

090.8 - 131

明治大学科学技術研究所研究報告

総 合 研 究

第 31 号

地球環境変化に伴う植物反応の生理的
および細胞工学的研究

秋 濱 友 也
角 田 公 正
内 藤 忠 雄
輿 水 肇
鳥 倉 弘 文

目 次

はじめに	(1)
システイン合成酵素遺伝子 (c y s 1) 導入タバコ の特性解析および検定法の検討	(3)
植物の硝酸還元活性による環境評価手法 および環境指標の確立に関する研究	(61)
ナスのNO ₂ 感受性における品種間 差異に関する研究	(89)
種々の沿道植栽帯における大気汚染物質 浄化効果の比較研究	(97)

地球環境変化に伴う植物反応の生理的
および細胞工学的研究

秋 濱 友 也
角 田 公 正
内 藤 忠 雄
輿 水 肇
鳥 倉 弘 文

Biotechnological and physiological analysis
of the plant response
with environmental change on the earth

Tomoya AKIHARA
Kosei TSUNODA
Tadao NAITO
Hajime KOSHIMIZU
Hirobumi TORIKURA

The Institute of Science and Technology, Meiji University
1-1-1 Higashimita, Tama-ku, Kawasaki 214-8751

はじめに

人類は飽くことなく文明発展をめざし、急速な都市化、工業化を追い求めている。特に発展途上国においては、公害対策も追いつかぬまま、自然破壊が進む一方である。ところで、大気汚染をはじめとする公害は、もはや一国の問題にとどまらず、今や地球全体の問題となりつつある。

ここでとりあげる大気汚染についても、過剰な CO_2 は地球温暖化につながるとされる。また NO_x は植物を窒息させ、酸性雨被害ももたらす原因とされている。フロンによるオゾン層の破壊や O_3 を原因とする光化学スモッグ、作物に対する被害も放って置くわけにはいかないものである。

本研究は、明治大学生田キャンパスの地球環境装置、通称エコトロンを用いて行われた、オゾン O_3 、二酸化炭素 CO_2 、窒素酸化物 NO_x に対する植物環境ストレスに関する共同研究である。すなわち、イネなどを中心に CO_2 の濃度を高めた場合に、収量構成要素にある程度有効に働くことが考えられ、その限界を超えたところで公害汚染の問題が引き起こされるので実証しようとした。また、自然環境と樹木の空気清浄化に果たす役割を実際にフィールド調査により確かめようとした。また、大気汚染耐性を考える上で、唯一、硫化水素耐性を示すシステイン合成酵素遺伝子を植物に遺伝子組み換えによって導入する実験などを進めた。

以上のように、大気汚染関連で地球環境装置を使用した実験とこれまで対外的に発表してきた研究を総合して報告書を作成した。

システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの特性解析
および検定法の検討

**Analysis of tobacco plants transformed with the wheat
O-acetylserine(thiol)lyase gene and investigation of methods
for environmental assay.**

井上真以子・秋濱友也
Inoue Maiko · Akihama Tomoya

1 9 9 8

明治大学農学研究科

Meiji University

1-1-1 HIGASHIMITA, TAMA-KU,

KAWASAKI

214 JAPAN

目次

論題 システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの特性解析および検定法の検討

Analysis of tobacco plants transformed with the wheat
O-acetylserine(thiol)lyase gene and investigation of methods for environmental
assay.

緒言

第1章 システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの作出
および検定法の検討

第1節 システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの作出

1-1 材料・方法

1-2 結果および考察

第2節 硫酸、硝酸による *cys1* 導入タバコの特性解析
および検定法の検討

2-1 材料・方法

2-2 結果および考察

図表

第2章 システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの特性解析

第1節 酸、アルカリについての特性解析

1-1 材料・方法

1-2 結果および考察

第2節 *cys1* 導入タバコのゲノム DNA に対する
サザンプロット解析

2-1 材料・方法

2-2 結果および考察

第3節 システイン合成酵素活性

3-1 材料・方法

3-2 結果および考察

図表

第3章 総合考察

謝辞

摘要

引用文献

緒言

1997年12月、21世紀に向けた地球温暖化防止策を検討する気候変動枠組み条約⁴⁾第3回締約国会議（地球温暖化防止京都会議）が開かれたことは記憶に新しい。今や地球環境問題は、国境を越え、地球規模にまで拡大し、深刻な問題を引き起こしている。

近い未来、地球環境は地球上の生命の存続を脅かすほどにまで悪化するだろうと予測されている⁷⁾。このため早急な解決策が求められているが、実際のところ、刻々と変化する地球環境に追いついていけない状態にある。

オゾン層の破壊、地球の温暖化、酸性雨³⁰⁾、海洋汚染、有害廃棄物の越境移動、砂漠化、土壌の流出、熱帯雨林や野生生物種の減少などの地球環境問題²⁷⁾はすべてが複雑に絡み合っ、一つの問題群を構成している³⁴⁾。このため、問題群に対しての解決策が必要であるが、これは人間の活動を縮小させることになるため、なかなか踏み出せないでいる。

そこで組換え DNA 技術を用いて植物による汚染物質浄化（フィトレメディエーション;phytoremediation）⁴⁰⁾の能力を向上させることを目的とした様々な研究がなされている^{11),13),14),21),23)}。

O-acetylserine (thiol) lyase はシステイン生合成経路内のキーとなる酵素である。そして *O*-acetyl-L-serine と、遊離あるいは担体に結合した硫化物からシステインを合成する反応を触媒している⁸⁾。(Fig.1)

システイン合成酵素遺伝子に関しては、ホウレンソウ^{18),19),20)}やアラビドプシス^{1),6)}、その他の植物²²⁾での単離も報告されている。また、isoform の存在も報

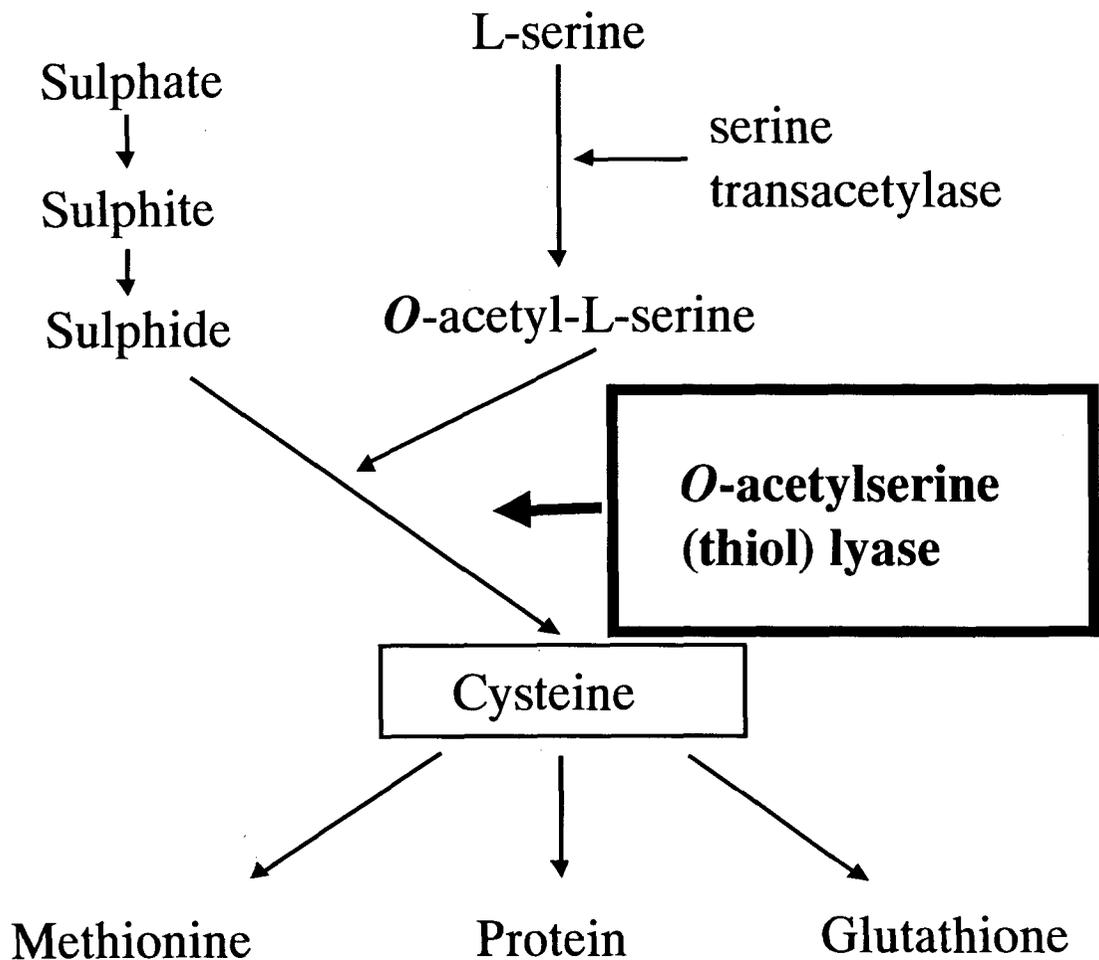


Fig.1 Main assimilatory sulphate reduction pathway in plant.

告されている^{18),20)}。

ユーセフィアンら(1993, 1997)はコムギから単離された *O*-acetylserine (thiol) lyase gene (*cys1*) を導入した植物は、 H_2S および SO_2 にかかなりの耐性を示したと報告している^{39),40)}。

齊藤ら(1994)はホウレンソウから単離したシステイン合成酵素遺伝子を導入した植物は、亜硫酸イオンに対して部分的に耐性があったと報告している²¹⁾。

システイン合成酵素は植物と原核生物でしか見つかっていない^{21, 20)}。ということは植物と原核生物は、自然界の硫黄サイクルにおいて、無機性硫黄を有機性硫黄に固定するという重要な役割を担っている。このため、古くから注目されてきた。

しかしながら、最近までにこの*cys1*の機作に関する知見はあまり得られていないものの、様々な要因に対して何らかの応答がある可能性が考えられる。またこれらの知見を数多く得ることは年々深刻化する環境問題を解決していく上でも有用なことであり、興味ある研究課題である。

こうした研究を行うにあたり、大気汚染ガスについての検定は、チャンバーの使用など様々な形で行われている¹⁴⁾。しかしながら、実験器具、ガスなど高額なものが多く、また隔離温室などの施設、場所の問題も生じてくる。

そこで本実験では大気汚染の一つ、酸性雨に着目し、酸性雨の主成分である硫酸、硝酸に対して*in vitro*植物を用いた特性解析を行うとともに、液体ストレスの*in vitro*植物における検定法についても検討した。

本研究は1997年8月、日本植物細胞分子生物学会に、システイン合成酵素遺伝子導入タバコの特性解析として発表したものである。

第 1 章

システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの
作出および検定法の検討

第1章 シス테인合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの作出 および検定法の検討

序論

コムギから単離されたシス테인合成酵素遺伝子 *O*-acetyl serine (thiol) lyase gene (*cys1*) を導入した植物は硫化水素に対して抵抗性を持つということが報告されている³⁹⁾。最近までにこの *cys1* の機作に関する知見はあまり得られていないものの、様々な要因に対して何らかの応答がある可能性が考えられる。これらの知見を数多く得ることは、年々深刻化する環境問題を解決していく上でも有用なことであり、興味ある研究課題である。本研究では、モデル植物であるタバコ¹²⁾を供試し、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコの特性解析および検定法の検討を行った。(Fig.2)

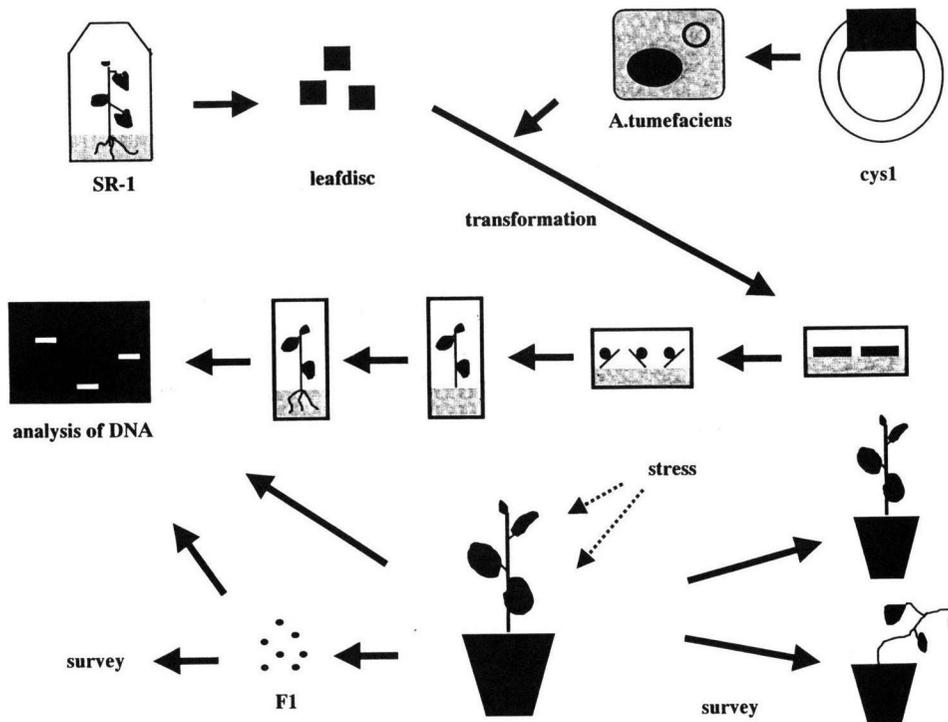


Fig.2 Outline of experiment.

植物は pH3 以下の酸性雨により葉の表面に白色斑点が現れる²⁵⁾。そこで本章では酸性雨の主成分である硫酸、硝酸を *cys1* を導入したトランスジェニックタバコの葉面に散布することにより、植物体の変化を観察するとともに、環境ストレスに対する植物検定のための手法について検討した。

第1節 システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの作出

1-1 材料・方法

植物材料

タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) の種子 (Fig.3-A) を適当な濃度に薄めた中性洗剤で約 5 分間洗浄した後、流水で約 15 分間洗浄した。その後、70%エタノールで約 1 分間、2%次亜塩素酸ナトリウム溶液で約 20 分間の表面殺

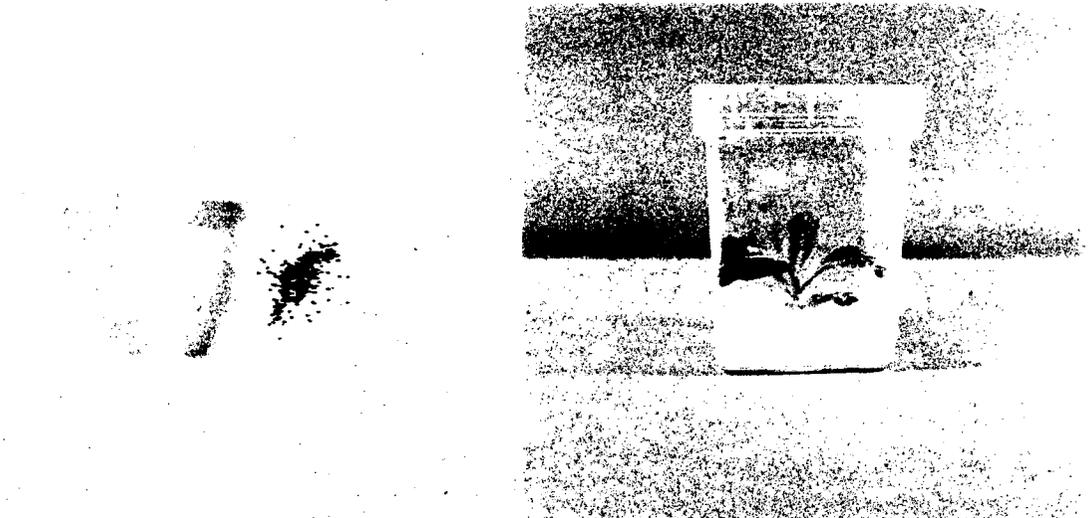


Fig. 3-A Seeds of SR-1. , B Cultured SR-1.

菌処理をした後に、クリーンベンチ内で、滅菌水で3回すすいで次亜塩素酸ナトリウム溶液を洗い落とし、滅菌したろ紙で表面に付着した水分を取り、一晚風乾させた¹⁰⁾。風乾させた滅菌種子を Murashige & Skoog (MS) 寒天培地¹⁶⁾(シヨ糖 3%、寒天濃度 0.8%、pH5.7) へ 30 粒ずつ播種し、25°C 16 時間日長で、培養した。また感染には、このようにして得られた、無菌の *in vitro* 植物体を供試した。(Fig.3 -B)

菌株系統

本研究では *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pBI121 においてプラスミドベクター pBI121 の GUS 遺伝子領域を *cys1* に置換したものをを用いた。(Fig.4) LB 固形培地 (寒天濃度 1%、pH7.5) にて、4°C、暗黒下で約 15 日毎に継代維持されている本菌株を、感染に先立って、km50mg/l を含む LB 液体培地にて、25°C で、約 18 時間培養し、感染に供試した。

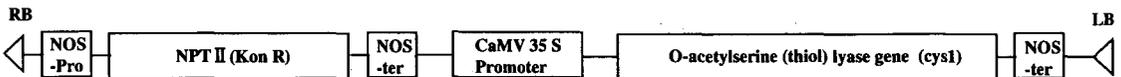


Fig. 4 Construction of pBI 121 splicing *cys1*.

感染および不定芽の誘導

上述のようにして得られた無菌植物体の葉に、以下のように直接接種法¹⁵⁾にて、*Agrobacterium tumefaciens* の感染を行った。まず、葉をメスで 7mm 角に切り出し、(主脈は除く) リーフディスクとし、アグロバクテリウムの培養液に 2 分

間浸漬した後、滅菌ろ紙で菌液を拭き取り、3%ショ糖、1mg/l ベンジルアミノプリン、0.1mg/l ナフタレン酢酸を含む MS 固形培地（寒天濃度 0.8%、pH5.7）上で、25℃、48 時間暗所で共存培養した。共存培養後、500mg/l クラフォラン、100mg/l カナマイシンを加えた、同培地に移植し、25℃、16 時間日長で培養し、除菌および不定芽を誘導した。3~5 週間後、感染部位から発生してきた不定芽（Fig.5-

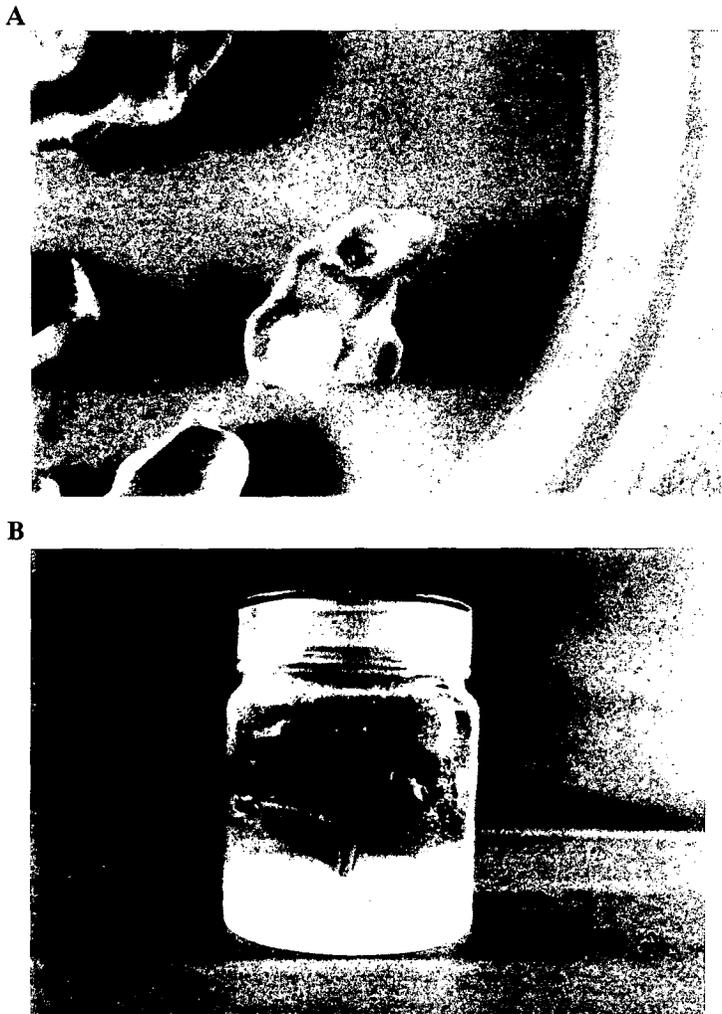


Fig. 5-A Unfixed shoot of fourth week after transformation.
B Tobacco plants transformed with the wheat cys1.

A) を切り取り、3%ショ糖、50mg/l カナマイシンを含む MS 固形培地（寒天濃度 0.8%、pH5.7）に移植し、根を誘導し、幼植物体を得た。（Fig.5-B）

除菌が完全か否かは、得られた幼植物体の葉を切り刻み、50mg/l カナマイシンを含む LB 液体培地にて 25℃で一晩浸透培養を行い、菌の増殖が見られるか否かで判断した。

形質転換体の DNA 単離と PCR 反応

上述により得られた幼植物体 22 個体と、非形質転換体 1 個体について、CTAB 法²⁹⁾により、葉より DNA を単離した。また、タバコの場合、第 3, 4 三葉で最も DNA が多いことから³³⁾、DNA を単離する際は幼葉を供試した。約 0.1g の葉を乳鉢および乳棒を用いて液体窒素内で、粉碎した。生重の約 5 倍量の 2×CTAB 抽出バッファー（0.8% cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB)、0.22M Tris-HCl (pH8.0)、0.8M NaCl、22mM EDTA (pH8.0)）の入ったエッペンに試料を入れてよく懸濁させ、約 30 分間、65℃でインキュベートした。（10 分毎に振盪）その後、遠心（15000rpm×10 分間）し、上清とほぼ等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（49：1）（以下、クロロホルムとする）を加えてよく攪拌し、約 10 分間転倒混和した。その後、遠心（15000rpm×10 分間）し、上清とほぼ等量のクロロホルムを加えてよく攪拌し、約 10 分間、転倒混和した。その後、遠心（15000rpm×10 分間）し、上清に上清の約 1/10 量の 10%CTAB（10%CTAB、0.7M NaCl）を加え、緩やかに混和した。その後、プレパレーションバッファー（1% CTAB、50mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA(pH8.0)）を等量加えて混和し、室温で 30 分以上静置した。その後、遠心（15000rpm×10 分間）し、沈殿を 300 μl の NaCl-TE ソリューション（1N NaCl、10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA(pH8.0)）

で溶かし、等量のイソプロパノールを加えて軽く混和し、室温で 30 分間静置した。その後、遠心 (15000rpm×10 分間) し、上清を除き、70% Ethanol を 400 μ l 加え、さらに遠心 (15000rpm×7 分間) し、沈殿を洗浄した。沈殿を遠心エバポレーターにより乾燥させたのち、50 μ l の TE バッファーにて溶解した。

このようにして抽出された DNA を、10ng に調整し、PCR 反応に供試した¹⁷⁾。プライマーは、CaMV35S プロモーター、および *cys1* の DNA sequence から、両遺伝子内部約 850bp を増幅する Reverse primer 26 mer (5'-ATG TAT GAG TTG GGT GTC TTT GCT GC-3')、Forward primer 28 mer (5'-AAG CTT GGG CIA TTG AGA CTT TTC AAC A-3') を使用した。

試料 1 μ l に 1 μ l の Reverse および Forward Primer、2.5 μ l の 10×PCR buffer (500mM KCl、100mM Tris-HCl pH8.3、15mM MgCl₂、0.01% gelatin)、4 μ l 10mM dNTP mixture、0.2 μ l の Taq polymerase (5unit/ μ l) を加えて、25 μ l の反応液とした。

PCR は Program temp control system (PC-700、Astec) を用い、反応は 94°C×30sec. (Denature)、54°C×1min. (Annealing)、72°C×2min. (Extension) の条件で、30 サイクル反復し、反応後、PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法によりバンドの検出を行った。

1-2 結果および考察

得られた形質転換体は第一選抜として Km50mg/l を含む MS 固形培地にて培養し、うち生育の見られた 22 個体を PCR 反応に供試した。その結果、22 個体中 16 個体で、850bp 付近にバンドが検出された。(Fig.6) またこれらの葉を切り刻み、

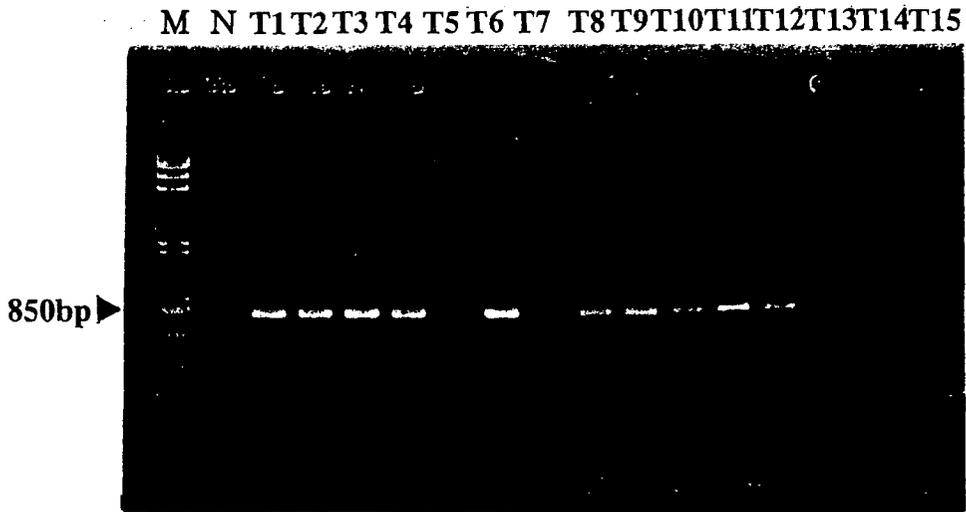


Fig. 6 PCR of tobacco transformed with *cys1*.
M:marker, N:nontransform, T1-15:transform

Km50mg/l を含む LB 培地にて一晩振盪培養したところ、アグロバクテリウムの増殖は見られなかった。これより、得られた 16 個体は個々のゲノム中に *cys1* が組み込まれた形質転換体であることが示唆された。22 個体のうちバンドが検出されなかった 6 個体については、選抜培地での生育が確認されたことから、NTP II 遺伝子が導入され、発現はあると思われるが、*cys1* 部分が導入されなかったか、もしくは正確に転写、発現していないと思われる。また DNA 抽出時の泳動写真によるとスメアなバンドが見えることから、RNA が残っていると思われる。このため、第 2 章のサザンハイブリダイゼーションで用いた Total DNA は、CTAB 法の途中で RNase 処理を組み入れた抽出法で抽出することとした。

第2節 硫酸、硝酸による *cys1* 導入タバコの特性解析および検定法の検討

2-1 材料・方法

植物材料

in vitro での特性解析には第1節により作出した、*cys1* の導入が認められ、無菌状態で維持継代されたタバコ、およびコントロールとして、感染を行っていない、無菌状態で維持継代されたタバコのそれぞれ第5葉まで展開した個体を、各処理区につき10個体ずつ供試した。その後の *in vivo* での特性解析には、それぞれ無菌状態で継代維持された *cys1* の形質転換個体および非形質転換個体をバーミキュライト：ピートモス=7：3を用いて順化し、1ヶ月間クリーンルーム内で25℃、16時間日長のもと栽培したものを各処理区につき15個体ずつ供試した。

硫酸および硝酸

超純水に1Nの硫酸を加え、pH3に調整したものを、オートクレーブにより加圧滅菌し、硫酸ミストとした。同じく超純水に1Nの硝酸を加え、pH3に調整したものを、オートクレーブにより加圧滅菌し、硝酸ミストとした。

検定方法 *in vitro* での検定は、各処理区ともクリーンベンチ内でピペットで1日に3mlずつ硫酸を培養個体の葉面に均一に、2週間散布した。また培養瓶に溜まった硫酸は次回の散布時前に、瓶を傾けて、別の容器に回収した。硝酸においても同様に散布した。*In vivo* での検定は、クリーンルーム内で、スプレーで1日に6mlずつ硫酸を葉面に均一に、72日間、1日おきに散布した。灌水は1日おきに行った。硝酸についても同様に行った。

生育調査

in vitro については白色斑点数を調査した。このとき、白色斑点数は各個体それぞれの葉における白色斑点数の合計とした。また散布後、何日目白色斑点が現れたか調査した。グラフは各処理区での平均値をもとに作成した。*In vivo* については植物体の草丈の上半分を上位、下半分を下位として分けて、被害率を調査した。被害率は、各個体上位と下位からランダムに葉を3枚ずつ選び、1cm四方 ($1\text{cm}^2=1$ 区画とする) となるように格子型に糸をはわせた道具を用い、それぞれの葉面積を測り、

被害率 = それぞれの葉における白色斑点の現れた区画数 / それぞれの葉面積 $\times 100$ (%)

とした。(Fig.7)

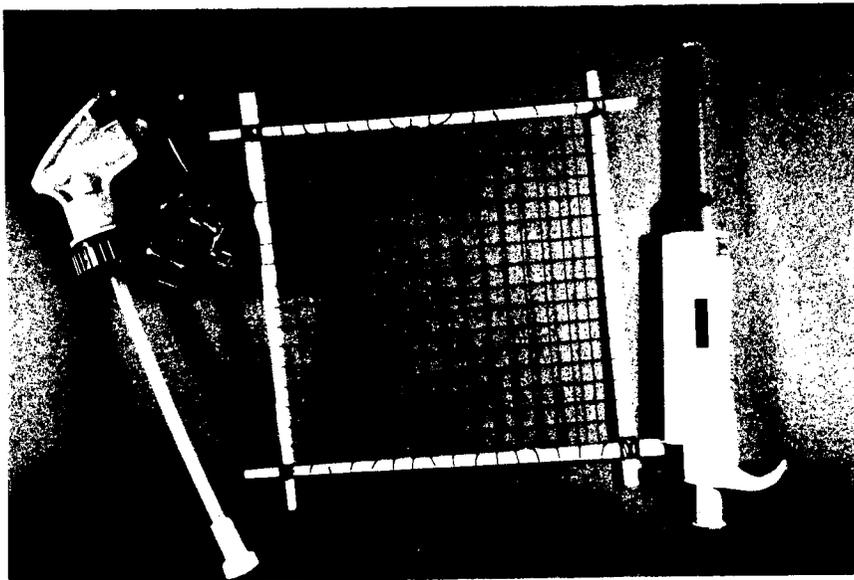


Fig.7 Experimental apparatus.

