

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～ 2012

課題番号：22310026

研究課題名（和文）光干渉法による極短時間植物ナノ動態計測に基づく光化学オキシダントの作物影響評価法

研究課題名（英文）Evaluation of photochemical oxidant stress of crops based on ultra-short term growth dynamics using novel optical interferometric technique

研究代表者

門野 博史 (KADONO HIROFUMI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：70204518

研究成果の概要（和文）：超高感度な統計干渉法を用いて秒オーダーの極短時間における植物の葉などの成長挙動をサブナノメータの分解能で計測できるシステムを用いて、環境汚染物質として主にオゾンに焦点を絞り、イネなどの作物に対するオゾンストレスを早期にかつ定量的に評価することを目的とした実証研究を行った。その結果、従来法に比較して数時間の短時間のオゾン曝露によるストレスを高感度にモニタ可能であり、また品種間のオゾン耐性の差を評価することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：Highly sensitive optical interferometer named Statistical Interferometric Technique (SIT) was developed to measure ultra-short term growth dynamics of plant leaves in temporal scale of second. Paying a special attention to crops under exposure of photochemical oxidant, the technique was applied to monitor ozone stress of crops, e.g., rice plants. It was proved that the technique was valid to monitor the stress of crops under ozone exposure much faster than the conventional methods. In addition, it was possible to distinguish the tolerances for ozone between the cultivars of crop.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2012年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：光干渉法、極短時間植物成長、光化学オキシダント、オゾンストレス、レーザスペックル、植物生長ゆらぎ、光合成速度

1. 研究開始当初の背景

光化学オキシダントは、濃度が近年においても上昇し続けている大気汚染物質である。この光化学オキシダントの90%以上を

占めるオゾンは、一般的に、比較的低濃度であってもオゾンの長期慢性曝露は農作物の成長抑制や収量低下をもたらす。高濃度オゾンが記録される場合には葉への可視的障害

など市場価値が低下する。したがって、簡便かつ早期に大気汚染の影響をモニタリング可能な手法の開発が求められている。

申請者らはこれまでに、レーザー光のランダムな散乱場の統計的性質を基準として利用する超高感度な干渉計測法[4]を提案した。本手法を植物計測に応用すると植物の挙動を秒オーダーの極短時間の時間スケールでかつ成長変化をサブナノメートル (10^{-10} m) の精度で計測することが出来る。これまでの研究により、オゾンストレス下での植物の成長挙動を秒オーダーの実時間で計測することが可能であることが示され、新しい環境診断技術への可能性が示された[2,3]。本手法に基づく植物成長計測装置の試作機も製作されており、フィールドにおける実証研究が課題となっている。以下に、この方法を植物の成長計測に応用することにより発見された現象について要約する。

(1) 干渉法による植物のナノメートルゆらぎ現象

光化学オキシダントの主要成分であるオゾンの暴露(0.12ppm)の影響を調べた。オゾン暴露以前は植物の葉の伸び率が激しく変動していることである。申請者はこの現象が多くの実験により他の植物でも広く観察される普遍的な現象であることを確認した。すなわち、マクロには一様に成長しているかに見える植物は、秒スケールの極短時間で成長を観察するとナノメートルスケールのゆらぎを伴いながら成長している。(以下、「ナノメートルゆらぎ」と略記)。

(2) ナノメートルゆらぎ現象の発見とその環境応答

オゾン暴露後は非常に短時間(分オーダー)で揺らぎが減衰し、暴露を中止してもその状態が長時間にわたって持続していることである。申請者はこのほかにも光環境と水環

境を変化させて同様な実験を繰り返し行った結果、成長のナノメートルゆらぎが、環境変化に敏感に、しかも短時間に応答することが分かった。しかしながら、ナノメートルゆらぎの生理学的なメカニズムは依然不明であり、また、環境汚染物質との定量的な関係も明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が提案している統計干渉法に基づいて、秒オーダーの極短時間における植物の葉などの成長挙動をサブナノメートルの分解能で連続的に *in situ* 計測できるシステムを用いて、植物の環境に対する極短時間成長動態を知ることにより、新しい植物の環境ストレスモニタリング技術を確立することである。本技術を作物植物に適用することにより、早期に生育や収量等への影響の予測を行う手法を開発する。

本研究では具体的な環境汚染物質として、主にオゾンに焦点を絞り、その他の環境要因として温度・日照条件下で、イネなどの作物を含む植物のオゾンストレスを早期にかつ定量的に評価することを目的とした実証研究を行う。本手法を確立するためには、ナノメートルゆらぎの生理学的なメカニズムの解明を行う必要がある。

本研究のサブテーマを以下に要約する。

- ① 植物成長の極短時間形態応答の計測システムの構築
- ② 植物の極短時間成長動態と環境ストレスおよび長期的生育状態予測の指標としての有効性の検証
- ③ ナノメートルゆらぎの生理学的起源の解明

3. 研究の方法

(1) フィールドで使用可能な計測装置の開発
すなわち、可搬性、計測能力・計算能力の向

上, 簡便な操作性を持つ装置を作成する. また, この装置を用いた植物の形態応答の解析手法の開発をおこなう.

