葉緑体蛍光を用いた植物の状態変化の高感度測定

正 員 林 健 司 (九州大学大学院システム情報科学研究院)

非会員 秋 吉 秀 信 (九州大学大学院システム情報科学研究院)

High Sensitive Detection of Plant State Changes using Chloroplast Fluorescence

Kenshi Hayashi, Member, Hidenobu Akiyoshi, Non-member (Graduate School of Informatin Science and Electrical Engineering, Kyushu University)

We developed fast detecting method to measure influences of chemical substances to plant. Fluorescence from chloroplast was used for the signal from plant. Used chemicals were alleropathy substances, that is extracted from plants and is known as inhibitor of the growth. Fluorescence induction phenomena and frequency responses of fluorescence from pumpkin leaf were measured, while time constants and normalized response value were estimated from time course of fluorescence image. As a result, alleropathy substances affect fluorescence from the leaf and high sensitive and high speed detection is realized. Furthermore, the data is not affected by individual differences of plant and experimental circumstance. Therefore, the present method can be utilized for an index of plant activity.

キーワード：植物, アレロパシー, 葉緑体蛍光, 蛍光誘導期, 周波数応答

Keywords: plant, alleropathy, chloroplast fluorescence, fluorescence induction, frequency response

1. はじめに

生体の内部状態を測定する目的で植物等の生体に現れる変化を捉えようとする時、諸物理量を定量的に測定することで生体内部の情報を定量化することは困難である場合が多い。本研究は植物葉の葉緑体蛍光を通じて、生体の内部情報を測定することを目的とする。これまで植物の葉緑体蛍光測定に関しては数々の研究がなされ光合成の電子伝達過程の詳細が明らかとなっているが、それらは光合成を行なう器官(クロロフィルやキノン)を取り出すために葉を磨り潰して実験対象とするため、非破壊に生体の外部から内部状態の測定をする目的には向いていない。今回、我々は植物葉の蛍光画像測定を行い、植物の活性に影響を与えると考えられる化学物質を植物に与えた際に現れる植物体の変化の非破壊・非接触的な検出を試みた。使用する化学物質は、植物から抽出される物質で他の植物の成長を阻害するなど生化学的に様々な影響を与える事で知られるアレロパシー物質である⁽¹⁾。杉のまな板や寿司のワサビに殺菌効果があることはアレロパシー物質を利用した例として挙げられる。使用したアレロパシー物質である安息香酸とイソチオシアン酸アリルは植物の生育を阻害することが知られている。このような化学物質を作用させた場合に生じる植物の光応答の変化をとらえ、生体に変化が生じたか否かを植物を非破壊に定量的に計測することが本研究の目的で

ある。アレロパシー物質が植物に与える影響は発芽試験や成長抑制試験など、その検出に長い時間を必要とするため、実用的な植物の活性状態のモニターという意味からも、その高感度かつ高速な検出方法の開発は重要である⁽²⁾⁽³⁾。

本研究では葉緑体蛍光を調べることによってアレロパシー物質の影響の検出を行った。植物のクロロフィルが光合成を行なう際に吸収する光は主に約 430 nm と 680 nm の 2ヶ所に吸光度のピークを持つことが知られている⁽⁴⁾。クロロフィルは幅広い光の波長のエネルギーを取り込み、光合成に使用されなかったエネルギーや光合成過程における電子伝達系で変化したエネルギーの一部は葉の表面から波長約 683 nm の蛍光として放出される。葉緑体に含まれるクロロフィルは波長約 680 nm の光で作用する P680 と波長約 700 nm で作用する P700 の 2 種類が存在する。酸化側で働く P680 では、集光色素によって吸収された光のエネルギーは P680 を励起させ、この酸化還元電位により水が分解され $H^+ \cdot O_2 \cdot$ 電子を発生する反応が起こる。電子はキノン・シトクロム・プラストシアンなどの器官を経て P700 に伝達され、電子は還元側で働く励起された P700・フェレドキシン・鉄 - イオウセンターを介し還元物質を作り出す。これらの過程で生成された酸化・還元物質と CO_2 は後に糖に固定される⁽⁵⁾。

