

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

愛媛県立松山南高等学校 ビタミンC班 3年 伊藤 祐希 藤原 諒
指導教諭 目見田 拓

1. 序論

1.1. 現状と課題

日光には私達が色を識別できるような可視光, 熱として感じる赤外光, そして, 目に見えない紫外線(UV)が含まれている。

日光は細胞内の DNA を損傷させて皮膚細胞をがん化させたり, 白内障の病気の引き金になったりすることもある。そのため, 近年では日焼け対策が推奨され, 過剰とも言える対策が取られている。

その一方で, 日光は生体内の化合物の合成に関わっているため, 過剰な日焼け対策が問題になっている。例えば, 微量栄養素であるビタミン D は日光に当たることによって体内で合成されることが知られている。更に, ビタミン D には小腸や肝臓でカルシウムとリン酸の吸収を促進する働きがあり, それによって血中のカルシウム濃度が一定に保たれ, 丈夫な骨が作られる。そのため, 過度な日焼け対策によってカルシウムを吸収できなくなり, O 脚や骨の発育不良を引き起こし, くる病といったビタミン D 欠乏症に罹る子どもが増えている。近年では 2009 年から 5 年間の間にビタミン D 欠乏症に罹る子供の数が 3 倍に増加しているという問題がある¹⁾。また, 大人では高齢女性を中心に寝たきりの原因の第 2 位である骨粗鬆症患者数が増加しており, 高齢化とともにこれからも増加することが示唆されている²⁾。

このように, 日光はヒトにとって有益である一方で, 有害でもある。私達は, 常に日

光にさらされ, 日光によって光合成反応を引き起こす植物にとっても, ヒトと同様に過度な日光の摂取は有害ではないのかという疑問が浮かんだ。

そこで, 私達は, 光条件とビタミン C であるアスコルビン酸 (AsA) の量, および, 活性酸素の量の相関関係を調べ, この疑問を解決しようと試みた。

1.2. 本研究の目的

多くの好気性生物は, 糖を使って代謝し, 最終的にミトコンドリアにおいて酸素を使って生命を維持するために必要なエネルギーを合成している。一方, 植物やシアノバクテリアなどの光合成生物は, 図 1 に示したように, 葉緑体において, 水と光を使って電子伝達反応によってエネルギーを合成している。

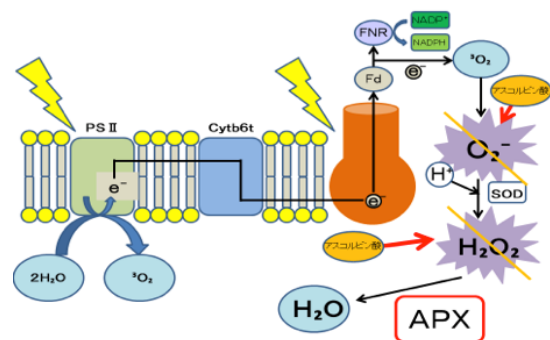


図 1. 植物の葉緑体内における光エネルギー変換反応 (光合成電子伝達系) と CO₂ の固定反応

そして, このエネルギーを使っ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, 光合成電子伝達で生

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物質へと変化する。発生した活性酸素は動植物の細胞に損傷を与えるため、その有害性が指摘されている。それを防ぐため、各組織において抗酸化酵素と呼ばれる酵素が存在する。その一つにアスコルビン酸ペルオキシターゼ (APX) と呼ばれる酵素があり、植物は電子伝達系においてこの APX を用い、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)。

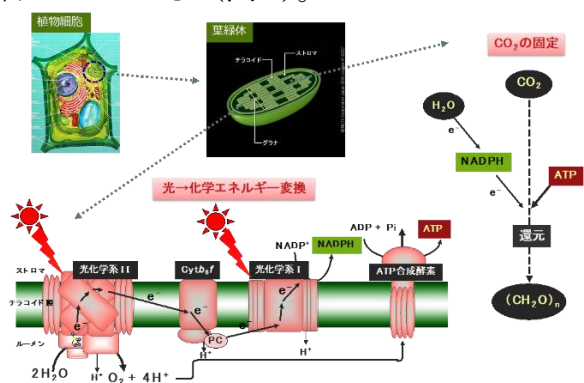


図 2. 電子伝達系におけるアスコルビン酸 (AsA) のはたらき

これらの事から、光条件と植物体内に含まれる AsA 量との間には密接な関係があるといえる。

そこで私達は、植物におけるストレス防御機構について調べることを最終目的として、異なる光条件で培養したシアノバクテリアの AsA 量を調べ、更に活性酸素の一つである一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の量を調べてこれらの相関関係を調べることにした。

