

スギナに見られる蛍光成分Ⅲ

静岡県立磐田南高等学校 生物部

2年 市川こはる 1年 長谷川帆風 村上陽菜 田中純平

1. 動機

2021 年度の新人部員勧誘実験で、植物の葉の TLC(薄層クロマトグラフィー)を行った。クロロフィルの蛍光を見るために 375nm の小型紫外線灯を当てたところ、スギナ等の TLC 原点に、他の種子植物には見られない青い蛍光成分を確認することが出来た。蛍光成分には通常「脂溶性」が多い中、スギナの青い蛍光成分は「水溶性」である。この水溶性蛍光成分については私達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とから、純粋にこの美しい青色蛍光が何であるかを知りたいと思った。

2. これまでの研究

・青い蛍光成分は水溶性である。・他のシダ植物や種子植物にも蛍光が見られることがわかっている。・青い蛍光成分は細胞壁に見られ、乾燥や熱に強く安定している。・ $^1\text{H NMR}$ やフラボノイドのカラムによる高速液体クロマトグラフィーでは成分の同定には至らなかった。・古い地下の茎がより強く蛍光することから、二次細胞壁が蛍光していると考えられる。・細胞壁のうち、中心柱の原生木質部の蛍光が特に強い。・細胞壁に見られるという特徴から、青い蛍光成分の正体はリグニンに関係する成分であると考えた。(水溶性ではないリグニンは、水溶性の青い蛍光成分とは異なる)

3. リグニンとは

植物はリグニンによって木化する。リグニンは、細胞壁の内側に徐々に形成する 二次細胞壁 で合成される、安定した「不溶性」の高分子で青い蛍光を持つ。1つの物質の名称ではなく不規則なフェノール化合物の総称である。リグニンには S,G,H のタイプがあり、植物門によって異なる。現在我々は、研究している「水溶性」の青色蛍光成分がリグニンの前駆物質ではないかと考えている。

4. 本年(2023)度の研究

青い蛍光成分の特徴を薬品による化学的変化によって探る研究、及び、リグニンの前駆物質ではないかという予想から、植物門によって異なる結果が得られるかの研究を行った。

- ・蛍光成分の薬品への反応を調べ、蛍光成分の候補を絞り込む。
- ・スギナ以外の植物の持つ青い蛍光成分を比較し、植物門による違いと進化との関係を探る。

5. 仮説

- ① 水溶性の青い蛍光成分は、塩基性により長波長側に蛍光が変化する物質である。
- ② 水溶性の青い蛍光成分は植物門によって異なる。

6. 材料・機器等

<材料> 【シダ植物】 スギナ *Equisetum arvense* トクサ (スギナと同じトクサ属) *Equisetum hyemale* オシダ *Dryopteris crassirhizoma* 【裸子植物】 ソテツ *Cycas revoluta* ヒノキ *Chamaecyparis obtusa* 【被子植物】 イロハモミジ(以下カエデと表記) *Acer palmatum Thunb* ソメイヨシノ(以下サクラと表記) *Prunus x yedoensis* シロツメクサ *Trifolium repens*

<薬品> 蒸留水、メタノール、NaOH 溶液 0.1mol/L、KOH 溶液 0.1mol/L、Ca(OH)₂ 溶液 0.1mol/L、NH₃ 溶液 0.1mol/L、HCl 溶液 0.1mol/L、H₂SO₄ 溶液 0.1mol/L、HNO₃ 溶液 0.1mol/L、植物ホルモン(NAA、GA、IAA、2,4-D、KI、6-BA)

<器具>紫外線灯(365nm)、小型紫外線灯(375nm)、展開槽、ろ紙、
(紫外線灯の波長 10nm の差による蛍光の違いは無い)

<機器>共焦点レーザー顕微鏡(励起光 405nm)、蛍光分光光度計(375nm)、遠心分離機
断面の観察にはレーザーにより鮮明な蛍光を観察できる共焦点レーザー顕微鏡を、成分の
分析には蛍光分光光度計を、静岡県立大学にて使用させていただいた。

7. 研究1 薬品による変化

「塩基性により長波長側に蛍光が変化する物質である」の仮説を検証するための研究。

<予備実験>

スギナの水抽出液に NaOH を作用させ紫外線を照射した時、青い蛍光が緑色を帯び鮮やかになる事がわかった。すなわち「長波長側に蛍光が変化した、蛍光強度が強くなった」。

