

発芽過程におけるマメ科種子貯蔵蛋白質に関する生理生化学的研究 第七報 小豆とささげの発芽過程における貯蔵成分の変化

宇高 京子, 酒井 弥生

(平成21年9月30日受理)

Physiological Biochemical Study of Legumes Storage Protein in Germination Process. Part 7 Changes in Storing Elements of Red bean and Cow pea.

UDAKA, Kyoko and SAKAI, Yayoi

(Received on September 30, 2009)

キーワード：小豆、種子、発芽

Key words : Red bean ,Seed, Germination

1. 緒言

完熟した種子の組織は脱水状態にあり、形態的には未分化で、細胞内生理活性は極めて低い個体である。しかし、食用マメ科種子は穀類蛋白質に比べても蛋白質含量が高く、昔から有用な植物性蛋白質の供給源であり、調理・加工などの食材として多く用いられて来た。また、いったん休眠が解除されると種子内休眠器官の代謝系が活発化し胚が発育できうる状態に置かれる。さらに光、水、温度、ガス、pHなど外的条件に影響されながらも、さらに成長を続け、ついに「幼根が種皮を破る」という形態的な現象を最終過程として、それに先立って起こる一連の細胞内生理生化学的变化を一般に「発芽」という。このような種子休眠および発芽は、細胞内における遺伝的機構に組み込まれた高位の制御によってもたらされた特殊な生理的状态にあると考えられる。従来から宇高らは、大豆貯蔵蛋白質の生合成と分解作用について検討している。^{1)~8)}

前報に続き、小豆とささげの発芽過程における貯蔵成分の変化について検討したので報告する。

2. 実験方法

(1) 試料の調製

小豆とささげ乾燥完熟種子(2007年度北海道産)を用いた。種子を1%洗剤で洗った後、70%エタノール中で30秒、次に5%晒し粉液中に30分浸漬し、殺菌する。これを滅菌水で十分に晒し粉液を洗い流した後、4時間

滅菌水に浸漬し、滅菌ポリ箱中で滅菌水を浸み込ませたガーゼを置き、恒温機(20℃)で発芽さす。発芽1日目、3日目、5日目、7日目、9日目に種子を採取し、皮、子葉、胚軸に分けて凍結乾燥し、その前後の差を水分含量とした。その後、イワタニミルサー(300DG、5分間)で子葉粉末とし以下の実験に供した。

(2) 吸水量の測定

上記(1)のように小豆とささげ乾燥完熟種子を調整し滅菌水に浸し、吸水させる。30分毎に計量し、吸水率を求めた。

(3) 灰分の定量

直接灰化法(550℃)で定量した。

(4) 脂質の定量

ソックスレー抽出法で定量した。

(5) フェノール試薬法による蛋白質の定量

上記(1)の子葉粉末4.0gに0.8M一食塩を含む0.01M-バルビタール緩衝液80mlを加え24時間攪拌抽出した(4℃)。次に日立高速冷却遠心機(SCR-20B)で16000rpmで25分遠心し(4℃)、その上澄液0.1mlと純水0.1mlおよびアルカリ性銅溶液1ml加え、良く混和し、室温で10分放置し、希釈フェノール試薬0.1mlを加え、30分以上経過してから500nmでその吸光度を測定した。

(6) 全窒素量の定量

マクロケルダール法で定量した。

(7) 酸分別沈澱法

上記(1)の子葉粉末50.0gに0.8M一食塩を含む0.01M-バルビタール緩衝液900mlを加え24時間攪拌抽出した(4℃)。次に日立高速冷却遠心機(SCR-20B)で11000rpmで40分遠心し(4℃)、沈澱は沈澱区分とし

