

植物細胞外で葉緑体を機能させる

野口愛佳

【概要】

ほうれん草から遠心分離機を用いて抽出した葉緑体が光合成を行うのか、予備実験 1（抽出）、予備実験 2（固定）、本実験 1~4（光の照射）を行うことで確認した。

予備実験 1 及び予備実験 2 は成功し、本実験 1~3 では酸素が、本実験 4 においては酸素・糖の両方が試薬によって確認された。また、今回の実験では、本実験 1~3 においては糖及びデンプンは確認されず、本実験 4 においても糖の反応があったもののまだまだ課題は多い。

Do you think it is impossible to take out chloroplasts while they're photosynthesis? This study has two preparations and four main experiments. The two preparations succeeded but the main parts was not sure. But, the result of my main experiment shows that chloroplast taken out surely did photosynthesis, because both oxygen and sugar formation was detected.

【研究動機】

生物で光合成について習ったとき、植物細胞から葉緑体を取り出しても光合成は行われるのかと疑問に思い、確かめてみようと思った。

【研究目的】

植物細胞内で行う光合成を、葉緑体を取り出した状態で行う。ただし、本実験 1~3 の実験は予備実験 1~2 を行った当日に実行し、本実験 4 は当日と 3 日後に行ったものとする。

〈予備実験 1（抽出）〉

ほうれん草の葉の部分だけを用いて遠心分離機で抽出する。

〈予備実験 2（固定）〉

予備実験 1 で得られた葉緑体の一部をアルギン酸カルシウムに閉じ込め（これを以後葉緑体ビーズと呼ぶ）、比較のためにアルギン酸カルシウムだけのものも用意する。

本実験 1（OHP・試験管使用）

予備実験 1・2 で得られた葉緑体・葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウムで短時間 OHP の光を照射した結果を調

べた。

本実験 2（OHP・試験管使用）

固定時間によって光合成能力に差があるかもしれないと考え、葉緑体ビーズ、アルギン酸のナトリウムともに滴下後すぐ・30 分後・60 分後・90 分後のものも用意した。

本実験 3（OHP・三角フラスコ使用）

三角フラスコに変更した点を除いては本実験 1 と同様である。

本実験 4（日光・ビーカー使用）

OHP を日光に変更し、当てた時間を 7 日間にした点を除いては本実験 1 と同様である。

【仮説】

予備実験 1 及び予備実験 2 は抽出・固定に成功し、本実験においては光合成が行なわれ、酸素または糖もしくは両方が試薬・検知器で確認される。

【実験器具・薬品】

(1) 予備実験 1

4%スクロース水溶液（後に pH7.5 トリス（ヒドロキシメチル）アミノメ

タン塩酸緩衝液（以下、トリス塩酸緩衝液とする）を使用）・ほうれん草の葉・遠心管・遠心分離器

(2) 予備実験 2

アルギン酸ナトリウム・塩化カルシウム・予備実験 1 で得られた葉緑体・注射器

(3) 本実験 1, 2

pH7.5 リン酸緩衝液使用シュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液・フェーリング液・葉緑体・葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウム・炭酸水素ナトリウム・試験管・ゴム栓・OHP・アルミホイル

(4) 本実験 3

葉緑体・葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウム・OHP・二股試験管・三角フラスコ・集気瓶・気体誘導管・石灰石・pH7.5 リン酸緩衝液使用シュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液・石灰水・ヨウ素液・フェーリング液・塩酸・溶存酸素計・アルミニウム

【実験方法】

(1) 予備実験 1 (抽出)

- ① ほうれん草の葉 50g と 4%スクロース水溶液 200mL (後にトリス塩酸緩衝液を使用) ミキサーに入れて強で 1 分間かけて液体を作り濾過する。
- ② 遠心分離器にセットして 300G の遠心力を 10 分かけ、それぞれの上澄み液を駒込ピペットで遠心管に取る。
- ③ ②と同様に 500G の遠心力を 10 分かけ、それぞれの沈殿物を駒込ピペットで遠心管から取る。これが葉緑体である。
- ④ ①～④を繰り返す。

(2) 予備実験 2 (固定)

- ① 1.5%アルギン酸ナトリウム水溶液と 1.0%塩化カルシウム水溶液を作る。
- ② 1.5%アルギン酸ナトリウム水溶液に予備実験 1 の葉緑体を加える。また、比較のために葉緑体を入れていないアルギン酸ナトリウムだけのものも用意する。
- ③ 注射器を用いて各々を 1.0%塩化カルシウム水溶液に加えていく。
- ④ ③を水洗いする。

(3) 本実験 1 (試験管使用)

(葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウムともに 1 種類のみ使用)

