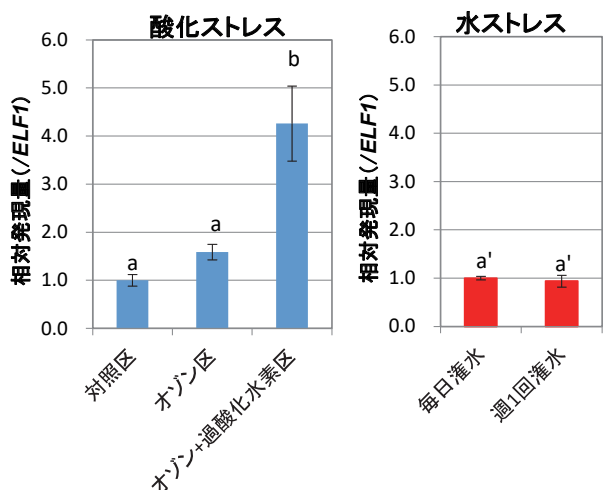
また、SODによるオゾン等酸化性物質の消去反応により生成した過酸化水素が細胞内情報伝達物質となり、植物体内でエチレンあるいはサリチル酸の生合成が起こることが知られている。エチレン生合成系に関わるACS(ACC合成酵素、ACC:1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸)ファミリー及びACO(ACC酸化酵素)ファミリー、また、生成したエチレンがエチレン受容体(ERS1:エチレンレスポンスセンサー-1など)に結合することによって起こるエチレン応答に関わる酵素なども、オゾン+過酸化水素区

で有意に発現量が上昇していた(図2)。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合成及びエチレン応答、サリチル酸生合成(データ示さず)の活性化が起こっていることが示唆された一方で、水ストレスを与えたブナ葉では、これらの相対発現量の上昇はすべて見られなかった。Zhang *et al.* (2015)は半乾燥地域に適応した多年生低木フィジックスナットの葉で、水ストレスによってACOやERSなどの発現が有意に上昇していたとしており、水ストレスを与えた植物でエチレン生合成が起こることが報告されている場合もあるが、今回ブナ葉ではエチレン生合成及びエチレン応答、サリチル酸生合成の活性化は見られなかった。

3.2 相同性解析による特異的 primer セットの設計及び塩基配列決定結果

ブナのストレス評価を行うためには、酸化ストレスだけでなく、水ストレスに特異的な挙動を示す遺伝子を探す必要がある。水ストレスを受けた植物で起こることが想定される防護応答にはABA(アブシジン酸)依存性経路とABA非依存性経路があり、気孔を閉鎖し水の蒸散を防ぐ応答と、細胞の浸透圧調整作用を有し、水ストレス防御に働く適合溶質を誘導する応答を活性化させる。日本ブナの遺伝子配列情報は無いが、水ストレスに関与することが広く知られているABA非依存性経路のDREB(Dehydration-Responsive Element Binding Protein)について検討を行った。GenBankでDREB, mRNAで検索し、遺伝子配列情報が多かった木本植物であるマルバグワ(*Morus notabilis* C.K.Schneid)で相同性解析を行った。植物種が異なっても配列が保存されている部分をターゲットとし、特異的 primer セットを設計した。マルバグワで遺伝子情報が公開されているDREBファミリー30種のうち、特異的 primer セットが設計できたのがDREB1B, DREB2A, DREB2B,

(a) ACO1



(b) ERS

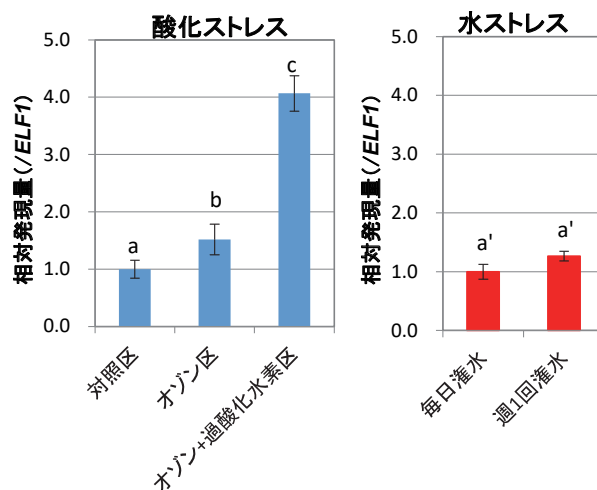


図2 酸化ストレス及び水ストレス条件下のブナ葉のエチレン生合成系及びエチレン応答遺伝子発現変化。(a)ACO1 (b)ERS。バーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは有意に差があることを示す(p<0.05)。

