

LED誘起蛍光法による植物葉とミドリムシの光合成活性の測定

著者	増田 健二, 竹本 裕之
雑誌名	技術報告
巻	28
ページ	33-38
発行年	2023-03-01
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00029524

LED 誘起蛍光法による植物葉とミドリムシの光合成活性の測定

増田健二¹・竹本裕之²

(¹静岡大学技術部教育研究支援系・²静岡大学技術部機器分析部門)

1. はじめに

光合成色素は光合成に働き、光合成の細胞内器官である葉緑体に存在する。葉緑体は、その中にチラコイド膜を持っており、クロロフィルやカロテノイドの多くは、タンパク質と結合してこのチラコイド膜の中に存在する。クロロフィルは炭酸同化を行い、でんぷん類をつくり栄養として蓄える。カロテノイドは吸収した光エネルギーをクロロフィルに渡す光捕集機能を持ち、過剰な光による傷害を防ぐ光阻害防御機能であるキサントフィルサイクルをにない、過剰な光エネルギーを熱に変換して放散している。

図 1 に、光合成とクロロフィル蛍光の模式図を示す。光エネルギーを吸収して誘起状態となったクロロフィル a 色素が元の基底状態に移るときに、その差に相当するエネルギーを放出する。このうち、一部が蛍光という形で放出されたものをクロロフィル a (以降 Ch1a) 蛍光という^[1]。Ch1a 蛍光は、光合成活性に関係し、古くから光合成反応系の解析に利用されてきた^[2]。

これまでの Ch1a 蛍光の解析手法は、レーザー誘起蛍光 (Laser-Induced Fluorescence : LIF) 法^{[3]-[6]}により、植物葉の Ch1a 蛍光スペクトルを測定しているものである。緑葉ではクロロフィルによる 685nm (F685) と 740nm (F740) に蛍光のピークが見られる。Ch1a (P680) を誘起させる光の波長は 680nm 未満であり、光合成に利用されない余剰エネルギーのほとんどは、カロテノイドで熱に変換されて放散され、ごく一部が蛍光(F685)という形で放出される。740nm にピークがある Ch1a 蛍光は、光合成活性状態でチラコイド膜内に存在する光化学系 I (PS I) のクロロフィルから発せられる^[7]。

従来には、紫外・可視レーザー光を用いたレーザー誘起蛍光法があり、植物葉のクロロフィル蛍光スペクトルを測定している。図 2 のように、レーザー光を植物葉に照射するとその熱のため、植物の光合成反応は衰退し、F740 蛍光ピーク値は小さくなっていく、このため正確な光合成活性の測定ができなかった。本研究では植物にダメージを与えることなく、光合成活性を測定できる LED 誘起蛍光法を開発した^[8]。本技術では、ほとんど熱がでない (赤外線カット) LED を照射するため、植物葉の光合成活性を衰退させることなく、クロロフィル含量の定量的な測定ができ、精度が高い光合成活性の診断が可能となった。また今回、この技術をミドリムシの光合成活性の測定に応用した。

