

## 牧草炭水化物の生理化学的研究 第3報

誌名	日本草地学会誌
ISSN	04475933
巻/号	162
掲載ページ	p. 112-118
発行年月	1970年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所  
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



## 牧草炭水化物の生理化学的研究

### 第3報 秋期間におけるオーチャードグラス葉鞘

#### フラクトサンの重合度の変化

小島邦彦\*・伊澤健

東北大学農学部附属農場 (宮城県玉造郡鳴子町)

#### 緒言

多くのイネ科牧草中に含まれるいわゆる可溶性炭水化物は、通常グルコース、フラクトースおよびシュクロースなどの糖類と<sup>1,2)</sup>、重合体であるフラクトサンが主要なものとされている。このフラクトサンは寒地型イネ科牧草中の茎葉基部に貯蔵態炭水化物として比較的少量に含まれ<sup>3,4)</sup>、生育過程の推移<sup>5,6)</sup>、窒素肥料の施用<sup>7,8)</sup>あるいは気温の変化<sup>4,9)</sup>など環境条件に応じて量的に著しく変動しやすい非構造多糖類 (Nonstructural Polysaccharide) として知られている。

このような植物体中の炭水化物組成を分別定量するのに、溶媒として通常 80% アルコールが使用され<sup>10,11)</sup>、糖類は可溶区分に、フラクトサンは不溶区分に分離される。可溶区分の内容については、さらにペーパークロマトグラフィなどによって、各糖類を容易に分離定量することができる。

他方不溶区分におけるフラクトサンについては、イネ科牧草の多くのものではフラクトースからなる単純多糖類といわれ<sup>12,13)</sup>、その内容といえは分子サイズまたは重合度といった性質が当面の問題となってくる。しかしこれに対する簡便な定量手段がないため、これまで牧草の生理学的観点からの考察は極めて少いと云わざるを得ない。僅かに最近なされた SMITH ら<sup>13,14)</sup> のエタノール溶媒による溶性区分法および SUZUKI<sup>15)</sup> のゲル濾過法の適用例を挙げ得るにすぎない。ことに後者の分析手段は簡単でしかも効果的方法であるにもかかわらず、イネ科牧草類のフラクトサンに関する限り他に応用例をみない。

本報では、秋から冬にむかう気温の低下にともなう、オーチャードグラス地上部の炭水化物組成の量的ならびに質的推移を調べるにあたり、フラクトサンに対しては分子篩効果を利用した Sephadex Gel カラムクロ

マトグラフィを適用して、その重合度における相対的な変動について特に注目した。

#### 材料および方法

**分析試料の調製** 供試材料としてのオーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L., 雪印改良) は 1968 年春、条播とし、農学部附属川渡農場の慣行にしたがって栽培し、同年 9 月 18 日に第 2 回目の刈取を実施した。同月 24 日、草丈約 15 cm に達した時に第 1 回目の試料を、以後 12 月初旬まではほぼ 20 日おきに試料を採取した。植物体は葉身と葉鞘に分け、100°C、30 分加熱して酵素反応を止め 70°C で乾燥した。試料の採取時間は午前 9 時から正午の間とした。乾燥試料はあらかじめ粉砕器にかけて粗粉末とし、さらにボールミルで一夜粉碎して 100 メッシュ以下の粉末とした。

**炭水化物組成の分別定量法** 図 1 にその概要を記した。風乾試料 0.2~0.5 g に 85% (V/V) エタノール 20 ml を加え室温にて 1 時間振とうしたのち遠心分離した。この抽出操作を 3 回繰返すことによって十分その目的を達した。アルコール抽出液は磁製皿にとり、50°C 以下の熱風で蒸発乾固し、水を加えて一定容とした。この際飽和醋酸鉛 0.3 ml を加えて除蛋白し、過剰の醋酸鉛は飽和修酸ソーダを加えて除去した。抽出区分には主として低分子糖類が含まれ、Anthrone 法<sup>16)</sup>または加水分解後 Somogyi 法<sup>17)</sup>で定量した。一部は濃縮してペーパークロマトグラフィによって各糖を分離、熱水で溶出して定量を試みた。

