

化石クルミ中に残存する脂質

井上雅雄^{*1}・楡井久^{*2}・市原優子^{*3}

I まえがき

クルミ種子中に多量の脂質が含まれていることは衆知のことであるが、化石となって地層から産出したクルミ中には脂質が残っているか否か、残っているとすればその量は、そして脂質の性質は現生のものとくらべてどの様に変化しているか、それらを知るために現生クルミおよび地質年代の異なる3種の化石クルミについて、完全な核(現生クルミでは子葉を含む、化石クルミでは肉眼的にみて子葉はのこっていない)の脂質を分析した。

分析の対象とした脂質成分は、脂肪の本体をなすトリグリセライド、その分解によって生ずる脂肪酸^{*4}、微量ではあるが植物脂肪中に常に存在するステロールとそのエステル⁴の4種である。

II 試料

この研究に用いた試料は楡井(1971)が本邦産の化石クルミについて分類学的研究をおこなった際に集めたものである。試料の産出地・産出地層名・産出場所における層相・種名・地質年代・推定絶対年代を次に示す。

現生クルミ：福島県会津市芦の牧温泉，大川左岸，
樹から採取，Juglans sieboldiana
化石クルミ

Kos：富山県射水郡小杉町太閤山，日の宮砂泥層，礫層中の砂質泥，Juglans sieboldiana，中期洪積世，
 0.1×10^6 yr. 土

Dr：奈良県奈良市興福院北方ドリームランド裏，大阪層群 Ma 1 層の下位約 25

m，礫層中の泥炭質淡水粘土，Juglans mandshurica，前期洪積世，
 1.0×10^6 yr. 土

Su：新潟県北蒲原郡黒川村須巻西方の谷，灰爪層，シルト質粘土，Juglans megacineria，鮮新世， 4×10^6 yr. 土

III 分析法

水洗後風乾したクルミ核をエタノール-アセトン溶液に浸して表面の汚染を除き、粉碎して分析試料とした。分析の手順は次のとおりである。

1. 脂質の抽出

分析試料から一定量を秤取し、1g 当り 5 ml の 0.25% 塩酸溶液を加え、0℃で5~10分ホモジネートする。ホモジネート溶液を分液ロートに移し、8倍容のクロロホルム-メタノール溶液(2:1, v/v)を加えて振盪し、脂質成分をクロロホルム層に移して抽出する。抽出は3回おこなう。抽出液を30℃で減圧濃縮し、硫酸ソーダを加えて脱水後、硫酸ソーダを濾別し、減圧濃縮して抽出試料とする。

2. 脂質成分の分画

脂質成分の分画は薄層クロマト法によった。薄層プレートとしては、メルク社の PSC - Fertingplatten Kieselgel 60F 254, 厚さ 2 mm を使用した。

抽出濃縮した試料にクロロホルムを少量(0.1~0.2 ml)加え、その中から適当量(80~160 μ l)を分取して上記のプレート上につけ、石油エーテル-エーテル-酢酸(90:10:1, v/v)溶液を展開剤として24℃で展開する。展開終了後、元素蒸気で脂質成分を発色させる。既知物質とし

*1 大阪大学医学部中央研究室

*2 千葉県公害研究所地盤沈下研究室

*3 大阪市立大学理学部地学教室

*4 高級脂肪酸のみ分析した。

*5 現生試料：2.45g, Kos 試料：2.0g,

Dr 試料：7.0g, Su 試料：12.0g

第1表 クルミ試料中のトリグリセライド・遊離脂肪酸・ステ
ロールエステル・ステロール含有量 ($\mu\text{mol/g}$)

	トリグリセライド*	遊離脂肪酸	ステロールエステル	ステロール
現 生	271.35	9.48	0.331	2.53
Kos (中期洪積世)	0.08	0.33	0.016	0.25
Dr (前期洪積世)	0.14	0.03	0.003	0.09
Su (鮮新世)	0.04	0.09	0.003	0.17

