

汚染大気が植物細胞に及ぼす影響の基礎的研究

Fundamental studies of air pollution effects on plant cell

代表研究者 東京都立大学理学部助教授 和田正三
Assoc. Prof., Fac. of Sci., Tokyo Metropolitan Univ. Masamitsu WADA

協同研究者 東京都立大学理学部助教授 南川隆雄
Assoc. Prof., Fac. of Sci., Tokyo Metropolitan Univ. Takao MINAMIKAWA

環境庁国立公害研究所室長 近藤矩朗
Head, Environ. Biol. Div., The National Inst. for Environmental Studies
Noriaki KONDO

東京都立大学理学部助手 門田明雄
Instructor, Fac. of Sci., Tokyo Metropolitan Univ. Akeo KADOTA

1. SO_2 uptake into culture medium was measured by means of ion chromatography. Culture media exposed to 0.5 ppm SO_2 accumulated SO_3^{--} (and/or HSO_3^-) and SO_4^{--} . The total accumulation and the rate of accumulation of SO_2 in culture media depended upon the buffering action of each medium.

2. The rate of dissolution of SO_2 gas into culture medium (1 mM K-phosphate buffer) and the rate of destruction of SO_3^{--} in the medium were determined by ion chromatography. The former was affected by the blowing speed of SO_2 gas fumigation rather than the concentration of SO_2 . The latter was exponential, when Na_2SO_3 was dissolved in the medium as the source of SO_3^{--} . After 2.5 hr, SO_3^{--} remained only 1/10 of original concentration. But when fern spores were suspended in the solution at the concentration of 1 mg/ml, the destruction of SO_3^{--} was restrained for several hrs. All experiments were carried out at 25°C.

3. The fumigation of 0.1 ppm SO_2 decreased the germination rate of fern spores of *Adiantum capillus-veneris* slightly, but influenced greatly the gametophyte development for abnormality. It became clear that the fern gametophyte is very sensitive to SO_2 compared with other plants used for air pollution experiments so far.

4. Spores which were preincubated at 25° for 3 days in the dark, were suspended in 1 mM K-phosphate buffer, pH 6.0, and incubated for 4 days under continuous red light in the presence or absence of 3 mM SO_3^{--} . At day 0, 2 and 4 of the incubation, contents of cell constituents were determined. Total lipid content decreased continuously over 4 days of incubation in the absence of SO_3^{--} or in the presence of 3 mM SO_4^{--} . In contrast, when SO_3^{--} was added to the medium, the decrease stopped after day 2. The content of insoluble glucan increased markedly between day 2 and 4 in the medium without SO_3^{--} , but with SO_3^{--} , it decreased continuously over the 4 day experimental period. The protein content decreased promptly by day 2, but the decrease was delayed when SO_3^{--} was added to the medium. The content of amino acids also decreased by day 2, but it increased thereafter in the absence of SO_3^{--} or in the presence of SO_4^{--} . In the presence of SO_3^{--} , however, the content continued to decrease until day 4. The results clearly indicate that 3 mM SO_3^{--} in the incubation medium depresses the mobilization of lipid and protein, the synthesis of insoluble glucan and the increase of amino acid pool sizes in the fern spores.

5. Spore germination, cell division and cell elongation were inhibited by SO_3^{--} at the concentration higher than 1 mM. The cell bulging at the protonemal apex under red light was most prominent phenomenon induced by SO_3^{--} .

6. SO_3^{--} -induced apical bulging of *Adiantum* protonema was recorded using a time lapse

video recorder with infra-red light and was subsequently analyzed. The rate of apical growth of protonemata under red light was retarded just after the application of SO_3^{--} . The growing zone of the protonemal tip was not restricted to the tip of the protonema, as in normal growth, but was spread over the subapical region. The apical bulging lasted for more than 24 hr. Some of the protonemata burst and some of them resumed apical growth again. In the control, where SO_4^{--} was applied to protonemata, apical growth was hardly influenced, although a little apical bulging occurred.

7. Ultrastructure of the protonemata treated with SO_3^{--} or SO_4^{--} was observed with an electron microscope. Cell wall thickening was the most distinct phenomenon in SO_3^{--} treated cells. The effect of SO_3^{--} on chloroplast ultrastructure was not clear in this material, although it has been reported in higher plants. So far other organelles have not been observed to be influenced specifically by SO_3^{--} .

研究の目的

大気汚染の増大は生物に多大な影響をもたらし、人体をはじめ、動物に対する害毒は言うに及ばず、植物に対しても草木の枯死や生長阻害の被害を与えていた。今や、我が国においては汚染の広域化、複合化が進み、ヨーロッパや北米大陸における酸性雨の被害も深刻なものになっている。しかしながら、この植物に対する汚染大気の真の影響が何であるのか、それは個体を構成する個々の細胞のレベルで何を引き起こしているのか、生長阻害は個々の細胞の伸長量の減少であるのか、それとも細胞分裂が阻害され細胞の増殖が阻止されているのか、といった基本的な問題は全く未解決のままである。汚染大気が個々の細胞のレベルでいかなる生理学的、細胞構造学的、代謝生理学的影響を与えていたのかを、基礎科学の立場から、シダ植物の単細胞性原糸体細胞を使用し、統一的に解明していくことを本研究の目的とした。我々は過去十余年間にわたり、シダ植物の单相世代である原糸体細胞を実験材料として細胞分裂、細胞伸長の研究を続けてきたが、この実験系は単細胞または一次元的な数細胞であるため、三次元的な配置を持つ多細胞系では解析不可能な現象を観察・追求できる利点があり、既に高等植物の生理現象のモデル系として、多くの知見が得られている (Miller 1968, Furuya 1983)。またその発達過程が照射する光の波長や、方向、強度などによって制御できるため、発芽・細胞の伸長・細胞の分裂などの素過程に分けられ、これらの現象に

対して独自に大気汚染の影響を見ることができる。本研究ではこの実験系の持つ利点を利用し、大気汚染源の細胞および細胞下レベルにおける影響を調べた。

研究の経過および成果

I. 培養液中の SO_3^{--}

(1) SO_2 ガスの培地中への溶解と pH 変化

汚染大気は、一般に葉の気孔からガスとして植物体に入り、そこで水と反応した SO_2 は H^+ , HSO_3^- , SO_3^{--} を生じ、植物細胞に入ったこれらのイオンが植物体に各種の害を与えると考えられている。気孔という特殊器官のない1~数細胞からなるシダ配偶体の場合も、結局は培養液に汚染大気が溶け込み、生じたイオンが細胞に害毒を与えることになるが、気孔は汚染源の濃度に依存して開閉する (Majernik & Mansfield 1970, Kondo & Sugahara 1978) ため、植物体に取り込まれる SO_2 量の推定は、非常に複雑である。それに対し培地中の溶存量のみに依存するシダ配偶体の実験系では、投与量が確実のために、多細胞植物の単純化されたモデルとなる。そこでまず、 SO_2 ガスの各種培養液中への溶解について、安部 弘、近藤らが国立公害研究所で実験を行なった。その結果、0.5 ppm SO_2 を風速 $20 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ で通気し、一定液量、一定表面積の培養液中に吸収される SO_2 量は、培養液の組成、特に培養液の緩衝能力に依存することがわかった(図 1)。緩衝能力の増大に伴って SO_2 の溶解は増すがその割に pH 変動は少なく、5 mM の K-リン酸緩衝(以下 KPB と略

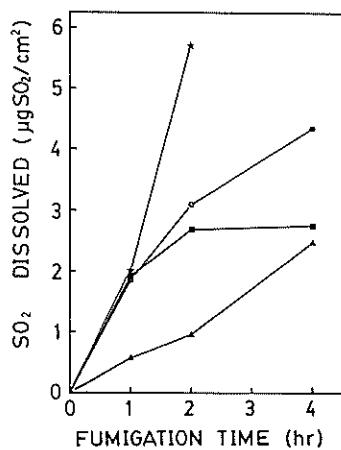


図 1 0.5 ppm SO_2 ガス暴露 (風速 $20 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$) による溶存 SO_2 量の緩衝液依存性。
 —★—: 20 mM KPB 液 (pH 6),
 —▲—: 5 mM KPB 液 (pH 6),
 —○—: McIlvaine 緩衝液 (pH 4),
 —■—: 蒸留水

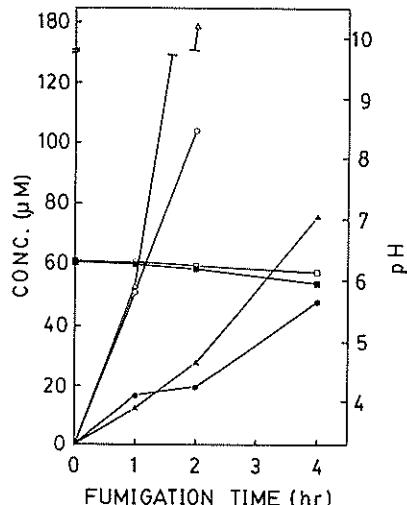


図 2 0.5 ppm SO_2 ガス暴露 (風速 $20 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$) に伴う SO_3^{--} , SO_4^{--} 量の増加と pH 変化。
 20 mM KPB 液中の SO_3^{--} (—○—) および SO_4^{--} (—△—) 量, 5 mM KPB 液中の SO_3^{--} (—●—) および SO_4^{--} (—▲—) 量,
 20 mM (—□—), 5 mM (—■—) KPB 液中の pH 変動。

(記) 液中では、暴露前 pH 6.28 が 4 時間の暴露により pH 5.95 程度に低下した。一方、純水の

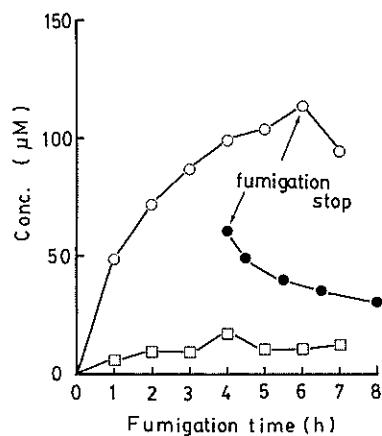


図 3 0.1 ppm SO_2 ガス暴露 (風速 $80 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$) と暴露停止による KPB 中の SO_3^{--} 溶存量の変化。—○—, —●—: SO_3^{--} , —□—: SO_4^{--} .