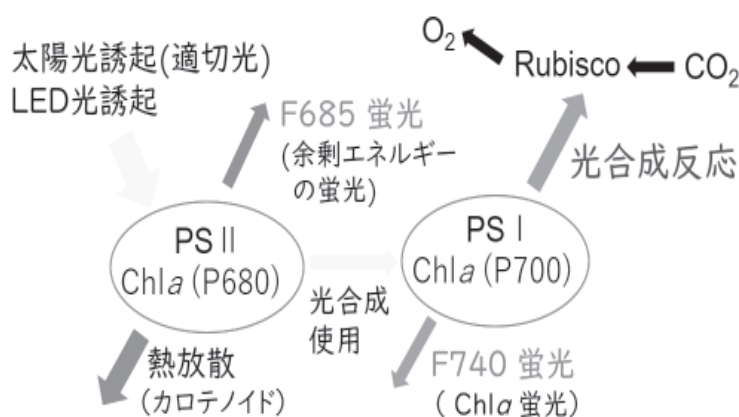


図 1 光合成とクロロフィル a 蛍光の模式図

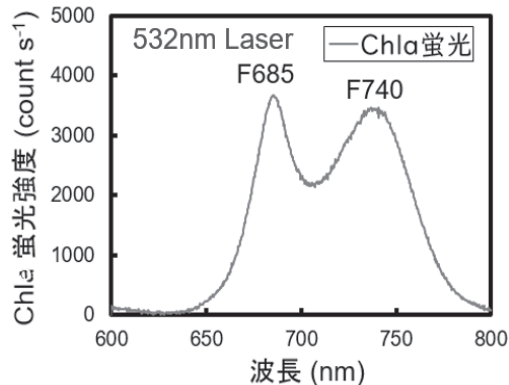


図 2 レーザー誘起蛍光法 (従来手法)

2. ポトス葉（緑葉・白葉）のChl a 蛍光

植物葉として、緑色の葉に白色の斑入りのポトス葉を用いた。共焦点レーザー顕微鏡（Leica TCS SP8）では、倍率 63 倍において表面から 100 μm 程度の深さまで測定ができる。本装置を用いて 740nm にピークのある Chl a の蛍光画像を取得した。図 3(a) の緑葉では深さ 30 μm 程度からの棚状組織に米粒状の Chl a 蛍光(F740)が密集して見られた。表皮細胞部分には、厚さ 5 μm 程度の高濃度のフラボノイドが存在し、有害な紫外線を吸収する働きをしている。フラボノイドは紫外線で誘起すると、緑色の蛍光を発する。図 3(b) の白葉では、米粒状の Chl a 蛍光は点在しており、フラボノイドもより薄くなり楕円縞模様となっている^[6]。

続いて、冷却式 CCD 分光器（Ocean Optics QE65Pro : 波長範囲 500–870nm, 波長分解能 0.1nm, 感度 16bit）を用いて分光スペクトル計測を行った。図 3(c) に示すように、LED 光(破線)をシアンフィルタ(620~740nm カット)とホットミラー(675nm~カット)を透過させて、620nm より長波長側をカットした光(青一点鎖線)で誘起すると、685nm と 740nm にピークのある緑葉の Chl a 蛍光スペクトル(緑線)が検出できる。白葉(赤点線)では、740nm のピークはほとんどなくなり、685nm のピークも小さくなっている。

