HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定
Author(s)	園池, 公毅
Citation	低温科学, 67, 507-524 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/2115/65618
Type	bulletin (article)
Note	4章 分光測定 3. パルス変調蛍光 a;　2017-05-25 冊子体に掲載された同論文を加筆修正して公開した。
File Information	LTS67allf_522-523shusei.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

3．パルス変調蛍光
a．クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定

園池　公毅[1)]

クロロフィル蛍光はその起源となる光化学系の種類や量，そしてエネルギー移動を反映するため，光化学系の量比やステート遷移に関する情報をそこから得ることができる．また，室温での蛍光測定にパルス変調測定法を適用することにより，植物の光合成の状態を非破壊的に測定することができる．この場合，クロロフィル蛍光自体は光化学系IIから発光するが，電子伝達の相互作用を通して，系II以外の光合成の状態に関する情報を蛍光から得ることもできる．本稿では，クロロフィル蛍光測定の原理と，測定結果を定量化する方法，そして結果として得られたパラメーターの解釈の方法について解説し，さらにパルス変調法の吸収測定への応用についても触れる．

Basics of the Measurements of Photosynthesis by Pulse Amplitude Modulation

Kintake Sonoike

Recently developed technique of pulse amplitude modulation (PAM) fluorescence measurement is a very effective method to characterize the various aspects of photosynthesis. Principles of the measurements and basic application to the photosynthesis research is summarized.

3.a.1　光合成測定としてのクロロフィル蛍光

3.a.1.1　蛍光の一般論

蛍光とは，光を吸収して励起状態となった色素が元の基底状態に戻る際に，基底状態と励起状態の差に相当するエネルギーの一部を光の形で放出する現象である[1)]．照射した光の光子数（またはエネルギー）に対してどれだけの蛍光が放出されるかの比率を蛍光の量子（またはエネルギー）収率という．ある物質が一定の光量子束密度 I_{abs} の光を吸収した時の蛍光の強さ F はその物質の蛍光の量子収率を ΦF とした時に

$$F = I_{abs} \cdot \Phi F$$

として表される．ΦF が一定とみなしうる時には F を測定することによって I_{abs} を求めることが可能なので，蛍光色素 Cy3，Cy5 や蛍光タンパク質 GFP などを利用した蛍光測定においては，I_{abs} が蛍光物質の量に比例すると仮定して，例えば mRNA の量やその他の物質の指標とする．一方，クロロフィル蛍光の測定においては，I_{abs} を一定とみなし，F を測定することによってクロロフィルの ΦF の変化を見積もることにより，光合成系に関する情報を得ることになる．なお，文献の中において F（蛍光強度）と ΦF（蛍光収率）を区別していない場合もあるが，I_{abs} が一定であるとの前提の下では F と ΦF の挙動は一致するため，解釈においては通常大きな問題とはならない．

3.a.1.2　光合成色素の蛍光

有機溶媒中におけるクロロフィルの蛍光収率は室温で通常 0.3 程度である．しかし，植物の葉におけるクロロフィルの蛍光収率は 0.01-0.003 と極めて低い．この差は，クロロフィルが吸収したエネルギーが光合成に使われる場合には蛍光として放散されるエネルギーの割合が低下するとして解釈できる．クロロフィル蛍光の強さは温度依存性を示し，低温になると蛍光強度は増大する．室温では，光化学系 I の蛍光収率は光化学系IIに比べて非常に小さくなり，特に蛍光のうち 690 nm 付近を主に検出している場合は，光化学系IIの蛍光がそのほとんどを占める．

3.a.1.3　低温蛍光スペクトル測定による光化学系量比の測定

室温では光化学系 I の蛍光は弱く，また二つの光化学系の蛍光の波長が近いため，両者を区別することは通常できない．一方，液体窒素温度（−196℃，絶対温度 77 K）まで冷却すると，光化学系 I のクロロフィルは 715-735 nm に蛍光発光を示すのに対して，光化学系IIは 685 nm と 695 nm に蛍光発光を示し，これはコアアンテナに由来する（蛍光測定の章を参照）．光化学系 I の場合は，コアアンテナ単独では 720 nm に蛍光極大を示すが，LHCI

1）東京大学・新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻

を結合した光化学系Ｉでは 735 nm に極大が見られる．LHCII 自体の蛍光極大は 680 nm 付近であるが，光化学系IIのコアアンテナへの励起エネルギー移動は極めて効率的であるため，葉や細胞などにおいて光化学系IIと複合体を形成している時には LHCII の蛍光はほとんど検出されない．一方，紅藻やシアノバクテリアにおいては，クロロフィルの蛍光の他にフィコビリンの蛍光が観察される．LHCII とは異なり，*in vivo* でもある程度の蛍光が見られ，特にクロロフィルへのエネルギー移動が阻害されるような条件では強い蛍光が観察される．液体窒素温度では，アロフィコシアニンの蛍光が 685 nm に，フィコシアニンの蛍光が 660 nm 付近に観察されることが多い．

蛍光の収率は各複合体で異なるので蛍光の強さから光化学系量自体を見積もることはできないが，蛍光スペクトルの測定により 2 つの光化学系の相対的な比率を見積もることは可能となる．また，各光化学系からの蛍光発光の強さは，その光化学系にエネルギーを渡すアンテナのサイズに比例する．従って，ステート遷移のように，条件によってアンテナサイズが変化するような場合には，クロロフィル蛍光の強さに反映されることになる．これを利用して，例えばステート 1 からステート 2 への遷移が起こっているかどうかを推定することも可能である（次節参照）．

この際，試料のクロロフィル濃度が蛍光スペクトルに影響を与える場合があることに注意する必要がある．試料のクロロフィル濃度が高いと，クロロフィルから発光した蛍光が試料から外へ出る前に別のクロロフィルによって吸収される．これを自己吸収という．クロロフィルの赤色部の吸収バンドの波長は 670-680 nm 付近なので，その影響は，光化学系IIの 685 nm の蛍光の場合に一番大きく，次が 695 nm の蛍光になり，光化学系Ｉの蛍光に対する影響は一番小さくなる．従って，クロロフィル濃度が高い試料では光化学系IIの蛍光が選択的に吸収され，見かけ上，光化学系IIが少なくなっているように見える．クロロフィル濃度が異なる試料間でスペクトルを厳密に比較することはできないと考えた方がよい．液体試料の場合は，5 μg/ml 以下のクロロフィル濃度にするとほぼクロロフィルの自己吸収の影響を避けることができる．クロロフィル蛍光スペクトルは，植物の葉でもそのまま測定できる点が利点であるが，葉の場合は局所的なクロロフィル濃度が極めて高いので，スペクトルを見ると必ず光化学系Ｉのピークが相対的に非常に大きくなっている．従って，クロロフィル濃度が異なる葉の間でスペクトルを比較しても意味がないという点に注意する必要がある．

一般的な蛍光光度計でも，液体窒素温度での測定を可能にするユニットを増設することにより測定が可能になるが，機種によっては特注による改造が必要となる．試料を冷やす方法としては，試料セル自体を液体窒素に浸す場合と，試料セルの金属部分を一部液体窒素に浸して熱伝導によって温度を下げる場合の二通りがある．前者の場合は，測定光の光路が液体窒素の中を通るため，特に熱の絶縁が不完全な場合，液体窒素の中の泡が測定を妨害する場合があることに注意する．また，後者の場合は，冷えた試料セルが空中にでているため，場合によっては霜が付いて測定を妨害する場合があるので注意する．蛍光光度計では，測定光の光路と検出する蛍光の光路が直角になっている場合が多い．液体窒素温度による測定では試料が凍結するため試料の散乱が大きいので，試料セルは 1 mm 程度の薄いものを用いる．その際，試料セルの向きがちょうど測定光と 45 度の角度に配置されると測定光の反射光が検出器に入ってしまうので，どちらかに少しずらしておくことが望ましい．

光化学系の量比を測定する場合，試料は，5 分程度の暗順応をしてから暗所で凍結するとステート遷移の影響が避けられ，再現性のある結果が得られる．測定波長は 650 nm から 770 nm 程度までによい．励起光は 430 nm 付近の青い光を用い，その場合スリット幅は最大で構わない．蛍光を検出する側のスリット幅は 2 nm 程度とすることが多い．陸上植物の場合は 650 nm においては蛍光は通常発光しないので，この波長における信号の強さを蛍光のゼロ点としてよいが，紅藻やシアノバクテリアといったフィコビリンを含む生物では，きちんとバックグラウンドを測定する必要がある．水やバッファーによるバックグラウンドの測定により，励起光の反射などに起因する迷光などのアーティファクトの存在も確認することができる．ただし，試料が存在する条件では試料の吸収によって迷光の大きさは減少するので，バックグラウンドを単に引き算することによってアーティファクトを補正することが困難な場合もある．

光化学系の量比の指標としては 685 nm の蛍光強度 F 685 もしくは 695 nm の蛍光強度 F 695 と 735 nm（実際には極大波長を取るのでシアノバクテリアなどでは 725 nm）の蛍光強度 F 735（F 725）の比，つまり F 735/F 685 もしくは F 735/F 695 を用いる．高等植物の場合，F 695 に比べて F 685 の方が条件による変動が少ないため，F 735/F 685 を光化学系Ｉ／光化学系IIの比の指標として用いる場合が多い．シアノバクテリアの場合，685 nm の蛍光は，系IIのクロロフィル蛍光の他にフィコビ

リンの蛍光の寄与もあるので，F 725/F 695 を指標とする例が多い．いずれにせよ，これらの値は指標に過ぎず，光化学系Ⅰ／光化学系Ⅱのモル比を示すわけではないことに注意する必要がある．

3.a.1.4　低温蛍光スペクトルによるステート遷移の測定

藻類とシアノバクテリアにおいては，ステート遷移が光合成に与える影響が大きいため，液体窒素温度でクロロフィル蛍光スペクトルを測定することによって容易にステート遷移の大きさを見積もることができる．シアノバクテリアは原核生物であるため，細胞内の光合成電子伝達系が呼吸鎖と一部の電子伝達成分を共有している．また，藻類でも，大きな葉緑体呼吸が見られる．従って，これらでは，高等植物とは異なり，暗順応した細胞においてプラストキノンプールは還元されてステート２の状態になっている．一方で，光化学系Ⅱの阻害剤であるDCMU を加えて光を照射すれば，光化学系Ⅰの働きでプラストキノンプールは酸化されてステート１の状態になる．このようにして，細胞を簡単にステート１もしくはステート２の状態にすることができるので，5－15 分暗順応した細胞での蛍光スペクトルと DCMU を終濃度 10 μM 加え，光を１分ほど照射してそのまま液体窒素で凍らせて測定した蛍光スペクトルを比較すれば，ステート遷移を観察することができる．ステート２では光化学系Ⅱのアンテナサイズが小さくなっているので，相対的に光化学系Ⅱの蛍光は弱くなり，逆にステート１では光化学系Ⅰの蛍光が弱くなるはずである．２つの状態でクロロフィル蛍光スペクトルに差があればステート遷移が起こっている，差がなければステート遷移に異常がある，と結論できる．陸上植物でも理論的には同様な実験が可能であるが，ステート遷移の蛍光に対する寄与が小さいので，２つのステートごとに別々の測定が必要な本方法では試料間の誤差が生じやすく，正確な測定が難しい．従って陸上植物の場合は，後述するパルス変調などによる蛍光の連続測定中に励起光を変えることにより蛍光強度の変化を検出することによってステート遷移に関する情報を得る場合が多い．

