

酸化ストレスに対する  
ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)  
葉内活性酸素除去系の応答

小川 匡之

報告番号 甲第 4964 号

①

酸性化ストレスに対する  
ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)  
葉内活性酸素消去系の応答

名古屋大学大学院生命農学研究科

林学専攻

森林環境資源学研究室

小川 匡之

2001年

## 目次

第1章 序論	1
1-1 酸性降下物の植物への影響	1
1-2 酸性化ストレスに対する植物の生理応答	4
1-3 生体内の活性酸素	5
1-4 ヒノキについて	8
1-5 本研究の目的	11
図表	13
第2章 ヒノキ葉内活性酸素消去系酵素活性の季節変化	14
2-1 緒言	14
2-2 材料と方法	14
2-2-1 実験系	14
2-2-2 植物材料	15
2-2-3 蒸留水霧暴露	16
2-2-4 酵素活性測定	16
2-3 結果	18
2-4 考察	18
図表	20
第3章 酸性霧ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の応答	23
3-1 緒言	23
3-2 材料と方法	26
3-2-1 実験系	26
3-2-2 植物材料	26
3-2-3 酸性霧暴露	26
3-2-4 酵素活性測定	28
3-2-5 葉内アスコルビン酸 (AsA) 濃度測定	29
3-3 結果	30
3-3-1 葉内酵素活性	30
3-3-2 葉内 AsA 濃度	32

3-3-3 可視障害	32
3-4 考察	33
図表	40
第4章 根圏 Al ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の応答	54
4-1 緒言	54
4-2 材料と方法	55
4-2-1 実験系	55
4-2-2 植物材料	56
4-2-3 Al 処理	57
4-2-4 樹高および器官別乾重比測定	57
4-2-5 酵素活性測定	58
4-2-6 根・葉内元素分析	58
4-2-7 葉内アスコルビン酸 (AsA) 濃度測定	59
4-3 結果	59
4-3-1 樹高および器官別乾重比	59
4-3-2 酵素活性	60
4-3-3 根・葉内元素	63
4-3-4 葉内 AsA 濃度	65
4-4 考察	66
図表	74
第5章 大沢・豊橋国有林野外調査	99
5-1 緒言	99
5-2 材料と方法	99
5-2-1 材料	100
5-2-2 3層分析	100
5-2-3 土壌 pH 測定	100
5-2-4 葉内酵素活性測定	101
5-3 結果	101
5-4 考察	102
第6章 総合考察	108
6-1 地上部への酸性化ストレス	108

6-2 地下部への酸性化ストレス	110
6-3 活性酸素消去系酵素と金属元素	113
6-4 地上部と地下部への酸性化ストレスの相互関係	114
6-5 活性酸素消去系の野外調査におけるストレス指標への応用の可能性	116
6-6 結論	117
図表	119
摘要	121
謝辞	128
引用文献	129

## 第1章 序論

### 1.1 酸性降下物の植物への影響

近年、大気汚染が一因と考えられている森林衰退が世界各地で観測されている (Vann *et al.*, 1995)。産業革命以降、人々は石油や石炭などの化石燃料を大量に使用し、その結果、硫黄酸化物(SO<sub>x</sub>)、窒素酸化物(NO<sub>x</sub>)などが排出されている。それらは大気中で反応し硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)・亜硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)や、硝酸(HNO<sub>3</sub>)・亜硝酸(HNO<sub>2</sub>)に変化し、雨や霧などに溶け込んだり、ガスや粒子のまま直接降下するなど酸性降下物となる。それらの酸性降下物は人体被害の他、土壌の酸性化や森林衰退、湖沼の酸性化など、自然環境に対してもさまざまな悪影響を与えることが知られている。このような酸性化問題は近年、地球温暖化、オゾン層の破壊とともに地球環境問題の一つとなっている (村野、1993a)。酸性雨被害とは、雨や雪、霧に溶けた大気汚染物質の湿性沈着と乾性沈着に起因した酸による土壌、植生、陸水、人体、文化財を含む建造物等への諸影響の事である。

四大公害病に代表されるように、1960年代の日本国内では高度経済成長に伴う公害が深刻な問題となった。日本の工業都市では激甚公害型の大気汚染が観測されたが、その後の排出量規制などの導入により硫黄酸化物(SO<sub>x</sub>)汚染は急速に改善された。これは

日本の環境保全行政の成功例として広く知られている。

大気中 SO<sub>2</sub> 濃度の年平均値の推移に注目すると、1960 年代は 0.06ppm あったが、70 年代後半に入ると 0.02ppm 以下になり、最近では 0.01ppm 以下となっている(環境白書、1998)。SO<sub>2</sub> 排出量動向は大気中濃度と整合的傾向にあり、排出量削減が大気中濃度低下に寄与してきたことが分かる。日本の酸性雨の原因物質については大陸からの飛来汚染が懸念されているが、電力中央研究所の観測によれば、日本の 21 地点単純硫黄換算乾湿沈着量は 1.4 g/m<sup>2</sup>年であり、乾性 4 割、湿性 6 割である。モデルシミュレーションによる、その起源別の推計では、日本の人工起源 4 割、日本の火山起源 2 割、大陸人工起源 4 割とされ、うち中国が 2 割強、韓国が 2 割弱程度である(Ichikawa and Fujita, 1995)。

NO<sub>2</sub> の改善は SO<sub>2</sub> ほど単純ではなく、その環境基準達成は特に大都市地域において困難である。これは自動車排気ガス測定局で高濃度の NO<sub>x</sub> が測定されていることから確認されるように、自動車からの寄与が大きいことが一因である。NO<sub>x</sub> 排出量の動向は、1980 年代半ばまでは、SO<sub>2</sub> ほど急速ではないが減少してきた。しかし、それ以降わずかながら増大に転じている(環境白書、1998)。

酸性雨が原因と推測される森林被害として、ヨーロッパでは、ドイツウヒ(*Picea abies*)、ヨーロッパモミ(*Abies alba*) や ヨーロッパブナ(*Fagus sylvatica*)の衰退が報告され(Scütt and Cowling, 1985; Blank *et al.*, 1988)、北アメリカでは、高地のアカミト



ウヒ(*Picea rubens*)の成長抑制が観測されている(Lovett and Kinsman, 1990)。日本では、関東・甲信地方や、関西・瀬戸内地方でのスギ(*Cryptomeria japonica*)の衰退が報告されている(梨本・高橋、1991)。

酸性雨による森林衰退は、酸性雨により窒素(N)が過剰に供給され、植物全体のバランスが崩れ、ストレスを受けるという説もあるが(野内、1994)、直接的影響と間接的影響の両方によるメカニズムが考えられている(村野、1993a)。土壌の酸性化によって、土壌粒子に吸着している  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ などの塩基性陽イオンが  $\text{H}^+$ に置換されて溶脱するため、植物に必要な土壌中の栄養元素量が減少する。また、さらに酸性化が進むと粘土の部分崩壊が起こり、粘土鉱物結晶の中で多量に固定化されている Al が交換性 Al となり、溶離しやすい状態となる。この交換性 Al は、中性から微アルカリ性では水酸化物  $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ を形成し不溶性の状態であるが、pH が低下すると  $\text{Al}^{3+}$ となり土壌水に溶け出し(松本、2000)、植物に及ぼす被害の一要因と考えられている。「現在までに得られている知見を基準にして、生態系に影響を及ぼさない汚染物質の負荷量」として臨界負荷量が定義づけられているが(Løkke *et al.*, 1996)、土壌酸性化による Al 毒性に関しては、土壌中 Al 濃度そのもの、Ca/Al モル濃度比、 $(\text{Ca}+\text{Mg}+\text{K}) / \text{Al}$  比があげられる(河野、1997)。その中で、Ca/Al 比=1.0 が有力な指標として提案されている(Cronan and Grigal, 1995)。土壌中の Ca 濃度が高ければ酸中和能力が高くなるが、土壌の酸中和能力を超えた酸性化が起こると顕著な被害が発生する恐れがあり、現在では酸性降下物に

よる影響が明らかでなくとも、土壌中に酸性物質が蓄積されれば日本でも数十年後に被害が顕在化する恐れがあると指摘されている。

近年、日本では、北関東赤城山や神奈川県大山での酸性霧、奥日光白根山での高濃度オゾン、福岡県宝満山での総合観測など、局地的な森林衰退の原因究明を目的とした観測・研究がなされており(高橋、1990)、状況証拠としての、環境汚染物質および樹木被害のデータは蓄積されつつある。しかしながら林木枯損のメカニズムにおいては、ガス状 SO<sub>2</sub> やオゾンなどの複合影響、乾燥ストレスなど気候条件の変動などのため、酸性沈着の影響・寄与を明らかにするのは現状では非常に困難である。今後、日本の森林の衰退を予測し、それを回避するためには、自然環境および人為的環境条件下における個々のストレス因子に対する樹木の生理応答や、耐性獲得のメカニズムを解明し、現場の森林環境へ適用できるようにすることが重要な課題である。

#### 1-2 酸性化ストレスに対する植物の生理応答

植物は動物と異なり移動の自由を持たないため、低温、乾燥、強光等の環境条件の変動により常にストレスを受け、植物にとって、それら様々な環境ストレスに対する適応が非常に重要である。そして植物は、形態的な適応と同様に、生存戦略として生理的なレベルでの変化によってもストレスに対する適応を示す。逆に、その生理機能変化をス

トレス指標として捉えた研究が数多く見られる(渡邊ら、1999)。

植物の生理機能に及ぼす酸性降水物の影響の中で、光合成への影響については比較的多くの報告がされている。河野ら(1995a)は人口酸性雨暴露がヒノキの乾物生産量の減少と同時に純光合成速度にも負の影響を与えることを報告している。

エチレンは植物の老化や障害に伴って発生する植物ホルモンのひとつであるが、大気汚染ガスやその他の要因によって生じるさまざまなストレス条件下で増加し、傷害を促進する作用を示す(佐治、1999)。酸性降水物への応答としては Takenaka *et al.*(1995)が酸性霧暴露によりヒノキ苗木のエチレン生成量が増大することを報告している。

土壌酸性化に伴う Al の溶脱に対して、植物は根から有機酸を分泌し、Al 毒性から自らを防御している(Ma *et al.*, 1997)。また、樹木においてもヒノキやコナラ(*Quercus serrata*)の根圏で pH を上昇させて Al 毒性を緩和する防御機構が報告されている(Tomioka and Takenaka, 2001)。

### 1-3 生体内の活性酸素

地球上のほとんどの生物は酸素(O<sub>2</sub>)なしでは生きられず、地球大気への酸素の蓄積によって好気性生物は酸素を電子供与体として用いて進化を遂げてきた。それは酸素呼吸が、発酵や嫌氣的呼吸と比較して、遥かに高いエネルギーを獲得できるからである(浅

田、1988)。グルコースの嫌氣的解糖によって2分子のATPを取り出すのに対して、同じ糖から酸素呼吸では38分子のATPを取り出すことができ、その効率は19倍である(浅田、1988)。

基底状態での $O_2$ 分子は三重項状態にありヒラジカル性を有し、他の2原子分子である水素や窒素などと比べては高い反応性を持っているものの、比較的反応性に乏しい。しかし、1電子還元種であるスーパーオキシド( $O_2^-$ )、2電子還元種である過酸化水素( $H_2O_2$ )、3電子還元種であるヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )、そして電子励起状態の酸素分子である1重項酸素( $^1O_2$ )等は極めて高い反応性を示し、生体内で酸化剤として働く(図1-1)。これらの分子種は活性酸素種と呼ばれる(Fridovich, 1975)。様々な環境ストレスを与えられた植物内では、これら活性酸素種が過剰に生成され、光化学反応阻害を招き、生体膜の損傷や細胞成分の酸化など植物体内の広範囲にわたって影響を与える(Elstner, 1982)。しかしながら、ほとんど全ての高等生物には活性酸素除去系が備わっており、カロテノイド、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールといった活性酸素除去物質と共に、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)、カタラーゼ(CAT)といった活性酸素除去系酵素が有毒な活性酸素を分解・解毒することが知られている(Scandalios, 1992)。一方、NADH オキシダーゼ(NADHOD)、NADPH オキシダーゼ(NADPHOD)やキサントリンオキシダーゼ(XOD)がスーパーオキシド産出に関与していることが知られている(Sandalio *et al.*, 1988)。そして、これらの

酵素の活性を測定することによって、汚染物質の植物への影響を評価することができることが報告されている(Tanaka and Sugahara, 1980; Jung *et al.*, 1994)。

SODはスーパーオキシドを $H_2O_2$ と $O_2$ に変える反応を触媒することによって、生体内からスーパーオキシドを消去する(Scandalios, 1993)。さらにSODの触媒反応によって生じた過酸化水素( $H_2O_2$ )を水( $H_2O$ )、酸素( $O_2$ )に変える反応を触媒するものの一つがCATである(Chance *et al.*, 1979)。APXはアスコルビン酸を基質として用い、 $H_2O_2$ を $H_2O$ に変える反応を触媒する植物固有の酵素である(Asada, 1992)。また、APX、グルタチオンレダクターゼ(GR) (Foyer and Halliwell, 1976)などがアスコルビン酸やグルタチオンといった基質を酸化還元し、活性酸素種の消去に関与するアスコルビン酸・グルタチオンサイクルが存在する(図1・2) (Asada, 1992)。

活性酸素は大気汚染物質に限らず低温、乾燥など様々なストレスによって引き起こされる植物の障害にも関与している可能性が示唆されており(森田・田中, 1999)、乾燥(Baisak *et al.*, 1994)、オゾン(Jung *et al.*, 1994; Inaba *et al.*, 1998)、 $SO_2$  (Tanaka and Sugahara, 1980)、塩(Lechno *et al.*, 1997)などの様々なストレスにより生ずる活性酸素に対する植物の応答に関して多くの研究がなされてきた。しかしながら、酸性化ストレスに対する植物の応答を酵素活性で評価した研究は、湿性酸性降下物(Benes *et al.*, 1995)、Al(Cakmak and Horst, 1991)に関しては共に欧米では行われつつあるが、我が国ではほとんど行われていないのが現状である。また、植物材料として樹木を用いた

研究は極めて少ない。

#### 1.4 ヒノキについて

ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc. Endlicher)は、ヒノキ科の常緑針葉高木で、樹幹は直立し、通常高さ 30~40m、直径 50~150cm になる。枝状は細く密生し、樹冠は壮齢木では卵形で、先端が丸くなる特徴をもつ。樹皮は赤褐色、平滑で、やや広く長く縦にさける。樹皮に接触して流下する雨水(樹幹流)の pH が低くなることが知られている(竹中・恩田、1998)。葉は鱗状で交互対生し、鈍頭をなし、上面は濃緑色である。下面は上下左右の葉の接するところに白色の気孔線があり、Y 字形を呈する。雌雄同株で、雄花は細枝の端に多数つき、雌花は枝の梢につき、球形で長さ 3~5mm である。球果はほとんど球状で径 8~12mm である。種子は卵形または卵状楕円形で、光沢があり、両面凸凹形である。長さ 3mm、幅 2.7~3mm で左右に翼がある。4月に開花し、10月に種子は成熟する。

ヒノキは本州、四国、九州の暖帯から温帯にかけて分布する。天然分布の北限地は福島県の永戸山および赤井岳であり、南限地は鹿児島県下屋久国有林である。天然分布地の垂直分布の最低は三重県の有馬松原および新宮市大浜の海拔およそ 10m で、最高は長野県北アルプスの燕岳の海拔およそ 2200m である(橋詰ら、1993)。

ヒノキはやや傾斜のある適潤地で最も旺盛な生育をするが、かなり乾燥にも耐える力が強く急傾斜地、尾根筋、岩盤上にも育つ。浅根性であり、かつ枝葉が密であるので風や雪のため倒木しやすい。稚幼樹はやや日陰に耐えるが、成長するにつれて十分な陽光を欲するようになる。ヒノキは通常モミ、ツガ、アカマツ、サワラ、アスナロ、クロベ、トウヒ、コウヤマキ、ハリモミなどの針葉樹やブナ、イヌブナ、トチノキ、ホオノキ、ミズナラ、カエデ類などの落葉広葉樹、カシ類、シイ類、サカキ、クロガネモチなどの常緑広葉樹と混交するが、各所に純林も見られる。

日本においては、スギの次に人工造林面積が多く、スギよりも土地に対する適応性が強いので造林不成績地は少ない。高知県の魚梁瀬地方、静岡県为天城山や天竜地方、愛知県の段戸山国有林や三重県の尾鷲地方には優良林分がある。ヒノキの品種については天然生のものを京都系ヒノキと高野系ヒノキ、またはホンビ(高野型、太枝型、早生種)とサクラヒ(京都型、細枝型、晩生種)に分けている。また九州阿蘇地方には、さし木栄養系によるナンゴウヒがある。ヒノキはスギよりも活着率が高いが、低温の害を受けやすい。乾燥に対して強いが、土地の肥沃な湿潤な林地では徳利病に、また東北、北陸地方の寒冷地では漏脂病にかかりやすい。このほか地域によっては幼齡樹で野ネズミ、野ウサギ、シカの被害を受けることが多い。ヒノキの造林適地は弱乾性褐色森林土(B<sub>c</sub>型)、適潤性褐色森林土(B<sub>D</sub>型)である。最適気温は年平均 10°Cで、年降水量はスギ(1700mm以上)より少なくてよい。冬季日当たりや通風の悪いところや、適潤地では低温の害を

受けやすい(橋詰ら、1993)。

現在の日本の森林面積は 2,515 万 ha、国土の 67%を占めている。そのうち木材生産のために造成されたスギ・ヒノキを主体とした人工林は 1,040 万 ha、全森林面積の 41%であり、天然林は 1,338 万 ha、同 53%となっている。林業就業者は 1960 年の 44 万人から 1995 年には 9 万人にまで減少し、就業者に占める 50 歳以上の割合も 69%と高齢化が著しい。このような状況で、間伐をはじめとする人工林の適正な管理作業は充分に行われていないのが現状だが、人工林の場合、特に間伐が行われなかったヒノキ林では樹冠が鬱閉し林床に到達する光量が極端に減少し、下層植生が生育できず林床が裸地化してしまう。このようなヒノキ林では雨滴の衝撃により土壌の浸透能が大きく減少し、表面流が発生しやすい状況に陥る(恩田、1995)。また、スギやヒノキといった針葉樹の樹幹流の pH 値が 3~4 と低いことが知られている(佐々ら、1991)。日本における降雨の pH の平均値が約 4.6 であることから、ヒノキなどでは樹体において樹幹流の pH 値を低下させる機構が働いていると考えられる (Takenaka *et al.*, 2000)。従って、樹幹流として土壌に到達する降水の化学的性質の違いが、土壌の酸性化の過程に影響している事が推測される。

ヒノキ自体が酸性降下物に対して高い耐性を示すこともあり(河野ら、1994)、現時点で明らかに酸性降下物が原因のヒノキ林枯損の報告はなされていないが、上述の状況を考えると、今後、その被害が顕在化する可能性は充分にある。



一方、1960年代後半より関東平野の社寺林や屋敷林のスギの衰退が目立つようになったことから、ヒノキと並んで日本の主要造林樹種であるスギの酸性降水への応答の研究は比較的多数行われている(野内、1990)。関東、甲信地方や、関西、瀬戸内地方のスギ衰退現象と酸性降水物の関連が指摘され(梨本・高橋、1991)、また、スギ衰退樹の根元土壌は酸性化し、土壌 Al 濃度が高い傾向にあることが報告されている(梨本、1990)。また、スギを用いたポット実験による研究多く(伊豆田ら、1991a ; b ; 三宅ら、1991 ; 松村ら、1995 ; 太田垣ら、1996 ; 三輪ら、1996 ; 河野・松村、1999)、スギ苗での酸性化ストレスと成長量や光合成活性との関係が明らかにされている。それに対し、ヒノキを用いた研究はこれまでに報告はあるものの(河野・松村、1999)、スギに比べてその数は少なく、酸性化ストレスに対するヒノキの生理応答に関する知見は少ない。

#### 1.5 本研究の目的

本研究の目的は、我が国の主要造林樹種の一つであるヒノキに焦点を当て、地上部・地下部への酸性化ストレスに対する応答を明らかにし、その適応戦略を解明することにある。本研究ではヒノキの実生苗を用いて、地上部は酸性霧への暴露、地下部は根圏への Al 添加をストレスとして、それに対する樹木葉の活性酸素消去系酵素の活性を測定した。日本ではヒノキは造林樹種として重要であり、また、将来的に酸性化ストレスが

樹木に影響を与える可能性がある。さらに、ヒノキは樹幹流 pH が低いため、広葉樹などと比較して土壌の酸性化が進みやすい。これらの可能性からヒノキを対象とする研究は重要である。また、樹木葉の活性酸素消去系酵素の活性変化は環境ストレスに対する樹木の重要な初期の生理応答である。さらに、この活性変化は森林衰退につながる生体内の反応として重要であり、その解明は極めて意義深い。

さらに、活性酸素消去系酵素の活性を、環境ストレスに対する樹木の影響指標として野外で応用する可能性を探ることも目的とした。

図表

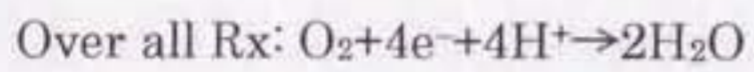
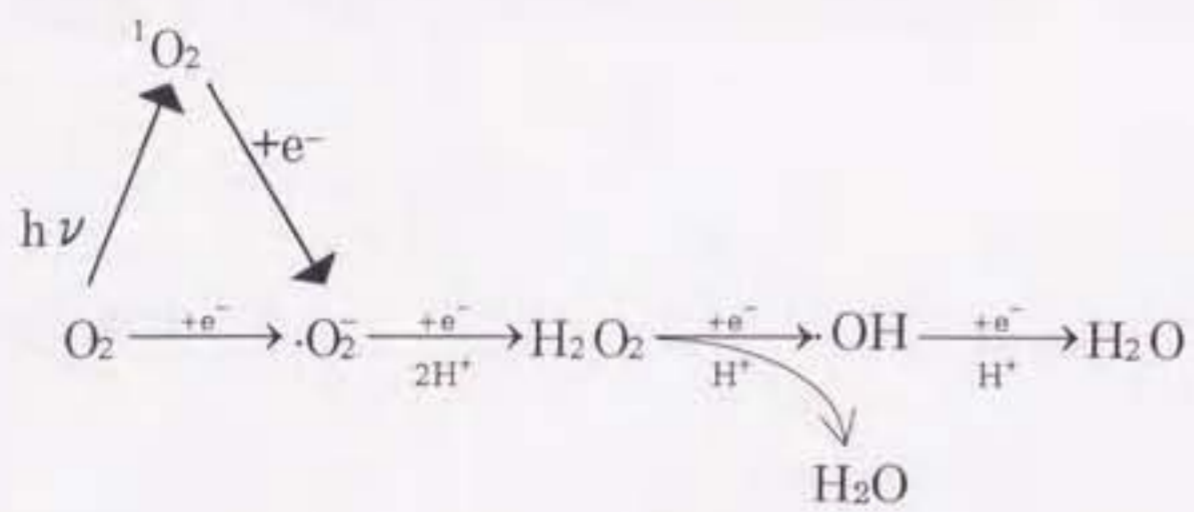


図 1-1 酸素から水への還元過程における活性酸素の生成

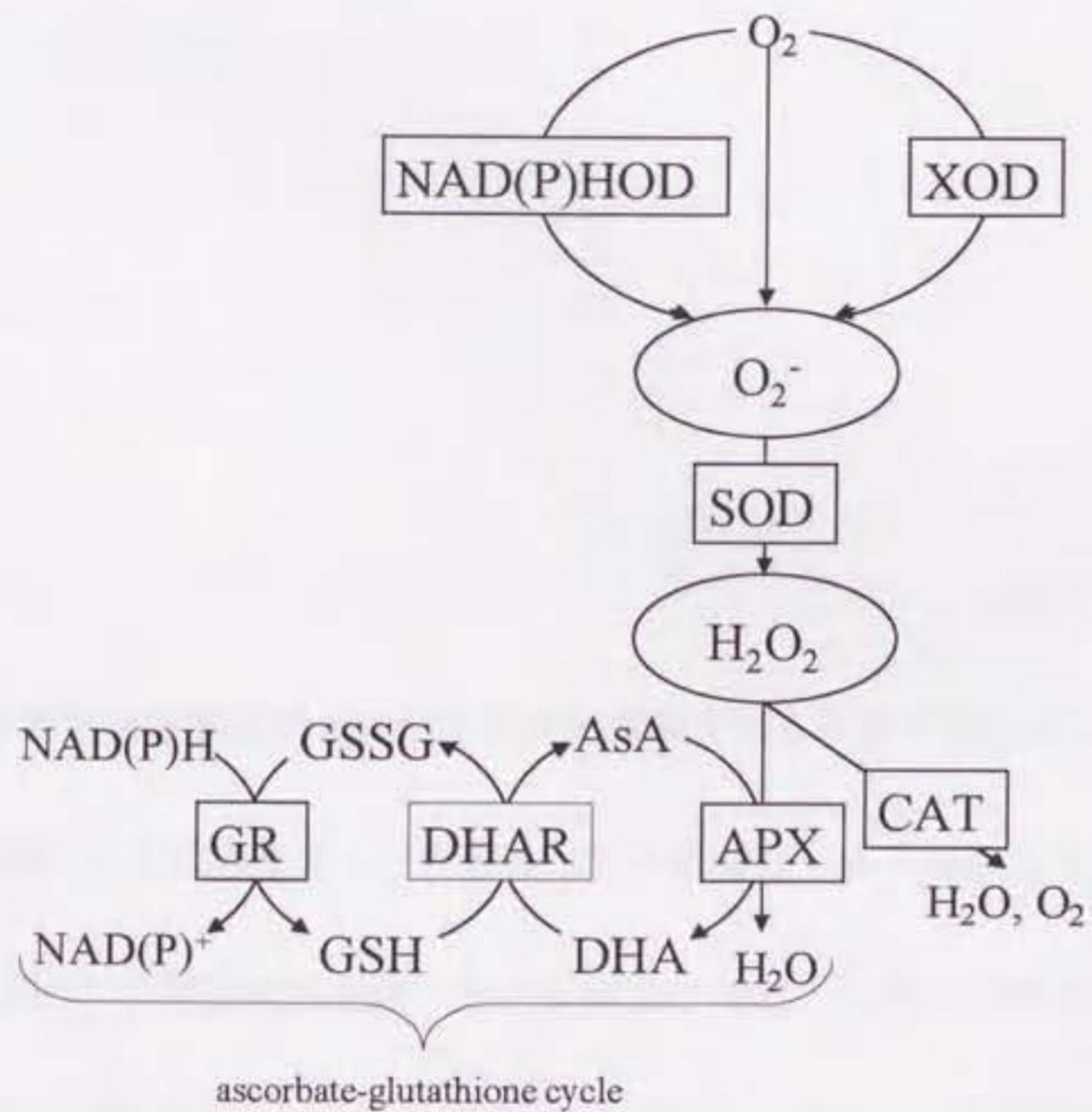


図 1-2 活性酸素除去系酵素経路図

## 第2章 ヒノキ葉内活性酸素消去系酵素活性の季節変化

### 2-1 緒言

前章で述べたように、ヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の特性などの知見は極めて少ない。従って、生理代謝系の一部である活性酸素消去系酵素のストレスに対する応答を調べる以前に、これらの酵素活性の季節変動について基礎的知見を得ることが必要である。本章では、同一個体のヒノキ葉内 SOD、APX 活性の季節変動を明らかにすることを目的とした。

### 2-2 材料と方法

#### 2-2-1 実験系

本章ではヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の季節変動を明らかにするために 2 種類の実験を行った。実験 2-1 では鉢植えヒノキ苗木の同一個体から各月毎に当年葉を採取し酵素活性 (SOD・APX) の季節変動を調べた。実験 2-2 では、夏季は自然条件下、冬季は温度を一定に保って生育した苗木から切り枝を採取して、蒸留水の霧の暴露実験を行い、光条件と温度条件の SOD 活性へ関与の仕方を調べた。

## 2-2-2 植物材料

実験 2-1 では 4 年生ヒノキ(愛知県産)苗木 5 本を供試木として用いた。1999 年 4 月、苗木を赤玉土、腐葉土を 1 対 1 の割合で混合した土とともに、プラスチック製ポット(直径 185 mm、高さ 200 mm; アイリスオーヤマ、仙台)に移植し、名古屋大学東山キャンパス内の圃場で生育した(図 2-1)。陽射しを遮る物はなく、水は自然降雨と雨のない日は水道水を朝 8:00 頃に与えた。サンプリングは 1999 年 5 月 19 日、6 月 15 日、7 月 25 日、8 月 23 日、10 月 21 日、11 月 25 日、2000 年 1 月 29 日の 11:00 頃に行った。各個体から当年葉を採取し液体窒素で瞬時に凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

実験 2-2 では 4 年生のヒノキ(オサカクローン:岐阜県産)苗木を供試木として用いた。1995 年 4 月、苗木を鹿沼土、赤玉土、褐色森林土を 2 対 3 対 5 の割合で混合した土で、プラスチック製ポット(直径 185 mm、高さ 200 mm; アイリスオーヤマ、仙台)に移植し、名古屋大学東山キャンパス内の圃場で生育した。11 月から 3 月の冬季には自然光グロースキャビネットに移して生育した。その条件は明期 8 時間(室温  $25^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 60%、光量  $20-200\text{ W m}^{-2}$ )、暗期 16 時間(室温  $25^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 60%、光量  $20-200\text{ W m}^{-2}$ )であった。

### 2-2-3 蒸留水霧暴露

実験 2-2 では、2 年生の枝を供試木から採取して、1/500 濃度のハイボネックス溶液(村上物産、東京)を入れた 50 mL の三角フラスコに差した。明期 16 時間(光量  $25 \text{ W m}^{-2}$ )、暗期 8 時間の条件下、エアーポンプで 1 週間エアレーションした後、枝を蒸留水の霧に暴露した。暴露は光量  $25 \text{ W m}^{-2}$ 、 $25^\circ\text{C}$  の実験室内に設置したチャンバー内 ( $30 \times 37 \times 50 \text{ cm}$ ) で、1 日 3 回 (8:00、12:00、16:00) 20 分間ずつ 3 日間行った(図 2-2)。霧はガラスネブライザー(日本商事、大阪)に圧縮空気を送り込んで(Mizuno and Katou, 1995)、1 分間に 0.25 mL 発生させた。霧の粒径は直径  $2 \sim 10 \mu\text{m}$  であった(水野、私信)。暴露中、枝は一様に濡れるが、水滴の落下はなかった。以上の手順を暴露 1 シリーズとして、1995 年 9 月 1 日から 1996 年 9 月 17 日までに 10 シリーズ行った。

### 2-2-4 酵素活性測定

実験 2-1 では、冷凍保存したサンプルより当年葉を 1.0 g 採取し、MOPS-KOH (pH 7.5) 0.1 M、ナトリウム・EDTA 1 mM、DTT (dithiothreitol) 1 mM、アスコルビン酸 1 mM を含んだ緩衝溶液 10 mL に、ポリビニルポリピロリドン(Polyclar AT, Sigma 社) 0.1 g を添加して破碎した。破碎液は  $20,000 \text{ g}$  で 5 分間遠心分離をした。上澄みに 50 % 飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し、 $20,000 \text{ g}$  で 5 分間遠心分離をした。その沈殿を上述の緩衝液 4.5 mL で懸濁し、さらに  $20,000 \text{ g}$  で 5 分間遠心分離をした。その

上清を 4°C で 4 時間透析し、低分子物質を取り除いたものを酵素液として用いて酵素活性を測定した。

実験 2-2 では最後の霧暴露から 15 時間後、切り枝から当年葉を 1.0 g 採取し、実験 2-1 と同様に緩衝溶液 3 mL で破碎した。破碎液は 20,000 *g* で 5 分間遠心分離をした。上澄みは Sephadex G-25 (coarse) を充填したカラム (1.7 × 5.5 cm) でゲル濾過し、低分子物質を取り除いた粗酵素液とし、以下の酵素活性測定に用いた。

酵素活性測定は分光光度計 (model DU Series 600; Beckman, California、実験 1) (U-3210 型; 日立製作所、東京、実験 2) を用いて 25 °C で行った。SOD 活性測定は Asada *et al.* (1973) の方法で行った。石英セル内に 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 100 μL、1 mM ナトリウム-EDTA 100 μL、1 mM キサンチン 100 μL、0.1 mM シトクローム *c* 100 μL、酵素液 100 μL、蒸留水 470 μL、キサンチンオキシダーゼ 3.5 mU を入れ、 $A_{550}$  の変化を測定した。APX 活性測定は Tezuka *et al.* (1997) の方法で行った。石英セル内に 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 250 μL、50 mM アスコルビン酸 8 μL、酵素液 50 μL、蒸留水 690 μL、0.1 M 過酸化水素 2 μL を入れ、 $A_{290}$  の変化を測定した。サンプルからの酵素液のタンパク量は Lowry *et al.* (1951) の方法で測定し、各酵素活性は単位タンパク量 (mg) 当たりで示した。測定は全て 3 回ずつ行い、その平均値を結果として表した。

## 2-3 結果

実験 2-1 の結果に関しては、SOD 活性の季節変化を図 2-3、APX 活性の季節変化を図 2-4 に示した。SOD、APX 共に、5 月から 1 月までの間では 7 月に最も高活性を示し、1 月が最も低かった。SOD は  $0.7\sim 19.0$  ( $\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$ )、APX は  $16.3\sim 692.2$  ( $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein min.}^{-1}$ ) の範囲で測定された。

実験 2-2 に関しては、霧暴露後の葉内 SOD 活性の季節変化を図 2-5 に示す。SOD 活性は夏季に上昇し、冬季に下降する傾向を示し、その違いは 10 倍程度であった。

## 2-4 考察

実験 2-1、2-2 では共に、夏季に酵素活性が高く冬季に低いという共通の結果が得られた(図 2-3、4、5)。Polle and Morawe (1995) はおよそ 60 年生のブナ(*Fagus sylvatica*) の活性酸素消去系酵素の活性変化について報告しているが、夏季に活性が高くなるという変動の傾向は本実験のヒノキの結果と一致する。しかし、その年によって変動はあるものの、今回のヒノキと比較してブナの SOD 活性は 10 倍ほど大きかった。APX 活性は両樹種ともほぼ同じレベルであった。

夏季で酵素活性が大きくなり、冬季に小さくなるのは、植物そのものの生理活性の季節変化に対応していると考えられる。低温は植物の生化学的活性を低下させる。(増田、



1988)。しかし、実験 2・2 では、11 月から 3 月の冬季には苗木を自然光グロースキャビネット (25 °C) に移して生育しており、それでも活性が低下していることから (図 2・5)、酵素活性の増減を左右するのは、温度よりも光条件による可能性が高い。活性酸素種は光合成の過程において副次的に産出され、また、350 ppm という現在の地球上の CO<sub>2</sub> 濃度下においては C4 植物以外では必然的に光呼吸が行われ、活性酸素種の生成は避けられない (真野・浅田、1999)。夏季の光過剰条件下では電子伝達鎖における活性酸素の生成が増加し、その除去のため活性酸素除去系酵素の SOD や APX 活性が増大すると思われる。

次章より本章の結果を基に、酸性化ストレスのヒノキへの影響について論じる。

図表



図 2-1 実験材料 鉢植えヒノキ

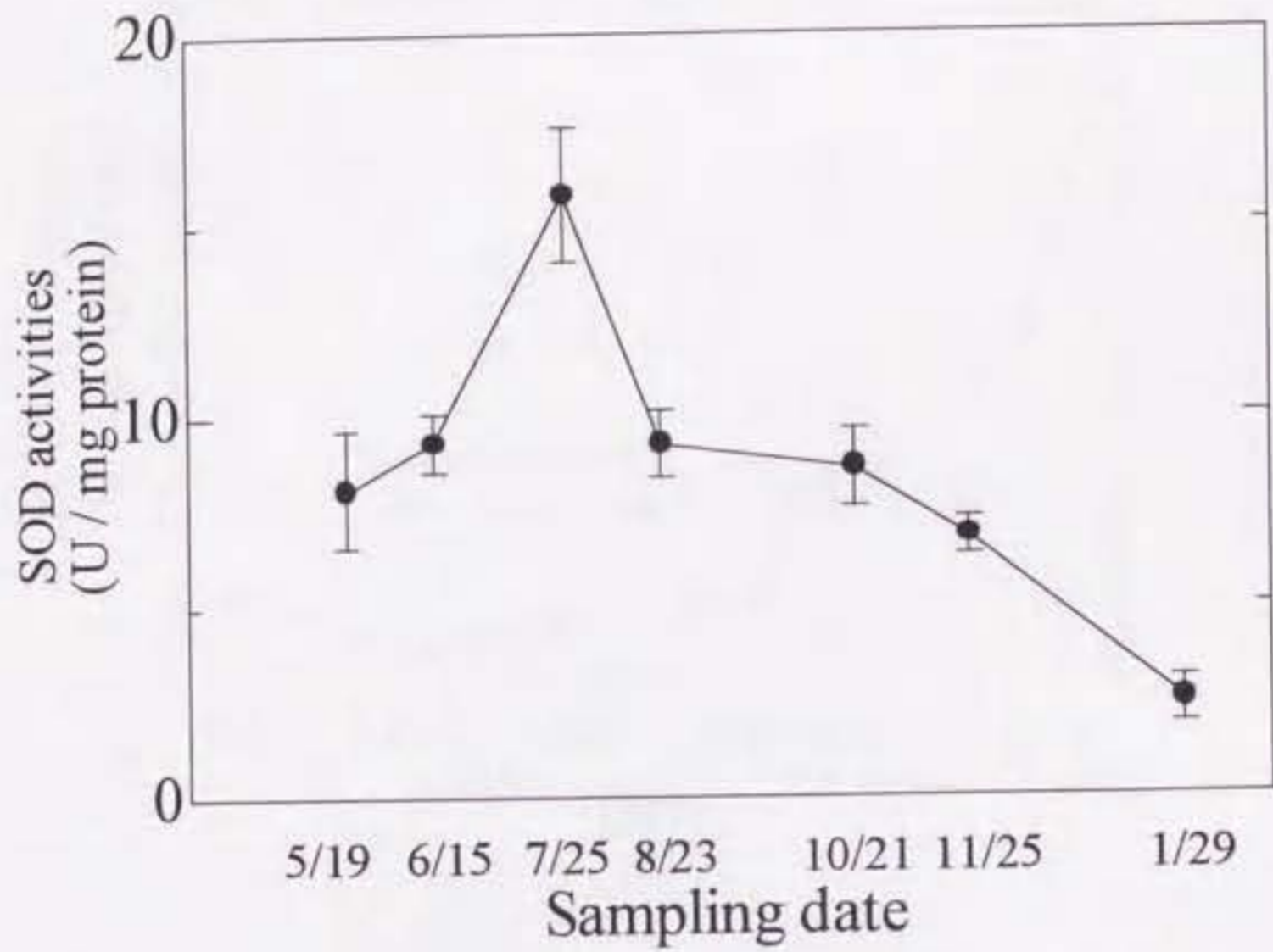


図 2-2 実験 2-1 ヒノキ葉内 SOD 活性の季節変化

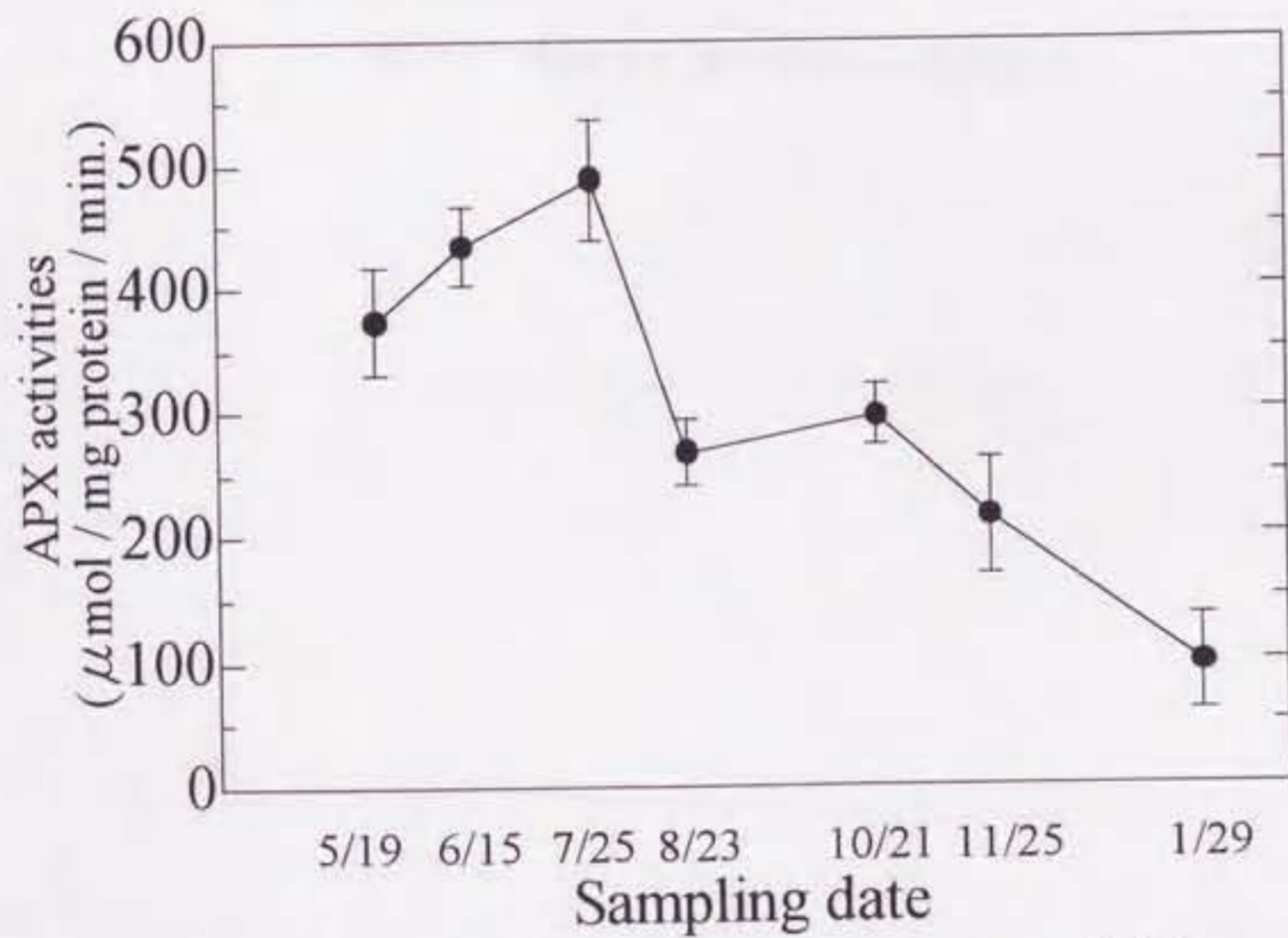


図 2-3 実験 2-1 ヒノキ葉内 APX 活性の季節変化

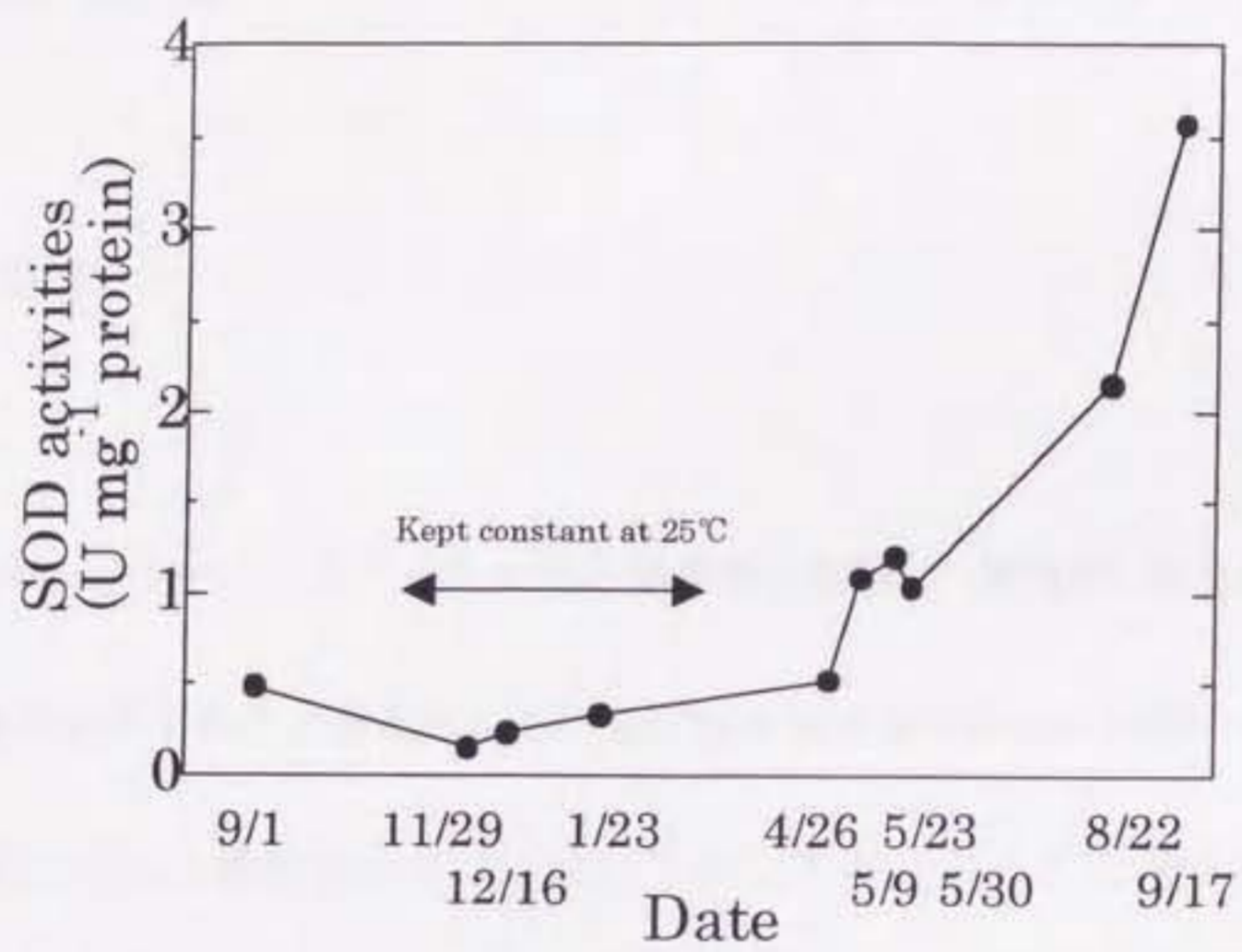


図 2-4 実験 2-2 切り枝 SOD 活性変化

### 第3章 酸性霧ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の応答

#### 3-1 緒言

NO<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub> や O<sub>3</sub> といった大気汚染物質と同様に、酸性雨、酸性霧も森林衰退の直接・間接的原因であると考えられている(Chen and Wellburn, 1989; Jacobson *et al.*, 1990)。酸性雨による葉被害については以下のようなメカニズム(野内、1994; Sheppard, 1994)が提唱されている。葉面上に滞留する酸性の雨滴は、細胞内から葉表面に分泌されバッファー系に寄与している無機イオン、アミノ酸、タンパク質や炭水化物などを溶脱させることにより中和される。しかし、pH の低い酸性雨では水素イオン(H<sup>+</sup>)を多量に含むので、そのバッファー系で中和しきれない H<sup>+</sup> がクチクラワックスと反応したり、クチクラに存在するといわれているクチクラの穴を通して浸透する。そして、表皮細胞の原形質膜と反応し、さらには細胞質内へ侵入する。細胞質内では酵素の立体構造や反応性を維持するために、pH は狭い範囲で保たれているが、バッファー能を超えた H<sup>+</sup> の侵入があると細胞質内が酸性化し、さまざまな酸性障害が生じるものと思われる。

酸性雨や酸性霧が樹木へ与える影響に関する論文は数多く報告されているが、それらは可視障害や成長量(Vann *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990; Kohno *et al.*, 1995; Heller *et al.*, 1995)、光合成活性(Thornton *et al.*, 1990; Muthuchelian *et*

*al.*, 1993; Muthuchelian *et al.*, 1995)、炭素固定 (Heaton and Crossley, 1995)、クロロフィル量 (Shan *et al.*, 1995)、エチレン合成 (Chen and Wellburn; Takenaka *et al.*, 1996) 等を対象としたものであり、樹木内活性酸素消去系酵素への影響を論じたものはほとんどない。Benes *et al.* (1995) は、人工酸性雨がボンデローサマツ (*Pinus ponderosa*) 成木葉内 SOD、APX 活性に及ぼす影響を報告したが、人工酸性雨の酸性度と葉内酵素活性の相関関係を見出すことはできなかった。一方、Kong *et al.* (1998) は *Pinus massoniana* を用いた 3 ヶ月の酸性雨暴露実験で pH 2.2 以下の酸性雨で葉内 SOD 活性が上昇することを報告している。

酸性霧は広義には酸性雨の一種として考えられるが、霧の粒子は直径 1–10  $\mu\text{m}$  であり、直径数 mm の雨滴と比較して遥かに小さい (Minami and Ishizaka, 1996)。従って、霧は雨よりも葉に付着しやすく、葉内に侵入しやすいので、その滞留時間の長さともあわせて、いわゆる「酸性雨」よりも「酸性霧」として植物に直接与える影響が大きいと考えられている (Tezuka *et al.*, 1998)。石坂ら (1996) は、日本のほぼ中央に位置する乗鞍岳山頂付近、標高 2770 m 地点での霧水水滴の直径と pH の関係について調べており、直径 0.9–2.5、2.5–5.0、5.0–10.5 と  $>10.5 \mu\text{m}$  の霧水では、その pH はそれぞれ 1.4–2.0、1.6–1.9、3.0、 $>3.0$  であると報告している。すなわち、粒径の小さい霧の方が酸性度が高いことが明らかになっている。一般的に、野外観測で霧水をバルク測定したときの pH は 3.0–4.5 と言われており (村野, 1993b)、霧の酸性度を過小評価

している可能性がある。

乗鞍岳山頂付近の霧水 pH 観測で、そのバルクの pH は 3-4 であるが (Minami and Ishizaka, 1996)、Tezuka *et al.* (1998)によると、霧の成分中に硫酸や硝酸といった無機酸だけでなく、ギ酸や酢酸といった有機酸が含まれていること (表 3-1)、また、乗鞍岳に生育していたオオシラビソ (*Abies mariesii*) のうち、霧の発生が頻繁な地域の葉中 SOD 活性は、少ない地域のものと比較して著しく高かったことが報告されている。有機酸は有機ガスの大気中の酸化によって発生する。例えば、ギ酸 (HCOOH)は、対流圏で NO<sub>x</sub> や紫外線の存在下でメタン(CH<sub>4</sub>)から誘導されたホルムアルデヒド(HCHO)が、オゾン (O<sub>3</sub>) のようなオキシダントによって酸化され、自然に発生する(Wuebbles and Tamareisis, 1993; Le Bras, 1997)。また、人為起源の有機ガスからの生成もある。霧水成分中の有機酸濃度についての詳細な知見は得られていないが、森林域では植物由来の有機ガスから生成した有機酸も大気中に存在していると考えられるため、乗鞍岳以外の森林地帯の霧水成分中にも有機酸が多く含まれると推測される (Isidorov *et al.*, 1985)。しかし、酸性霧成分中の有機酸の植物への影響は明らかにされていない。本章ではヒノキの地上部からの酸性化ストレスとして、特に有機酸を含めた酸性霧ストレスに焦点を当てた。

