[農化 第 51 卷, 第 10 号, p.575~581, 1977]

成熟期における落花生種子の脂質, 脂肪酸および トコフェロール組成の変動について*

芝原 章, 福水 誠, 山庄司志朗, 吉田弘美, 梶本五郎
(神戸学院大学栄養学部)

昭和 52 年 3 月 3 日 受 理

Changes in the Compositions of Lipids, Fatty Acids and Tocopherols in Peanut Seeds during Maturation (Studies on the Lipids of Peanuts Part II)

Akira SHIBAHARA, Makoto FUKUMIZU, Shirō YAMASHŌJI,
Hiromi YOSHIDA and Gorō KAJIMOTO
Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University

The compositional and quantitative changes of lipids, fatty acids and tocopherols in peanut seeds from 15 to 80 (mature) days after gynophore earthing were investigated. The rapid increase in the amounts of total lipids in the seeds from 40 to 80 days was caused mainly by the marked formation of triglycerides containing oleic and linoleic acids. The triglycerides and compound lipids contained the common kinds of fatty acids except linolenic acids through the seed maturation, though their fatty acid proportions were different. The major fatty acids in these lipids were palmitic, oleic and linoleic acids, and the total percentage of these acids in them was above 80% after 30 days. In this period, changes in the fatty acid compositions were similar in both the triglycerides and the compound lipids; oleic acid rapidly increased with decreasing proportions of palmitic and linoleic acids. Peanut seed tocopherols were constituted of α -, γ - and δ -homologues, in which α -tocopherol was predominant at the early stage of seed developing and γ -tocopherol at maturity. The amounts of tocopherols increased, having a correlation with the accumulation of unsaturated fatty acids of triglycerides in the seeds from 40 days to maturity.
(Received March 3, 1977)

緒 言

油糧種子成熟中の脂質成分の変化に関する報告は多く、大豆⁽¹⁻³⁾、トウモロコシ^(4,5)、ヒマ^(6,7)、ナタネ^(8,9)等で活発な研究がなされ、最近では、グリセロ脂質系における脂肪酸の、グリセリル基への結合位置を問題とするような、分子種組成の変化がトウモロコシ⁽¹⁰⁾、ヒマ⁽¹¹⁾、ナタネ⁽¹²⁾で報告されている。これらの油糧種子は、すべて地上で結実するが、代表的な油糧種子の1つである落

* 落花生の脂質に関する研究(第2報)、前報は文献⁽¹⁴⁾。

花生 (*Arachis hypogaea* L.) は、種子の成熟が光の存在しない地中で進行するという、興味ある成育過程を持つ植物であり、他の油糧種子とは異なった条件下で、脂質の生合成が行われていると考えられる。しかし落花生種子成熟に伴う脂質成分の変化については、ほとんど研究されておらず、これは同一成熟度の種子を経時的に採集するのが困難なためであると考えられる⁽¹³⁾。著者らは、落花生の子房柄が地中へ侵入する日を基準とすると、子房柄の地中での伸長期間がほぼ一定であるため、比較的成熟度のそろった種子を採集できることを知り、

前報⁽¹⁴⁾では、未成熟種子と完熟種子の脂肪酸組成を比較検討した。

今回、種子成熟に伴う脂質ならびに脂肪酸の組成変化を明らかにするとともに、それらと、脂溶性ビタミンであるトコフェロール (Toc) の組成変化との関連性を調査すべく実験に着手した。Toc の機能は、ビタミン E 作用とともに、脂質の酸化防止作用が広く知られている。しかしながら、成熟過程にある油糧種子中での Toc の生合成と、その機能に関する研究は非常に少なく、Toc は生理作用を持つものか、種子脂質の酸化防止に何らかの役割を果たしているのか、あるいは両者の作用をあわせ持っているのか、その存在意義については、現在のところ不明である。吉田、梶本⁽¹⁵⁾は大豆、トウモロコシ、ヒマで種子成熟中の脂質成分と Toc の組成変化を調査し、それらの関連性を指摘した。本実験は落花生を対象として、各脂質クラスならびにその構成脂肪酸と、Toc との量的関係に着目し、油糧種子中における Toc の存在意義を解明する基礎として行ったものである。

