

ホウレン草における光合成電子伝達活性への オゾン被曝の影響

Effects of Ozone on Photosynthetic Electron Transport in Spinach

栗屋 優*・村林 真行*・松野 武雄*

Masaru AWAYA, Masayuki MURABAYASHI and Takeo MATSUNO

Synopsis

The effects of ozone on photosynthetic electron transport in spinach were investigated under several experimental conditions. Electron transport from water to 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP-Hill reaction) in the chloroplasts isolated from the O₃-fumigated leaves was inhibited even under such conditions that visible injury was not detectable. The relative activity (%) of DCPIP-Hill reaction decreased with increasing O₃-dose [O₃ concentration (ppm) × fumigation time (h)]. The changes in relative activity of DCPIP-Hill reaction with time after the O₃-fumigation were also investigated.

1. 緒 言

環境汚染に対する評価は、分析化学・物理化学的手法ならびに生物に対する影響の面からも論議することが重要であると考えられ、特に大気汚染の場合には植物を利用する方法（指標植物法）^{1),2),3)}が注目されるようになった。植物は、動物のように移動することがなく、多くの場合大気汚染物質に対して動物よりも敏感で、その植物をとりまく大気環境の状態をよく反映するものと考えられている。大気汚染物質の植物に対する影響としては、(1)細胞が破壊されて壊死を生ずる急性障害、(2)汚染物質の蓄積による、壊死を伴った慢性障害、(3)光合成の低下、生長変化、収量減少などの生理的影響に分けられるが、(1)、(2)を合わせて可視障害、(3)を不可視障害と呼ぶこともある。

一般に指標植物法では、大気汚染物質に対する感受性の高い植物を指標として、その葉面に現れる可視障害の程度から環境汚染を評価している⁴⁾。しかしながら、現段階では定量的表現が困難であること、および指標植物の感受性の個体差、生育条件により障害度が変動することなどの問題点があげられる。

一方、可視障害が起こる以前に生理生化学的機能が

変化することが知られており、また、種々の生理生化学的性質の変動と可視障害との関連について菅原ら⁵⁾が検討している。それによると、SO₂に被曝した葉から単離した葉緑体クロロフィルの蛍光収率が低下することも示されている。戸塚ら⁶⁾は、汚染ガスを植物体内にとりこむ性質を利用して、SO₂については葉中のイオウ、NO₂については窒素化合物の検出を試み、祐田⁷⁾は葉中のフッ素含有量を気相フッ化物汚染の指標として用いることを試みている。

本研究室においては、大気汚染物質としてオゾンを取りあげ、大気汚染物質による植物の不可視障害について、再現性のある、かつ定量的な指標を求めることを検討している。オゾンは光化学オキシダントの主成分であり、植物に影響を与える物質として重要である^{8),9)}。オゾンによる可視障害では、成熟した葉の表面に白色小斑点、赤褐色小斑点などの症状が現れ、柵状組織が損傷を受ける。生化学的な現象としては、光合成を抑制し、呼吸に対する刺激を与えるとされている⁹⁾。大気中のCO₂が気孔を通して植物の葉内のクロロプラストへ拡散する現象と同じように、大気汚染物質は葉の周囲の空気から気孔表面、気孔、細胞間隙、細胞膜、クロロプラストという経路で葉中へとりこまれると思われる。オゾンは強い酸化作用とラジカル連鎖反応によって細胞膜やオルガネラの生体膜の不飽和脂肪酸、SH化合物（酵素など）を攻撃すると考

* 環境計測工学研究室
Department of Environmental Monitoring Technology

えられ¹⁰⁾, また, 各種の生理生化学的な変化を誘発し, 植物の正常な機能活動を阻害すると思われる。

本研究ではオゾンに曝露した葉より葉緑体を単離し, その光合成電子伝達活性を測定し, オゾンドース(曝露濃度×時間)と光合成電子伝達反応阻害との関連について検討した。またオゾンに曝露した後, 経日的に葉を採取して葉緑体を単離し, その光合成電子伝達反応活性の変化について測定した。

