

ホウレン草における光合成電子伝達反応活性へのオゾン被曝の影響 (II)

Effects of Ozone on Photosynthetic Electron Transport in Spinach (II)

村林 真行*・栗屋 優*・辻 秀子*・松野 武雄*

Masayuki MURABAYASHI*, Masaru AWAYA*, Hideko TSUJI* and Takeo MATSUNO*

Synopsis

The effects of ozone on photosynthetic electron transport in chloroplasts of spinach leaves were investigated. The photosynthetic activities of the photosystem-I, the photosystem-II and the total photosystem were expressed by DPIP_{H2}-NADP photoreduction rate, DPIP-Hill reaction rate and NADP-Hill reaction rate, respectively. The activities were determined by means of spectrophotometer. The activity decrease of the photosystem-I, resulting from the ozone fumigation, was nearly equal to that of the total photosystem, and a little larger than that of the photosystem-II.

1. 緒 言

環境汚染に対して用いられる指標植物法¹⁾は、その植物をとりまく大気環境の状態をよく反映し、種々の利点を有している。しかしながら可視障害発現以前の被害の状態が明らかでなく、定量的評価の方法等にも問題も残されている。これまでに光化学オキシダントの植物に対する影響については Dugger ら²⁾により述べられているほか、オゾンに曝露したアサガオの葉の電子顕微鏡観察から、チラコイド膜系の崩壊の様子が報告されており³⁾、また SO₂ に被曝した葉の葉緑体の活性 (DPIP-Hill 反応等) の測定が行われている⁴⁾。しかし葉の阻害の機構には不明な点が多い。

前報⁵⁾では植物の光合成電子伝達反応活性のうち、光化学系 II の反応活性に対するオゾン被曝の影響について報告した。そこでは可視障害が発生しないような条件 (オゾン濃度×時間) でも反応活性の低下がみられることや、光化学系 II によって駆動される、H₂O から DPIP に至る電子伝達系に阻害がおこること等を明らかにした。しかしながら、電子伝達系の他の部位に損傷はないか、あるいは、電子伝達系の全体的損傷な

のか等は不明であった。

本実験ではこれらの点を明らかにするために、オゾン曝露を行った同一試料から単離した葉緑体について、光合成電子伝達反応活性を、光化学系 I、光化学系 II および光化学系全体の反応活性に分けてそれぞれ測定することとした。すなわち、光化学系 I の反応活性は、DPIP_{H2}-NADP (Dichlorophenolindophenol reduced form-Nicotinamide Adenin Dinucleotide Phosphate) 光還元反応速度の測定により求め、光化学系 II の反応活性は、DPIP (Dichlorophenolindophenol)-Hill 反応速度の測定により求め、また光化学系全体の活性は NADP-Hill 反応速度の測定により求めた。

2. 実験方法

実験に用いた装置の一部は前報で述べたので、詳細は省略し、その概要を記す。

2.1 植物試料

横浜国立大学平塚教場および環境科学研究センターで栽培した鉢植のホウレンソウ (Atlas種) を用いた。葉緑体単離にあたっては、播種後約 7~13 週で、第 5~第 10 葉を用いた。

2.2 オゾン曝露

オゾンナイザーで発生させたオゾンを経験により一定

* 環境計測工学研究室
Department of Environmental Monitoring
Technology
(1980年9月30日受領)