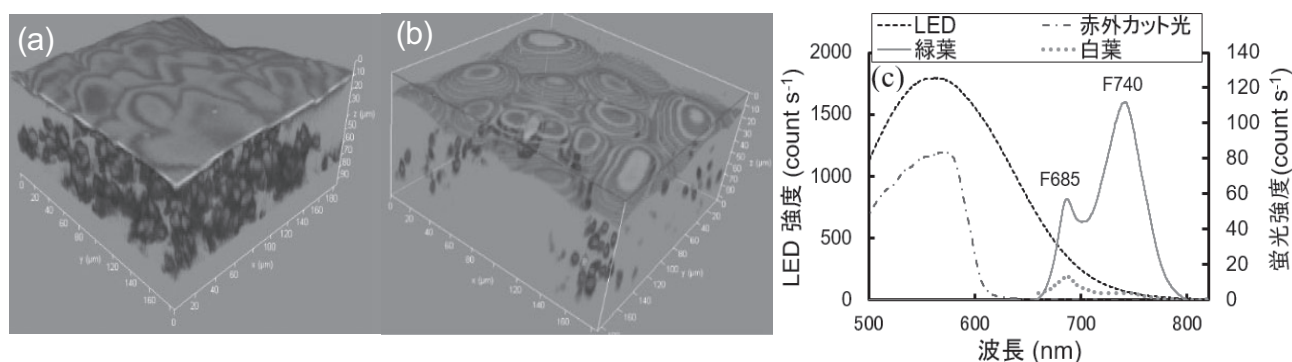


図 3 蛍光スペクトルとクロロフィル含量 蛍光顕微鏡画像 (a) 緑葉 (b) 白葉 (c) LED 光誘起 Chl a 蛍光

3. 葉色別の SPAD 値とクロロフィル a 蛍光スペクトルの比較

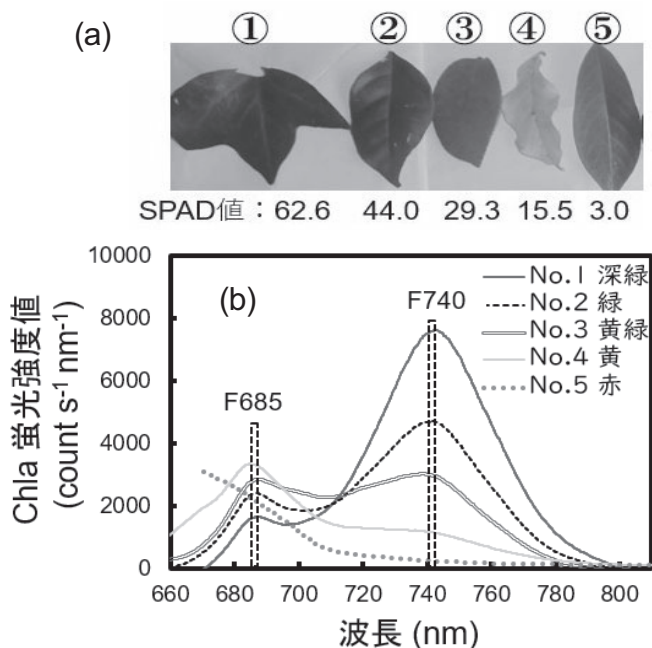


図 4 葉色と SPAD 値とクロロフィル a 蛍光の比較

(a) サンプル葉 (b) Chl a 蛍光スペクトル

植物葉の光合成反応の活性化の診断のために考案されたのが葉緑素計 (SPAD: Soil and Plant Analyzer Development) である。クロロフィルが吸収する赤色 (650nm) と吸収のない近赤外 (940nm) の LED 光を交互に照射すると、光が葉を透過して受光素子に導かれて光電変換される。これら 2 つの光学濃度を測定し、差を元に SPAD 値を求めている (光学濃度差方式)。SPAD 値によりクロロフィル濃度の推定も可能となっている^{[9]-[12]}。SPAD 値はクロロフィル含量と相関があり、作物の窒素吸収が多いと、葉中色素のうち光合成に必要なクロロフィル含量が高まり、葉色が濃くなる。水稻では葉身の窒素含有量が高まるにつれてクロロフィル含量が直線的に増加する。水稻の窒素栄養状態の測定では、葉色より精度が高い診断が可能である^[13]。

図 4(a)のように、①深緑(SPAD 値 : 62.6) > ②緑(44.0) > ③黄緑(29.3) > ④黄(15.5) > ⑤赤(3.0)の順で SPAD 値が大きくなった。

図 3(c)の青一点鎖線のような 620nm より長波長側をカットした LED 光で誘起すると 685nm と 740nm にピークのある Ch1a 蛍光が検出できる (図 4(b))。光化学系 II (PS II)に含まれる Ch1a によって P680 に集められた光エネルギーは、光合成に使用されない場合、余剰エネルギーの蛍光(F685)として PS II から放出される。740nm にピークがある Ch1a 蛍光(F740)は、光合成反応によって PS I の Ch1a から発せられる。LED により光合成有効放射強度 (Photosynthetically Active Radiation, PAR) が $300\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度の適切な強度光を照射すると、光合成反応が起こる。①深緑葉は光合成が活性化し、F740 蛍光強度値が最も大きくなり、光合成に使われないで放出される F685 蛍光の強度値が最も小さくなっている。反対に、⑤黄葉は、F740 蛍光強度値は小さくなり、F685 の余剰エネルギーの蛍光強度値が大きくなっている。

