

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688026

研究課題名(和文) 減圧パルス-クロロフィル蛍光計測法による光合成電子伝達分配比の測定

研究課題名(英文) Measurement of leaf photosynthetic rate by analyzing dynamic change in chlorophyll fluorescence intensity induced by a pulsed pressure reduction

研究代表者

高山 弘太郎 (Takayama, Kotaro)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：40380266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が開発した「減圧パルス-クロロフィル蛍光計測法」を用いた光合成機能評価技術の確立に向けた研究開発を行った。その結果、減圧パルス付与によるChl 蛍光強度の上昇幅であるPeak heightは、O<sub>2</sub> free条件下を除いて光合成速度と有意な相関が認められた。また、光合成速度が著しく低下するCO<sub>2</sub> free条件下では、光呼吸やAlternative electron flowのために電子伝達は高く維持されるが、Peak heightは大きく低下することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, the pulsed pressure reduction induced chlorophyll fluorescence induction (PPR-CFI) measurement technique was developed. In this study, we applied the PPR-CFI to assess the leaf photosynthetic function under O<sub>2</sub> and/or CO<sub>2</sub> free conditions. The peak height, which is the extent of the chlorophyll fluorescence intensity increased just after the reduction of air pressure induced by a pulsed air pressure reduction (-80 kPa for 10 seconds), showed a strong correlation with the photosynthetic rate measured under several CO<sub>2</sub> concentrations, but the correlation was disappeared under O<sub>2</sub> free condition. In addition, the CO<sub>2</sub> free condition, the net photosynthetic rate was zero, kept the electron transport rate (PSII) at relatively higher level because of the photorespiration and alternative electron flow but strongly decreased the peak height. This result proved that the peak height measured by the PPR-CFI has high sensitivity to the photosynthetic rate.

研究分野：植物診断計測工学

キーワード：画像計測 植物診断 光合成 環境応答

1. 研究開始当初の背景

植物の環境応答の解析には、植物生体情報を非破壊かつ非接触で連続的に計測できる技術が不可欠である。様々な植物生体情報のなかでも、植物の生命維持の根本である光合成機能に関する生体情報のプライオリティは高い。Chl 蛍光は、光合成の主色素(Chl *a*)から発せられる光であり、これを正確に計測することで光合成反応の状態を非破壊かつ非接触でモニタリングできる(図 1)

Chl 蛍光計測法によって取得される最も代表的な蛍光パラメータが、光化学系 II (PS II) から光化学系 I (PS I) への光合成電子伝達速度である。この値は、嫌氣的条件下(2% O<sub>2</sub> 濃度)において光合成速度と高い相関を示す。このことは、PS I における主たる電子受容体が NADP<sup>+</sup>と H<sup>+</sup>であり、生成された NADPH がカルビン・ベンソン回路における CO<sub>2</sub> 固定反応に効率よく用いられていることを意味している。

一方、通常の大気条件下(約 21% O<sub>2</sub> 濃度)では、すべての伝達電子がカルビン・ベンソン回路のための NADPH の生成に用いられる訳ではない。伝達電子の一部は O<sub>2</sub> 分子に伝達され、植物体にとって有害な活性酸素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)が生じる(Mehler 反応)。生じた活性酸素は、water-water cycle によりエネルギーを消費して速やかに無毒化され(Asada 1999)、可視的な傷害は生じないものの、エネルギーロスは大い。

Water-water cycle への電子伝達速度は、最大で光合成電子伝達速度に匹敵する場合もあり、その生理学的意義としては、光合成開始時の ΔpH の生成と ATP 合成、過剰な電子を捨てる役割(Asada 1999)などがあげられる。特に、様々な生物的・非生物的ストレスによってカルビン・ベンソン回路の活性が低下した場合には、water-water cycle への電子伝達量が増加し、活性酸素の生成速度が water-water cycle の活性酸素消去能力を超えると、Chl 分子の分解など致命的な生理機能障害が生じる。このことは、water-water cycle とカルビン・ベンソン回路への電子伝達分配比のモニタリングが、光合成反応系のストレス状態を把握する上で極めて重要であることを意味している。

