

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

2015年12月19日 文責：半場祐子

(1) パラメータ

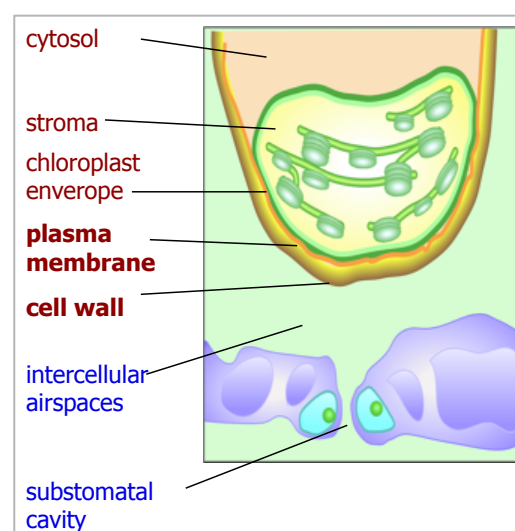
記号	説明	実測/仮定	単位
A	光合成速度	実測	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
P_a	外気中の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_s	葉の表面の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_e	チャンバに入る空気中の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_o	チャンバから出る空気中の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_i	葉内の細胞間隙の二酸化炭素分圧	実測	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
P_c	葉緑体中の二酸化炭素分圧	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 (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じ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。

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

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：

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

(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)。

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

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 $a_b = 2.9\%$
- 2) 葉の表層から細胞間隙までの二酸化炭素拡散; 分別は $a = 4.4\%$
- 3) 細胞間隙から葉緑体までの二酸化炭素拡散; 分別は $a_i = 0.7\%$
- 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 $b = 29$ or 30%
- 5) 光呼吸; 分別は $f = 11.6\%$
- 6) 日中呼吸 (光照射中に生じる呼吸); 分別は $e' = -0.5\%$

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

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

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。

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

葉肉コンダクタンス (g_m) は、次のようにあらわされる：

$$P_i - P_c = A / g_m \quad (\text{KITgm-3-4})$$

(3-4) 式を (3-3) 式に代入すると

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

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 Δ_{obs} 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。

$$g_m = \left(b - b_s - a_i - e' \frac{R_d}{A+R_d} \right) \frac{A}{P_a (\Delta_i - \Delta_{obs})} \quad (\text{KITgm-3-6})$$

オンライン測定によって得られた Δ_{obs} は次のように計算される。

$$\Delta_{obs} = \frac{1000 \times \xi (\delta_o - \delta_e)}{1000 + \delta_o - \xi (\delta_o - \delta_e)} \quad (\text{KITgm-3-7})$$

$$\xi = \frac{P_e}{P_e - P_o} \quad (\text{KITgm-3-8})$$

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)。

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

t は Ternary effect をあらわす項であり

$$t = \frac{(1+a')E}{2g_{ac}^t} \quad (\text{KIT-gm4-2})$$

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別であり

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

式(4-1)の日中呼吸(R_d)に関するパラメータ 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：

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

ここで $\delta^{13}C_{\text{tank}}$ は CO_2 ボンベ中の CO_2 の炭素安定同位体比であり、実測する。 $\delta^{13}C_{\text{atmosphere}}$ は大気の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：

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

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：

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

Γ^* は日中呼吸(R_d)がないときの CO_2 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）。（KITgm-4-7）

3種類の光強度のもとで A/C_i カーブを作成し、その交点を求める（右図）。この交点は、RuBPカルボキシル化による CO_2 取り込みと光呼吸による CO_2 損失がつりあう点であり、この点における CO_2 濃度が C^* 、光合成速度が $-R_d$ 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：

$$\Delta_f = \frac{1+t}{1-t} \left(f \frac{\Gamma^*}{C_a} \right) \quad (\text{KITgm-4-8})$$

(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 $0.4926 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 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 g_m を計算した。境界層コンダクタンス+ターナリー効果を考

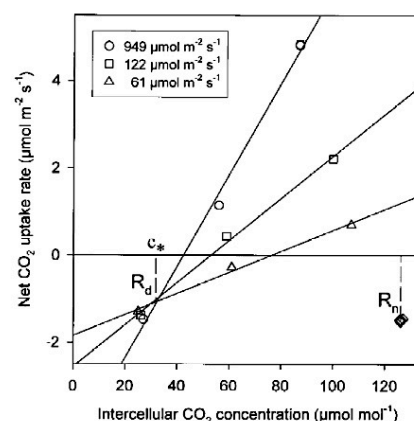


Figure 1. Relationship between net CO_2 uptake rate A and intercellular CO_2 concentration c_i at three levels of incident PPF in a leaf of *Nicotiana tabacum* L. cv. SNN. According to Laisk (1977), the intersection points of regression lines represent the dark respiration rate during illumination R_d and the intercellular CO_2 concentration c^* at which $A = -R_d$, respectively. Intracellular resistances r_i are calculated as the reciprocal values of the slopes of regression lines. CO_2 evolution rate in darkness (R_n) was measured at about $120 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$.

