

異なる光条件下におけるトウモロコシに含まれる アスコルビン酸量に関する研究

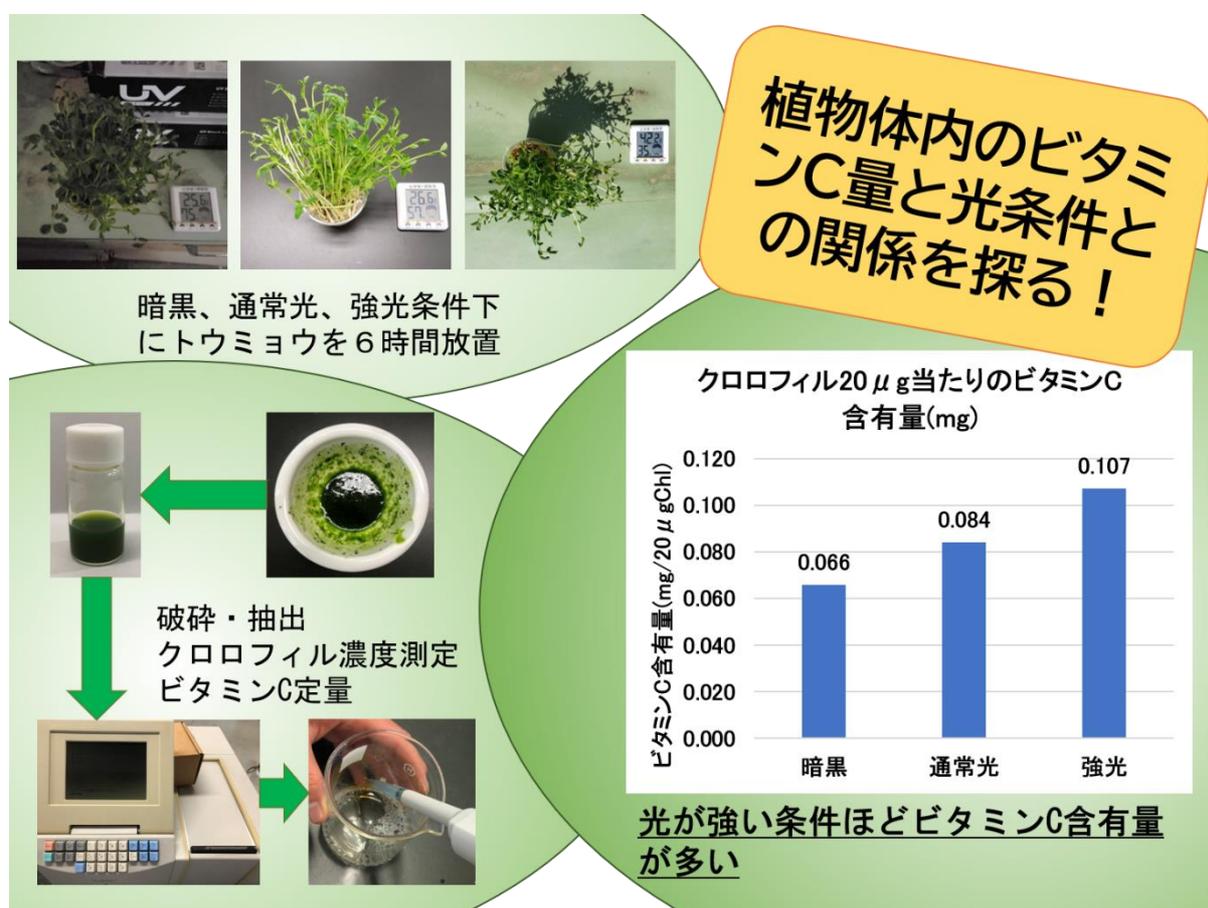
愛媛県立松山南高等学校 (ビタミンC班)

