

8 蛍光を発する植物Ⅱ

静岡県立掛川東高等学校 サイエンス部

1 年 鈴木光弘 花岡大志 武藤旭

1 動機

バレンシアオレンジ果皮の抽出液を、薄層クロマトグラフィーで分離すると、可視光ではほとんど色がない。しかし、紫外線を当てると、たくさんの蛍光色のバンドを見ることができた。私たちはそのバンドに大変興味を持った。

昨年より「植物はなぜ蛍光物質を作るのか」について研究を行っている。本年度は、成分の同定と保存による変化の研究を行った。

2 昨年の研究

- ・バレンシアオレンジの果皮に紫外線をあてると、果皮の内側が緑色に蛍光する。
- ・保存して時間がたつと蛍光 537nm の蛍光すなわち緑色の蛍光が減る。
- ・京都大学の論文から蛍光物質はフラボノイドではないかと予想されている。
- ・蛍光を発する生物の中には有害な紫外線を吸収し、可視光線に変えることで、身を守っているのではないかと予想される生物も存在する。

3 本年度の研究

研究 A 成分の同定

バレンシアオレンジ果皮の抽出液を薄層クロマトグラフィーによって分離した。Rf 値から分析しようとしたが、Rf 値では成分を突き止められなかったため、大学の先生方の助言を受けて、高速液体クロマトグラフィーによって成分の同定を行った。

研究 B 保存による変化

保存による変化を薄層クロマトグラフィーと蛍光分光光度計による色分析で行った。

4 研究 A 成分の同定

材料…バレンシアオレンジ 励起波長…366nm(紫外線灯の最大波長)

薬品：抽出溶媒…エチルエーテル 展開溶媒…アセトン：石油エーテル 3：7

抽出溶媒 (TLC からの抽出) …ジメチルスルホキシド：メタノール 1：1

(1) 方法 1 薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離

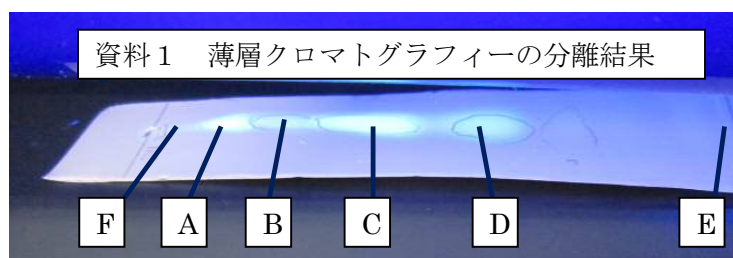
生物Ⅱの教科書にある同化色素の分離と同じ方法を用いた。

- ① 細かく削ったバレンシアオレンジの皮を抽出溶媒エチルエーテルに 1 日つけて、成分を抽出した。
- ② アセトン：石油エーテル=3:7を展開溶媒として成分を分離し、紫外線で確認した。

(2) 結果 1

- ① 6 種に分離したことが確認できた。(資料 1 参照)
- ② それぞれを A～F バンドと名付けた。

資料 1 は成分を分離した薄層クロマトグラフィーに 366nm の紫外線をあてた写真である。左から展開した。また、E のすぐ右に 10cm の展開前線がある。



(3) 方法2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離

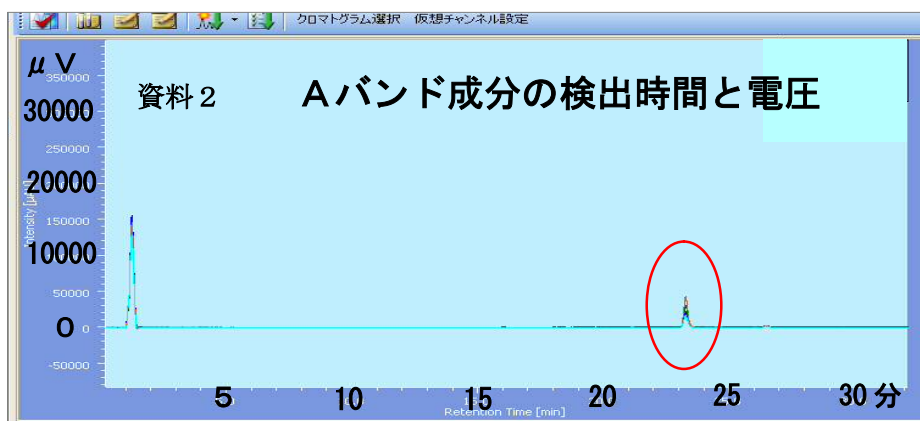
- ① TLC を 150 本行い、A～F のバンドのシリカゲルを柄つき針で丁寧に削り取る。
- ② シリカゲルに付着した成分を、ジメチルスルホキシド:メタノール = 1:1 溶液に抽出する。
- ③ ろ紙でろ過し、シリカゲルを除く。
- ④ A～F を、注射器 および ろ過装置 を使って精密にろ過する。
- ⑤ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のカラムに通し、分析を行う。
- ⑥ 静大農学部フラボノイドのデータより抽出成分の同定をする。