(2) 統計干渉植物成長計測装置を用いてオゾンストレス下にある植物(作物)の成長挙動を観測し, オゾンストレス評価法としての有用性を定量的に評価する.

(3) 成長のナノメータゆらぎを含む極短時間の動態特性, 起源の解明に関する基礎的な研究をおこなう. 統計干渉法による計測は, 単に植物表面の形態変化を読み取っているにすぎず, 計測結果について他の方法による結果との整合性を吟味することは重要である. 従来法である光合成速度, 蒸散速度測定装置を用いて, 植物の基本的な生命活動である光合成活動との相関, 生体内の物質移動との相関関係を明らかにすることにより, ナノメータゆらぎを含む極短時間成長動態の環境ストレスの指標としての有効性の検証をおこなう.

4. 研究成果

(1) 短時間成長の基礎特性 — 自発的揺らぎ

実験ではイネ(コシヒカリ)の苗を日照条件(白色光源)に対する極短時間の成長応答を計測した. イネの葉をホルダーで固定し, 統計干渉法により葉の先端から1~2cmの位置で計測した. 白色光源を12時間ごとに照明・無照明を切り替えながら72時間の測定をおこなった結果をFig.1に示す. Fig.1から照明を点灯した直後に成長が小さくなり, 消灯した直後に成長が大きくなるという現象を見ることができる.

Fig.1からある期間の10秒間を拡大した成長挙動をFig.2に示す. 本手法を用いると植物の成長挙動を秒単位かつナノメートルオーダーで観察可能であることがわかる. 我々の手法は全く新しい時間スケールでの植物の成長動態を解明する手段となる.

Fig.2のグラフの傾きは葉の2点間の相対伸縮速度を表す. Fig.3に5.5秒間の伸縮から得られた葉の成長速度の変化を72時間に渡り計測した結果を示す. これからわかるように秒スケールでの植物の成長は決して一定ではなく絶えず揺らいでいることが分かる. これは, 我々の手法により初めて明らかになった現象である. さらに興味深いことは, この揺らぎ現象は環境条件に敏感に反応して変化することである. 成長速度の標準偏差は照明条件に対して, 0.729, 1.303, 0.929, 1.504, 0.854, 2.033 nm/secmmと変化しており, 照明点灯時成長揺らぎは増大していることがわかる.

