



土壌アントラキノンの分布特性と機能に関する研究

鈴木, 武志

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Date of Publication)

2007-11-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1673

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3129783>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001673>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

土壌アントラキノンの分布特性と機能
に関する研究

平成9年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

鈴木 武志

目 次

第1章 序論	1
第2章 日名倉山土壌からのアントラキノンの単離・同定	5
第1節 試料および方法	5
1.土壌試料	5
2.抽出および化合物の単離	7
3.化合物Eの還元分解	8
4.化合物Dのアセチル化	10
5.化合物の構造決定	10
第2節 結果および考察	11
第3節 要約	25
第3章 主要な土壌アントラキノンの定量法の開発	26
第1節 試料および方法	26
1.標品の調整	26
2.土壌試料	27
3.土壌抽出試料の調整	27
4.薄層クロマトグラフィー	28
5.デンシトメトリー	29
第2節 結果および考察	31
1.デンシトメトリーにおける測定条件について	31
2.検出限界および検量線の直線性について	31
第3節 要約	34

第4章 土壤中の主要アントラキノンの分布特性	35
第1節 試料および方法	35
1. 土壌試料	35
2. 根圏土壌と非根圏土壌との分離	46
3. 一般理化学性	46
4. 主要な土壌アントラキノンの定量法	47
第2節 結果および考察	49
1. 表層土壌における分布	49
2. 土壌断面における垂直分布	53
3. 根圏土壌と非根圏土壌におけるアントラキノンの分布	65
4. 草原の森林化に伴う主要な土壌アントラキノン含量の変化	66
5. 総合考察	68
第3節 要約	69
第5章 土壌アントラキノンの機能	70
第1節 試料および方法	71
1. Chrysotalunin のアルミニウム錯体の合成	71
2. 生物検定	71
第2節 結果および考察	71
1. Chrysotalunin のアルミニウム錯体の合成	71
2. Chrysotalunin のアルミニウム錯体の機能	73
第3節 要約	75
第6章 総合考察	76
謝辞	79
引用文献	80

第 1 章 序論

アントラキノン(anthracene-9,10-dione)誘導体は、産業や医薬の分野で主要な化合物群の 1 つである。産業の分野では、古代エジプト時代から染料として用いられ(西, 1985), 今日に至っても食品, 化粧品, 染髪剤, 絵の具等の様々な着色剤として広く用いられている。また, 医薬の分野では, 9 世紀初めからアラビアで下剤として, 中国では, 抗ガン性生薬(羊蹄根, 虎杖, 大黃)の主成分として知られてきた(宮田, 1981)。今日では, 抗生物質や下剤の調合剤として多用されているが, その一方で, 毒性や発ガン性についての研究も数多く報告されており(Sendelbach, 1989), 広く注目されている化合物の 1 つである。

自然界においては, 高等植物, 昆虫, 地衣類, 糸状菌の二次代謝産物として約 400 種類近くのアントラキノン誘導体が知られている。これは, キノン化合物として最も大きなグループに相当し, 研究対象となってきたその歴史的背景から見ても, 最も重要な化合物群に位置づけられている(Thomson, 1971)。また, アントラキノン誘導体は, 生物体中だけではなく, 瀝青質岩の化石その他地質的堆積物中に存在することも知られている(Treibs & Steinmetz, 1933; Dunning 1963)。

土壌学の分野でアントラキノンという言葉が初めて登場するのは, 土壌腐植酸のアルカリ過マンガン酸分解後の分解産物中にアントラキノンやアントラセンが存在することが確認された報文(Kumada et al., 1961)である。同様の結果は, Cheshire ら(1967)によっても得られている。また, 数種のアントラキノンの酸化重合物が, スペクトル分析の結果から腐植物質と大変類似しているという報告もある(Saiz-Jimenez et al., 1972)。そして, これらの結果をもとに, アントラキノンは土壌腐植の構成成分の 1 つとして認識されている。

直接土壌から初めて単離されたアントラキノンは, 当時, 新規化合物であった chrysotalunin (1,8,1',8'-tetrahydroxy-3,3'-dimethyl-7,7'-bianthraquinone; 以下 CLN)である(McGrath, 1967)。CLN は発見当時から 30 年以上を経た今日に至るまで, 土壌以外から単離された報告はなく, その生産者(由来)もわかっていない。しかし, 土壌中での CLN 含

量は、アイルランドのヒース植生下の腐植質土層(腐植質ポドゾル)で 120 mg kg^{-1} (McGrath, 1971), 日本のササ植生下の表層土下部(黒ボク土)で約 50 mg kg^{-1} (Fujitake et al., 1992), ニュージーランドのカウリマツ植生下の腐植質土層(カウリポドゾル)で約 200 mg kg^{-1} (Foo & Tate, 1977)も確認されており, 世界各国の土壤に存在する事が知られている. このことは土壤中の非腐植物質の含量として考えれば, 最も高含量に存在する化合物の1つであるといえる.

最近, 高速液体クロマトグラフィーを用いた迅速で精密な CLN の定量法が確立され (Fujitake et al., 1991a), 日本の無作為に選んだ 90 地点におよぶ表層土壤中の CLN 含量が測定されている. これによれば, CLN は全ての土壤に存在し, 土壤中に普遍的に存在する化合物であることが指摘されている (Fujitake et al., 1991b). また, 土壤断面での垂直分布ではポドゾル, 黒ボク土, 褐色森林土, 赤色土の土壤で最表層部より表層下部で含量が高いことが報告されており (Fujitake et al., 1992a), 土壤有機物としては特異な分布様式を示すことが明らかになっている.

ところで, CLN 以外のアントラキノンについて着目して文献を整理すると, アイルランドと日本の一部の土壤から, physcion (3-methyl-6-methoxy-1,8-dihydroxyanthraquinone; 以下 PYS), chrysophanol (3-methyl-1,8-dihydroxyanthraquinone; 以下 CPL), emodin (1,6,8-trihydroxy-3-methylanthraquinone; 以下 EMD), skyrin (1,6,8,1',6',8'-hexahydroxy-3,3'-dimethyl-5,5'-bianthraquinone; 以下 SKR), chrysin (1,8-dihydroxyanthraquinone), 7,7'-biphyscion (1,8,1',8'-tetrahydroxy-3,3'-dimethyl-6,6'-dimethoxy-7,7'-bianthraquinone; 以下 7BP) の6種のアントラキノンが単離されていることがわかる. また, Fujitake (1991)によると, 二次元薄層クロマトグラフィーを用いて検索した結果, 日本における主要アントラキノンには, CLN を筆頭に 7BP, PYS, CPL と2つの未同定化合物であることが報告されている. この中で, CLN と 7BP は生物体から単離された例のない特殊な化合物であり, したがって, 2つの未同定の化合物も生物体から得られたことがない特殊な化合物である可能性が高い.

これらのアントラキノンの共通骨格はペリ位に hydroxyl 基があることで, 土壤の多価カチオンとのキレート作用を予想させる. また, 医薬や繊維の分野では, アントラキノ

ンのキレートに関連する論文も多い。実際、PYSは試験管内の実験で、鉄とのキレート化合物を生成することが報告されている(Engstrom et al., 1980)。同様の部分構造をもつ 4,9-dihydroxypelyrene-3,10quinone 誘導体が土壤中の無定形の酸化鉄と結合態で存在するとの Nakabayashi ら (1982) の報告からも、土壤中のアントラキノンは多価カチオンと複合体を形成する可能性は極めて高く、アントラキノンの土壤中での存在を把握することは、土壤の有機無機複合体の研究においても興味深いと考えられる。

また、アントラキノンは、酸化還元反応や光増感酸化反応に関与すると考えられる carbonyl 基や hydroxyl 基を持つために、抗ガン性、抗菌性、毒性などに加えて他感作用などの機能を有することが予想されている(藤井・土屋, 1993)。この他感作用については、その実例として、水耕栽培等での実験であるが、オオイタドリ (*Polygonum sachalinense* FR.) の根茎中に含まれる EMD と PYS がレタス等の苗床試験でそれぞれ、100ppm ($3.7 \times 10^{-4} \text{M}$) と 200ppm ($7.0 \times 10^{-4} \text{M}$) で地上部と地下部の成長を阻害し(Inoue et al., 1992)、細菌の *Rhodo discolor* が生産する SKR は 0.54ppm ($1.0 \times 10^{-6} \text{M}$) でトマトの地上部の成長を阻害する(Gäumann & Obrist, 1960) という報告がある。このようなアントラキノンは生物に対して生理活性を示し、土壤中でその機能を発現することが考えられる。しかし、これらの化合物が様々な土壤中にどのような含量で存在し、また、普遍的に存在すると考えられる CLN がどのような機能を示すのかは不明である。

EMD, PYS, CPL の様に、1 と 8 位に hydroxyl 基を持つアントラキノンは、生物体では acetate-malonate 経路で生産され、体内を移動し、体外に放出されたり、体内に蓄積されたりすることが知られている(Thomson, 1971)。また、これらの化合物は、二次代謝産物ではあるが生理活性などの機能を持ち、何らかの形で生産者の役にたっていると考えられている。化合物の反応に関与すると考えられる各種の無機化合物を包含する土壤では、生物とは違った化合物の生成過程があり、土壤固有の有機化合物が存在し、それらが生物に対してある種の機能を持つことも考えられる。その代表例が土壤アントラキノンのことである。どのような機能を持つかはまだわかっていないが、生体から単離された例のない CLN が土壤中に普遍的に存在する事実から、土壤のアントラキノンは生物由来のアントラキノンの生成過程や挙動とは全く違うことに起因することが予想される。しかし、生

物を対象に化合物の構造や機能などが盛んに研究されている天然物有機化学的な視点でもって、土壌のアントラキノン誘導体を対象に研究をおこなった例はみられない。

本研究では、土壌のアントラキノンの生成過程や挙動および機能を明らかにすることを目的に、天然物有機化学的な視点でもって土壌のアントラキノン誘導体の研究を行った。まず、未同定の主要アントラキノンの構造を明らかにし、主要アントラキノンの定量法を確立し、定量的にその分布特性を調べた。さらに、CLN とその生成要因や挙動に関係あると思われるアルミニウムの錯体を作製し、土壌中における植物に対する作用について検討した。

第2章 日名倉山土壌からの主要アントラキノンの単離・同定

天然物有機化学の分野においては、生物を対象に化合物の構造や機能が盛んに研究されているが、土壌を対象としたものは少ない。土壌においても生物とは違った化合物の生成過程があり、土壌固有の有機化合物が存在し、それらがある種の機能を持つと思われる。土壌中のアントラキノンは、アイルランドで chrysotalunin (CLN), chrysophanol (CPL), physcion (PYS)(McGrath, 1972)が、カナダ(McGrath, 1972)とニュージーランド(Foo & Tate, 1977)では CLN が、日本では、CLN, CPL, chrysazin, skyrin, 7,7'-biphyscion (7BP), emodin の他に、oxyskyrin と予想される化合物が(Matsui & Kumada, 1974; Fujitake & Azuma, 1991; Fujitake 1991), また、旧ソビエトでは、emodin と CPL と予想される化合物(Kolesnikov et al. 1978)が検出されている(Fig. 2-1)。しかし、Fujitake(1991)によれば、これらの化合物の中で主要な化合物は CPL, PYS と生物体から単離された例のない CLN, 7BP と未同定の2つの化合物であると報告されており、未同定の化合物も生物体から単離された例のない化合物である可能性は高い。

この章では、Fujitake(1991)の二次元展開薄層クロマトグラフィーを用いて、前述の未同定アントラキノンの多量に含まれる、兵庫県の日名倉山土壌(黒ボク土)を用いて、それらのアントラキノンの単離・同定を試みた。

第1節 試料および方法

1. 土壌試料

兵庫県佐用郡日名倉山の A 層土壌(0-7cm, 黒ボク土, Umbric Andosol)を用いた。日名倉山土壌の断面写真を Fig.2-2 に示した。土壌の概略と土壌断面調査にもとづく断面記載を以下に示す。

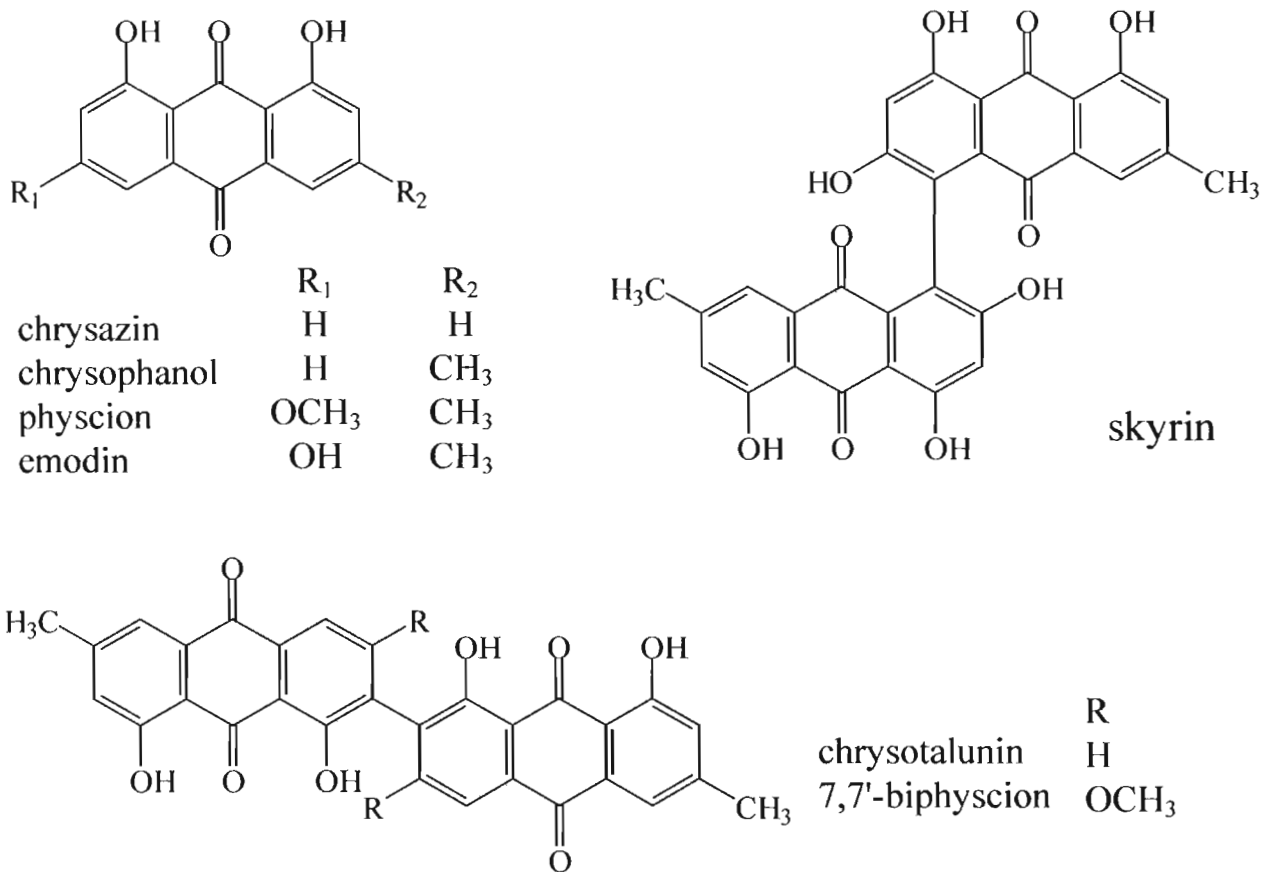


Fig. 2-1 Chemical structures of hydroxyanthraquinones, which have been isolated hitherto from soil



Fig. 2-2 Photograph of Mt. Hinakura soil profile

日名倉山土壌

調査地点：兵庫県佐用郡佐用町奥海日名倉山キャンプ場横

地形：尾根状肩斜面

標高・方位・傾斜：600m・N35E・16°

試料採取日：1995年5月25日

植生：アカマツ，スギ，ミズナラ，クリ，チマキザサ

母材・堆積様式：非固結性火成岩(火山灰)・風積

土壌断面記載：

Ah1；0-7cm，黒褐色(10YR 2/3)，腐植頗る富む，中根多，小根細根極めて多，LiC，団粒状構造発達度弱，ち密度 6，粘着性弱，可塑性弱，半湿，層界平坦明瞭

Ah2；7-19cm，暗褐色(10YR 3/3)，腐植富む，10cm 未風化細亜角礫有り，中小細根多，LiC，小亜角塊状構造発達度弱，ち密度 10，粘着性弱，可塑性弱，半湿，層界平坦明瞭

Bw1；19-38cm，黄褐色(10YR 5/6)，腐植含，中根有，小細根多，LiC，小亜角塊状構造発達度強～中，ち密度 14，粘着性中，可塑性中，半湿，層界平坦判然

Bw2；38-54cm，黄褐色(10yr 5/8)，腐植有，半風化小亜角礫富，中小細根希，LiC，小亜角塊状構造発達度弱，ち密度 21，粘着性中，可塑性中，半湿，層界不規則明瞭

BC；54-68cm，明赤褐色(5YR 5/8)，腐植有，半風化小亜角礫含，CL，小亜角塊状構造発達度弱，ち密度 24，粘着性中，可塑性中，半湿

2.抽出および化合物の単離

日名倉山土壌（風乾細土）約 500g を用いてクロロホルム（1500mL）でソックスレー抽出を行った。この操作を円筒濾紙中の試料だけを交換して，土壌試料量が約 5kg に相当するまで繰り返し行った。得られた抽出液約 1500ml をメンブランフィルター（日本ミリポア㈱，1.0 μ m）で吸引ろ過し，沈殿（Fr.1）とろ液（Fr.2）に分けた。沈殿（Fr.1）はクロロホルム（150mL）でソックスレー抽出をおこない，ソックスレーの受器には黄色の結晶が得られた。この結晶をメタノール，水，アセトン，酢酸エチル，ヘキサンで洗浄し，化合物 A を得た。ろ液（Fr.2）は乾式シリカゲルカラムに供試した。すなわち，シリカゲ

ル（ワコーゲル C200，和光純薬(株) 200g を充填させたカラム（ ϕ 62mm \times 400mm）に，得られたろ液を注加し，さらにクロロホルムを約 800ml 流した．カラムを通過した溶液を分取し，ロータリーエバポレーターで減圧乾固した．

以上の操作を繰り返し，土壌試料として計 15kg 分の乾式シリカゲルカラム処理画分を得た．この画分を湿式のシリカゲル（200g）でカラムクロマトグラフィーに付し，溶出液を次の 3 つの画分 Fr.2a (150-1000mL; hexane : benzen = 1 : 1 (v/v)), Fr.2b (1500-2300mL; benzen), Fr. 2c (2300-2800mL benzen) に分画した．

Fr.2a は，シリカゲル 60G（ナカライテスク(株)）で作成した分取薄層クロマトグラフィープレート（20 \times 20cm，厚さ 2.0mm）を用いて展開溶媒 石油ベンジン：酢酸エチル：水：ギ酸（89:10:飽和:1, v/v/v/v）で展開し，上部のバンド（化合物 B）と下部のバンド（化合物 C）を得た．

Fr. 2b は四塩化炭素に溶解し，メンブランフィルターでろ過し，ろ液は減圧濃縮した．その画分をメタノール，ヘキサンで再結晶し，分取 TLC（展開溶媒ベンゼン）で精製後，アセトニトリルで再結晶し，化合物 D を得た．

Fr.2c はテトラヒドロフランに溶解し，その少量ずつを，コスモシール（ナカライテスク(株), 50g）でカラムクロマトグラフィー（75% エタノール）に付し，Fr.2c1 (200-330ml) と Fr.2c2 (350-500ml) を得た．Fr. 2c1 はエタノールで再結晶を繰り返し，分取 TLC（ベンゼン）により精製し，化合物 E を得た．Fr.2c2 は，メタノールで再結晶を繰り返し，化合物 F を得た．尚，各種クロマトグラフィーに用いた溶媒は，ナカライテスク(株)製特級を，再結晶にはナカライテスク(株)製特級を蒸留したものをを用いた．以上の単離操作を Fig. 2-3 に示した．

3.化合物 E の還元分解

得られた化合物 E に，1N NaOH を 2mL 加え，次いでヒドロサルファイトナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)を 0.1g 加え 70 $^\circ\text{C}$ で 20 分間加熱した後，50mL 容分液ロートに移し，3N HCl で酸性化した．これに，酢酸エチルと脱塩水を加え，振とう抽出を行った．水洗を 4 回行った後，酢酸エチル層をエバポレーターで減圧乾固し，TLC に供試した．TLC は展開溶媒にヘキサン：酢酸エチル：水：ギ酸(89:10:3.5:1, v/v/v/v)を用い，展開後，5% KOH-メタノール溶液を噴霧し，赤から赤紫に呈色するスポットを検出した．

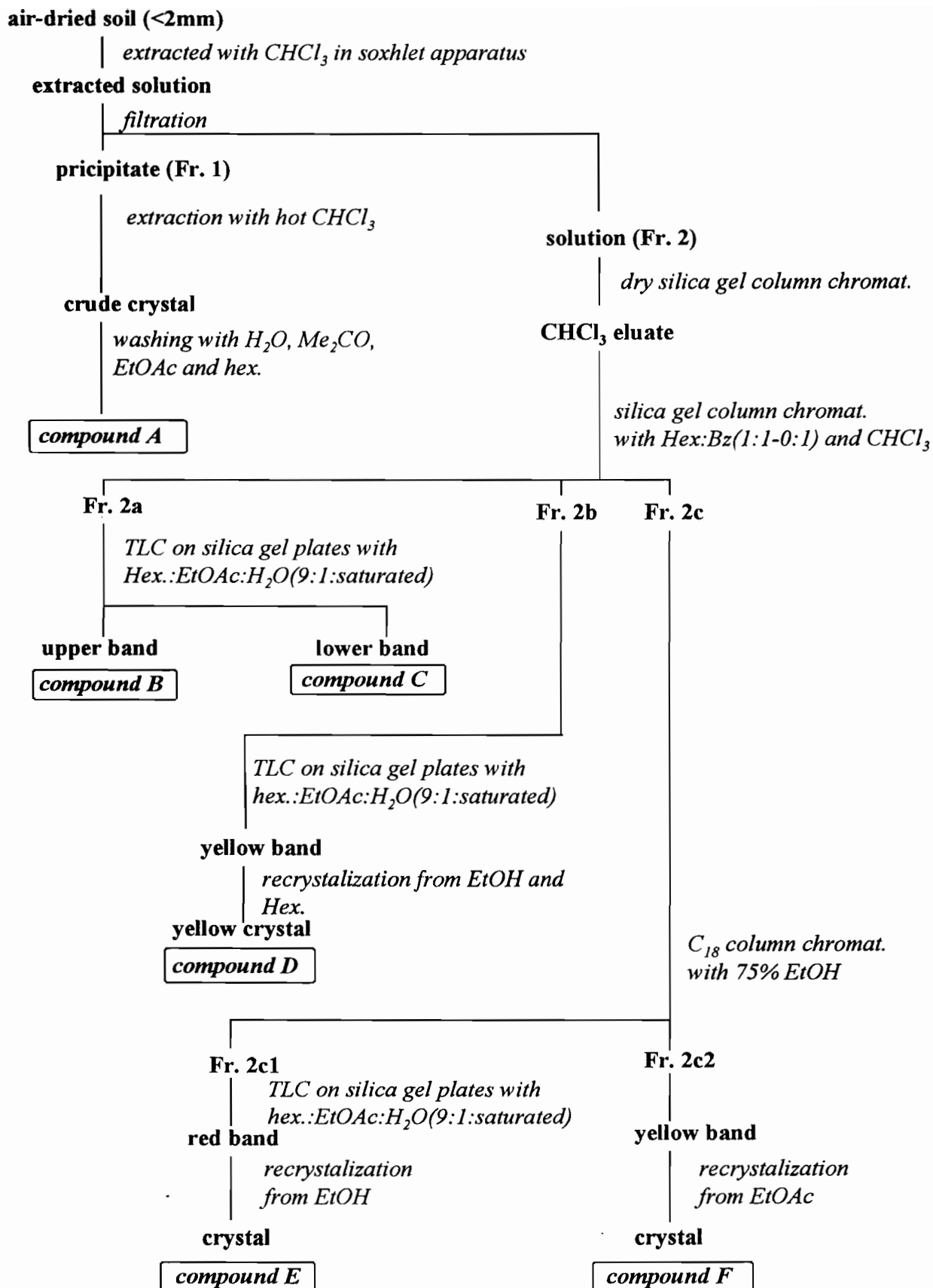


Fig. 2-3 Procedure of compounds isolation from Mt. Hinakura soil

4.化合物 D のアセチル化

得られた化合物 D にピリジン 100 μ L, 無水酢酸 50 μ L を加え, 60 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱した後, 窒素ガスで乾固した. この画分を, 分取 TLC に供試した. すなわち, 分取用 TLC プレート(TLC plates silica gel 60; 厚さ 2mm; Merk)をクロロホルムで展開し, その一部に 5% KOH-メタノール溶液を噴霧し, 赤から橙色に呈色した主画分のバンドをかきとり, そのシリカゲル粉末をベンゼン:酢酸エチル(8:2, v/v)で溶出し, 減圧乾固し, アセチル化合物を得た.

5.化合物の構造決定

紫外-可視吸収 (UV-VIS) スペクトルは, Jasco V-530, 赤外吸収 (IR) スペクトルは, KBr 法で Shimadzu FT-IR 4000 を, ORD スペクトルは, Jasco J-500 を使用して測定した.

^1H -核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの測定は, 重クロロホルム(chloroform-D(100%D); CEA グループ)に溶かし, 5mm の試料管を用い, Bruker AC type 250Mz を使用し, 測定した. 測定条件は以下の通りである.

観測周波数(SF) ; 250.13 MHz

内部標準 ; CDCl_3 7.25ppm

積算回数(NS) ; 128 回(化合物 D), 16 回(化合物 E), 9034 回(化合物 D のアセチル化合物)

データ取得時間(AQ) ; 3.185 sec

パルス幅(P1) ; 15.00 usec (90 $^{\circ}$)

測定温度(TE) ; 300K

^1H - ^1H COSY スペクトルの測定は ^1H -NMR で調整した試料を, 同様の機器を用いて行った. 測定条件は以下の通りである.

観測周波数(SF) ; 250.13 MHz

内部標準 ; CDCl_3 7.25ppm

積算回数(NS) ; 8

データ取得時間(AQ) ; 0.703 sec(化合物 D), 1.327 sec(化合物 E)

FID 取り込みデータ点数(TD) ; F1: 937, F2: 2048(化合物 D)

F1: 1762, F2:4096(化合物 E)

パルス幅(P1) ; 15.00 usec (90°)

測定温度(TE) ; 300K

電子衝撃イオン化法マススペクトル (EI/MS) , 高分解能マススペクトル (HRMS) は, Hitach 4100 を用いた. イオン化電圧 70eV でおこない, 試料はチャンバー温度 200℃, 直接導入法にて測定した.

第 2 節 結果および考察

単離した化合物 (A~F) の R_f 値と TLC プレート上での呈色反応を Table 2-1 に, UV-VIS スペクトルの極大波長と EI/MS のデータをそれぞれ Table 2-2, 2-3 に示した. アントラキノン は 5% KOH メタノール溶液, 酢酸マグネシウム飽和メタノール溶液, 酢酸銅飽和メタノール溶液で呈色反応を示す. また, UV-VIS スペクトルは 240-290nm (ベンゼン環の吸収帯) , 260-290nm (カルボニル基の吸収帯) , と 400-500nm の波長で極大吸収を示す(Thomson,1971). Table 2-1 をみると, 単離したすべての化合物は 5% KOH メタノール溶液, 酢酸マグネシウム飽和メタノール溶液, 酢酸銅飽和メタノール溶液に対して陽性を示し, UV-VIS スペクトルにおいても上述の吸収帯に極大吸収を持つ. したがって, これらの化合物はアントラキノンであることが予想される.

また, Table 2-1 に示したように, 化合物 A の R_f 値は展開溶媒 I~V でそれぞれ 0.83, 0.00, 0.00, 0.00, 0.81 であり, 同じく化合物 B の R_f 値は 0.83, 0.83, 0.64, 0.65, 0.77, 化合物 C の R_f 値は, 0.83, 0.76, 0.55, 0.63, 0.77, 化合物 F の R_f 値はそれぞれ 0.85, 0.52, 0.22, 0.35, 0.82 であり, CLN, CPL, PYS, 7BP の R_f 値にそれぞれほぼ一致した. 3 種の呈色試薬に対する反応においても化合物 A~C, F と同上の標品の化合物とそれぞれ一致した. Table 2-2 をみると化合物 A~C, F は, UV-VIS スペクトルについても極大波長が化合物 A で 264, 289, 440 - 460nm, 化合物 B で 256, 276, 286, 429nm, 化合物 C で 257, 265, 288, 430nm, 化合物 F で 246, 270, 286, 310, 444, 460nm であり, それぞれ, CLN, CPL, PYS, 7BP とほぼ一致した. Table 2-3 のとおり, EI/MS の結果か

らも各化合物のフラグメントピークは化合物 A で 506, 489, 460, 431, 253, 化合物 B で 254, 238, 210, 181, 化合物 C で 284, 255, 241, 213, 185, 化合物 F で 566, 549, 535, 520, 517, 506, 491, 297, 283, 267, 262 とそれぞれ CLN, CPL, PYS, 7BP と一致する. 一方, 化合物 D と E は, ここに示した標品や自然界でよく見られるアントラキノンのデータ (例えば emodin, skyrin, chrysazin など) とは一致しなかったが, Fujitake(1991)の TLC の R_f 値と比較すると主要な土壌アントラキノンである 2 つの未同定である化合物に相当することがわかった.

