

## ピークはなぜ出ない? ~高校での成長促進物質の同定方法の確立を目指して~

兵庫県立川西北陵高等学校 自然科学部 2年 村上希武

**1. 動機および目的** 本部は平成27年度よりクヌギ林の保全を目的に、光の強さとクヌギの生長物質の違いについて研究を行ってきた。その中で、代表的な生長物質であるインドール酢酸 (以下 IAA) をペーパークロマトグラフィーで展開すると、ほとんどの場合ではっきりとしたピークが生じず、そればかりか Rf 値によっては成長抑制が生じるという不可解な現象を目の当たりにした。この現象の原因を探るために、以下の実験を行った。

### 2. 材料 エンバク (*Avena sativa*)

エンバクは、イネ科カラスムギ属に分類される一年草の栽培種である。実験材料で使用した「ネグサレタイジ」は、最も安価で幅広く流通しており手に入れやすかったことから実験材料としたが、エンバクの野生種であり品種改良されていないことから、個体差が大きいという難点がある。以下アベナと表記する。

### 3. 仮説 はっきりとしたピークが出なかった原因として以下の三つの仮説を立てた。

仮説①：使用しているアベナ種子は個体差が大きく、IAA の検出ができなかった。(昨年度 えん麦/ネグサレタイジ/タキイを使用)

仮説②：クロマトグラフィーの原点へのスポットの回数が不適切である。(昨年度 30 回スポット)

仮説③：展開液に含まれる物質のいずれかが、アベナの成長を抑制するはたらきをもつ。

(昨年度 イソプロパノール：アンモニア：水=8：1：1の展開液使用)

**4. 実験** 全ての実験に共通する「アベナ伸長テスト」は次の方法で行った。吸水し発芽したアベナの種子を土に蒔き、暗室で育成した。その後、2~3 cmに生育したアベナの幼葉鞘の先端3 mmを切り取った後、6.5~6.7 mmの長さに切り取った。これを各試験液に浸し、暗室にて20~24時間静置後、切片の長さをデジタルノギスで計測した。

【実験1】まず、仮説1を検証するために、様々な IAA 濃度の水溶液を試験液とし、アベナ伸長テストを行った。

《方法1》IAA0.1 gを微量のエタノールに溶かした後水99.9 gを加え、 $1.0 \times 10^{-1}\%$  IAA水溶液を調製した。この溶液を水で10倍に希釈し $1.0 \times 10^{-2}\%$  IAAを調製した。同様に10倍希釈を繰り返して、 $1.0 \times 10^{-3}\%$ 、 $1.0 \times 10^{-4}\%$ 、 $1.0 \times 10^{-5}\%$  IAA水溶液を調製した。

《結果1》アベナの幼葉鞘は、IAA濃度 $1.0 \times 10^{-5}\%$ ~ $1.0 \times 10^{-2}\%$ で蒸留水での平均伸長率を上回った。一方、IAAが $1.0 \times 10^{-1}\%$ の試験液では、蒸留水での平均伸長率を下回った。(図1) また、平均伸長率が最大になったのは、 $1.0 \times 10^{-3}\%$ であった。

《考察1》アベナの幼葉鞘は IAA 濃度の違いにより伸長率が変化し、IAA の検出が可能

であることが明らかとなった。平均伸長率からは、IAA濃度が $1.0 \times 10^{-3}\%$ 付近が最適濃度であるということが伺える。一方、高濃度の IAA においてはデータのばらつきが大きく、一定数以上の数を実験

