

擬似的微小重力環境下におけるリョクトウ
の機能性評価とテラヘルツ分光法による
デンプン量の推定

中島 周作

2019

1章	緒言	1
	参考文献	
2章	クリノスタットで栽培したリュクトウ中の色素量計測	11
2-1	実験目的	
2-2	実験装置および方法	
2-2-1	実験試料	
2-2-2	クリノスタットの原理と装置	
2-2-3	培地の作成方法	
2-2-4	栽培方法	
2-2-5	生長の測定方法	
2-2-6	色素の抽出および測定方法	
2-2-7	測定条件とサンプル数	
2-3	結果および考察	
2-3-1	生長の評価	
2-3-2	色素量の測定	
2-3-3	阻害剤を用いた内因性エチレンの評価	
	参考文献	
3章	クリノスタットで栽培したリュクトウの抗酸化作用の評価	36
3-1	実験目的	
3-2	実験装置および方法	
3-2-1	栽培方法	
3-2-2	長さの解析	
3-2-3	抗酸化物質の定量方法	
3-2-4	抗酸化作用の評価	
3-2-5	α -アミラーゼ活性の測定	
3-2-6	デンプンの定量方法	
3-2-7	測定条件とサンプル数	
3-3	結果および考察	
3-3-1	生長の評価	
3-3-2	抗酸化物質および抗酸化作用の評価	
3-3-3	アミラーゼ活性およびデンプン含有量	
	参考文献	

4章	炭化水素のテラヘルツスペクトル	58
4-1	実験目的	
4-2	実験装置および方法	
4-2-1	サンプル調整	
4-2-2	ペレットの作成方法	
4-2-3	テラヘルツ分光法	
4-2-4	X線回折	
4-3	結果および考察	
4-3-1	デンプンと糖のテラヘルツスペクトル	
4-3-2	異なる植物種由来のデンプンのテラヘルツスペクトルとX線回折パターン	
	参考文献	
5章	テラヘルツ分光法を用いた発芽リョクトウ中のデンプン量の推定	74
5-1	実験目的	
5-2	実験装置および方法	
5-2-1	栽培方法	
5-2-2	テラヘルツ分光法	
5-2-3	アミラーゼを用いたデンプンの加水分解	
5-2-4	デンプン推定の検量線	
5-2-5	測定条件とサンプル数	
5-3	結果および考察	
5-3-1	生長の評価	
5-3-2	発芽リョクトウのテラヘルツスペクトル	
5-3-3	アミラーゼを用いた加水分解後のテラヘルツスペクトル	
5-3-4	デンプン定量のための検量線	
	参考文献	
6章	結言	84
	謝辞	87
付録	テラヘルツ分光法を用いたリョクトウ種子中のデンプン量の推定	88
	A6 細胞の培養	
	参考文献	

1章 緒言

世界的人口増加に伴う食料需要の拡大や食文化の多様化により輸入農産物が市場を占める割合が急速に増加しており (Figure 1.1.), 農産物の価格競争が激化している. 日本国内では輸入農産物との差別化を図るため, 機能性成分を多く含む機能性農産物の栽培・生産が注目されている. 機能性成分とはアントシアニン, カロテノイド, リコピン, イソフラボン, アスコルビン酸などの生体物質でガン, 骨粗しょう症, 心疾患, 炎症, ドライアイなどの予防と回復効果があることで知られる[1-7]. 天然成分であるため薬のような副作用もなく, その効能から農学分野だけでなく医学, 薬学分野での応用も検討されている. そこで植物工場に代表される環境制御下での人工的な食料生産において, 季節や環境に左右されず効率的・安定的な機能性農産物の生産に期待が寄せられている. そのため現在, 温度, 光, 養分などの栽培環境を最適化するだけでなく, 紫外線照射や低温など適度なストレスを与えることで機能性成分を増加させる栽培方法の検討や分析技術を駆使して機能性農産物を選抜するための技術開発も盛んに行われている[8-11]. 本研究では機能性農産物の生産に向けて新たな栽培方法と品質評価技術として有効と期待できる擬似的な微小重力環境とテラヘルツ分光法の有用性を明らかにしていく.

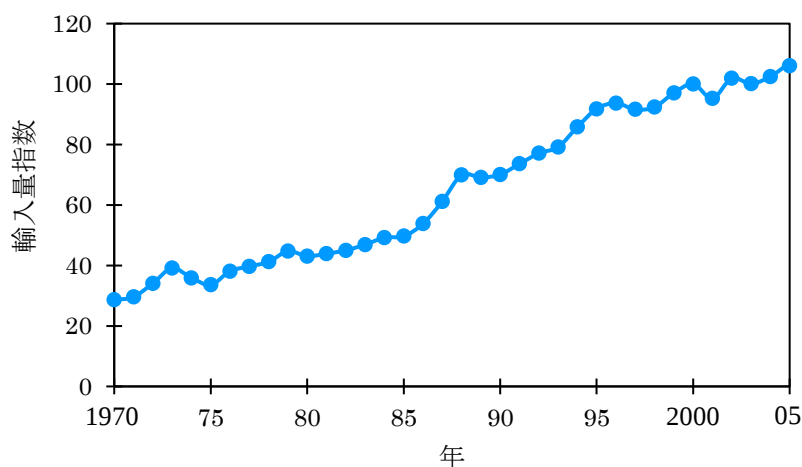


Figure 1.1. 日本の農産物輸入量の推移[12]. 2000 年の輸入量を 100 とする.

およそ数億年前に植物が地上に繁栄して以降, 気温, 湿度, 日射量などは劇的な変化を繰り返してきたが, 重力は不変の環境要因であったため植物は地上の重力に適応するように進化を遂げてきた[13]. 例えば, 発芽した植物では根は重力方向に, 茎は重力と反対方向に伸長していく. このように植物は重力を生長のためのシグナルとして利用しているため, 微小重力環境のように重力が変化した環境はストレスとなり生長や生体物質に大きな影響を与える. 過去の宇宙実験により微小重力環境下における形態[14-20], 遺伝子発現[21-23], 細胞分裂[24, 25], 生殖能力[26-30], 光合成量[31, 32], 植物ホルモンの挙動[33, 34], 生体物質[35-38]などの変化について

多くの知見が得られている．さらに宇宙では機能性成分が増加することも示されている．リュクトウの葉に含まれるクロロフィル量が増加した例[39]やアブラナに含まれるグルコシノレート量が約 75%増加した例が挙げられる[40]．また宇宙で栽培した大豆に含まれるポリフェノール[41]やイソフラボン[42]が増加することも報告されている．これらの結果は、微小重力環境の宇宙で農産物を栽培すれば高機能化する可能性を示唆するものである．しかし、設備投資や輸送費に莫大なコストが必要となるため、宇宙農業の早期実用化は現実的ではない．そこで地上で微小重力環境を再現し、農産物を栽培すれば機能性農産物の効率的な生産に繋がる可能性が期待できる．

地上で微小重力環境を作り出す方法として長らくクリノスタット（以下 CL と記す）が活用されてきた[43, 44]．CL は植物を 0.2 から 10 rpm の低速で回転させることで擬似的に微小重力環境を作り出す装置である（Figure 1.2.）．宇宙での真の微小重力（通称：無重力）と CL が作り出す擬似的な微小重力の影響は厳密には異なるが[45-48]，地上で微小重力環境を再現して機能性成分が増加するかを検討する本研究において CL は有用な装置と言える．CL は長らく宇宙実験のシミュレーションの装置として利用されてきたが、機能性農産物の生産に有効であるかを検証した例は報告されていない．そこで一つのアプローチとして CL を使った新たな栽培環境下で機能性農産物の生産可能性を検討していく．CL の原理や構造については 2 章で詳しく説明する．

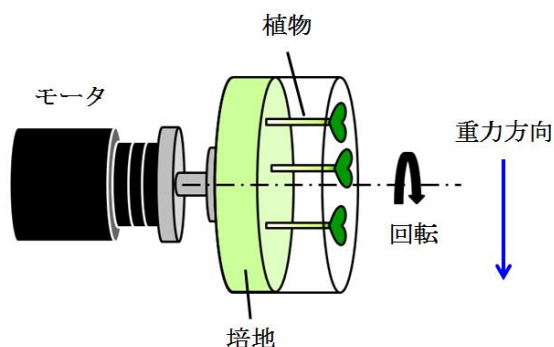


Figure 1.2. クリノスタットの模式図．

また、限られたスペース内で人工照明を使つての食料生産を想定した場合、低品質な個体を極力減らし高品質な個体を栽培していくことで生産コストを抑え効率的・安定的な機能性農産物生産に繋がっていく．仮に種子や発芽初期の段階で機能性成分を多く合成する個体を予測できれば高機能化するポテンシャルがある良質な個体を選抜し栽培することが可能となる．本研究では、その指標として種子の主成分であるデンプンに着目した．光合成により生産されるグルコースが結合してできるデンプンは生長のためのエネルギー源となる重要な生体物質である．生体内に貯蓄されたデンプンは必要に応じて糖に分解され、様々な機能性成分を合成するための前駆体としての役割を果たす[49, 50]．そのため光合成量が多いほど生長が速く機能性成分を多く合成する傾向にあることが分かっており[51]，光合成量は農産物の品質を予想するための一つの指標とされている[52]．しかし光合成によって生産される代謝産物はあくまでグルコースであり複雑な酵素反応を経てはじめてデンプンが合成される[53]．そのためグルコースからデンプンが作られる合成経路に何らかの抑制因子が働くと、光合成量がデンプン合成量に直結しない場合もある．さらに農学分野で対象となる植物や農産物には個体差があることも考慮すると光合

成量は間接的な指標に過ぎず、やはりエネルギー源となるデンプンを直接計測する必要がある。加えて種子や発芽初期は光合成を行うための器官が十分に形成されておらず、子葉に貯蔵されているデンプンをエネルギー源としている。そのため光合成量が指標となるのはある程度生長した植物体であり、初期生育段階の農産物に対しては機能性農産物を選抜するため指標にはならない。よって種子や発芽植物のデンプン量を高精度で計測していくことで、良質な個体の選抜・栽培が可能になり機能性農産物の生産に繋がると期待できる。

植物中のデンプンを精度よく定量する方法として酵素法が利用されている[54]。酵素法では主に(1)内因性の糖の除去、(2)酵素を用いたデンプンの分解、(3)生成された糖の定量の3段階の工程が必要となる(Figure 1.3.)。まず、エタノールやメタノールを用いてサンプルに含まれる内因性の糖を除去した後に、オーブンで乾燥させる。その後、アミラーゼやグルコシダーゼなどの酵素でデンプンを加水分解する。最後に、生成された単糖もしくは二糖を既存の分析方法で定量する。精度が高い酵素法は長らく植物中のデンプン定量法として利用されてきたが、破壊試験であり煩雑な工程が必要とされる。そのためデンプン量を非破壊で知ることができれば高機能化が見込まれる個体を選抜できると考えられているが、そもそも非破壊デンプン計測技術が無いことにより上記のように間接的な光合成量が指標として使われているのが現状である。

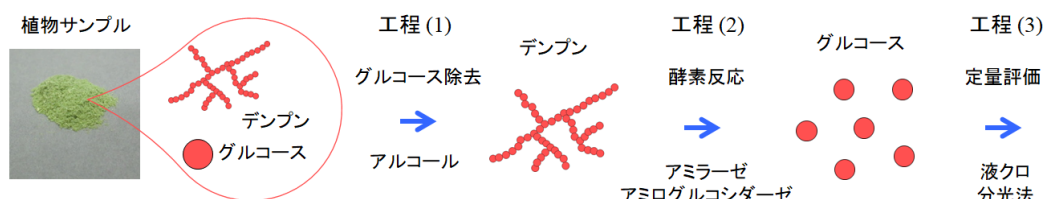


Figure 1.3. デンプン定量の従来法[54].

農産物の非破壊計測法として分光技術が活用されており様々な用途が見出されている。例えば、赤外分光法およびラマン分光法では伸縮や変角振動など官能基の振動モード(分子内振動モード)がピークとして観察され[55]、植物・農産物を対象とした物質の同定[56-61]、病理状態の評価[62, 63]、熟度判定[64]などに利用されている。これらの手法でデンプンの標準品を測定すると、螺旋構造の形成・消失、水分量、ゲル化や劣化に伴う微細な構造変化が観察できる[65-68]。デンプンの構造については後の4章で詳しく説明する。しかし、赤外・ラマン分光法は植物・農産物中のデンプン計測には適しておらず、トウモロコシ内のデンプンを近赤外分光法で定量した研究が報告されているが結果の精度は高くなかった[69]。この要因として2つのことが挙げられる。まず構造がよく似た糖類とデンプンのスペクトルが極めて似ていることが大きな制限となっている。赤外分光やラマン分光では分子内振動が観察されるため、グルコース分子を基本骨格とするグルコース、マルトース、オリゴ糖などのピークはデンプンと同じ位置に現れてくる[70, 71]。よって、これらの糖類も含む植物サンプルではデンプンと糖類の吸収ピークが同じ位置に立つため分光データからデンプンの情報を切り出すことが困難となる。また2つ目の要因

は 20 万種類以上とも言われる生体物質の多様性であり[72]，これらの物質の分子内振動モードが吸収ピークとして現れてくる．そのため赤外やラマン分光法で植物を測定すると，いくつかの吸収ピークが重なった複雑なスペクトルとなり，やはりデンプンに関する分光情報だけを得ることが難しくなる．先行研究でも赤外やラマン分光法で得られる植物のスペクトルが複雑になり，吸収ピークの同定が困難になることが指摘されている[73]．

テラヘルツ（以下 THz と記す）波は，赤外線とミリ波の中間に位置する 100 GHz から 30 THz の周波数帯にあたる電磁波である．従来，通信技術や天体観測などに利用されてきたが，光源や検出器が近年急速に発展し，材料科学，医学，生物学，農学などの分野で新たな応用方法が検討されている[74]．分子内振動モードが観察される赤外やラマン分光法と比較して，波長の長い THz 波では分子間振動モードが観察でき物質の構造がスペクトルに反映される[75, 76]．例えば，同一物質でも結晶性分子と不定形分子（アモルファス）とを THz 帯で測定した場合，スペクトルに大きな違いが見られる．結晶性分子では分子間の水素結合や共有結合などの分子間振動モードがシャープなピークとして現れるのに対して，アモルファスでは結晶構造が崩れているためブロードなスペクトルが観察される[77-81]（Figure 1.4.）．

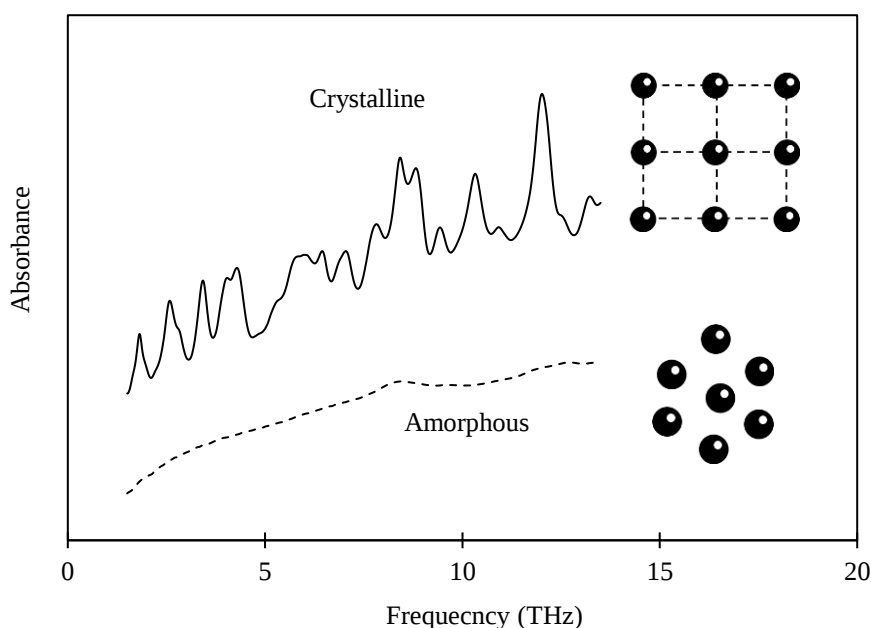


Figure 1.4. 結晶性分子とアモルファス分子の THz スペクトルの一例（サンプル：スクロース，濃度 5%）．

植物内で糖やアミノ酸など水溶性の分子は生体水に溶解している．一度，水に溶けると水溶液中で分子間結合が切れ単分子となるため結晶構造に由来する吸収ピークは無くなるということが分かっている．そのため赤外やラマン分光とは異なり，多くの生体物質を含む植物サンプルであっても THz 帯では吸収ピークが少ないブロードなスペクトルになる．例えばセルロース含有量が 90%

を超える綿花を THz から中赤外の帯域(3.0-105 THz) で測定すると、セルロールの標準品に比べてピークが減りスペクトルがブロードになることが観察されている[82]. 一方でデンプンは不溶性の物質であり細胞質内でデンプン粒として貯蔵されているため顕微鏡で容易に観察でき (Figure 1.5.), 植物内でも結晶構造を持つことが X 線を使った研究で測定されている[84-88]. よって THz 波で植物を測定した場合、デンプンのように結晶構造を持つ生体物質のみがピークを示

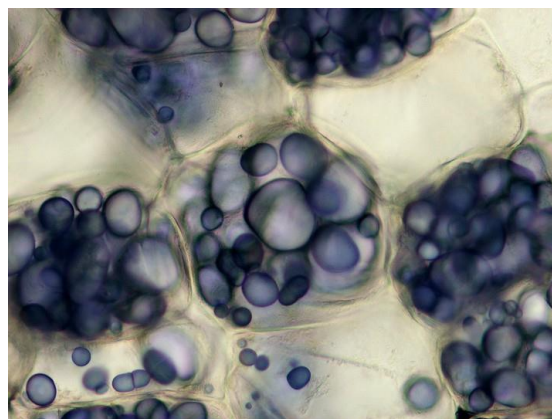


Figure 1.5. 細胞内のデンプン粒[83].

し、アモルファス化した他の生体物質のピークは現れない可能性が考えられる. そのため多様な生体物質を含む植物であっても THz 帯ではスペクトルが複雑にならず、デンプンの情報を切り出すことができると期待される. 以上のように、植物内での生体物質の特性や構造を考えると従来の赤外やラマン分光法よりも THz 波の方が原理的にデンプン計測に適していると考えられる. さらに近年、発芽コムギを THz イメージングでモニタリングすると生長に伴い変化が見られ、また 0.2-2.0 THz の吸光度が増加することが観察された[89]. 著者達はこれらの結果から THz 波を用いることでデンプンの分解過程がモニタリングできると主張している. しかし発芽後の種子内では多様な生体物質の発現・分解が同時に起きるため、THz 帯で見られた変化がデンプン分解に由来すると結論づけるには先行研究の結果は不十分である. さらに THz 分光法でデンプンや農産物を測定した研究も極めて少なく、どのようなスペクトルが得られるかさえ未だに定かではない. よって将来的に THz 波を用いて農産物内のデンプンの非破壊計測を目指す上で、まずデンプンの標準品や農産物の THz スペクトルを積み上げていくことが必要となる. そこで 2 つ目のアプローチとしてデンプン非破壊計測に向けた基礎研究として THz 分光法を用いることで農産物内のデンプン計測が可能であるかを検討した.

以上のように本研究では、機能性農産物の生産に効果があると考えられる CL と THz 波の有用性を検討していく. CL の実験では擬似的な微小重力環境が機能性農産物の栽培に有効であることを明らかにすることを目的とする. そこで CL で栽培したリョクトウ中の色素量 (第 2 章) と抗酸化物質および抗酸化作用 (第 3 章) を計測した. さらに THz 分光法が農産物内のデンプン量を推定するポテンシャルを有するかを明らかにすることを 2 つ目の目的とする. そこで標準品のデンプンや糖を測定し分子構造と THz スペクトルの関係を調べた上で (第 4 章), 実際の農産物内のデンプンをモニタリング・定量評価した (第 5 章). 各章の冒頭では、簡潔に実験目的を記す.

参考文献

- [1] Tall, J. M.; Seeram, N. P.; Zhao, C.; Nair, M. G.; Meyer, R. A.; Raja, S. N. Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat. *Behav. Brain Res.* **2004**, *153* (1), 181–188.
- [2] Kurahashi, N.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; Otani, T.; Inoue, M.; Tsugane, S. Soy product and isoflavone consumption in relation to prostate cancer in Japanese men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16* (3), 538–545.
- [3] Simonich, M. T.; Egner, P. A.; Roebuck, B. D.; Orner, G. A.; Jubert, C.; Pereira, C.; Groopman, J. D.; Kensler, T. W.; Dashwood, R. H.; Williams, D. E.; et al. Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B1-induced multi-organ carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* **2007**, *28* (6), 1294–1302.
- [4] Ferruzzi, M. G.; Blakeslee, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr. Res.* **2007**, *27* (1), 1–12.
- [5] Rao, A. V.; Rao, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* **2013**, *55*, 1–331.
- [6] De Pascual-Teresa, S.; Sanchez-Ballesta, M. T. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7* (2), 281–299.
- [7] Sun, C.; Zheng, Y.; Chen, Q.; Tang, X.; Jiang, M.; Zhang, J.; Li, X.; Chen, K. Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit. *Food Chem.* **2012**, *131* (4), 1287–1294.
- [8] Kulandaivelu, G.; Maragatham, S.; Nedunchezian, N. On the possible control of ultraviolet - B induced response in growth and photosynthetic activities in higher plants. *Physiol. Plant.* **1989**, *76* (3), 398–404.
- [9] Solecka, D.; Boudet, A. M.; Kacperska, A. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **1999**, *37* (6), 491–496.
- [10] Sztatelman, O.; Grzyb, J.; Gabryś, H.; Banaś, A. K. The effect of UV-B on Arabidopsis leaves depends on light conditions after treatment. *BMC Plant Biol.* **2015**, *15* (1), 1–16.
- [11] Font, R.; del Río-Celestino, M.; Cartea, E.; de Haro-Baolón A. Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochem.* **2005**, *66* (2), 175–185.
- [12] 農林水産省ホームページ : http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h18_h/trend/1/t1_1_1_02.html (2018年4月2日現在)
- [13] Volkmann, D.; Baluška, F. Gravity: One of the driving forces for evolution. *Protoplasma* **2006**, *229* (2–4), 143–148.
- [14] Lyon, C. J. Wheat Seedling Growth in the Absence of Gravitational Force. *Plant Physiol.* **1968**, 3–7.
- [15] Kiss, J. Z.; Edelmann, R. E.; Wood, P. C. Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient Arabidopsis seedlings in spaceflight studies. *Planta* **1999**, *209* (1), 96–103.
- [16] Porterfield, D. M.; Matthews, S. W.; Daugherty, C. J.; Musgrave, M. E. Spaceflight exposure effects on transcription, activity, and localization of alcohol dehydrogenase in the roots of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **1997**, *113* (95), 685–693.
- [17] Levine, L. H.; Heyenga, A. G.; Levine, H. G.; Choi, J. W.; Davin, L. B.; Krikorian, A. D.; Lewis, N. G. Cell-wall architecture and lignin composition of wheat developed in a microgravity environment. *Phytochemistry* **2001**, *57* (6), 835–846.
- [18] Stutte, G. W.; Monje, O.; Hatfield, R. D.; Paul, A. L.; Ferl, R. J.; Simone, C. G. Microgravity effects on leaf morphology, cell structure, carbon metabolism and mRNA expression of dwarf wheat. *Planta* **2006**, *224* (5), 1038–1049.
- [19] Paul, A. L.; Amalfitano, C. E.; Ferl, R. J. Plant growth strategies are remodeled by spaceflight. *BMC Plant Biol.* **2012**, *12* (1), 1.
- [20] Nakashima, J.; Liao, F.; Sparks, J. A.; Tang, Y.; Blancaflor, E. B. The actin cytoskeleton is a suppressor of the endogenous

skewing behaviour of Arabidopsis primary roots in microgravity. *Plant Biol.* **2014**, *16* (SUPPL.1), 142–150.

- [21] Aubry-Hivet, D.; Nziengui, H.; Rapp, K.; Oliveira, O.; Paponov, I. A.; Li, Y.; Hauslage, J.; Vagt, N.; Braun, M.; Ditengou, F. A.; Dovzhenko, A.; Palme, K. Analysis of gene expression during parabolic flights reveals distinct early gravity responses in Arabidopsis roots. *Plant Biol.* **2014**, *16* (SUPPL.1), 129–141.
- [22] Martzivanou, M.; Babbick, M.; Cogoli-Greuter, M.; Hampp, R. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of Arabidopsis thaliana cell cultures. *Protoplasma* **2006**, *229* (2–4), 155–162.
- [23] Driss-Ecole, D.; Schoëvaert, D.; Noin, M.; Perbal, G. Densitometric analysis of nuclear DNA content in lentil roots grown in space. *Biol. Cell* **1994**, *81* (1), 59–64.
- [24] Yu, F.; Driss-Ecole, D.; Rembur, J.; Legué, V.; Perbal, G. Effect of microgravity on the cell cycle in the lentil root. *Physiol. Plant.* **1999**, *105* (1), 171–178.
- [25] Matía, I.; González-Camacho, F.; Herranz, R.; Kiss, J. Z.; Gasset, G.; van Loon, J. J. W. A.; Marco, R.; Javier Medina, F. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *J. Plant Physiol.* **2010**, *167* (3), 184–193.
- [26] Musgrave, M. E.; Kuang, A. X.; Matthews, S. W. Plant reproduction during spaceflight: Importance of the gaseous environment. *Planta* **1997**, *203*, S177–S184.
- [27] Kuang, A.; Xiao, Y.; McClure, G.; Musgrave, M. E. Influence of microgravity on ultrastructure and storage reserves in seeds of Brassica rapa L. *Ann. Bot.* **2000**, *85* (6), 851–859.
- [28] Musgrave, M. E.; Kuang, A.; Xiao, Y.; Stout, S. C.; Bingham, G. E.; Briarty, L. G.; Levenskikh, M. A.; Sychev, V. N.; Podolski, I. G. Gravity independence of seed-to-seed cycling in Brassica rapa. *Planta* **2000**, *210* (3), 400–406.
- [29] Campbell, W. F.; Salisbury, F. B.; Bugbee, B.; Klassen, S.; Naegle, E.; Strickland, D. T.; Bingham, G. E.; Levinskikh, M.; Iljina, G. M.; Veselova, T. D.; et al. Comparative floral development of Mir-grown and ethylene-treated, earth-grown Super Dwarf wheat. *J. Plant Physiol.* **2001**, *158* (8), 1051–1060.
- [30] Levinskikh, M. A.; Sychev, V. N.; Derendyaeva, T. A.; Signalova, O. B.; Salisbury, F. B.; Campbell, W. E.; Bingham, G. E.; Bubenheim, D. L.; Jahns, G. Analysis of the spaceflight effects on growth and development of Super Dwarf wheat grown on the Space Station Mir. *J. Plant Physiol.* **2000**, *156* (4), 522–529.
- [31] Jiao, S.; Hilaire, E.; Paulsen, A. Q.; Guikema, J. A. Brassica rapa plants adapted to microgravity with reduced photosystem I and its photochemical activity. *Physiol. Plant.* **2004**, *122* (2), 281–290.
- [32] Tripathy, B. C.; Brown, C. S.; Levine, H. C.; Krikorian, A. D. Growth and Photosynthetic Responses of Wheat Plants Crown in Space. *Plant Physiol* **1996**, *11* (1 1996), 801–806.
- [33] Schulze, A.; Jensen, P. J.; Desrosiers, M.; Buta, J. G.; Bandurski, R. S. Studies on the growth and indole-3-acetic acid and abscisic acid content of Zea mays seedlings grown in microgravity. *Plant Physiol* **1992**, *100*, 692–698.
- [34] Ueda, J.; Miyamoto, K.; Yuda, T.; Hoshino, T.; Fujii, S.; Mukai, C.; Kamigaichi, S.; Aizawa, S.; Yoshizaki, I.; Shimazu, T.; Fukui, K. Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 space experiment. *J. Plant Res.* **1999**, *112* (1108), 487–492.
- [35] Cowles, J. R.; Scheld, H. W.; Lemay, R.; Peterson, C. Growth and lignification in seedlings exposed to eight days of microgravity. *Ann. Bot.* **1984**, *54* (Suppl 3), 33–48.
- [36] Mashinsky, A.; Ivanova, I.; Derendyaeva, T.; Nechitailo, G.; Salisbury, F. “From seed-to-seed” experiment with wheat plants

- under space-flight conditions. *Adv. Sp. Res.* **1994**, *14* (11), 13–19.
- [37] Colla, G.; Battistelli, A.; Proietti, S.; Moscatello, S.; Rouphael, Y.; Cardarelli, M.; Casucci, M. Rocket seedling production on the International Space Station: Growth and nutritional properties. *Microgravity Sci. Technol.* **2007**, *19* (5–6), 118–121.
- [38] Musgrave, M. E.; Kuang, A.; Brown, C. S.; Matthews, S. W. Changes in Arabidopsis leaf ultrastructure, chlorophyll and carbohydrate content during spaceflight depend on ventilation. *Ann. Bot.* **1998**, *81* (4), 503–512.
- [39] Cowles, J.; Lemay, R.; Jahns, G. Seedling growth and development on Space Shuttle. *Life Sci. Sp. Res. XXV* **1994**, *14* (11), 3–12.
- [40] Musgrave, M. E.; Kuang, A.; Tuominen, L. K.; Levine, L. H.; Morrow, R. C. Seed storage reserves and glucosinolates in Brassica rapa L. grown on the international space station. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2005**, *130* (1306), 848–856.
- [41] De Micco, V.; Aronne, G. Biometric anatomy of seedlings developed onboard of Foton-M2 in an automatic system supporting growth. *Acta Astronaut.* **2008**, *62* (8–9), 505–513.
- [42] Levine, L. H.; Levine, H. G.; Stryjewski, E. C.; Prima, V.; Piastuch, W. C. Effect of spaceflight on isoflavone accumulated in etiolated soybean seedlings. *J. Gravit. Physiol.* **2001**, *8*(2), 21–27.
- [43] van Loon, J. J. W. A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Adv. Sp. Res.* **2007**, *39* (7), 1161–1165.
- [44] Borst, A. G.; Van Loon, J. J. W. A. Technology and developments for the random positioning machine, RPM. *Microgravity Sci. Technol.* **2009**, *21* (4), 287–292.
- [45] Hensel, W.; Sievers, A. Effects of prolonged omnilateral gravistimulation on the ultrastructure of statocytes and on the graviresponse of roots. *Planta* **1980**, *150* (4), 338–346.
- [46] Kraft, T. F. B.; van Loon, J. J. W. A.; Kiss, J. Z. Plastid position in Arabidopsis columella cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine. *Planta* **2000**, *211* (3), 415–422.
- [47] Herranz, R.; Anken, R.; Boonstra, J.; Braun, M.; Christianen, P. C. M.; de Geest, M.; Hauslage, J.; Hilbig, R.; Hill, R. J. A.; Lebert, M.; Medina, F. J.; Vagt, N.; Ullrich, O.; van Loon J. J. W. A.; Hemmersbach, R. Ground-based facilities for simulation of microgravity: Organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology* **2013**, *13* (1), 1–17.
- [48] Brungs, S.; Egli, M.; Wuest, S. L.; Peter, P. C.; Jack, J. J.; Ngo Anh, T. J.; Hemmersbach, R. Facilities for simulation of microgravity in the ESA ground-based facility programme. *Microgravity Sci. Technol.* **2016**, *28* (3), 191–203.
- [49] Wittstock, U.; Halkier, B. A. Glucodiolate research in the Arabidopsis era. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7* (6), 263–270.
- [50] Thibodeaux, C. J.; Melançon, C. E.; Liu, H. W. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. *Nature* **2007**, *446* (26), 1008–1016.
- [51] Sonnewald, U.; Fernie, A. R. Next-generation strategies for understating and influencing source-sink relations in crop plants. *Curr. Opin. Plant Sci.* **2018**, *43*, 63–70.
- [52] 園池公毅. 光合成とはなにか-生命システムを支える力. 講談社. **2008**.
- [53] Martin, C.; Smith A. M. Starch biosynthesis. *Plant Cell* **1995**, *7*(7), 971–985.
- [54] Smith, A. M.; Zeeman, S. C. Quantification of starch in plant tissues. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (3), 1342–1345.
- [55] Schulz, H.; Baranska, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib.*

Spectrosc. **2007**, *43* (1), 13–25.

- [56] Pascal, A.; Peterman, E. J. G.; Gradinaru, C.; van Amerongen, H.; van Grondelle, R.; Robert, B. Structure and interactions of the chlorophyll a molecules in the higher plant Lhcb4 antenna protein. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9317–9321.
- [57] Bamba, T.; Fukusaki, E. I.; Nakazawa, Y.; Kobayashi, A. In-situ chemical analyses of trans-polyisoprene by histochemical staining and Fourier transform infrared microspectroscopy in a rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver. *Planta* **2002**, *215* (6), 934–939.
- [58] Baranski, R.; Baranska, M.; Schulz, H. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. *Planta* **2005**, *222* (3), 448–457.
- [59] Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; De Oliveira, L. F. C.; Alia, J. M.; Le Hyaric, M.; De Ameid, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *532* (2), 177–186.
- [60] Da Silva, C. E.; Vandenabeele, P.; Edwards, H. G. M.; Cappa De Oliveira, L. F. NIR-FT-Raman spectroscopic analytical characterization of the fruits, seeds, and phytotherapeutic oils from rosehips. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392* (7–8), 1489–1496.
- [61] Mazurek, S.; Szostak, R.; Kita, A.; Kucharska, A. Z.; Sokół-Lętowska, A.; Hamouz, K. Determination of antioxidant activity and polyphenols content in chips by Raman and IR spectroscopy. *Food Anal. Methods* **2017**, *10* (12), 3964–3971.
- [62] Ivanova, D. G.; Singh, B. R. Nondestructive FTIR monitoring of leaf senescence and elicitor-induced changes in plant leaves. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2003**, *72* (2), 79–85.
- [63] Gandolfo, D. S.; Mortimer, H.; Woodhall, J. W.; Boonham, N. Fourier transform infra-red spectroscopy using an attenuated total reflection probe to distinguish between Japanese larch, pine and citrus plants in healthy and diseased states. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *163*, 181–188.
- [64] Trebolazabala, J.; Maguregui, M.; Morillas, H.; de Diego, A.; Madariaga, J. M. Portable Raman spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *180*, 138–143.
- [65] Wilson, R. H.; Kalichevsky, M. T.; Ring, S. G.; Belton, P. S. A fourier-transform infrared study of the gelation and retrogradation of waxy-maize starch. *Carbohydr. Res.* **1987**, *166* (1), 162–165.
- [66] van Soest, J. J. G.; de Wit, D.; Tournois, H.; Vliegthart, J. F. G. Retrogradation of potato starch as studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Starch/Stärke* **1994**, *46* (12), 453–457.
- [67] van Soest, J. J. G.; Tournois, H.; de Wit, D.; Vliegthart, J. F. G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1995**, *279* (C), 201–214.
- [68] Bello-Pérez, L. A.; Ottenhof, M. A.; Agama-Acevedo, E.; Farhat, I. A. Effect of storage time on the retrogradation of banana starch extrudate. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (4), 1081–1086.
- [69] Orman, B. A.; Schumann, R. A. Comparison of Near-Infrared Spectroscopy Calibration Methods for the Prediction of Protein, Oil, and Starch in Maize Grain. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39* (5), 883–886.
- [70] Vasko, P. D.; Blackwell, J.; Koenig, J. L. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part I: Identification of O-H and C-H-related vibrational modes for D-glucose, maltose, cellobiose, and dextran by deuterium-substitution methods. *Carbohydr. Res.* **1971**, *19* (3), 297–310.

