



Title	ガスクロマトグラフィーと酸素電極を用いた無機炭素親和性の測定
Author(s)	大西, 紀和; 福澤, 秀哉
Description	2章 個体・環境の測定 4. 藻類の光合成関連測定 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, 149-158
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39113
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-024.pdf



4. 藻類の光合成関連測定

b. ガスクロマトグラフィーと酸素電極を用いた無機炭素親和性の測定

大西 紀和^{1)*}, 福澤 秀哉¹⁾

炭酸固定を研究する上で、溶存無機炭素に対する親和性を評価することは、生物がどのように CO_2 を利用しているのかを知る上で重要である。微細藻類の CO_2 (無機炭素) 濃縮機構を研究する上で重要なガスクロマトグラフィーを利用した無機炭素親和性の測定法を紹介する。

A Method for photosynthetic affinity against inorganic carbon using gas chromatography and oxygen electrode.

Norikazu Ohnishi, Hideya Fukuzawa

In order to understand how the photosynthetic organisms utilize carbon dioxide, it is important to evaluate the photosynthetic affinities against inorganic carbon. Especially microalgae efficiently utilize carbon dioxide by inducing carbon-concentrating mechanisms. We described a refined method to measure the photosynthetic affinity using gas chromatography and oxygen electrode.

4.b.1 はじめに

炭酸固定酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) は、1 分子のリブローズ-1,5-ジリン酸と 3 分子の CO_2 と 3 分子の水分子から、2 分子の 3-ホスホグリセリン酸を生成するカルボキシラーゼ反応に加えて、2 分子のリブローズ-1,5-ジリン酸と 2 分子の酸素から 2-ホスホグリコール酸と 3-ホスホグリセリン酸を生成するオキシゲナーゼ反応も触媒する。光合成生物にとって、本酵素の CO_2 に対する親和性と O_2 に対する親和性の違いは炭酸固定能を規定する大きな要因である。また、RubisCO の CO_2 に対する K_m 値は、陸上植物に比べて水生光合成生物は、高い値を示すことから、 CO_2 を有効に利用するために無機炭素 (Ci ; CO_2 と HCO_3^-) 濃縮機構 (carbon-concentrating mechanism: 以下 CCM と略す) をもつことが知られている (図 1)。この CCM は Ci 欠乏環境において誘導され、細胞膜や葉緑体胞膜における輸送体と細胞の各コンパートメントに局在する炭酸脱水酵素によって構成されており、Rubisco 周辺に CO_2 を濃縮することで光合成の効率を維持する役割を担っている¹⁻³⁾。ここでは、CCM の総合的活性の指標として用いられる、ガスクロマトグラフィーと酸素電極を用いた細胞の無機炭素に対する親和性の評価方法を述べる。実験材料として緑藻クラミドモ

ナスを使った場合について述べるが、本方法は、その他の藻類 (ラン藻⁴⁾, 灰色藻⁵⁾ など) にも利用されている。ただし、測定結果を解析する際に利用する細胞濃度や酸素電極の温度等のパラメーターは、生物種ごとに設定する必要がある。

光合成における細胞の無機炭素 (Ci) に対する親和性とは、細胞を酵素に例えて、どのレベルの光合成基質が最大光合成活性を与えるのかを測定して、 $K_{1/2}$ 値 ("K-half" と読む。 $K_{0.5}$ と表記することもある) として表記する。例えば、この $K_{1/2}$ 値が低ければ、CCM が作動しており細胞全体として、 Ci に対して親和性が高い状態を示す

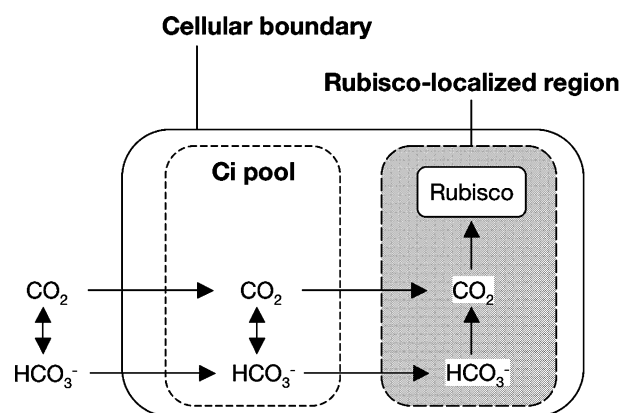


図 1: 微細藻類の無機炭素濃縮機構を示した概略図。細胞外から取り込まれた無機炭素 (Ci ; CO_2 と HCO_3^-) は、 Ci pool を経て Rubisco の局在するコンパートメント (カルボキシゾームやピレノイド) に輸送され、最終的に CO_2 として Rubisco に供給される。 CO_2 と HCO_3^- の交換反応には、炭酸脱水酵素が関与する (文献 8 参照)。

1) 京都大学大学院生命科学研究科

(*現 岡山大学大学院自然科学研究科)

と判断できる。本解析法は Ci 輸送も含めた細胞の光合成特性を知る方法である。

具体的には、培地中および細胞中の Ci を一旦枯渇させ、その細胞懸濁液に NaHCO_3 溶液を徐々に加えていき、各濃度における酸素発生活性 (Dissolved inorganic carbon (DIC)-dependent photosynthesis activity) を測定する。最大の酸素発生活性 ($V_{\max}$) の 50% の活性を与える NaHCO_3 濃度を算出し、これを $K_{1/2}$ 値とする。ただ、培地中および細胞中の Ci を、完全に除去する (枯渇させる) ことは難しい。定性的には、酸素発生速度をモニターして、新たな酸素発生が無くなった時点で「 Ci は枯渇した」と仮定する場合もあるが、 Ci に対する親和性の低い細胞の場合は、酸素発生が停止するまでに時間を要するので、その間に細胞の生理状態が変化してしまう可能性がある。そこで、酸素発生速度の測定を開始する時点での、細胞懸濁液における溶存 Ci 量を推定する必要がある。そのためには、細胞懸濁液に含まれる Ci を水素ガスと Ni 触媒 (メタナイザー) を用いてメタンに還元し、これをガスクロマトグラフ (ガスクロ) (図 2) で定量する。この値を用いることで、初期 Ci 濃度を知ることができるので、低 Ci 濃度での光合成速度を正確に評価することが可能となる^{6,7)}。

