



Title	二次元解析
Author(s)	高見, 常明; 遠藤, 剛
Description	4章 分光測定 3. パルス変調蛍光 e
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 539-543
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39189
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-074.pdf



3. パルス変調蛍光

e. 二次元解析

高見 常明¹⁾, 遠藤 剛²⁾

現在, 海外の数社からクロロフィル蛍光測定装置と CCD カメラを組み合わせた 2 次元測定を目的とした装置が市販されている。ここでは, 二次元測定の実際とそれを利用した光合成突然変異株の選抜について述べる。

2-D analysis of chlorophyll fluorescence

Tsuneaki Takami, Tsuyoshi Endo

Practical application of commercially available equipments for 2-D analysis of chlorophyll fluorescence is shown. Screening of photosynthetic mutants using 2-D fluorescence analysis is also presented.

3.e.1 二次元測定装置

これまでに市販されている二次元クロロフィル蛍光装置には Imaging PAM (Walz 社), FluorCam (PSI 社), CF imager (Technologica 社) などがある。また自作することも可能である。これらの装置はそれぞれパルス変調法 (Imaging PAM と CF imager) ポンプ&プローブ法 (FluorCam) を用いている。また解析プログラムの特徴として飽和閃光照射時の画像 (パラメータ) 取得を行う装置 (Imaging PAM), 任意カ所の画像取得を行える装置 (FluorCam, CF imager) と大別できる。

二次元クロロフィル蛍光装置は, その名の通りクロロフィル蛍光を画像として取得し解析できる装置である。市販されている装置はあらかじめ測定に必要なプログラムテンプレートが付属されている。ある程度測定者の任意で測定系を構築でき, 誰でも簡単に測定できる。注意する点は装置によって測定に用いる光強度が%表示であったり, デフォルト値で設定されているため実際の光強度とは異なった値であったりするため, 測定前に光強度を確認・調整することである。各装置の特徴を以下に示す。

・Imaging PAM:

クエンチング, 光合成電子伝達量 (光-光合成曲線) 解析ができる
解析プログラム数は少ない

飽和閃光照射時のパラメータを記録

ROI (region of interest, 装置により表現が異なるので注意) を設定している部分のクロロフィル蛍光キネティクスを表示
装置ラインナップが豊富

・FluorCam:

蛍光誘導期, クエンチング解析ができる
解析プログラムを実験者の任意で作成可能
クロロフィル蛍光のサンプリングレート (画像取得) を設定できる
ピクセルごとのクロロフィル蛍光キネティクス表示が可能
装置ラインナップが豊富でカスタマイズ可能
アクセサリが豊富

・CF imager:

蛍光誘導期, クエンチング解析ができる
解析プログラムを実験者の任意で作成可能
解析項目が充実
光源に 16 枚の LED パネルを使用 (光源の自由度が高い)
他の 2 機種ではできない長時間の測定ができる

これらの装置は測定が自動であり難しい操作を必要としないため, 強光ストレスなどのストレス処理の評価などに有用な装置である。また Walz 社, Hansatech 社, PSI 社などから発売されている PAM, FMS, Fluorimeters などのクロロフィル蛍光測定装置とほぼ同等の