非破壊に検出可能な測定量として、この過程で放出される蛍光を測定することで、光合成における電子伝達系に影

響を与える化学物質の影響を検出できる。つまり、蛍光を測定するということは光合成における電子伝達系で起こる電子の酸化・還元反応を見ていることになり、その時間変化測定は電子伝達系全体の制御系を観測していることに相当する。この様に光合成の反応過程は光合成システムが持つ電子や化学物質の受け渡しに要する時間、つまり時定数と密接な関係があり、時定数の変化をとらえることで、光合成システム全体の内部変化を検出できる可能性がある。植物体の活性変化は生化学システムを通じて光合成システムに影響を与える可能性が高く、葉緑体蛍光によってそのような活性変化を測定できると考えられる⁽⁶⁾。また、生体を測定対象とするためには何らかの定量的な指標が必要となるが、本研究では葉緑体蛍光を用い個体差の影響を受けにくい時定数と周波数応答を計測することで高感度・高速な内部状態変化の検出を可能にした。

2. 実験材料および方法

〈2・1〉 実験装置 図1に実験装置を示す。測定は全て暗箱中で行った。光源はメタルハライドランプ（160 W）を用いた。励起光を導く光ファイバーの末端側のフィルターには青色光のみを通す帯域フィルター（Corning 4-96）、熱線を遮る水フィルターおよびND（neutral density）フィルターを設けた。NDフィルターは励起光に含まれる全ての波長領域の光を減光するフィルターで、ステッピングモーターにより様々な周波数で励起光を遮るシャッターとして外部から操作し、低周波数応答測定のための刺激入力とした。

蛍光画像は中心波長 683 nm の干渉フィルターを通した CCD カメラにより撮影した。蛍光画像はコンピュータ（Apple Macintosh 8500）と内蔵の AD 変換器により 256 階調のグレースケールとしてデジタル化して取り込み、解析して化学物質による蛍光の変化を検出する。取り込むサンプリング周期は蛍光誘導期現象の測定では 10 frame/s、周波数応答の測定では変調励起光 1 周期あたり 20 frame とした。刺激となる励起光の変調周波数は 0.1 Hz～3.3 Hz とした。従って、20 frame/周期は約 2.0 frame/s～66.6 frame/s となるが、使用した実験機器の性能から最大 30 frame/s までの取り込み範囲とした。

〈2・2〉 材料

〈2・2・1〉 植物葉 実験には発芽してまもない背丈 15cm ほどの成長段階のカボチャを使用した。用いた植物葉は葉の展開が終了した成熟段階のものである。カボチャを採用した理由は葉が大きく、測定に向いていること、そして成長が速く実験材料に適していることなどが挙げられる。葉から出される蛍光には個体差があり、後述する蛍光誘導期過程も類似はしているが、その強度や波形は個体により完全な一致は見られない。また、インキュベータ中の一定環境で生育させるが、季節により蛍光の発光量が異なる。

〈2・2・2〉 化学物質 使用した 2 種類のアレロパシー物質と植物への投与は容量 680 L の密閉した暗箱内で一定量を気化させることで行なった。いずれの化学物質も与え

図 1 測定系

Fig. 1. Experimental setup.

図 2 蛍光誘導期現象画像（1 秒おき）

Fig. 2. Images of fluorescence induction (shot per 1 sec).

