

6

地球環境調査計測事典

Encyclopedia of Measurement and Analysis on Global Environment

第1巻 陸域編 ①

Vol. 1 Terrestrial Environment ①

監修

ニュートン編集長／東京大学名誉教授

竹内 均

フジテクノシステム

1-2 蛍光測定法

まえがき

生体内の蛍光分子は、それぞれ特有の励起エネルギー準位に対応する波長の光を吸収する。そして、励起されたエネルギー準位から、分子内振動によりエネルギーを失いながら最低励起準位に、さらに、吸収波長に比べて長波長の蛍光発光を伴って基底状態に戻る。このため、蛍光には、その蛍光を発している蛍光分子の状態に加えて、生体内でのエネルギーの放出過程の様々な反応に関連する情報が含まれる。蛍光の測定は、光の測定であるので、比較的測定が容易で、生体内の反応に関する情報を破壊することなく、また、非接触で得ることができる。このような特徴をもつ蛍光測定は、様々な分野において使用されているが、ここでは特に植物の生体情報計測手法としての蛍光測定について紹介する。

1. クロロフィル蛍光

クロロフィル蛍光は植物の光合成反応系のクロロフィル α から直接発せられる蛍光である。その波長域は生葉で683 nm付近にピークをもつとされる。クロロフィル α やその他の吸収色素によって吸収された光（クロロフィル蛍光を励起させる光の波長 λ は $\lambda < 683$ nmと考え、吸収された光エネルギーのうち、光合成に利用されなかったものはクロロフィル蛍光として排出される。クロロフィル蛍光が発せられるまでの概念図を図1に示す。

2. クロロフィル蛍光誘導期現象

1931年の「カウツキー効果（クロロフィル蛍光誘導期現象）」の発見以降、クロロフィル蛍光測定は植物科学における生体情報計測手法として頻りに用いられてきた。カウツキー効果とは暗期条件下で植物葉に光を照射すると、それに対応してクロロフィル蛍光強度が経時的に変化するというものである。このクロロフィル蛍光強度の経時変化をクロロフィル蛍光誘導期曲線とよぶ。クロロフィル蛍光誘導期曲線はO, I, D, P, S, M, Tというようにそれぞれの局面で特徴づけられている。これをO-I-D-P用語体系という。クロロフィル蛍光誘導期曲線とその用語体系を図2に示す。図2に示したO-I-D-P-S-M-T変化は光合成電子伝達系における特定の反応と対応しており、O-Iは光化学系IIにおける初期電子受容体 Q_A の光還元、I-Dは光化学系Iによる Q_A の部分酸化、D-Pは光化学系IIを介した水からの電子の流

れによる Q_A の還元、P-Sは光化学系Iの還元側の光活性化による Q_A の再酸化、さらにM-Tはチラコイド膜を介した高エネルギー状態の生成などを反映しているとされる。つまり、さまざまな環境ストレスがクロロフィル蛍光誘導期曲線に及ぼす変化を調べることににより、そのストレスが光合成のどの反応にどのように影響しているのかを、葉の構造を破壊することなく推測できるのである¹⁾。

しかし、クロロフィル蛍光誘導期現象の測定には、いくつかの問題点があげられる。具体的には、

- ① 測定センサー一部が感知する光に含まれているクロロフィル蛍光成分と環境光（センサー部に直接入射する蛍光以外の光）成分を分離することが困難であるため、測定は暗期条件下での測定に限られる
- ② クロロフィル蛍光誘導期現象の測定前に、約20分以上の暗処理が必要不可欠である
- ③ クロロフィル誘導期曲線の測定では、曲線の傾きやOIDPSMTの時間的な移動等を用いて各種ストレスの影響を診断するため、定量的な指標を示すことが難しい
- ④ 最大蛍光強度（P）から定常蛍光強度（T）へ