Table 2-1 Characteristics of isolated compound A - F and authentic samples on thin layer chromatography

compounds	R _f values ^a					color reacton ^b		
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	①	②	③
compound A	0.83	0.00	0.00	0.00	0.81	purple	orange	orange
B	0.83	0.83	0.64	0.65	0.77	red	red	red
C	0.83	0.76	0.55	0.63	0.77	red	red	red
D	0.86	0.69	0.33	0.53	0.81	purple	red	red
E	0.85	0.61	0.28	0.44	0.81	red	red	red
F	0.85	0.52	0.22	0.35	0.82	purple	red	red
chrysazin	0.80	0.83	0.59	0.59	0.76	red	red	red
chrysophanol	0.83	0.77	0.55	0.65	0.77	red	red	red
physcion	0.83	0.77	0.55	0.65	0.77	red	red	red
emodin	0.37	0.61	0.15	0.25	0.43	red	red	red
7,7'-biphyscion	0.83	0.51	0.22	0.36	0.82	purple	red	red
skyrin	0.14	0.45	0.01	0.05	0.22	purple	red	red
chrysotalunin	0.83	0.00	0.00	0.00	0.83	purple	orange	orange

^a solvent systems I) benzen : ethyl formate : HCOOH (75:24:1, v/v/v); II) dibutyleter : CH₃COOH (10 : 1, v/v); III) hexane : aceton : H₂O (10 : 10 : 7, v/v/v); IV) petroleum ether (b.p.50-80°C) : ethyl acetate : H₂O (75:25:3.5, v/v/v); V)benzen : MeOH (4:1, v/v)

^b color reactant reagents ① 5% methanolic KOH solution; ② saturated methanolic MgOAc solution; ③ saturated methanolic CuOAc solution

Table 2-2 UV-VIS absorption of isolated compounds A-F and authentic samples

compounds	solvent	λ_{\max} (nm) ^a					
compound A	CHCl ₃		264	289			440-460
B	EtOH	256	276	286			429
C	EtOH	257	265	288			430
D	CHCl ₃						
E	CHCl ₃	248	263				438 450
F	CHCl ₃	246	270	286	310		444 460
chrysazin	EtOH	251	273	283			429
chrysophanol	EtOH	257	277	287			429
physcion	EtOH	257	266	288			431
emodin	EtOH	253	266	289			436
skyrin	DiOx	258		290			448
chrysotalunin	CHCl ₃			264	289		440-460
7,7'-biphyscion	CHCl ₃			283	310		444 460

^aThe data of italics indicate shoulder peaks

Table 2-3 EI/MS spectral data of isolated compounds A-F and authentic samples

compounds	M ⁺ (%)	principal ions (%)
compound A	506 (100)	486(36), 460(6), 431(5), 253(12)
B	254 (40)	238(100), 210(5), 181(13)
C	284 (100)	255(5), 241(4), 213(3), 185(6)
D	506 (100)	489 (13.7), 460 (4.7), 253 (7.8)
E	566 (100)	535 (27.6), 504 (8.8), 297 (16.7), 283 (11.4)
F	566 (100)	549(8), 535(99), 520(6), 517(7), 506(5), 491(8), 297(48), 283(15), 267(8), 262(7)
chrysazin	240(100)	212(13), 184(12)
chrysophanol	254(44)	238(100), 226(5), 210(8), 181(19), 152(18)
physcion	284(100)	255(7), 241(6), 213(5), 185(2), 135(5)
emodin	270(100)	242(5), 241(6), 213(5), 185(2), 135(5)
chrysotalunin	506(100)	486(35), 460(5), 431(5), 253(12)
7,7'-biphyscion	566(71)	549(7), 535(100), 521(5), 520(16), 297(35), 283(12.5), 267(6)

化合物 D は、黄色の無定型粉末として得られ、 $[\alpha]_D=0$ であった。この化合物は Table 2-1 に示した呈色反応から hydroxyanthraquinone と考えられた。化合物 D の UV-VIS スペクトルを Table 2-2, Fig.2-4a に示した。264, 444nm にピークが、291nm にショルダーが認められた。この様に、260 - 290 nm および 400 - 500 nm 付近にピークを持つ曲線は、1,8-dihydroxyanthraquinone の誘導体で特徴的に見られると言われている (Tomson, 1971)。

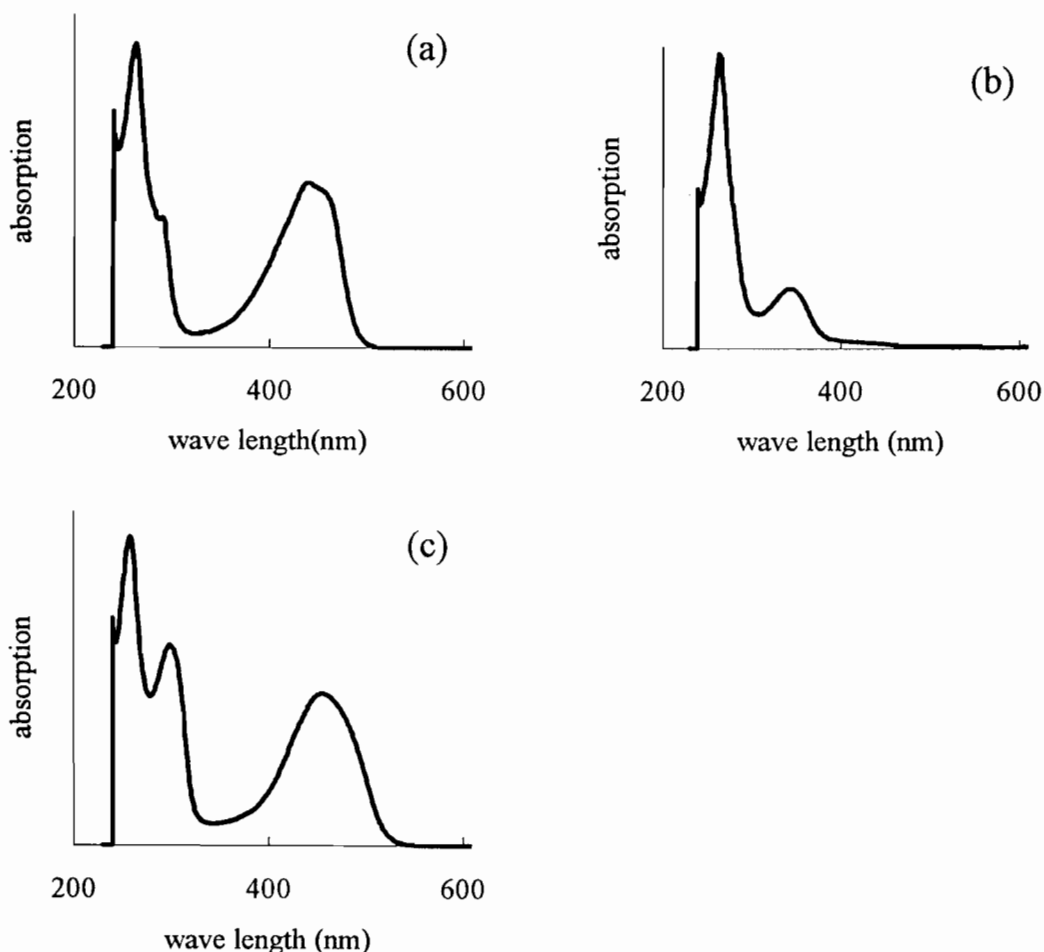


Fig. 2-4 UV-VIS spectra of (a) compound D, (b) its acetate and (c) compound E

化合物 D の IR スペクトルを Fig. 2-5a に示した。1672 cm^{-1} に非キレート性のカルボニル基を示す弱いピークが、1603 cm^{-1} にキレート性のカルボニル基を示す強いピークが見られた。このことより化合物 D は 1,8-dihydroxyanthraquinone であることが予想される。さらに、マススペクトル分析を行い、得られたマススペクトルを Fig. 2-6a に示した。EI/MS より分子量は 506, HRMS では 506.0996 となり、元素組成は $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_8$ (計算値 506.1000) と推定された。また、 m/z 253 は全分子量のちょうど半分にあたり、これは CPL の分子

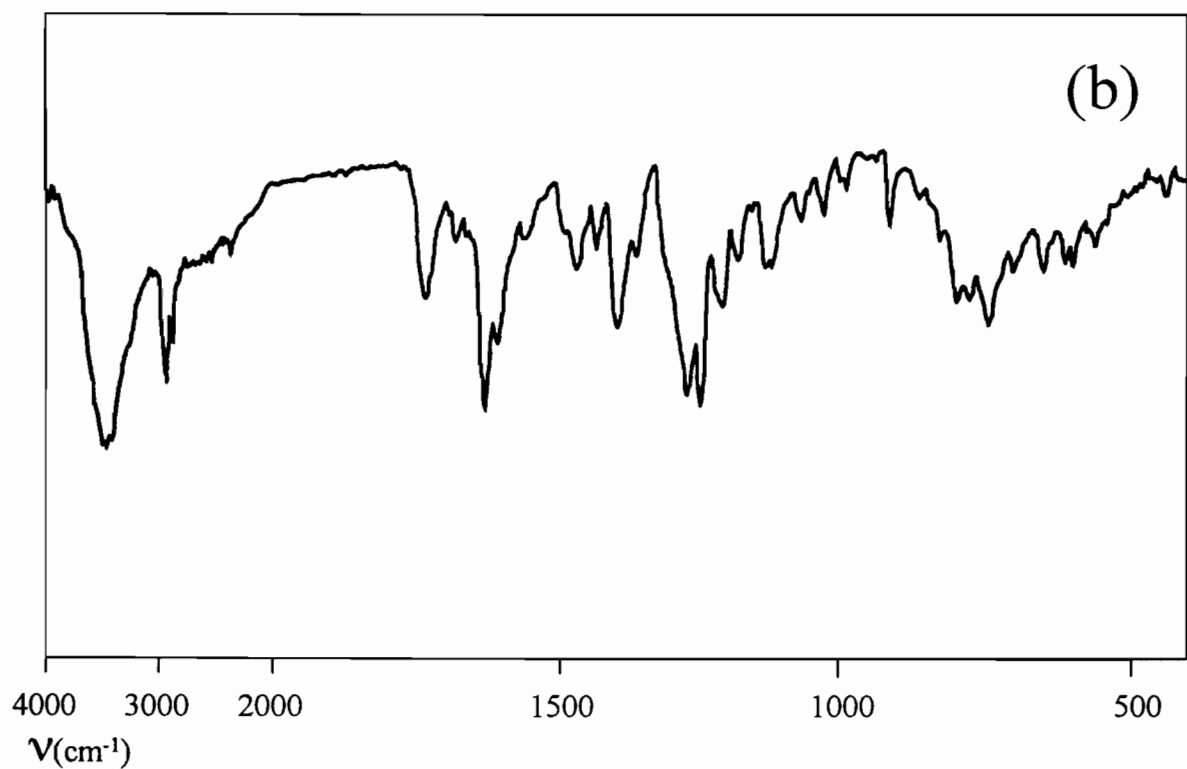
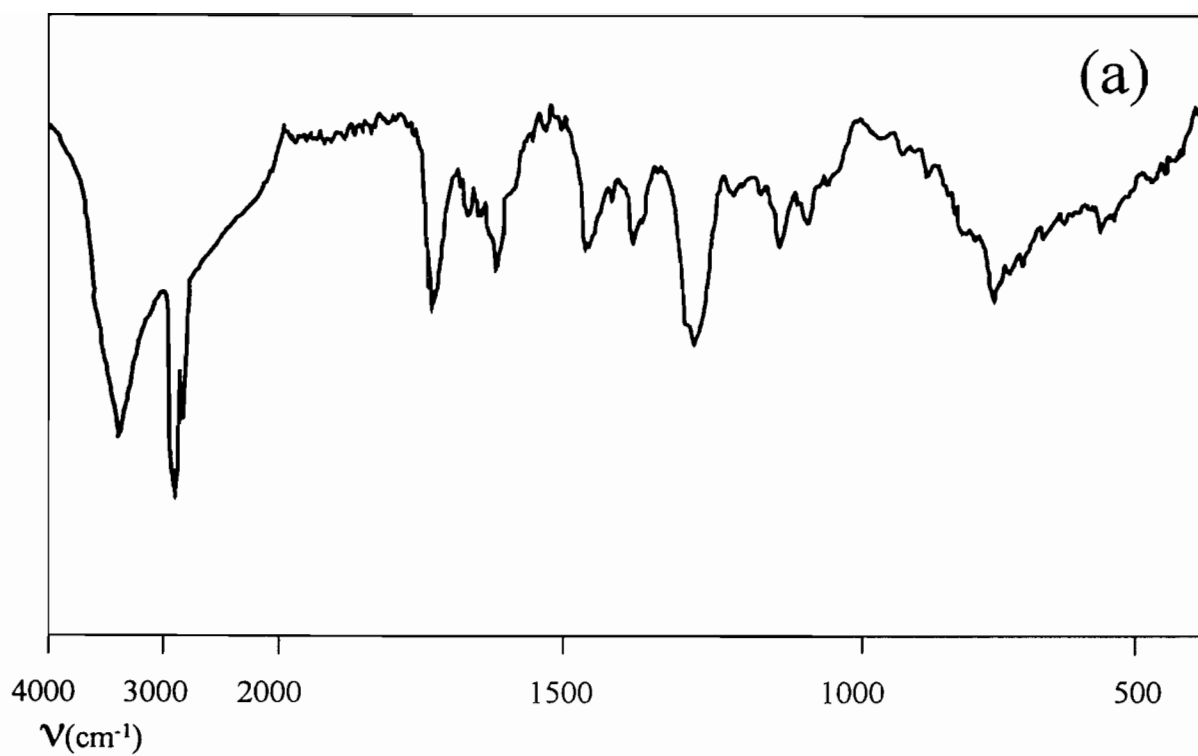


Fig. 2-5 IR spectra of (a) compound D and (b) compound E

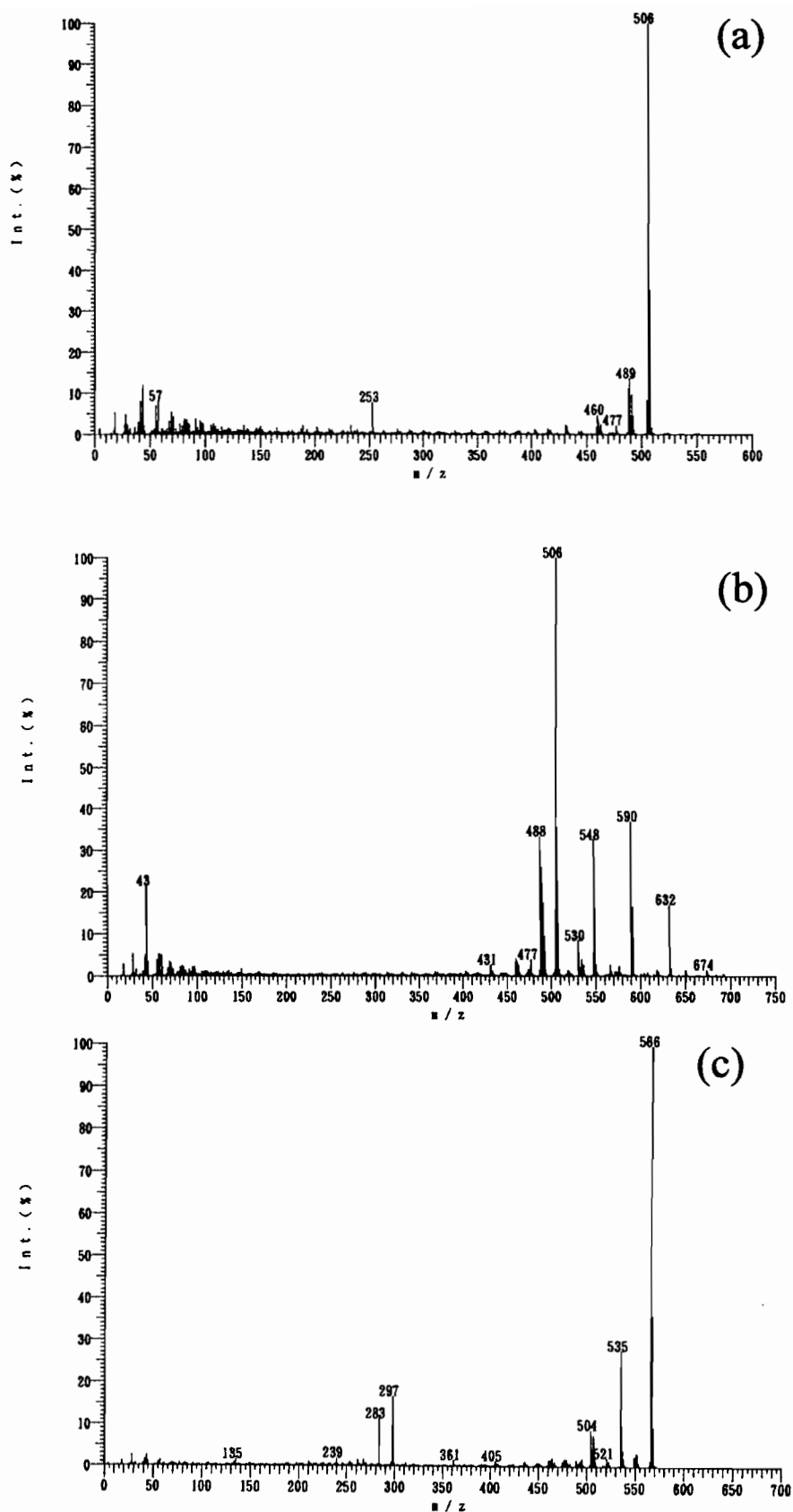


Fig. 2-6 EI/MS spectra of (a) compound D, (b) its acetate and (c) compound E

量から dehydrodimer に由来する水素分子 1 つを失った構造物の分子量と一致している。一方、アセチル化した試料の EI/MS フラグメント (Fig.2-6b) では、全分子量が化合物 D の分子量である 506 からさらに 168 増えた 674 となっており、これは分子量 43 のアセチル基が化合物 D の持つ 4 つ水酸基の水素と置換したことを示している。

また、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル ($\text{CDCl}_3\text{-D}$) (Fig. 2-7, Table2-4) は、以下の部分構造 A, B, C の存在を示した。

- A. 4 組のペリ位の hydroxyl 基 [δ 12.44 (1H, *s*), 12.36 (1H, *s*), 12.00 (1H, *s*), 11.92 (1H, *s*)]
- B. 2 組の芳香族に直接結合したメチル基 [δ 2.49 (1H, *s*), 2.30 (1H, *s*)]
- C. 8 組の芳香族水素 [δ 7.97 (1H, *d*, $J=7.7$), 7.86 (1H, *dd*, $J=7.0, 1.1$), 7.83 (1H, *bs*), 7.70 (1H, *t*, $J=8.0$), 7.69 (1H, *s*), 7.62 (1H, *d*, $J=7.8$), 7.31 (1H, *dd*, $J=8.3, 1.1$), 7.13 (1H, *bs*)]

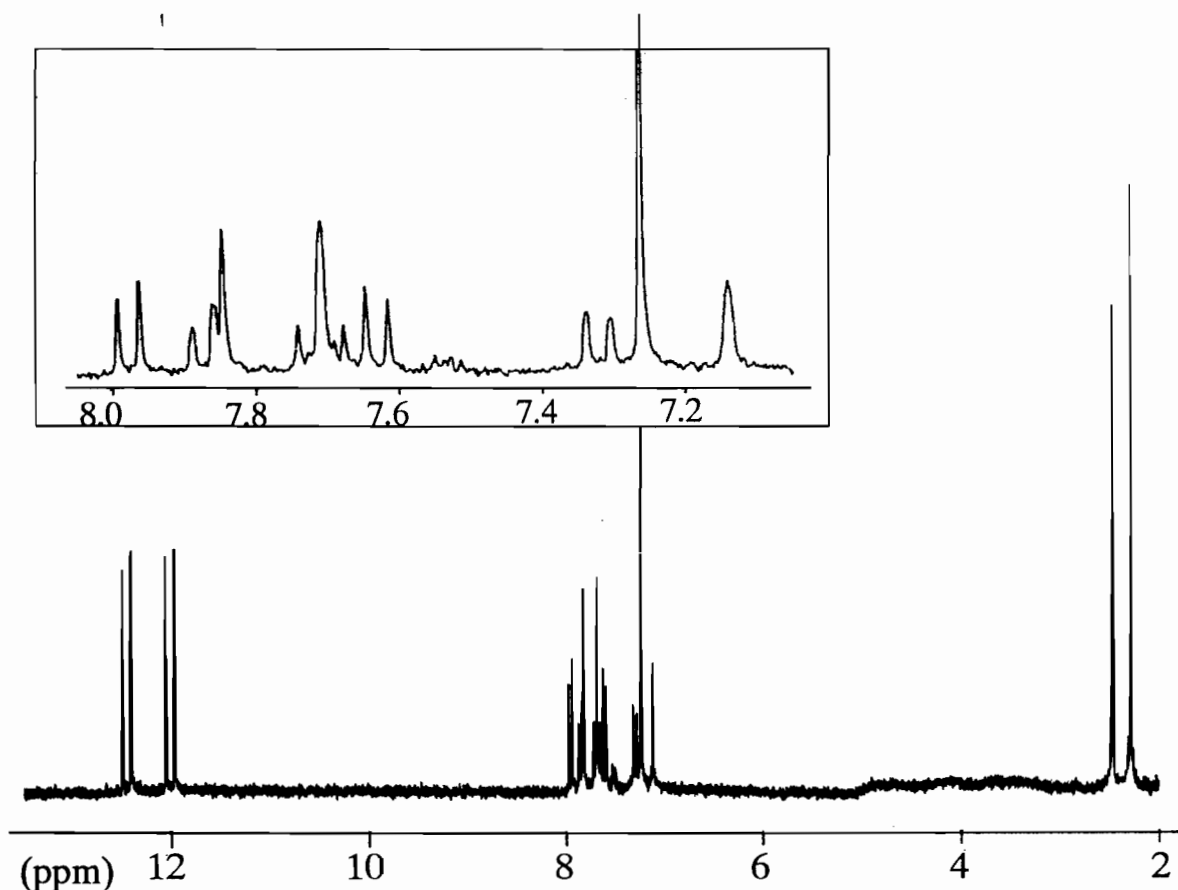


Fig.2-7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound D

Table 2-4 ¹H-NMR spectral data for chrysophanol, physcion, compounds D and E (δ , ppm, in CDCl₃)

H	compound D	compound E	chrysophanol ^a	physcion ^b
2		7.01 <i>m</i>	7.0 <i>m</i>	7.04 <i>bs</i>
4	7.83 <i>bs</i>	7.33 <i>m</i>	7.56 <i>m</i>	7.57 <i>bs</i>
5	7.86 <i>dd</i> (8, 1.1)		7.75 <i>q</i>	7.32 <i>d</i> (2.5)
6	7.70 <i>t</i> (8)		7.6 <i>t</i>	
7	7.31 <i>dd</i> (8 1.1)	6.76 <i>s</i>	7.22 <i>q</i>	6.60 <i>d</i> (2.5)
2'	7.13 <i>bs</i>	7.01 <i>m</i>		
4'	7.69 <i>s</i>	7.33 <i>m</i>		
5'	7.97 <i>d</i> (8)			
6'	7.62 <i>d</i> (8)			
7'		6.76 <i>s</i>		
3-Me	2.30 <i>s</i>	2.32 <i>s</i>	2.42 <i>s</i>	2.45 <i>s</i>
3'-Me	2.49 <i>s</i>	2.32 <i>s</i>		
6-OMe		3.73 <i>s</i>		3.92 <i>s</i>
6'-OMe		3.73 <i>s</i>		
-OH	11.92 <i>s</i>	12.12 <i>s</i>	11.8 <i>s</i>	12.05 <i>s</i>
	12.00 <i>s</i>	13.04 <i>s</i>	11.93 <i>s</i>	12.26 <i>s</i>
	12.36 <i>s</i>			
	12.44 <i>s</i>			

Values in parentheses are coupling constants in Hz

The marks of Italics indicates as follows; *s*, singlet; *d*, doublet; *t*, triplet; *q*, quartet; *dd*, double doublet; *m*, multiplet; *bs* broad singlet.

Assignments are based on ¹H-¹H COSY and ¹H-NMR data of physcion and chrysophanol

^a Cited data from ref. (De Villatro & González, 1974)

^b Cited data from ref. (Alemayehu et al., 1988)

これらの特徴は CPL の二量体の特徴と一致し, symmetrical でない CPL の二量体であることが推測される. アセチル化した化合物 D の UV-VIS スペクトルと ¹H-NMR スペクトルは, microcarpin (Fig. 2-8)のアセチル化物の文献値(González et al, 1973)と一致した (Table 2-5, 2-6). さらに, 化合物 D の ¹H-¹H COSY スペクトルを測定すると Fig.2-9 の矢印により示した H-H 間に相関が見られ microcarpin に矛盾しないスペクトルが得られ, Table2-4 の様に各水素を帰属できた. したがって化合物 D を microcarpin (Fig. 2-8)と同定した.

化合物 E は赤い無定型粉末で $[\alpha]_D=0$ であった. この化合物は Table 2-1 に示した呈色反応から hydroxyanthraquinone と考えられた. 化合物 E の UV-VIS スペクトルは 259, 300, 455 にピークが認められた(Fig.2-4c, Table 2-2). この様に, 260 - 290 nm および 400 - 500 nm 付近にピークを持つ曲線は, 1,8-dihydroxyanthraquinone の誘導体で特徴的に見られる (Tomson, 1971) .

Table 2-5 ¹H-NMR spectral data of acetylated compound D and acetylated microcarpin (González et al. 1973)

H	acetylate compound D	acetylated microcarpin
Ar-Me	2.27 3H, <i>s</i>	2.23 <i>s</i>
	2.56 3H, <i>s</i>	2.53 <i>s</i>
Ar-H	7.24 1H, <i>bs</i>	7.27 1H, <i>bs</i>
	7.40 1H, <i>dd</i> (<i>J</i> =8, 1.5)	7.44 1H, <i>dd</i> (<i>J</i> =8, 1.5)
	7.58 1H, <i>d</i> (<i>J</i> =8)	7.59 1H, <i>d</i> (<i>J</i> =8)
	7.77 1H, <i>t</i> (<i>J</i> =8)	7.80 1H <i>t</i> (<i>J</i> =8)
	8.04 1H, <i>bs</i>	8.06 1H <i>bs</i>
	8.14 1H, <i>s</i>	8.15 1H <i>bs</i>
	8.23 1H, <i>dd</i> (<i>J</i> =8, 1.5)	8.22 1H <i>dd</i> (<i>J</i> =8, 1.5)
	8.28 1H, <i>d</i> (<i>J</i> =8)	8.26 1H <i>d</i> (<i>J</i> =8)
Ar-Oac	2.15 3H, <i>s</i>	2.04 3H, <i>s</i>
	2.17 3H, <i>s</i>	2.07 3H, <i>s</i>
	2.46 6H, <i>s</i>	2.38 6H, <i>s</i>

Values in parentheses are coupling constants in Hz

The marks of Italics indicates as follows; *m*, multiplet; *t*, triplet; *d*, doublet; *s*, singlet; *bs*, broad singlet; *dd*, double doublet.

