HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光合成研究のための安定同位体測定法
Author(s)	半場, 祐子
Description	2章 個体・環境の測定 1. 個葉から葉緑体スケールのガス交換 b
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 73-82
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39103
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-014.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

1．個葉から葉緑体スケールのガス交換
b. 光合成研究のための安定同位体測定法

半場　祐子[1)]

安定同位体は，光合成の環境応答を調べる上で細胞レベルから生態系レベルまで広範囲に利用できるツールである．安定同位体とは何かを解説し，その測定方法と光合成研究への利用法を解説する．

Measurement of the plant stable isotopes.

Yuko T. Hanba

Stable isotopes have been widely used in biochemistry, physiology and ecology as an useful index for plant environmental responses. Principles of the isotope fractionation and its application to photosynthesis research will be discussed.

1.b.1　安定同位体とは

1.b.1.1　安定同位体について

植物の光合成研究を研究対象の空間的なスケールで分類すると，大きな方から生態系，群落，個体，組織，細胞，オルガネラとなるであろう(表1)．研究手法は分子・生化学的手法，生理的手法，微気象的方法やリモートセンシングなどが用いられているが，安定同位体は他の方法と比べると，細胞レベルから生態系レベルまで広範囲に利用できること，また積算的な情報が得られ比較的分析コストが安価であるという特色がある．

同位体とは，ある特定の元素に属し，核の中性子数が異なるため質量が異なっている原子のことをいう．同位体は，時間の経過とともにエネルギーを放射して別の元素に壊変する放射性同位体と，時間が経過しても不変である安定同位体 stable isotope とに分けられる[1),2)]（表2）．放射性同位体の安定性は半減期 (half-life) であらわされる．一方，安定同位体の量は存在比 abundance であらわされる．ある特定の元素の中では1つの安定同位体の存在比がきわめて高く，例えば ^{12}C は全ての C の98.9%を占める．

安定同位体比は標準物質に対する偏差であらわされる．この偏差は非常に小さいので1000分偏差（パーミル：‰）であらわされる．ある物質 X について，2種の安定同位体の比率を R とすると，安定同位体比は次の式で計算される．

$$\delta X = \{R_{サンプル} / R_{標準物質} - 1\} \times 1000(‰) \qquad (1)$$

植物に関係する主な軽元素について，安定同位体比の表記法と測定精度を表3に示す．

1.b.1.2　安定同位体比の測定法：質量分析計

安定同位体比は，安定同位体専用の質量分析計（isotope mass spectrometer；略して MASS と称す）を使って測定する．国内でよく使われている測定装置には，サーモフィッシャー社が扱っているシリーズ（Finnigan MAT252，Delta Plus など）がある．

質量分析計の大まかな原理を解説する．質量分析計は通常，分子量64以下の軽元素の安定同位体比を測定する．サンプル中に含まれる元素の安定同位体比を質量分析計で測定するためには，あらかじめそれぞれの元素が気体になっている必要がある(表3)．測定にあたっては，サンプルと標準物質の安定同位体比測定を交互に行う(図1)．サンプルの単独測定を行わない理由は，測定に長時間かかるためその間に装置のドリフトが生じ，測定精度を悪化させるためである．短時間の交互測定を4回～10回繰り返し，標準物質からの偏差の平均値を算出する．サンプルと標準物質はそれぞれ別々の導入口（インレット inlet）から導入され，チェンジオーバーバルブにより交互に分析管に送られる．気体分子の平均自由行程を長くするために，質量分析計の内部は 10^{-5}Pa 以下の高真空に保たれている．導入された気体はイオンソースを通ってイオン化され，加速電圧をかけられて高速で磁場に進入する．磁場ではイオン化された気体は進路が曲がるが，質量に応じて曲率が異なるため，ここで分子量の異なる分子を分離することができる．ファラデーカップと呼ばれる装置でイオン化された分子を受け取る．

1）京都工芸繊維大学　生物資源フィールド科学教育研究センター

表 1：植物の光合成研究に使われる手法とその特色

方法	測定スケール	利点	欠点
安定同位体	細胞から生態系まで	積算的な情報が得られる，分析が容易でランニングコストが安い	影響因子の特定が難しい場合がある 測定装置は高価
生化学的方法	細胞，葉の切片，植物抽出物（タンパク質など）	詳細な分析が可能で反応機構の研究に適している	生体外測定のため生体内での再現性が不明確
生理学的方法（ガス交換法）	葉，シュート	生きた植物で測定できる，測定が比較的簡便	測定時の環境条件に大きく影響される，瞬間的な情報しか得られない
生態学・微気象的方法，リモートセンシング	群落，生態系	大規模スケールで推定可能	時間とコストがかかる，植物反応との関連づけが難しい

表 2：植物の研究に利用される主な同位体の種類と存在比および半減期[1)2)]

元素	安定同位体	存在比(%)	放射性同位体	半減期
水素	^{1}H ^{2}H	99.985 0.015	^{3}H	12.32 y
炭素	^{12}C ^{13}C	98.89 1.11	^{10}C ^{11}C ^{14}C ^{15}C	19.3 s 20.3 m 5715 y 2.45 s
酸素	^{16}O ^{17}O ^{18}O	99.76 0.04 0.20	^{14}O ^{15}O	70.6 s 122.2 s
窒素	^{14}N ^{15}N	99.63 0.37	^{12}N ^{13}N	0.1 s 10 m
硫黄	^{32}S ^{33}S ^{34}S ^{36}S	95.0 0.76 4.22 0.014	^{35}S	87.51 d

表 3：安定同位体比とその表記法

元素	安定同位体の比率 R	表記	測定気体	測定精度[2)]（‰）
H	$^{2}H/^{1}H$(D/H)	δD	H_2	0.2*
C	$^{13}C/^{12}C$	$\delta^{13}C$	CO_2	0.01**
O	$^{18}O/^{16}O$	$\delta^{18}O$	CO_2	0.01**
N	$^{15}N/^{14}N$	$\delta^{15}N$	N_2	0.02*
S	$^{34}S/^{32}S$	$\delta^{34}S$	SO_2	0.5***

