

植物の光合成および葉成分へのオゾンとPANの影響

野内 勇

1 はじめに

光化学オキシダントの植物毒成分であるオゾンとPAN(パーオキシアセチルナイトレート)の植物に与える障害パターンにはそれぞれ特徴があり、大きな差異がある。一般にオゾンには成熟葉の葉表面に白色や着色(褐色や黒色など)化したネクロシスの小斑点症状を生じ、PANでは未成熟葉の葉裏面に光沢化や青銅色化を生じる。これら被害症状を組織学的に見れば、オゾンの小斑点症状は柵状組織の細胞が小グループで多数崩壊しており、白色小斑点では崩壊した細胞は脱色するが、着色小斑点では細胞が崩壊するとともに重合したフェノール物質などの色素が細胞に沈着したものである^{1), 2)}。PANの葉裏面の光沢化や青銅色化は、海面状組織細胞が連続して著しく収縮崩壊し、これに伴って細胞内空隙が拡大し、空気泡が充満したためと見られている^{1), 3), 4)}。このように同じ酸化性物質でありながら、オゾンとPANでは攻撃部位(葉令や組織細胞)が異なっていることや、植物種間でのオゾンとPANの感受性や抵抗性植物は両者に共通するものはほとんどないことから、オゾンとPANの植物障害の作用機構は異なっていると思われる。

現在、多くの研究者により支持されているオゾンの植物障害発現機構は次のようなものである⁵⁾。まずオゾンはプラズマレンマ(外原形質膜)や細胞内オルガネラ(小器官)の包膜の選択的透過性を変化させ、細胞やオルガネラから溶質や塩を流出させたりあるいは流入させたりしてしまい、細胞やオルガネラ内のイオンや水バランスを変化させる。このイオン環境や水分含量の変化は各種の生理機能や代謝機能に大きな影響を与える。すなわち、多くの酵素過程はイオン環境によってコントロールされている。例えば、呼吸は塩濃度の増加により増加し、電子伝達と光リン酸化はイオ

ン高張液により抑圧され(in vitroの測定で)、タンパク合成と光合成中間体のタイプと量は H^+ と Mg^{2+} 濃度によって急激に変化する。このようなイオンと水バランス変化による生理や代謝異常は、究極的に細胞崩壊やネクロシスと組織の死を生じるとするものである。しかし、オゾンが膜の透過性を変えてしまう理由は膜の不飽和脂肪酸あるいはタンパクSH基を酸化するためであろうとされているが、オゾンの初期攻撃がSH基であるのか不飽和脂肪酸であるのか現在まだわかっていない。

PANの植物障害発現機構については、PANに関する研究が少なく、まだほとんど知られていない。わずかにPANによりSH基がジスルヒド(-S-S-)に可逆的に酸化されるため、SH基を活性中心にもつSH酵素の阻害⁶⁾や光還元性SHタンパク質⁷⁾との反応が知られているにすぎず、PANの作用がオゾンと類似のものかどうか知られていない。

そこで、植物へのオゾンとPANの植物毒性の差異を明らかとし、あわせてその被害発現機構を解明するため、光合成および呼吸の植物の生理作用と植物葉成分へのオゾンとPANの影響を検討し、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験材料および実験方法

(1) 供試植物

供試した植物は、オゾンに感受性の強いアサガオ(品種スカーレット・オハラ)、PANに感受性の強いベチュニア(品種ホワイトエンサイン)、オゾンとPANに共に感受性の強いインゲンマメ(品種銀手亡)を用いた。アサガオは1/5000アールのワグネルポットに数粒直まきした。生長のよい2株を残して育成し、全葉数が15~20枚程度のものを用いた。ベチ

ユニアは播種後約1ヶ月後にノイバウエルポットに移植し、さらに30~40日後に葉数が15~20枚程度に生育したベチュニアを用いた。インゲンマメは芽出し後ノイバウエルポットに播種し、7~10日後の初生葉が最も拡大した時期のものを用いた。なお、アサガオは火山灰土壌に腐葉土を約3:1の割合で混合した土壌を使用し、ベチュニアとインゲンマメは市販の培養土を用い、植物の生育とともに毎週1000倍液のハイポネックス溶液を50~200 ml与えた。

植物は自然光型の人工気象室内(昼間温度27℃, 夜間温度22℃)で育成し、活性炭で濾過した空気を送入した。

(2) オゾン暴露

オゾン発生器(日本オゾン株式会社)により生成したオゾンを活性炭で濾過した浄化空気で希釈し、自然光型の人工気象室(小糸工業, 1.5×1.5×1.7 m)内に導き、オゾン暴露を行った。オゾン濃度はケミルミ法のオゾンモニター(紀本電子, Model 806)で測定し、濃度調節はミニコンピューターにより電磁弁をon-offするpI制御により行い、濃度の変動は5%以下であった。なお、オゾン計の目盛校正は1%中性ヨウ化カリウム緩衝液のミゼットインピンジャー法によりオゾン濃度を求め、動的校正した。

(3) PAN 暴露

PANの合成および濃度測定は、すでに報告⁴⁾してある方法に準じ、また暴露は人工光型人工気象室(小糸工業, 1.2×0.42×1.2 m)内で行った。

(4) 葉体内成分の定量

葉成分分析試料はオゾンおよびPAN暴露により、それぞれの被害症状発現部位を含む葉片を採取し、分析に供した。

① クロロフィル

クロロフィルの定量は、80%アセトン抽出により645nmと663nmの吸光度を測定し、Arnonの式⁸⁾により求めた方法とOgawaとShibata⁹⁾のヒドロキシルアミン試薬によるクロロフィルbを正確に求める方法の両者を用いた。クロロフィルa/b比を正確に求めたい場合を除き、多くの場合、80%アセトンでのArnonの方法によった。

② カロチノイド

カロチノイドはクロロフィル抽出溶液を30%KOH含有のメタノールで40℃, 3時間でケン化をおこない、

石油エーテルで抽出定容(Vml)とし、445nm付近の最大ピークの吸光係数を $E_{1cm}^{1\%} = 2505$ として次式によって求めた。

$$\text{全カロチノイド(g)} = A_{445} \cdot v(\text{ml}) / E_{1cm}^{1\%} \times 100$$

③ 核酸

核酸(RNAおよびDNA)はSchmidt-Thannhanserの方法¹⁰⁾によって過塩素酸を用いてクロロフィル抽出後の残渣より抽出し、RNAはオルシノール反応、DNAはジフェニルアミン反応によって比色定量¹¹⁾した。

④ タンパク質

RNAおよびDNAを抽出した残渣に0.1N-NaOHを加え、90℃で7.5分加熱してタンパク質を可溶化し、Lowryら¹²⁾の方法およびケルダール法によって定量した。

⑤ 過酸化脂質

直径1cmの葉ディスクをリーフパンチにより打抜き、2mlの蒸留水で乳鉢によりホモジネートし、0.5%チオバルビツール酸を含有した20%トリクロル酢酸5mlを加え、95℃で30分間インキュベートした。遠心して得られた上澄の532nmと600nmの吸光度を読み取り、(532-600)nmの差吸光係数としてHeathとPackerら¹³⁾の $155 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて定量した。

$$\text{過酸化脂質} (\mu \text{ mole/ml}) = A(532 - 600) \text{ nm} / 155$$

⑤ 可溶性タンパクフラクションパターン

アサガオ葉0.5gを50mMリン酸バッファー(pH 7.0)でホモジネートし、4層のガーゼで濾過した液を10,000gで20分間遠心した上澄液をセファデックスG-200(分離範囲分子量5,000~800,000)の1.5×35cmのカラムに添着した。上記バッファー300mlでゲル濾過し、5mlずつフラクションコレクターで分取し、タンパク質をLowryの方法で定量した。なお、これらの操作はすべて4℃以下の低温度でおこなった。

⑥ 無機イオンの葉からのリーチング

オゾンおよびPAN暴露した直後に葉片を採取し、蒸留水100mlのペトリ皿中に浸漬し、30℃の暗黒下で24時間静置し、葉から溶出したK, Na, Ca, Mgの無機イオンを原子吸光で定量した。