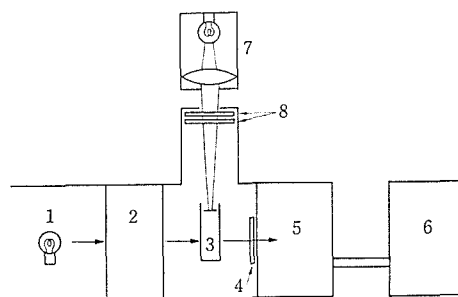
の濃度に稀釈して、曝露箱に導き、試料植物に被曝させた。この稀釈のための空気には、コンプレッサーからの空気を精製して用いた。即ち、三酸化クロム含浸の沓紙を用いて SO_x を除去し、オゾンと活性炭を用いて NO_x を除去した。装置の図は前報⁵⁾に示した通りである。オゾン濃度としては 0.08ppm から 1.9ppm の間を選び、被曝時間は 2 時間 (実験の都合により 1 および 3 時間のものを含む) とした。オゾン曝露に先だって、試料植物を曝露箱に入れ、光照射 (東芝 FL 20S BRF 植物用と FL20SW 白色蛍光灯で約 3,000lx) のもとで、空気のみを流速 5 l/min で 30 分間流した。次いで上記濃度のオゾンを含む空気を 5.2~5.5 l/min で 2 時間流した。曝露箱の容量は 18 l である。曝露中の空気は 30 分毎にサンプリングし、オゾン濃度を中性ヨウ化カリウム法により求めた。ブランク実験として、曝露箱に植物試料を入れ、オゾンを含まない空気を同様にして流して測定を行った。

2.3 葉緑体の単離

オゾン被曝後の試料から葉を採取、水洗いしさらに蒸留水でよくすすいだ後、水分をふき取って、サララップに包み、冷蔵庫中で約 30 分冷却した。一方、サッカロース 68.5g、塩化ナトリウム 0.58g、リン酸一水素ナトリウム 1.78g 及びリン酸二水素カリウム 1.70g、アルブミン 0.5g に再蒸留水を加え溶解後、水酸化カリウム水溶液で pH=7.0±0.1 に調整し、再蒸留水により正確に 500ml とし、緩衝溶液として冷却保存した。冷却しておいた葉は、茎の部分を除いて細断し、あらかじめ冷却しておいたホモジナイザーのカップに入れ、葉 5g に対し約 20ml の割合で冷却した緩衝溶液を加え、氷冷しながら 18,000r.p.m. で 30 秒間破碎した。この破碎液をまず 8 層のガーゼを通してよく絞り、さらに 16 層のガーゼで沓過した。沓液を 2,000 G で 50 秒間冷却遠心分離して、葉緑体を沈殿させた。この沈殿した葉緑体を少量の緩衝溶液に懸濁し、使用するまで冷却保存した。

2.4 光合成電子伝達反応活性の測定

光合成電子伝達反応活性のうち、光化学系 I の活性は DPIPH₂-NADP 光還元反応活性から求め、光化学系 II の活性は DPIP-Hill 反応活性から、また光化学系全体の活性は NADP-Hill 反応活性の測定から求めた。いずれも励起光照射の可能な分光光度計により測定した⁶⁾。Fig. 1 にその概念図を示す。図中 7 は励起光光源で、タングステンランプを使用し、途中 8 に赤外線吸収フィルターおよびカットオフフィルターを挿入し、透過光の波長を 650~790nm とした。また受光部の光電管の前 4 には、測定光以外の迷光を防ぐため、反応に応じたフィルターを入れた。即ち、DPIP-Hill



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

Fig. 1 Spectrophotometer for the measurement of the photosynthetic electron transport

反応の場合は 614nm に透過極大を持つ干渉フィルターを用い NADP-Hill 反応および DPIPH₂-NADP 光還元反応については、340nm 付近に透過極大を持つガラスフィルターを用いた。

2.4.1 DPIP-Hill 反応活性の測定

光化学系 II の活性を表わす DPIP-Hill 反応活性については、葉緑体に対し人工的電子受容体として酸化型の 2,6ジクロロフェノールインドフェノール(DPIP)を与えて光照射し、DPIP の光還元速度を測定して活性を求めた。

まず DPIP-Na の水溶液と前記の緩衝溶液および再蒸留水を用いて、614nm における吸光度を測定し、DPIP 濃度 (μM) と吸光度の関係から μM 吸光係数 ε (l μmol⁻¹) を求めた。