*200 μL，**100 μL，***50 μg，サーモエレクトロンサイエンティフィック㈱の技術資料より引用

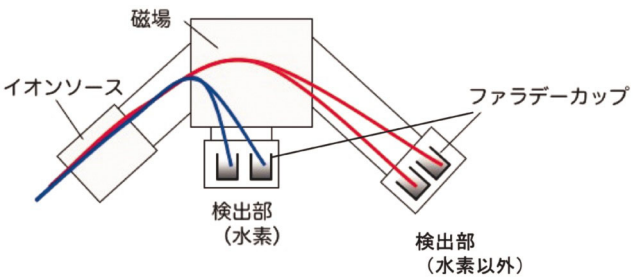

図 1：安定同位体比測定用の質量分析計における基本的な構造と測定原理．導入口から導入された測定気体は質量によって分離され最終的にファラデーカップで検出される．

1.b.1.3　標準物質

安定同位体の測定にあたっては，国際標準物質 international standard が定められている(表 4)．国際標準物質は希少であることが多く，実際の測定には国際標準物質に対する安定同位体比が既知であるワーキングスタンダードをそれぞれの研究機関で定め，これをスタンダードとして用いる．例えば窒素や炭素のワーキングスタンダードとしてはガスボンベの N_2 や CO_2 が用いられる．

1.b.1.4　サンプルの前処理

1.b.1.4.1　植物の有機物に含まれる窒素・炭素

植物の有機物に含まれる窒素や炭素の安定同位体比分析には，サンプルのガス化と安定同位体比測定を同時に行うことができる，燃焼システムと質量分析計が接続された自動分析装置が広く用いられている（図 2)．

測定の前処理は，サンプルを穏やかに熱乾燥させて(60～80℃)，有機物が混入しないようにしながら 40 メッシュ程度に細かく粉砕する．有機物質の同位体組成はいったん乾燥させればほとんど変化しないため，分解が起こらない状態で保存されているサンプルの炭素同位体組成は長期間一定であり，標本等で分析を行なうことが可能である．１回の分析に必要なサンプルの量は測定装置や条件によって異なるが，図 2 のシステムで植物の炭素を分析する場合は 2 mg 程度，植物の窒素を分析する

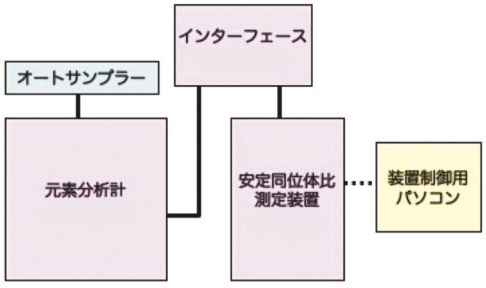

図 2：有機物の炭素および窒素の安定同位体比を自動的に分析するための測定装置．燃焼部分（元素分析計）がインターフェースを介して質量分析計に接続されている．

表 4：それぞれの安定同位体に対する国際標準物質一覧[1)2)]

安定同位体	標準物質	略称	安定同位体比
$^{2}H/^{1}H$ (D/H)	ウイーン標準海洋水 Standard Light Antarctic Precipitation	VSMOW, SLAP	0.00015576 0.000089089
$^{13}C/^{12}C$	Pee Dee ベレムナイト*	PDB	0.0112372
$^{18}O/^{16}O$	ウイーン標準海洋水 Pee Dee ベレムナイト Standard Light Antarctic Precipitation		0.0020052 0.0020672 0.0018939
$^{15}N/^{14}N$	大気		0.003676
$^{34}S/^{32}S$	Diablo 峡谷隕石**	CD	0.045005

*アメリカ・ノースキャロライナ州の Pee Dee 層に産出する矢石（イカの仲間の化石）の炭酸カルシウム

**アメリカ・アリゾナ州の Diablo 峡谷にあるクレーターで産出する隕石の成分（トリオライト）

場合は 10 mg 程度である．計量してスズ箔に包み，オートサンプラーにセットする（図 2）．1 日に 100 サンプル以上分析が可能である．

測定装置の精度はさまざまな理由により変動することがある．測定を行うたびに精度を確認し，適宜測定値の補正を行う必要がある．例えばワーキングスタンダードとして使用しているアラニンやチロシンを 10 サンプルあたり 1 回程度分析することにより，チェックを行う．

1.b.1.4.2　真空ラインを利用した大気中 CO_2 の分取

大気中の CO_2 の炭素安定同位体比を測定するためには CO_2 を精製する必要がある．このためにはパイレックスガラス製，あるいはステンレス製の真空ラインを使用する（図 3）．真空ラインは高性能のポンプを使って強力に空気を引きながら，低温寒剤を使ってガスを精製する装置である．通常は特注品となる（光信理化学製作所・東京など）．液体窒素（−170°C）とドライアイスエタノール（−70°C）のトラップを作る（デュワー瓶などの保冷容器に低温寒剤を入れる）．これらのトラップを使用して大気ガスから窒素や水蒸気を取り除き，CO_2 を精製してガラス管に収集・封入する．大気ガスには，CO_2 と質量数が同等である N_2O が含まれており，精製の過程で取り除くことができない．0.1 g 程度の還元銅をガラス管の中に入れておき，封入が終わったら 400°Cのマッフル炉で 3 時間焼く．この過程で N_2O が N_2 に還元される．真空ラインと質量分析計を直結し，精製過程を省いて CO_2 の炭素安定同位体比分析が行えるようなシステムも稼動している．

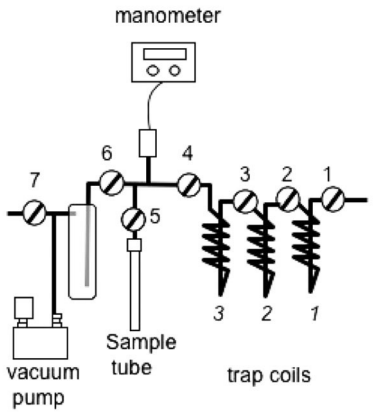

図 3：大気ガスから CO_2 を精製するための真空ラインの概略図．真空ポンプを使ってラインの中を引き，真空計で真空度を確認しながら精製作業を行なう．気体はライン右側から送り込む．

