

23. 葉色研究法の開発

- 植物セネッセンスを利用した基礎研究 -

学校法人 静岡理工科大学 静岡北高等学校 科学部植物班
2 年 佐藤 克之 梅原 奈菜 小長谷 勇太

1.はじめに

秋の風物詩である紅葉は、古くは日本最古の歌集「万葉集」に「もみぢ」の言葉があるように、長きに渡り私たち日本人に季節感と感動の念を与える身近な自然現象である。この葉色変化は、どのような色素が量的変化をすることにより起きているのか。また、これら葉色変化には最低でも1年の月日を必要とし、研究を行う期間が限定される。これを解決すべく実験法の開発を検討する。

2.目的

葉色の変化はどのような色素が量的変化をしているのか。また、季節を問わず時間を短縮出来る葉色研究法を開発するため、植物を強制的に飢餓状態にさせ老化を促進させるセネッセンス誘導を行い自然界の葉色研究と同様の結果が得られ、葉色研究に有効であるか検証することを目的とする。

3.実験の方法

3-1.通年の葉色変化

3-1-1.試料：木本 14 種類、計 666 リーフディスク

クスノキ(*Cinnamomum camphora*)、イチョウ(*Ginkgo biloba*)、ミズキ(*Aesculus turbinata*)、ナンキンハゼ(*Triadica sebifera*)、アジサイ(*Hydrangea macrophylla*)、カエデ(*Acer palmatum*)、ユリノキ(*Liriodendron tulipifera*)、ツツジ(*Rhododendron*)、アカメガシワ(*Mallotus japonicus*)、トチノキ(*Swida controversa*)、ウメ(*Prunus mume*)、ケヤキ(*Zelkova serrata*)、サクラ(*Cerasus jamasakura*)、ベニシダレ(*Acer palmatum*)

器具及び試薬

アセトントリスバッファー(80:20,pH7.8)、エッペンチューブ、乳鉢、乳棒、ガラスキュベット、メスシリンダー、質量計、コルクボーラー、分光光度計、遠心分離機、駒込ピペット、25%塩酸

3-1-2.方法

1).抽出

直径 1cm のコルクボーラーで1枚の葉につき 3 枚リーフディスクを作成し、それぞれ葉柄側から順に①②③とし(図 1)、質量を測定した。葉面積が小さくリーフディスク作成が困難な試料は、葉の先端部分をおおよそ同じ大きさに切り出した(図 1)。冷却した乳鉢にリーフディスクを1枚入れ、アセトントリスバッファーを加え磨り潰した後、エッペンチューブに移し入れ 6000rpm で 3 分間遠心分離し、メスシリンダーに移し入れた。抽出が不十分な場合は再びアセトントリスバッファーを加え、遠心分離した。その後、総量を約 3mL とし、正確な液量を測定した。



図 1. リーフディスク作成方法

2).測定

抽出液をガラスキュベットに移し入れ、分光光度計を用いて1標本につき 3 回測定した。波長は 470nm、537nm、647nm、653nm、663nm、665nm を使用した。25%塩酸を1滴加え、再び 665nm、653nm の吸光度を測定した。

3).色素量の計算

測定した吸光度からリーフディスク 1 枚に含まれる Chlorophyll *a*、Chlorophyll *b*、Anthocyanin、Carotenoids、Pheophytins *a* 及び Pheophytins *b* 量を計算した。計算式は Sims and Gamon(2002)[1]～[4]及び Lichtenthaler[5][6]を使用し、以下に示す。

$$\text{Anthocyanin}(\mu\text{mol/mL})=0.08173(A_{537})-0.00697(A_{647})-0.002228(A_{663}) \quad [1]$$

$$\text{Chlorophyll } a(\mu\text{mol/mL})=0.01373(A_{663})-0.000897(A_{537})-0.003046(A_{647}) \quad [2]$$

$$\text{Chlorophyll } b(\mu\text{mol/mL})=0.02405(A_{647})-0.004305(A_{537})-0.005507(A_{663}) \quad [3]$$

$$\text{Carotenoids}(\mu\text{mol/mL})=[A_{470}-\{17.1 \times (\text{Chl. } a + \text{Chl. } b) - 9.479 \times \text{anthocyanin}\}] / 119.26 \quad [4]$$

$$\text{Pheophytins } a(\mu\text{g/mL})=22.42(A_{665})-6.81(A_{653}) \quad [5]$$

$$\text{Pheophytins } b(\mu\text{g/mL})=40.17(A_{653})-18.58(A_{665}) \quad [6]$$

