

## FIB-SEM によるデンプン顆粒内空洞の観察

浜松医科大学医学部・総合人間科学・生物学, JST-CREST 針山 孝彦  
筑波大学数理物質科学研究科電子物理工学専攻 村上 勝久



(左から) 浜松医科大学医学部・総合人間科学・生物学, JST-CREST 針山 孝彦,  
筑波大学数理物質科学研究科電子物理工学専攻 村上 勝久



### 要旨

野の花は、その花粉を媒介する昆虫や鳥との関係が深く、それらの動物の視覚弁別機能の範囲に適応するように進化してきた。ウマノアシガタは艶やかな光沢をもつ黄色い花弁が特徴だ。花弁の表側は紫外線を反射するが、その中心部や花弁の裏側は紫外線反射がなく光沢も少ない。花弁表面側は、最表面薄膜とカロテノイド層に続くデンプン顆粒層から構成されていた。強い光沢は花弁の最表面にある薄膜が関連していることが強く示唆され、ヒトにとって黄色く見える理由はカロテノイド層の吸収によること、紫外線反射は花弁の表面に含まれるデンプン顆粒層が担っていることがわかった。また、デンプン顆粒が高密集積した円錐構造のため、多方向に光を反射していることもわかった。この構造と反射スペクトルを解析することにより、花弁内に含まれているデンプン顆粒が紫外線領域を含む強い反射能をもち、かつ空気層を含んでいる可能性が示された [1]。そこでデンプン顆粒そのものが空気層を含んでいるか、FIB-SEM によって切断面を構造解析した結果、デンプン顆粒内部は空洞であって UV 反射に必要な空気層が内部にあったことを見出した。この反射の仕組みは、バイオミメティクス材料としてのヒントを与える可能性が高い。生物がもつ光材料を規範とした材料開発を目指す事で、より効率の良い機能性材料設計を行うことができるだろう。



### 1. 緒言

種子植物の中で、花と呼ばれる生殖器官が発達して、胚珠が心皮に包まれて子房の中に収まったものを被子植物という。この花は、雄しべの先にある花粉が直接胚珠に触れることはなく、虫や鳥などによって運ばれ雌しべの柱頭に付くことによって受粉される。このように、昆虫に花粉を運んでもらう花は、動物への報酬として蜜を与える手段を獲得しているが、遠く離れている動物に対してその蜜のありかを示さなくてはならない。花は、花粉媒介者への視覚信号として、天空光を高い反射率で返し、花自身や背景との間でコントラストを生み出す器官として進化したともいえる。花の色が、花粉媒介をしてくれる動物にとって見やすいものに変化させることによって、その存在を強調してきたとすると、花と花粉媒介動物は共進化してきたのではないかと考えられる。ヒトには近紫外線領域の光を受容することができないために単一の色としか見えない花が、実は花粉媒介者の虫や鳥には花弁の中心部と周辺部で色が異なって見えコントラストが生じることによって、蜜標として機能しているものが少なくない。花が近紫外線領域の光を反射（以下、UV 反射）するようになったのは、虫や鳥が UV 領域の光を受容弁別できるという能力に対して共進化した結果と考えることができる [2]。実際、多くの花の種で UV 反射を示すものが知られており、花弁の広い面積が UV 反射

し中心部の蜜のある部分がUV反射しないものが多い[3]。しかし、この成果を炭素、酸素、水素、窒素という元素を主成分にもつ高分子によって形成される植物がどのようにUV反射を生み出しているのかの詳細な研究はいまだなされていない。本報では、生物由来の高分子がどのようにUV反射を達成しているかについて報告し、光学系のバイオミメティックス研究への足掛かりとしたい。