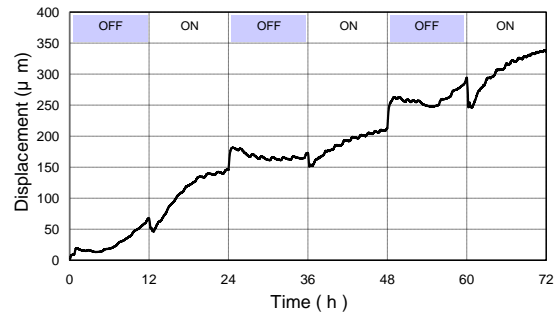


Fig. 1 コシヒカリの成長測定結果

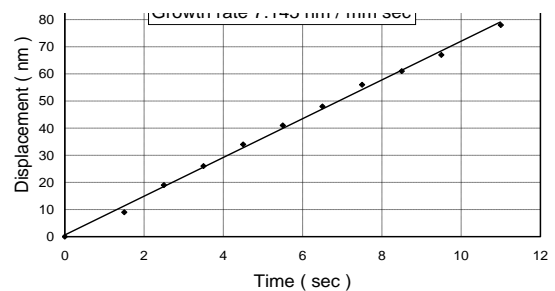


Fig. 2 コシヒカリの成長測定結果

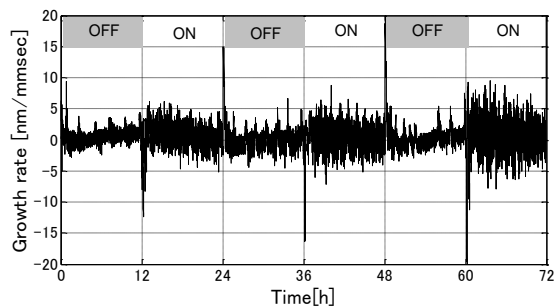


Fig. 3 コシヒカリの相対成長速度

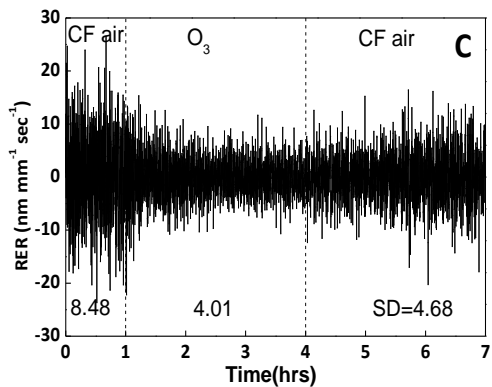


Fig. 4 コシヒカリのオゾン(120ppb)曝露に対するNIFの変化

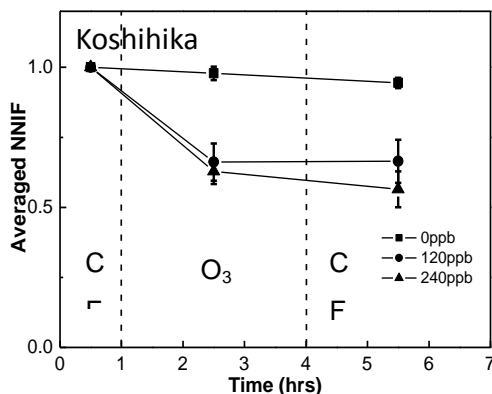


Fig. 5 コシヒカリのオゾン曝露に対するNIFの標準偏差の低下

この揺らぎ現象を我々はナノメータスケールの自発的揺らぎ(NIF: Nanometric Intrinsic Fluctuation)と呼ぶことにする。ここまで“成長”という言葉を用いてきたがこの“成長の揺らぎ”現象は従来の意味の成長とは全く異なる現象である。例えば、葉は成熟すると従来の意味の成長は止まるがこの揺らぎ現象は依然として存在している。従ってこの現象はいわゆる“成長”とは生理的起源の全く異なる現象だと考えられる。

(2)慢性的オゾンストレスと従来法との比較
次に、大気汚染物質の植物への影響を観測した。ここでは、大気汚染物質として唯一改善の兆しのない光化学オキシダントの主要物質であるオゾンを作物植物であるハツカダイコンとダイズに曝露する実験を行った。オゾン濃度は0ppb、通常の大気、通常の大気のオゾン濃度を1.5に高めた大気を用いて1

ヶ月間曝露実験を行った。その結果、NIFの標準偏差(SD)の値はいずれも有意な減少を計測した。一方従来法である光合成速度、気孔開口率も同様な減少傾向を観測した。従って植物のオゾンストレスモニタリングに関して本提案手法と、従来法との高い相関関係が確認された。

(3)短時間オゾンストレス下のNIF特性

次に、短時間のオゾン曝露に対する影響を調べた。対象植物としてはイネの品種であるコシヒカリとフサオトメを用いた。これらの品種は収量に基づく実験から前者はオゾンに対して比較的感受性が高く後者は比較的耐性があることが確かめられている。オゾン濃度は0ppb(コントロール)、120ppb、240ppbで行った。これらの濃度はそれぞれ光化学オキシダント注意報および警報が発令される基準濃度である。

Fig. 4にコシヒカリに対して濃度120ppbのオゾン曝露を3時間曝露した際のNIFの変化を示す。図からわかるように0-1時間の通常の状態ではNIFの標準偏差(SD=8.48nm/secmm)が曝露開始後急速に低下し(1-4時間)4.01nm/secmmとなり、曝露が終了すると4.68 nm/secmmへと多少の回復が見られる(4-7時間)。このようにNIFの大きさはオゾンストレスに対して大きく変化することがわかる。従ってNIFの標準偏差は植物の活性度を反映しており、オゾンストレスの尺度になる可能性を示唆している。

次に、同様な実験を6つの異なる株に対して繰り返し、NIFの標準偏差の変化を、オゾン曝露前、曝露中、曝露後で計測した結果をFig. 5に示す。図からわかるように曝露中、曝露後において曝露前に比べておよそ標準偏差が40%程度低下していることがわかる。また、オゾン濃度が高いほど低下率が大きいことがわかる。フサオトメに対するオゾン暴

露実験結果を比較すると、フサオトメでは NIF の低下率はコシヒカリに比べておよそ半分程度であることがわかった。このことは収量に基づいたオゾン耐性の評価結果と一致している。

