



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	呼吸速度（CO ₂ 発生速度）測定
Author(s)	野口, 航
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 c
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, 83-87
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39104
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-015.pdf



1. 個葉から葉緑体スケールのガス交換

c. 呼吸速度 (CO₂ 発生速度) 測定

野口 航¹⁾

動物、植物を問わず、酸化的呼吸は糖などの基質を、O₂ を消費して CO₂ と H₂O に分解し、その過程で ATP を生成する反応である。植物の葉では光照射下において、同時に O₂ を消費して CO₂ を発生する光呼吸反応が行われる。そのため、ミトコンドリアの TCA 回路を経由した呼吸を暗呼吸 (dark respiration) と呼ぶ。本章では植物組織の CO₂ 発生速度としての暗呼吸速度の測定法について紹介する。

Measurement of CO₂ efflux rate

Ko Noguchi

Mitochondrial respiration consumes O₂ in the respiratory chain and produces CO₂ from the TCA cycle. In illuminated leaves, photorespiration also consumes O₂ and produces CO₂. In this chapter, I introduce methods of CO₂ efflux rate from the TCA cycle in darkened or illuminated leaves.

1.c.1 呼吸系における CO₂ 発生反応

植物の呼吸系における CO₂ 発生は、ミトコンドリアの TCA 回路 (クエン酸回路) のピルビン酸脱水素酵素複合体 (pyruvate dehydrogenase complex, PDC), イソクエン酸脱水素酵素 (NAD-dependent isodehydrogenase, NAD-IDH), 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体 (2-oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDC), リンゴ酸酵素 (malic enzyme, ME) の 4 反応でおこる (図 1)。また、酸化的ペントースリン酸回路の 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6-phosphogluconate dehydrogenase) の反応においても、1 分子の 6-ホスホグルコン酸から 1 分子の CO₂ が発生する (図 2)¹⁾。

ピルビン酸が唯一のミトコンドリア基質として使われ、TCA 回路で完全に分解される場合には、1 分子のピルビン酸から PDC, NAD-IDH, OGDC の反応により 3 分子の CO₂ が発生する。しかし、硝酸同化に TCA 回路からクエン酸やイソクエン酸が炭素骨格として供給される場合には、TCA 回路が完全に回転できない。そのときには、補充反応としてオキサロ酢酸やリンゴ酸が TCA 回路の基質として使われ、ピルビン酸の供給のためにリンゴ酸酵素が働く場合がある。また、生合成反応に NADPH が供給される場合には、酸化的ペントースリン酸回路から供給される。

1.c.2 CO₂ 発生速度としての暗呼吸速度の測定

暗呼吸速度は暗黒下で通常、光合成測定装置を用いて測定する。栽培時の温度・湿度条件で測定すると良い。以前は、自作のガス交換用同化箱 (チャンバー) に葉を

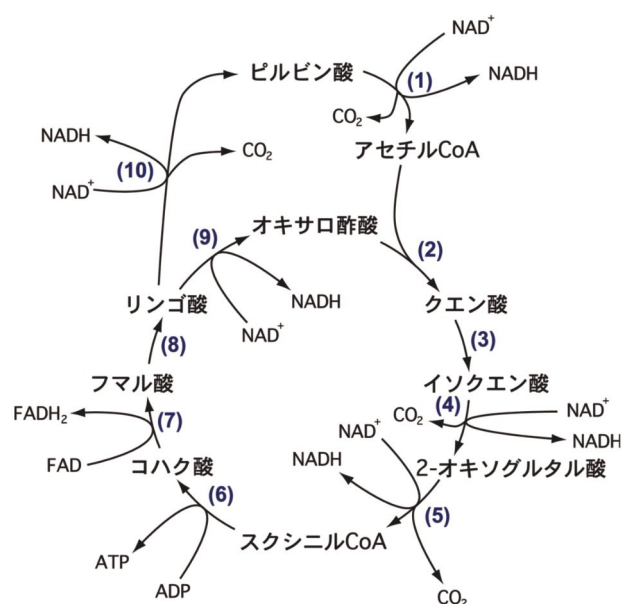


図 1: 植物ミトコンドリアの TCA 回路。(1)ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC), (2)クエン酸合成酵素, (3)アコニターゼ, (4)イソクエン酸脱水素酵素 (NAD-IDH), (5)2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体 (OGDC), (6)スクニル CoA リガーゼ, (7)コハク酸脱水素酵素, (8)フマラーゼ, (9)リンゴ酸脱水素酵素, (10)リンゴ酸酵素 (ME)。