ウマノアシガタ *Ranunculus japonicus* Thub. は、英名で Japanese Buttercup とも呼ばれ、キンポウゲ科キンポウゲ属の多年草で、北海道から南西諸島まで分布し、国外では朝鮮、中国、台湾まで広がる。ヨーロッパ、アジア、アフリカに産する *Ranunculus repens* L. (英名 Buttercup) と酷似しており、5枚の花弁をもつ花は直径およそ2cmで、独特の強い光沢の黄色を呈している。筆者らは、生物がもつ色に興味をもち、おもに昆虫の構造色を中心に研究を推進してきたが、より広域のバイオミメティックス研究推進の目的で2009年頃から植物の花の色の起源についての研究を開始した。なぜこの花はピカピカと光っているのだろうという素朴な思いが、このウマノアシガタという植物の花を手にとった始まりだった。これまでに、たくさんの花の反射の研究があり、昆虫と花の共進化に注目した多種にわたった精力的な研究もある。同種についても深く研究されているものがあり、なかでも身近な Buttercup (ウマノアシガタの近縁種) は、その輝きが多くの人々の注目を集めるらしく多数の研究がなされている[4][5][6][7][8]。2012年には、Silvia Vignolini ら[9]がイギリスの Butter cup (ウマノアシガタの近縁種) を使って、その花弁の発色の起源について報告した。

われわれは、日本産のウマノアシガタを用いて、その発色の仕組みの中でも、UV反射に注目し、花弁全体の発色の起源を解析した。



## 2. 実験

### 2.1 材料

ウマノアシガタ *Ranunculus japonicus* Thub. は、北大構内で自生しているものを採集して使用した。

### 2.2 形態観察

透過型電子顕微鏡法は通常の方法を用いた。簡単に述べると、0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に溶かした2% グルタルールおよび2% パラフォルムアルデヒドを含む前固定液 (冷蔵庫温度) に一晩浸けた後、1% 四酸化オスミウム水溶液で1時間固定した後、エチルアルコールシリーズで脱水処理し、エポン・アラルダイド溶液に置換し包埋した。およそ70nmに薄切した後、2% ウラニルアセテート溶液に5分間および0.4% クエン酸鉛溶液に3分

間ずつ浸し電子染色をした。観察は、JEM-1220 (JEOL) を用いた。また、走査型電子顕微鏡の観察は、前述と同様の方法で脱水処理した後、凍結乾燥 (JFD300, JEOL) し、四酸化オスミウムで極薄くコーティング (PMC-5000, Meiwa) した後に、FESEM (Hitachi S-4800) で観察した。

### 2.3 反射スペクトル測定

分光スペクトルの測定には反射型プローブ方式の分光器 (Ocean Optics, USB2000 + 反射プローブ R400-7UV-VIS) および光源 (Ocean Optics, DT-MINI-GS) を使用した。



## 3. 化学的・光学的解析

生物の発信者の工夫は、花の色や形をみると理解しやすい。花の色は、植物自身もつ葉や周辺植物の葉とは異なり、花弁が大きく発達し花の形は複雑であるものが多い。日当たりのよい山野に生息するウマノアシガタの花は、独特の強い光沢のある5枚の花弁をもつ (図1a, c)。花弁の中央表側の反射スペクトルを測定すると、図1bで示した曲線が得られた。上向きの二つの緑矢印で示した部位は、クロロフィル (葉緑素) の吸収帯域に一致し、下向きの黄矢印で示した部分はおそらく花に特徴的なカロテノイドの吸収によるものではないかと考えられた。花弁の裏側の反射スペクトルを測定すると、図1dの結果が得られ、花弁の表面の長波長域に似た曲線でクロロフィルの吸収も観察されるが、紫外部域の反射が欠如していた。また、全体の反射率が、表面が90%ほどであるのに比べて裏面では60%程度であり、およそ30%もの差があった。

花弁に含まれているだろう色素を、100% エタノール溶液に一昼夜液浸し抽出した溶液の吸収スペクトルを測定すると、450nm付近に3峰のピークをもつものと、340nmと670nm付近にピークが確認された (図2)。450nm付近の帯域の強い吸収を示すものは、その波形から、カロテノイド、また両側の小さな吸収はクロロフィルであると考えられる。花弁の反射スペクトル波形は、ウマノアシガタの反射に色素の吸収が重なったものであると予想された。

ウマノアシガタの発色の起源と構造との関係を調べるために、走査型と透過型電子顕微鏡を用いて形態観察した。走査型電子顕微鏡で観察すると、表面側の花弁は、細胞の区切りが見える以外は、非常に平らな面をもって (図3a)。一方、花弁の裏側表面は、凸凹とし波打つような構造をしていることがわかる (図3b)。表裏の反射率の違いは、花弁の表面の凸凹の違い、つまり表面側が鏡面のように平らであり、裏面側が凸凹であることの違いによるものであることが推測された。

