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

野 内 勇*

Effects of Ozone on Nucleic Acid and Protein in Woody Plant Leaves

by Isamu NOUCHI

はじめに

オゾンは光化学的に生成される二次汚染質の一つであり、植物の葉に赤褐色斑・漂白・クロロシス・ネクロシス等の特徴的な被害症状を生じさせ、特に樹木の黄紅葉化や落葉現象を促進する。落葉は植物が老化するにつれて段階的に起こる現象である。そしてこの老化は個々の器管であろうと植物体全体であろうと代謝速度の低下とリボ核酸(RNA)およびタンパク質の合成速度の低下とを伴うことが一般的に示されている。オゾン暴露による葉中のクロロフィル量、クロロフィル a/b 比の低下およびアントシアン色素の生成等より、オゾンが葉の老化を促進する作用をもつものであろうとの推察¹⁾を行っていたが、さらに老化過程にある葉とオゾン暴露された葉の核酸・タンパク質およびクロロフィルの量的比較を行なうことによって、オゾンは植物の葉に対し、老化を促進する物質であるということを明らかにしようと試みた。

1. 実験材料と方法

1-1. 供試植物

供試植物は非汚染地域と思われる東京都西多摩郡五日市町の東京都農業試験場五日市分場で生育した挿木2年生のポプラ、接木1年生のソメイヨシノ、挿木2年生のムクゲの苗木を1973年4月に21cm鉢に植定し、実験開始時まで当地で育成した。暴露実験開始1週間前より東京都公害研究所屋上にある活性炭浄化装置付の人工気象室内にこれらの鉢を置いた。オゾン暴露による影響を調べる分析試料には被害の最も受けやすい成熟葉のみを用いすべて同一樹木から採取した。また老化実験のための葉についてもほぼ同じ部位の成熟葉を用いた。

1-2. オゾン暴露実験

すでに報告してある実験方法²⁾のとおりオゾンガスを自然光下の人工気象室で暴露した。ポプラ、ソメイヨシ

ノではオゾン濃度を15pphm、ムクゲでは30pphmとし日中10～16時の6時間のみの暴露を行ない、ポプラ、ソメイヨシノでは2日間の計12時間、ムクゲでは9時間の暴露を行なった。温度は日中(6時～18時)を30°C、夜間(18時～6時)を20°Cとし、暴露期間中の湿度は最低75%、最高95%、平均80%、照度は最低1万ルクス、最大10万ルクス、平均6万ルクスであった。オゾン濃度は化学発光法で測定し、暴露中の濃度変化は±2pphmであった。

1-3. 老化葉

葉柄をつけて採取した葉を暗室内、室温(1973年10月22日～10月28日)にて水道水上に浮かべ老化を促し、毎日同時刻に分析を行なった。

1-4. 分析法

クロロフィルを80%アセトンで抽出し、この抽出物より、さらに核酸をSchmidt-Thannhanse法³⁾で抽出して紫外部吸収により核酸量を決定した。またタンパク質はLowryら⁴⁾のpheno-Ifolin法で定量した。

1-4-1. クロロフィル

主脈を取り除き、ハサミで細断した新鮮葉を80%アセトンで水冷しながらホモジネートした。冷却遠心分離機で2回の遠心分離を行ない定容とし、649nmおよび665nmの吸光度を測定し、クロロフィル量を決定した。

1-4-2. 核酸

クロロフィルを抽出した残渣を0.1% HClO_4 含有の70%エタノールに懸濁し遠心分離を行なった。次にエタノール:エーテル(3:1)に懸濁し3分間温やかに煮沸させ遠心分離を行なった。この操作を2回繰返し、エタノール・エーテル可溶性物質を除去した。次に、残渣を冷0.2N- HClO_4 に懸濁し、遠心分離の操作を2回行なって酸可溶性物質を除去した。得られた残渣に0.3N-KOHを加え37°Cで16～20時間インキュベートした。RNAの加水分解はこの条件で完了する。氷冷してから60% HClO_4 で中和し、さらに HClO_4 を追加して最終濃度を4%とした。これを遠心分離し、さらに4% HClO_4 で1回洗浄して最初の上清液と合わせてRNA分画とした。RNAを抽出した残渣を4% HClO_4 に懸濁し、90°C、15分間加熱して、冷却後遠心分離した。さらに1回4%