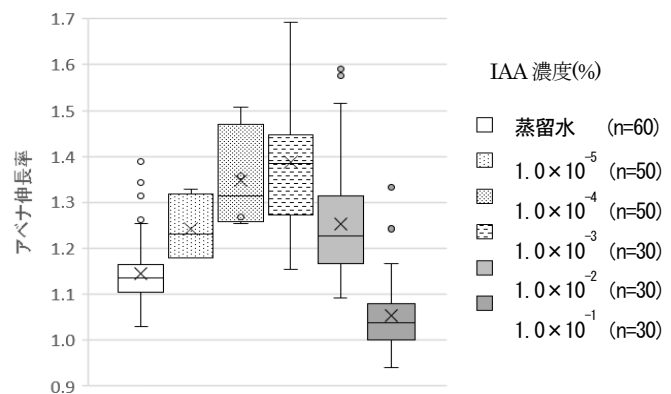


図1 IAA濃度とアベナ伸長率

に用いなければ、信頼度の高い結果は得られないことも明らかになった。これについては、実験を重ね、外れ値を示した個体の除外などを検討する必要がある。

《結論1》仮説1は誤りである。

【実験2】次に、仮説2を立証するために、実験1で最もアベナが伸長した濃度 ( $1.0 \times 10^{-3}\%$ ) のIAAを原点にスポットし、ペーパークロマトグラフィー(以後PCと表記)で分析を行った。

《方法2》展開液はイソプロパノール：アンモニア：水=8：1：1の体積比にしたものを用いた。原点にスポットする回数は、10、20、30回の3種類を用意した。展開後のろ紙は、原点から溶媒前線までを10等分した後にpH緩衝液(リン酸塩緩衝液)にクエン酸を加えpH5に調製しショ糖を2%加えたものに1日浸して試験液とし、アベナ伸長テストを行った。コントロールには、ろ紙を加えず試験液のみのものを用いた。

《結果2》図2～図4において、コントロールのアベナ伸長率の平均(n=5、標準誤差±0.05)を100とし、各Rf区でのアベナ伸長率の平均(n=5、標準誤差±2.4)を相対値(%)で表した成長率を縦軸に、Rf値を横軸に用いた。

10回スポットしたものでは、Rf値0.4～0.5でピークを検出できた(図2)。20回スポットしたものでは、Rf値0.3～0.4でピークを検出できた(図3)。30回スポットしたものでは顕著なピークが見られなかった(図4)。

《考察2》10回のスポットで見られたRf値0.4～0.5のピークは、昨年度の研究でも複数回見られ、また、橋詰(1985)<sup>1</sup>でも報告があることから、IAAのピークが正しく検出されていると思われる。20回のスポットでは10回のピークよりもやや弱く、少しずれた位置(Rf値0.3～0.4)にピークが現れた。さらにスポットの回数を増やした30回では、ピークは消失した。これについては、スポットの回数を増やすことによって滲みが大きくなり、原点のIAAの位置がずれてしまったことが考えられた。そこで、実際にスポットを10回繰り返すと滲みの面積は14%～20%拡大されることが確認された。

《結論2》IAAのPCにおいて、スポットの回数を増やすとピークが上手く生じない。スポットの回数はなるべく少ない方が望ましい。

【実験3】仮説3を検証するために、次の実験を行った。

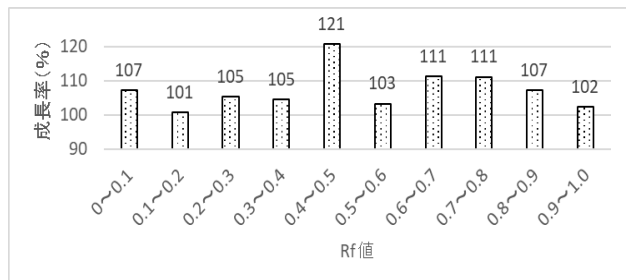


図2 IAAのPC結果(10回スポット)

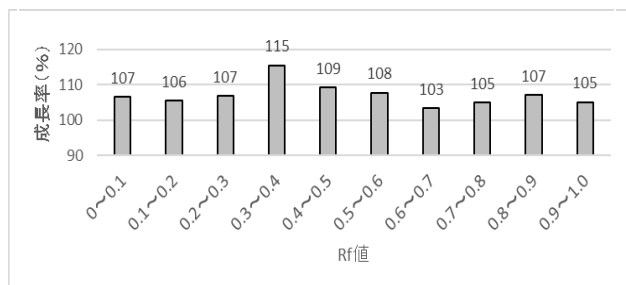


図3 IAAのPC結果(20回スポット)