本章では、ヒノキ葉を無機酸および有機酸溶液から発生させた霧に暴露したときに、酸性霧が葉内の NADHOD、NADPHOD、XOD、SOD、CAT、APX、GR 活性および

AsA 濃度に与える、無機酸と有機酸による影響の違いを明らかにすることを目的とした。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 実験系

本章の課題に関して、切り枝を用いた3種類の酸性霧暴露実験を行った。実験3-1では3日間暴露後の活性酸素生成・消去系酵素活性を調べた。実験3-2では暴露期間7日間の活性酸素消去系酵素活性の経時変化を追跡した。実験3-3では28日間暴露によるヒノキ葉の可視障害発現について観察した。

### 3-2-2 植物材料

実験材料として岐阜県産のヒノキ苗木を用いた。実験3-1と3-3では実験2-2と同じ生育条件の苗木を用い、また、実験3-2では、実験2-1と同じ生育条件の苗木20本を用いた。

### 3-2-3 酸性霧暴露

実験3-1では同一の供試木から3本ずつ、実験3-2では同一の供試木から7本ずつ2



年生の枝を採取して、1/500 倍濃度のハイボネックス溶液（村上物産、東京）を入れた 50-mL の三角フラスコに差した。酸性霧が混入しないようにパラフィルム（American Natural Can, Greenwich, CT, USA）でフラスコの口を覆った。明期 16 時間（光量  $25 \text{ W m}^{-2}$ ）、暗期 8 時間の条件で 3 日間、エアーポンプでエアレーションした後、蒸留水、硫酸、ギ酸、酢酸溶液の各霧に枝を暴露した。Jacobson *et al.* (1990) による、「同条件下ではアカミトウヒ (*Picea rubens*) に対して、硝酸よりも硫酸の方がよりダメージを与える」という報告を基に、無機酸として硫酸を選択した。有機酸はギ酸と酢酸を用いた。暴露は光量  $25 \text{ W m}^{-2}$ 、 $25^\circ\text{C}$  の実験室内に設置した、チャンバー ( $30 \times 37 \times 50 \text{ cm}$ ) 内で、1 日 3 回 (8:00、12:00、16:00) 20 分間ずつ 3 日間行った(図 2-2)。以上の手順を暴露 1 シリーズとし、実験 3-1 では 1995 年 9 月 1 日から 1996 年 9 月 17 日までに 10 シリーズ行い、実験 3-2 では 2000 年 7 月 29 日～8 月 4 日の 7 日間の、いずれも酵素活性の高い時期に行った。暴露方法は実験 2-2 と同じである。実験 3-1 での酸性溶液濃度は  $1 \text{ meq L}^{-1}$  あるいは  $0.1 \text{ meq L}^{-1}$  とし、実験 3-2 では  $1 \text{ meq L}^{-1}$  とした。ギ酸と酢酸は弱酸であり、解離定数はそれぞれ  $1.8 \times 10^{-4}$  と  $1.8 \times 10^{-5}$  ( $25^\circ\text{C}$ ) である。故に  $1 \text{ meq L}^{-1}$  と  $0.1 \text{ meq L}^{-1}$  での pH はそれぞれ、硫酸が 3.0 と 4.0、ギ酸が 3.4 と 4.2、酢酸が 3.9 と 4.5 である。本実験の溶液 pH は従来の野外観測での霧水 pH 値、3.0–4.5 (村野、1993) の範囲内にした。

実験 3-3 では葉の可視障害発現観察のために切り枝を用いて、1 日 1 回、30 分の霧暴露

を1996年11月18日から12月15日までの28日間行った。酸性溶液の濃度は $1 \text{ meq L}^{-1}$ で、その他の条件は実験3-1と同じである。

これらの酸性霧暴露は、 $\text{H}^+$ の総負荷量に換算して、1枝当たり、実験3-1が $45 \mu\text{eq}$ 、あるいは $4.5 \mu\text{eq}$ 、実験3-2が1、3、5、7日後にそれぞれ15、45、75、 $105 \mu\text{eq}$ 、実験3-3が15、28日後にそれぞれ112.5、 $210 \mu\text{eq}$ であった。

#### 3-2-4 酵素活性測定

実験3-1では暴露終了15時間後、実験3-2では処理前と処理開始1、3、5、7日後の3回目の霧暴露後に、切り枝から当年葉を $1.0 \text{ g}$ 採取し、実験2-2と同様に操作して破碎し、実験3-2では更にDTT (dithiothreitol)  $1 \text{ mM}$ を加えた。懸濁液は $20,000 \text{ g}$ で5分間遠心分離を行った。

実験3-1ではその上澄みをSephadex G-25 (coarse)を充填したカラム( $1.7 \times 5.5 \text{ cm}$ )でゲル濾過し、低分子物質を取り除いた。

実験3-2では、その上澄みに50%飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し、 $20,000 \text{ g}$ で5分間遠心分離した。その沈殿を上述の破碎用緩衝液 $4.5 \text{ mL}$ で懸濁し、さらに $20,000 \text{ g}$ で5分間遠心分離した。その上清を4時間透析し、低分子物質を取り除いた。

上記の方法で得られた酵素液を用いて、以下の酵素活性を測定した。

酵素活性測定は分光光度計 (U-3210 型; 日立製作所、東京、実験3-1) (model DU

Series 600; Beckman, California、実験 3-2)を用いて 25 °C で行った。SOD と APX の活性測定は 2-2-4 と同じ方法で行った。CAT 活性測定は Beers and Sizer (1952)の方法により、石英セル内に 99.84 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) と 16.7 mM 過酸化水素の混合液 900  $\mu$ L、酵素液 50  $\mu$ L を入れ、 $A_{240}$  変化を測定した。GR 活性測定は Carlberg and Mannervik (1985)の方法により、石英セル内に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 750  $\mu$ L、3 mM NADPH 2  $\mu$ L、4 mM 酸化型グルタチオン (GSSG) 2  $\mu$ L、酵素液 50  $\mu$ L を入れ、 $A_{340}$  変化を測定した。NADHOD および NADPHOD 活性測定は Azzi *et al.* (1975)の方法により、石英セル内に 0.25 M TES-KOH 緩衝液 (pH 7.0) 80  $\mu$ L、0.1 mM アセチル化したシトクローム *c*、4 mM NADH あるいは NADPH 20  $\mu$ L、酵素液 100  $\mu$ L、さらに 50 mg SOD の有無を利用して  $A_{550}$  変化を測定した。XOD 活性測定は Hashimoto (1974)の方法により、石英セル内に 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 300  $\mu$ L、1 mM K-オキソ酸 300  $\mu$ L、酵素液 50  $\mu$ L、さらに 0.2 mM キサンチンの有無を利用して  $A_{292}$  変化を測定した。酵素液のタンパク量も 2-2-4 と同様に測定した。全ての測定は 3 回ずつ行い、その平均値を結果として表した。

### 3-2-5 葉内アスコルビン酸 (AsA) 濃度測定

処理前と処理開始 1、3、5、7 日間後の 3 回目の霧暴露後に、アスコルビン酸量測定用にサンプルを採取した。測定は Shigeoka *et al.* (1979)の方法で行った。切り枝から

当年葉 0.10 g を採取し、5%メタリン酸を 10mL 加えて破碎し、それを 20,000 g で 20 分間遠心分離し、上澄み 0.5mL に 3mM DCIP 1mL を加えて AsA を酸化してデヒドロアスコルビン酸(DHA)にした後、7.5mM 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン、0.75%チオ尿素を含む 1.65M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 0.5mL を加えて 50°C で 1 時間反応させ、85% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 1.25mL 加え、25 °C で A<sub>540</sub> を測定し検量線より総 AsA 量を算出した。DCIP を加えないで同様な操作を行い DHA を別に測定し、総 AsA 量と DHA 量の差から還元型 AsA 量を算出した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 葉内酵素活性

図 3-2 に苗木全体と切り枝実験の SOD 活性の違いを示す。どの処理区でも切り枝の SOD 活性が苗木のものより高かったが、全体的な傾向は同じであった。すなわち、対照区、硫酸区、ギ酸区の順で活性が高くなっていた。よって、切り枝を用いた実験で、苗木と同じ評価ができることが確認された。

霧暴露後の葉内 SOD 活性を表 3-2、図 3-3 に示す。1 meq L<sup>-1</sup>、0.1 meq L<sup>-1</sup> のどちらの濃度でも、SOD 活性は酸性霧暴露によって上昇したが、硫酸よりもギ酸の方がその上昇は著しかった。酢酸処理も硫酸より高い SOD 活性を招いたが、ギ酸と比較して

その活性は低かった。

CAT 活性においては、硫酸、ギ酸処理区では、対照区に対し有意な差が認められなかったが、酢酸処理ではやや低下した (図 3-4)。APX も SOD と同様に、硫酸酸性霧よりも有機酸 (ギ酸・酢酸) 酸性霧処理の方が、ヒノキ葉内の活性が高くなる傾向を示した (図 3-5)。

ヒノキ葉内 NADHOD (図 3-6a) および NADPHOD (図 3-6b) の活性も、SOD、APX 同様に酸性霧の影響を受け、NADHOD 活性の方が、NADPHOD よりも強く影響を受けていた。XOD 活性も酸性霧暴露により増大し、特に  $0.1 \text{ meq L}^{-1}$  のギ酸暴露によって著しい活性化が認められた (図 3-7)。

図 3-8、9、10、11 と表 3-3、4、5、6 に、実験 3-2 の処理開始 1、3、5、7 日後の SOD、CAT、APX、GR 活性変化を、それぞれ処理前の個体の活性値を 1 としたときの相対値で表した。

対照区の SOD 活性は 7 日間ほぼ一定であった。酸性霧処理区は処理 1 日後に上昇して処理 3 日後には対照区よりも低下した。ギ酸・酢酸処理区では 1 日後の活性上昇が硫酸処理区よりも大きかったが、処理開始 7 日後の各酸性霧処理区の酵素活性には有意差はなかった ( $p > 0.05$ , Fisher's LSD test) (図 3-8、表 3-3)。

対照区の CAT 活性はほぼ一定であったが、7 日後に上昇した。酸性霧処理区は対照区と変わらないか、低い活性を示した (図 3-9、表 3-4)。

対照区の APX 活性は処理 3 日目まで緩やかに上昇し、その後緩やかに減少した。酸性霧処理区は処理 1 日後には対照区よりも低下した。ギ酸・酢酸処理区は 1 日後の活性低下は硫酸処理区よりも大きかったが、処理開始 7 日後の各酸性霧処理区の酵素活性に有意差はなかった ( $p>0.05$ , Fisher's LSD test) (図 3-10、表 3-5)。

対照区の GR 活性はほぼ一定であった。酸性霧処理区は処理 1、3 日後には対照区よりも低い活性を示した。ギ酸・酢酸処理区は処理 5 日後に、硫酸処理区は処理 7 日後に対照区よりも上昇した (図 3-11、表 3-6)。

### 3-3-2 葉内 AsA 濃度

図 3-12、13、14、15 に 1 週間酸性霧暴露処理期間のヒノキ葉中総 AsA 濃度、AsA 還元型/酸化型比、還元型 AsA 濃度、DHA 濃度の処理期間中の変化を示す。対照区の総 AsA 濃度は処理 5 日後まで上昇し 7 日後に低下した。硫酸区は 3 日後まで緩やかに低下し 5 日後に上昇し 7 日後にまた低下した。ギ酸区は 3 日後まで緩やかに低下し、7 日後まで上昇した。酢酸区は 3 日後と 7 日後に上昇した。還元型 AsA の比率は対照区と硫酸区に処理後半に増加する傾向が、ギ酸区と酢酸区に処理後半に低下する傾向が見られた。還元型 AsA と DHA 濃度は総 AsA 濃度とほぼ同じ傾向で変化した。

### 3-3-3 可視障害

実験 3-1 では可視障害は発現しなかった。

実験 3-2 では処理 6 日後にギ酸処理区の 7 本中 2 本で小さな斑点状のネクロシスが観察された。

実験 3-3 の暴露開始 15 日後、硫酸区とギ酸区の両方で小さな斑点状のネクロシスが観察された。28 日後、ギ酸区で最も強く被害が観察され、葉の大半が枯れるか壊死を起こしていた (図 3-15)。硫酸区では小さなネクロシスが葉面に観察された。対照区では葉が曲がる以外に特に変化はなかった。

### 3-4 考察

本実験において、 $1 \text{ meq L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ meq L}^{-1}$  どちらの濃度でも、酸性霧暴露によって SOD 活性が上昇した (表 3-2、図 3-2、3-3、3-8)。光合成速度 (河野ら、1995a) やエチレン生成 (Takenaka *et al.*, 1996) といった他の生理応答を測定した霧暴露実験では、 $0.1 \text{ meq L}^{-1}$  すなわち pH 4 処理では変化が認められていないことから、酸性霧ストレスに対して SOD 活性が他の生理活性よりも敏感に応答するといえる。

実験 3-1 の結果 (図 3-3、3-4、3-5) と実験 3-2 の結果を比較してみると、SOD と CAT 活性に関しては霧暴露処理 3 日後の結果よりもむしろ 1 日後の結果が一致していた (図

3-8、3-9)。1 meq L<sup>-1</sup>の暴露実験は実験3-1が1996年8月19~21日の3日間、実験3-2が2000年7月29日~8月4日の7日間に行っている。第2章の季節変化の結果では、7月下旬のほうが活性が高くなっており、実験3-2が、活性の高い時期に行われたために応答が早かった可能性がある。また、葉のサンプリングを実験3-1では3日間3回の霧暴露終了15時間後に行っているが、実験3-2は最後の暴露直後に行っていることから、暴露後の経過時間による影響も考えられる。

Sandalio *et al.* (1988) は、NADHOD、NADPHOD、XODのいずれもスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)生成に働くことを報告している。今回の実験でヒノキ葉内のNADHOD (図3-6a)、NADPHOD (図3-6b) およびXOD活性(図3-7)は、いずれも酸性霧暴露により活性化されており、酸性霧暴露によるO<sub>2</sub><sup>-</sup>産出がこれらの酵素全ての活性化による可能性が示された。しかし、チラコイド膜の光化学系IでもO<sub>2</sub><sup>-</sup>が生成することが知られており(Asada and Takahashi, 1987)、酸性霧によるO<sub>2</sub><sup>-</sup>産出プロセスの解明には至らなかった。

APX活性の結果を実験3-1と実験3-2と比較すると、酸性霧暴露によって実験1は活性上昇(図3-5)で実験3-2は活性低下(図3-10)と全く反対の結果が得られた。この理由についてはSODでの考察と同様に、実験時期の違い、あるいは暴露から葉採取までの時間の違いによることが推測される。すなわち、処理直後の活性上昇が1日以内に起こり、測定できなかったことが考えられる。このことは、次章のAI暴露実験でAPX活



性が一度上昇しその後下降していることから示唆される。APX と CAT は共に  $H_2O_2$  に関与するが、細胞内で局在する場所が異なっている(Scandalios, 1993)。高等植物では、APX は葉緑体内に存在するが、CAT は存在せず、APX が  $H_2O_2$  解毒に重要な役割を果たすといわれている (Asada, 1992)。Ashenden *et al.* (1995) によって、酸性霧暴露により植物は光合成量を低下させることが報告されており、酸性霧が葉緑体にダメージを与えていることが示唆されている。ヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) の 3 時間オゾン暴露実験では、APX が  $H_2O_2$  除去に主として働いていることが報告されている (Inaba *et al.*, 1998)。本研究では実験 3-2 の処理 7 日後に対照区を含む全処理区で APX 活性が低下し、CAT 活性が回復している。対照区も同じ傾向で応答していることから、APX 活性低下は、切り枝を用いたことによるストレスが関わっている可能性がある。さらに、APX 活性低下に伴い、SOD の働きによって生成した過酸化水素( $H_2O_2$ )が蓄積し、CAT が遅れて活性化されたことが考えられる。また、そのタイムラグから  $H_2O_2$  の細胞内の移動も考えられる。これらの事から、葉緑体に局在する APX が、CAT よりも  $H_2O_2$  除去に速やかに応答していることが推測される。

Tezuka *et al.* (1998) はオオシラビソ (*Abies mariesii*) への  $1 \text{ meq L}^{-1}$  の溶液を用いた霧暴露で、硫酸 (pH 3.0) よりもギ酸 (pH 3.4) の方が SOD 活性の上昇を招くと報告している。本実験 3-1 では、活性酸素の関与する酵素活性が、pH が高いのにも拘わらず硫酸よりも有機酸(ギ酸・酢酸)暴露に対して強く反応する事が示され (図 3-3~3-7)、

実験 2 でも有機酸区はより早く強い活性上昇および低下をもたらした(図 3-8~3-11)。

樹木葉表面に付着した  $H^+$  は、細胞壁・膜上のイオン交換サイトで  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  といった無機イオンと交換することにより、植物にストレスを与え、また、 $K^+$  の溶脱などの障害が生じると考えられている(Schaefer and Reiners, 1990)。このプロセスでは  $H^+$  イオン濃度の高いほうがダメージが大きいことになる。しかしながら、本研究の結果は、高 pH の有機酸の方がより強いストレスを与えていることを示している。そこで、次のようなメカニズムが考えられる。細胞膜は脂質二重構造であり、膜表面は負の電荷に帯電されている。強酸である硫酸は、完全にイオン状態に解離しており細胞内に浸入しにくい。しかし解離定数がそれぞれ  $1.8 \times 10^{-4}$  と  $1.8 \times 10^{-5}$  (25°C) であるギ酸と酢酸は、pH 3~4 程度の酸性霧溶液では非解離状態の分子が多く存在する。これらは無電荷なので、細胞内に浸入でき、細胞内(pH 7)で解離し細胞内の pH を低下させるものと考えられる(Felle, 1987)。細胞内の pH 低下は、 $K^+$  の溶脱など様々な影響を与えると考えられる(図 3-16)。このような理由で、ギ酸や酢酸が同濃度で pH が高いにも拘わらず、硫酸よりも植物に強く影響を与えると推測される。

Mizuno *et al.* (1997) は、pH 2.0 に調整したギ酸(1 meq L<sup>-1</sup>) や硫酸の溶液の霧にヒノキ地上部切片を暴露し、木部灌流液中の  $K^+$  濃度を測定している。その結果、硫酸とギ酸を混合した場合は  $K^+$  濃度が上昇したが、ギ酸のみ、あるいは硫酸のみの霧暴露では上昇しなかったと報告している。これは、硫酸によって低 pH となった条件下で非解

離のギ酸が容易に細胞内に侵入し、細胞膜の脱分極を起こしたためと推測される。これによりイオンチャネルが機能を失い、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ といった陽イオン溶脱を引き起こすことが考えられる。Tezuka *et al.* (1998) の乗鞍岳での観測結果 (表 3-1) では、野外の霧水成分中に硫酸や硝酸といった無機酸だけでなく、ギ酸や酢酸といった有機酸が含まれていることが報告されている。従って、自然条件下では無機酸と有機酸が霧水中に混在することにより、さらに植物に被害を与える可能性があるといえるであろう。

また、APX 活性 (図 3-10) と APX の基質である AsA 量と還元型/酸化型比 (図 3-12~14) の霧暴露期間 7 日間の経時変化を比較すると、対照区と硫酸区では APX 活性上昇と AsA 量増加および還元型比減少、APX 活性減少と AsA 量減少および還元型比増加が同時に起こる傾向が認められた。一方、ギ酸区と酢酸区では明確な関係は見出せなかった。酢酸はクエン酸回路上の物質であり (増田、1988)、ギ酸も同じくカルボン酸であるので植物の代謝経路に深く関わる可能性のある物質である。ヒノキ葉中の有機酸濃度としては、1 年生苗葉中のシュウ酸、クエン酸、リンゴ酸濃度はそれぞれ  $5 \mu M g^{-1} fw$  程度であることが調べられている (富岡、私信)。実験 3-2 の 7 日間の負荷量は、ギ酸・酢酸で  $105 \mu eq$  であり、これらが葉内に侵入したとすれば、代謝系への影響は少なくないと考えられる。GR 活性の結果 (図 3-11) において、有機酸区が処理 7 日後に強く活性化されているのは、有機酸の細胞内の侵入によって NADPH 酸化 (図 1-2) を伴う光合成電子伝達が活性化された可能性がある。河野ら (1995) はヒノキとスギ (*Cryptomeria japonica*)

を用いて、酸性雨暴露による影響を報告しているが、pH低下が純光合成速度と暗呼吸速度増大をもたらす傾向を示している。活性酸素は光合成の過程でも産出されるので(浅田、1988)、光合成と活性酸素は極めて密接な関係にある。強光条件下では光過剰状態となり活性酸素種が生成されることが知られており、逆に、光合成活性が高ければ活性酸素の生成は抑えられる(真野・浅田、1999)。処理3日目以降の有機酸酸性物質暴露による活性酸素消去系酵素の挙動は葉内活性酸素の減少を示唆するが(図3-8)、これは光合成活性が増大したことによる活性酸素の減少を示しているかも知れない。

本実験でのヒノキ葉内総AsA量は、変動はあるもののおよそ $40\sim 60\ \mu\text{M g}^{-1}\text{fw}$ であった。これはコムギ(*Triticum durum*)でおよそ $4\sim 6\ \mu\text{M g}^{-1}\text{fw}$ (De Gara *et al.*, 1997)や*Festuca pratensis*の $6\sim 7\ \mu\text{M g}^{-1}\text{fw}$ (Kingston-Smith *et al.*, 1997)といった草本の値の10倍、ブナ(*Fagus sylvatica*)の $10\sim 20\ \mu\text{M g}^{-1}\text{fw}$ (Polle and Morawe, 1995)の4倍程度と極めて豊富に存在する。このことよりAPX活性の低下がAsA不足による失活(Asada, 1990)によるものではないことが推測される。従って、APX合成系へ酸性物質が影響することが考えられる。また、葉内の高AsA濃度が酵素系の基質としての働きとは別に抗酸化剤そのものとして働き、ヒノキの抗酸化機構の重要な役割を担っている可能性がある。

本実験で可視障害は実験3-2の処理6日後と、実験3-3の処理15日以降に発生し、有機酸がより強い可視障害を引き起こした。実験3-2は代謝の活発な夏に、実験3-3は

代謝の低い冬に行われているため、実験 3-2 での障害が早く進行することが推測される。しかし、ギ酸の 1 枝当たりの負荷量は実験 3-2 が 6 日後 90  $\mu\text{eq}$ 、実験 3-3 が 15、28 日後にそれぞれ 112.5、210  $\mu\text{eq}$  であり、その全てが葉内に浸入したわけではないが、表面付着量として、1 枝当たり 100  $\mu\text{eq}$  前後で可視障害が発現するという結果で一致した。河野ら(1995)は、pH 3.0 以上の人工酸性雨ではヒノキ葉に可視障害は発現しないと報告している。しかし、本実験では明らかに pH 3.0 以上で可視障害が発現しており、この原因としては切り枝を用いたことによるストレスも一因と考えられるが、有機酸であるギ酸を用いたことによる影響およびネブライザーを用いた粒径の細かい(2~10 $\mu\text{m}$ )霧を用いたことによる効果が考えられる。このことから、有機酸を含む酸性霧が、酸性雨よりも可視障害を発現する可能性のある強力なストレス要因であることが示唆された。

本章の結果より、pH 4 の酸性霧がヒノキ葉内活性酸素消去系酵素活性に 1 日以内で影響を与えること、酸性霧中の無機酸よりも有機酸成分がヒノキ葉内活性酸素消去系および生成酵素を活性化させること、より強い可視障害を発現させることが示された。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する SOD 活性が高いのに、消去する CAT、APX 活性が低いことから、細胞内に  $\text{H}_2\text{O}_2$  が蓄積する可能性があることが示唆され、APX の活性低下の原因は、十分なヒノキ葉中の AsA 濃度から、基質量の低下によるものではないことが示唆された。

図表

表 3-1. 乗鞍岳山頂付近において観測された霧水中の化学成分(1995 年 8 月 30 日)

Time	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Formate	Acetate	Oxalate
4:42 - 4:58	2.93	6.02	18.19	3.19	4.34	0.67
4:58 - 5:14	2.32	4.77	15.27	2.89	3.95	0.52
16:45-16:53	2.99	13.53	35.91	2.27	2.85	1.19
17:38-18:05	3.89	14.76	41.97	1.88	2.59	1.35
20:25-20:33	0.14	0.19	2.44	0.24	0.14	0.10

(Tezuka *et al.*, 1998 より引用)

表 3-2. 霧暴露後の SOD 活性

Date	Conc. (meq L <sup>-1</sup> )	Mist		
		Control	Sulfuric acid	Formic acid
SOD activity (U mg <sup>-1</sup> protein)				
Sep. 1, 1995	1	0.48 ± 0.05	2.54 ± 0.11	3.52 ± 0.17
Nov. 29, 1995	0.1	0.15 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.46 ± 0.01
Dec. 16, 1995	0.1	0.23 ± 0.02	0.49 ± 0.05	0.62 ± 0.05
Jan. 23, 1996	0.1	0.33 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.59 ± 0.01
Apr. 26, 1996	1	0.52 ± 0.01	0.84 ± 0.04	1.85 ± 0.05
May. 9, 1996	1	1.09 ± 0.09	2.09 ± 0.16	3.79 ± 0.10
May. 23, 1996	1	1.20 ± 0.10	1.98 ± 0.05	2.97 ± 0.08
May. 30, 1996	0.1	1.03 ± 0.08	1.52 ± 0.09	2.11 ± 0.09
Aug. 22, 1996	1	2.15 ± 0.05	4.10 ± 0.09	6.45 ± 0.61
Sep. 17, 1996	0.1	3.57 ± 0.12	5.07 ± 0.16	7.65 ± 0.24



図 3-1 霧暴露の様子

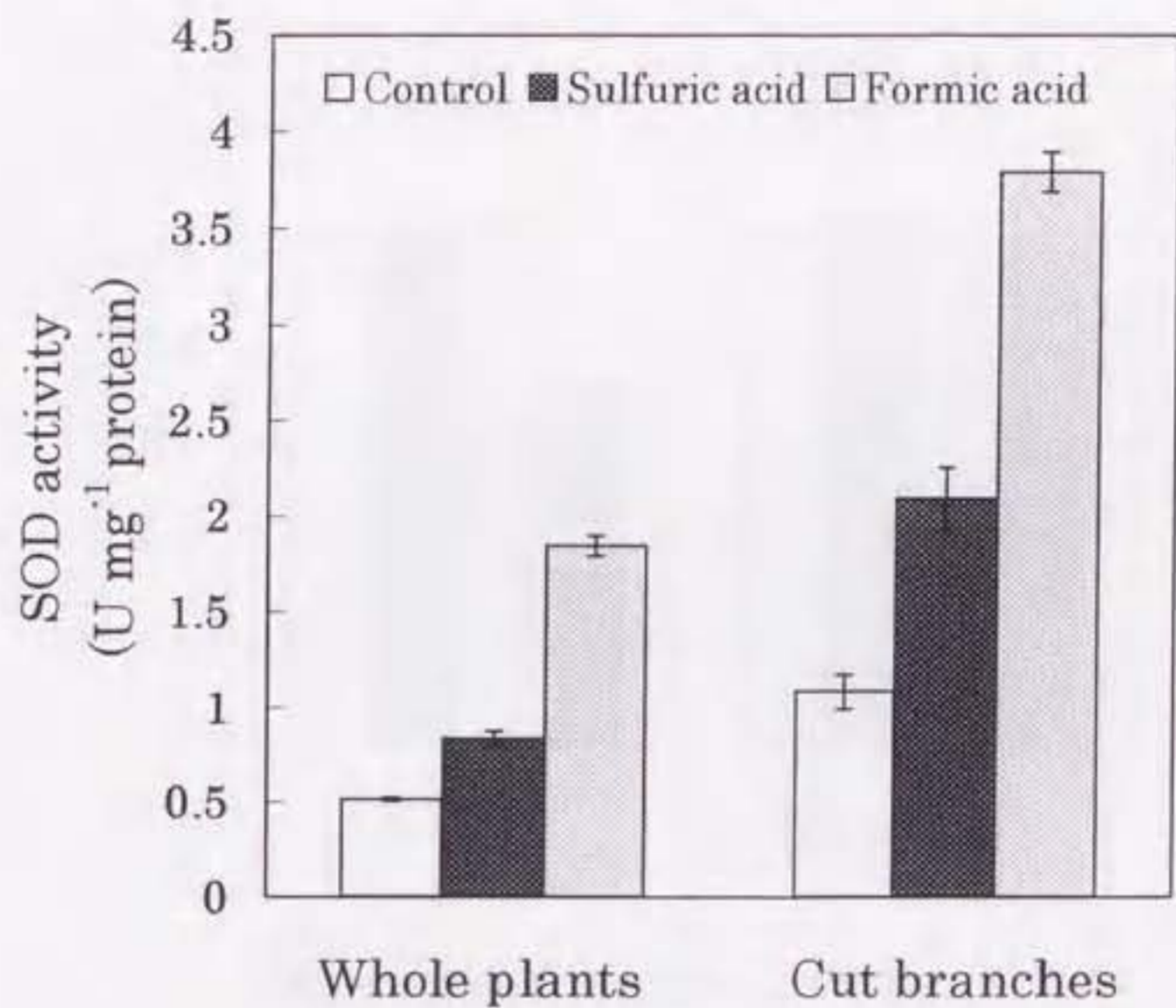


図 3-2 鉢植えヒノキ苗木と切り枝の霧暴露後葉内 SOD 活性の比較

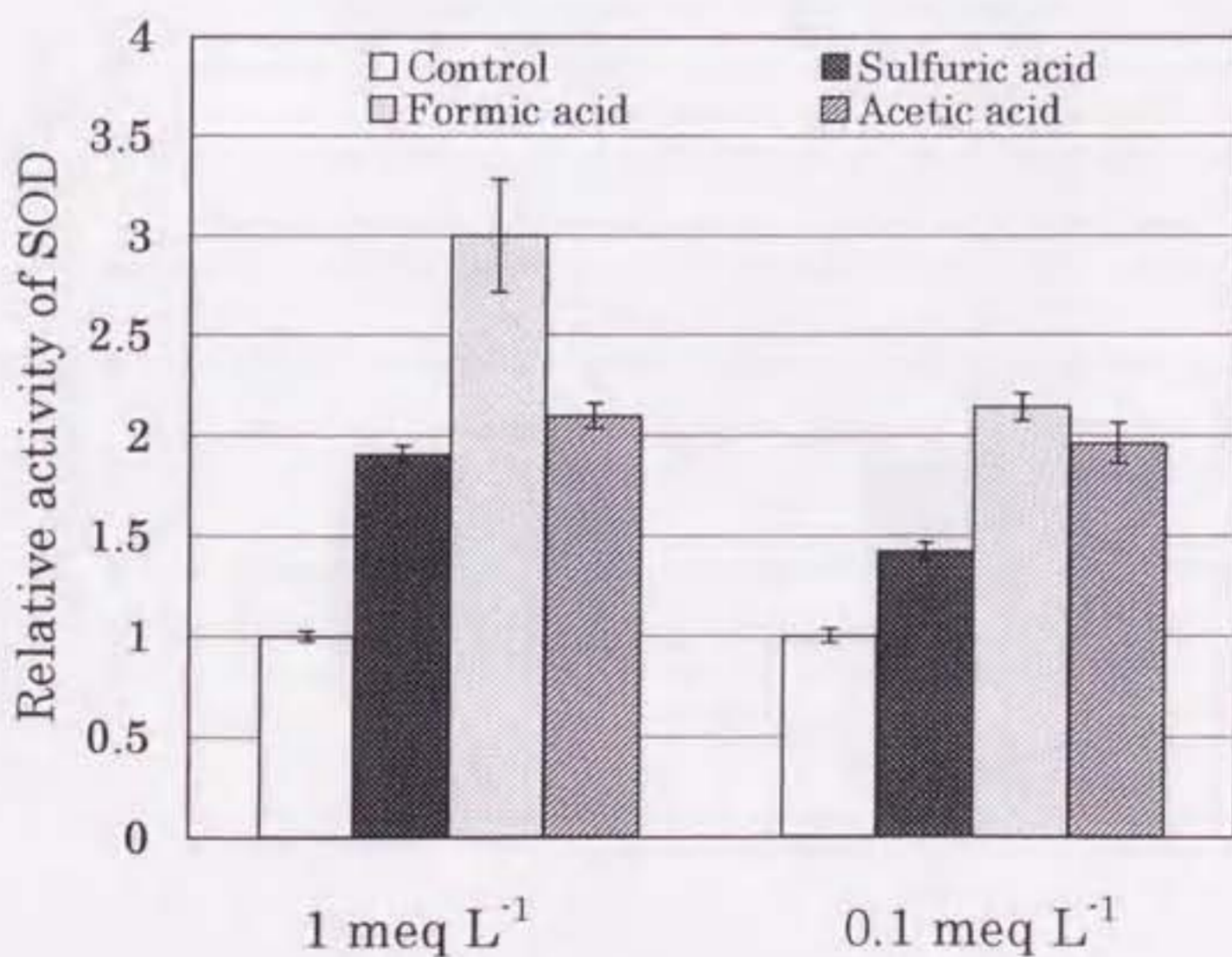


図 3-3 霧暴露後の葉内 SOD 活性



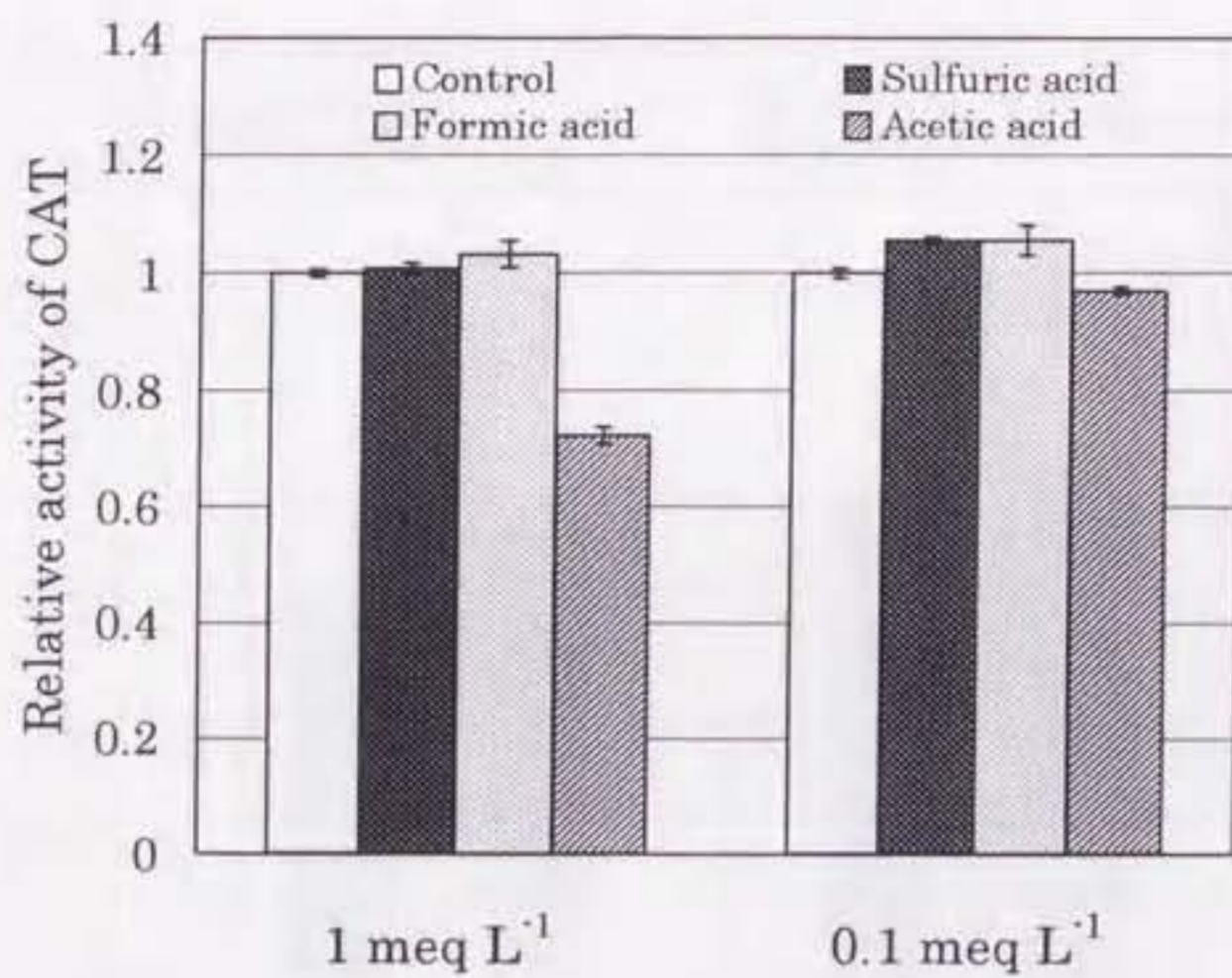


図 3-4 霧暴露後の葉内 CAT 活性

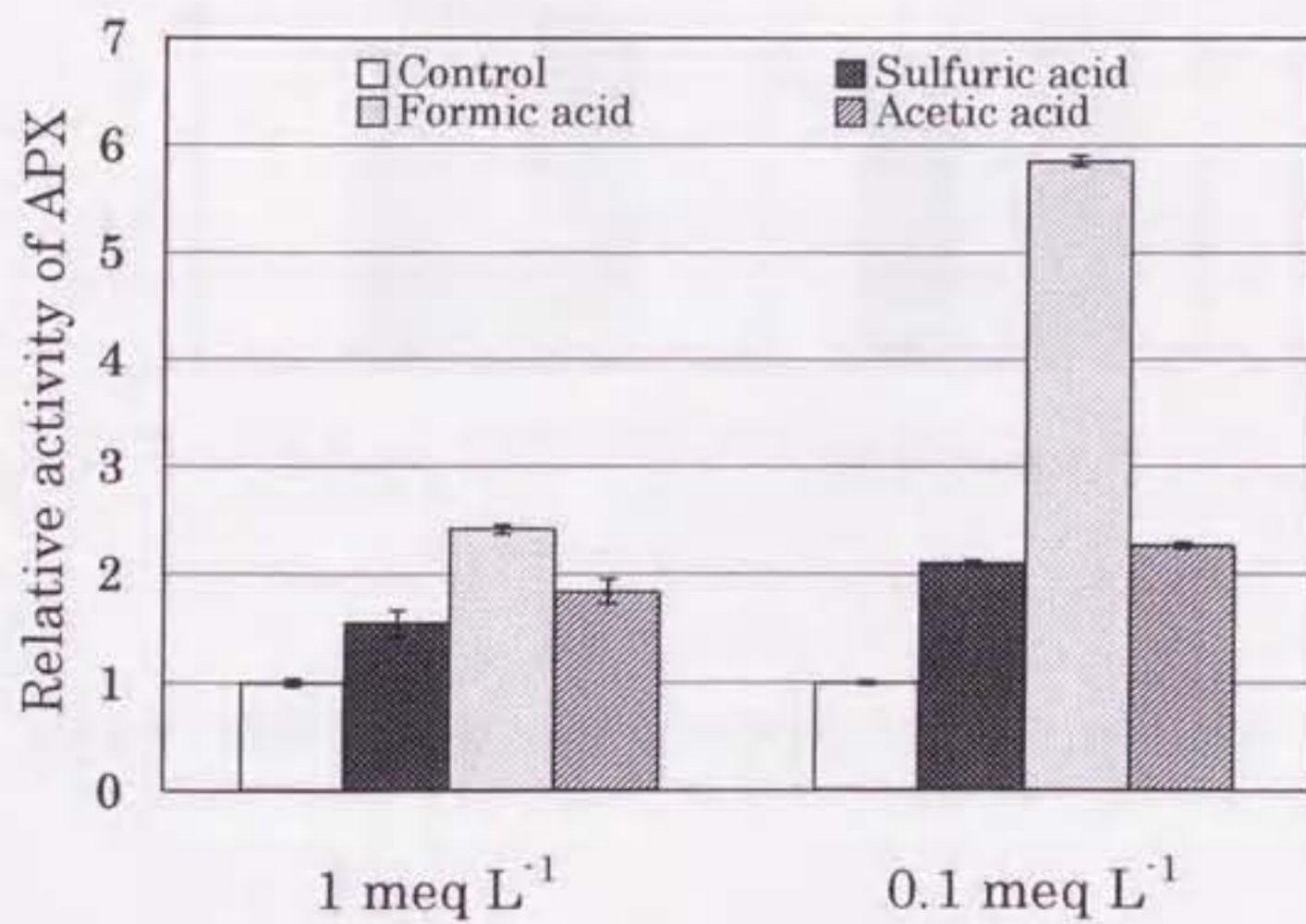


図 3-5 霧暴露後の葉内 APX 活性

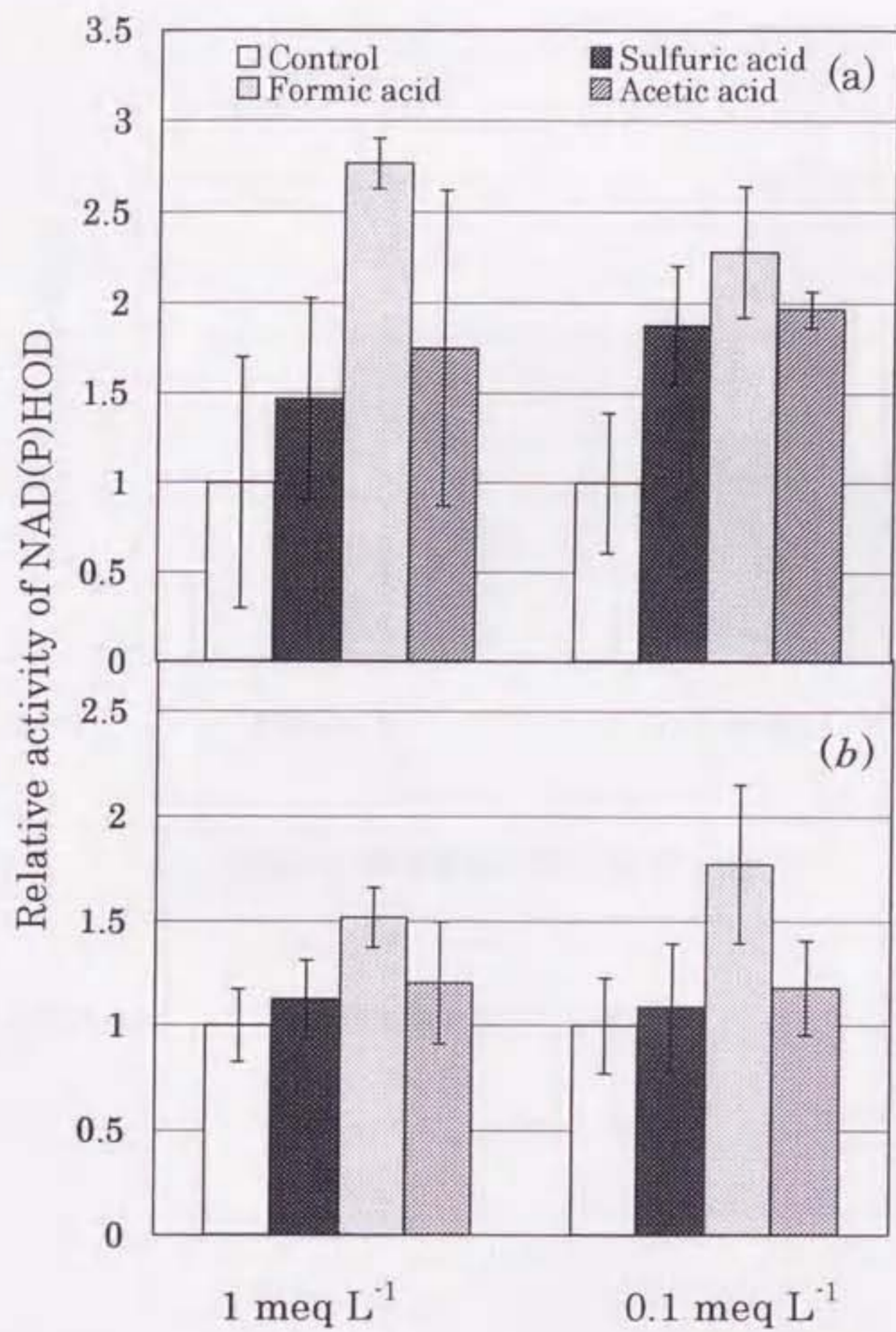


図 3-6 霧暴露後の葉内 NADHOD(a)、NADPFOD(b)活性

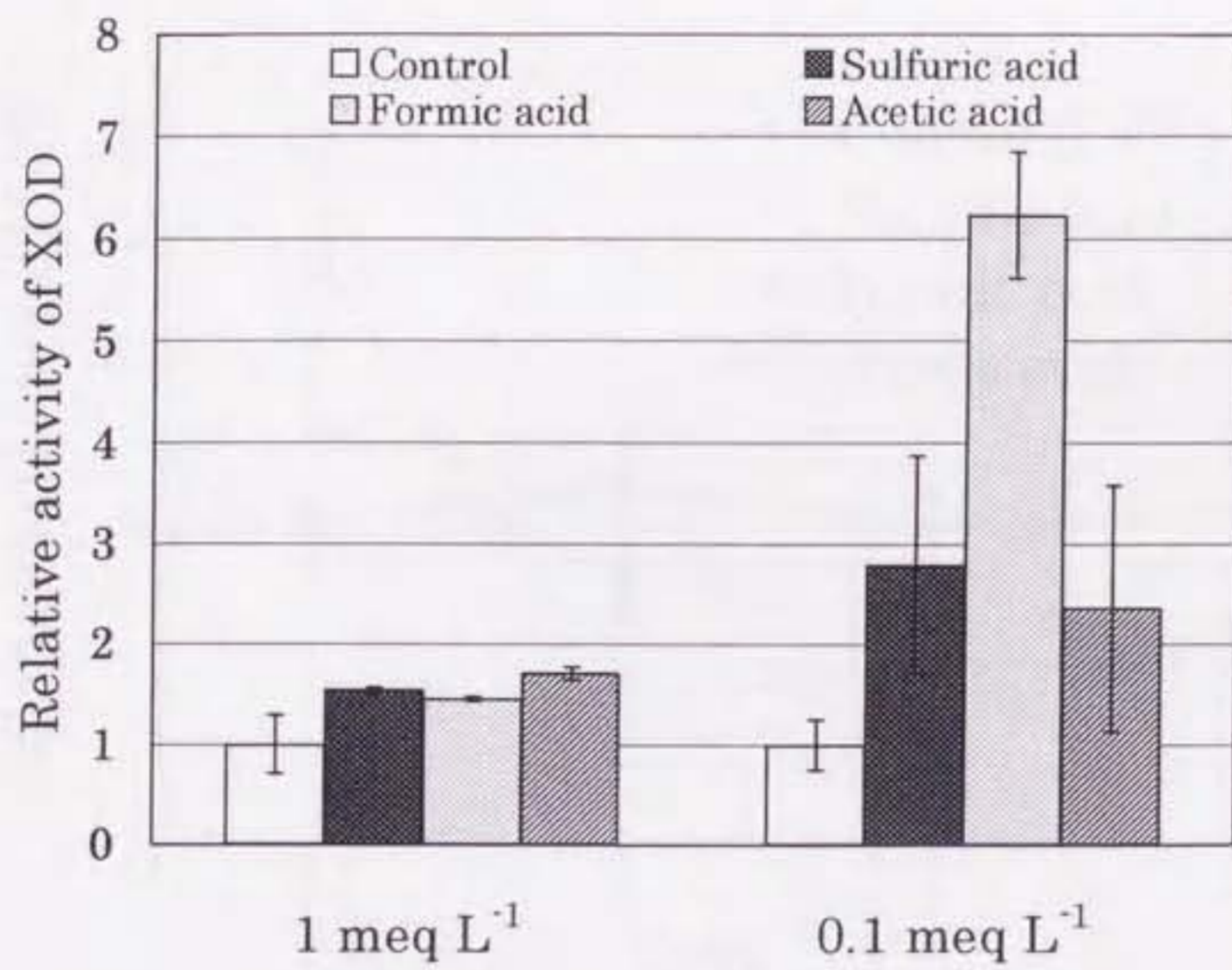


図 3-7 霧暴露後の葉内 XOD 活性

\*図 3-2~3-7 のエラーバーは測定誤差を表す (n=3)。

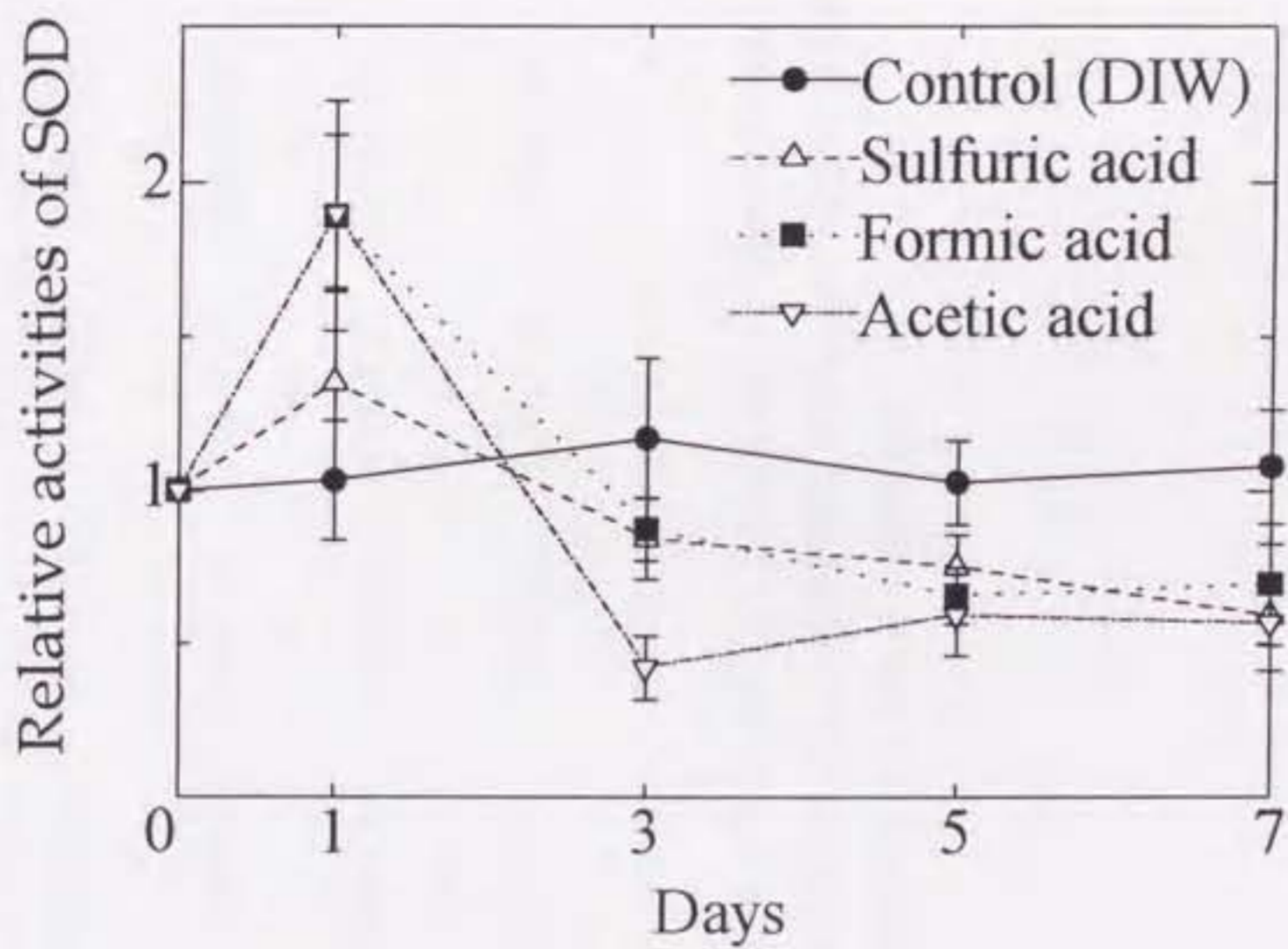


図 3-8 霧暴露後の葉内 SOD 活性の経時変化

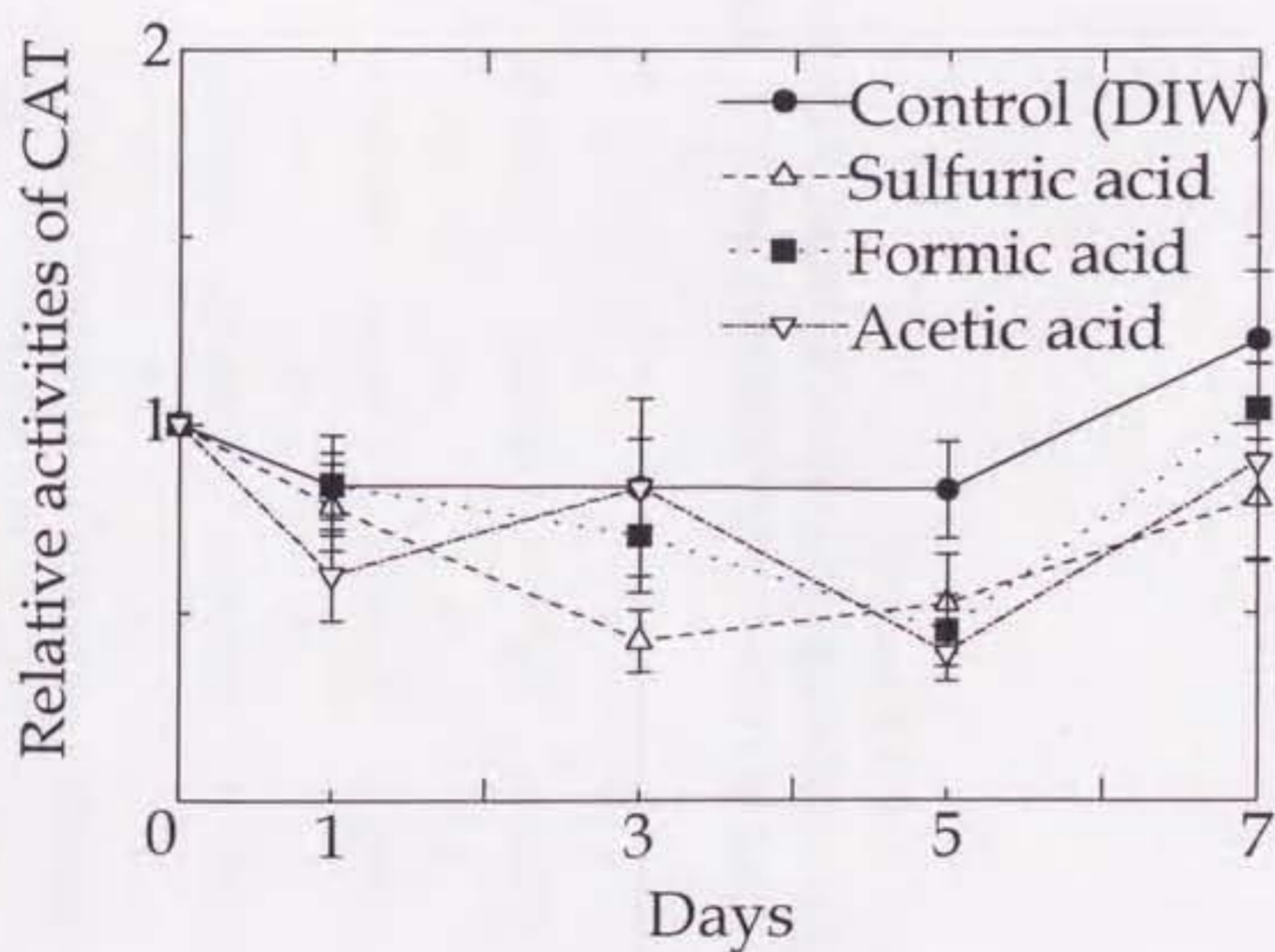


図 3-9 霧暴露後の葉内 CAT 活性の経時変化

表 3-3 霧暴露処理 7 日間の SOD 活性変化

SOD	1 day	3 days	5 days	7 days
Control (DIW)	1.03±0.20 a	1.17±0.26 a	1.03±0.14 a	1.08±0.19 a
Sulfuric acid	1.35±0.31 a	0.84±0.13 ab	0.75±0.10 ab	0.59±0.10 b
Formic acid	1.89±0.37 a	0.87±0.10 ab	0.66±0.09 ab	0.70±0.13 ab
Acetic acid	1.90±0.25 a	0.42±0.10 b	0.59±0.13 b	0.57±0.16 b