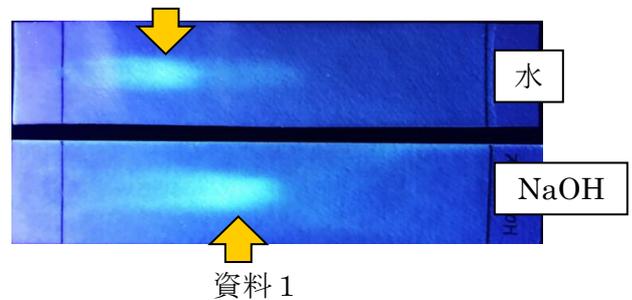
<方法>

- (1) 乾燥したスギナ地上茎 0.3g、蒸留水 4ml をそれぞれスクリー管に入れ冷蔵保存する。
- (2) **クロマトグラフィー** スギナ水抽出液「水」と、1mol/L NaOH を作用させた溶液「NaOH」を、水：メタノール=1：1 を展開溶媒としてろ紙によるクロマトグラフィーを行う。その後紫外線 365nm を当てて青色蛍光の Rf 値を比較した。
- (3) **蛍光波長分析** (1)の「水」と「NaOH」を、蛍光分光光度計により蛍光波長を分析して比較した。
- (4) **薬品による変化** ろ紙の中央にスギナの水抽出液を約 0.1ml つけ、3 滴(約 0.1ml)ずつ蒸留水及び溶液を滴下する。【塩基性・酸性】溶液は全て 0.1mol/L とし、NaOH 溶液、KOH 溶液、Ca(OH)₂溶液、NH₃溶液、HCl 溶液、H₂SO₄溶液、HNO₃溶液 を滴下した。また、蛍光成分がリグニンの前駆物質だとすると、蛍光成分の生成には植物が生成する植物ホルモンが影響している可能性もあるのではないかと考え、【植物ホルモン】NAA、GA、IAA、2,4-D、KI、6-BA を滴下した。

<結果>

【「水」「NaOH」のクロマトグラフィー】

スギナの水抽出液と、NaOH 溶液を作用させたものを比較した。クロマトグラフに紫外線 365nm を当てたのが資料 1 である。矢印は蛍光成分の原点からの距離を示す。NaOH により色が緑蛍光になっただけでなく Rf 値も変化することから、NaOH により別の物質に変化したことが分かった。

