

外来種が救世主！？ ～アレロパシーの可能性～

仙台高専 A チーム

佐々木凜 木村大希 千葉ありさ 山川大智

1. 背景・目的

環境省が作成する生態系被害防止外来種リストに記載されているように日本の生態系に影響を与えるセイタカアワダチソウには、アレロパシー物質である *cis*-dehydromatricaria ester (*cis*-DME)を根から放出して他の植物の生長を抑制する働きがあり、絶滅危惧種を含む在来植物の植生に影響を及ぼす。種子による繁殖のほかに地下茎でも増殖するため繁殖力がとても高く、刈り取ってもすぐに再生し、生命力も高いため一度蔓延するとセイタカアワダチソウのみから成る群落を作り、そこでは他の植物が生育しにくい土壌を作るといった影響を及ぼす。このことからセイタカアワダチソウは環境に悪影響をもたらす植物であるが、この植物のアレロパシーの特性を生かして自然由来の農薬を作ることができないかと考えた。

今回の研究ではセイタカアワダチソウの根から *cis*-DME を抽出し、仙台高専にある器具を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー法により単離し、その特性を評価することを第一の目的とする。さらに、単離した *cis*-DME がカイワレダイコンの発芽に与える影響を調査しセイタカアワダチソウの自然由来の農薬としての活用可能性を検討することを第二の目的とする。



図 1.セイタカアワダチソウ

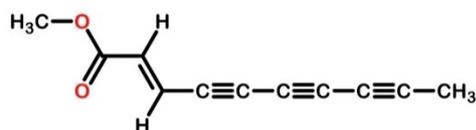


図 2. *cis*-DME の構造式

2. 使用器具・試薬・装置

・器具

乳鉢、乳棒、ビーカー、葉さじ、乾燥機、電子天秤、マグネチックスターラー、スターラーチップ、漏斗、濾紙、ロータリーエバポレーター、綿、ナスフラスコ、TLC プレート、UV ライト、ガラスキャピラリー、カラム管、駒込ピペット、ニップル、三角フラスコ、ホットプレート

・試薬、その他

エタノール、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、シリカ、ヨウ素、カイワレダイコンの種、アルゴン、クロロホルム、重水素化クロロホルム

・装置

核磁気共鳴分光計(NMR) Bruker 社 AVANCE-III (400MHz)

3. 実験

3.1 *cis*-DME の単離

3.1.1 実験手順

・根の成分の抽出

- 1) セイタカアワダチソウの根を学校周辺で採取した。
- 2) 採取した根を乾燥機で 60℃で 4 日間乾燥させ、乳鉢を用いてすり潰した。
- 3) すり潰した根 5g ずつを水、エタノール、ヘキサンそれぞれ 100mL に入れ、半日つけおいた。
- 4) 3) の試料を濾過し、エバポレーターで濃縮した。
- 5) 濃縮した試料は綿栓濾過し、微細な固体を取り除き三種類の抽出液を得た。

・薄層クロマトグラフィー(TLC)

- 1) TLC プレートの上端と下端の端から 3mm 程度のところに鉛筆で線を引きいた。
- 2) ガラスキャピラリーを用いて、三種類の試料を TLC プレートの下端の線上に軽く触れさせ、試料を少量つけた。
- 3) 少量の展開溶媒(ヘキサン：酢酸エチル = 5:1 および 10:1)が入った容器に TLC プレートを入れ、展開溶媒がもう上端の線上に上ったところで容器から取り出した。
- 4) ヨウ素によりプレートを着色し UV ライト(254nm)をあて、鉛筆でスポットを囲い印をつけ、移動距離を記録した。

・シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる *cis*-DME の単離

- 1) 展開溶媒としてヘキサンでシリカを湿らせ、カラム管の半分の高さ程度まで充填した。
- 2) フラッシングを行い、シリカ層を密にした。
- 3) 上から海砂をシリカの上に薄く敷いた。
- 4) ヘキサンにより抽出した試料をカラム管の壁面を伝わらせながらゆっくりと流し、シリカ層に注入した。
- 5) 展開溶媒としてヘキサンと酢酸エチルの混合溶液を酢酸エチルの濃度が 5%から 7%に徐々に上げながら流した。この時、UV ライト(365nm)を当て有機化合物の位置を確認しながら行った。
- 6) カラムの先端に化合物が近づいてきたことを確認し、何回かに分けてビーカーに取った。TLC によって他の物質が混ざっていない部分のみを一纏めにし、エバポレーターで濃縮した。
- 7) 酢酸エチル 15%溶液を流し、同様に化合物を取り出し、濃縮した。
- 8) 濃縮した試料は酢酸エチル 1mL に溶解させ、それぞれカラム管から出てきた順に HA、HB、HC と名前をつけた。

3.1.2 結果と考察

TLC

TLC を行うと、極性の高くない化合物ほどスポットが上端側に移動する。図 2 の構造式より *cis*-DME の極性はそれほど高くない。このことから、試料の中に *cis*-DME などの有機化合物が含まれていた場合スポットは移動すると考えられる。

