

クロロフィル蛍光顕微画像計測による  
葉緑体レベルの光合成機能解析

2005 年 2 月

東京大学大学院 農学生命科学研究科

生物・環境工学専攻 生物環境情報工学研究室

指導教官 大政 謙次

遠藤 良輔

# 目次

1. 序論.....	1
1.1 研究の背景.....	2
1.2 既往の研究.....	5
1.3 研究の目的及び構成.....	9
2. クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの作製.....	11
2.1 クロロフィル蛍光.....	12
2.2 システムの構成.....	14
2.3 光学フィルタの選択.....	17
2.3-a 供試材料のクロロフィル蛍光スペクトルの測定.....	17
2.3-b 光学フィルタのスペクトル特性.....	22
2.4 画像の補正処理.....	24
2.4-a メディアン処理検証実験.....	24
2.4-b シェーディング検証実験.....	27
2.4-c $\gamma$ 補正検証実験.....	30
2.5 クロロフィル蛍光解析手法.....	33
2.5-a 飽和パルス法.....	33
2.5-b クロロフィル蛍光パラメータ( $F_m$ , $F_m'$ , $F$ , 及び $F_0$ )について.....	36
2.5-c クロロフィル蛍光クエンチングパラメータ( $qP$ , $\Phi_{PSII}$ , $NPQ$ , $qN$ )について.....	38
2.6 飽和パルス光の決定.....	41
2.6-a 飽和パルス光強度の決定.....	41
2.6-b 飽和パルス光照射時間の決定.....	43
2.7 蛍光の反応速度定数論.....	45
2.8 クロロフィル蛍光画像計測システムによる蛍光クエンチングパラメータの算出.....	47

2.9 本研究で用いる蛍光クエンチングパラメータ .....	51
3. クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを用いた微小藻類の光合成機能の解析 ....	52
3.1 研究の目的.....	53
3.2 材料及び方法.....	54
3.3 結果及び考察.....	58
3.4 本章のまとめ.....	66
4. 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの開発 .....	67
4.1 研究の背景.....	68
4.1-a Rolfe and Scholes による研究.....	69
4.1-b 共焦点レーザスキャン顕微鏡システムによる 3D 画像構築.....	70
4.2 研究の目的.....	71
4.3 3D 蛍光画像構築.....	72
4.4 実験材料.....	74
4.5 焦点面画像の取得.....	75
4.6 焦点測度の算出.....	79
4.7 最小二乗法フィルタ .....	80
4.8 最小二乗法フィルタと他のフィルタの比較.....	82
4.8-a 加算変形ラプラシアンフィルタ .....	82
4.8-b SD フィルタ .....	82
4.8-c 結果と考察 .....	83
4.9 最小二乗法フィルタの改良.....	86
4.9-a マスクサイズの自動化.....	87
4.9-b 結果 .....	87

4.10 3D 画像及び合焦蛍光画像の算出.....	89
4.10-a 焦点距離及び合焦蛍光画像算出.....	89
4.10-b 結果と考察.....	91
4.11 本章のまとめ.....	94
5. 中濃度のオゾン曝露がヒマワリ葉海綿状組織における葉肉細胞の光合成機能に与える影響の解析.....	95
5.1 研究の背景及び目的.....	96
5.2 材料及び方法.....	97
5.3 結果.....	101
5.4 考察.....	112
5.5 本章のまとめ.....	118
6. 総括.....	119
6.1 本研究の要約.....	120
6.2 今後の課題.....	123
謝辞.....	125
引用文献.....	126

## 1. 序論

## 1.1 研究の背景

有機リンや除草剤などの水質汚染物質，オゾンなどの大気汚染物質，水分ストレスや紫外線，及び高温ストレスなどの環境ストレスは，微小藻類，及び高等植物に多大な影響を及ぼしている(Larcher, 1995; Kramer and Bowyer, 1995; Carpenter et al., 1998)。これらの影響によって，植物体内では，光合成電子伝達速度や熱放散量に変化し，光合成系(本論では葉緑体チラコイドにおける反応とストロマにおける反応を指す)における機能の低下が生じる。この光合成機能の低下によって生育の遅れが生じ，さらには障害や萎れ等の可視傷害があらわれる。微小藻類，及び高等植物は，それぞれ湖沼生態系，及び陸上生態系において生産者として重要な生態的役割を担っており，これらの傷害がそれぞれの生態系にもたらす影響は甚大である。そのため，環境ストレスが植物の光合成に与える影響について解析することは重要である。

このような環境ストレスに対する早期の光合成障害検知手法の発達，特に植物の生理機能に関する画像センシング技術は，光学機器，及びコンピュータの基本性能の大幅な上昇により近年長足の進歩を遂げている。スポット計測がセンサ領域の平均値のみを出力するのに対し，画像計測はセンサ領域の面的な情報を出力できる。さらに，不可視情報の可視化によって，伝達される情報が直感的に理解しやすい点，また，非破壊かつ非接触で対象からの情報を得ることができる点も大きな特色といえる。

植物に関する分野での生体画像計測は，個体群レベルに対する遠距離センシング(Zarco-Tejada, 2000)から，熱画像計測(大政ら, 1988; Omasa, 1990; Jones, 1999; Jones and Leinonen, 2003)，さらには遺伝子突然変異のスクリーニング(Shikanai et al., 1999)などの近距離センシングまで，非常に多岐にわたる(Myers 1983; 大政, 船田, 1996; 大政 2002)。

蛍光画像計測では，植物から能動的に発せられる蛍光を計測する点が特徴である。蛍光計測には，励起波長，蛍光波長，及び蛍光強度の 3 軸が存在するため，網羅的な計測を行った際のデータ量は膨大なものとなる。植物から発せられる蛍光には，蛍光波長 440nm 付近にピークを持つ青色蛍光，蛍光波長 520nm 付近にピークを持つ緑色蛍光，蛍光波長 690nm 付近にピークを持つ赤色蛍光，及び 740nm 付近にピーク

を持つ遠赤色蛍光が挙げられる。このうち、励起波長が紫外波長域の場合にみられる青色蛍光及び緑色蛍光は、主に細胞壁の主成分であるセルロースや、液胞やフラビン色素から発する蛍光と考えられる (Chappelle and Williams, 1987; Lang et al., 1994 ;Schweiger et al., 1996; Lang et al., 1996; 小西, 大政, 2003; Buschmann and Lichtenthaler, 1998; Buschmann and Lichtenthaler, 1999; Buschmann et al., 2000)。一方、赤色蛍光及び遠赤色蛍光は、主にクロロフィル a から発せられるクロロフィル蛍光である (Krause and Weis, 1991; Govindjee, 1995; Maxwell and Johnson, 2000)。

クロロフィル蛍光の発光強度及び収率は、光エネルギーの利用先である様々な反応系(以後、これらの反応系を光合成系、光合成系での反応を光合成反応と総称する)の状態を強く反映している。クロロフィル蛍光画像計測法を用いた光合成反応の計測は様々な分野で行われており (Omasa et al., 1987; Daley et al., 1989), 植物診断の手法や (Daley, 1995; Lichtenthaler et al., 1996; 大政ら, 2001; 高山, 大政, 2001; Gray et al., 2003; Chaerle et al., 2004), 生理機能解明の手段としても多く用いられている (Mott et al., 1993; Bro et al., 1996; Osmond et al., 1999; Meyer and Genty, 1999; Krizek et al., 2001; Meng et al., 2001; Lawson et al., 2002; Omasa and Takayama, 2003; Chaerle et al., 2003)。さらに、群落や個体群から個体 (Johansson et al., 1996; Grunwald and Kuhl, 2004), 個葉 (Omasa et al., 1987; Daley, 1995), そして細胞小器官レベル (Oxborough and Baker, 1997; Gunning and Schwartz, 1999; Endo and Omasa, 2004) まで様々なスケールの研究に適用されている。

顕微鏡による観察は、肉眼では観察不可能な微小領域の形態的特徴を可視化する唯一の方法であり、その研究の歴史は 17 世紀の Robert Hooke にまでさかのぼる。顕微鏡は、電子顕微鏡と光学顕微鏡に大別される。非破壊かつ非接触で観察が行えるのは光学顕微鏡で、光学顕微鏡はさらに、透過型顕微鏡、反射型顕微鏡、及び蛍光顕微鏡などに分類される。

また、顕微鏡による 3D 画像計測は、合焦点抽出とともに発達してきた。3D 画像は、対象の平面的情報だけでなく高さ情報も提供できるため、特に、立体的な構造が発達した組織に対して詳細な解析を行うことができる。走査型共焦点レーザー顕微鏡システムは蛍光顕微鏡の一種で、蛍光染色法の発達に伴って研究成果の増加している分野である。走査型共焦点レーザー顕微鏡システムは、光軸中にピンホール

を配置し、焦点の合った領域のみを結像する特徴がある。そのため、3D 画像の構築に非常に威力を発揮する。本システムを用いて、師管や柔組織の 3D 画像が構築され解析に用いられている。



## 1.2 既往の研究

1930 年代に Kautsky らは、植物に光を照射した際に、急速な蛍光強度の変化があらわれることを発見した。この誘導期現象が発見されて以来、クロロフィル蛍光の起源、強度変化に起因している現象等の解明を目指して、多くの研究者が議論を重ねてきている。この誘導期現象が発見されて以来、クロロフィル蛍光の起源、強度変化に起因している現象等の解明を目指して、多くの研究者が議論を重ねてきている。1980 年代に入り、サンプルに対する光の照射法を工夫することで、蛍光強度の変化を光化学的な要因と、非光化学的な要因に分離する試みが多くなされた。このように、クロロフィル蛍光収率変化の要因を光化学的な要因と非光化学的な要因に分離して解析を行う方法はクエンチングアナリシス(quenching analysis)とよばれる。Bradbury and Baker は 1981 年に、明期光を照射してクロロフィル蛍光を誘導した植物葉に、続けて別の明期光を照射した(Bradbury and Baker, 1981)。この際、2 番目の明期光照射開始時期を様々に変化させることで、得られるクロロフィル蛍光収率が変化することを発見し、光化学的クエンチングと非光化学的クエンチングを分離した(Doubling light 法)。さらに、Quick and Horton は、Bradbury and Baker が用いた Doubling light 法を拡張した(Quick and Horton, 1984)。これによって、Doubling light 法で用いられた 2 番目の明期光は、測定葉のクロロフィル蛍光が最大収率に達する強度にまで引き上げられ(飽和光)、さらに、パルス化され一定の間隔で照射されるようになった。Quick and Horton が開発したこの手法は、飽和パルス法とよばれ、クロロフィル蛍光計測に関する研究の中で現在最も普遍的な手法となっている。さらに、Bilger & Schreiber が、光合成系で消費されたエネルギーを光化学的クエンチング(qP)と非光化学的クエンチング(qN)とに分離して以来、様々な蛍光クエンチングパラメータが開発された。これらのうち、近年普遍的に用いられているのが $\Phi_{PSII}$ (Genty, et al., 1989)と、stern-volmer の蛍光物質に対する法則をクロロフィル蛍光に導入して算出された NPQ(Bilger and Björkmann, 1990)である。これらは、先程の qP 及び qN とは異なり、クロロフィル蛍光の最小収率を測定する必要がないのが大きな利点となっている。

クロロフィル蛍光計測が非破壊非接触計測である利点は、イメージング技術を導入することによってさらに拡張された。クロロフィル蛍光画像計測は、Omasa et al.

によって 1987 年に初めて開発された(Omasa et al., 1987)。Omasa et al の研究は Induction 法により行われ、キュウリ葉面の  $\text{SO}_2$  曝露直後、及び回復時におけるクロロフィル蛍光の経時変化が不均一であることが示された。また、Daley, et al.(1989)は、クロロフィル蛍光画像計測に飽和パルス法を導入し、ABA による葉の光合成活性の不均一性を示した(Daley et al., 1989)。これら二つの先駆的な研究によって、計測領域に不均一な蛍光発光がみられる対象にとって、画像計測は不可欠な手法となったといえる。

その後、クロロフィル蛍光画像計測は、葉面における不均一な光合成反応をマッピングする手段として頻繁に利用されるようになった(Fenton and Crofts, 1990)。Genty & Meyer (1995)は、DCMU(正式名称)や ABA(正式名称)を与えたときの $\Phi_{\text{PSII}}$  画像を算出した(Genty and Meyer, 1995)。さらに、NPQ がクロロフィル蛍光画像計測に導入された(Rolfe and Scholes, 1995)。また、クロロフィル蛍光強度の振幅(Siebké and Weis, 1995)、葉面における気孔の開閉やそれに伴うクロロフィル蛍光のパッチネス(patchiness)(Mott, 1995; Eckstein et al., 1996; Eckstein et al., 1998; Beyschlag and Eckstein, 2001)、葉の向軸面と背軸面における気孔反応の相違の解析(Mott et al., 1993)、光強度の変化に対する応答の解析(Eckstein et al., 1996; Beyschlag et al., 1996; Beyschlag and Eckstein, 2001)、葉内  $\text{CO}_2$  濃度のマッピング(Meyer and Genty, 1998)などが行われた。葉内  $\text{CO}_2$  濃度のマッピングにおいては、 $\Phi_{\text{PSII}}$  から葉内  $\text{CO}_2$  濃度( $\text{Ci}$ )を算出することで気孔コンダクタンス画像が算出され、ガス交換分析手法における  $\text{Ci}$  の過大評価は、ガス交換の葉面における不均一性とクチクラ蒸散の影響を過小評価したためと報告されている。さらに最近、熱赤外画像計測システムとの同時計測により、ABA 処理後の植物葉の気孔コンダクタンス及び蛍光パラメータが異なる光条件下において計測された(Omasa and Takayama, 2003)。その結果、気孔がある程度閉鎖しても、気孔コンダクタンスがある値以上であれば、蛍光パラメータはほとんど変化しないが、気孔コンダクタンスがある値以下にまで低下すると、蛍光パラメータが急激に変化するという現象が確認された。

大気汚染や水質汚染、乾燥や紫外線、及び高温などの環境ストレスは、光合成を行う生物(高等植物、及び光合成を行う藻・細菌類一般。以下、高等植物及び緑藻類を植物と総称する)に多大な影響を及ぼしている(Larcher, 1995; Kramer and Bowyer,

1995)。クロロフィル蛍光画像計測は、このようなストレスに対する植物障害の診断手法としても広く用いられており、その例としては、水ストレス障害(Omasa et al. 1991; Lang et al., 1996; Meyer and Genty, 1999; Lichtenthaler and Babani, 2000; Bartak et al., 2000), 低温障害(Omasa and Shimazaki 1990; Lang et al., 1996; Gray et al., 2003), 紫外線障害(Omasa and Shimazaki 1990), 大気汚染物質障害(Omasa et al. 1987; Omasa and Shimazaki 1990; Leipner et al., 2001), ウィルス感染障害(Balachandran et al., 1994; Balachandran et al., 1997; Buschmann and Lichtenthaler, 1998; Osmond et al., 1998; Lohaus et al., 2000), 菌感染障害 (Peterson and Aylor, 1995; Scholes and Rolfe, 1996; Meyer et al., 2001), 光合成電子伝達阻害剤による障害(Daley et al., 1989; Daley, 1995; Genty and Meyer, 1995; Lichtenthaler et al., 1997; Kim et al., 2001), 植物ホルモンの影響( Daley, 1995; Genty and Meyer, 1995; Mott, 1995; Eckstein et al., 1998; Meyer and Genty, 1999; Fryer et al., 2003)などの診断が挙げられる。最近では、突然変異体のスクリーニングシステムを行う際の選別システムとしてもクロロフィル蛍光画像計測の適用が試みられている(Niyogi et al., 1997; Niyogi et al., 1998; Shikanai et al., 1999; Barbagallo et al., 2003)。