処理前平均活性は 9.86 U mg<sup>-1</sup> protein。5 個体の平均値 ± SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す (P>0.05)。

表 3-4 霧暴露処理 7 日間の CAT 活性変化

CAT	1 day	3 days	5 days	7 days
Control (DIW)	0.84±0.09 a	0.83±0.13 a	0.82±0.13 a	1.22±0.18 a
Sulfuric acid	0.78±0.11 a	0.42±0.08 a	0.52±0.13 ab	0.80±0.16 a
Formic acid	0.84±0.13 a	0.70±0.15 a	0.45±0.10 b	1.04±0.12 a
Acetic acid	0.60±0.12 a	0.83±0.24 a	0.39±0.07 b	0.90±0.26 a

処理前平均活性は 194.25 μM mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup>。5 個体の平均値 ± SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す (P>0.05)。

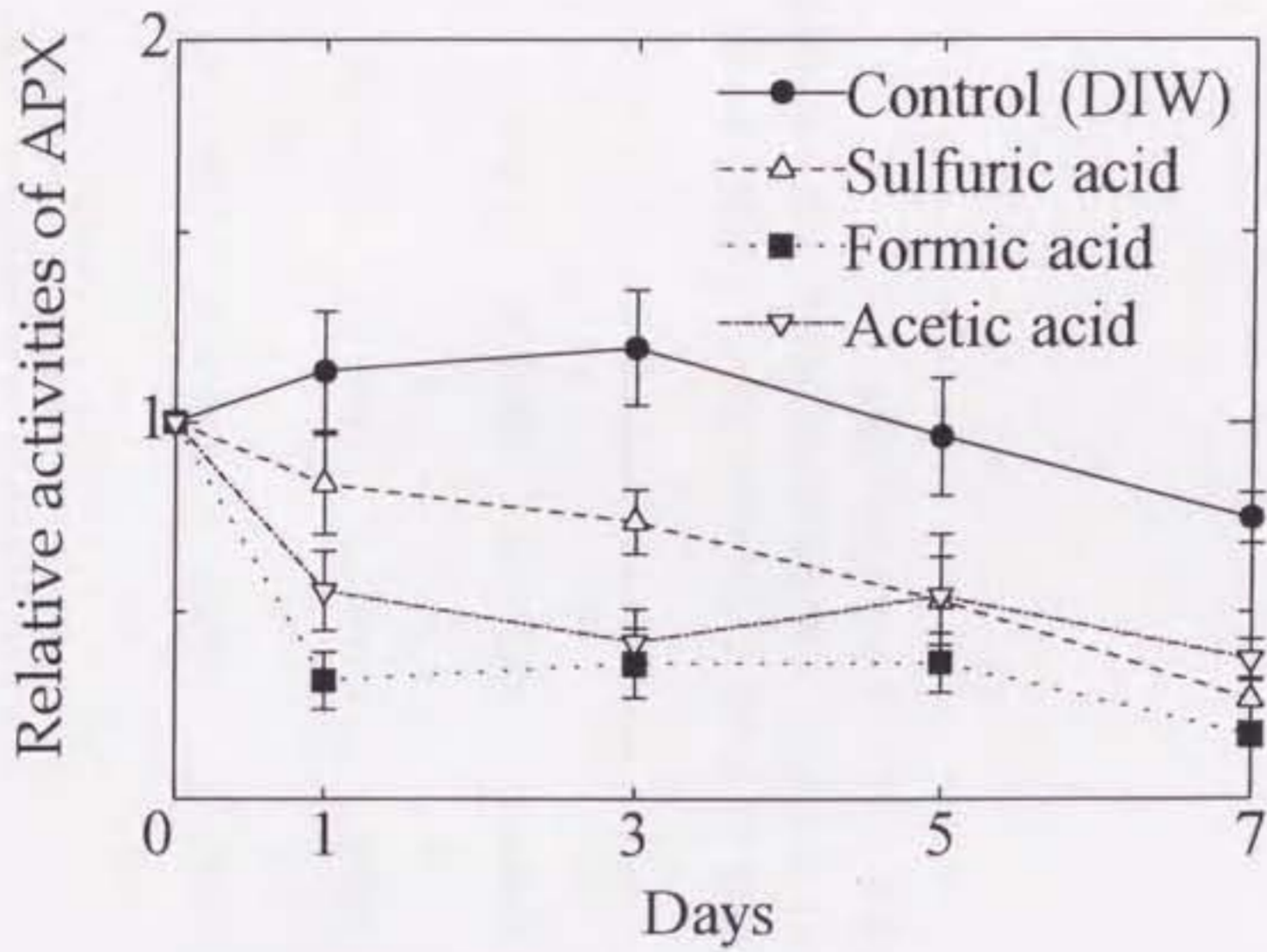


図 3-10 霧暴露後の葉内 APX 活性の経時変化

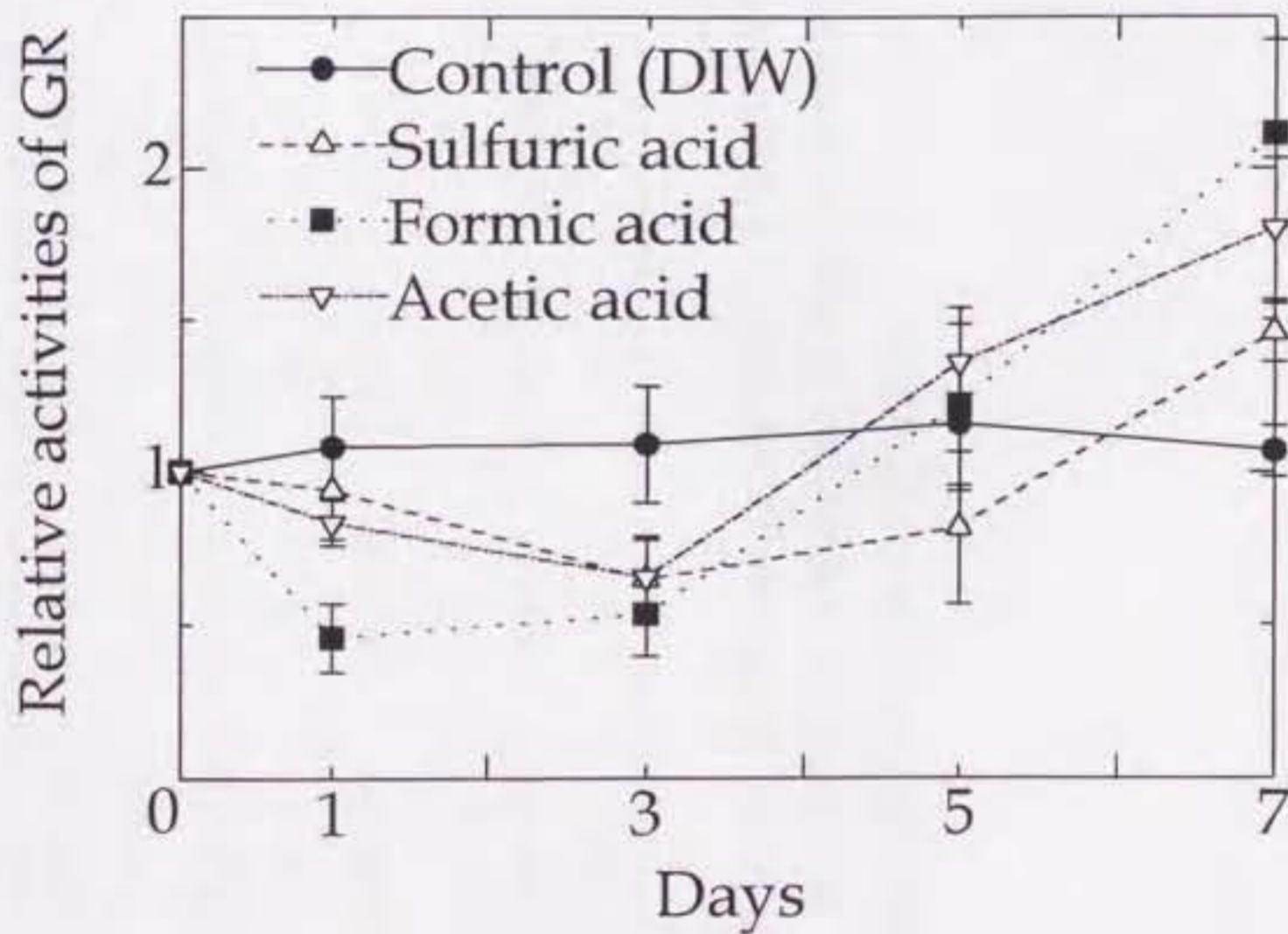


図 3-11 霧暴露後の葉内 GR 活性の経時変化

表 3-5 霧暴露処理 7 日間の APX 活性変化

APX	1 day	3 days	5 days	7 days
Control (DIW)	1.13±0.16 a	1.19±0.15 a	0.96±0.15 a	0.75±0.07 a
Sulfuric acid	0.84±0.13 ab	0.74±0.08 b	0.53±0.12 ab	0.27±0.06 bc
Formic acid	0.32±0.08 c	0.36±0.09 c	0.36±0.08 b	0.17±0.03 c
Acetic acid	0.55±0.11 bc	0.42±0.09 bc	0.54±0.16 ab	0.37±0.05 b

処理前平均活性は 565.44  $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ 。5 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P>0.05$ )。

表 3-6 霧暴露処理 7 日間の GR 活性変化

SOD	1 day	3 days	5 days	7 days
Control (DIW)	1.08±0.17 a	1.09±0.19 a	1.16±0.22 a	1.07±0.08 a
Sulfuric acid	0.94±0.16 a	0.65±0.13 ab	0.82±0.25 a	1.46±0.10 ab
Formic acid	0.46±0.11 b	0.53±0.14 b	1.22±0.26 a	2.11±0.31 b
Acetic acid	0.83±0.07 ab	0.65±0.13 ab	1.36±0.18 a	1.80±0.24 b

処理前平均活性は 33.78  $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ 。5 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P>0.05$ )。

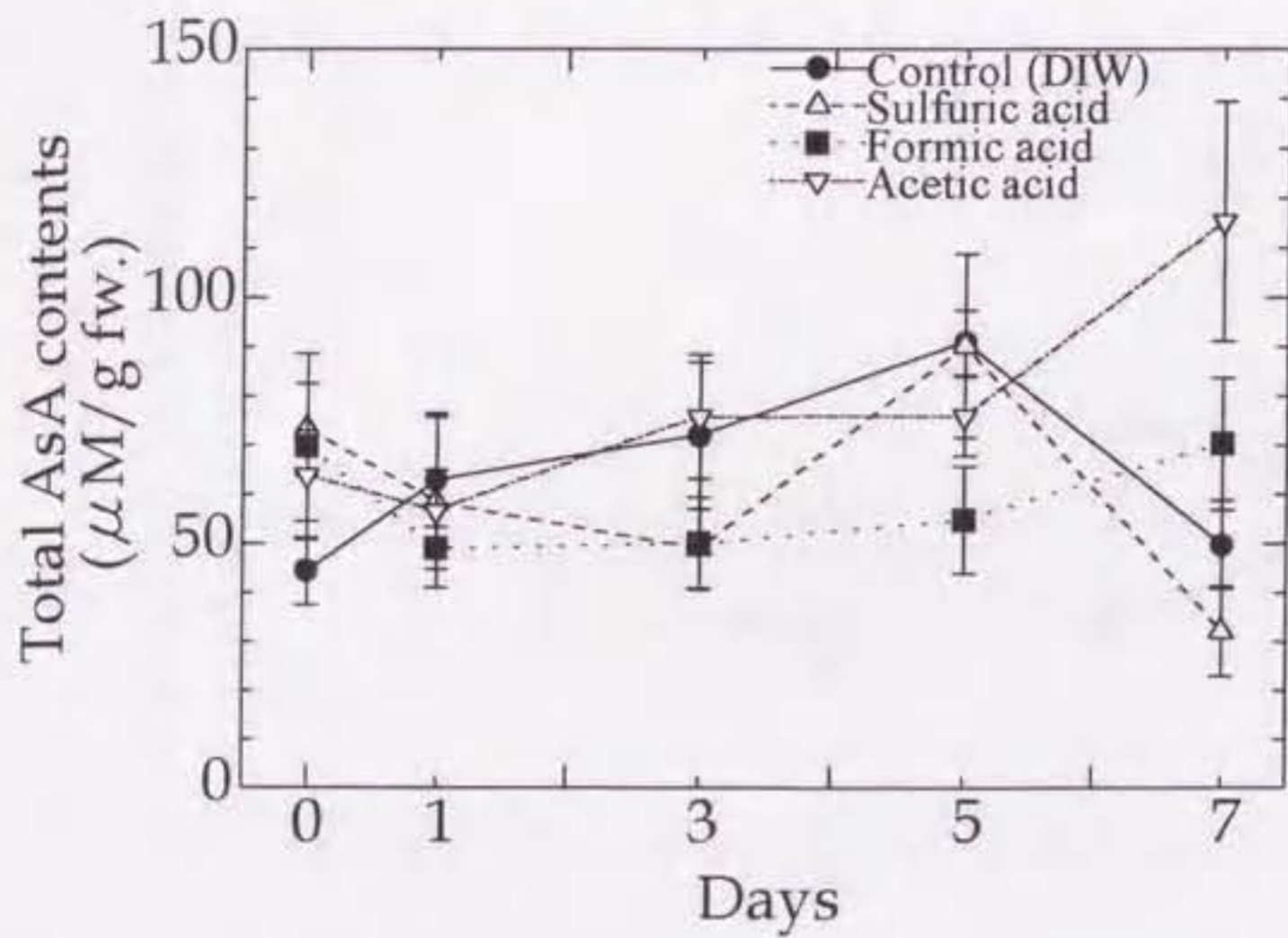


図 3-12 霧暴露期間の葉内総 AsA 量の経時変化

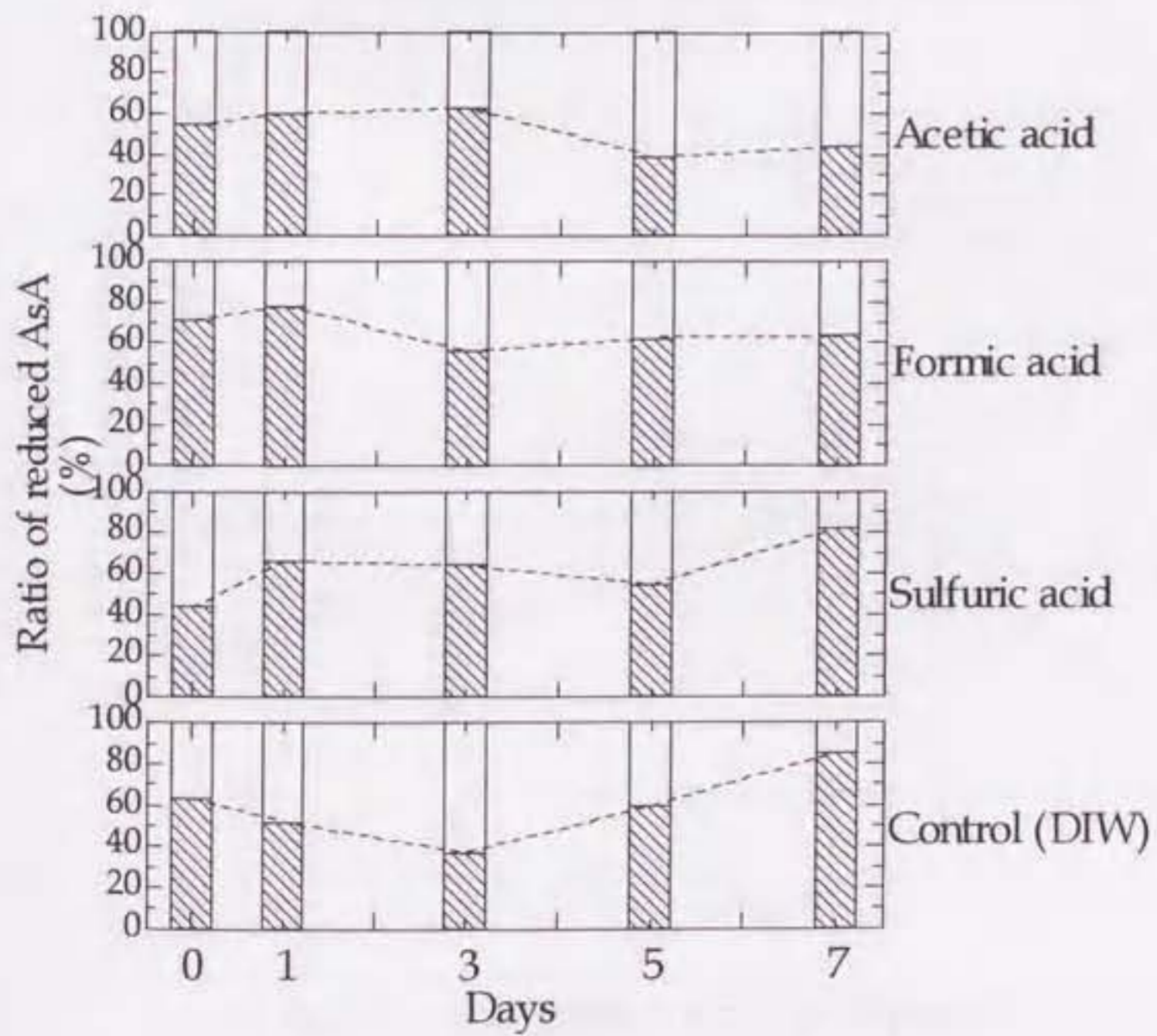


図 3-13 霧暴露期間の葉内還元型 AsA 比率の経時変化



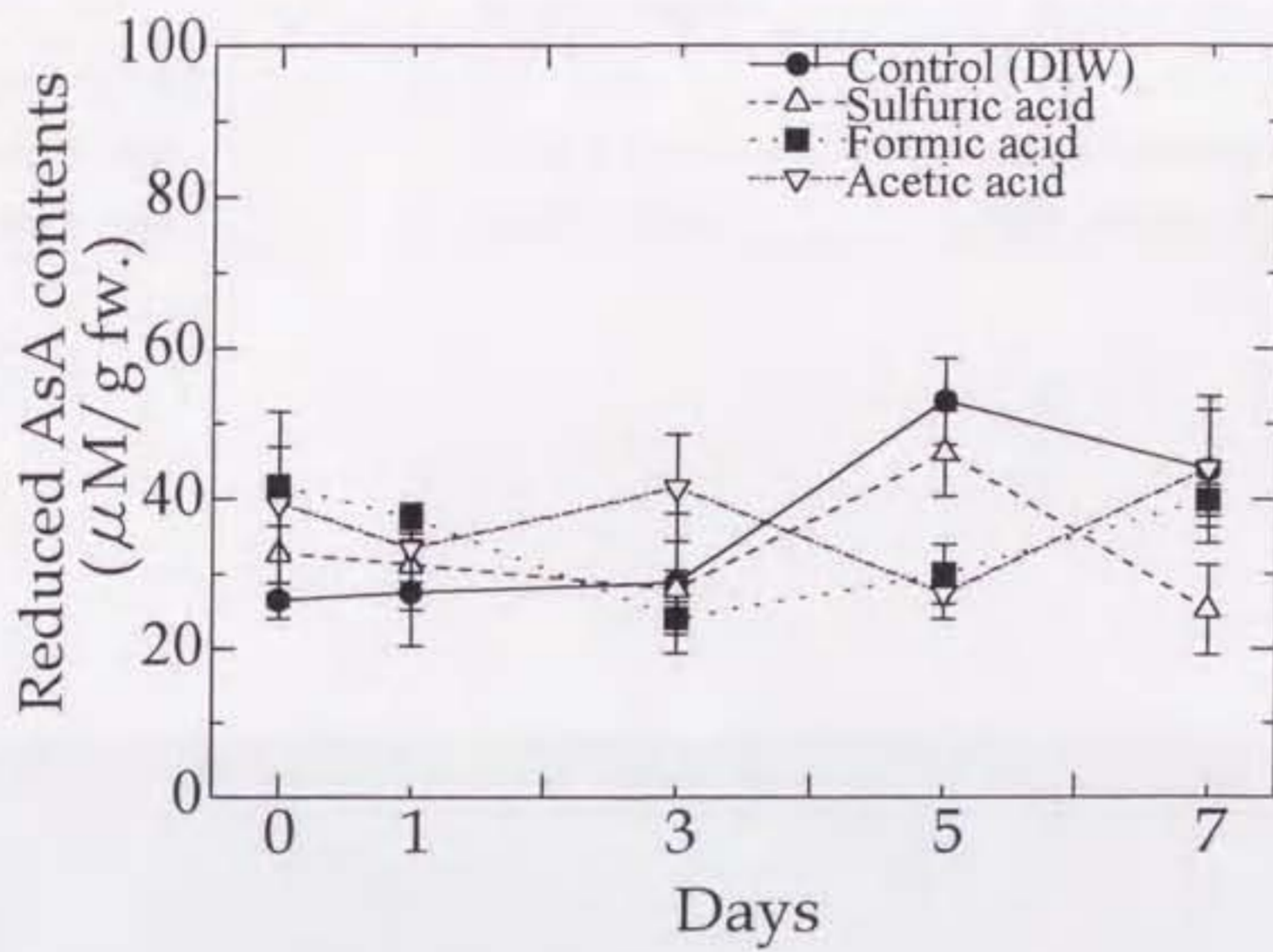


図 3-14 霧暴露期間の葉内還元型 AsA 量の経時変化

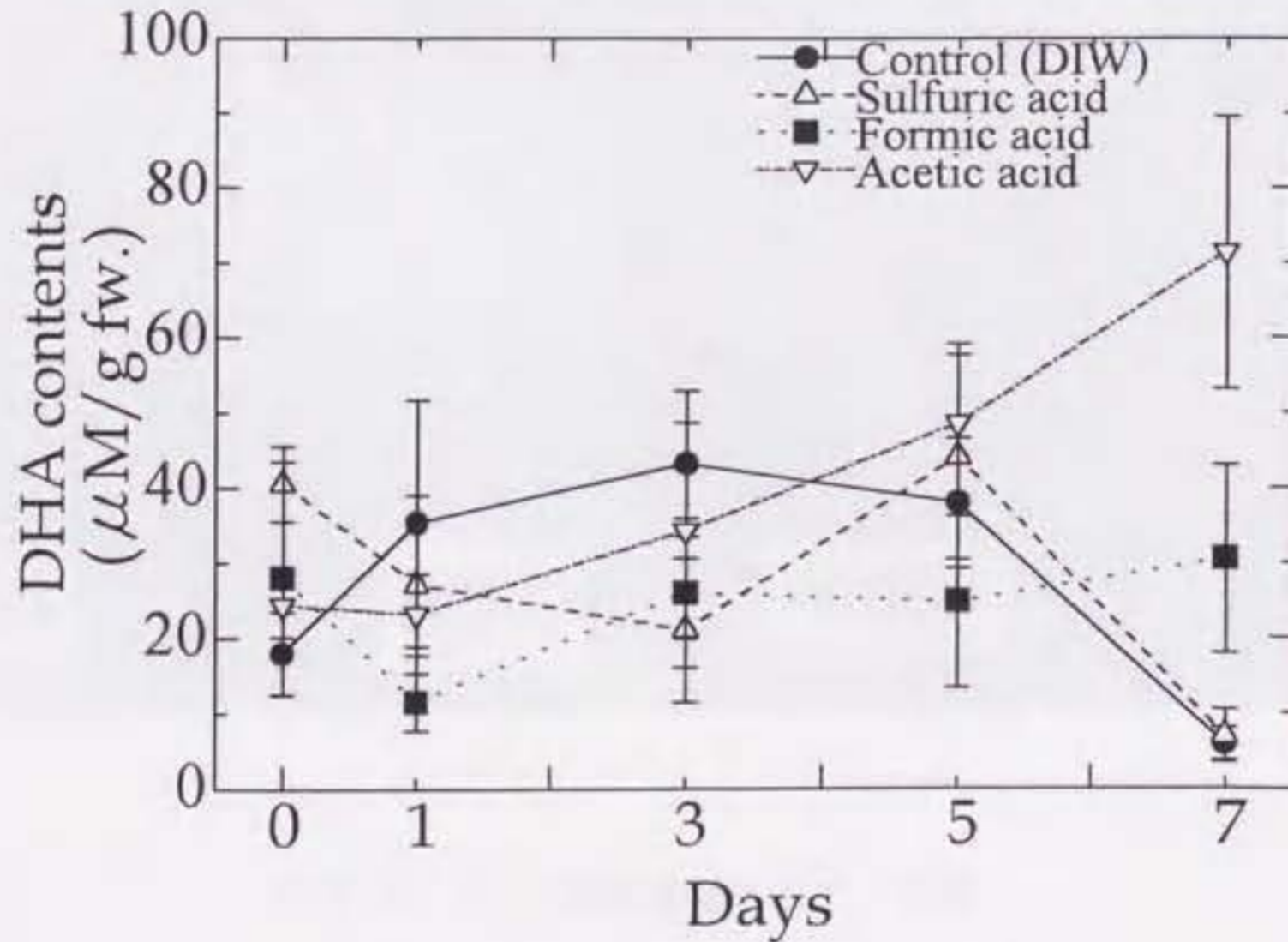


図 3-15 霧暴露期間の DHA 量の経時変化

表 3-7 霧暴露により発現した可視障害

	15 days after	28 days after
Control (DIW)	n.d	n.d
Sulfuric acid	Small necrosis	Small necrosis
Formic acid	Small necrosis	Dehydration, dead

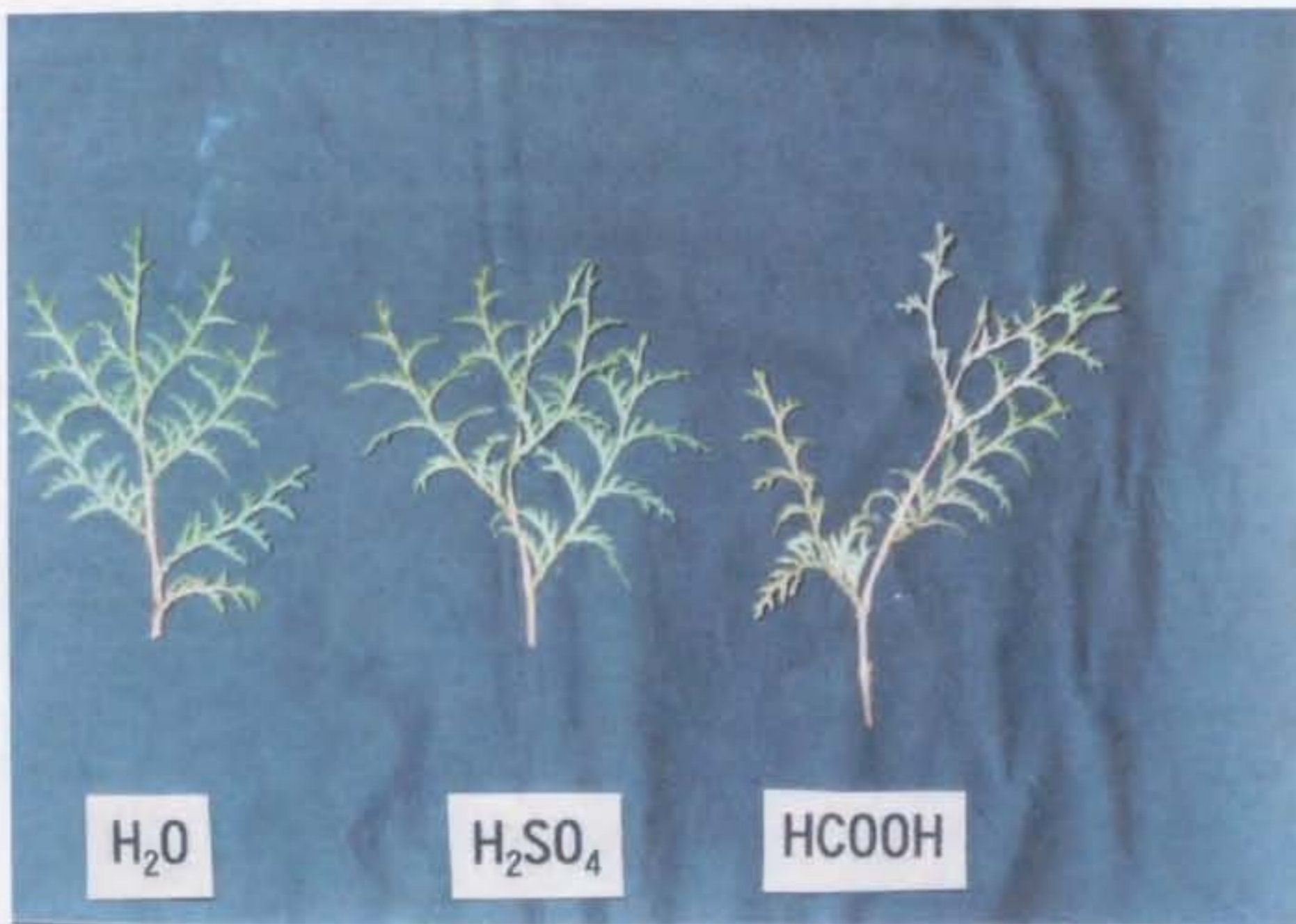


図 3-16 28 日間霧暴露後のヒノキ葉

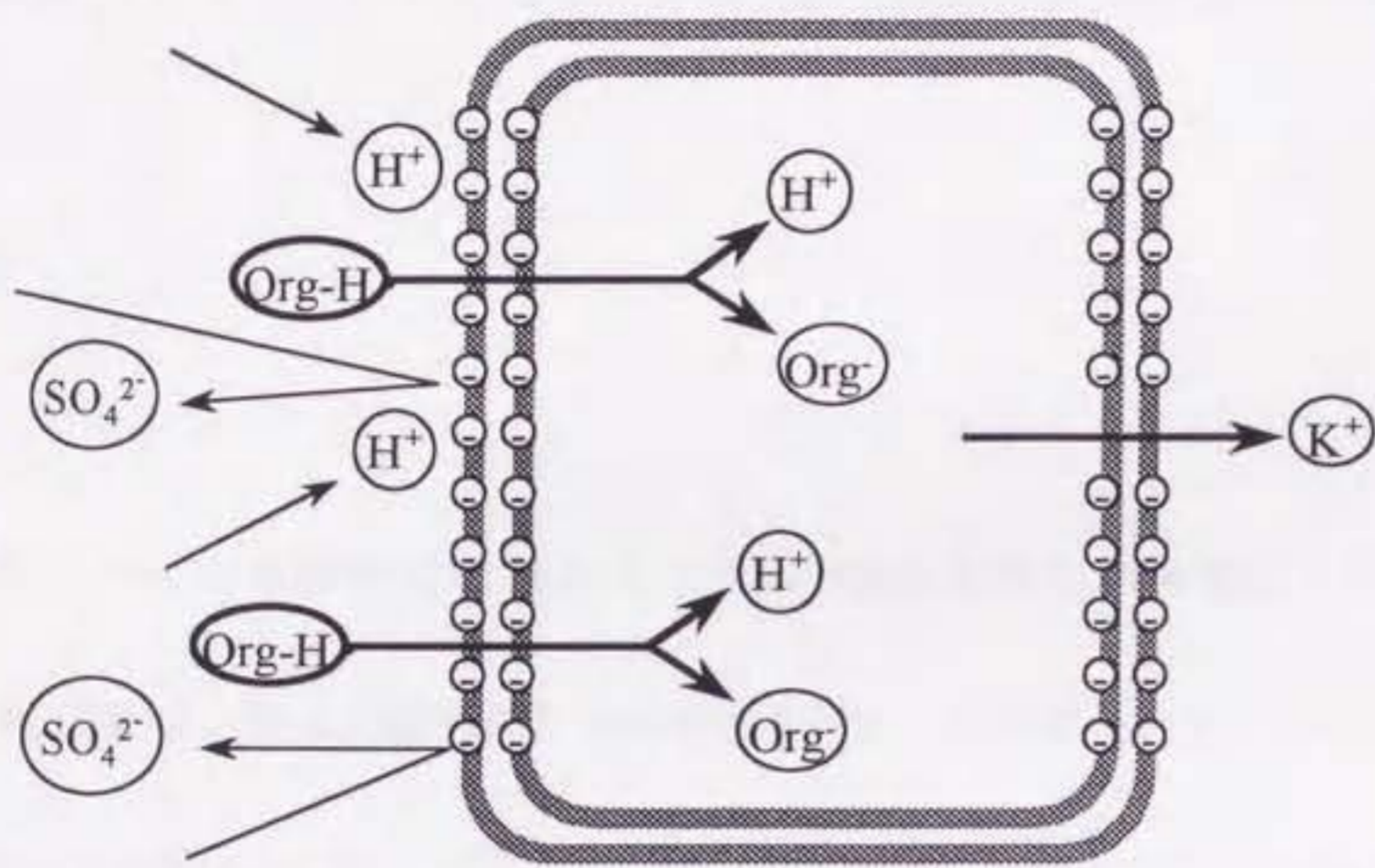


図 3-17 酸性物質が細胞へ及ぼす影響の模式図

## 第4章 根圏 Al ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の応答

### 4-1 緒言

pH 4.0 以下の土壌酸性化はアルミニウム(Al)の溶脱を引き起こし(Sato and Takahashi, 1996)、多くの植物にとって毒性を示すことが知られている(Foy *et al.*, 1978; Rengel, 1992)。Al はリン(P)、マグネシウム(Mg)、カルシウム(Ca)といった栄養元素の吸収を妨げ、植物の成長阻害を起こすといわれている(Kelly *et al.*, 1990)。Matsumoto *et al.* (1992) はオオムギを用いて Al 処理による、根細胞膜上の  $K^+$ - $Mg^{2+}$ -ATP 酵素の減退や、 $Ca^{2+}$ イオンの置換を報告している。一方、陽イオン、特に Ca や Mg は Al 毒性を緩和する事が知られている(Kinraide and Parker, 1987)。Ulrich (1983) は土壌溶液中の Al 濃度そのものよりも、Ca/Al モル濃度比の方が、樹木へのストレスへ関与していると提言している。Cronan and Grigal (1995)はドイツウヒやアカトウヒなど 18 樹種の Al ストレスに関する総説で、土壌溶液中の Ca/Al モル濃度比が 1.0 のとき樹木の成長あるいは栄養摂取に与える有害な影響は 50%、その比が 0.5 のとき 75%、0.2 のとき 100%である、と結論を下している。

Al ストレスの植物への影響に関する報告は数多くなされているが、成長量 (Joslin and Wolfe, 1989; Zysset *et al.*, 1996)、元素分析(Zysset *et al.*, 1996)、根の形態観察

(Kelly *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1998; Hirano *et al.* 2000)など、成長阻害や根の形態変化などに焦点を合わせた研究がほとんどで、植物内活性酸素消去系への影響に関するものは多くない (Cakmak and Horst, 1991; Severi, 1997; Richards *et al.*, 1998)。活性酸素種はストレスによって生成されるが、その生物体内でのストレス伝達への関与が注目されている (道家, 1999)。根への Al ストレスに対する葉での活性酸素消去系の応答を測定すれば、活性酸素種のストレス伝達への関与、すなわち生理代謝への影響のトリガーとしての役割の一端を明らかにできると期待できる。

よって本章では、一定の  $Al^{3+}$  濃度で培養液中の Ca/Al モル濃度比を変えた場合の SOD、CAT、APX、GR の各酵素活性への影響の違いを調べるとともに、APX、GR の活性に重要な関わりを持ち、それ自身も活性酸素消去を行う AsA 濃度への影響を調べることによって、Al ストレスの葉への伝達のメカニズムと、Ca による緩和効果のメカニズムに関する知見を得ることを目的とした。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 実験系

本章では根圏 Al ストレスのヒノキ葉内活性酸素消去系への影響を解明するために、Ca/Al モル濃度比を変えた培養液へ短期(1 週間)と長期(12 週間)、2 種類の期間の暴露実

験を行った。前者を実験 4-1、後者を実験 4-2 とする。実験 4-1 は 1998 年と 1999 年に 2 回、実験 4-2 は 1997 年に行った。

#### 4-2-2 植物材料

ヒノキ苗木を実験材料として用いた。実験 4-1 の供試木は、1998 年 4 月、3 年生苗木を、赤玉土、腐葉土を 1 対 1 の割合で混合した培養土を含む、プラスチック製ポット(直径 185 mm、高さ 200 mm; アイリスオーヤマ、仙台)に移植し、名古屋大学東山キャンパス内の圃場で生育した。生育期間中、ポットはガラス室内に置き、自然気温条件を保ちつつ降雨の混入を防いだ。1998 年 5 月 4 日と 1999 年 5 月 4 日に根を良く洗った苗木を、直径 2.0 - 2.8 mm のガラスビーズとテフロンチップを敷き詰めたワグネルポット(1/5000 are, 3.6 L; Fujimoto Kagaku Kogyo Co., 東京)に移植した。ガラスビーズは根圏の養分を均一に保つため用い、根への過度の圧迫を防ぐためにテフロンチップを混合した。1/5 濃度 Hoagland No. 2 (Hoagland and Arnon, 1950)培養液を用いた。その組成は表 4-1 に示す。実験期間中、ポットはプラスチック製の雨除け屋根を取り付けた鉄製フレーム(1.9 × 5.3 × 1.8 m)内に置き、自然気温条件を保ちつつ降雨の混入を防いだ。苗木それぞれ 35 本を供試木として用い、樹高はおよそ 50~60 cm であった。

実験 4-2 では、1995 年 4 月、苗木を 3-2-2 と同様に圃場で生育させ、5 年生となった 1997 年 5 月 30 日に、実験 4-1 と同様の方法で移植した。35 本を供試木として用い、樹高はお

よそ 70 cm であった。

#### 4-2-3 Al 処理

供試木は 7 本ずつ 5 処理区に分け、5 mM  $\text{AlCl}_3$  と様々な濃度の  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  を加えた培養液を与えた。表 4-2 に各処理区の Ca、Al 濃度と Ca/Al モル濃度比を示す。処理区 1(対照区)は 1/5 濃度 Hoagland No. 2 培養液をそのまま与え、処理区 2-5 には一律 5 mM  $\text{AlCl}_3$  を与え Ca の濃度を変えた。5 mM の Al 処理はヒノキに成長阻害を起こすことが報告されている (Kohno *et al.*, 1995)。全ての培養液は Al の形態を  $\text{Al}^{3+}$  に保つため HCl を添加しておよそ pH 3.5 に調整した。実験 4-1 の処理は 1998 年 6 月 23 日と処理は 1999 年 6 月 8 日に開始し、処理開始日、2、4、6 日後に約 200 ml の培養液を夕方に各ポットに与えた。実験 4-2 の処理は 1997 年 8 月 18 日に開始し、週 2 回から 3 回、約 200 ml の培養液を夕方に各ポットに与えた。

#### 4-2-4 樹高および器官別乾重比測定

実験 4-2 で処理開始前と、開始 8、12 週間後、各処理区 7 本ずつの、培地表面から頂芽の先端部までの樹高を巻尺を用いて 1mm 活約で測定した。処理 12 週間後、各区 3 本ずつを生葉、枯葉、幹、白根、その他の根に分け、蒸留水で洗浄した。生葉の半分は酵素活性測定に用いたが、残りの葉と他の器官は 85 °C で 48 h 乾燥した。その後、

各器官の乾重を測定し、苗木全体の乾重に対する比率を算出した。

#### 4-2-5 酵素活性測定

実験 4-1 では処理前と処理開始 1、3、5、7 日後、実験 2 では処理前と処理開始 1、7、12 週間後、酵素測定用に枝を採取した。切り枝から当年葉を 1.0 g 採取し、酵素活性を測定した。その方法は第 3 章に準じた。

#### 4-2-6 根・葉内元素分析

実験 1 の 1999 年度は処理開始 1 週間後、実験 2 は処理開始 12 週間後、元素分析用に各処理区 7 個体ずつと 3 個体ずつ根と葉を採取し蒸留水で洗浄した。その後、80°C で 24h 乾燥し、粉碎した。粉碎した試料 0.1 g をテフロン小容器に量りとり、これに濃硝酸 5.0 mL を加え密封して、小容器をテフロン外容器に入れた。さらにこの外容器をポリプロピレン製外筒に収め、レンチとバイスにより締め付け密封した。分解装置 (ETHOS 1600; MILESTONE) で湿式灰化した後、20 分間流水で冷却した。ポリプロピレン製外筒をゆっくり開栓し、テフロン小容器を取り出した。内容物に移し、蒸留水を 25 mL まで加えて希釈し、分析用の原液とした。

この試料を高周波プラズマ発光分析装置 (IRIS AP; 日本ジャーレルアッシュ, 京都) による誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析法で定量分析し、植物体の元素含有量を求めた。



根中の Al については原液を 10 倍に希釈して測定したが、その他の元素は原液をそのまま使用して測定した。分析した元素は実験 4-1 が Al、B、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、P、S、Zn で、実験 4-2 が Al、B、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、P、Zn であった。

#### 4-2-7 葉内アスコルビン酸 (AsA) 濃度測定

実験 1 の 1999 年度実験では、処理前と処理開始 1、3、5、7 日後間後の 3 回目の霧暴露後に、アスコルビン酸測定用にサンプルより枝を採取した。その方法は第 3 章に準じた。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 樹高および器官別乾重比

図 4-1A、B にそれぞれ実験 4-2 における、処理 8 週間後、12 週間後の樹高成長を示した。どちらの測定期でも処理区 2 (Ca/Al=2.5) が最高値を示し、Ca/Al 比低下と共に樹高も低下したが、有意差はなかった ( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)。Ca 濃度が等しい処理区 1 と 5 の比較から、Al は 8 週間および 12 週間の樹高成長に影響を与えなかったことが示唆された。

処理 12 週間後の器官別乾重比を表 3-3 に示した。Ca/Al モル濃度比は、白根を除い

て各器官乾重に有意な影響をもたらさなかった。白根乾重比において、処理区 1(対照区)と処理区 2、3 (Ca/Al 比=2.5、1.0)の間に有意差が認められたが( $p < 0.05$ , Fisher's LSD test)、Ca/Al モル濃度比と器官別乾重比の間に明確な関係は見出せなかった。

また、可視的な障害は実験 4-1、4-2 共に全く見られなかった。

#### 4-3-2 酵素活性

図 4-2、4-3、4-4、4-5 に実験 4-1 におけるそれぞれ SOD、CAT、APX、GR 活性の 7 日間の変化をそれぞれ処理前の個体の活性値を 1 としたときの相対値で表した。また、表 4-4、4-5、4-6、4-7 に同じデータに標準誤差と Fisher の最小有意差検定の結果も併せて示した。A が 1998 年度の B が 1999 年度の実験結果である。1998 年度の SOD 活性(図 4-2A・表 4-4A)では、処理区 1(対照区)の酵素活性は実験期間中変化がなかった。処理区 2、3、4、5 の酵素活性は処理 1 日後に上昇し、Ca/Al モル濃度比が小さいほど、高い活性を示した。処理 3 日後、処理区 2 (Ca/Al 比=5.0)の活性は対照区と同レベルまで低下し、実験期間中そのまま安定していた。処理区 3(Ca/Al 比=2.5)の活性は処理 7 日後にコントロールレベルまで低下した。処理区 4 と 5 (Ca/Al 比=1.0 と 0.16)は徐々に活性を低下させたが、対照区より有意に高い活性を示し続けた( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)。1999 年度の SOD 活性(図 4-2B・表 4-4B)では、処理区 2、3、4、5 の酵素活性は処理 1 日後に上昇し、Ca/Al モル濃度比が小さいほど、高い活性を示した。処理

5日後、処理区 1、2、3 の活性が上昇し全ての処理区で活性に有意差が認められなくなった。処理区 2 の活性は処理 7 日後に低下し、徐々に活性を低下させた処理区 5 と有意な差を示した( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)。これらの結果より、葉内 SOD 活性は培養液の Ca/Al 比に影響されることが明らかとなった。

図 4-6、表 4-8 に実験 4-2 の処理開始 1、7、12 週間後の SOD 活性変化をそれぞれ処理前の個体の活性値を 1 としたときの相対値で表した。処理 7 週間後に処理区 5 が、処理 12 週間後に処理区 3、4、5 の SOD 活性は対照区に比較して有意に増加していた。このことから、長期間の処理によっても葉内 SOD 活性は培養液の Ca/Al 比に依存することが示された。

