

4. Plant Senescence による葉色研究法の開発と利用

学校法人 静岡理工科大学 静岡北高等学校 科学部 植物班 葉色チーム

2 年 石原愛梨 酒井僚也 澤田真緒 井上凌輔

1. はじめに 紅葉は日本人に馴染み深い自然現象である。しかし、その葉色変化が起きる要因は解明されていない。よって、本研究では葉色変化の要因を追求し、その研究方法を確立する。

2. 目的

2-1. 抽出法の確立 本研究では葉色変化が色素とどのような関係性があるのかを追求する。光合成色素の測定には比較的初期費用が低い吸光度法を用いる。葉に含まれる色素測定の吸光度法には様々な抽出法及び定量法があるため、抽出法及び分光学的な定量法を確立することを目的とする。

2-2. 通年の葉色変化 昨年度までの結果より、葉色変化は特定の色素が量的変化をすることにより起こることがわかった。よって、本研究では色素の量的変化は、年による違いを調査する。

2-3. Plant Senescence 自然界で葉色が変化する時期は制限され、常時葉色実験が可能な方法を確立する。昨年度、動物実験に用い強制的に細胞老化を促す Senescence を用い、葉色が変化することを確認した。よって本研究では Senescence 条件を変化させ、葉色変化の要因追求を試みる。

3. 実験の方法

3-1. 分光学的な色素定量法の選定

3-1-1. 文献調査 アセトントリスバッファー(80:20 volume;pH=7.8)による抽出

Sims and Gamon より

$$\text{Chl. } a \text{ (}\mu\text{mol/mL)} = 0.01373(A_{663}) - 0.000897(A_{537}) - 0.003046(A_{647})$$

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

$$\text{Chl. } b \text{ (}\mu\text{mol/mL)} = 0.02405(A_{647}) - 0.004305(A_{537}) - 0.005507(A_{663})$$

$$\text{Antho. (}\mu\text{mol/mL)} = 0.08173(A_{537}) - 0.00697(A_{647}) - 0.002228(A_{663})$$

Lichtenthaler より $\text{Phe. } a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 22.42(A_{665}) - 6.81(A_{653})$ $\text{Phe. } b \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 40.17(A_{653}) - 18.58(A_{665})$

光合成色素の抽出にはアセトン、メタノール及びジメチルホルムアミドがあり、計算式は 20 以上あった。本研究では、安価、安全で一度に Chl. a、Chl. b、Carote. 及び Antho. が測定可能な Sims and Gamon を使用することにした。さらに、Lichtenthaler によりアセトントリスバッファーの抽出液中に 25% 塩酸を一滴加えることにより Chl. a 及び Chl. b に加熱もしくは酸を加えると生じる Phe. a 量及び Phe. b 量を測定可能である。よって、Phe. a 及び Phe. b 量も測定項目に加える。

3-2. 抽出法の確立 抽出法は以下の方法が示されている。

乳鉢に葉を加え、抽出液を加え手早く磨り潰す。これをエッペンチューブに移し入れ、遠心分離することで上澄みに色素を抽出し、分光光度計を用いて吸光度を測定する。

上記には詳細が示されていない。よって、抽出法を確立するため 1. 植物の選定 2. 抽出に用いる葉面積 3. 抽出時の温度 4. 遠心分離時間 5. 安定したデータを得るために必要な葉枚数を決定する。

3-2-1. 植物の選定

3-2-1-1. 材料: 木本 18 種類 ウメ (*Prunus mume*), ゲッケイジュ (*Laurus nobilis*), カエデ (*Acer palmatum*), ケヤキ (*Zelkova serrata*), ツバキ (*Camellia japonica*), キンモクセイ (*Osmanthus fragrans*), イチョウ (*Ginkgo biloba*), アカメガシワ (*Mallotus japonica*), ミズキ (*Swida controversa*), ユリノキ (*Liriodendron tulipifera*), アジサイ (*Hydrangea macrophylla*), ツツジ (*Rhododendron*), ベニシダレ (*Acer palmatum*), トチノキ (*Aesculus turbinata*), サクラ (*Cerasus jamasakura*), ナンキンハゼ (*Triadica sebifera*), クスノキ (*Cinnamomum camphora*), サンゴジュ (*Viburnum odoratissimum*)