近年は、従来のクロロフィル蛍光画像計測システムに様々な改良や追加がされ、可搬型のもの(Osmond et al., 1998), レーザー光による励起を行うもの(Lichtenthaler et al., 1996; Omasa et al. 1998), パルス変調のもの(Nedbal et al., 2000; Nedbal et al., 2000; Kupper et al., 2000; Kupper et al., 2004), 顕微鏡を画像計測システムに組み込んだもの(Oxborough and Baker, 1997; Osmond et al., 1999; Kupper et al., 2000; Leipner et al., 2001; Lawson et al., 2002; Lawson et al., 2002; Rolfe and Scholes, 2002; Endo and Omasa, 2004), 葉面の凹凸に対応したもの(Rolfe and Scholes, 2002)なども開発されている。

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研究は、1997年、 $F_0$ (暗期最小蛍光収率)の計測が可能な解像度を持つクロロフィル蛍光画像計測システムが開発されたことにより始まり、葉面の微小な範囲におけるクロロフィル蛍光計測が行われた(Oxborough and Baker, 1997)。ほぼ同一のシステムを用いて、インゲンマメ葉に対するオゾン曝露の影響が気孔周辺部から現れることも報告された(Leipner et al., 2001)。また、光強度、 $CO_2$ 濃度、及び湿度の変化における、葉肉細胞と孔辺細胞

の葉緑体から発せられるクロロフィル蛍光の比較も行われている(Lawson et al., 2002)。

藻類に関しては、解釈の容易さから、特に藍藻類におけるクロロフィル蛍光計測が活発に行われており、1998年にはCampbell et al.による藍藻類におけるクロロフィル蛍光についてのレビューが提出されている。また、Dodge et al.(2000)は、ユーグレナ個体群のクロロフィル蛍光を測定し、キサントフィルサイクルを持たないユーグレナにおいても、qE(後章参照)の形成がみられることを報告している。環境ストレスに対する藻類の影響に関しては、Lu et al. (2000)が水銀の影響について、スピルリナ個体群のクロロフィル蛍光計測を行い、水銀濃度の上昇に伴って $\Phi_{PSII}$ の低下が見られることを報告した。

藻類を対象にしたクロロフィル蛍光顕微画像計測も報告されており、バイオフィルム内の数種類の底棲性の藻類の $\Phi_{PSII}$ が、光強度が大きくなるにつれ一様ではなくなることが報告されている(Oxborough et al., 2000; Perkins et al., 2002)。また、Gunning and Schwartz は、クロロフィル蛍光が葉緑体のみから発光することを利用して葉緑体の形態を藻間で比較し、クロロフィル蛍光画像の分類学への適用を試みた(Gunning and Schwartz, 1999)。

顕微鏡を組み込んだシステムの短所には、焦点の合う範囲が狭いことが挙げられる。焦点解析の方法は、当初、自動的に焦点のあった画像を得るために用いられてきた(Jarvis, 1976)が、1980年代半ばより深さ方向の情報を得るために利用され始めた(Krotkov, 1987; Grossmann, 1987; Darell and Wohn, 1990; Krotkov and Bajcsy, 1993)。1990年代にはShape-from-focus法が考案され(Nayar and Nakagawa, 1994)、さらに、実生のようなテクスチャの粗い被写体の計測にも適用できるよう改良された(大政, 国府田, 1998; 大政ら, 1997)。クロロフィル蛍光画像に対する適用例としては、最近、画像内の焦点の合った箇所を組み合わせ、複数枚の画像から焦点のあったモンタージュ画像を合成する試みが報告されている(Rolfe and Scholes, 2002)。

### 1.3 研究の目的及び構成

このように、クロロフィル蛍光画像計測は、植物の光合成機能解析に対して非常に有効な手法であるが、微小藻類に関して、細胞小器官レベルで、in situ による光合成障害の解析を行った報告はない。現在の、藻類に対するクロロフィル蛍光計測に関する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ため、測定領域に含まれる微小藻類の光合成活性の不均一性については考慮されていない。また、高等植物を対象として、高さ情報と光合成機能の一つである光合成電子伝達収率との関係について微小領域で解析した報告もない。しかし、微小領域における光合成機能を評価することによって、マクロな計測では平均化によって失われるような情報を抽出できるほか、ストレスに対する応答について新たな知見が得られると期待される。そこで本研究では、対象の計測に適したクロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発し、微小領域における光合成機能について、蛍光クエンチングパラメータを用いて解析を行うことを目的とした。

本研究では、ほぼ同一の光合成器官を有しながら構造が対照的な、単細胞生物の微小藻類と多細胞の高等植物を供試生物として用いた。微小藻類に関しては、普遍的な微小藻類の一種 *Spirogyra distenta* 個体群が、様々な生育ステージを混在させながら生息していることに着目した。そこで、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システムを製作し、除草剤の一種である DCMU が、生育ステージの異なる *Spirogyra distenta* の光合成機能に与える影響について解析を行った。さらに、微小藻類に比べ組織構造の発達した高等植物に対して、葉肉細胞の葉面からの距離(以後、葉内における葉肉細胞の高さ情報と称する)と蛍光クエンチングパラメータとの関係を解析するために、高倍率での計測が可能な 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発した。そして、中濃度オゾン曝露がヒマワリ葉海綿状組織の葉肉細胞の光合成機能に与える影響について解析を行った。

本論文は 7 章より構成される。第 1 章では研究の背景、既往の研究、及び研究の意義について述べる。第 2 章では、クロロフィル蛍光画像、及びその解析手法について概説し、第 3 章で、クロロフィル蛍光顕微画像解析システムの作製及び検証を

行う。第 4 章では、本システムを用いて、除草剤の主成分の一つである DCMU が、生育ステージの異なる微小藻類の光合成機能に与える影響について解析する。第 5 章では、第 3 章で作製したシステムに 3D 画像計測システムを導入し、検証を行う。第 6 章では、第 5 章で開発した新システムを用いて、オゾン曝露されたヒマワリ葉に対して光合成機能の解析を行う。第 7 章では、結論として本研究の成果を述べる。

## 2. クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの作 製

## 2.1 クロロフィル蛍光

ここで、本研究で用いられるクロロフィル蛍光について概説する。

葉緑体アンテナクロロフィルによって吸収された光は、主に 3 つのプロセスをたどって消費される。ひとつは、光化学系にまわされ、光合成反応の原動力となるものであり、最適な条件の下で弱い光を照射すると、初期光化学反応は最も効率よく行われ、吸収された光の 90%以上が光合成に用いられる (Bjorkman & Demmig, 1987)。二つ目のプロセスは、過剰なエネルギーとして熱放散にまわされるもので、植物体を防御する点で重要である。これらのプロセスで消費されなかったものは、蛍光として再度光として放出される。室温条件では、蛍光のほとんどは光化学系 II (PS II) のクロロフィル a から発せられる。光合成組織の最大蛍光収率( $\Phi_{Fm}$ , PS II の全ての反応中心が閉じている状態で測定)は、吸収された光のほとんど 3%程度でしかない。さらに、反応中心が開いている状態の蛍光収率( $\Phi_{F0}$ )は、光化学反応によって、約 5 分の 1(およそ 0.6%)になる。しかし、このような微弱な光強度であっても、クロロフィル蛍光の測定は、その特性によって極めて容易なものとなっている。葉緑体クロロフィルは光を吸収して励起エネルギーを得ると、振動や回転等によってエネルギーを放出した後に、第一励起状態となる。これにより、クロロフィル蛍光は照射光よりも長波長側に偏る。そのため、クロロフィル蛍光測定では、短波長光を照射する一方で長波長光を取得することで、サンプルのクロロフィル蛍光成分のみを抽出している。

これら三つのプロセスは、それぞれが密接に関連しあっており(Fig.2-1)、クロロフィル蛍光を測定することにより、光合成生物の光化学的特性、及び熱放散に代表される非光化学的特性の変化に関する情報を抽出することが可能である。



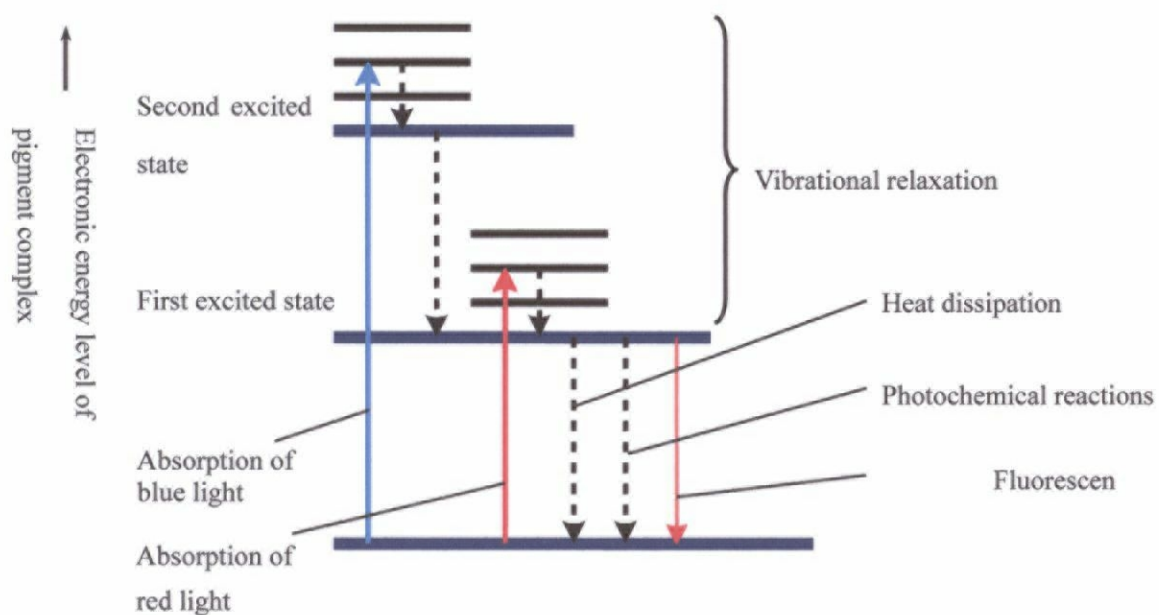


Fig.2-1 Process of excitation and reversion of pigment complex. When Chl. absorbs light it is ground state to its singlet excited state,  $^1\text{Chl}^*$ . From there it has several ways to relax back to ground state. It can relax by emitting light, seen as fluorescence. Its excitation can be used to fuel photochemical reactions, or it can de-excite by heat dissipation; both of these mechanisms reduce the amount of fluorescence.

## 2.2 システムの構成

クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの概要図を Fig. 2-2 に示す。本システムは、大政らの開発したクロロフィル蛍光画像計測システム(大政ら, 2000)に光学顕微鏡を導入したものからなっている。光源には Nikon 製ハロゲンランプ(PSM-1520)を明期光照射用に, SUMITA 製ハロゲンランプ(LS-M180)を飽和パルス光照射用に用いた。これらは, 画像取得範囲(対物レンズ 20 倍を使用時  $0.3\text{mm} \times 0.2\text{mm}$ , 対物レンズ 50 倍を使用時  $0.12\text{mm} \times 0.08\text{mm}$ )が均一に照射されるよう配置された。対物レンズには Mitutoyo 製のレンズ 3 種類を使用した(20 倍(開口数 0.42), 50 倍(開口数 0.55), 100 倍(開口数 0.55))。本レンズは高い開口数と長い焦点距離を有し, 本計測システムに適している。光学フィルタには, 照射光用には青色のショートパスフィルタ, クロロフィル蛍光取得用には赤色のロングパスフィルタを用意した。これによって, クロロフィル蛍光成分のみが取得できるようにした。クロロフィル蛍光画像の撮像には, 時間蓄積, 及びゲインの調節が可能な浜松ホトニクス社の冷却型 CCD カメラユニット(C5985)を用いた。撮像された画像は SONY のデジタルビデオレコーダ(DSP-V10)によって録画し, その後キャプチャボードによってコンピュータに取り込み, 自作ソフト(付録参照)を用いて各種処理解析を行った。本システムの外観を Fig. 2-3 に示す。

以下に, 本システムで用いたフィルタ, 画像補正処理, 飽和パルス光の設定について述べる。

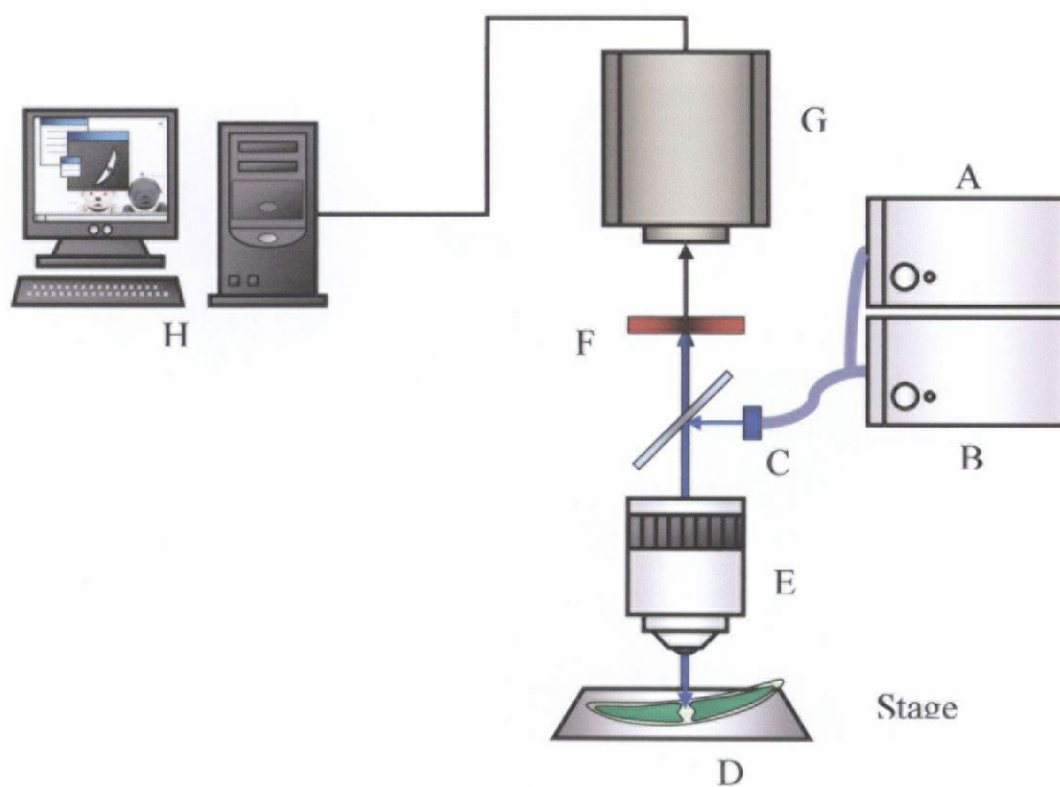


Fig. 2-2 Chlorophyll *a* fluorescence imaging system with optical microscope. : A, Actinic light source; B, Saturation light source; C, Short-pass filter ( $\lambda \leq 607$  nm); D, Test organism; E, Objective; F, Long-pass filter ( $\lambda \geq 635$  nm); G, Cooled charge-coupled device (CCD) camera; H, Monitor; I, Digital video recorder; J, Computer.



Fig. 2-3 Image of the Microscopic image analysis system of chlorophyll fluorescence.