1) 九州大学生物資源環境科学府

2) 京都大学生命科学研究科

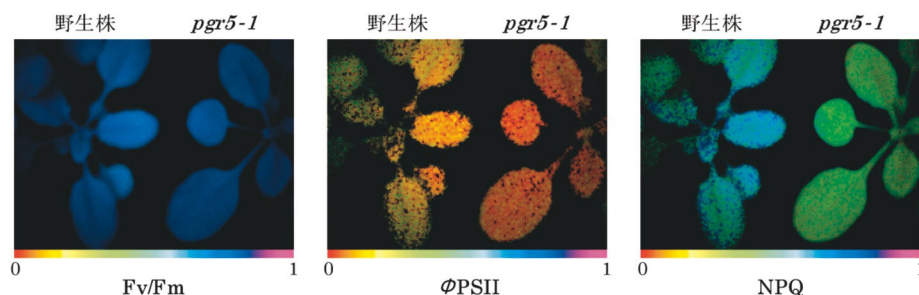


図1：Imaging PAMによる二次元クロロフィル蛍光パラメーター画像

それぞれ光化学系II最大量子収率 (F_v/F_m)，光強度 $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ における光化学系II量子収率 (ΦPSII)，熱放散の指標である NPQ の二次元画像である。*pgr5-1* はサイクリック電子伝達を欠き，チラコイド膜を介した pH 勾配が形成されにくい突然変異株である。そのため強光条件下では CO_2 固定に必要な ATP が不足し，その結果 ΦPSII が低下すると考えられている。同様に熱放散の誘導には pH 勾配の形成（チラコイドルーメンの酸性化）が必要であるため，*pgr5-1* では NPQ の値が強光条件下において野生株よりも低くなる。

解析が行え，光化学系II最大量子収率 (F_v/F_m)，光化学系II量子収率 (ΦPSII)，Non-Photochemical Quenching (NPQ) などのクロロフィル蛍光から算出されるパラメータを二次元画像として取得できる（図1）。また ROI を設定することで画像からパラメータを算出することも可能である。

最近では二次元クロロフィル蛍光装置を使った研究が多く報告されており，強光ストレス応答や凍結・低温ストレス応答の評価^{1,2)}，病原菌感染の経時応答³⁾，*dgl* のような葉緑体形成に異常を表す変異株の評価⁴⁾ などに使われている。

3.e.2 装置の自作について

パルス変調法を必要としない二次元クロロフィル蛍光測定装置は，光源とフィルターと CCD カメラを組み合わせることで比較的容易に自作可能である。市販されている二次元クロロフィル蛍光装置では画像解析結果を自動で算出するのに対し，自作した二次元クロロフィル蛍光装置では画像取得・演算用のソフトウェアを自作するか，画像解析ソフトを使用して画像演算を行う必要がある。手間のかかる自作装置の利点はあるか？という疑問が生じるが，市販の装置と比べて検出器となるカメラを高性能なものを使うことが可能であるため，非常にきれいな画像の取得が行え，後述する光合成突然変異株の単離の強力なツールとなる⁵⁾。

光化学系 I の循環的電子伝達系のひとつである NDH 経路の活性を欠く突然変異株で具体例を示すと，自作した装置では，図2に示すように任意ヶ所での画像取得が可能で image2 から image1 を減算することにより野生株は像が浮かび上がり，NDH 活性を欠く *crr2-2* では像が消失するという画像処理が行える。また画像演算を行

う際，*crr2-2* の像を浮かび上がらせることも可能であり，NDH 活性欠損変異株のスクリーニングやポジショナルクロニングを行う際に効果的である。このような機能は市販の装置にはプログラムテンプレートの都合上，基本的には装備されていない。任意で画像取得ができる FluorCam では減算することは可能であるが，カメラ性能が劣るため鮮明な像を得ることは難しい。

3.e.3 二次元クロロフィル蛍光装置での測定手順

- 1) 暗馴化した植物にピントを合わせる^{※1}。市販の装置では構造上の理由からカメラの焦点距離と光源からの照射距離が制限されてしまう。鮮明な画像を取得するためには一番初めにピントを合わせることが重要である。
- 2) 測定光を設定する。測定方式にポンプ&プローブ法を用いている FluorCam ではカメラシャッタースピードと感度を測定光と合わせて設定を行わないとクロロフィル蛍光が飽和してしまい正しい測定が行えない。
- 3) 作用光・飽和閃光の設定する。多くの測定の場合，飽和閃光は最大にしておいて問題ない。光源の角度や被写体との距離を自由に設定できるタイプの装置では，視野の中心と周辺で受光量が大きく異なることがあるので，光量を測りながら光源の角度等を微調節する必要がある。距離が離れすぎると中央では飽和している閃光が，周辺では飽和閃光になっていないという