実験方法

1. 試料種子 昭和 49 年度千葉農試産の落花生種子原種「テコナ」を、昭和 50 年 5 月 22 日から本学農場で播種育成した。7 月上旬から開花が始まり、子房柄の伸長と、その地中への侵入が見られ、そして子房が肥大する。本実験では、子房柄の地中侵入日を基準として、完熟にいたるまで経時的に裂開果 (サヤ) を採集した。供試品種「テコナ」では、1 サヤに 2 粒の種子が形成されるが、先豆と基豆の成熟度が未成熟段階で著しく異なる。したがって基豆だけをサヤから分離し、成熟度のそろった種子 30~50 粒を用いて、その重量 (湿重量) と水分量を測定した。以下の実験にはすべて基豆だけを使用した。

2. 脂質の抽出 新鮮種子を磨砕後、これにクロロホルム-メタノール (1:1, v/v) を加えホモジナイズして、常法により脂質を反復抽出後、水洗、脱水して総脂質を得た。

3. 薄層クロマトグラフィーと脂質の定量 クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 溶液とした総脂質の一定量を、常法により作製したシリカゲル G プレート (20×20 cm, 厚さ 0.5 mm) に帯状に着点し、*n*-ヘキサニルエーテル (エーテル)-酢酸 (80:33:1, v/v/v) で展開した。風乾後、まず原点に残ったものを複合脂質

画分 (CL) としてかき取り、次にこのプレートをヨウ素蒸気にとり、標準品の *R_f* 値に一致するトリグリセリド画分 (TG) とジグリセリド画分 (DG) を検出し、クロロホルム-メタノール (1:1, v/v) またはエーテルで、各脂質をシリカゲルから回収した。TG, DG, CL の定量はヒドロキサム酸法により、そのエステル結合を比色定量し、その値からそれぞれの脂質量を算出した。検量線作製の試料はパルミチン酸メチルを使用した。なお本報告でいう CL は、正確にはエステル型複合脂質のことである。

4. ガスクロマトグラフィー ガスクロマトグラフィー用試料の調製およびその分析条件は、前報の方法⁽¹⁴⁾に準じて行った。

5. Toc の定量 総脂質 600~700 mg を精秤し、津郷らの方法⁽¹⁶⁾に準じて、5% (w/v) ピロガロール・エタノール溶液 4 ml を加え、加温下で溶解し、60% (w/v) 水酸化カリウム水溶液 1 ml を加えて、20 分間ケン化した。室温まで放冷後、不ケン化物をエーテルで抽出し、蒸留水で中性になるまで水洗して、無水硫酸ナトリウムで脱水した。次にこれを濃縮して、活性アルミナカラムに負荷し、*n*-ヘキサニル 50 ml、つづいてエーテル 50 ml で溶出した。エーテル画分を分取後、減圧でエーテルを留去して、ベンゼンで定容とした。その一定量をシリカゲル G プレート (10×20 cm, 厚さ 0.25 mm) に着点し、ベンゼン-メタノール (98:2, v/v) を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィーに供した。0.2% (w/v) 2', 7'-ジクロロフルオレセイン・エタノール溶液を噴霧し、紫外光下で Toc 同族体標準品の *R_f* 値と一致するスポットをかき取り、パソフェナントロリン法⁽¹⁶⁾でそれらを比色定量した。以上の操作は褐色のガラス器具を用いるか、または暗室内で行い、常に直射光線をさげながら行った。供試試料には β -Toc が存在しなかったが、これは Kobayashi らの方法⁽¹⁷⁾による二次元薄層クロマトグラフィーで確認した。

実験結果と考察

1. 成熟に伴う種子重量と水分量の変化

子房柄の地中侵入後 15 日目から 80 日目にいたる種子重量と、水分量の変化を Fig. 1 に示す。15 日目 (以下、子房柄の地中侵入後を略しこのように表示する) の種子は、長径がわずかに 6~7 mm であるが、80 日目になると 20 mm 以上にもなり、種子重量は成熟期間中増加

Fig. 1. Changes in Weight of Seed and Water Content during Maturation.