実験では、酸素電極とガスクロを短時間のうちに並行して操作することになるので、正確な測定を行うには準備と慣れが必要である。また、測定当日に対数増殖期の細胞を使用する必要があるため、あらかじめ計画を立てて、細胞を培養しておく。測定前日には、測定用各種溶液 (細胞懸濁液用バッファのストック溶液等) を調製する。測定当日には、(1)ガスクロの準備、(2)細胞懸濁液用バッファの調製 (ガスクロの準備中に行う。前日までに行っても良い。)(3)酸素電極の準備 (ガスクロの準備中に行う。

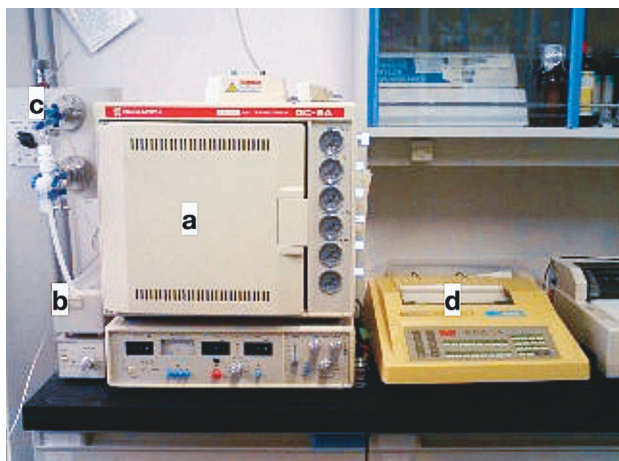


図 2: ガスクロマトグラフの全体像。a. 本体, b. メタナイザー, c. ガラスセル, d. レコーダー。

一部は前日までに行っても良い。)(4)細胞の調製 (ガスクロの準備中に行う。)を行い、測定する。器具等を片付けて得られたデータを解析する。ただし、測定当日は、まずガスクロの準備から始める。途中 2 時間程度の待ち時間があるので、酸素電極等の準備をする。

4.b.2 器具・装置

- ・酸素電極 (英国 Hansatech Inst. 製, 国内では旭光通商株が「クロロラボ 1」として販売)

測定チャンバーに飽和 KCl 溶液を入れて保管しておくことが多い。その場合は、コントロールボックスやレコーダーのスイッチを入れてみて、反応するようであれば新たに電極を組み直す必要は無い。酸素電極のセットアップについては、前項を参照する。

- ・循環型恒温槽 (EYELA 製, CCA-1111, 28°C に設定)
- ・励起光源 (Megalight100, SCHOTT AG, Mainz, Germany; 測定中に光強度を変えることができる装置が良い)
- ・ガスタイトシリンジ (先端が針状の物。ガイド付 $10\ \mu\text{L}$ 用 2 本と, $100\ \mu\text{L}$ 用, $200\ \mu\text{L}$ 用各 1 本)
- ・酸素発生活性測定用レコーダー (YOKOGAWA 製, LR-4220; 測定しながら NaHCO_3 溶液を加えた点をマークしていくので、記録面が水平なタイプが良い。また、わずかな酸素発生量を正確に測定するために測定レンジを低めに設定する必要がある、かつ 1 回の測定に 10 分程度要するので、チャートの幅は $25\sim 30\ \text{cm}$ 程度が必要)
- ・ガスクロクロマトグラフ (島津製メタナイザー MTN-1, レコーダー [クロマトパック C-R6A] を接続した GC-8A に特注のインジェクションセットを接続して使用。脚注¹⁾ 参照)
- ・窒素ガス (ガスクロに接続するボンベとは別に準備し, HEPES バッファの脱気と, Ci の枯渇に使用する。レギュレーターの後には二分岐コックを連結し, シリコンチューブを接続し, さらにその先端には, ピペットチップを付ける)
- ・電動アスピレーター (ガスクロのカラムの洗浄に使用)

^{注1} メタナイザー前のガラスセルとインジェクションバルブの加工は、関西学院大学理工学部生命科学科の松田祐介先生による。

4.b.3 試薬類

- 100 mM Na_2CO_3 溶液 (ガスクロマトグラフィー-Calibration standard 用. メスフラスコで調製し, ゴム栓で密閉しておく)
- 活性測定用 NaHCO_3 溶液 (20 mL 容量の三角フラスコ (3 本) に超純水をガラスピペットで正確に 20 mL を測り取り, NaHCO_3 を 1.26 g (750 mM), 0.252 g (150 mM), 0.025 g (15 mM) ずつ加えてスターラーで攪拌する. 溶解したらゴム栓をして密閉しておく) (図 3).
- 細胞懸濁用 1M HEPES- NaOH (pH 7.8) (500 mL 程度. オートクレーブ処理する).
- 25% (v/v) H_3PO_4 溶液 (ガスクロ用)

4.b.4 実験

4.b.4.1 ガスクロマトグラフ (ガスクロ) の準備

- 1) 本体とメタナイザーの電源を入れる (部屋の換気を忘れないこと).
- 2) メタナイザーの調節つまみを回して, 触媒温度 (カタリシス) を 450°C に設定する.
- 3) ガラスセル下のコックを閉じ, ガラスセルの横にあるつまみを CHARGE に合わせる.
- 4) ガスクロに接続した窒素, 圧縮空気の高圧ボンベを開栓し, 水素ガス発生装置 (島津, OPGU-2100S) を始動する.
- 5) ガスクロ本体のつまみで各ガスの分圧を以下のように合わせる. 圧力を間違えると 7) で点火できないので注意.



図 3: ゴム栓をした NaHCO_3^- 溶液. 密閉できていることが重要である.

