

報 文



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(III)

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

鈴木信市*・村林真行**・松野武雄**

Sinichi SUZUKI, Masayuki MURABAYASHI, Takeo MATSUNO

Synopsis

Effects of ozone on the photosynthetic capacity of chloroplasts isolated from spinach leaves were investigated. The experiment was carried out in the following two ways.

- 1) After the fumigation of spinach with ozone, the chloroplasts were isolated and photosynthetic capacity was measured.
- 2) Ozone was bubbled into a suspension of the isolated chloroplasts and the photosynthetic capacity was measured.

Electron transport rates in photosystem I ($\text{DCPIP} \rightarrow \text{MV}$, with DCMU), photosystem II ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) and the total photosystem ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$) were determined as a measure of the photosynthetic capacity. Electron transport in the photosystem II was more inhibited by ozone than in photosystem I both in basal chloroplasts and uncoupled chloroplasts. Ozone bubbling effect on the cyclic photophosphorylation and H^+ concentration gradient was also investigated.

1. 緒 言

従来、自然環境評価のための方法として植物指標法が提案されてきたが、植物による大気汚染評価法については、今だに数量的評価を可能にする方法が開発されていない。特に汚染物質濃度が低いか、被曝時間が短い場合、定量化はもとより、植物に潜在的被害が生ずるのか否かも明らかではない。大気汚染物質のうち、光化学オキシダントは植物に対して大きな被害をもたらすものであり、汚染物質として最も注目されているものである。しかしながら、その植物に対する作用機構については十分明らかにされていない。本研究室では、こうしたことから植物指標法について、新し

い環境評価法としての応用を目的として、光化学オキシダントの主要な成分の一つであるオゾンを経環境汚染物質に選んで、これまで研究を行ってきた。本研究ではそのような見地から

- 1) オゾンによる生理生化学レベルの変動を現象としてとらえること、
- 2) それによりオゾンの植物体に対する作用機構を推定すること、
- 3) それらの知見より、大気汚染物質による影響を評価する上での指標性を見出すこと、

を目的として実験を行った。

実験は大別して、曝露 (fumigation) 実験とバブリング (bubbling) 実験を行った。すなわち、ホウレンソウ生体にオゾンを経曝露して、オゾン曝露による光合成系の変化を調べることに、さらにこれをモデル化して、オゾンの葉緑体に対する影響を調べるために、葉緑体懸濁液にオゾンを経バブリングして光合成系の変化を測定することの2点である。このうち曝露実験は本研究

* 現在：石油公団
Present address : Japan National Oil Corp.,
Chiyoda-ku, Tokyo.

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

(1981年8月31日受領)

室で3年前より行っているものである。

2. 実験方法

2.1 オゾン曝露実験

2.1.1 オゾン曝露

ハウレンソウ (パイオニア種), 播種後 4~6 週間目のものを, 透明アクリル樹脂製の曝露箱に入れ, その曝露箱ごと 25°C に温度コントロールしたグロースチャンパー中に入れて, 20,000lx の光を照射した。30 分環境適応後, 2 時間所定濃度のオゾン曝露した。この間 30 分毎に KI テストによって濃度モニターした。曝露終了後, 1 時間経過のハウレンソウの第 2 葉をとり, Hall の分類²⁾によるタイプ C 葉緑体を所定の方法³⁾で単離, 保存した。なお, クロロフィル濃度の測定は Arnon の方法⁴⁾によった。

2.1.2 活性測定

オゾン曝露しないハウレンソウより単離した葉緑体を対照試料, オゾン曝露したハウレンソウより単離した葉緑体をオゾン曝露試料とし, それぞれの電子伝達反応活性を測定した。試料は 0°C で 1 時間静置後, 測定試料をつくり, 電解電圧 -0.6 V のクラーク型酸素電極によって, 測定温度 25°C で, 光強度 26,000lx の光を照射して測定した。測定した電子伝達反応活性は, 系全体 ($H_2O \rightarrow MV^*$), 系 I ($DCPIP_{H_2} \rightarrow MV$, $DCMU^*$), 系 II ($H_2O \rightarrow FeCy^*$) のそれぞれ基底値 (basal level) と, NH_4Cl を用いた脱共役値 (uncoupled level) である。

