水稻種実を暗所で発芽させた際のイノシトールリン酸の変化*

倉沢文夫, 早川利郎, 渡辺鉦吉

(新潟大学農学部農芸化学科生物化学教室)

昭和 43 年 7 月 7 日 2 受理

Change of Inositol Phosphate in Rice Seed during Germination in Dark

By Humio KURASAWA, Toshiro HAYAKAWA and Shokichi WATANABE

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University

The Changes of phosphorous compounds in the rice kernel during germination were followed. No net change was observed in total and acid soluble phosphate. Inositol phosphate showed a markedly rapid decrease while inorganic phosphate content increased during germination. The main component of inositol phosphate was found to be inositol hexaphosphate both before and after the germination.

Free inositol content per gram of the seed before germination was 0.04mg, while after germination it reached a value of 0.55mg. Total inositol, on the other hand, decreased from 1.885mg to 1.245mg during this period. Per cent of free inositol in total inositol before germination was 2.01 and it increased to 43.99 after germination.

(Received July 2, 1968)

緒 論

イノシトールリン酸は植物界に広く分布している。禾本科植物の種実の中ではリン酸の 80% はイノシトールリン酸の形で存在する。これらの植物では登熟期にデンプンが合成されるが、その際用いられたリン酸はイノシトールリン酸として貯蔵される。一方、発芽期では代謝に必要なリン酸はイノシトールリン酸から供給されるものと思われる。

既報⁽¹⁾において私どもはイノシトールが *Schizosaccharomyces pombe* を用いることにより定量されることを認めた。

本報においては、水稻を暗所で発芽させた際、イノシトールリン酸の変化について研究した。植物の発芽に伴うイノシトールリン酸の変化については Burkholder⁽²⁾, Darbre⁽³⁾ らの報告がある。Burkholder⁽²⁾ は大麦を 5 日~6 日発芽させるとイノシトールの含量は乾物 1g 中に 630 μ g から 1290 μ g に増加することを認めている。Darbre ら⁽³⁾ は大麦を発芽させると、全イノシトールは

g 当り 2690 μ g が 2630 μ g と変化がなく、遊離イノシトールは 85 μ g から 300 μ g に増加することを認めている。

以上のように、大麦の発芽によるイノシトールの含量の変化についての実験はあるが、水稻種実の発芽におけるイノシトールリン酸、イノシトールの含量の変化についての研究はない。よって私たちは水稻を暗所で発芽させた際における籾中のリン酸化合物、およびイノシトールの含量について実験したので報告する。

実験の方法および結果

籾を暗所で発芽させて、各時期に発芽種子を採って実験材料とし、これらの材料についてリン酸化合物の含量の変化、イノシトールリン酸塩の形態およびイノシトールの含量の変化について実験した。

I. 試料の調製

昭和 39 年度、新潟県農業試験場にて生産された水稻農林 43 号の籾を用いた。籾を 0.1% 昇汞で 20 分間殺菌した後、蒸溜水で完全に洗淨した。この籾をシャーレ中に播種し、温度 30°C の恒温器中にシャーレを入れて発芽させた。播種直後、1 日、3 日、6 日、9 日、12 日後

* 水稻種実のミオイノシトール合成酵素に関する研究 (第 2 報)

に粉を取り出し, 室温で通風乾燥後 50 メッシュに粉碎した. 無水リン酸の入ったアブデルハルデン乾燥器で 80°C で減圧乾燥後, デシケーター中に保管して, 試料とした.

II. 発芽による粉重の減少

シャーレに乾熱殺菌した脱脂綿を敷き, その中に粉を約 15 g (含水物) を播種し, 発芽粉をそれぞれ取り出し, 105°C で乾燥して恒量として, 粉重の減少の割合を示した. 結果は第 1 表のようである.

第 1 表 発芽日数と粉重の変化 (無水物 g)

発芽日数	播種直後	1 日後	3 日後	6 日後	9 日後	12 日後
発芽前粉重	12.93	12.93	12.92	12.91	12.93	12.93
発芽後粉重	12.93	12.87	12.54	11.46	10.42	7.78
粉重減少割合 %	0	0.46	2.94	11.27	19.38	39.81
100 粒 重	2.65	2.64	2.58	2.36	2.14	1.58

III. 発芽種子内のリン酸化合物の分画定量

各リン酸化合物 (全リン, 酸可溶性リン, フィチン態リン, 無機リン, リン脂質態リン) の分画定量は, 主に Pons⁽⁴⁾の方法を参考にして行なった.

