

# 環境ストレスと植物の生態成長 — 光学的手法によるイオンストレスの早期検出 —

大矢 智幸\*・倉重 秀昭\*\*・甲斐 昌一\*\*\*

## Biophoton Response under Salt Stress in Red Bean

Tomoyuki OHYA, Hideaki KURASHIGE and Shoichi KAI

(Received September 7, 1998)

**Abstract:** Plants show strong self-adaptation by structural changes to various environments, because they are not able to move away freely from unpleasant environments. The stress due to environmental changes leads to various physiological changes in plants in order to protect themselves, which can be detected in many ways. The salt stress is one typical stress frequently met in nature which causes serious damages to agriculture. Therefore the early detection of suffering stresses and recovering from their influences are very important in healthy growth of plants. The modern technology supplies highly sensitive techniques to detect such stress-effects in plants. We focus here a high sensitive optical detection called the biophoton detection to investigate the salt stress effect to a red bean (*Phaseolus angularis*). The response in biophoton emission from a red bean due to the salt stress was attempted using external addition of various strengths of the salt stress (weak, strong, critical) on each growth stage of a red bean. The intensity of biophoton emission from red beans for the salt stresses showed specific concentration dependence as well as the dependence on the timing of application of the salt stress during growth. After application of the stress, the intensity and the location of strong biophoton changed as time passed.

**Keywords:** Biophoton emission, Biophoton detection, Salt stress, *Phaseolus angularis*

### 1. はじめに

動・植物間には生物学的に様々な違いがあるが、その中でもっとも大きな違いの一つに移動性があげられる。植物は不順環境にさらされると自由に移動することができないため、そのストレスに対し直ちに適応を試み、その結果生理的かつ構造的な変化が引き起こされる。例えば、乾燥にさらされると、茎や葉は木化し、内部水の蒸散を防ぐように変化する。また、NaClストレスにさらされた植物では、特定の遺伝子が発現または抑制され<sup>1)2)</sup>、最終的には気孔閉鎖や葉の生長停止、光合成率の減少といった変化が生じる<sup>3)4)5)</sup>。

今回、我々はこのように環境ストレスにより引き起こされる生理的な変化を検出する手法の開発を試みた。

本研究では生理シグナルとして無侵襲・無接触という利点から光学的な手法(生物フォトン)に注目した<sup>6)7)8)</sup>。この生物フォトンとは、良く知られたホタルやクラゲ、夜光虫といった特定の生物の発光現象に比べ格段に弱く、全ての生物に普遍的に見られる極微弱発光現象であり、その発光起源は活性酸素の発生に由来していると考えられている<sup>9)</sup>。例えば、ミトコンドリアの呼吸作用で活性酸素が生じることから考え<sup>10)</sup>、その発光は細胞活性、ひいては生物の成長やその生理状態に深く関与していると推測される。ところで、我々はこれまで植物の生長を植物ホルモンの投与とフォトン放射の測定によって調べてきた。その結果、細胞分裂時にフォトン放射が強くなること、また植物ホルモンの投与によって発光強度が変わること等が明らかになった<sup>11)12)</sup>。これらの基本応答を踏まえた上で、本研究では特に環境ストレスとして塩害(NaClストレス)に注目し、生物フォトン発光との関係を調べることにした。塩害による被害は、アフリカ

平成10年9月7日受理

\* 応用物理学専攻博士後期課程

\*\* 応用物理学専攻修士課程

\*\*\* エネルギー量子工学専攻

や中南米といった地域に限らず近隣の中国や我が国においてもみられ、世界的に農作物の生産率を下げている主要因の一つである。塩害対策として現在、品種改良や灌漑施設の完備といった手段が講じられているが事後処理的な対処法であり、生物フォトンにより作物の生理状態を逐一把握することが可能になれば、より早い時期での対処が可能となり、環境保全や食物安定供給への貢献が期待される。

## 2. 実 験

### 2.1 サンプル

本研究ではサンプル植物として大納言秋アズキ（学名 *Phaseolus angularis* 中原採取場産）を採用した。また、種子間の個体差を少なくするため、3000個の中から標準偏差内の重量を持つ種子を実験試料として用いた。種子は温度 35℃、湿度 95% で 24 時間給水（給水終了時を以後の成長の基点（0 時間）としている）させた後、温度 24℃、湿度 82% 下で生育させた。なお、二次的な生長ダイナミクスである光合成の効果を避けるため生育は暗黒下で行った。

