

5 高等植物に含まれるジベレリンに関  
する研究

10  
15 山根久和

# 目次

ページ

緒論 1

第一章 エニシダ未熟種子に含まれる  
新ジベレリンA<sub>35</sub>とそのグルコ  
シドの単離、構造解析

第一節 緒言 7

第二節 エニシダ未熟種子に含まれ  
るジベレリン類の単離 9

第三節 酢酸エチル可溶酸性ジベレ  
リン、F-I、F-II (GA<sub>35</sub>)  
の化学構造 17

第四節 n-ブタノール可溶酸性ジベ  
レリン (F-III) の化学構造 25

第五節 考察 31

第六節 実験の部

第二章 GA<sub>35</sub>、GA<sub>35</sub>グルコシドの生理  
活性

第一節	緒言	46
第二節	結果	51
第三節	考察	56
第四節	実験の部	59

第三章 ゴガツササゲ種子におけるジ  
ベレリンの代謝

第一節	緒言	61
第二節	ゴガツササゲ種子の完熟期 におけるジベレリンの代謝	65
第三節	発芽時における内生ジベレ リンの挙動	86
第四節	胚生長期におけるジベレリ ンの代謝	90
第五節	総括	100
第六節	実験の部	106

結語	114
参考文献	118
謝辞	125

## 緒 論

ジベレリン研究の起源は、十九世紀に逆のぼる。すなわち、1898年、堀は古くからわが国の稲作における主要病害の一つであり、特に台湾において猛威をふるっていた馬鹿苗病が、馬鹿苗病菌の寄生によりひきおこされることを明らかにした。<sup>1)</sup> 更に、1926年、黒沢は馬鹿苗病の病徴が馬鹿苗病菌の分泌する毒素の化学作用によるものであることを明らかにするとともに、該毒素が熱に安定な物質であること、また、稲のみならず他の植物に対しても同様の作用をなすこと等を報告した。<sup>2)</sup>

こうした植物病理学者の馬鹿苗病に関する諸研究は、やがて化学者の興味をひくこととなり、1938年の藪田、住木による稲馬鹿苗病菌の生産する徒長物質〈ジベレリン〉の結晶化という偉大な成果を生むにいたった。<sup>3)</sup>

ジベレリンは、その植物生長促進作用の故に、多くの植物生理学者、天然物有機化学者

の興味を一層集めるところとなり、1951年、  
 Mitchellらによる、ある種の豆のエーテル抽出  
 物が葉の伸長、幼植物の生長促進等の生理活  
 性を有するという報告<sup>4)</sup>をはじめとして、主に  
<sup>5)</sup>ペーパークロマトグラフィーと生物試験を組  
 み合わせる方法で、高等植物中にジベレリン  
 様物質が存在するであろうことが報告されは  
 じめた。

1958年、MacMillanは、紅花インゲンの未熟種  
<sup>10)</sup>子からジベレリンA<sub>1</sub> (GA<sub>1</sub>)を単離し、続い  
 て、GA<sub>5</sub>、GA<sub>6</sub>、GA<sub>8</sub>と命名された新ジベレ  
 リンの単離に成功した。<sup>5)</sup>

高等植物からジベレリンを単離しようとする  
 研究は、1960年代になって、一層盛んとな  
<sup>6)</sup>り東大グループにより、GA<sub>19</sub> (タケノコ)、  
 GA<sub>21</sub>、GA<sub>22</sub> (ナタマメ未熟種子)<sup>7)8)</sup>、GA<sub>20</sub>、G  
 A<sub>26</sub>、GA<sub>27</sub>、GA<sub>29</sub> (アサガオ未熟種子)<sup>9)</sup>、GA<sub>30</sub>  
 、GA<sub>31</sub>、GA<sub>33</sub>、GA<sub>34</sub> (ヨルガオ未熟種子)<sup>12)</sup>、  
 GA<sub>32</sub> (モモ幼果)<sup>13)</sup>、小清水らによって、GA<sub>18</sub>  
 、GA<sub>23</sub>、GA<sub>28</sub> (キバナノハウチワマメ未熟種  
<sup>14)</sup> <sup>15)</sup> <sup>5)</sup> <sup>10)</sup> <sup>15)</sup>

子)、また、Pryceらにより、GA<sup>16)</sup> (紅花インゲン未熟種子) などの新ジベレリン類が、続々単離構造決定されるにいったた。

高等植物の示す様々な生理現象が、植物体内に存在する内生の植物生長調節物質により制御されていることが明らかにされつつある現在、ジベレリン研究の究極の目的は、その作用性を物質的に明らかにすることにある。そのためには、広く植物界に存在するジベレリン類を検索し、その構造を明らかにするとともにその分布を調べること、また、各種ジベレリンの生理活性を測定し、ジベレリンの分子が作用するために必要な官能基、植物体内の受容体の性質を明らかにすることが、極めて重要な研究課題となる。さらに、放射性同位元素で標識したジベレリン及びジベレリン前駆体等を用いて *feeding experiment* を行い、高等植物におけるジベレリンの生合成、代謝経路を明らかにするとともに、その作用点の究明、また、植物の生長現象に対応したジベ

レリン類の挙動についても追求する方向に研究を進展させる必要がある。

こうした背景のもとに、著者はまず高等植物からジベレリンを単離する研究の一環として、一般に多量のジベレリン類を含むことが知られている豆科植物の一種、エニシダ (*Cytisus scoparius*) 未熟種子についてジベレリン様物質の検索を行い、新ジベレリン A<sub>35</sub> とその配糖体 GA<sub>35</sub> グルコシド<sup>17)</sup> を単離した。この単離操作及び構造解析を第一章において述べる。

第二章においては、GA<sub>35</sub>、その誘導体 F-I、GA<sub>35</sub> グルコシドの他、最近ヨルガオ未熟種子より単離された GA<sub>33</sub>、GA<sub>34</sub> などの新ジベレリン類の七つの系で測定した生理活性<sup>18)</sup> について考察を加える。

他方、高等植物中には、酢酸エチル可溶性酸性区に分画される、いわゆる遊離型ジベレリンの他に、これより極性の高い水溶性ジベレリン様物質の存在することが知られていた。

東大グループは、アサガオ未熟種子より 3-O-<sup>19)</sup>  
 $\beta$ -D-glucosyl-GA<sub>3</sub>、2-O- $\beta$ -D-glucosyl-GA<sub>26</sub>、-GA<sub>27</sub>  
<sup>11)</sup>  
 、-GA<sub>29</sub>を、Schreiber らは紅花インゲン未熟種<sup>20)</sup>  
 子より、2-O- $\beta$ -D-glucosyl-GA<sub>8</sub>を単離同定し、  
<sup>5</sup>これら水溶性ジベレリンの一つのグループが  
 ジベレリングルコシルエーテルであることを  
 明らかにした。

ジベレリングルコシルエーテルは、

①水溶性であること、

<sup>10</sup>②そのアグリコンと比べ著しく生理活性が低  
<sup>21)</sup>  
 下すること、

③種子の完熟していくにしたがい遊離型ジベ  
 レリンが減少していくのに対し、その存在量  
<sup>22) ~ 25)</sup>  
 が増加していくこと、

<sup>15</sup>④一般に、高等植物は発芽直後、ジベレリン  
<sup>26)</sup>  
 の生合成能がないうし、

といった諸知見より、ジベレリンの移動態、  
 貯蔵態あるいは不活性態である可能性が考え  
 られてきた。ところで、近年、東大グループ  
 により、ゴガツササゲ完熟種子から、四種の



ジベレリングルコシルエステルが単離された<sup>27)</sup>ことは、きわめて重要である。ジベレリングルコシルエステルは、ジベレリングルコシールエステルに比べ生理活性は高く、その活性はアグリコンのそれにほぼ匹敵し、また、生体内で加水分解をきわめて受けやすい。<sup>28)</sup>さらに、GA<sub>4</sub>、GA<sub>3</sub>グルコシルエステルなど、ジベレリン生合成の初期段階に属するジベレリンのグルコシルエステルが出現していること等は、植物生理学上、きわめて興味深いものがある。

第三章においては、ゴガツササゲ種子にトリチウムで標識したジベレリン類を接種し、これらを追跡した結果を述べ、高等植物におけるジベレリンの生合成、代謝経路をたどるとともに、発芽時におけるジベレリン類の挙動を調べ、ジベレリン及びその配糖体の生理的意義についても考察を加えた。

# 第一章 エニシダ未熟種子に含まれる新ジベレリンA<sub>35</sub>とそのグルコシドの単離、構造解析

## 第一節 緒言

本研究が開始された時点において、カビ (*Gibberella fujikuroi*) から15種 (GA<sub>1</sub> ~ GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub> ~ GA<sub>16</sub>, GA<sub>24</sub>, GA<sub>25</sub>)、高等植物からは、24種 (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> ~ GA<sub>9</sub>, GA<sub>17</sub> ~ GA<sub>23</sub>, GA<sub>26</sub> ~ GA<sub>34</sub>) のジベレリン類が単離同定されていた。

高等植物からのジベレリン単離研究の初期においては、GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>、GA<sub>9</sub> を除き、高等植物から単離されたジベレリン類はすべてC-13水酸基を有していた。後に述べるようにジベレリンは、mevalonic acid から、*ent*-kaurene、炭素数20のC<sub>20</sub>ジベレリン、C<sub>19</sub>ジベレリンという順に生合成されていくことが明らかにされている。MacMillan 及び勝見は、カビから単離さ

れたすべての $C_{20}$ ジベレリンが $C-13$ 水酸基を欠いているのに対し、高等植物から単離された $C_{20}$ ジベレリンは、 $GA_{17}$ 、 $GA_{18}$ 、 $GA_{19}$ 、 $GA_{23}$ 、 $GA_{28}$ など一般に $C-13$ 水酸基を有することから、カビと高等植物のジベレリン生合成面における最大の違いは $C-13$ 位の水酸化の時期にあると考えた。高等植物から、*ent-kaurene* 骨格、 $C-13$ 水酸基を有する *steriol* が単離されたこと、また、カビはこれをジベレリンに代謝すること<sup>35)</sup>ができないうし<sup>10)</sup>という実験的事実もまた上記仮説を裏付けるように思われる。

しかしながら、アサガオ未熟種子より、 $C-13$ 水酸基を欠く $GA_{26}$  ( $C_{19}$ ジベレリン)、 $GA_{27}$  ( $C_{20}$ ジベレリン)が単離されたこと<sup>10)</sup>、また、ヨルガオ未熟種子やモモ幼果より、 $GA_{30} \sim GA_{34}$ などの $C-13$ 水酸基を欠いたり、 $C-12\alpha$ や $C-15\beta$ に水酸基をもつ新しい型のジベレリン類が単離、構造決定されたこと<sup>12)</sup>は、高等植物におけるジベレリン生合成経路がきわめて多様性をもつことを示唆するものであろう。

