

光阻害の原因が複数のメカニズムの同時寄与である可能性[‡]

東北大学 大学院生命科学研究科

小口 理一*

光阻害のメカニズムには未だ不明な点が多く、複数の仮説間で論争が続いている。大きな論点の一つとして、光阻害の最初の原因が、クロロフィルによる吸光なのか酸素発生複合体内のマンガンによる吸光なのかという問題がある。クロロフィルとマンガンの吸光スペクトルには大きな差がある点、クロロフィルが吸収した光エネルギーは光合成等で消費される一方でマンガンによる吸光はそのままマンガンの遊離につながる点、光阻害を測定するクロロフィル蛍光法は高等植物の葉のどの深さを測定しているか解らない点に注目し、光の色と強度を変えて光阻害実験を行うとともに、葉内での光阻害強度の変化を調べた。実験は光化学系II修復阻害剤を与えて行った。クロロフィルによる吸光とマンガンによる吸光が同時に関わらなければ説明できない結果となり、複数のメカニズムが同時に関わる可能性が示唆された。また、葉内には光阻害の勾配があり、クロロフィル蛍光による光阻害強度測定には有意な誤差が生じている事が明らかになった。

1. はじめに

光は植物にとって欠くことのできない資源である一方、そのエネルギー故に光合成器官に損傷を与える^{1,4)}。光阻害は強光環境でよく観察されるが、光強度は太陽の動きや、気象条件、上層の葉群の動態などによって、時間的にも変化するため、特に弱い光強度から強い光強度への変化が光阻害につながりやすいことが知られている⁵⁾。また、陰生植物や陰葉の方が陽生植物や陽葉よりも光阻害を受けやすい⁶⁾。

光阻害は農・林業生産物の収量低下をもたらすとともに、高・低温や乾燥、不適な土壌といったストレス環境下で強まるため、荒廃地・不適土壌といった場所での森林再生の妨げにもなっている^{7,8)}。このことから、光阻害のメカニズムの解明は、農・林業の生産向上、バイオ燃料生産技術の向上、砂漠地帯や荒廃地での森林再生技術の向上を介して、食料問題や地球温暖化問題といった持続可能社会実現に向けた大きな課題の解決に貢献できると考えられている。そのため、光阻害のメカニズム及び光阻害耐性機構については多くの研究が進められてきた⁹⁻¹²⁾。しかし、未だそのメカニズムには不明な部分が多い。

光阻害は広義には、熱放散による光合成効率の低下や、活性酸素種の発生による葉緑体や細胞の不可

逆的な傷害も含まれるが、本稿では、主要な原因である光化学系IIの不活性化について述べる。光化学系IIの不活性化のメカニズムについて現在、大きく分けて二つの仮説が提唱されている。一つ目は、光化学系IIのクロロフィルが受けた光エネルギーのうち光合成や熱放散などで消費しきれない過剰な光エネルギーがダメージを引き起こすとし、Excess energy仮説と呼ばれる^{13,14)}。二つ目は、光化学系IIの酸素発生複合体に存在するマンガンが光によって励起されることで遊離し、酸素発生複合体が機能を失った状態で、光化学系IIの反応中心が励起されることがダメージを引き起こすというもので、Mn説もしくはTwo-step仮説と呼ばれる^{15,16)}。前者では、過剰な光エネルギーが発生しない弱光環境では光化学系IIの光阻害は起こらないはずであるのに対し、後者では弱光環境であっても一定確率でマンガンが光を吸収するために光阻害は起こるはずである。このように二つの説には根本的な違いがあるが、論争に決着がついていない。

著者らは、これまでの研究ではこれらの複数のメカニズムが光阻害に同時に関わる可能性が考えられてこなかったことに注目した。そこで、複数のメカニズムが同時に起きている可能性を考慮し、これらのメカニズムの寄与を定量することを目的とする研究を

[‡] 解説特集「光阻害」

* 連絡先 E-mail: riichi@biology.tohoku.ac.jp

行った。

また、これらの研究にともない、現在光阻害の測定で最も広く用いられているクロロフィル蛍光法において、高等植物の葉の測定では有意な誤差が生じる事が明らかになったので、それについても紹介する。

