

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2007年度～2009年度

課題番号：19570025

研究課題名(和文) 個葉の温度環境への順化・適応機構に果たす葉内CO<sub>2</sub>拡散過程の役割の解明

研究課題名(英文) Implications for leaf internal diffusion conductance to photosynthetic adaptation for temperature.

研究代表者 坂田 剛 (Sakata, Tsuyoshi)

北里大学・一般教育部・助教

研究者番号：60205747

研究成果の概要(和文)：

1：大気圧の低下、葉内のCO<sub>2</sub>拡散コンダクタンスの低下、葉内の活性化しているルビスコ量の増大により、個葉光合成の最適温度は低下することがシミュレーション解析によって明らかになった。2：高山の低温環境に生育するイタドリ個体群と低地の高温環境に生育するイタドリ個体群を比較した結果、ルビスコの酵素化学的性質の温度依存性には違いが見られなかった。3：個葉光合成の最適温度は低温個体群で約5℃低く、この最適温度調節に活性化したルビスコの量が主に関わっていることが示された。4：葉内拡散コンダクタンスに、両個体群間で顕著な違いは見られなかったが、いずれも高温時に増加する傾向が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

1: We showed that the low atmospheric pressure, low internal conductance for CO<sub>2</sub>, and large amount of activated Rubisco cause drop in an optimum temperature for leaf photosynthesis using the simulation analysis. 2: We didn't detect any difference of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of Rubisco between a low temperature population growing at a high altitude and a high temperature population growing at a low altitude. 3: The low temperature population showed the optimum temperature for leaf photosynthesis as low as 5°C than the high temperature population. We showed this adaptation was mainly caused by the differences in the amount of activated Rubisco at high temperature. 4: There was not significant difference in the internal conductance, which increased at high temperature, between the populations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科：基礎生物学

科研費の細目：生態・環境

キーワード：ルビスコ、高標高、低大気圧、光合成、葉内拡散コンダクタンス

## 1. 研究開始当初の背景

本課題の目的は、植物の温度順化・適応の重要な要素である個葉光合成の最適温度調節のメカニズムを明らかにすることである。個葉光合成の最適温度は植物の生育温度と一致するよう調整され、植物がそれぞれの生育温度で効率的な光合成生産を行うことに役立っている(Berry & Björkman 1980; Yamori et al. 2005)。光合成の温度依存性にはルビスコ (CO<sub>2</sub>を同化する酵素)の活性と、その基質である RuBP 再生速度のバランスが関係することがすでに示されている(Hikosaka 1999 など)。

一方で、個葉光合成には、葉内空隙から葉緑体内部までの CO<sub>2</sub> 拡散過程が大きな影響を与え、光合成の主要な量的制限要因のひとつであることもしめされてきた(例えば Evans et al. 1986)。近年、申請者らは、葉内の CO<sub>2</sub> 拡散が光合成の大気圧依存性に影響を与えることを明らかにし(Sakata & Yokoi 2002)、葉内の CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンスが小さいと低大気圧下で光合成が強く抑制されることを示唆した。申請者は前述の研究過程で、葉内部の CO<sub>2</sub> 拡散が気相と液相という温度依存性の異なる二つのプロセスから構成されていることに着目し、葉内 CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンスが、さまざまな温度依存性をもちうることを見出した。この温度依存性の変化を通じ、個葉光合成の最適温度は変化することが予想される。実際、高山の低温環境に生育する植物は葉内 CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンスが低地の植物に比べて低い例が示されており、低温環境下への個葉光合成の順化に葉内の CO<sub>2</sub> 拡散過程が一定の役割を果たしている可能性がある。加えて、近年、細胞膜表面の水チャンネルタンパク質、アクアポリンの量が葉内 CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンスに影響することも示された(Hanba et al. 2004)。したがって、アクアポリンの量を調節することによって葉内拡散コンダクタンスを変化させ、個葉光合成の最適温度を調整している可能性も指摘することができる。

以上の背景を元に、申請者は「個葉光合成の温度順化に葉内 CO<sub>2</sub> 拡散過程が主要な役割を果たしている」という仮説を持つにいたった。

## 2. 研究の目的

本課題の目的は、「個葉光合成の温度順化に葉内 CO<sub>2</sub> 拡散過程が主要な役割を果たしている」という仮説を検証することである。そのために、まず、1) 葉内拡散コンダクタンスが個葉光合成の最適温度に与える影響を理論的手法と実験的手法の両方を用いて明らかにする。そのため、これまでに申請者らの開発した個葉光合成モデル(Sakata & Yokoi 2002)を改良し個葉光合成の温度依存性のシミュレーション解析を行う。その上で、2)生育温度が異なる植物を用いて光合成最適温度の調節に葉内の CO<sub>2</sub> 拡散過程が果たしている役割を明らかにする。そのため、異なる生育温度条件下に生育する植物野外個体群間で光合成最適温度と葉内 CO<sub>2</sub> 拡散過程を比較する。

### 3. 研究の方法

#### [個葉光合成モデルの検討]

葉内コンダクタンスとパラメータを持つ 個葉光合成モデルを、光合成の温度依存性の解析に用いることができるかどうか検討を行うため、最初に本研究課題で材料に用いる高標高イタドリ個体群の光合成速度が低大気圧によって受ける影響を様々な葉内拡散コンダクタンスを想定したシミュレーション解析によって行った。ついで、温度変化が光合成速度に及ぼす影響を同様にシミュレーション解析し、光合成速度の大小やその温度依存性に葉内コンダクタンスや生育大気圧が及ぼす影響を明らかにした。これらの結果から光合成の最適温度を決める要因のひとつとして葉の内部での CO<sub>2</sub> 拡散過程が果たす役割を考察した。

#### [材料と調査地]

測定材料には、申請者らがこれまでにいくつかの研究で材料に用いてきた、タデ科の多年生草本イタドリを用いる。生育温度の異なる、二つのイタドリ個体群である神奈川県の北里大学キャンパス内の個体群（高温個体群）および、富士山五合目付近の個体群（低温個体群）を用い、後述する各種測定を行った。両個体群のシュートを夜明け前に採取・水切りし、暗黒下・生育温度条件下で研究室に持ち帰り下記の測定を行った。

両調査地にはデータロガー（HOBO マイクロステーション H21-002）を設置し、気温の季節変化を測定した。申請旅費は、主に富士山五合目付近での調査のために使用した。

#### [個葉光合成の温度依存性に及ぼす葉内拡散コンダクタンスの影響の実測]

前述したイタドリの二個体群の光合成最適温度を比較し、その違いに、葉内の CO<sub>2</sub> 拡散のしやすさ（コンダクタンス）が及ぼしている影響を明らかにする。測定には申請者らが過去に開発した実験方法(Sakata & Yokoi 2002)を用いた。酸素一室素濃度を 4 段階に調整したボンベからのガスを適切な湿度まで加湿した後に、光合成蒸散測定装置（Licor 6400, Li-Cor, Lincoln, NE）に供給し葉のガス交換速度の測定を行った。さらに、イタドリの葉の周辺の CO<sub>2</sub> 濃度を Li-6400

によって制御し、 $A_n-C_i$  反応曲線を 4 段階の  $O_2$  濃度条件下で測定した。この測定を葉温 10, 17, 24, 30, 35°C の 5 段階で行い、両型のイタドリの光合成能力と葉内拡散コンダクタンスの温度依存性を比較した。測定した結果を後述する個葉光合成モデルを用い、葉内の  $CO_2$  拡散過程が生育温度への適応に果たしている役割を解析した。測定の終了した葉を、**disk** 状に打ち抜いた後、即座に液体窒素で凍結し、-80°C ディープフリーザー（現有）中に保管した。

この葉 **disk** サンプルを用い、光合成の鍵酵素であるルビスコの活性を Sakata & Yokoi (2002) の方法を改良し測定した。得られたルビスコの酵素特性と個葉レベルの光合成特性を比較し、その違いが葉内の  $CO_2$  拡散過程によって説明できるかどうか、前述の個葉光合成モデルによって検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 個葉光合成のモデルによる解析

##### 4-1-1. 個葉光合成モデル

本研究課題では、葉に光が十分に当たり、かつ通常大気 CO<sub>2</sub> 濃度条件下での光合成速度を取り扱う。従って、光合成速度が ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (以下、ルビスコ) のカルボキシレーション速度によって制限されている状態をモデル化するため、Farquhar et al. (1980) の個葉光合成の数学モデルを発展させた以下のモデルを作成した。

$$A_n = E(V_c - 0.5V_o) - R_d$$
$$= E\left(\frac{V_{cmax}C_e}{C_e + K_c(1 + O_e/K_o)} - 0.5\frac{V_{omax}O_e}{O_e + K_o(1 + C_e/K_c)}\right) \cdot \frac{1}{60} - R_d \quad (1)$$

ここで、 $V_c$  と  $V_o$  ( $\mu\text{mol mg Rubisco}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) は、ルビスコによるカルボキシレーション速度とオキシゲネーション速度を表し、 $V_{cmax}$  と  $V_{omax}$  ( $1.77$  と  $0.58 \mu\text{mol mg Rubisco}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) はそれぞれの最大速度、 $K_c$  と  $K_m$  ( $8.0$  と  $335 \mu\text{M}$ ) は CO<sub>2</sub> と O<sub>2</sub> に対するミカエリス定数を表している。それぞれの定数は、Makino et al. (1988) がイネを材料に決定した値を用いた。 $C_e$  と  $O_e$  ( $\mu\text{M}$ ) は葉緑体ストロマ中のルビスコ近傍における CO<sub>2</sub> 及び O<sub>2</sub> の濃度をあらわし、 $R_d$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) と  $E$  ( $\text{mg m}^{-2}$ ) は明条件下でのミトコンドリア暗呼吸速度と、葉の中で活性化しているルビスコの量をあらわしている。

$C_e$  は以下の式で表すことができる。

$$C_e = C_{i^*} - 60 \frac{A_n}{g_i} \quad (2)$$

ここで、 $C_{i^*}$  ( $\mu\text{M}$ ) は葉内空隙の CO<sub>2</sub> 濃度と平衡した液層での CO<sub>2</sub> 濃度をあらわし、 $g_i$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1} (\mu\text{M CO}_2)^{-1}$ ) は、葉内空隙からルビスコ近傍までの CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンスを現している。気孔による大気から葉内空隙までの CO<sub>2</sub> 拡散の制限は、常に一定であると仮定し、大気と  $C_i$  の CO<sub>2</sub> 濃度比は 0.75 とした (Yoshie 1986)。一方、ルビスコ近傍の O<sub>2</sub> 濃度は、大気 O<sub>2</sub> 濃度と平衡であると仮定した。気相の CO<sub>2</sub> と O<sub>2</sub> の液相への溶解度は Edwards and Walker 1983 に従った。

また、大気圧  $P$  (kPa) は、Percy (1989) に従い、標高  $Z$  (m) から

$$P = 101.325 (1 - 0.000022569 Z) 5.2553 \quad (3)$$

として求めた。

大気中の CO<sub>2</sub>濃度と O<sub>2</sub>濃度がそれぞれ 360 μmol mol<sup>-1</sup>と 0.21 mol mol<sup>-1</sup>の時の光合成速度  $A_{n360}$ は  $R_d$ が 0.1 μmolmol<sup>-1</sup>Rubisco s<sup>-1</sup>であると仮定し、式(1)~(3)によって求めた。

