

解説

パルス変調クロロフィル蛍光測定におけるデータの解釈

園池公毅 (東京大学・新領域)
—現早稲田大学—

1. はじめに

昨年まで4年間にわたり光合成研究会の常任幹事として会報の編集を担当し、さまざまな方に原稿の執筆をお願いしてきました。ところが因果応報というべきでしょうか、今度は、編集を引き継いで頂いた筑波大学の野口さんから、パルス変調クロロフィル蛍光について解説した記事を書いて欲しい、との依頼がありました。まさか、自分がやめた途端、会報への協力を拒むわけにもいきませんから、お引受けはしましたが、どのように書くのかについては考え込まざるを得ませんでした。蛍光とは何か、パルス変調とは何か、から説明するのでは、ページ数がいくらあっても足りません。また、機器測定というものは、自分で機械を動かしてみないとわからない点というのが常にあり、測定方法を文章で表すことによる限界もあるでしょう。考えた末、本稿の目的を、「パルス変調クロロフィル蛍光のデータの載った論文を読んだ時に、そのデータを解釈するのを手助けする」ことに置くことにしました。従って、測定の原理は最小限にとどめ、測定の方法についてもほとんど触れません。そのような部分については、また、書く折りもあるかも知れませんが、僕のホームページの中の

<http://www.photosynthesis.jp/keikou.html>

にある程度は説明してありますので、そちらをご覧ください。また、本稿の後半のパラメーターの説明の部分はこのホームページ上の説明とかなり重なっていることを申し添えます。また、今回はレファレンスをつけることができませんでした。

前置きの最後にもう一点だけ。クロロフィル蛍光に関しては、高等植物と、単細胞藻類およびシアノバクテリアとの間には大きな違いがあり、データの解釈も異なります。本稿では、これもスペースの関係から材料を高等植物の場合に限ることにします。

2. 蛍光の最小値 F_0 と F_0'

測定の原理は書かない、とは言ったものの、何もしないでは始められません。以下の2つが最低限の知識です。

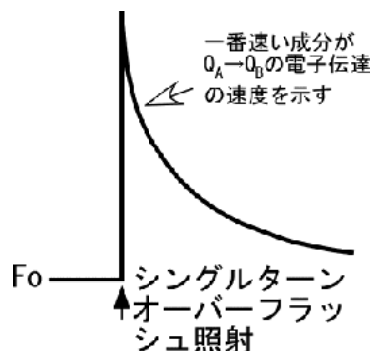
- (1) 蛍光の強さは励起光の強さに比例し、蛍光収率がその比例関係を決める
- (2) 励起光のエネルギー = (蛍光 + 熱 + 光合成) のエネルギー

この2つのことから言えるのは、一定の光(励起光)をあてている時に、熱になるエネルギーや光合成で使われるエネルギーが増えれば、蛍光になるエネルギーは減る、つまり、蛍光収率は下がる、ということです。具体的には、光化学的要因(系IIの Q_A が還元されている時、つまり光合成反応が進行しない時に蛍光が高くなり、逆に酸化されている時は蛍光が低くなる)と非光化学的要因(エネルギーを熱として放散するシステムが働くと蛍光は低くなり、熱放散システムが働かないと蛍光は高くなる)に分けて考えることができます。暗所に充分おいた葉では、 Q_A は完全に酸化されていますから蛍光は低く、この値を F_0 といいます。この F_0 は、クロロフィル量などによって変化するため、これだけを定量的に評価する例は多くありません。しかし、高温などのストレス条件下や、光合成関連の変異株などでは、 F_0 が高くなることがよくあり、光合成関連変異体のスクリーニングの際などには、 F_0 を指標にする例があります。高温ストレスによる F_0 上昇のメカニズムとしては姫路工大の佐藤和彦さんのグループなどによって暗所における Q_A の還元などが提唱されています。一方で、 Q_A が完全に酸化されている条件でも、直前の光照射によって熱放散のシステムが働いていれば、それによって蛍光収率が減少しますから、励起光をきった直後などには蛍光レベルが F_0 よりさらに低下する場合があります。このレベルを F_0' と呼びます。 F_0' 自体はさほど意味のあるパラメーターではあり