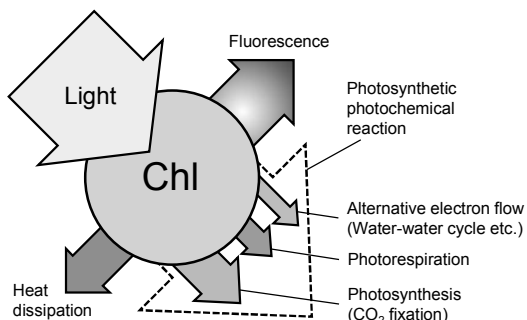


図 1 Distribution of light energy absorbed by chlorophyll pigment.

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が考案した Chl 蛍光計測技術と生物環境工学的なチャンバ内環境制御技術を融合させた「減圧パルス-Chl 蛍光計測法」を発展させ、光合成電子伝達系で伝達される電子のうち、カルビン・ベンソン回路で利用されるものと、water-water cycle へ伝達されるものとの比率を連続的かつ簡便に測定する全く新しい測定法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Chl 蛍光計測システムの概要

図 2 に、減圧パルス-クロロフィル蛍光計測システムの外観写真(A)と模式図(C)を示す。内容積 38.5 ml (内寸 1.1 cm [H] × 7 cm [W] × 5 cm [D])の透明アクリルリーフチャンバ(B)に葉を固定する。青色 LED より葉面に光を照射して光合成を行わせると同時に、上側チャンバに取り付けた携帯型 PAM クロロフィル蛍光計測装置 (MINI-PAM, WALZ, Germany)を用いて蛍光収率を計測した。また、Chl 蛍光画像計測システムを用いた Chl 蛍光強度の計測も並行して行った。なお、チャンバに供給する空気流量と CO<sub>2</sub> 濃度は携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400XTF, LI-COR Inc.)を用いて制御し、チャンバの入口と出口の CO<sub>2</sub> および H<sub>2</sub>O の濃度差を計測することで光合成速度と蒸散速度を算出した。チャンバ内の気圧計測にはアンプ付き圧力センサ(AP-44, (株)キーンエンス)を用いた。

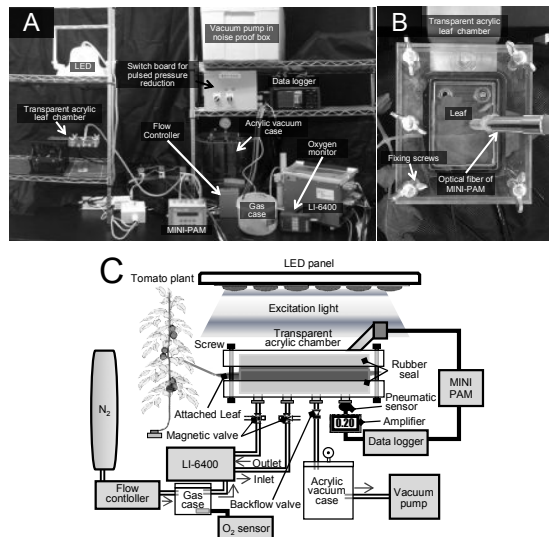


図 2 The developed Chl fluorescence measurement system with a pulsed pressure reduction system (A: Photo of the whole system, B: Photo of the leaf chamber, C: Schematic diagram of the whole measurement system).

(2) 減圧パルス付与方法の改良

本研究では、減圧パルス付与による Chl 蛍光強度の上昇幅を Peak height と定義した(図 3)。真空ポンプ(Mini Diaphragm Vacuum Pumps, KNF, Germany)を用いて容量 18.2 L のアクリル

ル真空容器(アズワン(株))内をあらかじめ減圧しておき、これとリーフチャンバを繋ぐ(逆流防止機能付の電磁弁を開く)ことで瞬間的な減圧を可能にした。この改良により 80 kPa の減圧(到達可能気圧 20 kPa)が可能となった。本研究では、大気圧からの減圧量を減圧強度と定義した(80 kPa 減圧時には「-80 kPa」と表記)。なお、リーフチャンバと光合成蒸散測定装置との接続部には三方向電磁弁を配した。各電磁弁はコントロールパネルにより自動制御され、チャンバの密閉から 0.1 秒後に減圧パルス(10 秒間)を付与する。

