LED 誘起蛍光法による植物葉とミドリムシの光合成活性の測定

増田健二[1]・竹本裕之[1,2]

[1]静岡大学、技術部

[2]静岡大学、グリーン科学技術研究所

我々は、植物にダメージを与えることなく光合成活性を測定できる LED 誘起蛍光法を開発した。 従来、植物の葉のクロロフィル蛍光スペクトル測定に用いられていたレーザー誘起蛍光法は、発熱により植物の光合成反応が低下し、光合成活性を正確に測定できなかった。今回開発した方法では、LED 光をホットミラーとシアンフィルターに通すことで、620nm より長い波長の遠赤色光と近赤外光はカットする。これにより、近赤外光による発熱や、730nm 付近の遠赤色光による光合成に関わるフィトクロムの不活性化を防ぐことができる。植物葉の光合成反応を低下させることなく、クロロフィル量を正確に測定できるため、光合成活性を高精度に診断することが可能である。本手法の応用例として、ミドリムシの光合成活性の測定も示す。

Key Words: *absorption energy, chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, laser-induced fluorescence method*

1. はじめに

光合成色素は光合成に働き、光合成の細胞内器官である葉緑体に存在する。葉緑体は、その中にチラコイド膜を持っており、クロロフィルやカロテノイドの多くは、タンパク質と結合してこのチラコイド膜の中に存在する。クロロフィルは炭酸同化を行い、でんぷん類をつくり栄養として蓄える。カロテノイドは吸収した光エネルギーをクロロフィルに渡す光捕集機能を持ち、過剰な光による傷害を防ぐ光防御機能であるキサントフィルサイクルをにない、過剰な光エネルギーを熱に変換して放散している。

図 1 に、光合成とクロロフィル蛍光の模式図を示す。光エネルギーを吸収して誘起状態となったクロロフィル *a* 色素が元の基底状態に移るときに、その差に相当するエネルギーを放出する。このうち、一部が蛍光という形で放出されたものをクロロフィル *a*（以降 Chl*a*）蛍光という[1)]。Chl*a* 蛍光は、光合成活性に関係し、古くから光合成反応系の解析に利用されてきた[2)]。

これまでの Chl*a* 蛍光の解析手法は、レーザー誘起蛍光 (Laser-Induced Fluorescence：LIF) 法[3)-6)]により、植物葉の Chl*a* 蛍光スペクトルを測定しているものである。緑葉ではクロロフィルによる 685nm (F685)と 740nm (F740)に蛍光のピークが見られる。Chl*a* (P680)を誘起させる光の波長は 680nm 未満であり、光合成に利用されない余剰エネルギーのほとんどは、PS II からカロテノイド