HPLC の機械では「カラム」という管を通して、液体の成分を分離する。成分によってカラムを通りぬける時間が異なる。液体が純物質ならば、検出のピークが1回のみ出てくることになる。静大農学部には、フラボノイドのデータがあり、カラムを通りぬける時間に加えて、紫外線の吸収波長からフラボノイドの成分を同定することができる。

(4) 結果2

資料2のグラフはAバンドの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のグラフである。検出のピークがひとつなので(赤丸部分)、Aバンドは純物質であることがわかる。純物質が得られたということは、私たちの薄層クロマトグラフィーで用いた抽出や展開の溶液は、成分の分離に適していたことがわかる。

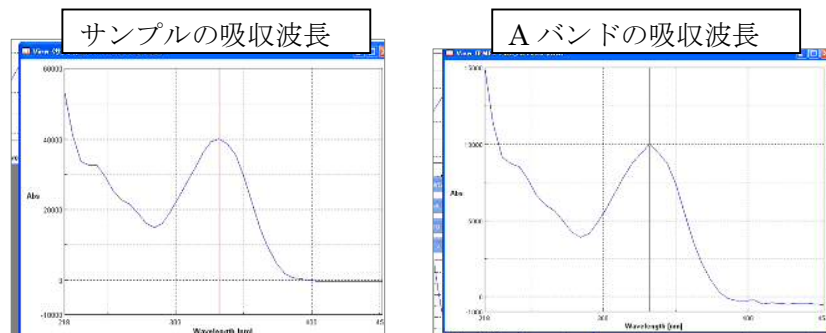
カラムを通り抜けた検出時間は 23.2 分だった。この時間を静岡大学のデータと照らし合わせると、シネセチンではないかと予想できる。



資料3のグラフは、シネセチンを同定できた時のグラフである。フラボノイドは紫外線を吸収するため、どの波長を吸収するかで成分同定ができる。左のグラフがシネセチンのサンプルの吸収波長である。右のグラフが私たちの分離したAバンドの成分の吸収波長である。どちらも横軸が波長、縦軸が吸光度を示す。2つのグラフの形が同じなので、Aバ

ンドの成分はシネセチンと同定された。

資料 3

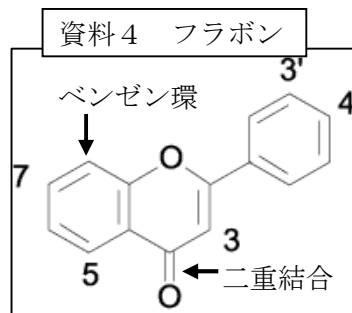


同じようにすべてのバンドを分析した結果、3つの成分が同定できた。Aはシネセチン、Bはノビレチン、Dはヘプタメトキシフラボンである。

(5) 考察

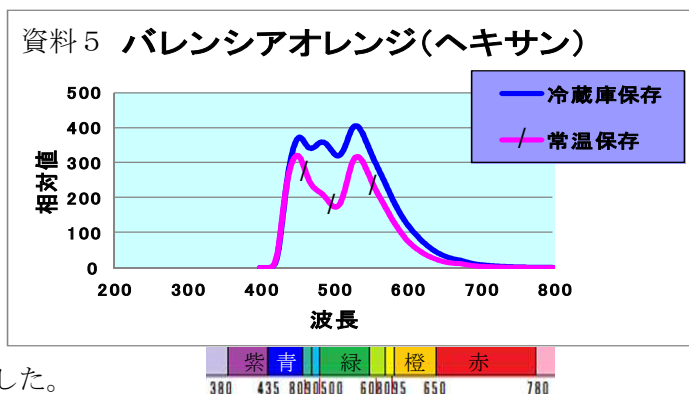
昨年、京都大学で柑橘類を研究している近藤教授から、柑橘類果皮の蛍光物質の候補を教えていただいている。フラボノイドのポリメトキシフラボンである、シネセチン・ノビレチン・タンゲレシチン・ヘプタメトキシフラボンの4種である。今回その4種のうち、シネセチン・ノビレチン・ヘプタメトキシフラボンの3種が同定できた。予想された4成分のうち、3つもの成分が同定されたのは驚きだった。