* 東京都公害研究所

HClO₄ で洗浄して最初の抽出液と合わせて DNA 分画とした。RNA および DNA は 260nm の吸光度を測定し、RNA および DNA 量は次式より決定した。

$$\varepsilon(p) = \frac{30.98E}{C \cdot l}$$

$\varepsilon(p)$: リン 1 原子当りの吸光係数

C : リンの濃度 (g/l)

l : 吸収層の厚さ

E : 核酸溶液の吸光度

ただし、核酸のリン含量は 9%, 0.5~1.0 N-HClO₄ 中での RNA および DNA の $E(p)$ はそれぞれ 11,000, 8,800 の値を用いた⁶⁾。

なお、全核酸の定量には、酸可溶性物質を除去した後 4% HClO₄ で 90°C 15 分の加熱分解を行なった⁷⁾。

1-4-3. タンパク質

タンパク質量は Lowry らの方法によった。上記 RNA, DNA を抽出した残渣に 1N-NaOH を加え、90°C 7.5 分間加熱して可溶し遠心分離を行なった。この操作を 3 回繰返して定容とし、folin-phenol 試薬を用いてタンパク質量を決定した。

2. 実験および結果

2-1. ポプラ葉の全核酸およびタンパク質へのオゾンの影響

1973 年 8 月にカリナポプラを用い、15pphm のオゾン濃度で 12 時間の暴露を行ない、暴露期間中 3 時間毎に葉を採取することによって、その葉中の全核酸とタンパク質量の経時変化を調べた。オゾン暴露開始後 9 時間頃より、ポプラ葉のオゾン被害症状である黒褐色の斑点がわずかに出現した。全核酸およびタンパク質量は、最初の 6 時間までは目立った変化を見せないが、可視被害の

Fig. 1 Changes in Nucleic Acid and Protein Content of *Populus nigra* during Ozone Exposure

出現に先立ちあるいは相まって著しく減少した。結果を Fig. 1 に示す。暴露直前の核酸およびタンパク質量 100 をとして示した。

2-2. ソメイヨシノ葉の RNA・DNA およびタンパク質へのオゾンの影響

ポプラを用いた全核酸の定量的場合には、減少を示した核酸が RNA か DNA のどちらの核酸であるか判明しない。そこで RNA と DNA との分離定量を行なった。実験はポプラと同様に行ない、可視被害も同様に 9 時間頃より赤褐色のアントシアン色素の小斑点が出現し、その斑点は時間とともに拡大していった。結果を Fig. 2 に示す。RNA およびタンパク質量はオゾン暴露 3 時間で一時的な増加を示し、6 時間でコントロールと同じ程度となり、9 時間以降急速に減少した。DNA は暴露期間中ほとんど変化しなかった。

Fig. 2 Changes in RNA, DNA and Protein Content of *Prunus yedoensis* during Ozone Exposure

2-3. ムクゲ葉の RNA・DNA・タンパク質およびクロロフィルへのオゾンの影響

ソメイヨシノを使ってオゾンによる RNA・DNA・タンパク質への影響の経時変化を調べたが、ムクゲを用いさらにクロロフィルの経時変化を加えて 10 月に分析を行なった。一般に生長期にある成熟葉が最もオゾンに対し感受性であり、老葉は被害を受けにくいということが知られているため、10 月の実験では、オゾン感受性は夏季より低下している事が予想される。そこで 30pphm という高濃度のオゾンを暴露した。暴露時間は被害出現の 9 時間で止め、さらに暴露後 3 時間 7 時間および 21 時間の経時変化を調べた。被害症状は漂白斑および、クロロシス斑であった。結果を Table 1 に示す。暴露期間中の RNA・DNA およびタンパク質は減少を示した。クロロフィルはクロロフィル a の分解量がクロロフィル b の分解よりも多く、クロロフィル a/b 比は低下を示した。

