

## 強塩ストレス下におけるアズキの根の生物フォトン応答

川畑 龍三\*・大矢 智幸\*\*・岡部 弘高\*\*\* 甲斐 昌一\*\*\*

### Biophoton Response of Red Bean Root under High Salinity

Ryuzou KAWABATA, Tomoyuki OHYA, Hiroataka OKABE  
and Shoichi KAI

(Received November 6, 2000)

**Abstract:** When a red bean was soaked in salt water, all cells in its root were broken and strong photon radiation was simultaneously observed. The biophoton response changed depending on its growth stage. By application of the physiological stress in the earlier growth stage, the stronger photon intensity was measured and the cell damage developed more rapidly. The present result suggested that the physiological situation of a plant could be monitored in real time by photon measurement.

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

#### 1. はじめに

植物をとりまく自然界には、塩、乾燥、光、温度などの様々な環境ストレスが存在する。中でも塩分濃度上昇や乾燥によって引き起こされる水分ストレスは、植物の生長に対して阻害、停止といった深刻なダメージを与える。実際の塩害では、農作物は土壤溶液中の塩分濃度が0.1%で生育低下を起こし、0.3%を超えると著しく損なわれる<sup>1)</sup>。現在、塩害によって至るところで地球規模の被害が生じている。

塩害を始めとした環境ストレスがもたらす農作物生産量減少に対する解決策として、分子生物学を中心とする遺伝子工学的手法が用いられつつある。例えば、塩環境下での光合成能力低下を抑制する遺伝子<sup>2)</sup>や耐塩性シアノバクテリア<sup>3)</sup>の研究を基にした環境ストレス耐性植物の開発が行われている。しかし、遺伝子操作による新種の植物の開発が食物の安全性を保証しているとは言い難く、さらには新しい環境破壊を導くおそれさえある。そこで、高度な環境制御による高効率の農業生産を目指した植物工場を成立させるためには、より高度なモニタリング手法の開発は不可欠である。

その候補として、我々は植物の生理状態を敏感に反映し、非侵襲かつ非破壊で計測が可能な生物フォトンと呼ばれる極微弱な発光現象に注目し、その生理シグナルの利用を試みてきた。生物フォトンには主に生化学反応で余剰的に発生する活性酸素種に由来することが知られている<sup>4)</sup>。また、過敏反応時に発生する活性酸素種も生物フォトン放出源となる<sup>5)6)</sup>。これらを勘案すると、生物フォトン計測によって植物の生理状態を逐一把握することが可能であり、環境ストレスの早期対策として有効な手段となると考えられる。そこで我々は発芽・発根期のアズキ種子を用いて、フォトン計測により塩ストレス下における植物の耐性メカニズムについて研究を進めてきた。その結果、塩ストレスに対するフォトン応答は塩濃度の変化に従って発光強度やその経時変化が異なること<sup>7)8)</sup>、また4.5Mの高塩ストレス下で観測されるフォトン応答は極めて強い発光を示し、その時生体内で根端細胞の細胞膜崩壊が生じる<sup>8)</sup>という知見が得られた。

本研究では、4.5Mの塩ストレスによる異常発光が根の生長に伴ってどのような変化をするかを調べるために、生長時期が異なる個別のアズキ種子を選び、それらを4.5MのNaCl水溶液に浸漬したときに放出されるフォトンの強度および時間変化を計測した。

平成12年11月6日受理

\* エネルギー量子工学専攻修士課程

\*\* 日本学術振興会

\*\*\* エネルギー量子工学部門

## 2. 実 験

### 2.1 試料

種子間の個体差を小さくするため、3000個の中から標準偏差内の重量を持つ種子を測定に用いた。種子は温度35℃、湿度95%に設定した恒温恒湿槽（ヤマト科学社製：IG47M）の中で24時間給水（給水終了時を以後の生長の基点（0時間）とした）した後、温度24℃、湿度82%に設定した別の恒温恒湿槽（島津理化学社製：BECⅡ-350）の中で生育させた。