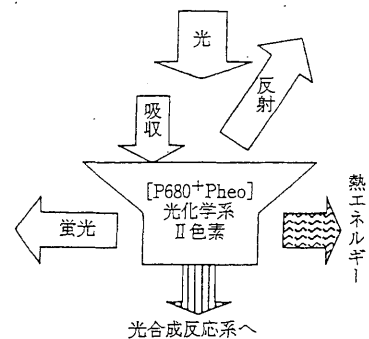


図1 クロロフィル蛍光の発光過程

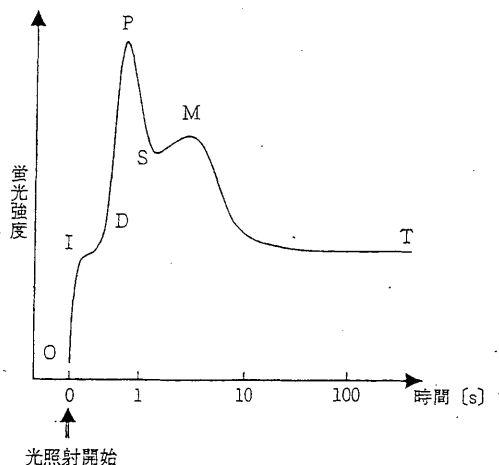


図2 クロロフィル蛍光誘導期曲線

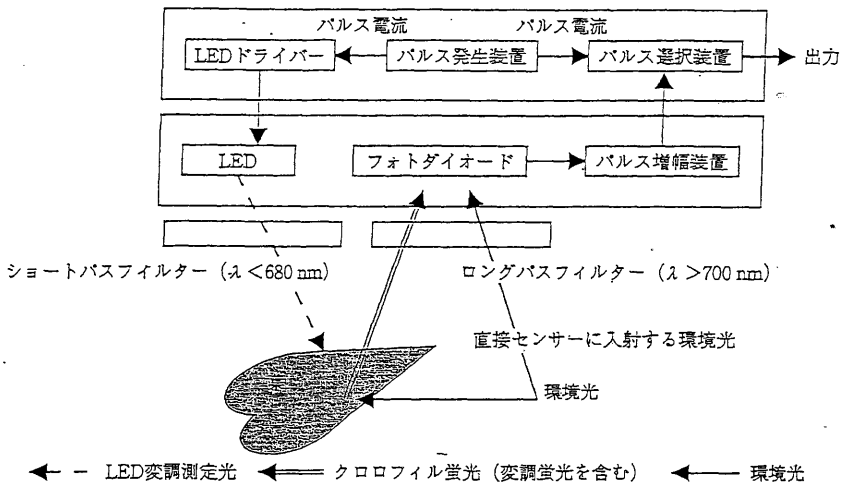


図3 PAMクロロフィル蛍光測定装置の概念図
文献5)を改変

の蛍光強度の減衰に関する反応を正確に特定することが難しい等があげられる。

3. PAMクロロフィル蛍光測定

3.1 測定原理

PAMクロロフィル蛍光測定装置は、一定強度の変調測定光を照射し、これによって励起された変調クロロフィル蛍光（以下、変調蛍光）を選択的に抽出することにより、明期条件下において実際に光合成を行っている状態でのクロロフィル蛍光収率（吸収された光子のうちクロロフィル蛍光として発せられた光子の割合）の測定を可能にした。

PAMクロロフィル蛍光測定装置は、大きく分けて2つの機能で構成されている。変調測定光の照射部分と、変調蛍光を選択的に抽出する部分である。変調測定光の照射に関して、最初に開発された装置は、光源からの光を機械的に切断することによって変調測定光を作り出すタイプのものであったが^{2,3)}、その後より高い周波数の変調測定光を作り出すために光源としてLED (light-emitting diodes) を使用したものが開発された⁴⁻⁶⁾。つぎに、変調蛍光の選択的な抽出に関して、高い精度で変調蛍光とそれ以外の変調されていない光を分離するために、パルス振幅変調 (PAM) がクロロフィル蛍光測定に導入された^{5,6)}。これら2つの機能をあわせもったPAMクロロフィル蛍光測定装置は、変調蛍光とそれの 10^6 倍の強度をもつ変調されていない光を分離することが可能である。