図 3 に TLC のスポットの位置を示す。また表 1 にスポットの移動距離を示す。TLC を行った結果、水で抽出した試料のスポットはまったく動かず、エタノールで抽出した試料とヘキサンで抽出した試料は、それぞれ複数のスポットが観察された。

したがってスポットが移動しなかった水で抽出した試料には *cis*-DME は含まれておらず、ヘキサンとエタノールでそれぞれ抽出した試料は複数の有機化合物の混合物であり、*cis*-DME が含まれている可能性があると考えられる。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

この TLC で複数の化合物が混ざっていると明らかになった抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。カラムクロマトグラフィーでは極性の違いによりシリカへの吸着速度が異なりそれぞれの化合物がバンド状にシリカ層内を移動する。図 4 に今回の実験でのバンドの様子を示す。極性の低い化合物ほどシリカゲルに吸着せず早く出てくる。そのためカラム管から早く出てきた H_A は極性が低く、H_c は H_A と H_B に比べて極性が高い。

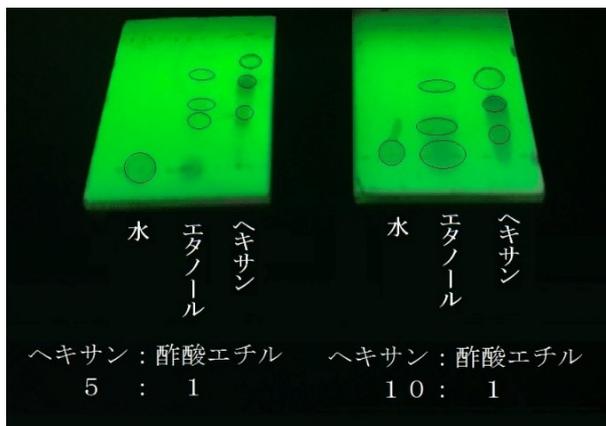


図 3. UV 照射時の TLC プレートの様子



図 4. シリカゲルカラムクロマトグラフィーの様子

表 1: スポットの移動距離

		スポット 1	スポット 2	スポット 3
5 : 1	ヘキサン	1.38	1.10	0.600
	エタノール	1.15	0.800	0.550
10 : 1	ヘキサン	1.05	0.610	0.250
	エタノール	0.850	0.330	

3.2. NMR による測定

3.2.1 実験手順

- 多くの *cis*-DME を得るためにもう一度セイタカアワダチソウの根を採取し、12g の乾燥体を 250mL のヘキサンにより抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。その際、酢酸エチルの濃度が 1% から展開を始め、濃度を 5%、7% と上げ有機化合物を分取した。
- H_A と H_B を NMR で測定し、有機化合物の構造を同定した。

3.2.2 結果と考察

単離した際、試料は 4 つに分かれたが TLC の結果、先に出てきた 2 つの化合物は同一の物質であるため三種類の化合物に分かれたことがわかった。また、今回の実験で出てきた三種類の化合物は 3.1 の実験の H_A、H_B、H_c と同じ化合物であることが分かった。

NMR の測定の結果を図 5 に示す。*cis*-DME は文献⁽³⁾より、2.08, 3.85, 6.30, 6.32 ppm にそれぞれピーク値が現れる。図 5 を見ると H_A の NMR では、3.0~4.0、5.0~7.0 にピークがほとんど出でおらず、3.85、6.30、6.32 の近いところでピーク値が出ていない。したがって、H_A は *cis*-DME ではない。一方で、図 6 を見ると H_B の NMR では 2.02、3.79、6.27、6.30 にピークがあり、文献に近いところでピーク値が出ているため、H_B は *cis*-DME であるといえる。

このことから、セイタカアワダチソウの根にある *cis*-DME をヘキサンにより抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより高濃度で精製できることがわかった。