3-2-1-2. 結果 ツバキ、ゲッケイジュ、サンゴジュ及びキンモクセイは紅葉で抽出困難であった(図 1)。ミズキ、サクラ及びウメは抽出時、粘性を生じ吸光度も不安定であった。よって、硬葉樹、ミズキ科及びウメ科以外の 11 種を材料とする。



図 1. 左: イチョウ, 右: ツバキ

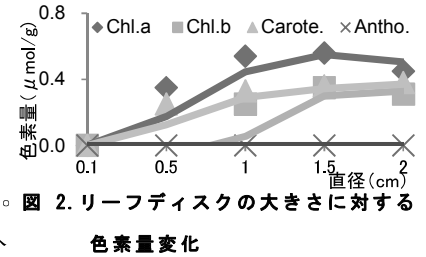
1 分間すりつぶした結果

3-2-2. 抽出に用いる葉面積

3-2-2-1. 材料 イチョウ

3-2-2-2. 方法 1枚の葉から直径 0.1cm、0.5cm、1.0cm、1.5cm、2.0cm のリーフディスクを作成し抽出を行い、分光光度計を用いて吸光度を測定した。

3-2-2-3. 結果 直径 0.1cm のリーフディスクでは色素量が少なすぎ吸光度測定が不可能であり、直径 1.0cm 以上のリーフディスクで色素量が安定した(図 2)。よって、1枚の葉から数枚のリーフディスクを作成するため、葉面積がより小さい直径 1.0cm に決定した。図 2. リーフディスクの大きさに対する色素量変化



3-2-3. 抽出時の温度

3-2-3-1. 材料 カエデ

3-2-3-2. 方法 1枚の葉から 5枚のリーフディスクを作成し、恒温槽を用いて 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃の水浴中で抽出を行い、分光光度計を用いて吸光度を測定した。

3-2-3-3. 結果 温度の上昇に伴い Chl.a 及び Chl.b が減少した(図 3)。Phe.a 及び Phe.b を測定すると Chl.a 及び Chl.b の減少量とほぼ等しく、Chl.a 及び Chl.b が分解することで Phe.a 及び Phe.b 生じることがわかった(図 4)。よって、低温であるほど Chl.a 及び Chl.b の分解を抑えることができるため、10℃以下で実験を行うことにした。

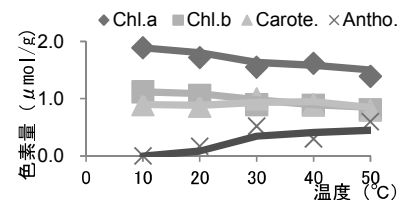


図 3. 温度に対する色素量変化

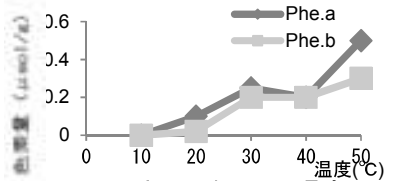


図 4. 温度に対する Phe. 量変化

3-2-4. 遠心分離の時間

3-2-4-1. 材料 イチョウ

3-2-4-2. 方法 1枚の葉からリーフディスクを 6枚作成し、遠心分離機を用いて 6,000rpm で 30秒、1分、2分、3分、4分、5分の各時間で遠心分離を行い、分光光度計を用いて吸光度を測定した。

