

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：37112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550109

研究課題名(和文)植物体表面における物質輸送のビーム偏向・蛍光・吸光度リアルタイム計測法の開発

研究課題名(英文)Development of a Novel Real-time Measurement Method for Monitoring Materials Movements across a Plant Surface by Probe Beam Deflection/fluorescence/absorbance

研究代表者

呉 行正(wu, xing-zheng)

福岡工業大学・工学部・教授

研究者番号：70234961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はビーム偏向法をO₂の蛍光消光法、さらに吸光度法とを結合することにより、植物体表面の物質輸送の新たなリアルタイム計測法の開発を研究した。具体的には、植物体表面近傍にレーザープローブ光を通過し、その偏向信号を測定することにより、生理的物質輸送の動的過程をモニタリングし、また、ルテニウム錯体のO₂による蛍光消光変化を測定することにより、溶存酸素の時間変化をモニタリングし、さらに、吸光度変化を測定することにより、レーザー光波長で光吸収を示す物質のモニタリングを行った。アナカリスなどの水生植物を実試料として用い、光合成過程と呼吸過程の違いを明らかにし、本法の有用性を実証した。

研究成果の概要(英文)：Probe beam deflection method was combined to dissolved oxygen-quenching of fluorescence and absorbance methods to develop a novel real-time detection method for monitoring materials movements across a plant surface. A laser probe beam was passed by a vicinity of a plant, and its deflection was monitored to obtain information on materials movements across the plant surface. Also, fluorescence of Ru-complex, which is quenched by dissolved oxygen, is also monitored to obtain the change of dissolved oxygen concentration. Furthermore, absorbance of the laser probe beam was monitored to get information on concentration change of chemical species which absorb the probe beam. *Egeria densa* and *Ceratophyllum demersum* L were used as model samples, and results of monitoring of their photo-synthetic and aspiration process showed that the novel detection could used for monitoring of materials movement across the plant surface, dissolved oxygen change near the plant surface.

研究分野：分析化学

キーワード：計測 植物 吸光度 蛍光 偏向 溶存酸素

1. 研究開始当初の背景

大気中の CO₂ 濃度が年々増加しており、人類は地球温暖化問題に直面している。CO₂ 固定に最も現実的な方法は植物の光合成の利用だと考えられる。一方、植物の CO₂ 固定能力は種によって大きく異なるが、なぜそのような差異があるのか、その詳細は未だ解明されていない事が多い。もし、植物体表面における生理的物質(例えば CO₂、O₂ 等)の輸送過程をリアルタイムに計測できれば、植物種による CO₂ 固定能力の差異の解明に大いに役立つに違いない。

申請者は今までプローブ光の偏向を利用した化学反応の新規計測法を開発し、更に、この手法を単一細胞の計測、植物体表面における生理的物質の輸送のリアルタイム計測に応用してきた。

植物体の生理活動(例えば、光合成や呼吸)において、植物体の表面から生理的物質の出入り、及び植物体内の生体反応の反応熱により、植物体表面近傍で濃度勾配と温度勾配が存在する。この濃度及び温度勾配により、屈折率勾配を誘起し、さらに植物体表面近傍を通すレーザープローブ光の偏向を生じる。そこで、この偏向をモニタリング・解析すれば、植物体表面における生理的物質の輸送変化に関する知見が得られると考えられる。この発想に基づいて、予備実験で水生植物ヒメガマの葉近傍の偏向信号を測定したところ、成育期のヒメガマでは偏向信号が大きく、老齢期のヒメガマでは偏向信号が小さかった。これは生育期のヒメガマの方が生理的物質の出入りが大きく変化していることを意味する。

一方、偏向信号は表面近傍での屈折率勾配の時間変化によるもので、表面近傍で濃度変化を示すすべての物質の情報を反映するものの、具体的にどの物質がどの程度の出入りを行っているかを同定することができない。つまり、偏向信号の測定結果から、出入りする物質の定性的な情報を得ることができない。もう一方、植物体表面で出入りしている O₂ は蛍光を消光したりするので、蛍光消光法で定量できることが知られている。また、植物から溶出される有機物に可視紫外領域の光を吸収するものもあるので、場合によっては吸光度法で溶出物質の定量もできると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではビーム偏向法を O₂ の蛍光消光法、さらに吸光度法とを結合することにより、植物体表面の物質輸送の新たなリアルタイム計測法を開発しようとしている。具体的には、植物体表面近傍の偏向信号を測定することにより、生理的物質輸送の動的過程をモニタリングし、更に、O₂ による蛍光消光と吸光度変化を同時に測定することにより、O₂ 輸送情報、光吸収を示す有機物の植物からの溶出情報を選択的に計測できる測定系を開発しよ

