

植物のアミノ酸生成量に関する実験方法の確立

小河 優希 楠木 涼太 富永 幹士 福田 陽大
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

植物の遊離アミノ酸生成に関する研究は、植物工場の発展の分野において重要な役割を果たしている。そこで、本研究では、まずは植物のアミノ酸生成量の測定方法を確立することにした。

1. 研究の動機と目的

近年、先端生命科学分野において植物に太陽光ではなく、有色LEDを照射することで発育状態を制御する技術が脚光を浴びている。具体的には、食品として扱う植物の場合は、大きく育てることによって可食部を増加させること、味覚に作用する糖分や水分量を調整することでより栄養成分に優れたものを生産することができると考えられている。現在、先行研究の結果を総合すると、光は種子から発芽の段階、青色光は発芽以降の段階においてそれぞれ植物、体の強く影響を及ぼすことが明らかにされている。一方で栄養物質や呈味物質の生成と照射光の関連性及びその背景にあるメカニズムは解明されていない、そこで我々の研究班はこれらの関連性やメカニズムを明らかにし、最終的に植物を完全に人工灯の素で栽培するうえで最も能率的な光の強度、色の混合比、照射時間、その他諸条件を割り出し、植物工場等で大量生産をする場合の最適な栽培モデルを構築し、迫り来る食糧難を克服し持続可能な産業を守る取り組みの一翼を担いたいと考え、この実験に取り組むこととした。

2. 先行研究の実施状況

植物体中の遊離アミノ酸の検出の一般的な方法には、ペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸の定性分析が知られている。本研究では、定性実験よりも実験の結果が正確に得られる定量実験の方法の確立を第一の目的として研究を行うとする。

3.1. 予備実験

まず、サニーレタスが発芽して2週間で先行研究のようにレタスが成長するか確認した。

方法

パレットに水を浸して、その上にウレタン培地(スポンジ)を浮かせて、切れ目に隠れるくらいの深さで種を入れ、サランラップを上からかぶせてインキュベーター内で発芽させる。この時、白色蛍光

灯を当て、温度は25度に保った。

結果

3日で発芽約10日で1~2cmまで成長した。葉は子葉が2枚出た。しかし何度繰り返してもこの伸長まで成長した後葉に斑点が表れ色が緑色から黄緑色に変色し枯れた。また、スポンジが水を吸っていなかった。。

考察

スポンジが硬すぎるために根がしっかりと張れなかったのではないかと。あるいはスポンジを浮かせる方法に問題があるのではないかと。

3.2. 予備実験2

方法

パレットの中に湿らせたキッチンペーパーをしきつめ、その上に種子を置きインキュベーター内で発芽させる。この時の光と温度の条件は方法1と同じく白色蛍光灯をあて温度は25度に保った。

結果

方法1と同様の結果となった。

考察

光阻害によって成長が妨げられたのではないかと。



図1 インキュベーター内の発芽の様子

3.3. 予備実験3

方法

水耕栽培キットを用いた。キットで使うスポンジは方法1と同様のものを用いた。この時の光の条

件は方法1と同じく白色蛍光灯をあて温度は25度に保った。

結果

スポンジは水を吸ったものの発芽後は方法1と同じ結果となった。しかし、約2週間たっても葉が成長しなかったために失敗したと思っていたが、その後片づけるのを忘れてしまい放置していると約2か月後にサニーレタスが成長しているのが確認できた。

考察

光阻害によって成長が妨げられたのではないかと。

3.4. 予備実験4

方法

シャーレに湿らせたキッチンペーパーをしきつめシャーレの蓋を閉じ、アルミホイルで包み光を遮断した。この時の光と温度の条件は方法1と同じく白色蛍光灯をあて温度は25度に保った。

結果

方法1と同様の結果となった。

考察

光が全く当たらないと育たない。



図2 シャーレ内の発芽の様子

3.5. 予備実験5

方法

タッパーに湿らせたキッチンペーパーをしきつめ種を置き蓋をする。蓋はプラスチック製で透明ではないため少し光が弱まる。この時の光と温度の条件は方法1と同様に白色蛍光灯をあて温度は25度に保った。

結果

発芽しはが4枚でた。しかしそのあとは方法1と同様に枯れた。

考察

ほかの方法より成長の兆しが見えた。

4. 本実験

実験原理

本実験では、植物に含まれるアミノ酸含量を測定するにあたって、ニンヒドリン発色法を用いてアミノ酸の比色定量分析を行うことにした。(ニンヒドリン発色法とは、ニンヒドリンがアミノ酸の持つアミノ基と反応して青紫～赤紫色(ルーヘルマン紫)に呈色する反応) 定量するアミノ酸の1種であるグルタミン酸標準溶液で検量線を作成し、実験で扱った植物の試料溶液のグルタミン酸量を求める。この値をアミノ酸総量に標準化することとする。

