

8. 蛍光を発する植物Ⅲ

静岡県立掛川東高等学校

2年 鈴木光弘 武藤旭 花岡大志 1年 池田大記 小澤祐河 中島耕之介

1 動機

柑橘の果皮の成分を抽出して、薄層クロマトグラフィー(TLC)によって分離すると、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。

一昨年より「植物は何のために蛍光成分をつくっているのか」についての研究を行っており、昨年は蛍光成分の同定に成功した。本年度は蛍光成分のカビへの作用を研究した。

2 昨年までの研究

平成23年の研究では、バレンシアオレンジの果皮に紫外線(366nm)をあてると、果皮の内側が537nmの緑色に蛍光することが分かり、京都大学の論文から蛍光成分はフラボノイドではないかと予想した。平成24年の研究ではTLCによって蛍光成分の分離に成功し、蛍光成分を同定することができた。この柑橘の蛍光成分に、カビなどを防ぐ作用があるのではないかと予想した。

3 本年度の研究

本年度は蛍光成分のカビへの作用を研究した。TLCのバンドから蛍光成分を抽出し、それを培地に加えてカビの繁殖を抑制できるかを調べた。

4 材料

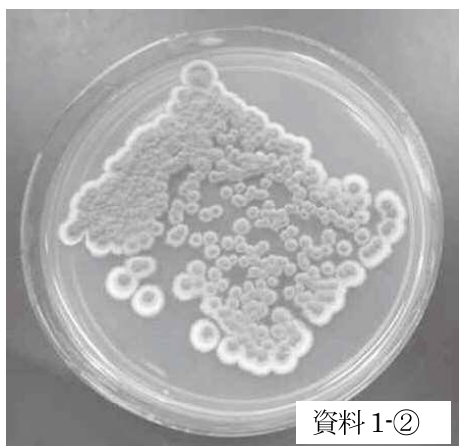
柑橘…バレンシアオレンジ・ネーブルオレンジ

目的の蛍光成分を抽出できるものを使用した。昨年使用したバレンシアは夏の柑橘である。そのため1年を通して蛍光成分を得るために、冬用の柑橘が必要だった。予備実験でTLC分離を行い、一番分離の状態の似ているネーブルで共通の成分を探した。

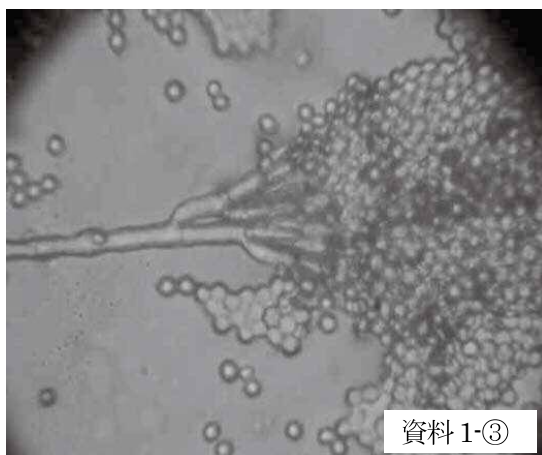
カビ…*Penicillium* 属

柑橘が緑色の粉をふいたようになる代表的なカビを選び(資料1-①)、腐敗した柑橘からカビを単離培養した(資料1-②)。資料1-③は単離培養したカビの顕微鏡写真である。集落の色調、胞子が形成される特徴的な形態、腐敗した柑橘から分離されたということから、*Penicillium* 属と考えられる。





