

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05592

研究課題名(和文) 反射分光指数(PRI)を用いた植物の環境ストレス評価

研究課題名(英文) Photochemical Reflectance Index (PRI)

研究代表者

上妻 馨梨 (Kohzuma, Kaori)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70704899

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)：変動する気象環境下において、農作物のストレス状態を瞬時に検知し、それぞれの問題に対処する必要がある。本研究では反射分光のパラメータの1つであり530nmの変化を検出する光化学反射指数(PRI)を用いて、植物の環境ストレスをハイスループットモニタリングする測定法の開発を行った。まず、PRIが何を検出するシグナルであるかシロイヌナズナの変異体を用いて生理学的な検証を行った。次に、ハイパースペクトルカメラを用いて強光乾燥ストレス下でPRIが変化することを可視情報として捉えた。これらの結果を踏まえ、野外のトウモロコシ群落においてストレス検出を行い、PRIが農業分野で有効なツールになることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の環境ストレスの指標として光合成能力を評価する方法は一般的である。これまで、植物の光合成挙動をin vivoで測定する方法としては、パルス変調(PAM)を用いたクロロフィル蛍光解析法がよく知られており、FV/FMは光合成研究だけでなく多方面において植物の健全性の指標として使われてきた。しかし、この測定には暗黒処理や飽和パルス光が必要であり、広域や光環境下でのリアルタイム測定は難しいという問題があった。PRIはこれらを解決できることから、野外や植物工場といった農業現場での簡便な作物健康診断ツールとしての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In a fluctuating climatic environment, crop stress conditions need to be detected rapidly to address each problem. In this study, we developed a measurement method for high-throughput monitoring of environmental stress in plants using photochemical reflectance index (PRI), which is one of the parameters for remote-sensing and detects changes at 530 nm. First, we physiologically validated what PRI is detecting using Arabidopsis mutants. Next, we captured PRI changing under excess light and drought stress as visual information by a hyperspectral camera. Based on these results, we performed stress detection in a field maize community and showed that PRI could be an effective tool in agriculture.

研究分野：光合成

キーワード：反射分光 光合成 環境応答 ハイパースペクトルイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

作物の収量は生育期間の物質生産の積算であるため、環境ストレスやその応答能力などのすべての結果が収量に集約される。増加する地球の全人口を支えるために必要な農作物の生産量は、40年後には現在の170%が必要であることが概算されているが、近年の急激な地球の環境変化と、それに伴う極端な気象振幅は作物増産をより困難にしている。そのため、植物が感知する環境ストレスをリアルタイムに検出し、問題に対して即座に対応することが求められる。

これまで、植物の光合成挙動を *in vivo* で測定する方法としては、パルス変調 (PAM) を用いたクロロフィル蛍光解析法がよく知られており、 $F_v/F_m$  は光合成研究だけでなく多方面において植物の健全性の指標として使われてきた。しかし、この測定には暗黒処理や飽和パルス光が必要であり、光環境下でのリアルタイム測定は難しい。これらの問題を解決する測定法として 531nm の反射光から見積もる PRI (Photochemical Reflectance index 光化学反射指数) に着目した。PRI は 531nm の反射シグナルを 570nm で正規化した式で表される。

$$\text{【PRI} = (R_{531\text{nm}} - R_{570\text{nm}}) / (R_{531\text{nm}} + R_{570\text{nm}}) \text{ * R は反射率】}$$

植物は強光、高/低温、乾燥下などで過剰な光エネルギーを受け取った場合、余剰エネルギーを熱として放散する (熱放散)。この機構には葉緑体チラコイド膜内に蓄積する高いプロトン濃度に起因したキサントフィル色素の構造変化が関与しており、531nm の反射光から検出できる可能性が示唆されていた (図1)。植物がストレス状態であるか否かを見極めることは農業現場においては大きな課題である。PRI は反射光であることからカメラでの可視化が可能であり、フィールドにおいて強力な計測ツールに成り得ることから、PRI シグナルの生理学検証とストレス検出ツールとしての有効性の証明に挑んだ。

