

シダ植物に見られる蛍光成分Ⅱ

静岡県立磐田南高等学校
生物部 2年 有藤葵 1年 市川こはる

1. 動機

2021 年度始めに、新入部員の研究に対する興味・関心を引く為に様々な実験を行った。その一環として、TLC (薄層クロマトグラフィー) を使い、近くの公園や神社などの植物の葉の成分を展開した。成分を展開し、クロロフィルの蛍光を見るために 375nm の紫外線ライトを当てたところ、スギナ等のシダ植物の TLC 原点に、他の種子植物にはみられない青い蛍光成分を確認することができた。この青い蛍光成分については、昨年我々の論文以外に文献が見つからず、他では知られていない可能性がある。これらの結果からシダ植物にみられる蛍光成分について興味を持ち、この青い蛍光成分について最も蛍光の強かったスギナを中心に研究を始めた。

2. これまでの研究

2021 年の研究において、シダ植物の青い蛍光成分について以下のことが分かった。

- ・水溶性である。
- ・青い蛍光成分は複数の蛍光成分から構成されている。水で抽出し、メタノール：水 = 1 : 1 で展開したスギナの TLC に、325nm の励起光を当てると、F1 から F5 に分けることができた。
- ・F1 は 460nm (青色) をピークにして蛍光する。F2~F5 は 520 nm (緑色) に蛍光する。
- ・複数の蛍光成分の内、一番蛍光の強い F1 は芳香族化合物ではないことが NMR 分析で判明した。
- ・F1 は紫外線をよく吸収する特徴があることが分かった。我々は、蛍光成分に有害な紫外線を吸収する役割があると考えた。

3. 本年(2022)年度の研究

植物体としてのスギナを組織レベルで観察し、蛍光部位から蛍光成分の候補を絞り込むことを目的とした。

4. 材料・機器等

〈材料〉スギナ *Equisetum arvense*

〈薬品〉メタノール、蒸留水

〈器具〉紫外線ライト(375nm)、紫外線灯 (365nm)、展開槽、ろ紙

〈機器〉共焦点レーザー顕微鏡 (励起光 405nm)

5. 予備実験

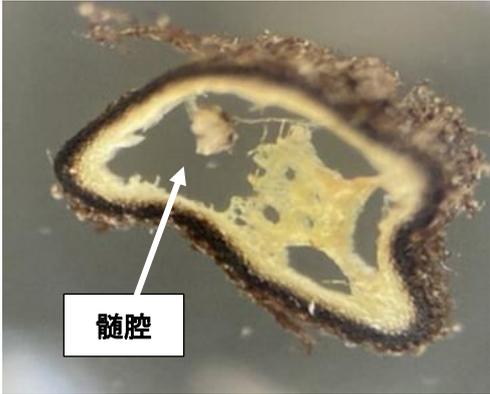
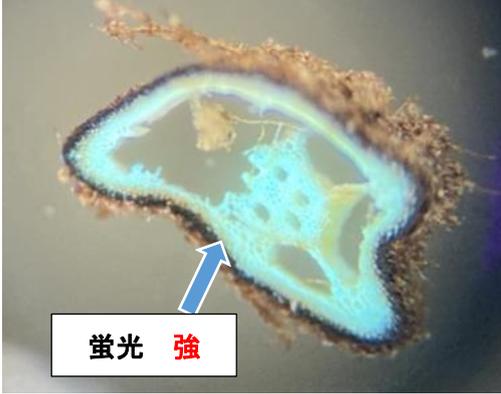
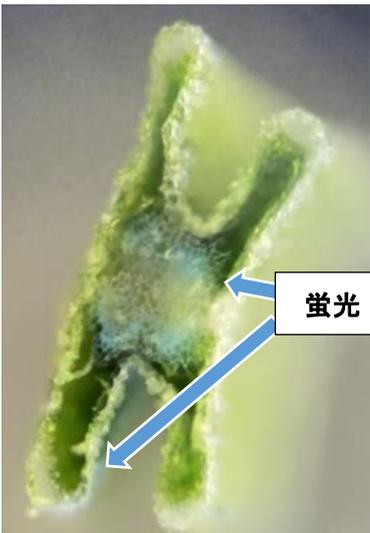
2021 年はすりつぶして抽出した成分に注目したが、本年 2022 年はスギナの植物としての状態や構造に注目して、蛍光の特性をより精密に観察することにした。

