

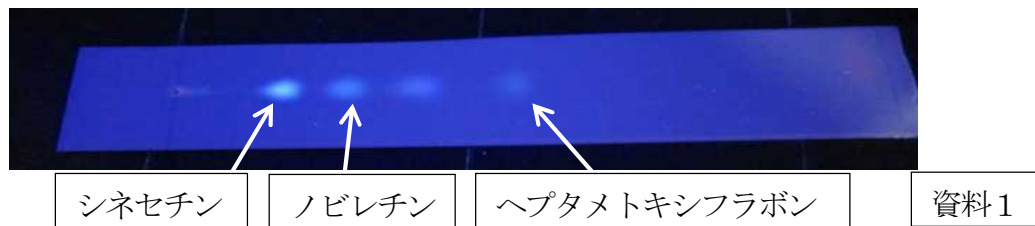
蛍光を発する植物VI

静岡県立掛川東高等学校 サイエンス部
2年 伊藤大騎 1年 角替晴信 若林孝尚 松永都夢

1 動機

紫外線で柑橘類の果皮が蛍光することから、それらを抽出してTLCによって分離し、HPLCで調べたところ、3つの蛍光成分が含まれているとわかった(資料1)。

私たちはこのことに大変興味をもち、「植物はなぜ蛍光成分を生成するのか」を6年間、探求してきた。



2 昨年までの研究

ネーブルの蛍光成分をTLC(薄層クロマトグラフィー)で分離することで、シネセチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボンというフラボノイドが分離できることをHPLC(高速液体クロマトグラフィー)で確認した。フラボノイドは紫外線から植物を守るために生成されると言われている。我々の研究では、この3つの成分は柑橘の緑色のカビである *Penisillium* 属を減少させることが分かった。昨年と一昨年2回ずつの結果から果実が成長するにつれてシネセチン、ノビレチンが減少し、ヘプタメトキシフラボンは増加する傾向が見受けられた。ヘプタメトキシフラボンだけが増加することから、シネセチン、ノビレチンと違う経路で生成されると予想した。シネセチン、ノビレチンが成長初期に必要ということは、未熟な果実が種子を紫外線から守るための成分ではないかと考えた。

3 本年度の研究

1ヶ月ごとの成長段階の健康のネーブルを採取し、3つの蛍光成分、シネセチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボンの含量を比較する。それによって昨年より正確な結果を出し、必要な条件や時期を推測する。

ネーブル以外の柑橘類をTLCで分離し、種子を持つ柑橘にシネセチン、ノビレチンが多いのかについてHPLCで分析してネーブルと比較した。

4 材料・薬品

- TLC用 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
- TLC用 展開溶媒 ジエチルエーテル
- HPLC用 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略称で呼ばれているため、今後、略称を用いる

5 方法1 <ネーブルの1ヶ月ごとの成長段階の蛍光成分含量>

ネーブルの生成する蛍光成分がいつ必要なのかを探るために、掛川森林果樹公園から健康なネーブルを毎月3個以上ずつ採取し、1ヶ月ごとの成長段階の蛍光成分を定量した。定量には静岡大学のHPLC(高速液体クロマトグラフィー)と検量線のデータをお借りした。

- (1) ネーブルの個体差をなくすため、3個のネーブルから等量の果皮をはがし、乾燥させてミルサーで粉状に粉砕する。
- (2) 乾燥重量0.2gを量り取り、10mLのジムソーメタで一昼夜抽出し、ろ過した。
- (3) ろ過した抽出液をHPLCで分析し、静岡大学の検量線の傾きのデータから、濃度を算出する。
- (4) その後計算して、果皮1g中の蛍光成分の含量 μg を求めた。

計算方法 (静岡大学 加藤雅也先生 ご指導による)