資料 1-②



資料 1-③

5 薬品

抽出溶媒（果皮からの成分抽出）…アセトン：石油エーテル＝3：7

展開溶媒…ジエチルエーテル

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

※この溶媒はジムソメタと呼ばれており、今後その略称を用いる。

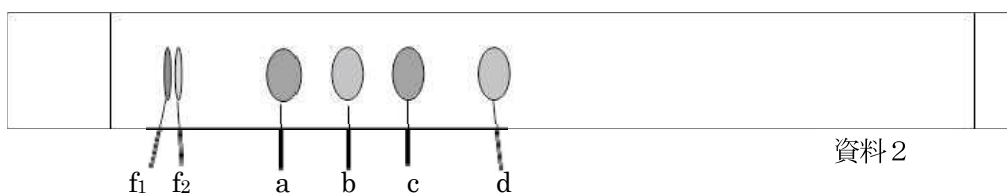
抽出溶媒（カビへの作用時）…エタノール

6 方法

(1) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による蛍光成分の分離

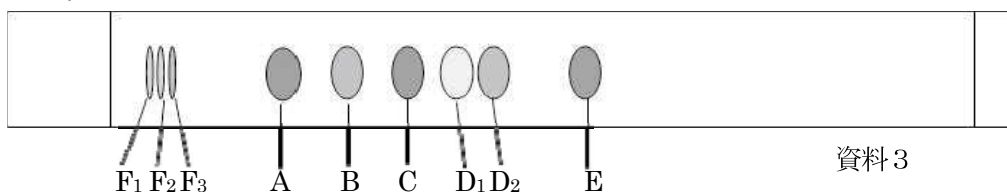
バレンシアとネーブルの果皮 1 つ分の蛍光成分を抽出溶媒で 1 昼夜抽出し、果皮の成分の抽出液をそれぞれ、TLC シートにおいて 100 本以上展開した。

資料 2 はバレンシアの蛍光成分の展開の様子である。バンドは左から f_1, f_2, a, b, c, d とした。昨年の研究で 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というフラボノイドであることが分かっている。



資料 2

資料 3 はネーブルの蛍光成分の展開の様子である。バンドは左から $F_1, F_2, F_3, A, B, C, D_1, D_2, E$ とした。

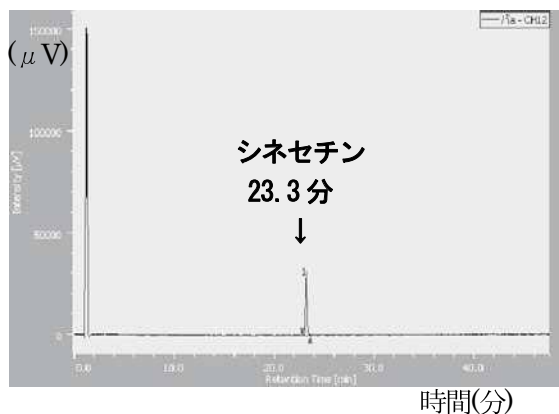


資料 3

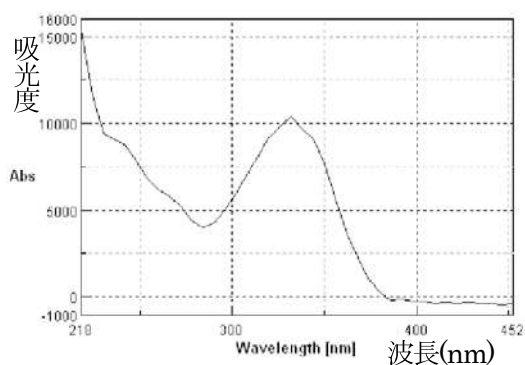
(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による蛍光成分の同定

蛍光した TLC 100 本の各バンドのシリカゲルを、波長 366nm の紫外線のもと、柄つき針で削り取り、シリカゲルに付着した蛍光成分をジムソメタに抽出した。抽出液をろ過してシリカゲルを除き、HPLC のカラム (YMC ultraHT ProC18) に通して分析を行った。静岡大学農学部のフラボノイドのデータにより蛍光成分の同定を行った。

まず資料4のように、成分がカラムを通り抜ける時間のピークから、シネセチンと予想する。次に資料5のように、成分の紫外線吸収波長をシネセチン標品と比較することで、a バンドがシネセチンであると同定できる。

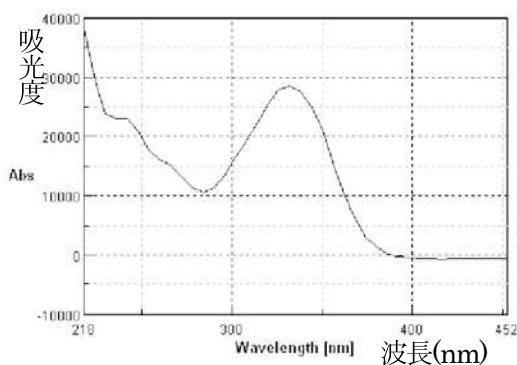


資料4



シネセチン標品の吸収波長

資料5



a バンド成分の吸収波長

(3) 蛍光成分のカビへの作用

1つの培養シャーレあたり、カビの生育に影響を与えないエタノール量が $200\mu\text{L}$ であることを予備実験で確認後、エタノールを蛍光成分の抽出溶媒として使用した。柑橘1つ分の果皮を削り、 100mL びんに抽出溶媒を入れ1昼夜抽出した。その抽出液から TLC を100本以上行い、分離されたバンドごとに蛍光成分の付着したシリカゲルを削り取った。それぞれの成分のシリカゲル 0.1g にエタノール 3mL を加えて1昼夜かけて蛍光成分を抽出し、ろ過した。

