

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 (IV)

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

井上 勉*・村林 真行**・松野 武雄**

Tsutomu INOUE*, Masayuki MURABAYASHI** and Takeo MATSUNO**

Synopsis

Effects of ozone on the photosynthetic capacity of chloroplasts isolated from spinach leaves were investigated. The effect of the air bubbling was eliminated and the net effect of ozone was obtained by stabilizing the chloroplasts on treatment with polyvinyl alcohol (PVA). Electron transport rates in the photosystem-II were more inhibited by ozone than in the photosystem I both in basal chloroplasts and uncoupled chloroplasts. Ozone was thought to react as an electron transport inhibitor in the photoelectron transport system. The reaction rates in the photophosphorylation and H^+ concentration gradient were reduced with the increase in the ozone concentration. The reduction in the reaction rates of the photophosphorylation was thought to be mainly due to the electron transport inhibition and H^+ leakage from thylakoid membrane.

1. 緒 言

光化学オキシダントの主成分であるオゾンによって植物が損傷を受ける現象は、かなり古くから知られている¹⁾。一方葉緑体は植物に可視傷害が現れる以前に影響を受けるオルガネラの一つであることも明らかにされている^{2),3)}。しかし、どのような機構で阻害を受けるのかについては不明の点が多い。

そこで、前報まで^{4),5)}では、葉緑体にオゾン被曝させ、その影響を単離葉緑体の活性測定から求めた。この場合、オゾン被曝実験には、次の2通りの方法を用いた⁵⁾。

1) 栽培中の試料(鉢植えのホウレンソウ)を透明の容器に入れ、これに所定濃度のオゾンを含む空気を一定時間流した。オゾン被曝後、葉緑体を単離してそ

の活性を測定した。

2) あらかじめ単離した葉緑体懸濁液に、所定濃度のオゾンを含む空気を一定時間バブリングした後、その葉緑体の活性測定を行った。

以上の方法のうち、1)は被曝時間も比較的長くとれ、実際の大气環境中に近い条件で被曝させられる。その反面、植物の生育段階や、生育時期などの個体差および気孔の開閉状態などによる影響を受けやすく、データのばらつきが大きくなるきらいがある。これに対して、2)はこのような欠点はなくなるが、葉緑体が液の攪拌や空気のバブリングなどの物理的、化学的刺激に対して非常に不安定であるため、ブランク値が安定しないという欠点を有している。そこで前報では、バブリングそのものによる葉緑体の損傷を防ぐために、オゾン濃度を高く、バブリング時間を短かく(≈5分間)する方法を採った。しかし実際の大气中では、通常低濃度で長時間被曝する場合が多く、またドース(被曝濃度×時間)が等しければ被曝の影響が等しいという保証もないので、オゾン曝露のシミュレーション実験としては、できる限り低濃度、長時間という自然の条

* 現在：日本曹達(株)二本木工場、新潟県中頸城郡中郷村
Present address : Nippon Soda, Nakago-mura, Nakakubikigun, Niigata-ken

** 環境計測工学研究室
Department of Environmental Monitoring
Technology (1982年8月31日受領)

件に近い方が望ましい。そのようなことから、葉緑体を空気のバブリングに対して安定化することを試みることにした。

一方、葉緑体の安定化の方法については、エネルギー変換に関連した光合成のシミュレーションの目的からも研究が行われており、いくつかの方法が試みられている⁶⁾が、ポリビニルアルコール (PVA) を用いた包括法により好結果が得られている⁷⁾。そこで本研究では、この PVA 包括法によって葉緑体をバブリングに対して安定化できるものと考え、この方法を用いて、種々の葉緑体活性が保持されることを確認することとした。さらに、この安定化した葉緑体を用いてオゾン被曝による葉緑体の活性変化の測定を行い、オゾン被曝による阻害の機構を検討した。

2. 実験方法

2.1 葉緑体の単離

パイオニア種ハウレンソウから採取した葉を水洗し、さらに蒸留水でよくすすいだ。水分をふきとってからポリエチレンフィルムに包み、冷蔵庫で約30分間冷却した。ついで、茎の部分を除去し、氷冷したホモジナイザーのカップに入れ、あらかじめ冷却しておいた葉緑体単離液 (0.4M : 蔗糖, 50mM : トリシン-KOH, 10mM : NaCl, pH 7.8) を、葉 5~10g に対して 30ml の割合で加え、18,000r.p.m. で30秒間破碎した。破碎液は4層のガーゼで濾過し、濾液を 0°C, 500G で5分間遠心分離し、さらにその上澄液を 0°C, 2000G で5分間遠心分離することによりタイプc葉緑体を沈澱させた。

