



研究技術紹介

白岩善博：シリーズ～微細藻類の光合成活性測定法～

藻類は、一般に、維管束植物とコケ植物以外の酸素発生型の光合成を行う生物の総称として用いられる。光合成反応は独立栄養の根幹をなし、藻類の生命維持に重要な役割を果たし、その特性は生物分類、系統の体系化において重要な指標とされてきた。したがって、光合成機能の正確な測定と評価が藻類の研究には不可欠である。我国においては、光合成研究のうち、生理、生化、分子生物学及び光合成装置の微細構造に関する研究の多くは、たとえ藻類を生物材料に用いていたとしても、日本藻類学会(誌)における発表は数の上では僅少であり、その実験手法などは本誌の多くの読者にはなじみの薄いものであるように思われる。

日本藻類学会誌における光合成関連の発表は、これまで生態学的立場に基づいた研究が多いように見受けられたが、最近、藻類の生理学的特性の解析手段として、また、藻類の生態系における役割を解明する上での光合成特性に関する研究が見受けられるようになってきた。これらの現状を踏まえて、現在、主に微細藻類を用いて光合成研究を行っている研究者が、汎用されている光合成の研究法を紹介し、また、その留意点などを指摘し、実際の研究において参考にしていただくことを目的に、日本藻類学会和文誌の連載として、本「微細藻類の光合成活性測定法」を企画した。本企画は、以下に示すように、第1回～第5回よりなり、微細藻類を用いて光合成活性を測定する際の方法について詳細にかつ平易に記載することを目的とした。なお、記述に当たっては、光合成を専門としない研究者が実施する場合を念頭に置き、比較的簡便な方法で実施できること、特別大がかりな装置を必要としないこと等を条件とした。ただし、それによって測定精度が劣ることがなく、最前線の研究でも十分受け入れられることを条件とした。これから藻類の光合成特性を解析しようとしている研究者や学生を初めとして、現在、既にそれらの研究を行っている方々の参考となることを願う次第である。

第1回「色素および光合成反応中心の定量法」三室守、村上明男(基礎生物学研究所)：藻類の分類体系

とも関連が深い光合成色素、反応中心の分光学的な定量法を中心に述べる。(1)対象とする光合成色素は、クロロフィル、カロテノイド、フィコビルリンである。HPLCなどの最近急速に普及した機器を用いる分析方法を述べると共に、分析に至るまでの試料の調製法、特に細胞からの抽出方法など、定量分析に重要であるが今までは解説が少なかった問題点を、実際の試料に即して解説する。(2)反応中心の定量方法は従来は、特殊な分析機器がなければ困難とされていた。この状況は現在少しずつ改善されてきている。そこで、現在分光学的に十分な精度で測定可能な、光化学系I反応中心(P700)、光化学系II反応中心の指標となりうるシトクロム b_{559} を中心に、実際の手順を解説する。それと同時に、その測定に至るまでの試料(チラコイド膜)の調製方法についても、筆者らの経験に基づいて解説し、留意点、問題点などを明らかにする。

第2回「酸素電極測定法」和田野晃(大阪府立大学農学部)：高等植物型の光合成をする生物は、炭酸ガスを1分子同化するために、1分子の酸素を発生するとされている。その根拠を、カルビン-ベンソン回路と光化学系との結び付きから簡単に説明をし、なぜ酸素の測定で光合成の炭酸同化の測定が可能になるかを明らかにする。酸素の測定法としてのポーラログラフィー型酸素電極の簡単な原理、使用法、日常の管理法などについて記し、酸素の溶解度と測定用のセルの容積から、発生した酸素の絶対量の求め方、速度の表記法についても言及する。廉価な電極と、単3電池および抵抗とボリューム、記録計を用いた簡便なシステムの組み立て方や、パーソナルコンピュータとのインターフェース、測定データの表計算ソフトへの取り込みも紹介したい。

第3回「光化学系活性測定法」佐藤典裕、都筑幹夫(東京薬科大学生命科学部)：光合成は、光受容、クロロフィルによる電子の放出とその伝達、NADPの還元、リン酸化、CO₂固定とその代謝というさまざまな反応がほぼ直列につながった一連の反応系であ

る。そのため、光合成速度はさまざまな要因により、それぞれのステップで制御される。光受容や電子伝達などはチラコイド膜で起こるが、光の持つ物理的なエネルギーから電子の受け渡しという化学的反応への変換が行なわれるのが光化学系である。本稿では、酸素電極を用いた、緑藻クラミドモナスの光化学系IおよびIIの活性測定法について具体的に解説する。また、チラコイド膜をドデシルマルトサイドで可溶化することで、クロロフィルを遊離せずに、光化学系IおよびII複合体を単離する手法の紹介も含める予定である。

第4回「光合成キネティクス測定法」佐藤朗，白岩善博（新潟大学大学院自然科学研究科，同理学部）：光合成活性は基質である溶存無機炭素濃度の変化に応じて変動する。したがって，植物（藻類）の，ある生理条件下における光合成活性を決定する場合，どの基質濃度（CO₂律速条件下か飽和条件下か）において測定するかが重要である。すなわち，ある限定された条件下における光合成活性なのか，その植物の持つ最大光合成活性（能力）なのかが問題となる。しかし，これらの点に関する理解がない場合，それを考慮することなく光合成活性が測定され，報告されている場合がある。本稿では，光合成速度と基質濃度の関係を解析することの重要性について述べると

共に，測定の実際として，クラーク型酸素電極を用いて行う種々の基質濃度条件下における淡水及び海産性微細藻類の光合成酸素発生速度の測定法及び求めた光合成の基質依存曲線の解析法について，測定系の限界や問題点について述べる。

第5回「酵素の抽出及び活性測定法」鈴木健策（農林水産省東北農業試験場）

微細藻類における酵素活性測定に必要な基本的抽出手法と注意点について概説した後，カルビンサイクルとグリコール酸代謝に関連する主要な酵素について，比較的簡単な活性測定法を中心に紹介する。(1) 酵素の抽出：細胞の破砕方法（超音波破砕器，ガラスビーズ，フレンチプレス，パールプレス，イエーダプレス等，抽出用緩衝液の組成・添加物（プロテアーゼインヒビター，保護剤等）等。(2) カルビンサイクル関連酵素活性測定法：RuBPカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ，PGAキナーゼ，グリセロールアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素，トリオースリン酸イソメラーゼ，アルドラーゼ，FBPジホスファターゼ等。(3) グリコール酸代謝関連酵素活性測定法：ホスホグリコール酸ホスファターゼ，グリコール酸オキシダーゼ，グリコール酸デヒドロゲナーゼ，グリオキシル酸還元酵素，ヒドロキシピルビン酸還元酵素，カタラーゼ等。(4) その他の酵素活性測定法：カルボニックアンヒドラーゼ。

(新潟大学理学部)