(A) 4%スクロース溶液使用

- ① 各々の試薬と葉緑体を 1.0mL、滴下後すぐの葉緑体ビーズとアルギン酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムを 1.0g ずつ量り取る。
- ② 純水または溶液に炭酸水素ナトリウムを加えて溶かす。
- ③ 葉緑体ビーズまたは葉緑体を②に加えてゴム栓をし、アルミホイルを全体に巻いたものと、巻かずに OHP の光に当てたものを用意する。また、それぞれの試験管を OHP の上にならべ、電源を入れ、一時間放置する。
- ④ 一時間後、シュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液・フェーリング液を加えて各々の変化を観察する。

(B) トリス・塩酸緩衝液使用

予備実験 1 でトリス・塩酸緩衝液を使用しただけで、実験方法は変わらない。

(4) 本実験 2 (試験管使用)

(A) 4%スクロース溶液使用

(葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウムともに 4 種類のみ使用)

葉緑体ビーズ、アルギン酸のナ

トリウムとともに滴下後すぐ・30分後・60分後・90分後のものを使用する。他は同様に行う。

(B) トリス・塩酸緩衝液使用

トリス・塩酸緩衝液を使用しただけで、実験方法は変わらない。

(5)本実験3

(全てトリス・塩酸緩衝液使用)

- ① 水・アルギン酸カルシウム・葉緑体・葉緑体ビーズを用意し、それらを三角フラスコに入れて、各々アルミ箔でOHPの光を遮るものと、OHPの光をあてるものを用意する。
- ② 二股試験管に石灰石と塩酸を入れて二酸化炭素を反応させる。
- ③ 三角フラスコ・二股試験管・集気びんを図1のようにつなぐ。
- ④ OHPの光を7時間45分あて、放置する。
- ⑤三角フラスコ内の水・集気びん内の水の溶存酸素量、集気びん内の気体の線香による確認、各々の溶液を加えたときの色の变化、葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウムの色の变化を調べる。



図1 本実験3③ 実験の様子

(6) 本実験4

葉緑体ビーズ+純水を100mL ビーカーに入れて日光のあたるベランダに放置する。光合成が行われているかどうかはシュウ酸鉄(III)水溶液・フェーリング液の色の变化で確かめる。

【実験結果と考察】

(1) 予備実験1 (図2・図3参照)

顕微鏡を用いて葉緑体に変形することなくそのままの形で抽出されていることを確認し、葉緑体は光合成をする機能を有しているとして予備実験2に移る。



図2 300Gの遠心力を10分(左から遠心分離器にかけた直後・上澄み液・沈殿物)



図3 500Gの遠心力を10分(左から遠心分離器にかけた直後・上澄み液・葉緑体)

(2) 予備実験2 (図4~図6参照)

同様に固定に成功し、本実験に移る。



図4 予備実験1で得られた葉緑体(左)

図5 葉緑体ビーズ(中)

図6 アルギン酸カルシウム(右)

(3) 本実験1 (試験管使用)

(葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシウムとともに1種類のみ使用)

(A) 4%スクロース溶液使用

・実験結果

(酸素の検出) (図 7 参照)

pH7.5 リン酸緩衝液+葉緑体
ビーズ・pH7.5 リン酸緩衝液+
葉緑体→酸素発生。

pH7.5 リン酸緩衝液+アルギ
ン酸カルシウム→酸素発生なし

(糖の検出) (図 8 参照)

(A) 4%スクロース溶液使用時

→ 全て反応

(B) トリス塩酸緩衝液使用時

→ 全て反応なし

・考察

酸素は発生したと考えられるが、
糖の析出はできなかった。



図 7 酸素の検出

(pH7.5 リン酸緩衝液使用)

左から葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシ
ウム・葉緑体・pH7.5 リン酸緩衝液



図 8 糖の検出

(フェーリング液使用)

左から葉緑体ビーズ・アルギン酸カルシ
ウム・葉緑体・フェーリング液

(4)本実験 2

・実験結果 (図 7・図 8 参照)

本実験 1 と同様の結果となった。

・考察

酸素は発生したと考えられるが、
糖の析出はできなかった。照射時
間・照射面積を変えると糖の析出が
できるかもしれないと考え、本実験
3に移る。

(5)本実験 3

【実験結果】 (図 9～図 13・表 1 参照)

7時間 45分を当てた結果、葉緑
体ビーズは浮かび、アルギン酸カル
シウムは沈んだままであり、葉緑体
ビーズ・アルギン酸カルシウムにシ
ュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液をかけた結果、
青緑に変化した。OHP の光を長時
間あてたためか、葉緑体は脱色され
ていた

【考察】

葉緑体ビーズが浮いたことおよび、
葉緑体ビーズにシュウ酸鉄(Ⅲ)水
溶液をかけるとただちに青緑になっ
たことから、酸素が発生したことが
わかる。

また、葉緑体ビーズ・アルギン酸
カルシウムにフェーリング液をかけ
て加熱しても反応がなかったこと、
およびヨウ素液の反応がなかったこ
とより、デンプンはもちろんグルコ
ースさえもできなかった。