ませんが、後述する非光化学消光 q_N の算出などに必要になります。

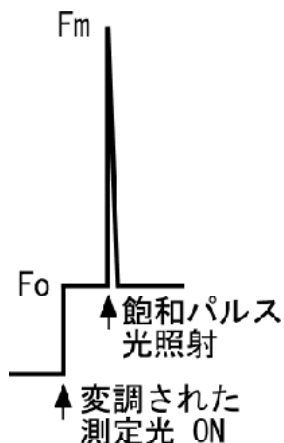
3. 蛍光の最大値 F_m と F_v/F_m

暗所に置いた葉に光合成が飽和するような強さのパルス光をあてると、蛍光の上昇が見られます。この飽和パルス照射時の蛍光の最大値を F_m と呼びます。ここでも、短いパルスの間では非光化学的要因は変化しないと考えられますから、蛍光の変化は光化学的要因、つまり Q_A の還元によって起こります。パルス変調による測定の場合は、原理的には変調された測定光以外の光による蛍光は検出されませんから、ここで見られる蛍光の上昇は、蛍光の収率の上昇を反映しています。 F_m 自体は何かの指標として使われることはあまりありませんが、 F_o と組み合わせることにより、 $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$ という形で、光化学系 II の最大量子収率を示すパラメーターを計算することができます。このパラメーターは、他の多くのパラメーターと異なり、原理的に光化学系 II の量子収率と定量的・直線的な関係があります。健康な植物では 0.80-0.83 程度となり、量子収率の低下に伴って直線的に減少しますので、もっとも使いやすいパラメーターといってもよいでしょう。しかし一つだけ注意しておくべきなのは、 F_v/F_m は光化学系 II の電荷分離だけに依存する、という点です。その他の b_6/f 複合体や光化学系 I の活性の低下は反映しませんし、光化学系 II の反応でも、初期電荷分離と直接関係のない反応の変化は検出できない可能性があります。例えば、暗所においた葉緑体に DCMU を加えれば、光化学系 II も全体の光合成も完



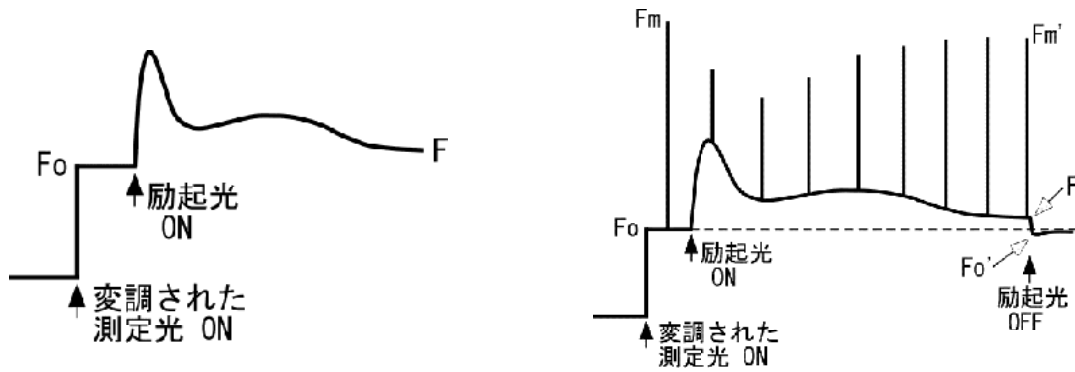
全に阻害されますが、そこに飽和パルス光をあてれば Q_A までは電子が流れますから、 F_v/F_m はそこそこの高い値が得られます。 F_v/F_m が高いからといって光化学系 II が健全である、とは言えないのです。より広い範囲の光合成反応の変化を知りたい場合は、後述するパラメーター ϕ_{II} を見るべきでしょう。 F_v/F_m は光化学系 II が全体として阻害される、といった場合には有効なパラメーターで光阻害の程度の評価などによく使われますが、光化学系 II の特定の箇所に阻害が起こる場合には、それについての情報が得られない場合があります。

一方で、飽和パルス照射後の F_m からの蛍光の減衰は、 Q_A の暗所での再酸化を反映します。 F_o の状態でシングルターンオーバーのフラッシュを照射すれば、その減衰曲線の一番早い成分は Q_A から Q_B への電子伝達速度を表します。この速度は通常サブミリ秒のオーダーなので、100 kHz のパルス変調と適当な A/D 変換の組み合わせにより、簡単に測定が可能です。以前は、 Q_A から Q_B への電子伝達速度の測定には、閃光分光光度計が必要でしたが、今は非常に楽になりました。なお、蛍光強度の減衰は通常 3 成分の和として近似でき、二番目の成分は Q_A とマンガンクラスター間の電荷再結合に、一番遅い成分は不活性な系 II にそれぞれ由来するとされていますが、実際に測定してみると遅い 2 つの成分の寄与はさほど大きくないこともあって、遅い成分の測定から何かを結論することは難しいように思います。