#### 4-1-2. 低大気圧が、葉温 25°Cにおける $A_{n360}$ に与える影響

本研究課題では低温生育個体群として、富士山の五合目（標高 2250 m）に生育するイタドリを材料に用いる。まず、低大気圧が光合成速度  $A_{n360}$ に与える影響のみを評価するため、4-1-1で作成したモデルを用い、葉温 25°Cにおける  $A_{n360}$ のシミュレーション解析を行った。研究代表者らのこれまでの研究（Sakata and Yokoi 2002）によって、富士山の五合目（標高 2250 m）に生育するイタドリおよび、低地のイタドリの葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  はそれぞれ  $560 \pm 190$  と  $1280 \pm 360$  (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> (μMCO<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>)であることが明らかになっている。また、過去に報告された  $g_i$  の値の多くは、100 から 1300 (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> (μMCO<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>)の範囲であることから(図1)、シミュレーション解析に用いる、 $g_i$ の範囲は、75 から 1200(μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> (μMCO<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>)とし、それに加え、葉内の CO<sub>2</sub> 拡散による光合成制限がないと仮定した  $g_i = \infty$  の条件での解析を行った。



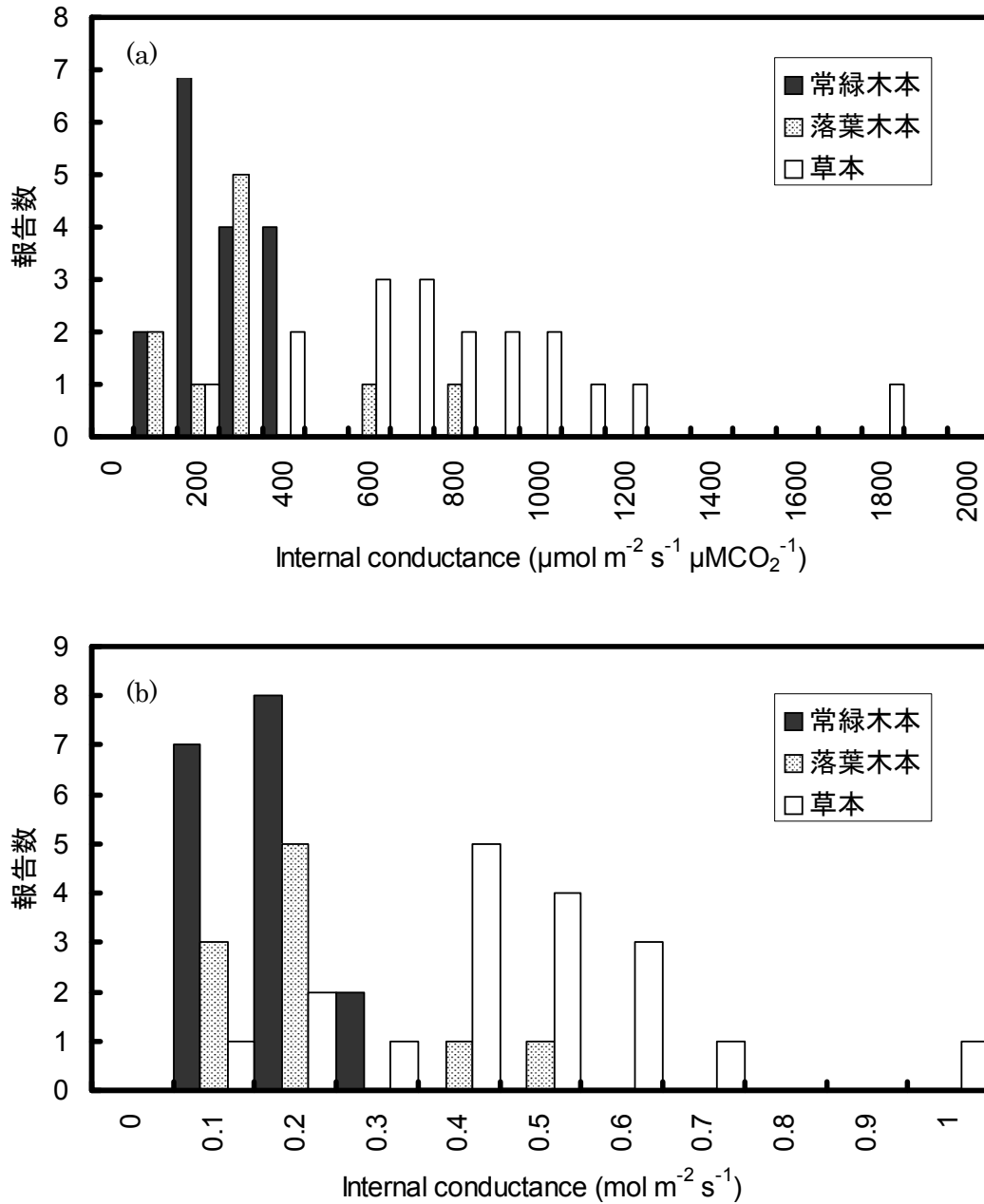


図 1. 過去に報告された葉内拡散コンダクタンス  $g_i$

過去に、Loreto et al. 1992、Lloyd et al. 1992、Loreto et al. 1994、Epron et al. 1995、Scartazza et al. 1998、Hanba et al. 1999、Lauteri et al. 1997、Kogami et al. 2001、Hanba et al. 2004 によって、報告された葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  を生活形で分類し集計した結果。(a)と(b)は、報告された値を 25°Cの水への  $\text{CO}_2$ の溶解度を用いて互いに変換を行った。

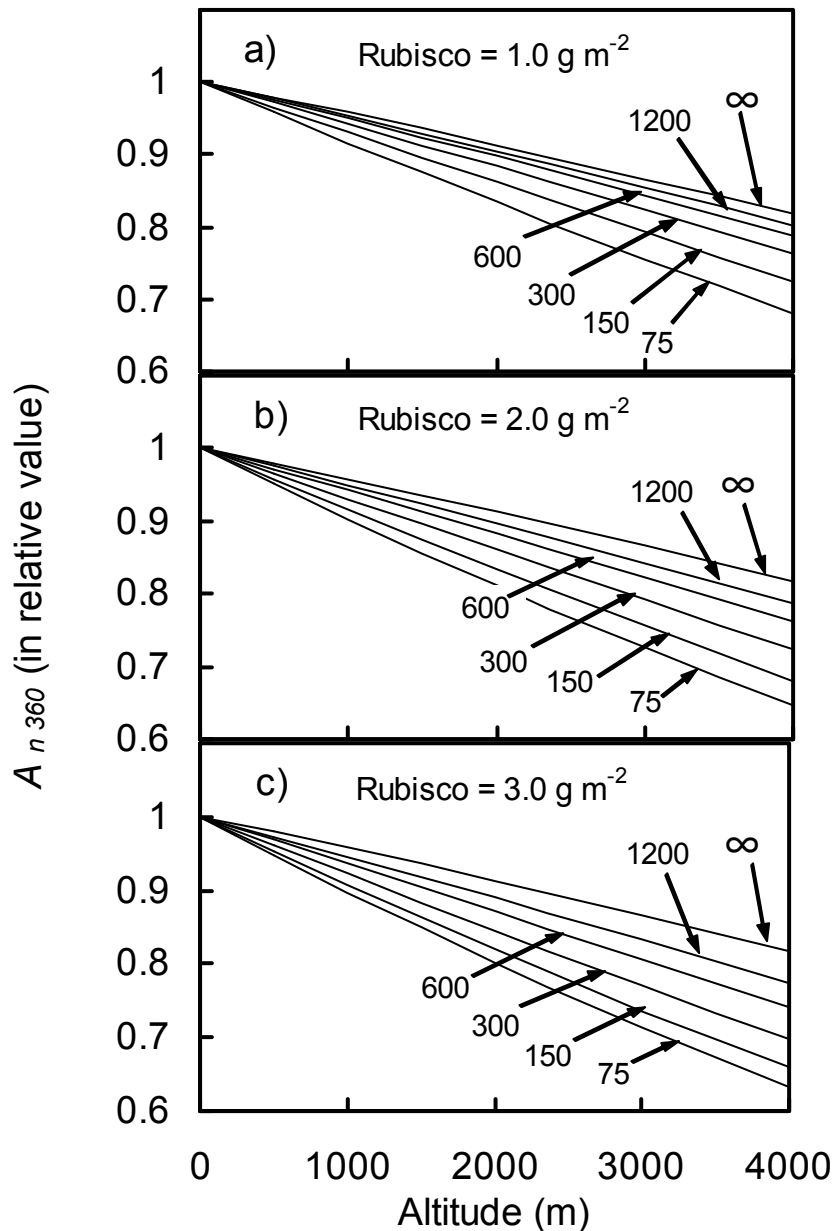


図2. 低大気圧がおよぼす個葉の光合成速度  $A_{n360}$  への効果

大気中の  $\text{CO}_2$  濃度と  $\text{O}_2$  濃度がそれぞれ  $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$  と  $0.21 \text{ mol mol}^{-1}$  の時の個葉光合成速度  $A_{n360}$  に高標高の低大気圧が及ぼす効果。4-1-1 で作成したモデルを用い任意の標高における葉温が  $25^\circ\text{C}$  の時の  $A_{n360}$  を数値シミュレーションした結果。各標高における  $A_{n360}$  は標高 0 m における  $A_{n360}$  に対する相対値で表した。各図中の複数のラインは、それぞれ葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ min}^{-1} (\mu\text{MCO}_2)^{-1}$ ) が矢印で示された値で数値シミュレーションした結果を表す。(a) 葉の中の活性化したルビスコの含量  $E = 1.0 \text{ g m}^{-2}$  の場合。b)  $E = 1.0 \text{ g m}^{-2}$  の場合。c)  $E = 3.0 \text{ g m}^{-2}$  の場合。

その結果、どの条件下でも標高が高くなり大気圧が低下すると、個葉光合成速度は抑制されることが予測された（図2）。大気圧が減少すると大気中の  $O_2$  分圧が低下しルビスコによるリブローズビスリン酸 (RuBP) のオキシゲネーション反応が抑制され、光合成能力は上昇する。しかし、同時に低大気圧によって  $CO_2$  分圧も減少し、RuBP のカルボキシレーション反応も抑制される (Terashima et al. 1995)。図2の結果は、葉のルビスコ含量や葉内拡散コンダクタンスがどのような条件であっても、低大気圧下ではカルボキシレーション反応の抑制のほうが、オキシゲネーション抑制よりも光合成速度に大きく影響することを示している。この予測は、Terashima et al. 1995 や Sakata and Yokoi 2002 らの測定結果と矛盾しない。

また、 $g_i$  が無限大で葉内での  $CO_2$  拡散過程を無視した場合には、活性化しているルビスコの含量  $E$  に関わらず、一定の割合の光合成速度抑制が発生することも示された。例えば、本研究課題で材料に用いた高地のイタドリが生育する標高 2250 m の場合、 $E$  に関わらず、標高 0 m で光合成に対して 0.90 まで、光合成速度が低下することが予測された。

一方、現実の葉を想定した  $g_i$  が有限値の場合には、 $g_i$  が低い葉ほど、高標高での光合成速度抑制はより顕著になることが示された。さらにその抑制は、 $E$  が多くなるとさらに大きくなることも示された。

$g_i$  が小さい葉（葉内における  $CO_2$  拡散過程がより制限的な葉）、 $E$  が大きい葉（葉の面積辺りのカルボキシレーション能力が高い葉）、いずれの場合にもルビスコ周辺の  $CO_2$  分圧は大気中より顕著に低下している。このルビスコ周辺の  $CO_2$  分圧の低下によって、高標高での光合成速度抑制はより顕著になることが明らかになった。