2-2 結果および考察

in vitro 硫酸 (Fig. 8)

非形質転換体、形質転換体ともに散布後 3 日目にはじめて白色斑点が確認された。その後、非形質転換体では 3 日目に、形質転換体では 4 日目に供試したすべての個体において、白色斑点が見られた。非形質転換体においては、その後白色斑点が急激に増加し、散布後 2 週間の時点で、白色斑点が約 60 個確認された。一方形質転換体においては、増加の傾向は見られるものの、急激な増加はなく、散布後 2 週間の時点で白色斑点は約 20 個と非形質転換個体に比べ約 1/3 という結果を得た。これにより、*cys1* を導入したトランスジェニック個体には硫酸に対する耐性があることが示唆された。またその際、植物体の下の方の葉でより白

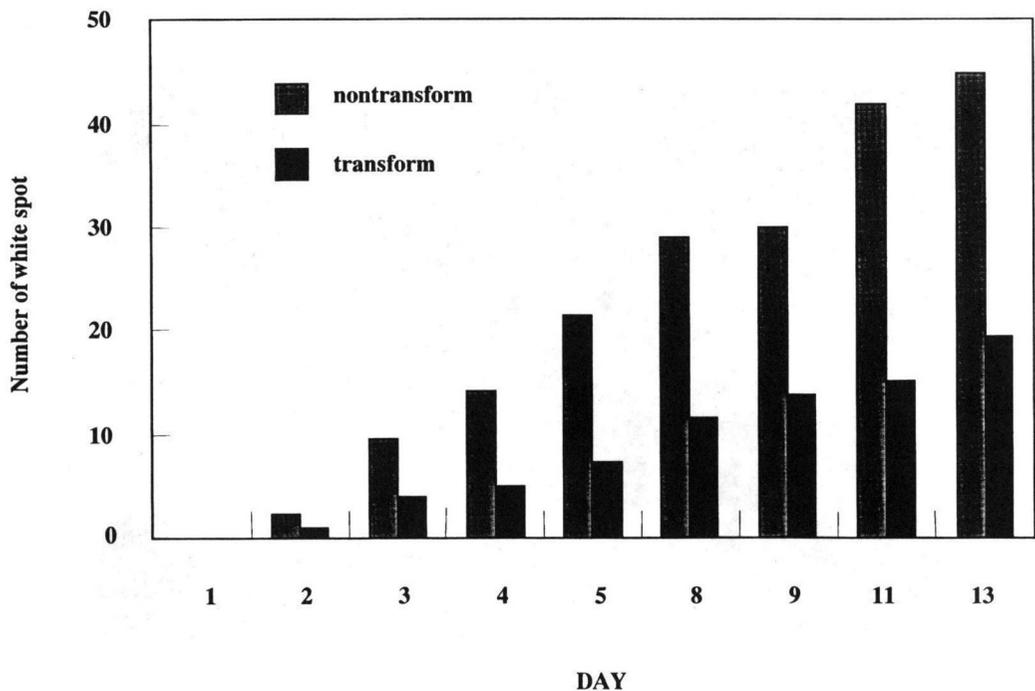


Fig.8 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by sulfuric acid. (*in vitro*)

色斑点が多く現れていたことが確認された。この事実を証拠づけるため、*in vivo* スプレー実験では、植物体を上位と下位に分けそれぞれに被害の出かたで差が見られるのかどうかも調査した。また *in vitro* 植物では植物の大きさが限られているため 3ml という量で葉面に均一に散布することができたが、*in vivo* 植物では葉も大きく、葉数も多いことから 6ml ずつスプレーすることとした。

In vivo 硫酸 (Fig. 9, 10)

スプレー開始後 6 日目、12 日目に、後は 12 日毎に生育調査を行った。スプレー開始後、6 日目の時点で両処理区ともすべての個体で白色斑点が確認された。非形質転換体においては 6 日後の生育調査で被害率は約 25%、その後 48 日後ま

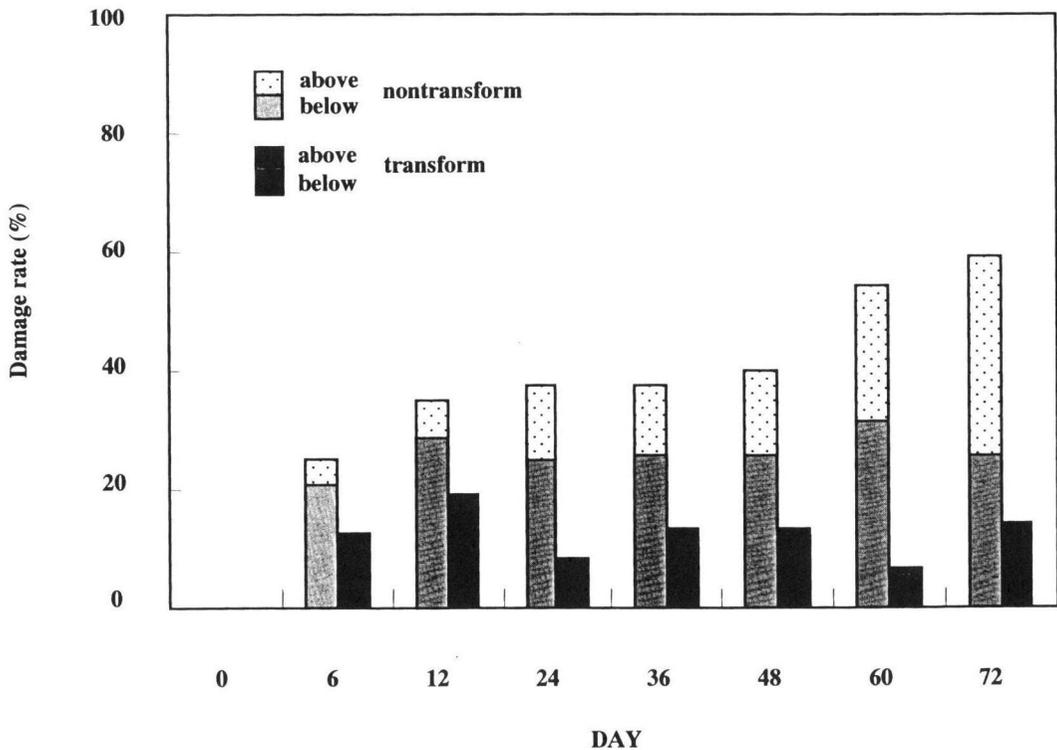


Fig.9 Damage rate of tobacco after sprayed surface of leaf by sulfuric acid.(*in vivo*)



Fig.10 Tobacco plants were sprayed sulfuric acid for 72 days. (*in vivo*)
(left, transform right, nontransform)

で緩やかに増加し被害率は約 40%であった。その後 60 日後には急激な増加が見られ被害率は約 60%だった。被害率はすべて植物体の上位よりも下位で高く、全体の約 70%の被害が下位で確認された。一方形質転換体においては、6 日後の調査から最後の 72 日後の調査まで一貫して被害率は約 15%前後であった。ここでもまた被害率は植物体の上位よりも下位で高く、全体の約 80%は下位で確認された。このことより形質転換体は非形質転換体に比べ硫酸に対しては明らかに耐性を示していることが示唆された。また被害は植物体の下位でより大きいことが示唆された。

In vitro 硝酸 (Fig. 11)

形質転換体は散布後 1 日目に、非形質転換体は 2 日目にはじめて白色斑点が

確認された。その後、非形質転換体においては白色斑点数は急激に増加し、散布後 16 日目には約 200 個と散布 3 日後の約 10 倍であった。一方形質転換体では急

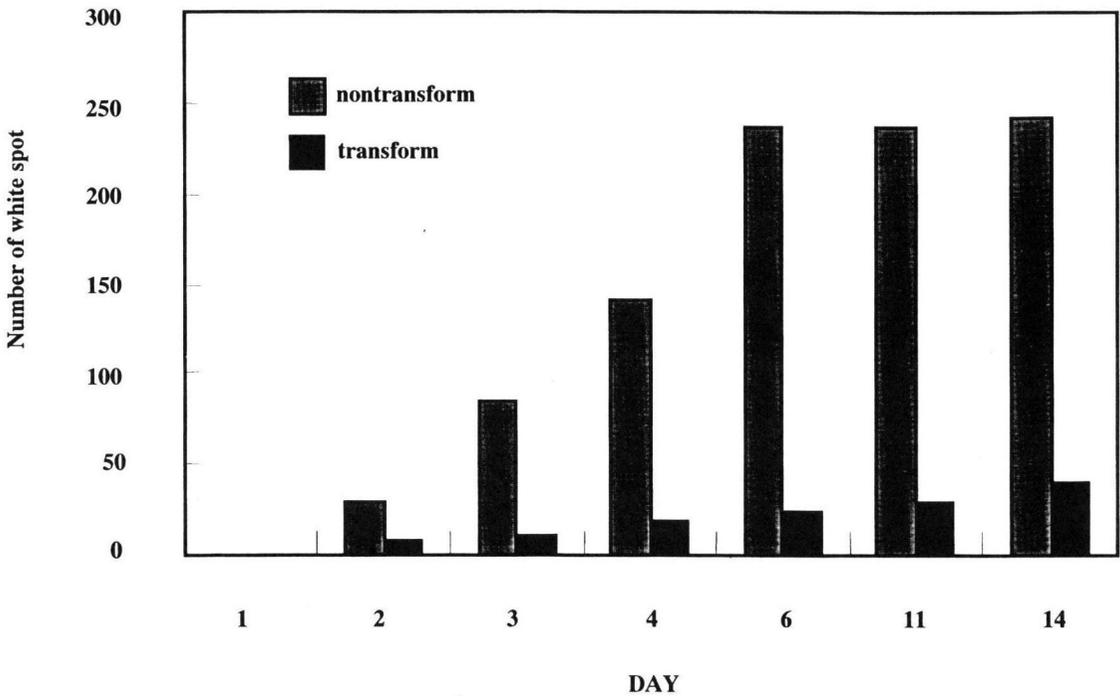


Fig.11 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by nitric acid. (*in vitro*)

激な増加はなく、散布後 16 日目では約 50 個と非形質転換体の約 1/4 の白色斑点数であった。このことより *cys1* を導入したトランスジェニック個体は硝酸に対して耐性があることが示唆された。また硝酸においても植物体の下位の葉でより多くの白色斑点が確認された。

In vivo 硝酸 (Fig. 12, 13)

生育調査は硫酸のときと同様、スプレー開始後、6 日目、12 日目に、あとは 12 日毎に行った。非形質転換体においてはスプレー開始後 6 日目の時点ですべての

個体において白色斑点が確認された。一方形質転換体においてはスプレー開始後 30 日目ですべての個体において白色斑点が確認された。非形質転換体においてはスプレー開始 6 日後の時点で被害率は 15%であった。その後被害率は急激に増加し、72 日目の生育調査まで約 40%前後の値を示していた。一方形質転換体においては 6 日後の時点で被害率は約 10%であった。その後急激な増加は見られず、72 日まで約 20%前後の値を示していた。72 日目の被害率を比較すると、形質転換体は非形質転換体の約 1/3 であった。これにより *cys1* を導入したトランスジェニックタバコは硝酸に対して耐性があることが示唆された。また植物体の上位と下位での被害の差は調査中一貫して下位の方が大きいことが確認された。

硫酸に対する耐性については、序論でもふれたように、*cys1* を導入したタバコは硫化水素に耐性があることが報告されている³⁹⁾。そして同じ硫黄の元素を含む硫酸を使用することにより、硫化水素のときと同様に硫酸における硫黄源がシステイン生合成経路内の遊離あるいは単体で存在する硫化物としてシステインに合成されたと思われる。なお、システイン合成酵素活性については第 2 章で述べたいと思う。また、斉藤ら (1994) により、ハウレンソウより単離したシステイン合成酵素遺伝子を導入したタバコの葉片は、亜硫酸イオンに対して部分的に耐性であったという報告があることから²¹⁾、本実験での硫酸葉面散布による結果は、納得できる結果であると思われるが、まだ生理的な面ではほとんどが解明されていないことから、今後の研究に期待する所が大きい。

しかし、硝酸に対する耐性については、ほかに報告がないことから、本章では結果だけを述べ、第 3 章ですべての結果を考慮した上で考察していきたいと思う。

硫酸、硝酸において、植物体の下位で被害が大きかったことについては、葉面

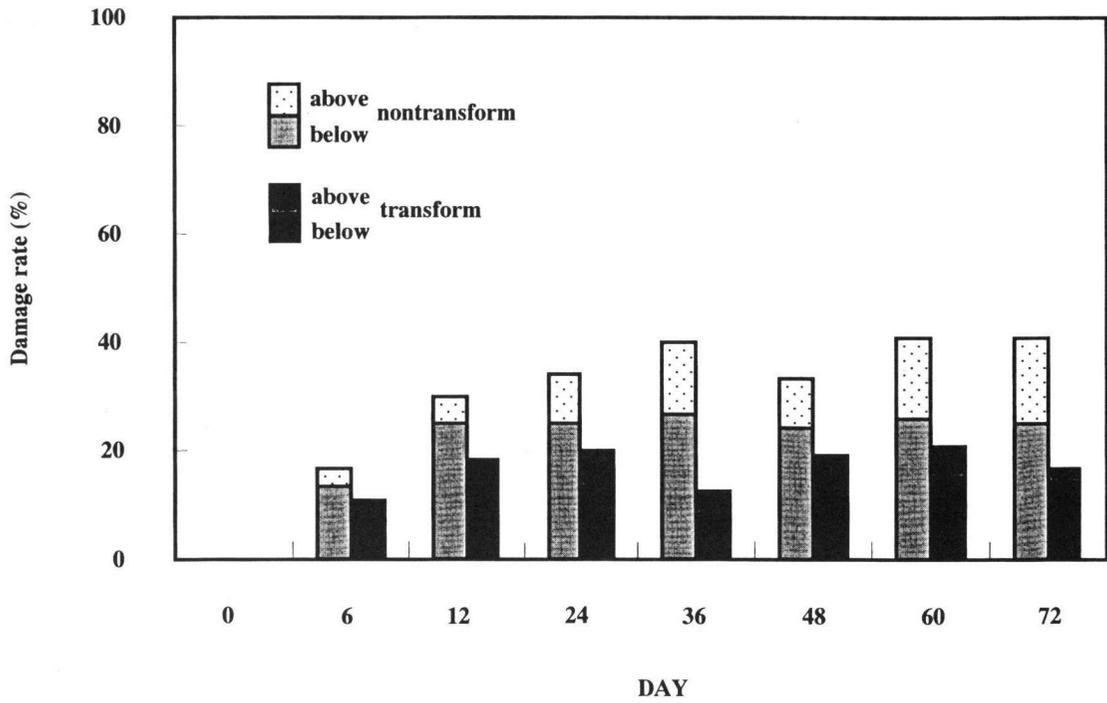


Fig.12 Damage rate of tobacco after sprayed surface of leaf by nitric acid.(*in vivo*)

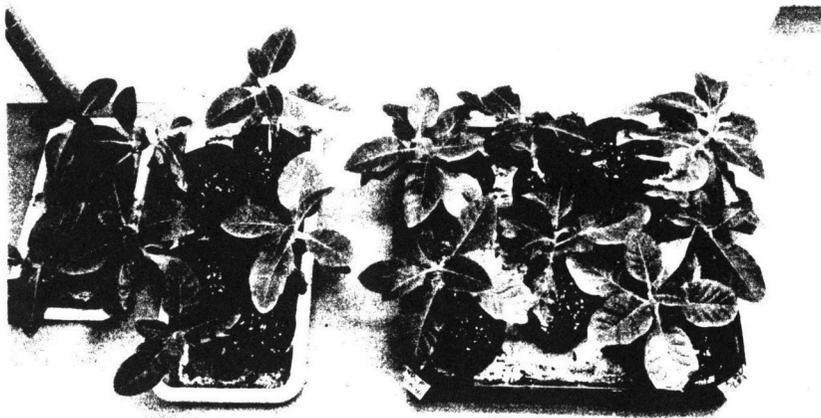


Fig. 13 Tobacco plants were sprayed nitric acid for 72 days. (*in vivo*)
(left, transform right, nontransform)

散布時に、植物体の上の方の葉の硫酸、硝酸が、下の方の葉へ流れ落ち、結果的に下の方の葉に多く硫酸、硝酸がかかっているということも原因の一つとして考えられる。

検定法に関しては、まず、散布する硫酸、硝酸の量においては *in vitro*、*in vivo* ともにすべての葉に均一にまた、散布後余分な硫酸、硝酸が葉から滴り落ちる程度であることから、*in vitro* では 3ml、*in vivo* では 6ml が適量であると思われる。次に散布の間隔については、*in vitro* では短期間で結果を見るために毎日散布したが、これは、実際の環境として考えれば、とても急性的な変化を見ていると思われる。そこで少しでも現実に起こりうる状況に近づけるため、また慢性的な変化が観察できるように *in vivo* 実験では、72 日間という長期にわたりスプレーし、また 1 日おきにスプレーすることにより、実際に起こりうる状態を目指した。その結果、多少数字に違いは見られるものの、傾向としては同じ結果が得られたことから、*in vitro* での検定の結果は信頼できるものであると思われる。また、*in vitro* の検定法は、2 週間という短期間でかつ簡便に傾向をつかむことができる検定法であることが示唆された。今後この検定法を使用することにより、液体のストレスに対しての培養植物の特性解析が時間、手法的な面で効率的で容易なものになるとと思われる。

第 2 章

システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの特性解析

第2章 システイン合成酵素遺伝子 (*cys1*) 導入タバコの特性解析

序論

本章では、第1章で検討した *in vitro* での検定法に基づき、様々な物質について *cys1* を導入したトランスジェニックタバコの後代を用いて特性解析を行った。第1章では硫酸および硝酸に対して耐性が見られたことから、本章では、酸全般についての傾向を見るために塩酸、酢酸、リン酸について特性解析を行うとともに、次亜塩素酸ナトリウム³²⁾やアルカリであるアンモニアや水酸化ナトリウムについても特性解析を行った。また、*cys1* 導入タバコとその後代についてサザンハイブリダイゼーションを行うとともにそれらの個体におけるシステイン合成酵素活性についても調査した。

第1節 酸、アルカリについての特性解析

1-1 材料・方法

植物材料

第1章で作出した *cys1* 導入タバコを、クリーンルーム内で順化し、その後隔離温室内で自家受精により後代を得た。得られた後代は、第1章と同様の方法により種子滅菌を行い、その後、Km200mg/l を含む MS 寒天培地 (シヨ糖 3%、寒天濃度 0.8%、pH5.7) にて2週間培養し、その後 Km50mg/l を含む MS 寒天培地 (シヨ糖 3%、寒天濃度 0.8%、pH5.7) にて約45日間継代、培養を繰り返した。また、第1章と同様の条件にて、PCR を行い、約 850bp 付近にバンドの得られた個体のみ、その後の特性解析に供試した。

塩酸、酢酸、燐酸

超純水を 1N の塩酸で pH3 に調整し、オートクレーブにより加圧滅菌したものを用いた。酢酸、燐酸についても同様に調整し、加圧滅菌したものを用いた。

次亜塩素酸ナトリウム

濃度を 0.003% に調整し、フィルター滅菌をしたものを用いた。

水酸化ナトリウム

超純水を 1N の水酸化ナトリウムで pH11 に調整し、オートクレーブにより加圧滅菌したものを用いた。

アンモニア

超純水に 15% のアンモニア水で pH11 に調整し、フィルター滅菌をしたものを用いた。

検定方法

第 1 章と同様の方法で検定を行った。

生育調査

塩酸、酢酸、燐酸、次亜塩素酸ナトリウム、水酸化ナトリウムについては第 1 章と同様の方法で行った。アンモニアについては、葉が脱色するという症状が見られ、また症状の変化も速いことから、各個体の各葉においてその葉面積における脱色された葉面積が、0% のものを 0、10% 以下のものを 1、10~50% までのもの

のを 2、50～80%までのものを 3、80～100%までのものを 4、枯死したものを 5 として、目測により 6 段階に分けて評価し⁹⁾、その個体内での合計をその個体の被害度数として表した。また、処理区内での平均値をグラフで表した。

1-2 結果および考察

塩酸 (Fig. 14, 15)

非形質転換体においては、散布開始後 1 日目で白色斑点が確認され、また開始後 2 日目にはすべての個体で、白色斑点が確認された。その後、白色斑点数は急激に増加し、散布 10 日目には約 45 個であった。一方形質転換体においては、開始後 7 日目ですべての個体で白色斑点が確認された。また白色斑点数の急激な増加は見られず、10 日目には約 15 個と、非形質転換体の約 1/3 であった。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは塩酸に対して耐性があることが示唆された。

酢酸 (Fig. 16, 17)

非形質転換体においては散布開始後 1 日目で白色斑点が確認され、また開始後 3 日目ですべての個体で白色斑点が確認された。その後白色斑点数は増加し続け、散布 10 日目には約 70 個であった。形質転換体においては開始後 1 日目で白色斑点が確認され、開始後 3 日目ですべての個体で白色斑点が確認された。その後、白色斑点数は増加傾向を示し、散布 10 日目には約 50 個と、非形質転換体の約 5/7 であった。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは酢酸に対して耐性があることが示唆された。

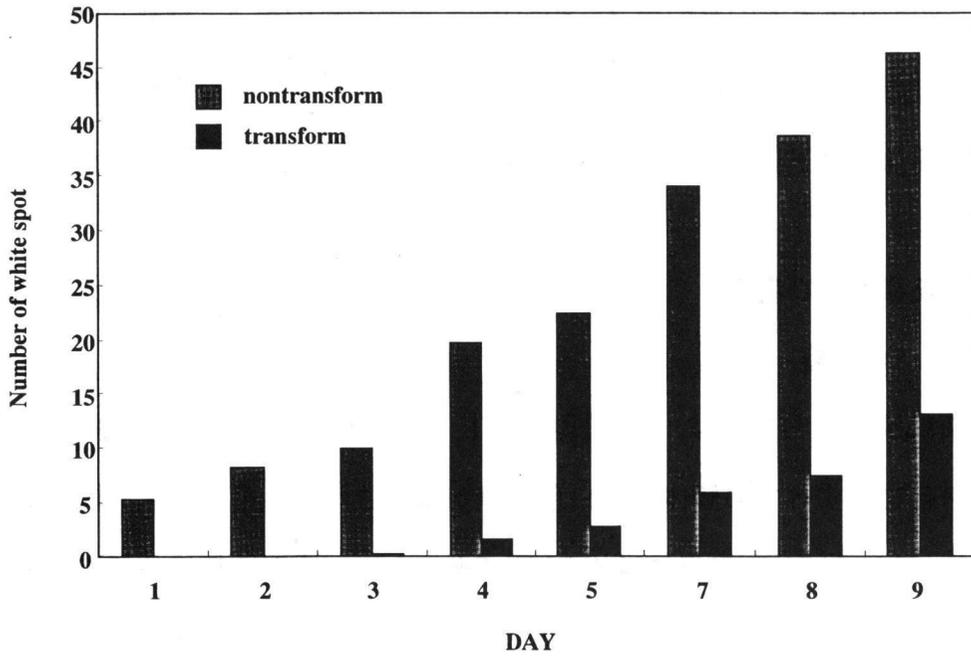
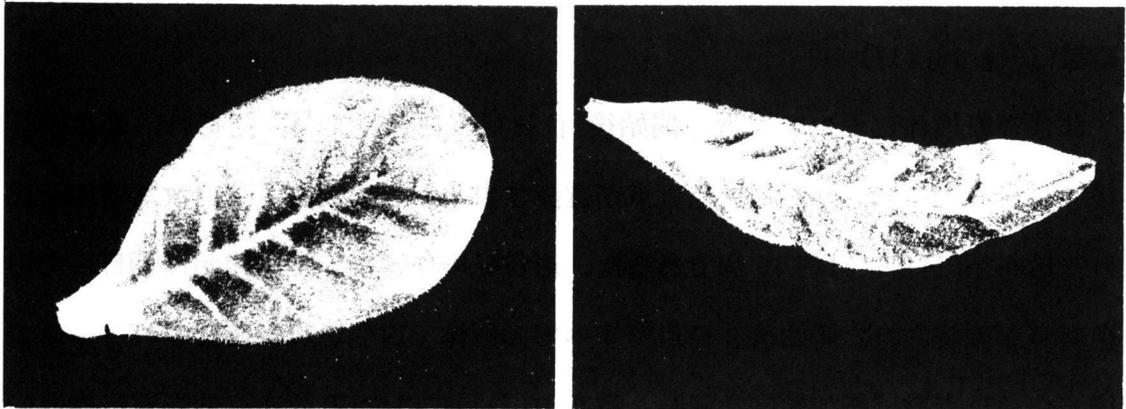


Fig.14 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by hydrochloric acid.



A, transform

B, nontransform

Fig. 15 Damage of tobacco's leaf by hydrochloric acid. (*in vitro*)

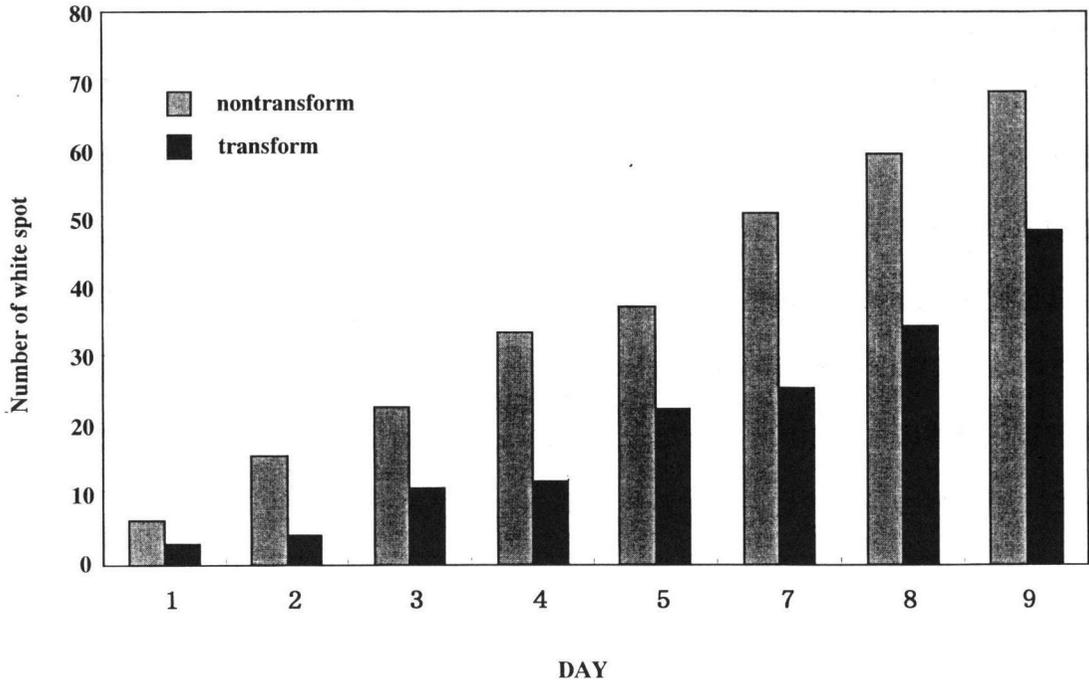
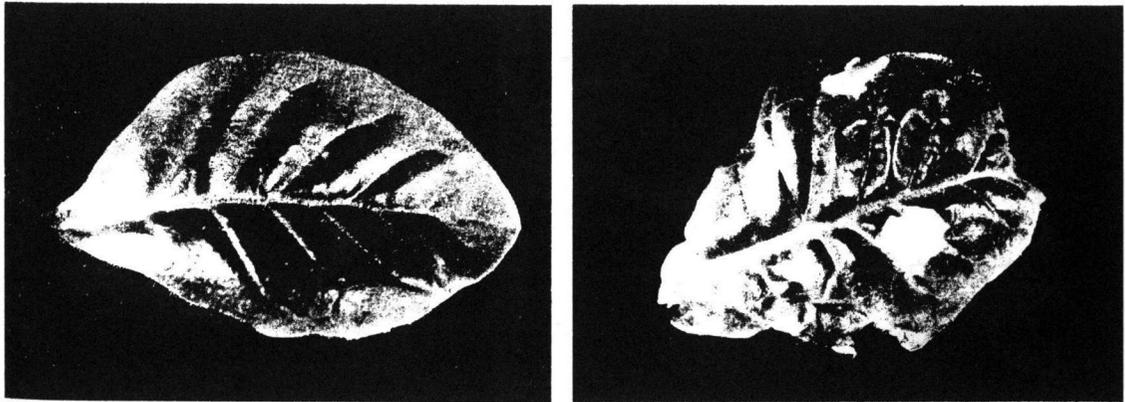


Fig.16 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by acetic acid.



A, transform

B, nontransform

Fig. 17 Damage of tobacco's leaf by acetic acid. (*in vitro*)

磷酸 (Fig. 18, 19)

非形質転換体においては散布開始後 1 日目で白色斑点が確認され、また開始後 2 日目にはすべての個体で白色斑点が確認された。その後、白色斑点数は急激に増加し、散布 10 日目には約 50 個であった。一方形質転換体においては開始後 1 日目で白色斑点が確認された。また散布期間中、白色斑点の現れない個体が確認された。また白色斑点数の急激な増加は見られず、散布 10 日目には約 15 個と、非形質転換体の約 3/10 であった。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは磷酸に対して耐性があることが示唆された。

次亜塩素酸ナトリウム (Fig. 20, 21)

非形質転換体、形質転換体ともに散布開始後 1 日目で、すべての個体で白色斑点が確認された。非形質転換体においては白色斑点数はその後増加し続け、散布後 10 日目には約 90 個であった。一方形質転換体においては散布後 6 日目以降は白色斑点数に増加の傾向が見られず、散布後 10 日目には約 40 個と非形質転換体の約 4/9 であった。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは次亜塩素酸ナトリウムに耐性があることが示唆された。

水酸化ナトリウム

散布後、両処理区において白色斑点や葉の黄変、褐変、脱色などの症状が現れた。しかし、各個体によってそれぞれ症状が違うため、どの症状が水酸化ナトリウム散布による症状なのかを断定することが難しく、生育調査を行うことができなかった。

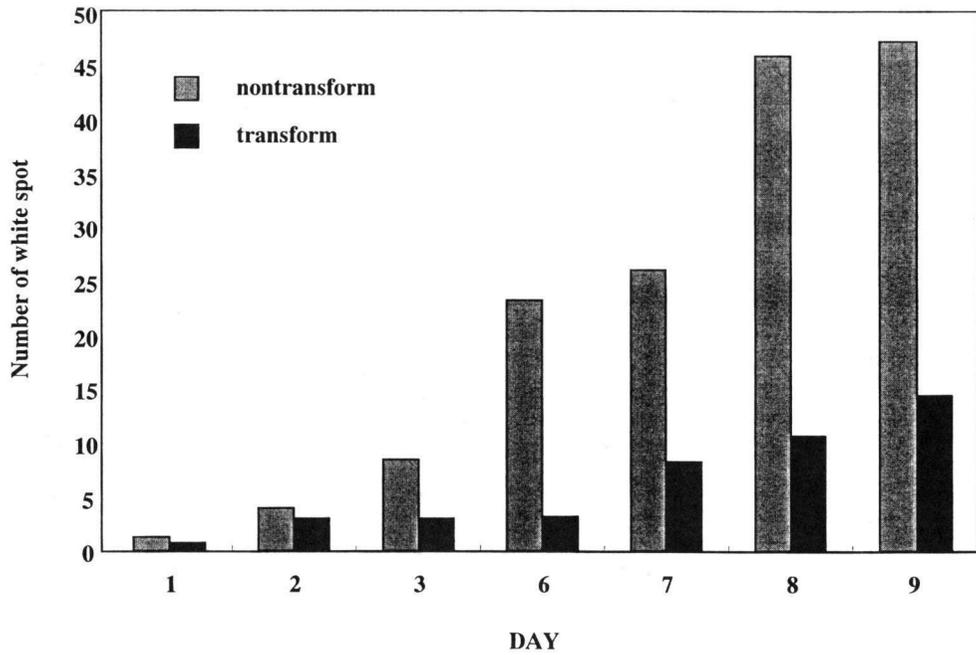


Fig.18 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by phosphoric acid.

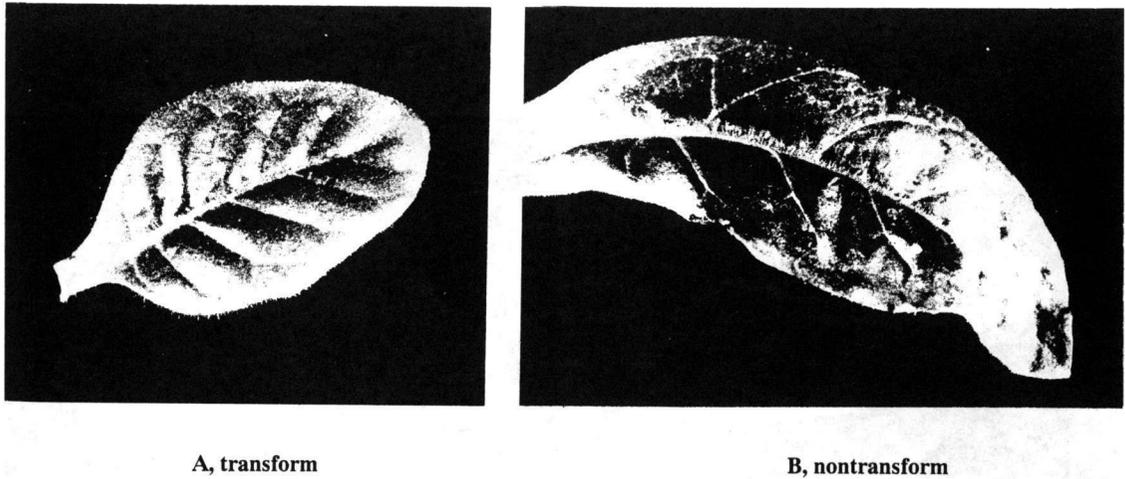


Fig. 19 .Damage of tobacco's leaf by phosphoric acid. (*in vitro*)

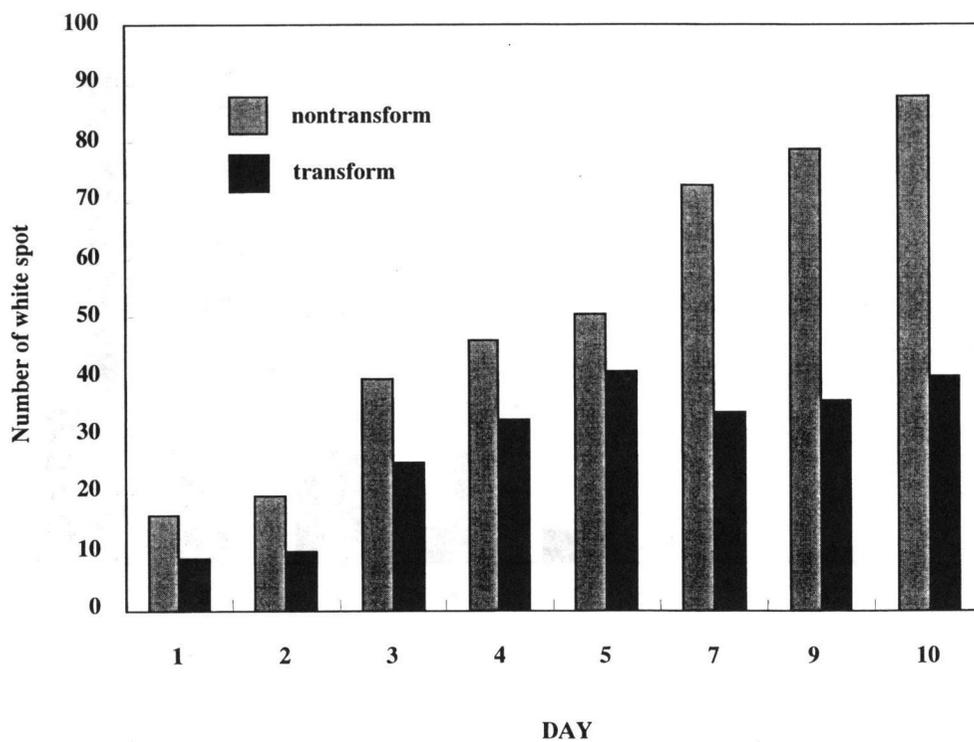
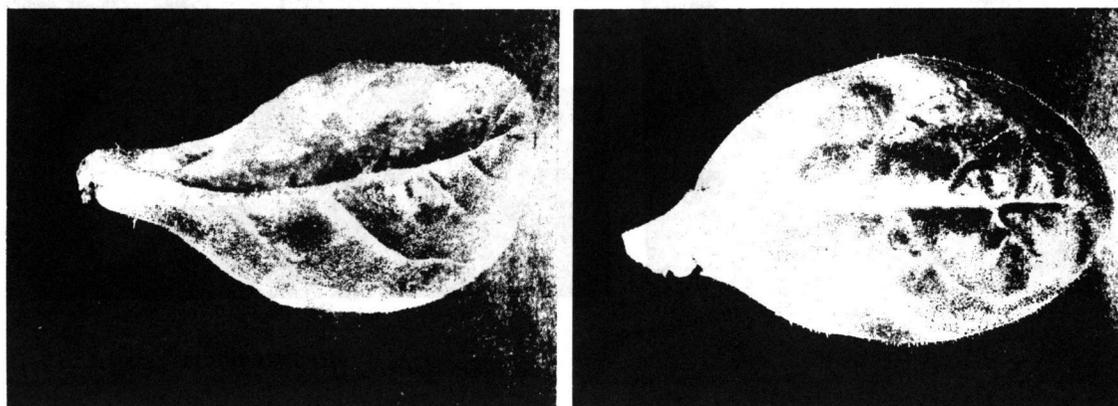


Fig.20 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by Sodium Hypochlorite Solution.