* トリグリセライド中の脂肪酸のモル数

第2表 トリグリセライド・遊離脂肪酸・ステロールエステルの脂肪酸組成 ($\mu\text{mol/g}$)
 $C_{16}=0$: パルミチン酸, $C_{18}=0$: ステアリン酸, $C_{18}=1$: オレイン酸,
 $C_{18}=2$: リノール酸, $C_{18}=3$: リノレン酸

試料	$C_{16}=0$	$C_{18}=0$	$C_{18}=1$	$C_{18}=2$	$C_{18}=3$
トリグリセライド					
現 生	12.23	1.02	59.6	16.85	30.0
Kos	0.032	0.013	0.026	0.013	—
Dr	0.025	0.027	0.065	0.025	—
Su	0.007	0.032	—	—	—
遊離脂肪酸					
現 生	0.765	0.082	1.662	5.20	1.77
Kos	0.172	0.038	0.103	0.013	—
Dr	0.018	0.005	0.012	—	—
Su	0.051	0.018	0.019	—	—
ステロールエステル					
現 生	0.036	—	0.128	0.167	—
Kos	0.016	—	—	—	—
Dr	0.003	—	—	—	—
Su	0.003	—	—	—	—

て、トリパルミチン・パルミチン酸・コレステ
ロールパルミテート・コレステロールを同条件で展
開し、脂質成分の同定に用いた。

3. トリグリセライド・遊離脂肪酸・ステロール エステルの加水分解とメチルエステル化

薄層プレート上の分画部分のうちステロール以
外の3成分をかきとり、それを各成分ごとにアン
ブル瓶に移し、ベンゼン1 ml (脂肪酸の酸化を
防ぐ)と5%塩酸-メタノール溶液10 mlを加え、
閉管して70℃で3時間加水分解する。分解液を
分液ロートに移し、10 mlの石油エーテルを加え
て振盪すると、エステル化した脂肪酸は石油エー
テル層に移るので、この層を分離し窒素気流中で
濃縮する。エーテルによる抽出は2回行なう。こ

うしてえた3成分中の脂肪酸エステルはガスクロ
マト装置にかけるまで0℃で保存する。

4. ガスクロマト法による高級脂肪酸の分離・定 量

前述の方法でえた脂肪酸エステルに、アラキジ
ン酸 ($C_{20}=0$) の石油エーテル溶液0.1 mlを内
部標準試料として加え、そのうち2 μL を分取し
てガスクロマトグラフ装置にかける。筆者らは島
津4A F型装置を使用した、分離用カラムとして
は、内径4 mmのガラスカラムに、Diethylen
glycol succinate polyester を充填して
用いた。測定条件は、カラム温度: 195℃, キヤ
リアーガス流量: 60 ml/min, 水素圧: 0.6 Kg/cm²
空気圧: 1 Kg/cm²である。同定のための既知物質

としては、パルミチン酸・ステアリン酸・オレイン酸・リノール酸・リノレン酸のメチルエステルを使用した。なお、内部標準試料としたアラキジン酸は試料中に含まれていないことを確認している。

5. ステロールの定量

薄層プレート上のステロールのスポットをかきとり、一定量のクロロホルムを加えて遠沈法によりステロールを抽出し、クロロホルムを窒素気流中で除去してその濃縮液をえる。それに氷酢酸 3.0 ml を加え、50℃のウオーターバス中で沈殿が消失するまで攪拌する。冷却後発色剤（塩化第2鉄 1.00 mg を濃硫酸 1.00 ml に溶かしたもの）を 2 ml 加え、560 mμ の光で比色定量する。

IV 分析結果

試料より抽出した脂質から、トリグリセライド・遊離脂肪酸・ステロールエステル・ステロールの4種を分離することができた。そのクロマトグラムは、現生試料と化石試料との間でいちぢるしく異なり、現生試料ではトリグリセライドに大きなスポットが見出されるが、化石試料では遊離脂肪酸のスポットの方が大きい。薄層クロマト法により分画された4成分について、含有量・脂肪酸組成を測定した結果は次のようである（表1・2）