Table 1 Chlorophyll, Nucleic Acid, and Protein Content in Leaf Blades of *Hibiscus syriacus* Exposed to Ozone. (m/g of fresh weight)

Sample	Total Chlorophyll	Chlorophyll a/b	Protein	RNA	DNA	RNA/DNA
Before exposure	2.24	2.30	30.5	0.90	0.23	4.0
6 hour exposure	2.10	2.17	26.3	0.81	0.23	3.6
9 " "	1.76	1.84	17.5	0.64	0.22	2.6
3 hours after exposure			16.5	0.53	0.21	2.6
7 " "			15.3	0.46	0.21	2.2
21 " "			13.0	0.38	0.20	1.9

Table 2 Chlorophyll, Nucleic Acid, and Protein Content in Leaf Blades of *Hibiscus syriacus* Floated on Water. (m/g of fresh weight)

Water Float	Total Chlorophyll	Chlorophyll a/b	Protein	RNA	DNA	RNA/DNA
0 days	2.27	2.36	27.5	0.84	0.22	3.8
1 day	2.22	2.36	25.5	0.81	0.22	3.6
2 days	2.21	2.30	24.0	0.77	0.22	3.5
3 days	2.09	2.29	23.1	0.77	0.21	3.6
4 days	2.09	2.26	23.0	0.73	0.21	3.5
5 days	2.02	2.02	21.0	0.69	0.21	3.4
6 days	1.97	1.89	18.8	0.66	0.20	3.3

Fig. 3 Changes in Chlorophyll A and B of *Hibiscus Syriacus* during Ozone Exposure

暴露終了後もさらに RNA・DNA およびタンパク質量は減少を続けていった。クロロフィル a およびクロロフィル b の分解過程を Fig. 3 に示す。

2-4. ムクゲの老化葉における RNA・DNA・タンパク質およびクロロフィル量の変化

葉柄をつけたままムクゲの葉を採取し、暗室で水道水

に浮かべた。毎朝採り出し、0 日より 6 日まで分析を行った。結果を Table 2 に示す。RNA・タンパク質およびクロロフィル量は漸減し、RNA/DNA 比・クロロフィル a/b 比は低下した。

3. 考 察

核酸はあらゆる細胞中に存在し、タンパク質合成を支配し、遺伝情報を受け持ち生体情報のすべてに関与している。タンパク質は酵素を形成し、原形質の大部分を占めている。植物葉の核酸・タンパク質におよぼすオゾンの影響についてはすでに多くの報告がある。Lee⁸⁾ はタバコ葉のミトコンドリア中の核酸とタンパク質の減少を報告し、Chang⁹⁾ はビントビーン葉の葉緑体リボソームと細胞質リボソームの減少を示し、さらに、葉緑体リボソームの SH 基のレベルが細胞質リボソームのものよりずっと早く減少することを報告している。Craker¹⁰⁾ はアオウキクサを用いてオゾン暴露後における RNA とタンパク質の経時変化を調べ、24 時間後には RNA は 65%、タンパク質は 75% に減少することを報告している。当研究室でもボブラ・ソメイヨシノ・ムクゲ等の樹木を用いてオゾンによる核酸およびタンパク質への影響を調べ、暴露開始後 RNA・タンパク質量は一時的なわずかな増加が観察されることもあるが、暴露時間の増加につれて