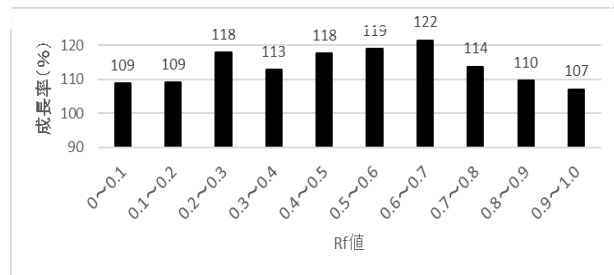


図4 IAAのPC結果(30回スポット)

《方法3》実験2で用いた試験液：アンモニア=9:1、試験液：イソプロパノール=9:1の体積比に調製したものをを用いてアベナ伸長テストを行った。なお、試験液のみをコントロールとして使用した。

《結果3》アンモニアのアベナ伸長率平均が0.93、イソプロパノールのアベナ伸長率平均が0.99、コントロールのアベナ伸長率平均が1.12であったことから、アンモニアとイソプロパノールには、アベナの伸長を抑制する効果が認められた(図5)。

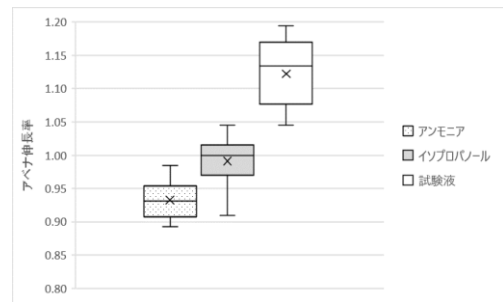


図5 展開液に含まれる物質とアベナ伸長率

《考察3》アンモニアにおける抑制効果については pH の影響が考えられたため、すべての試験液の pH を計測したところ、アンモニア溶液が 10.7、イソプロパノール溶液が 5.1、試験液が 5.0 であった。アベナの伸長は pH が小さくなるほど促進されることが知られており<sup>2)</sup>、アンモニアによる pH の増大が細胞伸長に影響を与えたと考えられる。イソプロパノールについては pH の変化はなかったが、取り出したアベナ切片が白濁して見えたことから、細胞の機能が停止してしまい、伸長成長できなかったことが考えられる。

《結論3》イソプロパノールとアンモニアには、抑制効果がある。

【改良実験】以上3つの仮説の検証の結果を踏まえて、従来の実験方法の改良を行った。

《方法》①1回のクロマトグラフィーで100本程度のアベナを確保するなど、可能な限り十分な数のアベナを使用する。②スポットする回数を1回にする。その際、ろ紙を浸す試験液中の IAA 濃度がアベナの最適濃度付近 ( $1.0 \times 10^{-3}\%$ ) になるように調整する。③展開溶媒に含まれる抑制効果のある物質を除去するため、展開後のろ紙を十分に乾燥させてから、試験液に入れる。

①~③の改良点を踏まえた方法で5回の実験を繰り返し、その平均値を用いた。

《結果》Rf 値 0.4~0.5 を中心としたピークは見られるが、Rf 値 0.1~0.2 にもピークが見られた(図6)。

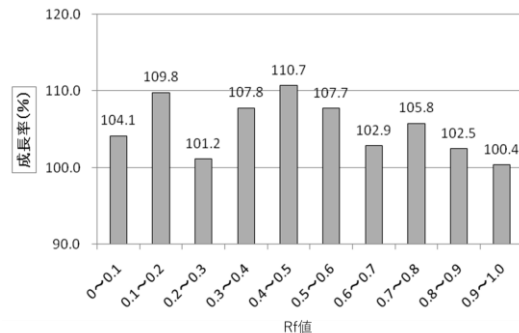


図6 改良実験の IAA の PC 結果

《考察》ピークが分散してしまった原因としては、

放課後の短時間で実験を行っていたため、十分に物質が展開しきれていない可能性と、ろ紙を切断する際に使用しているハサミに物質が付着する等のコンタミネーションの可能性が考えられる。

## 5. 今後の展開

- ・今回の結論を踏まえて実験を改良し、再度 IAA の PC を行う。
- ・改良した実験で再度植物ホルモンの検出を試みる。

## 6. 参考文献

- 1) 橋詰隼人：広葉樹の苗木の生長に対するジベレリンの効果及び苗木の生長と内生生長物質との関係 広葉樹研究 No.3:33~49(1985)
- 2) 横田孝雄, 室伏旭：植物ホルモン分析法(2)