



## 研究技術紹介

# 光合成キネティクス研究法 — 微細藻類の光合成による "CO<sub>2</sub>" の利用および固定特性の解析 —

佐藤 朗<sup>1</sup>・小林 寛<sup>1</sup>・白岩 善博<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>新潟大学大学院自然科学研究科 〒950-21 新潟市五十嵐 2-8050

<sup>2</sup>新潟大学理学部生物学科 〒950-21 新潟市五十嵐 2-8050

Akira Satoh, Hiroshi Kobayashi and Yoshihiro Shiraiwa 1997. Kinetic analyses of photosynthesis: Properties of the utilization and fixation of dissolved inorganic carbon in photosynthesis of microalgae. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 45: 21-28.

Analyses of the kinetic properties of photosynthesis are very important to characterize algal cells, namely to know how efficiently those are able to utilize external dissolved inorganic carbon (DIC) under limiting conditions of DIC and how high the maximum ability to fix DIC under saturating conditions of DIC is. For those purposes data obtained experimentally should satisfactorily be exact for the theoretical analyses. In this article we describe the detailed methods how to determine experimentally the rates of photosynthetic evolution of O<sub>2</sub> at various concentrations of DIC using a Clark-type oxygen electrode and how to analyse the kinetic curves theoretically to calculating kinetic parameters, such as K<sub>m</sub>(CO<sub>2</sub>) and the maximum photosynthesis, using a computer programme.

*Key Index Words:* CO<sub>2</sub> concentration-CO<sub>2</sub> fixation-CO<sub>2</sub> utilization-Kinetic analysis-O<sub>2</sub> electrode-Photosynthesis

Akira Satoh<sup>1</sup>, Hiroshi Kobayashi<sup>1</sup> and Yoshihiro Shiraiwa<sup>1,2</sup>: <sup>1</sup>Graduate School of Natural Science, Niigata University, Niigata 950-21, Japan and <sup>2</sup>Faculty of Science, Niigata University, Niigata 950-21, Japan

### はじめに

藻類の光合成固定経路はC<sub>3</sub>型であり、まずRubisco (リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) によって固定されたCO<sub>2</sub>がカルビン・ベンソン回路を経て種々の有機物へと代謝されていく。その基本経路は同じであるが、Rubiscoの特性、"CO<sub>2</sub>" (無機炭素分子の総称) の利用および固定産物の代謝に関しては藻類に特徴的な機構が多く知られている (都筑・白岩1992)。藻類の場合、CO<sub>2</sub>は外液から境界層→細胞壁→細胞膜→細胞質→葉緑体包膜→ストロマを経てRubiscoに達し固定される。したがって、その各々の段階においてCO<sub>2</sub>の輸送および拡散には大きな抵抗が存在し、結果的にCO<sub>2</sub>固定を制限する要因となる。また、光合成の基質となる"CO<sub>2</sub>"は、

水中ではそのpHに依存して解離し、CO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>あるいはCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>として存在する。その存在比はpHのみならず、溶液中の塩濃度等の解離定数を変化させる要因の存在により大きく異なる (図1)。そのため、反応液の状態および各々の藻細胞がいずれの"CO<sub>2</sub>"分子種を利用するか、すなわちCO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>あるいはCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>のうちのどれが細胞膜を通過する分子種であるかは非常に重要である。これまでの知見によれば、単細胞藻類が吸収する"CO<sub>2</sub>"分子種はフリーのCO<sub>2</sub>分子であり、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>ではないことが一部のラン藻を除いて一般的に確かめられている。一方、大型藻類においては、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>利用の例が多く報告されているが、細胞膜を介した直接的なHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>吸収の例は少なく、細胞表面に局在するカルボニックアンヒドラーゼ (CA) が関与する「みかけの

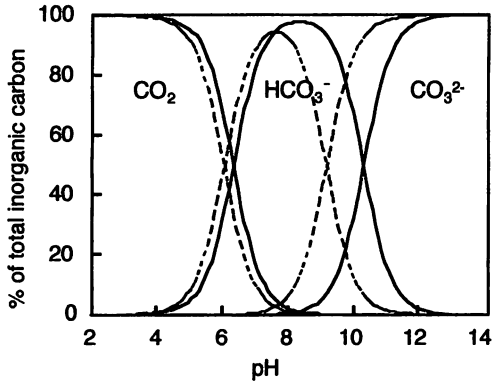


図1. 25℃における淡水(実線)および海水(35% salinity, 破線)における各溶解無機炭素分子種の存在比(Mehrbach et al. 1973)。

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>吸収」が存在する可能性が示されている。更に、葉緑体包膜を通過する"CO<sub>2</sub>"分子種およびRubiscoの基質となる"CO<sub>2</sub>"分子種もまたフリーのCO<sub>2</sub>である。したがって、藻類は至適生育環境である中性付近のpH域において、平衡状態においてより多く存在するHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>ではなく、その数十～数百分の一の濃度しか存在しないCO<sub>2</sub>分子を基質として吸収し、かつ葉緑体においてもCO<sub>2</sub>分子を固定することになる。そのため、基質となるCO<sub>2</sub>に対する親和性を高く維持するための機構を作り上げなければならない必然性が生じたものと考えられる(都筑・白岩1992, Suzuki et al. 1994)。