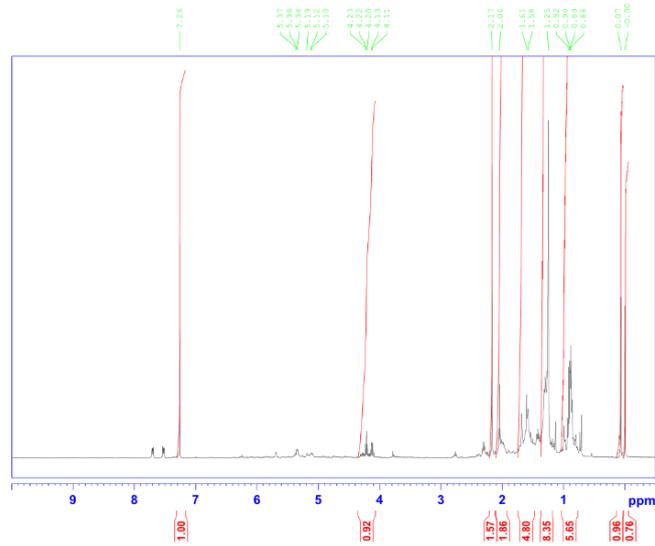


図 5. HA の NMR チャート

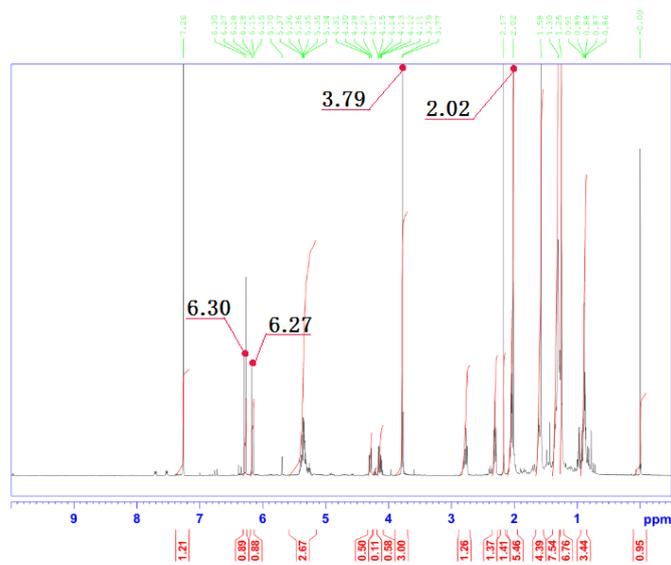


図 6. HB の NMR チャート

3.4 カイワレダイコンの発芽実験

3.4.1 実験手順

- 1) シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した *cis*-DME をエタノール 1mL と水 10mL との混合溶液に溶解させた。
- 2) ビーカー2つに脱脂綿を敷き詰めて、カイワレダイコンの種を 20 個 (5×4) ずつ並べた。
- 3) 片方にはエタノール 1mL と水 10mL ずつ入れ、もう片方にはエタノールと水の混合溶媒に *cis*-DME を入れた。
- 4) カイワレダイコンの経過を観察し、発芽した種の個数を数え、発芽率を算出した。

3.4.2 結果と考察

図7にカイワレダイコンの発芽の様子を示す。また、表2にカイワレダイコンの発芽率を示す。カイワレダイコンの発芽実験から、2つのビーカーにエタノールと水を入れ片方には *cis*-DME を入れ発芽状況を観察したが、*cis*-DME が入っていないほうのビーカーではカイワレダイコンは発芽したが、入っているほうのビーカーでは発芽しなかった。2つのビーカーでは、*cis*-DME の有無の条件以外は等しい条件下で実験を行った為、発芽状況の違いは *cis*-DME が影響していることだといえる。また、この実験の結果から *cis*-DME は植物の生長を抑制しているといえる。さらにこの特性を生かすことで、セイタカアワダチソウから雑草などの生長を抑制する効果のある自然由来の農薬が作れる可能性があることがわかる。

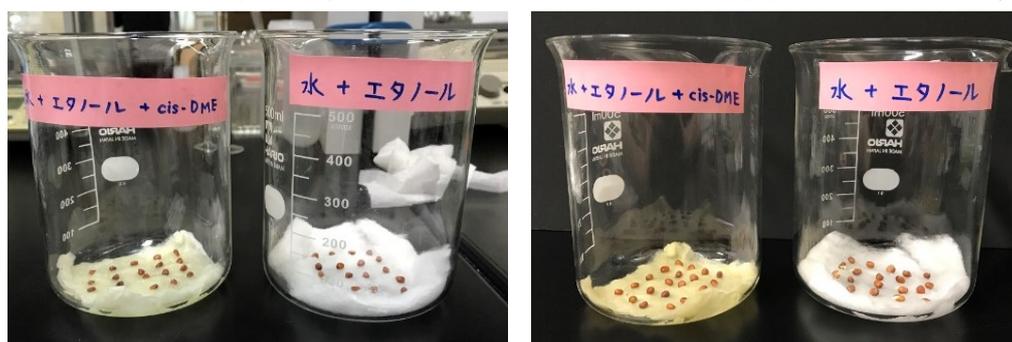


図7.カイワレダイコンの発芽の様子. (左)実験開始直後、(右)2日後.

表2：カイワレダイコンの発芽率

	発芽した個数(個)	発芽率(%)
水+エタノール	12	60
水+エタノール+ <i>cis</i> -DME	0	0

4.まとめ

- ・ *cis*-DME はセイタカアワダチソウの根中に存在し、ヘキサンなどの有機溶媒によって抽出できた。
- ・ 仙台高専にあるガラス器具や装置を利用することで、抽出した *cis*-DME を精製できた。
- ・ *cis*-DME にはカイワレダイコンの発芽を抑制する性質があることがわかった。
- ・ 以上の結果より、セイタカアワダチソウの根から抽出できる *cis*-DME を活用することで雑草の発芽を抑制する効果のある自然由来の農薬を作ることができる可能性がある。

5.参考文献

- (1) 生態系被害防止外来種リスト http://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/files/05_rist_zentai_c.pdf
- (2) セイタカアワダチソウ 悪影響 <http://www.city.agano.niigata.jp/soshiki/scikatsu/8493.html>
- (3) NMR 目安

Akio Kobayashi, Shigeo Morimoto, Yoshiari Shibata, Kyohei Yamashita, Makoto Numata, C10-polyacetylenes as allelopathic substances in dominants in early stages of secondary succession, *J. Chem. Ecol.*, 6., 1, 1980.