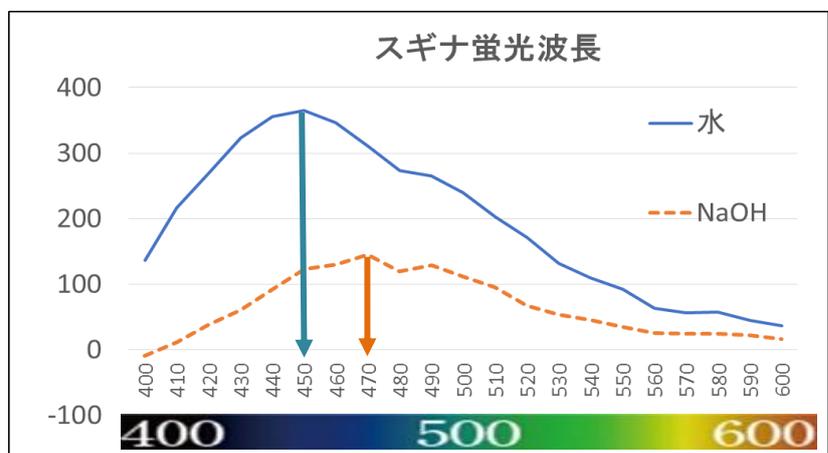


【「水」と「NaOH」の蛍光波長分析】

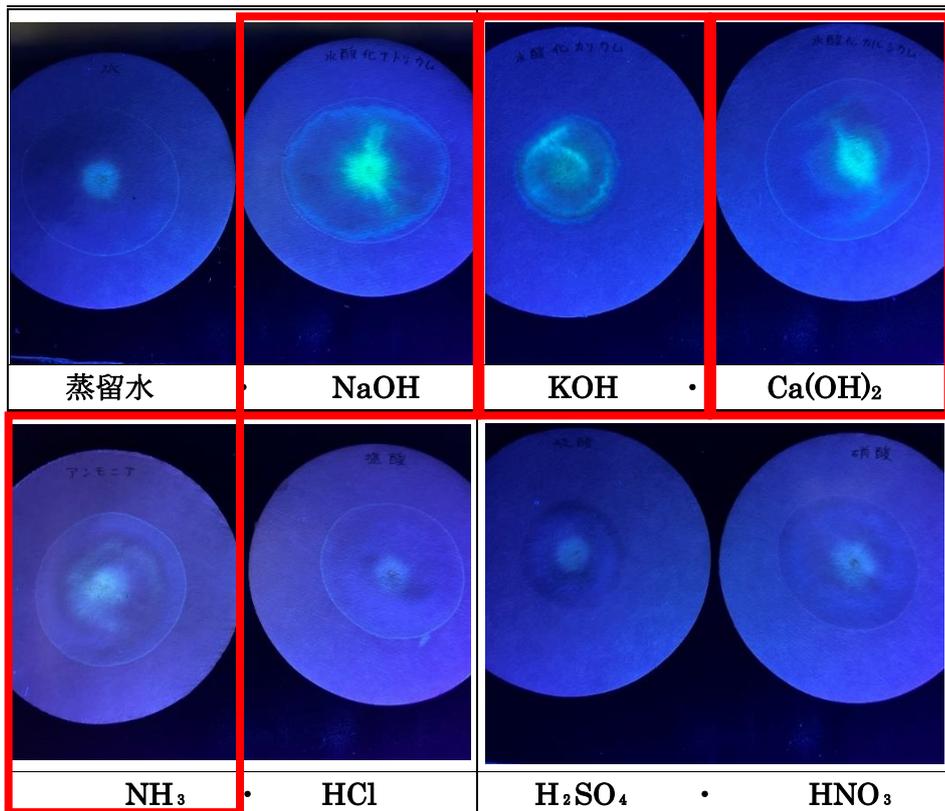
スギナの水抽出液に、蛍光分光光度計で 375nm の紫外線を照射した場合の蛍光波長を分析した。通常ピークが 450nm の青い蛍光を発していたスギナが、NaOH を作用させると、ピーク 470nm(長波長側)の青緑色に変化することが分かった(資料 2)。

【薬品による変化 塩基性・酸性】

スギナの水抽出液に塩基性・酸性溶液を滴下し、紫外線灯(365nm)を照射した時の変化で



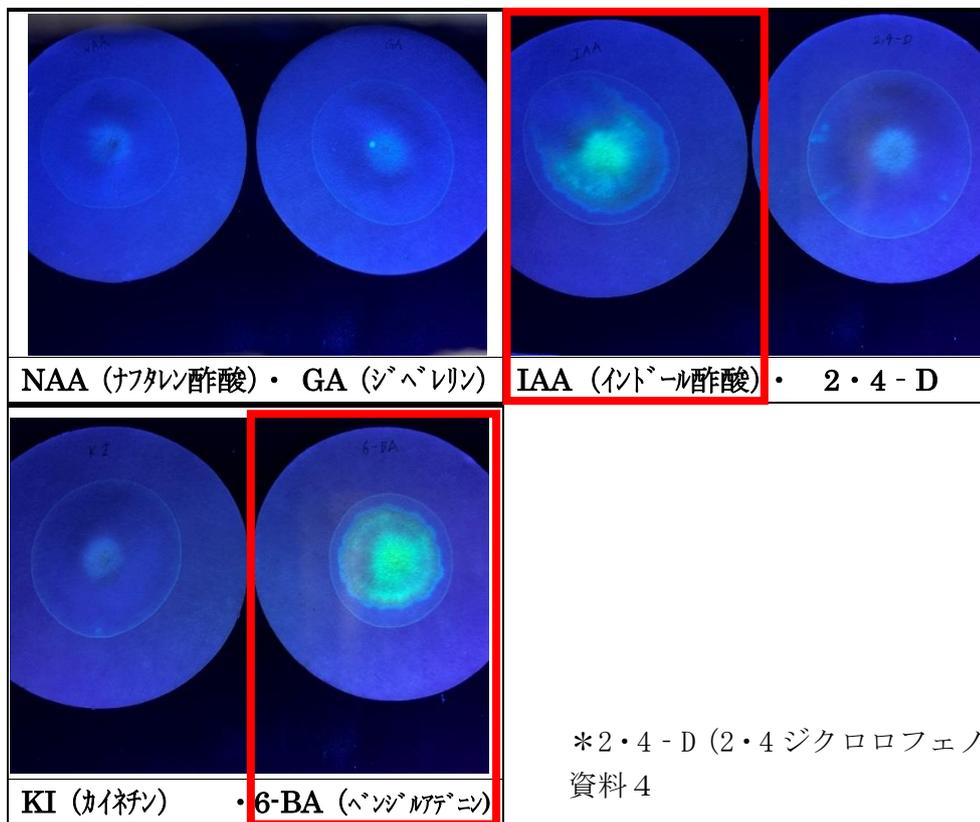
ある。塩基性の薬品 NaOH、KOH、Ca(OH)₂、NH₃の結果を四角で囲んだ。塩基性では、純水に比べて青蛍光と緑蛍光がはっきりと分離し、緑蛍光が強くなっている。一方、酸性の薬品 HCl、H₂SO₄、HNO₃では強い緑蛍光は見られなかった(資料3)。



