

発芽種子におけるアミラーゼ活性

－実験方法に関する考察－

高桑 純

ムギの発芽種子では、胚においてジベレリンが合成され、このジベレリンの作用によってアミラーゼが生成してデンプンを分解し、成長のためのエネルギーを生み出していることが知られている。この仕組みを確かめる実験を計画し、そのために適した実験材料、サンプル数、処理時間などを検討した。また、温度やホルモン濃度についても、実験結果に大きな影響を与えられ、今後それらの条件についても調べる必要があると考える。

[キーワード] 高等学校理科 ムギ 発芽 ジベレリン アミラーゼ

はじめに

高等学校生物 I における「植物の反応と調節」では、植物ホルモンの作用が取り上げられている。この単元における探究活動は、結果が出るまでに時間がかかることや、素材となる生物の入手が困難であること、さらには明瞭な結果が出にくいなどの理由により実施例が少ない傾向があるように思われる。その中で、ムギの発芽におけるジベレリンの作用を調べる実験^{*1)}は、比較的準備に手間がかからず、操作も簡単であることから、高等学校の生物の授業において導入しやすい教材であると考えられる。ここでは、ムギの発芽におけるジベレリンの作用を確認するために適した方法と、その条件などについて検討したので、その結果を報告する。

A 実験方法

ムギなどの種子に水分を吸収させると、胚においてジベレリンの合成が始まり、合成されたジベレリンが種皮の内側にあるアリュールン層に作用して、アリュールン層からデンプンの分解酵素であるアミラーゼを生成させることが知られている。このアミラーゼは、胚乳中に多量に含まれるデンプンを分解し、発芽のためのエネルギー源となる糖を生成する。発芽していない種子と発芽間もない種子とを切断し、それぞ

れデンプンを含んだ寒天プレートに一昼夜のせた後ヨウ素液をかけると、発芽間もない種子の周辺だけがヨウ素反応を示さないことから、発芽種子にアミラーゼが存在することを確認させる竹入の実験^{*2)}は、非常に手軽で確実に結果が得られる方法である。

ここでは、発芽種子でアミラーゼが作用していることに加え、アミラーゼの生成には胚の存在が必要であることと、アミラーゼの生成にはジベレリンが必要であることを、併せて確認させるために、次のような実験方法を取り上げた。

1 材料

ムギの種子、ペトリ皿、ろ紙、アルミニウムはく、ピンセット、柄付き針、カミソリ（またはナイフ）、ビーカー、ガラス棒、ガスバーナー、三脚、セラミック付き金網、恒温器、粉末寒天、可溶性デンプン、ヨウ素液、ジベレリン

2 方法

- (1) ペトリ皿にろ紙を2枚ほど敷き、ろ紙の表面に水がたまる程度に水をかけ（以下、浸水処理という）、ムギの種子を適量まいて、アルミニウムはくでくるんでから20℃に調節した恒温器に入れておく。
- (2) 300ml程度のビーカーに、水100mlと粉末寒天1g、可溶性デンプン1gを入れ（A）、焦げつかないようにガラス棒でかき混ぜなが

ら加熱する。それとは別に、同様の混合液に 10^{-3} mol/l ジベレリンを 1 ml 加えたもの (B) も用意する。

- (3) 粉末寒天と可溶性デンプンが溶けて液体が透明になったら加熱をやめ、ペトリ皿に約 15 ml ずつ注いでペトリ皿全体に液体を広げ、ふたをしてから室温で冷ます (以下、寒天プレートという)。この量で、ペトリ皿およそ 6 枚ずつの寒天プレートができる。
- (4) 次の日になると、種子は水を吸収してふくらんでいるので、種子を取り出し種皮をむく。種皮をむいた種子では、図 1 のように胚が確認できる。

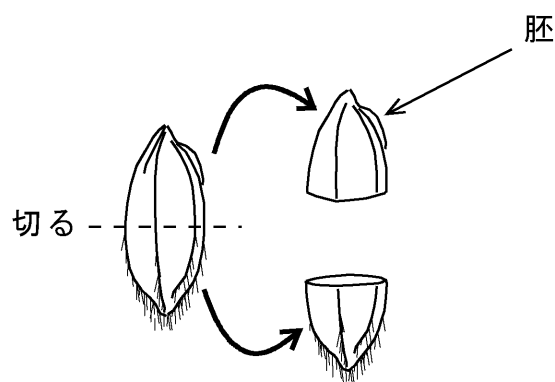


図 1 ムギの種子

- (5) 図 1 のように、カミソリを用いて種子を中央で切断し、胚を含む部分 (+) と胚を含まない部分 (-) とに分ける。
- (6) + の種子を A と B の寒天プレートそれぞれの表面に、切断面を下にしてのせ、アルミニウムはくでくるんでから恒温器に入れておく。- の種子についても、同様に行う。したがって、4 枚の寒天プレートを使用することになる。
- (7) 24 時間後、寒天プレートの表面にヨウ素液をかけ、ヨウ素反応の状態を調べる。