2.2 オゾンバブリング実験

2.2.1 オゾンバブリング条件

10 ml 試験管に, 所定の調整液に懸濁された 500- $\mu gChl/ml$ 葉緑体懸濁液 (0°C) 2 ml を入れる。これにキャピラリーを先端部が底より 1 mm にくるように取付け, ここから KI テストによって濃度既知のオゾンを含む空気を流速 10 ml/min で 5 分間バブリングした。なお対照試料としては, 同様の条件で空気のみをバブリングしたものを用いた。

2.2.2 タイプ C 葉緑体のオゾンによる活性変化

ハウレンソウ (アトラス種) の葉より所定の方法でタイプ C 葉緑体を単離, 2.2.1 の条件でバブリングした。バブリング後の活性の測定は測定温度 25°C において, 電子伝達, 光リン酸化, プロトン勾配のそれぞれについて行った。電子伝達反応活性は 2.1.2 で述べた

のと同様な系について測定した。光リン酸化については, pH 6.0 において PYO* を cofactor としたサイクリックな光リン酸化活性を 30,000lx の光を照射しながら pH 勾配法⁵⁾で求めた。プロトン勾配は照射光強度 30,000lx, pH 8.0 において pH メータを用いて測定した。

2.2.3 共役因子 CF_1^* を除いたシラコイド標品のオゾンによる活性変化

所定の方法³⁾でタイプ B 葉緑体から CF_1 を取り除いた標品に対し, 2.2.1 の方法でバブリングした。バブリング後の活性測定は, 系 I, 系 II, 系全体の電子伝達反応活性それぞれについて行った。

2.2.4 オゾン阻害葉緑体に対する DCCD 添加効果

2.2.1 によってオゾン曝露したタイプ C 葉緑体に DCCD* を添加し, DCCD 無添加のものと同様にプロトン勾配の大きさを比較した。

Table 1 Change in electron transport rates in chloroplasts of spinach fumigated with ozone for two hours

a) basal level

O_3 conc. (ppm) \times time (h)	electron transport rates $\mu eq/mg$ Chl.h		
	PS* I $DCPIP_{H_2} \rightarrow MV$	PS* II $H_2O \rightarrow FeCy$	total PS* $H_2O \rightarrow MV$
control	206	288	208
0.42ppm \times 2h (inhibition %)	199 (3)	272 (6)	188 (10)
0.82ppm \times 2h (inhibition %)	192 (7)	252 (12)	168 (19)

b) uncoupled level**

control	292	640	524
0.42ppm \times 2h (inhibition %)	273 (7)	576 (10)	440 (16)
0.82ppm \times 2h (inhibition %)	270 (8)	532 (17)	384 (27)

* PS : photosystem

** uncoupled level : photophosphorylation was uncoupled by adding NH_4Cl

* MV : methyl viologen

* DCPIP : 2, 6-dichlorophenolindophenol

* DCMU : 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea

* FeCy : potassium hexacyanoferrate (III)

* PYO : pyocyanin

* CF_1 : coupling factor of chloroplasts

* DCCD : N, N'-dicyclohexylcarbodiimide

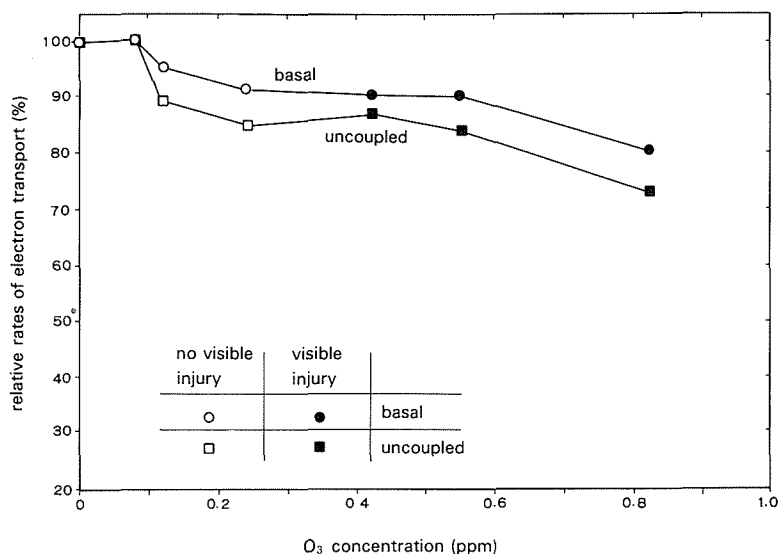


Fig. 1 Change in the electron transport rate of the total photosystem in chloroplasts of spinach fumigated with ozone