全リン: 乾燥試料 0.5~1 g (この場合リンの含量が 1.5 mg を越えないようにする) をケルダール分解瓶に入れ, これに濃硫酸 3 ml を加えて加熱する. さらに 30% 過酸化水素 3~4 滴を加えて加熱する. 分解後 100 ml に稀釈し, これより 10~20 ml 採り, 還元モリブデン法⁽⁴⁾によって比色測定する.

無機リン: 乾燥試料 500~600 mg に冷却せる 0.75 N トリクロル酢酸 25 ml を加え, 約 1 時間振盪抽出後, 無灰濾紙にて濾過し, 初めに出てくる濾液をのぞき, その後の濾液より 5~10 ml を正確にとり, イソブチルアルコール法⁽⁴⁾によって比色定量した.

酸可溶性リン: 乾燥試料 500~600 mg に 0.75 N トリクロル酢酸 25 ml を加え, 約 1 時間振盪抽出後, 無灰濾紙にて濾過し, 初めに出てくる濾液を除き, その後 5~10 ml を正確に採り, 全リン定量法に準じて分解したのち, 無機リン法に準じて定量した.

リン脂質態リン: 試料 0.5~1.0 g をソクスレー脂肪抽出器にてベンゼン・エチルアルコール混液 60 ml にて抽出する. 抽出混液を蒸発させた後, 95% エチルアルコール 10 ml にて 2 回, さらに 70% エチルアルコールにて 2 回加熱しながら抽出物を磁製ルツボ中に流し落す. 加熱によってアルコールを蒸発除去する. 磁製ルツ

ボ中に硝酸マグネシウム溶液 (95% エチルアルコールに硝酸マグネシウムを飽和させる) 3 ml を加え, よく液を浸し, 最初低温で乾かした後 400~600°C で灰化する. 10 N 硫酸 2 ml を加え, 100 ml に稀釈し, これより 10~15 ml を採り, イソブチルアルコール法⁽⁴⁾によって比色測定した.

フィチン態リン: リン脂質を抽出した残留物を用いる. 残留物が入っている円筒濾紙を湯煎鍋上で溶剤を蒸発させ, 残留物をフラスコに移し, 2% 塩酸 50~100 ml

を正確に加え, 振盪機で 2 時間フィチンを抽出する. 後, 無灰濾紙で濾過し, 最初の部分を棄てた後 20 ml を採る. フェノールフタレンを 1 滴加え, 5 N NaOH 2 ml を加え, 次に 1 N NaOH と 1 N HCl で中和する. 脱塩水で 25 ml に稀釈し, これに塩化鉄

($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 g を 1 N HCl に溶かして 1 l とする) 5 ml を加え, よく攪拌して湯煎鍋上で 15 分間煮沸する. 冷水で 20 分間冷却後, 生じたフィチン鉄塩を 1,800 rpm で 20 分間遠心分離を行なう. 沈澱は 10% 硫酸ソーダを含む 0.6% 塩酸 5 ml で攪拌洗浄する. 攪拌棒は 2 ml の塩酸で洗浄する. 再び 1800 rpm で 20 分間遠心分離する. 沈澱は熱水 5 ml に懸濁させ, 1 N NaOH 2 ml

第 1 図 発芽に伴うリン酸化合物の含量の変化 (乾重 1 g 中)

×—× 全リン ○—○ 無機リン
△—△ 酸溶性リン ●—● フィチン態リン

を加え、100℃ の湯浴中で時々攪拌しながら加温する。生ずる水酸化鉄は濾別する。濾液および水酸化鉄を熱水 5ml で 3 回洗浄した洗液は合して、ケルダールのフラスコに入れ、全リン定量法に準じて分解定量した。

発芽種子中の各種リン化合物の含量は第 1 図のようである。

全リン、酸可溶性リンは各時期による含量の変化は、ほとんどなかったが、フィチン態リンは減少し、それに伴って無機リンは増加していた。

IV. 発芽の各時期におけるイノシトールリン酸の分画定量

発芽に伴ってフィチンリンは減少して、無機リンは増加していた。よって播種直後、1 日、3 日、6 日、9 日後に籾を取り出し、室温で通風乾燥後 50 メッシュに粉細し、イノシトールリン酸を抽出し、これらを Dowex 1×2 (Cl 型) に吸着させ、塩酸の濃度を変えて溶出させ、イノシトールリン酸の形態について調べた。イノシトールリン酸の分画、調製には永井⁽⁵⁾らの方法を参考にした。各発芽種子(乾燥粉末) 50~80g に 0.5N 塩酸溶液 500ml を加え、室温で 4 時間振盪させ、イノシトールリン酸を抽出する。活性炭を少量添加して、セライトを用いて濾過し、10% 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 8.0 に中和後 25% 酢酸バリウムを沈澱が生じなくなるまで加える。生じたバリウム塩は遠心分離によって集め、バリウムイオンがなくなるまで水洗する。風乾後、80℃ で減圧乾燥した。得られた試料 0.6~3g を採り、0.1N 塩酸 500ml に溶解後遠心分離し、上澄液を Dowex 1×2 (Cl 型, 200~400 メッシュ, 20cm×1cm) に吸着させた後、塩素の反応がなくなるまで水洗した。ついで 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0N 塩酸, おおの 250ml で溶出した。流速は 10 分間に 25ml の割合で行なった。各画分より 0.5ml を採り、過塩素酸 0.9ml を加え、60 分間分解して、中村法⁽⁶⁾でリンを定量した。結果は第 2 図のようである。

