

コリン類縁体およびN-置換グリシン
類縁体の光合成促進活性に関する研究

蔡 晃 植

コリン類縁体およびN-置換グリシン 類縁体の光合成促進活性に関する研究

蔡 晃植

目次

序論	1
第一章 光合成促進物質の検索	12
1-1 光合成促進物質検索法の確立	14
1-2 各種化合物に対する検定	19
1-3 呼吸に与える影響	28
1-4 光合成炭酸固定に与える影響	32
1-5 散布実験	37
1-6 光合成促進物質の構造活性相関	39
1-7 まとめおよび考察	41
第二章 コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の代謝研究	44
2-1 小麦プロトプラストへの取り込み	46
2-2 小麦を用いた代謝実験	49
2-3 コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の代謝経路	64
2-4 まとめおよび考察	69
第三章 コリン類縁体およびN-置換グリシン類縁体と植物ホルモ ンとの相互作用	74
3-1 ジベレリンとの相互作用	76
3-2 サイトカイニンとの相互作用	82
3-3 オーキシンの相互作用	84
3-4 アブシジン酸との相互作用	87
3-5 エチレンとの相互作用	87

3-6 まとめおよび考察	90
--------------	----

第四章 コリン類縁体およびN-置換グリシン類縁体が光独立栄養

培養細胞に与える影響	94
------------	----

4-1 培養細胞の光合成に与える影響	99
--------------------	----

4-2 培養細胞の呼吸に与える影響	107
-------------------	-----

4-3 培養細胞の生育に与える影響	110
-------------------	-----

4-4 光mixotrophic培養細胞の光合成電子伝達速度に与える影響	120
--------------------------------------	-----

4-5 まとめおよび考察	122
--------------	-----

第五章 コリン類縁体およびN-置換グリシン類縁体が有する光合成

促進作用の検討	128
---------	-----

5-1 光化学系に与える影響	130
----------------	-----

5-2 炭酸固定系に与える影響	132
-----------------	-----

5-3 まとめおよび考察	137
--------------	-----

まとめおよび総合考察	142
------------	-----

実験	147
----	-----

謝辞	178
----	-----

文献	180
----	-----

序論

世界的な人口増加により、要求される食糧は年々増加する一方、環境破壊に伴う緑地の砂漠化や耕地土壌荒廃化、工業化にともなう環境汚染等により、食糧生産の増加はそれほど多くない。このような状況のもとで、地球的規模での相対的な食糧不足が人類の生存をも脅かす問題としてクローズアップされ、自然環境を保護、維持しつつ、植物の物質生産能力を高め、収量の増加をはかることが緊急かつ重要な課題となっている。植物の物質生産能力を高めるためには、育種的手法や遺伝子操作的手法を用いた多収穫品種の開発、肥料や農薬等を含めた栽培条件の改善等いくつかの方法があるが、植物の光合成能力を高めることもこのうちの重要な方法の一つである。なぜならば、植物乾物体重の90%前後は光合成によって固定された CO_2 に由来しており、植物の光合成能力を増大することによって植物の太陽エネルギー利用効率の増大がはかれるからである。これまでに、いろいろな方法による植物の光合成促進の試みがなされており、化学的手段による光合成促進もその良い例である。そして、既知の植物ホルモンであるジベレリンやオーキシン、サイトカイニンがトウモロコシやインゲン、ハツカダイコン等の光合成を促進し^{1), 2), 3)}、これら植物ホルモン処理により光合成電子伝達反応と共役した光リン酸化反応^{4), 5)}や光合成炭酸固定系でKey酵素といわれているRuBPカルボキシラーゼの活性^{6), 7), 8)}をも促進すると報告されている(表1)。また、讃井⁹⁾らは、イネ初穀中に含まれる生長促進物質であるニコチン酸アミドが、葉緑体形成の促進や前述のRuBPカルボキシラーゼの活性化等により光合成活性を増大すると

報告している。一方、従来から作物の栄養生長、生殖生長を顕著に促進することが知られているナフテン酸が^{10)・11)}、インゲン、ブドウ、ワタの光合成を促進することが報告されている¹²⁾。さらに、Riseらによって光合成促進活性を有する化合物としてトリアコンタノールも報告されている。トリアコンタノールはアルファルファの種子から抽出された炭素数30個のアルコールであるが、高等植物や緑藻類の光合成を促進し、RuBPカルボキシラーゼの活性をも高めると報告された¹³⁾。