実験 4-1、1998 年度の CAT 活性の 7 日間の変化を図 4-3A・表 4-5A に示した。処理区 1、2 は同じ傾向で 7 日間緩やかに活性の低下を続けた。処理区 3、4、5 の酵素活性は処理開始 1 日後若しくは 3 日後に上昇し、その後緩やかに減少し同レベルに落ち着いた。活性の変動は SOD と比較して小さく、実験期間中全ての処理区間に活性の有意差は認められなかった( $p > 0.05$ , Fisher's LSD-test)。1999 年度の活性変化を図 4-3B・表 4-5B に示したが、処理区 1 は活性の変動が小さかった。処理区 2 は対照区より低いレベルで推移した。処理区 3 は処理 5 日後に上昇するがその他は対照区と同レベルであった。処理区 4、5 の酵素活性は処理開始 1 日後に上昇し、その後変動はあるものの対照区より常に高いレベルを保った。

実験 4-2 の 12 週間 Al 暴露実験の CAT 活性の結果を図 4-7・表 4-9 に示した。処理開始 1 週間後と 7 週間後、培地 Ca/Al モル濃度比の減少に伴って CAT 活性も減少する傾向にある事が明らかとなった。しかし、処理開始 12 週間後各処理区の酵素活性に有意差は認められなかった( $p>0.05$ , Fisher's LSD test)。

1998 年度の APX 活性の 7 日間の変化を図 4-4A・表 4-6A に示した。処理区 1 の酵素活性は処理開始 3 日後に低下し、その後緩やかに増加した。処理区 2、3 の活性は 7 日間緩やかな増加を続けた。処理区 4、5 の活性は処理開始 1 日後に低下し、3 日後にいったん上昇するが、その後急激に減少し続けた。処理 7 日後に対照区と処理区 4、5 の酵素活性の間に有意差が認められた( $p<0.05$ , Fisher's LSD-test)。1999 年度の結果(図 4-4B・表 4-6B)では、処理区 1 の酵素活性は処理開始 5 日後に上昇するがほぼ一定であった。処理区 2、3 の活性は対照区とほぼ同じ挙動を示したが処理 7 日に対照区より低下した。処理区 4 の活性は処理開始 3 日後に低下し緩やかに減少した。処理区 5 は、処理 1 日後に急激に上昇し、その後緩やかに減少し続けた。処理 7 日後に対照区と処理区 2、3、4、5 の酵素活性の間に有意差が認められた( $p<0.05$ , Fisher's LSD-test)。

1998 年度の GR 活性の 7 日間の変化を図 4-5A・表 4-7A に示した。処理区 1 の酵素活性は処理開始 3 日後に低下し、その後緩やかな増加を続けた。処理区 2 の活性は実験期間中安定していた。処理区 3、4、5 の活性は処理開始 1 日後に低下し、3 日後に一旦上昇するが、その後急激な減少を続けた。処理 7 日後に対照区と処理区 3、4、5 の酵素

活性の間に有意差が認められた( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)。7日間の APX 活性と GR 活性変化は酷似しており、特に処理区 1、4、5 で顕著であった。1999 年度の GR 活性の 7 日間の変化(図 4-5B・表 4-7B)では、処理区 1 の酵素活性は処理期間中緩やかな変化を示した。処理区 2、4、5 の活性は実験期間中似た挙動を示し、処理 3 日後に上昇するが、その他は対照区より低いレベルで安定していた。処理区 3 の活性は処理期間中コントロールより低いレベルでの安定を続けた。処理 7 日後に対照区と処理区 2、3、4、5 の酵素活性の間に有意差が認められた( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)。

#### 4-3-3 根・葉内元素

図 4-8~4-30 に Ca/Al 培養液添加処理後のヒノキ葉、および根中各元素濃度を示した。7 日後葉中 Al 濃度に処理区間の有意差は認められなかった( $p > 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-8A)。しかしながら、根中 Al 濃度は各 Al 処理区において、処理区 1(対照区)よりの著しい増加が認められた( $p < 0.05$  Fisher's LSD-test) (図 4-8B)。12 週間後も根中 Al 濃度は各 Al 処理区において、処理区 1(対照区)よりの著しい増加が認められた( $p < 0.05$  Fisher's LSD-test) が(図 4-9B)、葉中 Al 濃度に処理区間の有意差はみられなかった( $p > 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-9A)。

7 日後、葉中 Ca 濃度は各区で有意差は認められなかったが、根中 Ca 濃度は対照区に比べ、Al 処理区で有意に低下した( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-10)。12 週間後、

葉中 Ca 濃度は対照区に比べ、処理区 2、3、4 で有意に増加したものの、処理区 5 では低くなる傾向があり、培養液中の Ca/Al 比が小さくなるにつれて減少した(図 4-11A)。根中 Ca 濃度は対照区に比べ、処理区 5 で有意に減少し( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)、その他の Al 処理区で有意に増加した( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-11B)。

7 日後、葉中 K 濃度には傾向はなく、根中 K 濃度は処理区 2、3 で減少した(図 4-12)。12 週間後、葉中 K 濃度は対照区と比較して Al 処理区で低下する傾向があり、根では処理区 4 で有意に増加した( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-13)。

7 日後、根中 Mg 濃度は全 Al 処理区で著しく低下したが、葉中濃度の差はなかった(図 4-14)。12 週間後も同様の結果が得られた(図 4-15)。

7 日後の P 濃度には葉、根ともに、傾向は見出せなかったが(図 4-16)、12 週間後、Al 処理区の葉では有意差は認められないものの、やや濃度低下していた(図 4-17A)。根中濃度は処理区 3、4 でやや増加したが、有意差は認められなかった( $p > 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-17B)。

7 日後、葉中 B 濃度は処理区 2 以降で著しく低下し、処理区 4、5 では検出されなかった(図 4-18A)。根中 B 濃度も処理区 2 以降で著しく低下し、処理区 3、4、5 では検出されなかった(図 4-18B)。12 週間後の葉中 B 濃度の対照区と Al 処理区には有意な差は認められなかったが、培養液中の Ca/Al 比が小さくなるにつれて増加傾向を示し、処理区 2(Ca/Al=5.0)と処理区 5(Ca/Al=0.16)の間で有意な差が認められた( $p < 0.05$ , Fisher's

LSD-test) (図 4-19A)。根中 B 濃度は対照区に比べ処理区 5 で有意に減少した( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-19B)。

7日後、葉中 Cu 濃度は処理区 3、4、5 で有意に低下したが( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)、根中濃度に有意差は見られなかった( $p > 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-20)。12 週間後も葉中 Cu 濃度は培養液中の Ca/Al 比が小さくなるにつれて有意に減少したが( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)、根中濃度に顕著な違いはみられなかった( $p > 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-21)。

7日後、葉中 Zn 濃度には傾向が認められなかったが、根では有意差は認められないものの、Al 処理区で低下する傾向が見られた(図 4-22)。12 週間後、葉の Zn 濃度は処理区 4 で高く、根では Al 処理区で有意に濃度低下が認められた( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図 4-23)。

Fe 濃度はどちらの期間も根、葉ともに傾向は見出せなかった(図 4-24、25)が、12 週間後、Al 処理区の葉では有意差は認められないものの、やや濃度低下していた(図 4-24A)。

7日後、根中 Mn 濃度は全 Al 処理区で著しく低下したが、葉中 Mn 濃度には傾向は認められなかった(図 4-26)。12 週間後、葉中 Mn 含有量は対照区に比べ、処理区 3、4 で有意に増加し( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)、根中濃度は 7 日後とほぼ同様に Al 処理区で対照区より低下する傾向が見られた(図 4-27)。

Sは葉では傾向がなく、根の処理区2、3で7日後、12週間後どちらも低下する傾向があった(図4-28、29)。

7日後、根中Na濃度は全Al処理区で有意に低下し( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test)、葉中Na濃度は処理区4、5で有意な低下が認められた( $p < 0.05$ , Fisher's LSD-test) (図4-30)。

#### 4-3-4 葉内 AsA 濃度

図4-31に実験4-1の1週間Al培養液処理期間のヒノキ葉中総AsA濃度変化を示した。その値は、およそ $40 \sim 60 \mu\text{M} / \text{g fw}$ であった。処理開始5日後に対照区は急減し、逆に処理区3、4は急増した。しかし、Ca/Al比との相関や、APXとの相関は認められなかった。

#### 4-4 考察

河野ら(1995b)はヒノキとスギ(*Cryptomeria japonica*)を用いて、Ca濃度を0.8 mMに固定しAl濃度を変化させた4ヶ月の水耕実験を行ない、Al濃度が5 mM以上になると有意に成長阻害を起こしたことを報告している。Zysset *et al.* (1996)はヨーロッパグリ(*Castanea sativa*)を用いて31週の水耕実験を行ったが、Ca/Al比が0.1 (Ca=1 mM,



Al=10 mM) になると葉のバイオマス減少と細根比(直径 1 mm より小さな根の乾重 / 直径 1~2mm の根乾重)減少が認められた。本実験では培溶液の Ca/Al 比減少によって、ヒノキの器官別乾重比(表 4-3)には影響しなかったが、樹高成長(図 4-1)には有意差は認められなかったものの、処理 8 週間、12 週間で Ca/Al 比減少によって成長が低下するという結果を得た。これは対照区である処理区 1 の成長が最も低かったことから、培養液中の Ca/Al 比というよりもむしろ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  増加による施肥効果であると推測される。

実験 4-1 で、SOD 活性は処理開始 1 日後から培養液の Ca/Al モル濃度比の減少に伴い高くなることが示された(図 4-2・表 4-4)。このことより、根圏 Al ストレスがヒノキ葉内の活性酸素種を 1 日以内に増加させることが示唆される。Al ストレスによる根の活性酸素消去系への影響や(Cakmak and Horst, 1991; Richards *et al.*, 1998)、Al による樹木根の形態への影響が多く報告されている(Joslin and Wolfe, 1989; Kelly *et al.*, 1990; Zysset *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1998; Hirano *et al.* 2000) が、その葉への影響を論じたものは数少ない。樹木において根への Al ストレスが 1 日以内に葉に伝わるといふ結果は他の生理応答の研究では報告されておらず、活性酸素消去系がストレスへの初期応答として、極めて重要であることが示唆される。

実験 4-1 の 1998 年度実験で、処理区 2、3、4、5 の SOD 活性は処理 1 日後に上昇し、Ca/Al モル濃度比が小さいほど、高い活性を示した。処理区 2 (Ca/Al=5.0) と 3

(Ca/Al=2.5)の酵素活性はそれぞれ、処理開始3日後と7日後にコントロールレベルまで減少した(図4-2A・表4-4A)。処理開始7日後の対照区と処理区4 (Ca/Al=1.0)、5 (Ca/Al=0.16)のSOD活性における有意な差は樹木における土壌溶液中のCa/Alモル濃度比の閾値が1.0であるというCronan and Grigal (1995)の結論と一致する。また、1999年度のSOD活性(図4-2B・表4-4B)も同じような傾向にあった。これらの結果から、根圏Caが樹木根表面あるいは中でAlと競合し毒性を緩和し、数日以内にAlストレスを葉に到達させなくするのではないかと推測される。また、実験4-2で処理区2、3のSOD活性が処理開始7週間後に対照区との有意差が認められなくなり、処理12週間後に再び有意差が認められたのは、長期暴露によって根の形態変化が進み、初期とは異なるストレスがかかったからだと思われる。Hirano *et al.* (2000)はヒノキを用いた本研究と同じCa/Al条件での12週間の処理で根圏のCa/Al比低下が分岐根長の低下などの根の形態変化を引き起こすと報告している。形態変化を起こすほどの根へのストレスが再び葉に伝わり、再び葉内の活性酸素を増大させたのであろう。

図4-8、4-9にみられる様に、Al添加により根中Al濃度は上昇したが、葉中Al濃度は影響を受けなかった。これは葉内酵素を活性化させる葉へのAlストレスが、根から葉へのAlそのものの移動でないことを示唆している。Godbold *et al.* (1988)はAl処理したアカミトウヒ (*Picea abies*) の根の内皮がAlに対するバリアとして存在していると報告している。また、Larsen *et al.* (1996)はAl感受性 *Arabidopsis thaliana* の根で

のカロースの堆積が、Al による根成長阻害に関与すると推測している。しかしながら、根圏への Al ストレスがどの様に葉へ伝達するかについての詳細な知見は得られていない。

7日間の処理では、葉の Ca 濃度に影響は見られなかったが、12週間後は影響が見られた(図 4-12)。SOD 活性が Ca/Al 比減少に伴い、処理開始直後上昇し、いったん抑制され、再び上昇するが(図 4-2、4-6)、最初に活性上昇と再度の活性上昇の原因は異なるかもしれない。最初の活性上昇は原因が定かでないが、再度の活性上昇、すなわち活性酸素増大は、葉への Ca 移動の阻害による可能性もある。

Ca と共に土壌酸性化の臨界負荷量指標として採り上げられるのは K と Mg であり(Cronan and Grigal, 1995)、また、P も重要な栄養元素である。K と P は根では影響が見られないが、12週間後の葉の Al 処理区で有意差は認められないものの、濃度の低下が見られた(図 4-18、19、24、25)。一方、Mg は根で著しい吸収阻害が認められたが、葉では有意差は認められなかった(図 4-20、21)。これによって、栄養元素の中で Mg の転流阻害が葉の活性酸素増加の原因ではないことが示唆されたが、Al ストレスが長期にわたれば K や P の葉への移動阻害が起こる可能性が示された。

植物根には Al 毒性に対して様々な防御機構が備わっているといわれるが、Al の植物への毒性は Al 自体の化学形態に依存し、キレート結合した Al は単量体時( $Al^{3+}$ )と比較して植物への成長阻害作用が緩和される(Hue *et al.*, 1986)。いくつかの植物はクエン酸

のような有機酸を根から分泌して Al ストレスに対抗していることが知られている(Ma *et al.*, 1997)。また、ヒノキも根圏 Al ストレスに対して、根圏 pH を上昇させたり、有機酸濃度を増加して防御することが解明されている(富岡、私信)。それら防御機構の働きを、葉内の活性酸素消去系酵素で評価するのは可能であると思われる。根から葉への Al ストレス伝達機構についても分かっておらず、ヒノキの酸性化ストレス防御機構解明のため、その両機構の相互作用に関する解析が必要である。

元素分析により、7日後 Al 処理区での B の著しい減少が明らかになった(図 4-10)。

これは Lukaszewski and Blevins (1996)のカボチャ (*Cucurbita pepo*)を用いた研究での Al と B の深い関係を示した結果と一致する。しかし、B 欠乏によって AsA 濃度を減少させるという点では、AsA 濃度に影響を及ぼさない本研究の結果とは一致しなかった。これには、ヒノキ葉中の高 AsA 濃度が関係しているかも知れない。また、12週間後では根では同じような傾向を見せるが、葉では逆に Ca/Al 比の減少に伴い濃度を増加させていた。B は細胞分裂や細胞壁形成に働くといわれており、また、Al ストレスへ関与が指摘されている。しかし、その詳細な役割は明らかではない(Lukaszewski and Blevins 1996)。今後、B を考慮に入れた実験系での研究が必要である。

処理開始7日後に Al 処理区の根では、Zn、Mn、S、Na の濃度低下が認められた(図 4-22B、26B、28B、30B)。これは、Ca、Mg、B と同じ傾向であり、根におけるこれらの元素の吸収阻害が示唆された。一方、処理開始7日後に Al 処理区の葉では、Cu、

Na の濃度低下が認められ(図 4-20A、30A)、また、処理開始 7 日後の Al 処理区の葉で S の濃度が上昇していた(図 28A)。処理開始 7 日後に、各処理区の葉での、主要栄養元素濃度にまだ差はみられず、これらの元素が Al ストレス伝達に関与している可能性が示された。

実験 4-1 期間中の APX と GR 活性の変動では(図 4-4、4-5)、APX 活性は時間的な前後はあるものの Ca/Al 比が低い処理区が早く上昇し、処理 7 日後には対照区より低下するという傾向を見せた。GR は低 Ca/Al 比処理区で処理 3 日後に活性上昇しその後低下するという似た傾向を示した。APX と GR には全く同じというわけではないが、似た挙動を示すという事で、関連性が見出せる。両酵素はアスコルビン酸-グルタチオンサイクル上にあり(図 1-2)、アスコルビン酸とグルタチオンの酸化還元に伴い働いている(Nakano and Asada, 1981)。本実験の結果から、葉内のアスコルビン酸-グルタチオンサイクルが 7 日間の Al ストレスによって活性化させられ、その後抑制されていることが推測される。しかし、処理期間中の APX 活性(図 4-4)と総 AsA 濃度(図 4-35)との間に明確な関係は見出せなかった。AsA は APX の基質で、AsA が欠乏すると APX は失活することが知られている(Asada, 1992)。APX と GR 活性に似た傾向が認められたため、その活性変動にアスコルビン酸-グルタチオンサイクルの AsA 量の関与が予想されたが、根圏 Ca/Al 比減少による葉内 APX 活性低下の原因は、葉内 AsA 濃度の変化によるものではないことと思われる。

SOD は活性酸素の一種であるスーパーオキシドを過酸化水素( $H_2O_2$ )に変え、植物のシンプラスト内では主に CAT、APX によってそれを無毒化する(浅田、1988)。実験 4-1 の SOD(図 4-2・表 4-4)と CAT(図 4-3・表 4-5)、APX 活性(図 4-4・表 4-6)、また、実験 4-2 の SOD(図 4-6・表 4-8)と CAT(図 4-7・表 4-9) を比較すると SOD と CAT・APX どちらも連動しておらず、CAT・APX が SOD によって生成された  $H_2O_2$  を効果的に消去しているとは考え難い。よって、SOD 活性の増加と APX 活性の減少により、細胞内に  $H_2O_2$  が蓄積される可能性が推測される。また、アポプラスト等に存在する他の過酸化水素消去酵素である、グルタチオンペルオキシダーゼや西洋ワサビペルオキシダーゼなどが  $H_2O_2$  消去に働いた可能性もある。葉内酵素を活性化させる根圏 Al ストレスの葉への伝達が Al イオンそのものの移動でない事が示唆されたが、根から葉へのストレス伝達機構についての詳細な知見はまだ得られていない。活性酸素種の急激な増加は全身獲得抵抗性(SAR)への引き金といわれ、「オキシダティブバースト」と呼ばれる(道家、2000)。また、植物は SAR 獲得のため、細胞内  $H_2O_2$  濃度を高めるという説もある(Chen *et al.*, 1993)。加えて、ジャガイモが病原菌に対して障壁を作るのに付随してアポプラストで  $H_2O_2$  がペルオキシダーゼによって生成されるとの報告もある(Chai and Doke, 1987)。「オキシダティブバースト」という観点から見れば、Al ストレスに対して SOD と APX 活性の 7 日間の変動が異なり  $H_2O_2$  が蓄積されるという理由を説明できるかもしれない。すなわち、根圏 Al ストレスを受けたヒノキは SAR を得るために SOD、APX

活性を調整して故意に  $H_2O_2$  を体内に蓄積させているかもしれない。この仮定の証明の為に今後の研究で、アポプラスト局在ペルオキシダーゼ活性測定と活性酸素測定部位の特定が必要である。ヒノキ葉内の SOD、CAT、APX、そして GR といった活性酸素消去系酵素は、根圏 Ca/Al モル濃度比が小さいほど活性化が認められ、処理開始 1 日以内に根圏ストレスが葉に伝達されることが明らかになった。また、葉内活性酸素消去系酵素に影響が現れる条件下でも、葉の可視障害や地上部の成長低下が認められないことが示された。一方、元素分析により、葉における活性酸素消去系酵素の活性増大は、根から葉への Al の移動によらないことが明らかになった。SOD 活性は処理 1 日後に増加し、7 週間後には低下し、12 週間後には再び活性化されたことと、12 週間後には葉内の K、P 濃度が減少していた結果から、根から葉へ伝達されるストレスが、処理初期と 12 週間後では異なることが示唆された。根圏 Ca/Al モル濃度比が小さいほど、葉内 SOD および CAT 活性を上昇させ、対照的にアスコルビン酸-グルタチオンサイクル上にある、APX および GR 活性を減少させた。この APX 活性減少は基質である AsA 減少による失活でないことが明らかになった。根から葉への Al ストレス伝達機構については未だ明らかではないが、活性酸素の関与も考えられ、他の防御機構とともに活性酸素消去系酵素が根圏 Al ストレスに対して重要な役割を担っていることが示唆された。

図表

表 4-1. 1/5 濃度 Hoagland solution No. 2 溶液の成分組成

Element	Compound	Concentration (mM)
K	KNO <sub>3</sub>	1.2
Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.8
Mg	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4
P	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
Mn	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0091
Fe	Fe EDTA	0.0179
Zn	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0008
Cu	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0003
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0046
Mo	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0005

表 4-2. 各処理区溶液中の Ca と Al 濃度および Ca/Al 比

Group	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (mM)	AlCl <sub>3</sub> (mM)	Ca/Al ratio
1	0.8	0	—
2	25.0	5.0	5.00
3	12.5	5.0	2.50
4	5.0	5.0	1.00
5	0.8	5.0	0.16



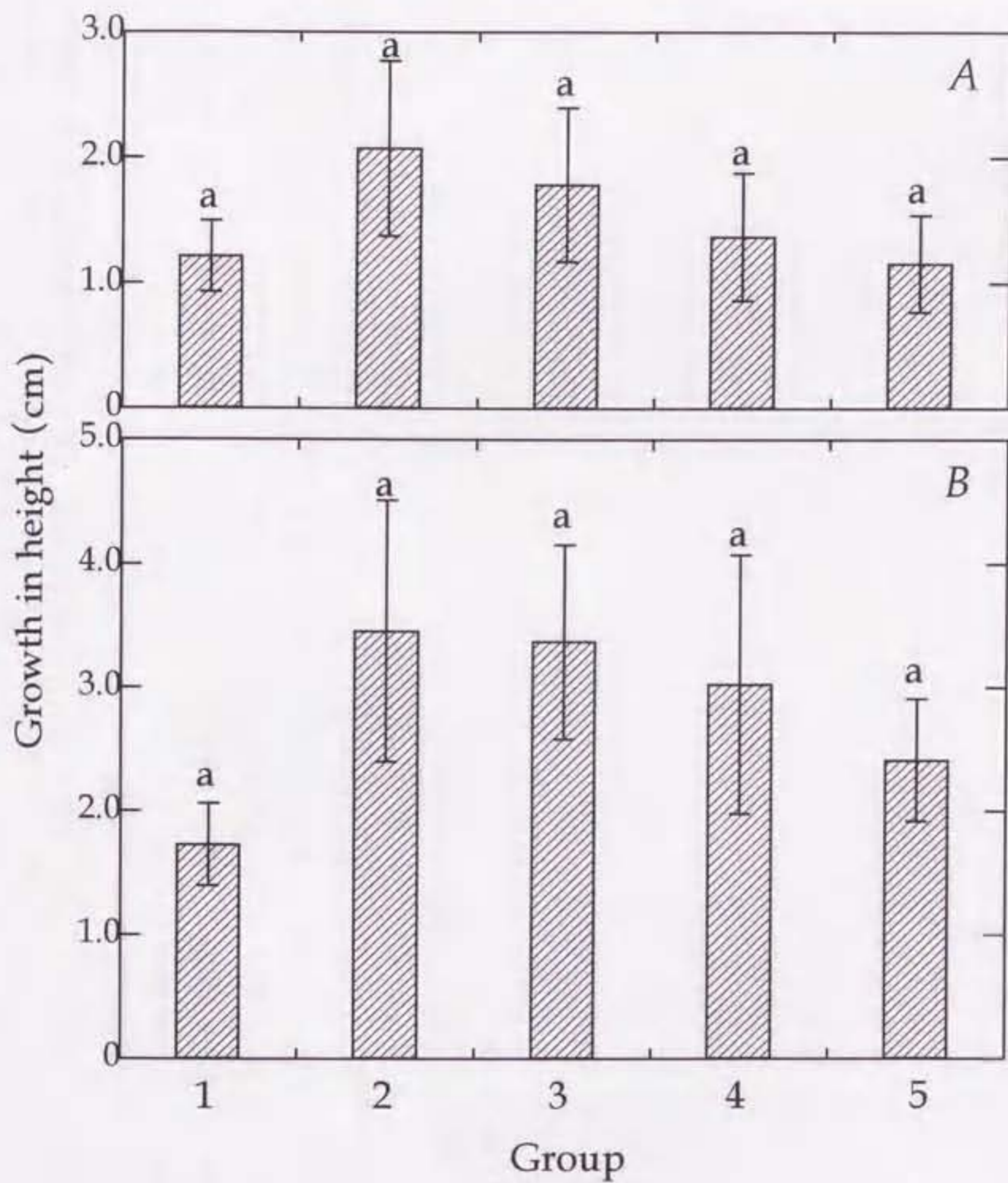


図 4-1 8 週間(A)および 12 週間(B)AI 処理後の樹高成長量

7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P > 0.05$ )。

表 4-3 12 週間 AI 処理後の器官別乾重比

Group	Fresh needles (%)	Dead needles (%)	Stems (%)	White roots (%)	Other roots (%)	Above-ground part*1 (%)	Subterranean part*2 (%)
1	37.2 ± 4.4 a	4.3 ± 2.4 ab	31.3 ± 2.9 a	5.9 ± 1.3 a	21.4 ± 4.7 a	72.7 ± 4.7 a	27.3 ± 4.7 a
2	40.0 ± 2.8 a	2.6 ± 1.2 ab	34.9 ± 1.3 ab	2.7 ± 0.2 b	19.9 ± 2.9 a	77.4 ± 3.2 a	22.6 ± 3.2 a
3	40.4 ± 3.6 a	1.9 ± 0.5 a	31.5 ± 2.9 a	2.7 ± 0.1 b	23.5 ± 2.7 a	73.8 ± 2.5 a	26.2 ± 2.5 a
4	37.0 ± 0.6 a	4.0 ± 1.3 ab	33.7 ± 2.1 ab	4.3 ± 0.3 ab	21.1 ± 1.6 a	74.6 ± 1.4 a	25.4 ± 1.4 a
5	39.5 ± 2.7 a	2.1 ± 0.6 ab	39.7 ± 2.9 b	4.3 ± 0.3 ab	15.0 ± 2.6 a	81.2 ± 2.3 a	18.8 ± 2.3 a

\*1 Above-ground part = Fresh needles + Dead needles + Stems

\*2 Subterranean part = White roots + Other roots

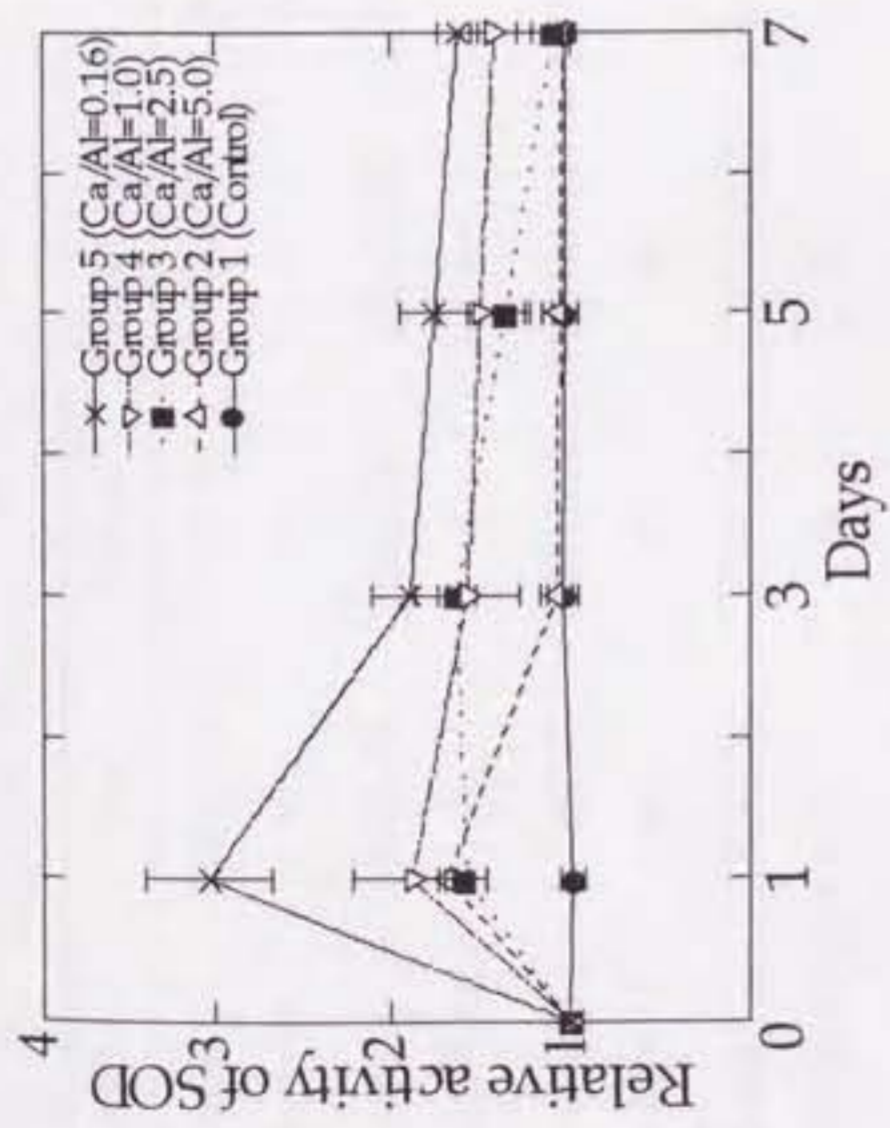


図 4-2A 処理 7 日間の SOD 活性変化(98 年)

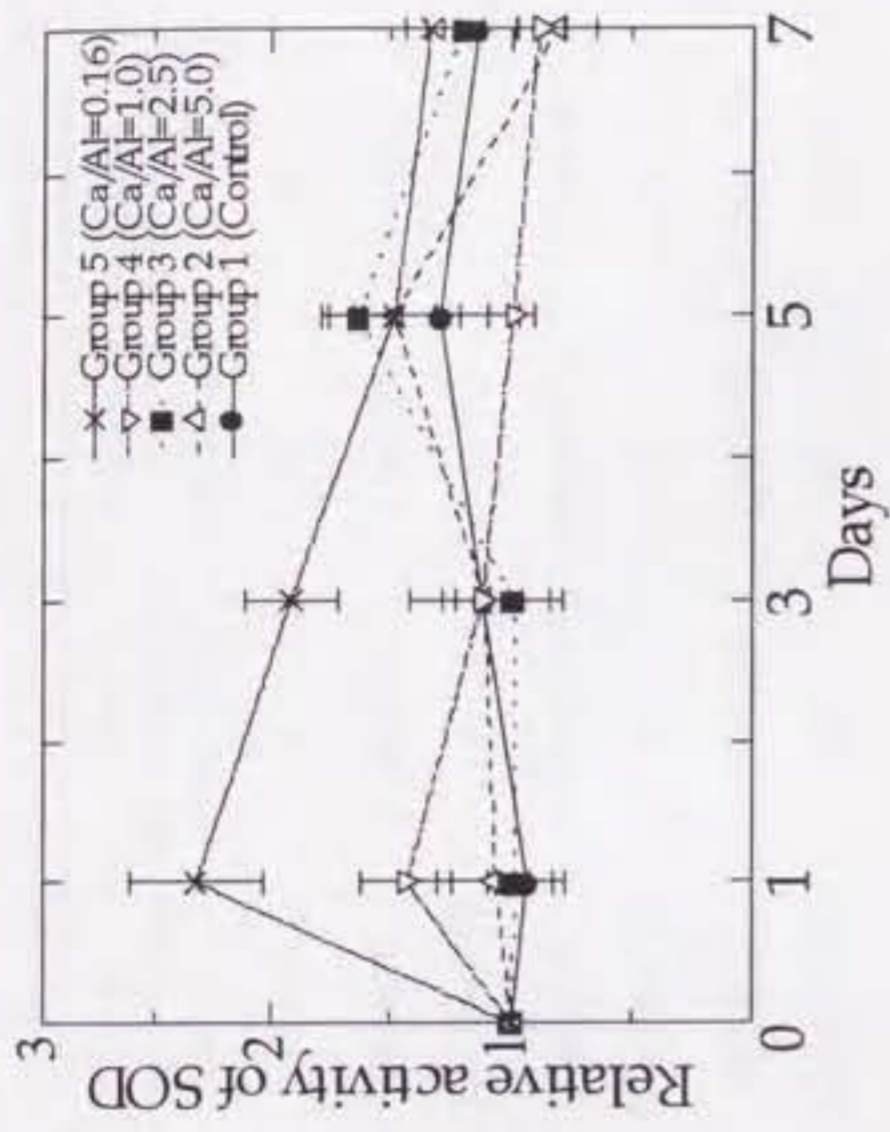


図 4-2B 処理 7 日間の SOD 活性変化(99 年)

表 4-4A 処理 7 日間の SOD 活性変化(98 年)

SOD	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	0.99±0.07 a	1.04±0.08 a	1.04±0.07 a	1.03±0.04 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	1.69±0.05 ab	1.08±0.09 a	1.07±0.10 a	1.05±0.07 a
Group 3 (Ca/Al=2.5)	1.59±0.12 ab	1.63±0.11 ab	1.37±0.13 ab	1.10±0.12 ab
Group 4 (Ca/Al=1.0)	1.89±0.34 b	1.58±0.29 ab	1.50±0.24 b	1.43±0.13 bc
Group 5 (Ca/Al=0.16)	3.02±0.36 c	1.90±0.21 b	1.76±0.19 b	1.63±0.11 c

処理前平均活性は 7.10 U mg<sup>-1</sup> protein。7 個体の平均値 ± SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す(P>0.05)。

表 4-4B 処理 7 日間の SOD 活性変化(99 年)

SOD	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	0.93±0.16 a	1.12±0.16 a	1.29±0.32 a	1.14±0.22 ab
Group 2 (Ca/Al=5.0)	1.06±0.24 a	1.11±0.32 a	1.48±0.27 a	0.81±0.17 a
Group 3 (Ca/Al=2.5)	0.99±0.06 a	0.99±0.15 a	1.63±0.16 a	1.20±0.09 ab
Group 4 (Ca/Al=1.0)	1.43±0.19 ab	1.12±0.11 a	0.99±0.10 a	0.89±0.10 ab
Group 5 (Ca/Al=0.16)	2.32±0.29 b	1.91±0.19 b	1.48±0.17 a	1.33±0.11 b

処理前平均活性は 7.07 U mg<sup>-1</sup> protein。7 個体の平均値 ± SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す(P>0.05)。

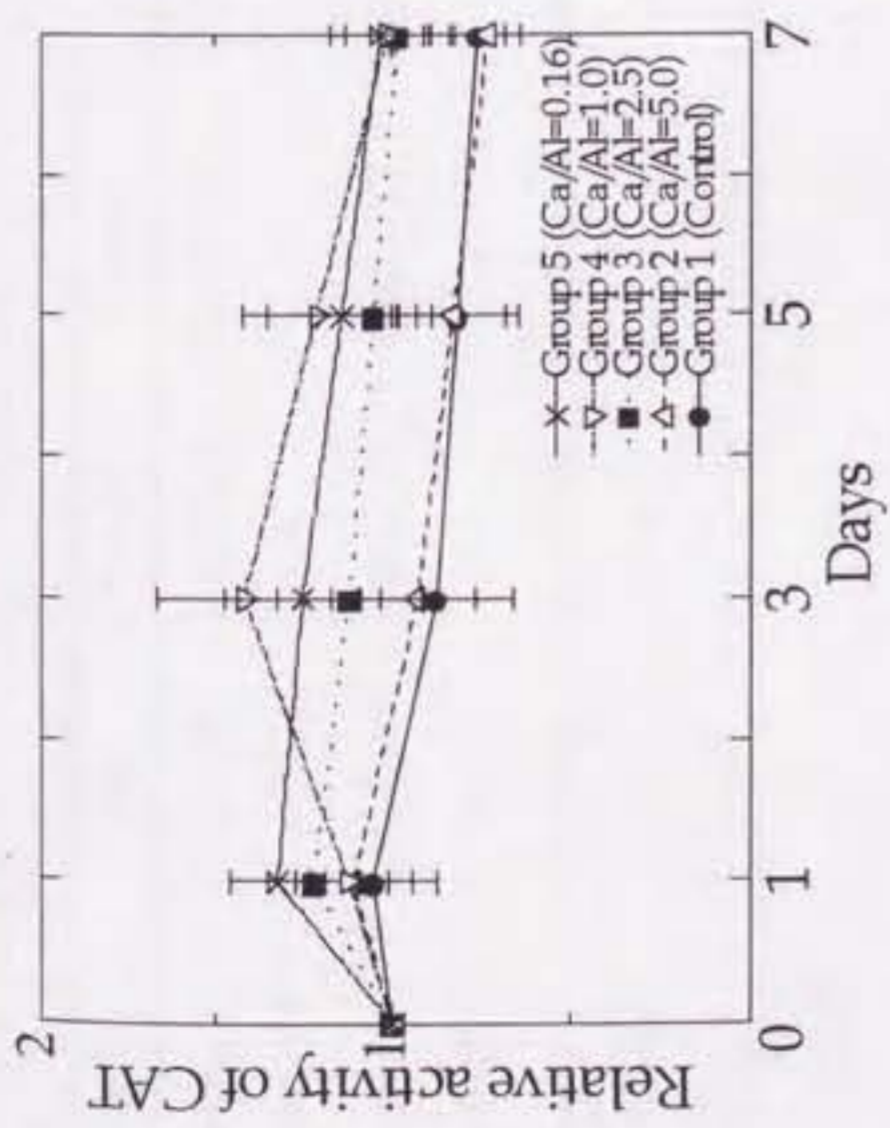


図4-3A 処理7日間のCAT活性変化(98年)

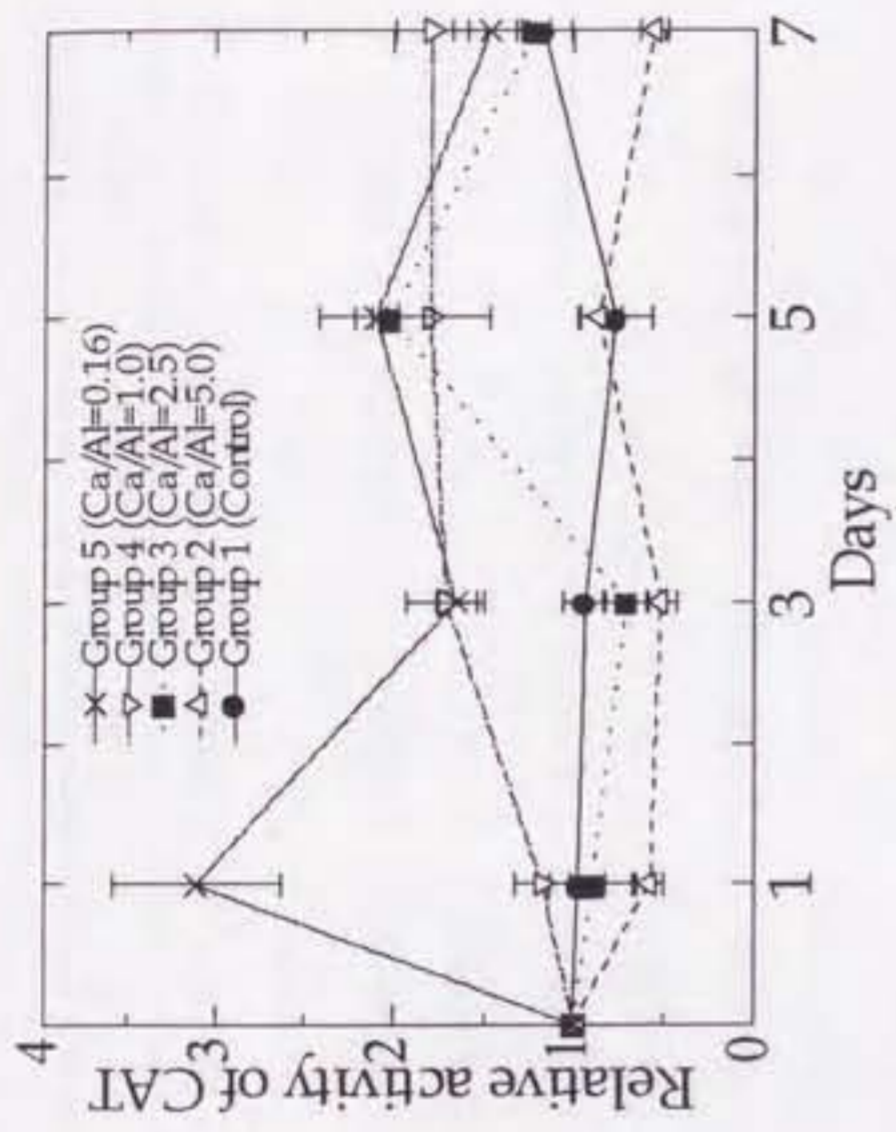


図4-3B 処理7日間のCAT活性変化(99年)

表 4-5A 処理 7 日間の CAT 活性変化(98 年)

CAT	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	1.06±0.18 a	0.88±0.21 a	0.82±0.17 a	0.76±0.08 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	1.11±0.16 a	0.93±0.16 a	0.83±0.15 a	0.73±0.09 a
Group 3 (Ca/Al=2.5)	1.22±0.12 a	1.12±0.20 a	1.05±0.16 a	0.98±0.07 a
Group 4 (Ca/Al=1.0)	1.12±0.11 a	1.41±0.24 a	1.21±0.21 a	1.01±0.12 a
Group 5 (Ca/Al=0.16)	1.32±0.14 a	1.25±0.22 a	1.14±0.21 a	1.03±0.14 a

処理前平均活性は 45.22  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ 。7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P>0.05$ )。

表 4-5B 処理 7 日間の CAT 活性変化(99 年)

CAT	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	0.98±0.16 a	0.94±0.12 ab	0.77±0.20 a	1.18±0.16 ab
Group 2 (Ca/Al=5.0)	0.58±0.07 a	0.52±0.09 a	0.86±0.12 a	0.56±0.08 a
Group 3 (Ca/Al=2.5)	0.90±0.24 a	0.71±0.13 a	2.02±0.21 b	1.22±0.080 bc
Group 4 (Ca/Al=1.0)	1.18±0.15 a	1.71±0.22 c	1.80±0.33 ab	1.80±0.20 c
Group 5 (Ca/Al=0.16)	3.11±0.48 b	1.66±0.11 bc	2.10±0.32 b	1.47±0.21 bc

処理前平均活性は 38.73  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ 。7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P>0.05$ )。

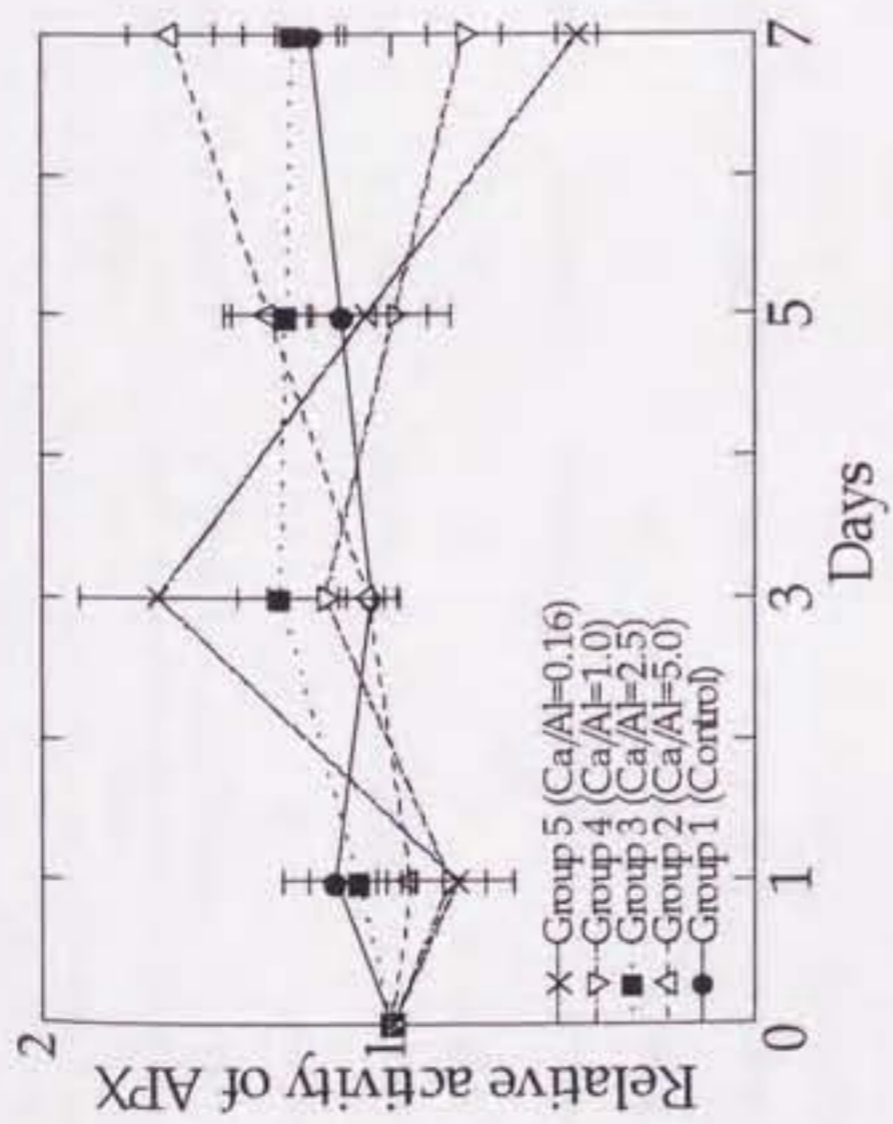


図 4-4A 処理 7 日間の APX 活性変化(98 年)

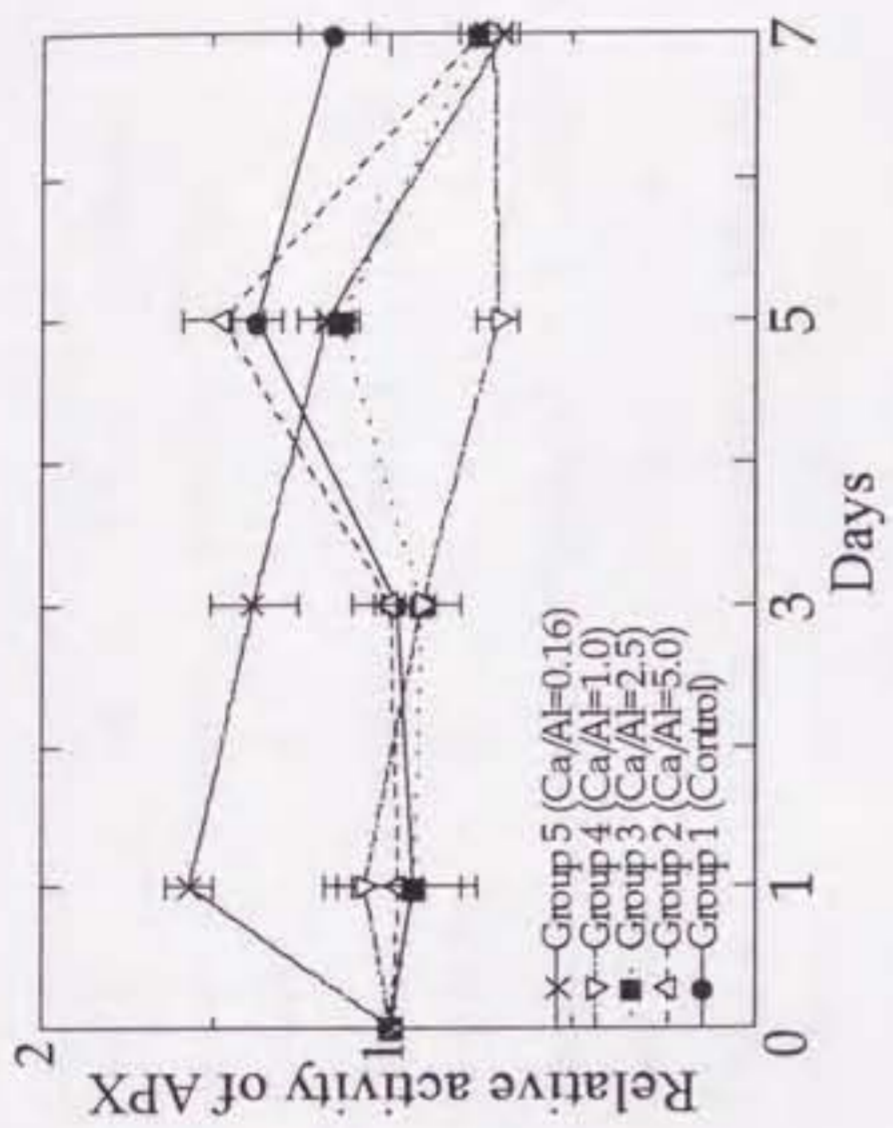


図 4-4B 処理 7 日間の APX 活性変化(99 年)

表 4-6A 処理 7 日間の APX 活性変化(98 年)

APX	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	1.16±0.15 a	1.06±0.07 a	1.14±0.10 ab	1.23±0.10 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	0.95±0.10 a	1.07±0.09 a	1.34±0.12 ac	1.62±0.12 b
Group 3 (Ca/Al=2.5)	1.10±0.14 a	1.31±0.12 ab	1.30±0.15 c	1.28±0.13 ab
Group 4 (Ca/Al=1.0)	0.84±0.10 a	1.19±0.16 ab	1.00±0.15 b	0.80±0.10 c
Group 5 (Ca/Al=0.16)	0.82±0.15 a	1.66±0.23 b	1.07±0.17 b	0.49±0.06 c

処理前平均活性は 138.10  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ 。7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P>0.05$ )。

表 4-6A 処理 7 日間の APX 活性変化(99 年)

APX	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	0.94±0.03 a	0.99±0.06 a	1.37±0.07 ab	1.16±0.10 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	0.980±0.17 a	1.00±0.11 a	1.47±0.12 b	0.76±0.05 b
Group 3 (Ca/Al=2.5)	0.94±0.17 a	0.92±0.11 a	1.14±0.06 a	0.75±0.01 b
Group 4 (Ca/Al=1.0)	1.07±0.12 a	0.92±0.04 a	0.71±0.06 c	0.72±0.05 b
Group 5 (Ca/Al=0.16)	1.56±0.07 b	1.38±0.12 b	1.18±0.08 a	0.69±0.04 b

処理前平均活性は 188.64  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ 。7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す ( $P>0.05$ )。