1.b.1.4.3　植物の酸素・水素の安定同位体比

化学変化が生じないように保存されたサンプルのセルロースを抽出し，ニトロ化してニトロセルロースとする．このニトロセルロースを燃焼させ，酸素の安定同位体を分析する場合は二酸化炭素を，水素の安定同位体を分析する場合は水を収集して安定同位体比を測定する[2)]．2000 年ごろに開発された熱分解元素分析計（TCEA-IRMS，サーモフィッシャーサイエンティフィック）を質量分析計に接続して使用することにより，有機物の酸素と水素の同位体比を自動で同時測定することが可能となった．

1.b.1.4.4　植物の水の酸素・水素の安定同位体比

植物は採取後，すぐにガラス管に密閉する．真空蒸留によって水を抽出し，酸素の安定同位体を分析する場合は二酸化炭素と交換平衡させて二酸化炭素を収集しその安定同位体比を分析する．水素の安定同位体を分析する場合は亜鉛を触媒として水を水素に還元し，収集してその安定同位体比を分析する[2)]．

1.b.2　炭素安定同位体比

1.b.2.1　炭素安定同位体比 $\delta^{13}C$ と光合成

炭素の安定同位体 ^{12}C と ^{13}C は，大気中や水中を拡散する速度や化学反応の反応性が異なる．軽い同位体 ^{12}C

の方が拡散する速度は速く，一般的には化学反応に対する反応性も高い．植物の光合成は様々な物理化学反応プロセスを経ているため，光合成の基質である大気 CO_2 と比較すると植物の炭素化合物の炭素は ^{13}C が相対的に少ない．このように ^{13}C がどの程度分別されたかを同位体分別（discrimination）という．光合成の初期過程での同位体分別は特に記号 Δ（ギリシャ文字の大文字のデルタ）で表し，次の式で表される．

$$\Delta = \delta_a/\delta_p - 1 \qquad (2)$$

δ_a，δ_pはそれぞれ標準物質 PDB に対する，大気中の CO_2 および植物の $\delta^{13}C$ である．

1.b.2.2.1　大気中の CO_2 の炭素安定同位体比

光合成の基質である大気中 CO_2 の $\delta^{13}C$ は植物の $\delta^{13}C$ の決定要因のひとつとなる（式 2）．自動車の排気ガスのように化石燃料起源の CO_2 は，上空の大気に比べると ^{13}C が少なくなることが知られている[3]．つまり，都市部や工業地帯の大気中の CO_2 は，山間部や砂漠のような人間の活動の影響が少ないところとは $\delta^{13}C$ が異なる（表 5）．

また，森林の大気の CO_2 には土壌呼吸や植物の呼吸によって放出される CO_2 が混合している．呼吸によって放出される CO_2 には ^{13}C が少なくなっている．そのため，呼吸 CO_2 が滞留しやすい条件，例えば地表付近，樹木の密度が高い森林（熱帯林など），夜間は，森林の大気の CO_2 にはさらに ^{13}C が少なくなる[4]（表 5）．

1.b.2.2.2　光合成による同位体分別

光合成は植物の $\delta^{13}C$ に最も大きな影響を与える要因である．光合成によって CO_2 が固定されるときにはたらく酵素は植物が利用している光合成経路によって異なり，C_3 植物では主に Rubisco，C_4 植物と CAM 植物では主に PEP カルボキシラーゼと Rubisco である．Rubisco と PEP カルボキシラーゼとは同位体分別が大きく異なる（表 6）．大きな同位体分別を示す酵素 Rubisco が主にはたらく C_3 植物は，C_4 植物や CAM 植物と比べて ^{13}C が少ない．イネ科の植物については，C_3 植物の炭素の $\delta^{13}C$ は平均値で－28 ‰であるが，C_4 植物では－14 ‰である[5]．CAM 植物の値は－10～－20 ‰であり，昼間と夜間に固定される CO_2 の比率などによって同一植物においても変動がみられることがある[5]（図 4）．

C_3 植物では，同位体分別 Δ は細胞間隙の CO_2 分圧と強い相関がある．葉内で CO_2 分圧の低下がないと仮定した場合，Δ は次のようにあらわされる[6]．

$$\Delta = a[(C_a - C_i)/C_a] + bC_i/C_a \qquad (3)$$

C_a と C_i は，それぞれ大気と葉内（細胞間隙）の CO_2 分圧をあらわしている．a は，CO_2 が気孔から取り込まれる際に，$^{12}CO_2$ と $^{13}CO_2$ の拡散速度の違いによって生じる分別（4.4 ‰）である．b は，CO_2 固定酵素によって CO_2 が同化されるときの分別で，27 ‰－30 ‰と考えられている．この式から，C_3 植物の同位体分別は，酵素反応によってほとんど決まることが分かる．

CO_2 分圧と同位体分別との関係は，次のように説明することができる．Rubisco は $^{12}CO_2$ の方とよく反応するため，Rubisco の近くの空気（細胞間隙）では $^{13}CO_2$ よりも $^{12}CO_2$ が多く消費され，その結果相対的に $^{13}CO_2$ が増える．気孔が閉じてくると細胞間隙での $^{13}CO_2$ の濃度が高くなっていくため，Rubisco は $^{13}CO_2$ とも反応するようになってくる．一方，気孔が十分に開いていれば，細胞間隙と大気の CO_2 は十分に混合されるので，細胞間隙での $^{13}CO_2$ 濃度は大気よりもそれほど高くならない．このときには Rubisco が $^{13}CO_2$ と反応する割合は相対的に低くなる．このようなことから，大気中の CO_2 分圧 C_a が一定である場合には，C_3 植物の同位体分別は C_i が小さいほど小さくなる（相対的に軽い同位体が少なくなる）ことになる[7]．