N_2 (PRIMARY):	500 kPa
N_2 (CARRIER GAS 1):	280 kPa
H_2 (HYDROGEN 2):	70 kPa
Air:	5 kPa

- 6) 本体上部の左側の通気孔から点火する (図 4). スパテルを使って蒸気が出ているのを見ることで, 点火を確認する. スパテルが全く曇らないようであれば点火できていないので, 点火し直す.
- 7) メタナイザー内の Ni 触媒を還元させるために, H_2 ガスを 1 時間半程度通気する (この間にバッファの調製, 酸素電極の準備等を行う).
- 8) カタリシスを 400°C に, Air の圧力を 50 kPa にそれぞれ設定し直す.
- 9) ガラスセルのつまみを INJECT に合わせ, $100\ \mu\text{L}$ の 25% H_3PO_4 溶液をマイクロシリンジでガラスセルの中で均一に広がるようにアプライする. 均一に広がれば, 全体が泡立つようになる (図 5). アプライする時にガラスセルからの圧力でシリンジのピストンが押し上げられるので, ピストンから手を離さないようにする.
- 10) そのまま 1 時間以上放置しておき, この後にレコーダーの準備 (次項) を行う.

4.b.4.2 ガスクロ用レコーダー (クロマトパック) の準備

- 1) 電源を入れる. READY のランプが始めは点滅しているので, 点灯するまで待つ.
- 2) "SHIFT DOWN" を押しながら "I", "N", "I" と入力し, "ENTER" を押して初期化を行う ("INITIALIZED" と印字される).



図 4: ガスクロマトグラフへの点火の様子. 点火口付近に火炎の先端を近づけて点火する. 点火できると「ボン」と音がする.

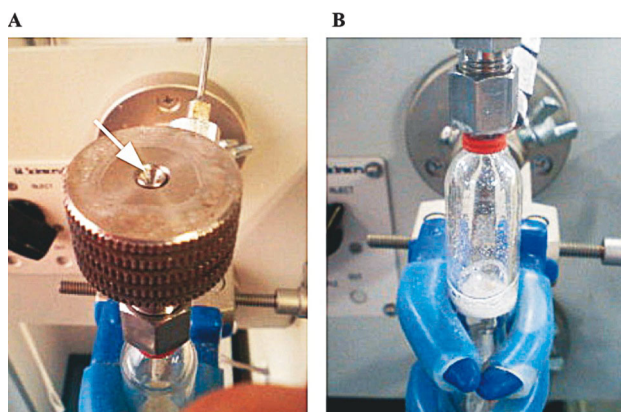


図5：ガスクロマトグラフに設置されたガラスセル。A. ガラスセルを上から見たところで矢印はマイクロシリンジの先端を挿入する場所を示す。B. ガラスセルに25%リン酸溶液をアプライしたときの様子。ガラスセルに均一に広がるとこのように泡立つ。

- 3) “PRINT” を押した後に, “CTRL” を押しながら “LEVEL” → “ENTER” の順でキーを押し, ゼロ点の値を印字する。
- 4) 3200~3800 μV の範囲になるようにガスクロ本体の COARSE のつまみを回して合わせ, 3) の手順で印字して確認する。
- 5) 各パラメーターを以下のように設定する。

MIN AREA :	10
SLOPE :	200
SPEED :	10
ATTEN :	2
- 6) “ZERO” → “ENTER” と押して, レコーダーペンを原点に合わせる。
- 7) “SHIFT DOWN” を押しつつ “S.TEST” を押し, “ENTER” と入力し, ノイズテストを行う (50 秒)。
- 8) “SHIFT DOWN” を押しつつ “PLOT” を押し, “ENTER” を押す。チャートが進み始めるので, ベースラインが安定するまで待つ。正しく設定できていれば, この時点でレコーダーペンは少しずつ左に移動する。リン酸をアプライしてから十分時間が経っていれば, 安定しているのでむしろレコーダーペンは左右には動かない (図6)。
- 9) ベースが安定したら, “SHIFT DOWN” を押しつつ “PLOT” を押し, “ENTER” でチャートを止める。レコーダーペンが大きく左に移動する場合は, 20 分程度してから 3) 以降を再度行う。

4.b.4.3 Calibration standard の測定

溶存 Ci 量 (DIC: dissolved inorganic carbon) を決定するために, Calibration standard として超純水と 200 μM Na_2CO_3 溶液について Ci 量の測定を行う。

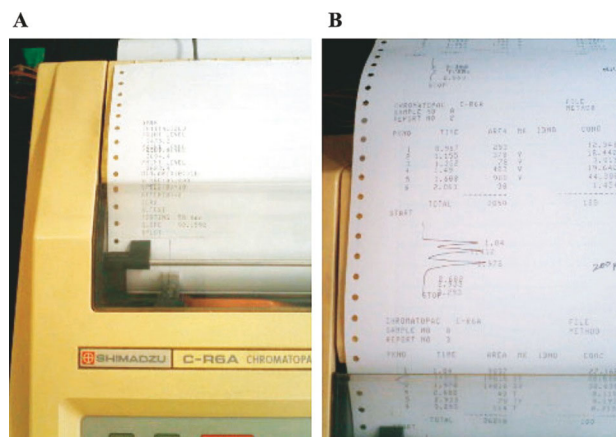


図6：ガスクロマトグラフのチャートレコーダーの様子。A. 運転準備ができ安定したときの様子。レコーダーのペンは左に寄った状態で止まる。B. 200 μM Na_2CO_3 溶液を3回ガラスセルにアプライした後のチャートの記録結果。ピークの高さはほぼ同じ高になる。

- 1) 三角フラスコ (10 mL 容量) に, 超純水をピペットで 10 mL 量りとおく。
- 2) レコーダーの “START” を押し, 測定を開始する。
- 3) 1) のフラスコから超純水を 10 μL とり, マイクロシリンジでガラスセルにアプライする (NaHCO_3 用の 10 μL マイクロシリンジを使って, 10 秒間隔くらいで 3 回以上アプライする)。
- 4) レコーダーの “STOP” を押してチャートを止め, 各ピークの面積 (AREA) を算出させる。
- 5) 1) のフラスコに 100 mM Na_2CO_3 溶液をマイクロシリンジ (Na_2CO_3 用の 50 μL タイプ) で 20 μL 加え, よく攪拌する (200 μM 溶液が調製できる)。
- 6) 再びレコーダーの “START” を押して測定を開始する。
- 7) 4) で調製した 200 μM Na_2CO_3 溶液を, 10 μL アプライする (NaHCO_3 用の 10 μL マイクロシリンジを使って 3 回以上アプライする)。
- 8) レコーダーの “STOP” を押して, チャートを止める。
- 9) それぞれのピークの面積 (AREA) が算出されるので, アプライ 1 回あたりのピーク面積の平均値を算出し, さらに以下の式により 1 μM の Na_2CO_3 , 10 μL あたりの面積を算出する。

$$([\text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ 溶液の面積}] - [\text{超純水の面積}]) / 200$$
得られた値を 1 μM DIC とし, 以降の解析に用いる。
- 10) 7) で使用したマイクロシリンジ内に Na_2CO_3 溶液が残らないように, 洗浄用の超純水で 10 回以上洗う。
- 11) ガスクロのレコーダーの “START” を押してチャートをスタートさせ, 10) で洗ったマイクロシリンジで 0 μM DIC 用超純水 (細胞懸濁用バッファの調製。