慮した場合の g_m は、これらを見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：

$$\Delta_i = a + (b-a) \frac{C_i}{C_a} \quad (\text{KITgm-5-1})$$

$$\Delta_e = \frac{eR_d}{(A+R_d)C_a} (C_i - \Gamma^*) \quad (\text{KITgm-5-2})$$

$$\Delta_f = f \frac{\Gamma^*}{C_a} \quad (\text{KITgm-5-3})$$

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：

$$g_m = \left(b - a_i - \frac{eR_d}{(A+R_d)} \right) \frac{A}{C_a} \frac{1}{a + \frac{(b-a)P_i}{Pa} - \Delta_o - \frac{eR_d(P_i - \Gamma^*)}{(A+R_d)Pa} - f \frac{\Gamma^*}{C_a}} \quad (\text{KITgm-5-4})$$

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

(6) コケ体内の CO₂コンダクタンス測定

安定同位体比を測定することによって、コケ植物体内の CO₂コンダクタンスを算出できる。Open システムでは、光合成による同位体分別によって、チャンバに入る空気の CO₂の安定同位体比(δ_e 'entering', ‰)とチャンバ出口の CO₂の安定同位体比(δ_o 'out' ‰)に差が生じる。チャンバの入り口と出口の CO₂分圧 C_eと C_oから、同位体分別は次のように計算される(Evans et al. 1986)

$$\Delta = \frac{\xi(\delta_o - \delta_e)}{1000 + \delta_o - \xi(\delta_o - \delta_e)} \quad \% \quad (\text{KITgm-6-1})$$

$$\xi = \frac{C_e}{C_e - C_o} \quad (\text{KITgm-6-2})$$

チャンバの入り口と出口の CO₂の安定同位体比δ_eとδ_oは、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。

■ ターナリー効果がないと仮定した場合

コケ植物による同位体分別は、式(KITgm-3-1)で $P_i = P_s$ とおき(細胞間隙はないので)、次の式で表される(Seibt et al. 2008)

$$\Delta = a_b \frac{P_a - P_s}{P_a} + a_m \frac{P_s - P_c}{P_a} + b \frac{P_c}{P_a} - f \frac{\Gamma^*}{P_a} \quad \% \quad (\text{KITgm-6-3})$$

P_a と P_s と P_c は、コケ周辺の大气、コケ表面(境界層)、およびカルボキシル化が行われている場所の CO₂モル分率である。また、 a_b は境界層における CO₂拡散に伴う分別(2.9‰)、 a_m は植物体内部における CO₂移動に伴う分別(1.8‰, $a_i + b_s$)、 b はカルボキシル化による分別(27‰)、 f は光呼吸に伴う分別(およそ 11.6‰)、 Γ^* は暗呼吸がないときの CO₂補償点である。この式では、日中呼吸に伴う同位体分別の影響はないものと仮定している。

日中呼吸に伴う同位体分別を考慮した場合、式(2-4-3)は次のようになる:

$$\Delta_{obs} = a_b \frac{P_a - P_s}{P_a} + a_m \frac{P_s - P_c}{P_a} + b \frac{P_c}{P_a} - f \frac{\Gamma^*}{P_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_c - \Gamma^*}{P_a} \quad \% \quad (\text{KITgm-6-4})$$

ここで、コケ内部で CO₂分圧がまったく低下しない($P_c = P_s$)と仮定したときの同位体分別 Δ_i は次のようにあらわされる:

$$\Delta_i = a_b \frac{P_a - P_s}{P_a} + b \frac{P_s}{P_a} - f \frac{\Gamma^*}{P_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_s - \Gamma^*}{P_a} \quad \% \quad (\text{KITgm-6-5})$$

これらの式より、CO₂分圧がまったく低下しないと仮定したときの分別と実測値との差は

$$\Delta_i - \Delta_{obs} = (b - a_m) \frac{P_s - P_c}{P_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_s - P_c}{P_a} \quad \% \quad (\text{KITgm-6-6})$$