次に遮光した試験管に 400 μM DPIP 溶液 0.2ml、再蒸留水 2.8ml 及び葉緑体を緩衝溶液中に懸濁した溶液 1ml (クロロフィル濃度 3~4 μg/ml) を入れて攪拌後、光照射しながら 614nm における吸光度の 1 分当りの減少量 ΔA (min⁻¹) を測定した。また、再蒸留水 3.0ml と葉緑体懸濁液 (緩衝溶液中) 1ml を混合したものについても、同様に吸光度の 1 分当りの減少量 ΔB (min⁻¹) を測定した。

クロロフィル濃度は Arnon⁷⁾ の方法により測定した。即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 645nm と 663nm における吸光度を測定して、クロロフィル濃度 C (μg ml⁻¹) を算出した。

以上の測定から DPIP-Hill 反応活性は、クロロフィル 1mg、1 時間当りに光還元された DPIP の量 (μmol) として、次式から求めた。

$$\text{反応活性} = \frac{(A - B) \times 60}{\epsilon C} \left(\frac{\mu\text{mol reagent red.}}{\text{mg Chl. h}} \right) \dots\dots\dots (1)$$

2.4.2 NADP-Hill 反応活性の測定

光化学系全体の活性を示す NADP-Hill 反応活性の測定には、人工的電子受容体として NADP を与えて照射し、NADP の光還元速度を測定することにより活性を求めた。

遮光した試験管に再蒸留水 2.8ml, 3 mM NADP 水溶液 0.2ml 及び葉緑体を緩衝溶液中に懸濁した溶液 1 ml (クロロフィル濃度 3 ~ 4 μgml^{-1}) を入れて攪拌後、照射しながら 340nm における吸光度の時間変化 ΔA (min^{-1}) を測定した。また葉緑体懸濁液 (緩衝溶液中) 1 ml と再蒸留水 3 ml を混合したものについても同様に吸光度の時間変化 ΔB (min^{-1}) を測定した。

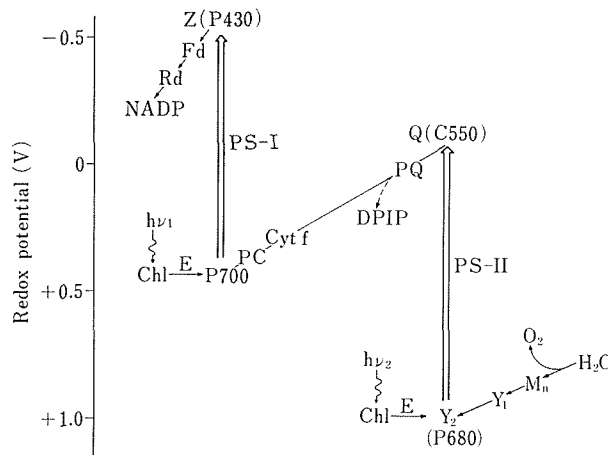
NADP-Hill 反応活性はクロロフィル 1 mg, 1 時間当りに光還元された NADP の量 (μmol) で表わし、ここに求めた ΔA および ΔB の値を用いて(1)式から算

出した。この場合 NADPH の 340nm における μM 吸光係数 ϵ として 6.3×10^3 ($1 \mu\text{mol}^{-1}$ at 25°C and $\text{pH}=7$) を用いた。クロロフィル濃度は DPIP-Hill 反応の場合と同様にして求めた。

2.4.3 DPIP₂-NADP 光還元反応活性の測定

光化学系 I の活性を表わす DPIP₂-NADP 光還元反応では、未詳物質 Q からプラストキノン PQ (Fig. 2)⁸⁾ への電子伝達を阻害する DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) の存在下で還元型 DPIP を人工的電子供与体として与え、NADP を人工的電子受容体として与えて照射し、NADP の還元速度を測定して活性を求めた。