—●— weight of seed, —○— water content.

する一方であった。水分量は、成熟初期に種子重量の80%以上もあり、成熟にしたがって漸次減少するが、完熟時でもなお30%以上を占めていた。80日目を超すと子房柄は枯れ、地中よりのサヤの収穫は不可能となる。そこで本実験は、80日目を超すと見なし、便宜上、39日目までを成熟初期、40～59日目を超すと成熟中期、60～80日目を超すと成熟後期と区分した。

2. 種子脂質の量的変化

種子重量の増加は20日前後から始まるが、種子中の総脂質はこれに約20日間の遅れをもって、40日前後から顕著に急増した。その結果をFig. 2に示す。成熟初期の種子は、主に水分と非脂質成分で構成されるが、完熟時には、種子1粒に約500mgの総脂質が蓄積され、これは種子乾物量の約半分を占めることになる。

種子中における各脂質クラスの量的変化をFig. 3に示す。これによると、TGの増加が40日目から著しい。DGとCLは量的にも少なく、類似の増加傾向を示すが、DGの絶対量は60日目を最高値として、完熟時には減少した。一般油糧種子中のCLは、種子の充実が最も盛んとなる時期に、その絶対量が最大になるといわれており⁽¹⁸⁾、トウモロコシ⁽⁴⁾、ナタネ^(8,9)等で報告されている。しかし落花生ではこういった現象が見られず、これは光の無い状態で種子の成熟が進行するため、光合成系機能脂質が欠損しているか、または存在しても増量が望めないこと等も、その原因の1つではないかと推定され、落花生種子中におけるCL生合成の特徴を表わすも

Fig. 2. Changes in Weight of Total Lipids in Peanut Seeds during Maturation.

Fig. 3. Changes in the Amounts of Major Lipid Groups in Peanut Seeds during Maturation.

—●— triglyceride, —△— compound lipids, —○— diglyceride.

のである。

今回図示は省略したが、各脂質クラスの量的変化を、総脂質に対するモル比率の面で見ると、15日目では総脂質の大部分をCLが占め、以後急減するのに対し、TGはCLの減少に相反して急増する。その後TGは成熟中期にいったん減少して、再び完熟時まで増加した。こ

のような種子成熟中期に見られるモル比率の面で, TG が一時的に減少する傾向は, ナタネでも観察され⁽⁹⁾, 色素成分や, ステリン脂質系の生成によるものと思われる. 総脂質に対する TG の重量を, モル比率および後述する TG 構成脂肪酸の平均分子量より計算すると, 成熟中期以後は, 総脂質重量の過半数を TG が占めていた. したがって Fig. 2 に示した総脂質の増加は TG の増加が主因となるようである. 一方, DG については, 成熟全般を通じてモル比率の変動は認められなかった. DG は, 脂質代謝の中間体として重要であるが, 量的に少なく今回深くは検討しなかった.

3. 種子脂質の脂肪酸組成変化

TG 構成脂肪酸のうち, 主要なものの組成変化を Fig. 4, CL のそれを Fig. 5, また少量および微量脂肪酸の組成変化を Table I に示す. TG の構成脂肪酸は, 30 日目までは 10 種類であるが, 以後 18:3 (脂肪酸, 炭素数:二重結合数) の消失のため 9 種類となる. 一方 CL は, 成熟全期間を通じて 10 種類の脂肪酸で構成されていた. このように, 落花生種子脂質の構成脂肪酸は, 他の油糧種子に比べて多種類であるのが特徴である. しかし主要脂肪酸は, 16:0, 18:1, 18:2 の 3 種類に限られ, 特に 30 日目以後は, この 3 種類の脂肪酸で TG, CL とともに 80% 以上を占められていた. これら組成の変化, ならびに 18:3 の変化については, 一部前報⁽¹⁴⁾で論じた.