- [71] Cael, J. J.; Koenig, J. L.; Blackwell, J. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part III: raman spectra of the polymorphic forms of amylose. *Carbohydr. Res.* **1973**, 29 (1), 123-134.
- [72] Dixon, R. A.; Strack, D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond..... *Phytochemistry* **2003**, 62 (6), 815-816.
- [73] Ribeiro da Luz, B. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: A tool for ecological and botanical studies. *New Phytol.* **2006**, 172 (2), 305-318.
- [74] Tonouchi, M. Cutting-edge terahertz technology. *Nat. Photonics* **2007**, 1 (2), 97-105.
- [75] Fischer, B. M.; Walther, M.; Jepsen, P. U. Far-infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* **2002**, 47 (21), 3807-3814.
- [76] Nagai, N.; Kumazawa, R.; Fukasawa, R. Direct evidence of inter-molecular vibrations by THz spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 413 (4-6), 495-500.
- [77] Bertie, J. E.; Whalley, E. Optical spectra of orientationally disordered crystals. II. Infrared spectrum of ice Ih and ice Ic from 360 to 50 cm⁻¹. *J. Chem. Phys.* **1967**, 46 (4), 1271-1284.
- [78] Walther, M.; Fischer, B. M.; Jepsen, P. U. Noncovalent intermolecular forces in polycrystalline and amorphous saccharides in the far infrared. *Chem. Phys.* **2003**, 288 (2-3), 261-268.
- [79] Strachan, C. J.; Rades, T.; Newnham, D. A.; Gordon, K. C.; Pepper, M.; Taday, P. F. Using terahertz pulsed spectroscopy to study crystallinity of pharmaceutical materials. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 390 (1-3), 20-24.
- [80] Hoshina, H.; Morisawa, Y.; Sato, H.; Kamiya, A.; Noda, I.; Ozaki, Y.; Otani, C. Higher order conformation of poly(3-hydroxyalkanoates) studied by terahertz time-domain spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, 96 (10), 3-6.
- [81] Otsuka, M.; Nishizawa, J. I.; Fukura, N.; Sasaki, T. Characterization of poly-amorphous indomethacin by terahertz spectroscopy. *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves* **2012**, 33 (9), 953-962.
- [82] Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; Williams, A. C. FT-Raman spectrum of cotton: a polymeric biomolecular analysis. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1994**, 50 (4), 807-811.
- [83] 福岡教育大教育学部ホームページ : <https://ww1.fukuoka-edu.ac.jp/~fukuhara/keitai/1-2.html> (2018年11月19日現在) .
- [84] Fuke, Y.; Matsuoka, H. Studies on the physical and chemical properties of kiwi fruit starch. *J. Food Sci.* **1984**, 49, 620622.
- [85] Hoover, R.; Sosulski, F. Studies on the functional characteristics and digestibility of starches from phaseolus vulgaris biotypes. *Starch - Stärke* **1985**, 37 (6), 181-191.
- [86] Osundahunsi, O. F.; Fagbemi, T. N.; Kesselman, E.; Shimon, E. Comparison of the physicochemical properties and pasting characteristics of flour and starch from red and white sweet potato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (8), 2232-2236.
- [87] Millan-Testa, C. E.; Mendez-Montealvo, M. G.; Ottenhof, M. A.; Farhat, I. A.; Bello-Pérez, L. A. Determination of the molecular and structural characteristics of okenia, mango, and banana starches. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (3), 495-501.
- [88] Chung, H. J.; Liu, Q. Molecular structure and physicochemical properties of potato and bean starches as affected by gamma-irradiation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, 47 (2), 214-222.
- [89] Jiang, Y.; Ge, H.; Lian, F.; Zhang, Y.; Xia, S. Early detection of germinated wheat grains using terahertz image and chemometrics. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (January), 1-9.

2 章 クリノスタットで栽培したリョクトウ中の色素量計測

2-1 実験目的

色素であるクロロフィル、カロテノイド、アントシアニンは機能性成分と知られている[1-3]. 緑黄色野菜の健康促進効果が高いと言われている理由もこれらの成分を多く含むためである. 微小重力環境下において色素を測定した研究は過去に幾例か報告されている. 2 rpm で回転する CL でイネを栽培した研究では, 通常重力環境下と比較して茎に含まれるクロロフィル濃度が増加した[4]. 一方で 1.5 rpm の CL でトマトを栽培した場合, 葉に含まれるクロロフィル濃度は減少している[5]. このように微小重力の実験では同じ測定対象であっても植物種や実験装置の違いにより異なる結果が得られる場合がある[6, 7]. カロテノイドについては, CL で栽培したトマトで減少する結果が得られている[5]. また宇宙で栽培したコムギやルッコラでもカロテノイド量が減少したことから[8, 9], 微小重力はカロテノイドに負の影響を与える可能性が示唆されている. さらに宇宙でリョクトウを栽培するとクロロフィル量が増加するが[10], これまでに CL で栽培したリョクトウ中の色素量を計測した例は報告されていない. そのため CL による擬似的な微小重力環境下で宇宙実験と同様にリョクトウ中のクロロフィル量が増加するか明らかではない. さらに我々の知る限りアントシアニンを測定対象とした微小重力の研究も報告されていない.

CL は植物ホルモンのエチレン生成を促進することが分かっている[11-13]. エチレンはクロロフィル, カロテノイド, アントシアニンの蓄積に影響を与えるため[14-17], CL で起きる色素量変化に関与する可能性が予想できる. 本章では, CL を活用することで植物中の色素量が増加するかを明らかにすることを目的とする. そこで CL で栽培したリョクトウに含まれるクロロフィル, カロテノイド, アントシアニン量を計測した. さらに, CL で起きる色素量変化の要因を明らかにするため, 阻害剤を用いて内因性エチレンとの関係性を検証した.

2-2 実験装置および方法

2-2-1 実験試料

リョクトウの種子や発芽したモヤシは, 主にアジアを中心に食料や飼料とされている. 近年の研究からリョクトウはフラボノイド, イソフラボン, カロテノイド, アントシアニンなどの機能性成分を豊富に含むことが分かり[18-22], また細胞やラットを用いた病理学, 医学の研究でも抗酸化作用や抗ガン作用があることが報告されている[23, 24]. さらに他の植物種と比較して生長速度が極めて速く栽培が容易であるため, 植物実験のサンプルとしても頻繁に用いられている[25].

実験に用いたリョクトウ種子と含有成分の割合を Figure 2.1. に示す. 種子では炭化水素とタンパク質が主成分であり, それぞれ乾物重量の約 60%と 25%を占める[26-28]. デンプンは最も含有量の高い炭化水素で種子の成熟と共に合成・蓄積が進んでいき[29, 30], 成熟した種子では 30-50%を占める[31, 32]. デンプン合成過程では, まず ADP-グルコースピロホスホリラーゼやデン

プン合成酵素によりグルコースが α (1-4) で結合した直鎖のグルカンに変わる．さらにデンプン枝作り酵素がグルカンが α (1-6) で結ぶことで枝分かれ構造を持つデンプンが合成される[33]．種子に蓄えられたデンプンは発芽後、 α -アミラーゼの作用によって多糖類のオリゴ糖に分解される．生成されたオリゴ糖は β -アミラーゼの働きによって二糖のマルトースに分解され、さらに α -グルコシダーゼの働きによって単糖のグルコースまで分解される[34]．またリョクトウを含む豆科植物では、スクロースを中間体とする別のデンプン分解経路を持つことも発見されている[34, 35]．発芽初期の植物体では葉緑体を含む葉が形成されていないため、光合成によりエネルギーを生産することができない．そのためデンプンから分解された糖類が生長や物質合成のためのエネルギーとして重要な役割を果たすことが分かっている．種子内のデンプンや糖の挙動は顕微鏡観察[36, 37]やクロマトグラフィー[38-40]を使って分析が進められてきた．

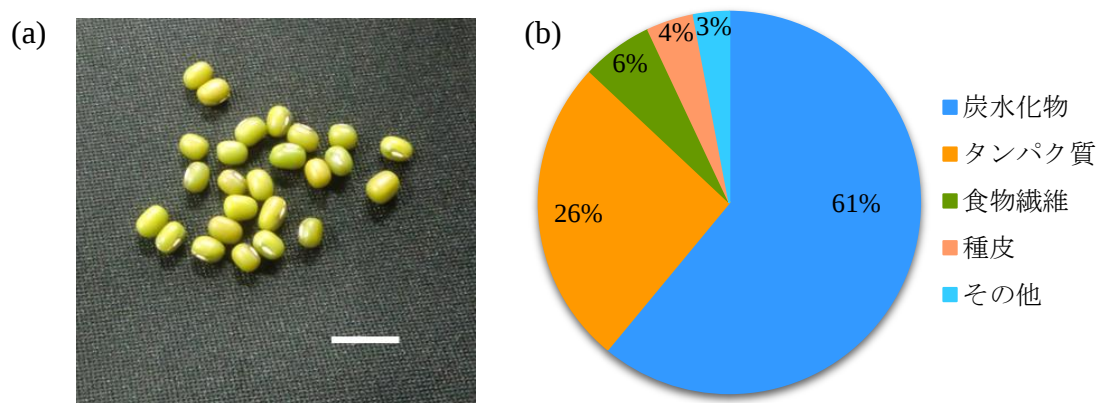


Figure 2.1. (a) : 実験に用いたリョクトウ種子 (スケール : 1 cm), (b) : 含有成分の割合[27]．

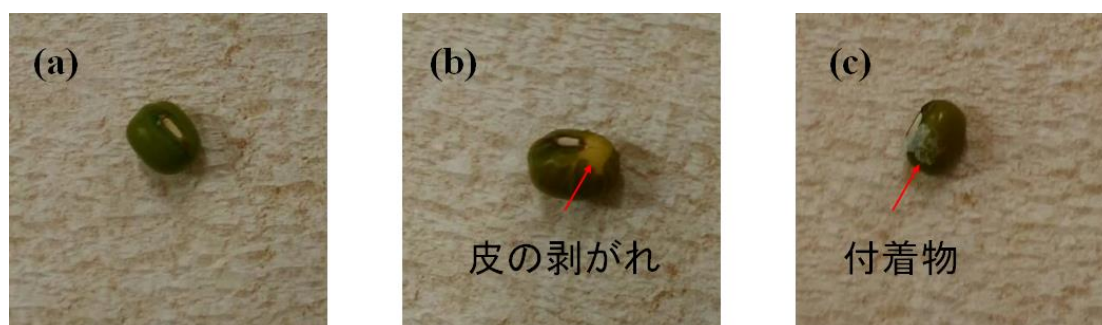


Figure 2.2. (a) : 正常な種子, (b) : 皮が剥がれた種子, (c) : 付着物がある種子．本実験では(a), (c)の種子を使用した．

発芽するとタンパク質も酵素によって分子量の小さなアミノ酸に分解され生長のために消費されていく．ペプチダーゼはアミノ酸同士を繋ぐペプチド結合を特異的に切断するタンパク質分解酵素である．発芽後 3-4 日でペプチダーゼの活性が最大となり、6 日目までに種子に蓄えられたタンパク質の大部分が分解される[41]．リョクトウ中のタンパク質は主にグロブリンとアル

ブミンで、それぞれタンパク質総量の 60%と 25%を占める成分である[42].

本実験では中原採種場から購入したリョクトウを実験試料として用いた（商品名：グリーンマッペ）。実験前に種子を選定し皮が剥がれた種子や砕けている種子を除去した。白い付着物がある種子も見られたが、これは種子を莢から取り出す際に莢内側の繊維が付着したためで発芽や生長に影響を与えないため実験に使用した（Figure 2.2.）。

2-2-2 クリノスタットの原理と装置

[1] クリノスタットの原理

微小重力が生物に与える影響を解明するために、植物や動物を対象として宇宙実験やパラボリックフライトによる実験が行われてきた[43-47]。しかし宇宙実験では 1 回の飛行で数十億円以上と言われる莫大なコストや事故の危険性が問題視されてきた。また、パラボリックフライトでは微小重力が継続する時間は数十秒から 1 分程度で、植物の生長を評価するには十分な時間ではない。そこで実験対象を低速で回転させることで擬似的に微小重力環境を再現できる CL の活用が提案された。CL の歴史は古く、回転する水車に付着した植物が重力の影響を受けないことをイギリス人の T. A. Knight が発見したことが起源である。その後、装置の開発やその効果を検証する研究が盛んに進められ[48-58]、現在では用途に応じて様々な CL が活用されている。水平と垂直両方向に試料を回転させ重力を 3 次的に打ち消す 2 軸回転の 3-D CL や[59]、顕微鏡や光電子増倍管を搭載して対象物を継続的に観察できる CL などが開発されている[60]。しかし、CL による擬似的な微小重力環境と真の微小重力環境が与える影響は厳密には異なることも分かっている[61, 62]。よって CL による結果はあくまでシミュレーションであり、微小重力が生物に与える影響を解明するには真の微小重力環境での検証が不可欠であるとも言われている[60, 61]。

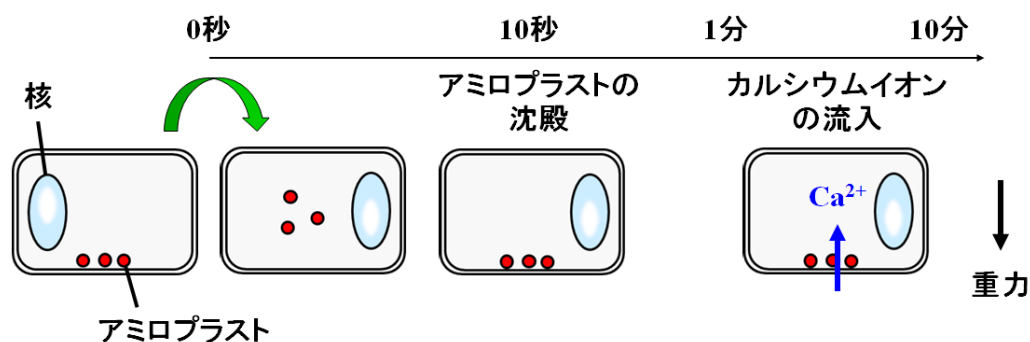


Figure 2.3. 重力応答の時間スケール。重力変化後、アミロプラストが細胞底面に沈殿するまでに数十秒程度を要する。さらに重力変化から 10 分程で細胞外から細胞内にカルシウムイオンが流入する[63-65]。

植物の重力応答の模式図を Figure 2.3.に示す。植物は根幹のコルメラ細胞にあるアミロプラストと呼ばれる細胞小器官を介して重力方向を感知している。細胞質よりも密度が高いアミロプ

ラストは細胞内で重力方向に沈降して、底面の細胞膜に接触するとカルシウムチャネルが開き細胞外から細胞内へカルシウムイオンが流入する。植物はカルシウムイオンの流入をシグナルとして重力方向を感知しており、アミロプラストを持たない変異体やレーザー照射により人工的にアミロプラストを消失された植物では重力応答を示さないことが観察されている[66, 67].

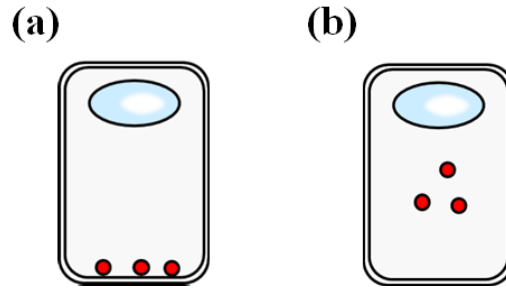


Figure 2.4. アミロプラスト分布の模式図[68]. (a) : 1-g, (b) : CL.

CL で回転させた場合、重力応答よりも短い時間で連続的に重力方向が変化するため、アミロプラストは沈殿せず細胞内を浮遊したような状態となる (Figure 2.4.). その結果、カルシウムイオンの移動がなくなり、植物が重力方向を感知できなくなる。以下では CL の回転によりアミロプラストが細胞内を浮遊することを理論的に示す。

アミロプラストの動きは小さな粒子が流体中を沈降する際の挙動を説明したストークスの式で説明できる[69].

$$F = 6\pi\eta r v \quad (2.1)$$

ここで、 F : 抵抗値, η : 細胞質の粘性度, r : アミロプラストの半径, v : 沈殿速度を表す。抵抗値 F は落下する力と等しくなるため、式 (2.1) は粒子の重量 m と重力加速度 g ($=980 \text{ cm/sec}^2$) を用いて

$$mg = 6\pi\eta r v \quad (2.2)$$

と書き換えられる。さらに質量 m はアミロプラストの密度 ρ_s と細胞質の密度 ρ_f を用いて

$$m = \frac{4\pi r^3}{3} (\rho_s - \rho_f) \quad (2.3)$$

と変形でき、式 (2.2), (2.3) より

$$v = \frac{2gr^2(\rho_s - \rho_f)}{9\eta} \text{ [cm/sec]} \quad (2.4)$$

で表すことができる． ω rpm で回転する CL で植物を栽培すると，以下の Figure 2.5.に示すようにアミロプラストは回転しながら細胞質内を移動する．1 回転する間，アミロプラストの移動距離 S は S_1, S_2, S_3, S_4 の和となる．

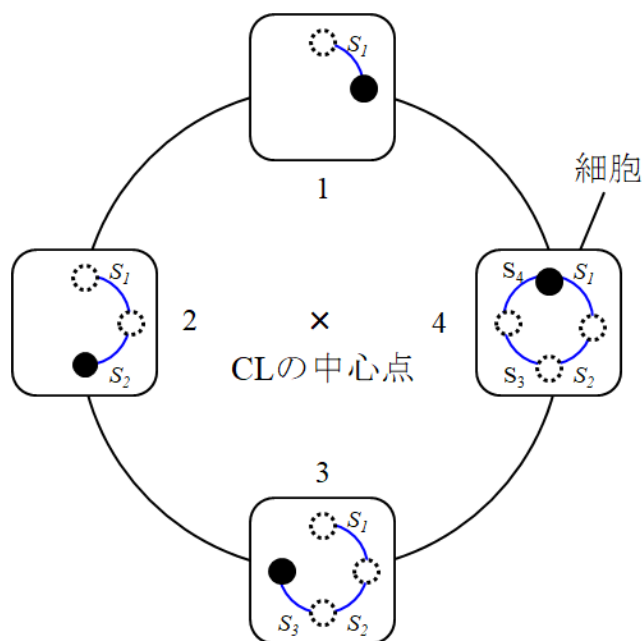


Figure 2.5. CL の回転によるアミロプラストの軌跡．黒丸：アミロプラスト，青線：移動の軌跡．

ここで

$$S = \frac{60v}{\omega} \quad (2.5)$$

となり，また v はストークスの式で示した沈降速度であるため

$$S = \frac{40gr^2(\rho_s - \rho_f)}{3\eta} \text{ [cm]} \quad (2.6)$$

と変形でき，細胞質の粘性度と密度，アミロプラストの半径と密度が既知であれば移動距離 S が求まる．式 (2.6) をアミロプラストが移動しながら描く円の半径 R に書き換えることができる．

$$R = \frac{20gr^3(\rho_s - \rho_f)}{3\pi\eta\omega} \text{ [cm]} \quad (2.7)$$

文献値を用いて[69, 70], 式 (2.7) に細胞質の粘性度 $\eta = 5.0 \times 10^{-1} - 2.0 \times 10^{-1}$ [Pa/s], 細胞質の密度 $\rho_f = 1.0 \times 10^3$ [kg/m³], アミロプラストの半径 $r = 1.0$ [μm], 密度 $\rho_s = 1.5 \times 10^3$ [kg/m³], 本実験で設定した CL の回転速度 $\omega = 2$ rpm をそれぞれ代入すると

$$0.26 \text{ } [\mu\text{m}] \leq R \leq 1.04 \text{ } [\mu\text{m}] \quad (2.8)$$

となり, アミロプラストの移動距離は数十 μm の細胞よりも小さいことが示された. 植物の根は生長と共に細胞分裂を繰り返すため重力を感知する根端のコルメラ細胞も新しくできた細胞に次々と入れ替わっていく. 従って, 通常重力下で栽培しアミロプラストが沈殿した植物であっても CL で回転させることで, 新たに形成される細胞内のアミロプラストは浮遊した状態を保つことになる.

[2] 装置

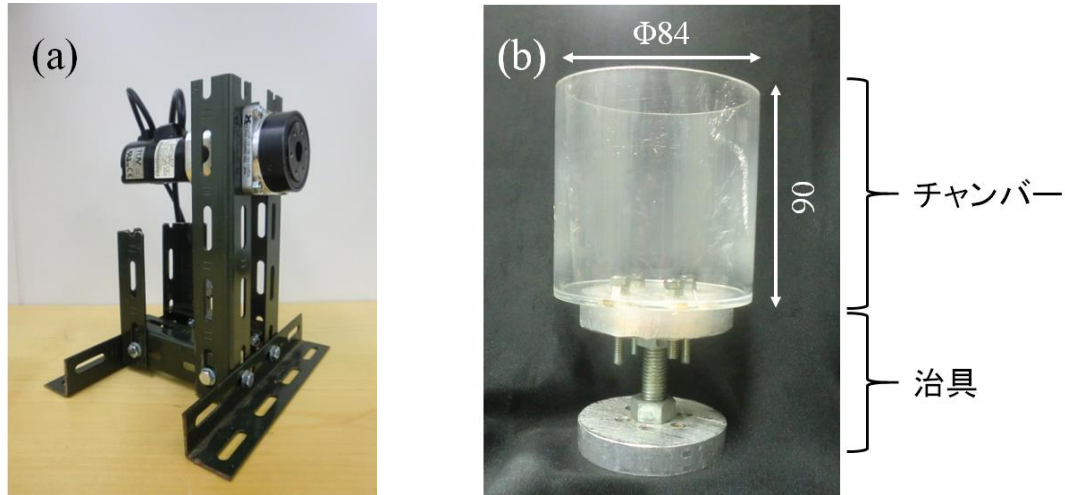


Figure 2.6. 使用した CL の構造. (a) : モーター, (b) : 栽培用チャンバー.

Figure 2.6.に CL の写真を, Figure 2.7.に治具の設計図をそれぞれ示す. 装置は AC サーボモーター (SGMAH-A5BAA21, 安川電機) と円柱の亚克力製容器 ($\Phi 84 \text{ mm} \times \text{深さ } 90 \text{ mm}$) を組み合わせ作製した. ステッピングモーターなどと比較して, サーボモーターは植物の生長に影響を与える振動が少ないという利点がある. モーターの土台は L 字のカラーアングルを組み合わせ作製し, モーターの回転速度は発振器 (FG-141, NF 販売) を用いて制御した. またモーターと亚克力製容器を接続するため, $\Phi 5$ の穴を 6 個と $\Phi 6$ の穴を 4 個開けたアルミ製の円柱盤と頭部を取り除いた M12 のねじとを組み合わせた治具を作製した. アクリル製容器は栽培用チャン

バーとしてリョクトウを回転させながら栽培した.

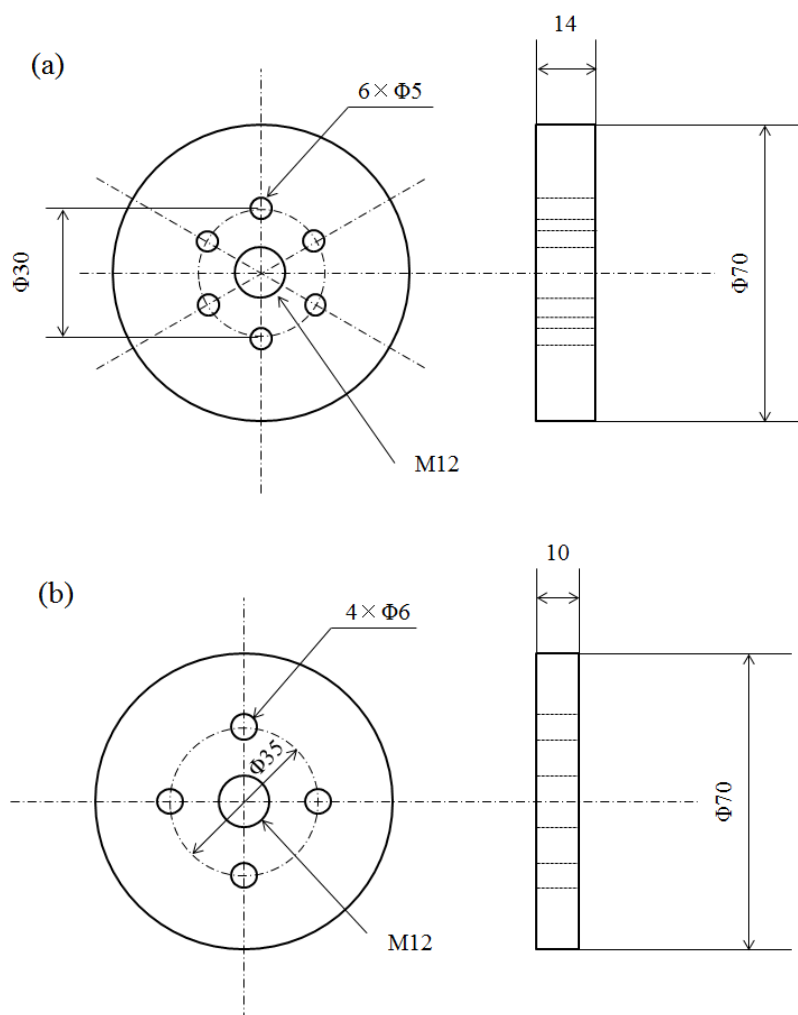


Figure 2.7. 治具の設計図. (a) : モーターとの接続用のアルミ円柱盤, (b) : 栽培用チャンバーとの接続用のアルミ円柱盤.

Table 2.1. インキュベータ SIW-450S の仕様.

制御温度範囲 (°C)	室温+5~80
精度 (°C)	±0.1
外形寸法 (mm)	550×567×760
内部寸法 (mm)	450×430×450
材質	ステンレス

CL はインキュベータ (SIW-450S, アズワン) 内に設置して温度制御下でリョクトウの栽培を行った. インキュベータの仕様は Table 2.1.にまとめた. SIW-450S は内寸が大きく, CL を入れ

るための十分なスペースを持つ。外扉の内側にガラス製の中扉を備えており、室内温度に影響を与えず植物を観察できる。また内外ともにステンレス素材で、コンタミネーション防止のためエタノールでの除菌も可能である。CL のモーターから延びる配線は上部にある排気孔を通して外部の電源と接続した。また同時に多くのリョクトウを栽培するために、2 台の CL をインキュベータに設置した (Figure 2.8.)。

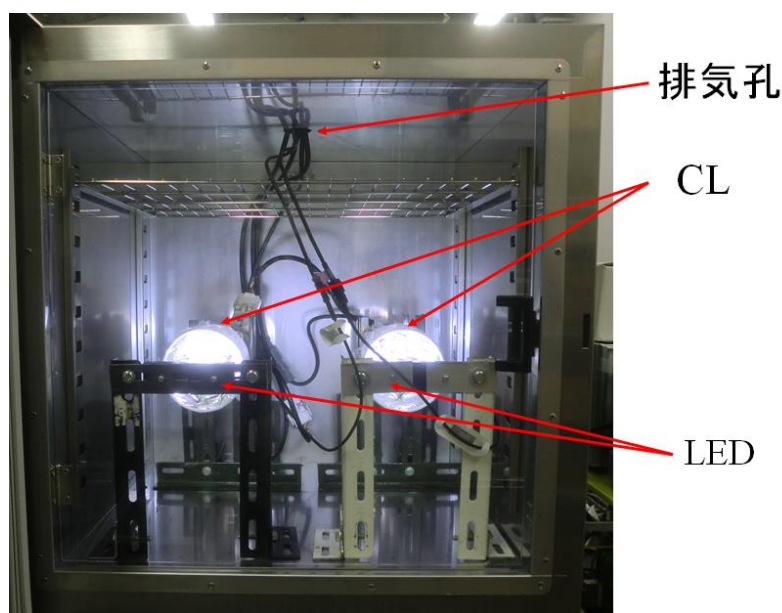


Figure 2.8. CL を設置したインキュベータ内部.

2-2-3 培地の作成方法

支持体には寒天培地を用いた。寒天は硬さや組成成分を制御しやすく、またロックウールなど他の支持体と比較して水の蒸発が少ないため、*in vitro* での植物実験で最もよく使用されている[71, 72]。しかし寒天培地はカビや雑菌の繁殖にも適した環境であり、不適切な手法ではコンタミネーションが起こり、栽培植物が死滅することもある (Figure 2.9.)。以下では、寒天培地作成のために用いた装置や方法について説明する。



Figure 2.9. カビが発生した培地.

[1] オートクレープ

実験に使用する培地は全てオートクレープ (NCC-1701B, アズワン) を用いて滅菌処理を行っ

た．オートクレーブは高温高压下で水や試薬に混入した雑菌やカビを完全に死滅させることができる．ただし使用方法を誤ると極めて危険であるため，以下に注意点を示す[73]．装置内は高温高压になるため，タンパク質，ビタミン，血清など熱変性する成分やアセトン，クロロホルムなど揮発性の溶剤は処理できない．同様な理由で，耐熱性の低いプラスチック容器やデッシュは変形や破損するため使用できない．また容器を密封すると滅菌処理中に溶媒が突沸して破損や破裂の危険性があるため，アルミホイルやシリコ栓で容器の口を覆う．以上の理由から，本実験ではガラス製の三角フラスコに培地成分を入れ，シリコ栓で蓋をした．シリコ栓のフィルターは微細な空隙構造で通気性はあるが雑菌やカビの胞子は通り抜けないため，蓋をした状態であれば滅菌処理後に試料を持ち運びできる．NCC-1701B では温度設定が 115 と 121 °C の 2 条件，滅菌時間を 20-99 分の間で設定できる．「液体滅菌モード」を使用することで滅菌処理後，徐々に減圧していき液体の突沸を防ぐことができる．装置使用後は，必ず容器内に貯まった水を排水する．滅菌処理中に寒天培地が突沸した場合，排水を忘れると冷えてから排水流路に詰まり，次の使用時に装置内の圧が過剰に上昇する危険性がある．

[2] クリーンベンチ

植物，細胞，菌を無菌培養する場合，コンタミネーションを防ぐためクリーンベンチ内で操作を行う．使用前にアルコール滅菌や備え付けの UV ランプを照射することで内部を無菌状態に保つことができる．またフィルターでろ過された循環気流を一方向に流すため操作中も無菌状態を保つことができる．クリーンベンチ内はピペットやデッシュなど必要な装置を置いていることが多いが，過剰に物を置くと UV ランプが当たらない場所ができてコンタミネーションの原因となる．本実験では，ピュアスペーサ (PS-100, アズワン) を装着したクリーンベンチ (TY-33AD, アズワン) を用いて，栽培チャンバーへの培地の移し換えや播種などの操作を行った．0.3 μm 以上の粒子はピュアスペーサ内のペパフィルタ (PS01-1AD, アズワン) で取り除かれる．

[3] 培地成分

Table 2.2. 培地として用いた試薬

試薬	製造元	品番
寒天	関東化学	01099-96
スクロース	関東化学	37000-00
ムラシゲ・スクーグ培地	ナカライテスク	M0221-0010
カルベニシリン二ナトリウム塩	和光純薬	037-23693
	シグマアルドリッチ	C1389-1G
硝酸銀	和光純薬	190-00834

実験途中で和光純薬製のカルベニシリン二ナトリウム塩が販売終了となったため，シグマアルドリッチ製の製品に変更した．

培地には寒天、スクロース、ムラシゲ・スクーグ培地、カルベニシリン二ナトリウム塩を用いた。寒天は常温の水にほとんど溶けないが、融点の 80-90 °C を超えると溶解し、冷えると硬化する。ただし強酸性条件下で高温にすると寒天の加水分解が起こり、冷めた後も固まらなくなる。pH が低い寒天培地を作成する場合には、オートクレープ処理後に pH 調整を行う必要がある。植物培養では寒天培地に糖、無機塩類、ビタミンなどを添加すると最適な条件となるため、本実験でもスクロースとムラシゲ・スクーグ培地を加えた。ムラシゲ・スクーグ培地は生長に必要な無機塩類で構成された成分で、1960 年代の開発以降、頻繁に用いられている。Table 2.3.にムラシゲ・ス

Table 2.3. ムラシゲ・スクーグ培地の含有成分[74, 75]

成分	分量 (mg)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
FeNa · EDTA	367
H ₃ BO ₃	62
KI	8.3
MnSO ₄ · H ₂ O	169
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	86
CaCl ₂	3320
KH ₂ PO ₄	1700
KNO ₃	19000
MgSO ₄	1805.4
NH ₄ NO ₃	16500
合計	43020.9

クーグ培地の含有成分を示す。抗生物質であるカルベニシリンはカビや微生物の繁殖を抑制する効果がある[76]。培地はオートクレープを用いて 121 °C で 25 分間滅菌処理した。ただしカルベニシリンは高温下では物性が変わるため、オートクレープ処理後に溶解した培地に添加し均一になるまで十分に混ぜ合わせた。

内因性のエチレンが植物に与える影響を評価するために、エチレン阻害剤を用いる方法が利用されている[77]。エチレン阻害剤には、アミノエトキシビニルグリシン、 α -アミノオキソ酢酸、サリチル酸、エチレンジアミン四酢酸ようにエチレン合成を阻害する物質と硝酸銀、硫酸銀、1-メチルシクロプロペンようにエチレンに吸収・吸着して活性を阻害する物質に分けられる[78-81]。今回は硝酸銀を用いて内因性のエチレンが色素に与える影響を評価した。硝酸銀もカルベニシリンと同様に、オートクレープ処理後に培地に添加した。

pH も生長に影響を与える要因で、弱酸性の pH 5.0-6.5 に調整されることが多い。一般的に、pH 測定にはデジタル式の pH 計を用いることが多いが、オートクレープ処理直後の培地は高温であるため pH 計の使用温度を超える場合が多い。そのため正確な値を得られないだけでなく装置が故障する可能性も懸念される。そこで寒天培地の pH 測定ではアナログ式のリトマス試験紙が用いられることが多く、本実験では 1 M の水酸化カリウムを用いて培地の pH が 5.8-6.1 になるように調整した。リトマス試験紙（スタンダード pH 試験紙、品番：1-8508-04、アズワン）は pH 4.0-7.0 の範囲を 0.3 刻みで測定できるものを使用した。

2-2-4 栽培方法

培地の組成は寒天 1%, スクロース 1.2%, 1/2 強度のムラシゲ・スクーグ培地, カルベニシリン二ナトリウム塩 250 $\mu\text{g/mL}$, 硝酸銀 1 mM になるように調整した. 具体的には, 寒天 1.5 g, スクロース 1.8 g, ムラシゲ・スクーグ培地 0.3225 g に水 150 mL を加え, オートクレープで処理した. その後, 0.0375 g のカルベニシリン二ナトリウム塩および阻害実験では 0.0255 g の硝酸銀を添加した. 培地は栽培用チャンバーに移し, 硬化するまで常温で半日以上静置した.

次にクリーンベンチ内でリョクトウの種子を 70%エタノールで 5 分, 95%エタノールで 1 分洗浄した後, 蒸留水で 2 回洗浄して寒天培地に植えた. 栽培チャンバーを CL に接続した後, インキュベータに入れ $26.0 \pm 1.5^\circ\text{C}$ で 2-4 日間栽培した. Figure 2.10.に実験系の模式図を示す. コントロールは静置状態で栽培した. 照明には白色 LED (LDL-74 $\times$ 27SW2, シーシーエス) を用いて培地表面の光量が $40\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 18 時間日長になるように設定した. Table 2.1.に示したようにインキュベータの精度は $\pm 0.1^\circ\text{C}$ であるが, LED の点灯・消灯時に $\pm 1.5^\circ\text{C}$ のバラつきが出る.

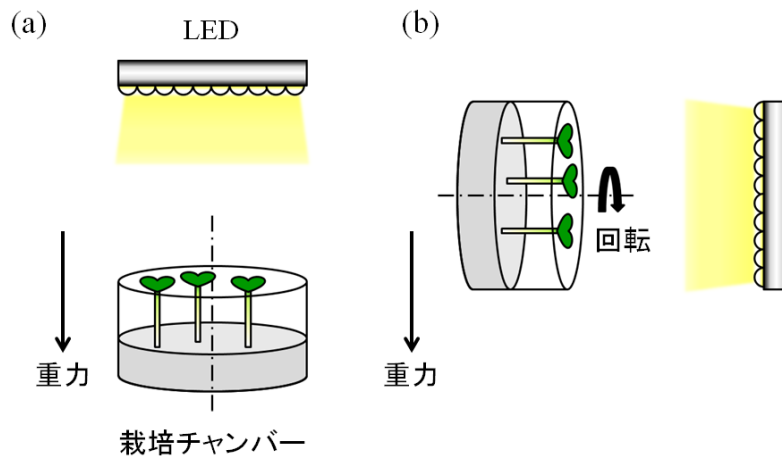


Figure 2.10. 実験系の模式図. (a) : コントロール, (b) : クリノスタット.