(5) 光合成および呼吸速度

光合成測定中のバックグラウンドのCO₂濃度を一定

に保つため、大きな10m³のビニールバックに活性炭で汚過した空気(約400ppmのCO₂濃度)をつめた。PAN暴露の場合は、別に用意した1.2m³のテドラーバックにこの空気を移すとともに、PANを所定の濃度になるように注入した。500W反射型のタングステンランプ4灯を10cmの水層を通したものを光源とした塩ビ製の同化箱(15×15×15cm)に、10m³のバックから5.7L/minの速流で空気を導びき、植物個体の光合成が一定値に達した後に、PANバックの流路に切換え、PANを2~3時間暴露した。その後再び清浄空気に切換え、光合成能の変化を追跡した。オゾン暴露の場合は、10m³のバックからの流路途中にガラス管に封入した6Wの紫外線ランプによりオゾンを発生させ、ランプ点灯本数と電圧制御によって、オゾン濃度を調節した。照射度は同化箱内中央で約40,000ルクスであり、同化箱内はミニファンで攪拌し、同化箱の入口と出口のCO₂濃度を赤外線ガス分析計(ベックマン、Platass-6A)で測定し、濃度差よりみかけの光合成速度(Fco₂)を次式により求めた。なお、Cin、Coutは、同化箱の入口と出口のCO₂濃度(ppm)、Vは通気速度(cm³/s)、Tは測定温度、Sは葉面積(cm²)である。なお、同化箱は簡易なアクリル製の恒温室内に設置しており、同化箱内の温度は27℃(T=300.2)程度でほぼ一定であった。

$$F_{CO_2} (10^{-6} g/cm^2 \cdot S) = 1.96 (C_{in} - C_{out}) \times V / 2S \times 273.2 / T$$

また、暴露終了後の光合成および呼吸速度の測定を酸素電極法によっても島崎ら¹⁴⁾の手法に従っておこなった。すなわち、70mlの透明アクリル反応セル中に2.6×5.7cmの葉片をはさみ込み、2.5mMの重炭酸ナトリウム(NaHCO₃)を含んだ1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)の中での酸素発生および酸素吸収をクラークタイプの酸素電極(YSI社 Model 53型)を用いて測定した。照射光はスライド映写機用ランプ(エルモプロジェクト100V-300W)を使用し、光源の熱による温度上昇を防ぐため、光源から1%硫酸銅溶液の10cm層、熱線カットフィルター(保谷HA-50)を順次に置き、反応セル全体を20℃に保った恒温水槽に沈め、20℃の恒温中で測定した。なお、反応セル内はマグネチックターラーで攪拌しており、照射度は反応セ

ルのアクリル樹脂の前面で50,000ルクスであった。発生および吸収した酸素量は、20℃の溶液中の酸素平衡濃度286μMを用いて、電圧変化から酸素量を求めた。

3 結果および考察

(1) クロロフィルおよびカロチノイド

オゾンによるクロロフィルの減少は、すでにタバコ¹⁵⁾、インゲンマメ¹⁶⁾、ホウレンソウ¹⁷⁾、ケヤキ¹⁸⁾など非常に多くの植物で報告されている。オゾン障害程度を評価する指標として、クロロフィル量の測定がおこなわれるほどクロロフィルは可視障害出現時には大きく減少することが知られている¹⁶⁾。ここでは、オゾン暴露0.15ppm、5時間)によるアサガオのクロロフィル量の変動を葉位別に測定した一例をあげる。オゾン暴露前に各葉位の葉の主脈に沿って葉を半分切り取り、クロロフィルを定量した。半葉が残っている株を0.15ppmのオゾンに暴露し、1日後に被害面積とクロロフィル量を測定して、暴露前後のクロロフィル量を比較した。結果を図1に示した。

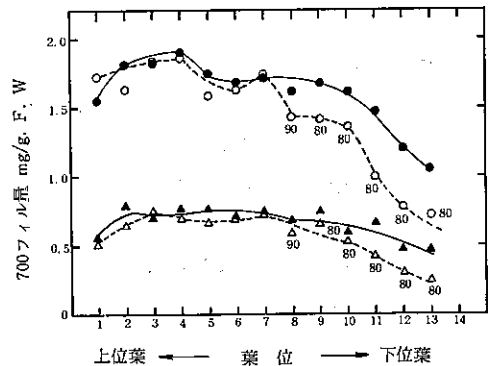


図1 アサガオ葉のクロロフィルにおよぼすオゾン(0.1ppm 5時間)の影響

- (●—●) 暴露前のクロロフィルa
- (▲—▲) 暴露前のクロロフィルb
- (○—○) オゾン暴露後のクロロフィルa
- (△—△) オゾン暴露後のクロロフィルb

可視害は8葉位目(上から数える)から出現し、図中の添字は可視害面積である。

被害は下位～中位の8枚に生じ、被害症状は12～13位の葉で黒色のネクロシスが10%程度あった他はすべて白色の微細斑点であり、被害面積は図中の数字で示した。被害の出現している葉でクロロフィルaおよびbで減少があることが示されている。

PANによるクロロフィルおよびカロチノイドへの影響に関する報告は少ない。そこでベチュニアおよびアサガオへのPAN暴露によるクロロフィルおよびカロチノイド量を測定した。ベチュニアはPAN 0.05 ppmで2, 4, 6および8時間暴露した。2時間の暴露では被害の発現はなかったが、4時間の暴露で葉裏面に白～灰白色化から上表面の白色斑点を生じ、8時間の暴露では両表面漂白のネクロシスの激しい症状を呈した試料を暴露後2日後に測定した。結果は図2に示した。クロロフィルa, bおよび全カロチノイドは共に減少しているが、特にクロロフィルaの減少が大きかった。

アサガオはPAN 0.15 ppmで1.5, 3, 4.5および6時間暴露した。1.5時間暴露のものにすでに葉裏面の軽い光沢化が見えており、3および4.5時間暴露では、葉裏面の葉脈間が陥没し、光沢度が著しく増加していた。6時間暴露では、上表面にまで被害がおおび灰緑色のネクロシスを呈した。クロロフィルおよびカロチノイドとともに葉裏面の光沢化まではほとんど変化がなく、ネクロシスが生じた段階におよんで初めてクロロフィルとカロチノイドが減少した(表1)。

なお、健全葉と被害葉の80%アセトン抽出液の吸収スペクトルには吸収極大のシフトは見られず、各極大における吸光度の減少のみが観察され、クロロフィルの分解はブリーチングによるものと推定された。なお、クロロフィルaおよびカロチノイドの分解が大きいたことが認められた。

被害症状とクロロフィルとの関係をさらに詳細に調

べるために、葉片を直接自記分光光度計(島津MPS-5000)にかけ、被害症状部を通る透過光の吸光度を測定した。図3はその吸収スペクトルであり、ベチュニアの葉裏面をみの銀白化症状と両表面の漂白ネクロシス症状である。青色部(400-500nm)のピークはクロロフィルとカロチノイドの両者であり、赤色部(670-680nm)のピークはクロロフィルである。銀白化症状では健全葉に比べ吸収ピークがわずかに低下しているのみであるが、漂白ネクロシス症状では、吸収がまったくなくなっていた。なお、アサガオの葉裏面の光沢化症状も同様に調べたが、わずかに吸収が低下しているほかは、健全葉の吸収スペクトルとほとんど変らなかった。この葉片による吸収スペクトルにより、PAN被害の葉裏面をみの銀白化症状や光沢化症状では、クロロフィルおよびカロチノイドの分解が少ないという定量分析の結果が支持された。

このように、オゾンおよびPANによりクロロフィルとカロチノイドは分解されるが、この分解機構はまだ知られていない。最近、桐と近藤¹⁷⁾はオゾンによるクロロフィルおよびカロチノイドの分解機構を研究し、クロロフィルおよびカロチノイドの進行には光と酸素

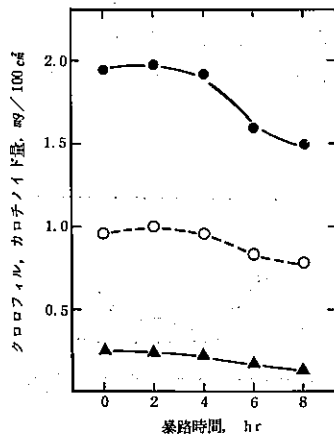


図2 ベチュニア葉のクロロフィル、カロチノイドへのPAN(0.050 ppm)の影響

表1 アサガオ葉成分へのPAN(0.15 ppm)の影響

暴露時間 hr	被害症状	クロロフィル mg/g·DW				全カロチノイド mg/g·DW	核酸 mg/g·DW		タンパク質 mg/g·DW	全窒素 mg/g·DW
		a	b	Total	a/b		RNA	DNA		
0	-	10.59	3.07	13.66	3.5	3.24	24.3	1.07	105.1	35.7
1.5	軽いブロンズ化	11.10	3.26	14.36	3.4	3.20	25.2	1.04	106.8	35.2
3	軽いブロンズ化	10.18	2.92	13.10	3.5	3.20	25.8	1.10	126.9	33.4
4.5	激しい光沢	10.51	3.09	13.59	3.4	3.47	24.8	1.95	140.3	46.7
6	表面に及ぶネクロシス	8.08	2.60	10.68	3.1	1.89	27.3	1.81	150.4	44.4