4. SPAD 値とクロロフィル a 蛍光ピーク、植生指数の比較

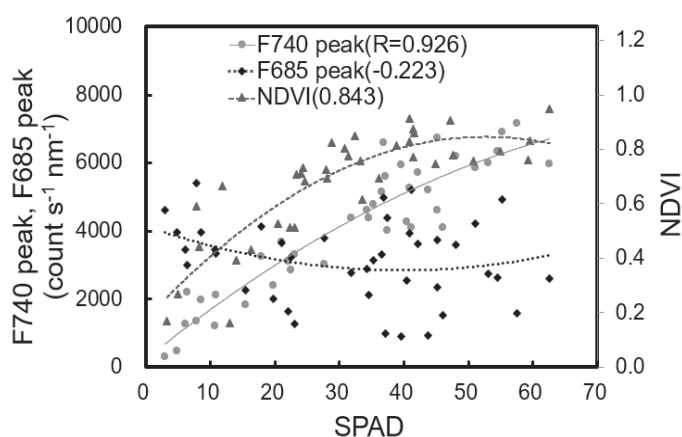


図 5 SPAD 値と Ch1a 蛍光ピーク値、NDVI の比較

正規化植生指数(Normalized Difference Vegetation Index)

$$\text{NDVI} = \frac{R_{\text{NIR}} - R_{\text{Red}}}{R_{\text{NIR}} + R_{\text{Red}}} \quad \text{NIR : 850nm, Red : 680nm}$$

SPAD 値が同じくらいの値に偏らないように 40 枚の葉を選び、SPAD 値と Ch1a 蛍光を測定した。図 5 は、横軸に SPAD 値、主軸に F740 (739.5-740.4nm) と F685 の蛍光ピーク値、2 軸に正規化植生指数 (NDVI) を示したグラフである。SPAD 値と F740 peak (●) の相関係数が $R=0.926$ と高い相関を示した。SPAD 値と NDVI (▲) もよい相関 ($R=0.843$) を示す。このことから、光合成活性は Ch1a の相対含量に由来し、PS I から発する F740 蛍光強度値から判断が可能であることが分かる。また、光合成に使用されずに PS II から放出される F685peak (◆) には SPAD 値との間に相関関係が見られない。

5. ミドリムシの反射・吸収スペクトル

ミドリムシ (ユーグレナ) は、葉緑体内の Ch1b に二酸化炭素を取り込んで酸素に変換する炭酸同化作用を行い、多糖類のパラミロンを生成して栄養として蓄える。藻類には、ミドリムシのように光合成を行うものがよく知られている。例えば緑藻には、Ch1b とカルテノイドが存在する^[14]。

LED 光を用いたスペクトル測定には、CCD 分光器 (Ocean Optics USB2000: 波長範囲 180-880nm, 波長分解能 0.4nm, 感度 14bit) を使用した。図 6(a)のように、ミドリムシ(赤線)から白板(点線)の反射光を差分したのが青線である。差分強度から緑の反射と青と赤の吸収が確認できる。また 685nm にピークのある Ch1b 蛍光を発する。図 6(b)では、ミドリムシの培養液 (乾燥重量ベース 0.957 mg/ml) を 100%として、20%ごとに希釈した場合の測定結果を示している。図 6(a)の差分強度(青線)を白板の反射強度(点線)で割ったのが図 6(b)の青線(培養液 100%)であり、黄緑(F570)の反射率と青(F440)・赤(F650)の吸収率を示している。図 6(c)では、ミドリムシの濃度とクロロフィルの存在を示す緑の反射率、青・赤の吸収率がいずれも 0.98 以上の高い相関を示した。クロロフィルの吸収による影響が小さい緑の反射率は、ミドリムシの濃度に伴う増殖の診断に適している。赤の吸収率(相関係数 0.991)からは、ミドリムシの相対的なクロロフィル含量の推定が可能である。青の吸収率も同様に高い相関を示した(相関係数 0.990)が、赤の吸収よりも 4 倍

