

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06015

研究課題名（和文）高感度フォトン検出技術を用いた植物の環境日変動応答の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the response of plants to environmental diurnal variation using the high-sensitivity photon detection technique

研究代表者

本橋 令子（Motohashi, Reiko）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90332296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：遅延蛍光は、励起光停止後に電子伝達経路の逆反応によりP680が再励起されて放出される微弱で長い秒単位の蛍光であり、サイクリック電子伝達経路を含む電子伝達系からカルビン・ベンソン回路といった光合成の広範囲を反映する。光合成には多くの栄養元素が関与していることから、遅延蛍光が植物の栄養状態を反映する可能性がある。各栄養元素を欠乏させた培地を用いてシロイヌナズナを水耕栽培した結果、N、P、K、Fe、Mg、Mn、Cu欠乏において光条件での遅延蛍光減衰曲線が通常条件と比較して変化した。しかし、Zn、S欠乏においては明確な変化が現れなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、植物工場や藻類の大量培養など光合成生物の産業利用が急速に進展しているなかで、光合成のモニタリングが重要であり、新規の光合成活性測定装置への期待は高い。本研究は、フォトン検出レベルの高感度光検出器による遅延蛍光の測定を栽培植物に適用し、光合成の生理状態を評価する。温度や光環境の植物の生理的な影響だけでなく、栄養欠乏から、乾燥ストレスの影響を遅延蛍光の減衰曲線の変化で検出でき、スマート農業や精密農業の作物生育管理手段として大きく貢献する。また、モデル植物の遺伝子変異株を用いて生理学的な基盤知見が蓄積され、遅延蛍光減衰曲線の成分が光合成のどの部分を指標としているか評価も可能である。

研究成果の概要（英文）：Delayed luminescence (DL) originates from the repopulation of excited states of chlorophyll from the stored energy after charge separation. DL emission is composed of several components. The faster decaying components have been characterized as they provide information about the fate of energy absorbed by recombination of P680 with QA and QB. The slow components of DL originate in back reaction in the photosynthetic chain, Plastocyanin, and Ferredoxin after QB. We screened DL mutants in more than 2000 knockout lines that predicted chloroplast proteins. As a result, DL could monitor a wide range of photosynthetic pathway including cyclic electron transport and Calvin cycle.

Considering essential elements of nutrition are involved in photosynthesis, it is possible that DL is affected by a nutritional deficiency. DL was able to detect physiological changes in *Arabidopsis thaliana* under N, P, K, Fe, Mg, Mn, and Cu deficiencies, but not under S and Zn deficiencies.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：遅延蛍光 光合成 シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モデル植物であるシロイヌナズナはほとんどの遺伝子の破壊株が整備され、ゲノム情報も集積し、栽培も簡単で、植物体サイズも小さく、一度に複数の実験が可能である。シロイヌナズナの葉緑体には、3500 以上のタンパク質が存在しているが、研究代表者らは葉緑体への局在が予測されたタンパク質の遺伝子破壊株を整備し、約 2500 ラインを保有している。研究代表者らはパルス変調クロロフィル蛍光測定装置(PAM)を用いて、葉緑体タンパク質の破壊株の中から光合成(光化学系 II 反応の量子収率)に関与するタンパク質の探索を行ない、多くの変異体を単離できたが、その多くがすでに論文として公表されているものであった。

そこで、新しい光合成の評価法として、遅延蛍光に注目した。遅延蛍光は分のオーダーで起こる比較的微弱な蛍光であり、反応中心で光エネルギーにより電荷分離反応が起こった後に、分離したエネルギーの高い電荷(光化学系の酸化側に生じた正電荷と還元側に生じた負電荷)が再結合することでクロロフィル P680 が再励起状態になり、それが基底状態に落ちる際に放出される蛍光である。つまり、遅延蛍光を効率的に検出し、そのキネティクスを解析することで、即時蛍光解析では得られていなかった酸素発生系を中心とした光化学系自身や光合成反応全体に関する情報を得ることが可能になり、新たな制御機構の発見にもつながることが期待される。

