

安定同位体法を用いた葉内での二酸化炭素拡散コンダクタンスの計算

2016 年 6 月 1 日 文責：半場祐子

(1) パラメータ

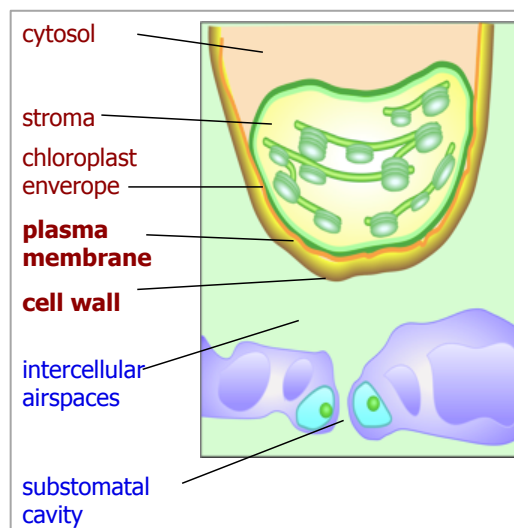
記号	説明	実測／仮定	単位
A	光合成速度	実測	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
P_a	外気の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_s	葉の表面の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_e	チャンバに入る空気の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_o	チャンバから出る空気の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_i	葉内の細胞間隙の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_c	葉緑体での二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
g_m	葉肉コンダクタンス	実測	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
a_b	境界層での二酸化炭素の拡散に伴う同位体分別	2.9	‰
a	気孔での二酸化炭素の拡散に伴う同位体分別	4.4	‰
a_i	水中での二酸化炭素の水和・拡散に伴う同位体分別	0.7	‰
b_s	水中への二酸化炭素の溶解に伴う同位体分別	1.1 (25°C)	‰
b	Rubisco と PEP-carboxylase による同位体分別	30 (or 29)	‰
f	光呼吸に伴う同位体分別	11.6	‰
Γ^*	日中呼吸がないときの CO_2 補償点	実測 (Laisk 法)	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
e'	日中呼吸に伴う同位体分別	-0.5	‰
R_d	日中呼吸速度 (光照射下での呼吸速度)	実測 (Laisk 法)	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
δ_e	チャンバに入る二酸化炭素の安定同位体比	実測	‰
δ_o	チャンバから出る二酸化炭素の安定同位体比	実測	‰

(2) 植物の同位体比と葉内での拡散に関する基礎的な知見

(2-1) 光合成組織での二酸化炭素取り込み

★二酸化炭素の拡散

葉内での二酸化炭素の拡散過程は、光合成速度を律速する重要な要因である。大気から葉緑体ストロマまでの二酸化炭素の拡散過程を図に示す。二酸化炭素は、外気から気孔腔を通過して細胞間隙までは気体の状態で拡散する。その後、二酸化炭素は、葉緑体の液相へ移動し、細胞壁 cell wall や細胞膜 plasma membrane、細胞質、葉緑体を囲む膜、葉緑体のストロマへと拡散する。



★拡散抵抗

二酸化炭素は、気体中で液体中の 10000 倍も速く拡散する。しかし、葉の構造は、液層で二酸化炭素が移動する距離をなるべく短く (1mm 以下 : cf. 葉緑体の厚さは 2-3mm) するように工夫されている。(葉肉細胞の大きさは小さく、表面積は大きくて細胞間隙に接している。葉緑体は細胞膜のすぐ近くに配置している)。液相抵抗の割合は、樹木では小さく (5-22%)、葉の抵抗が比較的小さな草本の作物では大きい (23-60%)。

(2-2) 光合成の際の同位体分別

★同位体分別がおこるしくみ

二酸化炭素分子には、重い同位体 ^{13}C が含まれる分子 $^{13}\text{CO}_2$ と、軽い同位体 ^{12}C のみが含まれる分子 $^{12}\text{CO}_2$ とがある。軽い同位体分子と重い同位体分子は、光合成で固定される割合が異なる。二酸化炭素の拡散は軽い二酸化炭素分子のほうが速く、また酵素 Rubisco は軽い二酸化炭素分子のほうをよく固定するため、結果的に植物体には ^{13}C が少なくなる。大気と比べて ^{13}C がどれくらいへっているかを、同位体分別 (discrimination: Δ) といい、次の式で現す。

$$\Delta \left(\text{‰} \right) = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \frac{\delta_p}{1000}} \quad (1)$$