図3にPAMクロロフィル蛍光測定装置の概念図を示す。この図において、フォトダイオードが検知する光強度は、植物から発せられるクロロフィル蛍光（変調

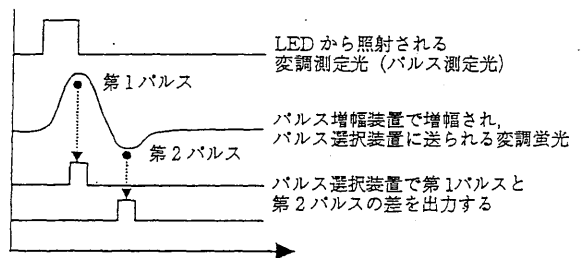


図4 変調蛍光の選択の概念図
文献5)を改変

光+明期条件下での定常蛍光」と、センサー部に直接入射する環境光の合計値である。次にこの合計値の中から、パルス増幅装置とパルス選択装置によって、変調蛍光成分のみを選択的に抽出し、出力する。以上の過程は、パルス発生装置が発生するパルス電流によってLEDドライバーとパルス選択装置が同期していることによって可能となっている。図4はパルス増幅装置とパルス選択装置によって、変調測定光 (LED) で励起された変調蛍光が増幅され選択的に抽出される概念図である。さらに、図5に蛍光測定時のフォトダイオードが検知する光強度の経時変化とPAMクロロフィル蛍光測定装置によって出力される蛍光収率の経時変化を示す。図5において、①はフォトダイオードに直接入射する環境光強度の変動を示しており、②は励起光照射による直接入射する光強度の増加および励起光によって励起されたクロロフィル蛍光強度の増加を示している。図5から、測定時にセンサー部に直接入射する環境光強度が変動しても、PAMクロロフィル蛍光測定装置がその影響を除去し、クロロフィル蛍光収率の変化のみを出力していることがわかる。