植物の光合成を促進し物質生産能力を増大させようというもう一つの方法として注目されるのは、光呼吸の制御に関する研究であろう。イネや大豆等の主要な作物が属するC₃植物は、光合成によって固定したCO₂の一部を光呼吸と呼ばれる炭素代謝系で大気中へ再放出することが知られている^{14)・15)・16)}。そして、この光呼吸によって大気中に再放出されるCO₂の量は、光合成によって一旦固定されたCO₂量の30～50%にも達するといわれている。これに対しトウモロコシやサトウキビ等が属するC₄植物には、C₃植物でみられたような光呼吸が認められず、これがC₄植物の見かけの光合成速度（真の光合成速度から暗呼吸速度と光呼吸速度を差し引いた光合成量）の高い理由であると考えられている。このような理由から、光呼吸を制御してC₃植物の見かけの光合成量を高めようとする試みが環境制御による方法、遺伝育種的方法、そして化学物質による方法などにより行われるようになった。このうち、環境制御による方法は光呼吸が起こりにくい環境、すなわち低O₂もしくは高CO₂条件下に植物をおくことによって光呼吸を制御する方法である。これまでに行われた実験から、低O₂下でC₃植物は見かけの光合成を促進し、生長を促進し乾物重量を増加させる

植物ホルモン	光合成速度促進	葉緑素の増加	酵素活性と光化学反応促進
ジベレリン	トウモロコシ		コムギ、エンバク Ru b i s C O活性の促進 アカクローバ Ru b i s C O活性の促進 トウモロコシ 光リン酸化促進
オーキシシン	インゲン ハツカダイコン		
サイトカイニン	インゲン トウモロコシ	インゲン オオムギ ライムギ	オオムギ、ライムギ Ru b i s C O活性の促進 トウモロコシ 光リン酸化促進
アブシジン酸			コムギ、ベニセタム PEPCa s e活性の促進 ウキクサ Ru b i s C o活性の促進 PEPc a s e活性の促進

表1 植物ホルモンによる光合成能力の向上事例⁴⁵⁾

ことが分かっている^{17), 18)} 反面、生殖生長が阻害され不稔や稔実不良が起これ子実作物では子実収量が減少することが報告されている^{19), 20)}。これに対し高CO₂条件ではこのような不都合が回避され、子実収量も増加することが知られている^{21), 22)}、炭酸ガスの濃度を圃場規模で高めることは考え難い。一方、育種的方法に関しては光呼吸の低い品種の育成が考えられ、種々の作物について光呼吸の低い品種の検索が行われてきた。しかしながら、これまでの実験結果は、光呼吸活性の低い品種は光合成活性も低く、光合成活性だけが低い品種の育成は成功していない^{23) 24) 25)}。光呼吸を制御する三番目の方法としては、化学物質による方法がある。光呼吸のグリコール酸経路の阻害剤を用いて、光呼吸の諸反応を阻害し光呼吸を制御しようという試みは、光呼吸経路が解明されるにつけて盛んに行われるようになった^{26) 27) 28) 29) 30) 31)}。著者らの研究グループも、植物の物質生産を増加させることを目標とした、光呼吸の化学的制御に関する研究を1978年から行ってきた。その結果、Ishibashiや Yun, Choらは、葉緑体における光合成は阻害せず光呼吸だけを特異的に阻害するアミノアセトニトリル (AAN) やアミノメタンスルホン酸 (AMS)、ビニルグリシン (VG) 等の阻害剤を見いだした³²⁾。そして、これら光呼吸阻害剤が無傷植物における光合成を促進する可能性を調べた結果、これら光合成には何等影響を与えないはずのこれら全ての阻害剤が無傷植物の光合成は著しく減少させることが明らかになり、さらにこの光合成の減少はこれら化合物による光呼吸の阻害が強くなるにしたがって大きくなることも同時に明らかになった^{33) 34) 35) 36)}。この結果は、無傷植物においては、結局光呼吸経路を化学的に阻害すれば光合成も阻害されることを示しており、光

