

## 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24年 5月20日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658078

研究課題名（和文） 葉内葉緑体における光合成機能の共焦点レーザー顕微解析法の開発

研究課題名（英文） Development of confocal laser scanning micro-imaging analysis method of chloroplast photosynthetic functions in intact leaf

研究代表者

大政 謙次 (Omasa Kenji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：70109908

研究成果の概要(和文):葉内葉緑体における光合成機能の共焦点レーザー顕微解析法を開発した。顕微鏡システムに使用した EM-CCD カメラの A/D 変換値は、500 から 14,500 のレンジで蛍光強度と正の線形関係があった。また、レーザー強度と測定された光強度 (PPF) の間にも線形関係があった。このシステムを用いて、タマシダ葉の葉緑体の 3D-F、3D-Fm' および 3D- $\Phi_{PSII}$  画像が計測された。さらに、農薬処理に伴う Kautsky 効果が調べられた。開発した顕微鏡システムは、非破壊で葉内葉緑体のクロロフィル蛍光強度や  $\Phi_{PSII}$ 、NPQ を計測できるので、葉緑体レベルでの光合成機能の研究のために有効的に使用できる。

研究成果の概要 (英文) : Confocal laser scanning micro-imaging (CLSM) analysis method of chloroplast photosynthetic functions in intact leaf was developed. For A/D conversion levels of EM-CCD camera used for the CLSM system the values revealed a positive linear relationship between fluorescence intensity and the A/D conversion level at each gain value in the range 500 to 14,500. The relationship between laser power and measured PPF was expressed as a linear equation. Using this system, 3D-F, 3D-Fm' and 3D- $\Phi_{PSII}$  images of Boston fern chloroplasts were measured. The dark/light transitions (Kautsky effect) of eggplant chloroplasts to agrochemical treatment were also measured. As the 3D CLSM system can provide the fluorescence intensity,  $\Phi_{PSII}$  and NPQ values of each chloroplast in a 3D cellular arrangement, this method has potential for investigating differences in the functions of chloroplasts in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：イメージング、共焦点レーザー顕微鏡、植物計測、3D、クロロフィル蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

農作物の生産性向上のためには光合成を増大させることが必要であり、植物工場などの生産施設では、CO<sub>2</sub>施肥や環境調節により、その増大を図っている。また、品種改良や遺伝子組み換えなどによる形質転換、バイオアッセイなどの際の生理指標としても、光合成反応をターゲットにする場合が多い。光合成を計測する方法としては、生体を破壊する生化学分析などの方法だけでなく、同化箱法や酸素電極法、クロロフィル蛍光法などの非破壊計測法があり、広く利用されている。これらの非破壊計測法の中で、クロロフィル蛍光法は、画像情報として得られるという特徴がある。大政らが、クロロフィル蛍光画像計測法(Omasa et al. Plant Physiol. 1987)を世界で始めて提案して以来、この分野の研究が進展し、現在では、幾つかのメーカーから装置が市販され、実際の現場でも普及、使用されるようになってきた。

細胞レベルでの光合成反応に関する非破壊情報は、形質転換の際のスクリーニングやバイオアッセイ、また、環境変化に対する細胞レベルでの反応メカニズムの解明などに有用であり、最近、細胞のクロロフィル蛍光解析に関して、申請者らの研究も含めて幾つかの研究が報告されるようになってきた。しかし、これらの研究は、通常の光学顕微鏡の改良による方法で、葉表面での蛍光計測に限定され、葉内部の情報が得られない欠点がある。また、蛍光計測特有の計測対象近傍からの光の影響によるボケ現象の影響がある。この問題の解決のためには、共焦点レーザー顕微鏡の使用が考えられるが、

クロロフィル蛍光法への利用には多くの問題があり、このため、新しい着想による方法の提案が必要とされていた。

## 2. 研究の目的

共焦点レーザー顕微鏡は、通常の光学顕微鏡と違い、レーザーをスキャンして計測するために、サンプルに均一に光が照射されず、一点あたりの光強度が非常に強い（通常、3桁位大きい）という特徴がある。このため、クロロフィル蛍光法による蛍光パラメータ解析に適用するのは困難で、従来は利用出来ないと考えられてきた。また、共焦点レーザー顕微鏡では、葉表面だけでなく、葉内部の細胞・葉緑体レベルの情報を得ることができるが、蛍光パラメータに対する影響はわかっていない。そこで、本研究では、レーザスキャンの高速化と均一化に加えて、レーザ照射法や解析法を検討し、共焦点レーザー顕微鏡による新しいクロロフィル蛍光パラメータ解析法を開発する。また、計測データを検討し、その性能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

