

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：37112  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K05572  
研究課題名(和文) 食料確保・増産に資する植物の非生物的環境ストレスの新規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 abiotic stress detection method for plants to contribute increase of food production  
  
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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生理活性物質の輸送に起因するプローブ光の偏向と溶存酸素(DO)による蛍光消光を利用して、植物の非生物的環境ストレスの新規リアルタイム計測法を開発した。具体的には、1)植物表面近傍のプローブ光偏向/蛍光消光測定系を作製し、さらに水生植物の葉、根、茎などの場所別の物質輸送のリアルタイムモニタリングに利用できることを明らかにした。2)本法は植物の金属ストレスの迅速測定に利用できることを明らかにした。3)また、本法は酸性雨による植物のストレスの測定に利用できることも明らかにした。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な人口増加により、食料の増産・確保は喫緊の課題であるが、水・土壌環境の汚染や気候変動などにより食料生産の減収を誘発しているのが現状である。従って、植物の非生物的環境ストレスへの応答機構を究明することは極めて重要である。一方、従来の植物の非生物的環境ストレスの測定は低感度で、しかも、時間もかかる。また、植物の葉、根、茎などの部位別での測定はできない。そこで、本研究は植物の測定したい部位の近傍にレーザー光を通し、その偏向信号および酸素による蛍光消光を測定することにより、植物表面における生理活性物質の輸送過程をリアルタイムに測定し、高感度、迅速な判定ができるので、植物の測定の新たな手段となる。

研究成果の概要(英文)：This research work developed a novel real-time monitoring method for abiotic stress in plants by making use of materials movements-induced beam deflection and dissolved oxygen quenched fluorescence at a vicinity of a plant surface. Firstly, this method enabled a more sensitive approach, allowing real time monitoring of DO and material movements in situ within micrometers of the plant surface. Secondly, the developed method has been successfully applied for real-time monitoring of heavy metal (HM) stress in aquatic plants caused by existence of HM ions such as copper ion. The experimental results showed that physiological activities of aquatic plants were greatly affected by existence of the HM ions. Thirdly, the method could be used for real time monitoring of acid rain stress in aquatic plants.

研究分野：分析化学

キーワード：植物の計測 非生物的環境ストレス 生理活性物質 プローブ光の偏向 蛍光消光 酸素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界的な人口増加に対する食料の安定供給のために食料生産の拡大は喫緊の課題であるが、土壌劣化や気候変動などが食料生産の減収を誘発すると知られている。食料増産を達成するには、非生物的ストレスによる減収を回避する遺伝子組換え植物の創出と導入や、塩害など環境ストレスに耐性を示す品種などの導入が重要と言われている。それを実現するために、植物の非生物的ストレスへの応答機構を究明する必要がある。一方、この応答機構を究明するには、植物表面の物質の出入りの変化を測定しなければならない。

現在、電極を利用するガスセンサーや、分光法や、クロマトグラフィー等様々な分析法が  $O_2$  や  $CO_2$  等の植物の生理活性物質の出入りを測定している。測定系は密閉 (Closed) 系か開放系 (Open) で行われ、前者は植物を密閉容器に入れ、後者は植物をいれた容器に新鮮な空気または養分を含む水溶液を常時流入する。いずれの場合、測定系内の水あるいは空気のある時間ごとにサンプリング・分析、あるいは何らかのセンサーで測定することにより、対象物の濃度を得る。しかし、測定された濃度は測定系内の空間的・時間的な平均値であり、実際の植物体表面の物質の出入りをリアルタイムに反映しているわけではない。また、植物体表面から出入りした物質は空間的に分散するので、測定感度は大いに低下する。さらに、植物体の葉、根、茎など部位別の物質出入りの区別測定はできない。

一方、申請者は化学反応過程で生じた濃度勾配、温度勾配をプローブ光の偏向で測定、解析する新規 in-situ 計測法を開発してきた。さらに、申請者は植物近傍のビーム偏向・蛍光の同時測定系を開発し、溶存酸素 (DO) のような生理的活性物質の水草表面での出入りを従来法より高感度、かつ部位別にリアルタイムに測定できることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は光一本で植物個体表面近傍の  $O_2$ 、 $CO_2$  等の生理的活性物質の高感度 in-situ モニタリングを行うことにより、植物体の環境ストレスへの応答を迅速的に計測できる新規植物計測法として開発し、更に植物の非生物的ストレスへの応答過程を明らかにする。

