

〈第31回 山崎賞〉

6. 蛍光を発する植物IV

静岡県立掛川東高等学校

2年 池田大記 中島耕之介 1年 永井涼太 長島佑理 増田聡太 赤堀智哉 河野慎太郎

- 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(資料1)。私たちはそのバンドに大変興味を持った。「植物は何のために蛍光成分をつくっているのか」について知るために研究を続け、今年で4年目になる。



資料1 TLCにより分離した蛍光成分 (紫外線 366nm)

2 昨年までの研究

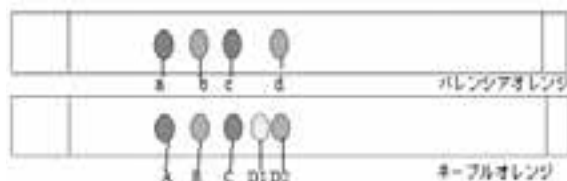
- ・バレンシアオレンジの果皮に紫外線(366nm)をあてると、果皮の内側が 537nm の緑色に蛍光する。
- ・TLCによって蛍光成分の分離に成功し、蛍光成分はフラボノイドのシネセチン・ノビレチン・ヘプタメトキシフラボンであることが分かった。
- ・蛍光成分のカビへの作用について研究し、蛍光成分はカビ *Penisillium* 属を抑制することが分かった。このことから柑橘の蛍光成分はファイトアンティシピン、つまり「植物が合成保持している抗菌性の化合物」ではないかと予想した。

- 3 本年度の研究 保存した柑橘にカビが生えるのは、収穫後に蛍光成分が合成できず、カビの抑制効果が減少したのではないかと予想した。また、常に合成しているとすると、未熟な果実など、果実の成熟度により蛍光分量に変化がないかに関心を持った。フラボノイドは紫外線から植物を守るために合成されるといわれている物質である(「フラボノイドの研究の実際 4.6 紫外線防御とフラボノイド」より)。そのため、果実の中の「種子」を紫外線から守るのならば、果実が小さく種子まで紫外線の届きやすい成長前の方が、蛍光成分が多いのではないかと予想した。以上のことから、今年は以下の実験を行った。

- ・収穫直後と収穫1か月後の柑橘の蛍光成分の成分ごとの定量と、カビの抑制作用を比較した。
- ・成長前のネーブル果皮に含まれる蛍光成分を定量し比較した。

4 材料 柑橘…バレンシアオレンジ・ネーブルオレンジ

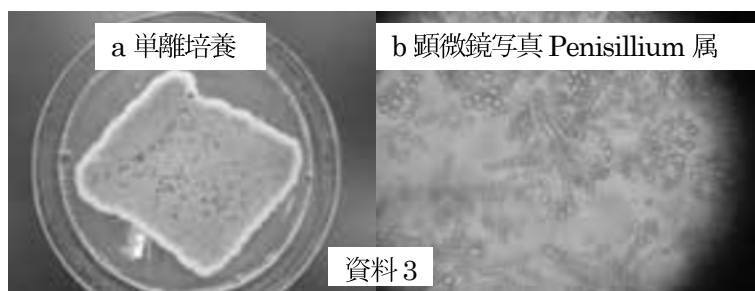
この2つのオレンジは蛍光成分の種類が似ており、目的の蛍光成分であるシネセチン・ノビレチン・ヘプタメトキシフラボンの3種を得ることができる。資料2はバレンシアとネーブルの蛍光成分の右側への TLC 展開の様子を示している。バンドは左からアルファベットの記号を付けた。a、Aはシネセチン、b、Bはノビレチン、d、D2はヘプタメトキシフラボンであることが分かっている。



資料2

カビ…*Penisillium* 属

柑橘の代表的な緑色のカビ。みかんなどにはえる粉をふいたようなカビを使用した。腐敗した柑橘からカビを単離培養した(資料3a)。資料3b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、*Penisillium* 属と考えられる。



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

※この溶媒はジムソー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 果皮中の蛍光成分含量の比較には、乾燥果皮を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により定量した。静岡大学に分析資料を持参して HPLC 機器をお借りし、操作方法をご指導いただきながら分析した。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)によって蛍光成分を分離し、HPLC で分離して蛍光成分を同定の上、量を比較した。カビへの作用は、培地に TLC で分離した蛍光成分を入れ、カビのコロニー数をコントロールと比較して蛍光成分のカビへの抑制効果を比較した。