Table 2-6 UV-VIS spectral data of compound D and microcarpin and its acetate (González et al. 1973)

compound	λ_{\max} (CHCl ₃)
compound D	262, 290, 453
microcarpin	264, 291, 455
acetylated compound D	263, 347
acetylated microcarpin	263, 346

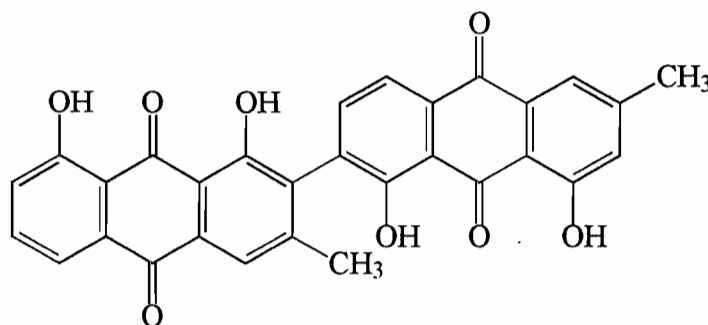


Fig. 2-8 Chemical structure of microcarpin

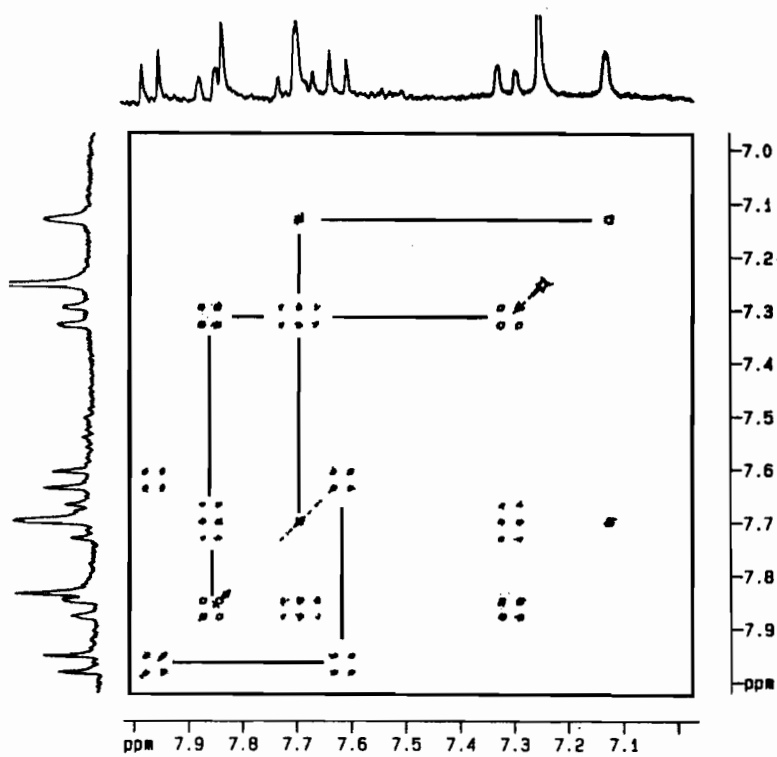
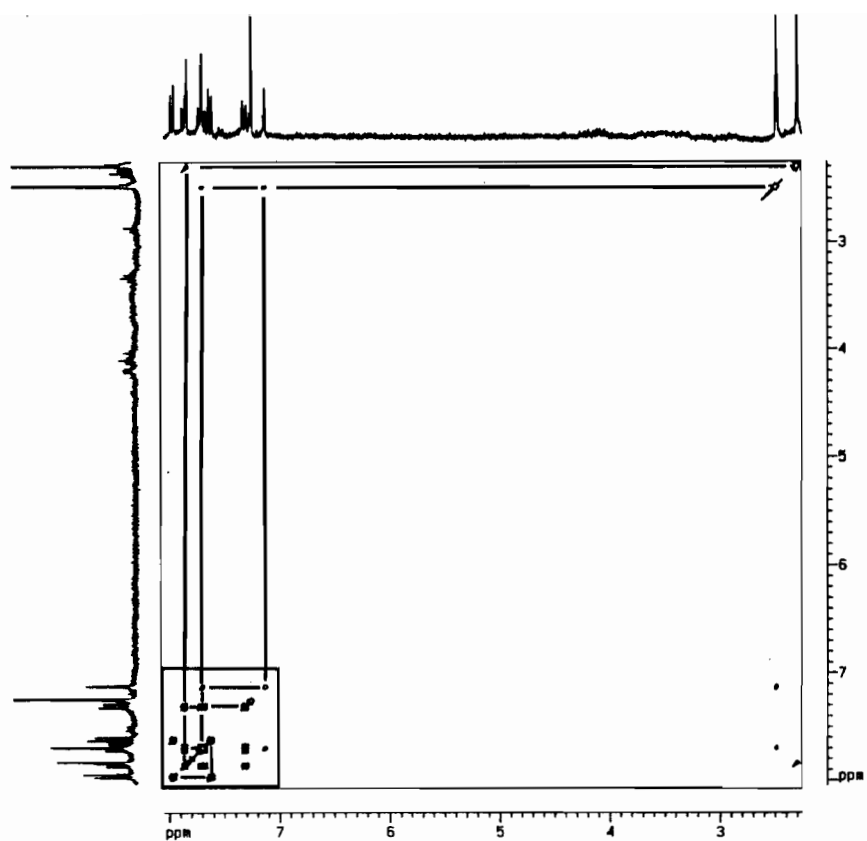


Fig.2-9 ¹H-¹H COSY spectra of compound D

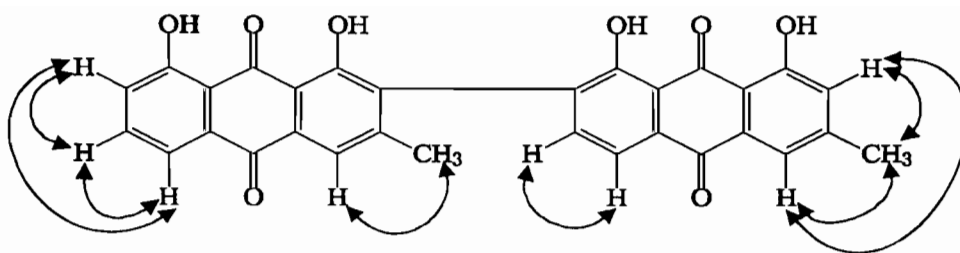


Fig. 2-9 continued

化合物EのIRスペクトルをFig. 2-5bに示した。1728 cm^{-1} に非キレート性のカルボニル基を示す弱いピークが、1626 cm^{-1} にキレート性のカルボニル基を示す強いピークが見られた。

化合物Eをアルカリジチオナイトナトリウムにより還元分解するとPYSのみが得られた（薄層クロマトグラフィーによる比較）ので、化合物EはPYSのdehydrodimerであると考えられる。

さらに、マスペクトル分析を行い、得られたマスペクトルをFig.2-6cに示した。EI/MSより分子量は566となり、HRMSでは M^+ 566.1211となり元素組成は $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ （計算値566.1211）となり、それぞれPYSのdehydrodimerの分子量、元素組成と一致した。また、 m/z 283は全分子量のちょうど半分にあたり、これはPYSの分子量からdehydrodimerに由来する水素分子1つを失ったものの分子量と一致している。

また、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル（ $\text{CDCl}_3\text{-D}$ ）（Fig.2-10, Table 2-4）は、以下の部分構造A, B, C, Dの存在を示した。

- A. 2組のペリ位のhydroxyl基 [δ 13.04 (2H, *s*), 12.12 (2H, *s*)]
- B. 1組の芳香族に直接結合したmethyl基 [δ 2.32 (6H, *s*)]
- C. 1組の芳香族に直接結合したmethoxyl基 [δ 3.73 (6H, *s*)]
- D. 3組の芳香族水素 [δ 6.73 (2H, *s*), 7.01(2H, *m*) 7.33 (2H, *m*)]

EI/MSスペクトル等でPYSの二量体と推測した場合、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルではシグナルが14あることが推測される。ところが、シグナルは7つしか見られないのでPYSのsymmetricalな二量体であることがわかる。また、PYSの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルと比較すると非常によく類似したシグナルパターンを示している。PYSの $^1\text{H-NMR}$ から考えると、最も高磁場側にある芳香族水素のシグナルである6.73は7,7'位の水素と帰属される。ま

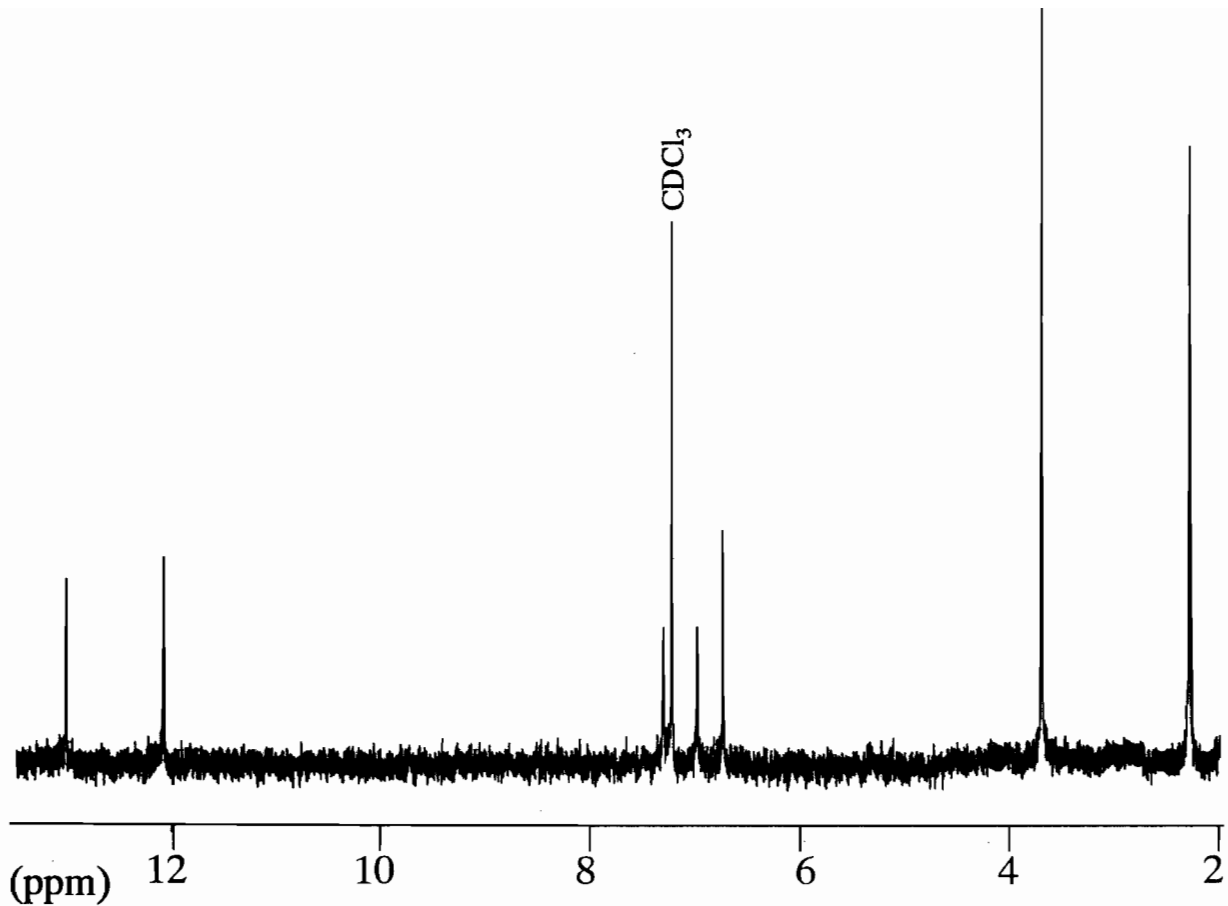


Fig. 2-10 ^1H NMR spectrum of compound E

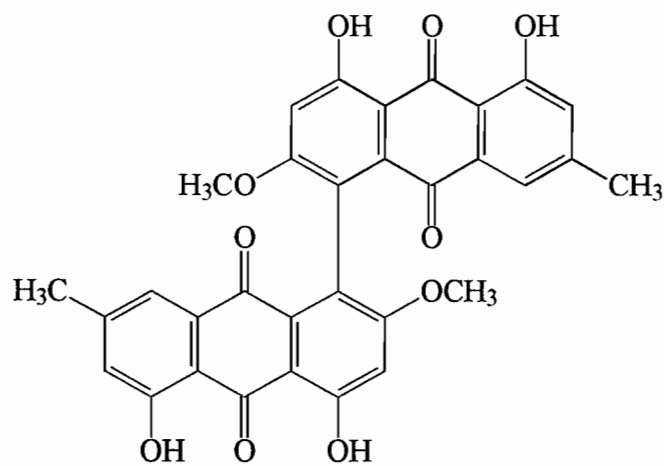


Fig. 2-11 Chemical structure of hinakurin

た、7.01 と 7.33 のシグナルは multiplet しているために互いにカップリングしていると考えられ、それぞれ、2,2'位と 4,4'位の水素と帰属され、5,5'位の芳香族水素がみられない。

したがって、化合物 E の構造は physcion が 5,5'位で dehydrocoupling している 5,5'-biphyscion (Fig.2-11)であると決定し hinakurin と命名した。 ^1H - ^1H COSY スペクトルを測定すると、Fig. 2-12 の矢印により示した H-H 間に相関が見られ 5,5'-biphyscion に矛盾しないスペクトルが得られた。

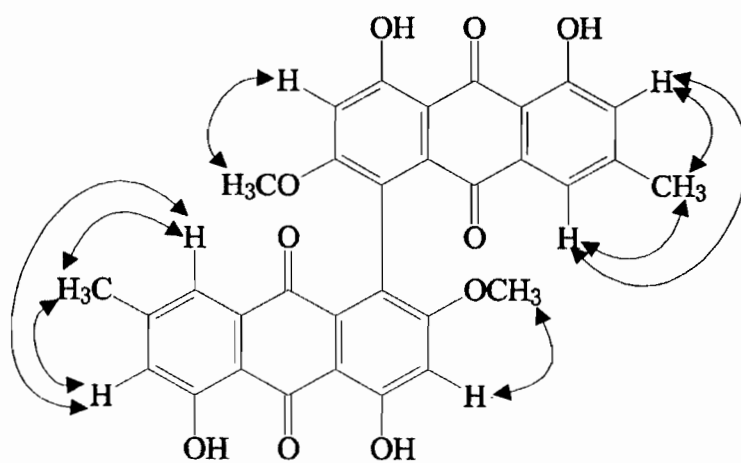
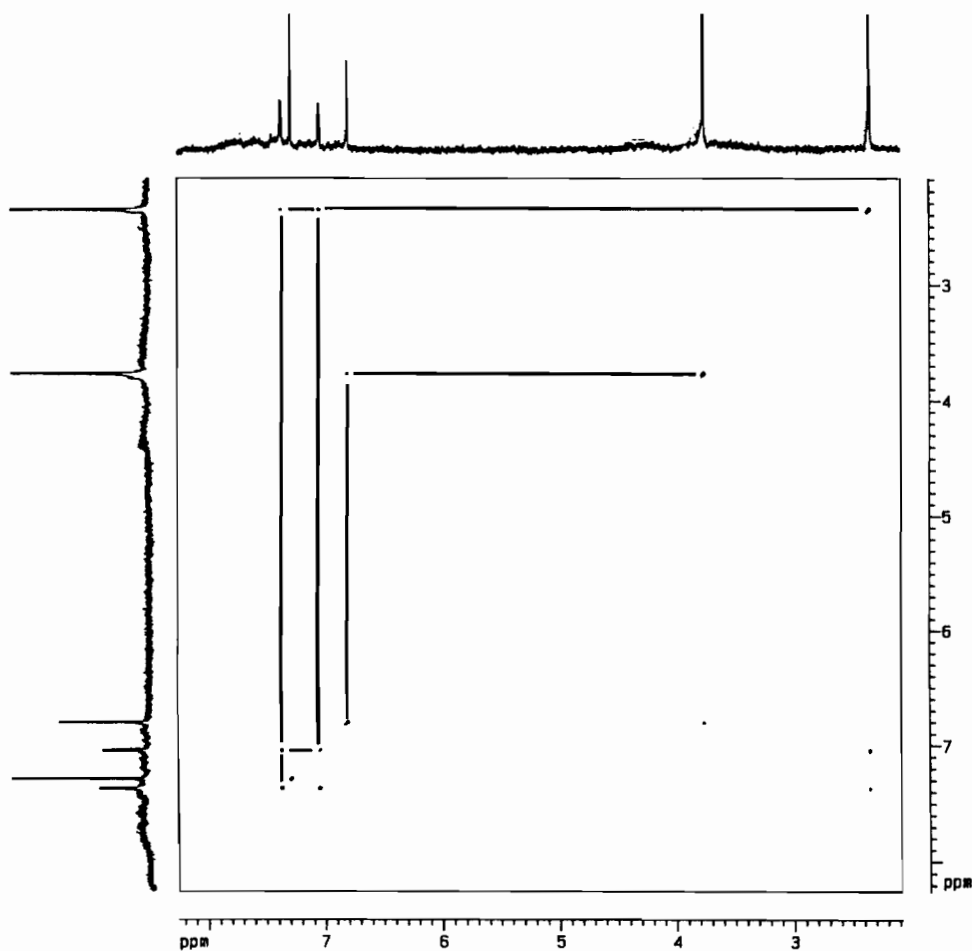


Fig. 2-12 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound E

以上のように、日名倉土壌から、A~Fの6種の化合物を単離し、A~Fの6種の化合物はそれぞれ chrysotalunin (CLN), chrysophanol (CPL), physcion (PYS), microcarpin (MCP), hinakurin (HKR), 7,7'-biphyscion (7BP) であると同定した。また、主要な土壌アントラキノンで、今まで未同定であった化合物が同定され、土壌中の主要なアントラキノンは CLN, CPL, PYS, MCP, HKR, 7BP であることが明らかになった。

CPL, PYS, は多種の高等植物や、糸状菌などが生産することが知られており、調査時には、生産者と思われる高等植物は見られなかったが、生産者と知られている高等植物が過去に存在していたことや、生産者と知られている糸状菌が存在することは十分考えられる。

CLNは土壌中に存在するアントラキノンとしては、最もよく知られており、量的にも多いと考えられているが、生産者は知られていない。

7BPは担子菌 *Dermocybe cinnamomeolutea*, *D. uliginosa*, *D. uliginosa*, *D. palustris* var. *sphagneti*, *Tricholoma flavovirens* (Pers. ex Fr.) Lund.の子実体からえられた flavomannin-6,6'-dimethyl ether の酸化合成により得られている (Steglich et al, 1972; Gluchoff, 1972)。*T. flavovirens* からは、子実体からも得られているが、抽出、精製中に人工的な酸化により、できたものではないかと筆者らは、述べている (Steglich et al, 1972)。土壌中でこのような酸化反応が起こることは考えられるが、日名倉山土壌中には担子菌の子実体や flavomannin-6,6'-dimethyl ether は見られず、土壌中での生産者が他にある可能性が高い。

MCPはユリ科の *Asphodelus microcarpus* (González et al., 1973)と5つの *Asphodeline* 属の植物 (Ulubelen & Tuzlaci, 1985; Ulubelen et al., 1988; Ulubelen et al., 1989)から単離された例があるが、土壌からは、初めて単離された化合物である。MCPの生産者として知られているこれらの植物は、地中海沿岸に自生し、日本の自然植生で存在する可能性は低く、これら以外に生産者があると思われる。

HKRは skyrin (Fig. 2-1)のメチル化により合成された例 (Shibata et al., 1955) はあるが、自然界から単離されたのは初めての化合物である。

この様に、二量体の土壌アントラキノンである CLN, 7BP, MCP, HKR は自然界では非常に希少な化合物であるが、これらの化合物は土壌中で主要であるとされている。これらの土壌中での生産者は、全くわからないが、どこにでも存在する生産者が少しずつ

生産し、長い年月を掛けて土壤中に蓄積されるか、これらの主要アントラキノンには PYS, CPL とそれぞれの二量体であるので、土壤中で我々の知らない方法で二量体化している可能性が高いと考えられる。

第 3 節 要約

兵庫県下の黒ボク土(日名倉山土壌)の表層試料(約 15kg)についてクロロホルム抽出並びに各種クロマトグラフィーと再結晶などの操作を用いて 2 種類の未同定のアントラキノン単体を単離した。次いで、これらの化合物の化学構造を検討した結果、microcarpin (MCP) 並びに、hinakurin (HKR) であると同定された。MCP は土壤中から初めて、また、HKR は天然物として初めて単離された化合物であった。土壤中の主要アントラキノンは単量体である chrysophanol (CPL), physcion (PYS) および、それらの二量体である CLN, MCP, 7,7'-biphyscion (7BP), HKR であり、しかもこれらの二量体は自然界では希少な存在として特殊な化合物であることが明らかになった。

第3章 主要な土壌アントラキノンの定量法の開発

植物体中のアントラキノンを測定する手段としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Van Den Berg & Labadie, 1985; Toth et al., 1993), ガスクロマトグラフィー (GC) (Henriksen, 1983; Van Eijk & Roeijmans, 1984), 薄層クロマトグラフィー (TLC) (Lemmens, 1965; Rai & Shok, 1989; Ma et al, 1989)などが知られている。しかし、土壌中のアントラキノン (CLN, 7BP 以外) を定量的に測定する方法については、未だに報告がない。これは、土壌からの抽出物中には黒褐色の樹脂系の不純物 (おそらく腐植高分子由来) や CLN が多量に含まれ、これらの物質が単純な前処理では、取り除くことができないのが最大の要因と考えられる。例えば HPLC では、これらの不純物が固定相に不可逆的に吸着し、また、GC では誘導化法を用いた場合でも気化しないものが大部分を占める上に、カラムへの不可逆的吸着を避けることができない。このような理由から、これまで土壌試料についておこなわれたアントラキノンの分析は、2次元展開 TLC 法による定性的な分析例 (Matsui & Kumada, 1974; Fujitake 1991)があるにすぎない。土壌中のアントラキノンに関する研究の必要性が唱えられながらも、その情報が極端に少ないという状況を招いているのは、定量が困難であったことがその主因である。前に述べた2次元展開 TLC のクロマトグラムを定量的に解析することは通常困難で、これを定量的に分析する新たな方法の開発が切望されてきた。

2次元展開 TLC によれば、すでに前章で単離した6つの化合物 CPL, PYS, 7BP, HKR, MCP, CLN, が土壌中の主要アントラキノンであることが示されている (Fujitake, 1991)。

そこで本章では、TLC-マルチ展開法 (Pick & Kovacs, 1991) とデンシトメトリーとの組合せを利用してこれらの主要なアントラキノンの定量法の開発を試みた。

第1節 試料および方法

1. 標品の調整

アントラキノンの標品は以下のとおりである。すなわち、7,7'-biphsion については Makino 土壌 (黒ボク土) からの単離物 (Fujitake, 1991) を、chrysophanol と physcion についてはそれぞれ Serva 社製 (New York) と Sarsyntex 社製 (Merignac) の市販品を使用し

た。各標品はそれぞれ 5mg を秤取り、100ml のクロロホルムに溶かした後、モル吸光係数 (ϵ) から正確な濃度を求めた。また、これらの標品を同量ずつ混合し、クロロホルムを用いて適当な濃度に希釈して、混合標準液とした。

2. 土壌試料

土壌抽出試料には、Table 3-1 に示したように、黒ボク土 2 地点の Ah1 層の土壌を用いた。

Table 3-1 soil samples used

Sample N.O.	Sample Name	Depth (cm)	Type of Land Use	Remarks ^a
13	Makino	0-8	Grass land	bamboo grass, eulalia
16	Mikawa	0-6	Grass land	bamboo grass

^aBamboo grass, *Sasa* and/or *Neosasamorpha* sp.; Eulalia, *Miscanthus sinensis*;

3. 土壌抽出試料の調整

風乾細微土(<0.5mm)10~20g を 200mL の三角フラスコに精秤し、これに 2N NaOH 溶液 40mL、アセトンを 20mL を加え、ゴム栓をして 40 秒間激しく振とうした。静置して上層 (アセトン層) 部を 500mL 容分液ロートに移し、これに 3N HCl を加えて酸性化した。下層 (NaOH 層) 部にはさらにアセトン 20mL 加えて同様の操作を上層部に色がつかなくなるまで繰り返した。次に、この分液ロートにエーテル 200mL、脱塩水 60mL を加えて振とうし、下層 (水層) 部は廃棄し、上層 (エーテル層) 部を脱塩水を用いて 3 回水洗した。その後この分液ロートに 1N NaOH 溶液を加えて振とうし、目的物を NaOH 層に移した。NaOH 層 (下層部) に色がつかなくなるまでこの振とう抽出を繰り返し行った。得られた全 NaOH 抽出画分は 3N HCl で酸性化し、1L 容分液ロートを用いて酢酸エチル 200mL で振とう抽出し、目的物を酢酸エチル層に移した。酢酸エチル層を 3 回水洗し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。こうして得られた抽出物を少量のクロロホルムに溶かして、シリカゲル 2.0g (ワコーゲル C200 和光純薬(株)製) をつめたミニカラム (ϕ 18mm×120mm) に注加し、シリカゲルに吸着させた。1 晩放置してクロロホルムを除去した後、カラムにヘキサン : 酢酸エチル(3:1, v/v) を 20mL 流し、この溶出画分を減圧濃縮した後、真空デシケーターで乾固した。乾固した試料を一定量のクロロホルム (0.5~2mL) に溶かし、TLC に供した。

4. 薄層クロマトグラフィー

TLCの展開溶媒、発色剤に使用した試薬は、すべてナカライテスク(株)製(京都)の特級品を使用した。展開溶媒としては、step 1の展開溶媒にはクロロホルム：酢酸エチル：ギ酸(89:10:1, v/v/v), step 2の展開溶媒には、ヘキサン：酢酸エチル：水：ギ酸(89:10:飽和:1, v/v/v/v)を用いた。

発色剤として、5% KOH メタノール溶液、酢酸マグネシウム飽和メタノール溶液を調製した。

薄層プレートは、シリカゲルを担体としたアルミプレート、すなわち Merck 製の KG60F₂₅₄(厚さ 0.2mm;20×20cm)の薄層プレートを使用した。

TLCの展開操作は2ステージ展開法を用いた。すなわち、混合標準液と2種の土壌抽出液の一定量を5 μ L容のワイヤーピペット(GLサイエンス(株))を使用して、薄層プレート(15cm×20cm)の下端から1cmのところから1.5cmの間隔でスポットした。このプレートをstep1の展開溶媒の溶媒蒸気で20分間飽和させた展開槽に入れ、8cm展開させた。展開後のプレートは、下端から7cmのところから2枚に切断し、下方の切片のプレートは廃棄した。上方の切片のプレートは再び同じ展開溶媒で1cm展開した(Fig.3-1, step 1)。このプレートを、ヘアードライヤーを用いて展開溶媒を完全に蒸発させた後、step2の展開溶媒の溶媒蒸気で、20分間飽和させた展開槽に入れ、9cm展開させた(Fig.3-1, step 2)。展開槽から取り出した薄層プレートはヘアードライヤーで溶媒を蒸発させた。ミカワ土壌の抽出試料については、以上の操作を行った薄層プレートを3枚用意した。

3枚の薄層プレートは、それぞれ発色剤として5% KOH-メタノール溶液を噴霧処理したもの(KOH処理プレート)、酢酸マグネシウム-メタノール溶液を噴霧処理したもの(Mg処理プレート)、発色剤を噴霧しない無処理のもの(無処理プレート)としてデンシトメトリーに供した。

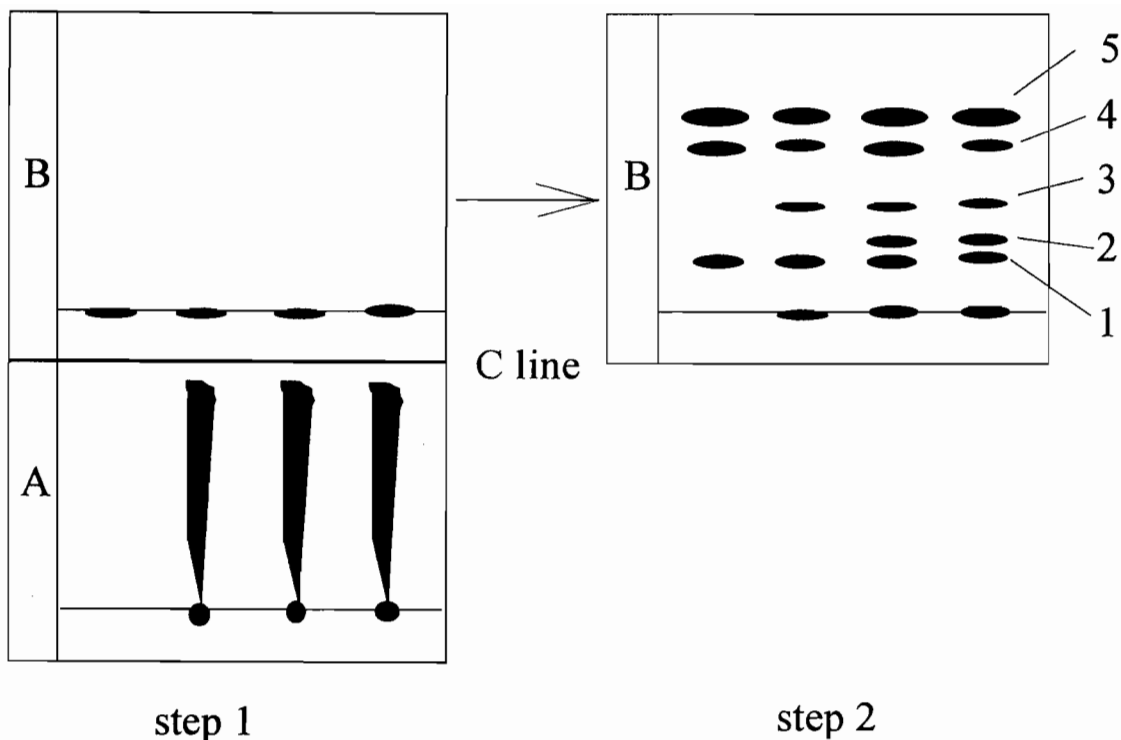


Fig. 3-1 Separation of the main HAQs in soil by two-stage developments on one plate. Plate parts A and B were separated by cutting along line C. The black lipid and/or humic-acid-like impurities are shown on part A (after step1), the main HAQs in soil as spot 1-5 on plate part B (after step 2). 1,7BP; 2,HKR; 3,MCP; 4, PYS; 5,CPL.

