



Title	高等植物葉緑体チラコイド膜光化学系IIおよびI電子伝達活性の生葉での同時測定
Author(s)	三宅, 親弘
Citation	低温科学, 67, 533-537 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
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39188
Type	bulletin (article)
Note	4章 分光測定 3. パルス変調蛍光 d
File Information	67-073.pdf



[Instructions for use](#)

3. パルス変調蛍光

d. 高等植物葉緑体チラコイド膜光化学系IIおよび I 電子伝達活性の生葉での同時測定

三宅 親弘¹⁾

測定光をパルス変調したロックイン増幅検出系を、生葉での蛍光測定法および分光測定法に用いて以来、クロロフィル蛍光測定における PSII の量子収率解析あるいは光化学系 I 反応中心 P 700 の量子収率解析が盛んに行われてきた (Genty et al. 1989, Klughammer and Schreiber 1994)。これは、パルス変調による測定光シグナルの交流化によりノイズ低減そして分光法における測定光の透過あるいは反射シグナルの増幅、また測定光に対する蛍光シグナルの増幅効率の飛躍的増大の恩恵による。パルス変調系のシステムおよび原理の詳細、さらに PSII および PSI それぞれの量子収率を見積もるモデルは、4章3.aを参考にしていただきたい。ここでは、生葉を用いて、光合成電子伝達系の光化学系IIおよび光化学系Iの電子伝達活性を同時に測定解析する方法を紹介する。

Measurements of Photosynthetic Electron Flow In Vivo

Chikahiro Miyake

Methods for the simultaneous determination of photosynthetic electron flows in both PSI and PSII with the technique of pulse amplitude modulation (PAM) were introduced.

3.d.1 原理

3.d.1.1 葉緑体チラコイド膜光化学系II電子伝達活性

3.d.1.1.1 活性評価の考え方

生葉における非循環的光合成電子伝達 (リニア-エレクトロンフロー: linear electron flow (LEF)) 活性は、光化学系IIの水の光酸化の結果生じる電子が、プラストキノン、シトクロム *b/f*-複合体、プラストシアニンを經由し、光励起された光化学系Iを介して、Fd-FNRにより NADP⁺の還元を利用される速度として評価される。つまり LEF で流れる電子の由来は、PSII で生成するものであり、その電子生成速度は PSII 反応中心 P 680 の光によるターンオーバーによる。したがって、4章3.aで記載されているパルス変調システムを用いたクロロフィル蛍光強度の測定で得られる PSII の量子収率 (Φ (PSII)) が LEF の電子伝達活性を反映し、LEF は、PSII の電子伝達活性として示される (式1)。

3.d.1.1.2 Φ (PSII) の意味するもの

PSII の量子収率 Φ (PSII) は、その定義より、PSII に吸収された光の量子密度に対する PSII 反応中心クロロフィル P 680 のターンオーバーの割合を示す。したがっ

て、PSII が吸収する光の量 ($\alpha \times \text{PFD}$) と LEF の活性 (PSII の電子伝達活性 ($\text{Je}(\text{PSII})$)) との間には以下の関係式が成立する。

$$\begin{aligned} \text{LEF} &= \text{Je}(\text{PSII}) \\ &= \alpha \times \Phi(\text{PSII}) \times \text{PFD} \end{aligned} \quad (1)$$

LEF: 非循環的光合成電子伝達 (リニア-エレクトロンフロー: linear electron flow (LEF)) 活性であり、PSII の電子伝達活性 ($\text{Je}(\text{PSII})$) として示される。単位は、 $\mu\text{mol e}^{-}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ である。

α : チラコイド膜における PSII への光の分配率である。したがって、PSI への光の分配率 β の値と合わせると、 $1 = \alpha + \beta$ の関係をもつ。

Φ (PSII): PSII の量子収率

PFD (photon flux density): 生葉へ照射される光の光量子密度であり、単位は $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ である。

実際の、多くの生葉が示す $\text{Je}(\text{PSII})$ と光強度の関係は図1の様式が一般的である (ここでは、モデル的に示す)。

この図から明らかなように、弱光の領域では、光強度の増大とともに、LEF は増加する。これは、LEF 速度の律速が光供給にあることを反映しており、 Φ (PSII) が高い値で一定に維持されていることを示している (図2)。