以上のような藻細胞による"CO<sub>2</sub>"の利用機構を解析し、その利用効率を評価するためには、各細胞の基質("CO<sub>2</sub>")に対する親和性および反応速度の解析を行うのが有効である。そのため、酵素反応において、酵素-基質間の親和性を解析するための反応速度論(キネティクス)を、細胞-基質間の関係に置き換えて、その解析法をそのまま適用することが一般的に行われている。しかし、実際にはそれらの解析において"酵素"をそのまま単純に"細胞"へと置き換えることは困難で、細胞内の複雑な反応系の存在により基質濃度曲線が変形する場合が多い。解析では、光合成のCO<sub>2</sub>濃度依存曲線を作成し、反応速度論的に最大光合成速度( $V_{max}$ )と、その $V_{max}$ の1/2の速度を与える基質(CO<sub>2</sub>)濃度[ $K_m$ (CO<sub>2</sub>)]を求め、その藻類の持つ最大光合成能力、基質制限条件下での光合成能力、基質に対する親和性等を評価する。

低濃度から高濃度に渡る種々の基質濃度で光合成活性を測定し、基質濃度に対する光合成の依存曲線を正

確に作成するためには、まず反応液中の"CO<sub>2</sub>"濃度をゼロにすると同時に細胞内の"CO<sub>2</sub>"濃度もゼロにする必要がある。これらの操作が不十分な場合、基質であるNaHCO<sub>3</sub>を反応液に注入する前でさえも、相当高い光合成活性(光合成O<sub>2</sub>発生速度)が認められる。これらのデータからは正確な $K_m$ (CO<sub>2</sub>)や $V_{max}$ を求めることはできない。以上をふまえて、本稿では、光合成のCO<sub>2</sub>濃度依存曲線の作成法について、測定前あるいは測定中の注意事項や得られた結果の解析法等を加えて紹介したい。

## 1. 酸素電極を用いた光合成測定の際の一般的操作法

### 1-1. 酸素電極装置

筆者らの研究室では、クラーク型酸素電極として主に英国Rank Brothers社製(代理店は(株)三啓, 東京都文京区湯島3-20-12, TEL: 03-3839-7354)を用いているので、以下の実験法の解説ではその装置を用いるものとして記述する。酸素電極および反応容器の形状は機種により種々工夫されているが、光合成O<sub>2</sub>発生速度および呼吸速度等を測定するために基本的に必要な個々の装置や原理は同じである。ただし、英国Hansatech社製(代理店は(株)旭光通商, 東京都港区麻布1-5-2, TEL: 03-3586-5251)のように光源および反応容器が専用で用意され量子収率の測定が可能な装置もある。酸素電極付光合成反応容器および測定システムについては和田野(1996)に詳しい。

### 1-2. CO<sub>2</sub>-freeの緩衝液(反応液)および細胞懸濁液の調製

CO<sub>2</sub>-free緩衝液(反応液)は、あらかじめ30分程度N<sub>2</sub>ガスを通気した蒸留水(あるいは培地)に、マグネティックスターラーで攪拌しかつN<sub>2</sub>ガスを通気しながら、緩衝剤を粉末のまま添加して調製する。pH調整にNaOH溶液を用いる必要がある場合は、あらかじめ密栓した遠心管中に過飽和のNaOH溶液を用意しておき、それを遠心した後その上清をCO<sub>2</sub>-freeのNaOH溶液として使用する。アルカリ溶液にはCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>が多く溶けこむが、過飽和NaOH溶液では混在していた"CO<sub>2</sub>"は沈殿として除去される。調製後の緩衝液をアスピレーターで脱気するとなおよい。液体培養および寒天培養等で生育させた微細藻類の細胞を収穫し、その細胞懸濁液の細胞濃度をpacked cell volume (PCV, 白岩・広川1982を参照)、クロロフィルあるいは細胞数等を求めることにより決定する。一回分の測定に必要な細

胞懸濁液の液量は1~5 mlであり、一回分ずつを一試験管内で調製するようにし、測定回数分だけ細胞を遠心により収穫する。遠心後、上清をアスピレーターで丁寧にかつ完全に吸い取り、ペレットのまま保存する。そして、使用時には直前に反応液に再懸濁して用いる。クロレラの場合、6時間程度はその光合成活性が保持されるが、藻種毎にあらかじめ保存法を検討しておく必要がある。

反応液としては、培養液にpH緩衝作用を持たせたものを用いるのが一般的であるが、*Chlorella*等では短時間の測定であるならば緩衝液のみでよい。緩衝液としては、Good's buffer (設定するpHに応じて、MES, HEPES, Bis-Tris-Propane, Tricine, PIPES等から選択して用いる)を25~50 mM程度の濃度で用いるのが適当である。これらのbufferは細胞内に取り込まれることなく、細胞活性に影響を与えないのが特徴である。