DREB2F, *DREB4D* の5種類であった。作成した primer セットを用い、ブナで該当部分の増幅が確認されたのは *DREB2F* のみであった。PCR 産物を精製し、塩基配列の決定を行ったところ、今回の特異的 primer セットで増幅された 100 塩基程度の部分配列のうち、元のマルバグワの配列と異なったのは 1 割程度であり、概ね塩基配列は保存されていることが明らかとなった(表 1)。決定された日本ブナの 100 塩基程度の配列を再度検索したところ、マルバグワの他、コルクガシやバレーオークなど多くの植物の *DREB2F* と 98% 以上の相同性が示され、今回の特異的 primer セットにより間違いなく日本ブナの *DREB2F* が増幅されていることが確認できた。一方、ABA シグナル伝達経路に関連する *SnRK2* (SNF1 関連リン酸化酵素) についても同様にシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *SnRK2* ファミリー 8 種、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) の *SnRK2* ファミリー 6 種、トウモロコシ (*Zea mays* L. subsp. *mays*) の *SnRK2* ファミリー 2 種で相同性解析を実施したが、ブナで該当部分を増幅することができなかった。

3.3 水ストレスを与えたブナ葉における mRNA 発現量の相対定量結果

2.1(2)で水ストレスを与えたブナについて、3.2で primer セットを設計した *DREB2F* を始め、水ストレスに関与する遺伝子の mRNA について、リアルタイム PCR による相対定量を行った。

植物は水ストレスを受けると急速に ABA を生合成する。ABA はゼアキサンチンからキサントキシンを経て生合成され、この生合成系に関わる酵素が *ZEP*

(ゼアキサンチンエポキシダーゼ)や *NCED* (9-cis-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ)である。*PP2C* (プロテインフォスファターゼ 2C) は ABA シグナル伝達経路のネガティブレギュレーターであり、ABA 非存在下では、*PP2C* は *SnRK2* と物理的に相互作用し、不活性化する。ABA 存在下では、ABA が結合した受容体が *PP2C* と複合体を形成し、*PP2C* が *SnRK2* から解離して、*SnRK2* の自己リン酸化による活性化が可能になる。活性化された *SnRK2* は、下流のシグナル伝達因子を活性化させ、ストレス応答性遺伝子やイオンチャネルをコードする遺伝子の発現が調節され、気孔の動きが制御される。図 3 に水ストレス条件下のブナ葉における *ZEP*, *NCED* 及び *PP2C* の対照を 1 とした相対発現量を示す。水ストレス条件下のブナ葉では、*ZEP* 及び *NCED* は有意に発現が低下していた。*PP2C* の相対発現量は変化がなかった。*SnRK2* については、相同性解析を実施したが、ブナで該当部分を増幅することができなかった。すなわち、今回、水ストレス条件下のブナ葉では、ABA 生合成系及び ABA シグナル伝達経路がともに活性化していなかった可能性が示唆された。しかし、水ストレスを与えた植物で *NCED* の発現量が上昇するのは、シロイヌナズナの葉及び根 (Zhang *et al.*, 2015) やインゲンマメの葉及び根 (Qin *et al.*, 1999) など多くの植物で報告されている。*PP2C* についても、Zhang *et al.* (2015) は多年生低木フィジックスナットの根や葉で、水ストレスによって発現上昇がみられたとしており、今回の結果と矛盾する。一方、*DREB2F* については、水ストレス条件下のブナ

表 1 マルバグワ (*Morus notabilis*) 及びブナ (*Fagus crenata*) の *DREB2F* の部分塩基配列。赤字は異なる塩基を示す。

植物種	塩基配列
マルバグワ (<i>Morus notabilis</i>)	AAGCCATGGAAGAAAGGCCCAACAAGAGGCCAAAGGTGGGCCACTGAACGCCTCATGCGAGTATCGAGG AGTAAGACAAAGAACATGGGGCAAATGGGTG
ブナ (<i>Fagus crenata</i>)	AAGCCATGGAAGAAAGGCCCAACAAGAGGCCAAAGGTGG CCCTC AGAACGCCT CGTGT GAGTATCG TGG TGTTC GACAAAGAACATGGGGCAAATGGGTG