2. 異なる光強度および波長下での光阻害速度

まず著者らは、以下の2点を工夫した実験系を考案した。

1. 過剰なエネルギーが生じない $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ほどの弱光ではexcess energyメカニズムによる光阻害は起こらないのに対しMnメカニズムによる光阻害は起こるため、この光環境での光阻害を測定することでMnメカニズムによる光阻害の大きさを推定できる。また、過剰エネルギーが高まる強光環境での光阻害強度と比較することで、excess energyメカニズムによる光阻害への寄与の推定も可能である。

2. excess energyメカニズムではクロロフィルによる吸光が光阻害の原因となるのに対しMnメカニズムではマンガンによる吸光が光阻害の原因であるが、クロロフィルとマンガンでは吸収スペクトルが大きく異なる(図1)。クロロフィルは青色と赤色域に極大吸収波

長があるため、excess energyメカニズムでは青色と赤色で緑色に比べて光阻害が大きくなるはずであるが、マンガンは紫外線域に極大吸収波長があり、青色から赤色にかけて吸光度が低下していくためMnメカニズムでは光阻害の強さは青色、緑色、赤色の順になると考えられている。よって、異なる色のLED光源を用いた光阻害実験により、各メカニズムの影響の大きさを推定することができる考えた。

また、これまでのMn仮説を支持する研究が単離チラコイド膜や切り葉で行われてきたことにも注目した。単離チラコイド膜や切り葉の状態では光合成活性を高い状態に保つことが難しい。光合成活性が低下して行くことで、一定光強度下であっても徐々にexcess energyが高まり、excess energyによる光阻害への影響を正しく評価できなくなる可能性が高い。そこで、我々は*in vivo*の弱光環境で実際に光阻害が起こるのかを確かめるため、切除していない葉の光阻害を非破壊的に観察することにした。植物には光阻害による損傷を修復する能力があるため、光阻害の程度は損傷速度と修復速度のバランスで決まる。本研究では修復速度の影響を排除するために、根から光化学系の修復阻害剤であるリンコマイシンを吸わせた個体を用いて実験を行った¹⁹⁾。

光阻害処理は、白色、青色(ピーク: 460 nm)、緑色(ピーク: 530 nm)、赤色(ピーク: 640 nm)発光ダイオード(LED)を用いて、弱光、中光、強光(それぞれ $30, 60, 950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)環境で行った。葉が受ける受光量を一定にするために、強光下では最長80分間の処理を行う一方で、弱光下では最長42時間半の処理を行った。修復阻害剤を根から吸わせた切除していない葉を用いることで、この長時間の光阻害処理が可能となった。

光阻害強度の測定には、非破壊的に繰り返し測定するため、クロロフィル蛍光測定装置(PAM101, Walz)を用いた。光阻害処理後30分間暗所におき、熱放散を緩和させた状態で、最小蛍光強度(F_0)および最大蛍光強度(F_m)を求めた。ここで $F_v = F_m - F_0$ とすると、 F_v/F_m は最大光化学系II効率と呼ばれ、光化学系II活性と強い相関を持つことが知られている²⁰⁾。 F_v/F_m の低下の大きさから光阻害の程度を推定した。(後述するように、クロロフィル蛍光法による光阻害の程度の測定には定量的な誤差が生じるが、定性的には問題はない。詳しくは第4節を参照のこと。)