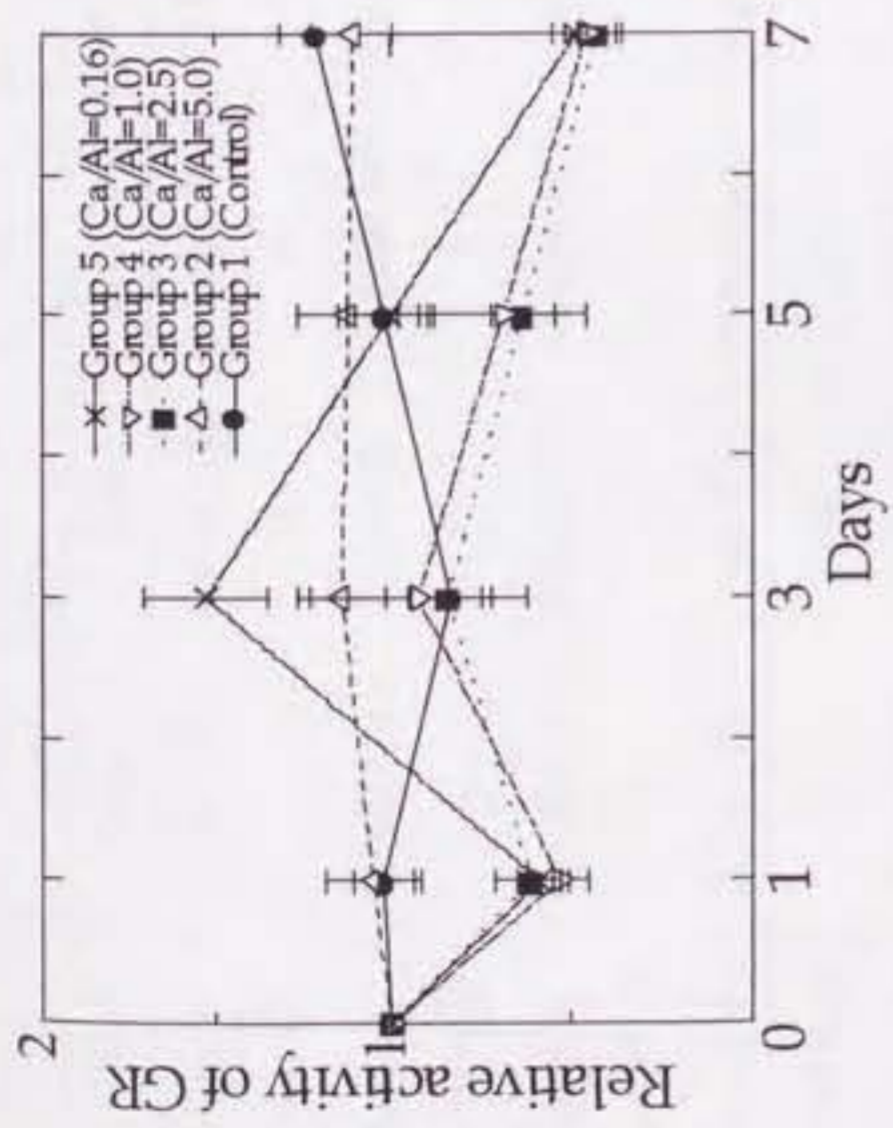


図 4-5A 処理 7 日間の GR 活性変化(98 年)

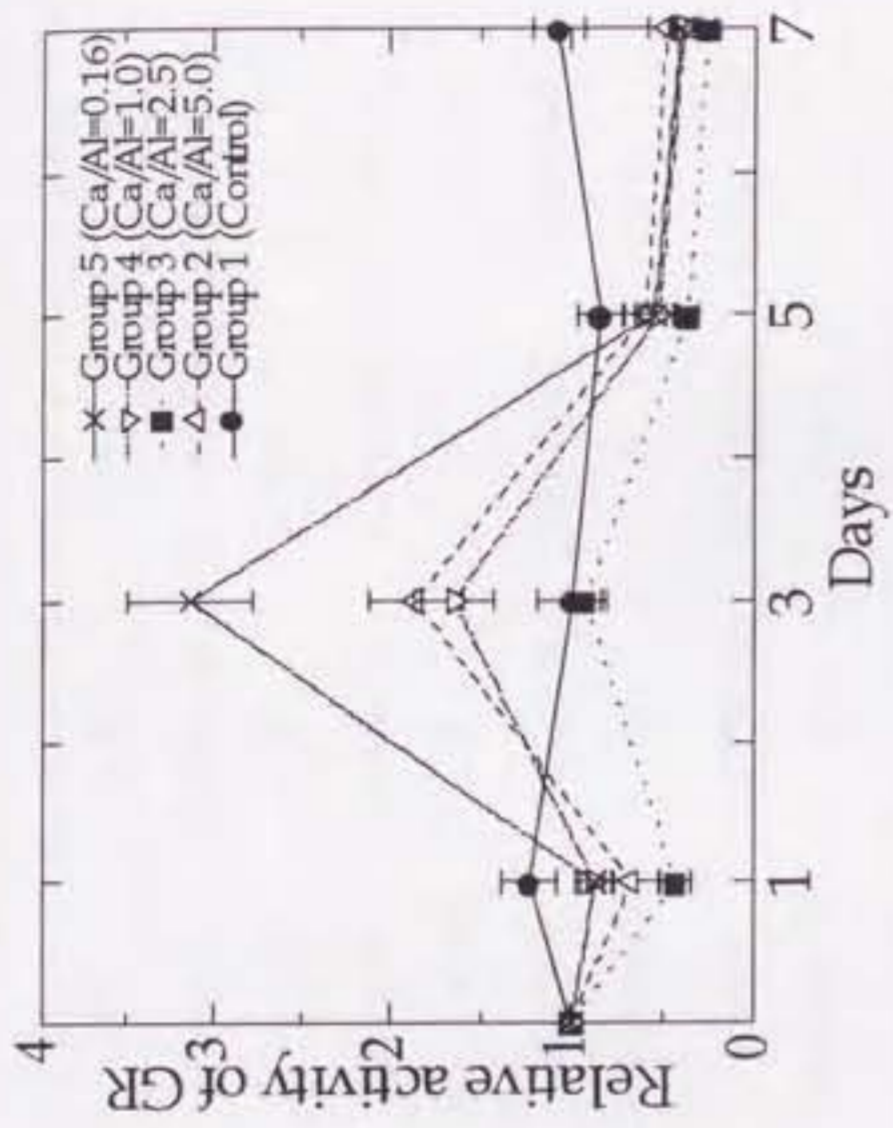


図 4-5B 処理 7 日間の GR 活性変化(99 年)

表 4-7A 処理 7 日間の GR 活性変化(98 年)

GR	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	1.02±0.09 a	0.87±0.12 a	1.02±0.13 ab	1.21±0.10 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	1.05±0.14 a	1.14±0.12 ab	1.12±0.14 a	1.11±0.11 a
Group 3 (Ca/Al=2.5)	0.61±0.11 b	0.84±0.10 a	0.64±0.09 c	0.43±0.05 b
Group 4 (Ca/Al=1.0)	0.53±0.08 b	0.93±0.30 ab	0.69±0.23 bc	0.46±0.10 b
Group 5 (Ca/Al=0.16)	0.59±0.06 b	1.52±0.18 b	1.00±0.12 ab	0.48±0.03 b

処理前平均活性は 15.94  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ 。7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す(P>0.05)。

表 4-7B 処理 7 日間の GR 活性変化(99 年)

GR	1 day	3 days	5 days	7 days
Group 1 (Control)	1.23±0.15 a	1.00±0.19 ab	0.84±0.12 a	1.08±0.14 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	0.67±0.15 b	1.86±0.26 b	0.59±0.11 ab	0.48±0.11 b
Group 3 (Ca/Al=2.5)	0.43±0.08 b	0.97±0.09 a	0.36±0.05 b	0.25±0.03 b
Group 4 (Ca/Al=1.0)	0.87±0.09 b	1.647±0.22 ab	0.521±0.10 b	0.384±0.07 b
Group 5 (Ca/Al=0.16)	0.87±0.109 ab	3.12±0.36 c	0.55±0.10 b	0.40±0.07 b

処理前平均活性は 11.93  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ 。7 個体の平均値  $\pm$  SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す(P>0.05)。

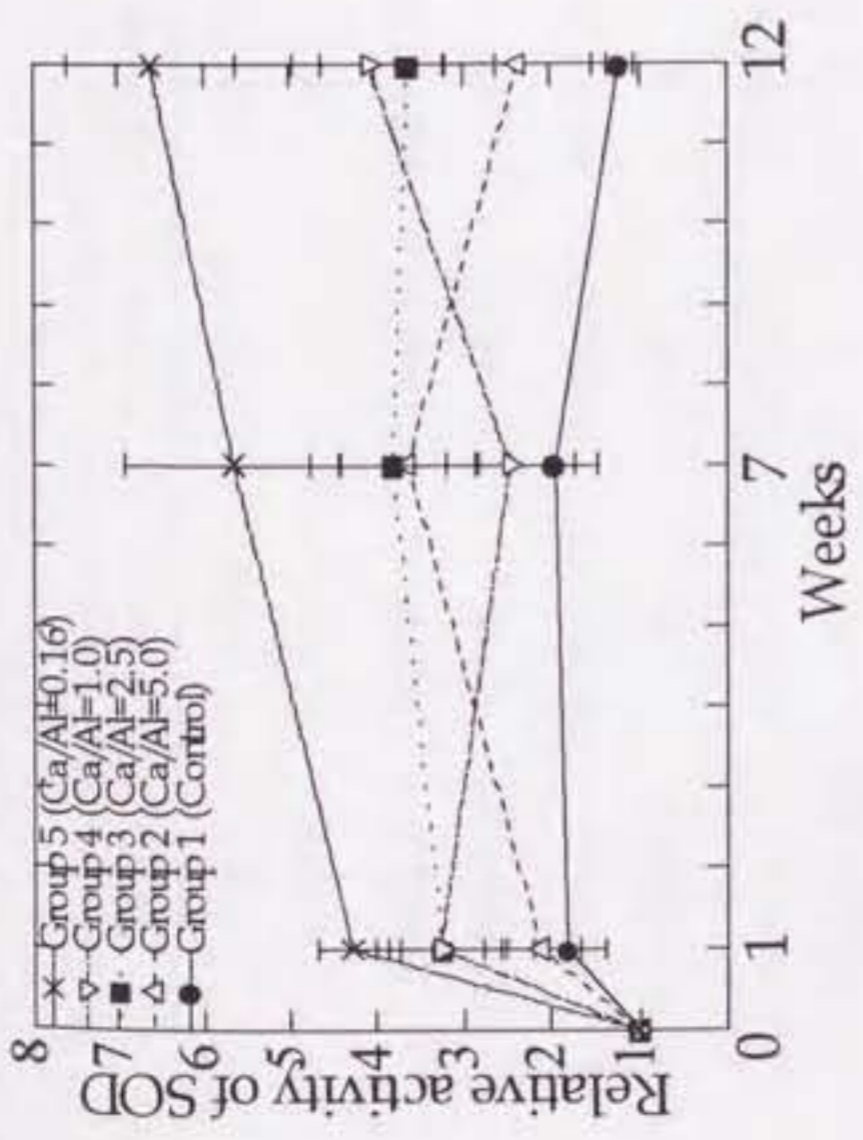


図 4-6 処理 12 週間の SOD 活性変化

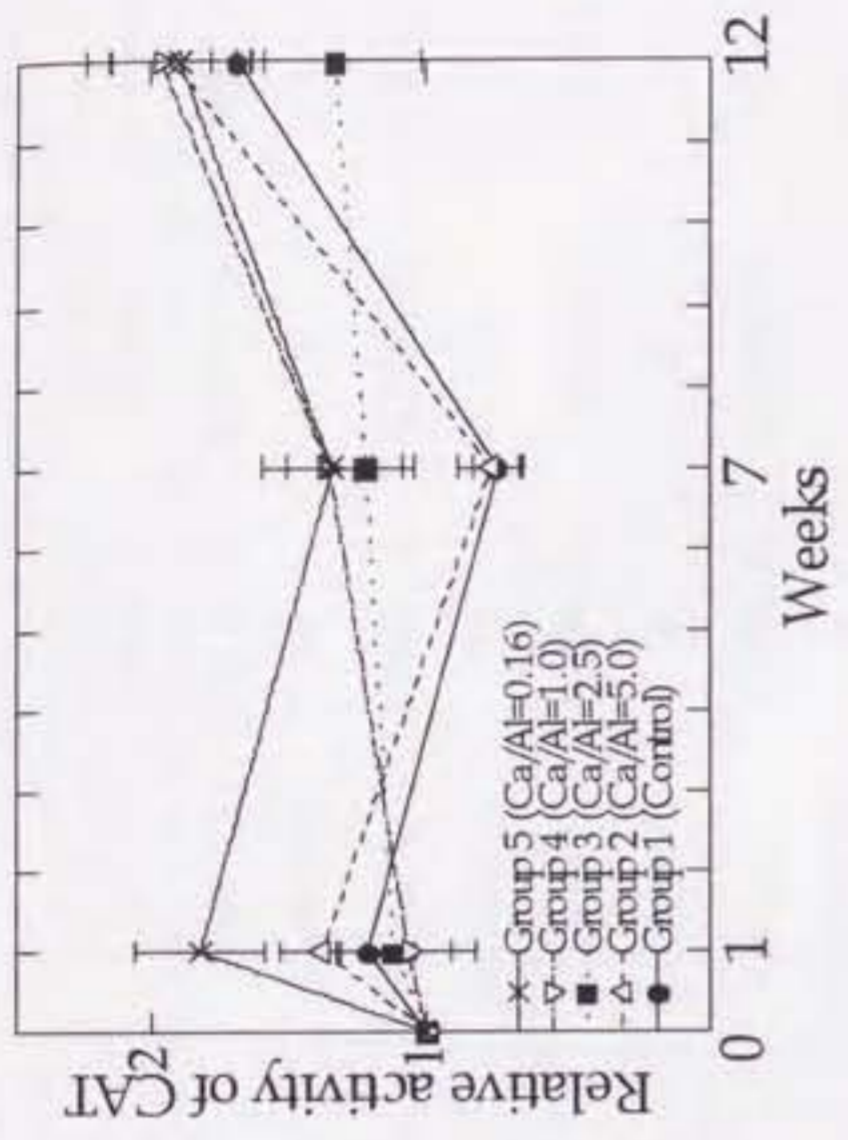


図 4-7 処理 12 週間の CAT 活性変化

表 4-8 処理 12 週間の SOD 活性変化

SOD	1 week	7 weeks	12 weeks
Group 1 (Control)	1.81±0.41 a	1.97±0.50 a	1.22±0.15 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	2.12±0.45 ab	3.64±0.81 ab	2.38±0.84 ab
Group 3 (Ca/Al=2.5)	3.25±0.47 bc	3.82±0.96 ab	3.63±0.99 b
Group 4 (Ca/Al=1.0)	3.27±0.74 bc	2.47±0.72 a	4.09±0.88 b
Group 5 (Ca/Al=0.16)	4.28±0.40 c	5.65±1.25 b	6.61±0.99 c

処理前平均活性は 5.32 U mg<sup>-1</sup> protein。7 個体の平均値 ± SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す (P>0.05)。

表 4-9 処理 12 週間の CAT 活性変化

CAT	1 week	7 weeks	12 weeks
Group 1 (Control)	1.21±0.16 a	0.75±0.08 a	1.68±0.10 a
Group 2 (Ca/Al=5.0)	1.38±0.15 ab	0.77±0.11 ab	1.91±0.23 a
Group 3 (Ca/Al=2.5)	1.12±0.21 a	1.22±0.17 bc	1.33±0.31 a
Group 4 (Ca/Al=1.0)	1.07±0.24 a	1.35±0.15 c	1.96±0.28 a
Group 5 (Ca/Al=0.16)	1.82±0.24 b	1.34±0.25 c	1.89±0.26 a

処理前平均活性は 29.68 μM mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup>。7 個体の平均値 ± SE で表す。同じ英字を付した処理区間には Fisher の最小有意差検定において有意差がないことを示す (P>0.05)。