が必要であることを示し、活性酸素の関与を考え、そのスカベンジャーを与えてクロロフィルaと全カロチノイドの分解にはスーパーオキシドアニオン(O_2^-)が関与している可能性のあることを提案している。この O_2^- は照射時に葉緑体電子伝達系から生成するが、スーパーオキシドデスムターゼやL-アスコルビン酸などの内生のスカベンジャーによって無害な濃度まで消去されるが、オゾン暴露によりこれら内生の O_2^- 消去系が失活し、 O_2^- により色素が分解するものと納と近藤は推定している¹⁷⁾。一方、PANに関してはGrossとDugger¹⁹⁾がクラミドモナス培地溶液に約100 ppmのPANを通気し、クロロフィルaおよびカロチノイドが著しく分解されることの報告があるにすぎず、分解機構はまったくわかっていない。カロチノイドは活性酸素の一種の一重項酸素(1O_2)の非常に効果的なスカベンジャーであることが知られている²⁰⁾。そして、PANは水との反応で一重項酸素を発生することが報告²¹⁾されており、カロチノイドとPANの反応が推定される。

(2) 核酸およびタンパク質

葉が老化するとクロロフィル、PANおよびタンパク質含量は低下することはよく知られており²²⁾、オゾンは葉の老化を促進する作用がある²³⁾とも考えられ

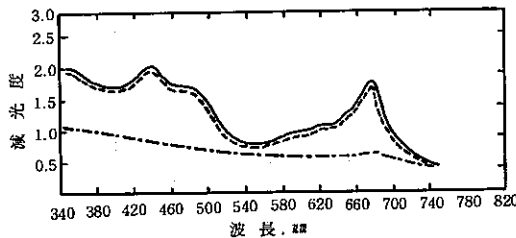


図3 ベチユニアのPAN被害葉の葉片吸収スペクトル

- (—) コントロール葉
- (---) 0.04 ppmのPAN 4時間暴露での裏面のみの白色化症状部
- (- - -) 0.04 ppmのPAN 4時間暴露での両面漂白ネクロシス症状部

ている。一方、PANにはどのような作用があるのかまったく知られていない。そこで、PANの作用を検討するためPAN暴露によるベチユニア葉の核酸およびタンパク質含量を、またオゾンとPANの作用が同じであるかどうかを調べるために、オゾンとPANに暴露されたアサガオ葉の核酸およびタンパク質含量を測定した。

(1)でクロロフィルとカロチノイドを抽出定量した0.050 ppmのPAN暴露のベチユニアと0.15 ppmのアサガオの核酸(RNA、DNA)およびタンパク質を定量し、合わせて水分含量を測定(105℃, 24時間)後の試料をケルダール法により全窒素量を求めた。なお、タンパク質の定量はケルダール法により求め、窒素量を6.25倍したものである。アサガオおよびベチユニアの結果を表1および表2に示した。ベチユニアではRNAおよびDNA量は被害が激しくなっても変化がみられなかったが、タンパク質および全窒素量はPAN暴露により増加する傾向がみられた。アサガオではPANは被害が激しくなってもほとんど変らなかったが、DNA、タンパク質および全窒素量はPAN被害が著しい4.5時間および6時間暴露で急激に増加した。

0.20 ppmのオゾンを1, 2, 3, 4時間暴露したアサガオでは被害がみられなかったが、6時間暴露では漂白斑点症状および8時間暴露では褐色ネクロシスを伴った漂白斑点症状を呈していた。最下位葉より2葉を除きその上位の葉4枚を暴露後2日後に採取し分析すると、クロロフィルおよびカロチノイドは8時間暴露で急激な減少を示したのと同様にRNAのみが減少し

表2 ベチユニア葉の核酸、タンパク質、全窒素へのPANの影響

暴露時間 hr	被害	核酸 mg/g·DW		タンパク質 mg/g·DW	全窒素 mg/g·DW
		RNA	DNA		
0	0	20.01	3.43	59.4	56.7
2	0	21.72	3.16	66.7	79.7
4	葉灰白色	18.85	3.03	62.1	70.8
6	葉表面漂白葉裏面灰白色	23.39	3.46	70.4	60.1
8	両表面漂白ネクロシス	23.56	3.61	112.2	53.6

表3 アサガオ葉成分へのオゾンの(0.20ppm)の影響

暴露時間	被害症状	クロロフィルmg/g・DW				全カロチノイド mg/g・DW	核酸 mg/g・DW		タンパク質 mg/g・DW	全窒素 mg/g・DW
		a	b	Total	a/b		RNA	DNA		
0	—	8.11	2.16	10.27	3.8	2.14	25.1	0.80	71.3	30.13
1	なし	8.10	2.06	10.16	3.9	1.84	25.6	0.91	66.4	—
2	なし	7.84	2.00	9.84	3.9	2.07	20.4	0.98	86.9	24.6
3	なし	7.54	2.02	9.04	3.7	2.18	27.4	1.09	85.3	—
4	なし	7.74	2.28	8.80	3.4	1.93	25.7	0.84	57.4	21.3
6	漂白斑	7.45	2.14	8.09	3.5	2.03	20.4	1.08	62.8	29.2
8	漂白斑	3.88	1.14	5.03	3.4	1.07	18.3	1.30	89.2	35.5

た。タンパク質および全窒素には暴露時間が増加しても減少したり増加したり不変のものがあり、明らかな傾向を示していなかった(表3)。

オゾン暴露によるタンパク質および核酸含量への影響に関してはすでにいくつか報告されている。TingとMukerji²⁴⁾は綿の子葉の感受性期(2日令)と抵抗性期(6日令)にオゾンを暴露(0.08ppm, 1時間)し、24時間後に可溶性タンパク質を測定すると、抵抗性期では5%しか減少しなかったが、感受性期では18%も減少していることおよびその減少は葉緑体にあることを報告している。また、CrakerとStarbuck²⁵⁾はインゲンマメ葉でオゾン暴露によりRNA分解酵素のRNase活性の増加を認めてRNAの減少を報告している。筆者²⁶⁾も以前にムクゲ葉片を水に浮かべて人為的に老化させた葉とオゾン暴露(0.30ppm, 9時間)葉のクロロフィル, RNA, DNAおよびタンパク質量を比較し、クロロフィル, RNAおよびタンパク質が老化葉およびオゾン暴露葉で共に減少することを示し、オゾンは葉の老化を急激に促進する物質であるとの推論をしていた。しかし、オゾンによる局所的な白斑や黄化症状は普通の老化とは異なるとの報告もなされている。Adepipeら²⁷⁾はタバコ葉のタンパク質とRNA量はオゾン暴露(0.30ppm, 2時間)後3日経過しても変化がないことを報告しており、Tingeyら²⁸⁾もオゾン暴露(0.50ppm, 2時間)したダイズ葉のタンパク質量および酵素活性を測定し、オゾンにより葉の老化が促進されるならば当然おこるであろうRNase, プロテアーゼ, ホスファターゼ, エステラーゼの活性レベルに刺激を認めず、Adepipeらと同様な結果

であったとしている。このように、RNAおよびタンパク質へのオゾンの影響は研究者により異なっているが、植物の種類、オゾンの暴露条件(濃度, 暴露時間)葉障害の程度、サンプリングの時期などで複雑に変化があることも考えられ、未だ明確な結論が得られないようである。

PANにより、激しい可視害を生じたペチュニアではタンパク質量が、またアサガオではDNA, タンパク質および全窒素量が著しく増加することおよびオゾンでのアサガオのタンパク質量と全窒素量が変動する現象の解釈は困難を極めている。高等植物では通導組織を通じて物質移動しており、葉から他の器官への転流が阻害された場合、窒素化合物が増加することはあり得るが、大きく見ても10~20%程度の範囲であろう。PAN暴露によるタンパク質と全窒素量の増加は最も多い時でそれぞれ1.5倍から1.3倍にも達しており、転流阻害やタンパク合成促進などの生理代謝的な要因とは考えにくい増加量である。また、細胞中の安定な物質であるDNA量が2倍近くにも増加する現象は不可解なものである。分析手順の中でPAN暴露での激しい被害葉のみ核酸抽出液がやや褐色に着色していた事実があり、分析上での要因により、見かけ上、核酸やタンパク質が増加した可能性もある。

