

研究紹介

炭素安定同位体法を用いた葉内CO₂コンダクタンスの測定

京都大学大学院 生命科学研究所 統合生命科学専攻

田副 雄士*

1. はじめに

現在の気中CO₂環境は植物の光合成にとって最適であるとは言い難く、CO₂濃度は光合成の律速要因の一つである。したがって、植物が光合成に必要な基質であるCO₂を多く取り込むことが出来れば、光合成能の向上に繋がる可能性がある。CO₂の取り込みと聞いて、多くの人は気孔による制御を真っ先に思い浮かべるかも知れない。確かに、気孔は細胞間隙のCO₂濃度を制御しているが、細胞間隙からRubiscoまでの物理抵抗が、葉緑体内のCO₂濃度を制御していることは、あまり知られていない。本稿では、光合成能の向上に繋がるかもしれない、葉内CO₂コンダクタンスについて解説すると共に、最新の研究結果についても紹介する。

2. 葉内CO₂コンダクタンスとは？

光合成において、気孔から取り込まれたCO₂は、細胞間隙を拡散によって移動し、葉肉細胞の細胞壁、細胞膜、細胞質を通過して葉緑体に入り、最終的にRubiscoによって固定される(図1)。このような葉内におけるCO₂の拡散移動には、大きな物理抵抗が生じている。特に、細胞壁から葉緑体内のストロマに達するまでの液相の抵抗は、同じ距離の気相の抵抗の10⁴倍にもなる¹⁾。葉内におけるCO₂の拡散抵抗は、一般的には逆数をとって、葉内CO₂コンダクタンス(注: 英語では、mesophyll conductance もしくはinternal conductanceと表記され、それぞれ g_m または g_i と簡略化されるが、本稿においては g_m で統一する。なお、日本語では、葉肉コンダクタンスと呼ぶこともある)として表され、g_m が大きければ、葉内においてCO₂が通りやすいことを意味している。

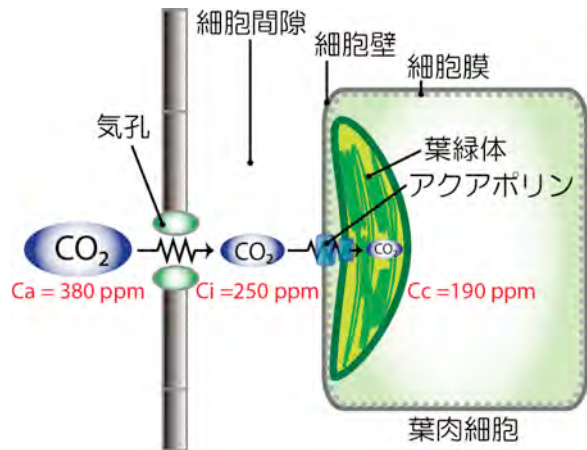


図1 葉内におけるCO₂の拡散経路

C_a:大気CO₂濃度、C_i:細胞間隙CO₂濃度、C_c:葉緑体内CO₂濃度

実際に、飽和光下 (1500 μmol photon m⁻² s⁻¹)、大気CO₂条件下 (380 ppm) で高い光合成をしているタバコの成熟葉における g_m を測定すると、およそ0.35 mol m⁻² s⁻¹ の値が得られる。この g_m がどの程度CO₂の低下に寄与しているかを計算すると、葉緑体内のCO₂濃度 (C_c) は 190 ppm になり、大気CO₂の半分にまで低下した(図1)。このように、g_m は葉内におけるCO₂拡散を大きく律速しており、近年、気孔に次ぐ第二の光合成律速要因として、注目されている。

g_m は1980年から90年代にかけて、様々な植物種を使って盛んに調べられてきた。その当時、g_m は葉肉細胞の細胞壁の厚さや、細胞間隙に接する葉緑体の面積といった、葉の形態的特徴によって決定されると考えられていた。実際に、細胞壁が厚くてしっかりとした構造を持つ木本種の葉の g_m は、草本種と比べて小さくなることが報告されている²⁾。しかし、近年、動物細胞において、細胞膜に局在するアクアポリンがCO₂も透過させていることが報告され³⁾、植物細胞におい