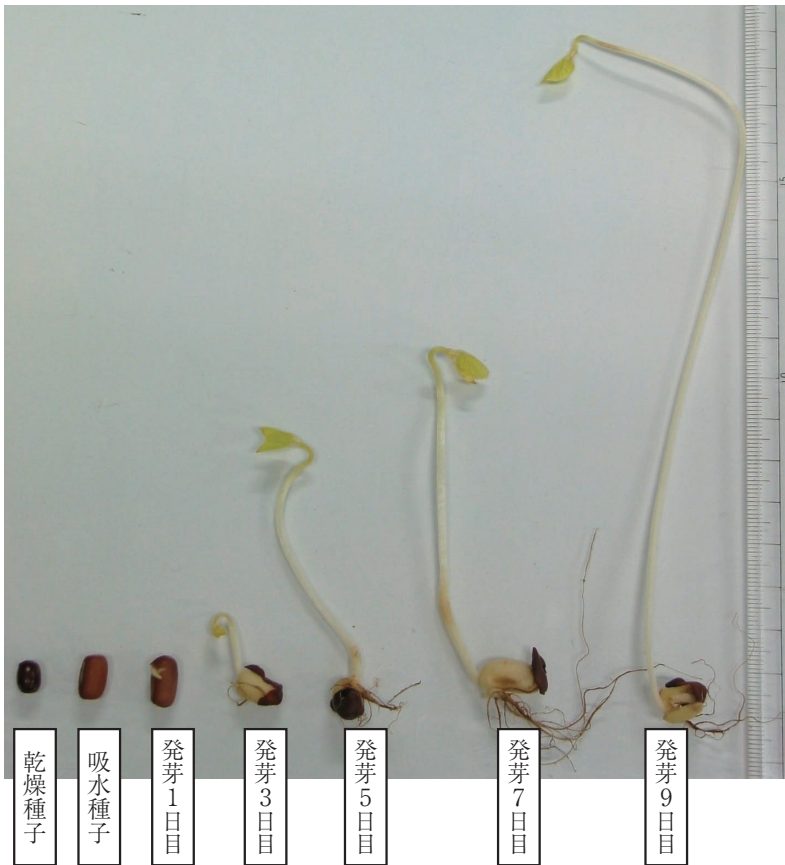


図1 小豆の発芽過程における形態的变化

図1 小豆乾燥完熟種子（発芽0日目）。1%洗剤、70%エタノールで1分間、5%晒し粉液1時間浸漬し、滅菌シャーレー上で滅菌水を浸み込ませたガーゼを敷き、その上に播種、発芽（20℃）さす。



図2 ささげの発芽過程における形態的变化

図2 ささげ乾燥完熟種子（発芽0日目）。1%洗剤、70%エタノールで1分間、5%晒し粉液1時間浸漬し、滅菌シャーレー上で滅菌水を浸み込ませたガーゼを敷き、その上に播種、発芽（20℃）さす。

た。その上澄液を同緩衝液で1日透析し、ホール (WH) とした。以下、0.1N-塩酸でpH7.0, pH6.5, pH6.0, pH5.5, pH5.0, pH4.5, pH4.0, pH3.5 と pH を 0.5 ずつ下げていった。

(8) グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (10~20%)

(8-1) 5%スタッキングゲル溶液 (濃縮ゲル)

30% アクリルアミド-0.8% ビスアクリルアミド 1.7ml と 0.5 M-トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) 2.50ml と 脱気水 6.0ml と 10% 過硫酸アンモニウム 100ul と T E M E D 10ul とを良く混和する。

(8-2) 10%ゲル溶液

30% アクリルアミド-0.8% ビスアクリルアミド 5.4ml と 1.5 M-トリス塩酸緩衝液 (pH8.8) 4.0ml と 脱気水 6.6ml と 10% 過硫酸アンモニウム 100ul と T E M E D 10ul とを良く混和する。

