



Title	酸素発生測定
Author(s)	野口, 航
Citation	低温科学, 67, 89-94 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39105
Type	bulletin (article)
Note	2章 個体・環境の測定 1. 個葉から葉緑体スケールのガス交換 d
File Information	67-016.pdf



[Instructions for use](#)

1. 個葉から葉緑体スケールのガス交換

d. 酸素発生測定

野口 航¹⁾

酸素発生は光合成に特徴的な反応である。酸素は光化学系IIの水の酸化分解の副産物として発生する。通常、光合成速度としてのO₂発生速度は、密閉容器内のO₂濃度の一定時間の変化を、気相型もしくは液相型のポーラログラフ方式のClark型の酸素電極¹⁾を用いて測定することが多い。本章では植物の葉や単離葉緑体のO₂発生速度の測定法について紹介する。

Measurement of O₂ evolution rate

Ko Noguchi

Oxygen evolution is one of characteristic reactions in photosynthesis. Oxygen evolution rate has been measured as changes in O₂ concentration in a closed chamber, using gas- or liquid-phase Clark-type oxygen electrode. In this chapter, I introduce methods of oxygen evolution rate of leaves or isolated chloroplasts.

1.d.1 気相型酸素電極を用いた葉の酸素発生の測定

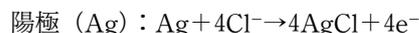
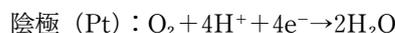
密閉容器内に葉を閉じ込め、容器内の気相のO₂濃度の変化をClark型酸素電極で測定する方法は、IRGAを用いたCO₂固定速度の測定システム（例えばLi-Cor社製LI-6400）に比べると、葉の光合成速度測定法としては、比較的安価で簡易な方法である。また微量のサンプルでも測定が可能である。現在、Hansatech社によって製造・販売^{#1}されているこの気相型酸素電極システムは、1981年にDelieu & Walkerによって考案された²⁾。David Walker自身によってこのシステムの使用方法についての丁寧な解説書が出版され³⁾、日本語訳も出版されている⁴⁾。ここでは使用法のごく簡単な紹介と注意事項をまとめる。

1.d.1.1 システムの構成とセットアップ

・気相型酸素電極システムの構成

Hansatech社の気相型の酸素電極システムは図1のような構造をしている。現在販売されているのはポリプロピレン製のLD2/3である。葉片を入れる部分（リーフディスクウェル）の下部にClark型酸素電極ディスク(S1)がはめ込まれ、その上下部分に温度調節のための水が循環できる。循環水の上部の窓を通して、専用の赤色LED光源(LH36/2R)やタングステンランプ光源(LS2)などを照射できる。またクロロフィル蛍光測定用のガラスファイバーを差し込めるポートもある。

Clark型酸素電極2つの電極（Pt電極とAg電極）間に、専用の制御器^{#2}で電圧を加えると電解反応が起こり、溶存物質が各電極で酸化あるいは還元され、電解電流を生じる。ある一定の電圧（0.4–0.8 V）の時には各電極で以下の反応がおこる。



電流は周囲の酸素濃度に比例するので、電流変化の測定から酸素濃度の変化を知ることができる。電流変化は電圧に変換・増幅され、記録計で読みとれる。可変抵抗を組み合わせて制御器を自作することも可能である。酸素電極の原理は(4)5aの章に詳しく記載されている^{#3}。酸素電極は温度にきわめて敏感に反応するので、気相型の酸素電極システムに水を循環するための恒温槽は、精度の高いものが良い。

・酸素電極の組立

酸素電極は測定ごとに組み立てた方がよい。測定後には銀電極は酸化されるので、研磨用の酸化アルミニウムと綿棒等で銀電極を磨く。洗浄後、白金電極の上に電解

1) 東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

^{#1} 日本ではHansatech社(<http://www.hansatech-instruments.com/index.htm>)の製品は旭光通商株式会社(<http://www.kyokko.com/index.html>)が取り扱っている。^{#2} Hansatech CB1-D3, Oxygraph, Oxytherm, OxyLabがある。CB1-D3は記録計でしかデータを読みとれないが、他はADコンバータが付いているので、パソコンで読みとれる。^{#3} 園池公毅博士のHP(<http://sunlight.k.u-tokyo.ac.jp/proto/O2evolve.html>)にも詳しく記載されている。