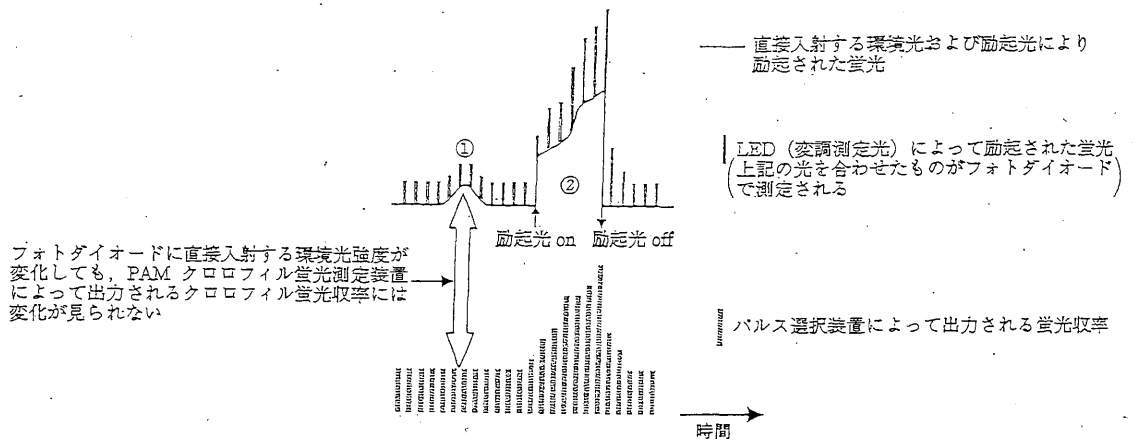


図5 PAMクロロフィル蛍光測定装置による蛍光測定概念図(文献7)を改変

表1 蛍光パラメーターとクエンチングパラメーター

蛍光パラメーター	F 蛍光収率	任意の時点での蛍光収率
	F_0 最小蛍光収率	暗期条件下で蛍光収率に変化を起こさない程度の弱い測定変調光を照射したときの蛍光収率 ($q_p=1$ かつ $q_N=0$)。またO-I-D-P-T用語体系においてOレベルに相当する。値設定の方法・条件等を明記する必要がある
	F_I Iレベルの蛍光収率	O-I-D-P-T用語体系においてIレベルの蛍光収率
	F_P Pレベルの蛍光収率	O-I-D-P-T用語体系においてPレベルの蛍光収率
	F_S 定常状態の蛍光収率	O-I-D-P-T用語体系においてTレベル(定常状態)の蛍光収率 定常状態とは外部環境が一定のとき蛍光収率が変化していない期間として筆者によって定義されている必要がある
	F_m 最大蛍光収率(暗期条件下)	暗期条件下においてPS II反応系のすべての電子受容体(Q_A)が還元された状態($q_p=0$)で、かつすべての非光化学的クエンチング反応系が最小活性状態($q_N=0$)における蛍光収率 例: 暗期条件下で飽和パルス光照射時の蛍光収率
	F'_m 最大蛍光収率(明期条件下)	明期条件下においてPS II反応系のすべての電子受容体(Q_A)が還元された状態($q_p=0$)での蛍光収率。明期条件下のため非光化学的クエンチングが見られる($q_N \geq 0$) 例: 明期条件下で飽和パルス光照射時の蛍光収率
	F'_0 最小蛍光収率(光条件下)	光条件下においてPS II反応系のすべての電子受容体(Q_A)が酸化された状態における蛍光収率。近赤外光を照射して人為的にPS II反応系を酸化状態にして測定されるパラメーター
	F_v 可変蛍光(暗期条件下)	すべての非光化学的クエンチング反応系が最小活性状態での最大可変蛍光量 例: $(F_m - F_0)$
	F'_v 可変蛍光(明期条件下)	明期条件下での最大可変蛍光量 例: $(F'_m - F'_0)$
クエンチングパラメーター	q_p 光化学的クエンチング係数	$(F'_m - F) / (F'_m - F'_0)$: $(1 - q_p)$ は明期条件下における還元状態の電子受容体(Q_A)の割合と相関がある
	q_N 非光化学的クエンチング係数	$1 - (F'_m - F_0) / (F_m - F_0)$: チラコイド膜内外の ΔpH ・熱エネルギーとしての放出・チラコイド膜エネルギーの増加に対応
	NPQ	$(F_m - F'_m) / F'_m$: q_N とほぼ同義(q_N に比べて熱エネルギーとしての放出の影響が大きい)
	optimal quantum yield	$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$
	PS II quantum yield	$(F'_m - F) / F'_m = \Delta F / F'_m$: CO_2 固定量と相関がある

文献8)を改変

3.2 クロロフィル蛍光分析

明期条件下において、クロロフィル蛍光は安定して低い値を示すが（暗期条件下で同じ強度の光を照射した場合のO-I-D-P用語体系におけるTに相当）、これは大きく分けて2つのクエンチングメカニズムによるものである。ひとつは、光化学系II反応系の光に反応する反応速度が速い系で起こっている光化学的クエンチングであり、もうひとつは、チラコイド膜内外のpH勾配形成、放熱による光エネルギーの発散、光合成反応系内の相互作用による光エネルギーの消費といった反応速度の遅い系で起こっている非光化学的クエンチングである。光合成を活性化している状態（明期条件下）で、クロロフィル蛍光測定により植物から有意義な生体情報を獲得するためには、これら2つのクエンチングを分離して評価する必要がある。特に、チラコイド膜内外のpH勾配の形成（これによってATPやNADPHを生産し、光合成の酵素反応系で利用する）に関係する非光化学的クエンチングの抽出は重要である。

Quick and Hortonは、オオムギのプロトプラストに飽和パルス光を照射して、光化学系II反応系の電子受容体を一時的にすべて還元状態にさせることによって、2つのクエンチングを分離した³⁾。この測定原理は、光化学的クエンチングは飽和パルス光照射によって完全に消滅するが、非光化学的クエンチングは反応速度が遅いので、ごく短時間の飽和パルス光照射中には変化しない、つまり、このような両者の反応速度の違いを利用することにより、明期条件下での飽和パルス光照射によって、非光化学的クエンチングのみを抽出することができる、というものである。このクエンチング分析法を「飽和パルス法」という。これをふまえて、光化学的クエンチング係

数 (q_p) や非光化学的クエンチング係数 (q_N) が定義され⁶⁾、これに続いて明期条件下における数々の有効なパラメーターが開発された。

3.3 クロロフィル蛍光パラメーター

PAMクロロフィル蛍光装置で測定することのできる代表的なパラメーターを表1に、それらの測定条件の一例を図6に示す。図6は光条件に応じて6つに分類できる。暗期条件下においてクロロフィル蛍光収率の上昇を引き起こさない程度の微弱な変調測定光（約6 nmol/(m²·s), $\lambda = 660$ nm) を照射した状態を①、①状態下で飽和パルス光（約1万 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 程度, 400 nm < λ < 700 nm, 0.5 ~ 2秒間) を照射した状態を②、①状態下から持続的な光（励起光：飽和光ではないが光合成を活性化させるのに十分な強度の光）を照射して明期条件にした状態を③、③によるクロロフィル蛍光誘導期現象の起きている最中に飽和パルス光を照射した状態を④、明期条件下でクロロフィル蛍光収率が安定した状態のときに飽和パルス光を照射した状態を⑤、③条件から励起光の照射を止め、同時に近赤外光（約6 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 程度, $\lambda > 700$ nm) を照射した状態を⑥とした。