CL を用いた実験では回転によって生じる遠心力を考慮する必要がある, 以下の式で計算できる[60].

$$a = \omega^2 \times r = (2\pi f)^2 \times r = \left(\frac{2\pi}{T}\right)^2 \times r \quad (2.9)$$

$$g = 9.81 \times a \quad (2.10)$$

ここで g : 求めたい遠心力 [g], a : 遠心力 [m/s^2], f : 回転数 [Hz], T : 1 回転に要する時間 [s], r : 回転体の半径 [m], ω : 回転速度 [rpm]を表す.

この式に栽培チャンバーの半径 $4.2 \times 10^{-2} \text{m}$, 回転速度 2 rpm を代入すると, 植物にかかる最大の

遠心力は $1.9 \times 10^{-4} g$ となる．この値は植物が感知できる重力の閾値（レンゲ豆： $2.0 \times 10^{-2} g$ [82]，シロイヌナズナ： $1.5 \times 10^{-2} g$ [83]）より十分に小さいことが分かる．

また5日目以降の栽培も試みたが，リョクトウのシュート長が 80 mm を超え重力方向に垂れ下がり始めた．その結果，CL の回転ごとにリョクトウ同士が接触するようになり明らかな接触刺激が見られた．接触刺激はエチレン生成を促進して，形態変化を引き起こすことが知られている[84]．よって5日目以降のリョクトウを測定しても，その結果が CL の回転に由来するか接触刺激の影響か区別できないため本実験での栽培期間は接触刺激が起きない4日目までとした．

2-2-5 生長の測定方法

リョクトウを2-4日間栽培した後，生体重，フック角度，側根数を計測した．エチレンはフック角度の増加と側根形成を促進するため[85]，フック角度と側根数はエチレン生成が増加したかを判断する指標となる．リョクトウの画像をスキャナー（GT-X900，エプソン）で取得し，画像解析ソフト WinRoof（version 6.1.1，三谷商事）を用いてフック角度を測定した．フック角度は先行研究に従って計測した[86]（Figure 2.11.）．

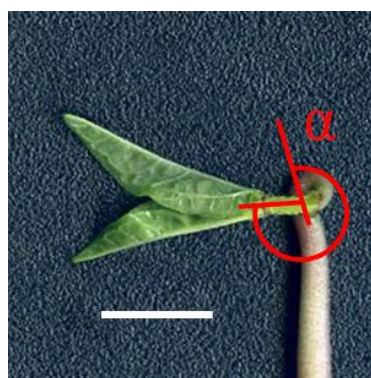


Figure 2.11. 胚軸先端部のフック． α はフック角度を示す．（スケール：1 cm）．

2-2-6 色素の抽出および測定方法

クロロフィル，カロテノイド，アントシアンの抽出および計測は，先行研究で示された方法を用いた．これらの物質は色素であるため可視領域の分光法により定量できる．

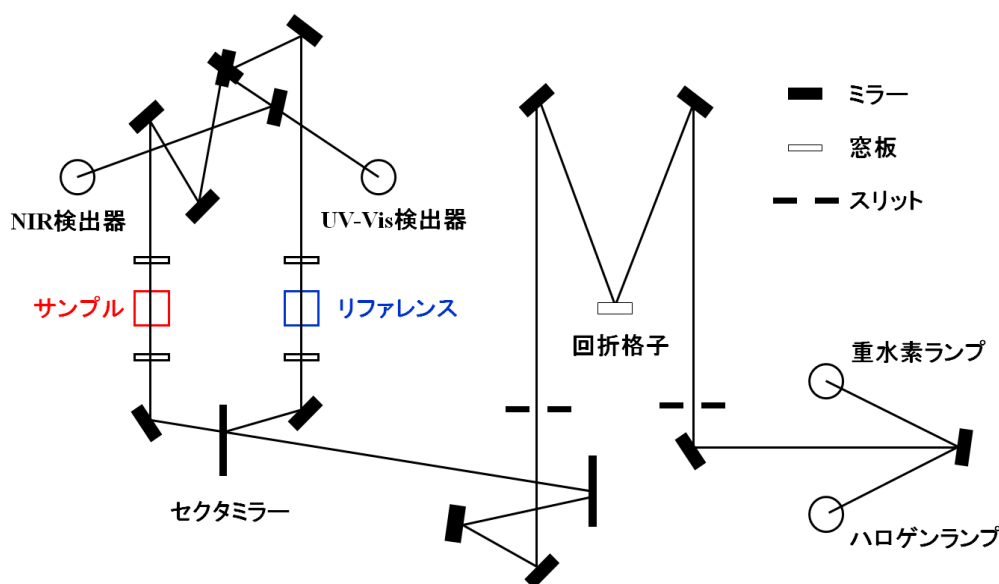


Figure 2.12. 分光光度計 V670 の光学系[87]．

[1] 分光器

測定には紫外可視近赤分光光度計 (V-670, 日本分光) を用いた. その光学系を Figure 2.12.に, 仕様を Table 2.4.にそれぞれ示す. V-670 は回折格子を光学素子とした分散型分光器で紫外から近赤外領域にあたる 190-2700 nm の分光測定を行うことができる. 光源から出た光は回折格子によって分けられ, スリットを通しことで単色光が得られる. さらに取り出された単色光を 2 つに分けるセクタミラーが備わっており, ダブルビームでレファレンスとサンプルを同時に測定できる. ダブルビーム測定では一度にサンプルの吸光度が得られるため, 測定時間を短縮できる. 本実験では温度や光に敏感で分解されやすい色素が測定物質であったため, 迅速な測定が求められる. そこでレファレンスセルに抽出液, サンプルセルに色素を含むサンプルを入れてダブルビームで測定を行った. セルは厚み 10 mm の石英ガラスセルを用いた.

Table 2.4. 分光光度計 V-670 の仕様

光源	重水素ランプ (190-350 nm) , ハロゲンランプ (330-2700nm)
検出器	光電子倍增管 (190-750 nm) , PbS 光電導セル (750-2700 nm)
測定範囲	190-2700 nm
分解能	0.25-5 nm

[2] クロロフィルとカロテノイドの定量

Table 2.5. クロロフィル, カロテノイドの定量に用いた試薬

試薬	製造元	品番
アセトン	和光純薬	013-00356

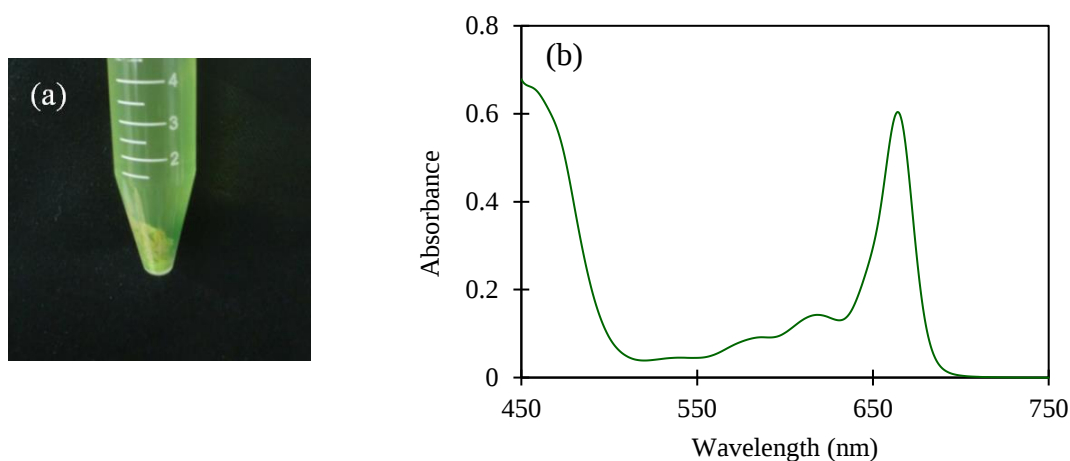


Figure 2.13. (a) : クロロフィルとカロテノイドの抽出液, (b) : 吸収スペクトルの一例 (サンプル: 栽培 4 日目のリュクトウの葉, 葉 5 枚を 10 mL の 80%アセントで抽出).

クロロフィルとカロテノイドの定量法を検証した研究は多く、アセトン、メタノール、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、クロロホルムなどの溶媒で抽出して、可視領域の吸光度を既知の式に代入することで算出できる[88-91]。本実験では試薬が安価で毒性も低いアセトンを用いて抽出を行った。5本のリュクトウから葉のみを切り取り、80%アセトン内で粉碎して暗下4℃で一晩抽出した。クロロフィルとカロテノイド量は生長に伴い増加するため、アセトンの量は栽培2日のサンプルで4 mL、3日で8 mL、4日で10 mLとした。抽出後、分解能0.2 nmで450-750 nmの吸収スペクトルを測定して、以下の式を用いてクロロフィルとカロテノイド量を算出した[89]。

$$Ca = 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8} \quad (2.11)$$

$$Cb = 21.50A_{646.8} - 5.10A_{663.2} \quad (2.12)$$

$$Cx+c = (1000A_{470} - 1.82Ca - 85.02Cb)/198 \quad (2.13)$$

Ca：クロロフィル a [μg/mL], Cb：クロロフィル b [μg/mL], Cx+c：カロテノイド [μg/mL], Ax：波長 x における吸光度

[3] アントシアニンの定量

Table 2.6. アントシアニンの定量に用いた試薬

試薬	製造元	品番
メタノール	和光純薬	132-06471
塩酸	和光純薬	080-01066
クロロホルム	和光純薬	035-02616
塩化シアニジン-3-O-グルコシド	フナコシ	MC09473

アントシアニンは溶媒の pH によって色が異なり、酸性条件下では赤～紫色を示す。この性質を利用して夾雑物の影響が少ない 520-540 nm の吸光度から定量が行われている。メタノール - 塩酸 (100:1, v/v) 内で生長したリュクトウ 1 個体を粉碎して、暗下 4℃で一晩置くと赤色の抽出液が得られる。しかし抽出液には 520-540 nm で吸収を持つクロロフィルも含まれているおり、前処理で除去する必要がある[92]。そこで抽出液に水とクロロホルムを加えて水相と有機相の二層に分離した。割合はメタノール - 塩酸：水：クロロホルム = 3:2:2 とした。アントシアニンは水相に溶けるのに対してクロロフィルは有機相に移動するため、上層の水相を取り出し吸光度の測定を行った。ただし、この液-液分離を用いてもクロロフィルの残滓が残るため、以下の式を用いた。

$$A_{\text{anthocyanin}} = A_{530} - 0.25A_{657} \quad (2.14)$$

$A_{\text{anthocyanin}}$: アントシアニンの吸光度, A_x : 波長 x における吸光度

得られた吸光度は, Figure 2.14.(d)に示した検量線を用いてシアニジン-3-O-グルコシド重量に換算した. 本実験のようにクロロフィルを含むサンプルでは上記のような前処理が必要となるが, 植物細胞や成熟した果実のようにクロロフィルを含まないサンプルでは前処理を必要とせず 520-540 nm のピークの最大値をアントシアニンの吸光度として用いることができる[93-96].

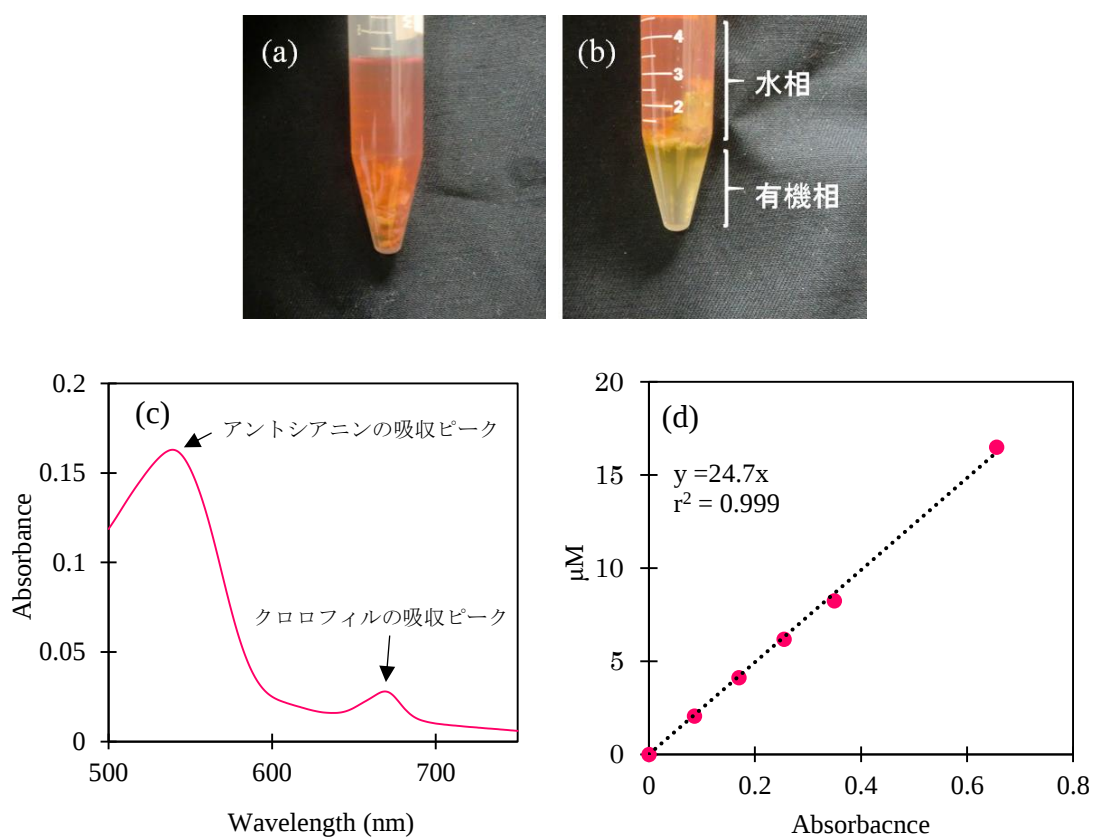


Figure 2.14. (a) : アントシアニンの抽出液, (b) : クロロホルムを用いた液-液分離, (c) : 吸収スペクトルの一例 (サンプル: 栽培 4 日目のリョクトウ, 植物体 1 本を 10 倍量のメタノール-塩酸で抽出), (d) : シアニジン-3-O-グルコシドを用いた検量線.

2-2-7 測定条件とサンプル数

生長の評価では, コントロールと CL で $n > 15$ のリョクトウを測定した. 吸光度測定は, 光によって分解されやすいクロロフィルとカロテノイドでは測定回数を 1 回のみとした. ただし吸収スペクトルに突発的なノイズが影響していないかを確認するために測定は数回繰り返し 1 回目のデータを測定値として用いた. アントシアニンでは, 1 サンプルに対して 5 回の測定を繰り返す

返し最大値と最小値を除去した 3 回の平均値を用いた。測定サンプル数はクロロフィルとカロテノイドは $n=8$ 、アントシアニンは $n=10$ とした。

2-3 結果および考察

2-3-1 生長の評価

生長に伴うリョクトウの生体重とフック角度の変化を Figure 2.15.に示す。4 日間の栽培後、コントロールと CL で生体重に変化は見られなかったがフック角度は栽培 4 日目に CL で 38%増加した。さらに栽培 4 日目で茎と根の境が明確になり側根も形成したため、シュートと根のそれぞれの生体重および側根数を計測した。その結果を Table 2.7.に示す。シュートの生体重に変化はなかったが、CL では根の生体重と側根数が有意に増加した。この生体重の増加は側根数が増加したためと言える。また先述のようにエチレンはフック角度の増加と側根形成を促進する作用がある[85]。本実験では内因性のエチレン量を直接は測定していないが、フック角度と側根数の増加は CL でエチレン生成量が増加したことを示唆する結果である。

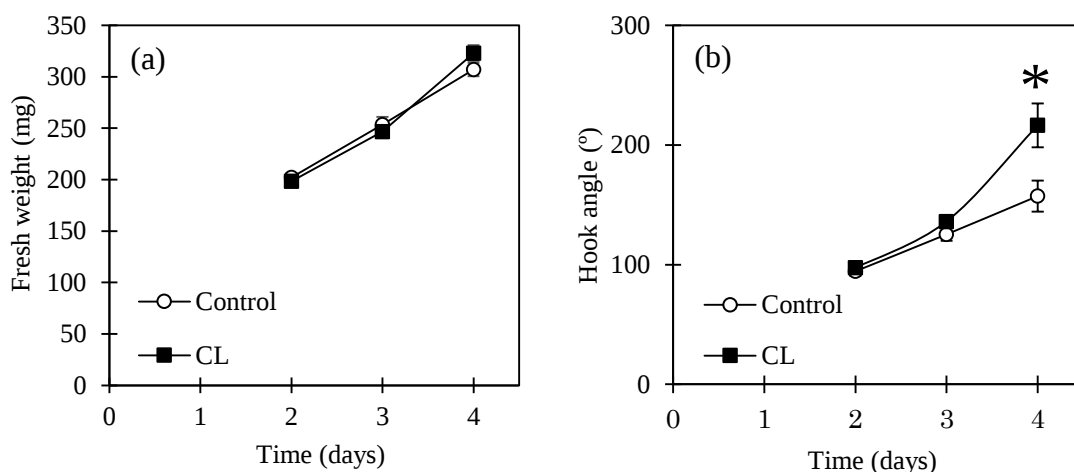


Figure 2.15. (a) : 生体重, (b) : フック角度 ($n>15$). アスタリスクは有意差を示す ($p<0.05$).

Table 2.7. 栽培 4 日目のシュート, 根の生体重および側根数 ($n>15$)

Growth condition	Fresh weight (mg)		No. lateral roots
	Shoot	Root	
Control	263.2±6.0	44.0±1.4	7.3±0.5
CL	266.9±6.4	56.1±2.3*	10.0±0.6*

アスタリスクは有意差を示す ($p<0.05$)

2-2-2 色素量の測定

色素量の測定結果を Figure 2.16 に示す。コントロールと CL を比較して、葉から抽出したクロ

ロフィル a, b およびカロテノイド量に変化は見られなかった (Figure 2.16. (a)-(c)). 一方で, CL で栽培したリョクトウでは 4 日目にアントシアニン量が減少した (Figure 2. 16. (d)). 抽出前に生体重を測定して同量の葉や植物体から色素を抽出したため, 生長の変化はアントシアニンの減少に影響していない. よって CL で見られたアントシアニンの減少は合成量の減少もしくは分解量の増加に由来すると言える.

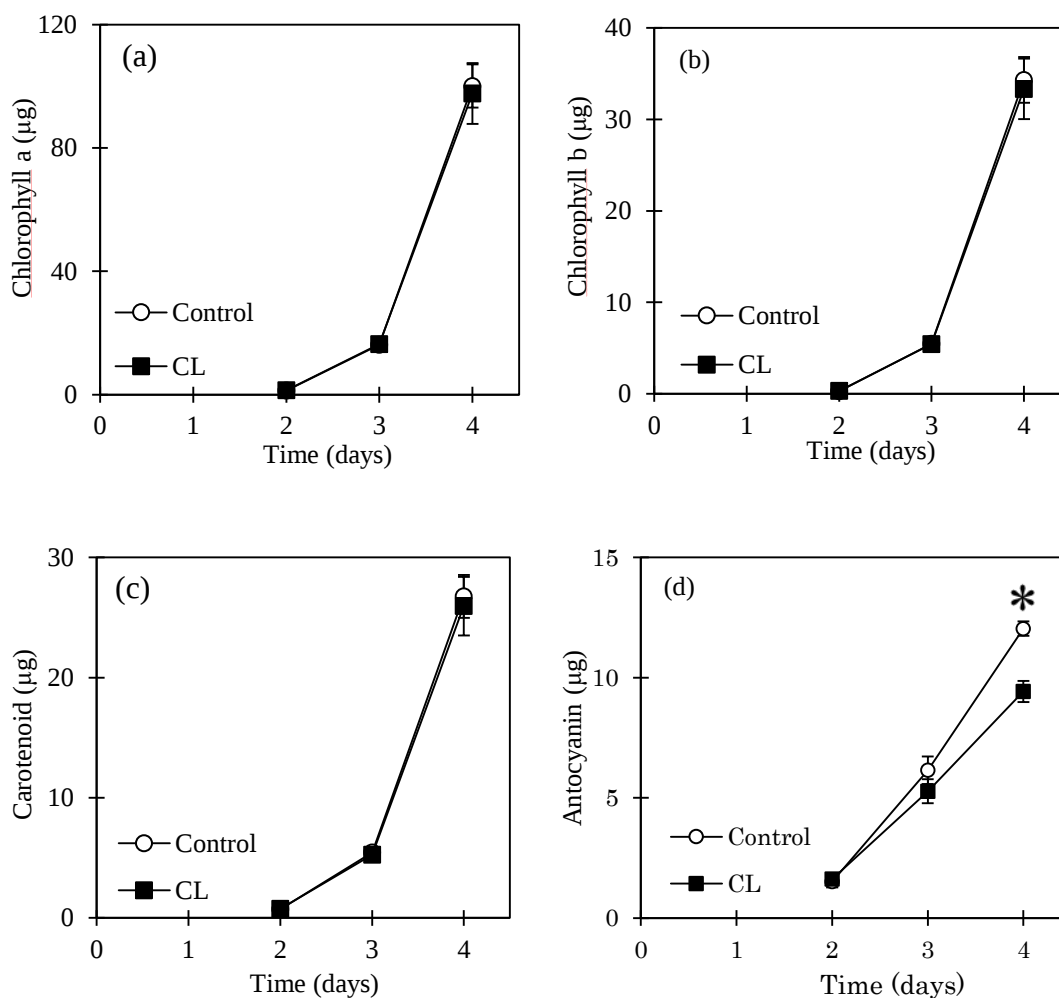


Figure 2.16. 色素量の測定. (a): クロロフィル a (n=8), (b): クロロフィル b (n=8), (c): カロテノイド (n=8), (d): アントシアニン (n=10). アスタリスクは有意差を示す ($p<0.05$).

2-2-3 阻害剤を用いた内因性エチレンの評価

CL で見られたアントシアニンの減少に内因性のエチレンが関与しているかを検討するため, 硝酸銀を含む培地で栽培したリョクトウ中のアントシアニン量を測定した. その結果を Table 2.8. に示す. CL では硝酸銀によりアントシアニン量が増加したが, コントロールでは硝酸銀の添加前後でアントシアニン量に変化は見られなかった. その結果, 硝酸銀を含む培地では CL とコン

トロールでアントシアニン量が同程度になることが確認された。よって CL で見られたアントシアニンの減少に内因性のエチレンが関与していることが示された。

CL を用いた過去の研究から擬似的な微小重力環境下で植物ホルモンが生長に影響を与えることが明らかにされている[6, 97]。さらに 3-D CL でエンバクを栽培した研究では、内因性のアブシシン酸とジャスモン酸がクロロフィルの退色を促進することが確認されている[98]。これらの結果に加えて、本実験では内因性のエチレンがリョクトウ中のアントシアニン減少に関与していることが示された。アントシアニンは、カルコンシンターゼ、ジヒドロフラボノールレダクターゼ、ロイコアントシアニンオキシゲナーゼなどの酵素の働きによってアミノ酸のフェニルアラニンから生合成される[99, 100]。エチレンは、これらアントシアニン合成酵素の発現に関わる遺伝子活性を抑制することが近年の研究で解明された[101]。従って、CL でアントシアニンが減少した要因は内因性エチレンの増加によってアントシアニンの生合成が抑制されたためと考えられる。

Table 2.8. 硝酸銀添加前後でのアントシアニン量の変化 (n=10)

Growth condition	Anthocyanin (μg)	
	Agar medium	AgNO ₃
Control	12.0 $\pm$ 0.3	11.9 $\pm$ 0.6
CL	9.4 $\pm$ 0.4 *	12.3 $\pm$ 0.6

アスタリスクは有意差を示す ($p<0.05$)

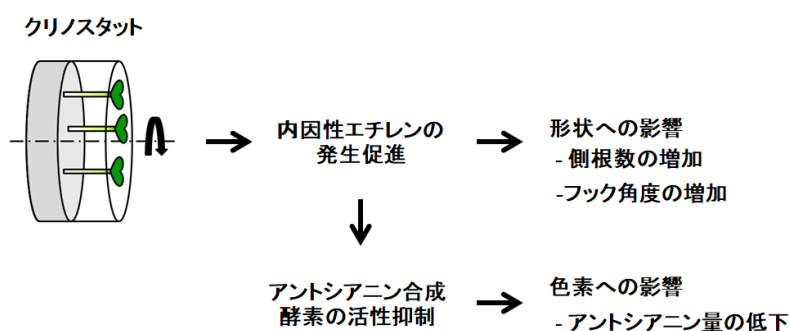


Figure 2.17. 本実験で得られた結果に対する考察. CL によりリョクトウから生成されるエチレン量が増加したため、側根数やフック角度が増加したと考えられる。またエチレンの作用でアントシアニン合成酵素の活性が抑制されたため、CL ではアントシアニン量が低下したと考えられる (本実験でエチレン量、酵素活性は未測定)。

一方で、CL でクロロフィルとカロテノイド量に変化は見られず、先行研究と異なる結果とな

った。この要因として栽培期間が4日と短く変化が見られなかった可能性が考えられる。宇宙でクロロフィルが増加した研究では、リョクトウを8日間栽培している[10]。別の植物を用いてクロロフィルとカロテノイドが減少することを明らかにした研究では、宇宙でコムギを19日[8]、ルッコラを6日[9]、CLでトマトを約3ヵ月間栽培している[5]。これらの結果と比較して、本実験での栽培期間はクロロフィルやカロテノイド量に変化が見られるのに十分ではなかった可能性が考えられる。

本実験ではCLを用いて色素量の増加させることを目指したが、期待した結果は得られなかった。しかしアントシアンのみが減少した結果はCLの農学分野への新たな応用可能性を示唆するものである。アントシアニンを多く含む農産物は渋みが強いことが知られている。例えば、ブロッコリーは低温に曝されると花芽にアントシアニンが蓄積し紫色になる。このようなブロッコリーは見た目が悪く、また渋みが強い商品価値が低下する。本実験で得られたように、CLを用いることで他の成分に影響を与えずアントシアニンのみを特異的に減少されることが可能であれば、ブロッコリーのような特定の農産物の品質向上に寄与する可能性が期待できる。今後、このような農産物をCLで栽培した場合に、アントシアニンおよび他の生体物質にどのような影響があるかを明らかにすることが求められる。

参考文献

- [1] Ferruzzi, M. G.; Blakeslee, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr. Res.* **2007**, *27* (1), 1–12.
- [2] Rao, A. V.; Rao, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* **2013**, *55*, 1–331.
- [3] De Pascual-Teresa, S.; Sanchez-Ballesta, M. T. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7* (2), 281–299.
- [4] Jagtap, S. S.; Awhad, R. B.; Santosh, B.; Vidyasagar, P. B. Effects of clinorotation on growth and chlorophyll content of rice seeds. *Microgravity Sci. Technol.* **2011**, *23* (1), 41–48.
- [5] Colla, G.; Roupael, Y.; Cardarelli, M.; Mazzucato, A.; Olimpieri, I. Growth, yield and reproduction of dwarf tomato grown under simulated microgravity conditions. *Plant Biosyst.* **2007**, *141* (1), 75–81.
- [6] Aarouf, J.; Schoëvaert, D.; Maldiney, R.; Perbal, G. Changes in hormonal balance and meristematic activity in primary root tips on the slowly rotating clinostat and their effect on the development of the rapeseed root system. *Physiol. Plant.* **1999**, *105* (4), 708–718.
- [7] Kordyum, E. L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *Plant Biol.* **2014**, *16* (SUPPL.1), 79–90.
- [8] Mashinsky, A.; Ivanova, I.; Derendyaeva, T.; Nechitailo, G.; Salisbury, F. “From seed-to-seed” experiment with wheat plants under space-flight conditions. *Adv. Sp. Res.* **1994**, *14* (11), 13–19.
- [9] Colla, G.; Battistelli, A.; Proietti, S.; Moscatello, S.; Roupael, Y.; Cardarelli, M.; Casucci, M. Rocket seedling production on the International Space Station: Growth and nutritional properties. *Microgravity Sci. Technol.* **2007**, *19* (5–6), 118–121.
- [10] Cowles, J.; Lemay, R.; Jahns, G. Seedling growth and development on Space Shuttle. *Adv. Sp. Res.* **1994**, *14* (11), 3–12.
- [11] Leather, G. R.; Forrence, L. E.; Air, P. Increased ethylene production during clinostat experiments may cause leaf epinasty. *Plant Physiol.* **1972**, 183–186.
- [12] Cottignies, A.; Jeune, B.; Corbineau, F.; Perbal, G. Increased mass production of veronica arvensis grown on slowly rotating clinostat. *Environ. Exp. Bot.* **1994**, *34* (3), 303–310.
- [13] Hilaire, E.; Peterson, B. V.; Guikema, J. A.; Brown, C. S. Clinorotation affects morphology and ethylene production in soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.* **1996**, *37* (7), 929–934.
- [14] Kang, B. G.; Burg, S. P. Involvement of Ethylene in Phytochrome-mediated Carotenoid Synthesis. *Plant Physiol.* **1972**, *49*, 631–633.
- [15] Craker, L. E.; Wetherbee, P. J. Ethylene, light, and anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* **1973**, *51* (3), 436–438.
- [16] Amir-Shapira, D.; Goldschmidt, E. E.; Altman, A. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: In vivo breakdown intermediates suggest different degradative pathways for Citrus fruit and parsley leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (7), 1901–1905.
- [17] Gong, Y.; Mattheis, J. P. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets. *Plant Growth Regul.* **2003**, *40* (1), 33–38.
- [18] Bai, Y.; Xu, Y.; Chang, J.; Wang, X.; Zhao, Y.; Yu, Z. Bioactives from stems and leaves of mung beans (*Vigna radiata* L.). *J. Funct. Foods* **2016**, *25*, 314–322.
- [19] Lai, F.; Wen, Q.; Li, L.; Wu, H.; Li, X. Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81* (2), 323–329.

- [20] Randhir, R.; Lin, Y. T.; Shetty, K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.* **2004**, 39 (5), 637-646.
- [21] Silva, L. R.; Pereira, M. J.; Azevedo, J.; Gonçalves, R. F.; Valentão, P.; de Pinho, P. G.; Andrade, P. B. Glycine max (L.) Merr., Vigna radiata L. and Medicago sativa L. sprouts: A natural source of bioactive compounds. *Food Res. Int.* **2013**, 50 (1), 167–175.
- [22] Na Jom, K.; Frank, T.; Engel, K. H. A metabolite profiling approach to follow the sprouting process of mung beans (Vigna radiata). *Metabolomics* **2011**, 7 (1), 102–117.
- [23] Kabir, M.; Rizkalla, S. W.; Champ, M.; Luo, J.; Boillot, J.; Bruzzo, F.; Slama, G. Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. *J. Nutr.* **1998**, 128 (December 1996), 35–43.
- [24] Xu, B.; Chang, S. K. C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chem.* **2012**, 134 (3), 1287–1296.
- [25] Kollárová, K.; Henselová, M.; Lišková, D. Effect of auxins and plant oligosaccharides on root formation and elongation growth of mung bean hypocotyls. *Plant Growth Regul.* **2005**, 46 (1), 1–9.
- [26] Awolunate, E. O. Accumulation and quality of storage protein in developing cowpea, mung bean and soya bean seeds. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, 34 (12), 1351–1357.
- [27] El-Adawy, T. A.; Rahma, E. H.; El-Bedawey, A. A.; El-Beltagy, A. E. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2003**, 58 (3), 1–13.
- [28] Mubarak, A. E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (Phaseolus aureus) as affected by some home traditional processes. *Food Chem.* **2005**, 89 (4), 489–495.
- [29] Tsay, J. S.; Kuo, W. L.; Kuo, C. G. Enzymes involved in starch synthesis in the developing mung bean seed. *Phytochemistry* **1983**, 22, 1573–1576.
- [30] Chopra, J.; Kaur, N.; Gupta, A. K. Ontogenic changes in enzymes of carbon metabolism in relation to carbohydrate status in developing mungbean reproductive structures. *Phytochemistry* **2000**, 53 (5), 539–548.
- [31] Jaya, T. V.; Venkataraman, L. V. Changes in the carbohydrate constituents of chickpea and greengram during germination. *Food Chem.* **1981**, 7 (2), 95–104.
- [32] Hoover, R.; Li, Y. X.; Hynes, G.; Senanayake, N. Physicochemical characterization of mung bean starch. *Food Hydrocoll.* **1997**, 11 (4), 401–408.
- [33] Martin, C.; Smith, A. M. Starch biosynthesis. *Plant Cell* **1995**, 7 (7), 971–985.
- [34] Swain, R.R.; Dekker E.E. Seed germinations studies I. *Biochica et Biophysica Acta* **1964**, 81, 620–623..
- [35] Smith, A. M.; Zeeman, S. C.; Smith, S. M. Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, 56 (1), 73–98.
- [36] Harris, N. Starch grain breakdown in cotyledon cells of germinating mung bean seeds. *Planta* **1976**, 129 (3), 271–272.
- [37] Toyooka, K.; Okamoto, T.; Minamikawa, T. Cotyledon cells of Vigna mungo seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *J. Cell Biol.* **2001**, 154 (5), 973–982.
- [38] Kuo, T. M.; VanMiddlesworth, J. F.; Wolf, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36 (1), 32–36.
- [39] Aman, P. Carbohydrates in raw and germinated seeds from mung bean and chick pea. *J. Sci. Food Agric.* **1979**, 30 (9), 869–

- [40] Monerri, C.; Garcia-Luis, A.; Guardiola, J. L. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. *Physiol. Plant.* **1986**, *67* (1), 49–54.
- [41] Okamoto, T.; Minamikawa, T. A vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP) that digests seed storage globulin: Characterization, regulation of gene expression, and posttranslational processing. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152* (6), 675–682.
- [42] Tang, D.; Dong, Y.; Ren, H.; Li, L.; He, C. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). *Chem. Cent. J.* **2014**, *8* (1), 1–9.
- [43] Souza, K. A.; Black, S. D.; Wassersug, R. J. Amphibian development in the virtual absence of gravity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (6), 1975–1978.
- [44] Suda, T. Lessons from the Space Experiment SL-J / FMPT / L7 : The Effect of Microgravity on Chicken Embryogenesis and Bone Formation. **1998**, *22* (5), 73–78.
- [45] Ijiri, K. Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of Medaka fish. *Adv. Space Res.* **1998**, *21* (8–9), 1155–1158.
- [46] Zeredo, J. L.; Toda, K.; Matsuura, M.; Kumei, Y. Behavioral responses to partial-gravity conditions in rats. *Neurosci. Lett.* **2012**, *529* (2), 108–111.
- [47] Aubry-Hivet, D.; Nziengui, H.; Rapp, K.; Oliveira, O.; Paponov, I. A.; Li, Y.; Hauslage, J.; Vagt, N.; Braun, M.; Ditengou, F. A.; Dovzhenko, A.; Palme, K. Analysis of gene expression during parabolic flights reveals distinct early gravity responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Biol.* **2014**, *16* (SUPPL.1), 129–141.
- [48] Sarkar, D.; Nagaya, T.; Koga, K.; Nomura, Y.; Gruener, R.; Seo, H. Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, *15* (3), 489–498.
- [49] Yuge, L.; Hide, I.; Kumagai, T.; Kumei, Y.; Takeda, S.; Kanno, M.; Sugiyama, M.; Kataoka, K. Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2003**, *39* (1–2), 89–97.
- [50] Takeda, M.; Magaki, T.; Okazaki, T.; Kawahara, Y.; Manabe, T.; Yuge, L.; Kurisu, K. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells. *Neurosci. Lett.* **2009**, *463* (1), 54–59.
- [51] Li, J.; Zhang, S.; Chen, J.; Du, T.; Wang, Y.; Wang, Z. Modeled microgravity causes changes in the cytoskeleton and focal adhesions, and decreases in migration in malignant human MCF-7 cells. *Protoplasma* **2009**, *238* (1–4), 23–33.
- [52] Wakayama, S.; Kawahara, Y.; Li, C.; Yamagata, K.; Yuge, L.; Wakayama, T. Detrimental effects of microgravity on mouse preimplantation development in vitro. *PLoS One* **2009**, *4* (8), 2–11.
- [53] Xiao, Y.; Liu, Y.; Wang, G.; Hao, Z.; An, Y. Simulated microgravity alters growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* (cyanophyta). *Toxicon* **2010**, *56* (1), 1–7.
- [54] Li, Z. D.; Song, Y. H.; Ma, Y. H.; Wei, H.; Liu, C. H.; Huang, J. S.; Wang, N.; Sha, J.; Sakurai, F. Influence of simulated microgravity on avian primordial germ cell migration and reproductive capacity. *J. Exp. Zool.* **2002**, *292* (7), 672–676.
- [55] Tremor, J. W.; Souza, K. A. The influence of clinorotation on the fertilized amphibian egg. *Sp. Life Sci.* **1972**, *3*, 179–191.
- [56] Anken, R. H.; Baur, U.; Hilbig, R. Clinorotation increases the growth of utricular otoliths of developing cichlid fish. *Microgravity Sci. Technol.* **2010**, *22* (2), 151–154.

