



Title	トドマツ球果の受精期および結実期における化学成分の変遷
Author(s)	片寄, 譚
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 36(3), 633-662
Issue Date	1979-11
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/21019">http://hdl.handle.net/2115/21019</a>
Type	bulletin (article)
File Information	36(3)_P633-662.pdf



[Instructions for use](#)

# トドマツ球果の受精期および結実期に おける化学成分の変遷

片 寄 譚\*

Seasonal Changes in Chemical Components of *Abies  
sachalinensis* Cones During the Periods of  
Fertilization and Maturity

By

Takashi KATAYOSE\*

## 目 次

序 .....	634
I. 緒 論 .....	635
I-1 トドマツ球果について .....	635
I-2 球果に関する従来の研究 .....	635
II. 実 験 .....	639
II-1 実験材料の採取 .....	639
II-2 球果の生重量および含水量の測定 .....	640
II-3 各溶媒による抽出量の測定 .....	640
II-3-1 メタノール抽出量 .....	640
II-3-2 アルコール-ベンゼン抽出量 .....	640
II-3-3 温水抽出量 .....	641
II-4 クロマトグラフィー .....	641
II-5 アントシアニンの定量 .....	641
II-6 アミノ酸の分析 .....	641
II-7 各抽出成分の分離 .....	641
II-7-1 アントシアニン .....	641
II-7-2 d-(+)-カテキン .....	642
II-7-3 セロチン酸 .....	642
II-7-4 アビエチン酸 .....	642
II-7-5 $\beta$ -シトステロール .....	643
II-7-6 $\beta$ -シトステロールグルコシド .....	643

1979年1月31日受理

\* 北海道大学農学部林産学科林産製造学教室

Laboratory of Chemical Technology of Forest Products. Dept. of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

III. 結果および考察 .....	643
III-1 球果の生重量, 含水量および各溶媒による抽出量の時期的変遷 .....	643
III-2 クロマトグラム .....	645
III-3 アントシアニンの時期的変遷 .....	646
III-4 アスパラギンおよびグルタミンの定性 .....	648
III-5 アミノ酸の変遷 .....	648
III-6 各抽出成分の同定 .....	651
III-6-1 アントシアニン .....	651
III-6-2 d-(+)-カテキン .....	654
III-6-3 セロチン酸 .....	655
III-6-4 アビエチン酸 .....	655
III-6-5 $\beta$ -シトステロール .....	656
III-6-6 $\beta$ -シトステロールグルコシド .....	656
III-7 総合考察 .....	656
VI. 結 論 .....	658
参考文献 .....	659
Summary .....	661

## 序

林木育種事業において、優良種子の生産は大きな位置を占める問題である。花芽の分化から種子生産にいたる、着花、結実の習性に関しては、形態学的な研究が中心に進められており、とくに、種子形成にいたるまでの幼球果生育の変遷は外部形態の観察として多くの研究が認められる<sup>1),2),3),4),5),6),7),8)</sup>。

しかしながら、幼球果に対する化学的研究は材料採取の困難さや、利用価値等の関係からきわめて少ない。

さらに、開花、受粉、受精ならびに結実といった種子形成上の重要な生理的諸現象に対する生化学的な研究は、その現象の正確な把握の困難さが大きな障害ともなっている<sup>9),10),11)</sup>。

しかし、形態学、生態学と化学成分の関連性は興味深い問題であり、科学研究における境界領域の問題として、大いに興味をもたれる。

本論文は北海道の代表的な樹種である、トドマツの幼球果の生重量, 含水量, 溶媒による抽出量, アントシアニン, とくに, シアニジン, デルフィニジンおよびペチュニジン各配糖体, アミノ酸, とくに, アマイド化合物, アスパラギン酸, セリン, グルタミン酸, アラニンの種子形成の重要時期(受精, 結実期)における変遷状態を追求し, さらに, セロチン酸, アビエチン酸,  $\beta$ -シトステロールとその配糖体, 3種のアントシアニンおよびd-(+)-カテキンの物質の確認をおこない, 球果の成熟過程における結実の習性を化学的成分の立場から追求することを主目的にし優良種子生産のための基礎的知見を得ることをと目的とした。

本研究を実施するにあたり, 研究題目の選定には, 北海道大学農学部半沢道郎名誉教授な

らびに農林水産省林業試験場北海道支場松浦堯氏に、また、御指導をうけた、農学部木材化学講座榊原彰教授、笹谷宣志助教授、林産製造学講座里中聖一助教授、三浦清助手、安田征一助手(現名古屋大学助教授)、また、標品をいただき、適切な御助言をいただいた農産物利用学講座坂村貞雄教授さらに耐凍性試験をお願いした造林学講座武藤憲由教授をはじめ、学科内大学院生の方々に厚く御礼申し上げる。

また、実験材料の授取にあたっては、札幌営林局の方々ならびに造林学講座木俣聡彦氏に深く深謝する。

なお、本稿は「北海道大学審査学位論文」である。

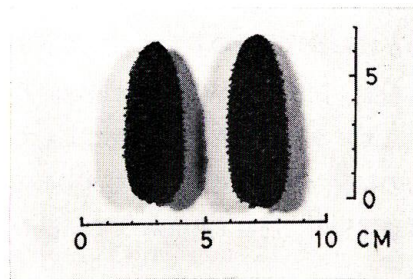
## I. 緒 論

### I-1 トドマツ球果について<sup>7),8),13),14),15)</sup>

トドマツ球果は円柱形で無梗にちかく、先端は円形または鈍形を示し、その長さは5.0 cmから8.5 cm、直径は2.0 cmから2.5 cmで一般に背反した苞鱗を超出する。また、その種鱗は有梗で腎臓状をした両凸面鏡形で、その上縁はわん曲し、外部の全面には褐色の細かい軟毛を生じ、苞鱗は種鱗より短かいかあるいはわずかに長く先端は真直かいくぶん背反する。

アオトドマツはほとんどアカトドマツと変りないが、苞鱗は種鱗より長く、このことが両者の識別点とされている。

下の写真にトドマツ球果を示す。



### I-2 球果に関する従来の研究

球果に関する研究は生態学的な研究が多くなされており、化学成分に関する報告は非常に少ない。

第一に生態学的な研究について概略を記すと、結実にいたる初期的な変化は花芽の分化にはじまる。春期に開花する樹木では、その前年に花芽および葉芽の形態の相違が生じた時にはじまる。主な針葉樹において花芽の分化<sup>19)</sup>はだいたい Table 1 に示すとおりである。

トドマツにおいては7月上旬より下旬にかけて花芽および葉芽の分化がはじまる。しかし、分化初期は両者の識別が肉眼的には困難であるが、8月、9月と生長するにつれて、肉眼的な識別が可能になる。この年の生長は緩慢で、秋10月に葉芽は卵状球形で直径4 mmから4.5 mm、

Table 1. Seasons of flower bud formation of conifers in Japan

	Seasons of flower bud formation	
	♀	♂
<i>A. sachalinensis</i>	early July~late July	early July~late July
<i>L. leptolepis</i>	early July~late July	early July~late July
<i>P. jezoensis</i>	mid-July~mid-Aug.	mid-July~mid-Aug.
<i>P. densiflora</i>	mid-Aug.	mid-July~late July
<i>P. thunbergii</i>	late Aug.	late July~early Aug.
<i>C. japonica</i>	mid-July~mid-Sep.	late June~late Sep.
<i>C. obtusa</i>	late July~mid-Sep.	early July~mid-Sep.

長さ 5.5 mm から 6.5 mm であり、雌花芽は長楕円状球形で直径 4.0 mm から 5.0 mm、長さ 6.0 mm から 7.0 mm となり葉芽よりも大型である。これらの大きさと休眠期を迎え、その表面は多量の樹脂によって被われ越冬する。

結実年の春に再び生長を開始し、直径および長さも急激に大きくなり、5月中旬から下旬にかけて開花する<sup>17),18),19),20)</sup>。

そして、同時期に雄花の花粉の飛散が認められる。開花期と同時に受粉期が約一週間続き、その後、6月上旬に受精期を迎える。

6月中旬における球果の生長は、長さおよび直径はもとより、堅牢さを加えてきて、7月中旬になると、外部形態においてはほとんど成熟球果と変らないぐらいにまで発達する。

7月以降になると、球果の生長は緩慢となり、9月の成熟期に入る。トドマツの球果は、完熟すると枝には球果軸のみを残して落下する。

さらに、開花および受精期は産地的に差異をもち、気象条件とくに、気温および日照により異なり、また、生育立地条件によっても差が認められる。札幌地方においては5月中旬から下旬の温暖な日に開花<sup>2),17),18)</sup>をはじめ。しかし、道有林のトドマツの調査によれば<sup>19),20)</sup>、旭川林務署管内で海拔高の差による気温および日照時間などの気象的因子の影響も大きいと認められている。

次に、開花および受精後、結実にいたる過程での研究は少ないが、開花期の後、1ヵ月から2ヵ月のうちに、球果および種子の外形は急速に発展し、その年の7月下旬になれば、外観的に成熟期の状態とほとんど変らなくなる。

そして、開花および受精後の幼球果を100とした場合、75%から90%の着果率を示す。

さらに、冬期間の凍害、寒害および鳥獣害等を考慮すると、花芽形成時の40%前後は球果に生長すると思われる。また、この時期の球果の海拔高による成熟過程の差異も報告されている。

成熟期に達した球果は含水量を減じ<sup>19)</sup>、緑色または紫黒色から色沢を失い、苞鱗もまた生氣がなくなり、鱗片がばらばらになって、その内部の種子を落下させる。

トドマツ以外の球果をもつ樹木<sup>21)</sup>については、*Pinus resinosa*<sup>23)</sup>、*Pseudotsuga menziesii*<sup>5)</sup>

および *Abies balsamea*<sup>3)</sup> などに関して、それぞれの球果の長さ、直径および生重量等について、時期的な変化が報告されている。

第二に、球果の化学成分についての研究は少ないが、興味深いものとしては *Pinus ponderosa* および *Pinus lambertiana* の未熟種子より、ジベレリン様物質の研究があげられる。

化学成分の時期的な変化は DICKMANN, D. I. および KOZLOWSKI, T. T. によって、*Pinus resinosa* の花芽形成時から結実期までが行なわれている<sup>22), 23)</sup>。

しかしながら、これらの化学成分の消長もリグニン、セルロース、ヘミセルロースおよびトリクロル酢酸による抽出成分、さらに無機成分の変遷であって、個々の抽出成分の消長については行なっていない。

*Pinus resinosa* の球果における上記の物質の変動は、花芽形成年すなわち、開花前年においては、それぞれの量が徐々に上昇を示し、越冬する。冬期間、各成分は花芽の生長に伴って増加の傾向を示す。急激な変化は越冬後の開花年に起る。すなわち、その年の4月に、各成分は増加を開始し、受粉および受精期を経て、8月上旬頃まで増加の傾向にある。

しかしながら、生長が進むにつれ、抽出成分は減少しはじめ、ヘミセルロースはほぼ一定の値を示し、リグニンおよびセルロースは増加して完熟する。このことを Fig. 1 および Fig. 2 に示した。

生長してゆく球果は多量の炭水化物を必要とし、これは球果の緑色部での光合成だけでは不十分であって、葉齢1年の針葉で合成された炭水化物が開花年の4月初期に球果へ移動する<sup>24), 25)</sup>。さらに、6月頃には葉齢2年および3年の針葉からも移動する。4月初旬に球果中に少量の澱粉が認められ、この量は6月まで増加の傾向をたどり、6月中旬頃、鱗片中の種子に近い部分に蓄積される。そして、種子の成熟とともに、澱粉の量は減少を示す。

このために、鱗片は種子形成時の一時的な養分の貯蔵組織であると推定<sup>23)</sup>されている。ま

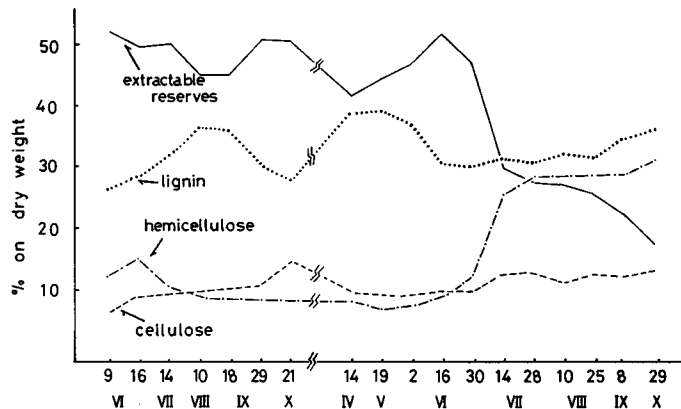


Fig. 1. Seasonal changes in extractable reserves, lignin, hemicellulose and cellulose of cone.