(8-3) 20%ゲル溶液

40% アクリルアミド-1.07% ビスアクリルアミド 8.0ml と 50% グリセリン 2.4ml と 脱気水 1.5ml と 0.1% B P B 溶液 (14.3M) 0.1ml と 1.5 M-トリス塩酸緩衝液 (pH8.8) 4.0ml と 20% S D S 液 80ul と 10% 過硫酸アンモニウム 52ul と T E M E D 10ul とを良く混和する。以上を各々グラジエントに入れ、良く攪拌しながらゲル化し、その上に5%スタッキングゲル溶液を加え固化さす。

3. 実験結果と考察

図1は小豆の発芽過程における形態的变化の観察である。すなわち、発芽3日目では胚軸が伸び始め、発芽5日目では上胚軸は伸び始める、発芽7日目では根毛の発達が著しい。図2はささげの発芽過程における形態的变化の観察である。すなわち、発芽3日目では胚軸は伸び始め、発芽5日目では上胚軸は伸び始める、発芽7日目では根毛の発達がある。図3は小豆とささげの吸水率の比較である。小豆の吸水は浸漬後約4.5時間頃からは始まる。ささげの吸水は浸漬後約0.5時間頃からは始まる。いずれにしても、ささげの方が倍以上吸水は良い。図4は小豆とささげの発芽過程における胚軸の長さの比較である。発芽9日目では両者共に同じ位の胚軸の長さであるが、しかし、ささげの方が成長が良い。図5は発芽過程における小豆とささげ含水量の比較である。図3のようにささげの方が吸水は良いが、含水量は小豆の方が少し良い。図6は発芽過程における小豆とささげの灰分量の比較である。両者共に同じ位で差はない。図7は発芽過程における小豆とささげの脂質含量の比較である。ささげの方が脂質量 (2.1%) が多く、発芽5日目頃 (1.4%) から分解が始まっている。図8は発芽過程における子葉の小豆とささげの蛋白質量の比較である。両者共に発芽3日

目頃から分解が始まっている。図9は発芽過程における小豆とささげの全窒素量の比較である。小豆は発芽5日目では減少し、その後は増加している。ささげは発芽3日目頃減少し、その後増加している。図10~図14までは発芽過程における小豆の酸分別沈澱法により得た蛋白質区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。発芽過程に従って、高分子から低分子へと分解が進み (バンドの移動) 共に pH5.0 に変換点が見られる。従って、例えば、43kDa 当たりを分取する為には、pH7.0 から pH5.0 までを分画すればよい。図15~図19までは発芽過程におけるささげの酸分別沈澱法により得た蛋白質区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。発芽過程に従って、高分子から低分子へと分解が進み (バンドの移動) pH4.5~ pH5.0 に変換点が見られた。

4. 要約

- (1) 小豆とささげの発芽過程における形態的变化の観察である。両者ともに、発芽3日目では胚軸が伸び始め、発芽5日目では上胚軸は伸び始める、発芽7日目からは根毛の発達が著しい。
- (2) 小豆の方がささげより吸水率は低く吸水時間がかかったが、含水量は良い。
- (3) 小豆とささげの発芽過程における胚軸の長さの比較である。ささげの方が発芽初期と中期では成長が良かった。
- (4) 発芽過程における小豆とささげの灰分量の比較であるが、両者共に同じ位で差はない。
- (5) 発芽過程におけるささげの脂質と蛋白質量は減少し、しかし、小豆とささげの全窒素量は増加している。
- (6) 小豆とささげの10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像により、発芽過程に従って、高分子から低分子へと分解が進み (バンドの移動) 共に pH4.5~ pH5.0 に変換点が見られた。

