



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	PAMおよびガス交換測定器を用いた，蛍光および二酸化炭素同時測定による植物の光エネルギー利用の評価： ガス交換解析とクロロフィル蛍光の同時測定
Author(s)	牧野，周
Description	4章 分光測定 3. パルス変調蛍光 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， 525-527
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39186
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-071.pdf



3. パルス変調蛍光

b. PAM およびガス交換測定器を用いた、蛍光および二酸化炭素同時測定による植物の光エネルギー利用の評価 —— ガス交換解析とクロロフィル蛍光の同時測定 ——

牧野 周¹⁾

光合成ガス交換解析とクロロフィル蛍光解析による測定技術は、植物の葉の光合成能力を非破壊的に評価できる技術としてそれぞれ別々に開発されてきたものであり、現在、植物の光合成を評価するもっとも有力な測定技術の一つである。ここでは、両手法の同時測定解析得られるパラメータを紹介しその理論と問題点および測定上の注意事項について解説する。

Simultaneous measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence

Amane Makino

Simultaneous measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence have made it possible to evaluate photosynthetic capacity from the electron flux in PS II to carbon assimilation and photorespiration at the level of an intact leaf. I introduce theory and principal of this technique and describe the technical problems on the measurements.

光合成ガス交換とクロロフィル蛍光の同時解析は、研究者独自の考案により 1990 年代頃より報告されている。代表的なものとしては、Genty ら¹⁾ の PSII の量子収率からの電子伝達速度算出の正当性の確認、Di Marco ら²⁾ や Harley ら³⁾ の葉肉細胞における CO₂ 拡散伝導度の評価法、Miyake & Yokota⁴⁾ の water-water cycle などのオルターナティブ電子伝達活性の評価等に用いられてきた。いずれも、それらのパラメータを評価するのに重要な情報を与えたが、精度高く定量的に評価すると言う意味では限界がある手法でもある。

しかし、ガス交換とクロロフィル蛍光を同時測定することにより、原理的には PSII からの電子伝達活性への光の利用効率から Rubisco サイトでの CO₂ 固定活性までの反応が生葉レベルで定量的に、しかも非破壊的に比較考察できる解析手法であるので、光合成全体の反応の調節機構やポテンシャルとしての総合能力を評価するにはもっとも有力な手法であることは間違いない。

ここでは、Miyake & Yokota⁴⁾ および Makino ら⁵⁾ の報告に従い、ガス交換とクロロフィル蛍光の同時解析によって評価可能なパラメータを紹介し、理論と問題点および測定上の注意事項について解説する。なお、本書では、ガス交換解析の技術は、(2)1. にて、クロロフィル

蛍光解析の技術は(4)2 a および(4)3 a. にて紹介されるので、それらの詳細な原理や測定法については割愛する。

3.b.1 同時測定の原理と理論

光合成ガス交換法により測定される光合成速度 (CO₂ 交換速度) から、Farquhar らの光合成モデル理論 [詳細は(2)1 a] に基づくと、その測定された光合成速度を説明するリニア電子伝達速度が算出可能となる (Jg, 単位は通常葉面積当たりで $\mu\text{mol e m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。

$$Jg = (A + Rd)(4Cc + 8\Gamma^*) / (Cc - \Gamma^*) \quad (1)$$

A はガス交換で測定される光合成速度 (光呼吸速度を含めた光合成速度を意味する, 単位は $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), Rd は測定条件の光強度下における呼吸速度 (単位は $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), Cc は葉緑体内での CO₂ 分圧 (単位は通常 Pa), Γ^* は光合成速度と光呼吸速度間の CO₂ 補償点で、Rubisco の酵素的キネティックパラメータであらわされる。

$$\Gamma^* = 0.5 V_o K_c / V_c K_o \quad (2)$$

Vc と Vo は Rubisco のカルボキシラーゼ活性とオキシゲナーゼ活性それぞれの Vmax (単位はともに $\text{mol mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) で Kc と Ko はそれぞれ Rubisco のカルボキ

1) 東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

シラーゼ活性の CO_2 に対する K_m (単位は通常 Pa) とオキシゲナーゼ活性に対する K_m (単位は通常 Pa) である。

一方、同時測定したクロロフィル蛍光解析から測定された PSII の量子収率より Genty ら¹⁾ の式を用いて PSII での電子伝達速度が算出される (J_f , 単位は $\mu\text{mol e m}^{-2} \text{s}^{-1}$)。

$$J_f = \alpha I \Delta F / F_m' \quad (3)$$

$\Delta F / F_m'$ は PSII の量子収率, I は光合成ガス交換クロロフィル蛍光の同時測定を行っている時の葉の表面での光強度 (単位は $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), α はその光測定条件で PSII が吸収する光強度の分配割合を意味し, Genty らの報告¹⁾ に基づき, 弱光 ($100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度), 低 O_2 分圧 (1 kPa 程度), 高 CO_2 分圧 (100 Pa 程度) の測定条件では J_g は J_f に等しいと仮定して算出する。通常は 0.4 から 0.45 くらいの値が得られる。