(3) 可溶性タンパク質ゲル浮遊フラクション

オゾンおよびPANに暴露されたインゲンマメ葉を経時的に電子顕微鏡で観測したThomsonら^{29), 30)}は、最初に見られる形態異常が葉緑体のストロマにあり、ストロマ内に多数の顆粒の出現を見ている。葉緑体ストロマは水溶性成分であり、CO₂固定反応に関与する

酵素、脂肪酸代謝や脂質合成などに関与する酵素などが存在しており、可溶性タンパク質が多い。オゾンおよびPANによる葉緑体ストロマ内部の異常は、この可溶性タンパク質の変質が考えられる。また、葉緑体を取りまく細胞基質にも多量の可溶性タンパク質が含まれており、葉緑体ストロマおよび細胞基質を合わせた可溶性タンパク質へのオゾンとPANの影響を検討した。

アサガオのオゾン被害葉（ネクロシスを伴った漂白斑症状）、PAN被害葉（葉裏面の陥没光沢化）および老化葉（緑色をほとんど残していない黄色葉）の細胞磨砕液をゲル濾過した。なお、オゾンとPANの被害葉は共に0.20ppmのオゾンおよびPANに6時間暴露し、オゾンでは1日後に、PANでは3日後に採取した葉であり、結果を図4に示した。

オゾンの障害を受けやすい成熟葉とPANの障害を受けやすい展開中の若い葉でのフラクシオンパターンはまったく同じであり、30ml流出部分の鋭いピークと55~80ml流出部分のブロードなピークの2つのピークがあり、300mlまでのゲル濾過ではこの他にはピークはなかった。なお、セファデックスは分子篩効果を

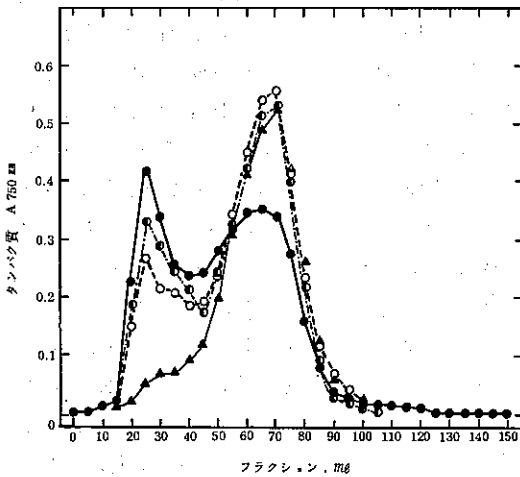


図4 アサガオ葉の可溶性タンパク質へのオゾン (0.30 ppm、6時間) の影響

- (●—●) コントロール葉
- (○—○) オゾン暴露漂白斑症状
- (●—●) オゾン暴露黒色ネクロシス
- (▲—▲) 健全な状態下での老化葉(黄化)

持ち、セファデックスゲル濾過は分子量の大きな物質ほど最初に溶出される。PAN被害葉はコントロールとまったく同じパターンを示しているが、オゾン被害葉は最初の30ml流出の鋭いピーク（葉緑体ストロマ中に局在するフラクシオンI—プロテインと呼ばれているCO₂固定酵素のRuBPカルボキシルラーゼである）が小さくなり、2番目のブロードなピークが増大しており、老化葉のパターンに近づくパターン変化となった。

オゾンは可溶性タンパク質、特にフラクシオンI—プロテインに大きな変化が見られたが、PANではフラクシオンI—プロテインへの影響がほとんど認められなかった。PANの影響がオゾンに比し少ない理由の一つとして、PANが海绵状組織細胞しか障害をおよぼさないことがあげられる。すなわち、葉肉細胞に含まれる葉緑体は柵状組織に8割、海绵状組織に2割程度の比で分布している³¹⁾ため、葉全体の磨砕液では障害を受けた葉緑体が全体として希釈されてしまうと考えられる。

(4) 過酸化脂質

脂質の不飽和脂肪酸は酸化されやすく、ヒドロパーオキシドとなってさらに自動的酸化をうけてマロンディアルデヒドまで分解していく。これに2個のTBAが反応して赤色に発色するのがTBA法の原理であり、TBA反応によるMDA含量の測定が、脂質の過酸化

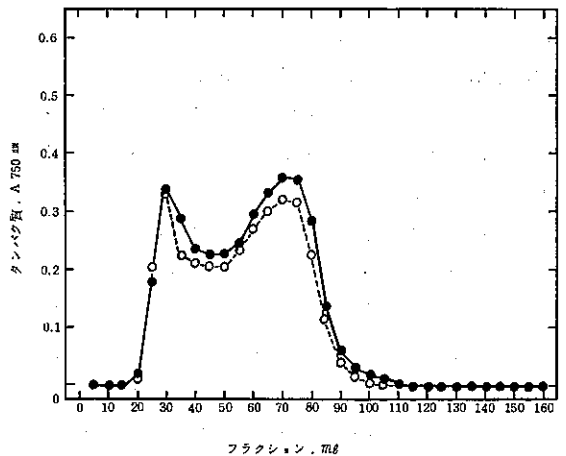


図5 アサガオ葉の可溶性タンパク質へのPAN (0.15ppm、4時間) の影響

- (●—●) コントロールの未展開葉
- (○—○) PAN暴露、裏面光沢化

表4 PAN暴露 (0.030ppm,4時間)によるペチュニア葉のMDA含量

葉位	暴露前	暴露直後	30分後	4時間後	24時間後
2~3	1.47	1.22 (水浸)	1.22 (脱水し葉薄くなる)	1.58 (脱水)	3.46 (脱水枯死100%)
4	1.40	1.54	1.02 (脱水し葉薄くなる)	1.42 (脱水)	3.84 (表面漂白・裏面100%光沢)
5	1.54	1.90 (水浸)	1.19 (脱水し葉薄くなる)	1.15 (脱水)	3.86 (表面漂白・裏面90%灰白色)
6	1.72	2.10	1.28 (脱水し葉薄くなる)	1.38 (脱水)	3.79 (表面漂白80%・裏面90%灰白色)
7	1.78	-	-	1.38 (漂白斑とネクロシ)	3.86 (表面漂白80%・裏面90%灰白色)
8 (最大葉面積)	1.85	-	-	2.17 (漂白斑とネクロシ)	4.27 (表面漂白40%・裏面50%灰白色)
9	1.67	-	-	-	4.02 (表面漂白30%・裏面0)
10	2.27	-	-	-	3.95 (表面漂白10%・裏面0)

-は測定なし。葉位は上から数えた。単位はnmole/リーフディスク(直径1cm)

表5 オゾン暴露(0.40ppm、4時間)によるペチュニア葉のMDA含量

葉位	暴露前	3時間後	24時間後
2~3	1.54	1.22(葉緑2%ネクロシ)	1.11(ネクロシ5%)
4	1.28	1.22(ネクロシ5%)	1.84(ネクロシ10%)
5	1.16	1.69(ネクロシ20%)	1.92(ネクロシ10%)
6	1.45	1.72(ネクロシ50%)	1.47(ネクロシ10%)
7	1.90	1.87(ネクロシ70%)	2.15(ネクロシ50%)
8	2.26	2.36(ネクロシ80%)	2.24(ネクロシ30%)
9	2.19	3.81(ネクロシ10%)	2.32(ネクロシ10%)
10	2.26	- (なし)	2.71(ネクロシ1%)
11	2.35	- (なし)	1.81(なし)
12	2.73	3.69(なし)	

-は測定なし。葉位は上から数えた。単位はnmole/リーフディスク(直径1cm)

の指標として広く一般におこなわれている。そこで、オゾンおよびPANによる脂質の過酸化をペチュニア葉のMDA含量の測定で検討した。

ペチュニアに、0.030ppmのPANを4時間暴露し、暴露直後の可視障害症状の見えない時、その30分後の可視障害症状発現の前兆症状の水浸状的しおれ状態の時、さらに4時間後の葉裏面の白色陥没斑や葉表面の漂白斑症状をみせた時にサンプリングをおこなった。結果を表4に示した。MDAは健全な葉でもある程度含まれており、その含量は葉令(葉位)により異なり、特に古い葉に多く含まれている。被害症状のない暴露直後および前兆症状の水浸症状や脱水的症状では、M

DA含量の増加はほとんど見られていない。しかし、24時間後での典型的なPAN被害症状を呈している葉では、すべての葉位でのMDA含量はほぼ2倍程度増加しており、PAN暴露により過酸化脂質が生成されることが明らかとなった。

0.40ppmのオゾンで4時間暴露したペチュニアは、暴露直後に水浸斑が見えており、その3時間後には上位葉がネクロシを呈し、葉がしおれ脱水的となり、24時間後には葉の両表面に漂白のネクロシ斑が生じたサンプルを分析した。結果を表5に示した。PANの場合とは異なり、24時間後の症状が安定した場合でも多くの増加はなかった。