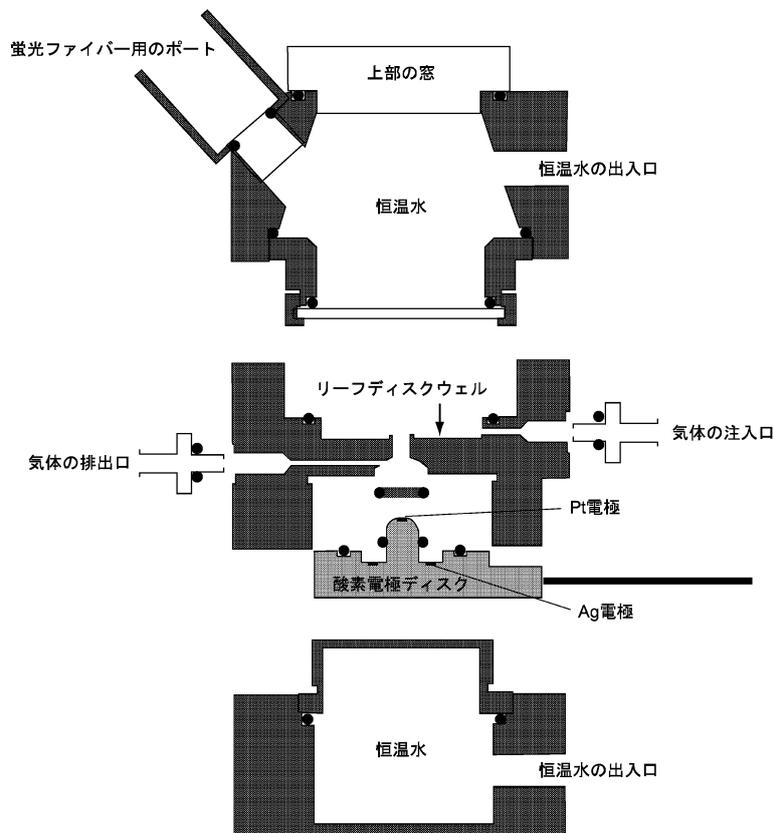


図1：Hansatech社製の気相型の酸素電極システム(LD2/3)の模式図。光は上部の窓を通して照射し、左右の気体の出入り口に三方コックを取り付ける。上下のブロックに恒温槽からの水を循環して、温度を一定にする。

液^{※4}をたらし、ペーパースペーサー^{※5}と薄いテフロン膜^{※6}を載せ、Oリングで固定する。固定するには専用のメンブレンアプリーケーター(A2)があると、Oリングの取り付けが簡単である。取り付け後に、テフロン膜がきちんと張れているかを確認する。白金電極だけでなく、銀電極のおさまっている凹みも電極液で満たすと良い。Oリングの位置を確認し、組み立てた酸素電極を気相型システムに取り付ける。取り付け時に閉め過ぎると出力電圧が不安定になる。

・制御器と記録計の取付け

酸素電極と制御器をつなぎ、電圧をかける。Hansatech社のアナログ制御器(CB1-D3)では出力電圧が増幅されるので、記録計への出力が1.5V程度になるように出力制御ツマミで調節すると良い。恒温槽の水を酸素電極システムに循環し、温度を一定にする。酸素電極は10分くらいでほぼ安定になるが、銀電極が酸化してくるので、出力電圧はしだいにゆっくりと減少していく。

・測定前の注意事項

気相型酸素電極システムは閉鎖系の酸素濃度変化を測定するので、システムからのリークは大きな測定誤差につながる。リークの有無は次のように調べる。窒素やヘリウムなどのガスをシステムの横の三方コックから導入し、減少した出力電圧が増加しないかを確認するか、もしくはシリンジを用いて0.5mL程度の空気を横の三方コックから導入し、増加した出力電圧が減少しないかを確認する。リークがあればOリングにゴミが附着しているか、三方コックがきちんと接続されているかを確認する。