2. 実験方法

2.1 植物試料

横浜国立大学平塚教場で育成した鉢植のホウレンソウ(品種: 平安日吉丸)の播種後約15~20週のものを実験試料として用いた。

2.2 オゾン曝露

Fig. 1 に示す装置を用いてオゾン曝露を行った。図中オゾナイザーⅠは大気中の NO_x を酸化・除去するためのもので, オゾナイザーⅡは空気中にオゾン在所定濃度になるように供給するためのものである。大気中の SO_x を除去するために三酸化クロム紙(三酸化クロム硫酸酸性溶液をガラスフィルターペーパーにしみこませ, 乾燥したもの)を充填した管を用いた。植物試料を曝露箱に入れて光照射(植物育生用蛍光灯と白色蛍光灯で曝露箱内照度が約 20,000lx)し, 空気のみを流速 5 l/min で流す。次に, オゾンを空気と混合して所定の濃度に調節し, 所定時間(2~5時間)流速 5.5 l/min で曝露箱に流した。曝露中オゾン濃度のモニターは, Fig. 1 に示した吸収ビンにより30分ごとにガスを採取し, 中性ヨウ化カリウム法¹¹⁾により分

光光度計を用いて定量することによって行った。

2.3 葉緑体の単離

所定濃度のオゾンに所定時間(2~5時間)曝露した植物試料の葉を採取し, 蒸留水で充分洗浄し, 水分をふきとる。次いで, 氷冷しておいた 0.4M ショ糖, 0.02M NaCl を含む 0.05M リン酸緩衝液(pH 7.5)中で, 試料葉をホモジナイザーにより破碎して, その破碎液を4層のガーゼでろ過した。ろ液を 500×G で5分間冷却遠心分離(0~4℃)して細胞細片などを除去し, 上澄をさらに 2,000×G で10分間冷却遠心分離(0~4℃)して葉緑体を沈殿させた。この葉緑体をできるだけ少量の前述緩衝液に懸濁して光合成電子伝達反応の測定を行った。

2.4 光合成電子伝達反応の測定

単離葉緑体による2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCPIP)の光還元(=DCPIP-Hill反応)は, 試料部をFig. 2のように改造した分光光度計を用いて 614nm の吸収の減少により測定した。受光部の光電子増倍管の前に迷光を防ぐための干渉フィルター(東芝 KL-61)を取り付け, 励起光は顕微鏡用光源(9V, 5A)の前に赤外線吸収フィルター(東芝 IRA-25S)およびカットオフフィルター(東芝 R-65)を取り付けて 650~700nm の光を用いた。反応試料をセルに入れ, 励起光を上方より測定光と90度の角度で照射して反応を行わせた。反応試料は 4 ml で, 次の組成からなる: 12.5mM リン酸緩衝液(pH 7.5), 100mM ショ糖, 5mM NaCl, 20μM DCPIP, およびクロロフィル 3~5 μg/ml 相当の単離葉緑体。

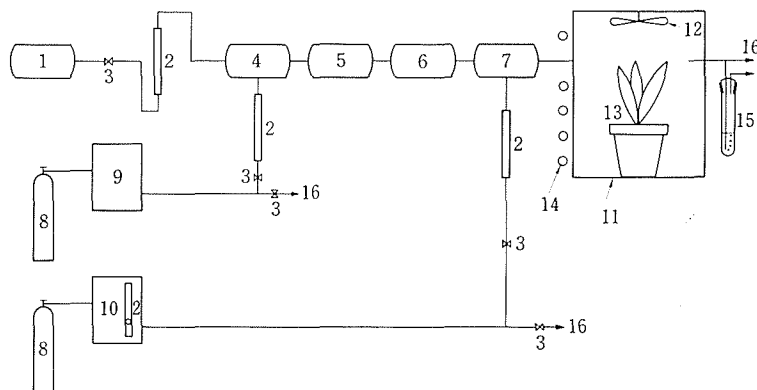


Fig. 1 Ozone fumigation system

1: Air compressor, 2: Flow meter, 3: Flow control valve, 4: NO_x oxidation vessel, 5: NO₂ absorber (activated carbon), 6: SO_x absorber, 7: O₃-air mixer, 8: Oxygen, 9: Ozonizer I, 10: Ozonizer II, 11: Fumigation box, 12: Fan, 13: Sample (spinach), 14: Fluorescent lamp, 15: Gas sampler, 16: Draft chamber

