

「そば」種子における発芽期の生長過程について

飯塚 義富*・村上 哲男**

On the process of the germinating of Buckwheat's seeds.

Yoshitomi IIZUKA, and Tetsuo MURAKAMI

Synopsis

In germinating process of the Buckwheat's seeds, we investigated timely relative variation in quantity of RNA, moisture, and true-protein. After seeding of the Buckwheat's seed on the absorbent cotton with water, we quantitated RNA, moisture, and true-protein, by each methods at each established time, "RNA (phenol method), moisture (moisture meter), and true-protein (Barnstein method)".

In the effects, the quantity of RNA were tendency to general increase and shown minimum values in cases of 8 hrs., 32 hrs..

The quantity of true-protein did not shown variation untill in 8 hrs., and reached maximum value in 16 hrs., after that gradually decreased with to pass time, at last, shown minimum values in 32 hrs.. Next, the variation in quantity of moisture shown emergent increase untill in 4 hrs., after the time increased in gentle.

By the result of experiment, for only moisture we could known that the quantity of moisture varied on the formula of $y=20.003+0.396x$. We found two steps out of timely relative variation in quantity of RNA and true-protein.

I 緒 言

「そば」の起源をしらべると、「そば」は、中央アジアの原産であるといわれ、上代の頃、大陸から日本へ渡来し、各地で栽培されるようになったという。

我国では、既に、奈良、平安の時代に、備荒食糧として相当広く栽培されていたようであり、

* 生物化学研究室 (Lab. of Biochemistry)

** 食品科学研究所 (Research institute for Food Science)

「続日本紀」によれば、天正天皇の養老6年(722年)の夏、雨が降らず大飢饉に見舞われた。その時の7月に「そば」を植えるよう命令が下されたと伝えられている¹⁾

このように「そば」が、山地や荒廃地で、あるいは飢饉の年に備荒食糧として植えさせられたのは、「そば」の生育力が大変強く、また、格差の激しい気候風土にも耐えうる植物であるためである。

普通、「そば」は播種後、75日程度で収穫することが出来る。このように「そば」の生活力は、他の食糧生産を目的として栽培される多くの種子植物には、あまり見ることの出来ない興味ある事実である。

ここで考えられることは、「そば」を含む多くの種子植物が休眠状態から発芽成長を示す場合、まず未発芽の種子が発芽過程に入り、さらに進んで幼芽、幼根の伸長を見る時期となる。この時期には、胚乳中の貯蔵養分がどんどん消費され、やがて種子内の養分をも枯渇してしまう。そして幼苗は全く独立した生育体制に入るが、この一般的な休眠から発芽への現象とは別に、「そば」種子には、特有の内部的発芽過程が見られるのではなからうかと推察するのである。

先に述べた一連の過程における、核酸、蛋白質、水分の役割は、ホルモンなどとともに特に重要なもので、いずれも生命維持に不可欠物質である。それ故に、これらを調べることにより、逆に「そば」種子の発芽、ひいては、休眠現象の解明に一考察が加えられるのではなからうかと考え、著者らは「そば」種子の発芽を通して見られる、RNA量、純蛋白質量、水分量の時間的相互変化に焦点をあわせてみた。

II 実験方法^{2, 3, 4)}

「そば」種子は、綿利製粉 K.K. より提供してもらった、昭和46年度収穫の熊本産のもので、それを水撰、塩水撰処理後、比重1.0~1.33の種子を撰り分け、ドライヤーで乾燥したものを実験に使用した。

RNAの定量

「そば」種子を25g秤量し、水飽和させた脱脂綿上に播き、25°Cに調節した恒温器中で生育させ8時間間隔で48時間にわたりRNA量を測定した。

① 試薬調製

ベントナイト溶液の調製⁵⁾

100gのベントナイト(和光純薬)を1.5ℓの蒸留水に加え、ブレンダーで均一に分散させ15分間静置する。沈下した粗粒がはいらないように注意して、分散液を遠心管に移し、遠心操作(2,500 r.p.m., 15min.)を行ない沈渣を除き、上清部をついで遠心操作(8,500 r.p.m., 15min.)により分離して、上清を捨て、残った沈渣に0.1モルEDTA溶液を600ml加えpH7.0にし、ブレンダーを用いて再分散し、25°Cで48時間攪拌を続ける。