恒温恒湿槽内での種子の生育は、脱脂綿を敷いたプラスチック製の容器（縦350mm×横250mm）に400ccの純水を注ぎ、種子を7×7の格子状に並べて行った。生育環境の劣悪化を防ぐために、12時間毎に脱脂綿と純水を入れた新しい容器に種子を移し替えた。また、光合成によるエネルギー供給を避けるため生育は暗黒下で行った。

### 2.2 根長の計測

植物の発芽・発根期における生長は発根、発芽、子葉形成、側根形成といったいくつかの段階を経て進行する<sup>9)</sup>。我々はこれまでに発芽・発根期の根の生長に関するモデルを導出し、その生長がロジスティック方程式に従うことを報告している<sup>10)</sup>。図-1に、根の生長曲線を示す。

根の伸長は、発芽・発根期の比較的短い期間にも変化する。それぞれ生長の初期、中期、後期には根の伸長は加速度最大、速度最大、減速度最大となる。本研究では給水終了後、48～72時間、96～144時間、168時間以上を経過した種子根がそれらに相当する<sup>10)</sup>。種子根の伸長速度や加速度から生長過程を確認するために根長を12時間毎に測定した。

### 2.3 フォトン計測

試料として、給水終了後48～72時間（初期）、96～144時間（中期）、168時間以上（後期）を経過した個別の種子を使用した。最初に純水の入ったシャーレに種子根を浸した状態でフォトン計測を行い、その時のフォトン発光強度を参照値とした。参照値のフォトン計測終了後、種子根を4.5MのNaCl水溶液を入れたシャーレに浸漬し、同様な手順で約12時間計測した。フォトン計測には、冷却型二次元光子計数管（浜松ホトニクス社製：PIAS-TI500, C-1809）を用いた。

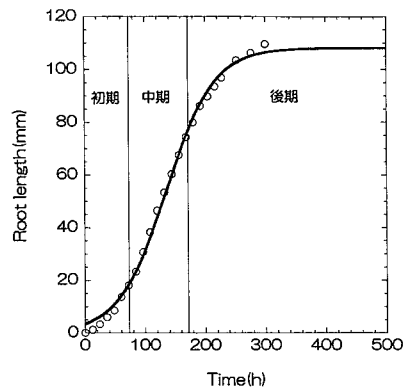


図-1 根の生長曲線

## 3. 結 果

### 3.1 各生長時期のフォトン応答

給水後96時間の種子を4.5MのNaCl水溶液に浸漬すると数分後に根の先端から発光が生じ、時間の経過と共に発光部位は先端部分から基部に伸びて根全体に広がった。しかし、その発光も約6時間後には、ほぼ減衰した。図-2は、4.5MのNaCl水溶液に種子を浸漬してからの根の先端2.6mm部分の20分積算のフォトン強度の経時変化を示している。浸漬後、フォトン強度は著しく増加し、直ちにピークに達した後、次第に減衰することが分かった。

給水終了後72時間、120時間、168時間経過した種子を4.5MのNaCl水溶液に浸漬した時のフォトン応答を図-3に示す。各生長時期で、塩ストレス印加後にフォトン強度が増加し、ピークに達した後、ゆっくりと減衰する傾向が共通して見られる。しかし、フォトン強度の最大値（以下、最大フォトン強度と記す。）の大きさと、それを示す時間がストレスを印加した時間によって異なった。

### 3.2 最大フォトン強度の生長依存性

図-4は、給水後48時間から400時間まで生育した個別の種子を各々別々に4.5MのNaCl水溶液に浸漬した時のそれぞれの最大フォトン強度の生長時期に対する依存性を表している。種子を4.5MのNaCl水溶液に浸漬した時の時期が早いほどフォトン強度が大きくなる傾向を示している。また、生長速度が大きく、根の長さのばらつきが大きい生長中期には、最大フォトン強度のばらつきも大きい。

