

# Handy PEA+による Rapid Light Curvesの測定

## 新しいアプリケーション



# Handy PEA+を使ったRapid Light Curves測定 - 新しいアプリケーション

## 概要

Rapid Light Curves(RLC)は、1990年代後半から光合成の研究に使用されており、主にパルス振幅変調(PAM)蛍光光度計が使用されています。このアプリケーションノートでは、非変調型ハンザテック社製Handy PEA+を使用したRLCの測定方法について説明します。M-PEAを用いたRLCの測定については、別のノートで解説しています。

## 光合成研究における光度曲線

光合成の研究において、さまざまな種類のライトカーブが長年にわたって用いられてきました。なぜなら、ライトカーブは植物の現在の光合成活性と潜在的な光合成活性の両方を、さまざまな環境光強度にわたって評価できるからです(Ralph & Gademann 2005)。

P-E曲線(または光合成-照度曲線、図1)は、従来、異なる周囲光強度での酸素発生率の測定から作成されていました(Houliiez et al 2017)。

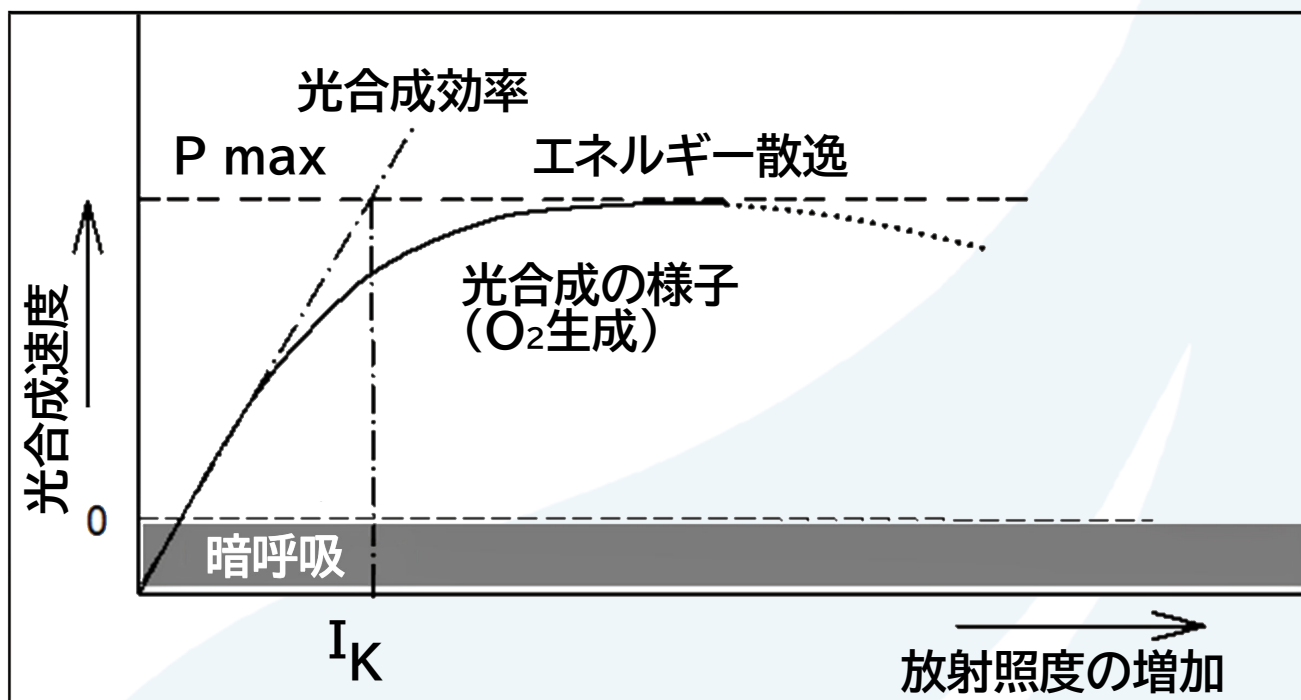


図1. 光-光合成曲線、すなわち光合成速度の放射照度依存性を示す図です。 $\alpha$ 勾配は光合成の最大効率(P-E)を示します。 $\alpha$ 勾配と最大光合成速度Pmaxの交点は光飽和( $I_K$ または $E_K$ )を示し、飽和を超える余剰光エネルギーは散逸します。最適照度を超えると、光合成速度は低下します(光合成曲線の点線部)。この現象は通常、ダウンレギュレーションまたは光阻害と呼ばれます(Masajidek et al.2021より抜粋)。

Steady-state light curves(SSLC)は、電子伝達速度(ETR)を光合成有効光量子束密度(PPFD)の関数としてプロットするクロロフィル蛍光ベースの測定プロトコルで、従来のP - E曲線と同等です(Houliiez et al 2017)。

SSLCは、強度を上げながら数段階の光照射を行い、その間の光合成速度を測定します。各ステップの時間は、そのステップで定常状態の光合成速度を達成するのに十分な長さです。SSLCプロトコルは通常、完了までに数分から数時間かかることがあります。屋外では、時間帯、植物の日周変化、動的な気象条件などの様々な要因を考慮する必要があるため、異なる植物間で結果を比較する際に大きな課題となります(Rascher et al 2000)。