うとしている。また、本法を植物体の光合成過程、酸性雨による被害過程への計測にも応用しようとしている。

3. 研究の方法

3.1 植物体表面における生理的物質の輸送のビーム偏向・蛍光・吸光度測定系の作製
測定系はバイオレット半導体レーザー(波長 405nm)、ブルー(波長 445nm)をプローブ光及び蛍光・吸光度測定用の光源として使用した。そのレーザー光をまずダイクロミラーを通し、レンズによりセル中の植物表面近傍に絞った。セルから出てくるプローブ光はもう一つのレンズにより、二分割フォトダイオードの中心に絞った。植物体表面近傍の蛍光はダイクロミラーにより反射され、ピンホール/フィルター/PMTにより測定された。植物体入れのセルは X-Y-Z ステージに乗せ、植物体の任意部位の表面近傍にプローブ光を通すように調整した。セルに植物の培養液(Hoagland 培養液等)を入れた。

蛍光強度は PMT により測定された。二分割フォトダイオードの光強度 I_1 と I_2 を $(I_1 - I_2) / (I_1 + I_2)$ の形で処理し、偏向信号とした。また、 $-\log(I_1 + I_2) / (I_0)$ は植物体表面近傍の吸光度として使用した(I_0 はレーザー光強度である)。蛍光強度、吸光度、偏向信号はマルチチャンネルデジタルマルチメーターにより検出し、パソコンで保存される。

3.2 試料と手順

植物試料には水草アナカリス(*Egeria densa*)とカボンバ(*Ceratophyllum demersum* L.)を用いた。また、稲の発芽過程の計測には稲を用いた。

数センチ長さに切った水草試料あるいは稲一粒を培養皿に入れ、ガラス板で動かないように覆った。次に、水道水あるいは、HYPONeX 培養液を 1000 倍希釈した溶液を培養皿に約 20mL 入れ、プローブ光を植物近傍に通過するように調整し、偏向信号をモニタリングした。

酸性溶液あるいは酸性雨の影響の実験では、一定 pH の塩酸水溶液あるいは福岡で収集した雨水を培養皿に入れた。また、同時に吸光度法で検討する場合、分光光度法で植物を一定時間浸した酸性溶液の吸収スペクトルを測定した。

蛍光測定の実験では、ルテニウム錯体溶液 Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) chloride (10^{-6} M) を使用した。

4. 研究成果

4.1 ビーム偏向・蛍光・吸光度測定系の試作、改良、及び有用性の検証:

測定系は当初ブルーレーザーダイオード(波長 445nm)をプローブ光及び蛍光・吸光度測定用の光源として使用したが、実験過程でその光源の強度変動が大きかったので、より安定なバイオレット半導体レーザー(波長 405nm)に変更し、更に、光路でハーフミラ

ー/フォトダイオードを設置し、その光源の変動を補正した。尚、このように改良した系は安定性が向上したものの、蛍光を測定する際、蛍光強度の温度による影響の補正ができないこと、溶存酸素の絶対濃度の測定ができない問題があることを明らかにした。

そこで、測定系にさらに温度も測定する溶存酸素センサーを導入し、それで溶存酸素の絶対濃度の補正を行った。ルテニウム錯体溶液 Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) chloride (10^{-6} M) 及び窒素通気、亜硫酸ナトリウムの添加により除酸素した錯体溶液を用い、溶存酸素の濃度を測定したところ、本法は偏向信号、吸光度信号をモニタリングと同時に、蛍光消光法による溶存酸素の濃度変化もモニタリングできることを明らかにした。

4.2 水生植物の光合成・呼吸過程における酸素輸送過程のモニタリング

ルテニウム錯体の蛍光強度をモニタリングすることにより、溶存酸素の濃度変化を計測した。水草アナカリスなどの光合成過程で溶存酸素の濃度が時間とともに増加し、暗室の呼吸過程で時間とともに減少したことを実測した。また、水草の近傍の溶存酸素の濃度変化はバルク溶液中の変化と異なることも分かった。その同時に、偏向信号も、吸光度信号もモニタリングした。