^{※4} 気相型酸素電極の電解液は、飽和KCl溶液、0.4Mホウ酸緩衝液(pH9)、1M重炭酸ナトリウム(1M炭酸ナトリウムでpHを9に合わせておく)を1:1:2で混ぜ合わせたものを用いる²⁾。

^{※5} タバコ紙が良い。直径2cmくらいの円に切り取る。真ん中に白金電極が見えるくらいの穴を開けると、応答が速くなる。

^{※6} テフロン膜はタバコ紙よりもすこし大きめの円に切り取ると良い。Hansatech付属のテフロン膜(S4)は幅が25mmであり、ちょうどよい大きさとなっている。テフロン膜は薄い方が応答が良い。Hansatechから厚さ0.0125mmのテフロン膜(S4)を購入できる

窒素やヘリウムなどのガスを導入することにより、電極の残留電流（ゼロ補正）と感度を確認できる。電極の残留電流はジチオナイト(Na₂S₂O₄、ヒドロサルファイトナトリウム)でも確認できるが、気相型だと使用しにくい。測定前にリーフディスクウェルに当たる光強度を測定しておくが良い。水の層を通して葉に当たるので、光強度が弱くなる。

1.d.1.2 酸素発生速度の測定

ここではアナログ制御器 CB1-D3 と記録計を用いたときの測定例をまとめる。デジタル制御器 (Oxygraph など) を用いた時の操作法はソフトウェアの説明書も確認してほしい。

- 1) リーフディスクウェルに葉片を入れる前に、大気条件下 (21% O₂, 380 ppm CO₂) での記録計の出力電圧を確認する。電極の酸化で出力電圧が徐々に減少していくので、測定前と測定後に確認した方がよい。ゼロ補正を行ったときの出力電圧と大気条件下での出力電圧の差が、「21% O₂ と平衡にあるときの電圧」とする。
- 2) 葉面積を 10 cm² に切り取れる付属カッター (941002) を用いて葉を切り取り、しばらく水に浮かべておいたあと、リーフディスクウェルにセットする。葉面積が小さい葉の場合には、別に葉面積を測定する必要がある。葉片の下に、機器セットに付属のステンレスディスク、毛細管マット、スポンジを敷く^{※7}。毛細管マットは測定中に葉が乾燥しないように水で適度に湿らせておく (濡らすのではない)。
- 3) 酸素電極システムの上部を固定し、両端の三方コックを閉じた後に、リーフディスクウェル内の体積を求める。リーフディスクウェルに横の三方コックから 0.5 mL の大気をシリンジで導入し、出力電圧の変化からリーフディスクウェル内の有効体積を求められる^{※8}。また同時にリークも確認できる。リーフディスクウェル内の有効体積は葉の厚さなどによって変化するが、4-6 mL 程度になる。
- 4) リーフディスクウェル内の有効体積は小さいので、大気条件 (380 ppm CO₂) で測定するとすぐに CO₂

を消費しきってしまう。多くの例では 5% CO₂ 濃度という高い CO₂ 濃度条件で測定している。5% CO₂ 濃度になるようにボンベから三方コックに気体を導入しても良いし、簡易な方法として呼気を導入しても良い。呼気を導入する場合には、記録計の出力電圧を見ながら約 5% CO₂ (=16% O₂) の電圧まで導入後、両端の三方コックを閉じ、リーフディスクウェルを閉鎖系にする。

- 5) まず、暗黒下での呼吸速度を測定し、出力電圧が安定しているかを調べる。記録計の電圧変化が一定になるまで待つ。出力電圧の変化が小さい場合には、記録計のレンジを変更するか、制御器 CB1-D3 の Back-off ツマミと出力制御つまみでレンジを拡大すると良い。
- 6) 光を照射する。光強度を変える場合には、変化後に葉はすぐに応答できないので 5 から 10 分程度光を照射した後に、記録計の電圧変化を読みとる。
- 7) 葉が光合成を行うとチェンバー内の CO₂ 濃度が減少する。4% CO₂ 以下 (=17% O₂ 以上) になったら、再度両端の三方コックを開けて呼気を導入する。