#### 4-1-3. 低大気圧および葉内 CO<sub>2</sub> 拡散過程が $A_{n360}$ の温度依存性に与える影響

低大気圧および葉内のCO<sub>2</sub> 拡散過程が $A_{n360}$  の温度依存性に与える影響を評価するため、4-1-1 で作成したモデルを用いて数値シミュレーション解析を行った。シミュレーションに用いるルビスコの酵素化学的パラメータ  $V_{Cmax}$ 、 $V_{Omax}$ 、 $K_C$ 、 $K_O$  は、Jordan and Ogren 1984 がホウレンソウを材料に決定したデータに基づき温度依存性を推定した (図3)。

図4は  $A_{n360}$  の温度依存性に及ぼす低大気圧とおよび葉内の CO<sub>2</sub> 拡散過程の影響を数値シミュレーションした結果である。25°Cにおける  $A_{n360}$  は標高が高くなり気圧が低下するにつれて低下することが、図2で示されているが、この傾向は25°C以外の温度でも維持されていた (図4-a)。また、気圧の低下がもたらす  $A_{n360}$  の低下は、高温時により顕著であった。したがって、各標高における  $A_{n360}$  が最大になる温度、すなわち光合成の最適温度は、気圧が低下するとより低温にシフトすることが示された。

また、同一の気圧条件下 (標高 100 m) であっても、葉内の CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンス  $g_i$  が異なると、 $A_{n360}$  の最適温度に違いが見られることも示された (図4-b)。 $g_i$  が有限の値をもつ現実の葉は  $g_i = \infty$  を仮定した葉に比べ、いずれの温度においても  $A_{n360}$  は小さくなるが、その違いは高温側でより顕著になり、光合成の最適温度は  $g_i$  が小さい葉ほど低温側にシフトしていることが示された。すなわち、 $g_i$  の小さな葉は、光合成速度が低いことに加え、最適温度が低い特徴を持つことが予想された。

さらに、同一の気圧条件 (標高 100 m) であっても、葉が含む活性化したルビスコの量  $E$  が異なると、 $A_{n360}$  の最適温度に違いが見られることも示された (図4-c)。 $E$  が小さな葉に比べ、大きな葉はいずれの温度においても、 $A_{n360}$  は大きかった。 $E$  の小さな葉と大きな葉の間の  $A_{n360}$  の違いは、高温側でより顕著になり、光合成の最適温度は  $E$  の大きな葉ほど低温側にシフトすることが示された。

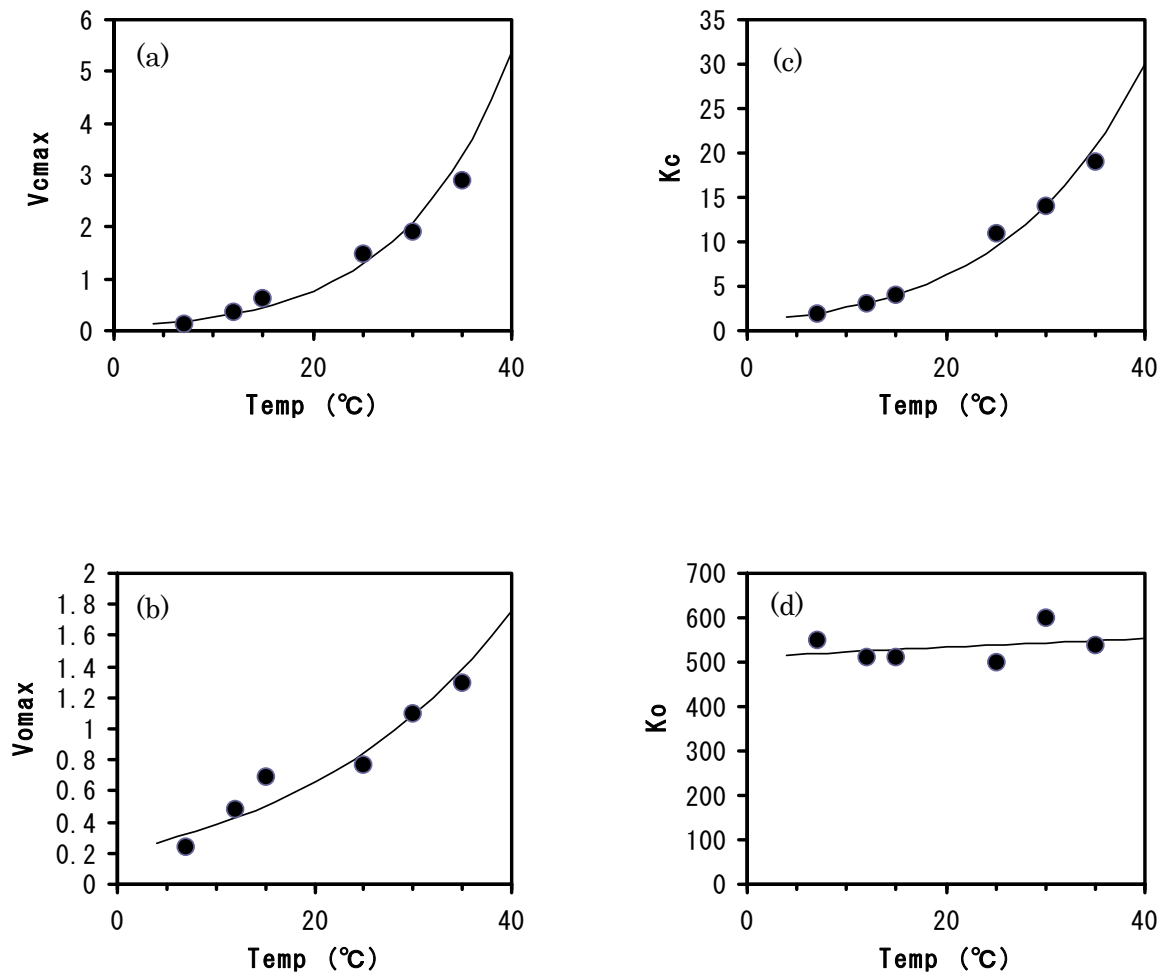


図3. シミュレーション解析に用いたルビスコの酵素化学的パラメータの温度依存性

ハウレンソウを材料に生化学的手法によって決定されたルビスコの酵素化学的パラメータ。回帰曲線は、各パラメータは、式： $\exp(c - \Delta H / RT)$  によって回帰した ( $R = 0.0821$ )。

(a)  $V_{Cmax}$  ( $c = 30.236, \Delta H = 734.18$ )、(b)  $V_{Omax}$  ( $c = 14.99, \Delta H = 370.95$ )

(c)  $K_C$  ( $c = 26.389, \Delta H = 591.02$ )、(d)  $K_O$  ( $c = 6.854, \Delta H = -13.82$ )

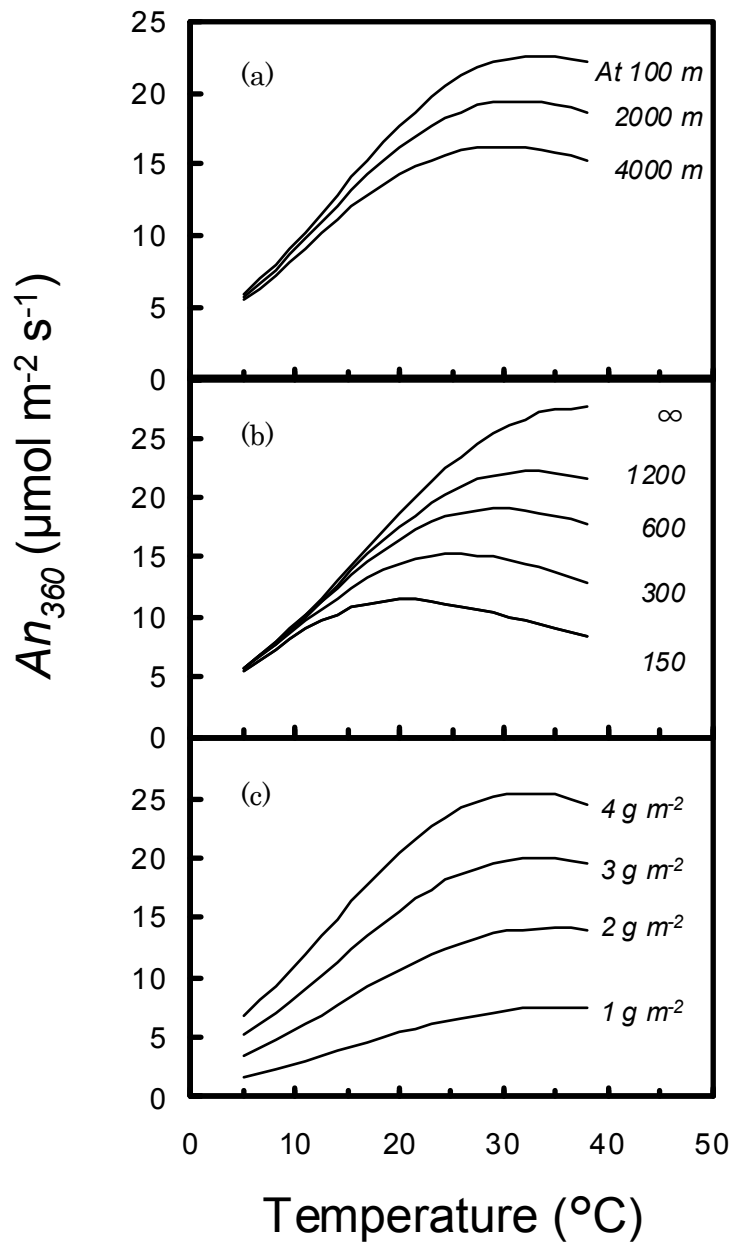


図 4. 個葉の光合成速度  $A_{n360}$  の温度依存性の数値シミュレーション解析

$A_{n360}$  の温度依存性に及ぼす、(a) 高標高での低大気圧、(b) 葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  および、(c) 葉に含まれている活性化したルビスコの量  $E$  の影響。それぞれの、図中の線は各パラメータが標記の値の場合に示す  $A_{n360}$  の温度依存性を表す。各図で個別に指定していないパラメータはそれぞれ、標高 = 100 m、 $E = 3.4 \text{ g m}^{-2}$ 、 $R_d = 0.2E$ 、 $g_i = 1300 \text{ (}\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ (}\mu\text{MCO}_2\text{)}^{-1}\text{)}$  である。ルビスコの酵素化学的性質の温度依存性は Jordan and Ogren 1984 に基づいた図 3 に従った。

#### 4-1-4. 高山に生育する植物の $A_{n360}$ の温度依存性

図1で示したように、葉内の  $\text{CO}_2$  拡散コンダクタンス  $g_i$  の値は、植物の生活形との関連が認められ、草本植物に比べ木本植物、特に常緑の木本植物で小さい傾向が認められる。本研究課題で材料に用いたイタドリは、落葉性多年生草本であり、低地に生育するイタドリの  $g_i$  は  $1280 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ min}^{-1} (\mu\text{MCO}_2)^{-1}$  と草本植物の中でも最も  $g_i$  が大きい植物のひとつであるといえるだろう (Sakata and Yokoi 2002)。一方、低温に生育する調査対象個体群として持ちいる、高標高地のイタドリは  $g_i$  が  $560 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ min}^{-1} (\mu\text{MCO}_2)^{-1}$  と、草本植物の中では小さな値で、平均的な落葉木本植物の  $g_i$  と大差ない値である。高標高地に生育するイタドリが低地のイタドリに比べ小さな  $g_i$  を持つことは、Kogami et al. 2001 からも報告している。