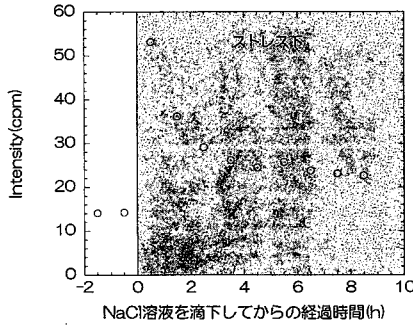


図-2 強塩ストレスによる光子応答

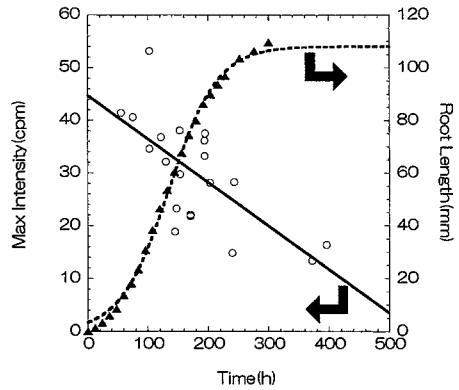


図-4 最大光子強度の生長依存性

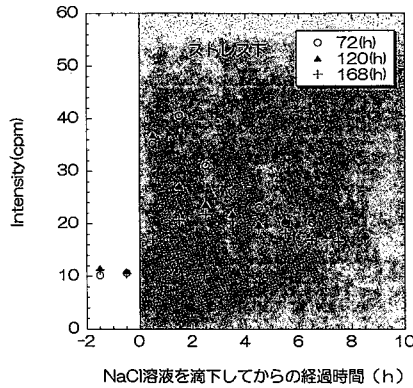


図-3 各生長時期での光子応答

4. 考 察

以前、我々は4.5MのNaCl水溶液に種子を浸漬したときの光子強度は他の濃度(0.01, 0.1, 1M)に比べて著しく強く、また細胞膜の崩壊といった他の濃度では観測されない内部の形態的变化が生じることを報告した<sup>8)</sup>。また、塩ストレスと同様に水ストレスを生じる乾燥ストレスを与えた場合でも、根の外側から脱水や酸化などによる細胞膜の崩壊や細胞質成分の変性が起こる過程で発光が観測されている<sup>12)</sup>。これらのことから細胞膜の崩壊と強い光子放射には密接な関係があると考えられる。細胞膜崩壊が起こる機構は、細胞膜内外の浸透圧差による膜破裂とストレスにより大量に発生した活性酸素種による膜破壊の二通りが考えられる。顕微鏡観察によれば、細胞膜崩壊が起こるまでの様子は、原形質が分離した後で膜が徐々に薄くなり、その後崩壊する<sup>11)</sup>という順序で進行する。こ

のような観察結果から、細胞膜崩壊は化学反応により膜の浸蝕が生じたためと考えられる。

細胞膜は、タンパク質と脂質から構成されている。生物光子の源と推定されている活性酸素種は、細胞膜中の脂質成分である不飽和脂肪酸を修飾し、生じた脂質ラジカルが酸化されて脂質ヒドロペルオキシドが生成され、さらに酸化が進むという様に生成物が雪崩的に電子を奪い合うことより膜を崩壊させる<sup>13)</sup>。以上を考慮すると、強塩ストレスによる著しい発光は生体内で発生した活性酸素種の量を間接的に反映していると考えられる。したがって、図-4で示した最大光子強度は、根で最も活性酸素種が発生している状態を反映したものであると考えられる。ここで、我々が観測しているのは種子の先端から2.6mmまでの部分であり、その部分はほぼ根の分裂帯に相当する<sup>9)</sup>。この分裂帯では細胞分裂が盛んに行なわれており、種子の生長時期に関係なく常に生まれつばかりの新しい細胞が存在する。つまり、どの生長時期でもこの部分の細胞の活性には違いが無いと考えられる。では、生長時期によって最大光子強度が異なる理由は何か。これには次の様な可能性が考えられる。分裂帯では常に新しい細胞が産み出されているが、生育を暗室で行っているため細胞分裂のために必要な養分は種子自らが持つ子葉のみであり、根の生長と共にその供給は困難となる。したがって生長が進むにつれて、細胞分裂の活性が低下し細胞が産出される割合が落ちていく。そのため、分裂帯であっても生長の時期によって、根の先端部を占める新細胞の総数に違いがあるものと思われる。これらのことから生長の後期ほど、分裂がゆっくりとしており、それに応じて細胞内や細胞膜中に生