(1) 柑橘果皮の成分定量

- ① 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砕した。
- ② 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。
- ③ 抽出液をろ過し、シリカゲルを除いた。
- ④ 2 μ L を HPLC のカラム(YMC ultraHT ProC18)に通し、分析を行った。
- ⑤ 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(μ g)を計算した。

<蛍光成分の含量の計算方法>(静岡大学農学部 加藤雅也先生のご指導による)

面積値÷傾きで濃度 x (μ g/mL)を計算する。その濃度 x を果皮 1g 中の含量 μ g に換算する。

- ① 分析した量が果皮 0.2g 中の量であるので 1g に換算するため 1/0.2g。
 - ② 溶液ジムソーメタ 10mL 中の量であるため $\times 10$ mL。
 - ③ HPLC 機器に保存されたデータが 10 μ L のものであるが、分析に使った抽出液が 2 μ L であるので換算する。2/10=1/5。
- ①②③より、1/0.2g $\times 10$ mL $\times 1/5 = 10$ 濃度 x に 10 をかけ、柑橘果皮 1g 中の含量 μ g に換算する。

収穫直後バレンシア a(シネセチン)の例

面積値=139007(a バンド結果) 傾き=12064.5(シネセチンのデータより)

濃度 μ g/L を x とし、計算 $x = 139007 \div 12064.5 = 5.7609 \dots$

果皮 1g 中含量 μ g $10x = 10 \times 5.7609 = 576.09 \mu$ g

(2) 薄層クロマトグラフィー(TLC)による蛍光成分の分離

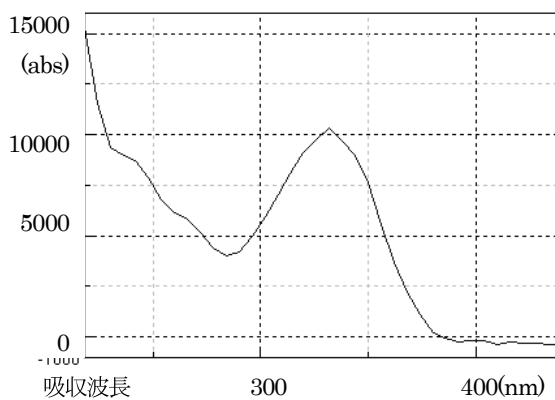
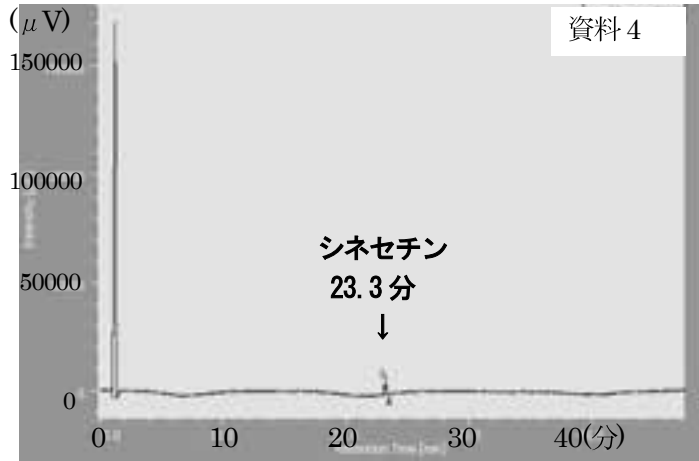
- ① バレンシアとネーブルの果皮 1 つ分の蛍光成分を抽出溶媒で 1 昼夜抽出した。
- ② 果皮の成分の抽出液をそれぞれ、TLC シートにおいて 300 本以上展開した。

(3) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による蛍光成分の同定・量の比較

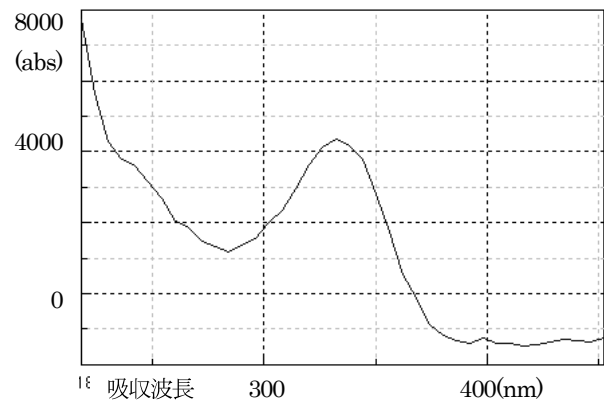
- ① 蛍光した TLC 200 本の各バンドのシリカゲルを、波長 366nm の紫外線のもと、柄つき針で丁寧に削り取った。
- ② シリカゲルに付着した蛍光成分をジムソーメタに抽出した。