研究代表者らは 2500 の葉緑体タンパク質遺伝子破壊株の遅延蛍光を測定し、野生型と異なる遅延蛍光減衰波形を示す葉緑体タンパク質遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、25 変異株を得ることができた。変異体の一部は野生型よりも生育が遅く、植物体のサイズが小さかったが、多くは野生型と表現型の違いは観察されず、表現型に表れない植物の生理的な変化を遅延蛍光によって検出できることが示された。現在まで、高等植物の遅延蛍光には違いがあるが、その違いの解釈が困難であったが、25 の遺伝子破壊株の原因遺伝子と遅延蛍光減衰波形の類似性から、遅延蛍光の異常を遺伝子に結び付けることが可能であることもわかった。変異体の遅延蛍光減衰波形は大きく 4 タイプのグループに分けられ、各グループの原因遺伝子の機能の共通性が確認でき、最も大きなグループの原因遺伝子の機能は、NDH 複合体(NADH dehydrogenase-like complex)や NDH 構成するタンパク質 RNA の編集やフェレドキシン(Fd)を含む循環的電子伝達経路に関するものであった。また、得られた変異体はカルビン・ベンソン回路のタンパク質も含み、広範囲の光合成経路をモニター出来ることが解った。遅延蛍光測定により得られた光合成表現型と遺伝子との関連付け可能であることを示すことが出来た。

2. 研究の目的

シロイヌナズナを用いて「遅延蛍光による光合成評価」の基礎的な研究知見を収集し、葉菜類の基本的な生育上の課題が検出できるかどうかを見極める。基本的な葉菜類の生育・品質上の課題として栄養欠乏があげられる。遅延蛍光計測技術で、作物の見た目に影響が現れる前に栄養欠乏が検出できるかを見極め、育種や栽培管理への技術転用の可能性を知ることが目的とする。

3. 研究の方法

養水分吸収の不良は作物の生育量を低下させ、最終的には収量や品質も低下するため、作物の栄養状態を把握する技術は重要となる。また、施肥管理も重要で、基肥として土壤に施した肥料分の動態を把握し、適切なタイミングで追肥するためにも作物の栄養状態を把握する必要が

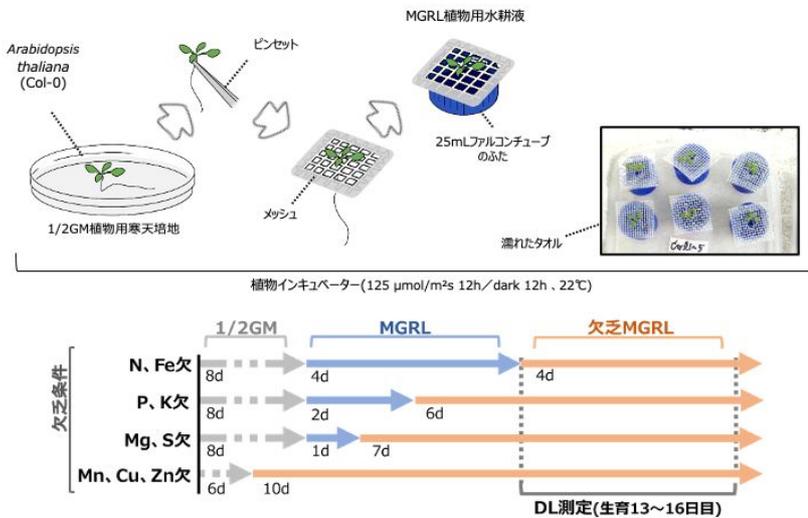


図1. 遅延蛍光による環境ストレス(栄養欠乏)のモニタリング
 上:シロイヌナズナの栽培方法、下:栄養欠乏処理条件
 Fe欠乏における完全にクロロシスを呈した植物体は、1/2GM培地で8日間生育させた後、Fe欠MGRL液に移して生育16日目に測定した。

ある。そして、このような栄養状態の制御は作物の品質制御技術としても利用でき、葉菜類では過剰な窒素施肥はえぐみや苦みの原因となるため、その品質改善の点からも適切な施肥管理が重要となる。窒素施肥管理は難しく、微量な差が表現型(葉色)では検出

できないが、シロイヌナズナの幼苗を窒素欠乏状態に移し、3日後に遅延蛍光減衰波形の違いを検出することができた。そこで、正常な栄養状態で栽培したシロイヌナズナと異なる遅延蛍光減衰波形を示す栄養欠乏条件を探索し、本技術で検出可能な栄養欠乏を見極め、栄養欠乏診断方法の確立を目標とする。