再び遠心操作（2,500 r.p.m., 15 min.）を行ないその上清部から8,500 r.p.m., 20 min. の遠心操作でベントナイト沈渣として回収する。これを 0.01 モル酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.2）に再分散し、同上の低速、高速遠心操作を2回くり返してEDTAを洗い去る。

最終的に得た、沈渣を 0.01 モル酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液に再分散してベントナイト保存液とする。その1 ml をとり、ベントナイトの乾燥重量を測って保存液の濃度を決めておく。

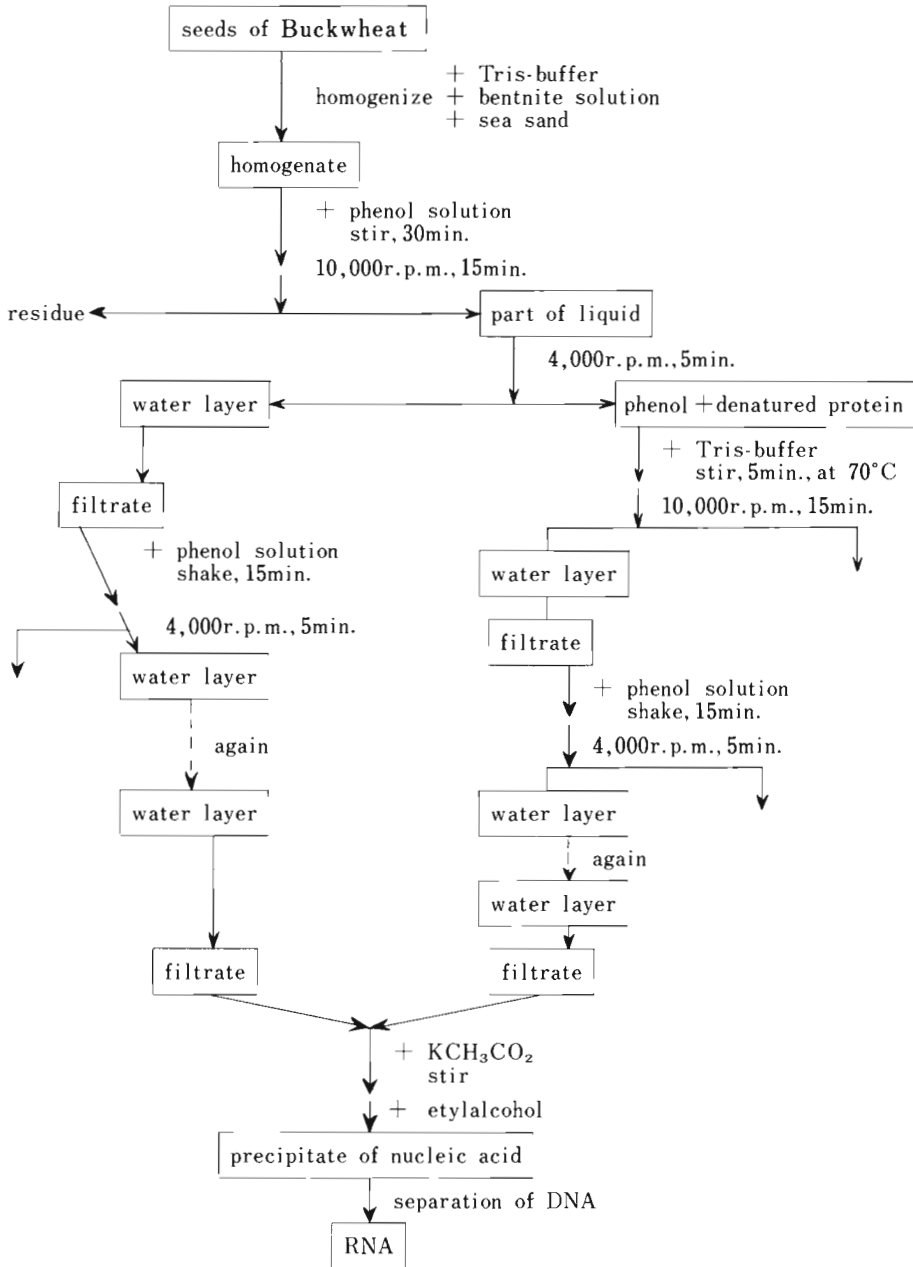


Fig 1

トリス緩衝液飽和フェノール溶液の調製

液体フェノールに対して、約20%程度のトリス緩衝液を加えて、試薬びんの中でよく振とうする。静置後、表面に水層が数mm分離（一昼夜放置）する様な状態にする。

② RNA の抽出

RNA の抽出操作はフェノール法^{6) 7) 8)}に従った。(Fig.1)

「そば」種子を、0.01モルトリス緩衝液（*pH*7.4 米山薬品製）を30ml、ペントナイト溶液10ml、海砂（20~30 mesh）30gと共に乳鉢でよくすりつぶし、ホモジネートを調製する。

調製したホモジネートに、トリス緩衝液飽和フェノール溶液75mlを加えて、30分間ゆるやかに攪拌する。この間にフェノールにより変性した蛋白質は、遠心操作（10,000 r.p.m., 15 min.）により水層とフェノール層に分離した中間に出現する。遠心操作の終了後、残渣以外の液層部分をただちにビーカーに移す。(Fig.2)