表1のクエンチングパラメーターのなかで、PSII quantum yield ($\Delta F/F'_m$) は光合成のCO₂固定量と相関があるとしてGentyらによって示されたパラメーターであり⁹⁾、一般的にこの値が大きいときには効率よく光合成が行われているといえる。また、NPQは q_N を表現できるパラメーターとして提案されたものである¹⁰⁾。これら2つのパラメーターは、その算出に暗処理・近赤外光照射等のわずらわしい初期実験や初期設定が不必要

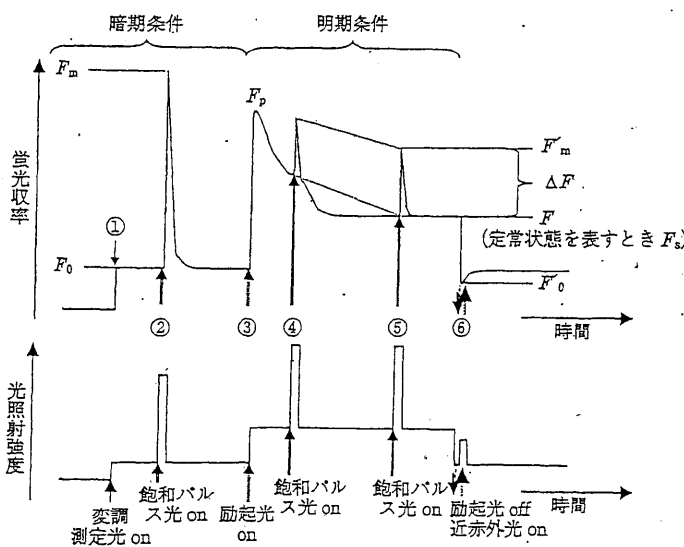


図6 各種蛍光パラメーター測定時の光条件と蛍光収率の変化
文献8)を改変

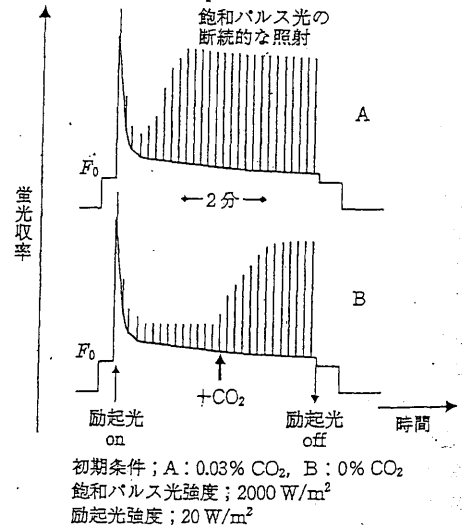


図7 PAMクロロフィル蛍光測定装置を用いた測定例
文献6)を改変

なので、フィールドでのクロロフィル蛍光測定において頻繁に用いられている。

以上に述べたようなクロロフィル蛍光の測定原理と分析法の開発により、今まで不十分にしか理解されていなかった明期生育条件下での光合成反応を観察できるようになった。これによって、それまで暗期条件下でのクロロフィル蛍光誘導期現象の初期反応 (O-I-D-P過程) に向けられていた関心が光合成反応系全体の電子伝達効率に向けられるようになり、さらには、明期条件下での光反応や酵素反応系の研究にクロロフィル蛍光測定が頻繁に使用されるようになった。

