

原著論文

微小藻類の *in situ* クロロフィル蛍光顕微画像計測Microscopic Image Instrumentation of Chlorophyll a
Fluorescence from *in situ* Microalgae

遠藤良輔* 大政謙次* 近藤次郎**

Ryosuke ENDO*, Kenji OMASA*, Jiro KONDO**

*東京大学大学院農学生命科学研究科 113-8657 文京区弥生 1-1-1

*The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Science,
Yayoi 1-1-1 Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan

**財団法人国際科学技術財団 115-0001 港区虎ノ門 4-3-20

**The Science and Technology Foundation of Japan,
Toranomom 4-3-20 Minato, Tokyo, 115-0001, Japan

ABSTRACT

We have developed a new image instrumentation system of chlorophyll a fluorescence with an optical microscope, capable of *in situ* analysis at the cellular level. With this system we analyzed the effects of DCMU on photosynthetic activity of green alga *Closterium navicula*. The fluorescence parameters qP , qN and NPQ , and $Yield$, which represent photochemical quenching, non-photochemical quenching, and photosystem II photochemical efficiency, were calculated from images taken under actinic and saturating illumination. Chlorophyll fluorescence (F and F'_m) intensity of alga whose photosystem inhibited by DCMU was higher than healthy alga. The qN and NPQ was reduced greatly throughout injured alga. These results indicated the inhibition by DCMU eliminated non-photochemical quenching. In contrast, qP and $Yield$ were not very different from healthy alga. These results showed that photochemical quenching occurred ordinarily, but $Yield$ could not be applied as an indicator of CO_2 fixation rate in such a case. It is necessary to choose the experimental condition to determine the validity of $Yield$.

Key words : Chlorophyll fluorescence, *Closterium navicula*, DCMU, Microscopic image instrumentation, Quenching parameter

1. はじめに

クロロフィル蛍光画像計測は、非破壊・非接触で光合成生物の機能を解析する手法の一つである。光合成反応中心から能動的に発せられるクロロフィル蛍光の強度を測定することで、電子伝達反応や光リン酸化反応など、光合成反応過程についての直接的な診断をすることが可能である¹⁾。クロロフィル蛍光画像計測の歴史は比較的早く、水ストレス障害²⁾、低温障害³⁾、大気汚染物質障害^{3),4)}などの植物障

害診断や、生理機能解析の手段として用いられてきた。また、対象も藻類⁵⁾⁻⁷⁾を含めて光合成生物全般にわたって研究がなされている他、インダクション法⁴⁾や飽和パルス法⁸⁾、及びそれらを組み合わせたもの⁹⁾など、手法についても多くの開発がなされている。近年では対象のマイクロ化が進み、気孔の蛍光画像計測¹⁰⁾や、画像計測手法を用いてはいないが、単一の気孔孔辺細胞プロトプラストの蛍光強度測定¹¹⁾もなされている。特に、藍藻を含む藻類には、突然変異体や遺伝子組み替え個体の迅速な選別⁵⁾や、自然個体

群の *in situ* での微量の測定⁵⁾にクロロフィル蛍光が利用されている。また藻類は、環境モニタリングの材料^{12), 13)}として広く用いられており、ミクロな単位での蛍光画像計測を実現することで、さらに個体レベルでの光合成機能の解析が可能になると考えられる。

しかし、単一細胞レベルで、*in situ* によるクロロフィル蛍光画像計測を行った報告はなく、藻類についても、既往の報告の多くは個体群レベルの平均蛍光強度を計測するにとどまっている⁵⁻⁷⁾。しかし、単一細胞レベルでの蛍光強度が *in situ* で計測可能ならば、同一の刺激に対する生体反応の個体間でのばらつきや、細胞内におけるクロロフィル蛍光の面的な分布など、より詳細な生体の解析が可能になると思われる。

そこで本研究では、細胞レベルの解像度を持つ光学顕微鏡を、クロロフィル蛍光画像計測システムに組み込んだ新しいシステムを開発した。そして、代表的な緑藻の一種であるミカヅキモに対して、光合成阻害剤であるDCMUを滴下し、飽和パルス法によって解析を行った。一連の計測は、全て *in situ* で行われた。