(1) 蛍光成分の安定性

スギナは 1 日で乾燥するが、数か月たっても蛍光が減少しない上、1 年たったものでも蛍光が残っている。乾燥しても蛍光成分が変化しないことから、青い蛍光成分は非常に安定した物質であることがわかる。

(2) スギナの構造観察 (資料 1)

スギナを地下茎から掘り出し、切片を作って構造観察したところ、地上の茎よりも地下茎の蛍光が強いことが判明した。地下茎は固く、髄腔があることでつぶれやすいため、完全な形の切片作成が非常に困難である。地上の茎も同様に空洞部分が多く、組織の観察が難しい。

	可視光	紫外線 375nm
地下茎	 <p>髓腔</p>	 <p>蛍光 強</p>
地上茎		 <p>蛍光 弱</p>

資料1 スギナの構造観察

スギナは、地下茎から葉柄が伸びる普通のシダと違い、地上部までに茎が伸びており、茎に小さな鱗片状の葉がつく。茎の中には、髓腔がある（資料1）。これは空気の少ない水辺の植物（イネ・ハス）に共通の構造であり、シダは水中生活から陸上生活への橋渡的存在といえる（神戸の自然シリーズ 神戸のシダより）。シダは進化の過程で植物の上陸後間もない古生代から生きる陸上植物である。シダと裸子植物は、道管の間に穴の開いた壁が残った「仮道管」を持つ。

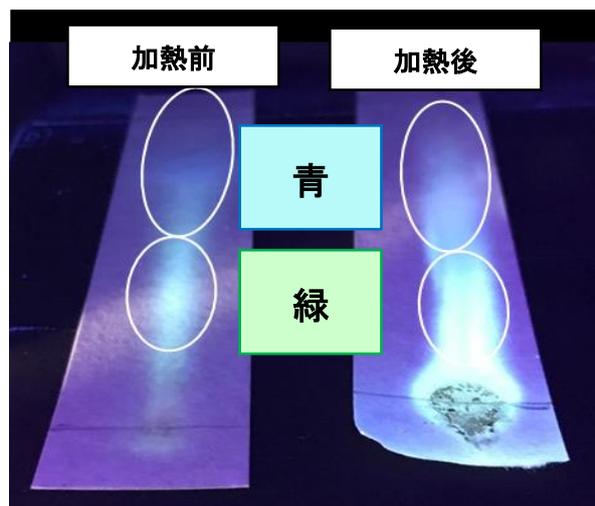
6. 仮説

蛍光成分は非常に安定しており、乾燥して細胞壁だけになっても蛍光することから、「蛍光成分は細胞壁にかかわる物質である」と仮説をたてた。

7. 研究1 高温時の変化

スギナを水につけた抽出液は、紫外線を当てると青い蛍光を発する。2021年は成分の変性を恐れて常温以上にしないようにしていたが、1年たっても蛍光する安定した物質と分かったため、本年度は、抽出液を加熱（煮沸）して蛍光を観察した。すると、加熱時間が多くなるほど蛍光が強くなることを発見した。ただし水分が失われるまで煮詰めると蛍光は失われる。

抽出液の成分のうち蛍光が強くなるのはどの成分か確認するために、加熱前と60分加熱(煮沸)後の抽出液に、メタノール:水=1:1展開溶液を使い、ろ紙で展開した。その結果、原点から遠い方から、資料2のように、青・緑の2色の蛍光に分かれ、加熱により蛍光が強くなるのは緑色蛍光の成分であることが分かった。青色蛍光はあまり変化しない。この青と緑の蛍光成分を調べるために植物の蛍光成分に詳しい静岡大学にご協力いただいて、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)によって分析していただいた。