急激な減少を示した。またDNAはオゾンによって変化を受けにくいという結果が得られた。RNA・タンパク質へのオゾンの影響に関する代謝機構は明らかでないがCraker¹⁰⁾はオゾンが、①直接に代謝を攻撃し、それを酸化する。②正常時では活性の低かった酵素系を活性化させる。RNase (RNA 分解酵素)、プロテアーゼ (タンパク質分解酵素) ③RNA とタンパク質の合成速度を遅延させるという3つの事が考えられるとした。Mudd¹¹⁾はオゾンがRNase アミノ酸残基を酸化し、とくにシステインは最も酸化されやすいことを報告し、Todd¹²⁾は酵素とオゾンの反応でオゾンが酵素の活性を阻害し、SH 基が酸化に最も感受性であることを報告した。Bagi & Farkas¹³⁾はオゾン被害を受けたタバコ葉では、2時間以内にRNase 活性が増加することを報告している。これらの報告などから、Craker¹⁰⁾はオゾンが直接に酵素系を酸化し、また分解酵素の活性化によってRNAとタンパク質の損失がありうると推論した。ソメイヨシノでのオゾン暴露開始3時間後のRNA・タンパク質量の一時的なわずかな増加は、物理的・化学的および生物的傷害によっておこる代謝変動の化学変化と同じように思われる。すなわち、傷害を受けるとそれまで活動していなかった細胞が盛んにRNAの合成を始め¹⁴⁾、その結果、ポリソームの含量が増加し、またアミノ酸のタンパク質への取り込みも増加する¹⁴⁾¹⁵⁾ためであろう。しかしその後の継続したオゾン暴露で、オゾンの強い酸化作用によってRNA・タンパク質の分解量が増加し、RNA・タンパク質量が減少すると思われる。ソメイヨシノへのオゾン暴露で葉上面にアントシアン色素の生成が観察されたが、このことからタンパク質の減少は理解されるだろう。すなわち、タンパク質合成とアントシアン色素の生成とはシキミ酸代謝を共通な経路としてタンパク質への経路とアントシアンへの経路とはフェニルヒルビン酸の段階が分岐点となっている。それ故、アントシアン生成はタンパク質合成の低下を意味している¹⁶⁾。DNAへのオゾンの影響は、DNAがグアニンとシトシン、チミンとアデニンの塩基間で水素結合をなし、安定な二重螺旋構造を持つためオゾンによる直接の影響は少ないのかもしれない。DNAの汚染質ガスの影響としては、Holn & Abeles¹⁷⁾は落葉や成長阻害をひきおこすエチレンをビーン葉に暴露して、7時間の暴露期間中に葉組織中のDNA合成やDNA量に変化を与えなかったことの報告がある。Crakerや筆者のデータではオゾンの核酸およびタンパク質への影響として生理的機構を追求することはできない。しかしながら、オゾンが植物の生長に不可欠な細胞組成物に変化を生ぜしめることは証明できた。さて、細胞ではタンパク質や合成されるとともにたえず分解している。このタンパク質の合成と分解の balan

スは若い細胞では合成に傾き、老化した細胞では分解が多く、生じたアミノ酸は若い組織に運ばれ合成に用いられる。葉の老化は加齢とともに、葉の組織細胞内のクロロフィル核酸・タンパク質などの分解による減少によって特徴づけられる。したがって、葉の緑が黄色に退色することはその外見の特徴の一つである。また老化葉では、老化の進行とともに全タンパク質の減少にもかかわらずRNase, DNase, ペプチターゼなどの活性が増加する。一般に老化葉は新鮮葉に比べて細胞の integrity が消失している。したがって老化がはじまると小胞体リボソーム・ミトコンドリアなどの細胞器管に構造的な異常もたらされる¹⁸⁾。そして葉の老化の現象は、成熟葉や水に浮かべた葉の切片などで顕著にみられる。葉柄をつけたままの緑葉を暗所で水の上に浮かべると、緑葉は貯蔵組織ではないので、栄養分の貯えが少なく時間とともに老化していく過程で様々な代謝成分の変化をおこすことが知られている。Newman¹⁹⁾は水の上に浮かべた大麦葉のクロロフィル量が減少し、黄色化していく過程で経時的にクロロフィル a/b 比が2.76から1.94に低下したことを報告した。もちろん、正常の自然な秋の黄紅葉化においてWolf²⁰⁾やToyama²¹⁾らも同様な結果を報告している。Osborne²²⁾はオナモミ葉を水の上に浮かべその老化過程における核酸・タンパク質およびクロロフィル量を調べ、RNA・タンパク質およびクロロフィルの大きな減少量を観察し、RNA/DNA 比の低下を報告した。またOota²³⁾は細胞老化の主要な姿はRNAとタンパク質から構成されているリボソームの分解であると報告している。そこで、ムクゲ葉を水に浮かべて老化を促進し、老化過程にある葉とオゾンに暴露された葉の核酸・タンパク質およびクロロフィルの量的比較を行なった。その結果、RNA・タンパク質・クロロフィル量は大きく減少し、一方DNAは減少がわずかであるという両者とも類似の挙動を示した。しかし、老化葉におけるこれらの量は漸減するのに対し、オゾンに暴露された植物葉のオゾン被害出現時の減少は著しいものであった。このことは、正常な葉では、成熟葉から老葉への移行には長期間を必要とするはずであるが、オゾンはそれをごく短時間の間に急激に行なわしむる作用を結果としてもっているといえるだろう。このように可視被害としての黄紅葉や落葉現象ばかりでなく、核酸・タンパク質およびクロロフィルなどの細胞内成分の変化もまた細胞老化の過程と一致していることが実験より明らかになった。以上の結果より、オゾンは強い酸化作用で細胞内組成物に傷害を与えその傷害の最後の結果として葉の老化を、あるいは、さらには落葉にまでいたらしむる作用を持つ物質であることを示している。

