

博士論文(要約)

フラウンホーファー線を用いたクロロフィル 蛍光パラメータの推定と精度検証

2015年12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 教授

図布新巴雅尔

「本博士論文の内容は、学術雑誌論文として出版される計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。」

論文の内容の要旨

生物・環境工学専攻
平成 24 年度博士課程入学

氏名： 冨布新巴雅尔

指導教員： 大政謙次 教授

論文題目： フラウンホーファー線を用いたクロロフィル蛍光パラメータの推定と精度検証

クロロフィル蛍光測定は能動方式と受動方式に分かれる。能動方式の蛍光測定は、近距離から励起光あるいは測定光を葉に照射し、蛍光を直接測定する。一方、受動方式の蛍光測定 (FLD 法) は、太陽光励起の下でフラウンホーファー線を用いて、測定された分光放射輝度から蛍光を求める。能動方式の蛍光測定は方法的に確立されており、高精度での蛍光測定が可能であるのに対して、FLD 法による蛍光測定は、非常に弱い蛍光信号を分光放射輝度から推定するため、測定法としての検証が必要である。そこで本研究では、能動方式の蛍光測定を基準とし、FLD 法による蛍光測定で得られた値と比較することにより、クロロフィル含有量との関係や蛍光パラメータの精度の検証を行った。特に、FLD 法では、レーザー励起による飽和パルス光を用いて、光化学系 II の量子収率 ($\Phi_{PS II}$)、非光

化学消光(NPQ)、電子伝達率(ETR)などを測定する新しい方法を開発し、その精度検証を行った。

本論文は5章で構成される。第1章の序論では、本研究の背景及びクロロフィル蛍光の既往の研究を纏めた。植物は太陽光エネルギーを吸収し光合成を行い、水と二酸化炭素から炭水化物を合成するとともに酸素を放出する。光合成色素により吸収された光エネルギーは全て光合成に使われるのではなく、熱として多くのエネルギーを放出する。また、数%程度以下のエネルギーが蛍光として放出される。これらの光合成、熱放散、蛍光によるエネルギーは、何れかの収率が変化すると残りの二つの収率も変化する関係にある。

クロロフィル蛍光は植物が光合成を行う反応過程で主にクロロフィル a から放出される。蛍光に含まれる光合成の反応に関する情報は豊富である。このため、クロロフィル蛍光の測定は、光合成研究のために広く使用されている方法の1つである。クロロフィル蛍光の能動的な蛍光測定は、近距離での測定に限定されるが、市販のパルス変調蛍光測定(PAM)装置を用いれば、ΦPSIIやNPQ、ETRなどを測定できる。また、フィルターで励起光と蛍光を分離する方法もあるが、太陽光下での測定には適さない。

FLD法による蛍光測定は、太陽光の下で、酸素吸収帯O₂B (686 nm)とO₂A (760 nm)付近のフラウンホーファー線深度を測定し、放射輝度から蛍光を推定する方法である。近年、航空機や衛星リモートセンシングによる太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定が行われるようになってきており、群落レベルの正規化植生指標(NDVI)や総一次生産量(GPP)などとの関係や植物ストレスの評価に応用されている。

第2章では、クロロフィル蛍光の基礎知識について述べた。高等植物は光合成色素であるクロロフィルとカロテノイドを含有している。これらの光合成色素で吸収された光エネルギーは光合成反応に利用されるが、その一部は、686 nmと740 nm付近にピークを持つクロロフィル蛍光として放出される。しかしながら、686 nm付近のピークは葉の強い吸収帯と重なっており、かなりの割合が再吸収される。740 nm付近では再吸収の影響が小さくなり、760 nm付近ではほとんど再吸収の影響がない。

第3章では、定常クロロフィル蛍光測定について、能動方式の一つである青色励起光照射法とFLD法により測定された蛍光収率とクロロフィル含有量との関係を検討した。この章の実験では、植物育成チャンバー内で生育させたパブリカを供試植物材料とした。測定には、10-18週間生育させた完全に展開した、異なる部位の成熟葉を使用した。測定前に葉を定常光下で十分に順応させた。人工光下で、フィルターを用い励起光と蛍光を分離し、分光器で蛍光の分光特性を測定し、参照基準とした。一方、太陽光下で、高波長分解能分光計を用い、

20 分順応させた葉の分光放射輝度を測定し、酸素吸収帯 (O_2B (686 nm) と O_2A (760 nm)) を用い、FLD 法によりクロロフィル蛍光を算出した。測定中、人工光の光合成有効光量子束密度 (PPFD) は $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の一定値で、太陽光の PPFD は $800\text{--}1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。また、蛍光強度が励起光強度に依存して変化するため、蛍光収率 (ΦF) を求めた。さらに、葉面上の特定の箇所の人工光励起と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光を測定後、クロロフィル含有量を定量化した。686 nm 付近で、上記の二つの方法で測定されたクロロフィル蛍光収率 $\Phi F_a 686.4$ と $\Phi F_s 686.7$ は、クロロフィル含有量の増加に伴い、急激に減少した。ここで、 ΦF の添字 a は人工光励起、添え字 s は太陽光励起で、数字は波長 (nm) を示す。一方、760 nm 付近では、 $\Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 760.4$ は、ばらつきはあるが増加した。しかし、二つの方法でのクロロフィル蛍光収率比、 $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ は、クロロフィル含有量と明確な逆の相関を示し、相関係数がそれぞれ 0.94 と 0.73 であった。この相関は、クロロフィル含有量が多い時ややばらつきがあったものの、クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より低い時非常に似た分布を示し、相関係数がそれぞれ 0.91 と 0.89 になった。クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より多い時の太陽光下でばらつきが大きかった原因については、以下の二つが考えられる：一つ目は強い太陽光強度下で光合成速度と熱放散が著しく異なり蛍光に割り当てられるエネルギーの量が大きく変化した。二つ目はクロロフィル含有量が多い時、686 nm 付近の葉の再吸収が著しく大きくなり、蛍光の放射輝度に対する値が相対的に小さくなるため、蛍光を抽出することが難しくなった。