〈濃度〉面積値÷検量線の傾き=濃度 mg/mL

〈含量〉果皮1g中の含量 μg に換算する。

① 検量線が果皮0.2g中の量なので、1gに換算する → $1\text{g}/0.2\text{g}$

② 溶液ジムソーメタ10mL中の量なので10倍 → $\times 10\text{mL}$

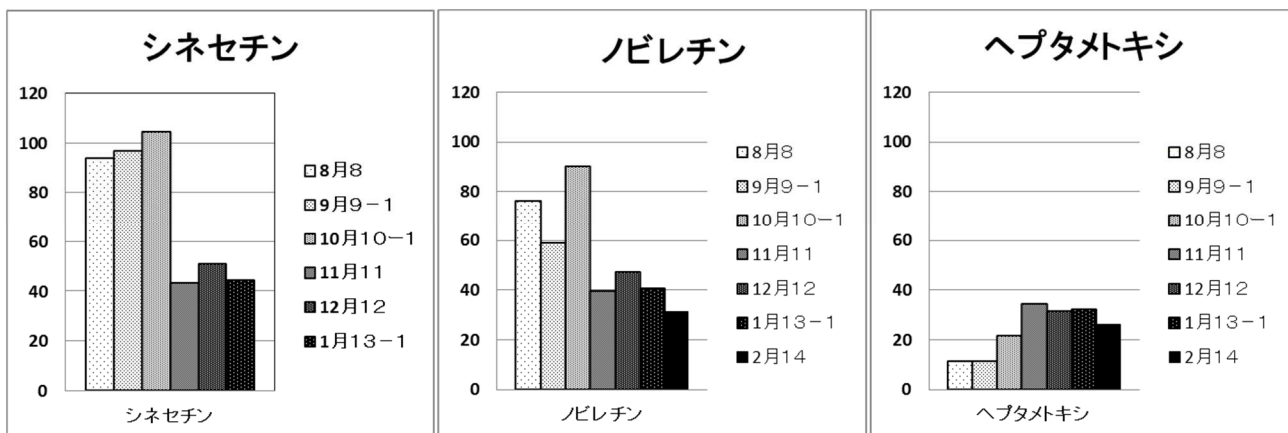
③ HPLC機器に保存されたデータが $10\mu\text{L}$ のものであるが、分析に使った抽出液が $2\mu\text{L}$ なので換算する。 → $2/10 = 1/5$

①②③より、 $1\text{g}/0.2\text{g} \times 10\text{mL} \times 1/5 = 10$

濃度 mg/mL に上記の10をかけて、果皮1g中の含量 μg に換算する。

6 結果1 <ネーブルの1ヶ月ごとの成長段階の蛍光成分含量>

資料2のグラフは、1ヶ月ごとの乾燥果皮1g中の蛍光成分の含量 μg の変化を示している。昨年の傾向通り、果実が成長するにつれシネセチン、ノビレチンが減少し、ヘプタメトキシフラボンが増加することが分かった。ネーブル果実が未熟な8月にはシネセチン、ノビレチンはヘプタメトキシフラボンの1~9倍含有しているが、成熟時の1月では、シネセチン、ノビレチンはヘプタメトキシフラボンの1.1~1.2倍程度しか含有しない。