- ③ 抽出液をろ過し、シリカゲルを除いた。
- ④ 2 μ L を HPLC のカラム(YMC ultraHT ProC18)に通し分析を行った。
- ⑤ 静岡大学農学部フラボノイドのデータにより蛍光成分の同定を行った。
- ⑥ ①と同じ 面積値 \div 傾きの計算で濃度を算出し比較する。

<成分同定方法> 成分によってカラムを通りぬける時間が異なる。たとえばシネセチンであれば 23.3 分であり、純粋な物質ならばピークは 1 回のみである。資料 4 は TLC の a バンドの分析結果であり、a バンドには一種類の成分のみが含まれることがわかる。



標品の吸収波長



資料 5

a バンド成分の吸収波長

カラムを通りぬける時間と、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。資料 5 のグラフは吸収波長(nm) とその吸光度(abs)であり、左がシネセチン標品、右は a バンドの吸収波長である。2 つが同一であるため、a バンドの成分はシネセチンと同定できる。

(4) 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 μ L であることを予備実験で確認した。その後、エタノールを蛍光成分の抽出溶媒として使用した。

- ① 柑橘 1 つ分の果皮を削り、100mL びんに抽出溶媒を入れ 1 昼夜抽出する。その抽出液から TLC を 200 本以上行う。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る。それぞれ aA,bB,dD2 の成分のシリカゲル 0.06g 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た。
- ② 蛍光成分の抽出液をろ紙でろ過し、シリカゲルを取り除いた。
- ③ 一方、カビの *Penisillium* 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。
- ④ シャーレに加熱殺菌した真菌用の寒天培地を流し入れたものを各成分 3 つずつ用意した。

⑤ 60℃まで冷ましたところに、蛍光成分抽出液 200 μL を加え、コントロールにも同じく 200 μL のエタノールを加えた。

⑥ *Penisillium* を塗布し、シャーレを密閉して培養した。

⑦ 4 日後にカビのコロニー数をカウントする。

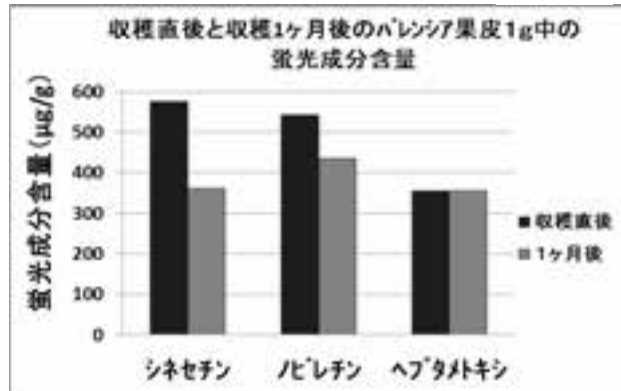
資料 6

7 結果

(1) 収穫直後と収穫 1 か月後の蛍光成分含量の比較

収穫直後と収穫 1 か月後のバレンシア果皮 1g 中の蛍光成分含量を比較したところ、次のように成分が減少した。(資料 6)

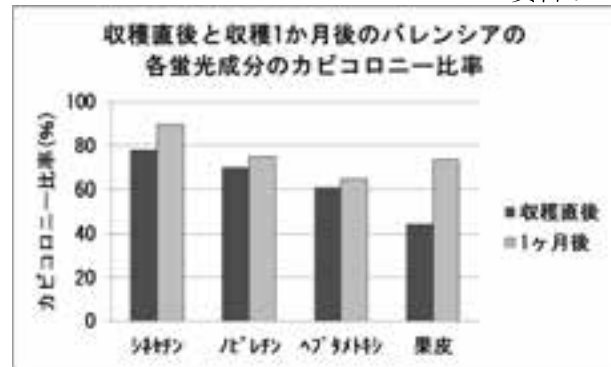
シネセチンは 576 μg → 362 μg = 264 μg 減少した。同様に、ノビレチン 114 μg、ヘプタメトキシフラボン 0 μg 減少。