た濃度では植物葉が数日程度の時間で枯れるといった明らかな影響は及ぼさない。

(i) イソチオシアン酸アリル (C_4H_5NS)

天然カラシ油、黒カラシ油中に配糖体として存在し、アリルカラシ油とも呼ばれる。玉葱の辛味の成分でもあり、強い殺菌作用を持つ。イソチオシアン酸アリルは常温で 4 mg を気化させ、暗箱中で気体を拡散させ、植物に作用させた。

(ii) 安息香酸 ($C_7H_6O_7$)

南洋産のバラム樹の分泌する樹脂に多く含まれ、種々の食品の防腐剤として使用されている。安息香酸は暗箱中で 5 mg を加熱気化させ植物葉に与えた。

〈2・3〉 蛍光誘導期現象の測定 蛍光誘導期現象とは暗所に長時間置かれ、光合成が失活した状態の植物葉に光照射を行った際、光合成反応の回復に伴い時間的に変化しながら蛍光を発する現象である（図2）。光合成の指標として蛍光誘導期現象に伴う植物葉からの蛍光強度の時間変化を解析することで光合成システムに関する情報が得られ、更に蛍光画像を解析することにより葉の状態を空間的に高い分解能で知ることでもある。

〈2・3・1〉 方法 図3(a)に示すように試料となる個体を暗箱中で暗状態に約 1 時間放置した後、励起光を照射して蛍光誘導期現象を起こす。画像は励起光を照射する直前から取り込みはじめ、蛍光の時間変化（誘導期現象）を観測した。測定後は直ちに励起光を消し、再び光合成を

図3 測定手順 (a) 蛍光誘導期 (b) 周波数応答
(小さい三角マークがサンプリング開始点)
Fig. 3. Measurement procedure. (a) fluorescence induction, (b) frequency response (Little triangle marks are start points of each sampling.)

失活させ蛍光誘導期を起こすために約1時間置く。1回目の蛍光誘導期の測定後、アレロパシー物質を与え、その後1時間おきに蛍光誘導期現象の測定を繰り返した。

〈2・3・2〉 蛍光誘導期現象の解析 コンピュータに取り込まれた画像から葉の部分の10×10ピクセルの正方形の領域の蛍光画像を抽出し、その平均値を求める。この操作を連続的に取り込まれた画像について行い、蛍光強度変化の時系列とする。得られた蛍光誘導期現象は最初の数秒に二つの蛍光強度のピークを持ち、化学物質の影響によりその振幅やピークに到達するまでの時間が変化する。この変化の定量的な指標を得るために蛍光強度の振幅ではなく個体差などの影響のない時定数を推定する。蛍光誘導期波形のはじめの数秒以内にある主な時定数 τ_i ($i = 1 \sim 4$)を決定するため、次のモデル式について修正マルカート法によりカーブフィッティングを行なった⁽⁷⁾⁽⁸⁾。

$$f(A, \tau, t) = \sum_{i=1}^4 A_i \exp(-t/\tau_i)$$

この時定数を測定時間を追って解析することにより時定数変化をとらえ、アレロパシー物質の影響を検出した。

〈2・4〉 周波数応答の測定

〈2・4・1〉 方法 測定手順を図3(b)に示す。被測定葉に励起光を照射した状態で1時間暗箱中に放置した。この状態では蛍光誘導期現象による時間変化は無くなり、蛍光強度は一定値となっている。これは昼間の通常の植物の状態に相当する。その後、NDフィルターを取り付けたステッピングモーターを制御して任意の周波数で励起光を変調し、方形波状に時間変化する励起光を与えた。その際に得られる蛍光応答をコンピュータに取り込んだ。1回目の測定後、アレロパシー物質を与え、1時間おきに蛍光応答測定を繰り返す(図3(b))。用いたNDフィルターの光の透過率は70%なので、最大振幅15%、振幅の中心が85%の変調励起光を与えたことになる。なお、周波数応答は0.1 Hz

図4 イソチオシアン酸アリルによる蛍光誘導期の変化
Fig. 4. Changes of fluorescence induction by isothiocyanic-allyl.

図5 安息香酸による蛍光誘導期の変化
Fig. 5. Changes of fluorescence induction by benzoic acid.