5. デンシトメトリー

デンシトメトリーには Shimadzu dual wavelength flying spot scanner CS9000 を用い、反射法に基づくジグザグスキャンニング法で測定した。検出波長の検討は、デンシトメトリーの *in situ* の紫外-可視吸収スペクトル測定機能を利用し、TLC 上の各スポットについての最適波長を求めて行った(Fig. 3-2)。無処理プレートについては、可視部 1 波長モード ($\lambda=435\text{nm}$)、可視部 2 波長モード ($\lambda_f=540\text{nm}$, $\lambda_s=435\text{nm}$)、紫外部 1 波長モード ($\lambda=270\text{nm}$)、KOH 処理プレートは、可視部 1 波長モード ($\lambda=540\text{nm}$) と 2 波長モード ($\lambda_f=450\text{nm}$, $\lambda_s=540\text{nm}$)、Mg 処理プレートについては、1 波長モード ($\lambda=490\text{nm}$) で測定した。なお、2 波長検出モードとは差スペクトルによる検出を意味し、 λ_f は基準波長を、 λ_s はサンプル波長を表す。

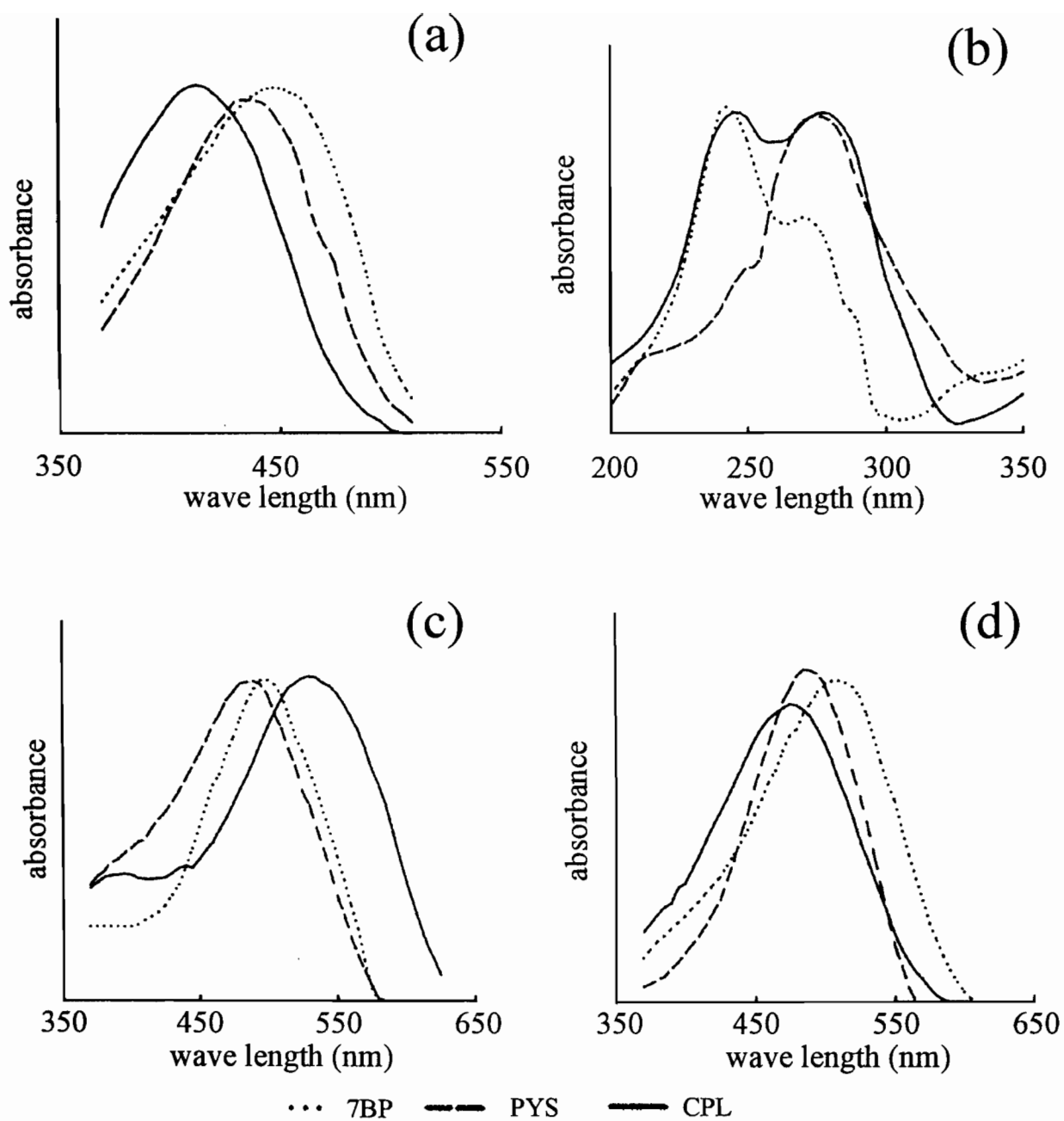


Fig. 3-2 *In situ* UV-Visible spectra of 7BP, PYS and CPL on TLC plates. (a) Visible spectra of anthraquinones on non-treatment plates; (b) UV spectra of anthraquinones on non-treatment plates; (c) Visible spectra of anthraquinones on KOH treatment plates; (d) Visible spectra of anthraquinones on MgOAc treatment plates

第2節 結果および考察

1. デンシトメトリーにおける測定条件について

上記2種の展開溶媒の組合せで、2ステージ展開法による展開操作を行った薄層プレート調整した。発色処理およびデンシトメトリーの検出波長の異なる各デンシトグラムを Fig.3-3 に示した。

Fig.3-3 をみると、発色処理をしたデンシトグラム(Fig. 3-3d, f)はベースラインが一定せずに再現性がとりにくい様子が見られる。発色剤を噴霧する場合には試薬を薄層プレート上に均一にかける必要があるが、その操作が困難であるために、不均質シートになることに原因があると思われる。これは、2波長測定モードの場合でも同様であった(Fig. 3-3e)。一方、発色剤を噴霧しない場合には、不純物のピークが各アントラキノンのピークの検出を妨害する可能性が高いと予想される。無処理プレートの紫外部1波長モードの場合にかなりその傾向が認められるが(Fig. 3-3c)、可視部ではそのような傾向は見られなかった(Fig. 3-3a)。このことは、予想以上に step1 の段階で不純物が除かれていたことを示している。無処理プレートの2波長測定モードでは、ベースラインが安定し、各ピークの形状が最もシャープで、分離状態とピークの高さがともに優れていた(Fig. 3-3b)。以上の結果から、展開後のプレート処理は、呈色試薬を使用せずにそのままのプレートを用いることとし、デンシトメトリーによる測定は可視部2波長モード ($\lambda_f=540\text{nm}$, $\lambda_s=435\text{nm}$) で行うことで、最良の結果が得られることがわかった。

2. 検出限界および検量線の直線性について

前節の結果から得られた条件下で、土壌試料と標品を検討した場合のデンシトグラムを Fig.3-4 に示した。これらのデンシトグラムをみると、いずれのデンシトグラムについても分離状態やピークの形状が良好なことがわかる。

検量線は、3つのいずれの標品の場合も 25~300ng の範囲で直線性が高かった(Fig.3-5)。標品の質量とピーク面積との間の相関係数は、7BP, PYS, CPL に対してそれぞれ $r = 0.999$, $r = 0.999$, $r = 0.994$ であった。ピーク面積から各標品の質量を定量する際の検出限界は 25ng であった。したがって、25~300ng の広い範囲で信頼性があり、かつ、感度の高い定量法が行えることがわかった。

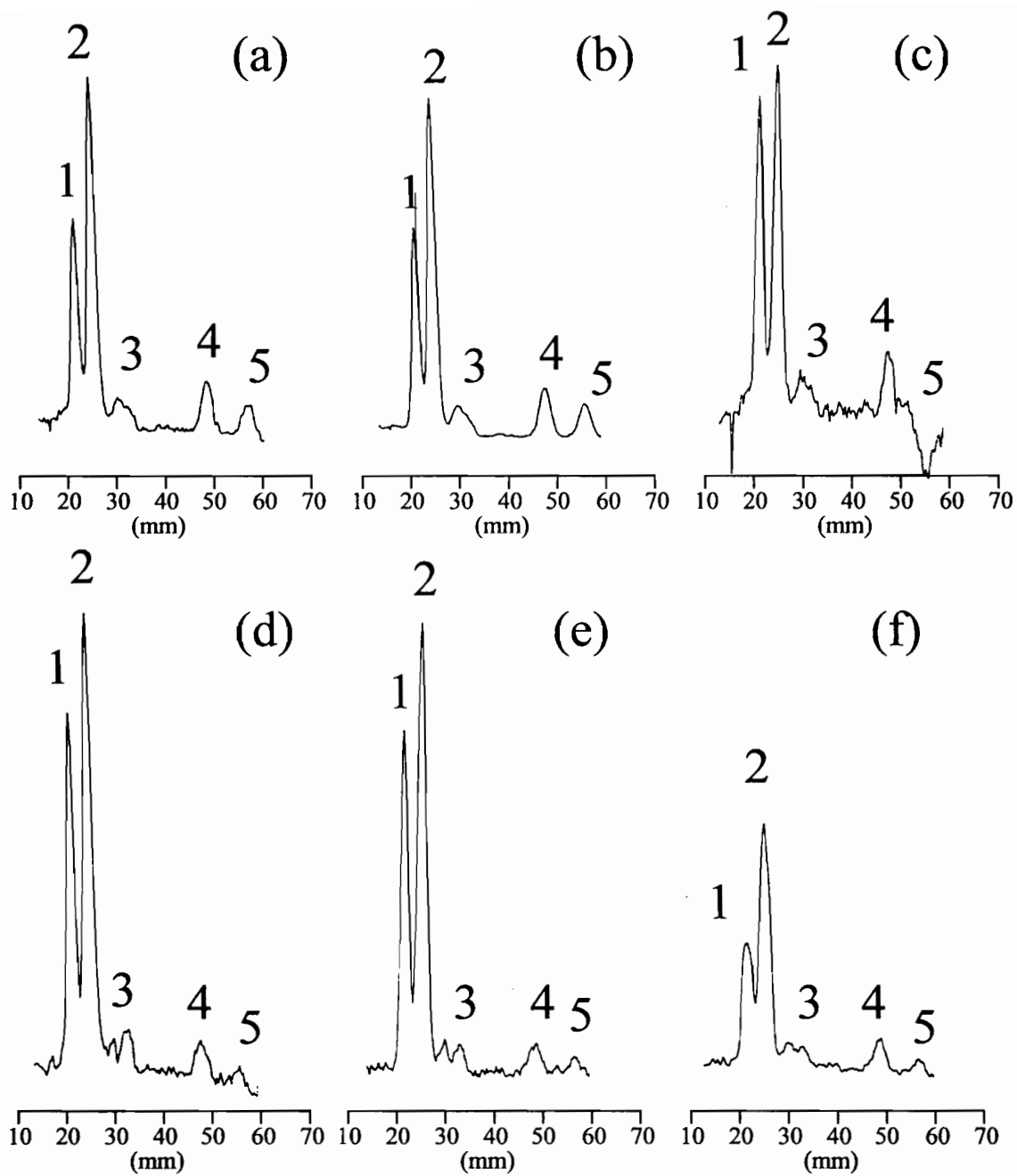


Fig. 3-3 Densitograms of Makino soil sample obtained from (a) single beam of non-treatment plate ($\lambda=435\text{nm}$), (b) double beam of non treatment plate ($\lambda_f = 540\text{nm}$, $\lambda_s = 430\text{nm}$), (c) single beam of non treatment plate ($\lambda = 270$), (d) single beam of KOH treatment plate ($\lambda = 540\text{nm}$), (e) double beam of KOH treatment plate ($\lambda_f = 450\text{nm}$, $\lambda_s = 540\text{nm}$), and (f) single beam of MgOAc treatment plate ($\lambda=490\text{nm}$). 1, 7,7'-biphyscion; 2, hinakurin; 3, microcarpin; 4, physcion; 5, chrysophanol

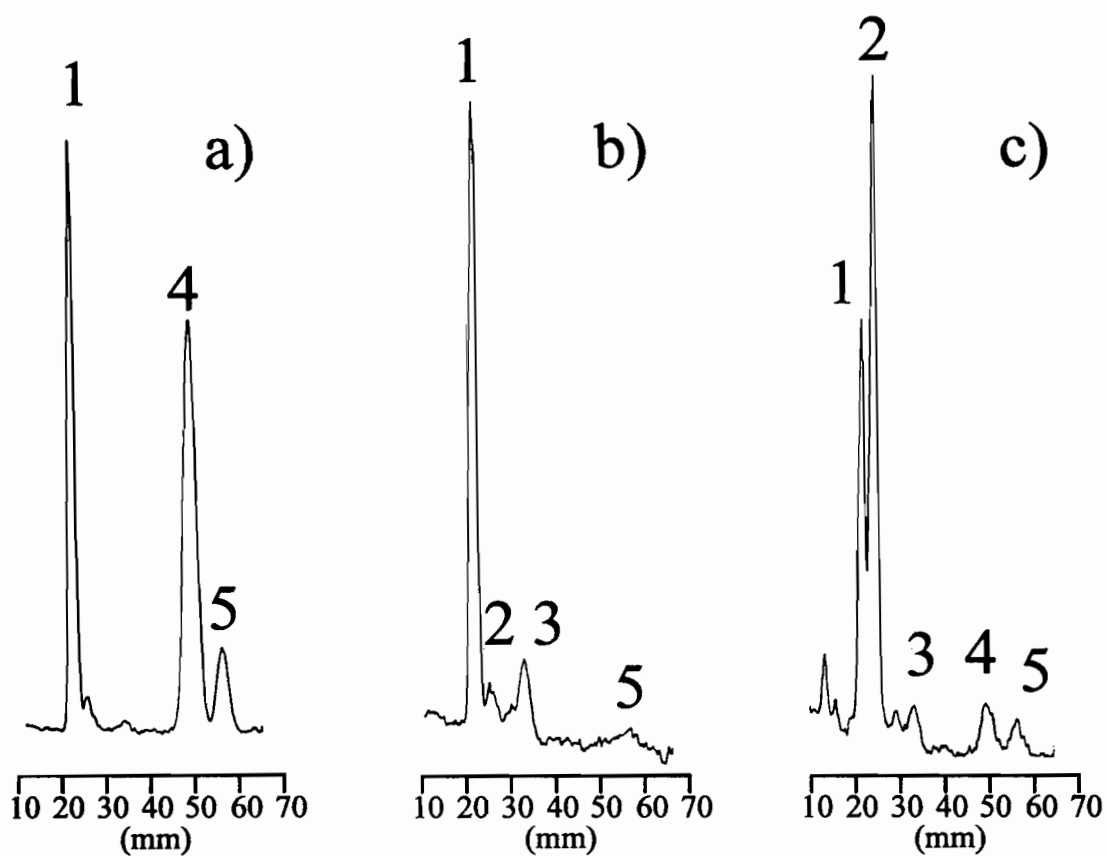


Fig. 3-4 Densitograms obtained from (a) standard solution, (b) Makino soil, and (c) Mikawa soil. 1, 7,7'-biphyscion; 2, hinakurin; 3, microcarpin; 4, physcion; 5, chrysophanol

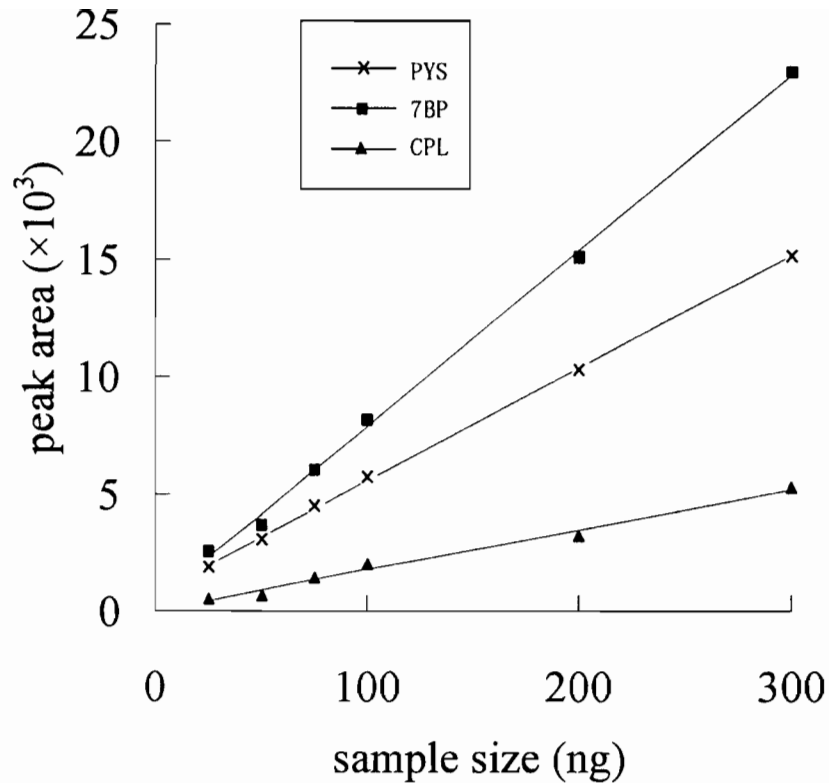


Figure 3-5 Calibration curves for BP, PYS, CLP

第 3 節 要約

土壌中の主要アントラキノン同時定量が、TLC-2ステージ展開法とデンシトメトリーの組み合わせによって可能となった。その場合、step1の展開溶媒には、クロロホルム：酢酸エチル：ギ酸 (89:10:1, v/v/v) を用い、step2の展開溶媒にはヘキサン：酢酸エチル：水：ギ酸(90:10 :3.5:1, v/v/v)を用いた。また、展開後の薄層プレートは呈色処理等を行わず、反射法にもとづくジグザグスキャン法で、2波長モードによる ($\lambda_f = 540\text{nm}$, $\lambda_s = 435\text{nm}$) 測定を行うことが最良の方法であることが確かめられた。この定量方法は、検出範囲が広い上に検出感度が高く、検量線の直線性も高い。また、市販の20×20cmのプレートを用いた場合、1枚のプレートで12のサンプルが同時に処理でき、迅速に測定できる優れた定量法であるといえる。

第4章 土壤中の主要アントラキノンの分布特性

土壤中では最も主要なアントラキノンである chrysotalunin (CLN)については、アセチル化と HPLC の組合せによる定量法が確立している (Fujitake et al., 1991a). その CLN は日本のあらゆる型の表層土壤で検出され (最大で 40mg kg^{-1}), 黒ボク土や, ササを主体とする草原植生下の土壤に多く存在することが知られている (Fujitake et al., 1992). また, CLN の土壤断面内の垂直分布をみると, 最表層よりもむしろ表層下部で CLN 含量が高いことも報告されている. しかし, その他の主要アントラキノンの組成や, 濃度, 分布については, 定量法がこれまで存在しなかったことから未だに不明である.

2次元展開薄層クロマトグラフィー法による定性的な検索により, CLN 以外の土壤中の主要なアントラキノンには, chrysophanol (CPL), physcion (PYS), 7,7'-biphyscion (7BP) と 2つの未同定の化合物であることがわかっている (Fujitake, 1991). 前述のとおり第2章で未同定化合物を microcarpin (MCP), hinakurin (HKR) と同定し, 第3章でこれらの5つのアントラキノンの同時定量法を確立した.

土壤中でのアントラキノンの生成や挙動を把握するためには, 主要アントラキノンの分布特性を明らかにする必要がある. したがって, 本章では, 第3章で確立した定量法と CLN の定量法を用いて, 日本の各地に分布する黒ボク土および褐色森林土とネパール王国の土壤中の主要なアントラキノンを測定し, 表層土壤における分布と, 土壤断面内における垂直分布を調べた. また, ススキ草地の土壤, 並びに同地点でその植生がアカマツ林に遷移した土壤について主要なアントラキノンの比較を行った.

第1節 試料および方法

1. 土壤試料

表層土壤における分布を調べるために, Fig. 4-1 に示した 24 地点の日本の表層土壤と 2 地点のネパール王国の表層土壤を採取し, Table 4-1 に示したように, 黒ボク土 19 地点, 褐色森林土 7 地点の A 層および Ah1 層の土壤を用いた. アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土の分類には, y_1 が 6 以下をアロフェン質黒ボク土, y_1 が 6 以下を非アロフェン質黒ボク土とした (三枝ら, 1992). また, 断面内の垂直分布を調べるた

Table 4-1 Soil samples used

Sample N.O.	Sample Name	Depth (cm)	Type of Land Use ^a	Remarks ^b
<i>Japanese soils</i>				
<i>Umbric Andosols</i>				
1	Hayakita	0-12	F	broad leaf forest
2	Erimo	0-23	G	pasture
3	Koiwai	0-19	G	pasture
4	Kanagasaki	0-11	F	red pine, bamboo grass
5	Sugadaira-G	0-10	G	eulalia
6	Sugadaira-F	0-7	F	red pine, bamboo grass
7	Yatsugatake	0-12	F	oak
8	Yugashima	0-10	F	Ceder, oak
9	Soni	0-20	G	bamboo grass
10	Mimuro	0-21	G	cypress, bamboo grass
11	Mineyama	0-22	G	ceder, bamboo grass
12	Sugyome	0-10	G	cypress, bamboo grass
13	Makino	0-8	G	bamboo grass, eulalia
14	Gyoseizan	0-10	G	bamboo grass
15	Akagi	0-17	F	ceder, bamboo grass
16	Mikawa	0-6	G	bamboo grass
17	Godan	0-8	G	bamboo grass, eulalia
18	Otsu	0-22	G	alang grass
19	Miyakonojo	0-13	G	pasture
<i>Distric Cambisols</i>				
20	Hachiura	0-20	F	ceder, bamboo grass
21	Saiki	0-22	F	cypress, bamboo grass
22	Isarigami	0-25	F	cypress, eulalia
23	Maya	0-34	F	chinquapin
24	Kuroiwa	0-3	F	red pine, bamboo grass
<i>Nepal soils</i>				
25	Jiri-g	0-10	G	pasture
26	Jiri-f	0-4	F	pine

^aType of land use are as follows: F, forest; G, grass land.

^bBamboo grass, *Sasa* and/or *Neosasamorpha* sp.; Eulalia, *Miscanthus sinensis*; Red pine, *Pinus densiflora*; Ceder, *Cryptomeria japonica*; Oak, *Quercus* sp.; Beech, *Faguceae* sp.; Chinquapin, *Castanopsis* sp.; Cypress, *Chamaecyparis obtusa*; Alang grass, *Imperata cylindrica*; Pine, *Pinus wallichana*.

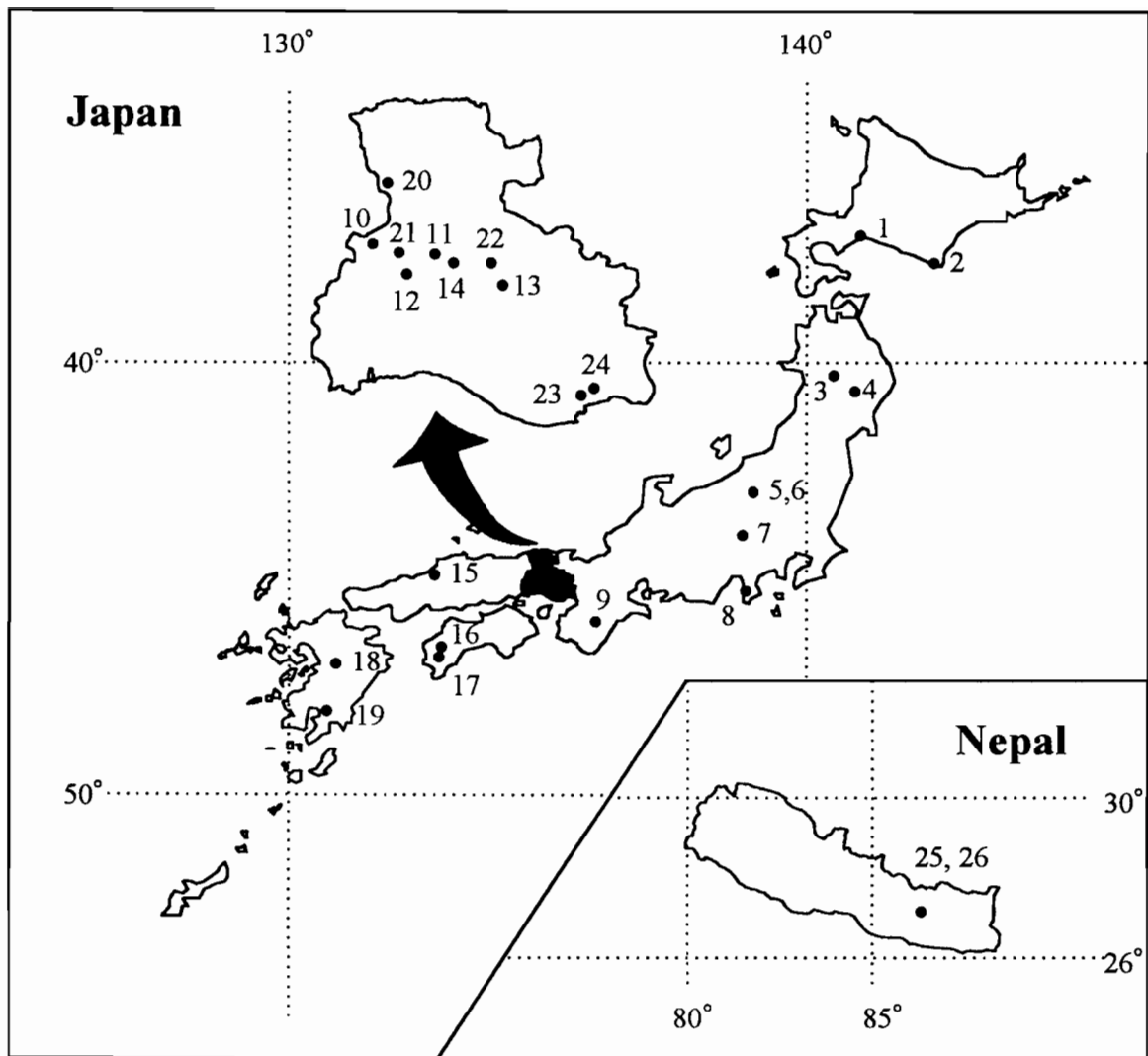


Fig. 4-1 Location of sampling sites.

めに Sugadaira-G (SG-G), Sugadaira-F (SG-F), Gyousei (GS), Soni (SN), Makino (MKN), Kuroiwa (KR), Jiri-F (JR-F) 土壌については、各土壌断面の各層位ごとの土壌を用いた。また、SG-G, SG-F, SN, GS の土壌については、断面分布を詳しく調べるために 5cm ごとに区分してサンプリングを行った土壌も用いた。土壌の概略と土壌断面調査にもとづく断面記載を以下に示した。また、Fig. 4-2 に土壌断面の写真を示した。尚、土壌群の分類は FAO UNESCO (1990) による分類名を用いた。

(1) Sugadaira-G (SG-G) 土壌

採取地：長野県小県郡真田町菅平高原実験センター

土壌群：Umbric Andosols (黒ボク土)

地形：平坦

斜面方位，傾斜，標高：N5E，6°，1320m

地目：ススキ草地

採取年月日：平成6年10月14日

地質：安山岩

天候：晴れ

母材・堆積様式：非固結性火成岩(火山灰)・風積

土壌断面記載：

Ah1；0-10cm，黒褐(10YR 3/2)，腐植頗る富む，LiC，ち密度 21，細根極めて多，小根多，中根まれ，団粒状構造発達度中，細孔隙富，小孔隙有，粘着性中，可塑性強，半湿，層界平坦明瞭

Ah2；10-21cm，黒(10YR 2/1)，腐植頗る富む，HC，ち密度，細根極めて多，小根多，中根まれ，0.5～1cm 粒状構造発達度中，細孔隙富む，小孔隙有，粘着性中，可塑性強，半湿，層界平坦明瞭

Ah3；21～35cm，黒褐(10YR 2/2)，腐植頗る富む，LiC，ち密度 25，細根多，小根有，2cm 亜角塊状構造発達度強，細孔隙富む，小孔隙有，粘着性中，可塑性強，半湿，層界平坦判然

Ah4；35-62cm，黒褐(10YR 2/2)，腐植頗る富む，LiC，ち密度 20，細根多，小根多，2cm 亜角塊状構造発達度弱，細・小孔隙含む，中・粗孔隙有，粘着性中，可塑性強，半湿，層界平坦面然

Bw1；62～80cm，褐(10YR 4/6)，腐植含む，LiC，ち密度 20，細根・小根まれ，亜角塊状構造発達度中，細・小孔隙有，粘着性中，可塑性中，半湿，層界平坦判然

Bw2；80cm～，黄褐(10YR 5/8)，腐植有，LiC，ち密度 24，未風化巨礫含，細・小・中・大根無し，4cm 亜角塊状構造発達度中，細・小孔隙含む，中・粗孔隙有，粘着性弱，可塑性中，半湿

(2) Sugadaira-F (SG-F) 土壤

採取地：長野県小県郡真田町菅平高原実験センター

土壤群：Umbric Andosols(黒ボク土)

地形：平坦

斜面方位，傾斜，標高：N2W，10°，1320m

地目：アカマツ林

採取年月日：平成6年10月14日

地質：安山岩

天候：晴れ

母材・堆積様式：非固結性火成岩(火山灰)・風積

土壤断面記載：

Ah1 ; 0～7cm, 黒褐(10YR 2/2), LiC, 腐植頗る富む, 細根・小根極めて多, 中根・大根希
団粒および粒状構造, 細・小孔隙含む, 粘着性弱, 可塑性中, 半湿, 層界平坦
明瞭

Ah2 ; 7～17cm, 黒褐(10YR 2/3), CL, 腐植頗る富む, ち密度 23, 半風化円形小礫有り,
細根・小根有り, 中根希, 団粒状および1～2cm 亜角塊状発達度強, 細・小孔隙含
む粘着性中, 可塑性中, 半湿, 層界平坦明瞭

Ah3 ; 17～31cm, 暗褐(10YR 3/4), LiC, 腐植富む, ち密度 22, 半風化亜角小礫(スコリア)
有, 細根・小根有, 2cm 亜角塊状構造発達強, 細孔隙富む, 小孔隙有り, 粘
着性中, 可塑性強, 半湿, 層界波状判然

Ah4 ; 31～47cm, 黒褐(10YR 2/2), LiC, ち密度 20, 腐植頗る富む, 細根多, 小根多, 2cm
亜角塊状発達度弱, 細・小孔隙含む, 中・粗孔隙有り, 粘着性中, 可塑性強, 半
湿, 層界平坦明瞭

Bw1 ; 47-67cm, 褐(10YR 4/6), 腐植含む, LiC, ち密度 20, 未風化巨礫含, 細根・小根
まれ, 亜角塊状発達度中, 細・小孔隙有り, 粘着性中, 可塑性中, 半湿, 層界平
坦漸変

Bw2 ; 67cm-, 黄褐(10YR 5/8), 腐植なし, LiC, ち密度 24, 未風化巨礫含, 細・小・中・
大根無し, 4 cm 亜角塊状構造発達度中, 細・小孔隙含む, 中・粗孔隙有, 粘着性弱,

可塑性中，半湿

(3) Gyosei (GS) 土壤

採取地：兵庫県神崎郡大河内町峰山高原暁晴山

土壤群：Umbric Andosols (黒ボク土)