遮光した試験管に再蒸留水 2.4ml, 400 μM アスコルビン酸水溶液 0.2ml, 400 μM DPIP 水溶液 0.1ml, 4 mM NADP 水溶液 0.2ml, 葉緑体を緩衝溶液中に懸濁させた液 1 ml および 400 μM DCMU メタノール溶液をこの順に加えて、よく攪拌した。この溶液について、照射しながら 340nm の吸光度の時間変化 ΔA (min^{-1}) を測定した。また再蒸留水 2.9ml, 葉緑体



- PS-I: Photosystem-I
- PS-II: Photosystem-II
- Chl.: Antenna chlorophyll
- NADP: Nicotinamide adenin 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
- Y₂ (P680): Trapping center of PS-II
- Y₁ Reducing substances

Fig. 2 Photosynthetic electron transport system in higher plants

懸濁液 1 ml および DCMU メタノール 溶液 0.1 ml を混合した液についても、同様にして吸光度変化 ΔB (min^{-1}) を測定した。

DPIP₂-NADP 光還元反応活性は、これらの値を用いて、NADP-Hill 反応活性の場合と同様(1)式から求めた。

Table 1 Effect of ozone fumigation on the photosynthetic activities of chloroplasts and observation of leaves

Sample No. (Period of growth (weeks))	a) O ₃ Dose (ppm×h)	b) V.I.	c) PS-I Act. ($\mu\text{mol NADP red.}$ mg Chl. h)	d) (Rel. Act.) (%)	e) PS-II Act. ($\mu\text{mol DPIP red.}$ mg Chl. h)	d) (Rel. Act.) (%)	f) NADP-Hill Act. ($\mu\text{mol NADP red.}$ mg Chl. h)	d) (Rel. Act.) (%)
1-1 (7)	0.00	...	<u>74.5</u>	100.0	<u>132.0</u>	100.0	<u>115.9</u>	100.0
1-2 (7)	0.28×2	-	44.8	60.1	116.9	88.6	46.4	40.0
1-3 (7)	1.12×2	++	53.9	72.3	101.1	76.6	55.2	47.6
2-1 (9)	0.00	...	73.0	94.3	120.5	106.0	90.8	102.3
2-2 (9)	0.00	...	81.7	105.6	106.9	94.0	86.7	97.6
Average			<u>77.4</u>	100.0	<u>113.7</u>	100.0	<u>88.8</u>	100.0
2-3 (9)	0.23×2	-	46.6	60.2	190.1	167.2	45.9	51.7
2-4 (9)	0.47×2	-	54.9	70.9	85.5	75.2	54.7	61.6
2-5 (9)	1.19×2	-	52.0	67.2	78.2	68.8	64.6	72.7
2-6 (9)	1.49×2	+	44.2	57.1	86.6	76.2	54.7	61.6
2-7 (9)	1.49×3	+	52.5	67.8	82.3	72.4	58.2	65.5
3-1 (9)	0.00	...	106.5	115.0	115.0	85.2	101.3	107.0
3-2 (9)	0.00	...	86.6	93.5	134.0	99.3	94.7	100.0
3-3 (9)	0.00	...	84.6	91.4	155.7	115.4	88.1	93.0
Average			<u>92.6</u>	100.0	<u>134.9</u>	100.0	<u>94.7</u>	100.0
3-4 (9)	0.12×2	-	73.0	78.8	121.0	89.7	69.3	73.2
3-5 (9)	0.38×2	-	55.8	60.3	126.4	93.7	64.5	68.1
3-6 (9)	0.48×2	-	60.9	65.8	128.9	95.6	64.8	68.4
3-7 (9)	1.09×2	-	68.4	73.9	139.4	103.3	52.5	55.4
3-8 (9)	1.32×2	-	61.9	66.8	106.4	78.9	37.2	39.3
3-9 (9)	1.85×2	+	49.8	53.8	112.5	83.4	57.3	60.5
4-1 (13)	0.00	...	<u>79.1</u>	100.0	—	—	<u>89.7</u>	100.0
4-2 (13)	0.11×2	-	63.4	80.2	—	—	71.6	79.8
5-1 (13)	0.00	...	62.0	97.0	68.5	98.4	85.6	100.0
5-2 (13)	0.00	...	65.8	103.0	70.6	101.4	85.6	100.0
Average			<u>63.9</u>	100.0	<u>69.6</u>	100.0	<u>85.6</u>	100.0
5-3 (13)	0.08×1	-	67.0	105.0	68.8	98.9	82.5	96.4
5-4 (13)	0.09×2	-	65.1	101.9	71.2	102.3	75.9	88.7
5-5 (13)	0.20×2	-	47.2	73.9	70.7	101.6	80.7	94.3
6-1 (10)	0.00	...	81.2	92.1	84.3	103.6	75.3	91.1
6-2 (10)	0.00	...	95.2	107.9	78.5	96.4	90.0	108.8
Average			<u>88.8</u>	100.0	<u>81.4</u>	100.0	<u>82.7</u>	100.0
6-3 (10)	0.30×2	-	85.7	97.2	67.1	82.4	74.4	90.0
6-4 (10)	0.12×2	-	78.0	88.4	79.6	97.8	81.9	99.0