※1 測定上の注意として市販の装置，自作の装置ともに画像演算を行い，クロロフィル蛍光パラメータを算出するため，測定中に風などで植物が動かないようにする。

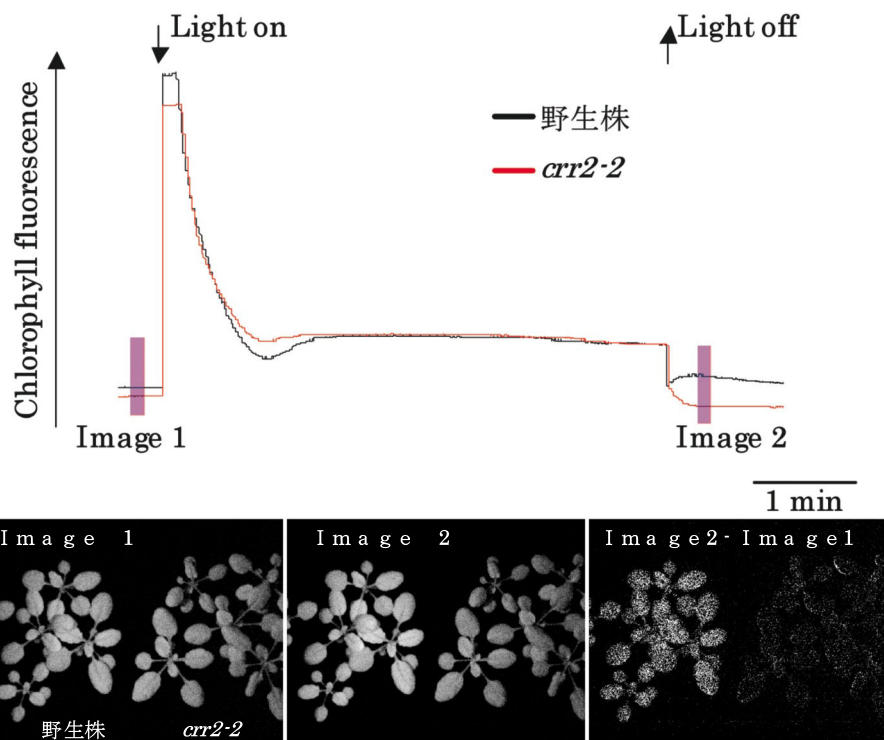


図2：自作二次元クロロフィル蛍光装置による NDH 活性の評価

NDH 活性を欠く変異株 *crr2-2* では作用光消灯後のクロロフィル蛍光の一過的上昇が起こらないため image2 から image1 を差し引くと野生株のクロロフィル蛍光のみが現れる。

状況もあり得るわけで、当然計算される蛍光パラメータに信頼はおけなくなる。

4) 解析開始。

5) 解析終了。市販の装置であればクロロフィル蛍光から算出されるパラメータが画像として自動的に算出される。

3.e.4 二次元クエンチング解析による光合成突然変異体の選抜

クロロフィル蛍光を指標とした光合成突然変異株の選抜は古くから行われており、一般に hcf (high chlorophyll fluorescence) と称され、その幾つかは原因遺伝子が同定され生化学的な解析も行われている。二次元クロロフィル蛍光装置では様々な蛍光パラメータに着目した選抜が容易に行える。多くのパラメータのうち、最も端的に光合成活性に直結し、市販の二次元クロロフィル蛍光装置にデフォルトで計算式が組み込まれているものは、Fv/Fm, NPQ, qP などであり、光合成機能の欠損はこれらのパラメータを正しく測定することで、かなり詳細な情報を得ることができる。ここではこれらの蛍光クエンチング解析法のパラメータに異常を示す突然変異

株の選抜についての紹介をする。なお当然のことながら光化学系や電子伝達の状態は光照射後数秒間の蛍光の初期誘導波形にも影響を与えるため、これに着目した選抜法も開発されており⁶⁾、クエンチング解析に比べ測定が短時間で済む等のメリットがあり有力な選抜法として期待される。

3.e.4.1 材料と選抜法

ここでは植物分子遺伝学のモデルとなっているシロイヌナズナの幼植物を用いた実験を想定して論を進める。選抜の母集団には、T-DNA をランダムに挿入した形質転換体のライブラリまたは、エチルメタンスルホン酸 (EMS) 等の突然変異誘発剤により変異を導入した植物のライブラリを用いる。もちろん劣勢ホモの形質が現れる世代の種子を用いる。シロイヌナズナの場合、ホルモンを含まない組織培養用寒天培地⁸²⁾を張ったシャーレに滅菌種子を 50 ないし 100 個時き、発芽後 2 週間程度程度の幼植物を対象として二次元クロロフィル蛍光装置にて