一方、カビの *Penicillium* 属を単離培養して、加熱殺菌した蒸留水に単離したカビの胞子を入れたものを用意した。加熱殺菌した真菌用の寒天培地を流し入れたシャーレを 60°C まで冷ましたところに、それぞれ蛍光成分の抽出液 $200\mu\text{L}$ を加え、コントロールにも同じく $200\mu\text{L}$ のエタノールを加えた。そこへ *Penicillium* 属を塗布し、シャーレを密閉して培養した。

(4) 柑橘果皮の成分定量

バレンシアとネーブルの果皮を乾燥させ、ミルサーで果皮を粉碎し、乾燥重量 0.2g を量り取り、 10mL のジムソーメタで果皮の成分を抽出した。抽出液をろ過し、HPLCのカラムに通して分析を行った。その後、各成分のピークの面積値を調べ、各フラボノイド検量線の傾きのデータを静大からいただき、果皮 1g 中の蛍光成分の含量(μg)を計算した。

7 結果

(1) HPLC による成分同定

昨年同定したバレンシア a, b, d と、今年分析したネーブル A, B, D₂ のそれぞれのバンドは同じ成分が含まれていることが確認できた。柑橘の種類によっては同じ位置にバンドが現れるとは限らないのにもかかわらず、バレンシアとネーブルは非常に似ており、1 年を通して同じ成分を抽出して実験できることが確認できた。ただし、バレンシアの d バンドはヘプタメトキシフラボンの他に、わずかにタンゲレチンが含まれている。

TLC バンド	バレンシア	ネーブル
a・A バンド	シネセチン	シネセチン
b・B バンド	ノビレチン	ノビレチン
d・D ₂ バンド	ヘプタメトキシフラボン+タンゲレチン	ヘプタメトキシフラボン

(2) 蛍光成分のカビへの作用

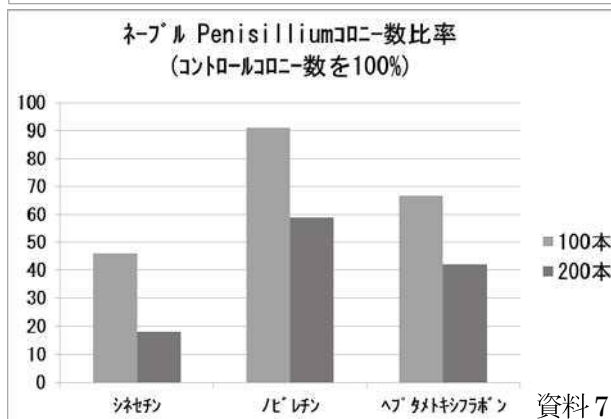
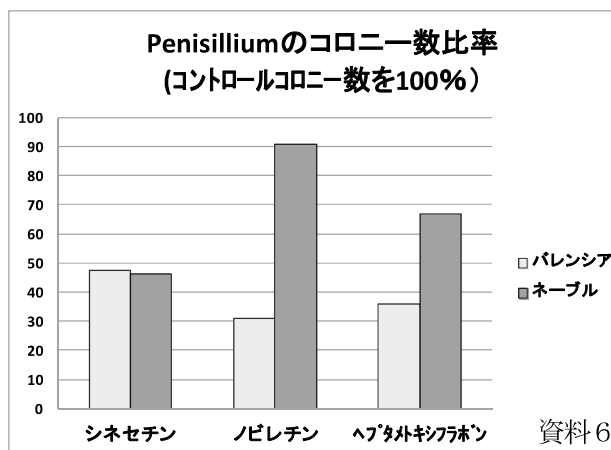
エタノールを 200 μ L 加えたコントロールの *Penisillium* 属のコロニー数に対して、バレンシアとネーブルそれぞれの蛍光成分を加えたシャーレのコロニー数を数え、各 5 つのシャーレに生えた *Penisillium* 属のコロニー数を平均した。培地に塗布する孢子数を統一することは難しいため、コントロールを 100% としたときの、各蛍光成分の抽出液を入れた培地のコロニー数の比率を求め、グラフを作成した（資料 6）。グラフの高さが 100% よりも小さいほど、蛍光成分がカビを抑制したことになる。

グラフによると、たとえばバレンシアから抽出したシネセチンの培地では、カビの発生が 47.5% に抑制されたことがわかる。このように蛍光成分を作用させた時、基本的にコントロールよりも、カビの発生が抑えられることが分かった。