播種直後、発芽 3 日目の試料は 1N 塩酸溶出画分が得られ、発芽 6 日、9 日目の試料は 1N 塩酸溶出画分が主な成分ではあるが、0.7N 塩酸、0.3N 塩酸溶出画分が僅かながら存在した。次に 1N 塩酸溶出画分の分析を行なった。すなわち、溶出画分は集めて減圧濃縮し、10% 水酸化ナトリウム溶液を用いて、pH 8.0 に調整後 25% 酢酸バリウムを沈澱が生じなくなるまで加え、生じたバリウム塩は遠心分離によって集め、バリウムイオンがな

第 2 図 発芽の各時期におけるイノシトールリン酸の分画定量

播種直後		発芽 3 日目	
試料の全リン	172 mg	試料の全リン	121 mg
溶出されたフィチンリン	170 mg	溶出されたフィチンリン	114 mg
回収率	99%	回収率	94%
発芽 6 日目		発芽 9 日目	
試料の全リン	120 mg	試料の全リン	20.0 mg
溶出されたフィチンリン	84 mg	溶出されたフィチンリン	13.6 mg
無機リン	28 mg	無機リン	4.3 mg
回収率	93%	回収率	90%

くなるまで水洗する。風乾後、80℃ で減圧乾燥する。得られたバリウム塩は 0.1N 塩酸で溶解後塩化第 2 鉄塩を加え、よく攪拌して湯煎鍋上で 15 分間煮沸し、遠心分離する。0.2% 塩酸にて洗浄後水に懸濁し、1N 水酸化ナトリウム溶液を加え、よく攪拌しながら煮沸し、生ずる水酸化鉄を濾過する。よく洗浄し、濾液に等量のエチルアルコールを加え、冷所に放置して結晶を析出させる。得られたイノシトールリン酸のナトリウム塩はエチルアルコールにて脱水後、減圧にて乾燥する。得られた 1N 塩酸溶出画分の結晶 40mg を採って、前報の方法に

よってイノシトールの含量を, 中村法⁶⁾によってリンの含量をそれぞれ定量した。41 μ moles のイノシトール, 251 μ moles のリンの存在を認め, イノシトールとリンの割合はほぼ 1:6 であることを知り, この画分はイノシトールヘキサフスフェートであることを認めた。無機リンは Dowex に吸着されず流失されるが一部 0.1 N 塩酸溶出画分に含まれていることを認めた。

V. 発芽種子内の遊離イノシトール, 全イノシトールの含量の変化

発芽種子内の全イノシトール, 遊離イノシトールの定量を行なった。全イノシトールの定量用の試料の調製は Agranoff⁷⁾ らの方法を参考にした。試料 100 mg に 6 N 塩酸 3 ml を加え, 加圧釜にて 134°C で 10 時間分解した。活性炭処理後吸引濾過する。濾液は濃縮乾固させて脱塩酸を行ない, さらに少量の水に溶解して Amberlite IR-120 (H 型), および IRA-410 (OH 型) (ともに 10 ml) を通過後, 濃縮して 100 ml にして実験試料とした。一方, 遊離イノシトール測定のため Darbre⁸⁾ の方法を参考にして試料を調製した。試料 1 g に 0.04 N 塩酸 10 ml を加え, 2 分間ホモジナイザーにかけた後, 遠心分離して上澄液を得た。この操作を 4 回繰返し, 上澄液を合して濃縮後, Amberlite IR-120 (H 型), および IRA-410 (OH 型) (ともに 10 ml) を通過させて 100 ml とした。これらの試料から 1 ml を採り, これに基礎培地 1 ml を加え, 加圧釜中で 115°C で 10 分間滅菌する。微生物定量法は既報のイノシトール定量法と全く同様に行なった。既報のイノシトールの定量には同じ濃度に稀釈した試料 3 本をとって測定し平均値を求めたが, 本報告では全イノシトールの測定の場合には段階稀釈 (1, 1/2, 1/3) をし, 遊離イノシトールの場合には段階濃縮 (1, 2 倍, 4 倍) をした試料で測定して平均値を求めた。結果は第 2 表のようである。