方法は、8日間通常の1/2MS培地で栽培し、水耕培地MGRL液(Fujiwara et al., 1992)に移し、幼苗をN、P、K、Ca、Mg、S、Fe、B欠乏培地に移植し、経時的に遅延蛍光データを取得し、MGRL液で栽培したシロイヌナズナの遅延蛍光データと比較し、栄養欠乏の影響を遅延蛍光で検出できるか調べた。すべての実験は、1回に5個体測定し、著しく異なるデータを除き、3回実験を行うことにより再現性の確認を行った(図1)。

4. 研究成果

シロイヌナズナの幼苗をN欠乏培地に移植1日目から葉面積がCtrl(コントロール)と比較して有意に減少していた(図2b)。N欠乏培地移植4日目における葉面積はCtrlの約0.37倍であり、顕著な生育阻害を示した。また、移植3日目以降において葉柄を中心にアントシアニンの蓄積がみられた(図2a)。

光条件下におけるN欠乏植物の遅延蛍光減衰波形は、Ctrlと比較して40秒付近の蛍光強度が大きく増加するような波形を示した(図2c上)。40秒付近の0.1秒蛍光強度比は、Ctrlと比較して生育が進むにつれ有意に増加した(図2c下)。遮光条件下における減衰波形でも同様に、40秒付近の蛍光強度が大きく増加するような波形を示した(図2d上)。遮光条件下における40秒付近の0.1秒蛍光強度比でも、Ctrlと比較して有意に増加していた(図2d下)。

N欠乏条件下における光条件及び遮光条件で遅延蛍光減衰波形は、共通してCtrl(コントロール)と比較して40秒付近の蛍光強度が有意に増加した。このことから、両条件において同じ生理的变化を遅延蛍光が反映したと考えることができる。N欠乏条件下では、光合成タンパク質のLHC、PS、PS、シトクロム b_6/f 複合体、ATPシンターゼ、Rubiscoの含有量が減少するため、炭酸固定及び電子伝達系の低下を引き起こすと考えられた(Mu and Chen, 2021)。また、カルビン・ベンソン回路のSBPaseやFBA2が欠損した遺伝子破壊株では、10秒付近から蛍光が急激に減少するような減衰波形であった。このことから、減衰波形の10秒以降はカルビン・ベンソン回路の影響を大きく受けると推測できる。以上より、N欠乏条件下における遅延蛍光減衰波

形は、10秒以降の蛍光が増加していることから、特にカルビン・ベンソン回路の影響を示していると考えられた。N欠乏によるRubiscoタンパク質の減少がカルビン・ベンソン回路の停滞を招いたと思われる。

P欠乏条件において植物体は、移植3日目から葉面積がCtrl(コントロール)と比較して有意に減少していた(図3b)。P欠乏培地への移植6日目における葉面積はCtrlの約0.53倍であり、顕著な生育阻害を示した。また、移植4日目以降においてアントシアニンの蓄積が顕著にみられた(図3a)。

光条件下における遅延蛍光減衰波形は、Ctrlと比較して15秒付近の蛍光強度が大きく減少した(図3c上)。P欠乏の15秒付近の0.1秒蛍光強度比は、Ctrlと比較して有意に減少していた(図3c下)。遮光条件においては、Ctrlと比較して急激に蛍光強度が減少した(図3d上)。50秒付近における0.1秒蛍光強度比は、Ctrlと比較して有意に減少していた(図3d下)。

P欠乏条件における光条件での遅延蛍光減衰波形は、サイクリック電子伝達のNDH依存経路が欠失したことによるグループ1の減衰波形と類似していた。このことから、P欠乏条件における遅延蛍光減衰波形の変化は、サイクリック電子伝達のNDH依存経路の活性が減少したことを示していると推測できた。

ハウレンソウの葉において、ストロマのPiの枯渇によりATPシンターゼの活性が低下し、ATPシンターゼの駆動に必要であるプロトン駆動力が解消されず増加したという報告がある(Takizawa et al., 2008)。P欠乏条件においても同様に過剰なプロトン駆動力を形成している可能性が高い。サイクリック電子伝達経路(NDH依存経路及びPGR5/PGRL1依存経路)は、過剰な還元力を得ることなくプロトン駆動力を増加させるため(Wang et al., 2015)、P欠乏条件下においてサイクリック電子伝達のNDH依存経路が抑制されたと推測できる。