アルコール抽出残渣については室温下で 1 時間水で振とう抽出すること 3 回、除蛋白してフラクトサン試料溶液を得る。定量にはフラクトースまたはフラクトサンに特異な Seliwanoff 法<sup>18)</sup>を用いた。

**フラクトサン試料の調製** 葉鞘の乾燥試料の一部からは次の如くフラクトサンを調製して、ゲル濾過の実験に

\* 現在は東北大学農学部 (仙台市北六番丁)

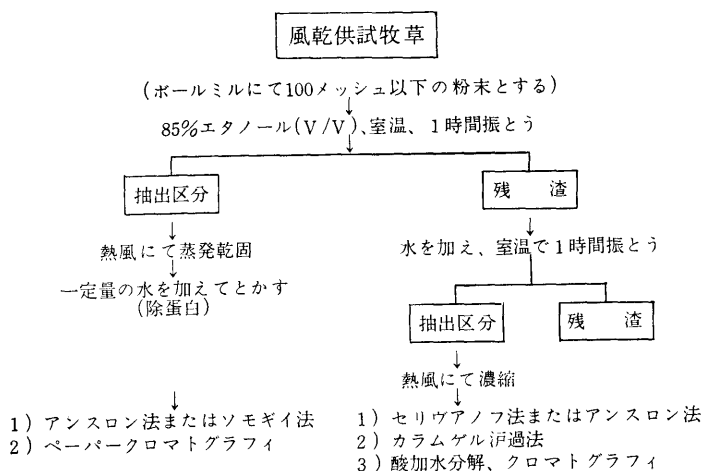


図 1. 牧草炭水化物の分別定量法

供試した。風乾試料 1～2 g からの水抽出液 20 ml に上記の如く、醋酸鉛を加えて除蛋白したのち、5 倍量の無水エタノールを加えて -5°C に約 1 週間保蔵した。遠心分離して得た沈澱を無水アルコールで 2 回洗滌、室温下に真空デシケーター中で乾燥し、0.2 g～0.5 g の粗フラクトサンの白色粉末を得た。これは 98% 以上の高純度のもので、下記ペーパークロマトグラフィにおいて 250 μg のフラクトサンをスポットしても遊離の糖類および短鎖フラクトサン(下記)は全く検出されなかった。

ペーパークロマトグラフィ；滷紙には東洋滷紙 No.51 (40 cm×40 cm) を、展開溶媒には *n*-ブタノール醋酸；醋酸；水=5：3：1 (V/V) を使用した。20°C 恒温下に下降法、16 時間の展開を試みた。糖の検出には酸性フタル酸アニリンと P-アニシジンの両試薬を同時併用した<sup>19)</sup>。

クロマトグラムにおける各糖の分離は極めて良好であったが、アルコール抽出液の糖区分にはスポット位置におけるフラクトサンに隣接してラフィノースとほぼ同位置に低分子のフラクトサンが検出された。一般に上記展開溶媒を使用した場合、フラクトサンは 3 ないし 5 程度の重合度 (DP.) をもつものがこの位置に移動され、DP. 7 程度以上のもものでは 2 日間の展開によっても原位置にとどまるという<sup>15)</sup>。本報では前者を短鎖、後者を長鎖の各フラクトサンとして便宜的に区別した。

ゲルカラムクロマトグラフィ；Sephadex ゲルの G-75 タイプを使用し、直径 1 cm、高さ 90 cm のベッドを用いた。展開溶媒として 0.3% 塩化ナトリウムを 18 ml/

hr の速さで溶出させた。フラクトサン試料 5 mg を 0.5 ml の 0.3% 塩化ナトリウムに溶解してカラムに加えた<sup>20)</sup>。溶出液は 2 ml 毎に採取し、前記比色法によってフラクトサンを定量した。

### 結果および論議

#### 茎葉炭水化物組成の消長

多年性イネ科牧草中の可溶性炭水化物含量は、外的環境とくに気温に著しく支配されることが多く、年間を通じてたえずそのレベルの変動が起っている。オーチャードグラス茎葉基部または葉鞘における所謂貯蔵態炭水化物についてみると、一般に 5 月から 6 月にかけてフラクトサン