高山に生育する多くの植物は物理的に堅硬な葉を持ち、高山の厳しい気象環境下で生育していることが繰り返し報告されている (Reich et al. 1991 など)。実際、厳しい気象環境下では葉の細胞壁への有機物投資が増加すること (Onoda et al. 2004) や、高山植物の葉の細胞壁は厚いこと (Körner and Pelaez 1989) が報告されている。液相における  $\text{CO}_2$  拡散は気相での拡散に比べ  $10^4$  も小さいため、細胞壁が厚く葉肉表面から葉緑体ストロマまでの距離が大きくなると、 $g_i$  は小さくなるはずである (Terashima et al. 2005)。さらに、Körner et al. 1985 は高山に生育する植物の光合成生産が低地の植物に比べ、 $\text{CO}_2$  拡散過程による強い制限を受けていることを葉内有機物の炭素同位体比から示している。従って、高山に生育する植物の個葉光合成速度  $A_{n360}$  は低大気圧および低い  $g_i$  によって顕著に抑制され (図2) かつ、その最適温度は低地の植物より低温にシフトしている (図4) 可能性が高いといえるだろう。

高山域に生育する植物は葉に大量の窒素を含むことが多くの研究者によって報告されてきた (Körner and Diemer 1987, Friend et al. 1989, Friend and Woodward 1990, Vitousek et al. 1990, Westbeek et al. 1999, Sakata et al. 2006)。この窒素は葉の中の光合成装置、特にルビスコに投資され低大気圧によって抑制される光合成速度を補償している可能性が指摘されている (Sakata et al. 2006)。葉中のルビスコ量が多いと、 $A_{n360}$  が上昇するだけでなく、その最適温度はより低温側にシフトすることが本研究課題によって明らかになった (図4-c)。従っ

て、高山植物に見られる大量の葉室素は、光合成速度の最適温度を高山の低温環境に適合させる役割も果たしている可能性が高いといえるだろう。



## 4-2. 個葉光合成の温度依存性に及ぼす葉内拡散コンダクタンスの影響の実測

### 4-2-1. 調査地概観

本研究課題の材料には、神奈川県の北里大学キャンパス内の個体群（高温個体群）および、富士山五合目付近の個体群（低温個体群）を用いた。いずれの、個体群も開けた場所に生育し日中に被陰を受けることはなかった。



図5. 調査地の位置

本研究課題に使用したイタドリの高温個体群（K0100）と低温個体群（F2250）の位置。高温個体群（K0100）は北里大学 相模原キャンパス内（標高 100 m）に自生するイタドリ個体群である。低温個体群（F2250）は山梨県 富士吉田市の富士山五合目付近（標高 2250 m）に自生するイタドリ個体群である。両個体群とも日中被陰を受けることはなかった。



**図6. 高温個体群 (K0100)**

神奈川県 相模原市 北里大学 相模原キャンパス (標高 100 m) に自生するイタドリ個体群を高温個体群 (K0100) として用いた。駐車場横の法面上にイタドリが自生している。

2009年4月30日 撮影。

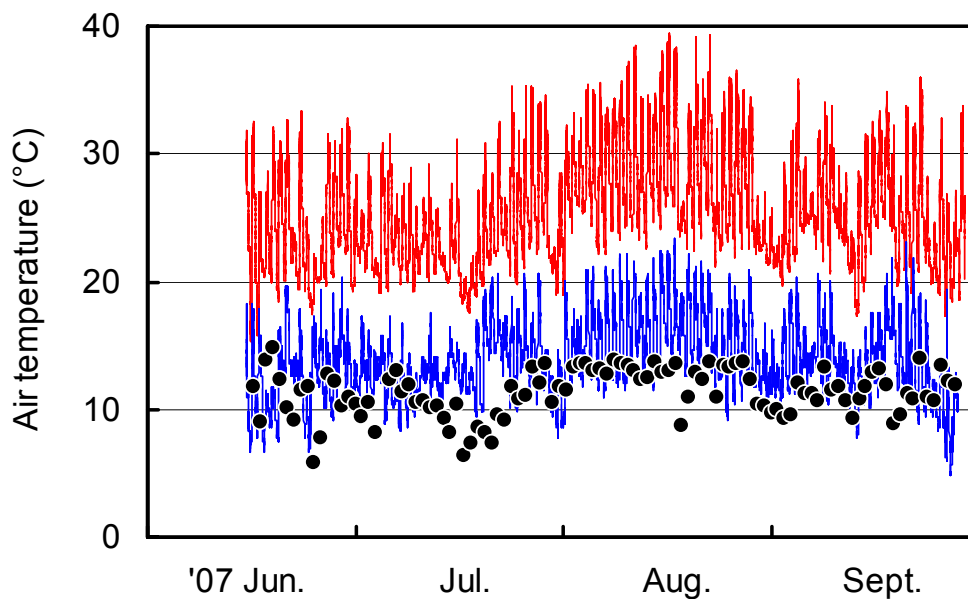


**図7. 低温個体群 (F2205)**

山梨県 富士吉田市の富士山五合目 (標高 2250 m) の森林限界付近に自生するイタドリ個体群を低温個体群 (F2250) として用いた。火山性スコリア荒原に近縁のオンタデやミヤマハンノキなどと共にイタドリが自生している。2007年8月1日 撮影。

#### 4-2-2. 調査個体群の生育温度環境

調査に用いた兩個体群の生育温度環境を評価するため、地面からの高さ 130cm に設置した、温度センサーで気温を計測しデータロガーで記録した (図 8)。高温個体群の気温は低温個体群の気温に比べ計測した生育期間を通じて高く、高温個体群気温の日最低気温が低温個体群の日最高気温を上回ることがほとんどであった。兩個体群間の日平均気温の差は計測した生育期間中の平均 11.3°C であった。



**図 8. 調査地の気温**

高温個体群 (K0100) と低温個体群 (F2250) の生育地における気温の季節変化。それぞれの生育地標高は 100 m (K0100) と 2250 m (F2250) である。気温センサーは地面からの高さ 30 cm に設置し、30 分間隔で記録した。赤線と青線は高温および低温個体群生育地の気温をそれぞれ表す。黒丸は両生育地間の日平均気温の差を表す。計測期間中の日平均気温差は平均 11.3°C であった。

#### 4-2-3. 両個体群の光合成特性の温度依存性

両個体群の葉を調査地より採取し、研究室に運んだ後に個葉光合成の  $\text{CO}_2$  依存性と  $\text{O}_2$  依存性を 15, 20, 25, 30, 35°C で測定して個葉光合成特性の温度依存性を解析した。図 9 はその一例をそれぞれの調査対象個体群について示したものである。葉内の  $\text{CO}_2$  濃度  $C_i$  に対し個葉光合成速度が直線的な依存関係を示す範囲で、両者の関係を直線回帰し、その傾き ( $A_n-C_i$  の初期勾配) と X 切片 ( $\text{CO}_2$  補償点  $\Gamma$ ) を求めた。いずれの個体群および測定温度においても、初期勾配は  $\text{O}_2$  濃度の上昇と共に減少した。また、 $\Gamma$  は  $\text{O}_2$  濃度の上昇と共に増加することが、いずれの個体群および測定温度においても確認された。

図 10 は、この初期勾配と  $\Gamma$  の  $\text{O}_2$  依存性を、測定温度ごとに測定個体群間で比較した結果である。初期勾配の値は、図 9 で確認したとおり、 $\text{O}_2$  濃度の上昇に反比例して減少することが確認された。初期勾配の値は 15°C および 30°C で、K0100 が F2250 に比べて高かったが、25°C では F2250 の方が高い傾向が見られ、初期勾配は測定温度によってどちらの個体群で高くなるか一貫した傾向は見られなかった。

一方、 $\Gamma$  は両個体群間とも  $\text{O}_2$  濃度に比例し増加し、かつ両個体群間で値の違いは見られなかった。 $\Gamma$  の  $\text{O}_2$  濃度に対する傾きはルビスコの  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  親和性の逆数の 0.5 倍に相当する (Laisk & Loreto 1996)。従って、両個体群間で、ルビスコの酵素化学的性質には違いがないことが示唆され、かつ高温ではルビスコの  $\text{CO}_2$  に対する親和性が  $\text{O}_2$  に対する親和性に比べ相対的に低下することが示された。

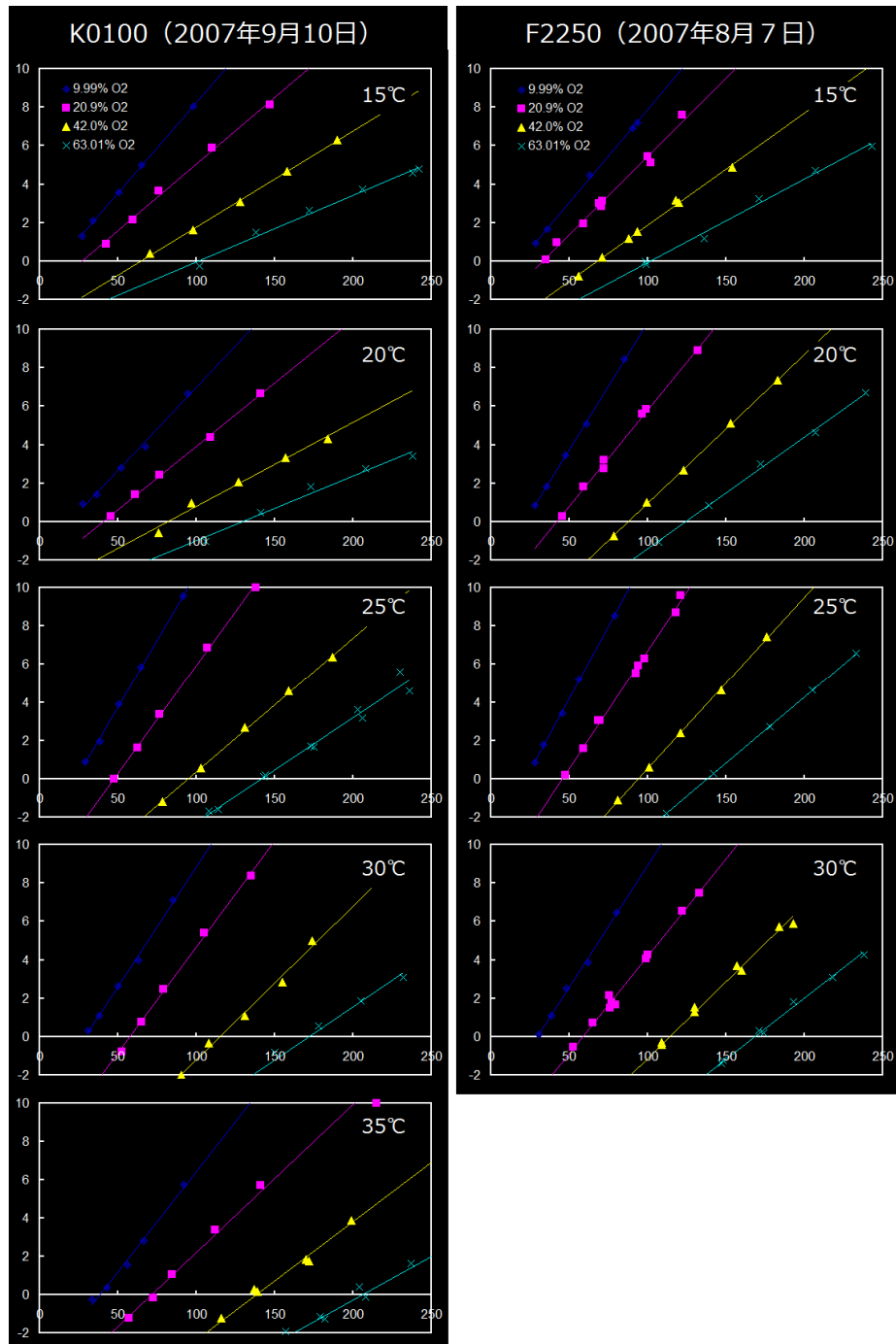


図9. 個葉光合成のCO<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>依存性の測定例

高温個体群 (K0100) と低温個体群 (F2250) の葉を採取し研究室 (標高 100 m) に持ち帰り測定した光合成特性の測定結果。葉の周辺に供給する大気の O<sub>2</sub> 濃度は 4 種類の酸素—窒素濃度バランスさせたガスボンベによって調整した。さらに CO<sub>2</sub> 分圧を Li-6400 によって制御し、 $A_n-C_i$ , O<sub>2</sub> 関係を測定した。葉温は、Li-6400 の温度調節機能に加え、人工気象器 (Model LPH-200RDSMP) によって制御を行った。