a) Spinach (Atlas): 1-1 to 1-3, sowed on Sept. 11, 1979, 2-1 to 2-7, sowed on Sept. 22, 1979, 3-1 to 3-9 and 4-1 to 4-2, sowed on Oct. 11, 1979, 5-1 to 5-5, sowed on Nov. 9, 1979 and 6-1 to 6-4, sowed on Dec. 5, 1979

b) Degrees of injury expressed by the sign -: not detectable, by the sign +: medium injury and by the sign ++: severe injury

c) Photosystem-I activity: DPIP₂-NADP photoreduction rate

d) Relative activities expressed as a percent of the average values (figures with underline) of the blank experiments

e) Photosystem-II activity: DPIP-Hill reaction rate

f) NADP-Hill reaction activity; total photosystem reaction rate

3. 結果および考察

植物試料を種々の濃度のオゾンに一定時間曝露した後、葉を採取し、葉緑体を単離して、その光合成電子伝達反応活性を測定した結果を Table 1 に示す。反応活性は、光化学系 I、光化学系 II および光化学系全体について測定したものである。相対活性は、オゾンに無被曝の試料の活性の平均を 100 として表わした、それぞれの活性のパーセントである。なお、試料の栽培時期等の影響を出来る限り除くため、無被曝試料の活性は被曝試料と同時期にまいた試料についてその都度測定した。オゾン被曝の時間は主として 2 時間としたが、実験の都合上 1 時間および 3 時間のものも含まれている。

これらの値を縦軸に相対活性(%), 横軸にオゾンドーズ (オゾン濃度 (ppm) × 曝露時間 (h)) として表わすと Fig. 3, Fig. 4 および Fig. 5 のようになる。横軸にドーズをとったが、これはドーズが等しければ曝露効果が厳密に等しいことを確認した結果ではなく、曝露時間の異なる実験結果を同一のグラフ上に表わすために便宜的、近似的にとった手段である。実際には大部分の実験の曝露時間が 2 時間であるから、問題はないと思われる。

図および表から明らかなように、可視障害は 2.4 ppm h 以上で現われている。この値は前報の結果とはよく一致しているが、既に報告されている値 (0.05 ppm × 1 ~ 2 h⁹⁾, 0.07 ~ 0.02 ppm × 2 h¹⁰⁾ 等に比べるとやや大きい。これは試料の違いのほか、曝露時の