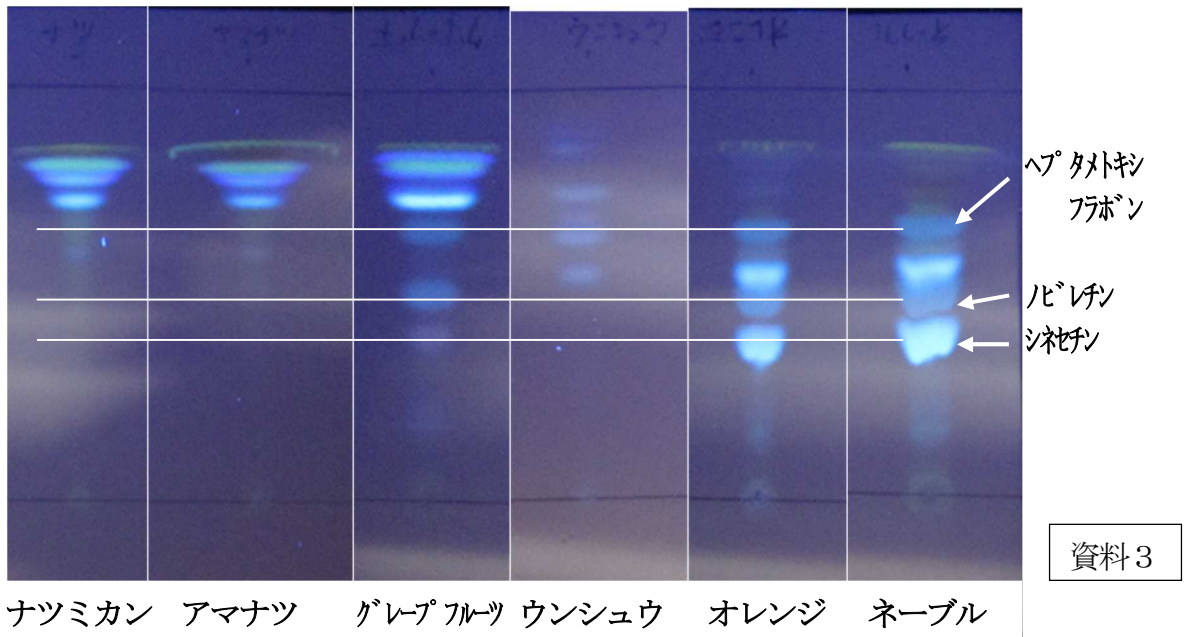
資料2

7 方法2 <5種類の柑橘の蛍光成分含量>

シネセチン、ノビレチンが種子を守ると仮定すると、種子を持つ柑橘にはこの2成分が多いのではないかと予想し、種子のある柑橘とない柑橘の蛍光成分を比較した。

(1) 種子を持つ柑橘としてナツミカン、アマナツ。ネーブルに近い柑橘としてオレンジ。タイプの違う柑橘としてグレープフルーツ、ウンシュウ。これらの5種類の柑橘を選んだ。すべて7月に手に入れた成熟した果実である。

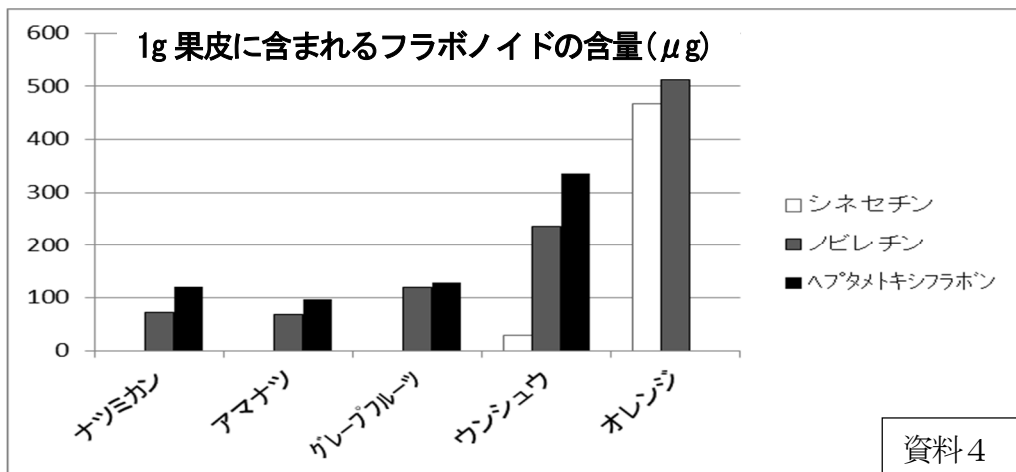
(2) これらの果皮の抽出成分をネーブル果皮の抽出成分と並べてTLCで分離を行い(資料3)、ネーブルのシネセチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボンと同じと思われる蛍光成分をチェックした。(白線はTLCにおいて同じRf値の位置を比較するためのものである)



(3) 方法1と同じ方法でHPLCを使い、果皮1g中のシネセチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボンの含量 μg を調べる。

8 結果2 <5種類の柑橘の蛍光成分含量>

5種類の柑橘の蛍光成分をHPLCで分析した結果が資料4である。それぞれの果皮1g中の成分含量 μg を、左からシネセチン(白)・ノビレチン(灰色)・ヘプタメトキシフラボン(黒)の順で示した。ノビレチン(灰色)は全ての柑橘で確認できた。しかし、種子を持つ柑橘のナツミカン、アマナツにはシネセチン(白)は確認できず、オレンジに多く含まれた。ヘプタメトキシフラボン(黒)はオレンジのみ含まれなかった。アマナツ、ナツミカン、グレープフルーツは蛍光成分が似ている傾向があった。蛍光成分の多い柑橘はウンシュウとオレンジである。