3 結果

- (1) 種子がアミラーゼを生成すると、図 2 のように、種子の周囲にヨウ素反応の起こらない部分 (以下、非反応域) ができるので、A+ では種子の周囲に非反応域ができる。



図 2 種子周辺のヨウ素反応

一方、胚がジベレリンを合成する前に種子を切断していれば、A- では種子の周囲でも反応が起こり、非反応域は観察されない。

- (2) B の寒天プレートを用いた場合には、プレート中にジベレリンが含まれているため、胚の有無 (+, -) に関わらず種子の周囲には非反応域が観察される。

4 参考

- (1) 発芽させるときに、種子の呼吸を妨げないように、種子が水没しないよう注意する。
- (2) 種子を入れたペトリ皿をアルミニウムはくで包んだのは光の影響を排除するためである。
- (3) 粉末寒天と可溶性デンプンを溶かすために、電子レンジで 2 分ほど加熱する方法もある。
- (4) 種皮をむくのは、胚の位置を確認するためである。

B 実験条件の検討

前述のような結果を得るための各種条件について検討した。

1 実験材料

入手しやすいムギの種子として、イヌやネコのための食物繊維補給用の植物種子を用いた。大半がエンバクの種子 (商品によってはオオムギの種子) である。このエンバクの種子を用いて、浸水処理の時間と発芽率との関係を調べた。

その結果を図3に示す。なお、発芽率を調べるに当たっては、胚が種皮の外に出てきたものを発芽したと判断した。

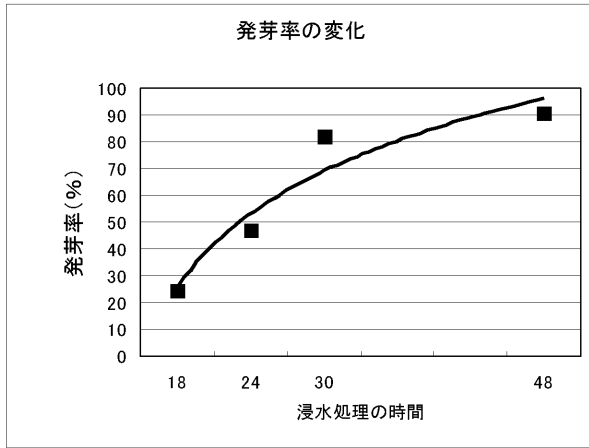


図3 発芽率の変化

グラフからわかるように、使用した種子ではほぼ90%以上の発芽率があった。したがって、発芽率から考えれば、この実験に使用する素材としては問題ないと考える。

2 サンプル数

図3からわかるように、発芽の時期は個体差が大きいため、ジベレリン合成が始まる時期や、アミラーゼの生成が始まる時期にもかなりのばらつきがあると考えられる。したがって、この方法で実験を行う場合、一つの条件あたりの個体数が少ないと、予測される結果が得られない可能性がある。また、データについても、反応の有無だけでは不十分であり、一つの条件あたり10個体以上のサンプルを用意し、反応の程度を数値化して平均値を求め、異なった条件におけるデータを比較することが望ましいと考える。

3 浸水処理の時間

ジベレリン合成が始まる時期や、アミラーゼの生成が始まる時期にもかなりのばらつきがあることはすでに述べたが、種子を浸水処理してから寒天プレート上にのせるまでの時間も、結果に大きく影響する。この時間が長すぎると、合成されたジベレリンが種子全体に広がり、種子全体でアミラーゼが生成され、胚を含む部分

と(+)胚を含まない部分(-)とで同じ結果が出てしまう。逆に短すぎた場合、結果を調べる24時間後にはまだアミラーゼの生成が始まっていない可能性がある。

この実験に適した浸水処理時間を調べるために、20℃で24時間浸水処理した種子を用意し、2枚のプレート(A)上に+と-をそれぞれ20個ずつのせ、30℃の暗黒下に24時間置いた。24時間後ヨウ素液をかけて反応を調べ、プレートごとにヨウ素反応の起こらなかった部分(以下、非反応域という)の数と直径の平均値をもとめた。さらに浸水処理48、72時間の種子についても同じように調べ、浸水処理の時間と非反応域の数との関係を図4のグラフに、浸水処理の時間と非反応域の直径の平均値との関係を図5のグラフに示した。

