

pHと温度変化によるルシフェリンの発光の違いに関する研究

化学44班:西村 心、谷山 美奈

Abstract

The optimum pH for luciferin luminescence is pH8 and the optimum temperature is 40°C. However, the effect of changing both temperature and pH on luminescence is unknown. In this study, we investigated the effects on luminescence when both were changed. As a result, it was found that the emission color changed when the temperature was changed within the range of temperature and pH at which luminescence can be confirmed, but it was found that the effect on the emission color was small when the pH was changed.

要約

ルシフェリン発光における至適pHはpH8、至適温度は40°Cとされている。しかし、温度とpHの双方を変化させた場合の発光への影響は知られていない。本研究では双方を変化させた際の発光への影響について調べた。その結果、発光を確認できる温度・pHの範囲において温度を変化させると発光色に変化が見られたが、pHを変化させた際には発光色への影響は小さいことがわかった。

1. はじめに

ウミホタル等の発光生物はルシフェリン発光によって光を放つ。この現象は酵素のルシフェラーゼと基質のルシフェリンの結合によって生じる。この発光は先行研究(参考文献1)においてこの現象の至適温度は40度、至適pHはpH8とされている。しかし、温度とpHの双方を変化させた場合の発光への影響は知られていない。本研究ではこのことに注目し、双方を変化させることで発光にどのような影響があるのかを調べた。

この研究を進めるにあたり、2つの仮説を立てた。1つ目はpHが極端に高い環境及び低い環境では発光が確認出来ないのではないかと考えた。2つ目は高温条件では発光しないのではないかと考えた。これは、ルシフェリン発光は生物発光であることより生物が生息しにくいと推測される環境下では発光しにくいと考えたためである。

2. 研究手法

キッコーマン株式会社ホタライトシリーズを用いて実験を行った。A液用粉末であるルシフェラーゼ酵素をイオン交換水50mlで溶解し、A液を作成した。B液用粉末であるルシフェリン、アデノシン-3-リン酸、硫酸マグネシウム7水塩、グリシン緩衝剤の混合物をイオン交換水50mlに溶解し、B液を作成した。A液、B液をそれぞれ1ml:1mlで混合することで見られる発光を観察した。

《実験1》

- ①ビーカー内で酢酸10mlにイオン交換水190mlを加え、5%CH₃COOHaqを作成した。
- ②ビーカー内で炭酸ナトリウム10gにイオン交換水190gを加え、溶解させ、5%Na₂CO₃aqを作成した。
- ③A液:B液を試験管内で1ml:1mlの割合で混合させ、発光の様子を観察した。
- ④③の発光を確認したものに、5%CH₃COOHaqを1ml加え、発光の様子を観察した。
- ⑤③の発光を確認したものに、5%Na₂CO₃aqを1ml加え、発光の様子を観察した。

《実験2》

- ①CH₃COOHaqとNa₂CO₃aqの中和によって、pH6、pH7、pH8、pH9の溶液を作成した。その際、pH試験紙を用いて目視でpHを測定した。
- ②A液1mlと上記いずれかのpH溶液1mlを加えた試験管を水道水を300ml加えた500mlのビーカーに入れた。ビーカー内の水を加熱し、水温を20°C、30°C、40°C、50°C、60°C、70°Cに調整したことを確認した後、試験管内にB液を1ml加えた。その際の発光の様子を観察した。

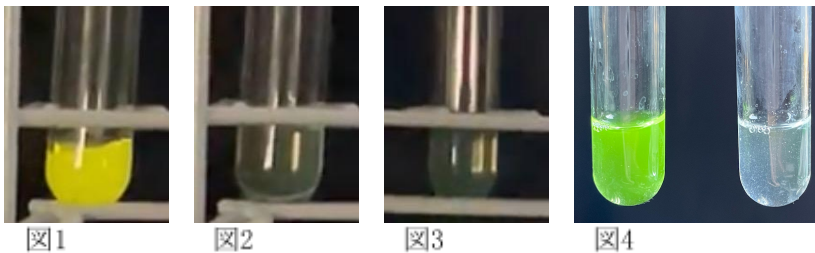
《実験3》

- ①実験3と同様にCH₃COOHaqとNa₂CO₃aqの中和によって、pH6、pH7、pH8、pH9、pH10の溶液を作成した。その際、pHメーターを用いて測定した。
- ②実験3と同様に発光実験を行った。

3. 結果

《実験1》

- ①A液とB液を混合させると黄色発光を確認することが出来た(図1)。
- ②5%Na₂CO₃aqを加えると発光が消えた(図2)。しかし、溶液の色が黄色から薄い黄緑色に変化したことを確認することが出来た。
- ③5%CH₃COOHaqを加えると発光が消えた。
- ④②、③の実験で発光を失った溶液を明るい場所で撮影すると図4のようになった。右の溶液が②の実験後のものであり、左の溶液が③の実験後のものである。