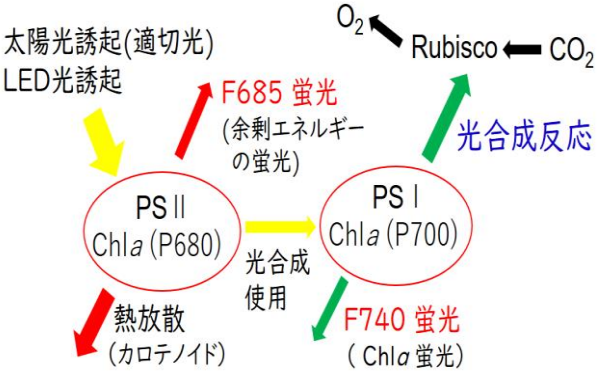


図 1 光合成とクロロフィル *a* 蛍光の模式図

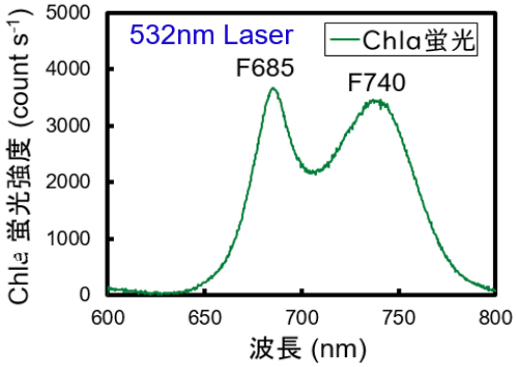


図 2 レーザー誘起蛍光法（従来手法）

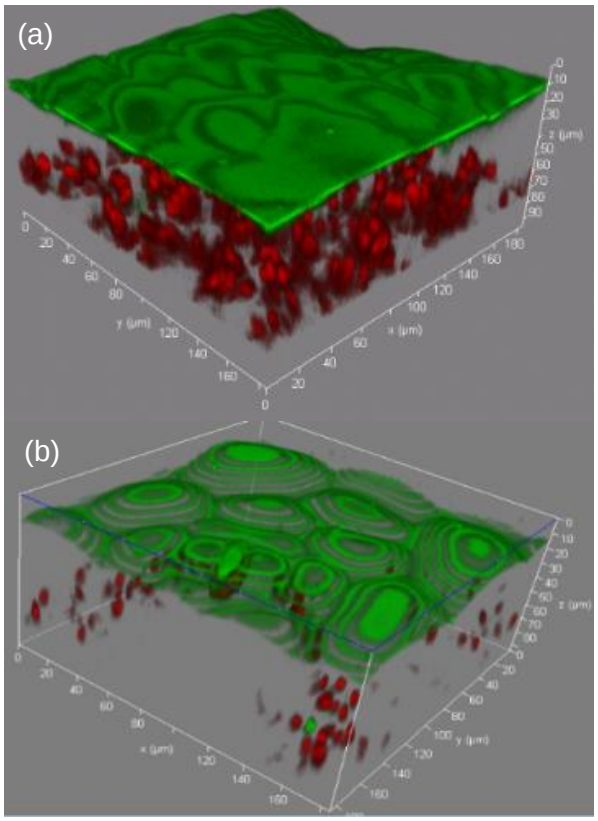
に送られ、熱に変換されて放散される。また、ごく一部が蛍光(F685)という形で放出される。740nm にピークがある Chl*a* 蛍光は、光合成活性状態でチラコイド膜内に存在する光化学系I (PSI)のクロロフィルから発せられる [7]。

従来の方法には、紫外・可視レーザー光を用いたレーザー誘起蛍光法があり、植物葉のクロロフィル蛍光スペクトルを測定している。図 2 のように、レーザー光を植物葉に照射するとその熱のため、植物の光合成反応は衰退し、F740 蛍光ピーク値は小さくなっていく、このため正確な光合成活性の測定ができなかった。本研究では植物にダメージを与えることなく、光合成活性を測定できる LED 誘起蛍光法を開発した [8]。本技術では、ほとんど熱がでない（赤外線カット）LED を照射するため、植物葉の光合成活性を衰退させることなく、クロロフィル含量の定量的な測定ができ、精度が高い光合成活性の診断が可能となった。また今回、この技術をミドリムシの光合成活性の測定に応用した。

2. ポトス葉（緑葉・白葉）の Chl*a* 蛍光

植物葉として、緑色の葉に白色の斑入りのポトス葉を用いた。共焦点レーザースキャナー蛍光顕微鏡(Leica TCS SP8)では、倍率 63 倍において表面から 100μm 程度の深さまで測定ができる。本装置を用いて 740nm にピークのある Chl*a* の蛍光画像を取得した。図 3 (a)の緑葉では深さ 30μm 程度からの棚状組織に米粒状の Chl*a* 蛍光(F740)が密集して見られた。表皮細胞部分には、厚さ 5μm 程度の高濃度のフラボノイドが存在し、有害な紫外線を吸収する働きをしている。フラボノイドは紫外線で誘起すると、緑色の蛍光を発する。図 3(b)の白葉では、米粒状の Chl*a* 蛍光は点在しており、フラボノイドもより薄くなり楕円縞模様となっている [6]。

冷却式 CCD 分光器（Ocean Optics QE65Pro：波長範囲 500－870nm, 波長分解能 0.1nm, 感度 16bit）を用いて分光スペクトル計測を行った。図 3 (c)に示すように、LED 光(破線)をシアンフィルタ(620～740nm カット)とホットミラー(675nm～カット)を透過させて、620nm より長波長側をカットした光(青一点鎖線)で誘起すると、685nm と