1. トリグリセライド

現生試料のトリグリセライド含有量は 271.35 μmol/g で、抽出した脂質の 9.5% 以上を占めている。しかし約 10 万年を経過した Kos 試料の含有量は 0.084 μmol/g で、現生試料の 0.03% にすぎない。より古い試料の含有量も同程度である（表1）。

また、現生試料のトリグリセライドからはパルミチン酸 (C₁₆=0)・ステアリン酸 (C₁₈=0)・オレイン酸 (C₁₈=1)・リノール酸 (C₁₈=2)・リノレン酸 (C₁₈=3) の5種が同定されたが、不飽和脂肪酸であるリノール酸の含有量が特に高く、飽和脂肪酸であるステアリン酸の含有量が最低である。この脂肪酸組成はクルミ種子の脂肪酸組成^{*6} (Shorland, 1962) の特徴をよく現わして

いる。しかし化石試料ではその様な特徴は全くみられない。そして鮮新世の Su 試料からは不飽和脂肪酸が3種とも検出されず、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸のみが見出される（表2）。

2. 遊離脂肪酸

現生試料中の遊離脂肪酸含有量は 9.48 μmol/g で、抽出した脂質の 3% 強である。しかしその量は化石試料 Kos で 0.33 μmol/g、同 Dr で 0.03 μmol/g と年代の古い程順次減少する。ところがより古い試料 Su では減少することなく、僅かながら Dr 試料より高い値、0.09 μmol/g を示す（表1）。グリセライド同様、パルミチン酸・ステアリン酸・オレイン酸・リノール酸・リノレン酸の5種が検出された。そのうち不飽和脂肪酸であるオレイン酸・リノール酸・リノレン酸は化石試料中ではいちぢるしく減少しており、リノール酸は Kos 試料から、リノレン酸は Dr 試料より古い試料で検出できない（表2）。なお、化石試料では炭素数 14・12 の脂肪酸の存在を暗示するピークがみられたが、分析条件を変えないと正確な同定ができないのでこの論文では取上げなかった。

3. ステロールエステル

現生試料の脂質からはステロールエステルが極く微量ながら検出された。その含有量は化石試料では Kos・Dr の順に減少する。しかし鮮新世の Su 試料では Dr 試料にくらべ減少していない（表1）。

また、現生試料のステロールエステルからは、パルミチン酸・オレイン酸・リノール酸が検出された。この場合もまた脂肪酸の主体をなすのはオレイン酸・リノール酸、すなわち不飽和脂肪酸である。しかし、化石試料ではオレイン酸・リノール酸はなく、パルミチン酸だけがみられる（表2）。

4. ステロール

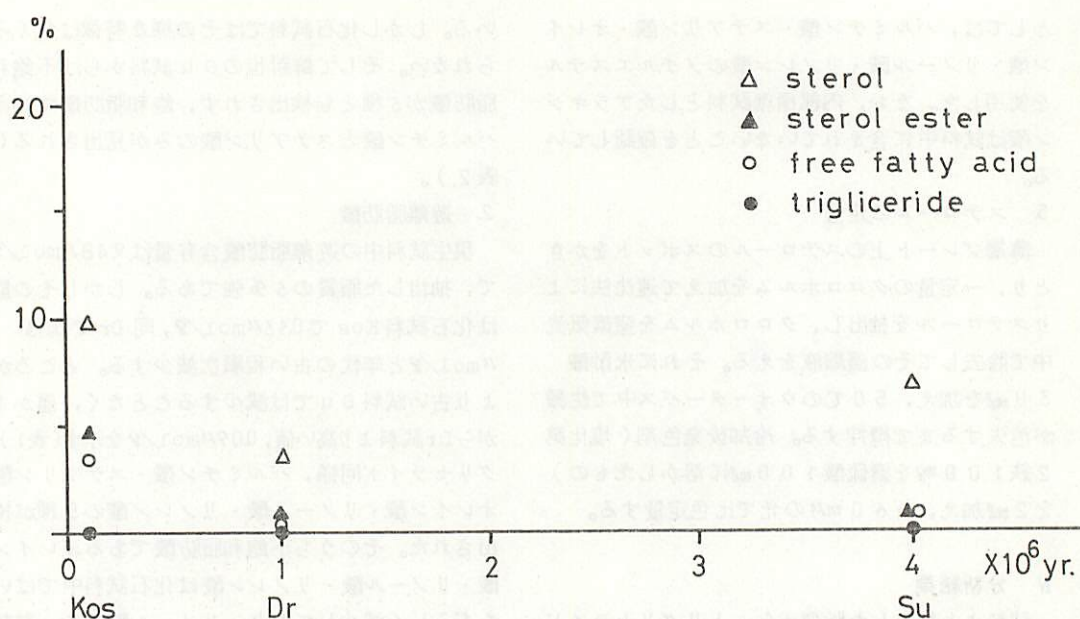
現生試料には 2.53 μmol/g、抽出した脂質の 2% 弱に相当するステロールが存在する。このステロールは Kos 試料で 0.25 μmol/g、Dr 試料で 0.09 μmol/g と順次減少するが Su 試料では 0.17 μmol/g と逆に増加している。