2.2 葉緑体の安定化

単離した葉緑体を、オゾンを含まない空気のバブリングに対して安定化させるために PVA 処理を行った。それには、2.1 で得たタイプc葉緑体の上澄液を除去したのち、葉緑体調整液 (0.4M : 蔗糖, 50mM : トリシン-KOH, 10mM : NaCl, 10% : PVA-重合度 500, pH 7.8) を加えて懸濁し、クロロフィル濃度が 200 μ g/ml (プロトン勾配測定の場合は 500 μ g/ml) となるように調整した。以上の操作は、暗中で、できるだけ短時間に行い、葉緑体懸濁液は使用するまで 0°C で暗中に保存した。

2.3 クロロフィル濃度の測定

クロロフィル濃度は、Arnon の方法⁸⁾により、分光光度計を用いて、645nm および 663nm における吸光度を測定することによって求めた。

2.4 オゾンバブリング

コンプレッサーから送られた空気をシリカゲル管に通して水分を除去し、活性炭により NO_x を、三酸化

クロム紙により SO_x をそれぞれ除去した。この精製した空気と、オゾンナイザーに酸素を送って発生させたオゾンとを適宜混合して所定のオゾン濃度の空気を得た。オゾン濃度の分析は中性ヨウ化カリウム法⁹⁾ によった。

バブリングの試料は、クロロフィル濃度を 20 μ g/ml (プロトン勾配測定の場合は 50 μ g/ml) に調整した葉緑体懸濁液で、この 25ml を試験管に入れ、まわりを氷で冷却した。オゾンを含む空気は、キャピラリーを用いて 10ml/min の流速で60分間バブリングした。

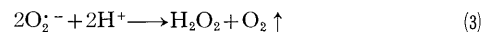
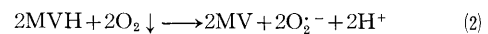
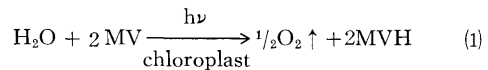
2.5 葉緑体の活性測定

2.5.1 電子伝達系の活性測定

電子伝達反応系としては、光化学系全体活性、光化学系 I 活性および光化学系 II 活性を、酸素電極を用いて測定した。

a) 光化学系全体活性の測定

光化学系の反応中心 P700 によって還元された電子受容体 P430 は強い還元力を有し、メチルビオローゲン (MV) を添加すると、これを直接還元する (Fig. 1)^{10,11)}。還元された MV は酸化還元電位が非常に低く、水中の酸素によって自動酸化され H₂O₂ を生成する。この場合の反応式は次のようになる¹²⁾。



ただし、用いた試料にカタラーゼ活性があると、生成した過酸化水素が水と酸素に分解されてしまうので、Na₂S₂O₃ を添加してカタラーゼ活性を阻害しておく。

葉緑体が光の照射を受けて上記の反応が進行すると、葉緑体懸濁液中の酸素濃度が減少するので、これを酸素電極により測定した。測定に用いた装置の概要を Fig. 2 に示す。水フィルターと熱線吸収フィルターにより照射光からの熱を防ぎ、セルの周りに恒温水を流して温度を一定 (25°C) に保った。反応混合液は磁気攪拌子により攪拌した。照射光は 26,000lx の飽和光とした。

b) 光化学系 I 活性測定

系 I のみの活性を測定するためには、系 II 側からの電子の流れを、DCMU* により途中で止めて、代りに人工的な電子供与体 DPIP** - アスコルビン酸を与え