1) 東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

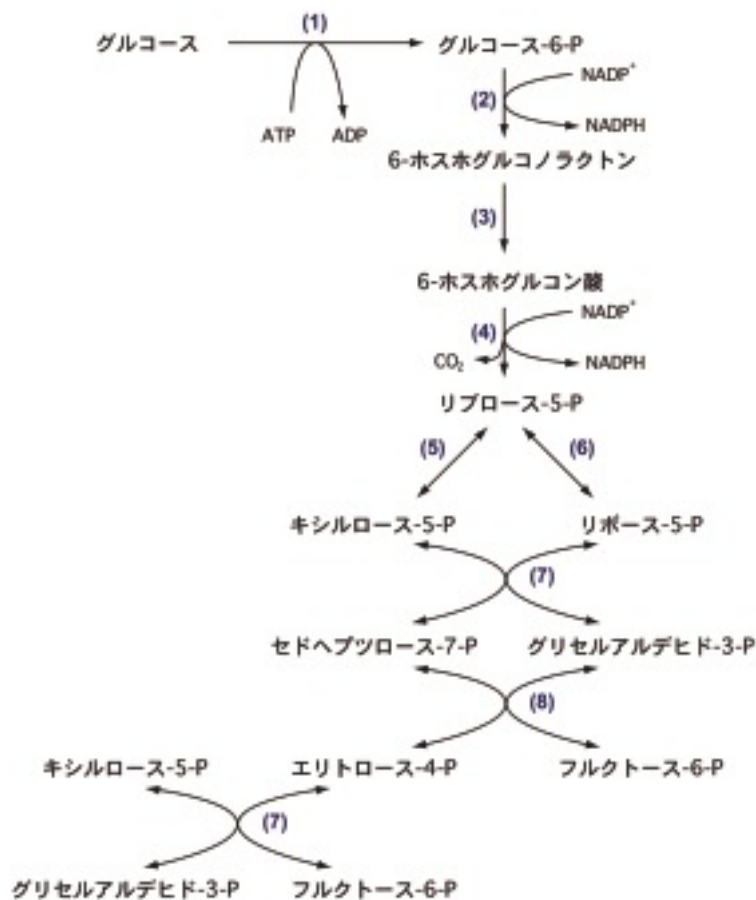


図2：酸化的ペントースリン酸回路。(1)ヘキソキナーゼ、(2)グルコース-6-リン酸脱水素酵素、(3)ラクトナーゼ、(4)6-ホスホグルコン酸脱水素酵素、(5)リブコースリン酸エピメラーゼ、(6)リブコースリン酸イソメラーゼ、(7)トランスケターラーゼ、(8)トランスアルドラーゼ。

挟み、同化箱の入口と出口の CO_2 濃度差を差分式 IRGA (例えば LiCor 社製 ガス交換測定装置 LI-6262 など) で測定していたが、近年は Li-Cor 社製 携帯型ガス交換測定装置 LI-6400 を用いて測定した例がよく報告されている²⁾。

LI-6400 では、ある程度葉温や湿度を調節でき、測定された CO_2 濃度や H_2O 濃度から自動で暗呼吸速度を計算してくれるため、非常に簡便である。しかし、葉の暗呼吸速度は光合成速度に比べて、速度の絶対値が小さいので、測定の際には注意が必要である。LI-6400 を用いる場合には、 6 cm^2 のチャンバーもしくは 2 cm^2 のクロロフィル蛍光を同時に測定できるユニットのチャンバーで、葉のガス交換速度を測定することが多い。暗呼吸速度の低い葉の場合には、チャンバーサイズが小さいとチャンバーの入口と出口の CO_2 濃度差が十分に得られず、安定した値が得られない場合もある。また、LI-6400 ではチャンバーのガスケットに葉を挟んで測定する。測定時のチャンバー内の CO_2 濃度が周囲の CO_2 濃度と差がある場合 (例えば、高 CO_2 条件下での暗呼吸速度の測

定) には、チャンバーのガスケットを通じて CO_2 がリークしうる³⁾。特にチャンバーの入口と出口の CO_2 濃度差を上げるために、流量を下げたときに起こりやすい。リークを最小限にするためには、パージ装置をチャンバーのガスケット周りにつけるとかなり有効である⁴⁾。