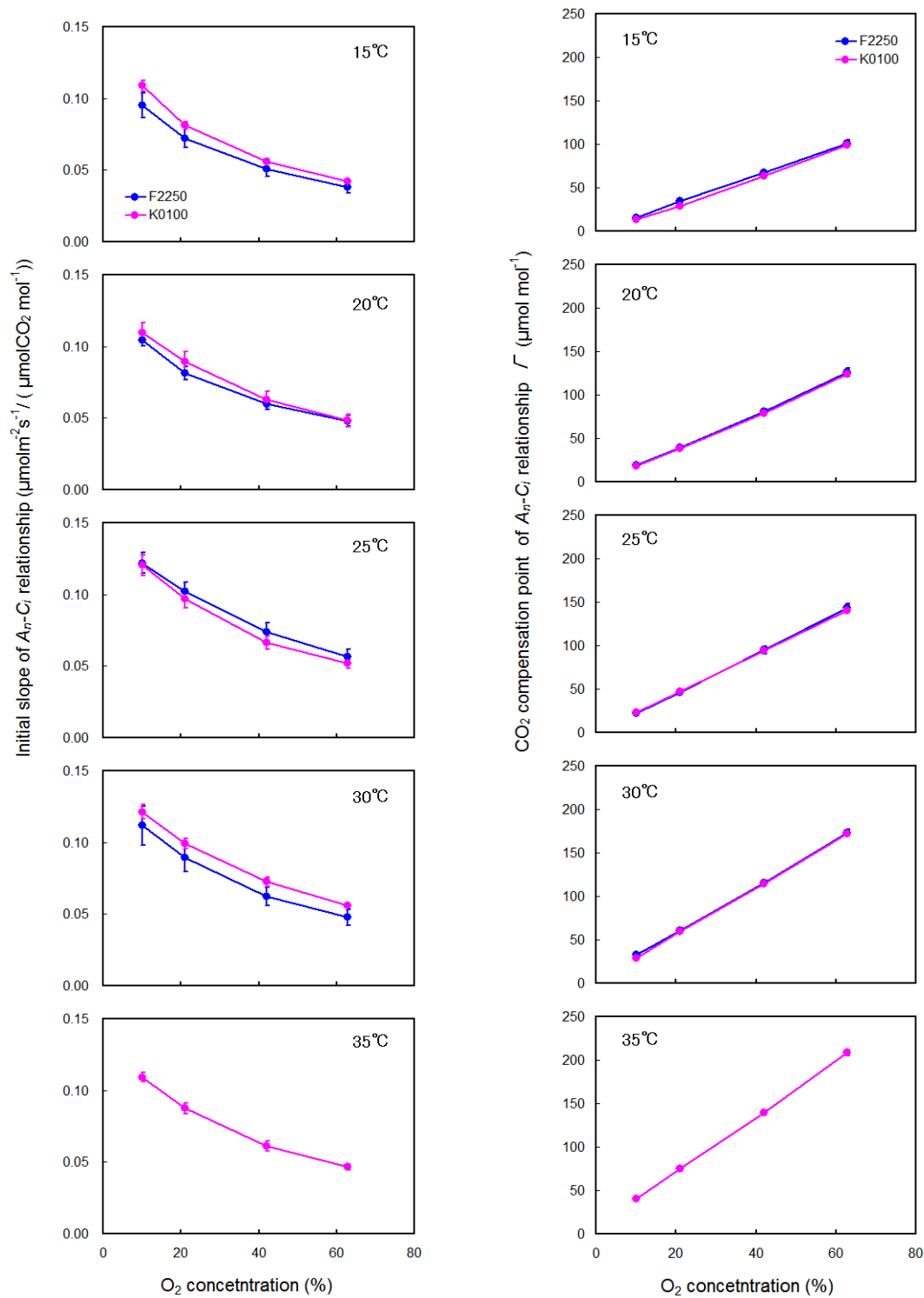


図 10.  $A_n-C_i$ の初期勾配と  $\text{CO}_2$ 補償点  $\Gamma$  の  $\text{O}_2$ 依存性

個葉光合成の  $\text{CO}_2$  および  $\text{O}_2$  依存性の (図 9 はその一例) 解析結果。葉内の  $\text{CO}_2$  濃度  $C_i$  に対し個葉光合成速度が直線的な依存関係を示す範囲で両者の関係を直線回帰し、その傾き ( $A_n-C_i$  の初期勾配) と X 切片 ( $\text{CO}_2$  補償点  $\Gamma$ ) を求めた。35°C は K0100 のみ測定した。各測定点のバーは標準誤差を表す (n=5 ~ 6)。

#### 4-2-4. 両個体群の光合成速度 $A_{n360}$ の温度依存性

前節 4-2-3 で示したように、両個体群のルビスコの酵素化学的性質には差が見出されなかった。それにもかかわらず、 $A_n \cdot C_i$  関係の初期勾配の  $O_2$  依存性は測定温度に応じた個体群間の違いが存在していた。従って、ルビスコの性質ではなく、葉面積あたりの活性化しているルビスコ量  $E$  や葉内での  $CO_2$  拡散コンダクタンス  $g_i$  の温度依存性に個体群間で違いが存在し、個葉光合成  $A_{n360}$  の温度依存性に影響している可能性がある。そこで、気孔閉鎖の影響を除いた状態での  $A_{n360}$  の温度依存性を推定し、個体群間に違いがあるか検討を行った。

RuBP のカルボキシレーション速度が光合成速度の制限要因になっている際の、光合成速度は

$$A_n = \left( \frac{V_{cmax} * \times (C_e - \Gamma^*)}{C_i + K_c (1 + O_e / K_o)} \right) + R_d \quad (4)$$

$$\Gamma^* = \frac{O_e}{2 \times K_s} \quad (5)$$

で、あらわすことができる (Farquhar et al. 1980)。ここで、 $V_{cmax}^*$  と、 $K_s$  は、個葉光合成の見かけの最大カルボキシレーション速度とルビスコの  $CO_2/O_2$  親和性をそれぞれ表し、 $K_s$  は図 10 の  $\Gamma$  の  $O_2$  依存性より決定した (Laik & Loreto 1996)。その後、測定した各  $O_2$  条件および温度条件において得られたデータを式 4 で回帰することによって  $V_{cmax}^*$  と  $R_d$  を推定した。

図 11 は推定した  $V_{cmax}^*$  と  $R_d$  の  $O_2$  依存性を示している。葉温  $35^\circ C$  を除き、 $V_{cmax}^*$  に顕著な  $O_2$  依存性は見出されず、ほぼ一定の値を示していた。温度上昇とともに、 $V_{cmax}^*$  は増加する顕著な傾向がみられ、特に葉温  $30^\circ C$  では、K0100 個体群  $V_{cmax}^*$  の値が F2250 の値よりも大きい傾向が見出された。一方  $R_d$  には、明瞭な  $O_2$  依存性が見出され、高  $O_2$  濃度時に、 $R_d$  が抑制される傾向が見られた。

気孔閉鎖の影響を除いた状態での  $A_{n360}$  を求めるため、 $C_i$  を大気  $CO_2$  濃度  $360 \mu mol mol^{-1}$  の 0.75 倍とし、図 11 で示した  $V_{cmax}^*$  と  $R_d$  を式 4 に代入して  $A_n$  を求めた (図 12)。標高 100 m における K0100 の  $A_{n360}$  (図 12-a) は最大速度を示す温度は  $30^\circ C$  であった。一方、F2250 の  $A_{n360}$  は最大速度を示す温度は  $25^\circ C$  で、光合成の最適温度は、F2250 の方が  $5^\circ C$  程度低いことが明らかになった。