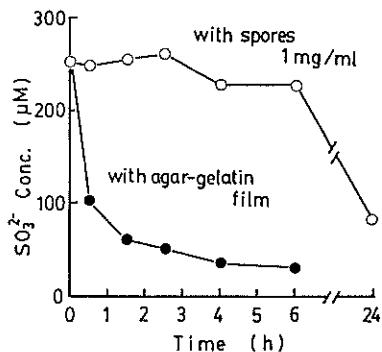


図 4 Na_2SO_3 の KPB 溶液中における SO_3^{--} 量の経時変化。

場合には SO_2 暴露後 2 時間で既に溶解量は飽和し、pH も 3.5 前後で定常化した。また、溶解した SO_2 をイオンクロマトグラフで測定した結果、半分弱が SO_3^{--} または HSO_3^- で存在し、残り半分以上は SO_4^{--} に酸化されていることが明らかとなった (図 2)。

次に今後の研究に最適と考えられる KPB 液中の SO_2 ガスの溶解と、その後の動態を調べた。国立公害研のガス暴露装置を使用し、0.1 ppm SO_2 を風速約 $80 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ で培養液上に暴露し、溶存する SO_3^{--} を測定した結果、図 3 のような時間経過で溶解し、4 時間後には約 $100 \mu\text{M}$ まで

溶解した（—○—）。 SO_2 ガス暴露を中止すると SO_3^{2-} 量は急激に減少した。一方、同じ濃度の SO_2 ガスを $1 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ で暴露した場合は、連續暴露 2 日目でも SO_3^{2-} の溶存量は $10 \mu\text{M}$ 以下であった。また、同一条件下でも図 3 の（—○—）（—●—）のように溶解量に差が生じるなど、 SO_2 ガスの暴露実験では暴露する SO_2 濃度自体より、暴露方法、特に培養液表面と SO_2 ガスの界面の状態が重要であることが推察された。

(2) 亜硫酸塩溶解による培地中の SO_3^{2-} の変動と pH 変化

以上のように SO_2 ガスの培養液への溶解は非常に複雑であり、溶存量は常に変動してしまうため、一定量の汚染源を再現性よく植物に投与することは困難である。そこで化学物質として与えた時の溶存 SO_3^{2-} の変動を Na_2SO_3 溶液中の SO_3^{2-} の変化量として調べた（図 4）結果、 1 mM の KPB 液に Na_2SO_3 を $500 \mu\text{M}$ の濃度として溶解した場合、 SO_3^{2-} 量は溶解直後に半減し、その分だけ SO_4^{2-} が増加した。この溶液をシダ胞子培養の一方法であるゼラチン・寒天膜存在下でインキュベートすると、2 時間半後には溶解初期の $1/5$ に減少した。溶液を放置した場合もほぼ同様の減少が見られた。一方、シダ胞子を $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の割合で混入させると SO_3^{2-} の減少は極端におさえられ、6 時間のインキュベート後でも 10% 以下の減少にとどまり、24 時間後にも 0 時間の 30% が残存した。

以上のことから、培地中の SO_3^{2-} の動静は、いずれの場合にも暴露の条件、生物材料などに大きく左右されるので、実験条件の設定をより厳密に行なう必要があることがわかった。

SO_2 の影響は、溶解した SO_2 から生じる SO_3^{2-} 、 HSO_3^- 、 H^+ によると考えられる。そのため従来生化学的な研究には扱いのむずかしいガスの暴露はせず、 K_2SO_3 または Na_2SO_3 を溶解して得られる SO_3^{2-} の溶液を使用してきた。しかし亜硫酸塩の溶解では pH の大きな変動が考えられるため pH の KPB 液濃度依存性を調べた（表 1）。その結果亜硫酸塩の濃度が高いほど、また KPB 液の濃度が低いほど、pH は上昇すること、また溶

表 1 硫酸塩・亜硫酸塩溶液 pH の KPB 液濃度依存性とその経時変化。

濃度 (M)	溶液作製 後の日数	KPB 液の濃度			
		1 mM	10 mM	100 mM	1 M
K_2SO_3	0	7.77	6.79	6.17	6.12
	10^{-2} 2 or 3*	6.43*	6.28	6.12	6.09
	5	6.34	6.27	6.17	6.12
	0	6.69	6.02	6.01	6.08
	10^{-3} 2 or 3*	6.19*	6.08	6.04	6.08
	5	6.16	6.03	6.18	6.09
	0	7.69	6.88	6.23	6.10
	10^{-2} 2 or 3*	6.34*	6.39	6.11	6.08
	5	6.28	6.24	6.15	6.11
Na_2SO_3	0	6.52	6.12	6.09	6.07
	10^{-3} 2 or 3*	6.18*	6.17	6.12	6.09
	5	6.13	6.19	6.17	6.12
	0	6.21	5.96	5.97	6.01
	10^{-2} 2 or 3*	6.31*	6.13	6.07	6.02
	5	6.32	6.27	6.16	6.12
	0	5.98	5.84	5.98	6.01
	10^{-3} 2 or 3*	6.08*	6.09	6.03	6.01
	5	6.13	6.18	6.17	6.12
K_2SO_4	0	6.19	6.01	6.09	6.12
	10^{-2} 2 or 3*	6.28*	6.19	6.12	6.08
	5	6.26	6.21	6.16	6.11
	0	6.01	6.01	6.08	6.12
	10^{-3} 2 or 3*	6.17*	6.15	6.16	6.13
	5	6.07	6.18	6.18	6.15
	0	6.00	6.01	6.00	6.02
	Control	6.11*	6.04	6.11	6.02
	5	6.12	6.01	6.17	6.11

* 印のついた 1 mM の値は溶液作製後 3 日目に測定した。

液を室温に放置すれば、pH は徐々に低下していくことがわかった。

II. 配偶体の発達に対する pH および緩衝液濃度の影響

(1) 発芽率の緩衝液濃度および pH 依存性

前述の実験の結果、 SO_2 ガスまたは K_2SO_3 、 Na_2SO_3 の溶解によって培養液の pH は変動することが明らかになり、しかも前者は pH の低下、後者は pH の上昇をもたらす。 SO_3^{2-} の効果を pH 変動による影響から分離するためには、緩衝液濃度を高くし、pH 変化を最小におさえる必要があ

表 2 胚子発芽率に対する KPB 液濃度および K_2SO_3 , K_2SO_4 濃度の相関関係

KPB 液濃度 (M)	対照	発芽率			
		K_2SO_3 濃度 (M)		K_2SO_4 濃度 (M)	
		10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}
実験 I	10^{-3}	94.3±2.2	76.7±13.2	20.0±2.3	96.3±0.9
	10^{-2}	67.7±0.7	43.3±1.2	22.7±1.2	56.0±2.1
	10^{-1}	21.7±2.3	25.7±5.7	13.7±0.9	26.3±2.3
実験 II	10^{-3}	98.7±0.9	96.3±0.7	1.3±0.9	91.7±2.9
	10^{-2}	53.0±9.3	41.0±6.8	2.3±1.2	68.0±2.5
	10^{-1}	5.3±1.5	2.0±0.6	0.3±0.3	1.7±0.9

る。そこで、まず発芽に対する緩衝液濃度の影響を調べた。pH 6.0 に固定し、濃度だけを変化させた KPB 液中に少量 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) のホウライシダ胞子を播き、1 日暗黒下で吸水させた後 4 日間赤色光 (0.5 W m^{-2}) で培養し発芽率を調べた(表 2)。その結果、緩衝液濃度が高くなれば発芽率が抑制されることがわかり、実験にはなるべく低濃度を使用する必要があることが明らかとなつた。

培地として使用する緩衝液の濃度が低ければ、亜硫酸塩の溶解による pH 変動が大きくなる(表 1)ため、次には緩衝液の濃度を一定にし、pH を変化させて、発芽に対する pH 依存性を調べた(図 5)。培養法は前述のとおりである。その結

果、KPB 液 1 mM の場合、調べた pH 4.9~7.1 の範囲内では発芽率に対する抑制効果はほとんどなく、pH 7.7 で多少低下した。一方、10 mM では pH 5.4 に至適 pH が見られ、その前後特に pH 7 以上、pH 4.6 以下では大きな発芽抑制が見られた。これは KPB 液 10 mM 以上では、 Na_2SO_3 , K_2SO_3 溶解により pH が大きく変動するためである。そこで以後の実験では 1 mM の KPB 液を使用することにした。

(2) 細胞における伸長・屈性・分裂の pH 依存性
胞子発芽に対し、KPB 液の濃度によっては pH が阻害的に働くことから原糸体の発達過程に対する pH の影響を調べた(図 6, 7)。1 mM

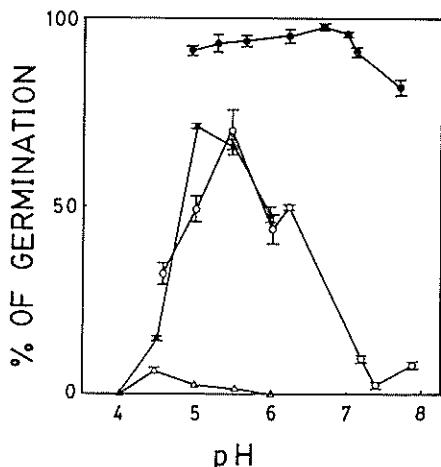


図 5 シダ胞子発芽に対する pH の影響。KPB 液 1 mM (—●—), 10 mM (—○—); クエン酸緩衝液 1 mM (—▲—), 10 mM (—△—)。