花弁の表面側に見える細胞の区切り (図3cの白破線の

右側)は、細胞壁を反映したものと考えられ、図 3d の Front side 直下の電子密度の高い黒く観察される細胞に対応する。この表皮細胞のクチクラを含む最外層の細胞の集まりは、先の細いピンセットなどを用いて簡単にシート状にはがすことができる。はがして観察すると、うねるような凸凹とした周期構造が観察された(図 3c の白破線の左側)。この構造を拡大して観察すると、内部にデン

プンと思われる粒状の構造が観察された(図 3c 挿入図)。このデンプンと思われる構造物がある場所は、透過型電子顕微鏡で観察した図 3d の Front side に近い白抜き矢印の構造が密集している場所に対応している。これらの顆粒の構造から、デンプンではないかと推測され、ヨウ素デンプン反応でデンプンであることを確認した(データは示していない)。図 3c の顆粒をもつ周期構造の一つ

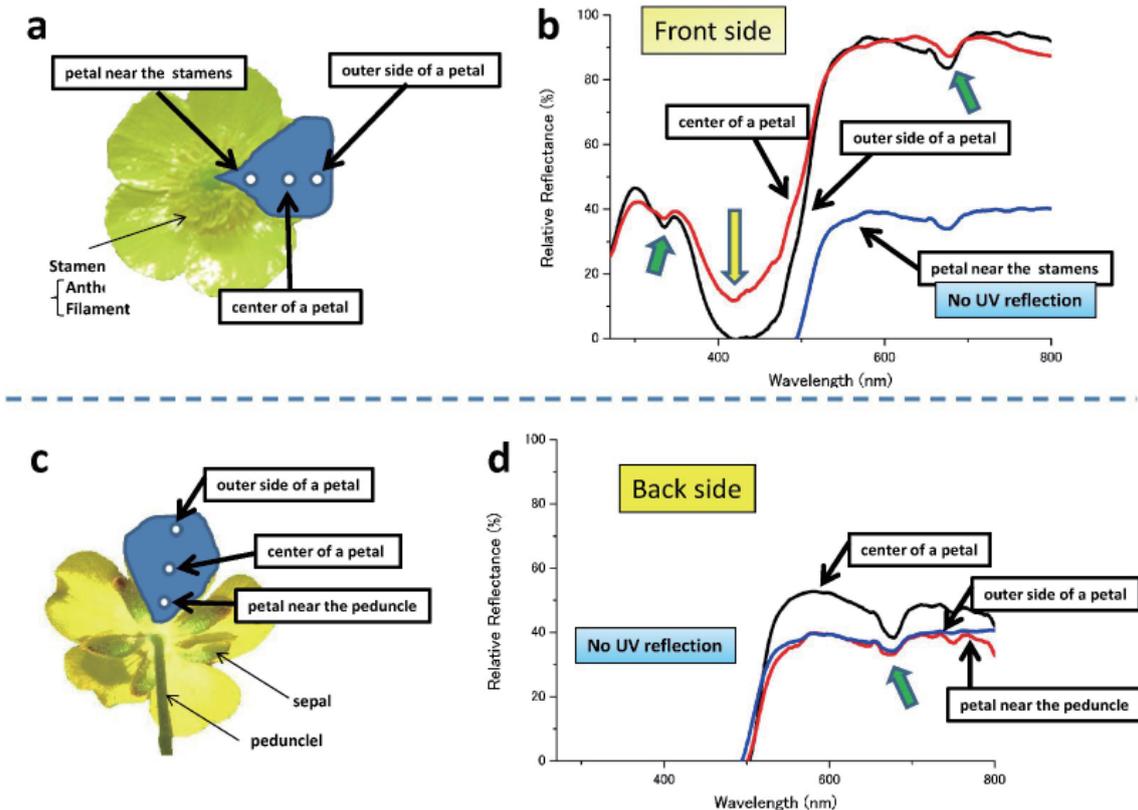


図 1 ウマノアシガタ花弁と反射スペクトル曲線。反射スペクトルは花弁の表と裏の複数点で測定した。表側の表面 (a, b) では花弁中央部や周辺部で UV 反射が見られるが、おしべ近傍やその下では UV 反射が無い。花弁裏面 (c, d) の反射曲線は、表側のおしべ付近と同程度。