3-2.セネッセンス誘導実験

3-2-1.試料：木本 14 種類(4-1-1.と同様)計 666 リーフディスク

器具及び試薬：スクロース(4-1-1.と同様)

3-2-2.方法

1).セネッセンス誘導

葉を採取し水のみ十分に与え、アルミホイルで包み暗幕をかけて遮光し強制的に葉を飢餓状態にさせ、老化促進を 1～14 日間行った。さらに、スクロースを加え同様の方法で誘導した。

2).抽出 3).測定 4).色素量の計算 (4-1-2.と同様)

4.実験の結果

通年の葉色変化及びセネッセンス誘導実験の結果、葉には Phe.*a* 及び Phe.*b* は殆ど含まれていなかった。従って、以下に示す結果には Phe.*a* 及び Phe.*b* を除いた。今回は、通年の葉色変化、通常及びスクロースによるセネッセンス誘導実験の結果、顕著な結果が出た植物種 3 種のみ掲載する。また、緑色の葉には Chl.*a*、Chl.*b*、Carote.が含まれており、イチヨウのみ Antho.が含まれていない結果となった。さらに、葉に含まれる色素量を比較すると、おおよそ Chl.*a*:Chl.*b*=3:1 であった。

4-1.クスノキ

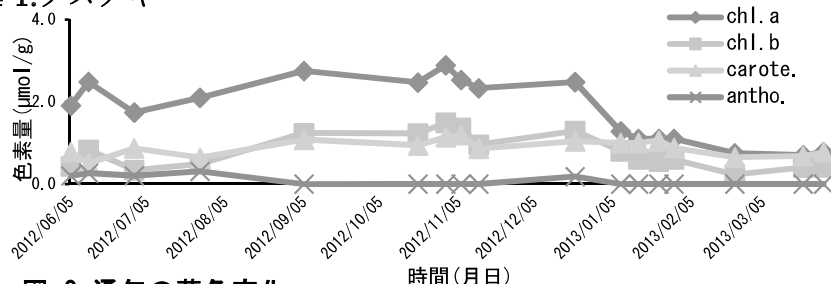


図 2. 通年の葉色変化

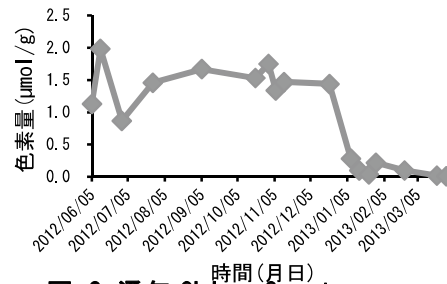


図 3. 通年 Chl. *a*-Carote.

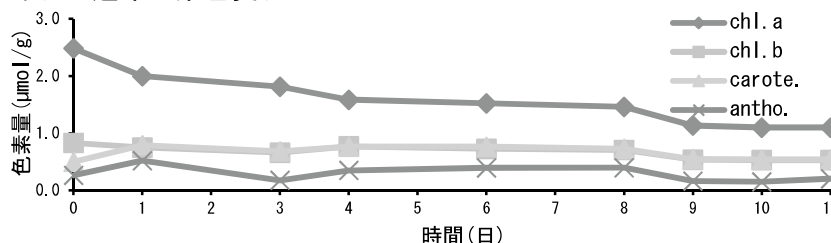


図 4. セネッセンス誘導通常(0～11 日)

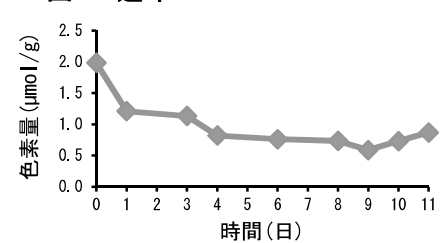


図 5. セネッセンス誘導通常 Chl. *a*-Carote.