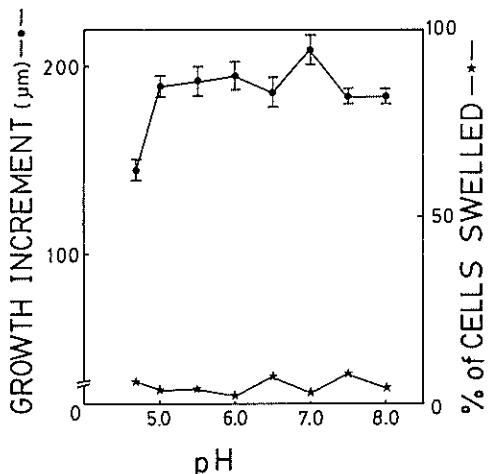


図 6 24 時間当たりの原糸体伸長量 (—●—) および先端膨潤率 (—★—) の pH 依存性。連続赤色光下 pH 6.0 で 6 日間培養した後 pH を変え、さらに 24 時間赤色光 (0.5 W m^{-2}) で培養した。

KPB液 pH 6.0, 連続赤色光 ($0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) 下で 6日間培養した原糸体の赤色光下での伸長, 光屈性および原糸体を赤色光下から白色光下に移して

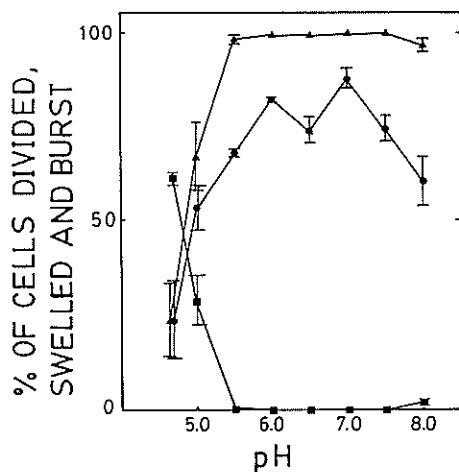


図 7 原糸体の細胞分裂率 (—●—), 先端膨潤率 (—▲—) および細胞破裂率 (—■—) の pH 依存性。連続赤色光下 pH 6.0 で 6 日間培養した後 pH を変え、その後 24 時間に白色光 ($\text{ca. } 4 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) を照射し、細胞分裂・先端膨潤を誘導した。

誘導される細胞分裂に対する pH の影響を pH 4.5~8.0 の範囲で調べた。その結果、pH 5 以上ではほとんど影響がないのに対し、pH 4.5 ではすべての現象に阻害作用が見られた。赤色光下 24 時間での細胞の伸長は、pH 5 以上では $200 \mu\text{m}$ 前後であるのに対し、pH 4.5 では $150 \mu\text{m}$ 以下であり、白色光下に移した後 24 時間に起こる細胞分裂と先端部の膨潤は、pH 5 以下で著しく阻害されるとともに先端部で破裂した細胞が急増した。このように、pH 低下はシダ配偶体の発達に大きく作用することが明らかになったが、 SO_2 ガス暴露による KPB 液の pH 低下はほとんどなく (図 2)，以下に述べる SO_2 の障害は、シダ配偶体の場合、pH 低下によるものではないことが示唆された。

III. 配偶体の発達に対する SO_3^{--} の影響

(1) SO_2 ガス暴露のシダ胞子発芽に対する影響

直径 3 cm のペトリ皿に 1 mM KPB 液を 3 ml 注入し、ホウライシダの胞子を培地上に浮遊させ、約 $0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ の赤色光下で、 0.1 ppm SO_2 を風速 $1 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ で 5 日間連続暴露し

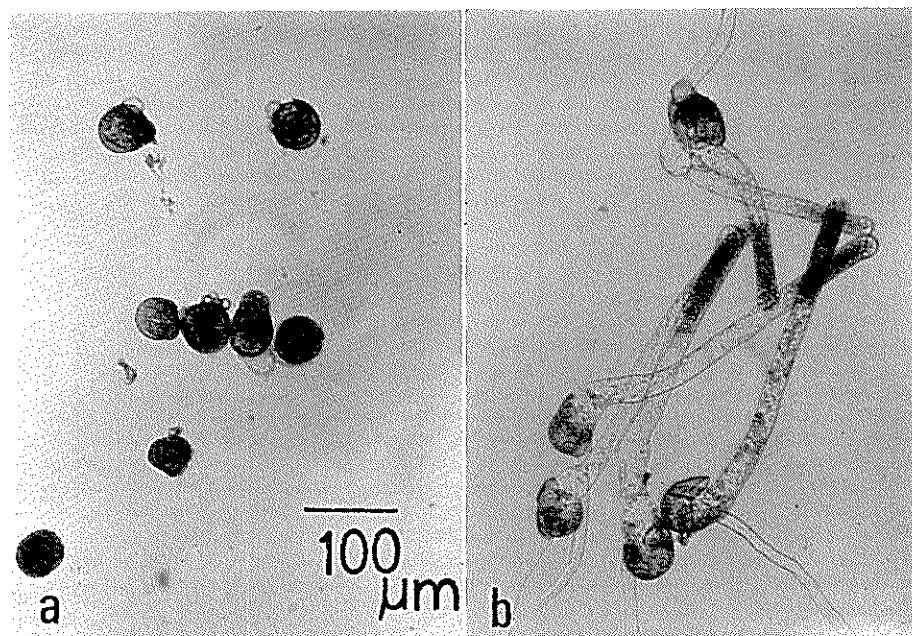


図 8 0.1 ppm SO_2 ガス暴露 (風速 $1 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$) のシダ胞子発芽に対する影響。a: ガス暴露 5 日目, b: 対照。

表 3 胞子発芽率に対する胞子密度・ K_2SO_3 濃度・漂白剤(次亜塩素酸ナトリウム)処理の相互作用。

漂白剤による洗浄	胞子密度 (mg/ml)	発芽率				
		K_2SO_3 濃度 (M)				
		0	10^{-3}	3.3×10^{-3}	6.6×10^{-3}	10^{-2}
+	10	94.3±1.7	82.7±1.5	55.3±0.3	21.7±2.0	6.3±0.7
	1	95.7±1.5	85.0±2.0	67.0±4.5	25.0±4.4	6.7±2.3
	0.1	95.3±0.3	91.0±4.0	66.7±1.3	27.3±3.9	8.0±0.6
	0.01	93.3±0.9	83.7±1.2	58.3±4.1	26.0±4.6	9.8±0.8
-	10	94.3±1.2	94.0±2.1	91.7±0.7	88.7±2.0	84.0±1.5
	1	96.3±0.9	91.0±0.6	83.3±2.2	67.3±5.5	47.3±7.5
	0.1	94.3±1.2	86.3±1.5	76.0±3.0	36.0±1.7	24.7±2.8
	0.01	89.3±3.3	87.0±1.0	71.3±5.5	41.7±8.2	16.0±4.2

た。この条件下での SO_3^{--} 溶存量は約 $10 \mu M$ である。この 5 日間の連続暴露直後の胞子の発芽率は、ガス暴露しない対照 88% に対し、ガス暴露したものは 57% であり、発芽率そのものに対する影響はさほど大きいものではなかった。しかし、原糸体の発達状態には大きな影響がみられた(図 8)。対照では図 8-b に見られるように正常な仮根、原糸体の発達、伸長が起こるのに対し、 SO_2 暴露のものでは、仮根がわずかに突出するだけであり、またその形状も各種の異常型を呈した。また、連続赤色光下で正常に発達させた原糸体に $0.1 \text{ ppm } SO_2$ を 1 日処理すると枯死するなど、 $0.1 \text{ ppm } SO_2$ 暴露はシダ配偶体の発達に大きく影響することがわかった。

(2) 発芽における SO_3^{--} の効果に対する胞子密度・次亜塩素酸ナトリウムの影響

溶解した SO_3^{--} の酸化による減少が、多量(1 mg/ml)のシダ胞子の存在下では極端におさえられることが、図 4 に明らかであるため、異なる胞子密度下での発芽に対する SO_3^{--} の影響を調べた(表 3)。胞子密度を $0.01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ から $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ までとし、胞子は 1 mM の KPB 液に懸濁し、連続赤色光下で発芽を誘導した。また胞子は $0.3\sim0.4\%$ の次亜塩素酸ナトリウム(漂白剤)で洗浄した区分としない区分を用意した。その結果、次亜塩素酸ナトリウムで洗浄した胞子では、胞子密度にかかわりなく SO_3^{--} の濃度上昇に依存して発芽率は低下した。一方、次亜塩素酸ナトリウムで洗浄しなかった区分では胞子密度の

低下に伴って SO_3^{--} の影響がより大きく現われた。この結果は、図 4 に示された次亜塩素酸ナトリウムで処理されてない胞子の密度が高いと SO_3^{--} の減少が少ないという結果とは一見矛盾しており、培養液中の残存 SO_3^{--} 濃度の低いほうがより発芽をおさえるような結果となっている。

(3) シダ胞子吸水・発芽時の物質代謝に及ぼす SO_3^{--} の影響

標記の研究を行なうに先立って、シダ胞子の吸水・発芽時の物質代謝に関する基礎的知見がきわめて乏しいことを省み、まず、ホウライシダの吸水・発芽期の細胞内成分および数種の加水分解酵素活性の経時的変動を調べた。

シダ胞子は滅菌し、 50 ml の蒸留水に懸濁して、暗所 25°C で 3 日間培養した。ついで、この胞子懸濁液を 10 等分して各々をペトリ皿に移し、1 部は連続赤色光下(約 $1.1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$)で、他は対照として暗所で、さらに 7 日間(計 10 日間)培養した。8 日および 10 日目の発芽胞子はナイロンメッシュにより未発芽胞子と選り分けた。胞子は日を追って採取し、熱メタノール処理したのち、乳鉢により磨碎し、水-メタノール-クロロホルム(1:1:1)で抽出した。不溶性画分はグルカンの、また有機画分は全脂質の定量に用いた。水可溶性画分はさらにイオン交換樹脂カラムにより分画後、有機酸・糖・アミノ酸の分析に供した。また、酵素活性の測定には、各ステージの胞子または配偶体を凍結乾燥後、その $0.1\sim0.2 \text{ g}$ を 10 mM メ