- [57] Zheng, H. Q.; Wei, N.; Chen, A. D.; Wang, L. F.; Zheng, W. B.; Zhang, T. Live imaging technique for studies of growth and development of chinese cabbage under microgravity in a recoverable satellite (SJ-8). *Microgravity Sci. Technol.* **2008**, 20 (2), 137–143.
- [58] Salisbury, F. B.; Wheeler, R. M. Interpreting plant responses to clinostating. I. Mechanical stresses and ethylene. *Plant Physiol.* **1981**, 67, 677–685.
- [59] Hoson, T.; Kamisaka, S.; Masuda, Y.; Yamashita, M.; Buchen, B. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* **1997**, 203 (S1), S187–S197.
- [60] Horn, A.; Ullrich, O.; Huber, K.; Hemmersbach, R. PMT (photomultiplier) clinostat. *Microgravity Sci. Technol.* **2011**, 23 (1), 67–71.
- [61] Herranz, R.; Anken, R.; Boonstra, J.; Braun, M.; Christianen, P. C. M.; de Geest, M.; Hauslage, J.; Hilbig, R.; Hill, R. J. A.; Lebert, M.; Medina, F. J.; Vagt, N.; Ullrich, O.; van Loon J. J. W. A.; Hemmersbach, R. Ground-based facilities for simulation of microgravity: Organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology* **2013**, 13 (1), 1–17.
- [62] Brungs, S.; Egli, M.; Wuest, S. L.; Peter, P. C.; Jack, J. J.; Ngo Anh, T. J.; Hemmersbach, R. Facilities for simulation of microgravity in the ESA ground-based facility programme. *Microgravity Sci. Technol.* **2016**, 28 (3), 191–203.
- [63] Perbal, G.; Driss-Ecole, D. Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends Plant Sci.* **2003**, 8 (10), 498–504.
- [64] Volkmann, D.; Tewinkel, M. Gravisensitivity of cress roots: investigation of threshold values under specific conditions of sensor physiology in microgravity. *Plant Cell Environ.* **1996**, 19, 1195–1202.
- [65] Plieth, C.; Trewavas, A. J. Reorientation of seedlings in the Earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. *Plant Physiol.* **2002**, 129 (June), 786–796.
- [66] Blancaflor, E. B.; Fasano, J. M.; Gilroy, S. Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol* **1998**, 116 (1), 213–222.
- [67] Kiss, J. Z.; Hertel, R.; Sack, F. D. Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of Arabidopsis thaliana. *Planta* **1989**, 177 (2), 198–206.
- [68] Perbal, G. From ROOTS to GRAVI-1: Twenty five years for understanding how plants sense gravity. *Microgravity Sci. Technol.* **2009**, 21 (1–2), 3–10.
- [69] Dedolph, R. R.; Dipert, M. H. The physical basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation. *Plant Physiol.* **1971**, 47, (2003).
- [70] Driss-Ecole, D.; Jeune, B.; Prouteau, M.; Julianus, P.; Perbal, G. Lentil root statoliths reach a stable state in microgravity. *Planta* **2000**, 211 (3), 396–405.
- [71] Thorpe, T. A. History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* **2007**, 37 (2), 169–180.
- [72] 古在豊樹. 植物組織培養の新段階. 農山漁村文化協会. **1998**.
- [73] キャシー・バーカー. アット・ザ・ベンチ. メディカル・サイエンス・インターナショナル. **2000**.
- [74] Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, 15 (3), 473–497.
- [75] Murashige, T. Nutrition of plant cells and organs in vitro. *In Vitro* **1973**, 9 (2), 81–85.

- [76] Knudsen, E. T.; Rolinson, G. N.; Sutherland, R. Carbenicillin: A new semisynthetic penicillin active against pseudomonas pyocyanea. *Br. Med. J.* **1967**, 3 (5557), 75–78.
- [77] Beyer, E. M. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* **1976**, 58 (3), 268–271.
- [78] Leslie, C. A.; Romani, R. J. PlantCell Reports Salicylic acid : A new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* **1986**, 5, 144–146.
- [79] Roustan, J. P.; Latche, A.; Fallot, J. Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. *Biol. Plant.* **1990**, 32 (4), 273–276.
- [80] Chi, G. L.; Pua, E. C. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of Brassica campestris ssp. chinensis (Chinese cabbage) in vitro. *Plant Sci.* **1989**, 64 (2), 243–250.
- [81] 小柴恭一, 神谷勇治. 新しい植物ホルモンの科学 (第2版) . 講談社. **2011**.
- [82] Driss-Ecole, D.; Legué, V.; Carnero-Diaz, E.; Perbal, G. Gravisensitivity and automorphogenesis of lentil seedling roots grown on board the International Space Station. *Physiol. Plant.* **2008**, 134 (1), 191–201.
- [83] Dümmer, M.; Forreiter, C.; Galland, P. Gravitropism in Arabidopsis thaliana: Root-specific action of the EHB gene and violation of the resultant law. *J. Plant Physiol.* **2015**, 189, 24–33.
- [84] Biro, R. L.; Jaffe, M. J. Thigmomorphogenesis: Ethylene evolution and its role in the changes observed in mechanically perturbed bean plants. *Physiol. Plant.* **1984**, 62 (3), 289–296.
- [85] Ecker. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science (80-.)*. **1995**, 268 (5211), 667–675.
- [86] Vandenbussche, F.; Petrasek, J.; Zadnikova, P.; Hoyerova, K.; Pesek, B.; Raz, V.; Swarup, R.; Bennett, M.; Zazimalova, E.; Benkova, E.; Van Der Straeten, D. The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in Arabidopsis thaliana seedlings. *Development* **2010**, 137 (4), 597–606.
- [87] 日本分光 V-630/650/660/670型分光光度計 取扱説明書 ハード/機能編
- [88] Porra, R. J.; Thompson, W. A.; Kriedemann, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenerg.* **1989**, 975 (3), 384–394.
- [89] Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **1987**, 148 (C), 350–382.
- [90] Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **1994**, 144 (3), 307–313.
- [91] Moran, R.; Porath, D. Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-Dimethylformamide. *Plant Physiol.* **1980**, 65 (3), 478–479.
- [92] Rabino, I.; Mancinelli, A. L. Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiol.* **1986**, 922–924.
- [93] Suzuki, M. Enhancement of anthocyanin accumulation by high osmotic stress and low pH in grape cells (Vitis hybrids). *J. Plant Physiol.* **1995**, 147 (1), 152–155.
- [94] Mori, T.; Sakurai, M.; Seki, M.; Furusaki, S. Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, 65 (3), 271–276.
- [95] Mizukami, H.; Tomita, K.; Ohashi, H.; Hiraoka, N. Anthocyanin production in callus cultures of roselle (Hibiscus sabdariffa

- L.). *Plant Cell Rep.* **1988**, 7 (7), 553–556.
- [96] Do, C. B.; Cormier, F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* **1990**, 9 (3), 143–146.
- [97] Miyamoto, K.; Yamasaki, T.; Uheda, E.; Ueda, J. Analysis of apical hook formation in Alaska pea with a 3-D clinostat and agravitropic mutant ageotropum. *Front. Plant Sci.* **2014**, 5 (April), 137.
- [98] Miyamoto, K.; Yuda, T.; Shimazu, T.; Ueda, J. Leaf senescence under various gravity conditions: relevance to the dynamics of plant hormones. *Adv. Space Res.* **2001**, 27 (5), 1017–1022.
- [99] Winkel-Shirley, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, 126 (2), 485–493.
- [100] Koes, R.; Verweij, W.; Quattrocchio, F. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* **2005**, 10 (5), 236–242.
- [101] Jeong, S. W.; Das, P. K.; Jeoung, S. C.; Song, J. Y.; Lee, H. K.; Kim, Y. K.; Kim, W. J.; Park, Y. I.; Yoo, S. D.; Choi, S. B.; Choi, G.; Park, Y. I. Ethylene suppression of sugar-induced anthocyanin pigmentation in arabidopsis. *Plant Physiol.* **2010**, 154 (3), 1514–1531.

3 章 クリノスタットで栽培したリョクトウの抗酸化作用の評価

3-1 実験目的

2 章で示したように CL でリョクトウを栽培すると一部の色素量に変化は見られたが、リョクトウの機能性が向上するか低下するかは未だに定かでない。CL で機能性農産物の生産が可能であるかを明らかにするには個々の成分分析だけでなく、農産物の機能性を直接評価することが求められる。その一つとして抗酸化作用が挙げられる。抗酸化物質には病気や老化の原因となる有害な活性酸素を分解する働きがあり、抗酸化作用が高い農産物を摂取することで病気の予防やアンチエイジングに繋がる。不対電子を持つフリーラジカルは酸化作用を示す物質で、抗酸化物質と反応すると不対電子が放出され物性が変化する。2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl : 以下 DPPH と記す) や 2,2-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) : 以下 ABST と記す) などのように不対電子の有無により色が変わる人工的なフリーラジカルは農産物・食品の抗酸化作用を調べる研究で活用されている[1, 2]。また農産物に含まれる主要な抗酸化物質はカロテノイド、フェノール化合物、ビタミン C (アスコルビン酸) であり[3]、これらの物質も同時に評価することで抗酸化作用との関係性を明らかにできると考えられる。さらにリョクトウ種子に含まれるデンプンは発芽後に様々な生体物質を合成するための材料であり、また過去の宇宙実験で抗酸化物質の変化に関わっている可能性が示唆されている。例えば大豆に含まれるポリフェノールが増加することを発見した研究では同時にデンプン量の低下も測定されている[4]。またグルコシノレートが増加したアブラナでもデンプン量の低下が確認されている[5]。つまりデンプン量やデンプン分解酵素の α -アミラーゼに着目することで、微小重力環境下で見られる抗酸化作用が変化する要因を解明できると考えられる。

本章では抗酸化作用に注目して、CL を活用することでリョクトウの抗酸化作用が向上するかを明らかにしていく。そこでフリーラジカルを用いた抗酸化作用の評価と抗酸化物質の定量を行った。また子葉の α -アミラーゼ活性とデンプン量も合わせて測定し、抗酸化作用との関係性を検討した。

3-2 実験装置および方法

3-2-1 栽培方法

実験試料および装置は 2 章で示したリョクトウ種子と CL を使用した。予備実験でスクロースやムラシゲ・スカーグ培地などを含まない方が、CL でリョクトウの形態がより顕著に変化することが観察された。よって本章では 0.8%の寒天のみを含む培地 (pH: 5.8-6.1) でリョクトウを 4 日間栽培した。培地の組成を変更したため、生体重や長さなど生長の評価も再度行った。

3-2-2 長さの解析

シュートと根の長さを測定するため、スキャナー (GT-X900, EPSON) により 200 dpi でリョ

クトウの画像を取得した。その後、画像解析ソフトウェア WinROOF (version 6.1.1, 三谷商事) を用いて解析を行った。「計測」→「手動計測」→「ライン長計測」の機能は手動で描いた直線や曲線の長さを計測できるため、植物のように曲がった対象物の計測に適している。先行研究を参考にしてシュートの長さは葉を除いた胚軸の長さとした[6] (Figure 3.1.)。データはピクセルで出力されるため、長さが既知の紙を用いて 1 cm が 78.7 ピクセルであることを確認して長さに換算した。

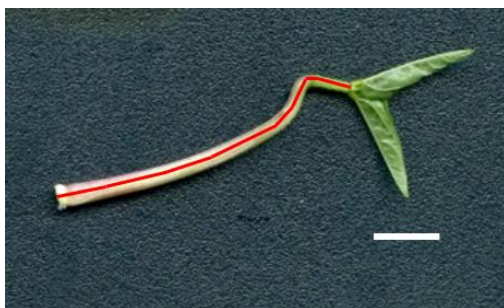


Figure 3.1. WinROOF「ライン長計測」を用いた解析方法の例。赤線が手動で描いた線を表し、その合計ピクセルを長さに換算した（スケール：1 cm）。

3-2-3 抗酸化物質の定量方法

[1] 前処理

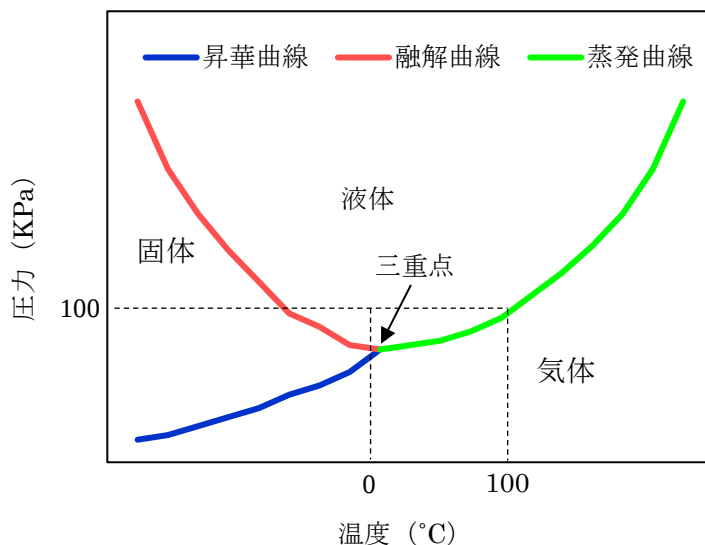


Figure 3.2. 水の状態曲線[8, 9]. 凍結乾燥（低温低圧）状態では、氷は水蒸気へと昇華する。

抗酸化物質の抽出効率を高めるため、凍結乾燥処理を行った。凍結乾燥は低温低圧下で試料中

の凍結した水（氷）を除去する技術である。水分量や乾物重量の計測に用いられる加熱乾燥と比較して、凍結乾燥は熱変性する試料にも使用できるため生体試料を乾燥する場合に利用されている。一方で、乾燥に時間がかかることや結合水などは除去できないといったデメリットもある[7]。以下では、凍結乾燥の原理と使用した装置について説明する。



Figure 3.3. FDU-1200 の外観。 (a) : 凍結乾燥機, (b) : 装置内部の冷却コイル。

Table 3.1. 凍結乾燥機 FDU-1200 の仕様。

冷却方式	冷却コイル方式
冷却温度	-45 °C 以下
除湿量	1 回で最大 1 L
冷媒	ハイドロフルオカーボン
真空計	0.0 - 533.3 Pa
使用周囲温度範囲	5 - 35 °C

Figure 3.2.に水の状態曲線を示す。通常圧下において水は温度上昇と共に固体、液体、気体へと状態変化するが、低圧下では液体にならず固体から気体へと昇華する。水の三重点は 0.01 °C, 0.6 KPa であるため、温度と圧力をこれ以下に設定すれば氷は水蒸気へと変化する。

凍結乾燥機（FDU-1200, 東京理化工機）は冷却コイルを用いて装置内部を-45 °C 以下の低温、真空ポンプ（GLD-051, アルバック機工）で 10 Pa 以下の低圧に保つことができる。装置の仕様は Table 3.1.に示す。本体と試料容器を繋ぐユニットは 4 本に枝分かれしたフラスコ用多岐管（PMH-4A, 東京理化工機）を用いた。このユニットは用途に応じて交換でき、バイアル瓶を直接繋げる多岐管やデッシュを置くことができるドライチャンバーなども使用できる。凍結したサンプルは付属の凍結乾燥瓶に入れユニットと連結させる。凍結乾燥瓶にキムタオルなどを入れると外気を遮断でき、試料の融解を防ぐことができる。使用後はサンプルから除去された水が装置内に残るため、必ずドレインバルブを開き排水する必要がある。水が残った状態で再び使用

すると、真空ポンプのオイルに水が溶けこみ減圧の妨げや故障の原因となる。

真空ポンプの排気口にはミストトラップ (OMT-050A, アルバック機工) を接続した。ミストトラップは煙状になったオイルの揮発を防ぎモータの熱だけを排気する効果があるため、オイルの消費や装置周辺環境の汚れ防止となる。また、定期的に真空ポンプの掃除やオイル交換が必要で、異物を吸引しポンプの排気音が大きくなった時やオイルが水を吸い白濁もしくは酸化により黒ずんだ時などが目安である。使用済みのオイルは非ハロゲン廃油として処理する。

栽培後、リョクトウは液体窒素で瞬時に凍結させ、2 日以上凍結乾燥した。凍結乾燥した植物サンプルは -80 °C であれば数ヵ月間保存できる[7, 10]。そこで凍結乾燥したリョクトウを乳棒と乳鉢で粉体にしてから -80 °C のフリーザー (マイバイオ VT-78, 日本フリーザー) で保存した。

[2] カロテノイドの定量

2 章に示したようにカロテノイドは 80%アセトンで抽出して定量を行った[11]。ただし、本実験では凍結乾燥した粉体をサンプルとした。

< 実験手順 >

- (1) 50 mg のリョクトウ粉体に 80%アセトン 8.0 mL を加えて、4 °C に 48 時間置き、カロテノイドを抽出した。
- (2) 3,000 g で 10 分間遠心分離した後、上清液を 0.45 μm のメンブレンフィルタでろ過した。
- (3) 紫外可視近赤分光光度計 V-670 を用いて、分解能 0.2 nm で 450-750 nm の吸光スペクトルを測定した。
- (4) 2 章で示した式 (2.11)-(2.13) に測定値を代入して、カロテノイド量を算出した。

[3] フェノール化合物の定量

農産物中にはイソフラボン、フラボノイド、アントシアニン、タンニンなど多様なフェノール化合物が含まれている。液クロなどの分析装置で一つ一つの物質を定量できるが、化合物の種類が多いため総量を測定することは困難である。そこで、フォーリン-チオカルト試薬を用いた呈色方法が利用されている。従来、フォーリン-チオカルト試薬はタンパク質分析に利用されていたが[12]、研究が進むにつれフェノールなどの分析にも活用できることが明らかになった[13]。フォーリン-チオカルト試薬の製造では、まずはモリブデン酸ナトリウムとタングステン酸ナトリウムを水溶液中で加熱した後、塩酸、リン酸、水を添加する。その後、硫酸リチウムを加えると黄色のフォーリン-チオカルト試薬が得られる。ただし、フェノール定量法として普及した現在でも、フォーリン-チオカルト試薬の含有成分は未だ明らかになっていない。タングステン-モリブデンリン酸がフェノールによって還元されると $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ が形成され、黄色の水溶液が青色に変化すると考えられている[1]。この青色強度からサンプル中のフェノール化合物を定量できる。以下では用いた試薬と実験手順を示す。

Table 3.2. フェノール化合物の定量に用いた試薬.

試薬	製造元	品番
アセトン	和光純薬	013-00356
フォーリン-チオカルト液	シグマアルドリッチ	F9252-100ML
炭酸ナトリウム	和光純薬	197-015
没食子酸一水和物	和光純薬	077-06092

< 実験手順 > [14]

- (1) 100 mg のリョクトウ粉体に 80%アセトン 2.5 mL を加えて、4 °C に 48 時間置き、フェノール化合物を抽出した.
- (2) 抽出液を 0.45 μm のメンブレンフィルタでろ過した.
- (3) 100 μL の抽出液に 2.5 mL の 10 倍希釈フォーリン-チオカルト液を加え、1 分間振とうし、さらに 4 分間静置した.
- (4) 濃度 60 mg/mL に調整した炭酸ナトリウム 2.5 mL を加えて、常温暗下で 2 時間反応させた.
- (5) 725 nm の吸光度を測定した (得られた吸光度を A_{sample} とする).
- (6) サンプルを含まない抽出液を同様にフォーリン-チオカルト液と反応させて、725 nm の吸光度を測定した (得られた吸光度を A_{blank} とする).
- (7) A_{sample} と A_{blank} の差を測定値として用いた.

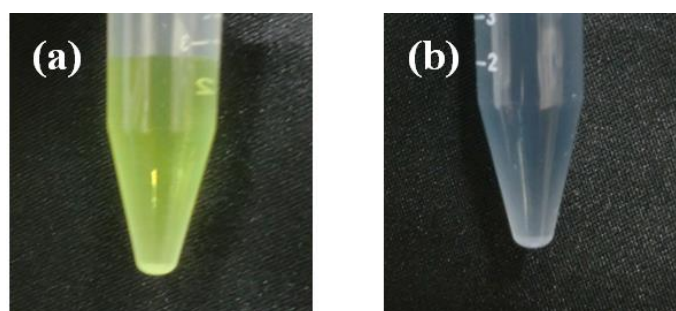


Figure 3.4. フォーリン・チオカルト試薬を用いたフェノール化合物の定量方法. (a): 反応前のフォーリン-チオカルト試薬, (b): 反応後の溶液.

フェノール化合物の標準品として没食子酸 (gallic acid) が用いられているため[10], 没食子酸量と吸光度との検量線を作成して (Figure 3.5. (a)), リョクトウ抽出液で得られた吸光度を重量に換算した.

[3] アスコルビン酸の定量

植物や食品中のアスコルビン酸の定量には液クロや滴定法が用いられることが多いが、夾雑物の除去など煩雑な前処理を必要とする. そこで本実験ではモリブデン青法を用いた[15]. この

方法は酸性条件下でアスコルビン酸によりモリブデンリン酸錯体が還元されると青色を発する性質を利用したもので、アスコルビン酸の量が多ければ反応液は濃い青色を示す。その強度を測定することで間接的にアスコルビン酸を定量できる。他の測定法と比較して簡便であるため、植物や食品だけでなく血液などに含まれるアスコルビン酸の定量にも利用されている。以下に用いた試薬と実験手順を示す。

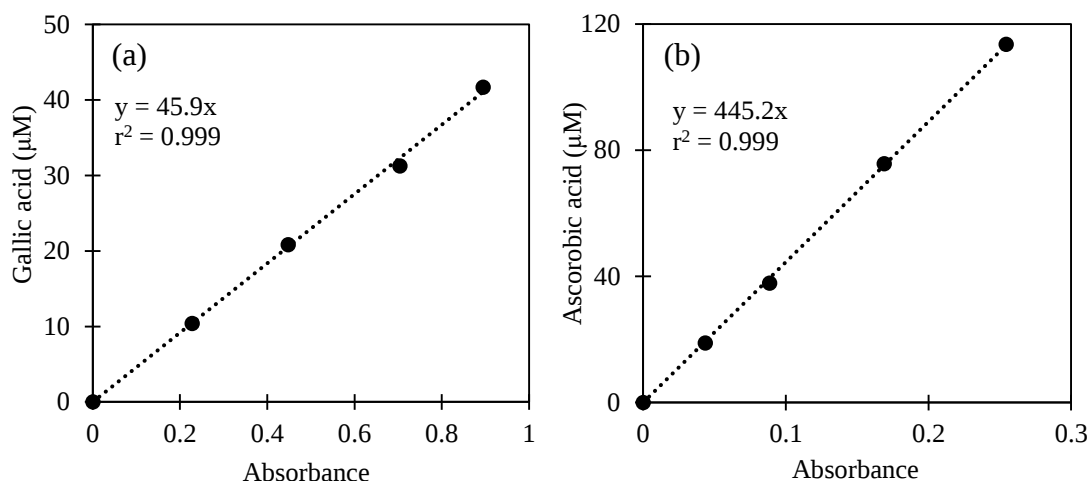


Figure 3.5. (a) : 没食子酸, (b) : アスコルビン酸標準品を用いた検量線.

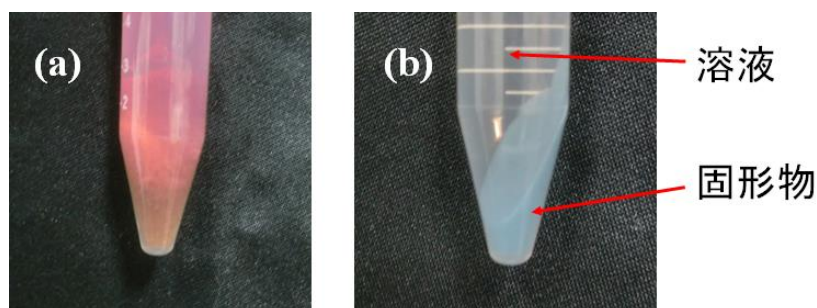


Figure 3.6. モリブデン青法によるアスコルビン酸の定量方法. (a) : リョクトウ抽出液, (b) : 反応後の溶液. 夾雑物は溶解せず固形物として沈殿する.

< 実験手順 >

- (1) 200 mg のリョクトウ粉末に 0.05 M シュウ酸-0.2 mM EDTA 混合液 7.5 mL を加えて、常温に 12 時間置き、アスコルビン酸を抽出した。
- (2) 3,000 g で 5 分間遠心分離した後、抽出液を 0.45 μm のメンブレンフィルタでろ過した。
- (3) 5 mL の抽出液に 0.5 mL のメタリン酸-酢酸混合液, 1 mL の 5%硫酸を加えた後、さらに 2 mL の 5%モリブデン酸アンモニウム水溶液を加えた。
- (4) 常温暗下で 15 分間反応させた後、3,000 g で 2 分間遠心分離して固形物を沈殿させた。

- (5) 上清液を $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルタで再度ろ過し、 $760\ \text{nm}$ の吸光度を測定した（得られた吸光度を A_{sample} とする）。
- (6) サンプルを含まない抽出液を同様に反応させ、 $760\ \text{nm}$ の吸光度を測定した（得られた吸光度を A_{blank} とする）。
- (7) A_{sample} と A_{blank} の差を測定値として用いた。

Table 3.3. アスコルビン酸の定量に用いた試薬.

試薬	製造元	品番
シュウ酸	和光純薬	156-00452
エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	関東化成	E0084
メタリン酸	和光純薬	135-12755
酢酸	和光純薬	017-00256
硫酸	和光純薬	192-04696
モリブデン酸アンモニウム	和光純薬	018-26661
アスコルビン酸	和光純薬	014-04801

メタリン酸-酢酸混合液は反応促進剤で、従来 1 時間程度かかっていた呈色反応を数分で終了させることができる[16]。またキレート剤である EDTA を添加することで、アスコルビン酸を分解する金属イオンの作用を抑制できる。得られた吸光度はアスコルビン酸標準品を用いた検量線により重量に換算した (Figure 3.5. (b))。

3-2-4 抗酸化作用の評価

DPPH は数少ない安定したラジカルで抗酸化作用の評価によく用いられている。DPPH をエタノールやメタノールなどの有機溶媒に溶解させると、 $520\ \text{nm}$ 付近に吸収ピークを示す紫色の水溶液となる。抗酸化物質の影響で DPPH から不対電子が分離すると水溶液は黄色に変色するため、 $520\ \text{nm}$ 付近の吸光度変化からサンプルの抗酸化作用を評価できる。

ABTS は 1993 年に抗酸化作用の評価に活用できることが発表されて以降[17]、改良が重ねられ現在では頻繁に使用されるラジカルとなった[18]。ABTS-二アンモニウム塩にペルオキシ二硫酸カリウムを加えると、ラジカルを持つ ABST^+ が発生して濃い青色の水溶液が得られる。抗酸化物質と反応すると溶液は薄い水色へと変色する。農産物の抗酸化作用を評価する実験では、数種類のラジカルが活用されることが多いため[2, 19]、本研究でも DPPH と ABTS の 2 種類を用いた。以下、抗酸化作用の評価に用いた試薬と実験手順を示す。

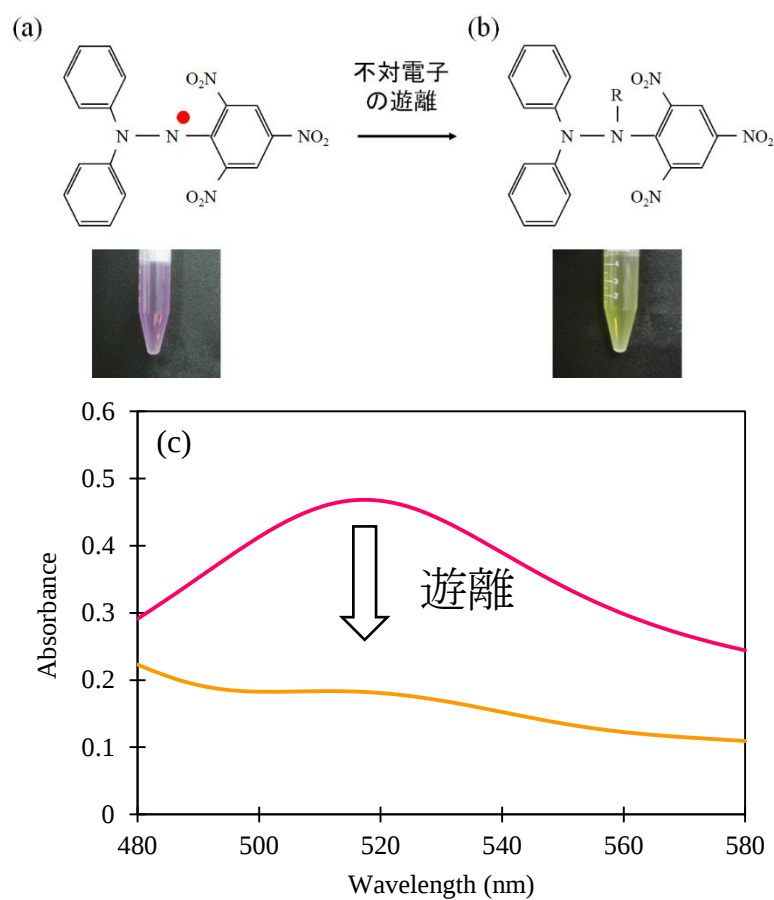


Figure 3.7. (a) : 不対電子を持つ DPPH (赤丸 : 不対電子), (b) : 不対電子遊離後の DPPH, (c) : 吸収スペクトルの変化.

Table 3.4. 抗酸化作用の測定に用いた試薬.

試薬	製造元	品番
DPPH	東京化成	D4313
ABTS-二アンモニウム塩	和光純薬	018-10311
ペルオキシ二硫酸カリウム	シグマアルドリッチ	216224-5G
6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (通称: トロロックス)	東京化成	H0726

< DPPH 測定の実験手順 > [20]

- (1) 100 mg のリョクトウ粉体に 80%アセトン 2.5 mL を加えて、4 °C に 48 時間置き、抗酸化物質を抽出した。
- (2) 抽出液を 0.45 µm のメンブレンフィルタでろ過した。
- (3) 抽出液 0.1 mL とエタノールに溶解した 0.1 mM の DPPH 3.9 mL を混ぜ、1 分間振とうした。
- (4) さらに常温で 30 分間反応させた。
- (5) 517 nm の吸光度を測定した（得られた吸光度を A_{sample} とする）。
- (6) サンプルを含まない抽出液を同様に反応させ、517 nm の吸光度を測定した（得られた吸光度を A_{blank} とする）。
- (7) $[1-(A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}})] \times 100$ を DPPH 分解率として用いた。
- (8) 得られた分解率は Figure 3.9.(a)に示した検量線を用いてトロロックス重量に換算した。

< ABTS 測定の実験手順 > [21]

- (1) ABTS-二アンモニウム塩 7 mM とペルオキシ二硫酸カリウム 2.45 mM を含む水溶液を常温で 60 時間以上置き、 ABTS^+ を発生させる。
- (2) 734 nm の吸光度が 0.7 ± 0.02 になるように反応液を水で希釈した。
- (3) (2)の溶液 3.5 mL に DPPH 測定と同様な抽出液を 0.1 mL 加え、1 分間振とうした。
- (4) 常温でさらに 5 分間反応させた後、734 nm の吸光度を測定した（得られた吸光度を A_{sample} とする）。
- (5) サンプルを含まない抽出液を同様に ABTS^+ と反応させ、734 nm の吸光度を測定した（得られた吸光度を A_{blank} とする）。
- (6) $[1-(A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}})] \times 100$ を ABTS 分解率として用いた。
- (7) 得られた分解率は Figure 3.10.(b)に示した検量線を用いてトロロックス重量に換算した。

3-2-5 α -アミラーゼ活性の測定

植物の抽出液とデンプン標準品を溶かした溶液とを反応させ、デンプン分解量を測定することで α -アミラーゼ活性を測定できる。反応液にヨウ素液を加えると反応前は青紫色を呈するが、デンプンが分解されると赤褐色へと変化するため可視領域の吸光度変化からデンプン分解量を知ることができる。以下では、具体的な実験手順を示す。

< アミラーゼ測定の実験手順 > [22]

- (1) リョクトウ 1 本から 2 つの子葉を切り取り、予め 4 °C で保存して 50 mM のリン酸カリウムバッファー (pH 6.8) を加えて乳鉢ですり潰した。
- (2) 抽出液を 1.5 mL のマイクロチューブに移して、4 °C , 10,000 g の条件で 10 分間遠心分離した。
- (3) 1%デンプン溶液 0.5 mL, 0.1 M の酢酸ナトリウムバッファー 0.3 mL, 超純水 0.1 mL を含む

溶液を予め 55 °C で加温しておく.

- (4) (3)の溶液に(2)の抽出液を 0.1 mL 加え, 55 °C で 5 分間加温した.
- (5) 反応後すぐに 1 M の塩酸 0.5 mL を加え, 酵素を失活させ反応を停止させた.
- (6) (5)の反応液 0.2 mL に 1 M の塩酸 0.1 mL, 0.2%のヨウ素液 0.1 mL を加えて, さらに全量が 10 mL になるように水で希釈した後, 610 nm の吸光度を測定した (得られた吸光度を A_{sample} とする).
- (8) 予め塩酸を加えアミラーゼを失活させた抽出液を(4)-(6)の手順で同様に測定した (得られた吸光度を A_{blank} とする).
- (9) $[1-(A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}})] \times 100$ をアミラーゼによるデンプン分解率として用いた.
- (10) 得られた分解率は α -アミラーゼ標準品の重量に換算した.

Table 3.5. アミラーゼ活性の測定に用いた試薬.

試薬	製造元	品番
りん酸水素二カリウム	和光純薬	160-04292
りん酸二水素カリウム	和光純薬	165-04242
酢酸ナトリウム	和光純薬	192-01075
超純水	和光純薬	214-01301
塩酸	和光純薬	080-01066
デンプン (溶性)	関東化学	鹿 1 級
ヨウ素	和光純薬	099-05432
ヨウ化カリウム	和光純薬	161-03982
α -アミラーゼ	シグマアルドリッチ	A3176-500KU

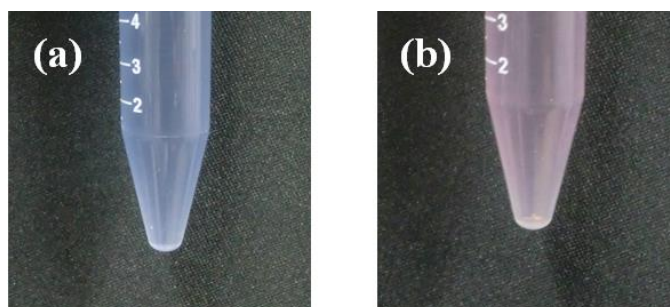


Figure 3.10. α -アミラーゼの測定方法. (a) : 反応前のデンプン溶液, (b) : 反応後の溶液.