呼吸を化学的に阻害することによって光合成量を増加させることは難しいことを示唆する。さらに、光呼吸の制御に関してOgren³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾らは次のような実験をおこなった。光呼吸の欠損する変異株を得るため、*Arabidopsis thaliana*の種子を、突然変異源物質であるエチルメタンスルホン酸で処理し、その種子から発芽した植物を光呼吸が認められない1%CO₂の大気下でしばらく生育させ、正常に育った植物を通常の大気中に移した。そして、通常大気中で正常に育った植物は捨て、黄白色化を起こし弱った植物だけを選抜し、その植物を再び1%CO₂大気中に戻した。この操作を繰り返して4万個の植物から40個の変異株を得た。これら変異株の光呼吸回路の関連酵素を調べたところ、この変異株は光呼吸回路の酵素を欠損しており、さらにこれら変異株の光呼吸能力は極めて低いことが明らかになった。そして、この光呼吸能力が極めて低い変異株の光合成能力を調べた結果、光呼吸回路の酵素を欠損している全ての変異株で光合成能力も低いことが明らかになった。この結果は、前述のCho等によって明らかにされた結果と良く一致するものであり、光呼吸を特異的に阻害することによって光合成が促進される可能性は少ないことを示す。なぜ、光呼吸を阻害すると光合成も阻害されるのだろうか。この問題に関して前述のOgrenらは、*Arabidopsis*より得たグリシンデカルボキシラーゼ欠損株や、セリントランスヒドロキシメチラーゼ欠損株における光合成速度の低下が、RuBisCoの光活性化の阻害に起因することを報告し、これら酵素欠損株において蓄積されることが予想される光呼吸回路の反応中間体であるグリコール酸やグリオキシル酸が光呼吸回路酵素の阻害を引き起こし、その結果光合成が阻害されることを明らかにした⁴⁰⁾。

植物の物質生産能力を向上させることを目的とした光合成促進のもう一つの方法としては、化学物質による直接的な光合成の促進が考えられる。水と二酸化炭素を太陽エネルギーを利用し有機物質に変換する反応、光合成はその重要性も相まってたくさんの研究者を魅了してきた。これら多くの研究者達のたゆまない努力により、植物の光合成は非常に複雑で高度に統制されたシステムであることが明らかになりつつある。植物の光合成は緑色細胞中の葉緑体（クロロプラスト）の中で行われている。光合成は大きく分けると太陽エネルギーを吸収し還元力を得る反応（明反応）と、明反応によって得た還元力を用い二酸化炭素を固定する反応（暗反応）にわけられる。また、明反応はさらに、光合成色素により光が吸収され、2つの光化学反応中心で化学エネルギーに変換される過程（初期反応または初発光化学反応）、水分子が H_2O 脱水素酵素の働きによって光分解を受け、電子とプロトンを放出する過程（水の光分解反応）、水分子より引き抜かれた電子が一連の電子伝達反応によって、最終的な電子受容体NADPにまで到達する過程（電子伝達反応）、さらに電子伝達反応に連動して、ATP合成酵素によりATPが合成される過程（光リン酸化）の4つの過程に分けられる。この反応のうち、最初の初発光化学反応だけは物理化学的な反応であり、液体窒素中でも進行するがそのほかの過程にはすべて、温度依存性の酵素が関与した温度依存的な反応である。光合成の概略を図1に示した。この図でみるように光合成の各過程はすべて組織化されており、非常に規則正しく配列されている。光合成の明反応に関与する酵素はクロロプラストのチラコイド膜に存在しており、暗反応に関与する酵素はストロマ中に分布している（図1参照）。

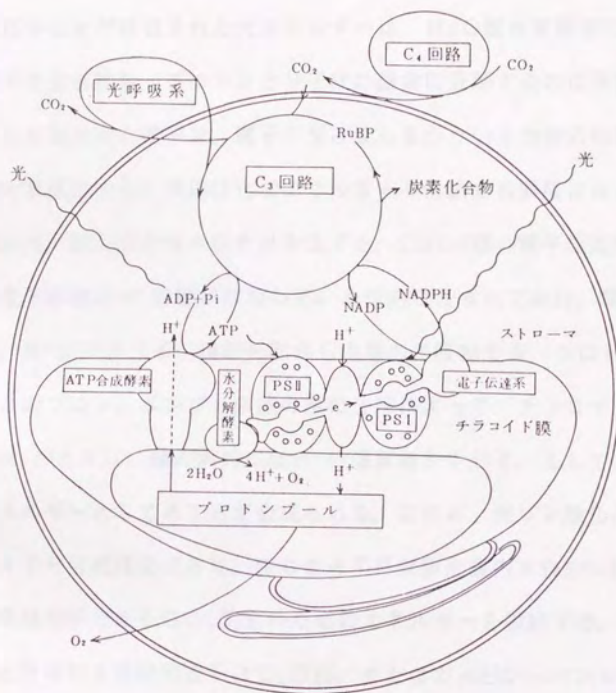


図1 光合成システム (鮫島⁴⁶⁾ らによる)