1.d.1.3 酸素発生速度の計算法

光合成速度 (P) は、通常 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の単位として表す。以下のパラメータ A から E を測定値として求め、光合成速度を計算する。

大気 (21% O ₂) と平衡状態にあるときの電圧	A [V]
ある一定時間あたりの電圧の変化	B [V s ⁻¹]
測定温度における 21% O ₂ のモル濃度	C [mol L ⁻¹]
リーフディスクウェル内の有効体積	D [L]
葉面積	E [m ²]

$$P = \frac{B \cdot C \cdot D}{A \cdot E} \cdot 10^{-6}$$

1.d.1.4 測定時の注意事項

最も起こる測定誤差の原因がリーフディスクウェルのリークである。Oリングや三方コックの摩耗を測定前に確認した方がよい。またリーフディスクウェル内の湿度が高い場合には、上のガラスが曇る時がある。葉に当たる光強度が下がるので、上部をはずして拭く必要がある。

気相型酸素電極システムはクロロフィル蛍光測定用のポートが上部に付属している。クロロフィル蛍光シグナルが小さい場合には、上部の水槽のプラスチックの蓋を改造し、光照射と蛍光測定用のガラスファイバーを葉に近づけられるようにしても良い。

^{※7} リーフディスクの下に敷くステンレスディスク、毛細管マット、スポンジの順は付属のマニュアル、もしくは文献を参考にしてほしい。厚い葉を用いるときにはスポンジを外しても良い。

^{※8} リーフディスクウェル内の有効体積は、次の式で求められる。

$$v = \frac{R_1}{R_2 - R_1} \cdot s$$

v はリーフディスクウェルの有効体積 (mL), R_1, R_2 は s (mL) の大気を入れる前と入れた後の電圧 (V)。

1.d.2 液相型酸素電極を用いた酸素発生の測定

液相型酸素電極システムは、溶液中の酸素濃度を測定することによって、試料の光合成速度を求められる。光合成速度の測定用試料としてよく用いられるのは、藻類、葉肉細胞プロトプラスト、単離葉緑体、単離チラコイド膜である。酸素電極として通常は、気相型と同様に Clark 型酸素電極を用いるので、測定原理は同じである^{3,4)}。

反応容器としてはプラスチック製とガラス製がある。プラスチック製の方が壊れにくく扱いやすいが、光合成測定では光を照射し、阻害剤を加える場合もあるので、透明度が高く、阻害剤が吸着しにくいガラス製の方が良い。液相型酸素電極システムは Hansatech 社のシステムと Rank Brothers 社⁹⁾のシステムがある。Hansatech 社のシステムでは、酸素電極ディスク、制御器は気相型と同じものを使用できるが、Rank Brothers 社のシステムの方が比較的安価である。

1.d.2.1 液相型システムの構成

Rank Brothers 社製の液相型の酸素電極システムは図2のようである。マグネチックスターラーの上に酸素電極を固定し、水を循環できる反応容器を上固定する。Rank Brothers 社製のガラス製反応容器は、2.5 mL (OXY051A)、6 mL (OXY050A)、50 mL (OXY052A)の3種類の容量のタイプがある。上下可動のふたがあり、液量が0.5–2 mL までなら2.5 mL (OXY051A)、3–5 mL までなら6 mL (OXY050A)、容量を大きくしたい場合には50 mL (OXY052A)を用いると良い。酸素電極につながる制御器は、Rank Brothers 社製ではシグナルを増幅できる制御器¹⁰⁾と増幅できない制御器があるが、自作の制御器でも良い。

酸素電極は温度にきわめて敏感に反応するので、反応容器に水を循環するための恒温槽は、精度の高いものが良い。溶液中の酸素の拡散が律速しないように、溶液をスターラーで攪拌する。攪拌したときに電気的ノイズが小さいスターラーバーを選ぶ。

光源は横から照射して光合成反応を進める。光源の照射により反応容器内が暖まってしまう場合には、水フィルターなどを光源と反応容器との間に入れる。クロロフィル蛍光も同時に測定する場合には、Hansatech 社製