3-2-4-3. 結果 Carote.量は遠心分離時間が変化しても色素量の変化が小さかった(図 5)。30秒では Chl.a 及び Chl.b 量が多く、1分、2分では減少した。30秒では葉の組織が全て沈殿しておらず、浮遊物が吸光度に誤差を生じたと考えられる。さらに、1分、2分では沈殿物は緑色をしており、Chl.a 及び Chl.b が組織に付着したまま沈殿しており、分離し切れていないと考えられる。さらに、5分では Chl.a 及び Chl.b 量が減少した。これは遠心分離時間が長く、Chl.a 及び Chl.b が分解されたと考えられる。よって、遠心分離時間は 3分~4分が適しており、迅速に実験を行うために 3分間とした。

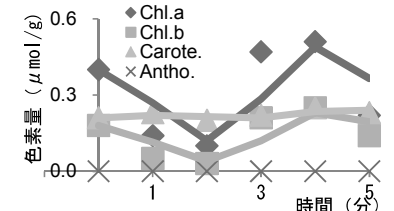


図 5. 遠心分離時間に対する色素量変化

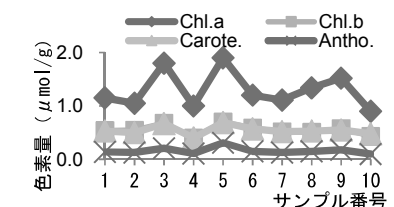


図 6. 同一色の葉に対する色素量

3-2-5. 葉枚数

3-2-5-1. 材料 カエデ

3-2-5-2. 方法 カラーチャートにより同色であると判断した葉を 10枚採取し、同条件で抽出及び吸光度を測定した。

3-2-5-3. 結果 同色の葉であっても各色素量は異なることがわかる(図 6)。Chl.a と Antho.の割合はほぼ一定であった(図 7)。これにより葉色は各色素量の割合によることがわかる。10枚のうち無作為に 2枚、3枚、5枚 10枚を 10回選び出し Chl.a と Antho.の割合平均をとると、2枚は 7.531、3枚は 8.173、5枚は 8.175、10枚は 8.444 となった。葉枚数が多ければ多いほど木全体の葉色に近くなるため、10枚の Chl.a

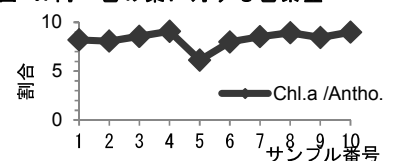
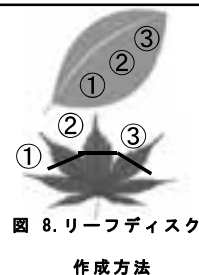


図 7. 同一色の葉に対する Chl. a/Antho.

と Antho. の割合平均に比較的近い 3 枚、5 枚を考え、3 枚と 5 枚の差は 0.002 と非常に小さかった。したがって、植物への負担を考慮し、3 枚に決定した。

3-3. 色素測定法の決定 4-2. の結果より、葉の選定、抽出法及び吸光度は以下の方法に決定した。

葉の選定にはミズキ科、バラ科及び硬葉を避ける。直径 1cm のコルクボーラーを用い葉柄側から①②③のリーフディスクを作成し(図 8)、質量測定する。リーフディスク作成が困難な試料は、先端部分をおおよそ同じ大きさに切り出す(図 8)。カラーチャートを用いて葉色を記録する。冷凍庫で冷却した乳鉢にリーフディスクを 1 枚、アセトントリスバッファーを加えすり潰し、エッペンチューブに移し入れ 6,000rpm で 3 分間遠心分離し、メスシリンダーに上澄み液を移し入れる。抽出が不十分な場合はアセトントリスバッファーを加えホモジナイザーペッスルで沈殿物をすり潰し、遠心分離する。アセトントリスバッファーを加え正確な液量を測定する。分光光度計を用いて 470nm、537nm、647nm、653nm、663nm、665nm の吸光度を測定し、Sims and Gamon により Chl.a、Chl.b、Carote.、Antho.、Lichtenthaler により Phe.a、Phe.b を定量する。