δ_a 、 δ_p はそれぞれ、標準物質 PDB (Pee Dee belemnite : Pee Dee 層で発見されたイカの仲間の化石) に対する、大気中の二酸化炭素および植物の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)。

一般的に、ある物質の炭素安定同位体の比率 (^{13}C と ^{12}C の比) を炭素安定同位体比という。炭素安定同位体比は、慣習的に、標準物質に対する千分偏差 (‰) で表すことになっており、以下の式で計算される：

$$\delta^{13}\text{C} \left(\text{‰} \right) = [(\text{サンプルの } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) / (\text{標準物質の } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) - 1] \times 1000 \quad (2)$$

(3) 拡散コンダクタンスの計算 Ternary effect を考慮しない式

光合成に伴って生じる、 C_3 植物での同位体分別は、以下の式で表される(Bourbor 2010)。

$$\Delta = a_b \frac{P_a - P_s}{P_a} + a \frac{P_s - P_i}{P_a} + (b_s + a_i) \frac{P_i - P_c}{P_a} + b \frac{P_c}{P_a} - f \frac{\Gamma^*}{P_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_c - \Gamma^*}{P_a} \quad (3-1)$$

すなわち、以下の6つのステップで、光合成に伴う二酸化炭素の安定同位体の分別が起こる。

- 1) 大気から葉の表層まで (境界層) での二酸化炭素拡散; 分別は $a_b = 2.9\text{‰}$
- 2) 葉の表層から細胞間隙までの二酸化炭素拡散; 分別は $a = 4.4\text{‰}$
- 3) 細胞間隙から葉緑体までの二酸化炭素拡散; 分別は $a_i = 0.7\text{‰}$
- 4) 葉緑体内での Rubisco および PEP カルボキシラーゼによる二酸化炭素固定; 分別は $b = 29 \text{ or } 30\text{‰}$
- 5) 光呼吸; 分別は $f = 11.6\text{‰}$
- 6) 日中呼吸 (光照射中に生じる呼吸) ; 分別は $e' = -0.5\text{‰}$

3) と 4) が、気孔から葉緑体までの二酸化炭素分圧の低下 (二酸化炭素の葉肉コンダクタンス) に関係する項である。葉肉コンダクタンスは、次のようにして計算できる。

気孔から葉緑体までの二酸化炭素分圧の低下がまったくない (つまり、葉肉コンダクタンスが無限大である) と仮定する ($P_c = P_i$)。その場合の仮想的な同位体分別 Δ_i は 式(3-1)から

$$\Delta_i = a_b \frac{P_a - P_s}{P_a} + a \frac{P_s - P_i}{P_a} + b \frac{P_i}{P_a} - f \frac{\Gamma^*}{P_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_c - \Gamma^*}{P_a} \quad (3-2)$$

実際に生じる同位体分別 Δ と、仮想的な同位体分別 Δ_i との差は、次の式で表される。

$$\Delta_i - \Delta = (b - b_s - a_i) \frac{P_i - P_c}{P_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_i - P_c}{P_a} \quad (3-3)$$

葉肉コンダクタンス (g_m) は、次のようにあらわされる：

$$P_i - P_c = A / g_m \quad (3-4)$$

(3-4) 式を (3-3) 式に代入すると

$$\Delta_i - \Delta = (b - b_s - a_i - e' \frac{R_d}{A+R_d}) \frac{A}{g_m P_a} \quad (3-5)$$

Δ_i 、 A 、 P_a 、 R_d はガス交換測定によって実測する。また、オンライン測定によって得られた Δ を $\Delta_{\square\square\square}$ とする。 b 、 b_s 、 a_i は定数であると考えてよい。従って、(3-5)を g_m について解くと、拡散コンダクタンス (g_m) が計算できる。

$$g_m = (b - b_s - a_i - e' \frac{R_d}{A+R_d}) \frac{A}{P_a(\Delta_i - \Delta_{obs})}$$

オンライン測定によって得られた $\Delta_{\square\square\square}$ は次のように計算される。

$$\Delta_{obs} = \frac{1000 \times \xi (\delta_o - \delta_e)}{1000 + \delta_o - \xi (\delta_o - \delta_e)} \quad (3-6)$$

$$\xi = \frac{P_e}{P_e - P_o} \quad (3-7)$$

P_e 、 P_o は、チャンバの入り口と出口の二酸化炭素分圧で、ガス交換測定によって測定される。 δ_e 、 δ_o は、チャンバの入り口と出口の二酸化炭素の安定同位体比で、真空ラインを使って集めたガスの同位体比測定により求められる。