2. 実験方法と材料

2.1. 実験材料

本研究では、別府温泉海地獄から単離された好熱性シアノバクテリアである *Thermosynechococcus elongatus* を材料に用いて実験を行った。同じ細胞濃度 (クロロフィル濃度を $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に合わせた) にそろえたシアノバクテリアを、真夏の昼間の照

りつける太陽光と同等の強光条件下 ($800 \mu\text{E}$) で一定時間培養した。

2.2. チラコイド膜画分の抽出

まず、細胞の濃度をそろえるために、分光光度計 (Hitachi U2001) を使い、葉緑素を含む光合成微生物で一般的に用いられている、波長 730 nm における吸光度 (O.D._{730}) を測定した。そして、細胞を体積が 50 mL の遠心管に分注し、 25°C , $3,500 \text{ g}$ で遠心分離 (AR-500-04 ローター, Tomy MX-300) して細胞を沈澱させた。上澄み液を捨て、沈澱した細胞を $500 \mu\text{L}$ の FL 緩衝液 (40 mmol/L MES , 15 mmol/L CaCl_2 , 15 mmol/L MgCl_2 , 20 mmol/L NaCl , $\text{pH}6.5$) に懸濁した。

次に、懸濁した細胞と等量のガラスビーズ ($\phi=100 \mu\text{m}$ Zirconia/Silica Beads, BioSpec Products, Inc.) を加えて 15 秒間ボルテックスミキサーによって攪拌した (図 3)。2 秒間静置し、これを 30 回繰り返すことにより、細胞を破碎した。未破碎の細胞を除去するために、沈澱したガラスビーズの上澄みを別の遠心管に回収した後に再度遠心分離して、その上澄みを別の容器に移してチラコイド膜画分とした。



図 3. ボルテックスミキサーによる細胞の破碎

2.3. クロロフィル濃度の定量

$50 \mu\text{L}$ のチラコイド膜画分と $150 \mu\text{L}$ の純水を混合し、そこに最終濃度が 80% になるように $800 \mu\text{L}$ のメタノールを加えて、ボル

テックスミキサーで 15 秒ほど攪拌して色素を抽出した後、4°C、10,500 g で遠心分離 (AR-015-24 ローター, Tomy MX-350) した。

遠心分離後の上清を波長 665 nm 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 mg Chl/mL) を見積もった。

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

2.4. ヨウ素溶液を用いた酸化還元滴定

まず細胞の波長 730 nm における吸光度を測定し、塩水溶液 (15 mmol/L CaCl₂, 15 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NaCl) に懸濁し、27°C、3,500 g で 5 分間遠心分離した。その後、ガラスビーズ法を用いて細胞を破碎し、再び 5 分間遠心分離 (27°C、3,500 g) した。

その際の破碎方法は塩溶液 (pH=6.8) で破碎後、メタリン酸溶液 (pH=1.7) に溶媒を変える方法が最も適切であったため、その方法で破碎を行った。遠心分離後、得られた上澄みのクロロフィル (Chl) 定量を行い、10 µg Chl/mL となるように試料の濃度を合わせた。

調製したサンプル 1 mL、でんぷん溶液 10 mL、10%メタリン酸溶液 1 mL に対し、2.4 mmol/L のヨウ素溶液を滴下し、酸化還元滴定によって各光条件下における AsA 濃度を測定した。なお、1 mL の 10 µg/mL チラコイド膜画分サンプルは、波長 730 nm における吸光度が 1.0 の細胞の場合、1 mL に相当する。

終点の判断については終点を迎えた際の極大吸収波長をあらかじめ測定し、その際に得られた 582.5 nm 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。

2.5. 細胞における一重項酸素 (¹O₂) 生成

速度の測定

それぞれの異なる条件で培養した 20 mL のシアノバクテリア細胞を 25°C、3,500 g (AR-500-04 ローター, Tomy MX-300) で 5 分間遠心分離した後、上澄を捨て、沈殿した細胞を少量の FL 緩衝液 (40 mmol/L MES, 15 mmol/L CaCl₂, 15 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NaCl, pH=6.5) に懸濁した。そこに FL 緩衝液を加えて 10 mL にメスアップし、よく攪拌した後に、25°C、3,500 g で 5 分間遠心分離した。上澄を捨て、沈殿した細胞に 10 mmol/L の L-ヒスチジンを新たに加えた少量の FL 緩衝液に懸濁し、最終濃度を 1 µg Chl/mL に合わせた。