* 連絡先 E-mail: utazoe@lif.kyoto-u.ac.jp

ても同様に、細胞膜や葉緑体の包膜に局在しているアクアポリンがCO₂も透過させている可能性が議論されるようになった²⁾。この仮説を裏付けるように、アクアポリンを過剰発現させたイネやタバコの葉では、アクアポリン量の増加に伴い g_m も大きくなったという報告がある^{4,5)}。もし、アクアポリンが、g_mに影響を及ぼしているのであれば、g_mも気孔と同様に、環境に応じて臨機応変に変化する可能性があり、従来までの、g_mが葉の形態的特徴によってのみ決定されるという考えを改める必要がある。

3. 葉内CO₂コンダクタンスの求め方

g_mは、Fickの拡散方程式により、次のように表される。

$$A = g_m (C_i - C_c) \dots (1)$$

式 (1) より、細胞間隙のCO₂濃度 (C_i) と、葉緑体内のCO₂濃度 (C_c) の差に、細胞間隙から葉緑体までの葉内CO₂コンダクタンス (g_m) をかけると、光合成速度 (A) が導かれる。この式 (1) において、CO₂ガス交換測定により得られる値は、AとC_iだけなので、g_mとC_cを求めるためには、もう一つ別の式が必要となる。この式を導くためには、いくつかの方法があるが、現在最も信頼度が高いと言われている方法が、炭素安定同位体法である。

炭素安定同位体法とは、自然大気中に存在する炭素安定同位体である¹³CO₂と、¹²CO₂の比 (炭素安定同位体比) を測定する方法である。質量の軽い¹²CO₂の方が、拡散しやすく、Rubiscoによって固定されやすい。この性質を利用し、ガス交換測定装置のリーフチャンバー (同化箱) に入るCO₂と出てくるCO₂をサンプリングし、それぞれの炭素安定同位体比を調べることで、光合成においてCO₂の拡散による抵抗がどの程度生じているかを見積もることができる。具体的には、以下のモデル式を用いる⁶⁾。

$$\Delta = a \frac{c_a - c_i}{c_a} + a_i \frac{c_i - c_c}{c_a} + b \frac{c_c}{c_a} - \frac{eR_d/k + f\Gamma^*}{c_a} \dots (2)$$

左辺のΔは光合成における葉全体の炭素安定同位体分別を示しており、右辺のC_a、C_i、C_cはそれぞれ、大気、細胞間隙、葉緑体内のCO₂濃度を示している。ま

た、a、a_i、bは、気孔を通るときのCO₂拡散、葉内におけるCO₂拡散、RubiscoによるCO₂固定、の炭素安定同位体分別係数で、それぞれある定数が仮定されている。最後のfとeは、光呼吸と、呼吸によって生じる炭素安定同位体分別係数を示しており、R_dは光照射下における呼吸速度、kはRubiscoのCO₂固定効率、Γ*はCO₂補償点を示している。式 (2) を要約すると、葉全体の炭素安定同位体分別Δは、CO₂の拡散と固定によって生じる同位体分別から、呼吸により発生するCO₂の同位体分別を引いたものと等しい、というモデル式である。呼吸の同位体分別の部分は、筆者らにより改良されたモデル式⁷⁾が発表されているが、基本的概念は式 (2) と同じである。g_mは、この式 (2) と式 (1) から計算する。

g_mの計算に必要なΔは、光合成測定時に、ガス交換装置のリーフチャンバーから出てくるガスをサンプリングし、液体窒素で濃縮してガラス管に封入し、それを質量分析装置で測定することにより求めることが出来る。しかし、ガスのサンプリングに30分程度の時間がかかるため、瞬間的なg_mの変化を調べるのは困難である。最近、Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy (TDLAS) といった高性能のレーザー分光装置の普及のお陰で、リーフチャンバーから出てくるガスのΔをオンラインで検出できるようになり、瞬間的なg_mの挙動を追うことが可能となった。

4. 急激的なCO₂変化に対するg_mの挙動

TDLASとガス交換装置から成るオンラインシステムの開発により、瞬間的な環境の変化に対応して、g_mがどのような挙動を示すかについて、少しずつ明らかになりつつある。環境要因の一つであるCO₂濃度は、光合成速度を大きく左右し、気孔の制御にも影響を与えるが、g_mに与える影響については、長い間議論的とされてきた。そこで筆者らは、TDLASのオンラインシステムを用いて、瞬間的にCO₂濃度を変えた時のg_mの挙動について、タバコの成熟葉を用いて調べた。