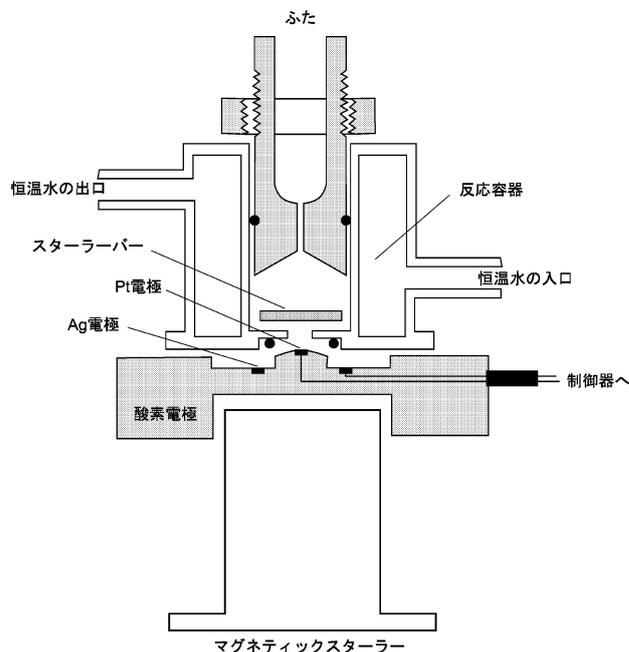


図2：Rank Brothers 社製のガラス製液相型の酸素電極システムの模式図。

の液相型酸素電極システム (DW2/2) がファイバーを反応容器に近づけられ、光が散乱しにくい構造なので良い。

1.d.2.2 酸素電極の組立てと測定前の注意事項

気相型と異なり、液相型の酸素電極の組立ては測定前日しておくことと測定が安定する。厚いテフロン膜¹¹⁾を用いると、1週間以上は使用できる。銀電極を磨いた後、タバコ紙 (真ん中に穴をあけると良い) とテフロン膜を円形に切り、飽和 KCl 溶液を Pt 電極部に垂らし、Oリングで固定する。Ag 電極の凹み部分にも飽和 KCl 溶液を入れると良い。反応容器と酸素電極の台とが密着する部分に真空グリースを塗り、反応容器と酸素電極の台とを固定する。テフロン膜を取り付けた後に酸素電極を使用しないときには、反応容器を蒸留水で満たし、テフロン膜が乾燥しないようにしておく。

恒温槽から反応容器に水を循環させ、温度を一定にしておく。酸素電極の反応容器に蒸留水を半分程度入れ、スターラーを攪拌することで大気を取り込みながら、酸素電極の出力電圧が一定になるまで待つ (通常10分程度)。出力電圧がかなり不安定ならテフロン膜を貼り直す。出力電圧が安定したら大気中の酸素と平衡にある水の酸素濃度の出力電圧を読みとる。

⁹⁾ 日本では Rank Brothers 社 (<http://www.rankbrothers.co.uk>)製の酸素電極は、株式会社三啓 (<http://www.sankei-coltd.co.jp>) が取り扱っている。

¹⁰⁾ マグネチックスターラー台とも一体型なのでサイズが大きい (Digital Model 10)。

¹¹⁾ 筆者はワイエスアイ・ナノテック株式会社 (<http://www.nanotech.co.jp/index.html>)製の Membrane kit Standard (5775) のテフロン膜を使用している。

表1：1気圧の空気と平衡になった蒸留水中の酸素濃度の温度依存性⁹⁾

温度 (°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
酸素濃度 (μM)	442	386	341	305	276	253	235	220	206	192	176

次に、反応容器にジチオナイトを少量入れ、電極の残留電流（ゼロ補正）と反応速度（感度）を確認する。感度が悪い場合にはテフロン膜を貼り直した方がよい。ジチオナイトを加えた後、ふたを挿入し、ふたの中央の穴に水面が少し上がるように調節する。出力電圧が一定になったときの電圧値を、酸素濃度が0 μMの時の出力電圧とする。ジチオナイトを添加する前と後の出力電圧の差が、水の飽和溶存酸素濃度（25°Cなら253 μM表1参照）に相当する。

