

光合成色素の抽出と分離

実験の目的

光合成関連色素として chlorophylls だけでなく carotenoids(xanthophylls も含む)も関与している。光合成の反応中心にある以外の chlorophylls も carotenoids も集光性色素(light-harvesting pigments)として機能している。これらの色素を簡単に抽出して分離することと官能基や化学構造の違いにより R_f 値がどのように変化するかを理解することを本実験の目的とする。また、その際、chromatography の原理と応用法および生物分野における標準的画像解析ソフトである ImageJ の操作について学ぶ事も目的とする。後述に従って、実験当日までに各自のノート PC に ImageJ または Fiji をインストールして起動できることを確認して、実験当日に持参すること。

操作

・光合成色素の色素の抽出と TLC

1・柔らかめの植物材料を乳鉢で脱水のためのシリカゲルを加えてパウダー状になるまで粉砕する。その際に、できるだけ少量の hexane : acetone = 3 : 2 を加えて、色素を抽出する。(あまりに hexane : acetone = 3 : 2 の量が少な過ぎる場合は溶液が気化してなくなってしまうので足すこと。) hexane : acetone = 3 : 2 を加える時期は粉砕時でも、粉砕後でも構わない。

2・1の操作の間に TLC 展開槽 (染色瓶を流用する) に hexane : acetone = 3 : 2 を 2~3 mm 程度の深さになるまで入れておき、最低 20 分は蓋をして放置し、蒸気を飽和させておく。

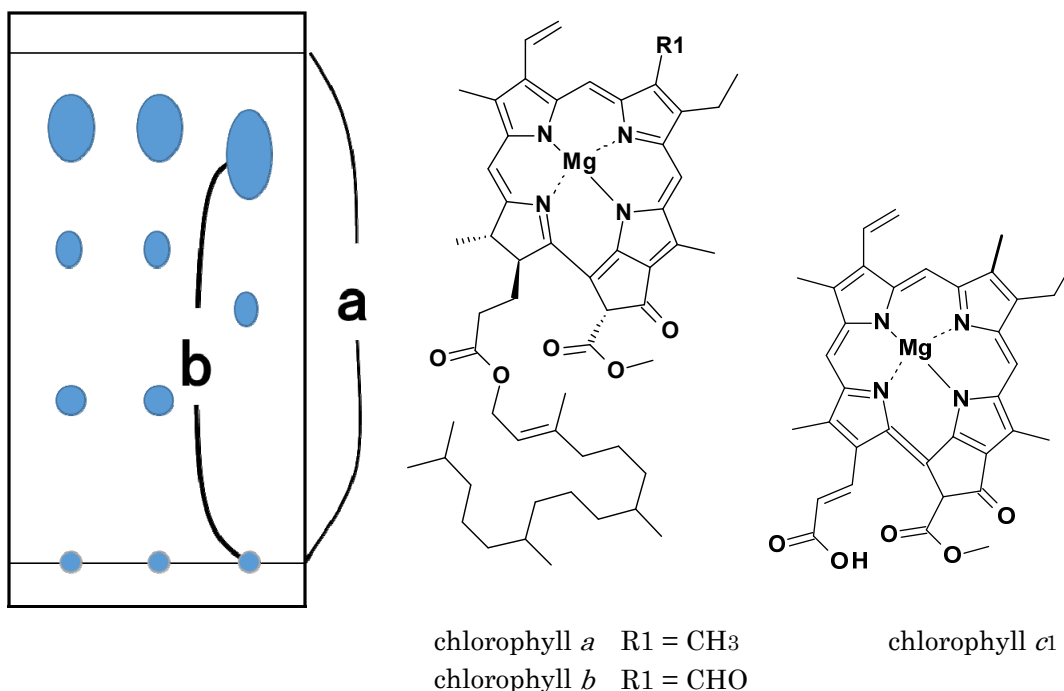
3・イエローチップでサンプルを TLC 板にスポットする。海藻であるワカメと高等緑色植物であるホウレンソウのコントロールを左右にスポットしてから自分のサンプルをスポットする。スポットが大きくなりすぎないように複数回に分けて少しずつ酔歩とすること。ただし、複数回にわたって同一サンプルを同一個所にスポットする場合は、先にスポットしたサンプルが乾いている必要があるため息を吹きかけながらスポットすること。