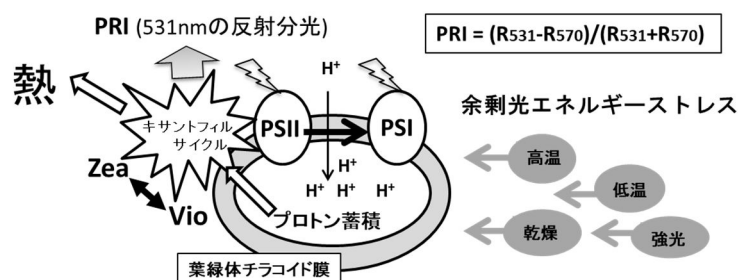


図1. 熱放散機構と PRI パラメータ。さまざまな環境ストレスによって光エネルギーが余剰に蓄積するとチラコイド膜内にプロトンが高蓄積する。膜内の pH 低下はキサントフィル色素の構造変化 (Vio Zea) を誘導し、エネルギーを熱として放散する。PRI はキサントフィル色素の変化を検出する可能性が示唆されていたが、生理学な知見は乏しかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物が感知する環境ストレスをリアルタイムに観測することで農業現場でのさまざまな問題に対して即座に対応するために、1) PRI パラメータの生理学的検証、2) PRI による作物の環境ストレス検出、3) 野外での実証実験を行い、ストレスをハイスループットに検出する技術の確立をめざした。

### 3. 研究の方法

PRI を活用し植物の余剰光エネルギーストレスをリモートセンシングすることで、農業現場において生育状態の問題に即時に対応することを目指した。具体的には、1) 光強度を変化させた時の 531nm と 570nm の反射シグナルを分光放射計で計測し、同時にクロロフィル蛍光解析との相関を見ることで、PRI を評価した。これらの測定をシロイヌナズナの変異体で行うことで、PRI が何を検出するのか、生理学的に検証した。2) 実験室において、コントロールされた環境下で作物に乾燥ストレスを付与した際の、PRI 変化とキサントフィル色素の変換率の相関を観察した。3) 野外において、乾燥処理をしたトウモロコシ群落をハイパースペクトルカメラで撮影し、PRI を算出することで、ストレス状況を可視化した

### 4. 研究成果

#### (1) PRI パラメータの生理学的検証

生態学の分野において PRI は NPQ (non-photochemical quenching) に相当するパラメータであると認識されている。しかし、NPQ の構成要素にはキサントフィルサイクルだけではなく、PsbS 依存のエネルギークエンチングや光障害、ステート遷移などが知られている。特に、PsbS の活性化はキサントフィル色素の構造変化と同様にチラコイド膜内の pH 低下がトリガーとなることから、PRI パラメータとの関係性を検証する必要がある。シロイヌナズナのキサントフィルサイクル機能欠損変異体である *npq1* と PsbS の欠損変異体である *npq4* の PRI を野生型と比較した(図 2)。PRI は光強度の増加に伴って低下することが知られている。野生型と *npq4* では光依存的に値が低下したのに対し、*npq1* ではその低下がわずかであった。この結果から、PRI は NPQ の中でも PsbS 依存のエネルギークエンチングではなく、キサントフィルの変換を特異的に検出していることが明らかになった [Kohzuma and Hikosaka 2018 *BBRC*] [上妻 2018 *光合成研究*]。本検証を行うために既存の光合成評価手法であるクロロフィル a 蛍光解析法を用いて PRI を評価した。この際に確立した同時測定法をテクニカル論文として報告した [Kohzuma 2019 *JovE*]。

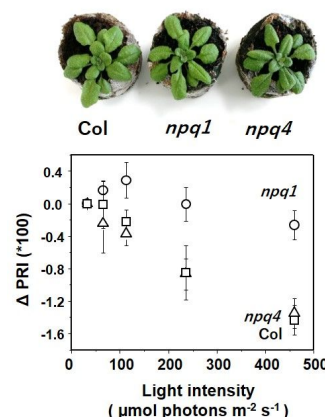


図 2. シロイヌナズナの変異体を用いた PRI の生理学的検証。 は野生型 (Col)、 は *npq1*、 は *npq4*。キサントフィルの変換が起こらない *npq1* において、PRI の光依存的な変化は見られなかった。