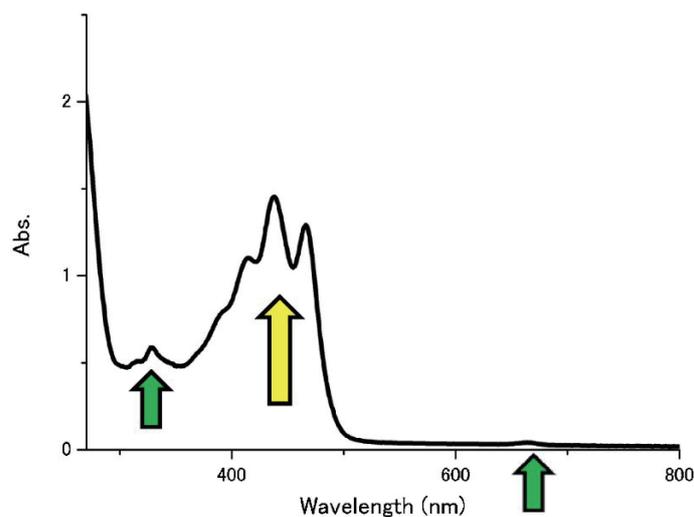


図 2 エタノール液浸で抽出された色素の吸収スペクトル。緑矢印のピークはクロロフィル、黄色矢印のピーク (400 ~ 500nm) はカロテノイド由来の吸収と考えられる。