3. 結果および考察

3.1 オゾン曝露実験

さまざまな濃度のオゾン曝露試料の系全体 ($H_2O \rightarrow MV$) の活性をオゾン濃度に対してプロットしたのが Fig. 1 である。活性は対照試料に対する相対活性 (%) の形で表わしてある。可視障害が現われた試料については黒丸で示した。また、基底および脱共役レベルにおける系 I、系 II、系全体の電子伝達反応活性を示したのが Table 1 である。

これらの結果より、系 II ($H_2O \rightarrow FeCy$) の方が系 I ($DCPIP H_2 \rightarrow MV, DCMU$) よりオゾンに対して感受性が高いこと、基底レベルと脱共役レベルを比較してみると、オゾン阻害の影響が脱共役レベルでより大きくでていることがわかる。またオゾンによって光合成電子伝達反応活性は低下するが、それは可視障害の現われたものでもわずかであることがわかった。

これらの結果は、本研究室でこれまでに得られた、分光光度法を用いた測定結果¹⁾と違っている。分光光度法では系 I ($DCPIP H_2 \rightarrow NADP^{++}, DCMU$) の方が系 II ($H_2O \rightarrow DCPIP$) より阻害の程度が大きく、しかも、系全体 ($H_2O \rightarrow NADP^{+}$)、系 I の阻害の大きさは本実験の結果に比して大きいものであった。両結果の違いを次のように考えた。分光光度法の系 I、系全体の電子受容体である $NADP^{+}$ と酸素電極法による電子受容体である MV は電子伝達系において電子の受け

取る部位が違い、 $NADP^{+}$ のみ、Fd*, FdRd* という両タンパク質を介して電子が手渡される。Fd, FdRd は SH 試薬によって阻害を受けることが知られているが、オゾンが遊離基連鎖反応によって SH 試薬として働き、Fd, FdRd を特異的に阻害しているのではないかと考えた。

3.2 オゾンバブリング実験

2.2.2 の実験における電子伝達系全体 ($H_2O \rightarrow MV$) 活性とオゾンバブリング濃度との関係を Fig. 2 に、また 46 nmol/ml オゾンバブリング試料についての、系 I、系 II、系全体の光合成活性変化を Table 2 に示した。これらの結果から、オゾンの電子伝達反応系に対する影響について次のことが明らかになった。

- 1) 基底レベルの活性が低下すること。
このことにより、オゾンは脱共役剤としては働いていないことがわかった。
- 2) 脱共役レベルの活性が低下すること。
このことより、オゾンは電子伝達阻害剤として働いていることがわかった。
- 3) そのオゾンによる電子伝達系の阻害は、系 I ($DCPIP H_2 \rightarrow MV, DCMU$)、系 II ($H_2O \rightarrow FeCy$) 両者でみられるが、系 II の方が系 I より阻害の程度が大きいこと。

以上の点から、オゾンは主として系 II の近傍で何らかの働きをしていると思われる。

* $NADP^{+}$: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

* Fd : ferredoxin
* Fd Rd : ferredoxin-NADP reductase

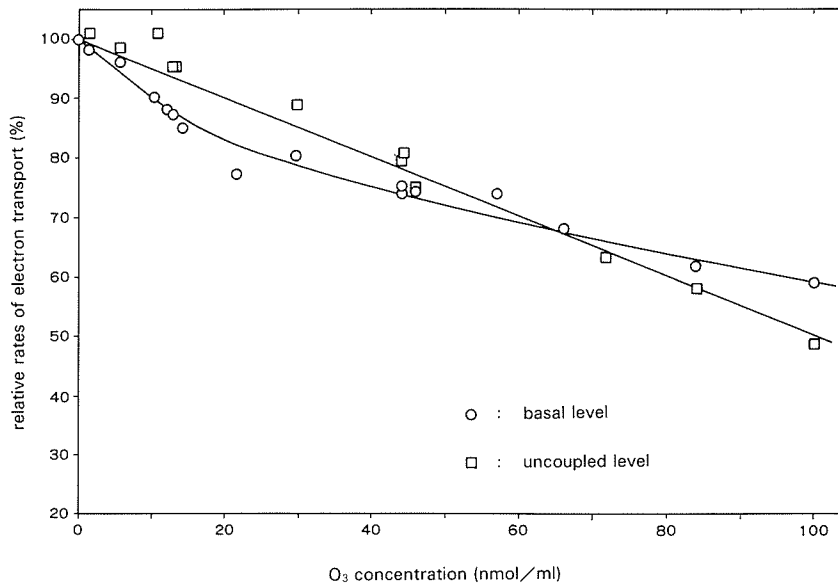


Fig. 2 Change in the electron transport rate of the total photosystem in chloroplasts exposed to the bubbling of ozone