高等植物におけるジベレリンの生理的意義やその生合成、代謝を考える上で、各種高等植物に含まれるジベレリンを検索することは、きわめて重要な意味をもつと思われる。

5 本章においては、ヒルガオ科とならび、一般に多量のジベレリンを含むとされている豆科植物の一種、エニシダ (*Cytisus scoparius*) 未熟種子中に存在していた新ジベレリン A<sub>35</sub> とそのグルコシドの単離、構造解析について述べる。

## 10 第二節 エニシダ未熟種子に含まれるジベレリン類の単離

15 豆科植物の一種、エニシダは、晩春、葉腋に1~2個ずつ黄色の美しい蝶形の花をつける南欧原産の低木で、観賞用あるいは生花用として栽培される。サヤはエンドウ様で平たく、開花後、5~6週間て種子は完熟にいた

る。

抽出に用いた未熟種子は、開花後3~4週間のもので、サヤも含めて37kgである。未熟種子は、ブレンダーで粉碎後、メタノールで2回抽出した。抽出液は、減圧下でメタノールを溜去した後、残った水層を図1-1の方法に従って分画し、酢酸エチル可溶酸性区(AE)、同中性区(NE)、n-ブタノール可溶酸性区(AB)、同中性区(NB)、水層残渣(Ag)の5分画を得た。このうち、生物試験において強力な活性のみられるAE区及びAB区について、ジベレリン様物質の検索を行った。

AE区(67.7g)は、まず、pH5.42の1Mリン酸緩衝液と酢酸エチルとを用いた10回移行の向流分配を行った。各分画について、矮性稲短銀坊主を用いた生物試験と薄層クロマトグラフィー(以下、TLCと略記)を行ったところ、No.7~10に活性がみられ、また、TLCにおいてはNo.8~10に硫酸処理、加熱後、U

エニシダ未熟種子

粉碎、メタノール抽出

抽出液

減圧濃縮

水層

9N 硫酸で pH3 に調整  
酢酸エチル抽出

酢酸エチル層

水層

飽和重曹水で抽出

n-771-11 で抽出

酢酸エチル層

水層

n-771-11 層

水層

酢酸エチル可溶中性区  
(NE 区)

酢酸エチル  
で抽出 (PH3)

飽和重曹水  
で抽出

水層残渣  
(Ag 区)

酢酸エチル層

水層

酢酸エチル可溶酸性区  
(AE 区)

n-771-11 層

水層

n-771-11 可溶中性区  
(NB 区)

n-771-11 で抽出  
(PH3)

n-771-11 層

水層

n-771-11 可溶酸性区  
(AB 区)

図 1-1 分画操作

5

10

15

Vランプ下で青色のジベレリン様蛍光が観察された。そこで No. 7 ~ 10 (24.7g) を合わせ、活性炭吸着クロマトグラフィーを行った。溶出をアセトン-水で行うと、活性物質はアセトン-水、35 : 65 ~ 45 : 55 の区分に溶出される。これら活性区分 (3.2g) をさらにシリカゲル吸着クロマトグラフィーにより精製すると、ジベレリン様物質は、酢酸エチル-ベンゼン、50 : 50 及び 60 : 40 の区分に溶出された。酢酸エチル-ベンゼン、50 : 50 の区分からは、分別再結晶により一種のジベレリン様物質 (F-I) を 20 mg 単離し、また、その再結母液と酢酸エチル-ベンゼン、60 : 40 の区分からは、ジアゾメタンによるメチル化後の分取 TLC によって、F-I メチルエステル (以下、F-I-Me と略記) を 5 mg、もう一種のジベレリン様物質 (F-II) をメチルエステルとして 6.6 mg 単離した。

F-II は、第三節において述べるように新ジベレリンであることが確認され、ジベレリン

# AE区 (67.7g)

向流分取  
酢酸エチル - 1Mリン酸緩衝液 (pH 5.42)

No. 1~6      No. 7~10      No. 11

活性炭吸着クロマトグラフィー  
アセトン-水で溶出

アセトン    35%    40%    45%

シリカゲル吸着クロマトグラフィー  
ベンゼン - 酢酸エチルで溶出

酢酸エチル    50%    60%

分別再結晶  
(酢酸エチル - ベンゼン)

F-I  
(20mg)      再結晶母液

ジアゾメタンでメチル化後  
分取TLC

F-I-Me      F-II-Me  
(5mg)      (6.6mg)

図 1-2 AE区 の 精製 過程



A35と命名された。

F-Iは、F-IIから酸触媒によってきわめて容易に導かれることから、精製過程で生じた artifact ではないかという疑念がもたれていた。事実、後年、40 kg のエニシダ未熟種子より、特に濃縮時の pH に注意して精製を行った場合、41 mg の F-II を単離したにもかかわらず F-I の存在は認められなかった。したがって、F-I は artifact と結論される。

F-I、F-II は、遊離酸では各種クロマトグラフィーで挙動を共にし、また、TLC においてもその R<sub>f</sub> 値、硫酸処理、加熱後の UV ランプ下における青色の蛍光、白色光下における緑色の色調等非常に類似している。以上の精製過程をまとめたものが図 1-2 である。

AB 区 (98.4g) については、まず、活性炭吸着クロマトグラフィーを用いて精製した。溶出をアセトン-水で行うと、活性物質は、

アセトニー水、30:70~40:60の区分に溶出された。次に、これら活性区分(6.3g)を合わせ、Sephadex G-50、pH 5.65の1Mリン酸緩衝液を用いた分配カラムクロマトグラフィー(n-ブタノール-酢酸エチル)、脱塩を兼ねた gradient 法による活性炭吸着クロマトグラフィー(アセトニー水)、シリカゲル吸着クロマトグラフィー(メタノール-クロロホルム)、分取ペーパークロマトグラフィーを順次行い、130 mgのジベレリン配糖体様物質(F-III)を単離した。

F-IIIは、TLCにおける硫酸処理加熱後のUVランプ下、白色光下の色調等、F-I、F-IIときわめて類似する。以上の精製過程を図1-3に示す。

AB区 (98.4g)

活性炭吸着クロマトグラフィー

アセトン-水で溶出

アセトン 30% 35% 40%

Sephadex G-50, pH 5.65 の 1M リン酸緩衝液を用いた

介孔シリカクロマトグラフィー

n-ヘptan-1-ol - 酢酸エチルで溶出

n-ヘptan-1-ol 15% 20% 25%

Gradient法による活性炭吸着クロマトグラフィー

アセトン-水で溶出

No. 1~5

No. 6~8

No. 9~20

シリカゲル吸着クロマトグラフィー

メタノール-クロロホルムで溶出

メタノール 15% 20%

介孔ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 51 使用, イソプロパノール-7N

アモニア-水 (8:1:1) で展開

F-III (130 mg)

④ 1-3 AB区 の精製過程

### 第三節 酢酸エチル可溶酸性ジベレリン、 F-I、F-II (GA<sub>35</sub>) の化学構造

F-II は、融点 252~254°C を示す針状結晶で、  
 ジアゾメタン処理することによりメチルエス  
 テルを与える。F-II-Me の高分解能マススペク  
 トルを測定すると、362.1699 に分子イオンピー  
 クが観測され、その分子式は、C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> (計算  
 値: 362.1727) と決定される。また、F-II-Me は  
 図 1-4 に示した NMR スペクトル (δ 3.71  
 、-COOCH<sub>3</sub>, 3H singlet) から、モノメチルエス  
 テルであることが明らかなので、F-II は C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>  
 O<sub>6</sub> を有することとなる。F-II-Me のトリメチル

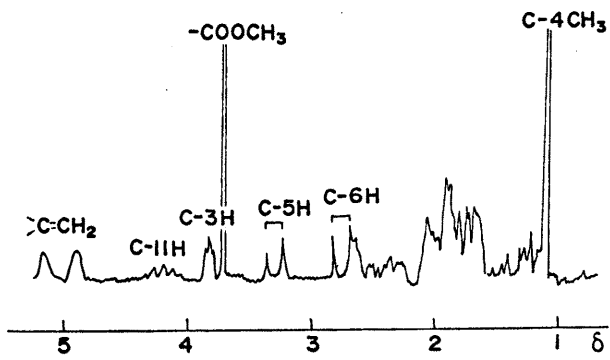
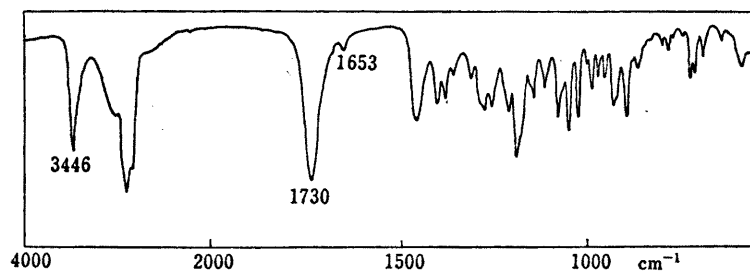


図 1-4 F-II-Me の NMR スペクトル  
(CDCl<sub>3</sub> 中)

シリルエーテル（以下、TMS-F-II-Meと略記）の低分解能マススペクトルは、分子イオンピークを $m/e$  506に示し、F-IIが2個の水酸基を有することを推測させる。

5 図1-5に示すように、F-IIのIRスペクトルは、 $3446\text{ cm}^{-1}$ に水酸基、 $1730\text{ cm}^{-1}$ にカルボニル、 $1653\text{ cm}^{-1}$ にエキソメチレンの吸収を有する。F-II-Meの重クロロフォルム中で測定したNMRスペクトルにおいては、 $\delta$  1.15にC-4 Meに由来する3H singlet、 $\delta$  3.26と2.74にC-5、C-6プロトンに特徴的な一対の1H doublets ( $J = 10.5\text{ Hz}$ )、 $\delta$  4.91と5.04にエキソメチレンに由来する2個の1H broad singletsが観測される。また、 $\delta$  3.86の1H triplet ( $J = 2.3\text{ Hz}$ )、 $\delta$