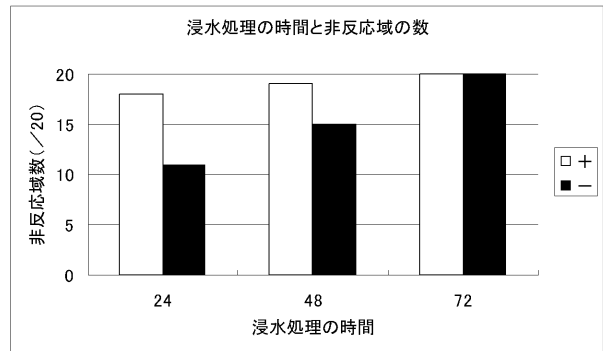


図4 浸水処理の時間と非反応域の数

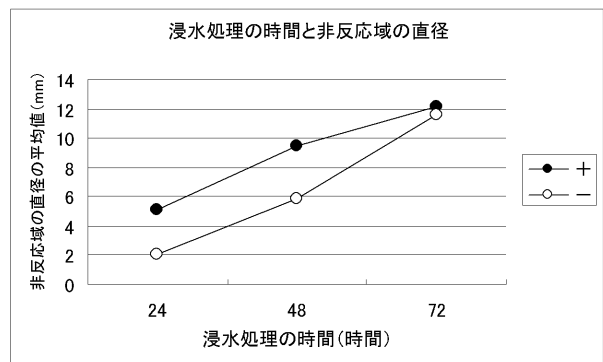


図5 浸水処理の時間と非反応域の直径

グラフからわかるように、浸水処理72時間の種子では+と-でほとんど差が見られない。この実験条件では、72時間後にはすでに種子全体でアミラーゼの生成が始まっていると思われる。

一方、48時間では、非反応域の直径には+と-との間にある程度の差が見られるが、非反応域の数では大きな差は見られなかったため、実際に実験を実施する場合に、観察だけによって明瞭な差を認めることは難しい。24時間後でも、-の種子の半分ほどに非反応域がみられる。しかし、その平均値はごくわずかであり、観察しただけでもその差は明らかである。

したがって、今回比較した条件の中では、浸水処理時間は24時間が最も適していると考えられる。今後、もっと短い処理時間での検討が必要である。

4 その他

この実験では、浸水処理の時の温度は20℃、寒天プレート上に置いてからの温度は30℃の温度設定で行っている。浸水処理の時の温度は浸水処理時間にも影響を与えられ、温度についても今後詳しい検討が必要である。

また、種子をプレートにのせてからヨウ素反応を調べるまでの時間を24時間で統一してあるが、図2からわかるように、非反応域の形成を調べるためには十分であったと考える。48時間後や72時間後でも実験してみたが、長くなるほどプレート上にバクテリアやカビのコロニーが増えてきて、これらの生物によるデンプンの分解が起きている可能性があることから、24時間前後が最も適しているようである。

Bの寒天プレートに含まれたジベレリンの濃度は、最終的に約 10^{-5} mol/l (100mlに 10^{-3} mol/lの溶液を1ml加えた)である。Bプレートを用いた結果は、十分なデータが得られなかったため、今回の報告には含めなかったが、Bプレートで-の種子を用いた場合、非反応域が非常に少なかった。今回使用したジベレリン濃度が適切でなかったか、あるいは素材の種子におけるアミラーゼの生成量が種子の部位によってばらつきがあるのではないかと考える。この条件についても今後検討の余地がある。

今回用いたジベレリンは、関東化学の製品と武田製薬から発売されているジベラ錠とを用い

た。一般にジベレリンは高価であり、学校現場では入手しにくい。武田製薬から農作物用の成長促進剤として発売されているジベラ錠は、価格的にも入手しやすく、同様の効果が得られることがわかった。

すでに述べたように、種子はエンバクを用いたが、オオムギでも同様の実験は可能であった。種子の大きさではオオムギの方が使いやすいが、今回使用してみたオオムギでは、種皮を取り除くのが難しいという問題点があった。

C 授業への導入について

実験自体は、種子の発芽のための処理とプレートの作成が1時間、結果の観察とデータ処理に1時間で、2単位時間あれば実施できる。しかし、事前の説明や仮説の設定を考えると、3時間かけるのが望ましい。

また、生物Iにおける植物ホルモンののはたらきは以前の生物IBに比べ精選されており、種子発芽のしくみも、ほとんどの教科書で取り上げられなくなっている。したがって、この実験を生物Iにおける探究活動の素材として紹介しているが、実施に2~3日かかることから、場合によっては生物IIの課題研究において実施することも考えられる。その場合、今回の報告に示しているような各種条件の検討もあわせて行うと、幅広い発展性が期待できる。

参考文献

- 1) 竹入隆弘 アミラーゼの実験 —リービッヒ・パスツール論争を考える— 生物研究 38巻1号 pp23-28 1999
- 2) 竹入隆弘 生物IBの探求活動としてのアミラーゼ発見の実験 遺伝 55巻3号 pp58-61 2001

(たかくわ まこと 生物研究室長)