廃棄果実種子滲出物の植物の成長に及ぼす効果

西島啓子**・富田-横谷香織*・津布楽洋和***

小瀬村誠治****・山村庄亮****・山田小須弥*・長谷川宏司*

要 約：木本果実種子（ユズ，カラタチ，ナシ）から滲出される滲出液中に，ケイトウ下胚軸伸長に影響を及ぼす物質が存在する可能性が明らかになった。これら種子滲出液中における生物活性の11種の無機塩の貢献度について調査したところ，生物活性と調査した無機塩組成との間に明らかな相関関係は見い出せなかったが滲出液中の無機物質（群）が成長に対して促進的影響を及ぼしている可能性が示された。ユズ，カラタチおよびナシの中で，特にユズ種子滲出液はその濃度により著しい成長促進活性と発芽抑制活性を示した。この生物活性は，特に促進的活性において，食品工場で廃棄される予定の凍結保存された種子から滲出された滲出液においても見い出された。また，この滲出液中にケイトウ下胚軸伸長を抑制する物質が存在する可能性も示された。この滲出液の濃縮物を灰化すると，それらの生物活

性は低下したことから滲出物が示す生物活性には何らかの有機物が関与している可能性が示唆された。

キーワード：種子分泌液，ユズ (*Citrus junos*)，食品廃棄物，生物活性物質，ヒユ科 (*Amaranthaceae*) exudate from seeds, *Citrus junos*, strained draff in the food industry, bio-active substance, *Amaranthaceae*

緒 言

近年，有限な地球上資源の急速な利用による資源不足から，資源のリサイクルは重要な課題となってきた¹⁾。我々は，これら資源の中で植物由来の生物有機資源に注目した。そして，これらの資源から，簡単な方法で生物活性を有する物質（群）を取り出し，生作物のための生物肥料や生物除草剤等に応用利用が可能かどうかについての基礎的研究を試みた。これまでに，クレス種子において，発芽時に，種子環境中に生物活性を有する物質が多量に放出される機能が見い出され，その原因物質の一つとして，2糖のレピジモイドが単離・同定されている²⁾。そして，この機能が広範囲な植物において見い出されることが報告されている^{3),4)}。また，種子発芽時およびその後の成長過程において，その生育環境中に何らかの成長抑制物質も放出されていることが報告されている⁵⁾。一方ジュースや醸造関係の食品工場では植物の果実を扱うが，その過程において排出される種子は廃棄物として廃棄される。そこでこれら廃棄される種子に注目し，食品工場等で排出される種子からの有用生理活性を有する物質の存在とその応用利用の可能性についての検討を行った。これまでに知られている種子滲出液に見い出される機能は，草本種子においてよく研究されているが，木本種子において同様に機能しているか否かについての詳細については，まだ明らかにされていない。これらを含めた

*筑波大学応用生物化学系

〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

**筑波大学大学院バイオシステム研究科

〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

***カゴメ総合研究所

〒329-2762 栃木県那須郡西那須野町西富山17

****慶應大学理工学部

〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1

Keiko Nishijima**, Kori Tomita-Yokotani*, Hirokazu Tsubura***, Seiji Kosemura****, Shosuke Yamamura****, Kosumi Yamada* and Koji Hasegawa: Effect of the exudate from strained draff, seeds of fruit, on plant growth.

* Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572, Japan.

** Master's Program in Biosystem Studies, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572, Japan

*** Research Institute, KAGOME Co., Ltd., Nishinasuno-Machi, Tochigi, 329-0027, Japan.

**** Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University, Hiyoshi, Yokohama, Kanagawa, 223-0061, Japan.

(2000年3月7日受付，2000年7月21日受理)

調査のために、まず食品工場で排出される可能性を含む3種の本木種子を材料として用い検討を行った。このような、廃棄物のより効率的な利用方法の確立は、新しい生物機能の発見と共に、今後様々な廃棄物の再利用の方向性を示す貴重な結果となると考える。

実験材料および方法

実験材料

ユズ(*Citrus junos*),カラタチ(*Poncirus trifoliata*), ナシ(*Pyrus pyrifolia*)の3種の果実種子を用いた。ユズ種子は中壱酢店(ミツカン)食品工場において排出され、洗浄・保存されていた生きた状態の種子と凍結保存されていた種子を提供していただいた。カラタチ種子は、すべて当年農林水産省果樹試験場から提供していただいた。ナシ種子は同様に当年農林水産省果樹試験場から提供していただいたナシをナイフで切り分け種子を取り出した。