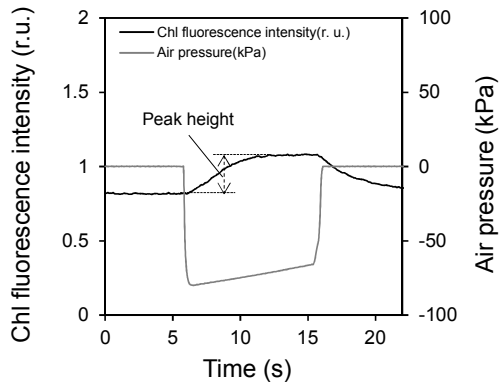


図 3 Changes in Chl fluorescence intensity induced by a pulsed pressure reduction. The extent of the increase in the fluorescence intensity is defined as 'Peak height'.

### (3) CO<sub>2</sub> and/or O<sub>2</sub> free 条件の作成

CO<sub>2</sub> and/or O<sub>2</sub> free の各ガス組成条件下での計測を行うために、N<sub>2</sub>ガス(CO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>を含まない)を使用した。CO<sub>2</sub>濃度はLI-6400XTFを用いて計測し、酸素濃度は酸素センサ(Oxyman Plus, 泰榮電器株式会社)を用いて計測した。

## 4. 研究成果

### (1) 連続的な減圧パルス付与が光合成速度と蒸散速度に及ぼす影響

愛媛大学植物工場研究センターの植物工場栽培されたトマト(*Solanum lycopersicum* L., 品種: 大安吉日)の完全展開葉を用いた。葉面における光強度をPPFD 270  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、供給する空気のCO<sub>2</sub>濃度を400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ とした。70分間にわたり、減圧パルス(減圧強度は-80 kPa)を10分間隔で計8回付与した。その結果、減圧パルスを繰り返し付与しても光合成速度および蒸散速度への影響は小さいことが確認された。

### (2) 減圧パルス-Chl 蛍光計測による光合成速度測定

(1)と同様の植物材料・光環境条件において、CO<sub>2</sub>濃度を変化させ(①800→600→400, ②1500→800→400→200→100  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )、この間の光合成速度、蒸散速度、Peak height の変化を計測した。なお、減圧強度は-80 kPa

とした。図4に、光合成速度とPeak heightの関係を示す。CO<sub>2</sub>濃度400~800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ では正の相関が確認されたが(A), より広範なCO<sub>2</sub>濃度条件では指数関数的な関係が確認された(B)。この結果は、減圧パルス-Chl 蛍光計測法によりPeak heightを評価することで光合成速度の簡易計測が可能だが、低CO<sub>2</sub>濃度環境下(100~200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )では光合成速度の違いを評価しづらくなることを示していた。

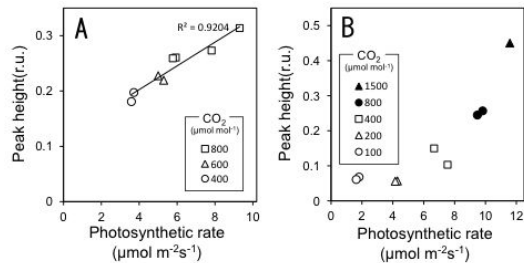


図 4 Relationship between photosynthetic rate and peak height measured under different CO<sub>2</sub> concentrations (A: 400-800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , B: 100-1500  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )