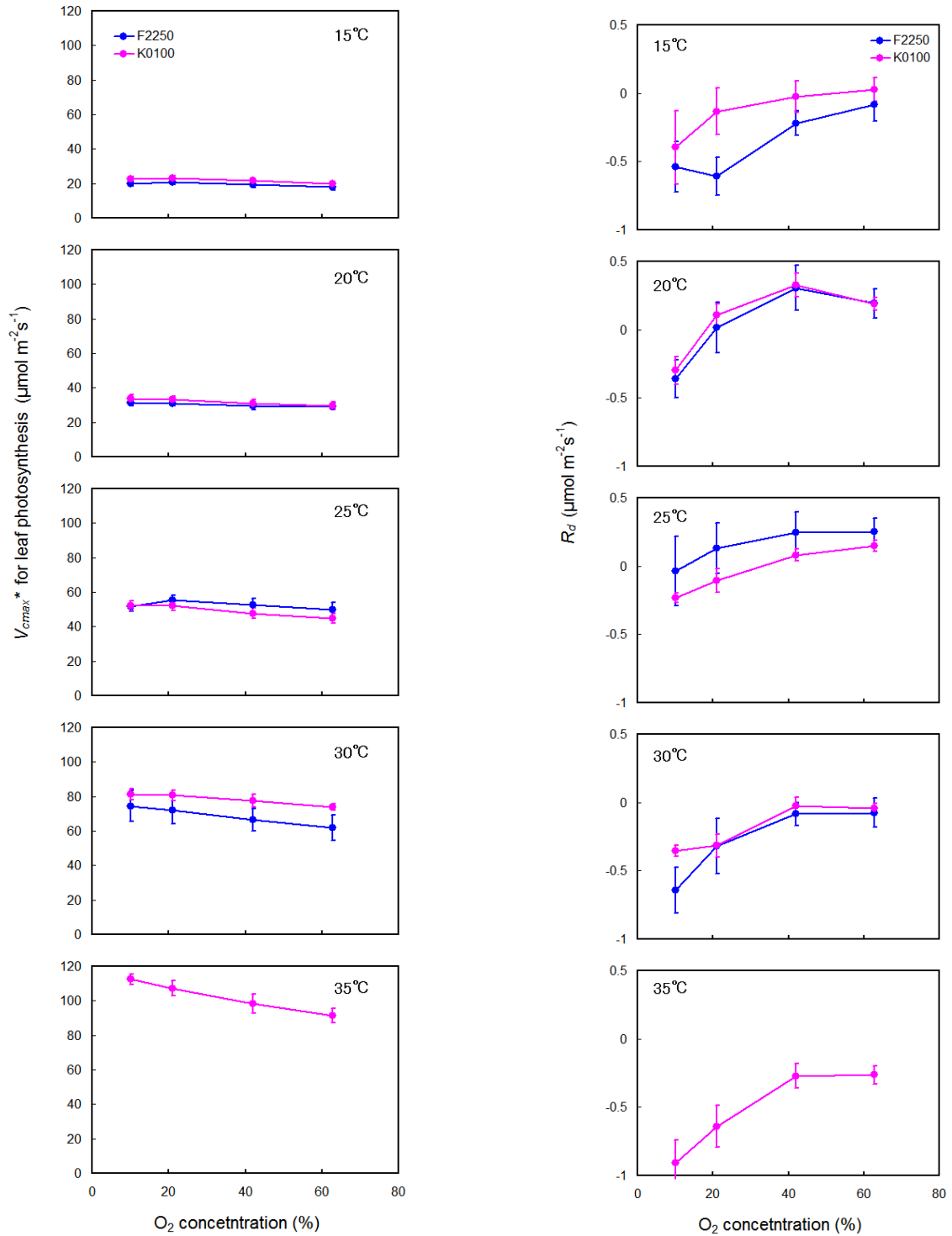


図 1 1. 個葉光合成の  $V_{max}^*$  および  $R_d$  の  $\text{O}_2$  依存性

個葉光合成の  $\text{CO}_2$  および  $\text{O}_2$  依存性を式： $A_n = V_{max}^* \times (C_i - \Gamma^*) / (C_i + K_C \times (1 + O_e / K_O)) + R_d$  によって回帰し  $V_{max}^*$  (個葉光合成の  $V_{max}$ ) と  $R_d$  を求めた。 $\Gamma^*$  はルビスコの  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  親和性  $K_S$  (本文参照) より、式： $\Gamma^* = O_e / 2 / K_S$  を用いて求めた。



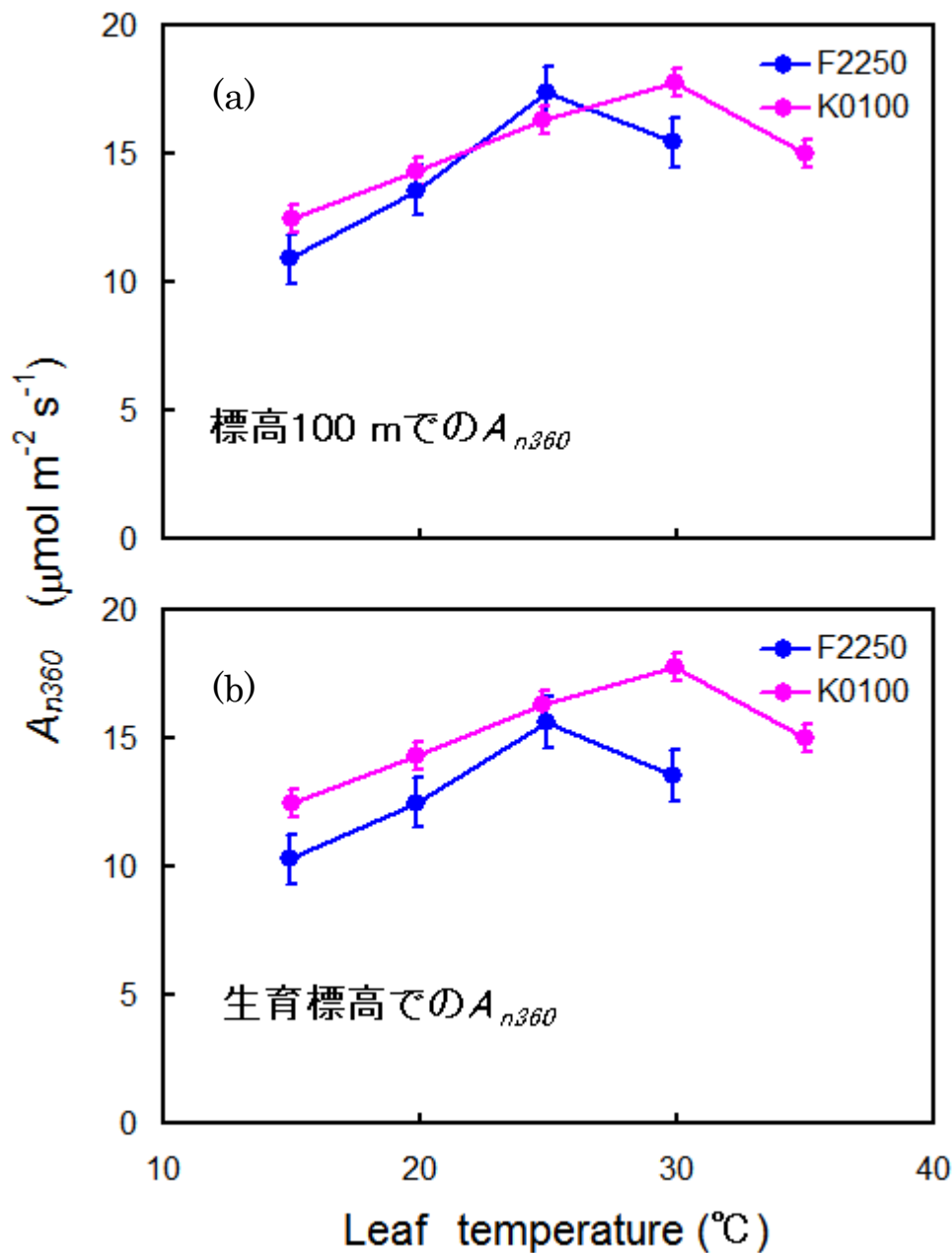


図 1 2.  $A_{n360}$  の温度依存性

個葉光合成の  $\text{CO}_2$  および  $\text{O}_2$  依存性から、推定した  $V_{cmax}$  \* および  $R_d$  (図 1 1 参照) を、式：  
 $A_n = V_{cmax}^* \times (C_i - \Gamma^*) / (C_i + K_C \times (1 + O_e / K_O)) + R_d$  に代入し、 $C_i = 277 \mu\text{mol mol}^{-1}$   
 における  $A_n$  を  $A_{n360}$  として求めた。(a) 標高 100 m の大気圧下における液相への  $\text{CO}_2$  と  $\text{O}_2$  溶  
 解量を用いて  $A_{n360}$  を求めた。(b) K0100 については標高 100 m の、F2250 については標高 2250  
 m の大気圧における液相への  $\text{CO}_2$  と  $\text{O}_2$  の溶解量を用いて  $A_{n360}$  を求めた。

また、それぞれの個体群の生育標高における光合成速度の温度依存性を評価するため、生育大気圧における、CO<sub>2</sub> および O<sub>2</sub> の溶解量を用いて An360 を求めた (図 1 2 - b)。その結果、F2250 の生育標高での An360 は、標高 100 m での An360 に比べ値が小さくなったが、その差は高温時に顕著で、低温時には大きな違いは見られなかった。この結果は、図 4 - a と同様の傾向を示しており、高標高では、光合成速度の抑制と、光合成最適温度の低下が見られることが図 1 2 から示唆された。

F2250 は K0100 に比べ、生育期間中の平均気温は 11℃程度低く (図 4)、光合成速度の最適温度が K0100 に比べ低いことが予想された。図 1 2 の結果はこの予想と矛盾せず、イタドリは生育温度の違いに応じた光合成の最適温度の違いが存在していた。低い大気圧は、光合成の最適温度を下げる効果がある (図 4 - a)。しかし、F2250 と K0100 の光合成の温度依存性には大気圧を同一にしても違いがあることが見出され、F2250 の生育地の低い大気圧のみでは、両個体群の最適温度の違いは説明できない。従って、イタドリには個葉光合成の最適温度の調節機構が存在することが強く示唆された。

#### 4-2-5. イタドリの光合成速度の最適温度調節機構

本研究課題で調査した、低温個体群 (F2250) と高温個体群 (K0100) において見出された光合成の最適温度の違いをもたらしている機構はどのようなものであろうか。個葉光合成の  $\text{CO}_2$  補償点  $\Gamma$  ( $A_n - C_i$  関係の X 切片) の  $\text{O}_2$  依存性には全ての測定温度において個体群間の違いは検出されず、両個体群のルビスコの  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  親和性の温度依存性に違いが無いことが明らかになった (図 10)。

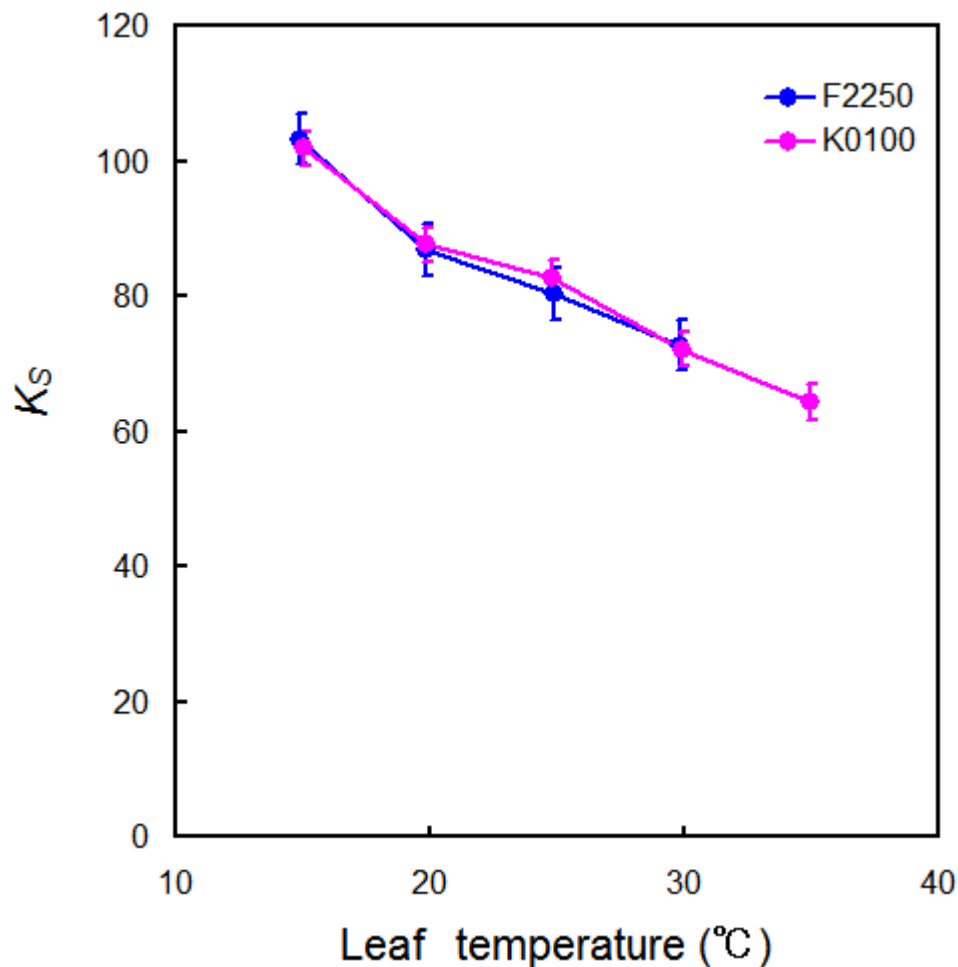


図 13. ルビスコの  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  親和性  $K_s$  の温度依存性