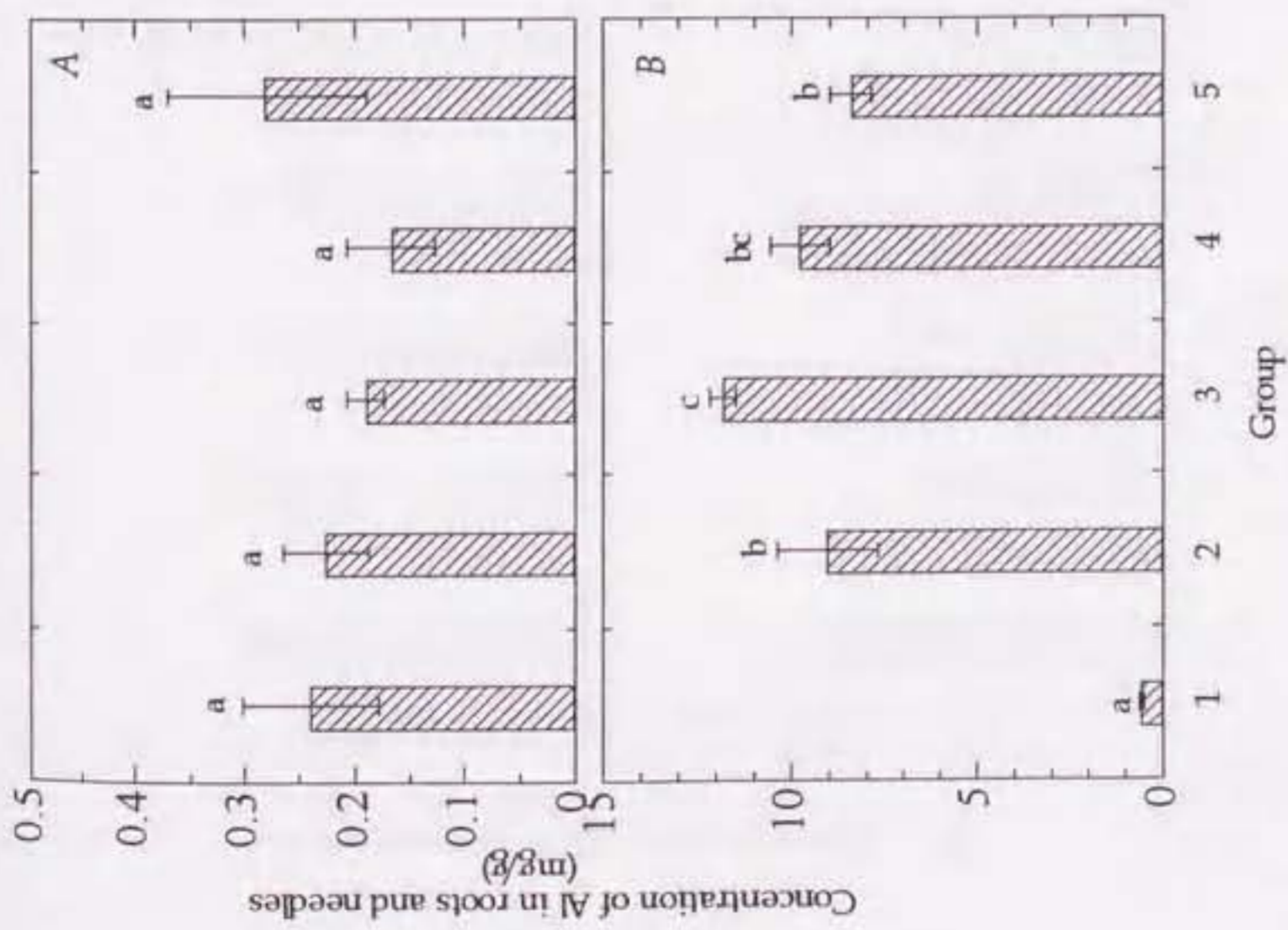


図4-8 7日間Al処理後の葉(A)根(B)中Al濃度

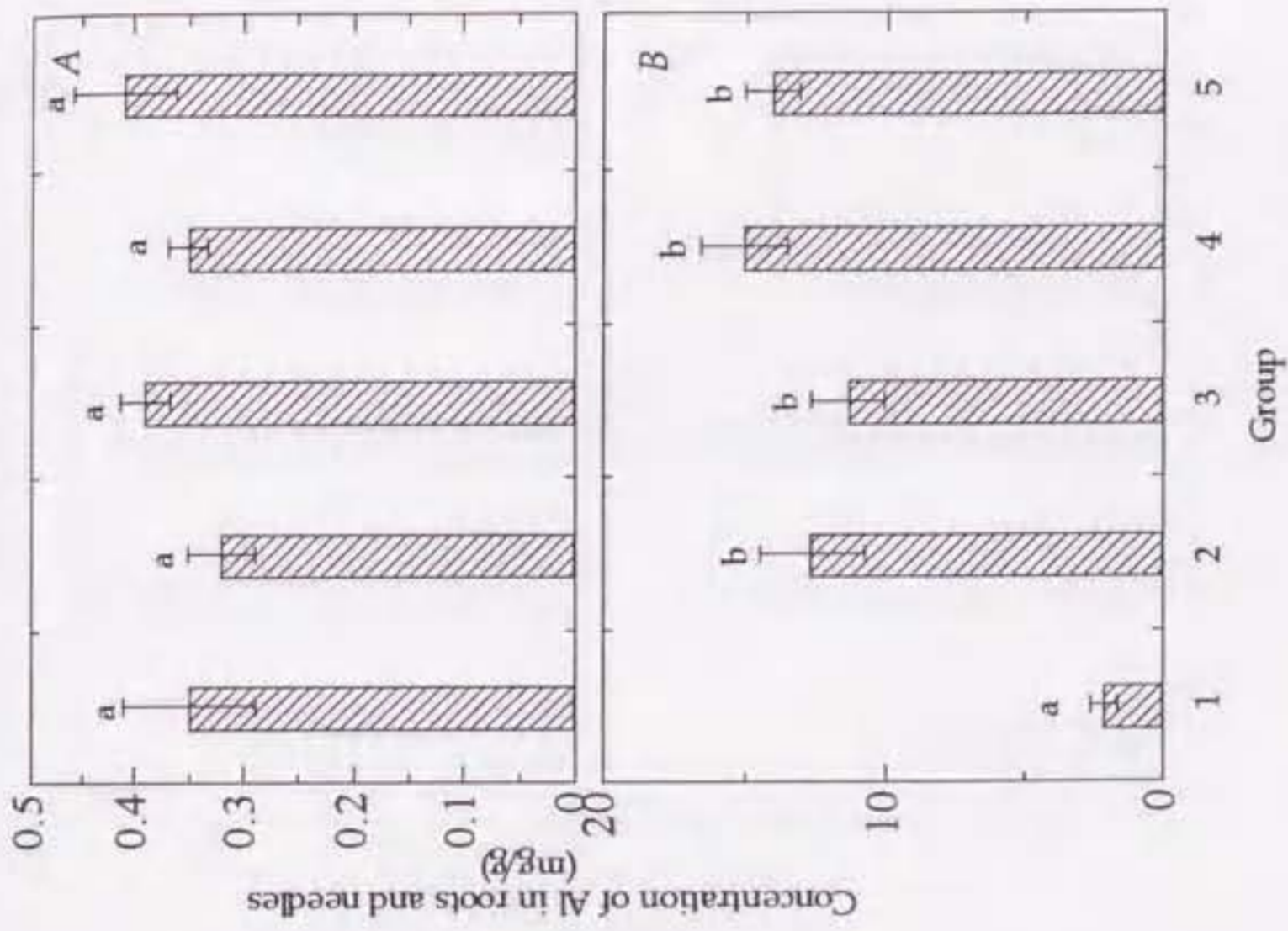


図4-9 12週間Al処理後の葉(A)根(B)中Al濃度

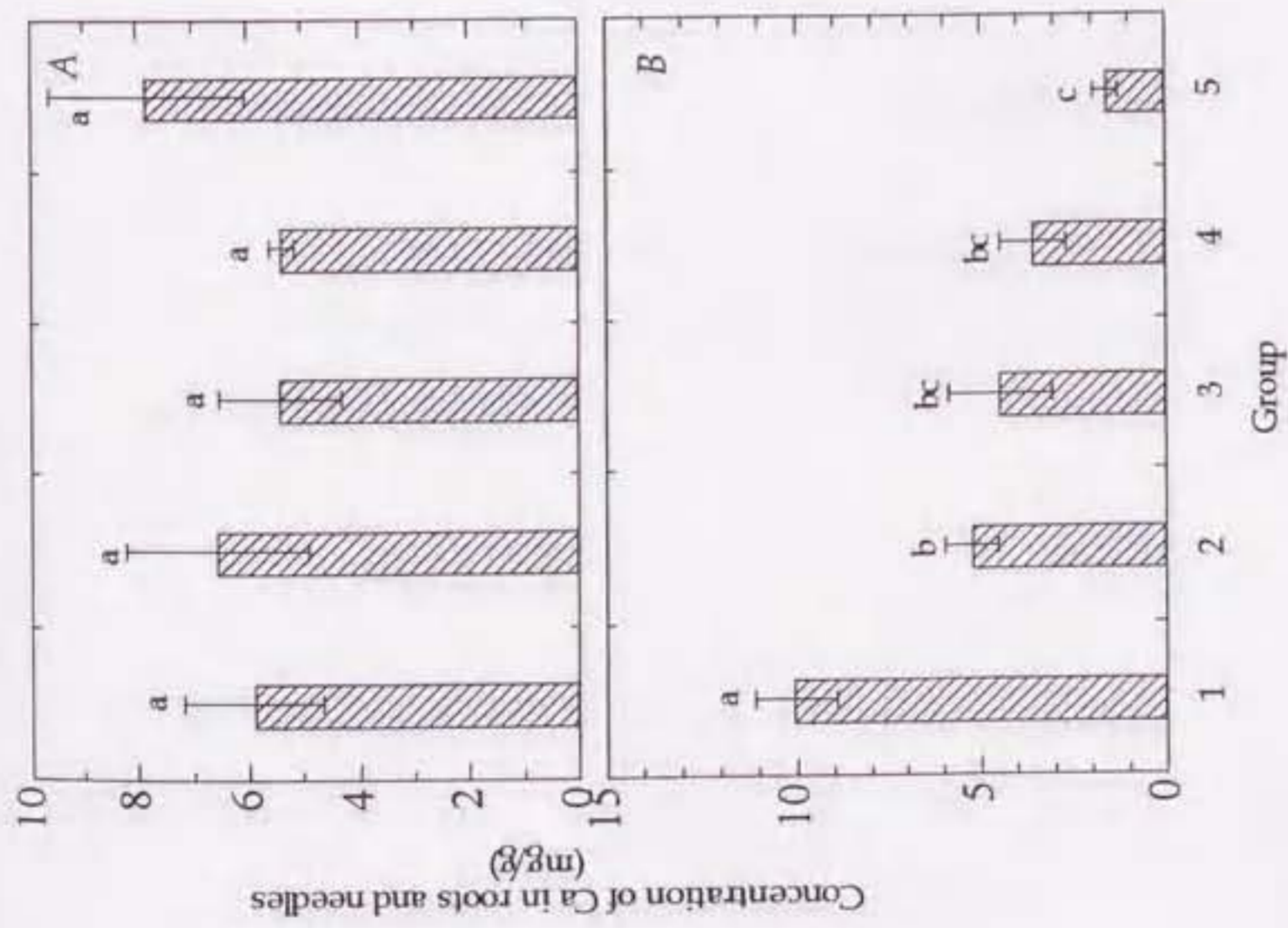


図4-10 7日間Al処理後の葉(A)根(B)中Ca濃度

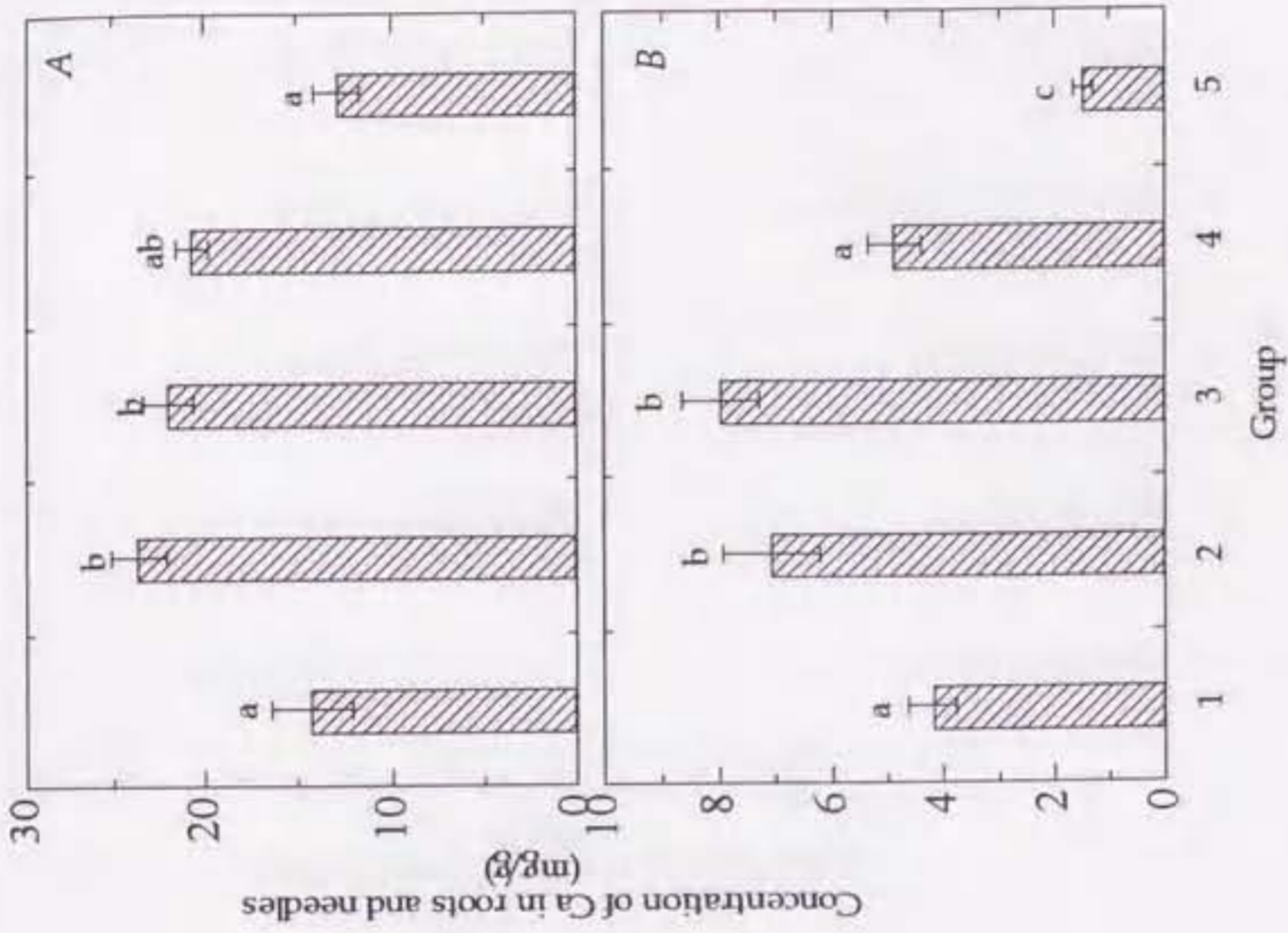


図4-11 12週間Al処理後の葉(A)根(B)中Ca濃度

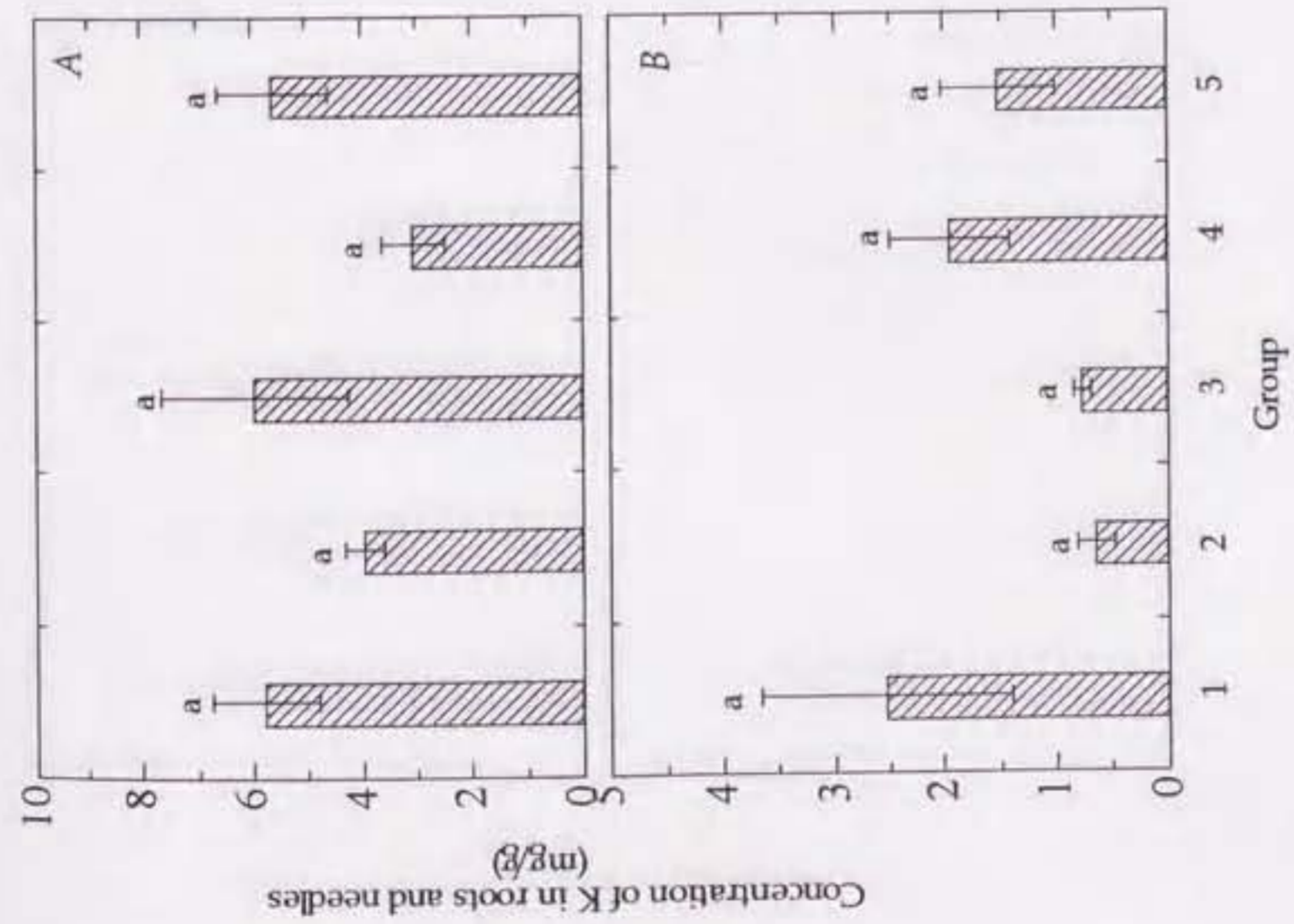


図4-12 7日間AI処理後の葉(A)根(B)中K濃度

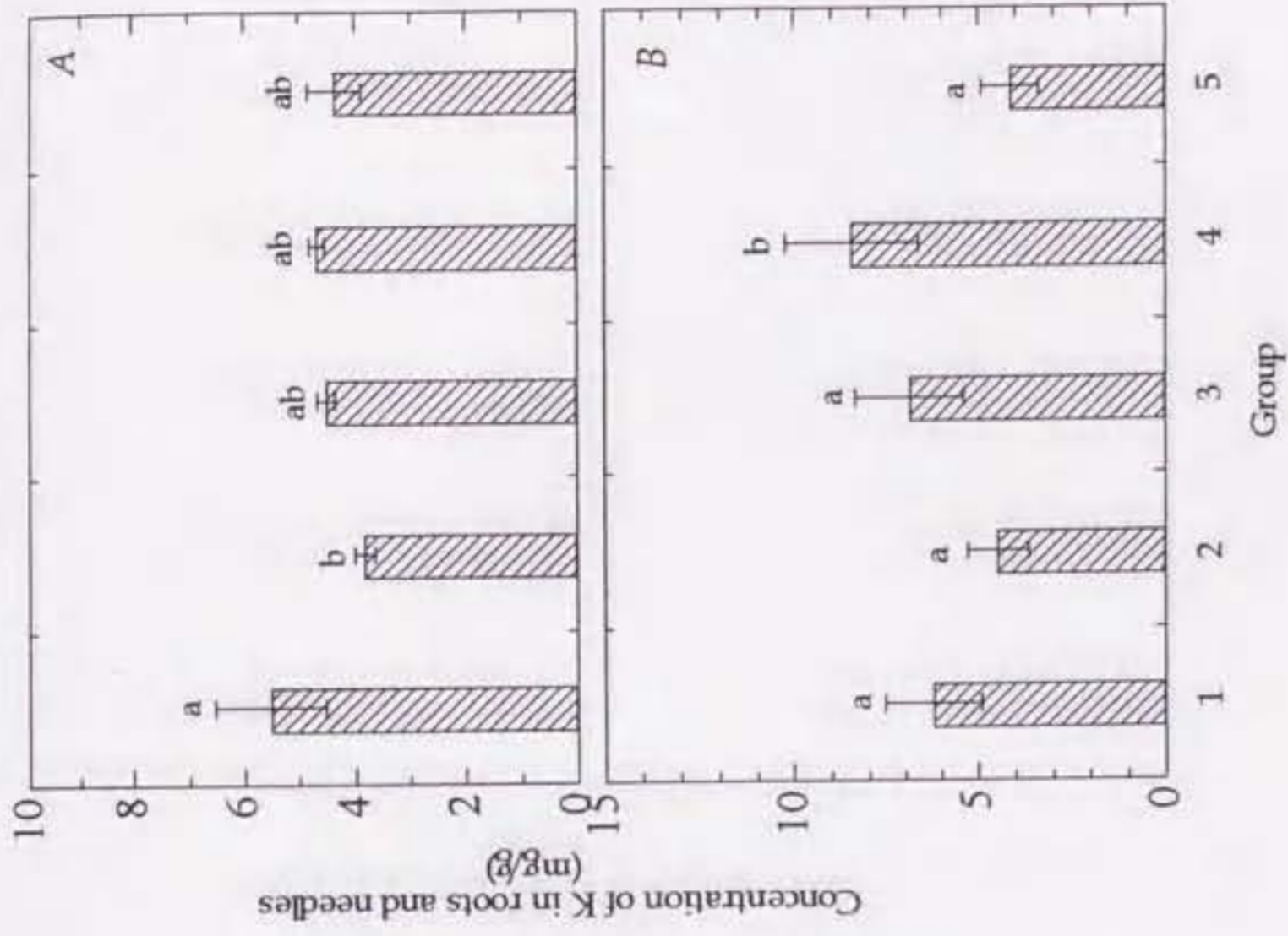


図4-13 12週間AI処理後の葉(A)根(B)中K濃度

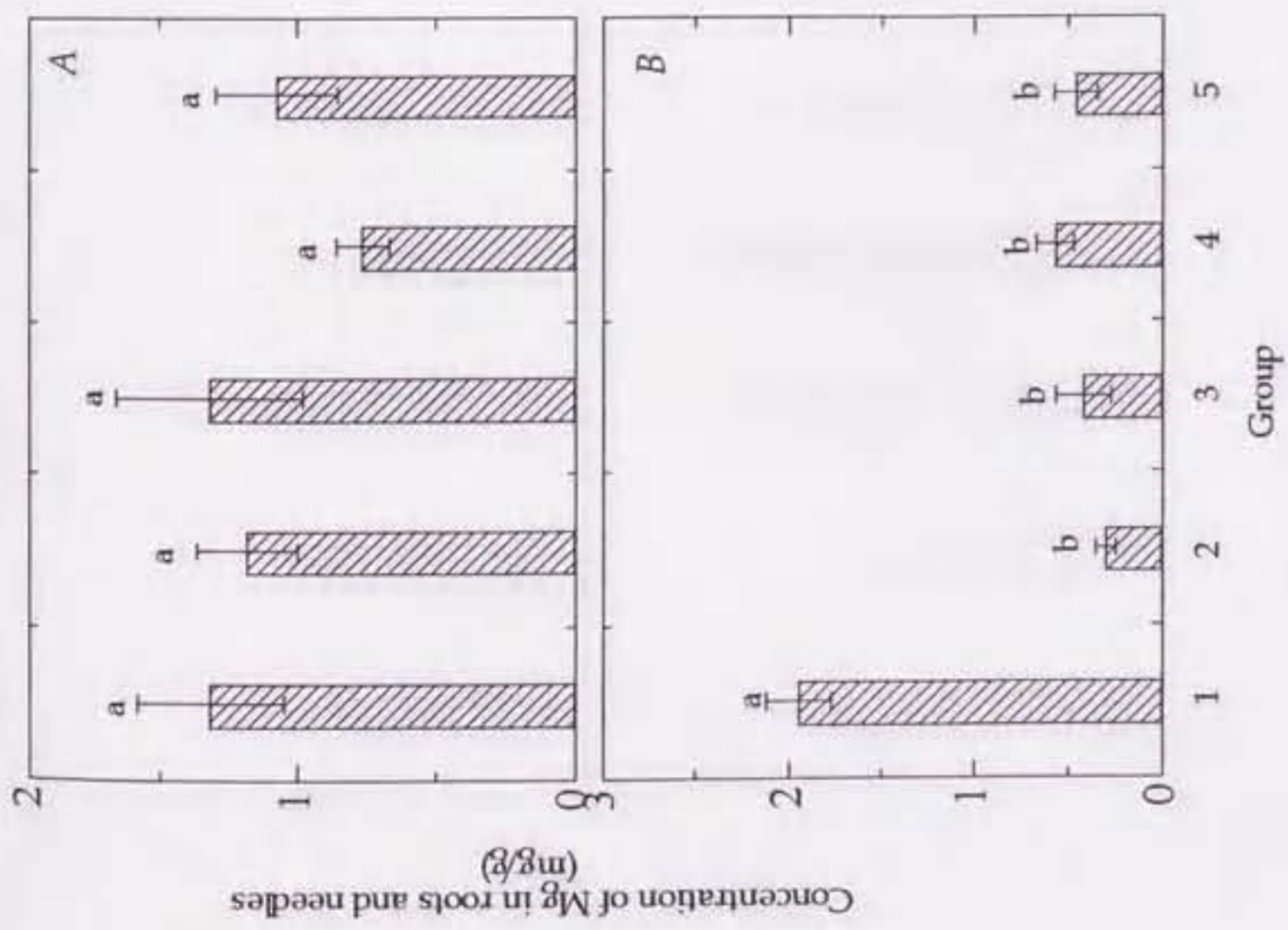


図 4-14 7日間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Mg 濃度

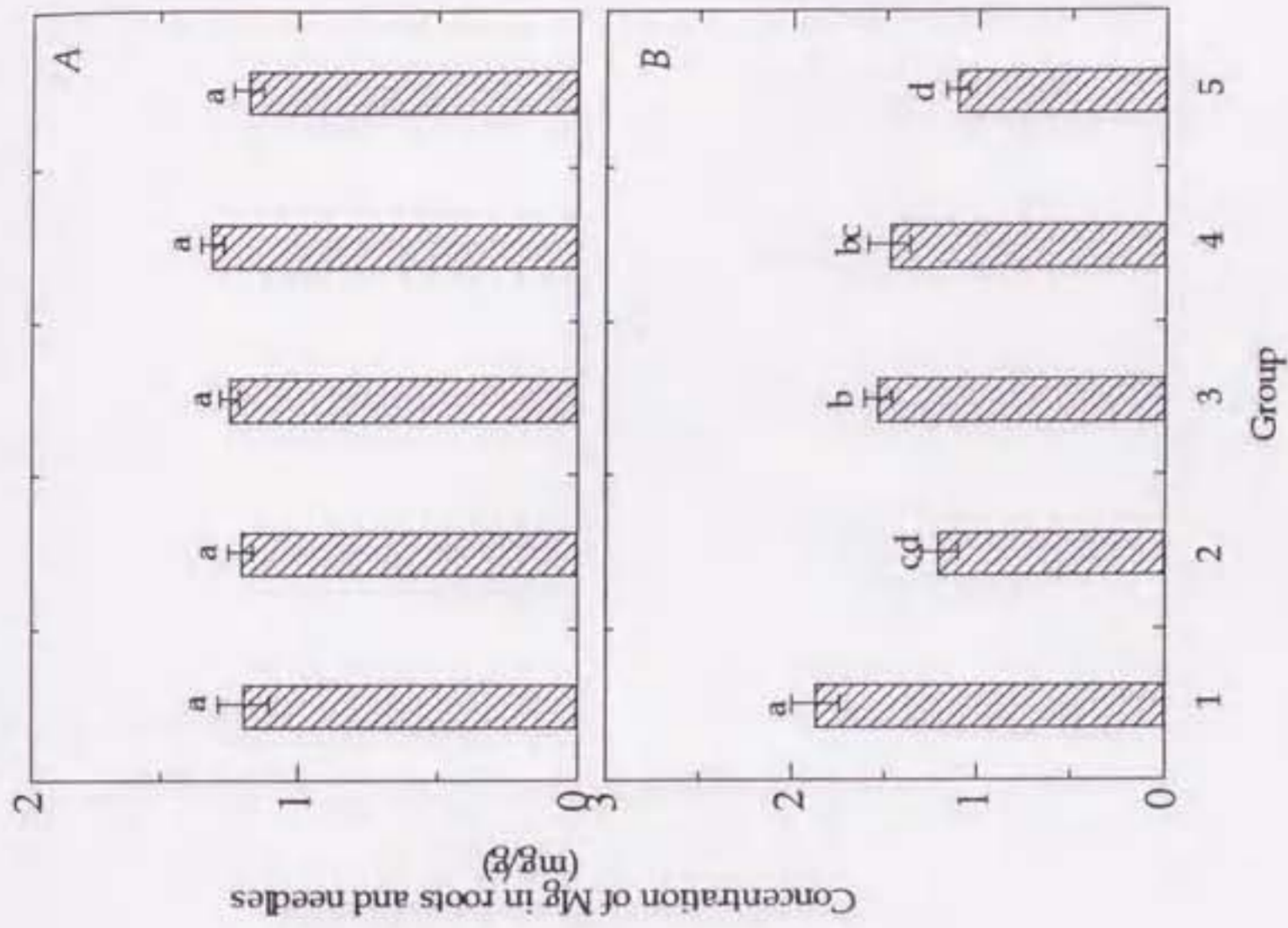


図 4-15 12週間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Mg 濃度



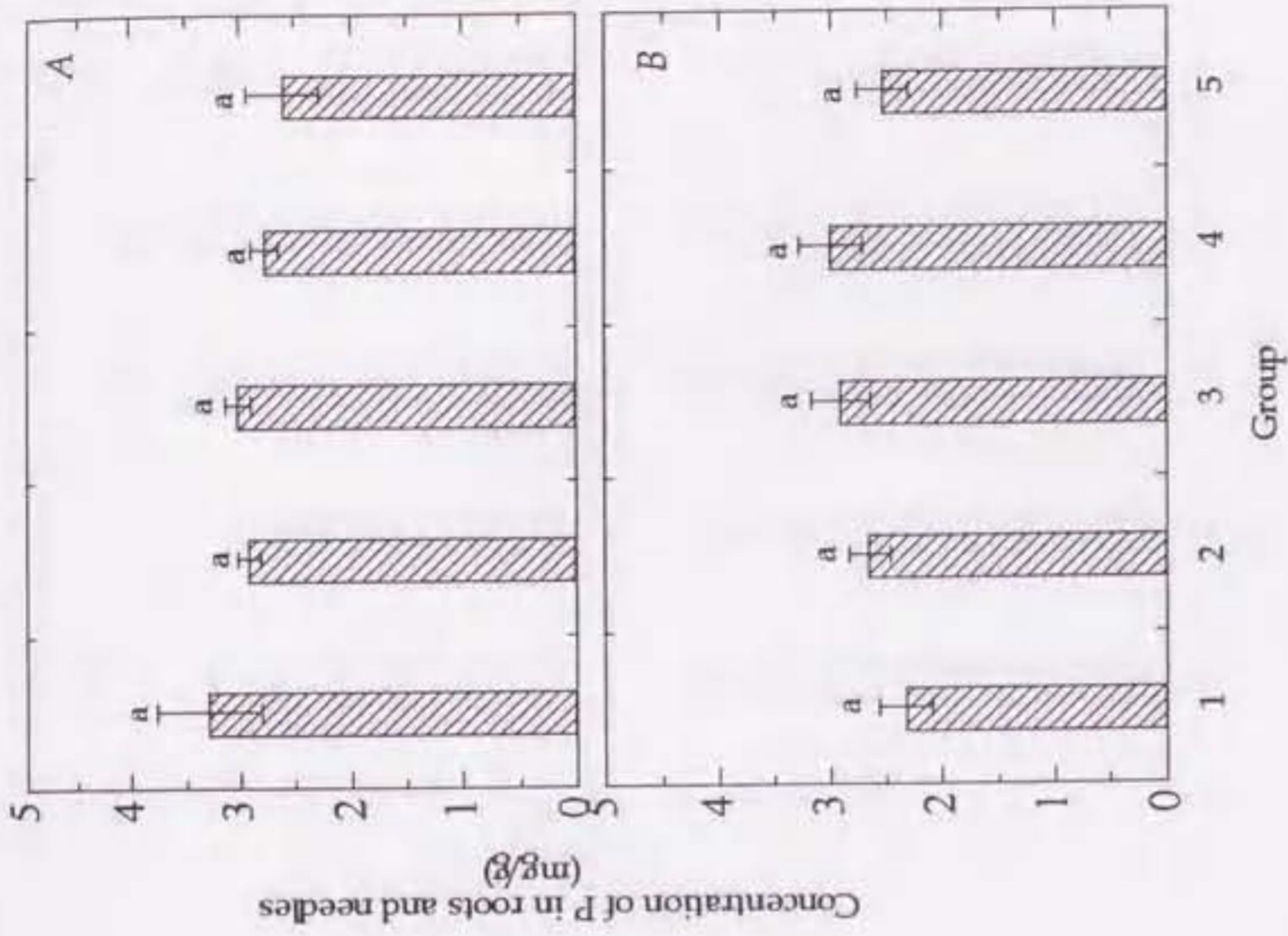


図 4-16 7日間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 P 濃度

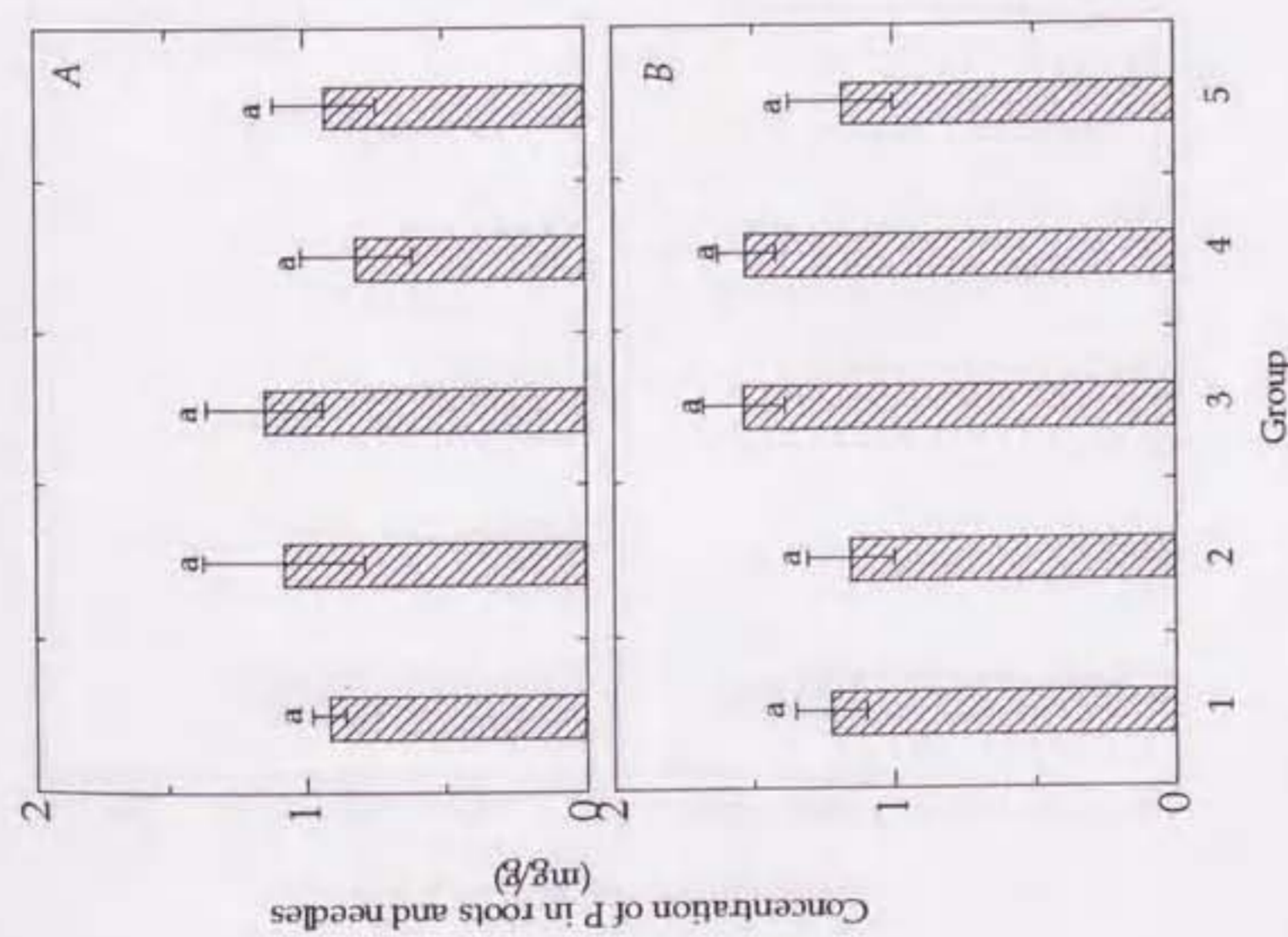


図 4-17 12週間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 P 濃度

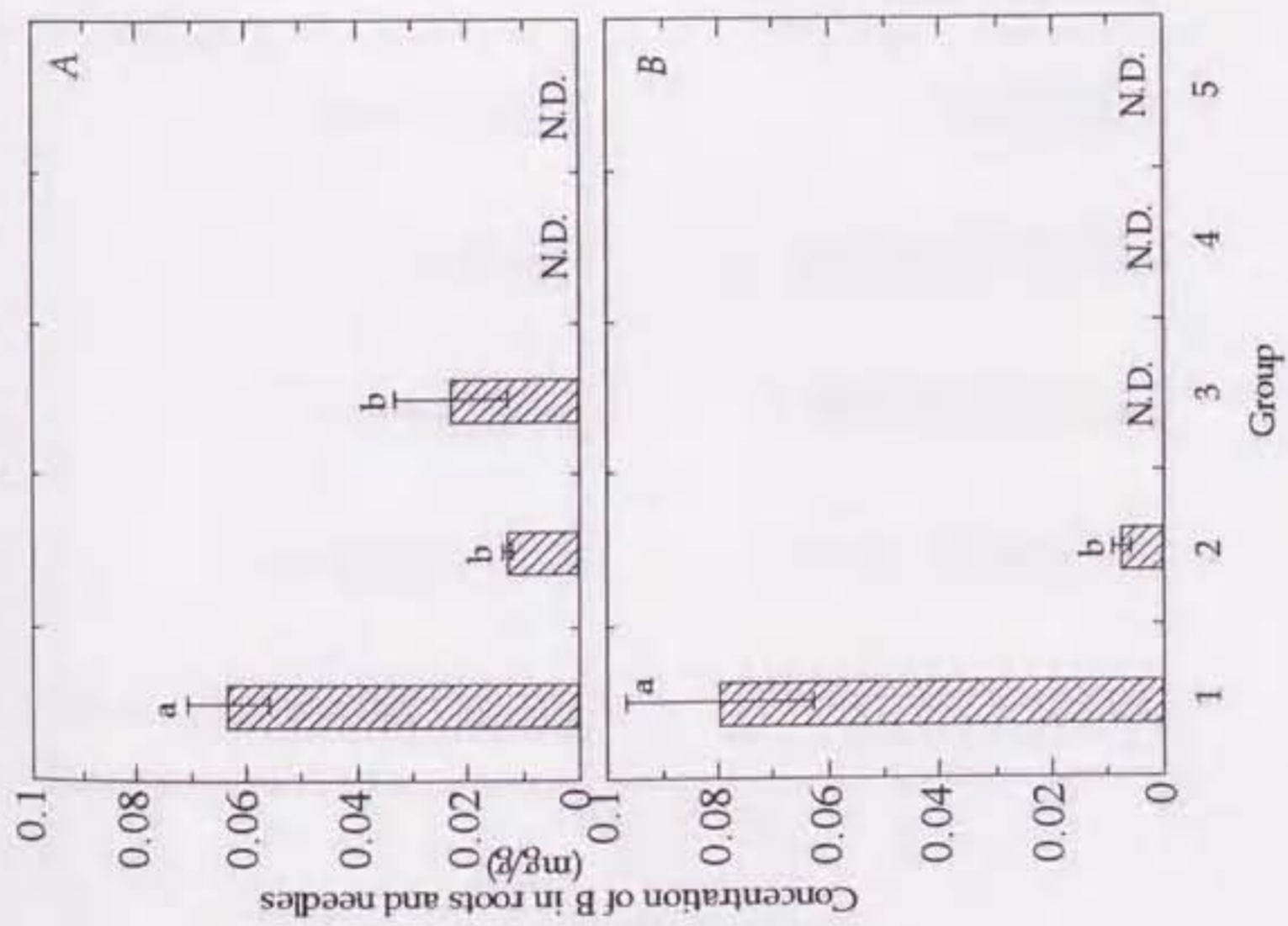


図 4-18 7 日間 AI 処理後の葉(A)根(B)中 B 濃度

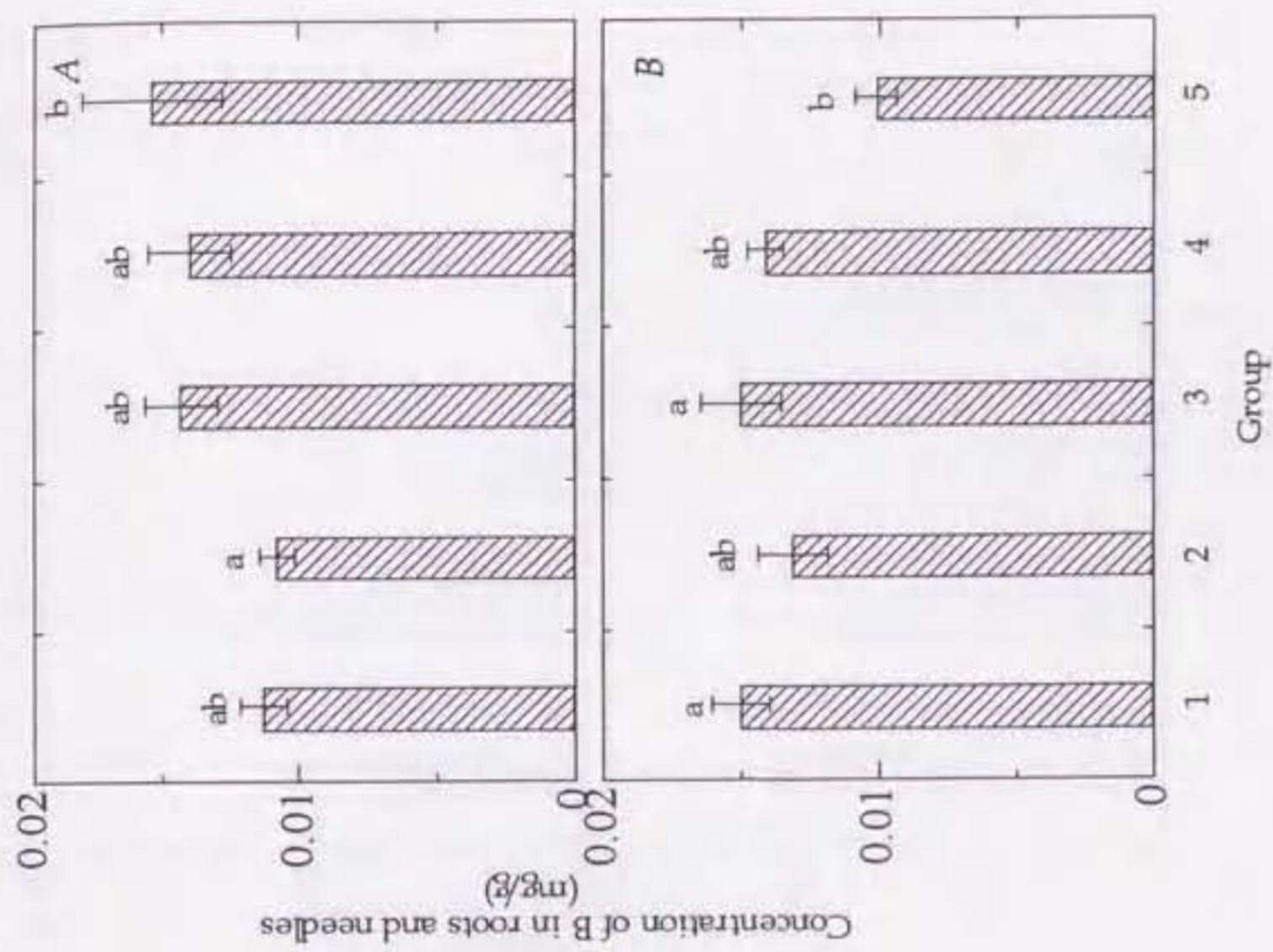


図 4-19 12 週間 AI 処理後の葉(A)根(B)中 B 濃度

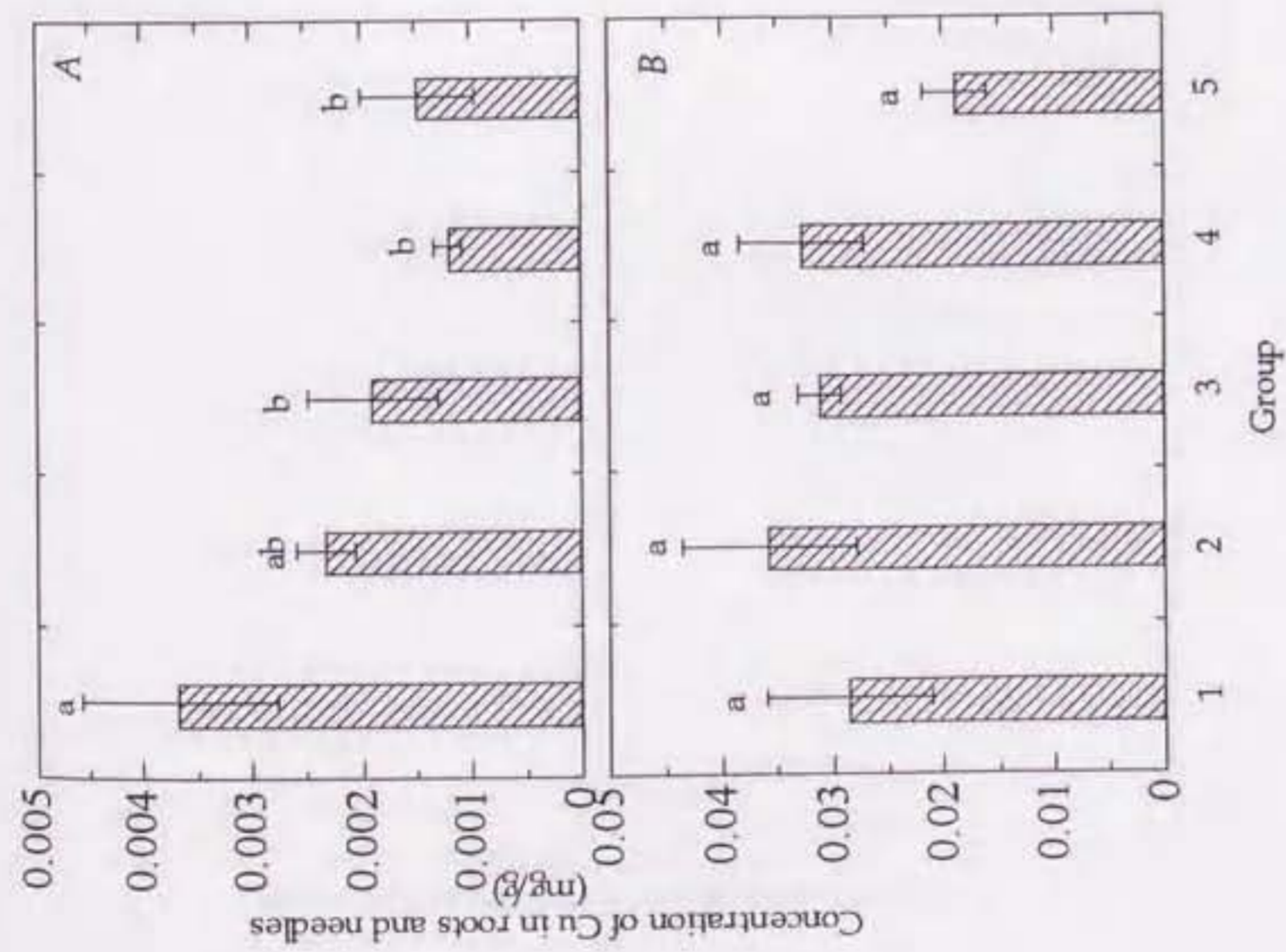


図 4-20 7日間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Cu 濃度

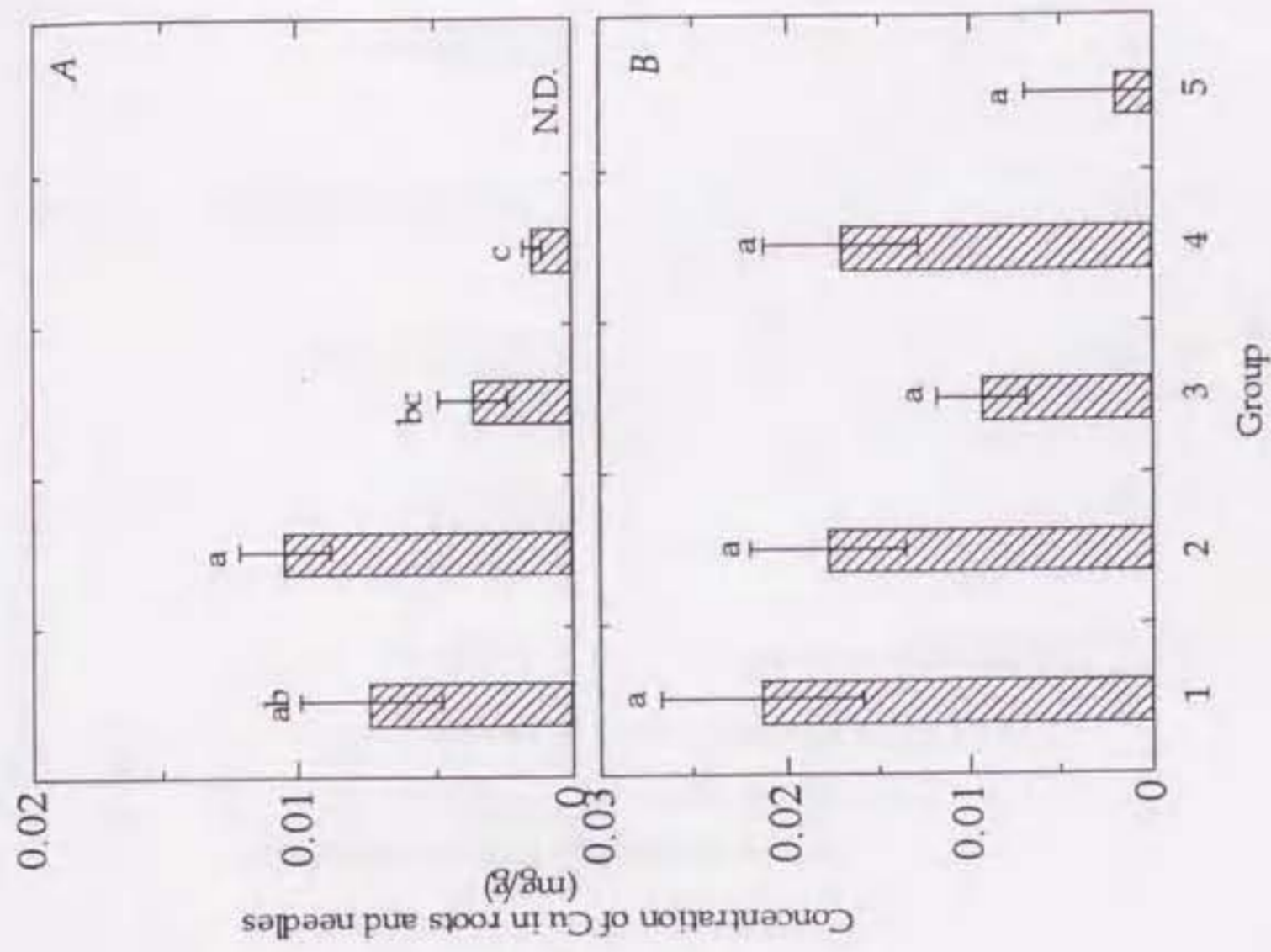


図 4-21 12週間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Cu 濃度

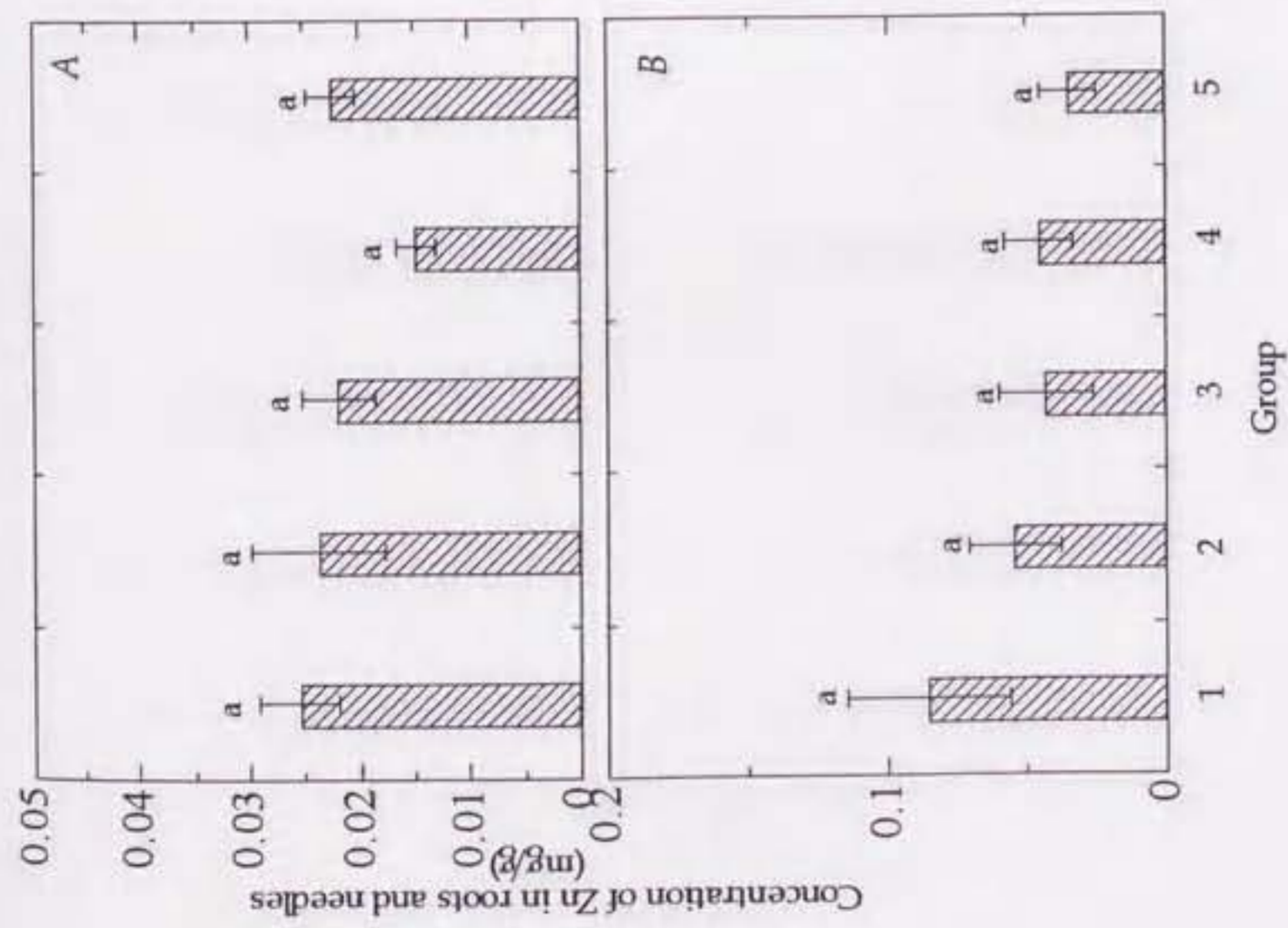


図 4-22 7 日間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Zn 濃度

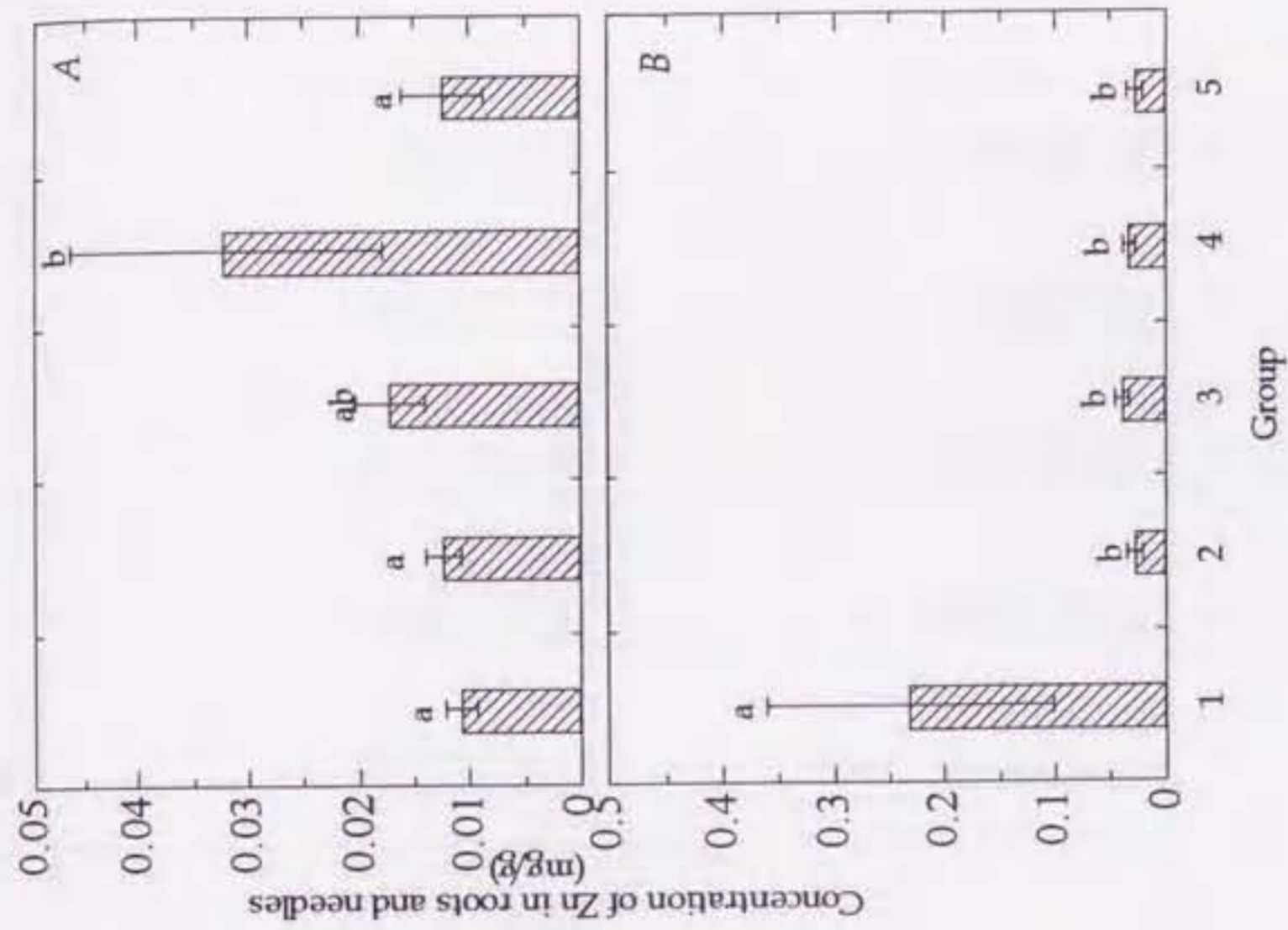


図 4-23 12 週間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Zn 濃度

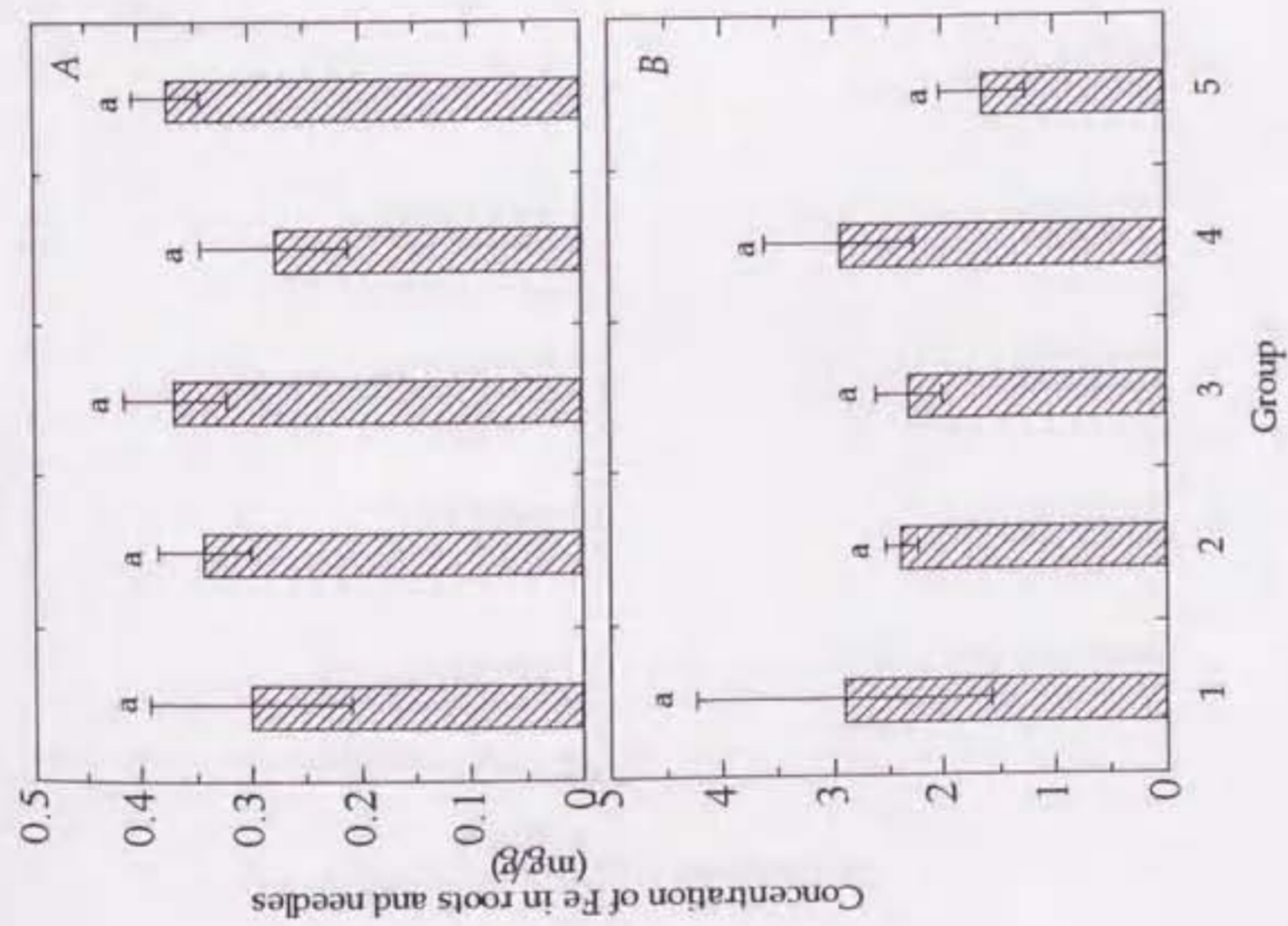


図 4-24 7日間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Fe 濃度

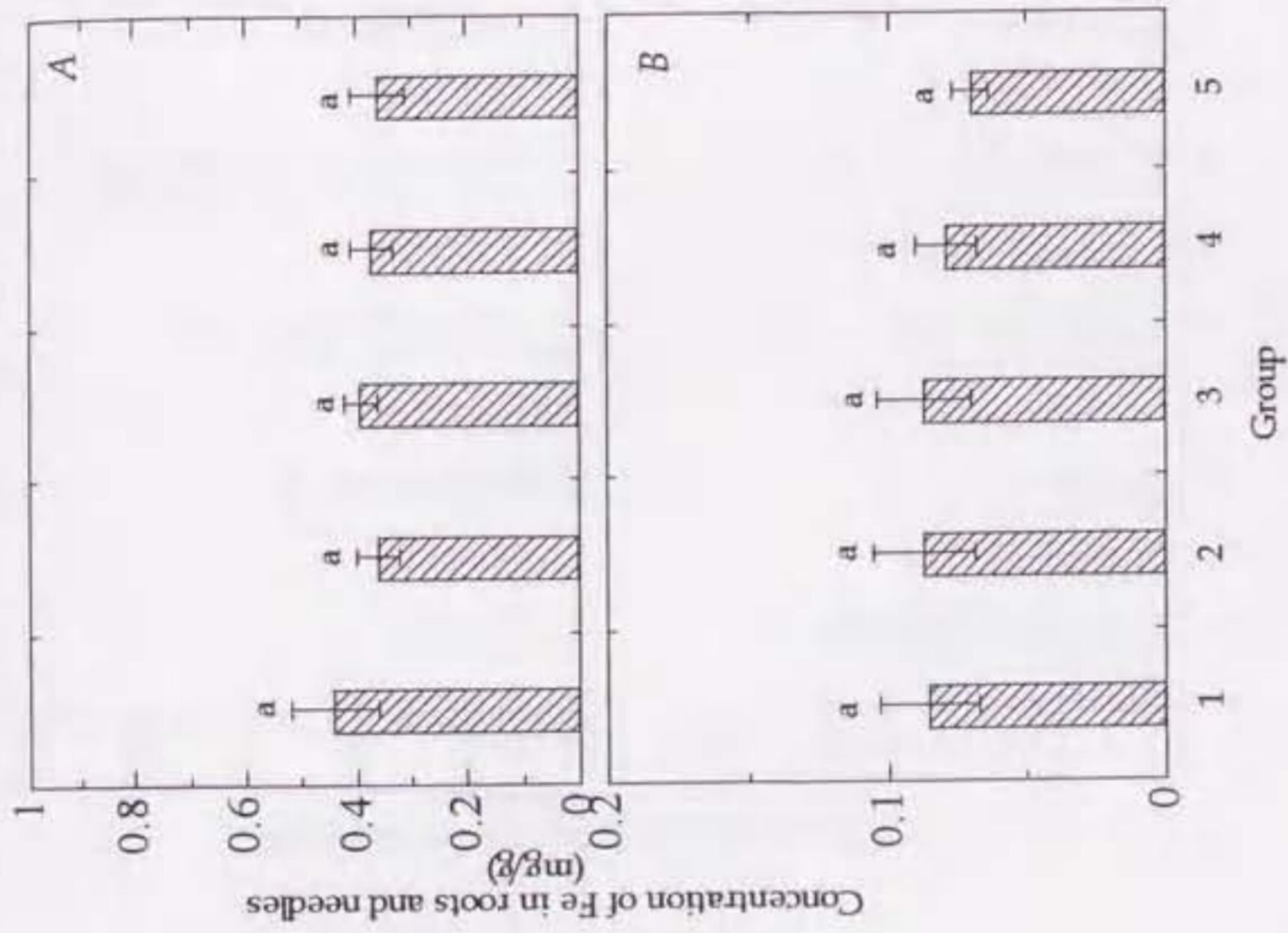


図 4-25 12週間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Fe 濃度

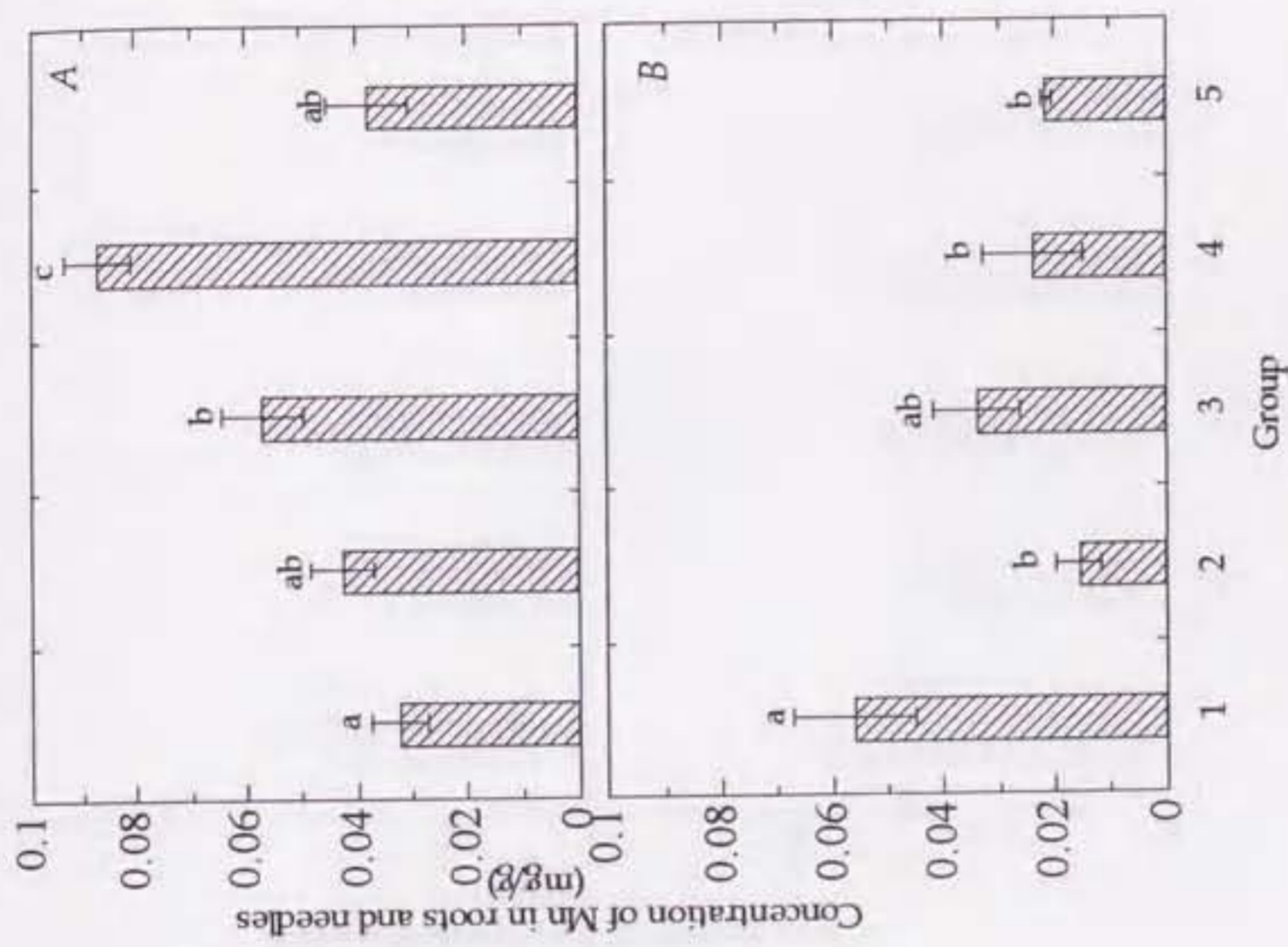


図 4-26 7 日間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Mn 濃度

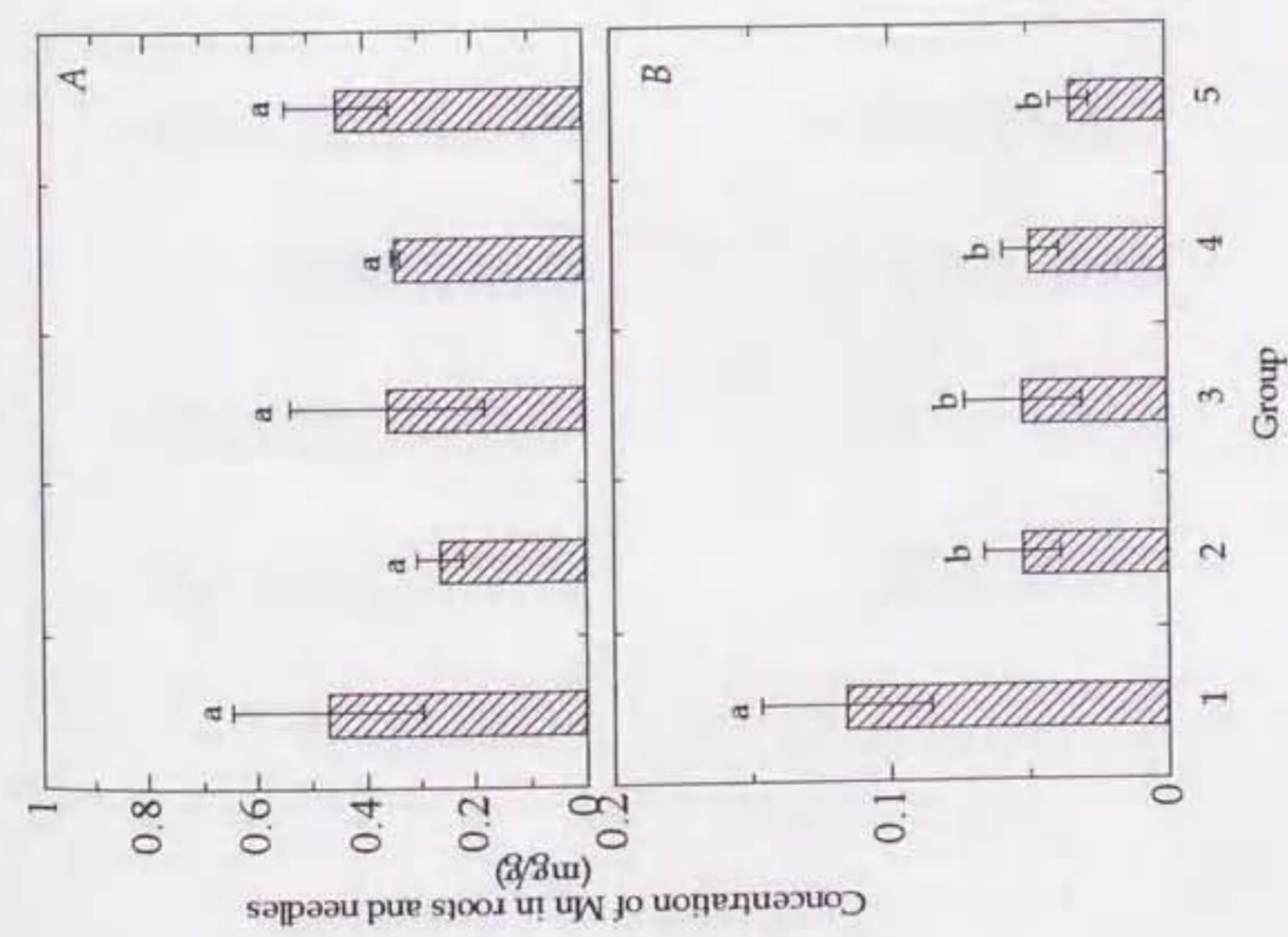


図 4-27 12 週間 Al 処理後の葉(A)根(B)中 Mn 濃度

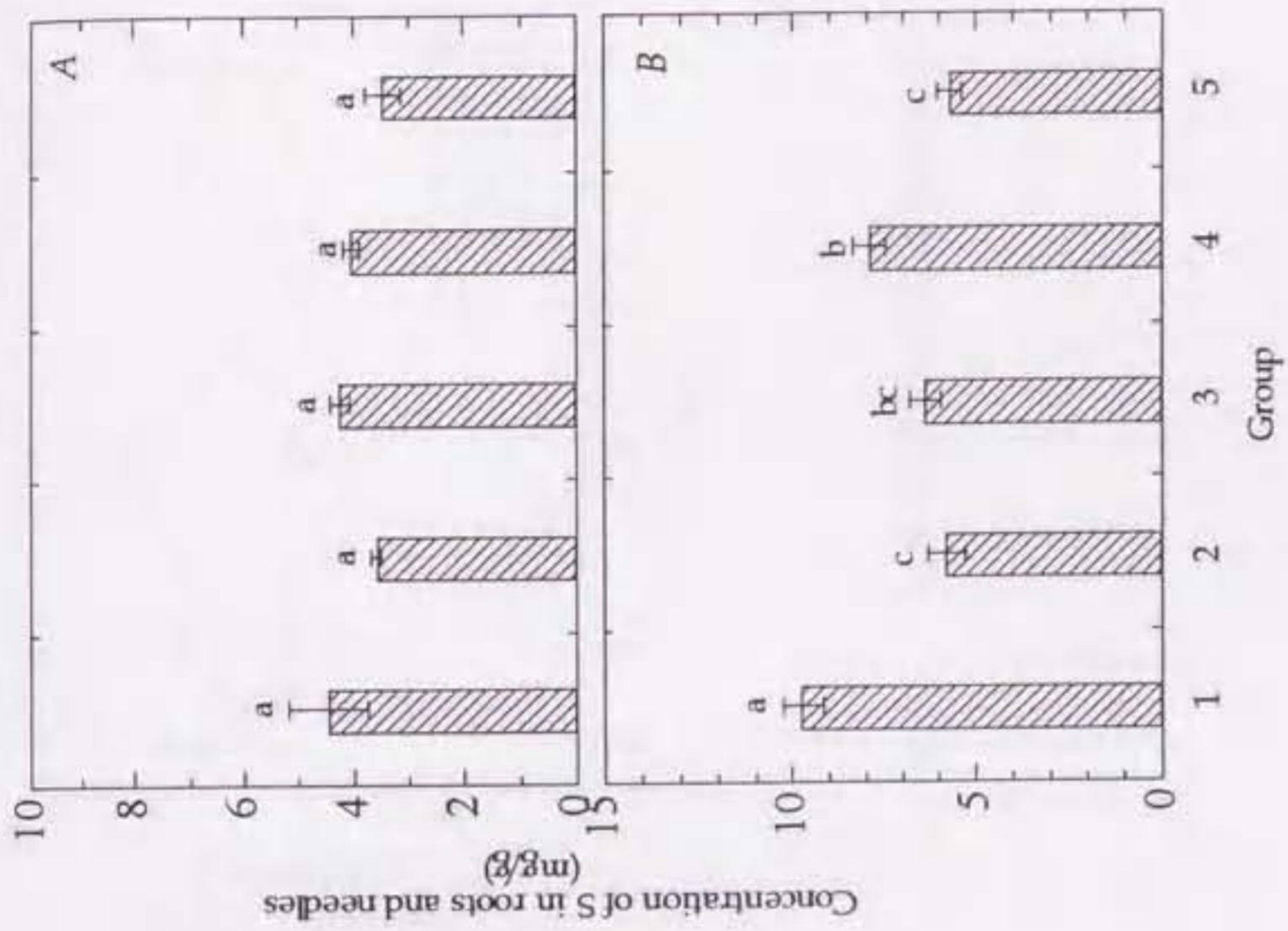


図 4-28 7日間 AI 処理後の葉(A)根(B)中 S 濃度

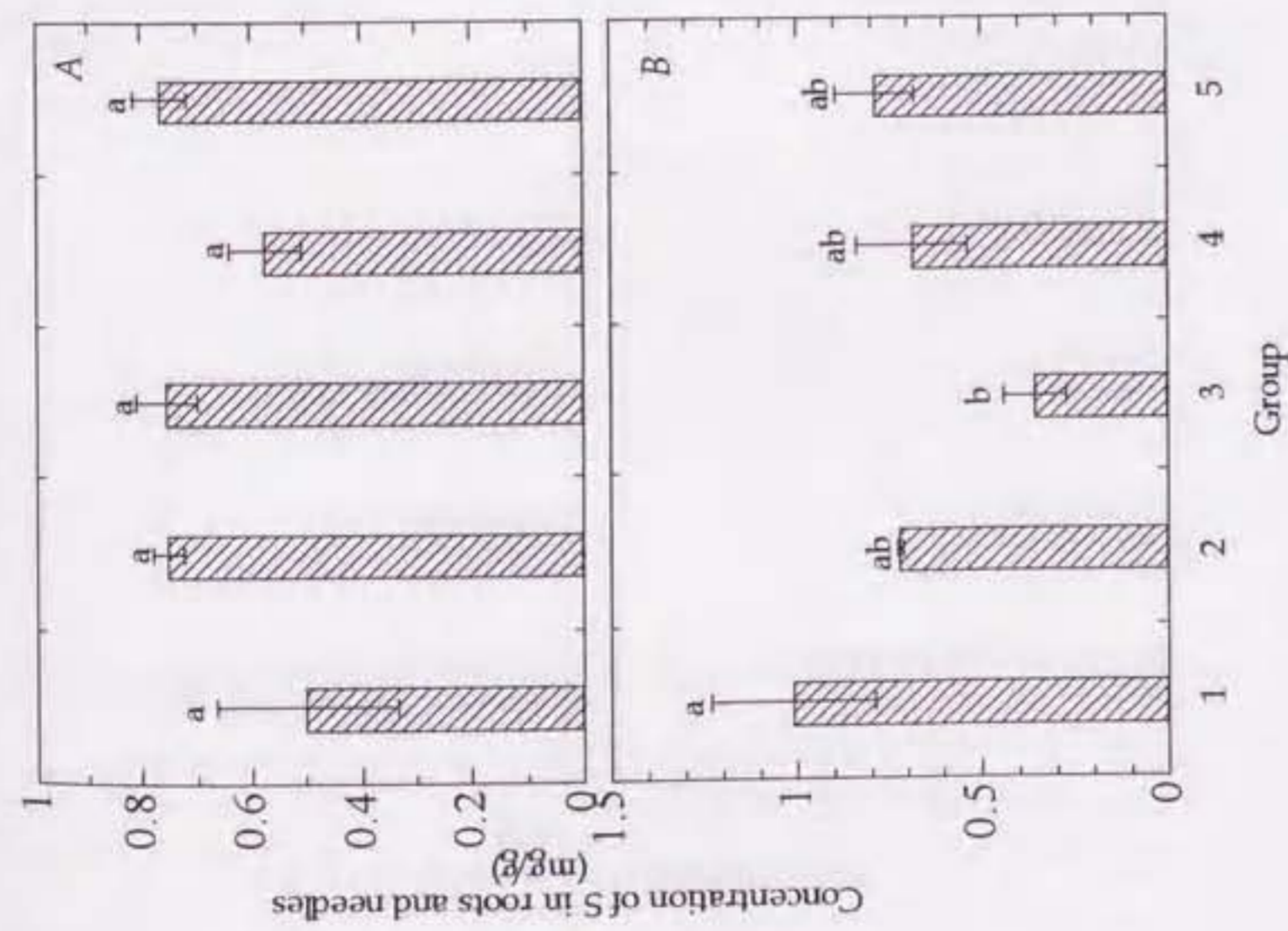


図 4-29 12週間 AI 処理後の葉(A)根(B)中 S 濃度

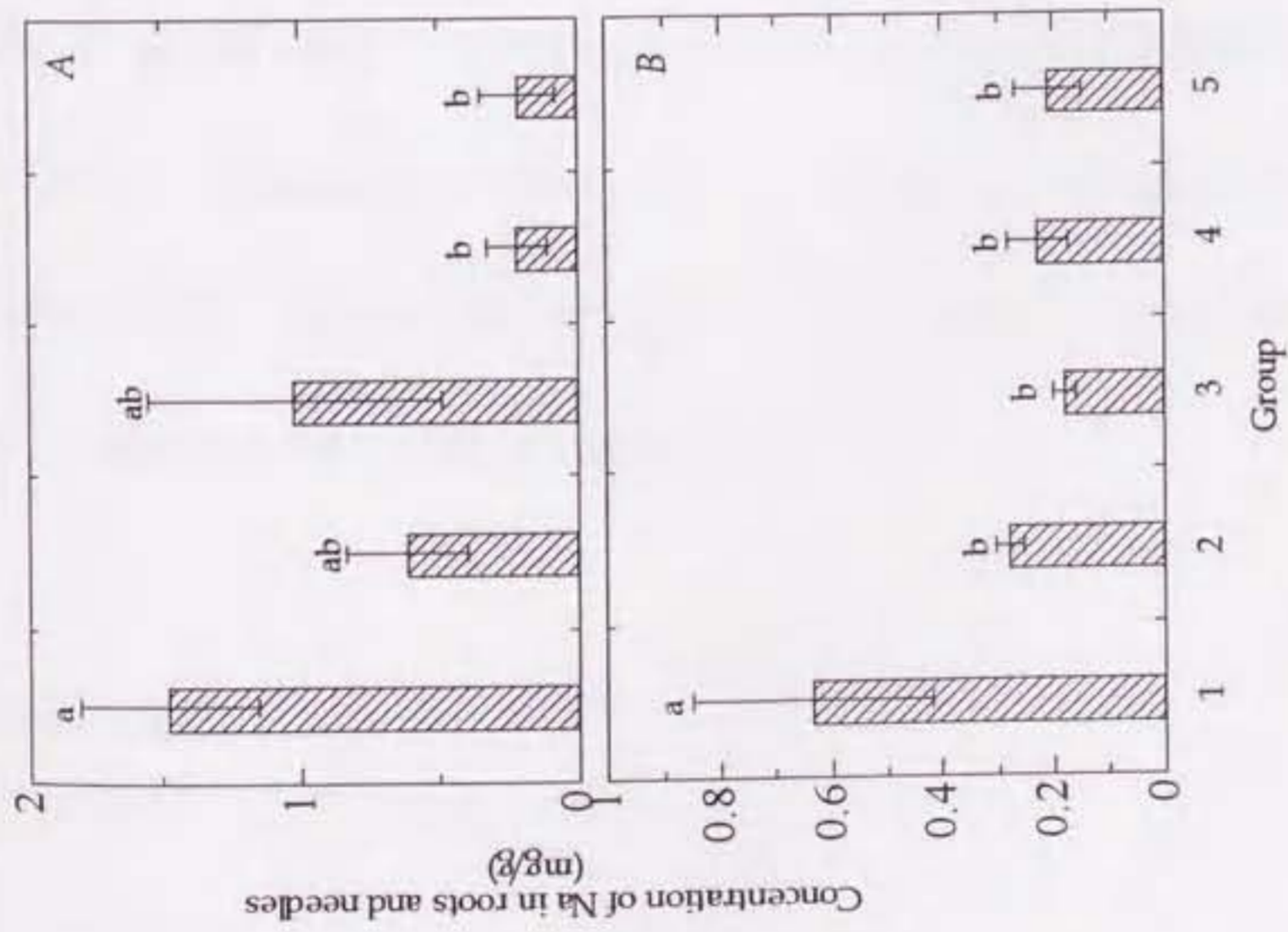


図4-30 7日間Al処理後の葉(A)根(B)中Na濃度

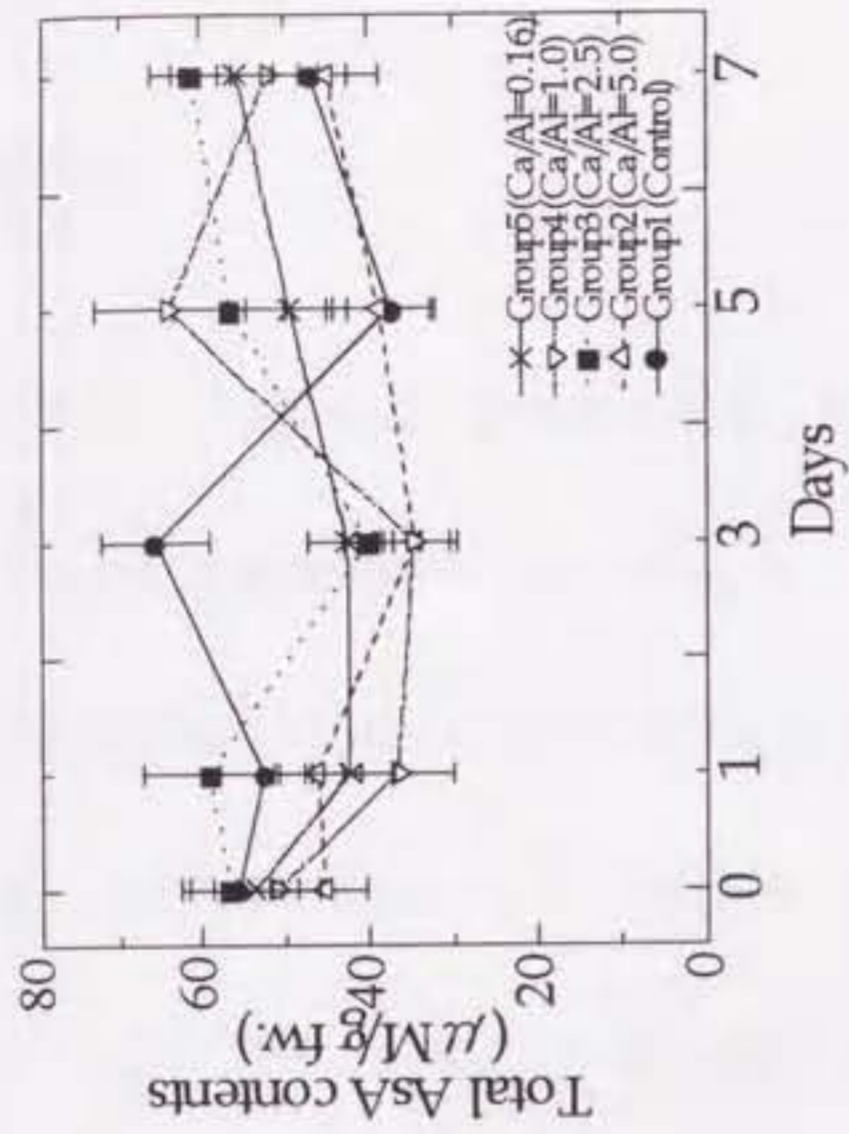


図4-31 処理7日間の総AsA濃度変化



## 第5章 大沢・豊橋国有林野外調査

### 5-1 緒言

1994年、1995年に、愛知県の東部、豊橋市内の大沢国有林および、豊橋国有林でヒノキの立枯れ被害が発生しており(図 5-1 ; 名古屋営林支局、1993)、1997年8月7日に名古屋営林支局(現・中部森林管理局名古屋分局)と共同で調査をした。大沢・豊橋国有林ヒノキ枯死の原因として、①数年前の猛暑と渇水による土壌水分の減少、いわゆる水ストレスが考えられる。これは、平成6年の夏は極端な猛暑、小雨を記録しているが、その前に大沢国有林では60%の複層伐、豊橋国有林では択抜や間伐が行われており、その影響があるのではという営林支局側の見地から推測される。また、②近年の土壌の酸性化も、酸性降水などの影響から考えられる。活性酸素消去系酵素の活性を測定することによって樹木のストレス指標とすることが出来るのではと考え、大沢・豊橋国有林の健全木の葉と、被害木の残存葉を採取し、SOD、APX、CAT活性の測定を行った。