《実験2》

結果は表1のようになった。縦の列はビーカー内の水の温度、横の行は加えた溶液のpHを表している。20℃、30℃下ではどのpHも黄色発光を確認することが出来た。40℃ではいずれのpHにおいても山吹色の発光を確認することが出来た。50℃においてはpH7とpH9では山吹色の発光を確認することが出来たが、pH6とpH8では発光を確認することが出来なかった。60℃、70℃においてはいずれのpHにおいても発光を確認することが出来なかった。しかし、発光を確認できなかったものにおいては表2のような溶液の色の変化を確認することが出来た。

表1 pH試験紙を用いて溶液を作成した際の発光実験の結果

	20℃	30℃	40℃	50℃	60℃	70℃
pH6						
pH7						
pH8						
pH9						

《実験3》

結果は表2のようになった。縦の列は温度、横の行は加えた溶液のpHを示している。20℃においてはいずれのpHにおいても黄色の発光を確認することが出来た。30℃においてはいずれのpHにおいても山吹色の発光を確認することが出来た。40℃においてはいずれのpHにおいても山吹色の発光を観察することが出来たが、全体的に20℃、30℃に比べると発光が弱かった。40℃の条件下においてpH8が最も明るく、pH10での発光が最も暗かった。50℃においてはいずれのpHにおいても発光を確認することが出来なかった。

表2 pHメーターを用いて作成した溶液を使用した際の発光実験の結果

pH	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
20	 黄色に発光	 黄色に発光	 黄色に発光	 黄色に発光	 黄色に発光
30	 山吹色に発光	 山吹色に発光	 山吹色に発光	 山吹色に発光	 山吹色に発光
40	 山吹色の微光	 山吹色の微光	 山吹色の微光	 山吹色の微光	 山吹色の微光
50	 発光せず	 発光せず	 発光せず	 発光せず	 発光せず

4. 考察

《実験1について》

酸性の溶液、及び塩基性の溶液を加えた際に発光が確認できなくなった。これはpHが過度に高い・低い条件下ではルシフェラーゼが失活化するからであると考えた。

《実験2について》

50℃の条件においてpH6とpH8では発光が確認できなかったが、pH7とpH9では発光が確認できた理由について考えた。理由として、pHをpH試験紙を用いて目視で計測していたためにpH9の溶液よりもpH8の溶液の方がpHが高くなっていたのではないかと考えた。

《実験3について》

50℃において発光しなかったことについては高温条件になったことにより、ルシフェラーゼが失活したことが原因であると考えた。20℃から40℃へ変化するにつれ、発光色が黄色から山吹色へと変化した理由についてもルシフェラーゼの失活化が影響していると考えた。

更に、先行研究において至適pHとされたpH8と至適温度とされた40℃の組み合わせが最も発光すると考えることができるが、20℃や30℃の条件においても発光が確認できたことからpHと温度の双方を変化させることによってpHのみ、温度のみを変化させて実験を行った際とは異なる結果が得られるのではないかと考えた。

5. 結論・展望

実験2、3より発光する範囲においてpHは発光の色への影響が小さいが、温度は発光の色への影響を与えると分かった。更に40℃においてはpHの変化によって発光の明るさに影響があると分かった。これらのことからpHと温度の双方を変化させると発光色や発光の有無に影響があると分かった。

今後は発光の様子や色などを客観的な数値で捉えることでより正確なデータを取り、発光時間の計測に繋げたい。又、実験の回数を増やすことでより正確性の高いデータをとれるようにしていきたい。

6. 参考文献ならびに参考Webページ

(1)仙台市立仙台青陵中等教育学校科学部 大江信太郎、田村真和、渡邊汐音. 農芸化学@High school. 酵素ルシフェラーゼの性質について. 2014.

https://katosei.jsbba.or.jp/download_pdf.php?aid=42

(2)しじみ. ネットdeカガク. ルシフェリンとは？発光の原理、種類、作り方まとめ. 2022.

<https://netdekagaku.com/luciferin/#:~:text=%E3%83%AB%E3%82%B7%E3%83%95%E3%82%A7%E3%83%AA%E3%83%B3%E3%81%AE%E7%99%BA%E5%85%89%E5%8E%9F%E7%90%86%E3%81%AF,%E7%99%BA%E5%85%89%E3%81%8C%E8%A1%8C%E3%82%8F%E3%82%8C%E3%81%BE%E3%81%99%E3%80%82>