花粉の生化学的研究(第7報)

花粉のビタミンについて

斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 深田 稔, 本居孝雄

(岩手大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 9 月 13 日 受 理

Biochemical Studies on Pollen

Part VII. Vitamins of Pollen

By Yoshihisa TOGASAWA, Teizo KATSUMATA, Minoru FUKADA and Takao MOTOI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University

The anemophilous pollen of *Pinus Banksiana*, *P. Thunbergii*, *P. densiflora* and *Zea Mays*, and the entomophilous pollen of *Cucurbita maxima* and *Lilium lancifolium* were studied for vitamins. (1) Vitamin A was not found in all samples. β -Carotene was detected in *Z. Mays*, *C. maxima* and *L. lancifolium*, but not in *Pinus*. (2) Vitamin B₁ content was most rich in *C. maxima* (2,153 $\gamma\%$ on the dry basis). The pollen of *Pinus* contained 748~915 $\gamma\%$ B₁, and its ester form was in the range of 42.2~58.0% of the total. Rate of ester form was 19.1~32.1% for other pollen. Vitamin B₂ contents in *C. maxima* and *L. lancifolium* (2,309, 1,829 $\gamma\%$, respectively) were more than those of other pollen. Rate of free riboflavin was in the range of 42.8~62.8% for all samples. The pollen of *Pinus* contained more FAD and less FMN than that of angiosperms. Vitamin C content in *Pinus* and *Z. Mays* (58.5~73.7 mg%) was more than that of other pollen. Reduced form was especially rich in *Pinus*. (3) The contents of pantothenic acid, biotin and choline varied between 305~974 $\gamma\%$, 16~60 $\gamma\%$ and 193.5~690.7 mg%, respectively.

(Received September 13, 1966)

植物の生殖単細胞としての花粉の糖質^(1,2), アミノ酸⁽³⁾, フラボノイド色素⁽⁴⁾, 無機成分とリン化合物⁽⁵⁾などについてすでに報告したが, このたび花粉のビタミンとくに補酵素としてのビタミンおよび花粉の発芽生理に関係あるビタミンについて検討した. なおAについては種類によりA活性の存在が報告されているものもあり, この点の検討もあわせて行なった.

実験方法

1. 試料 バンクスマツ(*Pinus Banksiana* Lamb.), クロマツ(*P. Thunbergii* Parl.), アカマツ(*P. densiflora* Sieb. et Zucc.), トウモロコシ(*Zea Mays* L. var. *indentata*), カボチャ(*Cucurbita maxima* Duch.), オニユリ(*Lilium lancifolium* Thunb.) 花粉を前報⁽⁵⁾同様調製して試料とした.

2. ビタミンの定量

(1) Aおよび β カロチンの検討: Koehn ら⁽⁶⁾の方法により得た不ケン化物の活性化グリセロールジクロロヒドリン(GDH)による比色法^(7,8), ペーパークロマトグラフィー⁽⁹⁾(PPC), 薄層クロマトグラフィー^(10,11)(TLC)などによりAおよび β カロチンの存否を検討した. 標準物質は国立衛生試験所製標準肝油(10,000 I.U./g), 理化学研究所製結晶Aアセテート(2,800,000~2,900,000 I.U./g)とこれらのケン化物(Aアルコール), およびエーザイ製薬会社製結晶 β カロチンを用いた. GDH試薬(GDH 1 ml中に三塩化アンチモン 25 mg, 濃塩酸 0.01 mlを含む溶液)は, Aのほかカロチンでも若干発色するので, 供試液中のAとカロチンの分別を, 硫酸マグネシウム-アンモニア法によるマグネシウム吸着PPC⁽⁹⁾(吸着PPC)により行ない, 可視光線下および紫外線下の観察を行なった. トウモロコシ, カボチャ,

オニユリ花粉の場合, A アルコール相当部位と β カロチン以外の色素との分離が悪かったので, さらに TLC^(10,11) による分別を行なった. TLC は吸着剤としてシリカゲル (第一化学薬品製シリカライダーを 20×20 cm のガラス板に 0.25 mm の厚さに塗付し, 110~120°, 2 時間加熱) の薄層, 展開溶媒として石油エーテル: エーテル: 酢酸 (80:20:4) を用い, 標準物質を対照とし, 紫外線下で検討した. その結果, A アルコール相当部位の検出されたオニユリ花粉について, 新たに TLC により A アルコール相当部位を集め, その部位をクロロホルムで溶出し, 溶出液の GDH 試薬による呈色並びに島津 QV-50 型光電分光光度計による紫外線吸収スペクトルの測定を行なった.