資料 7

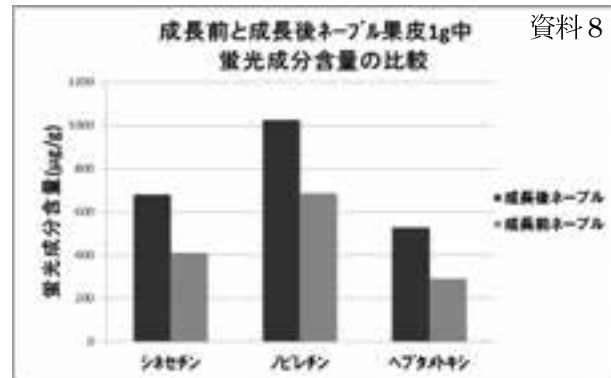
(2) 収穫直後と収穫 1 か月後の蛍光成分のカビへの作用の比較

コントロールのカビ(*Penisillium* 属)コロニー数に対して、バレンシア各蛍光成分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 7)。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。果皮は果皮全体からの抽出液を作用させたもの。資料 7によると、たとえば収穫直後のシネセチンはコントロール 100%に比べて 78%なのに対し、収穫 1 か月後のシネセチンは 90%になり、カビを抑制する作用が 12%減少することが分かった。



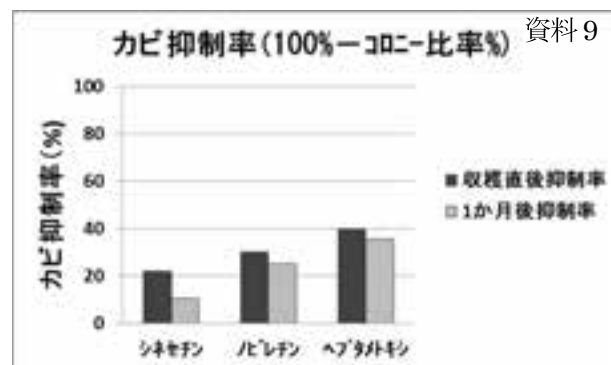
(3) 成長の時期による含量の違い

ネーブルの成熟は 2 月であり、成長前の若いネーブルは果樹がないと手に入らない。そこで掛川市の森林果樹公園のご協力で、6 月の直径 2cm 程度の緑のネーブルの果実を譲っていただき、成長前の果皮として調べた。成長前と成長後と比較すると、すべての蛍光成分において、成長前の蛍光成分が少ないことが分かった。(資料 8)



8 考察

6 月に収穫した柑橘を 1 ヶ月保存して、蛍光成分含量が減少するとカビコロニーの比率%が増加する。蛍光成分含量 μg をシ



ネセチンで比較すると、6月：7月=6：4で減少し、カビコロニー比率%を比較すると6月：7月=5：6と増加することがわかったがこれでは比べにくい。そこで、コントロールの100%からカビコロニー比率の%を引いて「カビ抑制率」とすれば、蛍光成分含量とよく似たグラフになるのではないかと考え、資料9のグラフにした。すると蛍光成分含量の資料6のグラフと同じ傾向を示すことがわかった。1ヶ月後に蛍光成分含量の減少の多いものほど、カビが抑制されることが明確になった。

資料10

蛍光成分含量とカビ抑制率を、数値でも置き換えて比較した。資料10は収穫直後を1とした時

	シネセチン	ノビレチン	4,7,8-tri-OH-flavone
蛍光成分 直後：1か月後	1：0.6	1：0.8	1：1
カビ抑制率 直後：1か月後	1：0.5	1：0.8	1：0.9

の1か月後の比を算出したもので、上が蛍光成分含量、下がカビ抑制率である。1ヶ月で蛍光成分が減少するほど、カビへの抑制率も減少するが、減少の比率も非常に近いことがわかった。これらから、蛍光成分の含量はカビの抑制に強く影響していることが分かった。予想を裏付ける結果が得られた。

今回のすべての結果から、蛍光成分はなぜ蛍光物質を作るのかを考察した。蛍光成分のフラボノイドが減っただけカビが抑制された。植物が蛍光成分を作る目的のひとつが、カビの抑制であると結論してよいと思われる。蛍光成分は植物がカビから身を守るために合成保持している抗菌性の物質、つまりファイトアンティシピンである可能性はかなり高いと思われる。