河瀬茉結・黒田耕生・澤原仁愛・冨田晃宏

指導教員：目見田拓

研究概要

アスコルビン酸(ビタミンC、以下 AsA)はヒトにとって必須の化合物であり、毛細血管・歯・軟骨などを正常に保つ働きや日焼けを防ぐ働き、ストレスやかぜなどの病気に対する抵抗力を強める働きを持っている。AsA が不足すると倦怠感や疲労感を引き起こし、欠乏に至るとコラーゲンの不足から壊血病を引き起こすことが知られている。また、伊藤ら¹⁾によって、植物と同様の酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアに含まれる AsA 量が、光条件によって変わることが示唆された。そこで私たちは、高等植物においても光条件によって AsA 量が増えるのではないかと考え、植物体内の AsA 量と光条件との関係を明らかにすることを今研究の目的とした。AsA が強力な還元剤であることから、ヨウ素デンプン反応を用いて AsA を定量した。その結果、強光条件の植物の AsA 含有量が通常光、暗黒条件の植物の AsA 含有量よりも多いことが分かった。



1. 背景と目的

アスコルビン酸(ビタミン C、以下 AsA)はヒトにとって必須の化合物であり、毛細血管・歯・軟骨などを正常に保つ働きや日焼けを防ぐ働き、ストレスやかぜなどの病気に対する抵抗力を強める働きを持っている。AsA が不足すると倦怠感や疲労感を引き起こし、欠乏に至るとコラーゲンの不足から壊血病を引き起こすことが知られている。

ヒトを含む動物は光合成を行うことができないため、食事から生活に必要なエネルギーを取り込む必要がある。それに対し、植物のような光合成生物は、図 1 に示したように、葉緑体にあるチラコイド膜で水と光を使って電子伝達反応を行う。この反応では光エネルギーが化学エネルギーに変換され、この化学エネルギーを用いることで、ATP といったエネルギーを合成することができるのである。そして、このエネルギーを用いて二酸化炭素を糖に変える炭酸固定反応を行っている。森村ら³⁾によると、光合成電子伝達反応によって生じた酸素の一部は、代謝過程において活性酸素と呼ばれる反応性の高い気体へと変化する。本来、活性酸素は免疫を高める効果を持つ気体であるが、過剰に発生した活性酸素は動植物の細胞に損傷を与えてしまい、その有害性が指摘されている。この活性酸素の過剰発生防ぐために活性酸素を除去する役割を担うのが抗酸化酵素と呼ばれる物質で、各組織内に存在している。

その酵素の一つにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) とよばれる酵素があり、植物は電子伝達反応においてこの APX を使い、AsA から過酸化物へ電子を渡すことで活性酸素を除去している(図 2)。

これらのことから、光条件と植物体内の AsA 量とは密接な関係があると考えた。

また、伊藤ら¹⁾によって、異なる光条件下で培養したシアノバクテリアに含まれる AsA 定量結果から、AsA 合成に光が関与していることが示唆された。

以上のことから、私たちはシアノバクテリア同様の光合成を行う植物においても AsA 合成に光が関与しているのではないかと考えるに至った。そこで私たちは、植物体内の AsA 量と光条件との関係を見つけることを研究の目的とした。