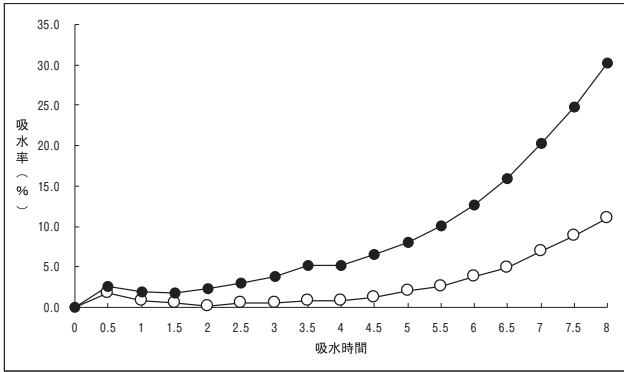


図3 発芽過程における小豆とささげの吸水率の比較
○：小豆、●：ささげ

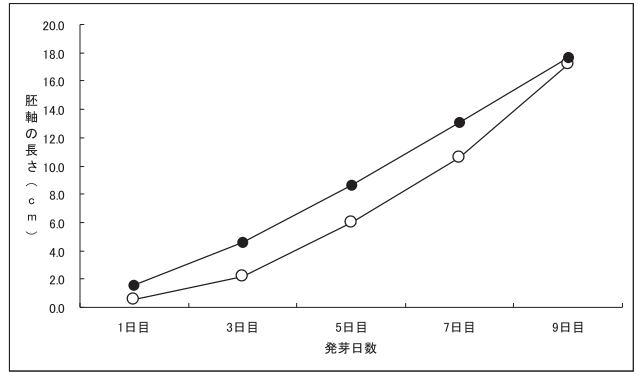


図4 発芽過程における小豆とささげの胚軸の長さの比較
○：小豆、●：ささげ

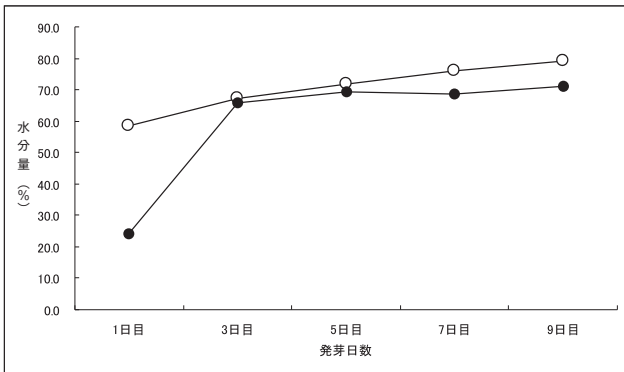


図5 発芽過程における小豆とささげの含水量の比較
○：小豆、●：ささげ

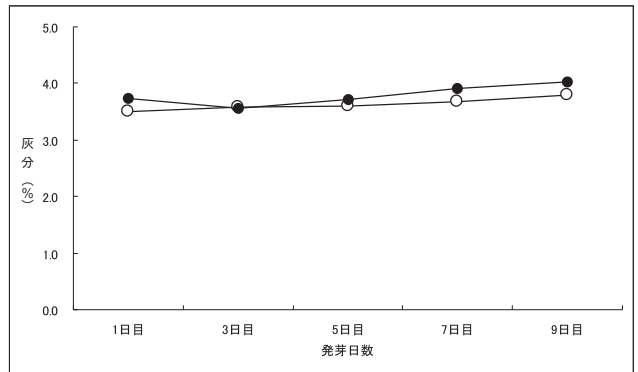


図6 発芽過程における小豆とささげの灰分量の比較
○：小豆、●：ささげ

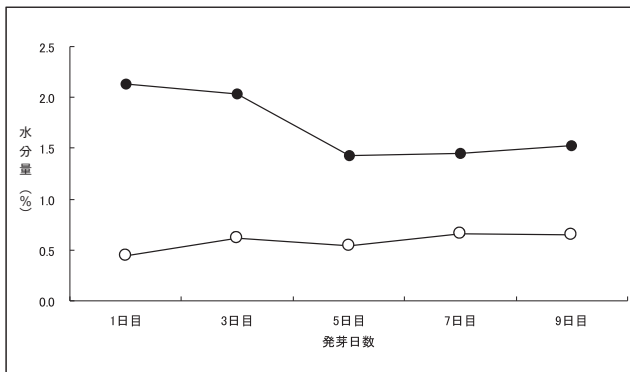


図7 発芽過程における小豆とささげの脂質含量の比較
○：小豆、●：ささげ