遮光条件における減衰波形の変化は、光条件での減衰波形が異なるCu欠乏において同様な変化を示し、光条件での減衰波形が類似したK欠乏においては異なる変化を示した。このことから、P欠乏の遮光条件における減衰波形の変化は、NDH依存経路活性の減少とは別の因子を反映している可能性が高いと考えられる。

栄養欠乏時のシロイヌナズナの生理的变化を遅延蛍光により検出することができたが、S、Zn欠乏についてはできなかった。また、N、P、K、Mg、Mn、Cu欠乏の植物体では致命的な物理的变化が現れる前に、遅延蛍光にて生理的变化を検出することができた。光条件下では遅延蛍光減衰波形が安定しており、N、P、K、Fe、Mg、Mn、Cu欠乏条件下における遅延蛍光の変化を明確に反映していた。減衰波形の変化を示す生理的变化は、栄養欠乏条件ごとに以下の4つに大別される。N欠乏条件：カルビン・ベンソン回路の乱れ P、K欠乏条件：チラコイド膜間のK⁺、Pi濃度が減少したことによるNDH依存経路活性の減少 Cu、Mg欠乏条件：Cu/ZnSODの減少、過剰な還元力に対応するためのサイクリック電子伝達経路活性化 Mg、Mn、Fe欠乏条件：PSの減少が考えられた。遮光条件下における減衰波形は安定していなかったが、N、P、K、Mg、Cu欠乏条件における遅延蛍光の変化を明確に示していた。N欠乏条件においては、光条件下と同様の生理的变化を示すと考えられたが、それ以外の欠乏条件については考察が困難であった。遮光条件における減衰波形の変化は、P、K欠乏条件では光条件下にて類似した減衰波形を示し、遮光条件では異なっていた。また逆に、Cu、P欠乏条件では遮光条件においても類似した減衰波形を示したが、光条件下では異なっていた。つまり、遮光条件における遅延蛍光減衰波形は、サイクリック電子伝達のNDH経路をほとんど反映しておらず、光条件下とは別の生理的变化を反映している可能性があった。また、K、S、Mg欠乏条件では光条件よりも遮光条件において有意に減衰波形が変化した。これらのことから、光条件と遮光条件は別の因子

を反映している可能性があり、栄養欠乏診断においては両方の条件による測定が必要であることが分かった。

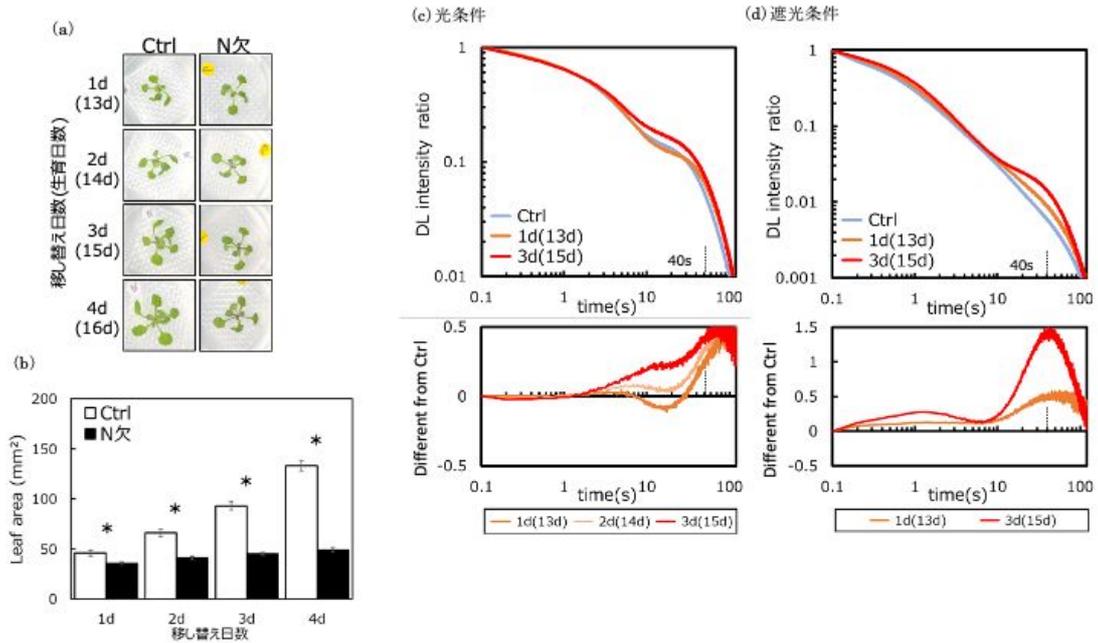


図2. N欠乏条件下による遅延蛍光の変化(n=5×3)