4. F の変化

暗順応させて蛍光が F_o レベルにある植物の葉に、



連続した励起光をあてると、 Q_A の酸化還元とキサントフィルサイクルなどの熱放散系によるエネルギー放散の誘導によって、蛍光強度は複雑な変化を示し、最終的に一定の値に落ち着きます。この課程を蛍光の誘導期現象といい、その蛍光の収率変化はコークー効果と呼ばれています。その間の蛍光レベル、もしくは最終的に定常状態になった時の蛍光レベルを F (もしくは F_s) と表記します。蛍光レベル F 自体は、光化学的要因と非光化学的要因の両方の影響を受けるので、定量的に扱われることはほとんどありませんが、変異体のスクリーニングなどにおいては、 F の変化で変異のほしいの推量を行なうことがあります。例えば、光化学系 I の変異株では、系 II からの電子の引き抜きが遅くなるので、励起光によって上昇した F がそのまま高い値に維持されるという表現型を示すことが多いようです。また、アメリカの Niyogi のグループや九州大学の鹿内先生のグループは、熱放散の誘導が起こらない変異株を F の最終レベルを指標に多数単離されています。前者は F に対する光化学的要因の影響に注目したもの、後者は F に対する非光化学的要因の影響に注目したものとと言えるでしょう。

5. F_m' の変化

上記のように連続した励起光をあてているうちに、飽和パルス光を例えば 20 秒間隔ほどで照射すると、飽和パルス光によって Q_A は完全に還元されますから、蛍光収率はその間だけ上昇します。この時のピークの値を F_m' といいます。この場合、励起光の強度にもよりますが、 Q_A は完全に還元されても熱放散系の誘導による蛍光収率の減少 (非光化学消光) は起こりますから、 F_m' は F_m に比べると小さくなります。つまり、 F_m' は蛍光の収率に影響を与える 2 つの

因子のうち、非光化学消光の影響だけを受けることになりますから、 F_m' の値をつないだ線の変化は、非光化学消光の変化をしめすことになります。

非光化学消光は、強光下において光エネルギーを積極的に熱に変換することによる蛍光収率の低下を示します。具体的には、1) チラコイド膜のプロトン濃度勾配ができたときのキサントフィルサイクルなどによる過剰エネルギー消去、2) アンテナ複合体の反応中心間の移動 (ステート変化) による蛍光収率の減少、3) 光化学系 II の光障害による蛍光収率の減少が主なもので、高等植物においては、プロトン濃度勾配の項が比較的大きいとされます。プロトンの濃度勾配は、励起光を消すと、ATPase を通したプロトンの流出で数十秒の時間スケールで解消しますし、ステート変化は 10 分程度で起こる現象です。また、光障害の修復は通常数十分の時間スケールでおきますから、これらの 3 つの要因は、励起光を消した後も飽和パルス光をあて続け、 F_m' の再上昇を観察すれば区別することができます。この 3 つの成分を分けて定量化する方法も、Quick and Stitt など複数のグループにより提案されていますが、ここでは詳細は省略致します。

6. 非光化学消光 q_N と NPQ

上述のように、蛍光の誘導期現象は、光化学反応的要因と非光化学反応的要因にわけて考えることができますから、それぞれを、定量化して解析することができます。光化学反応的要因と非光化学的要因は蛍光収率の変化として観察されますが、蛍光収率の絶対値だけでは、試料中のクロロフィル濃度などによって変化してしまうので、他の試料と比較できません。そこで、相対値の形をとります。

まず、非光化学的要因を考えてみましょう。蛍光の収率は、 Q_A の酸化還元に依存して、値が F_m から F_o まで変化しますが、ある一定の励起光があたっていると、エネルギーを熱に変える収率が暗所における収率より高くなりますので、蛍光の値は、 Q_A が完全に還元しているときは、 F_m から F_m' へ、完全に酸化しているときは、 F_o から F_o' へ低下します。

また、 F_m と F_o の差である F_v は F_v' へと低下します。そこで、ある励起光照射によって、どれだけ蛍光収率が低下するかを qN という以下のようなパラメーターを使って表します。