個葉光合成の  $\text{CO}_2$  および  $\text{O}_2$  依存性から Laisk & Loreto 1996 の方法に従って推定した  $K_s$  の温度依存性。  $K_s$  は、図 10 に示した、  $\text{O}_2$  濃度に対する  $\Gamma$  の傾きの逆数に 0.5 を乗じ求めた。  $K_s$  は次の式で表される、ルビスコの  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  親和性である。

$$K_s = \frac{V_{C_{\max}} / K_C}{V_{O_{\max}} / K_O}$$

すなわち、個葉光合成を規定する式 (1) と (2) のパラメータのうち  $V_{cmax}$ ,  $V_{omax}$ ,  $K_o$ ,  $K_c$  の温度依存性については両個体群間での違いは無い可能性が高い。Sakata and Yokoi 2002 は葉温 25°C において同様の結論を導いているが、本研究課題によって葉温 15 から 30°C の範囲においてもルビスコの酵素化学的性質に違いが無い可能性が示された。従って、両個体群の個葉光合成の最適温度の違いを説明する機構として、活性化している葉内ルビスコ量  $E$  および葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  の値の違いおよび、それらの温度依存性の違いが機能している可能性がある。

葉内ルビスコ量  $E$  および葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  の温度依存性を評価するため、Sakata and Yokoi 2002 の方法で  $E$  と  $g_i$  の推定を行った。図 10 で示した  $A_n-C_i$  関係の初期勾配の  $O_2$  依存性は、 $E$  と  $g_i$  およびルビスコの酵素化学的性質によって決まる。

$$\frac{1}{CE(O_e)} = aO_e + b,$$

$$a = \frac{1}{K_s E} \left( \frac{1}{V_{Omax}} + \frac{0.5}{V_{Cmax}} \right),$$

$$b = \frac{1}{g_i} + \frac{K_c}{E V_{Cmax}} \quad (6)$$

そこで、図 14 に例を示したように、初期勾配の逆数と  $O_2$  濃度の関係を直線回帰しパラメータ  $a$  と  $b$  を決定し、 $E$  と  $g_i$  の推定を行った。

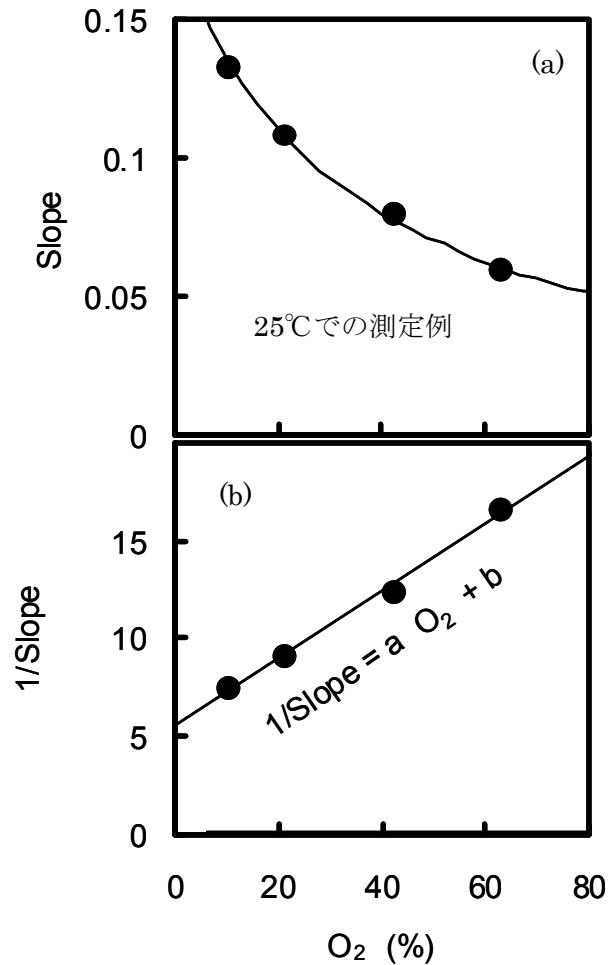


図 1 4.  $A_n-C_i$  関係の初期勾配 slope およびその逆数の  $O_2$  依存性

Sakata and Yokoi 2002 の方法を用い、活性化した状態のルビスコ量  $E$  および葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  を推定するための解析図の一例。 $A_n-C_i$  関係の初期勾配 slope は  $O_2$  濃度と反比例の関係を示す (図 1 0 も参照)。Slope の逆数と  $O_2$  濃度の関係を直線回帰し (b) の図中に示したパラメータ  $a$  と  $b$  を決定し  $E$  と  $g_i$  の推定に用いる。推定方法の詳細は本文を参照。

図 1 5 は、活性化した状態の  $E$  の推定値の温度依存性を表している。調査を行った高温個体群 K0100 および低温個体群 F2250 いずれも、 $E$  の最大値は葉温  $20^{\circ}C$  であると推定された。葉温  $20$  度以下では、高温個体群と、低温個体群の間に推定された  $E$  の間に有意な差は認められなかった。

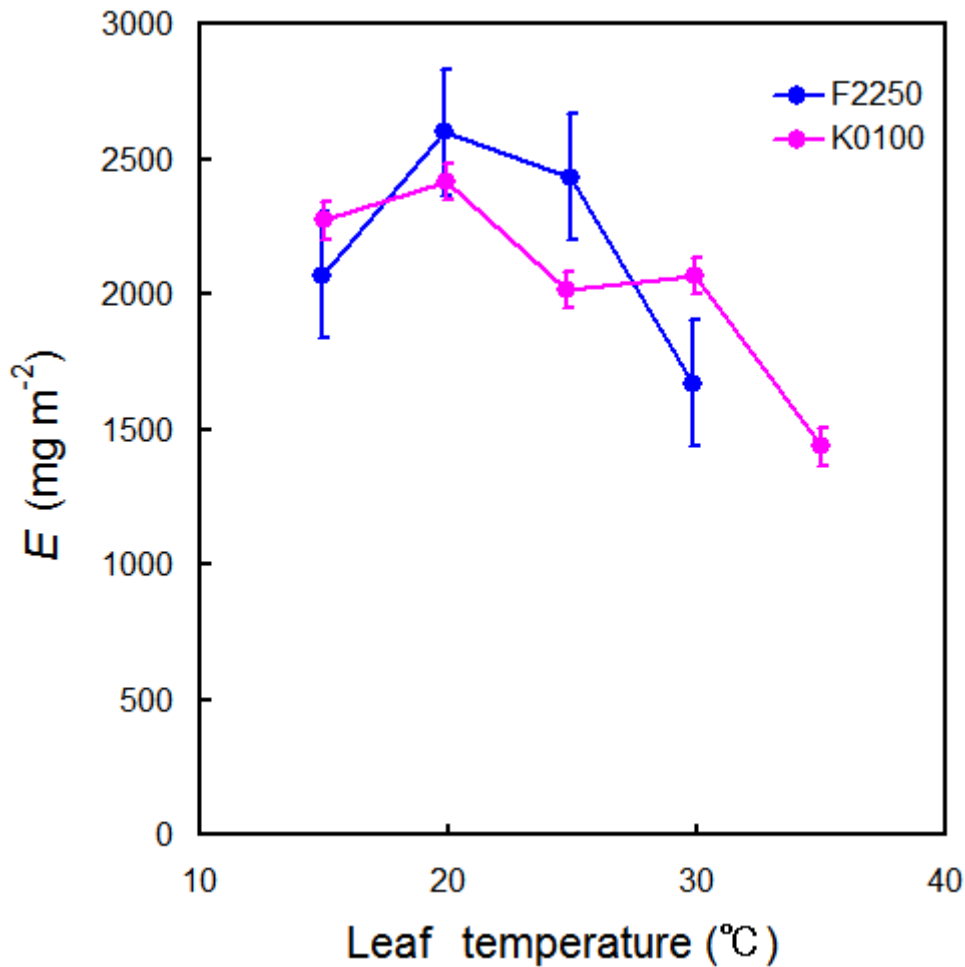


図 15.  $A_n-C_i$  関係の初期勾配の  $O_2$  依存性から推定した  $E$  の温度依存性

Sakata and Yokoi 2002 の方法を用いて推定した活性化した状態のルビスコ量  $E$  の温度依存性。図 10 で示したパラメータ  $a$  およびルビスコの酵素化学的性質を本文中の式 (6) に代入して求めた。ルビスコの酵素化学的性質は Jordan and Ogren 1984 がハウレンソウを材料に決定したデータに基づく。

一方、25°C以上では  $E$  の推定値の温度依存性に、両個体群間の違いが検出された。F2250 では、 $E$  の推定値は、25°Cまでは、その最大値と有意な差は見られなかったが、30°Cまで温度が上昇すると、最大値に比べて70%未満になり、有意な低下を示した。対照的に、K0100 の  $E$  は30°Cでは顕著な低下を示さず、その最大値の85%以上を維持していた。K0100 においても葉温が35°Cまで上昇すると、 $E$  はその最大値の60%未満まで低下することが示された。

すなわち、イタドリは生育温度に応じた活性化ルビスコ量  $E$  の温度依存性が見られることを意味している。この、両個体群に見られる  $E$  の温度依存性の違いは、標高 100m での  $A_n360$  の温度依存性の違いと矛盾していなかった。従って、調査した二つの個体群の光合成の最適温度の違いは、少なくとも部分的には  $E$  の温度依存性の違いによって説明できることが明らかになった。Hikosaka et al. (2006) は *Plantago asiatica* の温度順化実験から、個葉光合成の見かけの最大カルボキシレーション速度  $V_{Cmax}^*$  は低温環境で生育させた場合に高温環境で生育させた場合に比べ高温で低くなり、その結果個葉光合成の最適温度が低くなることを示している。本研究課題で得られたデータは、野外に生育するイタドリ個体群でも同様の機構が個葉光合成の温度適合の一部を担っていることを示唆している。

#### 4-2-6. イタドリの葉内拡散コンダクタンス $g_i$ の温度依存性

図16は、葉内拡散コンダクタンス  $g_i$  の温度依存性を両個体群間で求めるため、パラメータ  $a$  と  $b$  (図14を参照) を測定温度ごとにプロットしたものである。図16中の測定点のいくつかは図中の赤い線 ( $g_i = \infty$  を表す) よりも右側に位置し、 $g_i$  の値の推定をこの解析で行うことはできなかった。図16中の各線を決定するために用いたルビスコの酵素化学的性質は、Jordan and Ogren 1984 がハウレンソウを材料に示したデータに基づいている。現時点でルビスコの酵素化学的性質の温度依存性を *in vitro* で測定した報告例は Jordan and Ogren 1984 以外に存在しない。おそらく、イタドリのルビスコ酵素化学的性質が Jordan and Ogren 1984 の報告結果とは異なっていることが、 $g_i$  の温度依存性推定を行えない原因であると考えられる。

定量的な  $g_i$  推定を図16から行うことはできなかったので  $g_i$  の温度依存性の定性的な評価を行う。K0100のパラメータ  $a$  と  $b$  の組み合わせは、葉温  $15 \sim 30^\circ\text{C}$  の範囲でほぼ赤い線付近に集中している。葉温  $35^\circ\text{C}$  では、赤い線より右側に測定点が分布し、 $g_i$  が増加していることが示唆された。同様に、F2250についても、葉温  $15 \sim 25^\circ\text{C}$  の範囲でほぼ赤い線付近に集中し、葉温  $30^\circ\text{C}$  では赤い線の右側に測定点が分布していた。従って、両個体群とも、 $E$  が顕著な低下を示さない温度範囲では、 $g_i$  はほぼ同程度であり、高温時に  $E$  が顕著に低下するとき、 $g_i$  が増加する可能性が示唆された。今後、イタドリのルビスコの酵素化学的性質の温度依存性を決定して、 $g_i$  の温度依存性を定量的に評価し、上記の可能性を確認することが必要であろう。