(a) 移し替え日数(生育日数)の経過による植物体の写真

(b) 移し替え日数における葉面積(mm²)の比較(*: p<0.01、エラーバーは標準誤差を示す)

(c) 上: 光条件下における遅延蛍光減衰波形 下: 光条件下におけるCtrlとの減衰波形の差

(d) 上: 遮光条件下における遅延蛍光減衰波形 下: 遮光条件下におけるCtrlとの減衰波形の差

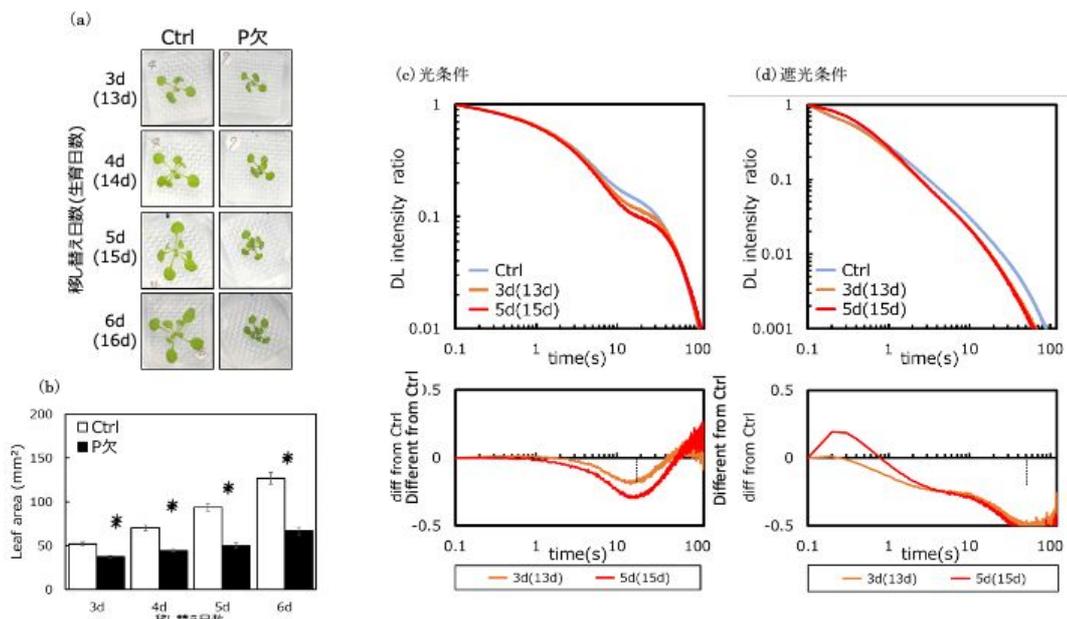


図3. P欠乏条件下による遅延蛍光の変化(n=5×3)

(a) 移し替え日数(生育日数)の経過による植物体の写真

(b) 移し替え日数における葉面積(mm²)の比較(*: p<0.01、エラーバーは標準誤差を示す)

(c) 上: 光条件下における遅延蛍光減衰波形 下: 光条件下におけるCtrlとの減衰波形の差

(d) 上: 遮光条件下における遅延蛍光減衰波形 下: 遮光条件下におけるCtrlとの減衰波形の差

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 矢作蒼生、深沢知加子、勝又政和、本橋令子 |
| 2. 発表標題 シロイヌナズナでの遅延蛍光による植物の栄養欠乏診断 |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 矢作蒼生、勝又政和、本橋令子 |
| 2. 発表標題 遅延蛍光測定によるシロイヌナズナのサイクリック電子伝達評価 |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 So Yahagi, Chikako Fukazawa, Masakazu Katsumata, Reiko Motohashi |
| 2. 発表標題 Detection of nutrition deficiency using Delayed Luminescence in Arabidopsis |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 本橋令子 |
| 2. 発表標題 フォトン検出を用いた光合成機能センシングは可能か？ |
| 3. 学会等名 日本光合成学会 光合成測定装置ワークショップ |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|