

## 論文の内容の要旨

論文題目 The Mechanism of PAN Injury and PAN Sensitivity in *Petunia hybrida* Vilm.  
(ペチュニアの大気汚染物質(PAN)障害及び感受性のメカニズムに関する研究)

氏名 岡 恵利佳

大気汚染物質ペルオキシアセチルナイトレート(PAN)は、光化学二次汚染物質(光化学オキシダント)の一種である。PANを含む光化学オキシダントの量は現在も横這いか若干増加傾向にある。また、PANは5ppb以下の低濃度で植物に可視障害を引き起こすため、都市やその近郊では今後もPAN障害が見られるであろうと予想される。

PAN障害には、他の大気汚染物質による障害とは異なる様々な特徴がある。野外における主なPAN障害は葉に銀色やブロンズ色の光沢が現れる金属光沢化と呼ばれるPANに特有の現象である。その他に脱水症状や退色も観察される。また、PAN処理開始から障害発生に至るまでの時間が他の大気汚染物質と比較して非常に長い。更に、PAN障害は展開途中の若い限られた葉にしか現れず、展開を終えるとPAN耐性を示すようになることも特徴的である。つまり、一つの植物個体の中でも葉によってPAN感受性が異なるのである。この特徴を利用すれば、一個体の中でPAN感受性葉とPAN耐性葉の比較をすることによりPAN感受性のメカニズムを解明できると考えた。

PAN感受性が高い植物として知られているのが *Petunia hybrida* Vilm.である。このペチュニアを用いた修士課程の研究で、PAN障害にいたる過程では光を必要とする反応と必要としない反応が起こっていることが示され、障害発生部位の形態学的解析などから、PAN障害への活性酸素の関与が示唆された。しかし、PAN障害に至るメカニズムと植物の持つPAN障害からの防御機構はどちらも未だ解明されていない。

本研究では、ペチュニアにおける葉の成熟に伴ったPAN感受性の変化を利用して、PAN感受性葉におけるPAN障害の発生機構、及びPAN耐性葉におけるPAN障害からの防御機構について明らかにすることを目的とした。中でも、植物の様々なストレス応答に関与する2つの物質、活性酸素とエチレンの挙動を解析することにより、PANに対する応答の解明に迫ることを目指した。

本研究ではペチュニアのホワイトチャンピオン(WHITE)とブルーチャンピオン(BLUE)を実験材料として使用した。

## <第1章 葉の成熟に伴う PAN 感受性の変化と気孔の発達との関係>

0.7 ppm 前後の濃度の PAN に 1 h さらしたペチュニアの葉を切り取り、マイクロプレート上でインキュベートすると、PAN 処理開始から 4 ~ 8 h で脱水症状が現れ始めた。脱水が進行した葉では生重量の減少がみられた。そこで、葉の成熟による PAN 感受性の変化を、脱水による生重量変化を指標として測定した (Fig. 1 C)。Fig. 1A のように定義した leaf number を横軸に示すと、leaf number 3 以下の葉には生重量の減少が見られないが、leaf number 6~9 あたりで感受性のピークを迎え、leaf number 10 以上になると葉は再び耐性になることが明らかになった。また、障害発生前に測った生重量 (Fig. 1B) が最大の葉の前後で、感受性から耐性への変化が起こることが分かったため、生重量が最大の葉を基準として、それより leaf number が小さく、かつ leaf number 4 以上の葉を“感受性の葉”、大きい葉を“耐性の葉”として今後の解析に用いることにした。PAN 障害の発生部位は、leaf number が進むにしたがって、先端のみの障害から葉の中央部へ、そして葉の基部のみの障害、というように移動することが示され、PAN 感受性が 1 枚の葉の中におけるわずかなエイジの違いによって厳密に制御されていることが分かった (Fig. 2)。

このような PAN 耐性→感受性→耐性という変化をもたらす要因として、気孔からの PAN 吸収量の違いが考えられる。そこで、葉を透明化し、葉表面の気孔装置の顕微鏡観察を行ない、気孔の発達について調べた。孔辺母細胞やまだ気孔が形成されていない若い孔辺細胞から成る気孔装置をステージ I、気孔が観察される気孔装置をステージ II としてカウントしたところ、葉の先端の気孔装置は基部の気孔装置よりステージ II のへ発達が早く、ステージ II が全体の 90 % を占めるようになる leaf number と耐性から感受性への変化はほぼ一致した (Fig. 3)。