## 2.3 光学フィルタの選択

### 2.3-a 供試材料のクロロフィル蛍光スペクトルの測定

本システムは、クロロフィル蛍光が励起光より長波長側にシフトして排出される性質を利用しているため、励起波長と、それによって排出されるクロロフィル蛍光波長域を的確に把握する必要がある。本実験では、分光蛍光光度計を用いて、供試材料として使用する微小藻類、及び高等植物の蛍光スペクトルを測定した。そして、本システムにおいて使用する、励起波長域を特定するショートパスフィルタ、及びクロロフィル蛍光成分のみを透過するロングパスフィルタの波長について解析した。

#### 材料及び方法

供試材料には、*Closterium moniliferum*, *Spirogyra distenta*, 及びヒマワリを用いた。そして、供試材料懸濁液を測定セルに滴下し、励起波長 500-800nm, 蛍光波長 550-850nm の分光蛍光スペクトル測定を行った。蛍光スペクトル測定には、日立製作所製の蛍光分光光度計 F-4500 を用いた。

#### 結果

*Closterium moniliferum*, *Spirogyra distenta*, 及びヒマワリの蛍光スペクトルについて、それぞれ Fig. 2-4, 2-5, 2-6 に示す。*Closterium moniliferum*, *Spirogyra distenta* の両者においてはほぼ同様の蛍光スペクトル分布が得られた。どちらのグラフにおいても、蛍光波長 680-700nm 域をピークとして高い蛍光収率が認められる。通常、高等植物においては、クロロフィル蛍光スペクトルは 683nm 付近にピークを持つため、この蛍光域がクロロフィル蛍光であると考えられる。また、クロロフィル蛍光は、680nm 以下の励起光照射によって生じていることが確認された。これらより、これらの藻類にはロングパスフィルタには 680-700nm 付近の蛍光波長を透過するものを、また、ショートパスフィルタには 680nm 以下のものを用いる必要があることがわかった。一方、ヒマワリは前 2 者とは異なる蛍光スペクトル分布を見せた。クロロフィル蛍光の極大値は 680nm 付近、及び 730nm 付近に存在した。蛍光の波長域はクロロフィル複合体の分子組成によって変化することから、高等植物の一種であるヒマワリは、前 2 者とは異なるクロロフィル分子を持っている可能性が考えられた。もっとも、

ヒマワリにおいても、先と同様のフィルタによってクロロフィル蛍光を取得できると考えられた。

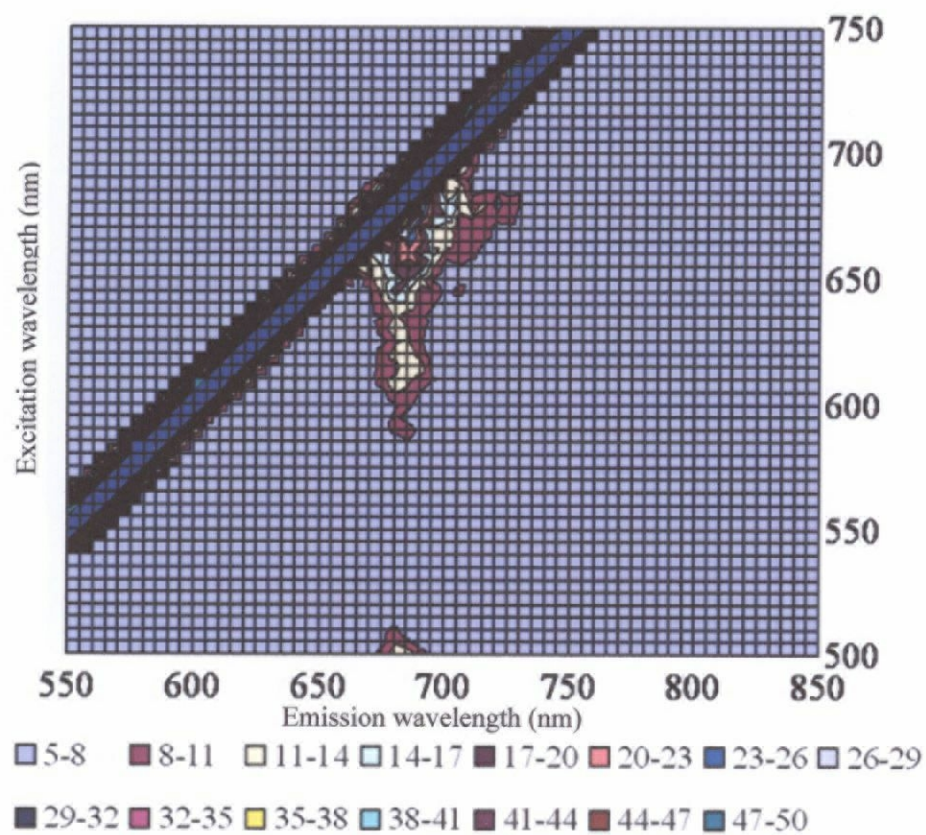


Fig. 2-4 Relationship between the excitation (from 500- to 750nm) and the steady-state fluorescence (from 550- to 850nm) of *Closterium moniliferum*.



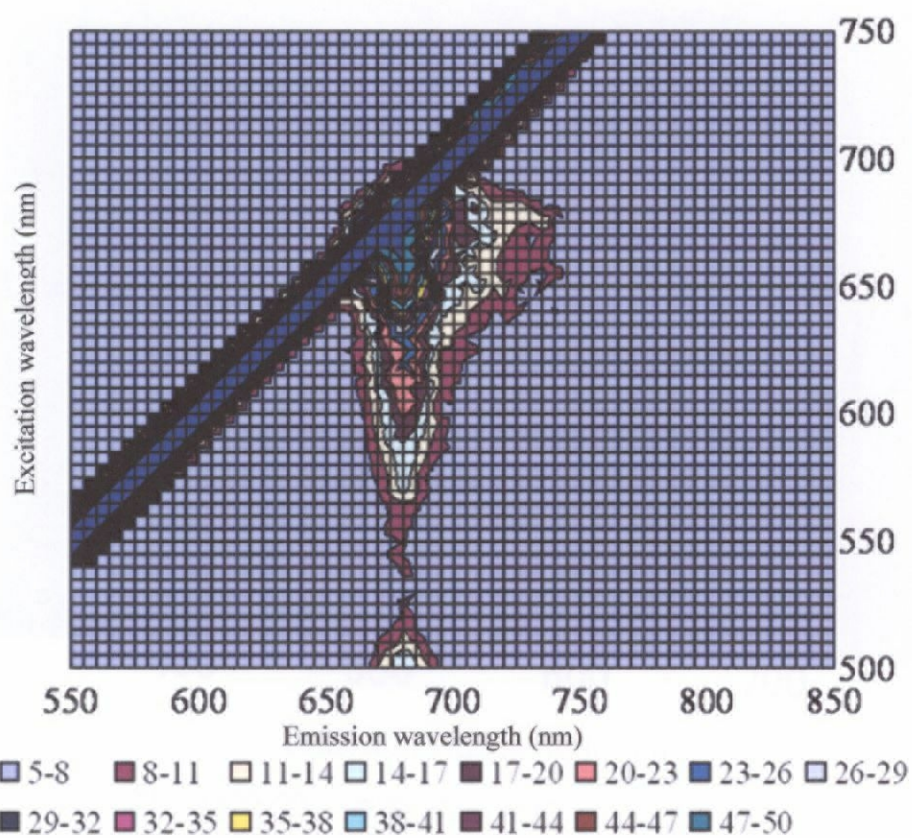


Fig. 2-5 Relationship between the excitation (from 500- to 750nm) and the steady-state fluorescence (from 550- to 850nm) of *Spirogyra sp.*



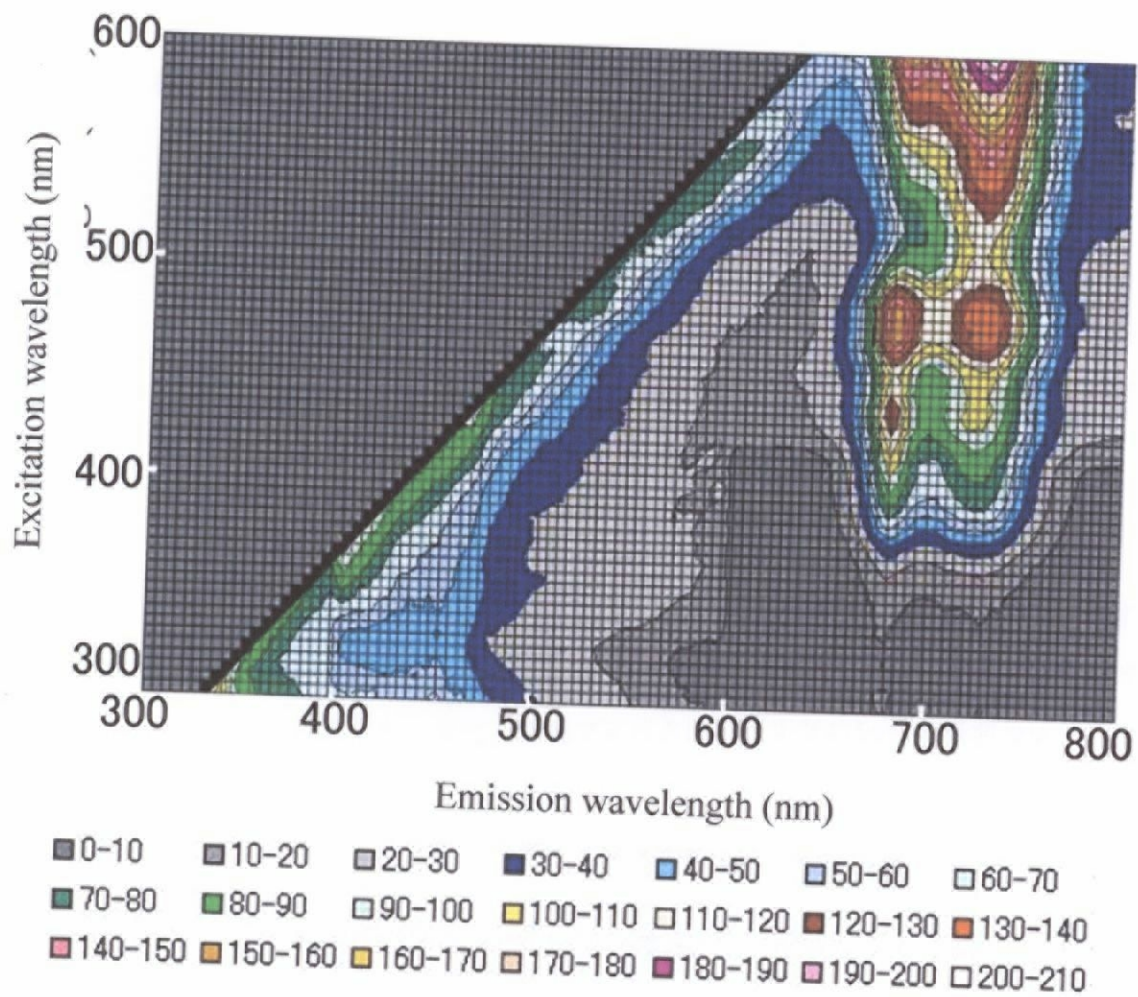


Fig. 2-6 Relationship between the excitation (from 300- to 600nm) and the steady-state fluorescence (from 350- to 800nm) of *Helianthus annuus* L.

### 2.3-b 光学フィルタのスペクトル特性

光学フィルタは、波長の透過率低下に対してある程度の波長幅を持つ。そのため、ショートパスフィルタとロングパスフィルタの透過波長域が重ならないよう考慮して、使用する光学フィルタを決定した。

#### 材料及び方法

藻類のクロロフィル蛍光を励起し、かつ、クロロフィル蛍光スペクトルと波長透過域の重ならないと考えられる青色フィルタを選択した。また、クロロフィル蛍光成分のみを透過し、青色光フィルタからの透過光を透過させないと考えられる赤色フィルタを選択した。これらを、280-2500nm までの波長域のスペクトル分布が測定可能な分光放射計 MSR-7000 を用いて、400-800nm の波長域について透過率を計測した。

#### 結果

Fig. 2-7 にフィルタの透過率を示す。横軸は波長、縦軸は白色板の反射に対する各光学フィルタの透過率を示している。青色フィルタは、波長  $\lambda \leq 607\text{nm}$  の短波長光成分のみを透過した。また、赤色フィルタは波長  $\lambda \geq 635\text{nm}$  の長波長成分のみを透過した。本グラフより、これらのフィルタに透過波長域の重なる波長域はないと判断できた。そこで、これらの光学フィルタを本研究で用いることにした。

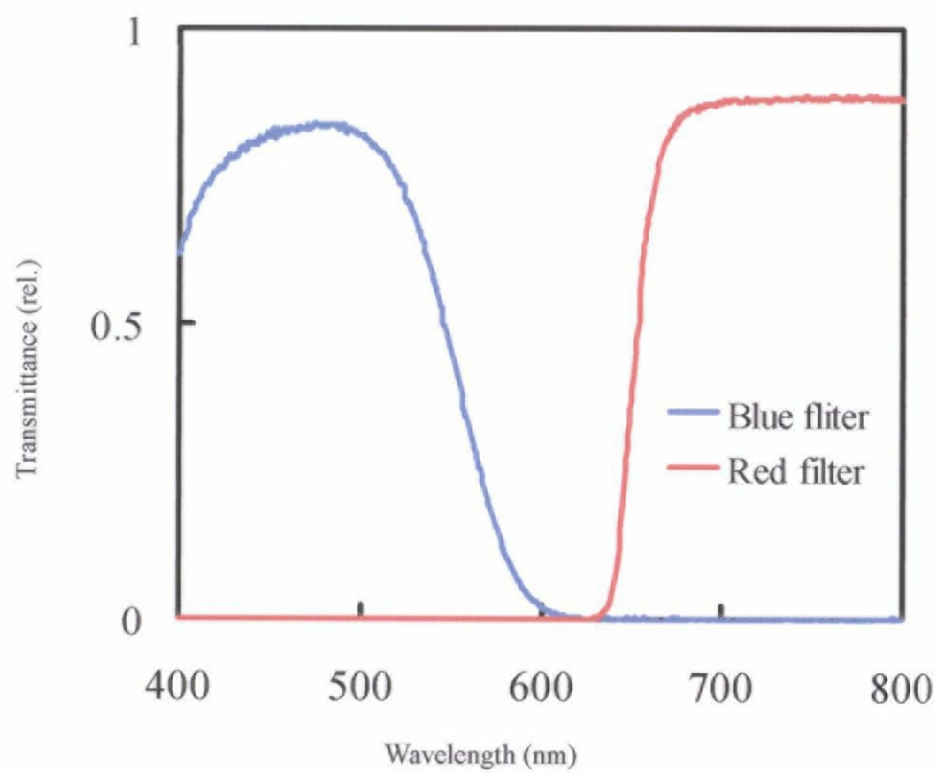


Fig. 2-7 Spectral properties of the short-pass filter, and the long-pass filter.