このオゾンによるMDA 含量の増加がPAN に比較し少ないことは、オゾンの被害面積および被害程度ともPAN に比べて小さいことによる可能性がある。

オゾンおよびPAN 被害症状の前兆症状の水浸や脱水症状段階では、MDA 含量の増加はほとんどなく、オゾンとPAN の特徴的被害症状を呈した24時間後にMDA 含量が増加することは、見かけ上、不飽和脂肪酸が過酸化されて細胞死がおこる原因とみるよりは、完全に葉組織細胞死の結果、過酸化脂質が生成されたように見える。TomlinsonとRich⁽³²⁾もインゲンマメ葉へのオゾン暴露(0.25ppm, 3時間)で、可視障害が見えない時はMDA の増加はないが、可視障害出現後にMDA の著しい増加を認めており、また、葉を人為的に傷つけるとMDA 含量が増加することから、脂質過酸化は障害の原因であるよりもオゾン障害の結果を生じたものであると結論している。なお、膜脂質へのオゾンの影響を脂肪酸組成と含量をガスクロで測定したSwansonら⁽³³⁾やKoiwaiら⁽¹⁵⁾の結果では、オゾン暴露後の葉や葉緑体の脂肪酸組成と含量にはほとんど変化がみられなかった。彼等はオゾンの攻撃が膜の不飽和脂肪酸であるとしても、影響される脂質の不飽和脂肪酸の量的変化があまりにも少なく、脂肪酸と全脂肪酸の組成には変化がみられなかったと報告している。なお、Heath⁽³⁴⁾はTBA 反応と紫外線吸収法によるMDA 量の分析法を検討し、TBA 反応では酸と加熱により脂質過酸化が進行し、MDA 量が実際には2~4倍も高くなることを報告している。

オゾンの細胞への第一次作用点は、膜脂質の不飽和脂肪酸であると考えている研究者は非常に多い。FrederickとHeath⁽³⁵⁾はクロレラにオゾン暴露し、TBA 反応とガスクロによる脂質分析をおこない、オゾンの細胞への影響を検討している。オゾン通気後5分間

程度ラグタイムがあるが、その後指数的にクロレラ生存数が減少するとともに、MDA 生成量は増加し、MDA生成量と鏡像関係にあることを観察しており、また、わずかな量であるが不飽和脂肪酸が減少していることを認め、TBA 反応とガスクロによる脂質分析結果より計算し、細胞脂質のたった1%が酸化されただけで細胞死をひきおこすことが可能であると報告している。

(5) 無機イオンのリーチング

細胞内にはいろいろな無機物があり、タンパク質や炭水化物と結合していたり、水に溶けてイオンの形で存在している。無機イオンのKは原形質内の化学反応に対し触媒的に作用し、浸透圧の調節にあずかっており、他の無機イオンに比べると圧倒的に多い。また、Caは原形質のコロイド状態、ゲル化や凝固に関係があり、Mgは諸酵素の作用を促進する。オゾンの作用により膜の透過性が変化すると細胞内から外へ糖などの有機物⁽³⁶⁾や水⁽³⁷⁾および無機イオン⁽³⁸⁾の流出が増加することが報告されている。そこでPANによっても膜の透過性が変化するかどうかを検討するため葉片からの無機イオンの流出量を測定した。

インゲンマメではオゾンとPANの両ガスを、ベチ

表6 インゲンマメ初生葉のオゾン暴露による無機イオンリーチング

O ₃ 暴露時間	被害面積, %	全クロロフィル mg/g·DW	無機イオン, μg/cm ²			
			K	Na	Mg	Ca
0	0	15.37	1.00	0.32	0.37	1.71
1	0	15.17	2.36	0.57	0.07	0.56
2	5	12.36	2.41	1.30	0.14	0.52
4	20	13.94	9.43	0.81	0.03	0.29
8	55	12.89	8.97	1.45	0.15	0.63

表7 インゲンマメ初生葉の PAN (70ppb) 暴露による無機イオンリーチング、MDA および全窒素含量への影響

暴露時間	被害面積, %	MDA 量	全窒素 mg/g·DW	無機イオン, μg/cm ²			
		nmole/g·DW		K	Na	Mg	Ca
0	0	263	53.9	1.00	0.32	0.37	1.71
1	0	330	61.0	4.50	0.29	0.08	0.26
2	80, 裏面みの灰白色	460	52.0	37.5	0.49	3.51	3.75
4	100, 表面50%裏面100%	405	54.5	44.2	0.28	1.51	3.77
6	100, 表面100%裏面100%	411	46.3	81.7	0.41	0.28	6.58

表8 ベチュニア葉へのPAN (0.04 ppm) 暴露による 無機イオン, MDA, 全窒素への影響

暴露時間	クロロフィル	MDA	全 窒 素	無機イオン mg/g・DW			
	mg/g・DW	n mole/g・DW	mg/g・DW	K	Na	Mg	Ca
0	17.5	316	48.9	0.27	0.21	0.21	0.57
1	11.18	411	53.1	1.14	0.25	0.12	0.53
2	12.43	448	47.9	6.63	1.50	0.80	6.73
4	8.88	487	48.6	4.79	1.54	0.34	4.07

ニアではPANのみ実施した。インゲンマメの初生葉では0.30ppmのオゾンと1, 2, および4時間暴露と、0.07ppmのPANを1, 2, 4および6時間暴露をおこなった。オゾンおよびPANともに2時間暴露のものより可視被害が現われ、暴露時間の増加につれて被害が激しくなった。ベチュニアでは0.040ppmのPANを1, 2, および4時間暴露では、1時間暴露でも被害が現われた。暴露終了直後にカミソリで枝を切断し、インゲンマメでは切断葉柄が水に直接触れないように水に浸漬した。K, Na, Mg およびCaの無機イオンの蒸留水中へのリーチング量を表6, 表7, 表8に示した。なお、葉の被害面積、葉片中のクロロフィル, MDA, および全窒素量も合わせて測定し表に示した。オゾンおよびPANの暴露により被害が現われた葉から溶質する無機イオンのうち、特にKイオンの増加が顕著であった。その他のイオンでは一定の傾向がみられないがPAN暴露でのCa増加もベチュニアとインゲンマメで共通していた。なお、水に浸漬した葉の被害は、暴露後清浄空気育成室に置いてある株と比較し、著しく被害は抑制されていたことが観察された。細胞内の各種の膜の透過性が変化するとKイオンの流出が速やかに、かつ、顕著に増加することが知られているが、本実験においてもオゾンおよびPAN暴露によりKの流出が増加することから、膜の透過性が増加したことを間接的に実証した。

(6) 光合成および呼吸

ア 同化箱法によるオゾンおよびPAN暴露の光合成速度の測定

全葉数15~20枚をもつベチュニア個体に0.03ppmと0.15ppmのPANをそれぞれ2時間暴露し光合成

(CO₂固定)速度を同化箱法で測定した。0.030ppmでは可視被害は出現せず、0.15ppmでは暴露後2~3時間してやや白っぽくなった。水浸状症状が見え始め、翌日には漂白ネクロシスとなった。光合成速度は0.03ppmでは暴露中、暴露後を通して、ほとんど変化が認められなかった。0.15ppmの高濃度では、暴露中、暴露後2時間程度まではほとんど変化せず、その後可視被害の出現と相まって急激に光合成速度が減少し、約65%まで減少した(図6)。翌日、被害部分をハサミで切り取り葉面積計で測定した結果、被害面積は約30%であり、光合成減少率35%とほぼ一致していた。

インゲンマメ初生葉(発芽後4~5日目)の光合成へのオゾンおよびPANへの影響を検討した。オゾン0.16ppmでは可視障害が生じなく、光合成速度への影響は少なかった。オゾン0.28ppmでは漂白斑症状が約2.5%程度生じた。光合成速度は2時間後より徐々に低下をはじめたが、4時間の暴露でも約80%程度の阻害であった(図7)。なお、同時に測定した蒸散速度の結果より、CO₂ガス拡散抵抗が4時間暴露で1.5倍に増加していることから、気孔抵抗の増加(気孔の閉鎖)により光合成速度が減少するものと推測された。一方、PANではわずかな被害が見られた0.06ppm(被害面積1%)の暴露でも、葉裏面の全面に灰白色斑が生じた0.095ppm(両表面合わせた被害面積58%)の暴露でも、2~3時間の暴露期間中には光合成速度およびCO₂ガス拡散抵抗にはほとんど変化がなかった(図8)。暴露終了後0.060ppmではその後も変化がなかったが、0.095ppmではその後しばらくしてPAN被害の前兆症状である水浸状症状が見えるにおよんで、光合成速度が急激に低下をはじめ、暴露終了後2