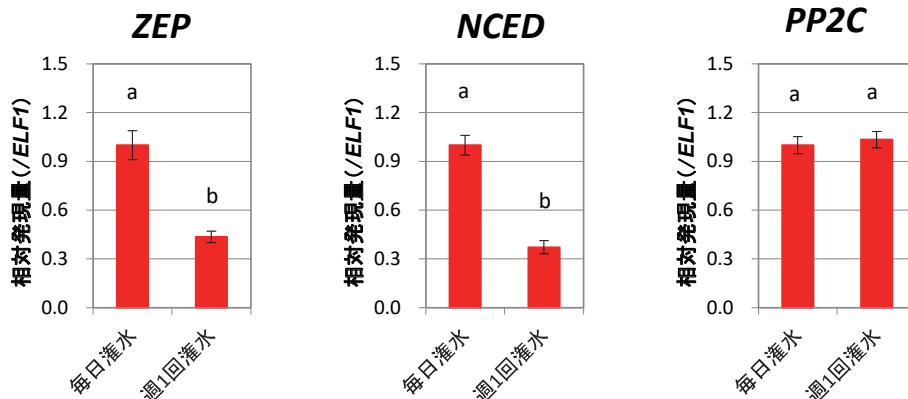


図 3 水ストレス条件下のブナ葉の ABA 生合成系及び ABA 応答遺伝子発現変化。バーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは有意に差があることを示す ($p < 0.05$)。

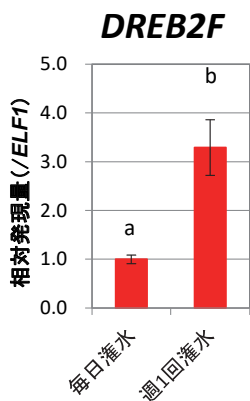


図4 水ストレス条件下のブナ葉の *DREB2F* 遺伝子発現変化。

バーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは有意に差があることを示す ($p < 0.05$)。

葉で有意に発現量が上昇していた(図4)。Zhang *et al.* (2015)もフィジックスナットの葉で、水ストレスによって *DREB2C* が強く発現上昇したとしている。

水ストレス条件下のブナ葉の遺伝子発現解析結果から、ブナではABA依存性経路を介した応答に係る遺伝子の発現上昇は見られず、ABA非依存性経路を介した応答に係る遺伝子のみ発現量が上昇していた。ただし、今回、根の遺伝子発現解析は実施していないことから、根でABA生合成系が活性化していた可能性は否定できない。ABAシグナル伝達応答についても、*PP2C*や*NCED*にはいくつかの種類があるため、ブナで遺伝子配列が明らかにされている*PP2C*及び*NCED*が水ストレスに関与する酵素ではなかった可能性もある。また、活性酸素消去系が活性化していなかったことから、週1回灌水という今回の水ストレスはブナにとってシビアではなかった可能性もある。ただし、*DREB2F*については、今回程度の水ストレスに応答したことから、今後酸化ストレスに対する応答を検討したうえで、ブナの水ストレス評価に使用できる可能性が示唆された。

4. まとめ

酸化ストレス及び水ストレスを曝露した日本ブナの葉を用いて遺伝子発現解析を実施し、遺伝子発現差異について検討した。その結果、以下の知見を得た。

(1)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*)の発現が上昇していた。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*ERS*)に係る遺伝子群も発現量が上昇していた。一方で、水ストレスでは、これらの遺伝子群の発現は、一部上昇もみられたものの、ほとんど

が変化していなかった。

(2)水ストレスにより遺伝子発現が活性化すると考えられるABA非依存性経路の*DREB*及びABA依存性経路の*SnRK2*について相同性解析を実施し、ブナ以外の遺伝子配列から植物種が異なっても配列が保存されている部分をターゲットに特異的primerセットを作成した。*DREB*については、マルバグワの*DREB2F*からブナで該当部分を増幅できる特異的primerセットの作成に成功し、決定した塩基配列から日本ブナの*DREB2F*が増幅されていることが確認できた。一方、*SnRK2*については、ブナで該当部分を増幅することができる特異的primerセットは作成できなかった。

(3)水ストレス条件下のブナ葉では、ABA生合成系のmRNA(*ZEP*や*NCED*)の発現は有意に低下し、ABAシグナル伝達経路に係るmRNA(*PP2C*)の発現は変化していなかった。一方、ABA非依存性の*DREB2F*については、発現が活性化していた。

今回、水ストレス応答に係る遺伝子について、日本ブナでの塩基配列がほとんど明らかとなっていない中で、ABA非依存性経路の*DREB2F*の特異的primerセットが作成され、日本ブナで該当部分の増幅が確認できた。さらに水ストレスに応答してその発現量が上昇することを確認した。これが水ストレスに特異的な応答であることが確認できれば、丹沢山地におけるブナ葉の水ストレスの有無を評価する項目として使用できる可能性がある。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が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。水ストレス実験に関しては、京都府立大学の上田研究室(当時)の学生諸氏にご協力いただいた。ここに関係諸氏に謝意を表す。本研究は、国立環境研究所と地方環境研究所等との第II型共同研究No.3の一環として実施した。

引用文献

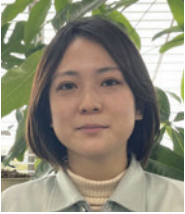
- Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Betz, G. A., Knappe, C., Lapierre, C., Olbrich, M., Welzl, G., Langebartels, C., Heller, W., Sandermann,