光合成反応で、光は光合成色素に吸収されて、光化学反応中心Ⅰ（ $PS I$ ）と光化学反応中心Ⅱ（ $PS II$ ）で化学エネルギーへと変換される。光化学反応中心Ⅱで吸収された光エネルギーは、 H_2O 脱水素酵素の働きで水から電子を引き抜き、プロトンと分子状の酸素に分解するのに消費される。水から引き抜かれた電子は、電子の受け渡しを行ういくつかの物質を經由し、光化学反応中心Ⅰで再び化学エネルギーを供給され最後に $NADP$ に受け継がれ、還元型の $NADPH$ を生ずる。この一連の電子伝達系の途中には、電子移動と H^+ 移動が共役している反応が含まれており、電子移動に伴って、 H^+ がチラコイド膜の外部から内部へと移動する（プロトンポンプ）。このプロトンポンプと前述の水の分解によって、チラコイド膜の内腔には H^+ がたまり、膜の内外には H^+ の濃度差が生じる。そしてこの濃度差をエネルギーとして ATP が合成される。これが、光リン酸化反応と呼ばれる ATP 合成反応であり、生じた ATP は原形質内を自由に移動し光合成の最終目的である CO_2 固定のためのエネルギーを供給する。一般に、暗反応と呼ばれる炭酸固定系は C_3 回路、またはカルビン・ベンソン回路と呼ばれる。取り込まれた CO_2 は、 $RuBp$ カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（*Rubisco*）がもつカルボキシラーゼ作用により、リブローズジリン酸と反応し2分子のホスホグリセリン酸を生ずる。このホスホグリセリン酸はその後、ジホスホグリセリン酸、グリセルアルデヒド3リン酸、ジハイドロキシアセトンリン酸を経て炭素数6のフルクトースジリン酸に変換される。さらに、フルクトースジリン酸は縮合反応やアルドール反応等を繰り返し、7炭糖のセドヘプツロースジリン酸、セドヘプツロース7リン酸、5炭糖のリボース5リン酸、リブローズ5リン酸に変換され、最

最終的にリブローズジリン酸になり回路は一周する。そして、この回路が一周する間に1分子のグルコース6リン酸が合成され光合成の炭酸固定が終了する。

さて、前にも述べたように植物の物質生産のほとんどは光合成によるものである。では光合成速度を促進することにより植物生産能力は向上するのであろうか。一般的に、植物の物質生産能力は、単位葉面積あたりの CO_2 吸収速度を表す単位光合成能と、個体の葉面積との積として表せる光合成速度及び光合成初期産物が植物体へ転換される際の生産効率とによって決定される⁴¹⁾。このことは、光合成の速度だけが植物の物質生産を支配しているのではないことを示すが、物質生産の絶対量は光合成速度に依存していることから、光合成を促進することが植物の物質生産能力を増大する方法の一つであることは間違いないことも同時に示唆する。 C_4 植物は光呼吸がほとんどないので、見かけの光合成速度は C_3 植物に比べ高い。 C_3 植物と C_4 植物の単葉光合成能の最大値は、それぞれ $15 \sim 40$ および $40 \sim 80 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ と C_4 植物の方が約2倍も高い⁴²⁾。さらに、Giffordらは生化学的酵素レベルでの C_4/C_3 の反応速度比は数倍～数十倍にもなると報告している⁴³⁾。さらに、このように高い光合成能力を有する C_4 植物の生産性について、Monteithらは、 C_4 植物での群落乾物生産速度の最大値は $50 \sim 54 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ であるのに対し、 C_3 植物では $34 \sim 39 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ と小さく、さらにこの差は生育期間を考慮にいれた平均値をとってみても変わらないと報告した⁴⁴⁾。また、石井と村田¹⁴⁾も多くの植物種について既応の文献を再検討し、短期間の群落乾物生産速度では C_3 と C_4 では顕著な差はないが、純生産を生育日数で除した平

均乾物生産速度で比較すると、 $1.8 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ 以上はすべて C_4 であり、 $1.4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ 以下はすべて C_3 植物であるとしており C_4 植物の優位性を指示している。そして、このことから、光合成能力が高いということは、一つの潜在的生産能を有していることであると結論している。

以上のように、光合成を促進し植物の物質生産能力を増大させる試みは多くの研究者によってなされてきたが、化学的手段による光合成促進の報告は、前述のようにいくつかの植物ホルモンとナフテン酸等が報告されているだけで、ましてや光合成促進物質を検索しそれに成功した例はこれまで報告されていない。その理由として、光合成促進物質を簡便かつ有効的に検索できるアッセイ系が存在しなかったことや、既知の明らかな光合成促進物質が存在しなかったことなどがあげられる。