これらの細胞が単位時間あたりに生成する一重項酸素の発生速度をクラーク型酸素電極 (Hansatech) を用いて測定した。

反応液組成は 25 µg Chl/mL の細胞試料を 200 µL、反応緩衝液を 750 µL、0.2 mol/L L-ヒスチジン 50 µL、10 mmol/L DCMU 1 µL で、これに 20,000 µE の強光を照射しながら、25°C で測定した。

DCMU とは光合成電子伝達系の最初の反応を行う光化学系 II (PS II) に作用して電子伝達の阻害を起こす薬剤のことである。

3. 各実験条件の検討

3.1 細胞の破碎条件の検討

宮下ら⁴⁾は、清涼飲料水に含まれる AsA の定量を行う際には、強い酸性のメタリン酸溶液を用いることが必要であると示唆している。

しかし、宮下らと異なり、私達の出発材料は生きた細胞であり、細胞内の AsA 量を測定するには、まず細胞を破碎する必要がある。

私達は、細胞をできるだけ生理条件に近づける必要があると考え、生化学で一般的に用いられる緩衝液である MES 緩衝液を

用いて pH を 6.5 に保った状態で細胞を破碎した。しかし、この方法で抽出した AsA をヨウ素溶液で滴定すると、滴定に十分な量の AsA が含まれていなかった。

そこで光合成辞典⁵⁾を調べてみたところ、AsA の解離定数は、 $pK_1=4.25$ 、 $pK_2=11.57$ であることが分かった。そのため、中性条件である $pH=6.5$ の溶媒中では AsA のヒドロキシ基からすでに H^+ が解離しており、滴定に十分な量の AsA が含まれていなかったと考えた (図 4)。

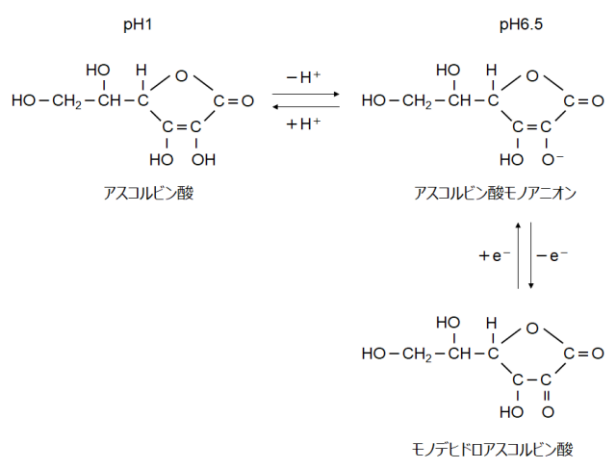


図 4. 水溶液中における AsA (アスコルビン酸) の解離

そこで、宮下らの実験のように、 $pH1.7$ のメタリン酸溶液中で細胞破碎を試みた。しかし、この方法では、細胞を破碎することが出来ず、AsA を抽出することが出来なかった。その理由として、溶液中に電解質イオンが少ないため、浸透圧が小さく、細胞が破碎できないのではないのかと考えた。

そして、メタリン酸水溶液に塩を混ぜ、電解質イオンを増やした溶液を用いて、細胞破碎を行った。しかし細胞を破碎することはできなかった。

これらの結果を踏まえて、私たちは pH の低いメタリン酸水溶液に細胞を浸すことにより、細胞壁になんらかの影響を与えたのではないのかと考えた。そこで破碎できなかった細胞を光学顕微鏡で観察してみたところ、

図 5 に示すように、中性条件の MES 緩衝液中の細胞に比べて、 $pH1.7$ の酸性条件のメタリン酸溶液中では細胞が小さく縮んでいた。

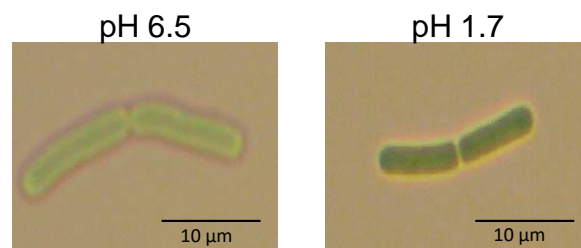


図 5. $pH6.5$ の MES バッファー中、および、 $pH1.7$ のメタリン酸水溶液中におけるシアノバクテリア *T. elongatus* 細胞の光学顕微鏡写真