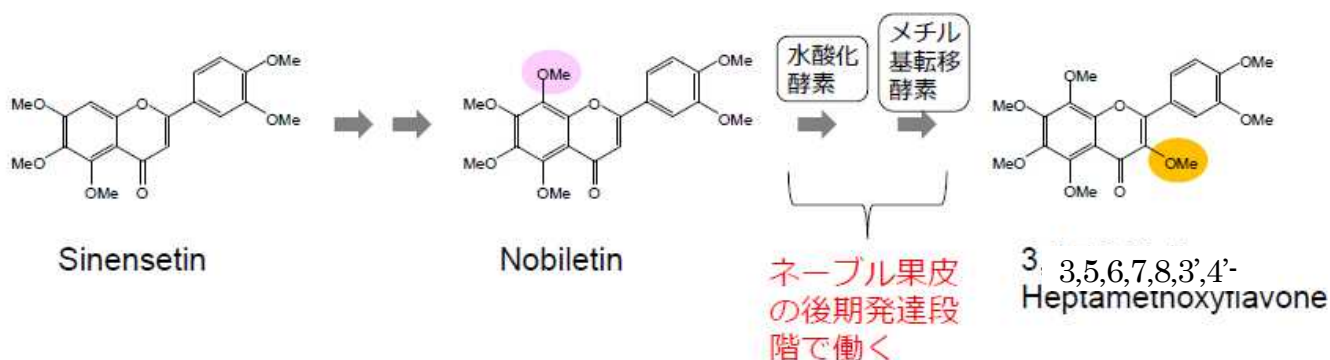
9 考察

<ネーブルの1ヶ月ごとの成長段階の蛍光成分含量>

1ヶ月ごとの蛍光成分含量の結果から、シネセチン、ノビレチンはネーブルの成長初期に作られ、成長するにつれてヘプタメトキシフラボンが作られることの確認が得られた。

3つのフラボノイドの構造式を、昨年度理化学研究所に問い合わせている。本校の結果を照らし合わせると、柑橘の体内では資料5のようにシネセチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボンの順に作られると推定されるという。この場合、一つずつメトキシ基がついていくことになる。成長初期にはシネセチン、ノビレチンが順に作られ、成長後期には、もう1つメトキシ基が付き、ヘプタメトキシフラボンに変換されると予想される。

今年の月ごとの変化と、ヘプタメトキシフラボンの総量が少ないことから、初期に作られたシネセチンがノビレチンに合成されて行く過程で、ノビレチンの一部がヘプタメトキシフラボンに随時合成されていくという流れが、ネーブル成長過程で行われたと考えられる。



<理化学研究所提供>

資料5

<5種類の柑橘の蛍光成分含量>

今回調べた5種類の柑橘は、すべて成熟しているため、フラボノイドの生成過程の終了時の含量である。

(1) ナツミカン・アマナツ・グレープフルーツ

種子のあるナツミカン、アマナツと、グレープフルーツはシネセチンが全く確認できない点から、種子があることと、シネセチン含有することには関係はないことがわかる。シネセチンが未熟な種子を紫外線から守っているわけではないと考えられる。また、シネセチン → ノビレチン → ヘプタメトキシフラボンの順に生成されるとすると、ナツミカンとアマナツは、①シネセチンを必要としないノビレチン生成経路を持つ ②シネセチンがすべてノビレチンを介してヘプタメトキシフラボンに合成されてしまった。の2パターンが考えられる。

(2) ウンシュウ

ウンシュウはシネセチン < ノビレチン < ヘプタメトキシフラボンの順に多く含有しており、シネセチンを残したまま最終的にヘプタメトキシフラボンを生成したと考えられる。また、ヘプタメトキシフラボンの含量が5種の中で一番多いということは、ウンシュウは成熟するにつれヘプタメトキシフラボンを必要とすると言える。

(3) オレンジ

反対に、オレンジではシネセチン、ノビレチンが5種の中でも多量に生成される一方で、ヘプタメトキシフラボンは確認できなかった。柑橘の成熟時にヘプタメトキシフラボンが必要とは限らないことがわかった。

これら5種類を考え合わせると、成熟時にヘプタメトキシフラボンが必要でない果実も存在し、柑橘類の種類によって成熟時にどの蛍光成分を必要とするかが異なることがわかった。ほかの柑橘も1ヶ月ごとの蛍光成分含量を調べる必要を感じた。

10 今後の課題

- (1) ネーブル以外の柑橘の1ヶ月ごとの成分定量を行い、シネセチン が初期に作られているのかを確認する。
- (2) 成熟時に ヘプタメトキシフラボン を含有する柑橘と含有しない柑橘の、*Penicillium* 属への耐性や、乾燥耐性、温度感性などの違いを調べ、ヘプタメトキシフラボン の働きを予想する。

11 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—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
- ◎植物色素フラボノイド 青木俊夫、明石智義:監修/文一総合出版
- ◎一般財団法人 日本植物生理学会 HP みんなのひろば 植物 Q&A

謝辞 ありがとうございました。

静岡大学農学部 共生バイオサイエンス学科

加藤雅也教授、及川みちる氏、田淵真氏

HPLC を利用させていただき、ご助言をいただきました。

掛川市森林果樹公園 兼堀行男施設長、

多くのネーブルを無償で提供していただきました。

理化学研究所 榊原圭子氏

生合成経路を教えてくださいました。