#### (2) 実験室におけるストレス付与実験と PRI イメージング

PRI シグナルが、植物の余剰光エネルギーストレス応答時に変化するキサントフィル色素の変化をダイレクトに反映することを明らかにしたことから、植物のストレス検出マーカーとして非常に有効であると考え、まず、実験室レベルにおいて、ストレスに耐性の高い野生スイカの PRI の変化を観察した(図 3)。強光下で乾燥ストレスを 1 週間与えた野生スイカでは顕著な PRI の変化が観察された。同時キサントフィル色素の変換率と高い相関があることが観察された [Kohzuma et al., 2021 *JPR*]。これらの PRI の変化の様子はハイパースペクトルカメラを用いて可視

化できることも示された(図4)。

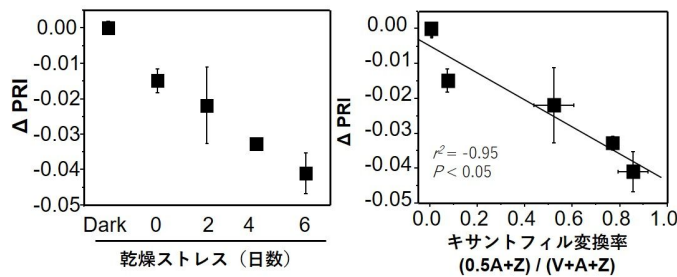


図3．強光下で乾燥ストレスを与えた際の野生スイカのPRI変化。ストレス日数に伴って誘導され、同時、キサントフィル変換率も増加した。

### (3)野外(圃場)における群落レベルでのPRI変化の検証

実験室レベルにおいて明らかにした作物のストレス検出とPRI変化の関係性を踏まえ、実際に野外においてPRIが効果的に活用できるか、世界の主要作物であるトウモロコシを用いて実証実験を行った[Kohzuma et al., 2021 JPR]。トウモロコシは沖縄県農業研究センターの協力のもと、2018年秋から2019年春にかけて、栽培環境の準備、作付けから栽培、ストレス付与、ハイパースペクトルカメラによる撮影を行った[上妻 2022 アグリバイオ]。その結果、乾燥ストレスの検出だけでなく、再灌水によるストレスの回復をリアルタイムにモニターすることに成功した。このようなリアルタイム観測は、IoT (Internet of Things) やAI (Artificial Intelligence) などのデータ管理手法と組み合わせることで、精密農業にも展開可能な技術になると期待される。

図4はPRIイメージングのさまざまなスケール展開の例を示したものである[上妻 2021 光合成研究]。キサントフィル色素の変化は光合成生物普遍的な機構であることから、PRIイメージングは植物種と限定せずさまざまな種で検出可能である。野外の広域から、モデル植物などの小型の個体。さらに顕微鏡に装着することで細胞レベルの観察も行うことができる。このようにPRIイメージングは拡張性の高いツールであることを示した。

