

生物フォトンで生体のストレスを測る

九州大学大学院工学研究院エネルギー量子工学部門 岡部 弘高

Biophoton is ultraweak chemiluminescence from biological system and much weaker than usual bioluminescence from luciferin/luciferase systems. The main source of biophotons is the reactive oxygen species (ROS). Though ROS is toxic and arises during the fundamental metabolic process such as mitochondrial aerobic respiration, they are detoxified by ROS scavengers. However, endogenous ROS increases, when living things are exposed to various environmental stresses. Therefore, the intensity of biophoton reflects the stresses of living things.

Keywords: biophoton, reactive oxygen species, stress, mitochondrial aerobic respiration, ROS scavenger

1. はじめに

生物フォトンとは、光子として観測されるほど強度が弱い生物発光現象、またはその時放出される光子を指す言葉として用いられているが、明確な定義は無い¹⁻⁵⁾。生物フォトンとして広く認知されているのは、生理代謝や外界刺激によって生化学的に励起された生体分子種が低エネルギー状態に遷移することで生じる極微弱生化学発光であり、生命の営みの中で付随的に起こる現象である^{2,4,5)}。そこにはホタルやオワンクラゲの生物発光に見られる特定の反応物質（反応基質：ルシフェリン、反応酵素：ルシフェラーゼ）は介在しない。したがって、個体間通信、他種生物への威嚇・逃避などの役割を持つ生物発光とは本質的に異なるものであり、それら生物発光と比べると格段に弱く、超高感度の光検出器でなければ観測は不可能である。その強度は $10^3 \text{photons/s} \cdot \text{cm}^2$ （約 $10\text{-}16 \text{W/cm}^2$ ）以下で非常に弱いが、それでも室温での黒体輻射の可視光強度（ $1 \text{photons/s} \cdot \text{cm}^2$ ）と比較すると2~3桁大きい。

Stress evaluation of living things by biophoton measurements
Hirotsuka OKABE (*Department of Applied Quantum Physics and Nuclear Engineering, Faculty of Engineering, Kyushu University*)
〒819-0395 福岡市西区元岡 744
TEL: 092-802-3528, FAX: 092-802-3531
E-mail: okabe@ap.kyushu-u.ac.jp

生物フォトンの主な源は、ミトコンドリアでの細胞呼吸に付随して生み出された反応性の高い活性酸素種である。酸素を用いた酸化還元反応は非常に効率が高く、生物はその反応を呼吸という形で利用しているが、一方で呼吸に付随して生み出された活性酸素種はそのままでは他の生体分子を酸化して破壊する。そこで、生体には活性酸素種をスーパーオキシドジスムターゼ等の酵素やビタミン等の低分子抗酸化物で無害化する機能が備わっている。この無害化の反応過程は無放射遷移や多段階の遷移を経るために熱としてエネルギーを放出するので、健康な生体においては抗酸化機構が働いて生物フォトン発光はほとんど無い。しかし、弱いストレス下では各種遺伝子の発現によって一時的に生理活性が高まり、抗酸化機構とのバランスが乱れ、一定量の活性酸素種が無害化されずに残り、それらの活性酸素種はストレスメッセンジャーとして細胞機能の調節に利用される。さらに、ストレス状態が続くと生理活動が低いレベルに落ち、細胞呼吸量も少なくなるので、活性酸素種の量も少なくなる。また、強いストレス下では、各種生理機能の不全が抗酸化機構の障害へと発展し、その結果大量の活性酸素種が発生する。このような活性酸素種は生体分子と反応し、その比較的大きな反応エネルギーは近赤外から可視・紫外の波長の光として放出される。このように、生体にストレスが加わると、動植物を問わず生体の抗酸化機構に影響を与え、その結果生物フォトン発光に変化が表れる。このように、生物フォトンは生体のストレスをリアルタイムで計測するのに適していると考えられ⁶⁻⁸⁾、さらには癌のイメージング^{9,10)}なども試みられている。そこで我々の研究室では甲斐昌一教授の下、基礎的な知見を得るために生体として単純な植物種子根を対象として研究を行ってきた^{4,11-16)}。ここでは、塩分¹²⁾、乾燥¹³⁾ストレスに対する研究について紹介する。