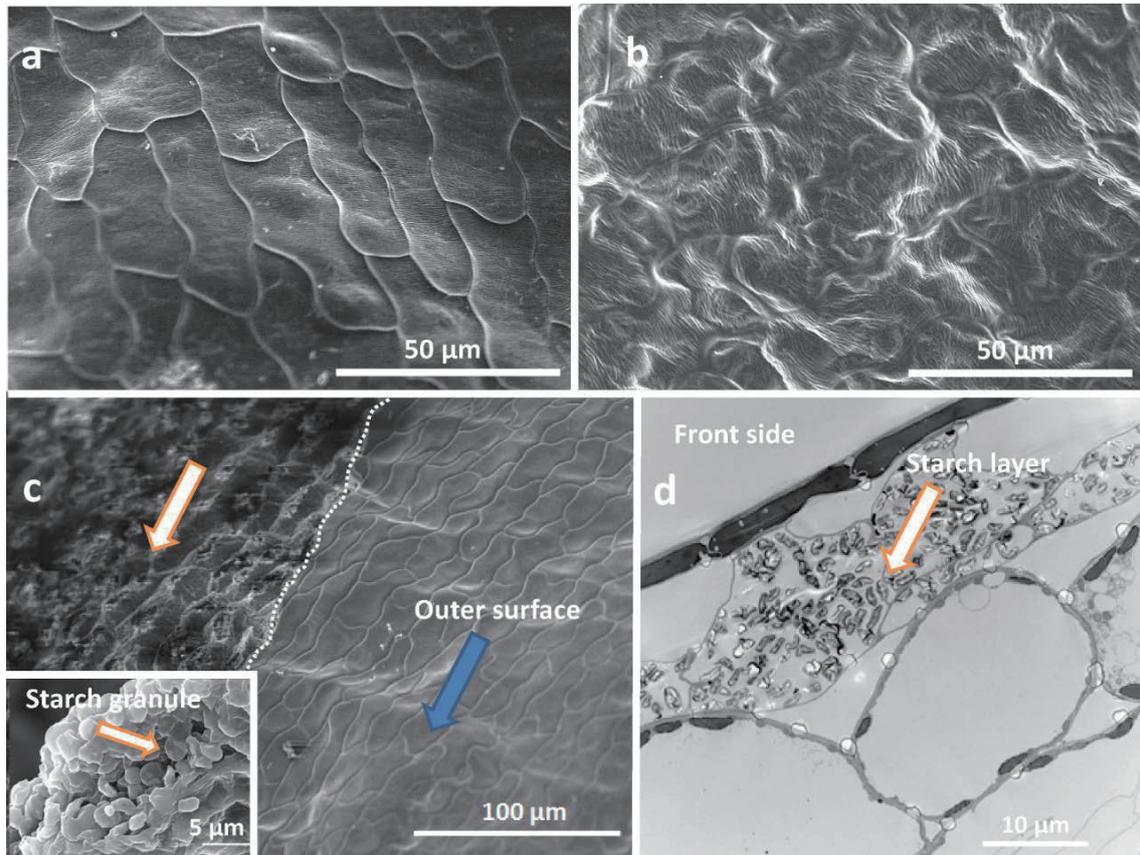


図3 走査型電顕により示された表面凹凸. 表面 (a) は裏面 (b) より平坦であることがわかる. 白矢印はスターチ顆粒を示す. でんぷんであることは確認済み. 各スターチのピラミッド構造 (c 白矢印) が, 花卉表面最外層直下の対応する構造 (c 青矢印) が形成される原因となっている. スターチ密集領域の透過電顕画像 (d 白矢印).

つは, 花卉の長軸方向に扁平なピラミッドのような構造であり, 図 3d の表皮細胞のクチクラを含む最外層の細胞の集まりと Starch layer の間の電子密度の低い部分をはがした後の, Starch layer の表面構造に対応すると考えられる.

図 4 は花卉の中央部を表裏で切断した透過型電子顕微鏡像である. 葉の表皮の下にあって, 細胞が縦に数層配列し 1mm 程度の厚みとなる柵状組織の各細胞の周辺には, 緑矢印で示したたくさんの葉緑体が存在していることが観察された. 表面側の花卉のクチクラ直下の細胞が集まって形成されている最外層は, 電子密度の高い部分 (図 4 の Front side 側の四つの黄矢印) が観察され, 柵状組織の内部にも同様に電子密度の高い部分が観察され, カロテノイドが集積している部分ではないかと推測された. その直下の, 黄矢印と青矢印の間の部分は細胞壁だけが残し, その内部を高倍率で観察しても, 細胞小器官などの構造は観察されず, 細胞骨格様の構造のみが観察された. おそらく構造形成後死んでいるものと考えられる. 比較的電子密度が高いことから, タンパク質など電子染色によって染まりやすい物質が含有されている可能性がある. 青矢印の部分は先に述べたデンプン顆粒が集積した部分である.

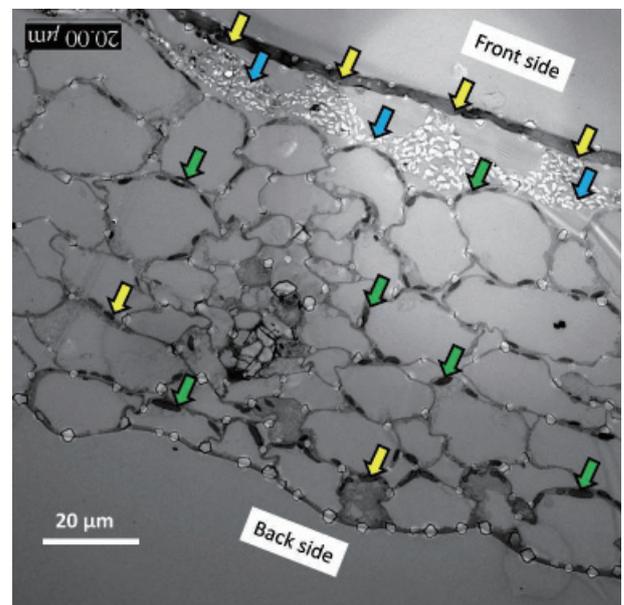


図4 花卉中央部の断面図.  
青矢印は蓄積されたスターチ顆粒を,  
緑矢印は葉緑体を, 黄矢印は色素体・色素細胞を示す.