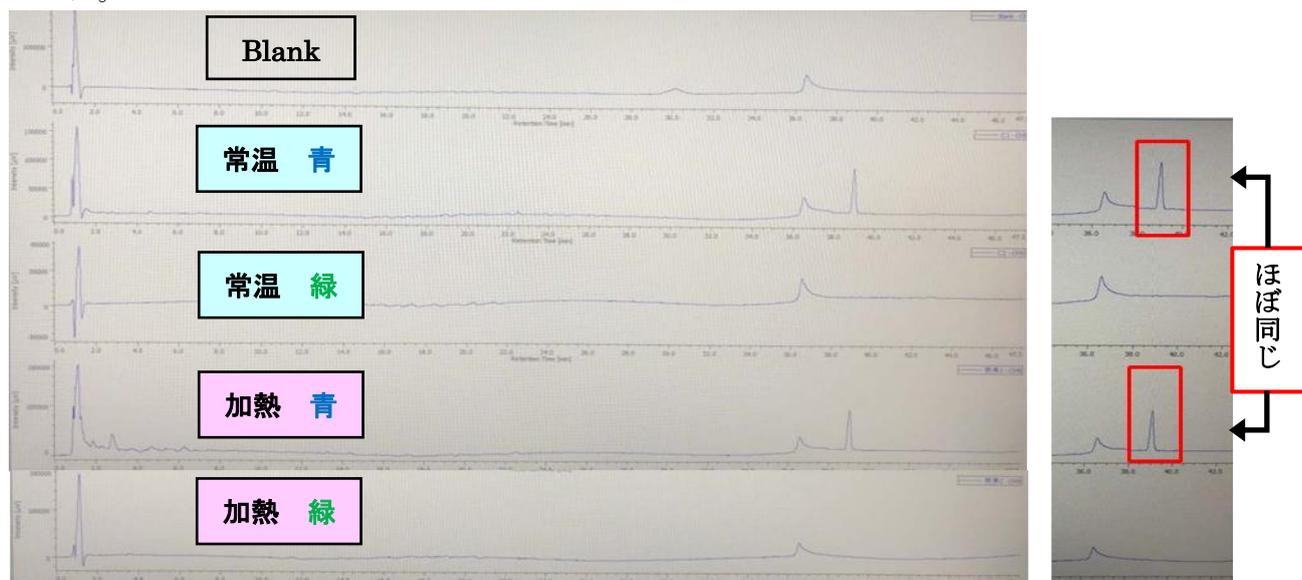
資料2 加熱前後のろ紙展開

<方法>

- (1) スギナを水につけて水溶性成分を抽出、
半分はそのまま常温とし半分は60分間加熱する。
- (2) メタノール:水=1:1展開溶液を使い常温時と加熱時の成分をろ紙で10枚ずつ展開した
- (3) 青色蛍光と緑色蛍光を別々に分析するために、展開された「青色」部分と「緑色」部分のろ紙を切り抜く。
- (4) 切り抜いたろ紙をさらに小さく切り、それぞれ20mLスクリービンに入れ、メタノール:水=1:1溶液を入れて、ろ紙から再び溶液に抽出する。
- (5) ろ紙をピンセットで絞って取り出し、スクリービンに常温と加熱のそれぞれの「青色」と「緑色」部分の抽出液を密封する。この成分のHPLC分析を、静岡大学にお願いした。

<結果>

資料3が蛍光成分のHPLC分析の結果である。常温、加熱のどちらも、青色蛍光成分にだけ特徴あるピークが見られた(四角赤枠)。加熱時のピークの面積はほぼ同じであり、加熱により青色蛍光成分量が変化しないことがわかる。この青色蛍光成分は静岡大学の把握しているフラボノイド標品に、一致するものはなく成分は不明なままである。この分析では緑色蛍光成分に特徴は見つからなかった。