2. 生物フォトンの測定装置

生物フォトンの発光強度は極めて小さく、最高感度の測定手法が必要である。従って計測には光子計数法が用いられ、そのために熱ノイズを抑えた冷却型の光電子増

倍管や二次元光子計数管が必要になる。また、最近ではイメージインテンシファイア付きの CCD や電子増幅機能を備えた EMCCD 等の超高感度カメラも利用可能になってきた。一方、生物フォトン測定するための環境も重要である。例えば、健康な生体の生物フォトン発光は特に弱く、その状態のイメージングを行うためには背景光をほぼ完全に遮断するだけでは不十分で、遅延発光 (delayed luminescence)¹⁷⁾ と呼ばれる極微弱な蛍光を排除しなければならない。遅延発光とは、いわゆる蛍光物質以外の物質から放射される極微弱な蛍光で、通常の光に曝された物質は暗環境に移してもフォトンレベルでは数秒から長いものでは数日に渡って発光を継続する。従って、一般に生物フォトン測定は、遅延発光の少ない暗室中に測定試料を置いて数分以上の暗状態を保った後に行う必要がある。図 1 に最新型のカメラで撮影した著者の手の指の画像を示す。暗環境に入っただけは明るく光っていたが、やがて一定の明るさになり、図 1 は 20 分経過後に 5 分の露光で得られた。また、生物フォトン測定においても、その発光スペクトルには発光分子種などの多くの情報が含まれていることが期待され、分光計測が試みられている。生物フォトンは極微弱で、回折格子やプリズムなどの平行光束を必要とする分光法は不向きである。そこで、生物フォトン分光には光学フィルターを用いるのが一般的である^{16,18)}。

このように、現状では生物フォトン測定は簡便とはいえず、研究室レベルの測定法に留まっている。

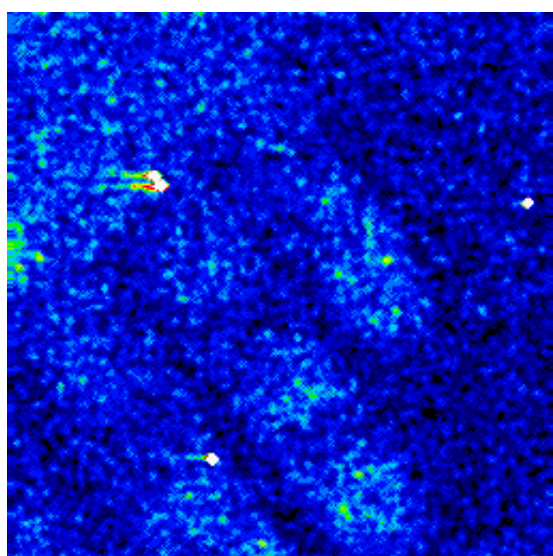


図 1. 著者の指からの生物フォトン発光 (20 分暗状態経過後、5 分間露光：輝点は宇宙線)

3. 植物における乾燥・塩ストレス応答と生物フォトン発光

3.1 生理応答

植物体の大部分は水が主要な構成成分であり、特に光合成などの生理代謝が活発な葉などの器官では約 70～90%の水分を含んでいる¹⁹⁾。このように多量の水分を保持していても、乾燥ストレスや塩ストレスにより体内水分が僅かに減少すると、膨圧変化による水ポテンシャルの低下が起こる。このため細胞体積が縮小し、細胞液の濃度が高まることで様々な生理傷害が生じる。例えば、水の透過性低下による細胞の吸水速度の減少に伴い、有糸分裂活性、DNA 合成活性そしてタンパク質の生合成や酵素活性などが阻害される^{19,20)}。また脱水により細胞内のイオン濃度が上昇するため、細胞の恒常性が攪乱する^{19,20)}。