は高いレベルで維持されるが、夏期の高温時には一時的に消耗されて減少する。つづいて 9 月頃から冬期にいたる冷涼な期間に再び蓄積がおこる<sup>6)</sup>。

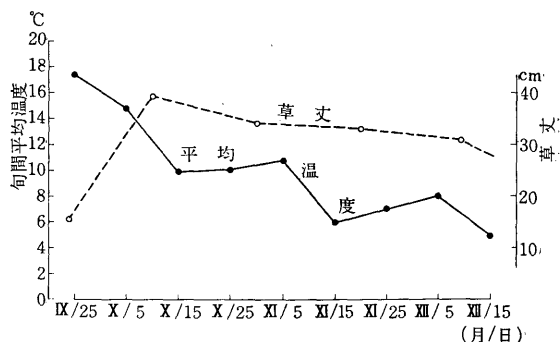


図 2. 気温の変化とオーチャードグラスの生育状況

図 2 は 宮城県玉造郡川渡農場における 1968 年 9 月下旬から 12 月中旬にかけての 旬間平均気温と、オーチャードグラスの生育状況をしらべた結果である。気温は 9 月から 12 月にかけて次第に低下し、18°C 附近から 5°C 附近にいたる。この間 11 月と 12 月に一度ずつ数種の降雪がみられたが根雪とはならなかった。牧草の草丈は、10 月上旬までは増加し、その後気温の低下にたがって古葉の枯死、落葉が顕著となり、生長は次第に減退の一途をたどった。

図 3 はこの生育の減衰期間における地上部の炭水化物組成の消長を示すものであり、ほぼ 20 日おきに試料を採取し、葉身と葉鞘にわけて分析を試みた。

葉鞘中のフラクトサンの含有率は、9 月から 10 月の

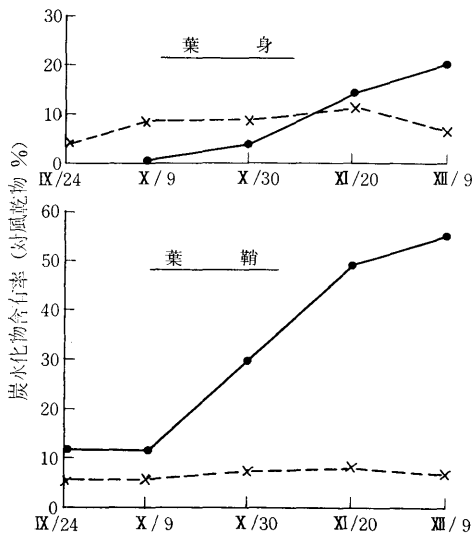


図 3. 葉身・葉鞘中の炭水化物の経時的変動  
 { —•— 85% エタノール非可溶性フラクトサン  
 { ...× 85% エタノール可溶性糖類

試験開始初期には 10% 程度にすぎないが、以後気温の低下にしたがって増加し、12月上旬には 50% 以上にも達する。85% エタノール可溶性糖類は 5~8% にすぎず、経時的に大きな変動を示さない。

葉身は葉鞘に比してエタノール可溶性糖類の含有率が割合に高いが、フラクトサンの含有率は著しく低く、12

月初旬にいたっても 20% に達するにすぎない。しかし葉身に含まれるフラクトサンも、葉鞘におけると同様、気温の低下にしたがって含有率の増加する傾向は明らかに認められる。

次に葉鞘中の可溶性炭水化物のうち、まずアルコール可溶区分に含まれる各糖類の組成を明らかにするため、ペーパークロマトグラフィによって分離定量を試みた。その結果を表 1 に示す。なおペーパークロマトグラフィにおける糖の回収率は、表示の如く 90% 前後である。

85% エタノール可溶性炭水化物にはグルコース、フラクトース、シュクロースおよびフラクトサンの少量が検出され、合計してみると 9 月末から 10 月初旬には 5% 前後とやや低く、10 月末から 12 月にかけて僅かに増加する傾向にある。糖類の中では 9 月 24 日の試料（以下 IX/24 試料という形で略記する）を除きいずれもシュクロースの含有率が 3~5% と最も高く、次いでフラクトース、グルコースの順となる。