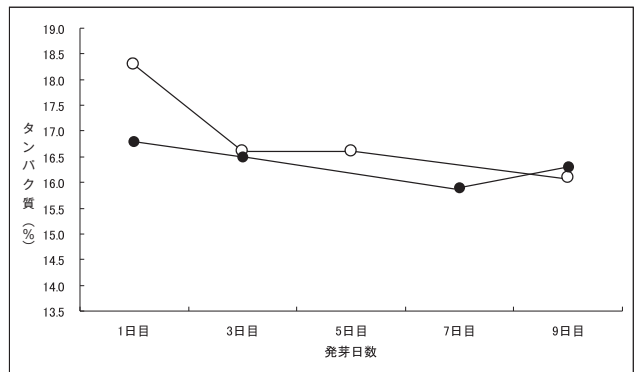


図8 発芽過程における小豆とささげのタンパク質量の比較
○：小豆、●：ささげ

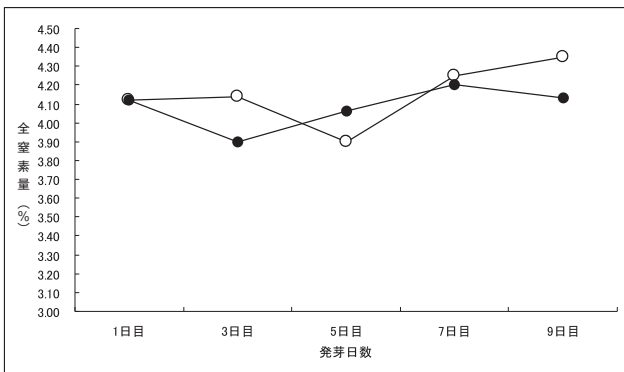


図9 発芽過程における小豆とささげの全窒素量の比較
○：小豆、●：ささげ

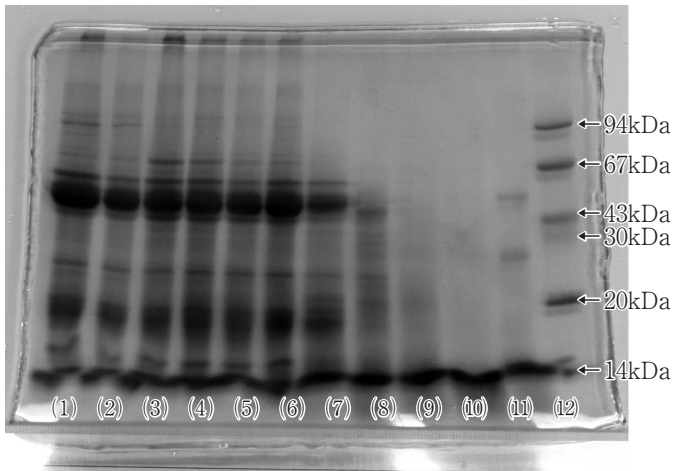


図10 小豆発芽1日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

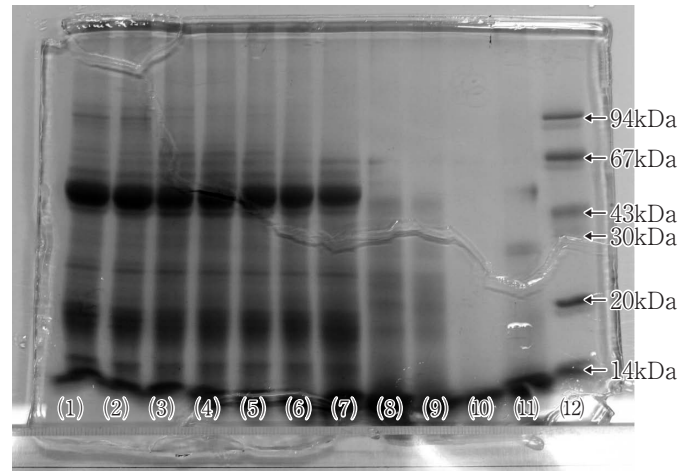


図11 小豆発芽3日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

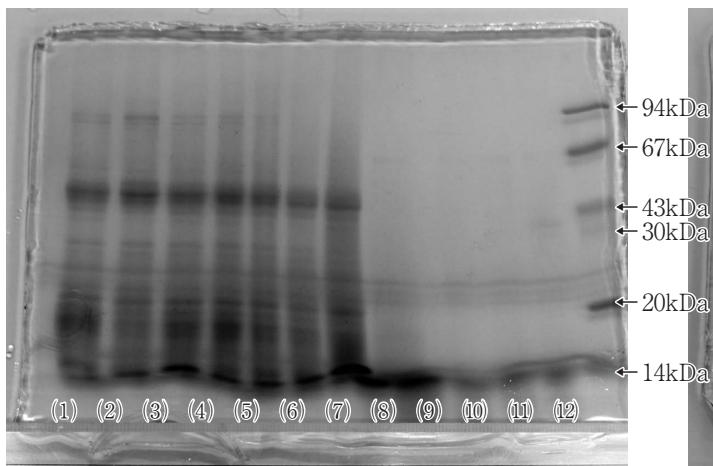