だが、この方法では、アミノ酸(グルタミン酸)のほかにもタンパク質やペプチド基の α -アミノ酸(タンパク質の構成ユニット)とも反応してしまう。つまり、植物の試料溶液に溶けたタンパク質を取り除く必要がある。そこで、本実験では、「エタノール沈殿」を取り入れることにした。この方法は、比較的簡易であり、高分子化合物である植物内の可溶性タンパク質を沈殿させることができるうえに、タンパク質分解酵素を失活させることができる点で、非常に効果的である。

以上のことから、目的のアミノ酸総量を分析できることになった。

方法

過程1. 植物のアミノ酸抽出液の生成

使用器具

レタス、乳鉢、乳棒、エタノール、三角フラスコ、スターラー、遠心分離機

方法

レタスと乳鉢、乳棒を前日から冷凍庫で保存し凍結させる。磨碎時に発生する酵素反応を可能な限り防ぐために取り出したレタスを速やかに磨碎する。この時、条件を不変にするため、どのレタスも磨碎の程度が均一になるようにする。また、磨碎はミキサーで行うと適切なレタスの水抽出液が得られないと判断したため、乳鉢と乳棒を用いて行うとする。

磨碎終了後速やかにエタノールを混ぜ80%水溶液になるようにする。この時レタスから出る水の量も含めて最終濃度80パーセントエタノールになるようにする。

その後三角フラスコの80%水溶液の中に磨碎物が分散された状態でドラフトチャンバー内でアルミ箔で蓋をして約30分スターラーで攪拌する。

この懸濁液を遠沈管に移す。この時三角フラスコ内に残った試料の固形物を80%エタノールで遠沈

管に流し込む。これを数回繰り返す。一回目の遠心分離後、遠沈管内の上清は有利アミノ酸を含む必要な画分であるので三角フラスコに移す。遠沈管に残った沈殿物にはまだアミノ酸までが少量混ざっているので新たに 80%エタノール水溶液を遠沈管の半分くらい加え攪拌する。よく攪拌したら再び遠心分離を行う。2回目の遠心分離後遠沈管内の上清をすべて一回目の後移した三角フラスコに加える。これらによって集めたすべての上清から蒸留によってエタノールを除去する。ここでは、ニンヒドリン比色実験の過程で用いる恒温槽を用いる。これによって凝縮された抽出液をメスフラスコに入れる。元の容器に残った抽出液を蒸留水で洗いこむ。その後、抽出液の体積を定量する。定量後、メスフラスコ内の抽出液を、蓋をおさえて上下を逆転することを含めて、しっかり振り混ぜて均一な濃度の水溶液にする。

過程 2. ニンヒドリン発色法によるアミノ酸定量

使用器具

グルタミン酸、クエン酸 1 水和物、水酸化ナトリウム、ニンヒドリン(特級)塩化スズ(II)二水和物、メチルセルソルブ、2-プロパノール、リップ付き試験管、ビー玉、メスピペット、安全ピペッター

試料の調製

i. グルタミン酸標準溶液

グルタミン酸 50mg を蒸留水に溶解し 100ml に定容する。これを 10 倍希釈し 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を作る。

ii. クエン酸緩衝溶液

0.4mol/L のクエン酸 50ml に 2.0mol/L の水酸化ナトリウムを 28ml 加え、1ml ずつ水酸化ナトリウムをたし PH5.2 に調整する。

iii. ニンヒドリン溶液

ニンヒドリン(特級) 5 g をメチルセルソルブ 250ml に溶解しクエン酸緩衝液 250ml と混合する。

iv. 塩化スズ(II)溶液

塩化スズ(II) 50 mg をクエン酸緩衝溶液に溶解し 25ml に溶解する。

v. 希釈液

2-プロパノールと蒸留水を 1 対 1 に混合する。

過程 3. ニンヒドリン反応

- 1、試験管に標準溶液と試料溶液を蒸留水と合わせて 1.0ml 入れる。
- 2、1 にニンヒドリン溶液 0.5ml と、塩化スズ溶液 0.5ml(還元剤)を入れ、激しく混ぜ合わせる。

- 3、試験管のくちにビー玉をのせ、80 度の恒温槽中で 30 分間加熱する。ビー玉は、加熱して発生する水蒸気を冷やして還流をもたらす効果がある。



図 3 恒温槽内の試験管の様子

- 4、速やかに水道水中で冷却し室温に戻した後 2-プロパノールと蒸留水の希釈液を 5.0ml 加え、均一に攪拌する
- 5、肉眼で比色した後に、検量線で試料液中の総アミノ酸量を求める。

結果

グルタミン酸標準溶液の 2 回の結果を①、②と定める。

肉眼で比較したところ、以下のようになった。(各試験管内の液量は移し替えたものであり、液量の差異は実験結果に直接影響を及ぼさない。)

(右からグルタミン酸標準溶液 0, 5, 10, 15, 20 μg)



図 4 ①の試験管の様子

次に、570nm(紫色)で吸光度を求め、検量線を作成した。(横軸:グルタミン酸標準溶液 [μg]、縦軸:吸光度 [A])