5 10 15 図1-5 F-IIのIRスペクトル（ヌジヨール）

4.22の $^1\text{H}$  multipletは、2個のカルビニルプロトンの吸収と考えられる。尚、図1-6にF-II-Meのマススペクトルを示す。

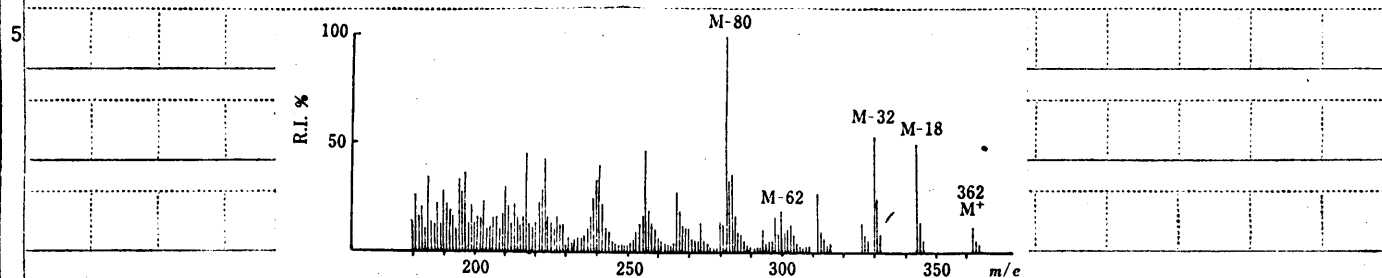


図1-6 F-II-Meのマススペクトル

F-I, F-I-Meはともにポリスラム状結晶で、融点はそれぞれ269~271, 208~210°Cである。F-I-Meの高分解能マススペクトルには、 $m/e$  362.1725に分子イオンピークが観測され、分子式はF-II-Meと同じく $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$  (計算値: 362.1727) であることを示している。F-I-Meも、図1-7に示すNMRスペクトル ( $\delta$  3.70,  $-\text{COOCH}_3$ , 3H singlet) から、モノメチルエステルであることが明らかなのでF-IもF-IIと同様 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ を有することとなる。しかしながら、TMS-F-I-Meの低分解能マススペクトルは、 $m/e$  434に分

子イオンピークを示し、F-IIの異性体でありながら、F-Iには水酸基が1個しか存在しないことを示唆している。

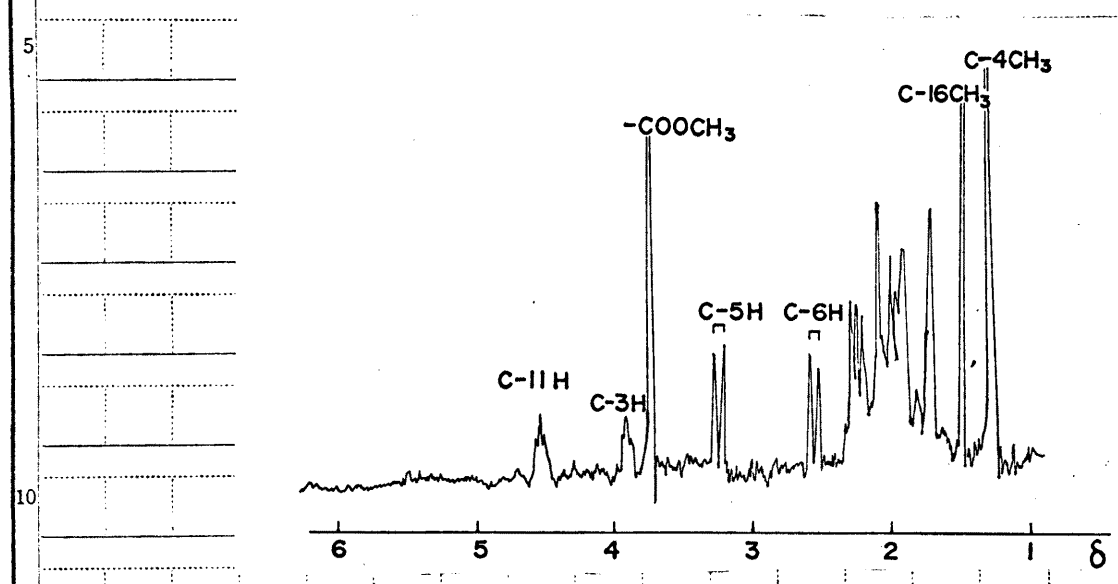


図 1-7 F-I-MeのNMRスペクトル (CDCl<sub>3</sub>中)

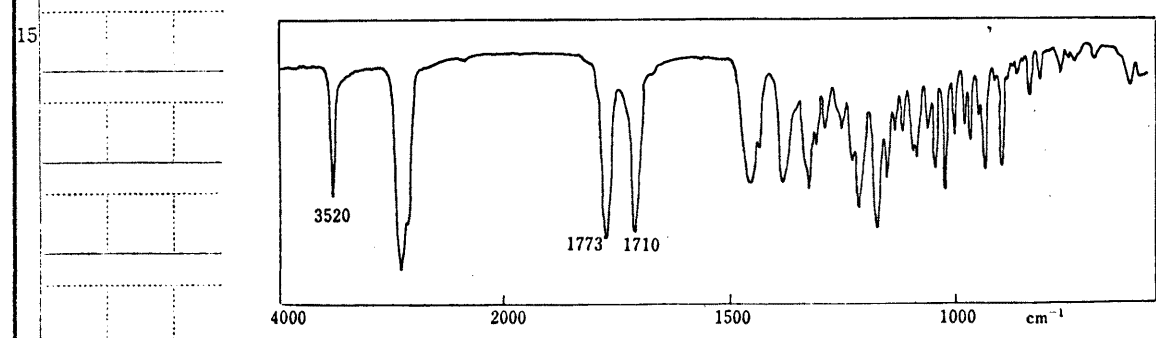


図 1-8 F-I-MeのIRスペクトル(フジヨール)

F-I-MeのIRスペクトルは、 $3520\text{ cm}^{-1}$ に水酸基、 $1773\text{ cm}^{-1}$ に $\gamma$ -ラクトン、 $1710\text{ cm}^{-1}$ にメトキシカルボニルの吸収を示すが、エキソメチレンの吸収はみられない。F-I-MeのIRスペクトル、なうむに、低分解能マススペクトルを図1-8、1-9の示す。

重クロロフォルム中で測定したF-I-MeのNMRスペクトルは、 $\delta 1.22$ にC-4 Meの3H singlet、 $\delta 1.43$ にGA<sub>2</sub>やGA<sub>10</sub>などのタイフのジベリリンに特徴的なC-16 Meに由来する3H singlet、 $\delta 3.22$ と $2.53$ にC-5、C-6プロトンに由来する一対の1H doublets ( $J = 6.5\text{ Hz}$ )、 $\delta 3.90$ にカルボニルプロトンの1H triplet ( $J = 2.3\text{ Hz}$ )、 $\delta 4.53$ に $>\text{CH-OR}$ に由来すると考えら

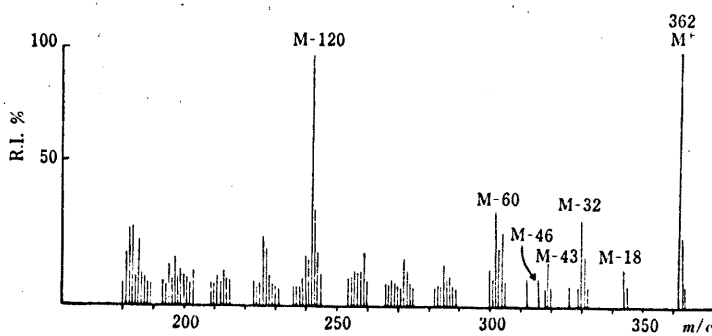


図1-9 F-I-Meのマススペクトル



れる 1 H triplet ( $J = 3 \text{ Hz}$ ) の吸収を示す。  
 ここで、C-5、C-6 プロトンの結合定数が 6.5 Hz と既知ジベレリンのそれよりかなり小さいこと、また、 $\delta 4.53$  の 1 H triplet が他のいかなる既知ジベレリンのカルビニルプロトンより低磁場にシフトしていることが特徴的である。

以上に述べたような各種スペクトルの検討から、F-I、F-II はそれぞれ表 1-1 に示すような官能基を有すると考えられる。

	F-I	F-II
Sec. -OH	1	2
-CH-OR	1	0
$\gamma$ -Lactone	1	1
-COOH	1	1
$>C=CH_2$	0	1
-C-CH <sub>3</sub>	2	1

表 1-1 F-I、F-II の官能基

ところで、F-I、F-II の官能基を比較すると、F-I は F-II の水酸基の一つとエキソメチレンとの間にエーテル結合が形成されたものに相当する可能性が考えられた。

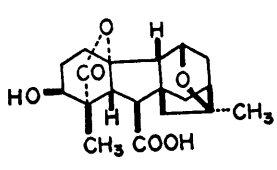
そこで、F-II から F-I への化学変換を試みた。F-II を封管中 0.3 N メタール性塩酸で 1 時間煮沸すると、高収率で F-I が得られた。F-II において、C-16 とエーテル結合を形成する可能性のある位置としては、C-11 $\beta$  と C-12 $\beta$  が考えられる。しかしながら、C-12 $\beta$  水酸基の可能性は、F-II-Me の NMR スペクトルのエキソメチレンの chemical shift に基づいて除外される。すなわち、GA<sub>26</sub>-Me diacetate の NaBH<sub>4</sub> 還元物の一つである化合物 III (図 1-10) においては、エキソメチレンに由来する吸収は、 $\delta$  5.16 に 2H broad singlet としてあらわれ、F-II-Me における  $\delta$  4.91、5.04 よりも低磁場に観測されるからである。

一方、F-II において C-11 と C-16 との間にエーテル結合が形成された場合、C 環の ring conformation は舟型から椅子型となり、C-5、C-6 プロトン間の dihedral angle が変化する。また、C-11 $\alpha$  プロトンは、axial から equatorial となる。こうして、F-I-Me の NMR スペクトルにお

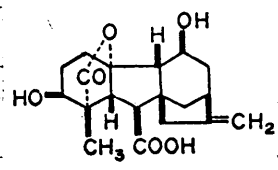
いて特徴的であった。C-5、C-6 プロトンの結合定数の小さいこと、 $>CH-OR$  に由来する  $\delta$  4.53 の 1 H triplet の chemical shift の低いことがきわめてよく説明され、したがって、F-II の 1 個の水酸基は C-11 に  $\beta$  配位をもつて結合していると結論される。

F-II および F-I において、残る一つの水酸基が C-3  $\beta$  に存在することは、F-II-Me、F-I-Me の C-5 プロトンの chemical shift、ならびに、重ピリジン中で測定した F-I-Me の NMR スペクトルにおいて C-4 Me が重クロロフォルム中で測定した場合にくらべ、約 0.3 ppm 低磁場にシフトしていることから明らかである。<sup>37)</sup>

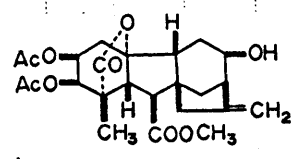
こうして、F-II は II のような構造を有する新ジベレリンであることが確認され、GA<sub>35</sub> と