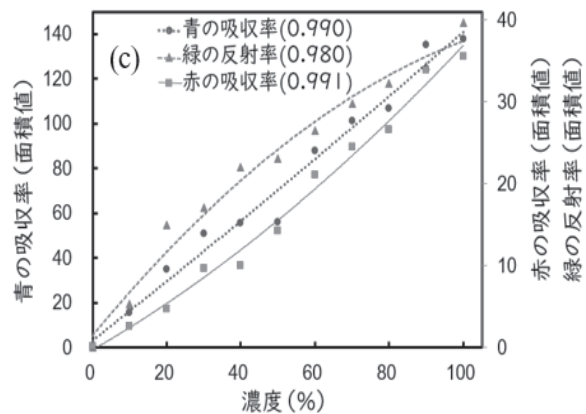
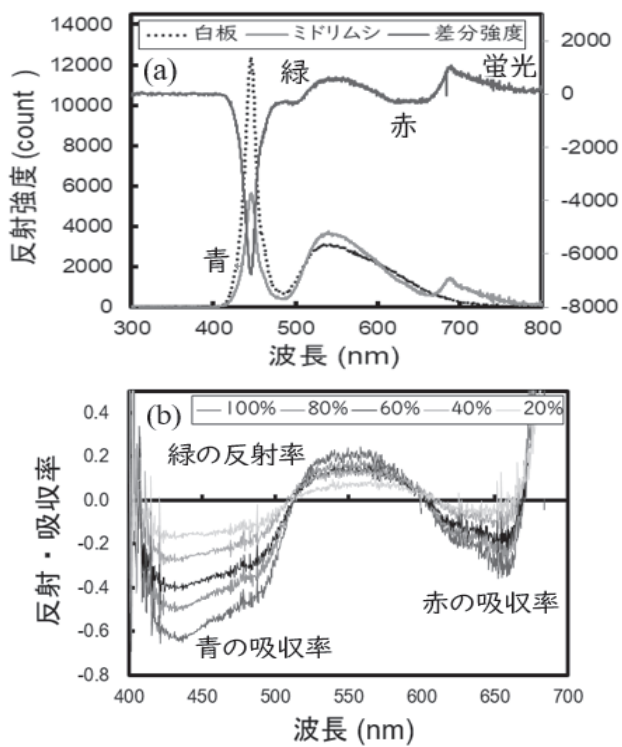


図6 ミドリムシの反射・吸収スペクトル
 (a) 反射強度スペクトル (b) 反射・吸収率
 スペクトル (c) 反射・吸収率と濃度の関係

程度大きな値となっている。これは、クロロフィルの吸収が赤の吸収より青の吸収が大きいこととカルテノイドの吸収が合わさったためである。

6. 植物葉とミドリムシの蛍光スペクトルの比較

実験室（暗室）においてLED光源を利用し、CCD分光器（Ocean Optics QE65Pro：波長範囲 500–870nm, 波長分解能 0.1nm, 感度 16bit）を用いて、Chl 蛍光スペクトル測定を行った。