資料3

【薬品による変化 植物ホルモン】

スギナの水抽出液に植物ホルモンを滴下し、紫外線灯(365nm)を照射した時の変化(資料4)。



*2·4-D (2·4ジクロロフェノキシ酢酸)

資料4

四角の枠で囲った、IAA（インドール酢酸）と 6-BA（6-ベンジルアデニン）の 2 種のホルモンで、塩基性溶液と同じように緑蛍光を示した(資料 4)。

そこで、pH 試験紙（ADVANTEC 社製）にて pH を確認したところ、IAA（インドール酢酸）と 6-BA（6-ベンジルアデニン）の 2 種は塩基性、他は酸性であることが分かった(資料 5)。

植物ホルモン	NAA	GA	IAA	2・4-D	KI	6-BA
pH	4	4	11	4	1	11

<考察>

NaOH 溶液を作用させると、スギナ水抽出液は、青色蛍光から緑色蛍光の別の物質に変化した。それは、展開時の Rf 値が変化したこと、そして蛍光波長のピークが 450nm から 470nm に変化したことから確認できた。塩基性溶液を作用させた時には NaOH 作用時とほぼ同じ変化が起こる。「**水溶性の青い蛍光成分は、塩基性により長波長側に蛍光が変化する物質である。**」という仮説は証明されたことになる。

なお、植物ホルモンは水に難溶のものも多く、IAA や 6-BA の製品はアルカリ性溶液に溶解してある。緑色の蛍光に変わったのは、植物ホルモンが作用したというより、溶媒のアルカリ性溶液に反応したと思われる。