4・スポットしたサンプルが展開液に浸からないに展開槽の中に入れ展開させる。液の先端が上から約 5 mm の所まで来たら TLC 板を取り出し、速やかに先端部分に鉛筆で線を引き、光によって色素が退色しやすいので、デジタル写真を直ちに撮り、ノート PC に転送して ImageJ または Fiji を用いてスポットごとに R_f 値(retardation factor : b/a)を求める。操作法については、後述の「ImageJ による TLC の解析」とともに Sirius にアップロードしておいた PowerPoint ファイルで予習しておくこと。「線による解析」と「バンド解析」の両者又は片方で解析を行うこと。

分離がうまくいかないときは展開液の組成を色々変えてみてもよい。順相 TLC では R_f 値と溶媒強度(極性)は正の相関関係がある。なお、hexane の溶媒強度は 0.01 で、acetone の溶媒強度は 0.56 (バイオタージ・ジャパン株式会社の HP で紹介されている値 https://www.biotage.co.jp/app_top/tech_purif/opt-solvent-strength/)であるため、hexane : acetone = 3 : 2 の溶媒強度は

$$0.01 \times 0.6 + 0.54 \times 0.4 = 0.222$$

となる。一般には分離したい目的の物質の R_f 値が 0.15 - 0.35 に収まるようにすると高い分解能が得られやすい。そこで、ある溶媒強度の移動相において TLC を行った結果、近接した R_f 値を持つ複数の物質が存在している時、近接した R_f 値が高い複数の物質を分離するためには溶媒強度を下げ、近接した R_f 値が低い複数の物質を分離するためには溶媒強度を上げれば良いことになる。



補足 1…chlorophyll から Mg²⁺がはずれて水素原子 2 個と置換された pheophytin や更に phytol 残基のはずれた pheophorbide が灰褐色のバンドとして chlorophyll の近傍に検出されることもある。

補足 2…乾燥ワカメ由来の chlorophyll *a* は過熱等によって異性化している割合が高いためその *R_f* 値と、高等陸上生物由来の chlorophyll *a* の *R_f* 値とがずれていることが多いが、色彩はほぼ同じである。

補足 3…実験の結果を写真に撮る際には、TIFF(Tag Image File Format)での保存が望ましいがスマートフォンでは TIFF では保存できないものが多いため、JPEG で保存されたものを解析する。TIFF は基本非圧縮の画像ファイルで様々な画像に関する情報を数多く保持できる。

・ ImageJ による TLC の解析

Sirius にアップロードしてある PowerPoint ファイルを参照して解析すること。 ImageJ のインストールや iPhone 等から写真ファイルのフォーマットの変換については後述の説明を先に読んで対処しておくこと。

ImageJ を起動後、メニューから *File > Open…* ファイルを選択 し、画像ファイルを開き、必要であれば不要な外周の消去や傾き補正や Background 補正を行う。この教科書では Windows 版をもとに操作方法について説明する。「線による解析」と「バンド解析」では、「線による解析」の方が簡便であるがノイズが大きくなる傾向があり、「バンド解析」の方が煩雑ではあるがグラフのピークが見やすい傾向がある。

① 線による解析

1・メニュー・ウインドウの選択ボックスの左から 4 つめにある線ツールを選択して、ポインターを画像ウインドウに持って行くと +ポインターになるので、それを TLC の原点上において左クリックしながら展開の先端に向けてポインターを動かして展開の先端に達したら、左クリックをやめると直線が引かれる。(注意点・・・原点から展開先端に向けて線を引くこと。)