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

** DPIP : dichlorophenolindophenol

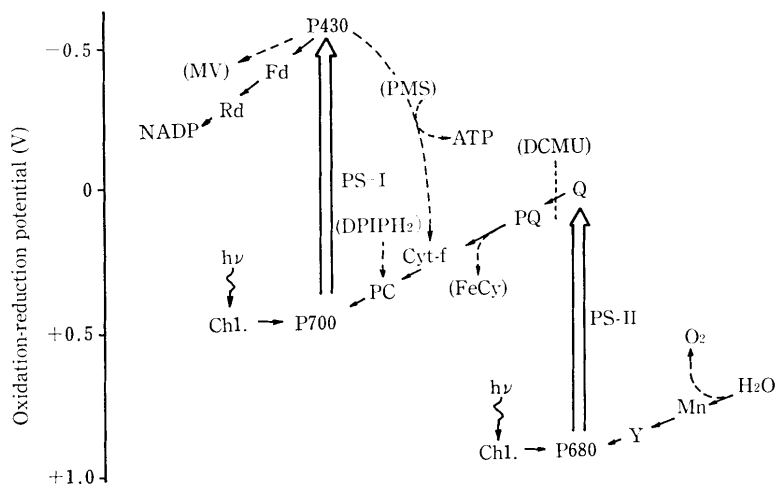
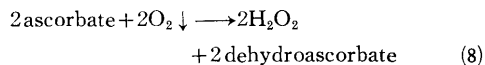
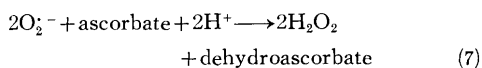
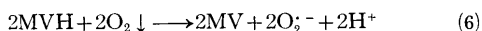
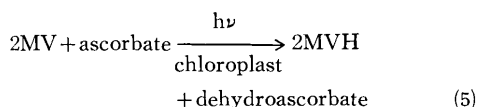


Fig. 1 Photosynthetic electron transport system in higher plants

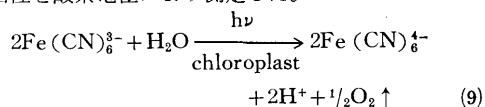
- PS-I : photosystem-I
 PS-II : photosystem-II
 Chl. : antenna chlorophyll
 NADP : nicotinamide adenin dinucleotide phosphate
 Fd : ferredoxin
 Rd : ferredoxin-NADP reductase
 P430 : primary electron acceptor of PS-I
 P700 : trapping center of PS-I
 PC : plastocyanin
 Cyt-f : cytochrome-f
 PQ : plastoquinone
 Q : primary electron acceptor of PS-II (C 550)
 P680 : trapping center of PS-II
 Y : unknown electron carrier
 Mn : unknown electron carrier containing Mn
 MV : methyl viologen (artificial electron acceptor)
 FeCy : $K_3Fe(CN)_6$ (artificial electron acceptor)
 DPIPH₂ : reduced form of dichlorophenolindophenol (artificial electron donor)
 PMS : phenazinemethosulphate (cofactor for cyclic photophosphorylation)
 DCMU : 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea (artificial inhibitor)

た (Fig. 1)。反応は次式のように全体として酸素の吸収がおこるので、これを a) の場合と同様に酸素電極により測定した。



c) 光化学系 II 活性測定

ヘキサシアノ鉄酸 (III) カリウム ($K_3[Fe(CN)_6]$) は電子伝達系において系 I と系 II の間で電子を奪う。そこで、 $K_3[Fe(CN)_6]$ を用いて、次式に従って系 II の活性を酸素電極により測定した。



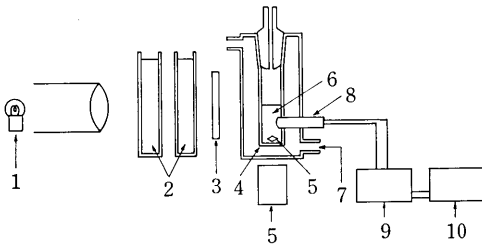


Fig. 2 Apparatus for the measurement of electron transport

- 1: iodine lamp 2: water filter
 3: glass filter 4: reaction cell
 5: stirrer 6: reaction mixture
 7: temperature controlled water
 8: oxygen electrode 9: control system
 10: recorder

2.5.2 光リン酸化反応活性測定

電子伝達反応と共役して起こる光リン酸化反応のうち、循環的光リン酸化反応の活性を Fig. 3 に示すような pH ガラス電極を用いて測定した。反応液の攪拌、温度保持は酸素電極の場合と同様にした。反応は次式通りで、測定には反応混合物に濃度既知の塩酸を加え、それによって誘起された pH 変化から反応液の H^+ 変化量を求め、これと n 値 ($=0.958$) とから H^+ 変化量を求めた¹³⁾。実験は光リン酸化反応の最適 pH である pH 8.0 で行った¹⁴⁾。