8. 研究 2 植物間の蛍光の比較

「**蛍光成分は植物門によって異なる**」の仮説を検証するための研究。

共焦点レーザー顕微鏡、蛍光分光光度計は、静岡県立大学にて使用させていただいた。

<比較した植物> 6 材料、機器を参照

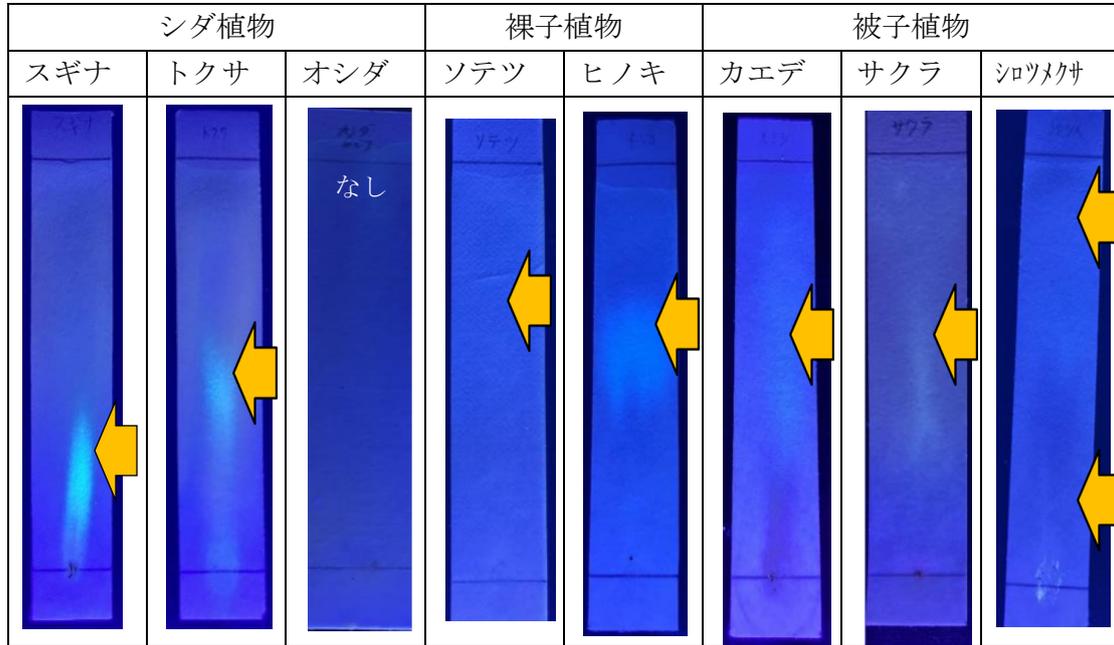
<方法>

- (1) それぞれの植物の葉や地上茎を、室温で完全に乾燥させる。
- (1) 乾燥した植物を 0.3g、抽出溶媒(純水)4ml をそれぞれスクリー管に入れ冷蔵保存する。
- (2) **クロマトグラフィー** ろ紙を使い水：メタノール＝1：1で展開する。展開は 10cm に統一。
- (3) **蛍光成分抽出** 濃度を高めるために、20 回クロマトグラフィーで展開し、青蛍光が確認できる部分の成分を抽出する。20 枚の展開したろ紙から蛍光部分のみ切り取ってスクリー瓶に入れ、水：メタノール＝1：1 溶液中に蛍光成分を再抽出した。また、植物成分を抽出していないろ紙だけのものを水：メタノール＝1：1 で抽出し、その溶液を基準溶液とした。
- (4) **蛍光波長分析** (4)で作った試料は、遠心分離機 ×1000G・1 分で、ろ紙の繊維を沈殿させた後、上澄み液の蛍光波長を測定した。蛍光分光光度計で 375nm の紫外線を当てて蛍光波長を測定し、測定した蛍光波長から基準溶液の値を引いた値を蛍光強度(相対値)とした。基準溶液の値を引くのは、ろ紙及び抽出溶媒の持つ蛍光を取り除くための処理である。
- (5) **茎断面の蛍光** 乾燥させた各植物は切片プレパラートを作り、共焦点レーザー顕微鏡で断面に 405nm の光を当て、蛍光する組織を観察した。

<結果>

【クロマトグラフィー】<水溶性>

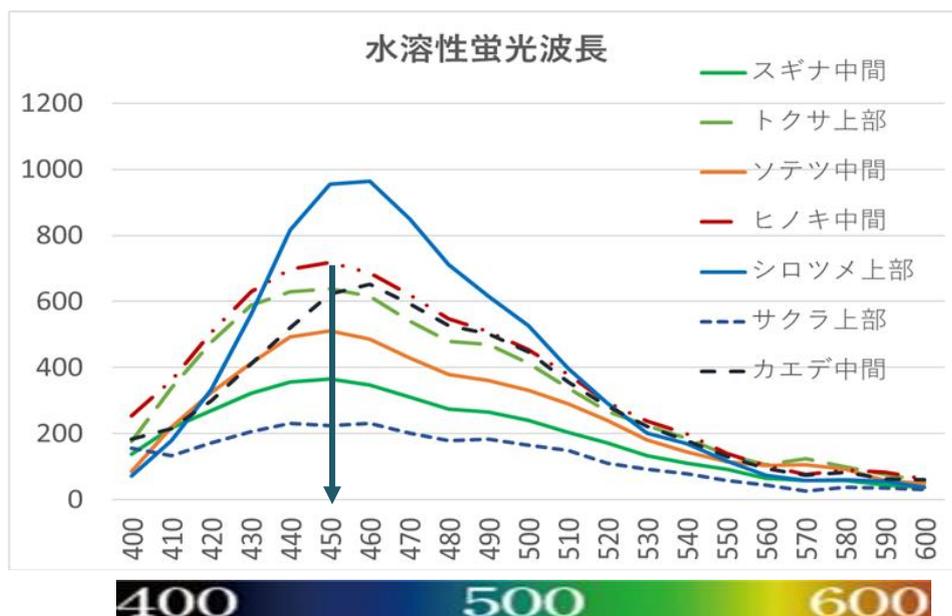
ろ紙で左の原点から右の展開前線まで展開し 365nm の紫外線灯下で撮影したクロマトグラフィー結果である。矢印 ← は蛍光成分の原点からの距離を示している。青い蛍光の Rf 値をスギナと比較すると、同じトクサ属のトクサでもスギナとは異なることが分かった。スギナとは異なるが、Rf 値に共通点があるのは裸子植物のソテツとヒノキである(資料6)。