### 1-3. 自己消費による細胞内"CO<sub>2</sub>"の除去(枯渇処理)操作

反応容器内で光合成を行なわせ、細胞のCO<sub>2</sub>の固定能力を利用して細胞内に蓄積されているCO<sub>2</sub>を枯渇させる。見かけ上のCO<sub>2</sub>依存のO<sub>2</sub>発生が見られなくなった状態(CO<sub>2</sub>補償点)を、CO<sub>2</sub>濃度ゼロ状態と仮定している。1-2項のCO<sub>2</sub>-free操作が十分でないと、光合成O<sub>2</sub>発生が停止するまでに要する時間が非常に長くなる。このような場合では、細胞は強光および極低濃度のCO<sub>2</sub>条件下におかれており、細胞がダメージを受け光合成活性の低下が認められると共に、細胞が低CO<sub>2</sub>濃度へ適応し、細胞の特性が変化するので注意を要する。著者らは、CO<sub>2</sub>-free操作に要する時間を最大30分間と限定しており、これを越えて"CO<sub>2</sub>が枯渇しない場合は、最初からCO<sub>2</sub>-free操作をやり直し、短時間でCO<sub>2</sub>-freeが完了できたものだけを実験に使用するようになっている。

### 2. 測定に際しての諸条件の設定

CO<sub>2</sub>濃度以外に、光合成に影響する外因性の制限要因としては、光強度、光質、温度およびO<sub>2</sub>濃度などがある。したがって、ある藻種について光合成のCO<sub>2</sub>濃度依存曲線を測定する場合、まず、光飽和条件を決定し、その条件のもとで至適温度を決定する。そして、光強度を飽和条件に、温度を至適条件に設定し一定に保つ必要がある。細胞濃度は、単位細胞量当りの光合成活性が最大となる値とする。細胞濃度が低すぎると単位時間当りのO<sub>2</sub>濃度変化が小さすぎて測定が困難とな

り、細胞濃度が高すぎると、細胞同士の遮蔽によって減光され、光律速条件となり正確な光合成活性を測定できない。藻種およびその光合成活性にもよるが、1~3 μl PCV/mlの細胞濃度が適当である。

飽和光強度の決定は、終濃度で5~20 mMの範囲の飽和基質濃度条件下で行う。また、測定温度は種によって異なるが単細胞緑藻クロレラでは25~30℃、クラミドモナスや円石藻では20~25℃の範囲が適当である。

空気と平衡状態にある細胞懸濁液中の酸素濃度は25℃で258 mMである。閉鎖系のため、光合成測定を続けていくと、酸素濃度は次第に増加していく。再現性と信頼性のあるデータを得るためには、光合成の酸素阻害(ワールブルク効果)の影響を考慮し、時々N<sub>2</sub>ガスを通気することにより酸素濃度が30%を超えないようにする。

### 3. 光合成速度の測定の実際

細胞懸濁液を反応容器に入れ、CO<sub>2</sub>を枯渇させた後、NaHCO<sub>3</sub>濃度を段階的に上げ、各濃度での光合成活性を測定するのが実際の操作である。安定した酸素電極を用いれば測定自体はあまり難しくはない。順にNaHCO<sub>3</sub>溶液を添加するとその分液量が増え、キャップのキャピラー中の水位が上がるので、その都度キャップを僅かに引き上げ容器内の水位を調節することが重要である。チャート上で光合成活性を示す直線的なO<sub>2</sub>濃度変化のラインが得られたならば、次のNaHCO<sub>3</sub>濃度を添加し、一定速度を測る操作を繰り返す。極低濃度の時には、レコーダーの感度を上げ、チャートスピードを遅くして、チャート上で適切な傾きが得られるように調節する。測定の最後には光を消して、酸素発生が停止すること、すなわち、これまでの酸素発生が光合成によるものであることを確認する。ただし、光照射後のO<sub>2</sub>吸収速度は、正確な暗呼吸速度を示すものではない。正確な暗呼吸を得るためには、15分程度そのまま暗条件に保った後、一定になった速度を求める必要がある。

光合成酸素発生速度は、単位量当りの細胞が単位時間内に発生した酸素量として表す。具体的な計算の例については和田野(1996)を参照されたい。当研究室では、1 ml PCVの細胞が1時間に発生する酸素量(μmol O<sub>2</sub> evolved/ml PCV/h)、単位クロロフィル当り(μmol O<sub>2</sub> evolved/mg chlorophyll/h)または単位細胞数当り(μmol O<sub>2</sub> evolved/10<sup>7</sup> cells/h)で表している。

#### 4. 光合成基質 (NaHCO<sub>3</sub>) の添加方法と注意点

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> と CO<sub>2</sub> は、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  の平衡関係にあり、Henderson-Hasselbalch の式が当てはまり、 $\text{pH} = \text{pK}' + \log ([\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2])$  の関係式が導かれる。すなわち、基質として NaHCO<sub>3</sub> を添加した時の CO<sub>2</sub> と HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> の存在比は、同一の反応液を用いる場合、その pH に依存する。したがって、pH と温度条件を一定にした測定では、与えた NaHCO<sub>3</sub> の任意の濃度から pK' の値をもとにして CO<sub>2</sub> および HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 各々の濃度を求めることができる。例えば、塩濃度が低い (数十ミリモルの緩衝液等) 反応液を用いる場合、25℃では pK'=6.365、30℃では pK'=6.348 (Umbreit et al. 1949) を適用して、pH 8 および 25℃での測定では、 $8.0 = 6.365 (30^\circ\text{C} \text{では } 6.348) + \log([\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2])$  を解いて、 $[\text{HCO}_3^-]:[\text{CO}_2] = 43.2 : 1$  (30℃では 44.7 : 1) となる。すなわち、2 mM (2,000 μM) の NaHCO<sub>3</sub> を反応液に添加した場合、 $[\text{CO}_2]$  は  $2,000 \times 1/44.2 = 45 \mu\text{M}$  (30℃では  $2,000 \times 1/45.7 = 43.8 \mu\text{M}$ )、 $[\text{HCO}_3^-]$  は  $2 \times 43.2/44.2 = 1.95 \text{ mM}$  (30℃では  $2 \times 44.7/45.7 = 1.96 \text{ mM}$ ) となる (図 1)。極低基質濃度や低 pH での測定の場合、光合成によって消費された CO<sub>2</sub> 量を見逃す可能性がある。その補正は、基質濃度を添加した後から次の濃度を添加するまでに発生した O<sub>2</sub> 量を求め、固定炭酸ガスと放出酸素のストイキオメトリー (和田野 1996 参照) により、CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> = 1:1 として、消費されたと思われる CO<sub>2</sub> 量を算出して差し引くことにより行う。後述するように、両逆数プロットを行なう際には特に低基質濃度の逆数値のパラツキが大きくなり、誤差が大きくなるので、補正をした値を用いないと適切な直線が得られない。