葉の暗呼吸速度は光照射後に減少することが多い^{5,6)}。光照射後には葉の光合成産物すなわち呼吸基質が減少するので、暗呼吸速度が減少すると考えられている⁷⁾。また、暗呼吸速度は、夜間の半ばもしくは終わり頃に再び増加する例も報告されている^{8,9)}。Midnight rise of respiration もしくは morning rise of respiration と呼ばれる現象である。この現象の理由として、内在性リズムもしくは呼吸 ATP の需要量の一時的な増加と考えられているが不明である。いずれにしろ、夜間の暗呼吸速度は一定ではなく変化するため、葉の積算炭素獲得量などの計算には注意が必要である。

1.c.3 呼吸商

組織の CO_2 発生速度の測定からでは、どのような反応由来の CO_2 を測定しているかは分からない。しかし、酸素電極などで O_2 消費速度を同時に測定し、呼吸商 (respiratory quotient, RQ, CO_2 発生速度/ O_2 消費速度) を求めることにより、呼吸基質や呼吸系からの還元力 (NADPH や NADH) の利用程度を推定できる。

タンパク質や脂肪のように、分子中酸素の割合が炭水化物よりも少ない物質が呼吸基質になる場合には、呼吸商は1よりも小さくなり、それぞれ約0.8, 0.7となる。トウゴマやナタネなど脂肪を多く含む種子では、発芽時の呼吸商は1よりも小さくなり、デンプンを多く含む種子では、呼吸商は1に近い。一方、リンゴ酸などの有機酸が基質になる場合には、呼吸商は1よりも大きくなる¹⁰⁾。また、生理的な反応が呼吸商に影響する場合がある。硝酸イオンをアンモニウムイオンに変換する硝酸同化反応では CO_2 が放出されるため、硝酸態を与えた植物の根の呼吸商は、アンモニア態を与えた根の呼吸商よりも高くなることが知られている。成長速度の速い植物の根では、硝酸同化がさかんなために成長速度の遅い植物の根に比べて、呼吸商が高い¹⁰⁾。

1.c.4 光照射下の呼吸速度の測定

光照射下の C_3 植物の葉では、Rubisco もしくは PEP-

Case による CO_2 固定、光呼吸経路の glycine dehydrogenase complex (GDC) からの CO_2 発生 (R_{PR}) と TCA 回路からの CO_2 発生 (R_{day} ¹¹⁾) が同時に起こり (図3)、ガス交換測定装置ではその正味の速度を測定している。Rubisco kinetics のパラメータを求めるためや総光合成速度を求めるためにも、光照射下における R_{day} を推定する方法がいくつか報告されている。

1.c.4.1 Laisk 法

R_{day} を求めるために良く用いられている方法である¹¹⁻¹³⁾。 CO_2 交換速度 (A) は、Rubisco の carboxylation 速度 (v_c) と oxygenation 速度 (v_o)、 R_{day} により次式のようにまとめられる。