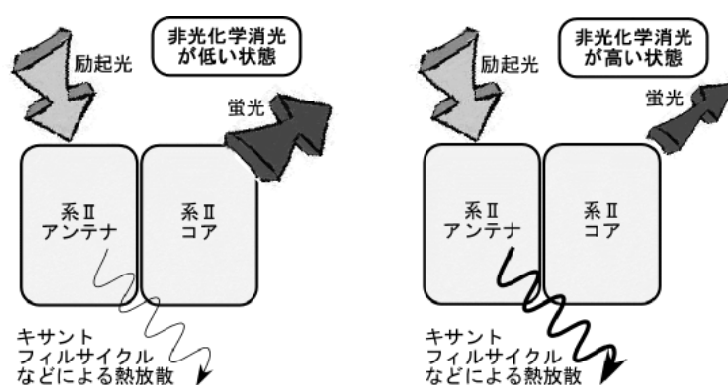
$$qN = 1 - (F_m' - F_o') / (F_m - F_o) = 1 - F_v' / F_v$$

この qN は非光化学消光 (non-photochemical quenching) と呼ばれます。消光 (quenching) とは蛍光収率が減少することで、この場合は、熱になる反応が大きいために消光のパラメーターが大きくなるように、1 から引き算をしています。暗所では、 $F_v' = F_v$ ですから qN は 0 になります。一方、消光が最大限になって $F_m' = F_o'$ ($F_v' = 0$) となる時、 qN は 1 になります。つまり、 qN は熱になる反応の大きさに依存して、0 から 1 の値を取ります。単に消光を定量化するだけなら $1 - F_m' / F_m$ でも $1 - F_o' / F_o$ でもよいのですが、その場合、 F_m' や F_o' は 0 にはならないので、 qN は 1 までは大きくなりません。 F_v を使うと (実際に実現するかどうかは別として) 理論的には F_v' が 0 になりうる (qN が 1 になりうる) ので、このようなパラメーターにしているのでしょう。

qN のかわりに NPQ というパラメーターを非光化学消光の指標として用いる場合もあります。 qN は、その計算式の中に、 F_o' を含むために、きちんと計算しようとするとう励起光を一旦消して測定を行なう必要があり、連続的な測定ができません。そこで、

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

というパラメーターが考案されました。これならば、最初に暗所で F_m を測っておけば、あとは、連続的に F_m' を測定していだけで、パラメーターを計算できます。また、このパラメーターは、どれだけ F_m が励起光によって消光されて F_m' になったかを、相対的に示すものですから、直感的にも理解しやすい



と思います。このパラメーターは、なぜか、分母が F_m ではなく F_m' になっているので、1 以上の値を取ることもあります。それでは、 qN と NPQ の違いは何でしょうか。 qN も NPQ も厳密な理論的バックグラウンドがあるものではなく、経験的なものです。従って、実用的に使いやすい方を使えばよい、と考えて構いません。一般に、弱光領域では、 qN の方が大きく変化しますので、弱光領域での非光化学消光の変化を敏感に捉えたいときは qN がお勧めです。一方、 qN は強光領域では飽和してしまうので、強光領域も含めた広い領域の変化を捉えたいときは NPQ の方がよいでしょう。また、非光化学消光の原因となるキサントフィルの脱エポキシ化の程度や、非光化学消光を起こす物質の濃度、非光化学消光の反応速度などとの相関も、 NPQ の方が高いようです。キサントフィルサイクルや非光化学消光との定量的な関連づけを行ないたいときは NPQ の方がお勧めでしょう。

7. 光化学消光 qP

ついで、光化学反応的要因を考えてみましょう。ある一定の励起光があたっているときは、非光化学消光によって蛍光の収率は変化し、 Q_A が完全酸化および完全還元の時値は、 F_o' および F_m' になります。励起光のもとでの定常状態になったときの蛍光を F とすれば、この時の Q_A の酸化還元状態に応じて F は F_o' と F_m' の間の値を取るはずで。そこで、 F_o' と F_m' の差を 1 とし F を標準化した値を qP とすると

$$qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_o')$$

となります。当然ですが、 Q_A が完全に還元されたときは $F = F_m'$ となりますから、 qP は 0 に、完全に酸

化されたときは、 $F = F_o'$ となりますから、 qP は1となります。つまり、 qP は、 Q_A の酸化還元状態に応じて0から1の値を取るパラメーターで、光化学消光(photochemical quenching)と呼ばれます。この場合は、 Q_A が酸化されているほど、エネルギーは光合成に使われて蛍光強度は小さくなりますから、消光を示すパラメーターは大きくなることとなります。ただし、 qP は厳密な理論的裏付けがあるわけではなく、経験的なパラメーターであり、 Q_A の酸化還元状態と完全に直線関係があると保証されているわけではないことに注意してください。特に、非光化学消光が大きいときには、 Q_A の酸化還元状態は、 qP の値から予想されるより酸化的であることが多いようです。