手順5)を参照)を10 μL 取って測定する。Calibration standard 測定時のものと比べて、ほぼ同じ大きさのピークが検出されれば良い。明らかに大きなピークが検出された場合は、シリンジ内に Na_2CO_3 が残っていたので、更に超純水で数回洗浄し、再度測定する。

〈参考〉ガスクロで少量の液体をアプライする際の注意点

- 10 μL のマイクロシリンジは、先端が細く曲がり易い。これに対し、ガスクロのガラスセルのサンプル注入口は、抵抗があり径も小さいので、シリンジの針の挿入が難しい。10 μL のシリンジでアプライする場合は必ず針部分に手を添え、ゆっくりと挿入すること。挿入する方向によっては、途中で金属部品に突き当たってしまい、ガラスセル内まで針を挿入できないことがあるが、その場合は一旦引き抜き、再度方向を少し変えて挿入すること。
- 10 μL をアプライする場合に、サンプルがガラスセル内で四方に散ってしまいと正確な測定ができない。正確な測定には、シリンジの中の液体の量が残る4 μL 程度までは丁寧に(ゆっくりと)ピストンを下げてシリンジの先端に水滴を作り(図7)、次に一気にまとめて液滴を真下のリン酸溶液に落とすようにする。液がカラムの壁面に飛散したら再度アプライする必要がある。

4.b.4.4 細胞懸濁用バッファの調製

調製後のバッファを放置しておくとき大気中の CO_2 が溶解してしまい、測定誤差が生じる。そこで、溶存 CO_2 濃度を減らすため、バッファの窒素置換(脱気)を行う(ガスクロ本体の準備中)。容器にゴム栓をしていても、測定前日には脱気しておく。



図7：ガスクロマトグラフのガラスセルに10 μL の Na_2CO_3 溶液をアプライする様子。シリンジのピストンを少しずつ下ろして先端に液滴を作り、それから一気に全部落とすと少量でも正確に測定が可能となる。

- 1) 1 M HEPES (pH 7.8) を200倍希釈して50 mM HEPES (pH 7.8) を用意し(100~200 mL程度)、更にこれと同量の超純水も用意する。
- 2) 両液をホットスターラーで沸騰しない程度に熱し(フラスコの内壁に泡が付着する程度)、攪拌しながら N_2 ガスを通気する(図8A)。この時、水分が蒸発し過ぎないように、かつ蒸気がある程度逃げないようにフラスコにラップをかけておく。水分が蒸発して体積が減るので、50 mM HEPES (pH 7.8) を入れたフラスコには、あらかじめペンで水位のところに線を引いておく。
- 3) 脱気を1時間以上行った後(最初の半分近くまで体積が減っているはず)、氷上で冷やしながら N_2 ガスを通気する。
- 4) 室温程度まで冷めたら、氷から出して N_2 ガスを止める。50 mM HEPES の体積が減るので、 N_2 ガスの通気を止めてすぐに脱気を行った超純水を1)の水位まで加えて体積を合わせる。
- 5) 50 mM HEPES (pH 7.8) は、ゴム栓をして(図8B)室温に置く。残った超純水については、測定当日に調製した場合も0 μM DIC用としてゴム栓で密閉しておく。

4.b.4.5 溶存酸素濃度の測定

注意*) 酸素電極はセットアップ毎に感度が異なるので、レコーダーのチャートの目盛りがどの程度の酸素濃度に相当するかを実験毎に見積もる必要がある。酸素電極の掃除や組み直しは前日に行っても良いが、この溶存酸素濃度の測定は必ず測定当日に行う。

注意*) 測定に使うジチオナイト (Sodiumhydrosulfite, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) は酸化されやすい物質なので、密栓して乾燥状態で保存する。

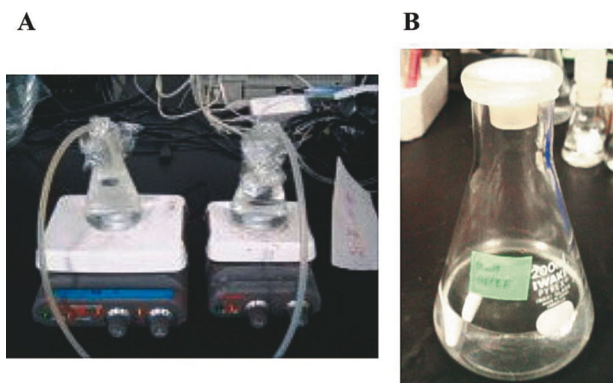


図8：バッファの脱気と保存の様子。A. ホットスターラーに載せたフラスコに、窒素ガスをピペットチップを先端に付けたシリコンチューブで通気している。B. 脱気後のバッファはゴム栓の薄い部分を折り返して密栓する。

- 1) あらかじめ循環型恒温槽の電源を入れておき、28°Cの水を測定チャンバーに循環させておく。
- 2) 測定チャンバーから KCl 溶液を除き、数回超純水で洗う。
- 3) 調製直後の超純水 (0 μ M DIC 用超純水) を 1.5 mL 入れる。
- 4) スターラーを回して、コントロールボックスに表示される値、またはレコーダーのペンの動きが安定するのを待つ (30 分程度、少しずつ上昇するはず)。
- 5) レコーダーのレンジを 5 V または 10 V に、チャートスピードを 1200 mm/h に設定する。
- 6) チャートをスタートさせ、Air-line を 30 秒程度記録する。
- 7) 測定チャンバーに、マイクロスパテルにすり切り一握程度のジチオナイトを加え、すぐにフタをする (この場合は液面にフタの下部が接触しないようにする)。電極が正しくセットできていれば、すぐにレコーダーのペンは左に動く (図 9)。
- 8) 1 分以内に電位が安定するので、この値を N₂-line とする。安定したら記録を停止し、直ちに測定チャンバーを超純水で 10 回以上洗う。ジチオナイトはテフロンメンブレンを傷める上に、洗浄が不十分だと測定は失敗する。