PAN 処理に先立って ABA を根から処理し気孔の閉鎖を誘導すると、感受性の葉の可視障害が抑制された (Fig. 4)。PAN 耐性から感受性への変化には、気孔の発達による PAN 吸収量の増加が関与していることが示唆された。気孔を開かせる効果のある薬剤フシコクシンを葉にスプレー処理し気孔を開孔させて PAN にさらしても、耐性の葉は開孔とは無関係に耐性を示した (Fig. 4)。耐性の葉は吸収した PAN を解毒する機構を獲得している可能性が示唆された。

PAN 障害が起こる一因であると考えられている活性酸素に対する耐性を比較した。葉内でスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を発生させる薬剤であるパラコート処理したリーフディスクにおけるクロロフィル a の分解は、感受性の葉の方が顕著であった (Fig. 5)。この結果から、活性酸素耐性の獲得が PAN 耐性にも関与している可能性が示唆された。

## <第2章 PAN 障害における活性酸素の関与>

活性酸素が PAN 障害の発生に関与している可能性を検証するため、活性酸素の発生を抑えることを試みた。PAN 処理後のペチュニアを窒素通気装置に入れて嫌気条件下で培養したところ、PAN 障害はほぼ完全に抑制され (Fig. 6)、活性酸素の生成が PAN 障害の発生に関与していることが示唆された。次に、PAN にさらした葉を用いて、活性酸素のうち  $O_2^-$  と過酸化水素を染色により観察した。その結果、PAN 処理した感受性の葉の葉肉細胞に、PAN 障害に先立って  $O_2^-$  を示す染色が見られた (Fig. 7)。PAN 障害が発生した後には  $O_2^-$  はみられず、過酸化水素の染色がみられた (Fig. 7)。耐性の葉には感受性の葉のような PAN 処理による活性酸素の増加はみられなかった。感受性の葉にのみ、葉肉細胞に活性酸素の蓄積が引き起こされたことから、感受性の葉と耐性の葉の活性酸素消去系に違いがあるのではないかと考えた。活性酸素消去系の主な酵素、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、グルタチオンレダクターゼ (GR)、カタラーゼ (CAT) 及び葉の総ペルオキシダーゼ (POX) の活性を測定したところ、耐性の葉において感受性の葉より高い活性がみられたのは SOD と CAT、POX であった (Fig. 8)。また、これらの酵素のうちでも耐性の葉の POX 活性が非常に高いことが明らかになった。

## <第3章 PAN 障害におけるエチレンの関与>

植物ホルモンのエチレンは、様々なストレス応答において障害の促進効果が報告されており、PAN 障害におけるエチレンの効果にも興味を持たれる。PAN にさらした葉から放出されたエチレンを経時的に測定した結果、PAN 処理開始 6-8 h から、障害発生 (脱水) とほぼ並行してエチレン生成が始まることが示された (Fig. 9)。クロロフィルの分解はエチレン生成の開始より約 20 h 遅れて始まった。PAN にさらした葉にエチレンの受容阻害剤ノルボルナジエン (NBD)

を処理したところ、障害が抑制されたため、エチレンが PAN 障害を促進する効果を持つことが示唆された (Fig. 10)。

<まとめ>

本研究により、活性酸素とエチレンはどちらも PAN 障害に関与していることが示された。しかし、活性酸素の蓄積とエチレン生成、及び PAN による被害症状の時間経過は独特であった。PAN 障害の発生過程は、① 可視障害発生に先立つ  $O_2^-$  の蓄積、② 脱水と並行して起こる過酸化水素の蓄積とエチレンの生成、③ クロロフィルの分解 という少なくとも3つの段階に分かれていた。この結果から、 $O_2^-$  の蓄積は、直接的には PAN による脱水の引き金とはならないことが示唆された。 $O_2^-$  から過酸化水素の蓄積への変化が障害発生のカギとなっていることが考えられる。脱水が発生するまでの過程としては、 $O_2^-$  と過酸化水素の反応により生成する OH ラジカルの関与や、 $O_2^-$  による過敏感細胞死の誘導などが考えられるが、更なる検証が必要である。 $O_2^-$  と過酸化水素の蓄積に明確な時間差があったこと、また、エチレンの生成がオゾンや二酸化硫黄に対する反応と比べて非常に遅かったことなどは、今後、これらの物質それぞれの役割を解明するのに役立つであろう。