二つの方法で求めた蛍光収率比の相関 ($(\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4) / (\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5)$) が 0.84 の高い値を示し、 $y=x$ 線に近似した。また、人工光励起の蛍光収率比が低い時 (約 2 以下)、太陽光励起の蛍光収率比がより低くなり、精度が低下した。しかしながら、クロロフィル含有量の違いにかかわらず、全体では良い相関を示し、太陽光下で FLD 法によるクロロフィル蛍光収率の測定の有効性を確かめることができ、また、クロロフィル含有量の推定が可能であることが示された。

第 4 章では、飽和パルス光によるクロロフィル蛍光の測定において、能動方式の一つである PAM 法と FLD 法で測定された蛍光パラメータ ($\Phi PS II$ 、NPQ、ETR) を比較し、精度検証を行った。この章の実験では、植物育成チャンバー内で生育させたパプリカとトウモロコシ、観葉植物であるパキラを供試植物材料として使用した。実験には、十分に展開した、葉緑素濃度の分布が比較的均一で、大きな葉脈のない箇所を選び、植物を 20 分間暗処理した後、太陽光下で高分解能分光計を用いて約 10 分間、分光放射輝度を測定した。FLD 法によるクロロフィル蛍光の推定は、葉の吸収がほとんどない O_2A (760 nm) 付近で 0.4 nm 波長幅

の分光特性データを用い解析を行った。FLD法では、最大蛍光収率を求めめるため、赤色レーザを使用した。同時に PAM 法で蛍光パラメータを測定し、参照基準とした。実験では、パプリカで 39 個、トウモロコシとパキラはそれぞれ 40 個の測定データを解析した。測定の際の環境条件はそれぞれ異なり、パプリカ (PPFD:11-1726 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、SPAD:37.5-52.9、葉面温度:20.8-35.2 $^{\circ}\text{C}$)、トウモロコシ (PPFD:9-1860 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、SPAD: 22.7-36.6、葉面温度:21.1-32.7 $^{\circ}\text{C}$)、パキラ (PPFD:17-1537 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、SPAD:23.2-56.1、葉面温度:20.1-27.6 $^{\circ}\text{C}$) であった。三種類の植物とも、PPFD の増加に伴い $\Phi\text{PS II}$ は減少し、NPQ は増加した。また、ETR は増加したが、PPFD が大きくなるとやや減少傾向を示した。そして、そのばらつきは大きかった。植物種の比較では、トウモロコシの $\Phi\text{PS II}$ の減少幅が一番小さく、大きな PPFD 下でも高い値を示し、NPQ の増加幅も小さかった。パキラは大きな PPFD の時、 $\Phi\text{PS II}$ と NPQ の増減幅が他の 2 種に比べて激しく大きかった。これらの結果は、光強度が強い時、トウモロコシの光合成速度がパプリカより大きく、一方、暗いところでの生育に順化している観葉植物のパキラは、強い光環境下では著しく光合成速度が低下し、熱放散が増大することを示している。なお、パプリカとパキラは C3 植物で、トウモロコシは C4 植物である。PAM 法と FLD 法による $\Phi\text{PS II}$ 、NPQ と ETR の相関を三種類の植物で比較すると、共に非常に高い相関を示した、 $\Phi\text{PS II}$ については、 R^2 はそれぞれパプリカで 0.90、トウモロコシで 0.84、パキラで 0.90 であった。また、NPQ では、 R^2 はそれぞれパプリカで 0.85、トウモロコシで 0.78、パキラで 0.88 であった。さらに、ETR では、 R^2 はそれぞれパプリカで 0.81、トウモロコシで 0.87、パキラで 0.79 であった。これらの結果から、本研究で開発した、FLD 法による蛍光パラメータの解析の有効性が確かめられた。

第 5 章は、本論文の総括である。本論文では、太陽光励起下で FLD 法を用いたクロロフィル蛍光測定法について検討し、クロロフィル含有量の影響やクロロフィル蛍光パラメータ ($\Phi\text{PS II}$ 、NPQ と ETR) の推定精度の検討を、従来法との比較で行った。その結果、太陽光励起の定常クロロフィル蛍光は、クロロフィル含有量と高い相関を示した。また、PAM 法と FLD 法による $\Phi\text{PS II}$ 、NPQ と ETR の推定値は高い相関を示し、FLD 法による $\Phi\text{PS II}$ 、NPQ と ETR の推定が可能であることが検証された。