3.a.1.5　クロロフィル蛍光の誘導期現象

暗所においた光合成細胞に一定の連続光を照射すると，その蛍光強度が図１のように複雑に変化することは 19 世紀から知られていた[2]．このような蛍光強度変化をクロロフィル蛍光の誘導期現象という．実際には，吸収された光のエネルギーは，光合成に使われ，また蛍光として際放出されるだけでなく，さまざまな反応を経て熱になる分も存在する．吸収された光のエネルギーがどのように変化するかは，さまざまな反応の競争の結果決まると考えられる．それぞれの反応の収率を足し合わせたものは１になると考えられるので，ある反応の変化は他の反応の相補的な変化を伴う．光化学反応に伴って蛍光の収率が減少することを光化学消光（photochemical quenching），熱放散の増大に伴って蛍光の収率が減少することを非光化学消光（nonphotochemical quenching）という．実際に，クロロフィル蛍光の誘導期現象において，蛍光収率と光合成の速度の間に負の相関があることは古くから指摘されていた．蛍光の収率自体は，当然のことながら熱になる反応の速度によっても左右されることから，蛍光の誘導期現象が，そのまま光合成速度の変化を示すわけではない．しかしながら，暗所においた葉に光合成が飽和するような光をあてて，１秒程度までの短い時間のクロロフィル蛍光強度の変化を見る場合には，その変化は主に光化学消光によると考えられる．そして，この蛍光挙動は暗所で酸化されていた光化学系Ⅱの電子受容体である Q_A が光照射によって還元される過程によってほぼ説明できる．すなわち，最初に Q_A が完全酸化されている状態 O（全ての反応中心が open である状態）では蛍光強度は最低（F_O）であり，Q_A が還元されていくに連れて（close した反応中心が増えるに連れて）蛍光強度は増加しやがて P で極大値（F_P）に達する．この P で，Q_A が完全還元されている場合（全ての反応中心が close である場合）は，この F_P は蛍光の最大値 Fm に等しくなる．蛍光の値は F_P 以後も，さらに電子伝達や炭酸固定の活性状態の変化により S-M_1-M_2-T と複雑な変化を示す場合が多い（図１）．この変化がどの程度の時間で引き起こされるかは，照射した光の明るさに依存することもあり，一定ではない．また，研究グループによって，O，P，S，M，T といった名前の付け方も様々である．

比較的強い励起光を用い，サブミリ秒からの短い時間

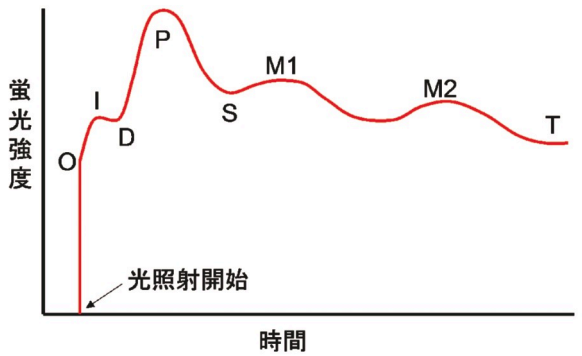

図１：暗所に順応させた葉に連続光を照射した時の蛍光強度変化の例

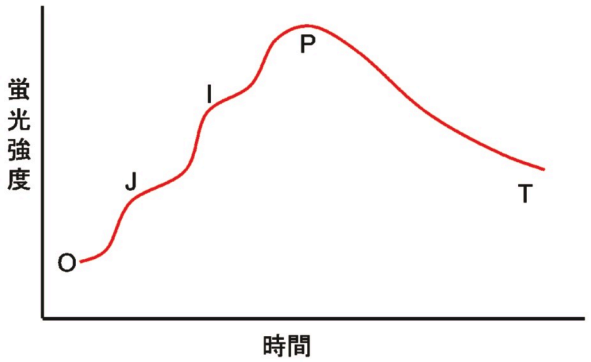

図2：暗所に順応させた葉に飽和光を照射した時のサブミリ秒からの蛍光強度変化を対数目盛で示した例

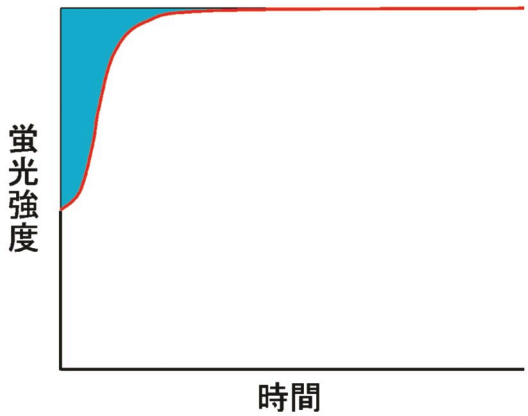

図3：DCMUで処理したチラコイド膜に連続光を照射した時の蛍光強度変化の例

スケールにおいて測定したクロロフィル蛍光を時間を対数にプロットした場合，F_O から F_P への変化は Q_A への電子伝達速度と Q_A から Q_B 以降への電子伝達速度の釣り合いを反映するため，複数の変曲点を持つ複雑な挙動を示す(図2)．2つの変曲点(JとI，場合によって I_1 と I_2 と記述する)を含めた誘導期現象(O-J-I-P)による光合成状態の解析は，Hansatech Instrument社のPlant Efficiency Analyzerによって簡便に行なうことができ，その方法論はJIPテストとしてStrasserらによって定式化されている[3]．Strasserらによって考案されたさまざまなパラメーターは，植物の光合成状態の変化を簡便にスクリーニングする方法として有用であるが，その変化の原因を特定することは通常難しい．

Q_A から Q_B への電子伝達をDCMUの添加により阻害した場合には，Q_A の還元速度だけによって蛍光挙動が決まるため，誘導期現象の立ち上がりは極めて速くなり，またより単純になる(図3，赤の線で示した変化)．実際には，単一の反応速度でこの蛍光の立ち上がりを記述することはできないが，それは，アンテナサイズの異なる2種類の光化学系(α センター，β センター)が存在することにより，Q_A の還元速度が均一ではないことによる．Q_A が時間と共に還元される量は図3の光照射開始からある時間までの水色の部分の面積として計算しうるため，この面積の時間変化を解析することにより，アンテナサイズの解析などを行なうことができる．

このように，Q_A の酸化還元を反映する光化学消光だけでもさまざまな因子の影響を受けるのに加え，キサントフィルサイクルなどのエネルギーを熱として放散する反応を反映する非光化学消光もクロロフィル蛍光に影響を与えるため，クロロフィル蛍光挙動の解釈には常に困難がつきまとう．これを解決するためには，3.a.2.2節で述べるように飽和パルス光の導入などにより，要因の切り分けを行なう必要がある．

3.a.1.6 ポンプ&プローブ法

蛍光の測定においては，色素を励起するための測定光を試料に当てる必要があるが，従来の方法では，測定光に弱い連続光を使用し，この連続光が光合成を駆動する励起光の役割も果たす．これに対してポンプ&プローブ法では，この測定光に短く強いパルス光を用い，光合成の励起には別の光源(閃光またはパルス光のことが多い)を用いる．ポンプ&プローブの「ポンプ」とは，光合成の励起に用いる最初の閃光照射のことで，「プローブ」はその後のパルス光による測定のことを指す．通常の連続光による蛍光測定の場合は，測定光による励起効果が無視できないが，このようなパルス光を用いた場合は，パルスの持続時間を短くすれば，パルス強度を強くしても，時間平均したときの光の強さは連続光に比べてきわめて小さくなる．従って，ポンプ&プローブ法では，(1)事実上励起効果を持たない(見かけ上暗所での)蛍光測定が可能になる，(2)測定パルス光の強度を上げることができるため感度のよい蛍光測定が可能になる，という2つの利点がある．このような利点を持つポンプ&プローブ法は，(1)測定光が励起作用を持つと測定が困難となる，閃光照射後の蛍光時間変化の追跡，(2)きわめて希薄な溶液(例えば海水そのもの)の蛍光測定などの感度を要求される測定，といった場合に用いられる．

通常，ポンプ&プローブ法では，まず，光化学系IIを還元する閃光を照射する(図4)．この閃光により Q_A はまず還元され，次いで再酸化されるという時間変化を示し，それによって蛍光の収率変化が引き起こされる．この際，最初の閃光照射(t0)からある一定時間後(t0+Δt)に測定パルス光を照射して蛍光を測定する．このΔtを変化させて繰り返し測定を行うことにより，蛍光の時間変化，つまり Q_A の酸化還元状態の時間変化を知ることができ

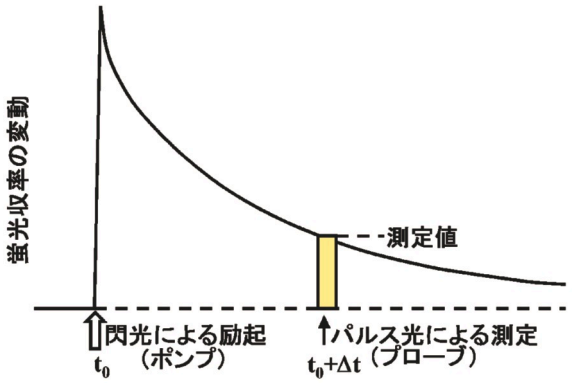

図4：ポンプ＆プローブ法による蛍光収率の測定

る．閃光照射後の蛍光の立ち上がり（Q_A の還元）速度は，光化学系IIのアンテナサイズに依存するので，この立ち上がり速度からアンテナサイズに関する情報を得ることができる．また，Q_A の再酸化は，Q_B への電子伝達によって起こるので，図5のように光化学系を1回だけ励起するシングルターンオーバーフラッシュ後の蛍光の減衰の初期速度を見ることによって Q_A から Q_B への電子伝達速度を見積もることができる．特に後者のような情報は，原理的に定常光による蛍光測定では難しく，ポンプ＆プローブ法の利点がもっとも良く生かされる測定例である．Waltz 社のキセノン PAM 蛍光測定装置においては，このような測定原理により高感度の測定が可能となっている．測定パルスの励起効果を最低限に抑えるために，通常は1回の励起閃光後の測定で測定パルスは1回しか用いないが，測定パルスの励起効果が無視できるときは，閃光照射後に測定パルスを複数回当てることにより，1回の測定のみで時間変化を求めることもできる．Photon System Instruments 社の二重変調蛍光測定装置においては，この方法がとられている．

特殊な応用例として，蛍光カメラによる2次元蛍光画像時間分解解析が上げられる．蛍光を CCD カメラによって捉えて画像として解析する際に，測定パルスと同期させてシャッターを切ることにより，上記のパルス＆プローブ的な効果を得ることができる．この場合，測定パルスとは別に，光合成を励起させるための定常光を当てることにより，蛍光の誘導期現象を2次元画像で捉えることが可能となる（蛍光イメージングの節3.d を参照）．