また、土壌中の水分量と土壌pHも測定した。

### 5-2 材料と方法

### 5-2-1 材料

大沢国有林で健全木 1 本、被害木 2 本、豊橋国有林で健全木 1 本、被害木 1 本を対象とした。それぞれを、大沢健全、大沢被害 1、大沢被害 2、豊橋健全、豊橋被害と呼称する。3 層分析および土壌 pH 測定のため、その根本土壌を採土円筒で各木毎に 3 つと、葉細胞内酵素測定のため各高さの葉を採取し、液体窒素で凍結して持ち帰った。葉を採取した高さは、大沢健全が地上 9m、10m、11m、12m、15m、大沢被害 1 が 6m、8m、9m、11m、大沢被害 2 が 9m、10m、11m、12m、豊橋健全が 4m、7m、10m、12m、15m、豊橋被害が 11m、12m、14m、15m、16m であった。

### 5-2-2 3 層分析

採土円筒内土壌の、気層、液層、固層の体積比を知るため、まず実容積測定器（大起理化工業社、DIK-1000）を用いて気層体積を測定した。続いて生重を測定し、風乾させて乾重を測定した。その値を用いて液層と固層の比を算出した。

### 5-2-3 土壌 pH 測定

風乾土壌 10g に水 25mL を加え、かき混ぜ 1 時間放置する。その後ガラス電極 pH 計（東亜電波工業社、HM-12P）のガラス電極を挿入し、pH(H<sub>2</sub>O)を測定した。また、風乾土壌 10g に 1N 塩化カリウム液 25mL を加え、pH(H<sub>2</sub>O)の場合と同じ操作で

pH(KCl)を測定した。

#### 5-2-4 葉内酵素活性測定

現地で液体窒素で凍結した葉をドライアイスで冷却しながら名古屋大学の研究室に持ち帰り、前章までと同様の方法で SOD、APX、CAT の各酵素活性を測定した。

### 5-3 結果

#### 5-3-1 土壌性質

土壌の 3 層構造および pH 値を表 5-1・図 5-2 に示した。土壌水分量と被害との間に相関は認められず、現在の土壌水分が葉の枯れには影響していないことが分かる。土壌 pH は、大沢地区では被害区の pH がやや低い傾向がみられるが、豊橋地区ではほぼ一定であった。

#### 5-3-2 葉内酵素活性

各高さで採取した酵素活性を比較すると、どの酵素も高さが違くと、同一木でも全く活性が異なり、比較が極めて困難である(図 5-3、5、7)。しかし、樹木毎で平均値を出し比較すると、バラつきは大きいものの、SOD 活性が被害区の方がやや高く(図 5-4)、CAT 活性は被害区の方がやや低いという大まかな傾向がみられた(図 5-6)。APX 活性は

被害区3本のうち2本が健全区より高い結果であった(図5-8)。

#### 5.4 考察

活性酸素はオゾンや強光など様々な要因で発生することが知られており(浅田、1988)、さらに樹木は草本植物と比較して個体差が大きい。現時点で野外調査に活性酸素消去系酵素測定を応用するというのは大変困難であると言わざるを得ない(図5-3、5、7)。また、同一木で共通する酵素活性の傾向を持たないのは、既にストレス状態を脱したか、ストレスに対する耐性を獲得したことも考えられる。

しかし、各樹木毎の平均値では、SOD活性が被害区の方でやや高く(図5-4)、CAT活性は被害区の方でやや低いという大まかな傾向がみられ(図5-6)、これは Takenaka *et al.* (1999)による、神奈川県大山におけるモミ(*Abies firma*)林の被害区と健全区の各酵素活性結果の関係と共通している。これが、野外における被害木の酵素活性の特異的傾向である可能性がある。



図 5-1 大沢国営森林および豊橋国営森林

表5-1. 土壤3層分析およびpH値結果

	実容積	生重	乾重	気層	液層	固層	備考	pH(H <sub>2</sub> O)	pH(KCl)
	ml	g	g	ml	ml	ml			
大沢健全1	61.9	112.8	84.1	38.1	28.7	33.2		5.22	3.99
大沢健全2	59.9	115.2	90.3	40.1	24.8	35.1	礫やや多し	5.09	4.02
大沢健全3	51.9	93.3	69.6	48.1	23.7	28.2		5.40	4.20
大沢被害1-1	71.4	125.1	93.3	28.6	31.8	39.6	礫多し	4.77	3.75
大沢被害1-2	75.5	132.8	97.3	24.5	35.5	40.0		4.70	3.56
大沢被害1-3	68.1	122.5	92.5	31.9	30.0	38.1		4.51	3.36
大沢被害2-1	67.1	138.1	116.8	32.9	21.3	45.8	礫多し	4.60	3.80
大沢被害2-2	53.8	101.3	80.1	46.2	21.2	32.6		5.58	4.23
大沢被害2-3	49.1	91.4	72.3	50.9	19.1	30.0	礫やや多し	4.27	3.49
豊橋健全1	57.0	103.1	79.1	43.0	24.0	33.0		4.28	3.36
豊橋健全2	48.0	92.5	75.4	52.0	17.1	30.9		4.05	3.15
豊橋健全3	69.5	122.4	90.4	30.5	32.0	37.5	礫やや多し	4.36	3.43
豊橋被害1	61.6	94.2	56.6	38.4	37.6	24.0		4.14	3.34
豊橋被害2	64.2	112.9	82.3	35.8	30.6	33.6		4.26	3.45
豊橋被害3	61.6	101.6	69.7	38.4	32.0	29.6		4.20	3.40

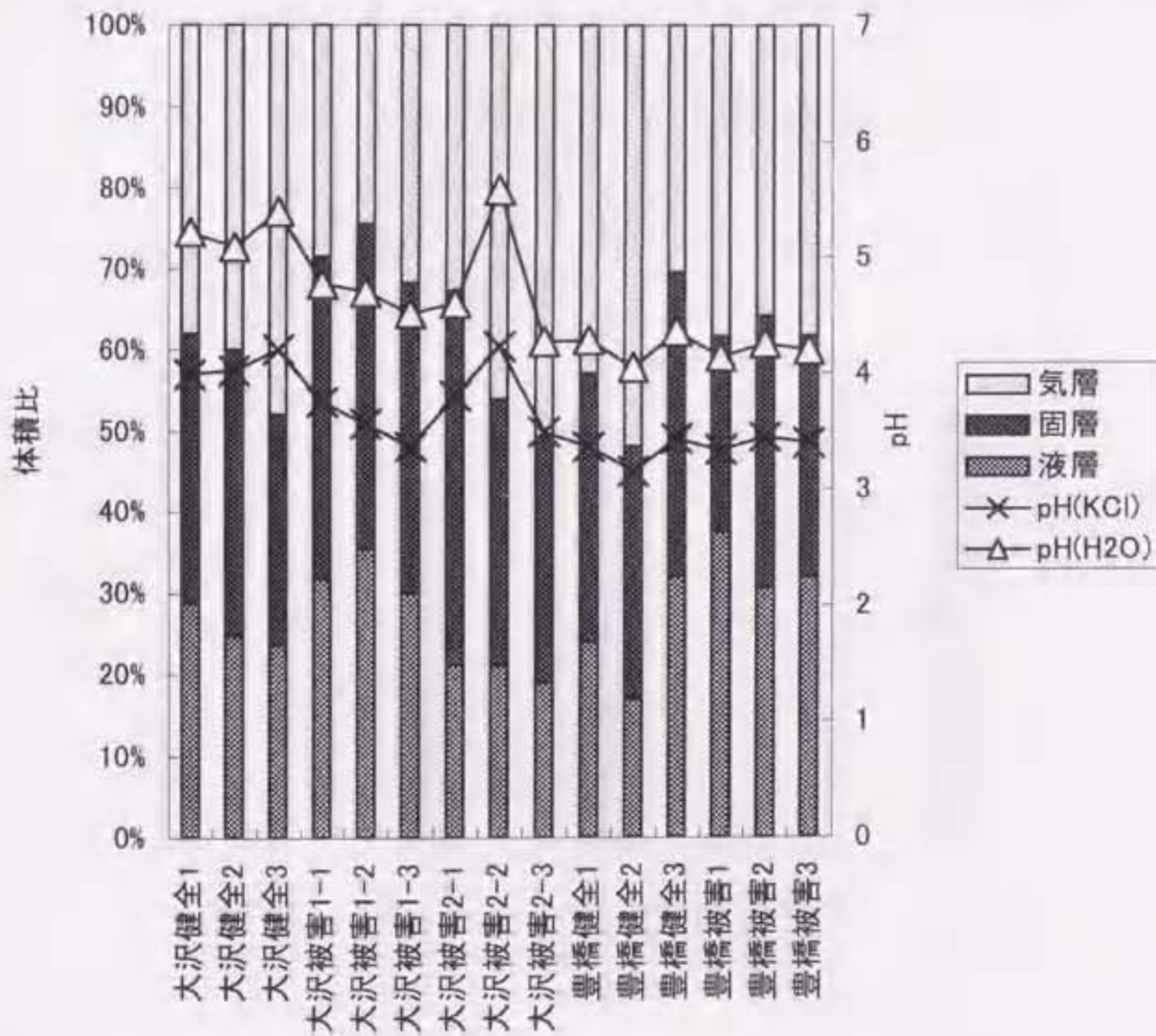


図5-2. 土壤3層分析およびpH値結果

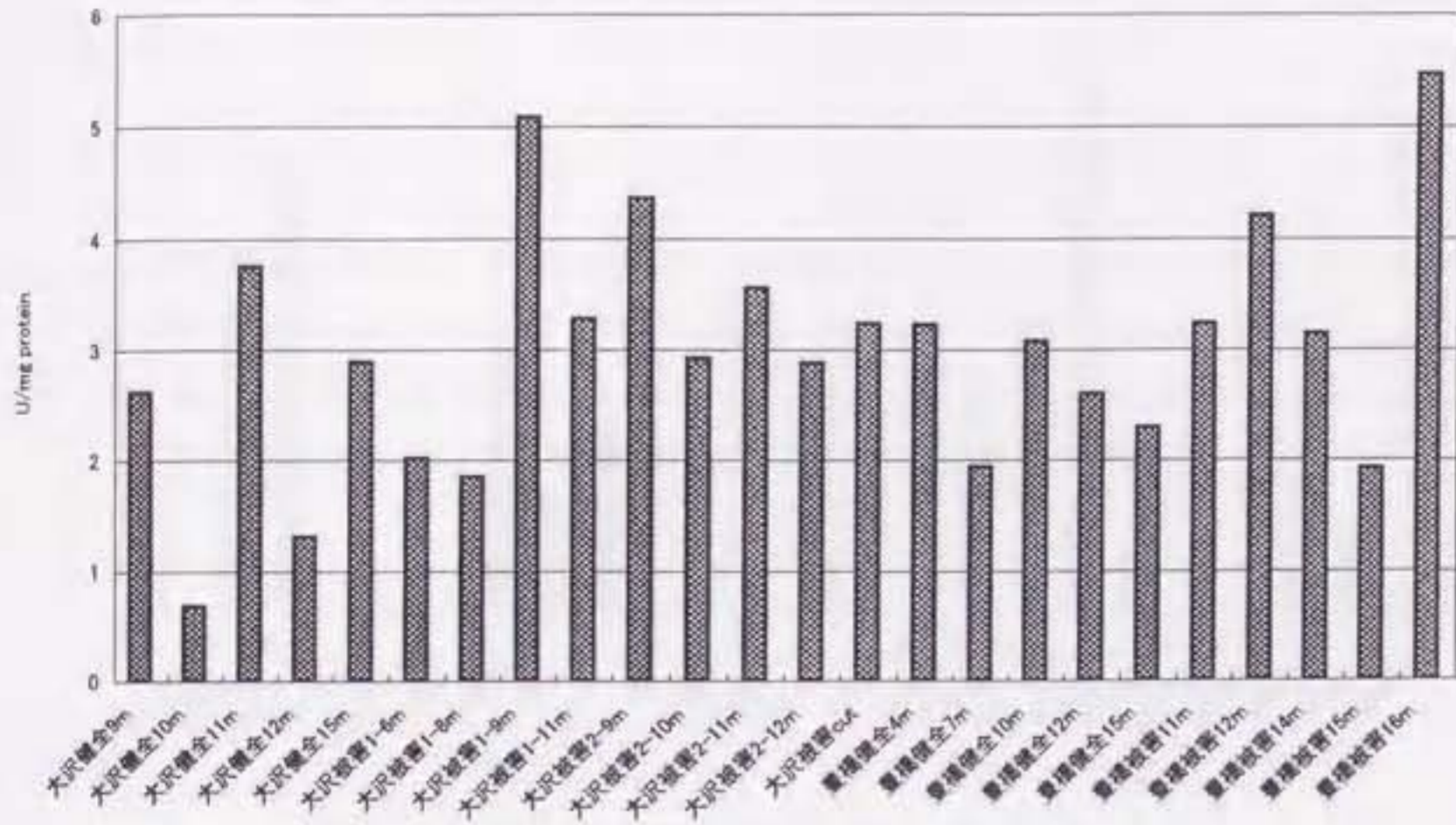


図 5-3 豊橋野外調査各サンプル毎葉内 SOD 活性

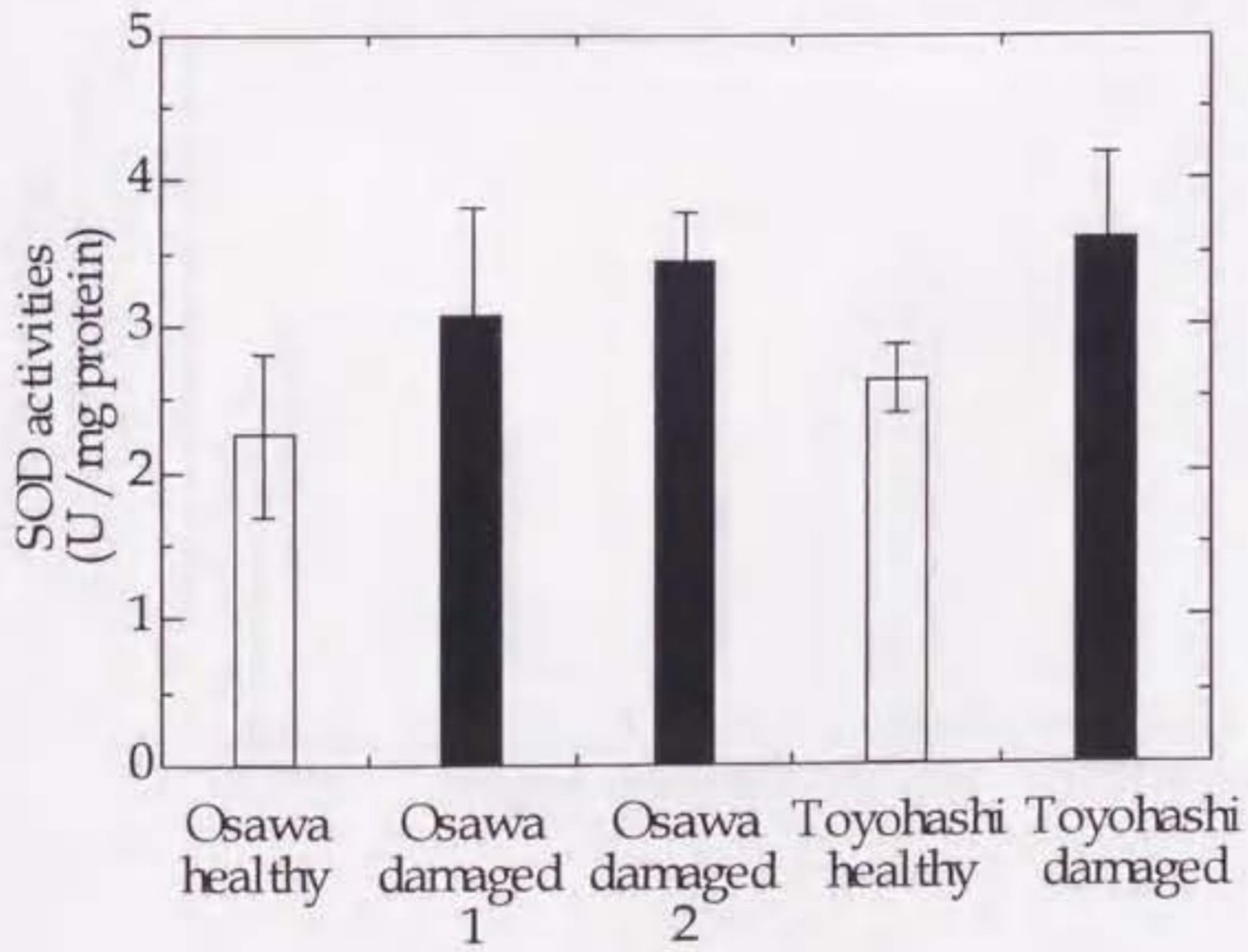


図 5-4 豊橋野外調査各樹木毎葉内 SOD 活性

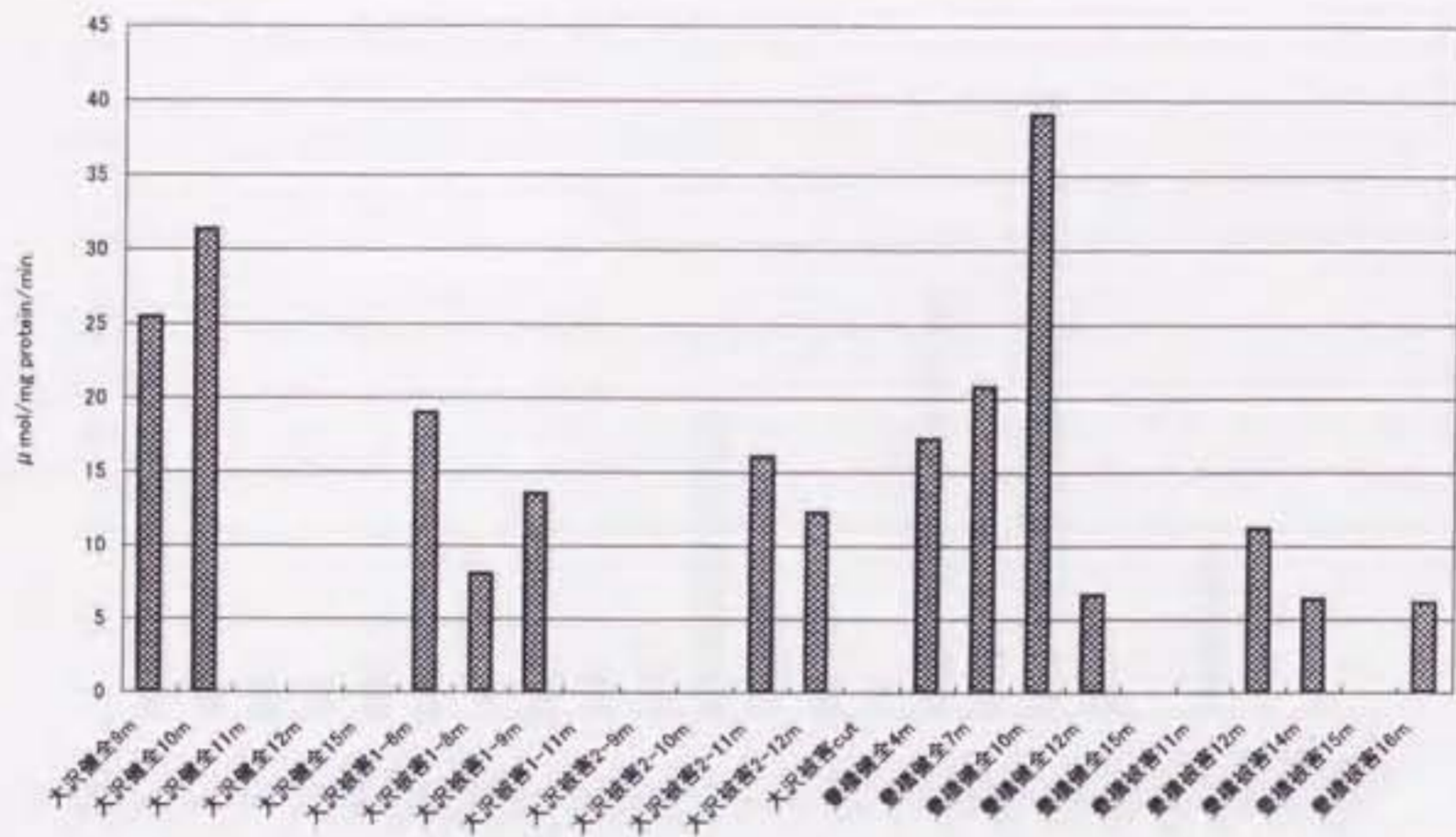


図 5-5 豊橋野外調査各サンプル毎葉内 CAT 活性

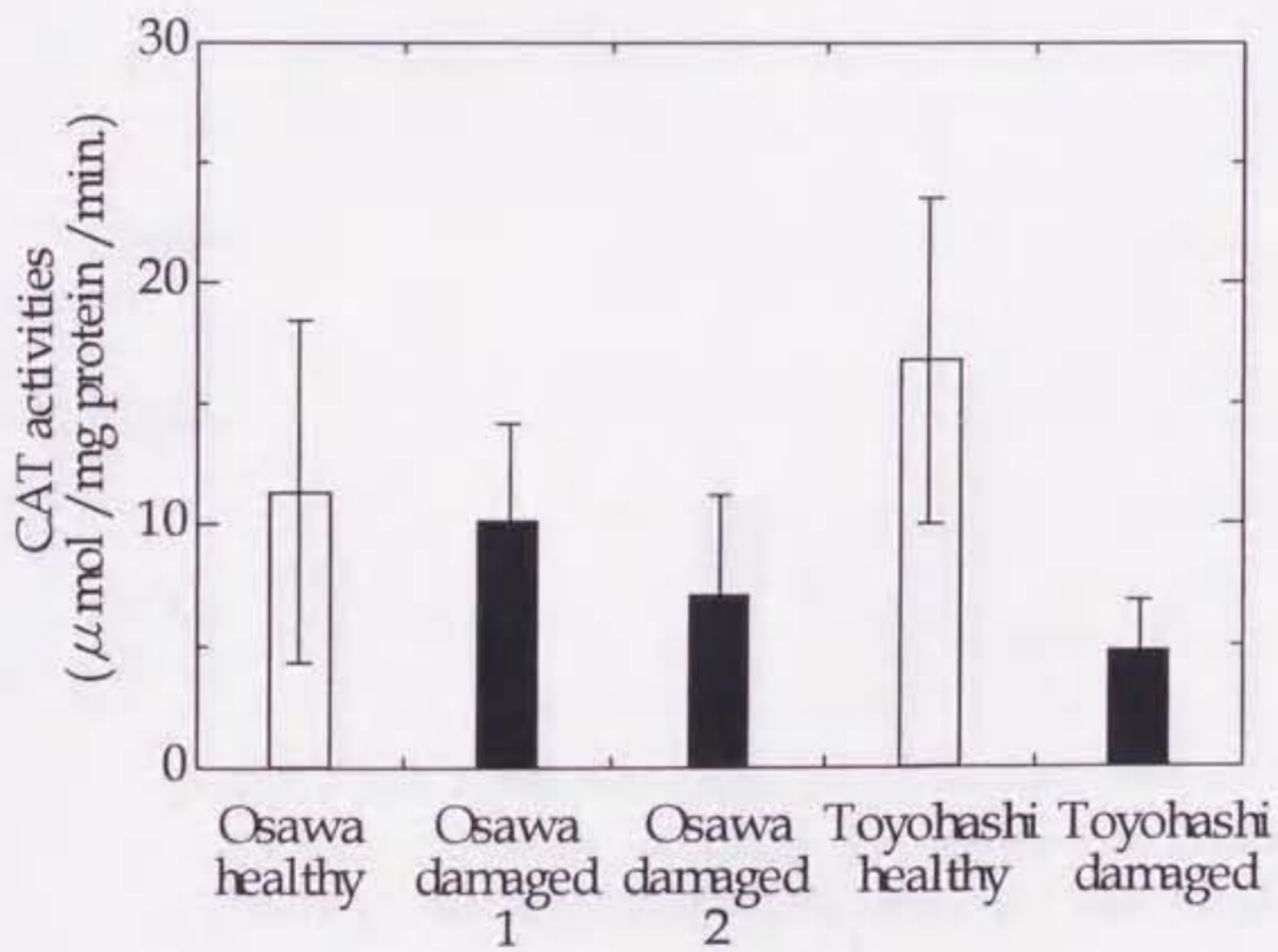


図 5-6 豊橋野外調査各樹木毎葉内 CAT 活性



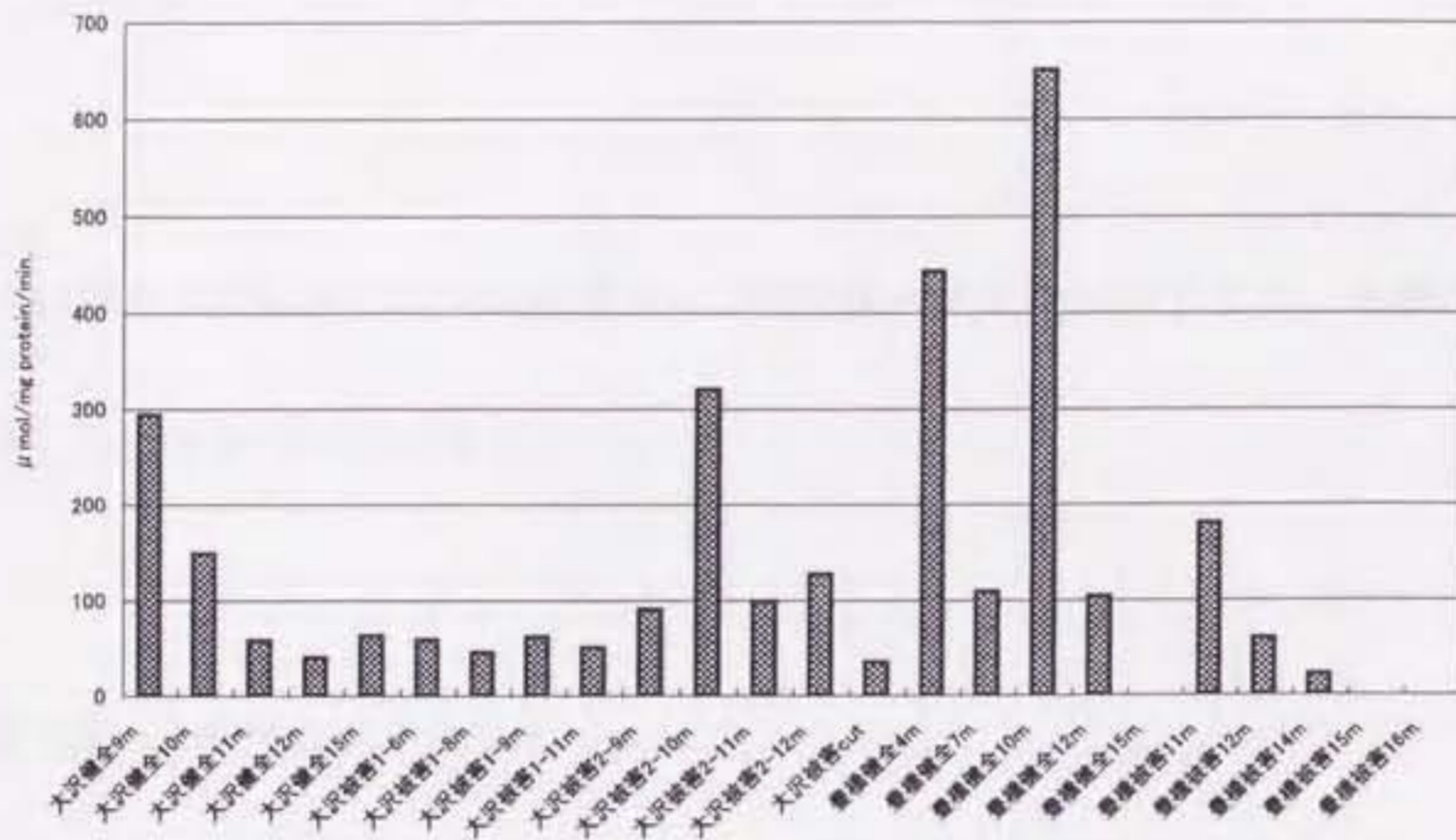


図 5-7 豊橋野外調査各サンプル毎葉内 APX 活性

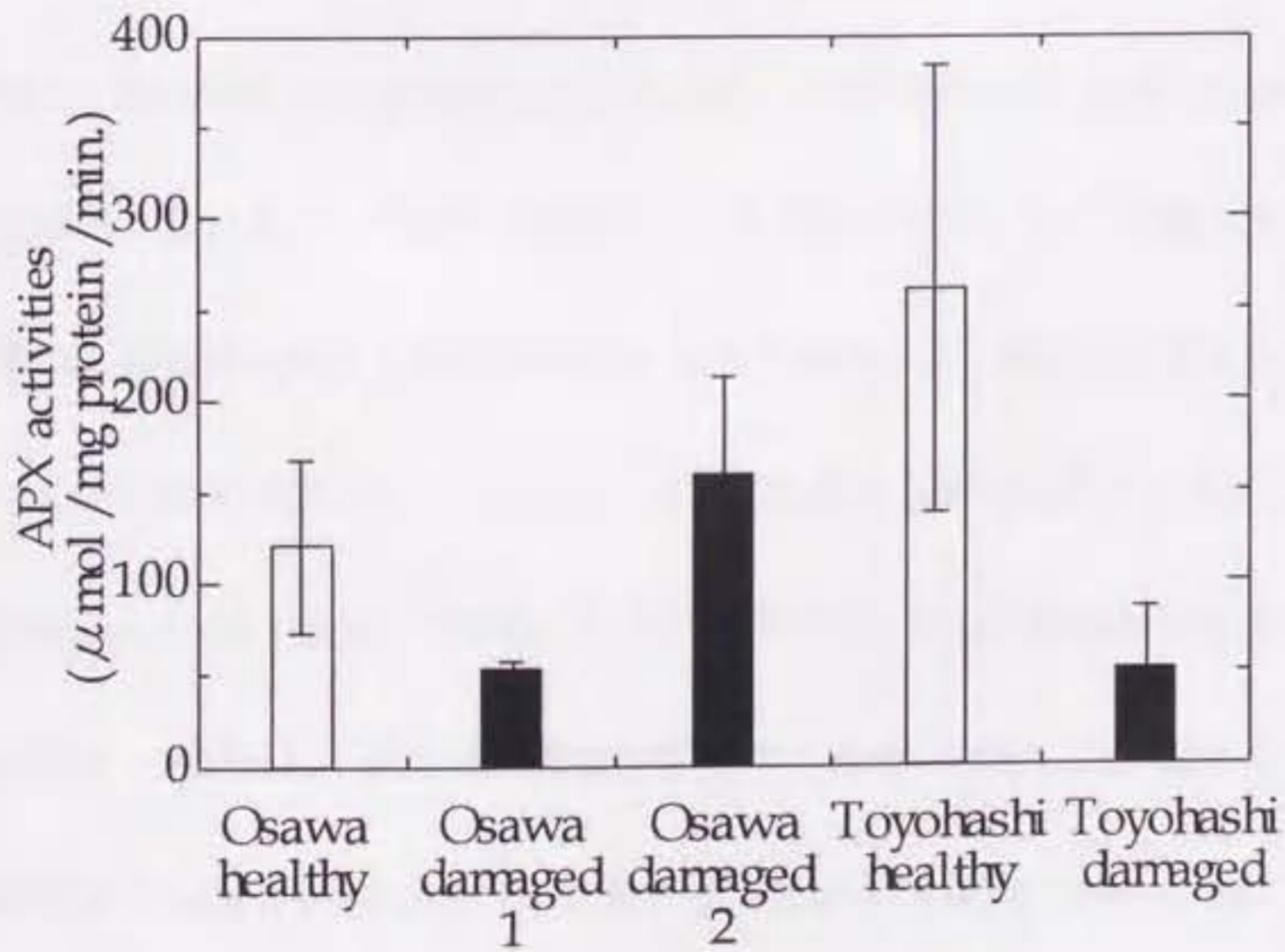


図 5-8 豊橋野外調査各樹木毎葉内 APX 活性

## 第6章 総合考察

本章では前章までに得られた知見を基に、酸性化ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系について総合的な考察を行う。

### 6-1 地上部への酸性化ストレス

葉面上に滞留した酸性霧滴中に多量に含まれる  $H^+$ イオンは、先ず葉面のクチクラ層を侵食し、気孔を塞ぐなどの害を与える。また、細胞内から葉表面に分泌されバッファ一系に寄与している  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ といった無機イオン、アミノ酸、タンパク質や炭水化物などの溶脱を自身との交換反応によって増加させ、葉のバッファ一系の能力を超えて、 $Ca^{2+}$ 、 $K^+$ の溶脱など、さまざまな障害を生じさせると考えられている(Schaefer and Reiners, 1990 ; 野内, 1994)。今までの研究で、 $SO_2$ に接触させた植物が暗条件では反応せず、光照射して初めて可視害を起こすことや、単離した葉緑体を  $HSO_3^-$ と共に光照射すると、 $O_2$ が連鎖反動的に生成することから(Asada *et al.*, 1987)、 $SO_2$ や硫酸による植物葉障害へ活性酸素が関与していることが示唆されている(田中, 1988)。本研究の結果から、その仮定の証明がなされた。

さらに、有機酸酸性物質の植物葉へのより強い影響が明らかになった。今までの研究

は酸性雨成分として硫酸や硝酸に重点を置いていた(河野ら、1995a; Kong *et al.*, 1998)。  
確かに、自然降雨の酸性成分として硫酸や硝酸はその大部分を占め、硝酸中には  $\text{NH}_4^+$   
や  $\text{NO}_3^-$  が多く含まれるために N 過多が植物へのストレス因子として働くことも報告さ  
れている(Smith 1990)。本研究では硝酸区を設定しなかったが、Jacobson *et al.* (1990)  
は、同条件下ではアカミトウヒ(*Picea rubens*)に硝酸よりも硫酸の方がよりダメージを  
与えると報告している。また、高濃度の  $\text{SO}_2$  が接触した植物は明所の方が可視害が出  
やすいが、 $\text{NO}_2$  に対しては暗所で接触させた方が可視害が出やすいという報告(田中、  
1988)から、活性酸素消去系への影響測定の無機酸処理区としては硫酸区が適当であっ  
たと思われる。Tezuka *et al.* (1998) の乗鞍岳での測定値(表 3-1)のように霧水成分に少  
なからず有機酸は含有されており、Tezuka *et al.* (1998) による霧暴露で、硫酸(pH 3.0)  
よりもギ酸(pH 3.4)の方が SOD 活性の上昇を招くという報告から、本研究では、地  
上部への酸性化ストレスとして成分に有機酸を含む酸性霧を設定した。本研究の無機酸  
と有機酸処理の活性酸素消去系酵素と AsA の応答変化の違いより、酸性霧中の有機酸  
成分がヒノキ葉へ強く影響し、その葉内代謝系へ関与する可能性が示された。有機酸は  
弱酸なので解離度が低く、脂質二重構造をもつ細胞膜を通過しやすい。また、酢酸はクエ  
ン酸回路上で働き、植物生理代謝に深く関与すると考えられる。酸性物質の低 pH による細  
胞外からの影響に加えて、有機酸による細胞内からの作用により、樹木葉へより強いスト  
レスを与えることが示唆された。また、粒径によって、植物への影響も異なると考えられ

るので、ネブライザーを用いた霧発生は適切であったと考えられる。

河野ら(1995a)の報告では人工酸性雨の pH が低くなれば、ヒノキの純光合成速度と暗呼吸速度への影響は大きくなる傾向があった。この実験は地上部・地下部双方の影響を見ているので単純に比較できないが、活性酸素は光合成の過程で産出されるので(浅田、1988)、光合成と活性酸素は極めて密接な関係にある。処理 3 日目以降の活性酸素消去系酵素の挙動は葉内活性酸素の減少を示唆するが、これは光合成活性が増大したことによる活性酸素の減少を示しているかも知れない。また、Chia *et al.* (1984) はマメ (*Phaseolus vulgaris*) を用いて酸性雨暴露実験によって、酸性雨によりスーパーオキシドが発生して葉緑体膜の脂質過酸化を起こし光合成の低下を招いている可能性を示している。逆に、植物が SO<sub>2</sub> に接触すると光合成電子伝達系よりも CO<sub>2</sub> 固定系が早く阻害され、光化学系の還元力が O<sub>2</sub> の還元に使われ、活性酸素が生成しやすくなる(田中、1988)。活性酸素消去系と光合成系は密接に関係しており、その相互作用を明らかにするのは重要な研究課題である。

## 6.2 地下部への酸性化ストレス

本研究では地下部への酸性化ストレスとして、Al ストレス、それも Al 濃度を一定として Ca 濃度を変え根圏、Ca/Al 比によってストレス強度を調整した。土壤中で Ca が

Al 毒性を緩和することはよく知られており、根圏 Ca/Al 比が土壤酸性化のストレス指標として提案されている(Cronan and Grigal 1995)。本研究では、5 mM という日本の標準的な土壌の約 1 mM という値と比較するとやや過剰な Al 濃度においては、根圏 Ca/Al 比が樹木へのストレス強度指標として成り立つという結果が得られた。

根圏へ Al ストレスを加えると、元素分析の結果から葉へ Al が輸送されていないのが明らかなのに、葉の活性酸素消去系酵素が活性化されたり抑制されたりした。しかもそれが、1 日以内という非常に短い時間内で起きていることが明らかとなった。根圏への Al ストレスがどの様に根へ伝達するかについての詳細な知見は得られていないが、処理1日後の葉内酵素活性上昇は Al ストレス伝達にも活性酸素が深く関わることを示す。そして、樹木において根への Al ストレスが1日以内に葉に伝わるという結果は他の生理応答の研究では報告されておらず、活性酸素消去系がストレスへの初期応答として、極めて重要であることが示唆された。

実験 4-1 の1週間の Al 暴露実験で、処理区 2-5 の SOD 活性は処理 1 日後に上昇し、処理区 2 (Ca/Al=5.0) と 3 (Ca/Al=2.5) の酵素活性はそれぞれ、処理開始 3 日後と 7 日後にコントロールレベルまで減少した(図 4-2A・表 4-4A)。この結果から、根圏 Ca が樹木根表面あるいは中で Al と競合し毒性を緩和し、数日以内に Al ストレスを葉に到達させなくするのではないかと推測される。Ca、K、Mg は、Al 処理区では根で著しい吸収阻害が認められたが、葉では有意差は認められなかった(図 4-18、19、20、21)。これ

によって、Ca、K、Mgといった栄養元素の葉への移動阻害が処理1日後の葉内活性酸素増加の原因ではないことが示唆された。

しかし、SOD活性がCa/Al比減少に伴い、処理開始直後上昇し、いったん抑制され、再び上昇するが(図4-2、4-6)、最初の活性上昇と再度の活性上昇の原因は異なるかもしれない。最初の活性上昇は原因が定かでないが、再度の活性上昇、すなわち活性酸素増大は、葉へのCa移動阻害による可能性もある。実験4-2で処理区2、3のSOD活性が処理開始7週間後に対照区との有意差がなくなって、処理12週間後に再び有意差を持つのは(図4-6)、長期暴露によってCaのAl毒緩衝能力を越えてしまったからだと思われる。7日間の処理では、葉のCa濃度に影響は見られないが、12週間後は影響が見られたことから(図4-12)、これを表していると思われる。Hirano *et al.* (2000)はヒノキを用いた本研究と同じCa/Al条件での12週間の処理で根圏のCa/Al比低下が分岐根長の低下などの根の形態変化を引き起こすと報告している。形態変化を起こし、Caの転流が阻害され、再び葉内の活性酸素を増大させたのであろう。

植物根にはAl毒性に対して様々な防御機構が備わっており、キレート結合したAlは単量体時( $Al^{3+}$ )と比較して植物への成長阻害作用が緩和される(Hue *et al.*, 1986)ため、いくつかの植物はクエン酸のような有機酸を根から分泌してAlストレスに対抗していることが知られている(Ma *et al.*, 1997)。また、ヒノキも根圏Alストレスに対して、根圏pHを低下させたり有機酸濃度を増加して対抗しようとしていることが解明されつ

つある(富岡、私信)。それら防御機構へのメッセンジャーとしての活性酸素の役割も推測される。実験 4-1 の 1 週間 Al 処理で SOD は活性化を続けるが(図 4-2A)、APX は抑圧されることから(図 4-4A)、CAT や他の過酸化水素消去系が効果的に機能しなければ、葉内に過酸化水素が蓄積されることになる。これが、SAR 獲得のためのヒノキの適応機構である可能性もあり、酸性化ストレスへの他の適応機構と活性酸素の関わり明らかにすることによりヒノキの適応戦略の解明が可能であると思われる。

### 6-3 活性酸素消去系酵素と金属元素

SOD は活性中心に金属を含む金属酵素で、その金属の種類によって Cu, Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD の 3 種類が知られている(Asada and Kanematsu, 1978; 北川と勝部、1988)。第 4 章における 7 日間 Al 処理後の葉中の金属元素を見ると Cu は Ca/Al 比の減少と共に減少しているが(図 4-8)、その他の Zn、Mn、Fe には特に傾向は見られない(図 4-28、22、16)。ヒノキ葉の SOD がどの金属酵素かは明らかではないが、Cu, Zn-SOD であると仮定すると、根圏低 Ca/Al 比の影響によって根における SOD 活性が上昇し、Cu が消費されたことも推測される。また、葉においては Zn が 0.02 mg/g 程度と Cu よりも濃度が 10 倍高いことから Zn には影響が見られなかったかも知れない。12 週間処理後は、Cu は Ca/Al 比の減少と共に減少しており(図 4-9)、Fe に影響はない

(図 4-17)、7 日後と同じ傾向を示しているが、葉の Mn と Zn は処理区 4 (Ca/Al=1.0) まで Ca/Al 比の減少とともに増加し、処理区 5 (Ca/Al=0.16) で減少する共通の傾向を示した(図 4-23、29)。処理期間が長くなり、働く SOD の種類が変化している可能性が示された。植物葉内で働く SOD の種類についての詳しい知見は得られていないが、SOD の種類は局在場所に依存しており(北川・勝部、1988)、Al ストレスの影響部位が処理期間によって変わる可能性が示唆された。

タンパク質合成に重要な役割を果たす S は(Rawn, 1989; Bray, 1975)、処理 7 日後には根で、処理 12 週間後には根・葉ともに Al 処理区で減少する傾向があった(図 4-26、27)。Al ストレスによって、タンパク質である酵素の合成のために S が消費された可能性がある。

本研究では遺伝子解析は行っていないが、活性酸素消去系酵素の測定と共に、その mRNA 解析を行えば、酸性化ストレスと活性酸素消去系に関してより深い知見が得られると思われる。

#### 6.4 地上部と地下部への酸性化ストレスの相互関係

樹木が林内で酸性降下物の被害に遭う場合、地上部・地下部両方酸性化される可能性は高い。Kong *et al.* (2000) は *Pinus masoniana* を用いた 2 ヶ月の暴露実験で、葉へ



の pH 2.0 と 6.5 の溶液暴露と、0/0、0/1、1/10、10/1 と変えた根圏 Ca/Al 比の複合酸性ストレスの、どちらもストレス負荷が高いほうが相互作用で樹木葉の SOD 活性が増大することを報告した。

本研究では地上部と地下部から複合的に酸性化ストレスをかける実験は行わなかったが、野外においては、土壤酸性化は土壤のバッファ能力もあり、Al 溶脱までには時間を必要とし、直接葉と接する酸性霧が先ずヒノキへのストレス物質として作用すると思われる。第 3 章と 4 章の実験結果を比較すると葉内活性酸素消去系酵素は地上部からの酸性化ストレスに対して、地下部からより早く応答しているようである。植物が大気汚染物質からのストレスを受けると、植物は光合成産物を地上部に回し、根への分配を減らす事が知られている(野内、1994)。さらに、地下部への Al ストレスが加わり、根へのダメージは大きくなると思われる。葉の光化学系や代謝系に異常があれば、根からのストレス伝達系も影響を受けダメージが増加する可能性は高いと考えられる。地上部・地下部双方への酸性化ストレスが植物へのダメージを相乗的に高める可能性がある。

酸性霧成分中の有機酸が無機酸とは違った影響を葉に与えることが推測されたが、根圏 Al ストレスに対して有機酸を分泌する防御機構について明らかになってきている(Ma *et al.*, 1997)。地上部への有機酸酸性霧ストレスが Al 耐性有機酸分泌系に影響を与える可能性がある。

しかし、その一方で、地上部・地下部一方へのストレスによって活性酸素消去系が活

性化され、他方へのストレス耐性を高める可能性もある。低濃度 (0.1 ppm) SO<sub>2</sub> に長期暴露し SOD 活性を上昇させたポプラを、より高濃度 (0.5 ppm) SO<sub>2</sub> に暴露した際に、対照よりも高い抵抗性を示すことが報告されている (田中、1988)。野外において、常に根圏 Al ストレスにさらされて活性酸素消去系を活性化し、抵抗性を獲得したヒノキが、突然の強い酸性霧ストレスに対し強い抵抗性を示すことも考えられる。本研究結果よりその可能性も示唆された。