2・メニューから *Analyze > Plot Profile* を選択すると、グラフ・ウインドウが開く。

3・ポインターをグラフ上に持って行くとメニュー・ウインドウの選択ボックスの左の下にその座標が $x = \dots$, $y = \dots$ で表示される。分離された色素は別々の物質であるからこの実験では y の値は無視して良い。ポインターをグラフの右端に持って行ったときの x の値を a とする。グラフ上のそれぞれのピークにポインターを持って行き、そのときの x の値を b として、それぞれの R_f 値(b/a)を出す。なお、グラフ・ウインドウの下部にある List をクリックすると x と y の数値が得られ(表データとして保存も可能)、 y が極大もしくは極小となっている x の値を a で割れば R_f 値が得られる。

4・二つのコントロールと持ってきた一つのサンプルの計 3 種類について同様の操作を行う。

② バンド解析

バンド解析を行う際の重要な注意点は、原点が自動的に上もしくは左として設定されるため、原点が右、または下に写っている TLC の写真の場合には、メニューから *Image > Transform > Rotate 90 Degrees Right (Left)* や *Image > Transform > Flip Horizontally (Vertically)* で原点が上か左になるようにする。もしくは、原点が下もしくは右のままの写真を解析するのであれば、ピークの x の値を c とすると R_f 値は $b/a = (a - c) / a$ として求められる。

1・メニュー・ウインドウの選択ボックスの左端の□ツールを選択し、ポインターを画像ウインドウに持って行くと+ポインターになるので、原点と展開の先端を含む長方形を左クリックしながら初めのレインに対して作成する。

2・メニューから *Analyze > Gels > Select First Lane* を選択すると、長方形の中に 1 が現れる。

3・+ポインターを長方形 1 の上に持って行くと矢印ポインターになるので左クリックしながら次のレインに移動させると新しい長方形ができて移動する。正しい位置になったら、左クリックをやめてメニューから *Analyze > Gels > Select Next Lane* を選択すると新しい長方形の中に 2 が現れる。

4・同様に+ポインターを長方形 2 の上に持って行くと矢印ポインターになるので左クリックしながら次のレインに移動させると新しい長方形ができて移動する。正しい位置になったら、左クリックをやめてメニューから *Analyze > Gels > Select Next Lane* を選択すると新しい長方形の中に 3 が現れる。(注意…+ポインターは一番新しい長方形の上でしか矢印ポインターにならないので、一番数字の大きな長方形を選ぶこと。3 番目以降のレインにも拘わらず長方形 1 を鋳型として選んだため、うまくいかない学生が毎年いる。)必要なレインの数だけこの操作を繰り返す。

5・メニューから *Analyze > Gels > Plot Lanes* を選択すると、グラフ・ウインドウが開く。

6・ポインターをグラフ上に持って行くとメニュー・ウインドウの選択ボックスの左の下にその座標が $x = \dots, y = \dots$ で表示される。ポインターをグラフの右端に持って行ったときの x の値を a とする。グラフ上のそれぞれのピークにポインターを持って行き、そのときの x の値を b として、それぞれの R_f 値(b/a)を出す。なお、上述のように原点が右、または下に写っている TLC の写真の場合には、ピークの x の値を c とすると R_f 値は $b/a = (a - c) / a$ から求められる。

結果と考察

TLC の結果をスケッチし、有効数字を考えてそれぞれのスポットの R_f 値を書くこと。また、色と図の構造式から chlorophylls のどの種類にどのスポットが対応するか、考察すること。更に、carotenoids に関しても酸素を含まない carotenes と酸素を含む xanthophylls を R_f 値から区別し、その理由を説明すること。なお、個々の carotenoid を同定する必要はない。つまり、緑色のものを chlorophylls と、黄色系統を carotenoids (R_f 値から酸素を含まない carotenes と酸素を含む xanthophylls を判別する)と、灰褐色のものを pheophytin や pheophorbide と判別し、どのスポットが chlorophyll *a, b, c* や carotenes と xanthophylls に該当すると判断した理由を説明すること。更にこの実験で用いた順相 TLC による物質の分離の原理を記載すること。