エタノール可溶区分における混入フラクトサンは風乾物に対して 1% 以下にとどまり、日数の経過にしたがって増加の傾向にある。そして長鎖フラクトサンの約 2 分の 1 が短鎖フラクトサンとなっている。しかし表 2 から明らかなように、IX/24~X/30 の期間にはエタノール不溶性フラクトサンの含有率が比較的低いので、全フラクトサンに対するエタノール可溶区分への混入率は 3~4% と、晩秋の試料における 1.6% に比して大きい数値を示す。

表 1. 85% エタノール可溶区分における炭水化物の分別定量 (対風乾物 %)

試料採取 (月/日)	炭水化物			フラクトサン		合計	PPC* 回収率
	フラクトース	グルコース	シュクロース	短鎖	長鎖		
IX/24	2.49	0.41	1.49	0.08	0.23	4.70	86
X/9	1.13	0.41	3.49	0.16	0.30	5.49	89
X/30	1.16	0.45	4.40	0.35	0.55	6.91	91
XI/20	1.43	0.67	3.69	0.27	0.41	6.47	86
XII/9	1.46	0.60	3.03	0.26	0.55	6.90	91

\* ペーパークロマトグラフィ

表 2. 葉鞘フラクトサンの 85% エタノール可溶区分への分配率 (対乾物 %)

試料採取 (月/日)	抽出区分			C. 残渣中のフラクトサン	可溶区分への分配率* (%)
	可溶区分				
	A. 短鎖	B. 長鎖	A+B		
IX/24	0.09	0.27	0.36	11.8	3.0
X/9	0.18	0.34	0.52	11.3	4.4
X/30	0.39	0.60	0.99	29.6	3.2
XI/20	0.31	0.48	0.79	49.3	1.6
XII/9	0.29	0.61	0.90	55.0	1.6

\*  $\{(A+B)/(A+B+C)\} \times 100$ , 全フラクトサンに対する比率。

これまで気温の変化と可溶性炭水化物の消長との関係については多くの報告がなされている。たとえば江原ら<sup>21)</sup>は、寒地型牧草中のフラクトサン含量は、15°Cから25°Cと温度の上昇とともに減少し、さらに全糖、還元糖、非還元糖などの含有量も、幾分減少することを報告し、暖地における飼料作物の品質低下の一因をなすものとしている。SULLIVAN及びSPRAGUE<sup>9)</sup>によるとペレニアルライグラスのフラクトサンは10~15.5°Cで速かに株中に蓄積されるが、21~26.5°Cでは変動が少く、26.5°C~32°Cで減少するという。またSMITH<sup>2)</sup>はチモシーにおける可溶性炭水化物の含有率は、高温下より低温下に生育した植物体に高く、温度はフラクトサンの蓄積レベルに影響したが、全糖のレベルにはほとんど影響をあたえないとしている。

**葉鞘フラクトサンの Sephadex ゲルカラムクロマトグラフィにおける挙動**

上記の実験でオーチャードグラスのフラクトサンは秋期間に、地上部とくに葉鞘部にかなり高濃度で蓄積されることがわかったが、この多糖類の分子サイズまたは重合度といった質的变化が同時に起っていることは想像に難くない。図4はX/9とXII/9に採取した葉鞘より調製したフラクトサンのSephadexゲルカラムクロマトグラフィにおける溶出曲線を示す。

X/9試料はXII/9試料に比して溶出速度はおそく、しかも広範囲にわたって溶出してくる。このことは前者のフラクトサン分子の不均一性を示唆するものであり、いわゆる多分散の傾向を示している。その溶出位置はDextran 20 ( $\bar{M}_w=22,300$ ,  $\bar{M}_n=15,000$ ) と Dextran 10 ( $\bar{M}_w=11,200$ ,  $\bar{M}_n=5,700$ ) との間にまたがる。他方XII/9試料は溶出曲線のピークがややシャープとなり、Dextran 20 とほぼ同位置かその直前に溶出する。