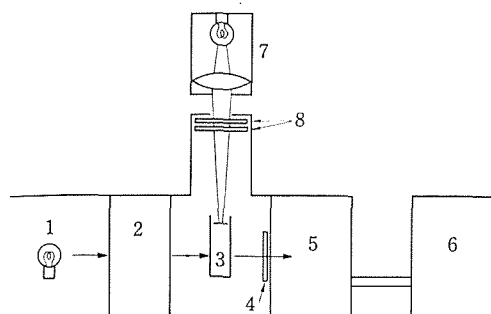


Fig. 2 Spectrophotometer for the measurement of photosynthetic electron transport

1: Light source for the spectrophotometer, 2: Monochromator, 3: Cell, 4: Interference filter, 5: Photomultiplier and amplifier, 6: Recorder, 7: Microscope lamp, 8: Heat absorbing filter and cut-off filter.

2.5 クロロフィルの定量

クロロフィルの定量は Arnon の方法¹²⁾によった。すなわち一定の葉緑体懸濁液から80%アセトン水溶液でクロロフィルを抽出し、分光光度計を用いてその645nm, 663nmにおける吸光度を測定して、クロロフィル濃度を算出した。

3. 結果および考察

植物試料（ホウレンソウ）を所定濃度のオゾンに所定時間曝露した直後と24時間後に葉緑体の光合成電子伝達反応活性（DCPIP-Hill 反応活性）を測定した（Table 1, 2）。光照射を行った後の曝露箱内温度は20～24°Cであった。オゾンドースに対し、Hill 反応相対活性（%）（無曝露の対照試料の Hill 反応活性の値を100%とした）をプロットしたものを Fig. 3（曝露直後）、Fig. 4（24時間後）に示す。オゾンドースが1.5ppm hにおいては曝露直後でHill 反応活性が約25%低下しているが可視障害は認められず、（Fig. 3, Table 1）オゾンドースが2.5ppm hを超えると可視

Table 1 Hill activity of the chloroplasts isolated from leaves without O₃ fumigation

Sample ^{a)}	Hill activity ($\mu\text{mol DCPIP red.}/\text{mg chl. h}$)
H11	71.0
H12	74.5
H18	72.4
mean	72.6

a) H11 and H12: spinach (Heian-hiyoshimaru) sowed on Oct. 18, 1978; H18: spinach (Heian-hiyoshimaru) sowed on Oct. 31, 1978

Table 2 Hill activity of the chloroplasts and observation of leaves after O₃ fumigation

Sample ^{a)} (fumigation date)	O ₃ dose ^{b)} (ppm h)	Immediately after the fumigation			24h after the fumigation		
		V. I. ^{c)}	Hill activity ($\mu\text{mol DCPIP red.}/\text{mg chl. h}$)	(relative activity ^{d)})	V. I. ^{c)}	Hill activity ($\mu\text{mol DCPIP red.}/\text{mg chl. h}$)	(relative activity ^{d)})
H22 (Mar. 26)	0.38 ^{e)}	—	67.9	(93.5)	—	51.3	(70.7)
H24 (Apr. 16)	0.52 ^{e)}	—	68.1	(93.8)	—	58.0	(79.7)
H15 (Feb. 15)	0.72 ^{e)}	—	62.8	(86.5)
H 7 (Jan. 24)	1.00 ^{e)}	—	61.5	(84.7)	—	43.4	(59.8)
H17 (Feb. 19)	1.28 ^{e)}	—	54.3	(74.8)	—	42.9	(59.1)
H21 (Mar. 12)	1.46 ^{e)}	—	52.6	(72.5)	—	58.6	(80.7)
H 9 (Jan. 30)	2.24 ^{e)}	—	64.6	(89.0)
H13 (Feb. 6)	2.58 ^{f)}	+	57.5	(79.2)	+++	58.0	(79.7)
H14 (Feb. 8)	2.66 ^{e)}	++	55.3	(76.2)	+++	29.7	(40.9)
H20 (Mar. 5)	3.40 ^{e)}	+	62.2	(85.7)	+	51.1	(70.4)
H16 (Feb. 17)	3.72 ^{f)}	—	37.1	(51.1)
H10 (Jan. 31)	3.85 ^{g)}	++	43.2	(59.5)	+++	48.1	(66.3)

a) H7 to H14 and H16: spinach (Heian-hiyoshimaru) sowed on Oct. 18, 1978; H15 and H17 to H21: spinach (Heian-hiyoshimaru) sowed on Oct. 31, 1978

b) O₃ dose=O₃ concentration (ppm)×fumigation time (h)

c) The degree of V. I. (Visible Injury) is expressed as follows; —: not detectable, +: slight injury, ++: medium injury and +++: severe injury

d) Relative activity is expressed in percentage of the corresponding value of the chloroplasts isolated from leaves without fumigation.