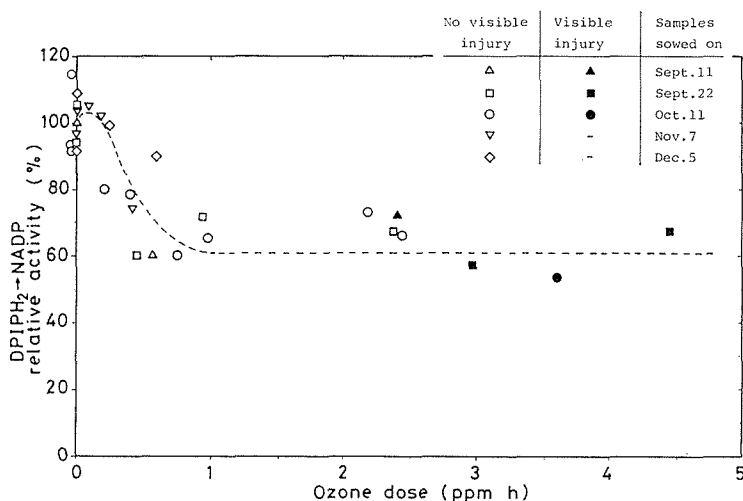


Fig. 3 Relation between DPIPH₂-NADP Photoreduction activity (PS-I) and ozone dose