地形：平坦

斜面方位および傾斜：N，3°

地目：チマキザサ草地

採取年月日：平成6年5月28日

地質：安山岩

天候：晴れ

母材・堆積様式：非固結性火成岩(火山灰)・風積

土壤断面記載：

Ah1 ; 0-10cm, 黒色(7.5YR 2/1), 腐植頗る富む, LiC, ち密度 9, 礫なし, 火山ガラス有り, 細根多, 中根まれ, 粒状構造, 粘着性中, 可塑性強, 湿, 層界平坦明瞭

Ah2 ; 10-16cm, 黒褐色(7.5YR 3/2), 腐植頗る富む, LiC, ち密度 14, 火山ガラス有り, 細根多, 中根まれ, 小亜角塊状構造発達度中, 粘着性中, 可塑性強, 半湿, 層界平坦明瞭

2Ah1 ; 16-35cm, 暗褐色(7.5YR 3/4), 腐植富む, LiC, ち密度 17, 火山ガラス有り, 細根有り, 中根まれ, 小亜角塊状構造発達度中, 粘着性中, 可塑性強, 半湿

3Ah1 ; 35-41cm, 暗褐(7.5YR 3/3), 腐植富む, LiC, ち密度 17, 長径 1cm 安山岩風化亜角礫あり, 細根多, 中根まれ, 亜角塊状構造発達度中, 粘着性中, 可塑性強, 半湿, 層界平坦明瞭

3AB ; 41-47cm, 褐(7.5YR 4/4), 腐植有, LiC, ち密度 18, 安山岩風化亜角小礫含む, 細根有り, 壁状構造, 粘着性中, 可塑性強, 半湿, 層界平坦明瞭

3Bw ; 47-76cm, 明褐色(7.5YR 5/8), 風化礫 赤(10YR4/6), 腐植有, LiC, ち密度 18, 安山岩風化亜角小礫含む, 細根有り, 壁状構造, 粘着性中, 可塑性強, 半湿, 層界不規則判然

3BC ; 76-95cm, 明赤褐(5YR 5/8), 腐植有, CL, ち密度 19, 安山岩風化亜角小礫含む,
細根まれ, 壁状, 粘着性中, 可塑性中, 半湿

(4) Soni (SN) 土壤

採取地 : 奈良県宇陀郡曾爾村奥香落高原

土壤群 : Umbric Andosols (黒ボク土)

地形 : 尾根部肩状斜面

地目 : ササ草地

採取年月日 : 平成 5 年 4 月 27 日

地質 : 安山岩

天候 : 曇りのち晴れ

母材・堆積様式 : 非固結性火成岩(火山灰)・風積

土壤断面図記載 :

Ah1 ; 0-20cm, 黒色 (10YR 2/1) , 腐植頗る富む, LiC, ち密度頗るしょう, 細根, 小根,
中根極めて多, 2~4mm 団粒状構造, 細孔隙含む, 粘着性弱~なし, 可塑性弱, 半
湿, 層界平坦明瞭

Ah2 ; 20-25cm, 黒褐色 (10YR 2/3), 腐植頗る富む, LiC, ち密度軟, 細根多, 中根有り,
小角塊状構造, 2~4mm 団粒状構造, 細孔隙含む, 粘着性弱, 可塑性弱, 半湿, 層
界平坦明瞭

Ah3 ; 25-35cm, 暗褐色 (10YR 3/4), 腐植富む, LiC, ち密度堅 , 細根有り, 小亜角塊状
構造, 団粒状発達度中, 細孔隙含む, 粘着性弱, 可塑性中, 半湿, 層界平坦判然

2Ah1 ; 35-58cm, 黒褐色(10YR 2/3) 腐植富む, LiC, ち密度軟~しょう(18)細根多, 中角
塊状構造発達度中, 団粒状発達度中, 細孔隙含む, 粘着性弱, 可塑性中, 半湿,
層界平坦画然

2AB ; 58-67cm, 暗褐色(10YR 3/3), 腐植富む, LiC, ち密度軟, 細根有り, 小亜角塊状構
造, 団粒状発達度中, 細孔隙含む, 粘着性弱, 可塑性中, 半湿, 層界平坦判然

2Bw ; 67cm-85cm, 黄褐色(10YR 5/8), 腐植有, CL, ち密度軟, 2~3cm の風化礫有また
は無し, 細根有り, 2~3cm 亜角塊状構造発達度中, 細孔隙含む粘着性弱, 可塑

性弱，半湿

2BC ; 85cm-, 黄褐(10YR 5/8), 腐植有, CL, 密度軟, 大角礫含む, 細根有り, 2~3 cm 亜角塊状発達度中 細孔隙含む, 粘着性弱, 可塑性弱, 半湿

(5) Makino (MKN) 土壤

採取地 : 兵庫県多可郡中町牧野

土壤群 : Umbric Andosols (黒ボク土)

地形 : 山腹緩斜面

地目 : アカマツ林

採取年月日 : 平成元年 12 月 18 日

地質 : 流紋岩

天候 : 曇り

母材・堆積様式 : 非固結性火成岩(火山灰)・風積

土壤断面図記載 :

Ah1 ; 0-8cm, 黒褐 (5YR 2/1) , 腐植頗る富む, LiC, ち密度 14, 細小根多, 20~30mm 亜角塊状構造発達度中, 団粒構造発達度中, 粘着性中, 可塑性中, 半湿, 層界平坦漸変

Ah2 ; 8-23cm, 赤黒 (2.5YR 1.7/1) , 腐植頗る富む, CL, ち密度 17, 大角礫有り細小根希, 中根有, 20~50mm 亜角塊状構造発達度強, 粘着性弱, 可塑性なし, 半湿, 層界平坦漸変

Ah3 ; 23-38cm, 赤黒 (2.5YR 1.7/1) , 腐植富む, LiC, ち密度 15, 巨角礫富む, 細根含, 小根有り, 20~50mm 亜角塊状構造発達度強, 団粒構造発達度中, 孔隙細含, 粘着性中, 可塑性弱, 半湿, 層界平坦判然

AB ; 38-56cm, 黒褐 (7.5YR 3/2), 腐植含む, CL, ち密度 16, 巨角礫富む, 細小根有り, 亜角塊状構造発達度弱, 孔隙細富, 小有, 粘着性中, 可塑性中, 半湿, 層界不規則明瞭

Bw1 ; 56-75+cm, 褐 (7.5YR 4/6), 腐植有, LiC, ち密度 16, 礫層, 壁状構造, 孔隙細富, 小有, 粘着性中, 可塑性中, 半湿

(6) Kuroiwa (KR) 土壤

採取地：兵庫県神戸市灘区摩耶山町摩耶山

土壤群：Distric Cambisols (褐色森林土)

地形：尾根

斜面方位，傾斜，標高：S46W，25° 665m

地目：コナラ林

採取年月日：平成4年10月13日

地質：花崗岩

天候：晴れ

堆積様式：匍行土

土壤断面記載：

Ah1 ; 0~3cm, 暗褐(10YR 3/4), 腐植富む, L, ち密度 13, 小亜角礫含む, 細根極めて多, 中根有り, 2~5mm 粒状発達度中, 小孔隙有り, 粘着性弱, 可塑性無し, 半湿, 層界平坦判然

Ah2 ; 3~9cm, 褐(10YR 4/6), 腐植含む, L, ち密度 16, 小亜角礫含む, 中根希, 1cm~ 亜角塊状構造発達度中, 小孔隙有り, 粘着性弱, 可塑性弱, 半湿, 層界平坦漸変

AB ; 9~19cm, 黄褐(10YR 5/8), 腐植有り, CL, ち密度 20, 小亜角礫含む, 細根有, 1cm~ 亜角塊状構造発達度中小孔隙有り, 粘着性弱, 可塑性中, 湿, 層界平坦漸変

Bw1 ; 19~27cm, 明褐(10YR 5/6), 腐植有り, CL, ち密度 17, 小亜角礫含む, 小根有, 中根稀, 角塊状構造発達度小, 小孔隙有り, 粘着性弱, 可塑性中, 湿

Bw2 ; 27~37cm, 明褐(10YR 5/6), 腐植含む, CL, ち密度 17, 亜角礫小含む, 根有り, 中根稀, 角塊状構造発達度小, 小孔隙有り, 粘着性弱, 可塑性中, 湿, 層界平坦漸変

BC ; 37~65cm, 明褐(10YR 5/6), 腐植有り, CL, ち密度 17, 巨礫有り, 細根有り, 角塊状構造発達度小, 小孔隙有り, 粘着性弱, 可塑性中, 湿

(7) Jiri (JR-F) 土壤

採取地：ネパール王国, Dolakha district, Jiri city, livestock

土壌群：Distric Cambisols (褐色森林土)

地形：尾根

斜面方位，傾斜，標高：S62W，32° 1850m

地目：ゴヨウマツ植林地(40年)

採取年月日：平成2年3月24日

地質：変成岩

天候：晴れ

堆積様式：匍行土

土壌断面記載：

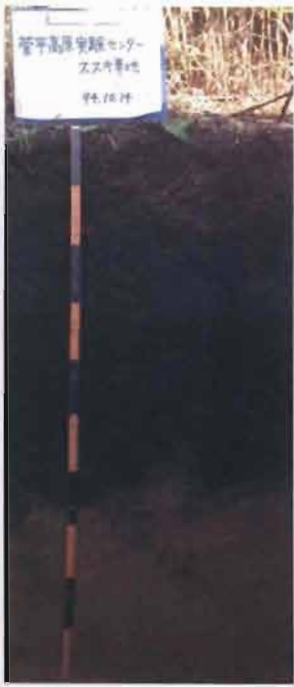
Ah1 ; 0～4cm, 暗褐(7.5YR 3/4), 腐植含む, L, ち密度 16, 小礫含む, 細根有中根希, 2～5mm 粒状発達度中, 小孔隙有り, 半湿, 層界平坦判然

Ah2 ; 4～12cm, 褐(10YR 4/4), 腐植含む, L, ち密度 20, 小～大角礫含む, 中根希, 細根有, 粒状構造発達度中, 小孔隙有り, 半湿, 層界平坦判然

Bw1 ; 12～22cm, 褐(10YR 4/6), 腐植含む, L, ち密度 17, 小～大角礫含む, 中根希, 細根多, 1cm～亜角塊状構造発達度中, 小孔隙有り, 半湿, 層界平坦判然

Bw2 ; 22～41cm, 褐(10YR 4/6), 腐植有り, L, ち密度 19, 小～大角礫含む, 細根稀, 壁状, 小孔隙有り, 乾, 層界平坦漸変

BC ; 41～(60)cm, 黄褐(10YR 4/6), 腐植含む, L, ち密度 22, 小～大角礫富む, 細根稀, 壁状構造, 小孔隙有り, 乾



a



b



c



d



e



f



g

Fig.4-2 Photographs of sampling soil profiles; a) Sugadaira-G ; b) Sugadaira-F; C) Gyousei; d) Soni; e) Makino; f) Kuroiwa; g) Jiri-F

2. 根圏土壌と非根圏土壌との分離

根圏土壌と非根圏土壌の分離については鈴木・石沢(1965)の方法に基づきおこなった。すなわち、第2章で用いた日名倉山土壌から土壌の構造をなるべく崩さずに、チマキザサの根を土壌がついたまま採取した。この根についたままの土壌を脱塩水中に20分間浸漬して、根に緩く保持されている土壌(非根圏土壌)を落とした。次いで、残部を根につけたまま、別の容器中の脱塩水中に移し、ここで、手で土壌を全部落とした(根圏土壌)。これらの土壌を風乾し、風乾細微土に調製した。

3. 一般理化学性

1) pH (H₂O)

風乾細土(<2mm)10gに脱塩水25mLを加え、ガラス棒でよく攪拌した後、30分以上放置し、上澄液のpHをガラス電極法により測定した。

2) 有機炭素量 (O-C)

風乾細微土(<0.5mm)をチューリン法(土壌標準分析・測定法委員会, 1986)によって測定した。

3) 脱鉄処理可溶の鉄・アルミニウム量 (DCB-Fe, DCB-Al)

風乾細微土(<0.5mm)0.5gを50mLの遠沈管に測り採り、0.3Mクエン酸三ナトリウム溶液35mLを正確に加えて、湯浴上で小型ロートをかぶせて70から80°Cに加温した。この温度に保った後、ヒドロサルファイト0.5gを加えてときどきかき混ぜながら20分間放置後、冷水で冷却した。この遠沈管を遠心分離(1000rpm, 5分間)後、上澄液を乾燥濾紙(東洋濾紙(株), No.6)を用いて濾過した。この濾液の一部(0.5mL)を50mL容メスフラスコにとって定容し、この希釈液を誘導結合プラズマ(ICP)発光分析法によって測定した。

4) 酸性シュウ酸アンモニウム溶液可溶の鉄・アルミニウム量 (TAM-Fe, TAM-Al)

風乾細微土(<0.5mm)0.5gを50mL容遠沈管に測り採り、TAMM試薬(シュウ酸25.2g, シュウ酸アンモニウム49.68gを水に溶かして2Lとした)35mLを正確に加え、ロータリ

ーシェーカーで1時間振とう後、その上澄液を乾燥濾紙（東洋濾紙（株）, No.6）で濾過した。この濾液の一部（0.5mL）をとり、50mL 容メスフラスコで定容し、この希釈液を ICP 発光分析法によって測定した。

3)交換酸度

風乾細土(<2mm)20g を 100ml の三角フラスコにとり、これに 1N 塩化カリウム溶液 50ml を加え、密栓してときどきふりまぜながら 24 時間 30°C の恒温機内に放置し、ろ過して得られた浸出液 20ml を約 1 分間煮沸して脱炭酸した後、フェノールフタレインを指示薬として 0.1N 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。この滴定値を 6.25 倍して浸出液 125ml あたりの滴定値 y_1 を算出した。

4. 主要な土壌アントラキノンの定量法

1) CLN の定量

Fujitake ら(1991a)の方法に準じて行った。

すなわち、土壌試料(風乾細微土)2g を 50mL 容三角フラスコに精秤し、これに 2N NaOH 溶液 10mL, アセトン 20mL を加え、ゴム栓をして 40 秒間激しく振とうした。静置して上層（アセトン層）と下層（NaOH 層）に分け、上層（アセトン層）部を 300mL 容分液ロートに移し、これに 3N HCl を加えて酸性化した。下層（NaOH 層）部にはさらにアセトン 10mL を加えて同様の操作を上層部に色がつかなくなるまで繰り返した。そして、この分液ロートに酢酸エチル 60mL, 脱塩水 60mL を加えて振とうし、下層（水層）部は廃棄し、上層（酢酸エチル層）部を脱塩水を用いて 3 回水洗した。得られた酢酸エチル層はロータリーエバポレーターで減圧濃縮した後、内容物を少量のクロロホルムに溶かして 4mL 容のバイアルに移した。アセチル化操作は、次のように行った。上記のバイアルにピリジン 150 μ L, 無水酢酸 50 μ L を加え、スクリューキャップで密栓した。これを 100°C の沸騰浴につけて、20 分間反応させた後、真空デシケーターに移して溶媒を除去した。このものについて、再度同様のアセチル化操作を繰り返した。こうして得られたアセチル化物を少量のクロロホルムに溶かして、シリカゲル（ワコーゲル C-200, 和光純薬（株）製）を 2g 詰めたミニカラム（ ϕ 18mm \times 120mm）に注加しシリカゲルに吸着さ

せた。一晩放置してクロロホルムを除去した後、カラムにベンゼンを 20mL 流し、このベンゼン溶出画分は廃棄した。次に、このカラムに、クロロホルム：酢酸エチル (9:1, v/v) を 20mL 流し、この溶出画分をとって減圧濃縮した後、真空デシケーターで乾固した。乾固した試料を一定量のクロロホルム 0.5mL~2mL に溶かし、そのうち 10 μ L をマイクロシリンジを用いて HPLC に供した。

なお、定量方法は絶対検量線法により行った。検量線用の試料は、マキノ土壤から単離した CLN (Fujitake, 1991) を一定量測り取り、前述のアセチル化操作以後の操作を同様に行い HPLC に供した。HPLC は以下の条件で行った。

ポンプ；Shimadzu LC-6A liquid chromatograph

UV 検出器；Shimadzu SPD-6A UV Spectrophotometric detector

カラム；Whatman カートリッジカラム (ϕ 4.6mm \times 125mm)

充填剤；Partisil 5 ODS 2

流速；0.8mL/min

移動相；メタノール：0.1%酢酸水溶液 (78:22, v/v)

検出波長；264nm

2) CLN 以外の土壤中の主要アントラキノンの測定方法

第 3 章に準じて、2 ステージ展開 TLC-デンシトメトリー法により測定した。また、土壤抽出液の調整も第 3 章に準じて行った。

尚、定量方法は絶対検量線法により行い、HKR, MCP の含量については 7BP の検量線を用いて概算した。

以下に操作・測定条件を示す。

【操作条件】

薄層プレート；Merk KG60F₂₅₄ (厚さ 0.2mm; 20 \times 20)

展開操作；2 ステージ展開法

展開溶媒；step1 クロロホルム：酢酸エチル：ギ酸 (89:10:1, v/v/v)

step2 石油エーテル (b.p.60-80)：酢酸エチル：水：ギ酸 (90:10:3.5:1, v/v/v/v)

【測定条件】

測定モード；反射モード，ジグザグスキャン法，2波長差スペクトル

波長； $\lambda_f=540\text{nm}$ ， $\lambda_s=435\text{nm}$

第2節 結果および考察

1. 表層土壌における分布

Table 4-2 に今回供試した表層土壌の一般理化学性と主要な土壌アントラキノン含量を、また Table 4-3 に主要な土壌アントラキノン含量の平均値を示した。Table 4-3 に示したように 7BP, HKR, MCP, PYS, CPL の平均値はそれぞれ、257, 148, 82.2, 68.4, 183 $\mu\text{g kg}^{-1}$ であり、CLN 含量 (HPLC 法) の平均値 11.2 mg kg^{-1} と比べると 50 分の 1 から 100 分の 1 であることがわかった。また、個々の土壌で比較して CLN と較べると他のアントラキノンが微量であることがわかる (Table 4-2)。したがって、土壌中で最も主要なアントラキノンは CLN であるといえる。この含量の違いは、まず第 1 に土壌中で生産される量が各アントラキノンによって異なることが考えられる。しかし、土壌にいくつかのアントラキノンを添加してインキュベーション実験を行った例として、McGrath (1972) は 1 ヶ月で CPL はすみやかに消滅したが、CLN はその量に変化しなかったことを報告しており、また、Linhres ら (1979) は CPL や emodin などの単量体のアントラキノンが 4 週間でその半分量が分解されることを報告している。これらの実験は土壌そのものや、インキュベーションの諸条件が異なっているために、単純に結論を出せるものではない。しかし、比較的多くの微生物や高等植物が CPL や PYS などのアントラキノンを生産することが知られていることを考慮すると、CLN 以外のアントラキノンは、多量に生産されたとしても分解あるいは重合などの化学変化により消滅し、一方、CLN は化学変化に対して安定であるため土壌中に蓄積するのではないかと考えられる。

また、CLN 以外のアントラキノンのうち、7BP, HKR, PYS については数点の土壌ではその存在が確認されない場合があったが、およそこれらを含めて 5 つのアントラキノンすべてが、土壌に普遍的に存在するといつてよい。

Table 4-3 に示したように、PYS とその二量体である 7BP と HKR は、標準偏差が平均値よりも大きく土壌によるばらつきが大きいことがわかる。また、CPL とその二量体で

ある CLN と MCP は標準偏差が平均値よりも小さくばらつきが PYS とその二量体よりも小さいことがわかる。

Table 4-2 Some chemical properties and anthraquinones contents of soil samples

Sample N.O.	CLN (mg kg ⁻¹)	7BP	HKR ^a	MCP ^a	PYS	CPL	pH (H ₂ O)	O-C (g kg ⁻¹)	y ₁	DCB-Fe (g kg ⁻¹)	TAM-Al (g kg ⁻¹)
1 ^c	0.3	Tr.	Tr.	5	15	91	6.00	57	0.6	24.5	3.8
2 ^c	2.8 ^b	17	12	23	133	360	5.50	159	12.2	21.5	24.8
3 ^c	4.1	31	9	7	24	269	5.30	114	2.0	37.7	84.5
4 ^c	6.0 ^b	66	Tr.	9	20	241	5.00	145	23.6	42.8	59.5
5	11.8	69	17	97	55	258	6.16	149	0.9	20.1	35.6
6	25.7	825	73	152	64	299	5.11	158	9.3	22.4	50.0
7	1.9 ^b	357	0	147	148	176	4.70	118	8.9	52.1	39.7
8 ^c	11.2	36	17	34	40	440	4.60	206	21.6	13.4	21.1
9	22.8	121	Tr.	263	195	443	5.19	142	11.4	14.7	23.0
10	8.5 ^b	19	Tr.	65	28	137	5.10	221	18.6	19.6	15.6
11	8.4 ^b	105	0	101	0	78	5.00	109	12.7	27.3	6.8
12	12.4 ^b	1020	82	152	0	65	4.40	73	17.0	26.0	13.6
13	9.8 ^b	1680	91	210	19	99	4.75	136	22.8	17.4	24.8
14	12.3	103	0	48	55	411	4.18	177	49.6	8.6	13.0
15	19.0 ^b	26	14	22	27	36	5.10	129	-	8.1	44.2
16	24.6 ^b	1940	3465	236	572	320	4.45	181	44.1	26.7	19.7
17	29.1 ^b	80	0	172	192	293	4.60	174	25.9	14.8	9.6
18 ^c	1.1 ^b	3	3	3	8	58	5.70	37	0.6	74.4	131.1
19 ^c	3.5 ^b	3	3	4	16	153	6.30	80	0.6	20.9	68.0
20	6.9 ^b	52	44	133	119	382	5.30	21	8.7	18.6	12.7
21	6.9	33	13	52	14	22	5.20	85	36.9	17.6	5.0
22	7.9	32	9	41	15	71	3.60	43	29.0	20.4	5.9
23	2.0	22	Tr.	19	0	5	4.10	54	15.6	7.6	3.0
24	16.0	31	Tr.	85	21	29	4.53	98	29.0	5.4	6.1
25	19.2	17	0	22	0	0	5.73	84	-	19.6	18.4
26	16.7	0	0	38	0	20	5.90	57	-	18.4	11.8

^a estimated using calibration for BP

^b data are cited from ref. (Fujitake et al., 1991b)

^c analytical data except for anthraquinones contents are cited from ref. (Wada et al. 1986)

Tr. means trace amount

- means not determined

Table 4-3 Mean values of HAQs contents in the soils of different types (mean±SE)

		CLN (mg kg ⁻¹)	7BP (μg kg ⁻¹)	HKR (μg kg ⁻¹)	MCP (μg kg ⁻¹)	PYS (μg kg ⁻¹)	CPL (μg kg ⁻¹)
<i>Umbric Andisols</i>	mean±SE	11.3±8.94	342±590	199±791	92.1±86.2	84.7±133	222±135
N=19	min.-max.	0.295-29.1	0-1940	0-3470	3.17-263	0-572	36.1-443
<i>Umbric Andisols</i> (allophane imogolite soils)	mean±SE	4.16±4.55	21.4±29.5	6.31±6.87	23.1±41.1	23.7±18.7	166±95.5
N=5	min.-max.	0.30-11.8	0.00-69.0	0.00-17.1	3.17-96.7	7.86-55.4	91.0-269
<i>Umbric Andisols</i> (chloritized 2:1 mineral soils)	mean±SE	13.5±9.03	490±668	288±955	124±84.2	113±155	259±137
N=13	min.-max.	2.80-29.1	16.8-1940	0.00-3460	9.13-263	0.00-571	65.1-442
<i>Distric Cambisols</i>	mean±SE	10.8±6.44	26.8±15.9	9.39±16.1	55.6±40.4	24.2±42.7	75.6±137
N=5	min.-max.	2-19.2	0-51.5	0-43.9	19.1-133	0-119	0-382
Total	mean±SE	11.2±8.22	257±520	148±677	82.2±77.5	68.4±118.3	183±149
N=23	min.-max.	0.295-29.1	0-1940	0-3470	3.17-263	0-572	0-443

CLNを除いた5つのアントラキノンの中では、7BPの平均値が397μg kg⁻¹ (Table 4-3)とやや高い値を示す。しかしながら、これは特定の土壤に7BPが多量に含まれていることが原因となっている。Table 4-2をみると、Mikawa, Sugyome, Makinoの土壤は、7BPがそれぞれ1940, 1020, 1680μg kg⁻¹と他の土壤に較べて10倍程度高い値を示し、この3つを除いた場合の平均値は89.1μg kg⁻¹となり、他のアントラキノンの平均値とあまり変わらない。7BP含量の高い3つの土壤の特徴としては、黒ボク土で、pHが4.5前後であることがあげられる。

HKRは概算ではあるがMikawa土壤で3mg kg⁻¹以上存在し、この値は、CLN以外のアントラキノンの中ではもっとも高い値を示した。しかし、なぜミカワ土壤だけに多量に含まれているのかは不明である。また、このアントラキノンは7BPが1mg kg⁻¹以上存在する土壤には必ず見出される。

黒ボク土と褐色森林土における各アントラキノン含量の平均値はCLNでそれぞれ11.3mg kg⁻¹と10.8mg kg⁻¹, 7BPでそれぞれ342μg kg⁻¹と26.7μg kg⁻¹, HKRでそれぞれ199μg kg⁻¹と9.39μg kg⁻¹, MCPでそれぞれ92.1μg kg⁻¹と55.6μg kg⁻¹, PYSでそれぞれ84.7μg kg⁻¹と24.2μg kg⁻¹, CPLでそれぞれ222μg kg⁻¹と75.6μg kg⁻¹, であった(Table 4-3)。有意な差

は PYS と CPL の場合を除いて認められなかったが($p < 0.05$, Mann-Whitney 検定), いずれのアントラキノンも黒ボク土のほうが多かった。一般に黒ボク土は, 有機物含量が褐色森林土よりも高く有機物を集積しやすい土壌である。したがってアントラキノンも例外ではなく黒ボク土に多く集積しているのかもしれない。しかし, 有機物含量(炭素含量)との直接的な相関は見出せなかった。したがって, 土壌で主要なアントラキノンは他の多くの有機物吸着に関わる無機成分とは異なる成分, すなわち黒ボク土に特有な無機成分と特異反応して吸着され, 土壌中に蓄積されるのかもしれない。土壌中の主要アントラキノンがペリ位に水酸基を持つ 1,8-dihydroxy 型であり, 多価カチオンとキレート複合体を形成する可能性が以前より推測されている。したがって, これら無機鉱物との関連性は高いと考えられる。そこで, さらに, アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土との間での, アントラキノン含量を比較した。Table 4-3 にそれぞれアントラキノンの平均値と標準偏差を示した。アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土における平均値は CLN でそれぞれ 4.16 mg kg^{-1} と 13.5 mg kg^{-1} , 7BP でそれぞれ $21.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ と $490 \mu\text{g kg}^{-1}$, HKR でそれぞれ $6.31 \mu\text{g kg}^{-1}$ と $288 \mu\text{g kg}^{-1}$, MCP でそれぞれ $23.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ と $124 \mu\text{g kg}^{-1}$, PYS でそれぞれ $23.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ と $113 \mu\text{g kg}^{-1}$, CPL でそれぞれ $166 \mu\text{g kg}^{-1}$ と $259 \mu\text{g kg}^{-1}$ となり, いずれのアントラキノンも非アロフェン質黒ボク土のほうが多く, HKR, PYS, CPL の場合以外では有意な差が見られた($p < 0.05$, Mann-Whitney 検定)。アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土は同様に活性なアルミニウムを多く含むが, アルミニウムの形態が異なると考えられる。この二種の土壌の違いは粘土鉱物組成にある。アロフェン質黒ボク土は主に非晶質のアロフェンやイモゴライトから成り, 非アロフェン質黒ボク土は, 2:1~2:1:1 型中間種鉱物を主体とする結晶性粘土鉱物からなる(Shoji & Saigusa, 1977)。また, 農業的な立場では, 非アロフェン質黒ボク土は, アルミニウムの過剰害が大きいことが知られ, この害の大きさは, 黒ボク土において y_1 と正の相関があることが知られている(Saigusa et al., 1980)。そこで, 黒ボク土での, y_1 と各アントラキノン含量との間で回帰分析を行うと, y_1 と CLN 含量の間では $r=0.471$ となり, 正の相関($p < 0.05$)が認められた(Fig. 4-2)。したがって, 害作用のあるアルミニウムがこれらのアントラキノン, 特に CLN の生成過程に関係があるかもしれない。

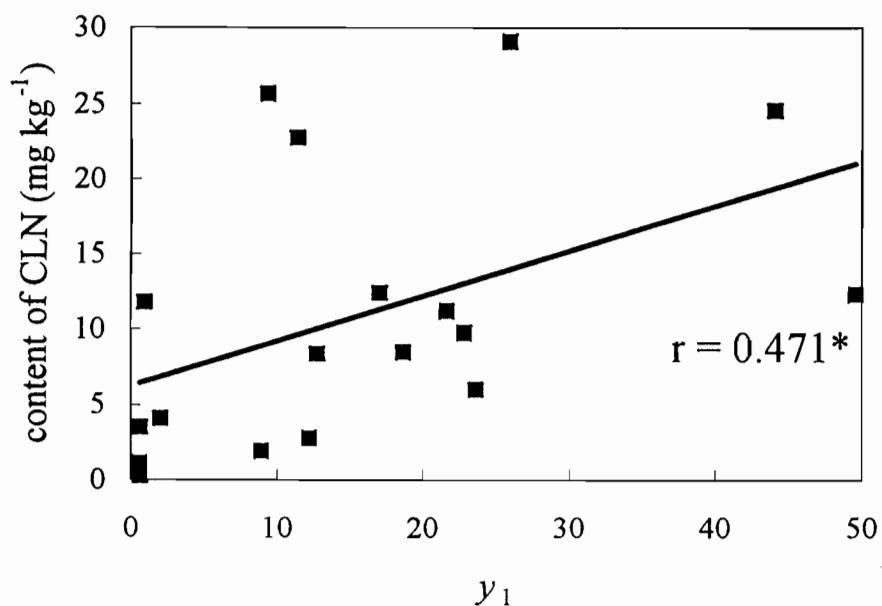


Fig. 4-3 Correlation of y_1 and content of CLN in Umbric Andosols
*means 5% levels of significance

2. 土壌断面における垂直分布

Table4-4 に土壌断面の一般化学性と各種アントラキノン含量を示した. SG-G の土壌断面における炭素含量ならびに各アントラキノン含量を層位ごとおよび5cmごとにプロットしたものを Fig. 4-4 に示した. 同様の結果を SG-F については Fig. 4-5, GS については Fig. 4-6, SN については Fig. 4-7 に示した. 層位ごとにプロットしたただけのものとして MKN については Fig. 4-8, 同様の結果を KR については Fig. 4-9, JR-F については Fig. 4-10 に示した.