細胞破碎がうまくできなかった理由は、細胞壁が強い酸により変性し、細胞壁が固くなったため、細胞破碎がうまくできなかったためだと結論付けた。

以上のように、先行研究と同じ方法では細胞から AsA を抽出できない問題点が見つかった。そのため、適切な細胞の破碎方法を探す必要があった。

そこで私達は、細胞破碎に使用する溶媒と pH 条件の異なる 4 つの破碎溶液の条件で、細胞の破碎状況と収率を比較した。その 4 つの条件は、表 1 に示したように、① $pH6.5$ の MES 緩衝液中でガラスビーズによる破碎、② $pH1.7$ のメタリン酸溶液中でガラスビーズによる破碎、③ $pH1.7$ の塩を含んだメタリン酸溶液中でガラスビーズによる破碎、④ $pH6.8$ の塩水溶液 (15 mmol/L $CaCl_2$, 15 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L $NaCl$) でガラスビーズを用いて破碎した後、溶液に $pH1.7$ のメタリン酸溶液を加えたものである。その結果、MES 緩衝液中で破碎した条件①では、破碎前の細胞のクロロフィル量の約 10% のクロロフィル量のチラコイド膜しか得られなかった。そして、先行研究に従って、強い酸性を示すメタリン酸水溶液中で破碎した条件②では、

表 1. 細胞破碎に使用する溶媒と pH 条件の異なる 4 つの破碎溶液の条件

条件	pH	破碎溶媒	破碎結果	細胞からの チラコイド膜回収率	回収率 (相対値)
①	6.5	MES 緩衝液	○	約 10%	20%
②	1.7	メタリン酸	×	3~4%	6%
③	1.7	メタリン酸 + 塩溶液	×	3~4%	6%
④	6.8→1.7	塩溶液 → メタリン酸	○	50~60%	100%

たった 3~4%しか回収できなかつた。

そこで、メタリン酸溶液に塩を加えれば浸透圧が代わり、細胞を破碎しやすくなるのではないかと考えて、塩 (15 mmol/L CaCl₂, 15 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NaCl) を含むメタリン酸溶液中で破碎してみたが (条件③), 3~4%しか回収できず、塩の効果は認められなかつた。

これらの結果から、私達は細胞破碎の時の pH が低いと細胞が破碎されないのではないかと考え、まず、塩溶液で破碎してから、メタリン酸溶液を加えて pH を下げれば良いのではないかと思いついた (破碎条件④)。この方法で試みた結果、破碎前の細胞のクロロフィル量の 50~60%のクロロフィル量のチラコイド膜を得ることができた (図 6)。

そこで、本研究では、④の破碎条件で細胞を破碎し、AsA の定量を行った。

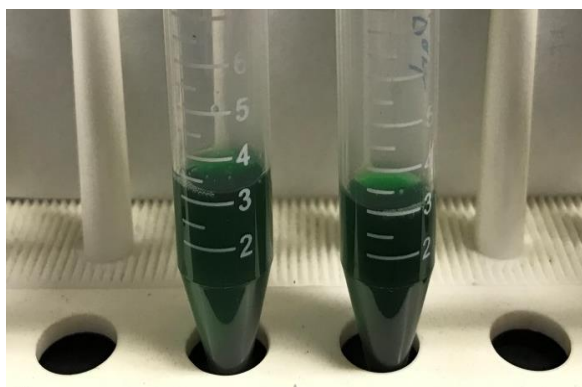


図 6. 得られた細胞液

3.2 ヨウ素滴定時の終点の吸光度の測定

ヨウ素滴定では、AsA は還元剤としてはたらし、ヨウ素を還元してヨウ化物イオンにする。このとき、指示薬としてデンプン溶液を加えることで、AsA がすべて反応すると、ヨウ素デンプン反応により、青色が残るようになり終点分かる。

AsA 水溶液の色は無色透明であるため、測定試料が透明であればヨウ素デンプン反応による終点の判断は容易である。しかし、私たちは葉緑体色素を持つシアノバクテリアのチラコイド膜を試料として用いたため、緑色であった (図 7)。



図 7. ヨウ素滴定前のクロロフィルによる緑色

そのため、滴定による色の変化が非常に分かりづらく、目視による終点を明確に定めることができなかった。試しにヨウ素溶液を滴下し続けて過剰に加えると、ようやく色の変化が分かった (図 8)。