画像解析ソフト ImageJ のインストールについて

ImageJ はアメリカの NIH が配布しているフリーの画像解析ソフトで、生命科学分野において広く用いられている事実上の画像解析の標準ソフトである。写真などのビットマップ画像を編集・加工・解析できる。様々な plug-in や macro による機能拡張も容易である。このソフトは Java 仮想マシン上で動作するため、様々な OS 上で動作可能である。そこで、ImageJ を各自の PC にインストールするに当たり、Java が PC にインストールされているかどうかをあらかじめ調べ、それに応じて Java がバンドルされている、もしくはされていないバージョンを選択する必要がある。ImageJ の web site を見て、適切なものをダウンロードし、インストールすること。なお、ImageJ の代わりに ImageJ に様々な plug-in や macro を加えるとともに、新しい機能を付け加えた Fiji をインストールしても構わない。ただし、Fiji には多数の plug-in や macro が含まれるために、ソフトを立ち上げるのに必要

な時間が ImageJ に比べてかかる。

共通実験Ⅱの光合成色素の分離実験において、ImageJ を用いた画像解析の基礎を学ぶことを目的として ImageJ を TLC 解析に用いる。そのため、光合成色素の分離実験には各自のノート PC に必ず ImageJ をインストールして持参するとともにデジタルカメラかカメラ付き携帯電話(スマートフォン含む)も持参すること。更に学生実験が始まる前にソフトの起動確認を各自しておくこと。

なお、ImageJ を PC にインストールしなくても、PC やスマートフォンの web browser 上で ImageJ を使えるが、PC にインストールすることを推奨する。

DNA やタンパク質のゲル電気泳動解析やプレート上のコロニー数の計測や細胞数の計測や顕微鏡画像解析や蛍光タンパク質の細胞内局在性解析などの今後の学生実験の様々なものに应用可能なため、多数の解説 HP が存在するのでどのような操作をすれば良いのかを各自で調べ、これらの画像解析ソフトを利用して今後のレポートに反映させることが望ましい。

ImageJ のインストールにはいくつかの仕様があるので、ソフトをダウンロードしても以下の説明を良く読んでからインストールすること。

・ダウンロード元

ImageJ <https://imagej.net/ij/download.html>

Fiji <https://imagej.net/software/fiji/downloads>

(下記の説明は ImageJ の web site に基づいている。Fiji の web site では、アイコンからソフトを選択する形式になっているが、以下の選択するソフトや行う操作は同じである。)

1・初めにノート PC に Oracle 社の Java がインストール済みかどうか、確認すること。Java のインストールの有無によってダウンロードするソフトが異なってくるが、分からない場合には Java がバンドルされているソフトをダウンロードすること。

2・ソフトは ZIP ファイルとして圧縮されている。展開してから使用すること。展開後には元の ZIP ファイルを廃棄してよい。OS に初めから展開機能がある場合が多いが、ない場合には OS が Windows であれば 7-Zip (<https://sevenzip.osdn.jp/>)をインストールしておく。MacOS で圧縮された添付ファイルなどを展開する場合にも日本語のファイル名が文字化けしないので Windows OS 付属のソフトより便利である。

3・ダウンロードされるソフトはインストーラーではない。展開されたフォルダを置く場所には制限があるので以下の説明やダウンロード元の説明を良く読むこと。展開された ImageJ のフォルダ中に Java のフォルダと ImageJ のアプリケーションソフトウェアが入っているので、両者を同じフォルダの中に置いておくこと。例年、ImageJ のアプリケーションソフトウェアだけをフォルダからデスクトップに移動させて起動しないと訴えてくる学生がいるが、ショートカットやエイリアスを作成してからショートカットやエイリアスをデスクトップに移動させること。

Platform Independent (PC の OS に関わらず、Java がインストール済みや既存の ImageJ を最新版にする場合)

To install ImageJ on a computer with Java pre-installed, or to upgrade to the latest full distribution (including macros, plugins and LUTs), download the **ZIP archive** (6MB) and extract the ImageJ directory. Use the **Help > Update ImageJ** command to upgrade to newer versions.