しかし、同じ成分を作用させているにも関わらず、バレンシアとネーブルのカビ抑制に差がみられる。特にネーブルから抽出したノビレチンは 90.9% でほとんどコントロールと同じであり、カビはあまり抑制されていない。

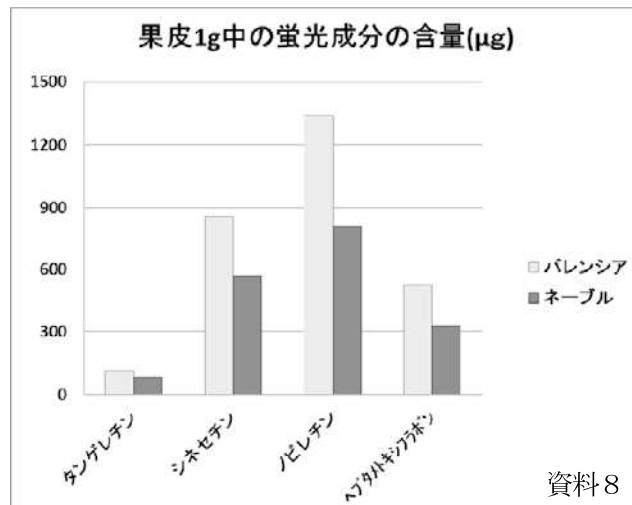
そこで、ネーブルの蛍光成分の量を 2 倍に増やし、カビへの抑制作用が高まるか調べた（資料 7）。2 倍にするために、TLC を 200 本以上行い、シリカゲル 0.2 g にエタノール 3mL を加えて蛍光成分を抽出した。

資料 7 から、ネーブルの蛍光成分は 3 種類ともカビへの抑制作用が高まったことがわかる。ノビレチンも抑制された割合が増えたことから、弱いながらも抑制作用があることがわかる。また、シネセチンの抑制作用が大きいことがわかった。



(3) 柑橘果皮の成分定量

柑橘果皮 1g 中に含まれる蛍光成分が何 μg かを定量した結果が資料 8 である。ノビレチンが一番多く含まれており、バレンシアが $1337\mu\text{g}$ 、ネーブルが $814\mu\text{g}$ 含まれていた。また、全体的に蛍光成分の量はバレンシアの方が多いことがわかる。



8 考察

蛍光成分のフラボノイドをカビに作用させたところ、*Penicillium* 属を抑制することができた。昨年予想

した通り、蛍光成分にカビの抑制作用があることがわかったことは大きな発見だった。また、全体的にバレンシアの蛍光成分の方がカビへの抑制作用が強いことがわかった。これは、バレンシアの方が果皮 1g 中の蛍光成分が多いため、培地中の蛍光成分の量が多かったからと考えられる。

生物の教科書に、「菌類に侵された植物が、菌の侵入後に作り出す抗菌性の化合物」のことを「ファイトアレキシン」と呼ぶと記されていた。我々の研究している柑橘の蛍光成分は、通常の植物も生成しているため、菌類の侵入後に作り出す化合物とは思えない。一方、通常時に「植物が合成し保持している抗菌性の化合物」のことは「ファイトアンティシピン」と呼ぶと、薬学用語辞典に記されていた。我々は、蛍光成分のフラボノイドがファイトアンティシピンである可能性を考えている。ファイトアンティシピンは普段から利があるため、植物が通常時に合成保持している化合物のはずである。蛍光成分はカビへの抑制作用以外にも植物にとって大切な役割があると考えられ、大変興味深い。

9 今後の課題

通常の柑橘果皮にはフラボノイドが複数存在している。2種類以上のフラボノイドを混合して、カビへの作用を調べる。また、蛍光成分があるにも関わらず、収穫後の柑橘はカビに侵されることがある。収穫後時間のたった柑橘は、フラボノイドが減少するのを調べる。さらに、収穫前の若い果実と、成熟した果実のフラボノイド量を比較する。どの時期に蛍光成分が多く生成されるかを比較し、抗菌作用以外に蛍光成分がどんな役割を果たしているのかを探る。

10 参考文献

- *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
- *公益財団法人日本薬学会ホームページ 薬学用語辞典
- *食品の真菌検査 一同定と観察― 東京都立衛生研究所 諸角聖
- *高等学校 生物 第一学習社(教科書)

11 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 神谷志織氏 池戸勇太氏 HPLC を利用させていただき、ご助言をいただきました。ありがとうございました。