## 2.4 画像の補正処理

### 2.4-a メディアン処理検証実験

本システムでは、浜松ホトニクス社製の冷却型高感度 CCD カメラ C5985 を用いており、S/N 比は比較的高い。しかし、暗黒状態で撮影するとわかるように、本来なら一様のピクセル値を示すはずの画像には、必ずランダムなノイズが生じる。植物の生理活性と無関係なこれらのノイズは、画像処理によって除去する必要がある。

そこで、画像処理の標準的な手法である、線形処理(平均化フィルタ)及び非線形処理(メディアンフィルタ)を、取得したクロロフィル蛍光画像に対して適用し、比較する実験を行った。平均化フィルタとは、着目するピクセルを、隣接するピクセルを加えた合計 9 つのピクセル値の平均値で置き換えるフィルタであり、メディアンフィルタとは、同様の 9 つのピクセル値のうち、それらの中央値で着目するピクセルの値を置き換える手法である。

#### 材料及び方法

サンプルには、本システムにおいて、ゲインを 8 倍に設定して取得した *Closterium moniliferum* のクロロフィル蛍光画像を用いた。この画像に対し、平均値フィルタを適用した画像についてヒストグラムを算出した。同様に、メディアンフィルタを適用した画像、及び元画像に対してもヒストグラムを算出し、それらの画像及びヒストグラムの形状を比較した。

#### 結果

Fig. 2-8 に結果を示す。順に、元画像(I)、平均値フィルタを元画像に適用した画像(II)、そして、メディアンフィルタを元画像に適用した画像(III)である。元画像に散在している、白いインパルス上の点がノイズとして除去されるべき箇所である。それぞれの画像における右のグラフは、ピクセル値のヒストグラムを表したものであり、赤線で囲んだ部分は画像取得の際に生じた、インパルス性のノイズのピクセル値域を示している。

平均化フィルタでは、全体に、元画像に較べてぼかされた、なだらかなヒストグラム曲線になっており、元画像の急激なピクセル値の変化を保存できていないこと

がわかった。また、ノイズは平均化によって軽減したが、除去には至らなかった。つまり、平均化フィルタ等の線形処理によるノイズ除去は、輪郭部（エッジ）を含む信号や非定常な信号をフィルタ前後において保存することが不可能であり、信号の劣化（ボケ）を招いてしまうと考えられた。一方、メディアンフィルタは、周囲に対して不自然な輝度を持ったピクセル値(インパルス性ノイズ)を除去した一方で、解像度を低下させず、画像のエッジを保存することができた。

この結果を踏まえ、本研究ではノイズ除去のための画像補正処理として、メディアンフィルタを適用した。

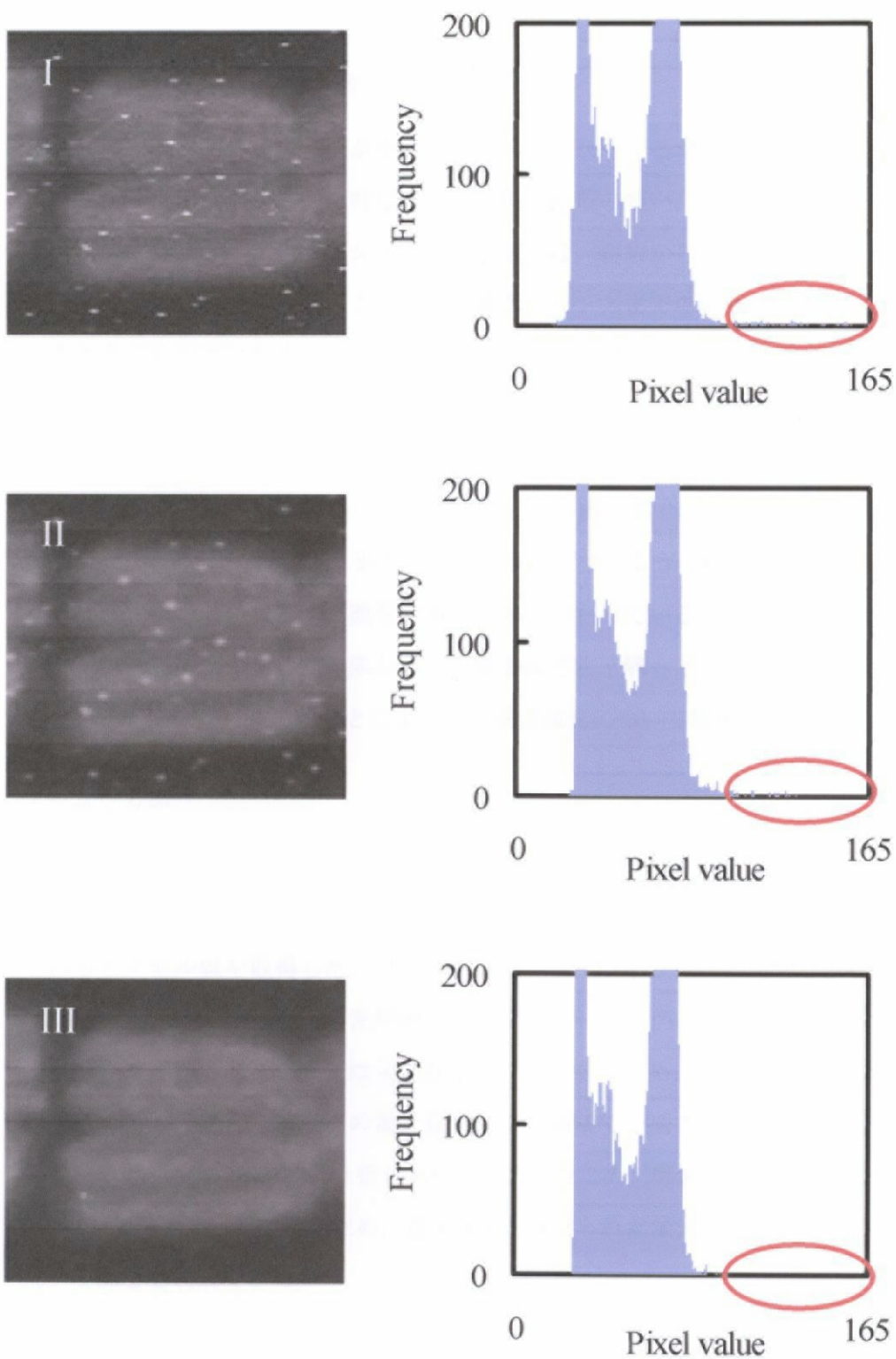


Fig. 2-8 Effects of image correction filter applying to the original image. Histograms at the right hand side of each image show distribution of values. Red lines indicate the ranges of noises.

## 2.4-b シェーディング検証実験

画像の端の方から届く光量が中心部に比べて少なくなるために、周辺部が暗くなってしまう現象は周辺減光と呼ばれ、特に焦点距離の短い広角レンズで撮影した場合に顕著に見られる。広角レンズでの周辺減光は、斜めからレンズに入射した光が通過する開口部が楕円となることや、画像からレンズまでの距離が周辺部ほど長くなること、レンズに斜めに光が当たることなどから起こる。これについては、入射角が $\theta$ である周辺部で  $\cos \theta^4$  だけ明るさが減少することが証明されている（コサイン 4 乗則）。これによると、例えば画角（画面上に鮮鋭な画像として写し込むことができる範囲を角度で表したもの）80 度のレンズの周辺部では、 $(\cos(80/2))^4=0.34$  となり中央部の 34%の明るさしかないことになる。このような現象は、周辺部の光量低下は広角レンズになるほど顕著であることがわかっている。そこで、様々な明るさの蛍光板を撮像して、左上隅から中央部を経て右下隅へと至る直線上のピクセル値をグラフにプロットすることによって、周辺減光について解析した。

### 材料及び方法

サンプルには市販の蛍光板を用い、20 倍対物レンズを使用した。蛍光板に対して、照射する光強度を  $\text{PPF } 94.46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} - 4371 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の間で変化させ、出力されるピクセル値を取得した。なお、蛍光板の蛍光収率は温度に対する依存性が高いため、実験は各試験区での光照射の都度に、クーリングのための休止期間をおいた。なお、用いられた蛍光板は蛍光収率が一定であるため、蛍光板に均一な光強度の光を照射した場合、蛍光板の蛍光強度はその領域で一様であると考えられる。本実験は対物レンズの倍率が 20 倍のものを使用したため、撮像された蛍光板の面積は約  $0.06\text{mm}^2$  であった。そのため、蛍光板から発せられた蛍光強度は、その領域内で均一であると判断できた。

### 結果

本実験の結果について、Fig. 2-9 に示す。X 軸は、画面中央を 0 とし、中央から右下に進むごとに 1 ピクセルと数えた時の各ピクセルの相対的位置、Y 軸はその位置におけるピクセル値を示している。また、Line1-15 は蛍光板の蛍光強度を様々に変えたときの各対角線のピクセル値変化を示している。これより、Line1 から Line15 に至る

まで、対角線上のピクセル値が平坦に分布していることが示された。この理由としては、顕微鏡対物レンズの画角が極めて狭いことが考えられた。コサイン 4 乗則より、画角が大きい場合には周辺からレンズに届く光は極めて小さくなるが、本研究で用いる対物レンズのように画角が小さい場合には周辺減光が小さくなることが知られている。

これより、本研究で使用するクロロフィル蛍光顕微画像計測システムでは、特に周辺減光によるシェーディング補正を行う必要のないことがわかった。



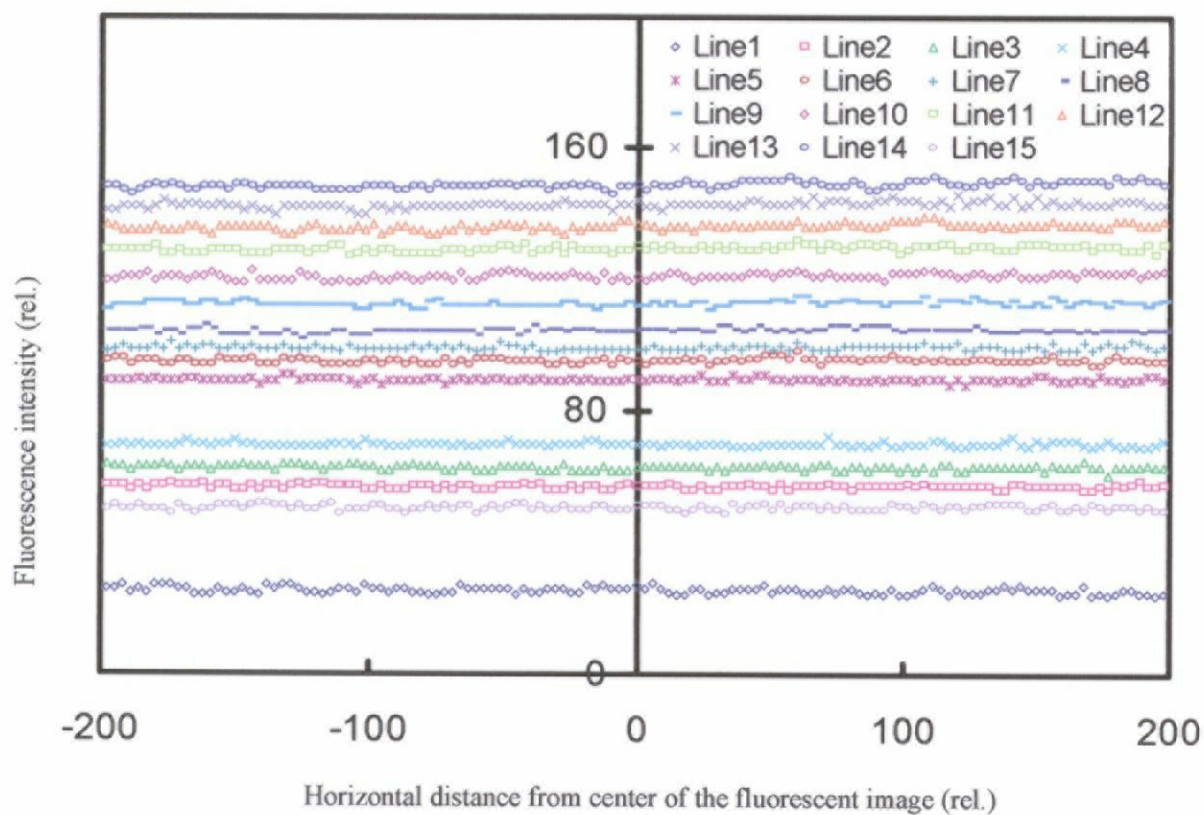


Fig. 2-9 Relationships between pixel value and location within the image taken by the microscopic image instrumentation system of chlorophyll fluorescence. Each line indicates pixel values of fluorescent card under various light intensities, respectively.

#### 2.4-c $\gamma$ 補正検証実験

本研究では、取得したクロロフィル蛍光画像の各ピクセル値から、各種クロロフィル蛍光クエンチング画像を算出するため、出力されたピクセル値がクロロフィル蛍光強度と線形関係にあることが前提となる。しかし、多くの光学機器には、人間の目によって最適な明るさとなるよう、実際のピクセル値(D)と表示される出力値(E)は非線形的な関係になる場合が多い。これはガンマ特性と呼ばれ、次式、

$$\gamma = \log_E D$$

で表される。仮に、本システムにおいて、 $\gamma$  値が 1 以外の値をとる場合は、ガンマ補正式を導入して、出力値を補正する必要がある。

そこで本実験では、蛍光収率が一定である蛍光板に対して、様々な強度の光を照射し、得られた蛍光画像のピクセル値(0-255 のグレースケール)から、入力と出力との線形性を検証した。

#### 材料及び方法

サンプルには市販の蛍光板を用い、20 倍対物レンズを使用した。蛍光板に対して、照射する光強度を  $\text{PPF } 94.46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} - 4371 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の間で変化させ、出力されるピクセル値を取得した。なお、蛍光板の蛍光収率は温度に対する依存性が高いため、実験は各試験区での光照射の都度、クーリングのための休止期間をおいた。

#### 結果

結果を Fig. 2-10 に示す。出力された輝度値の変化は、照射光強度の変化とほぼ線形であるとみなせた( $r^2=0.9996$ )。蛍光板は温度一定の条件下で同一の蛍光収率を示すため、照射光強度と蛍光強度は線形であるといえる。これらより、出力された輝度値と蛍光強度は線形関係にあると判断できた。ところで、光が照射されていない暗黒状態で、ピクセル値は 0 ではなく、27 という平均値を示す一方、ハレーションを起こす程度の輝度画像に対しても、ピクセル値は 240 程度にしかならなかった。一般に、輝度値の低いレベルでは、S/N 値も低くなるため、バックグラウンドとして減算する値は、暗黒状態における平均値の 27 ではなく、回帰式より得られた y 切片の

24.8 を用いた。そして、本研究でクロロフィル蛍光画像を取得する際には、ピクセル値が両端値の 15%に入らないように蓄積時間及びゲインを調節した。

本研究では、以後、本システムで取得したクロロフィル蛍光画像のピクセル値を、その部位における相対的な蛍光強度であるとみなす。

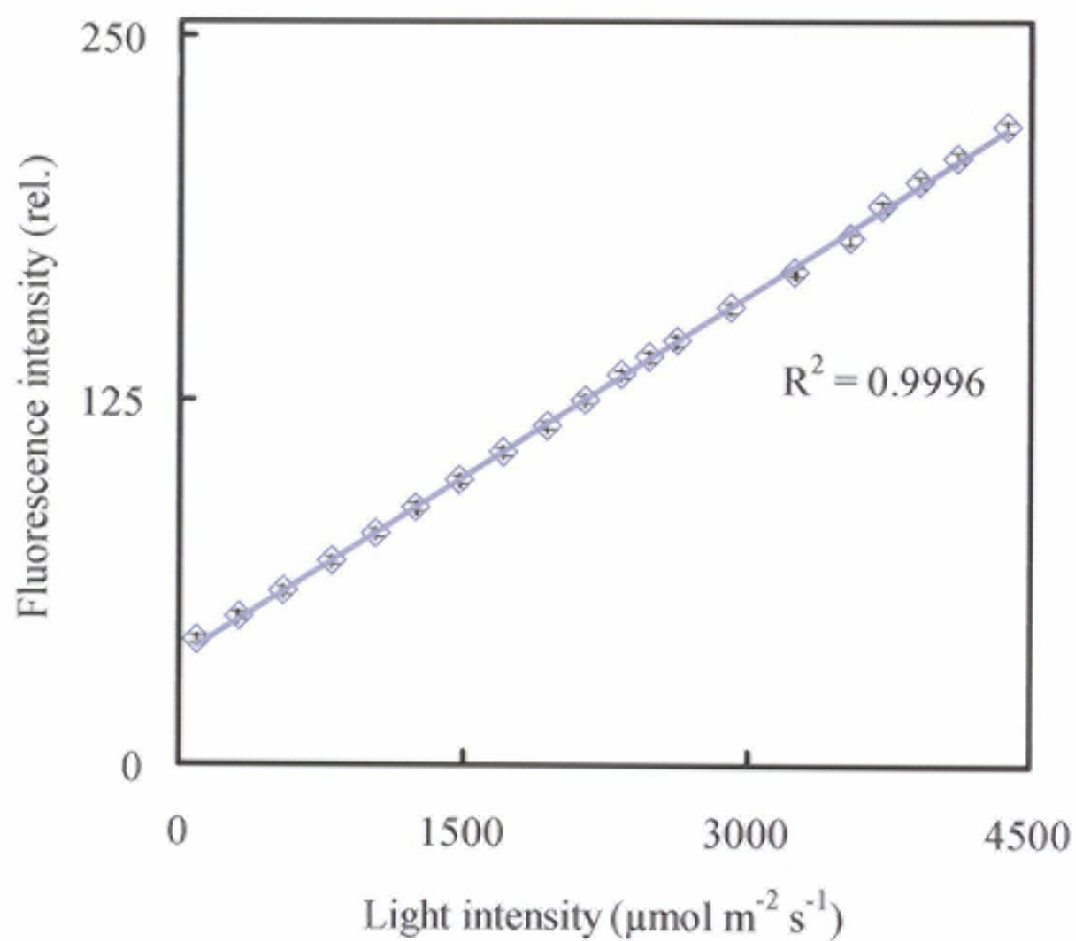


Fig. 2-10 Relationship between the intensity of the irradiation light and fluorescence intensity as A/D conversion level of digital video recording image. The vertical bar indicates SD.