図2は、低CO₂ (200 ppm)から高CO₂ (1000 ppm:■)、または高CO₂から低CO₂ (△) へと、瞬間的にCO₂濃度を切り換えたときの、光合成速度 (A)、気孔コンダクタンス (g_s)、g_mの変化を示す。CO₂濃度を200 ppmから1000 ppmに瞬間的に上げると、Aは急激に増加した (図2a)。気孔は、低CO₂下で開き、高CO₂下で閉じる傾向があるため、g_sの挙

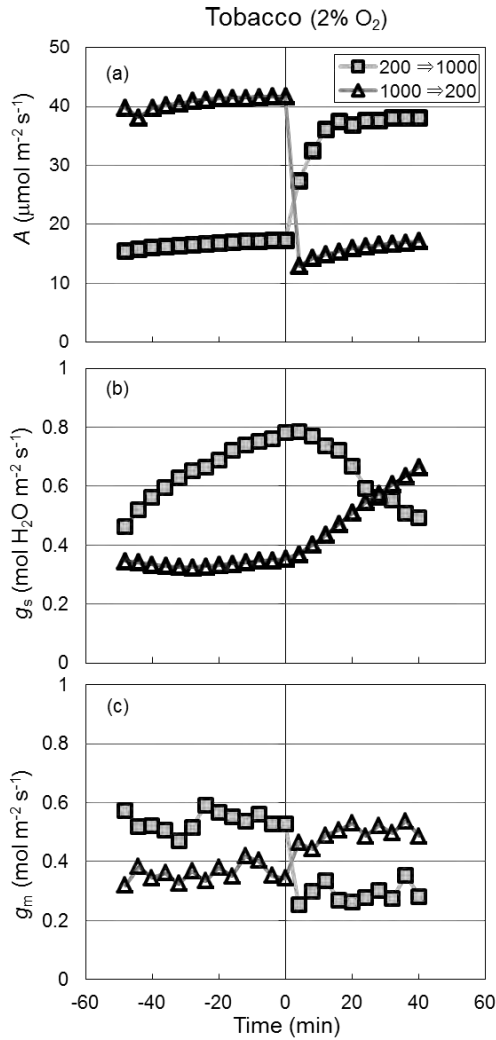


図2 瞬間的なCO₂濃度の変化に対する、光合成速度 (A)、気孔コンダクタンス (g_s)、葉内CO₂コンダクタンス (g_m) の時間変化
CO₂濃度を200 ppmから1000 ppmに瞬間的に変えたとき(■)と、1000 ppmから200 ppmに変えたとき(△)の、タバコの成熟葉のA、g_s、g_mの時間変化を、光強度1500 µmol photon m⁻² s⁻¹、2% O₂、葉温25°Cで測定した。CO₂濃度を変えたときを、Time = 0で表す。(Tazoe, Y., von Caemmerer, S. & Evans, J.R. 未発表)

動はそれを反映していたが、Aとは異なり、g_sはゆっくりと変化した(図2b)。g_mは、200 ppm CO₂でおよそ0.6 mol m⁻² s⁻¹と、g_sと変わらない値を示したが、CO₂濃度を1000 ppmに切り換えると、g_mは瞬時に0.3 mol m⁻² s⁻¹にまで減少した(図2c)。逆に、CO₂濃度を1000 ppmから200 ppmに下げたときには、瞬間的なg_mの増加の程度は小さかった。同様の結果は、シロイヌナズナやコムギでも確認された。このような、瞬間的なCO₂濃度の変化に対応してg_mも変わるという結果は、環境に応じてg_mが臨機応変に変化するという

仮説を支持するものであり、アクアポリンのCO₂応答の変化が、今回のg_mの変化に影響を与えている可能性も考えられる。しかし、CO₂濃度の変化が、植物のアクアポリンにどのように作用するのかについては、まだ不明な点が多く、現段階において、そのメカニズムについて明確に説明することは難しい。アクアポリンとg_mとの関係については、今後の研究成果に期待したい。

5. 異なるO₂条件下におけるg_m

低CO₂下においてg_mが増加することにより、葉緑体内におけるCO₂濃度と光合成に、どのような影響を与えているのだろうか?この疑問について考察するために、異なるO₂条件下でg_mを測定した結果を紹介する。