(from the results by DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.)

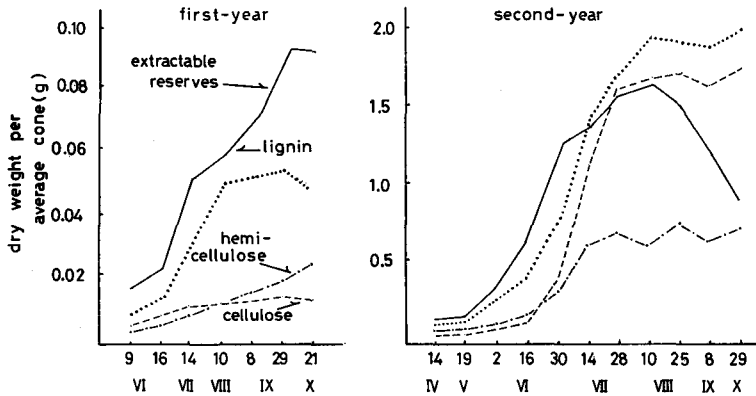


Fig. 2. Seasonal changes in extractable reserves, lignin, hemicellulose and cellulose of cone.

(from the results by DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.)

た種子は鱗片に比べて呼吸は活発であって、グルコースの吸収量<sup>26)</sup>は2倍から4倍であり、成熟につれて呼吸は低下する

構成物質と抽出成分との間において、主たる転換は成熟期の約3カ月前、すなわち、6月中旬頃よりはじまる。成熟につれて、蓄積物(リグニンおよびセルロース)は徐々に増加し、抽出物は急激に量が減少してゆくという、球果の抽出成分の変化が認められる。

次に、無機成分の変化については、それぞれの濃度は、 $N > K > P > Ca > Mg$ の順に存在し、とくに、注目されるのは窒素成分の消長であって、この成分は前述のトリクロル酢酸による抽出成分と似た傾向を示し、種子形成にともなって、球果より種子へ移動すると思われる。

Fig. 3 および Fig. 4 に *Pinus resinosa* の窒素成分の消長を示した。

また、クロマツ (*Pinus thunbergii*) の球果の発達についての研究(クロマツは受粉から受精

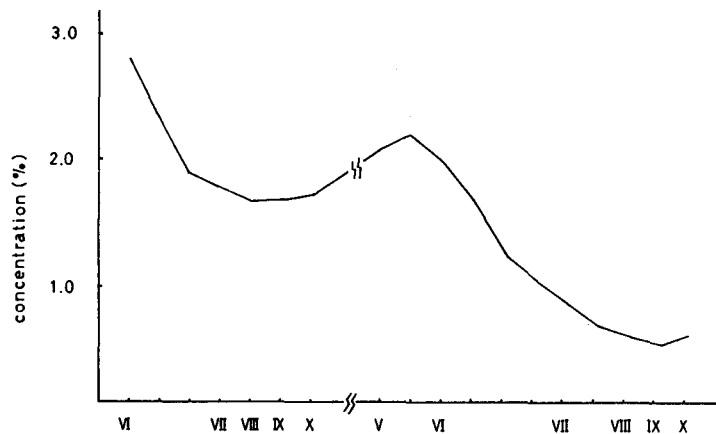


Fig. 3. Seasonal changes in N-nutrient of cone.

(from the results by DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.)

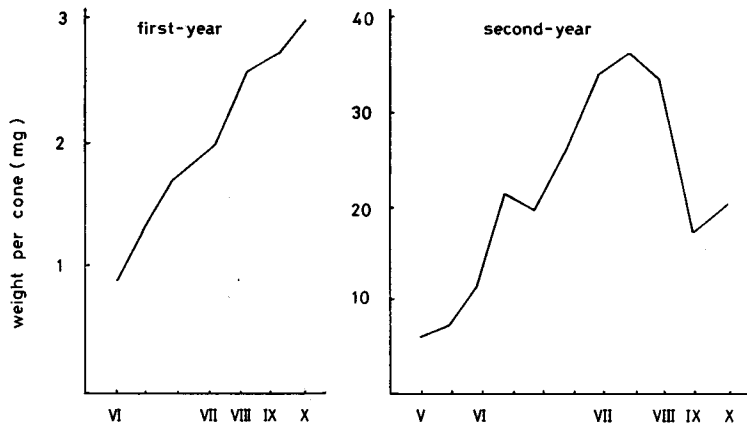


Fig. 4. Seasonal changes in N-nutrient of cone.  
(from the results by DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.)

までに13カ月を必要とする)では<sup>27)</sup>, 受精後の球果の窒素化合物は, まず, 鱗片にあつまり, 種子の形成にともない鱗片から種子へ移動し, 球果の鱗片は樹体から種子へ移動する養分の一時的な貯蔵組織であると推定されている。

しかしながら, トドマツ球果については, まだ知見が得られておらず, 窒素化合物の内容も明らかにされていない。さらに, アントシアニンの同定および時期的な変遷についての報告は見あたらない。

## II. 実 験

トドマツにはアオトドマツおよびアカトドマツが主なものであるが<sup>28)</sup>, 北海道におけるトドマツを分類すると, アオトドマツ, ネムロトドマツ, アカトドマツおよびオニハダトドマツに分類されている。アオトドマツおよびアカトドマツは樹皮の状態では区別が困難で, 球果の苞鱗の形や超出程度によって識別される。しかし, 両者はほとんど混交状態を示すため, きわめて雑種性が強く多くの型が認められている<sup>17)</sup>。北海道における分布は多くの変異型を含み, それぞれの地域に混交している。そして, 道南部から道北東部にかけて, アオトドマツからアカトドマツが多くなる傾向がみられる。しかしながら, 両者の間に明確な境界はない。

実験に使用したトドマツ幼球果は, 各供試木の個体間の変異ならびに開花, 受粉および受精の時期に対する個体間の差を出来るだけ少なくするために, メタノール抽出部, アルコールベンゼン抽出部および温水抽出部の各抽出量を測定し, さらに, 各抽出部のクロマトグラフィーを実施して, 成分的に同一と推定されるものを実験材料とした。そして, 最終的には150本を供試木と選定した。

### II-1 実験材料の採取

球果の採取場所は札幌市郊外, 札幌営林局, 簾舞担当区内, 1132林班を中心に設定した。1132林班を含む一帯は農林水産省林業試験場, 北海道支場の天然更新試験地となっている。



本研究においては、天然木での研究を重要視したので上記の試験地を札幌営林局の御好意により使用した。

トドマツ球果は梢頭部に着生し、普通のトドマツ林においては、枝下が高いので特殊な木登用具<sup>29)</sup>を必要とする。元来、木登用具は球果の採取だけでなく、おもに枝打の場合に用いられる。従来から、多くの用具が各地方の実情に応じて考えられ、その一つに電柱用としていたツメをつけた金具を足に結びつけて登る方法があって、北海道では、トドマツその他の球果採取に用いられ、いろいろ改良されたものも存在する。しかし、金具では樹皮に傷がつき、樹脂を噴出して樹勢が衰弱して研究上支障をきたしやすいことが多い。

枝下高が10 m以下であれば梯子を使用して下枝より登る方法がよいと思われる。今研究の採取には金属製梯子を使用することとした。

また、梢頭部の作業が困難なために、梢頭部を切りおとしたり、着花枝を落すことは樹勢を弱める結果にもなり、翌年の着果にも大きく影響を与えるので、梢頭部においては、樹冠内の安定な場所に位置し、用意したベルト等で身体を幹に安定させ、10番線の針金で下方の枝を手元に引き寄せ、個々の球果をもぎ取ることとした。

採取位置は、トドマツでは樹冠上部の球果が下部の球果に比して、大型で種子も大きく、その発芽勢も高く、大きな苗が出来るため、出来るだけ上部の球果を採取し、5年生枝までの球果を採取することにした。また、不正形や小型の球果、または、樹脂の多い球果は受精が不良であったり、虫害粒が多い場合があり、これらのものは採取の対象から除外した。また、もぎ取りによる方法は母樹の着果枝を損傷しない点に特徴がある。

## II-2 球果の生重量および含水量の測定

6月上旬、中旬および下旬の3時期に、平均的な球果を各時期50個体を用いて、それぞれの生重量を測定した。

さらに、含水量は各時期の球果50個体を用いて、それぞれの試料1gを105°C乾燥器で恒量となるまで秤量をくり返し、乾燥減量をもって含水量とした。

## II-3 各溶媒による抽出量の測定

### II-3-1 メタノール抽出量

メタノール抽出量は凍結乾燥を行った試料(凍結乾燥の試料は105°Cで実施した試料に比較して若干水分量が高い)5gを用い、ソックスレー抽出器を使用し、溶媒が着色しなくなるまで抽出を行い溶液を濃縮乾固し、恒量となるまで乾燥して、抽出量とした。抽出量の測定には、各時期25個体の試料を使用し、ばらつきの少ない15個体を選び平均値をもって抽出量とした。

### II-3-2 アルコール-ベンゼン抽出量

アルコール-ベンゼン抽出量はエタノール-ベンゼン(2:1 v/v)の混液を使用して、凍結乾燥した試料5gをソックスレー抽出器で6時間抽出を行い、溶液を濃縮乾固し、恒量となるまで乾燥し、抽出量とした。抽出量の測定にはメタノール抽出量と同様に、15個体の平均値を

もって抽出量とした。

### II-3-3 温水抽出量

温水抽出量は凍結乾燥した試料 5 g を 105°C で 3 時間還流させ、溶液を濃縮乾固し、恒量となるまで乾燥し、抽出量とした。抽出量の測定はメタノール抽出量と同様に、15 個体の平均値をもって抽出量とした。