### 2.2 実験方法

アズキの根の発芽・発根期における生長には発根、発芽、子葉形成、側根形成といった様々な段階が存在する。そこで、給水終了後、48 時間、96 時間、168 時間を経過した種子（これは、それぞれ根の伸長—加速度最大、速度最大、加速度最小—飽和時に相当する）の根を選び、それらに 3 つの異なった濃度の NaCl ストレス 0.01M、0.1M、1M（それぞれ、軽度の生長阻害、深刻な生長阻害、致死に相当）を投与し、その際のフォトン応答を計測した。またその他に、非常に強い NaCl ストレス（4.5M：飽和）に根をさらし、2 次元でフォトン発光の時間変化を調べた。

フォトン放射の計測にあたっては、NaCl ストレスを与える 6 時間前に種子 20 個を、純水を入れたシャーレに選び計測対照値とした。次に溶液を各濃度の NaCl 溶液に換え、同様な手順で約 60 時間計測する。微弱な余剰放射生物フォトン計測には、光電面ノイズを避けるために冷却型光電子増倍管計測器（浜松ホトニクス社製：C-2550、光電管 R649）を用いた。また 2 次元計測には冷却型 2 次元光子計数管（浜松ホトニクス社製：PIAS-T1500、C-1809）を用いた。なお、各ストレスが生長に与える影響を調べるため、フォトン

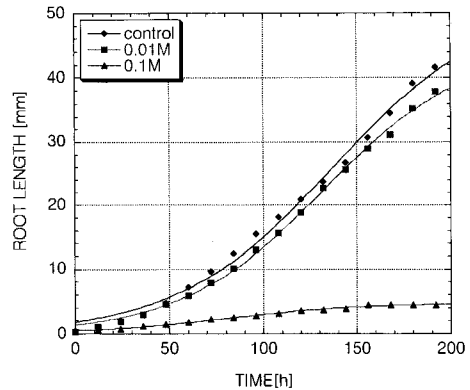


図-1 NaCl 溶液下で生育させた際の生長曲線。記号は各 NaCl 溶液の濃度を表している。◆：0M、■：0.01M、▲：0.1M

計測の後、純水を入れたシャーレに移し、その後の根の長さを計測、生長に支障が発生していないかを同時に確認した。

## 3. 実験結果

### 3.1 NaCl ストレスと根の生長

一般に NaCl ストレスにさらされた植物では、気孔閉鎖や葉の生長停止、光合成率の減少などが引き起こされる<sup>3)4)5)13)</sup>。作物は 0.1% (0.017M) で生長阻害、0.3% で深刻な生長障害を受けるといわれており、NaCl は植物体に非常に強い阻害効果を生むことが知られている<sup>14)</sup>。

本実験では軽度の生長阻害、深刻な生長阻害、致死ストレスに対応する 3 濃度の NaCl 溶液を使用した。以下に各 NaCl ストレス下での生長曲線を示す (図-1)。

ストレスがない場合、種子根の生長がロジスティック曲線になることはこれまでの研究より分かっており<sup>11)12)</sup>、今回の実験でも 0M と 0.01M の場合の双方で根の生長ダイナミクスは非常に似たロジスティック曲線を描いた。0.01M ストレス下の種子根は、肉眼で見ると 0M の種子と有為な差が認められず、阻害作用がない印象を与える。しかし図-2 のグラフで示すように、72 時間以降に投与しても生長阻害作用はほとんど観測されないが、0 時間からストレスを与えた場合、72 時間以降投与のものとは比べ、その最終長が短かく、明らかに生長阻害効果が現れていることがわかる。一