植物のオゾン影響の従来の評価法として、光合成速度、気孔伝導度、クロロフィル蛍光法も同時に適用した。これら従来法では、この実験のように濃度 120ppb で3時間という短時間のオゾン暴露では有意な変化は検出できなかった。

(4) NIF の起源

NIF の起源に関して細胞レベルおよび植物体スケールでの水の輸送の関与を調べるための実験をおこなった。細胞膜上にはアクアポリンと呼ばれる細胞内外への水の輸送に関与しているタンパク質が存在する。HgCl₂ 溶液を用いてこの機能を阻害する実験をおこなった。加えて、アブシン酸投与により気孔を閉鎖する実験を行い気孔を通して外部への水の移動を阻害する実験をおこなった。いずれの実験に置いても NIF の大きな低下が認められた。従って、NIF の現象には細胞レベルから植物体レベルでの水の輸送が関与していることが示された。Fig. 6 にニラに対して 0.2mM の濃度の HgCl₂ を投与した際の NIF の変化を示す。NIF はおよそ半分に低下していることが分かる。

(5) まとめ

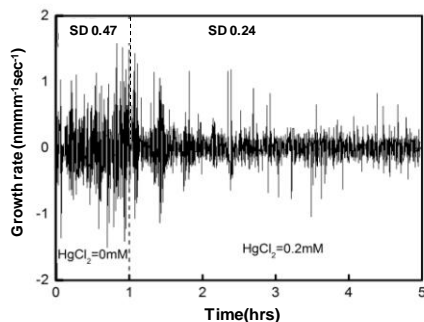


Fig.6 HgCl₂ による NIF の低下

本研究では統計干渉法という超高感度な干渉法を開発して環境影響下の植物の極短時間の成長動態を計測した。統計干渉法はレーザスペckルパターンの統計的特性を基準とする原理的に新しい干渉法であり、生物試料のような散乱表面を持つ物体に適用可能であることが利点である。本手法により、植物の成長速度が極短時間で大きく揺らいでいる現象(NIF)が発見された。NIF の生理化学的起源はこれからの研究を待たなければならないが、これまでの研究から細胞内外での水の移動が関係するのではないかと考えている。この揺らぎ現象が植物の活性状態を反映しており短時間でオゾンなどのストレスに対して敏感に変化することを確認した。本手法は、従来法に比べて非常に敏感な環境ストレス評価法となりうることが示唆された。また、品種改良などの研究や最適な栽培条件を植物毎に確立することにより植物工場などへの新しいツールとして期待ができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 12 件)

① 門野博史, “統計干渉法を用いた植物の極短時間成長ゆらぎの起源の解明” 第 60 回応用物理学会春期学術講演会, 神奈川工科大学, 29p-A2-2 27~30March(2013).

② L.S. Thilakarathne, H. Kadono, and T. Yonekura, “Investigation of ultra short term growth behaviour of two crops soybean and radish under ozone stress using Statistical Interferometry”, Combio 2012, Adelaide Convention Centre, Adelaide, South Australia, , POS-WED-064, 23-27 September (2012).

③ B.L.S. Thilakarathne, U.M. Rajagopalan, H. Kadono, and T. Yonekura, “Ultra short term growth behaviour of two crops Soybean and Hatsukadaikon under ozone stress using Statistical Interferometry- a comparison with

conventional ozone assessment measures”, Optics with life Sciences, Genova, 4-6 July. pp 97(2012).

④ B.L.S Thilakarathne, H. Kadono, and T. Yonekura, “Investigation of short term growth rate fluctuation of two Japanese rice cultivars under the ozone stress using Statistical Interferometry”, 日本生物環境工学会 2011 年北海道大会, 北海道大学・札幌, 6-8 September (2011).

⑤ 野口秀昭、門野博史、米倉哲志, “植物の極短時間成長ゆらぎの成長阻害剤に対する応答特性,” 日本生物環境工学会 2011 年北海道大会, 北海道大学・札幌, 6-8 September (2011).

⑥ L.S Thilakarathne, H. Kadono, and T. Yonekura, “Investigation of ultra short term growth behavior of rice plants (*Oryza sativa* L.) in vegetative growth period under the ozone stress using Statistical Interferometry”, 8 th International Symposium on Plant Functioning in a Changing Global Polluted Environment, Groningen, Netherland, 5-9 June (2011).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門野 博史 (KADONO HIROFUMI)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：70204518

(2) 研究分担者

三輪 誠 (MIWA MAKOTO)
埼玉県環境科学国際センター・自然環境担当・研究員
研究者番号：30375589
米倉 哲志 (YOMEKURA TETSUSHI)
埼玉県環境科学国際センター・自然環境担当・研究員
研究者番号：40425658