1) 神戸大学大学院 農学研究科 生命機能科学専攻 植物栄養学研究室

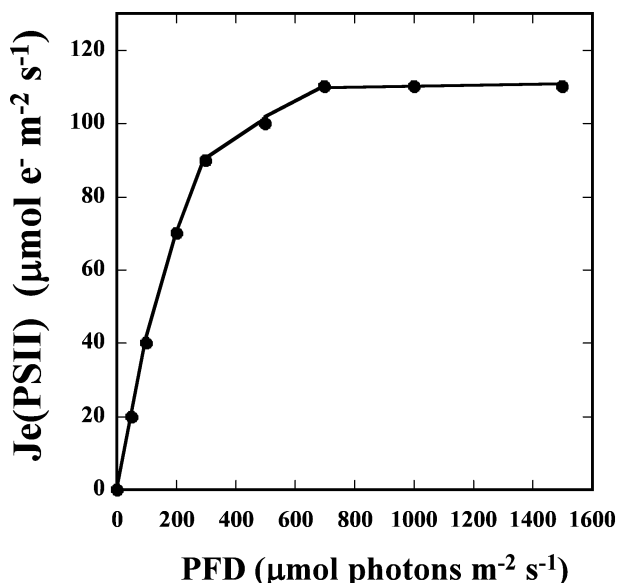


図1：PSII 電子伝達活性 (Je(PSII)) の光強度依存性

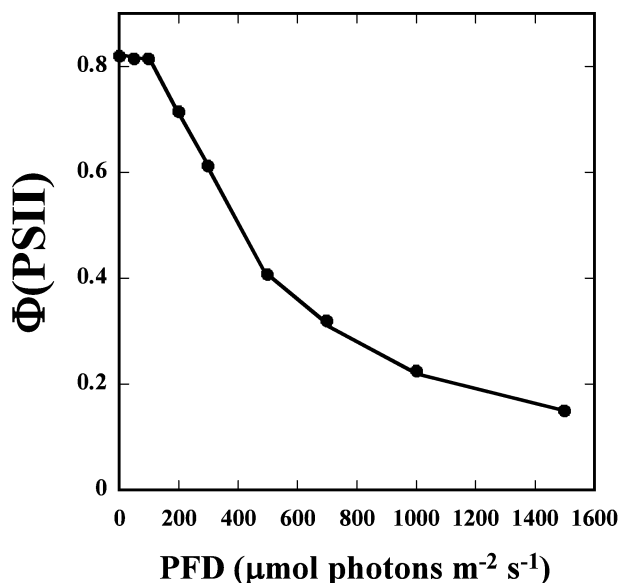


図2：PSII 量子収率 (Φ(PSII)) の光強度依存性

一方、光強度の増大とともに、LEFはその増加が頭打ちになり、最終的には飽和してしまう。これは、LEF速度の律速が、暗反応でのCO₂固定速度によることを反映している。このような状況下では、Φ(PSII)は光強度の増大とともに、減少しており、このことがLEFの低下を説明する。

3.d.1.2 葉緑体チラコイド膜光化学系I電子伝達活性

3.d.1.2.1 活性評価の考え方

生葉でのPSIの電子伝達活性評価には、現在、主に、2つの方法が活用されている。以下にその考え方を紹介する。

3.d.1.2.2 PSIの量子収率測定解析

基本的に、PSIIの量子収率と同じ考え方である(Klughammer and Schreiber 1994)。つまり、その定義より、PSIに吸収された光の量子密度に対するPSI反応中心クロロフィルP700のターンオーバーの割合を示す。したがって、PSIが吸収する光の量とPSIの電子伝達活性(Je(PSI))との間には以下の関係式が成立する。

$$Je(PSI) = \beta \times \Phi(PSI) \times PFD \quad (2)$$

Je(PSI)：PSIの電子伝達活性である。

β：チラコイド膜におけるPSIへの光の分配率である。したがって、PSIIへの光の分配率αの値と合わせると、 $1 = \alpha + \beta$ の関係をもつ。