乾燥ストレスを受けた植物では脱水回避あるいは脱水耐性と呼ばれる防御応答を生じる。脱水回避とは、原形質における水ポテンシャルの低下を遅らせることで、できるだけ長期間に体内の水分状態を適度に保持する生理応答である。そのために、蒸散量を調節するための気孔閉鎖、通水性向上のための茎径の拡張、そして細胞の吸水効率向上のための低分子有機化合物 (プロリン、ピニトール) の細胞内蓄積などの生理・形態的变化が誘導される^{19,20,22)}。また、これら一連の生理応答は植物体内でのアブシジン酸を介したシグナル伝達系やカルシウムイオン (セカンドメッセンジャー) によってトリガされると考えられている^{19,20)}。一方、脱水耐性とは原形質の水分が欠乏しても生理代謝機能を一時的に停止させ、仮死状態になることや光合成機能を変化させることで適応する防衛応答である。これは主に乾生植物に見られ、フィノースやトレハロースなどの炭水化物を生体膜に取り込むことで生体膜成分のリン脂質を安定化させる^{19,20,23)}。あるいは乾生植物では日中の高温乾燥時には気孔を閉じて、C3 光合成から気温が下がる夜間に気孔を開き炭酸同化を行なう CAM 型光合成に変換することで耐性を獲得する^{23,24)}。

さらに、塩ストレスにおいては脱水だけでなくナトリウムイオンの毒性によるイオンストレスの影響もある。イオンストレスは細胞に過剰のナトリウムイオンが流入することで生じ、原形質内のイオンバランス ($K^+ : Ca^{2+} : Na^+$) が乱れ生理傷害が起こる^{21,22)}。その代表例としては、光合成における光リン酸化反応の停止、呼吸機能の低下そしてタンパク質代謝の攪乱などが知られている¹⁹⁾。

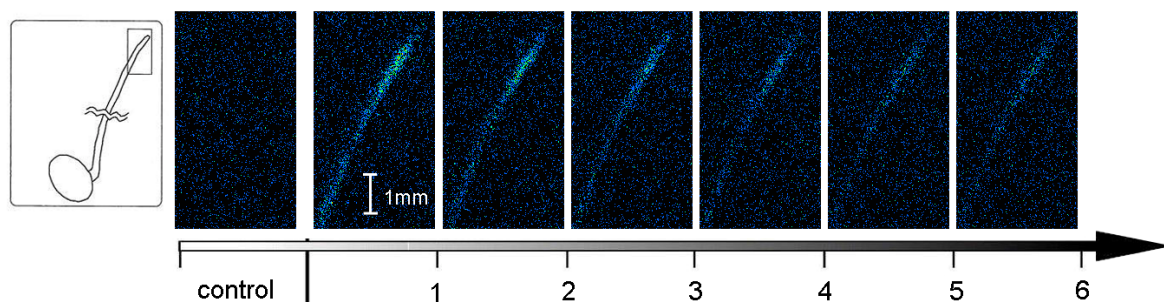


図 2. 乾燥によって誘導された根端付近からの発光の様子 (T=24°C, RH=50%、露光時間=1 時間)

また塩ストレスを受けた場合には、体内に入ってきたナトリウムイオンを根や茎の一部に止め、根の分裂組織や未熟な葉へ到達するナトリウムイオンの量を極力減らすことで塩環境下に適応することもある^{19,20,24}。その他、アガザ科の植物では塩分吸収に伴い、細胞体積を同時に増加させて体内の塩濃度を長期間一定に保つことが知られている^{19,20}。

3.2 生物フォトン発光

給水後 100 時間程生育し、根長数 cm になったアズキ種子根を、乾燥したシャーレ上に置いた後の根端付近の発光の様子を図 2 に、乾燥前と直後の発光強度変化を図 3 に示す。発光強度は乾燥開始後 20~30 分でピークを示し、その後 5~6 時間かけて減衰した。発光は種子根全体から観測されたが、特に先端部が強かった。これは、乾燥耐性が根の部位により違っているためである。根は地下組織であり、乾燥にさらされる地上組織である茎や葉に比べて乾燥に弱い。乾燥による傷害は、根の外側からの脱水による細胞膜や細胞質成分の変性から破壊へと進行していく。この過程で、生体内で生じた活性酸素種がフェントン反応や過酸化水素の不均化反応によりヒドロキシルラジカルに変化すると、生体膜を構成する不飽和脂肪酸から水素が引き抜かれ脂質ペルオキシルラジカルが生成され、フリーラジカル連鎖反応が起こる。この反応は一旦始まると周囲の脂質や酸素と反応して自動酸化の状態になり、連鎖反応の時間に比例して細胞膜へ深刻被害を与えることが知られている^{22,23}。したがって図 2 における広い範囲からの発光はこの脂質過酸化反応と考えられる。