遊離イノシトールは発芽前には 1 g 中 0.04 mg, 発芽 12 日目 0.55 mg に増加しており, 全イノシトールは

1.88 mg が 1.25 mg に減少していた。また遊離イノシトール/全イノシトールの割合は発芽前 2% が発芽 12 日目では 43.99% に増加した。

考 察

大麦の発芽によるイノシトールの含量の変化については Burkholder²⁾, Darbre⁸⁾ の研究がある。水稻種実の登熟期におけるイノシトールリン酸の含量の変化については浅田ら⁹⁾, 斉尾¹⁰⁾の研究がある。私どもは水稻の発芽期におけるイノシトールリン酸, イノシトールの変化について実験した。水稻種実を暗所で発芽させた際, フィチン態リン (イノシトールヘキサフスフェート) は減少し, それに伴って無機リンは増加した。種実中に含まれているリンの 80% はフィチン態リンであるので, 発芽の際に代謝に用いられる大部分のリンはフィチンから供給されるものと考えられる。この実験では種実を暗所で発芽させているのでリンは無機リンの形で検出されているが, 明所では無機リンは一部が再び有機リンに変わり, 代謝されるものと考えられる。次に発芽時にイノシトールリン酸の形態を調べたのに, 発芽の初期にはイノシトールヘキサフスフェートが検出され, その後, イノシトールヘキサフスフェートと無機リンが検出され, さらに発芽後期には少量の 0.3 N, 0.7 N 塩酸溶出画分が認められたが大部分はイノシトールヘキサフスフェートと無機リンであった。発芽前に 1 g 中の遊離イノシトールの量は 0.04 mg であったが, 発芽 12 日目には 0.55 mg に増加していた。全イノシトールは発芽前は 1.88 mg であったが, 発芽 12 日目は 1.25 mg に減少していた。

結 論

水稻農林 43 号を暗所で約 12 日発芽させた際に, リン酸化合物の含量の変化について実験した。全リン, 酸可溶性リンは各時期においてあまり含量の変化はなかったが, フィチンリンは減少し, それに伴って無機リンは増加していた。

第 2 表 発芽種子に含まれる遊離イノシトール, 全イノシトールの含量の変化

発 芽 日 数		発芽前	発芽後 1 日目	発 芽 3 日目	発 芽 6 日目	発 芽 9 日目	発 芽 12 日目
イノシトールの含量							
乾重 1 g 中の含量 (mg)	遊離イノシトール	0.04	0.17	0.31	0.48	0.54	0.55
	全イノシトール	1.88	1.72	1.75	1.66	1.58	1.25
	$\frac{\text{遊離イノシトール}}{\text{全イノシトール}} \%$	2.01	10.09	17.50	28.99	34.13	43.99
100 粒 中 の 含 量 (mg)	遊離イノシトール	0.10	0.54	0.80	1.13	1.16	0.88
	全イノシトール	5.01	4.54	4.55	3.91	3.39	1.99

発芽に伴う、イノシトールリン酸の形態を調査したのに、発芽前はほとんどイノシトールヘキサリン酸であったが、発芽によって無機リンが現われた。しかしイノシトールリン酸は大部分がイノシトールヘキサリン酸であった。

発芽に伴う、イノシトールの含量の変化については、1 g 中の遊離イノシトールは発芽前には 0.04 mg のものが発芽 12 日目では 0.55 mg に増加していた。全イノシトールは発芽前に 1.88 mg のものが発芽 12 日目では 1.25 mg に減少していた。遊離イノシトール/全イノシトールの割合は発芽前には 2.01% であったものが、発芽 12 日目では 43.99% に増加していた。

-
- (1) 倉沢文夫, 早川利郎, 金内喜昭: 農化, **42**, 587 (1969).
 - (2) P. R. Burkholder: *Science*, **97**, 562 (1943).
 - (3) A. Darbre and F. W. Norris: *Biochem. J.*, **64**, 441 (1956).
 - (4) W. A. Pons, Jr., M. F. Stansbury and C. L. Hoffpauir: *J. A. O. A. C.*, **36**, 492 (1953).
 - (5) Y. Nagai and S. Funahashi: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 794 (1962).
 - (6) 中村道徳: 農化, **24**, 1 (1950).
 - (7) B. W. Agranoff, R. M. Bradley and R. O. Brady: *J. Biol. Chem.*, **223**, 1077 (1958).
 - (8) K. Asada and Z. Kasai: *Plant Cell Physiol.*, **3**, 397 (1962).
 - (9) K. Saio: *ibid.*, **5**, 393 (1964).
-