A, transform

B, nontransform

Fig. 21 Damage of tobacco's leaf by Sodium Hypochlorite Solution. (*in vitro*)

アンモニア (Fig. 22, 23)

非形質転換体、形質転換体ともに散布後 1 日目ですべての個体で葉の脱色が確認された。また両処理区の被害度数に差はほとんど見られず、その後緩やかに増加の傾向を示した。散布 9 日目には被害度数は非形質転換体では 27、形質転換体では 32 と、わずかに形質転換体の方が高いものの両処理区ともほぼ同様の値が得られた。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコはアンモニアに対しては耐性が見られなかった。またアンモニアを散布した植物の葉に脱色という症状が見られることが確認された。

以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは塩酸、酢酸、リン酸、次亜塩素酸ナトリウムに対して耐性があることが示唆された。この結果についての考察は、第 3 章ですべての結果を考慮した上で述べていこうと思う。

手法的なことについては、毎回散布時に瓶の底に溜まった前回散布時のミストを、瓶を傾けて別の容器に回収していたが、散布 9 日目ごろから寒天培地が崩れ易くなることがあった。このため寒天濃度を 0.8% から 0.83% にすると崩れにくくなった。また、ピペットでのミストの回収も考えられるが、コンタミネーションの可能性を考えるならば手早く瓶を傾けてミストを回収する方が良いと思われる。

培養個体の中には、ミストをはじいてしまう個体が見られた。植物病理の実験において、植物への病原菌の接種時に葉面への菌の付着をよくするために、tween 20 などの界面活性剤を細菌懸濁液に加えて用いる場合がある^{24),28),35)}。このため、ミストへ界面活性剤を加えて散布してみるのも良いと思われる。

自家受精により得られた後代の中で、Km200mg/l を含む MS 培地で全く発芽の確認できない系統があった。これは遺伝的に固定されていないためであるが原

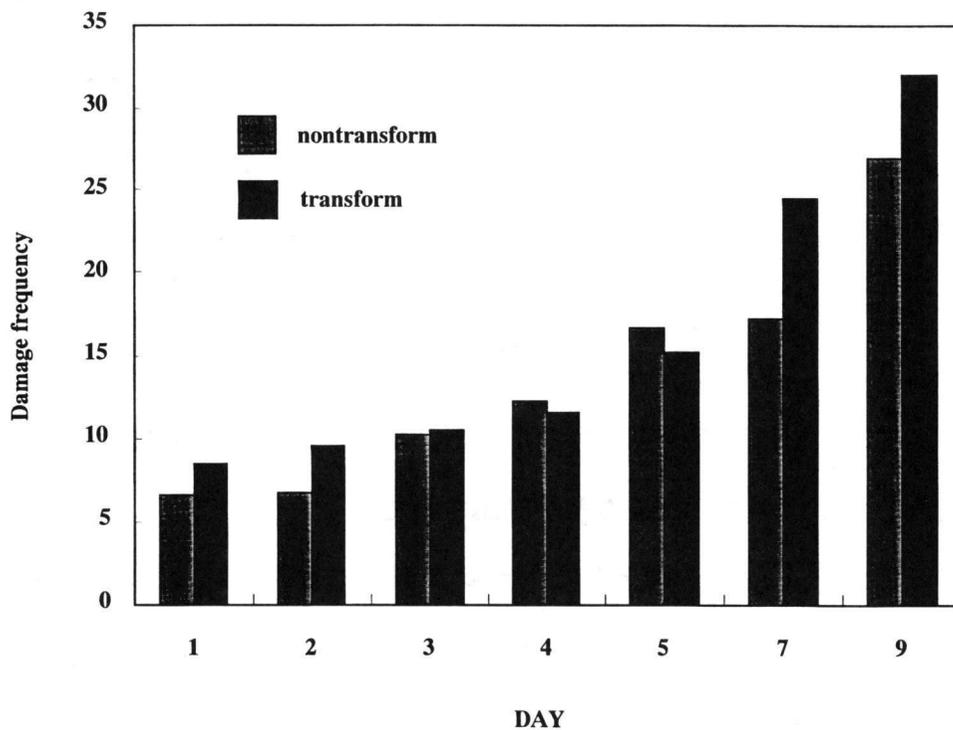


Fig.22 Change of number of white spot after sprayed surface of leaf by ammonia.

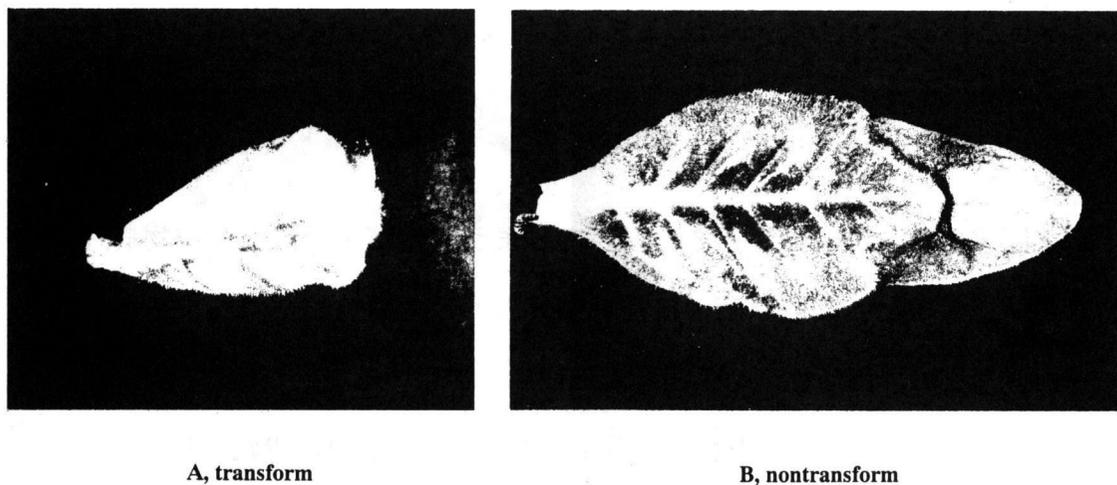


Fig. 23 Damage of tobacco's leaf by ammonia. (*in vitro*)

因として再生植物がキメラであったり、染色体異常を起こしていることが考えられる³⁷⁾。

第2節 *cys1* 導入タバコのゲノム DNA に対するサザンプロット解析

2-1 材料・方法

全 DNA 抽出の材料には第1章第1節で *cys1* の導入が確認された T1 および T1 の後代 F1、ネガティブコントロールとして *cys1* の導入を行っていない非形質転換体を用いた。抽出方法は第1章第1節で述べた CTAB 法で行った。また、ポジティブコントロールとしてラージプレップ³⁾により単離した、*cys1* の組み込まれたプラスミド DNA を用いた。

第1章第1節と同様の条件で PCR を行った。その後 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドによる染色で、プラスミド DNA、T1、F1 でのみ約 850bp 付近にバンドを確認した。その後 0.4M NaOH でナイロンメンブレン (Hybond-N⁺, Amersham) にトランスファーした。

ECL-system (Amersham) によってサザンハイブリダイゼーションを行った^{29),38)}。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションにはハイブリソリューション (5% Blocking reagent, 0.5M NaCl を溶解したもの) を用い、プローブとしてプラスミドから増幅された *cys1* を含む約 850bp の PCR 産物を用い、42°C で行った。

プローブの洗浄は 0.2×SSC/0.1% SDS で 42°C で 20 分間、2 回行った後、2×SSC で室温で 5 分間、2 回行った。

検出は、洗浄したメンブランを検出試薬 1 と検出試薬 2 を等量混合したものに約 1 分間浸し、X 線フィルムに感光させて行った。

2-2 結果および考察

cys1 を導入したトランスジェニックタバコ T1 とその後代 F1 とポジティブコントロールとしてのプラスミド DNA でのみ約 850bp に明瞭なバンドが確認できた。(Fig.24) また *cys1* の導入を行っていない非形質転換体ではバンドが得られなかった。以上のことから、プラスミド内の *cys1* が T1 へ移行し、また自家受精によって F1 へ移行したことが証明された。

また、非形質転換タバコでもシステイン合成酵素活性があることから、非形質転換体におけるアイソフォームの存在が考えられるが、PCR の時点で、バンドは確認されなかった。

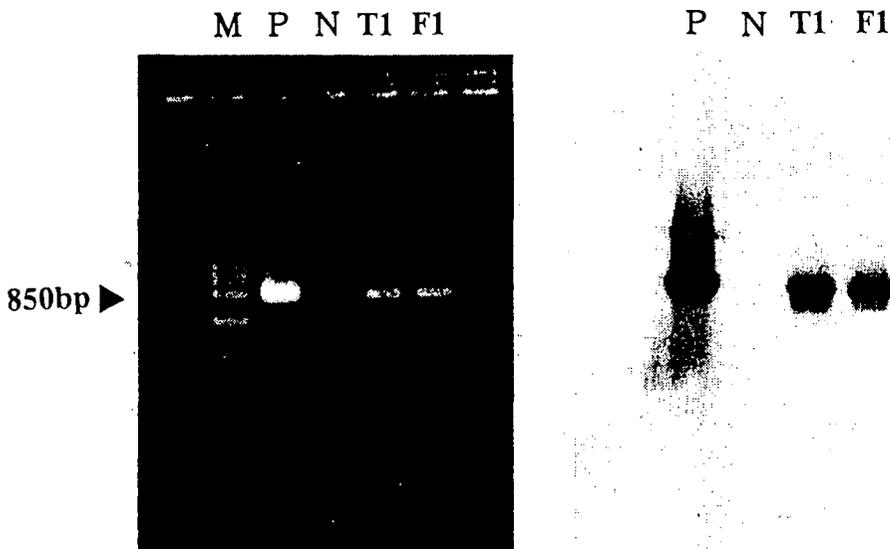


Fig. 24 Southern blot analysis of tobacco transformed with the wheat *cys1*. M:marker, P:plasmid DNA, N:nontransform, T1:transform, F1:next generation of T1

第3節 システイン合成酵素活性

3-1 材料・方法

酵素活性はユーセフィアンらの方法に基づいて行った³⁹⁾。非形質転換体、形質転換体とその後代の葉5gを10mlのソリューション(50mM Tris-HCl、1mM EDTA、5mM MgCl₂、2mM DTT、0.1% Triton X-100、0.5mM PMSF (pH7.5))へ0.5gの不溶性PVPを加えた乳鉢へ入れ、水中で約10分間ホモジナイズした。その後48000g、30分間、4℃で遠心分離し、上清を水中に静置し、2時間以内に酵素活性を測定した。なお、測定は明治大学農学部農芸化学科前田理久専任講師に委託した。

3-2 結果および考察

形質転換体とその後代において、非形質転換体に比べて約2倍の高い活性を示した。(Fig.25) このため導入された *cys1* により、システイン合成酵素活性が上がったことが示唆された。そして、第1章第2節の結果より、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコが硫酸 (pH3) および硝酸 (pH3) に対して耐性を示した要因として、システイン合成酵素活性が上がったためではないかと思われる。また形質転換体の中で非形質転換体に比べ、わずかに活性の高い系統が見られたが、これは植物の個体差によるものであると考えられる。

また、ホモジナイズの時間により酵素活性が変わってくることから³¹⁾、反復時には一定の時間で、またすべての個体を同時並行でホモジナイズするのが

良いと思われる。またホモジナイズの時間が長時間になればなるほど酵素活性が低下することから³¹⁾、10分間という、材料がペースト状になる時間を設定した。

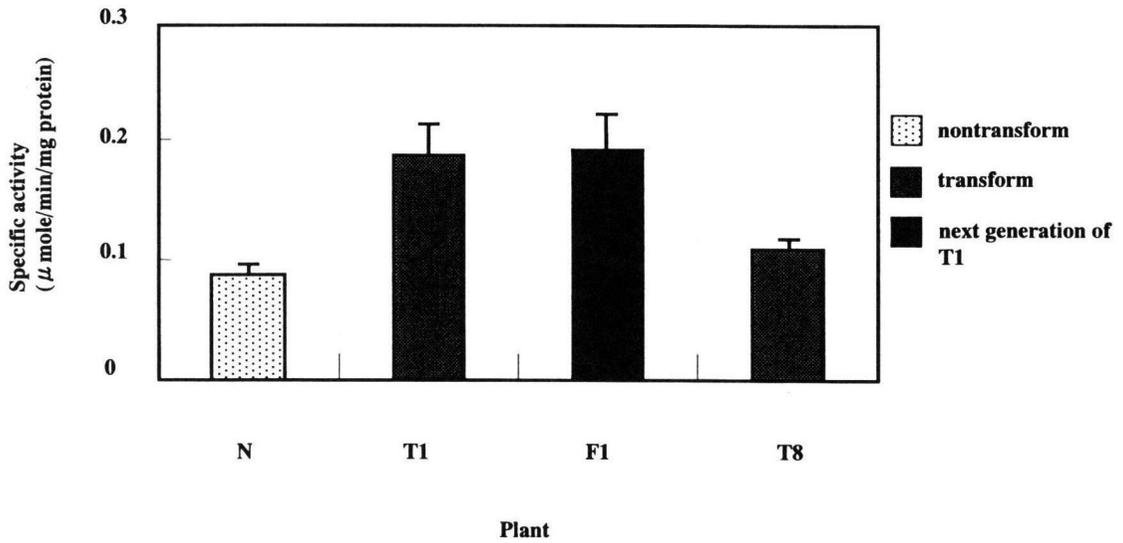


Fig.25 *O*-acetylserine (thiol) lyase activity of transgenic tobacco plant.

第3章

総合考察

第3章 総合考察

第1章第2節より、硫酸（pH3）を用いた葉面散布実験において *cys1* を導入したトランスジェニックタバコは非形質転換体に比べ、白色斑点数の急激な増加は見られなかった。硝酸（pH3）を用いた葉面散布実験についても同様の結果が得られた。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは硫酸、硝酸に対して耐性があるという新知見を得た。

また硫酸、硝酸に対する耐性が示唆されたことで、その他の酸についても同様の結果が得られる可能性がある。このため、第2章第1節では塩酸、酢酸、燐酸を用いた葉面散布実験を行い、それぞれの酸に対する耐性について調査した。

その結果、塩酸（pH3）を用いた葉面散布実験において、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは非形質転換体に比べ白色斑点数の急激な増加は見られなかった。また、燐酸（pH3）を用いた葉面散布実験においても同様の結果が得られた。酢酸（pH3）による葉面散布実験においては、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは非形質転換体に比べ、白色斑点数は少なかった。以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは塩酸、酢酸、燐酸に対して耐性があるという新知見が得られた。

以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは、酸に対して耐性がある可能性が考えられる。

また、0.003%次亜塩素酸ナトリウム（pH8.85）を用いた葉面散布実験において、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは非形質転換体に比べ、白

色斑点数の急激な増加は見られなかった。このことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは次亜塩素酸ナトリウムに対しても耐性があるということが明らかとなった。

しかし、アンモニア (pH11) に対しては耐性がなかったことから、アルカリに対しての耐性は不明である。

いずれの結果についても、生理的に証明するまでには至っていない。

硫酸については、ユーセフィアンら (1993, 1997)^{39),40)}、斉藤ら (1994) の報告²¹⁾をもとに予想していたような結果が得られた。また認められた耐性は第2章第3節のシステイン合成酵素活性が上がったためではないかと思われる。

また、Barroso ら (1995) はアラビドプシスより単離されたシステイン合成酵素遺伝子は硫黄の制御により発現が活性化され、また炭素、窒素源の供給により最大の発現を示したと報告している¹⁾。本実験では、硫黄を硫酸という形で供給した。また、*cys1* を導入したことでシステイン合成酵素活性が上がったという結果を得た。このため、Barroso らの報告は硫黄の制御により発現が活性化されたという点で興味深い。それと同時に、炭素と窒素により発現が最大となったことで、システイン合成酵素遺伝子は炭素や窒素とも何らかの関係があることを示唆している。このため、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコの硝酸に対する耐性もシステインの生合成に何らかの関わりがあると思われる。また本実験では *cys1* を導入した個体のシステイン合成酵素活性を測定している。今後は *cys1* を導入した個体に硫黄の処理をしたときのシステイン合成酵素活性について測定を行えば、また新たな知見が得られるだろう。

そして、本実験の結果は、汚染物質浄化能力の向上という点では、ほかの様々な汚染物質に対して浄化能力の向上が見られる可能性を示しており、今後、環

境問題解決の手がかりとして役立つのではないかと考えている。

例えば、*cys1* を導入した木本植物を作出し、それらが、酸に対して耐性を示せば、酸性雨の被害の深刻な地域への利用も夢ではないだろう。

また、今回検討したピペットを用いた *in vitro* 植物体における検定法は、液体のストレスに対しての特性解析には有効な方法であった。また今後、液体のストレスに限らず、汚染ガスなどのストレスに対しても簡便かつ短期間で特性解析ができれば、また一步、研究の前進につながると考えている。

cys1 の機作についてはまだまだ未知の領域が広がっている。今後、研究が進むにつれていろいろなことが明らかになっていくであろう。そして、今後の利用の可能性を広げるためにも、数多くの有用な新知見を得て、それらと生理的な部分との関係が少しでも明らかになるように今後の研究が進んでいくことを期待している。

謝辞

本研究の遂行にあたり秋田農業短期大学生物工学研究室 Shohab Youssefian 博士には遺伝子の分譲をして頂き、深く感謝いたします。

明治大学 前田理久専任講師より酵素活性測定の御指導頂き、深く感謝いたします。

園芸育種学研究室の皆様には研究の遂行にあたり、暖かい御支援と激励を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

摘要

コムギから単離されたシステイン合成酵素遺伝子 *O*-acetylserine (thiol) lyase gene (*cys1*) を導入した植物は、硫化水素に抵抗性を持つということが報告されている³⁹⁾。最近までにこの *cys1* の機作に関する知見はあまり得られていないものの、様々な要因に対して何らかの応答がある可能性が考えられる。これらの知見を数多く得ることは、年々深刻化する環境問題を解決していく上でも有用なことであり、興味ある研究課題である。将来は遺伝子組み換えにより汚染耐性木本植物を育成したいと考え、その第一歩としてモデル植物であるタバコ¹²⁾を供試した。本研究では、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコの特性解析および検定法の検討を行った。

無菌播種により作出した、タバコ無菌植物体の葉を感染材料とし、*A. tumefaciens* LBA4404 において pBI121 の GUS 遺伝子領域を *cys1* に置換したものを、直接接種法により接種した。接種後、約 3~5 週間すると、外植片の菌接種部位より、多数の不定芽が発生した。それらの不定芽を、カナマイシン 50mg/l、NAA0.mg/l、BA1.0mg/l を含む MS 培地にて継代を繰り返した。その後得られた幼植物体はホルモンフリーの MS 培地にて継代、培養を繰り返した。

次に *cys1* コーディング領域を含む 850bp を増幅できるように合成したプライマーを用いて、形質転換体と非形質転換体の葉から、CTAB 法により抽出した全 DNA と感染に用いた LBA4404 株より抽出したプラスミド DNA を用い、PCR 反応を行ったところ、形質転換体でのみ、プラスミド DNA と同位置の 850bp 付近に増幅産物が確認された。(Fig.6)

次に得られた形質転換体と非形質転換体について特性解析を行った。それぞれ 5 葉まで展開した培養個体の葉に均一になるように硫酸ミスト 3ml/日をピペ

ットで 2 週間散布した。用いた硫酸ミストは超純水を 1N 硫酸で pH3 に調整した。その結果、非形質転換、形質転換個体ともに散布 3 日後に植物体の下位の葉表面の一部に白色斑点が確認された。このような可視障害は、非形質転換個体では、日数の経過とともに葉表面全体に拡大するとともに、可視障害の見られる葉数は増加し、5 日後には 50%以上の葉で斑点が確認された。形質転換個体では白色斑点は確認されたものの、斑点の急激な増加はなく、また可視障害の観察された葉は 25%であった。2 週間後には非形質転換個体では、形質転換個体の約 3 倍の斑点数が確認された。(Fig.8)

同様に順化 1 ヶ月後の個体に硫酸ミスト 6ml/日をスプレーで 1 日おきに 72 日間散布した。その結果、72 日後の時点で、非形質転換体の被害率は 57%であるのに対し、形質転換体では 16%であった。また非形質転換体、形質転換体ともに植物体の上位よりも下位の葉で被害率が高いことが示唆された。(Fig.9)

次に超純水を 1N 硝酸で pH3 に調整した硝酸ミストを用いて、硫酸のときと同様に特性解析を行った。*in vitro* 個体において、非形質転換体では白色斑点数は急激に増加し、散布 16 日目には約 200 個であった。一方形質転換体では散布 16 日目には約 50 個と非形質転換体の 1/4 であった。*in vivo* 個体においても、非形質転換体の被害率は散布 72 日目の時点で約 40%であった。これに対し、形質転換体では約 20%と非形質転換体に比べ、約 1/3 であった。また硝酸においても非形質転換体、形質転換体ともに植物体の上位よりも下位の葉で被害が高いことが示唆された。(Fig.11、12) これにより形質転換個体には硫酸、硝酸ミストに対する耐性があることが示唆された。

また検定法については、*in vitro* の検定法において、*in vivo* とほぼ同様の結果が得られ、またピペットを使用するという簡便でかつ 2 週間という短期間で結果

が得られるという点で効率的な検定法であることが示唆された。

また得られた形質転換体を順化し、自家受精により後代を獲得した。得られた後代はカナマイシン 200mg/l を含む MS 培地にて無菌播種し、発芽後、カナマイシン 50mg/l を含む MS 培地にて継代を繰り返し、前述と同様、PCR 反応を行い、*cys1* の導入を確認した。

次に上述の検定法を用い、形質転換体の後代と非形質転換体の *in vitro* 個体において、塩酸、酢酸、リン酸、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア、水酸化ナトリウムについての特性解析を行った。塩酸、酢酸、リン酸は pH3 に、次亜塩素酸ナトリウムは 0.003% に、アンモニア、水酸化ナトリウムは pH11 にそれぞれ調整したものをを用いた。

その結果、塩酸において、非形質転換体では散布後、白色斑点数に急激な増加が見られ、散布 10 日目には約 45 個であった。それに対し、形質転換体では 10 日目には約 15 個と非形質転換体の 1/3 であった。(Fig.14)

次に酢酸において、非形質転換体では散布後、白色斑点数は増加し続け、散布 10 日目には約 70 個であった。形質転換体においても増加の傾向は見られたが、散布 10 日目には約 50 個と、非形質転換体の約 2/3 であった。(Fig.16)

次にリン酸において、非形質転換体では、散布開始後、白色斑点数は急激に増加し、散布 10 日目には約 50 個であった。それに対し、形質転換体では散布 10 日目には約 15 個と、非形質転換体の約 1/3 であった。(Fig.18)

次に次亜塩素酸ナトリウムにおいて、非形質転換体では散布後、白色斑点数は増加し続け、散布 10 日目には約 90 個であった。一方形質転換体では散布 10 日目には約 40 個と、非形質転換体の約 1/2 であった。(Fig.20)

アンモニアにおいては、葉に脱色が見られた。その被害度について、非形質

転換体と形質転換体の間にあまり差はなかった。(Fig.22)

水酸化ナトリウムにおいては、個体によってそれぞれ症状が異なるため、水酸化ナトリウムによる症状を特定することができず、特性解析を行うことができなかった。

以上の結果から、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは塩酸、酢酸、燐酸、次亜塩素酸ナトリウムに対して耐性があることが示唆された。

次に形質転換体とその後代、非形質転換体において、*cys1* コーディング領域を含む 850bp をプローブとし、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、形質転換体とその後代とプラスミドでのみ 850bp 付近にシグナルが検出され、この増幅産物が、実際に植物体のゲノム中に組み込まれた *cys1* が増幅されたものであることが証明された。(Fig.24)

次にシステイン合成酵素活性について検討した。測定はユーセフィアンらの方法に基づき行った。その結果、形質転換体とその後代では、非形質転換体の約 2 倍の高い酵素活性を示した。(Fig.25)

以上のことから、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは硫酸、硝酸、塩酸、酢酸、燐酸、次亜塩素酸ナトリウムに対して耐性があることが示唆された。これにより、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコは酸に対して耐性がある可能性が考えられる。そしてこれらの要因の一つには、システイン合成酵素活性が上がったためではないかと考えられる。

また、今回考案した検定法は、手法、検定期間において効率的な検定法であることが示唆された。

引用文献

- [1] Barroso C., Vega J., Gotor C. (1995) A new member of the cytosolic *O*-acetylserine (thiol) lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 363 1-5
- [2] Byrne C., Monroe R., Ward K., and Kredich N. (1988) DNA Sequences of the *cysK* Regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* and Linkage of the *cysK* Regions to *pstH*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 3150-3157
- [3] Currier, T.C. and E.W., Nester (1976) Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem. 66, 431-441
- [4] 浜中裕徳 監訳 (1997) 地球白書 1997-98 20
- [5] Hell R., Schuster G., and Gruissem W. (1997) An *O*-acetylserine (thiol) Lyase cDNA from Spinach. Plant Physiol. 102:1057-1058
- [6] Hell R., Bork C., Bogdanova N., Frolov I., Hauschild R. (1994) Isolation and characterization of two cDNAs encoding for compartment specific isoforms of *O*-acetylserine (thiol) lyase from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 351 257-262
- [7] 藤原邦達 著 (1992) ハンドブック 地球環境危機 2-28
- [8] 今堀和友、山川民夫 監修 (1990) 生化学辞典第2版 595-596
- [9] 金田裕一 (1997) ダイズの効率的な不定芽誘導法の確立および遺伝子導入系の開発 明治大学農学研究科農学専攻修士論文 42
- [10] 小島力 (1996) 芝草を用いた細胞融合による種間雑種の作出 明治大学農学研究科農学専攻修士論文 6
- [11] 近藤矩朗 (1994) 植物の大気汚染耐性の仕組み 植物細胞工学別冊 1 59-67
- [12] 久保友明 (1987) タバコ育種におけるバイオテクノロジー 育種学最近の進歩第28集 113-120
- [13] 森川弘道 (1994) NO_xを好む植物 化学と生物 Vol.32 No.2

- [14] 森川弘道、鎌田光宜、檜垣朝、田中俊憲、神幸夫、入船浩平 (1994) 好大気汚染物質植物の創製 植物細胞工学 別冊 1 76-86
- [15] 村中俊哉、赤間一仁、岡田清孝、町田泰則 (1992) 遺伝子導入実験法 ③ アグロバクテリウムを用いた形質転換 植物細胞工学 Vol.4 No.3 193-203
- [16] Murashige, Y. and Skoog, F., (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- [17] ミュリス K. B. (1990) 遺伝子を自動的に複製する PCR法の発見 サイエンス 16-25
- [18] Rolland N., Droux M., Lebrun M., and Douce R. (1993) *O*-acetylserine (thiol) lyase from Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaf: cDNA Cloning, Characterization, and Overexpression in *Escherichia coli* of the Chloroplast Isoform. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* Vol.300, No.1 213-222
- [19] Saito K., Miura N., Yamazaki M., Hireno H., and Murakoshi I. (1992) Molecular cloning and bacterial expression of cDNA encoding a plant cysteine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.89, pp.8078-8082
- [20] Saito K., Tatsuguchi K., Takagi Y., and Murakoshi I. (1994) Isolation and Characterization of cDNA That Encodes a Putative Mitochondrion-localizing Isoform of Cysteine Synthase (*O*-acetylserine (thiol)- lyase) from *Spinacia oleracea*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol.269, No.45 28187-28192
- [21] Saito K., Kurosawa M., Tatsuguchi K., Takagi Y., and Murakoshi I. (1994) Modulation of Cysteine Biosynthesis in Chloroplasts of Transgenic Tobacco Overexpressing Cysteine Synthase [*O*-acetylserine (thiol)- lyase]. *Plant Physiol.* 106:887-895
- [22] Saito K., Yokoyama H., Noji M., and Murakoshi I. (1995) Molecular Cloning and Characterization of a Plant Serine Acetyltransferase Playing a Regulatory Role in Cysteine Biosynthesis from Watermelon. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol.270, No.27 16321-16326
- [23] 佐治光、青野光子、海老沼宏安、松永悦子 (1994) 大気汚染耐性植物の開発 植物細胞工学 別冊 1 69-75
- [24] 佐藤昭二、後藤正夫、土居養二 編 (1983) 植物病理学実験法 90-91

- [25] 石弘之 著 (1992) 酸性雨
- [26] 島本功、佐々木卓治 監修 (1993) 植物の PCR 実験プロトコール 細胞工学別冊 45-53
- [27] 清水注 (1995) 環境要覧 1995/1996 16-26
- [28] 師山慈孝 監修 (1989) 植物病理学実験マニュアル 22-23
- [29] Southen,E. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98,503-517
- [30] 菅原十一 (1996) 最近話題の酸性雨-身近な酸性雨観察 遺伝 50 巻 4 号 99-103
- [31] 田伏岩夫 訳 (1982) 酵素反応機構
- [32] 寺田弘、筏英之、高石喜久 著 (1992) 地球にやさしい化学-生物と共存する環境を目指して 91
- [33] 遠山益 監訳 (1991) 植物分子生物学実験法 45
- [34] 内田安茂 編集人 (1991) 今「地球」を救う本 324-325
- [35] 脇本哲 監修 (1993) 植物病原性微生物研究法 17
- [36] 山田武 著 (1993) 生物実験のための統計学入門 101-109
- [37] 山田康之 編著 (1992) 植物分子・細胞工学マニュアル 187-188
- [38] 山内惇一、内田浩二 (1994) 分子細胞生物学基礎実験法 415-419
- [39] Youssefian S., Nakamura M.and Sano H. (1993) Tobacco plants transformed with the *O*-acetylserine (thiol) lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. The Plant Journal 4 (5) ,759-769
- [40] ショハブ・ユーセフィアン (1997) 遺伝子組換え植物による硫黄大気汚染物質の解毒 遺伝 51 巻 5 号 41-46

2C—09

システイン合成酵素遺伝子導入タバコの特性解析 井上真以子、Shohab youssefian¹、秋濱友也 (明治大・農、¹秋田農短・生物工学研)

(目的) コムギから単離されたシステイン合成酵素遺伝子 *l*-acetylserine (thiol) lyase gene (*cys1*) を導入した植物は、硫化水素に対して抵抗性を持つということが報告されている¹⁾。最近までにこの *cys1* の機作に関する知見はあまり得られていないものの、様々な要因に対して何らかの応答がある可能性が考えられる。これらの知見を数多く得ることは、年々深刻化する環境問題を解決していく上でも有用なことであり、興味ある研究課題である。将来は遺伝子組み換えにより汚染耐性木本植物を育成したいと考え、その第一歩としてモデル植物であるタバコを供試した。本研究では、*cys1* を導入したトランスジェニックタバコに硫酸ミストを散布し、その特性解析を行ったのでその結果を報告する。

(方法および結果) 実験材料としてタバコ (*Nicotiana tabacum* SR-1) を無菌播種し、MS 培地で培養した個体を供試した。形質転換はアグロバクテリウム感染法を用いた。菌株は *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 において pBI121 の GUS 遺伝子領域を *cys1* に置換したものをを用いた。硫酸ミストは超純水を 1 N 硫酸で pH 3 に調整した。得られたトランスジェニック個体及びコントロール個体の葉に均一になるよう硫酸ミスト 3 ml/日をピペットで 2 週間散布した。それぞれの処理区において 5 葉まで展開した培養個体を用いた。その結果、コントロール、トランスジェニック個体共に散布 3 日後に下位の葉表面の一部に白色斑点が確認された。このような可視傷害はコントロール個体では日数の経過とともに葉表面全体に拡大するとともに、可視傷害の見られる葉数は増加し、5 日後には 50% 以上の葉で斑点が確認された。トランスジェニック個体では白色斑点は確認されたものの、斑点数の急激な増加はなく、また可視傷害の観察された葉数は 25% だった。2 週間後にはコントロール個体ではトランスジェニック個体の約 3 倍の斑点数が確認され、得られたトランスジェニック個体には硫酸ミストに対する何らかの抵抗性があることが示唆された。

1) S.Youssefian et al. (1993) The Plant Journal 4(5) 759-769

植物の硝酸還元活性による環境評価手法 および
環境指標の確立に関する研究

1998年 3月

仁平純子・秋濱友也

(明治大学 農学部)

はじめに

大気汚染物質のうちで窒素酸化物については、さまざまな対策にもかかわらず依然として改善の傾向がみられない。特に冬期における大都市での窒素酸化物汚染は深刻なものになっており、人体はもとより生態系に対しても慢性的な悪影響が心配されている。