### II-4 クロマトグラフィー

球果の抽出物のペーパークロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーは下記の要領で行った。すなわち、展開溶媒としては、トルエン-ギ酸-ギ酸エチル (5:1:4 v/v)、酢酸エチル-メチルエチルケトン-ギ酸-水 (5:3:1:1 v/v) および n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5 v/v、有機層) を使用し、発色剤としては、50% 硫酸、ジアゾ化スルファニル酸およびニンヒドリンを使用し、必要に応じて、紫外線ランプを使用した。

### II-5 アントシアニンの定量

6 月上旬、中旬および下旬の球果を各時期 15 個体を用いて実施した。定量<sup>30),31)</sup> は乾燥試料 5 g を用い、0.01 N 塩酸水溶液で水抽出を 5 時間行い、その後、水溶液が着色を示さなくなるまで抽出をくり返し、水溶液を合した後、25°C 以下で約 100 ml に濃縮し、約 2,000 rpm で 20 分間、遠心分離を行い、生じた沈澱を除き、さらに、濾液を 20°C 以下で、時々脱塩水を加えてシラップ状となるまで濃縮した。その後、デシケーター中で充分乾燥し、0.01 N 塩酸メタノール溶液に色素を溶解し、不純物を除去し、約 5 倍量の無水エーテルを加えて色素を沈澱させ、この沈澱を 0.01 N 塩酸メタノール溶液に溶解し、全量を 100 ml として、定量の試料とした。

### II-6 アミノ酸の分析<sup>32)</sup>

アミノ酸の分析試料は凍結乾燥後の試料 20 g を水抽出することにより得られた。すなわち、水抽出は抽出液中にニンヒドリン試薬による発色が認められなくなるまで抽出を行い、その後、抽出液をイオン交換樹脂アンバーライト IR・410 に吸着させ、充分水洗後、2 N 塩酸溶液で溶出する。濃縮乾固して塩酸を除去し、水に溶解して、さらに、アンバーライト IRA・120 B に吸着させ、2 N アンモニア溶液で溶出後、濃縮乾固して、アンモニアを除去し、分析試料とした。

また、アミノ酸自動分析機による分析では、セリンの位置にアミド化合物が重なるため、アミド化合物の存在を確認する目的で、各時期の試料を 6 N 塩酸で 6 時間 110°C で加水分解後、脱塩酸を実施し、アミド化合物の分析試料とした。

### II-7 各抽出成分の分離

#### II-7-1 アントシアニン<sup>33),34),35)</sup>

札幌市郊外、札幌営林局、簾舞担当区内、1132 林班にて、幼球果約 10 kg を採取し、現地にて、1% 塩酸メタノール溶液に浸漬し実験試料とした。1% 塩酸メタノール溶液による抽出は、室温にて、24 時間で 3 回行い、抽出液を合して、同量の脱塩水を加えて、減圧下、20°C 以

下でメタノールを留去して、抽出液を水溶液とし、2N 塩酸溶液で活性化した、イオン交換樹脂、アンバーライト CG-50 を詰めた管に通す。色素は樹脂に吸着して、樹脂は微赤色を呈す。その後、樹脂を脱塩水で充分水洗後、99% エタノールを流すと、微赤色部は溶出する。樹脂はさらに0.5% 塩酸エタノールを流して、残存する色素を溶出する。

99% エタノール溶液は直ちに40°C以下で減圧下濃縮し、水を加えて水溶液とする。0.5% 塩酸エタノール溶液は同量の水を加えて、20°C以下で濃縮し、水溶液とする。この水溶液を再びアンバーライト CG-50 に吸着させ、99% エタノール溶液として、濃縮後、水溶液とする。

水溶液とした時、水に不溶の樹脂状物質が沈澱するので、これを濾過する。その後、濾液をポリアミドカラムを通す。色素部はカラムを水洗することにより容易に溶出することが出来る。このポリアミドによる操作を3回から5回行い不純物を除き、n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5 v/v, 有機層, B.A.W.) を用いて、ペーパークロマトグラフィーを行うと、3種のアントシアニンと推定される物質が認められた。また、この色素部の塩化鉄反応は青に呈色した。つぎに、この3種のアントシアニンを分離するために、B.A.W. でマスペーパークロマトグラフィーを実施して、3種のアントシアニンを分離した。分離後、さらに、ポリアミドに通して精製し、不純物を除き、再び、B.A.W. または1% 塩酸でマスペーパークロマトグラフィーを行い、2N 塩酸メタノールから再結晶をくり返して、3種の針状晶を得た。3種の結晶の収量はそれぞれ、16 mg, 25 mg および 15 mg であった。

#### II-7-2 d-(+)-カテキン

フェノール性物質の分離には、幼球果約20 kg を用い、採取後、ただちに、メタノール抽出を行い、抽出後、抽出液を減圧濃縮して、シラップ状として、多量の脱塩水を加えて溶解し、濾過後、ポリアミドカラムに吸着<sup>42)</sup>させる。その後、10% エタノール、20% エタノール、30% エタノール、50% エタノールおよび100% エタノールで順次溶出し、各フラクションを得た。10% エタノールおよび20% エタノール溶液を合わせて、濃縮後、シリカゲルカラムを用いて、ベンゼン-アセトン (5:1 v/v) を溶媒として、カラムクロマトグラフィーを行い、さらに、ベンゼン-酢酸エチル (7:1 v/v) およびベンゼン-アセトン (3:1 v/v) を溶媒として、プレパラティブ薄層クロマトグラフィーを行い、分離後、熱水より再結晶を行い、13.2 mg の針状晶を得た。

#### II-7-3 セロチン酸

球果約10 kg のメタノール抽出物のエーテル可溶部をシリカゲルカラムにベンゼンを展開液として、30 ml ずつ分取し、70本から100本の部分を濃縮乾固して、さらに、ヘキサン-ベンゼン (1:2 v/v) より再結晶を行い、無色の結晶性粉末 86 mg を得た。

#### II-7-4 アピエチン酸

前記のシリカゲルカラムをベンゼン-メタノール (100:3 v/v) で溶出して得られた部分を集め、さらに、ベンゼンを用いて、シリカゲルカラムを行い、微黄色の結晶 351 mg を得た。

**II-7-5  $\beta$ -シトステロール**

前記のシリカゲルカラムのベンゼン-メタノール (20:1 v/v) の溶出部分を濃縮し、含水メタノールより再結晶を行い、鱗片晶 130 mg を得た。

**II-7-6  $\beta$ -シトステロールグルコシド**

前記のシリカゲルカラムのベンゼン-メタノール (5:1 v/v) の溶出部分を濃縮し、ピリジンおよびエタノールによる再結晶をくり返して、針状晶 56 mg を得た。

**III. 結果および考察**

トドマツ球果は7月上旬から下旬にかけて、花芽および葉芽の分化がはじまり、徐々に、生長しつつ、冬期の休眠期を迎え、翌年の春、開花、受粉および受精の諸現象をうけて、その年の秋に結実する。春の開花時期より結実にいたるトドマツ球果の成熟過程は形態的には研究も多い。しかしながら、化学的成分を扱ったものはきわめて少ない。とくに、抽出成分の報告がなく未開拓分野となっている。

今研究においては、開花期より受粉および受精期を中心として、6月上旬より6月下旬にかけての幼球果の化学成分の変化および抽出成分について研究を行った。

**III-1 球果の生重量、含水量および各溶媒による抽出量の時期的変遷**

6月上旬、中旬および下旬における、球果1個あたりの生重量、含水量および3種の溶媒による抽出量の変化は Table 2 から Table 6 に示される。

球果の重量増加にともない、各抽出量は、絶対量を増加する傾向を示している。しかしながら、各抽出量も濃度で表わすと Table 7 に示されるように、アルコール-ベンゼン抽出量および温水抽出量は6月上旬から減少の傾向を示し、メタノール抽出量も6月中旬より減少の傾向を示す。

DICKMANN, D. I. 等によれば、受粉および受精期をおえた球果は抽出物の減少とともに、リグニンおよびセルロースが増加する傾向をを認めており、トドマツ球果においても、アルコ

**Table 2.** Seasonal changes in fresh weight per cone in June. (g)

early	middle	late
6.21	9.07	17.24

**Table 3.** Seasonal changes in moisture contents per cone in June. (g)

early	middle	late
3.91	5.67	12.42

**Table 4.** Seasonal changes in content in methanolic extractives per cone in June. (g)

early	middle	late
0.527	0.961	1.143

**Table 5.** Seasonal changes in content in alcohol-benzene extractives per cone in June. (g)

early	middle	late
0.356	0.489	0.688

**Table 6.** Seasonal changes in content in hot water extractives per cone in June. (g)

early	middle	late
0.556	0.772	1.239

**Table 7.** Seasonal changes in concentration of three extracts in June. (%)

	early	middle	late
methanol	8.5	10.6	6.6
alcohol-benzene	5.7	5.4	4.0
hot water	9.0	8.5	7.2

ール-ベンゼン抽出物の急激な減少は、この抽出物が他の高分子物質等へ変化していると推定される。さらに、*Pinus resinosa* において、トリクロル酢酸による抽出物の濃度は、6月末に最大値を示す<sup>22)</sup>。一方、トドマツの場合は6月上旬のアルコール-ベンゼンおよび温水抽出物の濃度が最大値を示し、さらに、6月中旬のメタノール抽出物の濃度が最大値を示す。このことは、開花および受粉期が *Pinus resinosa* では6月中旬であり、トドマツではそれが5月下旬であることを考慮すると、受粉期より約10日後に最高濃度を示すことは、その時期が受精期もしくは受精期直前であり、非常に興味深い現象である。

さらに、各種溶媒による抽出量の濃度も、トリクロル酢酸の場合6月下旬の最大値しか示さないが、今回の実験においては6月上旬にはアルコール-ベンゼン抽出物および温水抽出物の濃度が最大値を示し、さらに、メタノール抽出物の濃度は6月中旬に最大値を示し、アルコール-ベンゼンおよび温水抽出物のメタノール抽出物への移行とも推測される。

他の抽出物に比較して、温水抽出物は緩慢な減少を示すことが認められた。生長してゆく球果は多量の炭水化物を必要とし、とくに、形成されつつある種子は、鱗片に比較して、約2倍から3倍のグルコースを吸収するので、温水抽出物は緩慢な減少の傾向を示すと推定される。

## III-2 クロマトグラム

Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 および Fig. 8 にペーパークロマトグラムおよび薄層クロマトグラム

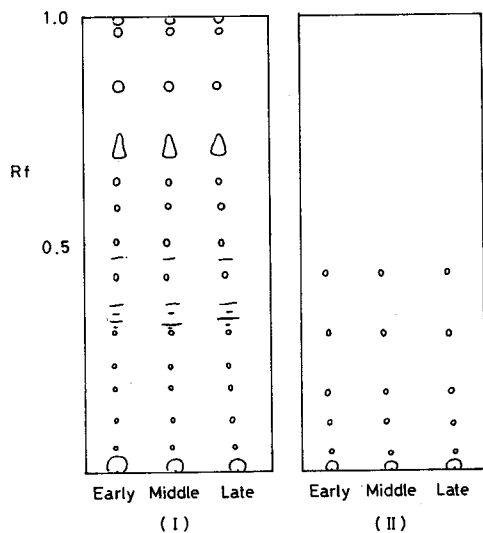


Fig. 5. TLC of methanolic extract in June.