共焦点3次元クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの条件として、1) 対象に照射される光が、植物にダメージを与えない程度の強度であり、暗期、明期と飽和パルス光の照射切り替えができること、2) 3次元計測のために高速Zスキャンができること、3) 比較的弱い照射光によって、高速撮影を行っても鮮明な画像が得られること、などがあげられる。図1に、この条件を満たすために開発したシステムの概念図を示す。このシステムは、倒立型光学顕微鏡、ニポウディスク式共焦点レーザースキャンユニット、EM-CCD

カメラ、周辺制御機器などからなる。上記の条件を満たすために、対物レンズを通してサンプルに照射される光強度を算出し、減光フィルタを装着したシャッターを新たに組み込んだ。また、高速 Z スキャンのために、ピエゾ Z スキャンシステムを導入した。さらに、弱光計測のために、高感度の EM-CCD カメラを用いた。Z スキャンモーター、ピエゾ Z-スキャンユニット、およびシャッターはコンピュータにより制御される。また、シャッターと EM-CCD カメラは同期させることができる。レーザー光 (488 nm) は、共焦点レーザースキャンユニットのニポウディスク上のピンホールを通して、顕微鏡の対物レンズから植物葉に照射される。植物葉の細胞内のクロロフィルから発せられるクロロフィル蛍光と反射光をバンドパスフィルタ ( $\lambda = 680$  nm)に通じることでクロロフィル蛍光のみ分離計測できるようにした。そして、この共焦点 3次元クロロフィル蛍光顕微画像計測シ

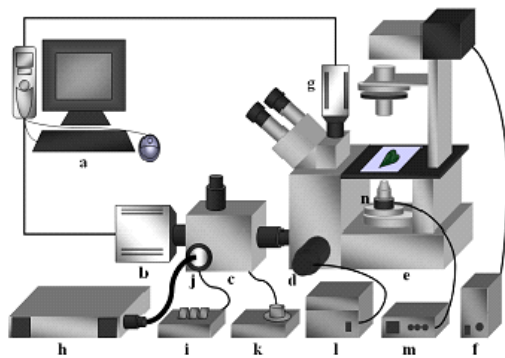


図1 共焦点3次元クロロフィル蛍光顕微画像計測システム。図中の a : パソコン、b : EM-CCD カメラ、c : 共焦点スキャンユニット、d : z スキャンモーター、e : 倒立型顕微鏡、f : ハロゲンランプ電源、g : 冷却型カラーカメラ、h : レーザ電源、i : シャッター制御装置、j : ND フィルターシャッター、k : ディスク回転制御装置、l : z スキャンモーター制御装置、m : ピエゾスキャン制御装置、n : ピエゾユニット

ステムの特性を明らかにするとともに、葉内組織の3次元クロロフィル蛍光画像計測を行った。材料としては、タマシダとナスの葉を用いた。

#### 4. 研究成果

まず、ゲインを変えたときの EM-CCD カメラの特性について蛍光シートを計測することによって行った。図2に、カメラのゲインが 50、100、150 の場合における蛍光強度と計測された蛍光画像の A/D 変換値との関係を示す。本実験に用いた EM-CCD カメラは、ゲインの値に関わらず、A/D 変換値は 450 ~ 14500 の間では直線応答性があることが確認された。

次に、顕微鏡の対物レンズを通して照射されるレーザー光強度を決定する方法について検討した。図3(A)に本実験で用いたピンホールの形状を示す。ピンホールの直径は 50  $\mu$ m であり、ほぼ真円とみなすことができた。このピンホールは計測対象面におけるレーザー光の直径よりも十分に小さかった。またピンホールを通ることでレーザー光強度は 1/5035 となることが示された。