また、成長前のネーブルの蛍光成分含量(資料8)によると、成長前のネーブルには蛍光成分が少ない。そのことから蛍光成分は成長する過程で増加すると考えられる。フラボノイドは紫外線から植物を守るために合成される。果実の中の「種子」を紫外線から守るのなら、果実が小さく種子まで紫外線の届きやすい成長前の方が、蛍光成分が多いのではないかと予想していたが、逆の結果であった。つまり、果皮は紫外線から種子を守っているのではないことになってしまう。今後、成長段階ごとの蛍光成分の含量変化を調査し、また、果皮以外のたとえば種子自身の含量を調べ、植物が蛍光成分を合成する意義を確かめたい。

9 今後の課題

(1) 成長段階ごとの蛍光成分の含量とカビへの作用の比較

柑橘はいつ蛍光成分を合成するのかを調べる。

(2) 果皮以外の蛍光成分の含量を調べる

果皮以外の種子などの蛍光成分を調べることで、蛍光成分は種子を守っているのかを調べる。

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
- *食品の心筋検査—同定と観察— 東京都立衛生研究所 諸角聖
- *植物色素フラボノイド第4章フラボノイド研究の実際4.6.紫外線防御とフラボノイド 高橋昭久・大西武雄・武田幸作 文一総合出版

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 池戸勇太氏 及川みちる氏 川上奈伯子氏

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。

*掛川市森林果樹公園

研究に使用した柑橘を提供していただきました。ありがとうございました。

7. ポリ乳酸のケミカルサイクルに関する研究

静岡県立御殿場南高等学校 生物部
2年 今田裕貴 市来隼一 杉山大知 加藤遼馬 他9名

1 研究の動機

本研究は地球環境問題に興味を持ったことがきっかけである。中でも私たちの身の回りにあふれているプラスチックは有限の資源である石油からできおり、容易に分解されないことから環境に悪影響を与えることがある。そこで私たちは生分解性プラスチックに着目した。

生分解性プラスチックは微生物に分解されるため、ケミカルサイクルが可能である。さらに、植物由来の原料を利用した場合、分解時に放出される二酸化炭素は植物の光合成によって吸収したものが大気中に戻ると考えることができるため、空気中の二酸化炭素は増加しない。これをカーボンニュートラルという。このように生分解性プラスチックは通常のプラスチックより環境への影響が少ない。

昨年は、身近な食物から生分解性プラスチックの作成を試みた。しかし、食べられる物を利用するのはもったいないと考え、発酵によって得られる乳酸を原料としてポリ乳酸（バイオプラスチック）を作成し、廃棄されるものを利用したケミカルサイクルの完成を目指すことにした。

2 ポリ乳酸のケミカルサイクル（化学物質の循環）について

植物を食物として利用した後に生じた廃棄物を乳酸発酵させ、発酵液から乳酸を分離し、ポリ乳酸を作成する。使用後に生分解もしくは焼却処分して生じた二酸化炭素は植物が光合成により固定したものであるため、地上の炭素の絶対量は変わらず、植物によって再び吸収され光合成に利用される。この一連の地球環境に配慮した循環システムをケミカルサイクルという（図1）。



図1 乳酸のケミカルサイクル

3 昨年の研究

昨年は、試薬として購入した乳酸から作成したポリ乳酸が環境中で生分解されることを確認した。

また、ポリ乳酸の原料の乳酸を生成する方法として、廃棄物である米のとぎ汁を発酵させると発酵液中に乳酸が生成されることをHPLC（高速液体クロマトグラフィー）を用いて確認できた。HPLCは横浜薬科大学 生化学研究室にてお借りした。

4 今年の研究

(1) 目的

乳酸発酵により原料となる乳酸を作成し、発酵液から分離してポリ乳酸を作成することで、乳酸のケミカルサイクルを完成させる。

(2) 研究の流れ

今年は、昨年使用した米のとぎ汁より回収や扱いが容易で、産業廃棄物でもある「米ぬか」を使用することにした。米ぬかを選んだのは、ぬか漬の酸味が乳酸によるものだというのを知り、乳酸が得やすいと考えたからである。実験は次の3つに分けて行った。

実験1 ポリ乳酸の作成方法の改良と生分解性の検証