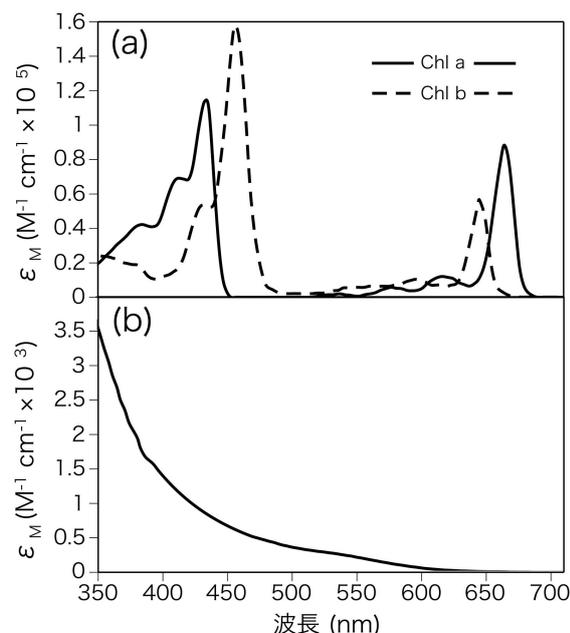


図1 クロロフィルa/bの吸光スペクトル (a) およびMnクラスターの予測吸光スペクトル (b)

縦軸は分子吸光係数。(b)はMnクラスターの25%が3価のマンガン、75%が4価のマンガンであることを仮定している。(a)のデータはOhashi et al.¹⁷⁾より。(b)のデータはBodini et al.¹⁸⁾より。

結果は、過剰エネルギーがほとんどない弱光や中光でも光阻害が起きており、光阻害の強度はマンガンの吸光スペクトルに従って青色、白色、緑色、赤色の順となっていた(図2)。これはMnメカニズムによる貢献を意味する。一方で、受光量あたりの光阻害の強度は、弱光や中光よりも強光で有意に高かった。この実験では強光では阻害時間を短く、弱光では阻害時間を長くして一定の光量子量を当てているため、励起されるマンガンの量は光強度によらず等しい。Mn説だけが正しいとすると、どの光強度でも阻害の程度は一緒になるはずだが、過剰エネルギーが高くなる強光で光阻害が大きくなっていったことは、excess energyメカニズムによる貢献を意味する。これらの結果から、excess energyメカニズムとMnメカニズムの両方が同時に起きていることが示唆された²¹⁾。

強光での光阻害の程度は、弱光や中光での光阻害

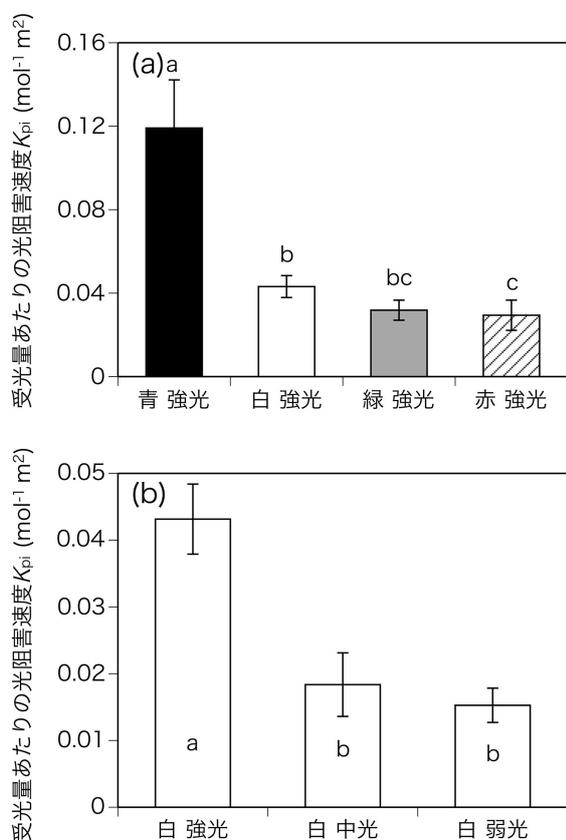


図2 *Capsicum annum*の葉が同一量 (4.6 mol m^{-2}) の光量子を受けたときの各色での光阻害強度 (a) および、同一条件での各光強度での光阻害強度 (b: 阻害を受けた光化学系IIの割合)