* 電極の応答が遅いと、電位は 1 分以内に安定しないので、電極を組み直す。組み直しても 1 分以内に電位が安定しない場合は、ジチオナイトが酸化されている可能性もあるので、別のロットに交換する。ジ

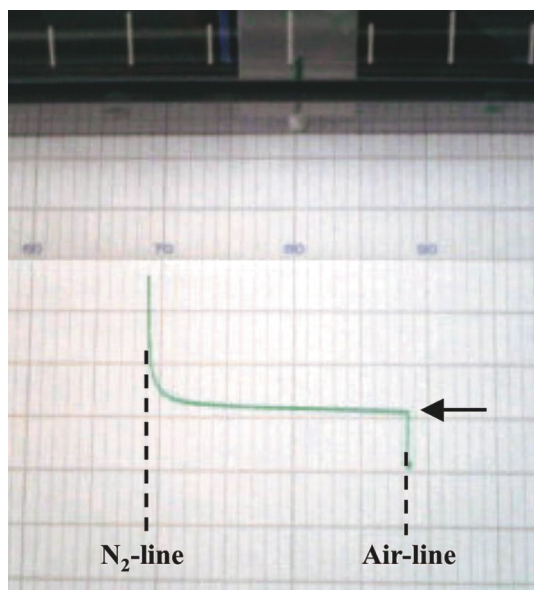


図 9: レコーダーの測定レンジを 5 V に設定した際の Air-N₂ line. 矢印はジチオナイトを加えた時を示す。

チオナイトを加えたところで Air-line に対して直角にペンが移動して 2~3 分以内にほぼ平衡に達するようであれば良い。チャートスピードを遅くすることは解決にはならない。

- 9) Air-line (O₂ 濃度は下表参照) から N₂-line (0 μ M O₂) までの電位差をチャート上で定規を使って測り、1 mm あたりの酸素量を推定する。Air-line における酸素量を、表 1 に示す。通常は 25°C で計算して問題無い。
- 10) 測定までに少し間がある場合は、飽和 KCl を 1 mL 入れておき、メンブレンの乾燥を防ぐ。

表 1: 15-30°C における溶存酸素濃度

温度 (°C)	15	20	25	30
溶存酸素量 (μ M)	313	286	254	228

4.b.4.6 細胞の調製

ガスクロの準備からレコーダーの準備までが完了してから (レコーダーに表示される数値が安定していることを確認しておく)、脱気済の 50 mM HEPES バッファーを用いて、測定用の細胞を調製する。カラムにリン酸溶液をアプライしてからの時間によっては、初期値が十分安定しないことがある。

- 1) 50 mL 培地で OD 730=0.2~0.4 まで培養した細胞を、700×g で 5 分、28°C で遠心して集める。
- 2) 培地を残さないように、上清を捨てる。
- 3) 脱気した 50 mM HEPES (pH 7.8-KOH) で懸濁する (下記の注意を参照)。この時、OD 730=1 の細胞は約 10 μ g Chl mL⁻¹ であるので、理論上最終濃度が 20 μ g Chl mL⁻¹ よりも少なめの量に懸濁する。

<注意> 脱気した HEPES バッファーはゴム栓をしたままの状態、以下の手順で 18 G の針を付けたシリンジ (15 mL 容量) をゴム栓中央付近に突き刺して取る。

<手順>

- a. シリンジで N₂ ガスを、細胞を懸濁するバッファーの量分だけ吸う。
- b. そのままの状態、バッファーの入ったフラスコのゴム栓に突き刺す。
- c. シリンジ中の N₂ ガスをフラスコ内に押し出す。
- d. フラスコを逆さにしてシリンジの針の先端がバッファーに浸るようにして、必要量のバッファーを吸い取る。
- e. シリンジの針をゴム栓から抜く。

- 4) クロロフィル濃度を定量する。15~20 μ g Chl mL⁻¹

であればそのまま実験に使う。濃い場合は $20 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$ に希釈し、再度定量する。 $15 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$ 未満の場合は遠心からやり直す。

4.b.4.7 溶存無機炭素に依存した光合成活性の推定と測定

細胞の状態に結果は左右されるので、細胞懸濁液を調製したら素早く測定を開始する。1 サンプルにつき、測定は2回行う。3 回目の測定の頃には細胞の状態が悪くなっていることがある（最大光合成速度 V_{max} が低下する）ので、手際よく測定を進めることが重要である。ガスクロと酸素電極の両方を使うので、混乱しないよう準備する。

4.b.4.7.1 マイクロシリンジ洗浄用として、100 mL または 200 mL のフラスコに、適当量の超純水を入れておく。また、 $10 \mu\text{L}$ のマイクロシリンジは一方を細胞採取用、他方を NaHCO_3 溶液用と決めておく。

4.b.4.7.2 初期 DIC の測定

1) 酸素電極の測定チャンバーに調製した細胞懸濁液を 1.5 mL 入れ、 $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光を照射し、 N_2 ガスを5分～15分程度通気する（図 10 A）。

* 通気が短すぎると溶存 Ci が十分に消費されない一方で、長すぎると細胞の状態が悪化するので注意。比較するサンプル間では、通気時間の長さを同じにする。

2) N_2 ガスのチューブを測定チャンバーから抜き、素早く蓋をする。

3) 酸素電極のレコーダーの測定レンジを 2 V に設定し、レコーダーペンを下ろしてチャートをスタートさせる。チャートスピードは $1,200 \text{ mm/hr}$ のままで、レ

コーダーペンはレコーダーやコントロールボックス（Back-ff の coarse, fine）で調節して、測定値の低い側（チャート用紙の端の方）に寄せておく。

4) ガスクロのレコーダーの“START”を押し、チャートをスタートさせる。

5) 測定チャンバーからマイクロシリンジを使って細胞を $10 \mu\text{L}$ 取り出し*、ガスクロのガラスセルにアプライする**、細胞を採取したタイミングを、酸素電極のチャートに印をつけておく。