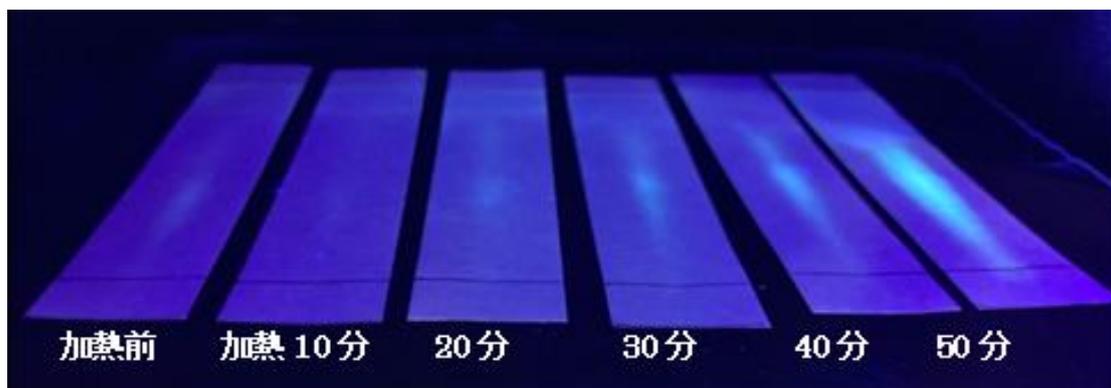


資料3 HPLC分析結果

<考察>

青色蛍光成分は加熱(煮沸)で蛍光が変わらない。HPLC 分析によれば、加熱によって成分量はほとんど変化しないことから、加熱に対して安定な成分であることがわかる。

緑色蛍光は加熱(煮沸)で蛍光が強くなる。確認するため、加熱 10 分ごとにメタノール：水=1：1 展開溶媒でろ紙展開し蛍光を調べたのが資料 4 である。時間を追って蛍光が強くなることがわかる。加熱により緑色蛍光が強くなる理由として、濃縮されたためと考えたが、加熱による化学変化や、2 つ以上の成分の複雑な結合なども考えられ、単純な濃縮ではない可能性が高い。今後の研究が必要である。



資料 4 加熱 10 分ごとのろ紙展開

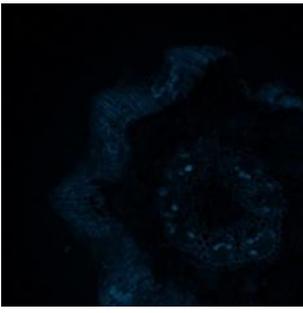
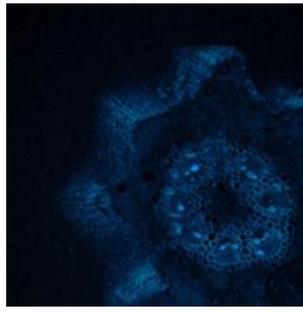
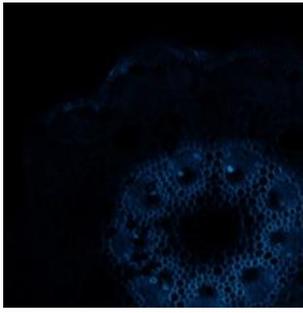
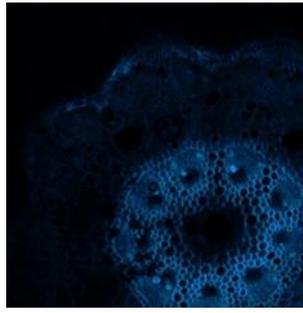
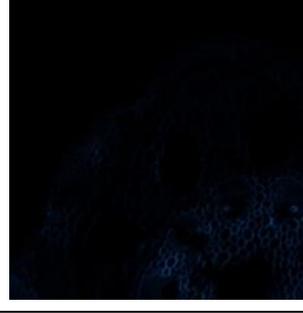
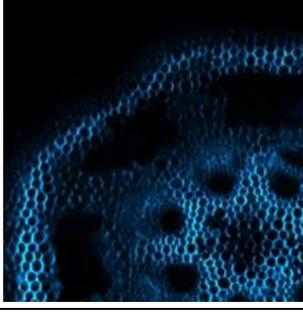
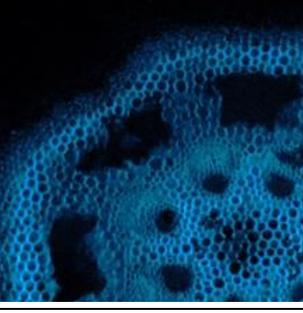
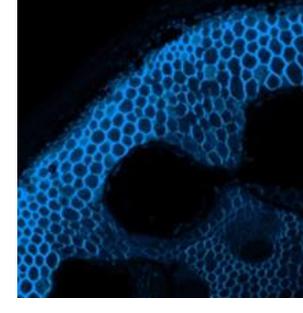
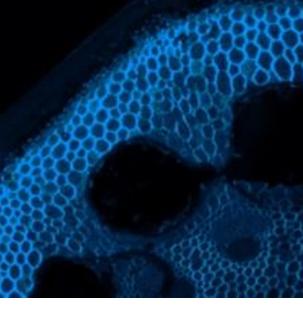
8. 研究 2