(a) は強光で阻害した結果のみを、(b) は白色光での結果のみを示した。

の程度の2倍ほどであったことから、excess energyメカニズムによる貢献とMnメカニズムによる貢献はほぼ同じ程度であることが推測されるが、この研究では異なる光強度条件での受光量を一定にするため、照射時間を大きく変えており、それに伴う、順化や老化の影響を含んでいる可能性を否定できない。また、種や環境条件によって貢献度が変化する可能性もある。それぞれのメカニズムの貢献度を明らかにするには今後の研究の発展が期待される。

3. 葉内での光阻害の勾配と光阻害スペクトル

森林などの群落では群落上部から下部にかけて光強度の勾配が見られるが、一枚の葉の内部でも光強度の勾配が見られる。これは群落で葉が光を吸収することで光強度が減衰していくのと同様に、葉の内部では葉緑体が光を吸収することで葉の表側から裏側にかけて光強度が減衰していくためである²²⁾。

光阻害は光エネルギーによって引き起こされるため、光強度が強いほど光阻害の程度は強くなる。このため、葉内での光強度の勾配は、葉内での光阻害の程度にも勾配をもたらすと考えられる²³⁾。また、光はその波長・色によって葉緑体による吸光度が異なる。葉や葉緑体が緑色をしていることから解るように、赤や青色の波長の光に比べると緑色の波長の光は、葉緑体に吸収されにくく、葉内でより深くまで光が届いている²⁴⁾。このような波長・色による葉内での光強度の勾配の差は、葉内での光阻害の程度の勾配にも差をもたらすと考えられる。

これらの仮説を確かめるため、光ファイバーを用いて葉内のクロロフィル蛍光を測定するシステムを立ち上げた。光ファイバーを用いてクロロフィル蛍光を測定することが出来る蛍光測定装置 (Microfiber PAM, Walz) の光ファイバー1本の先端をバーナーで熱して引き延ばし、先端の細さを直径30 μm 程に細くすることで、ファイバーが葉内に刺さるようにした。マイクロマンニピレーターを用いてマイクロメートル単位で葉に差し込んでいくことで、葉内の各深さでの光阻害の程度の測定を可能にした。青色光 (400-500 nm)、緑色光 (500-600 nm)、赤色光 (600-700 nm) で光阻害した結果、予測通り、赤や青色の波長の光に比べて緑色の波長の光の方が葉内での光阻害の程度の勾配が弱いことが示された(図3)。また、葉の表面付近では青、赤、緑の順で光阻害が強くなっていった

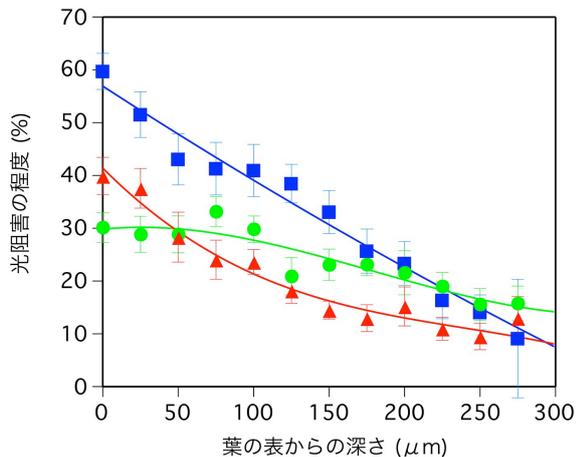


図3 *Capsicum annuum*の葉内での各深さにおける光阻害の程度

光阻害の程度は先端を30 μm程に細くして葉に刺さるようにした光ファイバーを葉内に挿入することで各深さでのクロロフィル蛍光を測定した。阻害処理前の光化学系IIの活性を100%としたときの割合で示す。□は青色光 (400 - 500 nm)、○は緑色光 (500 - 600 nm)、△は赤色光 (600 - 700 nm) で光阻害したサンプルを、誤差線は標準誤差を示す。Oguchi et al.²⁵⁾のデータを用いて図を改訂した。