窒素酸化物の植物に対する急性障害は、硫黄酸化物や光化学オキシダントなどの大気汚染物質ほど顕著ではなく、不可視的な影響も小さいと言われているが、窒素酸化物による大気汚染が改善されない現在、窒素酸化物による植物への慢性的、不可視的な影響を明らかにすることは、新たな環境評価法の開発、また生態系への影響を予測するうえで役立つものと思われる。

植物は主に窒素源を硝酸態窒素の形で能動輸送により根から取り込む。取り込まれた硝酸イオンは硝酸還元酵素により亜硝酸イオンにさらに、亜硝酸還元酵素によりアンモニウムイオンへと還元され、アミノ酸、蛋白質へと代謝されていく。硝酸還元は窒素代謝の第一段階であり、窒素肥料や光などの環境条件にも影響を受けることが知られているため、この硝酸還元活性に対する窒素酸化物の影響について明らかにすることは重要であり、硝酸還元活性は環境評価のための生化学的植物指標として利用できる可能性がある。

カボチャの芽生えを用いて NO_2 ガスによる硝酸還元活性の影響については、硝酸還元活性の調節が蛋白質レベルで制御されていることを示唆する結果が報告されている。

窒素酸化物による大気汚染は、特に冬期に深刻であることから、常緑木本植物に対する影響について知ることが必要であると思われる。そこで本研究では、常緑木本植物を用いて硝酸還元活性の測定が可能であるかどうか、さらに硝酸還元活性は窒素肥料や光などの環境条件に影響を受けやすいことが知られており、環境評価に利用できる可能性も考えられることから、野外に生育している木本植物について硝酸還元活性の測定を試み、大気汚染の植物指標として適切であるかどうかを検討した。

また、今後木本植物を植物指標として利用することは重要であるが、木本植物を新たに栽培するには時間がかかるため、草本植物を用いて、硝酸還元活性の測定による植物指標を確立するために、窒素肥料を硝酸態およびアンモニア態で与えることにより窒素酸化物に対する感受性の違いを導き、感受性の高い指標植物を開発するための基礎実験を行った。

本研究は1993年度、明治大学大学院博士後期課程農学研究科農学専攻、仁平純子の博士学位請求論文、大気汚染が植物の硝酸還元活性に及ぼす影響とその評価に関する研究として発表した、第2部、第2章の部分である。

材料と方法

1. 野外における常緑木本植物の硝酸還元活性測定法の検討

材料として野外、特に公園や庭などに生育している常緑木本植物であるサザンカとサンゴジュを用いた。

硝酸還元活性の測定法にはin vivoおよびin vitro測定法があるが、in vivo測定法のほうが実際の葉の活性に近いことが知られているうえ、測定が比較的簡易であることから、活性測定にはin vivo測定法を用いた。

測定方法は葉を採取後、葉から直径1 cmのディスクを打ち抜き、三角フラスコ中でディスクに硝酸イオンを与え、暗黒下30℃で反応させ、ディスクから放出される亜硝酸イオンの量を測定し、in vivoでの硝酸還元活性とした。

2. 硝酸還元活性の測定による植物指標の確立のための基礎実験

材料としてカボチャ (*Cucurbita maxima* Duch.) を用いた。はじめにカボチャの種子をピートバンに播き、発芽した後に鹿沼土あるいはハイドロコーンを入れたポットに植えかえた。その際根は蒸留水で洗浄した。植えかえたカボチャの幼植物は一昼夜蒸留水のみを与えた、その後硝酸態あるいはアンモニア態窒素肥料を与えて一定期間育成させた後に、in vivoでの硝酸還元活性を測定した。硝酸態あるいはアンモニア態窒素肥料については、ロングアシュトンの培養液の組成を参考に調整した。培養液の組成は表1に示した。その他の条件はすべて自然条件で行なった。

結果

1. 野外における常緑木本植物の硝酸還元活性測定法の検討

はじめに、木本植物においても草本植物であるカボチャと同様に、硝酸還元活性が *in vivo* 測定法により測定することができるのかどうかを検討するために、一般に公園などによくみられるサザンカについて硝酸還元活性の測定を試みた。その結果、サザンカでもカボチャにおける硝酸還元活性の測定法とほぼ同じ方法で測定することができた。

次に、サザンカ以外の他の常緑木本植物でも硝酸還元活性の測定ができるのかどうかを 16 種類の常緑木本植物を選んで検討した (表 2)。表中の吸引時間は硝酸カリウムを含む緩衝溶液を減圧下で吸引するときの時間で、8 種類の植物では約 6～12 分で完全に緩衝溶液を浸透させることができた。さらに亜硝酸イオンの発色状況も正常であることからこの 8 種類の木本植物については、硝酸還元活性の測定が可能であることが明らかになった。ビワ、クスノキ、ツツジ、アセビについては、12 分以上吸引しても葉のディスクに緩衝溶液が浸透しない部分があった。したがって緩衝溶液の浸透が不完全なために亜硝酸イオンの発色に誤差を生じやすいことがわかった。ネズミモチ、アオキは葉のディスクに緩衝溶液は浸透するが、ネズミモチは反応後の反応液が薄緑色になり、吸光度を正確に測定できなかった。アオキは亜硝酸イオンが検出されなかった。また、シイ、ゲッケイジュでは、緩衝溶液がまったく浸透せず、亜硝酸イオンも検出されなかった。このように、16 種類のうち後の 8 種類については硝酸還元活性の測定が不可能であった。

野外の植物を用いる場合、植物を採取してから活性測定を開始するまでに時間がかかるため、採取後時間が経過するのに伴いどの程度活性が変化するかを検討した。活性測定の可能な 8 種類の植物の中から採取可能な 5 種類を選び、採取した直後、1 時間後、2 時間後に活性を測定した。その結果、5 種類ともに 2 時間までは活性にほとんど変化のないことが明らかになった (図 1)。草本植物であるカボチャについても同様な実験を行なった結果、時間が経過するのに伴い活性の低下がみられた (図 2)。

同じ公園内に植えられているサザンカの個体により硝酸還元活性に差があるかどうか調べた結果、季節による変化はあるが、植えられている場所による差はほとんどみられなかった。また、一本のサザンカにおける葉の位置によって活性に差があるのかどうか調べた結果、上・中位の部分の枝では活性に差はなかったが、下の枝に付いている葉では活性が低いことがわかった。以後の実験では、できるだけ誤差を生じないようにするため木の中位の位置から採取するように心がけた。さらに、一本の枝に付いている葉の硝酸還元活性に位置による違いがあるのかどうかを調べた結果、枝の先端部分は活性が高かったが、それ以外では活性に差がなかったために、一本の枝の先端部の葉を除いてそれ以外の葉を活性測定に用いた。

2. 野外における常緑木本植物の硝酸還元活性の季節変化に関する検討

野外の常緑木本植物の硝酸還元活性の測定が可能であったことから、このような常緑木本植物の硝酸還元活性が 1 年を通じてどのように変化するかを明らかにするために、市

街地の公園に植えられているサザンカとサンゴジュを選び、硝酸還元活性の季節的変化を調べた。

サザンカおよびサンゴジュの葉を約1～2週間隔で、9時（午前）、12時（正午）15時（午後）に採取し、in vivoでの硝酸還元活性を測定した。まず、様々な採取時期における時刻による硝酸還元活性の変動について検討するために、一日の活性の変動を図に示した（図3、図4）。サザンカ、サンゴジュともに硝酸還元活性の高いときのほうが採取時刻による変動が大きく、活性の低いときには変動が小さかった。さらに一日の変動が測定日によって異なっていることがわかった。

次に、図5にサザンカの葉の硝酸還元活性を1992年5月から1993年5月までの1年間測定した結果を示した。1年間を通して全般的に春期に活性が最も高く、夏期に一度低下し、秋期から冬期にかけて徐々に増加して、再び春期になって高くなり、新しい葉が出るころに古い（前年度）葉の活性が低下した。図6はサンゴジュについてサザンカと同様に硝酸還元活性を測定した結果である。サンゴジュでは春期に活性が最も高く、夏期から秋期にかけて低くなり、冬期になって11～12月に若干上昇し、1月に再び活性が低下して、また春期になって上昇した。しかし、春期になってもサザンカほどは活性が高くならなかった。

さらに、サザンカについては1993年5～11月に活性を測定した結果を図7に示した。この結果は新しい葉が出た時点で1993年度の測定を開始して図にまとめたものである。1992年度に比べて、夏期の活性低下の時期が短く、秋期になっても活性の上昇が明らかではなかった。

3. 硝酸還元活性の測定による植物指標の確立のための基礎実験

はじめに栽培法の検討を行なった。培養土として鹿沼土およびハイドロコーンを選び、ポットについては1/5000aワグナーポットを使用した。それぞれの培養土をポットに播種後6日目のカボチャの幼植物を植た。硝酸態あるいはアンモニア態窒素肥料はワグナーポットの排水口に栓をして、それぞれ1000mlを直接ポットの中に入れて与え、2～3日ごとに培養土を交換しながら育成させた後、播種後21日目の第一葉、25日目の第二葉、28日目の第三葉について硝酸還元活性を測定した（表3）。その結果、その結果、鹿沼土で栽培したカボチャのほうが、硝酸態とアンモニア態窒素肥料による活性の変化が大きかったので、以後の実験では主に鹿沼土を用いることにした。

次に、ポットを4号鉢に代えて、同様な実験を行なった。培養液250mlとポットが入る深目の受皿を用意して、受皿にポットを置き、培養液を鉢の上から注ぎ入れ、2～3日ごとに新しい培養液と交換した。播種後16日目と20日目のカボチャの第一葉と第二葉について硝酸還元活性を測定した（表4）。16日目と20日目ともに、硝酸態で育てた場合は活性が高く、アンモニア態で育てた場合には活性が低かった。

さらに、同様な実験を繰り返し行なったが、9月になると硝酸態とアンモニア態窒素肥

料で育てたもの間で成長に違いが生じた。硝酸態で育てたカボチャでは生育がよいが、アンモニア態では葉も小さく、色も硝酸態で育てたものよりも薄かった。

次に、植えかえて1週間は蒸留水のみ与え第一葉が出た時点で成長が同じカボチャに大して、硝酸態とアンモニア態窒素肥料をそれぞれ与え、播種後21日目のカボチャの第一葉、第二葉、第三葉について硝酸還元活性を測定した(表5)結果、成長は同じであるが活性に変化を生じた。

ポットを1/5000 aに代えて、植えかえた直後から硝酸態とアンモニア態窒素肥料をそれぞれ与え育成したが、4号鉢と同様に成長に差が生じた。硝酸還元活性を測定した結果は表6に示した。硝酸態で育てたカボチャでは、新しい葉になるほど活性が高くなったが、アンモニア態では葉によって活性はほとんど変化しなかった。また、アンモニア態では夏期に測定したときよりも活性が高くなった。

考察

はじめに硝酸還元活性の *in vivo*測定法が木本植物でも可能かどうかを野外に生育している常緑木本植物の中からサザンカを実験材料に選んだ。この理由として、サザンカは公園や生け垣によく植えられていて、さらに葉が均一に揃っていて採取しやすいことなどがあげられる。野外の植物を用いる場合、均一な材料を手に入れることは非常に難しいのでその点においても目的に適っている。

まず、サザンカにおいても硝酸還元活性の *in vivo*測定法が適するかどうかを検討した結果、ほとんど草本植物と同じ条件で測定できることが明らかになった。したがって葉の硬い木本植物においてもこの方法が適用できるものと考えられる。

次に、サザンカ以外の木本植物においても硝酸還元活性の *in vivo*測定法が適用できるかどうか確かめた。実験場所から比較的近い公園などで採取できる常緑木本植物を16種類選んで活性の測定を試みた。今回の結果から16種類のうち8種類についてはサザンカと同様測定が可能であったことから、これら8種類の常緑木本植物は野外の調査に使えるものと考えられる。他の8種類の植物では、葉中に硝酸カリウムを含む緩衝溶液を浸透させるときに、ほとんどは浸透が不十分であり、シイ、ゲッケイジュではまったく浸透しなかった。さらに反応液中に亜硝酸がまったく放出されない植物もあり、これは葉の構造などに原因があるものと考えられる。

野外から植物を採取する場合、採取してから実験を開始するまでに時間がかかることが多く、その間に活性が低下すると正確な値を出すことができない。そこで、採取後の時間経過に伴う活性の変化を調べた結果(図1)、2時間まではほとんど活性に変化がないので、採取場所で採取してから戻るまでに2時間以内の範囲まで広げることができる。カボチャでは1時間で活性の低下が著しいため、この点からも野外調査には木本植物が適していることがわかった。

野外調査のための予備実験を各種行ってきたが、採取場所、採取後の経過時間、植物における採取部位などほぼ確立できたので、硝酸還元活性の測定可能な8種類の中からサザンカ、サンゴジュを実験材料として選び、サザンカは1992年5月から1993年11月、サンゴジュについては1992年5月から1993年6月までの期間、硝酸還元活性の測定を定期的に行なった。サンゴジュは1993年6月の時点で虫害によって採取できる葉がなくなったため、測定を中断しなければならなかった。

季節を通して活性の測定を継続した結果、サザンカ、サンゴジュともに春期に最も活性が高かった。これは、この時期の葉はまだ出たばかりの新葉であることから、葉を成長させるために窒素代謝が盛んであるものと思われる。夏期になると、活性は最も低下する。特にサザンカの場合、8月後半から9月前半にかけて活性が著しく低下した。これが何に原因するののかを調べるために、気象データとの比較検討を行なった。気象データから、気温、湿度、日射量をそれぞれ図に示した(図8、9)。気温、湿度、日射量に関しては活性変動の直接の原因となるような傾向はみられなかったが、降水量では1992年7月中旬9月中旬にかけて非常に少なく、この時期にサザンカの硝酸還元活性も低下していた。

したがって、この著しい活性低下は土壤の乾燥が大きく影響しているものと考えられる。1993年の結果からはこのように顕著な傾向はみられなかったが、8月24日に一時活性が低下したときには、2週間雨が降らなかった後の活性を測定した結果であり、このことからサザンカの硝酸還元活性は乾燥により影響されることが示唆された。サングジュに関しては、サザンカとは異なり降水量との間に顕著な関係は認められなかった。秋期から冬期にかけてサザンカでは活性が除々に上昇し、3月には測定を開始した時点の5月の活性まで上昇し、新葉が出る5月下旬に再び活性の低下がみられた。このときにはすでに木全体が新葉に覆われていた。したがって、古葉で活性が上昇したのは新葉を展開させるためであると考えられる。サングジュでは夏期から秋期にかけて全体的にゆるやかな活性の上昇で、むしろ1月から3月中旬にかけて活性が低下した。この場合、気象データから気温の低下が関係していることが予測される。3月下旬から気温が上昇するとともに活性も上昇していることから、サングジュでは活性変動に気温が関与しているものと思われる。また、この時期のサザンカでも気温が上昇するとともに硝酸還元活性も上昇している。したがって、サザンカ、サングジュともに、この時期の気温の上昇が活性変動に関わりをもっている可能性が考えられる。

また、一日の硝酸還元活性の経時変化から、活性の高い場合に変動が大きく、さらに一日の変化が測定日によっても異なっている。この場合には、一日の気象状況（日射量、気温など）が深く関わっていると考えられる。

これらの考察は気象データから推論したものであり、他のも種々の環境条件が関与していると考えられ、今後は他の環境条件からも植物の硝酸還元活性との関係を詳しく検討する必要がある。

さらに、二酸化窒素の一年間の変動から、夏期に低く、冬期に高くなる傾向があるので植物の硝酸還元活性の一年間の変化とも関係があるとも考えられる。しかし、この点に関しては現在のところ明らかな根拠はないが、これらの関係にも考慮しながら窒素酸化物による影響について検討する必要がある。

野外の常緑木本植物を用いて硝酸還元活性による環境評価について検討したが、今回の結果からは硝酸還元活性と大気環境との関わりを予測することができなかった。野外の木本植物を植物指標として利用することは重要であるが、大気環境を評価するには気象条件や土壤条件など環境条件に左右されることが多く、検討すべき問題を残している。

硝酸還元活性は土壤条件により影響される。植物は主に硝酸態窒素を窒素源として根から取り込むため、硝酸還元活性は窒素代謝において重要な役割を果たしている。また、硝酸還元酵素は硝酸イオンにより誘導されることが知られているので、窒素肥料としてアンモニア態窒素で与えると窒素代謝の硝酸から亜硝酸への代謝を触媒する硝酸還元酵素の活性が低下する可能性が考えられる。そこでアンモニア態で育てた植物を NO_2 ガスに暴露すると、気孔から吸収された NO_2 ガスが硝酸イオンと亜硝酸イオンに変わり、この硝酸イオンにより硝酸還元酵素が誘導され、活性が上昇する可能性がある。さらに、硝酸態とアンモニア態窒素で育てた植物を NO_2 ガスに暴露した場合の感受性に違いがあることが

報告されているので、これを植物指標として利用できる可能性が考えられる。

そこで、短期間で栽培できるカボチャを用いて、硝酸態とアンモニア態窒素で育てた場合の硝酸還元活性の変化について検討した結果、明らかに硝酸態とアンモニア態では硝酸還元活性に差を生じたことから、アンモニア態窒素を与えることにより窒素代謝のうちの硝酸からアンモニアへの経路が弱められている可能性が示唆された。また、通常窒素源を硝酸態窒素で取り込むカボチャでも、アンモニア態窒素を与えることにより硝酸態で育てた場合と同様に生育することが明らかになった。さらに、同様な実験を繰り返したが、9月を過ぎた頃から硝酸態とアンモニア態で成長にも差が生じたため、培養液を与える時期またポットの大きさなど変えて栽培方法の検討を試みた。その結果は、活性にも成長にも差を生じた。今回は栄養以外すべて自然条件で行なったため、気象条件がかなり影響しているものと思われる。今後はこれらの条件を一定にした場合についても検討する必要がある、カボチャ以外の植物についても同様な実験を行い、特にアンモニア態窒素を与えることにより硝酸還元活性が弱められる植物を確実に栽培できるようにすることがこれからの課題である。

まとめ

本研究では、植物の硝酸還元活性による環境評価手法の検討を行なうにあたり、野外に生育する常緑木本植物を用いて硝酸還元活性のin vivo測定法の検討および活性を定期的に測定し、1年間の季節変化を調べた。その結果、活性の変動には気象条件（降水量、気温）が影響している可能性が明らかになった。しかしながら、今回は大気環境（窒素酸化物）を評価することはできなかった。

さらに、大気環境（窒素酸化物）を評価するためには、大気汚染に対して感受性の高い植物をつくりだすことが重要であると考え、硝酸還元が土壌条件により影響を受けるという性質を利用して硝酸態とアンモニア態で植物を生育し、硝酸還元活性の変化から大気環境の評価を試みるための基礎実験を行なった。本実験では、硝酸態とアンモニア態で植物を生育するための栽培方法の検討しかできなかったが、硝酸態とアンモニア態では明らかに活性に変化を生じた。

これまでに大気汚染に対する植物影響の研究はかなり行なわれているが、実験材料として草本植物を対象したものが多く、今回基礎実験に用いたカボチャも栽培に時間がかからない、均一に育てやすいなどの利点が多く、大気汚染による影響を研究するのにも適しているが、冬期に深刻な影響を与える窒素酸化物の場合には常緑木本植物が実験材料として適しているのではないかと考えた。本来一定条件で育てた植物を用いるべきであるが、木本植物を均一に栽培するには非常に時間がかかるため、まずは野外に生育する常緑木本植物を実験材料とした。野外の植物は、気象条件、土壌条件などの種々の環境条件により左右されやすく、大気環境を評価するのはかなり難しいと思われるが、硝酸還元活性が木本植物でも測定できることが明らかになったので、さらに検討を重ねれば、環境評価に利用できる可能性が考えられる。

窒素酸化物による大気汚染がますます深刻になっている現在、窒素酸化物にたいして感受性の高い植物指標を開発することは非常に重要である。今回の基礎実験ではカボチャを用いたが、将来的には木本植物による植物指標の開発も重要な課題である。

表1 硝酸態およびアンモニア態培養液の組成

多量要素				微量元素 (アンモニア型・硝酸型共通)			
窒素の形態	化合物	濃度		化合物	濃度		
		g/l	mM		g/l	mM	
硝酸型	KNO ₃	0.404	4	クエン酸鉄 (5水化物)	0.0335	0.1	
	Ca(NO ₃) ₂ (無水物)	0.656	4		MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.00223	0.01
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.368	1.5		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00029	0.001
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.208	1.33		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00025	0.001
アンモニア型	K ₂ SO ₄	0.348	2	H ₃ BO ₃	0.0031	0.05	
	CaCl ₂ (無水物)	0.444	4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00012	0.0005	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.368	1.5	NaCl	0.0058	0.1	
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.478	1.33	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.000056	0.0002	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.528	4				

表 2 常緑樹木葉の in vivo における硝酸還元活性 (NR 活性) 測定の可否

樹木種	サザンカ	サンゴジュ	マサキ	ミカン	チャノキ	トウチク	ツバキ	トベラ
吸引時間	6~12分	6~12分	6~12分	6~12分	6~12分	6~12分	4~12分	6~12分
NO ₃ ⁻ 浸透状況 ¹⁾	○	○	○	○	○	○	○	○
NO ₂ ⁻ 発色状況 ²⁾	○	○	○	○	○	○	○	○
測定可否	○	○	○	○	○	○	○	○
樹木種	ビワ	クスノキ	ツツジ	アセビ	ネズミモチ	アオキ	シイ	ケヤク
吸引時間	12分以上	12分以上	12分以上	12分以上	4~12分	6~12分	12分以上	12分以上
NO ₃ ⁻ 浸透状況	△	△	△	△	○	○	×	×
NO ₂ ⁻ 発色状況	△	△	△	×	×	×	×	×
測定可否	×	×	×	×	×	×	×	×

- 1) 基質 (NO₃⁻) を含む緩衝液を葉中に浸透させたときの浸透状況
 ○: 葉中に完全に浸透した △: 浸透しない部分がある ×: まったく浸透しない
- 2) 亜硝酸イオン (NO₂⁻) の吸光度を測定する際に、発色試薬を加えたときの発色状況
 ○: 発色が正常 △: 発色が不完全 ×: 発色しない

表 3 硝酸態・アンモニア態窒素肥料で生育した場合のカボチャの硝酸化元活性の変化 (1993年7月測定)

測定部分	測定項目	土壌-培養液			
		鹿沼土 -NO ₃ ⁻	鹿沼土 -NH ₄ ⁺	ハイドロソーン -NO ₃ ⁻	ハイドロソーン -NH ₄ ⁺
第一葉 播種後21日目	葉生重量(g)	1.100	1.105	1.020	0.965
	NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	2.90	0.60	5.49	2.53
第二葉 播種後25日目	葉生重量(g)	1.185	0.799	1.607	1.217
	NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	4.61	0.27	3.26	1.88
第三葉 播種後28日目	葉生重量(g)	1.447	1.683	1.864	1.421
	NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	5.39	0.53	2.17	2.10

表4 硝酸態・アンモニア態窒素肥料で生育した場合のカボチャの硝酸還元活性の変化 (1993年8月測定)

測定部分	播種後の日数	測定項目	培養液	
			$\text{NO}_3^- - \text{N}$	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$
第一葉	16日	葉生重量(g)	1.118	0.938
		NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	4.63	0.60
第二葉	16日	葉生重量(g)	0.700	0.733
		NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	6.14	1.04
第一葉	20日	葉生重量(g)	1.524	1.728
		NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	5.01	0.37
第二葉	20日	葉生重量(g)	1.277	1.789
		NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	6.20	0.46

表 5 硝酸態・アンモニア態窒素肥料で生育した場合のカボチャの硝酸還元活性の変化 (1993年9月測定)

測定部分	測定項目	培 養 液	
		$\text{NO}_3^- - \text{N}$	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$
第一葉	葉生重量(g)	0.930	1.043
	NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	7.10	3.46
第二葉	葉生重量(g)	1.872	1.432
	NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	7.26	3.27
第三葉	葉生重量(g)	1.597	1.359
	NR活性 ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{fr}\cdot\text{wt}$)	7.92	3.65

カボチャを鹿沼土に植えかえて1週間蒸留水で育てた後に硝酸態・アンモニア態窒素肥料をそれぞれ与えた。播種後21日目に活性を測定した。

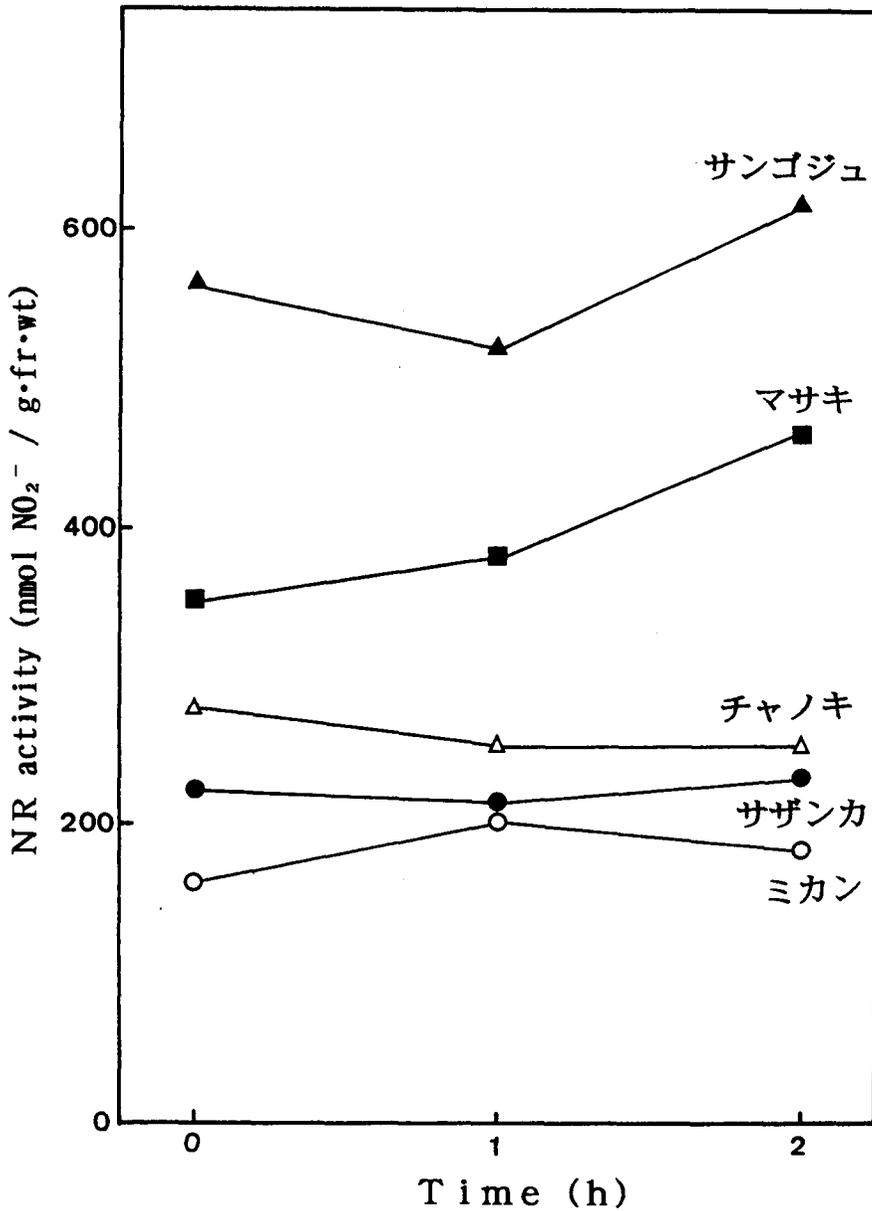


図1 植物採取後の経過時間による硝酸還元活性の変化
(木本植物)

野外から植物を採取し、紙袋の中に葉を入れ、放置した後に活性を測定した。

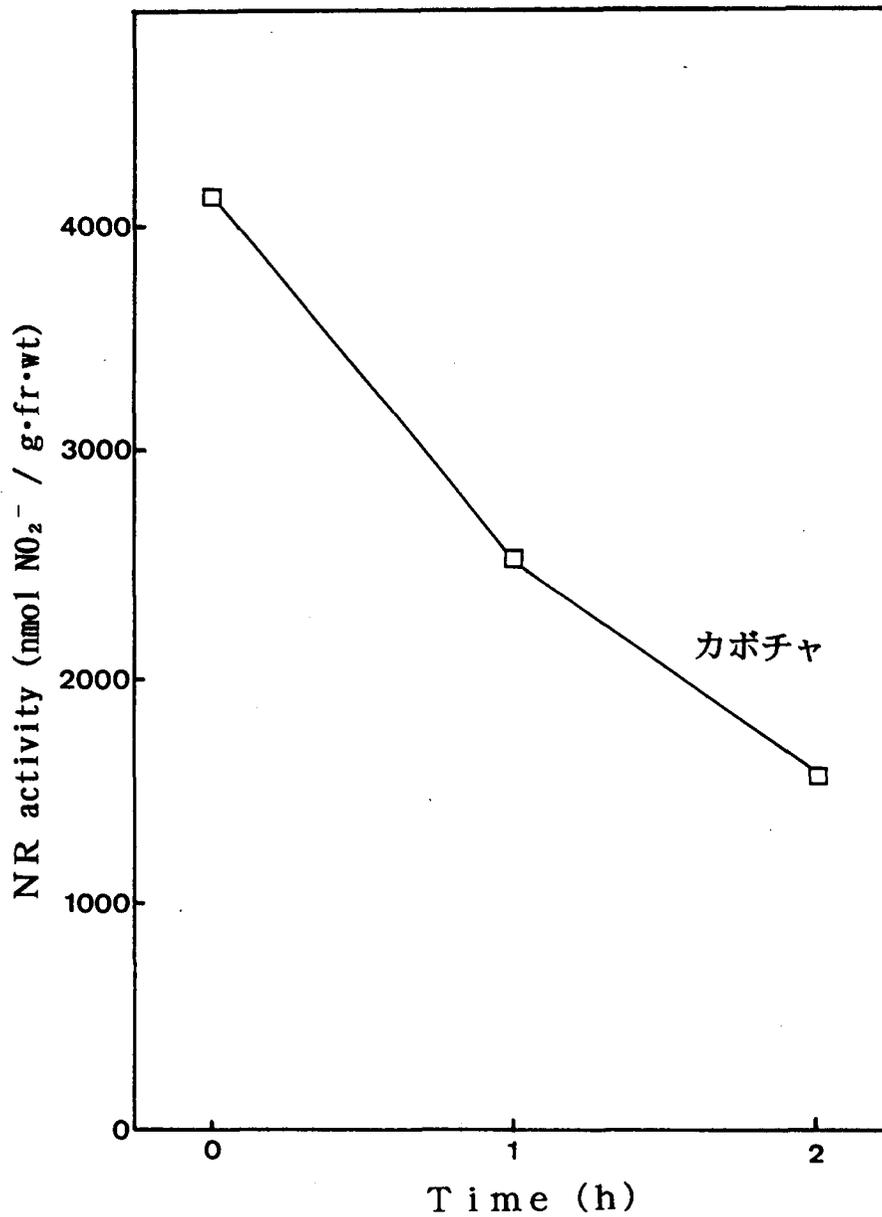


図2 植物採取後の経過時間による硝酸還元活性の変化
(カボチャ)