e) fumigation time=2h

f) fumigation time=3h

g) fumigation time=5h

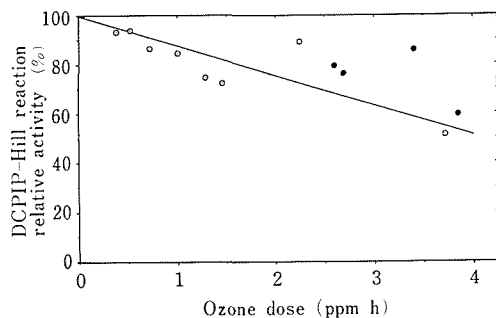


Fig. 3 Relation between O_3 dose and Hill activity immediately after the O_3 fumigation
Open circle: No visible injury
Solid circle: Visible injury appeared
(See Table 2)

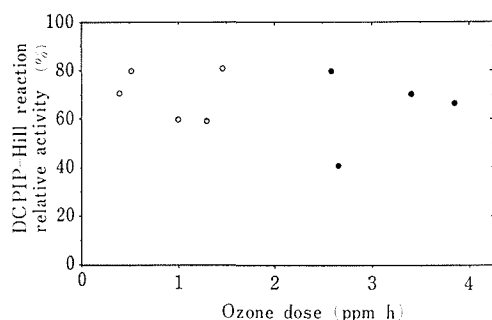


Fig. 4 Relation between O_3 dose and Hill activity 24h after the O_3 fumigation
Open circle: No visible injury
Solid circle: Visible injury appeared
(See Table 2)

障害が現われた。すなわち可視障害が生じるよりも低いオゾンドースにおいて光合成電子伝達反応阻害が起きていることになる。また、Fig. 3 によればオゾンドース 3.9ppm h 以下の範囲内では、オゾンドースと曝露直後の Hill 反応活性との間にはほぼ線形な関係がみられる。すなわちこの範囲ではオゾンドースの増大とともに光合成電子伝達反応阻害が大きくなると解釈できる。

高等植物における光合成電子伝達系の構成は Fig. 5 のようになっており、DCPIP は図中に示す位置で電子受容体(酸化剤)として作用する。したがって、DCPIP-Hill 反応活性は光化学系Ⅱによる電子伝達反応活性であり、本実験では、光化学系Ⅱによって駆動される H_2O から DCPIP への電子伝達系に阻害が起きている。その様式は、1) 電子伝達系の特定部位(光化学系Ⅱの周囲)の損傷、あるいは2) 葉緑体チラコイド膜の全体的損傷によるものと考えられる。こ

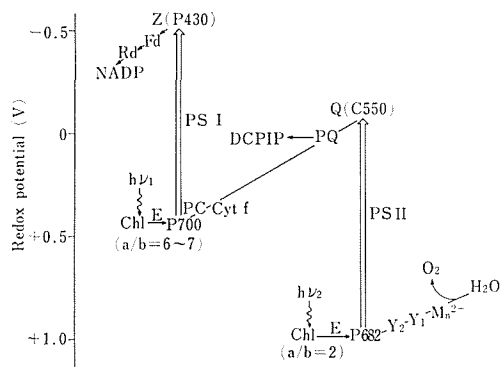


Fig. 5 Photosynthetic electron transport system in higher plants^{13), 14)}

PS-I: Photosystem-I
PS-II: Photosystem-II
Chl: Antenna chlorophyll
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Rd: Ferredoxin-NADP reductase
Fd: Ferredoxin
Z (P430): Primary electron acceptor of PS-I
PQ: Plastoquinone
P700: Trapping center of PS-I
PC: Plastocyanin
Cyt f: Cytochrome f
Q (C550): Primary electron acceptor of PS-II
P682: Trapping center of PS-II
 Y_1, Y_2 : Reducing substances