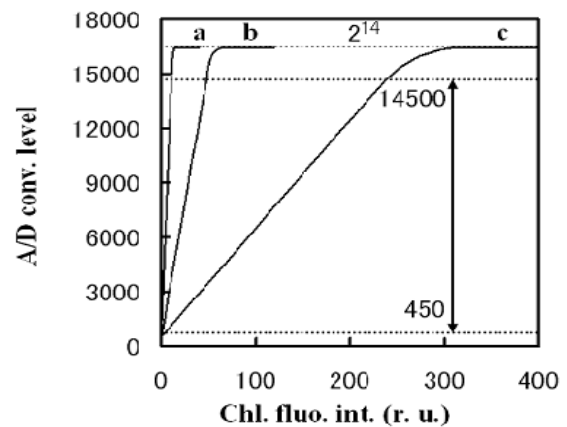


図2 蛍光強度と A/D 変換値との関係。  
a、b、c はそれぞれ、カメラの感度が 150、100、50 の時の特性

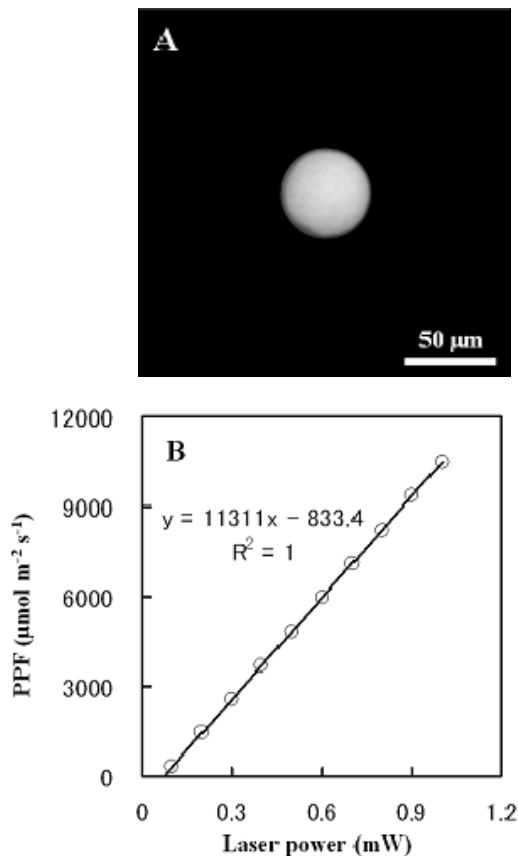


図3 ピンホールの画像 (A) とレーザー出力と PPF との関係

ピンホールを通して対物レンズから照射されたレーザー光の PPF にピンホールを用いたときの強度補正值 5035 を乗じることで得られた PPF 値と、レーザー出力の関係を図 3 (B) に示す。レーザー出力と推定された照射光の PPF との間には、直線的な関係がみられたため、実験では、レーザー出力から PPF を換算して用いた。なお、レーザー出力は 0~23 mW の間で調整できるようになっているが、上記の換算によると、最大出力である 23 mW では、計測対象に照射されるレーザー光の PPF は  $200 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  を超えることになる。これは、植物の光合成には強すぎる強度の光である。

図 4 に明期光 PPF が  $198 \text{ μmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  のときの 3D-F 画像 (A)、3D-Fm' 画像 (B) およびそれらより算出した 3D- $\Phi_{\text{PSII}}$  画像 (C) を示す。葉肉細胞内に存在する葉緑体の  $\Phi_{\text{PSII}}$  に

比べ、孔辺細胞内および表皮細胞内の葉緑体の  $\Phi_{\text{PSII}}$  は小さい傾向が見られた。既往の研究では、孔辺細胞に隣接した葉肉細胞内の葉緑体のみしか同時に計測できなかったが、本研究によって開発したシステムによって、孔辺細胞から離れた葉肉細胞内の葉緑体、さらにはシダ植物特有の表皮細胞内の葉緑体のクロロフィル蛍光パラメータも計測可能となった。葉肉細胞、孔辺細胞、表皮細胞内の葉緑体はいずれも、明期光強度が大きくなるにつれて、NPQ が増加し、 $\Phi_{\text{PSII}}$  が減少した。これは、熱放散活性の増大に伴う PSII 量子収率の低下と考えられる。

孔辺細胞内の葉緑体の  $\Phi_{\text{PSII}}$  は、葉肉細胞内の葉緑体の  $\Phi_{\text{PSII}}$  より小さかった。この結果は、既往の研究例にも見られた。孔辺細胞内の葉緑体の NPQ は葉肉細胞内の葉緑体の NPQ より大きい傾向が見られた。このため、孔辺細胞内の葉緑体は、葉肉細胞の葉緑体に比べて  $\text{CO}_2$  固定能が小さい可能性が考えられた。また、表皮細胞内の葉緑体の  $\Phi_{\text{PSII}}$  は、葉肉細胞内の葉緑体の  $\Phi_{\text{PSII}}$  よりも小さい傾向がみられたが、前者の NPQ は後者の NPQ よりも小さかった。さらに、表皮細胞内の葉緑体の蛍光強度は、葉肉細胞内の葉緑体の蛍光強度より大きかった。このことから、表皮細胞内の葉緑体は、 $Q_A$  以降の光合成電子伝達に阻害が生じている可能性が考えられた。

