

オゾンによる植物色素への影響*

野内 勇 大平 俊男

はじめに

緑色植物の緑色は、放射線・紫外線・種々の元素・いくらかの有機物質などにより、正常なクロロフィル形成が乱され、淡黄色、黄色、白色に変化する。これらのいろいろな要因は、クロロフィル形成に関与している酵素などに直接または間接的に影響を及ぼしたり、細胞やクロロプラストの核酸代謝、脂質代謝などを乱すものである。^{1),2) 3)} 亜硫酸ガスやオゾン等の大気汚染物質も同様に、クロロフィルを破壊し、光合成過程を乱し、植物の成長に大きな影響を及ぼしている。ここでは、オゾンによる植物の被害症状として、葉の漂白化・赤色化に注目し、オゾンによるクロロフィルの破壊と赤色アントシアンの生成について葉分析を行ない、若干の考察を試みた。

1 分析方法

(1) 供試植物

⁴⁾ 前報のオゾン暴露実験でO₃濃度20pphmに暴露した植物の葉を分析に用いた。クロロフィルの定量として、サントウサイ、ソメイヨシノを、ケヤキについては赤褐色色素の生じていないものを使用した。アントシアンの同定には、赤褐色や赤紫色となったケヤキ、アサガオの葉を用いた。

(2) クロロフィルの定量

主脈を取り除いた新鮮葉をハサミで裁断し、500mgを精秤し7.5mlの水を用いてホモジナイザーでホモジネートし、30mlのアセトンを加え80%アセトンとして冷蔵庫内で2時間静置した。ガラスフィルターで吸引濾過し、80%アセトンで洗い、濾液を50mlメスフラスコに移し、80%アセトンで定容とし、分光光度計（島津製作所 Double 40）を用い、649m μ 、665m μ の波長領域に⁵⁾ おける吸光度を測定し、次式を用いてクロロフィルa、クロロフィルb、全クロロフィル量を決定した。

$$\text{Chl a mg/g} = \{11.63(A_{665}) - 2.39(A_{649})\} \times \frac{50}{1,000 \times 0.5}$$

$$\text{Chl b mg/g} = (20.11(A_{649}) - 5.18(A_{665})) \times \frac{50}{1,000 \times 0.5}$$

$$\text{Total Chl mg/g} = \frac{(6.45(A_{665}) + 17.72(A_{649})) \times 50}{1,000 \times 0.5}$$

(3) クロロフィルの吸収スペクトル

前述の80%アセトンで抽出したクロロフィル溶液には水溶性色素を含有している。そこでこれら水溶性色素を除去する目的と、エーテル溶液の吸収帯が最も鮮明であるという理由でクロロフィルのエーテル溶液とした。すなわち、エチルエーテルと水を加えて分液し、水でよく洗ってアセトンを除き、無水硫酸で水分を除いた。このようにして処理したエーテル溶液を自記分光光度計（日立製作所 EPS-3T 型）にかけた。

(4) アントシアンの同定

アントシアンは天然には各種の糖や有機酸と結合した配糖体の形で存在しているため、糖と色素の本体である色素部（アントシアニン）のアグリコンとの二つに分けて同定した。

赤褐色色素の生じたケヤキと赤紫色色素を生じたアサガオの葉を、1%メタノール塩酸で冷浸し、濾過して得られた色素抽出液をn-ブタノール：塩酸：水、7：2：5（v/v）の上層のみを展開溶媒に用い、40×40cm（東洋濾紙 No. 52）の濾紙にマスパーパクロマトグラフィーを行なった。展開後、色素バンドを切り取り、1%メタノール塩酸で溶出し、再度マスパーパを行ない、完全に純化するまでくり返した。溶出液を減圧濃縮してメタノールをとばし、20%塩酸水を加えて3分間直火で加水分解した。冷却後、この液に少量のイソアミルアルコールを加えて強く振ると、アグリコンは上層のイソアミルアルコール層に移る。下層の水層は糖検出用の試料とした。振り取ったアグリコンに1%塩酸水とベンゾールを加えて強振するとアグリコンは純化されて水層に移る。これを再び少量のイソアミルアルコールで振り取って薄層クロマトグラフィーによるアグリコンの同定に用い