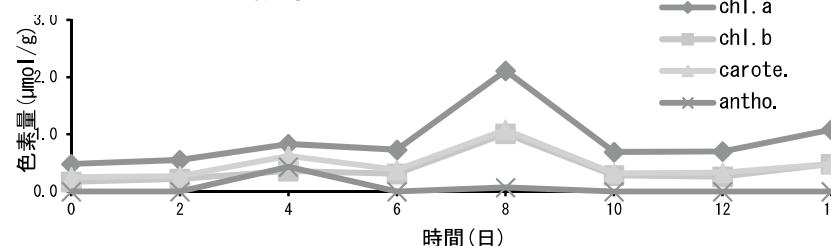


図 6. セネッセンス誘導通常(0～14 日)

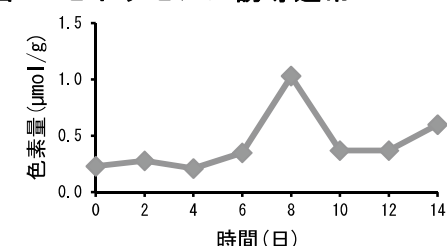


図 7. セネッセンス誘導通常 Chl. *a*-Carote.

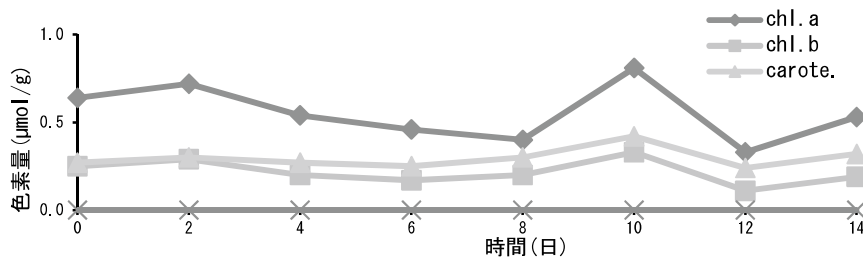


図 8. セネッセンス誘導スクロース

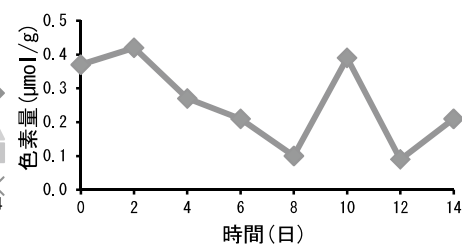


図 9. セネッセンス誘導スクロース
Chl. a-Carote.

クスノキの葉は通年の葉色変化より、緑色から茶色に変化した。図 2 より、1 月以降急激に Chl. a 量及び Chl. b 量が減少している。それに対し Carote. 量は通年を通して殆ど変化していない。Chl. a 量と Carote. 量の差を図 3 に示した結果、1 月以降から葉中に含まれる Chl. a 量と Carote. 量との差が減少している。通常のセネッセンス誘導では葉色は緑色から茶色へと変化した。しかし、図 4 と図 6 とで色素量の変化に差が生じた。図 4 では Chl. a 量及び Chl. b 量が減少しているのに対し、Carote. 量はあまり変化していない。図 6 では Chl. a、Chl. b 量及び Carote. 量が増加傾向にある。この結果は図 5 及び図 7 から見ても明らかである。スクロースを加えたセネッセンス誘導でも葉色は緑色から茶色に変化した。図 8 より、2 日目から 8 日目まで Chl. a 量及び Chl. b 量が減少しており、Carote. 量は変化が小さかった。図 9 より、2 日目から 8 日目までは Chl. a 量と Carote. 量の差が減少しているのに対し、10 日目及び 14 日目では異なる結果となった。

4-2. イチヨウ

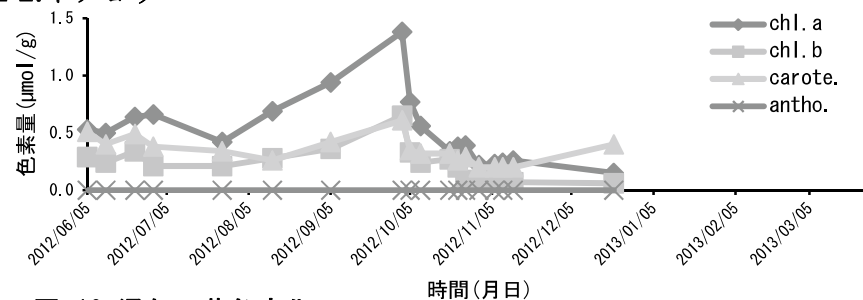


図 10. 通年の葉色変化

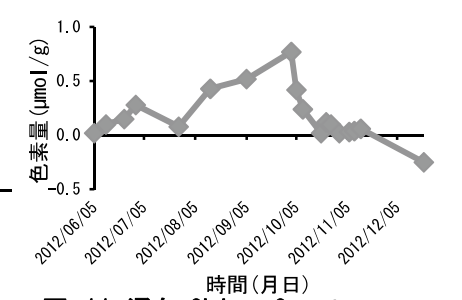


図 11. 通年 Chl. a-Carote.

