

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 (V)

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

井上 勉*・鈴木 信市**・村林 真行***・松野 武雄***

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

Synopsis

The effects of the ozone bubbling on the photosynthetic capacity of the chloroplast isolated from the spinach leaves were investigated. The photosynthetic capacity of the chloroplast was found to be inhibited by the addition of the supernatant fraction of the chloroplast suspension treated with ozone bubbling. Propionaldehyde was detected in the supernatant fraction. When the reagent of propionaldehyde was added to the normal chloroplast suspension, the inhibition similar to that of the ozone bubbling was observed. Propionaldehyde was determined to be the reaction product of ozone and the chloroplast, which inhibited the photosynthetic capacity of the chloroplast in the spinach.

1. 緒 言

光化学オキシダントの主成分であるオゾンにより、植物が損傷を受けると、多くの場合、可視障害を程する。しかし、損傷が軽微である場合は、目視による障害の検出は難しい。また、特にこのような場合、植物が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、これまでの研究では、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通気した後、その葉緑体の光合成機能を測定することにより、オゾン被曝が葉緑体の光合成電子伝達反応系や光リン酸化反応系に及ぼす影響について調べてきた¹⁾²⁾。このような実験を行う場合、単離した葉緑体をそのまま用

いると、葉緑体が不安定で、オゾンを含まない空気を通気するだけで損傷を受ける。前報³⁾では、単離した葉緑体をPVA(ポリビニルアルコール)で処理することにより、この葉緑体がオゾンを含む空気の通気によっては阻害を受けるが、空気のみを通気に対しては安定となることを見出した。また、オゾン被曝の影響は、光化学系Iに比べると光化学系IIの方が大きく、オゾンは葉緑体の光合成電子伝達反応系の中でも、主として光化学系IIの近傍で作用していること、光リン酸化反応およびプロトン勾配に対しても、阻害作用のあることが明らかになった。

しかしながら、葉緑体に対してオゾンがどのように作用して、葉緑体の機能を阻害するのかわからない。そこで一つの仮説として、オゾンが植物中の脂質等と反応して、二次物質を生成し、この二次物質が葉緑体の機能を阻害するのではないかと考えた。それは、オゾンの反応性と、水への溶解度を考えると、大気中のオゾンがそのままチラコイド膜中に浸入して、葉緑体の機能を阻害するという考え方には無理があると思われるからである。一方、もしもオゾンがこのように二次物質を生成するとすれば、オゾンはチラコイド膜

* 現在：日本曹達(株)二本木工場、新潟県中頸城郡中郷村
at present: Nippon Soda Co., Ltd. Nakago-mura, Nakakubiki-gun, Niigata-ken

** 現在：石油公団、東京都千代田区内幸町 2-2-2
at present: Japan National Oil Corp., 2-2-2, Uchisaiwai-cho, Chiyoda-ku, Tokyo

*** 環境計測工学研究室
Department of Environmental Monitoring Technology
(1983年5月31日受領)

等を構成するリン脂質や糖脂質のような高級不飽和脂肪酸と反応して、プロピオンアルデヒドやプロピオン酸を生成する可能性が高いと考えられる。

そこで本研究では、1)葉緑体とオゾンの反応により、葉緑体の光合成機能を阻害するような二次物質が生成するか、2)生成した二次物質のモデル化合物として、プロピオンアルデヒドおよびプロピオン酸を考え、これらの試薬を添加した時、葉緑体の機能がどのような阻害を受けるか、3)葉緑体懸濁液にオゾンを通気した時にプロピオンアルデヒドのような物質の生成が確認できるか、などの点を明らかにすることを目的として実験を行った。

2. 実験方法

2.1. 試料

バイオニア種ホウレン草から単離したタイプc葉緑体³⁾を、ポリビニルアルコール (PVA) 処理^{32,4)}により安定化し、その懸濁液を試料として用いた。すなわち、タイプc葉緑体の上澄液を除去したのち、葉緑体調整液 (0.4 M: 蔗糖, 50 mM: トリシン-KOH, 10 mM: 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 $200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (プロトン勾配測定の際は、 $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) となるように調整した。これらの操作は暗中で、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。