が、葉の内部では赤と緑の順番が逆転していた。葉の表面付近の光阻害の程度はクロロフィルの吸光スペクトルに従っており、excess energyメカニズムを指示する結果であった。一方で、葉の深い場所でも常に青色による光阻害は赤色による光阻害よりも程度が大きくなっていた。青色光は赤色光よりもクロロフィルによって吸収されやすいため、葉の深い場所には赤色光の方がより届いている²⁶⁾。よって、excess energy説だけが正しいとすると、赤色光の方が葉の深くでは光阻害の程度が高くなるはずである。しかし、青色光による光阻害の程度が大きくなっていたのは、青色の吸収が強いMnメカニズムによる貢献があったためと考えられる。さらに、各深さの光阻害の程度と光化学系IIの分布から、葉全体の光阻害の程度を計算したところ、光阻害の程度は青色、緑色、赤色の順になっており、こちらもMnメカニズムによる貢献を示唆した。よって、これらの結果は、Excess energy説とMn説の両者が光阻害に関わっていることを支持するものであった²⁵⁾。

また、このことは、葉のどの深さを測定しているかによって、光阻害スペクトルや光阻害の程度が変化することを意味する。測定機械や、材料によって変化することに注意して研究を行う必要がある。

4. クロロフィル蛍光法の誤差と、新しい光阻害・光化学系II活性測定法

現在、光阻害や光化学系IIの活性の測定にはクロロフィル蛍光法が最も広く用いられている²⁷⁻²⁹⁾。クロロフィル蛍光法は非破壊的に短時間で測定することが可能であり、野外でも用いることが出来るため、様々な分野で利用されている。しかし、クロロフィル蛍光法は測定光を葉の表面に当て、それによって励起されたクロロフィルから放出される蛍光を測定しているが、測定光も蛍光も可視光域の光であるため、クロロフィルによってよく吸収されてしまい、葉の表面の光化学系IIの状態は測れても、葉の深くの光化学系IIの状態を測ることが出来ないと考えられる。光阻害を受けた葉の活性状態を測るときなどは、前節で述べたように、葉の表面の光化学系は強い光を受けるために強い光阻害を受けているが、葉の裏面の光化学系IIは葉の組織を通過してきた弱い光しか受けられないためほとんど光阻害を受けていないような状況が生まれている(図3)。これにより、葉のどの深さを測るかによって、測定値に誤差が生じることが予想される。

実際、葉全体の光阻害を測定できる方法による結果と、測定光の色などの特徴が異なる複数のクロロフィル蛍光測定装置で測定した光化学系IIの活性の結果を比較すると図4のようになる。光阻害時間を変える事により様々な光化学系IIの活性を得ているが、横軸の一点は一つのサンプルであり、その一つのサンプルを複数のクロロフィル蛍光測定装置で測定している。理想的にはどの機械も同じ値を示すべきだが、縦に複数の点がある結果になっている。つまり同じサンプルを測定しても機械によって測定値が異なってしまうことを意味する。また、白抜きシンボルは赤色の測定光を使って測定したもの、黒塗りのシンボルは青色の測定光を使って測定したものを意味するが、全体的に赤色で測定したものが対角線の上側に、青色で測定したものが下側に来ている。これは、赤色の測定光を使う機械は光阻害後の光合成活性を過大評価しており、青色の測定光を使う機械は過小評価していることを示唆する。この差は、赤色光は青色光よりもクロロフィルによる吸光が弱いため(図1a)²⁶⁾、より深くの組織に測定光が達していたためと考えられる。つまり、青色光は葉の表付近ですぐに吸収されてしまうため、葉の表付近の光阻害が強い部分しか測定できていないため光合成活性を過小評価

し、赤色光は葉の奥深くまで届くため、葉の裏の光阻害がほとんど起こっていない部分も測定することで、光合成活性を過大評価していると考えられる。

葉組織全体の正しい光化学系IIの活性、光阻害の状態を調べるためには、酸素電極を用いて、光化学系IIを一回だけ励起するsingle turnover flashを複数回当て、発生する酸素量から光化学系の活性を求めるという方法をとる必要があった³⁰⁾。しかし、この酸素電極による方法は、single turnover flashによるごくわずかな酸素発生量を測る必要があるために、一回の測定に30分ほどかかってしまうことと、植物個体から切り離れた葉