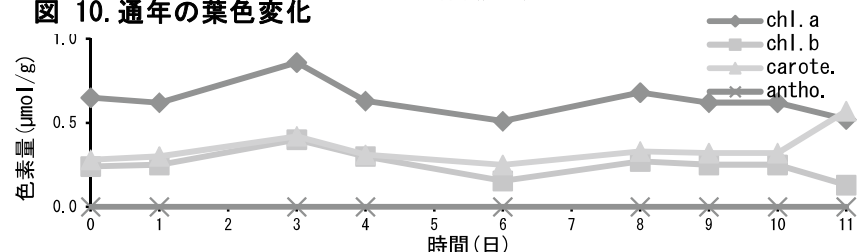


図 12. セネッセンス誘導通常 (0~11 日)

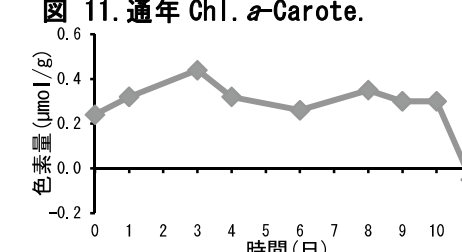


図 13. セネッセンス誘導通常 Chl. a-Carote.

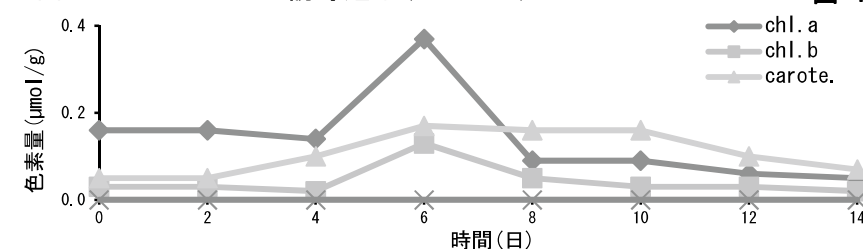


図 14. セネッセンス誘導通常 (0~14 日)

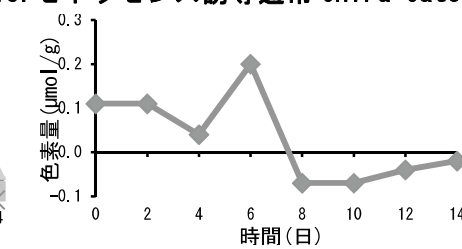


図 15. セネッセンス誘導通常 Chl. a-Carote.

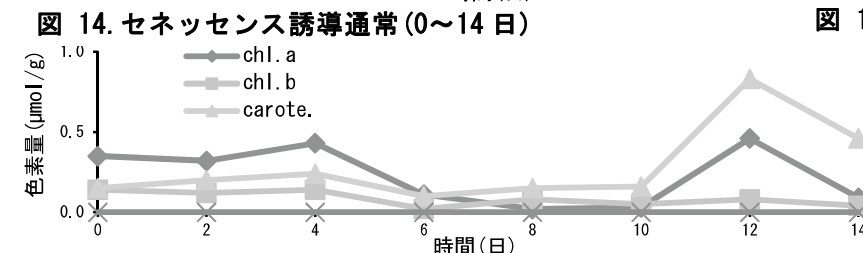


図 16. セネッセンス誘導スクロース

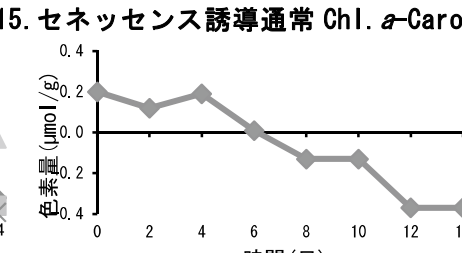


図 17. セネッセンス誘導スクロース
Chl. a-Carote.