このようにしてクロロフィル蛍光解析により求めた PSII の電子伝達速度はガス交換解析で求めた電子伝達速度 J_g を上回ることが多く, その差がオルターナティブな電子伝達速度 J_a とみなされる。

$$J_a = J_f - J_g \quad (4)$$

ここで算出される J_a は water-water cycle の電子伝達活性が高い場合にはプラス側の値に, PSI サイクリック電子伝達活性が高い場合にはマイナス側の値に振れる。

3.b.2 同時測定の理論上の問題点

ガス交換速度より電子伝達活性を算出する式(1)において, いくつかの問題点がある。まず, 呼吸速度 R_d の算出である。呼吸速度は明暗の条件で異なることが知られている (明所呼吸の方が暗所呼吸より小さい) ので, 暗所で測定された呼吸速度をここに代入することは正しくない。Brooks & Farquhar は光強度を変えて測定される見かけ上の CO_2 補償点に違いから R_d を算出する方法を報告している⁶⁾。理論的には正しい算出法であるとされているが, 実験誤差を伴いやすい。Cc の算出も簡単ではない。これについては(2)1 b.c において詳しく解説されるのでそちらを参照されたい。また, Γ^* の算出も無視でき得ない誤差を伴う。 Γ^* の算出も Brooks & Farquhar の報告⁶⁾ に従い可能であるが, 上でも述べたように誤差を生じやすい。彼らはホンレン草を用い 25°C で 4.27 Pa という値を見出し, 別に Rubisco の酵素キネティックより求めた Jordan & Ogren⁷⁾ の値と一致しているこ

とを強調している [式(2)より算出]。しかし, Jordan & Ogren の報告でも K_o の測定に大きな問題点がある。また, Rubisco のキネティクス値自身文献により値が大きく異なる (例えば von Caemmerer & Quick⁸⁾ を参照) ので, 正しい値の採用が難しい。

また, 式(1)のもっとも大きな問題点は, 測定される CO_2 交換速度がすべてリニアな電子伝達活性によって説明される光合成であることが前提となっており, サイクリック電子伝達活性の関与が考慮されていない点である。近年, いろいろな環境条件でサイクリック電子伝達活性が光合成全体の反応に貢献していることが明らかになってきており, 解釈には十分な注意が必要となる。上でも述べたように, サイクリック電子伝達の関与は J_a をマイナス側に振る要因となる。

クロロフィル蛍光解析による PSII の量子収率より電子伝達活性を算出する式(3)においては, 測定条件の光条件で PSII が吸収する光強度割合 α の算出方法に問題点がある。 α は Genty らの報告¹⁾ に基づき, 弱光条件で光呼吸を抑えた低 O_2 分圧/高 CO_2 分圧下ではオルターナティブの電子伝達は生じない前提で算出している。しかし, 低 O_2 分圧下では, サイクリック電子伝達活性が促進されるとの報告もある^{9,10)}。また, 光強度の上昇等に伴いこの α 値が変化する可能性も否定できない。

以上のように, ガス交換とクロロフィル蛍光を同時測定は, 光合成全体の反応の調節機構やポテンシャルとしての総合能力を評価する非常に有力な手法ではあるが, いくつかの問題点を含む解析法であることを認識しなければならない。

3.b.3 同時測定の注意事項

光合成測定を行う場合, 葉面での光強度, 温度, CO_2 分圧, O_2 分圧および湿度が厳密に制御可能な装置が備わっていることと, その測定に耐え得る厳密な同化箱装置を作製されていることが必要不可欠であることは言うまでもない。また, 同化箱装置内では葉面における CO_2 の拡散境界面抵抗が測定値に影響を及ぼさないように十分な風速が与えられること, 同化箱内外のガスの巻き込みや漏れが生じない工夫も必要である。一般には, ファンが内蔵された同化箱装置が用いられ, 同化箱内の空気圧が外気に対して多少陽圧になるような設計がされる場合が多い。例えば, Sharkey ら考案した装置¹⁰⁾ では, 論文には記載されていないが, 同化箱にはマノメーターがセットされており, 外気に対して 1% ほど陽圧が保たれることが確認できるようになっている。また, 彼らは Farqu-