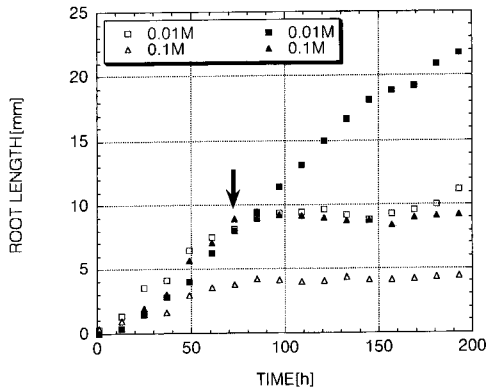


図-2 生育溶液としてNaCl溶液をはじめから（0時間）と生長途中（↓の位置 72時間に相当）から用いた際に得られた生長曲線。記号は各□：0時間から0.01Mを使用，■：72時間以降0.01Mを使用，△：0.1M（0時間～）▲：0.1M（72時間～）

方、0.1Mは植物体にとって非常に強いストレスであるため、0時間から加えられた種子にはほとんど生長が見られず、生長途中に加えられたとただちに生長が停止する。また、0.1Mストレス印加後の種子根を観測すると、根の先端に変色が認められ、このストレスが非常に強い生長阻害作用のみならず生長障害作用も引き起こしていることが分かる。さらに1Mのストレスでは、投与と同時に生長が止まる点では0.1Mの場合と同じだが、そののちに種子を純水溶液のシャーレに移した場合も生長せず、種子は次第に腐って行くのが観測された。このことから1Mのストレスが細胞壊死を引き起こし、致死ストレスであることが確認できる。これらの関係まとめると表-1のようになる。

### 3.2 NaClストレスとフォトン放射の時間変化

以下に各ストレスに対するフォトン放射の応答曲線を示す(図-3)。グラフ縦軸は余剰フォトン強度を示し、ストレス印加後の値  $X(t)$  をストレス印加前の平均値  $X_0$  で規格化 ( $X(t)/X_0 - 1$ ) してある。

48時間では種子がまだ生長途中にあるため、対照(0M)の応答曲線は右上がりとなっており、発光量の増大傾向を示している。これに対し、ストレスを印加したものでは、局所的には印加前の平均値を上回る

適応	生存	重大障害なし 0.01M
		重大障害発生 0.1M
不適応	致死	内溶液浸出 1M
		飽和溶液 (≒4.5M)

表-1 NaCl溶液の濃度と生長への影響。

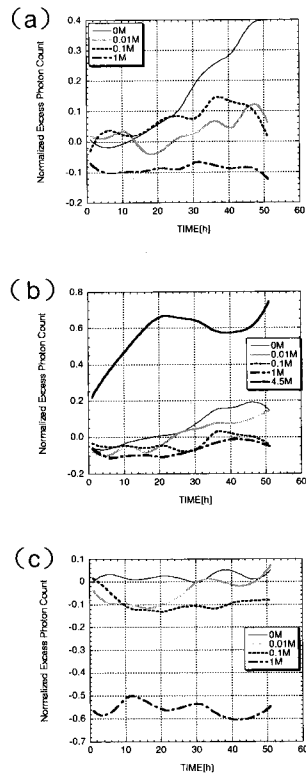


図-3 NaCl溶液濃度とフォトン放射への影響。a～cはそれぞれ48時間、96時間、168時間の生長過程にある種子に対応している。またグラフ縦軸はストレス印加後の値  $X(t)$  を印加前の平均値  $X_0$  で規格化してある。

が全体としては印加前のレベルを下回っている。96時間では、応答曲線は右上がりになるが、その傾きは48時間に比べて小さい、また0.1M、1Mといった強いストレスでは発光量は非常に低いレベルとなるが、弱いストレスである0.01Mでの変化は無ストレスの試料(以後対照と呼ぶ)に近いものとなる。168時間では、ほぼ生長が飽和しているため対照でも発光量の増減はあまり観測されない。0.01M、0.1Mではともに発光量は下がるが、前者は一旦は下がったレベルでさえも最終的には印加前とほぼ同じ値に到達するほど強い。一方、1Mでは発光量は非常に低いレベルになる。このように全体的に言えば、イオンストレスが加えられるとその濃度に応じて、ストレス印加前と比べ発光量は減少して行く傾向にある。しかしその一方で、ある一定以上の濃度(4.5M:飽和濃度に相当)に到達すると、反対に発光量は数倍に増大することが観測された(図-3(b))。