スギナ細胞の蛍光部位の特定

スギナの切片を作成し顕微鏡下で観察すると、細胞壁が蛍光しているように見えるが、通常の顕微鏡では観察が難しい。日本進化学会で高校生ポスター発表を行った際に助言をいただき、静岡県立大学において「共焦点レーザー顕微鏡」で観察させていただくことができた。共焦点レーザー顕微鏡とは、対象物表面にレーザーによりピンポイントで励起光を当て、非常に鮮明な蛍光を観察できる顕微鏡である。

<方法>

スギナの地下茎から地上茎の先まで、資料 5 のように スギナを 5 等分し、その断面図 1～5 を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。通常の 375nm の紫外線ライトに最も近い 405nm の励起光を当てた写真が資料 5 の写真である。「蛍光比較」は同じ条件での蛍光の強さの比較である。「蛍光調整」は、蛍光が見えやすいように明るさを調節したものである。

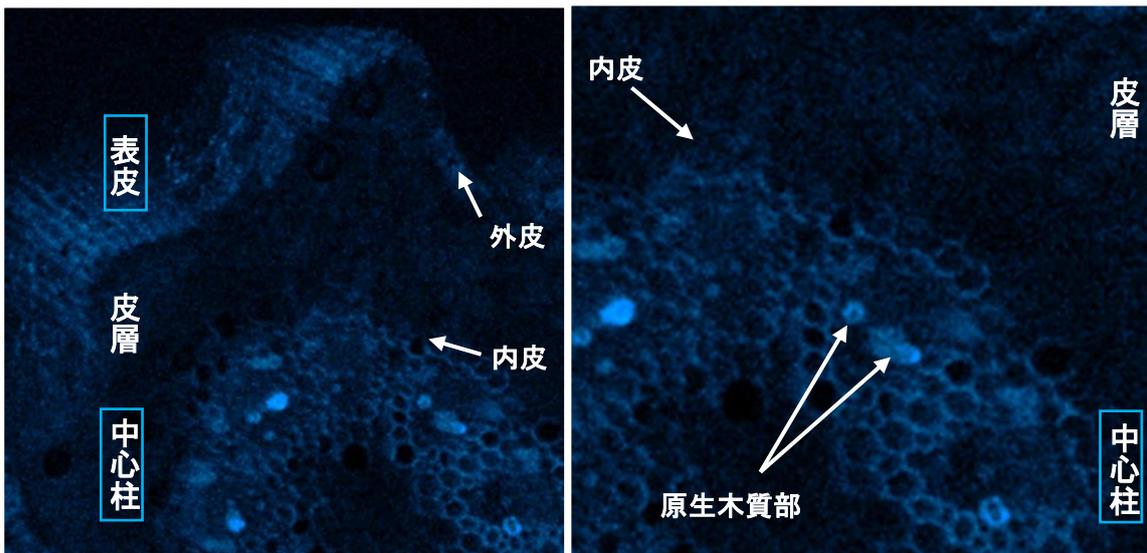
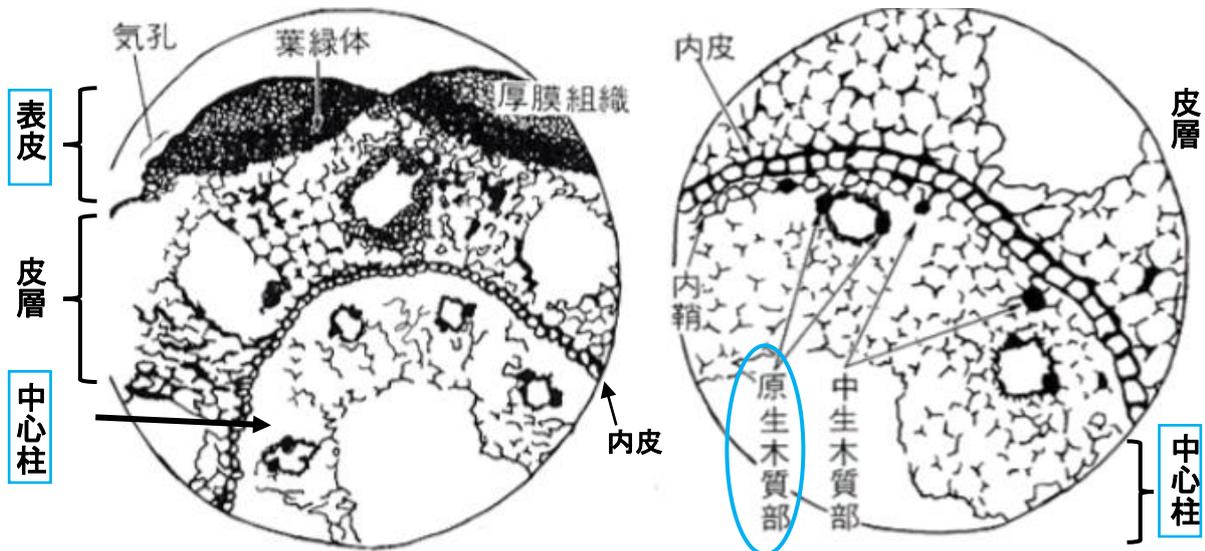
スギナ	蛍光比較〈同一条件〉	蛍光調整〈明るさ調節〉
		
