登熟中におけるイノシトールリン酸の変化 ならびに未熟米よりイノシトールの単離*

倉沢文夫, 早川利郎, 岡本郁夫, 今井正一

(新潟大学農学部生物化学教室)

昭和 44 年 4 月 14 日 受 理

Change of Inositol Phosphate in Rice Seeds during Ripening and Isolation of Inositol from Immature Rice Seeds [Note]

By Humio KURASAWA, Toshiro HAYAKAWA, Ikuo OKAMOTO and Shoichi IMAI
Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University

Changes of inositol phosphate and inositol in rice seeds during the ripening were studied. Total phosphorous, acid soluble phosphorus and phytin phosphorus showed a markedly rapid increase during the ripening, while inorganic phosphorus decreased. Also total inositol showed increase during ripening while free inositol decreased. Inositol phosphate were analyzed by the ion exchange chromatography (Dowex 1×2, Cl-type, 200~400 mesh). The main components of inositol phosphate in immature and ripe rice seeds were also inositol hexaphosphate.

From 1 kg of immature rice bran 533 mg of crystal was isolated by using 80% ethyl alcohol. The *R_f* value of crystal was 0.14 in an ascending solvent system of butanol: pyridine: H₂O=6:4:3. The melting point of this crystal was at 221~223°C. The infra-red spectrum was same with inositol standard. From these results this crystal was identified as inositol. In rice plant, it seems that inositol is synthesized at first and then inositol phosphate is produced from inositol.

(Received April 14, 1969)

糠中にはフィチン (イノシトールリン酸のマグネシウムまたはカルシウム塩) が約 10% 含まれている。一方、玄米中のリン酸の 80% はイノシトールリン酸になっている。水稻の登熟期には無機リン酸が、デンプンの合成の結果生成される。そしてこれらのリン酸はイノシトールリン酸塩となり、不溶性となり、デンプン合成が円滑に行なわれる。このように、イノシトールリン酸の生理的意義とくにイノシトールリン酸の生合成についての研究は重要である。水稻種実中でのイノシトールリン酸の生合成については、まだ不明な点が多い。

水稻のイノシトールリン酸の生合成についての研究には、水稻の登熟期におけるイノシトールおよびイノシトールリン酸の研究が大切である。水稻の登熟中におけるイノシトールリン酸についての研究は浅田ら⁽¹⁾、斎尾⁽²⁾

の研究がある。浅田らは登熟期の前期と後期について、遊離イノシトール、および結合イノシトールすなわちイノシトールリン酸について研究している。斎尾は登熟期の各時期についてイノシトールリン酸と無機リン酸を研究している。

私たちは水稻の登熟期の各時期におけるイノシトールリン酸の変化について研究し、さらに未熟米の糠中に多量の遊離イノシトールの存在を認め、遊離イノシトールの単離に成功したので報告する。

実 験

実験 1. 米粒の登熟中におけるイノシトールリン酸の変化

(1) 試料の調製 昭和 38 年度産米日本海 (新潟県農業試験場阿賀野川試験地にて栽培。出穂期 8 月 13 日~15 日) を用いた。出穂後 8 日目 (8 月 21 日), 13 日目 (8 月 26 日), 18 日目 (8 月 31 日), 25 日目 (9 月

* 水稻種実中におけるミオイノシトールの生合成に関する研究 (第 3 報)

7 日), 34 日目 (9 月 16 日, 収穫期) の各時期に刈り取り, 脱穀後籾を室温 (約 26°C) にて通風乾燥した. 籾のまま粉碎し, 30 メッシュの篩を通して 80°C で減圧乾燥して, 分析試料とした. これらの試料を用いてイノシトール, イノシトールリン酸の定量を行なった. 試料は通風乾燥によって乾燥した. そのためイノシトールリン酸の一部は酵素作用によって分解され, 定量値は実際に分布する量を必ずしも表わさない可能性もあるが, 一応定量値を記載した.

(2) 登熟中の籾に含まれているリン酸化合物の分画定量 全リン, 酸可溶性リン, フィチン態リン, 無機リンを既報⁽³⁾の方法によって分画定量した. 分析結果は第 1 表に示した.

籾が成熟するにつれて, 全リン, 酸可溶性リン, フィチン態リンが増加し, 無機リンは減少することを認めた.

(3) 登熟中における籾中の総イノシトール, および遊離イノシトール 総イノシトール, 遊離イノシトールの定量は既報⁽⁴⁾の方法で行ない, 微生物は *Schizosaccharomyces pombe* を用いた. そして総イノシトールの場合には乾燥粉末籾 1 g を, 遊離イノシトールでは乾燥粉末籾 100 mg を用いた. 結果は第 2 表のようである.