Fig. 4. Changes in the Composition of Major Fatty Acids in Peanut Seed Triglycerides during Maturation.

—○— 16:0, —△— 18:1, —●— 18:2,
—▲— 18:3.

Fig. 6 は, TG の主要構成脂肪酸の絶対量を, 種子成熟に伴う変化として表わしたもので, 40 日目前後から 18:1 が急激に増加することがわかる. 種子中における

Fig. 5. Changes in the Composition of Major Fatty Acids in Peanut Seed Compound Lipids during Maturation.

—○— 16:0, —△— 18:1, —●— 18:2,
—▲— 18:3.

Table I. Changes in the Compositions of Minor Fatty Acids in Triglycerides and Compound Lipids from Maturing Peanut Seeds

Lipid class	DAGE ^{a)}	Fatty acids (mole %)					
		14:0	18:0	20:0	20:1	22:0	24:0
Triglyceride	15	tr ^{b)}	1.6	1.3	0.5	2.9	1.9
	20	tr	1.9	1.3	1.6	5.8	2.6
	25	tr	1.9	1.4	1.4	5.4	1.7
	30	tr	2.2	1.6	1.5	5.4	1.5
	35	tr	2.6	1.5	1.2	5.2	1.6
	40	tr	2.4	1.4	1.3	4.6	1.1
	50	tr	2.4	1.9	1.1	3.1	1.5
	60	tr	3.2	1.6	1.0	2.2	1.2
	80	tr	3.0	1.1	1.0	1.8	1.4
Compound lipids	15	tr	1.2	tr	tr	tr	tr
	20	tr	1.2	tr	tr	tr	tr
	25	tr	1.2	tr	tr	0.5	tr
	30	tr	1.5	tr	tr	0.5	tr
	35	tr	1.4	tr	tr	0.8	0.7
	40	tr	1.6	tr	tr	0.8	1.0
	50	tr	1.9	tr	tr	0.4	0.7
	60	tr	2.6	tr	tr	tr	tr
	80	tr	2.3	tr	tr	tr	tr

^{a)}DAGE: days after gynophore earthing, ^{b)}tr: trace.

総脂質の増加は, TG の蓄積が主因となり, 特に 18:1 や 18:2 を取り込んだ TG が, この頃から多数生成されることを示唆するものである。

また, 成熟初期から成熟中期の初めにかけて, CL 中の 18:2 の比率が最も高くなる時期があり, さらにこの時期には, 22:0 と 24:0 という長鎖脂肪酸が一部 CL

に取り込まれて, その比率が高まっている。このことは, TG 合成が活発に作動し始める時期に, 機能脂質である CL 中の各脂質クラスに, 量的ならびに構造的な変化が大きく生じていることを示すもので, 種子脂質の生合成の面から興味深い現象である。

4. 種子中の Toc 組成変化

落花生種子中の Toc は, α -, γ -, δ -Toc の 3 種類で構成されていた。総脂質中における Toc 同族体の比率変化と, 種子中におけるそれらの量的変化を Fig. 7 に示す。Fig. 7 の各定量値は, Toc 標準品 (エーザイ株式会社製) を用いた分離定量で, $93 \pm 2\%$ (5 回平均) の回収率を得ており, この値を加味して算出したものである。 α -Toc は, 成熟初期に総脂質中の Toc の大部分を占め, 以後増減を繰り返すのに対し, γ -Toc は, α -Toc の増減に相反して変化する傾向を示した。一方, δ -Toc の変化は少なく, 総脂質に占める比率は, 成熟期間中はほぼ一定であった。全 Toc は α -, γ -, δ -Toc を合算したもので, 全 Toc の比率変化は, 主に α -Toc と γ -Toc が変化するためである。こういった変化の再現性については, 今後確認するとともに, さらに他の油糧種子についても調査してみるつもりである。つぎに種子中における全 Toc 量の変化を見ると, 40 日目前後から, Toc の種子への蓄積が明らかに多くなっていくのを示している。この時期は, 前述したように, TG の種子への蓄積が始まる時にあたり, 全 Toc 量と TG 量の増加傾向が類似しているようである。