3-4. 通年の葉色変化

3-4-1. 材料 4-2-1-2. より、木本 11 種。

3-4-2. 方法 4-3 と同様。2012 年 5 月～2013 年 1 月及び 2014 年 6 月～8 月の期間行った。

3-5. Plant Senescence

3-5-1. 材料 4-4-1. と同様木本 11 種類 2014 年 8 月 21 日採集の葉を使用。

3-5-2. 方法 葉に水を加え、遮光、28℃で、7 月 9 月の 2 回、1～19 日間 Plant Senescence を行った。その後、4-3 と同様に抽出及び吸光度測定をした。さらに、Antho. と Carote. の分子構造の一部がスクロースと似ており合成促進すると考え、スクロース(0.03mol/L)を加えた。さらに、葉色変化に気温が関係すると考え、静岡県で葉色変化が起こる 11 月平均気温である 14℃に設定した。

4. 結果(顕著な結果がみられた植物のみ示す)

4-1. ケヤキ

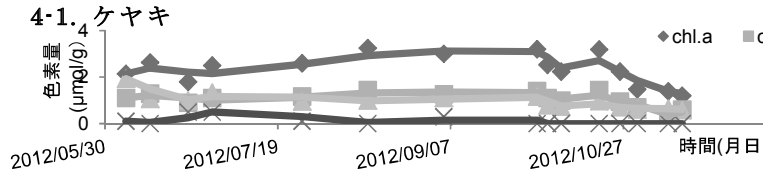


図 9. 2012 年通年色素量

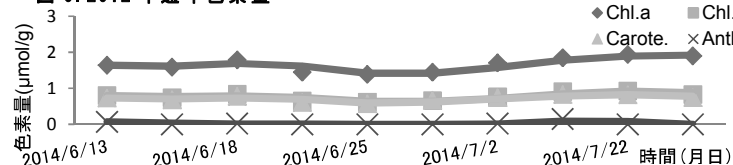


図 11. 2014 年通年色素量

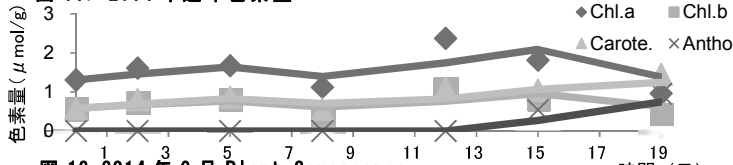


図 13. 2014 年 9 月 Plant Senescence

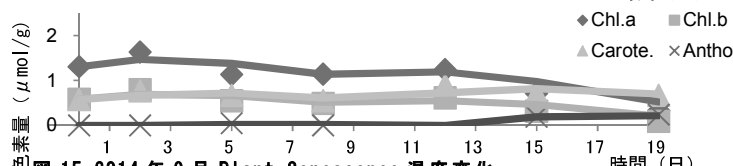


図 15. 2014 年 9 月 Plant Senescence 温度変化

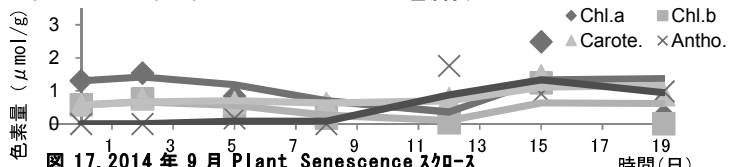


図 17. 2014 年 9 月 Plant Senescence スクロース

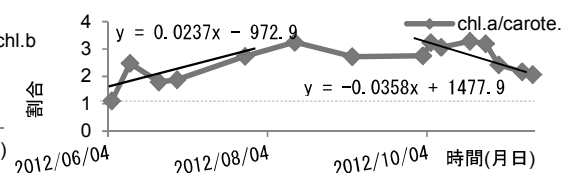


図 10. 2012 年通年 Chl. a/Carote.