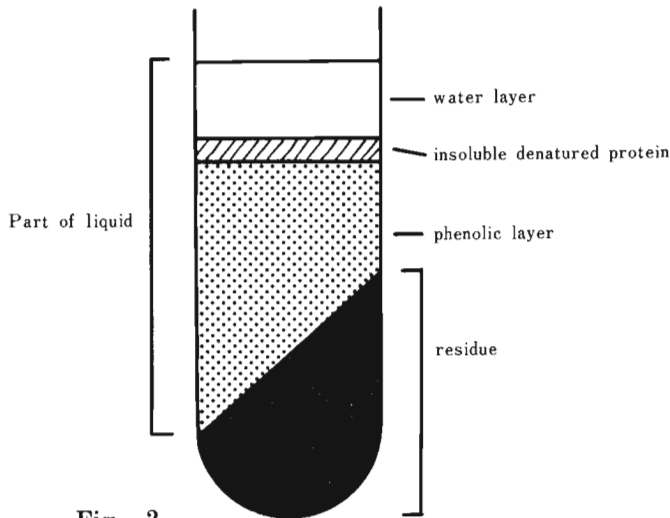


Fig 2

ビーカーの液層部分をガラス遠心管に入れて遠心操作（4,000 r.p.m., 5 min.）により再び、水層、変性蛋白層、フェノール層に分け、遠心管の上部よりピペットで水層部分を得る——(1)。一方、遠心管中に残ったフェノール層および不溶性蛋白質部分は、ビーカーに移し、トリス緩衝液20mlを加えたのち、70°Cの恒温槽中で5分間ゆるやかに攪拌する。これにより、フェノール層および不溶性蛋白質部分に残存していたRNAは、上部の緩衝液（水層）部分に抽出されてくるから遠心操作（10,000 r.p.m., 15 min.）によって、この水層部分を得る——(2)

得られた(1)(2)の水層部分を別々に、濾過（東洋濾紙No.5A）し、その各々の濾液に存在する蛋白質を除く意味で、等容のトリス緩衝液飽和フェノール溶液を加えて、15分間ゆるやかに振とうを行なった後、遠心操作（4,000 r.p.m., 5 min.）により、上部の水層部分を得る。これを濾過（No.5A）し、濾液に等容のトリス緩衝液飽和フェノールを加えて同上の操作で、濾液を得る。(1)

(2)の両液をあわせて1つにする。この汚液（水層部分）に0.15モルの酢酸カリウム溶液となるように、酢酸カリウムを加えて、ガラス棒で、よく攪拌する。続いて2倍容のエチルアルコールを加える。この時、汚液中にカリウム塩として存在していたRNA、DNAの両核酸は、沈澱してくるから（Fig.3）両者の形態上の相異を利用してDNAをガラス棒に巻きつけて除去する。