2. 材料及び方法

2.1 実験材料

供試材料には、東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能高分子総合センターIAMカルチャーコレクションで継代培養されたミカヅキモ (*Closterium navicula* L., IAM No.C-573) を用いた。ミカヅキモは室温20℃、日長12時間 (光源には蛍光灯を使用し、培養槽付近におけるPPF (Photosynthetic Photon Flux) は $75 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) の人工光温室において培養したものを用いた。培養槽は攪拌器によって24時間攪拌され、ミカヅキモが沈殿しないように注意した。培養液にはC培地 (List of Strains (2000); NIES-Collection, p30) を用いた。供試体は、生育状態のよいものを選択し、ピペットを用いてプレパラートに各試験区とも $1 \mu\text{l}$ ずつ滴下した。しかし、プレパラートに直接滴下すると、時間の経過につれ供試体が視野からずれてしまうため、プレパラート上にパルプを置いてそれにミカヅキモを滴下し、ミカヅキモをパルプに絡めることで、同一の箇所固定できるようにした。なお、ミカヅキモ自体は運動能力を有さず、この処理による蛍光強度の変化は確認されなかったため、ストレスはかかっていると判断した。

2.2 クロロフィル蛍光顕微画像計測システム

ここで、飽和パルス法について説明する。クロロフィルは、吸収した光によって励起され、そのエネルギーを反応中心に伝えている。このエネルギーは電子伝達系を通過して、

最終的には炭素固定に用いられるが、吸収された光エネルギーが全て光合成反応に用いられるわけではない。使われなかったエネルギーの内のほとんどは熱として外部に放散されるが、その他の極僅かなエネルギーは、吸収した光よりも長波長側の光エネルギーとして放出される。これがクロロフィル蛍光と呼ばれるもので、光化学系IIの電子受容体 Q_A の酸化還元状態を反映しているとされる^{1), 14)}。この蛍光強度は、光合成生物内部でエネルギーがどのように使われたかを反映しており、光化学系の活性化 (光化学的クエンチング) や、熱放散の増大、及びチラコイド膜内外のpH勾配形成 (非光化学的クエンチング) によって値を減少させる¹⁴⁾。飽和パルス法は、明期条件下での蛍光強度の減少について、二つのクエンチング成分 (光化学的クエンチング及び非光化学的クエンチング) を分離し、それらの値を計測することで有意義な生体情報を抽出する方法である⁸⁾。本システムは、この蛍光現象を細胞レベルの解像度で連続的に画像計測し、解析するものである。

F_m 画像・ F 画像・ F'_m 画像は、飽和パルス法において、各種の蛍光クエンチングパラメーター画像を算出するのに用いる蛍光パラメーター画像である。 F_m 画像の輝度値は、暗期条件下で光化学系IIの全ての電子受容体が還元された時点の蛍光強度を示している。また、 F 画像は明期条件下での定常蛍光強度、 F'_m 画像は、明期条件下で光化学系IIの全ての電子受容体が還元された時点の蛍光強度を示している。

Fig. 1 にクロロフィル蛍光顕微画像計測システムの概念図を示す。光源にはハロゲンランプ照射装置2台を使用し、

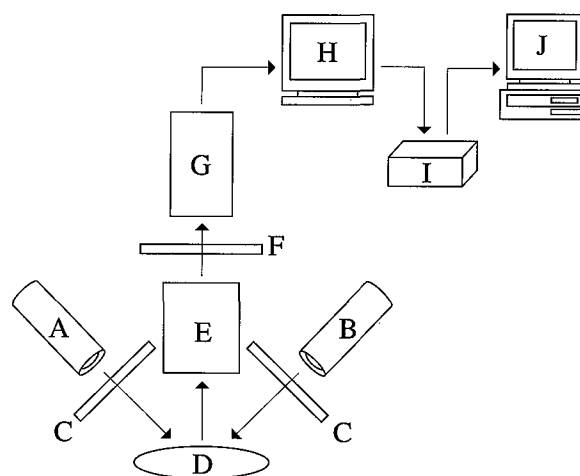


Fig. 1 Chlorophyll a fluorescence imaging system with optical microscope. : A, Actinic light source; B, Saturation light source; C, Short-pass filter ($\lambda \leq 560.0 \text{ nm}$); D, Test organism; E, Objective; F, Long-pass filter ($\lambda \geq 665.0 \text{ nm}$); G, Cooled charge-coupled device (CCD) camera; H, Monitor; I, Digital video recorder; J, Computer.