なお，C_4 植物では，CO_2 はまず PEP カルボキシラーゼによって葉肉細胞で固定された後，維管束鞘細胞で

表 5：さまざまな測定場所における大気 CO_2 の炭素安定同位体比

測定場所	炭素安定同位体比（‰）
上層大気	－8
都市部の大気*	－11.6
山間部の大気**	－10　京都市美山町国道 －12　タイ・ナラチワ熱帯林 －9　夏の北海道落葉広葉樹林
CO_2 ボンベ	－24 ～ －38

*京都市五条通での計測（未発表）
**Hanba et al.（1997）

表 6：光合成に関連する炭素安定同位体分別[35]

過程	分別（‰）
CO_2 の水への溶解	1.1
CO_2 の水和	－9.0
大気中での CO_2 拡散	4.4
水中での CO_2 拡散	0.7
カーボニックアンヒドラーゼ触媒による CO_2 の水和	1.1
PEP カルボキシラーゼによるカルボキシル化	2.0
Rubisco	29.0

Rubisco によって再固定される．C_4 植物については同位体分別のモデルはいまだに不完全な部分があるが，葉内で CO_2 の低下がないと仮定した場合，次のように表されている[8]．

$$\Delta = a + (b_4 + \phi(b_3 - s) - a)C_i/C_a \qquad (4)$$

a は，CO_2 が気孔から取り込まれる際に，$^{12}CO_2$ と $^{13}CO_2$ の拡散速度の違いによって生じる分別（4.4‰）である．b_4 は，CO_2 固定酵素 PEP カルボキシラーゼによってガス体の CO_2 が同化されるときの分別で，−5.7‰と考えられている．b_3 は，CO_2 固定酵素 Pubisco の分別である（30‰）．ϕ は維管束鞘細胞からの漏れであり，s は漏れに伴う分別である．C_4 植物でも細胞間隙の CO_2 分圧の変化に対して同位体比が変化することは分かっている．ただしその変動幅は C_3 植物よりもずっと小さい[9]．また，維管束鞘細胞で固定される CO_2 の比率が高いほど同位体比は低くなる（より C_3 植物に近い値になる）が[8]，維管束鞘からの漏れは光や生育温度などの環境要因により変動し，C_4 植物の Δ に影響を与える[10][11]．

1.b.2.3　炭素安定同位体比 $\delta^{13}C$ の光合成研究への利用

1.b.2.3.1　光合成回路の推定

C_3 植物と C_4 植物は，$\delta^{13}C$ が異なる（図 4）．このことを利用すると，植物の $\delta^{13}C$ から光合成回路を推定することができる[12]．現在のところ C_4 植物が含まれることが明らかになっている科を表 7[13] に示す．C_4 植物を含む最大の科であるイネ科の *Alleteropsis* 属，*Neurachne* 属，*Panicum* 属の中には C_3−C_4 中間型の性質をもつ種があるため，$\delta^{13}C$ からでのみ光合成型を決めることはできない[14]．また，CAM 植物と C_3 あるいは C_4 植物も，炭素の $\delta^{13}C$ によって区別することはできない（図 4）．

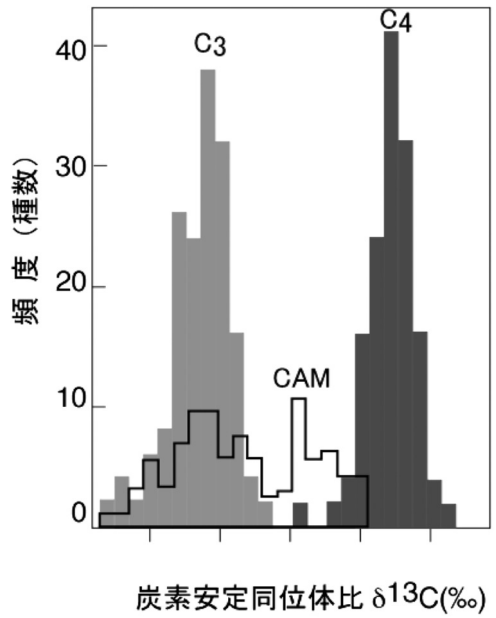

図 4：陸上高等植物における炭素安定同位体比の分布[7]．

1.b.2.3.2　水利用

炭素の $\delta^{13}C$ は，植物の水利用に関する指標として，欧米の研究者を中心に現在もグローバルスケールの研究などに広く利用されている[15][16]．ただし，後述するように $\delta^{13}C$ には葉内における CO_2 分圧低下の影響が大きいことが明らかになってきており[17]，$\delta^{13}C$ と水利用効率の関係は再考が必要であるともいわれている[18]．ここではまず，従来使われて来た簡単なモデルについて説明する．水利用効率（water use efficiency, WUE）は気孔コンダクタンス（g_s）あるいは蒸散（E）と光合成速度（A）の比で表される値で，葉から失われた水に対してどの程度炭素を固定できたかを表している．水利用効率は，植物に乾燥ストレスがかかっているほど高くなる．水利用効率 WUE は，植物葉内の CO_2 分圧（C_i）と植物体周辺の CO_2 分圧（C_a）及び葉−大気間の水蒸気圧差（VPD）と次のような関係にある[2]．

$$\mathrm{WUE} = A/E = C_a(1 - C_i/C_a)/(1.6\mathrm{VPD}) \qquad (5)$$

$\delta^{13}C$ も，水利用効率と同じように C_i/C_a と直線的な相関があるため，炭素の $\delta^{13}C$ から水利用効率を推定する

表 7：C_4 型光合成をもつ科[14]

	科	C_4 種数
双子葉植物		
	Cappararidaceae	＞2
	アカザ	550
	オシロイバナ	＞5
	キク	150
	キツネノマゴ	80
	ゴマノハグサ	14
	ザクロソウ	＞4
	スベリヒユ	70
	タデ	80
	トウダイグサ	250
	ナデシコ	50
	ハマビシ	～50
	ハマミズキ	～30
	ヒユ	～250
	ムラサキ	＞6
単子葉植物		
	トチカガミ	＞1
	カヤツリグサ	1330
	イネ	4600