図 5 は、ナス葉の Kautsky 効果の状態 D (0.3 秒後)、P (0.9 秒後)、T (30 秒後) における画像であり、白色を示している部分がナス葉の葉緑体である。真中に気孔の孔辺細胞がみえる。上段 A の画像は除草剤 ( $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) で処理を行った場合に観察された画像であり、下段 B の画像は蒸留水を用いて処理を行った場合に観察された画像である。蒸留水では P で葉緑体クロロフィル蛍光が高くなるという正常な Kautsky 効果が見られるが、除草剤

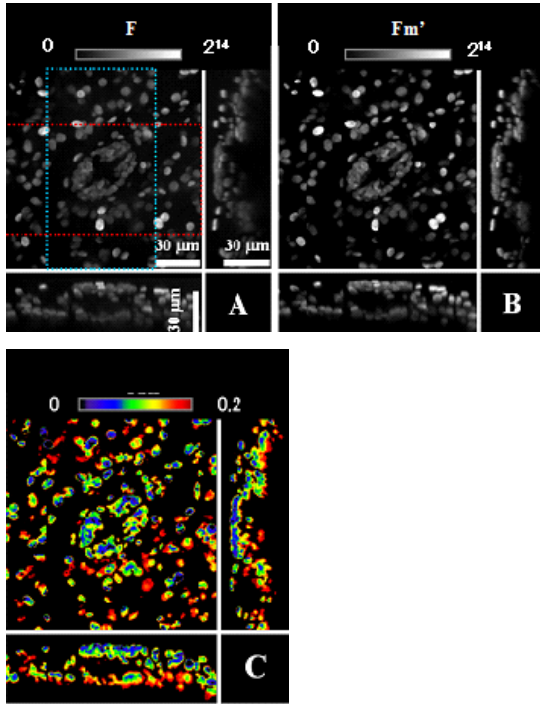


図4 タマシダ葉の3D-F画像(A)、3D-Fm'画像(B)および3D- $\Phi_{PSII}$ 画像(C)。

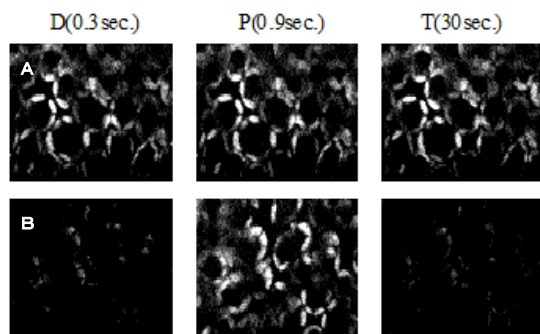


図5 ナス葉の Kautsky 効果の状態 D (0.3秒後)、P (0.9秒後)、T (30秒後) における画像。上段Aが除草剤処理をしたナス葉、下段Bが比較のための正常な状態の画像。

処理 ( $10^{-4}\text{molL}^{-1}$ ) により、D、P、Tいずれにおいても葉緑体クロロフィル蛍光が高くなっており、電子伝達系が除草剤により影響を受けていることがわかる。

## 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2件)

- ① K. Omasa. Fluorescence imaging of photosynthetic performance. PrometheousWiki. (2011)
- ② 大政謙次. アグリバイオイメージングの新たな展開. 農業及び園芸 85:1100-1109 (2010)

[学会発表] (計8件)

- ① 大政謙次. 画像工学の高度な活用. 学術会議公開シンポジウム. 太陽光植物工場 (2010.11) 東京
- ② 大政謙次. アグリバイオイメージングの新たな展開—Plant Phenomics と農業・環境分野への応用. アグリバイオインフォマティクスシンポジウム. (2010.10) 東京
- ③ K. Omasa. Functional remote sensing for vegetation and environmental researches. Seminar in Northeast Normal University. (2010.9)

[図書] (計1件)

- ① 大政謙次. 植物機能の画像計測技術の発展とその応用. 「太陽光植物工場の新展開」(野口伸・橋本康・村瀬治比古編著) 養賢堂 327-340 (2012)

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/joho/Omasa>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大政謙次 (OMASA KENJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：70109908