#### 5. CO<sub>2</sub> 枯渇が不可能な場合はどうするか?

いくら CO<sub>2</sub>-free 操作を続けても見かけ上の O<sub>2</sub> 発生がゼロにならず、若干の酸素発生が残ったり酸素吸収が見られる状態で、測定を開始しなければならないことがある。たとえば、細胞構造が壊れやすく、強い遠心操作ができずに、"CO<sub>2</sub>" を含む上清の除去が不完全である場合、細胞の特性として多量の "CO<sub>2</sub>" を細胞内に蓄積している場合、細胞表層にゲル状の物質がある場合などである。このような場合、正確な光合成-基質濃度依存曲線を得ることは事実上不可能であるため、以下の対処および補正法を用いて、およそのキネティックパラメーターを推定することにせざるを得ない。第一には、横軸方向 (x 軸の正方向) に曲線を平

行移動させ、マイナス値となる x 切片を原点に移動させ、得られたグラフを用いてキネティックパラメーターを算出する。第二には、各濃度の測定値から NaHCO<sub>3</sub> 添加前 (ゼロ点) の光合成速度を引いた値を計算しプロットする。この場合、V<sub>max</sub> 値が変化するので、便宜的におよその K<sub>m</sub> 値を推定することにのみ有効である。第三には、両逆数プロットを用いて基質濃度の真の値からの誤差が大きい低濃度の値を無視して、高基質濃度下での光合成速度のみを用いて K<sub>m</sub> と V<sub>max</sub> を計算する。

#### 6. O<sub>2</sub> リーク

反応容器キャップにはキャピラリー部があり、そこが上がってきた細胞懸濁液 (反応液) の上端は空気に

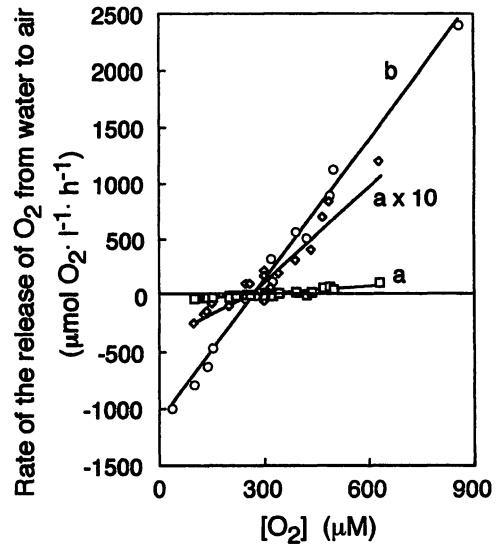


図 2. Rank Brothers社の酸素電極付光合成反応容器を用いた場合の溶存 O<sub>2</sub> 濃度と O<sub>2</sub> リーク速度との関係。a, 反応容器のキャップを完全に閉めた場合; a × 10, a の 10 倍拡大値; b, 反応容器のキャップを開けた場合。測定は蒸留水 5 ml を入れ、温度を 25℃ に保ち行った。

触れることになるが、キャピラリー中の液柱の長さがある程度とれば、気相と反応液間の O<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> の出入りは 10-30% の酸素濃度条件下の測定では無視できるほど小さい (白岩ら 1979)。しかし、酸素濃度が空気レベルと大きく異なり、極低および極高酸素濃度での光合成活性の測定時には O<sub>2</sub> のリークに十分な注意が必要である (図 2)。