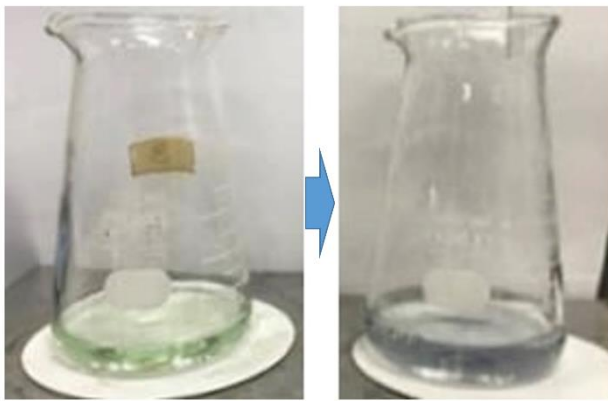


図 8. チラコイド膜画分溶液の色
左：ヨウ素溶液滴下前の試料
右：ヨウ素溶液を過剰に加えた試料

これでは正確に終点を決めることは難しく、実験結果に誤差が生じてしまうと考えた。そこで私たちは、終点を明確に知る方法について検討した。私たちはヨウ素溶液滴下前の試料は緑色であるが、過剰量のヨウ素溶液を滴下すると青色に変化することに着目した。ヨウ素溶液滴下前の緑色と過剰量のヨウ素溶液滴下後の青色の極大吸収波長の吸光度変化によって、正確な終点が判断できるのではないかと考えた。

次に、ヨウ素溶液滴下前のチラコイド膜画分試料（緑色）と、過剰量のヨウ素溶液を滴下して青色になった溶液の吸収スペクトルを、開始波長 800 nm から終了波長 400 nm の範囲で測定した。図 9 はその結果である。

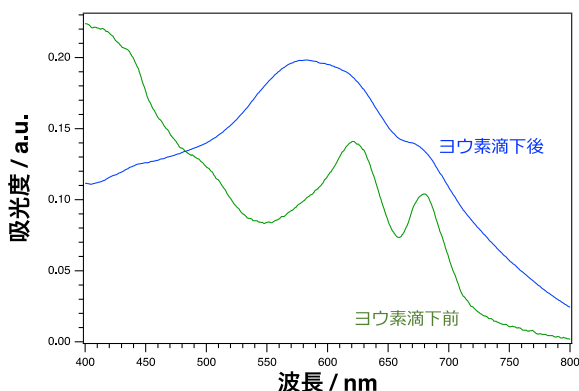


図 9. ヨウ素溶液滴下前およびヨウ素溶液を過剰に滴下した後のチラコイド画分の吸収スペクトル

緑：ヨウ素溶液滴下前，青：ヨウ素溶液を過剰に滴下した後のチラコイド膜画分

の緑色のスペクトル) では、630 nm と 680 nm に極大吸収波長が認められた。光合成辞典⁶⁾によると 680 nm はクロロフィルの吸収で、630 nm はフィコシアニン色素の吸収である。

一方、ヨウ素溶液を過剰に滴下して青色に変化した溶液 (図 9 の青色のスペクトル) では 680 nm と 582.5 nm に極大吸収波長が認められた。680 nm の吸収はチラコイド膜画分 (図 9 の緑色のスペクトル) にも認められた。

このことから、滴定前の試料にはクロロフィル色素 (680 nm)に加えて、滴定後に発色する青色の吸収波長 (582.5 nm) に近いフィコシアニンの青色の吸収波長 (630 nm) が重なって、目視による色の判断が困難になっていたと考えられた。

私たちは緑色のスペクトルに見られる 630 nm からわずかにずれていた 582.5 nm の極大吸収波長に着目した。私たちは、この波長がヨウ素溶液滴下後の青色の波長であると定め、582.5 nm における吸光度変化を調べることで終点の判断を可能にした。

これにより、当初の問題点であった実験毎の終点の判断による結果のばらつきを最小限に抑えることが期待できた。

4. 実験結果

4.1. ヨウ素を用いた酸化還元滴定

暗黒条件下 (0 μ E), 通常光条件下 (50 μ E), 通常光条件下で 24 時間培養後、強光条件下 (800 μ E) で 0.5 時間, 2 時間, および, 16 時間培養した (図 10)。