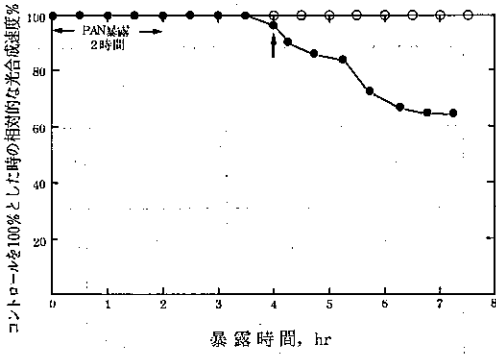


図6 ベチユニアの光合成速度に及ぼすPANの影響
(●—●) 0.15ppm、(○—○) 0.030ppm

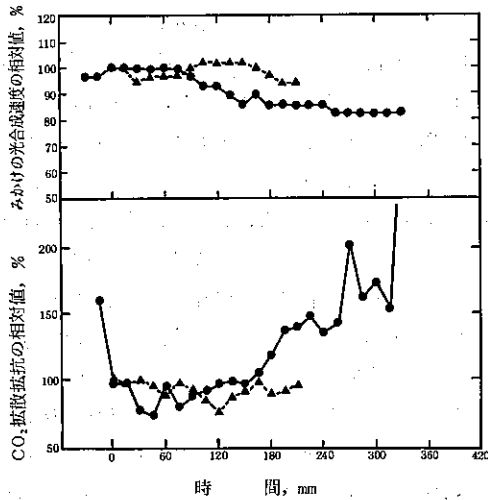


図7 インゲンマメのみかけの光合成速度および
ガス拡散抵抗に及ぼすオゾンの影響

(●—●) 0.28ppm
(▲—▲) 0.16ppm

時間後には光合成および蒸散速度はゼロとなってしまった。このように、光合成速度へのPANの影響はオゾンとはまったく異なっていることが知られた。

イ 同化箱法による光—光合成曲線

オゾンおよびPAN 暴露による光合成速度を測定し、インゲンマメ初生葉の光—光合成曲線を測定した。光照度の調整は光源と同化箱の間に白紙を挿入することによっておこなった。結果を図9に示した。わずかな可視被害を生じただけの0.16ppmのオゾンと0.06ppmのPAN 暴露では対照葉の光—光合成曲線とほとんど変らなかったが、かなりの被害を生じた0.28ppmの

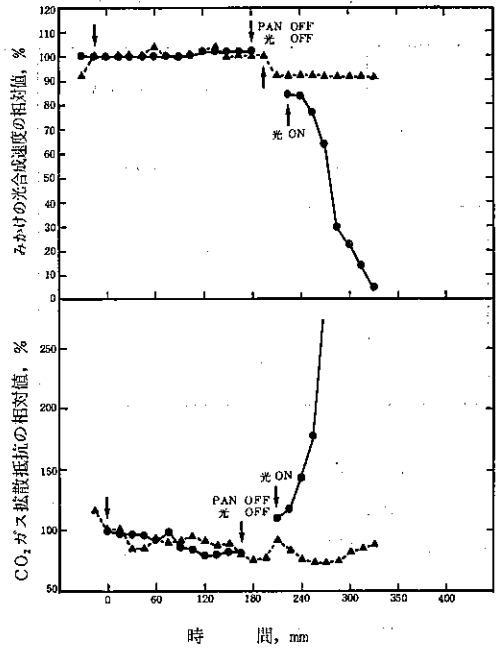


図8 インゲンマメのみかけの光合成速度および
ガス拡散抵抗に及ぼすPANの影響

(▲) 0.06ppm
(●) 0.095ppm

オゾンと0.095ppmのPANでは高照度下における光合成がより強く阻害される傾向にあった。

ウ 酸素電極法による光合成および呼吸速度の測定

オゾンおよびPAN ガスによる光合成および呼吸への影響を、オゾンとPANの暴露濃度および暴露時間を変えて検討した。

オゾンとPANの暴露時間を2時間として、オゾンおよびPAN濃度を段階的に変化させた場合の光合成速度をベチユニア成熟葉とインゲンマメ初生葉で測定した。光合成の測定を暴露終了後直後に測定したのが図10、図11である。ベチユニア、インゲンマメともにオゾン暴露により光合成阻害がみられており、インゲンマメでは可視被害の発生のない0.10ppmでも7%程度の阻害があった。ベチユニアでは低濃度での阻害はほとんどなく、0.40ppm以上の高濃度で光合成阻害が認められた。なお、オゾン暴露終了直後で可視阻害が見られたのは、インゲンマメの0.40ppmとベチユニアの0.50ppmのみであった。一方PAN暴露ではベチユニア、インゲンマメともに、暴露直後では光合成速度には大きな変化が見られなかった。PAN暴露後30、

000ルクスの人工光の人工気象室に置き、その後の葉被害の発現過程を観察すると、ペチュニアでは0.040ppmのPANで2時間後、インゲンマメでは0.092ppmで4時間後に可視害の発現が認められ、光合成速度の阻害が可視害の出現とともに認められた(図12, 図13)。なお、暗呼吸速度にはオゾンおよびPANで大きな変化は観察されなかった。

次に、暴露濃度を一定にし、暴露時間を増加させ経時的に光合成速度を測定した。光合成速度は暴露終了直後に測定した。0.20ppmのオゾンを暴露したインゲンマメ初生葉の光合成速度は、暴露時間の増加につれて減少し、可視被害症状としての水浸症状が見られた6時間暴露で40%の阻害を示した(図14)。一方、0.055ppmのPANを暴露したインゲンマメ初生葉では、水浸状の可視被害症状が見えはじめた4時間暴露時に、約50%程度もの光合成阻害が急激におこった(図15)。なお、クロロフィル量はオゾンおよびPAN暴露終了後ではほとんど変化していなかった。以上の結果は、同化箱法によって測定した結果とほぼ同じであった。これらの結果から、光合成におよぼすオゾンとPAN

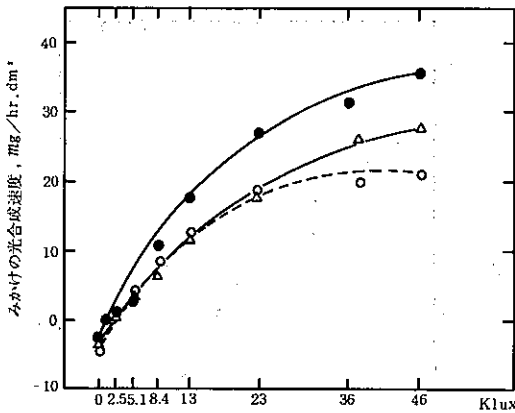


図9 オゾンおよびPAN暴露インゲンマメ初生葉(可視害発生)の光-光合成曲線

- (●-●) コントロール
- (○-○) PAN 0.095ppm
- (△-△) O₃ 0.20ppm

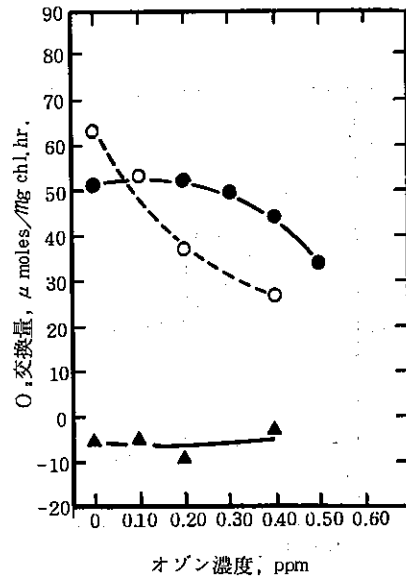


図10 ペチュニアの光合成およびインゲンマメの光合成、呼吸におよぼすオゾン濃度の影響

ペチュニアおよびインゲンマメ初生葉とともにオゾンを2時間暴露し、暴露直後に光合成を測定した。
 (●-●) ペチュニアの光合成
 (○-○) インゲンマメの光合成
 (△-△) インゲンマメの呼吸