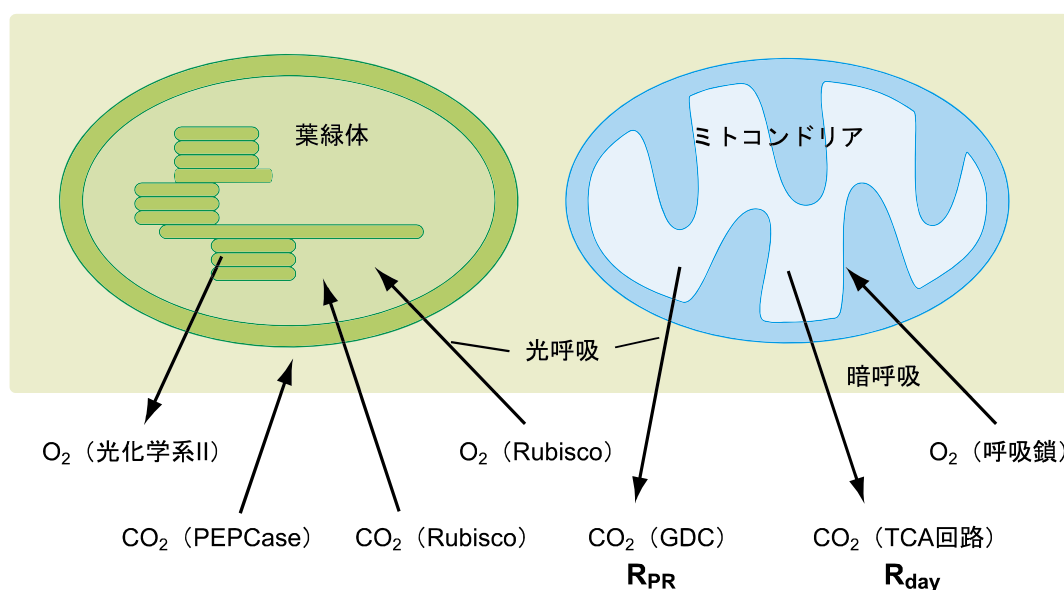
$$A = v_c - 0.5v_o - R_{day}$$

細胞間隙 CO_2 濃度 (c_i) が減少していくと、 v_c と $0.5v_o$ が等しい値になる濃度がある。そのときの c_i を Γ^* と呼び、 Γ^* のときに CO_2 交換速度 (A) は R_{day} と等しくなる。実際には図4のように、葉に当てる光強度を変えて A - c_i カーブを測定し、複数の A - c_i カーブの交点として、 Γ^* と R_{day} を求める。

Laisk 法は c_i によって R_{day} が変化しないということが前提となる。また c_i が低いときにはしだいに光合成産物が減少していくので R_{day} が変化しうる。すばやい測定が必要となる¹⁴⁾。

1.c.4.2 Kok 法

光合成速度の光依存性 (光-光合成曲線) を求めると、



¹¹⁾ R_d とも略される。

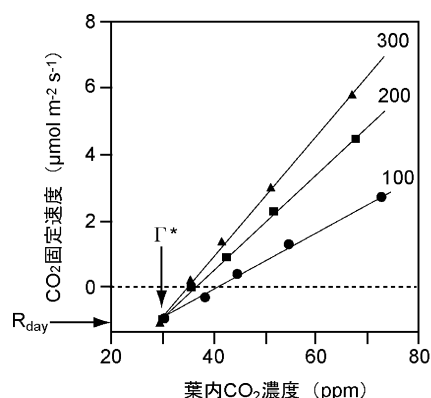


図4：イネ科ナガハグサ属コイナゴツナギ（カナダブルーグラス）の葉の CO_2 固定速度と葉内 CO_2 濃度との関係 (A-C_i 曲線)¹³⁾。図内の数字は光合成測定時の葉に照射した光強度 (光量子束密度 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。直線は各光強度のデータの回帰直線を示す。 v_c と $0.5v_o$ が等しくなる c_i を Γ^* 、そのときの CO_2 放出速度が R_{day} となる。

図5のように曲線の折れ曲がり点がしばしば測定される。これは Kok 効果と呼ばれる¹⁵⁾。折れ曲がり点よりも光強度が強いデータに対する回帰直線を外挿して、 R_{day} を y 切片として求める。Kok 法の問題点は、光強度が下げると c_i が増加するために、 R_{day} を過少評価しがちであることである。しかし、 c_i を一定にしても Kok 法から求めた R_{day} は Laisk 法よりも低いという報告もある¹⁶⁾。Laisk 法と Kok 法のどちらの方法でも、暗呼吸速度

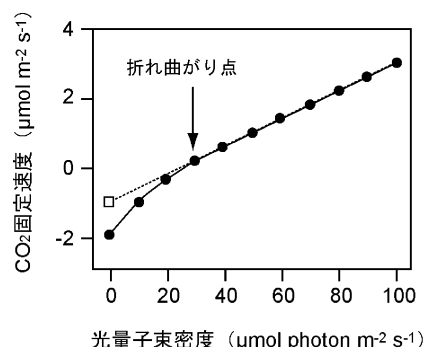


図5：Kok 効果を示している光-光合成曲線。文献値¹⁶⁾をもとにした典型的な CO_2 固定速度のデータが黒丸で示しており、弱光下で曲線が折れ曲がっている。直線近似できるデータの回帰直線を点線で示し、外挿点の白四角のシンボルが、光照射下の TCA 回路の CO_2 放出速度 (R_{day}) を示す。

(R_n) よりも R_{day} の方が低い。

1.c.4.3 ^{14}C ラベル

Laisk 法も Kok 法でも、TCA 回路から放出された CO_2 が葉内で Rubisco により再固定されるフラックス (R_{dr}) を考慮することができない (図6)。どちらの方法でも実際に測っているフラックス (R_{ex}) は、 R_{day} と R_{dr} の差である。 $^{14}\text{CO}_2$ でラベルしてパルスチェイスする方法では、 R_{dr} を考慮した方法が考案されている¹⁷⁾。