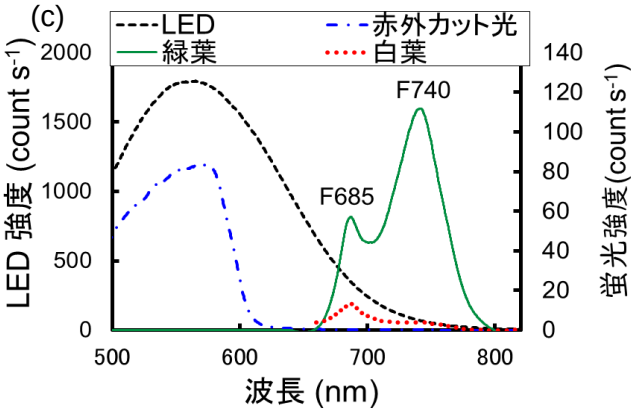


図 3 Chl*a* 蛍光スペクトルと Chl 含量 蛍光顕微鏡画像
(a)緑葉 (b)白葉 (c)LED 光誘起 Chl*a* 蛍光

740nm にピークのある緑葉の Chl*a* 蛍光スペクトル(緑線)が検出できる。白葉(赤点線)では、740nm のピークはほとんどなくなり、685nm のピークも小さくなっている。

3. 葉色別の SPAD と Chl*a* 蛍光スペクトルの比較

植物葉の光合成反応の活性化の診断のために考案されたのが葉緑素計(SPAD: Soil and Plant Analyzer Development）である。クロロフィルが吸収する赤色(650nm)と吸収のない近赤外(940nm)の LED 光を交互に照射すると、光が葉を透過して受光素子に導かれて光電変換される。これら2つの光学濃度を測定し、差を元にSPAD値を求めている(光学濃度差方式)。SPAD値によりクロロフィル濃度の推定も可能となっている [9)-12)]。SPAD 値はクロロフィル含量と相関があり、作物の窒素吸収が多いと、葉中色素のうち光合成に必要なクロロフィル含量が高まり、葉色が濃くなる。水稲では葉身の窒素含有量が高まるにつれてクロロフィル含量が直線的に増加する。水稲の窒素栄養状態の測定では、葉色より精度が高い診断が可能である [13)]。

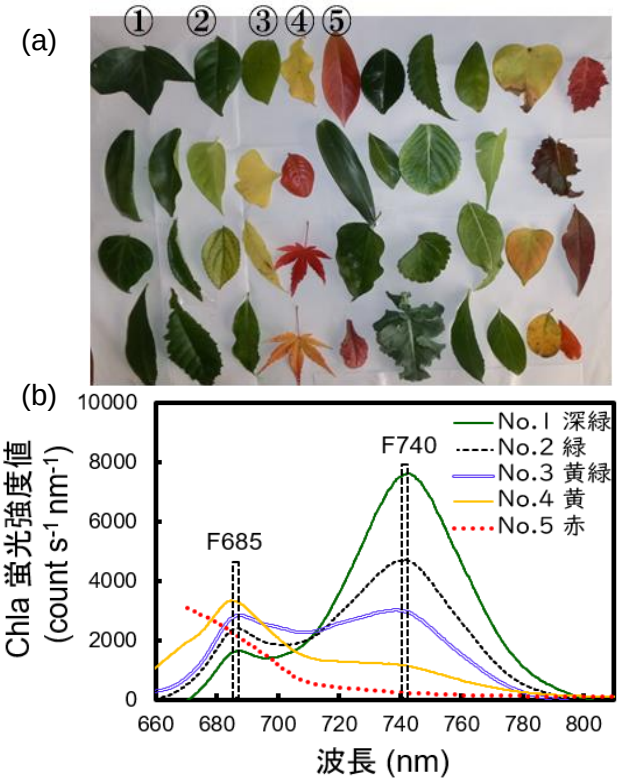


図 4 葉色と SPAD 値とクロロフィル *a* 蛍光の比較
(a) サンプル葉 (b) Chl*a* 蛍光スペクトル

図 4 (a)のように、① 深緑(SPAD 値：62.6)＞② 緑(44.0)＞③ 黄緑(29.3)＞④ 黄(15.5)＞⑤ 赤(3.0)の順で SPAD 値が大きくなった。

図 3 (c)の青一点鎖線のような 620nm より長波長側をカットした LED 光で誘起すると 685nm と 740nm にピークのある Chl*a* 蛍光が検出できる(図 4 (b))。光化学系 II (PSII)の Chla に集められた励起エネルギーは、光合成に利用されない場合、ほとんどが熱として放散され、ごく一部が F685 蛍光として PSII から放射される。740nm にピークを持つ Chla 蛍光は、活発な光合成の際にチラコイド膜に存在する PSI の Chl から放出される。