一方、根の先端部からの強い発光は次の様に考えられる。先端部位は根の中でも特に膜形成の不完全な未熟な細胞が多い部位であり粘性多糖類で覆われているので、20~30 分で根端の細胞に含まれる水分が全て蒸発することはない。乾燥開始 1 時間後に顕微鏡観察しても、表

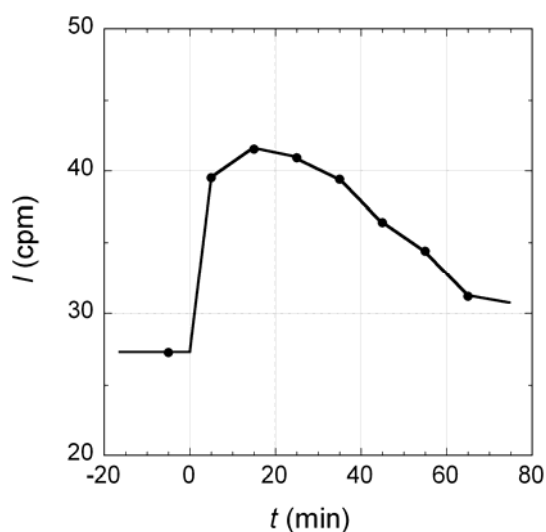


図 3. 乾燥前と直後の根端付近からの発光強度の変化 (T=24°C, RH=50%)

皮細胞が一層破壊されていた程度であり、柔細胞や中心部は全く影響を受けていなかった。したがって、抗ストレスあるいは適応反応としてストレス抵抗性遺伝子が発現し、アブシジン酸、プロリン、ベタインなどのホルモンやタンパク質の合成過程¹⁹⁻²³による一時的な生理活性の上昇が発光を起こしたと考えられる。

図 4 は生長開始後 48、96、168 時間経過したアズキ種子根 20 個を濃度 0.01、0.1、1、4.5M の塩溶液に浸漬した時に観測された発光強度の変化である。図 4 に示すように、塩濃度が 0.01~1M の範囲では発光強度は対照 (0M) に比べて減少し、塩濃度の増加と共に発光強度は減少した。一方、4.5M の場合には発光強度は著しく増加した。これは、1M~4.5M の間で種子根の生理状態が変化することを示唆している。

そこで、0.01、0.1、1M 濃度の塩溶液中での根の生長を調べたところ、0.01M では 0M と違いはなく、0.1M で根の伸長がほとんど観測されなくなり、1M おいては、

生長が完全に停止した。また、長時間乾燥させた場合と同様に、1M では溶液が白濁し、膜が半透性を失い細胞内容物が流失した。このことから 1M では、生長阻害のみならず、根端に生理傷害を引き起こしており、4.5M で観測された強い発光は、0.1~1M におけるものとは異なる生理的要因によるものである。顕微鏡観察によれば、4.5M の場合には、根細胞に急速な原形質分離が起こり約 6 分後には細胞膜の破壊が確認された。これに対し、1M の場合では原形質分離は生じたが細胞膜の破壊にまでは至らなかった。このことから、細胞膜の破壊が 4.5M 浸漬時の急激な発光増加の原因であり、その過程では原形質分離の後に、膜が徐々に薄くなることから、大量に発生した活性酸素種によるものと考えられる。すなわち、塩濃度 1M 以下の比較的低濃度では抗ストレス遺伝子の発現によって時間経過とともに発光強度が減少するが、4.5M の高濃度の場合には細胞の崩壊などによる傷害で非常に強い発光がみられる。そして、1M 以下では濃度が増加するにつれて発光の強度が減少し、ストレスの持続時間が長いほど発光が弱くなることから、抗ストレス状態では生理活性が落ちていることが分かる。