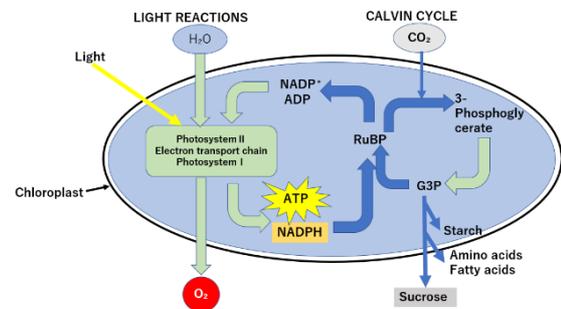


図 1. 植物の葉緑体内における光エネルギー変換反応(光合成電子伝達系)と CO₂の固定反応²⁾

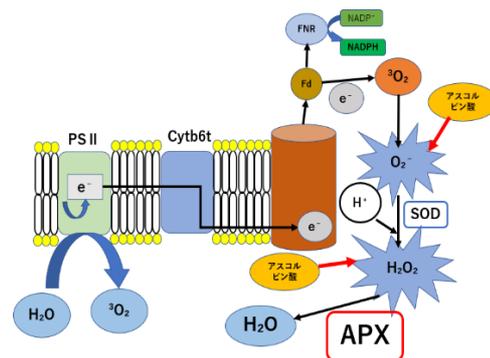


図 2. 電子伝達系における AsA のはたらき¹⁾

2. 方法

トウモロコシの葉を 1 cm 角に千切り、乳鉢を使い、10mL の抽出溶媒(pH=7.0, 0.1mol/L リン酸緩衝液:10%NaCl 水溶液=1:1)を徐々に加えながら破碎し、トウモロコシ破碎液を得た。そして、細胞片を除去するために、破碎液のろ過を行い、ろ液を、室温(25℃)、5590g で 5 分間遠心分離(VMS VS-100N)して、その上澄み液を別の容器に移して AsA 抽出液とした。その後、200 μL の AsA 抽出液に、最終濃度が 80% になるように 800 μL のメタノールを加えて、ボルテックスミキサーで 20 秒ほど攪拌して色素を抽出した後、室温(25℃)、5590g で 5 分間遠心分離(VMS VS-100N)した。分光光度計(Hitachi U2001)を使って、遠心分離後の上澄み液の波長 665nm の吸光度を測定し、下記の計算式でクロロフィル濃度(単位は mgChl/mL)を見積もった。

$$[Chl] = \frac{665nm \text{の吸光度}}{79.95} \times \text{希釈率}$$

1000 μL の AsA 抽出液と 1000 μL のデンプン溶液を混合した溶液に、マイクロピペットを使って、ヨウ素溶液を滴下し、酸化還元滴定により、AsA 抽出液の AsA 定量を行った。

終点の判断については、先行研究によって示されたヨウ素でんぷん反応の青色の波長である 582nm の波長に注目し、この波長における吸光度の変化から求めた。これによって、より定量的な実験を行うことが可能になった。

滴下したヨウ素溶液の量から、それぞれの AsA 抽出液に含まれる AsA 量を算出するために、検量線を作成した。その結果を図 3 に示した。近似曲線を求めると下記の直線①の式が与えられた。

$$\text{直線①: } y = 3.6965x$$

こうして、ヨウ素の滴下量から AsA 含有量を算出することが可能になった。

3. 結果

次に、トウモロコシに含まれる AsA 量を調べるために、ヨウ素溶液を 1.0ml 滴下することに資料溶液の 582nm の吸光度の値を測定した。582nm の波長は先行研究によってヨウ素でんぷん反応の青色の波長であることが示されている。

私たちは、吸光度の値が 0.45 を超えたところを終点と定め、この時に滴下したヨウ素の量を図 4 から得た。終点までに滴下したヨウ素溶液の量は暗黒条件下では 0.178mL、通常光条件下では 0.228mL、強光