LED により光合成有効放射強度（Photosynthetically Active Radiation, PAR）が 350μmolm^{-2}s^{-1} 程度の適切な強度光を照射すると、光合成反応が起こる。①深緑葉は光合成が活性化し、F740 蛍光強度値が最も大きくなり、光合成に使われないで放出される F685 蛍光の強度値が最も小さくなっている。反対に、⑤黄葉は、F740 蛍光強度値は小さくなり、F685 の余剰エネルギーの蛍光強度値が大きくなっている。

4. SPAD 値と Chl*a* 蛍光ピーク、植生指数の比較

SPAD 値が同じくらいの値に偏らないように 40 枚の葉を選び、SPAD 値と Chl*a* 蛍光を測定した。図 5 は、横軸

正規化植生指数(Normalized Difference Vegetation Index)

$$NDVI = \frac{R_{NIR} - R_{Red}}{R_{NIR} + R_{Red}} \quad NIR : 850nm,\ Red : 680nm$$

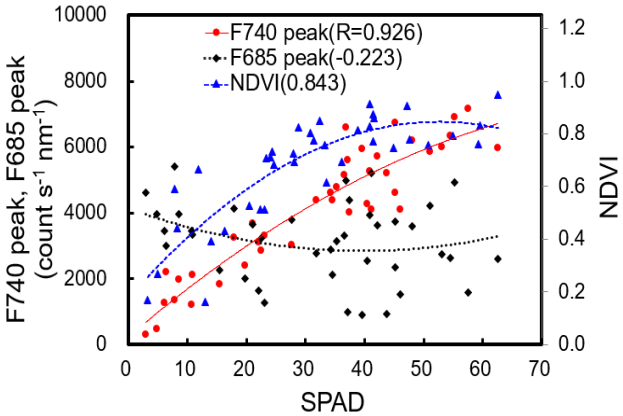


図 5 SPAD 値と Chl*a* 蛍光ピーク値、NDVI の比較

に SPAD 値、主軸に F740 (739.5-740.4nm) と F685 の蛍光ピーク値、2軸に正規化植生指数（NDVI）を示したグラフである。SPAD 値と F740 peak (●)の相関係数が 0.926 と高い相関を示した。SPAD 値と NDVI(▲)もよい相関(R=0.843)を示す。このことから、光合成活性は Chl*a* の相対含量に由来し、PSIから発する F740 蛍光強度値から判断が可能であることが分かる。また、光合成に使用されずに PSIIから放出される F685peak(◆)には SPAD 値との間に相関関係が見られない。

5. 植物葉とミドリムシの蛍光スペクトルの比較

ミドリムシ（ユーグレナ）は、葉緑体内の Chl*b* に二酸化炭素を取り込んで酸素に変換する炭酸同化作用を行い、多糖類のパラミロンを生成して栄養として蓄える。藻類には、ミドリムシのように光合成を行うものがよく知られている。例えば緑藻には、Chl*b* とカルテノイドが存在する[14]。

LED を用いたミドリムシの蛍光スペクトル測定には、冷却 CCD 分光器（Ocean Optics QE65Pro）を用いた。光源には高輝度 LED 懐中電灯（KENSUN）を使用し、自作ホルダーに取り付けた。ホルダーの前面にはホットミラーを，背面にはシアンフィルターを取り付けた。ホットミラーとシアンフィルターとの距離は 10mm である。LED フラッシュライト（8000 lm）の照射距離は 20mm、赤外線カット LED の光合成有効放射量（PAR）は、約 350 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ である。

ミドリムシの測定装置は、水面に対して 45°の角度で LED 光を照射します。光ファイバーの先端は、水面に対して垂直に、ミドリムシを入れた凹スライドグラスの中心から 20mm の位置に設置し、凹部分の全面（直径 15mm）の光を集光する（図 6）。

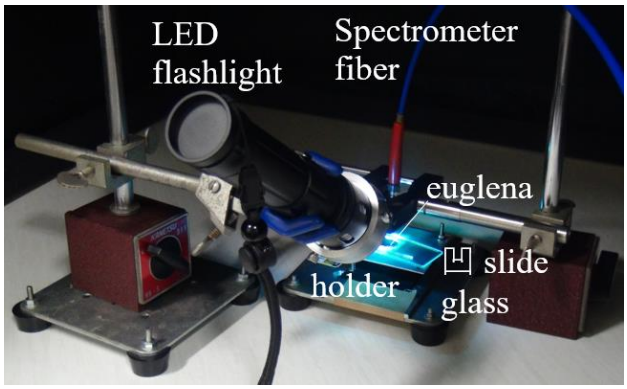


図 6　LED 誘起蛍光法によるミドリムシの測定装置

LED 誘導蛍光法の光源（青線）は、LED 光（破線）をホットミラー（675nm～NIR カット）とシアンフィルター（620～725nm カット）に通すことで赤外線をカットしている。ユーグレナの Chl*b* 蛍光のピークは 685 nm の赤い点線である（図 7）。