Rapid Light Curves(RLC)は、光合成の全体的なパフォーマンスに加えて、光化学系II(PSII)を通じた電子伝達の飽和特性に関連する詳細な情報を提供するために使用することができます(Ralph & Gademann 2005年)。

RLCは一連の比較的短い(30秒未満、通常は10秒)光ステップで構成されており、光強度は各ステップで増加します。各光ステップには、ETR値を計算する飽和パルスが挟まれます。P-E光合成曲線やSSLCとは異なり、RLCプロトコルは光ステップの間、光合成速度を定常状態にすることはありません。P-E曲線が光のバックグラウンドとは無関係に光合成性能の最適状態を示すのとは対照的に、RLCは光合成性能の現状を示すものです。RLCは定常状態に達しないため、測定までの光馴化状態や長期の光履歴を反映しません(Ralph & Gademann 2005)。

ETRをPPFDに対してプロットすると、RLCには3つの異なる領域が見られます(図2)。

### 1. 光制限領域

光合成速度が低光量によって制限されるのが光制限領域です。パラメータ $\alpha$ は、PPFDに対するETR上昇の傾きを示し、光捕捉効率(有効量子収率、 $\Phi$ PSII)に比例します(Schreiber, 2004)。

### 2. 光飽和領域

この段階では、電子伝達系の容量によって電子伝達速度が制限されます。ETR vs PPFD曲線は、ETRが最大となるプラトーに達します(パラメータ $ETR_{max}$ で示される)(Schreiber, 2004)。 $E_k$ ( $I_k$ と呼ばれることもあります)パラメータで示される最小飽和放射照度は、 $\alpha$ と $ETR_{max}$ の切片を調べることによって決定され(Sakshaugなど、1997)、消光と関連づけることができます。 $E_k$ 以下では光化学消光が支配的ですが、 $E_k$ 以上では非光化学消光が支配的です(Henley, 1993)。

### 3. 光阻害/ダウンレギュレーション領域

この領域では、植物が過飽和光強度にさらされると、ETR vs PPFD曲線はしばしば低下する傾向があり、これは光阻害と関連していると考えられます(Henley, 1993)。この効果は、定常的な光合成速度が得られる従来のP - EやSSLCで発生しやすいと考えられます。しかし、RLCプロトコルでは定常状態が達成されないため、通常、光障害が生じるのに十分な時間がありません。過飽和光強度におけるETRの低下は、PSIIの動的ダウンレギュレーションに関連している可能性が示唆されています(White and Critchley, 1999)。