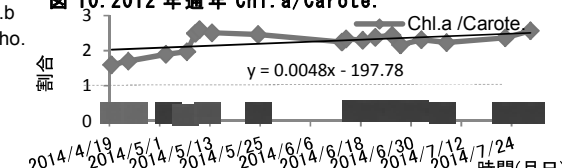


図 12. 2014 年通年 Chl. a/Carote. とカラーチャート

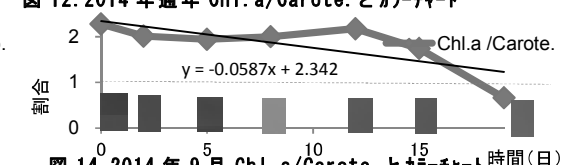


図 14. 2014 年 9 月 Chl. a/Carote. とカラーチャート

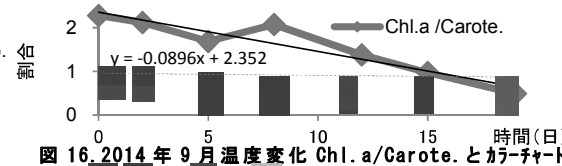


図 16. 2014 年 9 月温度変化 Chl. a/Carote. とカラーチャート

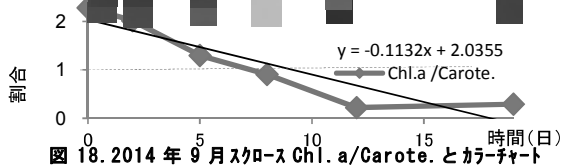
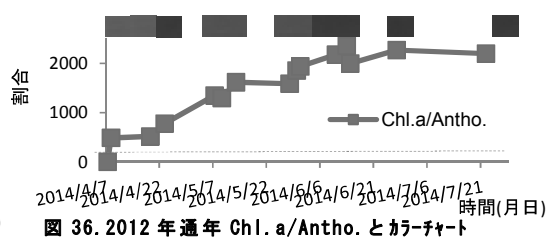
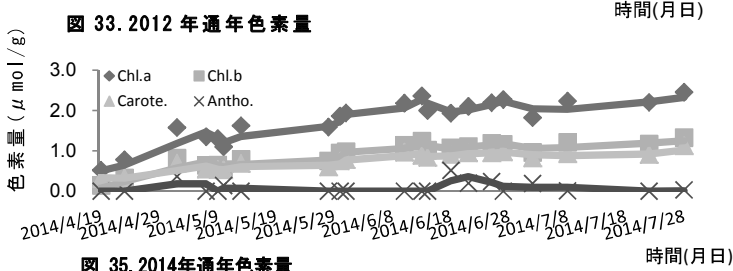