一方を明期条件にするための励起光照射用 (PPF75 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、もう一方を飽和パルス光照射用とした。飽和パルス光は光化学反応系の電子受容体を一時的に飽和させるのに十分な強度が必要である⁸⁾。そこで、照射光を様々に設定し、その際発せられる蛍光収率について調べた (Fig. 2)。その結果、蛍光収率は PPF 450 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 付近をピークとして、それ以上の光照射では逆に蛍光収率が減少することが確認されたため、飽和パルス光の光強度を PPF 450 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に設定した。また、両光源の制御は、照射口に設置したシャッターをプログラムにより開閉することで行った。両光源の光照射口には、光学フィルター ($\lambda \leq 560 \text{ nm}$) を装着し、ミカヅキモに照射される光を短波長光に限った。なお、照射光は光ファイバーによって測定するミカヅキモに誘導した。

励起されたクロロフィル蛍光は、光学顕微鏡の鏡筒内に設置された光学フィルター ($\lambda \geq 665 \text{ nm}$) を通って、冷却型 CCD カメラ (浜松ホトニクス C5952-02) によって撮像された。この画像をデジタルビデオレコーダー (SONY DSR-V10) によって連続的に録画し、静止画キャプチャーボードを介してコンピューターに取り込んだ。その後、画像を 8 bit (0 - 255)、640×480 pixels のグレースケールに変換し、各種蛍光パラメーター画像、及びクエンチングパラメーター画像の算出に用いた。ここで、画像補正の必要性を判断するため、CCD カメラに入射した蛍光強度と、計測された画像の A/D 変換値との関係について調べた。具体的には、拡散板を通して得た人工蛍光を、光強度を変化

させて本システムで使用する CCD カメラにより測定した。測定した画像を A/D 変換し、光強度との関係を調べたところ、Fig. 3 に示されるように、線形関係が成り立っていることが確認できた。また、照射光は計測範囲内を均一に照射していると判断できた。

2.3 計測及び解析方法

本システムにおける照射光、及び励起される蛍光強度の経時変化を Fig. 4 に示す。Fig. 4 A は、蛍光強度の経時変化、及び蛍光画像の取得時点を示し、Fig. 4 B は照射光強度の経時変化を示している。

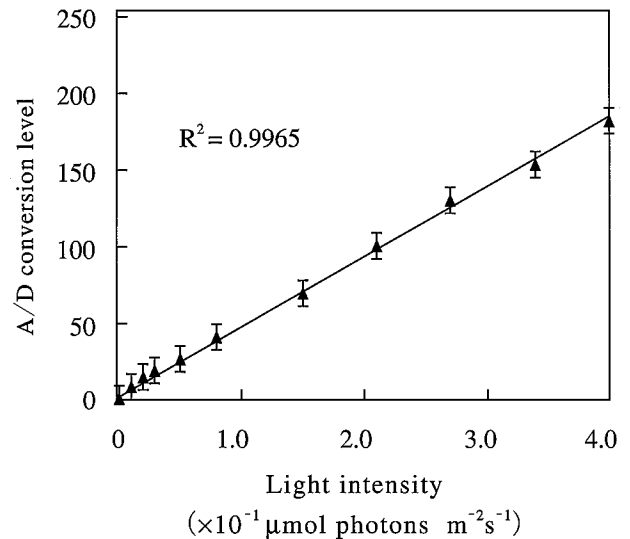


Fig. 3 Relationship between the intensity of fluorescence-like artificial light and the A/D conversion level of digital video image. The vertical bar indicates \pm SD.