I



II



III

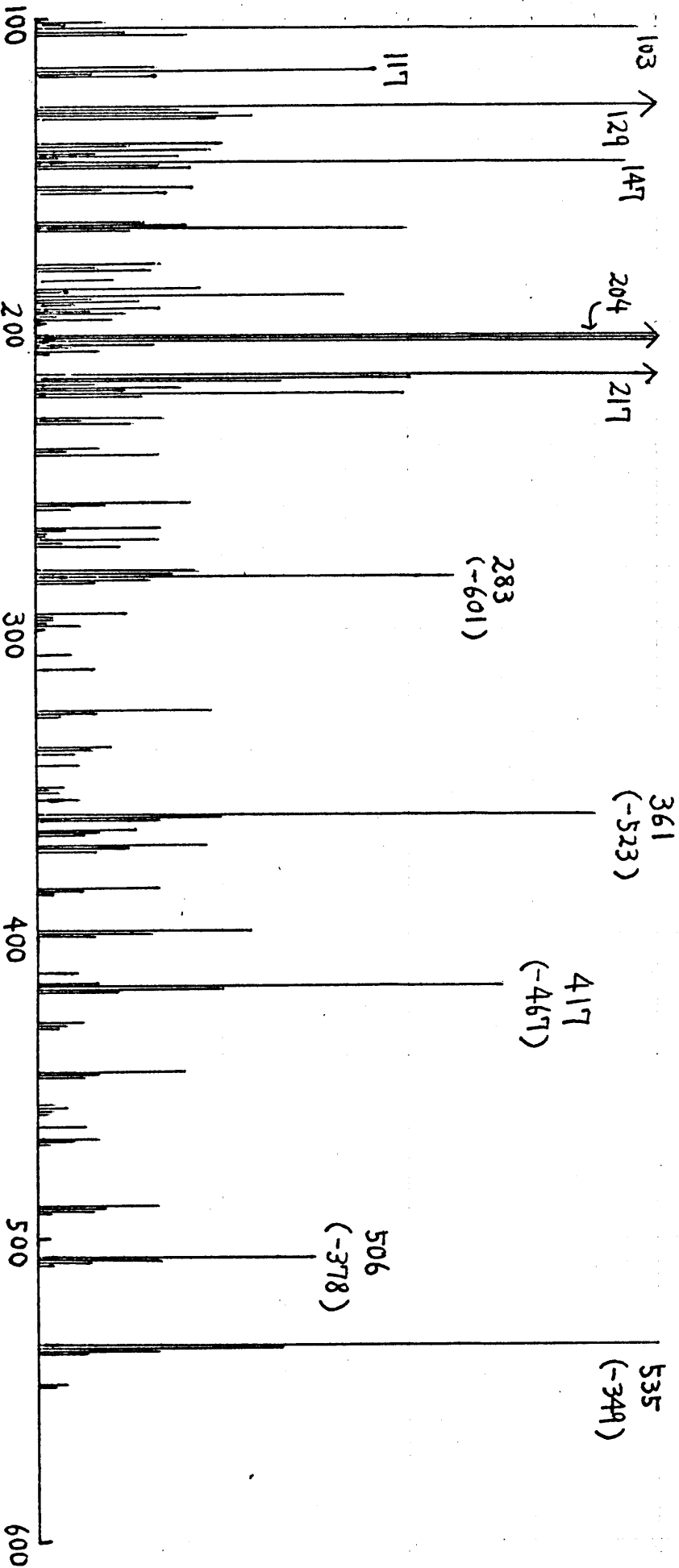
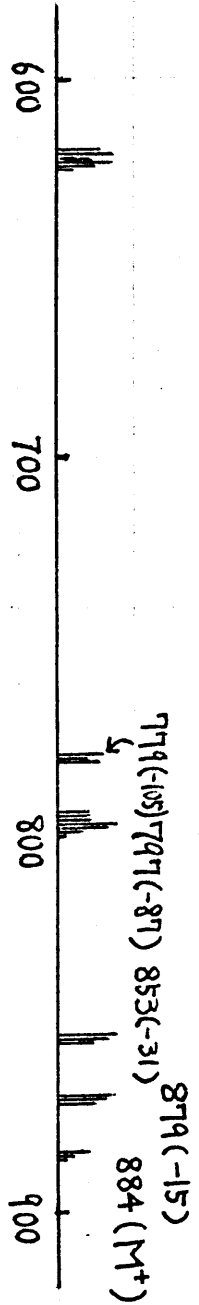
図 1-10 構造式

命名された。また、F-I (I) が、前述した通り、精製過程で F-II より生成した artifact であることも結論された。

#### 第四節 n-ブタノール可溶性ジベレリン (F-III) の化学構造

F-III は、セルラーゼ加水分解により GA<sub>35</sub> を与え、1N 塩酸による加水分解では、F-I とグルコースを与える。重アセトン-重水中で測定した F-III の NMR スペクトルにおける  $\delta$  4.43 の 1H doublet ( $J = 7 \text{ Hz}$ ) は、 $\beta$  グルコピラノシドに特徴的なアノメリックプロトンのシグナルである。TMS-F-III-Me の低分解能マススペクトル (図 1-11) は、 $m/e$  884 に分子イオンピークを示す他、グルコース部分に特徴的な  $m/e$  361、332、331、319、305、289、271、217、204、191 などのフラグメントイオンピークを示す。こうして、F-III は  $\beta$ -

→ X 2.3

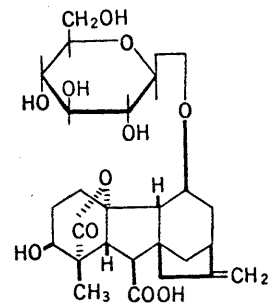


1-11 TMS-F-III-Me (TMS-GA<sub>35</sub> 7%ILJ≡F-Me) の 2777<sup>o</sup> 7 H V

D-グルコシル GA<sub>35</sub>であることが判明した。

ところで、GA<sub>35</sub>には2個の水酸基が存在し、グルコースの結合位置としてC-3βとC-11βの2箇所が考えられる。そこで、グルコースの結合位置決定の為、以下の実験を行った。F-Ⅲを無水酢酸-ピリジンでアセチル化し、生成したペンタアセテートを0.1Nメタール性塩酸で加水分解したところ、低収率ながらもF-Iアセテートが得られた。この実験的事実は、F-Ⅲが11-O-β-D-グルコシル GA<sub>35</sub>であることを示している。すな

わち、GA<sub>35</sub>グルコシドペンタアセテートのグルコシルエーテル結合が加水分解され、3-O-アセチル GA<sub>35</sub>が生



成するとともに、酸触媒に 図 1-12 GA<sub>35</sub>グルコシドよりC-11とC-16との間にエーテル結合が形成されF-Iアセテートを与えるわけで、グルコースの結合位置がC-3βならば、C-3βアセトキシ誘導体は得られない

はずである。

このことは、GA<sub>35</sub>グルコシドペンタアセテート、GA<sub>35</sub>-MeのNMRにおけるdecoupling実験によっても支持される。図1-13は、GA<sub>35</sub>グルコシドペンタアセテートのNMRスペクトルにおいて、グルコシル基のつけ根のC-11αプロトンがδ 4.22付近に残っていることを示している。

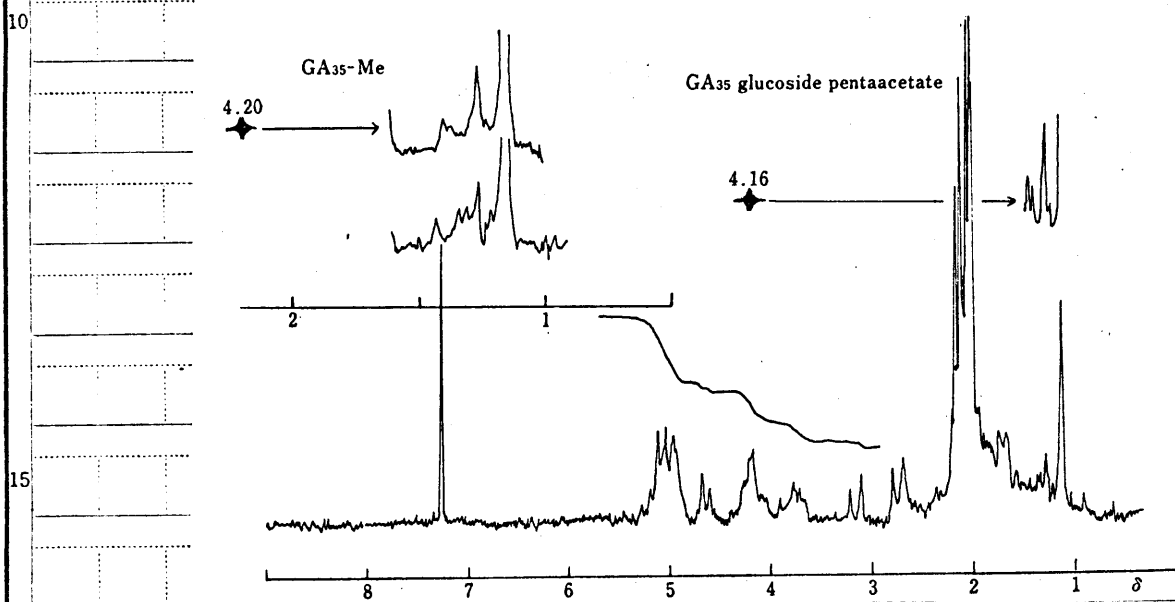


図 1-13 GA<sub>35</sub>グルコシドペンタアセテート、GA<sub>35</sub>-MeのNMR (CDCl<sub>3</sub>中)

ところで、 $^{13}\text{C}$  NMR もまたジベレリングル  
 コシドの構造解析にきわめて有効である。表  
 1-2 は、 $\text{GA}_{35}$  と  $\text{GA}_{35}$  グルコシドの各構成炭素  
 のケミカルシフトを内部基準のテトラメチル  
 シランの炭素からの down field shift (ppm) で表  
 わし、比較対照させたものであるが、 $\text{GA}_{35}$  が

Carbon	$\text{GA}_{35}$	$\text{GA}_{35}$ glucoside
1	29.43	29.49
2	29.85	29.49
3	69.77	69.83
4	55.64	55.76
5	52.18	52.18
6	52.91	52.97
7	175.16	175.35
8	51.87	51.80
9	61.04	59.46
10	94.59	94.77
11	64.01	62.86
12	42.96	42.41
13	39.38	39.13
14	37.43	37.80
15	45.62	45.57
16	157.99	157.63
17	107.39	107.57
18	15.77	15.78
19	179.53	179.59
1'	---	107.57
2'	---	75.60
3'	---	78.03
4'	---	74.57
5'	---	78.57
6'	---	71.78