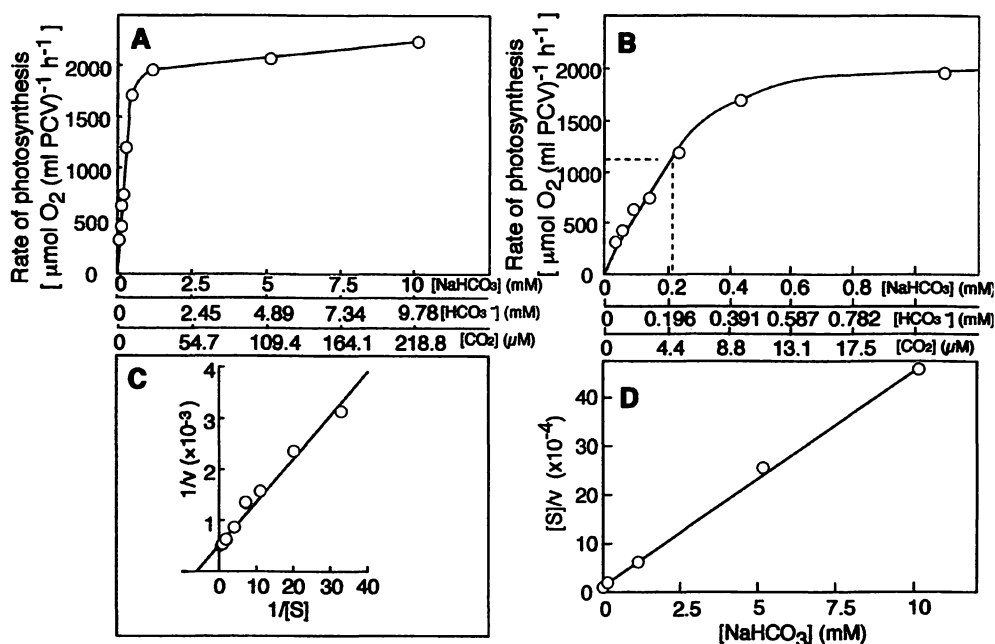


図3. 単細胞緑藻 *Chlorella sorokiniana* 細胞の光合成—基質濃度依存曲線 (AおよびB), 両逆数プロット (C) および[S]/v ~ [S]プロット (D)。測定は細胞濃度 1 ml PCV/ml, pH 8.0, 温度 30℃および光飽和 (225 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) 条件下で行った。K<sub>1/2</sub> 値の求め方を点線で示した。

7. 光合成 - 基質濃度依存曲線の解析法

7-1. 一般的解析法

上述の方法によって得られた光合成の基質濃度依存曲線の例を図3AおよびBに示した。前述のように、解析するキネティックパラメーターは最大光合成速度 (V<sub>max</sub>) と K<sub>m</sub> (CO<sub>2</sub>) もしくは K<sub>1/2</sub> (CO<sub>2</sub>) である。これを求める方法には、飽和曲線から直接読み取る方法 (図3A, B), 両逆数プロット (図3C) および [S]/v ~ [S]プロット (図3D) 等がある。光合成反応は、30℃およびpH8.0の条件で行われたので、第4項に示す計算によって"CO<sub>2</sub>"の解離状態を求めた。図3Aから直接読み取ると、V<sub>max</sub> = 2,230 μmol O<sub>2</sub> evolved/ml PCV/hである。この1/2の値すなわち 1,115 μmol O<sub>2</sub> evolved/ml PCV/hに対応するNaHCO<sub>3</sub>濃度を読み取ると (図3B), K<sub>1/2</sub>(NaHCO<sub>3</sub>) = 210 μMとなる。また、第4項で述べた比率を用いると、K<sub>1/2</sub>(CO<sub>2</sub>) = 4.6 μMと算出できる。

酵素反応速度論を応用し、図3Cに示すような両逆数プロットを作成すると、その直線の傾きが K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub>, x 軸 (基質濃度の逆数軸) 切片が、-1/K<sub>m</sub>, y 軸 (速度

の逆数軸) の切片が 1/V<sub>max</sub> となる。図3Cの場合、得られた直線の式は、y = 9.2 × 10<sup>-2</sup>x + 0.49 × 10<sup>-3</sup>であったので、K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> = 9.2 × 10<sup>-2</sup>, 1/V<sub>max</sub> = 0.49 × 10<sup>-3</sup>となる。これを解くと、V<sub>max</sub> = 2,040 μmol O<sub>2</sub> evolved/ml PCV/h, K<sub>m</sub>(NaHCO<sub>3</sub>) = 188 μM, すなわち K<sub>m</sub>(CO<sub>2</sub>) = 4.1 μMである。図3Dのような[S]/v ~ [S]プロットでは、得られる直線の傾きが 1/V<sub>max</sub>, 縦軸上の切片が K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> となる。図3Dの直線の式は y = 4.444 × 10<sup>-4</sup>x + 0.912 × 10<sup>-4</sup>であったので、V<sub>max</sub> = 2,150 および K<sub>m</sub>(NaHCO<sub>3</sub>) = 210 μM すなわち K<sub>m</sub>(CO<sub>2</sub>) = 4.6 μM である。本実験で用いたクロレラ細胞は通常の空气中で12時間生育させたもの (低CO<sub>2</sub>細胞) であるが、3%程度の高いCO<sub>2</sub>条件で生育させた細胞 (高CO<sub>2</sub>細胞) では、K<sub>1/2</sub>(CO<sub>2</sub>)が 20 ~ 25 μM, V<sub>max</sub> が 2,500 程度となり、生育時のCO<sub>2</sub>濃度条件によりそれらのパラメーターが変化することが明らかとなっている。

このような解析から、CO<sub>2</sub>飽和条件とCO<sub>2</sub>律速条件との両方において光合成活性を評価することの重要性が認識できる。すなわち、最大光合成活性のみで議論した場合、高CO<sub>2</sub>細胞の方が低CO<sub>2</sub>細胞より常に高い

表1. Spearsら(1971)の方法による円石藻 *Emiliana huxleyi* の光合成キネティクスの解析結果。実際には、方法IIでa~cおよびe~gを、方法IIIでdおよびhを求めた。表1 fと図4 Aが対応する。「 $K_L \leq$ 」は任意の基質濃度 ( $K_L$ を求める低濃度側の最大値)。Aは2回の実験データをそのまま、BはAのデータの平均値を解析した(解析は、実測値を加工せずにそのままAのように行うのが正しい)。