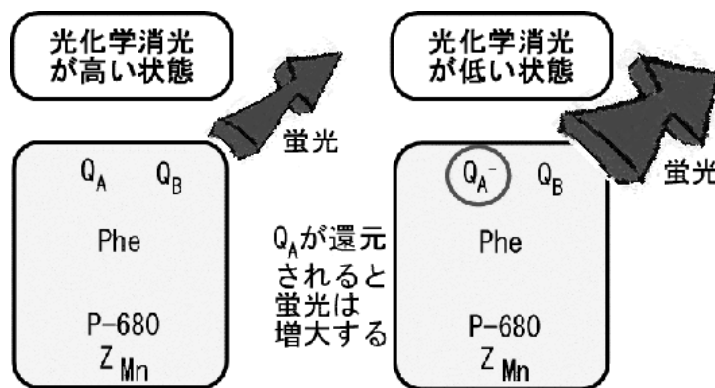
このようにして、蛍光収率の時間変化を2つのパラメーター、光化学消光と非光化学消光で説明することにより、蛍光の誘導期現象のあいだに、どのような光合成系の変化が起こっているかを解析することができます。

8. 蛍光パラメーター ϕ_{II} 、ETR とその解釈

先に述べたように、 F_v/F_m は光化学系 I の最大量子収率を示します。これは、暗所で Q_A が完全に酸化されているときの量子収率ですが、ある一定の励起光があたっているときにも、その状態で、系 II の中で Q_A が酸化されているものの量子収率を F_v/F_m' として表すことができます(当然ですが、 Q_A が還元されている系 II は電子伝達ができないので、量子収率は0です)。さて、 qP は上述のように Q_A がどれだけ酸化されているかの割合ですから、 F_v/F_m' に qP をかければ、ある励起光下での実効量子収率が計算できるはずですが。これを ϕ_{II} と呼びます。

$$\begin{aligned} \phi_{II} &= qP \cdot F_v/F_m' \\ &= (F_m' - F)/(F_m' - F_o') \cdot F_v/F_m' \\ &= (F_m' - F)/F_m' \end{aligned}$$

と変形できますから、系 II を通る電子伝達の実効量子収率は、 F_m' と F の2つを測定すれば求まることになります。つまり、一定の励起光をあてておいて蛍光を測定し (F)、ついで、飽和パルスをあてて蛍光を測定すれば (F_m') 実効量子収率が求まります。実際にこの値は、別の方法で求めた電子伝達の量子収率と非常によい相関があることが確かめられています。



ここで、1つ注意しなくてはならないのは、この ϕ_{II} は光化学系 II を通る電子伝達の量子収率ではありませんが、その値は、光化学系 II 以外の要因によっても左右されることです。 F_v'/F_m' は光化学系 II の状態によって決まりますが、 qP は、いわば系 II の下流にどれだけ電子がたまっているかですから、 b_6/f 複合体であれ、光化学系 I であれ、系 II の下流に存在するコンポーネントが機能を失った場合は小さくなり、結果として ϕ_{II} も小さくなります。従って、もし、何らかの条件または処理で、電子伝達の量子収率 ϕ_{II} が減少していたら、その原因が qP にあるのか、 F_v'/F_m' にあるのかを分けて考えてみれば、原因が光化学系 II の下流にあるのか、光化学系 II 自体にあるのかを見極めることができます。もし、 F_v'/F_m' が低下していたときには、さらに F_v/F_m が低下しているかどうかを見て、低下していれば光化学系 II の最大量子収率自体が低下していることになりすし、そうでなければ、励起光をつけたときに何らかの光化学系 II の量子収率を低下させるメカニズムが働いていることとなります。後者であれば、熱になる反応の量子収率は高くなる場合が多いですから、通常、 qN の上昇が観察されます。

以上をまとめると次のようになります。

ϕ_{II} の減少 → 光合成電子伝達の何らかの異常 (系 II に限らないことに注意)
 ↳ qP が減少している場合 → 光化学系 II の下流 (系 I など) に異常
 ↳ F_v'/F_m' が減少している場合 → 光化学系 II 自体に異常
 ↳ F_v/F_m が低下している場合 → 光化学系 II の最大量子収率が低下
 ↳ qN が上昇している場合 → 光化学系 II の熱放散系の上昇