ルカブトエタノール、1/2量のポリクラーATを含む50 mMトリス-HCl緩衝液(pH 7.4)とともに磨碎し、その遠心上清液を用いた。リバーゼは*p*-ニトロフェルカプリン酸と*p*-ニトロフェニルパルミチン酸を基質としてA₄₁₀の増加によって活性を測定した。アミラーゼは可溶性デンプンを基質としてジニトロサリチル酸法によって、また、アミノペプチダーゼはL-ロイシンおよびL-アラニン-ニトロアニリドを基質として分光学的に測定した。RNアーゼは酵母RNAを基質として測定した。ここで得られた実験結果の要旨は次のとおりである^{4), 5)}。

(a) 胞子中に中性脂質は高含量(0.58 g/g胞子)含まれているが、発芽・伸長に伴い著しく減少し、10日目には半減した。この間の乾重量の減少の約70%は脂質含量の減少によるものであった。暗所で培養した胞子ではこのような減少は認められなかった。貯蔵脂質は胞子発芽・伸長時の最も主要な炭素源・エネルギー源を供給していると考えられる。(b) 胞子吸水開始後、全可溶性糖含量および還元糖含量はきわめて急速に減少し、可溶性糖成分が脂質分解に先立つ胞子発芽初期の炭素源・エネルギー源になっていることが示唆された。不溶性グルカン含量も吸水開始後3日目まで減少したが、その後は増加する傾向がみられた。全有機酸含量にはめだった変化は認められなかった。(c) 吸水開始後3日目までタンパク質含量は多少増加したが、その後は明暗にかかわらず急速に減少した。胞子の可溶性タンパク質を一次元SDS-ゲル電気泳動法により分析したところ、分子量約14,400前後の2種の主要バンドが検出された。これらは赤色光下で発芽させた胞子の場合にのみ6～8日目に消失し、それに代わり高分子量域に数種の新バンドが現れた。(d) 遊離アミノ酸は吸水開始後の含量の経時変化パターンから次の3群に分けられた：胞子中に既にある程度含まれ、赤色光下の培養で6日目に完全に消失するが、暗所でほとんど含量変化がないもの(Lys, His, Proなど)、胞子にはほとんど含まれないが、暗所で培養した場合のみ顕著な増加を示すもの(Glu, Gln/Thrなど)、および胞子中に低含量

が認められ、3日目まで著しく増加するが、それ以後は明暗にかかわらず速やかに減少するもの(Gly, Ala)。(e) リバーゼは乾燥胞子中にかなり高レベルで存在するが、暗所の培養では減少した。しかし、赤色光下に移して発芽を誘導すると再び増加した。アミラーゼおよびアミノペプチダーゼも乾燥胞子に多く検出されたが、これらの場合には赤色光下に移しても減少しつづけた。RNアーゼは暗所での吸水3日間は減少するが、その後は明暗にかかわらず変化しなかった。これらのことから、ホウライシダ胞子中の加水分解酵素は、発芽誘導のいかんにかかわらず吸水後減少しつづけるもの、および発芽誘導によって増加し始めるもの、という2群に分けうることがわかった。

以上の実験結果から、ホウライシダの胞子発芽および原糸体伸長過程における物質代謝には、胞子中に既に存在する加水分解酵素が発芽誘導以前に暗所での吸水のみで活性化されて貯蔵物質の一部を分解するステップと、赤色光による発芽誘導後に初めて活性化されるステップがあることが示唆された。

以上のような基礎実験の結果を考慮しながら、以下の研究では、胞子吸水・発芽時の物質代謝の反映である細胞構成成分の組成変化に及ぼすSO₄²⁻の影響を調べた。

この研究では、胞子の発芽率を高め、また微生物の混入による胞子試料の損失をできるだけ防ぐため、培養条件を改良した。すなわち、まず共栓付き遠沈管に胞子を入れ、これを1 mM KPB、pH 6.0(10 μg·ml⁻¹のクロラムフェニコールを含む)に懸濁して暗所25°Cで吸水させた。この濃度のクロラムフェニコールが胞子発芽に影響を及ぼさないことは予備実験によって確かめた。吸水開始3日後に遠心分離して胞子を集め、これを1%次亜塩素酸ナトリウム溶液によって滅菌した。ついでペトリ皿(直径3 cm)に3 mlのKPB(10 μg·ml⁻¹のクロラムフェニコールを含む)を分注し、これに胞子を10 mg·3 ml⁻¹になるように無菌的に懸濁させた(KPB対照区)。また、KPBに3 mM K₂SO₄および3 mM K₂SO₄を溶解し、

同様にして胞子を懸濁させた (SO_3^{--} 区および SO_4^{--} 対照区)。各ペトリ皿中の胞子は赤色光下 25°C で培養した。光照射開始後 0, 2, 4 日目に胞子を採取し、凍結乾燥後に分析に供した。細

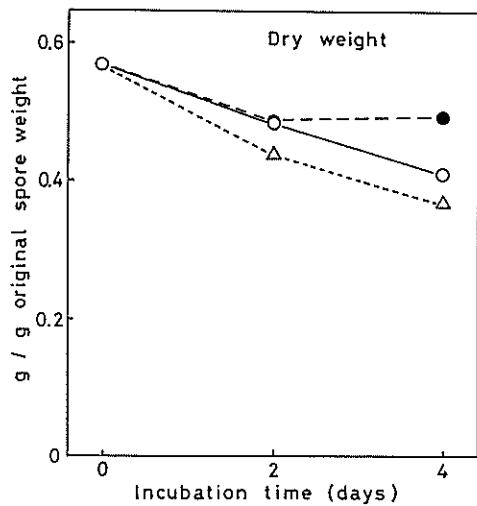


図 9 吸水後のシダ胞子の乾重量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。胞子を KPB (—○—), 3 mM SO_3^{--} を含む KPB (—●—) および 3 mM SO_4^{--} を含む KPB (—△—) に懸濁し、赤色光下で 4 日間培養し、0 日目、2 日目および 4 日目に試料を採取した。縦軸は吸水前の胞子 g 当たりの値を示す。

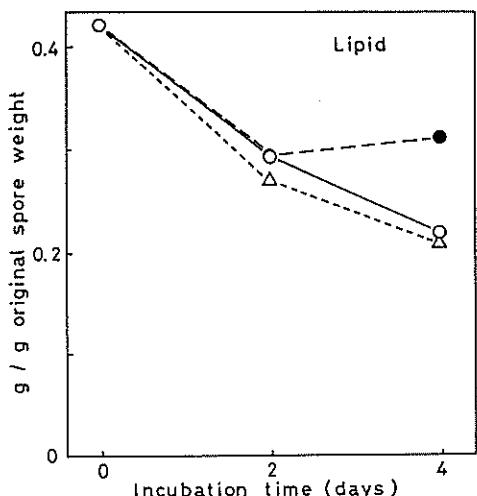


図 10 吸水後のシダ胞子の全脂質含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。記号等は図 9 に同じ。

胞内成分の分析法は前述の基礎実験に用いた方法に従った⁴⁾。

上記の培養条件下では、光照射 4 日目の胞子の平均発芽率は KPB 区、 SO_4^{--} 対照区、 SO_3^{--} 区のそれぞれで 32%, 17% および 0.2% であった。すなわち、 SO_4^{--} によって発芽率は半減し、また

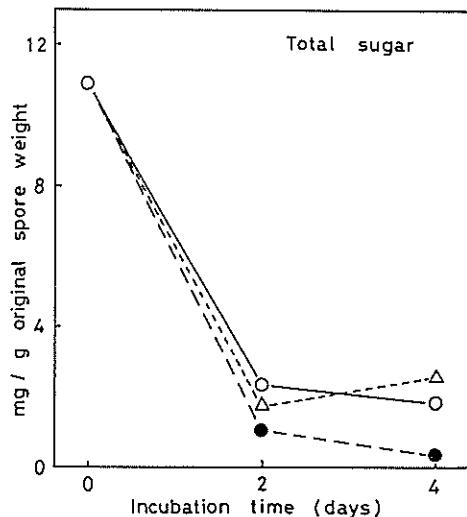


図 11 吸水後のシダ胞子の全可溶性糖含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。記号等は図 9 に同じ。

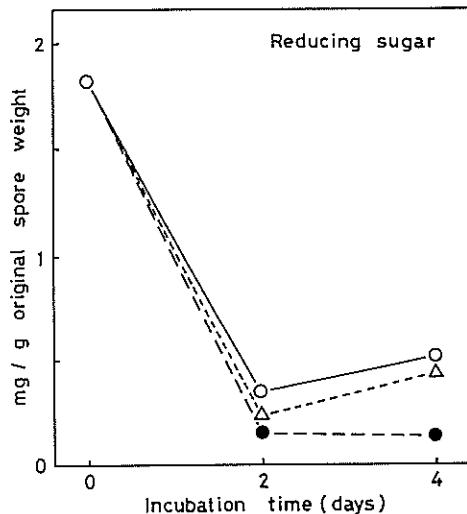


図 12 吸水後のシダ胞子の還元糖含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。記号等は図 9 に同じ。

SO_3^{--} によって胞子はほとんど発芽しなくなつた。しかし、 SO_3^{--} によって胞子が直ちに死滅したとは考えられず、下に述べるように、4日間の培養期間中 SO_3^{--} 区においても貯蔵物質の分解などの代謝は活性を保っていた。図 9 に示すように、KPB 対照区と SO_4^{--} 対照区では光照射開始後 4 日間にわたり乾重量は連続的に減少したが、 SO_3^{--} 区ではその低下は 2 日目以後停止した。KPB 対照区では SO_4^{--} 対照区に比べて発芽率は 2 倍近く高かったが、乾重量の減少の割合は後者よりも小さかった。理由はわからないが、 SO_4^{--} は多少ながら胞子中の物質分解系の活性を促進する働きがあるとみられる。