そこで, 種子中における総脂質, TG, CL の各量, そのほか TG 構成脂肪酸のうち不飽和脂肪酸の量と, その二重結合数量に対する全 Toc 量を計算した。その結果を Table II に示す。数値の取り扱いを簡単にするため, 40 日目におけるそれぞれの値を 1.00 とした相対比率もあわせ表示した。総脂質や CL の単位量に対する全 Toc 量は, 種子成熟に伴って高まる傾向があり, CL 量に対しては, 完熟時の値が 60 日目の値の 2 倍以上となっている。完熟時と 60 日目における CL 構成脂肪酸の組成には, さほど変化はなく (Fig. 5), 量的な変化しか生じていない。このような傾向では, 全 Toc 量と総脂質量, および CL 量の間にはさしたる関連性はないようであ

Fig. 6. Changes in the Amounts of Major Fatty Acids in Triglycerides from Maturing Peanut Seeds.

—○— 16:0, —△— 18:1, —●— 18:2.

Fig. 7. Changes of Tocopherol Content in Total Lipids and Seeds during Maturation.

—○— total Toc, —●— α -Toc, —□— γ -Toc, —△— δ -Toc.

Table II. Relationship between the Content of Seed Tocopherols and the Contents of Three Lipid Groups in Seed, and/or the Amounts of Component Unsaturated Fatty Acids and Their Double Bonds in Seed Triglycerides during Maturation

DAGE ^{a)}	T. Toc ^{b)}	T. Toc ^{c)}	T. Toc ^{d)}	T. Toc ^{e)}	T. Toc ^{f)}
	TL	TG	CL	UFA in TG	DB in TG
30	0.13	0.39	2.62	0.18	0.12
35	0.14	0.73	3.99	0.33	0.22
40	0.10	0.59	2.90	0.27	0.18
60	0.16	0.67	11.62	0.28	0.20
80	0.24	0.65	25.38	0.27	0.20
Relative ratio (value at 40 DAGE=1.00)					
30	1.30	0.66	0.90	0.67	0.67
35	1.40	1.24	1.38	1.22	1.22
40	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
60	1.60	1.14	4.01	1.04	1.11
80	2.40	1.10	8.75	1.00	1.11

^{a)}DAGE: days after gynophore earthing, ^{b)}T. Toc/TL: total tocopherols(μ g)/total lipids(mg), ^{c)}T. Toc/TG: total tocopherols (nmole)/triglycerides (μ mole), ^{d)}T. Toc/CL: total tocopherols (nmole)/compound lipids (μ mole), ^{e)}T. Toc/UFA in TG: total tocopherols (nmole)/unsaturated fatty acids in triglycerides (μ mole), ^{f)}T. Toc/DB in TG: total tocopherols (nmole)/double bonds in triglycerides (μ equivalent).

る。しかし TG 量や, TG 中の二重結合数量に対しては, 40 日目以後ほぼ一定となる値が見られ, とりわけ TG 構成脂肪酸のうち不飽和脂肪酸の量に, 全 Toc 量がよく一致する値を示した。種子成熟に伴って当然, 種子中の全 Toc 量が増大し, TG 構成不飽和脂肪酸量も増大するが, この不飽和脂肪酸 1 マイクロモルあたり, 全 Toc 量が 0.27 マイクロモル前後になる関係が, 40 日目以後完熟時まで継続した。このように, 種子に蓄積される TG 中の不飽和脂肪酸量の増加率と, 全 Toc 量の増加率が, 種子成熟中期以後一定に保たれる傾向を示しているが, 成熟初期にはこういった傾向は見られず, また Toc 同族体別, および不飽和脂肪酸の種類別について, Table II に示したような計算をしても一定の相関関係は認められなかった。