⁸²⁾ MS⁷⁾ や Gamborg の B5⁸⁾ 等の一般的な培地レシピの塩濃度を 2 倍希釈または希釈なしで使用する。培地にショ糖を 1-3 % 添加すると、光合成のみでは生育不可能な重篤な変異をもつ株も選抜できるが、これらは種子の採取が困難であり、その後の遺伝学的解析には不向き。

選抜を行う。

3.e.4.2 クロロフィル蛍光に異常のある変異株の分類

Meurer ら⁹⁾はクロロフィル蛍光のクエンチング解析により、表現型を示す変異株をPSIの異常、PSIIの異常、および光合成電子伝達系の異常に分類している。Shikanai ら⁵⁾は、蛍光パラメータに基づいた実際的な分類として、(1)high Fo、(2)NPQ形成異常、および(3)PQ異常に分けており、ここではその分類に従う。一般にhcfの表現型を示す変異株は、実際の蛍光測定では、測定光照射下での蛍光(Fo)が高いものと、作用光照射下で蛍光レベルが時間とともにクエンチングされないものに大別される。前者は本来Fv/Fm値が低い変異株が、低いFv/FmによるPSII機能の低下を補う適応として、葉面積当たりのPSIIの数を増やしFoレベルが上昇したものと推定できる(high Foタイプ)。すなわちhigh Foとはlow Fv/Fmの裏返し表現である。Fv/Fm値はP 680の近傍または酸化側の異常により低下する。また、光阻害の誘発および回復過程の異常も低下の原因となる。さらに、光合成電子伝達系や炭酸固定等に異常がある場合に、酸化的ストレス条件下では光阻害が起こるため、Fv/Fm値が低下する。

作用光下で蛍光クエンチングがうまくできない突然変異株は、飽和閃光を照射することによりNPQタイプとPQタイプに選別することができる。NPQタイプ(NPQが低下する突然変異株)はキサントフィルサイクルに依存したPSIIでの過剰エネルギーの熱放散機構の異常や光化学系Iの循環的電子伝達の異常等に起因する。一方、PQタイプ(PQが低下する突然変異株)はQAの還元側の電子伝達または光化学系Iの異常等により引き起こされる。

3.e.4.3 変異株の解析例

以上のようなスクリーニングで得られた変異株には、光化学系や光合成電子伝達系の構成タンパク質遺伝子そのもの、またはそれらの発現制御にかかわる遺伝子に変異を持つと考えられる。以下に最近報告された各タイプの突然変異株の原因遺伝子がコードしているタンパク質について解説する。

・High Foタイプ:

HCF60(RPS 17)¹⁰⁾(トウモロコシ葉緑体リボゾームサブユニット)

PsbO2¹¹⁾(アブラナ科特有の2つ目のPsbOイソタンパク質)

RnaR1¹²⁾(葉緑体リボゾームの発現制御に機能するRNase)

HCF173(short-chain dehydrogenase/reductase)¹³⁾
(psbAの転写後制御に関与するタンパク質)

・PQタイプ:

PAA1¹⁴⁾(葉緑体への銅イオン輸送にかかわるATPase)

PGR3(PPRタンパク質)¹⁵⁾(葉緑体遺伝子の転写後制御因子)

・NPQタイプ:

PsbS¹⁶⁾(キサントフィルサイクルにかかわるPSIIアンテナ)

・NPQとPQの複合タイプ:

PGR5¹⁷⁾(循環的電子伝達に必須なチラコイド膜タンパク質)