ことができる．$\delta^{13}C$ がよりプラスの値であるほど水利用効率は大きい．水利用効率が大きいことは，より乾燥ストレスがかかっていると解釈されることが多い．

$\delta^{13}C$ を水利用効率の指標として使うメリットとしては，生育期間の積算的な水利用効率を反映していること，乾燥した植物標本でも測定できること，多数のサンプルを短時間で測定できること等が挙げられる．森林の管理が林の水利用に与える影響などを調べることもでき[19]大変応用範囲が広いが，植物体全体の $\delta^{13}C$ にはさまざまな環境要因が影響を与えるため，特に野外の植物で解析を行なった場合には $\delta^{13}C$ の解釈には十分な注意が必要である（表1参照）．植物の $\delta^{13}C$ は，土壌水分や気象因子，植物の生長計測や生理的な計測などと組み合わせて解析を行なうべきである．また，常緑樹と落葉樹など，明らかに葉の内部形態が異なる種は，葉内における CO_2 分圧低下の $\delta^{13}C$ への影響が異なるため，$\delta^{13}C$ によって水利用効率を比較するのは避けた方がよい[17]．

1.b.2.3.3　葉内 CO_2 拡散コンダクタンスの推定

C_3 植物で CO_2 固定が行われる場所は，葉肉細胞中にある葉緑体内のストロマである．葉の CO_2 分圧は，CO_2 が気孔から葉内の細胞間隙さらに葉肉細胞の葉緑体ストロマへと拡散するにつれて低下していく．光合成に伴う炭素安定同位体比の変化は，厳密にいえば葉緑体のストロマの CO_2 分圧を反映している．炭素安定同位体比の測定と光合成の測定とを組み合わせることにより，葉緑体のストロマの CO_2 分圧を推定できる，すなわち葉内での CO_2 拡散コンダクタンス（内部コンダクタンス）を推定することができる．

これまでの研究により，気孔コンダクタンス，すなわち気孔の開閉が光合成の重要な制限要因であることは明らかになっていた．1990年代以降の研究により，内部コンダクタンスも気孔コンダクタンスと同程度，あるいはそれ以上に光合成速度の重要な制限要因になっていることが分かってきた[19]．気孔コンダクタンスに対する内部コンダクタンスの比率は地中海の草本あるいは木本種において1.4であるが[20]，果樹については0.6-0.9であり[21][22]，温帯の樹木ではわずか0.5-0.6である[23]．内部コンダクタンスによる光合成の制限比率は20－35％であり，落葉樹であるカエデの方が草本であるヒマワリよりも大きくなっていた[24]．

葉の内部 CO_2 コンダクタンスを測定する方法は，3種類に大別される；(1)炭素安定同位体法[25] (2)クロロフィル蛍光法[26] (3)A/C_i 曲線法[27]．このうち，炭素安定同位体法は経済コストと時間はかかるものの最も精度が高いとされている．ここでは炭素安定同位体法について説明する．

葉の内部 CO_2 コンダクタンスを測定するための測定装置を図5に示す．装置の右側部分は光合成ガス交換測定装置であり，ポットに植えたままの葉をチャンバにはさんで CO_2 吸収量と H_2O 蒸散量などを測定する．装置の左側部分はパイレックスガラス製の真空ラインであり，ポンプを利用してチャンバの空気を送り，液体窒素やドライアイスを用いて水蒸気や窒素ガスを取り除き CO_2 ガスの精製を行う．精製した CO_2 ガスについて，安定同位体用の質量分析計を用いて炭素安定同位体比の測定を行う（1.4.2章参照）．

植物の光合成によってチャンバの空気中に含まれる CO_2 の炭素安定同位体比は変化するが，その変化の度合いは，内部 CO_2 コンダクタンスがまったくないと仮定した場合と比較するとわずかにずれが生じる．そのずれの大きさと光合成速度の測定値から，内部 CO_2 コンダクタンスを計算することができる．以下に，内部コンダクタンスの計算方法を説明する[25]．用いられる略号を表8に示す．

C_3 植物における，同位体分別（discrimination：Δ）は以下の式で表される．

$$\Delta = a_b\frac{P_a-P_s}{P_a}+a\frac{P_s-P_i}{P_a}+a_i\frac{P_i-P_c}{P_a}+b\frac{P_c}{P_a}+\frac{\frac{eR_d}{k}+f\Gamma^*}{P_a} \quad (6)$$

すなわち以下の5つのステップで光合成に伴う CO_2 の安定同位体の分別が起こる．

1）大気から葉の表層まで（境界層）での CO_2 拡散
2）葉の表層から細胞間隙までの CO_2 拡散
3）細胞間隙から葉緑体までの CO_2 拡散
4）葉緑体内でのRubiscoおよびPEPカルボキシラーゼによる CO_2 固定
5）暗呼吸および光呼吸

3）が，CO_2 の内部拡散コンダクタンスに関係する項である．細胞間隙から葉緑体までの CO_2 分圧の低下がまったくない（つまり，CO_2 の内部コンダクタンスが無限大である）と仮定する（$P_c=P_i$）．さらに暗呼吸速度に伴う同位体分別と光呼吸による同位体分別が無視できると仮定する．その場合の仮想的な同位体分別は

$$\Delta_i = a_b\frac{P_a-P_s}{P_a}+a\frac{P_s-P_i}{P_a}+b'\frac{P_i}{P_a} \quad (7)$$