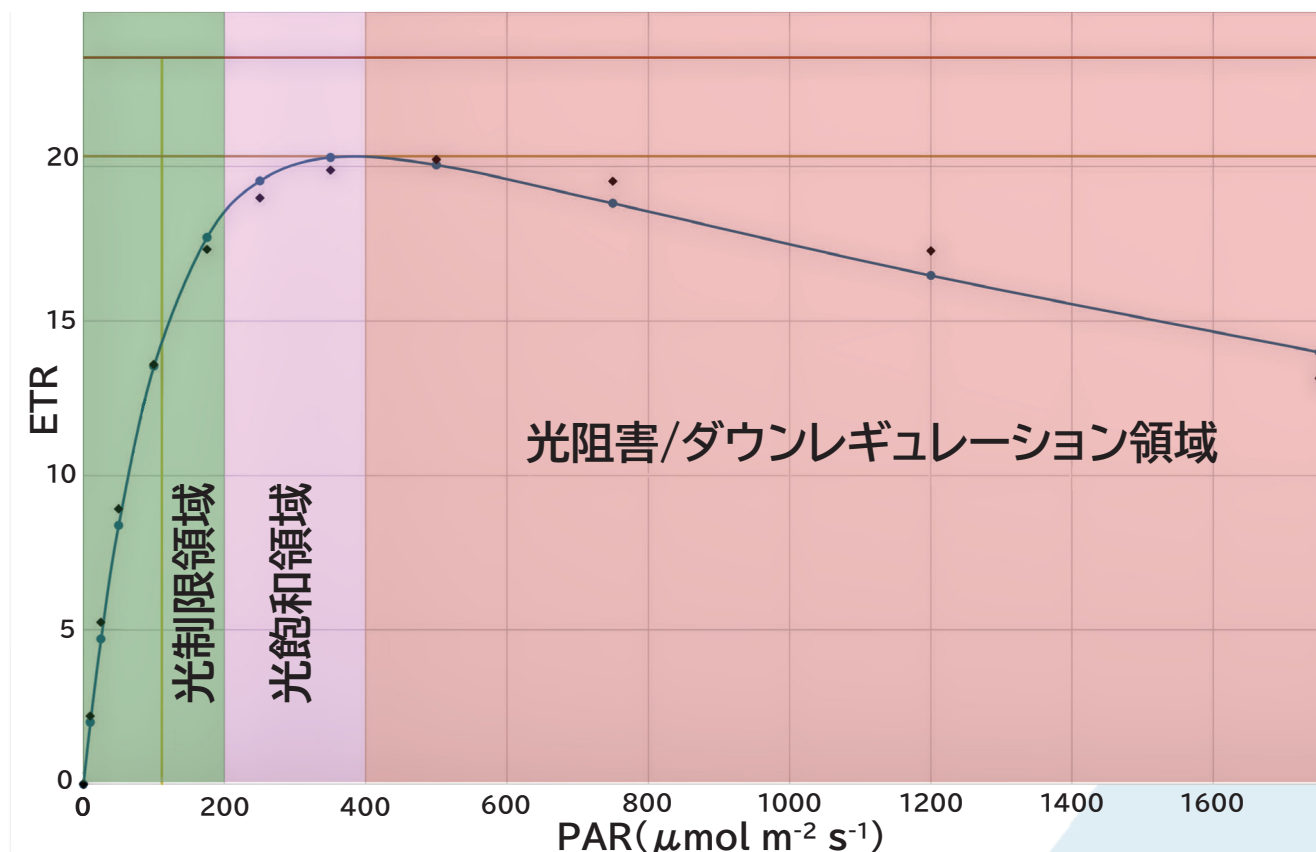


図2. ETRをPPFDに対してプロットすると、RLCは3つの異なる領域、(A) 光制限領域、(B) 光飽和領域、(C) 光阻害/ダウンレギュレーション領域、を示すことができます。