た。展開溶媒には、酢酸：塩酸：水，30：3：10(v/v)，
n-ブタノール：塩酸：水，7：2：5(v/v)を用いた。

糖試料溶液は NaOH を乾燥剤とした減圧デシケータ
の中で乾固する。残渣から多量の食塩を除くため、無水
メタノールで抽出し、濾過する操作を数回繰り返して糖
検出用の試料を得た。試料は標準サンプルと並列して濾
紙（東洋濾紙 No. 52）に添着し、n-ブタノール：ピリ
ジン：水，6：3：1 (v/v)，n-ブタノール：酢酸：水，
4：1：5 (v/v) で展開した後、硝酸銀発色試薬を用い
て糖の検出を行なった。

2 実験および結果

(1) クロロフィル

実験 1

1972年6月25日～7月11日まで継続した暴露実験のケ
ヤキ、ソメイヨシノと、同年8月11日～9月4日までの
暴露実験のケヤキを用いて、クロロフィル量の経時的変
化を調べた。

表1、2に結果を示したが、各樹種とも全クロロフィ
ル量は暴露期間が長くなるにつれて減少していった。
表2のケヤキのクロロフィル量の測定は3日毎の調査で
あるが、これによると、暴露18日を経過したものは、そ
れまでのものに比べ極端に低下し、それ以後も激しい減
少量を示した。また、クロロフィル a/b の比が低下した。

実験 2

草本植物ではサントウサイを用いて、暴露前後のクロ
ロフィル量の変化をみた。供試株や葉位によってクロロ

フィル量が大きく異なるため、単純にコントロールと暴
露したものとの比較ができなかった。そこで一つの株
を用い、暴露前に葉の主脈に沿って半分を切り取り定量
し、残り半分を20pphm O₃、6時間の暴露を行ない、暴
露後18時間後に定量した。

結果は表3に示した。クロロフィル量は最も新しい葉
を除いて減少しており、古い葉から新しい葉にいくにし
たがってクロロフィルの減少量も少なくなっている。ま
た、被害指数、被害葉面率の大きな被害の激しかった葉
のクロロフィルの減少量は増大している。クロロフィル
a/b は樹木と同様暴露後には減少した。

実験 3

暴露（20pphm, 18時間）によって葉全面に黄褐色小斑
点を生じたサラダナの被害葉の吸収スペクトルをみた。
吸収スペクトルを図1に示すが、コントロール被害葉と
では変化が見られなかった。

(2) アントシアン

セルロース薄層クロマト，ペーパークロマト，1%メ

図1 サラダナ葉から抽出したクロロフィルの
吸収スペクトル

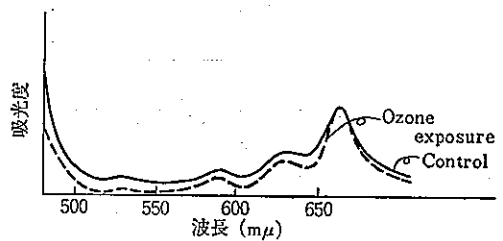


表1 オゾン暴露によるクロロフィル（全クロロフィル，クロロフィル a，クロロフィル b）量の変化
mg/g（新鮮重）

植物名	クロロフィル	暴露期間				
		暴露前	2日間	5日間	9日間	19日間
ケヤキ	Chl a	2.624	3.328	2.922	2.481	1.326
	Chl b	1.043	1.415	1.214	1.152	0.632
	Total Chl	3.667	4.743	4.136	3.633	1.958
	Chl a/b	2.52	2.35	2.41	2.15	2.10
ソメイヨシノ	Chl a	3.056	2.846	2.671	2.742	1.769
	Chl b	1.225	1.263	1.149	1.125	0.802
	Total Chl	4.277	4.112	3.820	3.867	2.569
	Chl a/b	2.50	2.26	2.32	2.44	2.21