図12 小豆発芽5日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

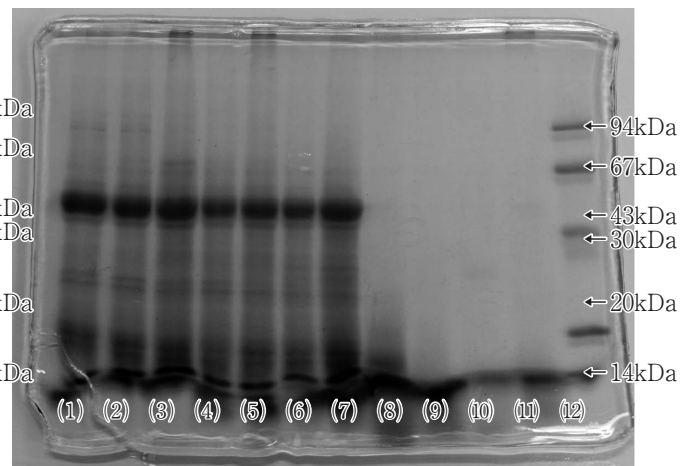


図13 小豆発芽7日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

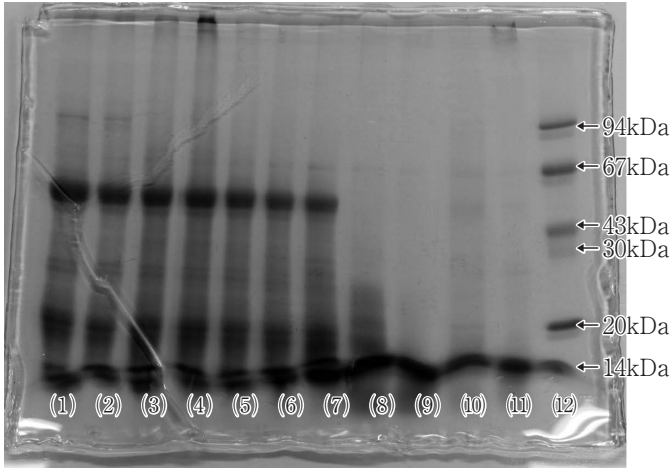


図14 小豆発芽9日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

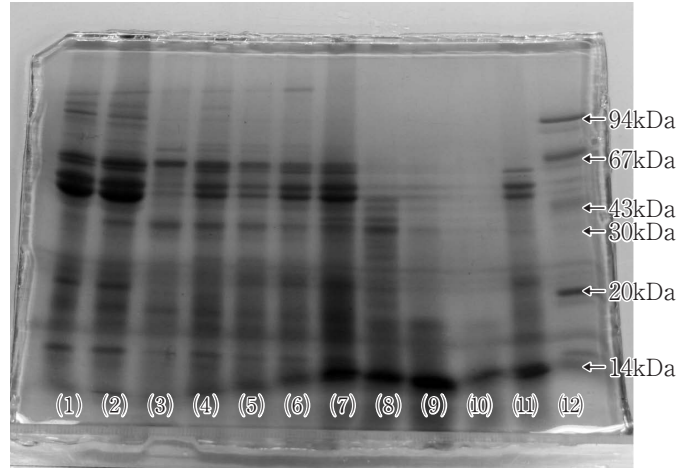


図15 ささげ発芽1日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

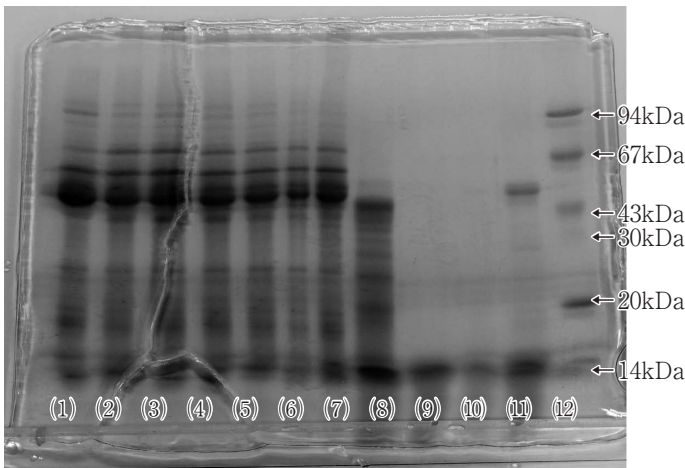