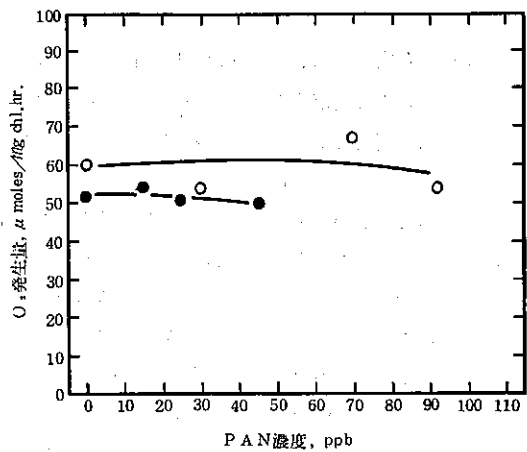


図11 インゲンマメおよびペチュニアの光合成におよぼすPAN濃度の影響

インゲンマメ初生葉およびペチュニアともにPANを2時間暴露し、暴露直後に光合成を測定した。
 (●-●) ペチュニア (○-○) インゲンマメ

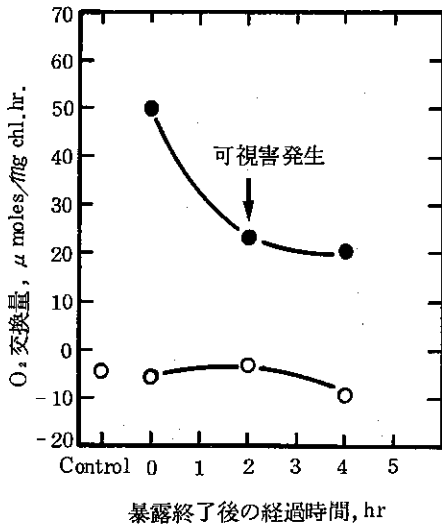


図12 ペチュニアの光合成および呼吸に及ぼす PAN の影響

0.040ppmのPANを2時間暴露し、暴露後30kluxの人工光下におき、暴露後の時間経過による可視害の発生と光合成および呼吸の変化を測定した。
 (●-●)光合成 (○-○)呼吸

の影響は非常に差異があることが明らかとなった。オゾンの光合成阻害は、ガス交換の出入口である気孔の閉鎖と光合成の明反応と暗反応の場である葉緑体の機能の損傷の両者であると考えられている。一方、PANは葉面上に可視的な傷害が見られないうちは光合成阻害をおこさないため、気孔の閉鎖や葉緑体への即座な直接的な攻撃ではないと思われる。すなわち、PANによる光合成低下は葉緑体を取りまく細胞の死による葉緑体の損傷によるものであろうと推察される。

光合成を測定する試料は、光合成測定に先立って30分程度暗黒にし、呼吸速度を測定した。呼吸速度は光合成速度の約10%程度であった。オゾンおよびPANともに、濃度や暴露時間の増加により、呼吸が増加するものや、逆に減少するもの、またほとんど変化のないものなど種々様々な結果となり、一定の傾向を示していなかった。また、可視害発現の有無によっても、呼吸の変化には一定の傾向がなかった。このようなことは、呼吸速度の測定法上に問題があるのか、あるいは

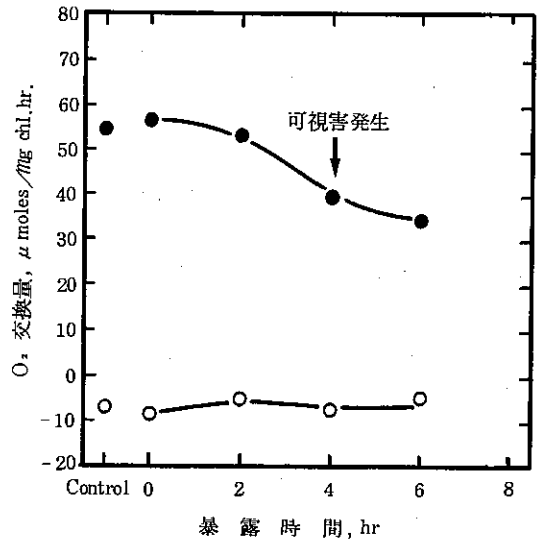


図13 インゲンマメ初生葉の光合成および呼吸に及ぼす PAN の影響

0.092 ppmのPANを2時間暴露し、暴露後30kluxの人工光下に置き、暴露後の時間経過により可視害の発生と光合成および呼吸の変化を測定した。
 (●-●)光合成 (○-○)呼吸

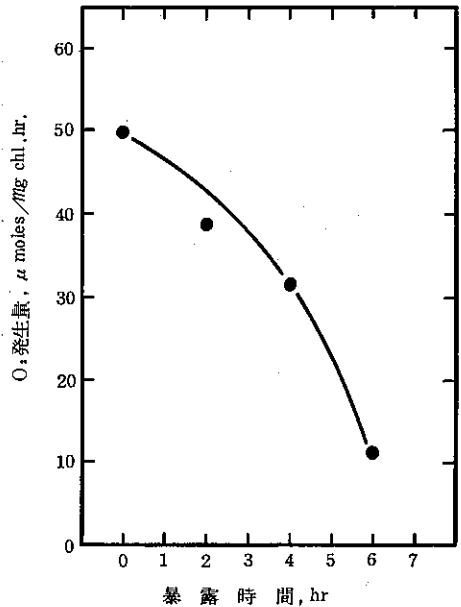


図14 インゲンマメの光合成に及ぼすオゾンの暴露時間増加による影響
 オゾン0.20ppm暴露終了直後に測定

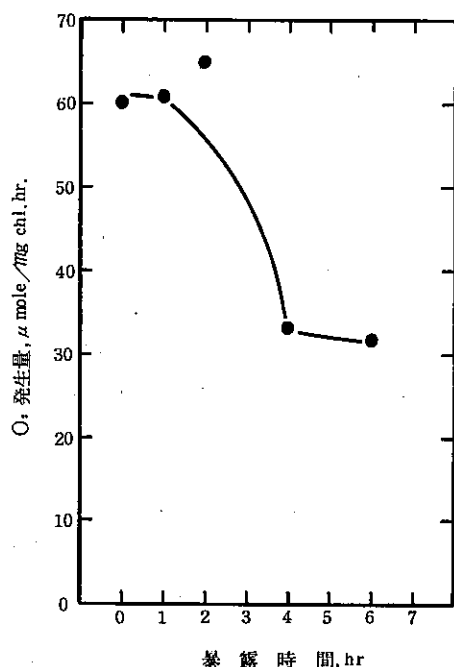


図15 インゲンマメの光合成におよぼすPANの暴露時間増加による影響
0.055ppmのPANを暴露し暴露終了直後に測定

はオゾンおよびPANの呼吸への影響がないためなのか明らかにはできなかった。

4 ま と め

オゾンに感受性の強いアサガオ、PANに感受性の強いベチュニアおよびオゾンとPANにともに感受性の強いインゲンマメを用いて、オゾンとPANの植物葉障害発現機構を解明するため、光合成および呼吸の植物の生理作用と光合成色素やタンパク質などの葉成分へのオゾンとPANの影響を検討し、次のような結果が得られた。

(1) ベチュニアおよびインゲンマメ個体を用いて、オゾンとPANの光合成への影響を同化箱法により測定した。オゾンでは可視障害を生じないような低濃度暴露の場合、光合成への影響は少ないが、可視障害が出現するような濃度では暴露後ややしてからみかけの光合成速度は徐々に阻害された。PANではかなり高濃度のPAN暴露でも暴露中はほとんど変化がみられないが、暴露終了後可視障害の前兆症状である水浸状症

状の出現と相まって光合成速度が著しく阻害された。

(2) ベチュニアおよびインゲンマメの葉片を用いて、オゾンとPANの光合成および呼吸への影響を暴露濃度と暴露時間を変えて酸素電極法により測定した。オゾンは暴露濃度および暴露時間の増加により光合成阻害が増大したが、PANは可視障害の発現のない場合、光合成の阻害は認められず、同化箱法での測定結果と同一の結果であった。呼吸への影響はオゾンおよびPANともに、濃度や暴露時間の増加により、呼吸が増加するものや逆に減少するもの、またほとんど変化のないものなど、種々な結果となり、一定の傾向が得られなかった。

(3) 光合成色素のクロロフィルとカロチノイドは、オゾンおよびPANにより著しい影響を受け、色のない物質に分解された。クロロフィルaの方がクロロフィルbよりもオゾンおよびPANにより分解されやすかった。なお、PANによる光合成色素の影響は、葉裏面の光沢化や白色化では少なく、葉表面におよぶネクロシスとなった時のみ大きくなった。

(4) アサガオのオゾン被害葉ではRNAに減少がみられたが、タンパク質と全窒素量は減少ばかりでなく増加するものもあり、一定の傾向がなかった。ベチュニアとアサガオのPAN被害葉ではタンパク質と全窒素量の増加が認められ、またアサガオ葉ではDNAの著しい増加があった。急激な葉組織破壊によるタンパク質や核酸の生理代謝的変化過程は知られていず、このタンパク質や核酸量の増減には、生理代謝的変動、組織中での物理的変化、分析誤差(PAN被害葉では核酸抽出液が着色化する)などが考えられるが、真の理由は不明のままであった。