1 g 中の総イノシトールは籾が成熟するに伴って増加

第 1 表 登熟中の籾内のリン酸化合物の分画定量

時 期	項 目	全 リ ン		酸可溶性リン		フィチン態リン		無 機 リ ン	
		mg	μmoles	mg	μmoles	mg	μmoles	mg	μmoles
出穂後 8 日目	乾 重 1 g 中	3.0	96.9	2.4	77.5	2.3	74.3	0.46	14.9
" 13 日目		3.1	100.1	2.5	80.7	2.4	77.5	0.30	9.7
" 18 日目		3.1	100.1	2.5	80.7	2.4	77.5	0.19	6.0
" 25 日目		3.2	103.3	2.6	83.9	2.5	80.7	0.18	5.6
" 34 日目		3.2	103.3	2.6	83.9	2.5	80.7	0.11	3.4
出穂後 8 日目	100 粒 中	2.3	72.6	1.8	58.1	1.7	55.7	0.35	11.2
" 13 日目		4.3	140.1	3.5	113.1	3.4	108.5	0.42	13.6
" 18 日目		4.8	156.2	3.9	125.9	3.7	120.9	0.30	9.4
" 25 日目		6.2	199.4	5.2	161.9	4.8	155.8	0.34	10.3
" 34 日目		7.1	230.3	5.6	187.1	5.6	180.2	0.25	7.6

第 2 表 登熟中の籾内の総イノシトール, 遊離イノシトール

項 目	時 期	出穂後	"	"	"	"
		8 日目	13 日目	18 日目	25 日目	34 日目
乾 重 1 g 中	総	1685	1810	2370	2410	2850
	μg					
	μmoles	9.3	10	13	13	16
	遊離	324	288	264	190	124
100 粒 中	μg					
	μmoles	1.8	1.6	1.45	1.06	0.69
	総	1260	2730	4550	6570	9120
	μg					
	μmoles	7	15	24	35	45
	遊離	240	430	517	520	400
	μg					
	μmoles	1.35	2.42	2.83	2.90	2.20

した. 遊離イノシトールは成熟に伴って減少した.

(4) 登熟の各時期におけるイノシトールリン酸の形態 登熟の各時期に得られたイノシトールリン酸の構造を知るために, イオン交換樹脂によりリン酸塩の吸着溶出を行なった⁽⁵⁾. 粉碎試料 200 g に 0.5 N 塩酸 1.6 l を加え, 4 時間振盪抽出を行ない, 遠心分離後, 上澄液に脱色炭とセライトを加え, よく攪拌後濾過する. 濾液を pH 8.0 に水酸化ナトリウム溶液で中和後, 飽和酢酸バリウム溶液を加えてイノシトールリン酸塩を沈殿させる. 遠心分離後, 沈殿を水洗する. これをエチルアルコール, エーテルにて脱水, 乾燥した. 乾燥物 3 g に 0.1 N 塩酸 500 ml を用いて溶解後濾過し, Dowex 1×2 (200~400 メッシュ, Cl 型樹脂, 25 cm×2 cm) に吸着させ, Cl イオンの反応がなくなるまで水洗し, 後 0.1 N, 0.3 N, 0.5 N, 0.7 N, 1.0 N 塩酸のおおの 250 ml で 10 分間 25 ml の割合で集めた. 結果は第 1 図のようである. 出穂後 8 日目, 13 日目, 18 日目, 25 日目, 34 日目の籾はともにイノシトールヘキサリン酸のみを含んでいた. よって未熟籾も完熟籾もともにイノシトールヘキサリン酸のみを含んでいることを認めた.

実験 2. 未熟籾からイノシトールの単離

実験 1 で明らかなように, 登熟初期の籾中には完熟籾に比較して遊離イノシトールと無機リンを多量に含んでいることが判明した. よって未熟籾からイノシトールの単離を試みた.

(1) 試料の調製 昭

和 40 年度産米 (新潟県立農業試験場) の千秋楽の未熟米および完熟米を用い, 粉碎後 50 メッシュの篩を通し, 乾燥した.

(2) 未熟米, 完熟米から得た抽出物のペー

パークロマトグラフィー 試料 10 g をエーテルにて脱脂後, 遊離イノシトールを 80% エチルアルコールにて 4 回加熱, 抽出を行なった. 抽出液に飽和酢酸鉛溶液を加えて, 不純物を除き, 次に硫化水素を通じて残存する鉛を除いた後, 減圧にて濃縮した. 濃縮液をペーパークロマトグラフィー (PC と略記) にかけた. 展開剤はブタノール: ピリジン: 水=6:4:3,

第 1 図 登熟中の籾から得られたイノシトールリン酸のイオン交換クロマトグラム

Dowex 1×2					
出穂後日数	8日目	13日目	18日目	25日目	34日目
用いられた試料の全リンmg	90	135	93	90	130
溶出されたフィチンリンmg	80	122	88	85	125
無機リンmg	5	0			
回収率%	94	90	94	94	96

呈色剤⁽⁶⁾は濃硝酸：10% 塩化カルシウム溶液：2% 塩化白金酸溶液＝1：1：1 の混液を用いた。濾紙は東洋濾紙 No. 40, 120°C で 20 分間加熱する。