SG-G 土壌の断面 (Fig. 4-4) においては, 炭素含量が第1層 (Ah1) 目から第2層 (Ah2) 目にかけて 1.1%増加し, それから下層へ向かうにしたがって徐々に減少する分布を示した. HKR 以外の5種のアントラキノンも第2層目で最も多く含まれる分布を示し, この傾向は炭素の分布とほぼ似通っているかに思える. しかしながら, 第1層目から第2層目へのそれら5種のアントラキノンの増加率は炭素含量のそれをかなり上回り, 炭素含量の増加以上に各アントラキノンが増加していることがわかる.

Table 4-4 HAQs contents and chemical properties in soil profiles

soil sample	depth	CLN	7BP	HKR	MCP	PYS	CPL	O-C	pH	DCB extract		TAM extracts	
horizon	(cm)	(mg kg ⁻¹)	(μg kg ⁻¹)			(g kg ⁻¹)			(H ₂ O)	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃
SG-G													
Ah1	(0-10)	11.8	78	19	110	56	183	149	6.16	20.1	51.6	14.2	35.6
Ah2	(10-21)	21.4	181	TR.	162	105	413	169	5.76	19.4	48.4	17.9	47.0
Ah3	(21-35)	12.0	166	33	64	69	168	129	5.73	23.7	60.7	19.2	50.4
Ah4	(35-62)	3.8	79	156	32	1	40	128	5.72	20.4	51.0	17.6	46.0
Bw1	(62-80)	0.9	0	Tr.	15	6	3	25	5.83	10.6	28.6	10.5	24.8
Bw2	(80-100)	0.5	0	Tr.	8	4	2	17	5.85	9.2	24.5	9.2	20.6
	(0-5)	9.2	82	Tr.	71	27	95	137	-	-	-	-	-
	(5-10)	16.5	55	Tr.	25	34	156	162	-	-	-	-	-
	(10-15)	23.1	165	30	109	80	469	165	-	-	-	-	-
	(15-20)	29.3	202	36	179	119	634	164	-	-	-	-	-
	(20-25)	18.4	281	42	193	127	468	144	-	-	-	-	-
	(25-30)	15.2	172	22	92	80	225	133	-	-	-	-	-
	(30-35)	10.6	252	32	83	47	110	128	-	-	-	-	-
	(35-40)	7.6	356	37	64	91	344	129	-	-	-	-	-
	(40-45)	6.2	98	0	33	30	122	127	-	-	-	-	-
SG-F													
Ah1	(0-7)	25.7	936	83	172	64	212	158	5.11	22.4	57.2	18.9	50.0
Ah2	(7-17)	49.8	347	33	169	36	231	132	5.28	20.4	50.4	15.0	37.6
Ah3	(17-31)	9.0	233	41	50	22	104	74	5.78	20.9	51.8	20.1	53.6
Ah4	(31-47)	1.0	57	19	43	16	51	40	5.89	23.6	59.1	29.9	83.0
Bw1	(47-67)	0.5	8	Tr.	13	3	1	10	5.69	18.4	45.2	21.6	58.9
BC	(67-86)	0.4	7	0	6	3	1	7	5.80	17.9	44.2	22.5	61.7
	(0-5)	27.7	1919	219	80	74	173	147	-	-	-	-	-
	(5-10)	39.9	947	141	110	42	214	128	-	-	-	-	-
	(10-15)	49.4	659	84	192	41	174	117	-	-	-	-	-
	(15-20)	26.4	234	39	51	22	81	93	-	-	-	-	-
	(20-25)	7.4	401	40	59	36	110	69	-	-	-	-	-
	(25-30)	5.5	347	37	51	41	162	63	-	-	-	-	-
	(30-35)	5.5	217	29	50	20	108	59	-	-	-	-	-
	(35-40)	3.7	105	13	24	10	37	48	-	-	-	-	-
	(40-45)	4.1	90	Tr.	29	10	34	53	-	-	-	-	-
GS													
A11	(0-10)	12.3	103	0	48	55	411	177	4.18	8.6	21.0	6.8	13.0
A12	(10-16)	14.1	35	0	96	53	570	124	4.58	13.7	31.2	7.3	14.6
A13	(16-35)	14.2	8	0	34	5	67	65	4.90	16.1	39.1	7.2	14.9
2A1	(35-41)	16.0	3	0	45	0	13	56	4.90	16.5	40.2	8.9	19.9
2A3	(41-47)	8.6	1	0	15	3	20	26	4.81	10.9	31.7	7.5	15.4
2B2	(47-76)	1.9	Tr.	0	3	0	1	9	5.03	6.6	18.5	5.2	8.4
2BC	(76-95)	0.3	Tr.	0	1	0	0	4	5.28	4.6	12.3	3.6	3.8
	(0-5)	Tr.	92	0	68	21	214	183	-	-	-	-	-
	(5-10)	5.7	48	0	72	21	295	135	-	-	-	-	-
	(10-15)	10.9	11	0	93	15	286	105	-	-	-	-	-
	(15-20)	11.0	32	0	20	0	47	82	-	-	-	-	-
	(20-25)	13.9	33	0	51	Tr.	21	63	-	-	-	-	-
	(25-30)	15.0	18	0	22	Tr.	18	62	-	-	-	-	-
	(30-35)	16.1	36	0	28	0	25	56	-	-	-	-	-
	(35-40)	13.8	19	0	31	Tr.	40	52	-	-	-	-	-

Table 4-4 continued

soil sample horizon	Depth (cm)	CLN (mg kg ⁻¹)	7BP	HKR ^a	MCP ^a	PYS	CPL	O-C (g kg ⁻¹)	pH (H ₂ O)	DCB extract		TAM extracts	
										Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃
			(μg kg ⁻¹)						(g kg ⁻¹)				
SN													
Ah1	(0-20)	28.9	51.1	Tr.	166	80	919	142	5.19	14.7	40.8	10.2	23.0
Ah2	(20-25)	22.1	40.5	Tr.	34	10	91	92	5.11	16.7	47.0	11.3	26.2
2Ah1	(25-35)	11.2	1.5	Tr.	5	6	67	69	5.20	23.7	61.6	14.0	34.9
3Ah1	(35-58)	8.4	30.2	Tr.	16	8	53	58	5.10	23.2	59.8	13.6	33.5
3AB	(58-67)	6.3	7.6	Tr.	14	4	33	28	5.00	13.0	35.9	11.8	28.6
3Bw1	(67-85)	2.2	6.3	Tr.	9	0	1	14	5.11	10.4	27.8	7.3	14.5
3BC	(85-110)	1.4	9.9	Tr.	8	0	Tr.	9	5.12	6.2	17.2	5.4	8.9
	(0-5)	23.4	76	Tr.	54	46	429	175	-	-	-	-	-
	(5-10)	24.0	37	Tr.	336	73	936	150	-	-	-	-	-
	(10-15)	29.3	3	Tr.	314	73	1175	135	-	-	-	-	-
	(15-20)	31.2	98	Tr.	366	81	1144	138	-	-	-	-	-
	(20-25)	28.8	113	Tr.	233	12	406	113	-	-	-	-	-
	(25-30)	21.6	66	Tr.	230	17	351	84	-	-	-	-	-
MKN													
Ah1	(0-8)	9.8 ^b	1680	91	210	19	99	136 ^b	4.75 ^b	17.4 ^b	23.2 ^b	11.2 ^b	24.8 ^b
Ah2	(8-23)	25.6 ^b	216	Tr.	221	25	150	131 ^b	4.70 ^b	22.3 ^b	37.7 ^b	12.1 ^b	39.2 ^b
Ah3	(23-38)	21.7 ^b	106	Tr.	180	19	151	117 ^b	4.78 ^b	21.9 ^b	36.1 ^b	13.1 ^b	36.4 ^b
AB	(38-56)	7.5 ^b	44	Tr.	131	9	35	62 ^b	4.77 ^b	22.9 ^b	22.1 ^b	6.8 ^b	16.2 ^b
Bw	(56-75)	0.1 ^b	1.9	0	7	0	1	10 ^b	4.75 ^b	-	-	-	-
KR													
Ah1	(0-3)	16.0	31	0	85	21	29	98	4.53	5.4	14.7	4.6	6.1
Ah2	(3-9)	18.3	124	0	17	Tr.	Tr.	33	4.90	5.8	15.9	4.7	6.9
Bw1	(9-19)	11.6	12	0	23	0	0	20	4.85	5.9	16.3	5.0	7.5
Bw2	(19-27)	3.2	0	0	3	0	0	13	4.82	5.5	15.0	5.1	7.7
Bw3	(27-37)	1.0	0	0	2	0	0	8	4.98	5.0	13.3	4.6	6.4
BC	(37-65)	0.2	0	0	0	0	0	4	5.00	3.7	9.3	4.0	4.6
JR-F													
Ah1	(0-4)	16.7	0	0	38	0	20	57	5.90	18.4	11.6	12.6	11.8
AB	(4-12)	15.4	0	0	35	0	0	43	5.65	22.7	14.2	11.8	12.5
Bw1	(12-22)	35.3	0	0	61	0	6	27	5.70	21.9	12.7	11.7	11.9
Bw2	(22-41)	16.6	0	0	45	0	0	15	5.70	22.5	10.7	9.4	9.6
Bw3	(41-60)	11.5	0	0	23	0	0	11	5.89	23.0	8.6	7.5	6.8

^a estimated using calibration for BP

^b data are cited from ref. (Fujitake et al., 1992a)

Tr. means trace amount

- means not determined

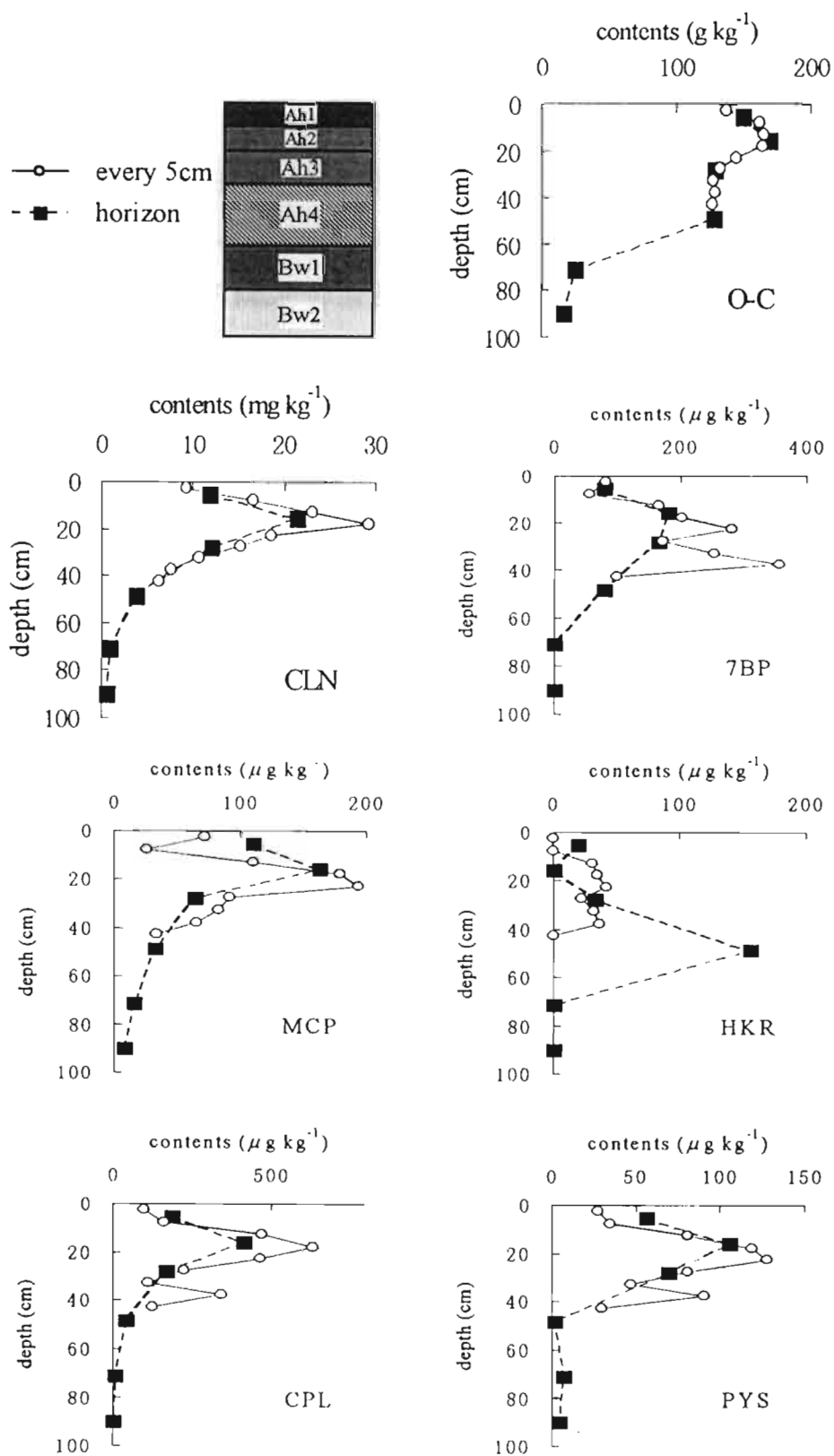


Fig. 4-4 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon (O-C) in SG-G soil profiles

SG-F 土壌の断面 (Fig.4-5) においては、炭素含量が最表層から下層へ向かうにしたがって減少しているのに対して、CLN, CPL は第2層 (Ah2) で最大の含量を示していることがわかった。特に CLN は第1層からその層にかけての含量の増加が顕著であった。一方 7BP および PYS, HKR は、炭素含量の減少と共に減少する分布を示した。しかしながら、5cm ごとの分布をみると (Fig.4-5) , PYS, CPL は 25-30cm の深さにおいても増加しており、7BP および MCP の場合もわずかではあるがその深さにおいて増加していることがわかった。

GS 土壌の断面 (Fig. 4-6) においては、炭素含量が最表層から下層へ向かうにしたがって、徐々に減少する傾向が見られたのに対して、CPL, PYS は第1層 (Ah1) 目から第2層 (Ah2) 目に、CLN は第4層 (3Ah1) 目に向かって増加していた。MCP は第2層目と第4層目で含量が増加していた。第4層目における増加は CLN の分布と一致していた。

SN 土壌の断面 (Fig. 4-7) においては、炭素含量が最表層から下層へ向かうにしたがって徐々に減少しているのに対して、CLN, PYS, MCP は 15-20cm の、CPL は 10-15cm の深さに最も多く含まれている分布を示した。

MKN 土壌の断面 (Fig.4-8) においては、炭素含量が下層になるにつれて減少している。一方、CLN, CPL, PYS, MCP は第2層 (Ah2) から第3層 (Ah3) で最大の含量を示し、それから下層になるにつれて減少する傾向がみられた。また、7BP および HKR は最表層に最大値を示し、それ以下の層では急激に減少していることがわかった。

KR 土壌の断面 (Fig. 4-9) においては、炭素含量が下層になるにつれて減少しているのに対し、CLN と 7BP は第2層 (Ah2) で最も多く含まれ、PYS, CPL, MCP は下層になるにつれて減少する傾向を示した。HKR はこの土壌では検出されなかった。

JR-F 土壌の断面 (Fig. 4-10) においては、炭素含量が下層になるにつれて減少しているのに対し、CLN と MCP は第3層 (Bw1) に最も多く、CPL は第一層で最も多く含まれている分布を示した。

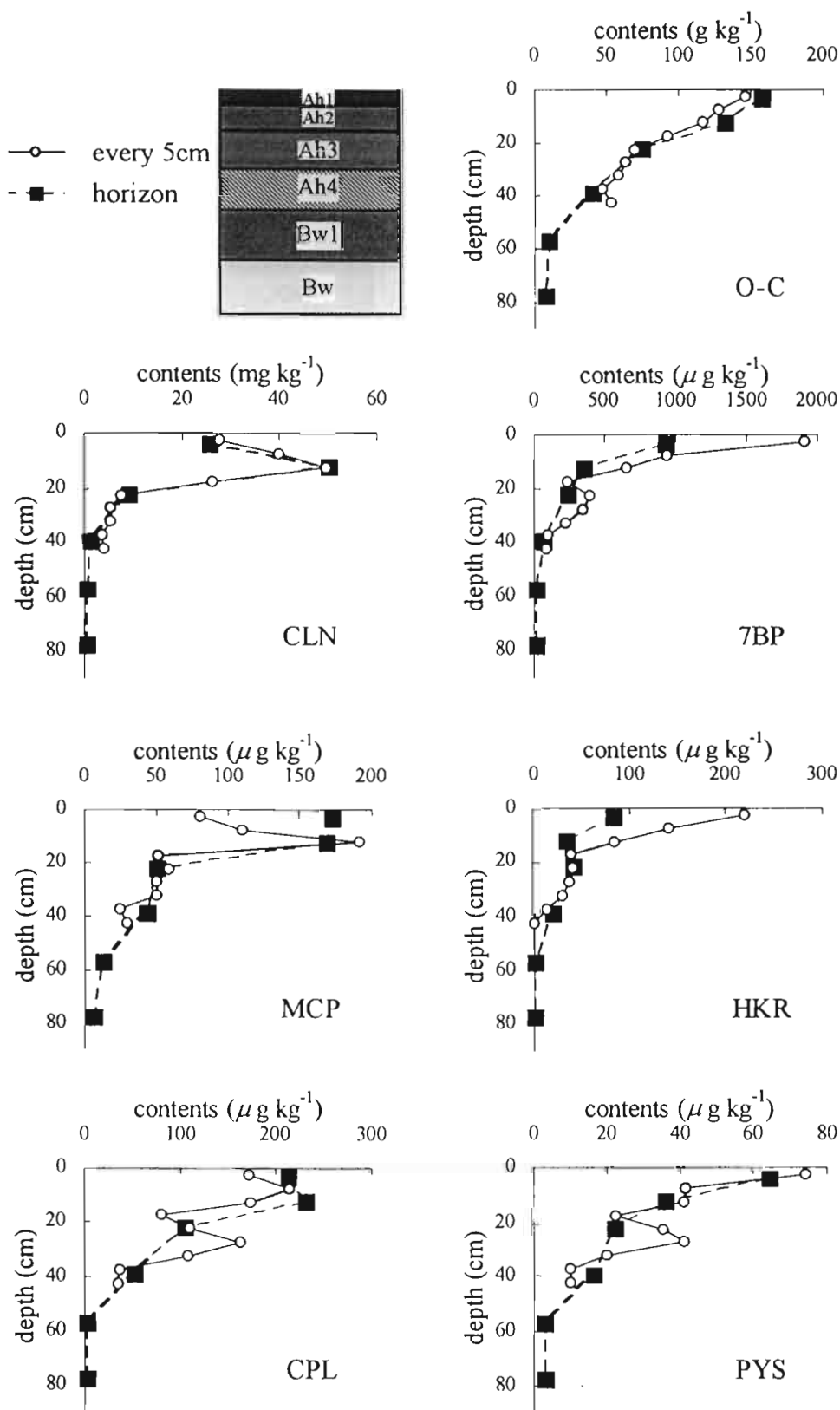


Fig. 4-5 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in SG-F soil profiles

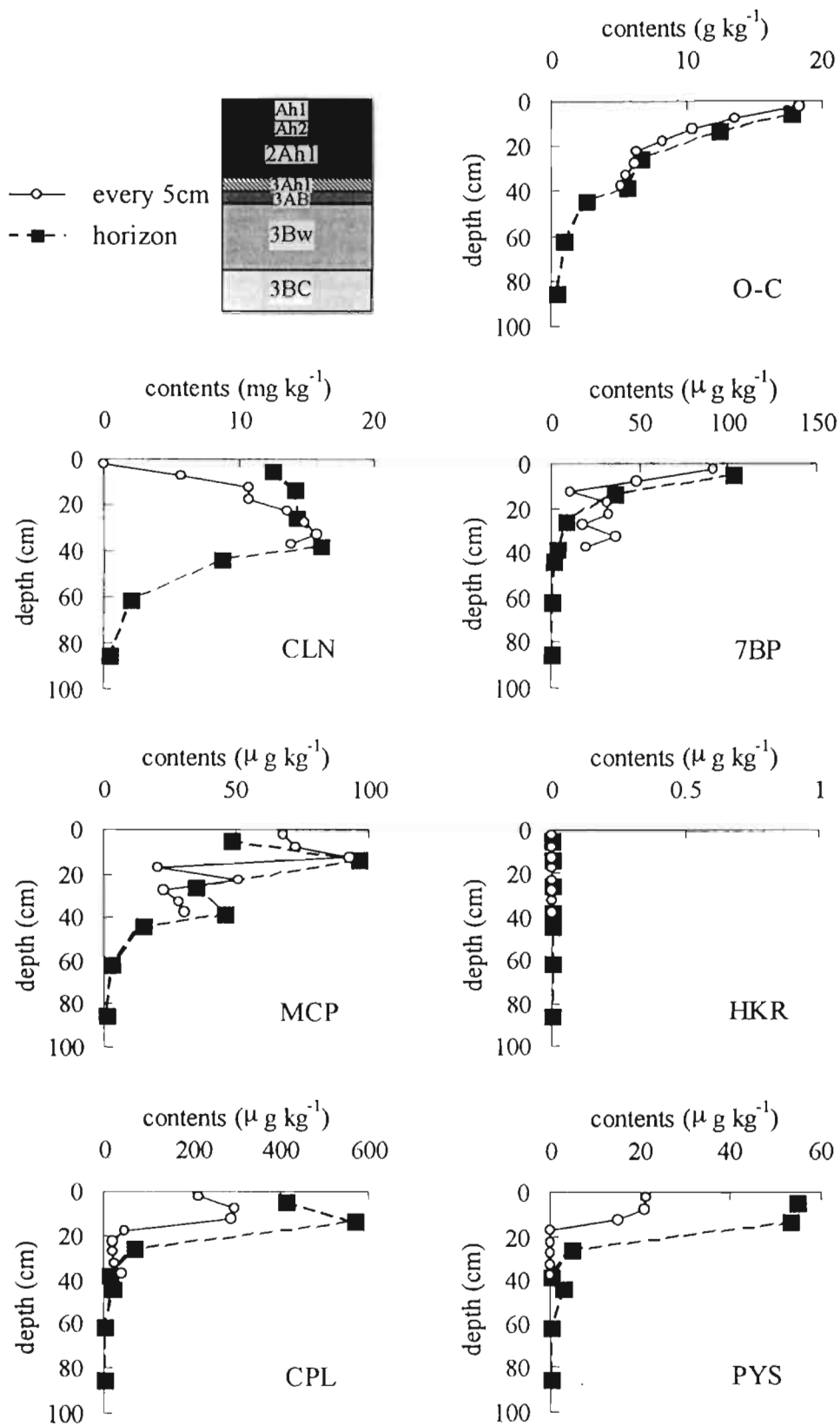


Fig. 4-6 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in GS soil profiles