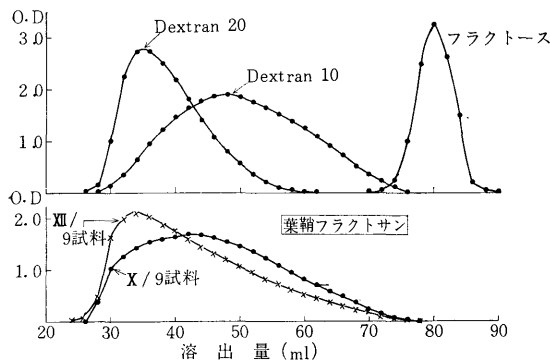


図4. Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィにおける葉鞘フラクトサンの溶出曲線 (アンスロン法にて定量、縦軸は625 m $\mu$ における吸光度)

なお本実験条件下ではXII/9試料はDextran 20と同様Void Volume近くに溶出し、正確な重合度の推定は困難である。したがってこの場合、クロマトグラフィにおける支持剤としてはG-100またはG-200など架橋度のより疎なタイプのゲルを使用すべきであろう<sup>20)</sup>。

以上の実験結果から葉鞘中に貯えられるフラクトサンは気温の低下にしたがってその含有率が增加するのみならず、質的にも変化しており、重合度を増してより高分子の状態に貯蔵されるものと推定される。

しかし図4の溶出曲線の型がシャープな正規分布を示さないという事実は、重合体の不均一性という同植物フラクトサン本来の性質のあらわれによるものではなく、クロマトグラフィ技術における人為的結果、たとえばフラクトサン試料調製の不充分、展開溶媒の不適性あるいはゲルの不均一な填充などによる可能性も考えられる。

通常、植物体中に含まれるフラクトサンは、高濃度のアルコールによって短鎖のもののみが抽出され、長鎖のものは低濃度のアルコールまたは水によって抽出される<sup>23)</sup>。そこでオーチャードグラス葉鞘の乾燥粉末試料から、85%エタノールで最初糖類ならびに短鎖フラクトサンを抽出除去し、次にその残渣から各濃度段階のエタノールで抽出されるフラクトサンの比率を調べてみた。その結果を図5に示す。

X/9試料ではアルコール濃度の減少にしたがって、抽出されるフラクトサンの割合はほぼ直線的に増加する。他方XII/9試料ではアルコールの高濃度域における抽出割合は低く、低濃度域においてそれが急激に増加する。この結果はX/9試料のフラクトサンは低分子のものから高分子のものまで比較的均一に混じた多分散の様相を呈し、XII/9試料では高分子のフラクトサンの割

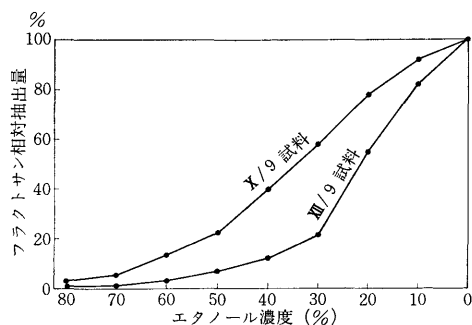


図5. エタノール濃度とフラクトサンの抽出量との関係

の多いという前記のゲル濾過実験の結果に一致する。

SMITH らは上記のようなアルコール溶媒による溶性区分法を使って、イネ科牧草中のフラクトサンの分子サイズにおける生理的変動についていくつかの実験を試みている。たとえば開花期におけるチモシー茎葉部で含有率の高くなる低温処理下では、高温処理下のものに比してより長鎖のフラクトサンが出現することを報告しており<sup>22)</sup>、これはわれわれのゲル濾過の結果を裏づけるものである。またチモシー茎葉部のフラクトサンは生育 stage や部位によって分子量が変化するものであって、成熟期に水溶性炭水化物の増加が著しく、特に長鎖フラクトサンがその主要なものであり、他方活動期にはそれが量的にも少くフラクトサンは比較的短鎖の形をとるとい<sup>24)</sup>。

われわれのゲル濾過法による結果や上記 SMITH らの溶性区分法による結果から、一般にイネ科牧草中に含まれるフラクトサンの分子量はその含有量と密接な関係があるらしく、フラクトサン含有率が高いレベルで維持される環境条件下では、重合度が増大する傾向にあるとい<sup>24)</sup>。