Java が PC にインストール済みの場合は Java がバンドルされていないもの(**ZIP archive**)をダウンロードすると後の管理が便利である。ImageJ を最新版に更新する際には、ImageJ を起動後に上記の下線部の操作を必ず行っておくこと。Fiji の場合は、二つの更新操作があり、上記の ImageJ の更新操作 **Help > Update ImageJ**に加えて Fiji に組み込まれている plug-in 等の更新のため **Help>Update...**を行うこと。

以下は、OS 毎の説明である。(https://imagej.net/ij/download.html の説明)

Mac OS X (Java がインストールされていない場合は **ImageJ bundled with Java 8**か、M1 (ARM)

Mac であれば **ImageJ bundled with Zulu OpenJDK 13.X.X** をダウンロードする必要があるので要注意)

Download **ImageJ bundled with Java 8** (may need to work around Path Randomization).
Instructions. With M1 (ARM) Macs, download **ImageJ bundled with Zulu OpenJDK 13. X.X**.

Instructions を良く読み、指示に従うこと。展開後のフォルダ中の `Installation Notes.html` は同じ内容である。リンク先の “**ImageJ マニュアル : Mac OS X へのインストール**” に記載されている “**Download ページから ImageJ for Mac OS X をダウンロードする。ダウンロードした ZIP ファイル (Image1.xx.zip) は、"ImageJ" フォルダに自動展開される。このフォルダを "アプリケーション" フォルダにコピーして開き、ImageJ64.app を Dock にコピーする。**” という指示に従い、更に OS のバージョンごとの指示にも従うこと。

なお、インストールしようとした時に「開発元を確認できないため、開けません。」と表示された場合については以下の操作をすること。

- ・一時的にアプリケーションを使用する場合

「システム環境設定」を開き、「セキュリティとプライバシー」を選択する。そして、「一般」タブを開くと、ダウンロードしたアプリケーションの実行許可があるので、「このまま開く」をクリックすると「開発元は未確認です。開いてもよろしいですか?」という確認画面が表示され、「開く」をクリックして ImageJ を起動する。この方法では一定時間しかアプリケーションを使用できない。

- ・恒常的にアプリケーションを使用する場合

Finder で開きたいアプリケーション(ImageJ)を検索する。その際には、Launchpad ではショートカットメニューにアクセスできないので Launchpad を使用しない。次に、Control キーを押しながらアプリケーションアイコンをクリックして、ドロップダウンメニューから「開く」を選択し、「開く」をクリックする。セキュリティ設定の例外として保存され、今後はダブルクリックで開くことができる。(The first time you run ImageJ, you may get an "ImageJ can't be opened because it is from an unidentified developer" message, which can be bypassed by right clicking on ImageJ.app and selecting "Open" from the drop down menu.) また、うまく起動しない場合にはパスランダム化による影響の可能性があるので対応すること。(MacOS 10.12 (Sierra) and later have a security feature called Path Randomization that can cause ImageJ to not work as expected. Path randomization is in effect if the "ImageJ home" path shown in the *Image>Show Info* window starts with "/private" and plugins are not installed in the Plugins menu. You can disable path randomization by dragging ImageJ.app to another folder and then (optionally) dragging it back.)

Fiji に関しては、Java ごとインストールする場合はダウンロード元の上のリンゴのアイコンを、Java 不要の場合にはその下の No JRE (これには複数の OS 用のソフトが含まれているため、使用に当たっては適切なソフトを選択する必要がある。他の OS 用のソフトは削除可。)をクリックしてソフトをダウンロードすること。展開したフォルダ中に対するインストール操作は、ImageJ の指示と同様である。

Linux

Download **ImageJ bundled with Java 8**. **Instructions**.