*EZA（Ethoxyzolamide）等の阻害剤を加える場合は、細胞を採った後にマイクロシリンジを使って添加する。阻害剤を含んだ細胞懸濁液をガスクロにアプライすると、正確な測定ができないので注意する。

**細胞懸濁液がガラスセルの中で垂直に落ちたことを確認すること。横に飛び散った場合は、正確に測定できていないのでやり直す。

6) ガスクロのチャートにピークが確認できたらレコーダーペンをベースラインに戻るまで待ってから“STOP”を押してチャートを止め、AREA の面積を算出させる。これを初期 DIC とする。

4.b.4.7.3 光合成活性の測定

酸素電極のレコーダーのチャートは止めずに、前項の DIC 濃度の測定から続けて行う。

1) 励起光を $750 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ にする。

2) 表 2 に従って、 NaHCO_3 溶液をマイクロシリンジで低濃度のものから順に 30 秒間毎に加えていく（図 10 B）。 NaHCO_3 溶液を加えたタイミングをマークして、 NaHCO_3 の終濃度も書き込んでおく（図 10 C）。

* 30 秒のタイミングを逃してしまった場合でも、溶液

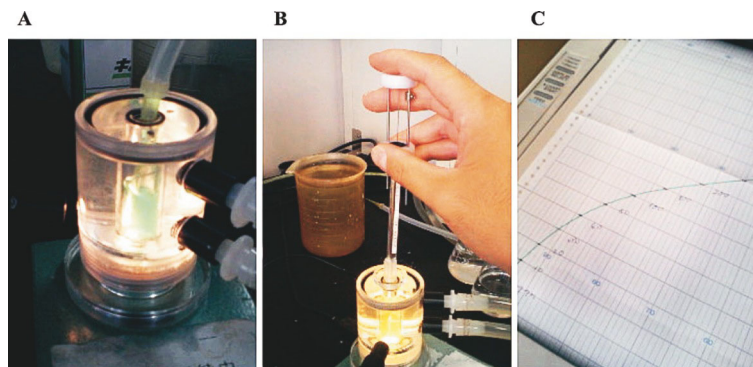


図 10：無機炭素 (Ci) の枯渇と酸素発生速度の測定。A. 細胞に N_2 ガスを通気し、 Ci を枯渇させている様子。ガス圧が高すぎると細胞懸濁液が飛散し液量が減るが、低すぎると細胞が Ci を消費し切るまで時間を要するので、程良いガス圧に調節する。B. 測定チャンバーの蓋上部の穴から、マイクロシリンジで NaHCO_3 溶液を加える様子。C. 活性測定時のチャートの様子。 NaHCO_3 溶液を加えた時点にマークを付けておく。 NaHCO_3 溶液を加える毎に、徐々に酸素濃度が上昇する。

表2：活性測定時に加える各 NaHCO_3 溶液の量と終濃度

Stock 液	量 (終濃度)	stock 液	量 (終濃度)	stock 液	量 (終濃度)
15 mM	1 μl (10 μM) 2 μl (20 μM) 3 μl (30 μM) 4 μl (40 μM) 5 μl (50 μM)	150 mM	1 μl (100 μM) 1 μl (100 μM) 2 μl (200 μM) 3 μl (300 μM) 4 μl (400 μM)	750 mM	1 μl (500 μM) 2 μl (1,000 μM) 4 μl (2,000 μM) 10 μl (5,000 μM)

を加えたポイントをマークしておけば良い。要は、チャート上で何 mm 進んで何 mm 上昇したか（＝単位時間あたりどれだけ O_2 が発生したか）がわかれば良い。

- 3) 最高濃度まで測定を終えたらレコーダーのチャートを止め、励起光を切る。
- 4) 測定チャンバーから細胞を除き、 NaHCO_3 が残らないように超純水で 10 回以上洗う。また、 NaHCO_3 に使ったマイクロシリンジも、洗浄用の超純水で 20 回以上洗う。 NaHCO_3 が残っていると、次の測定が正確に行えないので注意する。
- 5) ガスクロのレコーダーの“START”を押してチャートをスタートさせ、マイクロシリンジで 0 μM DIC 用の（調製直後の）超純水を 10 μL 計り取り、ガスクロにアプライして DIC 量を測定する。アプライした液体は超純水なので、シリンジが十分洗ってあれば Calibration standard 測定時のものと同程度の高さのピークが検出される。明らかに大きなピークが検出された場合は、シリンジ内に NaHCO_3 が残っているということなので、更に数回超純水で洗って再度測定する。

4.b.4.8 あと片付け

4.b.4.8.1 酸素電極

- 1) レコーダー、Back-Off 装置、循環型恒温槽の電源をそれぞれ切る（特に順番はない）。
- 2) 測定チャンバーは数回超純水で洗い、最後に飽和 KCl を 1 mL 程度入れてフタをする。液面がフタの下側に付かないようにする。

4.b.4.8.2 ガスクロマトグラフ

- 1) ガラスセル横のツマミを CHARGE に合わせ、下のバルブを開く。
- 2) ガラスセル上部のフタを外してチューブをつなぎ、アスピレーターをつないで吸引する。
- 3) ガラスセル下部から超純水を吸引させて、カラム内を洗う。
- 4) ガラスセル下部にアスピレーターをつないで、上部から超純水を吸引してカラム内を洗う。
- 5) 洗浄が終わったらメタナイザーのカタリシスを 300°C に合わせて、水素、空気ポンペの元栓のみ閉じる。

- 6) 窒素ガスは、PRIMARY を 100 に合わせて一晩放置する。

- 7) 翌日も測定を行う場合は、この状態から 4.b.4.1 ガスクロ本体の準備の手順(2)以降の準備を行うことができる。測定を行わない場合は、翌日には窒素ガスの元栓を閉じて、メタナイザー、ガスクロ本体の電源を切る。

4.b.4.8.3 マイクロシリンジ

- 1) 使用したマイクロシリンジは、全て超純水を十数回通す。特に NaHCO_3 用のシリンジは十分洗浄しておくこと。
- 2) ピストンを外して、タオルペーパー等の上で一日乾燥させる。
- 3) 乾いたらピストンをシリンジに戻し、それぞれの箱に戻す。濡れた状態でピストンを戻さないこと（内側に張り付いて抜けなくなる）。