彼らは $^{14}\text{CO}_2$ であらかじめ葉の光合成産物をラベルしておき、その後、 $^{12}\text{CO}_2$ ・光照射下で $^{14}\text{CO}_2$ として出て

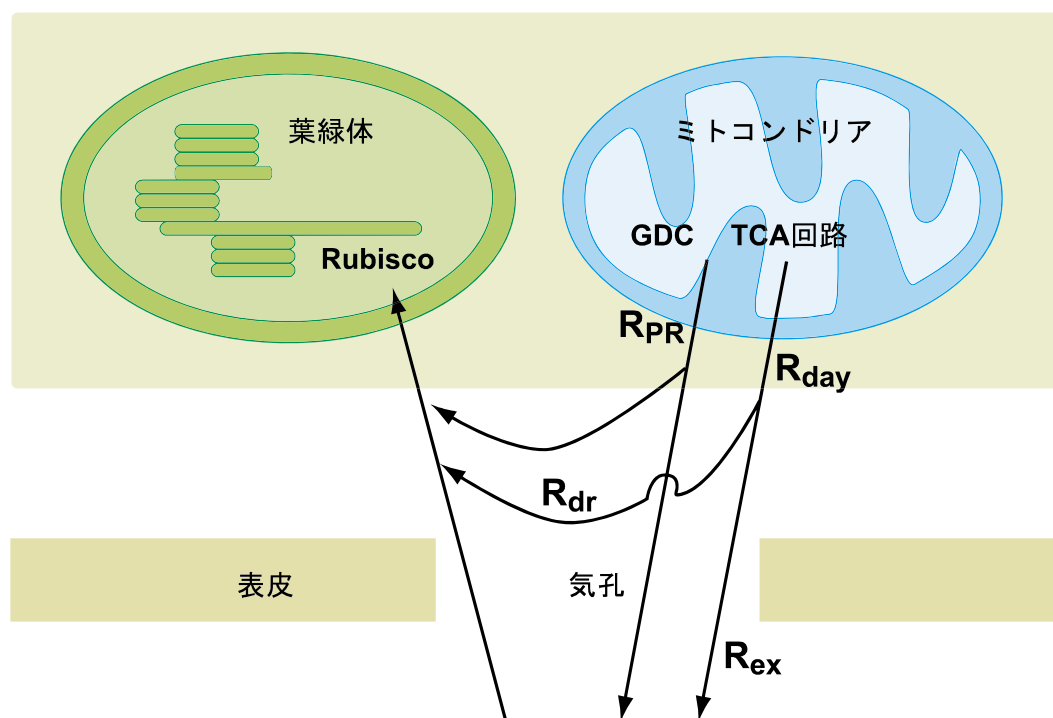


図6：光照射下の葉において、ミトコンドリアの TCA 回路から放出された CO_2 (R_{day}) の一部 (R_{dr}) は、葉内で Rubisco により再固定され、葉外に出ていくフラックス (R_{ex}) は R_{day} の一部である。

くるフラックスを測定している。そのときに、2つのO₂濃度条件、21% O₂条件と光呼吸が抑制される1.5% O₂条件、で¹⁴CO₂フラックスを測定し、光呼吸経路からのCO₂発生とTCA回路からのCO₂発生とを分けている。さらに3% CO₂条件下でも測定している。3% CO₂下では細胞間隙CO₂の¹⁴C/¹²C比が非常に低く抑えられ、TCA回路から発生した¹⁴CO₂がRubiscoで再固定される可能性が低い。

この方法は、O₂濃度や*c_i*が変化したときに、ミトコンドリアの呼吸速度(TCA回路の速度)が変化しないことが前提となっている。この方法でもとめた*R_{day}*も暗呼吸速度*R_n*よりも低い^{17,18)}。