から3.33 Hzの10点で測定した。

〈2・4・2〉 周波数応答の解析 一回の測定で得られた蛍光の周波数応答について、後に述べる方法で葉上の同一位置の10×10ピクセルの平均値を抽出し規格化した。この規格化された蛍光強度の周波数応答をプロットし、アレロパシー物質の影響をその遮断周波数によって判断する。

3. 結果

〈3・1〉 蛍光誘導期現象による状態変化検出 蛍光誘導期現象の変化を図4と図5に示す。図の縦軸は実験毎に誘導期の蛍光強度のピーク値がほぼ一定値となるように適宜測定系を設定して得られた相対値である。まず、蛍光誘導期の波形であるが、どちらの化学物質についても波形に変化が現れることがわかる。イソチオシアン酸アリルに対しては振幅が時間を追って小さくなり、同時に最初のピーク(P_1)に達するまでの時間が早くなる。また、安息香酸の方は振幅が徐々に大きくなり P_1 に達するまでの時間が変化しないのに対し、第二のピーク(P_2)については早くなっている。

蛍光強度の振幅は被測定葉の個体差、例えば葉の厚みや表面の汚れの影響、葉の活性度、さらに照射光の強度分布

などに大きな影響を受ける。そのため葉の活性度だけを定量的に測定するという目的には合わない。そこで、誘導期現象の時系列に2.3.2で述べたモデル式でカーブフィッティングを行い、得られた時定数変化を葉の状態変化の定量的指標とする。結果を表1と表2に示す。表よりカーブフィッティングで得られた時定数($\tau_1 \sim \tau_4$)はどちらの化学物質を用いても減少する傾向にあることがわかる。なお、 τ_1 の値は負であるが、これは立ち上がりの時定数であることを意味している。

表 1 イソチオシアン酸アリルによる時定数変化
Table 1. Changes of τ by Isothiocianic-allyl.

	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4
0 h	-24.057	0.410	0.342	9.220
1 h	-25.385	0.332	0.306	8.895
2 h	-15.359	0.349	0.327	5.245

表 2 安息香酸による時定数変化
Table 2. Changes of τ by Benzoic acid.

	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4
0 h	-8.862	0.183	0.156	30.737
1 h	-7.130	0.164	0.122	22.646
2 h	-5.916	0.156	0.116	23.976

〈3・2〉 周波数応答による状態変化検出 蛍光誘導期現象測定による植物の状態検出は、次の理由により高速な測定が出来ない。まず、蛍光誘導期現象を測定するためには最低約1時間の暗状態での放置を要する。また、カーブフィッティングにより時定数を解析する際の収束の判断が必要で即時検出ができない。さらに、画像の時間変化を必要とする場合、大きなコンピュータ資源を要する。これらの問題は植物の生育状態のモニターという点からは大きな欠点といえる。そのため高速な測定を行なうために光合成システムが線形システムとして振る舞うような小振幅の周波数応答により光合成システムの時定数の測定を試みた。

〈3・2・1〉 応答の線形化 図6に実際に観測された変調励起光への応答波形を示す。この図は方形波状励起光を照射した時の蛍光画像から得られた時系列で、励起光と同じく方形波状に変調されている事がわかる。図のように蛍光強度の振幅は落ちているものの波形自体は矩形波となっている。NDフィルタを変更し、変調励起光の振幅を15%よりも増やした場合、波形は方形波状ではなく蛍光誘導期現象にみられる振幅変化が現れはじめる。このように励起光を15%以下で振幅変調をすることで非線型の葉緑体蛍光応答が小振幅刺激により線形化できる。

次に、図6を例として周波数応答を規格化する方法を述べる。蛍光強度の平均値(方形波の中心値)は約29.0(相対値)にある。励起光を振幅15%変調させた場合、取り得る蛍光強度の最大値は34.1であり、振幅は5.1となる。図

図 6 変調励起光への蛍光の応答波形
Fig. 6. Time course of chlorophyll fluorescence to chopped excitation light.