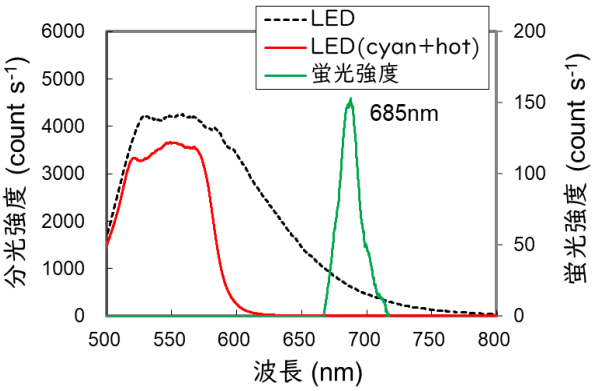


図 7　LED 誘起蛍光法によるミドリムシの蛍光測定

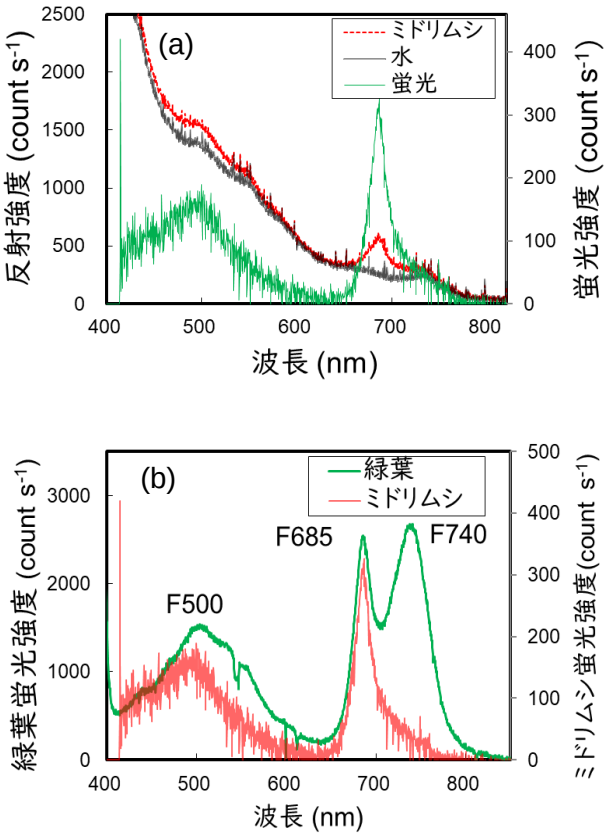


図 8 緑葉とミドリムシの蛍光スペクトル比較

(a) ミドリムシの蛍光取得法　(b) 紫外線誘起蛍光

UV（350－400nm）ライトを用いた蛍光スペクトル測定には、CCD 分光器（Ocean Optics USB2000: 波長範囲 180－880nm, 波長分解能 0.4nm, 感度 14bit）を使用した（図 8）。

図 8 (a) に UV ライト(Alonefire XHP99)を誘起光源に用いたミドリムシの蛍光検出方法を示す。凹スライドガラスに80$\mu\ell$のミドリムシの培養液を入れ、UV ライト光を照射して、ミドリムシの反射光（赤線）を取得した。ミドリムシ（赤線）から水（黒線）の反射光を差分したのが蛍光強度スペクトル（緑線）である。ミドリムシの Chl*b* は、赤色の波長の光を吸収して、光合成反応に伴う F685 蛍光を発する。また、カルテノイドは、青色の光を吸収して F500 蛍光を発する。緑葉とミドリムシにおけるカルテノイドの F500 蛍光とクロロフィルの F685 蛍光は類似している。ミドリムシは、緑葉のような光化学系I (PSI)からの F740 蛍光は見られなかった。

6. おわりに

開発した LED 誘導蛍光法は、植物葉の光合成反応を低下させることなくクロロフィル量を正確に測定できるため、光合成活性を高精度に診断することが可能です。本法の応用例として、ユーグレナの蛍光・吸収スペクトルを測定し、光合成活性の診断を行いました。