Table 2 Change in photosynthetic capacities of chloroplasts exposed to ozone bubbling

a) basal level

experiment	electron transport rates $\mu\text{eq}/\text{mg Chl. h}$		
	PS-I DCPIP H_2 \rightarrow MV	PS-II $\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{FeCy}$	total PS $\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{MV}$
control	269	262	224
O ₃ bubbling* (inhibition %)	258 (4)	197 (25)	166 (26)

b) uncoupled level

control	370	460	457
O ₃ bubbling* (inhibition %)	348 (6)	363 (21)	343 (25)

c) cyclic photophosphorylation and H⁺ concentration gradient

experiment	cyclic photo-phosphorylation**	H ⁺ conc. gradient***
control	267	0.363
O ₃ bubbling* (inhibition %)	211 (21)	0.283 (22)

* O₃ bubbling : 46 nmol/ml \times 10ml/min \times 5 min

** $\mu\text{mol ATP formed}/\text{mg Chl.h}$

*** $\mu\text{mol H}^+/\text{mg Chl.}$

なお, Coulson らも同様の実験を分光光度法により試みているが⁶⁾, 彼らの測定によれば系 I (DCPIP $\text{H}_2 \rightarrow$ NADP⁺, DCMU) の方が系 II ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ DCPIP) よりもオゾンに対して感受性が高いとしている。本実験とのこのような差は, 3.1 で考察したのと同様に, 使用した電子受容体の差によるものではないと思われる。もしそうであれば, オゾンの電子伝達阻害剤としての阻害部位が指摘できることになるので, 同一条件での今後の実験が望まれる。

オゾンが電子伝達阻害剤であることをより明確にするため, 2.2.3 の実験を試みた。系全体 ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ MV) の活性変化を Fig. 3 に示す。この変化は, タイプ C 葉緑体の脱共役レベルの活性変化に対応している。このことから, オゾンが電子伝達阻害剤として働いていることは明らかである。

光合成系 I と共役している PYO を cofactor とした光リン酸化活性のオゾンバブリングによる影響を Fig. 4 に示す。また同時にプロトン勾配の測定結果も示した。オゾンバブリングによって光リン酸化活性は低下した。また, Table 2 からわかるが, Coulson らが求めた結果と同じように, サイクリックな光リン酸化系の阻害の大きさは, それが系 I と共役しているにもかかわらず, 系 I の阻害よりずっと大きいものであった。

光リン酸化の阻害がおこる原因として次のようなことが考えられる⁷⁾。

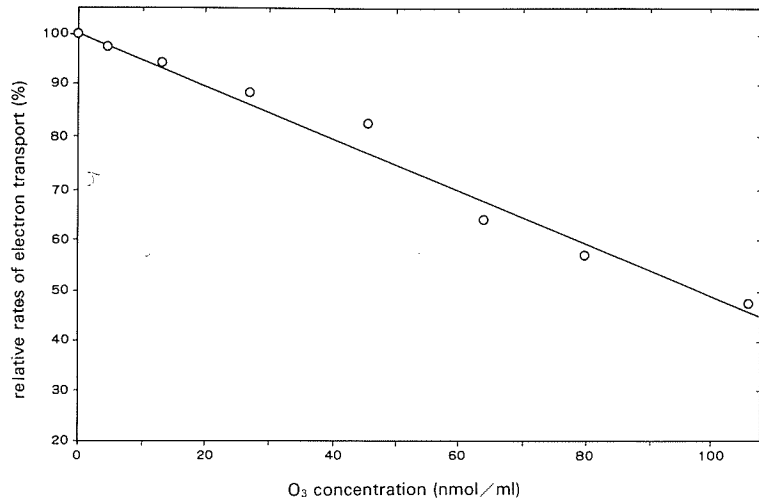


Fig. 3 Change in the electron transport rate of the total photosystem in chloroplasts without CF₁ exposed to the bubbling of ozone