3-2-6 デンプンの定量方法

リョクトウに含まれるデンプンは酵素法で定量した[23]. この方法では α -アミラーゼとアミログルコシダーゼでデンプンを分解して, 生成されたグルコースの定量を行う. 本実験では, グル

コースの定量評価に高速液体クロマトグラフィー（High-performance liquid chromatography：以下 HPLC と記す）を用いた。

[1] HPLC の原理と装置[24-26]



Figure 3.11. HPLC の外観.

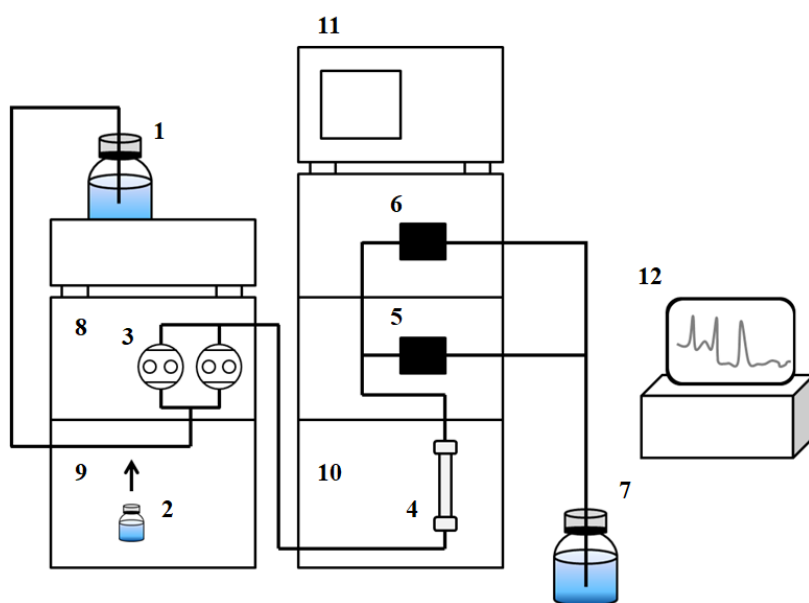


Figure 3.12. 装置の模式図. 1：溶離液（移動相），2：サンプル，3：ポンプ，4：カラム，5：UV 検出器，6：示唆屈折率検出器，7：廃液，8：送液ユニット，9：オートサンプラ，10：カラムオーブン，11：システムコントローラ，12：クロマトパック.

HPLC はカラムで分離した成分を吸光度検出器や示差屈折検出器などを用いて定量する装置である。HPLC の最大の特徴は極めて高感度であり、近年の研究ではアトモル (10^{-18} mol) やzeptoモル (10^{-21} mol) レベルでの定量も行われている。以下では今回のグルコースの測定に使用した装置だけでなく、本研究グループが活用している全ての装置やカラムについても合わせて説明する。

Table 3.6. HPLC の主な仕様.

ポンプ	流速	0.0001 - 10 mL/min
	精度	± 0.5 μ L
UV 検出器	検出波長	190 - 700 nm
	分解能	1 nm
オーブン	カラム温度	4 - 85 °C
	分解能	1 °C
装置使用温度		4 - 35 °C

(1) 送液ユニット (LC-20AD)

移動相を流路内に送る送液ユニットは 2 台のポンプが内蔵されたダブルプランジャーポンプを用いた。ポンプが 1 台の場合、溶液の吐出と吸引の切り替え時に流路内の圧力が一瞬低下して、ベースラインの変動やゴーストピークの要因となる。2 台のポンプを用いることで流路内の圧力を一定に保ち、このようなノイズを低減できる。またポンプを 2 台内蔵しているため、分析中に移動相の混合比を変えるグラジエント方式での分析も可能である。ポンプ内部はルビーやサファイヤが用いられており有機溶剤に冒されにくい構造となっている。流路内に溶け込んだ気泡は大きなノイズとなるため、毎回装置を立ち上げる際に移動相を流して脱気する必要がある。そこで測定前に 8.0 mL/min で 3 分間移動相を流した。

(2) オートサンプラ (SIL-20AC)

オートサンプラは、試料を流路内に注入するシステムである。試料は専用のホウ硅酸ガラス製の試料びんに入れてサンプルラックにセットする。サンプリングニードルが設定量の試料を吸い上げて注入ポートから流路内に運ばれる。

SIL-20AC では装置内を 4 - 40 °C の範囲で調整できるため、常温で分解されやすい試料でも長時間置くことができる。またサンプルラックには最大で 70 本の試料びんをセットでき、プログラムを作成すれば自動で連続分析することも可能である。ただし連続分析ではキャリーオーバーが発生しやすくなる。キャリーオーバーとは前回計測した試料がサンプルニードルに残り次のサンプルに混入すること

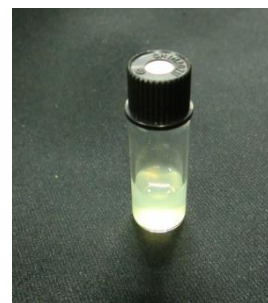


Figure 3.13. 試料びん

を言い、波形の乱れや再現性に低下を引き起こす。計測前にニードルを洗浄することでキャリーオーバーを防ぐことができ、移動相と同じ溶液を洗浄液として用いた。洗浄液は洗浄ポートに貯められ試料吸引前にニードルが洗浄される。洗浄液が洗浄ポートに運ばれる流路内も脱気する必要があり、測定前に毎回 25 分間脱気を行った。

(3) 検出器

検出器は示唆屈折率検出器（別名：RI（Refractive index）検出器）と紫外可視領域の吸光度検出器を使用している。

(I) RID-20A

RI 検出器は屈折率が試料の濃度によって変化するのを利用したものである。ベースラインが変動しやすく、また測定感度は高くないためサンプル量が多く必要になる場合もあるが、糖のように紫外可視領域で吸収を持たない成分分析で威力発揮する。Figure 3.14.に RI 検出器の光学系を示す。LED 光源から出た光はレンズ、スリットを通過した後、フローセルを平行光線で通過する。セルはサンプル側とリファレンス側の 2 つの部屋があり、斜めのガラス版で仕切られている。セルを通った光はミラーで反射してフォトダイオードに届く。サンプルが流れ屈折率が変化するとその屈折率差に比例して、フォトダイオード上で光の像が水平方向に移動するため、その像の位置に比例した電気信号が検出器に送られる。よって測定時にはサンプルセルとリファレンスセルは使用する移動相で満たしておく必要があり、測定前に毎回 30 分間オートページを行い両セルに移動相を流した。

屈折率は圧力によって大きく影響を受ける。圧力が 10 hPa 変化すると有機溶媒の屈折率が 0.1 μ RIU 変化する。サンプルセルとリファレンスセルで相殺されるのでこの変化がクロマトに直接影響するわけではないが、悪天候や台風の日など気圧が変わることが予想される日の測定は避けるべきである。また直風が当たるとベースラインの変動を引き起こすため、装置の設置場所なども考慮する必要がある。

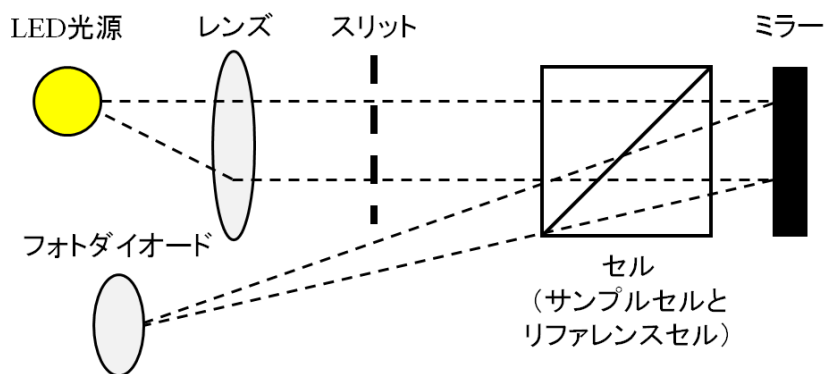


Figure 3.14. 示唆屈折率検出器の光学系.

(II) SPD-20A

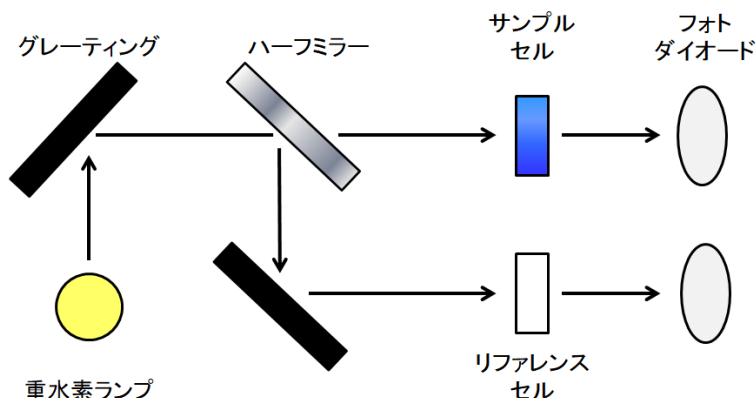


Figure 3.15. 吸光度検出器の光学系.

SPD-20A は紫外可視領域の吸光度測定で対象物質を定量する. 光源は重水素ランプで 190 - 700 nm の範囲で波長を設定できる. Figure 3.15.に吸光度検出器の光学系を示す. 2 章の分光器と同様で HPLC の検出器でも光源から出た光は回折格子により分光され, ハーフミラーを通りリファレンスセルとサンプルセルに届く. リファレンスセルには空気が含まれており, サンプルセルには移動相が流れている. それぞれのセルを通過した光はフォトダイオードで測定される. セルは石英素材で容量 12 μ L, 厚さ 10 mm である.

(4) カラムとオープン (CTO-20AC)

カラムは用途に応じてアミノカラム (Luna 250 mm $\times$ 4.6 mm, 島津ジーエルシー) と C_{18} 逆相カラム (VP-ODS 150 mm $\times$ 4.6 mm, 島津ジーエルシー) を用いた. アミノカラムはシリカゲル基材にアミノプロピル基を化学結合した固定相で糖類の分離に用いられている. ODS カラムは乾燥したシリカゲルに無水トルエンを加えた後, シランカップリング剤を滴下して作製される. 試料に含まれる成分は一度カラムに保持された後, 溶解度が高いものから順に溶出される. C_{18} カラムは現在最も多用されているカラムで移動相を工夫すれば高分子やイオンを除きほとんどすべての成分を測定できる.

カラムを長期間使用すると内部構造の剥離や目詰まりを起し物質を保持できなくなる. このような状態になったら新品に交換するべきであるが, 使用中や使用後の適切な処理によりカラムの劣化を防ぎ長期間使用することが可能となる. 劣化の主な要因はカラムにかかる圧力であるため測定中でも 20 MPa 以下に保つことが大切である. 送液ユニット (LC-20AD) に内部圧が表示されるため参考となる. 使用後は 100%メタノールを 1 mL/min で 30 分程度流すとカラムに吸着した試料成分を除去できる. また有機溶媒を充填することで微生物の発生を防ぎ, カラムの寿命を延ばす効果もある. カラムの洗浄はアセトニトリルでも可能だがメタノールより 4-5 倍高価であるため, ここではメタノールの使用を推奨する.

カラムの温度は流速・物質の保持時間に影響を与える要因で測定中は一定に保つ必要があり,

微細な温度変化でも再現性の低下に繋がる．CTO-20AC は長時間使用しても ± 0.1 °C 以上の温度変動が起こらないように設計されている．

(5) クロマトパック (C-R8A)

クロマトパックは測定データを横軸：測定時間，縦軸：電圧値の波形に変えるデータ処理装置である．

(6) システムコントローラ (SCL-10Avp)

LC-20AD, SIL-20C, SPD-20A, CTO-20A の操作を行うコントローラとして使用した．

[2] デンプンの定量

一般的に糖の分析では示差屈折率検出器とアミノカラムが用いられるため本研究でも同様な方法を用いた．吸光度検出器でも測定は可能であるが，紫外可視領域で吸収ピークを持つ物質を修飾する必要があり，時間を要するといったデメリットがある．以下，デンプンの加水分解から定量までに用いた試薬と実験手順を示す．

Table 3.7. デンプンの定量に用いた試薬．

試薬	製造元	品番
無水エタノール	和光純薬	321-00025
酢酸ナトリウム	和光純薬	192-01075
アセトニトリル	和光純薬	019-08631
酢酸	和光純薬	017-00256
α -アミラーゼ	シグマアルドリッチ	A3176-500KU
アミログルコシダーゼ	シグマアルドリッチ	10115-1G-F
グルコース	Serva	22700.01

< 実験手順 > [23]

- (1) 20 mg のリョクトウの粉体に 60 °C の 80%エタノールを 5 mL 加えて，1 分間激しく混ぜ合わせる．
- (2) 60 °C のウォーターバスで 5 分間振とうさせる．
- (3) 3,000 g で 5 分間遠心分離後，上清液のみを除去した．
- (4) (1)-(3)のエタノール抽出を合計 4 回繰り返し，内因性のグルコースを除去した．
- (5) 残った固形物をオーブンで乾燥させた後，蒸留水を 2 mL 加えて 121 °C に設定したオートクレープで 30 分間加熱した．
- (6) オートクレープ処理したサンプルを常温まで冷ましたから α -アミラーゼ (≥ 1 unit) とアミノ

グルコシダーゼ (≥10 units) を含む酢酸ナトリウムバッファーを 2 mL 加え, 37 °C で一晩加温した.

(7) 反応液を 0.45 μm のメンブレンフィルタでろ過した後, HPLC で測定した.

((1)-(4) : 内因性グルコースの除去, (5)-(6) : 酵素による加水分解, (7) : HPLC での測定)

移動相にはアセトニトリルと水を 70 : 30 で混合した溶液を用い 1.0 mL/min で流した. カラム温度は 30 °C に設定した. クロマトのピーク面積を測定値として, α-アミラーゼ標準品を用いて作成した検量線から重量に換算した (Figure 3.16.). 分析後, グルコース量を 0.9 倍してデンプン量とした.

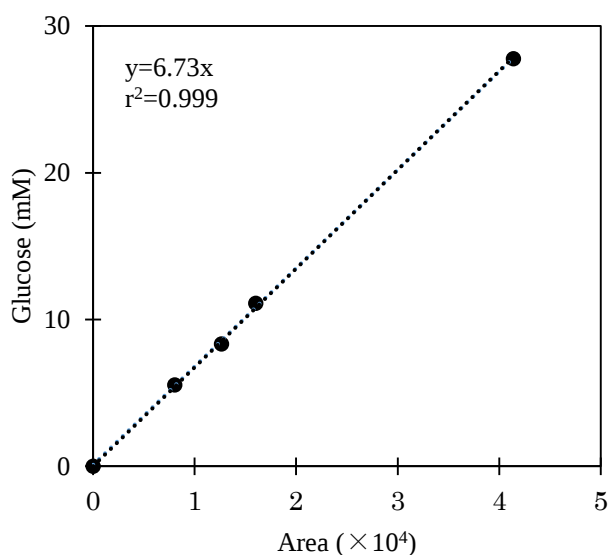


Figure 3.16. α-グルコースの検量線

3-2-7 測定条件とサンプル数

本実験の吸光度測定は時間経過に伴って呈色に変化していくため, 測定は 1 回のみとした. ただし突発的なノイズがスペクトルに影響していないことを確認するため, 数回測定を繰り返し吸光度が徐々に変化していく様子を観察した. 生長の評価では各栽培条件で $n>15$, その他の計測では $n=10$ のサンプルを用いた.

3-3 結果および考察

3-3-1 生長の評価

コントロールと CL での生長を比較した結果を Table 3.8.に示す. シュートの生体重に有意な変化は見られなかったが, CL では根の生体重が増加し, またシュートと根が伸長した. よって, CL ではリョクトウの生長が促進されることが分かった.

Table 3.8. シュートと根の生体重と長さ (n>15)

Growth condition	Fresh weight (mg)		Length (mm)	
	Shoot	Root	Shoot	Root
Control	288.3±6.3	68.5±2.1	51.7±2.5	63.9±7.3
CL	289.8±6.0	57.4±2.3 [*]	43.3±1.9 [*]	43.3±3.1 [*]

アスタリスクは有意差を示す (p<0.05)

3-3-2 抗酸化物質および抗酸化作用の評価

Table 3.9. 抗酸化物質の定量評価 (n=10)

Growth condition	Antioxidant compound (mg/g dry weight)		
	Carotenoid	Phenol	Ascorbic acid
Control	0.29±0.01	5.68±0.25	0.45±0.02
CL	0.38±0.02 [*]	6.49±0.19 [*]	0.63±0.05 [*]

アスタリスクは有意差を示す (p<0.05)

Table 3.10. 抗酸化作用の評価 (n=10)

Growth condition	Antioxidant activity (μM/g dry weight)	
	DPPH	ABTS
Control	8.6±0.4	10.8±0.3
CL	10.3±0.3 [*]	11.9±0.3 [*]

アスタリスクは有意差を示す (p<0.05)

抗酸化物質を定量した結果を Table 3.9.に、抗酸化作用の評価した結果を Table 3.10.にそれぞれ示す。CL で栽培したリョクトウではコントロールと比較して、カロテノイドが 32%、フェノール化合物が 14%、アスコルビン酸が 40%有意に増加することが確認された。カロテノイドについては 2 章の結果とは異なる傾向となった。これは培地成分の違いや抽出部位が葉と植物体全体で違うことなどが原因と考えられる。さらに DPPH と ABTS を用いた評価から CL で栽培したリョクトウでは抗酸化作用が有意に向上することが分かった。これらの結果から CL を活用することで抗酸化作用の高いリョクトウが生産できることが明らかになった。

3-3-3 α-アミラーゼ活性とデンプン量の測定

子葉の α-アミラーゼ活性とデンプン量を測定した結果を Table 3.11.に示す。CL ではアミラーゼ活性が 42%増加し、またデンプン量が 23%減少することが分かった。つまり CL ではアミラーゼが活性化させ子葉に蓄えられていたデンプン分解が促進されたため、デンプン量が減少したと言える。

先述のようにデンプンは生長のためのエネルギー源であるため、宇宙農業を見据えた過去の

研究でも微小重力環境下におけるデンプンの挙動やデンプン分解に関わる酵素活性を知ることが重要視とされてきた。宇宙実験から多くの植物でデンプン量が減少し、デンプン分解酵素が活性化することが確認されている[27]。同様な結果は CL を用いた研究でも確認されており、大豆の子葉[28]やコショウソウの根[29]でもデンプン量の減少が見られている。今回、リョクトウでも同様な変化が見られることが新たに分かった。

Table 3.11. デンプン含有量 (n=10)

Growth condition	α -amylase activity (mg/g)	Starch (mg/cotyledons)
Control	78.8 $\pm$ 5.2	13.6 $\pm$ 0.6
CL	111.5 $\pm$ 8.8 *	10.5 $\pm$ 0.6 *

アスタリスクは有意差を示す (p<0.05)

本実験で得られた結果は CL にはリョクトウの生長と抗酸化作用を向上させる効果があることを示すものである。この変化の要因としてデンプンから生成された糖が挙げられる。発芽初期の植物にとって子葉から輸送される糖は細胞分裂や器官形成に不可欠なエネルギー源であり、人工的に子葉を取り除くと糖輸送が阻害され生長が著しく抑制される[30]。アミラーゼの活性化とデンプン量の低下はデンプン分解が促進されたことを意味しており、CL で栽培したリョクトウではエネルギーとなる糖が豊富な状態にあることを示唆している。CL でダイズを栽培した過去の研究では根の生長促進の要因がデンプン分解促進と糖の増加である可能性を示唆している[6]。同様に本実験でもデンプンから生成された糖の増加がリョクトウのシュートと根の生長を促進したと考えられる (Figure 3.17.)。

また糖は CL で見られた抗酸化物質の増加にも関わっていると考えられる。植物内で糖はエネルギー源としての役割だけでなく、遺伝子の発現や生体物質の合成を制御するシグナルとしても作用する。例えば、内因性・外因性のグルコースやスクロースはカロテノイド合成遺伝子を活性化させカロテノイドの増加を引き起こす[31, 32]。また内因性のグルコースやスクロースはフェノール化合物の合成も促進することも知られている[33]。さらにアスコルビン酸の生合成はグルコースを起点物質としており[34, 35]、CL で栽培したリョクトウではアスコルビン酸合成の材料が多い状態にあると言える。現状では抗酸化作用が向上する詳細なメカニズムを説明することは難しいが、デンプン分解の促進によって生成された糖がカロテノイド、フェノール化合物、アスコルビン酸の合成を促進したため、CL で抗酸化作用が向上したものと考えられる (Figure 3.17.)。

CL は長らく宇宙実験のシミュレーションのための装置として活用されてきたが、本実験で得られた結果は機能性農産物を生産するための新たな栽培装置となるポテンシャルを示すものである。他のマメ類、穀物、果実などでも発芽後にアミラーゼの働きによってデンプン分解が起きることから CL はこれらの農産物の抗酸化作用も向上させる効果があると考えられる。今後、別の農産物をサンプルとした実験が進められることで、CL の農学分野における有用性が見出され

ると期待される。

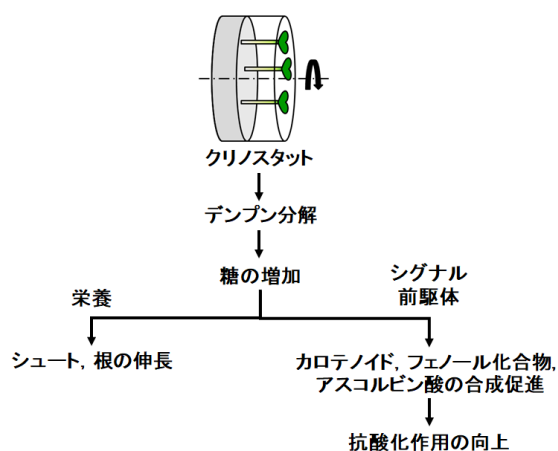


Figure 3.17. 本実験で得られた結果に対する考察. CL で栽培したリョクトウでは α -アミラーゼが活性化されデンプン分解が促進されたため, 糖が増加したと考えられる. 糖は生長のための栄養分として使われたためシュートや根が伸長した. また糖は抗酸化物質の合成するための活性因子や前駆体として作用した結果, カロテノイド, フェノール化合物, アスコルビン酸の合成が促進され, 抗酸化作用が向上したと考えられる (本実験で糖は未測定).

参考文献

- [1] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (6), 1841–1856.
- [2] Cao, X. P.; Chen, Y. F.; Zhang, J. L.; You, M. M.; Wang, K.; Hu, F. L. Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its *in vitro* antioxidant activity. *Phytomedicine* **2017**, *34* (December 2016), 76–84.
- [3] Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19* (6–7), 669–675.
- [4] De Micco, V.; Aronne, G. Biometric anatomy of seedlings developed onboard of Foton-M2 in an automatic system supporting growth. *Acta Astronaut.* **2008**, *62* (8–9), 505–513.
- [5] Musgrave, M. E.; Kuang, A.; Tuominen, L. K.; Levine, L. H.; Morrow, R. C. Seed storage reserves and glucosinolates in *Brassica rapa* L. grown on the international space station. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2005**, *130* (1306), 848–856.
- [6] Hilaire, E.; Peterson, B. V.; Guikema, J. A.; Brown, C. S. Clinorotation affects morphology and ethylene production in soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.* **1996**, *37* (7), 929–934.
- [7] Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (3), 536–549.
- [8] 中村洋. 分析試料前処理ハンドブック. 丸善. **2003**.
- [9] 中村洋. ちょっと詳しい液クロのコツ, 前処理編. 丸善. **2006**.
- [10] Ainsworth, E. A.; Gillespie, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (4), 875–877.
- [11] Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **1987**, *148* (C), 350–382.
- [12] Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73* (2), 627–648.
- [13] Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1998**, *299* (1974), 152–178.
- [14] Erkan, N.; Ayranci, G.; Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* **2008**, *110* (1), 76–82.
- [15] Bajaj, K. L.; Kaur, G. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. *Analyst* **1981**, *106* (1258), 117–120.
- [16] Elnenasy, E. L. S.; Soliman, R. A sensitive colorimetric method for estimation of ascorbic acid. *Talanta* **1979**, *26* (12), 1164–1166.
- [17] Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84* (4), 407–412.
- [18] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **1999**, *26* (98), 1231–1237.
- [19] Xu, B. J.; Chang, S. K. C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer lines. *Food Chem.* **2012**, *134* (3), 1287–1296.

- [20] Xu, B. J.; Chang, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* **2007**, 72 (2), 159–166.
- [21] Bai, Y.; Xu, Y.; Chang, J.; Wang, X.; Zhao, Y.; Yu, Z. Bioactives from stems and leaves of mung beans (*Vigna radiata* L.). *J. Funct. Foods* **2016**, 25, 314–322.
- [22] Tripathi, P.; Leggio, L. L.; Mansfeld, J.; Ulbrich-Hofmann, R.; Kayastha A. M. α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*)—Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling. *Phytochem.* **2007**, 68 (12), 1623–1631.
- [23] Smith, A. M.; Zeeman, S. C. Quantification of starch in plant tissues. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (3), 1342–1345.
- [24] 中村洋. 液クロを上手に使うコツ. 丸善. **2004**.
- [25] 中村洋. ちょっと詳しい液クロのコツ, 分離編. 丸善. **2007**.
- [26] 松下至, 石井孝昭. これならわかる液体クロマトグラフィー, その仕組みと使い方. 化学同人. **2011**.
- [27] Kuznetsov, O. A.; Brown, C. S.; Levine, H. G.; Piastuch, W. C.; Sanwo-Lewandowski, M. M.; Hasenstein, K. H. Composition and physical properties of starch in microgravity-grown plants. *Adv. Space Res.* **2001**, 28 (4), 651–658.
- [28] Brown, C. S.; Piastuch, W. C. Starch metabolism in germinating soybean cotyledons is sensitive to clinorotation and centrifugation. *Plant Cell Environ.* **1994**, 17 (3), 341–344.
- [29] Hensel, W.; Sievers, A. Effects of prolonged omnilateral gravistimulation on the ultrastructure of statocytes and on the graviresponse of roots. *Planta*, **1980**, 150(4), 338–346.
- [30] Wheeler, A. W. Effect of removing cotyledons, apical growing region, or trifoliate leaves on the growth and growth-substance content of dwarf French bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.* **1966**, 17 (4), 621–626.
- [31] Huff, A. Nutritional control of regreening and degreening in citrus peel segments. *Plant Physiol.* **1983**, 73 (2), 243–249.
- [32] Zhou, X.; Mcquinn, R.; Fei, Z.; Wolters, A. M. A.; van Eck, J.; Brown, C.; Giovannoni, J. J.; Li, L. Regulatory control of high levels of carotenoid accumulation in potato tubers. *Plant Cell Environ.* **2011**, 34 (6), 1020–1030.
- [33] Bolouri-Moghaddam, M. R.; Roy, K. L.; Xiang, L.; Rolland, F.; den Ende, W. V. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS J.* **2010**, 277 (9), 2022–2037.
- [34] Valpuesta, V.; Botella, M. A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci.* **2004**, 9 (12), 573–577.
- [35] Wheeler, G. L.; Jones, M. A.; Smirnov, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **1998**, 393, 365–369.

4 章 炭化水素のテラヘルツスペクトル

4-1 実験目的

4,5 章では, THz 分光法を用いたデンプン測定の結果を示す. 多数のグルコース分子が結合したデンプンはアミロースとアミロペクチンから構成される. 以下の Figure 4.1.と Figure 4.2.にそれぞれの分子の構造を示す. アミロースはグルコースが α (1-4) で結合した直鎖の分子で, 分子量が 1.0×10^5 - 1.0×10^6 であるのに対して[1], アミロペクチンは α (1-4) および α (1-6) で結合した枝分かれ構造を持ち分子量が 1.0×10^7 - 1.0×10^9 とアミロースより大きく構造も複雑である[1, 2]. グルコースが α (1-4) で結合するとその立体構造は 6 分子で 1 回転するような螺旋構造を形成していく. アミロース分子間やアミロペクチンの枝分かれ部位から延びる二本鎖は水素結合を介して二重螺旋構造を形成する[1]. またデンプンは植物種によって粒子レベルから分子レベルで極めて多様な構造を持つユニークな生体物質である. 例えば, アミロースとアミロペクチンの割合やアミロペクチンの立体構造など粒子レベル (“long-range order”) での結晶構造の違いに応じてデンプンは A, B, C タイプの 3 種類に分類される[3, 4]. 一般的に, コメ, コムギ, トウモロコシなどの穀物は A タイプ, バレイショなどの塊茎や高アミロースデンプンは B タイプ, 豆類やバナナなど一部の果実に含まれるデンプンは C タイプを示す. このような粒子レベルでの結晶構造の違いは長らく X 線回折を用いて分析されてきた. さらにデンプンは分子レベル (“short-range order”) の微細な構造も多様で, 赤外分光法や核磁気共鳴を用いてこのような nm オーダーの構造が測定されてきた[5].

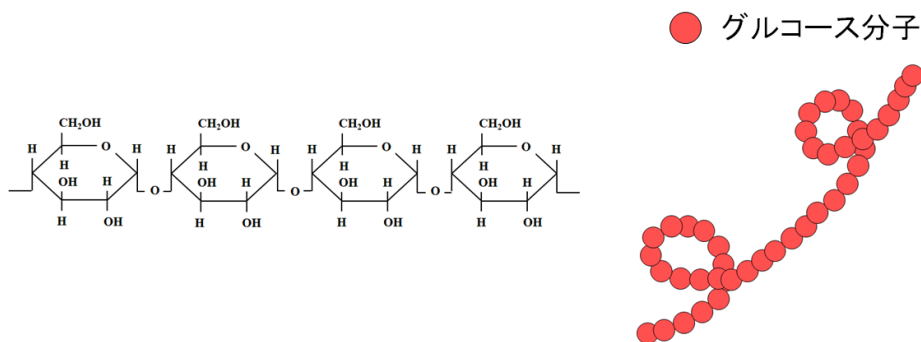


Figure 4.1. アミロースの構造. グルコースが α (1-4) で結合して螺旋構造を形成する.

これまでにデンプン標準の THz スペクトルを計測した結果は報告されているが[6-9], 結晶構造と THz スペクトルの関係性や農産物中のデンプン測定などについては未だ十分に研究が進んでいない. 本章では農産物中のデンプン測定に向けた基礎研究として, デンプンの long-range order や short-range order での結晶構造の違いがどのように THz スペクトルに反映されるかを以下の 3 つのアプローチから明らかにしていく. まず (1) 結晶性とアモルファス化したデンプンの THz スペクトルを測定しスペクトルの形状やピーク位置を確認した. 次に (2) デンプンと構

造がよく似た 3 種類の糖も同様に THz 分光法で測定しデンプンのスペクトルと比較した。この実験では特にアモルファス化した糖で見られる分子内振動モードのピーク位置に注目しデンプンのスペクトルをより深く解釈することを目指す。さらに (3) 異なる植物由来のデンプン標準品、アミロースとアミロペクチンの THz スペクトルや long-range order での結晶構造の違いを識別できる X 線でも測定し、デンプンの構造と THz スペクトルの関係性を明らかにしていく。

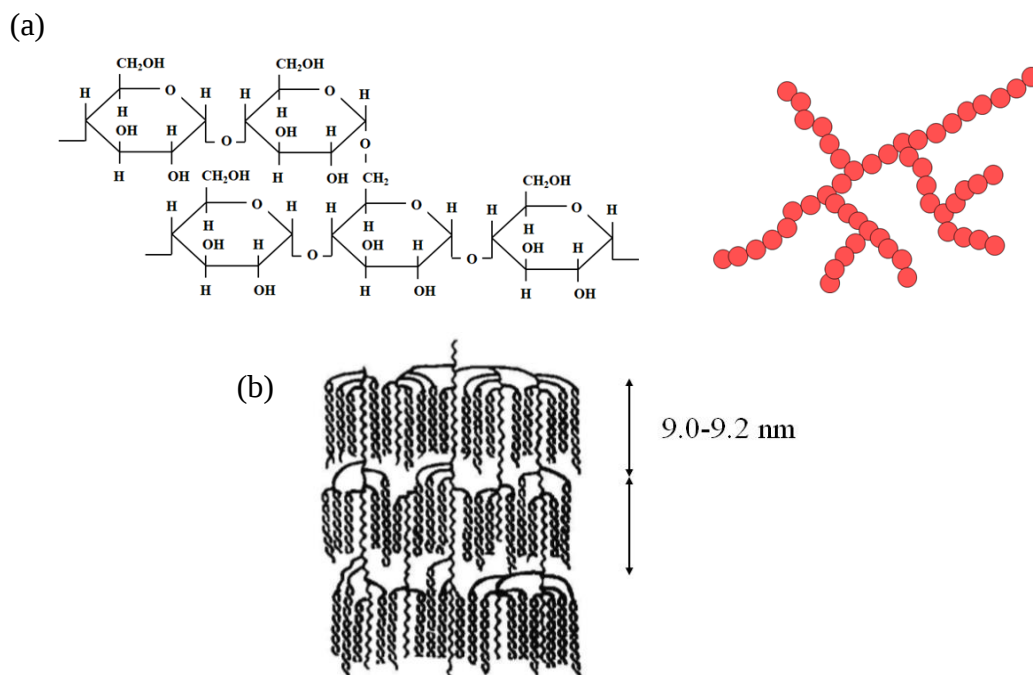


Figure 4.2. アミロペクチンの構造. (a): 立体構造の模式図. グルコースが α (1-4) および α (1-6) で結合した枝分かれ構造を持つ. (b): 分子レベルでの立体構造の模式図[10, 11]. 枝分かれ部位から延びる二本鎖は二重螺旋構造を形成する.