資料6

【蛍光波長】<水溶性>

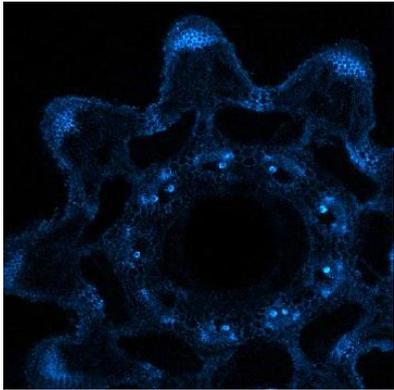
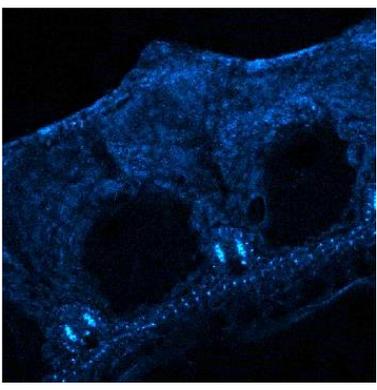
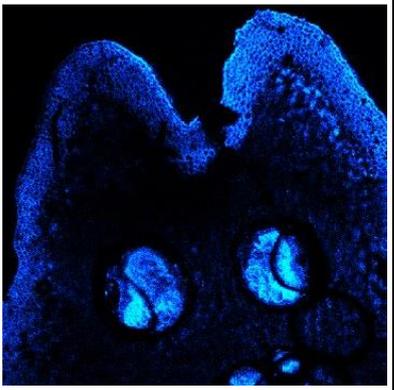
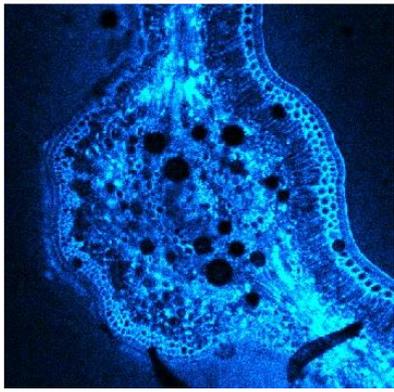
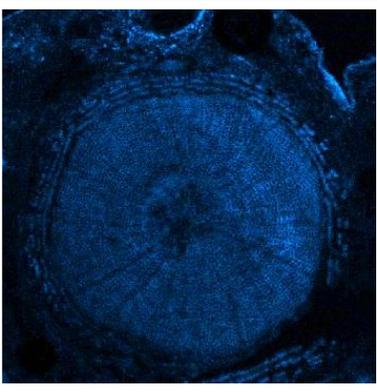
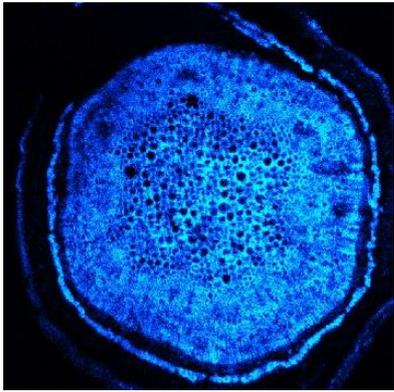
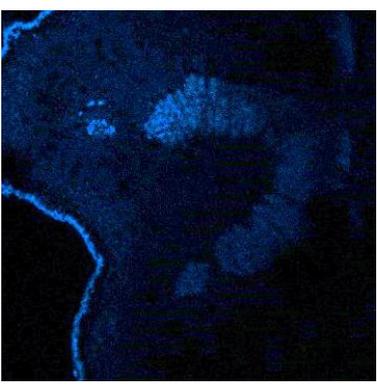
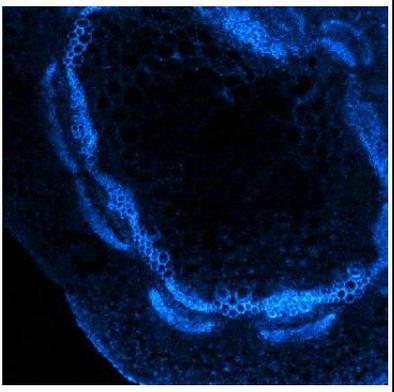
蛍光分光光度計により、明確にピークが現れた水溶性蛍光波長を比較した結果が資料7である。横軸は波長、縦軸は蛍光強度の相対値を示し、青色蛍光とは 405nm~460nm がピークになるものを指す。450nm 付近でのスペクトルが似ているのがスギナ中間、トクサ上部、ヒノキ中間、サクラ上部であるが、上記クロマトグラムにて Rf 値が異なっているため、色は似ているが同じ物質ではないと考えられる。