なお、実験に用いたオゾン濃度15pphmは、大都市お

よびその周辺地域の春から初秋にかけての環境大気中ではしばしば出現しており、光化学的に生成されたオゾンは都市の樹木の早期黄紅葉化や落葉を早めていると思われる。そして、さらに樹木の衰退を早め、残されている数少ない都市の緑に重大な影響を及ぼしていることは明らかであろう。

ま と め

ポプラ、ソメイヨシノ、ムグゲの樹木を用いて、オゾン暴露実験を行ない、樹木葉中の核酸とタンパク質へのオゾンの影響を調べた。

- 1) オゾンに暴露された樹木葉の核酸(RNA)およびタンパク質は分解され、その含量の減少は著しかった。
- 2) オゾン暴露開始後、RNAおよびタンパク質の一時的な増加もみられるが、暴露時間の増加につれて、その含量は減少した。特に、可視被害の出現時にはRNA、タンパク質およびクロロフィル量の減少は急激であった。
- 3) オゾンに暴露された葉と老化葉との核酸・タンパク質およびクロロフィルの量的比較を行なった。老化葉では、これらの含量は漸減するのに対し、暴露された葉では急激に減少した。

以上の結果などより、オゾンは葉の老化を急激に行なわしむる作用をもつ物質であるとの推察を行なった。

最後に、本稿に対し適切な批評と朱筆を加えられた帝京大学医学部植物学講師の遠山益博士、および、御援助いただいた東京都公害研究所大気部の大平俊男部長、沢田正主任研究員、ならびに著者とともに研究にあたった大橋毅氏、また苗の育成および管理をしていただいた東京都農業試験場五日市場分の引間真佐輝主任研究員、岩波基樹、浅香俊男の諸氏に心から感謝の意を表します。

要 約

オゾンは植物葉に特徴的な被害症状、特に樹木では黄紅葉化や落葉を生じさせる。この報告は、生細胞中で生理的に重要な成分である核酸およびタンパク質に及ぼすオゾンの影響について調べたものである。オゾン暴露期間の増加につれて、核酸およびタンパク質は初め徐々に分解し、被害症状出現時には急激なRNA・タンパク質の低下が現われた。そしてオゾンに暴露された葉と老化葉について核酸・タンパク質・クロロフィルの量的比較を行なったところ、RNA・タンパク質およびクロロフィル量が低下するという両者類似の挙動が観察された。オゾンは植物の正常な代謝を阻害して種々様々な傷害作用を及ぼすが、結果的には、一般的に認められている老

化葉中での変化と同じであった。このことより、光化学反応によって生じる酸化物質の一つであるオゾンは葉の老化を急激に促進する作用をもつものと推定した。

Summary

Ozone causes peculiar injury symptoms to plant leaves, especially for the leaves of woody plants it causes them to change into yellow or red in color at relatively early date and to fall before their normal maturity. In this report the effect of ozone on nucleic acid and protein, physiologically important components in living cell, was discussed. With the period of ozone exposure increasing nucleic acid and protein began to decompose, and at the time when visible symptom appeared, the rapid loss of nucleic acid and protein was observed. The quantitative comparison between the nucleic acid, protein, and chlorophyll in senescent leaves and ones damaged by ozone indicated that both resultants were of a similar pattern, that is, a decrease in the contents of nucleic acid, protein, and chlorophyll.