4-2 実験装置および方法

4-2-1 サンプル調整

構造がよく似た 4 種類の炭化水素の基礎的な分光情報を得るため、標準品の試薬を使って結晶性分子とアモルファスの THz スペクトルを測定した。本実験では水に溶解しやすいジャガイモ由来の溶性デンプンを用いた。またデンプンと同様にグルコース分子を基本骨格に持つ、多糖のオリゴ糖、二糖のマルトース、単糖のグルコースをサンプルとした。それぞれの分子の構造は Figure 4.3.に示す。デンプンは水溶液中で加熱すると溶解しゲル化する。一度ゲル化すると結晶構造が崩れアモルファス化することが X 線回折を使った測定で分かっている[12]。そこで水を加えたデンプンをオートクレープで 121 °C, 30 分間処理し、ゲル化させた。その後、凍結乾燥して得られた粉体をアモルファスデンプンとして測定した。糖類は高温で加熱し溶解させることでアモルファス化させた。具体的には、オリゴ糖は 230 °C, マルトースは 110 °C, グルコース

は 150 °C でそれぞれ加熱した後，常温で冷やし乳鉢で粉体にして計測に用いた．Figure 4.4.に加熱前後での変化の一例を示す．さらにトウモロコシとコメ由来のデンプン標準品，アミロースとアミロペクチンの標準品も測定した．

Table 4.1. ペレット作成で用いた試薬．

試薬	製造元	品番
ジャガイモ由来デンプン	関東化学	鹿 1 級
トウモロコシ由来デンプン	和光純薬	193-09925
コメ由来デンプン	シグマアルドリッチ	S7260-500G
アミロース	シグマアルドリッチ	A0512-250MG
アミロペクチン	シグマアルドリッチ	10120-250MG
イソマルトオリゴ糖	和光純薬	098-03481
マルトースー水和物	和光純薬	138-00611
グルコース	和光純薬	049-31165
ポリエチレン	Shamrok 社	S-394-SD4

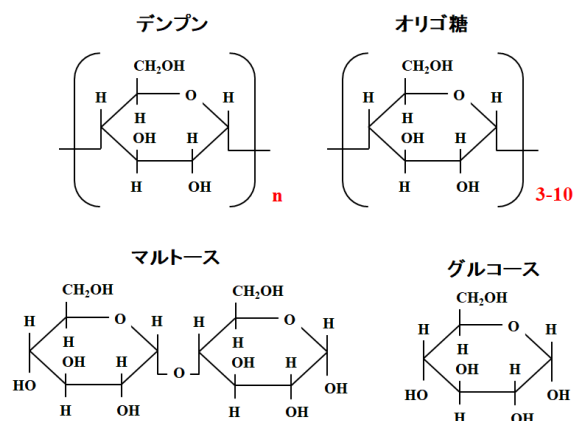


Figure 4.3. 測定した炭化水素の構造式

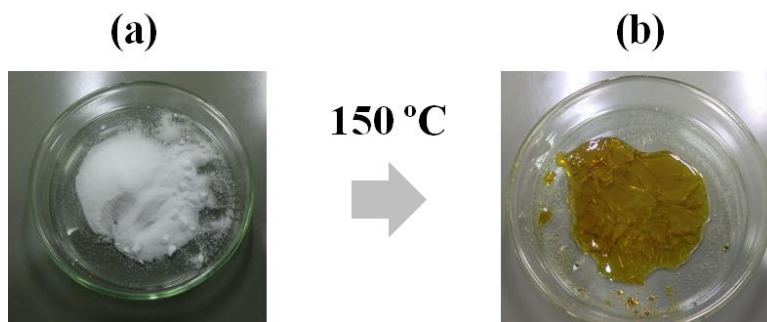


Figure 4.4. グルコースの変化．(a)：結晶性分子．(b)：アモルファス．

4-2-1 ペレットの作成方法

THz 測定ではサンプルをペレットにして透過測定を行った。サンプル 100%のペレットでは光が透過しないため、希釈剤でサンプル濃度を薄める必要がある。PE は THz 帯で透過性の高い物質であり (Figure 4.5.), この帯域での希釈剤として用いられている[13]. ペレット作成の手順として、まず 80 °C のオーブンで 3 時間以上乾燥させた PE を開口径 300 μm のふるいにかけた。同様にサンプルも 150 μm のふるいにかけた後、質量ベースで濃度が 5%になるように PE とデンプン標準品を混ぜ合わせた。ここで必要量より多めに粉体を用意しておくと作成中にペレットが破損しても、すぐに作り直すことができる。実験室の湿度が 65%を超えると、ふるいを通した細かな粉体が空気中の水分を吸いダマになりやすい。そこで湿度が高くなる夏場や雨の日は除湿器稼働させるなど湿度を下げる工夫が必要となる。

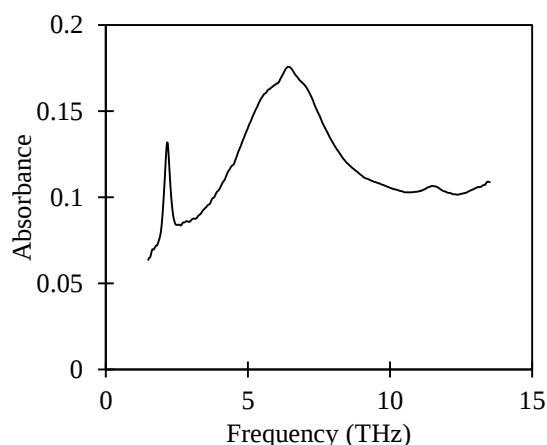


Figure 4.5. PE の吸収スペクトル.



Figure 4.6. ペレット作成. (a): 錠剤成形器に粉体サンプルを充填する. (b): 装置を用いて加圧.

PE とサンプルを十分に混ぜ合わせた粉体 160 mg を KBr 錠剤成形器 (島津製作所) へ充填した。その後、真空ポンプ (SA18-3M, 島津製作所) を用いて 5 分間予備排気を行い粉体に含まれ

る水分を除去した．湿度が高く粉体の吸水が多い場合は予備排気を 10 分とした．さらに真空ポンプを稼働させたまま加圧装置（SSP-10A，島津製作所）により約 15 KN の圧力をかけた状態で 10 分間加圧成形した．また重量 152 mg の PE100%ペレットも作成し，リファレンスとして計測した．作成したペレットは直径 13 mm，厚み 1.25 ± 0.05 mm となる（Figure 4.7.）．

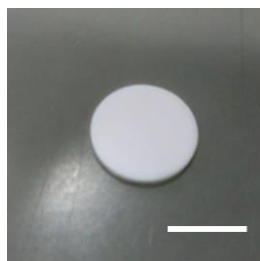


Figure 4.7. 使用した PE100%ペレット（スケール：1 cm）．

4-2-2 テラヘルツ分光法

[1] フーリエ変換型分光法の原理[14, 15]

赤外光領域での分光法として，干渉計を用いた方法が利用されている．以下では，本実験でも使用したフーリエ変換型分光法で一般的に用いられるマイケルソン干渉計について説明する．マイケルソン干渉計はビームスプリッターと移動鏡・固定鏡の 2 枚の平面鏡で構成されている（Figure 4.8.）．ビームスプリッターは入射した光の一部を透過させ，残りを反射させる光学素子で入射光に対して 45° に配置されている．移動鏡は光軸に対して平行に移動する機能が備わっている．干渉計に入った光はビームスプリッターで 2 つに分割され，移動鏡および固定鏡で反射されてビームスプリッターに戻り，再び 1 つに合成される．

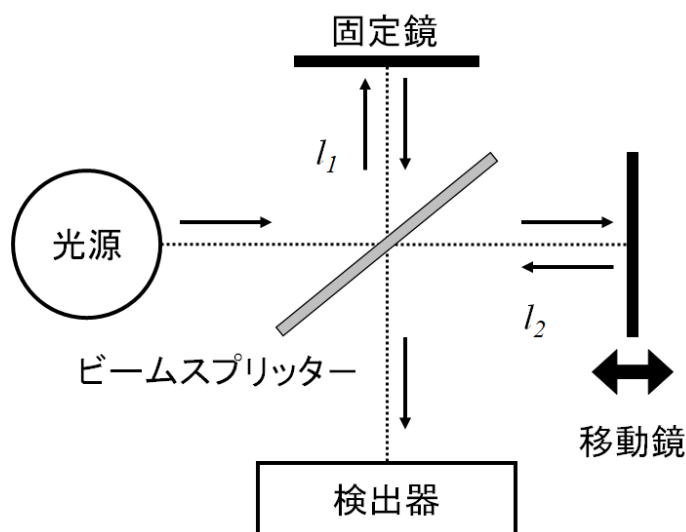


Figure 4.8. マイケルソン干渉計の模式図．

マイケルソン干渉計において光の電場振幅を A とすると、波長 λ の光を時刻 t に x の位置で観察する時の電場強度 ϕ は、

$$\phi = A \sin \frac{2\pi(ct-x)}{\lambda} \quad (4.1)$$

と表される．ここで c は光速を示す．ビームスプリッターから固定鏡までの距離を l_1 ，移動鏡までの距離を l_2 とすると，固定鏡と移動鏡から出た干渉光の強度 E は

$$E = A \sin \frac{2\pi(ct-2l_1)}{\lambda} + A \sin \frac{2\pi(ct-2l_2)}{\lambda} \quad (4.2)$$

で表される．光の強度は振幅の 2 乗の時間平均であるため，検出強度 I は

$$I = A^2 (1 + \cos \frac{2\pi(2l_2-2l_1)}{\lambda}) \quad (4.3)$$

となる．さまざまな波数の光がマイケルソン干渉計に入射したときに得られる出力光の強度は，光路差 $x = 2l_2 - 2l_1$ ，波数 $\nu = 1/\lambda$ を用いて

$$I(x) = \int_0^\infty B(\nu)(1 + \cos 2\pi\nu x) d\nu \quad (4.4)$$

と表される． $B(\nu)$ は光源から出る光の波数依存性を表す関数であり，インターフェログラムと呼ばれている．インターフェログラムを移動鏡の掃引距離でフーリエ変換することで，波数が表現されたスペクトルが得られる．また上記の式で，積分範囲は無限であるが実際の可動鏡の可動距離は有限である．可動範囲内でフーリエ変換を行うとスペクトルがギザギザした波打ち構造が発生するため，一般的に測定範囲の両端が滑らかに減少する窓関数を掛け合わせ変換を行う．

[2] 装置



Figure 4.9. FARIS-1s の外観.

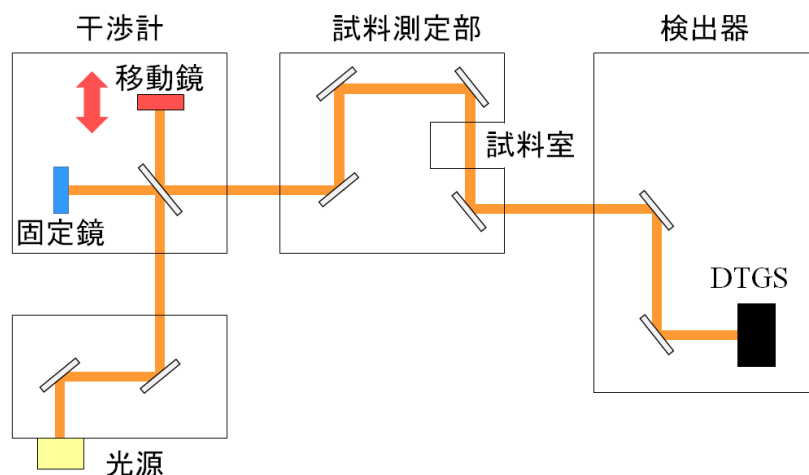


Figure 4.10. 内部構造の模式図.

本実験ではサブミリ波専用フーリエ変換分光光度計（FARIS-1s, 日本分光）を用いてペレットの透過測定を行った。Figure 4.9.に装置の外観を，Figure 4.10.に内部構造の模式図をそれぞれ示す。FARIS-1s では光源として低周波側に強度をもつ高圧水銀ランプと広い高度分布をもつセラミックランプを選択できる。本実験では広帯域でのスペクトルを取得するため，セラミックランプを使用した。一般的に赤外領域のフーリエ変換型分光器ではビームスプリッターの素材として Mylar が用いられるが，FARIS-1s では THz 帯で透過性の高いシリコンが材質となっている。試料を通った THz 波は，重水素化トリグリシン硫酸結晶（Deuterated triglycine sulfate：以下 DTGS と記す）を集電素子とする検出器で検出される。また THz 波は空気中の水蒸気により減衰するため，干渉ユニットに接続された減圧装置で空気を吸引して，測定中は装置内部を 100 Pa 以下の減圧状態に保った。ペレットを置く試料室は装置外部にあるため，エアドライヤー（IDF1E, SMC）を用いて乾燥空気を流して試料室内の湿度を 10%以下に制御した。ペレットは治具を使って光路上に置いた（Figure 4.11.）。



Figure 4.11. 使用した治具.

測定範囲は 1.5-13.5 THz, 分解能 0.12 THz (4 cm^{-1}), 積算回数 300 回に設定した. 100% PE ペレットとサンプルペレットを交互に測定し, 以下式 (4.5) から吸光度を求めた.

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (4.5)$$

ただし, I_0 : リファレンスの強度, I : サンプルの強度, A : 吸光度とする. この操作を 3 回繰り返し 1 枚のペレットに対して異なる 3 カ所を測定した結果の平均を吸光度とした. また各サンプルに対して別々の 3 枚のペレットを測定して平均値 $\pm$ 標準誤差を最終的な測定結果として用いた. ピーク位置の議論を行うため, Savitzky-Golay 法によりスムージングしノイズを除去した上で, 同方法で二次微分処理を行った. スムージング, 二次微分処理共にデータ数は 19 点とした. 得られた二次微分スペクトルのデップからピーク位置やピーク強度を求めた.

4-2-3 X 線回折

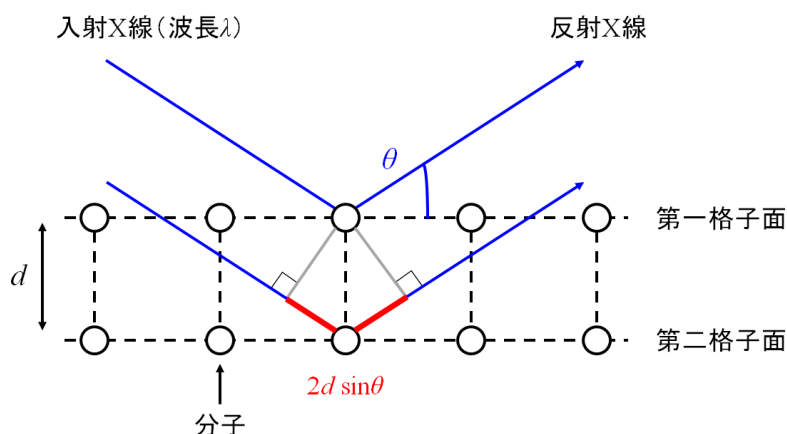


Figure 4.12. X 線回折の原理. 赤線は行路差を示し入射 X 線の整数倍の時に回折が現れる[16].

X 線回折は, サンプルで散乱した X 線が干渉して回折が起きることを利用した測定技術である. 得られた回折情報からサンプル成分の同定や定量, 結晶の大きさや結晶化度を知ることができる. 以下に X 線回折の原理を示す. 原子が規則正しく配列した物質に原子間距離と同程度の $0.5\text{-}3\text{ Å}$ の X 線が入射すると, X 線が散乱される. ここで物質の第一格子面で散乱される X 線と第二格子面で散乱される X 線の行路差は $2d \sin\theta$ となる (Figure 4.12.). ただし, d : 格子面間隔, θ : 入射角をそれぞれ表す. この行路差が入射 X 線の波長 λ の整数倍の時に, 反射 X 線の干渉の波が重なり強度を強め合うため回折が観察される. つまり $2d \sin\theta = n\lambda$ を満たす入射角のみで X 線回折が現れるため, 回折角 2θ と回折強度を測定することでサンプルの X 線回折パターンを得ることができる.

デンプン標準品の X 線回折パターンを調べるため全自動水平型多目的 X 線回折装置 (SmartLab,

リガク)を用いた。光源である銅管球から発せられた X 線には $K\alpha$ 線と $K\beta$ 線が含まれており、そのままサンプルに入射すると異なる 2 種類の回折パターンが同時に現れてくる。そこで、 $K\beta$ 線を除去するフィルターとモノクロメーターを通すことで $K\alpha$ 線のみを取り出している。SmartLab では平行ビーム法もしくは集中法でサンプルに X 線を照射できる。粉体サンプルの場合、集中ビーム法で測定することが多く平行ビーム法よりも強度が高く検出できるが、誤差が出やすくサンプル粒径が大きいとピークが見えにくくなることやピーク位置がずれる可能性がある。そこで全てのデンプン標準品を $38\ \mu\text{m}$ のふるいにかけてから、 $20\times 20\times 0.5\ \text{mm}$ のガラス試料板に敷き詰めて測定を行った。測定時は光源の管電圧 45 kV、管電流 200 mA に設定して、測定範囲 $2\theta = 4\text{--}40^\circ$ (分解能 0.05°)、走査速度 $3^\circ/\text{min}$ でデンプン標準品の回折パターンを計測した。X 線測定は S/N 比が高く測定毎のばらつきが少ないため、測定は 1 回のみとした。

4-3 結果および考察

4-3-1 デンプンと糖のテラヘルツスペクトル

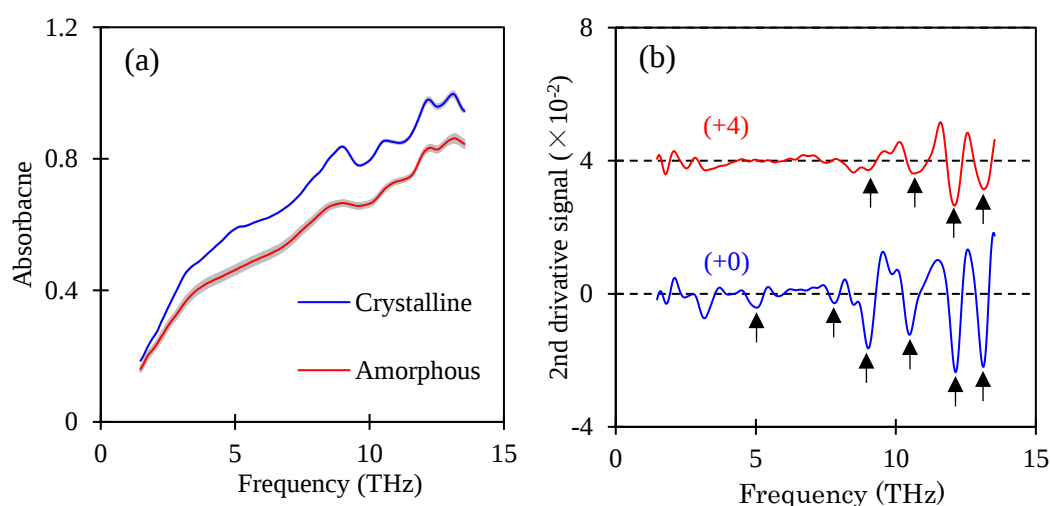


Figure 4.13. 結晶性とアモルファス化したデンプンの THz スペクトル ($n=3$)。 (a) : 吸収スペクトル, (b) : 二次微分スペクトル。アモルファスデンプン (+4) はオフセットした。黒矢印はピーク位置を示す。3 THz 付近のデップは他のサンプルでも同様に確認されたためデンプンの吸収に由来しない可能性が高い。

Table 4.2. 結晶性とアモルファス化したデンプンのピーク位置

Sample	Peak positions (THz)					
Crystalline	5.0	7.8	9.0	10.5	12.1	13.1
Amorphous	-	-	9.0	10.6	12.1	13.1

縦軸を吸光度、横軸を周波数としたデンプンの THz スペクトルを Figure 4.13.に、ピーク位置

を Table 4.2. にそれぞれ示す．結晶性のデンプンでは 5.0, 7.8, 9.0, 10.5, 12.1, 13.1 THz に 6 つのピークが見られたが，アモルファス化したデンプンでは低周波側の 2 つのピークは見られなくなり，9.0, 10.6, 12.1, 13.1 THz に 4 つのピークが観察された．またアモルファスデンプンのピーク強度は結晶性デンプンよりも低くなった．結晶性とアモルファスの二次微分スペクトルで 3.0 THz 付近に小さなデップが見られたが，これはデンプンだけでなく糖や次章で説明するリョクトウでも観察されたことからデンプンの吸収に由来するピークではない可能性が高く今回はピークとして扱わないこととする．

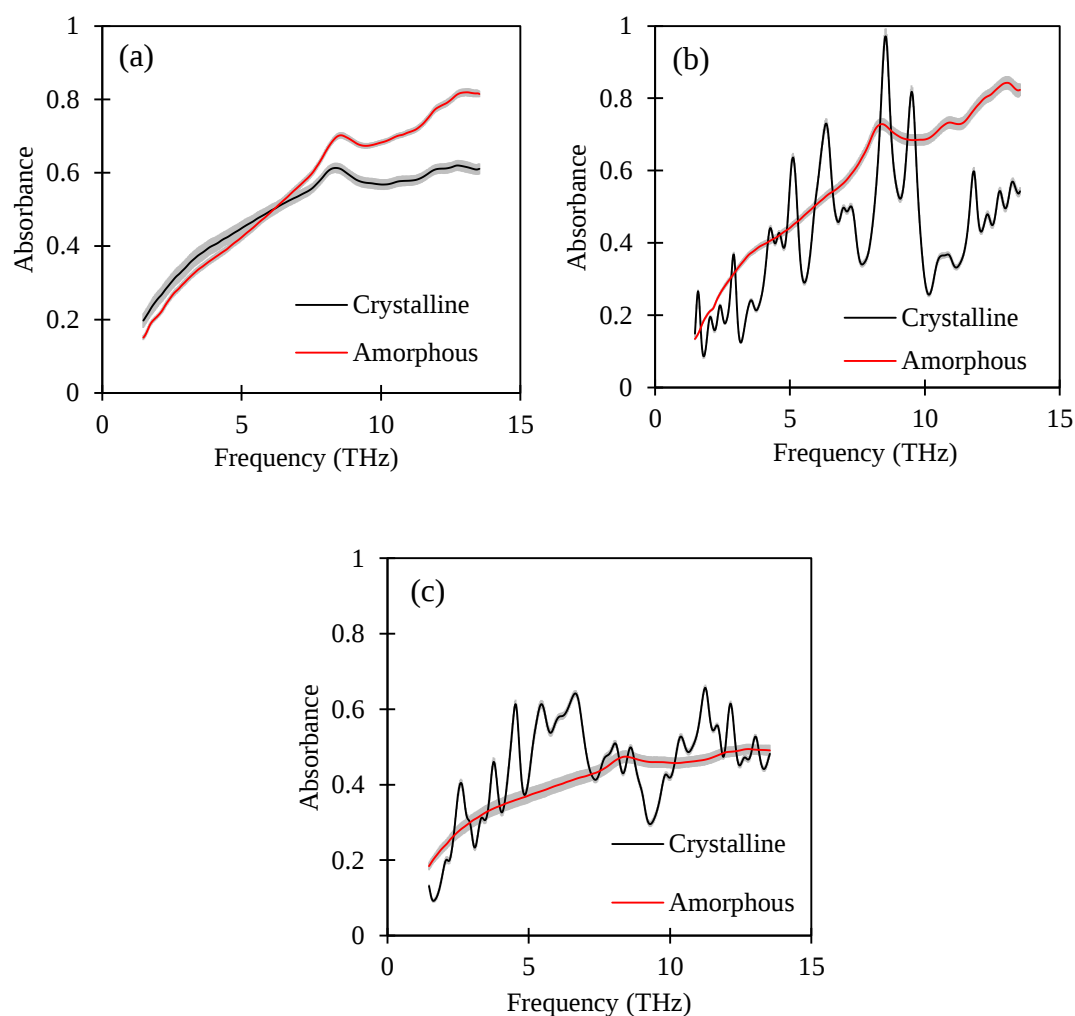


Figure 4.14. 結晶性とアモルファス化した糖の THz スペクトル (n=3). (a) : オリゴ糖, (b) : マルトース, (c) : グルコース.

次に 3 種類の糖の THz スペクトルを Figure 4.14. に，ピーク位置を Table 4.3. に示す．多糖のオリゴ糖は結晶性とアモルファスでスペクトルの変化は小さかった．一方で二糖のマルトースと単糖のグルコースでは状態変化に伴いスペクトルに大きな変化が見られ，結晶状態ではシャー

ブなピークが観察されたのに対して、アモルファスではブロードなピークを持つスペクトルとなった。またアモルファス化すると 3 種類の糖のスペクトル形状が類似しており、同じような周波数にピークを持つことが分かった。糖によってピーク位置が若干異なる要因として 2 つのことが考えられる。一つはベースラインの傾きの違いなどノイズの影響を受けた可能性であり、もう一つは構造の違いによって振動モードのエネルギーが異なることに由来した可能性が挙げられる。

Table 4.3. アモルファス化した糖のピーク位置

Sample	Peak positions (THz)			
Oligosaccharide	8.5	10.6	12.0	12.8
Maltose	8.3	10.8	12.1	13.1
Glucose	8.4	-	12.0	12.7

本実験の測定範囲である 1.5-13.5 THz の帯域はテラヘルツと中赤外領域の境に位置しており、分光測定では分子間振動モードと分子内振動モードの吸収ピークが混在して現れる。炭化水素の場合、低周波側で水素結合や共有結合の分子間振動モードが、高周波側で炭素骨格などの分子内振動モードが吸収ピークとして観察される[17-21]。よって本実験で得られたデンプンや糖の吸収ピークも分子間振動モードと分子内振動モードが混在していると言える。分子間振動モードの変化はピークの有無やピーク強度の変化として観察されるのに対して、分子内振動モードの変化はピークシフトとして観察されることが多い[22]。これらの知見に基づいて結晶性デンプンで見られた 6 つピークの帰属について考察を行う。まずアモルファス化することで低周波側の 5.0 と 7.8 THz のピークが消失したことから (Table 4.2.), これらのピークはデンプンの分子間振動モードに由来すると考えられる。またデンプンを加熱してアモルファス化 (ゲル化) すると水素結合が切れ二重螺旋構造が解けることが知られている[23] (Figure 4.15.). よって 5.0 や 7.8 THz のピークは分子間の水素結合の振動モードであり、アモルファス化することで水素結合が切れたためピークが消失した可能性が考えられる。

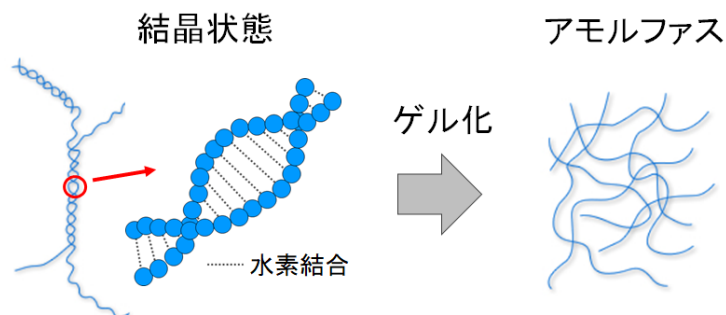


Figure 4.15. デンプンの構造変化。ゲル化により水素結合が切れ螺旋構造が解ける[23]。

一方で、結晶性分子・アモルファス共にピークが確認された高周波側の 9.0, 10.5, 12.1, 13.1 THz は分子内振動モードと考えられる。さらに糖の測定結果も合わせ、これら 4 つのピークをより深く考察すると、9.0 THz のピークはデンプンのみで確認されたのに対して、他の 10.5, 12.0, 13.0 THz 付近のピークは他の糖でも観察された。よって今回得られた結果は 9.0 THz のピークは高分子のデンプンに特有の吸収ピークで、THz 帯に特有の集団振動モードである可能性を示唆するものである。ピークの帰属を詳細に議論するには理論計算と照らし合わせることが求められるが、本実験で得られた結果は 9.0 THz のピークはデンプンに特有であり、植物や農産物内のデンプンを計測する際に有効な指標になる可能性を示している。

Table 4.4. デンプンの吸収ピークの帰属についての考察.

Peak position (THz)	Vibrational mode	Assignments
5.0	Intermolecular	Hydrogen bond ?
7.8		
9.0		
10.5	Intramolecular	Collective vibration ?
12.1		Skeletal vibration
12.1		(C-C-O, C-C-C)
13.2		[6-8, 17-21]

4-3-2 異なる植物種由来のデンプンのテラヘルツスペクトルと X 線回折パターン

ジャガイモ、トウモロコシ、コメ由来のデンプンの THz スペクトルを比較した結果を Figure 4.16. に示す。低周波側ではジャガイモ由来のデンプンで吸光度が大きいが、高周波側ではトウモロコシとコメ由来のデンプンの方が大きくなった。またピーク強度は高周波側に行くほどトウモロコシとコメ由来のデンプンが強くなった (Figure 4.16.(b))。以上のように、3 種類の異なる植物種由来のデンプンを THz 帯で測定するとジャガイモ由来のデンプンで異なる傾向が見られた。

次にアミロースとアミロペクチンの THz 帯の吸収スペクトルを Figure 4.17. に示す。低周波側ではアミロースの吸光度が高いのに対して、高周波側ではアミロペクチンの吸光度が高くなった。またピーク強度はアミロペクチンの方が高くなった。この違いはアミロースとアミロペクチンの構造に由来すると考えられる。2 本のアミロースが螺旋構造を取ると分子間に多数の水素結合を形成していくため、分子間振動モードの吸収が大きくなる。一方で分子量が大きいアミロペクチンは基本骨格となるグルコース分子の総数が多く分子内振動モードの吸収が大きくなると言える。先述のように THz 帯では水素結合に由来する分子間振動モードは低周波側に、炭素骨格などに由来する分子内振動モードは高周波側に吸収が現れてくる。よって水素結合の数が多いアミロースの吸収が低周波側で大きく、分子内振動モードが大きいアミロペクチンの吸収が高周波で大きくなった可能性が考えられる。

文献によると今回測定した3種類のデンプン標準品のアミロース含有量はジャガイモで22%, トウモロコシで27%, コメで17%である[24]. アミロース・アミロペクチンの含有比の違いがTHz スペクトルに影響している場合, トウモロコシとコメでスペクトルに顕著な違いが出るはずである. しかし Figure 4.16.に示したようにジャガイモ由来と他の2種類で違いが見られたことから, デンプンのTHz スペクトルはアミロース・アミロペクチンの構成比だけで決まるものでないことが明らかになった.

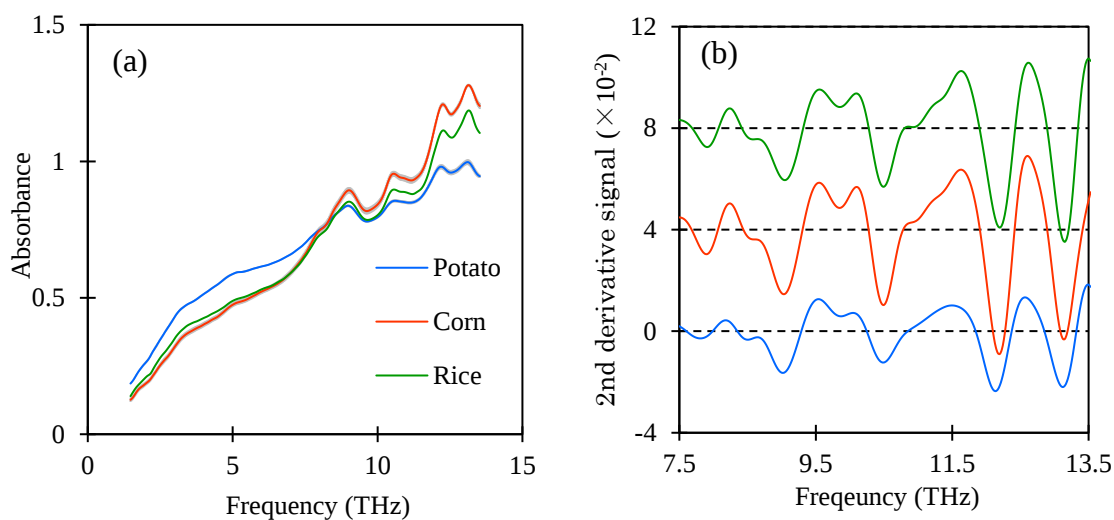


Figure 4.16. 異なる植物種由来デンプンのテラヘルツスペクトル (n=3). (a): 吸収スペクトル. (b): 二次微分スペクトル. トウモロコシ由来デンプン (+4) とコメ由来デンプン (+8) はオフセットした.

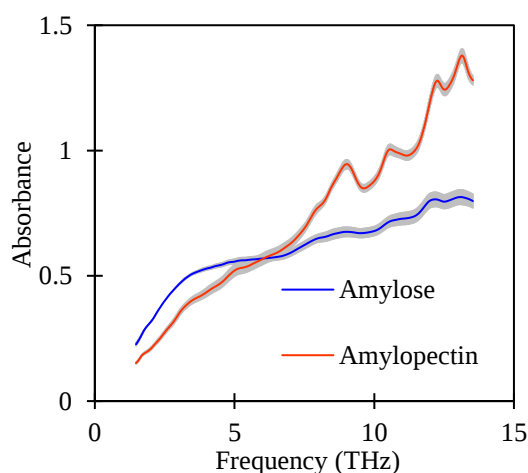


Figure 4.17. アミロースとアミロペクチンのテラヘルツスペクトル (n=3).

ジャガイモ, トウモロコシ, イネ由来のデンプンの X 線回折パターンを Figure 4.18.に示す.

横軸は測定角度、縦軸は回折の強度としている。トウモロコシとイネ由来のデンプンでは A タイプの回折パターンが観察され、 $2\theta = 15, 17, 18, 23^\circ$ にピークが見られた。一方、ジャガイモ由来のデンプンは B タイプの回折パターンで、 $2\theta = 15, 17^\circ$ にピークが見られた。これらのデンプン標準品の X 線回折パターンを調べた先行研究でも同様な回折パターンが観察されている[25, 26]。以上の結果から、THz スペクトルと X 線回折パターンのどちらの測定でもジャガイモのみ異なる傾向を示すことが明らかになった。

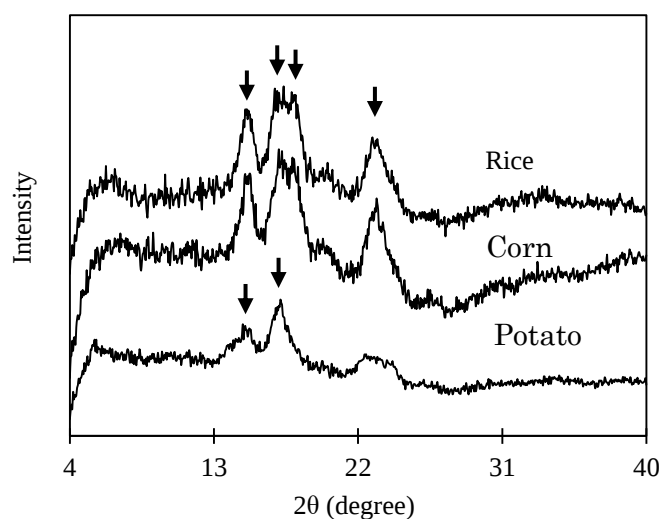


Figure 4.18. デンプン標準品の X 線回折パターン。黒矢印はピーク位置を示す。

中赤外分光法やラマン分光法では、デンプンの short-range order の構造の違いを測定できるが、A タイプ、B タイプの識別など long-range order の構造の違いは観察できないことが知られている。例えば、X 線回折パターンが異なるコムギ (A タイプ) とジャガイモ (B タイプ) を中赤外分光法で測定するとスペクトルに変化がないことが観察されている[27]。また他の研究でも同様な結果が報告されている[28, 29]。一方で、本実験で得られた THz スペクトルでは高周波と低周波の吸光度の違いやピーク強度から A タイプと B タイプのデンプンを識別できる可能性が示唆された。ただし、A タイプのトウモロコシとコメ由来のデンプンでスペクトルに変化は見られなかった。本実験のように異なる植物種由来のデンプンを赤外分光法とラマン分光法で測定した過去の研究では、同じ A タイプのデンプンでもスペクトルの違いが観察されている[30]。これは、short-range order の構造の違いがスペクトルに反映されているためと言える。よって、THz 分光法はデンプンの long-range-order の構造の違いに敏感であるのに対して、中赤外分光やラマン分光で測定できる short-range order の構造の違いを測定するには適していないと考えられる。

参考文献

- [1] Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* **2004**, 39 (2), 151–165.
- [2] Ball, S.; Guan, H. P.; James, M.; Myers, A.; Keeling, P.; Mouille, G.; Buléon, A.; Colonna, P.; Preiss, J. From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **1996**, 86 (3), 349–352.
- [3] Sarko, A.; Wu, H. - C H. The Crystal Structures of A - , B - and C - Polymorphs of Amylose and Starch. *Starch - Stärke* **1978**, 30 (3), 73–78.
- [4] Gernat, C.; Radosta, S.; Anger, H.; Damaschun, G. Crystalline parts of three different conformations detected in native and enzymatically degraded starches. **1993**, 45 (9), 309–314.
- [5] Lopez-Rubio, A.; Flanagan, B. M.; Gilbert, E. P.; Gidley, M. J. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. *Biopolymers* **2008**, 89 (9), 761–768.
- [6] Cael, J. J.; Koenig, J. L.; Blackwell, J. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part III: raman spectra of the polymorphic forms of amylose. *Carbohydr. Res.* **1973**, 29 (1), 123–134.
- [7] Cael, J. J.; Koenig, J. L.; Blackwell, J. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part VI: normal coordinate analysis of V-amylose. *Biopolymers* **1975**, 14 (9), 1885–1903.
- [8] Calat, A. Study of the raman and infrared absorption spectra of branched polysaccharides. *Acta Biochim. Pol.* **1980**, 27 (2), 135–142.
- [9] Wu, H.; Heilweil, E. J.; Hussain, A. S.; Khan, M. A. Process analytical technology (PAT): Effects of instrumental and compositional variables on terahertz spectral data quality to characterize pharmaceutical materials and tablets. *Int. J. Pharm.* **2007**, 343 (1–2), 148–158.
- [10] Imberty, A.; Buléon, A.; Tran, V.; Pérez, S. Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch - Stärke* **1991**, 43 (10), 375–384.
- [11] Jane, J. L.; Wong, K. S.; McPherson, A. E. Branch-structure difference in starches of A and B-type x-ray patterns revealed by their naegeli dextrans. *Carbohydr. Res.* **1997**, 300 (3), 219–227.
- [12] Jouppila, K.; Roos, Y. H. The physical state of amorphous corn starch and its impact on crystallization. *Carbohydr. Polym.* **1997**, 32(2), 95–104.
- [13] Shi, Y.; Wang, L. Collective vibrational spectra of α - And γ -glycine studied by terahertz and Raman spectroscopy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2005**, 38 (19), 3741–3745.
- [14] 田隅三生, 西尾悦雄. FT-IR の基礎と実際. 東京化学同人. **1994**.
- [15] 尾崎幸洋, 近赤外分光法. 日本分光学会. **2015**.
- [16] Als-Nielsen, J.; McMorrow, D. X 線物理学の基礎. 講談社. **2012**.
- [17] Vasko, P. D.; Blackwell, J.; Koenig, J. L. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part II: normal coordinate analysis of α -D-glucose. *Carbohydr. Res.* **1972**, 23 (3), 407–416.
- [18] Hineno, M. Infrared spectra and normal vibration of β -d-glucopyranose. *Carbohydr. Res.* **1977**, 56 (2), 219–227.
- [19] Korolevich, M. V.; Zhibankov, R. G.; Sivchik, V. V. Calculation of absorption band frequencies and intensities in the IR spectrum of α -d-glucose in a cluster. *J. Mol. Struct.* **1990**, 220 (C), 301–313.
- [20] Zhibankov, R. G.; Andrianov, V. M.; Marchewka, M. K. Fourier transform IR and Raman spectroscopy and structure of

carbohydrates. *J. Mol. Struct.* **1997**, 436–437, 637–654.