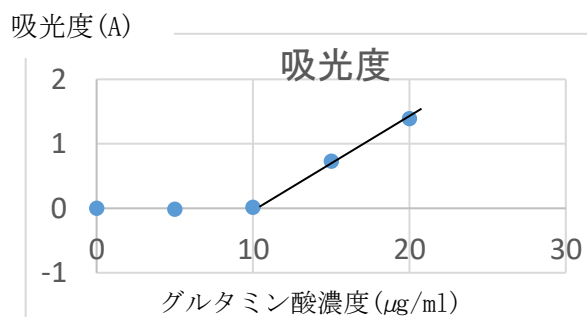


図 5 ①の検量線

考察

肉眼で見てわかるように、グルタミン酸溶液を 15、20 μl 含んだ溶液で発色反応が見られ、また、吸光度の値から 15~20 には比例関係があると思われる。

グルタミン酸標準溶液②

(右からグルタミン酸標準溶液 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 μg)

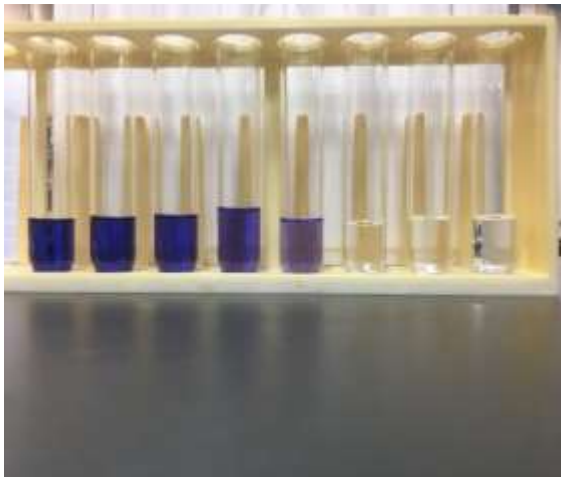


図6 ②の試験管の様子

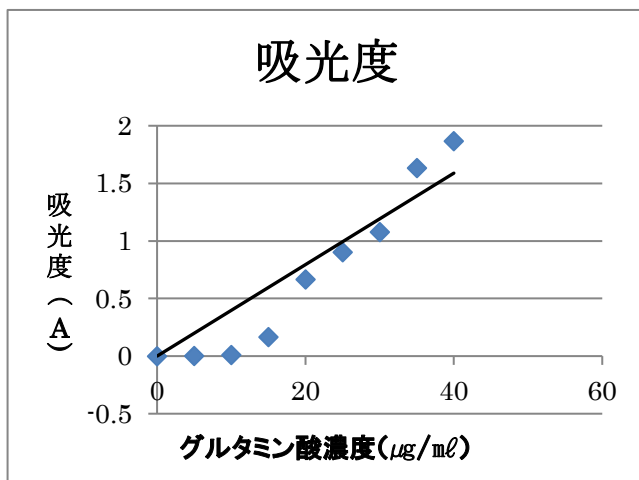


図7 ②の検量線

5. 考察・今後の展望

今回私たちは予備実験で何回もレタスの水耕栽培に努めたが失敗した。いくつかの方法を試してみたがほぼすべての方法で同じような結果となった。ただ偶然、2か月程度放置していたサニーレタスで成長が確認できたことから生育期間が短かったのではないかと考えている。先行研究を参考にしてサニーレタスの生育期間を2週間にしていたが環境等の影響により高校程度の設備では本来1か月程度は要するのではないかという結論に至った。ただ、このこ

とに気付いたのが研究終了間近であり、放置していたものであったため温度、気温、光等の条件は予備実験と異なる。

また、新型コロナウイルスの影響により研究期間が短かったこと、及び予備実験の失敗のために本実験まで行うことができなかった。そのため本実験の方法を確立して研究終了となった。この方法で今後私たちが行うことのできなかった本実験が行われることを切に願う。

今回の失敗の大きな要因はサニーレタスが2週間で育つと確信していたことであろう。それを反省し今後の研究に活かしていきたい。

5. 謝辞

神戸大学人間発達環境学食環境学研究室 白杉直子教授

兵庫県立神戸高等学校サイエンスアドバイザーの方々

[参考文献・参考URL]

1、100均スポンジで野菜を作ろう！人気ブロガーのアイデアあふれる水耕栽培、

https://agri.mynavi.jp/2018_01_23_16792/

2、レタスは光強度・光質により代謝を自在に変化する

<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/images/pdf/180521kusano-1.pdf>

3、LEDを使用した搔レタス栽培における赤色光をベースとした光質の影響、斎藤裕太、清水浩、中嶋洋、宮坂寿郎、大土井克明、2012年24巻1号 p. 25-30

4、中川致之、阿南豊正、茶のアミノ酸の簡易定量法 1979年1979巻50号 p. 56-61

5、岡本研正、柳智博、RGB3色高光度LEDを用いた植物栽培と生育センシング、1999年68巻2号 p. 156-160

6、信濃栄、彼谷俊夫、植物体のアミノ酸の検出について 1958