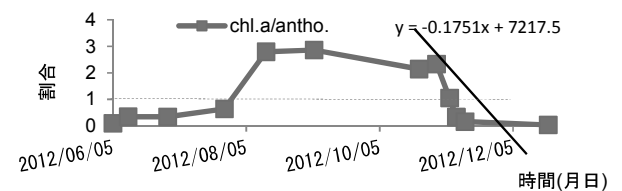
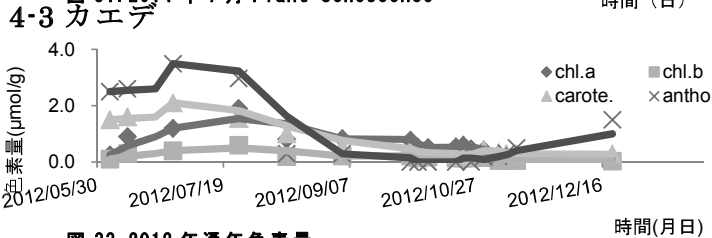
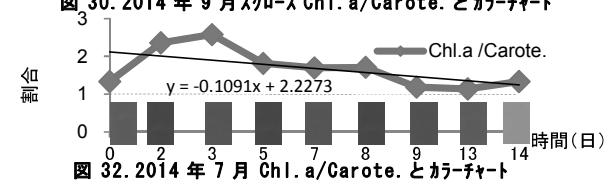
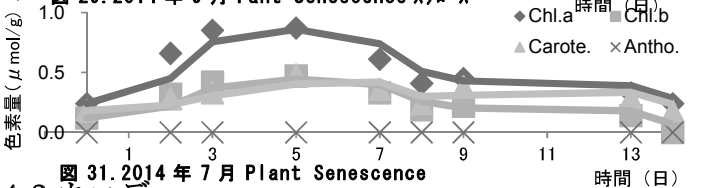
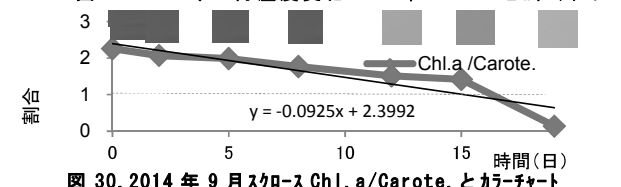
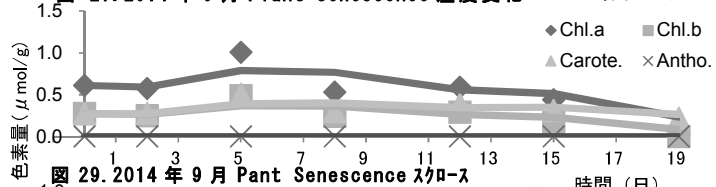
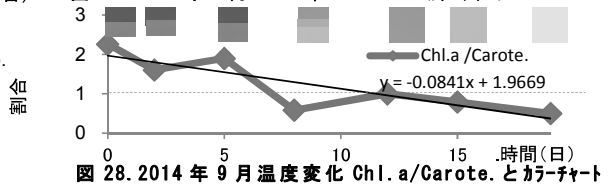
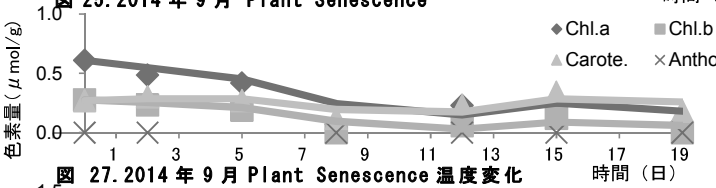
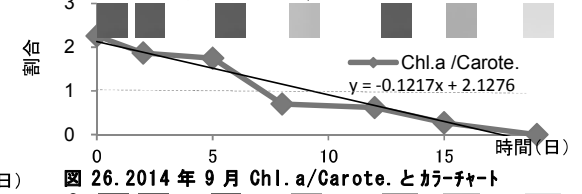