図16 ささげ発芽3日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

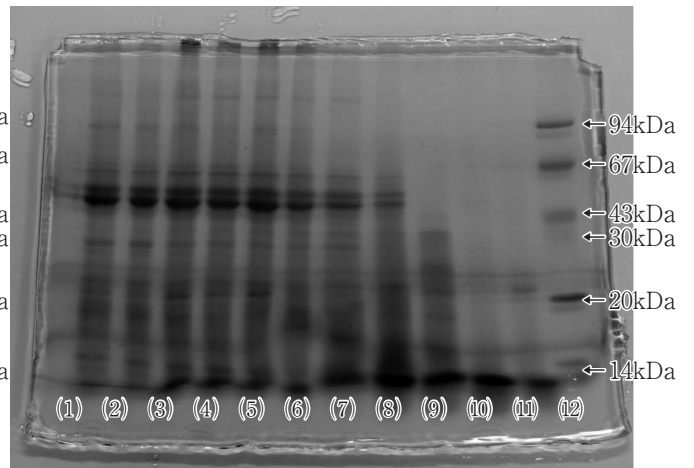


図17 ささげ発芽5日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈殿区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

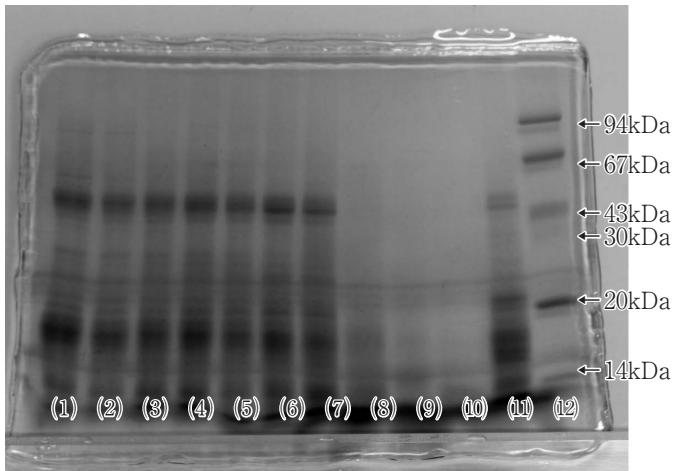


図18 ささげ発芽7日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈澱区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