### (3) CO<sub>2</sub> and/or O<sub>2</sub> free 条件下での減圧パルス-Chl 蛍光計測

(1)と同様の植物材料・光環境条件において、ガス環境を通常大気(CO<sub>2</sub>濃度400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , O<sub>2</sub>濃度21%; 以降, [+ , +]), CO<sub>2</sub> free(CO<sub>2</sub>濃度0  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , O<sub>2</sub>濃度21%; 以降, [- , +])およびO<sub>2</sub> free(CO<sub>2</sub>濃度400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , O<sub>2</sub>濃度0%; 以降, [+ , -])で変化させた。具体的には、ガス環境を[+ , +]→[- , +]→[+ , +]→[+ , -]→[+ , +]→[- , -]→[+ , +]→[- , +]→[+ , +](これを2サイクル)と約40分間隔で変化させ(O<sub>2</sub> freeを[+ , -], CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> freeを[- , -]), 約540分間連続して光合成速度、 $\Phi_{\text{PSII}}$ およびPeak heightを計測した。

図5に光合成速度、 $\Phi_{\text{PSII}}$ およびPeak heightの経時変化を示す。光合成速度は[- , +]と[- , -]においてCO<sub>2</sub>不足により大きく低下したが、[+ , -]では暗呼吸、光呼吸およびオルタナティブ電子伝達の一部(Water-water cycle)が阻害されたことにより光合成速度が上昇した。 $\Phi_{\text{PSII}}$ とPeak heightは[- , +], [+ , -], [- , -]において低下が確認され、両パラメータ間に有意な相関が認められた(R = 0.66)。また、光合成速度とPeak heightには有意な強い相関が確認された(R = 0.96)。

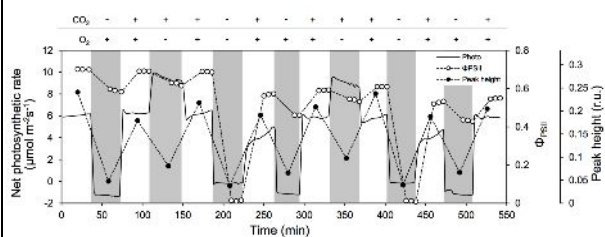


図 5 Changes in net photosynthetic rate,  $\Phi_{\text{PSII}}$  and Peak height under various gas conditions.

しかしながら、Peak height をもってしても [+ , -]における光合成速度の上昇を検知することはできなかった。このことは、O<sub>2</sub> free という特殊なガス環境下において、熱放散が強く活性化したためであると考えられた。

<引用文献>

- ① Asada, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 50, 1999, 601-639

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① K. Takayama, R. Hirota, N. Takahashi, H. Nishina, S. Arima, K. Yamamoto, Y. Sakai and H. Okada. Development of Chlorophyll Fluorescence Imaging Robot for Practical Use in Commercial Greenhouse. Acta Horticulturae, 1037, 671-676, 2014. 査読有 URL:[http://www.actahort.org/books/1037/1037\\_86.htm](http://www.actahort.org/books/1037/1037_86.htm)
- ② Kotaro Takayama, Diana King, Sharon A Robinson and Barry Osmond. Integrating Transient Heterogeneity of Non-Photochemical Quenching in Shade-Grown Heterobaric Leaves of Avocado (*Persea americana* L.): Responses to CO<sub>2</sub> Concentration, Stomatal Occlusion, Dehydration and Relative Humidity. Plant Cell Physiology, 54(11), 1852-1866, 2013. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pct128. Epub 2013 Sep 27

[学会発表] (計 1 件)

- ① 高山弘太郎, 原田沙織, 高橋憲子, 仁科弘重. 減圧パルス-クロロフィル蛍光計測技術による光合成速度評価. 日本生物環境工学会 2014 年東京大会. 講演要旨集 p. 84-85, 2014/9/8-11, 東京(明治大学).

[図書] (計 2 件)

- ① K. Takayama, Chlorophyll Fluorescence Imaging for Plant Health Monitoring. In Plant Image Analysis: Fundamentals and Applications, eds. S Dutta Gupta and Yasuomi Ibaraki, pp. 207-228, CRC press, 2014.
- ② 高山弘太郎, スマート農業—農業・農村のイノベーションとサステナビリティ(分担), 399 頁, : 生体情報計測の活用, pp. 181-183, 農林統計出版, 2014.

[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

<http://www.agr.ehime-u.ac.jp/faculty-and-graduates-school/shisetsu/shisetsu-2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 弘太郎 (TAKAYAMA, Kotaro)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号 : 40380266