表1は、異なるO₂条件(2、21%)、CO₂条件下(200、1000 ppm)における、A、g_m、細胞間隙と葉緑体内のCO₂濃度差(C_i-C_c)の結果を示す。2% O₂下では光呼吸が抑えられるので、その分CO₂固定効率が上がる。そのため、200 ppmの低CO₂下では、Aは2% O₂下の方が大きくなった(表1)。しかし、1000 ppmの高CO₂下では、光呼吸の影響は小さくなるので、Aの最大値はO₂濃度によって、あまり変わらなかった。

2% O₂下におけるg_mは、図2と同様に、200 ppm CO₂で大きく、1000 ppm CO₂で小さくなった。しかし、21% O₂下において、g_mはCO₂濃度により変化しなかつ

表1 異なるO₂、CO₂条件下における、光合成速度(A)、葉内CO₂コンダクタンス(g_m)、細胞間隙と葉緑体内のCO₂濃度差(C_i-C_c)

異なるO₂(2、21%)、CO₂(200、1000 ppm)条件下における、タバコの成熟葉のA、g_m、C_i-C_cを、光強度1500 µmol photon m⁻² s⁻¹、葉温25°Cの条件で測定した。値は、平均値 ± 標準誤差(n = 3)を示す。(Tazoe, Y., von Caemmerer, S. & Evans, J.R. 未発表)

O ₂ (%)	CO ₂ (ppm)	A (µmol m ⁻² s ⁻¹)	g _m (mol m ⁻² s ⁻¹)	C _i - C _c (ppm)
2	200	16.8 ± 0.8	0.54 ± 0.01	31 ± 1
	1000	37.3 ± 1.7	0.29 ± 0.04	135 ± 17
21	200	10.6 ± 0.4	0.32 ± 0.03	34 ± 4
	1000	40.5 ± 1.2	0.33 ± 0.05	128 ± 22

た。得られたA、 g_m と式(1)を用いて、 $C_i - C_c$ を計算すると、200 ppm CO_2 において、2% O_2 下で31 ppm、21% O_2 下で34 ppmと、 O_2 濃度によらずほぼ一定であった。したがって、式(1)より、2% O_2 、200 ppm CO_2 における g_m の増加は、Aの増加を伴っていたといえる。

以上の結果をもとに、低 CO_2 条件下における g_m の増加が、光合成に与える影響について考察する。低 CO_2 、21% O_2 下では、光呼吸によるRubiscoの CO_2 固定効率の低下が、光合成速度の低下に影響していると考えられる。一方で、2% O_2 下では、光呼吸が抑えられるので、 C_c が光合成を律速している可能性が高い。このような条件下では、 g_m の増加によって C_c が大きくなることで、光合成速度の増加に繋がったと考えることもできる。しかし、低 CO_2 下における g_m の増加は、 O_2 条件に依存しないと主張する論文⁸⁾もあり、 g_m の増加の意義については、まだはっきりとした結論は出ていない。

O_2 濃度により、低 CO_2 下における g_m が異なる理由として、光呼吸が Δ に影響を与えている可能性も考えられる。式(2)において、光呼吸の炭素安定同位体分別係数 f は、一定であると仮定されており、本研究においても、過去の知見⁹⁾より $f = 11.6\text{‰}$ という値を用いている。しかし、実際に、光呼吸が光合成の Δ に、どの程度影響を与えているかについては様々な説があり、まだ決着がついていない。試しに、係数 f の値を変えて、 g_m の CO_2 依存性を計算した結果を図3に示す。ご覧の通り、21% O_2 下では、仮定する f の値に

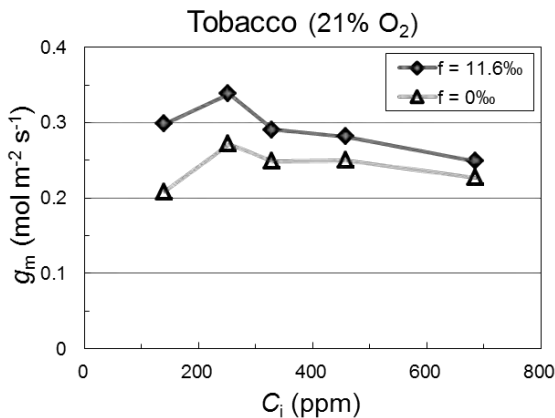


図3 光呼吸の炭素安定同位体分別係数 (f) が g_m の CO_2 依存性に与える影響

タバコの成熟葉を用いて、光強度 $1500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、21% O_2 、葉温 25°C 、様々な CO_2 条件下で測定を行った。 g_m は $f = 11.6\text{‰}$ (◆)、または $f = 0\text{‰}$ (△)と仮定して計算した。(Tazoe, Y., von Caemmerer, S. & Evans, J.R. 未発表)