# Parameter b

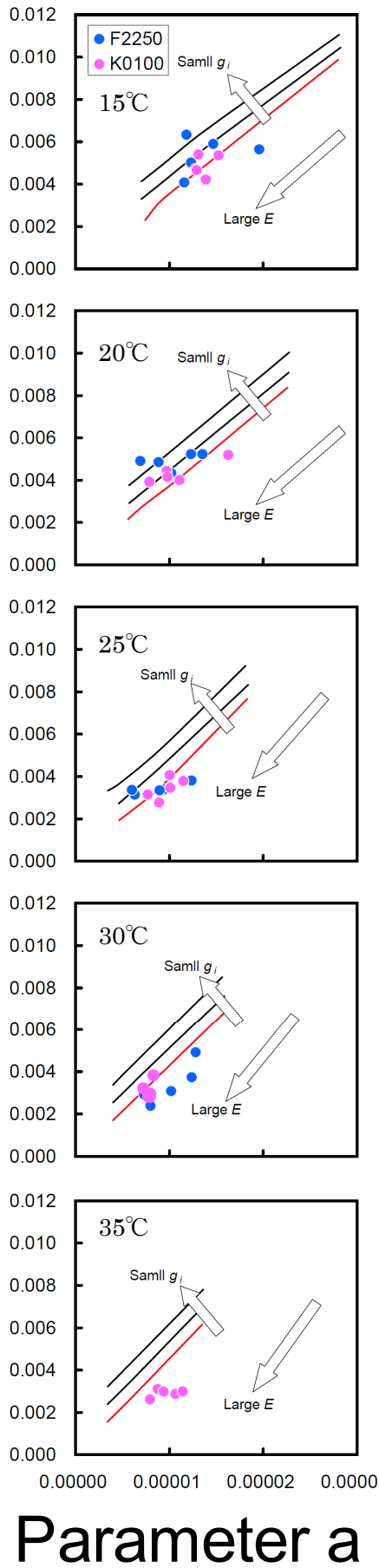


図 16.  $A_n-C_i$  関係の初期勾配の  $O_2$  依存性から求めたパラメータ a と b

$A_n-C_i$  関係の初期勾配 slope の逆数と  $O_2$  濃度の関係から求めたパラメータ a と b (図 14 を参照)。パラメータ a と b から Sakata and Yokoi 2002 の方法を用いて  $E$  と  $g_i$  の推定を行うことができる。各図中の赤い線、中央の線、および右端の線は  $g_i = \infty$ 、 $g_i = 1200$ 、および  $g_i = 600 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ min}^{-1} (\mu\text{MCO}_2)^{-1}$  の葉が示すパラメータ a と b の組み合わせをそれぞれ示す。 $E$  が大きい葉のパラメータ a と b の組み合わせは各線上で下方に位置する。

#### 4-2-7. 本研究課題の特色と意義

本研究の特色は、葉内部の CO<sub>2</sub> 拡散コンダクタンスおよび、ルビスコの量を個葉光合成の温度依存性の調節因子としてとらえ解析した点である。大気中の CO<sub>2</sub> 分子は葉の表面の気孔を通過したのち、葉内部の気相空間および細胞表面から葉緑体内部までの液相部分を拡散によって運ばれてゆく。この葉内 CO<sub>2</sub> の拡散は葉内の空間の大きさや細胞壁の厚さなど形態的な特徴に大きく影響をうけ、光合成を抑制するネガティブな要因としてのみ理解されてきた。また、ルビスコ量は光合成速度の量的調節要因として主に理解されてきた。これまで、葉内拡散コンダクタンスやルビスコの量が個葉光合成の温度依存性の調節因子として機能する事例を野外で生育する植物を材料に示した研究例はない。本研究課題によって野外に生育するイタドリを材料に活性化したルビスコの量が光合成の最適温度調節機構として機能していることを実証することができ、植物の温度環境への適合機構の一端が新たに確認された。

また、生育環境の大気圧が低いこと、葉の中の活性化したルビスコの量が多いこと、葉内拡散コンダクタンスが小さいこと、このいずれによっても光合成の最適温度が低下することを示したことも本研究課題の大きな成果といえる。特に、高山植物で一般的に見られる大量のルビスコや小さな葉内拡散コンダクタンスは、光合成最適温度を高山の低い温度環境に適合させる調節機構として機能している可能性がある。今後は、より多くの高山植物を材料に、これらの可能性を検討することが高山植物の生理生態学的理解に必要であろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Bekku, S.Y., Sakata, T., Nakano, T., Koizumi, H. (2009) Midday depression in root respiration of *Quercus crispula* and *Camaecypris obtusa*: Its implication for estimating carbon cycling in forest ecosystem. *Ecological Reserch* **24**, p865-871. 査読あり

(2) 別宮 (坂田) 有紀子, 坂田 剛 (2009) 葉っぱと根っこはつながっている : 根の呼吸の日中低下現象とその要因, *日本生態学会誌* **59**, 55-63. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

(1) 別宮 有紀子 (都留文科大学), 坂田 剛 (北里大学), 田中 格 (山梨県森林総合研究所),  
中野隆志 (山梨県環境科学研究所) 根と葉はつながっている: 根の呼吸速度と蒸散速度の関係  
日本生態学会第 56 回大会 (盛岡) 2009 年 3 月

(2) 坂田 剛 (北里大), 中野 隆志 (山梨環境科学研), 可知 直毅 (首都大) 高標高域にお  
ける低大気圧が個葉光合成の温度依存性におよぼす影響 日本生態学会第 55 回大会 (福岡)  
2008 年 3 月

(3) 別宮 (坂田) 有紀子 (都留文科大学), 坂田 剛 (北里大学), 中野 隆志 (山梨県環境科  
学研究所) 根の呼吸速度の季節変化と日中低下 日本生態学会第 54 回大会 (松山) 2007 年 3 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 剛 (Sakata, Tsuyoshi)

研究者番号 : 60205747

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

## 7. 謝辞

本研究課題の遂行には研究代表者が主要な役割を果たしたが、研究課題のアイデアや実施方針の決定には横井 洋太 博士に助言をいただいた。富士山における野外調査に関する助言やデータ収集などに関して中野 隆志 博士に協力をしていただいた。また、別宮（坂田）有紀子 博士には様々な助言と協力をしていただいた。ここに深く感謝の意を表する。

## 8. 参考文献

- Berry J.A. & Björkman O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 491-543.
- Edwards, G.E. and Walker, D.A. (1983) *C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*. Blackwell, Oxford.
- Epron, D., Godard, D., Cornic, G. and Genty, B. (1995) Limitation of net CO<sub>2</sub> assimilation rate by internal resistances to CO<sub>2</sub> transfer in the leaves of two species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment*, 18, 43-51.
- Evans, J.R., Sharkey, T.D., Berry, J.A. and Farquhar, G.D. (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO<sub>2</sub> diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 281-292.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer and S. Berry, J.A. (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta*, 149, 78-90.
- Friend, A.D. and Woodward, F.I. (1990) Evolutionary and ecophysiological responses of mountain plants to the growing season environment. *Advances in ecological research*, 20, 59-124.
- Friend, A.D., Woodward, F.I. and Switsuer, V.R. (1989) Field measurements of photosynthesis, stomatal conductance, leaf nitrogen and <sup>13</sup>C along altitudinal gradients in Scotland. *Functional Ecology*, 3, 117-122.
- Hanba, Y.T., Miyazawa, S.-I. and Terashima, I. (1999) The influence of leaf thickness on the CO<sub>2</sub> transfer conductance and leaf stable carbon isotope ratio for some evergreen tree species in Japanese warm temperate forests. *Functional Ecology*, 13, 632-639.
- Hanba, Y.T., Shibasaki, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. and Katsuhara, M. (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant, Cell and Environment*, 45, 521-529.
- Hikosaka, K., Ishikawa, K., Borjigidai, A., Muller, O. and Onoda, Y. (2006) Temperature acclimation of



- photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of Experimental Botany* 57, 291-302.
- Hikosaka K., Murakami A. & Hirose T. (1999) Balancing carboxylation and regeneration of ribulose biphosphate in leaf photosynthesis: temperature acclimation in an evergreen tree, *Quercus yrsinaefolia*. *Plant, Cell & Environment* 22, 841-849.
- Jordan, D.B. and Ogren, W.L. (1984) The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta*, 161, 308-313.
- Kogami, H., Hanba, Y.T., Kibe, T., Terashima, I. and Masuzawa, T. (2001) CO<sub>2</sub> transfer conductance, leaf structure and carbon isotope composition of *Polygonum cuspidatum* leaves from low and high altitudes. *Plant, Cell and Environment*, 24, 529-538.
- Körner, C. and Diemer, M. (1987) *In situ* photosynthetic responses to light, temperature and carbon dioxide in herbaceous plants from low and high altitude. *Functional Ecology*, 1, 179-194.
- Laisk, A. and Loreto, F. (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*, 110, 903-912.
- Lauteri, M., Scartazza, A., Guido, M.C. and Brugnoli, E. (1997) Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology*, 11, 675-683.
- Loreto, F., Harley P.C. Marco G.D. and Sharkey T.D. (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by three different methods. *Plant Physiology*, 98, 1437-1443.
- Loreto, F., Marco, G.D., Tricoli, D. and Sharkey, T.D. (1994) Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. *Photosynthesis Research*, 41, 397-403.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. (1988) Differences between wheat and rice in the enzyme properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta*, 174, 30-38.

- Pearcy, R.W., Ehleringer, J., Mooney, H.A. and Rundel, P.W. (1989) *Plant physiological ecology*. Chapman and Hall, London.
- Sakata, T., Nakano, T. and Yokoi, Y. (2006) Altitudinal changes in Rubisco and APX activities in *Aconogonum weyrichii* in the alpine region of Mt. Fuji. *Polar Bioscience*, 19, 115-122.
- Sakata, T. and Yokoi, Y. (2002) Analysis of the O<sub>2</sub> dependency in leaf-level photosynthesis of two *Reynoutria japonica* populations growing at different altitudes. *Plant, Cell and Environment*, 25, 65-74.
- Scartazza, A., Lauteri, M., Guido, M.C. and Brugnoli, E. (1998) Carbon isotope discrimination in leaf and stem sugars, water-use efficiency and mesophyll conductance during different developmental stages in rice subjected to drought. *Australian journal of plant physiology*, 25, 489-498.
- Terashima, I., Masuzawa, T., Ohba, H. and Yokoi, Y. (1995) Is photosynthesis suppressed at high elevations due to low CO<sub>2</sub> pressure. *Ecology*, 76, 2663-2668.
- Vitousek, P.M., Field, C.B. and Matson, P.A. (1990) Variation in foliar <sup>13</sup>C in Hawaiian *Metrosideros* polymorpha; a case of internal resistance? *Oecologia*, 84, 362-370.
- Westbeek, M.H.M., Pons, T.L., Cambridge, M.L. and Atkin, O.K. (1999) Analysis of differences in photosynthetic nitrogen use efficiency of alpine and lowland *Poa* species. *Oecologia*, 120, 19-26.
- Yamori W., Noguchi K. & Terashima I. (2005) Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions. *Plant, Cell & Environment* 28, 536-547.
- Yoshie, F. (1986) Intercellular CO<sub>2</sub> concentration and water-use efficiency of temperate plants with different life forms and from different microhabitats. *Oecologia*, 69, 370-374.