Fiji に関しては、64-bit OS であればダウンロード元の上のペンギンのアイコンを、32-bit OS であればページの下 32-bit のペンギンのアイコンをクリックしてソフトをダウンロードし、Java 不要の場合にはリンゴのアイコンの下 No JRE をクリックしてソフトをダウンロードすること。その中には ImageJ-linux64, ImageJ-win32.exe, ImageJ-win64.exeが含まれているので ImageJ-linux64 を選ぶこと。使用している OS 以外のソフトを削除して良い。

Windows (最近の Windows は 64-bit OS であるため、32-bit OS の説明は省略する。Java がインストールされているどうかは、プログラムのリストを調べればわかる。Java がインストールされていたら上述の **Platform Independent** の ZIP archive をダウンロードしても良い。)

64-bitOS で Java がインストールされていない場合は、

Download **ImageJ bundled with 64-bit Java 8. Instructions.** からダウンロードする。

ダウンロードした ZIP ファイルを右クリックして“すべて展開”を選択して展開する。展開されたフォルダの置き場所には以下の“注意”の制限がある。

注意・ImageJ や Fiji のフォルダの置き場所は、プログラムが設定ファイルを自動的にフォルダ内に作成するのでドキュメント・フォルダかダウンロード・フォルダやユーザー名フォルダの下に作製したフォルダなどが望ましく、“Windows (C:) > Program files フォルダ”を避けること。

“Caution: "Program Files" not recommended!

If you are installing ImageJ on Windows, we strongly recommend that you store your ImageJ.app directory somewhere in your user space (e.g., "C:\Users\[your name]\ImageJ.app") rather than in "C:\Program Files" or other system-wide directory. If you move ImageJ.app to such a directory, modern versions of Windows will deny ImageJ write permission to its own directory structure, preventing it from being able to update.”

フォルダ中の ImageJ.exe をクリックすると ImageJ が起動する。ImageJ が起動しない場合は、右クリックで“管理者として実行”にすると起動することがある。なお、C:\>ProgramData>Microsoft>Windows> スタート メニュー > プログラム (C:\ProgramData\Microsoft\Windows\Start Menu\Programs)に ImageJ.exe のショートカットを入れておくとスタートメニューから起動できる。

Fiji に関しては、64-bit OS であればダウンロード元の上の大きいアイコンをクリックしてソフトの ZIP ファイルをダウンロードして同様に展開する。フォルダの場所に関しては前述の ImageJ と同じ制約がある。なお、Fiji で Java 不要の場合にはリンゴのアイコンの下 No JRE をクリックしてソフトをダウンロードすること。その中には複数の OS 用のソフトが含まれているので ImageJ-win64.exe を選んでクリックするとソフトが起動する。使用している OS 以外のソフトを削除して良い。

ImageJ を PC にインストールせずに web browser 上で使用したり、スマートフォンの web browser 上で使用したりする場合

ImageJ を PC やスマートフォンの web browser 上で利用することが、最近、可能となっている。しかし、機能や使える browser や処理速度などの制限がある。ソフトのインストールが分からなかったり、PC を持ってこれなかったりした場合にはタブレットやスマートフォンなどを用いてもよい。ただし、スマートフォンの画面は小さいため、操作性は著しく劣る。Windows PC や Mac やスマートフォンで、Microsoft Edge(Chromium)や Chrome や Firefox や Safari での動作を確認しているが、他の browser での動作確認を行っていない。

使い方は <https://imagej.net/ij/index.html> にアクセスして、Run ImageJ in Browser (GitHub) (<https://ij.imjoy.io/>)をクリックすると ImageJ.JS というロゴが出てしばらく設定に時間がかかるが、web 上で ImageJ が立ち上がる。なお、PC にインストールする場合とは異なり、update する必要はない。