の点を検討するためには電子伝達活性を系Ⅰ、系Ⅱに分けて測定することが必要であろう。

曝露直後よりも24時間後に DCPIP-Hill 反応活性の低下する場合がいくつかみられた。(Table 2, Fig. 3, Fig. 4) そこで、光合成電子伝達阻害が一時的なものか不可逆的なものかを検討するために、オゾン曝露を行った植物試料を屋外(試料の一部を栽培している条件下)に放置して、同一試料から経日的に葉を採取して DCPIP-Hill 反応活性を測定した(Fig. 6)。この結果は同一試料とはいえ異なる葉から単離した葉緑体についての比較であり、葉によって電子伝達反応阻害の受け方が違う可能性もあるので、断定的なことは云えない。しかし、オゾン曝露による光合成電子伝達反応阻害はオゾンドースが 1.46~3.40ppm h においては一時的なものであり、オゾンドースの増大につれて電子伝達反応活性の回復に要する時間が長くなる傾向のあることがみられた。

本実験では、可視障害が発生するオゾンドースが 2.6ppm h 以上と、一般に報告されている値(0.02ppm

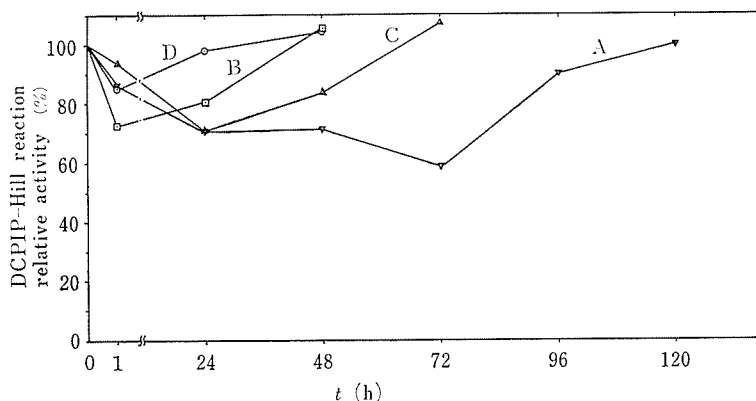


Fig. 6 Changes of Hill activity with time after the O_3 fumigation

A: H20 (1.70ppm \times 2h)

B: H21 (0.73ppm \times 2h)

C: H22 (0.19ppm \times 2h)

D: H24 (0.26ppm \times 2h)

$\times 4 \sim 8$ h, $0.05\text{ppm} \times 1 \sim 2\text{h}^{15)}$ に比べて大きくなっているが、これは品種、栽培時期等の違いのためにオゾンに対する感受性が低くなるのではないかと思われる。したがって、品種・栽培時期等の異なる試料について実験を行い、検討する必要がある。

4. 謝 辞

本研究を行うにあたり、植物試料の栽培について有益な御助言を賜った横浜国立大学教育学部麻生武夫教授に感謝の意を表する。また試料を提供していただいた教育学部平塚教場の方々に謝意を表する。

文 献

- 1) 松中昭一: 指標生物, p. 33 (1975) 講談社
- 2) 牛場忠広・田崎忠良: 環境植物学, p. 251, (1978) 朝倉書店
- 3) 山添文雄: ぶんせき, No. 3, 157 (1978)
- 4) 松中昭一: 指標生物, p. 56 (1975) 講談社
- 5) 菅原他: 国立公害研究所特別研究成果報告 R-2

p. 35 及び p. 47 (1978)

- 6) 戸塚他: 同上, p. 57, p. 67, p. 77, p. 89
- 7) 祐田泰延: 公害と対策, 15, (3), 411 (1979)
- 8) 野内勇: 遺伝, 30, (7), 37 (1976)
- 9) W. M. Dugger and I. P. Ting: Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 215 (1970)
- 10) H. E. Stokinger and D. L. Coffin: Air Pollution, 2nd ed. (Ed. by A. C. Stern) volume I, p. 446 (1968) Academic Press
- 11) 日本分析化学会関東支部: 公害分析指針, 大気編 2-a, p. 10 (1972) 共立出版
- 12) D. J. Arnon: Plant Physiol., 24, 1 (1949)
- 13) 柴田和雄: 化学総説, 12, 45 (1976)
- 14) コーンスタンプ (田宮信雄ら訳): 生化学 (第4版), p. 392 (1978) 東京化学同人
- 15) C. S. Brandt and W. W. Heck: Air Pollution 2nd ed. (Ed. by A. C. Stern) volume I, p. 401 (1968) Academic Press