2.2. クロロフィル濃度の測定

クロロフィル濃度は、Arnonの方法⁵⁾により、分光光度計を用いて、645 nm および 663 nm における吸光度を測定することによって求めた。

2.3. 光合成機能の測定³⁾⁶⁾

葉緑体の光合成機能としては、光化学系I, 光化学系II, 光化学系全体の反応活性, サイクリックな光リン酸化反応活性, およびプロトン勾配を測定した。

光化学系Iの反応活性は、葉緑体懸濁液に DCMU* を添加して、系II側からの電子の流れを途中で止め、代わりに人工的な電子供与体 DPIP** アスコルビン酸を与え、照射した時に生じる酸素濃度の低下速度を酸素電極を用いて測定した。

光化学系IIの活性は、葉緑体懸濁液に、電子伝達系の系Iと系IIの間で電子を奪うヘキサアンノ鉄(III)酸カリウム ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)*** を添加して照射し、この時生じる酸素濃度の増大速度を酸素電極を用いて測定した。

光化学系全体の活性は、葉緑体懸濁液にメチルピオ

ローゲン (MV) を添加して照射した時に生じる酸素濃度の低下速度を酸素電極を用いて測定した。

実際の測定手順としては、2.1. で述べた試料溶液を希釈して、組成を [0.04 M: スクロース, 5 mM: トリシン-KOH, 90 mM: KCl, 4.5 mM: MgCl_2 , 0.9 mM: K_2HPO_4 , 1 mM: NaCl, $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ のクロロフィルに相当する葉緑体, 1%: PVA, pH: 7.8] となるようにした。この液 3 ml を、 25°C の恒温ガラス電極セル²⁾ (光リン酸化反応測定用のもの) に入れ、各反応に応じて下記の試薬をその濃度になるようにマイクロシリンジで添加後、できるだけ少量の KOH と HCl 溶液で pH を調整した。

- a) 光化学系I...0.2 mM: MV, 0.1 mM DPIP, 1.5 mM: アスコルビン酸, 2 mM: NaN_3 , $20 \mu\text{M}$: DCMU
- b) 光化学系II...2.0 mM: $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (酸素電極のセルに添加)
- c) 光化学系全体...0.2 mM: MV, 2 mM: NaN_3

その後、ピペットで酸素電極用のセル³⁾に移し、励起光を照射して反応を開始させた。なお、照射時間は1分以内とした。

光リン酸化反応の活性測定では、試料溶液として電子伝達反応測定の時と同じ組成の溶液を用い、これに $50 \mu\text{M}$ となるように PMS*, 1 mM となるように ADP を加え、KOH および HCl 溶液で pH を 8.0 に調整した後、照射したときの pH 変化をガラス電極を用いて測定した。

プロトン勾配の測定では、試料溶液の組成は、[0.04 M: スクロース, 5 mM: トリシン-KOH, 90 mM: KCl, 4.5 mM: MgCl_2 , 1 mM: NaCl, $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ のクロロフィル濃度に相当する葉緑体, 1%: PVA] で、この混合液 3 ml を 25°C の恒温ガラス電極セルに入れた。さらに $50 \mu\text{M}$ となるように PMS を添加し、KOH と HCl で pH を 6.0 に調整した後、照射した時の pH 変化を測定した。これは、照射により H^+ ポンプの作用で H^+ がチラコイド膜に取り込まれ、上昇する外液の pH 変化を測定するものである。

2.4. 二次物質生成の影響を調べるための実験

葉緑体懸濁液に $120 \text{ nmol}/\text{cm}^3$ の濃度のオゾンを経過させた後、遠心分離し、その上澄液を分離した。次に正常な葉緑体懸濁液を別途用意し、これに前記上澄液を添加して攪拌し、2.3. で述べた葉緑体の光合成諸機能に対するオゾン通気上澄液添加の影響を測定した。

対照試料としては、次の2種を用いた。

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

** DPIP: dichlorophenolindophenol

*** 図表中では FeCy と略記

* PMS: phenazinmethosulphate

- a) 葉緑体懸濁液にオゾンを含まない清浄な空気を通気し、その上澄液を、別途用意した正常な葉緑体懸濁液に添加して攪拌したもの
- b) 葉緑体は含まないが、それ以外は葉緑体懸濁液と同組成の溶液にオゾンを通気し、この液を別途用意した正常な葉緑体懸濁液に添加して攪拌したもの