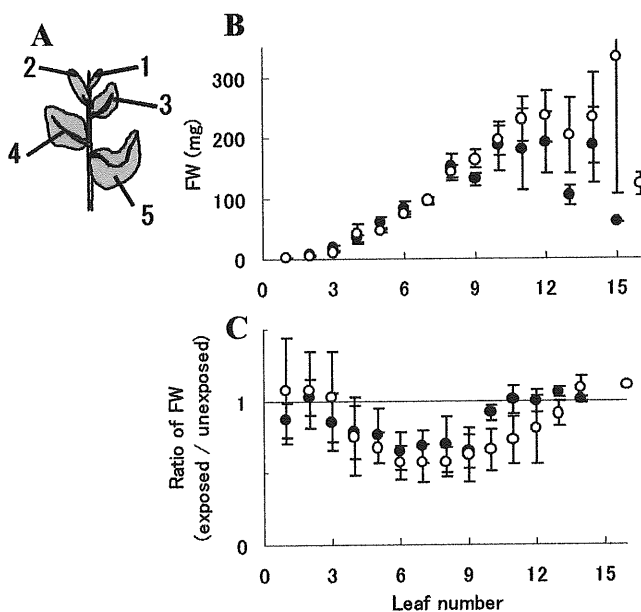


Fig. 1 葉の成熟に伴うPAN感受性の変化  
展開を始めた最も若い葉を1とし、若い方から古い方へ数えた葉の番号をleaf numberとした(A)。各leaf numberのBLUE(●)とWHITE(O)の葉の生重量(B)とPAN障害による生重量の変化(C)を示した。leaf number 1~3ではPAN耐性、leaf number 6~9あたりでは感受性を示し、leaf number 11 (BLUE)・14 (WHITE)で再び耐性を示すようになった。

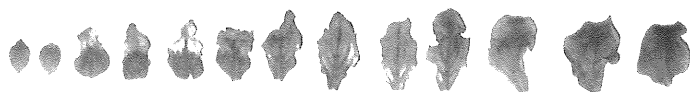


Fig. 2 PAN障害発生部位の変化  
PAN障害発生部位は、leaf numberにしたがって葉の先端から中央、基部へと移っていった。

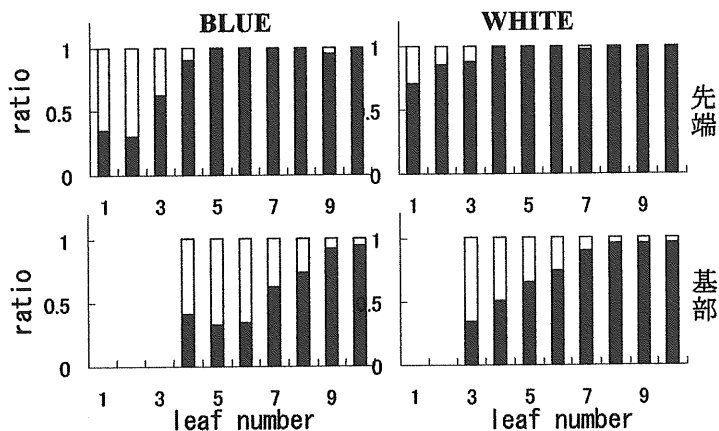


Fig. 3 気孔の発達  
葉を3等分して先端と基部の表層を微分干渉顕微鏡で観察し、孔辺母細胞あるいは一対の孔辺細胞の間に気孔が形成されていない気孔装置をステージI(□)、気孔の見られる気孔装置をステージII(■)としてカウントし、ステージIの気孔とステージIIの気孔の比率を示した。ステージIIの増加は基部より先端の方が早く、PAN耐性から感受性になるleaf numberとステージIIの出現の間には相関がみられた。

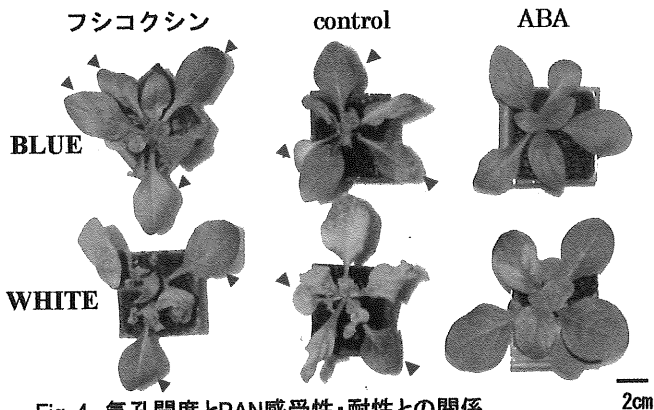


Fig. 4 気孔開度とPAN感受性・耐性との関係  
ABAを処理して気孔の開鎖を誘導した後にPANにさらすと、PAN感受性の葉の障害が抑制された。一方、開孔を誘導するフシコクシンを処理しても、PAN耐性の葉には障害が起らなかった。赤い矢頭は障害の起きなかった耐性の葉を示す。