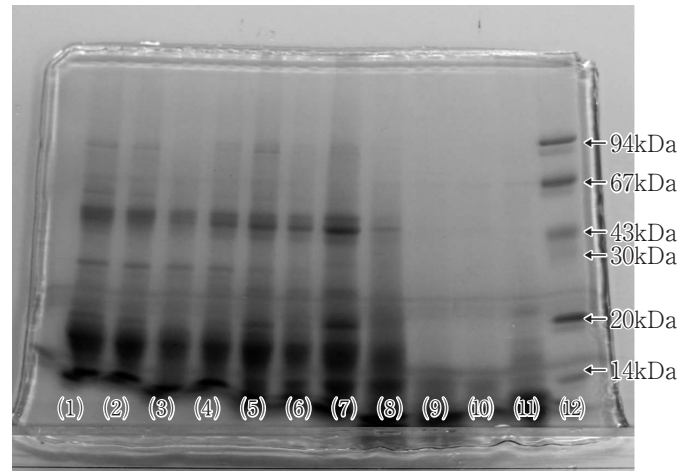


図19 ささげ発芽9日目の酸分別沈澱法より得た蛋白区分の10m~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1)ホール (2)沈澱区分 (3)pH7.0 (4)pH6.5
 (5)pH6.0 (6)pH5.5 (7)pH5.0 (8)pH4.5
 (9)pH4.0 (10)pH3.5 (11)上澄区分
 (12)分子量マーカー

参考文献

- (1) M.Arahira, K.Udaka, et al., Eur. J.Biochem. 267, 2649-2657 (2000)
- (2) 星野かおり、宇高京子：東京家政大学研究紀要、第41集 (2001)
- (3) yVan Hai Nong, K.Udaka, and Chikafusa Fukazawa.J. Biochem. 132, 291-300 (2002)
- (4) 宇高京子、北村陽子、酒井弥生：東京家政大学研究紀要、第42集 (2002)
- (5) 宇高京子、北村陽子、酒井弥生：東京家政大学研究紀要、第43集 (2003)
- (6) 宇高京子、酒井弥生：東京家政大学研究紀要、第44集 (2004)
- (7) 宇高京子、酒井弥生：東京家政大学研究紀要、第45集 (2005)
- (8) 宇高京子、酒井弥生：東京家政大学研究紀要、第49集 (2009)

Abstract

- (1) It is an observation of a morphological change that red bean and cow pea in germination process. Both red bean and cow pea, the embryo axis begins to expand on the third germination day. Next, the above embryo axis begins to expand on the fifth germination day, and then, the development of root hair is remarkable from the seventh germination day.
- (2) The rate of water absorption of the red bean was lower than that of the cow pea and then, time of water absorption of the red bean was long. But the moisture contents of the red bean was more better than that the cow pea.
- (3) The growth of the embryo axis of a cow pea was more better than that the red bean in initial and middle stages of the germination process.
- (4) Neither the red bean nor the cow pea changed into the ash contents in the germinating process.
- (5) In the germination process, a lipids and a proteins of the cow pea were decrease, but a total nitrogen contents of the red bean and the cow pea were increases.
- (6) According to the germination process, a low molecule and decomposition advance from the high molecule (depending on the movement of the band) and both ,the conversion point was observed from pH4.5 by pH5.0 to 10~20% gradient polyacryl-amide gel electrophoretic patterns.