2.5. 葉緑体の光合成機能に対するプロピオンアルデヒドおよびプロピオン酸の影響の測定

オゾンと葉緑体の反応により、二次物質としてプロピオンアルデヒド、あるいはプロピオン酸が生成するものと仮定し、これらが葉緑体の機能にどのような影響を与えるかについて調べた。葉緑体懸濁液に、試葉から所定濃度に調整したプロピオンアルデヒド、またはプロピオン酸を添加した後、その光合成機能を測定し、添加の影響を求めた。

2.6. オゾンと葉緑体の反応で生成する二次物質の分析

クロロフィル濃度 $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ に相当する葉緑体懸濁液 25 cm^3 に、オゾン濃度 $120 \text{ nmol}/\text{cm}^3$ の空気を $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ の流速で 60 分間通気した後、SIM 法による GC-MS を用いて、葉緑体懸濁液中の二次生成物質としてアルデヒド類の分析を行った。

カラムはクロモソープ 101 の $60\sim 80$ メッシュ 1 m を用い、 100°C から 180°C まで $10^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温した。アルデヒドは、 $m/e=29$ の特性ピークを測定し、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ までを分析した。

2.7. ベンジジン添加による阻害部位推定のための実験

オゾン等により葉緑体の電子伝達系の機能は、主として光化学系 II の近傍で阻害されることが明らかになっている。一方ベンジジンは光化学系 II の入口、即ち P680 と Mn の中間にある物質 Y に電子を供給すると考えられている。

そこで、オゾンにより生成した二次物質、あるいはプロピオンアルデヒド添加による、光化学系 II に対する阻害効果が、ベンジジンの添加 ($33 \mu\text{M}$) によってどのように回復するかを調べた。

3. 結果および考察

3.1. オゾンによる二次物質の生成

オゾンにより生成した二次物質の光合成機能に対する影響を Table 1 に示す。比較のために、一番右の欄に、ほぼ同濃度 ($100 \text{ nmol}/\text{cm}^3$) のオゾンで直接葉緑体懸濁液に通気した時の、葉緑体の光合成機能の相対値 (正常値に対する割合) を示した。光化学系 II、光化学系全体、光リン酸化反応、およびプロトン勾配の各機能が、オゾン処理葉緑体懸濁液の上澄液を添加することにより低下した。特に光化学系 II に対する阻害は、オゾンで直接通気した場合と同様に系 I に対する阻害より大きい。

上澄液添加の場合と直接オゾン通気の場合とでは、実験条件が幾分違うこと (直接通気の方が測定までの時間がやや長いことなど) から、そのまま定量的な比

Table 1 The effect of the addition of the supernatant fraction of the ozone treated chloroplast suspension and ozone bubbling on the photosynthetic reaction rates of the chloroplast

reaction	(chloroplast)	reaction rates of chloroplast with addition of supernatant fraction		relative reaction rates (%)	relative reaction rates of chloroplast treated with O_3 * ³ (%)
		with addition of supernatant fraction* ¹	reference* ²		
DPIP _{H2} →MV	(basal)	399* ⁴	457* ⁴	87.2	95
H ₂ O→FeCy	(basal)	93* ⁴	125* ⁴	74.7	52
H ₂ O→MV	(basal)	168* ⁴	241* ⁴	69.8	75
H ₂ O→MV	(uncoupled)	421* ⁴	556* ⁴	75.8	75
proton conc. grad.		0.137* ⁵	0.179* ⁵	76.5	50
photophosphorylation		152* ⁶	209* ⁶	72.8	56

*¹ with the addition of the supernatant fraction of the chloroplast suspension treated with $120 \text{ nmol}/\text{cm}^3$ of ozone bubbled at the flow rate of $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ for 60 min

*² normal chloroplast with no addition of the supernatant fraction

*³ treated with $100 \text{ nmol}/\text{cm}^3$ of ozone bubbled at the flow rate of $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ for 60 min

*⁴ $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl. h}$

*⁵ $\mu\text{eq H}^+/\text{mg chl.}$

*⁶ $\mu\text{eq formed ATP}/\text{mg chl. h}$

較はできないが、上澄液添加の影響はオゾンを経緑体懸濁液に直接通気した場合と非常によく似ている。このことから、オゾンによる経緑体の電子伝達系への阻害作用が、オゾンによって生成した二次物質に依存するものであることが明らかになった。また、この二次物質は電子伝達系とプロトン勾配、および光リン酸化反応活性を同じように低下させることから、電子伝達阻害剤として働いていると考えられる。