3.a.2　パルス変調蛍光測定

3.a.2.1　パルス変調蛍光測定

PAM という言葉は Pulse Amplitude Modulation（パルス変調）に由来し，この後半の Amplitude Modulation はラジオで使う AM と同じである．AM ラジオでは，放送局によって決まった周波数のラジオ波を信号に用い，音の強弱を波の振幅の大小に変換して送る．ラジオを聞く人が自分の聞きたい放送局の放送だけを聞くことができるのは，さまざまな周波数のラジオ波のうち特定の（自分の聞きたい放送局の）周波数の信号だけを増幅しているためである．ある周波数成分に信号を載せて送れば，それ以外に他の信号が飛び交っていても，それらの信号が別の周波数成分である限り無視することができる．パルス変調蛍光測定（PAM）においては，この変調の技術を利用してノイズを減らすと共に，以下に述べるようなさまざまな光源を用いた測定が可能となっている．

従来の弱い連続光を使う蛍光測定では，測定光が励起光の役割も兼ねていた．この場合，連続光の強さが弱いと（図6，赤の線で示した変化）蛍光の最大値 Fm を求めることができない一方，光が強くなると（図6，青い線で示した変化）蛍光の立ち上がりが速くなり，F_0 を正確に求めることが困難となる．蛍光測定におけるパルス変調とは，この測定光を，短い繰り返しパルス光で行い（図7 A），試料からの発光のうち，測定パルス光の繰り返し周期と同じ蛍光成分だけを増幅して測定値とする（図7 B）．この方法は，測定にパルス光を用いる点では上述

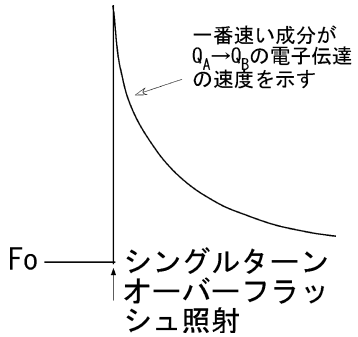

図5：蛍光による Q_A から Q_B への電子伝達速度の測定例

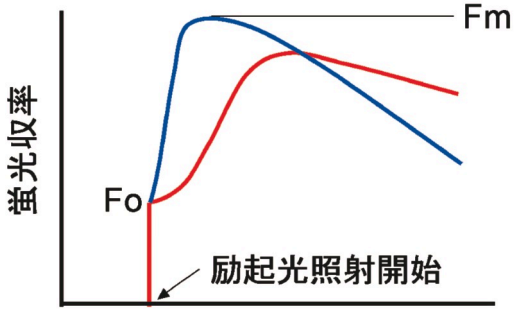

図6：連続光照射によるクロロフィル蛍光測定の問題点（赤：励起光が弱い場合，青：励起光が強い場合）

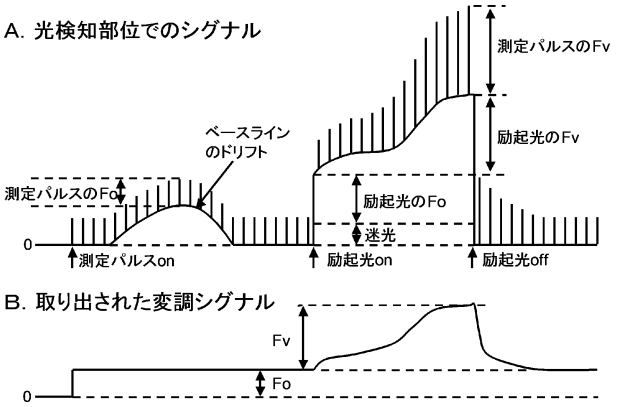

図7：パルス変調法による蛍光測定の原理（A：光検知部位での蛍光強度，B：取り出された変調シグナルの大きさ）

のポンプ＆プローブ測定と似ているが，一定の周波数（実際には1 kHz～100 kHz）の信号だけを増幅する点が大きく異なる．このような測定方法は，2つの大きな利点をもたらす．1つ目は，ポンプ＆プローブ法と同様，測定パルス光の強度をある程度強くしても，パルスの幅を非常に短くすれば，時間平均したときの光の強さを連続光を使用したときに比べて，非常に小さく抑えることができる点である．つまり，適切なパルス強度と周波数を選べば，測定光による光合成系の励起は無視できるくらいに小さくなり，暗所での蛍光 F_O を正確に測ることができる（図8）．さらに，変調という方法の特性上，繰り返し周期を持たない光による蛍光は増幅されないので，他の光が当たっている状態でも測定が可能になる．図7に示すように，ベースラインのドリフトや迷光があっても，それらは繰り返し周期を持たないので，（測定光の周波数と同じ周波数を持つノイズでない限り）信号としては現れないので，非常に安定した感度での測定が可能であり，生葉などでも充分な測定結果を得ることが可能である．同様に外部から連続的な励起光や単発のパルス光を与えた場合も，励起光自体による蛍光は増幅されない（図7 B）．検出されるのは，励起光による蛍光収率の変化のみとなる．つまり，必要であれば，野外で自然光が当たっている条件での蛍光の収率をも測定することができる．ただし，ポンプ＆プローブ法に比べると測定パルスの照射回数が非常に多くなるため，励起効果を避けるためには1回のパルス強度は小さくせざるを得ず，一般的に，絶対的な感度はポンプ＆プローブ法よりも低くなる．

3.a.2.2　飽和パルス光の導入

前節で述べた測定パルス光に加えて，パルス変調蛍光測定においては，もう一種類，飽和パルス光と呼ばれる光源が測定に用いられる．クロロフィル蛍光挙動の解釈を困難にしている1つの原因は，Q_A の酸化還元（光化学消光）と熱放散系の変化（非光化学消光）という2つの要因が共に蛍光を変化させる点にある．しかし，20 ns程度で起こる Q_A の還元に対して，熱放散系の変化はずっと遅い．従って，光合成を飽和させるような短いパルス光を与えることにより，熱放散の状態は変化させずに Q_A だけを還元することができる．飽和パルス光照射前の蛍光収率と照射中の蛍光収率の差は，Q_A の還元を反映するはずである．一方，この飽和パルス光照射中の蛍光収率は熱放散による影響を主に反映する．このようにして，飽和光を導入することにより，蛍光挙動に影響を与える2つの要因を分離することができる．このようにパルス変調に飽和パルス光を組み合わせることにより光化学消光と非光化学消光を区別して見積もる測定方法をクエンチング測定という．前項で説明したように，パルス変調法によって始めて，飽和パルス光によって引き起こされる蛍光収率の変化を飽和パルス光が励起光となって生じる蛍光の変化から分離できる．飽和パルス光を導入したクエンチング解析はパルス変調法の利点を最大限生かした手法であると言える．

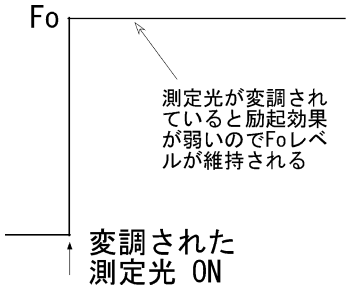

図8：パルス変調による F_O の測定

3.a.2.3　一般的なクエンチング測定

暗順応させた植物の葉をパルス変調蛍光測定装置による測定する例を以下に紹介する（図9）．測定パルスの照射を開始すると蛍光は F_O レベルまで上がる．前述した

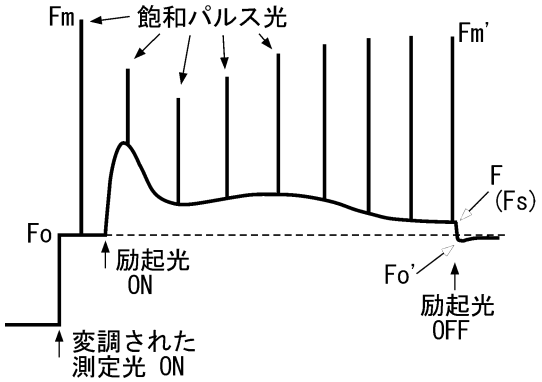

図9：パルス変調法への飽和パルスの導入

ように，測定パルス光の時間平均した強さは非常に弱いので，そのままでは蛍光は F_o レベルのまま変化しない．そこへ，飽和パルス光をあてると Q_A が一時的に還元されて蛍光は最大レベルの Fm にまで上昇する．パルス変調の場合，この蛍光レベルの上昇は，飽和パルスが励起した色素からの蛍光が加わるためではなく，飽和パルスによって Q_A が還元されて蛍光の収率が上がったことによる間接的な影響が現れるためである．一般的にパルス変調測定方法においては，蛍光の収率の変化を測定していると考えてよい．飽和パルス光は通常 10－20 秒間隔であて続けることが多い．次に光合成を駆動する励起光の照射を開始する．これは連続光なので，やはり励起光による直接の蛍光は観察されず，励起光により蛍光の収率が変化した間接的な結果として蛍光収率の変化が見られる．蛍光レベルは光化学消光と非光化学消光の 2 つの要因により変化しながら最終的に一定の値 Fs（F という場合もある）に落ち着く．一方，この間，飽和パルス光があたっている時には Q_A は完全に還元されるので，その時の蛍光強度 Fm'は非光化学消光の影響だけを受けることになる．つまり，Fm' の値をつないだ線の変化は，非光化学消光の変化を示すことになる．励起光を停止すると，Q_A の酸化により蛍光は減少するが，その時の蛍光の最小レベル F_o' は最初の F_o レベルより小さくなる場合がある．これは，励起光停止後，Q_A の再酸化は速やかに起こるのに対し，非光化学消光の解消は遅いため，非光化学消光により蛍光強度が F_o レベルよりもさらに減少することによる．

この測定によって得られるそれぞれの時点における蛍光の強度（F_o，Fm，Fm'，Fs，F_o'）から蛍光パラメーターを計算することにより光合成の状態を知ることができる．パラメーターの意味及び計算方法は次節に譲り，ここでは，実際の測定にあたっての注意点について述べる．

a）暗順応の時間

測定前の暗順応の時間は，測定が何を目的としているかによって異なる．もし，電子伝達の量子収率 Φ_{II} のみを知りたいのなら，パラメーターの算出には Fm や F_o は必要ないので，そもそも暗順応をする必要はない．場合によっては，励起光すら必要でなく，栽培・培養している所へ，単にパルス変調測定装置のグラスファイバーを近づけて測定すれば生育光強度での Φ_{II} は求まる．次に，短時間のストレス処理などをした後の光合成効率の変化などを知りたいときには，暗順応は 5 分程度で測定することになる．当然ながらストレスの影響は処理終了後，徐々に小さくなるので，あまり長く暗順応を行なうと，結局処理の効果を見ることができない．逆にその植物の葉の最大の能力を知りたいときには，非光化学消光などがほぼ解消すると思われる 30 分以上の暗順応をすることが望ましい．ただ，冬季の樹木の葉などでは，日中の低温光ストレスによる光合成効率の低下が，夜の間に完全には回復せず朝まで残る例なども報告されており，30 分おけば最大能力が求まるとは断言できない．

b）励起光照射の時間

励起光の照射を開始したあとには，一時的な蛍光収率の変動があり，通常は数分でその変動が Fs に落ち着く（定常状態になる）ので，そこで励起光を停止して F_o' を測定する．しかし，場合によっては，だらだらと蛍光収率が（たいていは低い方へ）変化し続けるような場合もある．特に，光阻害に弱い変異体を生育光と異なる光環境においた場合など，なかなか定常状態にならない場合がある．光阻害が時間によって進行するような場合は数時間蛍光強度が変化し続ける場合もあるので，基本的には大きな変動が落ち着いた状態を準定常状態と考えて励起光を打ち切ることになる．また，一定値になるのを待っていると F_o より蛍光が小さくなってしまう場合もある．これは，シロイヌナズナの変異体などにおいてはしばしば見られ，非光化学消光が非常に強く誘導されることが原因であると考えられる．この場合には，Fs が一定の値に落ち着くのであれば，F_o よりも値が小さくなること自体は問題ない．いずれの場合においても，励起光を止めた後に，再び元の F_o のレベルに戻るかどうかが一つの判断の目安となる．F_o レベルに戻らない場合は，不可逆的な阻害が進行していると考えられ，より励起光を弱くするなどの対策が必要となる．

c）F_o'の測定

上述のように，強い励起光照射下では F_o 自体も非光化学消光ににによって F_o' まで低下する．この F_o' のレベルを求めるためには，非光化学消光が減衰しないうちに Q_A の再酸化が完了する（光化学消光が 0 になる）必要がある．光化学系 II の下流に何らかの阻害が見られる場合などは，励起光を消すと同時に光化学系 I に選択的に吸収される 700 nm 以上の光を照射して Q_A の速い再酸化を保証する必要がある．ただし，藻類やシアノバクテリアにおいては，第 5 章で述べるように暗順応した状態で，既に蛍光の消光が見られるため，F_o' のレベルが F_o レベルよりも高くなる場合が多い．陸上植物においても，F_o' レベルの測定をきちんと行なうことはそれほど容易ではなく，励起光が弱い場合などにおいては F_o' レベルが F_o レベルより大きくなる場合もあり，パラメーターの計算において，F_o で代用する場合もある．また，F_o' を実測