植物の葉は、光合成色素としてクロロフィル *a*（Chl *a*）を含み、光化学系 I（PSI）と光化学系 II（PSII）の直列からなる電子伝達系を持っています。適切な光（PAR: 200-600 mol m^{-2} s^{-1}）応答において、Chla の光形態形成に関わるフィトクロムは、赤色光（600-670 nm）の吸収により活性化される。F740 蛍光は、光合成によって活性化されたチラコイド膜の PSI に含まれる Chla が、吸収したエネルギーを励起状態から基底状態に戻す際に放出する蛍光である。光合成に使われなかった励起エネルギーの大部分はカロテノイドに移動し、熱として放散される。また、少量は PSII から蛍光（F685）として放出される。Chla 含量は、光合成反応時に PSI から放出される F740 蛍光と光合成に利用されない PSII から放出される F685 蛍光の 2 つのピーク波長の強度比（F740/F685）から求めることができる。Chla 量と F740 蛍光強度値には高い相関があった。このことから、光合成活性は Chla 量に由来し、PSI から放出される F740 蛍光強度値から判断することができることがわかった。

ユーグレナは光合成色素としてクロロフィル *b* (Chl*b*)を持ち、電子輸送に 1 種類の光化学系のみを用いている。光合成反応を行い、二酸化炭素を還元し、ユーグレナ特有の多糖類であるパラミロンと、細胞内貯蔵物質である脂肪を生産している。ユーグレナの濃度が高くなると、赤色吸収率（吸収したエネルギー量）が増加し、同じ割合で蛍光強度値も増加しました。このことから、ユーグレナの光合成活性は、Chlb が吸収した励起エネルギー量に由来し、F685 の蛍光強度値から判断することができることがわかった。本研究の方法は、非破壊・非接触でミドリムシの光合成活性を測定でき、緑の反射率による増殖の評価や Chl*b* 蛍光強度を用いた光合成活性の診断を行う技術としてのシステム開発への応用が期待できる。

謝辞

本研究を実施するにあたりミドリムシを提供して頂きました、静岡市立高校の曲田澄子先生、科学探究科 2022 年度課題研究ミドリムシ班の生徒の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

1) G.H.Krause & E.Weis. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis. The Basics. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant.Mol.Biol, 42 313-349 (1991)
2) Govindjee. 63 years since Kautsky-Chlorophyll-*a* Fluorescence. Aust. J. Plant Physiol., 22 131-160 (1995)
3) E. W. Chappelle *et al*. Newcomb:Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. Appl. Opt., 23 134-138 (1984)
4) H. K. Lichtenthaler *et al*. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. J. Plant Physiol., 148 599-612 (1996)
5) Takahashi kunio *et al*. Study of a Method of

Measuring the Transverse Distribution of Illuminating Laser Light and Laser-Induced Chlorophyll Fluorescence in Plant Leaves Using A Micro-Fluorescence Imaging (MFI) System. Journal of Light & Visual Environment,22 (1) 53-62 (1998)

6) 増田健二（2014）「植物葉の蛍光リモートセンシング計測システムの開発とストレス障害」静岡大学技術報告 19 25-30（URL,http://doi.org/10.14945/00008037）

7) Zoran G. Cerovic *et al*. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. Agronomy. EDP Science., 19 (7)

8) 増田健二（2022）「植物群落の太陽光誘起蛍光による光合成測定」静岡大学技術報告 27 31-34（URL,http://doi.org/10.14945/00028636）

9) Campbell R. J. *et al*. Growing conditions alter the relationship between SPAD-501 values and apple leaf chlorophyll. HortScience, 25 330-331 (1990)

10) Sandoval V. M. *et al*. Ammonium concentration in solution affects chlorophyll meter readings in tomato leaves. J. Plant Nutr., 22(11) 1717-1729, (1999)

11) Rodriguez I. R. *et al*. Using a chlorophyll meter to determin the chlorophyll concentration, nitrogen concentration, and visual quality of St. Augustinegrass. HortScience, 35 751-754 (2000)

12) Netto A. T. *et al*. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. Sci. Hortic, 104 199-209 (2005)

13) 伊藤秀和（2014）「農作物の光応用による診断」照明学会誌 98-9 516-520

14) 日本光合成学会「クロロフィルとカルテノイドの吸収スペクトル」光合成事典