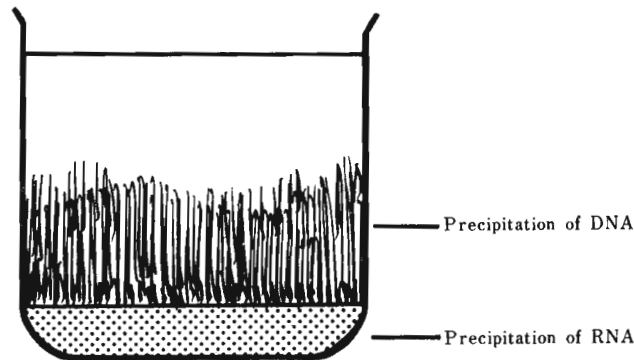


Fig 3

る。

DNAを完全に除去したのちRNAの沈澱しているアルコール溶液をドライアイスの入ったアイスボックス（ -10°C 以下）中で一時間静置する。その後、遠心操作（4,000 r.p.m., 5 min.）によりRNAの沈澱を集め、100 mlのエチルアルコールに分散させた後、アイスボックスで、一夜放置した後、再び遠心操作（4,000 r.p.m., 5 min.）を経てRNAの沈澱を集め、100 mlのエチルアルコールに分散させアイスボックス中で一時間静置する。

それから遠心操作（4,000 r.p.m., 5 min.）により最終的にRNAの沈澱を得る。このRNAの沈澱を40 mlの蒸留水に溶解し、混入しているエタノールを除くためにエバポレーターにより20 mlに迄、濃縮し、これを原液サンプルとする。

③ RNAの定量

核酸は230~240 $m\mu$ に吸収の極小、260 $m\mu$ に極大値をもつという核酸特有の性質を利用してRNAを定量した。

原液サンプルを20:1（蒸留水：サンプル）に希釈し、分光光度計（UV-Vis Spectrophotometer Hitachi Perkin Elmer）により210~360 $m\mu$ の範囲でUVの吸収スペクトルを測定した。また別に純品RNA（和光純薬）により、検量線を求めておき、この検量線から原液サンプルのRNA量を定量した。

純蛋白質の定量（Barnstein法）⁹⁾

「そば」種子、約1.5 gを正確に秤量し、水飽和させた脱脂綿上に播き、 25°C に調節した恒温器中で生育させ8時間間隔で48時間にわたり測定した。

「そば」種子を海砂（20~30 mesh）2 gとともに乳鉢ですりつぶし、蒸留水100 mlを加えて、ビー

カーに洗い流し、10%ミョウバン溶液2mlを加え* 60°Cの湯浴上で10分間加温する。ついで6%硫酸銅溶液25mlを加え5分間攪拌し、次に1.25%水酸化ナトリウム溶液25mlを加えよく攪拌し、水酸化銅を生成せしめると同時にタンパク質を沈澱回収する。

静置すると凝集状の沈澱は徐々に沈降し上澄みと分かれる。上澄みをひだつきにおった沷紙(東洋沷紙No.5A)にあけ、沈澱に水を加えて静置、傾斜法により、硫酸イオンの反応(洗液の一部をとり、一規定の塩化バリウム溶液0.2mlを加える。もし硫酸イオンが存在すれば白色沈澱を生ずる)がなくなる迄、洗浄をくり返し、終了後沈澱を全部、沷紙上に洗い流して、蒸留水で数回洗浄する。沈澱と沷紙は、60~80°Cではぼ乾燥し、沈澱と沷紙を一諸にケルダール分解フラスコに移し、ケルダール法に従い全窒素量を測定する。