せず，

$$F_o' = F_o/\{(Fv/Fm)+(F_o/Fm')\} \quad (1)$$

という式を用いて，計算で求める方法も提案されている[4]．

この他の測定機器の設定項目の調整については3.a.4で述べる．

3.a.3　クエンチング測定結果の定量化と解釈

3.a.3.1　qNとNPQ

上述のように，蛍光の誘導期現象を引き起こす原因は，光化学消光と非光化学消光にわけて考えることができるので，それぞれを分離して定量化することが必要となる．蛍光の強度自体は励起光の強さ，試料中のクロロフィル濃度などによって変化してしまうので，他の試料・条件と比較することはできない．そこで，相対値の形をとることになる．

暗順応した葉の蛍光の収率は，Q_A の酸化還元に依存して，値が F_o から Fm まで変化する．ここにある一定の励起光があたると，非光化学消光が増大することにより，蛍光の値は，Q_A が完全に還元しているときは Fm から Fm' へ，完全に酸化しているときは，F_o から F_o' へ低下する．また，Fm と F_o の差である Fv は Fv' へと低下する．そこで，ある励起光照射によって，どれだけ蛍光収率が低下するかを qN という以下のようなパラメーターを使って表す．

$$qN = 1-(Fm'-F_o')/(Fm-F_o) = 1-Fv'/Fv \quad (2)$$

この qN は非光化学消光の指標となる．消光（quenching）とは蛍光収率が減少することで，この計算式では，熱になる反応が大きいときに消光のパラメーターが大きくなるように，1から引き算をしている．暗所では，Fv'＝Fv なので qN は0になる（高等植物の場合，シアノバクテリアの場合は3.a.5を参照）．一方，消光が最大限になって $Fm' = F_o'$ (Fv'＝0) となる時，qN は1になる．つまり，qN は非光化学消光の大きさに依存して，0から1の値を取る．単に消光を定量化するだけなら 1−Fm'/Fm でも $1-F_o'/F_o$ でもよいが，その場合，Fm' や F_o' は0にはならないので，定量化した値は1までは大きくならない．Fv を使うと（実際に実現するかどうかは別として）理論的には qN＝1−Fv'/Fv は1になりうる．

非光化学消光の主な原因は，1）チラコイド膜のプロトン濃度勾配ができたときのキサントフィルサイクルなどによる過剰エネルギー消去，2）アンテナ複合体の反応中心間の移動（ステート遷移）による蛍光収率の減少，3）光化学系IIの光阻害による蛍光収率の減少が主なもので，高等植物においては，プロトン濃度勾配によって誘導されるキサントフィルサイクルの寄与が大きい（図10）．この3つの成分を区別して測定する方法が，Quick and Stitt によって提案されている[5]．励起光を切ったあとの非光化学消光の解消を考えた場合，プロトンの濃度勾配は，ATPase を通したプロトンの流出により数十秒の時間スケールで解消する一方，ステート遷移は10分程度で起こり，光阻害の修復には通常数十分の時間を必要とする．従って，これらの3つの要因は，励起光を消した後の qN の低下（Fm' の上昇）の時間経過を観察すれば区別することができることになる．励起光を消したあとも飽和パルス光を当て続け，その飽和パルス光による蛍光の変化を観察していき，それぞれの時点の Fm'の大きさから図11のように a，b，c などを求めると，Quick and Stitt の計算式では，

$$q_f = 1-a/c \quad (3)$$
$$q_m = 1-c/d \quad (4)$$
$$q_s = 1-d/e \quad (5)$$

として，蛍光消光のうち早く減衰する成分 f，中間の成分 m，遅い成分 s を分けることができる．これらの数値は，

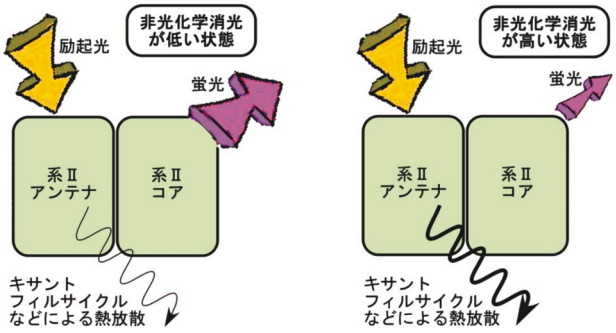

図10：非光化学消光の概念図

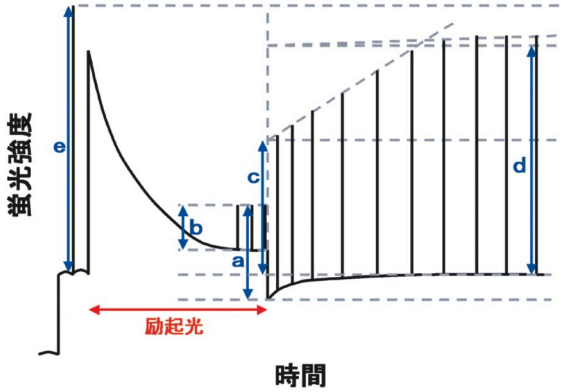

図11：非光化学消光の解析例

$$qN = 1 - a/e \qquad (6)$$

であることを考えると，全体の非光化学消光 qN と

$$1 - qN = (1 - q_f)(1 - q_m)(1 - q_s) \qquad (7)$$

という関係で結びつけられる．つまり各成分の積で全体が表されることになる．そしてこれらの成分は，阻害剤を使った実験などに基づき，それぞれプロトン濃度勾配による項 qE，ステート遷移による項 qT，光阻害による項 qI に相当すると解釈される．

さて，これだけだと簡単そうで，実際にあまり考慮を払うことなくこの方法を適用している論文も見られるが，実際には，3 つの成分がきちんと分かれる条件は，植物によっても異なることが報告されている．考えるべき条件としては，飽和パルス光の間隔と強さがある．飽和パルス光の間隔については，オオムギの葉では 100 秒以上の間隔をあければ，非光化学消光の緩和が妨害されないと報告されている．飽和パルス光の強さについては，非光化学消光が強く誘導されている条件では，光捕集効率が当然低下しているので，より強い光が飽和に必要となる．オオムギの葉の場合は，励起光を切って 5 秒後の時点では，3,400 μmol/m^2/s の光でもまだ飽和しないという報告がある．励起光を切って 30 秒以上すれば 2,100 μmol/m^2/s の光で飽和するとのことなので，30 秒以後のデータだけを用いれば問題ないと思われる．

qN のかわりに NPQ というパラメーターを非光化学消光の指標として用いる場合もある．qN は，その計算式の中に，F_o' を含むために，きちんと計算しようとすると励起光を一旦消して測定を行なう必要があり，連続的な測定ができない．そこで，

$$NPQ = (Fm - Fm')/Fm' \qquad (8)$$

というパラメーターが考案された．これならば，最初に暗所で Fm を測っておけば，あとは，連続的に Fm' を測定していくだけで，パラメーターを計算できる．また，このパラメーターは，どれだけ Fm が励起光によって消光されて Fm' になったかを，相対的に示すものなので，直感的にも理解しやすい．このパラメーターは，分母が Fm ではなく Fm' になっているので，1 以上の値を取ることもある．qN も NPQ も厳密な理論的バックグラウンドがあるものではなく，経験的なものである．従って，実用的に使いやすい方を使えばよいと考えて構わない．一般に，弱光領域では qN の方が大きく変化するので，弱光領域での非光化学消光の変化を敏感に捉えたいときは qN がよい．一方，qN は強光領域では飽和するので，強光領域も含めた広い領域の変化を捉えたいときは NPQ の方がよいだろう．また，NPQ は，F から F' への蛍光の消光に関する Stern-Volmer の関係

$$F/F' = 1 - k\tau[Q] \qquad (9)$$

が Fm において成り立つとした時の $k\tau[Q]$ に相当するので，消光物質の濃度 [Q] と比例関係にあると考えられる（k は消光の速度定数，τ は蛍光寿命）．そのため，非光化学消光の原因となるキサントフィルの脱エポキシ化の程度や，非光化学消光を起こす物質の濃度，非光化学消光の反応速度などとの相関は NPQ の方が高いとされる．キサントフィルサイクルや非光化学消光との定量的な関連づけを行いたいときは NPQ の方が適切である．

3.a.3.2 qP と qL，q_{CU}

次に，光化学消光の定量化を考える．光化学消光においては，Q_A の還元に伴って蛍光収率が増大すると考える（図 12）．ある一定の励起光があたっているときは，非光化学消光によって蛍光の収率は変化し，Q_A が完全に酸化もしくは完全に還元されている時の蛍光強度は，それぞれ F_o' および Fm' になる．励起光のもとでの定常状態になったときの蛍光 Fs を考えた場合，その時の Q_A の酸化還元状態に応じて Fs は F_o' と Fm' の間の値を取るはずである．そこで，F_o' と Fm' の差を 1 として Fs を標準化した値を qP とすると

$$qP = (Fm' - Fs)/(Fm' - F_o') \qquad (10)$$

となる．Q_A が完全に還元されたときは Fs＝Fm' となるので qP は 0 に，完全に酸化されたときは Fs＝F_o' となるので qP は 1 となる．つまり，qP は，Q_A の酸化還元状態に応じて 0 から 1 の値を取ることになる．

このパラメータは，当初，蛍光強度が Q_A の酸化還元状態を反映するという経験的な事実に基づいて考案されたが，光化学系 II が複合体間でエネルギー移動を行なわないというモデル（puddle model）を前提にした場合には，