3.4 測定例

ここではPAMクロロフィル蛍光測定装置で飽和パルス法を用いて測定を行った例を示す。図7はインゲンマメの葉を用いて、クロロフィル蛍光誘導期現象の最中に飽和パルス光を断続的に照射したときのCO₂条件の違い (初期条件 A : 0.03% CO₂, B : CO₂除去) による F'_m の変化の違いを見た実験である。実験開始から一定時間経過した後に、BにCO₂を与えてAと同一とした (+CO₂と表示)。CO₂が十分にある条件下では F'_m は初め一時的に低い値を示した後、すぐに高い値になり安定する (図7のA)。しかし、CO₂が存在しない条件下では、 F'_m は低い値のままで安定しており上昇しない。その後CO₂を与えると初めて上昇して高い値を示すようになる (図7のB)。この実験において、 F'_m の経時変化を調べることで、クロロフィル蛍光誘導期曲線 (F の経時変化) だけでは獲得が難しかった、酵素反応系の活性状態の経時変化に関する情報も読み取ることができているといえる。

次に、葉齢の違いによる水ストレスに対する反応の違いを示した実験例を図8に示す。実験には異なった葉齢のインゲンマメの葉を使用し、(a)は第6葉~第7葉、(b)は第4葉~第5葉、(c)は第1葉、というように葉齢により3グループに区分して測定を行っている。縦軸は明期定常条件下におけるPSII quantum yield ($\Delta F/F'_m$) の測定値、横軸は葉中の水ポテンシャル値を示している。この実験では、水の供給を中止することによって、葉の水ポテンシャルを低下させ、これを水ストレスとした。(a) ~ (c) いずれにおいても、水ポテンシャルが-0.9 MPaを下回ると、 $\Delta F/F'_m$ 値の低下が見られるが、若い葉ほどその程度が大きくなっている¹¹⁾。この実験において、若い葉は葉齢の高い葉に比べ、葉の水ポテンシャルの低下に対してより敏感に反応し、光合成活性がより大きな影響を受けるということがわかる。

4. レーザー励起蛍光法

レーザー励起蛍光 (laser-induced fluorescence : LIF)

法は、レーザー光を植物葉に照射することによって励起されるさまざまな波長帯の蛍光の測定を行う。光強度が強く、発散が少ないレーザーを光源として用いるため、測定対象植物との測定距離を長くすることができるという利点がある。筆者は、Arレーザー (457.9 nm < λ < 514.5 nm) を光学的にスキャニングし、蛍光誘導期現象を遠隔で測定できる蛍光イメージングライダースystemを開発し、このシステムを用いて、大気汚染物質・水分欠乏・紫外線・冷却等の環境ストレスによって引き起こされる光合成活性の変化の早期検知が可能であることを示した¹²⁾。

近年、LIF画像を測定して、植物葉面での不均一な反応を植物診断に利用するといった研究が進んでいる。このように、画像処理を用いたLIFのことを特にLIFIS (laser-induced fluorescence imaging system) とよぶ。