資料7

【茎断面の蛍光】

共焦点レーザー顕微鏡 405nm で撮影した「茎断面の蛍光」である。共焦点レーザー顕微鏡には、375nm の紫外線を照射する機能がないため、405nm が一番紫外線に近い波長である。青い蛍光は細胞壁に見られ、細胞内には観察できない。維管束が強く蛍光し、特に道管のある木部の蛍光が強い。シダ植物のスギナとトクサは原生木質部、オシダは網状中心柱の蛍光がひとときわ目立つ。ヒノキ、カエデは茎部分が木化しているため茎中心部も蛍光している(資料8)。

茎断面の蛍光 (共焦点レーザー顕微鏡 405nm、調整済み)			
シダ植物			
	スギナ	トクサ	オシダ
	裸子植物		
ソテツ		ヒノキ	
被子植物			
	カエデ	サクラ	シロツメクサ

<考察>

上記の結果を総合する。「水溶性」において、植物に見られる青い蛍光成分は、シダ植物を含め、スギナと一致するものはないことがわかった。蛍光成分の色は似ているが、Rf 値が異なっているために別の物質である。また、茎断面の蛍光は基本的に道管のある木部で強く、やはりリグニンと無関係とは思えない。リグニンとの関わりを今後探っていきたい。

私たちが研究対象にしている「水溶性」の青色蛍光成分において、植物門と青色蛍光の相関は見られなかった。「水溶性の青い蛍光成分は植物門によって異なる」という仮説は証明されなかった。逆に考えると、水溶性の青い蛍光成分は、種によって異なる進化の過程で、それぞれ獲得してきた成分と考えられ、植物の個性の豊かさを感じた。

9. まとめ

- (1) 「蛍光成分は、塩基性により長波長側に蛍光が変化する物質である」という仮説は証明された。Rf 値が変化し、蛍光波長のピークが 450nm から 470nm に変化することからも、塩基性溶液により別の物質に変化することを確認できた。
- (2) 「蛍光成分は植物門によって異なる」のではないことが分かった。スギナの持つ水溶性の青い蛍光成分の Rf 値は、同じ属のトクサさえも異なっており、他の植物とも異なっていた。水溶性の青い蛍光成分は種によって異なる進化の過程でそれぞれ獲得してきた個性的な成分と考えられる。

10. 今後の課題

- (1) スギナの水溶性の青い蛍光成分について、リグニンの前駆物質の可能性と、塩基性で変化するという今回の結果から成分を絞り込み、成分分析する方法を探る。
- (2) リグニンが加熱で変化する可能性を静岡理工科大学の居波智也先生に伺った。植物門ごとの細胞壁のリグニンを、薬品や加熱処理などの方法で、水溶性の青い蛍光成分に変化させることができないかを探る。
- (3) リグニン標品のろ過や希釈方法、植物ホルモンの希釈方法など、実験方法を確立する。

11. 参考文献

- ・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>
- ・植物と人を“支える”細胞壁の科学 飛松 裕基 (京都大学)
<http://www.rish.kyoto.ac.jp/logos/wpcontent/upload/>
- ・細胞壁のはなし 東邦大学 生物学の新知識 2009年9月号 川田 健文(2009)
<https://www.toho-u.ac.jp/sci/bio/column/017557.html>
- ・植物バイオマス化学研究室(東京農工大学) 松下泰幸(2021)
<https://web.tuat.ac.jp/~plant-biomass-chem/index.html>

12. 謝辞

静岡県立大学 食品栄養科学部 田村謙太郎先生

静岡理工科大学 土木工学科 居波智也先生

本研究にご協力いただいた皆様に感謝申し上げます。ありがとうございました。