果実種子滲出液の収集

3種の果実種子各々30粒を1%次亜塩素酸ソーダで30分間浸漬し殺菌消毒した後、水道水で30分間洗い、更に蒸留水で数回すすいだ。直径9cmのペトリシャーレに円形に加工したステンレスネットを敷き、消毒した種子を乗せ、20mlの蒸留水を加えて暗黒中25°Cで2日間培養を行った。培養液は一日一度新しい蒸留水と入れ替え、得られた培養液は種子滲出液としてろ紙(ADVANTEC No.1 150mm)でろ過した後、エバポレーターを用いて減圧下35°Cで濃縮・乾固した。これらの種子滲出物は次に行う作業まで-40°Cで冷凍保存した。なお、スケールを上げた場合のユズ種子滲出物の収集については、生きた状態で保存された種子および凍結保存された種子それぞれ200g(約360粒)を用い、1Lビーカーを用いて500mlの蒸留水と共に攪拌しながら暗黒中25°Cで2日間培養を行った。この作業以降については、前述の方法と同様に行った。なお、生きた状態で保存されていた種子から、この方法で滲出液を得た場合のその後の発芽率を調べたところ、発芽率はほぼ100%であった。

無機物分析

高周波誘導結合プラズマ(ICP)発光分光法により

滲出液の灰化物の無機物質を定量した。40粒のユズ、カラタチおよびナシの3種の果実種子を各々消毒した後、円形に加工したステンレス製のネットを敷いたペトリシャーレ(直径90mm)に置き20mlの蒸留水を加え、先の方法と同様にして、各々の種子滲出液を集めた。集めた滲出液を各々直径33mmのろつばに移し風乾した後、完全に灰化するまで、ガスバーナーを用いて強熱した。ろつばを室温にまで冷却し、一定の蒸留水を加えて灰化物を溶かして、濃度を調製し試料液とした。日立ICP発光分析装置P-4000形により、灰化物試料液中の無機物の定量を行った。また、この灰化物は生物活性を調べるために、生物検定を行った。

ユズ種子滲出物における各画分の灰化処理も、同様にろつばに移し灰化処理し、生物検定を行った。

凍結保存された果実種子滲出物の分画

凍結保存されたユズ種子滲出液の濃縮物に少量の蒸留水を加え溶解した後分液ロートに移し、等量の酢酸エチルを加え振り分けた。この操作を3回繰り返し、酢酸エチル層、水層をそれぞれを濃縮・乾固した。各画分については、灰化処理を行い、処理前との生物活性の比較を行った。また、生きた状態の種子および凍結保存された種子それぞれの種子滲出液についても同様に灰化処理を行い、処理前との生物活性の比較を行った。

生物検定

種子滲出液の成長促進活性の調査には、ケイトウ下胚軸伸長試験を指標とした。得られた種子滲出物を、蒸留水で溶解し蒸留水500μl当たりでそれぞれの濃度を調製し、生物検定の試験液として用いた。対照には蒸留水を用いた。ろ紙を敷いた直径33mmのペトリシャーレにそれぞれの濃度に調製された試験液を加え、ケイトウ種子を10粒播種し暗黒下25°Cで4日間培養した後ケイトウ下胚軸の長さを測定した。

結果および考察

1. 木本果実発芽種子滲出液の成長促進効果

ユズ、カラタチおよびナシの種子滲出液について、ケイトウ下胚軸伸長試験を用いて成長促進活性を調べた結果、ユズ種子3粒当たりの滲出液を与えた場合に対照100%に対して225.5%と最も高い成長促進

第 1 図 果実種子滲出物がケイトウ下胚軸伸長に及ぼす効果。(a)はユズ、(b)はカラタチ、(c)はナシの場合を示す。対照の下胚軸の長さを100%とした。バーは標準誤差を示す。

第 1 表 3 種の木本果実種子1000粒当たりの無機物質含量

	Al	B	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	Zn	Ashy ($\mu\text{g}/\text{seed}$)	P50*
$\mu\text{g}/1000\text{seeds}$													
<i>Citrus junos</i>	0.625	0.900	—	—	9.575	1.825	—	7.075	820.375	1.068	—	25.00	110
<i>Poncirus trifoliata</i>	0.542	0.886	—	0.029	41.671	12.600	—	1.900	662.600	1.486	—	38.57	110
<i>Pyrus pyrifolia</i>	0.690	0.350	—	0.180	35.960	8.860	—	3.210	997.730	1.085	—	42.00	110

*P50：対照に対して1.5倍伸長促進を示すのに必要な灰化物の濃度 (ppm)