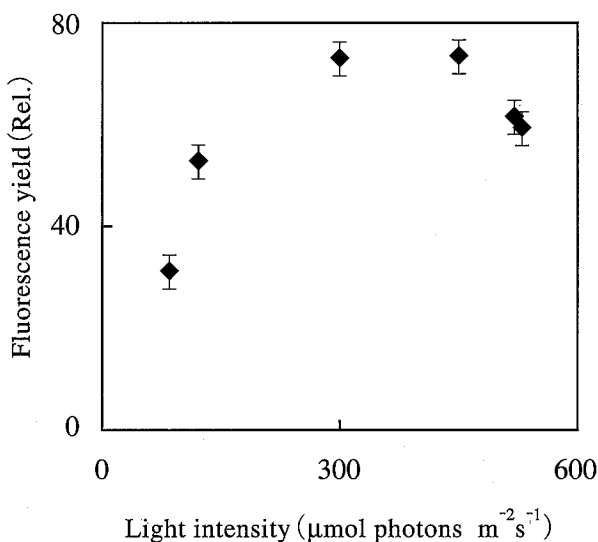


Fig. 2 Relationship between the intensity of light pulse (2.0 s) and the chlorophyll fluorescence yield. The vertical bar indicates \pm SD.

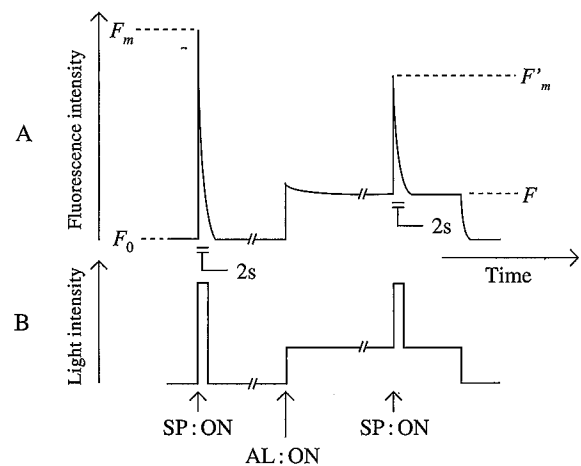


Fig. 4 Schematic diagram of chlorophyll fluorescence imaging process. A, Time course of fluorescence intensity; B, Time course of light intensity irradiated to the sample. SP: Saturation Pulse AL: Actinic Light

ミカヅキモは、光化学系の Q_A を全て酸化させるため、約30分間暗処理した後実験に使用した。まず、暗期条件下で飽和パルス光を照射し、照射中に F_m 画像を取得した。その後、約20分間暗処理を行い、励起光の照射を開始した。ミカヅキモの蛍光強度が安定した後、再び飽和パルス光を照射し、照射直前に F 画像、照射中に F'_m 画像を取得した。

なお、本実験は試験区として、DCMU (3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素) によって光化学系IIの電子伝達を阻害されたミカヅキモを用いた。DCMUは尿素系光合成阻害剤であり、光化学系IIの電子受容体 Q_B に特異的に作用し、次の電子受容体であるプラストキノン(PQ)への電子の受け渡しを阻害する^{13, 14, 15}。このDCMUを、50 μ Mのモル濃度で滴下した試験区を用意し、対照区との蛍光強度、及び蛍光クエンチングパラメーター画像の差について解析した。DCMU試験区の作成及び蛍光パラメーター画像取得は以下の手順で行った。対照区と同一個体についてDCMUの影響を調べるため、対照区の試験から開始し、対照区の F'_m 画像を撮り終えた後、約20分間静置かつ暗処理を行った。そして、明期条件移行後にDCMUを滴下することで、DCMU試験区とした。その後、試験区を明期条件下におき蛍光強度が定常状態に達した時点で飽和パルス光を照射し、照射直前に F 画像、照射中に F'_m 画像を取得した。そして、約20分間暗処理を行った後で飽和パルス光を照射し、 F_m 画像を取得した。

これらの蛍光パラメーター画像を用いて、蛍光クエンチングパラメーター画像である、 qP 画像・ qN 画像・ NPQ 画像・ $Yield$ 画像を算出した。 qP 画像は、光化学系IIに存在する電子受容体 Q_A のうち酸化状態にある割合を示しており、次式によって求められる。

$$qP = \frac{F'_m - F \times ratio}{F'_m - F'_0}$$

ここで、 F'_0 とは暗期条件下において近赤外光を照射し、光化学系Iを活性化して電子受容体を完全に酸化した状態での蛍光強度であり、本研究では

$$F'_0 = 0.2 \times F_m$$

とおいた⁸⁾。また、クエンチングパラメーター画像を算出するに当たっては、同一の光強度下での蛍光強度である、相対的蛍光収率を求める必要がある。そこで、飽和光と照射光の光強度の比を算出し ($ratio$)、 F 画像に掛けることにより、クエンチングパラメーター画像を算出した。 qN 画像は、非光化学的クエンチングの指標となるパラメーター画像であり、葉緑体内におけるチラコイド膜内外のpH勾配の形成、吸収された光エネルギーの熱エネルギーとし