4.3 稲の発芽過程の計測への応用

本法で稲の発芽過程で、稲近傍の偏向信号、溶存酸素に起因する蛍光強度の変化もモニタリングした。

4.4 ビーム偏向法と吸光度法との併用による酸性雨の植物への影響

本法で塩酸酸性溶液、酸性雨の水草への影響を検討した。酸性溶液あるいは酸性雨により、水草から何らかの物質が溶出され、その溶出過程は植物近傍の偏向信号のモニタリング結果より、分光光度法で測定した溶液の吸光度の結果の方が一定時間遅れていることが分かった。即ち、植物近傍で偏向信号をモニタリングする方がより迅速で正確な溶出過程を計測できることを意味する。また、実際本法が酸性雨の植物への影響の研究に使えることを明らかにした。

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 5 件)

1. Comparative Studies on Effects of Acid Solutions on Aquatic Plants by Beam Deflection and Absorbance Spectroscopy Methods, Xing-Zheng Wu, Liangjiao Nie, and Tomomi Inoue, *Anal. Sci.*, **31**, in-press (2015). (査読あり)
2. Real-time Noninvasive Monitoring of UV Light-induced Cell Death by the Deflection

of a Probe Beam, Xing-Zheng Wu, Tomohisa Kato, and Satoshi Terada, *Anal. Sci.*, **30**, 1023-1025 (2014). (査読あり), DOI: 10.2116/analsci.30.1023.

3. Effect of acid solutions on plants studied by the optical beam deflection method, Liangjiao Nie, Mitsutoshi Kuboda, Tomomi Inoue, Xing-Zheng Wu, *J. of Environ. Sci.*, **25** (Suppl.), S93-S96 (2013). (査読あり), DOI: 10.1016/S1001-0742(14)60634-3.
4. Direct Sampling in Air of Capillary Electrophoresis, Saaya Minematsu, Xing-Zheng WU, *Anal. Sci.*, **29**, 373-375, (2013). (査読あり), DOI: 10.2116/analsci.29.373
5. Determination of vanillin in vanilla perfumes and air by capillary electrophoresis, Saaya Minematsu, Guang-Shan Xuan, Xing-Zheng Wu, *J. of Environ. Sci.*, **25** (Suppl.), S8-S14 (2013). (査読あり), DOI: 10.1016/S1001-0742(14)60617-3.

[学会発表](計 7 件)

1. Comparative Studies of Effects of Acid Rains on Aquatic Plants by Beam Deflection and Absorbance Spectroscopy Methods, Liangjiao Nie, Tomomi Inoue, Xing-Zheng Wu, Pittcon 2015, March, 2015 (New Orleans, USA).
2. Effects of Acid Rains on Aquatic Plants Studied by Beam Deflection and Absorbance Spectroscopy Methods, Liangjiao Nie, Tomomi Inoue, Xing-Zheng Wu, China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry (keynote), 75-76, August, 2014 (瀋陽、中国)
3. Deflection method of a probe beam and its application in Hazard identification on a single cell level (invited), Xing-Zheng Wu, Progress on Post-genome Technologies, proceedings of the 9th international forum on post-genome technologies (IFPT'9), 14-15, November, 2013 (シンセン、中国)
4. Optical beam deflection approach for studying effects of acid rain on plants, Liangjiao Nie, Tomomi Inoue, Xing-Zheng Wu, Pittcon 2013, March, 2013. (Philadelphia, USA)
5. A Novel Optical Detection System Making Using of Fluorescence and Beam Deflection for Monitoring Materials Movements across a Plant Surface, 伍 曉燕、井上智美、呉 行正, 日本分析化学会第 63 年会講演プログラム集, Y1001(講演番号), 2014.9, 広島大学 (広島市).
6. ビーム偏向法と吸光度法による酸性雨の水草への影響の検討, 轟 良嬌、井上智美、呉 行正, 第 74 回分析化学討論会講演プログラム集, F2006(講演番

- 号) 2014.5, 日本大学(郡山市)
7. プローブ光の偏向法および吸光光度法による酸の植物への影響の研究, 轟良嬌、井上智美、吳行正, 日本分析化学会第62年会要旨集, H1011Y(発表番号), 2013.9, 近畿大学(東大阪市)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吳行正 (Wu Xing-Zheng)

福岡工業大学・工学部・教授

研究者番号: 70234961

(2) 研究分担者

井上智美 (Inoue Tomomi)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態

系環境研究センター・主任研究員

研究者番号: 80435578