Solvent: Toluene-Formic acid-Ethyl Formate (5:1:4 v/v)

Detecting reagent:

I: 50%  $H_2SO_4$ 

II: Diazotized Sulfanilic Acid

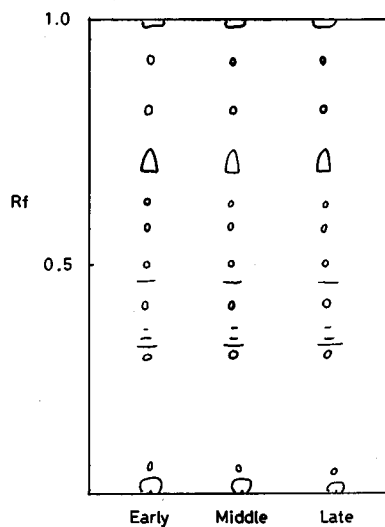


Fig. 6. TLC of alcohol-benzene extract in June.

Solvent: Toluene-Formic Acid-Ethyl Formate (5:1:4 v/v)

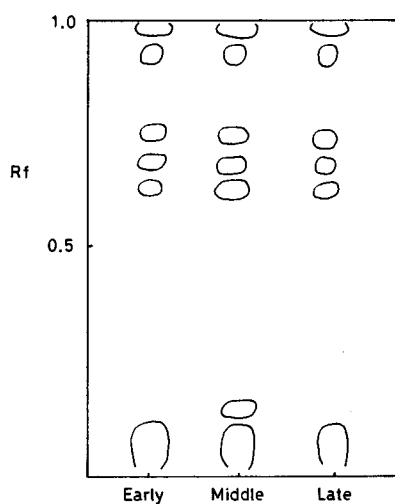
Detecting reagent: 50%  $H_2SO_4$ 

Fig. 7. TLC of hot water extract in June.

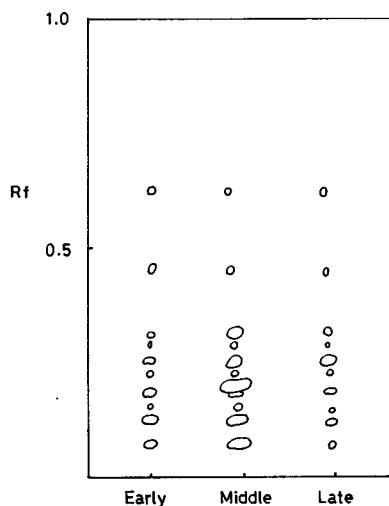
Solvent: Ethyl Acetate-Methyl Ethyl Ketone-Formic Acid- $H_2O$  (5:3:1:1 v/v)Detecting reagent: 50%  $H_2SO_4$ 

Fig. 8. PPC of hot water extract in June.

Solvent: n-Butanol-Acetic Acid- $H_2O$  (4:1:5 v/v)

Detecting reagent: Ninhydrin

を示す。これらの結果により、温水抽出部以外には、大きな変化は認められなかった。温水抽出部において、6月中旬の試料は、上旬および下旬の試料と比較して、ニンヒドリン試薬で発色するアミノ酸と推定される物質に変化が認められた。

### III-3 アントシアニンの時期的変遷

定量を実施するために、色素(アントシアニン)の0.01N塩酸メタノール溶液の紫外線吸収スペクトルより、定量波長を決定した。

0.01N塩酸メタノール溶液の紫外線吸収スペクトルをFig. 9に示す。

Fig. 9に示されるように、0.01N塩酸メタノールに溶解した色素は276 m $\mu$  および544 m $\mu$  に極大値を示した。

時期的な変遷を知るために、各時期15個体の球果を用いて、6月上旬、中旬および下旬のアントシアニンの定量を行った。

測定波長は276 m $\mu$ 、515 m $\mu$ 、540 m $\mu$  および544 m $\mu$  を用いた。

また、定量に際しては、100 mlにした原液を3倍にうすめて実施した。

Fig. 10に276 m $\mu$ の波長での定量結果を示し、Fig. 11に515 m $\mu$ の波長での定量結果を示し、Fig. 12に540 m $\mu$ での定量結果およびFig. 13に544 m $\mu$ での定量結果を示した。

アントシアニンの変化については、開花直後の5月上旬より、球果が生長するにつれて、球果の色調が赤味を増し、6月中には、濃赤色から黒色へと変化する。

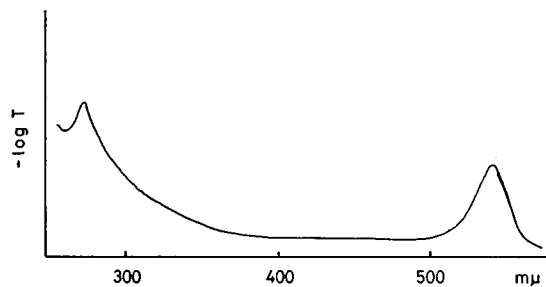


Fig. 9. UV spectrum of anthocyanins in 0.01 N HCl-MeOH.

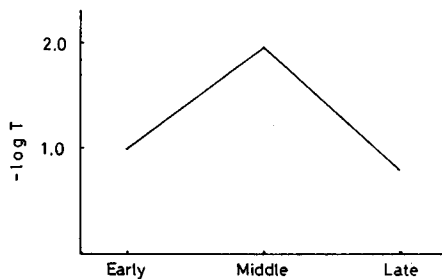


Fig. 10. Seasonal changes in anthocyanin per g of cone in June at 276 m $\mu$ .

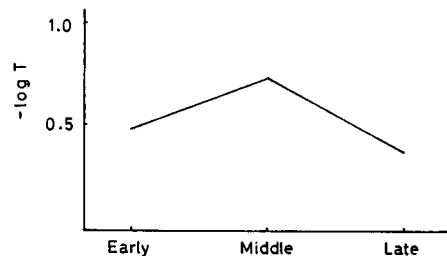


Fig. 11. Seasonal changes in anthocyanins per g of cone in June at 515 m $\mu$ .

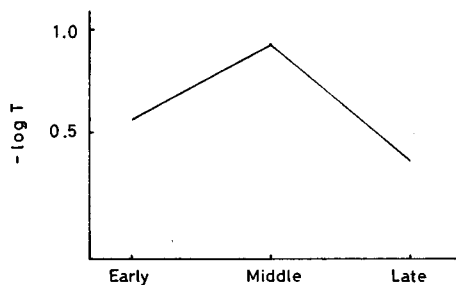


Fig. 12. Seasonal changes in anthocyanins per g of cone in June at 540 m $\mu$ .

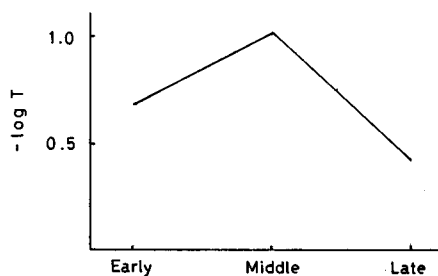


Fig. 13. Seasonal changes in anthocyanins per g of cone in June at 544 m $\mu$ .

アントシアニンは少量ではあるが5月上旬の開花期より存在し、受粉および受精後にアントシアニンが新たに出現することはないと推定される。

しかし、Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12 および Fig. 13 から明らかなように、アントシアニンの量的な変化は認められた。すなわち、6月中旬の試料は6月上旬および中旬の試料と比較して、より高い含量のアントシアニンを示した。

また、6月上旬、中旬および下旬の3時期において、紫外線吸収スペクトルの結果より、コピグメンテーションによると思われる<sup>33), 43), 44)</sup>。青色効果は表われず、量的な変化のみが認められた。

アントシアニンの生合成には、多くの生理的条件により影響をうけることが報告されている。なかでも、光による影響<sup>45), 46), 47)</sup>が最もよく取り扱われているが、糖<sup>48), 49)</sup>、各種の阻害剤、前駆物質および生長物質などの影響も調べられている。光やある種の糖はアントシアニンの生成を促進する。しかし、核酸代謝およびタンパク質代謝<sup>48), 49), 50)</sup>はアントシアニンの生成を低下させる。とくに、FAUST, M. はタンパク質の合成とアントシアニンの生成とはシキミ酸代謝を共通の経路とし、タンパク質への経路とアントシアニン(フラボノイド)への経路とは、フェニルピルビン酸の段階が分岐点となって、タンパク質合成に好都合な条件はアントシアニン生成には不都合な条件であると推定している。

さらに、アミノ酸およびその類似体<sup>50)</sup>はアミノ酸の種類によって、かなりの相違があり、ある種のアミノ酸は促進的に作用するが、他のものは阻害的效果を示す。また、同一アミノ酸でも濃度によって、その影響は異なる場合もある。

生長物質の影響もまちまちであるが、ジベレリン酸はアントシアニン(フラボノイド)生成を抑制するが、 $\alpha$ -ナフチル酢酸は促進する。ジベレリンは種子の形成時には生産が盛んであり、種子中の遊離型ジベレリンの含量は種子の生長にともなって増加する<sup>51)</sup>。

KRUGMAN, S. L. によれば、*Pinus ponderosa* および *Pinus lambertiana* の未熟種子より、ジベレリン様物質の存在が推測されている。

トドマツにおいて、6月上旬、中旬および下旬のアントシアニンの含量の変化は、開花期(5月



下旬)より徐々に増加する。そして、6月中旬に最大値を持ち、下旬にかけて減少する。そして、この減少する傾向は、種子形成にともなう、タンパク質の合成およびジベレリン様物質の増加が、アントシアニンの生成に抑制的に働くものと推定される。

### III-4 アスパラギンおよびグルタミンの定性

各抽出部におけるクロマトグラム (Fig. 5, Fig. 7 および Fig. 8) での検索により、温水抽物の6月中旬の試料から、6月上旬および下旬の試料には確認されない物質が認められた。このものは、ニンヒドリン試薬による呈色反応は赤紫色を呈し、アミノ酸と推定される。さらに、アミノ酸分析の結果 (Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18 および Fig. 19) とも考え併せて、アスパラギンおよびグルタミンと確認した。

アミノ酸分析の結果を Fig. 14 から Fig. 19 に示す。

### III-5 アミノ酸の変遷

Fig. 14, Fig. 15 および Fig. 16 に示されるように、標準試料と比較して、下記のアミノ酸が存在すると推定される。

すなわち、アスパラギン酸 (Asp.), スレオニン (Thr.), セリン (Ser.), グルタミン酸 (Glu.),

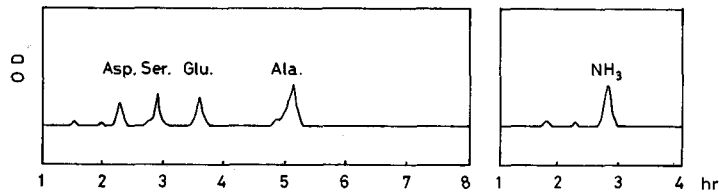


Fig. 14. Amino acid analysis in early June.