har の式を用いて、光合成速度を計算する時も大気圧プラス 1 % の補正を行っている。

近年では、米国の Li-Cor 社製のポータブル光合成装置 LI-6400 が広く普及している。この装置では上記の条件をおおよそ満足するものである。しかし、同化箱内がどのくらい陽圧にされているかは公表されていない。また、低 CO₂ 分圧条件での外気 CO₂ の巻き込みや高 CO₂ 条件での CO₂ の漏れも確認されており、装置そのものを包み込むエアバッグを併用して、外気との CO₂ 分圧差を可能な限り小さくして測定することを推奨する報告¹¹⁾もある。いずれにせよ、これらの CO₂ の巻き込みや漏れがないことの確認は、熱処理した葉を同化箱にはさみ、CO₂ フリー条件や 100 Pa 以上の高 CO₂ 分圧ガスを同化箱に流し込み、同化箱流入前後の空気の CO₂ 分圧に差が生じないことでチェックできる。

ガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定でも同化箱の工夫を凝らす必要がある。なぜならば、ガス交換はなるべく同化箱前後での CO₂ 分圧差を大きくすることが望まれるため、ある程度測定面積を確保した同化箱が必要となる。例えば、Li-Cor 社の LI-6400 では標準タイプとして 6 cm² の同化箱が設定されている。Walz 社から販売されているポータブル装置 GFS-3000 でも同等の測定面積が確保されている。しかしながら、クロロフィル蛍光測定では測定光が葉面に均一に照射されることを厳密に要求されるので、比較的小さなスポット測定で行われる(通常は 1 cm² 程度)。すなわち、同時測定を行う場合は、大きな面積に厳密に均一な光強度の照射が求められる。Li-Cor 社から販売された最初の同時測定装置 LI-6400R は販売直後に一旦製造中止となり、現行のモデルでは同化箱面積が 2 cm² まで小型化された。おそらく、初期型のものでは、測定光の均一性に問題があり、改良が加えられたものと想像している。しかし、同化箱の小型化はやはり、同化箱前後の CO₂ 分圧差を小さくするためガス交換測定の精度を下げるものであった。例えば、この装置を用いての弱光条件や各種ストレス条件での光合成速度解析は測定される絶対速度が低いため無視でき得

ない誤差を生じさせる。また、例えば、上述の α 値の正確な算出も困難となる。最近、Walz 社から測定面積が 8 cm² 確保されたクロロフィル蛍光同時測定ユニット 3055-FL が販売されたが、残念ながら、筆者はその使用実績の情報を得ていない。

自作する場合は、さらに同化箱内でクロロフィル蛍光測定のためのファイバーが光源からの影を落とさないような工夫も必要となる。リングライトのように同化箱の周囲から均一に光照射ができ、ライト穴の中央から蛍光測定用のファイバーが組み込めるような装置が良いであろう。筆者らは日本ピー・アイ社の COLD SPOT スクエアリングライトを使い、ファイバーからの影が同化箱に落ちないように作製した装置で解析を進めている¹²⁾。

参考文献

- 1) B. Genty, J. Briantais & N. Baker, *Biochim. Biophys. Acta* **990** (1989) p.87
- 2) G. Di Marco, F. Manes, D. Tricoli & E. Vitale, *J. Plant Physiol.* **136** (1990) p.538
- 3) P. C. Harley, F. Loreto, G. Di Marco & T. D. Sharkey, *Plant Physiol.* **98** (1992) p.1429
- 4) C. Miyake & A. Yokota, *Plant Cell Physiol.* **41** (2000) p.335
- 5) A. Makino, C. Miyake & A. Yokota, *Plant Cell Physiol.* **43** (2002) p.1017
- 6) A. Brooks & G. D. Farquhar, *Planta* **165** (1985) p.397
- 7) D. B. Jordan & W. L. Ogren, *Planta* **161** (1984) p.308
- 8) S. von Caemmerer & W. P. Quick, *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, ed. R. C. Leegood, T. D. Sharkey & S. von Caemmerer Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 2000, p.85
- 9) T. Joët, L. Cournac, G. Peltier & M. Havaux, *Plant Physiol.* **128** (2002) p.760
- 10) T. D. Sharkey, *Plant Physiol.* **78** (1985) p.71
- 11) M. Rodegbiero, U. Niinemets & A. Cescatti, *Plant Cell Environ.* **30** (2007) p.1006
- 12) N. Hirotsu, A. Makino, S. Yokota & T. Mae, *Plant Cell Physiol.* **46** (2005) p.1377