3.e.4.4 選抜の実際

- 1) 15分程度以上暗適応したシャーレ内の幼植物に測定光を照射し、Foレベルのデータ(もしくは画像)を得る。High Foタイプはこの時点で高い蛍光を示すため、選抜可能。
- 2) 飽和閃光を照射しFm値を得る。この作業は後にFv/Fm、NPQ、PQ値を計算するために必要である。二次元画像でhcf株を選抜する場合には必要ではない。
- 3) 5分間程度、作用光を照射した後、蛍光データを得る。この時点ではNPQタイプ、PQタイプが高い蛍光を示す。弱めの作用光を照射するとPQタイプが選抜しやすく、逆に強めの作用光を使うとNPQタイプが選抜しやすい。両者を同時に選抜するためには、400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度の白色光が適当。NPQタイプとPQタイプを区別するには、作用光照射下飽和閃光を照射し、クエンチング全体に対するNPQとPQの比を測定すればよい。
- 4) 以上、二次元測定により選抜されたhcf株は、表現型を確かめるため通常のPAM蛍光測定装置で再度クエンチング解析を行う必要がある。二次元測定ではhigh FoタイプとPQタイプの区別は難しいことが多い。これは測定光による反応中心の励起と蛍光放出が無視できないため、両者を区別するためには、通常のPAM測定の際に赤外光のバックグラウンドのもとでFoを(正しく)測定する必要がある。また、PQの低下は、NPQの低下を招くことが多いため、PQタイプとNPQタイプの分別も典型的なものを除くと難しい場合が多い⁵⁾。PQタイプの変異の場合、P 700の酸化還元測定を併用することにより、光合成電子伝達系の変異(または異常)の位置を推定することができる。
- 5) T-DNAの挿入位置の決定やポジショナルクローニ

ングで原因遺伝子を同定するとともに生化学的、遺伝学的解析を行う。遺伝子の同定が済めば、光合成電子伝達系や炭酸固定の構成成分の遺伝子が原因遺伝子の場合、比較的簡単に決着がつく場合が多いが、葉緑体の遺伝子発現に関わる核支配の制御遺伝子であった場合には、遺伝子同定から先の研究が正念場になる。

参考文献

- 1) E. Miura, Y. Kato, R. Matsushima, V. Albrecht, S. Laalami, & W. Sakamoto, *Plant Cell* **19** (2007) P.1313.
- 2) B. Ehlert, & D. K. Hinch, *Plant Methods* **4** (2008) p.12.
- 3) S. Berger, Z. Benediktyová, K. Matouš, K. Bonfig, M. J. Mueller, L. Nedbal, & T. Roitsch, *J. Exp. Bot.* **58** (2007) P.797.
- 4) W. Chi, J. Ma, D. Zhang, J. Guo, F. Chen, C. Lu, & L. Zhang, *Plant Physiol.* **147** (2008) P.573.
- 5) T. Shikanai, Y. Munekage, K. Shimizu, T. Endo, & T. Hashimoto, *Plant Cell Physiol.* **40** (1999) P.1134.
- 6) M. Higuchi, & K. Sonoike, *Fundamental Aspects to Global Perspectives*, eds. A. van der Est, & D. Bruce, International Society of Photosynthesis, 2005, p.716.
- 7) T. Murashige, & F. Skoog, *Physiol. Plant.* **15** (1962) p. 473.
- 8) O. L. Gamborg, R. A. Miller, & K. Ojima, *Exp. Cell Res.* **50** (1968) p.151.
- 9) J. Meurer, K. Meierhoff, & P. Westhoff, *Planta* **198** (1996) p.385.
- 10) N. P. Schultes, R. J. H. Sawers, T. P. Brutnell, & R. W. Kruger, *Plant J.* **21** (2000) p.317.
- 11) R. Murakami, K. Ifuku, A. Takabayashi, T. Shikanai, T. Endo, & F. Sato, *FEBS Lett.* **523** (2002) p.138.
- 12) M. Kishine, A. Takabayashi, Y. Munekage, T. Shikanai, T. Endo, F. Sato, *Plant Mol. Biol.* **55** (2004) p.595.
- 13) K. Schult, K. Meierhoff, S. Paradies, T. Töller, P. Wolff, & P. Westhoff, *Plant Cell* **19** (2007) p.1329.
- 14) T. Shikanai, P. Müller-Moulé, Y. Munekage, K. K. Niyogi, & M. Pilon, *Plant Cell* **15** (2003) p.1333.
- 15) H. Yamazaki, M. Tasaka, & T. Shikanai, *Plant J.* **38** (2004) p.52.
- 16) X.-P. Li, O. Björkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson, & K. K. Niyogi, *Nature* **403** (2000) p.391.
- 17) Y. Munekage, M. Hojo, J. Meurer, T. Endo, M. Tasaka, & T. Shikanai, *Cell* **110** (2002) p.361.