		
		
		
		

資料5 共焦点レーザー顕微鏡による切片観察

<結果>

共焦点レーザー顕微鏡の観察から分かったことは以下である。

- (1) 蛍光するのは細胞壁である。細胞内には蛍光が認められない。
- (2) 蛍光に強弱がある。資料蛍光比較のように同じ条件で比較すると、上部の茎は蛍光が見えないほど弱い。一方、根元に近い茎ほど強く蛍光する。
- (3) 資料6は資料5の1の写真の拡大であり、図は「神戸のシダ」に掲載されていた茎の断面図である。顕微鏡の写真とスギナの構造を表す図の比較を行い、より精密に観察した。
 - ① 左側の図と写真のように、茎は外側から、表皮・皮層・中心柱でできており、皮層の内側を内皮が囲む。皮層にはデンプンが蓄えられ、中心柱では維管束で水や有機物を運んでいる。今回の撮影において、皮層の蛍光は弱く、外皮と中心柱の蛍光が強い。つまり蛍光を発する場所は、表皮と中心柱であり、維管束を含む中心柱の蛍光が特に強い。スギナの維管束は裸子植物と同じ維管束であり、仮道管と師管を持つ。
 - ② 蛍光の強い中心柱を拡大すると、右側の写真のように、原生木質部が強く蛍光する。



資料6 切片の詳細

9. 考察

(1) 地下茎の蛍光が強い

昨年の研究から、F1 は 320nm 付近の紫外線を吸収することがわかっているが、地表に出ている葉の部分よりも、光の当たらない地中にある地下茎の蛍光が強い。このことから、2021 年に予想していた、F1 が紫外線を吸収するのは「植物にとって有害な紫外線を吸収する」ためではないと考えられる。

(2) 蛍光が長時間安定

蛍光は、葉や上部の茎よりも地下茎が強く蛍光する。上部の茎は若い細胞で、地下茎は分裂成長した古い細胞でできている。これは、蛍光成分が細胞の成長につれて増加することを意味するのではないか。文献で調べたところ、植物の道管・仮道管は、細胞分裂時に細胞板から 1 次細胞壁ができた後、その内側に 2 次細胞壁ができ、細胞壁中に、「リグニン」という青色蛍光を発する芳香族高分子が蓄積して木化していく。同時に細胞はアポトーシスを起こして原形質を失い、細胞壁だけになって空洞化する。我々の調査している蛍光部分は仮道管などを含む中心柱の細胞壁に見られる。スギナが乾燥して原形質が失われても蛍光が消えなかったのは、細胞壁に蛍光成分が蓄積されていると考えることができる。蛍光が長時間変化せず安定であることについても、リグニンが複雑多様で難分解性の化学構造を持つことと、関係するかもしれない。