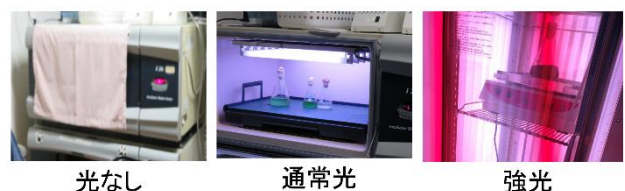


図 10. 異なる光条件下での培養の様子

次に、シアノバクテリア細胞 1 mL 中に含まれる AsA 量を調べるため、ヨウ素溶液を 0.5 mL 滴下するごとに試料溶液の 582.5 nm の吸光度の値を測定し、プロットした (図 11)。

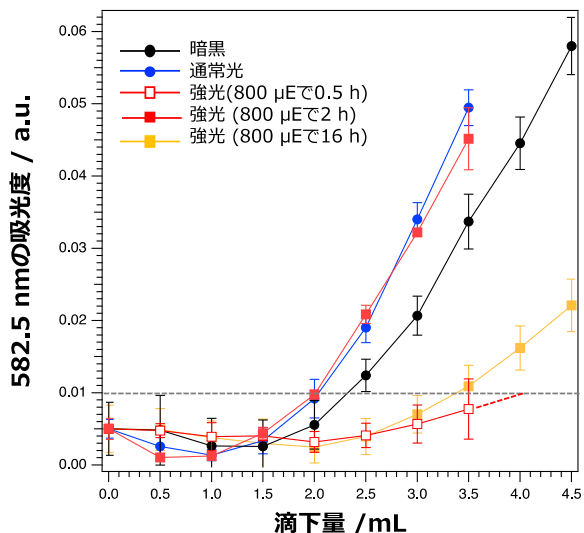


図 11. 582.5 nm における吸光度変化とヨウ素の滴下量の関係
 黒：暗黒条件で培養した細胞，青：通常光で培養した細胞，白抜き赤：強光で 0.5 時間培養した細胞，赤：強光で 2 時間培養した細胞，オレンジ：強光で 16 時間培養した細胞。強光は 800 μ E，通常光は 50 μ E の光強度である。吸光度が 0.01 の時 (グレー点線) のときのヨウ素滴下量から，AsA 量を計算した。なお，強光 0.5 時間の滴定結果は吸光度 0.01 に満たなかったため，赤点線のように予測して算出した。

私たちは、吸光度の値が 0.01 を超えたところを終点と定め、このときに滴下したヨウ素の量を図 11 から得た。

終点までに滴下したヨウ素溶液の量は、暗黒条件下で培養した細胞では 2.3 mL，通常光条件下で培養した細胞では 2.0 mL であった。強い光ストレスを与えるために、通常光条件下で 24 時間培養した後、強光条件下 (800 μ E) で 0.5 時間，2 時間，16 時間培養したところ，これらの細胞におけるヨウ素の滴下量は，それぞれ，4.0 mL，2.0 mL，3.5 mL であった (表 2)。

表 2. 各光条件下におけるヨウ素溶液の滴下量と AsA 量

培養条件	ヨウ素滴下量	AsA 量 /mL	相対値
暗黒	2.3 mL	1.1 mg	115%
通常光	2.0 mL	0.99 mg	100%
強光 0.5 h	4.0 mL	2.0 mg	200%
強光 2 h	2.0 mL	0.99 mg	100%
強光 16 h	3.5 mL	1.7 mg	175%

滴下したヨウ素溶液の量から，それぞれの光条件下におけるシアノバクテリア内に含まれる AsA 量を算出するために，検量線を作成した (図 12)。検量線を引くにあたり標準アスコルビン酸溶液 (50 mg/10 mL, 10 mg/10 mL, 5 mg/10 mL, 1 mg/10 mL) をそれぞれ作製し，ヨウ素溶液 (2.4 mmol/L) でそれぞれ滴定した。その結果を図 12 に示した。近似曲線を求めると直線の式①が

$$y = 0.2021x \quad \text{①}$$

で与えられたので，y に図 11 から得たヨウ素の滴下量を代入して AsA 量 (mg) を求めた。こうして，式①から算出した AsA 量を表 2 にまとめた。表 2 には，通常光条件下における AsA 量を 100 としたときの相対的な AsA 量の比較も示した。