(4) 拡散コンダクタンスの計算 Ternary effect を考慮した式

二酸化炭素分子の拡散は、お互い同士、また水蒸気分子およびその他の大気分子との衝突によって影響を受ける (Ternary effect)。蒸散速度が高い場合には、この水蒸気による効果が無視できなくなる場合がある。Ternary effect を考慮すると、葉肉コンダクタンスは次の式で計算される (Evans and von Caemmerer 2013)。

$$g_m = \frac{1+t}{1-t} \left(b - a_i - \frac{eR_d}{A+R_d} \right) \frac{A}{C_a} \frac{1}{\Delta_i - \Delta_o - \Delta_e - \Delta_f} \quad (4-1)$$

t は Ternary effect をあらわす項であり

$$t = \frac{(1+a')E}{2g_{ac}^t} \quad (4-2)$$

ここで、 E は蒸散速度、 g_{ac}^t は二酸化炭素拡散に対する全コンダクタンス、 a' は境界層と気孔とを併せた分率であり

$$a' = \frac{a_b(C_a - C_s) + a(C_s - C_i)}{(C_a - C_i)} \quad (4-3)$$

式(4-1)の日中呼吸(R_d)に関係するパラメータ e は、植物が生育しているときの大気と測定中の大気の同位体比の差に関係しており、次の式で計算できる：

$$e = \delta^{13}C_{tank} - \delta^{13}C_{atmosphere} \quad (4-4)$$

ここで $\delta^{13}C_{tank}$ はCO₂ボンベ中のCO₂の炭素安定同位体比であり、実測する。 $\delta^{13}C_{atmosphere}$ は大気炭素安定同位体比であり、-8‰と仮定する（温室などの場合は実測した方がよい）。

気孔から葉緑体までの二酸化炭素分圧の低下がまったくない（つまり、葉肉コンダクタンスが無限大である）と仮定する（ $P_c=P_i$ ）。その場合の仮想的な同位体分別 Δ_i は次の式であらわされる：

$$\Delta_i = \frac{1}{(1-t)} a' + \frac{1}{(1-t)} ((1+t)b - a') \frac{C_i}{C_a} \quad (4-5)$$

また、呼吸によって生じる分別 Δ_e は次の式であらわされる：

$$\Delta_e = \frac{1+t}{1-t} \left(\frac{eR_d}{(A+R_d)C_a} (C_i - \Gamma^*) \right) \quad (4-6)$$

Γ^* は日中呼吸(Rd)がないときのCO₂補償点であり、Laisk法によって計算することができる（Peisker and Apel 2002）。

3種類の光強度のもとでA/Ciカーブを作成し、その交点を求める（右図）。この交点は、RuBPカルボキシ化によるCO₂取り込みと光呼吸によるCO₂損失がつりあう点であり、この点におけるCO₂濃度がC*、光合成速度が-Rdである。

C*は、 Γ^* の代わりに使うことができる（Tazoe et al. 2009）。

さらに、光呼吸にともなう分別は次の式であらわされる：

$$\Delta_f = \frac{1+t}{1-t} \left(f \frac{\Gamma^*}{C_a} \right) \quad (4-7)$$

(5) 拡散コンダクタンスの計算 Ternary effect と境界層コンダクタンスを無視した式（Tazoe et al. 2011）

（2015.11.19 計算）チャンバの中でファンが高速で回転している場合には、境界層コンダクタンスは非常に大きくなるため、境界層に関係する項を無視することができる。例えば、2014 年に行った測定では、チャンバ1（15cm×13cm）を用いた場合、54cm でのろ紙での境界層コンダクタンスは0.4926 mol m⁻² s⁻¹であった。通常は葉面積は54cm よりも小さいため、これが最小の境界層コンダクタンスと考えられる。これにターナリー効果を考慮に入れて、シダ植物のワラビについてgmを計算した。境界層コンダクタンス+ターナリー効果を考慮した場合のgmは、これらを無視した場合と比べると1%しか差がなかった。