での発散等を示している。 qN 画像は次式により算出した¹⁶⁾⁻²⁰⁾。

$$qN = 1 - \frac{F'_m - F'_0}{F_m - F'_0}$$

ここで、

$$F'_0 = F'_0 = 0.2 \times F_m$$

とおいた⁸⁾。 NPQ 画像も qN 画像と同様非光化学的クエンチングについてのクエンチングパラメーター画像であるが、 qN 画像に比べ熱エネルギーとしての放散の影響を大きく反映するとされる¹⁵⁾。 NPQ 画像は次式により算出される。

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}$$

$Yield$ 画像は、光化学系IIに存在する電子受容体 Q_A のうち酸化状態にある割合 (qP) と、そのうち電子伝達に利用された光量子 ($F'_m - F'_0 / F'_m$) との積であらわれ、 CO_2 固定速度と相関がある蛍光パラメーターといわれる²⁰⁾。 $Yield$ は次式によって算出される。

$$Yield = \frac{F'_m - F \times ratio}{F'_m} = \Delta \frac{F}{F'_m}$$

以上の各パラメーターはKooten and Snel²¹⁾に準拠した。

3. 結果及び考察

Fig. 5 に、本システムによって得られた蛍光画像を示す。対照区 (Fig. 5 A) に比べて、DCMUを滴下した試験区 (以下、DCMU区と略; Fig. 5 B) では、 F 及び F'_m 画像で高い蛍光強度が認められた。一方 F_m 画像は、対照区との間

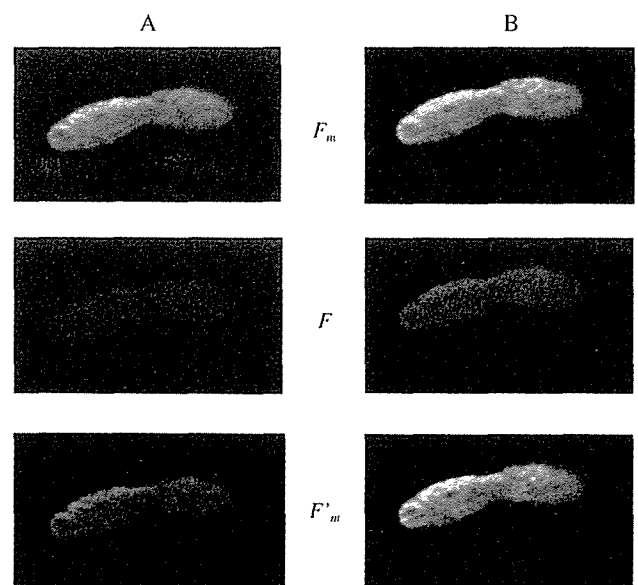


Fig. 5 Chlorophyll fluorescence images obtained by the saturation pulse method. A, Control; B, +DCMU 50 μ M.

に差が余りみられなかった。その理由としては、暗期条件で飽和パルス光を照射すると、どちらの試験区においても Q_A が一時的に全て還元され、吸収した光エネルギーのほとんどを蛍光として放出したためと考えられる。 F 画像については、対照区では連続的な励起光照射によりミカヅキモが明期条件に適応し、 Q_A の酸化による光化学的クエンチングの形成、また、吸収したエネルギーの熱としての発散、及びチラコイド膜エネルギーの増加による非光化学的クエンチングの形成によって蛍光強度が減少したと考えられる。一方DCMU区では、光化学系IIでの電子伝達阻害により、吸収した光エネルギーを光合成に利用できず、その多くを蛍光として発散してしまうため、蛍光強度が高く保たれたと考えられる。

F'_m 画像が、DCMU区において高い蛍光強度を示した理由については次のように説明できる。対照区では、正常な光合成反応に伴う非光化学的クエンチングの形成により、吸収した光エネルギーが CO_2 固定反応系に用いられるため、蛍光強度が F'_m 画像より低い値となるが、DCMU区では、DCMUにより光合成反応が阻害され、非光化学的クエンチングが正常には形成されないため、吸収した光エネルギーの大部分が蛍光として放出されてしまい、蛍光強度が F'_m 画像とほぼ同じ値になったと考えられる。