### 3.3 NaClストレスによるフォトン放射の空間パターン

前節では、高濃度NaClストレスを印加すると発光量が数倍増加することを述べた。そこで次に、フォトン放射が空間的にどの部位より発生しているのかを明らかにするため、フォトン放射の2次元計測を行った。図-4はNaCl 4.5M溶液を印加した後、2.5時間積算して得られた発光パターンである。

根は画面上方に向かって伸びており、画面下方が種子側に相当する。この図から発光は根の先端のみに起こっていることが分かる。この時の発光強度の時間変化を示したのが図-5(a)~(e)である。ストレスを印加するまで発光はほとんど観測されないが、ストレス印加後15分程で強い発光がはじまる。発光は根の先端部分からはじまり、次第にその発光部位が種子方向へと移って行き、最終的には全体として発光が弱くなって行く。その様子を図-5(2)に示す。

次に根に0.1MのNaClストレスを印加した際に観測された発光パターンを示す。先に述べたように0.1MのNaCl溶液は投与前に比べ、発光量を下げる傾向にあるため投与後も判別できる程の強さの発光は観測されない。しかしながら10時間ほど経過すると、次第に発光が観測されるようになり、11時間後には完全にパターンとして捉えられるまでになった。これは種子を無蓋のシャーレに置いて観測していたため、次第

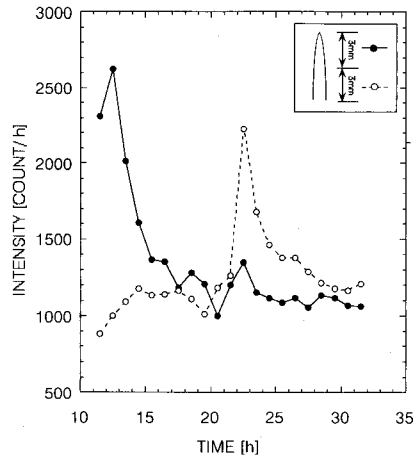


図-7 図-6のグラフにおける根の上部●、下部○の発光強度の時間変化。

にシャーレ内の水分が蒸発し、根付近のNaCl濃度が閾値を超え、強いストレスを受けたために発光が始まったのではないかと推測される。また、この発光パターンにおいても前述したような空間的な移動が観測された(図-6)。つまり発光は初めに先端部位で生じ、次第に減衰して行く。それと入れ替わるように、今度は根の下方部で強い発光がはじまり、その発光も時間とともに次第に減衰して行く。これらの発光パターンを根の上部と下部で、発光量の時間変化をグラフにすると図-7のようになり、発光には2つのピークが存在することが初めて観測された。

## 4. 議論とまとめ

96時間、168時間のサンプルでは、対照と0.01Mのフォトンの応答曲線は良く似た様相を示すが、48時間では両者はかなり異なっている(図-3)。0.01Mの塩水を、72時間以上経ってから投与してもその効果はほとんどみられないが、最初から投与した場合には図-2からも分かるように、これが阻害作用を示すストレス強度であることを考慮すると、48時間成長を経たサンプルにとって0.01Mが無視できるほど微弱なストレスではないこと、すなわちストレスによる効果は生長時期により異なることが示唆される。

また、0.1Mや1Mといった非常に強いストレスが加えられた場合、ストレス印加前に比べ発光量が減少して行く傾向が48時間、96時間、168時間の各生長段階で観測された。これは次のように説明される。