さて、ここで、 ϕ_{II} は電子伝達の量子収率ですから、これに吸収された光の光量子束密度をかければ、電子伝達の速度（ETRと略称）が求まるはずですが、照射している光の光量子束密度はすぐに測定できますが、葉に吸収された光の光量子束密度の実測は簡単でないため、蛍光測定機器についているプログラムでは、照射光量子束密度に葉の吸収係数として0.84をかけて吸収された光の光量子束密度とします。実際の葉の吸収係数は植物種によっても葉によっても異なりますから、このようにして求められるETRは便宜的なものであることに注意しなければなりません。さらに、光化学系は光化学系Iと光化学系IIが直列に電子伝達を行いますから、吸収された光のうち、どれだけ光化学系IIに使われるかによって電子伝達速度の見積は違ってきます。一般的に、反応中心あたりのアンテナクロロフィルの数は、光化学系I、系IIともに200前後ですので、光化学系Iと光化学系IIはほぼ1:1に光を吸収すると考え、

$$ETR = \phi_{II} \cdot PAR \cdot 0.84 \cdot 0.5$$

として計算している例が多いようです。ここでPARというのは光合成有効放射 photosynthetically active radiationの略で、クロロフィルが吸収できる範囲の波長の光量子束密度（面積時間あたりの光量子数）です（単位は mol quanta m² s⁻¹）。

このようにして計算したETRは、必ずしも炭酸固定速度の実測値と一致しません。これは、上記の前提（葉の吸収係数や光化学系間のエネルギー分配比）が正確ではないことにも由来しますが、電子伝達によって作られた還元力のうちに炭酸固定に使われない部分があることも大きな要因です。炭酸固定系の鍵酵素であるRubiscoが、酸素をも基質として使うことによる光呼吸や、電子伝達により酸素が直接還元されて過剰な還元力が消去される浅田回路（water-water cycle）が働くときは、電子伝達速度が炭酸固定速度を上回るようになります。このような原因による差なのかどうかは、高二酸化炭素濃度、低酸素濃度の雰囲気でも光呼吸や浅田回路を抑えてやれば、確かめることができます。

9. パラメーターのチェック

パルス変調を用いたクロロフィル蛍光測定を行なえば、上記のようなパラメーターを使って簡便に光

合成の状態をモニターすることができます。その簡便さにより、それまで光合成測定をしたことのない人にも光合成の測定ができるようになりました。一方で、それに伴って、投稿されてきた論文原稿はもちろん、すでに雑誌に載っている論文でも、おかしなパラメーターの使い方をしている例が見られます。一番多いのは、 ϕ_{II} の低下を光化学系IIの活性低下の証拠として扱う例です。これは、 ϕ_{II} を光化学系IIの実効量子収率と呼ぶことによる混乱でしょう。光化学系Iが阻害されても光化学系IIの実効量子収率が低下することは上に述べたとおりです。他に、論文のqPとFv'/Fm'を掛け算しても ϕ_{II} にならない、という例もしばしば見受けられます。これは、単純な思い違いか、計算ミスだと思われそうですが、雑誌に投稿する前に簡単に自分でチェックできる点です。この他、Fv/Fmは励起光に依存しない（というより、励起光をあてない状態で測定する）パラメーターであるのに、Fv/Fmの励起光強度依存性を出していた論文も過去にありました。これは、励起光を変えて様々なパラメーターを測定する際に、Fv/Fmも同時に計算されるので、何も考えずに機械的にグラフを作ったのでしょうか。また、逆にqP、qN、 ϕ_{II} といったパラメーターは励起光下で測定するパラメーターですから、励起光の強さが明記されていないと評価することができません。qNに差がないといっても、弱光条件で差がないのか、強光条件で差がないのかでは意味が違ってきます。論文を読む際には（もちろん自分で実験をする際にも）、そのような点に注意する必要があります。

10. おわりに

クロロフィル蛍光測定は、非破壊的な測定なので経時的な測定が可能であるなど、様々な利点を持っています。測定自体も、(いろいろ注意を払わなくてはならない点ではありますが)操作自体は極めてシンプルです。測定機器も、自分で持っていなくても、周りを見回せばどこかにある、と言えるまで普及してきました。論文を読んで自分もやってみようと思った人は是非トライしてみてください。