三つの実験区における乾重量の減少の傾向は、シダ胞子乾重量の約 70% を占める主要貯蔵物質である脂質の含量変化を反映しているとみてよい(図 10)。すなわち、 SO_3^{--} 区では、他の 2 種の対照区と比べた場合、2 日目以後の脂質分解はほぼ完全に抑えられたことがわかる。また、全可溶性糖および還元糖の含量はいずれの実験区においても 2 日目まで著しく低下した。この低下の割合はわずかながら SO_3^{--} 区がもっとも高く、 SO_4^{--} 対照区がこれに次いだ(図 11, 12)。これらの含量は 2 種の対照区では 2 日目から 4 日目にかけ

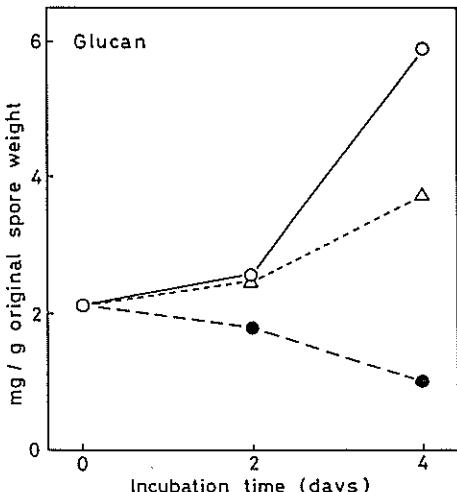


図 13 吸水後のシダ胞子の不溶性グルカン含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。記号等は図 9 に同じ。

て、ほぼ不变または上昇の傾向がみられたのに対し、 SO_3^{--} では対照区に比べてさらに低い値を示した。図 13 に見られるように、不溶性グルカンは KPB 対照区では 2 日目から 4 日目にかけて極めて顕著な合成が認められ、また、 SO_4^{--} 対照区でも前者よりは低いものの明らかな含量増加が見られた。これに対し、 SO_3^{--} 区でのその含量は 4 日間にわたり低下するのみであった。

タンパク質含量はいずれの区においても 2 日目までは急速な減少を示した(図 14)。この分解速度は KPB 対照区、 SO_4^{--} 対照区、 SO_3^{--} 区の順に高かった。2 日目から 4 日目にかけては、タンパク質含量に大きな変化はなかったが、3 区間の含量差はさらに広まった。それぞれのタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析したところ、いずれの場合も少なくとも 8 種のポリペプチド・バンドが検出されたが、各区の間でとくに明らかな質的差異は認められなかつた(図 15)。 α -アミノ態窒素はいずれの区でも 2 日間で急速な含量の減少を示したが、その低下の割合は SO_3^{--} 区、 SO_4^{--} 対照区、KPB 対照区の順に高く、ちょうどタンパク質含量変化の場合

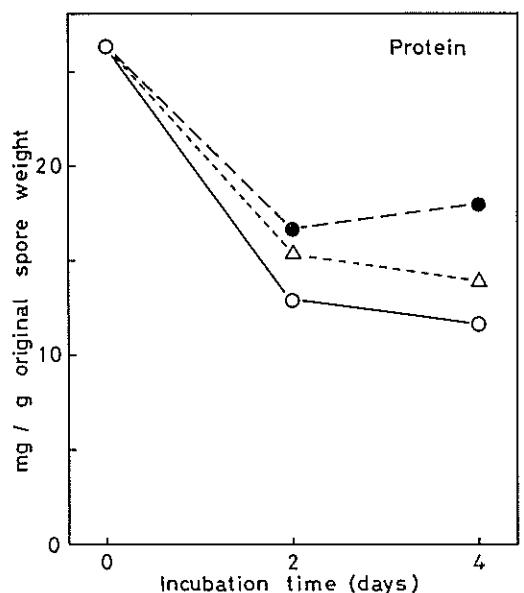


図 14 吸水後のシダ胞子のタンパク質含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。記号などは図 9 に同じ。

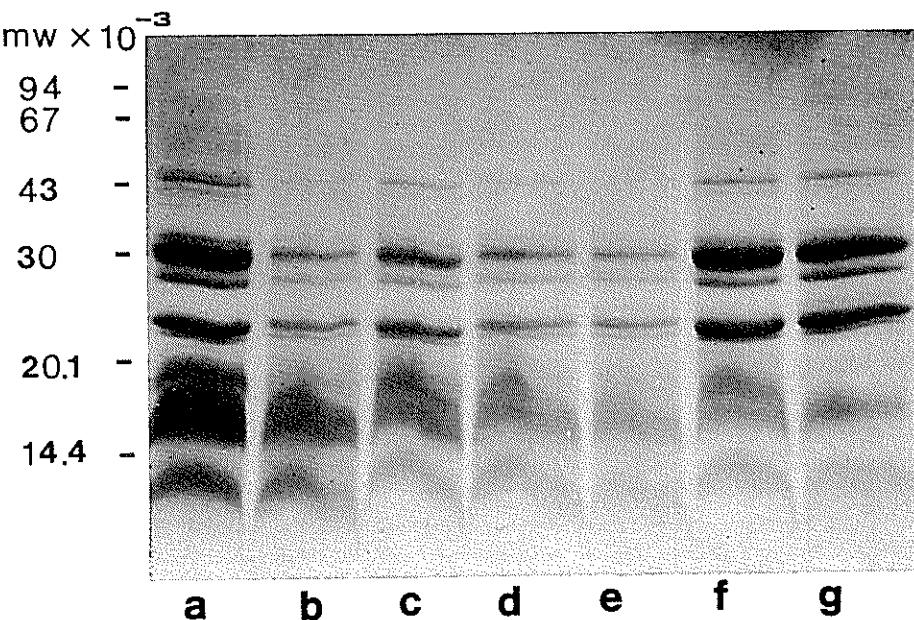


図 15 吸水後のシダ胞子中のタンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンに及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。a) 0 日目, b) KPB 対照区の 2 日目, c) SO_3^{--} 区の 2 日目, d) SO_4^{--} 対照区の 2 日目, e) KPB 対照区の 4 日目, f) SO_3^{--} 区の 4 日目, g) SO_4^{--} 対照区の 4 日目。

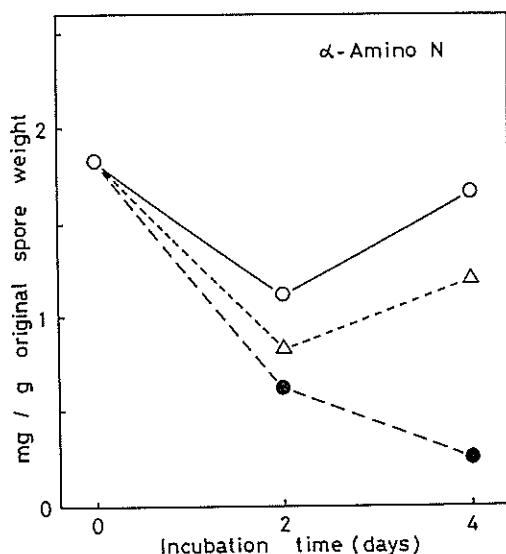


図 16 吸水後のシダ胞子の α -アミノ態窒素含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響、記号などは図 9 に同じ。

とは逆のパターンを示した（図 16）。 α -アミノ態窒素含量は 2 日目から 4 日目にかけて二つの対照区では増加に転じたが、 SO_3^{--} 区のみはさらに減少しつづけた。図 17には主なアミノ酸の含量変化を示してある。三つの区について、全 α -アミノ態窒素含量と類似の変動パターンを示したアミノ酸はアスパラギン酸、スレオニン、セリン、プロリント、アラニン、ロイシン、リジンおよびアルギニンであった。とくに、これらのうちアスパラギン酸など 5 種のアミノ酸は SO_3^{--} 区の 2 日目以後ほとんど検出されなくなった。グルタミン酸、グルタミン、グリシンおよびバリンは他の 8 種のアミノ酸とは異なった含量変化のパターンを示したが、二つの対照区と比較した場合、 SO_3^{--} 区では 2 日目から 4 日目にかけて含量が低下傾向にあることは変わりなかった。図 17 に加えていない他のアミノ酸は、いずれの実験区においても 0, 2, 4 日目の含量が $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 胞子以下であった。