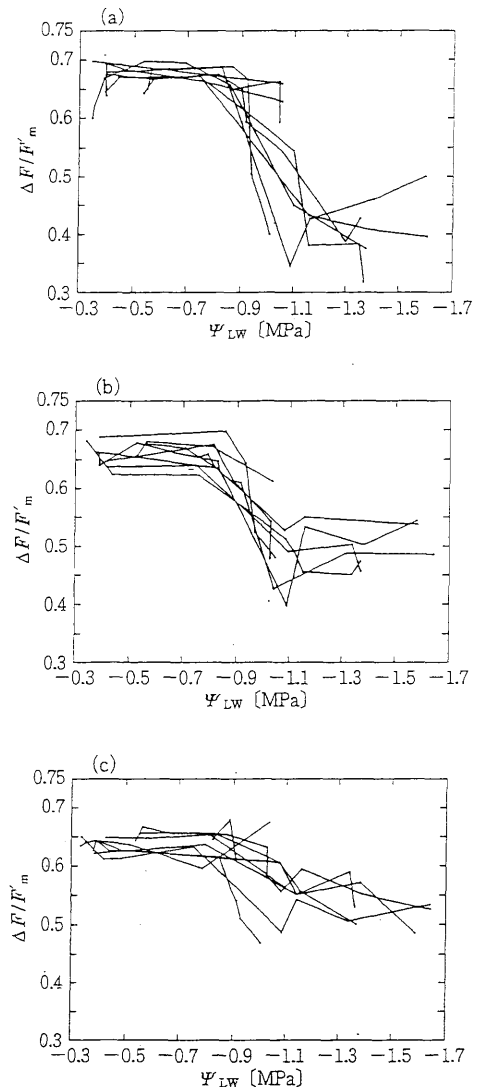


図8 葉齢による水ストレスに対する反応の違い (文献11)を改変

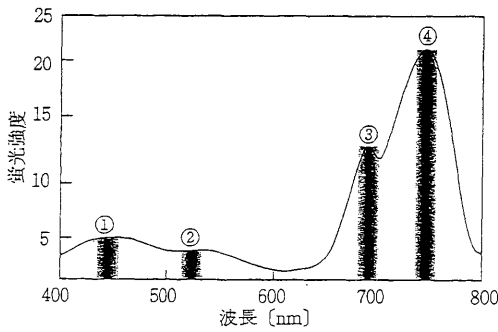


図9 紫外線レーザーにより励起される蛍光スペクトル分布
文献13)を改変

タバコの緑色葉に紫外線レーザー ($\lambda = 355 \text{ nm}$) を照射して励起される蛍光スペクトル分布

- ①: 青色帯 ($430 \text{ nm} < \lambda < 450 \text{ nm}$)
- ②: 緑色帯 ($520 \text{ nm} < \lambda < 530 \text{ nm}$)
- ③: 赤色帯 ($684 \text{ nm} < \lambda < 695 \text{ nm}$)
- ④: 近赤外帯 ($730 \text{ nm} < \lambda < 740 \text{ nm}$)

レーザー光源としては、光強度・励起される蛍光の種類が多様さから、主に紫外線レーザーが使用される。紫外線レーザーによって励起される蛍光のスペクトル分布を図9に示す。図9に示したように紫外線レーザー ($\lambda = 355 \text{ nm}$) を光源として使用し、緑色葉から発せられる蛍光を測定すると、赤色・近赤外といったクロロフィル蛍光以外にも、400 nm から800 nm までの広範な波長域で蛍光を検知することができる。ここで、紫外線レーザーを励起光源として使用した場合に検知される蛍光スペクトルは、4つのバンドに特徴づけることができる。それぞれ青色帯 ($430 \text{ nm} < \lambda < 450 \text{ nm}$)、緑色帯 ($520 \text{ nm} < \lambda < 530 \text{ nm}$)、赤色帯 ($684 \text{ nm} < \lambda < 695 \text{ nm}$)、近赤外帯 ($730 \text{ nm} < \lambda < 740 \text{ nm}$) の4バンドである。青色帯はF440、緑色帯はF520、赤色帯はF690、近赤外帯はF740などとよばれる。F690やF740は、光合成活性状態のチラコイド膜上に存在する色素タンパク質中のクロロフィルaから発せられており、これらの比 (F690/F740) は、植物生体内でのクロロフィル濃度の指標となることが知られている。これに対して、F440やF520は上面および下面の表皮の細胞壁中にある植物フェノール類から発せられており、葉脈もこの帯域の蛍光発光に大きく関与していると考えられている¹³⁾。

LIF測定装置の概略を図10に示す。光源部は、紫外線を発射する紫外線レーザー光源、その光を葉面全体に照射するためのレーザー拡幅器、レーザー光をパルス化するためのシャッターから構成される。蛍光測定センサー部は、蛍光を特定の波長ごとに分割するためのバンドパスフィルター、測定対象物に焦点を合わせるためのレンズ、微弱な蛍光の強度を高めるためのイメージンテンスファイヤー、蛍光画像を取得するためのCCDカメラから構成される。

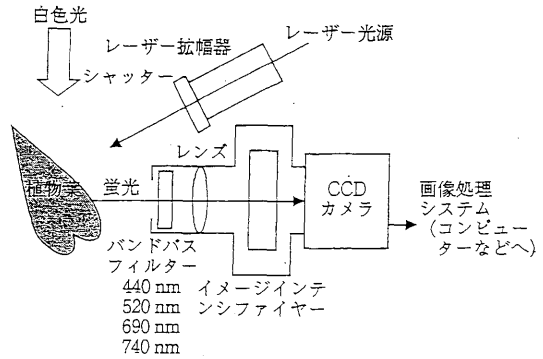


図10 LIF測定装置の概略図
文献13)を改変

白色光は植物葉が実際に光合成を行っている状態にするためのもの

青色帯と赤色帯の比 (F440/F690) および青色帯と近赤外帯の比 (F440/F740) は環境変化に敏感に反応する指標とされ、さらにこの指標を用いて光合成器官の障害の診断や植物のストレス状態を早期に検知することができる。このほかにも様々なパラメーターが開発されつつある。