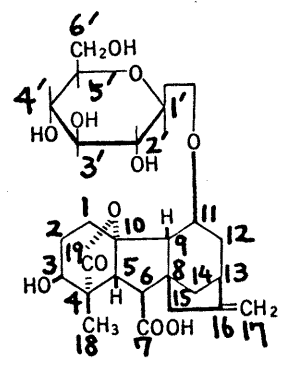


表 1-2  $\text{GA}_{35}$ 、 $\text{GA}_{35}$  グルコシドの各構成炭  
 素のケミカルシフト ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  中)



ルコシドにおいては、C-11  $\beta$  水酸基にグルコースが結合しているため、C-11がアグリコンのそれにくらべ、1.15 ppm 低磁場にシフトしていることを示している。一方、他の炭素に由来するシグナルの大きなシフトはみられない。なお、71.78 ~ 105.33 ppm にあらわれているグルコースに由来する部分のシグナルパターンは、図 1-14 から明らかなように  $\beta$ -グルコースに特徴的なものである。

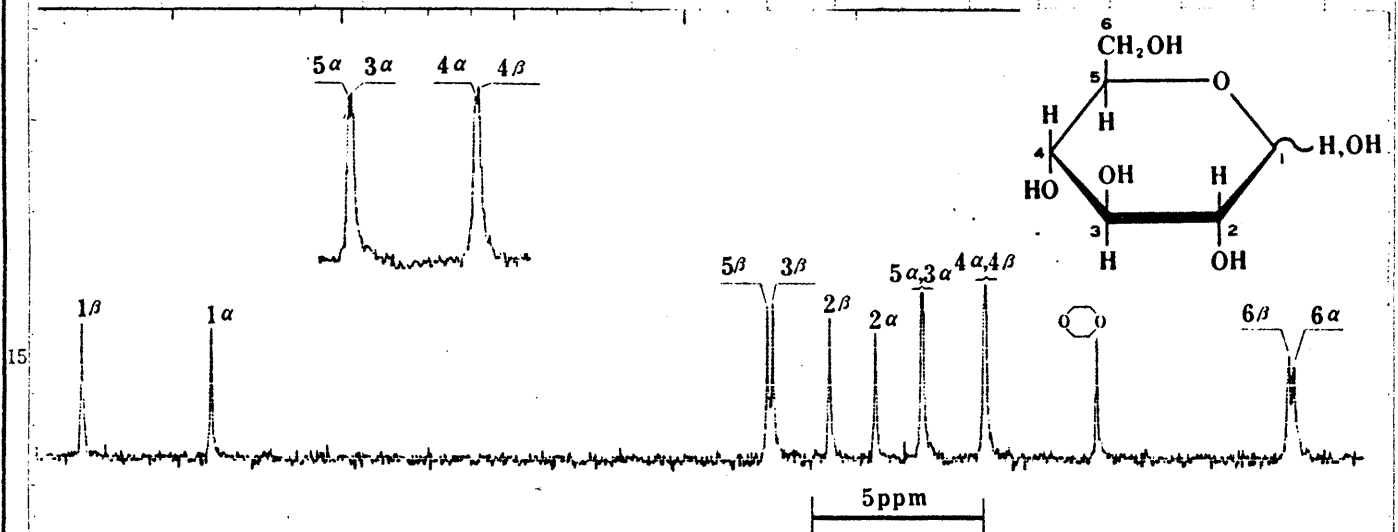


図 1-14 D-グルコースの proton noise decoupled spectrum (D<sub>2</sub>O中)

## 第五節 考察

GA<sub>35</sub>は、C-11水酸基を有する最初のジベレリンであるばかりでなく、豆科植物に含まれるジベレリンとしては、はじめて、C-13水酸基を欠くものである。

最近まで、豆科植物に含まれるジベレリンとして単離ないしその存在の確認されていたものは、紅花インゲンのGA<sub>1</sub>、GA<sub>5</sub>、GA<sub>6</sub>、GA<sub>8</sub>、GA<sub>17</sub>、GA<sub>19</sub>、GA<sub>20</sub>、キバナノハウチワマメのGA<sub>18</sub>、GA<sub>23</sub>、GA<sub>28</sub>、ナタマメのGA<sub>21</sub>、GA<sub>22</sub>、ゴガツササゲのGA<sub>1</sub>、GA<sub>5</sub>、GA<sub>8</sub>等ですべてC-13水酸基を有しており、カビと高等植物におけるジベレリン生合成の最大の違いはC-13水酸化の時期にあるという仮説が提出されていたことは、第一節に述べた通りである。しかしながら、エニシダ未熟種子より、この度、GA<sub>35</sub>とそのグルコシドが単離されたこと、また、本研究の後、ゴガツササゲ種子中にGA<sub>4</sub>、GA<sub>37</sub>などC-13水酸基を欠くジベレ

39)

リン類の存在が確認されたことは、豆科植物にかぎったとしてもジベレリンの生合成経路に多様性のあることを示唆するものであろう。

5 GA<sub>35</sub>の C-3、C-11の水酸化の時期については明らかでないが、ある種の植物に *sodeponin* など *ent-kaurin* 骨格の C-11位に O-function の<sup>40)</sup> 導入されたジテルペンの存在していることは、C-11位の水酸化が *ent-gibberellane* 骨格の形成以前<sup>10)</sup>に行われている可能性も考えられる。

横田らは、アサガオ未熟種子より単離した7種のジベレリングルコシドの構造の比較から、アグリコン部分の最も立体障害をうけていない水酸基とグルコースがエーテル結合を<sup>15)</sup>していることを見出し、これが植物生理学上何らかの意味を有するのかもしれないことを指摘した。<sup>41)</sup> GA<sub>35</sub>グルコシドにおいても、また、GA<sub>35</sub>の立体障害をうけていない方の C-11β位にグルコースが結合している事実は興味深いものがある。

山口らは、種々のジベレリン類の<sup>13</sup>C proton noise decoupled spectra, proton off-center decoupled spectra を測定し、同一の炭素骨格を有し官能基の位置の異なるジベレリン類を比較対照することにより、各構成炭素の帰属を報告し、さらに<sup>38)</sup>、*Gibberella fujikurui* 培養液より単離された新ジベレリンA<sub>40</sub>についてこれを適用し、<sup>13</sup>C NMR がジベレリンの構造解析にきわめて有効であることを示している。<sup>42)</sup> 本研究において、GA<sub>35</sub> グルコシドの<sup>13</sup>C NMR スペクトルの測定を行い、アグリコンのそれと比較したところ、グルコシルエーテル結合の位置決定、グルコースアノマーの判別がきわめて容易に行えることが明らかとなった。今後、ジベレリン配糖体の構造解析にも、<sup>13</sup>C NMR がますます威力を発揮するであろうことが予測される。

## 第六節 実験の部

## 〔各種スペクトルの測定〕

IRスペクトルは、JASCO IR-S KU spectrometerを用い、nujol mullとして測定した。PMRスペクトルは、内部基準として、テトラメチルシランを用い、JEOL JNM-4H-100 spectrometerにより測定した。低分解能マススペクトルは、Hitachi RMU-6Lを、高分解能マススペクトルは、Hitachi RMH-2を用い、直接導入方式で測定した。加速電圧およびイオン化室温度は、ともに、70 eVおよび180 °Cである。トリメチルシリル化物のマススペクトルは、試料をメタノール、または、アセトンに溶かしサンプルチューブにつめたガラスウールにしみこませた後、乾燥ペリジンを *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide-trimethylchlorosilane (1:2:1) 溶液 (TMS 化溶剤) をキャピラリーで加え、十分に排気を行ってから測定した。<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、JNM PFT-100 spectrometer

system を用い、25.1 MHz でパルス・フーリエ変換法によって測定した。パルス幅は 8 ~ 16  $\mu\text{sec}$  (10  $\mu\text{sec}$  =  $\frac{1}{4}$  パルス) で、パルス間隔は 0.8 ~ 80 秒である。溶媒は、内部基準のテトラメチルシランを 0.5% 含む重ヒロジン ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) を用いた。

### 〔薄層クロマトグラフィー〕

吸着剤として、Kiesel gel GF<sub>254</sub> (Merck) を使用した。薄層プレート上のジベレリン類は、70% 硫酸噴霧後、加熱し UV ランプ下の蛍光によって検出した。展開溶媒は、A E 区については、酢酸エチル-クロロホルム-酢酸、20 : 8 : 1 (v/v) である。(R<sub>f</sub> 値 : F-I, 0.37 ; GA<sub>35</sub>, 0.37 ; F-I-Me, 0.58 ; GA<sub>35</sub>-Me, 0.53 ; GA<sub>35</sub> グルコシドペンタアセテート, 0.74 ; GA<sub>3</sub>, 0.38) AB 区については、クロロホルム-メタノール-酢酸-水、45 : 15 : 3 : 2 (v/v) を用いた。(R<sub>f</sub> 値 : GA<sub>35</sub> グルコシド, 0.50 ; GA<sub>8</sub> グルコシド, 0.33)

## 〔ガスクロマトグラフィー (GC)〕

Hitachi K 53 Gas Chromatograph を使用し、水素炎検出器で検出した。測定条件は、以下の通りである。

5 充填剤 ; 2% OV-1 on Chromosorb W (Mesh 80 ~ 100)

カラム ; シラン処理したガラスカラム、1m × 3 mm i.d.

キャリアーガス ; N<sub>2</sub> (29.0 ml/min)

10 カラム温度 ; 197°C

保持時間 (min) ; F-I-Me, 6.1, Gr A<sub>35</sub>-Me, 10.6, Gr A<sub>1</sub>-Me, 10.1, TMS-F-I-Me, 6.1, TMS-Gr A<sub>35</sub>-Me, 9.9, TMS-Gr A<sub>1</sub>-Me, 11.0

15 [1970年に採取したエニシダ未熟種子よりの F-I、F-II (Gr A<sub>35</sub>)、F-III (Gr A<sub>35</sub> グルコシド) の単離]

1970年に、東京大学検見川運動場で採取したエニシダ未熟種子 (サヤを含めて 37 kg) を

ブレンダーで粉碎後、メタノールで2回抽出した。抽出液は、減圧下でメタノールを溜去した後、常法通り分画を行い、AE、NE、AB、NB、Agの5分画を得る。このうち矮性稻、短銀坊主を用いた生物試験で顕著な活性がみられるAE区およびAB区についてジベレリン様物質の検索を行った。

## A. AE区(67.7g)の精製

### a. 向流分画

上相として酢酸エチル300 ml、下相としてpH 5.42の1 M リン酸緩衝液300 mlを用いて10回移行の向流分画を行い、No.1(高極性)からNo.11(低極性)の11分画を得た。このうちNo.8~10にTLCでジベレリン様物質が検出され、また、矮性稻短銀坊主を用いた生物試験ではNo.7~10に活性があらわれたので、No.7~10(24.7g)を合わせ次の操作にまわした。