蛍光を発する分子には構造的に特徴がある事を、昨年調べている。「ベンゼン環」と「二重結合」を持つことである(資料4)。フラボノイドのうちフラボンにはこの2つがそろっている。上記の4つもこの構造を持っている。フラボノイドは植物の生成する色素で多くの種類があり、紫外線を吸収する。中には植物の生体防御などの効果をもつものもある(日本薬学会 HP より)。今回同定された蛍光物質の3種も、バレンシアオレンジが、果皮をカビなどから防御するために生成している可能性がある、私たちは考えている。



5 研究 B 保存による変化

柑橘類を保存すると、蛍光の色が 500nm 付近の緑色が減り青色にみえるようになることが昨年調べられている(資料5)。そこで、今年は分離した A~F の成分のうち、保存により減少したり増加したりしたものがないかを調べることにした。



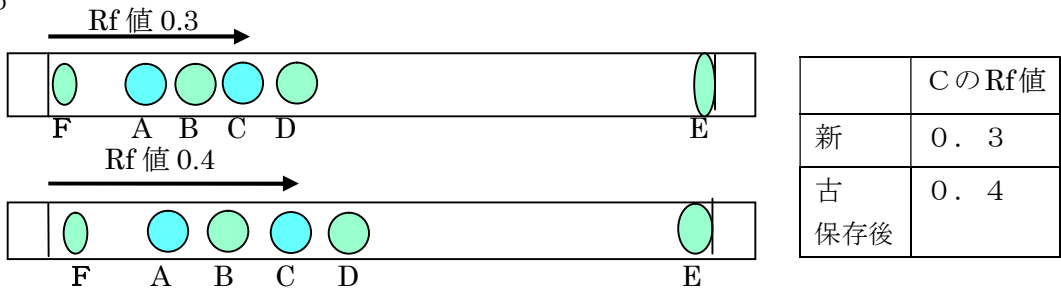
(1) 方法 1 薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離

新しいものと1カ月冷蔵庫で保存した古いものを、薄層クロマトグラフィーによって分離し、A~Fの変化を調べた。

(2) 結果 1

薄層クロマトグラフィーでの結果を図にしたのが資料6である。1 カ月保存すると、それぞれの成分のRf 値が大きくなった。C バンドのRf 値で10 本の平均で比較したところ、0.3 から0.4 になった。0.4 ÷ 0.3 で約1.3 倍大きくなったことになる。しかし減少したとみられる成分は見つかっていない。またE の成分の幅が増加した。