(3) 細胞壁の蛍光

共焦点レーザー顕微鏡による分析で、細胞内は蛍光せず細胞壁が蛍光した。このことから、仮説の「蛍光成分は細胞壁にかかわる物質である」は証明されたことになる。細胞壁の青色蛍光成分としては、(2) で挙げたリグニンが有名であるが、リグニンは水溶性ではないため、私たちの探している蛍光成分ではない。そこで私たちは現在、「リグニンの前駆体」に水溶性の物質が生じる可能性に注目している。リグニンは複雑な構造を持ち、まだ不明な部分も多い。リグニンが前駆体から形成される過程や、リグニン形成後に分解される過程のどこかで、蛍光を発する青い水溶性物質が生じる可能性があるのではないかと考えている。

下の表は植物の系統別に、細胞壁に含まれるリグニンの種類を分けたものである

	シダ植物	裸子植物 (針葉樹)	被子/双子葉類	被子/単子葉類
H 型リグニン	○	○	○	○
G 型リグニン	○	○	○	○
S 型リグニン			○	○

シダ植物や裸子植物 (針葉樹) の二次細胞壁では、一部の例外を除き、ほぼグアイアシル (G) 型前駆体だけが重合した G 型リグニンが合成される。一方、被子植物は G 型リグニンの他に S 型リグニンを持っていて、シダ植物と被子植物は細胞壁の組成が異なっている。文献によれば、リグニンの化学構造は様々であり「リグニンの化学構造と植物系統の間には強い相関が見られる」(飛松 2016) とある。リグニンについて調べていく中で、シダから種子植物への進化と、蛍光成分の違いが関係する可能性が高まった。青い蛍光成分は、「シダ」が「種子植物」に進化する過程で変化した成分なのではないか、と考えている。私たちの 2021 の研究で、種子植物にもわずかに青色蛍光が見られたが、シダ植物とは違う蛍光である可能性を、今後探る必要がある。また、リグニン前駆体はベンゼン環を持つものが多く、2021 年の F1 にベンゼン環がないという NMR 分析結果と異なっている。他の分析も取り入れて確認するつもりである。

10. 今後の課題

- (1) リグニン標品に、酸、アルカリ、植物ホルモン、植物の持つアミノ酸などを作用させ、蛍光を持つ水溶性物質に変化できる可能性を調査する。
- (2) スギナの水溶性蛍光成分と、細胞壁の蛍光物質が、同一の物質かを確認する。
- (3) シダ植物と被子植物の青色蛍光物質が同一の物質かどうか比較する。
- (4) 成分分析の方法を何種類か試し、ベンゼン環の有無を確認する。
- (5) 現在「酸アルカリによる青色蛍光成分の変化」について実験を行っている。共通性と相違点を探り、蛍光の法則を見つける。

11. 参考文献

- ・細胞壁のはなし 東邦大学 川田建文 (2009)
<http://www.toho-u.ac.jp/sic/bio/column/017557.html>
- ・植物と人を“支える”細胞壁の科学 京都大学 飛松裕基 (2016)
<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/logos/wpcontent/upload/2016/10/db21a1f83bebce7acc418b44f49fb46e.pdf>
- ・神戸の自然シリーズ 神戸のシダ Siraiwa Takumi (1980)
<http://www2.kobe-c.ed.jp/shizen/shida/shida/03058.html>

12. 謝辞

静岡県立大学 食品栄養科学 田村謙太郎先生
甲南大学大学院 理工学部生物学科 八木宏樹様
静岡大学 農学部 生物資源科学科 加藤雅也先生
静岡理工科大学 理工学部物質生命科学科 齋藤明弘先生
同 先端機器分析センター 脇川祐介先生
本研究にご協力いただいた皆さまに感謝申し上げます。ありがとうございました。