HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	葉緑体の光合成活性測定 ： 単離葉緑体を用いた炭酸固定測定
Author(s)	真野, 純一
Description	2章 個体・環境の測定 5
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, 159-160
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39114
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-025.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

5．葉緑体の光合成活性測定
―― 単離葉緑体を用いた炭酸固定測定 ――

真野　純一[1)]

単離葉緑体での炭酸固定測定によって，カルビン回路成分の機能的統合性に関する生化学的解析ができる．酸素電極を用いた炭酸固定測定法と，光合成部分活性測定法を紹介する．

CO_2-fixation in isolated chloroplasts

Jun'ichi Mano

Intact chloroplasts that have high activity of CO_2 fixation are useful for investigating the integrity of the Calvin cycle components and the electron transport chain.　Although obtaining highly active chloroplasts is sometimes difficult, the supplementation with glyceraldehyde-3-phosphate will result in a satisfying level of activity, which represents the whole pathway from H_2O to CO_2.

5.1　はじめに

炭酸固定活性の高い葉緑体が単離できる高等植物はホウレンソウ，エンドウマメなどに限られており，分子生物学の対象となるシロイヌナズナやタバコ，イネではまだ難しい．カルビン回路の integrity に関する生化学的解析には，単離葉緑体での炭酸固定測定が必要である．ここでは酸素電極を用いた炭酸固定測定法と，光合成部分活性測定法を紹介する．

5.2　炭酸固定活性の高い葉緑体の調製

葉緑体として炭酸固定研究に使える活性レベルは，CO_2 を電子受容体としたときの O_2 発生が 50 μmol mg $Chl^{-1}h^{-1}$ 程度以上であり，100 μmol mg $Chl^{-1}h^{-1}$ が得られれば，かなりよい．葉緑体の単離法の詳細は(3)2 a を参照していただきたいが，筆者の経験では活性の高い葉緑体を得るコツは次の通りである．(1)植物材料の鮮度．ホウレンソウも研究室（圃場）で栽培し，調製日の早朝に収穫する（天気のよい日は，日照にともない葉緑体にデンプン粒が蓄積し，インタクト率の高い葉緑体調製が難しくなる）．(2)葉を破砕する際，できるだけ低い温度で行う．筆者の研究室では調製開始の 1 時間くらい前に破砕用メディウムを冷凍庫で冷却し（フレーク状の氷が少しできる程度），使用している．(3)葉の破砕からパーコール密度勾配遠心分離までをできるだけすばやく行う．このような注意を払っても，CO_2 を与えるだけで活発に O_2 発生を行う葉緑体を得るのは難しい．これは，カルビン回路中間体の糖リン酸が葉緑体から失われてしまうことが主な原因と考えられる．筆者らはカルビン回路の全過程を含む光合成活性を測定するために糖リン酸中間体を補っている．

5.3　グリセルアルデヒド-3-リン酸（GAP）補塡による CO_2 固定測定

カルビン回路の中間体となる糖リン酸は葉緑体包膜のトランスポーターを介してストロマに入るため，外部から補塡することができる[1)]．外部から葉緑体に供給された GAP は，光照射下で ATP を消費し RuBP に変換され，Rubisco 反応が進行すると PGA となる．PGA から GAP への還元に，ATP と電子伝達系から供給される NADPH が消費され，これに伴い O_2 が発生する（図 1 ①）．CO_2 の代わりに PGA のみを電子受容体として葉緑体に与え，PGA 依存性の O_2 発生を観測することもでき

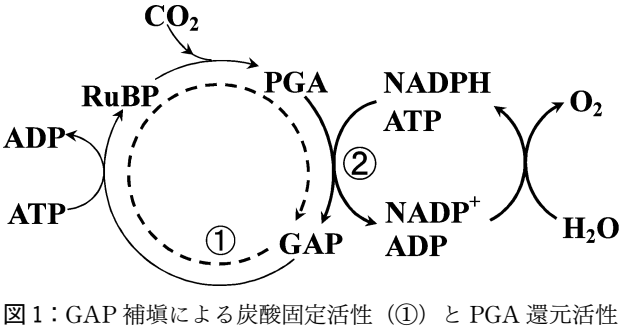

図 1：GAP 補塡による炭酸固定活性（①）と PGA 還元活性（②）．GAP 依存 O_2 発生（電子伝達）にはカルビン回路の全過程が関与する．

1）山口大学総合科学実験センターアイソトープ分析施設

る(②)．①の GAP 依存的 O_2 発生活性は電子伝達系とカルビン回路の全過程を含んでおり，反応に関わる成分が多いため，葉緑体調製後も活性は失われやすい．②は部分反応であり，PGA を GAP に変換する酵素（ホスホグリセリン酸キナーゼとグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ），電子伝達系からの NADPH 供給，光リン酸化による ATP 供給が揃えば観測される．包膜が破れストロマ成分が拡散してしまうと②の活性も失われてしまうので，部分反応といえども葉緑体の機能的統合性のひとつの指標となる．たとえば学生実験レベルでは，PGA 還元活性が脱共役剤により完全に阻害されることから電子伝達系とストロマ酵素系との共役について考察させることができる．

[実験方法]

1．用意する試薬など

(1) 葉緑体懸濁メディウム（X 2）

ソルビトール	0.6 M
$MgCl_2$	2 mM
NaCl	20 mM
DTPA（※）	1 mM
アスコルビン酸（用時添加）	2 mM
ピロリン酸ナトリウム	1 mM
Hepes-NaOH	100 mM，pH 7.6

※ diethylenetriamine *N, N, N′, N″, N‴*-pentaacetic acid

(2) GAP 溶液　50 mM

(3) $NaHCO_3$ 溶液　200 mM

(4) PGA 溶液　200 mM

(5) ホウレンソウ葉緑体

単離後，パーコール密度勾配遠心分離により精製し，葉緑体懸濁メディウム（X1）に懸濁した（～2 mgChl ml^{-1}）標品．インタクト率 90%以上が望ましい．

2．GAP 依存性 O_2 発生活性測定

(1) 酸素電極のセルに下の溶液を加え，蒸留水で全量を 990 μl とする．

葉緑体メディウム（X2）	500 μl
$NaHCO_3$ 200 mM	50 μl
GAP 50 mM	10 μl

(2) 葉緑体を 15 μgChl ml^{-1} となるよう加え，ふたをして暗所で撹拌しながら酸素濃度変化を 2 ～ 3 分間記録する．

(3) 光照射し，酸素発生を記録する．光照射時の最大 O_2 発生速度と光照射前の O_2 濃度変化速度の差を活性とする．

3．PGA 光還元活性

(1) 酸素電極のセルに下の溶液を加え，蒸留水で全量を 990 μl とする．

葉緑体メディウム（X2）	500 μl
PGA 200 mM	10 μl

(2)，(3)は上記 2．と同じ．

参考文献

1）D. Walker, Use of the Oxygen Electrode, Sheffield, Oxygraphics Ltd., 1987.