窒素量に「そば」の窒素-蛋白質換算係数6.31を乗じて純タンパク質量とする。

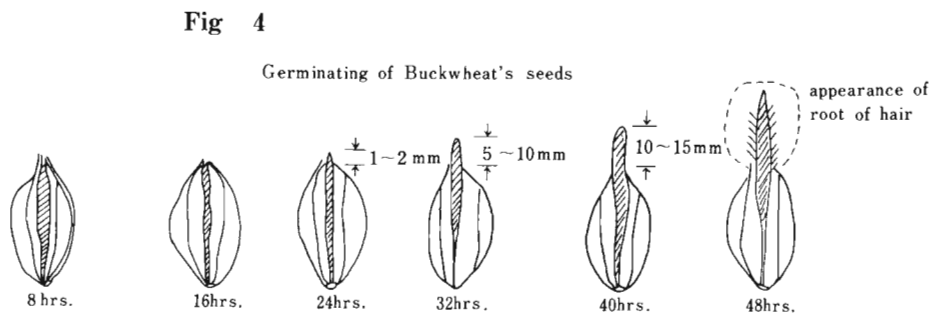
水分量の定量

播種床より各時間帯の「そば」種子5gを秤量し、播種後48時間までは4時間間隔で測定し、それ以後は24時間毎に、72時間、96時間、120時間後の水分を赤外線水分計(日本測定器研究所製)を用いて測定した。

III 結 果

発芽期における「そば」種子の生長過程を48時間にわたって、形態的に観察した。

Fig. 4 には「そば」種子の断面図を示している。



* フィチン態、無機リン酸の形で存在するリン酸をリン酸アルミニウムの形にする。

播種後8時間では、「そば」種子の内部に幾分か水気をおびているようであるが出芽以前の段階である。16時間では出芽直前の段階にまで進行していることがわかる。24時間で幼根が1～2mm伸び32時間～40時間にかけてさらに伸長し、48時間においては、主根に対し側根が出現する。

Fig. 5 は RNA 量の時間的変化を示すが、図の縦軸に「そば」種子 25 g 中（播種時の重量）の RNA 量を mg 単位で示し、横軸は播種後の時間である。

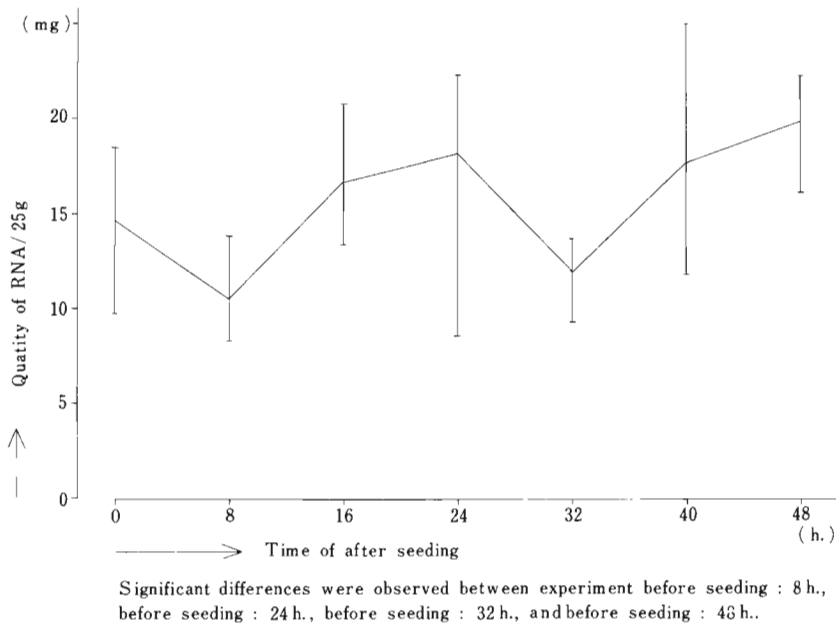


Fig 5 Timely variation for quantity of RNA of Buckwheat's seeds.