したがって、チャンバ1を用いた場合には、境界層コンダクタンスとターナリー効果を無視してよいと考えられる。この場合、式(4-5)、(4-6)、(4-7)は次のように書くことができる：

$$\Delta_i = a + (b-a) \frac{C_i}{C_a} \quad (4-5)A$$

$$\Delta_e = \frac{eR_d}{(A+R_d)C_a} (C_i - \Gamma^*) \quad (4-6)A$$

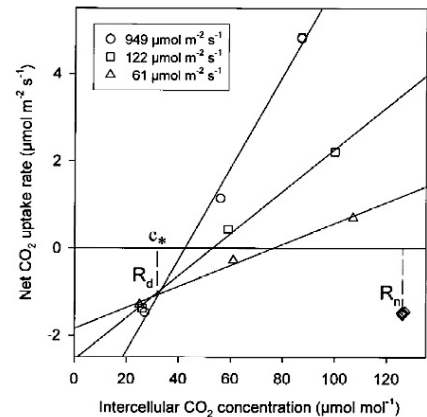


Figure 1. Relationship between net CO₂ uptake rate A and intercellular CO₂ concentration c_i at three levels of incident PPFD in a leaf of *Nicotiana tabacum* L. cv. SNN. According to Laisk (1977), the intersection points of regression lines represent the dark respiration rate during illumination R_d and the intercellular CO₂ concentration c^* at which $A = -R_d$, respectively. Intracellular resistances r_i are calculated as the reciprocal values of the slopes of regression lines. CO₂ evolution rate in darkness (R_n) was measured at about 120 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂.

$$\Delta_f = f \frac{\Gamma^*}{C_a} \quad (4-7)A$$

これらの式を (4-1) に代入すると、 g_m は次式で計算することができる：

$$g_m = \left(b - a_i - \frac{eR_d}{(A+R_d)} \right) \frac{A}{C_a} \frac{1}{a + \frac{(b-a)P_i}{P_a} - \Delta_o - \frac{eR_d(P_i - \Gamma^*)}{(A+R_d)P_a} - f \frac{\Gamma^*}{C_a}} \quad (4-1) A$$

参考文献

Evans JR, von Caemmerer S (2013) Temperature response of carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in tobacco. *Plant Cell Environ* 36:745–756

Douthe C, Dreyer E (2011) Mesophyll conductance to CO₂, assessed from online TDL-AS records of ¹³CO₂ discrimination, displays small but significant short-term responses to CO₂ and irradiance in *Eucalyptus* seedlings. *J Exp Bot* 62:5335–5346

Laisk A, Oja V, Kiirats O (1984) Assimilatory power (postillumination CO₂ uptake) in leaves-measurement, environmental dependencies and kinetic properties. *Plant Physiol* 76:723– 729

Nishida K, Kodama N, Yonemura S, Hanba YT (2015) Rapid response of leaf photosynthesis in two fern species *Pteridium aquilinum* and *Thelypteris dentata* to changes in CO₂ measured by tunable diode laser absorption spectroscopy. *Journal of Plant Research* 128:777–789

Tazoe Y, von Caemmerer S, Badger MR, Evans JR. (2009) Light and CO₂ do not affect the mesophyll conductance to CO₂ diffusion in wheat leaves. *J Exp Bot* 60: 2291–2301

パラメータの計算式

列	パラメータ	説明	数式など	式
A	No.	測定番号		
B	Date	測定日		
C	Sample ID	サンプル名		
D	Atm. Temp. (c)	大気温度	室温 (°C) を入力	
E	ChamberTemp (c)	チャンバ温度	恒温槽の循環水の温度 (°C) を入力	
F	Out-CO2 (μl l-1)	チャンバ出口のCO2分圧	4 方コックをSample側にし、Li-6262のCO2分圧の値をよみとる	
G	Out-VP (kPa)	チャンバ出口のH2O分圧	4 方コックをSample側にし、Li-6262のH2O分圧の値をよみとる.単位はkPa	
H	LeafTemp (mV)	葉温	レコーダのチャンネル5 の値を入力	
I	FlowRate (ml min-1)	流量	チャンバ出口につないだ流量計の値を入力	
J	Enter-CO2 (μl l-1)	チャンバ入り口のCO2分圧	4 方コックをReference側にし、Li-6262のCO2分圧の値をよみとる	
K	Enter-VP (c)	チャンバ入り口のH2O分圧	4 方コックをReference側にし、Li-6262のH2O分圧の値をよみとる	
L	LeafArea (cm2)	葉面積	測定前か測定後にチャンバにはさんだ部分の面積をスキャナで読み取る	
M	gb (mol m-2 s-1)	境界層CO2コンダクタンス	面積を変えたろ紙の蒸散速度から計算する	
N	Rday(μmol m-2 s-1)	日中呼吸	Laisk法で測定	
O	Γ* (μmol mol-1)	RdがないときのCO2補償点	Laisk法で測定	
P	Out-d13C	チャンバ出口のCO2の同位体比	真空ラインで収集したCO2の同位体比を質量分析計（地球研）で測定	
Q	Enter-d13C	チャンバ入り口のCO2の同位体比	真空ラインで収集したCO2の同位体比を質量分析計（地球研）で測定	
R	Differential (μl l-1)	チャンバの入り口と出口のCO2分圧の差 50 以上にする	=J - F	
S	Leaf Temp (c)	葉温	=0.6078+24.66*H	
T	VPD (kPa)	葉とチャンバ大気との飽差	=(U - V)*1000/101326	
U	Leaf-VP(mol mol-1)	葉におけるH2Oモル分率	=0.61365*EXP(17.502*S/(240.97+S))*1000/101325	KIT-3
V	Out-VP (mol mol-1)	チャンバ出口のH2Oモル分率	=G*1000/101325	KIT-4