3.2. プロピオンアルデヒドおよびプロピオン酸添加の影響

チラコイド膜を構成するリン脂質や糖脂質中の脂肪酸の多くは、不飽和脂肪酸であり、その中でもリノレン酸を多く含むとされている。このリノレン酸がオゾン分解した場合の生成物として、3炭素の骨格を持つプロピオンアルデヒドとプロピオン酸が考えられ

る。このようなことから、3.1. で述べた二次物質としてプロピオンアルデヒドとプロピオン酸とを想定し、これらを経緑体懸濁液に添加して、その光合成機能に対する作用を調べた。

Fig. 1 と Fig. 2 は、経緑体懸濁液にそれぞれプロピオンアルデヒドおよびプロピオン酸を添加した時の光化学系I、光化学系II、および光化学系全体の機能の変化を示したものである。プロピオン酸はいずれに対してもほとんど影響を与えないが、プロピオンアルデヒドは光化学系II ($H_2O \rightarrow FeCy$) および光化学系全体 ($H_2O \rightarrow MV$) に対して顕著な影響を与えることが示された。

Fig. 3 と Fig. 4 は経緑体の光リン酸化機能およびプロトン勾配に対するプロピオンアルデヒドおよびプロピオン酸添加の影響を示す。プロピオンアルデヒド、

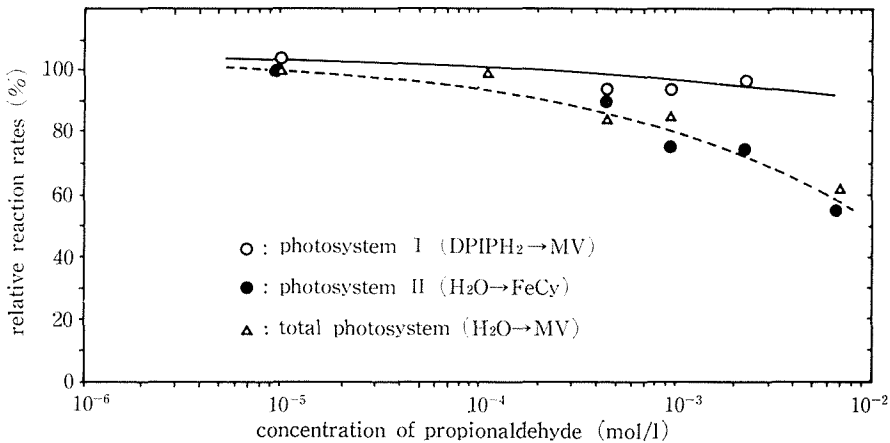


Fig. 1 Effect of propionaldehyde on the reaction rates of the photosynthetic electron transport systems. The reaction rates were expressed as relative values to those with no addition of propionaldehyde.

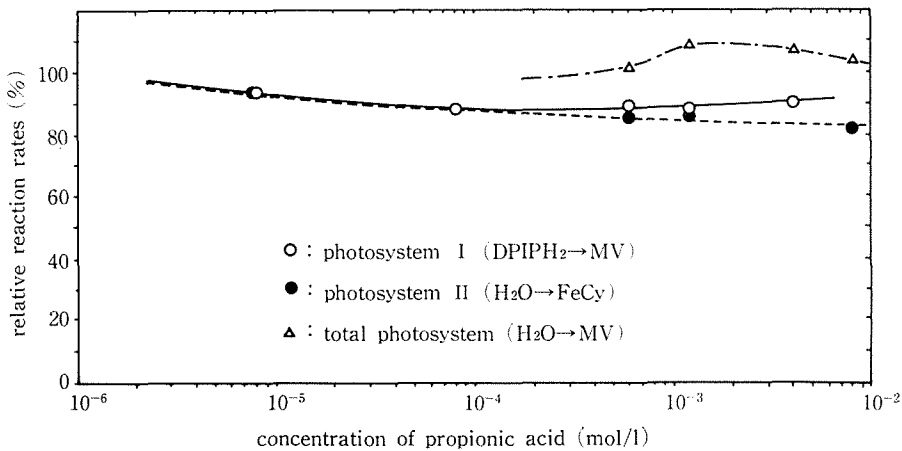


Fig. 2 Effect of propionic acid on the reaction rates of the photosynthetic electron transport systems. The reaction rates were expressed as relative values to those with no addition of propionic acid.