(2) 総 B_1 , 遊離型 B_1 (FB_1), エステル型 B_1 (EB_1): 総 B_1 , FB_1 はオクローム蛍光法⁽¹²⁾により定量し, 総 B_1 から FB_1 を差引き EB_1 量を求めた.

(3) 総 B_2 , 遊離型 B_2 , エステル型 B_2 : 総 B_2 はルミフラビン蛍光法⁽¹³⁾により定量し, 遊離型およびエステル型 B_2 は八木⁽¹⁴⁾の方法に従い, 東洋濾紙 No. 50, 展開溶媒, *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (4:1:5) を用い, 標準リボフラビン (FR), フラビンモノスクレオチド (FMN), フラビンアデニンジスクレオチド (FAD) を対照とし, PPC により分別, 紫外線下で相当部位を確かめ, これを切り取り加温抽出 (70~80°, 15 分間) 後, ルミフラビン法により FR, FMN, FAD の比率を求め, 総 B_2 よりおのおのの含量を算出した.

(4) 総 C, 還元型 C (RC), 酸化型 C (OC): 総 C および RC はインドフェノール法⁽¹⁵⁾により定量し, 総 C から RC を差引き OC 量を求めた. オニユリ花粉の場合着色いちじるしく, インドフェノール法の適用不可能で, ヒドラジン法⁽¹⁶⁾により発色させ, 520 m μ における吸光度を測定, あらかじめ作成した検量線から, OC+ジケトグルン酸 (DKG) (a), DKG (b), OC+RC+DKG (c) 含量を求め, (a)-(b) から OC, (c)-(a) から RC, (c)-(b) から総 C をそれぞれ求めた.

(5) パントテン酸 (PA): エーテル脱脂花粉につき, Difco Lab. 製基礎培地を用い *Lactobacillus arabinosus* ATCC 17-5 を用いる微生物定量法^(17,18)により定量した.

(6) ビオチン: 脱脂花粉につき, Difco Lab. 製基礎培地を用い, *Lactobacillus arabinosus* ATCC 17-5 を用いる微生物定量法^(18,19)により定量した.

(7) コリン: Glick⁽²⁰⁾ の方法により定量した.

結果および考察

花粉のビタミン中, A に関しては, Mameli ら⁽²¹⁾がフサアカシヤ花粉に A 活性を認め, Vivino ら⁽²²⁾は蜂の集めたタンボポ, スモモ, リンゴなどの混合花粉およびクローバー花粉の A, B_1 , B_2 , RC, PA など定量し, A の存在を否定している. これら両氏の報告から, 種類によっては A 活性を有する花粉の存在も考えられるので, まず花粉中の A 並びに β カロチンの存否を検討した. Koehn ら⁽⁶⁾の方法で得た花粉不ケン化物のクロロホルム溶液に, GDH 試薬を加え色調を観察したところ, カボチャ, オニユリ花粉では濃緑青色を, マツ類およびトウモロコシ花粉では A の赤紫色とやや類似したかすかに薄い紅色を呈した. したがって, さらにマツ類およびトウモロコシ花粉中の A および β カロチンの確認のため, 吸着 PPC を行なった. この場合, A アルコール (紫外線下, R_F 0.30 黄色蛍光) と β カロチン (可視光線下, R_F 0.60 黄色) はよく分離し判別容易であるが, マツ類花粉ではこれら両物質は全く認められず, β カロチンおよび

第 1 図 薄層クロマトグラフィーによるビタミン A および β カロチンの分別

薄層, シリカゲル 0.025×20×20 cm.

展開溶媒, 石油エーテル: エーテル: 酢酸 (80:20:4).

展開時間, 室温 1 時間.

○: 紫外線下で黄色蛍光, ただし花粉の場合はすべて微弱.