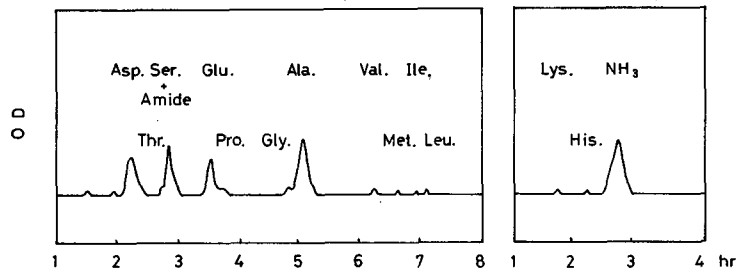


Fig. 15. Amino acid analysis in middle June.

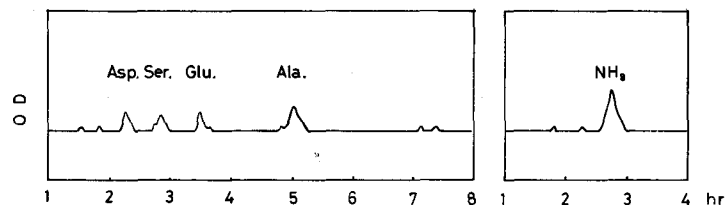


Fig. 16. Amino acid analysis in late June.

グリシン (Gly.), アラニン (Ala.), バリン (Val.), メチオニン (Met.), イソロイシン (Ile.), ロイシン (Leu.), リジン (Lys.) およびヒスチジン (His.) の 12 種類であった。これらの中で Asp., Ser., Glu. および Ala. の 4 種類のアミノ酸が大部分を占めている。

さらに, Fig. 17, Fig. 18 および Fig. 19 にアミド化合物の部分のアミノ酸分析図を示す。

Fig. 17, Fig. 18 および Fig. 19 までは, 加水分解以前の試料を標準試料として表わした。

Fig. 17 から Fig. 19 までの結果により, 6 月中旬の試料に多量のアミド化合物の存在が認められた。さらに, アミド化合物は加水分解することにより消滅し, Asp. および Glu. が増加することにより, アミド化合物はアスパラギン (Asp.-NH<sub>2</sub>) およびグルタミン (Glu.-NH<sub>2</sub>) と推定される。

さらに, 標準物質との比較により, 主要なアミノ酸である。Asp., Glu., アミド化合物, Ser. および Ala. の 6 月上旬, 中旬および下旬の量は Table 8 に示される。

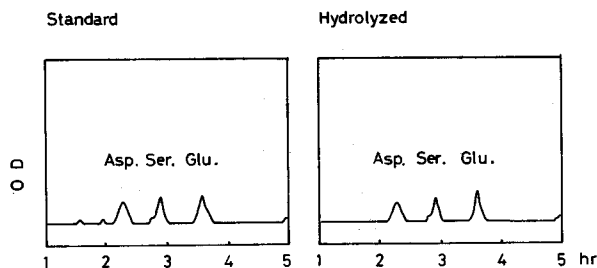


Fig. 17. Amino acid analysis in early June.

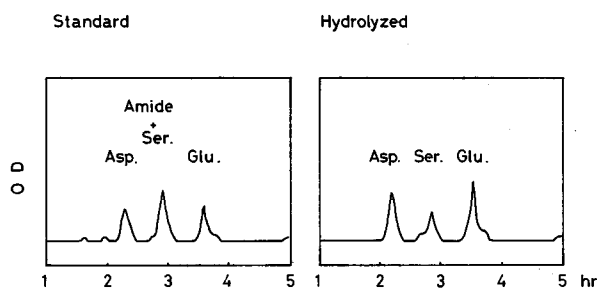


Fig. 18. Amino acid analysis in middle June.

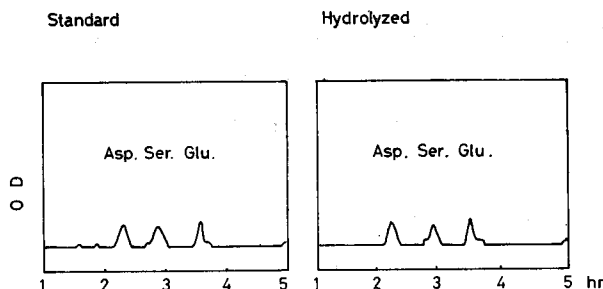


Fig. 19. Amino acid analysis in late June.

**Table 8.** Seasonal changes in Asp., amides, Ser., Glu. and Ala. per 20 g of cone in June. ( $\mu\text{M}$ )

	early	middle	late
Asp.	0.16	0.57	0.12
amides	N.D.	0.20	N.D.
Ser.	0.11	0.31	0.12
Glu.	0.21	0.67	0.31
Ala.	0.32	0.60	0.56

(N. D.: not detected)

6月上旬および下旬の試料と比較して、中旬の試料より、アスパラギンおよびグルタミンなどのアミド化合物が確認された。両者のアミド化合物は、球果内で形成されるか、他の組織から移動したものは明確に推定することは困難である。

*Pinus resinosa*<sup>22)</sup> において、球果内の窒素含量は Fig. 3 および Fig. 4 に示されるように、花芽分化時より、徐々に蓄積され、翌年の開花および受粉期より、種子内へ移動することが認められる。そして、窒素化合物の蓄積は受精期または受精直後の7月上旬から中旬の時期が他の時期と比較して、その蓄積が非常に大きいと認められる。

また、種子の成熟の前期において、窒素化合物が種子に集積し、成熟の後期においては、タンパク質の急速な形成がおこると推定されている。

6月中旬における、アミド化合物の存在は球果の鱗片にアミド化合物が集積し、成熟しつつある種子へ移動する直前の現象であると推測される。

樹液中のアミノ酸組成については、多くの分析結果が得られており、最も一般的なものは、アスパラギン酸、グルタミン酸およびそれらのアミドであるアスパラギンおよびグルタミンである。その他に、少量ではあるが、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、ロイシン、リジン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニンおよびチロシンなどのアミノ酸が報告されている。

BARNES, R. L. によれば<sup>52), 53), 54)</sup> *Pinus serotina* の樹液中のアミノ酸組成は季節によって変化する。その量は夏および冬は最低で、4月上旬の開花期の時期と11月から12月にかけての晩秋の時期に、全アミノ酸含量が最大となる。

また、クロマツ (*Pinus thunbergii*) の球果<sup>22)</sup> および種子<sup>55)</sup> の研究によれば、球果の窒素量は受粉後翌年の2月まではほとんど増加の傾向が認められない。そして、種子における、アミド化合物は、8月中旬に最大値を示す。また、受精期は6月前後の時期であると思われ、成熟種子が得られるのは受精年の11月である。そして、アミド化合物が最大値を示す、8月中旬の未熟種子は、2.3%の低率ではあるが発芽力をもつことが認められる。

これそれらのことにより、球果に存在するアミド化合物は、樹液より移動したものと推定される。さらに、アミド化合物の移動には、木質部の樹液では4月上旬の最大値が球果にお

いては6月中旬に集積するものと推測される。

6月中旬は、球果の発達過程で、受精期直後であると推定されており、その時期に、多量のアミド化合物が球果に存在することは、球果生長過程の重要な現象である。

さらに、グルタミン酸、アスパラギン酸およびセリンなども6月中旬に最大値を示した。

アミド化合物である、アスパラギンおよびグルタミンはそれぞれアスパラギン酸およびグルタミン酸を前駆物質として合成される。

一般に、アミノ酸とケト酸との間のアミノ基転移反応を触媒するトランスアミナーゼは植物界に広く分析しており、多くのアミノ酸は相応するケト酸とグルタミン酸あるいはアスパラギン酸から生成したものと推定される。

アミド化合物の存在は余剰なアンモニアの解毒作用<sup>(56), (57), (58), (59)</sup>とも考えられるが、本研究においては、種子へ移動する時期(結実初期)の集積現象と推測される。

### III-6 各抽出成分の同定

#### III-6-1 アントシアニン

トドマツ球果より得られた、3種のアントシアニンはB. A. W. でのペーパークロマトグラフィー(P. P. C.)は $R_f$ 値0.30, 0.23および0.18を示し、さらに、n-ブタノール-2N塩酸(1:1 v/v有機層)でのP. P. C.は0.06, 0.04および0.03の $R_f$ 値を示した。

つぎに、0.01N塩酸メタノール中での紫外線吸収スペクトルをFig. 20, Fig. 21およびFig. 22に示す。そして、点線は塩化アルミニウムを添加して得られたスペクトルである。

Fig. 20 から Fig. 22 に示されるように、3種のアントシアニンは280 m $\mu$  および 540 m $\mu$  付近に極大吸収を示した。

今回、得られたアントシアニンは、10%水酸化カリウムを含むエタノールでの加水分解では分解物が確認されず、さらに、紫外線吸収スペクトルでアシル化アントシアニンの場合は、310 m $\mu$  近くに吸収をもつが Fig. 20 から Fig. 22 に示されるように吸収をもたず、有機酸は存在しないと思われる。さらに、HARBONE, J. B. による、アントシアニンの紫外線吸収スペクトルの研究によれば、吸光度によって、アントシアニンの配糖体が推測される。

すなわち、440 m $\mu$  における吸光度と可視部における極大波長の吸光度の比により、配糖体型が明確に推定される。今回、トドマツ球果

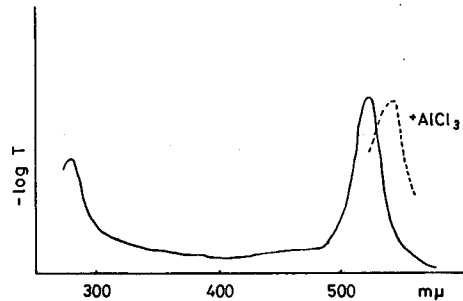


Fig. 20. UV spectrum of cyanin.

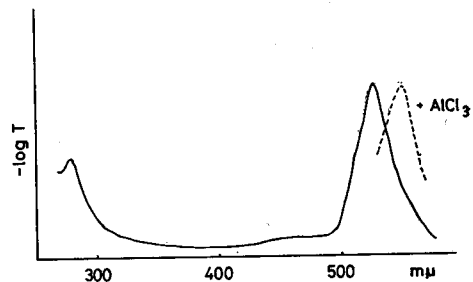


Fig. 21. UV spectrum of delphin.

より得られた、3種のアントシアニンはそれぞれの比が13, 10および10を示し、3位と5位に糖をもつ配糖体であると推定される。

さらに、Fig. 20 から Fig. 22 の点線で示される塩化アルミニウムの添加により、可視部のスペクトルに、それぞれ15 m $\mu$ 、22 m $\mu$ および23 m $\mu$ の深色効果が認められることにより、3種のアントシアニンのB環には、遊離の水酸基がオルト位に存在すると推測される。

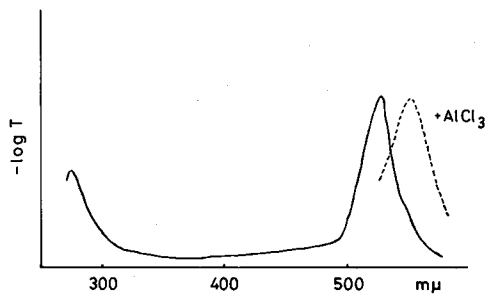


Fig. 22. UV spectrum of petunin.