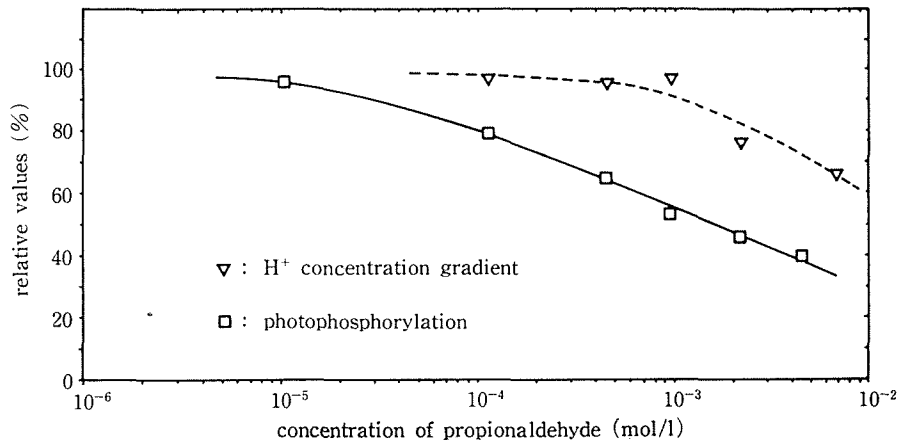


Fig. 3 Effect of propionaldehyde on the H⁺ concentration gradient and the photophosphorylation. The H⁺ concentration gradient and the photophosphorylation were expressed as relative values to those with no addition of propionaldehyde.

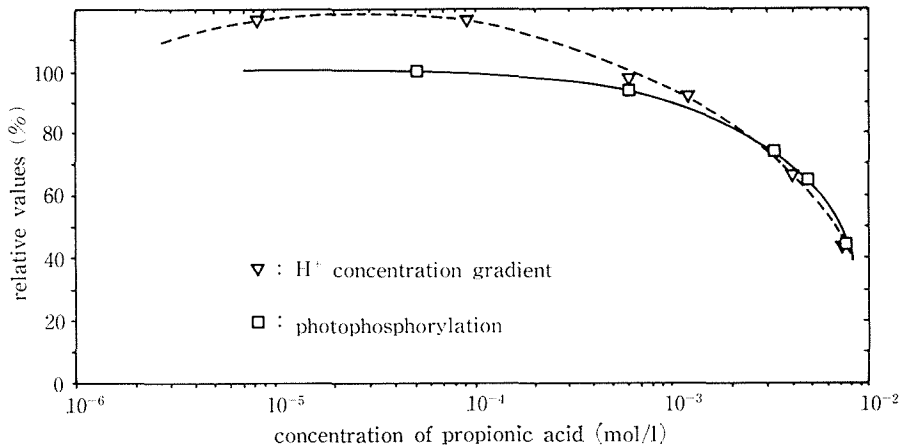


Fig. 4 Effect of propionic acid on the H⁺ concentration gradient and the photophosphorylation. The H⁺ concentration gradient and the photophosphorylation were expressed as relative values to those with no addition of propionic acid.

プロピオン酸いずれも、プロトン勾配および光リン酸化の機能に対して、顕著な影響を与えることが認められた。

プロピオンアルデヒドの場合は電子伝達系とプロトン勾配を同程度阻害することから、電子伝達阻害剤として働いていること、さらに光リン酸化反応に対する阻害がプロトン勾配に対する阻害に比べ著しいことからエネルギー伝達阻害剤としても働いていると考えられる。一方、プロピオン酸の場合は電子伝達系に対する阻害能はなく、また、エネルギー伝達阻害能もない。プロトン勾配および光リン酸化反応の機能に対するプロピオン酸の阻害は、何らかの機構によるチラコイド膜からのプロトンのリークによるものと考えられる。