このことから、4点の原因が考え
られる。1点目は、葉緑体の寿命が
短く、取り出して短時間のうちに光
合成をしなくなったこと。2点目は、
検出方法に問題があるということ。
3点目は、照射時間・水の量・二酸
化炭素量に問題があるということ。
4点目は光合成と関係ないとみられ
てきた葉緑体外の酵素が葉緑体の糖
の生成に関係していたこと。

また、OHP の光を長時間あてた
ためか、葉緑体は脱色されていたた
め、葉緑体が壊れていた可能性があ
り、溶液の反応がわかりやすかった
が、OHP の光に脱色作用があるので
あれば、葉緑体を繰り返し使うこ
とができないことがわかった。



図9 アルギン酸カルシウム



図10 葉緑体ビーズ
(OHPの光を当てなかったもの)



図11 葉緑体ビーズ
(OHPの光を当てたもの)

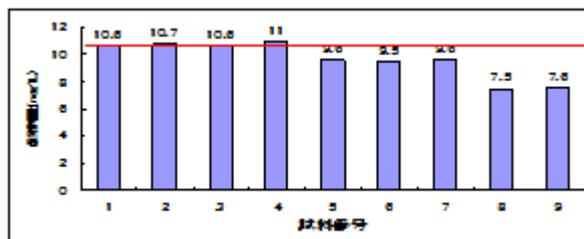


図12 左から葉緑体ビーズそのまま・葉緑体ビーズ+シュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液・葉緑体ビーズ+フェーリング液



図13 アルギン酸カルシウムそのまま・アルギン酸カルシウム+シュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液・アルギン酸カルシウム+フェーリング液

表1 溶存酸素量 (赤線は OHP 照射前の値)



1 OHP 照射前 2 葉緑体・明
3 葉緑体・暗 4 葉緑体ビーズ・明
5 葉緑体ビーズ・暗 6 水・明
7 水・暗
8 アルギン酸カルシウム・明
9 アルギン酸カルシウム・暗
(OHPの光が当たっているものを明、当たっていないものを暗とする)

(6)本実験 4

【実験結果】

葉緑体ビーズが一部浮いており、4日以内であれば、4%スクロース溶液を使ったものもトリス塩酸緩衝液を使ったものもシュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液と反応し、黄→緑となった。同日にフェーリング液を調べると4%スクロース溶液を使用したものもトリス塩酸緩衝液使用のものも青→赤の反応があった。しかし、7日目に同様に調べた時にはシュウ酸鉄(Ⅲ)水溶液にもフェーリング液にも両方とも反応はなかった(図7・図8)。

7日目から変色し始め、10日後に完全に色が変化。変化後は腐臭および何かが発酵したような臭いもあり、どちらの試薬にも変化がなかったため、日光を当てるのをやめ、廃棄。(図14~図16)

【考察】

4日目までは光合成が行われたが、7日目には行われなくなっていた。反応がなかったのは、その

間に葉緑体が光合成を行う能力を失ってしまい、それまでに存在していた糖もエネルギー源として生体維持に使用されたからだと考えられる。

OHP と日光で差が出たのは、波長の違いが光合成能力に影響したためだと考えられる。次回の実験では、白熱灯、LED を当てた時、酸素や糖の有無や脱色の有無を調べたい。



図 14 葉緑体ビーズ作成後すぐ(左)

図 15 葉緑体ビーズ 7 日目 (中央)

図 16 葉緑体ビーズ 10 日目 (右)

【結論】

葉緑体の抽出・固定には成功した。OHP を用いた実験では試薬により酸素は確認できたものの、糖は確認できなかった。しかし、日光を用いた実験では 4 日間なら酸素と糖の確認ができた。

【参考文献】

- 1) 2001 年度木曜班人工イクラ
- 2) 遠心分離器の使い方/生物学実験/文系学生実験/取り組み/平成 22 年度…/
- 3) 第 3 節 細胞の構造(啓林館)
- 4) 遠心分離機 使い方 遠心沈降/化学実験器具操作 ビデオ動画集/京都大学
- 5) 青少年のための科学の祭典 第 1 回神戸大会 (1996. 1. 6~7) 出展資料 バイオリアクターの作成~固定化酵母によるアルコール発酵~

- 6) フリー百科事典ウィキペディア (wikipedia) ベネジクト液
- 7) Omnis サークル Omnis Experience 第 51 回 (平成 17 年 3 月 18 日 於川越女子高校) ヒル反応~~三度~
- 8) 酸素を検出する物質 9) 生体システムでよく使用される緩衝液の調整法
- 10) 化学 I 新訂版 p65 図 8
- 11) 増補四訂版 サイエンスビュー 生物総合資料 生物 I・II 理科総合 B 対応 P32 「細胞分画法」
- 12) 大阪市立大学・大阪府立大学・読売新聞大阪本社主催「第 8 回 高校化学グラウンドコンテスト 要旨集」 「人工イクラの機能化~疎水性物質を取り込ませるには~」 p26~p29