## 2.5 クロロフィル蛍光解析手法

前項で述べた、クロロフィル蛍光測定からの生体情報抽出手法として一般に確立しているものには、Induction 法と飽和パルス法とが挙げられる。

Induction 法は、クロロフィル蛍光に特徴的な過渡的变化、特に早い時間での蛍光強度経時変化を測定する方法であり、PS II で起こっている諸反応の分析に有用であるといえる。発見者の名に因んでカウツキー効果と呼ばれるこの現象は、その誘導期曲線の各ポイントに、それぞれ O, I, D, P, S, M, T の名がつけられている。これらは、PS II 反応中心に存在する電子受容体  $Q_A$  の還元状態を反映しており、各ポイントにおける生理状態は、既往の研究によってその多くが解明されてきている。しかし、カウツキー効果のうち特に有用な部分、OIDP までの早い時間(1s 以内)での蛍光強度変化の取得は、本研究で使用するクロロフィル蛍光顕微画像計測システムでは、輝度取得のための時間蓄積の観点において困難である。そこで本研究では、もう 1 つのより一般的な手法である、飽和パルス法を主に用いることにした。そこで、飽和パルス法、及びこの手法によって算出される蛍光クエンチングパラメータについて、概説する。

### 2.5-a 飽和パルス法

クロロフィル蛍光は、光合成生物の内部状態の変化によって、その蛍光収率を様々なに変化させる。というのも、前節で述べた通り、葉緑体によって吸収された光が様々な用途で使用されているためである。その用途とは、光化学系、熱放散等の非光化学系、そしてクロロフィル蛍光であるが、飽和パルス法においては、光化学系及び非光化学系でのエネルギー消費を、クロロフィル蛍光を消光(クエンチング)させる要素であるとして、それぞれを光化学的クエンチング(photochemical quenching)、非光化学的クエンチング(non-photochemical quenching)と呼ぶ。飽和パルス法は、光合成生物の、暗期条件下での最大・最小蛍光収率、明期条件下での最大・最小蛍光収率、及び定常状態でのクロロフィル蛍光収率を測定することにより、これら光化学的クエンチングと非光化学的クエンチングとを分離する方法である。Fig.2-11 に、飽和パルス法による典型的な蛍光収率変化のグラフを示す。

飽和パルス法について議論する前に、蛍光収率と蛍光強度の違いについて述べる。蛍光強度が、クロロフィル蛍光画像の輝度値から得られた値のみを反映している一方で、蛍光収率は、さらに、照射された光強度の比を取ることによって、単位照射光強度あたりの蛍光強度を表している。クロロフィル蛍光は、蛍光収率が一定である普通の蛍光板とは異なり、PS II 反応中心の電子受容体  $Q_A$  の酸化還元状態を反映して蛍光収率が変化する。そのため、飽和パルス法のように照射光強度の異なる 2 つの光源を用いた場合には、蛍光強度ではなく、蛍光収率での議論が必要である。

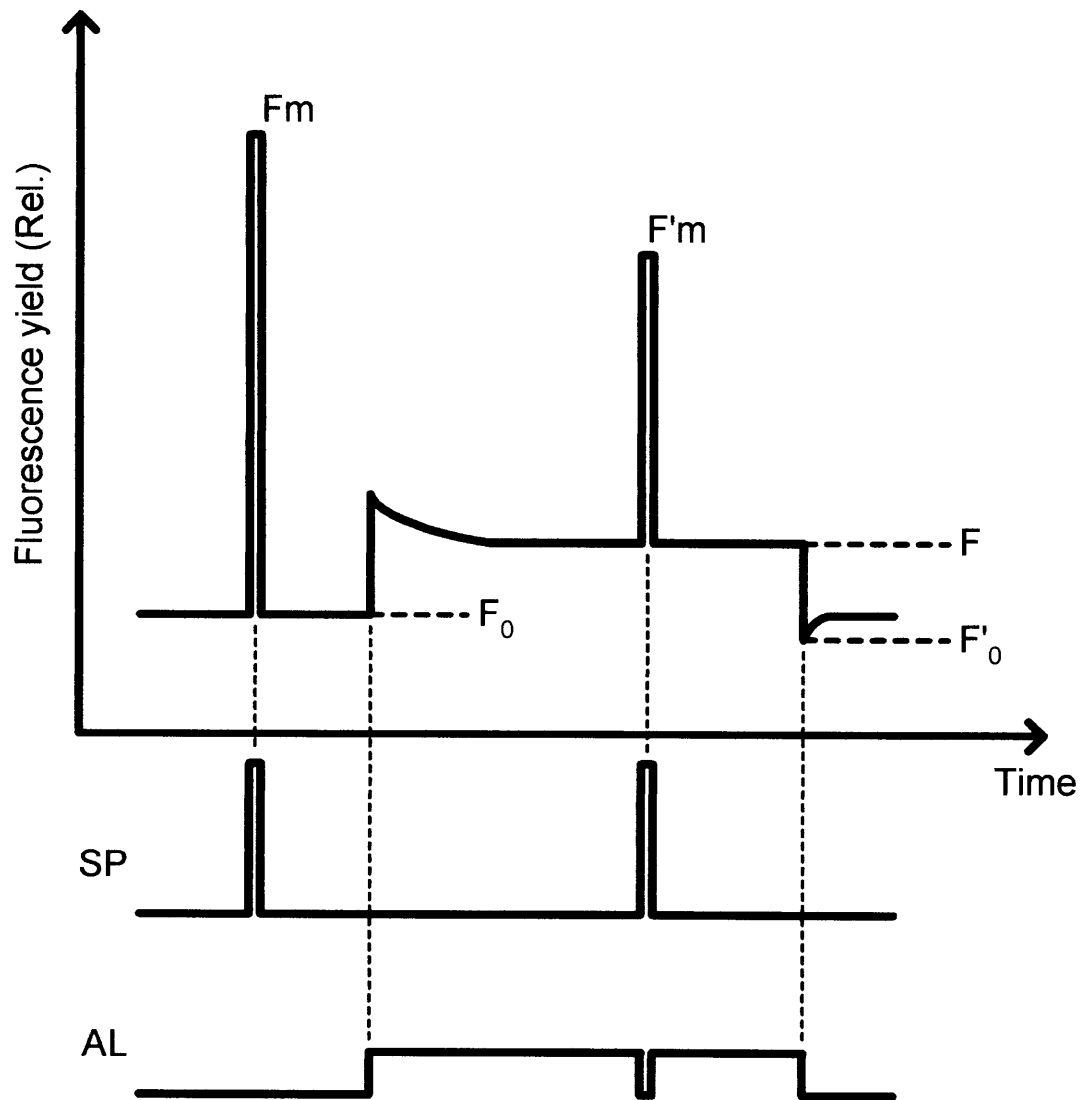


Fig. 2-11 Schematic diagram of chlorophyll fluorescence imaging measurement process by the saturation pulse method.  $F_m$  image are taken 10 min. at dark period.  $F$  image are taken at actinic light intensity.  $F'_m$  image are taken within seconds. SP: Saturation pulse, AL: Actinic light.

## 2.5-b クロロフィル蛍光パラメータ( $F_m$ , $F_m'$ , $F$ , 及び $F_0$ )について

クロロフィル蛍光の最大収率は、前述の、クロロフィル蛍光が  $Q_A$  の酸化還元状態を反映しているという特徴を利用して求める。一般に、 $Q_A$  が全て還元状態にあるとき（この状態を“閉じた(closed)状態”と呼ぶ）、P680 は励起しても電子を  $Q_A$  に受け渡せなくなるため、光化学的経路に電子伝達がされず、光化学的クエンチングが 0 になる。さらに、暗期条件下に置くことで、非光化学系でのエネルギー伝達が抑えられ、非光化学的クエンチングが最小になる。このように、暗期条件下において、 $Q_A$  を全て還元できる強度の光(飽和光と呼ぶ)を照射することにより、クロロフィル蛍光の最大収率を求めることができる。この蛍光最大収率を  $F_m$  と呼ぶ。また、このときのクロロフィル蛍光画像を  $F_m$  画像と呼ぶ。

さらに、明期条件下において前述の飽和光を照射することで、明期条件下における最大蛍光収率( $F_m'$ )を得ることができる。これは、光化学的反応が極めて速い反応系である一方で、非光化学的反応が比較的遅い反応であることを利用している。そのため、 $F_m$  取得時の飽和光についても言えることであるが、飽和光は、非光化学的反応が変化しない程度の短時間の照射を行わなければならない。これにより、飽和光は大抵の場合約 1-2 秒間の照射になる。この飽和光を飽和パルス光と呼ぶ。また、明期条件下におけるクロロフィル蛍光収率を  $F$ 、その画像を  $F$  画像と呼ぶ。

また、クロロフィル蛍光の最小収率は  $F_0$  と呼ばれる。一般に、 $Q_A$  が全て酸化状態にある(この状態を“開いた(open)状態”と呼ぶ)暗期条件下で、 $Q_A$  が還元状態にならない程度の弱光を照射すると、ほぼ全ての光エネルギーが光化学系で消費される。このとき最小の蛍光収率  $F_0$  が得られる。蛍光収率は  $F_m$  と  $F_0$  の間で変化し、一般に、光阻害を受けていないときの高等植物は  $F_v(=F_m-F_0)/F_m$  が約 0.8 という値をとる。一方、本研究の供試材料である緑藻類では比較的低い値(約 0.60)が報告されており(Krause & Weis, 1991)、供試材料に対する PAM 蛍光測定器での実測値もそれに近い値を示したため、本研究では  $F_0=F_m \times 0.6$  で近似した。また、明期光消光直後には蛍光収率の一時的な落ち込みが観察され、この時の蛍光収率を  $F'_0$  と呼んでいるが、Oxborough & Baker(1997a)は、



$$F'_0 = \frac{F_0}{\frac{F_v}{F_m} - \frac{F_0}{F'_m}}$$

で  $F'_0$  を近似できるとしている。

## 2.5-c クロロフィル蛍光クエンチングパラメータ(qP, $\Phi_{PSII}$ , NPQ, qN)について

前節の蛍光パラメータを用いて、種々の蛍光クエンチングパラメータの算出を行う。これらのパラメータを用いて、光合成生物の光化学活性、及び非光化学活性について相対的に評価することが可能である。

<光化学系に関するクエンチングパラメータ(qP,  $\Phi_{PSII}$ )>

qP は、qN と共に Bilger et al.(1986)によって提唱されたクエンチングパラメータであり、次式によって表される。

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

分子の  $F'_m$  と  $F$  の差は光化学的クエンチングを意味している。qP は、PS II 反応中心における電子受容体  $Q_A$  の酸化している割合、つまり、光合成電子伝達に利用できる、空き状態の PSII 反応中心の割合と非線形的な相関をもつパラメータである。qP と酸化している  $Q_A$  との間には、PSII 相互の連絡が 0 のとき、または、非光化学的クエンチングが最大値を取るときに、理論的な線形関係が成り立つ(Oxborough & Baker, 2001)。

次に、 $F'_v/F'_m$  ( $F'_v = F'_m - F'_0$ ) というパラメータを導入する。 $F'_v/F'_m$  は明期での PSII における最大量子収率を示しており、利用可能にある PSII の割合を表している。この  $F'_v/F'_m$  と qP との積、つまり、利用可能にある PSII において、実際に有効利用されているものの割合として、 $\Phi_{PSII}$  が定義される。 $\Phi_{PSII}$  が光合成生物の実際的な効率であるのに対して、qP や  $F'_v/F'_m$  ( $F_v/F_m$  も同様) は、その効率を変化させる、内在的な要素であるといえる。 $\Phi_{PSII}$  の変化は、 $F'_v/F'_m$  の変化、つまり  $F'_m$ 、 $F'_0$  の増減をもたらす非光化学的クエンチングと、qP の変化、つまり光化学的クエンチングの双方に関係しているパラメータであるともいえる。

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F}{F'_m} = \frac{\Delta F}{F'_m}$$

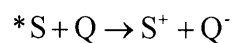
$\Phi_{PSII}$  は Genty によって開発され、Genty パラメータとも呼ばれる。実験条件下において、 $\Phi_{PSII}$  は電子伝達速度と非常に高い相関を持ち、また、後に示す条件を考慮すれば、 $CO_2$  固定速度とも高い関連性を示す。 $\Phi_{PSII}$  は測定に暗期条件を必要としないため、フィールドでの非破壊光合成活性測定において、普遍的に利用されているパラメータである。しかし、 $\Phi_{PSII}$  は PSII における電子伝達を反映しているに過ぎない。そのため、光化学系以後のエネルギー利用が、一定の割合で変化せずにカルビンサイクルに利用されている場合のみ、 $\Phi_{PSII}$  は  $CO_2$  固定速度と相関がある、ということに注意すべきである。実際には、PSII を通過した電子の授受によって産生されるエネルギー(ATP)及び還元力(NADPH)は、カルビンサイクルのみならず、他の反応系においても消費される。特に、光呼吸の増大において、 $\Phi_{PSII}$  と  $CO_2$  固定速度との相関関係は大幅に損なわれる。そのため、 $\Phi_{PSII}$  と  $CO_2$  固定速度との相関について報告した Genty の実験条件においては、光呼吸による影響を排除するため、大気ガス組成から酸素を省いている。

<非光化学系に関するクエンチングパラメータ(NPQ,  $qN$ )>

NPQ(Non-photochemical quenching)は、Bjorkmann & Belger によって 1990 年に導入されたパラメータであり、次式で表される。