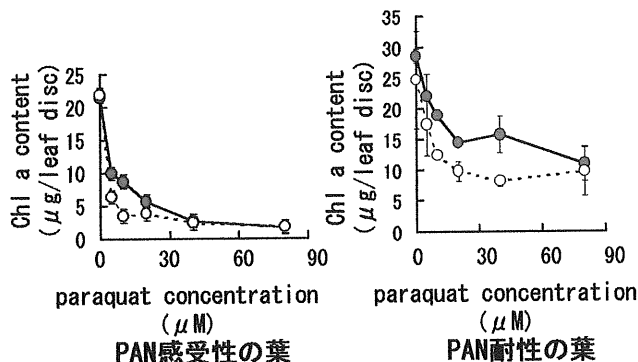


Fig. 5 パラコート耐性の変化  
活性酸素を生成する薬剤パラコートによるクロロフィルの分解は、BLUE(●)とWHITE(O)のどちらにおいてもPAN耐性の葉より感受性の葉の方が顕著であった。

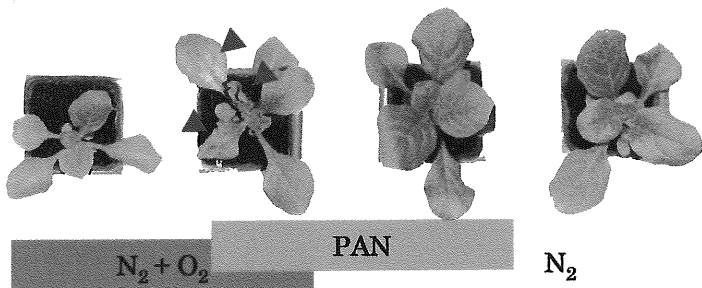


Fig. 6 嫌気条件によるPAN障害の抑制  
PAN処理直後のペチュニアを窒素通気装置を用いて嫌気条件に置くと、PAN障害(ピンクの矢頭)が抑制された。  
N<sub>2</sub> : 嫌気条件、PAN : PAN処理、N<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> : 窒素80%酸素20%

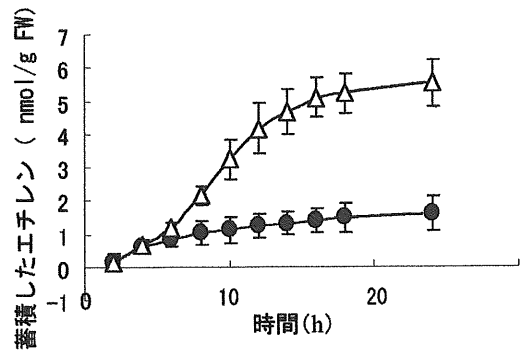


Fig. 9 PAN処理によるエチレンの生成  
エチレンの蓄積はPAN処理開始から6 h以降に顕著になった(△)。この時間は可視障害の発生時間と一致していた。●:コントロール