実際に生じる同位体分別と，仮想的な同位体分別との差は，次の式で表される．

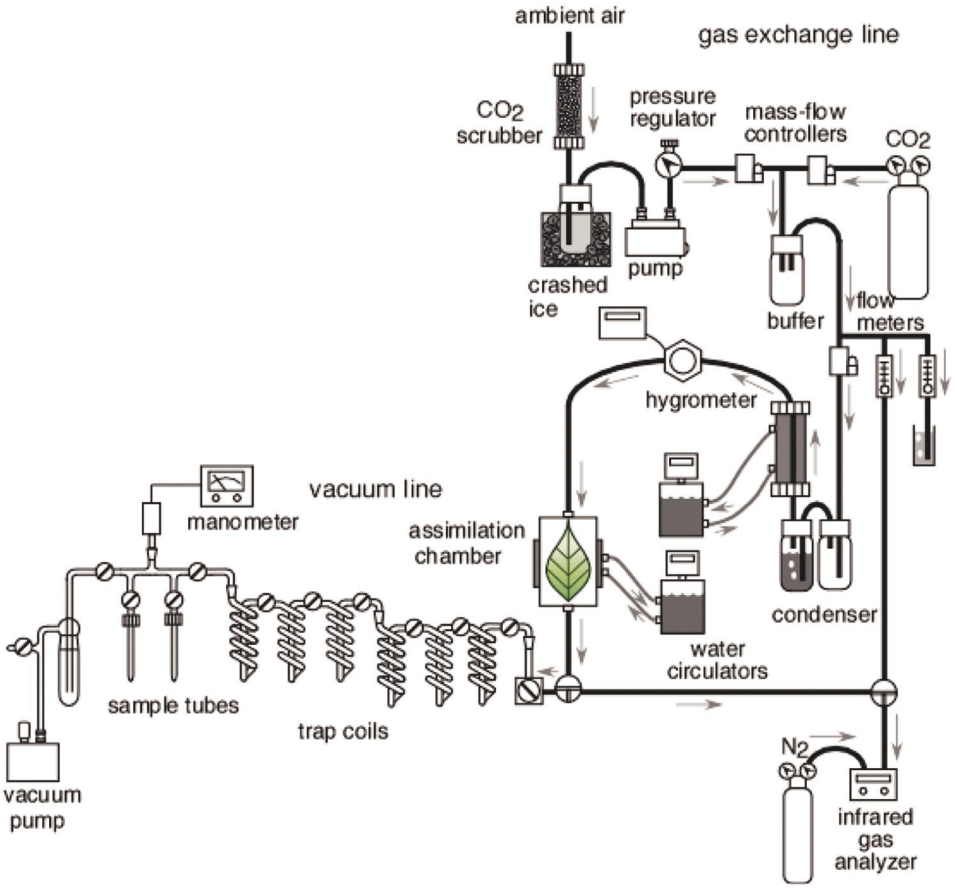

図5：葉内 CO_2 コンダクタンスを測定するための装置の概略．右側がガス交換測定装置，左側が真空ライン．

表8：葉内 CO_2 コンダクタンスの計算に使われるパラメーター一覧

記号	説明	単位
Δ	炭素安定同位体分別	‰
A	光合成速度	μmol m^{-2} s^{-1}
P_a	外気の二酸化炭素分圧	mol mol^{-1}
P_s	葉の表面の CO_2 分圧	mol mol^{-1}
P_e	チャンバに入る空気の CO_2 分圧	mol mol^{-1}
P_o	チャンバから出る空気の CO_2 分圧	mol mol^{-1}
P_i	葉内の細胞間隙の CO_2 分圧	mol mol^{-1}
P_c	葉緑体での CO_2 分圧	mol mol^{-1}
g_i	葉内での CO_2 の拡散コンダクタンス	mol m^{-2} s^{-1}
a_b	境界層での CO_2 の拡散に伴う同位体分別	‰
a	気孔での CO_2 の拡散に伴う同位体分別	‰
a_i	水中での CO_2 の水和・拡散に伴う同位体分別	‰
b	Rubisco と PEP-carboxylase による同位体分別	‰
b'	Rubisco と PEP-carboxylase による同位体分別の仮定値	‰
a	気孔での二酸化炭素の拡散に伴う同位体分別	‰
f	光呼吸に伴う同位体分別	‰
Γ^*	暗呼吸がないときの CO_2 補償点	mol mol^{-1}
e	暗呼吸に伴う同位体分別	‰
R_d	暗呼吸速度	μmol m^{-2} s^{-1}
k	Rubisco のカルボキシル化効率	mol m^{-2} s^{-1}
δ_e	チャンバに入る CO_2 の安定同位体比	‰
δ_o	チャンバから出る CO_2 の安定同位体比	‰

$$\Delta_i-\Delta=(b-a_i)\frac{P_i-P_c}{P_a}+(b'-b)\frac{P_i}{P_a}-\frac{\frac{eR_d}{k}+f\Gamma^*}{P_a} \quad (8)$$

気孔から葉緑体までの CO_2 の内部コンダクタンス（g_i）は，次のように定義される：

$$P_i-P_c=A/g_i \quad (9)$$

（4）式を（3）式に代入し，$b'=b$ と仮定すると

$$\Delta_i-\Delta=\frac{b-a_i}{g_i}\frac{A}{P_a}-\frac{\frac{eR_d}{k}+f\Gamma^*}{P_a} \quad (10)$$

Δ_i，Δ，A，P_a は，炭素安定同位体比と光合成測定によって計算できる．また，b，a_i は定数であると考えてよい．従って，$\Delta_i-\Delta$ に対して，A/P_aをプロットして，傾き（slope）を求めれば，その傾きから内部コンダクタンスが計算できる．

$$g_i=(b-a_i)/\text{slope} \quad (11)$$

傾きからではなく，測定データから直接拡散コンダクタンスを計算することもできる．暗呼吸速度に伴う同位体分別 e は非常に小さく，無視できる[25]．また，光呼吸による同位体分別 f の影響も無視できると考える．このとき内部コンダクタンスは

$$g_i=\frac{b-a_i}{\Delta_i-\Delta}\cdot\frac{A}{P_a} \quad (12)$$

ここでは b と a_i は，それぞれ $b=30$ ‰，$a_i=1.8$ ‰．$b=28$ ‰とする場合もある．

仮想的な同位体分別 Δ_iは，次のようにして求める．(6)式で，境界層の拡散抵抗が無視できる（$P_a=P_s$）と仮定して，$a=4.4$ ‰，$b'=30$ ‰とおき，次式で計算する．P_a，P_i は，ガス交換測定によって求められる．

$$\Delta_i=4.4(P_a-P_i)/P_a+30P_i/P_a \quad (13)$$

実際に生じる同位体分別 Δ は次のようにして計算する．

$$\Delta=\frac{\xi(\delta_o-\delta_e)}{1+\delta_o-\xi(\delta_o-\delta_e)} \quad (14)$$

$$\xi=\frac{P_e}{P_e-P_o} \quad (15)$$

P_e，P_o は，チャンバの入り口と出口の CO_2 分圧で，ガス交換測定によって測定される．δ_e，δ_oは，チャンバの入り口と出口の CO_2 の安定同位体比で，真空ラインを使って集めたガスの炭素安定同位体比測定により求められる．