### 3. 研究の方法

蛍光消光 / ビーム偏向測定装置は自作のものであった (図1)。アナカリスのような水生植物約 3 cm をガラスシャーレに置き、 $10^{-6}$  M Ru(II) 錯体/ $10^{-6}$  M  $Cu^{2+}$  等の重金属イオンを含む培養液約 20 mL を加えた。半導体レーザー (波長 405 nm) はダイクロイックミラーで反射され、対物レンズによって水草近傍に絞られ、偏向検出器でその偏向信号を測定した。また、水草近傍の Ru(II) 錯体の蛍光をダイクロイックミラーの下に設置した PMT により測定した。光合成の光源として、赤色の LED (波長 660 nm) を用いた。ガラスシャーレに市販の温度計、溶存酸素センサーも入れ、培養液のバルク相の温度と DO 変化も測定した。

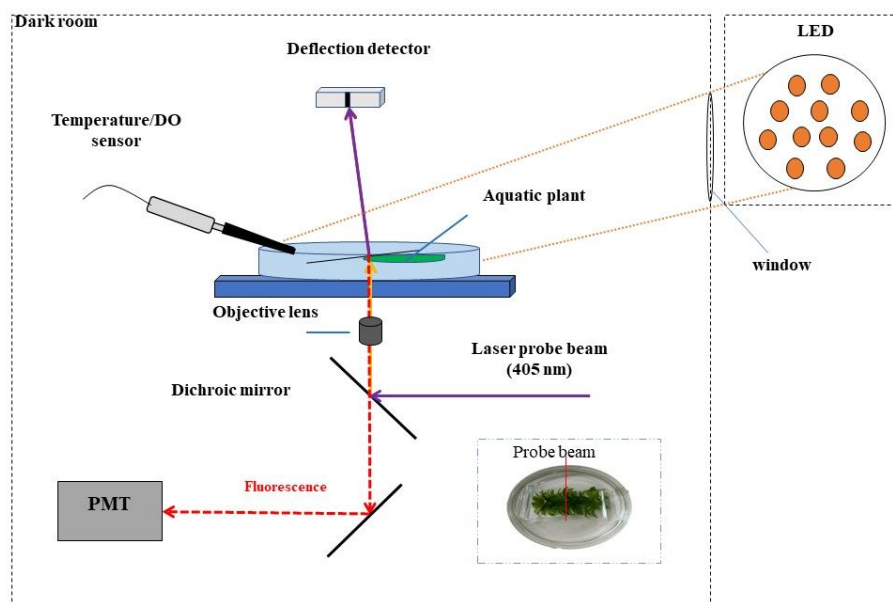


図1 自作した偏向信号/蛍光消光測定系

#### 4. 研究成果

##### 1) 水生植物表面近傍の DO 濃度及び生理活性物質の輸送に起因する偏向信号の高感度 in-situ リアルタイムモニタリング法の確立

今まで作製したビーム偏向・蛍光同時測定系の問題点を改良し、水生植物近傍の  $O_2$  の定量法を確立した。具体的には、植物体表面近傍の蛍光強度  $F$  を測定することにより、DO 濃度  $C_{O_2}$  を蛍光消光の Stern-Volmer 式によって求められた。

$$F_0/F = 1 + K C_{O_2}$$

上式中の  $F_0$  は DO 濃度がゼロの時の蛍光強度、 $K$  は Stern-Volmer 係数であった。 $F$ 、 $C_{O_2}$ 、 $K$  は温度  $T$  に依存するので、温度の変化を補正する計算アルゴリズムを開発した。

結果として、アナカリスなどの水生植物近傍の DO 及び物質輸送に起因する偏向信号の変化を高感度、リアルタイムにモニタリングできることを明らかにした。また、葉、根、茎など場所別の局所的なモニタリングもできた。実際、呼吸過程及び光合成過程で水生植物近傍の DO 及び偏向信号の時間変化は真逆であることを明らかにした。これは呼吸過程と光合成過程の生理活性物質の輸送は真逆であるからである。

##### 2) 水生植物の重金属イオンストレスへの応答のリアルタイムモニタリング

アナカリスのような水生植物の培養液に、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  のような重金属イオン  $10^{-6}$  M が存在すると、生理活性物質の輸送に起因する偏向信号および植物近傍の DO 濃度の時間変化が大きく変化することを明らかにした。重金属イオンが存在すると、本来呼吸過程と光合成過程で逆の時間変化を示す偏向信号と DO 濃度が逆の変化を示さなくなった。例えば、呼吸過程では植物近傍の DO の減少はより速くなり、また光合成過程でも、DO が時間と共に減少していくことが分かった。これは、重金属イオンの存在により、光合成過程を抑えられるのだけではなく、植物の生理活動でより多くの酸素を消費することを意味する。即ち、重金属イオンが存在すると、植物の生理活動で物質の輸送過程が大きく変化することを明らかにした。また、偏向信号と DO の時間変化をモニタリングすれば、水生植物の重金属イオンのストレスへの応答を測定できることも明らかになった。