○: 可視光線下で認められるスポット.

第2図 ビタミンAおよびオニユリ花粉A相当部位の紫外線吸収スペクトル

○—○ Aアルコールのクロロホルム溶出液。
●—● オニユリ花粉のAアルコール相当部位のクロロホルム溶出液。

Aの存在が否定された。その他の花粉では、すべてβカロチン相当のスポットは検出されたが、Aアルコール相当部位とβカロチン以外の黄-橙黄色色素が重複し、確

認が困難であったため、さらに TLC を行なった。その結果、第1図に示すごとく、Aアルコール相当部位は、オニユリ花粉にのみスポットが検出されたが、この部位をクロロホルムで溶出し、GDH 試薬を加えても何ら呈色せず、別にクロロホルム溶出液の紫外線吸収スペクトルを測定したが、ほとんど吸収を示さず(第2図、Aアルコールの最大吸収は335mμ)、オニユリ花粉のこの画分はA以外の蛍光物質と推定された。結局、著者らの供試したいずれの花粉にもAの存在は認められず、マツ類以外の花粉にβカロチンの存在を認めた。

Lebedev⁽²³⁾ は少量のカロチンを培地に添加すると花粉管の伸長を促進すること、Tsinger ら⁽²⁴⁾ はラン科植物花粉が発芽する際、花粉粒中の脂肪球に溶存しているカロチンが花粉管に移行し、生殖過程を刺激することを報告しており、カロチンが受精の極端に緩慢なマツ類に検出されず、受粉後短時間で受精を完了する被子植物花粉にのみ検出されたことは花粉の生殖生理上、興味ある現象と思われる。

B₁ はカボチャ花粉が最も多く、2,153γ% (第1表、以下花粉無水物中の含量で示す) で、オニユリ花粉 (442

第1表 花粉中のビタミン含量

	パンクスマツ	クロマツ	アカマツ	トウモロコシ	カボチャ	オニユリ
水分 %	15.73	17.48	15.74	25.42	16.69	12.64
固形分 %	84.27 100	82.52 100	84.26 100	74.58 100	83.31 100	87.36 100
B ₁ γ%	771.1 915.0	642.8 778.9	630.3 748.0	769.2 1031.4	1794.1 2153.4	386.6 442.5
B ₂ "	951.3 1128.9	761.1 922.3	832.5 988.0	723.2 969.6	1923.8 2309.2	1598.0 1829.2
C mg%	49.36 58.57	60.83 73.72	55.91 66.35	43.99 58.98	34.08 40.91	18.55 21.23
パントテン酸 γ%	715.4 848.9	326.8 396.0	821.1 974.5	666.5 893.7	736.2 883.7	267.2 305.9
ビオチン "	33.1 39.3	33.7 40.9	19.7 23.4	12.4 16.6	13.6 16.3	52.5 60.1
コリン mg%	225.68 267.79	159.71 193.54	171.00 202.94	515.16 690.73	527.74 633.45	295.12 337.79

第2表 花粉中 B₁, B₂, C の分別定量

	パンクスマツ	クロマツ	アカマツ	トウモロコシ	カボチャ	オニユリ
固形分 %	84.27 100	82.52 100	84.26 100	74.58 100	83.31 100	87.36 100
B ₁ γ%	771.1 915.0	642.8 778.9	630.3 748.0	769.2 1031.4	1794.1 2153.4	386.6 442.5
B ₂ γ%	951.3 1128.9	761.1 922.3	832.5 988.0	723.2 969.6	1923.8 2309.2	1598.0 1829.2
C mg%	49.36 58.57	60.83 73.72	55.91 66.35	43.99 58.98	34.08 40.91	18.55 21.23
パントテン酸 γ%	715.4 848.9	326.8 396.0	821.1 974.5	666.5 893.7	736.2 883.7	267.2 305.9
ビオチン "	33.1 39.3	33.7 40.9	19.7 23.4	12.4 16.6	13.6 16.3	52.5 60.1
コリン mg%	225.68 267.79	159.71 193.54	171.00 202.94	515.16 690.73	527.74 633.45	295.12 337.79