表2 オゾン暴露によるケヤキ葉のクロロフィル量の経時変化

mg/g (新鮮重)

暴露期間	コントロール				暴露葉			
	Chl a	Chl b	Total Chl	Chl a/b	Chl a	Chl b	Total Chl	Chl a/b
6	2.249	0.912	3.159	2.47	1.641	0.783	2.424	2.10
9	1.472	0.639	2.110	2.31	1.146	0.546	1.692	2.10
12	1.628	0.671	2.297	2.43	1.304	0.620	1.922	2.10
15	1.872	0.695	2.567	2.70	1.611	0.758	2.369	2.13
18	1.971	0.798	2.768	2.50	0.950	0.492	1.440	1.93
21	1.946	0.776	2.721	2.51	0.870	0.462	1.332	1.88
24	2.256	0.948	3.203	2.38	0.744	0.396	1.140	1.89
27	1.685	0.726	2.410	2.32	0.542	0.258	0.799	2.10

表3 オゾン暴露前後のサントウサイの各葉位におけるクロロフィル量の変化

mg/g (新鮮重)

葉位	暴露前				オゾン 20pphm 6時間暴露後						
	Chl a	Chl b	Total Chl	Chl a/b	Leaf injury	% of leaf damage	Chl a	Chl b	Total Chl	Chl a/b	
老葉 ↓	1	0.261	0.114	0.375	2.29	4	100	0.039	0.039	0.078	1.00
	2	0.408	0.180	0.588	2.27	4	80	0.188	0.090	0.277	2.08
	3	0.413	0.178	0.596	2.34	3	60	0.276	0.131	0.397	2.10
	4	0.299	0.126	0.424	2.37	2	40	0.251	0.117	0.368	2.14
	5	0.347	0.147	0.492	2.36	2	40	0.278	0.122	0.399	2.28
新葉	6	0.380	0.159	0.538	2.39	1	10	0.375	0.158	0.531	2.38
	7	0.330	0.135	0.464	2.44	0	0	0.395	0.186	0.580	2.12

表4 ケヤキとアサガオのアントシアニン (アグリコン) の Rf 値

試料	Rf値	展開溶媒 n-ブタノール: 酢酸:水 (7:2:5 v/v)	酢酸:塩酸:水 (30:3:10v/v)
	ケヤキ		0.36
アサガオ		0.36	0.38
ベオニジン		0.55	0.61
シアニジン		0.36	0.38
デルフィニジン		0.22	0.21
ベチュニジン		0.30	0.36, 0.18

表5 ケヤキとアサガオのアントシアニンの糖残基の Rf 値

試料	Rf値	展開溶媒 n-ブタノール: ピリジン:水 (6:3:1 v/v)	n-ブタノール: 酢酸:水 (4:1:5 v/v)
	ケヤキ		0.29
アサガオ		0.29	0.29
グルコース		0.29	0.28
ガラクトース		0.26	0.26
マンノース		0.36	0.32
キシロース		0.42	0.32
ラムノース		0.57	0.44

タノール塩酸溶液中のアグリコンの吸収スペクトルによって得られた結果を図2, 3, 4, 5, 6, 表4, 5に示した。

これらの結果から、ケヤキ、アサガオから抽出されたアグリコンはシアニジンであり、糖はグルコースであることが明らかになった。また、アグリコンの吸収極大

⁶⁾は 535m μ であった。この結果、オゾンによって生じた赤褐色色素、赤紫色色素はアントシアニンであることが確認された。

3 考 察

高等植物の葉には、一般に4種の色素(クロロフィル

図2 赤褐色化したケヤキ葉のアントシアニン (アグリコン) の吸収スペクトル

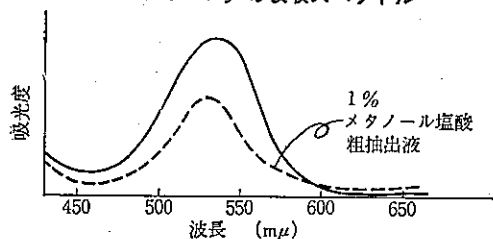


図3 アグリコンのセルロース薄層クロマトグラフィー
展開溶媒 酢酸:塩酸:水 (30:3:10 v/v)