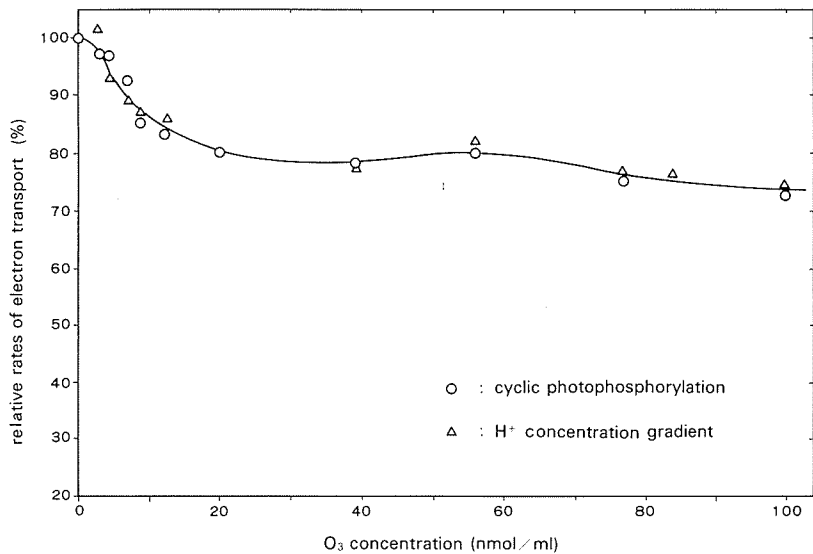


Fig. 4 Change in the cyclic photophosphorylation rate and in H⁺ concentration gradient in chloroplasts exposed to ozone bubbling

- 1) 電子伝達系の阻害
- 2) シラコイド膜の H⁺透過性増大
- 3) シラコイド膜内外の ΔpH の解消
- 4) H⁺チャンネル CF₀ に対する阻害
- 5) CF₁ の阻害
- 6) シラコイド膜からの H⁺ のリーク

このうち、2と3は脱共役剤、4と5はエネルギー伝達阻害剤である。電子伝達系の阻害以上にこの光リン酸化系が阻害をうけているということは、この系その

ものがオゾンによって阻害をうけていることを示している。また先に述べたように、オゾンは脱共役剤(2と3)ではない。プロトン勾配のオゾン阻害による活性低下は、光リン酸化の低下と平行である (Fig. 4)。これより、オゾンの光リン酸化に対する阻害はエネルギー伝達阻害(4と5)ではないことがわかった。光リン酸化系に対するオゾン阻害は、プロトン勾配の大きさに一致して低下していることから、オゾンによる光リン酸化阻害は、シラコイド膜からの H⁺ リークによ

る高エネルギー中間体低下による阻害(6)ではないかと推定した。そこでシラコイド膜からの H^+ リーク部分を確認するため、2,2,4のようにオゾン阻害葉緑体にDCCDを添加して効果を調べた。プロトン勾配はDCCD添加によって一部回復した(Fig. 5)。したがって、 H^+ がリークしていたのはDCCDによって H^+ リークがとめられる部分、すなわちシラコイド膜の表在タンパク CF_1 の部分であろうと思われる。オゾンは CF_1

と直接的に、あるいは間接的に相互作用をして CF_1 の構造を変えるか、または除去することによってその部分から H^+ をリークさせやすくしていると考えた。オゾン阻害葉緑体のDCCD添加後の相対活性をオゾンバブリング濃度に対しプロットしたのがFig. 6である。DCCD添加によっても回復しえない活性低下の大きさは、電子伝達系Iがオゾンによって受けている阻害の大きさと一致した。このことから、シラコイド膜