(5) 脂質過酸化物の指標であるマロンディアルデヒド(MDA)は、PAN暴露により、暴露直後や2~4時間後に出現する水浸状時では増加はなかったが、24時間後の典型的なPAN被害症状時では約2倍の増加が認められて、PANにより膜脂質が酸化されていることが明らかとなった。

(6) オゾンおよびPANを暴露した直後に葉片を採取したインゲンマメとベチュニアを蒸留水に浸漬すると、無機イオンのうち特にカリウムが顕著に溶出された。この結果は、膜の透過性がオゾンおよびPANにより変化したことの間接的な証拠となった。

以上が本研究で得られた結果であるが、オゾンに関

する部分はずでに多数の報告があり、目新しい事実ではないが、PAN に関してその多くが新たな知見である。同じ酸化性物質であるオゾンと PAN は障害発現部位や被害症状が著しく異なっているが、その生理生化学的影響では類似の部分と異なる部分があった。それ故、PAN の障害発現機構はオゾンとまったく同じではなく、別の作用機構によっていることが示唆された。

本研究には農林水産省農業技術研究所からの受託研究の成果が一部含まれている。農業技術研究所の関係諸氏の有益な助言を得た。また、国立公害研究所の島崎研一郎氏には酸素電極に関する多くの助言、御教示をたまわった。さらに、当研究所の大橋 毅氏には原子吸光分析の協力を得た。ここに厚く謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) Hill, A. C., Pack, M. R., Treshow, M., Downs, R. J. and Trautman, L. G.
Plant injury induced by ozone. *phytopathology*, 51, 356-363 (1961).
- 2) Treshow, M. Ozon damage to plants.
Environ. pollut., 1, 155-156 (1970).
- 3) Taylor, O. C., and Maclean, D. C.
Nitrogen oxides and the peroxyacetyl nitrates. pp. E1-E14. In J. S. Jacobson and A. C. Hill, Eds. *Recognition of Air Pollution Injury to vegetation: A pictorial Atlas.* Air Pollution control Association, Pittsburgh. (1970).
- 4) 野内 勇, 飯島 勉, 大平俊男. 植物に及ぼすパーオキシアセチルナイトレート (PAN) の影響. I. PAN による草本植物の被害症状. *大気汚染研究*, 9, 635-644 (1975).
- 5) Heath, R. L., Chimiklis, P. and Frederick, P. Role of potassium and lipids in ozone injury to plant membranes. pp. 57-75. In W. M. Dugger, Ed. *Air Pollution Effects on plant Growth.* A. C. S. Symposium Series 3. Amer. Chem. Soc., Washington, D. C. (1974).
- 6) Mudd, J. B. Enzyme inactivation by peroxyacetyl nitrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 102, 59-65 (1963).
- 7) Dugger, W. M. Jr. and Ting, I. P.
The effect of peroxyacetyl nitrate on plants: Photo-reductive reactions and susceptibility of bean plants to PAN. *Phytopathology*, 58, 1102-1107 (1968).
- 8) Arnon, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-5 (1949).
- 9) Ogawa, T., and Shibata, K. A. Sensitive method for determining chlorophyll b in plant extracts. *Photochem. Photobiol.*, 4, 193-200 (1965).
- 10) Schmidt G. and Tharnhanser, S. J.
A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonuric acid, and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161, 83-89 (1945).
- 11) 上代淑人. 核酸の定量法. pp. 55-59. 山川民夫編. "生体構成成分 I". 中山書店, 東京 (1971).
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, U. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 13) Heath, R. L. and Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. K. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 189-198 (1968).
- 14) 島崎研一郎, 伊藤久仁子, 菅原 淳. ホウレン草の葉の酸素交換反応とクロロフィルけい光の誘導期現象に及ぼす二酸化硫黄 (SO₂) 暴露の影響. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和 51/53 年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告第 10 号: 101-110 (1979).
- 15) Koiwai, A. and Kasaki, T. Effect of ozone on photosystem II of tobacco chloroplasts in the presence of piperonyl butoxide. *Plant cell physiology*, 17, 1199-1207 (1976).
- 16) Knudson, L. K., Tibbitts, T. W. and Edwards, G. E. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration.

- Plant physiol., 60, 606 - 608 (1977).
- 17) 榑 剛, 近藤矩朗. オゾン暴露によるハウレンソウ葉の光合成色素の分解について. 複合汚染の植物影響に関する研究. 昭和54/56年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告. 第28号, 31 - 37(1981).
- 18) 野内 勇, 大平俊男, オゾンの植物色素への影響. 大気汚染研究, 8, 120 - 125 (1973).
- 19) Gross, R. E. and Dugger, W. M. Jr. Responses of *chlamydomonas reinhardtii* to peroxyacetyl nitrate. Environ. Res., 2, 256 - 266(1969).
- 20) Kearns, D. R. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. Chem. Rev., 71, 395 - 427 (1971).
- 21) Steer, R. P., Darnall, K. R. and Pitts, T. N., Jr. The base induced decomposition of peroxyacetyl nitrate. Tetrahedron Letters, 43, 3765 - 3767(1969).
- 22) Osborne, D. J. Effect of kinetin on protein & nucleic acid metabolism in *xanthium* leave during senescence. Plant Physiol., 37, 595 - 602 (1962).
- 23) Rich, S. Ozone damage to plants. Ann. Rev. Phytopath., 2, 253 - 266 (1964).
- 24) Ting, I. P. and Mukerji, S. K. Leaf ontogeny as a factor in susceptibility of ozone: Amino acid and carbohydrate changes during expansion. Amer. J. Bot., 58, 497 - 504 (1971).
- 25) Craker, L. E. and Starbuck, J. S. Metabolic changes associated with ozone injury of bean leaves. Can. J. Plant Sci., 52, 589 - 597 (1972).
- 26) 野内 勇. 樹木葉の核酸およびタンパク質におよぼすオゾンの影響. 造園雑誌, 37, (3), 1 - 6 (1974).
- 27) Adepape, N. O., Fletcher, R. A. and Ormrod, D. P. Ozone lesions in relation to senescence of attached and detached leaves of tobacco. Atmos. Environ., 7, 357 - 361 (1973).
- 28) Tingey, D. T., Fites, R. C. and Wickliff, C. Ozone alteration of nitrate reduction in soybean. Physiol Plant., 29, 33 - 38 (1973).
- 29) Thomson, W. W., Dugger, W. M., Jr. and Palmer, R. L. Effects of peroxyacetyl nitrate on ultrastructure of chloroplasts. Bot. Gaz., 126, 66-72(1965).
- 30) Thomson, W. W., Dugger, W. M. Jr., and palmer, R. L. Effects of ozone on the fine structure of the palisade parenchyma cells of bean leaves. Can. J. Bot., 44, 1677-1682(1966).
- 31) 星川清親. 光合成器官としての葉の構造. pp 15-23. 戸荻義次監修. 作物の光合成と物質生産. 義賢堂 (1973).
- 32) Tomlinson, H. and Rich, S. Lipid peroxydation, a result of injury in bean leaves exposed to ozone. Phytopathology, 60, 1531 - 1532 (1970).
- 33) Swanson, E. S., Thomson, W. W. and Mudd, J. B. The effects of ozone on leaf cell membranes. Can. J. Bot., 51, 1213 - 1219(1973).
- 34) Heath, The reactin stoichiometry between ozone and unsaturated fatty acids in aqueous environment. Chem. Phys. Lipids, 22, 25 - 37 (1978).
- 35) Frederick, P. E. and Heath, R. L. Ozone - induced fatty acid and viability changes in *Chlorella*. Plant Physiol., 55, 15 - 19(1975).
- 36) Ting, I. P., Perchorowicz, J. T. and Evans, L. S. Effect of ozone on plant cell permeability. pp 8 - 21. In W. M. Dugger, Ed. Air pollution Effects on Plant Growth. A. C. S. Symposium Series 3. American Chemical society. Washington, D. C. (1974).
- 37) Evans, L. S. and Ting, I. P. Ozone - induced membrane permeability changes. Amer. J. Bot., 60, 155 - 162(1973).
- 38) Heath, R. L. and Frederik, P. E. Ozone alteration of membrane permeability in *chlore*

-lla. 1. permeability of potassium ion as mea-
-sured by ⁸⁶rubidium tracer. plant Physiol.,

64, 455 - 459 (1979).