r%)を除く他の花粉は 748~1,031 r% の範囲内である。オニユリ花粉以外の含量は、粉乳、肝臓およびパセリ、ピーマン、アスパラガスなどの特殊野菜類に匹敵するが、一般に植物界にこのような高濃度のものは少ない。すでに花粉の B_1 に関しては Sagromsky⁽²⁵⁾ の報告があり、またチアミンピロリン酸を補酵素とするカルボキシラーゼ活性については Okunuki⁽²⁶⁾ により報告されている。 B_1 の分別定量の結果 (第 2 表), EB_1 はマツ類花粉に多く総 B_1 の 42.2~58.0% で、他の花粉では 19.1~32.1% である。発芽時エンドウ種子では EB_1 を、ダイズ種子では FB_1 を増加するといわれ⁽²⁷⁾、また Dandliker⁽²⁸⁾、Cooper⁽²⁹⁾ は花粉の発芽に FB_1 が有効であることを指摘しており、花粉の発芽生理におよぼす FB_1 , EB_1 の重要性が認められている。

B_2 はカボチャ、オニユリ花粉に多くそれぞれ 2,309, 1,829 r% で、他の花粉では 922~1,128 r% である。粉乳、鶏卵、アサクサノリおよびパセリ、コマツナ、ミツバなどの野菜類に匹敵する含量である。堀田⁽³⁰⁾、Cooper⁽²⁹⁾ が花粉の発芽伸長に FR が有効であること、また Okunuki⁽³¹⁾ が花粉中に FAD を補酵素とするジエホラーゼを認めており、 B_2 をさらに FR, FMN, FAD に分別定量した結果、FR は総 B_2 中 42.8~62.8% で、FMN は他の花粉に比し、マツ類花粉に少なく、反対に FAD が多い傾向が見受けられた。

花粉中の C に関しては Weygand⁽³²⁾ によるタンポポ、ウマグリ、アブラナなどの総 C, RC の測定結果が報告されているが、著者らの測定した総 C 含量はオニユリ、カボチャ花粉ではそれぞれ 21.2, 40.9 mg%, 風媒花粉では 58.5~73.7 mg% の範囲内であった。総 C 中の RC はマツ類花粉にとくに多く 71.0~93.5% で、他の花粉では RC の割合が少なく、ことにカボチャ花粉が極端に少なく 5.2% で大部分が酸化型であった。

PA は蜜と花粉を餌とする蜂の分泌物である王乳中に 51.1 mg% と特異的に多く⁽³³⁾、Pearson⁽³⁴⁾ によれば花粉中の PA は王乳の約 1/17 であると、花粉中の PA を測定した結果オニユリ、クロマツ花粉が比較的少なくそれぞれ 305, 396 r% で、他の花粉は 848~974 r% の範囲内であった。ピオチンに関しては後藤⁽¹⁹⁾ の報告があり、また Vasil⁽³⁵⁾ はウリ科植物花粉の発芽伸長にピオチン並びに B_6 が有効であると報告している。花粉中ピオチン含量はオニユリ花粉が 60 r% で他の花粉 (16~40 r%) より比較的多い。コリンはマツ類花粉に少なく

193.5~267.7 mg% で、被子植物花粉では 337.7~690.7 mg% であった。

要 約

風媒花粉としてパンクスマツ、クロマツ、アカマツ、トウモロコシ花粉、虫媒花粉としてカボチャ、オニユリ花粉を用い、ビタミン A および β カロチンを検討し、 B_1 , B_2 , C, パントテン酸, ピオチン, コリンを定量、さらに B_1 , B_2 , C の結合型の分別定量を行なった。

(1) A は供試花粉中いずれにも検出されなかったが、 β カロチンはマツ類以外のトウモロコシ、カボチャ、オニユリ花粉中に存在を認めた。

(2) B_1 はカボチャ花粉がもっとも多く 2,153 r% であった。マツ類では 748~915 r% で、この中エステル型がほぼ半数をしめているが、他の花粉では明らかに遊離型が多い。 B_2 はカボチャ、オニユリ花粉に多くそれぞれ 2,309, 1,829 r%, 他は 922~1,128 r% で、遊離型はいずれも総 B_2 中のほぼ半数 (42.8~62.8% の範囲内) をしめている。FMN は他の花粉に比しマツ類花粉に少なく、反対に FAD が多い。C はマツ類、トウモロコシ花粉に多く 58.5~73.7 mg% で、RC はとくにマツ類花粉に多い。