### b. 活性炭吸着クロマトグラフィー

活性炭200gを減圧脱気後、カラムに充填す



る。向流分配によって得られた活性区分(24.7 g)は、20%アセトン水に溶かし、活性炭カラムに通過吸着せしめ、以後、アセトン濃度を5%ずつ増加させながら溶出を行う。溶出量は各濃度、4 lとし、溶出液2 lで1分画とすると、活性物質は、35%1~45%1(3.2 g)に溶出された。

C. シリカゲル吸着クロマトグラフィー  
bで得られた活性区分は、酢酸エチル-ベンゼン、20:80に溶かし、32.5 gのシリカゲル(Mallinckrodt)を充填したカラムに通過吸着せしめる。続いて、ベンゼン中の酢酸エチル濃度を、溶出液200 mlについて10%ずつ増加させて溶出を行うと、酢酸エチル:ベンゼン、50:50の区分から分別再結晶により、一種のジベレリン様物質(F-I)がプリズム状結晶(融点、269~271°C)として20 mg得られた。また、この区分の再結母液と酢酸エチル-ベンゼン、60:40の区分からは、ジアゾメタンによるメチル化後、分取TLCによって、5 mg

の F-I-Me (融点、 $208 \sim 210^\circ\text{C}$ : プリズム状結晶) と、もう一種のジベレリン様物質、F-II (GA<sub>35</sub>) のメチルエステルが 6.6 mg 得られた。F-I-Me、NMR  $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}$ : 1.43 (3H, s, C-4 CH<sub>3</sub>)、1.52 (3H, s, C-16 CH<sub>3</sub>)、2.87 (1H, d,  $J = 6.5\text{Hz}$ , C-6 H)、3.72 (1H, d,  $J = 6.5\text{Hz}$ , C-5 H)、3.65 (3H, s, -COOCH<sub>3</sub>)、4.08 (1H, t,  $J = 2.3\text{Hz}$ , C-3 H)、4.57 (1H, t,  $J = 3\text{Hz}$ , C-11 H)

## B. AB区 (98.4g) の精製

### a. 活性炭吸着クロマトグラフィー

活性炭 200 g を減圧脱気後カラムに充填し、AB区 (98.4g) を少量の水に溶かして通過吸着せしめる。溶出は、アセトン-水で行い、アセトン濃度 5% から始めて、4 l ごとに水中のアセトン濃度を 5% ずつ増加させる。溶出液 2 l で 1 画面とすると、活性物質は、30% 1 ~ 40% 1 までに溶出された (6.3g)。

## b. 分配クロマトグラフィー

Sephadex G-50、26g を 130ml の 1M リン酸緩衝液 (pH 5.65) で膨潤させ、カラムに充填する。a における活性区分は、20ml の緩衝液に溶かし 4g の Sephadex G-50 に吸着させてカラムの上のせる。溶出は、*n*-ブタノール酢酸エチルで行い、5% *n*-ブタノールから始めて、1ℓ ごとに *n*-ブタノール濃度を 5% ずつ増加させていくと、*n*-ブタノール 15% ~ 25% 区分に活性物質は溶出された (1.3g)。

## c. 活性炭吸着クロマトグラフィー

b で得られた活性区分は、10g の活性炭を用い、脱塩を兼ねた gradient 法による活性炭吸着クロマトグラフィーで精製した。溶出は、アセトン、水をそれぞれ 500ml ずつ用いて行った。1 分画を 50ml とすると、活性物質は、No. 6 ~ 8 に溶出された (650mg)。

## d. シリカゲル吸着クロマトグラフィー

シリカゲル 10g を充填したカラムに、c で得られた活性物質を *n*-ブタノール-クロロフォ

ルム、10:90に溶かし通過吸着させる。溶出液50mlごとにクロロフォルム中のメタール濃度を5%ずつ増加させていくと、メタール15~20%区分に活性物質が溶出された(360mg)。

c、分取ペーパークロマトグラフィー

東洋沓紙No.51を使用した。展開は、イソプロパノール-Nアノモニア水-水、8:1:1(%)を用いて、上昇法で行った。スポット原点より30cmのところまで展開を止め、過マンガン酸カリ脱色部分(R<sub>f</sub>値 0.28)を切りとり、メタールで溶出すると、F-III(GA357<sup>o</sup>ルコシド)が130mg得られた。IR  $\nu_{\max}^{\text{nujol}} \text{ cm}^{-1}$  : 3360 (broad), 1750, 1707, 1100~1000。

NMR  $\delta_{\text{Me+Si}}^{\text{CD}_3\text{COCD}_3}$  : 1.13 (3H, s, C-4 CH<sub>3</sub>)、4.43 (1H, d, J = 7 Hz, アノメリックプロトン)、4.88 および 5.02 (一対の1H, broad s, >C=CH<sub>2</sub>)。

[1972年に採取したエニシダ未熟種子よりの  
GA<sub>35</sub>の単離]

1972年に採取したエニシダ未熟種子(40 kg)  
は、前述したのと同様の方法で精製した。  
シリカゲル吸着クロマトグラフィーの後、活  
性区分を分取TLCで精製し、結晶化させた  
ところ、41 mgのGA<sub>35</sub>が針状結晶(融点 252~  
254°C)として酢酸エチル-1キサンより得ら  
れた。NMR  $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CD}_3\text{COCD}_3}$ : 1.12 (3H, s, C-4  
CH<sub>3</sub>), 2.59 (1H, d, J = 11 Hz, C-6 H  
)、3.23 (1H, d, J = 11 Hz, C-5 H)、  
3.72 (1H, ill-defined m, C-3 H)、4.10 (1H, m, C-11 H)、4.86 および 5.00 (一対  
の1H, broad s, >C=CH<sub>2</sub>)。

[矮性稲幼苗生物試験法]

矮性稲、短銀坊主を2日間、約30°Cで発芽  
させる。被験液1 mlの入った直径2 cm、高さ  
10 cmの試験管に芽生えを6個ずつ入れ、試験  
管の口をサララップでおおい、2800 luxの光

の下で約30℃に保つ。6日後、第二葉鞘の長さを測り、測定値とした。

### [ GA<sub>35</sub> グルコシドの酵素分解 ]

GA<sub>35</sub> グルコシド (10 mg) を、1 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4) に溶かし、20 mg のセルラーゼ (Sigma) を加えて、37℃で一晩放置する。反応液は、水 10 ml を加え pH を 3 に調整して酢酸エチルで抽出し、芒硝で脱水後、分取 TLC で精製したところ、酢酸エチル-ヘキサンからの再結晶により GA<sub>35</sub> の針状結晶が 3 mg 得られた (融点 252~254℃)。

### [ GA<sub>35</sub> グルコシドの酸加水分解 ]

GA<sub>35</sub> グルコシドを封管中 1 N 塩酸で 1 時間煮沸した。反応液に少量の水を加え、酢酸エチルで抽出したところ、有機相より F-I が得られた。また、水相は減圧下で水分を溜去した後、TMS 化溶剤を加えトリメチルシリル誘導体に導き、ガスクロマトグラフィーによ

って検討したところ、グルコースの存在が確認された。測定条件は、以下の通りである。

充填剤：2% OV-1 on Chromosorb W (Mesh 80~100)

カラム：ガラスカラム (2m x 3mm i.d.)

カラム温度：170°C、キャリアーガス：N<sub>2</sub> (40 ml/min)、保持時間：8.3分 (TMS- $\alpha$ -グルコース)

、14.0分 (TMS- $\beta$ -グルコース)

### [ GA<sub>35</sub> グルコシドのアセチル化 ]

GA<sub>35</sub> グルコシド 18 mg を 2 ml のピリジンに溶かし、1 ml の無水酢酸を加え、室温で20時間

放置する。反応液を氷冷した硫酸溶液にあげ

、pH 2~3 であることを確かめた後、酢酸エ

チルで抽出した。抽出液を芒硝で脱水し減圧

下で酢酸エチルを溜去した後、酢酸エチル-

ヘキサンから再結晶させると、GA<sub>35</sub> グルコシ

ドペンタアセテートの針状結晶 (融点 175~

177°C) が 14.8 mg 得られた。IR  $\nu_{\max}^{\text{nequl}} \text{ cm}^{-1}$ : 1777

、1748、1708、1653。NMR  $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$ : 1.10 (

3H, s, C-4 CH<sub>3</sub>)、2.70 (1H, d, J

= 10 Hz, C-6 H), 3.15 (1 H, d,  $J = 10$  Hz, C-5 H), 4.62 (1 H, d,  $J = 7$  Hz, アリメリックプロトン)。GA<sub>35</sub> グルコシド-Me ペンタアセテート, MS  $m/e$ : 734 ( $M^+$ )。

[ GA<sub>35</sub> グルコシドペンタアセテートより F-I-Me アセテートの生成 ]

少量の GA<sub>35</sub> グルコシドペンタアセテートを封管中、0.1 N メタリール性塩酸で 1 時間煮沸した。反応液は、中和後、減圧下でメタリールを溜去し、再び pH を 2~3 に調整して酢酸エチルで抽出する。抽出液を芒硝で脱水し、続いてジアゾメタンでメチル化した後、分取 TLC で精製した。R<sub>f</sub> 値 0.77 (酢酸エチル-クロロフォルム-酢酸, 20:8:1) を示す区分は、F-I-Me アセテートであることを、マススペクトルおよび TLC の R<sub>f</sub> 値の標品との比較によって確認した。MS,  $m/e$ : 404 ( $M^+$ )。



## 第二章 $GA_{35}$ 、 $GA_{35}$ グルコシドの生理活性

### 第一節 緒言

ジベレリンが高等植物に対し、種々の生理作用を示すことは、よく知られているところである。すなわち、無傷植物の茎に対する伸長効果をはじめとして、花芽形成、開花促進、休眠打破、単為結果の促進、加水分解酵素の活性増大などの作用を有し、これらの作用性の故に、ジベレリンは、果樹、園芸作物栽培に広く利用されている。

現在、用いられているジベレリンの生物試験法は、ほとんど植物に対する伸長効果を利用したもので、矮性稲、矮性エンドウ、矮性トウモロコシ、キュウリ等の芽生えが広く使用される。興味深いことに、ジベレリンの種類により同一植物に対する伸長効果が異なり、また、同一ジベレリンでも対象となる植物の種類によってその伸長促進効果が異なる。

Crozier らは、GA<sub>1</sub> ~ GA<sub>15</sub>、GA<sub>17</sub> ~ GA<sub>27</sub>の生理活性を9つの系を用いて測定し、ジベレリンの構造と生理活性<sup>43)</sup>についていくつかの知見を提出した。また、横田らは、アサガオ (*Phar-*