1.c.4.4 安定同位体を利用する方法

Gas-houndと呼ばれるLi-Cor社製のLI-800を用いる方法と、同位体質量分析計を用いる方法が報告されている。

LI-800は¹²CO₂に比べて¹³CO₂の感度が非常に低い(1.7%程度)。その感度の差を利用して*R_{day}*を求める¹⁹⁾。C₄植物において、通常のCO₂濃度下では光呼吸はほとんど働かない。そのため光照射下のCO₂発生は、TCA回路からのCO₂発生と維管束鞘細胞からのCO₂リークである。葉を挟んだ光照射下のチャンバーに、あらかじめ¹²CO₂のみを含む空気を流しておき、¹³CO₂のみを含む空気に切り替えた後に、葉から放出される¹²CO₂をLI-800で測定する。維管束鞘細胞からのCO₂リークはすばやく¹³CO₂に置き換わるために、葉から放出される¹²CO₂は、*R_{day}*からRubiscoに再固定されるフラックス(*R_{dr}*)を引いた*R_{ex}*になる。また同時に¹³CO₂条件下のCO₂固定速度(*P_n*)や気孔コンダクタンス(*g_s*)を¹³CO₂にも高い感度を示すガス交換測定装置(例えばLI-6262)で測定しておく。それらのデータと下記の式から*R_{day}*(=*R_{ex}*+*R_{dr}*)を求める。

$$^{12}c_i = R_{ex} / g_s$$

$$R_{dr} = ^{12}c_i / ^{13}c_i \times P_n$$

Loretoらは上記の方法でトウモロコシの葉の*R_{day}*は*R_n*とほぼ同じ値を示すことを報告している¹⁹⁾。またC₃植物でも同様の方法を用いて*R_{day}*を推定していたが、PEPCaseのCO₂固定や光呼吸によるCO₂発生を抑えることが難しく、正確な*R_{day}*を求めることはできなかった²⁰⁾。

同位体質量分析計を用いて、¹²CO₂と¹³CO₂を同時に測定することにより*R_{dr}*や*R_{day}*を推定することも報告されている²¹⁾。彼らの方法でも、高CO₂濃度条件では光呼吸が抑えられ、TCA回路からのCO₂発生は変化しないという前提が、*R_{day}*を推定するために必要である。

参考文献

- 1) H.-W. Heldt「植物生化学」, 金井龍二(訳), スプリンガーフェアラーク, 2000, p.150.
- 2) L. F. Ow, K. L. Griffin, D. Whitehead, A. S. Walcroft & M. H. Turnbull, New Phytol. **178** (2008) P.123.
- 3) D. Bruhn, T. N. Mikkelsen & O. K. Atkin, Physiol. Plant. **114** (2002) P.57.
- 4) S.-I. Miyazawa & I. Terashima, Plant Cell Env. **24** (2001) P.279.
- 5) J. Azcón-Bieto & C. B. Osmond, Plant Physiol. **71** (1983) P.574.
- 6) K. Noguchi, K. Sonoike & I. Terashima, Plant Cell Physiol. **37** (1996) P.377.
- 7) K. Noguchi & I. Terashima, Physiol. Plant. **101** (1997) P.1.
- 8) J. Yamagishi, R. Ishii & A. Kumura, Jap. J. Crop Sci. **58** (1989) P.114.
- 9) K. Lee & S. Akita, Plant Prod. Sci. **3** (2000) P.38.
- 10) H. Lambers, F. S. Chapin III & T. L. Pons, Plant Physiological Ecology, New York, Springer, 2008, p.102.
- 11) A. K. Laik, Kinetics of Photosynthesis and Photorespiration in C₃-Plants, Nauka, 1977.
- 12) A. Brooks & G. D. Farquhar, Planta, **165** (1985) P.397.
- 13) O. K. Atkin, M. H. M. Westbeek, M. L. Cambridge, H. Lambers & T. L. Pons, Plant Physiol. **113** (1997) P.961.
- 14) O. K. Atkin, A. H. Millar, P. Gardeström & D. A. Day, Photosynthesis: Physiology and Metabolism, ed. R. C. Leegood, T. D. Sharkey & S. von Caemmerer, Dordrecht, Kluwer, 2000, p.162.
- 15) B. Kok, Enzymologia **13** (1948) P.1.
- 16) R. Villar, A. A. Held & J. Merino, Plant Physiol. **105** (1994) P.167.
- 17) T. Pärnik & O. Keerberg, Physiol. Plant. **129** (2007) P.34.
- 18) T. Pärnik & O. Keerberg, J. Exp. Bot. **46** (1995) P.1439.
- 19) F. Loreto, V. Velikova, D. I. Marco, Aust. J. Plant Physiol. **28** (2001) P.1103.
- 20) P. Pinelli & F. Loreto, J. Exp. Bot. **54** (2003) P.1761.
- 21) S. Haupt-Herting, K. Klug & H. P. Fock, Plant Physiol. **126** (2001) P.388.