以上の研究結果は、 SO_3^{--} の存在によって光照射開始 2 日目以後の脂質の分解利用、不溶性グル

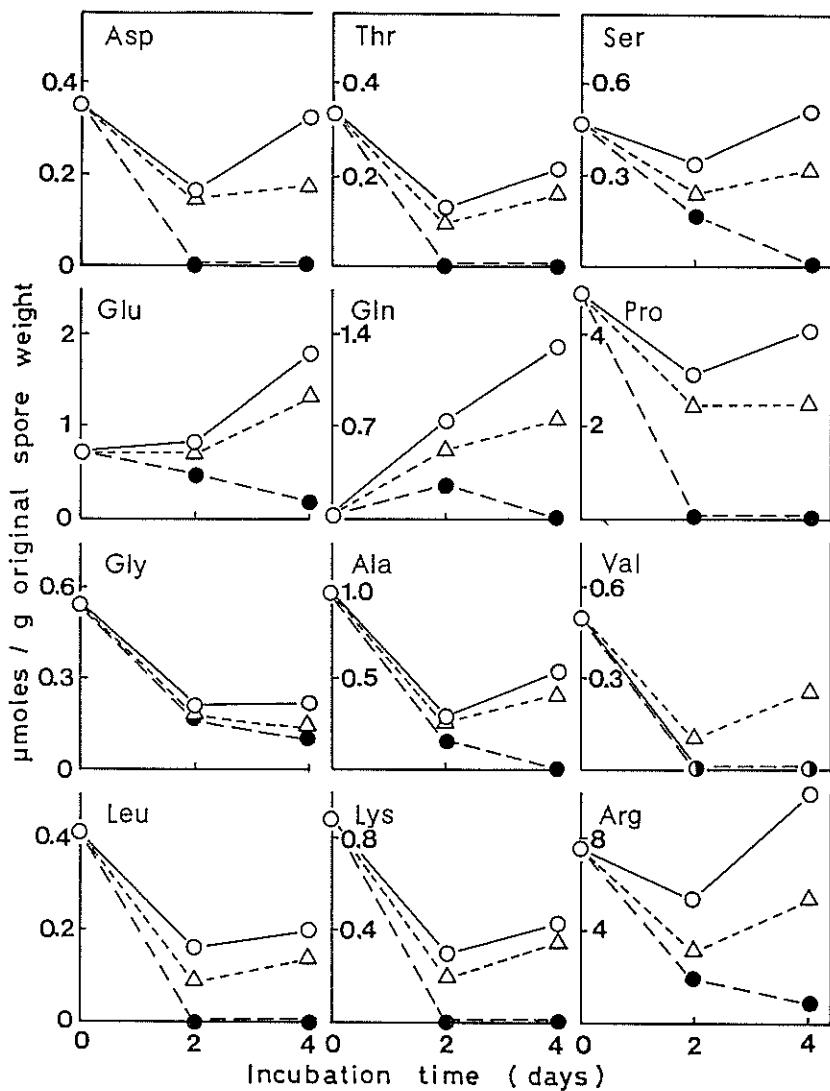


図 17 吸水後のシダ胞子のアミノ酸含量変化に及ぼす SO_3^{--} および SO_4^{--} の影響。記号などは図 9 と同じ。

カンの合成、タンパク質の分解と各種アミノ酸プールの増加が特に著しく抑制されることを示している。このように SO_3^{--} が胞子の貯蔵物質の分解利用系の活性低下をもたらすことは明らかであるが、これが SO_3^{--} による胞子発芽阻害の原因になっているのか、またはその結果であるのかについては現在のところ判断しがたい。

(4) 原糸体の発達に対する SO_3^{--} の影響

図 8 に示されたように、発芽後のシダ配偶体の

発達は SO_2 ガス暴露により強く影響されることがわかったので、この発達過程を光の波長、強度、方向などにより、細胞の伸長、屈性、分裂の各素過程に分けて誘導し、それぞれの現象に対する SO_3^{--} の影響を調べた。 SO_3^{--} の各現象に対するより直接的な影響を調べるために、培養法を改良（ゼラチン-寒天薄膜間に胞子を包み、培養液中に沈めて培養）するとともに、投与する SO_3^{--} 濃度の再現性を考えて、1 mM の KPB 液に K_2SO_3 ま

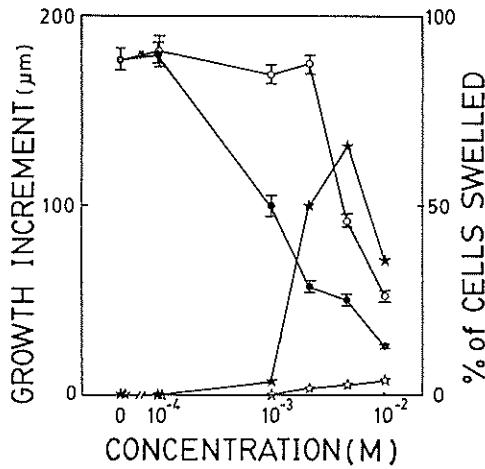


図 18 原糸体の生長 (—○—, —●—) および膨潤 (—☆—, —★—) に対する SO_3^{--} (—●—, —★—) SO_4^{--} (—○—, —☆—) の影響。

たは Na_2SO_3 を溶解した培養液中で配偶体の発達を観察した。対照には K_2SO_4 または Na_2SO_4 溶液を使用した。まず、分裂を伴わない細胞の伸長のみに対する影響を調べるために、 SO_3^{--} を含まない KPB 液中、連続赤色光下で 6 日間培養して得られた原糸体を、各濃度の SO_3^{--} または SO_4^{--} を含む培養液中に移し、その後 24 時間の赤色光下での伸長量を測定した(図 18)。その結果、1 mM 以上の SO_3^{--} では伸長が阻害され、3.3 mM 以上で細胞先端部で異常な先端膨潤が起こるとともに、先端部で破裂する個体が見られるようになり、6.6 mM では 20~30% の原糸体で破裂が観察された。対照の SO_4^{--} 存在下でも高濃度では伸長量の減少、細胞の破裂、先端部のわずかな膨潤も見られたが、 SO_3^{--} の効果に比べると小さかった。

SO_3^{--} を投与すると同時に赤色光の照射方向を変換し、原糸体の光属性反応に対する影響を調べたが、細胞が伸長した原糸体ではすべて光源方向に向って属性を示し、光属性の方向制御系のみに SO_3^{--} が影響するような現象は観察されなかつた。次に 6 日間赤色光下で培養した原糸体に SO_3^{--} を投与すると同時に、白色光 (ca. 4 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) を連続して照射し、24 時間後の細胞分裂率を測定した(図 19)。その結果、1 mM 以下の

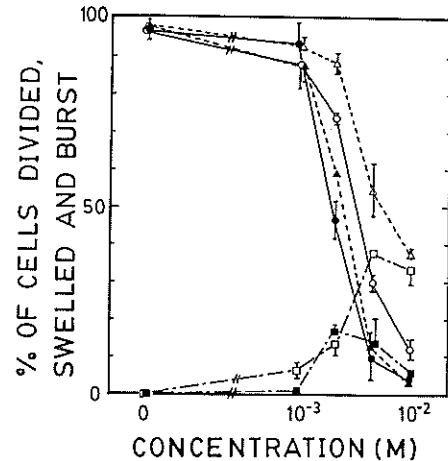


図 19 原糸体の分裂 (—●—, —○—), 膨潤 (—▲—, —△—) および破裂 (—■—, —□—) に対する SO_3^{--} (—●—, —▲—, —■—) SO_4^{--} (—○—, —△—, —□—) の影響。

SO_3^{--} はほとんど影響ないが、3.3 mM 以上で細胞分裂を起こさない個体が急増した。白色光の連続照射で通常誘導される先端部の球状の膨潤に対しても SO_3^{--} は同様の阻害効果を示した。一方、赤色光下同様に SO_3^{--} 高濃度では細胞破裂が観察された。6.6 mM 前後の SO_3^{--} 濃度では、生きているが分裂もしない状態の原糸体が観察されるが、この細胞が細胞周期のどの部分で停止しているかは今後の問題である。

(5) SO_3^{--} による原糸体先端膨潤の解析

① SO_3^{--} 存在下における原糸体先端膨潤の経時変化

上記のとおり、赤色光下で培養したホウライシダ原糸体に K_2SO_3 を 0.1 mM の KPB 液に溶解して作った 3.3 mM の SO_3^{--} を与えると、原糸体先端部で顕著な膨潤が観察される(図 20)が、この経時変化を原糸体の生長には影響のない赤外光により連続的にビデオ録画したのち、時間を追って計測した(図 21)。処理を受けた原糸体は、①処理後短時間内に破裂するもの(図 20, e 参照)、②先端部が徐々に膨潤するもの(図 20, a, b)、③膨潤過程の途中から伸長を再開するもの(図 20, c) に大別されるが、膨潤したものでも最終的には細胞の先端部で破裂する個体が多い。破裂

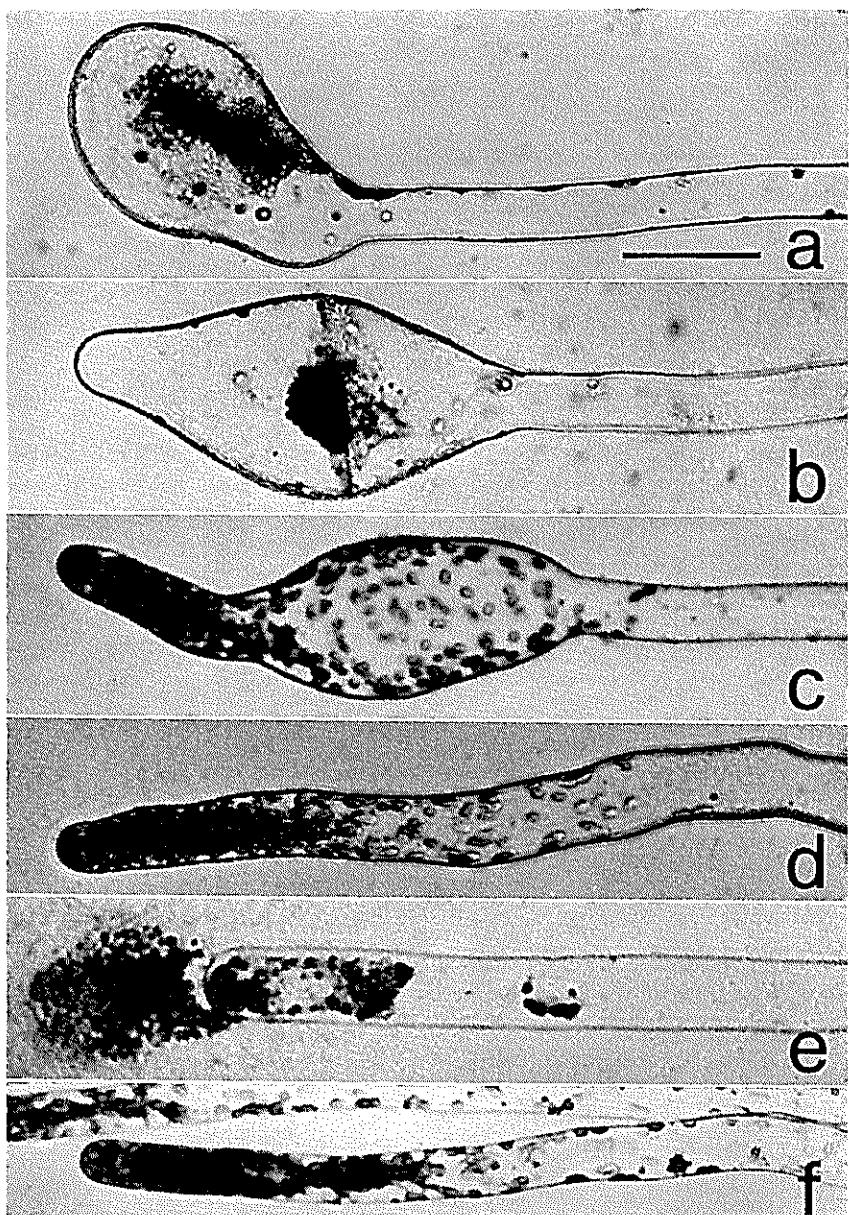


図 20 SO_3^{--} , SO_4^{--} 处理後の原糸体。6日間連続赤色光 ($0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) 下で前培養した後, 3.3 mM の SO_3^{--} または SO_4^{--} 下に移し, 引続き赤色光下で3日間培養した。a, b, c: SO_3^{--} 处理, b は処理中に細胞分裂した個体, c は伸長生長を再開した個体。d, e: SO_4^{--} 处理, d は生長を継続した個体, e は処理直後に破裂した個体。f: 細胞液のみを交換した対照。図 a 中の bar は $50 \mu\text{m}$.