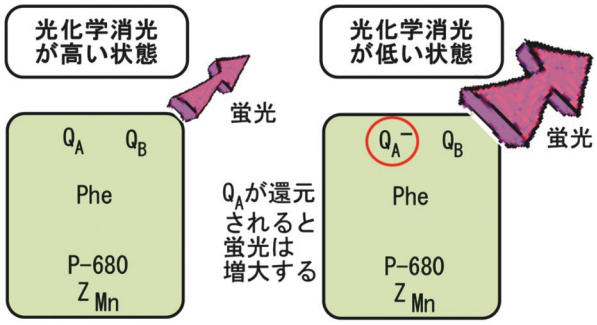

図 12：光化学消光の概念図

理論的に上式を導き出せることが示されている．しかしながら，実際の光化学系IIにおいては，複合体間のエネルギー移動が認められる．光化学系IIがアンテナを全て共有しているとするモデル（lake model）をもとに考案されたパラメーターqL は

$$qL=(F_o'/Fs)\cdot(Fm'-Fs)/(Fm'-F_o') \\ =(F_o'/Fs)\cdot qP \quad (11)$$

となり[6]，qP と qL の間には直線関係はない．lake モデルと puddle モデルの中間の状態をモデル化した connected unit モデルでは，光化学系IIの複合体間にある一定の確率でエネルギー移動が起こると仮定する．そこから導き出されるパラメーターq_{CU} は，エネルギー移動の確率を p とした時に

$$q_{CU}=(Fm'-Fs)/((Fs-F_o')\cdot p/(1-p) \\ +Fm'-F_o') \quad (12)$$

として表すことができる[6,7]．当然のことながら，p=0 では q_{CU} は qP に一致する．陸上植物では p=0.6 程度であるとの報告があり，その場合，q_{CU} は qP よりは qL に近い値を示す．

従って，一般的にもっともよく使用される光化学消光のパラメーターである qP は，Q_A の酸化還元状態との直線性という観点からすると，必ずしも適切ではないと考えることができる．ただし，多くのクロロフィル蛍光測定においては，Q_A の酸化還元状態との直線性よりも過去の文献の値との比較の方が重要である場合が多く，その意味では過去の蓄積の多い qP の有用性は高い．

3.a.3.3 Fv/Fm と Fv'/Fm'

次にもっとも有名なパラメータといってもよい Fv/Fm を考える．このパラメーターは，Kitajima and Butler によって最初に提出されたもので[8]，極めて簡単な前提から導出することができる．吸収した光エネルギーが，1）蛍光になる，2）光合成に使われる，3）熱になる，4）それ以外の方法で消光される，という 4 つの運命のどれかをたどると考え，それらの反応が k_F，k_P，k_D，k_Q という反応速度定数を持って競争しているとする．その場合，蛍光の収率は

$$\Phi_F=k_F/(k_F+k_P+k_D+k_Q) \quad (13)$$

となる．つまり，どれだけが蛍光になるかは全体の反応速度の中で，蛍光の反応速度がどれだけ速いかによって決まると考える．ここで，蛍光の収率と光合成の収率の関係を他の条件（k_D，k_Q）が変化しないとして考えた場合，光合成が働かない時（$k_P=0$）に蛍光の収率 Φ_F は最大値 Φ_{FM} を取るはずである．一方，光合成速度が最大の時($k_P=k_{PM}$)，蛍光の収率は最小値 Φ_{FO} を取る．ここで，今度は光合成の収率 Φ_P の最大値 Φ_{PM} を考えると

$$\Phi_{PM}=k_{PM}/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q) \quad (14)$$

となる．さて，Fm，F_O あるいは Fv はある時点での蛍光の強さを示すが，比のかたちであれば蛍光の収率に置き換えることもできるので，

$$Fv/Fm=(Fm-F_O)/Fm=(\Phi_{FM}-\Phi_{FO})/\Phi_{FM} \quad (15)$$

ここに，先ほどの式を k_P の値（0 または k_{PM}）を考えながら代入すると

$$Fv/Fm=\{k_F/(k_F+k_D+k_Q)-k_F/(k_F+k_{PM} \\ +k_D+k_Q)\}/\{k_F/(k_F+k_D+k_Q)\} \quad (16)$$

分子と分母に$(k_F+k_D+k_Q)/k_F$ をかけ算すると

$$Fv/Fm=1-(k_F+k_D+k_Q)/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q) \quad (17)$$

これを変形すると

$$Fv/Fm=k_{PM}/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q) \quad (18)$$

となるが，これは結局先ほどの式の右辺が同じなので

$$Fv/Fm=\Phi_{PM} \quad (19)$$

が導け，Fv/Fm が光合成の最大収率を示すことになる．この式の前提では 2.2 で説明した lake モデルが使われているが，この場合は puddle モデルを用いても全く同じ結果になる．

この Fv/Fm は暗順応した葉に飽和パルス光をあてるだけで求まる（図 13）ので測定が極めて簡便であり，広く使われている．高等植物では，最適条件で 0.8-0.83 の値が得られ，測定の再現性も高い．酸素発生の量子収率（1 光子あたり何分子の酸素が発生するか）は最適条件で，0.106 という報告がある．8 光子で 1 分子の酸素が発生し得ることを考えると理論上の収率は 0.125 になるはずであり，ここから予想される光合成の量子収率は

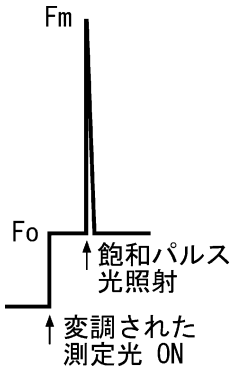

図 13：Fv/Fm の測定例

0.106/0.125＝0.85 となって Fv/Fm の実測値とほぼ一致する．

3.a.1.5 で述べたように，クロロフィル蛍光の収率変化は光化学系IIにおいて起こり，F_O から Fm への変化が Q_A の還元に伴って誘導されることを考えると，この Fv/Fm というパラメータは光化学系IIにおける P 680 と Q_A の間の電荷分離の量子収率を反映する．従って，Q_A から Q_B への電子伝達が何らかの要因（例えば DCMU の添加など）で阻害された場合でも，理想的な条件下では Fv/Fm は変化しないはずである．しかし，実際には，Q_A から Q_B への電子伝達が阻害された条件では，微弱な光によっても Q_A の還元型の蓄積が起こるため，測定光パルスによる F_O の上昇が見られ，結果的に見かけ上の Fv/Fm の低下が見られる．同様に，マンガンクラスターから Z までの酸素発生系が阻害された場合にも，飽和パルス光をあてている間の電子伝達が不十分になることから Q_A の還元が不十分になって Fm が低下し，結果として見かけ上 Fv/Fm が低下する．従って，Fv/Fm は光化学系IIのさまざまな収率低下を反映することになり，ストレス応答研究などにおいて光化学系IIの機能低下の指標として広く使われている．

Fv/Fm は暗所において Q_A が完全に酸化している条件での量子収率であるが，光が当たっている状態では，Q_A が部分的に還元され，同時に非光化学消光も誘導される．そのような条件での Q_A が酸化されている（open な）光化学系IIの量子収率を Fv'/Fm' として考えることができる．Fv/Fm が理論的に導出しうるものであるのに対して，Fv'/Fm' は半ば経験的なパラメーターであると考えた方がよい．それでも，Fv'/Fm' の振る舞いは qP と組み合わせることにより，次に述べるように極めて効果的に光合成の電子伝達の量子収率を記述することができる．

3.a.3.4 Φ_{II} と ETR

前述のように，ある一定の光が当たっている状態での，Q_A が酸化された状態の（open な）系IIの量子収率が Fv'/Fm' であるが，同じ条件で，Q_A が還元された（close な）系IIにおいては光化学反応は進行しないので，その量子収率は 0 として考えることができる．この場合，Q_A が酸化された光化学系IIの割合を qP とすれば，系IIを通る電子伝達の実効量子収率は，qP と Fv'/Fm' の積となるはずである．このパラメーターを Φ_{II}（Φ_{PSII} もしくは Yield と表記されている場合もある）と呼ぶ．この Φ_{II} は，

$$\begin{aligned}\Phi_{II} &= qP\cdot(Fv'/Fm') \\ &= (Fm'-Fs)/(Fm'-Fo')\cdot(Fv'/Fm') \qquad (20) \\ &= (Fm'-Fs)/Fm'\end{aligned}$$

と変形できるので，ある時点における蛍光 Fs とその時点で飽和パルス光をあてた時の蛍光 Fm' の 2 つの値があれば求まる．このように，極めて簡便に測定できるパラメーターでありながら，この値は実際に別の方法で求めた電子伝達の量子収率と非常によい相関があることが確かめられている[9]．

ここで，1 つ注意しなくてはならないのは，この Φ_{II} は光化学系IIを通る電子伝達の量子収率ではあるとはいえ，その値が光化学系II以外の要因によっても左右されることである．Φ_{II} のうち Fv'/Fm' の部分は光化学系IIの状態によって決定するが，qP は，シトクロム b_6/f 複合体であれ，光化学系Iであれ，炭酸固定系であれ，光化学系IIの下流に存在するコンポーネントが機能を失った場合は小さくなり，結果として Φ_{II} も小さくなる．従って，何らかの条件または処理で，電子伝達の量子収率 Φ_{II} が減少していた場合，その原因が qP にあるのか，Fv'/Fm' にあるのかを分けて考えてみれば，原因が光化学系IIの下流にあるのか，光化学系II自体にあるのかを見極めることができる．Fv'/Fm' が低下していた場合に Fv/Fm が低下していれば，光化学系IIの最大量子収率自体が低下していることになり，そうでなければ，励起光をつけたときに光化学系IIの量子収率を低下させる何らかのメカニズムが働いていることになる．後者であれば，熱になる反応の量子収率が高くなる場合が多いので，通常，qN（NPQ）の上昇が観察される．このようにして，光合成の低下の原因を切り分けることが可能である．

なお，この Φ_{II} に関しては，光化学系IIのエネルギー移動モデルから導出可能であり，しかも，lake モデルでも puddle モデルでも同じ結果を与える．このことは，qP が puddle モデルからのみ示されることを考えると，Fv'/Fm' が qP と同様モデル依存的であることを示す．従って，Q_A の酸化還元状態（光化学消光）の指標として qL を用いる場合は，Fv'/Fm' の代わりに（Fs/F_O'）・Fv'/Fm' を考える必要がある．

さて，Φ_{II} は電子伝達の量子収率なので，これに吸収された光量子数をかければ，電子伝達の速度（ETR と略称）が求まるはずである．あたっている光量子数はすぐに測定でるが，吸収された光量子数の実測は簡単でないため，蛍光測定機器についているプログラムでは，照射光量子数に葉の吸収係数として 0.84 をかけて吸収された光量子数としている場合が多い．実際の葉の吸収係数は植物種によっても葉によっても異なるので，このようにして求められる ETR は便宜的なものであることに注意しなければならない．さらに，光化学系は光化学系Iと光化学系IIが直列に電子伝達を行なうので，吸収された光の

うちどれだけが光化学系IIに分配されるかによって電子伝達速度の見積は異なることになる．一般的に，反応中心あたりのアンテナクロロフィルの数は，高等植物においては光化学系I，系IIともに200程度なので，光化学系Iと光化学系IIはほぼ1：1に光を吸収すると考え，

$$ETR = \Phi_{II} \cdot PAR \cdot 0.84 \cdot 0.5 \quad (21)$$

として計算している例が多い．ここでPARというのは光合成有効放射Photosynthetically active radiationの略で，クロロフィルが吸収できる範囲の波長の面積時間あたりの光量子数である（単位は mol $m^{-2}s^{-1}$）．