木本植物と同様にした後、活性を測定した。

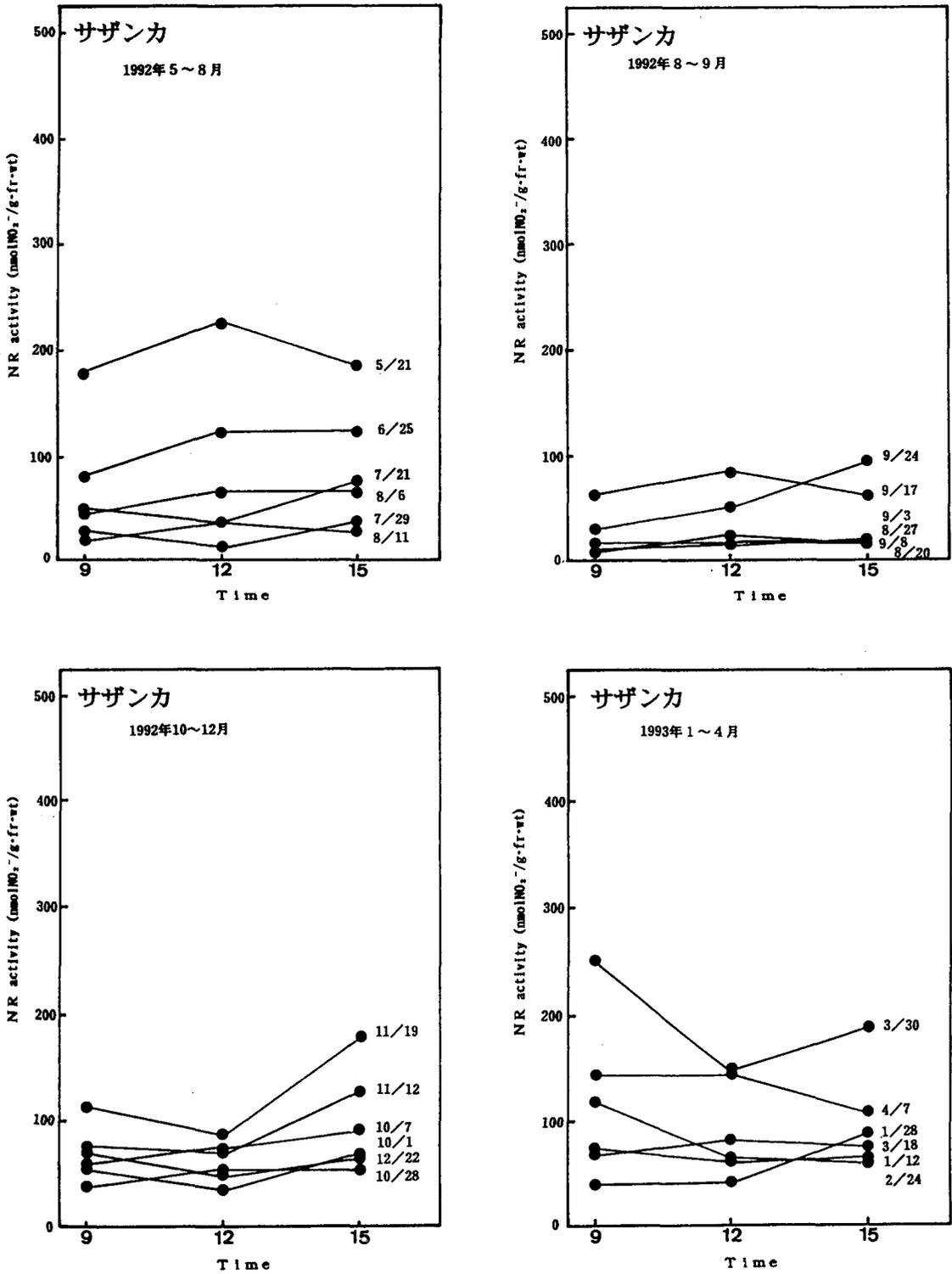


図3 採取時刻による硝酸還元活性の変化

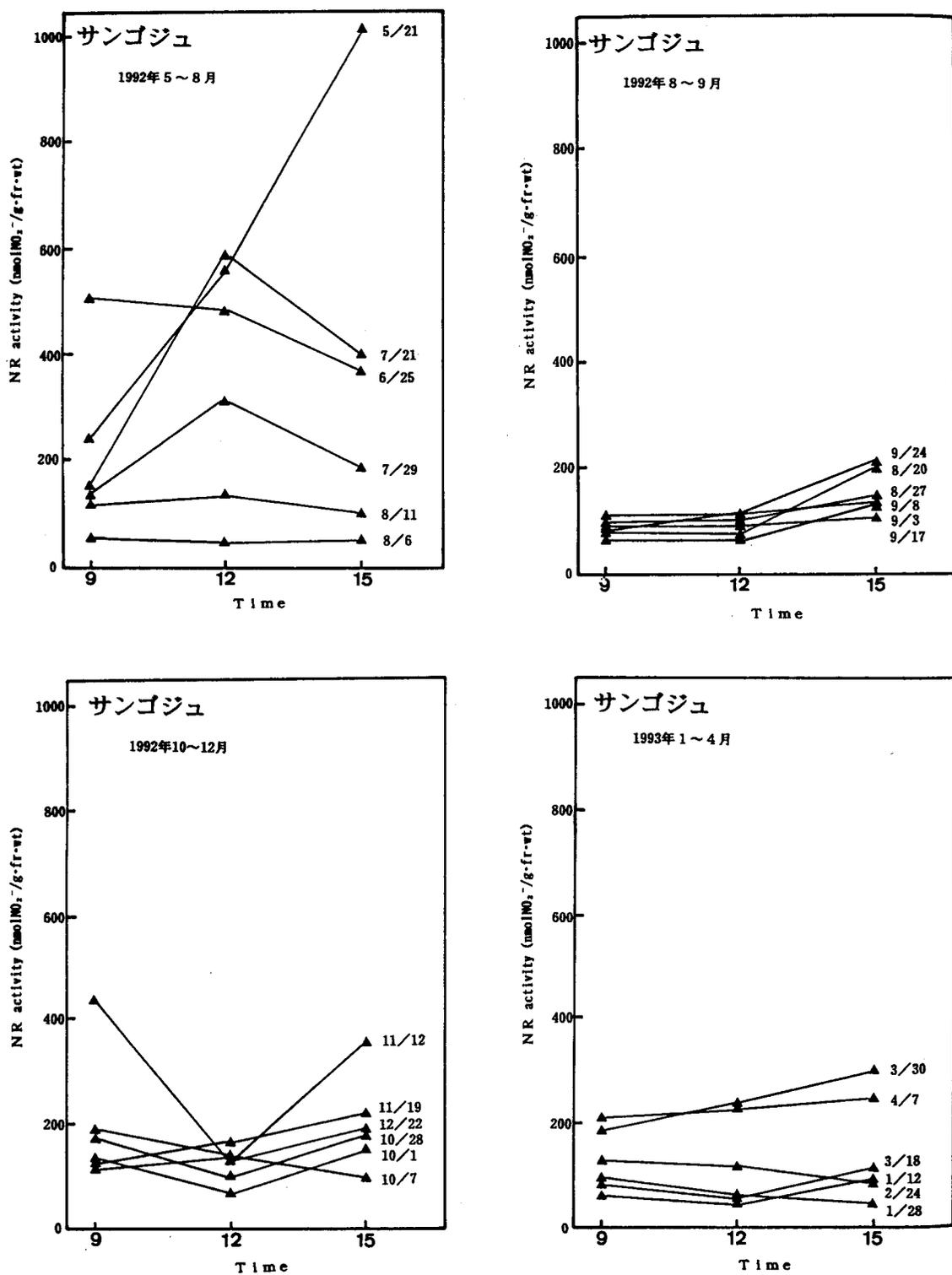


図4 採取時刻による硝酸還元活性の変化

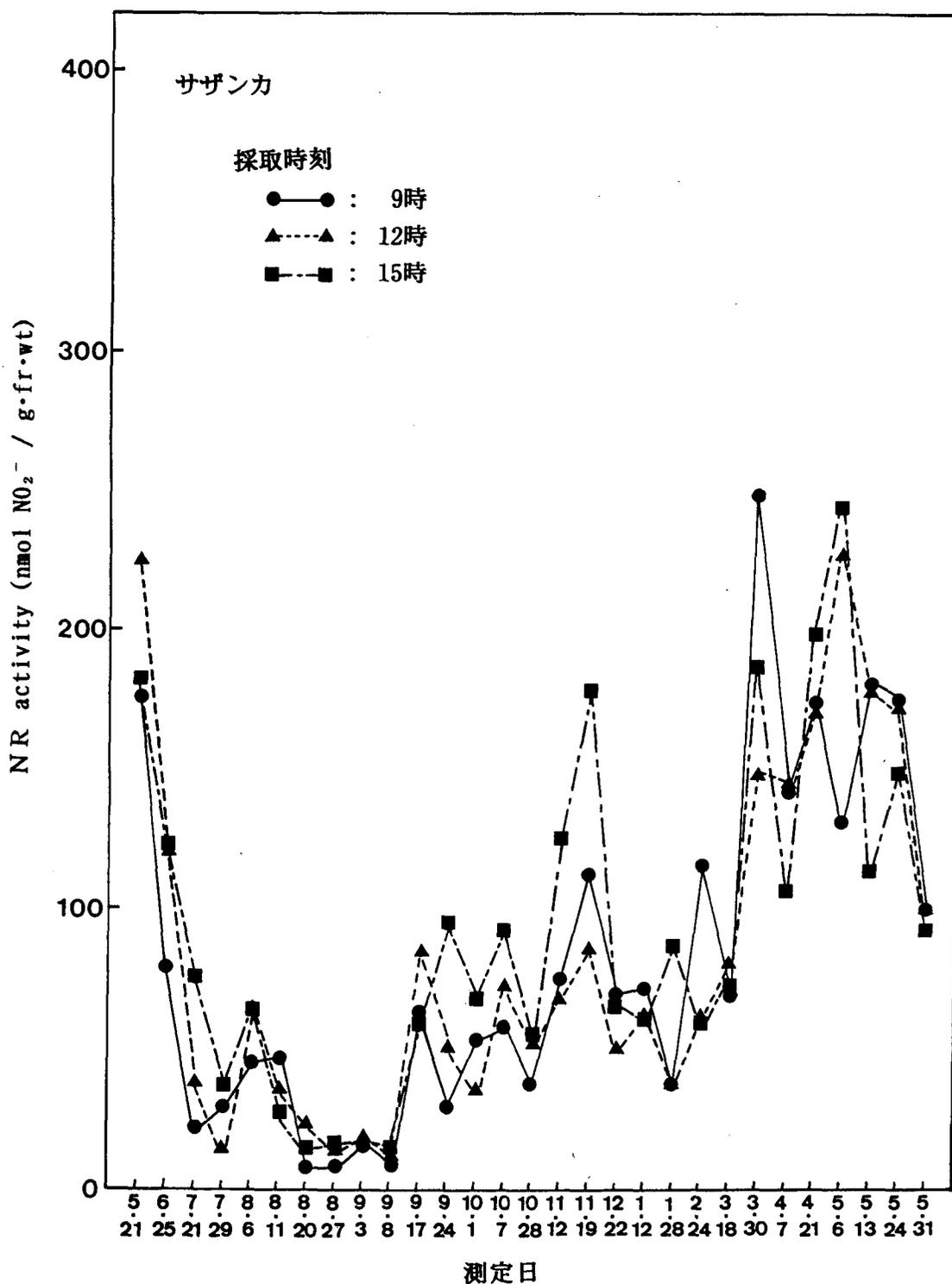


図5 硝酸還元活性の季節変化 1992年5月～1993年5月

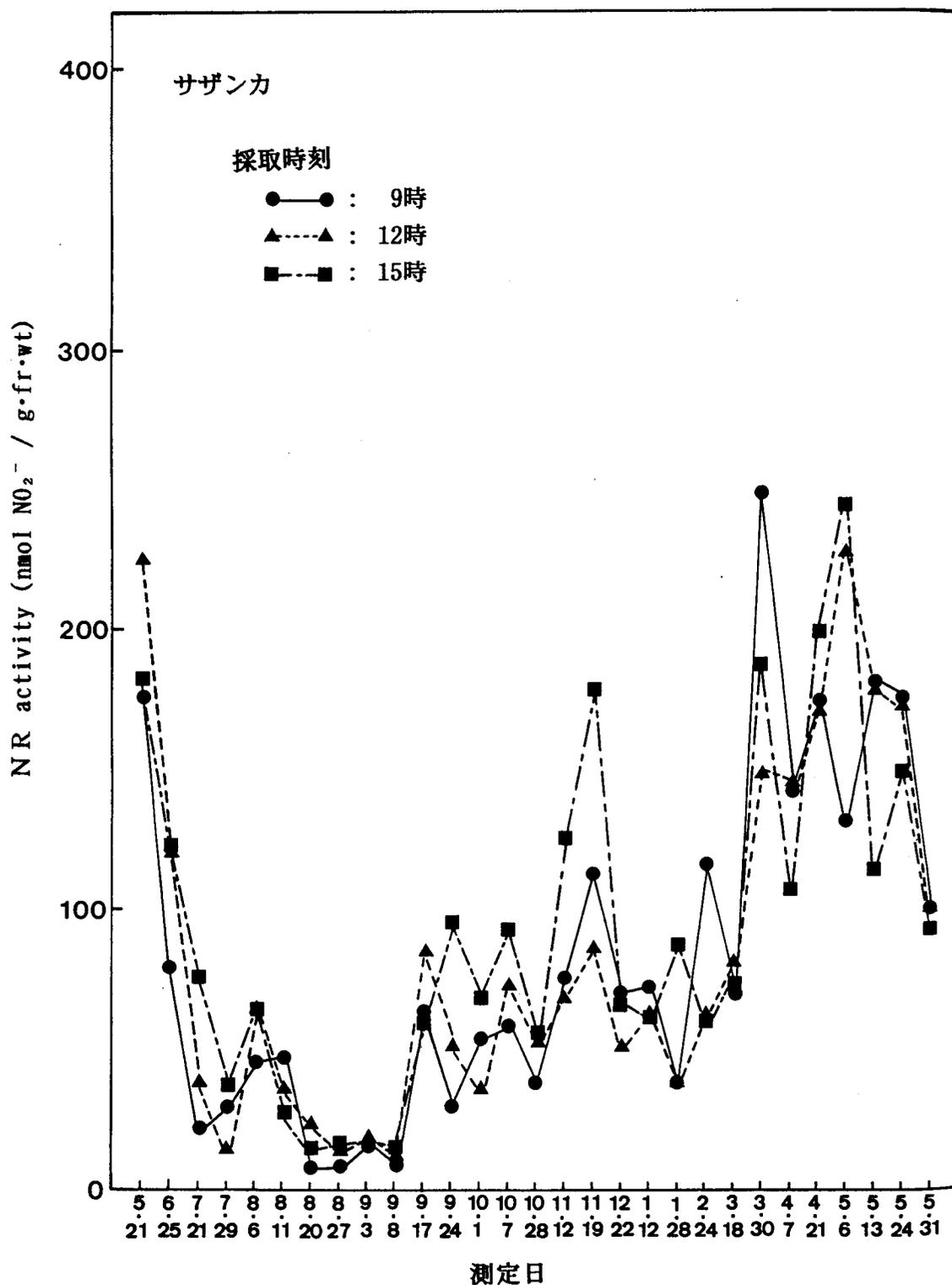


図5 硝酸還元活性の季節変化 1992年5月～1993年5月

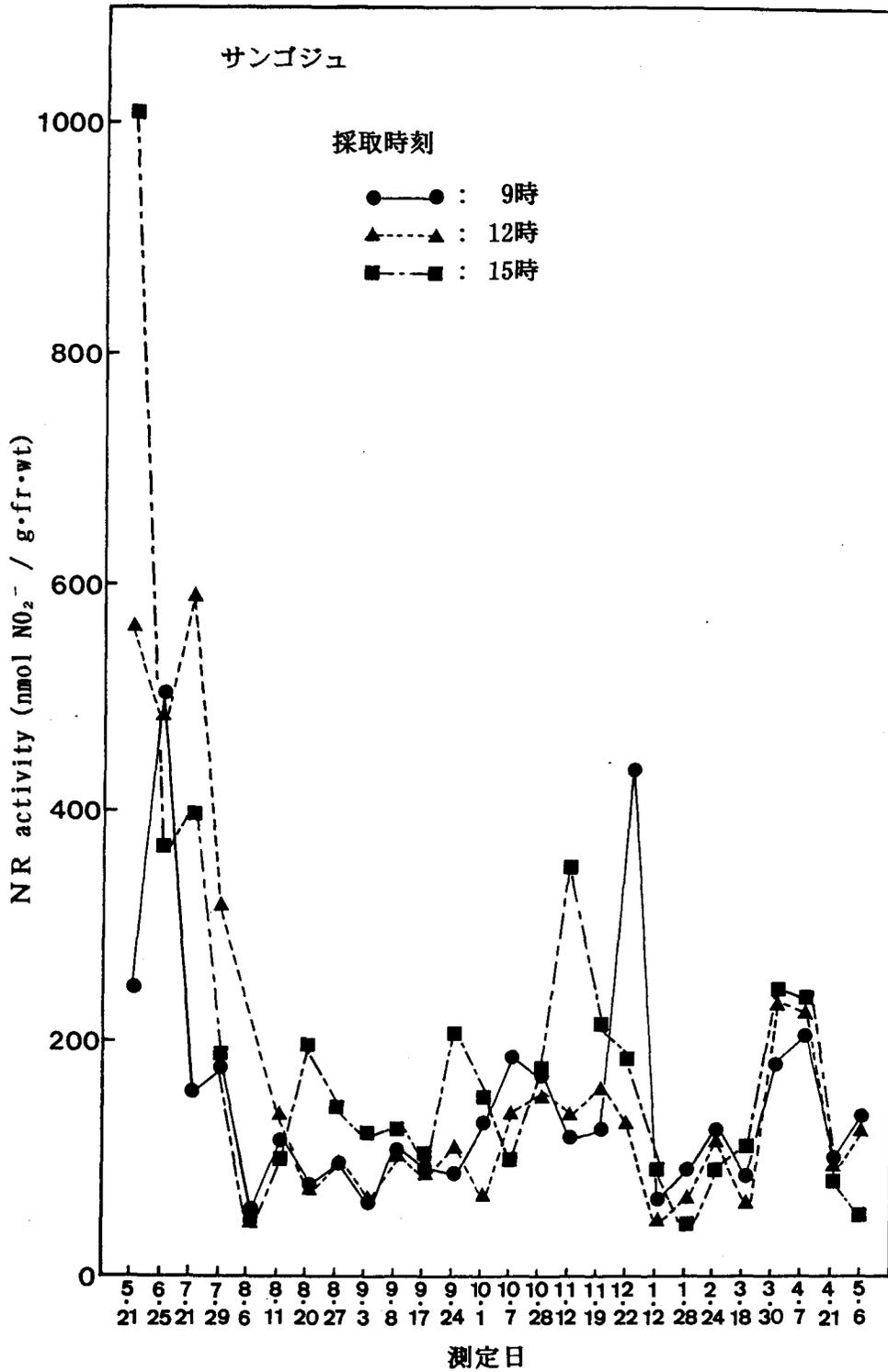


図6 硝酸還元活性の季節変化 1992年5月～1993年5月

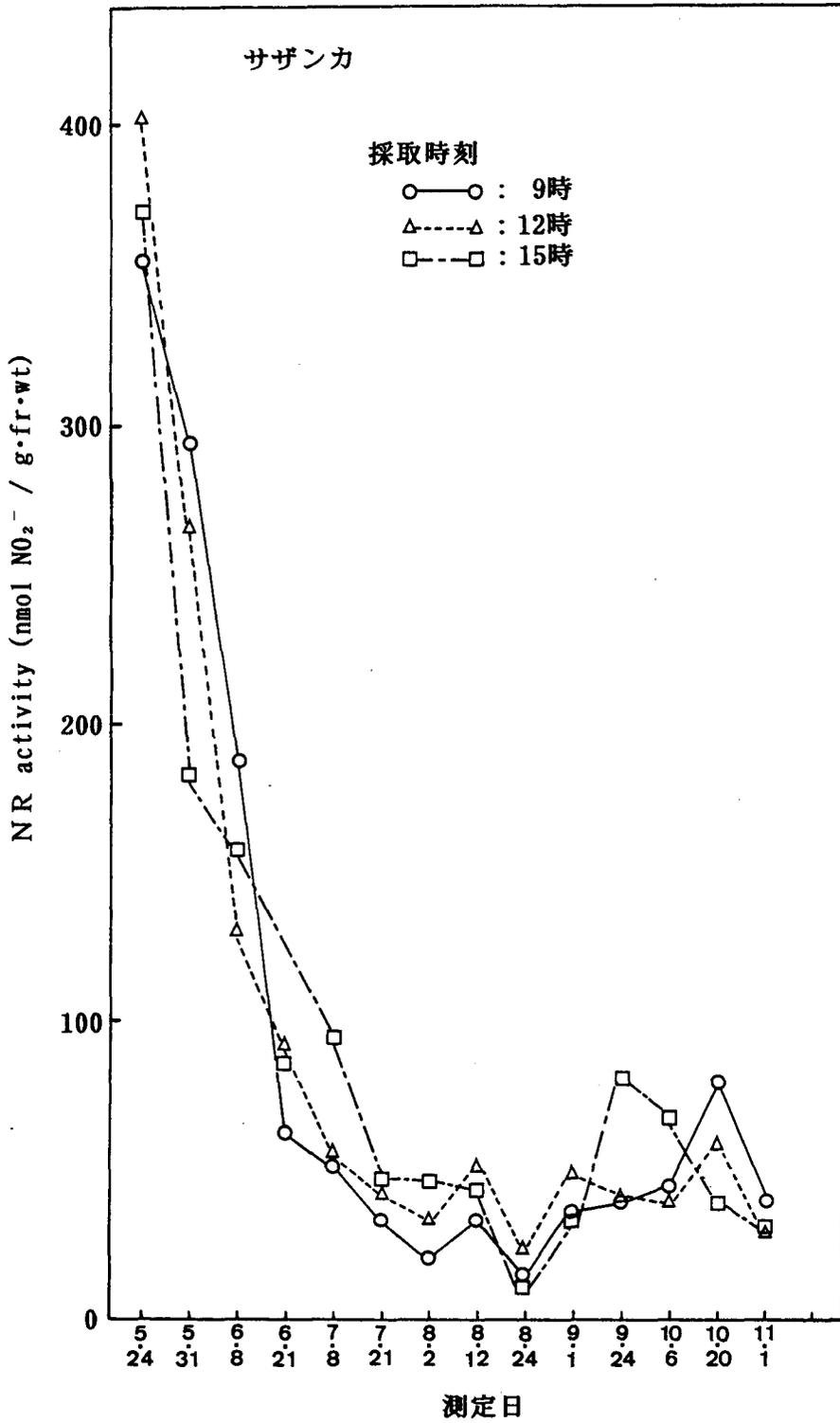
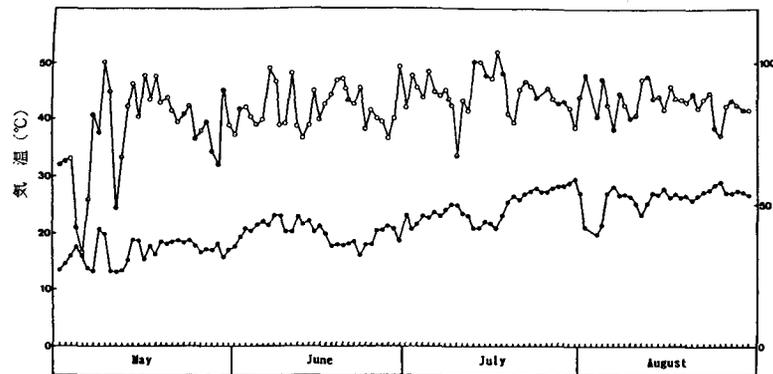
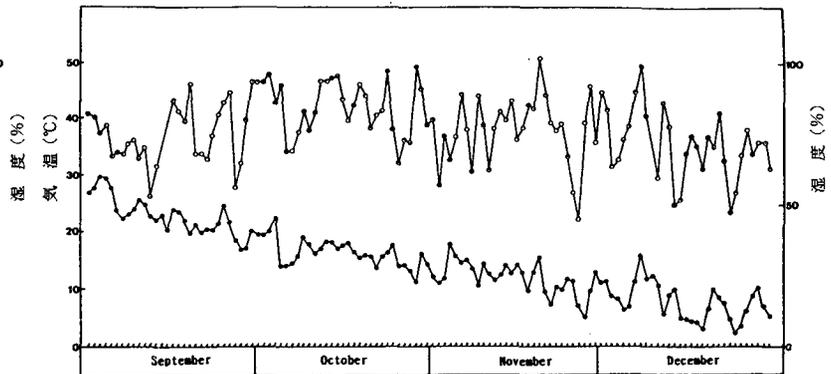


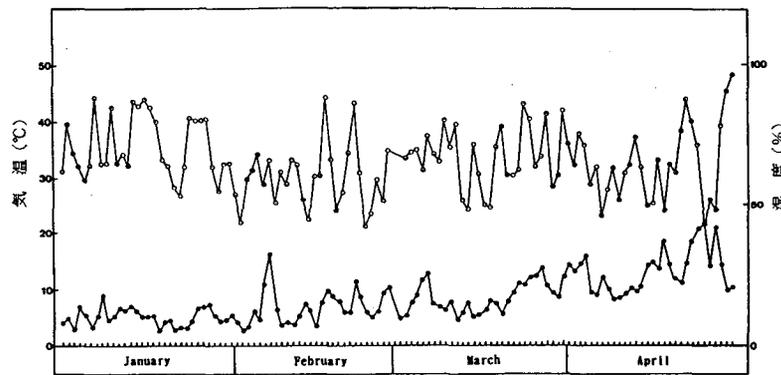
図7 硝酸還元活性の季節変化 1993年5月～11月



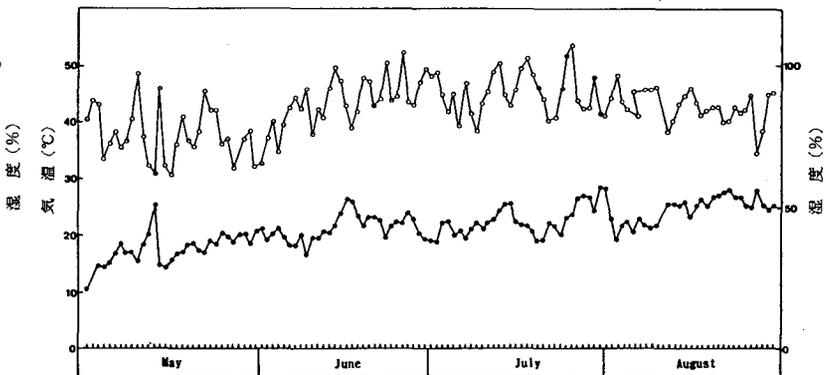
気象データ (気温、湿度) 1992年 5月～ 8月



気象データ (気温、湿度) 1992年 9月～12月



気象データ (気温、湿度) 1993年 1月～ 4月



気象データ (気温、湿度) 1993年 5月～ 8月

図8. 気象データ (気温、湿度) 1992年5月～1993年8月

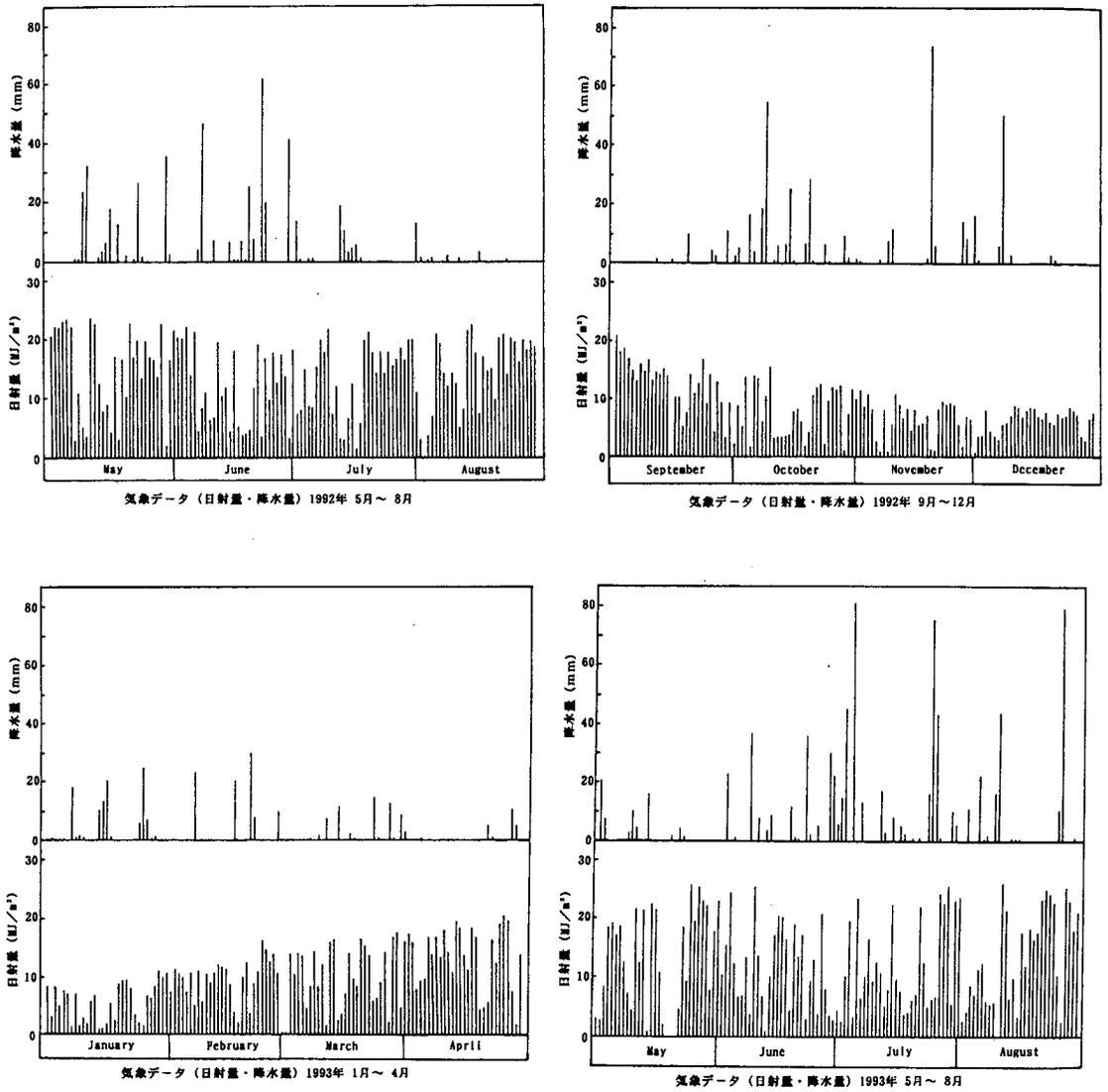


図9. 気象データ (日射量、降水量)

1992年5月～1993年8月

文 献

- Hisamatsu, S., J. Nihira, Y. Takeuchi, S. Satoh and N. Kondo (1988)
NO₂ suppression of light-induced nitrate reductase in squash cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 29:395-401.
- ヒュイット, E. J. ・ T. A. スミス 植物の無機栄養, 理工学社, p. 29-45
- 久野春子・大橋 毅(1993) 大気汚染の指標植物 (1). 大気汚染学会誌, 28:A45-52.
- 久野春子・大橋 毅(1993) 大気汚染の指標植物 (2). 大気汚染学会誌, 28:A65-76.
- 国立環境研究所(1992) バイオテクノロジーによる大気環境指標植物の開発に関する研究. 国立環境研究所特別研究報告
- 近藤矩朗・佐治 光(1992) 植物の大気汚染耐性. 大気汚染学会誌, 27:273-288.
- 神奈川県環境科学センター(1992) 平成2年度神奈川の大気汚染
- 神奈川県環境科学センター(1993) 平成3年度神奈川の大気汚染
- 門司正三・内嶋善兵衛編(1979) 大気環境の科学5 大気環境の変化と植物, 東京大学出版会
- 大政謙次・近藤矩朗・井上頼直編(1988) 植物の計測と診断, 朝倉書店, p. 33-34
- 生物化学ハンドブック編集委員会編 生物化学ハンドブック, 技報堂, p. 710-724.
- Shimazaki, K., S. Yu, T. Sakaki and K. Tanaka(1992) Differences between spinach and kidney bean plants in terms of sensitivity to fumigation with NO₂. *Plant and Cell Physiol.* 33:267-273.
- Takeuchi, Y., J. Nihira, N. Kondo and T. Tezuka(1985) Change in nitrate-reducing activity in squash seedlings with NO₂ fumigation. *Plant and Cell Physiol.* 26:1027-1035.
- reductase activities under various form of nitrogen nutrition in
- 戸塚 績・三宅 博(1991) 緑地の大気浄化機能. 大気汚染学会誌,

26:A71-80.

Yoneyama, T. (1991) Uptake, assimilation and translocation of nitrogen by crops. JARQ 25:75-82.

米山忠克・戸塚 績・石塚茂樹・藤沼康実・矢崎仁也(1978) 高等植物の生長に及ぼす二酸化窒素の影響(4), 数種木本植物の生長および植物体窒素濃度におよぼすNO₂暴露の影響. 国立公害研究所特別研究成果報告, 第2号, 95-101.

米山忠克(1979) 高等植物による大気二酸化窒素(NO₂)の吸収と代謝. 国立公害研究所研究報告, 第10号, 343-350.

米山忠克(1991) 安定同位体(¹⁵N, ¹³C)を用いた植物の栄養構造の研究. 日本土壤肥料学会誌, 62:211-214.