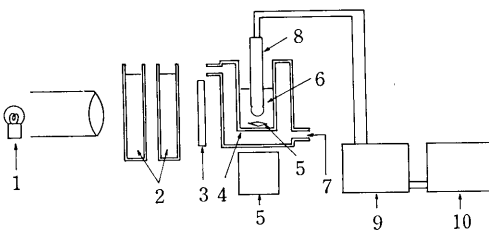
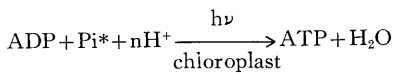


Fig. 3 Apparatus for the measurement of cyclic photophosphorylation and proton concentration gradient

- 1: iodine lamp 2: water filter
 3: glass filter 4: reaction cell
 5: stirrer 6: reaction mixture
 7: temperature controlled water
 8: pH glass electrode 9: pH meter
 10: recorder

* Pi: 無機リン酸を表わす。

2.5.3 プロトン勾配の測定

リン酸化の受容体 (ADP と Pi) を含まない反応液中で cofactor として PMS** を添加し、照射して電子伝達系を駆動させると、 H^+ ポンプの働きによって H^+ がチラコイド膜に取り込まれる。取り込まれた H^+ はチラコイド膜を透過できないため、外液の pH は上昇するので、この変化を 2.5.2 で述べたのと同様の方法で測定した。ただし、ADP と Pi は添加せず、pH は 6.0 で行った。

2.6 その他の実験条件

2.6.1 電子伝達反応と pH

電子伝達反応の速度は測定時の pH 値の影響を受けるので、pH を変えて測定を行い、最適 pH 値を求めた¹⁵⁾。

2.6.2 脱共役

電子伝達反応の速度は光リン酸化との共役が律速となっており、脱共役により正味の電子伝達反応活性が求められる。脱共役剤としては 3~15mM の NH_4Cl を用いた。

3. 結果および考察

3.1 葉緑体安定化実験

葉緑体の安定化を試みるに先だて、葉緑体懸濁液にオゾンを含まない精製した空気のみをバブリングし、その時の葉緑体の諸活性の変化を測定し、葉緑体がバブリングそのものによってどの程度影響を受けるかを調べた。Table 1 に 5 分間のバブリングが葉緑体におよぼす影響を示す。系 II が 20% ほど低下しているが電子伝達系は全体としてみれば、それ程阻害は受けていない。この点は前報⁵⁾ で確認したことと一致して

Table 1 Decrease in the reaction rates of the chloroplast treated with air bubbling for 5 minutes

reaction	chloro- plast	reaction rates ($\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl. h}$) no bubbling	5 min air bubbling	relative reaction rates(%)
DPIP H_2 →MV	basal	198	200	101
H $_2$ O→FeCy	basal	19.9	16.3	82
H $_2$ O→MV	basal	45.8	45.0	98

いる。Table 2 に 60 分間の空気のバブリングが葉緑体におよぼす影響を示すが、すべての活性が大幅に低下し、長時間のバブリング実験には葉緑体を安定化する必要のあることが明らかになった。

そこで葉緑体を安定化するため PVA 処理を施した

**PMS: phenazine methosulphate

Table 2 Decrease in the reaction rates of the chloroplast treated with air bubbling for 60 minutes

reaction	chloro-plast	reaction rates		relative reaction rates(%)
		no bubbling	60 min air bubbling	
DPIP ₂ H ₂ →MV	basal	475*	204*	43
	uncoupled	646*	310*	48
H ₂ O→FeCy	basal	55*	9*	16
	uncoupled	98*	12*	12
H ₂ O→MV	basal	61*	27*	44
	uncoupled	91*	35*	38
proton conc. grad.**		0.262**	0.079**	40
photophosphorylation		177***	70***	40

* $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl. h}$

** proton concentration gradient: $\mu\text{eq H}^+\text{mol}/\text{mg chl. h}$

*** μeq formed ATP mol/mg chl. h

Table 3 Stability of the PVA treated chloroplast against air bubbling for 60 minutes

reaction	chloro-plast	reaction rates		relative reaction rates(%)
		no bubbling	60 min air bubbling	
DPIP ₂ H ₂ →MV	basal	335*	333*	99.4
	uncoupled	437*	456*	104
H ₂ O→FeCy	basal	18.3*	17.3*	94.5
	uncoupled	38.2*	39.6*	104
H ₂ O→MV	basal	34.8*	34.0*	97.7
	uncoupled	62.2*	62.6*	101
proton conc. grad.**		0.368**	0.368**	100
photophosphorylation		211***	203***	96.2