## Rapid Light Curvesの測定

RLCプロトコルは、通常、10秒以内の最初の準暗時間から始まります。これにより、非光化学消光係数を大幅に緩和することなく、一次電子受容体(QA)の急速な再酸化が可能となります(Schreiber, 2004)。これは、例えば高速クロロフィル蛍光誘導の測定で使用される、数分以上の長時間の完全暗順応とは対照的です。完全暗順応の下では、明反応と暗反応が不活性化し、光化学系の完全な再酸化が起こります(Rascher et al 2000)。もしPSIとPSIIの完全な再酸化が起こった場合、RLCプロトコルの光源には誘導効果があり、データの解釈はより複雑になります。



図3. Handy PEA+連続励起式クロロフィル蛍光光度計

暗時間の直後に飽和パルス照射します。その後、段階的に強度を増す光照射が行われ、それぞれ飽和パルスが続きます。アクチニック期間はそれぞれ10秒です。

光照射ステップの強度を理想的に設定すると、前述の3つの領域でそれぞれ数点のデータポイントが生成されます。低光条件下でより効率的に光合成を行うサンプルでは、光制限領域でより多くのデータポイントを測定することが、 $\alpha$ パラメータのより良い推定に有益です。光耐性サンプルの場合、光飽和領域と光阻害領域でより多くのデータポイントを測定することで、より興味深い結果を得ることができます。

## Handy PEA+によるRLCの測定

Handy PEA+ (図3) ソフトウェアプロトコルエディタ、特にプレイルミネーション機能 (図4) は、一般的に非変調蛍光光度計に関連するパラメータとプロトコルを測定するために使用することができます。ΦPSII (またはY(II))、ETR、NPQ、消光分析モデルなど、非変調蛍光光度計に通常関連するパラメータやプロトコルを測定するために使用できます。

ハンザテック社のウェブサイト (Support > Applications) から入手できるサンプルプロトコルを使って、すぐにRLC測定を始めることができます。また、サンプルプロトコルをインストールして修正することもできますし、ゼロからプロトコルを作成することもできます。

命名法について重要な注意事項があります。Handy PEA+ で使用する制御・解析ソフトウェアであるPEA+は、現在、暗順応プロトコルが実行されたことを前提としているため、解析ツールの測定パラメータにはデフォルトで暗順応の命名法が適用されます。

ハンザテック社では、RLCデータの解釈に必要なグラフおよび統計分析を行うためのMicrosoft Excel®のテンプレートを提供しています。Handy PEA+のデータをスプレッドシートにエクスポートした後、表1の情報に従って、命名法を置き換えることができます。

## サンプルプロトコルの使用

1. サンプルRLCプロトコルをPCにダウンロードします
2. Handy PEA+をPCに接続します
3. PCでPEA+のソフトを開きます
4. Handy PEA > Select Com Port メニューオプションから、Handy PEA が接続されているPCのCOMポートを選択します
5. Handy PEA > Protocol Editor メニューオプションから、プロトコルエディタを開きます
6. プロトコルエディタで、メニューからFile > Openを選択します
7. PC上のサンプルプロトコルファイルに移動し、Openをクリックします
8. プロトコルエディターの左側で、Setupボタンをクリックします
9. Multi-Recordingウィンドウ (図4) では、Before Recordingの光源設定で、RLCの光ステップ強度を定義します。理想的な光照射ステップの強度の設定は、前述した3つの領域のそれぞれでいくつかのデータポイントを生成します。低照度下で効率的に光合成を行うサンプルでは、より低い光強度でより多くのステップを定義することが、 $\alpha$ パラメータのより良い推定に有益です。高光耐性サンプルの場合、より高い光強度、そしてより多くのアクチニックスステップを定義することで、より興味深い結果を得ることができます
10. プロトコルエディターウィンドウの左側で、Uploadボタンをクリックします