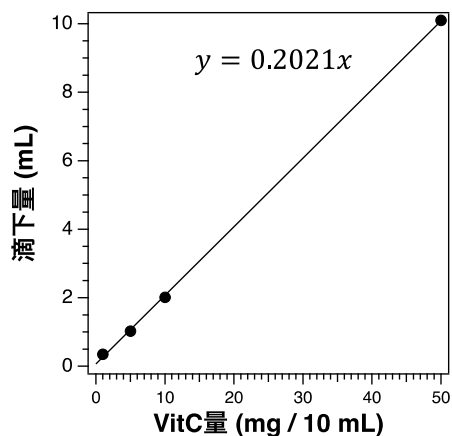


図 12. アスコルビン酸 (ビタミン C) の検量線

暗黒条件下で培養した細胞では、1 mL の細胞中に 1.1 mg の AsA が、通常光で培養した細胞では、1 mL の細胞中に 0.99 mg の AsA が含まれており、生育に必要な光強度の条件の方が AsA の含有量が少ないことが分かった。

そこで、強光を照射した時の AsA 量を調べるために、通常光で 24 時間培養しておいた細胞に強光を照射して経時的に細胞を採取し、同様の実験を行った。

その結果、強光 0.5 時間照射後の細胞では、通常光で培養した細胞中の AsA の 2.0 倍存在していた。強光照射 2 時間後の細胞では、通常光条件下の細胞と同じ量の AsA であったが、強光照射後 16 時間後には通常光条件細胞の 1.75 倍に増加することが分かった。

4-2. チラコイド膜画分の一重項酸素

($^1\text{O}_2$) 生成速度の測定

序論でも述べたように AsA 量と活性酸素の間には密接な関係がある。そこで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活性酸素の 1 つである一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 量を測定することで細胞内の AsA 量と活性酸素の相関関係を調べた。

暗黒条件下 (0 μE)、通常光条件下 (50 μE)、強光条件下 (通常光条件下で 24 時間培養後 800 μE , 0.5 h と 2 h) で培養したシアノバクテリアが単位時間あたりに生じる活性酸素量を調べるために、L-ヒスチジンをトラップ剤として加え、クラーク型酸素電極 (Hansatech) を用いて測定した。

その結果、表 3 に示したように、単位時間あたりの $^1\text{O}_2$ 発生量は暗黒条件下が 84.4 μmol 、通常光条件下が 48.2 μmol 、強光条件下 (0.5 h) が 60.3 μmol 、強光条件下 (2 h) が 66.3 μmol であった (表 3)。

表 3 各光条件下における一重項酸素と活性

培養条件	活性酸素($^1\text{O}_2$)量 [$\mu\text{mol (mgChl)}^{-1}\text{h}^{-1}$]	相対値
暗黒	84.4	175%
通常光	48.2	100%
強光 0.5 h	60.3	125%
強光 2 h	66.3	138%

この結果から、通常光条件での培養、つまり、シアノバクテリアが標準の状態の細胞では、強光照射下では 48.2 $\mu\text{mol } ^1\text{O}_2 \text{ (mg Chl)}^{-1}\text{h}^{-1}$ の一重項酸素を出すことがわかる。これに比べて、培養の際に強光を 0.5 h 照射したものと、2 h 照射した細胞は、通常光条件下より多い、それぞれ 60.3 $\mu\text{mol } ^1\text{O}_2 \text{ (mg Chl)}^{-1}\text{h}^{-1}$ と 66.3 $\mu\text{mol } ^1\text{O}_2 \text{ (mg Chl)}^{-1}\text{h}^{-1}$ の一重項酸素を発生した。より長時間強光照射した細胞の方が多く一重項酸素を発生させたことから、培養中の強光処理により、すでに活性酸素を出しやすい状態になっていたと考えられる。

5. 考察

本研究では、光環境条件の異なる条件で培養した光合成生物であるシアノバクテリアにおける AsA 量、および、これらの細胞の活性酸素の分子種である一重項酸素の発生量を調べることにより、光条件と AsA 生成量の関係を調べた。

図 11 および表 2 に示したように、暗黒条件下で育てた細胞よりも、通常光で育てた細胞の方が、細胞に蓄積している AsA 量は少なかった。

同じ条件で培養した細胞に更に強い強光 (20,000 μE) を照射して、単位時間に発生する一重項酸素の発生量を調べたところ、表 3 に示したように、通常の光条件で培養した細胞よりも暗黒条件下で培養した細胞の方が、1.75 倍多く一重項酸素を発生した。

このことは、光にさらされていない細胞

に急激に光ストレスを与えると、多くの活性酸素を生成するが、ある程度の光条件下にさらされている細胞では、活性酸素からの防御機構として AsA の生合成によって対応しているために、見かけ上の活性酸素の生成量を抑えていることを示している。