<sup>5</sup> *bitis nil*) 未熟種子から単離した7種のジベレリングルコシドとそのアグリコンの生理活性を6つの系を用いて測定し、ジベレリングルコシドが一般に不活性であり、試験液中に繁殖した微生物によって加水分解を受けた時の<sup>21)</sup>み、活性を示すことを明らかにした。<sup>10</sup>

ジベレリンの活性発現の機構<sup>44)</sup>については、二つの仮説が考えられている。

一つは、「鍵と鍵穴説」である。すなわち、種々のタイプのジベレリンに対して反応する植物組織は、そのジベレリン受容体の鍵穴の構造が比較的簡単であって、一方、限られたジベレリン類にしか反応しない植物組織は、鍵穴の構造が複雑なためとする考え方である。

二つめは、Phinney らによる「唯一特異的な

活性ジベレリンが作用し、他のジベレリンは、この活性ジベレリンに転化されて効力を示す」という説<sup>45)</sup>ほど極端ではないにしても、ジベレリンの生理活性は、その対象植物組織による活性型への相互転換のされやすさによるとする考え方である。

しかしながら、種々の型のジベレリンが単離され、その活性パターンが明らかにされつつある現在、実際は、おそらくこれら二つの仮説を組み合わせた機構によって活性が発現してくるものと考えられる。Dunley らは、矮性エンドウの芽生えにトリチウム標識した  $G A_{14}$  を与え、これが  $G A_{18}$ 、 $G A_{38}$ 、 $G A_{23}$  を経て  $G A_1$ 、 $G A_8$  へ転換されることを示した。<sup>46)</sup> (図2-1 参照) 矮性エンドウ検定法では、C-3 $\beta$ 、C-13に水酸基をもち、A環に $\gamma$ -ラクトン構造を有するジベレリン類が高活性を示すことが知られている。しかし、この検定系における活性は、 $G A_1 > G A_{38} > G A_{18} \doteq G A_{23}$  の順で、生合成的には、 $G A_{23}$  より前にあるはずの  $G A_{38}$  の

方が GA<sub>23</sub>より高活性である<sup>44)</sup>。これは、 $\delta$ -ラクトンと $\epsilon$ -ラクトンの構造的類似性に起因するものであろう。

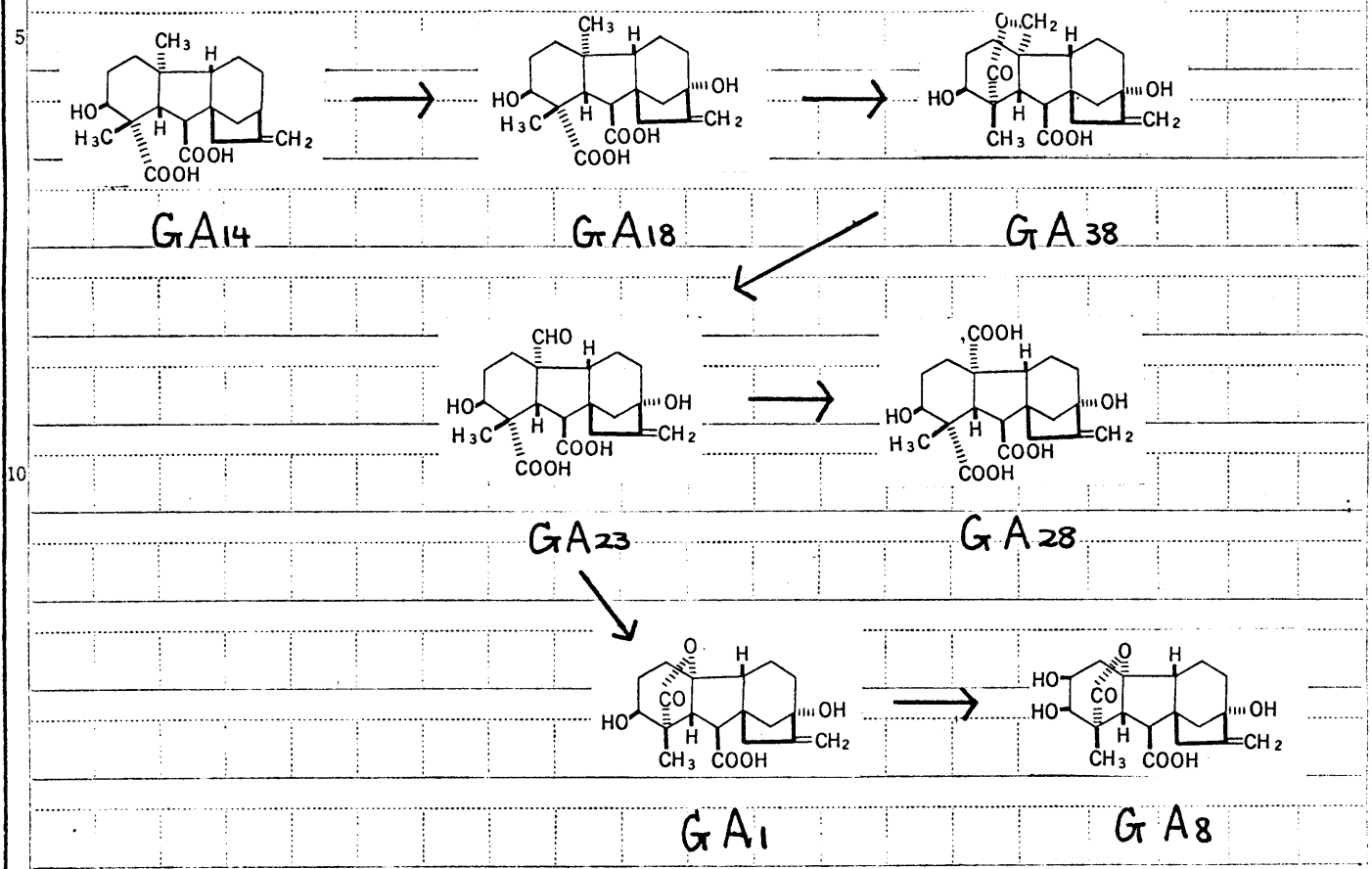


図 2-1 矮性エンドウ芽生えにおける<sup>3</sup>H-GA<sub>14</sub>の代謝経路

本章においては、第一章において述べた新ジベレリン A<sub>35</sub>とその誘導体、F-I、GA<sub>35</sub>ケルコシドとともに、最近、ヨルガオ未熟種子よ

り単離された GA<sub>33</sub>、GA<sub>34</sub>の生理活性を7つの系で測定し、その構造と活性との関連について考察を加えた。

図2-2に示すように、GA<sub>35</sub>はGA<sub>4</sub>と同じA環構造を有し、GA<sub>4</sub>との活性を比較することにより、C-11β水酸基の活性に与える影響について知見が得られることが期待される。また、GA<sub>33</sub>、GA<sub>34</sub>の活性を測定することによって、C-2β水酸基、C-3ケトン、C-12α水酸基の生理活性に対する寄与についても検討を加えた。

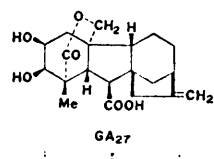
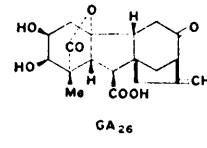
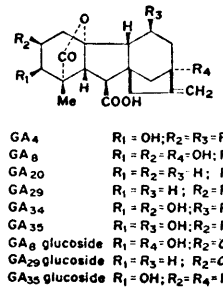
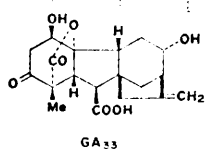
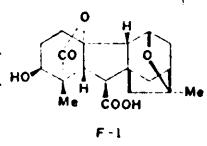
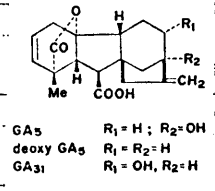
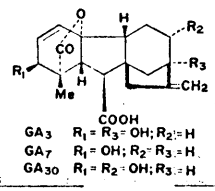
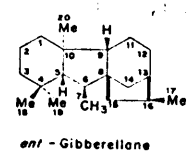


図2-2 構造式

## 第二節 結果

### [矮性稻幼苗検定法]

表 2-1、2-2 は、矮性稻、短銀坊主と矮稻 C に対する活性測定の結果である。

GA<sub>35</sub> は、両品種に対し、GA<sub>4</sub> にわずかに劣る程度の高活性を示すが、GA<sub>33</sub>、GA<sub>34</sub> ならびに GA<sub>35</sub> グルコシドは不活性で、100 ng/plant でわずかに活性を示す程度である。

表 2-1 短銀坊主に対する活性

gibberellin	ng gibberellin/seedling			
	0.1	1.0	10	100
GA <sub>33</sub>	18.40±0.54	16.60±0.61	17.80±0.36	19.80±0.33
GA <sub>34</sub>	19.00±0.57	18.60±0.61	17.00±0.49	21.20±0.33
GA <sub>35</sub>	21.20±1.04	20.40±0.92	24.60±0.83	38.20±1.04
F-I	18.40±1.46	17.00±0.49	17.20±1.04	28.80±0.87
GA <sub>35</sub> glucoside	17.20±0.52	17.80±0.66	22.00±0.80	24.80±0.59
GA <sub>3</sub>	23.40±1.82	28.60±2.17	35.00±3.17	50.40±2.17
GA <sub>4</sub>	18.80±1.07	21.00±0.75	27.20±1.73	49.20±3.41
control	17.00±0.58			

表 2-2 矮稻 C に対する活性

gibberellin	ng gibberellin/seedling			
	0.1	1.0	10	100
GA <sub>33</sub>	16.60±0.28	16.40±0.22	17.60±0.22	19.20±0.33
GA <sub>34</sub>	16.20±0.33	16.40±0.22	18.00±0.40	21.80±0.77
GA <sub>35</sub>	18.80±0.33	17.80±0.33	23.20±0.52	41.00±2.21
F-I	17.20±0.18	17.80±0.18	17.80±0.33	22.00±0.75
GA <sub>35</sub> glucoside	17.40±0.22	17.00±0.00	17.80±0.18	24.60±1.66
GA <sub>3</sub>	28.80±0.24	31.60±0.66	47.40±0.67	58.20±2.63
GA <sub>4</sub>	17.40±0.46	19.80±0.44	30.60±1.78	53.80±1.00
control	15.80±0.24			

[矮性トウモロコシ検定法]

表 2-3 d<sub>1</sub> に対する活性

gibberellin	μg gibberellin/seedling		
	0.1	1.0	10
GA <sub>33</sub>	40.00±1.13	48.20±1.04	70.20±2.46
GA <sub>34</sub>	35.40±0.96	42.20±2.49	55.40±2.60
GA <sub>35</sub>	43.80±2.66	59.40±2.13	104.20±4.09
F-I	37.20±2.03	48.40±3.92	83.20±3.03
GA <sub>35</sub> glucoside	36.60±1.15	42.20±1.68	50.50±1.92
GA <sub>3</sub>	79.75±2.56	106.80±2.32	128.60±7.26
GA <sub>4</sub>	66.40±1.61	96.40±4.84	102.60±5.94
control	41.00±1.72		