つぎに、上記の蛍光パラメーター画像から得られた蛍光クエンチングパラメーター画像についてFig. 6に示す。Fig. 6 Aは対照区の、またFig. 6 BはDCMU区の画像である。

qN 画像及び NPQ 画像の両試験区の差は、DCMUによる障害部位を明確に検知していた。これら二つのクエンチングパラメーター画像は、非光化学的クエンチングの割合を示すパラメーター画像であるが、Fig. 6より、DCMU区では qN 画像及び NPQ 画像が極めて低い値をとっており、非光化学的クエンチングが形成されていないことを示している^{14), 22)}。またこの結果は、通常 CO_2 固定速度と相関があるとされる $1-qN$ ²³⁾が、DCMUによる光合成機能障害においては CO_2 固定の阻害程度と相関を示すという報告を支持するものである⁸⁾。

一方、 qP 画像及び $Yield$ 画像は、両試験区間にあまり差がみられなかった。これらの画像で差が見られなかったことにより、DCMUによって Q_A から Q_B への電子の受け渡しが阻害されても、光化学的クエンチングは起こっていたと考えられる。また、既往の研究によれば、 $Yield$ 画像は CO_2 固定速度と相関のあるパラメーターといわれているが^{20), 22)}、DCMU区での $Yield$ 画像が低下しなかったことから、条件によっては、 $Yield$ 画像を CO_2 固定速度の指標としては使用できないことが示唆された。

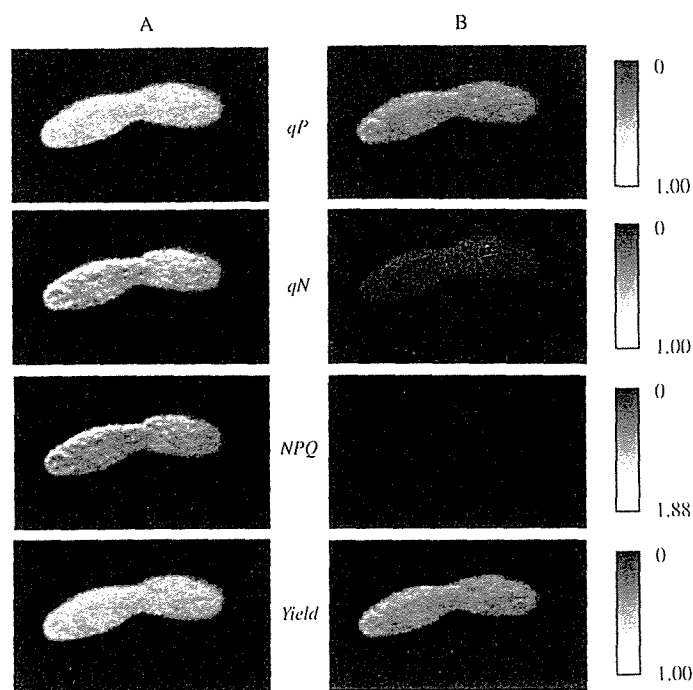


Fig. 6 Quenching parameter images (qP , qN , NPQ and $Yield$) obtained by the saturation pulse method. A, Control; B, +DCMU 50 μ M.

4. おわりに

本研究において開発したクロロフィル蛍光顕微画像計測システムを用いて、飽和パルス法による *in situ* でのミカヅキモの蛍光画像解析を行った結果、非光化学的クエンチングを反映するパラメーター画像 (qN , NPQ) において、DCMUによる光合成機能障害を明確に検知することができた。また、 qP 画像より、DCMU区においても光化学的クエンチングは起こっていたが、 $Yield$ 画像については、条件によっては CO_2 固定速度の指標としては使用できないことがわかった。

以上より、本システムによる微小藻類を用いた環境モニタリングや、植物の微小領域の蛍光測定への応用が可能であると考えられた。また、今後本システムに改良を重ねることで、より解像度の高い細胞小器官レベルでの計測を可能にするシステムを実現した場合、単一の葉緑体レベルでの蛍光強度の比較といった、より詳細な解析が可能になると考えられる。そうすれば、環境の変化に対する光合成生物の微小な応答の解析の他、生体内で実際に行われている、細胞または細胞小器官間での連絡等、諸々の生理機構の解明について、多大な寄与が可能であると期待される。