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

これは、Stern-Volmer 式をクロロフィル蛍光に適用したものである。一般に、励起状態の蛍光物質(\*S)と消光剤(Q)との間には、



で示されるような強い相互作用が認められ、かつ、会合体が生成しない条件下においては、

$$I_0/I = K_{sv}[Q] + 1$$

( $I_0$ , 消光剤非存在下での蛍光収率;  $I$ , 消光剤存在下での蛍光収率;  $K_{sv}$ , Stern-Volmer 定数)

の式が成り立つ(Stern-Volmer の法則)。これに飽和パルス法の蛍光パラメータを代入すると、 $I_0 = F_m$ ,  $I = F_m'$ ,  $K_{SV}[Q] = NPQ$  となり、式が成り立つ。

NPQ は非光化学的クエンチングを表しており、吸収された光のうちどのくらいが非光化学系に利用されているかについての指標となる。他の蛍光クエンチングパラメータが、0-1 の値をとるのに対して、NPQ は 0- $\infty$ の値をとるが、一般には、NPQ は 1-3.5 の付近で推移する。非光化学的クエンチングは、光化学系以外の蛍光収率を低下させる全ての要素を含んでいるため、その解析は複雑である。Müller et al.(2001)によれば、非光化学的クエンチングは、 $qE$ ,  $qT$ , 及び  $qI$  の 3 つの要素を含んでおり、これらはそれぞれの緩和時間が異なるため、明期光消光後における  $F_m$  の蛍光収率の経時変化から分離可能である。 $qE$  はエネルギー依存性クエンチングと呼ばれ、葉緑体チラコイド膜間における pH 勾配の形成と密接な関係をもつ。また、 $qT$  は状態遷移性クエンチングと呼ばれ、集光性クロロフィル複合体(LHCII)の一部が、PSII から分離することによって生じるクエンチングであり、 $qI$  は、光阻害によるクエンチングを表している。実際の利用には、 $qT$  は無視できる程度の大きさとして扱われており、また  $qI$  は、光阻害を受けていない高等植物の  $F_v/F_m$  がほぼ 0.8(藻類は 0.6)で一定することを利用して、予備実験として  $F_v/F_m$  を測定することにより回避することができる。そこで本研究では、NPQ の主成分を  $qE$  であるとみなしている。

$qE$  と pH 勾配との関係を説明付けるものは、1 つには LHCII 近傍に存在するキサントフィルサイクルが挙げられる。キサントフィルサイクルは、光合成生物が持つ代表的な熱放散サイクルで、需要を上回る過剰なエネルギーが供給されたときのエネルギー消散に役立っている。このようなエネルギー消散経路は、光合成装置の過剰なエネルギー供給によって生じる活性酸素の発生を未然に防ぐ手段として非常に重要な役割を担っている。キサントフィルサイクルにおける、ビオラキサンチンからゼアキサンチンへの変換は、チラコイド膜間の pH 勾配が形成されると、反応が活性化される。このビオラキサンチンの脱エポキシ化によって、LHCII から PSII への励起エネルギー伝達効率が低下することが報告されている(Müller et al., 2001)。

## 2.6 飽和パルス光の決定

飽和パルス法での解析にあたっては、飽和パルス光の強度及び照射時間の設定が必要不可欠である。というのも、飽和パルス光が、全ての  $Q_A$  を還元させつつ非光化学的クエンチングを増加させないものでなければならないからである。このため飽和パルス光は一般に、高い光強度及び短い照射時間で照射する。そこで本実験では、飽和パルス法による解析の予備実験として、供試材料に対して、様々な光強度及び照射時間で飽和パルス光を照射し、最適飽和パルス光の決定を行った。

### 2.6-a 飽和パルス光強度の決定

#### 材料及び方法

材料には、21℃、PPF  $120\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、C 培地で培養した *Closterium moniliferum* を用いた。これらを、プレパラート上で生育環境と同一の条件下におき、 $400\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  –  $4000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の飽和パルス光を5秒間照射した。なお、決定にあたっては、暗期条件下で実験を行った。

#### 結果

各種飽和パルス光による最大蛍光収率を Fig. 2-12 に示す。*Closterium moniliferum* は  $1000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上の飽和パルス光で蛍光収率が最大に達することがわかった。これより、本実験では、これらの藻類については、 $2000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度で飽和パルス光を照射することに決定した。

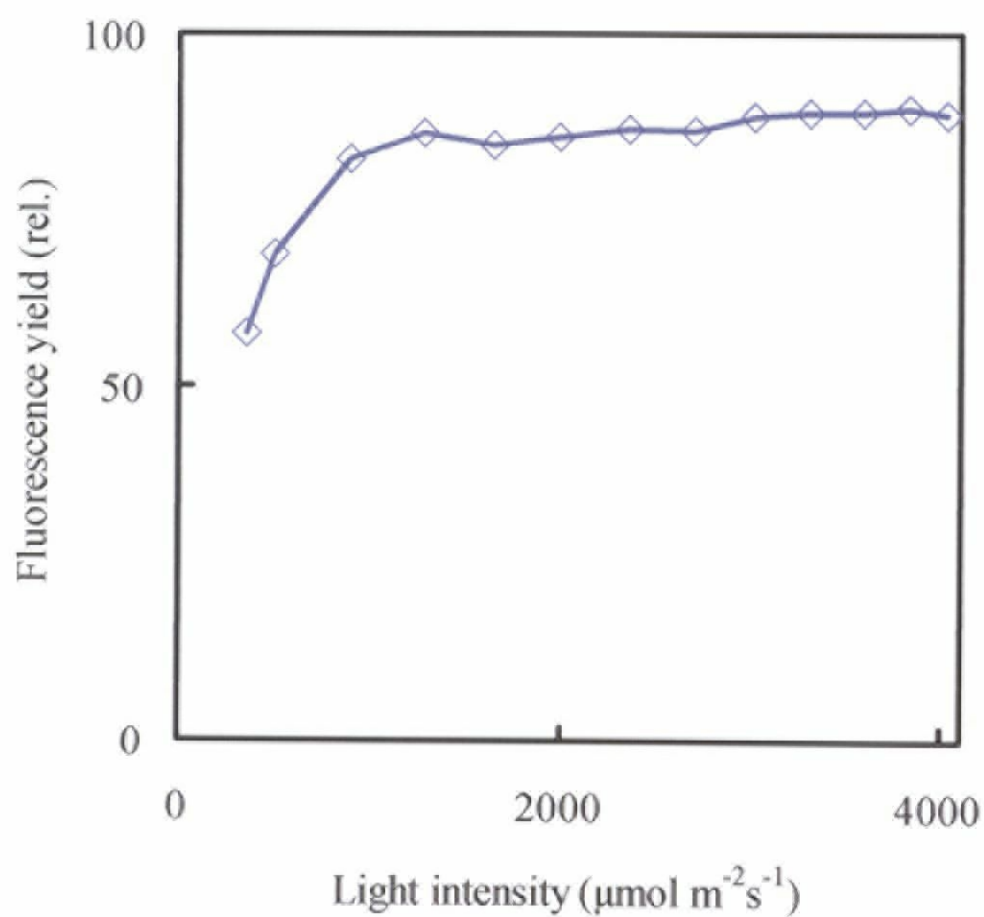


Fig. 2-12 Relationship between the intensity of the irradiation light pulse and relative chlorophyll fluorescence yield of *Closterium moniliferum*.

## 2.6-b 飽和パルス光照射時間の決定

### 材料及び方法

材料には、先の実験同様 *Closterium moniliferum* 及び *Spirogyra distenta* を用いた。これらを、プレパラート上で生育環境と同一の条件下におき、 $2000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の飽和光を 15 秒間照射して、供試材料のクロロフィル蛍光の経時変化について調べた。なお、明期では各種の酵素反応系が活性化され、非光化学的クエンチングがすでに形成されているため、クロロフィル蛍光は最大収率より低いところで値を保つ。ところが暗期では、蛍光が最大収率に達した後に PSI の還元側の光活性化による  $Q_A$  の再酸化が起こるため、明期に較べて蛍光収率の落ち込みが速い。そこで、飽和パルス光照射時間の決定にあたっては、暗期条件下で実験を行った。

### 結果

飽和パルス光の経時変化について、Fig. 2-13 に示す。*Closterium moniliferum*, *Spirogyra distenta* の両者において、クロロフィル蛍光は、飽和光照射後に鋭い上昇をした後短時間プラトーに達し、続いてゆるい低下を示した。最大蛍光収率( $F_m$ )は、プラトーの期間のみ観察されるため、本システムでは、両者において、プラトーが維持されている時間である 2 秒間を飽和パルス光照射時間として定め、プラトーの状態にあるクロロフィル蛍光収率を  $F_m$  として取得するよう設定した(Fig. 2-13)。

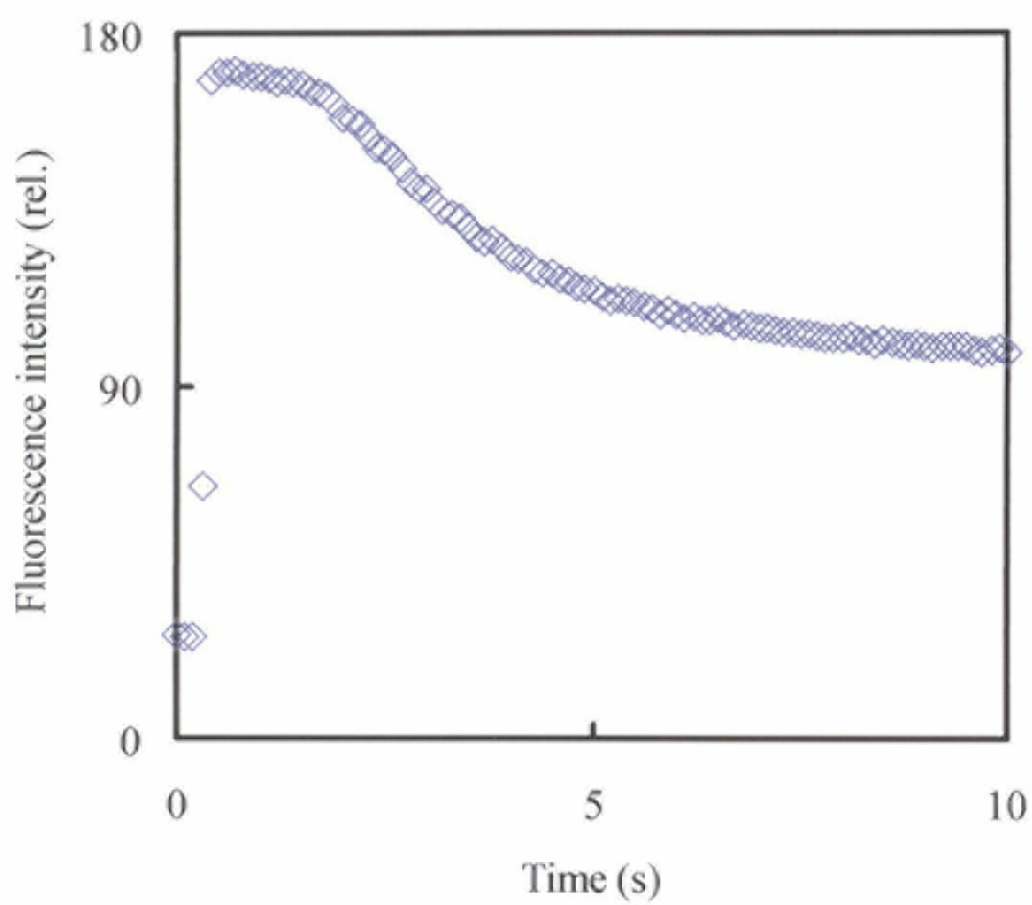


Fig. 2-13 Time course of *Closterium moniliferum* L. fluorescence intensity under the successive saturating light (PPF=2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )



## 2.7 蛍光の反応速度定数論

蛍光強度  $F_f$  は、吸収された光の量  $I_a$  と、クロロフィル分子を基底状態に遷移させる全ての要素速度定数の総和における、蛍光速度定数( $k_f$ )の占める割合を乗じたものと正比例する。

$$F_f = I_a \times \frac{k_f}{\sum k_i}$$

蛍光以外の重要な速度定数としては、光化学反応( $k_p$ )、熱放散( $k_d$ )、その他の非蛍光型色素複合体への励起エネルギー移動( $k_t$ )等が挙げられるが、これらを用いると、先の蛍光収率に次式で表される。

$$F = \frac{k_f}{k_f + xk_d + yk_p + k_t}$$

$$F_m = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_t}$$

$$F'_m = \frac{k_f}{k_f + xk_d + k_t}$$

$$F_0 = \frac{k_f}{k_f + k_p + k_d + k_t}$$

$$F'_0 = \frac{k_f}{k_f + k_p + xk_d + k_t}$$

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{k_p}{k_f + k_p + k_d + k_t}$$

$$\frac{F'_v}{F'_m} = \frac{k_p}{k_f + k_p + xk_d + k_t}$$

(ただし,  $x \geq 1$ ,  $0 \leq y \leq 1$ )

蛍光収率  $F$  が、分母に全ての非蛍光成分を含んでいる一方で、他のパラメータは、いくつかの非蛍光成分が変化している点に特徴がある。

最大蛍光収率である  $F_m$  は、 $Q_A$  が閉じた状態、つまり光化学系での電子伝達が行われない状態であるため、光化学反応( $k_p$ )も最小になる。また、暗期での蛍光であるため、熱放散経路も活性化しておらず、よって、熱放散( $k_d$ )も 0 となる。 $F_m'$  は明期における最大蛍光収率であるが、熱放散( $k_d$ )が  $F_m$  より大きくなっている。

一方、最小蛍光収率である  $F_0$  では、ほぼ全てのエネルギーが光化学反応に用いられるため、 $k_p$  が他の成分に較べて大変大きくなる。 $F_0'$  では、さらに非光化学的クエンチングによって  $k_d$  が増加する。これらの式を利用すると、一般に計測が困難である  $F_0'$  は次式のように表すことができ、計測を行うことなしに求めることができる (Oxborough & Baker, 1997)。

$$\begin{aligned}
 F_0' &= \frac{k_f}{k_f + k_p + xk_d + k_t} \\
 &= \frac{\frac{k_f}{k_f + k_p + k_d + k_t}}{\frac{k_f + k_p + xk_d + k_t}{k_f + k_p + k_d + k_t}} \\
 &= \frac{\frac{k_f}{k_f + k_p + k_d + k_t}}{\frac{k_p}{k_f + k_p + k_d + k_t} + \frac{k_f + xk_d + k_t}{k_f + k_p + k_d + k_t}} \\
 &= \frac{\frac{k_f}{k_f + k_p + k_d + k_t}}{\frac{k_p}{k_f + k_p + k_d + k_t} + \frac{\frac{k_f}{k_f + k_p + k_d + k_t}}{\frac{k_f + k_p + k_d + k_t}{k_f + xk_d + k_t}}} \\
 &= \frac{F_0}{\frac{F_v}{F_m} + \frac{F_0'}{F_m'}}
 \end{aligned}$$

また、これらを用いて蛍光クエンチングパラメータを表すと次式のようになる。

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'm - F}{F} = \frac{yk_p}{k_f + yk_p + xk_d + k_t}$$

$$qP = \frac{F'm - F}{F'm - F'_0} = \frac{\frac{yk_p}{k_f + yk_p + xk_d + k_t}}{\frac{k_p}{k_f + k_p + xk_d + k_t}}$$

$$NPQ = \frac{Fm - F'm}{F'm} = \frac{(x - 1)k_d}{k_f + xk_d}$$

$$qN = 1 - \frac{Fm - F_0}{F'm - F'_0} = \frac{xk_d}{k_f + xk_d + k_t}$$

これより、 $\Phi_{PSII}$  が測定時における実際の光化学反応収率を表していることが理解できる。これに対して  $qP$  は、明期における最大光化学反応収率に対する実際の光化学反応収率の比をとっており、開いている光化学反応系の割合を示していると考えられる。