PC やスマートフォンの機種や browser の種類に依存する問題があるので、実験の前には必ず動作確認をしておくこと。

*様々な学生実験の画像データ解析に用いるに当たり、以下の URL が参考になる。そして様々な学生実験に ImageJ を活用することが望ましい。

ImageJ 日本語情報 <http://seesaawiki.jp/w/imagej/>

<http://life-science-project.com/imagej/>

生命科学系 DB・ツール使い倒し系チャンネル 統合 TV <https://togotv.dbcls.jp/> で ImageJ を検索

*Apple 社の iPhone 等から写真ファイルを PC に転送する際の問題の対処法について

iPhone で撮影した写真を ImageJ や Windows PC で開けないことが多々ある。iOS や MacOS で

HEIF (High Efficiency Image File Format) という画像ファイル形式が採用され、それにつけられている拡張子は「.HEIC」である。この画像ファイル形式に ImageJ が対応していないからである。iPhone と Mac 版の ImageJ がある場合には、画像を Mac に転送して画像ファイルを画像表示ソフトで開いて JPEG に変換して保存してから ImageJ で開くか、画像を開いた後に画像をコピーして ImageJ を立ち上げておいて *Edit > Paste* をすれば良い。なお、以下の対処法 2, 3, 4, 6 でも良い。

iPhone からの画像ファイルを Windows 版の ImageJ で開く場合の対処方法をいくつか説明する。
実験の前にいずれかの方法で成功することを試しておくこと。

・対処法 1 かつて Windows は HEIF に標準では対応していなかったが、Windows 11 22H2 以降は標準で対応できるようになったので、古い OS を使用している場合には OS をアップデートする。ImageJ 以外の画像表示ソフトで画像ファイルを開いて JPEG に変換して保存してから ImageJ で開くか、画像を開いた後に画像をコピーして ImageJ を立ち上げておいてメニューから *Edit > Paste* をする。

・対処法 2 iPhone に対して (1) 設定 App を起動する、(2) 「カメラ」→「フォーマット」の順にタップする、(3) 「互換性優先」を選択すると、「.JPG」で保存されるようになる。それをメールで PC に添付して送る。ただし、「.JPG」は「.HEIC」よりも容量が大きくなるので、実験終了後には元に戻す。

・対処法 3 iPhone に対して (1) 設定 App を起動する、(2) 「写真」→「Mac または PC で転送」欄の「自動」を選択してから、iPhone と PC を USB ケーブルで繋いで、写真ファイルを PC に転送する。

・対処法 4 PC で (1) web browser 上で Google フォトを起動する、(2) iPhone から送られてきた「.HEIC」の画像ファイルを、Google フォトの画面にドラッグアンドドロップしてアップロードする、(3) Google フォトの画面上で、その画像ファイルに対して右クリックし「名前をつけて画像を保存」を選択する、(4) 拡張子を「.JPG」形式に書き換えて PC に保存する。

・対処法 5 「HEIC 変換 ソフト」のキーワードでサーチし、変換ソフトをダウンロードして PC にインストールする。そして、「.HEIC」ファイルを JPEG などの他の形式に変換して保存する。どのソフトがよいかということを推奨しないので、自己責任でインストールすること。なお、Microsoft Store を開いて、ライブラリを最新に更新すると、Microsoft 社の「HEIF 画像拡張機能」と「HEVC ビデオ拡張機能」をインストールできるので利用は可能である。

・対処法 6 Mac がある場合、「.HEIC」ファイルを Mac に転送した後、その画像ファイルに対して、(1) プレビュー画面の「ファイルメニュー」→「書き出す」をクリックする、(2) 書き出し名などを入力する画面が表示されたら、変換したいフォーマット「JPG」、「PNG」などを選択する、(3) 名前・タグを入力し、場所を選択して保存する、(4) それを Windows PC へ転送する。

(2004 年 執筆責任者 川合伸也)(2007 年, 2013 年, 2013 年, 2018 年, 2024 年改訂 川合 伸也)