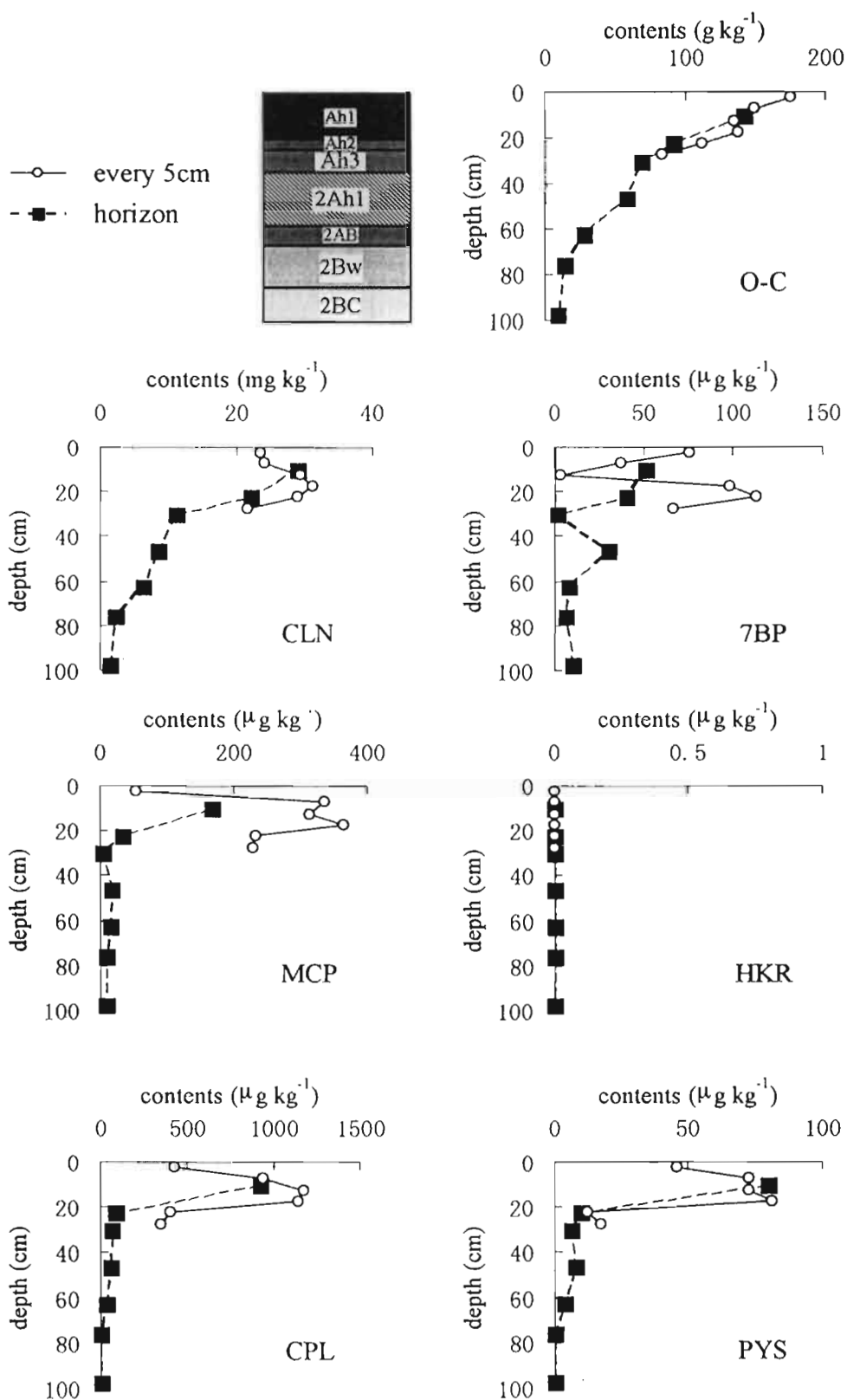


Fig.4-7 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in SN soil profiles

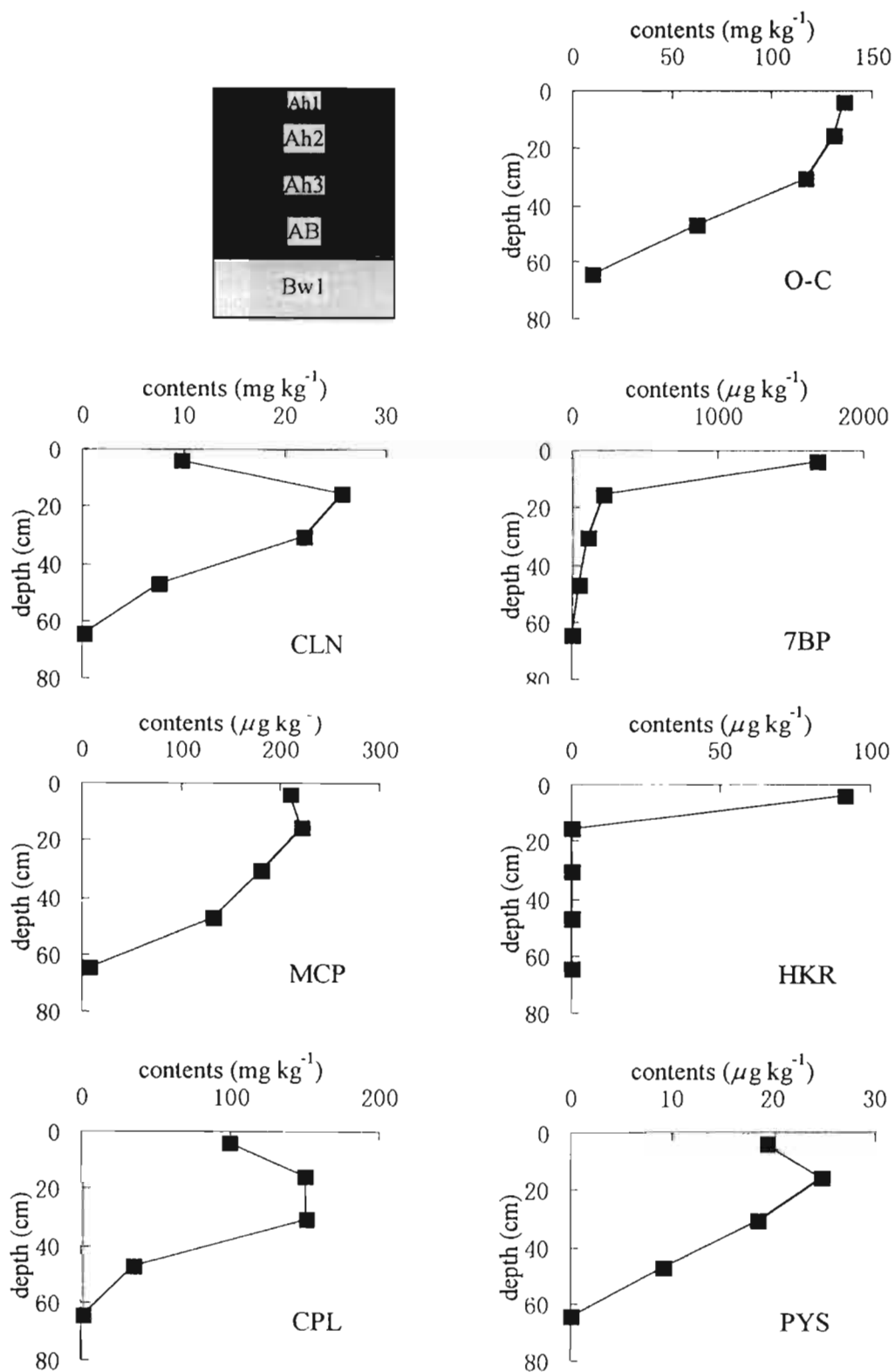


Fig.4-8 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in MKN profiles

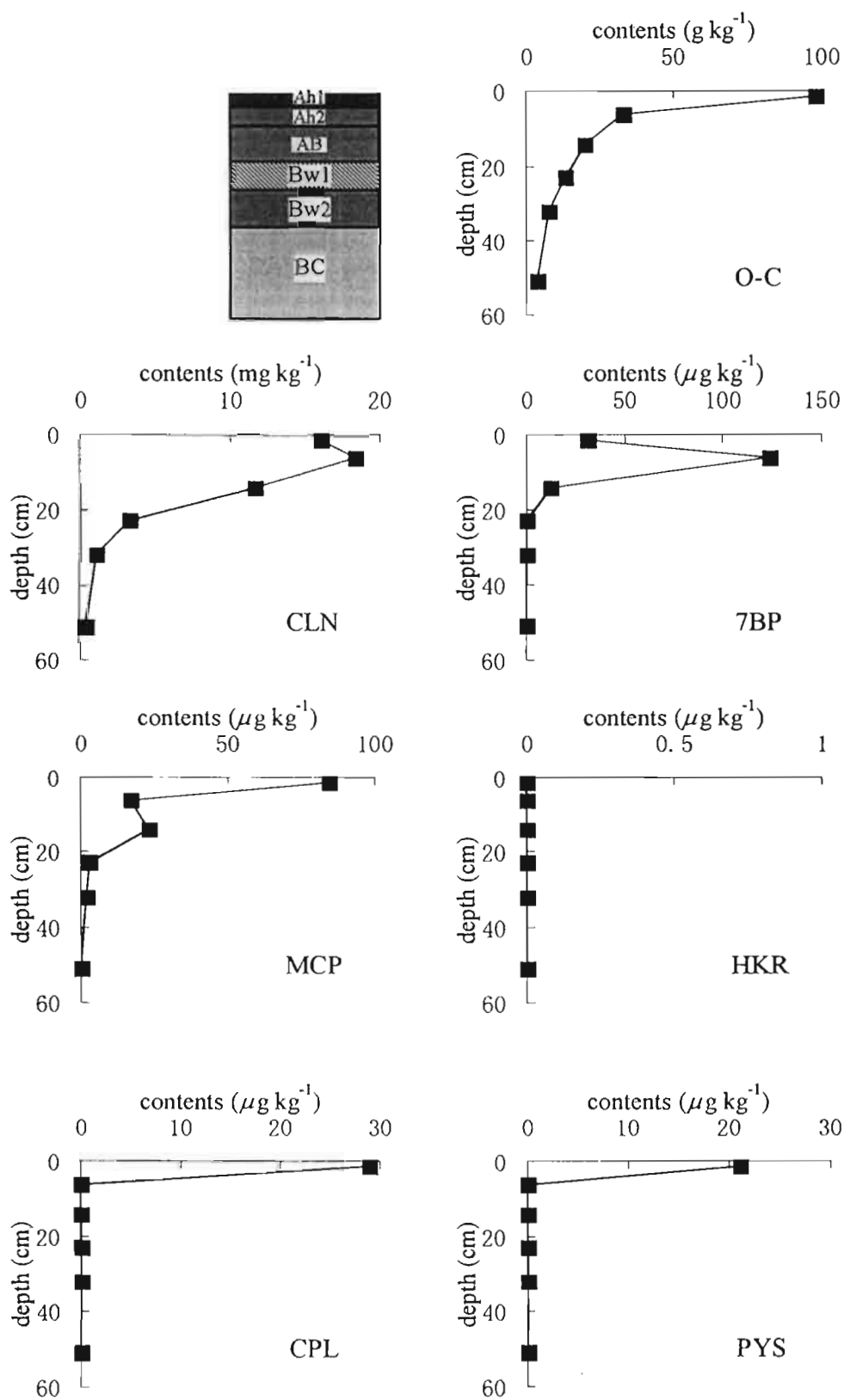


Fig.4-9 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in KR soil profiles

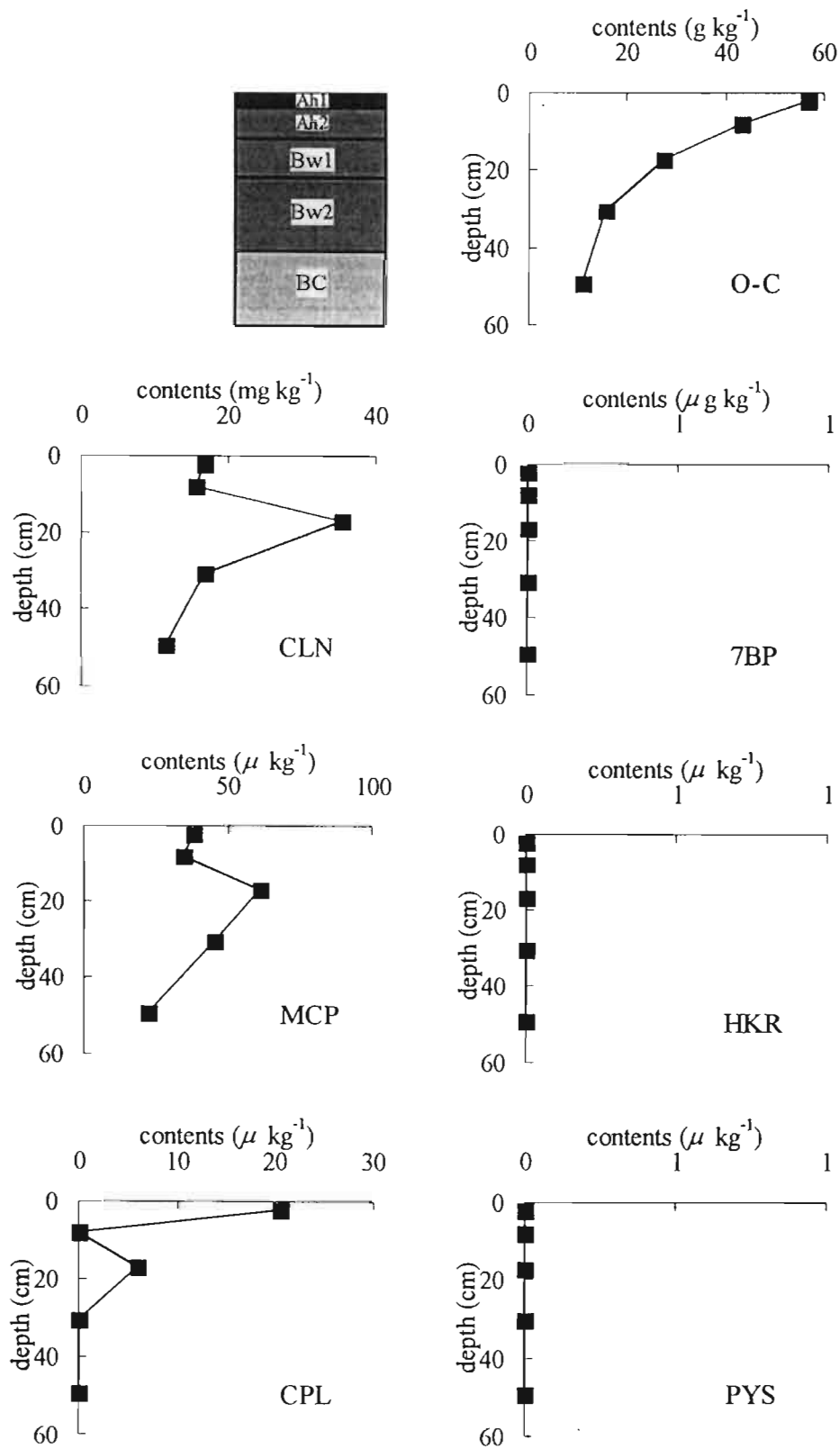


Fig. 4-10 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in JR-F soil profiles

黒ボク土、褐色森林土、赤色土などにおいて、CLNが、炭素含量の分布様式とは異なる分布様式(最表層より表層下部において最も多く含まれる)を示すことは既に報告されている(Fujitake et al.,1991; McGrath, 1967). 今回供試したすべての土壌断面においても、同様の結果が得られた。また、CLNの二量体のCPLとMCPが黒ボク土においてCLNと同様の分布を示すことが明らかになった。

一方、PYS, 7BP およびHKRはその断面内における分布は一定の様式を示さず、土壌によって大きく異なっていた。

CLN, CPL, MCPが表層下部で最も多く含まれる理由として以下の3つの可能性が考えられる。

1) CLNが糸状菌によって生産されることが推測されていること(McGrath, 1972; 藤嶽ら, 1992)やCPLはそれを生産する微生物が知られていること(Thomson, 1971; 1987)から、その集積カ所で各アントラキノンが生産されている可能性。

2) 生物の体内で生産されるアントラキノン類はそのほとんどが配糖体として存在すると考えられ(Thomson, 1971; Sendelbach, 1989), その前駆体は水溶性であることが多い。そのような水で移動しやすい前駆体が、生物活性の高い最表層で生成されたのち、土壌水とともに移動し、ある場所で土壌中の微生物的・化学的な反応をうけることで移動しにくいアントラキノンへと変化することで集積している可能性。

3) 1,8-dihydroxy 型のアントラキノンは、ペリ位に hydroxyl 基をもつことから、多価カチオンとの錯体形成の可能性が考えられており、実際、PYSは試験管内の実験により、鉄との錯体を形成することが報告されている(Engstrom et al., 1980)。このことから、表層で生産されたCLN, CPL, MCPは土壌中で無機化合物と水溶性の錯体を形成して下層へと移動し、ある場所でその配位結合が脱離することで移動しにくくなり集積する可能性。

Fujitakeら(1992a)は、CLNの断面内の垂直分布を見る際に、各層位のアントラキノン含量のみで検討してきたが、今回はさらに詳細な各アントラキノンの断面分布を調べるために、その他に5cmごとのアントラキノン含量の分布と比較した。その結果、SN以外の土壌においては、層位ごとと5cmごとでその分布に大きな違いは見られず、層位ごとの分布が5cmごとの分布をおよそ反映していることがわかった。これらの土壌は第1層目および第2層目の厚さは10cm未満であった。しかしながら、第1層目が厚く

20cm あった SN においては、層位ごとの分布でピークが見られなかった CLN, CPL, PYS, MCP が 5cm ごとの分布では 20cm 付近にピークがみられ、第 1 層目もしくは 2 層目上部に集積していることがわかった。このことから、第 1 層目および第 2 層目の厚さが 10cm 以上である土壌断面においては、5cm ごとの分布を調べる必要があるであろうと思われた。

3.根圏土壌と非根圏土壌におけるアントラキノンの分布

CLN は、ササやススキなどの草原土壌や、同じ褐色森林土でも林床にササを伴う土壌のほうが、含量が多いことが示されている(Fujitake et al., 1992b)。しかし、ササから CLN の単離を試みた結果、CLN は見られず、比較的他の植物に比べて量的に多いと思われるササやススキの根圏に特有の微生物が CLN を生産し、根の分布とこれらのアントラキノンの分布が対応していることも考えられる。

そこで、根圏と非根圏土壌における各アントラキノン含量についての測定を試みた。その結果、CLN 含量は根圏土壌、非根圏土壌でそれぞれ、26.7, 19.4mg kg⁻¹ で根圏土壌の方が高い傾向が見られた。その他の二量体のアントラキノン含量は、それぞれ、7BP で 79.8 と 86.1μg kg⁻¹, HKR で 66.6 と 66.7μg kg⁻¹, MCP で 89.9 と 93.0μg kg⁻¹ とあまり差はなかった。しかし、単量体のアントラキノンではそれぞれ、PYS で検出限界以下と 29μg kg⁻¹, CPL で 98.1 と 145μg kg⁻¹ と非根圏土壌の方が高い傾向がみられた。今回は根量を層別別に測定していないので、垂直分布と根圏の関係を明らかにすることはできなかったが、表層下部で多く含まれる分布を示す CLN, MCP, CPL のすべてが根圏土壌に多くないことから、これらのアントラキノンの分布と根量は一致していないと思われる。多くの高等植物や、微生物が生産することが知られている単量体のアントラキノンである PYS と CPL は、生物活性の高いと考えられる根圏土壌に多いと思われたが、非根圏土壌に多い傾向が見られた。したがって、これらのアントラキノンは、非根圏に多い生物に生産されるか、分解や重合化(二量化)作用が活発に行われていることが根圏では大きいと考えられた。

4.草原の森林化に伴う主要な土壌アントラキノン含量の変化

日本の気候下では、ススキ草地は刈り取りまたは火入れなど的人為的干渉を行わない限り森林へと植生の遷移が進行する。刈り取りにより人為的に維持している地点(ススキ草地)の土壌(SG-F)と、その人為的干渉を約 30 年前にストップさせて森林化させた地点(現アカマツ林)の土壌(SG-G)について、各アントラキノン含量を比較した。SG-G と SG-F における 5cm ごとの各アントラキノン含量の分布を Fig.4-11 に示した。

森林化に伴い黒ボク土壌の腐植物質は量の減少と、質の変化がみられると報告されている(田村ら 1993a, 1993b)。Fig. 4-9 をみると有機炭素量は 0-5cm 付近以外は植生の遷移により減少する傾向が見られた。一方、CPL の二量体である CLN と MCP の含量は森林化に伴って、0-15cm の範囲でやや増加する傾向が見られた。

PYS の二量体である 7BP と HKR は 0-20cm 付近で含量が大きく増加していた。これは、森林化に伴い、0-20cm 付近で 7BP と HKR の生産(二量化)活性が高くなったことが原因であると考えられる。黒ボク土では、森林化に伴い、通気性や透水性が上がり、pH が減少すると報告されており(田村ら, 1993a)、これらの状況はこれらのアントラキノンの土壌中での生産量が多くなる状態であると考えられる。前述のように、7BP は黒ボク土で最表層土壌の pH が 4.5 から 5.0 付近の土壌において多く含まれ、SG-G および SG-F の最表層土壌の pH がそれぞれ 6.2 と 5.1 であったことから、SG-F の最表層部において 7BP が増加した原因は pH である可能性は高い。HKR は 7BP と同様の分布をしめすことから、HKR の分布も pH に依存していることが推測される。また、HKR は 7BP と同様に PYS の二量体のアントラキノンであること、それぞれの分布様式が非常に似通っていることから、これら 2 種の土壌中での深い関連性が考えられる。

また、単量体のアントラキノンである PYS と CPL は、0-10cm 以外では含量が減少していた。このことから、森林化に伴って分解活性もしくは重合化が高くなったのであらうと考えられる。

森林化に伴って単量体のアントラキノンが減少し、二量体のアントラキノンが増加したことから、二量化したことも考えられる。

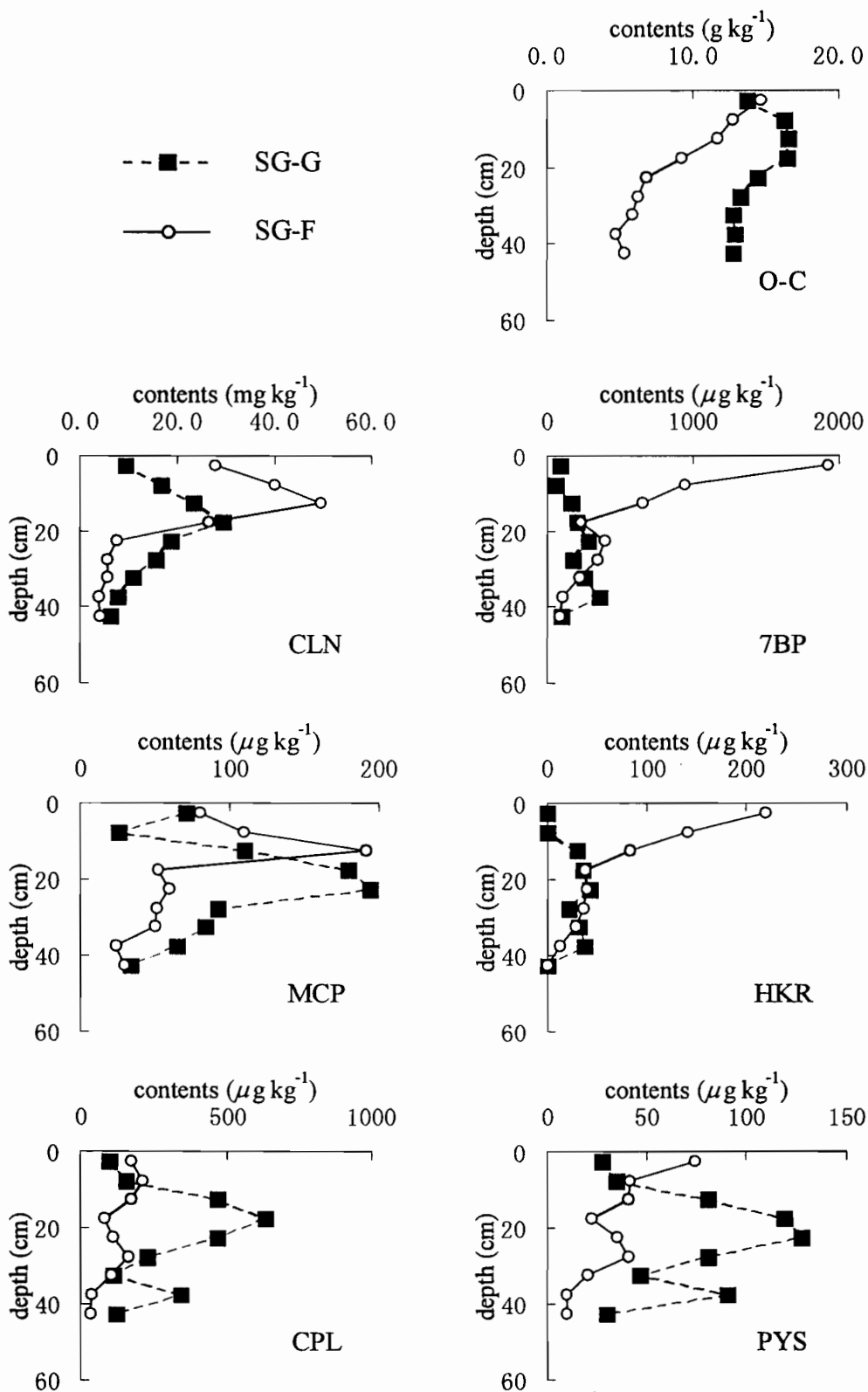


Fig. 4-11 Vertical distribution of main soil anthraquinones and organic carbon in SG-G and SG-F soil profiles

5.総合考察

以上のように土壤中の主要アントラキノン5種に関してはじめて定量的な測定を行った。CLNは土壤中で最も主要でその他のアントラキノンは微量であるが、いずれのアントラキノンもほぼ普遍的に土壤に存在することがわかった。これらのアントラキノンの分布特性は、CPLおよびその二量体であるCLNとMCP(CPL型)およびPYSおよびその二量体である7BPとHKR(PYS型)で以下のように異なった。

CPL型は、表層土壤の分布では土壤間での偏りが比較的小さく、土壤断面での垂直分布は黒ボク土において最表層よりも表層下部に多い分布を示した。また、ススキ草地からアカマツ林に植生が遷移するにつれ、単量体のCPLは減少し、二量体のCLNとMCPはやや増加する傾向が見られた。

PYS型は、表層土壤の分布では土壤間での偏りが大きく、土壤断面での垂直分布は土壤間で種々の分布様式を示した。また、ススキ草地からアカマツ林に植生が遷移するにつれ、単量体のPYSは減少し、二量体の7BPとHKRはやや増加する傾向が見られた。

この様に、PYS型とCPL型で分布特性が大きく異なることから、これらの生成過程はこの2つの型で異なると考えられる。

二量体のアントラキノンである、CLN、MCP、7BP、HKRは、現在の天然有機物化学の分野では、希少な化合物である。この様な、希少な化合物がほぼ普遍的に土壤中に存在することは、未知の生成過程が土壤中にあると考えられる。その生成過程としては、普遍的に存在する生物が微量にこれらのアントラキノンを生産し、土壤中に長い年月を掛けて蓄積されるか、通常の土壤によく見られる生物に生産される単量体のアントラキノンであるCPLとPYSが、何らかの方法で二量化していることが考えられる。しかし、分布特性がCPLとその二量体で、PYSとその二量体で類似しており、草地から森林への植生遷移により単量体のアントラキノンが減少し二量体のアントラキノンが増加する傾向が見られる。したがって、CPLの二量体とPYSの二量体はそれぞれ異なる過程で単量体のアントラキノンの二量化によって生成されている可能性が高いと考えられる。化学的に粘土や無機触媒による二量化やポリマー化は、繊維業界などで盛んに行われているが、hydroxyanthraquinoneには反応性が高いhydroxyl基が存在するため、dehydrocouplingによる二量化は起こりにくいと考えられる。Robertら(1981)は、農薬の2,4-dichlorophenol

が細菌の *Rhizoctonia praticola* の生産するフェノールオキシターゼにより dehydrocoupling する事を報告している。このことより、土壤微生物の生産するこの様な二量化酵素が土壤中に存在すれば、比較的多くの高等植物や糸状菌が生産する CPL と PYS が土壤中に放出され、土壤酵素により、CPL からは主として CLN が、副産物として MCP が産生し、PYS からは主として 7BP、副産物として HKR が産生する可能性が高いと思われる。

この二量化は分布特性の違いから CPL 型と、PYS 型で異なると思われるが、PYS 型は、7BP が pH に依存していることが考えられることから、pH に影響されるのかもしれない。

第 3 節 要約

土壤中の主要なアントラキノンである CLN はアセチル化 HPLC 法により、また、他の 5 種のアントラキノンは 3 章で確立した 2 ステージ展開 TLC-デンシトメトリー法によって、それぞれの分布様式を明らかにすることを試みた。

北海道から、九州までの広範囲にわたる日本各地の 24 地点と、ネパール王国の土壤 2 地点の表層試料の各種アントラキノン含量を測定した。その結果、CLN が土壤中最も主要なアントラキノンであることを発見した。CLN 以外のものは 10 分の 1 から 1000 分の 1 にすぎないが普遍的に広く各地に存在することがわかった。また、CLN はアロフェン質黒ボク土より非アロフェン質黒ボク土に多い傾向を見いだした。

黒ボク土 6 地点、褐色森林土 2 地点について、6 種のアントラキノンの土壤断面における分布様式を調べた。その結果、黒ボク土における垂直分布では、CPL とその二量体は最表層部よりもむしろ、表層下部に含量の最大値をもち、それから下層に向けて減少する傾向があり、PYS とその二量体は土壤によって、種々の分布様式を示した。

ススキ草地下と、その植生が遷移し成立したアカマツ林下での土壤中のアントラキノン含量を比較すると、単量体のアントラキノンは、この植生遷移に伴って減少する傾向が見られたが、それらの二量体は増加する傾向が見られた。

第 2 章の結果と、本章の結果から、土壤中の二量体のアントラキノンは、単量体のアントラキノンの二量化に由来すると推定した。

第5章 土壌アントラキノンの機能

日本の土壌では非アロフェン質黒ボク土での CLN 含量が高いことを第4章で記述した。非アロフェン質黒ボク土は植物へのアルミニウム毒性が高い土壌であることが知られていることから(Saigusa et al., 1980), CLN の分布特性にアルミニウムが何らかの形で関与している可能性を考えた。この可能性の一つとして、アントラキノンとアルミニウムのキレート形成能があげられる。すなわち、hydroxyanthraquinone は多価カチオンに対して錯体形成能を有することが知られており、実際に、physcion は鉄とキレート化合物を生成することが報告されている(Engstrom et al., 1980)。また、第4章では、土壌断面での垂直分布で CLN, MCP, CPL が表層下部に特異な分布特性を示すことは、キレート作用が一因である可能性が考えられた。

ある種のアントラキノンはアレロパシー作用を持つことが報告されている(Inoue et al., 1992; Gäumann & Obrist, 1960)。また、クルミの樹皮や葉に含まれる植物毒性のない 1,4,5-trihydroxynaphtalene の配糖体が土壌中で加水分解後酸化されて植物毒性の高い juglone が生成されることや(Bode, 1958), 植物毒性を示さない PYS や emodin の配糖体が加水分解されると植物毒性を示すこと(Inoue et al., 1992)が知られている。この様に体内では無毒な形態で存在しており、土壌に添加された後変化を受けて毒性の強い物質に変化を受けて毒性の強い物質に変化して他感作用をあらわすことは、他感作用の特徴の1つであると言われている(藤井・土屋, 1993)。したがって、CLN そのものは不溶性で生理活性がないと考えられるがアルミニウムとの複合体という形ならば何らかの生理活性があるかもしれない。

この様に、アントラキノンの土壌中での機能としては、アントラキノン自身の挙動に関係すると思われるキレート形成能と植物に対する生理作用がある。したがって、本章では CLN の植物生育に対する機能を明らかにするために、CLN とアルミニウムの錯体化合物(CAC)の合成を試み、さらに、得られた CAC が植物生育に及ぼす生理活性について調べた。

第一節 試料および方法

1.Chrysotalunin のアルミニウム錯体の合成

CLN 0.02mmol(第2章で単離したもの)を熱クロロホルム 1000mL に溶解し、0.2mM 硝酸アルミニウム九水和物(特級・ナカライテスク)メタノール溶液を1000mL 加え、40°C で8時間還流した。溶液は黄色から赤紫色に変化した。この溶液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、その一部を生物検定に供試した。また、残りの部分は透析チューブ(分画分子量 500・スペクトラム社)を用いてメタノール中で十分に透析を行い、精製した。

紫外-可視吸収(UV-VIS)スペクトルは、Jasco V-530を用いて測定した。

2.生物検定

アルファアルファ(*Medicago satyaa* L.)の種子を用いて、透析していないCACを含む培地とそれと同濃度の硝酸アルミニウムを含む培地を比較し、生育試験を行った。

すなわち、一定量のCAC(非透析)あるいは硝酸アルミニウム・九水和物(CAC作成時に使用した量に相当する量)をメタノール0.83mLに溶かし、その溶液を0.35%熱寒天水10mLで希釈し、素早くかき混ぜた。この時、pHは植物がH⁺の害を受けない4以上、アルミニウムの害が発現する4.5以下になるように、希水酸化ナトリウム溶液あるいは希硝酸溶液で調整した。その寒天溶液をペトリ皿(60×60mm)に注ぎ、室温で冷却し、アルファアルファの種子を10粒置床し、25°C暗黒条件下で5日間栽培した。その後、幼根と地上部(下胚軸、子葉鞘)の長さを測定した。

第2節 結果および考察

1.Chrysotalunin のアルミニウムの錯体の合成

CLNはクロロホルム溶液で黄色を呈し、可視部吸収スペクトルは455nmで極大吸収を示す。一方、CACは赤色を呈し535nmに極大吸収を示した(Fig. 5-1)。CLNはアルミニウムと錯体を形成する際に、hydroxyl基から、carbonyl基へ電荷の移動にもとづく電荷移動吸収によってピークが455nmから535nmへ深色移動したと考

えられる。

また、CACは塩酸メタノールを加えると、元のCLNと硝酸アルミニウムに戻った。また、CLNは熱クロロホルム以外の有機溶媒や、水に対しては極難溶性から不溶性であるが、CACは熱クロロホルムに対して難溶性で、メタノールや水に対しては可溶性であった。

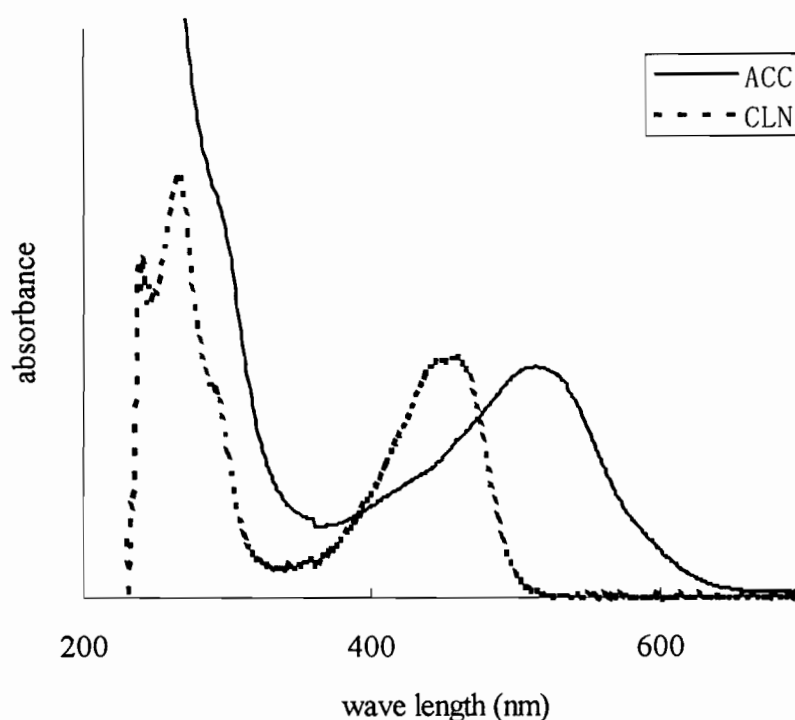


Fig. 5-1 UV-Visible spectra of ACC and CLN

以上の様に、2種類の化合物のスペクトルや溶解性の違いから、CLNは、クロロホルムとメタノールの混合溶液中でアルミニウムと錯体化合物を形成することがわかった。Engstromら(1980)は、糸状菌(*Aspergillus ruber*)が生産するPYSが鉄イオンと錯体形成することから、PYSが鉄の輸送に役立っている可能性をあげ、ペリ位に hydroxyl 基のあるアントラキノンすべてが鉄との錯体形成と輸送に役立っているかもしれないと結論づけている。しかし、この報文での錯体形成方法は強アルカリ状態で行っている。土壌中でこの様な状態が存在するという想定は難しい。本実験ではpHが約5の状態で作成している、日本の土壌の多くは酸性であり、

pHは4から6であるのが一般的である。土壤中では、本実験で行った様な反応が起こり得ることは十分考えられる。したがって土壤中で最も多量に含まれる金属の一つであるアルミニウム、特に、 y_1 とCLNには正の相関が見られることから、植物毒性の高い置換性のアルミニウムの移動にCLNが関与している可能性が考えられる。

数種のアントラキノンがある種の毒性を持つことが知られていると同時に(Sendelbach, 1989)、金属とキレート錯体を形成することにより生理作用を発現することが知られている。一例をあげると1,4,5,8-tetrahydroxyanthraquinone誘導体は、銅イオンと錯体を形成した後に、DNAと結合し、抗腫瘍性を発するという報告がある(Teissier et al., 1993)。CLNもアルミニウムと錯体形成することにより、何らかの生理活性を発現するかもしれない。

2. Chrysotaluninのアルミニウム錯体の機能

Fig.5-2に試験後の植物の写真、Table5-1に生物試験の結果を示した。アルミニウム単独培地およびそれと同量のアルミニウムに対して10分の1のモル当量のCLNを加えて作成したCAC培地におけるアルファルファの幼植物の成長について比較した。Table 5-1に示したように、アルファルファの地上部伸長率は、アルミニウム濃度が0.2, 0.4, 0.8mMの場合でそれぞれ119.1, 107.2, 65.2%となり、CACの場合で115.4, 112.5, 55.4%となりほとんど相違が認められなかった。しかし、幼根伸長率はアルミニウム単独培地の場合で65.3, 51.6, 21.8%, CACの場合で105.5, 60.3, 26.7%となり、いずれの濃度でもCACがアルミニウム単独培地より、阻害が少なかった($p < 0.05$, t検定)。CLNの添加量がアルミニウムの10分の1モル当量であることを考えあわせると、CLNがアルミニウムと錯体を形成することによりアルミニウム毒性を抑制することがわかる。

錯体を形成することにより、アルミニウムの毒性を軽減する化合物としては有機酸が知られている(Hue et al., 1986)。この場合、試験植物等は異なっているが、有機酸を加える量がアルミニウムの2分の1から等モル当量であり、CLNがアルミニウムの毒性を軽減する能力は有機酸の場合よりも大きいことが予想される。また、植物がアルミニウム毒性の軽減のために、外液のpHを上昇する物質を根から浸出し、アルミニウムを不溶化沈殿させ、アルミニウムの吸収を抑制することが知られ

ている(Taylor & Foy, 1985). 第4章で示したように, CLNはAl害の大きい非アロフェン質黒ボク土にや, 根圏土壤に多い. したがって, 植物 あるいは, 根圏に共生する微生物などが, アルミニウム毒性の防御策として CLNの生産に関わる酵素などを生産しているかもしれない.