イチウの葉は通年の葉色変化より、緑色から黄色へと変化した。図 10 より 10 月以降 Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少しており、Carote.量は増加している。図 11 より 11 月より 0 を下回っていることから、Carote.量は Chl.*a* 量を越えていることがわかる。水による通常のセネッセンス誘導でも葉色は緑色から黄色へと変化した。図 12 では 8 日目以降、図 14 では 6 日目以降 Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少しており、Carote.量が増加していることがわかる。さらに、図 13 では 11 日目、図 15 では 8 日目以降で 0 を下回っていることから、Carote.量が Chl.*a* 量を越えている。スクロースを加えたセネッセンス誘導でも葉色は緑色から黄色へと変化した。図 16 より 4 日目以降 Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少しており、6 日目以降 Carote.量が増加している。これは図 17 から明らかであり、6 日目以降 0 を下回っていることから Carote.量が Chl.*a* 量を上回っていることがわかる。さらに、通常のセネッセンス誘導とスクロースを用いたセネッセンス誘導の傾きを比較すると、どちらも負であるがその絶対値はスクロースを用いた方が大きかった。

4-3.ベニシダレ

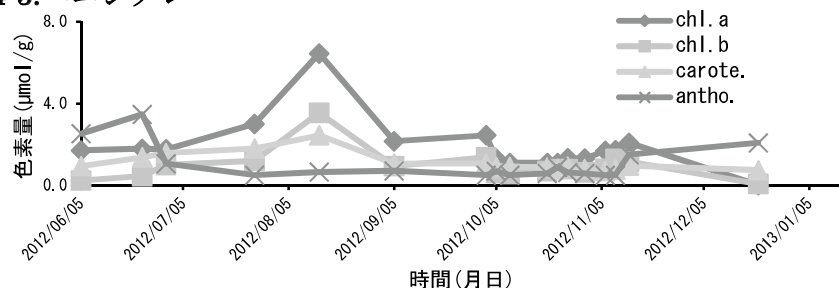


図 18. 通年の葉色変化

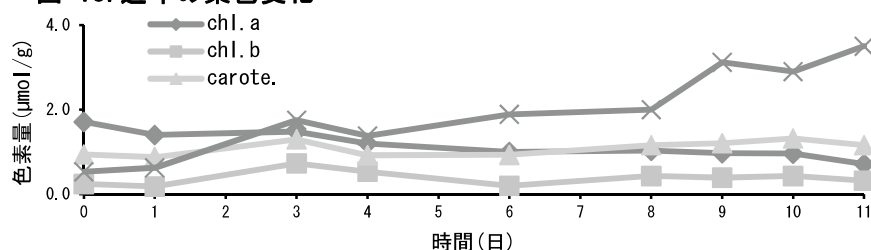


図 20. セネッセンス誘導通常 (0~11 日)

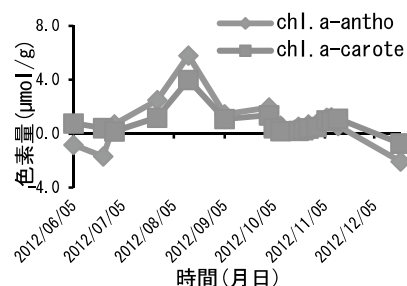


図 19. 通年 Chl. *a*-carote.

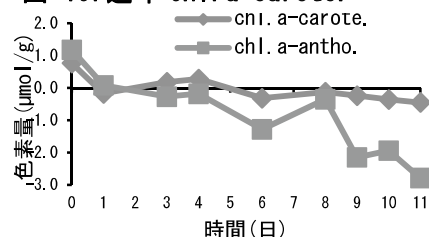


図 21. セネッセンス誘導通常 Chl. *a*-carote.

ベニシダレの葉は通年の葉色変化より、赤色、緑色、再び赤色へと変化した。図 18 より 7 月まで Antho.量が最も多く、それ以降は Chl.*a* が最も多く含まれている。さらに、11 月以降になると Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少しており、Carote.量はあまり変化しておらず、Antho.量は増加している。図 18 と図 19 より、Carote.量の変化は小さく Chl.*a* 量により変化していることがわかり、11 月下旬より Carote.が Chl.*a* 量を越えていることがわかる。さらに、Antho.量は Chl.*a* 量に依存するだけでなく、Antho.量が増加していることがわかる。水による通常のセネッセンス誘導でも葉色は緑色から赤色へと変化した。図 20 より傾きは小さいが Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量は減少している。それに対し、Carote.量は変化を殆どしていないが、Antho.量は日を追うごとに増加している。図 21 から Carote.量は 5 日目以降、Antho.量は 2 日目以降から Chl.*a* 量を越えていることがわかる。