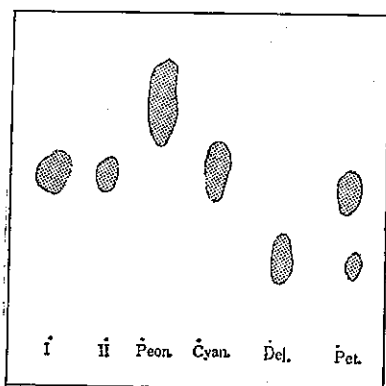
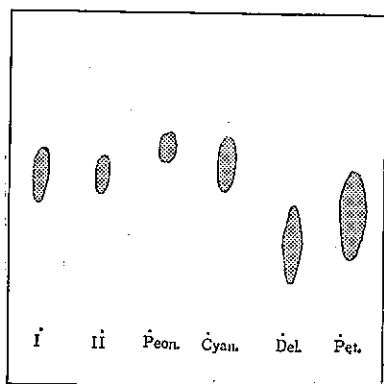


図4 アグリコンのセルロース薄層クロマトグラフィー
展開溶媒 n-ブタノール:ピリジン:水

I ケヤキ (6:3:1 v/v)
II アサガオ



a および b, カロチン, キサントフィル) がほぼ一定の比率で含まれ, 普通の緑葉では乾物中クロロフィル (a + b) が0.6~1.2%, カロチノイド (カロチン+キサントフィル) が0.07~0.2% あり, さらにクロロフィル a/b=29, キサントフィル/カロチン=1.5~2.0 である。

図5 糖のペーパークロマトグラフィー
展開溶媒 n-ブタノール:酢酸:水

I ケヤキ (4:1:5 v/v)
II アサガオ

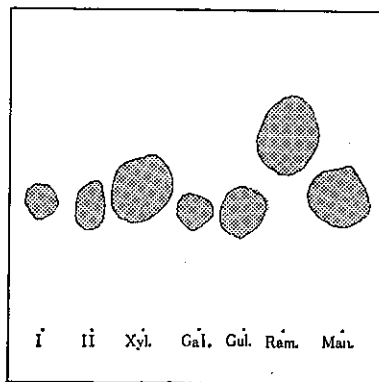
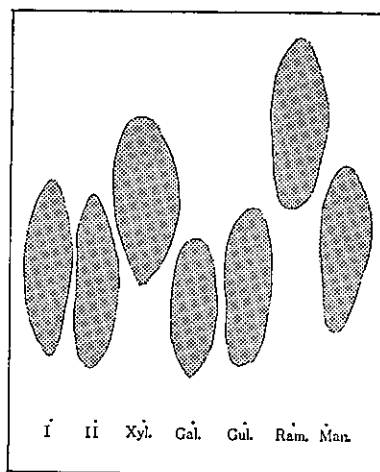


図6 糖のペーパークロマトグラフィー

展開溶媒 n-ブタノール:ピリジン:水

I ケヤキ (6:3:1 v/v)
II アサガオ



クロロフィルは植物体中で生理的(酵素など), 光, 化学物質などで分解されるが, どのようにして分解し, いったい何になるのかも現在まで正確にはほとんどわかっていない。オゾンに暴露され被害症状を呈したサラダナのクロロフィルの吸収スペクトルがコントロールのものと同様であったことは, 生きている植物体では, クロロフィルは見事に分解され, 消失して, 検出できるような分解産物をほとんど生じないことを裏づけている。

ここでは現在までに報告されているクロロプラストの

図7 代表的アントシアニン（アグリコン）の構造式

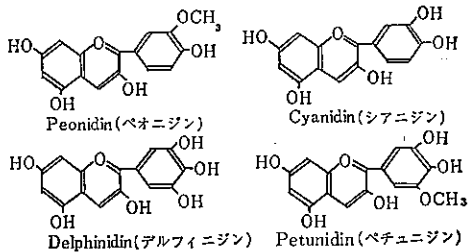
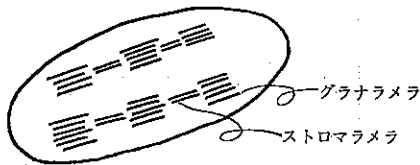