	$K_L \leq$	Cor.	$K_L$	$V_L$	$r_L$	Cor.	$K_H$	$V_H$	$r_H$	$\eta^2$
<b>A "Emiliana-1" + "Emiliana-2"</b>										
a	0.3	L 37	35 $\mu\text{M}$	54.6	0.991	H 38	3.2 mM	269	0.994	0.9870
b	0.5	L 41	<u>92 <math>\mu\text{M}</math></u>	<u>76.3</u>	0.980	H 42	<u>4.1 mM</u>	<u>252</u>	0.996	<u>0.9896</u>
c	1	L 65	217 $\mu\text{M}$	118	0.985	H 66	6.9 mM	224	0.986	0.9890
d	-----	-----	98 $\mu\text{M}$	84.6	-----	-----	5.2 mM	256	-----	<u>0.9911</u>
<b>B "Emiliana-average"</b>										
e	0.3	L 35	33 $\mu\text{M}$	54.0	1.00	H 36	3.1 mM	269	0.998	0.9887
f	0.5	L 45	<u>92 <math>\mu\text{M}</math></u>	<u>76.7</u>	0.993	H 46	<u>4.1 mM</u>	<u>252</u>	0.996	<u>0.9915</u>
g	1	L 67	217 $\mu\text{M}$	119	0.992	H 68	6.9 mM	223	0.988	0.9909
h	-----	-----	98 $\mu\text{M}$	84.6	-----	-----	5.2 mM	256	-----	<u>0.9930</u>

光合成活性を得られるように結論づけられてしまうが、大気平衡になっている溶液 (10  $\mu\text{M}$  程度の溶存  $\text{CO}_2$  を含む) では、最大光合成速度の1/2 (20~25  $\mu\text{M}$   $\text{CO}_2$  が必要) にも及ばない程の光合成活性しか示さない。逆に、低  $\text{CO}_2$  細胞では約4  $\mu\text{M}$  の  $\text{CO}_2$  濃度で最大光合成速度の1/2の速度の光合成を行なうことができる。これは10  $\mu\text{M}$  の  $\text{CO}_2$  濃度で、既に、最大に近い光合成活性を発揮できることを意味している。このように、光合成の基質濃度依存曲線の解析は、その藻類の持つ光合成能を知る上で重要である。特に、生態学的に特定の藻類の光合成活性の重要性を評価する場合、基質濃度飽和条件下のみでの活性を基にすると、誤った結論を導くことになる。

7-2. 2成分からなる基質濃度依存曲線の解析法—2種の  $\text{CO}_2$  固定反応が共存する場合のそれぞれの  $K_m$  と  $V_{\max}$  の求め方—

図4は、円石藻 *Emiliana huxleyi* 細胞の光合成  $\text{O}_2$  発生速度の  $[\text{NaHCO}_3]$  に対する基質濃度依存曲線を示したものである。一見、図3 Aと同様な典型的な Michaelis-Menten 型に思われるが、 $1/v \sim 1/[S]$  プロット (図4 B) が直線とならず、 $1/[S]$  が小さい範囲では  $1/v$  が曲線的に増大する (つまり次第に傾きが低下する)。また、 $1/[S]$  が大きい範囲では傾きが一定になる (図4 B)。これらのグラフを、「2つの異なる反応が1つの基質 (" $\text{CO}_2$ ") に作用している場合」と仮定して、そ

のキネティクスデータを解析すると、実測値に基づく曲線中に、図4 A中に破線 (H) および点線 (L) で示したような2つの反応成分が含まれていることが推定できる。以下に、その解析法および解析例を示す。

図4 Aの実測値のプロットに対する近似曲線の関数 (実線) を、Michaelis-Menten の式 (1) で表される2つの関数 (成分 H ( $v_H$ ) と成分 L ( $v_L$ )) の和 ( $v = v_H + v_L$ )、すなわち式 (2) と定義する。

$$v = V_{\max} / (1 + K_m / [S]) \dots \dots \dots (1)$$

$$v = V_L / (1 + K_L / [S]) + V_H / (1 + K_H / [S]) \dots \dots \dots (2)$$

ここで、 $K_m$  は Michaelis 定数、 $[S]$  は基質濃度、 $v$  は反応速度、 $V_{\max}$  は  $v$  の飽和値 (最大反応速度) を意味する。

$V_L$  と  $K_L$ 、 $V_H$  と  $K_H$  については、方法 I の①を参照すること。式 (2) のパラメータ  $\{K_L, V_L, K_H, V_H\}$  を、Spearsら (1971) の解析方法に従って、表計算ソフトウェア (Microsoft Excel など) を用いて、以下の手順 (①~⑫) で計算する (方法 I)。

- ① 任意の基質濃度の一つを選択する。ここでは、仮に0.5 mM とする。低基質濃度側 (0.1~0.5 mM) の反応速度  $v$  から低い  $K_m$  ( $K_L$  とする) とその  $V_{\max}$  ( $V_L$  とする) (図4 Aの点線 L) を、高基質濃度側 (1~35 mM) から高い  $K_m$  ( $K_H$  とする) とその  $V_{\max}$  ( $V_H$  とする) (図4 Aの破線 H) を求める。
- ② 高基質濃度側の  $[S]/v$  を計算し、 $[S]$  に対してプロットする (図5 Aの0)。