* $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl. h}$

** proton concentration gradient: $\mu\text{eq H}^+\text{mol}/\text{mg chl. h}$

*** μeq formed ATP mol/mg chl. h

ところ、Table 3 に示すような結果を得た。PVA処理により葉緑体は60分間の空気のみバブリングに対して、ほとんど活性が低下しないことが明らかになった。PVAは可溶性のポリマーであり、葉緑体懸濁液にこれを添加すると、その-OH基が液中でチラコイド膜と何らかの結合をつくり、チラコイド膜を構造的に補強するものと考えられる。ところが本実験の目的からすると、この安定化によって葉緑体の活性に影響

Table 4 Comparison between the reaction rates of the PVA-stabilized and unstabilized chloroplast

reaction	chloro-plast	reaction rates		relative reaction rates(%)
		PVA-stab.	unstabilized	
DPIP ₂ H ₂ →MV	basal	156*	158*	101
	uncoupled	445*	445*	100
H ₂ O→FeCy	basal	18.8*	18.8*	100
	uncoupled	104*	104*	100
H ₂ O→MV	basal	41.5*	45.4*	109
	uncoupled	94.5*	102*	108
proton conc. grad.**		0.419**	0.417**	101
photophosphorylation		399***	395***	101

* $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl. h}$

** proton concentration gradient: $\mu\text{eq H}^+\text{mol}/\text{mg chl. h}$

*** μeq formed ATP mol/mg chl. h

があるようでは都合が悪い。PVAがもしチラコイド表面に膜のようなものをつくっているとすれば、葉緑体活性測定の際用いるADPやMVなどとチラコイド膜表面上の活性点との反応が妨害されるであろう。そうすると、さらにオゾンとチラコイド膜との反応にも影響が出てくるものと考えられる。この点を確認するために、PVAによる安定化を行った試料と行わない試料について、葉緑体の諸活性の比較を行った。結果はTable 4のように、ほとんど差がないことが明らかになった。このことからオゾンとチラコイド膜との関係についても、PVA処理による影響は大きくないものと考え、オゾンバブリング実験の試料としてはPVA添加の葉緑体を用いることにした。

なお、電子伝達反応活性のpH依存性について実験を行った結果、pH 7.8にピークがあり、7.8を越えると、特に脱共役レベルの活性低下がみられた。それで、電子伝達反応の測定は、最適pH値7.8で行った。¹⁵⁾

3.2 オゾンバブリング実験

PVAで安定化した葉緑体懸濁液を用いて、比較的長時間(60分間)オゾンバブリングし、その影響を測定した。電子伝達反応活性に対するオゾンバブリングの影響として、基底レベル、脱共役レベルともに阻害がみられたが、系IIに対する阻害が最も著しく(Fig. 4)、つづいて系全体に対するもので、系Iに対する阻害は最も少なかった。系Iに対する影響は、Fig. 5に示すように、20~40nmol/mlで、基底レベルに極大がみられたが、これはFig. 6の光リン酸化に対する同じ

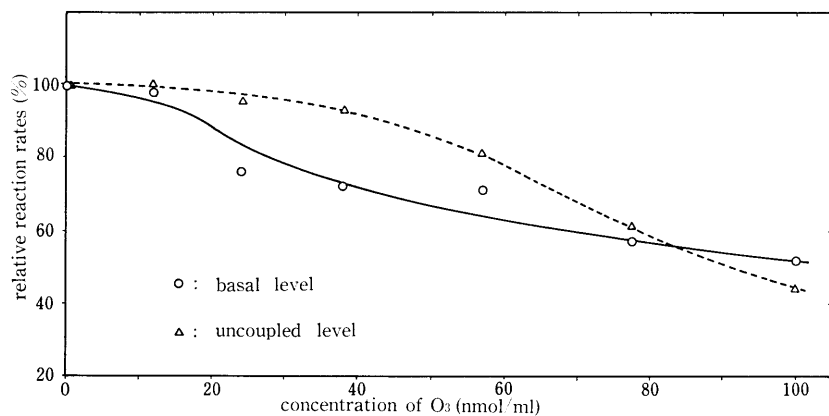


Fig. 4 Effect of O₃ bubbling on the relative reaction rates of the PS-II (H₂O → FeCy)