ここで、gmと光合成速度の関係は次のようになる

$$g_{int} = A / (C_s - C_c) \quad \text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (\text{KITgm-6-7})$$

これを KITgm-6-6 に代入し、 g_{int} について解くと、面積あたりの内部コンダクタンスは

$$g_{int_area} = \frac{1}{\Delta_i - \Delta_{obs}} \left(b - a_m - e' \frac{R_d}{A + R_d} \right) \frac{A}{P_a} \quad \text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (\text{KITgm-6-8})$$

乾燥重量あたりの内部コンダクタンスは

$$g_{int_mass} = \frac{g_{int} \times L \times 10^{-4}}{M} \quad \text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\text{KITgm-6-9})$$

ここで、 L はコケの表面積(cm^2)、 M はコケの乾燥重量(g)である。

Γ^* は、高等植物では葉温 T ($^{\circ}\text{C}$)に依存する:

$$\Gamma^* = 44.7 + 1.88 (T - 25) + 0.036 (T - 25)^2 \quad \mu\text{mol mol}^{-1} \quad (\text{KITgm-6-10})$$

である(Brooks and Farquhar 1985)。

コケ表面の CO_2 分圧 C_s は、高等植物における葉の境界層の CO_2 分圧に相当すると考えられる。葉の境界層における CO_2 分圧 C_s は、次のように近似できる(Gutschick and Simmoneau 2002)

$$C_s = C_a - A / g_{bc} \quad \mu\text{mol mol}^{-1} \quad (\text{KITgm-6-11})$$

ここで、 g_{bc} は境界層における CO_2 コンダクタンス($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) である。

式(KITgm-6-4)は、含水率 $\text{TWC}=1$ 、つまり表面における水の付着はない条件における式である。 $\text{TWC}>1$ 、つまり表面に水が付着しているときには、 C_s を C_x ；表面の水層における CO_2 モル分率に置き換えて、次のようになる。

$$\Delta = a_b \frac{C_a - C_x}{C_a} + a_m \frac{C_x - C_c}{C_a} + b \frac{C_c}{C_a} - f \frac{\Gamma^*}{C_a} - e' \frac{R_d}{A + R_d} \frac{P_c - \Gamma^*}{P_a} \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-6-12})$$

■ ターナリー効果を考慮した場合

コケは大量に水を含んでおり蒸散速度が高いため、水蒸気が同位体分別に与える Ternary 効果は無視できないと考えられる。Ternary 効果を考慮すると、内部コンダクタンスは次の式で計算される(Evans and von Caemmerer 2013)。

$$g_i = \frac{1+t}{1-t} \left(b - a_i - \frac{eR_d}{A + R_d} \right) \frac{A}{C_a} \frac{1}{\Delta_i - \Delta_0 - \Delta_e - \Delta_f} \quad \text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (\text{KITgm-6-13})$$

t は Ternary effect をあらわす項であり

$$t = \frac{(1+a')E}{2g_{ac}^t} \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-6-14})$$

ここで、 E は蒸散速度、 g_{ac} 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別であり

$$a' = \frac{a_b(C_a - C_s) + a(C_s - C_i)}{(C_a - C_i)} \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-6-15})$$

コケでは $C_i = C_s$ であるので、式(KITgm-6-15)は次のようになる:

$$a' = a_b \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-6-16})$$

日中呼吸(Rd)に関するパラメータ 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:

$$e = \delta^{13}\text{C}_{\text{tank}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{atmosphere}} \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-4-17})$$

ここで $\delta^{13}\text{C}_{\text{tank}}$ は CO₂ ボンベ中の CO₂ の炭素安定同位体比であり、実測する。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{atmosphere}}$ は大気の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)。

コケ表面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、内部コンダクタンスが無限大である)と仮定する($P_c = P_s$)。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:

$$\Delta_i = \frac{1}{(1-t)} a_b + \frac{1}{(1-t)} \left((1+t)b - a_b \right) \frac{C_s}{C_a} \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-4-18})$$

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:

$$\Delta_e = \frac{1+t}{1-t} \left(\frac{eR_d}{(A+R_d)C_a} (C_s - \Gamma^*) \right) \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-4-19})$$

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)。

さらに、光呼吸にともなう分別は次の式であらわされる:

$$\Delta_f = \frac{1+t}{1-t} \left(f \frac{\Gamma^*}{C_a} \right) \quad \text{‰} \quad (\text{KITgm-4-20})$$