以上の結果を、葉緑体に対するオゾン通気の影響と

比較すると、プロピオンアルデヒド添加の影響がオゾン通気の影響と非常に近く、また、プロピオン酸添加の影響がこれに加算されていると見ることもできる。

3.3. プロピオンアルデヒドの検出

ここまでの実験結果から、葉緑体懸濁液にオゾンを通気した場合、プロピオンアルデヒドのような二次物質が生成して、主としてこれが葉緑体の光合成諸機能を阻害するとの仮説が成り立つように考えられる。そこで、葉緑体懸濁液にオゾンを通気した場合に、二次物質と考えられるようなアルデヒド類が実際に生成するかどうかを明らかにするために、オゾンを通気した液中の生成物を分析した。Fig. 5(a) は市販の C₂~C₅ のアルデヒド特級試薬を混合した標準試料の GC-MS によるクロマトグラムであり、C₂~C₅ のアルデヒドが保持時間 8 分までに存在することを示している。

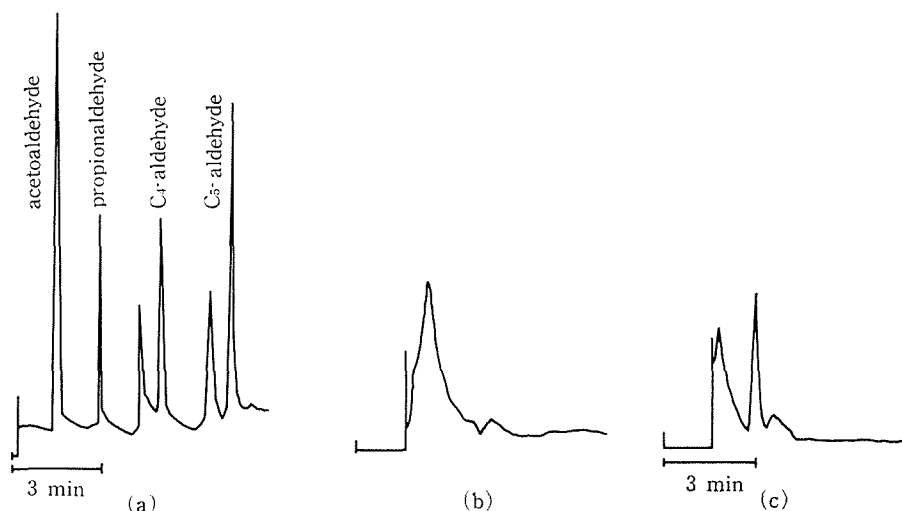


Fig. 5 Masschromatogram of standard aldehydes and chloroplast suspension.

- (a) reagents of C_2 to C_5 aldehyde.
 (b) chloroplast suspension with no treatment by ozone.
 (c) chloroplast suspension treated with 120 nmol/cm^3 of ozone bubbled at the rate of $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ for 60 min.

Fig. 5(b) はオゾン通気前の葉緑体懸濁液のブランク実験, Fig. 5(c) はオゾンを通気した葉緑体懸濁液についての分析結果で, プロピオンアルデヒド (保持時間3分) の生成が確認された。生成したプロピオンアルデヒドの濃度は $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ であった。

チラコイド膜を構成する脂質中の不飽和脂肪酸の量と通気したオゾン量とから推定すると, この程度のプロピオンアルデヒドが生成することは十分に考えられる。すなわち, $20 \mu\text{g/cm}^3$ のクロロフィルを含む葉緑体懸濁液には, 約 $60 \mu\text{g/cm}^3$ のリン脂質や糖脂質が含まれる。これらの脂質に含まれる不飽和脂肪酸は, 約 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ 程度であり, また, 通気したオゾンは, 約 $30 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ に相当するので, $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ のプロピオンアルデヒドを生成させることは可能であると思われる。このようなことから, 生成したプロピオンアルデヒドは, オゾンとチラコイド膜中の不飽和脂肪酸とが反応して生成したものと考えた。

一方, $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ 程度のプロピオンアルデヒドを添加しても, 120 nmol/cm^3 のオゾンを葉緑体懸濁液に直接通気した場合のような著しい電子伝達阻害は現れない (Fig. 1, Table 1)。この点については, 1) プロピオンアルデヒド添加実験では, ほぼ無傷の葉緑体であるのに対して, オゾン通気の場合はオゾンとの反応で葉緑体が多少損傷を受けることと, 2) プロピオンアルデヒド添加の場合は, 添加後, 葉緑体の機能測定までの時間が短い (約10分) のに対して, オゾン通気の場合は, 実験の都合上その数倍の時間を要する