#### 6-5 活性酸素消去系の野外調査におけるストレス指標への応用の可能性

第3章、第4章の7日間処理の結果から、酸性化ストレス処理を続けると、高いストレス区で SOD 活性は高いままであるが、APX 活性は低下するという傾向が見られる。また、第5章の豊橋野外調査で、被害区では SOD 活性は高いが、CAT 活性は低いという結果が得られた。そこで、それぞれの結果について、SOD 活性と、APX+CAT 活性の関係をグラフで表した(図 6-1、2、3、4)。これらから、地上部への酸性霧(図 6-1)、地下部への Al(図 6-2、3)いずれも処理7日目にはストレス強度が高い区で SOD 活性が高いのに CAT+APX 活性が低いという傾向が見られた。豊橋野外調査でも同様に、被害区では SOD 活性が高いが CAT+APX 活性が低いという結果が得られた(図 6-4)。

SOD は過酸化水素を生成する酵素であり、CAT と APX は共に、過酸化水素消去系

酵素であり(図 1-2)、この関係が崩れているということは、樹体内での過酸化水素の蓄積を意味し、この違いを野外での樹木のストレス指標として用いることが出来る可能性が示された。

第 2 章において SOD と APX の季節変動について述べ、活性酸素消去系酵素は他の植物生理代謝系と同様に、夏季に活性化され、冬季に減退することが明らかになった。活性酸素消去系酵素を野外で樹木のストレス指標として応用しようとする場合、ストレスに左右されない基本的な代謝活性指標を定め、それと活性酸素消去系酵素との比較が必要である。活性酸素消去系酵素は樹木にとって重要な生理応答であり、今後、複合ストレスを考慮した室内実験で他の生理応答および含有物との相関を明らかにし、野外へ応用可能な指標の構築への努力を続ける必要がある。

## 6-6 結論

本研究により酸性化ストレスに対し、ヒノキ葉内活性酸素消去系が深く関わるということが明らかになった。地上部への酸性化ストレスとして酸性霧ストレスが pH 4 でヒノキ葉に影響を与えること、酸性霧暴露によって 1 日で葉内活性酸素消去系酵素が他の応答より素早く活性化されることが明らかになった。また、無機酸と有機酸処理の活性酸素消去系酵素と AsA の応答変化の違いより、酸性霧中の有機酸成分がヒノキ葉へ強く影響

し、その葉内代謝系へ関与する可能性が示された。また、地下部への Al ストレスに対して、ヒノキ葉内の SOD、CAT、APX、そして GR といった活性酸素消去系酵素は、7 日間の実験で根圏の Ca/Al モル濃度比に影響を受けて変動した。葉内 SOD および CAT 活性は根圏 Al ストレスによって上昇したが、対照的にアスコルビン酸-グルタチオンサイクル上にある APX および GR 活性は根圏 Ca/Al モル濃度比の減少に伴って減少した。また、12 週間の実験で、ヒノキ苗木根圏の Ca/Al 比減少が可視障害をもたらさず、器官別乾重比等にはほとんど影響を与えないが、葉内 SOD、CAT 活性を処理 1 週間以内増加させた。これらの結果から根圏 Ca/Al モル濃度比の減少がヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の活性化を促すことが示された。一方、根中 Al 濃度は上昇したにも拘わらず、葉内濃度は処理区間で差がなかったことから、葉への Al 毒性は根から葉への Al そのものの移動によらないことが示された。根から葉への Al ストレス伝達機構については未だ明らかではなく、活性酸素の関与も考えられる。

さらに、SOD 活性と CAT+APX 活性の関係が、樹木のストレス指標になりうる可能性が示された。

本研究で得られた結果から、他の防御機構とともに活性酸素消去系酵素が根圏 Al ストレスに対して重要な役割を担っており、その防御機構として作用してことが明らかになった。

図表

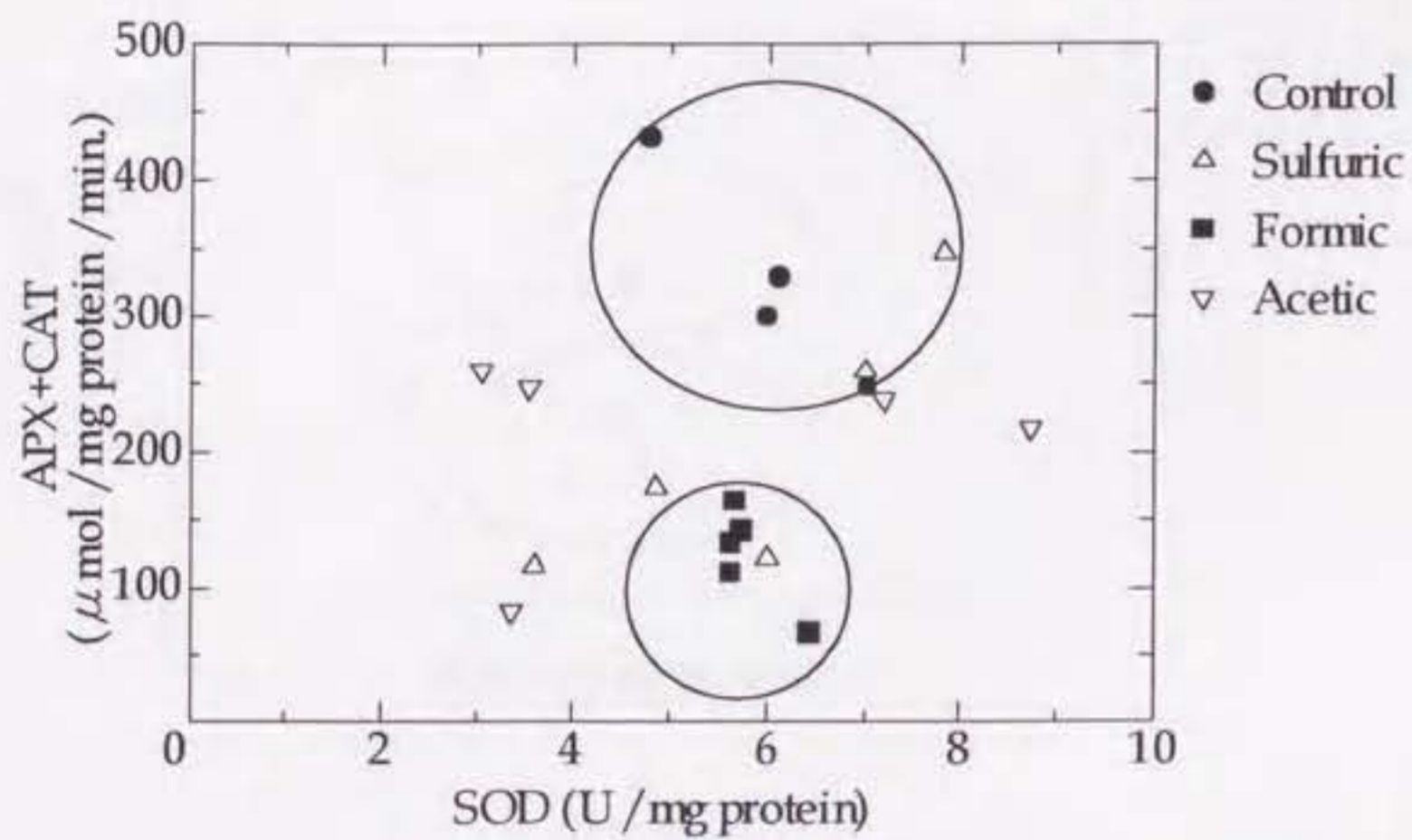


図 6-1 実験 3-1 における霧暴露開始 7 日後の SOD と APX+CAT 活性の関係

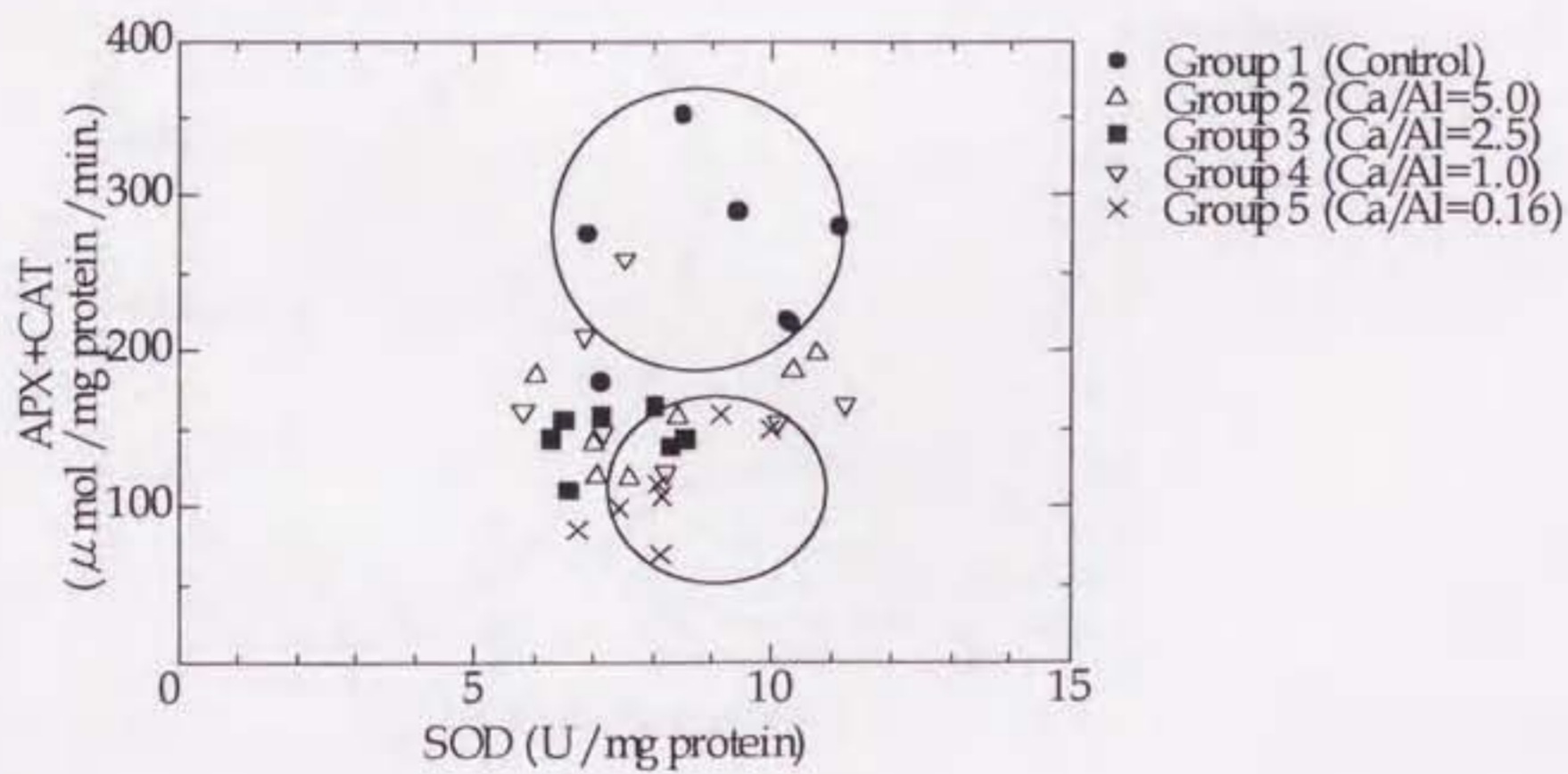


図 6-2 実験 4-1(98 年)における Al 暴露開始 7 日後の SOD と APX+CAT 活性の関係

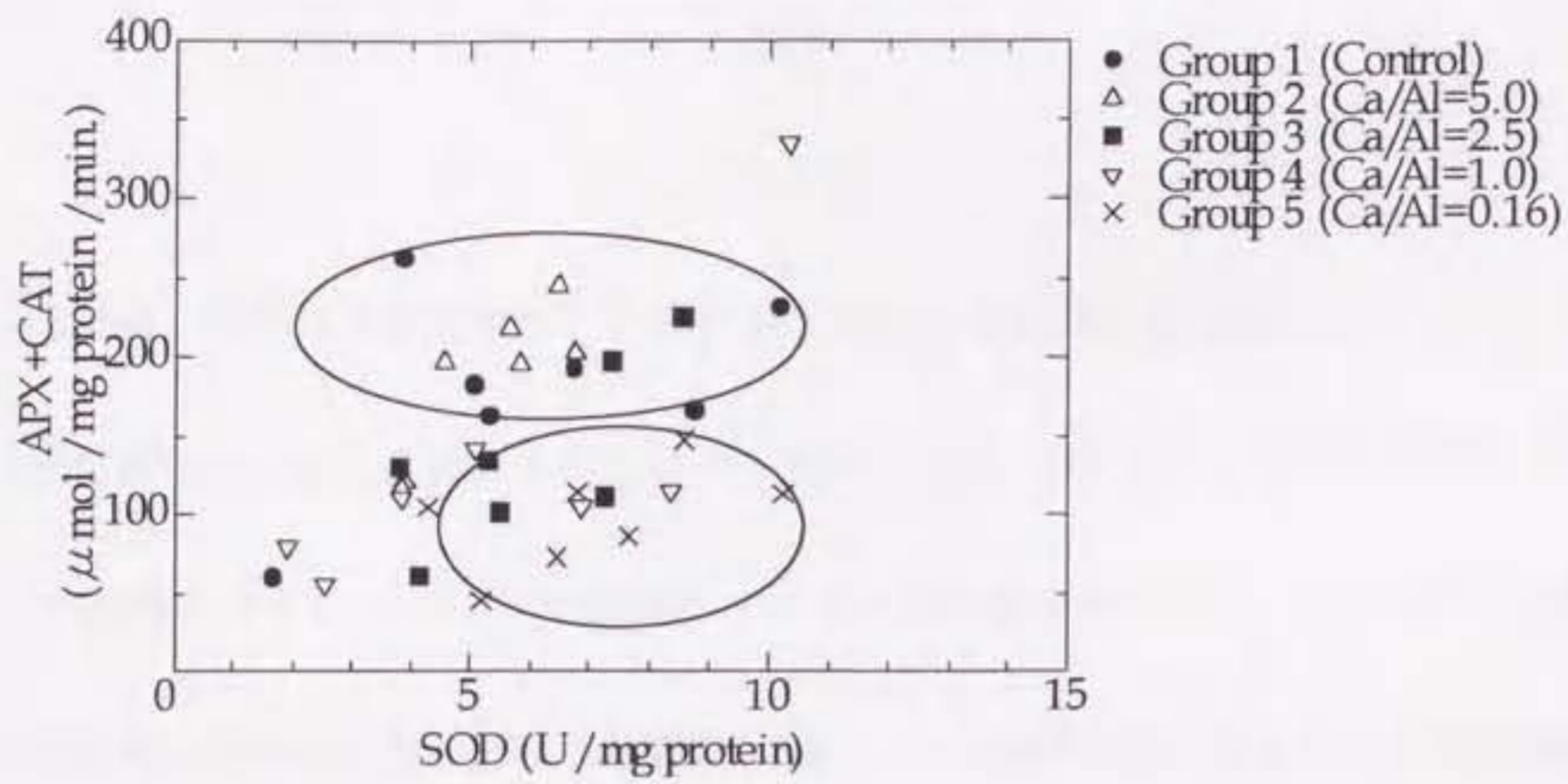


図 6-3 実験 4-1(99 年)における Al 暴露開始 7 日後の SOD と APX+CAT 活性の関係

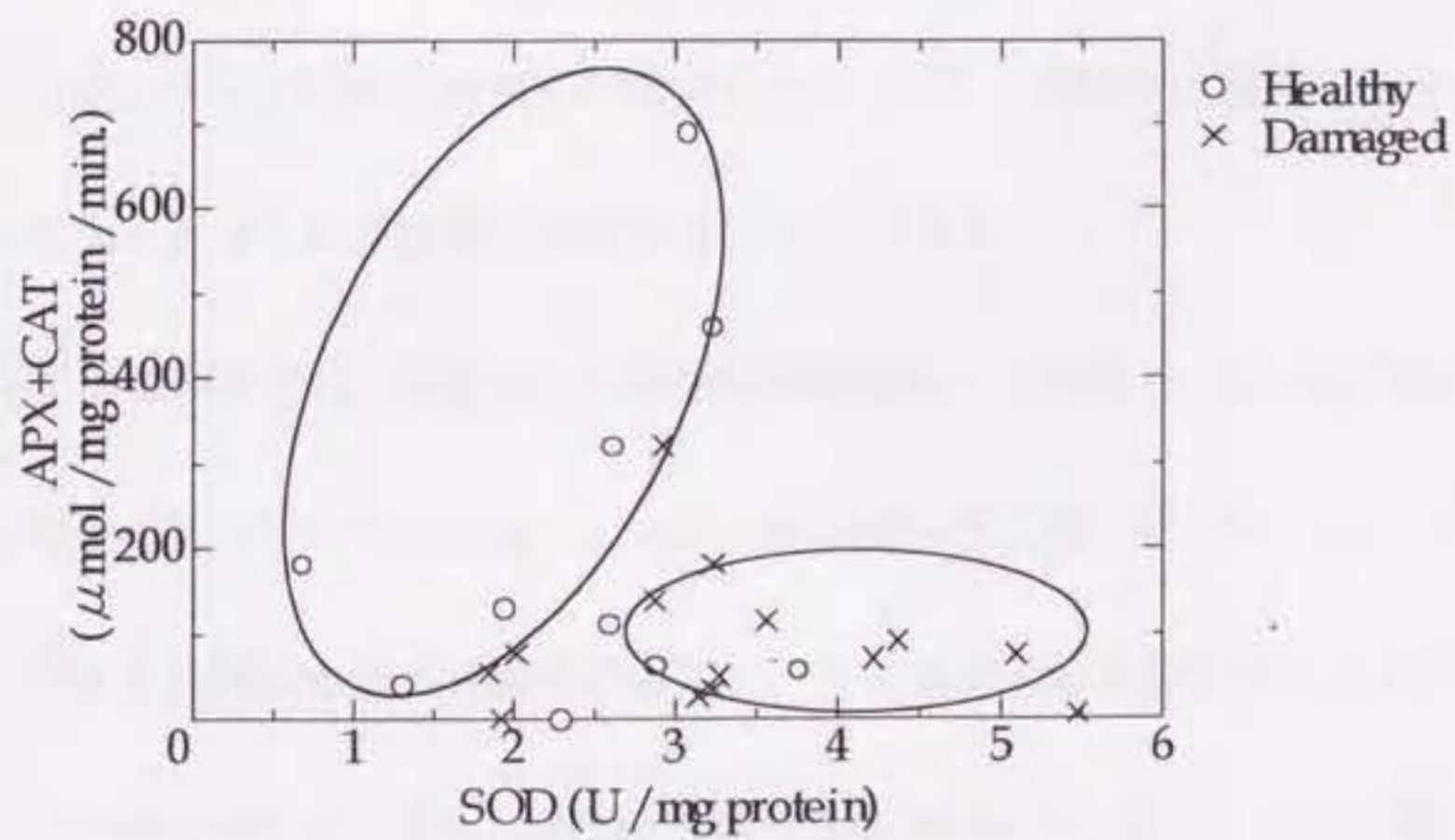


図 6-4 豊橋野外調査における SOD と APX+CAT 活性の関係

## 摘要

日本では、酸性雨や酸性霧などの酸性降下物による森林衰退は顕在化していないが、将来的にはその可能性を否定できないのが現状である。このような環境が酸性化するストレス(酸性化ストレス)によって樹木がどのような影響を受けるか、あるいは、どのような抵抗性を獲得するのかという問題は、これからの森林管理を考える上で重要な課題である。酸性降下物による森林衰退は、直接的影響と間接的影響の両方によるメカニズムが考えられており、樹木の地上部・地下部それぞれへの酸性化ストレスに対する生理応答について、より多くの知見が必要とされている。

一方、様々なストレスを与えられた植物体内では、活性酸素種が過剰に生成されるが、それを消去する活性酸素消去系酵素が存在し、それらの酵素の活性を測定することにより、植物へのストレス影響を評価することができる。

そこで本研究では、我が国の主要な造林樹種の一つであり、低 pH 樹幹流のために土壌が酸性化しやすい特徴をもつヒノキに焦点を当て、地上部・地下部への酸性化ストレスに対する活性酸素消去系酵素の応答と、その適応戦略を解明することを目的として、一連の研究を行った。また、活性酸素消去系酵素活性が、野外における樹木のストレス指標として適用し得るのかについても検討した。

## 1. ヒノキ葉内活性酸素消去系酵素活性の季節変化

- 1) ヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の季節変動を明らかにするために二種類の観測を行った。①鉢植えヒノキ苗木の同一個体から各月毎に当年葉を採取し、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)活性の季節変動を調べた。②夏季は自然条件下、冬季は温度を一定に保って生育した苗木から切り枝を採取して、蒸留水の霧の暴露実験を行い、実施時期の違いによる SOD 活性の違いを調べた。
- 2) ①で5月から1月までの間で SOD、APX 活性共に、7月に最大値、1月に最小値を示すことが明らかとなった。
- 3) ②でも SOD 活性は夏季に上昇し、冬季に下降する傾向が示され、温度条件よりも、光条件が酵素活性に強く関与することが示唆された。

## 2. 酸性霧ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の応答

- 1) 地上部への酸性化ストレスとして、有機酸を含んだ酸性霧ストレスに焦点を当て、切り枝としたヒノキ葉を無機酸である硫酸および有機酸であるギ酸・酢酸溶液(1 meq、0.1 meq)から発生させた霧に暴露したときの影響を調べた。実験では、①3日間の暴露実験による活性酸素に関与する酵素活性の変化、②7日間の暴露実験による活性酸素消去系酵素活性とアスコルビン酸(AsA)濃度の経時変化、③28日間の暴



露実験によるヒノキ葉の可視障害発現を観測した。

- 2) ①の結果として、pH 4 の酸性霧がヒノキ葉内活性酸素消去系酵素活性に影響を与えること、酸性霧中の無機酸よりも有機酸成分がヒノキ葉内活性酸素消去系および生成酵素を活性化させることが明らかになった。
- 3) ②の結果として、酸性霧暴露が葉内活性酸素消去系酵素を 1 日以内で活性化されることが明らかになった。
- 4) ②において、過酸化水素( $H_2O_2$ )を生成する SOD 活性が高いのに、 $H_2O_2$ を消去するカタラーゼ(CAT)、APX 活性が低いことから、細胞内に  $H_2O_2$ が蓄積する可能性があることが示唆された。
- 5) ②によってヒノキ葉の AsA 濃度はおよそ  $40\sim 60 \mu M g^{-1} fw$  と十分に存在し、APX の活性低下の原因が基質量の低下によるものではないことが示唆された。
- 6) ③によって、無機酸よりも有機酸酸性霧暴露によって、より強い可視障害が発現することが示された。

### 3. 根圏 Al ストレスに対するヒノキ葉内活性酸素消去系酵素の応答

- 1) 根圏における Al ストレスの葉への伝達メカニズムと、Ca によるストレス緩和効果のメカニズムに関する知見を得ることを目的として、一定の Al 濃度(5 mM)で Ca/Al モル濃度比を変えた(5.0、2.5、1.0、0.16)培養液でヒノキ苗を生育し、①短期(1 週

間)と②長期(12 週間)、葉内活性酸素消去系酵素活性と AsA 濃度の経時変化を追跡した。また、処理後の葉と根の元素分析を行った。

- 2) ①の結果として、根圏 Ca/Al 比が小さいほど、葉内活性酸素消去系酵素の活性化が認められ、処理開始 1 日以内に根圏ストレスが葉に伝達されることが明らかになった。
- 3) ②によって、葉内活性酸素消去系酵素には影響が現れる条件下でも、葉の可視障害や地上部の成長低下が認められないことが明らかになった。
- 4) ①、②の元素分析により、葉における活性酸素消去系酵素の活性増大は、根から葉への Al の移動によらないことが明らかになった。
- 5) ①、②において、SOD 活性は処理 1 日後に増加し、7 週間後には低下し、12 週間後には再び活性化されたことと、12 週間後には葉内の K、P 濃度が減少していた結果から、根から葉へ伝達されるストレスが、処理初期と 12 週間後では異なることが示唆された。
- 6) ①において、根圏 Ca/Al モル濃度比が小さいほど、葉内 SOD および CAT 活性を上昇させ、対照的にアスコルビン酸-グルタチオンサイクル上にある、APX およびグルタチオンレダクターゼ (GR) 活性を減少させた。この APX 活性減少は基質である AsA 減少による失活でないことが明らかになった。

#### 4.大沢・豊橋国有林野外調査

- 1) 1994年、1995年にヒノキの立ち枯れが観察された、愛知県の大沢・豊橋国有林で、ヒノキの健全木の葉と、被害木の残存葉を採取し、SOD、APX、CAT 活性の測定を行った。その結果を基に、活性酸素消去系酵素活性が野外における樹木のストレス指標として利用可能かどうかを考察した。
- 2) いずれの酵素も同一木で葉の高さによって活性が異なるが、平均すると、被害区ではSOD 活性が高く、CAT 活性は低く、APX には傾向が見られないという結果が得られた。

以上の結果を総合して、次のことが示唆された。

- 1) pH 4 の酸性霧に対して、活性酸素消去系酵素がこれまでに報告されている他の生理応答よりも敏感に応答することが明らかになった。このことは、pH 4 という酸性度でも樹木葉にとってストレスとなることを示している。
- 2) 無機酸と有機酸に対する活性酸素消去系酵素の応答の違いから、有機酸の場合には、その非解離状態の分子が細胞膜を通過し、細胞内で解離することにより、生理代謝に深く影響するメカニズムが考えられる。従って、野外で観測される有機酸と無機酸の混ざった酸性霧の影響として、従来考えられていた葉表面での  $H^+$  イオンと他の陽イオンの交換反応や、クチクラ層の破壊以外に、細胞内の直接影響があることを

示している。

- 3) 5mM という高濃度 Al の存在下でも、Ca/Al 比が高い場合は葉内 SOD の活性化が小さいことから、根圏の Al ストレスは Ca によって緩和されることが酵素レベルで明らかになった。このことより、森林における酸性物質の臨界負荷量として、Ca/Al 比を用いることは妥当であると判断できる。
- 4) 根圏 Al ストレスは、葉内 SOD 活性を 1 日以内に増大させること、また、そのストレス伝達は Al の葉への移動によるものでないことが示された。このことより、根圏への Al ストレスは活性酸素種などの他のストレス伝達物質によって葉へ伝達されることが示唆された。
- 5) Ca/Al 比が小さい条件では、葉内の SOD 活性は処理開始 1 日後に上昇し、一度低下した後、再度増大する傾向が認められ、二段階のストレス負荷が示唆された。二回目の活性上昇は、P などの栄養元素の吸収阻害によることが示唆された。
- 6) Al 処理開始 7 日後に、SOD 活性が高いのに対し、APX 活性が低いことから、ストレスに対する全身抵抗性獲得のために  $H_2O_2$  を蓄積させている可能性が考えられる。これまでに報告されている根からの有機酸分泌などの他の防御機構とともに、活性酸素除去系酵素が根圏 Al ストレスに対して防御機構として機能していることが示唆された。
- 7) 豊橋野外調査で、被害区においては SOD 活性は高いが、CAT 活性は低いという結

果が得られた。暴露実験による地上部への酸性霧処理および、地下部への AI 処理において、いずれも処理 7 日目にストレス強度が高い区で SOD 活性が高いのに対し、CAT と APX 活性が低いという傾向が見られていることから、SOD 活性と CAT+APX の活性の関係が、野外での樹木のストレス指標として用いることが出来る可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究のテーマを与えて下さるとともに、研究の面白さと厳しさをご指導下さいました、名古屋大学大学院生命農学研究科竹中千里助教授に心から感謝いたします。酵素の測定法から、研究者の心構えをご指導下さいました、名古屋大学大学院人間情報学研究科手塚修文教授に深く感謝いたします。多くの有益なご助言をいただきました、名古屋大学大学院生命農学研究科梅村武夫教授、同助手山本一清助手に感謝いたします。そして、名古屋大学大学院生命農学研究科森林環境資源学研究室、同人間情報学研究科環境システム論講座で同じ時を過ごした全ての人たちに改めて感謝の言葉を贈ります。

共に実験を行った、愛知県農林水産部松本千里氏に感謝いたします。霧発生法のご指導と的確なご助言をいただいた、名古屋大学大学院人間情報学研究科加藤潔教授、日本福祉大学情報社会学部水野暁子講師に感謝いたします。貴重なデータをご提供いただいた、名古屋大学大気水圏科学研究所助教授石坂隆博士に感謝いたします。豊橋での共同野外調査をご提案下さいました、名古屋営林支局(現・中部森林管理局名古屋分局)の方々に感謝いたします。

最後に、長い学生生活を温かく見守り続けてくれた両親に心からの感謝の言葉を贈ります。

## 引用文献

- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Asada, K. and Kanematsu, S. (1978). Distribution of cuprozinc, manganic and ferric superoxide dismutases in plants and fungi: An evolutionary aspect. In: *Evolution of protein molecules.* (Matsubara, H. and Yamanaka, T., eds.), pp. 361-372. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Asada, K. and Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Topics in Photosynthesis, Vol. 9.* (Kyle, D. J., Osmond, C. B. and Arntzen, C. J., eds.), pp. 227-288. Elsevier, Amsterdam.
- Asada, K., Urano, M. and Takahashi, M. (1973). Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 36: 257-266.
- Ashenden, T. W., Bell, S. A. and Rafarel, C. R. (1995): Responses of white clover to gaseous pollutants and acid mist: Implications for setting critical levels and loads. *New Phytol.* 130 (1): 89-96.
- Azzi, A., Montecucco, C. and Richter C. (1975). The use of acetylated

ferricytochrome *c* for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 597-603.

Baisak, R., Rana, D., Acharya, P. B. B. and Kar, M. (1994) Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol.* 35 (3): 489-495.

Beers, R. F. Jr. and Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 590-603.

Benes, S. E., Murphy, T. M., Anderson, P. D. and Houpis, J. L. J. (1995). Relationship of antioxidant enzymes to ozone tolerance in branches of mature ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) trees exposed to long-term, low concentration, ozone fumigation and acid precipitation. *Physiol. Plant.* 94: 124-134.

Blank, L. W., Robert, T. M. and Skeffington, R. A. (1988). New perspectives on forest decline. *Nature.* 336: 27-30.

Bray, R. C. (1975). Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In: *The enzymes*. Vol. 12, 3<sup>rd</sup> edit. (Boyer, P. D., eds.), pp. 300-414. Academic Press, New York.

Cakmak, I. and Hoast, W. J. (1991). Effect of aluminum on lipid peroxidation,



superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.

Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Method. Enzymol.* 113: 484 - 490.

Chai, H. B. and Doke, N. (1987). Systematic activation of  $O_2^-$  generation reaction, superoxide dismutase, and peroxidase in potato plants to *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 52: 585-590.

Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.

Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1885.

Chen, Y. and Wellburn, A. R. (1989). Enhanced ethylene emissions from red and Norway spruce exposed to acidic mists. *Plant Physiol.* 91: 357-361.

Chia, L. S., Mayfield, C. I. and Thompson, J. E. (1984). Simulated acid rain induces lipid peroxidation and membrane damage in foliage. *Plant, Cell, Environ.* 7: 333-338.

Cronan, C. S. and Grigal, D. F. (1995). Use of calcium/aluminum ratios as

indicators of stress in forest ecosystems. *J. Environ. Qual.* 24: 209-226.

De Gara, L., de Pinto, M. C. and Arrigoni, O. (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiol. Plant.* 100: 894-900.

Elstner, E. F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 73-96.

Felle, H. (1987). Proton transport and pH control in *Sinapis alba* root hairs: A study carried out with Double-barrelled pH microelectrodes. *J. Exp. Bot.* 38: 340-354.

Foy, C. D., Chaney, R. L. and White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Plant Physiol.* 29: 511-566.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133: 21-25.

Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147-159.

Godbold, D. L., Fritz, E. and Hüttermann, A. (1988). Aluminum toxicity and forest decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 3888-3892.

Hashimoto, S. (1974). A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase

in crude tissue homogenate. *Anal. Biochem.* 62: 426-435.

Heaton, T. H. E. and Crossley, A. (1995). Carbon isotope variations in a plantation of Sitka spruce, and the effect of acid mist. *Oecologia.* 103: 109-117.

Heller, L. I., Shaw, A. J. and Jacobson, J. S. (1995). Exposure of red spruce seedlings to acid mist: importance of droplet composition just prior to drying periods. *New Phytol.* 129: 55-61.

Hirano, Y. and Hijii, N. (1998). Effect of low pH and aluminum on root morphology of Japanese red cedar. *Environ. Pollut.* 101 : 339-347.

Hirano, Y., Matsumoto, C. and Takenaka, C. (2000). Root response of hinoki cypress seedlings to various levels of Ca/Al molar ratios. *Environ. Sci.* 7 : 71-82.

Hue, N. V., Craddock, G. R. and Adams, F. (1986). Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 28-34.

Ichikawa, Y. and Fujita, S. (1995). An analysis of wet deposition of sulfate using a trajectory model for East Asia. *Water, Air, Soil, Pollut.* 85: 1927-1932.

Inaba, T., Ogawa, T., Takenaka, C. and Tezuka, T. Response of enzymes scavenging active oxygen in alder (*Alnus hirsuta*) leaves exposed to ozone. *Environ. Sci.* 6 (1): 29-35.

- Isidorov, V. A., Zenkevich, I. G. and Ioffe, B.V. (1985): Volatile organic compounds in the atmosphere of forest. *Atmos. Environ.* 19: 1-8.
- Jacobson, J. S., Heller, L. I., Yamada, K. E., Osmeloski, J. F. and Bethard, T. (1990). Foliar injury and growth response of red spruce to sulfate and nitrate acidic mist. *Can. J. For. Res.* 20: 58-65.
- Joslin, J. M. and Wolfe, M. H. (1989). Aluminum effects on northern red oak seedling growth in six forest soil horizons. *Soil Sci.Soc. Am. J.* 53: 274-281.
- Jung, K., Rolle, W., Schlee, D., Tintemann, H., Gnauk, T. and Schüürmann, G. (1994). Ozone effects on nitrogen incorporation and superoxide dismutase activity in spruce seedlings (*Picea abies* L.). *New Phytol.* 128: 505-508.
- Kelly, J. M., Schaedle, M., Thornton, F. C. and Joslin, J. D. (1990). Sensitivity of tree seedlings to aluminum: II. red oak, sugar maple, and European beech. *J. Environ. Qual.* 19: 172-179.
- Kingston-Smith, A. H., Thomas, H. and Foyer, C. H. (1997). Chlorophyll a fluorescence, enzyme and antioxidant analyses provide evidence for the operation of alternative electron sinks during leaf senescence in a stay-green mutant of *Festuca pratensis*. *Plant, Cell, Environ.* 20: 1323-1337.

Kinraide, T. B. and Parker, D. R. (1987). Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. *Plant Physiol.* 83: 546-555.

Kohno, Y., Matsumura, H. and Kobayashi, T. (1995). Effect of simulated acid rain on the growth of Japanese conifers growth with or without fertilizer. *Water, Air Soil Pollut.* 85: 1305-1310.

Kong, F. X., Liu, Y, Hu, W., Shen, P. P., Zhou, C. L. and Wang, L. S. (2000). Biochemical responses of the mycorrhizae in *Pinus masoniana* to combined effects of Al, Ca and low pH. *Chemosphere* 40: 311-318.

Kong, F. X., Zhou, C. L. and Liu, Y. (1998). Biochemical and cytological responses of ectomycorrhizae in *Pinus masoniana* to artificial acid rain. *Chemosphere* 37: 179-187.

Larsen, P. B., Chin-Yin, T., Kochian, L. V. and Howell, S. H. (1996). Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol.* 110: 743-751.

Le Bras, G. (eds.) (1997). *Chemical Processes in Atmospheric Oxidation.* Springer-Verlag, Berlin. xxiv+314pp.

Lechno, S., Zamski, E. and Tel-Or, E. (1997) Salt stress-induced responses in cucumber plants. *J. Plant Physiol.* 150: 206-211.

- Lee, W. S., Chevone, B. I. and Seiler, J. R. (1990). Growth response and drought susceptibility of red spruce seedlings exposed to simulated acid rain and ozone. *For. Sci.* 36: 265-275.
- Lovett, G. M. and Kinsman, J. D. (1990). Atmospheric pollutant deposition to high-elevation ecosystems. *Atmos. Environ.* 24A: 2767-2786.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 256-275.
- Lukaszewski, K. M. and Blevins, D. G. (1996). Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiol.* 112: 1135-1140.
- Ma, J. F., Zheng, S. J. and Matsumoto, H. (1997). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 1019-1025.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y. and Kasai, M. (1992). Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 411-419.
- Minami, Y. and Ishizaka, Y. (1996). Evaluation of chemical composition in fog water near the summit of a high mountain in Japan. *Atmospheric*

Environment. 30: 3363-3376.

Mizuno, A. and Katou, K. (1995). Water transport during acid-induced growth of excised hypocotyl sections of *Vigna unguiculata* under xylem perfusion.

Plant Cell Physiol. 36 (3): 465-471.

Mizuno, A., Katou, K., Tsujita, S. and Ishizaka, Y. (1997). K<sup>+</sup> release from plant cells induced by an artificial acid fog. In: *Proc. the International*

*Symposium on Forest Decline Caused by Air Pollution*. 55-57.

Muthuchelian, K., Murugan, C., Harigovindan, R., Nedunchezian, N. and

Kulandaivelu, G. (1995). Growth, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation, activities of photosystems, ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase and nitrate reductase

in trees as affected by simulated acid rain. *Biologia Plantarum*. 37:

355-362.

Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. and Kulandaivelu, G. (1993). Effect of

simulated acid rain on <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and nitrate reductases in *Vigna sinensis* and *Phaseolus mungo*.

*Photosynthetica* 28: 361-367.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by

ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*.

22: 867-880.

Polle, A. and Morawe, B. (1995). Seasonal change of the antioxidative systems in foliar buds and leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*, L) in a stressful climate. *Bot. Acta* 108: 314-320.

Rawn, J. D. (1989). *Biochemistry*. 1105 pp. Neil Patterson, Burlington.

Rengel, Z. (1992) Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol.* 121: 499-513.

Richards, K. D., Schott, E. J., Sharma, Y. K., Davis, K. R. and Gardner, R. C. (1998). Aluminum induces oxidative stress genes in *arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 409-418.

Sato, K. and Takahashi, A. (1996). Acidity neutralization mechanism in a forested watershed in central Japan. *Water, Air, Soil, Pollut.* 88: 313-329.

Sandalio, L. M., Fernández, V. M., Rupérez, F. L. and Del Río, L. A. (1988). Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol.* 87: 1-4.

Scandalios, J. G. (eds.) (1992). *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.



- Scandalios, J. G. (1993). Update on abiotic stress: Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Scütt, P. and Cowling, E. B. (1985). Waldsterban, a general decline of forests in central Europe: symptoms, development, and possible causes. *Plant Disease* 69: 548-558.
- Schaefer, D. A. and Reiners, W. A. (1990). Throughfall chemistry and canopyprocessing mechanisms. In: *Acidic precipitation volume 3.* (Lindberg, S. E., Page, A. L. and Norton, S. A., eds.). pp. 241-284. xi+331pp., Springer, New York.
- Shan, Y., Feng, Z., Izuta, T., Aoki, M. and Totsuka, T. (1995). The individual and combined effects of ozone and simulated acid rain on chlorophyll contents, carbon allocation and biomass accumulation of armand pine seedlings. *Water, Air, and Soil Pollut.* 85: 1399-1404.
- Sheppard, L. S. (1994). Casual mechanisms by which sulphate, nitrate and acidity influence frost hardiness in red spruce: review and hypothesis. *New Phytol.* 127: 69-82.
- Shigeoka, S., Yokota, A., Nakano, Y. and Kitaoka, S. 1979. The effect of illumination on the L-ascorbic acid content in *Euglena gracilis* Z. *Agric.*

Biol. Chem. 43: 2053-2058.

Smith, W. H. (1990). Air pollution and forests. 618 pp., Springer, New York.

Takenaka, C. and Sasama, T. (2000). Ion exchange reactions on the stem surface of *Chamaecyparis obtuse* Sieb. Et Zucc. Trees. 14: 354-360.

Takenaka, C., Takami, C., Yoshida, K. and Tezuka, T. (1999). Change in physiological activities of *Abies firma* Sieb seedlings under natural environmental conditions in the Oyama, Kanagawa Prefecture, Japan. In: Proceedings of International symposium on oxidants / acidic species and forest decline in East, pp. 22.

Takenaka, C., Yamada, T. and Iwata, S. (1996). Ethylene emission from seedling of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) and Sugi (*Cryptomeria japonica*) under acidic stress. J. For. Res. 1: 183-185.

Tanaka, K. and Sugahara, K. (1980). Role of superoxide dismutase in defense against SO<sub>2</sub> toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO<sub>2</sub> fumigation. Plant Cell Physiol. 21(4): 601-611.

Tezuka, T., Ogawa, T., Matsumoto, K., Katou, K., Ishizaka, Y. and Takenaka, C. (1998). Organic acids in acidic fog are an important effector contributing to forest decline. Environ. Sci. 6 (2): 99-106.

- Tezuka, T., Ogawa, T., Matsumoto, K., Katou, K., Ishizaka, Y. and Takenaka, C. (1998). Organic acids in acidic fog are an important effector contributing to forest decline. *Environ. Sci.* 6 (2): 99-106.
- Tezuka, T., Tsuruhara, A., Suzuki, H. and Takahashi, Y. S. (1997). A connection between the self-incompatibility mechanism and stress response in lily. *Plant Cell Physiol.* 38: 107-112.
- Thornton, F. C., Piar, P. A. and McDuffie, C. Jr. (1990). Response of growth, photosynthesis, and mineral nutrition of red spruce seedlings to ozone and acidic cloud deposition. *Environ. Exp. Bot.* 30: 313-323.
- Tomioka, R. and Takenaka, C. (2001). Response of *Chamaecyparis obtusa* (hinoki) and *Quercus serrata* Thumb (konara) roots to aluminium stress. *Water, Air, Soil, Pollut.* (in press).
- Ulrich, B. (1983) Soil acidity and its relations to acidic deposition. p.127 – 146. In Ulrich, B. and Pankrath, J. (eds.) *Effects of accumulation of air pollutants in forest ecosystems.* D. Reidel, Boston.
- Vann, D. R., Striembeck, G. R. and Johnson, A. H. (1995). Effects of mist acidity and ambient ozone removal on montane red spruce. *Tree Physiol.* 15: 639-647.

Zysset, M., Brunner, I. Frey, B. and Blaser, P. (1996). Response of European chestnut to varying calcium/aluminum ratios. *J. Environ. Qual.* 25: 702-708.

浅田浩二. (1988). 活性酸素の生成・消去・作用. 活性酸素 pp 7-12. (中野稔、浅田浩二、大柳善彦編). 536pp.、共立出版、東京.

石坂隆、皆已幸也、大和政彦、銭公望、倉橋佳伸、鶴田治雄 (1990). 乗鞍岳における雲水の化学組成に関する観測 -霧水中の主成分の分析とその生成-日本気象学会 1990 年度秋季大会講演予稿集、pp. 130.

伊豆田猛、三輪誠、三宅博、戸塚績 (1990a). スギ苗の生長に対する人工酸性雨の影響. *人間と環境* 16: 44-53.

伊豆田猛、三輪誠、三宅博、戸塚績 (1990b). スギ苗の生長に対する土壌酸性化の影響. *人間と環境* 16: 55-61.

太田垣貴啓、三輪誠、伊豆田猛、戸塚績 (1996). 硫酸添加により酸性化させた褐色森林土で育成したスギ苗の光合成活性. *大気環境学会誌* 31: 11-19.

恩田裕一 (1995). 人工林化と土壌浸食. *地理* 40: 48-52.

環境庁(編) (1998). 環境白書 iv+519 pp.、大蔵省印刷局、東京.

北川康行、勝部幸輝 (1988). SOD の立体構造. 活性酸素 pp 231-236. (中野稔、浅田浩二、大柳善彦編). 536pp.、共立出版、東京.

河野吉久 (1997). 植物からみたクリティカルロード(臨海負荷量)とクリティカルポイント(臨界値). 大気環境学会誌 32: A65-A71.

河野吉久、松村秀幸 (1999). スギ、ヒノキ、サワラの生育におよぼすオゾンと人工酸性雨の複合影響. 大気環境学会誌 34: 74-85.

河野吉久、松村秀幸、小林卓也. (1994). 樹木の可視障害発現におよぼす人工酸性雨の影響. 大気環境学会誌. 29: 206-219.

河野吉久、松村秀幸、小林卓也. (1995a). スギ、ヒノキ、サワラの生育におよぼす人工酸性雨の影響. 大気環境学会誌 30: 191-207.

河野吉久、松村秀幸、小林卓也. (1995b). スギおよびヒノキの生育と養分吸収におよぼすアルミニウムの影響. 大気環境学会誌 30: 316-326.

佐々朋幸、後藤和秋、長谷川浩一、池田重人 (1991). 盛岡市周辺の代表的森林における林外雨、林内雨、樹幹流の酸性度ならびにその溶存成分-樹種による樹幹流の pH 固定値-. 森林立地 32: 43-58.

佐治光 (1999). 大気汚染ガス傷害・耐性の分子機構. 蛋白質 核酸 酵素 44: 2253-2259.

高橋啓二 (1990). 酸性降下物と森林被害. 酸性雨: 土壌・植生への影響 62-71. 環境庁水質保全局土壌農薬科監修. 189pp., 公害対策センター、東京.

竹中千里、恩田裕一 (1997). 大型人工降雨実験による森林の酸中和機能の解明-ヒノ

キ林の場合-。環境技術 26: 642-646.

田中浄 (1988). 活性酸素の環境因子による生成-公害ガス-. 活性酸素 pp 172-177.

(中野稔、浅田浩二、大柳善彦編). 536pp.、共立出版、東京.

道家紀志 (1999). 植物の感染・ストレス応答におけるオキシダティブースト-防御

応答のための緊急シグナル-. 科学と生物 37: 800-806.

名古屋営林支局 (1993). 岡崎営林署 施業管理計画図 第4葉.

梨本真 (1991). 関東地方におけるスギ衰退木の着葉形態の特徴. 森林立地 33:

59-64.

梨本真、高橋啓二 (1991). 関東甲信・関西瀬戸内地方におけるスギの衰退減少. 森林

立地 32: 70-78.

野内勇 (1990). 酸性雨の農作物および森林木への影響. 大気環境学会誌 25:

295-312.

野内勇 (1994). 酸性雨 2 植物生態系はどのような被害をうけるか 2. 酸性雨の農

作物の生長と収量に及ぼす影響. 土肥誌 65: 74-80.

橋詰隼人、中田銀佐久、新里孝和、染郷正孝、滝川貞夫、内村悦三 (1993). 図説実

用樹木学 iiiv + 214pp.、朝倉書店、東京.

増田芳雄 (1988). 植物生理学. Viii+386pp.、培風館、東京.

松村秀幸、小林卓也、河野吉久、伊豆田猛、戸塚績. (1995). スギ、ウラジロモミおよ

びシラカンバ苗の乾物成長とガス交換速度におよぼす人工酸性雨の影響. 大

気環境学会誌 30: 180-190.

松本英明 (2000). 酸性土壌で発現するアルミニウムストレスに植物はどう応答する

か. 科学と生物 38: 452-458.

真野純一、浅田浩二 (1999). 光酸素ストレスを回避する分子機構. 蛋白質 核酸 酵素

44: 2239-2245.

三宅博、亀井信一、伊豆田猛、戸塚績 (1991). 水耕栽培におけるスギ苗の生長に対す

るアルミニウムの影響. 人間と環境 17: 10-16.

三輪誠、伊豆田猛、戸塚績 (1996). 酸性雨による土壌酸性化に伴うアルミニウム溶出

とその樹木に対する影響. 生物科学 48: 10-17.

村野健太郎 (1993a). 酸性雨と酸性霧. x + 179 pp., 裳華房、東京.

村野健太郎 (1993b). 酸性霧研究の現状. 大気汚染学会誌 28: 185-199.

森田重人、田中國介 (1999). 植物の活性酸素消去系の遺伝子発現とストレス耐性. 蛋

白質 核酸 酵素 44: 2232-2238.

渡邊昭、篠崎一雄、寺島一郎 監修. (1999). 植物の環境応答-生存戦略とその分子機構

- 216pp., 秀潤社、東京.

報文目録

- 1) Tadashi Ogawa, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka.  
Responses of antioxidant enzymes to mist containing sulfuric or organic acid in Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) seedlings  
*Environmental Sciences* (1998) Vol. 6, No. 3: 185-196.
- 2) Tadashi Ogawa, Chisato Matsumoto, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka.  
Effect of Ca on Al-induced activation of antioxidant enzymes in the needles of hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*)  
*Journal of Forest Research* (2000) Vol. 5: 81-85.
- 3) Tadashi Ogawa, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka.  
Responses of antioxidant enzymes in the needles of hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) seedlings to nutrient solutions containing various calcium/aluminum ratios  
*Journal of Forest Research* (2000) Vol. 5: 259-263.



参考論文目録

- 1) Chisato Takenaka, Tsuyoshi Yamada, Tadashi Ogawa and Takafumi Tezuka.  
Physiological response of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) to acidic stress  
*Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Korea-Japan joint seminar for collaborative researches on biological science.* (1995) p.111-117, December 18-19, Nagoya, Japan.
- 2) Chisato Takenaka, Takehito Inaba, Tadashi Ogawa and Takafumi Tezuka.  
Physiological response of trees to air pollution  
*Proceedings of the International Symposium on Forest Decline Caused by Air Pollution —Photo-oxidants, Acid Rain and Fog—* (1997) p.58-59, December 8-10, Hiroshima, Japan.
- 3) Takehito Inaba, Tadashi Ogawa, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka.  
Response of enzymes scavenging active oxygen in alder (*Alnus hirsuta*) leaves exposed to ozone  
*Environmental Sciences* (1998) Vol. 6, No. 1: 29-35.
- 4) Takafumi Tezuka, Tadashi Ogawa, Kiyoshi Matsumoto, Kiyoshi Katou, Yutaka Ishizaka and Chisato Takenaka.  
Organic acids in acidic fog are an important effector contributing to forest decline  
*Environmental Sciences* (1998) Vol. 6, No. 2: 99-106.
- 5) Takehito Inaba, Tadashi Ogawa, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka.  
Response of enzymes scavenging active oxygen in chloroplasts and chlorophyll fluorescence in alder (*Alnus hirsuta*) leaves exposed to ozone  
*Environmental Sciences* (2001) Vol. 8, No. 4: in press.

inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