活性を示した(第1図)。カラタチ種子においても3粒当たり180.4%と高い促進活性を示し、またナシ種子においても、0.1粒で151.0%の成長促進活性を示した(第1図)。これらのことから、不用となる果実種子の滲出液中に、非常に高い成長促進活性を示す物質の存在が示された。一方、特にユズ種子滲出液において、第1図-(a)に示すように、10粒相当の高濃度の場合には発芽が全く認められず、著しい阻害活性を示したことから、種子滲出液中には、成長促進活性を有する物質の他に発芽阻害活性物質も存在すると考えられる。このような成長促進活性および阻害活性を示す原因物質は、種子発芽時におけるアレロパシーに関与している物質である可能性が考えられる。

これまでに、種子滲出液における成長促進活性の研究は、クレス、シロイヌナズナ等草本種子において活発に行われているが、木本種子については、ま

だ確かな報告がない^{4),5),6),7)}。本研究において、ユズ、カラタチおよびナシ種子滲出液がケイトウ下胚軸伸長に対して生物活性を示すことが実験室レベルで認められたことから木本植物においても、種子から伸長成長に関与する何らかの物質がその環境中に放出されていると予測され、この機能が植物広範囲に及んでいることがわかった。

2. 種子滲出液中における無機塩類の効果

種子滲出液中における無機塩類の効果について、ガスバーナーで灰化处理を行うことにより滲出液中から有機物を除き ICP 発光分析により無機元素の含有量の定量を行った(第1表)。調査された3種の滲出物の灰化物は、いずれもケイトウ下胚軸伸長に対して促進活性を示した。しかし、生物活性のレベルと分析した元素群との間には、明らかな相関関係は認められなかった(第1表)。本研究では、実験の都

合上、植物の重要な元素である窒素やリンを同時に分析することができなかったことから、窒素やリン等を分析した上で総合的な考察が必要であろう。しかし、ユズの場合であれば種子滲出物総量は灰化物量の少なくとも100倍以上であることや1粒相当の濃度では、活性に必要な無機物の濃度に至っていないこととなるにもかかわらず、図1-(a)に示すように1粒相当で150%を超える活性を示していることから、種子滲出物における生物活性は無機物類のみで説明することが難しく、無機物の他何らかの有機物が関与している可能性が考えられた。

3. 凍結保存された果実種子滲出物の生物活性

木本植物種子の中で、ユズ種子は食品工場から多量に廃棄される生物有機廃棄物の一つである。種子滲出液中に、ケイトウの伸長成長に関与する物質の存在が明らかになったことから、廃棄果実種子から肥料あるいは除草剤等を創製し、応用利用方法を開発できる可能性が期待できる。果実種子は果肉が除かれた状態で種子が乾燥すると発芽率が喪失するためその保存は大変難しい^{8),9)}。特にカンキツ類の種子

の保存は果実のままで保存が最適である⁸⁾。そのため食品工場からの廃棄物としての種子を生きたままの状態で利用することは困難であると考えられる。しかし、長期間保存可能な凍結種子を利用する方法であれば、十分応用利用の可能性が期待できる。そこで、これまでに調べられた種子滲出液の機能が、すでに発芽機能を喪失している凍結保存された場合の種子においても見出されるのかどうかについて顕著な生物活性を示したユズ種子を用いて調べた(第2図-(a), (b))。その結果第2図-(a), (b)に示されるように300ppmの濃度では、どちらの場合においてもほぼ同様の活性を示したが、1000ppmおよび3000ppmの濃度の場合では、凍結保存された種子から得られた滲出液において、生きた状態での種子よりもむしろ高い促進活性を示すことが明らかになった。ここで、大量に種子を扱った場合には、小スケールで滲出液を取り出した場合と方法に違いがあり、培養時の環境が異なることから、第1図と第2図との活性の比較は難しいが、発芽の段階にある種子の場合には、濃度が高くなると、成長促進活性が低下することがわかった。この時同時に行った、滲出物を灰化

第2図 生きた状態で保存されたユズ種子(a)および凍結保存されたユズ種子(b)それぞれの滲出物がケイトウ下胚軸伸長に及ぼす効果。□は滲出物を、■は滲出物を灰化した場合の結果を示す。灰化物の濃度は灰化処理前の濃度に相当する。対照の下胚軸の長さを100%とした。バーは標準誤差を示す。