よって、低 CO_2 下における g_m は大きく変化した。ちなみに、2% O_2 下では、 f の値を変えても、 g_m はほとんど変わらなかった。このように、光呼吸が g_m の計算に与える影響についても、注意する必要がある。

6. おわりに

本稿では、炭素安定同位体法による g_m の求め方に始まり、最新の研究の現状について解説してきた。今後、TDLASの普及により、誰でも簡単に g_m を見積もれる時代が来ると予想される。しかし、 g_m はあくまでも推測値であるため、 g_m の解釈には、十分な注意が必要であることを、心に留めておいてもらいたい。例えば、光合成速度が低い原因を考察するのに、気孔やRubiscoでうまく説明できないものを、 g_m のせいにしてしまい、間違った結論を導いてしまうこともある。今の技術では g_m を直接測定することは出来ないため、モデルを使って g_m を推定している限りは、このような間違いを避けることは難しい。しかし、 CO_2 を透過させるアクアポリン (aquaporin) ²⁾の解析や、TDLASを用いた詳細な測定、炭素安定同位体モデルの改良⁷⁾により、 g_m の性質、そして g_m の正体が、次第に明らかになりつつある。 g_m が CO_2 固定効率の向上に繋がるかどうか?この質問の答えを出すのは、そう遠い未来の話ではない。

なお、4月号の会報の研究紹介記事において、寺島が、約2ページにわたって葉内 CO_2 コンダクタンスに関して解説している¹⁰⁾。興味のある方は、そちらも併せて読んで頂きたい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、筆者がオーストラリア国立大学に在籍中に、John R. Evans 博士とSusanne von Caemmerer 教授の指導の下、おこなったものであり、両氏に深く感謝したい。また、適切なコメントを下さった寺島一郎教授、本稿作成の機会を与えて下さった野口航准教授には、この場を借りて厚く御礼を述べたい。

Received July 9, 2010, Accepted August 5, 2010, Published August 31, 2010

参考文献

1. Heldt, H.W. (金井 龍二 訳). (2000) 植物生化学 (原著 Pflanzenbiochemie 第2版. 1999). シュプリンガー・フェアラーク東京.
2. Terashima, I., Hanba, Y.T., Tazoe, Y., Vyas, P. and Yano, S. (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* 57, 343-354.
3. Nakhoul, N.L., Davis, B.A., Romero, M.F. and Boron, W.F. (1998) Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 274, 543-548.
4. Hanba, Y.T., Shibasaki, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. and Katsuhara, M. (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* 45, 521-529.
5. Flexas, J., Miquel, R.-C., Hanson, D.T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H. and Kaldenhoff, R. (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *Plant J.* 48, 427-439.
6. Evans, J.R., Sharkey, T.D., Berry, J.A. and Farquhar, G.D. (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO₂ diffusion in leaves of higher plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 281-292.
7. Tazoe, Y., von Caemmerer, S., Badger, M.R. and Evans, J.R. (2009) Light and CO₂ do not affect the mesophyll conductance to CO₂ diffusion in wheat leaves. *J. Exp. Bot.* 60, 2291-2301.
8. Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H. & Ribas-Carbo, M. (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant, Cell Environ.*, 30, 1284-1298.
9. Lanigan, G.J., Betson, N., Griffiths, H. and Seibt, U. (2008) Carbon isotope fractionation during photorespiration and carboxylation in *Senecio*. *Plant Physiol.* 148, 2013-2020.
10. 寺島 一郎 (2010) 葉が緑色なのは緑色光を効率よく利用するためである, 光合成研究 20, 15-20

Measurement of the Mesophyll Conductance with Carbon Isotope Method

Youshi Tazoe*

Graduate School of Biostudies, Department of Plant Gene and Totipotency, Kyoto University