1.b.3　窒素安定同位体比

1.b.3.1　窒素安定同位体比とは

植物の安定同位体でよく測定されているのは炭素についで窒素である．窒素の安定同位体比は光合成のプロセスとは直接関係しないが，ここで簡単に変動原理と利用方法を紹介する．窒素には 2 つの安定同位体 ^{14}N と ^{15}N がある．^{14}N は存在比が高く大気中の窒素の 99.633%を占める．大気の窒素の同位体組成は一定であるため[28]，大気中の窒素は窒素安定同位体の標準物質として使われている（表 4）．すなわち，大気中窒素の安定同位体比は 0 ‰である．窒素安定同位体比は $\delta^{15}N$ と標記され（表 3），自然界にある植物の $\delta^{15}N$ は−10〜＋10 ‰である[36]．

植物体の窒素安定同位体比の測定方法は 1.4 章を参照されたい．

1.b.3.2　窒素安定同位体比の決定要因と利用方法

炭素の安定同位体と同じように，植物の $\delta^{15}N$ は窒素供給源の $\delta^{15}N$，窒素代謝過程での同位体分別，窒素化合物の組成や転流などに影響を受ける（表 9）．植物への窒素供給源は，窒素固定をしない植物では土壌窒素，窒素固定する植物では土壌と大気中の窒素である．土壌表面の窒素は大気と比較すると ^{15}N が多く，$\delta^{15}N$ の平均値はおよそ 9.2 ‰である[2]．一般的には，土壌が深くなるほど ^{15}N が増加し，$\delta^{15}N$ の値はよりプラスになる[29]．

炭素の場合と同様，窒素についてもほとんどの反応では重い同位体 ^{15}N が分別される．ただし，窒素固定反応では軽い同位体 ^{14}N が分別される場合がある（表 9）．そのため，炭素の場合とは異なり，植物の $\delta^{15}N$ はプラスの値もマイナスの値もとりうる．植物の部位別の $\delta^{15}N$ を表 10 に示す[1]．

植物によって利用される土壌窒素は，硝酸態（NO_3^-）

表 9：さまざまなプロセスにおける窒素安定同位体分別[1]

過程	同位体分別係数
非生物的過程	
水中での NO_3^-，NH_3，NH_4^+ の拡散	1.000
大気中での NO_3^-，NH_3，NH_4^+ の拡散	1.018
土壌中の生物的過程	
N_2O 還元	1.034〜1.039
脱窒	1.028〜1.033
窒素固定	0.991〜1.004
硝化	1.015〜1.035
植物	
アンモニア同化	1.009〜1.020
硝酸同化	1.003〜1.030

表 10：カリフォルニア砂漠の根粒をもつマメ科植物 *Dalea schottii* における部位別の窒素安定同位体比[1)]

組織	δ^{15}N（‰）
葉	−1.5（0.2）
果実・花	−1.1（0.7）
茎	−3.1（0.1）
根	−3.0（0.6）
根粒	+6.3（1.4）
植物全体	−2.0（0.2）

かアンモニア態（NH_4^+）となっている．硝酸態で窒素が吸収される場合，最大 20 ‰の分別が生じる[36)]．また，窒素固定を行う植物の場合，植物組織の中では根粒に ^{15}N が濃縮されて他の組織よりも δ^{15}N が高くなる（表 10）．炭素と比べると窒素の同位体分別は小さく，また同位体分別がよく分かっていない反応過程も多いため，窒素の δ^{15}N と植物の生理的な過程とを関連づけるのは難しい場合が多い．

δ^{15}N は植物による窒素固定の研究に広く利用されている[1)30)]．窒素の同位体分別は小さいため，植物の δ^{15}N は窒素供給源の安定同位体比を反映すると考えてよい．窒素固定をする植物の窒素供給源は土壌と大気の 2 つである．土壌表面の窒素は平均 9.2 ‰であり，大気中窒素の δ^{15}N は 0 ‰である．したがって，窒素固定を行って大気から窒素の供給を受けているマメ科の植物は，窒素固定をしない植物よりも δ^{15}N が低くなる傾向を示す（図 6）．

1.b.4　酸素・水素安定同位体比

1.b.4.1　酸素・水素安定同位体比とは

植物の水素安定同位体比 δD および酸素安定同位体比 δ^{18}O は，植物による水利用と深い関係がある．安定同位体比の標準物質としては，水素も酸素も共に標準海水（standard mean ocean water: SMOW）が用いられる（表 4）．水素安定同位体比は非常に変動が大きく，降水では 400 ‰にもなる[1)]．また降水の δD と δ^{18}O との間には正の直線的な関係が成立することが知られており，天水線 Meteoric Waterline といわれている[1)]．

1.b.4.2　水素・酸素安定同位体比の決定要因と利用方法

水が蒸発するときには重い安定同位体が分別されるため，水蒸気には軽い安定同位体（^{16}O，H）が多く，残った水には重い安定同位体（^{18}O，D）が多くなる．逆に水蒸気が凝固して水滴になるときには，軽い安定同位体が分別される．蒸発と凝固による同位体分別の結果，気温と降雨の安定同位体比との間には正の相関関係が成立し，気温が高いほど降水の δ^{18}O はプラスになる[31)]．