暗黒条件下と通常光条件下の細胞における AsA 量と活性酸素量の結果から、光合成生物は、光があたっていない夜間等では、光ストレスによる活性酸素の発生が無いために AsA を蓄積しているが、生育に必要な光の照射下では、光によって活性酸素が発生するために AsA の合成量が増えたと考えられる。

細胞に真夏の昼間と同等程度の強光 (800 μ E) を照射下で 0.5 時間培養すると、AsA 量は通常光で培養した時の 2.0 倍多くなった (図 11 および表 2)。しかし、2 時間強光照射下で培養すると、AsA 量は通常光で培養したときと同じ量まで低下した。

一方、これらの光条件で培養した細胞の一重項酸素の発生量は、どちらも通常光で培養した細胞の約 1.3 倍であった。これらのことは、光合成生物が強光の環境にさらされると、活性酸素を発生して生命活動に必要なタンパク質や酵素を壊してしまうため、これらのダメージから守るために、強光がスイッチになって AsA の生合成を活発にさせ、30 分以内に細胞内の AsA 量を一時的に増やしたことを示している。

そして強光照射を 2 時間行くと、AsA 量は通常光照射時のレベルに落ち着いた。しかし、その後も強光照射し続けると、16 時間後には強光を 0.5 時間照射した時のレベルまで AsA 量は増えたことから、強光照射は AsA の生合成のスイッチとなり、短時間で生合成を活発にするが、2 時間程度で一旦落ち着き、その後、光照射を続けると、再び AsA の生合成を活発にすることが明らか

になった。

以上のことから、本研究では、1) 光合成生物にとって光は生育に必要不可欠であるものの、活性酸素を生成してしまう有害なものであるが、2) 光は AsA の生合成のスイッチとして働くために、細胞内の AsA 量を増やし、3) AsA は活性酸素を消去するために働くことを明らかにした。

AsA の生合成経路については、まだ不明な点があるが、これらの生合成に関わる酵素 (タンパク質) の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。

6. 研究のまとめと今後の展望

本研究を通して、以下のことが分かった。

- (1) 細胞内における AsA を含んだチラコイド膜の回収率を高める細胞の破碎方法として、細胞を塩溶液 (15 mmol/L CaCl₂, 15 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NaCl) で pH=6.8 に調製して破碎した後、メタリン酸を加えて pH を下げ、pH=1.7 にすると、破碎前の細胞のクロロフィル量の 50~60% のクロロフィル量を得ることができ、有効な方法である。
- (2) 細胞に含まれる AsA をヨウ素滴定で定量する際、582.5 nm における吸光度を調べることで終点の判断を正確に行うことができ、精度の高い定量実験ができる。
- (3) 光合成生物は、光があたっていない夜間等では、光ストレスによる活性酸素の発生が無いために AsA を蓄積しているが、生育に必要な光の照射下では、光によって活性酸素が発生するために AsA の合成量が増える。
- (4) 強光照射は AsA の生合成のスイッチとなり、短時間で生合成を活発にするが、2 時間程度で一旦落ち着き、その後、光照射を続けると、再び AsA の生合成を活発にする。

今後は、異なる光条件下での AsA 合成に関する実験結果をもとに、既存の野菜や果実の AsA 含有量をより多くして付加価値を与えたり、意図的に AsA 量を増加させたり、減少を防止したりするような輸送・保存方法につながる研究を行いたい。

7. 参考文献

1. 朝日新聞 2018
ビタミンD欠乏症が増加中 子どもの日焼け対策に注意を 2019年7月15日
<https://www.asahi.com/articles/SDI201808037716.html/>
2. 統合医療予防協会 2015
薬による骨折予防<<<運動による転倒予防 2019年7月15日
<http://infomedical.jp/?p=306>
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」 園芸文化 (2017) 4, 48-58
4. 宮下千穂, 沖田真咲, 細江奈央 「ビタミンCと光の関係」 大阪教育大学附属高等学校天王寺校舎 (2012)
5. 光合成事典 日本光合成研究会編, (2003) pp. 5
6. 光合成事典 日本光合成研究会編, (2003) pp. 90-91, pp. 394

8. 謝辞

本研究に御指導・御助言をいただきました愛媛大学プロテオサイエンスセンターの杉浦美羽先生, 愛媛大学大学院理工学研究科の中村誠さん, 高智五輝さんに厚く御礼を申し上げ、感謝の意を表します。