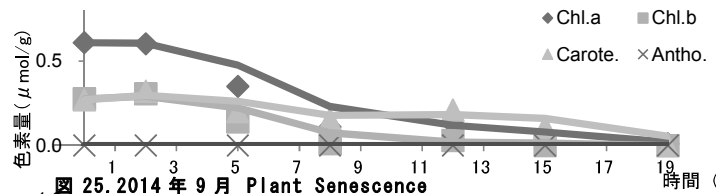
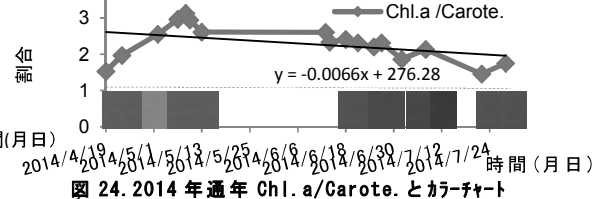
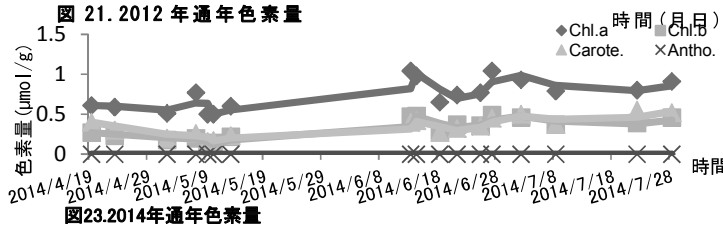
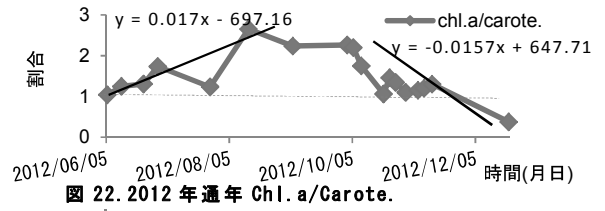
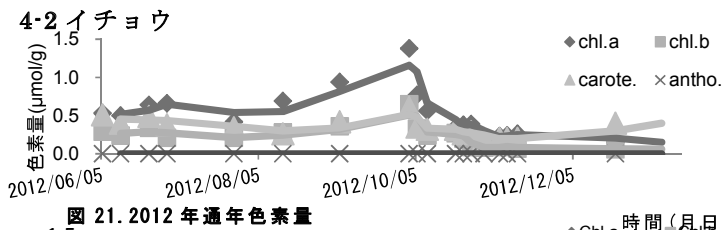
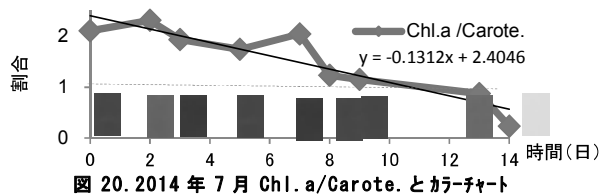
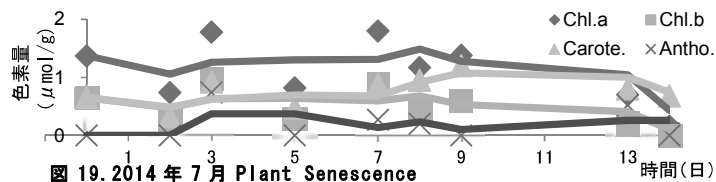
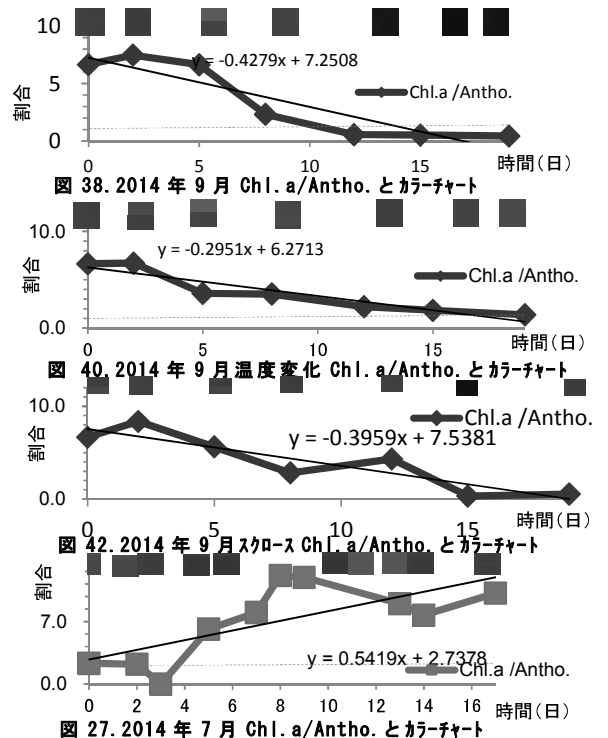
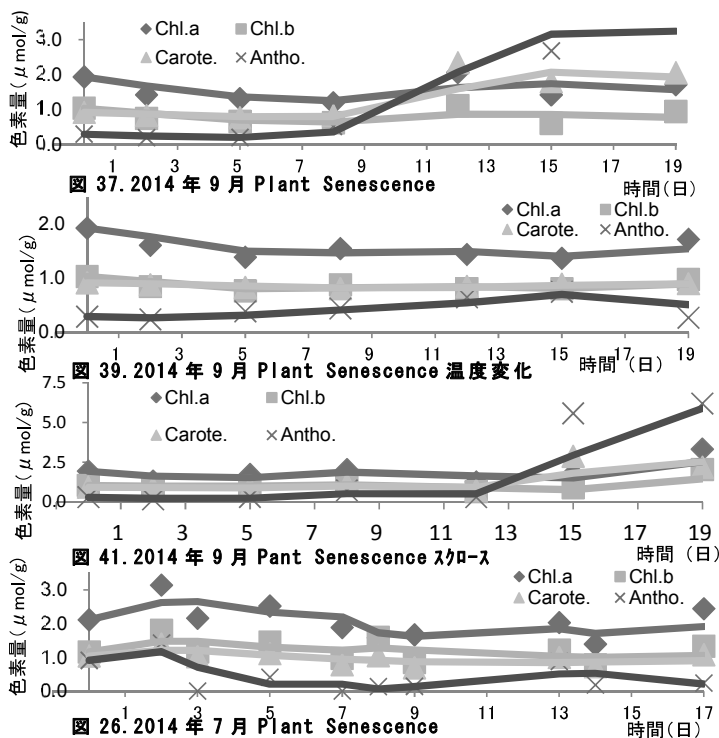