11. Handy PEAの利用可能なプロトコルスロットを選択し、受諾します。
12. Handy PEAの装置メニューからプロトコルを選択して実行します(下記の「RLCプロトコルの実行」を参照)。

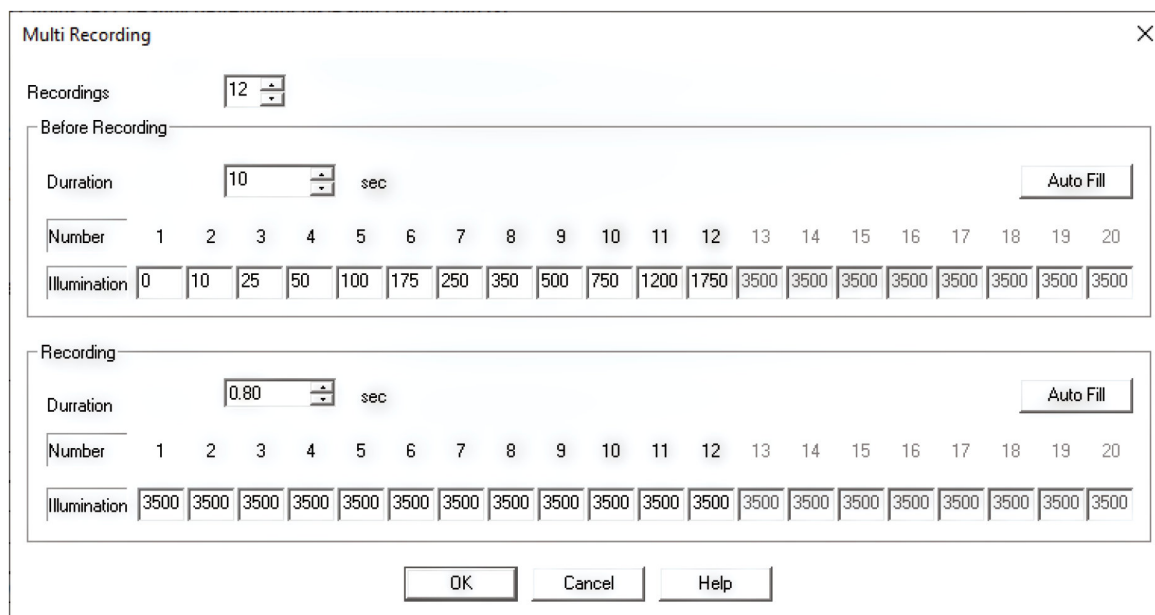


図4. PEA+ Protocol EditorのMulti-Recordingウィンドウに、サンプルプロトコルから読み込まれた設定が表示されています。ウィンドウの「Before recording」エリアでの設定は、個々のアクチニクライトステップの光強度を定義しています。

## RLCプロトコルをゼロから定義

PEA+ソフトウェアでRLCプロトコルを定義するには、以下の手順で行ってください。

1. PEA+ ソフトウェアから、Handy PEA+ プロトコルエディタを開きます
2. Title ボタンをクリックし、プロトコルの名前を設定します
3. プロトコルのゲインを適切なレベルに調整します。このレベルはサンプルによって異なり、プロトコルでオートゲインを有効にするか、RLCプロトコルを作成する前に適切なゲイン設定を決定する必要があります(詳細についてはHandy PEA+のマニュアルを参照してください)
4. プロトコルエディタウィンドウの左側にあるコントロールメニューから、設定を「Multi Recording」に切り替え、RLCに必要なレコーディング数(この場合、アクチニクステップ)を選択します
5. 「Before Recording」の持続時間設定を30秒未満(10秒を推奨)に設定します
6. 準暗時間の設定は、1番の照度設定を「0」のままとします
7. 後続の照明ボックスでは、先に述べたすべての領域をカバーするように、一組の光照射強度を定義します。例えば、10、25、50、100、175、250、350、500、750、1200、1750のような一連の光量ステップは、低光量/日陰の植物には十分です。高光量耐性植物の場合、この範囲の高い光量ステップは過飽和ではない場合があり、より高い光強度を選択する必要があります
8. 記録時間を1秒に設定します