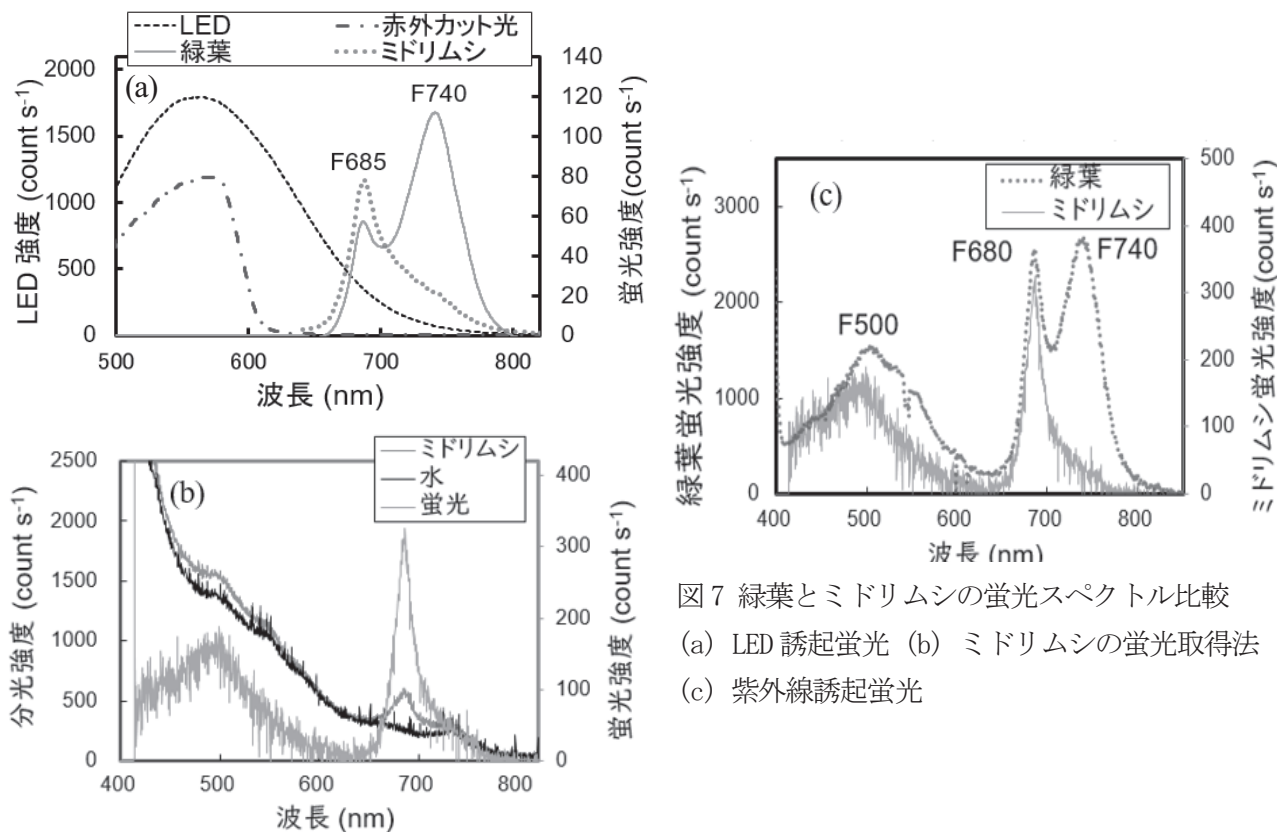


図7 緑葉とミドリムシの蛍光スペクトル比較
 (a) LED 誘起蛍光 (b) ミドリムシの蛍光取得法
 (c) 紫外線誘起蛍光

図7(a)に示すように、LED光(破線)をシアンフィルタ(620~740nmカット)とホットミラー(675nm~カット)を透過させて、620nmより長波長側をカットした光(青一点鎖線)で誘起すると、685nmと740nmにピークのある緑葉のCh1a蛍光スペクトル(緑線)が検出できた。同様に、620nmより長波長側をカットした光(青一点鎖線)で誘起すると、ミドリムシ(赤点線)の685nmにCh1b蛍光のピークが検出できた。