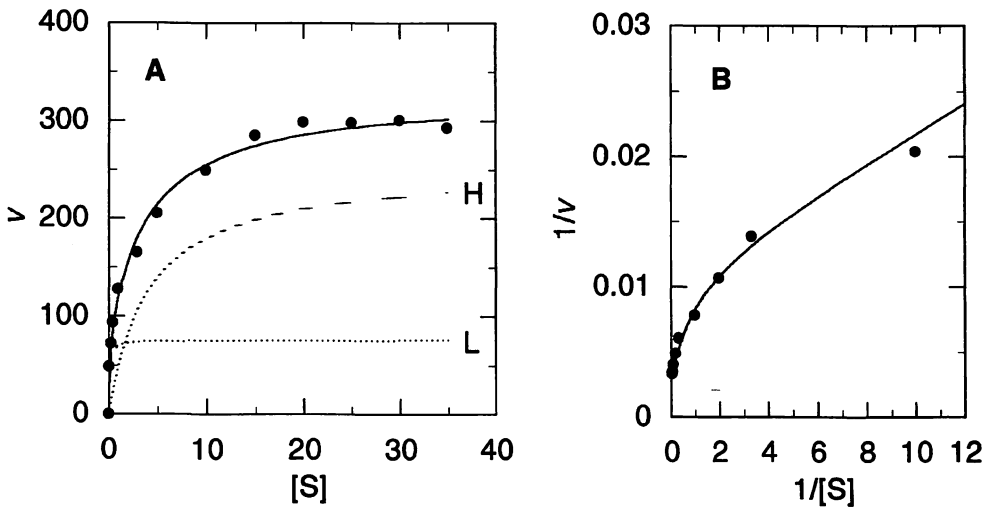


図4. 円石藻 *Emiliana huxleyi* の光合成速度の基質濃度依存曲線 (A) と、その Lineweaver-Burk プロット (B) (Sekino ら 1996)。点線と破線は、Spears ら (1971) の方法により求めた結果のそれぞれの  $K_m$  と  $V_{max}$  を Michaelis-Menten の式に代入して得たグラフ。図中のプロット (・) は 2 回の実測値の平均値を示す。

- ③ ②のプロットに対して最小二乗法で線形回帰し (図5 Aの直線0), 補正0回目の  $K_H$  と  $V_H$ , すなわち  $K_{H0}$  と  $V_{H0}$  を求める。  
ここで、回帰直線  $y = ax + b$  は、  
$$[S]/v = (1/V_{max})[S] + K_m/V_{max} \dots \dots (3)$$
 と表されるので、 $K_m = b/a$ ,  $V_{max} = 1/a$  となる。
- ④  $K_{H0}$  と  $V_{H0}$  を式 (1) に代入して、成分Hの反応

- 速度  $v$  の計算値  $v_{H0}$  を求める。
- ⑤ 低基質濃度側の実測値  $v$  から計算値  $v_{H0}$  を引いた値  $(v - v_{H0})$  で  $[S]$  を除し、プロットする (図5 Bの1)。
- ⑥ ⑤のプロットに対して最小二乗法で線形回帰し (図5 Bの点線1), 補正1回目の  $K_L$  と  $V_L$ , すなわち  $K_{L1}$  と  $V_{L1}$  を求める。

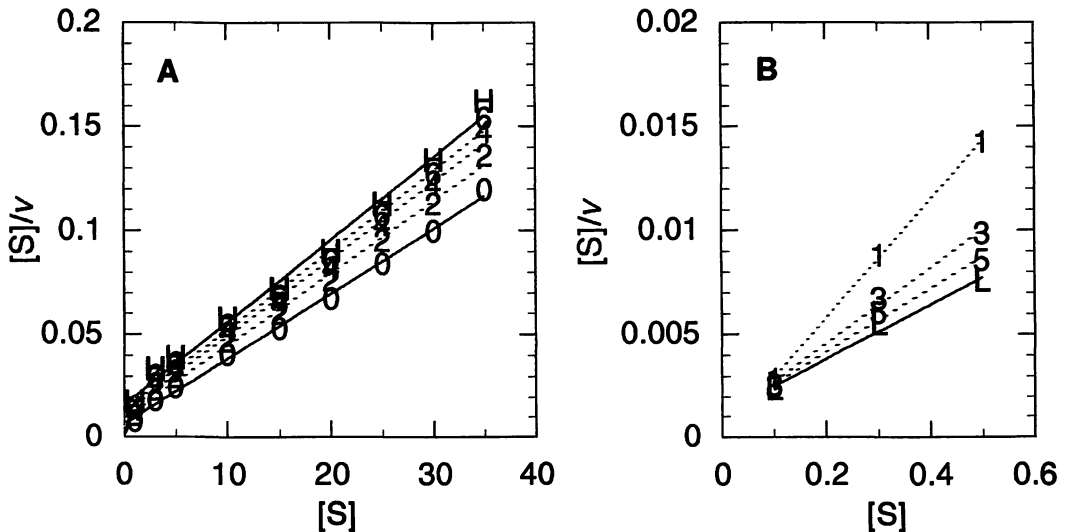


図5. Spears ら (1971) の方法による 円石藻 *Emiliana huxleyi* の光合成キネティクスの解析から 2 成分の  $K_m$  と  $V_{max}$  を求める手順。プロットに用いた数字は補正回数を示しており、H と L に収束した。