ナスの NO₂ 感受性における品種間差異に関する研究

1998 年 3 月

内藤忠雄、流石紀子、河野明子

(明治大学 農学部)

ナスのNO₂感受性における品種間差異に関する研究

内藤忠雄、流石紀子、河野明子

1. 目的

以前関東系のナス7品種を用いてNO_x感受性を調査した結果、群交2号が最も抵抗性の高い品種であることが認められたため、今回は群交2号と関東系品種のNO₂感受性を比較検討するため本実験を行った。NO₂感受性と気孔の大きさとの関係も調査した。

2. 材料

(株)サカタノタネより購入した栽培品種である群交2号、(株)タキイ種苗より購入した栽培品種である千両・千両二号・庄屋大長・築陽の5品種の種子を成育調査の結果をもとに播種・育苗し、4葉程度に展開した苗を使用した。

3. 方法

① NO₂の暴露条件

地球環境制御装置 ガス暴露システム KMC-2000 特殊型(小糸製作所)を用いてNO₂の暴露を行った。各処理地区一品種につき5株ずつ使用した。

◎ 暴露期間：1997年9月8日～9月10日

◎ 処理濃度：対照区0.0ppmとし、2.5ppm・5.0ppmの合計3区とした。

◎ 処理時間：9:00～14:00

◎ 処理条件：温度28℃一定、相対湿度RH80%一定

② NO₂暴露後の感受性調査

◎ 調査期間：1997年9月8日～9月16日

煙斑や黄化、カール、萎縮が観察された葉や、落葉した葉を障害葉とし、障害程度を0(一葉中で障害なし)、I(障害割合0～10%)、II(10～30%)、III(30～50%)、IV(50～70%)、V(70～100%)としてランク付けを行い、Iを1、IIを3、IIIを5、IVを7、Vを9と数値化し、日ごとの障害度平均を求めた。また、全葉数に対する障害はの割合も日ごとに調査した。

③ 気孔のサイズの計測

NO₂感受性調査において最も感受性の高かった群交二号と最も感受性の低かった築陽について気孔サイズを計測した。方法は、葉齢の同じ葉を1品種につき5枚採取し、裏面の表皮を光学顕微鏡で観察した。葉一枚につきランダムに5個気孔を選び、合計25個の孔辺細胞と気孔のサイズを測り、平均サイズを求めた。

4. 結果

① NO₂ の感受性

5品種における障害度平均を求めた結果、高濃度区(5ppm)で高数値を示した品種は、群交二号と千両であった。一方、低数値を示した品種は、庄屋大長と築陽であった。また、全葉数に対する障害度の割合を求めた結果、一般的にNO₂濃度の増加と共に障害葉の割合も増加した。

② 気孔のサイズ

孔辺細胞と気孔の面積の平均値を計算したところ、最も感受性の高い品種である群交二号の孔辺細胞の平均サイズは1425.0(μm^2)、気孔の平均サイズは32.7(μm^2)であったのに対し、最も抵抗性品種である築陽の孔辺細胞の平均サイズは1301.5(μm^2)、気孔の平均サイズは27.3(μm^2)であった。また、群交二号では大きめの気孔のサイズがほぼそろって分布していたのに対し、築陽では小さいものから大きいものまでさまざまなサイズの気孔が分布していた。

5. 考察

以前の研究ではNO_xのデータであったため群交二号が最も抵抗性が高かったので、NO_xとNO₂では感受性が平行的でないとの報告もあることから、今後さらに検討する必要がある。一方、抵抗性が高いとされていた群交二号に最も強く障害が現れた。このことは、気孔も大きめのものがそろっていたため、NO₂を体内に取り込みやすいのではないかと考えられる。

肥田直子、内藤忠雄 「ナスのNO_x感受性における品種間差異」日本育種学会(1994)で一部報告済

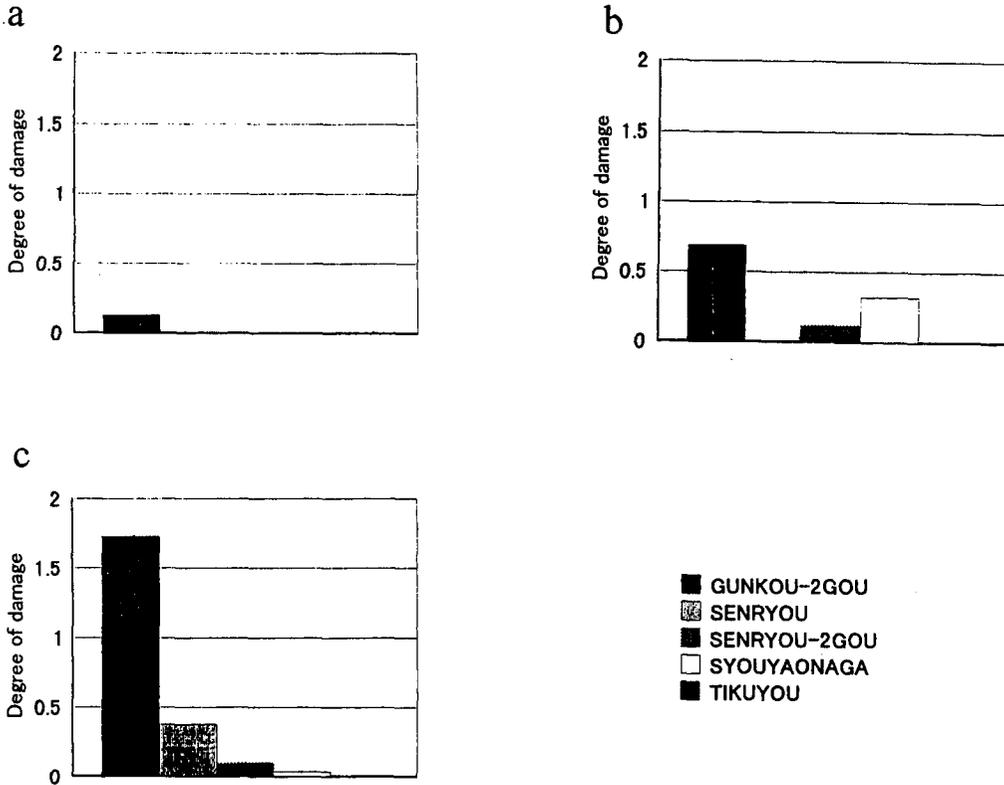


Fig. 1: Differences of the degree of damage on the fourth day after NO_x exposure among the cultivated varieties of eggplant. a: control, b: 2.5 ppm, c: 5.0 ppm. The degree of damages were estimated depending on the grade; 1:1, 3:3, 5:5, 7:7.

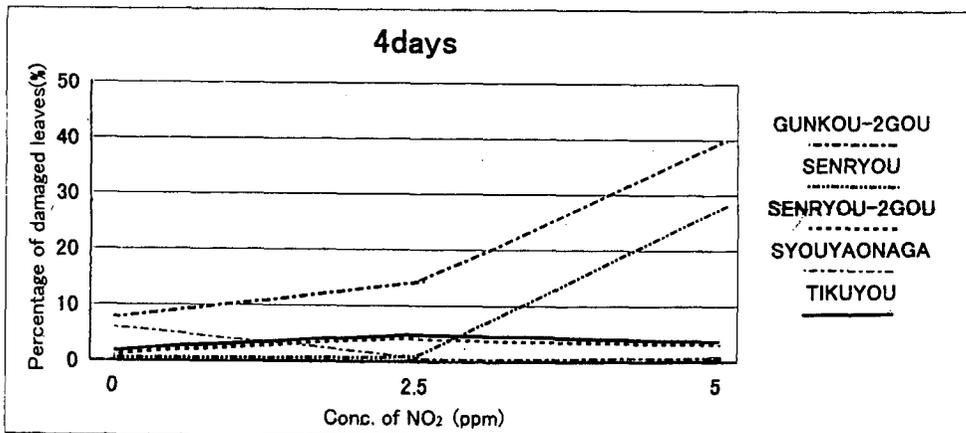


Fig. 2: Difference among the damaged leaves on the four days after NO_2 exposure to cultivated varieties of eggplant

Table 1. Differences on the size of guard cell and stoma between a tolerance variety TIKUYOU and a sensitive variety GUKUKOU-2GOU.

A	GUNNKOU-2GOU			Guard cell		Stoma		Size(L×W)
	Length	Width	Size(L×W)	Length	Width	Width		
L1	42	36	1512	15	2	30		
	47	39	1833	17	2	34		
	48	36	1728	14	3	42		
	42	38	1596	15	3	45		
	40	36	1440	13	3	39		
L2	44	38	1672	10	3	30		
	40	39	1560	8	4	32		
	42	33	1386	8	2	16		
	54	38	2052	16	2.4	19.2		
	53	40	2120	16	6	96		
L3	40	35	1400	8	2	16		
	38	26	988	10	2	20		
	38	33	1254	10	2	20		
	40	38	1520	8	3	24		
	36	30	1080	9	2	18		
L4	41	38	1558	10	3.4	34		
	43	36	1548	10	2	20		
	40	39	1560	10	4	40		
	40	36	1440	12	2	24		
	32	28	896	10	4	40		
L5	40	34	1360	10	3	30		
	34	24	816	10	3	30		
	42	28	1176	12	2	24		
	46	22	1012	16	2.4	38.4		
	36	38	1368	10	4	40		
Average	41.52	34.32	1435	11.48	2.848	32.064		
Variance			101625.44			246.67		
Standard deviation			318.79			15.7		

B	TIKUYOU			Guard cell		Stoma		Size(L×W)
	Length	Width	Size(L×W)	Length	Width	Width		
L1	44	36	1584	12	2	24		
	42	32	1344	12	3	36		
	40	30	1200	12	2	24		
	44	30	1320	10	2	20		
	37	35	1295	11	2	22		
L2	44	40	1760	10	2	20		
	34	32	1088	10	2	20		
	46	30	1380	18	2	36		
	40	35	1400	7	1.6	11.2		
	38	27	1026	11	1.8	19.8		
L3	44	26	1144	16	2	32		
	44	26	1144	16	2	32		
	34	32	1088	12	3	36		
	38	39	1482	8	3	24		
	43	32	1376	12	2	24		
L4	36	35	1260	10	2.8	28		
	34	36	1224	7	3.2	22.4		
	42	33	1386	12	1.6	19.2		
	44	37	1628	11	3.6	39.6		
	49	28	1372	15	2	30		
L5	42	36	1512	10	2	20		
	34	30	1020	8	2.4	19.2		
	42	30	1260	18	3.6	64.8		
	34	26	884	9	3	27		
	44	30	1320	14	2	28		
Average	40.52	32.12	1299.88	11.64	2.344	27.168		
Variance			39979.71			103.69		
Standard deviation			199.95			10.18		

種々の沿道植栽帯における大気汚染物質
浄化効果の比較研究

1998年 3月

奥 水 肇

(明治大学 農学部)

沿道植栽帯の大気浄化効果の検証

1. 調査目的

沿道大気汚染の局地的な対策として、近年緩衝緑地帯の設置などが考えられ、主要幹線道路などにおいて植樹帯を造成することも多くなっているが、植樹帯を設置した結果、大気汚染がどの程度軽減されるかについては、その効果を検証したような調査はほとんどない。

このため、沿道緑化による大気浄化効果を検討するために、平成4年度に実施した沿道緑化事例調査結果等を参考に環境施設帯など沿道緑化地を選定し、緑地内外のNO₂濃度を測定し、検討を行った。

2. 調査地点

調査地点は、比較的まとまった植樹帯が存在する道路を対象に、交通量の多い東京都周辺の主要幹線道路沿いと、交通量の比較的少ない茨城県つくば市内の道路の中から選定した。

まず、交通量の多い主要幹線道路として、平成4年度に調査した沿道緑化事例の中から、次に示す3地点を調査地点に選定した。

- ① 特例都道441号（放射36号線、通称三六道路）
：東京都練馬区小竹町、日交通量：約36,000台
- ② 東関東自動車道・国道357号（湾岸道路）
：千葉県習志野市香澄、日交通量：約124,000台
- ③ 首都高速9号深川線・主要地方道319号線（通称三目通り）
：東京都江東区辰巳、日交通量：約110,000台

以上の道路はかなり交通量が多く、排出される二酸化窒素総量は植物の吸収の限界量を超えている可能性があるため、比較対象として以下に示す交通量の比較的少ない筑波研究学園都市内の道路の沿道植樹帯を選定した。

- ④ 主要地方道42号（土浦境線）
：茨城県つくば市竹園、日交通量：約22,000台
- ⑤ 主要地方道63号（筑波土浦線、通称学園東大通り）
：茨城県つくば市天久保、日交通量：約16,000台
- ⑥ 主要地方道63号（筑波土浦線、通称学園東大通り）
：茨城県つくば市天久保、日交通量：約16,000台

本研究の一部は、第10回環境研究発表会（1996.11）（社）環境情報科学センターで発表し、写真・資料の一部は、公害健康被害補償予防協会、㈱ブレック研究所の了解を得て使用している。

- ⑦ 主要地方道63号（筑波土浦線、通称学園東大通り）
：茨城県つくば市天久保、日交通量：約16,000台

なお、地点⑤～⑦は同一道路であるが、地点⑤はアカマツ－シラカシ林、地点⑥がシラカシ－スギ林、地点⑦がクヌギ林と植樹タイプの違いによる大気浄化効果の検証を行った。

3. 調査期日

暴露期間は以下の通り。

地点①～③：

1995年11月2日～5日（3日間）

地点④～⑦：

1996年2月7日～14日（7日間）

4. 調査方法

自動車排気ガス中に多量に含まれる窒素酸化物のうち簡易測定法が開発されている NO_x について測定することとし、道路延長方向に直交するライントランセクトを原則として道路の両側に設置し（植栽帯の規模に応じて長さ10～50m前後とした）、道路近傍、植樹帯の内外など数カ所に測定地点を設けて、道路からの距離による NO_x 濃度の変化を測定した。

NO_x 濃度の測定は、簡易測定器であるディフュージョンサンプラー（ガスパック）を用いて行った。このガスパックは環境中の微量の NO_x を分子拡散の原理を利用してサンプリングし、汚染レベル、汚染分布及び濃度変動等を調査することを目的として開発された簡易測定器であり、測定結果に対する風速、温度及び湿度等の影響の非常に少ない設計となっている。

このガスパックを各測定地点に原則として地上から約2mの高さに設置し、一定期間大気中に暴露させ、吸収された NO_x 量から測定期間中の時間平均濃度を求めた。

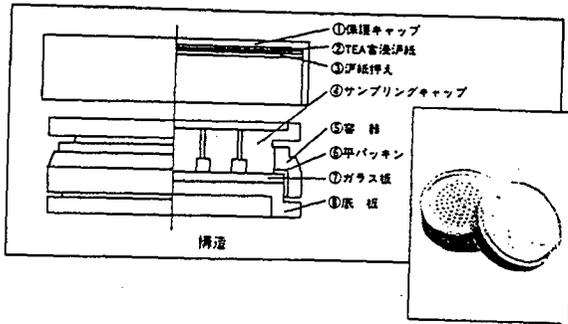


図 2 - 1
NO₂簡易測定器 (ガスパック)
の構造



写真 2 - 1 NO₂簡易測定器の設置状況。金網を用いて下向きに設置。

5. 調査結果

(1) 特例都道441号線（放射36号線、通称三六道路）

：東京都練馬区小竹町

【調査地点の概況】

道路構造は平坦構造であるが、住宅地域に位置しているため築堤（マウンド造成）により環境施設帯が設けられている。

地下鉄（営団地下鉄有楽町線）とともに計画された道路で、沿道住民の利便性と環境保全との融合を図るため積極的緑化が図られている。

行政と住民団体との長年にわたる相克と合意づくりへの情熱により「小学校校庭部の地下化」、「歩道の拡幅」、「緑豊かな築堤と遊歩道の設置」、「無電柱化」、「自転車置き場の設置」等を実現し、街づくりの一環として行われた。日交通量は約36,000台である。

【植栽構成と樹種】

道路と住宅地との間に幅約12mの環境施設帯が設けられている。道路の両側に築堤が設けられているが、幅約7m、高さ約2mで、車道側が高く、遊歩道側で緩く傾斜している。車道側の接道部には緑化用擁壁ブロックによりツツジ類が植栽され、高さ1.7m前後の遮音壁はツル植物に覆われている。

植栽構成は、樹高13m前後のケヤキを主とし、そのほかオオシマザクラなどの落葉広葉樹高木、クスノキなどの常緑広葉樹高木が混生している。また亜高木や中木を高木の周辺にランダムに配植するとともに、歩道側にはツツジ類等が植え潰しとして用いられ、住宅地側にも高さ約2mのカイズカイブキが列植されている。

植栽樹種は、主木としてかつての武蔵野の面影をしのばせるケヤキのほか、落葉樹高木としてオオシマザクラ、サトザクラ、ユリノキなど、常緑樹高木としてクスノキ、シラカシ、マテバシイなどが植栽されている。また、中木のハクモクレン、コブシ、ヤマボウシ、ハナカイドウ、ベニスモモ、カリン、ピラカンサ、低木のガマズミ、ムラサキシキブ、ジンチョウゲなど、花の美しい樹木や実のなる樹木、野鳥の集まる食餌木などが多用されているのが特徴であり、四季の変化に富んだ親しみやすい町並みを形成していることから、「三六四季の道」と名付けられ、親しまれている。

○落葉樹高木：クスノキ、シラカシ、マテバシイなど

○常緑樹高木：ケヤキ、オオシマザクラ、サトザクラ、ユリノキ

- 中 木：カイヅカイブキ、ツバキ、キンモクセイ、サザンカ、ヤブツバキ、カナメモチ、ピラカンサ、ムクゲ、ハクモクレン、コブシ、ヤマボウシ、ハナカイドウ、ベニスモモ、ハナミズキ、ナナカマド、ウメ、カリン、ヒメシャラ、シャラノキなど
- 低 木：カンツバキ、サザンカ、ガマズミ、ムラサキシキブ、クルメツツジ、ドウダンツツジ、キリシマツツジ、サツキ、クチナシ、レンギョウ、ジンチョウゲなど
- 地 被 類：テイカカズラ、サネカズラ、ムベなど

【大気浄化の観点から注目すべき点】

- ① 歩道の拡幅により植栽帯の幅を広くとり、また高木・中木・低木の組み合わせによる多層林形態により緑量を高めている。
- ② 汚染物質が大気中に拡散してしまう前に、できるだけ汚染物質発生源としての車道に近い場所に植栽するのが大気浄化の面では効果的であるため、この意味では中央分離帯の植栽、路側の緑化用擁壁ブロックによる低木植栽、ツル植物を用いた遮音壁の緑化などが効果的であろうと考えられる。

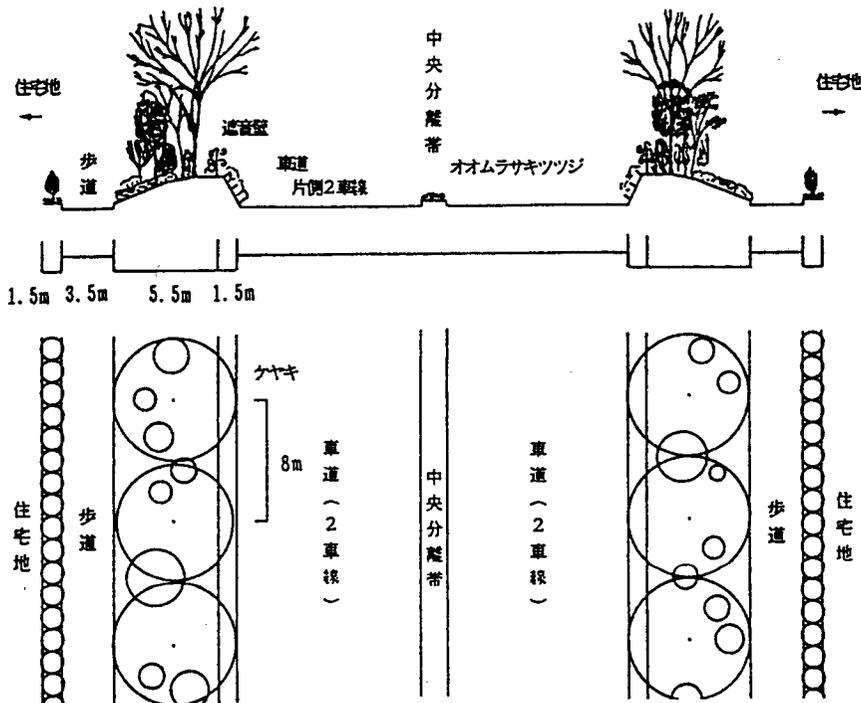


図 2 - 2 放射36号線道路の断面構成と植栽形態



写真 2 - 2 特例都道441号線（放射36号線、三六道路）。歩道の拡幅と築堤による緑化により緑豊かな環境施設帯を形成している。



写真 2 - 3 同上地点の植栽状況。ケヤキを主木としているほか、花や実の美しい樹木など四季の変化に富んだ親しみやすい景観を形成。

【測定結果】

図2-3、4は、放射36号線の両側に設定したNO₂測定地点の概況を示したものである。道路の両側に幅約7m、高さ約2mのマウンドを造成し、そこに緑地帯が形成され、遊歩道を挟んで住宅地側にもカイヅカイブキが生垣状に列植されている。

これらの図の上には、道路からの距離によってNO₂濃度がどのように変わるかを示した図を掲載したが、上り車線側、下り車線側いずれも同じような変化を示し、道路近傍で比較的濃度が高く、遠くなるにしたがって低くなる、いわゆる汚染発生源からの距離減衰が認められる。道路に一番近い測定地点(U1、D1)のNO₂濃度を100%とした時のNO₂濃度は道路から約5mの地点で60~80%、10mの地点で50~60%程度であり、低減率はそれぞれ20~40%、40~50%である(図2-5参照)。

低減の原因については、距離減衰のほか、遮音壁による遮断効果、築堤による遮断効果及び植物による遮断効果、吸収効果などが考えられる。また緑地内で道路最近傍地点より濃度が高いのは、道路最近傍地点が道路に沿った開放空間で汚染物質が拡散しやすいのに対して、緑地内では樹冠がうっ閉して汚染物質が滞留しやすいためであろうと考えられる。

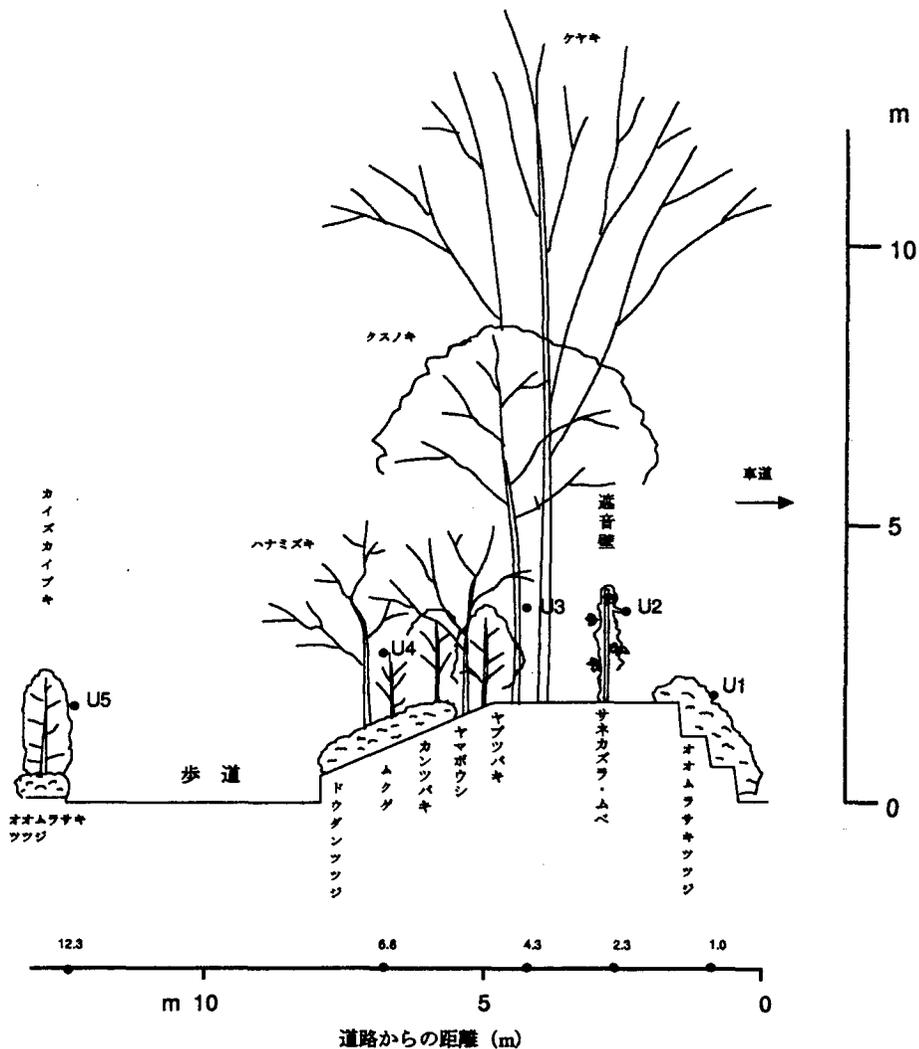
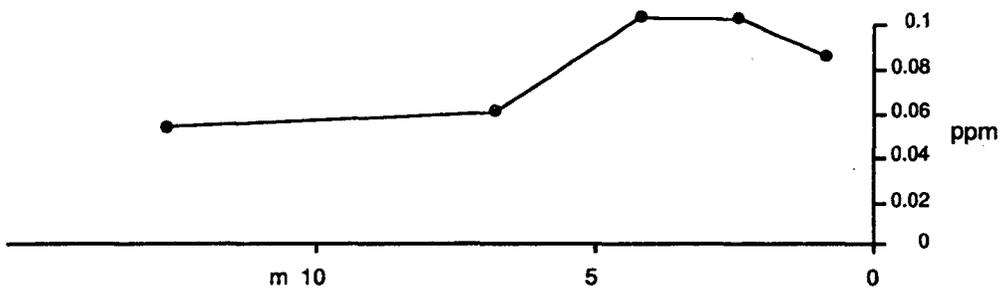


図 2 - 3 地点 1 (上り) 特例都道441号線 (放射36号線、三六道路) における測定地点の状況とNO2濃度

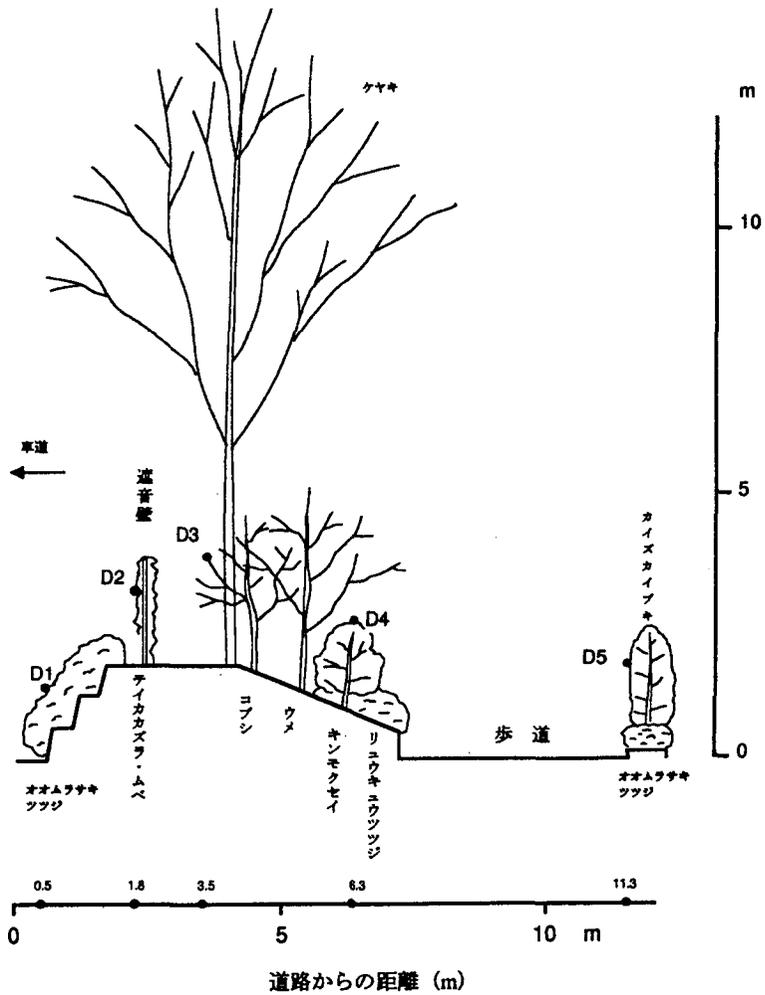
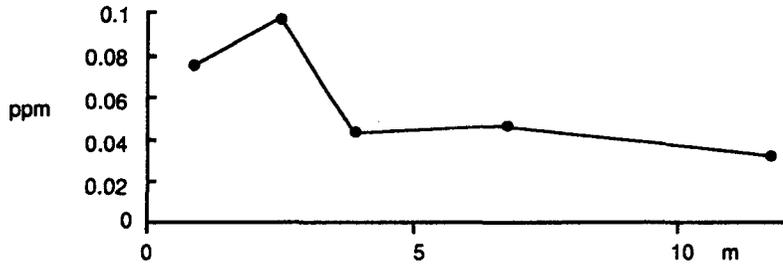


図 2 - 4 地点 1 (下り) 特例都道441号線 (放射36号線、三六道路) における測定地点の状況とNO2濃度

道路に一番近い調査地点の値を100%とした結果（小竹向原）

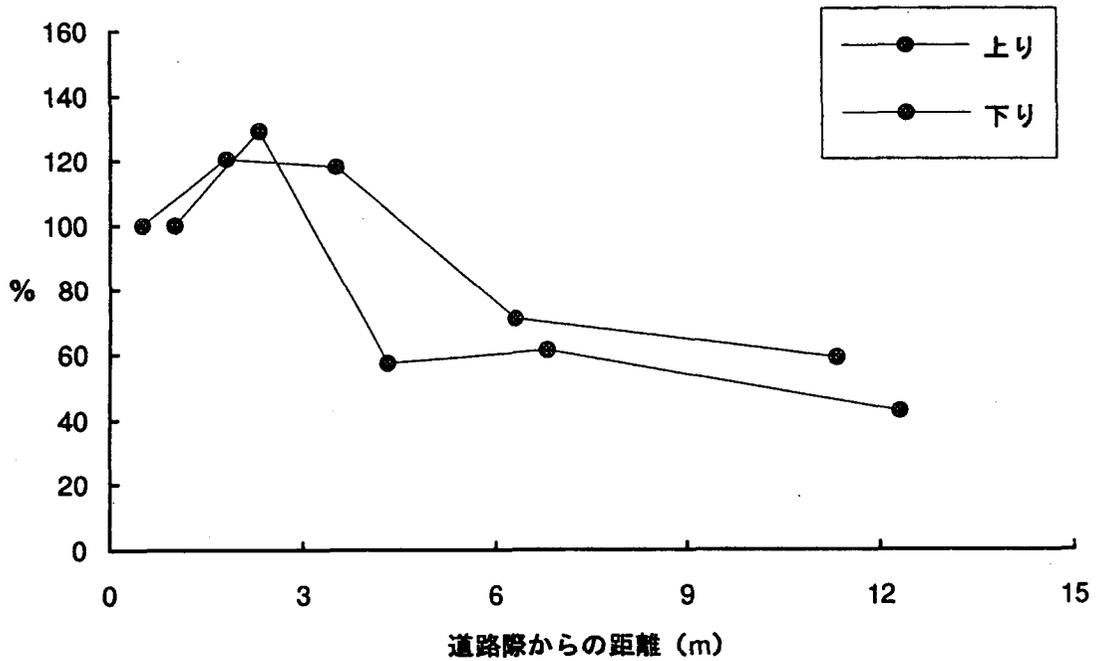


図 2 - 5 道路からの距離とNO₂濃度との関係（放射36号線）
（測定日：1995年11月2日～5日、測定高：約2m）

(2) 東関東自動車道・国道357号線（湾岸道路）

：千葉県習志野市香澄

【調査地点の概況】

東関東自動車道をはさんで片側2車線の国道357号線が連なる、都心と京葉工業地帯とを結ぶ主要幹線道路であり、その北側（下り車線側）に広がる住宅地域とのバッファゾーンとして設けられた緩衝緑地帯であり、現在、香澄公園となっている。

日交通量は約124,000台（高速道路：76,000台、国道：48,000台）である。

【植栽構成と樹種】

幅約10m、高さ約1.5mのマウンドが造成され、その中央付近に高さ約3mの遮音壁が設けられている。マウンド植栽帯にはタブノキ、マテバシイ、ヤマモモなどの常緑広葉樹高木が植栽され、うっ閉した樹林を形成し、道路側の林床はヘデラ類によって全面被覆されている。公園側のマウンド側面は緑化用擁壁ブロックによりツツジ類が植栽され、園路をはさんで芝生地が広がり、緑陰樹としてアキニレ、ナンキンハゼなどの高木樹種が疎らに植栽されている。

【大気浄化の観点から注目すべき点】

- ① 常緑広葉樹高木を主体とした植栽は緑の厚い壁となり、汚染物質の遮断、吸収効果が期待される。
- ② 道路側の林床を被覆しているツル植物は、緑量の増加、大気浄化のうえでも効果が期待される。
- ③ 全体的に常緑樹を主体とした樹種構成になっており、年間を通じた遮閉効果、大気浄化効果が期待される。



写真 2 - 4 東関東自動車道・国道357号線（湾岸道路）北側の緩衝緑地帯。マウンド造成による常緑広葉樹高木主体の植栽。香澄公園。



写真 2 - 5 同上地点車道側の植栽状況。常緑広葉樹高木がうっそうと繁り、緑の壁が形成されている。地表もヘデラ類に覆われている。

【測定結果】

図2-6は、湾岸道路の下り車線側に設定したNO_x測定地点の概況を示したものである。周辺は工業地域と住宅地域の境界に位置しており、習志野緩衝緑地として造成され、現在は香澄公園として近隣住民に親しまれる緑地が広がっている。

道路に沿って幅約10m、高さ約1.5mのマウンドが形成され、そこにタブノキ、マテバシイなどの常緑広葉樹高木を主体とした環境保全林が形成されている。また、園路を挟んで広大な芝生地が広がり、公園樹木が緑陰樹などとして植えられている。

道路端からの距離とNO_x濃度との関係を図2-6の上部に示したが、道路近傍で比較的濃度が高く、遠くなるにしたがって低くなる、いわゆる汚染発生源からの距離減衰が認められる。道路に一番近い測定地点(D1)のNO_x濃度を100%とした時のNO_x濃度の変化を図2-7に示したが、道路から約5mの地点で120~130%程度、10mの地点では約90%、20mの地点で約80%であり、低減率はそれぞれ-20~-30%、約10%、約20%である。

環境保全林内で道路最近傍地点より濃度が高いのは、道路近傍地点が道路に沿った開放的な空間であり汚染物質が拡散されやすいのに対して、緑地内では樹冠がうっ閉して汚染物質が滞留しやすいためであろうと考えられる。