このようにして計算したETRは，必ずしも炭酸固定速度の実測値と一致しない．これは，上記の前提（葉の吸収係数や光化学系間のエネルギー分配比）が正確ではないことにも由来するが，電子伝達によって作られた還元力のうちに炭酸固定に使われない部分があることも大きな要因となる．この点については，本書の光合成とクロロフィル蛍光の同時測定の項で述べられている．

なお，ETRの推定は，照射光量子密度が高い領域では収率 Φ_{II} が小さくなるため誤差を多く含むようになる．一方で，照射光量子密度の測定自体は比較的小さい値でも誤差が少ないので，一般的にETRの相対的な誤差は照射光量子密度が低い領域でも比較的小さい．これは，ガス交換による光合成速度の見積などの場合と逆であるので注意が必要である．

3.a.3.5　その他のパラメーター

上記の一般的なパラメーターの他に，吸収した光エネルギーの行方という観点からいくつかのパラメーターが提案されている．そのうちの一つ，Excessというパラメーターの考え方においては，吸収したエネルギーを，反応中心に伝えられる前にLHCII内でキサントフィルサイクルなどで消去される部分と，反応中心に伝えられる部分に分け，この割合は，反応中心がcloseであるかopenであるかによらないとする．つまり，openな反応中心では反応中心にエネルギーが伝わる収率がFv'/Fm'であるが，これがcloseな反応中心でも成り立つとする．逆に言うと，1−Fv'/Fm'がLHCII内で安全に消去されたエネルギーとなる．残ったFv'/Fm'が反応中心へと伝えられ，このうち反応中心がopenなものでは，電子伝達にエネルギーが使われるので，電子伝達の収率は前項で述べたようにqP·(Fv'/Fm')になる．一方，残りのcloseな反応中心にいったエネルギーを

$$D = (1 - qP) \cdot (Fv'/Fm') \quad (22)$$

と定義し，光化学反応にも使われず，かつキサントフィルサイクルなどによって安全に消去されることもなかった「過剰な」エネルギーとしてExcessと呼ぶ[10]．実際にDの大きさは光阻害の速度とよい相関を持つことがKatoらによって報告されている[11]．

一方，光阻害は光化学反応の結果生じるものであり，「過剰な」エネルギーによって説明されるべきではないとする考え方もある．その場合，吸収されたエネルギーは，1）光化学反応に使われる割合 Φ_{II}，2）光によって誘導される熱放散系によって熱になる割合 Φ_{NPQ}，3）熱または蛍光になる定常的な割合 $\Phi_{f,D}$，のどこかへ使われることになる．これをlakeモデルから導くと，

$$\Phi_{NPQ} = Fs/Fm' - Fs/Fm \quad (23)$$

$$\Phi_{f,D} = Fs/Fm \quad (24)$$

となり，これらに $\Phi_{II} = 1 - Fs/Fm'$ を足した合計は1となる[12]．ほぼ同じ意味を持つパラメーター Φ_{NPQ} と Φ_{NO} がもう少し複雑な形式で定義されている[6]．

3.a.4　パルス変調クロロフィル蛍光の測定条件

3.a.4.1　測定光の設定

パルス変調における測定光は，通常1マイクロ秒程度の長さのパルス光である．WaltzのPAMシステムでは，650 nm付近に発光極大があるLEDが測定光に使われ，周波数，強度を最大に設定したときの平均光量子密度は10 μmol $m^{-2}s^{-1}$ 程度である．パルス変調による蛍光測定の眼目の1つは，測定光による光合成の励起がほとんどなくすことができる点であるが，設定がいい加減な場合，これが実現しない場合がある．光合成系が励起されているかどうかは，測定パルス光をonにしたのちに，蛍光強度が変化していないかどうかでチェックできる．測定パルス光はきわめて短い時間（WalzのPAMシステムの場合100 μ 秒以下）で安定するので，もし，スイッチを入れたあとに蛍光強度の増加が見られたら，測定パルス光による励起効果と考えられる．測定パルス光の強度を高く設定せざるをない場合は，測定の直前まで測定パルスをoffにしておくとよい．

測定パルス光の強さは，1）パルスの持続時間，2）パルスの強さ，3）パルスの周波数，という3つのパラメーターのかけ算で決まる．このうち，パルスの持続時間は通常変えられない．また，パルスの周波数も，通常固定か，2種類の切り替えであり，連続的には変えられない．従って，実質上は，測定パルスの強さを変化させて，励起効果のない最大限の強さで測定すればよいことにな

る．

測定パルスの周波数が切り替えられる場合は，測定パルスの周波数が高いと励起効果も高くなるので，通常，低い周波数で測定を開始し，連続励起光の照射開始時，もしくは，励起用フラッシュ光の照射の直前に，高い周波数に上げることになる．Waltz の PAM ではこの切り替えを Auto 100 kHz モードという方法で行なう．この場合，トリガーによって飽和パルス光照射の 3 ms 前に周波数を自動的に切り替えることができる．周波数が高ければより大きなシグナルが得られ，従って信号ノイズ比（S/N 比）を減らすことができる．また，1 kHz の周波数で測定すれば，測定間隔は 1 秒に 1000 回なので 1 ms より速い変化は検出できないが，100 kHz の周波数で測定すれば 10 μs の変化まで捉えることができる．Q_A の酸化還元のような速い時間スケールの測定を行う場合は，高い周波数での測定が必須となる．ただし，Q_A の再酸化速度の測定の時のように単発の飽和パルス光の直前に高い周波数に切り替える場合は，パルスのあと，励起光がない状態で高い周波数での測定を続けると，蛍光強度変化の遅い成分が強調された形になる可能性があることを頭に置いておく必要がある．このような場合は，タイマーを使って 10 ms 程度でもとの周波数に戻すのがよい．

3.a.4.2　飽和パルス光の設定

飽和パルス光は Q_A を完全還元するのに充分なだけ強くなくてはならない一方，光合成系への一般的な影響を最小限にするため必要以上に強くてはならない．飽和パルス光の影響の大きさも，パルスの持続時間と強度のかけ算で決まる．一般的に，高等植物の葉では，連続光源からの 800 ms 程度の持続時間に設定したパルスが使われる．Waltz の PAM システムで使われる連続励起光光源 FL103 は Schott の KL1500 という光源を改造したもので，スイッチをオンにした直後の過電流を避けるため，最初の 300 ms は光が照射されず，さらに最大の光強度に達するまでに 200 ms かかる．従って，持続時間を 800 ms に設定した場合，実際に所定の光強度があたっている時間は，800－300－200＝300 で 300 ms ということになる．パルス強度は，実際に何段階か変えてみて，一番高い Fm を与える強度を選ぶのがよい．変調がうまく働いているときは，原理的には飽和パルス光自体は測定装置に影響を与えないが，飽和パルス光があまりにも強いと飽和パルスの反射光などが測定フォトダイオードに入ることによる影響を充分に除けなくなる．その場合は，光源に 700 nm 以下の光だけを通す short-pass フィルターを入れることにより，測定フォトダイオードを保護することができる．ちなみに，Waltz の PAM システムでは，測定光の平均光量子密度の 100 万倍までの非変調光は，変調作用によりシステムに影響を与えないとされている．

連続光源を使う代わりに，閃光を飽和パルス光として使う場合もある．閃光の場合，持続時間は 50 ms 程度必要となる．この場合，持続時間が短いので，充分光が飽和しているかどうかを確認する必要がある．また 50 ms という短い持続時間では，記録計のペンの速度が追いつかない場合がほとんどなので，Waltz のマルチプルターンオーバーフラッシュについているようなデータ保持機能を通して記録計に出力するか，オシロスコープやパソコンへデータを取り込んで処理する必要がある．なお，高等植物とは異なって，シアノバクテリアや藻類では，非光化学消光による蛍光強度の減少が非常に速い時間スケールで起こる（3.a.5 参照）．この場合も，正確な Fm の測定のためには，データ保持機能やオシロスコープ，パソコンの使用が必要となる．また，Waltz のマルチプルターンオーバーフラッシュには初期設定で青色フィルターが入っており，これは陸上植物においては問題ないが，紅藻やシアノバクテリアにおいてはフィコビリンを励起しないために飽和光として十分に働かない場合がある．その場合は，フィルターを取り外す必要があるが，その状態で陸上植物の葉の測定を行なうと強すぎる励起光による副作用が出る場合があるので注意を要する．

3.a.4.3　励起光の設定

励起光をどれだけの強さにするのかは，実験の目的によって異なる．一番よいのは，励起光の強さをふって，励起光強度依存性をきちんと測定することである．シアノバクテリアにおける qN の励起光強度依存性のように，それによって新しい情報が得られる場合もある（3.a.5.3 参照）．もし，1 つの励起光強度に決める必要がある場合には，測定する植物または細胞を栽培・培養していた光強度で行うのがもっとも一般的である．いずれにせよ，Fv/Fm 以外の全ての蛍光のパラメーターは励起光の強度に依存して変化するので，実験条件としてきちんと論文に明記することが必要である．

3.a.4.4　その他の設定項目　感度，応答速度

感度（ゲイン）は，信号の増幅度であり，これが高ければシグナルは大きくなるが，ノイズも大きくなる．従って，きちんとシグナルが見えている範囲内では低い方がよいと言える．シグナルの大きさは，前述のように測定パルスの強度にも依存するので，もしノイズが非常に大きく，かつ，F_0 の正確な決定が目的でない場合（例えば Φ_{II} の情報だけ必要な場合など）は，感度を上げる代わり

に測定パルスの強度を上げるという方法もある．いずれにせよ，感度と測定パルスの強度の組み合わせで考える必要がある．

応答速度（レスポンス，ダンピング）は，測定回路が，どれだけ速い変動にまで追随するかを決める．応答速度が速ければ(ダンピングが小さければ)，速い変化もきちんと捉えることができるが，信号の平均化効果が期待できないのでノイズは大きくなる．Q_A の酸化還元のような速い反応を測定する場合は，応答速度（レスポンス）を最大にする（ダンピングを最小にする）必要がある．連続励起光による速い蛍光誘導期現象の測定では 1 ms 程度の応答速度，秒単位の変化だけを測るのだったら，0.1 s 程度の応答速度で充分である．ただし，DCMU 添加時の蛍光の立ち上がりの測定などには 10 μs 程度の応答速度が必要となる．基本的に，測定したい変化のうち，最も速い変化の速度定数より，少し速い応答速度を選ぶことになる．F_O の測定だけであれば，基本的に測定値が変化しないので，一番遅い応答速度にしても構わない．DCMU の存在下で Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されている場合や，低温での測定では，Q_A の再酸化速度が遅くなるので，測定光の励起効果を最低限にしないと正確に F_O が測定できない．そこで測定光強度を下げるとどうしてもノイズが大きくなるが，そのような場合，応答速度を一番遅くすることにより，ノイズを抑えることができる．