謝 辞

供試体として使用したミカヅキモ (*Closterium navicula* L., IAM No.C-573) は、東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能高分子総合センターIAMカルチャーコレクションの好意により譲渡して頂いた。また、実験と解析に際しては、本研究室の高山弘太郎氏の助力を得た。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- Govindjee: Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence, *Aust. J. Plant physiol.*, **22**: 131-160 (1995)
- Omasa, K., Maruyama, S., Matthews, M.A., and Boyer, J.S.: Image diagnosis of photosynthesis in water-deficit plants, *IFAC Workshop Series, No.1*, pp.383-388 (1991)
- Omasa, K. and Shimazaki, K.: Image analysis of chlorophyll fluorescence in leaves, In: Hashimoto, Y., Kramer, P. J., Nonami, H. and Strain, B. R. (Eds.), *Measurement Techniques in Plant Science*, Academic Press, pp.387-401 (1990)
- Omasa, K., Shimazaki, K., Aiga, I., Larcher, W. and Onoe, M.: Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves, *Plant Physiol.*, **84**: 748-752 (1987)
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A.K., Gustafsson, P. and Oquist, G.: Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**: 667-683 (1998)
- Douge, M., Ohmann, E. and Tschiersch, H.: Chlorophyll fluorescence quenching in the alga *Euglena gracilis*, *Photosyn. Res.*, **63**: 159-170 (2000)
- Lu, C.M., Chau, J.H. and Zhang, J.H.: Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis* - assessment by chlorophyll fluorescence analysis, *Chemosphere*, **41**: 191-196 (2000)
- Daley, P.F., Raschke, K., Ball, J. T. and Berry, J.A.: Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence, *Plant Physiol.*, **90**: 1233-1238 (1989)
- 大政謙次, 高山弘太郎, 後藤英司: 除草剤による植物の光合成機能障害の画像診断—クロロフィル a蛍光解析におけるインダクション法と飽和パルス法の比較—, *植物工場学会*, **13(1)**: 29-37 (2001)
- Oxborough, K., Baker, N.R.: An instrument capable of imaging chlorophyll alpha fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization, *Plant Cell Environ.*, **20(12)**: 1473-1483 (1997)
- Goh, C.H., Schreiber, U. and Hedrich, R.: New approach of monitoring changes in chlorophyll a fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli, *Plant Cell Environ.*, **22 (9)**: 1057-1070 (1999)
- 高山成久, 菅谷芳雄, 春日清一: 河川, 湖沼における化学物質汚染とバイオモニタリング, *環境科学会*, **13(2)**: 271-276 (2000)
- 大森俊雄: 河川, 湖沼, 海洋の汚染と微生物の作用, 大森俊雄: *環境微生物学*, 昭晃堂, pp.83-95 (2000)
- Krause, G.H. and Weis, E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**: 313-349 (1991)
- 本田 博, 赤塚尹巳, 佐藤仁彦, 近内誠登: *新農業概論*, 朝倉書店, pp.1-194 (1993)
- Schreiber, U.: Detection of rapid induction kinetics with a new type of high frequency modulated chlorophyll fluorometer, *Photosyn. Res.*, **9**: 261-272 (1986)
- Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W.: Continuous recording of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, *Photosyn. Res.*, **10**: 303-308 (1986)
- Bilger, W. and Schreiber, U.: Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves of *Hedera canariensis*, *Photosyn. Res.*, **10**: 303-308 (1986)
- Bilger, W. and Bjorkman, O.: Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*, *Photosyn. Res.*, **25**: 173-185 (1990)
- Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, N. R.: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **990**: 87-92 (1989)
- Kooten, O. V. and Snel, J. F. H.: The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology, *Photosyn. Res.*, **25**: 147-150 (1990)
- Genty, B. and Meyer, S.: Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging, *Aust. J. Plant physiol.*, **22**: 277-284 (1995)
- Weis, E. and Berry, J. A.: Quantum efficiency of photosystem II in relation to "energy"-dependent quenching chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **894**: 198-208 (1987)