Ozone may affect normal metabolisms and cause a variety of injuries, but as a final result the decomposition was the same as changes generally observed in senescent leaves. In conclusion the author deduced that ozone, a highly active oxidizing compound produced photochemically, causes very rapid the senescence of the leaves of woody plants.

参 考 文 献

- 1) 野内 勇, 大平俊男 (1973): オゾンの植物色素への影響, 大気汚染研究 8, 120—125.
- 2) 野内勇, 大平俊男, 沢田正, 小口邦子, 古明地哲人 (1973): オゾンによる植物被害症状, 大気汚染研究 8, 113—119.
- 3) Schmidt, G. and Thannhanser, S.J. (1945): A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem., 161, 83—89.
- 4) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265—75.
- 5) Strain, H.H. and Svec, W.A. In, "The chlorophylls" Vernon, L.P. and Seely, G.R. ed. (1966): pp. 21—65, Academic press, New York and London.

- 6) 日本生物物理学会編集 (1963) : “核酸蛋白質研究法 I”, pp. 97—102, 吉田書店
- 7) Schneider, W.C. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. (1945) : J. Biol. Chem., **161**, 293—303.
- 8) Lee, T.T. (1968) : Effect of ozone on swelling of tobacco mitochondria. Plant Physiol., **43**, 133—138.
- 9) Chang, C.W. (1971) : Effect of ozone on sulfhydryl groups of ribosomes in pint bean leaves. Relationship with ribosome dissociation. Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 1429—35.
- 10) Craker, L.E. (1972) : Influence of ozone on RNA and protein content of LEMNA MINOR L. Environmental Pollution. **3**, 319—323.
- 11) Mudd, J.B., Leavitt, R. and McManus, T.T. (1969) : Reaction of ozone with amino acids and proteins. Atmospheric Environ., **3**, 669—681.
- 12) Todd, G.w. (1958) : Effect of low concentrations of ozone on the enzymes catalase, peroxidase, papain and urease. Physiol. Plant., **11**, 457—463.
- 13) Bagi, G. and Farkas, G.L. (1967) : On the nature of increase in ribonuclease activity in mechanically damaged tobacco leaf discs. Phytochemistry, **6**, 161—169.
- 14) Leaver, C.J. and Key, J.L. (1967) : Polyribosome formation and RNA synthesis during aging of carrot root tissue. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **57**, 1338—1344.
- 15) Ellis, R.J. and MacDonald, I.R. (1967) : Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet discs. Plant Physiol., **42**, 1297—1302.
- 16) 安田 斎 (1973) : “花色の生理, 生化学”, pp. 110—112 (1) 内田老鶴園新社
- 17) Holn, R.E. and Abeles, F.B. (1967) : Abscission: The role of RNA synthesis. Plant Physiol., **42**, 1094—1102.
- 18) 増田芳雄, 勝見允行, 今関英雅 (1971) : “植物ホルモン” pp. 193—250 (第3版) 朝倉書店
- 19) Newman, D.W., Rowell, B.W. and Byrd, K. (1973) : Lipid transformations in greening and senescing leaf tissue. Plant Physiol., **51**, 229—233.
- 20) Wolf, F.T. (1956) : Changes in chlorophylls a and b in autumn leaves. Amer. J. Bot., **43**, 714—718.
- 21) Toyama, S. and Ueda, R. (1965) : Electron microscope studies on the Morphogenesis of plastids. II. Changes in fine structure and pigment composition of the plastids in autumn leaves of Ginkgo biloba I. Science Reports of Tokyo Kyoiku Daigaku Section B. **12**, 31—38.
- 22) Osborne, D.J. (1962) : Effect of kinetin on protein & nucleic acid metabolism in Xanthium leaves during senescence. Plant Physiol., **37**, 595—602.
- 23) Oota, Y. (1964) : RNA in developing plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol., **15**, 17—36.