して生物活性を調べる実験を行ったところ、生きた状態での種子と凍結保存された場合とで、殆ど同様の結果を得た。即ち、同量の種子から得られる無機物の効果はほぼ同様に促進効果を有していると言える。凍結保存された種子滲出液中には、生きた状態の種子から滲出される抑制活性を有する物質（群）量が少ない可能性が考えられる。しかし、量は少ないと予測されるものの同様に存在する可能性も考えられることから、凍結保存された種子滲出液中における成長抑制活性について酢酸エチルを用いて分画を行って調べたところ、酢酸エチル不溶画分はケイトウ下胚軸伸長試験において促進活性を示したのに対して（第3図-(a)）、酢酸エチル可溶画分では抑制活性が示された（第3図-(b)）。また、酢酸エチル可溶画分における抑制活性は灰化処理を行うことにより消失することが明らかになった（第3図-(b)）。この結果は、種子滲出液中において見出された成長抑制活性の有機物の関与を示唆すると考えられる。一方、酢酸エチル不溶画分において示された促進活性も灰化によりその活性は完全に消失はしないが、低下することがわかった（第3図-(a)）。この結果か

ら成長促進活性には、無機物の関与の他、有機物の関与が示唆される。

本研究結果から、木本発果実種子から滲出される滲出液中に植物成長促進あるいは阻害活性を示す物質が含まれていること、この生物活性は、凍結保存された種子滲出液においても同様の機能を有していることが明らかになった。また、この活性の原因物質は、灰化を行った実験結果で明らかのように、無機塩類と共に、有機物の関与が示された。本研究の生物検定で用いたケイトウは、下胚軸の成長伸長において、外性の環境条件に比較的高い反応性を示すことや、数日で結果を得ることができると等の扱い易さの観点から、これまでアレロケミカルの探索時におけるスクリーニングに汎用されている。ケイトウはヒユ科の植物でこの仲間は熱帯から温帯にかけて世界中に分布していることや、比較的乾燥した地域に多く生息し、耕地雑草になっている種もあることが知られていること等から、今後、食品工場等において廃棄される種子残渣の洗浄液を、作物の園芸液体肥料の他、除草剤等に改良できる可能性も考えられる。現在、大量に廃棄される様々な植物由来

第3図 凍結保存されたユズ種子滲出物の酢酸エチル不溶画分(a)および可溶画分(b)のケイトウ下胚軸伸長に及ぼす効果。□は各画分を、■は各画分を灰化した場合の結果を示す。灰化物の濃度は灰化処理前の濃度に相当する。対照の下胚軸の長さを100%とした。バーは標準誤差を示す。

の残渣からの新たな機能物質の探索と創製およびこれらを利用した農業への発展の可能性を検討中である。

謝 辞：本研究において、果実種子を提供してくださいました農林水産省果実試験場育種部の寿和夫博士ならびに中埜酢店(ミツカン)、また無機塩類の分析でお世話になりました、カゴメ総合研究所分析センターに深く感謝致します。

引用文献

- 1) 喜多村嘉雄・志賀 薫・重永哲男・鈴木勇吉・高山清彦・西田隆重・藤原寿和・平賀義基・行成卓琢巳・柴田徳衛・田尻宗昭 1990. 産業廃棄物の現状について. 公害研究, **19**, 21-31.
- 2) Hasegawa, K., Mizutani, J., Kosemura, S. and Yamamura, S. 1992. Isolation and identification of lepidimoide, a new allelopathic substance from mucilage of germinated cress seeds. Plant Physiol. **100**, 1059-1061.
- 3) Shioya, H., Tsubura, H., Tanaka, H., Yamada, K., Anai, T. and Hasegawa, K. 1995. Contribution of organic and inorganic substance to allelopathic activity in exudate of germinated seeds. Weed Res., Japan, **40**, 14-19.
- 4) Yamada, K., Anai, T., Hasegawa, K. 1995. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. phytochemistry **39**, 1031-1032.
- 5) Yamamoto, T., Yokotani-Tomita, K., Kosemura, S., Yamamura, S., Yamada, K. and Hasegawa, K. 1999. Allelopathic substance exuded from a serious weed, germinating barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* L.), roots. J. Plant Growth Reg., **18**, 65-67.
- 6) Hasegawa, K., Amano, M. and Mizutani, J. 1992a. Allelopathic substances produced from cress seedlings. Weed Res., Japan, **37**, 71-73.
- 7) Hasegawa, K., Amano, M., Urashima, M., Li, H. and Mizutani, J. 1992b. Allelopathy of cress germinated seeds and tomato seedlings. Weed Res., Japan, **37**, 68-71.
- 8) 岩崎藤助 1953. 柑橘栽培法, 朝倉書店, 64-77.
- 9) 岩崎藤助 1966. カンキツ栽培法, 朝倉書店, 193-217.