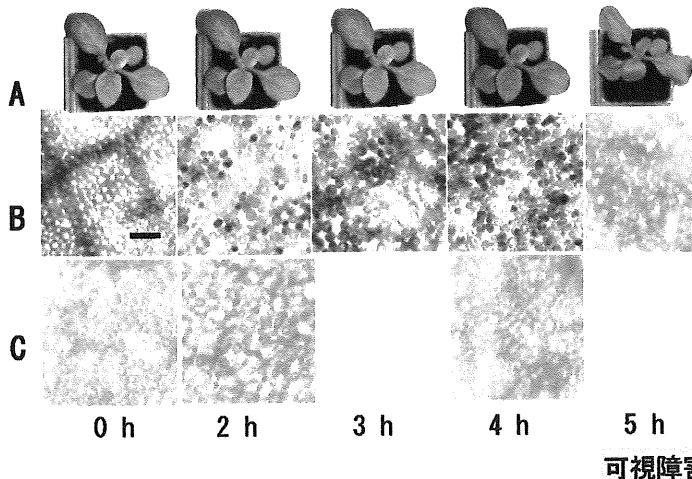


Fig. 7 PAN処理による活性酸素の生成  
PANにさらしたペチュニアの葉を用いて、B: NBT(ニトロブルーテトラゾリウム)によるスーパーオキシドの染色と、C: DAB(ジアミノベンジン)による過酸化水素の染色を行なった。Aにはそれぞれの時間に対応した植物体の写真を示す。スーパーオキシドの存在を示す青い染色はPAN処理から2 hですですみられ、可視障害発生以降にはみられなくなっていた。過酸化水素による茶色の染色は可視障害発生以降の組織にみられた。Bar: 50 μm

可視障害発生

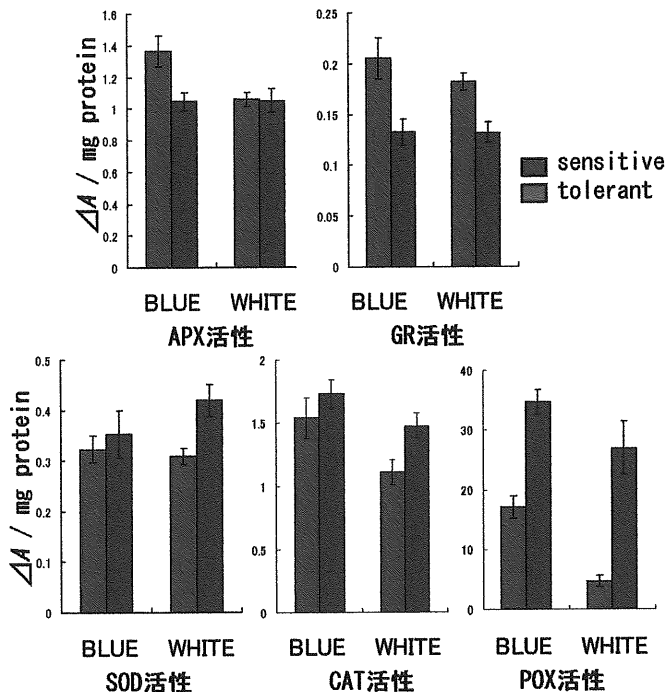


Fig. 8 活性酸素消去系関連酵素の活性  
APX(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ)、GR(グルタチオンレダクターゼ)の活性はPAN感受性の葉において耐性の葉より高い値を示した。SOD(スーパーオキシドジスムターゼ)CAT(カタラーゼ)、POX(総ペルオキシダーゼ)の活性はPAN耐性の葉において高く、PAN感受性から耐性への変化に関与している可能性があるのはSOD、CAT、POXであると考えられる。  
ΔA: 1分間における吸光度変化

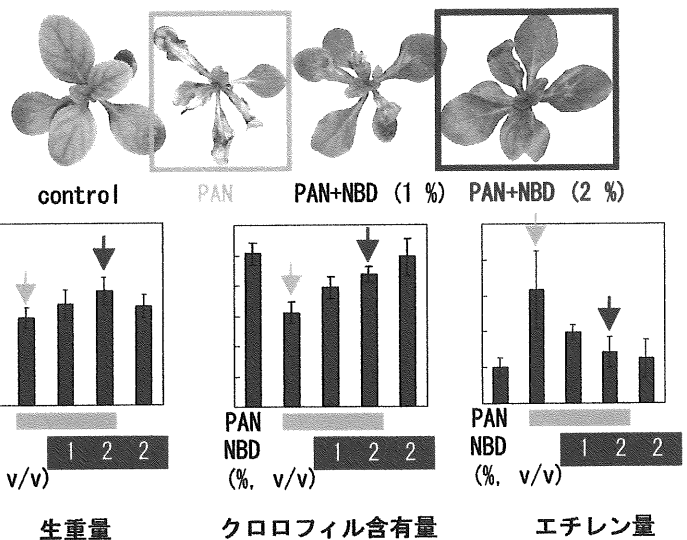


Fig. 10 PAN障害に対するNBD処理の影響  
PAN処理後の葉にエチレンの受容阻害剤であるNBD(ノルボルナジエン)を処理すると、可視障害、生重量の減少、クロロフィルの減少が抑制された。PAN処理後に発生するエチレンは、PAN障害を促進していることが示唆された。