(3) パントテン酸はオニユリ、クロマツ花粉がそれぞれ 305, 396 r% で、他の花粉は 848~974 r% である。ピオチンはオニユリ花粉に多く 60 r% で、コリンはカボチャ、トウモロコシ花粉に多い (633.4~690.7 mg%)。

終りに臨み、微生物定量に関し援助を与えられた本学教養部、菊池亮介講師に厚く感謝の意を表する。

本研究の要旨は昭和 38 年 4 月 2 日、日本農芸化学会大会で講演した。

- (1) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子: 本誌, 35, 623 (1961).
- (2) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子: 岩手大農報, 6, 6 (1962).
- (3) 勝又悌三, 斗ヶ沢宣久, 小幡弥太郎: 本誌, 37, 439 (1963).
- (4) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 川尻秀雄, 小野寺紀雅: 本誌, 40, 461 (1966).
- (5) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 太田達郎: 本誌投稿中.
- (6) C. J. Koehn, W. C. Sherman: *J. Biol. Chem.*, 132, 527 (1940).
- (7) A. E. Sobel, H. Werbin: *Anal. Chem.*, 19, 107 (1947).
- (8) 藤田秋治, 青山政太郎: ビタミン, 4, 127 (1951).
- (9) 鈴木隆雄: 同上, 13, 212 (1957).

- (10) H. K. Mangold : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 708 (1961).
- (11) 泰 満夫, 泰 正弘 : 日農化東北支部会講演要旨, p. 2 (1963).
- (12) 藤田元典 : ビタミン, **9**, 148 (1955).
- (13) 八木国夫 : 同上, **9**, 349 (1955).
- (14) 八木国夫 : 標準生化学実験, 文光堂, p. 149 (1953).
- (15) 藤田秋治 : ビタミン定量法, 南江堂, p. 542 (1955).
- (16) 藤田秋治 : 同上, 南江堂, p. 589 (1955).
- (17) 東大農化教室編 : 実験農芸化学, 上巻, p. 284 (1960).
- (18) 杉村敬一郎, 宮沢 滋 : 実験化学講座, 生物化学Ⅲ, 丸善, p. 265 (1958).
- (19) 後藤 実 : 薬誌, **76**, 420 (1956).
- (20) D. Glick : *J. Biol. Chem.*, **156**, 643 (1944).
- (21) E. Mameli, U. Carretta : *Chem. Zentr.*, **114**, I, 2000 (1943).
- (22) A. E. Vivino, L. S. Palmer : *Arch. Biochem.*, **4**, 129 (1944).
- (23) S. I. Lebedev : *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **59**, 987 (1948) ; *C. A.*, **42**, 6421 (1948).
- (24) N. V. Tsinger, V. A. Poddubnaya Arnol'di : *ibid.*, **110**, 157 (1956) ; *C. A.*, **51**, 3751 (1957).
- (25) H. Sagromsky : *Biol. Zentr.*, **66**, 140 (1947).
- (26) K. Okunuki : *Acta Phytochim.*, **13**, 93 (1943).
- (27) 中山 包 : 発芽生理学, 内田老鶴園, p. 136 (1960).
- (28) W. Dandliker, W. C. Cooper, H. P. Traub : *Science*, **88**, 622 (1938).
- (29) W. C. Cooper : *Botan. Gaz.*, **100**, 844 (1938).
- (30) 堀田一雄, 滝口きよ子, 大槻喜恵子 : ビタミン, **27**, 192 (1963).
- (31) K. Okunuki : *Acta Phytochim.*, **11**, 249 (1940).
- (32) F. Weygand, H. Hofmann : *Chem. Ber.*, **83**, 405 (1950).
- (33) P. B. Pearson, C. J. Burgin : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **48**, 415 (1941).
- (34) P. B. Pearson : *ibid.*, **51**, 291 (1942).
- (35) I. K. Vasil : *Am. J. Botany*, **47**, 239 (1960).
-