6においては蛍光最大強度は約32.5で振幅は3.1であるから、振幅最大値(5.1)で除して規格化値は0.686となる。

〈3・2・2〉 蛍光強度の規格化 葉緑体蛍光そのものは先述した通り、実験環境や個体の影響を大きく受けるため定量的な指標とはならない。実際、図7(a)に示すようにその強度分布は大きく広がっている。そのため次のような周波数応答による規格化を行った。まず前節で述べたように、取り得る振幅の最大値を1.0として規格化した。線形システムであれば、この規格化により分布は偶然誤差だけによる単純なものとなるはずであるが、図7(b)の例に示す通り、単純な分布とはなっていない。データは示さないがこれは蛍光強度の周波数応答が励起光の照射強度に依存するため、小振幅の励起光変調によりシステムが完全に線形化されているわけではないことを示唆している。図7(b)に示した分布のように、母集団が多く存在する系、あるいは正規分布とならないような系においては、その平均値により集団を代表させることの意味は希薄で、統計的な取り扱いが難しくなる。しかし、葉の凹凸、葉の首振り運動等を考えると照射光強度を葉上で均一にすることは現実的には非常に困難である。

そこで周波数応答を用いて規格化を行った。ここでは周波数応答の最大値を1.0とする規格化を行う。周波数で規格化する前(図7(a)(b))においては蛍光強度のばらつきにより多くのピークが現れているが、ある周波数で規格化することで明瞭なピークを持つ単峰性の分布となり、定量的に解析しやすいデータとなる。このように周波数応答を計測することは時定数を決定するという意味で有効であるだけでなく、規格化することで葉上の各点を定量的に比較できることを意味し、植物の内部状態測定のための定量的データの取得という点でも重要である。

〈3・2・3〉 アレロパシー物質による周波数応答の変化 周波数応答を用いた規格化によって得られるアレロパシー物質応答を図8と図9に示す。図8と図9から、1 Hz~2 Hzの間にある遮断周波数は明らかに時間の経過と共に高

図7 規格化による画素度数分布 (a) 元データ (b) 蛍光強度による規格化 (c) 周波数応答による規格化

Fig. 7. Distribution of pixel intensity distribution by normalization methods. (a) original data, (b) normalized by fluorescence intensity, (c) normalization using frequency response.

い周波数へ移動しており、時定数は減少していることを示している。植物に与えた化学物質は蛍光の反応が速くなる方向に働いているとも言える。一方、0.2 Hz～0.3 Hzの間にある遮断周波数は、アレロパシー物質を作用させることで消失した。この部分の時定数変化は蛍光誘導期現象の時間変化ではゆっくりとした変化部分に相当する。

〈3・3〉 考 察 蛍光誘導期現象と周波数応答のアレロパシー応答の実験より、互いに矛盾しない結果が得られた。表1と表2から読み取れる主な4つの時定数から遮

図8 イソチオシアン酸アリルによる周波数応答変化

Fig. 8. Changes of frequency responses by isothiocyanic-allyl.

図9 安息香酸による周波数応答変化

Fig. 9. Changes of frequency responses by benzoic acid.

断周波数を推定し周波数応答を描いた図10, 11に示す。振幅については図8と図9とは異なる。実際の応答には様々な時定数要素が内在していると考えられるために蛍光強度は単純に比較はできないが、遮断周波数が実験値(図8, 9)とはほぼ一致しているということが周波数応答と蛍光誘導期現象の化学物質による時定数の変化の一致を示している。表1と表2において、1.0 Hz付近に存在する遮断周波数は存在しないものの、4つの時定数を総合することで周波数応答は図8, 9と同じとなる。蛍光誘導期現象と周波数応答では励起光の照射方法等が異なるため、同じ光合成システムを測定しているということは自明ではないが、今回の結果は少なくとも測定した周波数領域では生体システムの同じ部分を測定していることを示唆する。

蛍光誘導期現象については生理学的にも詳細に調べられており、時定数を得るモデルも光合成システムの生理学的研究から得られている。今回の実験結果は、同じ光合成システムを周波数応答により観測可能であることを示している。従って、周波数応答は蛍光誘導期現象を計測し、解析することで化学物質による変化をとらえる方法よりも、高感度かつ高速な計測ができると言える。しかし、蛍光誘導期

図 10 イソチオシアン酸による時定数変化から計算された周波数応答

Fig.10. Synthesized frequency response using time constant changes by isothiocyanic-allyl.