- [21] Yang, L.; Weng, S.; Ferraro, J. R.; Wu, J. Far infrared study of some mono- and disaccharides. *Vib. Spectrosc.* **2001**, 25 (1), 57–62.
- [22] Nagai, N.; Kumazawa, R.; Fukasawa, R. Direct evidence of inter-molecular vibrations by THz spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 413, 495–500.
- [23] Wang, S.; Li, C.; Copeland, L.; Niu, Q.; Wang, S. Starch retrogradation: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, 14 (5), 568–585.
- [24] Zobel, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch - Stärke* **1988**, 40 (2), 44–50.
- [25] Jane, J. L.; Wong, K. S.; McPherson, A. E. Branch-structure difference in starches of A and B-type x-ray patterns revealed by their naegeli dextrans. *Carbohydr. Res.* **1997**, 300 (3), 219–227.
- [26] Cheetham, N. W. H.; Tao, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: An X-ray powder diffraction study. *Carbohydr. Polym.* **1998**, 36 (4), 277–284.
- [27] Sevenou, O.; Hill, S. E.; Farhat, I. A.; Mitchell, J. R. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, 31 (1–3), 79–85.
- [28] Wilson, R. H.; Kalichevsky, M. T.; Ring, S. G.; Belton, P. S. A fourier-transform infrared study of the gelation and retrogradation of waxy-maize starch. *Carbohydr. Res.* **1987**, 166 (1), 162–165.
- [29] Goodfellow, B. J.; Wilson R. H. A Fourier transform IR study of the gelation of amylose and amylopectin. *Biopolymers* **1990**, 30, 1183–1189.
- [30] Kizil, R.; Irudayaraj, J.; Seetharaman, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (14), 3912–3918.

5 章 テラヘルツ分光法を用いた発芽リョクトウ中のデンプン量の推定

5-1 実験目的

4 章で示したようにデンプン標準品をテラヘルツ分光法で測定すると、分子間・分子内の振動モードと考えられるピークが見られた。生体物質の多くはアモルファス化しているが[1], デンプンは結晶構造を保つため植物を測定した場合でも夾雑物の影響は少なく標準品と同様にデンプンのピークが観察できると予想される。この仮説を検証するために、本章では生長段階が異なる発芽リョクトウを THz 分光法で測定して、得られたスペクトルからデンプン分解過程をモニタリングできるかを検討した。さらにデンプンに由来するピークを用いてデンプン推定のための検量線を作成した。

5-2 実験装置および方法

5-2-1 栽培方法

事前にオートクレーブで滅菌処理した 1 L のガラス製ビーカーに寒天 0.8%の培地を用意した。クリーンベンチ内でリョクトウの種子を 70%エタノールで 5 分間, 95%エタノールで 1 分間洗浄した後, 蒸留水で 2 回洗浄してビーカー内の培地に植えた。種子はインキュベータ (SIW-450S, アズワン) 内で 1-7 日間栽培した。栽培中の温度を $26.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, 光条件を 18 時間日長で 25-

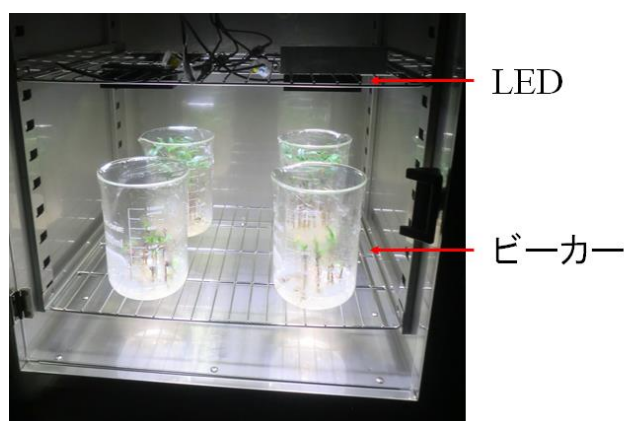


Figure 5.1. インキュベータ内部。

$35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ (培地表面の強度) に調整した。また、インキュベータには最大で 4 つのビーカーを置き栽培を行った (Figure 5.1.)。水は THz 帯で吸収を示すため[2], リョクトウ種子を測定する際にノイズとなる可能性が懸念される。そこで本実験では、リョクトウを凍結乾燥して得られた粉体を測定することとした。栽培後、5 本のリョクトウを 1 つのサンプルとして凍結乾燥機で 2 日以上乾燥させた。粉体にしたサンプルは -80°C のフリーザーで保存した。また基礎データとして栽培 1, 4, 7 日の生体重と凍結乾燥後の乾物重量も同時に測定した。

5-2-2 テラヘルツ分光法

4 章で示した方法でリョクトウを PE で希釈した粉体 160 mg を用いてペレットを作成した。使用したペレットの一例を Figure 5.2.に示す。ペレットのサンプル濃度は 5%とし, FARIS-1s を用いて透過測定を行った。分解能 0.12 THz で $1.5\text{-}13.5 \text{ THz}$ の分光スペクトルを測定した。1 枚のペレットに対して 300 回積算の測定を 3 回繰り返す、計 900 回の平均値を測定値として用いた。

また PE 100%のペレット (152 mg) をリファレンスとして同時に計測した．ピーク位置の議論を行うため, Savitzky-Golay 法によりスムージングしノイズを除去した上で, 同方法で二次微分処理を行った．得られた二次微分スペクトルのデップからピーク位置や強度を求めた．



Figure 5.2. ペレット (スケール : 1 cm)

5-2-3 アミラーゼを用いたデンプンの加水分解

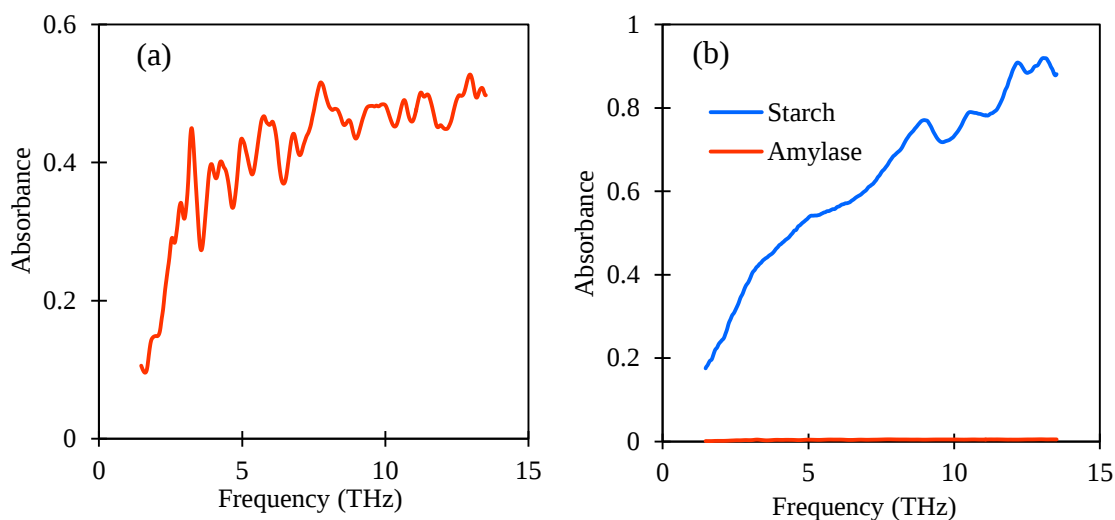


Figure 5.3. (a) : α -アミラーゼの THz スペクトル (サンプル濃度 5%), (b) : 加水分解水溶液中のアミラーゼの影響．溶液中の α -アミラーゼの濃度は 1%以下のため, 吸収は十分に小さい．

発芽リョクトウで見られたピークがデンプンに由来するかを明らかにするために, デンプン標準品およびリョクトウサンプルを α -アミラーゼで加水分解して酵素反応前後のスペクトル変化を測定した．

標準品とリョクトウサンプルに水を加えて, オートクレープを用いて 121 °C で加熱した．水溶液が冷えてから, サンプル重量に対して 1%以下になるように α -アミラーゼを加えて 37 °C で一晩反応させた．事前に α -アミラーゼの THz スペクトルを測定して, この濃度であればスペクトルへの影響は十分に小さいことを確認した (Figure 5.3.)．酵素でデンプンを分解する場合, 3 章で示したように pH を調整したバッファーを用いることが一般的である．しかし, バッファーに含まれる成分は THz 帯で吸収が大きいため, 加水分解の実験では溶媒を水のみとした．最適条件ではないため酵素反応に時間を要するが, 溶媒が水でもデンプンは完全に分解される．デンプンが分解されたことはヨウ素デンプン反応を使って呈色を示さないことから確認した．最後に,

加水分解後の反応液を凍結乾燥して得られた粉体を THz 帯で測定した。

5-2-4 デンプン推定の検量線

THz スペクトルを基にデンプン量推定のための検量線を作成した。二次微分処理はノイズを除去してピーク強度を得ることができるため、スペクトルから物質量を推定する検量線の作成に頻繁に利用されている[3, 4]。そこで、3 章で示した化学分析を使って測定したデンプン量とリョクトウの二次微分スペクトルのピーク強度を比較してデンプン推定の検量線を作成した。

5-2-5 測定条件とサンプル数

生体重と乾物重量の測定には、 $n>10$ のサンプルを用いた。また THz スペクトルは栽培日数毎に $n=5$ で、計 $n=35$ のリョクトウを測定した。

5-3 結果および考察

5-3-1 生長の評価

発芽 1 日目に幼根が形成され、4 日目までに葉、茎、側根が形成された。さらに 7 日目まで茎は伸長を続け、側根数も増加していった。一方、7 日目では子葉が離脱した個体も見られたが、これは子葉に蓄えられた養分が全て使われたためと言える。生長が進んだ発芽リョクトウで子葉が離脱することは過去の研究でも観察されている[5]。また、7 日間の栽培で生体重は増加を続けたが、乾物重に若干減少する傾向が見られた (Figure 5.5.)。これは養分の消費や子葉の離脱が原因と考えられる。また生長が進むにつれデンプン含有量が低下していく様子も確認された (Figure 5.6.)。

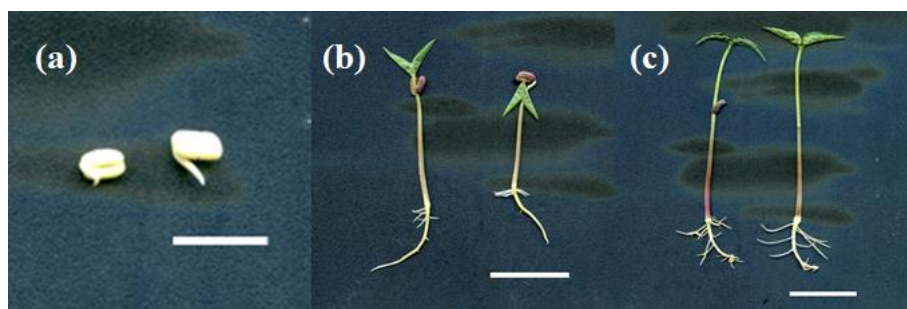


Figure 5.4. 発芽リョクトウの生長の様子. (a) : 1 日 (スケール : 2 cm), (b) : 4 日 (スケール : 4 cm), (c) : 7 日 (スケール : 4 cm).

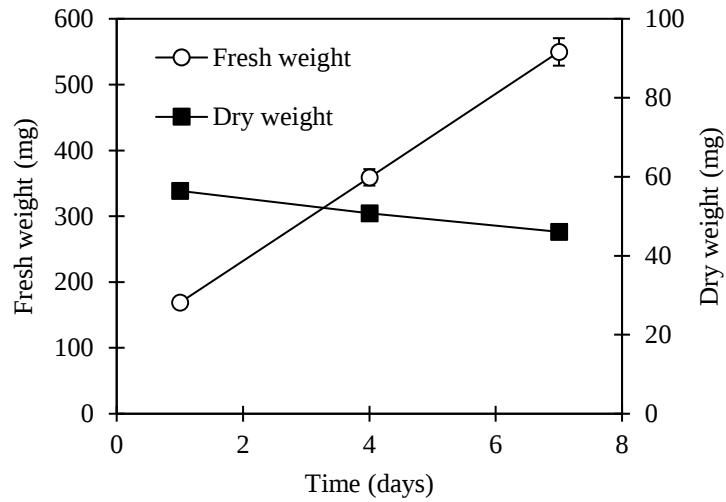


Figure 5.5. 発芽リョクトウの生体重と乾物重の変化 (n>10).

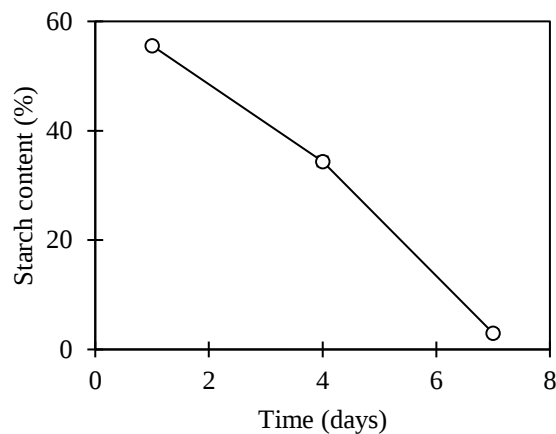


Figure 5.6. 発芽リョクトウのデンプン含有量の変化 (n=5).

5-3-2 発芽リョクトウのテラヘルツスペクトル

Figure 5.7.に横軸を周波数、縦軸を吸光度とした栽培 1, 4, 7 日の発芽リョクトウの THz スペクトルを示す. 栽培 2, 3, 5, 6 のサンプルも同様に測定したが全てを示すとスペクトルが見にくくなるため, 栽培 1, 4, 7 日のみとした. 発芽 1 日目のリョクトウはデンプン標準品と同様なスペクトルを示し, 5.0, 7.9, 9.0, 10.5, 12.2, 13.1 THz に 6 つのピークが見られた. また生長が進むにつれ, これらのピーク強度が徐々に低下していく様子が確認された. 特に前章で明らかになったデンプンのモニタリングに活用できそうな 9.0 THz のピークは明確に減少していき, 栽培 7 日目ではほとんど見られなくなった.

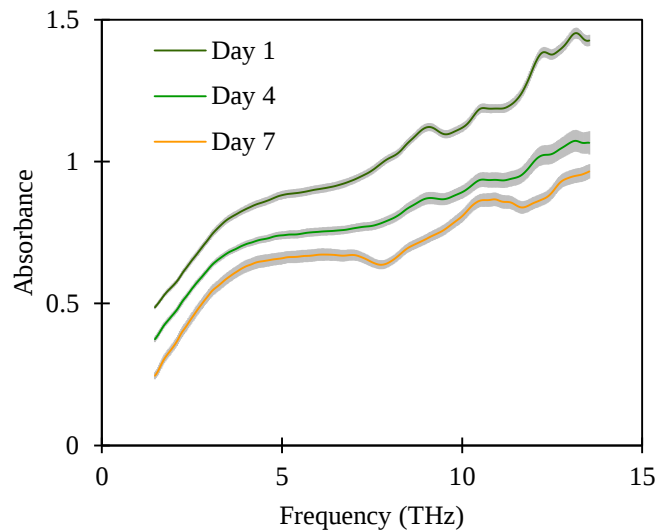


Figure 5.7. 発芽リョクトウの THz スペクトル (n=5). スペクトルが重なったため Day 1 (+0.3) と Day 4 (+0.15) はオフセットした.

以上のように発芽リョクトウとデンプン標準品で吸収スペクトルとピーク位置が類似しており、また生長が進むにつれピーク強度が徐々に低下して傾向が見られた。これらの結果は THz 分光法を用いることでデンプン分解過程をモニタリングできる可能性を示唆している。ただしピークに他の物質の吸収が含まれている可能性もあるため、リョクトウで見られた 6 つのピークがデンプンのみに由来するか、もしくは他の生体物質の情報も含んだピークであるかを検証する必要がある。そこで、 α -アミラーゼを用いて加水分解したサンプルのスペクトルを測定した。仮にピークがデンプンのみに由来していれば、加水分解後ピークがなくなることが予想される。次節では、デンプン標準品とピークが最も顕著に観察された栽培 1 日目の発芽リョクトウを酵素で加水分解した結果を示す。

発芽リョクトウでは種子に蓄積したデンプンがいくつかの中間体を経てグルコースまで分解される。生体物質の多くはアモルファス化しており [1], 糖類も水に溶解するため結晶構造が崩れていると考えられる。よって栽培 4 日や 7 日のリョクトウでは 8.5 THz 付近などにアモルファス化した糖の吸収ピークが現れるはずであるが、そのようなピークは確認されなかった (Figure 5.7.)。

この要因として以下の 2 つことが考えられる。デンプンから生成された中間体は連続的により小さな糖に分解される。例えば、デンプン分解の過程で生成されるラフィノーゼやスタキオースなどのオリゴ糖は生長が進むと含有量が減少もしくは無くなることが計測されている [6, 7]。よって栽培 4, 7 日の発芽リョクトウでオリゴ糖などの中間体のピークが見られなかった要因は連続的な酵素分解により低濃度であったためと考えられる。

一方で、グルコース濃度は発芽後に増加することが知られているため [6], グルコースのピー

クが観察されなかったのは濃度が直接の要因ではない。グルコースは植物内で栄養分としての役割だけでなく、安定性や溶解性を高めるため他の生体物質として結合する修飾剤としての働きがある。例えば、グルコースと結合したステロイド、フェノール化合物、フラボノイド、植物ホルモンなどが発見されている[8, 9]。さらに 1.5-19.5 THz の帯域で金属と糖の結合体を測定した研究では、測定全帯域で結合型は標準品の糖よりもピークが少なくなり、またブロードになることが確認されている[10]。つまり他の物質と結合することで糖の分子間と分子内の両方の振動モードが弱まることが示されている。これまでに植物に含まれる結合型グルコースの THz スペクトルを測定した例はないが、金属と糖の結合型と同様に顕著なピークを持たないと予想される。従って、栽培 4,7 日目の発芽リョクトウでグルコースのピークが見られなかった要因の一つとして、他の物質との結合により振動モードが弱まっていたためと考えられる。

5-3-3 アミラーゼを用いた加水分解後のテラヘルツスペクトル

[1] デンプン標準品（ジャガイモ由来）

4 章で示したように 5.0 と 7.8 THz は分子間振動モードでデンプンの構造に敏感なピークであるため、デンプン量をモニタリングする指標としては不向きである。よって、この加水分解の実験では分子間振動モードと考えられる高周波側の 4 つのピーク変化に着目していく。Figure 5.8. に加水分解前後のデンプン標準品の吸収スペクトルと 7.5 THz より高周波側の二次微分スペクトルを、Table 5.2. にピーク位置を示す。デンプン標準品では加水分解後、9.0、10.5 THz のピークが見られなくなり、新たに 8.4 と 11.0 THz にピークが確認された。加水分解デンプンのスペクトルやピーク位置が前章で示したアモルファス化したマルトースと近いことから、これらの新たなピークはデンプンが分解されてできたマルトースの振動モードと考えられる。

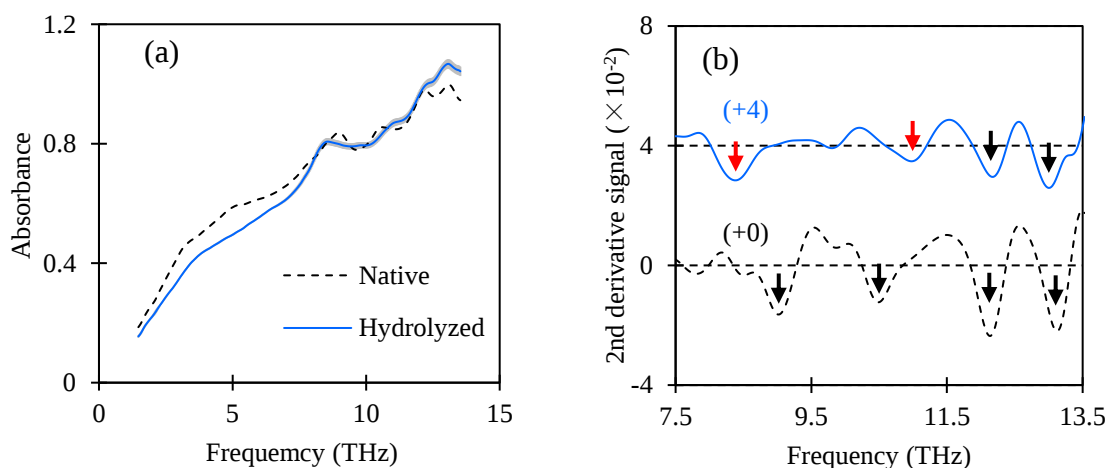


Figure 5.8. 加水分解前後でのデンプン標準品の変化 (n=3). (a): 吸収スペクトル, (b): 二次微分スペクトル. 加水分解後の二次微分スペクトル (+4) はオフセットした. 黒矢印は加水分解前のピーク位置, 赤矢印は加水分解後に新たな見られたピーク位置をそれぞれ示す.

Table 5.1. デンプン標準品の加水分解前後におけるピーク位置の変化

Sample		Peak position					
Native	-	9.0	10.5	-	12.1	13.1	
Hydrolyzed	8.4	-	-	11.0	12.2	13.0	

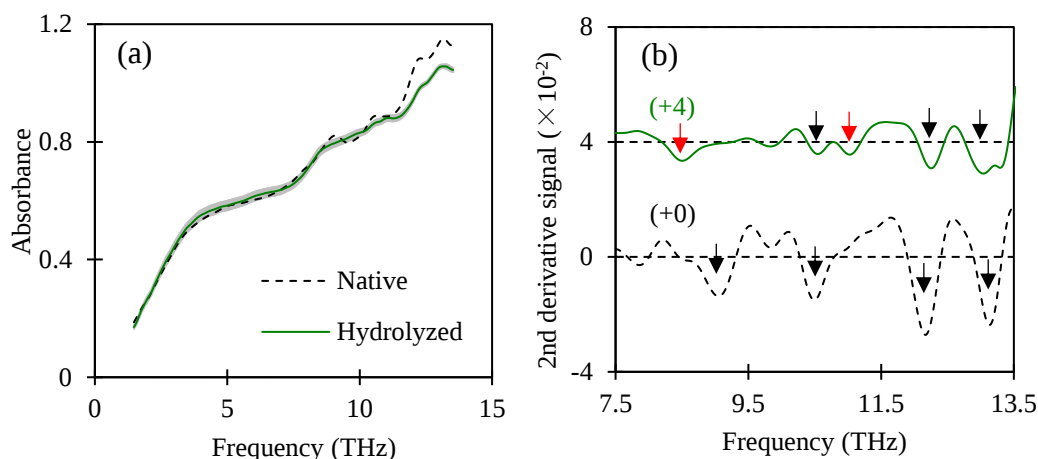


Figure 5.9. 加水分解前後での発芽リョクトウの変化 (n=5). (a): 吸収スペクトル, (b): 二次微分スペクトル. 加水分解の二次微分スペクトル (+4) はオフセットした. 黒矢印は加水分解前のピーク位置, 赤矢印は加水分解後に新たな見られたピーク位置をそれぞれ示す.

Table 5.2. 発芽リョクトウの加水分解前後におけるピーク位置の変化

Sample		Peak position					
Native	-	9.0	10.5	-	12.1	13.1	
Hydrolyzed	8.5	-	10.6	11.0	12.3	13.0	

[2] 発芽リョクトウとリョクトウ種子

リョクトウを加水分解した前後の THz スペクトルを Figure 5.9.に, ピーク位置を Table 5.2.にそれぞれ示す. デンプン標準品と異なりリョクトウでは加水分解後も 10.6 THz にピークが残ったため, リョクトウで見られた 10.5 THz のピークはデンプンだけでなく他の生体物質の吸収も含むピークであることが分かった. 考えられる物質の一つとしてオリゴ糖が挙げられる. 4 章で示したようにオリゴ糖は 10.6 THz にピークを持つため, デンプンが分解されたことによりピークが顕著に現れてきたと考えられる. 他のピーク変化についてはデンプン標準品と同様に傾向が見られた. 以上の結果から, リョクトウの高周波側で見られた 4 つのピークのうち 9.0 THz のピークはデンプンのみに由来するのに対して, 10.5, 12.1, 13.1 THz のピークはデンプンだけでな

く糖類や夾雑物の情報を含んだピークと言える．よってリョクトウのデンプンをモニタリングするために 9.0 THz のピークが有用な指標となることが示された．そこで，以下 5-3-4 では 9.0 THz のピークを用いてデンプンの定量評価を行った．

加水分解後，デンプン標準品では低周波側で吸光度が減少したのに対して (Figure 5.10. (a))，発芽リョクトウでは生長に伴い低周波側で吸光度が増加している．従って，発芽リョクトウで見られた低周波側の吸光度変化はデンプン分解とは関係性が低いと言える．しかし発芽小麦を THz 分光で測定した近年の研究では，低周波側 (0.2-2.0 THz) で見られた吸光度の上昇をデンプン分解と関連づけており誤った見解である可能性が高い[11]．発芽後，デンプンと同様にタンパク質も分解されるため，吸光度上昇の原因物質とは考えにくい．そこで低周波側にブロードなピークを持つ水が原因物質の一つとして挙げられる[12, 13]．仮に生長に伴い細胞壁などに結合水が吸着していくとしたら，凍結乾燥処理では除去されずスペクトルに吸収が反映される可能性が高い．今後，凍結乾燥以外の方法で乾燥させたサンプルのスペクトル測定やカルフィッシャー法などを用いて結合水を測定することで，発芽種子を THz 分光法で測定した時に見られる低周波側の吸光度上昇の要因が解明できると考えられる．

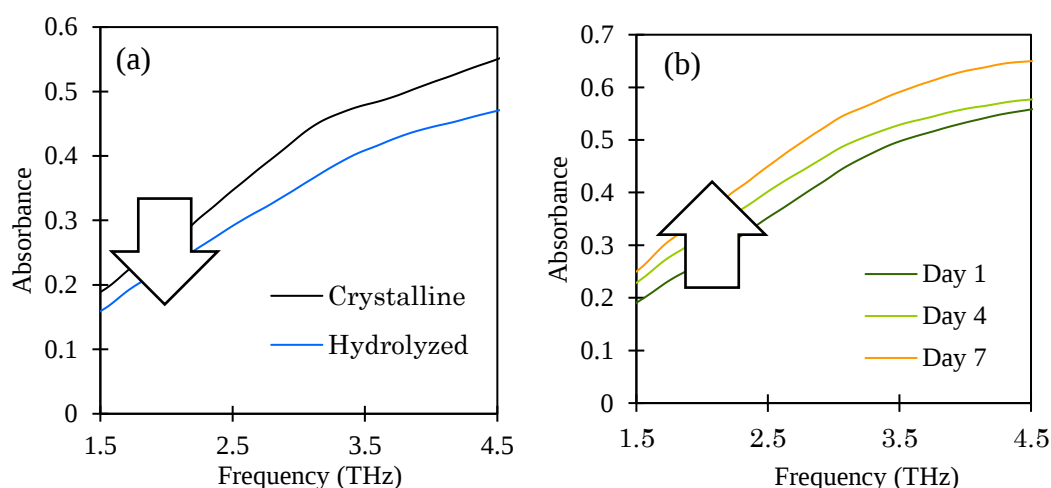


Figure 5.10. 低周波側のスペクトル変化. (a) : 加水分解前後のデンプン標準品．加水分解により低周波側の吸光度は減少. (b) : 発芽リョクトウ．生長に伴い低周波側の吸光度は増加.

5-3-4 デンプン定量のための検量線

横軸を化学分析によって定量したデンプン量，縦軸を 9.0 THz のピークの二次微分強度をとった検量線を Figure 5.11. に示す．サンプルは栽培日数 1-7 日の発芽リョクトウでデンプン含有量の最大は 57.0%，最少は 1.8% である．結果として決定係数 $r^2=0.95$ ，二乗平均平方根誤差 (root mean squared error : RMSE) 0.62 でデンプン量が推定できることが分かり，リョクトウで見られる 9.0 THz のピークはデンプン量を定量するのに有用な指標であることが示された．

以上のように THz 分光を活用することでリョクトウのデンプン分解過程をモニタリングでき，

またピーク強度を用いて定量評価できることが示された．今回は基礎研究として破壊的な測定を行ったが，得られた結果は THz 波がデンプン非破壊計測のポテンシャルを有することを示唆するものである．水を多く含む農産物を透過測定で測ることは難しいため，今回得られた知見を基に全反射減衰分光法や散乱計測などの測定法に展開していくことで，THz 波を活用した農産物のデンプン非破壊計測に繋がっていく可能性が期待できる．

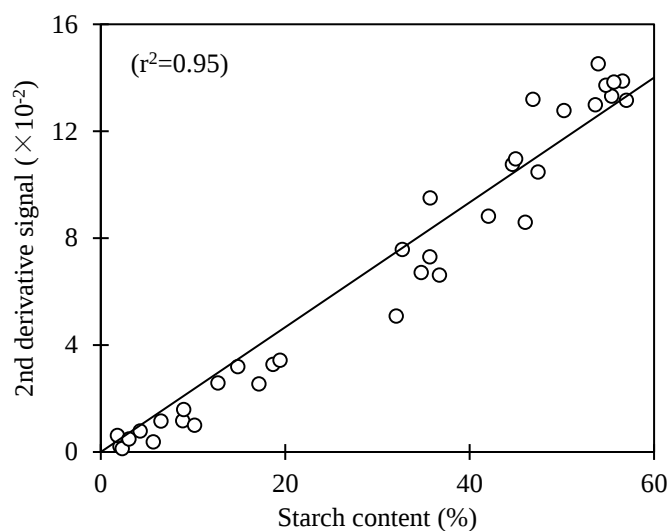


Figure 5.11. 発芽リョクトウを対象としたデンプン量推定のための検量線．

参考文献

- [1] Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; Williams, A. C. FT-Raman spectrum of cotton: a polymeric biomolecular analysis. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1994**, *50* (4), 807–811.
- [2] Xu, J.; Plaxco, K. W.; Allen, S. J. Absorption spectra of liquid water and aqueous buffers between 0.3 and 3.72THz. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (3), 36101.
- [3] Rodriguez-Saona, L. E.; Fry, F. S.; McLaughlin, M. A.; Calvey, E. M. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **2001**, *336* (1), 63–74.
- [4] Genkawa, T.; Ahamed, T.; Noguchi, R.; Takigawa, T.; Ozaki, Y. Simple and rapid determination of free fatty acids in brown rice by FTIR spectroscopy in conjunction with a second-derivative treatment. *Food Chem.* **2016**, *191*, 7–11.
- [5] Okamoto, T.; Minamikawa, T. A vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP) that digests seed storage globulin: Characterization, regulation of gene expression, and posttranslational processing. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152* (6), 675–682.
- [6] Kuo, T. M.; VanMiddlesworth, J. F.; Wolf, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36* (1), 32–36.
- [7] Jaya, T. V.; Venkataraman, L. V. Changes in the carbohydrate constituents of chickpea and greengram during germination. *Food Chem.* **1981**, *7* (2), 95–104.
- [8] Gachon, C. M. M.; Langlois-Meurinne, M.; Saindrenan, P. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: The emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10* (11), 542–549.
- [9] Wang, X. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Lett.* **2009**, *583* (20), 3303–3309.
- [10] Yang, L.; Sun, H.; Weng, S.; Zhao, K.; Zhang, L.; Zhao, G.; Wang, Y.; Xu, Y.; Lu, X.; Zhang, C.; Wu, J.; Jia'er, C. Terahertz absorption spectra of some saccharides and their metal complexes. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **2008**, *69* (1), 160–167.
- [11] Jiang, Y.; Ge, H.; Lian, F.; Zhang, Y.; Xia, S. Early detection of germinated wheat grains using terahertz image and chemometrics. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (January), 1–9.
- [12] Yada, H.; Nagai, M.; Tanaka, K. Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *464* (4–6), 166–170.
- [13] Yada, H.; Nagai, M.; Tanaka, K. The intermolecular stretching vibration mode in water isotopes investigated with broadband terahertz time-domain spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *473* (4–6), 279–283.