反応容器の液を取り替えるときにはアスピレータ（洗ビンの中のチューブを短くしたものでもよい）を用いて液を捨て、蒸留水ですすぐ。エタノールなどに溶かした阻害剤などを加えた場合にはエタノールでもすすいだ方がよい。アスピレータですすぐ際にテフロン膜を傷つけないように注意する。

1.d.2.3 酸素発生速度の測定

本章では、葉片、葉肉細胞プロトプラストと単離葉緑体を用いて、酸素発生速度を測定する方法について紹介する。藻類の酸素発生測定については2章4を、単離チラコイド膜の電子伝達活性については4章5を参照してもらいたい。

葉肉細胞プロトプラストや単離葉緑体の酸素発生速度は、2.5 mLもしくは6 mLの反応容器を用いる。6 mLの反応容器の場合には、反応液全量で3-4 mL程度にするとうい。測定に用いる緩衝液はあらかじめ恒温槽に入れて、測定温度に保っておくとよい。酸素は低温ほどより多く溶解する。低温のままの緩衝液を用いると、反応容器内で暖められ気泡が生じてしまう。

適切な緩衝液、測定試料、阻害剤などを反応容器に入れた後、試料室のふたを挿入し、ふたの中央の穴に水面が少し上がるように調節したのち、スターラーを回転させる。ふたをする前にスターラーを回すと、気泡が入りやすい。

測定に用いる緩衝液の例として、葉肉細胞プロトプラストの測定には、0.4 M sorbitol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5)⁹⁾、単離葉緑体の測定には、0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA-2K, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 5 mM Na pyrophosphate, 10 mM NaHCO₃, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)⁶⁾が用いられている。プロトプラストや葉緑体の懸濁液は、終濃度が20 mg Chl

L⁻¹に程度になるように入れる。

暗幕などを用いて暗条件にしておき、酸素電極の出力電圧が安定するのを待つ。安定後に反応容器に光を照射する。2分ほど測定した後に光を消す。記録計の用紙には光をon/offしたところを記入し、暗条件の傾きと照射条件の傾きを求める。この2つの直線の傾きの差から酸素濃度の変化として、酸素発生速度を求める。

葉片の酸素発生測定をするときには、Rank Brothers社製の反応容器をそのまま使用することはできない。自作の反応容器が必要となる。図3はソラマメ葉の裏表皮を剝離して、反応容器のふたの裏に接着し、酸素発生速度とクロロフィル蛍光を同時に測定できる液相型システムの模式図である⁶⁾。酸素電極はRank Brothers社製のものをそのまま用いた。葉片への光照射とクロロフィル蛍光の検出には、Walz社製のPAM101/102/103に付属したファイバーを用いた。反応容器には、10 mLの緩衝液（50 mM HEPES-KOH [pH 7.2], 0.5 mM CaSO₄, 20 mM NaHCO₃）を入れた。あらかじめ葉に緩衝液を減