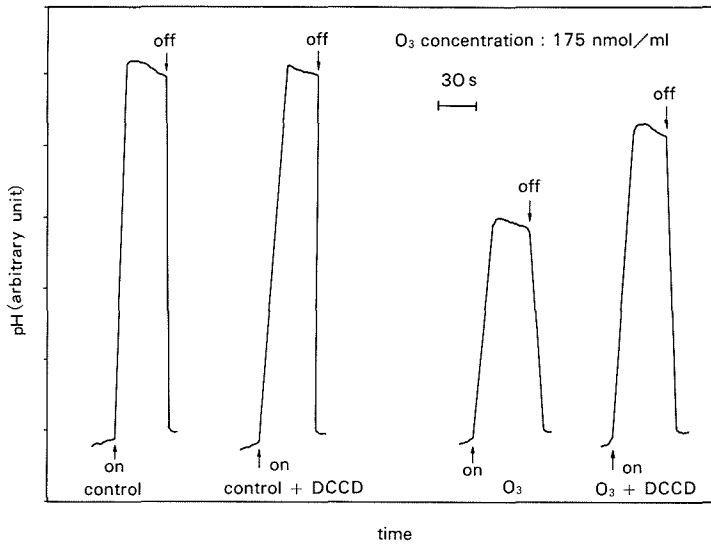


Fig. 5 Recovery of H^+ concentration gradient inhibited by ozone on addition of DCCD

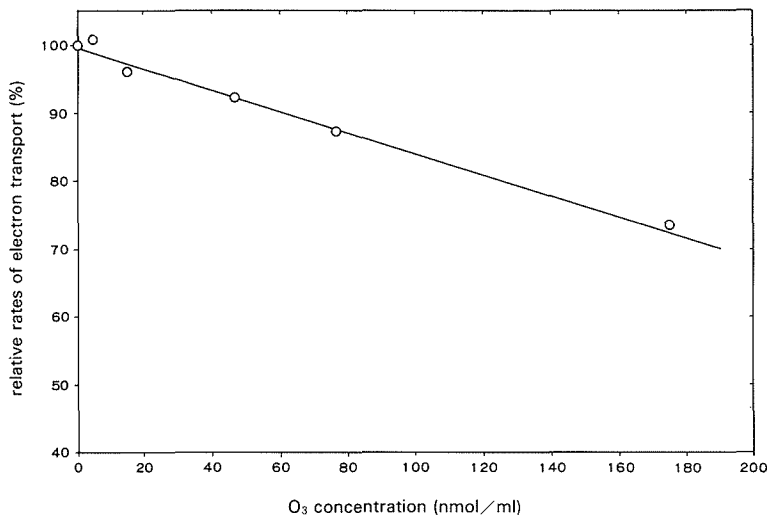


Fig. 6 Change in H^+ concentration gradient in the chloroplasts exposed to ozone bubbling
DCCD was added to the chloroplasts.

における H^+ のもれは、DCCD によって回復しうる部分だけであると考えられる。つまり CF_1 の部分のみからもれているのであろうと推定した。

4. 総括

オゾン曝露実験によって、ホウレンソウ生体はオゾン曝露の結果、次のような影響をうけていることが明らかになった。

- 1) 葉緑体の電子伝達反応活性は、基底、脱共役両レベルとも低下すること、
- 2) 脱共役レベルの低下の方が基底レベルの低下より大きいこと、
- 3) 系 II ($H_2O \rightarrow FeCy$) の阻害の大きさの方が系 I ($DCPIPH_2 \rightarrow MV, DCMU$) の阻害の大きさより大きいこと、

一方、オゾンバブリング実験の結果、オゾンによる光合成系に対する阻害を次のように考えた。

- 1) 電子伝達系に対する阻害は、特に系 II ($H_2O \rightarrow FeCy$) で大きいこと。このことから、オゾンは系 II の近傍で何らかの作用をしていると思われる。
- 2) 光リン酸化に対する阻害は、プロトンポンプとしての電子伝達系の阻害と、ポンプによって生成

したシラコイド膜を介しての H^+ の勾配が CF_1 の部分から H^+ リークが生ずることによって減少するための阻害をうけていると思われること。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、植物試料を提供いただき、また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謝意を表する。

文献

- 1) 村林真行, 栗屋 優, 辻 秀子, 松野武雄, 横国大環境研紀要 7 (1) 43 (1981)
- 2) D. D. Hall, Nature New Biol., 235, 125 (1972)
- 3) 日本化学会編, 「生化学実験講座, エネルギー代謝と生体酸化 (上)」 P258 東京化学同人 (1975)
- 4) D. J. Arnon, Plant Physiol, 24, 1 (1949)
- 5) N. Nishimura, T. Ito, B. Chance, Biochem. Biophys. Acta, 59, 177 (1962)
- 6) C. Coulson, R. L. Heath, Plant Physiol. 53 32 (1974)
- 7) 藤茂宏ら編, 「光合成の機作」: 蛋・核・酵 (別冊 21) (1979)