つぎに、各色素を2N塩酸で1時間加熱し、加水分解する。放冷後、同量のiso-アミルアルコールを加え、アルコール層と水層に分離する。着色がなくなるまでiso-アミルアルコールで抽出し、アルコール層を脱水後、濃縮する。3種のアントシアニンを、酢酸-塩酸-水(30:3:10 v/v)の溶媒でP.P.C.を実施すると、それぞれ0.45, 0.35および0.52のRf値を示し、それぞれのアントシアニンは、シアニジン、ペチュニジンおよびデルフィニジンであると推定され、また、標品のRf値とP.P.C.上で一致したので、それぞれシアニジン、ペチュニジンおよびデルフィニジンと推定した<sup>37)</sup>。

さらに、iso-アミルアルコール抽出後の水層は、イオン交換樹脂、アンバーライト IR-410を通して脱塩酸後、B.A.W.およびn-ブタノール-ピリジン-水(6:4:3 v/v)で、P.P.C.を実施した結果、グルコースが確認された。この結果3種のアントシアニンはシアニジン、ペチュニジンおよびデルフィニジンの配糖体で糖部はグルコースであると推定される。

つぎに、各アントシアニンの部分加水分解は、アントシアニンの1%塩酸メタノール溶液に同容量の20%塩酸を加え、70°Cの水浴上で加熱し、一定時間ごとに反応液をとりだし、P.P.C.上での挙動による、ABE, Y. および HAYASHI, K. の方法<sup>47)</sup>によって実施した。これによると、アントシアニンの3-モノシドの場合は2種、3-ビオシドの場合は3種さらに3,5-ジモノシドの場合は4種のアントシアニンおよびアントシアニンが認められ、アントシアニンの定性をより確実に知ることができる。

今回得られたアントシアニンは3種とも4種のスポットが認められ、紫外線吸収スペクトルの結果と合わせて、3,5-ジモノシドのアントシアニンの可能性が推定される。

つぎに、これらのアントシアニンに対して、過酸化水素水による加水分解を行った。過酸化水素水による加水分解は3位の糖が遊離する方法でCHANDLER, B. V. および HAPPER, K. A. による方法<sup>39)</sup>で実施した。すなわち、30%過酸化水素水を用いて室温で反応後、パラジウムブラックを加えて余剰の過酸化水素を除き、濾過後、30%アンモニア水で加水分解し、溶液を濃縮乾固し、充分乾燥して、無水のn-ブタノールを加えて抽出を行った。n-ブタノール抽出液は濃縮後、2N-塩酸で加水分解をし、エーテルで充分抽出し、アンバーライト IR 410を通して脱

塩酸を行った。

n-ブタノール抽出残査および塩酸での加水分解後の水溶液はトリメチルシリル化剤 (東京化成 TMS-PZ) を用いてシリル化を実施して、ガスクロマトグラフィーの試料とした。

ガスクロマトグラフィー<sup>40),41)</sup> は柳本 GC・8 型を使用し、吸着剤はポリエチレングリコール 20 M, 担体はクロモソルブ HMDS, 2 m のガラスカラムを用い、F.I.D. を使用した。

グルコースの標品は加水分解時と同様の操作を行い、シリル化後、検量線を作成し、定量を行った。

定量の結果、シアニン配糖体の 3 位のグルコースと 5 位のグルコース量は 1.00:0.95 ベチュニジンのそれは 1.00:0.94 およびデルフィニジンのそれは 1.00:0.92 を示した。

これらの結果により、トドマツ球果のアントシアニンは、シアニン、ペチュニジンおよびデルフィニジンの 3,5-ジグルコシドであると推定した。右図に構造式を示す。

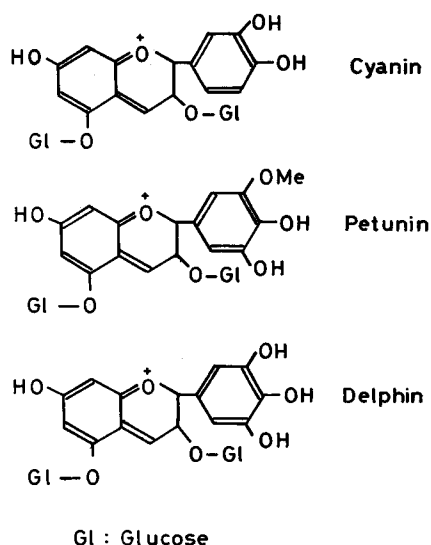
3 種のアントシアニンはトドマツ球果における花色の一因と考えられる。シアニン-3, 5-グルコシドはシアニンとよばれ、ヤグルマギク (*Centaurea cyanus*) の花, ダリア (*Dahlia variabilis*) の花およびヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans*) の花などに分布する。また, ペチュニジン-3, 5-ジグルコシドはペツニンとよばれ, ペチュニア (*Petunia hybrida*) の花および *Vitis rotundifolia* の果皮にムスカジニン (muscadinin) として含まれる。さらに, デルフィニジン-3, 5-ジグルコシドはデルフィンとよばれ, *Salvia patens* の花および *Verbena hybrida* の花などに含まれる。

天然界において, アントシアニンはすべて配糖体として存在し, 糖はグルコース, ガラクトースおよびラムノースなどである。そして, モノグルコシドの場合, ジグルコシドの場合および糖が 3 位と 5 位にわかれていた場合などがあり, 配糖体の数はかなり多いことが認められている。さらに, 諸種の有機酸の一分子または二分子が糖基にエステル結合する場合もある。

配糖体の植物における意義は, 過剰な糖類の貯蔵的な蓄積が考えられ, 種子などにおいては, このようなことも考えられる。

一方, 動物におけるフェノール代謝はグリコシデーションによって解毒されるが, 同じような意義が植物の配糖体にも推測されている。

さらに, 配糖体には, 上記の意義のほかに, 微生物感染に対する潜在的な作用, 浸透圧の調整, 生合成中間体および生長制御物質などの不安定な物質の保護および供給調節などが推定さ



れている。しかしながら、老廃物の排出機構が未分化な植物においては、単なる代謝終産物の蓄積であるかもしれない。

### III-6-2 d-(+)-カテキン

針状晶として、13.2 mgの収量で得られた物質は、ジアゾ化スルフェニル酸による呈色反応は黄色を示し、メタノール性塩化第二鉄での呈色は緑色を呈した。さらに、トルエン-ギ酸-ギ酸エチル (5:1:4 v/v) による薄層クロマトグラフィー (T.L.C.) は  $R_f$  値 0.20 を示し、2% 酢酸によるペーパークロマトグラフィー (P.P.C.) は  $R_f$  値 0.37 を示した。また、融点は  $172^{\circ}\text{C}$  であった。さらに、紫外線吸収スペクトルは  $\lambda_{\text{max}}$  280 m $\mu$  に極大値をもち、タンニン系統の物質と推定される。

この物質の核磁気共鳴スペクトルを Fig. 23 に示す。さらに標品である d-(+)-カエキンとの混融試験は融点降下を示さず、このものを d-(+)-カテキンと同定した。

元素分析値  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$  として 計算値 C: 62.06 H: 4.86

実験値 C: 61.82 H: 4.95

微量ではあるが、球果より得られた d-(+)-カテキンはトドマツ針葉よりも単離され<sup>60)</sup>、生長に抑制的に働くと報告されている。今研究では花芽の越冬することに着目し、この物質の耐

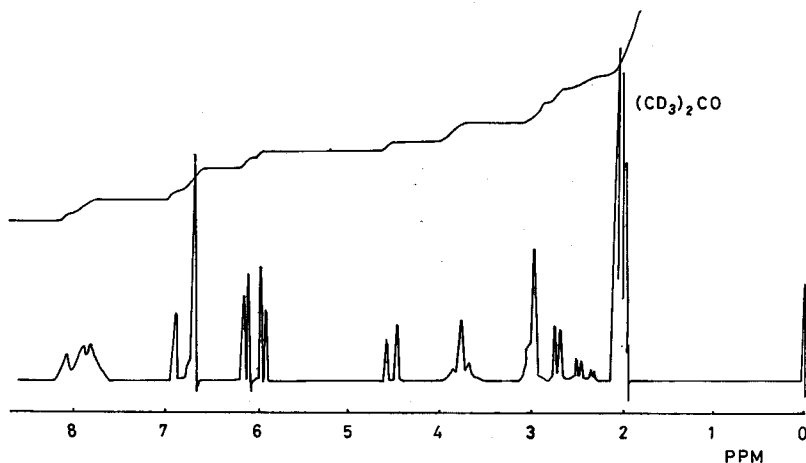


Fig. 23. NMR spectrum of d-(+)-catechin.

Table 9. Effects of d-(+)-catechin on frost hardness

Exposed at	-5°C for 35 min		-5°C for 35 min		-5°C for 30 min	
	Cont.	Subs.	Cont.	Subs.	Cont.	Subs.
Decolored						
Non					6, 8	9, 10
Partly					4, 2	1, 0
Mostly						
Wholy	10, 10	10, 10	10, 10	10, 10		

凍性効果<sup>61),62),63),64)</sup> について実験を行った。

Table 9 に耐凍性実験についての結果を示す。

この結果, d-(+)-カテキンには耐凍性効果は認められないと推測される。すなわち, これを与えなかった対照と比較して, 葉の脱色状態に大きな差がなかったからである。

### III-6-3 セロチン酸

無色の粉末として, 収量 86 mg 得られた物質は, トルエン-ギ酸-ギ酸エチル (5:1:4 v/v) での T.L.C. では  $R_f$  値 0.95 を示し, ベンゼンのみの場合は  $R_f$  値 0.70 を示した。融点は  $84.5^{\circ}\text{C}$  から  $86^{\circ}\text{C}$  であった。さらに, マススペクトルによる  $M^+$  は 396 に認められた。

赤外線吸収スペクトルを Fig. 24 に示す。これによると, このものは, ベンゼン核を持たず,  $-\text{C}=\text{C}-$  の二重結合も存在しない。  $3,300\text{ cm}^{-1}$  および  $1,750\text{ cm}^{-1}$  の吸収から, カルボン酸が推定される。

元素分析値  $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$  として 計算値 C: 78.79 H: 13.13

実験値 C: 79.41 H: 13.56

元素分析値の炭素の差が大きすぎるので, 同定は不十分と思われるが,  $M^+$  396 と比較して, セロチン酸と推した。

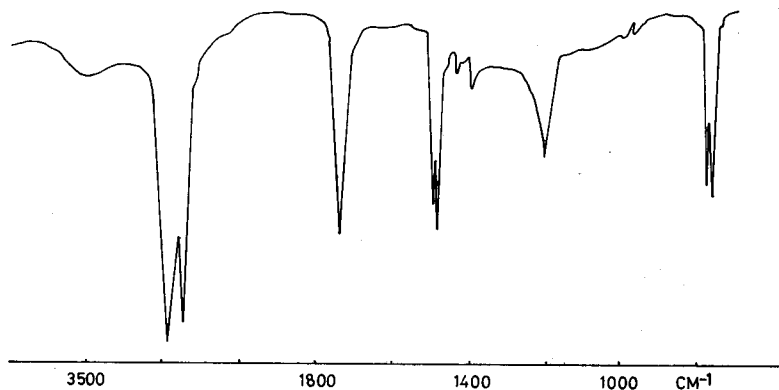


Fig. 24. IR spectrum of cerotic acid.