じる活性酸素種も生長初期の場合と比較すると少なくなるものと思われる。これが、最大発光強度変化の主要因となったと考えられる。

また、約400時間が経過し根の生長が停止した場合の最大フォトン強度に関しては細胞の老化によると考えられる。無ストレス下の環境であっても呼吸によって、生体内には活性酸素種が発生する。生物は、これらの発生した活性酸素を消去するための抗酸化酵素や非酵素低分子物質による消去機構を備えている<sup>14)</sup>。しかし、何らかの原因で消去しきれなかった若干の活性酸素種が常に細胞に少しずつ傷害を与える<sup>15)</sup>。その一例として挙げられるのが、細胞膜の脂質酸化である。つまり、生長が進行するにつれて活性酸素種によるダメージが蓄積され十分時間が経過した状態では細胞膜の酸化が進行していると推測される。従って、細胞膜中に発生する脂質ラジカルなどの活性酸素種の量は強塩ストレス下でも少なく、発光強度の低下を導いていると考えられる。

そこで、これらの推測を基に、酸化の量を表すと考えられる積算強度の経時変化を求めてみた。それを図-5に示す。給水終了後72時間経過の種子根の積算強度は、4.5MのNaCl水溶液に浸漬後から3時間ほど急激に増加した後、増加率は一定になる。一方、生長中期である120時間経過の種子根では、生長初期の場合ほど積算強度の著しい増加は無かった。それに対して、生長後期である168時間経過の種子は、最初からほぼ一定に増加し、上記議論を間接的ではあるが、支持する。

図-5では、ストレス印加時の生長時期の違いに応じて、印加から最初の数時間での積算強度が大きく違う。これからもストレスにより生成された活性酸素種の量に差があることが示唆される。また、その後の積算強度の増加率が各生長時期とも同様な値を示すことから、ストレス印加による細胞崩壊後は、均一に漏洩した脂質の酸化などが一様に進むものと考えられる。

植物には、乾燥や高塩濃度環境から身を守るための防御機構が備わっている。その代表的なものとして細胞内に高濃度で蓄積しても代謝系を阻害しない浸透圧調節物質であるベタインやプロリン、ピニトールが知られている。また、細胞に水分ストレスが生じたときに、親水性のタンパク質であるLEAタンパク質を誘導発現してストレス防御の働きをすることが知られている<sup>16)</sup>。しかし、非常に強い塩ストレスの場合では、こ