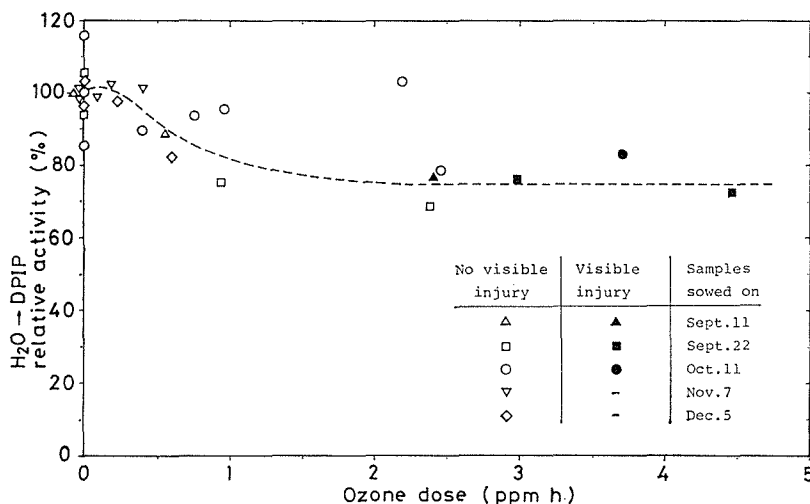


Fig. 4 Relation between DPIP-Hill reaction activity (PS-II) and ozone dose

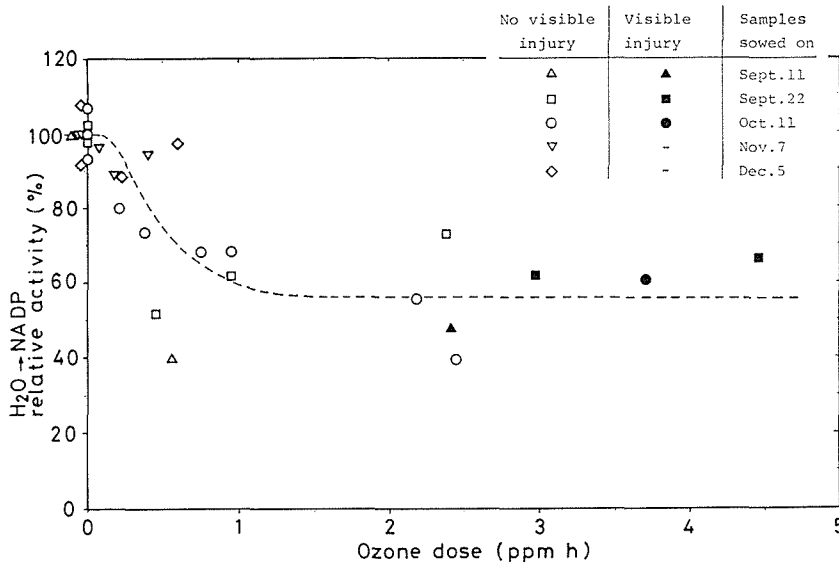


Fig. 5 Relation between NADP-Hill reaction activity (total PS) and ozone dose

照度,湿度等実験条件の違いによるものと考えられる。

可視障害の現れない濃度範囲においても, 光合成電子伝達反応活性は, いずれも明らかな低下を示した。例えば, 1.0ppm h において, 光化学系 I と光化学系全体活性では約40%の低下を示し, 光化学系 II 活性は約20%の低下を示した。Fig. 3 と Fig. 5 を比較すると明らかなように, 光化学系 I と光化学系全体活性の低下の傾向は極めて類似している。そしていずれも光化学系 II の活性の低下 (Fig. 4) より著しい。このことから考えて, 光化学反応系の中でも, 光化学系 I の活性の低下が系全体の活性の低下を支配しているものと思われる。

Fig. 3 と Fig. 4 を比較すると, データにばらつきはあるが, 低濃度 (0.3ppm 以下) での活性低下は光化学系 I の方が系 II より著しい。光化学系 I は葉緑体ラメラ構造中のチラコイド膜の外側に近い部分に存在するとされ, 光化学系 II は内側に近い部分に存在するとされている¹¹⁾¹²⁾。従ってオゾンによる損傷は, 先ずチラコイド膜の外側の部分の不活性化から始まるのではないかと推測された。

菅原ら¹³⁾¹⁴⁾は SO₂ 曝露により光化学系 II の活性, すなわち DPIP-Hill 反応活性が特異的に阻害されることを示している。測定条件の違いの影響がないものとすれば, これは SO₂ の場合とオゾンの場合とで電子伝達反応阻害の機構が異なっていることを示しているものと考えられる。

4. 総括

1) 可視障害の現れないオゾンドース (0.2~2.4ppm

h) においても光合成電子伝達反応活性には低下が検出された。

- 2) 光化学系 II の活性低下は光化学系 I 及び光化学系全体の活性低下に比べるとやや小さいことが示された。
- 3) 光化学系 I と光化学系全体の活性低下の傾向はほぼ等しく, 光化学系の阻害の中では, 光化学系 I の阻害が支配的であることが明らかになった。

5. 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麻生武夫教授に心から感謝の意を表す。

文 献

- 1) 松中昭一, “指標植物”, 講談社 (1975)
- 2) W. M. Dugger, I. P. Ting, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 215 (1970)
- 3) 遠山益, *遺伝*, 30, 7, 47 (1976)
- 4) 菅原淳, 近藤矩明, 島崎研一郎, 日本生物環境調節学会第15回大会講演要旨集 (1977)
- 5) 栗屋優, 村林真行, 松野武雄, 横浜国大環境研紀要, 6, 1, 59 (1980)
- 6) 日本生化学会編, “生化学実験講座12: エネルギー代謝と生体酸化”, 東京化学同人 (1976)
- 7) D. J. Arnon, *Plant Physiol.*, 24, 1 (1976)
- 8) 加藤栄, “光合成入門”, 共立出版 (1973)
- 9) C. S. Brandt, W. W. Heck, “Air Pollution”, 2nd Ed., vol. I, Academic Press (1968) p. 401

- 10) 大喜多敏一, (佐々木忠義他編), “環境工学”, 講談社 (1977)
- 11) 柴田和雄, 化学総説, 12, 45 (1976)
- 12) A. Trebst, Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 45 (1976)
- 13) 島崎研一郎, 菅原淳, 国立公害研究所特別研究成果報告 R-2, 35 (1978)
- 14) 島崎研一郎, 菅原淳, 岡田光正, 滝本道明, 国立公害研究所特別研究成果報告 R-2, 47 (1978)