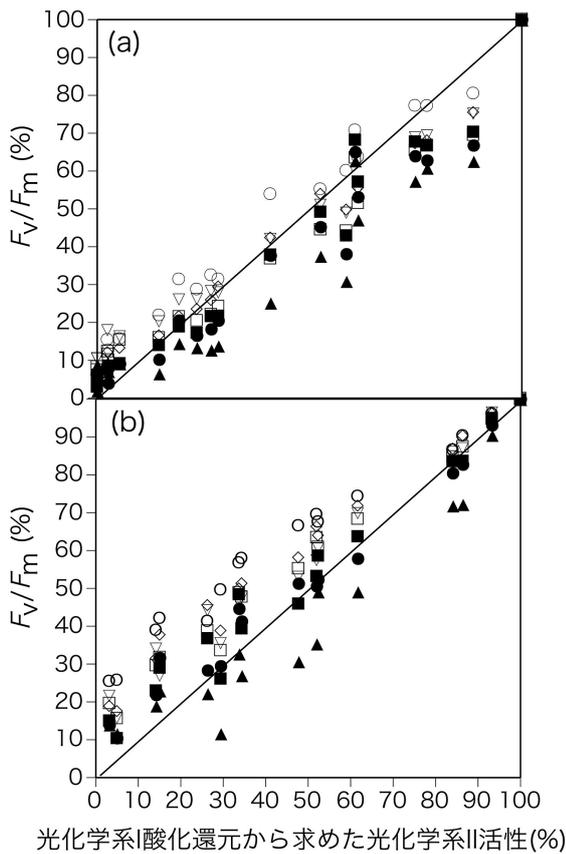


図4 クロロフィル蛍光法による光阻害処理後の光化学系II活性測定の誤差

縦軸は測定光の波長や光センサー用のフィルターなどが少しずつことなる複数の蛍光測定装置を用いて、色々な程度に光阻害した葉について、同じサンプルを複数の機械で測定した。中抜きは赤色測定光を用いた機種で、それぞれ○: PAM101 (Walz)、◇: miniPAM (Walz)、▽: PEAmeter (Hansatech)、□: PAM100 (Walz) を示す。黒塗りのシンボルは青色測定光を用いたPAM101を示し、■: 710 nm以上の蛍光を測定、●: 660 - 710 nmの蛍光を測定、▲: 660 nm以下の蛍光を測定。横軸は図5で示す光化学系Iの酸化還元速度から光化学系IIの活性を求めたもので、葉組織全体の活性を測定できる。(a) は*Capsicum annum*、(b) は*Spinacia oleracea*を用いた。図はOguchi et al.²⁵⁾を改訂。

でないと測定できないという欠点があった。そこで、著者らはオーストラリア国立大学のChow教授の下、全組織的な光阻害・光化学系II活性の測定法を考案した。この測定法は光化学系Iの酸化還元状態を測ることで光化学系IIの活性を測定するものである。光化学系Iの酸化還元状態が変化すると葉の吸光スペクトルが変化する。この変化は810 nm / 870 nmというクロロフィルなどの葉の色素によってほとんど吸収されない波長においても見ることが出来るため、測定光は葉の全組織に行き渡り、全組織的な測定を行うことが可能である³¹⁾。光化学系IIにはほとんど吸収されないが光化学系IIにより良く吸収されるfar-red光を当てて、光化