UV(350-400nm)ライトを用いたスペクトル測定には、CCD分光器(Ocean Optics USB2000)を使用した。図7(b)にUVライト(Alonefire XHP99)を誘起光源に用いたミドリムシの蛍光検出方法を示す。ホールスライドガラスに80 μ lのミドリムシの培養液を入れ、UVライト光を照射して、ミドリムシの反射光(赤線)を取得した。ミドリムシ(赤線)から水(黒線)の反射光を差分したのが蛍光強度スペクトル(緑線)である。

図7(c)に、植物葉とミドリムシの蛍光スペクトルの比較を示す。図6(b)のように、カルテノイドは400nm~500nmの光を吸収してF500蛍光を発する。また、ミドリムシのCh1bは、600nm~670nmの波長の光を吸収して、光合成反応に伴うF685蛍光を発する。緑葉とミドリムシにおけるカルテノイドのF500蛍光とクロロフィルのF685蛍光は類似している。ミドリムシは、緑葉のような光化学系I(PS I)からのF740蛍光は見られなかった。

図8(a)に、ミドリムシの培養液(乾燥重量ベース 3.82mg/ml)を100%として、20%ごとに希釈して測定したCh1b蛍光強度スペクトルを示す。

図8(b)は、横軸に濃度、主軸にF685(684.5-685.4nm)蛍光強度値、2軸に赤の吸収率を取ったグラフである。ミドリムシの濃度の上昇に伴って、赤の吸収率(吸収エネルギー量)が増加した。同様に蛍光強度値も同じ割合で増加した。このことから、ミドリムシの光合成活性は、Ch1bが吸収した光エネルギー量に由来し、蛍光強度値からの判断が可能であることが分かる。