ウマノアシガタ花卉表面の輝くような強い反射は、凍結乾燥などのために有機溶媒で洗うと一部分消える（図5）。実体顕微鏡で観察したときに輝く点（図5a 矢印）に対応する走査型顕微鏡像の場所（図5b）を拡大して観察した。図5cは\*印の部分から表面側から観察したものであるが、周辺部より平らに見える部分が観察され、赤矢印で示した部分を横から観察するとおよそ100nmの厚みのある薄層が存在していることがわかった。この薄層の物質は未同定であるが、薄層が輝く強い反射を生み出している可能性が高い。

花卉に達した光は、この表面で反射されるものに加えて、表面を通過したのち下層の数 $\mu\text{m}$ 程度のデンプン粒が集積している細胞層で反射され、表面（図4黄色矢印）のカロテノイド集積層を通過するのではないだろうか。花卉の表側だけが紫外外部域の反射を示すことから、このデンプン様構造物が紫外外部域の反射の起源であるのではないかと考えられる。そこで、片栗粉や小麦粉などの市販のデンプンの反射スペクトルを測定したところ（図6）、図6の黒い曲線で示したように紫外外部域にも比較的高い反射をもつことがわかった。そのデンプンに図2で示したウマノアシガタの花弁から抽出した溶液を加えたもの

を混ぜ、一昼夜ほど室温で放置すると色素はデンプン顆粒の上部に集積する。その反射スペクトルを測定すると図6の赤い曲線のようになり、そのスペクトルは図1bで示した花卉の紫外外部反射をしめる部位のスペクトル曲線と同じようになった。ウマノアシガタにおける紫外線の反射は、デンプン層が大きく寄与している可能性が示されたといえる。

自然環境で土に植わったウマノアシガタは、すべて花卉の下にスターチがある。これにより自然環境下では、植物の花弁はスターチによって紫外線などから守られている。

つぼみの状態の花を茎と共に切り出して（根も葉もなし）、真水の入った花瓶に入れ、開花をしてきたときに観察すると、一見、通常の開花の様子が観察される。しかし、この花に光を当てると、汗のように内部から分泌液が放出されて、しおれたようになる。しおれる前に、花を固定液に入れて、透過型電子顕微鏡観察すると花卉の中にスターチ層は観察されない。おそらく、スターチは開花時に、根か葉から花卉に運ばれるものと考えられる。