- ⑦  $K_{L1}$  と  $V_{L1}$  を式 (1) に代入して、成分 L の反応速度  $v$  の計算値  $v_{L1}$  を求める。
- ⑧ 高基質濃度側の実測値  $v$  から計算値  $v_{L1}$  を引いた値 ( $v - v_{L1}$ ) で [S] を除し、プロットする (図 5A の 2)。
- ⑨ ⑧ のプロットに対して最小二乗法で線形回帰し (図 5A の点線 2), 補正 2 回目の  $K_H$  と  $V_H$ , すなわち  $K_{H2}$  と  $V_{H2}$  を求める。
- ⑩ ④~⑧ を収束するまで繰り返すと、パラメータが求まる。その結果,  $|K_{L45}, V_{L45}, K_{H46}, V_{H46}| = |K_{L47}, V_{L47}, K_{H48}, V_{H48}|$  に収束して,  $K_L = 0.0919, V_L = 76.7, K_H = 4.06, V_H = 252$  が求まる。
- ⑪ ① の基質濃度を、例えば 1 mM へと変更して、②~⑩ を繰り返す (表 1a~c および e~g)。
- ⑫ ⑪ の結果、複数のパラメータを得た場合は、実測値に最も近い回帰曲線のパラメータを 1 組選ぶ。それが、Spears ら (1971) の方法に従って得られるパラメータである (表 1b および f)。

以上の Spears らの解析方法を BASIC でコンピュータで自動化できる (方法 II)。また、回帰計算ソフトウェア (DeltaGraph® Pro3 など) で式 (2) を定義すると、それぞれの  $K_m$  と  $V_{max}$  を直接簡単に求めることができる (方法 III)。この方法 III は、実測値のプロットと近似曲線 (式 (2)) との差が最小になること、つまり  $\eta^2$  (池田 1976) を 1 に近づけることを目指して、 $\eta^2$  が最も 1 に近いパラメータのみが得られる (表 1 d と h)。また、各プロットの位置や間隔 (任意の基質濃度やプロット数) に計算結果が影響されない (表 1 A と B) 等の利点がある。

## 8. おわりに

本稿では、筆者らが行っている光合成の基質濃度依存曲線の解析法について紹介した。この方法は、CO<sub>2</sub>-free 操作に多少の習熟を要する点を除けばそれほど困難ではない。ただし、本来は単一の酵素と基質との間に成り立つ理論を、多くの酵素反応からなる複雑な光合成の反応に単純に当てはめることには疑問があるが、正確なデータが得られれば、基質の利用及び固定に伴う細胞内の反応の解析を行うことが出来よう。

## 謝辞

O<sub>2</sub> リークの測定およびコンピュータライジングについて当研究室の土山修治および土田博子氏の協力を得たことに感謝いたします。

## 参考文献

- 池田央 1976. 統計的方法 I. 新曜社, 東京.
- Mehrbach, C., Culbertson, C. H., Hawley, J. E. and Pytkowicz, R. M. 1973. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.* 18 : 897-907.
- Sekino, K., Kobayashi, H. and Shiraiwa, Y. 1996. Role of coccoliths in the utilization of inorganic carbon by marine unicellular coccolithopholid, *Emiliania huxleyi*: a survey using intact cells and protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 37: 123-127.
- 白岩善博・広川豊康 1982. クロレラ (クラミドモナス, セネデスムス). p.235-249. 江上信雄・勝見允行 (編) 実験生物学講座 1, 生物材料調製法, 丸善, 東京.
- 白岩善博・宮地倭文子・宮地重遠 1981. 放射性同位元素を用いた炭酸固定経路の研究法. p. 193-248, 加藤栄, 宮地重遠, 村田吉男 (編) 光合成研究法, 共立出版, 東京.
- 白岩善博・広川豊康 1982. クロレラ (クラミドモナス, セネデスムス). p.235-249. 江上信雄・勝見允行 (編) 実験生物学講座 1, 生物材料調製法, 丸善, 東京.
- 白岩善博・宮地倭文子・宮地重遠 1981. 放射性同位元素を用いた炭酸固定経路の研究法. p. 193-248, 加藤栄, 宮地重遠, 村田吉男 (編) 光合成研究法, 共立出版, 東京.
- Spears, G., Sneyd, J.G.T. and Loten, E.G. 1971. A method for deriving kinetic constants for enzymes acting on the same substrate. *Biochem. J.* 125: 1149-1151.
- Suzuki, E., Shiraiwa, Y. and Miyachi, S. 1994. The cellular and molecular aspects of carbonic anhydrase in photosynthetic microorganisms. p.1-54. In: F.E. Round and D.J. Chapman (eds) *Progress in Phycological Research*, Vol. 10. Biopress Ltd., London.
- 都筑幹夫・白岩善博 1992. 藻類の光合成. p. 125-133. 宮地重遠 (編) 現代植物生理学第 1 巻, 光合成, 朝倉書店, 東京.
- Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F. 1949. Carbon dioxide and bicarbonate, p. 21-29. In: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Minneapolis, Minn.
- 和田野晃 1996. 光合成における炭酸ガス固定と酸素発生量の相関および酸素電極測定法. *Jpn. J. Phycol.* (Sôru), 44 : 109-114.