### III-6-4 アビエチン酸

微黄色の結晶として, 収量 351 mg 得られた物質は, 50% 硫酸を噴霧後,  $105^{\circ}\text{C}$  に約 5 分間加熱すると, 淡赤色を示し, トルエン-ギ酸-ギ酸エチル (5:1:4 v/v) の T.L.C. では  $R_f$  値 0.85, ベンゼン-メタノール (100:3 v/v) では  $R_f$  値 0.30 を示した。融点は  $174^{\circ}\text{C}$  を示した。さらに, 紫外線吸収スペクトルは  $\lambda_{\text{max}}$   $241\text{ m}\mu$  に極大値を示し, メタノール可溶物中で最も量が多く存在し, アビエチン酸であろうと推定される。

標品との混融試験は融点降下を示さず, アビエチン酸と同定した。

元素分析値  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$  として 計算値 C: 79.42 H: 9.99

実験値 C: 79.40 H: 9.90



### III-6-5 $\beta$ -シトステロール

鱗片晶として、収量 130 mg 得られた物質はリーベルマン-パークード反応が陽性で、融点は  $138^{\circ}\text{C}$  から  $139^{\circ}\text{C}$  を示し、 $\beta$ -シトステロールと推定され、標品との混融試験は融点降下を示さず、 $\beta$ -シトステロールと同定した。

元素分析値  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  として 計算値 C: 83.99 H: 12.15

実験値 C: 84.01 H: 12.20

### III-6-6 $\beta$ -シトステロールグルコシド

針状晶として、56 mg 得られた物質は融点は  $283^{\circ}\text{C}$  から  $285^{\circ}\text{C}$  を示し、モーリッシュ反応は陽性、リーベルマン-パークード反応は陽性を示した。しかし、塩化第二鉄をはじめとするフェノール試薬には陰性であった。この物質の赤外線吸収スペクトルは Fig. 25 に示される。

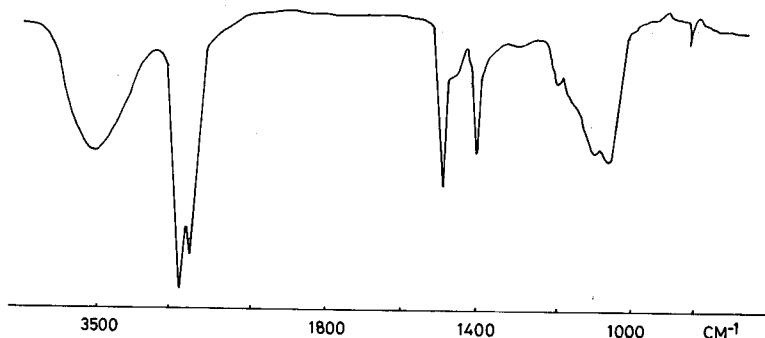


Fig. 25. IR spectrum of  $\beta$ -sitosterol glucoside.

Fig. 25 において、 $1,100\text{ cm}^{-1}$  付近の幅広い吸収は  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  に基づくものと推定され、また、 $1,075\text{ cm}^{-1}$  および  $1,010\text{ cm}^{-1}$  に存在する吸収は  $-\text{O}-$  糖に典型的な吸収と推定される。

さらに、芳香族およびカルボニルの吸収が認められず、リーベルマン-パークード反応が陽性であるので、ステロールの配糖体と推定される。

つぎに、この物質の 2N 塩酸による加水分解の結果、 $\beta$ -シトステロールおよびグルコースを確認したので、 $\beta$ -シトステロールグルコシドと推定される。さらに標品との混融試験は融点降下を示さなかったので、 $\beta$ -シトステロールグルコシドと同定した。

元素分析値  $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{O}_6$  として 計算値 C: 72.48 H: 10.47

実験値 C: 72.68 H: 10.55

ステロールおよびその配糖体は種子<sup>65)</sup> および材などに多く存在する物質である。

### III-7 総合考察<sup>66),67)</sup>

本研究において、受粉、受精および結実といった諸現象が球果にどのように現われるかを主目的とし、未だ、知見のない、トドマツ球果の抽出成分についても知見を得ることとした。

さらに、天然木における、球果の生態を重要視して、試料の採取場所は農林水産省、林業試験

場簾舞担当区内の天然更新試験地とし、トドマツの雑種性の強さ、個体間の変異ならびに開花、受粉および受精の時期に対する、個体間の差を少なくするために、供試木 150 本を選定して実験材料とした。

重量、水分および各種溶媒による抽出量の変遷を Fig. 26 に示し、各種溶媒による抽出量の濃度の変遷を Fig. 27 に示した。Fig. 26 および Fig. 27 は球果 1 個あたりの量で、6 月上旬の量をとって示すことにより、各時期の量の変遷を明確に知ることができる。

Fig. 26 に示されるように、生重量の増加に比べて、含水量の増加が著るしくなっている。

また、Fig. 27 に示されるように、各溶媒による抽出量の濃度は、6 月上旬から中旬にかけて最大値を示した。トドマツでは、開花および受粉期が 5 月下旬であることにより、溶媒による抽出物濃度が最大になることは、受精期直前もしくは受精期の現象として興味深く、各化合物の集積は受精現象と密接な関連があるものと推測される。また、アルコール-ベンゼン抽出物の急激な減少は、この抽出物の一部が高分子物質等へ変化したものと思われる。また、温水抽出物は緩慢な減少の傾向を示す。このことは、生長してゆく球果のエネルギー源となるため、徐々に減少してゆくものと考えられる。最後に、メタノール抽出物は、6 月中旬に最大値を示し、下旬にかけて急激な減少を示し、高分子物質へ変化するゆく過程が興味深い。

つぎに、アントシアニンならびにアミノ酸の変遷は、ともに、6 月中旬の時期に最大値を示し、比較的多く見出されるものとして、アスパラギンおよびグルタミンのアמיד化合物、アスパラギン酸、グルタミン酸およびセリンが認められた。

アスパラギンはアントシアニンの生成に抑制的に作用し、グルタミンが存在する時も、同様に、抑制的に作用する。しかし、球果の生長には、抑制的でないと推測される。トドマツの球果は、6 月下旬が生長期と報告されているが、同時に、種子の初期的な形成が進行中であり、

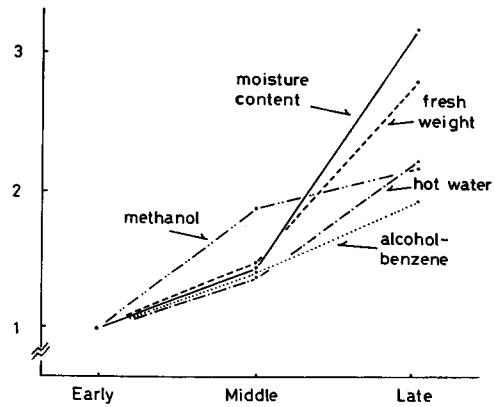


Fig. 26. Seasonal changes in fresh weight, moisture content and three extracts per cone in June.

(The weights of early June are to be termed as unit.)

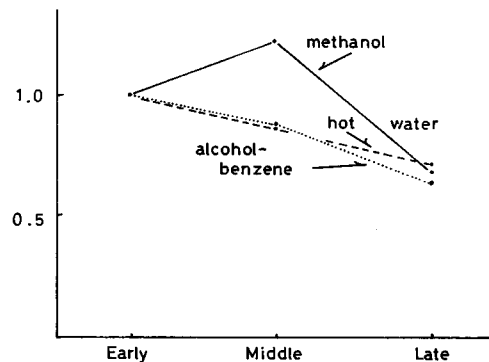


Fig. 27. Seasonal changes in concentration of three extracts in June.

(The weights of early June are to be termed as unit.)

未熟種子の発芽力を考えあわせると、球果に蓄積された、多量のアマイド化合物が、種子へ移動した時期(8月中頃と推定される)に結実が終了したものと推定される。

さらに、アマイド化合物の球果への集積は、球果の生長過程における、受精期の指標物質とも推定される。

最後に、抽出成分として得られた、3種のアントシニンは、トドマツ球果の赤黒色の花色の一因と考えられる。

#### IV. 結 論

林木育種事業において、種子の生産は重要な位置を占める問題である。種子の生産に対して、現在、精英樹の採種園の造成等の事業が実施されている。

種子の生産に関しては、形態学的な研究が多く報告されている。しかし、化学的成分の研究は、材料採取の困難さおよび利用価値等の関係から、極めて少ないのが現状である。

花芽分化にはじまり、開花、受粉、受精ならびに結実といった、種子形成上の重要な諸現象に対する、化学的な研究は、優良種子を得るために、重要な基礎研究であると思われる。

今研究は、北海道の代表的な針葉樹である、トドマツの球果を用いて、受粉後の球果の化学成分の変遷を調べ、あわせて、球果の抽出成分を検索し、種子生産のための基礎的知見を得ることを目的とした。

実験材料は生重量、含水率および各溶媒による抽出量の測定をおこない、さらに、クロマトグラフィーを実施して、150本の天然木を選定した。

6月上旬、中旬および下旬の生重量、含水率および各溶媒による抽出物の変遷を Table 2 から Table 6 に示し、さらに、濃度の変遷を Table 7 に示した。

つぎに、アントシアニンの変遷を Fig. 10 から Fig. 13 に示し、また、アミノ酸の変遷を Table 8 に示した。

これらの結果より、つぎの結論を得た。

1. 生重量の増加に比較して、含水率の増加が急激であった。すなわち、6月下旬の試料は上旬の試料と比較して、生重量は2.8倍であり、含水率は3.2倍であった。

2. 各溶媒による抽出量は、6月下旬の試料が上旬の試料と比較して、メタノール抽出量および温水抽出量は2.2倍であり、アルコール-ベンゼン抽出量は1.9倍であった。

3. 球果1個あたりの濃度として、各抽出量を比較すると、メタノール抽出部は、8.5%、10.6%および6.6%となり、温水抽出部は9.0%から7.2%へ減少し、アルコール-ベンゼン抽出部は5.7%から4.0%に減少した。

4. 各溶媒による抽出量の変遷は6月上旬から下旬にかけて、高濃度に集積する現象が認められ、下旬にかけて、高分子物質等へ変化するものと推定される。

5. アントシアニンおよびアミノ酸は、6月中旬に両者とも最大値を示し、下旬には減少

する傾向が認められた。

6. 6月中旬の試料から、グルタミンおよびアスパラギンのアמיד化合物が認められた。このことは、球果生長期の指標成分と推定され、結実の初期の一段階と推測される。

7. 球果の花色の一因としては、3種のアントシアニン(シアニン、デルフィンおよびペツニン)が認められた。

8. 受精および結実の生理的現象は、トドマツ球果においては、各化合物(とくに窒素化合物)の集積が重要な段階であると推定される。

9. 抽出成分として、3種のアントシアニン、d-(+)-カテキン、セロチン酸、アビエチン酸、 $\beta$ -シトステロールとその配糖体を同定し、15種のアミノ酸を検出した。