このほか，測定系にファイバーオプティクスを使った系では，光源や測定フォトダイオードと，ファイバーオプティクスの先端の距離を変えることにより，測定光・励起光の強度やシグナルの出力を微調整することができる．これは，出力を微調整できないタイプの光源を使っているときに便利なテクニックである．また，分岐型のファイバーオプティクスを使って測定光と励起光を照射している場合，一本一本のファイバーは別々の光源につながっていることを認識する必要がある．ファイバーオプティクスを測定対象の葉に密着させた場合は，励起光があたる葉の部分と蛍光を観察する部分は厳密には一致しない．測定面積が小さい場合は，この影響を無視できないので，葉とファイバーオプティクスの先端の間に最低 5 mm 程度の隙間を空ける必要がある．

3.a.5　藻類とシアノバクテリアにおける測定

3.a.5.1　藻類とシアノバクテリアの呼吸と光合成

シアノバクテリアは原核生物であり，陸上植物のように細胞内小器官を持たず，呼吸系と光合成系は膜系によって隔てられていない．特に，電子伝達系においてはプラストキノンプールからシトクロム b_6/f 複合体を経てシトクロム c までを光合成と呼吸系で共有しているため，光合成系の電子伝達鎖の酸化還元状態は呼吸系の影響を直接受ける．暗所で呼吸系が動いているシアノバクテリアでは，定常状態においてはプラストキノンプールはかなり還元された状態にあり，これは，NDH 複合体の活性が末端酸化酵素の活性よりも高いとして解釈できる．真核藻類においては，光合成系は葉緑体に存在し，ミトコンドリアの呼吸系とは局在が異なるが，おそらくは葉緑体呼吸の存在により，シアノバクテリアの場合と同様，暗所ではプラストキノンプールが還元状態に保たれる．筆者の経験では，少なくとも緑藻，紅藻，そしてサンゴの共生藻である渦鞭毛藻などで，陸上植物とは異なり，シアノバクテリアと同様の，呼吸系の光合成系への影響を考慮に入れた解析が必要である．

3.a.5.2　ステート遷移と qN

藻類またはシアノバクテリアの細胞でクロロフィル蛍光測定を行うと，暗所で飽和パルスを当てても，そもそも蛍光の最大値が得られない(図 14)．その後に励起光を当てたときの方がむしろ蛍光強度が高くなる．従って，このまま強引に qN などを計算しようとすると，負の値になるなど意味をなさない．これは，上述のように暗所でも藻類やシアノバクテリアではプラストキノンプールが還元されているために qN が大きい(蛍光が小さい)ことによる[13]．この点が，暗所ではプラストキノンプールが酸化されて qN が 0 になる陸上植物とは全く異なる．しかも藻類やシアノバクテリアの qN は，陸上植物のようにプロトン濃度勾配による部分の寄与が大きくない．プロトン濃度勾配を反映する ATP/ADP 比は，シアノバクテリアの場合はまったく qN と相関を示さない．紅藻やシアノバクテリアの場合は，フィコビリソームから光

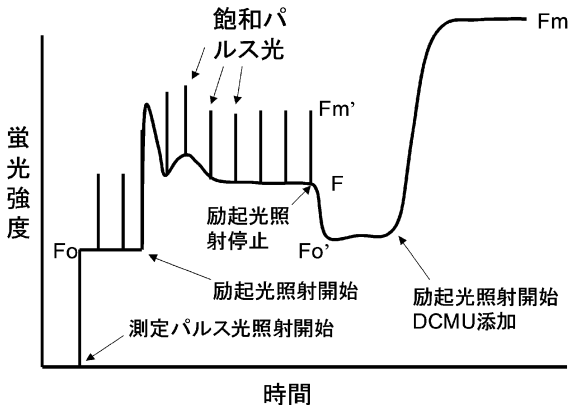

図 14：シアノバクテリアにおけるパルス変調蛍光測定例

化学系Ⅰへのエネルギー分配（ステート遷移）にともなう蛍光の消光が，qN のかなりの部分を占めるとされている．

3.a.1.3 でも述べたように，フィコビリソームから光化学系Ⅰへのエネルギー分配は DCMU を添加したときには完全に抑えられ(ステート１)，系Ⅱからの蛍光が相対的に一番大きくなり，qN は 0 となる．従って，DCMU を添加した後にはじめて蛍光の最大値 Fm が得られることになる．通常の条件ではフィコビリソームから光化学系Ⅰへのエネルギー移動が大きいため，光化学系Ⅱの蛍光は消光され，その結果，qN は大きい値をとる．一方の光化学系がもう一方の光化学系より励起される条件下においても，プラストキノンプールは，酸化状態，もしくは還元状態に片寄る．光化学系Ⅰが選択的に励起されるような光が照射された場合はプラストキノンプールは酸化され(ステート１)，逆に光化学系Ⅱが選択的に酸化されるような光が照射された場合はプラストキノンプールは還元される(ステート２)．ステートの状態は，主にプラストキノンプールがどの程度還元されているかによって調節されると考えられる．ただし，プラストキノンの酸化還元を表すはずの qP とステート遷移の指標となる qN の間には必ずしも相関がなく，この理由はまだ解明されていない．フィコビリソームを持たない緑藻などにおいても，陸上植物に比較してステート遷移がクロロフィル蛍光に非常に大きな影響を与えるという点では紅藻やシアノバクテリアと同様である．

藻類やシアノバクテリアの場合，もう一点，測定上の問題となるのは，非光化学消光の誘導が極めて速いことである．陸上植物の場合，前に述べたように 0.8 s 程度の飽和パルス光の照射によって Fm ないしは Fm'を得ることができるが，藻類やシアノバクテリアの場合は，この 0.8 s の間にも非光化学消光がおこり，蛍光が減少してしまう[14]．従って，レコーダーなどのレスポンスの遅い記録機器で測定をしていると，蛍光を過小評価することになる．このため，電気信号としてそのままパソコンへ取り込む，データ保持回路を使用する，オシロスコープを使う，などの対策が必須となる．

3.a.5.3　光環境測定への応用

シアノバクテリアにおいては qN の励起光強度依存性は，興味深い性質を持つ．qN は，暗所では呼吸によるプラストキノンプールの還元のため，高い値となるが，励起光を徐々に強くしていくと光合成の光化学系Ⅰと系Ⅱが動き始め，そのバランスがとれる光強度までプラストキノンが酸化され，qN は低下する(図 15)．さらに励起光を強くしていくと，シトクロム b_6/f 複合体でのプラストキノンの酸化が電子伝達の律速段階となるため，プラストキノンの還元が起こり，qN は再び上昇する．このように，qN は測定時の励起光強度に対して下に凸の曲線を取るが，qN が最小値となる光強度を，そのシアノバクテリアの生育光強度に対してプロットすると，非常によい相関が見られる[13]．つまり，シアノバクテリアでは，生育環境の光強度においてもっとも qN を小さくしており，言い換えるとエネルギーを無駄に熱に変える割合をもっとも小さくしていることになる．したがって，逆に，あるシアノバクテリアの qN の励起光強度依存性を測定し，その最小値を与える光強度を求めれば，そのシアノバクテリアが順化している光強度が求まることになる．野外において，あるシアノバクテリアがどのような光環境の中で生育しているかを推定することは通常困難が伴うが，このような方法を使えば，それを見積もることが可能になる．この方法はシアノバクテリア以外の藻類にも適用できると考えられる．

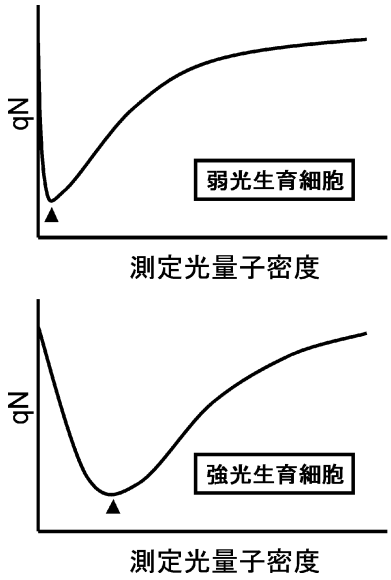

図 15：シアノバクテリアにおける非光化学消光の測定光強度依存性

3.a.5.4　オレンジカロテノイドタンパク質

従来，シアノバクテリアの非光化学消光は，ステート遷移で全てが説明されるとされていたが，近年，多くのシアノバクテリアにおいてオレンジカロテノイドタンパク質が蛍光の消光に寄与することが明らかとなった．オレンジカロテノイドタンパク質はカロテノイドを結合した水溶性のタンパク質で，フィコビリゾームを持つ生物に広く保存されている．シアノバクテリアの細胞の Fm' を連続的に測定している場合，暗所から弱光励起条件に細胞を移すと，ステート 2 からステート 1 への移行に

伴って，Fm' の増大が見られる．ここで，励起光を弱光から，クロロフィルのみを励起する（フィコビリソームを励起しない）青緑色光の強い光に切り替えた場合，シアノバクテリアではクロロフィルの 9 割近くは光化学系 I に結合しているため，細胞はステート 1 に保たれるはずである．にもかかわらず，青緑色の強い光への励起光の切り替えに伴い，Fm' の減少が観察され，しかもこの減少はオレンジカロテノイドタンパク質の変異体では消失する[15]．従って，シアノバクテリアにおいては，ステート遷移の他に，オレンジカロテノイドタンパク質によるエネルギー放散系が働いていると考えられる．このオレンジカロテノイドタンパク質による熱放散系は，過剰な光による光阻害からの保護などに働いていると考えられるが，その詳細な機構についてはまだわかっていない．

3.a.6　パルス変調の吸収測定への応用

3.a.6.1　吸収測定の原理

上記のパルス変調による蛍光測定では，当てる光の波長とシグナルとして受け取る光の波長をずらすことによって蛍光を測定しているが，当てる光の波長と受け取る光の波長を同じにすれば，その波長での吸収・反射・散乱などを測定することができる．通常の吸収測定とは違って，パルス変調によりノイズが軽減されるので，葉による吸収の少ない赤外領域の光を使えば，生葉での吸収変化の測定が可能となる．一般の吸収測定でのように発光部と受光部の間に試料を入れて吸収を測定することも可能であるが（透過型，図 16 a），葉の場合は，海綿状組織などで光が散乱されるので，その散乱光をグラスファイバーを経て受光することにより，発光部と受光部を葉の同じ側においた状態でも，吸収を測定することができる（内部反射型，図 16 b）．また，葉の内部での光の散乱が少ない場合には，葉の反対側に光の反射板をおいて測定することもできる（反射型，図 16 c）．

通常の分光器とは違って，パルス変調を利用した吸収測定では，受光部で受け取った光の量がそのまま信号として取り出される．つまりシグナルは吸収ではなく，受光した光強度を反映する．ところが，分光セルに入れた試料と違って，葉では，光がどこを通ったかについては全くわからない．例えば，上記の反射型では葉をいったん通り抜けた光が受光部に戻るので光路はかなり長くなるが，内部反射型では，主に葉の細胞間隙で反射された光が戻るため光路は比較的短くなる．従って，吸収の絶対測定は不可能である．情報が得られるのは，吸収の変化についてのみである．また光路長に影響を与える組織構造の変化が無視できる場合にのみ測定結果は意味を持つことに注意する必要がある．