- すべての光源設定を  $>3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (または Handy PEA+ が許容する最高値) に設定します
- プロトコルを Handy PEA+ コントロール ユニットにアップロードします

## RLC プロトコルの実行

- Handy PEA+ で、プロトコルメニューに移動し (System > Protocol を選択するか、直接画面にアクセスするには、1 > 2 > OK を押します)、アップロードされたプロトコルを選択して設定を表示します
- リセットキーを押してメインメニューに移動します
- System > Configure > More.. を選択し、Warnings を No に設定して、測定の警告設定を無効にします。最初の飽和パルス測定に続いて、その後の測定の一部またはすべては、低い  $F_m$  および  $F_v/F_m$  値となります。これは予想されることなので、測定に関する警告は必要ありません
- ID入力、ゲイン、自動保存などの他のすべての設定が要件に従って構成されていることを確認します。詳細については、Handy PEA+ のマニュアルを参照してください
- 必要なサンプルに Handy PEA+ 暗順応リーフクリップを付けますが、シャッターを閉じないでください。これは、光化学系の完全な再酸化がRLCに誘導効果をもたらし、データの解釈をより複雑にするためです (Rascher et al., 2000)
- Handy PEA+ センサーをリーフクリップに取り付け、サンプルの長時間の暗順応を避けるためにできるだけ早く測定を開始します
- 完了したら、Handy PEA+ をPCへ接続し、記録されたファイルをダウンロードします

## RLC データの分析

前述のように、PEA+ ソフトウェアはデフォルトで完全な暗順応が実行されていると想定し、それに基づいて命名法を適用します。RLCプロトコル中にキャプチャされたデータは、光に適応したサンプルからのものです。したがって、プロトコル中に行われた各測定について、PEA+ に表示されるパラメーターは、以下の表1に示すよう、再ラベル付けを行う必要があります。

PEA+ ソフトウェア デフォルトパラメーター	RLCプロトコルで測定される パラメーター
Fo	F
Fm	Fm'
Fv	Fv'
Fv/Fm	$\phi$ PS II

表1. Handy PEA+ で作成した RLC パラメータとデフォルトパラメーターの対照表



PEA+ソフトウェアには、現在、RLCデータの解釈に必要なグラフや統計解析機能はありません。しかし、ハンザテック社では、Handy PEA+のデータを書き換えることができるMicrosoft Excel®のテンプレートを提供しています。

RLCテンプレートは、Handy PEA+で収集した生データからPlattら(1980)の方程式を使用して曲線をモデル化します。このテンプレートは、Excel®内でSolverアドインを有効にする必要があります(Solverを有効にする方法の詳細については、[このリンク](#)を参照してください)。Solverアドインは、Sum of the Squared estimate of Errors (SSE)を最小化するGRG非線形法を用いて最適解/適合を計算するために使用されます。