#### 参 考 文 献

- 1) 松浦 堯: トドマツ雌, 雄花の樹冠内着生分布, 北海道の林木育種, **13**, 23 (1970).
- 2) 松浦 堯: トドマツ雌花の分化と発達における形態ならびに生理的変遷, 農林水産省林試北支年報, **34** (1961).
- 3) POWELL, G. R.: Postdormancy development and growth of microsporangiate and megasporangiate strobili of *Abies balsamea*, Can. J. Bot., **48**, 419 (1970).
- 4) DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.: Seasonal growth patterns of *Pinus resinosa* Ait. pistillate strobili in central Wisconsin, Can. J. Bot., **47** 839 (1969).
- 5) CHING, T. M. and CHING, K. K.: Physical and physiological changes in maturing Douglas-fir cones and seed, Forest. Sci., **8**, 21 (1962).
- 6) MCLEMORE, B. F.: Cone maturity affects germination of long leaf pine seed, J. For., **57**, 648 (1959).
- 7) 田添 元, 斎藤雄一: とどまつ, くらえぞまつ, あかえぞまつ種子の発芽に対する温度の影響について, 北大演報, **9**, 1 (1934).
- 8) 佐藤義夫: トドマツ, エゾマツ混淆天然林に於ける種子落下について, 北大演報, **11**, 45 (1940).
- 9) 高橋治郎, 小西千賀三: 土壤肥科学講座, 朝倉書店 (1960).
- 10) 田口亮平: 植物生理学大要. 養賢堂 (1958).
- 11) 古谷雅樹, 宮地重遠, 玖村敦彦: 植物生理学講座, 朝倉書店 (1972).
- 12) 戸荆義次, 山田 登, 林 武: 作物生理学講座, 朝倉書店 (1960).
- 13) 宮部金吾, 工藤祐舜, 須崎忠助: 北海道主要樹木図譜, **1**, 北海道庁.
- 14) 小沢準二郎: 針葉樹のタネ, 地球出版 (1962).
- 15) 岡本省吾: 標準原色図鑑全集. **8**, 樹木, 保育社 (1966).
- 16) 佐藤敏二, 斎藤雄一, 他7名共著: 造林学, 朝倉書店 (1965).
- 17) 原田 泰, 柳沢聡雄: トドマツ品種の分類, 帝室林野局北海道林試報告, 第2号, **3** (1946).
- 18) 成田留五郎: 樹木の開花期, 剥皮可能期間, 種子採集期, 北海道の林木育種, **3**, **4** (1960).
- 19) 小沢準二郎: 種子研究室における動向, 北方林業, **6**, 248 (1954).
- 20) 小沢準二郎: とどまつ造林篇, 前篇, 北方林業叢書 (1959).
- 21) CRAM, W. H. and WORDEN, H. A.: Maturity of white spruce cones and seed, Forest. Sci. **3**, 263 (1957).
- 22) DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.: Seasonal changes in the macro and micro nutrient composition of ovulate strobili and seeds of *Pinus resinosa* Ait., Can. J. Bot., **47**, 1547 (1969).
- 23) DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.: Seasonal variation in reserve and structural components of *Pinus resinosa* Ait. cones. Amer. J. Bot. **56**, 515 (1969).

- 24) DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.: Mobilization and incorporation of photoassimilated  $^{14}\text{C}$  by growing vegetative and reproductive tissues of adult *Pinus resinosa* Ait. trees, *Plant physiol.* **45**, 284 (1970).
- 25) DICKMANN, D. I. and KOZLOWSKI, T. T.: Photosynthesis by rapidly expanding green strobili of *Pinus resinosa*, *Life Sci.*, **9**, 549 (1970).
- 26) CHING, T. M. and FANG, S. C.: Utilization of labeled glucose in developing Douglas-fir seed cones, *Plant Physiol.*, **38**, 551 (1963).
- 27) 勝田 征, 佐藤大七郎: クロマツの球果の発達. *日林誌*, **46**, 166 (1964).
- 28) 岡田幸郎: アオトドとアカトド. *北方林業*, **9**, (3) (1957).
- 29) 藤林 誠, 辻 隆道: *林業労働図説* (1956).
- 30) PROCTOR, J. T. A. and CREASY, L. L.: An anthocyanin-decolorizing system in florets of *Cichorium intybus*, *Phytochem.* **8**, 1401 (1969).
- 31) KLEIN, A. O. and HAGEN C. W.: Anthocyanin production in detached petals of *Impatiens balsamina* L., *Plant Physiol.*, **36**, 1 (1961).
- 32) 波多野博行: アミノ酸自動分析法. *化学同人* (1964).
- 33) BENDZ, C. and HAGLUND, Å.: *Populus tremula* the anthocyanins of leaves and catkins, *Acta chem. Scand.* **22**, 1365 (1968).
- 34) BENDZ, C. and HAGLUND, Å.: Grass anthocyanins, *Acta chem. Scand.* **21**, 2286 (1967).
- 35) MULLICK, D. B.: New tests for microscale identification of anthocyanidins on thin layer chromatography, *Phytochem.* **8**, 2003 (1969).
- 36) HARBONE, J. B.: Spectral methods of characterizing anthocyanins, *Biochem. J.*, **70**, 1958 (1958).
- 37) BONNER, J.: *Plant Biochemistry*, Academic Press (1952).
- 38) ABE, Y. and HAYASHI, K.: Further studies on paper chromatography of anthocyanins, *Bot. Mag. Tokyo*, **69**, 577 (1956).
- 39) CHAMDLER, B. V. and HARPER, K. A.: Identification of saccharides in anthocyanins and other flavonoids, *Austral. J. chem.* **14**, 586 (1961).
- 40) SWEELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and WELLS, W. W.: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
- 41) 蛋白質, 核酸, 酵素編集部編, *糖質実験法*, 共立出版 (1963).
- 42) PRIDHAM, J. B.: *Methods in Polyphenol Chemistry*, Pergamon Press. (1963).
- 43) ASEN, S., STEWART, R. N., NORRIS, K. H. and MASSIE, D. R.: A stable blue non-metallic co-pigment complex of delphinidin and C-glycosylflavones in *Prof. Blaauw Iris*. *Phytochem.* **9**, 619 (1970).
- 44) ASEN, S., STEWART, R. N. and NORRIS, K. H. Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of red wing asalea, *Phytochem.* **10**, 171 (1971).
- 45) SIEGELMAN, H. W. and HENDRICKS, S. B.: Photocontrol of anthocyanin formation in turip and red cabbage seedlings, *Plant Physiol.* **32**, 393 (1957).
- 46) SIEGELMAN, H. W. and HENDRICKS, S. B.: Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin, *ibid* **33**, 185 (1958).
- 47) SIEGELMAN, H. W. and HENDRICKS, S. B.: Photocontrol alcohol, aldehyde and anthocyanin production in apple skin. *ibid* **33**, 409 (1958).
- 48) STRAUS, J.: Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue cultures I *ibid* **34**, 536 (1959).
- 49) STRAUS, J.: Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue cultures II *ibid*, **35**, 645 (1960).
- 50) ISHIKURA, N. and HAYASHI, K.: Biogenetic interrelation between anthocyanin and some of the concomitant substances in radish and turnip studies on anthocyanins L, *Bot. Mag. Tokyo*, **78**, 481 (1965).

- 51) 高橋信孝, 丸茂晋吾, 大岳 望: 生理活性天然物化学, 東京大学出版会 (1973).
- 52) BARNES, R. L.: Glutamine synthesis and translocation in pine. *Plant Physiol.*, **37** 323 (1962).
- 53) BARNES, R. L.: Organic Nitrogen compounds in tree xylem sap, *Forest Sci.*, **9**, 98 (1963).
- 54) BARNES, R. L.: Nitrogen transport in the xylem of tree., *J. Forest.* **61**, 50 (1963).
- 55) KATSUTA, M.: The synthesis of reserve protein in ripening pine seeds. *J. Jap. For.* **43**, 157 (1961).
- 56) 赤堀四郎, 金子武夫, 成田耕造: タンパク質の化学, 共立出版 (1970).
- 57) 中川一郎, 島蘭順雄: タンパク質の代謝と栄養, 朝倉書店 (1967).
- 58) 佐竹一夫: タンパク質, 朝倉書店 (1965).
- 59) 近藤金助: アミノ酸の栄養と生化学, 産業図書 (1965).
- 60) 柴草良悦: 生長物質等の散布によるトドマツ苗木の開花および秋伸び抑制試験, 北大演報, **30** (1), 33 (1973).
- 61) 武藤憲由: トドマツの耐凍性物質, 北大演報, **30** (1), 1 (1973).
- 62) 武藤憲由: トドマツの耐凍性物質, 第83回日林大会講演集, 89 (1972).
- 63) 今田敬一, 武藤憲由: 北海道主要造林樹種の凍害に関する研究 (I), 北大演報, **19** (1), 79 (1958).
- 64) 酒井 昭: 木本類の耐凍性増大の過程 IX, 低温化学, 生物篇, 18 輯, 23 (1960).
- 65) 津田恭介: ステロイド, 朝倉書店 (1965).
- 66) 安田 齊: 花色の生理・生化学, 内田老鶴園新社 (1973).
- 67) KOZLOWSKI, T. T.: Growth and Development of Trees **II**, Academic Press (1971).

### Summary

The studies on morphological and physiological changes in development of cones were reported by many investigators.

The number of published reports on seasonal changes of chemical components is very small and the study occupies important part in the seed formation.

At first, the seasonal changes were studied during the periods of fertilization and maturity and three anthocyanins, d-(+)-catechin, cerotic acid, abietic acid,  $\beta$ -stiosterol and its glucoside were identified and fourteen amino acids were detected from young cones of *Abies sachalinensis* (Todomatsu).

1. The seasonal changes in fresh weight, moisture content and weights of three extractives (methanol, hot water and alcohol-benzene) of cone increase rapidly from early June to late June.

2. After the pollination, in about 10 days, the both concentrations of alcohol-benzene and hot water extractives of cone reached the maxima values.

In middle June, the concentration of methanol extractives of cone reached maximum value.

3. The decrease in concentration of alcohol-benzene extractives is gradual, varying from 5.7% to 4.0%.

The decrease in concentration of hot water extractives is gradual, varying from 9.0% to 7.2%.

The concentration of methanol extractives is 8.5% initially, it increases to 10.6% in middle June, and decreases rapidly to 6.6%.

4. The quantities of anthocyanins and free amino acids are maxima values in middle June.

5. The presence of amide compounds (glutamine and asparagine) in middle June, is con-

sidered to be a indicator of some steps in seed formation.

6. Three anthocyanins (cyanin, delphin and petunin) are coloring substances of cones in appearance.

7. The fourteen amino acids detected are asparatic acid, threonine, serine, amide compounds (glutamine and asparagine), glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, methonine, isoleucine, leucine, lysine and histidine.