直後には細胞の収縮が起こる。図 21 中の膨潤過程を示す原糸体内の線は、処理後8時間おきの細胞の外形を示しており、処理後生長速度は激減し、先端部の生長域が広がるとともに生長の方向

性を失うことがわかる。

一方、 SO_3^{--} の影響の対照実験として K_2SO_4 (3.3 mM) の溶液を処理した原糸体の生長過程の経時変化を SO_3^{--} の場合と同一条件下で測定した

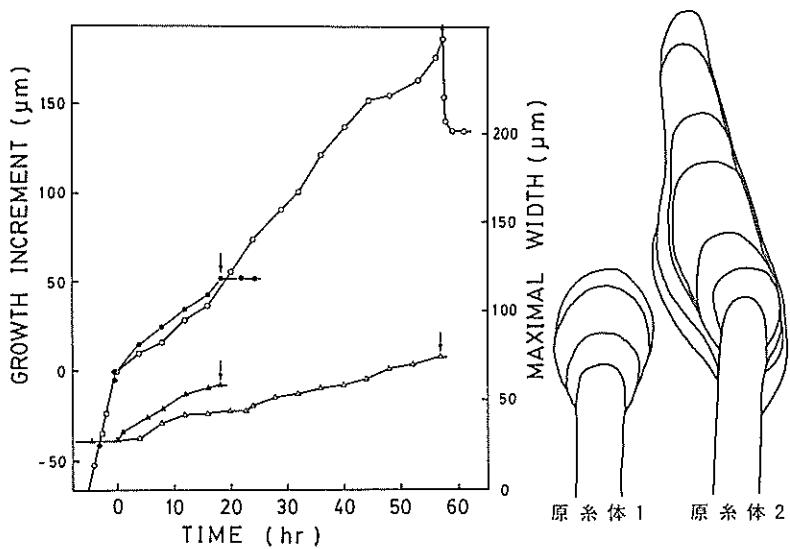


図 21 SO_4^{--} 存在下における原糸体先端膨潤の経時変化。連続赤色光下で 0 時間目に 3.3 mM の SO_4^{--} を投与し、その後原糸体 1(—●—, —▲—) および 2(—○—, —△—) の先端部における生長量(—●—, —○—) および最大幅(—▲—, —△—)を継続的に測定した。図中右側の原糸体 1, 2 は 0 時間目より 8 時間ごとの両原糸体の形状を示した。矢印は原糸体が破裂した時点。原糸体 2 では破裂直後に細胞の収縮が起こっている。

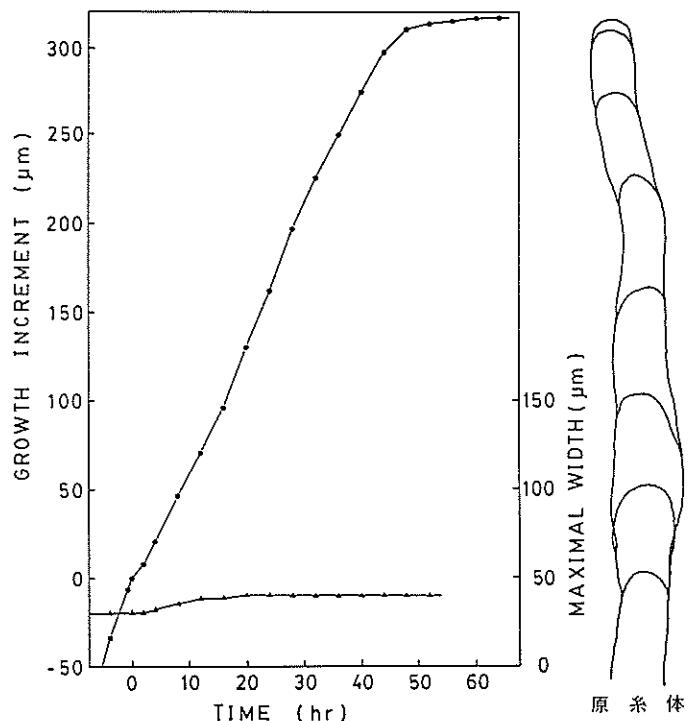


図 22 SO_4^{--} 存在下における原糸体先端生長の経時変化。0 時間目に $3.3 \text{ mM} \text{ SO}_4^{--}$ を投与し、先端部の生長量(—●—)と最大幅(—▲—)を継続的に測定した。その他の条件は図 21 と同じ。

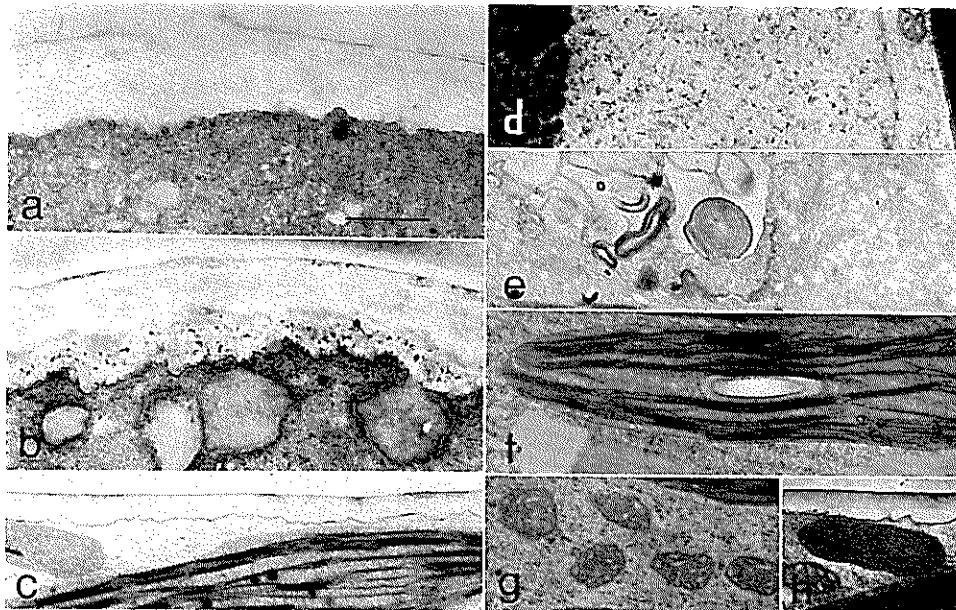


図 23 $\text{SO}_3^{--} 3 \text{mM}$ で処理した原糸体の微細構造。a, b: 原糸体先端部の細胞壁肥厚, a は細胞壁の一部破壊が見られる (5 時間), b は細胞壁の内側に異常な構造が見られる (24 時間)。c: 肥厚の起こらない基部の細胞壁 (24 時間)。d: 核の一部 (24 時間)。e: 膜系の異常 (5 時間)。f: 葉緑体 (3 時間)。g: ミトコンドリア (8 時間)。h: ミクロボディー (24 時間)。() 内は処理時間。図 a 中の bar は $1 \mu\text{m}$ を表す。a~h は同倍率。

(図 22)。処理を受けた原糸体は、①処理後短時間内に細胞先端部で破裂するものと、②先端部でわずかに膨潤が起こった後、大きな変化がなく伸長を続けたものに分けられた。 SO_3^{--} 処理同様、細胞破裂直後には細胞の収縮が起こっており、細胞収縮は SO_3^{--} による特異的な効果ではない。

② SO_3^{--} による先端膨潤細胞の電子顕微鏡観察

次に SO_3^{--} および SO_4^{--} 処理後時間を追って固定・包埋した原糸体細胞内の微細構造を電子顕微鏡により観察した。 SO_3^{--} 処理による最も顕著な変化は、先端膨潤に伴う先端部での細胞壁の肥厚であった(図 23)。この肥厚は SO_3^{--} 処理前に既に伸長し終った細胞壁では起こらず、処理中に伸長した細胞壁でのみ明らかであり、未処理の対照の 2~4 倍であった。しかしながら別の対照である SO_4^{--} 処理個体での細胞壁にも、程度の差はあるが明らかな肥厚が観察され、細胞壁の肥厚が SO_3^{--} に特異的な現象であるとは言えない。肥厚した細胞壁の詳細な構造変化は今後の研究課題である。

文献上では SO_3^{--} の影響が最も顕著にみられるという葉緑体 (Thomson 1975) については、 SO_3^{--} 処理後 5~8 時間に葉緑体の膨潤とそれに伴うグラナ間の広がりが観察される個体も見られたが、必ずしも顕著ではなかった。

原糸体の先端膨潤はコルヒチン処理によっても誘導され、この場合はコルヒチン未処理個体の亜先端部に存在する微小管が消失するが (Mineyuki 1984) SO_3^{--} 処理による膨潤では微小管の消失は起こっていないかった。

この他、細胞内顆粒の構造を比較検討したが、全体として SO_3^{--} 処理依存の特異的な微細構造の変化は今のところ見いだされていない。

考察と今後の課題

植物に対する大気汚染源の影響は我が国における光化学二次生成物や欧米における酸性雨などに見られるように、深刻な様相を呈しているものもあるが、その割にはその作用機構はほとんどわかつてないと言ってよい。解析が困難な要因はいくつも考えられるが、その一つは汚染源が気体の状