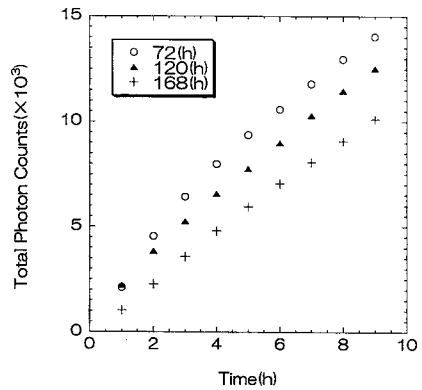


図-5 積算強度の経時変化

れらの生体防御物質やそれによるシグナル伝達が起こることは考えにくい。実際、大麦の根では、0.3Mの塩ストレスを与えた場合でさえも細胞内の核が崩壊することが報告されている<sup>17)</sup>。対象は違うが、本研究のように4.5Mの強塩ストレスの場合には、細胞は一度に死滅すると考えられる。例えば、アズキ種子の根先端部のスライスした切片に強塩ストレスを印加すると、6分後に細胞膜が破裂する<sup>8)</sup>という顕微鏡観察の結果からも裏付けられている。これらを総合すると強塩ストレスを印加後の最初の1時間以内に根の細胞は完全に死滅していると言える。この議論は、活性酸素種による発光が最大となるのがストレス印加後の最初の1時間程度という結果をよく説明している。しかし、一方で図-3からストレス印加後2時間に発光が最大となる様子が見られ、発光の機構が細胞崩壊によるものだけではない可能性も示唆されている。これを確定するには、さらなる研究が必要である。いずれにしても、今後、細胞崩壊による発光が否かを知るために、スペクトル分析による発光励起種の同定、および直接生きている細胞の割合を把握するために試薬を用いた顕微鏡観察といった多方面の研究が必要である。

## 5. ま と め

4.5MのNaCl水溶液に種子根を浸漬すると根細胞の膜破壊が生じ、強い発光が観測される。この発光は主に生体内で発生した細胞を崩壊させる活性酸素種によるものと考えられる。生長初期ほどこの発光は強く生長後期になると弱くなった。その要因として、分裂帯の細胞の総数や細胞膜の強度の違いに起因することが考えられるが、その詳細は不明である。今回フォトン

計測により、細胞崩壊という生体内部の変化をモニタリングできる可能性が示された。

フォトン計測は特殊な処理を必要とせず、高感度かつリアルタイムで試料の測定を行えるという特徴を持っている。したがって今後このような先端的な測定が用いられ、その情報処理のアルゴリズムが確立されれば、植物工場での最適生育環境の制御や環境ストレスの識別や定量化に応用できるものと期待される。

## 6. 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) 新免輝男：環境応答，朝倉書店(1991)。
- 2) S. Kishitani, T. Takanami, M. Suzuki, M. Oikawa, S. Yokoi, M. Ishitani, A. M. Alvarez - Nakase, T. Takabe and T. Takabe: *Plant Cell and Environment*, **23** (2000) 107-114.
- 3) T. Hibino, N. Kaku, H. Yoshikawa, T. Takabe and T. Takabe: *Plant Molecular Biology*, **40** (1999)409 -418.
- 4) 渡辺治夫：稲場生物フォトンプロジェクト研究概要集 (1991) 99-112.
- 5) T. Makino, K. Kato, H. Iyozumi, H. Honzawa, Y. Tachiiri and M. Hiramatsu: *Photochemistry and Photobiology*, **64** (1996)953-956.
- 6) X. Da, T. Shici, T. Yonghong, H. Yonghong and L. Dehong: *Chinese Science Bulletin*, **44** (1999) 2159 -2162.
- 7) 大矢智幸, 倉重秀昭, 甲斐昌一：九州大学工学集報, **71**(1998)575 - 581.
- 8) T. Ohya, H. Kurashige, H. Okabe, S. Kai: *Japanese Journal of Applied Physics*, **39** (2000) 3696-3700.
- 9) 森田茂紀・阿部淳：根のハンドブック，根研究会(1994).
- 10) S. Kai, T. Mitani, M. Fujikawa: *Physica A*, **210** (1994) 391 - 402.
- 11) K. Skriver and J. Mundy: *Plant Cell*, **2** (1990) 503 - 512.
- 12) 大矢智幸, 吉田敏, 川畑龍三, 岡部弘高, 甲斐昌一：九州大学工学集報, **73** (2000) 25 - 29.
- 13) 中野稔 他, 活性酸素と発光, 日本医学館(1990).
- 14) 吉川敏一：フリーラジカルの科学, 講談社サイエンティフィック(1997).
- 15) 小林一雄：蛋白質核酸酵素, **33** (1988) 2678 - 2683.
- 16) 渡邊昭 他：植物の環境応答, 秀潤社(1999).
- 17) M. Katsuhara and T. Kawasaki: *Plant and Cell Physiology*, **37** (1996) 169 - 173.