図の曲線は、実験結果の平均値であり、その上下に引いた線はバラツキを意味する。

この RNA 量を示す曲線は、全体に右上がりの傾向を示し、播種後8時間、32時間の二箇所で RNA 量の極小値が見られる。

Fig. 6 には、純蛋白質量の変化を示すが、縦軸に純蛋白質量を%で表わしている。

播種後、8時間迄は、純蛋白質量の変化は見られないが以後著しい増加を示し、16時間では極大値を示し、その後急激な減少傾向にあり32時間で、極小値をとった後、40時間迄増加している。

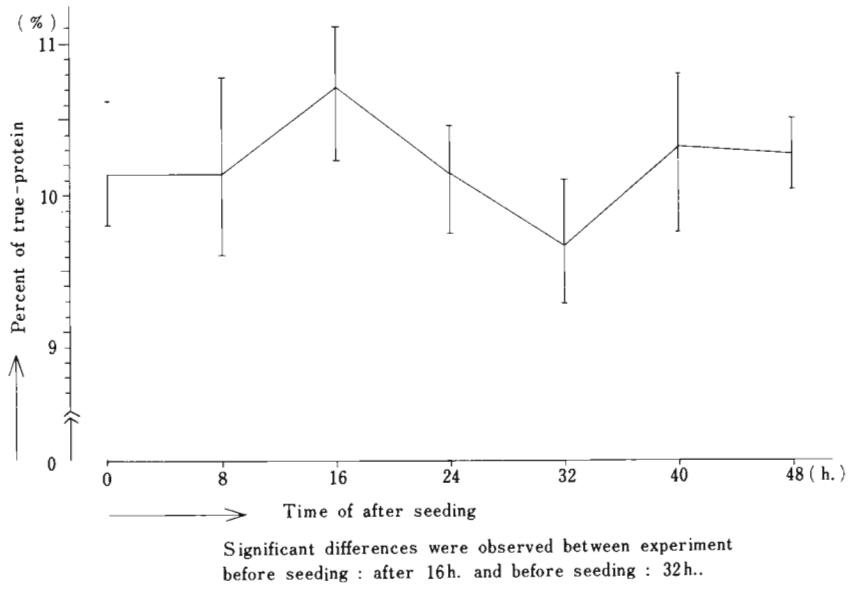


Fig 6 Timely variation for quantity of true-protein of Buckwheat's seeds

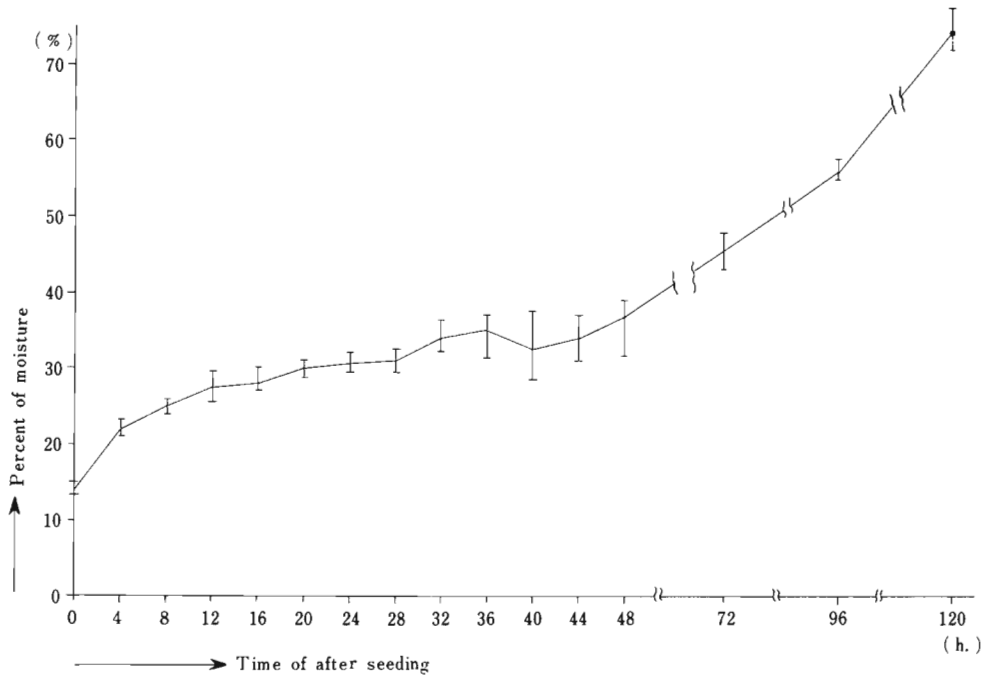


Fig 7 Timely variation for quantity of moisture of Buckwheat's seeds-1

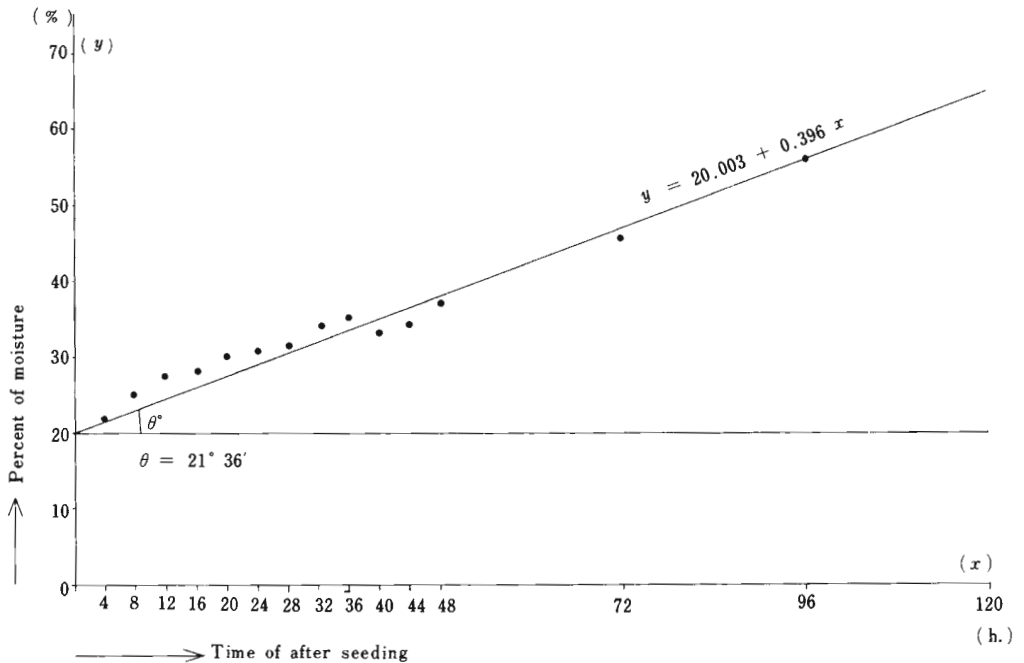


Fig. 8 Timely variation for quantity of moisture of Buckwheat's seeds. - II