図 11 安息香酸による時定数変化から計算された周波数応答

Fig.11. Synthesized frequency response using time constant changes by Benzoic acid.

現象は限られた周波数範囲の周波数応答等と比べ、より多くの光合成システムに関する情報を有しており、周波数応答よりも植物の内部情報の測定には優れた点もある。従って、2つの測定方法はその目的によって使い分けられるべきであろう。

今回、実験で与えた化学物質への植物の応答はその測定時間内で肉眼により影響を見出すことが困難で、成長抑制を検出するには数日以上時間を要する。このように、本研究における葉緑体蛍光による植物の状態測定は高感度であり、その他、水ストレスの影響なども極めて短時間に検出可能であり⁽⁹⁾、非破壊で高感度な植物の活性度測定となっている。

生体の内部情報を検出する手段として、小振幅応答と周波数応答を用いることはシステム工学としては一般的な手法である。従って、今回の測定方法は生体計測の手段として汎用的に用いることができ、簡易で高速な内部状態の診断方法として応用ができる。しかし、生体内において生じる生理学的な変化について直接的な知見を与えるものではないため、植物生理学などの基礎的な実験事実に基づいた考察によって生理学的な立場に立った有効な内部状態の診断が可能となるであろう。

植物の活性度計測は、環境保護・食料資源の維持などに役立つと考えられる。広域的には衛星を用いて活性度計測・環

境計測が行われているものの、小規模で狭い範囲、例えば農園や街路樹など、さらに個体そのものの状態測定はできない。本研究による活性度測定は、そのようなきめ細かい対応が必要な対象への用途があると考えられる。また、今回の研究は定量的指標が得られること、自動化が可能であること、被測定植物を非破壊で計測できること、高感度であり植物を空間的に測定できるなど多くの優れた特徴が挙げられ、様々な現場での応用も将来は十分に可能であると考えられる。

(平成 13 年 12 月 25 日受付, 同 14 年 4 月 2 日再受付)

文 献

- (1) E. L. Rice (八巻, 安田, 藤井訳): アレロパシー, 学会出版センター, (1991)
- (2) K. Oomasa, K. Shimazaki, I. Aiga, W. Larcher, M. Onoe: Image analysis of chlorophyll fluorescence transient for diagnosing photosynthetic system of attached leaves, *Plant Physiol.*, 84, 748-752 (1987)
- (3) 大政: 植物の生体機能解明のための非破壊画像計測, *化学と生物*, 28, 545-554 (1990)
- (4) 木下, 御橋: 蛍光測定, 学会出版センター, (1983)
- (5) H. Mohr, P. Schopfer (網野, 駒嶺 訳): 植物の生理学, シュプリンガー・フェアラーク東京, (1998)
- (6) W. Tezara, V. J. Mitchell, S. D. Driscoll, D. W. Lawer: Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP, *Nature*, 401, 914-917 (1999)
- (7) U-P. Hansen, B. Bruning, T. Fritsch, C. Moldaenke: Linear analysis applied to the comparative study of the I-D-P phase of chlorophyll fluorescence as induced by actinic PS- light, PS- light and changes in CO₂ concentration, *Photosynthesis Res.*, 28, 119-130 (1991)
- (8) W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery: *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press, (1988)
- (9) 林, 松藤: 植物の光刺激応答による活性度診断, Technical Report of IEICE, MBE95-142, 55-60 (1996)

林 健 司 (正員) 1960 年生. 1984 年 3 月九州大学工学部電子工学科卒業. 1990 年九州大学大学院博士後期課程了. 1990 年同大学助手. 1992 年鹿児島大学助教授. 1998 年九州大学大学院システム情報科学研究科助教授. 工学博士. 主として、バイオセンサー、バイオエレクトロニクス、電子機能性材料物性の研究に従事。

秋 吉 秀 信 (非会員) 1975 年生. 1998 年九州工業大学電気工学科卒業. 同年九州大学システム情報科学研究科入学. 現在、富士通株式会社所属。