6 章 結言

本研究では、環境制御下での食料生産において機能性農産物の効率的・安定的な生産を目指し、機能性成分を増加させる栽培方法と良質な農産物の選抜に向けたデンプン測定方法を検討してきた。具体的には CL による擬似的な微小重力環境下で栽培したリョクトウ中の機能性成分量や抗酸化作用を評価した。さらに THz 分光法を用いてデンプン標準品やリョクトウ中のデンプンを測定した。

2 章では、機能性成分である色素の計測を行った。CL で 4 日間栽培したリョクトウに含まれるクロロフィル、カロテノイド、アントシアニン量を測定し、通常の重力環境下で栽培したコントロールと比較した。クロロフィルとカロテノイド量に変化は見られなかったが、CL でアントシアニン量が有意に減少した。この要因を明らかにするため、エチレン阻害剤として使われている硝酸銀を培地に添加し栽培すると、CL とコントロールでアントシアニン量に変化が見られなくなった。よって CL に見られたアントシアニンの減少には内因性のエチレンが関与することが明らかになった。

3 章では、抗酸化作用に着目して CL の実験をさらに進めた。2 章と同様に CL で栽培したリョクトウの抗酸化物質と抗酸化作用を計測し、コントロールと比較した。結果として CL では抗酸化物質質量が増加し抗酸化作用も向上することが明らかになった。さらに CL で栽培すると子葉内でアミラーゼが活性化され、貯蓄されていたデンプンの分解が促進されることも確認された。よって CL で栽培したリョクトウではデンプンから分解された糖が豊富な状態にあることが予測できる。この糖が抗酸化物質合成のための活性因子や前駆体として利用されたため、CL で抗酸化作用が向上したと考えられる。これらの結果から CL はデンプン分解の促進および農産物の抗酸化作用を向上させるポテンシャルがあることが示された。

4 章では、デンプンや糖の標準品を用いて THz スペクトルと結晶構造の関係性を調べた。まず結晶性とアモルファス化したデンプンを測定することで分子間と分子内の振動モードが観察できることを明らかにした。またデンプンと構造がよく似た糖類の THz スペクトルとの比較から 9.0 THz の吸収ピークがデンプンでのみ観察されることを特定した。さらに異なる植物種由来のデンプンの THz スペクトルと X 線回折パターンを比較することで、THz 分光法ではデンプンの long-range order の構造が観察できる可能性を明らかにし、従来の赤外やラマン分光法で得られる情報との違いを示した。

5 章では、4 章の結果に基づき発芽リョクトウをサンプルとしてデンプン分解過程を THz 分光法でモニタリングできるかを検討した。発芽リョクトウではデンプン分解に伴い吸収ピークが減少していくことが観察され、THz 分光法によりデンプン分解過程をモニタリングできる可能性が示唆された。さらにアミラーゼを用いて加水分解すると 9.0 THz のピークが消失したため、デンプンのモニタリングに有用なピークであることが分かった。そこでピーク強度からデンプン量を推定する検量線を作成したところ決定係数 $r^2 = 0.95$ の精度でデンプン量を推定できるこ

とが明らかになったため、THz 分光法が新たなデンプン計測法になる可能性が示された。

CL は長らく宇宙実験のシミュレーションのための装置として利用されてきたが、本実験で得られた結果は発芽初期に起こるデンプン分解を促進し機能性農産物を生産するための新たな栽培装置になりうる可能性を示すものである。また同時に CL で栽培した農産物では、デンプン分解量に注目することで機能性をある程度予測できる可能性を示唆する結果であると言える。本研究で THz 波を活用することで従来法では困難であったデンプンの簡易計測の可能性が示唆されたため、THz 技術を活用することで単にデンプン量を推定できるだけでなく、CL で栽培した農産物の機能性を把握できる可能性が示された。以下では機能性農産物の生産に向けた CL と THz 技術の今後の展望について説明する。

農学分野における CL の有用性を検討していくために更なる知見が求められる (Figure 6.1.)。まず回転速度や回転方向など CL の条件を変えた場合に、デンプン分解や機能性にどのような影響があるかを調べ、最適な栽培条件を明らかにする必要がある。また他の農産物でも同様な実験を行い、どのような農産物であれば効果的に高機能化が進むかを調べる研究も求められる。

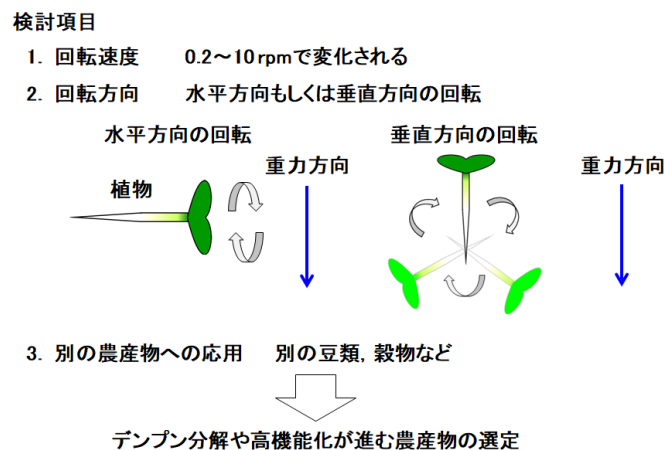


Figure 6.1. クリノスタットを用いた機能性農産物生産に向けた今後の展望

THz 波は原理的にデンプン測定に適していると考えられるが、これまでに農産物を測定した研究例は極めて少なくデンプンを測定するポテンシャルがあるか定かではなかった。そこで本研究では安定的な測定が可能なペレットを活用してリョクトウ中のデンプン計測を進めてきた。今後、デンプンを切り口とした機能性農産物の選抜に応用していくには、今回得られた知見に基づいて非破壊計測法を開発していく必要がある。しかし本研究と同様な透過測定では水分量が多い農産物に対して光が透過しないため、以下で説明するように全反射減衰分光法や散乱計測など別の測定法を導入していく必要がある。

1 章でも説明したようにデンプンは生体物質としては数少ない不溶性の物質であり、植物内ではデンプン粒として貯蔵されている。そのため水溶液中では結晶状態が崩れ THz 帯で吸収ピー

クを持たない水溶性の物質とは異なり、水を含んだ農産物であってもデンプンの吸収ピークが観察できると考えられる。そこで全反射減衰分光法を使ってプリズムに農産物を押しつけて測定することで (Figure 6.2.(a)), デンプンの吸収ピークが観察できる可能性が期待できデンプンの非破壊計測に繋がることが見込まれる。

また散乱計測でもデンプン非破壊計測の可能性が期待できる (Figure 6.2.(b))。デンプンの大きさは植物種によって違いはあるものの概して数 μm から 30 μm 程度であり THz 帯の波長と大きさが一致するため、THz 波はデンプンの散乱情報を得るのに適していると考えられる。また他の生体物質は植物内で溶解しているため外乱が少なくデンプンの情報を切り出しやすいと予想される。今回のように標準品などを使ってデンプンの散乱情報を得られる周波数を特定できれば散乱計測を使ってもデンプン非破壊計測ができるものと考えられる。

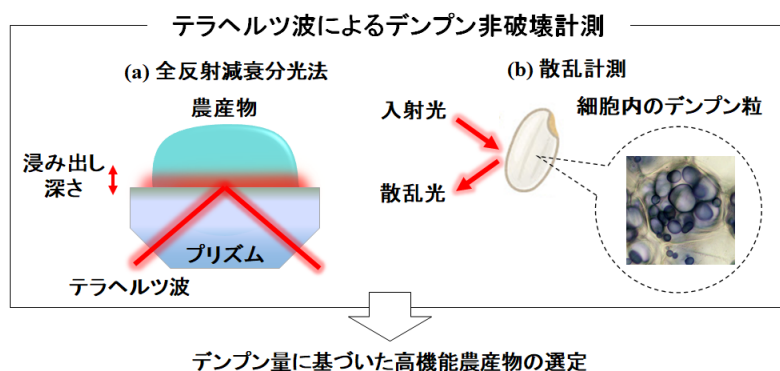


Figure 6.2. デンプン非破壊計測に向けた今後の展望

近年, CL および THz 技術の発展は著しく新たな装置, 光源, 検出器が次々と開発されている。これらの技術を駆使することでデンプン分解や機能性の向上を促進する CL の最適条件が明らかになるものと考えられる。さらに THz 波による非破壊デンプン計測が可能になれば機能性が高い個体の選抜や機能性を簡便に把握できるようになり、デンプンを切り口とした新たな品質評価技術ができる可能性が見込まれる。

謝辞

本研究は、京都大学大学院 農学研究科 生物センシング工学研究室において近藤直教授、小川雄一准教授、鈴木哲仁助教による御指導と御助言のもとで行われました。特に小川准教授には、細かな実験データの解釈から研究者としての心構えに至るまで大変貴重な御助言を頂きました。知識が乏しく考えが浅い私にとって、今後の研究生活で必ず財産になっていくと思います。また同農学研究科 農業システム工学研究室の清水浩教授に博士審査会で副査を担当して頂きました。投稿論文の作成時には、Garry John Piller 先生に丁寧に英語を添削して頂き多くの御助言を頂きました。先生方には、厚く御礼申し上げます。

書類の作成など事務仕事を引き受けて頂いた加戸綾乃様、西垣真樹子様に御礼申し上げます。

付録に示すようにリョクトウ種子を栽培するにあたり圃場の使用と栽培に御助力頂きました山中清司様、母の神谷元子、姪の神谷添花に御礼申し上げます。

本研究は JSPS 科研費 17J08363 の助成を受けたものです。また X 線回折の測定は文部科学省 21 年度補正予算で設立された「低炭素研究ネットワーク」京都大学ナノテクノロジーハブ拠点、液体窒素の使用は京都大学低温物質科学研究センターの支援を受けて実施されました。ここに、御礼を申し上げます。

付録

1 章 テラヘルツ分光法を用いたリョクトウ種子中のデンプン量の推定

本研究では、THz 分光法を用いてリョクトウ種子で起きるデンプン合成過程のモニタリングも行った。ただしペレットの測定方法や測定条件が最適でなかったことや十分なサンプル数を得られなかったことなどがあり本実験は付録に記載することとした。

1-1 実験方法

1-1-1 栽培方法

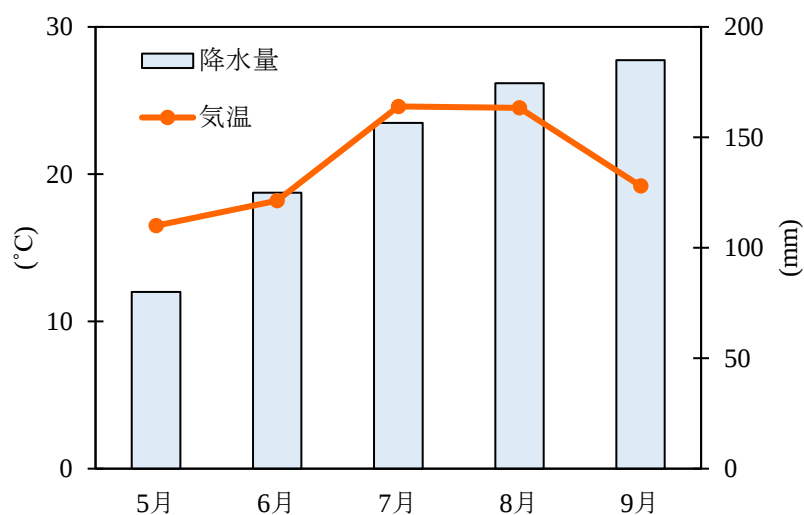


Figure 1.1. 栽培中の気温と降水量（奈良県奈良市針町） [1].



Figure 1.2. リョクトウの生長. (a) : 発芽から約 1 カ月後, (b) : 発芽から約 2 カ月後, (c) : リョクトウの花.

2017 年 5 月から 9 月にかけて奈良県山辺郡山添村の圃場でリョクトウを栽培した。播種から

数日で発芽し、約 1 ヶ月で背丈が 10 cm 程度に伸長した。その後は茎が倒れるのを防ぐため支柱に固定して栽培を続けると、播種から 2-3 ヶ月で黄色の花が咲いた。種子の生長を計測する場合、開花日を基準とするため[2, 3]、花の下に色の異なる糸やテープを結び開花後の日数（days after flowering : DAF）の目印とした。受粉すると花は 1-2 日で枯れ、種子が入った莢が形成される。豆科植物の莢には主に 2 つの役割があると言われており、外界の物理的刺激から種子を保護する働きと光合成により莢で生産されたエネルギーを種子に供給する働きである[4, 5]。種子が十分に生長すると、莢は黒く変色し乾燥していく。圃場でサンプリングした DAF 5, 8, 10, 12, 18, 25 の莢を遮光状態で京都大学まで運び、莢から種子を取り出した。1-15 本の莢から取り出した種子を凍結乾燥した後、測定まで -80 °C のフリーザーで保存した。また基礎データとして種子の生体重と莢の長さも同時に測定した。

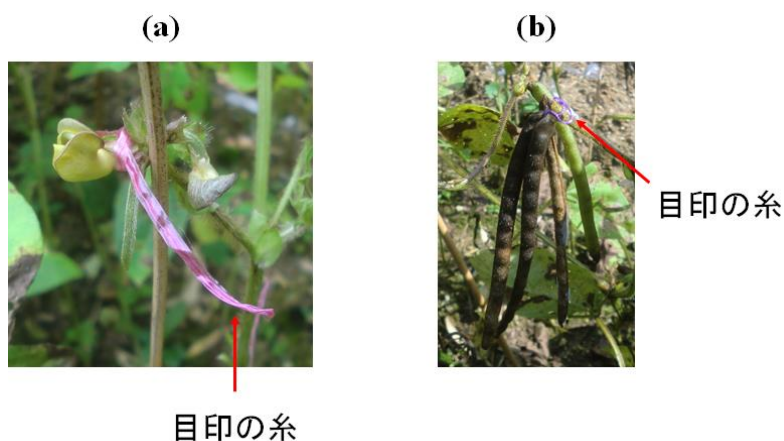


Figure 1.3. サンプリング方法. (a) : 開花した花の下に色の異なる糸やテープを結ぶ. (b) : 生長した莢の DAF が判別できる.

1-1-2 テラヘルツ分光法

リョクトウ種子と PE を混ぜサンプル濃度 6%に調整した粉体 150 mg でペレットを作成し、FARIS-1s で透過測定を行った。分解能 0.06 THz (2 cm⁻¹) として測定範囲は 1.5-13.5 THz で分光スペクトルを測定した。また 150 mg の 100% PE ペレットも用意しリファレンスとした。測定は毎回、治具のみを置いたエアー、100% PE ペレット、サンプルペレットの順に行った。エアーをリファレンスとして PE とサンプルの吸光度をそれぞれ算出した後に、以下の式を用いて PE95%分の吸光度を差し引きリョクトウ種子の吸光度を求めた。

$$A_{\text{Sample}} = A_{\text{Sample pellet}} - 0.95 \times A_{\text{PE pellet}} \quad (1.1)$$

ここで、 A_{sample} : 求めたいサンプルの吸光度、 $A_{\text{sample pellet}}$: サンプルペレットの吸光度、 $A_{\text{PE pellet}}$: 100% PE ペレットの吸光度とする。Figure 1.4.に示すように式 (1.1) を用いた測定方法と 4, 5 章

で示したように 100% PE をリファレンスとした方法を比較すると，吸収スペクトルを求めるだけであれば大差はない．ただし本実験で用いた方法は赤外や THz 帯でのペレット測定法として一般的ではなく，以下のような誤解を招くこともあるため避けるべきである．

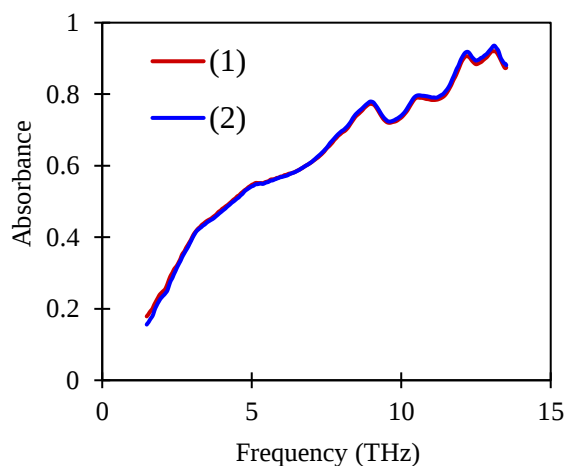


Figure 1.4. デンブンの吸収スペクトルの比較. (1): 式 (1.1) を用いて計算した吸収スペクトル. (2): 4, 5 章で示した測定で得られた吸収スペクトル.

投稿論文に対するレフリーからのコメント

I am sorry that it completing this review took quite a while. Yet, the reason is, that there is still one part of the manuscript that was not clarified but rater got more confused with the last revisions and I had to find the time to have a closer look on what is going on there. In the first revision there was this formula:

$$(I) A = A_{\text{samplepellet}}/t_{\text{samplepellet}} - 0.95 \times A_{\text{PEpellet}}/t_{\text{PEpellet}}$$

In the currenct revision it was changed to:

$$(II) \text{Absorbance}_{\text{sample pellet}} - 0.95 \times \text{Absorbance}_{\text{PE pellet}}$$

In the first revision (I) there are two unclarities/problems:

(1) Dividing amplitude by sample thickness does not give you absorbance. Have a look at Lambert-Beer's law to see that the relation is not linear but logarythmic. Besides that, reflections on the sample's surface should be considererd, too. (2) If I got your intention for this formula right, then your idea is that you sample pellet consists of 5% actual sample material and 95% PE. Thus, you want to substract the absorbance of these 95% PE from the overall absorbance of your sample pellet to get the actual absorbance of your 5% sample material. Apparently, you are using some kind of effective medium theory. Did you make this up just by intuition or is it backed by an underlying theory? Please be aware that there are many different effective medium theories, each suitable for different applications. So, it is important that you make clear why it is the right choice to do these calculations with your formula and not rather with one of the other effective medium theories. (see also: <https://www.intechopen.com/books/recent-optical-and-photonic-technologies/applications-of-effective-medium-theories-in-the-terahertz-regime>)

In the second revision of the formula (II) it is unclear, if problem (1) was just hidden or actually corrected. Please make clear how you get from your measured data to your presented results. Problem (2) still exists in the same way.

1-1-3 測定条件とサンプル数

種子の生体重計測では $n>15$, 莢の長さの測定では $n=10$ のサンプルをそれぞれ用いた. 各栽培日数で $n=3$ のサンプルを測定して, 検量線には $n=15$ のサンプルを用いた.

1-2 結果および考察

1-2-1 生長の評価

Figure 1.5. にリョクトウ種子の生長の様子を, Figure 1.6. にリョクトウ種子の生体重と莢の長さをそれぞれ示す. リョクトウ種子の表面は DAF 18 まで緑色であったが, その後は急速に黒ずんでいった. このような種子表面の色の変化は先行研究でも観察されている [6]. また, 種子の生体重は DAF 12 まで増加したが, その後は徐々に減少していった. リョクトウ種子では生長が進むにつれ内部の水分が蒸発して硬くなっていくため, DAF 12 以降の重量減少は主に種子内部の水分蒸発によるものと考えられる. 莢の長さは DAF 18 日まで伸長していったが, その後の 7 日間で若干減少する傾向が見られた.

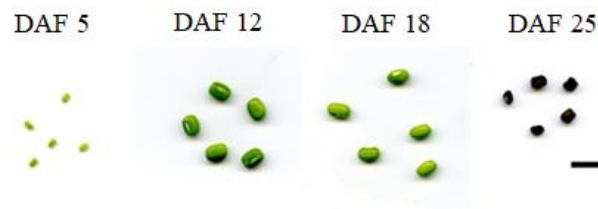


Figure 1.5. リョクトウ種子の生長の様子 (スケール : 1 cm).

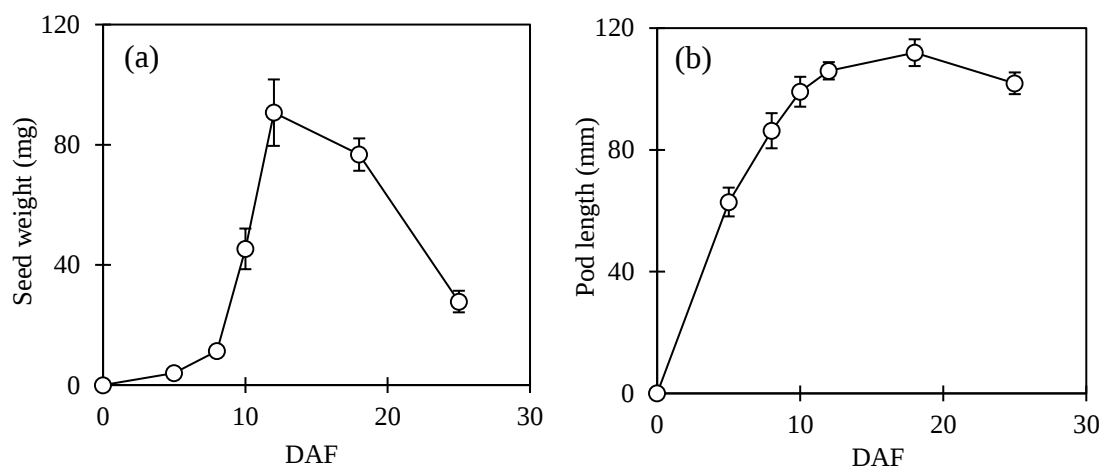


Figure 1.6. (a) : リョクトウ種子の生体重, (b) : 莢の長さ.

1-3-2 リョクトウ種子のテラヘルツスペクトル

Figure 7.7.にリョクトウ種子の THz スペクトルを示す。DAF 5 の種子では明確なピークは見られないが、生長と共に徐々に 5.0, 7.8, 9.1, 10.5, 12.2, 13.1 THz でピークが現れていく様子が確認された。発芽リョクトウと比較してピーク位置が若干異なる理由は測定分解が違うためと考えられる。よって THz 分光を用いることでリョクトウのデンプン合成過程もモニタリングできる可能性が示唆された。

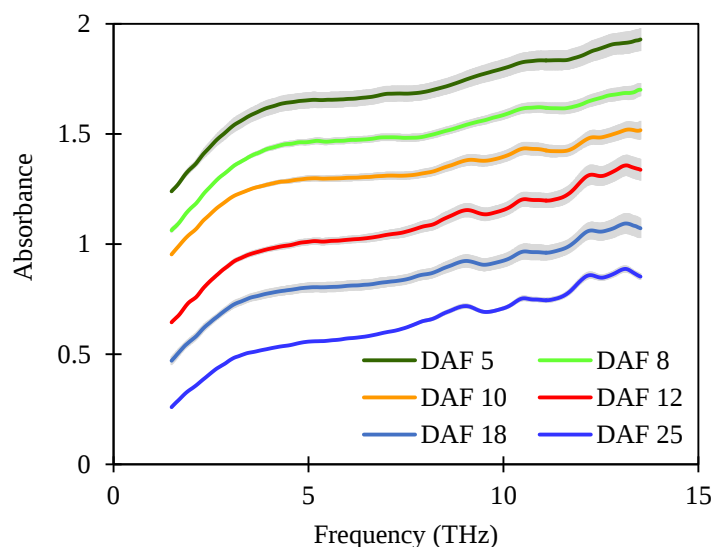


Figure 1.7. リョクトウ種子の THz スペクトル。スペクトルが重なったため DAF5-18 はオフセットした。DAF 5 (+1.0), DAF 8 (+0.8), DAF 10 (+0.7), DAF12 (+0.4), DAF18 (+0.2)。

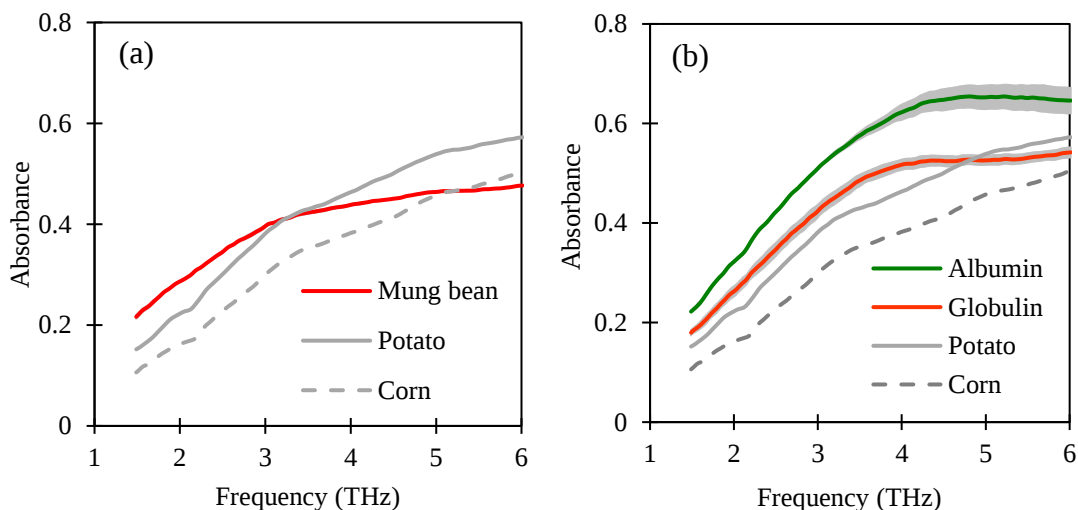


Figure 1.8. 低周波側のスペクトル。(a) : DAF 25 のリョクトウとデンプン標準品, (b) : タンパク質とデンプン標準品。リョクトウの吸光度はサンプル濃度 5%に換算した。

さらに得られた種子のスペクトルを標準品と比較した。DAF 25 の種子では A タイプ、B タイプいずれのデンプン標準品よりも低周波側の吸光度が高くなった (Figure 1.8. (a))。よって、リョクトウ種子ではデンプンだけでなく他の生体物質の吸収も低周波側のスペクトルに現れている可能性が考えられる。2 章で説明したようにタンパク質は炭水化物に次いで多い成分であり [7, 8], また過去の THz 研究でタンパク質は低周波側で吸収が大きいことも示されている [9, 10]。よって、リョクトウの低周波側のスペクトルにはタンパク質の吸収が影響していると予想される。これを検証するために、リョクトウに含まれる主要なタンパク質であるアルブミン (和光純薬, 品番: 017-10504) とグロブリン (シグマアルドリッチ, 製品コード: L3908-1G) の THz スペクトルを測定した。

ただしアルブミンとグロブリンは水に溶けるため、植物内では構造が変化している可能性が考えられる。そこで水に溶解された後、凍結乾燥して得られて粉体をペレットにして測定した (サンプル濃度 5%)。アルブミンとグロブリンの吸収スペクトルは、リョクトウと同様に低周波側でデンプン標準品より高くなった (Figure 1.8. (b))。これはリョクトウの低周波側の吸収スペクトルにアルブミンやグロブリンが影響をしていることを示す結果と言える。

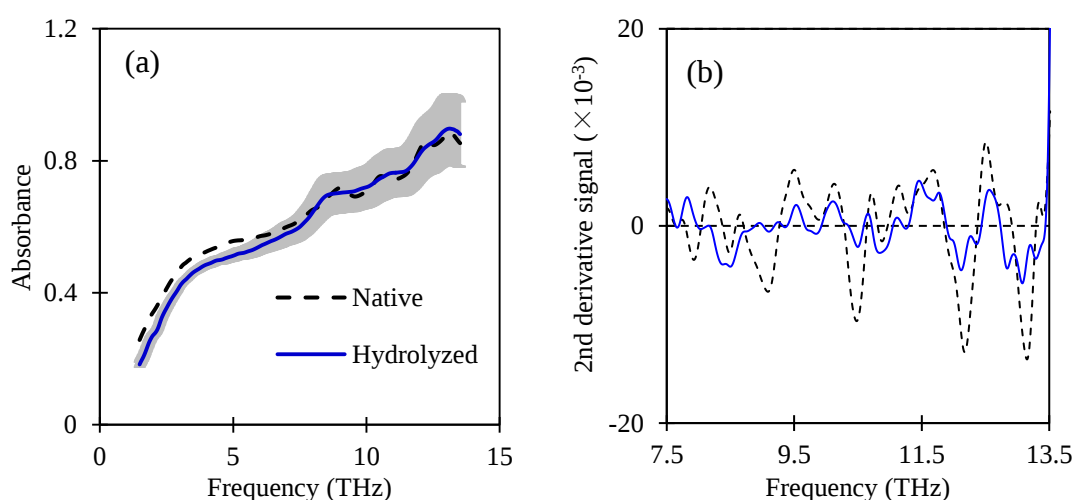


Figure 1.9. 加水分解したリョクトウ種子の THz スペクトル. (a) 吸収スペクトル. (b): 二次微分スペクトル.

1-3-3 加水分解したリョクトウ種子のテラヘルツスペクトル

加水分解したリョクトウ種子の吸収スペクトルと二次微分スペクトルを Figure 1.9. に示す。二次微分スペクトルでは多くのデップが見られた。これは分解能が細かすぎたために起きたノイズと考えられる。以上のように、分解能 0.06 THz でペレットを測定すると生体物質の吸収かノイズかを判断することが難しくなる。4 章, 5 章で示したように 9.1 THz のピークはデンプンに由来する可能性が高いため、以下ではこのピークの二次微分強度とデンプン量から検量線を作成した。

1-3-4 デンプン定量のための検量線

Figure 1.10.に横軸をデンプン量、縦軸を 9.1 THz の二次微分強度とした検量線を示す．決定係数 $r^2=0.96$ という結果が得られたが，検量線が明らかに原点を取っていないことが分かる．この要因としノイズの影響が考えられる．今回の測定では分解能が 0.06 THz と細かくノイズが出やすい条件であったため，ピークにデンプン+ノイズの情報が含まれておりピーク強度が大きく見積もられた可能性が考えられる．

以上のように THz 分光法を使ってリョクトウのデンプン合成過程もモニタリングできる可能性が示唆されたが，測定方法やサンプル数が十分とは言いきれず再実験が必要となった．

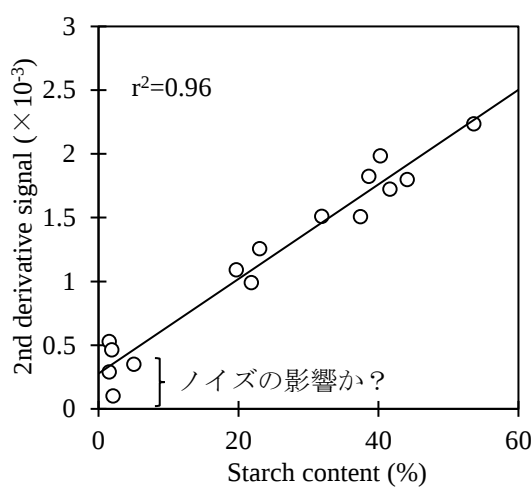


Figure 1.10. 発芽リョクトウを対象としたデンプン量推定のための検量線．検量線が原点を通らなかった要因としてノイズの影響が考えられる．

2 章 A6 細胞の培養

A6 細胞はアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の腎臓から取り出した細胞である。ガン細胞などを培養する場合、培養環境を温度 37℃、二酸化炭素濃度 5%に保つ必要があるが、A6 細胞は常温、二酸化炭素供給なしの環境でも成長するという利点がある。この性質を利用して、細胞実験のモデルサンプルとして活用されている。以下では、A6 細胞の培養法について説明する。

< 試薬 >

Table 2.1. A6 の培養に用いた試薬

試薬	製造元	品番
ライボビッツ培地	和光純薬	128-06075
超純水	和光純薬	214-01301
血清	Biosera	012BS961
抗生物質	シグマアルドリッチ	A5955-100ML
トリプシン	和光純薬	201-16945

< 培地 >

クリーンベンチ内で、ライボビッツ培地：超純水：血清：抗生物質 = 50 : 39.8 : 10 : 0.2 になるように調整する[11]。ただし、超純水は予めオートクレープを用いて滅菌処理を行った。また、血清は非動化処理済みのものを用いた。

< 培養過程 >

ウォーターバスなどを用いて解凍した細胞懸濁液に培地成分を加えて、5 分間遠心分離した後、上清液を除去し保存液を取り除く。再度、培地を加え 10 回ほどピペッティングをして均一な懸濁液を用意する。培養に適したサイズのデッシュに懸濁液を静かに流し込む。本実験では、直径 6 cm のデッシュに約 4 mL の細胞懸濁液を入れ、常温で培養し、成長の様子を位相差顕微鏡 (AE30-SA1, 島津理化) で観察した。播種直後の浮遊した細胞は円形をしているが (Figure 2.1 (a)), 数時間でデッシュに接着し、その後は細胞分裂を繰り返し増殖していった (Figure 2.1 (b)-(d))。培地は 5 日ごとに交換した。

細胞がデッシュの 70%程度になったタイミングで継代を行った (Figure 2.1. (e))。まず、トリプシンで細胞をデッシュから剥がすが、培地成分が残っているとトリプシンの作用が低下する。そこで、培地を抜いた後、PBS で 2 回洗浄してから少量のトリプシンを添加する。過剰にトリプシンを加えると細胞へのダメージが大きくなる。本研究では 6 cm のデッシュに対して 1 mL のトリプシンを加えて、静かに振とうし、細胞をデッシュから剥がした。その後、10%の DMSO を含む培地を十分量加えた細胞懸濁液を 1.5 mL のチューブに移し、-80℃のフリーザーで保存した。

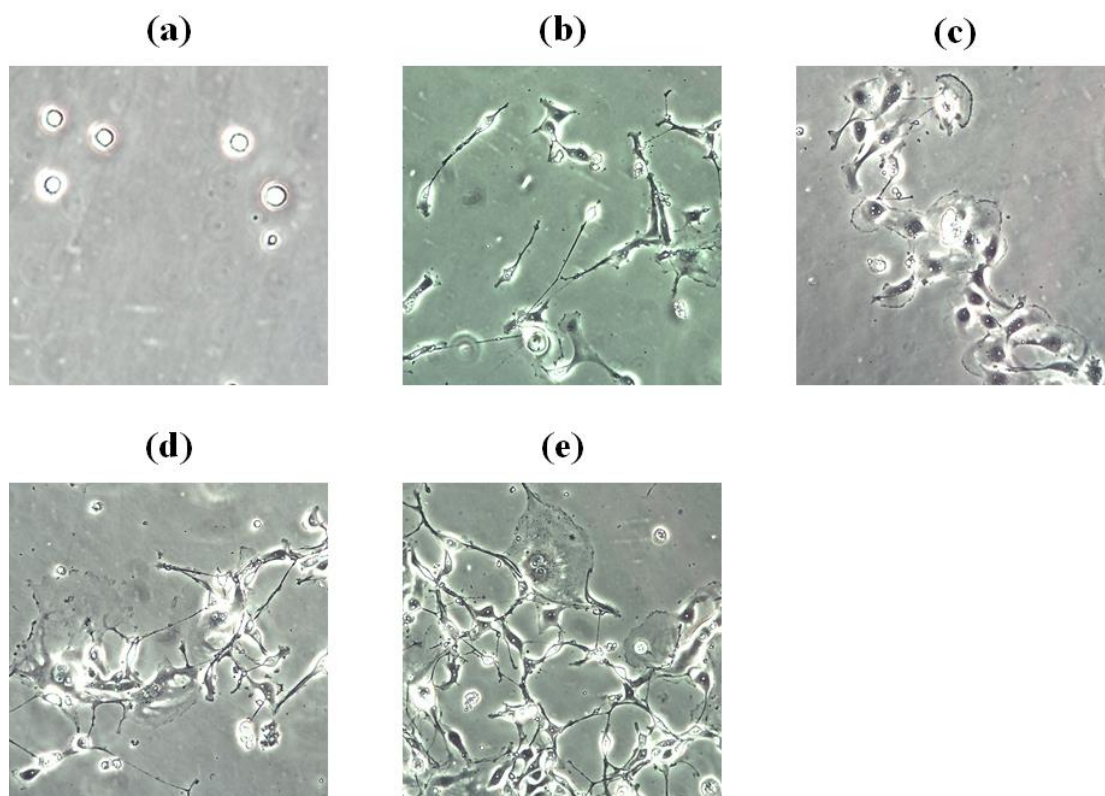


Figure 2.1. A6 細胞の成長の様子. (a) : 播種直後, (b) : 培養 4 日目, (c) : 培養 7 日目, (d) 培養 9 日目, (e) : 培養 13 日目.

参考文献

- [1] 気象庁ホームページ :

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=64&block_no=0630&year=2017&month=&day=&view=p1 (2018 年 3 月 24 日現在).

- [2] Chopra, J.; Kaur, N.; Gupta, A. K. Ontogenic changes in enzymes of carbon metabolism in relation to carbohydrate status in developing mungbean reproductive structures. *Phytochemistry* **2000**, *53* (5), 539–548.
- [3] Tsay, J. S.; Kuo, W. L.; Kuo, C. G. Enzymes involved in starch synthesis in the developing mung bean seed. *Phytochemistry* **1983**, *22* (7), 1573–1576.
- [4] Minamikawa, T.; Yamauchi, D.; Wada, S. Expression of α -amylase in *Phaseolus vulgaris* and *Vigna mungo* plants. *Plant Cell Physiol.* **1992**, *33* (3), 253–258.
- [5] Chopra, J.; Kaur, N.; Gupta, A. K. Role of enzymes of sucrose-starch conversion in seed sink strength in mung bean. *Biol. Plant.* **2005**, *49* (4), 561–566.
- [6] Kazłowski, B.; Chen, M. R.; Chao, P. M.; Lai, C. C.; Ko, Y. T. Identification and roles of proteins for seed development in mungbean (*Vigna radiata* L.) seed proteomes. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (27), 6650–6659.
- [7] Awolunate, E. O. Accumulation and quality of storage protein in developing cowpea, mung bean and soya bean seeds. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34* (12), 1351–1357.
- [8] Mubarak, A. E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chem.* **2005**, *89* (4), 489–495.
- [9] Falconer, R. J.; Zakaria, H. A.; Fan, Y. Y.; Bradley, A. P.; Middelberg, A. P. J. Far-infrared spectroscopy of protein higher-order structures. *Appl. Spectrosc.* **2010**, *64* (11), 1259–1264.
- [10] Shiraga, K.; Ogawa, Y.; Kondo, N. Hydrogen bond network of water around protein investigated with terahertz and infrared spectroscopy. *Biophys. J.* **2016**, *111* (12), 2629–2641.
- [11] Ikuzawa, M.; Akiduki, S.; Asahima, M. Gene expression profile of *Xenopus* A6 cells cultured under random positioning machine shows downregulation of ion transporter genes and inhibition of dome formation. *Adv. Spa. Res.* **2007**, *40* (11), 1694–1702.