V 考 察

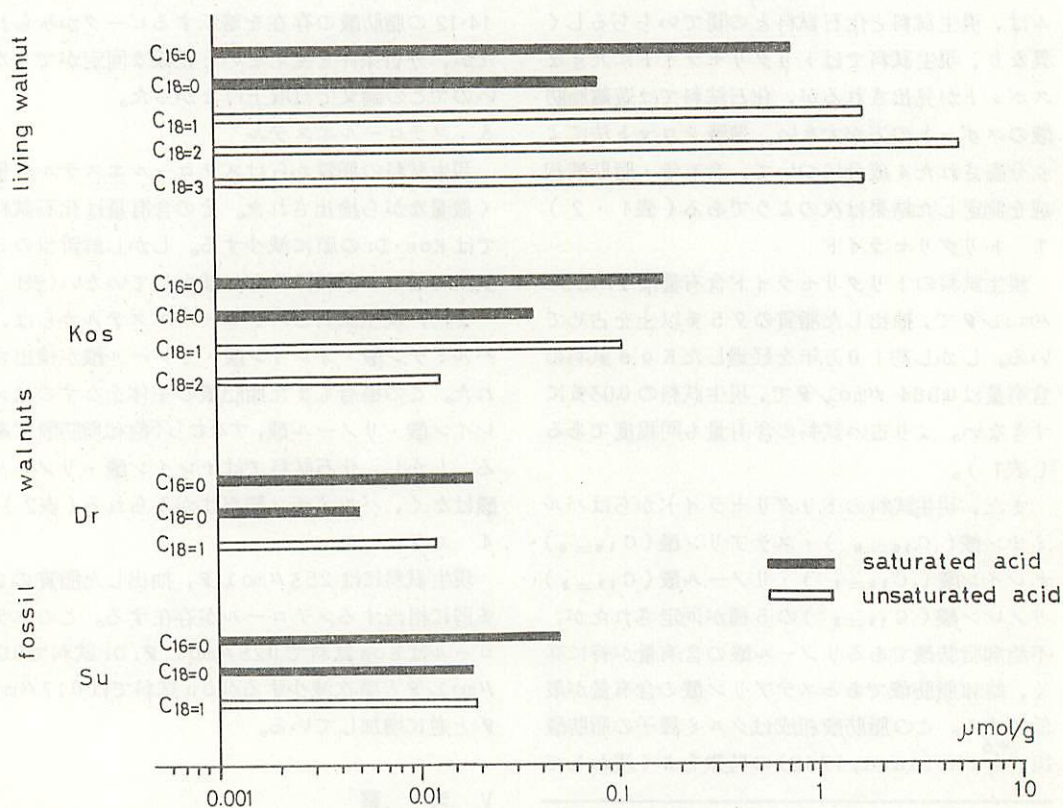
1. 脂質成分の分解について

現生試料に含まれている4種の脂質成分をそれぞれ100とし、化石試料中に残存するそれらの割合(%)を縦軸に、試料の推定絶対年代を横軸に

*6 西洋グルミ (*Juglans regia*) の種子の脂肪酸組成 (wt.%) パルミチン酸: 7%,
ステアリン酸: 1%, オレイン酸: 16%,
リノール酸: 72%, リノレン酸: 4%