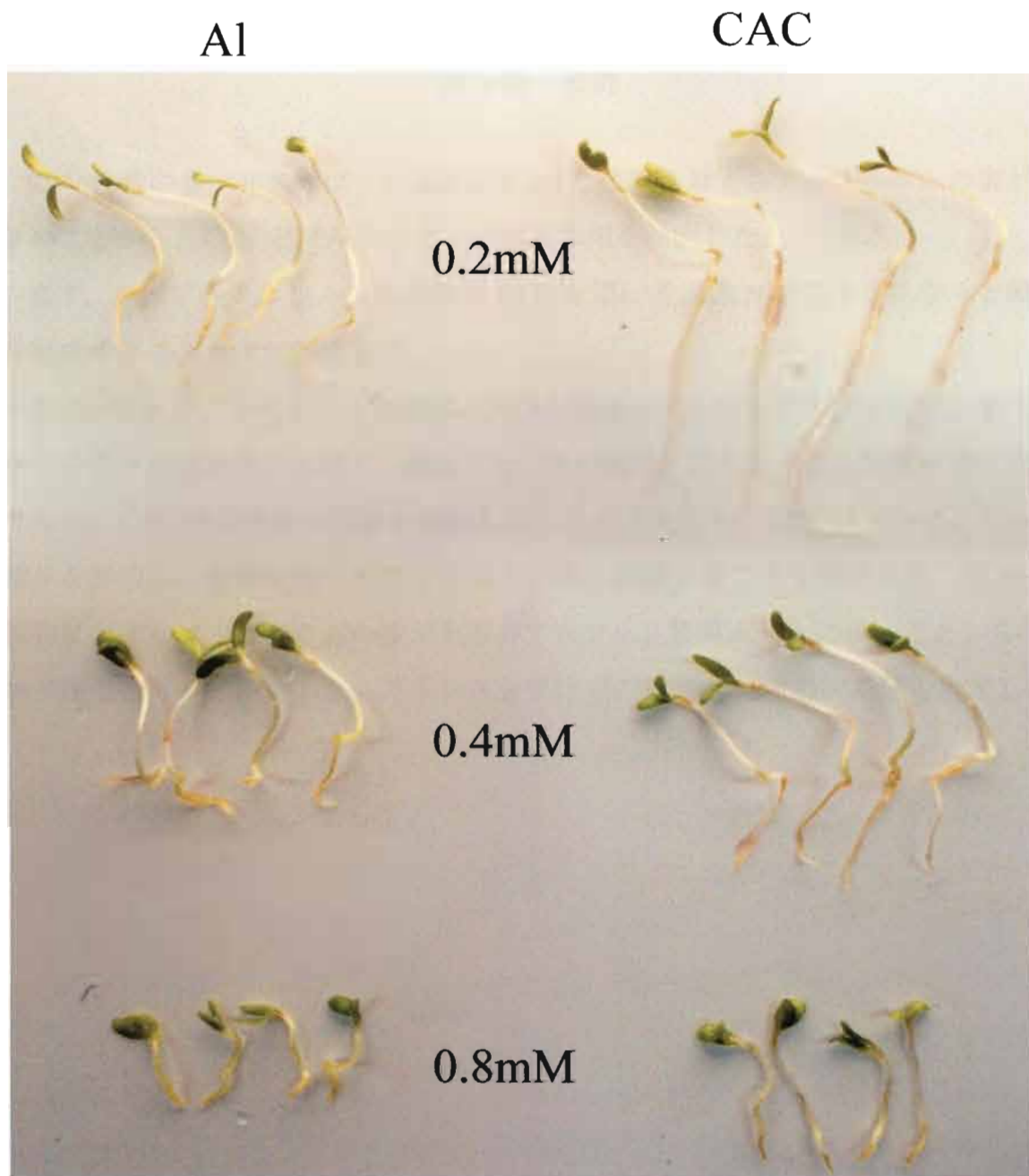


Fig.5-2 Alfalfa seedlings with Al and CAC (The concentration of CAC was represented as the concentration of Al used to form CAC)

Table 5-1 Effect of Al and ACC on alfalfa seedlings

Al conc. (mM)	root growth		shoot growth	
	Al	CAC	Al	CAC
0.2	84.5 ^b	105.5 ^b	122.5	115.4
0.4	48.9 ^a	60.3 ^a	107.2	112.5
0.8	21.1 ^b	26.7 ^b	49.1	55.4

data are percentages based on root and shoot growth under control (only agar gel) conditions

^a significant difference (p<0.1), ^b (p<0.05)

第3節 要約

CLN 含量の多い非アロフェン質黒ボク土は、植物に対するアルミニウムの害が大きいことから、CLN とアルミニウムの相互作用を検討した。

まず、硝酸アルミニウム九水和物と CLN を用いて、CLN がアルミニウムと錯体を形成することを明らかにした。

次に、CLN とアルミニウムの錯体(CAC)の機能をアルファアルファ苗床試験でアルミニウム単独培地と比較し、検討した。その結果、アルミニウム単独培地と比較すると、CAC は幼根伸長阻害を軽減した。このことより、CLN はアルミニウムと錯体を形成し、植物に対するアルミニウム毒を軽減することを明示した。CLN は植物に対するアルミニウムの害がある非アロフェン質黒ボク土に多いことから、植物や微生物等がアルミニウムストレスを受けてCLNを生産する可能性を推定した。

第6章 総合考察

自然界でもっとも主要なアントラキノンであると考えられる emodin (EMD), physcion (PYS), chrysophanol (CPL)は、高等植物では Rhamnaceae, Guttiferae, Rubiaceae, *Rumex*, *Cassia* 属, その他にも, 多くの糸状菌や地衣類, 昆虫などによって生産されることが知られている. これらのアントラキノンには, 当然土壌に存在することが予想される. 本研究では, EMD を除けばほとんどの土壌でこれらのアントラキノンが検出された. EMD はこの3つの化合物の中では hydroxyl 基が1つ多く, 比較的反應性の高いことが予想されている. また, 糸状菌 *Aspergillus terreus* の生産する EMD 分解酵素も知られており (Chen et al, 1995), この3つの化合物の中では最も分解されやすいのかもしれない. また, PYS と CPL は酵素的反應により EMD より派生することが知られている (Anderson et al., 1988; Anderson, 1985). 故に, 土壌中に放出された EMD が糸状菌等の酵素で, 容易に PYS や CPL に変わる可能性は高い. 土壌で主要な二量体のアントラキノンは PYS と CPL の二量体であるが, 今までの知見では, これらの生産者は極限られた地域に自生する植物や担子菌, あるいは生産者が不明である. 以上のことを考え合わせると, 土壌のアントラキノンは生物由来のアントラキノンの生成過程や挙動とは全く異なることが予想される. 第4章では, 土壌中での分布が二量体と単量体で, また PYS 型と CPL 型との間で異なっており, 土壌中で二量化が起こっている可能性を示唆した. 土壌中のアントラキノンの含量から考えると, EMD は素早く分解や重合化あるいは CPL や PYS に変化し, CPL からは主として CLN が, 副産物として MCP が産生し, PYS からは主として 7BP, 副産物として HKR が産生する事が考えられる. 二量化に関しては, 粘土鉱物などの無機物質による触媒作用が多いとも考えられるが, dehydrocoupling による二量化が, 触媒作用により起こることは, 反應性に富む hydroxy 基を持つこれらのアントラキノンに起こることは考えにくい. したがって, 酵素反應による二量化が考えられる. CLN はアルミニウム害が大きい土壌で含量が高く, 第5章では植物に対するアルミニウム害を軽減することが予想された. したがって, 植物の害となる交換性アルミニウムの多い土壌で, アルミニウムストレスにより二量化酵素が生産されたり活性化する事が予想される. PYS は pH が 5.3 前後の黒ボク土での含量が高いため, pH の影響によりその二量化酵素が特に活性化するのではないかと考えられる. 以上をまとめ, Fig.6-1 の様に土壌中でア

ントラキノン生成、代謝され、機能を発現するという仮説を考えた。

CLN と HKR は生物から単離された例のない化合物である。同様に、土壌ポリアミンの研究においても当時生物から単離された例が無かった aminobuthyl-homospermidine が確認されている(Fujihara & Harada, 1989)。また、土壌固有の化合物で最も代表的なものとしては、腐植物質の存在が知られている。腐植物質は、生体で起こりうる反応に加えて、無機触媒による重合反応や、その他の反応が複雑に作用して生成されるために、その構造も明らかにされていない。この様に、土壌中では、生物の体内では、知られていない反応が起き、生物から単離された例のない化合物がまだ多く存在すると考えられる。天然物有機化学の研究では主として生物体を対象とし、化合物の単離を行っているが、実際にそれらの生物が生活する場である土壌においては、有機化合物は他の生物の出した酵素や触媒効果のある無機物に常にさらされている。つまり、生物の体内では知られていない化合物の生成過程が存在し、未知の化合物がさらに未知の機能を発現しているとも考えられる。自然界で大きな領域をしめる土壌において、未知の化合物が主要なものであり、未知の生理活性を及ぼしているとすれば、今日の主要な天然有機化合物に関する常識が全く変わってしまうであろう。

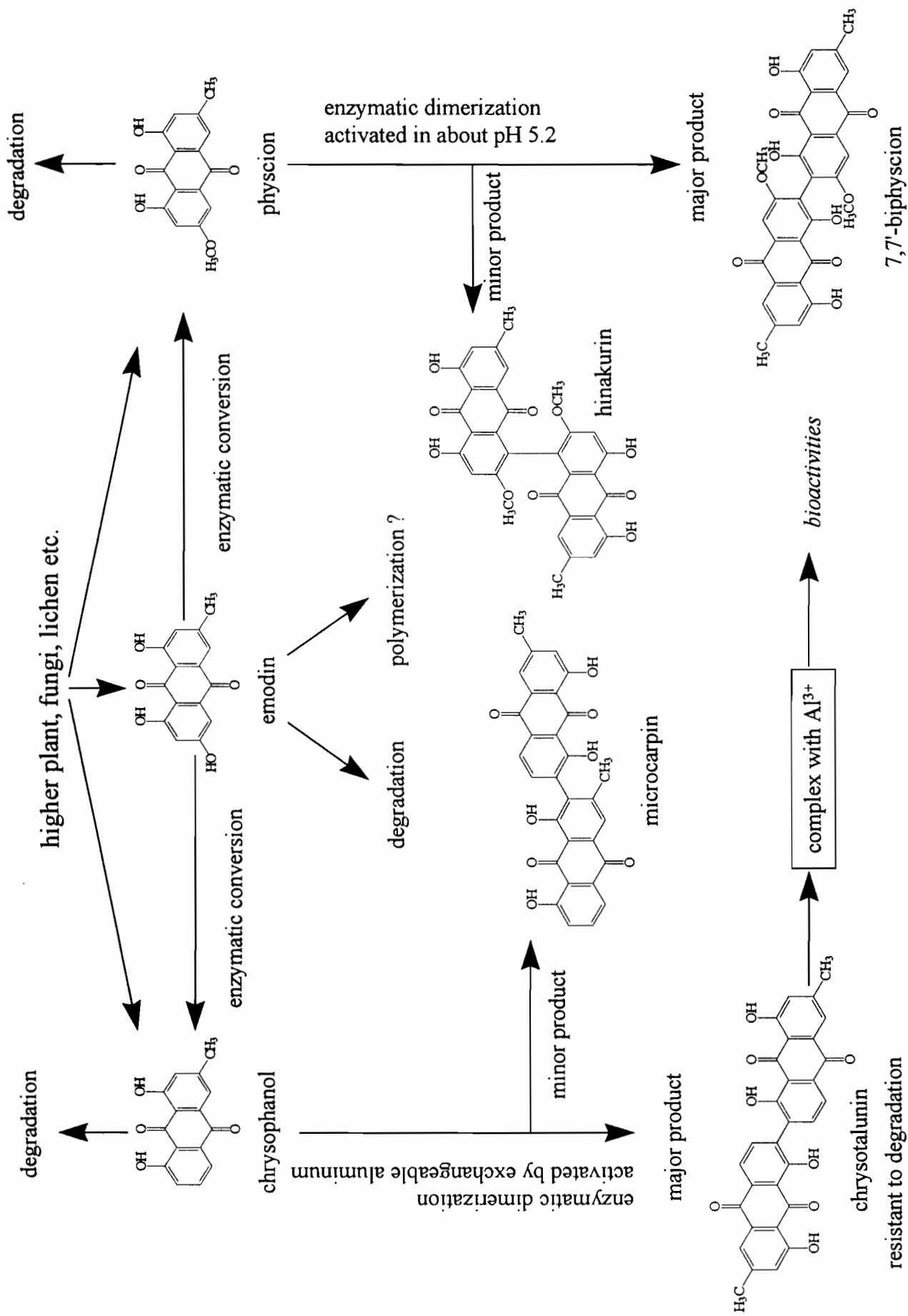


Fig.6-1 Fate of anthraquinone in soil (hypothesis)

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始御懇篤なるご指導とご配慮を賜りました神戸大学自然科学研究科の王子善清教授に心から感謝いたします。

本研究の機会を与えて下さり、終始御懇篤なるご指導を頂きました神戸大学農学部の藤嶽暢英助手に深く感謝いたします。

貴重な土壌試料を頂き、また、常に有益なご助言と励ましのお言葉をいただき、ご多忙にもかかわらず本論文を御校閲いただきました神戸大学自然科学研究科の大塚紘雄教授に心から感謝いたします。

本研究科入学の機会を与えて下さり、また、ご多忙にもかかわらず本論文をご校閲いただきました神戸大学自然科学研究科の藤井聡教授に深く感謝の意を表します。

ご多忙にもかかわらず本論文を御校閲いただきました、神戸大学自然科学研究科の畑 武志教授に心から感謝いたします。

本研究を進めるにあたりいろいろとご配慮いただいた神戸大学自然科学研究科の鈴木創三助教授に感謝いたします。

マススペクトルを測定していただいた大阪薬科大学の藤嶽美穂代助手、ORDスペクトルの測定にご協力いただいた大阪薬科大の馬場きみ江教授に厚く御礼申し上げます。

また、実験や土壌調査などにご協力いただいた上田陽子嬢、熊山佳博氏、福本真理子嬢をはじめとする神戸大学農学部土壌学研究室の卒業生の方々ならびに学生諸氏に、記して厚くお礼申し上げます。

最後に、貴重な土壌試料をいただき、常に有益なご助言と、叱咤激励のお言葉をいただいた神戸大学自然科学研究科の故 高橋竹彦教授に心から感謝いたします。

引用文献

Anderson, J. A.: Conversion of emodin to physcion by a cell-free preparation of *Aspergillus parasiticus*. *Phytochemistry*, **25** 1115-1117 (1986)

Anderson, J. A., Lin, B., Williams, H. J. & Scott, A. I.: Deoxygenation of phenolic natural products. Enzymatic conversion of emodin to chrysophanol. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1623-1624 (1988)

Alemayehu, G., Abegaz, B., Snatzke, G. & Duddeck, H. : Bianthraquinones and a spermidine alkaloid from *Cassia floribunda*, *Phytochemistry*, **27**, 3255-3258 (1988)

Bode, H. B.: *Planta*, **51**, 440-480 (1958)

Chen, Z., Fuji, I., Ebizuka, Y. & Sankawa, U.: Purification and characterization of emodinanthrone oxygenase from *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry*, **38**, 299-305 (1995)

Cheshire, M. V., Cranwell, P. A., Flashaw, C. P., Floyd, A. J. & Hawaorth, R. D.: Structure of humic acids. Humic acid II. *Tetrahedron*, **24**, 1669-1682 (1967)

De Villatoro, B. S. & González, F. G.: Chrysophanic acid, chrysophanein and chaparrin from *Alvaradoa amorphoides*. *Phytochemistry*, **13**, 2018-2019 (1974)

土壤標準分析・測定法委員会編：土壤標準分析・測定法, p86-94, 博友社 (1986)

Dunning, H. H. : In *Organic Geochemistry* ed. by Breger I.A. p.367, Pergamon Press. (1963)

Engstrom, G.W., McDorman, D. J. & Maroney, M. J.: Iron chelating capability of

physcion a yellow pigment from *Aspergillus ruber*. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1139-1141 (1980)

FAO-Unesco : Revised Legend, Soil Map of the World, World Soil Resources Report 60 (1990)

Foo, Y. L. & Tate, K. R.: Isolation of chrysotalunin a red pigment from a New Zealand soil. *Experientia*, **33**, 1271-1272 (1977)

Fujihara, S. & Harada, Y.: A novel polyamine, aminobutylhomospermidine, in Japanese volcanic ash soil. *Soil Biol. Biochem.*, **21**, 449-452 (1989)

藤井義晴・土屋一成；土壌－植物系における他感物質の役割. 土壌構成成分解析法(II) -新しい手法, 新しい考え方-. p.81-125, 博友社 (1993)

Fujitake, N. & Azuma J. : Occurrence of 7,7'-biphyscion in Japanese soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **37**, 333-336 (1991)

Fujitake, N., Azuma, J., Hamasaki, T., Nakajima H. & Saiki, K.: Determination of chrysotalunin with high-performance liquid chromatography and its distribution in soils of Japan. *Geoderma*, **48**, 83-91 (1991a)

Fujitake, N., Azuma, J. & Hamasaki, T.: Distribution of chrysotalunin a major soil anthraquinone pigment in various surface soils of Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **37**, 619-627 (1991b)

Fujitake, N.: Distribution of hydroxyanthraquinones in soils. 神戸大学自然科学研究科 博士論文 (1991)

Fujiake, N., Azuma J. & Hamasaki, T. : Vertical distribution of Chrysotalunin, a major

soil anthraquinone pigment, in soil profiles. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 579-583 (1992a)

Fujitake, N., Azuma, J., Hamasaki, T., Nakajima, H & Saiki, K.: Chrysotalunin a most prominent soil anthraquinone pigment in Japanese soils., *Sci. Total Environ.*, **177/118**, 219-226 (1992b)

藤嶽暢英, 久世祥代, 東 順三, 浜崎 徹; 土壌中の主要アンスラキノン色素 (chrysotalunin)の由来について. 日本土壌肥料学会講演要旨集, **38**, 14, (1992)

Gäumann, E. & Obrist, W.: Über die Schädigung der Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten durch einige Welketoxine. *Phytopath. Z.*, **37**, 145-158 (in German) (1960)

González, A. G., Freire, R., Hernández, R., Salazar, J. A. & Suárez, E.: Asphodelin and microcarpin, two new bianthraquinones from *Asphodelus microcarpus*. *Chem. Ind.*, 851-852 (1973)

Gluchoff, K., Arpin, M. N., Dangy-Caye, M.-P., Lebreton, P., Steglich, W., Töpfer, E., Pourrat, H., Regeat F. & Deruaz D.: Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. Sur le 7,7'-biphyscion, bianthraquinone obtenue partir de *Tricholoma equestre* L. per Fr.(Basidiomys te, Agricale). *Compt. Rend.*, **274**, 1739-1742 (in French) (1972)

Hansen, E. H. & Schnizer, M. : Zn-dust distillation and fusion of a soil humic and fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **33**, 29-36 (1969)

Henriksen, L. M. & Kjosén, H.: Derivatization of natural anthraquinones by reductive silylation for gas chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr.*, **258**, 252-257 (1965)

Hue, N. V., Craddock, G. R. & Adams, F. :Effect of organic acid on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**, 28-34 (1986)

Inoue, M., Nishimura, H., Li, H.- H. & Mizutani, J. : Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae). *J. Chem. Ecol.*, **18**, 1833- 1840 (1992)

Kumada, K.& Matsui, Y. : Detection of some condensed aromatic nuclei of humic acid. Studies on the composition of aromatic nuclei of humus I. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **16**, 250-255 (1970)

Kumada, K., Suzuki, A. & Aizawa, K. : Isolation of anthraquinone from humus. *Nature*, **191**, 415-416 (1961)

Kolesnikov, M. P., Mirchink, T. G. & Zaprometova, O. M. : Quinonid pigments in certain Soviet soils. *Soviet Soil Sci.*, **33**, 36-40 (1978)

Lemmens, L. : Determination of dihydroxydianthrone by densitometry after thin-layer chromatographic separation. *J. Chromatogr.*, **132**, 363-365 (1977)

Ma, X., Chen, Y. & Hui, R. : Analysis of anthraquinones in *Rheum franzenbachii* Munt (Rhubarb) by thin-layer chromatography. *Chromatographia*, **27**, 465-466 (1989)

Matsui, Y. & Kumada, K.: Hydroxyanthraquinones in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **20**, 333-341 (1974)

McGrath, D. : Nature and distribution in Irish soils of a new soil pigment. *Nature*, **215**, 1414 (1967)

McGrath, D. : Chrysotalunin a new bianthraquinone from soil. *Chem. Ind. (London)*, **42**, 1353 (1970)

McGrath, D. : Hydroxyanthraquinones in soil. *Geoderma*, **7**, 167-176 (1972)

宮田斉門：主に中国で常用試用されている抗ガン生薬とその処方例. 科学書院 p. 45-62, 179, 215 (1981)

Nakabayashi, K., Wada H. & Takai, Y. : Distribution pattern of Pg fraction of P-type humic acid and iron in a dark brown forest soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **28**, 217-223 (1982)

西 久夫: 色素の化学 共立出版 p23 (1985)

Pick, J. & Kovcs, L. : Lipid analysis by high performance thin layer chromatography II. Multidevelopment technique. *J. Planar Chromatogr.*, **4**, 91-92 (1991)

Rai, P. P. & Shok M.: Thin-layer chromatography of hydroxyanthraquinones in plant extracts. *Chromatographia*, **14**, 599-600 (1981)

Saigusa, M., Shoji, S. & Takahashi, T. : Plant root growth in acid Andosols from northeastern Japan: 2. Exchange acidity Y_1 as a realistic measure of aluminum toxicity potential. *Soil Sci.*, **130**, 242-250 (1980)

三枝正彦、庄子貞雄、伊藤豊彰、本名俊正：黒ボク土における交換酸度 y_1 の再評価 *土肥誌*, **63**, 126-218 (1992)

Saiz-Jimenez, C., Haider K.& Martin, J. P. : Anthraquinones and phenols as intermediates in the formation of dark-colored humic acid-like pigments by *Eurotium echinulatum*. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **39**, 649-653 (1975)

Sendelbach, L. E. : A review of the toxicity and carcinogenicity of anthraquinone

derivatives. *Toxicology*, **57**, 227-240 (1989)

Shoji, S. & Saigusa M.: Amorphous clay materials of Towada and soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **23**, 437-455 (1977)

Steglich, W., Töpfer-Petersen, E., Reininger, W., Gluchoff, K. & Arpin, N. : Isolation of flavomannin-6,6'-dimethyl ether and one of its racemates from higher fungi. *Phytochemistry*. **11**. 3299-3304. (1972)

鈴木達彦・石沢修一；畑土壌の微生物およびその活性と肥沃度. *農技研報*, **B15**, 92-181 (1965)

田村憲司、永塚鎮男、大羽 裕：黒ボク土の一般理化学性に及ぼす植生遷移の影響, *土肥誌*, **64**, 166-176 (1993a)

田村憲司、永塚鎮男、大羽 裕：黒ボク土の腐植の形態に及ぼす植生遷移の影響, *土肥誌*, **64**, 177-182 (1993b)

Taylor, G. J. & Foy, C. D.: Mechanisms of aluminium tolerance in *Triticum aestivum* L. (wheat). IV. The role of ammonium and nitrate nutrition. *Can. J. Bot.*, **63**, 2181-2186 (1985)

Teissier, E. M., Boitte, N., Helbecque, N., Bernier, J-L., Pommery, N., Duvalet, J.-L., Fournier, C., Hecquet, B., Catteau J.-P. & Hénichart, J.-P.: Synthesis and antitumor properties of an anthraquinone bisubstituted by the copper chelating peptide Gly-Gly-L-His. *J. Med. Chem.*, **36**, 2084-2090 (1993)

Thomson, R. H.: In Naturally occurring quinones II, Academic Press, London New York p.3, 6, 57, 367, 389, 429, (1971)

Thomson, R. H.: In Naturally occurring quinones III, Academic Press, London New York p. 382, 421, (1987)

Toth, Z. A., Raatikainen, O., Naaranlahti T. & Auriola, S. : Isolation and determination of alizarin in cell cultures of *Rubia tinctorum* and emodin in *Dermocybe sanguinea* using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **630**, 423-428 (1993)

Treibs A., & Steinmetz, H. : *Annalen*, **506**, 171 (1933)

Ulubelen, A. & Tuzlaci E.: Sesquiterpene lactones, flavonoids and anthraquinones from *Asphodeline globifera* and *Asphodeline damascena*. *Phytochemistry*, **24**, 2923-2924 (1985)

Ulubelen, A., Terem B., & Tuzlaci, E. : Anthraquinones and sesquiterpene lactones from *Asphodeline anatolica*. *Fitoterapia*, **59**, 159 (1988)

Ulubelen, A., Tuzlaci, E. & Atilan N.: Oxepine derivatives and anthraquinones from *Asphodeline tenuior* and *A. taurica*. *Phytochemistry*, **28**, 649-650 (1989)

Van Den Berg, A. J. J. & Labadie, R. P.: High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of 1,8-dihydroxyanthraquinones in plant cell cultures. *J. Chromatogr.*, **329**, 311-314 (1985)

Van Eijk, G. W. & Roeymans, H. J.: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl ethers of naturally occurring anthraquinones. *J. Chromatogr.*, **124**, 66-68 (1976)