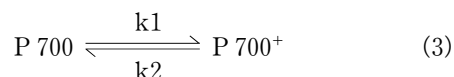
Φ(PSI)：PSIの量子収率

PFD(photon flux density)：生葉へ照射される光の光量子密度であり、単位はμmol photons m⁻²s⁻¹である。

Φ(PSI)の評価の原理は、4章3.aを参照されたい。なお、光の分配率を考慮しないΦ(PSI)×PFDの値は、PSIの相対電子伝達活性を示す。これは、また、PSIIの相対電子伝達活性にも適用され、それはΦ(PSII)×PFDとして示される。

3.d.1.2.3 光励起P700⁺の減衰速度測定解析

この解析では、以下のモデルが前提になっている(Clarke and Johnson 2001)。



P700が光励起されるP700⁺生成過程：速度定数をk1とする

P700⁺がプラスシアニンにより還元されるP700再生過程（ここでは、還元されたプラストキノンからの電子がシトクロムb/f-複合体を経てプラスチアンに受け取られている）：速度定数をk2とする

定常状態では、反応式(3)は、P700が励起され、そしてP700⁺が還元される反応が平衡状態にある。このとき、P700⁺の還元速度v(P700⁺)は、

$$v(P700^+) = k \times (P700^+)$$

として示される。kは、P700⁺の見かけの速度定数であり、k2に等しい。このモデルに従えば、kの大きさとP700⁺の大きさに依存して、P700⁺の還元速度が見積もられ、その値は、シトクロムb/f-複合体、そしてプラスチアンを介した還元型プラストキノンからの電子流入速度を反映することになる。

3.d.2 方法

3.d.2.1 機器の設置

PSII および PSI の電子伝達活性を、1つの生葉において同時に測定する場合、Walz 社の PAM を 2 台用いる。

下記に、測定システムの構図を示す。

PSII 量子収率評価のためのクロロフィル蛍光のシグナルは、チャート式レコーダーを用いて記録する
PSI 量子収率評価のための P 700⁺ のシグナルは、パルス照射に伴う短時間の時間遷移（ミリ秒～500 ミリ秒）でモニターが可能なオシロスコープを用いた記録計を活用する。

解析する生葉は、Li-Cor 社 LI-6400 に付属するアラビチャンパーにセットする。このチャンパーでは、葉温はモニターされないため、別途、熱伝対を用意し、生葉の温度をモニターする必要がある。

PSII および PSI の量子収率評価での電子伝達活性測定のためには、Walz 社 PAM のグラス・ファイバーを LI-6400 (LiCor 社) 付属のアラビチャンパーの上部に固定しなければならない。そのためには、チャンパー上部と一体化する筒状の固定ユニットを自作する必要がある(図 4)。ただし、これは測定時、Walz 社 PAM のグラス・ファイバーがセットされたアラビチャンパーからずれることなく一定に固定できる状況であれば、必ずしも必要ではない。

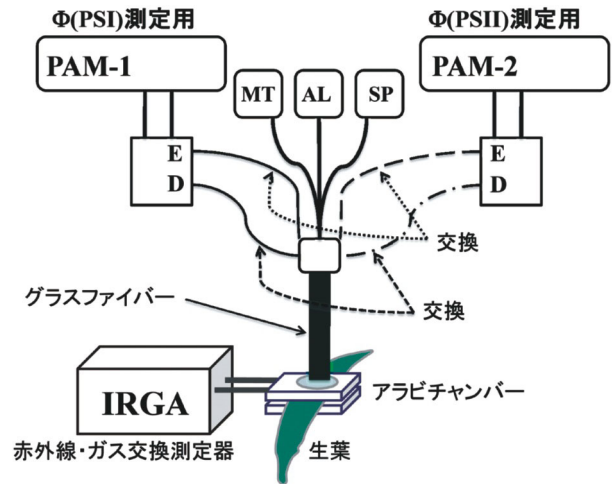


図 3：光化学系 I および光化学系 II 電子伝達活性同時測定システム。PAM-1, Φ (PSI) 測定用 PAM (ドイツ Walz 社)；PAM-2, Φ (PSII) 測定用 PAM (ドイツ Walz 社)；E および D, (Φ (PSI) 測定の場合) PAM 付属の測定光のエミッターおよび反射光の検出部, (Φ (PSII) 測定の場合) PAM 付属の測定光のエミッターおよびクロロフィル蛍光の検出部；MT, PAM 付属の Multiple Turnover Flash ユニット；AL, PAM 付属の作用光 (Actinic light) 照射ユニット；SP, PAM 付属の飽和パルス光照射ユニット (クロロフィル蛍光解析による Φ (PSII) の見積りに用いる)；IRGA, 赤外線ガス交換測定器 (この図では、測定器に付属したアラビチャンパー (商品名) が使用可能な米国 Li-Cor 社製 LI-6400 を想定している)。