表2-4 d<sub>3</sub>に対する活性

gibberellin	$\mu\text{g gibberellin/seedling}$		
	0.1	1.0	10
GA <sub>33</sub>	35.25±1.24	41.60±1.78	61.60±1.97
GA <sub>34</sub>	34.25±0.54	39.20±2.01	50.60±3.01
GA <sub>35</sub>	40.75±0.74	50.40±1.56	86.40±4.03
F-I	41.50±3.58	49.60±2.60	73.00±5.16
GA <sub>35</sub> glucoside	35.50±1.15	37.20±1.25	44.20±1.31
GA <sub>3</sub>	66.60±2.43	94.40±4.11	120.20±4.88
GA <sub>4</sub>	55.50±3.91	79.80±2.32	109.75±6.78
control	37.20±0.44		

表2-5 d<sub>5</sub>に対する活性

gibberellin	$\mu\text{g gibberellin/seedling}$		
	0.1	1.0	10
GA <sub>33</sub>	41.25±0.96	48.75±2.16	54.80±2.29
GA <sub>34</sub>	41.50±2.75	43.00±3.66	61.40±2.79
GA <sub>35</sub>	44.50±4.44	57.00±1.70	91.00±10.36
F-I	41.75±3.01	43.00±2.37	61.80±2.25
GA <sub>35</sub> glucoside	44.25±2.48	39.00±2.60	43.80±2.73
GA <sub>3</sub>	77.00±2.86	114.00±4.86	128.50±8.28
GA <sub>4</sub>	50.75±5.55	76.00±7.39	101.80±5.26
control	41.80±2.37		



矮性トウモロコシ  $d_1$ 、 $d_3$ 、 $d_5$  の三品種について活性測定を行った。その結果は、表 2-3 ~ 2-5 に示した通りであるが、 $GA_{35}$  は、 $d_1$ 、 $d_3$ 、 $d_5$  すべてに対し、 $GA_4$  の  $\frac{1}{10}$  以上の活性を有する。

$GA_{33}$ 、 $GA_{34}$ 、 $GA_{35}$  のルコシドならびに F-I は、一般に不活性で  $10 \mu\text{g/plant}$  でわずかに活性を示す程度であるが、F-I は  $d_3$  に対し  $GA_{35}$  と同程度の活性を示した。

### [矮性エンドウ検定法]

表 2-6 Progress No. 9 に対する活性

gibberellin	$\mu\text{g gibberellin/seedling}$			control
	0.1	1.0	10	
$GA_{33}$	$63.40 \pm 3.05$	$67.80 \pm 1.56$	$82.20 \pm 6.58$	a
$GA_{34}$	$53.60 \pm 2.54$	$57.00 \pm 2.28$	$62.50 \pm 1.15$	a
$GA_{35}$	$65.60 \pm 4.20$	$81.78 \pm 3.14$	$106.50 \pm 11.43$	a
F-I	$72.40 \pm 1.00$	$76.20 \pm 7.73$	$97.80 \pm 8.09$	b
$GA_{35}$ glucoside	$61.00 \pm 3.02$	$64.00 \pm 2.04$	$60.40 \pm 1.22$	c
$GA_3$	$151.00 \pm 16.06$	$204.40 \pm 29.93$	$248.60 \pm 29.96$	d
$GA_4$	$87.40 \pm 4.96$	$114.60 \pm 12.35$	$217.20 \pm 32.55$	e
controls: (a) $56.00 \pm 2.32$ ; (b) $66.40 \pm 2.17$ ; (c) $56.40 \pm 1.95$ (d) $68.60 \pm 1.89$ ; (e) $60.33 \pm 2.13$				

表2-6に示した通り、GA<sub>35</sub>はGA<sub>4</sub>の1/10程度の活性を有する。

GA<sub>34</sub>ならびにGA<sub>35</sub>グルコシドは不活性であったが、GA<sub>33</sub>ならびにF-Iは、10 μg/plant でわずかに活性を示した。

### [キュウリ下胚軸検定法]

表2-7 National Picklingに対する活性

gibberellin	μg gibberellin/seedling			control <sup>1)</sup>
	0.1	1.0	10	
GA <sub>33</sub>	29.60±1.66	29.50±0.75	30.00±1.30	a
GA <sub>34</sub>	30.70±1.58	26.86±1.13	28.60±0.86	b
GA <sub>35</sub>	32.00±1.41	42.40±3.11	57.00±4.03	a
F-I	27.50±1.39	29.80±1.17	28.90±0.77	b
GA <sub>35</sub> glucoside	23.60±0.46	26.00±0.72	29.00±1.12	b
GA <sub>3</sub>	----	39.80±1.29	51.00±2.51	c
GA <sub>4</sub>	41.70±2.14	48.00±1.74	53.40±1.77	b
controls: (a) 27.67±0.94; (b) 25.90±1.12; (c) 29.00±2.79				

結果は、表2-7の通りである。GA<sub>35</sub>は、この検定法においてきわめて高活性であり、その活性はGA<sub>3</sub>をしのぎ、GA<sub>4</sub>にわずかに及ば

ない程度である。

$G A_{33}$ 、 $G A_{34}$ 、 $G A_{35}$  グルコシドならびに F-I は、すべて不活性であった。

### 第三節 考察

一般に、 $G A_{35}$  は高活性を示すが、 $G A_{33}$ 、 $G A_{34}$ 、F-I ならびに  $G A_{35}$  グルコシドは、不活性ないしわずかに活性を示すにすぎない。

ここで用いた検定法では、 $G A_{35}$  の活性は一般にわずかに  $G A_4$  に及ばない程度で、この事実は、C-11 $\beta$  水酸基が活性発現に大きな影響を与えないことを示している。

キュウリ下胚軸検定法においては、C 環の C-12 $\alpha$  あるいは C-13 水酸基を有するジベリリニ類が低活性しか示さないことが知られている。すなわち、 $G A_{30}$  は  $G A_7$  より、 $G A_{31}$  ならびに  $G A_5$  は deoxy  $G A_5$  よりはるかに低活性である。<sup>(8)</sup> しかしながら、 $G A_{35}$  は、C 環に水酸基を有

しながらも、この検定法できわめて高活性を示し、C-11 $\beta$ 水酸基がこの検定系において、ほとんど活性を減少させないことを推測させる。

5 Brianらによれば、GA<sub>4</sub>ならびにGA<sub>7</sub>のC-3ケトン体は、一般に低活性であるにもかかわらず、キュウリ下胚軸検定法においては、GA<sub>4</sub>ならびにGA<sub>7</sub>とほぼ同等の活性を有する。一方、GA<sub>1</sub>ならびにGA<sub>3</sub>のC-3ケトン体は、<sup>47)</sup>すべての検定法において不活性であった。以上の事実は、C-3ケトン体がキュウリ下胚軸検定法を除き一般に生理活性を低下させること、また、C-13水酸基がキュウリ下胚軸検定法において活性を低下させることを示唆している。<sup>15</sup> GA<sub>33</sub>の、この検定法における低活性は、C-1 $\beta$ 水酸基の影響を無視することはできないにしてもC-12 $\alpha$ 水酸基によるものと思われる。GA<sub>33</sub>の他の系における不活性は、Brianらの知見ときわめてよく一致するといえよう。

GA<sub>34</sub>は、GA<sub>8</sub>と同じA環構造を有するが、GA<sub>8</sub>と同様、不活性ないしきわめて低い活性しか示さない。GA<sub>4</sub>とGA<sub>34</sub>の構造と活性を比較した場合、GA<sub>34</sub>が不活性であることは、C-2β水酸基に由来するものと推察される。実際、GA<sub>26</sub>、GA<sub>27</sub>、GA<sub>29</sub>などC-2β水酸基を有するジベレリン類は、不活性ないしきわめて低い活性<sup>21)</sup>しか示さない。

村上は、GA<sub>5</sub>、GA<sub>9</sub>、GA<sub>20</sub>などのC-3水酸基を欠くジベレリン類が、短銀坊主で高活性を示すのに対し、矮稻<sup>48)</sup>Cでは、低活性しか示さないことを指摘した。ここで用いたジベレリン類は、両品種に対し同様の活性を示すが、これは、C-3水酸基を有するか、あるいは、不活性体である為であろう。

GA<sub>35</sub>グルコシドは、C-11β equatorial グルコシルエーテル結合を有するにもかかわらず、矮性エンドウ検定法で不活性である。C-2βグルコシルエーテル結合をもつGA<sub>8</sub>グルコシド、GA<sub>29</sub>グルコシドは、この検定系でその了

グリコンとほぼ同等の活性を示すが、これは、  
 特性エンドウ組織中で、*equatorial* グルコシ  
 ルエーテル結合が比較的たやすく加水分解さ  
 れるためと考えられていた。<sup>21)</sup> しかしながら、  
 GA35 グルコシドがこの系で不活性であること  
 は、グルコシルエーテル結合の加水分解のさ  
 れやすさがそのコンホーメイションによるの  
 ではなく、その結合位置によることを示唆し  
 ている。

#### 第四節 実験の部

##### [特性稻幼苗検定法]

特性稻、短銀坊主なるびに特性稻 C (*Oryza*  
*sativa* L., dwarf cv. Tan-ginbōzu and Waitō-C) を用い  
 、村上により開発された点滴法<sup>48)</sup> により活性を  
 測定した。試料は、20% アセトン水溶液とし  
 て各芽生え当り 1 ml ずつ与えた。活性は、第  
 二葉鞘の長さ (mm) であらわした。

### [矮性トウモロコシ検定法]

矮性トウモロコシ  $d_1$ ,  $d_3$ ,  $d_5$  (*Zea mays* L.,  
mutants  $d_1$ ,  $d_3$ ,  $d_5$ ) を用い、田村らの方法に  
よって行った。試料は、0.1%のTween 20を含む  
20%アセトン水溶液とし、各芽生え当り 50  $\mu$ l  
ずつ与えた。ジベレリン処理後、30°Cで2800  
luxの蛍光灯を連続照射し、7日目に、第一葉  
鞘と第二葉鞘の長さ (mm) を測定し、その和  
をもって活性をあらわした。

### [矮性エンドウ検定法]

矮性エンドウ (*Pisum sativum* L. var. Progress No. 9)  
を用い、横田らの方法に従った。活性は、上  
胚軸の長さ (mm) であらわした。

### [キュウリ下胚軸検定法]

キュウリ (*Cucumis sativus* L., cv. National Pickling)  
に対する活性測定方法は、勝見らの方法によ  
って行った。活性は、下胚軸の長さ (mm) で  
あらわした。