図 18. 2014 年 9 月スクロース Chl. a/Carote. とカラーチャート





5. 考察 ケヤキの葉は通年、Plant Senescence の通常・温度変化・スクロースの全てにおいて緑色から茶色に変化したため褐葉である。通年 Chl.a/Carote. の 9 月下旬からの傾向と通常・温度変化・スクロースでの Plant Senescence の全ての傾きは負であり、Carote. の変化が小さく、Chl.a が減少していた。Chl.a/Carote. が 1 に近づく、もしくは 1 を下回る場合、長時間かかることがわかる。このような色素量の変化を示す場合、葉は褐葉するとわかった。イチヨウの葉は通年、通常・温度変化・スクロースでの Plant Senescence の全てにおいて緑色から黄色に変化したため黄葉である。通年 Chl.a/Carote. の 10 月初旬からの傾向と通常・温度変化・スクロースでの Plant Senescence の全てにおいて傾きは負であり、Carote. の変化が小さく、Chl.a が減少し、Chl.a/Carote. が 1 を下回った。このような色素量の変化を示す場合、葉は黄葉するとわかった。カエデの葉は通年、通常・温度変化・スクロースでの Plant Senescence の全てにおいて緑色から赤色に変化したため紅葉である。通年 Chl.a/Antho. の 11 月上旬からの傾向と通常(9 月)・温度変化・スクロースでの Plant Senescence の全てにおいて傾きは負であり、Antho. が増加し、Chl.a が減少した。このような色素量の変化を示す場合、葉は紅葉するとわかった。これらの結果より、通常の Plant Senescence は自然界の葉色変化と同様であることがわかった。よって、通常の Plant Senescence は色素量変化を早め、葉色変化を促進する働きがあると示唆された。温度による Plant Senescence はケヤキ、イチヨウ、カエデの全てにおいて、色素量変化が抑制された。本実験の方法は自然界の温度変化とは異なり、方法を検討する必要がある。スクロースによる Plant Senescence では、ケヤキ、イチヨウにおいて顕著な差は生じなかったが、カエデにおいて Antho. が増加した。よって、スクロースは Carote. 合成には関与しないと考えられるが、Antho. 合成には関与すると考えられる。通常の Plant Senescence の 7 月と 9 月を比較すると、ケヤキ、イチヨウは変化がないのに対し、カエデの 9 月は Antho. が増加するが、7 月は Antho. の増加がみられない。これにより、Antho. の合成には夏を越えることに大きな意味をもつと考えられる。
6. おわりに 通常の Plant Senescence は、葉色研究法として利用可能であると示唆された。したがって、今後は自然界の葉色変化はどのような外的影響を受けることで促進されるのかを追求するため、Plant Senescence を利用し、応用的な Plant Senescence を行いたいと考える。

7. 参考文献

R. J. Porra et al, (1989) Biochimica et Biophysica Acta 975: 384-394