5.考察

木本 14 種から色素を抽出し分析した結果、酸や熱を加えると生成される Phe.は殆ど含まれていなかった。これにより、自然界では酸や熱を加えられる影響を受けていないことがわかる。さらに葉には Chl.*a*、Chl.*b*、Carote.及び Antho.が含まれていた。それぞれの葉に含まれる色素量を比較すると、およそ Chl.*a*:Chl.*b*=3:1 となっていた。光合成色素のはたらきから考えると、この比率が最も効率良く光合成を行うことが出来ると考えられる。さらに、ミズキ、サクラ、ウメなどのミズキ科及びバラ科は粘性が高く抽出が困難であったため、色素量にばらつきが生じた。従って、正確な色素量を得ることは困難であり紅葉研究法の確立には標本として不向きと判断した。

クスノキは葉色を緑色から茶色に変化させることから褐葉であるとわかり、アジサイ、ツツジ、ケヤキも同様であった。クスノキは葉色を茶色に変化させる場合、Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少し、さらに Carote.量があまり変化していなかった。各色素がこのような量的変化をする場合、葉は褐葉をするとうわかった。イチヨウは葉色を緑色から黄色に変化させることから黄葉であるとわかり、トチノキ、ユリノキも同様であった。イチヨウは葉色を黄色に変化させる場合、Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少し、さらに Carote.量が増加していた。このような色素がこのような量的変化をする場合、葉は黄葉をするとうわかった。褐葉と紅葉は葉色から判断することは困難な場合があるが、各色素の量的変化を比較することにより Carote.が Chl.*a* 量を超えるかを判断することで可能になると考えられる。ベニシダレは葉色を緑色から赤色に変化させることから紅葉であるとわかり、アカメガシワ、カエデも同様であった。ベニシダレは葉色を赤色に変化させる場合、Chl.*a* 量及び Chl.*b* 量が減少し、さらに Antho.量が増加していた。各色素がこのような量的変化をする場合、葉は紅葉をするとうわかった。しかし、ベニシダレの場合 Chl.*a* 量が減少し、Carote.量の変化が小さいことから、Chl.*a* 量を Carote.量が越える。従って、Antho.の合成量が少なくなると葉色は黄色になると考えられる。自然界ではベニシダレやカエデの葉が黄色になることがあり、これは Carote.量が最大になっている場合に起きると考えられる。これらの結果より、葉色は最も多く含まれている色素に依存することが示唆された。

通年の葉色変化の結果と通常のセネッセンス誘導の結果を比較すると、色素量の変化が非常に良く似ていることがわかり、セネッセンス誘導は自然界で起こる紅葉、黄葉と同様な変化をすると考えられる。さらに、クスノキ、イチヨウのスクロースを加えたセネッセンス誘導では葉色変化が促進されている結果になっている。従って、葉色変化にはスクロースが少なからず関わっている可能性があると考えられる。これらの結果をふまえ、セネッセンス誘導は葉色研究法に有効であると考えられる。

6.おわりに

通年の葉色変化及びセネッセンス誘導により、葉色を決定しているのは最も多く含まれる色素であり、これにより葉色は変化することがわかった。さらに、葉色は茶色に変化する褐葉、黄色に変化する黄葉、赤色に変化する紅葉の 3 つに分けられる。褐葉の場合、Chl.*a* 量が減少し、Carote.量の変化が小さい。黄葉の場合、Chl.*a* 量が減少し、Carote.量が増加し、Chl.*a* 量を超える。さらに紅葉の場合、Chl.*a* 量が減少し、Antho.量が増加することにより Antho.量が Chl.*a* 量を超えることがわかった。セネッセンス誘導と通年の葉色変化は非常に良く似た結果を示したが、温度条件や葉の採集時期により変化すると考えられる。今後はさらにサンプル数を増やすと共に、条件を絞っていくことが課題である。さらに、カラーチャートを用いて葉色の比較をすることにより、さらに葉色と色素量との関係性を深めていくことも必要である。また葉色変化は秋のみならず、春にはナンキンハゼやクスノキなど、芽吹きに葉色を変化させている。これらの植物の葉もどのような色素が量的変化をしているのか、芽吹きに葉色変化にもセネッセンス誘導は有効なのかを研究していく。さらに、UV 照射、気孔の封鎖による呼吸停止によるセネッセンス誘導なども行いたいと考える。

7.参考文献

Lichtenthaler, HK and AR Wellburn (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592

Sims, DA and JA Gamon (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81: 337- 354.