ウマノアシガタ花卉表面の輝くような強い反射は、図5で示した最表面の平らなクチクラ表面の反射が寄与し、

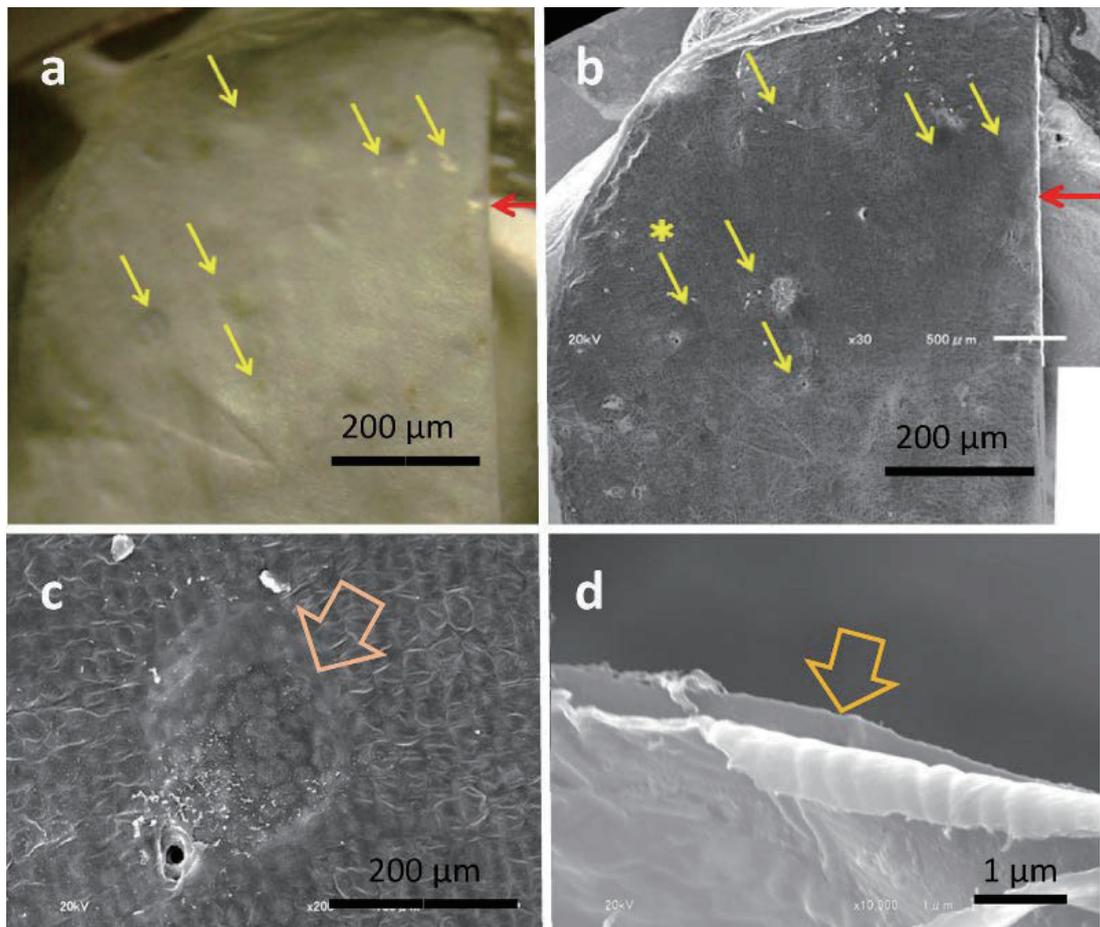


図5 実体顕微鏡による輝点 (a) を、走査型電顕画像 (b) と比較した。  
cとdはそれぞれ\*と赤矢印部分の高解像度写真であり、  
cは平坦で広いスポットであることを、dは約100nmの薄い層であることを示している。

紫外外部域の反射は、その面を超えてデンプン層まで達した光が再び反射していることが大きく寄与しているのだろう。とくに、デンプン層は、ピラミッド型をしていて、入射した光を多方向に反射している。これらの結果から、ウマノアシガタの花弁表面の紫外部まで含む強い反射スペクトルの起源は、花弁表面が平らであることに加えて最表層に薄層があることと、表面直下に存在するデンプン顆粒の集積が主たる要因で、その顆粒の周辺に存在するカロテノイドと葉緑素の吸収により、花弁の表側の反射スペクトルが決定されていることが強く示唆された。今後、反射方向および反射強度などの、より詳細な解析をすることで微細構造との関連が明確になるだろう。

花の発色の仕組みは、おもに太陽光スペクトルを色素が吸収しその残りが反射されてきているという発想の中で研究が続けられてきている。近年になって、電子顕微鏡技術や原子間力顕微鏡技術などが一般的になって、花の形態による反射の仕組みなどにも注目されるようになってきた。昨年報告された Vignolini ら [9] の研究は、その先鞭を付けた一つとして称えられるべきものといえる。ただ、ヨーロッパ種と日本種という種の違いがあるとはいえ、そこから得られた結果はずいぶんと違ったものであった。ごく近縁種の間での結果の大きな違いは、慎重な形態学的実験の手技の必要性和、物理光学的理解の重要性について改めて考えさせられるものでもある。生物材料の観察は、バイオミメティックスの規範となればよいという側面とともに、科学研究としての完成度を高める必要もある。

ウマノアシガタは、国内では北海道から南西諸島まで広がる多年草である。広く分布できるということは、その種がもつ特徴が生存に有利に働いていることを示しているとも考えられる。本種がもつ光の利用法は、一般に生物が生存のためのコストを最小限に抑え効率を上げた設計をしていることから鑑みても、効率的な設計なのだ

ろう。輝く花を、生体高分子の組合せだけで造り上げていることを改めて考えてみると、植物の精巧な原理を学ぶことで材料設計に活かすことができればと思う。



#### 4. 断面観察

ここまでの物理光学的解析から、高い反射率と紫外線領域の反射にはデンプン顆粒が空気層を含んでいることが示唆され、FIB による断面観察を行うこととした。筑波大学微細加工ナノプラットフォーム所有 FIB-SEM (FEI 製, Helios Nanolab™ 600i) の FIB で切削し、バイオ系試料への電子線照射を考慮しつつ断面を SEM モードで観察したところ、図 7 に示すように内部に空気層を含んでいることがわかった。これまでデンプン顆粒自身が空気層を形成していることは観察されておらず、本研究支援によってはじめて発見されたものである。