3.d.2.2 PSII および PSI の電子伝達活性の同時測定

本方法では、PSII のクロロフィル蛍光強度を常時モニターしつつ、PAM クロロフィル蛍光測定用のパルス測定光照射のためのエミッター (E) およびパルス変調蛍光

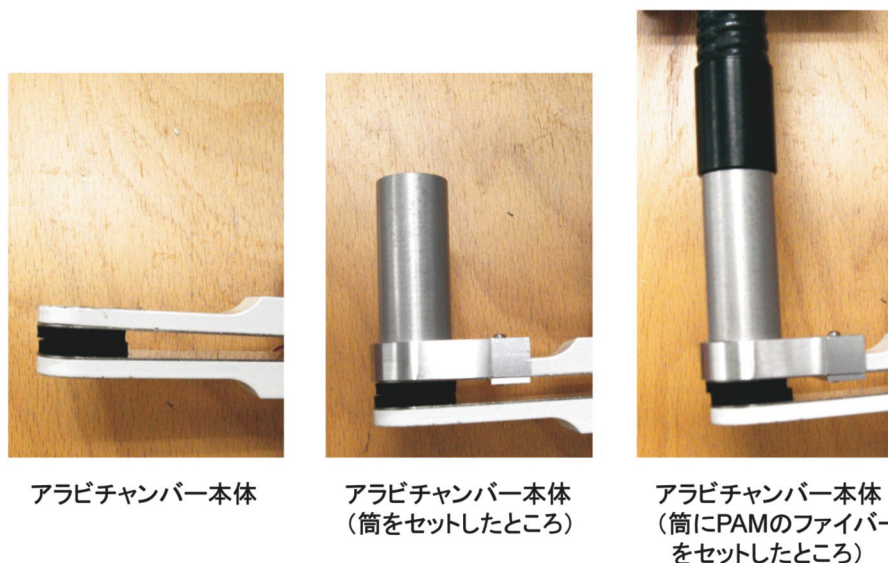


図 4：アラビチャンパー (商品名) (米国 Li-Cor 社製 LI-6400 付属) へ、PAM 用グラスファイバー (ドイツ Walz 社) を接続する筒の外観図

検出のための検出部 (D) それぞれに連結されている PAM のグラス・ファイバーを、PSI 量子収率評価を目的に P 700⁺ 測定のための測定光エミッター (E) および検出部 (D) に連結しなおす必要がある。

PSII 量子収率測定のためのクロロフィル蛍光測定および PSI 量子収率測定のための一般的な方法および注意点は、他の章(4章3.a)もまた参照されたい。ここでは、とくに P 700⁺ のシグナル検出において、PAM の設定に言及する。

P 700⁺ シグナル測定での測定光による生葉からの反射光を感度よく測定するためには、測定光強度を可能な限り最大にする必要がある。そのためには、PAM-101 ユニットにおいて、検出されるシグナルが過負荷 (OVERLOAD) にならない程度に測定光強度 (Measuring Light Intensity) を増大あるいは測定光の検出感度 (GAIN) を増大させる。さらに、PSI の量子収率測定のために照射する飽和パルスの照射開始そして終了後の P 700⁺ の時間変化 (ミリ秒~500 ミリ秒) をモニターするために、測定光の変調周波数を 100 kHz に設定する。

生葉において、光合成を駆動させるための光(作用光; Actinic light (AL)) の照射を行っている際あるいは暗黒下、最大の P 700⁺ の量を見積もるために照射する飽和パルス光として、Walz 社 PAM オプション Multiple Turnover Flash ユニット (MT) が与える 50 ms のパルス光を利用することができる。これにより、PSI の量子収