播種後の水分量の変化は、Fig.7 であるが、水分量は播種後4時間迄は急激に上昇し、その後48時間迄はゆるやかな上昇を示す。又、水分量の変化を一時函数的に増えるものとして直線式を求めたのがFig. 8 である。

図中、水分率を y 軸にとり、 x 軸には、測定時間を区切ったものである。その結果、4時間後の水分は、 $y = 20.003 + 0.396x$ で上昇することがわかった。

VI 考 察

以上の結果を概略的にみて、わかることは、水分量が一定の割合で上昇しているのに対して、RNA、純蛋白質量は、ほぼ同様の動き^{10) 11)}を示し両者共播種後8時間、32時間目で停滞あるいは、減少を示している。このようにRNAと純蛋白質量が、ほぼ同様の動きを示すことは、^{6, 7)}知られていることであるが、我々は、ここで上記した2つの時間の意味するところを考えさらにこういった2つの stage の存在することを前提として、考察を加えた。

播種後の「そば」種子は、その内部に貯えられた澱粉、脂肪、蛋白質などの貯蔵養分を利用して生長してゆくのであるが、播種後の時間経過に伴って、種子内の含有水分率は一定の割合で上昇するのであり、播種後4時間以内で早くも、始めの14%より20%を越えるに至る。また、中山¹²⁾らの小麦種子の場合をみると、最初の水分12~13%より16~17%に至るまでに呼吸量(排出炭酸ガス量)の著しい増大を示している。