また、 $NPQ$  は蛍光と熱放散に対する熱放散の割合を示しており、その他の非蛍光型色素複合体への励起エネルギー移動( $k_t$ )成分を含まない分、 $qN$  よりも熱放散を強く反映したパラメータであるといえる。

## 2.8 クロロフィル蛍光画像計測システムによる蛍光クエンチングパラメータの算出

第 2 章で述べたクロロフィル蛍光クエンチングパラメータを、本システムで取得したクロロフィル蛍光画像から算出するにあたっては、得られた画像がクロロフィル蛍光収率画像ではなく、クロロフィル蛍光強度画像であることに注意しなければならない。本節では、本システムによって取得したクロロフィル蛍光画像から、クロロフィル蛍光クエンチングパラメータ画像を算出する手順について説明する。

第 2 章でも述べた通り、クロロフィル蛍光収率とは、単位光照射量あたりの蛍光強度を表したものである。飽和パルス法では、異なる 2 種類の強度の光を植物に照

射してクロロフィル蛍光を得ているため、量光源の光照射量の比を算出することで、相対的なクロロフィル蛍光収率を得ることができる。Rolfe & Scholes(1995)は、飽和光強度を A、明期光強度を B としたとき、画像を取得する際の時間蓄積は同一にし、蛍光板によって取得した  $F_A/F_B$  ( $F_A$  及び  $F_B$  は、それぞれの光強度照射によって得られた蛍光板の蛍光強度)を求めることで、クロロフィル蛍光収率を算出し(次式における *ratio*)、それによって  $\Phi_{PSII}$  及び NPQ 画像を算出した(次式)。

$$\Phi_{PSII} = \frac{{}^iF'm - {}^iD - [({}^iF - {}^iD) \times \text{ratio}]}{{}^iF'm - {}^iD}$$

$$NPQ = \frac{{}^iFm - {}^iF'm}{{}^iF'm - {}^iD} \quad (\text{Rolfe \& Scholes, 1995; 一部改変})$$

ここで、 ${}^iF'm$ 、 ${}^iFm$ 、及び  ${}^iF$  は、それぞれピクセルごとの  $Fm'$ 、 $Fm$ 、 $F$  を表している。また、 ${}^iD$  は暗期下におけるピクセル値である。

一方、Genty & Meyer (1995)は、飽和光強度を A、明期光強度を B としたとき、明期光による F 画像取得の時間蓄積を、飽和光における  $Fm$  画像取得の A/B 倍とすることで、それぞれの相対的なクロロフィル蛍光収率を算出した。

これらは、本質的には同一の作業であるが、画像の質の点で Genty & Meyer (1995) が優れているといえる。というのも、Rolfe & Scholes (1995)の手法では、F 画像を  $Fm$  画像と同一の時間蓄積で撮っていることで、F 画像のピクセル値が小さくなりがちになってしまうためである。これにより、F 画像の S/N 比、及び蛍光変化に対するピクセル値の感度が著しく低下する。

そこで、本研究では Genty & Meyer (1995)に倣って画像取得の蓄積時間を変化させ、さらに Rolfe & Scholes (1995)の、蛍光板によるピクセルごとの *ratio* 算出によって、サンプルに照射される光強度の比を正確に求めた。これによって、既往の 2 つの研究における算出法よりも正確な蛍光収率が求められると考えられる。本研究におけるクロロフィル蛍光クエンチングパラメータ画像は以下のように算出した。

Fm 画像を取得するための飽和光強度を  $I_{SP}$ 、画像取得のための蓄積時間を  $T_{SP}$  とする。また、F 画像を取得するための明期光強度を  $I_{AL}$ 、画像取得のための蓄積時間を  $T_{AL}$  とする。このとき、

$$I_{SP} \times T_{SP} = I_{AL} \times T_{AL}$$

となるように、各値を設定した。実際には、 $I_{SP}$ 、 $I_{AL}$  は、先の実験及び植物の生育条件によって決定されており、また  $T_{SP}$  は、飽和パルス光照射時間内に限定されているため、

$$T_{AL} = \frac{I_{SP} \times T_{SP}}{I_{AL}}$$

となるように、 $T_{AL}$  を決定した。

さらに、Fm画像のピクセルごとの値を  $^iF_m$ 、F 画像のピクセルごとの値を  $^iF$ 、及び F'm画像のピクセルごとの値を  $^iF'_m$  とすると、 $^i\Phi_{PSII}$  (ピクセルごとの  $\Phi_{PSII}$ )、及び  $^iNPQ$  (ピクセルごとの NPQ) は、

$$^i\Phi_{PSII} = \frac{^iF'_m - ^iD - [(^iF - ^iD) \times ratio_1]}{^iF'_m - ^iD}$$

$$^iNPQ = \frac{(^iF_m - ^iD) \times ratio_2 - (^iF'_m - ^iD)}{^iF'_m - ^iD}$$

によって求まる。ここで、 $ratio_1$  は Fm'取得時の蛍光板ピクセル値  $F_{SP+AL}$  と、F 取得時の蛍光板ピクセル値  $F_{AL}$  との比、 $ratio_2$  は Fm'取得時の蛍光板ピクセル値  $F_{SP+AL}$  と、Fm 取得時の蛍光板ピクセル値  $F_{SP}$  との比である。このように、F 画像取得の際の S/N 比向上のために  $T_{AL}$  を長時間に設定し、さらに、ピクセルごとの照射面の光強度比を補正するために  $ratio$  を導入した。

また、各蛍光クエンチング画像における、任意の領域の値を示すときには、その領域の

$^i\Phi_{PSII}$ 、 $^iNPQ$  の平均値を算出した。

$$\Phi_{\text{PSII}} = \overline{\sum^i \Phi_{\text{PSII}}}$$

$$\text{NPQ} = \overline{\sum^i \text{NPQ}}$$

なお、PAM 蛍光測定器による蛍光クエンチングパラメータ値は、任意の領域における蛍光クエンチングパラメータ値の平均値ではなく、蛍光パラメータ値(Fm, Fm', F)の平均値から算出されたものである。

$$^{\text{PAM}}\Phi_{\text{PSII}} = \frac{\overline{F'm} - \overline{F}}{\overline{F'm}}$$

$$^{\text{PAM}}\text{NPQ} = \frac{\overline{Fm} - \overline{F'm}}{\overline{F'm}}$$

そのため、画像解析によるパラメータ値と PAM 蛍光測定器によるパラメータ値は、必ずしも一致しない。

## 2.9 本研究で用いる蛍光クエンチングパラメータ

クロロフィル蛍光顕微画像計測システムは、微小領域を対象とする計測であるため、マクロな領域を対象とするクロロフィル蛍光画像計測に較べて、光量の要求量が大きいこと、時間とともに対象が移動してしまうことが問題点として挙げられる。このような理由から、暗期におけるクロロフィル蛍光の最小収率  $F_0$  の計測は、本研究では行わなかった。また、暗期における最大蛍光収率  $F_m$  と明期における最大蛍光収率  $F_m'$  から算出されるパラメータである NPQ も、予備実験により、サンプルが回転などの移動をした際に画像の重ねあわせができなくなる等の問題が生じた。一方、 $\Phi_{PSII}$  は時間的に近接した画像である F 画像及び  $F_m'$  画像から算出が可能なパラメータであるため、サンプルの移動という問題点がなく、本計測システムに適していた。そこで、本研究では、 $\Phi_{PSII}$  画像を用いて光合成機能の解析を行った。

### 3. クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを用いた微小藻類の光合成機能の解析



### 3.1 研究の目的

一般に藻類は、植物と比較して防御機構が脆弱であるため、環境ストレスに対し敏感な反応を見せる(Hader et al., 1997, 1998)。特に、河川・湖沼への流出の危険性を伴う土壌処理系除草剤等の農薬の流出は深刻な水質汚染源であり、水系の生態系への影響が懸念されるものの一つといえる(Haynes et al., 2000)。流出した農薬が微小藻類に及ぼす影響については、スポット計測による研究例がいくつか報告されている(Christopher et al., 1992; Conrad et al., 1993; Jochem, 2000)。しかし、計測領域内での同種の微小藻類が不均一な反応を示す可能性については言及されていない。そこで本研究では、湖沼中で生育ステージの異なる微小藻類が混在して生活していることに着目した。そして、代表的な土壌処理系除草剤の主成分 DCMU が、生育ステージの異なる微小藻類の光合成機能に与える影響について解析した。

### 3.2 材料及び方法

供試材料には、緑藻植物門シャジクモ綱に属する *Spirogyra distenta* L.を用いた(Fig. 3-1)。また、培養液には C 培地を用い、培養中の光強度は PPF  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に設定した。この環境条件において、*Spirogyra distenta* は活発に分裂を行った。

DCMU 処理前に飽和パルス法による計測を行い、次に、光合成電子伝達阻害剤 DCMU( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ )によって *Spirogyra distenta* を処理して同様に計測を行った(Table 3-1)。そして、DCMU 処理前後の $\Phi_{\text{PSII}}$  画像の違いについて解析した。

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. 3-2 に示す。Fig. 3-2 のグラフは、蛍光強度の経時変化、及び蛍光画像の取得時点を示し、SP(Saturation Pulse; 飽和パルス光)、及び AL(Actinic light; 明期光)は照射光強度の経時変化を示している。

本実験では、藻類を明期定常状態に移行させるため、約 15 分間実験条件と同様の明期光下に置いた。なお、実験直前に、蛍光クエンチングパラメータ算出に必要な ratio を得るため、各光強度における蛍光板画像を取得した。そして、実験開始時に、反射光画像、続いて F 画像、その直後に飽和パルス光を取得して Fm'画像を取得した。この操作を 1 分おきに 3 回繰り返した。これらの画像は蛍光クエンチングパラメータ画像の算出に用いられた。

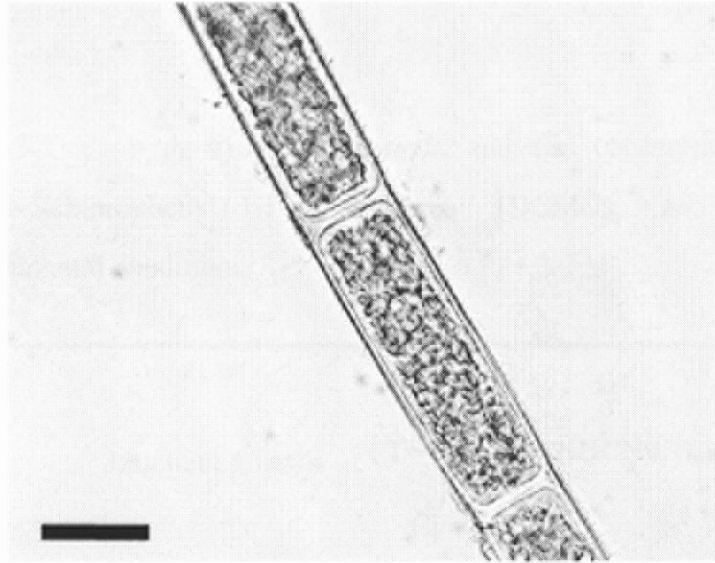
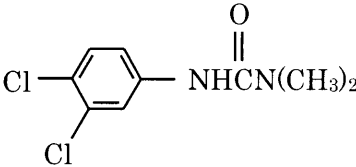


Fig. 3-1 A transparent color image of *Spirogyra distenta*. *Spirogyra distenta* were incubated in a test tube at 24 °C / 20 °C (day/night) air temperature in a controlled environment incubator (Eyela, Eyclatron FLI-301N) under fluorescent lights with a photosynthetic photon flux (PPF) of  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The photoperiod was 12 h / 12 h (day / night). Bar = 50  $\mu\text{m}$

Table 3-1            A structural formula and the concentration of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), and other experimental conditions.

---

Structural formula	
Concentration of DCMU	$3 \times 10^{-6}$ M
interval	approximately 30 minutes
a PPF of saturation pulse	$2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
a PPF of actinic light	$150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

---

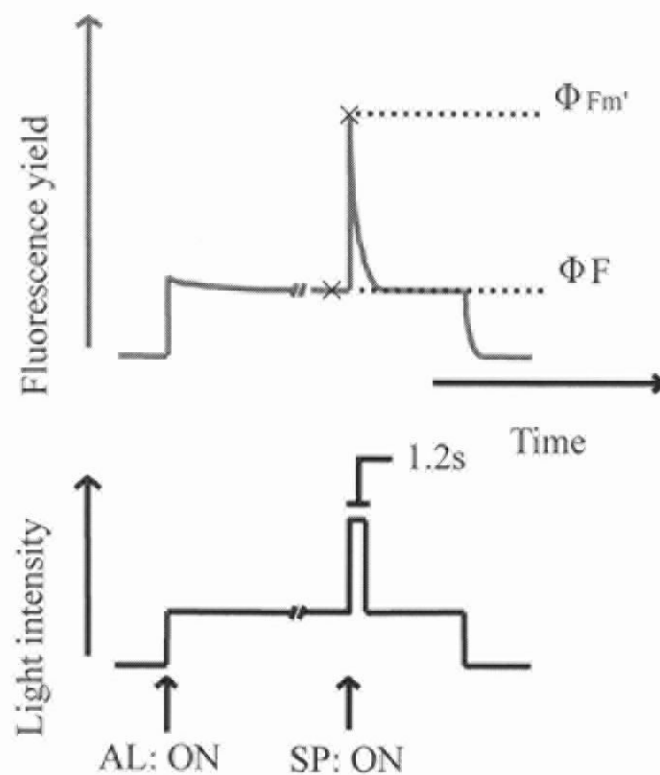


Fig. 3-2 Schematic diagram of chlorophyll fluorescence imaging measurement process by the saturation pulse method under this experiment.  $\times$  indicates that the images of chlorophyll fluorescence were taken.  $\Phi F$  image was taken at the steady state of chlorophyll fluorescence yield.  $\Phi F_{m'}$  image was taken at the maximum state of chlorophyll fluorescence yield under the saturated pulse radiation. Saturating pulse was 1.2 s in duration. SP: Saturation pulse (PPF of  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), AL: Actinic light (PPF of  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### 3.3 結果及び考察

Fig. 3-3 に、*Spirogyra distenta* の生活環を示す。*Spirogyra distenta* の葉緑体は、分裂による細胞新生後、中央付近より細胞両端に向かって伸張し、螺旋を描きながら細胞内に密集していく(日本淡水藻図鑑, 1999)。これより、左の *Spirogyra distenta* (A) は、右の *Spirogyra distenta* (C) に比べて、生育ステージが初期のものであると考えられる。

Fig. 3-4 に、PPF  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光を照射したときの 2 体の *Spirogyra distenta* 個体の反射光画像を示す。らせん状の小器官が *Spirogyra distenta* の葉緑体であり、その形の違いから 2 対がそれぞれ異なる生育ステージにあることがわかる。葉緑体以外の他の小器官は、本システムで取得できる波長の蛍光を発しないため観察されなかった。葉緑体の形状から判断して、Fig. 3-4 における右の個体は Fig. 3-3 の stage C にあたる成熟した *Spirogyra distenta*、左の個体は Fig. 3-3 の stage A にあたる若い *Spirogyra distenta* であると判断できた。