植物は不順環境にさらされるとそれに対して適応を

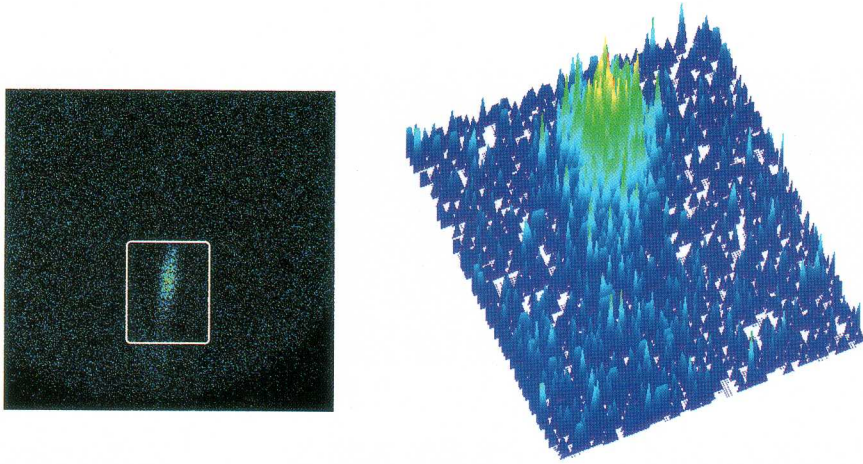


図-4 NaClストレス（4.5M）印加後、2.5時間積算して得られた発光パターン。右図は白線で囲まれた部位を発光強度を高さにとり3次元化したもの。

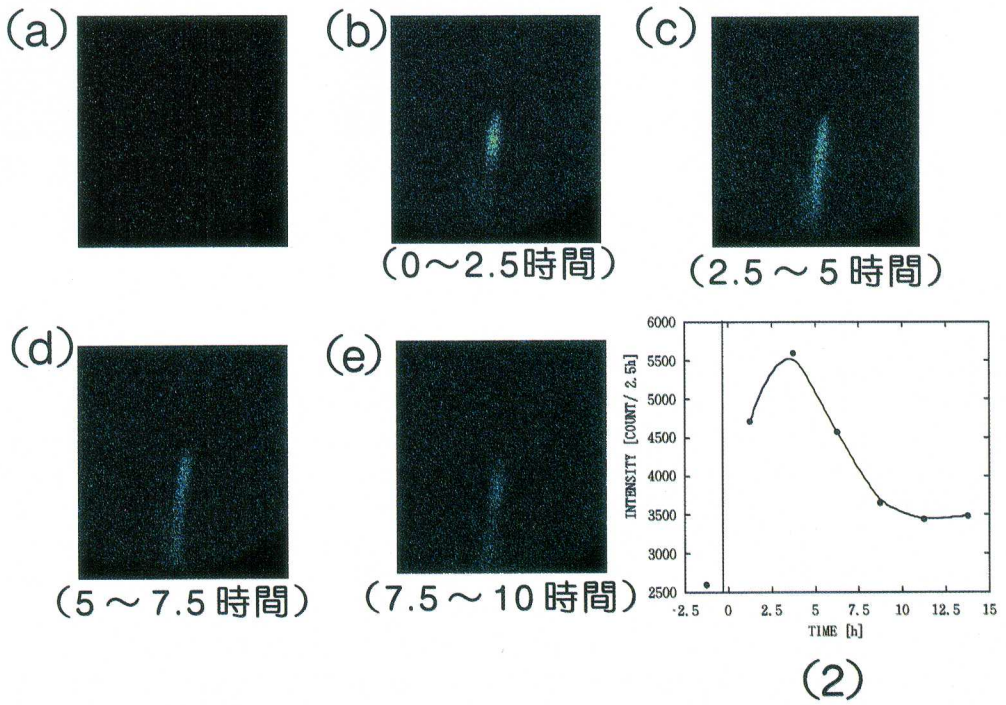


図-5 NaClストレス（4.5M）印加後のフォトン放射の時間変化。図中のグラフ（2）は根全体の発光量の時間変化を表している。



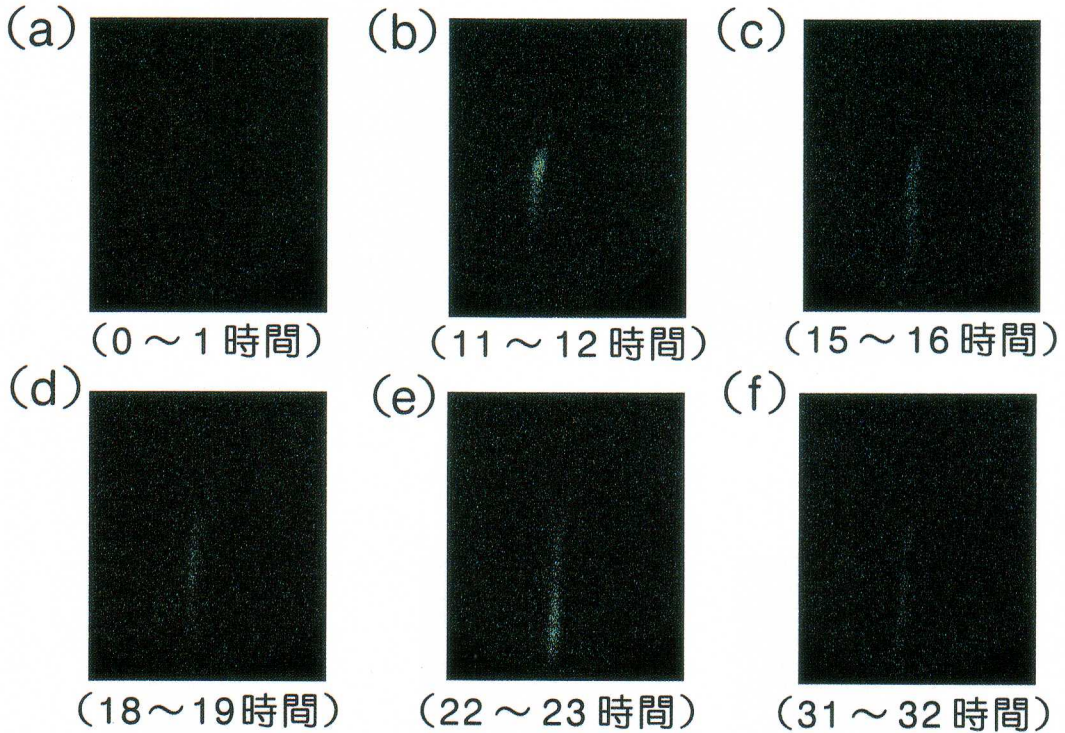


図-6 NaClストレス(0.1M)印加後に得られたフトン強度の時間変化。( )はストレス印加後からの時間を表している。

試みる。例えば NaClストレスの場合、木部内液などにおけるアブシジン酸 (ABA) の濃度上昇によりポリアミン等のタンパク質生成が促進され<sup>1)4)15)16)</sup>、それらが細胞の浸透圧上昇や葉中の水ポテンシャルの低下を誘引し、外界の過酷な浸透圧に抗すると考えられている<sup>3)</sup>。これら一連の反応は NaClストレスに限らず、乾燥や寒冷、熱、浸透ストレスを受けた植物でも観測されている<sup>17)18)</sup>。このように、一般に環境変化に対し抗ストレスホルモンである ABA の蓄積がトリガとなり遺伝子レベルでの生理変化が引き起こされる<sup>10)</sup>、このような ABA により誘導されるタンパク質合成は外生ホルモンの場合でも生ずることが報告されている<sup>20)21)</sup>。我々はこれまで植物ホルモンと生物