秋期から冬期にかけて葉鞘フラクトサンの含有率の増大、および分子サイズの変化という現象は、気温の低下という環境の変化のみならず、植物の Aging など他の要因にも関連すると考えられ、その生理的意義については今後数多くの成績の集積をまたねばならないが、現時点では次のように考えている。すなわち葉鞘は貯蔵態炭水化物フラクトサンの主要な集積の器官であって、越冬中の基礎生活維持エネルギーおよび翌春の発育開始時のヘテロトローフの過程におけるエネルギー確保のため、また体構成物質の素材供給のため、越冬前に多量に葉鞘基部に確保されねばならない。もしこの多量の炭水化物を蔗糖の如き低分子の糖類の状態では細胞中に集積しなければならぬとすると、浸透圧の異常増加によって細胞は破壊しその機能を失ってしまうであろう。しかし特に寒地型イネ科牧草葉鞘部にあつては、気温の低下に伴ないポリメラーゼの働きによってフラクトースを高分子の状態では貯蔵し、細胞原形質内の浸透圧を一定に保持するという一種の自衛手段を講じているのではないかと想像される。のみならずこのような重合体で貯蔵しておかれることが、低分子の糖類より各種酵素により分解消費に対して、生理活性的により安定な状態にあるといえるであろう。

今後の当面の課題として、外的環境条件に応じて、イネ科牧草葉鞘におけるフラクトサン集積、その分子量の増大、そして細胞原形質の浸透圧の変化など相互の関係

を明らかにすることが、気温の低下に伴なうフラクトサンの集積とその分子量の増大に関する意義をときあかす鍵となるであろう。

## 要 約

9月下旬から12月上旬にわたって、オーチャードグラス葉中に含まれる炭水化物組成の消長が調べられた。

85% エタノールに可溶性の炭水化物は葉鞘中で風乾物に対して5%前後、葉身中で5~10%と実験期間を通じて比較的一定に保たれ、量的にはシュクロース、フラクトース、グルコースの順に多く含まれる。このアルコール可溶区分には比較的短鎖のフラクトサン (DP. 3~6) も含まれ、全フラクトサンに対して、9月下旬~10月上旬には3~4%、10月下旬~12月初旬には1~2%の割合を占める。

葉鞘中のフラクトサンは10月初旬の試料では風乾物に対して約10%にすぎないが以後次第に増加して12月下旬には50%以上に達する。葉身中のフラクトサンも同様冬期に近づくにつれて増加の傾向を示すが、含有率は葉鞘に比して低く12月初旬でも約20%に達するに過ぎない。

葉鞘フラクトサンについてはその重合度の変動を、ゲル濾過法ならびにアルコール溶性区分法によってさらに検討が加えられた。

10月初旬に採取した試料中のフラクトサンは、Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィにおいて Dextran 10 ( $\bar{M}_n=57,000$ , DP. 32) と Dextran 20 ( $\bar{M}_n=15,000$ , DP. 83) の間にまたがって、かなり広範囲にわたって溶出した。他方12月初旬の試料中のフラクトサンは Dextran 20 とほぼ同等またはより早い速度で、しかも比較的狭い範囲で溶出した。

オーチャードグラス葉中のフラクトサンは秋期間には、葉鞘に単に蓄積されるのみならず、集積量に応じて分子の重合度を増大した形で貯蔵されるものと推定される。

謝辞：本研究に際し終始有益なご助言を賜った東北大学農学部、林兼六助教授、同大平幸次助教授、同藤原彰夫教授に謹んで感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) NORMAN, A.G.: *Agr. J.* **31**, 751 (1939)
- 2) GROTELUESCHEN, R.D. and SMITH, D.: *Agr. and Food chem.* **15**, 1048 (1967)
- 3) SPRAGUE, V.G. and SULLIVAN, J.T.: *Plant Physiol.* **25**, 92 (1950)
- 4) 小島邦彦・伊澤 健: 日草誌, **13**, 39 (1967)