*Spirogyra distenta* の細胞は円筒状の構造をしており、深さ方向の距離は本実験で用いた対物レンズの焦点深度よりも大きかった。そのため、取得された画像内には部分的に焦点の合わない領域が存在した。焦点の合っていない領域では、 $\Phi_{\text{PSII}}$  が正しく算出されていない可能性があるため、焦点が合っていると判断した領域の  $\Phi_{\text{PSII}}$  を解析に用いた。

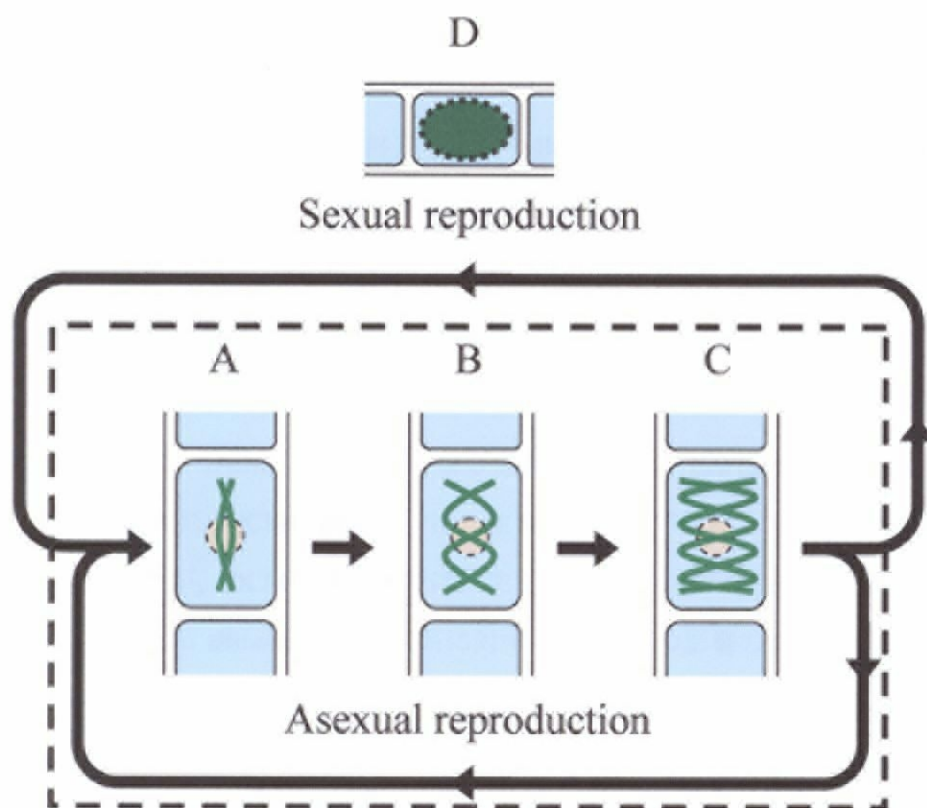


Fig. 3-3 Life cycle of *Spirogyra distenta*. *Spirogyra distenta* has two reproductive stages, sexual one by meiosis of zygote, or asexual one by mitosis. At the asexual stage, two small chloroplasts located centrally extend to both ends of a cell as double helix shaping (A, B, C). Strands grow by somatic cell division until they break, thus forming more individuals. In this study, chloroplast growth and development of interface cell at the asexual stage, which occurs more frequently than the other stage, was examined.

Fig. 3-5 に、DCMU 滴下前後の *Spirogyra distenta* の $\Phi_{PSII}$  画像を示す。DCMU 滴下前の *Spirogyra distenta* の葉緑体における $\Phi_{PSII}$  は、成熟個体では 0.39 から 0.46 の値をとり、若い個体では 0.35 から 0.46 の値をとっていた。このように、DCMU 滴下前においては、成熟個体と若い個体はほぼ同様の $\Phi_{PSII}$  を示した。この結果から、通常条件下では、若い個体が既に成熟個体と類似の光合成電子伝達収率を有していることがわかった。

次に、DCMU 滴下後 15 分経過した同一個体に対して同様に $\Phi_{PSII}$  を算出したところ、両方の個体とも $\Phi_{PSII}$  の低下が見られた。しかしながら、成熟個体の $\Phi_{PSII}$  が 0.28 から 0.35 の値をとっていたのに対し、若い個体の $\Phi_{PSII}$  は 0.13 から 0.23 の値をとっていた。このように、DCMU 滴下後の $\Phi_{PSII}$  は若い個体の方が成熟個体よりも大きく低下した。なお、DCMU の滴下前後で、反射画像に変化は見られなかった。

Fig. 3-6 に、DCMU の滴下が異なる生育ステージの *Spirogyra distenta* の $\Phi_{PSII}$  に与えた影響を示す。DCMU 滴下前では、生育ステージが異なっても $\Phi_{PSII}$  は類似した値であったが、DCMU 滴下後では、生育ステージが若いほど $\Phi_{PSII}$  は低下した。これは、*Spirogyra distenta* の光合成系に対する DCMU の影響の大きさが生育ステージに大きく依存していることを示している。このような現象が生じた原因としては、生育ステージが若い個体では、内外の物質の移動に関与する細胞壁や細胞膜等の構造が未熟であるため、成熟個体に比べて DCMU の透過性が高くなったことが可能性として考えられる。また、葉緑体の DCMU に対する感受性が異なっていることも、原因として考えられる。これについては、細胞膜や葉緑体を単離した、生理学的な実験を行う必要性があると考えられる。

これより、*Spirogyra distenta* の生育ステージによって、DCMU による影響が異なることがわかった。この結論は以下の 2 点についての問題を提議していると考えられる。

第一に、スポット計測による環境モニタリングのデータ精度を検証する必要があると考えられる。現在、湖沼の水質汚染レベルについて、藻類の種類や個体数、さらに蛍光のスポット計測を用いて推定する試みが行われている。しかし、本研究の結果より、DCMU による微小藻類の光合成機能障害には不均一性があることを示さ



れた。そのため、上述のモニタリングの際には、少なくとも予備実験として、顕微鏡による観察を通じて計測対象の生育ステージの混在度について評価する必要があると考えられる。理想的には、蛍光を指標にしたモニタリングに対しては、生育ステージを考慮した画像計測が望ましいと考えられる。

第二に、農薬の汚染による *Spirogyra distenta* への影響が、季節的な変動を見せる可能性があると考えられる。Fig. 3-7 は、温帯の湖沼に生息する *Spirogyra distenta* 個体数の増減を示したものである。このように、*Spirogyra distenta* は周年的な個体数の増減を繰り返しており、春と秋に大きな増殖期を持つ。この増殖期においては、分裂により若い生育ステージの個体が増加し、夏期には成熟個体が個体群の大半を示す。このことは、同一濃度の DCMU が湖沼に流出したとしても、その影響が季節的な変動を示す可能性があることを示唆している。例えば、春と秋では、若い生育ステージの個体の割合が大きいため、夏期には見られないような障害が、同一濃度の DCMU 流出で生じる可能性がある。また、このような不均一性は、生育ステージが混在する状況であれば生じうるため、湖沼内での分布のような、地理的な不均一性についても考察の余地があると考えられる。

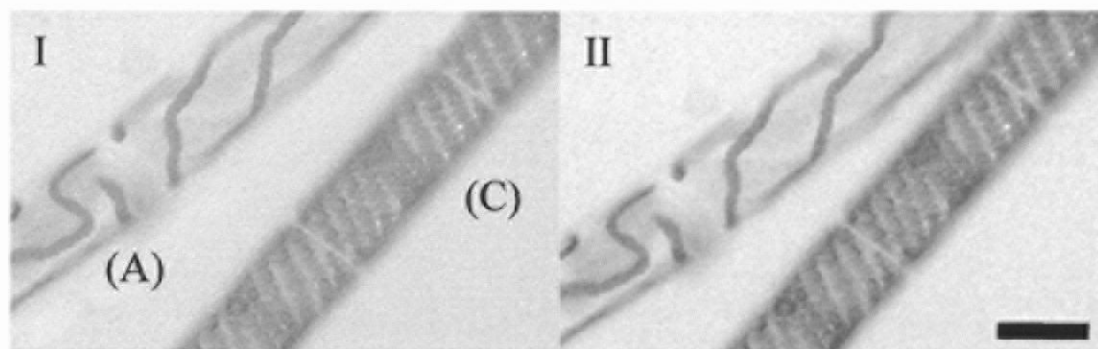


Fig. 3-4  $\Phi_{PSII}$  images just before DCMU ( $3 \times 10^{-6}$  M) treatment (I) and 15 min after treatment (II) of *Spirogyra distenta* at different growth stages. Haploid stages correspond to stages A and C in Fig. 3-3. Images were taken at PPFs of  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  actinic light and during a saturating light pulse of  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ .

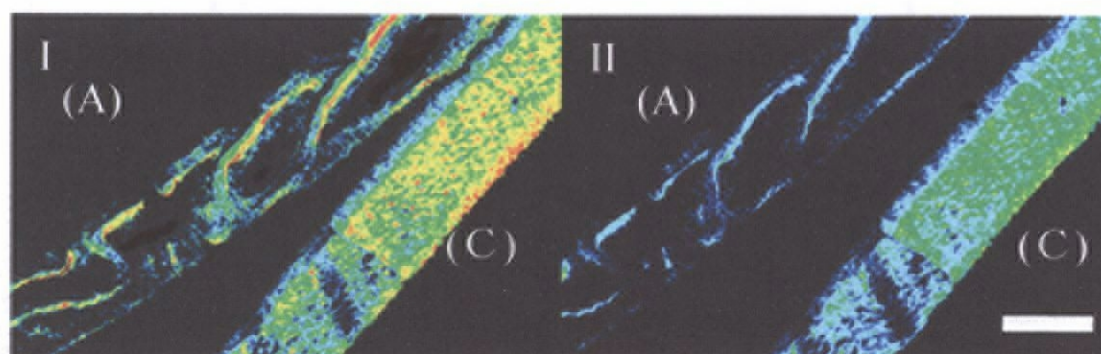


Fig. 3-5  $\Phi_{PSII}$  images just before DCMU ( $3 \times 10^{-6}$  M) treatment (I) and 15 min after treatment (II) of *Spirogyra distenta* at different growth stages. Haploid stages correspond to stages A and C in Fig. 3-3. Images were taken at PPFs of  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  actinic light and during a saturating light pulse of  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ .

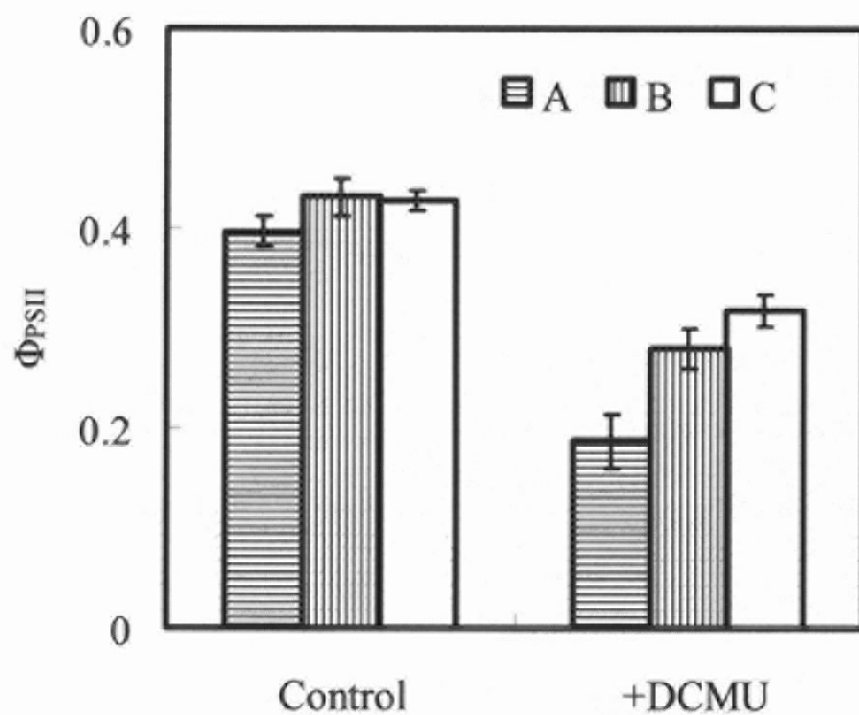


Fig. 3-6 Effects of DCMU ( $3 \times 10^{-6}$  M) treatment on  $\Phi_{PSII}$  values of *Spirogyra distenta* at different growth stages (A, B, and C in Fig. 3-3, see Fig. 3-4). The  $\Phi_{PSII}$  values were obtained at sites with in-focus and uniform reflectance. Experimental conditions were the same as those in Fig. 3-4.

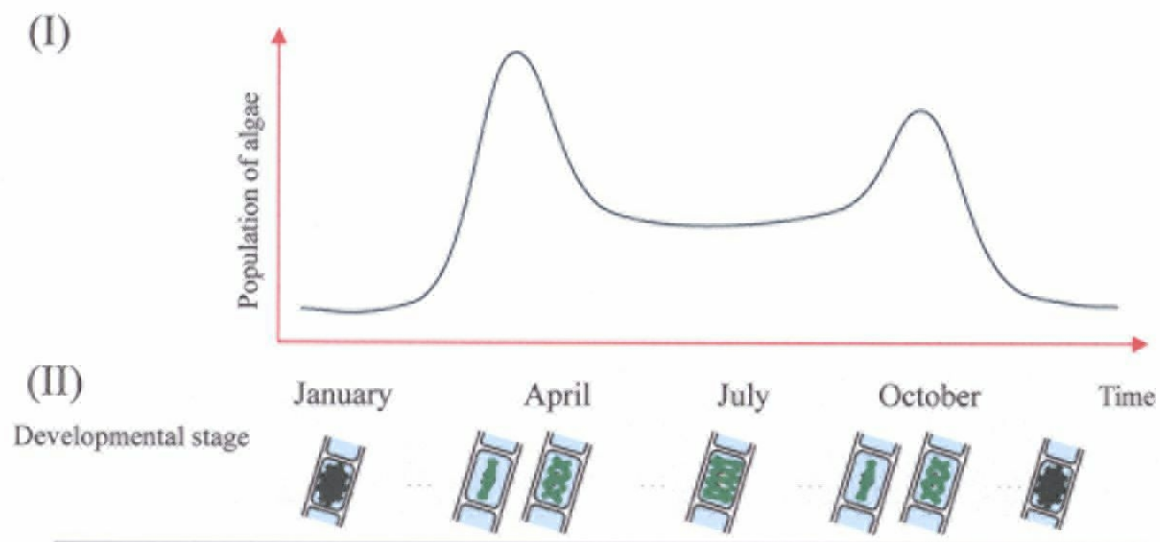


Fig. 3-7 Annual change of *Spirogyra distenta* population in a lake (I), and a developmental stage of *spirogyra distenta* at the time (II). *Spirogyra distenta* shows two proliferation periods in spring and autumn, because these seasons provide a suitable condition for algae, particularly about temperature and nutritive salt on the surface of the lake.

### 3.4 本章のまとめ

クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを用いて、除草剤成分の DCMU が微小藻類の光合成機能に与える影響について解析を行った。得られたクロロフィル蛍光画像から、光合成電子伝達収率を表すとされる  $\Phi_{PSII}$  画像を算出し、DCMU 前後の *Spirogyra distenta* の  $\Phi_{PSII}$  をピクセルごとに比較した結果、生育ステージが若い *Spirogyra distenta* ほど、DCMU によって  $\Phi_{PSII}$  が低下していた。これより、DCMU による光合成障害には、生育ステージによる差があることが示された。