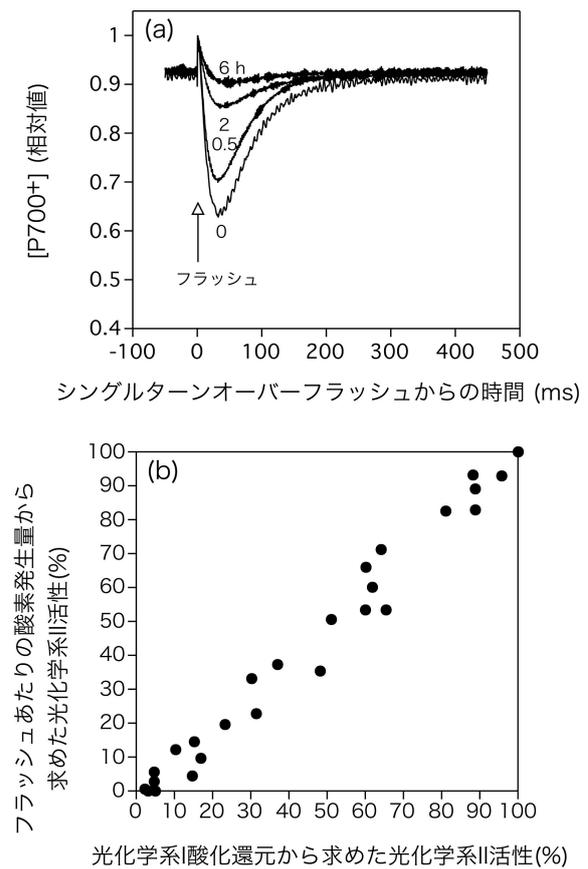


図5 P700 (光化学系I反応中心) の酸化還元反応速度を利用した、光化学系II活性測定法 (a) およびsingle turnover flashあたりの酸素発生量から求めた光化学系II活性との比較 (b)

(a) は光化学系Iの酸化還元状態から光化学系IIの活性を測定した結果の一例。Flashを当てる前の定常状態とFlashによる光化学系IIからの電子の流れが終わった後の定常状態とを結んだ直線と、Flashを当てた直後のカーブとの間の面積が光化学系IIの活性と比例する。図中の0-6 hと示されているラインは光阻害処理を0から6時間行った後の結果である。カーブと定常状態との間の面積が光阻害処理時間を長くすると小さくなるのが解る。

学系Iのみを酸化状態にしたあとに、single turnover flashを当てると、光化学系Iが完全に酸化された後、光化学系IIから電子が流れてくるために、光化学系は一度還元され、またその後、far-red光によって酸化されて定常状態に戻るといったことが起きる(図5a)。光化学系IIから流れてきた電子の量は活性状態にある光化学系IIの量と一致するため、定常状態からの変化量(具体的には光化学系I酸化還元の定常状態を結んだ線とsingle turnover flash直後のキネティクスカーブとの間の面積)が光化学系IIの活性と比例することを利用する³²⁾。この測定を様々な種で行い、酸素発生による光化学系II活性の結果と比較したところ、葉の厚さの違いに関わらず、ほぼ原点を通る直線で回帰され、どちらの測定方法も全葉組織的な測定が行われていることが示された³²⁾。図5bでは*Capsicum annuum*を測定した例を示す。

謝辞

本稿で紹介した研究においてご指導頂いた、オーストラリア国立大学 Wah Soon Chow教授、東京大学 寺島一郎教授、および共同研究者であるPeter Douwstra氏、藤田貴志氏、Pasquale Losciale博士に感謝申し上げます。