第1図 トリグリセライド・遊離脂肪酸・ステロールエステル・ステロールの残存率(%)を示す図



第2図 遊離脂肪酸から検出された飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の含有量(μmol/g)を示す図

C₁₆=0 : パルミチン酸, C₁₈=0 : ステアリン酸, C₁₈=1 : オレイン酸,
C₁₈=2 : リノール酸, C₁₈=3 : リノレン酸

として残存率をプロットすると図1がえられる。そこからわかるように、脂質4成分の残存率はトリグリセライド・遊離脂肪酸・ステロールエステル・ステロールの順に低い。とくにトリグリセライドは中期洪積世の試料ですでに100%近く消失している。これに対し、他の脂質成分は前期洪積世まで減少し、それより古い試料ではほぼ一定値を保つように思われる。このことは堆積岩中のアミノ酸が洪積世と鮮新世の境界付近まで減少し、それより古い年代では減少する傾向がみられない(市原ほか, 1968; 市原, 1972)のと非常によく似ている。

トリグリセライドの分解が他の脂質成分に比して早いのは、トリグリセライドのエステル結合が化学的に容易に切れるからと思われる。トリグリセライドのエステル結合が切れるとグリセロールと遊離脂肪酸が生ずる。生じた遊離脂肪酸は元来あったものに加わり、共に年代の経過に従って減少する。

ステロールエステルの分解はトリグリセライド程急激ではないが、分解の第一段階はやはりエステル結合の開裂であろう。エステル結合が切れて生じたステロールおよび遊離脂肪酸はこれまた元来あったものに加わり、それぞれ年代の経過とともに分解減少する。

しかし、遊離脂肪酸・ステロールエステル・ステロールの分解は全く消失するまで続くのではなく、その含有量は前期洪積世付近の化石でほぼ一定値に達し、それより古い化石では保存の状態などにより一定値を上下するものと思われる(図1)。堆積岩では白亜紀の頁岩に、多いもので $0.1 \mu\text{mol/g}$ 近くの脂肪酸があるという例が報告されている(Kvenvolden, 1966)。

2. 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の分解について

現生試料のトリグリセライドからは5種の脂肪酸が分離定量されたが、不飽和脂肪酸であるリノール酸($C_{18}=2$)が総脂肪酸中の過半数を占めオレイン酸($C_{18}=1$)・リノレン酸($C_{18}=3$)がそれにつぐ、そして、飽和脂肪酸であるパルミチン酸($C_{16}=0$)とステアリン酸($C_{18}=0$)は両方合せても5%にみえない。この特徴は遊離脂肪酸やステロールエステルにも現われている。しかし、化石クルミでは不飽和脂肪酸の減少がいちぢるしいために、中期洪積世の試料ですでにトリグリセライドの脂肪酸組成は現生のものとかなり異なる。

そして2重結合の多い酸程、すなわち不飽和度の高い酸程早く消失する(表2)。このことはトリグリセライドだけでなく遊離脂肪酸においても同様である。年代の古い試料程不飽和脂肪酸の相対的含有量が減少する様子を遊離脂肪酸を例にとって図2に示した。この様に不飽和脂肪酸の分解速度が飽和脂肪酸に比して速いのは、年代の経過にともなって不飽和脂肪酸の2重結合が飽和されることや2重結合の位置で鎖が開裂し酸の分解が進行しやすいことなどに原因するであろう。

Abelson et al. (1964) もクロレラを incubate して脂肪酸の安定性を調べ、不飽和度の高い脂肪酸から先に消失することを報告している。

謝辞: 分析結果をまとめるに当たり、大阪市立大学 粉川昭平博士からクルミの形態について、同市原実博士から化石クルミの産出層準・地質年代について御教示をえた。記して謝意を表する。