など, 反応条件の違いが挙げられ, これらのことから阻害率に差を生じたものと考えられた。

3.4. ベンジジンによる活性の回復

オゾンにより生成した二次物質やプロピオンアルデヒドを添加した場合の光化学系IIの反応活性の低下が, ベンジジンの添加によりどのように変化したかを Table 2 に示す。その結果, プロピオンアルデヒドにより阻害された光化学系IIの活性は, ベンジジンの添加によってかなり回復した。また, 二次物質 (オゾン通気上澄液) 添加による阻害の場合も, プロピオンアルデヒドの場合と似て, ベンジジン添加によって約10% 活性が回復した。ベンジジンは光化学系IIの入口, 即ち P680 と Mn の中間にある物質 Y に電子を供給すると考えられている。従って, ベンジジンの添加によって活性がある程度回復したことは, 二次物質およびプロピオンアルデヒドによる阻害の部位が, いずれも主として光化学系IIの酸化側でおこなっていることを示しており, 両者の阻害部位が近いことを示している。

以上のことから, 葉緑体懸濁液にオゾンを通気した場合, プロピオンアルデヒドを生成し, このプロピオンアルデヒドが葉緑体の光合成機能の阻害物質として作用していることが明らかになった。オゾンが葉緑体の機能を直接阻害しているか否かは, この実験だけでは不明であるが, プロピオンアルデヒドを生成する程にチラコイド膜等と反応していることから考える

Table 2 The recovery of the photosystem II reaction rates after the addition of benzidine

	reaction rates of photosystem II ($\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl. h}$)		relative reaction rates (%)
	reference* ¹	propionaldehyde* ²	
with no addition of benzidine	86.2	72.4	84.0
after the addition of benzidine* ³	89.3	82.5	92.4
	reference* ⁴	supernatant* ⁵	
with no addition of benzidine	87.4	66.0	75.5
after the addition of benzidine* ³	92.8	78.5	84.6

*¹ with no addition of propionaldehyde

*² with the addition of 10^{-3} mol/l of propionaldehyde

*³ benzidine was added to $33 \mu\text{M}$

*⁴ with no addition of the supernatant fraction

*⁵ with the addition of the supernatant fraction of the chloroplast suspension treated with $120 \text{ nmol}/\text{cm}^3$ of ozone bubbled at the flow rate of $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ for 60 min

と、葉緑体の光合成機能に対する阻害作用は、プロピオンアルデヒドのような二次物質とオゾンによる直接の反応の両者が働いているものと思われる。

4. 総括

単離した葉緑体の光合成諸機能に対するオゾン阻害について次のことが明らかになった。

1) 葉緑体懸濁液にオゾンを通気した場合、オゾンと葉緑体との反応により、葉緑体の光合成機能を阻害するような二次物質を生成することが明らかになった。

2) この二次物質はプロピオンアルデヒドを含むことが見出された。

3) 試薬のプロピオンアルデヒドの添加により、葉緑体の光合成機能に対して、オゾン通気の場合と同様の効果を示すことが明らかになった。

4) 以上のことから、オゾンと葉緑体との反応でプロピオンアルデヒドを生成し、このプロピオンアルデヒドが葉緑体の光合成機能を阻害することを確認した。

謝辞

本研究を進めるにあたって、長期にわたって試料についてお世話いただいた教育学部麻生武夫教授、ならびに GC-MS の分析に協力いただいた猪子正憲助手に謝意を表す。

文献

- 1) 鈴木信市, 村林真行, 松野武雄, 横浜国大環境研究紀要 **8**, 81 (1982)
- 2) 井上 勉, 鈴木信市, 村林真行, 松野武雄, 電気化学および工業物理化学, **51**, 145 (1983)
- 3) 井上 勉, 村林真行, 松野武雄, 横浜国大環境研究紀要, **9**, 47 (1983)
- 4) H. Ochiai, H. Shibata, T. Matsuo, K. Hashinokuchi, I. Inamura, Agric. Biol. Chem., **42**, 683 (1978)
- 5) D. I. Arnon, Plant Physiol., **24**, 1 (1949)
- 6) 井上 勉, 横浜国大大学院工学研究科 修士論文 (1982)