テンプレートには、参考のためにいくつかのRLC解析ワークシートのサンプルが含まれています(図5)。

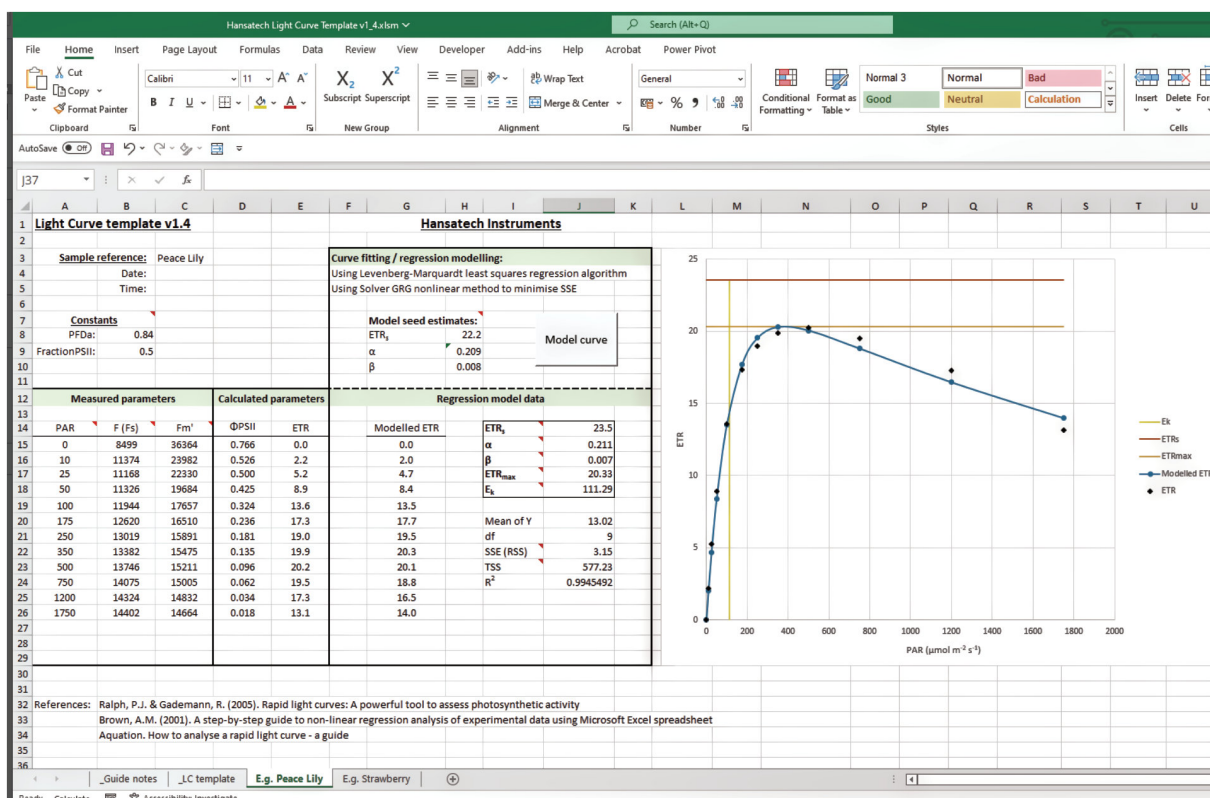


図5. Rapid Light Curves Excel®テンプレートでは、PPFDIに対する電子伝達速度のプロットにより、Handy PEA+からのデータを分析することができます。Solverアドインは、残差二乗和(SSE)を最小化するGRG非線形法を用いて最適解/適合を計算し、ETR、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、ETR<sub>max</sub>およびE<sub>k</sub>の最適適合値を計算するために使用されます。

テンプレートは、ハンザテック社のウェブサイトのSupport > Applicationsのページからダウンロードできます。以下のガイドラインは、PEA+ソフトウェアからRLC Excel®テンプレートへのデータ移行の説明です。PEA+の特定のコマンドと機能については、Handy PEA+のマニュアルを参照してください。

1. RLCプロトコルのすべての測定記録がPEA+のSummaryタブでハイライトされていることを確認します。
2. Parametersタブを開き、パラメータFoおよびFmが表示されていることを確認します。表示されていない場合は、Tools > 'Parameter View' Parametersメニューオプションで有効にすることができます。



3. 空のRLCテンプレートシートを、モデル化したい各データセットの新しいワークシートにコピーします
4. PEA+の最初の測定におけるFo値をセルC15に入力します(Fの下)
5. PEA+の最初の測定におけるFm値をセルD15に入力します(Fm'の下)
6. PEA+ Settingsタブで、“P. Light”の欄(最初のステップでは0である必要あり)からPAR値を取り、セルB15に入力します(PARの下)。PEA+でPAR値が表示されない場合は、ウィンドウ左側の“Ip”チェックボックスで“P. Light”列を押してください
7.  $\Phi$ PSIIとETRの値は自動的に計算されます。ETRはセルB8、B9で定義された定数を用いて計算されます。PFDaとFractionPS IIはそれぞれ0.84と0.5のデフォルト値(Baker、2008)に設定されていますが、必要に応じて書き換えをすることが可能です
8. 16行目以降の残りの測定値について、すべての $\Phi$ PSIIとETRの値が計算されるまで、F、Fm'、PARの値を入力します
9. “Plot”ボタンをクリックして、Solverを実行します。これにより、SSEが最小化され、カーブが生成されます。ETR、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、ETR<sub>max</sub>、E<sub>k</sub>のベストフィット値が計算されます