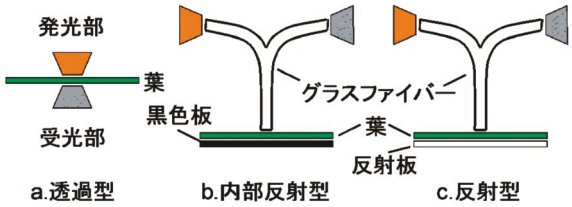

図 16：パルス変調による吸収測定の方法

3.a.6.2　P 700 の測定

P 700 は光化学系 I の反応中心クロロフィルで，酸化されると，700 nm 付近に吸収減少を，750–850 nm 付近にクロロフィルカチオンの生成に伴うブロードな吸収増加を示す．800 nm 付近ではクロロフィルの吸収はほとんどないこと，酸化還元による吸収変化が知りたい情報であること，の 2 点から，P 700 の測定は，パルス変調による測定に非常に適している[16]．実際の測定は，700 nm 付近の近赤外光を照射したことによる 820 nm の吸収変化を測定して P 700 の相対量を見積もる．クロロフィルの吸収はこの測定光の波長領域では小さいため，蛍光測定の場合と異なり，測定パルスの強度や周波数は低く抑える必要はない．

光化学系 I が吸収する近赤外光の照射によって P 700 が酸化されると 820 nm 付近の吸収は増加するので，受光部に入る光量は減少する．この光量の変化を吸収変化に換算するには以下のようにする．

まず，試料に入る前の光量を Io，試料を通過したあとの光量を I，試料が吸収変化を起こしたあとの光量を I＋ΔI とする．ある関数 y＝f(x) において，y の小さな変化 Δy は，x の小さな変化 Δx と f(x) の微分値（つまり，関数の傾き）である f'(x) を用いて，

$$\Delta y = \Delta x \cdot f'(x) \tag{25}$$

と表すことができる．ただし，この式が成り立つのは，Δx もしくは Δy が充分小さいときである．次に，吸収 A は透過率 T を用いて

$$A = -\log(T) \tag{26}$$

なので，小さな吸収変化 ΔA は，log(x) の導関数が log(e)/x であることと上の式を考え合わせると

$$\Delta A = -0.434\Delta T/(1/T) \tag{27}$$

となる．吸光度 T は I/Io なので，これを上の式に代入すると

$$\Delta A = -0.434(\Delta I/Io)/(I/Io) = -0.434\Delta I/I \quad (28)$$

となる．つまり P-700 の酸化に伴う光量の変化量を，吸収変化を起こす前の光量で割れば，吸収変化量になることがわかる．ΔI そのままでは吸収変化（ΔA）ではないこと，ΔI から ΔA への換算は ΔI が Io に比べて充分小さいときにのみ成り立つことに注意する必要がある．

3.a.6.3　系 I の実効量子収率

光化学系 II のある光強度における実効量子収率（Φ_{II}）は，その光強度における反応中心が open である割合 qP と open な光化学系 II の量子収率 Fv'/Fm' を掛け合わせることで求めることができる（3.a.3.4 参照）．同様な実効量子収率は光化学系 I についても定義できるはずである．反応中心が open な割合は，P 700 に関しては，[P 700]/([P 700$^+$]+[P 700])で表すことができる．open な光化学系 I の量子収率を直接測定することはできないが，一般に，光化学系 I の量子収率は条件によって変化しないとされているので，もしそれが正しければ，実効量子収率は open な反応中心の割合に比例するはずである．このような考え方で，光化学系 I についてもその量子収率 Φ_I を定義する場合がある．

実際に P 700 による吸収変化を測定すると，図 17 のようになる．暗所では P 700 は還元状態と考えられる．ここに赤外光を当てると P 700 のほとんどが酸化され，残ったわずかな還元型の P 700 も飽和パルス光（SP）を当てることにより酸化される．従って，図の a が P 700 の全量を示すと考えることができる．完全酸化の直後に，一過的な P 700 の還元が見られるが，これは飽和パルス光によって駆動される光化学系 II からの電子が P 700 を還元することによる．一方，一定強度の励起光（白色光）を当てた場合，P 700 は酸化型と還元型がある値で平衡状態になる（図の c）．ここで，飽和光を当てるとほとんどの P 700 が酸化される（図の b の部分）が，一部は還元型で残る．

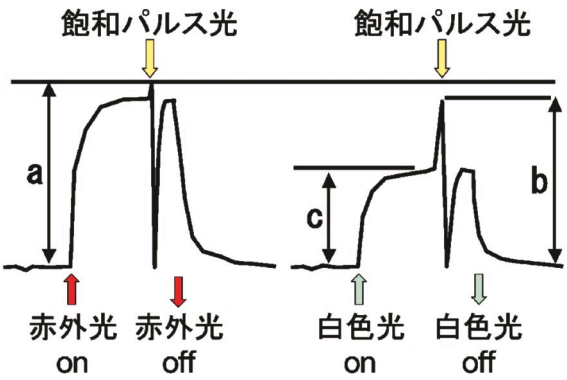

図 17：パルス変調による P 700 の酸化還元の測定例

この解釈として，系 I の電子受容体が励起光によって一部還元されているためにその一部では電荷分離が起こらず（もしくは電荷分離が起こっても電荷再結合（逆反応）が速く）P 700 を完全に酸化することができない，との考え方がある[17]．このような考え方にたてば，図の a と b の差の部分は，P 700 は還元型であっても電荷分離は起こらないので，open な光化学系 I の割合は (b−c)/a になり，これを Φ_I と定義する．

ただし，a と b の差の部分に関しては別の解釈も可能である．一般に，飽和パルス光源の光強度の立ち上がりには時間がかかるため，飽和パルス光が本当の意味で飽和光になるまでには一定の時間がかかる．飽和パルス光源は当然光化学系 II も励起するので，この時間内に光化学系 II からの電子が P 700 まで到達してしまうと，P 700 を完全に酸化することは難しくなる．このことは飽和連続白色光を当てた場合には P 700 が一部還元されることからもわかる．赤外光を当てているときには，ほとんどの P 700 があらかじめ酸化されているので飽和パルス光源により P 700 が完全酸化されるが，励起光照射時には，還元されている P 700 が多いため，飽和パルス光が P 700 を完全に酸化する前に光化学系 II からの電子が P 700 を還元してしまい，図の a と b の差の部分については P 700 を酸化しきれない，という解釈も成り立つ．この場合は，単に技術的な問題のために図の a の部分を酸化できないだけなので，open な光化学系 I の割合は (a−c)/a となる．

実際には実験の条件によってもどちらの考え方が正しいかは異なるようである．特に飽和パルス光の特性が大きく影響を与える．もともと Φ_I を定義した論文では飽和パルス光にメカニカルシャッターを組み合わせることにより光強度の立ち上がりを速くしているのでおそらく問題はないが，その後この方法を使った論文ではそのような配慮をしていないケースも多く，技術的な問題が大きく効いている可能性がある．図の a と b の差の部分の解釈として，上記の 2 つのケースのうちどちらが正しいかを見分けるには，暗所で飽和パルス光を当てたときに P 700 が全量酸化されるかどうかを見ればよいだろう．電子受容体の還元が図の a の部分の原因であれば，暗所では電子受容体は酸化されているはずなので P 700 は全量酸化されるはずであるし，光化学系 II からの電子が原因であれば，暗所ではもともと P 700 がほとんど還元されているので，P 700 は完全酸化されないはずである．いずれにせよ，このように定義された Φ_I は，実効量子収率そのものではなく，open な系 I の割合を示したものであ

ることに注意する必要がある．

3.a.7 参考となる総説など

最後に，クロロフィル蛍光の測定にあたって参考となる総説などを若干紹介しておく．

単行本としては，Papageorgiou と Govindjee の編集による〝Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis″(2004)が詳しい[18]．また，Yunus, Pathre, Mohanty による編集の〝Probing Photosynthesis″(2000）にも蛍光関係の総説が載っている[19]．その他，Austrarian Jouranl of Plant Physiology の 22 号 (1995) は蛍光の特集号になっており，数多くの総説が掲載されていて参考になる．特に，この号の最初に載っている Govindjee の総説[2] は，古い歴史から手際よくクロロフィル蛍光の紹介がされていて楽しい．この他，蛍光測定の素人向けの実際の測定方法の解説としては Ecological Studies というシリーズの中の〝Ecophysiology of Photosynthesis″の中の第 3 章〝Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assesment of In Vitro Photosynthesis″が極めてわかりやすい[20]．

クロロフィル蛍光の初歩全般を扱った総説としては，Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.に Krause と Weis が 1991 年に書いた〝Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics″が平易でわかりやすい[1]．日本語のものとしては，データの解釈方法について筆者が光合成研究会報に書いたもの（パルス変調クロロフィル蛍光測定におけるデータの解釈，2005 年）がある[21]．

この他，数多くの総説が出されているが，最近の総説としては Baker による〝Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo″が 2008 年に Annu. Rev. Plant Biol.に出ている[22] ので，そこに紹介される文献と共に参考にして欲しい．

参考文献

1）G. H. Krause & E. Weis, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **42** (1991) P.313.
2）Govindjee, Aust. J. Plant Physiol. **22** (1995) P.131.
3）B. J. Strasser & R. J. Strasser, Photosynthesis: from Light to Biosphere, vol. V, ed. P. Mathis, Dordrecht, Kluwer, 1995, p.977.
4）K. Oxborough & N. R. Baker, Photosynth. Res. **54** (1997) P.135.
5）W. P. Quick & M. Stitt, Biochim. Biophys. Acta **977** (1989) P.287.
6）D. M. Kramer, G. Johnson, O. Kiirats & G. E. Edwards, Photosynth. Res. **79** (2004) P.209.
7）J. Lavergne & H. W. Trissl, Biophys. J. **68** (1995) P. 2474.
8）M. Kitajima & W. L. Butler, Biochim. Biophys. Acta **376** (1975) P.105.
9）B. Genty, J.-M. Briantais & N. R. Baker, Biochim. Biophys. Acta **990** (1989) P.87.
10）B. Demmig-Adams, W. W. Adams III, D. H. Barker, B. A. Logan, D. R. Bowling & A. S. Verhoeven, Physiologia Plantarum, **98** (1996) P.253.
11）M. C. Kato, K. Hikosaka, N. HIrotsu, A. Makino & T. Hirose, Plant Cell Physiol., **44** (2003) P.318.
12）L. Hendrickson, R. T. Furbank & W. S. Chow, Photosynth. Res. **82** (2004) P.73.
13）D. Campbell & G. Öquist, Plant Physiology, **111** (1996) P.1293.
14）U. Schreiber, T. Endo, H. Mi & K. Asada, Plant Cell Physiol., **36** (1995) P.873.
15）D. Kirilovsky, Photosynth. Res. **93** (2007) P.7.
16）U. Schreiber, C. Klughammer & C. Neubauer, Z. Naturforsch. C **43** (1988) P.686.
17）C. Klughammer & U. Schreiber, Planta **192** (1994) P. 261.
18）G. C. Papageorgiou & Govindjee (ed.), Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Springer, 2004.
19）M. Yunus, U. Pathre & P. Mohanty (ed.), Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation, and Adaptation, Taylor & Francis, 2000.
20）U. Schreiber, W. Bilger & C. Neubauer, Ecophysiology of Photosynthesis, ed. C. D. Schulze & M. M. Caldwell, Springer-Verlag, 1994, p.45.
21）園池公毅，日本光合成研究会会報 **42**（2005）p.7.
22）N. R. Baker, Annu. Rev. Plant Biol. **59** (2008) P.89.