以上のように, 本実験で対象とした落花生種子の成熟過程で, 期間を中期以後に限れば, 全 Toc と TG 構成不飽和脂肪酸が, 一定の比例関係を保ちつつ種子に蓄積されていた。このことより, 種子中に存在する Toc の意義は, 発芽時に備えて蓄積される貯蔵脂質としての

TG を保護する作用, 主にその構成不飽和脂肪酸の酸化防止作用にあるのではないかと推定される。今後, 種子中や細胞中における Toc の存在場所, Toc 同族体の組成変化が意味すること等を検討していきたいと考えている。

要 約

成熟期における落花生種子の脂質, 脂肪酸およびトコフェロールの組成変化を調査した。

1. 子房柄の地中侵入後 20 日目前後から種子重量は増加し, これに約 20 日間の遅れをもって種子中の総脂質が急増した。総脂質の増加は, トリグリセリドの種子への蓄積が主因となっており, 特にオレイン酸やリノール酸を取り込んだトリグリセリドの増加が著しかった。

2. トリグリセリドと複合脂質は, 成熟全期間を通じて, 多種類の脂肪酸で構成され, その脂肪酸組成は異なった。しかし子房柄の地中侵入後 30 日目以後は, 両者ともにパルミチン酸, オレイン酸, リノール酸が主要脂肪酸となり, この 3 種類の脂肪酸で 80% 以上を占めた。またこの期間におけるトリグリセリドと複合脂質の脂肪酸組成変化では, パルミチン酸とリノール酸が減少し, オレイン酸が増加するという類似の傾向が見られた。

3. 種子中のトコフェロールは, α -, γ -, δ -トコフェロールの 3 種類で構成され, 成熟初期には α -トコフェロール, 完熟時には γ -トコフェロールが主体であった。成熟中期から完熟時まで, 全トコフェロール量はトリグリセリド中の不飽和脂肪酸量の増加に対応して, 一定の値を保ちつつ増加していた。

終りに, 落花生種子を提供してくださった千葉農試畑作研究室の三輪 晋氏に深く感謝します。本報告の概要は昭和 51 年 4 月, 日本農芸化学会大会 (京都) で講演した。

- (1) O. Hirayama and K. Fujii: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 1 (1965).
- (2) O. S. Privett, K. A. Dougherty, W. L. Erdahl and A. Stolyhwo: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 516 (1973).
- (3) R. F. Wilson and R. W. Rinne: *Plant Physiol.*, **54**, 744 (1974).
- (4) E. J. Weber: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**, 485 (1969); **47**, 340 (1970).
- (5) M. D. Jellum: *ibid.*, **47**, 245 (1970).

- (6) 竹内芳一, 櫛笥隆弘, 野口知雄, 高良 忠, 岩狭
与三郎: 農化, **41**, 276 (1967).
- (7) 竹内芳一, 櫛笥隆弘, 野口知雄, 瀧美 功, 岩狭
与三郎: 農化, **42**, 601 (1968).
- (8) M. E. Mckillican: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **43**, 461
(1966).
- (9) 芝原 章, 野田万次郎: 脂質生化学研究, **15**, 160
(1973).
- (10) E. J. Weber: *Lipids*, **8**, 295 (1973).
- (11) 野田万次郎, 山田幸一: 農化, **45**, 404 (1971).
- (12) 芝原 章, 野田万次郎: 脂質生化学研究, **16**,
227 (1974).
- (13) C. T. Young, M. E. Mason, R. S. Matlock and
G. R. Waller: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 314
(1972).
- (14) 芝原 章, 福水 誠, 山庄司志朗, 吉田弘美, 梶
本五郎: 農化, **51**, 61 (1977).
- (15) 吉田弘美, 梶本五郎: 農化, **46**, 355, 625 (1972).
- (16) 津郷友吉, 山内邦男, 菅野長右門: 農化, **42**,
367 (1968).
- (17) H. Kobayashi, C. Kanno, K. Yamauchi and T.
Tsugo: *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 282
(1975).
- (18) 野田万次郎: 油化学, **20**, 708 (1971).
-