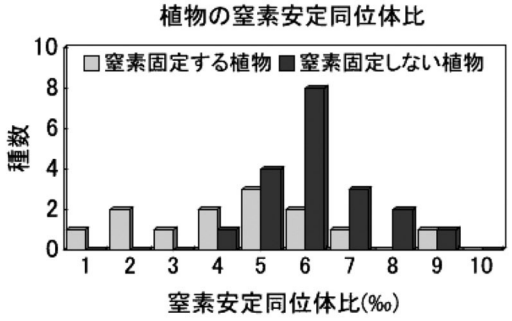

図 6：窒素固定を行なう植物と行なわない植物における窒素安定同位体比[2)]．

葉の水の δ D および δ^{18}O は，供給源の水の δD および δ^{18}O と，蒸散の影響を受ける．このことから，炭素安定同位体比 δ^{13}C と同様に，植物の基質である水の起源を δD および δ^{18}O から推定することが可能である[32)]．また，植物の水利用と関連させることも可能であると考えられるが，蒸散と同位体分別との関係モデル（Craig-Gordon モデル[33)]）は実測値とのずれが大きく未だに不完全であり，現在も修正が試みられている[34)]．

参考文献

1）E. T. Nilsen & D. M. Orcutt, The physiology of plants under stress, abiotic factors. New York, John Willey & Sons, 1996, P.689

2）J. R. Rhleringer & C. B. Osmond, Stable isotopes, ed. R. W. Pearcy, J. Ehleringer, H. A. Mooney and P. W. Rundel, Doedrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000, P.281

3）D. Widory & M. Javoya, Earth Planet. Sci. Lett. **215** (2003) P.289

4）Y. T. Hanba, S. Mori, T. T. Lei, T. Koike & E. Wada, Oecologia **110** (1997) P.253

5）J. C. Vogel, Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis, ed. California, Academic Press, Inc., 1993, P.29

6）Farquhar, G. D, O'Leary, M. H, Berry & J. A, Aust J Plant Physiol **9** (1982) P.121

7）半場祐子，「光合成機能の評価 3 ：炭素安定同位体」，種生物学会編，光と水と植物のかたち ── 植物生理生態学入門 ──，文一総合出版，2003．P.259

8）G. D. Farquhar, Aust J Plant Physiol **72** (1993) P.245

9）N. Buchmann, J. Brooks, K. Rapp & J. Ehleringer, Plant Cell Environ **19** (1996) P.392

10）J. Kubásek, J. Šetlík, S. Dwyer & J. Šantrůček, Photosynth Res **91** (2007) P.47

11) Y. Tazoe, K. Noguchi & I. Terasima, Plant Cell Environ **29** (2006) P.691
12) M. M. Bender & D. Smith, J. Br. Grassld Soc. **28** (1973) P.97
13) R. F. Sage, L. Meirong & R. K. Monson, The taxonomic distribution of C_4 photosynthesis., ed. California, USA, Academic Press, 1999, P.551
14) R. F. Sage, New Phytol **161** (2004) P.341-370
15) J. R. Ehleringer, A. E. Hall, & G. D. Farquhar, Stable isotopes and plant carbon-water relations, California, Academic Press (1993) P.539
16) S. Ponton, L. B. Flanagan, K. P. Alstad, B. G. Johnson, K. Morgenstern, N. Kljun, T. A. Black & A. G. Barr, Global Change Biology **12** (2006) P.294
17) Y. T. Hanba, H. Kogami & I. Terashima, Isotopes Environ. Health Stud. **39** (2003) P.5
18) U. Seibt, A. Rajabi, H. Griffiths & J. A. Berry, Oecologia **155** (2008) P.441
19) J. Flexas, M. Ribas-Carbó, A. Diaz-Espejo, J. Galmés & H. Medrano, Plant Cell and Environment **31** (2008) P. 602
20) F. Loreto, P. C. Harley, M. Di & T. D. Sharkey, Plant Physiol **98** (1992) P.1437
21) J. Lloyd, J. P. Syvertsen, P. E. Kriedemann & G. D. Farquhar, Plant, Cell and Environment **15** (1992) P.873
22) M. Lauteri, A. Scartazza, M. C. Guido & E. Brugnoli, Funct Ecol **11** (1997) P.675
23) Y. T. Hanba, H. Kogami & I. Terashima, Plant Cell and Environment **25** (2002) P.1021
24) 半場祐子, 日本生態学会誌 **57** (2007) P.361
25) S. Von Caemmerer & J. R. Evans, Aust J Plant Physiol **18** (1991) P.287
26) P. C. Harley, F. Loreto, G. D. Marco & T. D. Sharkey, Plant Physiol **98** (1992) P.1429-1436
27) G. J. Ethier & N. J. Livingston, Plant Cell Environ **27** (2004) P.137-153
28) A. Mariotti, Nature **303** (1983) P.685
29) M. I. Makarova, J. H. C. Cornelissen, R. S. P. V. Logtestijn & B. Glasserc, Soil Biology and Biochemistry **40** (2008) P.1082
30) T. L. Pons, K. Perreijn, C. V. Kessel & M. J. A. Werger, New Phytol **173** (2007) P.154
31) M. M. Barbour, L. A. Cernusak & G. D. Farquhar, Factors affecting oxygen isotope ratio of plant organic matter., ed. L. B. Flanagan, J. R. Ehleringer and D. E. Pataki, California, Elsevier Academic Press, 2007, P.9
32) H. Asbjornsen, G. Shepherd, M. Helmers & G. Mora, Plant and Soil **308** (2008) P.69
33) H. Craig & L. Gordon, Deuterium and oxygen-18 variations in the ocean and the marine atmosphere. I, ed. E. Tongiorgi, Proceedings of a Conference on Stable Isotopes in Oceanographic Studies and Palaeotemperatures., Lischi and Figli, Pisa, Italy, 1965, P.9-130
34) F. Ripullone, N. Matsuo, H. Stuart-Williams, S. C. Wong, M. Borghetti, M. Tani & G. Farquhar, Plant Physiol **146** (2008) P.729
35) M. H. O'Leary, Bio Science **38** (1988) P.328
36) R. D. Evans, Trends in Plant Science **6** (2001) P.121