図8 クロロプラストの構造



電子顕微鏡観察にもとづいて、オゾン暴露によりクロロフィル a/b 比が低下する理由を主に考察し、アントシアニン色素の生成とも考慮し、オゾンは葉の老化現象を促進するものとの推測を行なった。

クロロプラストは細胞内顆粒のうち緑色植物に限って見出され、この部分において光合成が行なわれている。またクロロフィルをはじめその他の光合成に関する色素類はリポタンパクからなる層状構造のラメラに局在している。ラメラはグラナラメラと、グラナラメラとグラナラメラとを結ぶ重なり合いの少ないストロマラメラとに大別される。両ラメラの生理的性質の差は Frey-Wyssling⁸⁾らによると、クロロプラストを遠心分離あるいは超音波で処理すると、その操作中にストロマラメラのみが壊れ、機械的ショックに弱いことが指摘されている。池田⁹⁾や吉田^{10), 11)}らは、試料を水に浮かべ栄養供給のない状態にしておくと、老化の進行にともないラメラ構造が崩壊する過程において、ストロマラメラは、グラナラメラより早く崩壊することを明らかにした。また、Anderson¹²⁾らは、ジトニンで処理したハウレンソウのクロロプラストを遠心分離により 5 分画すると、1,000 g 分画（大きい粒子）は主として水の光酸化および O₂ 発生に関与する系 II の光化学反応の活性を、144,000 g 分画（小さい粒子）は NADP の還元に関与する系 I の光化学反応の活性のみを持ち、クロロフィル a/b 比は前者が 2.4 で後者は 6.2 であると報告している。さらに、Sane¹³⁾らは、この光化

学系 I の活性のみを有する小さい粒子はストロマラメラであることや、ストロマラメラはクロロフィル a/b 比が大きく、グラナラメラはクロロフィル a/b 比は小さいことを見出した。この結果、ストロマラメラにはクロロフィル a が、グラナラメラにはクロロフィル b の存在量が多いことがわかった。このように考えてくると、葉の老化現象はクロロフィル a を多く含むストロマラメラがまず崩壊するためクロロフィル a/b 比が低下を示し、その後の長期のオゾン暴露でも、あまりクロロフィル a/b 比が低下を示さないことは、老化現象と同じように、ストロマラメラが完全に崩壊し、グラナラメラのみが残ったものと考えられ、全クロロフィル量の減少はグラナラメラも崩壊過程にあると思われる。ラメラ構造が変化する要因として、光や重金属 (Mn, Zn, Fe) などがあることが知られているが単にクロロフィル a/b 比という面からだけを見ると、オゾンによる被害と老化という現象はまったく同じような動向をしている。

正常な場合には、秋に葉が紅色あるいは黄色に変化するが、これはアントシアニンおよび未詳の色素が紅葉を、クロロフィルが特に秋の落葉前に分解して葉の中に残っていたカロチノイドが目立つようになるのが黄葉である。植物の葉のアントシアニン色素は、葉柄の基部に離層ができて糖類の移動が妨げられて葉に蓄積することが条件の一つとも考えられているが、生成機構などはほとんどわかっていない。オゾン、オキシダントによってアントシアニン色素が生成することは、1967年 Koukol⁶⁾ら“ぎしぎし”を用いて報告していたが、われわれの行なったオゾン暴露実験においても、ケヤキ、アサガオなどに赤色色素が観察され、これらの色素が表皮細胞にのみ生じていたところから、生じた色素がアントシアニンであると推定し、同定を行ない、アグリコンはアントシアニンの中に約 80% を占めるシアニジンであったことを確認した。また、アントシアニン生成の条件である多量の糖の蓄積は、Dugger¹⁵⁾らがオゾン暴露の後数週間で還元糖量の著しい増加を生じた報告などとあわせ、オゾンに暴露された落葉広葉樹にアントシアニン色素生成の可能性はあるものと思われていた。このようにオゾン害を受けた葉には、アントシアニン色素が生成されている。アントシアニン生成は、紫外線の強さ・窒素やリン酸の欠乏・温度などの環境的要因によっても左右されるので、アントシアニン