## ハンザテックインスツルメンツ社

ハンザテックインスツルメンツ社は、英国にある科学機器メーカーです。45年以上にわたって、細胞呼吸や光合成の分野で教育や研究を行うための高品質な機器の設計と製造に力を注いできました。現在では、世界100カ国以上で様々なプログラムに使用され、品質、信頼性、価格性能で高い評価を得ています。

### ハンザテック製品

ハンザテックの製品は、光合成と細胞呼吸の分野における幅広いアプリケーションをカバーしています。クラーク型ポーラログラフィック酸素センサーをベースとした酸素測定システム、連続励起およびパルス変調測定技術に対応したクロロフィル蛍光測定システム、サンプルのクロロフィル含有量を測定する光学機器などを製造しています。

### サポート

ハンザテックの製品をご購入頂いたお客様には、継続的なサポートと迅速で効率的な対応をお約束します。サポートは、直接、または当社のグローバルな代理店ネットワークから受けることができます。また、サポートチケットシステムへのアクセスも可能です。機器のマニュアルやソフトウェアのアップグレードを提供します。



## 参考文献

- BAKER NR. (2008)クロロフィル蛍光:生体内光合成のプロープ  
植物生物学年報 59, 89-113
- HENLEY WJ(1993)藻類における光合成光応答曲線の測定と解釈:  
光阻害と日周変化との関連 J Phycol 29:729-738
- HOURIEZ, E., LEFBVRE, S., LIZON, F., SCHMIT, F.G., (2017)  
急速光度曲線(RLC)または非連続定常光度曲線(N-SSLC):  
どの蛍光剤ベースの光反応曲線手法が植物プランクトンの光合成  
活性と馴化状態を強固に特徴づけるか?  
Mar Biol (2017) 164:175
- Masojídek, J.; Ranglová, K.; Lakatos, G.E.; Silva  
Benavides, A.M.; Torzillo, G. (2021)  
微細藻類大量培養における光合成と成長を支配する変数プロセス  
9, 820
- PLATT, T., GALLEGOS, C.L., HARRISON, W.G. (1980)  
海洋植物プランクトンの自然群における光合成の光阻害現象  
J. Mar. Res., 38: 687-401
- RALPH, P.J. & GADEMANN, R. (2005)  
急速光度曲線:光合成能力を評価する強力なツール  
Aquat. Bot., 82: 222-237.
- RASCHER, U., LIBIG, M., LUTTGE, U., (2000)  
ポータブルクロロフィル蛍光光度計で得られたクロロフィル蛍光  
パラメーターの瞬間光応答曲線のフィールドでの評価  
Plant Cel Environ. 23, 1397-1405.
- SAKSHAUG, E., BRICAUD, A., DANDONNEAU, Y.,  
FALKOWSKI, P.G.,KIEFER, D.A., LEGENDRE, L.,  
MOREL, A., PARSLOW, J., TAKAHSHI,M. (1997)  
光合成のパラメーター: 定義、理論、結果の解釈  
J Plankton Res 19:1637-1670
- SCHREIBER U (2004)  
パルス振幅変調(PAM)蛍光光度計と飽和パルス法:概説  
In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) クロロフィル蛍光:  
光合成のサイン、vol 19.  
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 279-319
- White AJ, CRITCHLEY, C.(1999)  
高速光度曲線: 光合成装置の状態を評価するための新しい蛍光法  
Photosynth. Res., 59, 63-72.