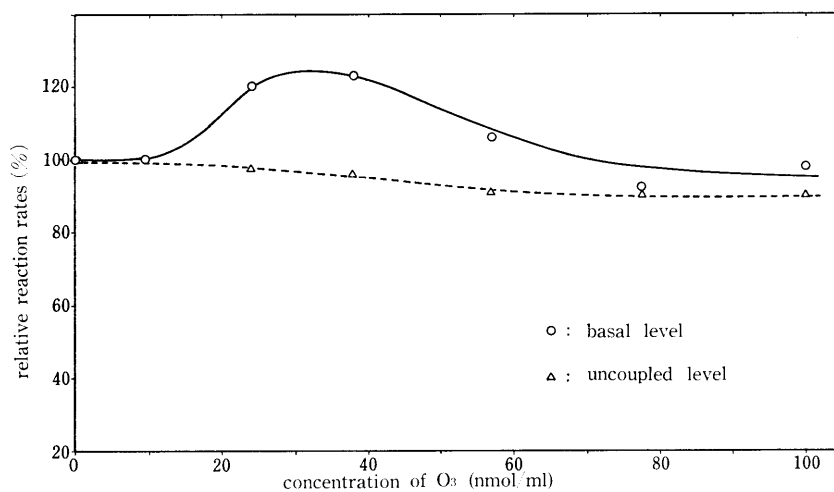


Fig. 5 Effect of O₃ bubbling on the relative reaction rates of the PS-I (DPIP H₂ → MV)

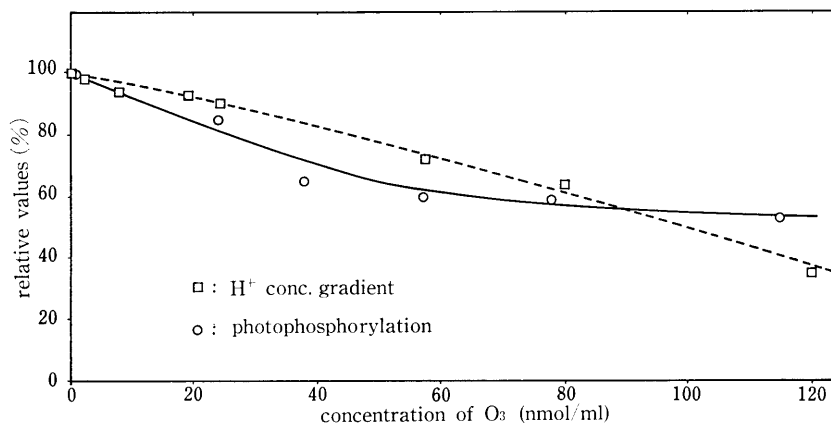


Fig. 6 Effect of O₃ bubbling on the relative values of the H⁺ conc. gradient and reaction rates of the photophosphorylation of chloroplast

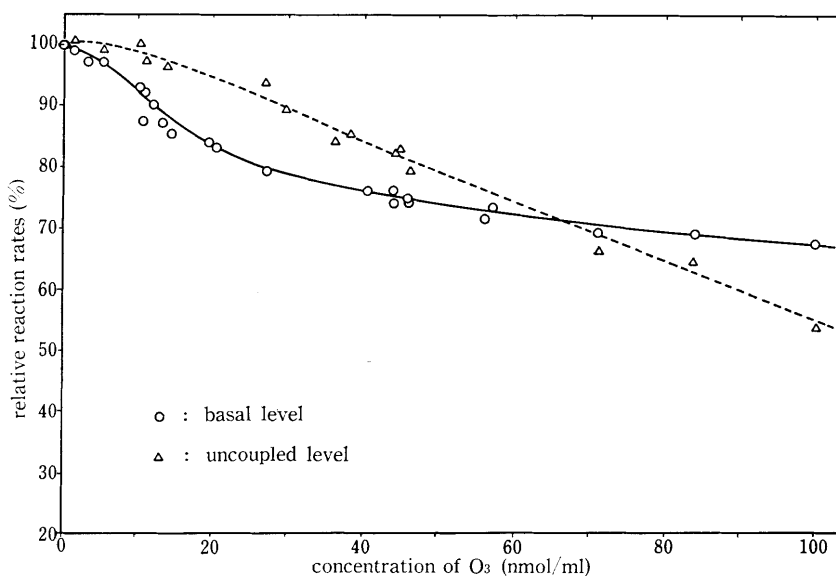


Fig. 7 Effect of O₃ bubbling (5min) on the relative reaction rates of PS-II without PVA treatment⁶⁾