あとがき

クロロフィルaは、ほとんどの高等植物がもっている色素であり、クロロフィルaから発せられる蛍光の波長域も植物種に関係なく、ほぼ同一である。つまり、蛍光測定を上手に使用すれば、植物種によらない生体情報を抽出することが可能である。さらに、蛍光測定は非破壊測定なので、測定対象の品質維持が容易であるため、各種ストレスに対する反応を経時的に測定することも可能である。以上をふまえて、蛍光測定は植物診断の手法としてきわめて有効であると考えられる。近年、クロロフィル蛍光測定を画像で行う装置も開発されており、それらによって葉面での不均一な障害の発現が議論されてきている¹⁴⁻¹⁶⁾。このような研究の進展により、さらに詳細な植物診断ができるようになるものと期待される。また、特にLIFは、測定器と測定対象との距離を伸ばすことができるという特徴を活かすことにより、リモートセンシング分野において光合成器官や植物体全体の健康状態診断の重要な手法の一つとなるであろう。

参考・引用文献

- 1) 大政謙次, 近藤矩朗, 井上頼直: 植物の計測と診断, 朝倉書店 (1988)
- 2) K. J. Dietz, U. Schreiber and U. Heber: The relationship between the redox state of Q_A and photosynthesis in leaves at various carbon-dioxide, oxygen and light.

- regimes, *Planta*, 166, 219-226 (1985)
- 3) W. P. Quick and P. Horton : Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts. II. Resolution of fluorescence quenching by redox state and the transthylakoid pH gradient, *Proceedings of the Royal Society of London*, 220, 371-382 (1984)
 - 4) E. Ogren and N. R. Baker : Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light, *Plant Cell Environment*, 8, 539-547 (1985)
 - 5) U. Schreiber : Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer, *Photosynthesis Research*, 9, 261-272 (1986)
 - 6) U. Schreiber, U. Schliwa and W. Bilger : Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, *Photosynthesis Research*, 10, 51-62 (1986)
 - 7) U. Schreiber and W. Bilger : Rapid assessment of stress effects plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements, *NATO ASI Series Plant Response to Stress*, 15, 27-53 (1987)
 - 8) O. van Kooten and J. F. H. Snel : The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology, *Photosynthesis Research*, 25, 147-150 (1990)
 - 9) B. Genty, J.M. Briantais and N. R. Baker : The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, 87-92 (1989)
 - 10) W. Bilger and O. Bjorkman : Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*, *Photosynthesis Research*, 25, 173-185 (1990)
 - 11) K. Tobe and K. Omasa : Leaf Age Dependence of Chlorophyll Fluorescence Parameters in Water-stressed Leaves of *Phaseolus vulgaris* L., *J. Agric. Meteorol.*, 55, No. 2, 155-163 (1999)
 - 12) K. Omasa : Image instrumentation of chlorophyll a fluorescence, *SPIE*, 3382, 91-99 (1998)
 - 13) H. K. Lichtenthaler et al. : Detection of Vegetation Stress Via a New High Resolution Fluorescence Imaging System, *J. Plant Physiol.*, 148, 599-612 (1996)
 - 14) J. G. Croxdale and K. Omasa : Chlorophyll a Fluorescence and Carbon Assimilation in Developing Leaves of Light-Grown Cucumber, *Plant Physiol.*, 93, 1078-1082 (1990)
 - 15) J. G. Croxdale and K. Omasa : Patterns of Chlorophyll Fluorescence Kinetics in Relation to Growth and Expansion in Cucumber Leaves, *Plant Physiol.*, 93, 1083-1088 (1990)
 - 16) C. B. Osmond et al. : Chlorophyll Fluorescence Quenching During Photosynthetic Induction in Leaves of *Abutilon Striatum* Dicks. Infected with *Abutilon Mosaic Virus*, Observed with a Field-Portable Imaging System, *Botanica Acta*, 111, 390-397 (1998)

[高山弘太郎・大政謙次]