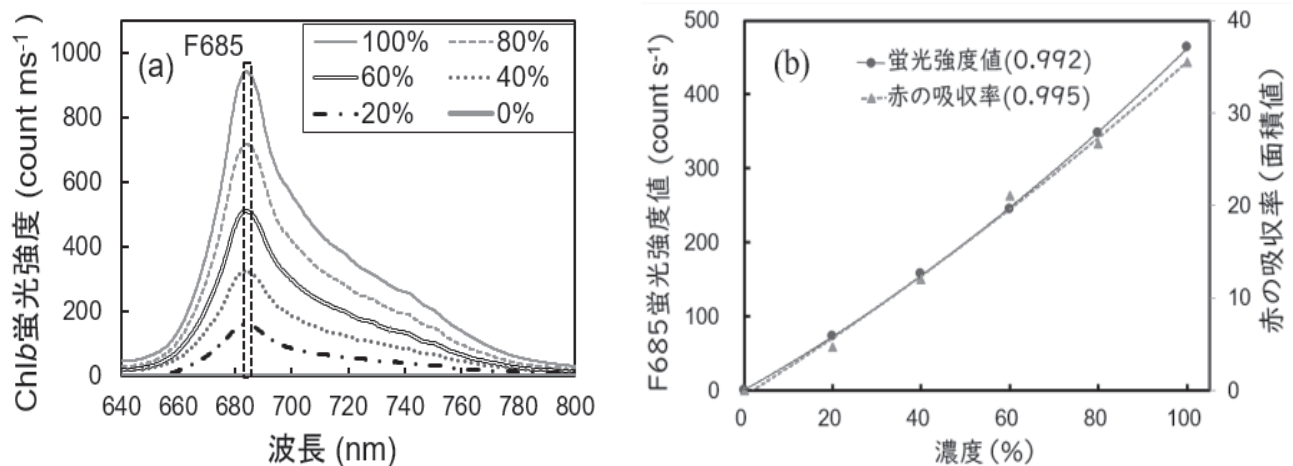


図8 ミドリムシの蛍光強度値 (a) 蛍光強度スペクトル (b) 蛍光強度値の濃度依存性

7. おわりに

クロロフィルやカロテノイドに吸収された光エネルギーは、光化学系II(PS II)のCh1a(P680)に集められる。光合成に使用しない過剰な誘起エネルギーのほとんどは、P680からカロテノイドに送られ、熱として散散される。また、ごく一部がPS IIから余剰エネルギーの蛍光(F685)として放出される。電子は、プラストキノンプールとシトクロムbf複合体を経て、光化学系I(PS I)に伝達される。PS Iにおいて、光合成反応により水分子から電子が引き抜かれ(水分解反応)酸素が発生する。さらに、ATP合成、還元物質の生成などが起こる。吸収された誘起エネルギーは、Ch1aが基底状態に戻る際に、一部は蛍光として放出される。適切光条件下(PARが200~600 μ molm⁻²s⁻¹程度)では、PS Iから放出されるF740蛍光強度値は、太陽光誘起強度の上昇に伴って大きくなり、Ch1aが吸収した光エネルギー量に比例する。

ミドリムシは、単細胞の微細藻類である。光合成反応を行い、細胞内貯蔵物質としてミドリムシ固有の多糖類のパラミロンを生成する。また、光合成によって二酸化炭素を利用して成長するときに、油脂を作り出す。これはバイオ燃料の原料として使用できる。これらの生成物質は、ミドリムシの培養条件（温度、培地成分、光の強度等）によっても大きく影響を受ける。ミドリムシは、光合成を活性化させることによって増殖し、パラミロンの生成を増大させている。本研究の方法は、非破壊・非接触でミドリムシの光合成活性を測定でき、緑の反射率による増殖の評価やCh1b蛍光強度を用いた光合成活性の診断を行う技術としてのシステム開発への応用が期待できる。

謝辞

本研究を実施するにあたりミドリムシを提供して頂きました、静岡市立高校の曲田澄子先生、科学探究科2022年度課題研究ミドリムシ班の生徒の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

1. G.H.Krause & E.Weis. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis. The Basics. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant.Mol.Biol, 42 313-349 (1991)
2. Govindjee. 63 years since Kautsky-Chlorophyll-*a* Fluorescence. Aust. J. Plant Physiol., 22 131-160 (1995)
3. E. W. Chappelle *et al* . Newcomb:Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. Appl. Opt., 23 134-138 (1984)
4. H. K. Lichtenthaler *et al*. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. J. Plant Physiol., 148 599-612 (1996)
5. Takahashi kunio *et al*. Study of a Method of Measuring the Transverse Distribution of Illuminating Laser Light and Laser-Induced Chlorophyll Fluorescence in Plant Leaves Using A Micro-Fluorescence Imaging (MFI) System. Journal of Light & Visual Environment,22 (1) 53-62 (1998)
6. 増田健二 (2014)「植物葉の蛍光リモートセンシング計測システムの開発とストレス障害」静岡大学技術報告 19 25-30 (URL, <http://doi.org/10.14945/00008037>)
7. Zoran G. Cerovic *et al*. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. Agronomie. EDP Science., 19 (7)
8. 増田健二 (2022)「植物群落の太陽光誘起蛍光による光合成測定」静岡大学技術報告 27 31-34 (URL, <http://doi.org/10.14945/00028636>)
9. Campbell R. J. *et al*. Growing conditions alter the relationship between SPAD-501 values and apple leaf chlorophyll. HortScience, 25 330-331 (1990)
10. Sandoval V. M. *et al*. Ammonium concentration in solution affects chlorophyll meter readings in tomato leaves. J. Plant Nutr., 22(11) 1717-1729, (1999)
11. Rodriguez I. R. *et al*. Using a chlorophyll meter to determine the chlorophyll concentration, nitrogen concentration, and visual quality of St. Augustinegrass. HortScience, 35 751-754 (2000)
12. Netto A. T. *et al*. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. Sci. Hortic, 104 199-209 (2005)
13. 伊藤秀和 (2014)「農作物の光応用による診断」照明学会誌 98-9 516-520
14. 日本光合成学会「クロロフィルとカルテノイドの吸収スペクトル」光合成事典