このことからわかる様に、細胞内への水の取り込み量がある量を越えると、呼吸量と共に、細胞内での代謝活性も著しい増大を示すことが考えられる。

実験結果より、「そば」種子の場合、4時間以内で物質代謝が活発化するであろうと考えられる。一方、これとは逆に、呼吸によって消費される基質の減少に伴い、発芽種子の乾燥重量は次第に減少して行くことになり、呼吸の最終段階で生成されるATPは生長点(幼根の伸長点)での物質合成に使われる。この他、貯蔵されている糖質類等もアミノ酸生成への代謝線に乗り移り、生長点では、これらが、ATPにより、エネルギーの供給を受けて蛋白質に合成されて行くのである。

先にも述べたように、一般にRNAは、大体蛋白質と同じような傾向を示し、特に細胞分裂が盛んに行われていると思われる部位に多いことから、幼根の伸長は、発芽種子全体としての乾物量の消費を伴いながらRNAおよび蛋白質量の増大につながるものである。ここで、4時間目以降より活発化しはじめた細胞内代謝を考えながら、冒頭の2つのstageの存在意味を考えてみると、まず8時間目の純蛋白質量の停滞およびRNAの減少は、16~24時間以降の幼根がほぼ出そろった時期の前段階にあたるわけである。次の32時間目の減少は、40~48時間目より著しく見られる主根および側根の生長をひかえての予備段階とも言うべき時期と考えられる。

この両者に共通している、内部的条件(環境)は第1に内部的養分平衡の変化である。すなわち、代謝面での質的变化であろう。第2には、成長をひかえてのエネルギー源蓄積の時期と考えられる。何故ならば、呼吸量の変化を調べていないので、確かではないが、もし、両時期(8,32時間)に呼吸量の著しい増大が見られるならば、貯蔵養分の呼吸基質としての供給の必要性から生長点でのRNAおよび純タンパク質量の増大を、おさえているためであると言えるかもしれない。

播種後16~24時間目のstageおよび40~48時間目のstageにおけるRNA、純蛋白質量の増大現象は、幼根の伸長(原形質量の増大)度から考えて、うなづけるところである。

こういった種子の休眠および発芽現象に対する研究は、今後ますます必要とされるであろう理想的貯蔵条件の設定に一貢献をなすうるものと思われる。

V 要 約

「そば」種子の発芽を通してみられるRNA量、純蛋白質量、水分量の時間的相互変化をしらべた。

実験は、「そば」種子を水飽和させた脱脂線の上に播種したのち、ある定められた時間に各々の方法で（RNA：フェノール法，純蛋白質量：Barnstein法，水分：水分計）で測定した。

RNA量は、全体的に増加の傾向にあり，8時間，32時間にその極小値を有した。

純タンパク質量は，8時間迄は変化しなかったが，以後急上昇して16時間で極大値，32時間には極小値を有していた。

水分量は，4時間迄は急激に上昇するが，以後48時間迄は，ゆるやかな上昇であった。又，4時間目以降の水分は， $y = 20.003 + 0.396x$ で上昇する。

発芽過程において水分量は，ほぼ一定した増加を示す。RNA量，純蛋白質量は，ほぼ同様の動きを示し，播種後，8時間，32時間目で停滞ないしは，減少といった，2つのstageが存在した。

VI 文 献

- (1) 河野友美，食品大辞典，508（1970）
- (2) IAN C. CALDWELL and J. FRANK HENDERSON, *Analytical Biochemistry* 34, (1970)
- (3) Murray P. Deutscher, Pierre Chambon, and Arthur Kornberg, *J. Biol. Chem.*, 243, 5117 (1968)
- (4) C. Kidson, K. S. Kirby, R. K. Ralph : *J. Mol. Biol.*, 7, 312 (1964)
- (5) 蛋白質・核酸・酵素編集部，核酸実験法，（1966）
- (6) 水野重樹，核酸の一般的分離・定量法，（1969）
- (7) 生物化学実験研究会，生物化学実験法，（1970）
- (8) 三浦謹一郎，核酸の化学，12（1966）
- (9) 小原哲二郎・鈴木隆雄・岩尾裕之，食品分析ハンドブック，45（1969）
- (10) 植物生理学会報，Vol.3, 35（1963）
- (11) 和田・佐藤・太田共著，基礎細胞学，82（1969）
- (12) 中山，発芽生理学，86（1968）