フトン強度を引き下げるという結果を得ており<sup>12)</sup>、これらを照らし合わせると、今回の NaClストレスによる発光量の減少には、NaClストレスにより誘導された ABA の蓄積が関与しているのではないかと考えられる。また NaClストレスの生長阻害効果に関して、植物は、はじめに培養基の浸透ポテンシャルの減少による効果を、次にイオンの毒性による効果といった 2段階の効果を受けるという仮説が提唱されており<sup>22)</sup>、それらも考慮すると、発光量減少の一因として高濃度の Naイオンの細胞内流入により細胞内のオルガネラの機能が不完全となり(細胞活性が落ち)、発光量の減少に結びついた可能性も否定できない。

一方、飽和濃度 (~ 4.5M) の NaCl 溶液を滴下した場合には、これまでとは逆にストレス印加前に比べ

発光量が上昇するといった傾向(図-3(b))が観測された。このことはストレス強度と発光量の間には反比例の関係が成立するのはある濃度以下ということの意味し、ある種の閾値が存在していることを示唆している。また、フォトンの2次元計測(図-7)からもこの閾値の存在を示唆する結果を得ている。さらに、この他にフォトンの2次元計測からは発光部位が時間的、空間的に変化して行くこと、ならびに発光には2つの部位で時間遅れを示した2つのピークが観測されていることなどが挙げられる。これらはイオンストレスを強く感じる部位が2ヶ所あり、それぞれ閾値が異なるのではないかと考えられる。