4. おわりに

我々の研究からアズキ種子根におけるストレス下の生物フォトン発光について簡単に紹介した。生物フォトン発光は生体のストレス状態をよく反映しており、ストレスの程度や生理障害の進行程度を量的に評価するのに

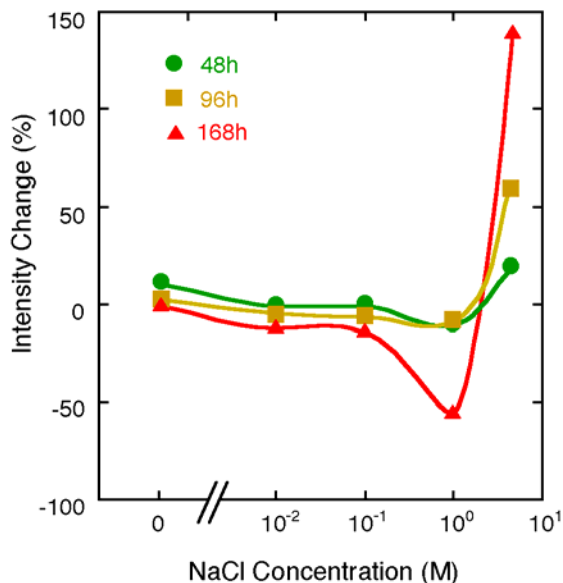


図 4. 生長開始 48, 96, 168 時間後のアズキ種子根からの発光強度の塩濃度 (0, 0.01, 0.1, 1, 4.5M) 依存性

有効と考えられる。最新の超高感度カメラ等の計測機器の発展に伴ってその有効性はさらに増すであろう。

参考文献

1. F. A. Popp, *et.al.*, *Collective Phenomena*, **1981**, 3, 187.
2. F. B. Abeles, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1986**, 37, 49-72.
3. L. A. Popp, Q. Gu, K. Li, *Modern Physics Letters B*, **1994**, 8, 1269.
4. S. Kai, T. Mitani, M. Fujikawa, *Physica A*, **1994**, 210, 391.
5. Y. Isojima, *et. al.*, *Neuro Reports*, **1995**, 6, .658.
6. T. Makino, *et. al.*, *Photochemistry and Photobiology*, **1996**, 64, 953.
7. C. Kageyama, *et. al.*, *Plant physiology and biochemistry*, **2006**, 44, 901.
8. S. Tada, K. Okazaki, *J. Biomech. Eng.*, **2006**, 128, 777.
9. M. Takeda, *et. al.*, *Cancer Science*, **2004**, 95, 656.
10. J. Kim, *et. al.* *Electromagnetic biology and medicine*, **2006**, 25, 97.
11. S. Kai, *et. al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1995**, 34, 6530.
12. T. Ohya, H. H. Okabe, S. Kai, *et. al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2000**, 39, 3696.
13. T. Ohya, H. Okabe, S. Kai, *et. al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2002**, 41, 4766
14. T. Ohya, H. Okabe, S. Kai, *et. al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2003**, 42, 7625
15. R. Kawabata, H. Okabe, S. Kai, *et. al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2004**, 43, 5646
16. R. Kawabata, H. Okabe, S. Kai, *et. al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2005**, 44, 1115
17. F. A. Popp, Y. Yan, *Physics Letters A*, **2002**, 293, 93.
18. M. Takeda, *et.al.*, *Cancer Letters*, **1998**, 127, 155.
19. 寺島一郎, *環境応答*, 朝倉書店, **2001**.
20. 篠崎一雄他, *環境応答・適応分子機構*, 共立出版, **2001**.
21. 増田芳雄, *植物生理学入門*, オーム社, **1997**.
22. 大川秀郎, 田中良和, *化学と生物*, **1999**, 37, 134.
23. W. D. Jeschke, *et. al.*, *J. Experimental Botany*, **1992**, 43, 777.
24. 軽部征夫, *エンジニアから見た植物のしくみ*, 講談社, **1998**.