- H. and Ernst D. (2009) Ozone affects shikimate pathway transcripts and monomeric lignin composition in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Research*, 12(2), 109-116. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0216-8>
- Glick, R. E., Schlagnhauser, C. D., Arteca, R. N. and Pell, E. J. (1995) 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. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.891>
- Jiang, Y., Watkins, E., Liu, S., Yu, X. and Luo, N. (2010) Antioxidative responses and candidate gene expression in prairie junegrass under drought stress. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 135(4), 303-309. <https://doi.org/10.21273/JASHS.135.4.303>
- 神奈川県自然環境保全センター(2016)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, 14. https://www.pref.kanagawa.jp/docs/f4y/kankoubutsu/center_hokoku/14.html(2022年7月25日確認)
- 越地 正・鈴木 清・須賀一夫(1996)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. https://www.agri-kanagawa.jp/sinrinken/info_hokoku/gyoum_22all.pdf(2022年7月25日確認)
- Lawlor, D. W. and Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plants, Cell and Environment*, 25(2), 275-294. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x>
- Moeder, W., Barry, C. S., Tauriainen, A. A., Betz, C., Tuomainen, J., Utriainen, M., Grierson, D., Sandermann, H., Langebartels, C. and Kangasjärvi, J. (2002) 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 Physiology*, 130, 1918-1926. <https://doi.org/10.1104/pp.009712>
- Naing, A. H., Campoll, J. R., Kang, H., Xu, J., Chung, M. Y. and Kin C. K. (2022) Role of ethylene biosynthesis genes in the regulation of salt stress and drought stress tolerance in *Petunia*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.844449>
- Nunn, A. J., Anegg, S., Betz, G., Sions, S., Kalosch, G., Seidlitz, H. K., Grams, T. E. E., Häberle, K.-H., Matyssek, R., Bahnweg, G., Sandermann, H. and Langebartels C. (2005) Role of ethylene in the regulation of cell death and leaf loss in ozone-exposed European beech. *Plant, Cell and Environment*, 28, 886-897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01339.x>
- Qin, X. and Zeevaart, J. A. D. (1999) The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15354-15361. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15354>
- 佐治 光(2018)オゾン等の大気汚染物質に対する植物の応答に関与する遺伝子とその機能. 大気環境学会誌, 53(2), 36-44. <https://doi.org/10.11298/taiki.53.36>
- 武田麻由子・相原敬次(2007)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. https://doi.org/10.11298/taiki1995.42.2_107
- 武田麻由子・小松宏昭・岡 敬一・阿相敏明(2013) 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. <https://www.pref.kanagawa.jp/documents/3105/h25bull04.pdf>(2022年7月25日確認)
- 武田麻由子・十河孝夫(2019)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. 神奈川県環境科学センター研究報告, 42, 8-15. <https://www.pref.kanagawa.jp/documents/60011/r01bull02.pdf>(2022年7月25日確認)
- 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(2007)ブナ林の再生に向けた総合解析. 丹沢大山総合調査団(編), 丹沢大山総合調査学術報告書, 703-710, 平岡環境科学研究所, 神奈川県相模原市.
- Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., Li, M., Jiang, H. and Wu, G. (2015) Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress. *BMC Plant Biology*, 15, 17. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0397-x>



武田 麻由子 / Mayuko TAKEDA

神奈川県環境科学センター 調査研究部水源環境担当主任研究員。1994年東京大学工学部化学工学科卒業。1997年東京大学工学系研究科化学生命工学専攻修士課程修了。1997年4月神奈川県入庁、環境科学センター配属。有害大気汚染物質やPM2.5など大気汚染の調査に取り組むとともに、オゾン等の大気汚染物質が樹木へ及ぼす影響について研究を行う。



丸山 朋見 / Tomomi MARUYAMA

神奈川県環境科学センター 調査研究部水源環境担当。2016年神奈川県大学工学部物質生命化学科卒業。2016年4月某金属加工油メーカーに入社、金属加工油と切花延命剤等の開発に従事。2021年より現職。同所属武田主任研究員のもと、丹沢山地のブナ林へのストレス評価を行っている。



青野 光子 / Mitsuko AONO

国立環境研究所 生物多様性領域副領域長 / 環境ストレス機構研究室室長。1987年筑波大学第二学群生物学類卒業。1988年筑波大学環境科学研究科中途退学、国立公害研究所入所。1996年東京工業大学にて博士(理学)取得。2021年より現職。筑波大学グローバル教育院教授併任。オゾン等の大気汚染物質の植物影響とそのメカニズムに注目し、主として分子生物学的な観点からの研究に取り組む。