4.b.4.9 データ解析

測定結果の解析は、1) 各測定点における酸素発生活性の計算、2) 各測定点における実際の DIC 濃度の計算、3) グラフ化の 3 ステップから成る。1), 2) では、Excel に計算式を入力しておくことで作業の効率が上がる。この時必要な情報は、以下の通り。

- 1) 光合成活性を測定した細胞のクロロフィル濃度
- 2) Air-N_2 の高さ（単位は mm）→ 4.b.4.5 を参照
- 3) ガスクロで測った初期 DIC 濃度 (μM) → 4.b.4.7.2 を参照

4.b.4.9.1 各 DIC 濃度における酸素発生活性の計算

まず、 NaHCO_3 溶液を加えたある点から次の点までで、チャートがどのくらい進んだ時に酸素発生量がどの程度上昇したのかを計算する。

- 1) 測定した全ての点について、次の a, b (図 11 の a, b に相当) をチャート紙に直接定規を当てて測る（1 mm の 10 分の 1 まで読み取る）。
 - a) 2 点間のチャートの進み具合
 - b) 2 点間での酸素発生量の上昇

ガスクロ測定用の細胞を採取した点から一番最初の NaHCO_3 溶液を加えた点（すなわち終濃度 10 μM の点）についても同様に、上記 a, b を測る。

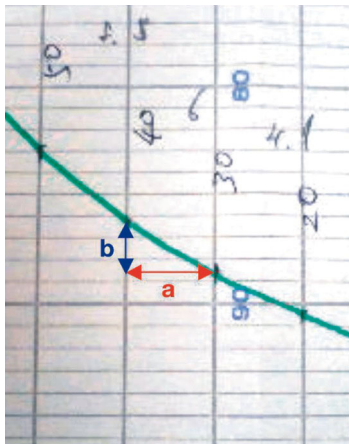


図 11：酸素発生測定後の解析。チャートの進んだ距離 (a) と測定点における酸素発生量 (b) を、それぞれ定規で測る。図の a,b の場合は、30 μM の測定点での酸素発生活性を算出することになる。

2) 各点における酸素発生活性 ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$) を算出する。5 mM 点の活性を最大光合成活性 (V_{max}) とし、野生株であれば通常 110–190 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 程度の活性が得られる。

4.b.4.9.2 各測定点における実際の DIC 濃度の計算

測定実験では細胞懸濁液に NaHCO_3 溶液を順次加えているが、実際の DIC 濃度は純粋な積算になるのではなく、各点で光合成によって低下しているはずである。4.b.4.7.3 で得られた酸素発生活性を基にして、各点における実際の DIC 濃度を求める。これを無視すると、最も重要な $K_{1/2}$ 値を数十 μM 高く見積もってしまうことになる。

1) 光合成の一般式 ($6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$) に基づくと、消費される DIC 量と発生する O_2 量は理論上 1 対 1 の関係にある。各測定点での酸素発生量 (図 11, b) から、それぞれの測定点間において消費された DIC 量を算出する (単位は μM で)。

2) 初期 DIC 濃度測定点–10 μM 点間での DIC 消費量

を初期 DIC 濃度から引き、この数値に 10 μM を加える。これを 10 μM 点での“実際の DIC 濃度”とする。

3) 10 μM 点–20 μM 点間での DIC 消費量を 10 μM 点での実際の DIC 濃度から引き、この数値に 20 μM を加えて 20 μM 点での“実際の DIC 濃度”とする。

4) 同様の操作を 5 mM 点まで行う。

* Excel を使ってテンプレートを作成しておくと、解析が簡略化できる。著者らはクロロフィル濃度、Air-line から N_2 -line までの高さ、初期 DIC 濃度、チャートの a,b の数値をそれぞれ入力すれば、各点での酸素発生活性、および実際の DIC 濃度が算出できるようにテンプレートを作成している (図 12)。

4.b.4.9.3 グラフ化による $K_{1/2}$ 値の決定

上記の作業が完了した時点で、ある程度 $K_{1/2}$ は見当がつくが (活性が V_{max} の 50% になる実際の DIC 付近)、その濃度付近の測定が正確に行えていない場合がある。 $K_{1/2}$ は、グラフ化して測定全体を見た上で決定した方が、妥当な値が得られる。

1) 横軸の“実際の DIC (μM)”、縦軸に酸素発生活性の絶対値 ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ hr}^{-1}$) または V_{max} を 100% とした時の相対値をとって、Excel または適当なグラフソフトを使ってグラフを描く。

2) 近似曲線を描き、最大活性 (V_{max}) の 50% を与える

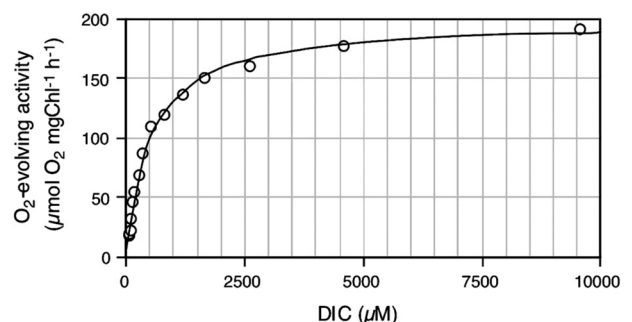


図 13：縦軸に酸素発生活性の絶対値をプロットした場合の例。

Template for O2 evolution									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
4	Chlorophyll ($\mu\text{g/ml}$)	18.2							
5	air-N ₂ (mm)	204							
6	Initial DIC (μM)	73.9							
7									
8	NaHCO ₃ supply	chart (mm)	O ₂ ↑ (mm)	Gradient X	$\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ hr}^{-1}$	DIC consumption (μM)	actual DIC (μM)	O ₂ ↑ (%) at 10 mM	
9		0	20.0	6.50	0.33	17.7	73.9	9.3	
10		10	10.0	3.6	0.36	19.6	8.1	75.8	10.3
11		20	10.0	4.1	0.41	22.4	4.5	91.4	11.7
12		30	10.0	6.0	0.60	32.7	5.1	116.3	17.1
13		40	10.0	8.5	0.85	46.4	7.4	148.8	24.3
14		50	10.0	10.0	1.00	54.6	10.6	188.3	28.6
15		100	10.0	12.5	1.25	68.2	12.4	275.9	35.7
16		100	10.0	16.0	1.60	87.3	15.5	360.3	45.7
17		200	10.0	20.0	2.00	109.1	19.9	540.5	57.1
18		300	10.0	22.0	2.20	120.0	24.8	815.6	62.9
19		400	12.0	30.0	2.50	136.4	27.3	1188.3	71.4
20		500	8.0	22.0	2.75	150.1	37.2	1651.1	79.6
21		1000	10.0	29.5	2.95	161.0	27.3	2623.8	84.3
22		2000	10.0	32.5	3.25	177.3	36.6	4587.2	92.9
23		5000	10.0	35.0	3.50	191.0	40.3	9546.8	100.0
24									