##### 3) 本法による水生植物の重金属イオンストレスの高感度測定

アナカリスのような水生植物の培養液に重金属イオンの濃度がどの程度になると、植物にストレスを与えるかについて本法で検討した。結果として、 $Cu^{2+}$  の場合、 $10^{-9}$  M 程度存在するとアナカリスの生理活性物質の出入りに変化があることを明らかにした。一方、従来法では  $10^{-5}$  M 以上でないと、重金属イオンのストレスを測定できなかった。即ち、本法による重金属イオンのストレスの測定は、従来法より 3 桁以上高感度となる。

また、重金属イオンのストレスに対する肥料の低減効果や、酸性雨による水生植物へのストレスも検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Xing-Zheng WU, and Kansuk PATTHAMAWA	4. 巻 1
2. 論文標題 Dissolved oxygen-quenched fluorescence / materials movement-induced beam deflection: A novel method for measuring heavy metal stress in aquatic plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Monitoring and Contaminants Reseach	6. 最初と最後の頁 91-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5985/emcr.20210006	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 Xing-Zheng WU, Kansuk PATTHAMAWA, Yosuke Okuhata	4. 巻 39
2. 論文標題 Sensitive detection of heavy metal stress in aquatic plants by dissolved oxygen-quenched fluorescence/materials movement-induced beam deflection method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1993-2000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-023-00412-7	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 奥畑陽介, 吉田託也, 呉行正
2. 発表標題 蛍光消光/ビーム偏向法を用いた植物の測定
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Patthamawan Kansuk, 呉 行正
2. 発表標題 プローブ光の偏向 / 蛍光消光法による植物の非生物的環境ストレスの新規計測法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第71回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉 行正
2. 発表標題 生物個体表面における物質輸送過程の新規リアルタイム計測法の開発
3. 学会等名 超異分野学会 大阪大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉 行正
2. 発表標題 植物の環境ストレスの新規リアルタイム計測法：ビーム偏向 / 蛍光消光法
3. 学会等名 超異分野学会 香川フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥畑 陽介・吉田 拓也・呉 行正
2. 発表標題 蛍光消光とビーム偏向法を用いた植物の新規計測法の開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xing-Zheng Wu, Kansuk Patthamawan, Yosuke Okuhata
2. 発表標題 Measurements of heavy metal stress in aquatic plants by dissolved oxygen-quenched fluorescence / Materials movement-induced beam deflection
3. 学会等名 ACS Spring 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Wu Xing-Zheng
2. 発表標題 Real-time in-situ Simultaneous Monitoring of Dissolved Oxygen and Materials Movements-Induced Deflection of a Probe Beam at a Vicinity of an Aquatic Plant
3. 学会等名 The 9 th Annual Conference of AnalytiX-2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wu Xing-Zheng
2. 発表標題 A Novel Method for Real-time in-situ Monitoring of Materials Movements across a Plant Surface by Making Use of Beam Deflection/Fluorescence Quenching
3. 学会等名 International Congress on Advanced Materials Sciences and Engineering 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塗詩豪、吳行正
2. 発表標題 溶存酸素による蛍光消光 / ビーム偏向法による植物の重金属ストレスの研究
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shi-Hao Tu, Kansuk Patthamawan, and Xing-Zheng Wu
2. 発表標題 Real-time in situ Simultaneous Monitoring of Dissolved Oxygen and Material Movement-induced Beam Deflection at Vicinities of an Aquatic Plant
3. 学会等名 Pacifichem 2021 Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Patthamawan Kansuk, 呉 行正
2. 発表標題 蛍光消光 / ビーム偏向法による植物の重金属ストレスの研究
3. 学会等名 日本分析化学会第72回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥畑陽介, 呉行正
2. 発表標題 蛍光消光 / プローブ光の偏向を利用した植物の新規計測法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第72回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 呉 行正
2. 発表標題 ビーム偏向 / 蛍光消光法による水草表面近傍の物質輸送過程のin situ測定
3. 学会等名 水草研究会第45回全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Patthamawan Kansuk, 呉 行正
2. 発表標題 植物の環境ストレスの新規リアルタイム計測法の開発
3. 学会等名 超異分野学会 大阪大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Patthamawan Kansuk, 呉 行正
2. 発表標題 プローブ光の偏向 / 蛍光消光法による植物の非生物的環境ストレスの新規計測法の開発
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 呉 行正	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 11
3. 書名 キャピラリー電気泳動・イオンクロマトグラフィー(第8節 試料前処理での留意点)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 検体測定装置、及び検体測定方法	発明者 呉 行正、奥畑陽介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-072017号	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------