態で存在し、それが溶解して初めて作用をするところにあろう。本研究を通して一番大きな問題は、いかにして SO_2 そのものの影響を見るかということであった。普通ある物質の影響を見る場合、その物質の濃度以外のすべての条件を一定にした上で濃度-反応曲線を調べるが、溶存する SO_3^{--} 濃度を再現よく、一定に保つことはほとんど不可能に近かった。まず SO_2 ガスの暴露実験では、 SO_2 の溶解は暴露する SO_2 濃度よりもむしろ（水面での接触状況と思われる）風速に強く影響されること、 SO_2 ガスの通気などにより一定の SO_3^{--} 量を確保したとしても、通気または暴露を停止した時点から SO_3^{--} 量は急速に減少していくこと、 K_2SO_3 、 Na_2SO_3 の溶解で得られる SO_3^{--} でも同様に溶解直後から SO_3^{--} 量は急激に減少していくことなど SO_3^{--} 量は常に変動していた。一方、 SO_3^{--} 量の変動をおさえるのに有効であった多量の胞子の懸濁では、多量の SO_3^{--} が存在するにもかかわらず、影響が全くないといいう一見矛盾した結果を呈した。これは SO_3^{--} が胞子のもつ何らかの物質によって安定化されるとともに、その結果 SO_3^{--} が胞子内の作用点に到達しなかったためと考えることができよう。ともかく SO_3^{--} 量は実験中も常に変動しているため、処理後短期間に見られる反応以外は、解析が不可能に近く、本実験で図表に示されている濃度についても、現実との大きな差が生じているはずである。

次に、 SO_3^{--} の濃度以外の条件が、同時に変動してしまうことも大きな問題である。 SO_2 ガスの溶解に伴い pH は低下するが、この程度も溶解する溶媒に依存し、緩衝液ならば pH 変動は少なく蒸留水だとその程度は大きかった。一方、 K_2SO_3 、 Na_2SO_3 を溶解した場合には pH は緩衝液中でも大きく上昇した。植物の種類や反応により至適 pH があるため、 SO_3^{--} の溶存量に伴い pH 変動が起これば、対象となっている反応に影響が現れても、それが SO_3^{--} の作用である保証はない。特に従来のように葉片 (Shimazaki *et al.*, 1984) や単細胞 (Paul & Bassham 1978) を用いた場合など、実験の便宜上 SO_2 の影響を K_2SO_3 など化学物質を溶解して得られる SO_3^{--} で代行す

る場合、本実験で見られたように pH 変動の方向が違うことや、カチオンの量が違うことなど大きな問題があり、この問題に対処するための多くの対照実験を取り入れて行くべきであろう。本実験でもシダ配偶体において SO_2 ガスおよび亜硫酸塩がともに強い阻害作用を持つことが明らかになったが、両実験の単純な比較はむずかしく、両者の阻害作用が同一現象であるのか、与えられた条件のうち何が作用したのかについては今後の課題である。

SO_3^{--} の毒作用には、 SO_3^{--} 自身によるタンパク質などの変性のほかに、 SO_3^{--} 、 SO_4^{--} の代謝により生成する H_2S によるもの (Silvius *et al.*, 1976)，葉緑体内で SO_3^{--} が SO_4^{--} に酸化される際に生成する活性酸素によるもの (Asada & Kiso, 1973) が知られており、 SO_2 暴露により生じる多様な障害に関わる直接の毒物を明らかにするのは困難である。これらの毒物は細胞構造や代謝機能に様々な影響を与えるが、 SO_2 に特異的でないものが多く、 SO_2 に独特な変化を見いだすのはむずかしい。本実験でも、 SO_3^{--} によって誘導される赤色光下における異常な先端膨潤現象も、電子顕微鏡レベルで調べると程度の差こそあれ SO_4^{--} 処理でも誘導されるため、 SO_3^{--} に獨得な効果であるとは言えず、また、細胞小器官の微細構造に関する SO_3^{--} による特異的な構造変化は見いだされないこと、配偶体発達の素過程に作用する濃度-作用曲線がほぼ同じであること、細胞の破裂や、発芽阻害およびその時の代謝活性の低下などを総合的に考え合わせると、 SO_3^{--} は細胞内のある決まった代謝活性や、決まった細胞構造に作用しているというよりは、むしろ生細胞を構成するあらゆる部分に平均的に影響を及ぼしているものと考えられる。

大気汚染の影響は単独の汚染源では現れにくいが、複合汚染になると、低濃度でもその効果が見られる (Menser & Heggstad 1966) 場合が多い。その点本研究で使われたシダの実験系は、0.1 ppm SO_2 という一般に単独では高等植物にはほとんど可視的な影響のない濃度で十分その効果が見られることや、国内の SO_2 の環境規準が日平

均 0.04 ppm であることを考え合わせると、今後の扱い方によっては、十分 SO₂汚染に対する生物計器になり得ることが示唆された。上に述べたように SO₂作用の解析や、SO₂に特異的な生物計器の開発には、解決しなければならない多くの課題が残されているが、諸般の困難を乗り越えて、本研究を継続的に進めて行く所存である。

謝 詞

この研究は研究代表者が東京都立大学に着任した直後の昭和 57 年度から 3 年間にわたり実施したものであるが、この間特に初年度においては、実験施設、実験機器が皆無に等しかった当研究室の設立にその経費の大部分を充当させていただいた。この研究設備は本研究が一段落した後も今後永く使用させていただくことになり、研究室の設立を可能にして下さった日産科学振興財團関係各位に心から感謝致します。また本研究の遂行に当たり、東京都立大学の小柴共一、安部 弘、伏見洋子、増田直子、国立公害研究所の竹内裕一、清水英幸諸氏の協力を得たことを感謝致します。

研究発表

- 1) 安部 弘、門田明雄、清水英幸、近藤矩朗、和田正三：ホウライシダ配偶体の発芽・生長に対する SO₂ の影響、日本生物環境調節学会第 21 回大会（福岡）（1983）。
- 2) 南川隆雄、小柴共一、和田正三：ホウライシダの胞子発芽および原糸体伸長における代謝生理、1. 細胞内成分の変動、日本植物生理学会 1984 年度年会（金沢）（1984）。
- 3) 小柴共一、南川隆雄、和田正三：ホウライシダの胞子発芽および原糸体伸長における代謝生理、2. 加水分解酵素活性の変動、日本植物生理学会 1984 年度年会（金沢）（1984）。
- 4) Minamikawa, T., T. Koshiba and M. Wada: Compositional changes in germinating spores of *Adiantum capillus-veneris* L., *Bot. Mag. Tokyo*, 97, 313-322 (1984).
- 5) Koshiba, T., T. Minamikawa and M. Wada: Hydrolytic enzyme activities in germinating spores of *Adiantum capillus-veneris* L., *Bot. Mag. Tokyo*, 97, 323-331 (1984).
- 6) 和田正三、近藤矩朗：ホウライシダ原糸体細胞の伸長ペターンにおよぼす SO₃⁻ の影響、日本植物学会第 49 回大会（札幌）（1984）。
- 7) 近藤矩朗：SO₂ による植物の傷害の初期過程について、第 25 回大気汚染学会（宇部）（1984）。
- 8) Minamikawa, T., N. Masuda, A. Kadota, T. Koshiba, N. Sado and M. Wada: Compositional changes in germinating spores of *Adiantum capillus-veneris*. US-Japan seminar on "Developmental physiology of fern haplophase" (Nikko) (1985).
- 9) Minamikawa, T., N. Masuda, A. Kadota and M. Wada: Effects of sulfite on compositional changes in germinating spores of *Adiantum capillus-veneris* L. (in preparation).
- 10) Wada, M., H. Abe, A. Kadota, H. Shimizu and N. Kondo: Problems of studying the real effects of sulfite on germination of fern spores cultured under liquid medium (in preparation)
- 11) Wada, M., Y. Fushimi and N. Kondo: Effects of sulfite and sulfate on the protonemal development of *Adiantum capillus-veneris* L. (in preparation)

文 献

- 1) Asada, K. and K. Kiso: Initiation of aerobic oxidation of sulfite by illuminated chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, 33, 253-257 (1973).
- 2) Furuya, M.: Photomorphogenesis in ferns. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, Vol. 16, Photomorphogenesis. Edited by W. Shropshire, Jr. and H. Mohr. Springer. pp. 569-600 (1983).
- 3) Kondo, N. and K. Sugaharu: Changes in transpiration rate of SO₂-resistant and -sensitive plants with SO₂ fumigation and the participation of abscisic acid. *Plant & Cell Physiol.* 19, 365-373 (1978).
- 4) Majernik, O. and T. A. Mansfield: Direct effect of SO₂ pollution on the degree of opening of stomata. *Nature*, 227, 337-378 (1970).
- 5) Menser, H. A. and H. E. Heggstad: Ozone and sulfur dioxide synergism: Injury to tobacco plants. *Science*, 153, 424-425 (1966).
- 6) Miller, J. H.: Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.*, 34, 361-440 (1968).
- 7) Mineyuki, Y.: Studies on intracellular nuclear positioning and microtubules in protonemata of *Adiantum capillus-veneris* L. D. Sc. Thesis. University of Tokyo (1984).
- 8) Paul, J. S. and J. A. Bassham: Effects of sulfite on metabolism in isolated mesophyll cells from *Papaver somniferum*. *Plant Physiol.*, 62, 210-214 (1978).
- 9) Shimazaki, K., K. Nakamachi, N. Kondo and K. Sugahara: Sulfite inhibition of photosystem II in illuminated spinach leaves. *Plant & Cell Physiol.*, 25, 337-341 (1984).
- 10) Silvius, J. E., C. H. Baer, D. Dodrill and H.

- Patrick: Photoreduction of sulfur dioxide by spinach leaves and isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 57, 799-801 (1976).
- 11) Thomson, W. W.: Effects of air pollutions on plant ultrastructure. In: Responses of plants to air pollution. Edited by J. B. Mudd and T. T. Kozlowski, Academic Press, New York. pp. 179-194 (1975).