また、高濃度のNaClストレスがどのような影響を植物の生理過程にあたえて、フォトン放射を誘導するのかについては、次の様な推測ができる。例えば300mMのNaClストレスにさらされたオオムギでは核の変形が生じるといった観測事例から考えると、細胞膜が破壊されて行く過程で発光が生じたもの<sup>23)</sup>、あるいは高濃度のイオンにさらされたことにより、プロトンポンプ等のイオン輸送経路がオーバーロードし、それが異常発光につながったものなどが推測される。しかしながら、高濃度のNaClストレスを受けるとモロコシでは通常の抗ストレス経路(ポリアミンの合成経路)がマヒするという報告もあり<sup>15)</sup>、その詳細は不明である。いずれにしても、イオンストレスを受けると早い時期に生物フォトン放射という形でストレスの影響を観測できる事が分かった。今後は、ストレスの強さが生物フォトンの変化にどのような形で最も顕著に識別されるかを調べる必要がある。特に、今回の実験では顕微鏡等を用いた微視的な観測を行っていないので、異常発光の原因を究明する上でもそれらのミクロなレベルのアプローチが今後の課題であると考えている。

## 5. 謝 辞

本研究は文部省科学研究費補助金萌芽的研究(2)課題番号09878108の一部として行ったものである。

## 参 考 文 献

- 1) S. Ramagopal: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84** (1987) 94-8.
- 2) P. Gulick and J. Dvořák: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84** (1987) 99-103.
- 3) A. Pardossi, F. Malorgio, D. Oriolo, R. Gucci, G. Serra, F. Tognoni: *Physiol. Plant.*, **102**(1998)369-76.
- 4) X. Socias, M. J. Correia, M. Chaves and H. Medrano: *J. Exp. Bot.*, **48**(1997) 1289-97.
- 5) E. Montero, C. Cabot, CH. Poschenrieder and J. Barcelo: *Plant Cell Environ.*, **21** (1998) 54-62.
- 6) 小林正樹, 宇佐史, 稲場文男: 計測自動制御学会論文集, **30** (1994) 385-391.
- 7) M. Kobayashi, B. Devaraja, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: *Frontiers Med. Biol. Engng.*, **7** (1996) 299-309.
- 8) M. Kobayashi, B. Devaraja, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: *Photochem. Photobiol.*, **65** (1997) 535-537.
- 9) 鈴木喜隆: 稲場生物フォトンプロジェクト研究概要集 (1991) 279-98.
- 10) 中野稔: ACTIVE OXYGEN & CHIMILUMINIS-CENCE 日本医学館 (1990) 23-34.
- 11) S. Kai, T. Mitani, M. Fujikawa: *Physica A*, **210** (1994) 391-402.
- 12) S. Kai, T. Ohya, K. Moriya, T. Fujimoto: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **34** (1995) 6530-38.
- 13) J. A. D. Zeevaart and R. A. Creelman: *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **39** (1990) (1988) 439-73.
- 14) D. H. Reinhardt and T. L. Rost: *Env. Exp. Bot.*, **35** (1995) 575-88.
- 15) L. Erdei, Z. Szegletes, K. Barabás and A. Pestenác: *J. Plant Physiol.*, **147** (1996) 599-603.
- 16) M. Correia, J. S. Pereira: *J. Exp. Bot.*, **46** (1995) 101-10.
- 17) C. Te. Chien, L. L. Kuo. Huang and T. P. Lin: *Ann. Bot.*, **81** (1998) 41-7.
- 18) M. Ishitani, L. Xiong, B. Stevenson and J. K. Zhu: *Plant Cell*, **9** (1997) 1935-49.
- 19) A. Moons, G. Bauw, E. Prinsen, M. V. Montagu and D. V. D. Straeten: *Plant Physiol.*, **107** (1995) 177-86.
- 20) K. Skriver and J. Mundy: *Plant Cell*, **2** (1990) 503-12.
- 21) A. Savouré, X.-J. Hua, N. Bertauche, M. V. Montagu, N. Verbruggen: *Mol. Gen. Genet.*, **254** (1997) 104-9.
- 22) R. Munns and A. Termaat: *Aust. J. Plant Physiol.*, **13** (1986) 143-60.
- 23) M. Katsuhara and T. Kawasaki: *Plant Cell Physiol.*, **37** (1996) 169-73.