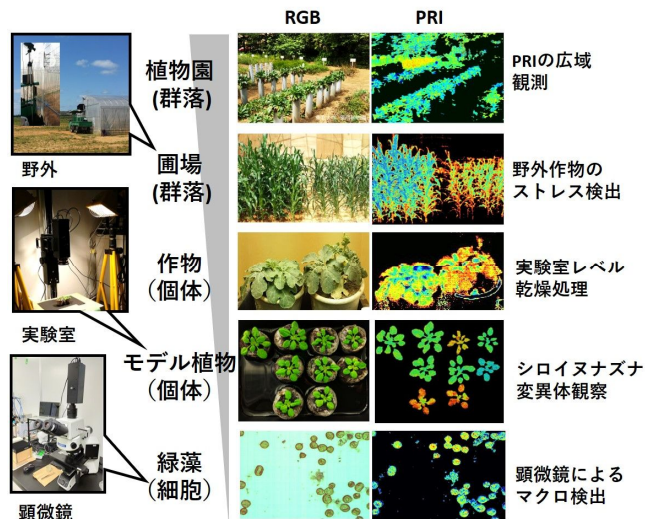


図4．PRIイメージングなさまざまスケール展開。一段目：東北大学の薬用植物園にて撮影。オレンジに見える領域はユリ科のハナスゲで高いZeaの蓄積が確認された。2段目：沖縄県農業研究センターで行ったトウモロコシ群落への乾燥実験。3段目：人工気象器で生育した野生スイカへの強光乾燥ストレス実験。いずれも乾燥ストレスでPRIの誘導が観察された。4段目：シロイヌナズナ変異体観察。5段目：緑藻メソスティグマの顕微鏡観察。青は高いPRIを赤は低いPRIを示す。PRIは低いほどストレス度合いが高い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kohzuma Kaori, Hikosaka Kouki	4. 巻 498
2. 論文標題 Physiological validation of photochemical reflectance index (PRI) as a photosynthetic parameter using Arabidopsis thaliana mutants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 52 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 上妻馨梨	4. 巻 28
2. 論文標題 葉緑体チラコイド膜のルーメン pH 可視化を目指して	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 93 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kohzuma Kaori	4. 巻 150
2. 論文標題 Evaluation of Photosynthetic Behaviors by Simultaneous Measurements of Leaf Reflectance and Chlorophyll Fluorescence Analyses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohzuma Kaori, Tamaki Maro, Hikosaka Kouki	4. 巻 134
2. 論文標題 Corrected photochemical reflectance index (PRI) is an effective tool for detecting environmental stresses in agricultural crops under light conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 683 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-021-01316-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohzuma Kaori, Sonoike Kintake, Hikosaka Kouki	4. 巻 134
2. 論文標題 Imaging, screening and remote sensing of photosynthetic activity and stress responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 649-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-021-01324-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 上妻馨梨, 滝澤謙二	4. 巻 31
2. 論文標題 530 nm, 透過から見るか? 反射から見るか?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 169-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 上妻馨梨,	4. 巻 6
2. 論文標題 光化学反射指数(PRI)による植物の環境ストレス評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 54-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上妻馨梨
2. 発表標題 ハイパースペクトルカメラを用いた植物の生理応答の可視化
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会 - オルガネラワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部慧介、上妻馨梨、彦坂幸毅
2. 発表標題 植物の葉経済スペクトルと病原菌防御の関係 : LMAは表皮強度上昇を通して感染防御に貢献する
3. 学会等名 第69回 日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上妻馨梨、彦坂幸毅
2. 発表標題 光化学反射指数(PRI)の光誘導キネティクス
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻祥子, 上妻馨梨, 伊福健太郎, 彦坂幸毅
2. 発表標題 木本植物の光化学系 光損傷速度および修復速度の種間比較
3. 学会等名 第69回 日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上妻馨梨、彦坂幸毅
2. 発表標題 常緑広葉樹ヤブツバキ群落で観察する群落表面と群落内の光化学反射指数(PRI)のばらつき
3. 学会等名 第11回 東北植物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上妻 馨梨
2. 発表標題 ほろ苦い夜の光合成 - 根で働くATP合成酵素 -
3. 学会等名 第11回 日本光合成学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻祥子, 上妻馨梨, 小澤理香, 伊福健太郎, 中野雄司, 石田厚, 彦坂幸毅
2. 発表標題 強光ストレス下における樹木の色素含有量の変化と光阻害耐性の多種間比較
3. 学会等名 第132回 日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻祥子, 上妻馨梨, 小澤理香, 伊福健太郎, 中野雄司, 石田厚, 彦坂幸毅
2. 発表標題 小笠原諸島における強光下で生育する個葉の光ストレスに対する生理生態反応
3. 学会等名 第68回 日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上妻馨梨
2. 発表標題 分光学的解析による光合成挙動の可視化
3. 学会等名 岡山大学資源植物化学研究所共同研究ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 kaori kohzuma
2. 発表標題 PRI as an index of plant environmental stresses
3. 学会等名 第83回 日本植物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上妻馨梨、草場信
2. 発表標題 PsbM contributes to PSII supercomplex stability during prolonged dark incubation in higher plants
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上妻馨梨, 彦坂幸毅
2. 発表標題 反射分光を用いた植物の強光乾燥ストレス応答の検出
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上妻馨梨, 彦坂幸毅
2. 発表標題 反射分光を用いた光合成挙動のリモートセンシング
3. 学会等名 第82回 日本植物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上妻馨梨, 彦坂幸毅
2. 発表標題 反射分光を用いた植物ストレスのリモートセンシング
3. 学会等名 第9回 日本光合成学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究紹介(上妻馨梨) 植物の光合成 <a href="https://kohzuma.wixsite.com/kaorikohzuma">https://kohzuma.wixsite.com/kaorikohzuma</a>
--

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
---------	---------