図 12：測定結果を計算する際に用いる Excel の template の例。

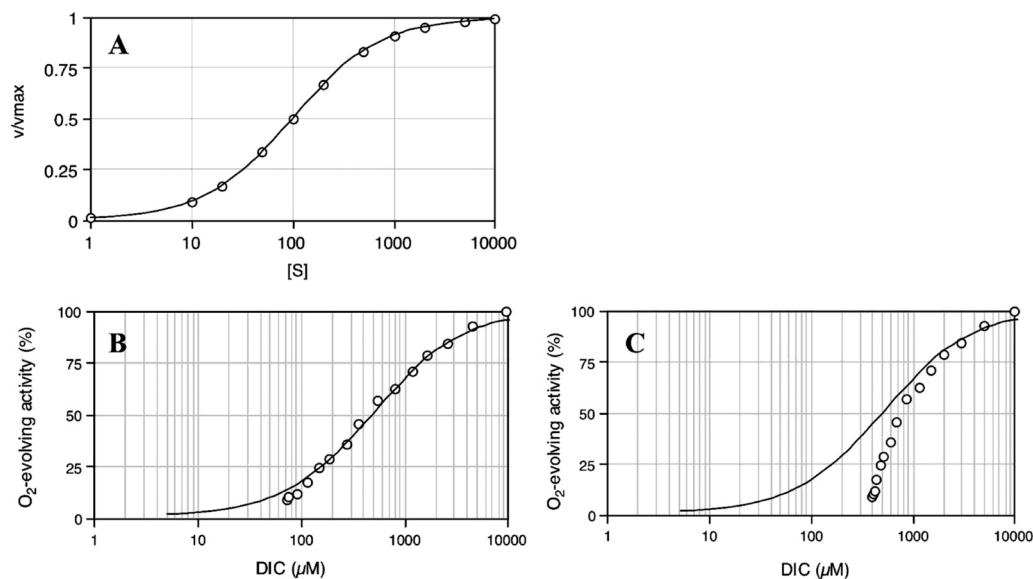


図 14：Michaelis-Menten 式と理論曲線を利用した、測定結果の評価の例。A. Michaelis-Menten 式に従って描いた酵素反応曲線。B. 理論曲線と実際の測定点を重ねた例。測定が正確であれば、ほとんどの点は理論曲線上に載る。C. 初期 DIC 濃度を実際よりも高濃度に推定し間違えた場合の理論曲線と実測値の関係。

DIC 濃度を $K_{1/2}$ としてグラフから読み取る (図 13)。

4.b.4.9.4 測定精度の評価

DIC 濃度と光合成活性はおおよそ一次酵素反応的な関係にあるので、Michaelis-Menten の式を利用すれば、実験の精度が評価できる。

- 1) Michaelis-Menten の式 ($v/V_{max} = [S]/(K_m + [S])$) に従って、任意の数値を入力して酵素反応の理論曲線を描く。この時、縦軸の v/V_{max} は 0 - 1 の範囲に linear で、横軸の基質濃度 $[S]$ は 1 - 10000 の範囲に log でそれぞれプロットする (図 14 A)。
- 2) 4.b.4.9.3 で縦軸に相対値をとって描いたグラフについて、横軸を 1 - 10000 の範囲に log でプロットし直し、1) の理論曲線と同じサイズのグラフ枠で描く。
- 3) 1) の理論曲線を 2) の実測データによる曲線と重ね合わせて、左右いずれかに移動させた時、2) の各点が大方載ってくれば測定は成功と判断できる (図 14 B)。大きくずれる場合は、何か実験操作に問題があったか (例えば、初期 DIC 濃度の測定を失敗した) か、新しい発見である。いずれにしても、測定を複数回行い、再現性を確認する。

* ある点だけ理論曲線からずれる場合は、理論曲線上に載ってくる他の点を主に考慮して $K_{1/2}$ を求める。シグモイド型にはなっても傾きが理論曲線とは一致しない場合は、プロットした点を測定した際に、本来の濃度よりも全体的に高濃度 (図 14 C) または低濃度側にシフトしている場合がある。この場合は、初

期 DIC の測定ミスが原因である可能性が高い。

謝辞

本法の確立には、関西学院大学理工学部・松田祐介先生に多大なご協力を得た。ここに記して感謝申し上げる。

参考文献

- 1) T. Yamano & H. Fukuzawa, J. Basic Microbiol. 49 (2009) p.42
- 2) M. R. Badger & M. H. Spalding, Photosynthesis: Physiology and Metabolism, ed. R. C. Leegood, T. D. Sharkey & S. von Caemmerer, The Netherlands, Kluwer Academic Publisher, 2000, p.369
- 3) J. A. Raven, Eur. J. Phycol 32 (1997) p.319
- 4) T. Omata, G. D. Price, M. R. Badger, M. Okamura, S. Gohta & T. Ogawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) p.13571
- 5) S. C. Burey, V. Poroyko, Z. N. Ergen, S. Fathi-Nejad, C. Schuller, N. Ohnishi, H. Fukuzawa, H. J. Bohnert & W. Löfelhardt, Plant Cell Environ. 30 (2007) p.1422
- 6) B. C. Birmingham & B. Colman, Plant Physiol. 64 (1979) p.892
- 7) Y. Matsuda & B. Colman, Plant Physiol 110 (1996) p. 1283
- 8) 福澤秀哉, 「タンパク質化学第 4 巻：酵素 4.4 リアーゼ (II)」, 廣川書店, 2003, p.177