- 5) OKAJIMA, H. and SMITH, D.: *Crop Sci.* **4**, 317 (1964)
- 6) COLBY, W.G. *et al.*: *Agr. J.* **57**, 169 (1963)
- 7) SMITH, D and JEWISS, O.R.: *Ann. Appl. Biol.* **58**, 145 (1966)
- 8) GRIFFITH, W.K. *et al.*: *Agr. J.* **56**, 437 (1964)
- 9) SULLIVAN, J. T. and SPRAGUE, V. G.: *Plant Physiol.* **24**, 706 (1949)
- 10) SHEARD, R. W.: *J. Sci. Fd. Agric.* **18**, 339 (1967)
- 11) 小島邦彦・林 兼六: 日草誌, **10**, 199 (1965)
- 12) PERCIVAL, E.G.: *British J. Nutr.*: **6**, 104(1952)
- 13) HIRST, E.L.: *Proc. Chem. Soc.* 193-204 (1957)
- 14) SMITH, D. and GROTELUESCHEN, R.D: *Crop. Sci.* **6**, 263 (1966)
- 15) SUZUKI, M.: *Can. J. Bot.* **46**, 1201 (1968)
- 16) YEMM, E.M and WILLS, A.J.: *Biochem. J.* **57**, 508 (1954)
- 17) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.* **160**, 61 (1945)
- 18) McRARY, W. L. and SLATTERY, M. C.: *J. Biol. Chem.* **157**, 161 (1945)
- 19) 川村信一郎・中村 博: 農化誌, **28**, 851 (1955)
- 20) KIRSTI, A. *et al.*: *J. Chromatog.* **28**, 69(1967)
- 21) 江原 薫・田中重行: 日作紀, **29**, 304 (1961)
- 22) SMITH, D.: *Crop Sci.* **8**, 331 (1968)
- 23) GROTELUESCHEN, R.D. and SMITH, D.: *Crop. Sci.* **8**, 210 (1968)
- 24) SMITH, D.: *Crop Sci.* **7**, 62 (1967)

(昭和45年1月29日受理)

## Physiological Studies on Carbohydrates of Forage Plants

### 3. Quantitative and qualitative variation of fructosan in leaf sheath of orchardgrass during autumn

Kunihiko OJIMA and Takeshi ISAWA

Faculty of Agriculture, Tohoku University  
(Kita-6-Banchio, Sendai)

#### Summary

Variation of carbohydrate contents in the top of orchardgrass with the descending of temperature during autumn was investigated.

Carbohydrates extractable with 85% ethanol were much sucrose, fructose and glucose in descending order, and the total amounts of sugars were not so variable, about 4 to 5% in leaf sheath and 5 to 10% in leaf blades, as fructosan during the three months of the test period. In the ethanol extractable fraction, the shorter chain of fructosan was also contained 3 to 5% within the total fructosan early and 1 to 2% late in the that period.

Fructosan in the leaf sheath was about 10% of the air dry matter early in October, but increased afterwards and attained to 50% over early in December. Fructosan in leaf blade also increased with descending temperature as well as in the leaf sheath, but its amount was not so much only 20% even in early December.

Variation in molecular weight of fructosan in leaf sheath during Autumn was also investigated by methods of gel filtration and of fractionation with various concentrations of ethanol.

Fructosan from leaf sheath sampled early in October was effluented in the wide range of volume between Dextran 10 ( $\bar{M}_w$ -1,1200,  $\bar{M}_n$ -5,700) and Dextran 20 ( $\bar{M}_w$ -22,300,  $\bar{M}_n$ -15,000) by means of Sephadex G-75 gel column chromatography. Fructosan from leaf sheath sampled early in December, on the other hand, was effluented in the volume corresponding with dextran 20 or larger.

The alcohol extractable amount of fructosan from dry meal sample of leaf sheath increased linearly with decreasing ethanol concentration in X/9th sample, but increased abruptly at low concentrations of ethanol in XII/9th sample.

It may be concluded that fructosan in the leaf sheath increases not only in its amounts, but also in degree of polymerization with the descending of temperature in Autumn.

(J. Japan. Grassl. Sci., 16, 112~118, 1970)