未熟米の場合には $R_f 0.14$ のスポットが現われる。このスポットは橙赤色で、発色後 20 分経過すると消失した。用いた呈色剤はイノシトールに特有の呈色剤であり、 R_f はイノシトールの R_f と同様であった。よってこのスポットはイノシトールであることを認めた。完熟米の場合には未熟米の場合のように、はっきりしたスポットは現われなかった。

(3) 未熟米よりイノシトールの単離 試料を 50% 精白して得られた糠 1 kg をエーテルにて脱脂後、80% エチルアルコールにて 4 回加温抽出を行なった。抽出液

は減圧濃縮してアルコールを除き、これに少量の水を加え、酢酸鉛にて処理後、硫化水素を用いて鉛を除いた。アンパライト IR-120 (H-型, 30 cm×2 cm) およびアンパライト IRA-410 (OH-型, 30 cm×2 cm) とともに 200～400 メッシュのカラムを通過させた後、1 l の水にて洗浄した。通過液と洗液とは減圧にて濃縮して約 20 ml にした。同量の 2 N 硫酸を加えて 1 N 硫酸とし、還流冷却器をつけて 3 時間加熱し、混入している少糖類を単糖類に変化させ、ついで、生成した単糖類を酸化して除去するため 0.3 N 水酸化バリウム溶液を同量加え、100°C で 15 分間加温した。糖酸、無機塩を除去するためアンパライト IR-120 (H-型, 25 cm×2 cm) およびアンパライト IRA-410 (OH-型, 25 cm×2 cm) を通過させた。減圧濃縮して冷蔵庫内に放置した。析出した結晶は、90% エチルアルコールにて再結した。未熟米の糠 1 kg より結晶 533 mg が得られた。針状結晶, mp 221～223°C, ミオイノシトールと混融せるに mp 220.5～221°C で融点の降下はなかった。PC の $R_f 0.14$ 。元素分析：実験値 C 40.26, H 7.05%, 理論値 $C_6H_{12}O_6$ として C 39.69, H 6.06%。赤外吸収スペクトルの結果はイノシトールと全く同様であった。

以上のように未熟米の糠から得られた結晶はイノシトールの結晶であることを認めた。

考察および結論

米のイノシトールリン酸の生合成については今日まだ十分に研究されていない。登熟期のイノシトール、イノシトールリン酸を研究すると、この物質の生合成についての手がかりが得られるものと考えられる。斎尾⁽²⁾は米の登熟期にイノシトールリン酸について研究して、登熟の各時期ともイノシトールヘキサリン酸と無機リンのみ検出した。そしてイノシトールヘキサリン酸は登熟とともに増加し、リン酸は減少することを認めている。浅田ら⁽¹⁾は米の登熟期のイノシトール、イノシトールリン酸について研究し、登熟の前期には多量の遊離イノシトールが存在し、後期にはイノシトールリン酸が急激に増加し、さらにイノシトールリン酸はイノシトールヘキサリン酸であることを認めている。田中ら⁽⁷⁾は米のイノシトールヘキサリン酸はイノシトールまたはイノシトールモノリン酸が化合物 x に結合して、その後合成されることを推定している。

私どもは水稻の登熟中における遊離イノシトール、イノシトールリン酸、無機リン酸の含量について実験し

た。登熟の初期には比較的遊離イノシトール, 無機リン酸が多量存在し, 登熟が進むにつれて遊離イノシトール, 無機リン酸が減少して, イノシトールリン酸が急激に増加することを認めた。イノシトールリン酸は登熟の初期も後期もともにイノシトールヘキサリン酸であることを認めた。次に未熟米の糠の部分の 80% エチルアルコール抽出物より結晶を単離した。そして結晶の R_f 0.14, mp 221~223°C, 元素分析, 赤外吸収スペクトルの結果, イノシトールであることを認めた。

よって水稻のイノシトールリン酸の生合成には最初イノシトールが合成され, これにリン酸が結合して, イノシトールリン酸になるものと考えられる。

- (1) K. Asada and Z. Kasai : *Plant and Cell Physiol.*, **3**, 397 (1962).
- (2) K. Saio : *ibid.*, **5**, 393 (1964).
- (3) 倉沢文夫, 早川利郎, 渡辺証吉 : 農化, **42**, 587 (1968).
- (4) 倉沢文夫, 早川利郎, 金内喜昭 : 農化, **43**, 55 (1969).
- (5) Y. Nagai and S. Funahashi : *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 794 (1962).
- (6) 奥村健吉 : ビタミン, **15**, 329 (1958).
- (7) 田中国介, 渡辺和彦, 葛西善三郎 : 京都大学食糧科学研究所報告, **30**, 61 (1967); 浅田浩二, 田中国介, 葛西善三郎 : 昭和 44 年度日本農芸化学会講演要旨, p. 85.