W	Enter-VP(mol mol-1)	チャンバ入り口のH2O モル分率	$=0.6135 \cdot \text{EXP}(17.502 \cdot K / (240.97 + K)) \cdot 1000 / 101325$	KIT-3
X	Chamber-VP (mol mol-1)	チャンバにおけるH2O モル分率	$=0.6135 \cdot \text{EXP}(17.502 \cdot E / (240.97 + E)) \cdot 1000 / 101325$	KIT-3
Y		チャンバに結露してい るかどうか判定	$=\text{IF}(V < X, "OK", "Dew ! ")$	
Z	A (μmol m-2 s-1)	光合成速度	$=1/6000 \cdot 101325 \cdot I \cdot (J-F) / (8.311 \cdot (E+273) \cdot L)$	KIT-1
AA	E (mmol m-2 s-1)	蒸散速度	$=1/6 \cdot 101325 \cdot I \cdot (V-W) / (8.311 \cdot (E+273) \cdot L \cdot (1-V))$	KIT-2
AB	gs (mol m-2 s-1)	CO2に対する気孔コン ダクタンス	$=AG \cdot M / (M-AG)$	式B-16
AC	gm (mol m-2 s-1)	葉肉コンダクタンス	$=(1+AI) / (1-AI) \cdot (30-0.7 \cdot AJ \cdot N / (Z+N) \cdot Z / F / (AL-AM-AN))$	式4-1
AD	Ci(μl l-1)	細胞間隙のCO2分圧	$=(AB-AA \cdot 10^{(-3)/2}) \cdot F-Z / (AB+AA \cdot 10^{(-3)/2})$	KIT-6
AE	Cc(μl l-1)	クロロプラストのCO2 分圧	$=AD-Z/AC$	式3-4
AF	g_total (mol m-2 s-1)	CO2に対する全コンダ クタンス	$=1/1.6 \cdot AA \cdot (1-(U+V)/2) / ((U-V)/1000)$	KIT-4,5
AG	Cs(μl l-1)	境界層のCO2分圧	$=F-Z/M$	式2-3-5
AH	a'	境界層と気孔とを併せ た分別	$=(2.9 \cdot (F-AH) + 4.4 \cdot (AH-AD)) / (F-AD)$	式4-3
AI	t	ターナリー効果	$=(1+AI) \cdot AA / (2 \cdot AG)$	式4-2
AJ	c ()	Day respirationの効果	$=Q-8$	式4-4
AK	ξ	チャンバの出口と入り 口のCO2分圧の差によ る効果 10以下が望まし い	$=J/(J-F)$	式3-7
AL	Δ i	葉肉コンダクタンスが 無限大のときの同位体 分別	$=1 / ((1-AJ) \cdot AI + 1 / ((1-AJ) \cdot ((1+AJ) \cdot 30 - AI) \cdot AD / F$	式4-5
AM	Δ o	同位体分別の測定値	$=AL \cdot (P-Q) / (1000 + P - AL \cdot (P-Q)) \cdot 1000$	式3-6
AN	Δ e	呼吸による同位体分別	$=(1+AI) / (1-AI) \cdot (AJ \cdot N / ((Z+N) \cdot F) \cdot (AC-O))$	式4-6