生成すなわちオゾン害であると判断することはできないが、環境的に疑問をはさむ余地のないような条件の時に、アントシアンが生成した場合にはオゾン害判定の重要な要素になり得ると思われる。また、一般にアントシアンは秋や枯死する前に生成されるところから、アントシアンが生成された時には、葉は相当に老化の進んでいることを暗示している。

オゾンの暴露によって、ケヤキなどの落葉広葉樹は早期黄紅葉化、早期落葉現象を呈するが、この現象はオゾンが落葉広葉樹の春の萌芽から秋の落葉に至る正常の生長サイクルを攪乱し、葉の老化現象を促進し、ひいては植物体の老化をも促進するものと推測した。

4 結 論

1972年夏期のオゾン暴露実験の被害症状観察に伴い、サントウサイ、アサガオ、ケヤキ、ソメイヨシノの色素分析を行なった。その結果、クロロフィル量の減少、クロロフィルa/b比の低下、アントシアン色素の生成をみた。以上の結果や落葉広葉樹のオゾン被害症状としての早期黄紅葉化、早期落葉および現在までに報告されているクロロプラストの電子顕微鏡観察などを考え合わせるとつぎのことが推断された。すなわちオゾンは、葉の老化現象を促進し、ひいては植物個体そのものの老化をも促進する役割りを果たすものである。

本実験を終えるにあたりクロロフィル、アントシアン色素に関しご指導いただいた帝京大学医学部の遠山益、東京教育大学理学部植物研究室の吉玉国二郎、農林省北陸農業試験場土壌肥料研究室の森田晃司の諸先生方に厚く、感謝いたします。

〈*本論文は大気汚染研究Vol 8 113~119 (1973)に掲載されたものである〉

参 考 文 献

1) Rao, D. N., and F. Lerlanc, E. Bryologist. 69,

- 69-75 (1966)
- 2) Coker, P. D. Trans. Br. bryol. Soc., 5, 341-7 (1967)
- 3) 門田正也, 山田寿美: 大気汚染研究, 4, 158(1969)
- 4) 野内勇, 大平俊男, 沢田正, 小口邦子, 古明地哲人: オゾンによる植物被害症状, 大気汚染研究, 113-9, 1973
- 5) Strain, H. H., and W. A. Svec. In, "The Chlorophylls" Vernon, L. P. and G. R. Seely, ed. 21-65, Academic press, New York and London. 1966.
- 6) Koukol, J., and W. M. Dugger, jr., Plant Physiol., 42, 1023-4 (1967)
- 7) 清水碩: 生物科学, 23, 31-42 (1971)
- 8) Frey-Wyssling, A., and K. Mühlethaler. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich. 94, 179 (1949)
- 9) Ikeda, T., and, R. Ueda. Bot. Mag. Tokyo. 77, 336-41 (1964)
- 10) Yoshida, Y. Plant and Cell physiolo., 10, 555-61 (1969)
- 11) Yoshida, Y., E. R. Waygood and P. K. Isaac. Bot. Mag. Tokyo. 82. 424-8 (1969)
- 12) Boardman, N. K., and J. M. Anderson. Nature, 203, 166 (1964)
- 13) Sane, P. V., D. J. Goodchild and R. B. Park. Biochim. Biophys. Acta. 216, 162-78 (1970)
- 14) 村上悟: 光合成の生化学(蛋白質, 核酸, 酵素編集部), 8-20, 共立出版, 東京 (1969)
- 15) Dugger, W. M., Jr., J. Koukol, and R. L. Palmer. J. Air Pollution Cont. Assoc., 16, 467-71 (1966)