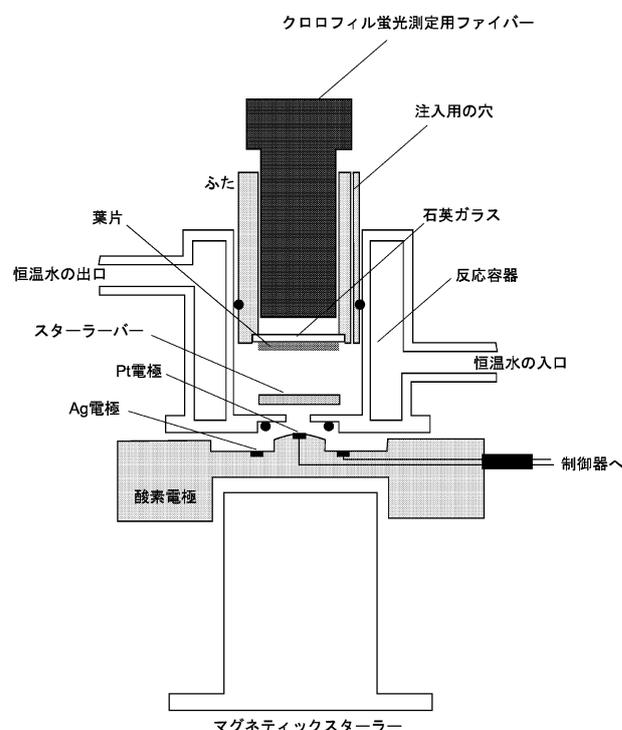


図3：葉片の酸素発生速度とクロロフィル蛍光を同時に測定できる液相型システムの模式図⁶⁾。酸素電極はRank Brothers社製の電極を利用している。ソラマメ葉の裏表皮を剝離して、反応容器のふたの裏に接着している。

圧により湿潤させておくと、高い活性が得られる。

1.d.3 Clark 型酸素電極以外の酸素濃度センサーを用いた測定

酸素濃度の測定には Clark 型酸素電極以外に、同じポーラログラフ方式の Joliot 型酸素電極や、磁気方式¹²、ジルコニア方式¹³、隔膜ガルバニ電池方式¹⁴、蛍光光学方式¹⁵ といった酸素濃度センサーが用いられている。光合成測定には、試料を電極に直接接触させる Joliot 型酸素電極が、フラッシュによる酸素発生の周期振動の測定に使われる。その他のセンサーを光合成研究に用いた例は少ないが、2つの隔膜ガルバニ電池方式のセンサーの差分電圧を測定できる酸素計¹⁶を、開放系ガス交換システムで用いた研究が報告されている^{7,8)}。

参考文献

- 1) L. C. Clark Jr., Trans. Amer. Soc. Artif. Inter. Organ **2** (1956) P.41.
- 2) T. Delieu & D. A. Walker, New Phytol. **89** (1981) P.165.
- 3) D. A. Walker, The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis, Sheffield, Robert Hill Institute, 1987.
- 4) D. A. Walker, 「光合成測定」平知明, 和田野晃 (監修) 旭光通商, 1995.
- 5) K. Padmasree & A. S. Raghavendra, Physiol. Plant. **105** (1999) P.546.
- 6) K. Yoshida, I. Terashima & K. Noguchi, Plant Cell Physiol. **47** (1996) P.22.
- 7) Y.-P. Cen, D. H. Turpin & D. B. Layzell, Plant Physiol. **126** (2001) P.1555.
- 8) P. A. Davey, S. Hunt, G. J. Hymus, E. H. DeLucia, B. G. Drake, D. F. Karnosky & S. P. Long, Plant Physiol. **134** (2004) P.520.
- 9) G. A. Truesdale & A. L. Downing, Nature **173** (1954) P. 1236.

¹² 酸素の常磁性を利用して酸素濃度を測定する。

¹³ 固体電解質ジルコニア素子が高温で酸素イオンに対して伝導性を示す。ジルコニア素子の両側に Pt 電極をつけて加熱し Pt 電極間に酸素分圧差が生じると、両電極間で酸素イオンが移動し起電力が生じる。この性質を利用して酸素濃度を測定する。

¹⁴ 電解液を入れた容器内に陽極側を貴金属 (Au など)、陰極側に卑金属 (Pb など) で電極を構成する。陽極側にとりつけたガス透過性の膜 (隔膜) を拡散透過してきた酸素量に比例した電流が流れる。電流測定により酸素濃度が測定できる。

¹⁵ 蛍光染色フィルムからの蛍光エネルギーが周囲の酸素により減少するという性質を利用し、蛍光エネルギーを光学的に測定する。Clark 型酸素電極と比較して高価だが、非常に細いタイプなど様々なセンサーヘッドを利用できる。Presens 社 (<http://www.presens.de>) や オーシャン オプティクス 社 (<http://www.optosirius.co.jp/OceanOptics/index.html>) が製造している。

¹⁶ AEI Technologies 社 (<http://www.aeitechnologies.com>) 製の S-3A/DOX や Qubit System 社 (<http://www.qubitsystems.com>) 製の S104 Differential Oxygen Analyzer がある。