#### 5. 結言

花の発色は、単純に色素の吸収によるものではなく、最表面反射、乱反射ができる構造、紫外線を反射できる物質組合せなどの多様な仕組みをもつことがわかった。タイなどの東南アジアの国々では、伝統的に顔にデンプン顆粒を塗る風習があり「タナカ」と呼ばれている。これは、デンプン顆粒が紫外線や近赤外線を反射することを経験的に学んだ風習だと考えられるが、本研究からもデンプン顆粒が内部にもつ空気層が強い反射に関わっていることが示された。

ウマノアシガタだけに限らず種々の花の発色の仕組みを学ぶことで、バイオミメティックスの規範とできる可能性が示された。

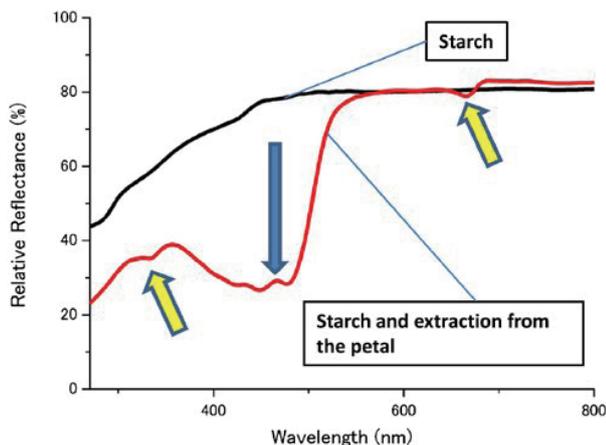


図 6 スターチと、スターチにエタノール抽出物を加えた混合物の反射スペクトル。  
エタノール抽出物質は室温蒸発後、スターチ表面に集中していた。

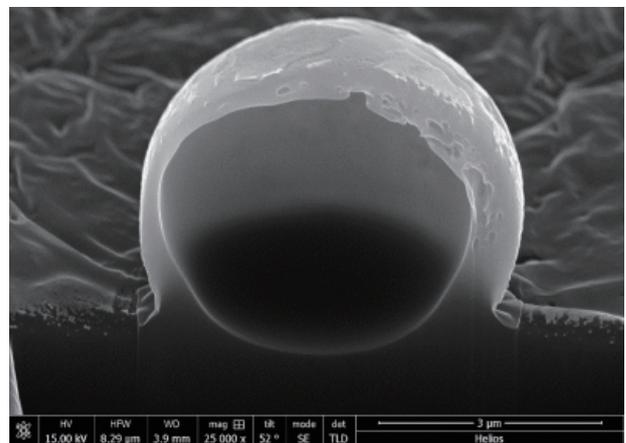


図 7 FIB-SEM で得られたスターチ断面図。  
内部に空洞が存在することが初めて見出された。



## 謝辞・付記

ウマノアシガタの採集にあたり、奥原 亜季、木村 古乃美（北海道大学）の両氏のご援助をいただきました。心より感謝申し上げます。



## 参考文献

- [1] 高分子論文集, **70**, No. 5, 221 (2013)
- [2] P. G. Kevan, L. Chittka, and A. G. Dyer, *J. Exp. Biol.*, **204**, 2571 (2001).
- [3] L. Chittka, A. Shimida, N. Troje, and R. Menzel, *Vision Res.*, **34**, 1489 (1994).
- [4] J. Parkin, *Ann. Bot.*, **42**, 739 (1928).
- [5] J. Parkin, *Ann. Bot.*, **45**, 201 (1931).
- [6] J. Parkin, *Ann. Bot.*, **49**, 283 (1935).
- [7] D. W. Brett and A. P. Sommerard, *Ann. Bot.*, **58**, 903 (1986).
- [8] S. Gaisterer, M. Musso, A. Asenbaum, and D. Furnkarnz, *Plant Biol.*, **1**, 670 (1999).
- [9] S. Vignolini, M. M. Thomas, M. Kolle, T. Wenzel, A. Rowland, P. J. Rudall, J. J. Baumberg, B. J. Glover, and U. Steiner, *J. Royal. Soc. Interface*, **9**, 1295 (2012).

(筑波大学 加藤 一郎)



### 【お問い合わせ】

微細加工プラットフォーム

筑波大学

☎ 029-853-5804

E-mail [staff@u-tsukuba-nanotech.jp](mailto:staff@u-tsukuba-nanotech.jp)

ホームページ

<http://www.u-tsukuba-nanotech.jp/>