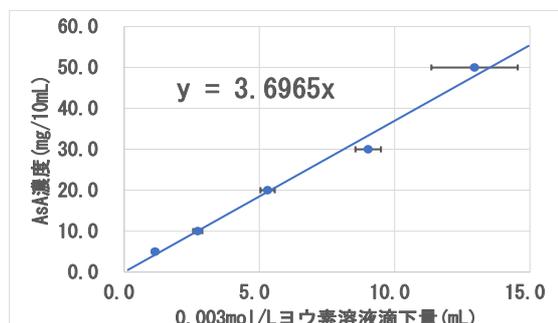


図 3. AsA 検量線

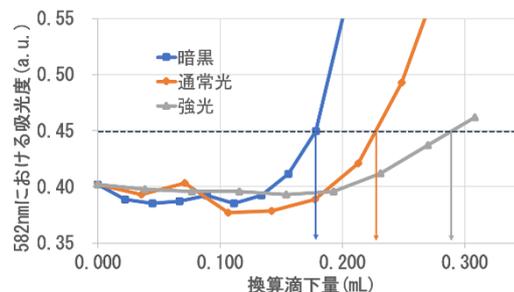


図 4. 582nm の波長における吸光度変化とヨウ素液滴下量の関係(滴下量は 20 μgChl 当たりの 0.0030mol/L のヨウ素溶液の滴下量に換算している。)

条件下では 0.290mL であった。

滴下したヨウ素溶液の量から、図 3 の検量線を用い
に含まれる AsA 量を算出した。直線①により求めた
AsA 量を表1にまとめた。表1には、通常光条件下に
おける AsA 量を 100 とした時の相対的な AsA 量も示
した。

4. 考察、まとめ

本研究では、暗黒条件下に置くことで、トウモロコシ
の AsA 量が減少し、強光条件下に置くことでトウモロコシ
の AsA 含有量が増加した。

まず、AsA は図 5 に示すような経路から合成される
ことが知られている⁴⁾。この経路で葉出発点は光合成
産物である D-グルコースから合成されたものであ
る。したがって、光合成が行われなければ、AsA 合成

の出発点となる物質が作られないことが分かる。また、田畑ら⁵⁾によって、AsA は活性酸素の除去に加え、細胞壁の形成や細胞分裂・伸長などに使われることが示された。すると、活性酸素の発生がない暗黒条件下でも AsA は細胞壁の形成や細胞分裂・伸長などに使われることが分かる。以上より、暗黒条件下では通常光条件下よりも AsA 量が減少すると考えられる。

伊藤ら¹⁾によると、強光条件では通常光条件に比べて多くの活性酸素が発生する。故に、活性酸素除去のために通常光条件よりも AsA 生成量が大きくなり、結果的に強光条件下に置いたトウモロコシのほうが通常光条件下に置いたトウモロコシよりも AsA 含有量が多くなると考えられる。

以上のことから、本研究では、光は光合成生物の AsA 生合成のスイッチとして働くために AsA 含有量を増やすことが明らかになった。AsA の生合成経路はまだ不明な点が多いが、これらの生合成に関わる遺伝子発現には光がスイッチになっている可能性が考えられる。

5. 文献

1. 伊藤祐希、藤原諒「異なる光条件下におけるシアノバクテリアに含まれるアスコルビン酸量に関する研究」(2019)
2. Buchanan, B.B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants (Vol. 40). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.
3. 森村洋子「植物はなぜビタミン C を多量に合成するのか」(2017)
4. 小山昌子、松浦能行「光合成生物におけるアスコルビン酸生合成研究の新展開」(2011)
5. TABATA K. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. Plant J. (2001) vol.27, p.139-148.

表 1. 各光条件におけるヨウ素溶液滴下量と AsA 量の関係

光条件	ヨウ素換算 滴下量	AsA量 /mL	相対値
暗黒	0.178 mL	0.066 mg	78%
通常光	0.228 mL	0.084 mg	100%
強光	0.290 mL	0.107 mg	127%

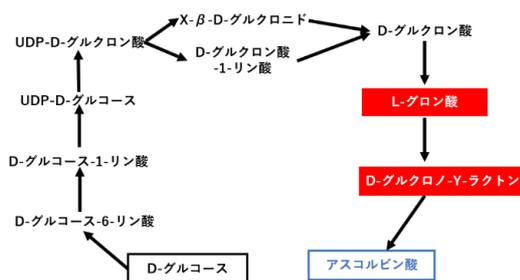


図 5. 植物の AsA 合成経路の概略⁴⁾