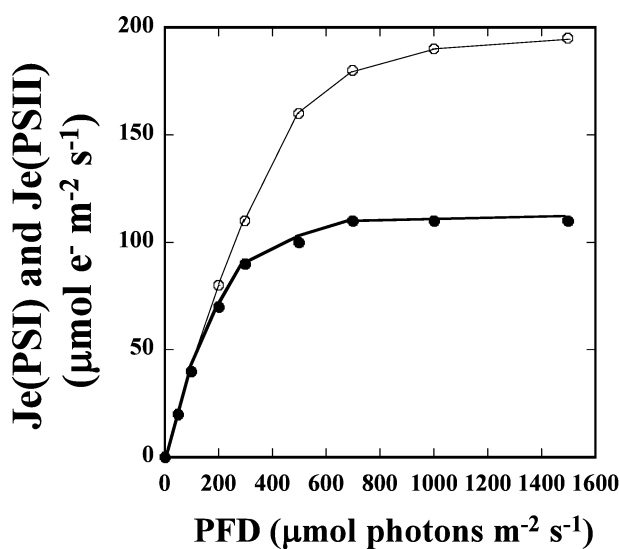


図5: PSI および PSII 電子伝達活性 (Je(PSI) および Je(PSII)) の光強度依存性: ○, Je(PSI); ●, Je(PSII). 光強度の増大とともに、Je(PSII) は増大するがやがて飽和する。一方、Je(PSI) は、Je(PSII) が光強度に対して飽和した後でもその活性は増大し、強光下での活性は、Je(PSII) を上回っている。

率 ($\Phi(\text{PSI})$) を以下のモデルから見積もることが可能となる (詳細は、4章3.a 参照)。

$$\Phi(\text{PSI}) = \frac{\text{(光照射時あるいは暗黒下、飽和パルスで生成する P 700}^+\text{ シグナル強度)} / \text{(暗黒下、遠赤外光で生成する P 700}^+\text{ シグナル強度)}}{\quad} \quad (4)$$

実際の解析においては、作用光を照射後、LI-6400 でモニターする CO₂ 固定速度が定常値に達するのを観測する。この間、クロロフィル蛍光解析による PSII の量子収率評価も同時に行っておく。

ある条件の下、たとえば一定の光強度の下、CO₂ 固定速度が定常値に達した後、PAM のグラス・ファイバーを P 700 測定に切り替える。この折、検出される P 700⁺ のシグナルは、オフセットし、ゼロ合わせをしておく。その後、50 ms の飽和パルス光照射を行い、生成する P 700⁺ シグナルの強度を評価し、PSI の量子収率を見積もる。測定後、再度、PAM のグラス・ファイバーをクロロフィル蛍光測定に切り替える。このようにして得られた $\Phi(\text{PSI})$ と $\Phi(\text{PSII})$ の値を用いて、PSI および PSII の電子伝達活性の光強度依存性を調べた結果を下記に示す (図5, 6) (三宅: 未発表)。

3.d.2.3 光励起 P 700⁺ の減衰速度測定解析

本方法では、作用光の照射後の P 700⁺ の減衰を評価す

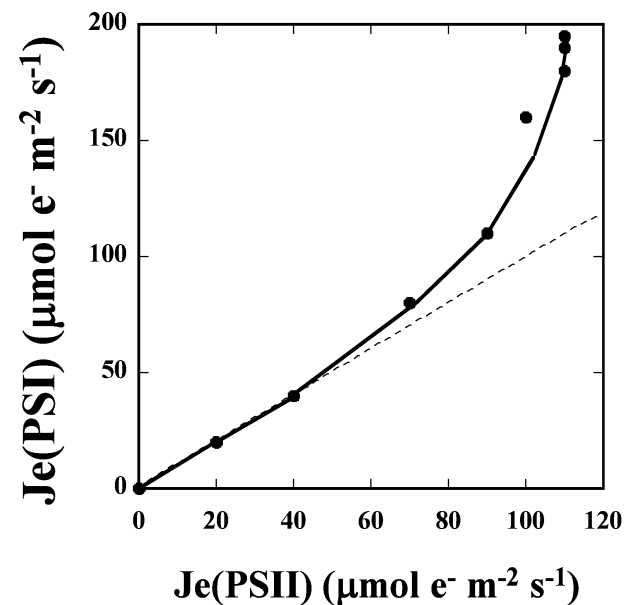


図6: PSI 電子伝達活性の PSII 電子伝達活性に対するプロット。図5で得られた Je(PSI) の値を Je(PSII) に対してプロットした。Je(PSI) の値が Je(PSII) と同じ値をとる場合の点線が示されている。Je(PSII) の光飽和に伴い、Je(PSI) は Je(PSII) の値とのずれを示し、そのずれは光強度の増大とともに大きくなる。これは、PSI 循環的電子伝達活性の発現と、光強度による活性増大を反映している。