引用文献

- ABELSON, P. H., T. C. HOERING and P. L. PARKER (1964): Fatty acids in sedimentary rocks. in *Advances in Organic Geochemistry* (U. COLOMBO and G. D. HOBSON, eds.), p. 169 ~ 174, New York, The MacMillan Co.
- 市原優子・市原実 (1968): 大阪層群の泥質堆積物に含まれているアミノ酸. 地質雑., vol. 74, p. 233 ~ 238.
- 市原優子 (1972): 日本の新生代層に含まれるアミノ酸. 地球科学, vol. 26, p. 69 ~ 79.
- KVENVOLDEN, K. A. (1966): Molecular distribution of normal fatty acids and paraffins in some lower Cretaceous sediments. *Nature*, no. 5023, p. 573 ~ 577.
- 楢井久 (1970): 日本のクルミ化石について. 大阪市立大学博士論文.
- SHORLAND, F. B. (1962): The comparative aspects of fatty acid occurrence and distribution. in *Comparative Biochemistry III* (M. FLORKIN and H. S. MASON, eds.), p. 1 ~ 102.

Lipids in fossil walnut stones

Masao INOUE, Hisashi NIREI and Yuuko ITIHARA

(Abstract)

Lipids extracted from fossil and living walnut stones were examined. The extracts from the living walnut specimen are mainly triglycerides and to lesser extent free fatty acids, sterols and sterol esters. But triglycerides are easily hydrolyzed, so that only a trace of it is found in the fossil walnut specimen of the middle Pleistocene. The concentration of free fatty acids, sterols and sterol esters also shows a decreasing trend, approaching steady state at the early Pleistocene specimen.

In the living walnut specimen, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids are detected from triglycerides and free fatty acids. Among them, linoleic, oleic and linolenic acids, unsaturated acids, from the most part of the detected fatty acids. In the fossil specimens, however, saturated acids excel unsaturated acids, because unsaturated acids are unstable compared with saturated acids.

古生物学各論 第一巻 植物化石

井尻正二監修 徳永重元・大森昌衛責任編集

築地書館, 2,760円(送料こみ)

かねがねお知らせしてあったように、井尻正二会員の還暦を記念した企画である、古生物学各論(全四巻)の第一巻が発売されました。

本書は、井尻氏が序文でも述べられているように、井尻氏個人の古生物学に関する四部作、すなわち古生物学論(改題、科学論)・古生物学汎論・古生物学各論・実験古生物学(化石の研究法)のひとつをなすものです。

第一巻の内容および執筆者は、

- | | |
|----------|------------|
| 1 植物化石序説 | 徳永重元 |
| 2 細菌植物 | 都留信也・大森昌衛 |
| 3 菌藻植物 | 広瀬弘幸・西田史朗 |
| | 長谷川康雄・大森昌衛 |
| 4 蘚苔植物 | 広瀬弘幸・大森昌衛 |

- | | |
|--------|-----------------|
| 5 シダ植物 | 浅間一男・木村達明 |
| 6 裸子植物 | 木村達明・浅間一男 |
| 7 被子植物 | 鈴木敬治 |
| 8 植物器官 | 藤 則雄・徳永重元 |
| 付図 1. | 古生代・中生代植物化石主要産地 |
| 2. | 古第三紀植物化石主要産地 |
| 3. | 新第三紀植物化石主要産地 |
| 4. | 第四紀植物化石主要産地 |

ひきつづき発刊される続巻の内容は、

- 第2巻 無脊椎動物化石・上
第3巻 無脊椎動物化石・下
第4巻 脊椎動物化石

井尻正二氏還暦記念出版実行委員会編

井尻正二氏の略歴と業績 600円(送料こみ)

内容は、

- 1 略 歴
- 2 学術論文目録
- 3 著書目録

- 4 評論・随筆・書評等に関する目録
- 5 井尻正二氏の思想形成史
- 6 井尻正二氏の著書に対する感想・書評の一例