低減の原因については、距離減衰のほか、遮音壁による遮断効果、築堤による遮断効果及び植物による遮断効果、吸収効果などが考えられる。

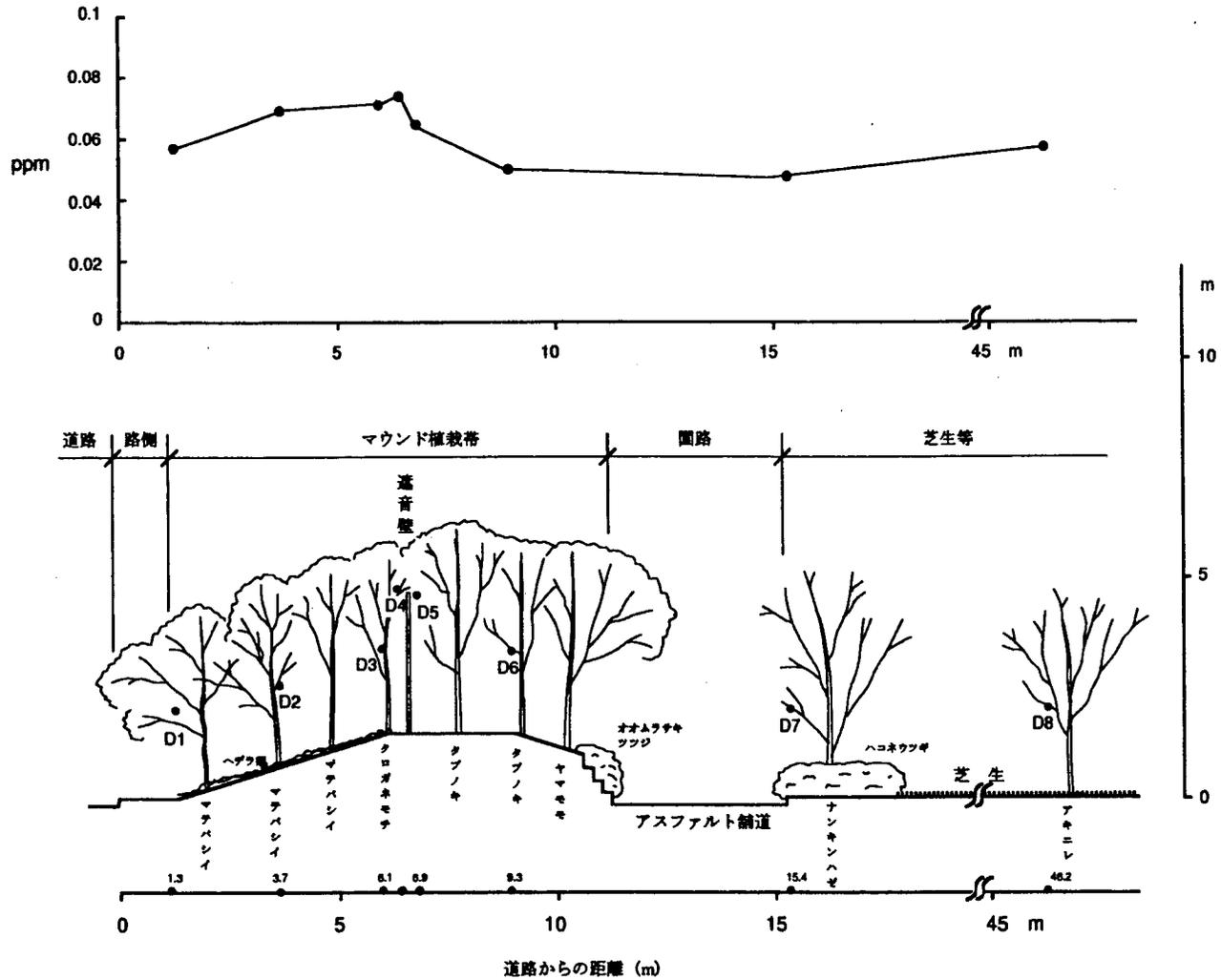


図 2 - 6 地点 2 東関東自動車道・国道357号線（湾岸道路）における測定地点の状況とNO₂濃度

道路に一番近い調査地点の値を100%とした結果（湾岸）

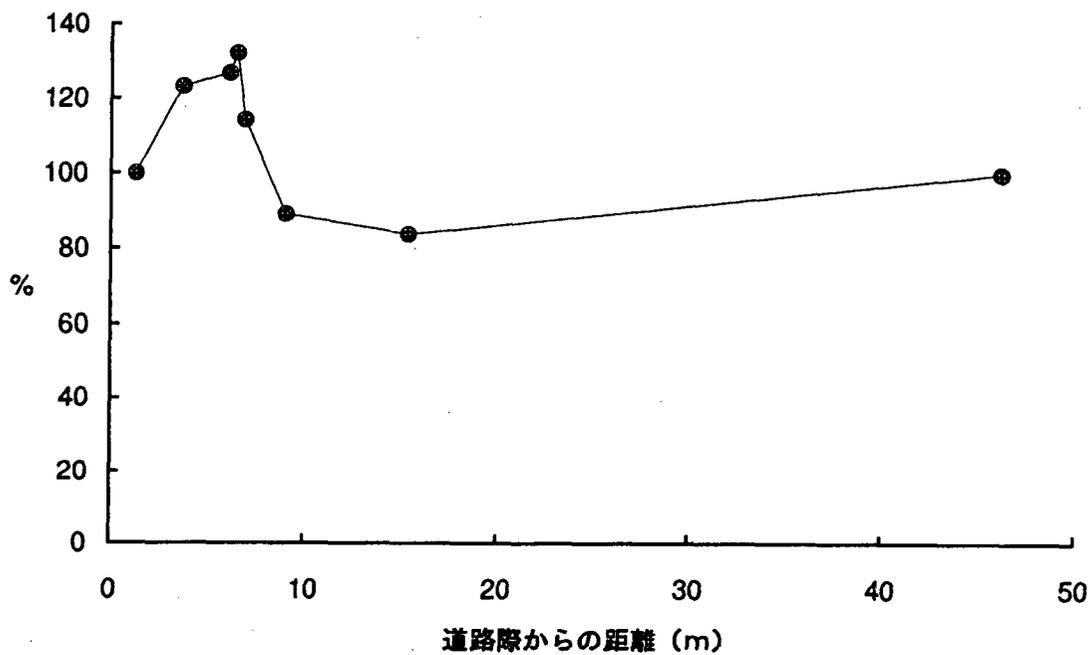


図 2 - 7 道路からの距離と NO_2 濃度との関係（湾岸道路）
（測定日：1995年11月2日～5日、測定高：約2m）

(3) 首都高速9号深川線・主要地方道319号線(通称三目通り)
: 東京都江東区辰巳

【調査地点の概況】

片側3車線の主要地方道319号線(通称三目通り)の上に首都高速9号深川線の高架が走る。上り車線側には都営辰巳団地があり、環境保全のために築堤を設け積極的な緑化が図られている。下り車線側は広大な埋立地に隣接し、ここにも歩道植栽帯を含め幅20m以上に達する植栽帯が造成されている。

日交通量は約110,000台(高速道路:67,000台、主要地方道:43,000台)である。

【植栽構成と樹種】

上り車線側では団地内の環境保全を図るため幅20m近いバッファゾーンが設けられている。石積みで囲んだ幅約10m、高さ約3.5mの築堤を設け、団地内への汚染物質の拡散防止が図られている。車道側はヘデラ類やツワブキなどの地被植物に覆われ、マウンド上はクスノキ、ヤマモモ、マテバシイなどの常緑広葉樹高木を主木として、その間にサンゴジュ、ツバキ、モッコクなどの常緑広葉樹中木が植栽されている。団地側はサルスベリ、オオシマザクラなど花の美しい落葉広葉樹高木の下にツツジ類などの低木が植えられている。このため、築堤は全体として複層林形態の緑のかたまりとなっている。

築堤の裏側には歩道が設けられ、街路樹としてアキニレが列植され、低木が植え込まれており、団地内の植栽に続いている。

一方、下り車線側では歩道に幅1~2mの植栽帯が2列設けられ、車道側には常緑広葉樹、落葉広葉樹高木を主とした複合植栽、歩道側には落葉広葉樹高木であるアオギリが街路樹として植栽されている。またその外側には幅15mの緩やかなマウンドが設けられ、タブノキ、ヤマモモ、マテバシイなどの常緑広葉樹高木が植栽され、環境保全林の機能を果たしている。

- 常緑樹高木: クスノキ、マテバシイ、ヤマモモ、ユズリハなど
- 落葉樹高木: アキニレ、サクラ、アオギリ、サルスベリなど
- 中木: サンゴジュ、モッコク、ウバメガシ、ヤブツバキなど
- 低木: トベラ、ハマヒサカキ、オオムラサキツツジ、サツキ、シャリンバイ、ハコネウツギなど
- 地被: ヘデラ・ヘリックス、ツワブキなど

【大気浄化の観点から注目すべき点】

- ① 車道と住宅団地の間に幅約20mのバッファゾーンを設け、充実した緑化を図っている。
- ② 車道側には幅約10m、高さ約3.5mの築堤を設け、遮蔽を図っている。
- ③ 築堤の緑化は、高木・中木・低木・地被などの組み合わせにより複合的な緑化を図っている。
- ④ 常緑広葉樹高木を主体に植栽し、冬季でも遮蔽効果や吸収効果が期待される。



写真 2 - 6 首都高速 9 号深川線・主要地方道 319 号線（三目通り）の沿道植栽帯帯。道路の両側に広がる環境保全林。



写真 2 - 7 同上地点の住宅団地側の植栽状況。幅約 10m の築堤を造成し、常緑広葉樹高木を主体に充実した緑化が図られている。

【測定結果】

図2-8、9は、三目通りの両側に設定したNO₂測定地点の概況を示したものである。上り車線側には都営団地が隣接するため、環境保全のためにバッファゾーンが設けられ、道路に沿って幅約10m、高さ約3.5mのマウンドが造成され、クスノキ、ヤマモモなどの常緑広葉樹高木を主体とした環境保全林が形成され、団地側の歩道には街路樹としてアキニレが列植されている。下り車線側は広大な埋立て地で、落葉広葉樹高木を主体とした2列の歩道植栽帯の外側にタブノキ、マテバシイ、ヤマモモなどの常緑広葉樹高木からなる幅約15mの環境保全林が形成されている。

これらの図の上部は、道路からの距離によってNO₂濃度がどのように変わるかを示したものであり、局地的にやや濃度が高い場所（D6地点）や低い場所（D2地点）があるものの道路からの距離にかかわらずNO₂濃度は0.06ppm前後でほぼ一定であり、いわゆる発生源からの距離減衰は認められない。その原因の一つとしては、両側6車線である主要地方道319号線のう上に高架式の首都高速9号深川線が平行して走っており、その影響が広範囲に及んでいるためであろうと考えられる。

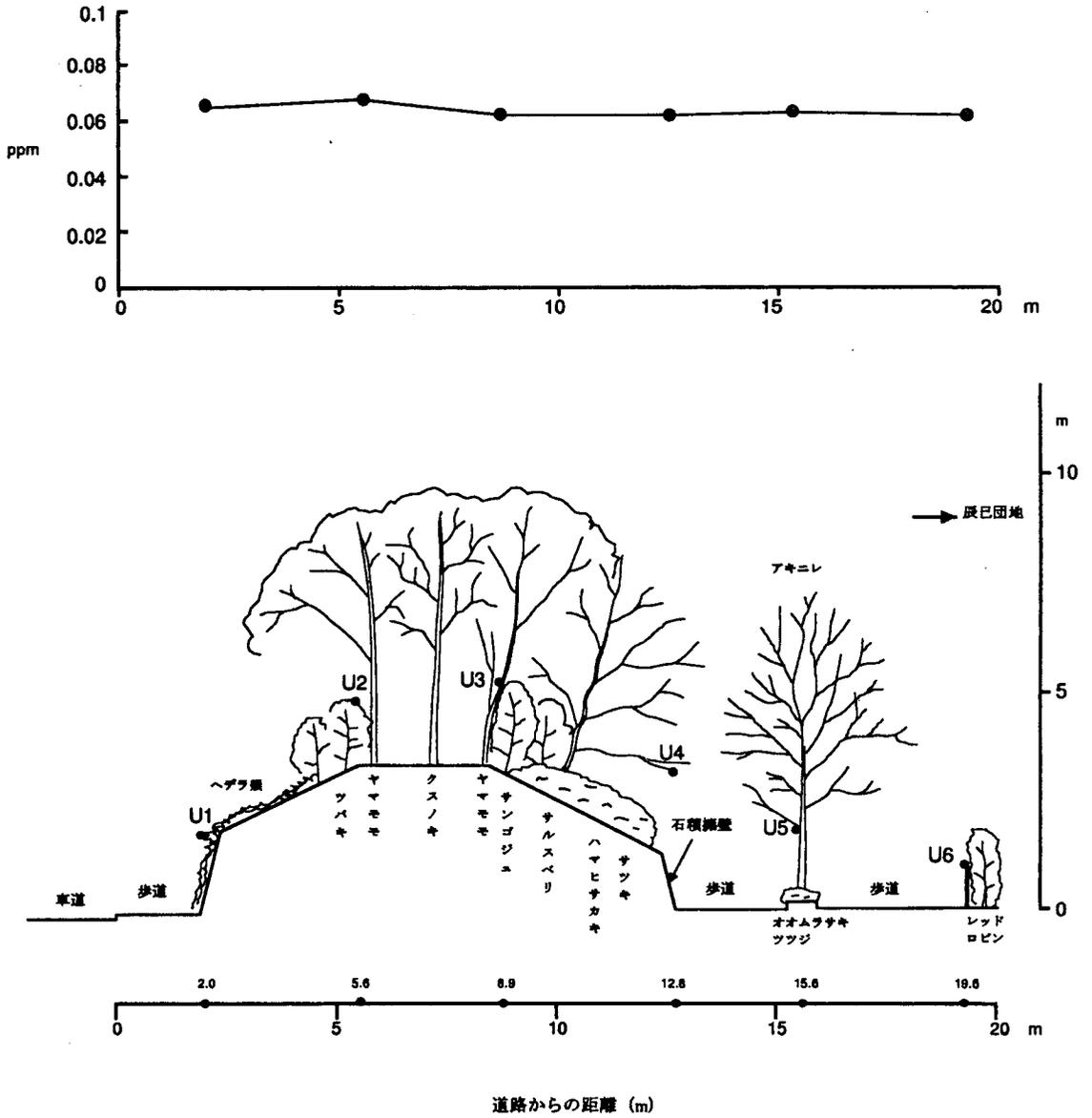


図 2 - 8 地点 3 (上り) 首都高速9号線・主要地方道319号線
における地点の状況とNO₂濃度

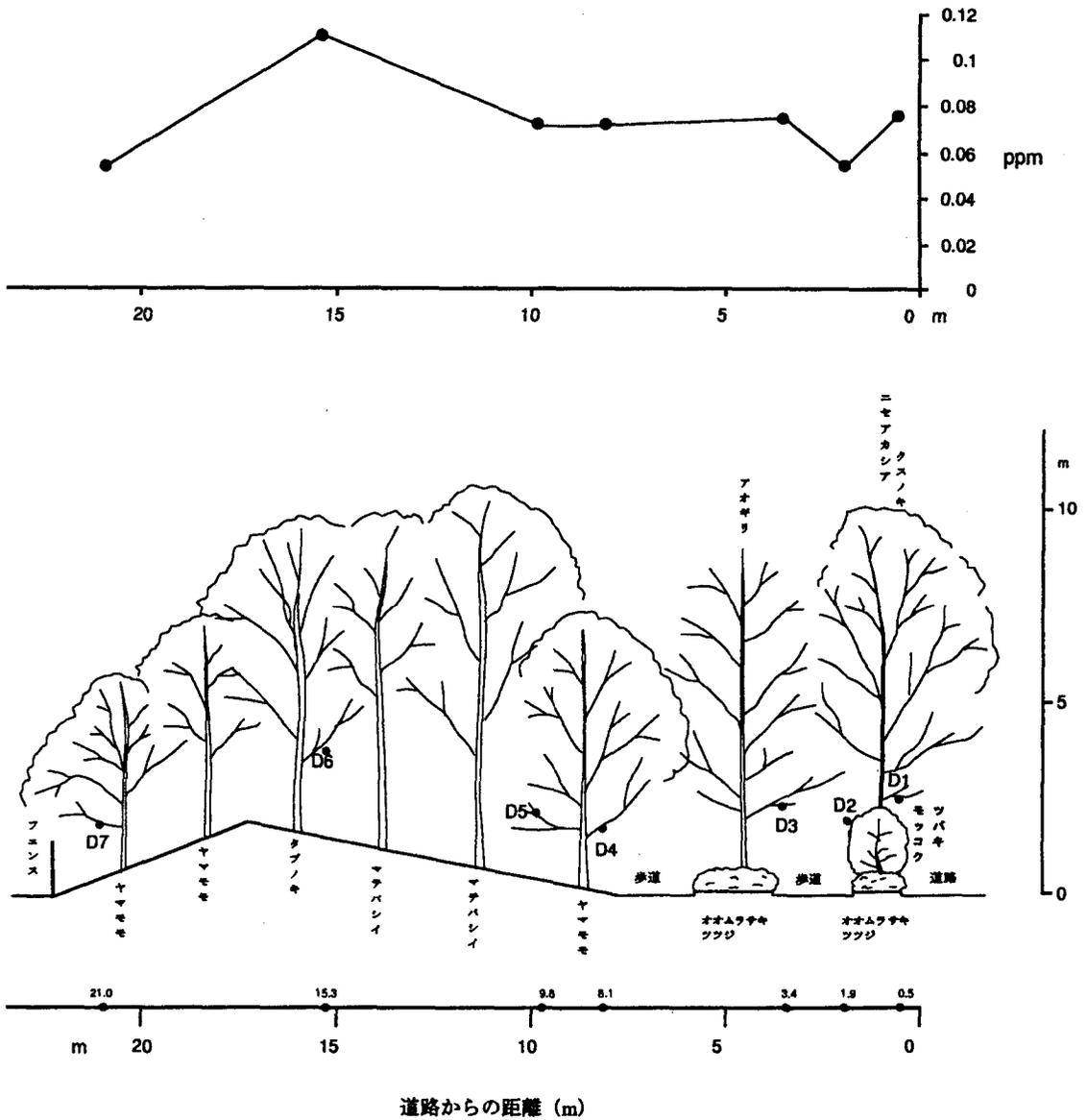


図 2 - 9 地点 3 (下り) 首都高速9号線・主要地方道319号線における地点の状況とNO₂濃度

道路に一番近い調査地点の値を100%とした結果 (辰巳)

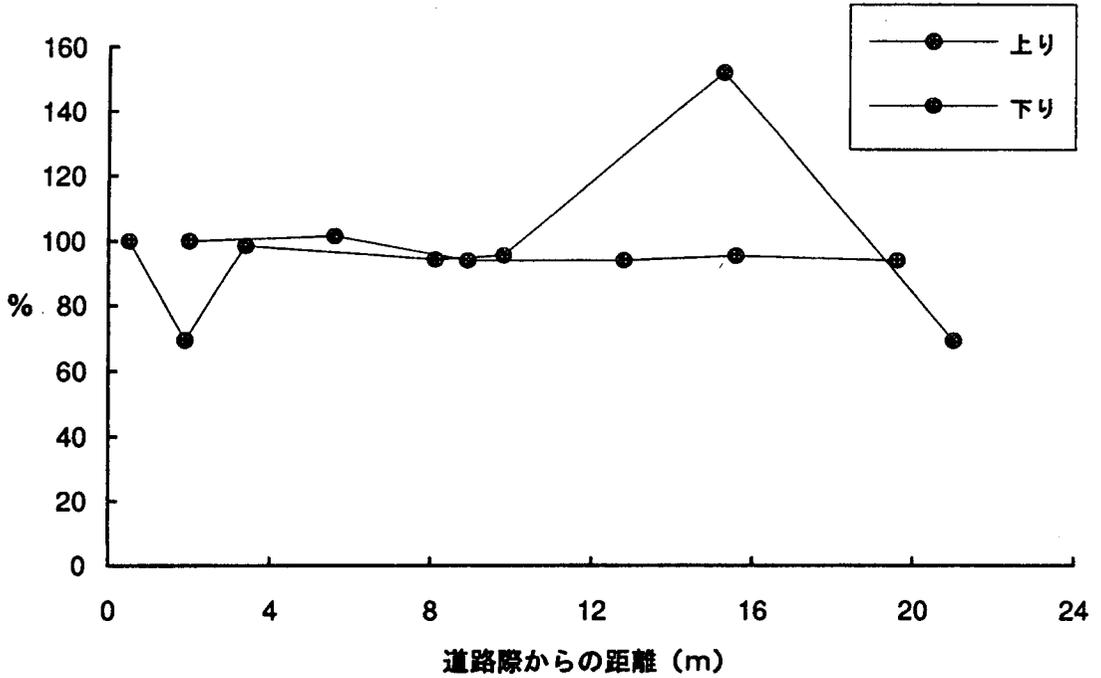


図2-10 道路からの距離とNO₂濃度との関係 (三ツ目通り)
(測定日: 1995年11月2日~5日、測定高: 約2m)

(4) 主要地方道42号(土浦境線)：茨城県つくば市竹園

【調査地点の概況】

片側3車線の主要地方道土浦境線が東西に走り、道路の中央には幅約5m程の中央分離帯がある。調査地点の約10m東には歩道橋がかけられている。周辺の土地用途は主として住宅地であり、調査地点とした道路の南側には住宅団地がある。南側の住宅団地と道路の間には高さ3m、幅7m程のマウンドがあり、アカマツの植栽が施され、緑量は多い。一方、道路の北側は歩道との間に植樹帯があるものの、南側に比べて緑量は少ない。本道路沿いには研究学園都市の中心である筑波バスセンターがある。日交通量は約22,000台である。

【植栽構成と樹種】

幅5m程の中央分離帯にはサツキ、サザンカが植栽されている。接道部には幅2mの歩道植樹帯があり、幅3.4mの歩道を隔てて、高さ3m、幅7m程のマウンドが設けられている。公務員宿舎とマウンドの間には側道と幅3mの植樹帯が設けられている。

中央分離帯には歩道橋近傍ではサツキが植栽され、その延長上にサザンカが約1.5m間隔で列植されている。歩道植樹帯には高さ8m前後のイチョウが植栽され、アオキが植え潰しとして用いられている。一方、マウンド上には高さ10m前後のアカマツが密植され、その他の樹種はない。また、側道と団地敷地との間の植樹帯にはクヌギを主体としてサルスベリ等の落葉広葉樹が植栽されており、側道との接道部はヘデラ類で覆われている。全体としてはマウンド上のアカマツ林が主体となって比較的緑量が多い構成となっている。

○常緑樹高木：アカマツ

○落葉樹高木：イチョウ、クヌギ、サルスベリなど

○中 木：アオキ、サザンカなど

○低 木：サツキなど

○地 被：ヘデラ類

【大気浄化の観点から注目すべき点】

- ① 車道と住宅団地の間に側道も含めて幅約20mのバッファゾーンを設け、充実した緑化を図っている。
- ② 常緑高木を主体に植栽し、冬季でも遮蔽効果や吸収効果が期待される。



写真 2 - 8 主要地方道42号（土浦境線）南側の沿道植栽帯。
マウンド上にアカマツが植栽されている。



写真 2 - 9 同上地点の住宅団地側の植栽状況。
クヌギを主体として落葉広葉樹が植栽されている。

【測定結果】

図2-11は、土浦境線の南側に設定したNO₂測定地点の概況を示したものである。調査地点3の三目通りと断面構成は類似しており、測定地点の外側には住宅団地が隣接し、環境保全のためにバッファゾーンが設けられ、道路に沿って幅約7m、高さ約3mのマウンドが造成されている。マウンド上にはアカマツが植栽されており、側道を隔てて団地との間にはクヌギ、サルスベリなどの落葉広葉樹高木が列植されている。ガスパックNO₂測定器は同図に示したように、断面上に9個設置した。内訳は、中央分離帯（A1）、歩道植樹帯（A2、道路端）に1個ずつ、マウンドのアカマツ植栽に5個（A3～A7）、側道を隔てた植樹帯に2個（A8～A9）である。

この図の上のグラフは、道路からの距離によってNO₂濃度がどのように変わるかを示したものである。この調査地の最高濃度は中央分離帯上の0.03ppmであるが、これは都内で測定された道路近傍地点の測定値の半分以下である。この値を頂点として道路から離れるに従って濃度は減少するが、マウンド上で濃度はやや上昇しマウンドの中央でピークを示した。マウンドの反対側の側道端のA8では最低値0.013ppmを示した。中央分離帯上の濃度を100%とすると、図2-12に示したように道路端の歩道植樹帯（A2）では56.7%、マウンドの中央（A5）では63.3%、側道端のA8は43.3%まで低減されるものの、住宅団地側近のA9では66.7%にまで上昇している。A9で比較的濃度が高かったのは側道の道路交通と、A9から柵を越えたところにある駐車場の影響が現れている可能性がある。マウンドの上に小ピークが現れ、その外側で濃度が急に減少することは、濃度低減の要因としてマウンドとその植栽による遮へい効果によるものが最も大きいことを示していると思われる。

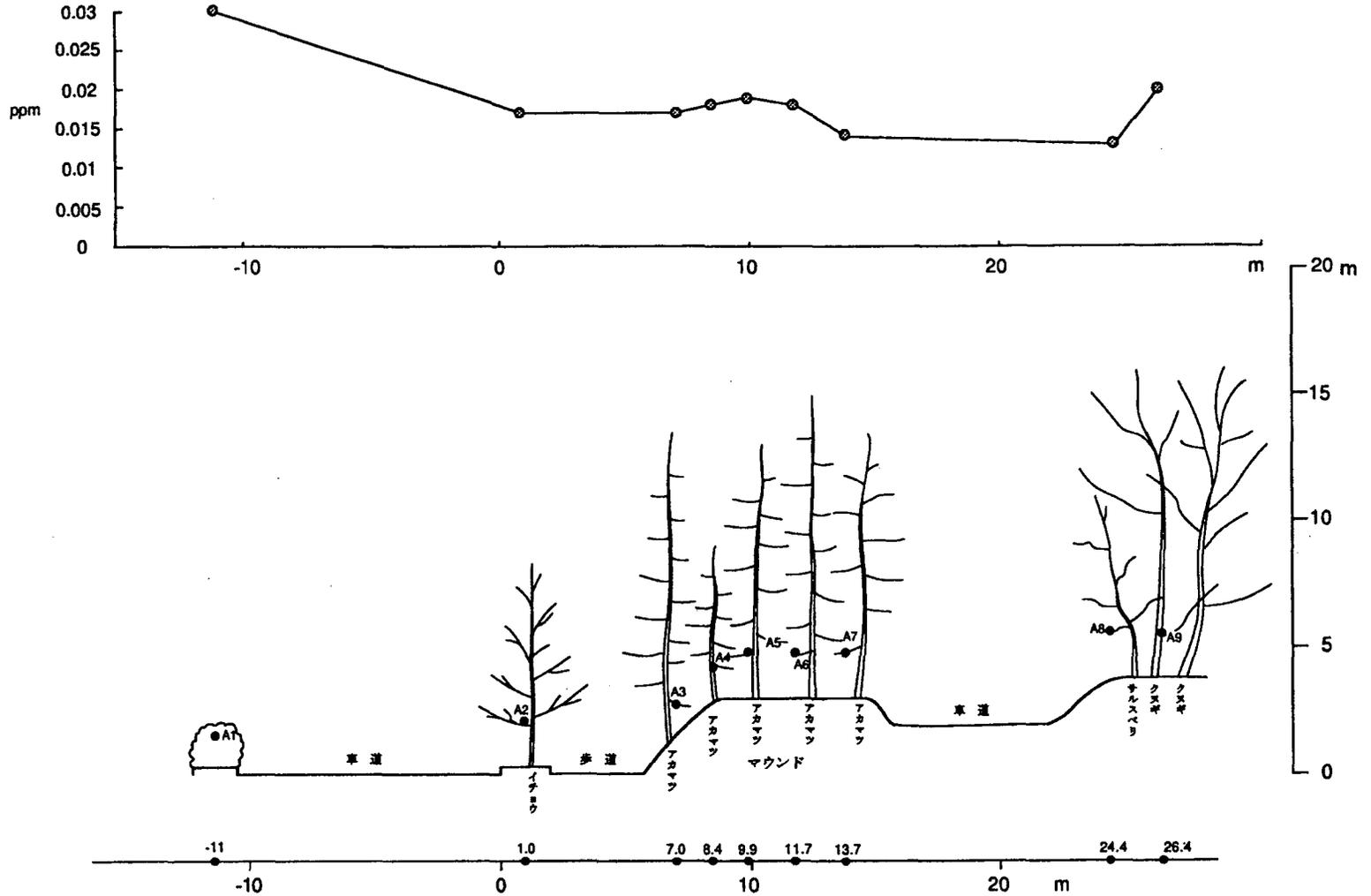


図 2 - 1 1 地点 4 土浦境線竹園橋付近 (アカマツ林) における地点の状況とNO₂濃度

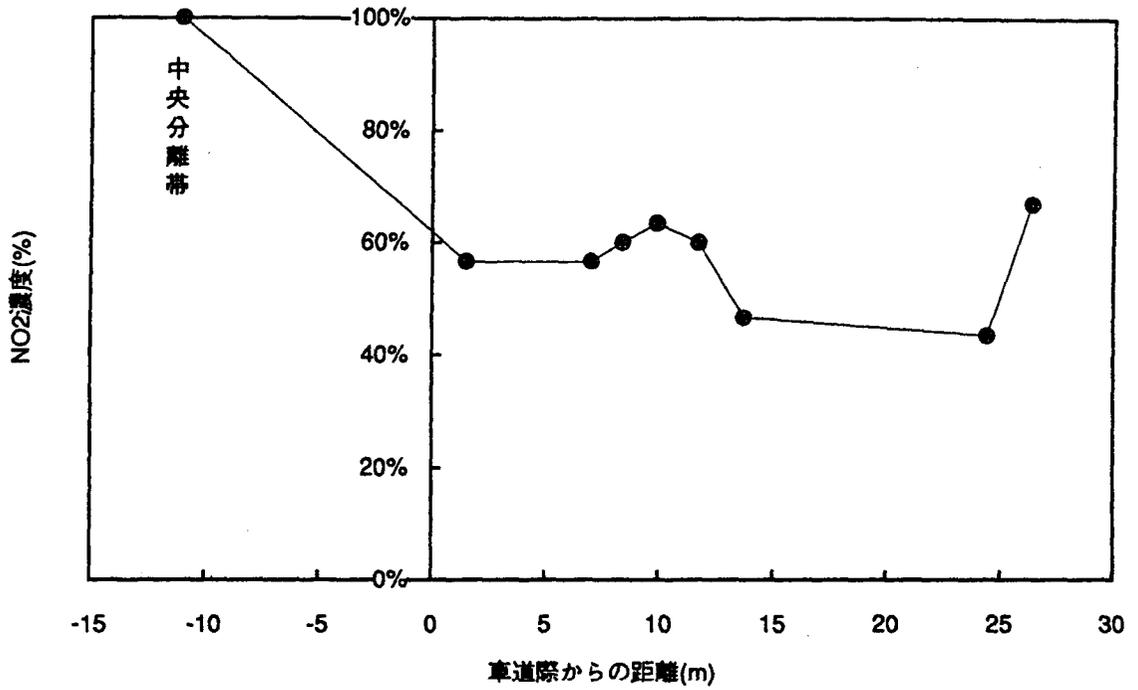


図2-12 道路からの距離とNO₂濃度との関係(土浦境線)
(測定日:1996年2月7日~14日、測定高:約2m)

(5) 主要地方道63号(土浦筑波線、通称学園東大通り) :

茨城県つくば市天久保、植樹タイプ：アカマツーシラカシ林

【調査地点の概況】

片側2車線の本道路は南北に走る、筑波大学と常磐自動車道を結ぶ学園都市内の主要道路の一つであり、日交通量は約16,000台である。調査地点の東側は筑波大学のキャンパスとなっている。筑波大学のキャンパスの周囲は筑波大学周辺保護緑地として樹林が整備され、アカマツやシラカシなどの常緑樹が主体となって、さまざまな樹種があり、全体として非常に緑量感にあふれた構成となっている。本調査では約1kmの区間で樹林タイプの違う3地点の測定を行ったが、この調査地点はそのうち、アカマツとシラカシを主体とした地点である。

【植栽構成と樹種】

幅約3m程の中央分離帯にはニシキギなどの低木が列植されている。また、道路両側の歩道植樹帯にはトウカエデが植栽され、ニシキギが低木として用いられている。大学保護林の幅は約30m程と非常に厚く、かつ植栽密度も比較的高いため、うっ閉した樹林を形成している。保護林の歩道側にはウバメガシが植栽されており、内部は高さ15mに達するアカマツ、シラカシを主体としてサワラなどの常緑樹、クヌギ、コナラなどの落葉樹が存在している。保護林の反対側はキャンパス内の周回道路となっているが、両側に高さ15m程のアケボノスギが列植されており、並木道となっている。

- 常緑樹高木：アカマツ、シラカシ、サワラ、アケボノスギなど
- 落葉樹高木：トウカエデ、クヌギ、コナラなど
- 中 木：ウバメガシなど
- 低 木：ニシキギ

【大気浄化の観点から注目すべき点】

- ① 大学の保護林は幅約30mと極めて厚く、植栽密度も高く充実した緑化を図っている。
- ② 保護林の樹種構成は、高木・中木、常緑・落葉など樹種数も多く複合的な効果が期待できる。
- ③ 常緑高木が主体であるため、冬季でも遮蔽効果や吸収効果が期待される。



写真 2 - 1 0 学園東大通り沿いの筑波大学周辺保護緑地
調査地 5 : アカマツ-シラカシ林



写真 2 - 1 1 同上地点のキャンパス側の植栽状況。

【測定結果】

図2-13は、学園東大通りの筑波大学周辺保護緑地のうち、アカマツ-シラカシタイプの樹林に設定したNO₂測定地点の概況を示したものである。保護緑地の幅は約30mであり、林内のアカマツは高さ15mに達している。樹林の反対側には大学キャンパス内の周回道路が走っている。ガスパックNO₂測定器は同図に示したように、断面上に9個設置した。内訳は、中央分離帯（B1）、歩道植樹帯（B2、道路端）歩道上（B3）に1個ずつ、樹林内に6個（B4～B9）であり、道路より最も遠方のB9は道路端より30m奥にある。