る必要があるために、定常状態に達した後、光が消える時間が発生する。筆者の経験では、約1～3秒の暗黒時間は、定常状態にある光合成のCO₂固定速度に影響を与えない。

この測定では、光照射後のP 700⁺の減衰を記録できるように、減衰時間である数百マイクロ秒～ミリ秒に対応できるオシロスコープが必要とされる。この測定でもやはり、P 700⁺シグナル検出条件は、上記と同様に設定する。

モニターすべき内容は、光照射中のP 700⁺のレベルおよび光照射後のP 700⁺の減衰曲線である。この測定では、P 700⁺の減衰曲線からP 700⁺が低下する速度定数(k)の値を見積もる必要がある。そのためには、オシロスコープへ取り込んだデータを用いて、減衰曲線を1次減衰カーブ(次式)として近似させるカーブフィッティング処理を行い、kの値を見積もる。フィッティングされたデータの処理は、市販の数式処理ソフトウェアの活用が可能である。

$$P\ 700^+ = A \times \exp(-k) \quad (5)$$

A: 光照射停止前のP 700⁺のレベル

得られたkおよびAの値を用いて、P 700⁺へ電子が流入する速度の初速を次式から評価する。

$$v(P\ 700^+) = k \times (P\ 700^+) = k \times A \quad (6)$$

また、この方法によるPSI電子伝達活性の評価も、PSIIクロロフィル蛍光解析と同時にを行う場合は、PAMのグラス・ファイバーの交換を行う必要がある。

3.d.3 問題点

3.d.3.1 光の分配の見積もり

生葉において、PSIIおよびPSIの電子伝達活性を見積もる場合、それぞれの活性の値を示す式に見られるように、光の分配率(α および β)が含まれる。 α および β は、

$$1 = \alpha + \beta \quad (7)$$

の関係をもつ。そこで、 α あるいは β のいずれかの値が明らかになれば、PSIIおよびPSIの電子伝達活性を見

積もることができる。幸いなことに、クロロフィル蛍光解析によるPSII量子収率測定とガス交換解析によるCO₂固定速度測定を同時に行うことにより、PSIIへの見かけの光分配率(α)を見積もることができる(4章3.b)。その値から、 β を見積もり、PSIIおよびPSIの電子伝達活性を評価する。

3.d.3.2 PSI量子収率測定における暗黒下でのP 700⁺の見積もり

一般に、長時間暗黒下に置かれた植物の光合成は不活化しているために、光照射直後は光合成電子伝達系が機能しない、またカルビンサイクル酵素が機能しない状況になっている。そのため、暗黒下での飽和パルス光照射によるP 700⁺の見積もり値が、遠赤外光により見積もられる値を下回る場合が多く見受けられる。この問題を克服するためには、中程度の光強度(200～300 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)で光合成を行わせ、定常状態に達した後、遷移的に暗黒下、その後の作用光の光強度を増大させる測定手順をとることにより、弱光下でのPSI量子収率を評価できる。

3.d.3.3 光励起P 700⁺の減衰速度測定解析の問題点

この方法の問題点は大きく2つに分けられる。第1に、P 700⁺が生成し、その量は検出できるレベルでなければならない。このような状況は、光合成を駆動するための光の強度がある程度大きくなければならず、弱光下でのPSI電子伝達活性の評価を困難なものにしている。第2に、式6から明らかなように、PSI電子伝達活性の絶対値を見積もることはできない。したがって、任意の生葉での相対値評価のみが可能であるということである。この点、さまざまな処理を施した植物間、あるいは他の品種間、また野生型と組換え体との間での活性比較が困難となっている。

参考文献

- 1) Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, N. R. *Biochim. Biophys. Acta* **990** (1989) P.87.
- 2) Klughammer, C. and Schreiber, U. *Planta* **192** (1994) P. 261.
- 3) Clarke, J. E. and Johnson, G. N. *Planta* **212** (2001) P. 808.