資料6



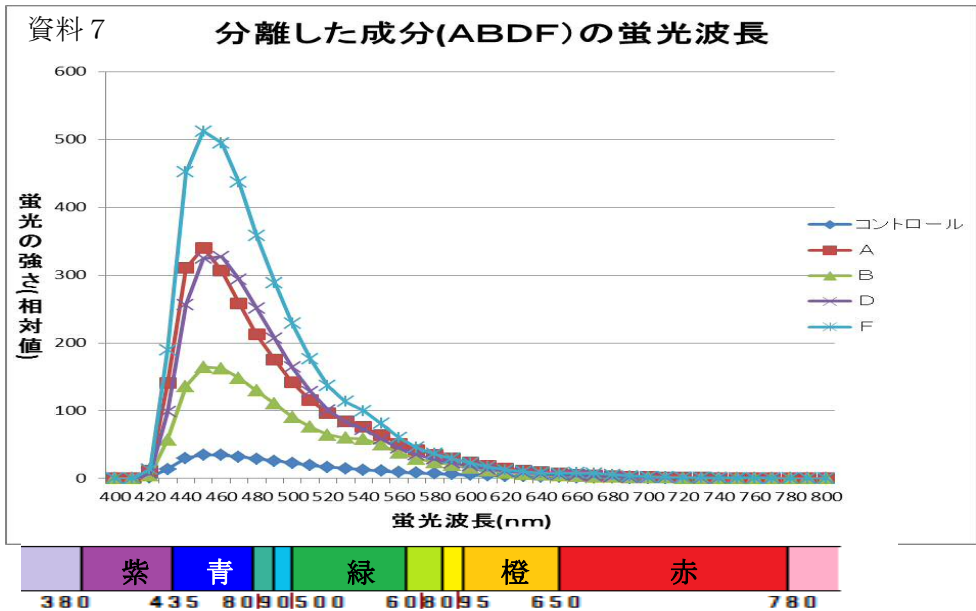
(3) 考察1

保存したとき Rf 値が1.3 倍大きくなるということは、成分が分解されて、分子が小さくなったことで移動速度が速くなったことや、シリカゲルへの吸着の強さが変化したことが考えられる。ただし、分解されるとフラボノイドの構造が変わり、蛍光を発しなくなる可能性が高くなる。その場合蛍光が減少するはずだが、蛍光が減少したようには見えなかった。今後、正確に定量して調べる必要がある。一番移動速度の速いE が増えたことと、Rf 値が増加することは関係があるのかもしれない。

(4) 方法2 蛍光分光光度計による蛍光波長の分析

蛍光分光光度計でA～F の蛍光色の波長を分析することで、保存によって減少する500nm 付近の成分が何かを調べようと考えた。

(5) 結果2



A～F の蛍光波長を蛍光分光光度計によって分析した。どの成分のグラフも同じような形をしている。E は量が少なく、今回は分析できなかった。C の蛍光が強く、ほかのバンドの蛍光波長を読み取ることができないため、C を除いたABDF の蛍光波長のグラフ

にしてみたのが資料7である。分析した結果、A,B,F が 450nm、C,D が 460nm が最大蛍光波長であり、すべてのバンドの色が 450nm 付近、つまり青色であった。500nm の緑色の成分は見つけられなかった。

(5) 考察

昨年の研究によると、保存期間が長くなるにつれバレンシアオレンジの蛍光は 500nm つまり緑色付近が減少した。今年は分析した成分を調べて 500nm で蛍光する成分を見つけ、減少した成分をつきとめられると考えたが、分離した成分がほぼ同じ 450nm 付近の青色であり、どれが減少したのかつきとめることはできなかった。

ただし今回、抽出のあと蛍光波長を測定するまでに時間がたっている。抽出後に成分の分解が進み、緑色が減った可能性もあるため、抽出後すぐに成分の蛍光波長を測定して確かめる必要がある。

6 今後の課題

植物は生きるために必要だから様々な成分を作り出すはずである。今回分離に成功した蛍光成分について、植物は何のために作り出すのかを調べていきたい。

(1) 蛍光することで紫外線から種子を守っているのか？

紫外線から種子を守ると仮定すると、成熟した大きい果実は果肉などで外部から距離があるため、蛍光成分で紫外線を吸収する必要は減るはずである。そのため、成熟した大きい果実よりも、未熟な小さい果実の方が、蛍光成分が多いはずである。成熟した果皮と未熟な果皮の成分を定量して比較する。

(2) 蛍光成分のフラボノイドによってカビなどから果皮を守っているのか？

フラボノイドによってカビなどから果皮を守っていると仮定すると、今回分離した成分によってカビの増殖を抑えることができるはずである。柑橘類に多いカビをシャーレに培養し、その中心に今回分離した成分A～Fを滴下することで、カビの増殖が抑えられるかを研究する。

(3) 保存によって蛍光が青くなるのは、どの成分の変化か調べる。

保存前後の成分を抽出して定量し、保存後に分解されるなどして減少している蛍光成分がないかを調べる。また、古くなると蛍光成分が減少するのならば、それによってカビなどから果実を守れなくなるのではないか確認する。

7 参考文献

- ・改訂版 高等学校 生物Ⅱ 数研出版
- ・公益社団法人日本薬学会 HP 薬学用語解説 <http://www.pharm.or.jp/dictionary/wiki.cgi>
- ・知りたいサイエンス 光る生き物 加藤薫＝監修／池田圭・武位教子著 技術評論社
- ・農業機械学会論文E A E F <http://www.jstage.jst.go.jp/article/eaef/2/2/54/pdf>

8 謝辞

* 静岡大学農学部 共生バイオサイエンス学科 加藤雅也准教授 小暮瑛氏 神谷志織氏
高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用させていただき、抽出した成分を同定することができました。熱心に御指導いただきありがとうございました。

* 静岡理工科大学 先端機器分析センター 早川一生 所長

蛍光分光光度計をお借りし、抽出した成分の蛍光波長を調べることができました。丁寧

な御指導に感謝いたします。