O₃濃度領域での阻害を考慮して、オゾンの脱共役作用によるものか、あるいはチラコイド膜からのH⁺のリークによるものと考えた。ただし、チラコイド膜に対するオゾンの透過性はあまり大きくないと考えられるので、脱共役作用のためというよりは、H⁺のリークによるのではないかと推定した。なお、ここで対象として考えた光リン酸化反応は、サイクリックな光リン酸化で、Fig. 1のように系Iの近くで電子伝達反応と共役しているものと考えられている。

Fig. 6で光リン酸化とH⁺勾配に対する影響には差が見られるが、これは光リン酸化に対する阻害が、H⁺リークや電子伝達系の阻害等、いくつかの複合した原因にもとづくことによるものと考えた。また光リン酸化、H⁺勾配に対する前報⁶⁾での傾向との違いは、葉緑体懸濁液作製時の処理の違いによるものと思われる。

Fig. 4に示したように、光化学系IIの電子伝達反応については、基底レベル、脱共役レベルともに阻害がみられることから、オゾンは電子伝達阻害剤として働いているものと考えられる。光化学系IIに対する阻害の傾向は、実験条件が違ってもかかわらず、前報の結果(Fig. 7)とよく似ており、オゾンが主として光化学系IIの近傍で作用していることを示している。

Fig. 4とFig. 7を比較すると、PVA処理によってオゾンに対する感受性の低下がみられた。生体中で、葉緑体は細胞により保護されていることを考えると、オゾン被曝のシミュレーション実験としては、一概に

無処理の葉緑体の方が良いとは言い切れない。オゾン被曝の影響を相対的に検討するためには、葉緑体を安定化させることにより、バブリング等、他の影響を除去し、データの再現性を高める意味から、PVA処理は有効であると考えた。

4. 総括

PVA処理葉緑体懸濁液にオゾンをバブルし、葉緑体の光合成機能に対する影響を測定することにより、次の点が明らかになった。

1) 葉緑体はPVA処理により空気のみバブリングに対して安定化した。この時葉緑体の光合成機能は保持されており、比較的長時間のバブリング実験を再現性よく行うことが可能となった。

2) オゾンバブリングの影響は光化学系Iにくらべると、光化学系IIの方が大きく、オゾンは光化学系IIの近傍で作用していることが推定された。

3) オゾンは電子伝達反応阻害剤として働いているが、光リン酸化反応に対する阻害は、このほかにチラコイド膜からのプロトンのリークの影響もあるものと考えた。

謝辞

本研究を遂行するにあたって、ハウレンソウ試料の栽培について御指導賜った教育学部 麻生武夫教授に深く謝意を表す。

文 献

- 1) C. Homan, *Plant Physiol.*, **12**, 957 (1937)
- 2) O. C. Taylor, W. M. Dugger, E. A. Cardiff, E. F. Darley, *Nature*, **192**, 814 (1961)
- 3) F. D. H. MacDowall, *Can. J. Bot.*, **43**, 419 (1965)
- 4) 村林真行, 栗屋 優, 辻 秀子, 松野武雄, 横浜国大環境研紀要 **7**, 43 (1981)
- 5) 鈴木信市, 村林真行, 松野武雄, 横浜国大環境研紀要 **8**, 81 (1982)
- 6) 落合英夫, 柴田 均, 松尾 哲, 橋口賢二, 湯川政雄, *農化*, **52**, 1, 31 (1978)
- 7) H. Ochiai, H. Shibata, T. Matsuo, K. Hashinokuchi, I. Inamura, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 683 (1978)
- 8) D. I. Arnon, *Plant Physiol.*, **24**, 1 (1949)
- 9) 鈴木 伸, 公害分析指針 2, 大気編2aオキシダント, 共立出版 (1972)
- 10) 藤茂 宏, 光合成, 裳華房 (1972)
- 11) 加藤 栄, 光合成入門, 共立出版 (1973)
- 12) B. L. Epel, J. Neumann, *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 520 (1973)
- 13) 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(上) 東京化学同人 (1976)
- 14) 鈴木信市, 横浜国大大学院工学研究科修論 (1981)
- 15) 井上 勉, 横浜国大大学院工学研究科修論 (1982)