図2-13の上部に道路からの距離によってNO₂濃度がどのように変わるかを示した。中央分離帯では0.017ppmだが、道路端では0.027ppmと道路端の方が1.6倍高い。そこから3m隔てた歩道上では0.015ppmとなり、樹林内では同じくらいの濃度で一定に推移し、道路から最も遠いB9では0.013ppmを示した。ただし、樹林内のB7（道路端より18mの地点）では濃度が0.029ppmと異常に高濃度を示した。これは道路端より1.1倍、中央分離帯より1.7倍の値であるが、この地点の近傍に発生源がある等、特に高濃度になるような要因は見あたらず、なぜこのような高濃度を示したかは不明である。中央分離帯上の濃度を100%とすると、図2-14に示したように歩道上（B3）では88.2%、樹林の端（B9）では76.5%まで低減されるが、低減効果は先に述べた地点④の土浦境線のアカマツ植栽のマウンド程ではなく、また、距離減衰もあまり見られない。このことは樹木による大気汚染物質の吸収効果よりもマウンドや樹木による汚染物質の遮へい効果の方が濃度低減の要因としては大きいことを示唆している。

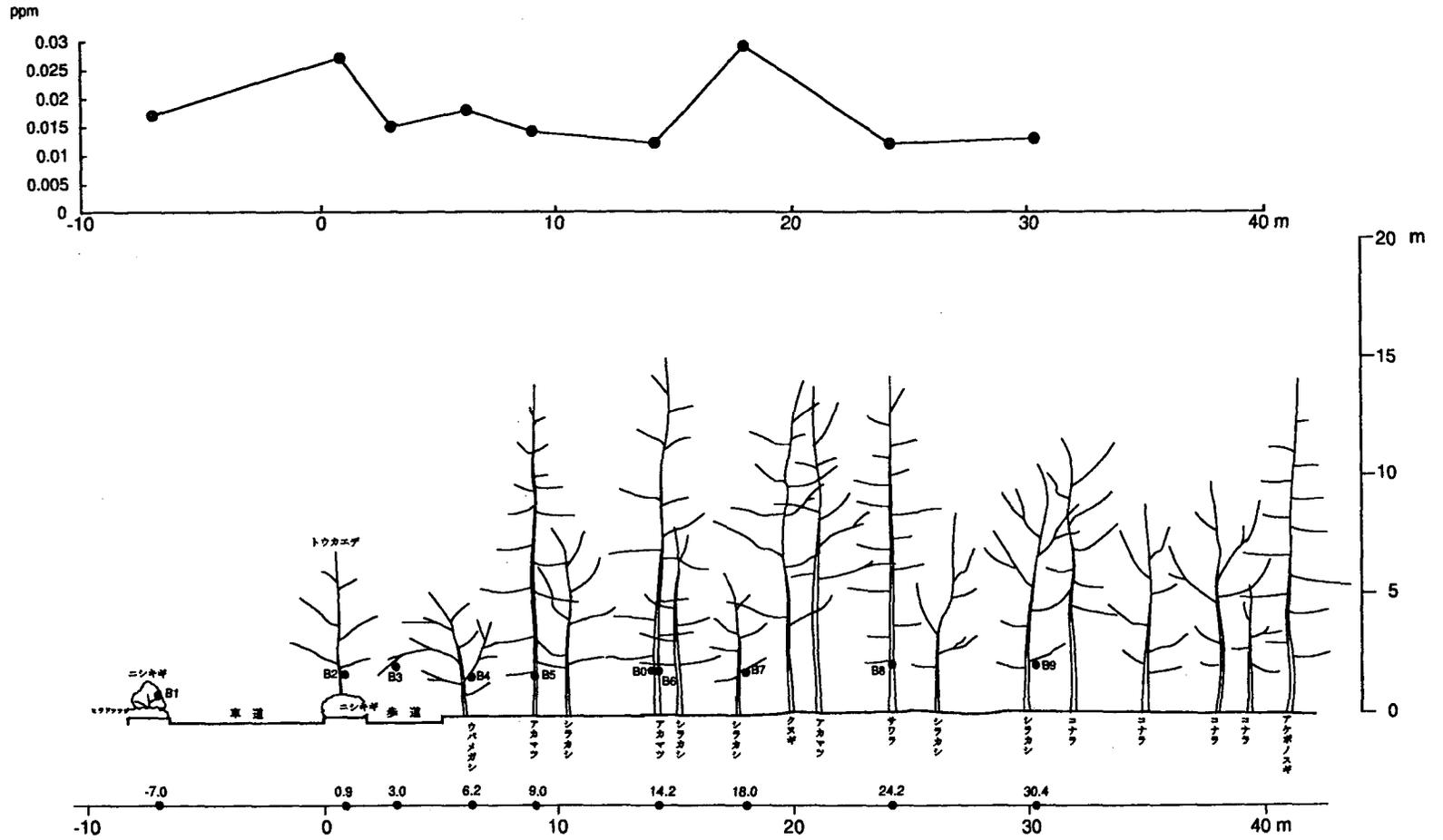


図 2 - 1 3 地点 5 筑波大学周辺保護緑地 (アカマツ - シラカシ林) における地点の状況とNO2濃度

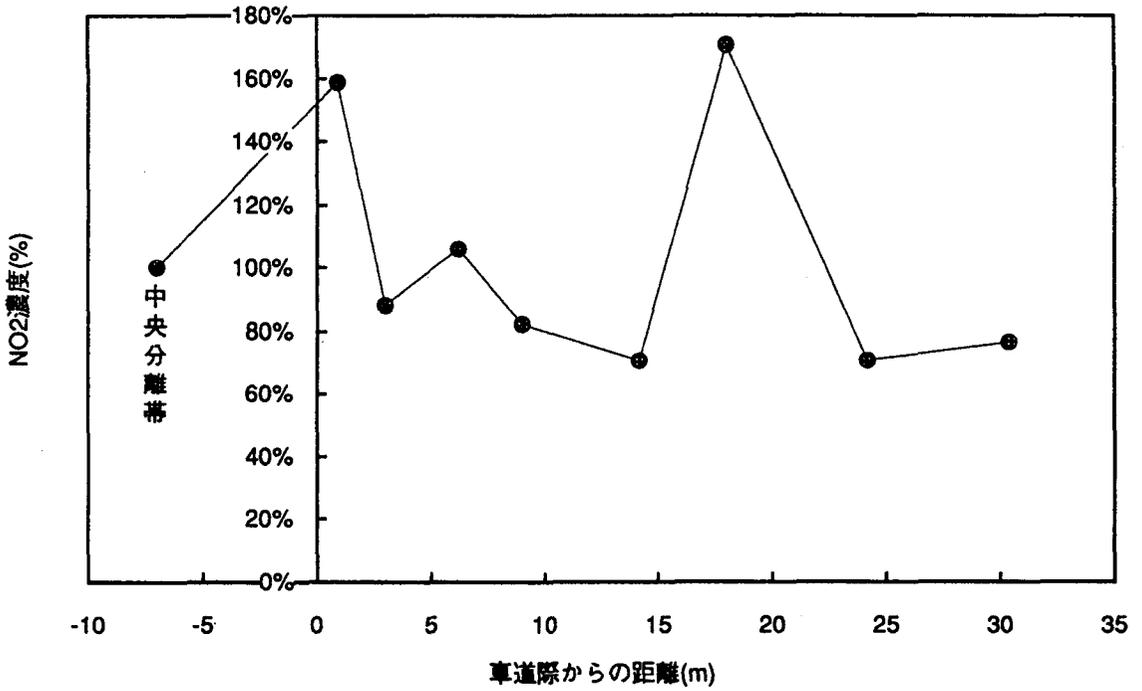


図 2 - 1 4 道路からの距離とNO₂濃度との関係 (調査地点5)
(測定日: 1996年2月7日~14日、測定高: 約2m)

(6) 主要地方道63号(土浦筑波線、通称学園東大通り) :

茨城県つくば市天久保、植樹タイプ:スギ-シラカシ林

【調査地点の概況】

調査地点⑤のアカマツ-シラカシ林より約1km程南方、筑波大学の正門の近くにある本調査地点はスギ、シラカシが主体となっている地点である。樹種構成の違いはあるものの、全体的に厚く、密植された樹林であり、調査地点⑥と同じく緑量感にあふれている。樹林地の反対側は駐車場となっている。日交通量は調査地点5と同じく約16,000台である。

【植栽構成と樹種】

中央分離帯及び歩道植樹帯は調査地点5と同じ植栽構成、樹種である。保護林の幅は約35mと調査地点5より若干厚く、樹種構成はスギ、シラカシが主体となった常緑樹林であり、アカマツ、ヒサカキなどがこの他の樹種としてあげられる。全体的に密であり、うっ閉した樹林地を構成している。シラカシ、スギなどの高木層は高さ15mに達している。

- 常緑樹高木:スギ、シラカシ、アカマツなど
- 落葉樹高木:トウカエデなど
- 中木:ヒサカキなど
- 低木:ニシキギなど

【大気浄化の観点から注目すべき点】

- ① 大学の保護林は幅約30mと極めて厚く、植栽密度も高く充実した緑化を図っている。
- ② 保護林の樹種構成は、高木・中木、常緑・落葉など樹種数も多く複合的な効果が期待できる。
- ③ 常緑高木が主体であるため、冬季でも遮蔽効果や吸収効果が期待される。



写真 2 - 1 2 学園東大通り沿いの筑波大学周辺保護緑地
調査地 6 : スギーシラカシ林



写真 2 - 1 3 同上地点の林内の状況。木々が密な状態である。

【測定結果】

図2-15は、学園東大通りの筑波大学周辺保護緑地のうち、シラカシスギ林タイプの樹林に設定したNO₂測定地点の概況を示したものである。保護緑地の幅は約35mであり、地点⑤より厚い。林内のスギ、シラカシは高さ15mに達している。樹林の反対側は大学内の駐車場である。測定器は本断面上に9個設置した。内訳は、地点⑤と同様の構成で、中央分離帯（C1）、歩道植樹帯（C2、道路端）歩道上（C3）に各1個ずつ、樹林内に6個（C4～C9）であり、道路より最も遠方のC9は道路端より37m奥にある。

図2-15の上部は、道路からの距離によってNO₂濃度がどのように変わるかを示したものである。中央分離帯が0.019ppmと最も高く、道路端では0.014ppmに低下し、樹林内にはいると約0.01ppmまで下がり、ほぼこの値の前後を推移するが、C7（道路端より17mの地点）では0.019ppmと中央分離帯と同濃度を示した。なお、最低値はC6（6.5m）、C9（31.5m）の0.009ppmであった。図2-16に示したように、中央分離帯上の濃度を100%とすると、道路端（C2）では73.7%、樹林の端（C9）では47.4%まで低減される。これは地点⑤よりも低い、地点④のマウンド程ではなく、また、C7のような高濃度地点が樹林内にあったことを考慮すると、距離減衰もあまり見られない。

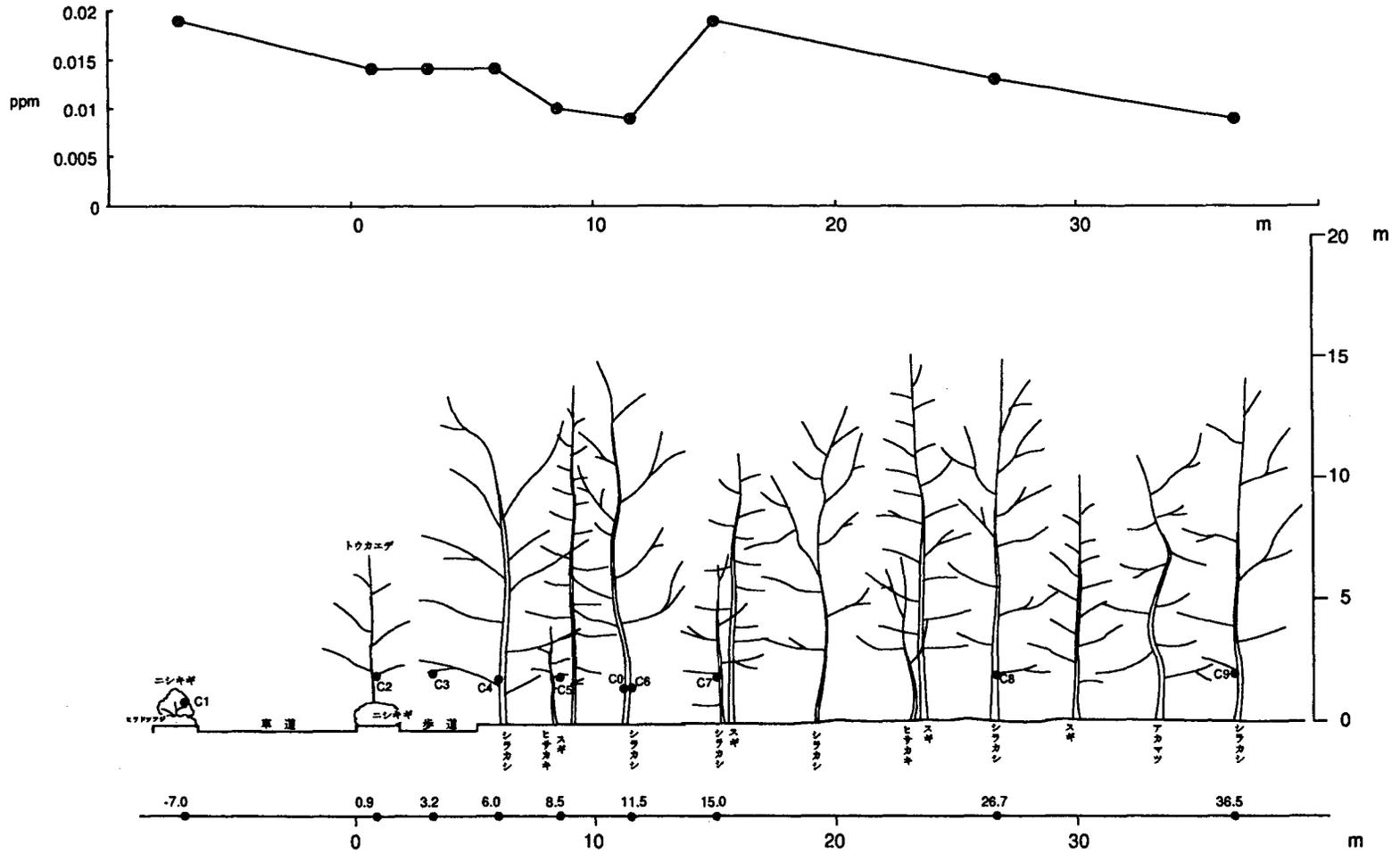


図 2 - 1 5 地点 6 筑波大学周辺保護緑地（シラカシ—スギ林）
における地点の状況とNO2濃度

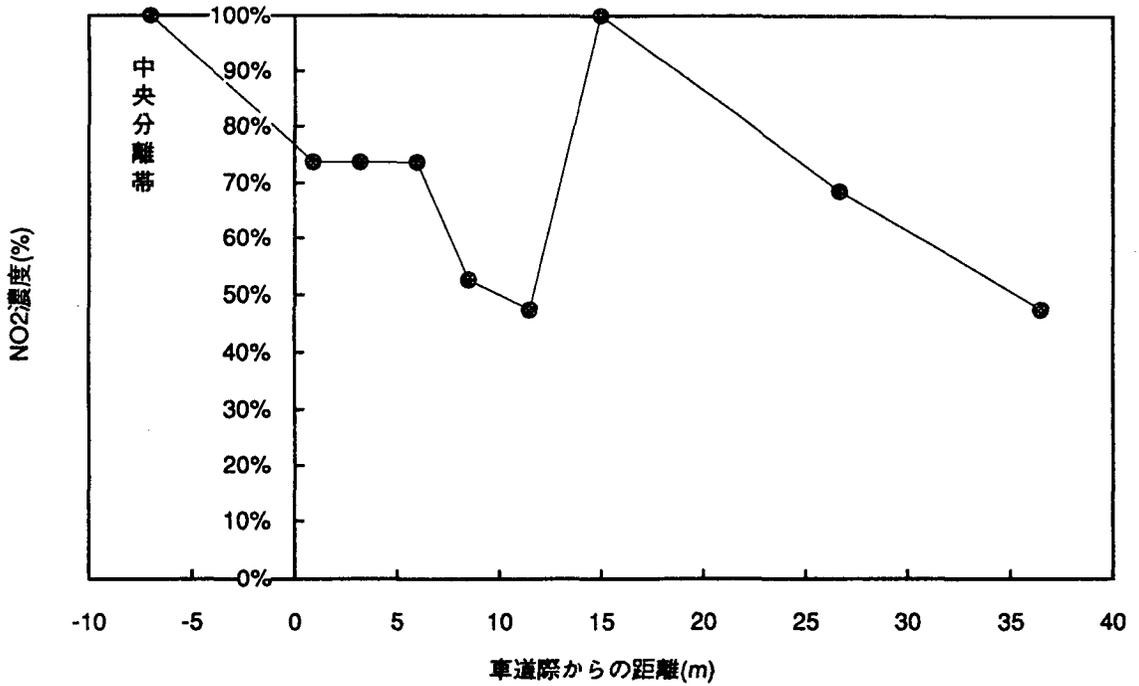


図 2 - 1 6 道路からの距離とNO₂濃度との関係(調査地点6)
(測定日: 1996年2月7日~14日、測定高: 約2m)

(7) 主要地方道63号(土浦筑波線、通称学園東大通り) :

茨城県つくば市天久保、植樹タイプ:クヌギ林

【調査地点の概況】

筑波大学周辺保護緑地は調査地点⑤、調査地点⑥のように、スギ、アカマツ、シラカシなどの常緑樹が主体となっており、冬季でも緑量が全体的に大きい。しかし本調査地点の両側5mの地帯はクヌギが主体の落葉広葉樹林であり、他の地点と趣を異にしている。本調査地点は調査地点6のスギ-シラカシ林とほぼ隣接しており、樹林帯の反対側は駐車場である。なお、日交通量は他の地点と同様、約16000台である。

【植栽構成と樹種】

中央分離帯、歩道植樹帯については調査地点5、調査地点6と同じである。保護林の厚さは、調査地点6と同様約35mである。保護林内は、先にも述べたようにクヌギが主体の落葉広葉樹林を構成しており、高さは約14m前後にまで達している。中木層にはイヌツゲ、ヒサカキなどの常緑広葉樹が植栽されている。

○落葉樹高木:クヌギ、クリ、トウカエデ

○中木:イヌツゲ、ヒサカキ

○低木:ニシキギ

【大気浄化の観点から注目すべき点】

①落葉樹林であるため、冬季の吸収効果は期待できないが、全体的に密に植栽され、夏季の吸収効果は大きいものがあると考えられる。

②他の地点と同様に高木・中木・低木などの組み合わせにより複合的な緑化を図っている。



写真 2 - 1 4 学園東大通り沿いの筑波大学周辺保護緑地
調査地 7 : クヌギ林



写真 2 - 1 5 同上地点のキャンパス側の植栽状況。

【測定結果】

図2-17は、学園東大通りの筑波大学周辺保護緑地のうち、クヌギ林タイプの樹林に設定したNO₂測定地点の概況を示したものである。測定地点は地点⑥に程近い場所にあり、保護緑地の幅は約35m、樹林の反対側には駐車場がある。林内のクヌギは高さ15mに達している。ガスバックNO₂測定器は同図に示したように、断面上に9個設置した。内訳は、地点⑤、⑥と同様の構成で、中央分離帯(D1)、歩道植樹帯(D2、道路端)歩道上(D3)に各1個ずつ、樹林内に6個(D4~D9)であり、道路より最も遠方のD9地点は道路端より35m奥にある。

図2-17の上部は、道路からの距離によってNO₂濃度がどのように変わるかを示したものである。中央分離帯(D1)では0.02ppm、道路端(D2)では0.01ppmを示すが、樹林の接道部(D4)では0.024ppmとここでの最高濃度を示した。樹林内では0.01ppmもしくはそれ以下となっており、最低値は樹林端のD8、D9の0.006ppmである。中央分離帯上の濃度を100%とすると、図2-18に示したように、道路端(D2)では50%、樹林の端(D9)では30%まで低減され、低減率は全調査地点中、最高を示した。

調査時期は冬季で、クヌギの落葉は終了し、樹木による汚染物質の吸収は林内に存在するヒサカキ、イヌツゲ等の低木で行われているのみの他に遮蔽効果、拡散効果があげられ、これらの相乗効果によって全体として低減が観測されていると考えられる。従って、本調査地のように、吸収、遮へいともにあまり期待できず、拡散による低減のみが観測される地点では、他の地点に比べ低減効果はあまり観測されないと予想していたが、結果はその逆を示した。

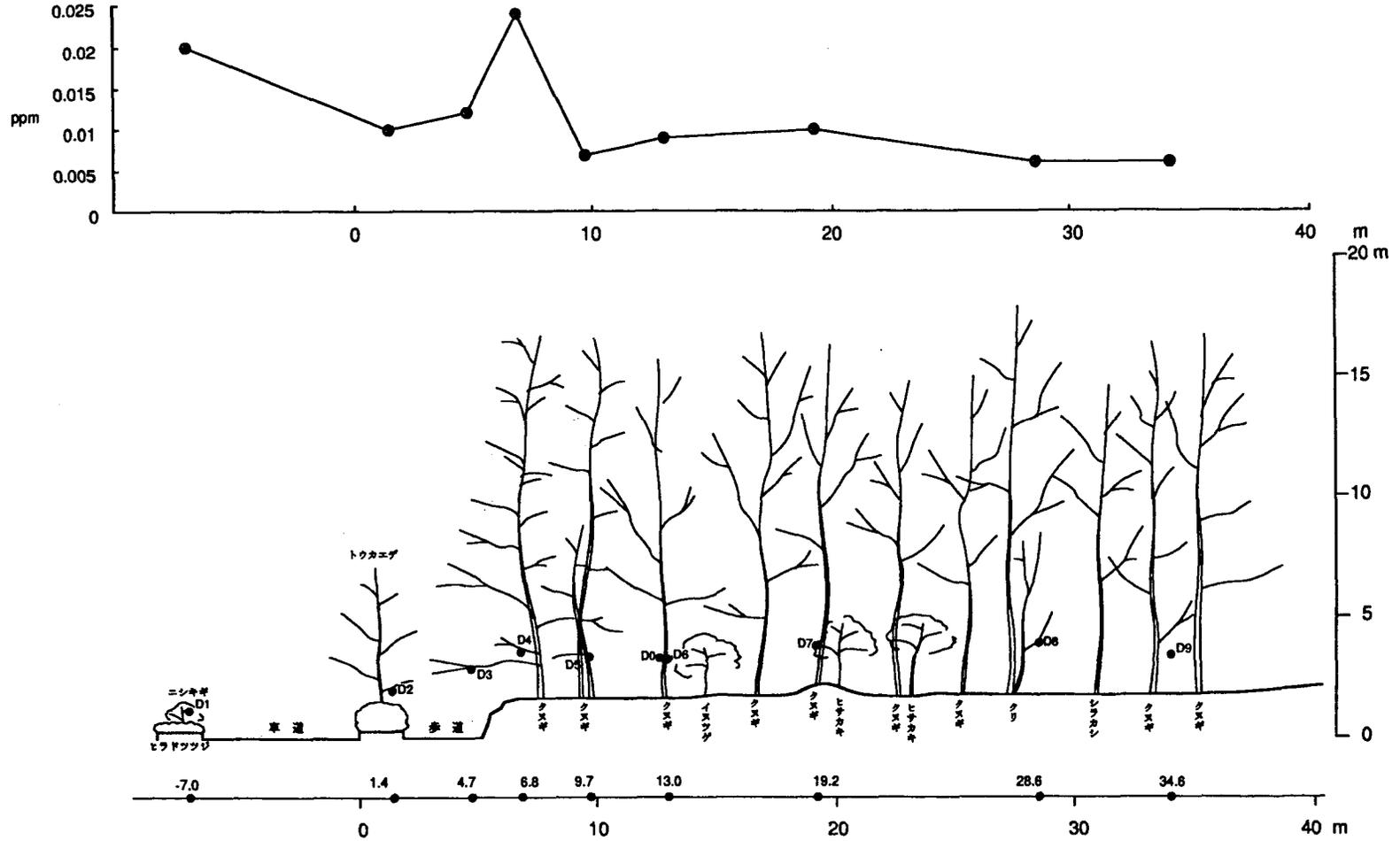


図 2 - 1 7 地点 7 筑波大学周辺保護緑地 (クヌギ林) における地点の状況とNO2濃度

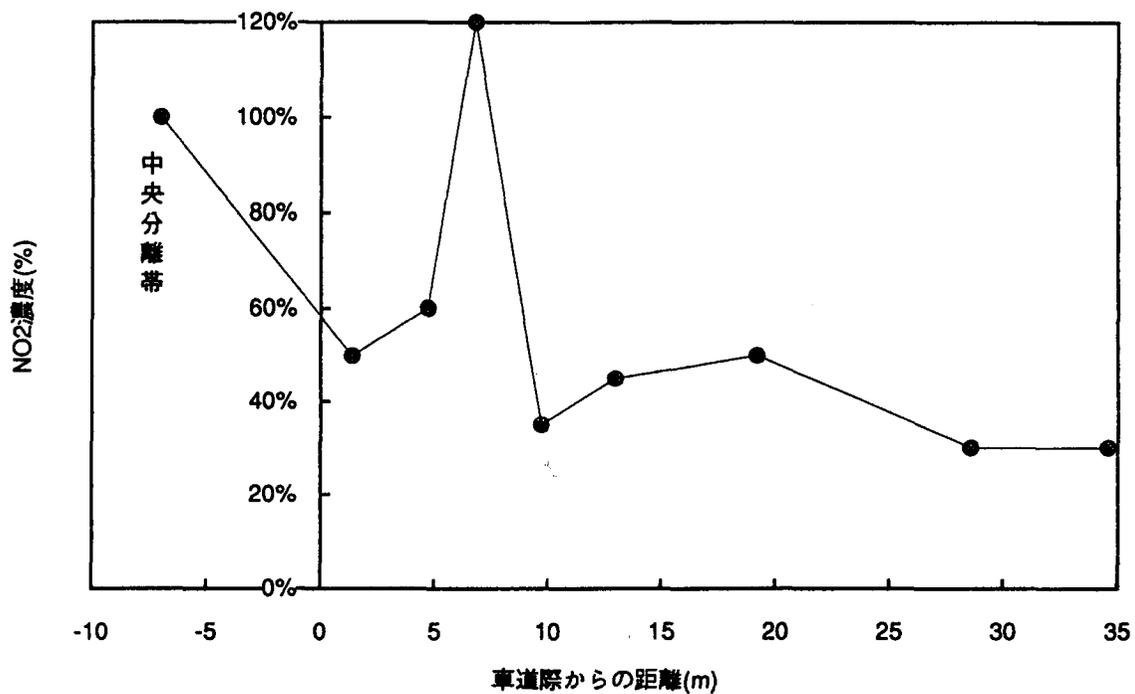


図 2 - 1 8 道路からの距離とNO₂濃度との関係 (調査地点7)
(測定日: 1996年2月7日~14日、測定高: 約2m)

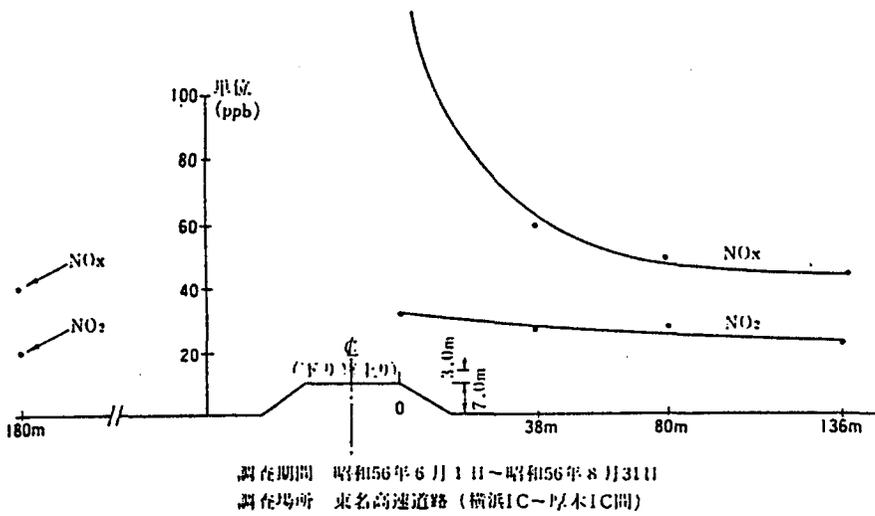


図 2 - 1 9 高速道路盛土部における窒素酸化物の距離減衰の例
(測定：地上1.5m)

出典) 前田依彦 (1984) : 高速道路と環境 - 最近の調査研究の概要 -
高速道路と自動車、第27巻、第4号

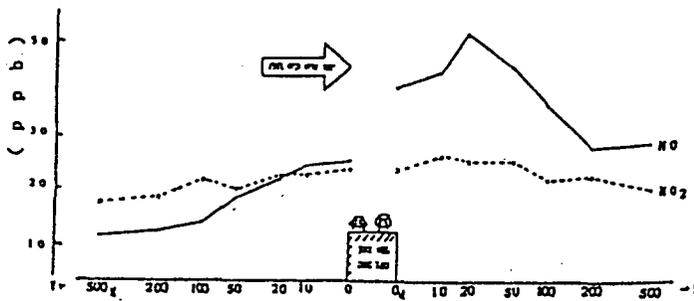


図 2 - 2 0 東名高速道路が沿道の窒素酸化物濃度に及ぼす影響

出典) 中村和光ほか (1988) : 道路沿線における窒素酸化物の環境調査
(第1報)、
第29回大気汚染学会講演要旨集

本調査においても放射36号線、湾岸道路及びつくば市内の各道路でNO₂の距離減衰が認められたが、道路端よりも環境保全林内のNO₂濃度が高いなど、発生源の影響を受けやすい道路近傍では、遮音壁や樹林により汚染物質が遮断されたり、林内に汚染物質が滞留しやすいことなど、植物による吸収効果以上にこのような物理的作用が大きく働いていることを示唆させる結果となっている。例えば、つくば市内の結果において、NO₂の低減効果が比較的良好に表れたのは緑量の多い筑波大学周辺保護林の常緑樹林ではなく、マウンド植栽帯の土浦境線や、筑波大学周辺保護林でも落葉後のクヌギ林であったことは、このように遮蔽効果や拡散効果などの物理的作用が低減の大きな要因となっていることを示していると考えられる。また、本調査結果では、都内、つくば市のいずれにおいても林内のNO₂濃度は道路からの距離に応じて単純に低減せず、一定になったり、時には増大する傾向にある場合もあり、複雑な傾向を示した。樹林が密であるほど複雑である傾向にあることから、これらのことから林内ではNO₂は一部滞留していることが考えられる。

また、本調査では、交通量の多い都内の道路と、比較的交通量の少ないつくば市内の道路沿道の植樹帯の調査を行い、その違いを検証した。表2-1に全調査地点の道路端におけるNO₂濃度と、最遠方設置地点における濃度及び道路端濃度との比を示した。調査地点の状況がそれぞれ異なるため、一律に論じることは難しいが、単純には道路端との比が小さいほど、樹林帯の低減効果が大きいことになる。本調査結果を概括すると、都内周辺の道路においては道路端との比が43~100%であり、つくば市内では48~117%と、特に交通量による違いはあらわれなかった。

表2-1 道路端の濃度と、最遠方設置地点の濃度比

地点番号	道路名	植樹タイプ等	道路端の濃度A (ppm)	最遠方調査地点			
				濃度B (ppm)	道路端比 B/A (%)	道路端からの距離 (m)	中央分離帯との濃度比 (つくば市内のみ)
1	三六道路(上り)	遮音壁あり	0.083	0.049	59.0	11.3	
	三六道路(下り)	遮音壁あり	0.075	0.032	42.7	12.3	
2	湾岸道路、東関道	遮音壁あり	0.056	0.056	100.0	46.2	
3	三目通り、首都高(上り)	マウンドあり	0.066	0.062	93.9	19.6	
	三目通り、首都高(下り)		0.069	0.048	69.6	21	
4	筑波境線	マウンドあり	0.017	0.02	117.6	21	66.7%
5	学園東大通り	アカマツ	0.027	0.013	48.1	25.4	76.5%
6	学園東大通り	スギーシラカシ	0.014	0.009	64.3	31.5	47.4%
7	学園東大通り	クヌギ	0.01	0.006	60.0	31.6	30.0%

総合研究をかえりみて

本研究は、1995年、明治大学科学技術研究所の総合研究として、下記の研究者を中心に大学院生を動員し実施された。

研究代表者	農学部教授	秋濱 友也
共同研究者	農学部教授	角田 公正
共同研究者	農学部教授	内藤 忠雄
共同研究者	農学部教授	輿水 肇
共同研究者	農学部専任講師	鳥倉 弘文

また、助成を受けた研究費は次の通りであった。

1994年度	310万円
1995年度	300万円
1996年度	290万円

これらの研究費は農学部の地球環境装置（通称、エコトロン）のガス類（ O_3 、 NO_2 、 CO_2 ）の購入、コンピューター制御のための補修、支払手数料、調査旅費等に役立たせて頂いた。

全国にも2～3台しかないというエコトロンで手がかかり、通年暴露実験はできなかったが大気汚染環境と関連のある研究へと広がりが見られたことは成功であった。終わりに科学技術研究所のご支援を頂いたことに感謝いたします。