Received July 12, 2013, Accepted July 22, 2013, Published August 31, 2013

参考文献

- Osmond, C. B. (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. in *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N. R. and Bowyer, J. R., Eds.) pp 1-24, BIOS Scientific Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O., and Leegood, R. (1997) Too many photos: Photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* 2, 119-121.
- Chow, W. S., Lee, H. Y., He, J., Hendrickson, L., Hong, Y. N., and Matsubara, S. (2005) Photoinactivation of Photosystem II in leaves. *Photosynth. Res.* 84, 35-41.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W. W., III (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* 172, 11-21.
- Naidu, S. L., and Delucia, E. H. (1997) Acclimation of shade-developed leaves on saplings exposed to late-season canopy gaps. *Tree Physiol.* 17, 367-376.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W. W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599-626.
- Long, S. P., Humphries, S., and Falkowski, P. G. (1994) Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 633-662.
- Alves, P., Magalhaes, A. C. N., and Barja, P. R. (2002) The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation, *Bot. Rev.* 68, 193-208.
- Oguchi, R., Terashima, I., Kou, J. C., and Chow, W. S. (2011) Operation of dual mechanisms that both lead to photoinactivation of Photosystem II in leaves by visible light. *Physiol. Plant.* 142, 47-55.
- Vass, I. (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiol. Plant.* 142, 6-16.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., and Murata, N. (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant.* 142, 35-46.
- Takahashi, S., and Badger, M. R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 53-60.
- Ögren, E., Öquist, G., and Hallgren, J. E. (1984) Photoinhibition of photosynthesis in lemna-gibba as induced by the interaction between light and temperature.1. Photosynthesis in vivo. *Physiol. Plant.* 62, 181-186.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E., and Andersson, B. (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1408-1412.
- Hakala, M., Tuominen, I., Keränen, M., Tyystjärvi, T., and Tyystjärvi, E. (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 68-80.
- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S. I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., and Murata, N. (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44, 8494-8499.
- Ohashi, S., Miyashita, H., Okada, N., Iemura, T., Watanabe, T., and Kobayashi, M. (2008) Unique photosystems in *Acaryochloris marina*. *Photosynth. Res.* 98, 141-149.
- Bodini, M. E., Willis, L. A., Riechel, T. L., and Sawyer, D. T. (1976) Electrochemical and spectroscopic studies of manganese(II), -(III), and -(IV) gluconate complexes.

1. Formulas and oxidation-reduction stoichiometry. *Inorg. Chem.* 15, 1538-1543.
19. Noren, H., Svensson, P., and Andersson, B. (1999) Auxiliary photosynthetic functions of *Arabidopsis thaliana* - Studies *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Rep.* 19, 499-509.
20. Krause, G. H., and Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349.
21. Oguchi, R., Terashima, I., and Chow, W. S. (2009) The involvement of dual mechanisms of photoinactivation of photosystem II in *Capsicum annuum* L. plants. *Plant Cell Physiol.* 50, 1815-1825.
22. Terashima, I., and Saeki, T. (1983) Light environment within a leaf I. Optical properties of paradermal sections of camellia leaves with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissues. *Plant Cell Physiol.* 24, 1493-1501.
23. Schreiber, U., Kuhl, M., Klimant, I., and Reising, H. (1996) Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM Fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynth. Res.* 47, 103-109.
24. Vogelmann, T. C. and Han, T. (2000) Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. *Plant Cell Environ.* 23, 1303-1311.
25. Oguchi, R., Douwstra, P., Fujita, T., Chow, W. S., and Terashima, I. (2011) Intra-leaf gradients of photoinhibition induced by different color lights: implications for the dual mechanisms of photoinhibition and for the application of conventional chlorophyll fluorometers. *New Phytol.* 191, 146-159.
26. Vogelmann, T. C., and Evans, J. R. (2002) Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ.* 25, 1313-1323.
27. Genty, B., Briantais, J. M., and Baker, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87-92.
28. Baker, N. R. (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89-113.
29. Evans, J. R. (2009) Potential errors in electron transport rates calculated from chlorophyll fluorescence as revealed by a multilayer leaf model. *Plant Cell Physiol.* 50, 698-706.
30. Chow, W. S., Hope, A. B., and Anderson, J. M. (1989) Oxygen per flash from leaf-disks quantifies Photosystem-II. *Biochim. Biophys. Acta* 973, 105-108.
31. Sacksteder, C. A., and Kramer, D. M. (2000) Dark-interval relaxation kinetics (DIRK) of absorbance changes as a quantitative probe of steady-state electron transfer. *Photosynth. Res.* 66, 145-158.
32. Losciale, P., Oguchi, R., Hendrickson, L., Hope, A. B., Corelli-Grappadelli, L., and Chow, W. S. (2008) A rapid, whole-tissue determination of the functional fraction of PSII after photoinhibition of leaves based on flash-induced P700 redox kinetics. *Physiol. Plant.* 132, 23-32.

Possibility of the Involvement of Multi-Mechanisms in Photoinhibition

Riichi Oguchi*

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University