光合成を化学的に促進することができれば、作物の物質生産を向上させることが期待できる。さらに、光合成の研究において光合成の阻害剤がなした役割を考え合わせると、光合成促進物質が光合成の研究に対しても大きな意義をもつことになる。このような見地から、著者は植物の光合成を化学的に促進することを目的として本研究を開始した。

本論文は全5章よりなる。まず、第一章では光合成促進物質を検索するための検定法の確立、および広範な化合物に対する検定とその結果、さらにはこの検定法によって認められた光合成促進活性を有する化合物の構造活性相関について述べた。第二章では光合成促進活性の認められたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の植物細胞内への取り込みとその代謝について述べた。第三章では、コリン類縁体とN-置換グリシ

ン類縁体が各種植物ホルモン様の活性を有するかどうか、さらにはこの植物ホルモンの活性にどのような影響を及ぼしているのかを述べた。さらに、第四章ではコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が有する光合成促進活性と植物の物質生産能力との相関性に対して光独立栄養培養細胞を用いて検討した結果を述べた。そして、最後の第五章ではコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が光合成の各部分に与える影響とこれら化合物の光合成促進活性の作用機作について述べた。

光合成促進物質の検索

第一章

光合成促進物質の検索

第一章 光合成促進物質の検索

植物の物質生産能力を増大させる方法の一つは光合成能力を高めることである。化学的手段による光合成促進の試みは、これまでに多くの研究者によってなされ、植物ホルモン⁴⁵⁾やナフテン酸¹²⁾、ニコチン酸アミド⁹⁾などにその作用のあることが報告されている。しかし、直接光合成促進物質を検索し、成功した例はこれまでに報告されていない。その理由の一つには、スクリーニング法が確立していなかったことがあげられる。すなわち、光合成促進物質を開発するためには、簡便かつ有効な生物検定法の開発が不可欠である。

本章では、光合成促進物質の生物検定法について述べるとともに、広範な化合物に対するスクリーニングの結果と、その結果見いだされたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の光合成促進活性について述べる。

1-1 光合成促進物質検索法の確立

1-1-1 光合成速度の測定

光合成とは、植物および光合成細菌によって行われる光エネルギーを利用した二酸化炭素から有機物を合成する反応であり、植物の光合成反応は次のように表される。



この式が示すように、光合成速度の測定法としては原理的に

1) CO_2 の取り込み速度を測定する方法

2) O_2 の放出速度を測定する方法

の二つの方法に分けることが出来る。1)の方法としては、赤外線分析計を用いた二酸化ガス交換速度測定法⁴⁷⁾や ^{14}C でラベルした二酸化ガスを用いる放射能測定法等があげられる。このうち赤外線分析計を用いた方法は、葉の組織を破壊せず個葉の状態で大気条件下の実際の光合成速度を測定でき、種々の環境条件の変化に対応した光合成速度の変化を正確に測定できるという利点があるが、測定系が比較的複雑かつ大規模である。また、 $^{14}\text{CO}_2$ を用いる方法は、比較的簡便で試料も少なくて済むという利点があるものの、アイソトープを使用するという煩雑さがある。2)の方法としてはワールブルグ検圧計を用いた酸素交換速度の測定法や、酸素電極を用いて酸素放出速度を測定する方法^{48) 49) 50)}等が上げられる。これらの方法は通常、葉切片を用いる場合が多いため試料が少なくて済み、葉の部位別光合成を気孔の影響を相当程度排除した状態で測定することが可能である。特に、酸素電極法は装置が簡単で葉緑体や単離細胞を用いた光合成やヒル

反応の測定が可能なことから、近年除草剤や光合成阻害剤の検定によく用いられている。これ以外にも葉の乾物重増加速度を測定する方法や、 ^{32}P でラベルした無機リン酸とADPから ^{32}P -ラベルATPの形成速度を測定する方法や、pHメーターを用いてプロトン勾配を測定する方法^{51) 52)}なども広く用いられている。

このように上記の方法は、それぞれ利点と欠点を持ち合わせており、その目的に応じて使い分けることが必要である。

1-1-2 生物検定法

光合成促進物質の生物検定法を確立するため、植物の切葉と赤外線ガス分析器を用いた二酸化ガス交換速度測定法と、葉切片と酸素電極を用いた酸素電極法を検討したが、両者とも無傷植物葉を用いるため、気孔開閉の問題や薬剤の浸透性の問題を排除できず、光合成促進剤の検定には適さないことが分かった⁵³⁾。さらに、これらの方法では葉に薬剤を処理しそれが植物内に取り込まれ活性を示すまでにかなり時間がかかることと、アッセイにあたり測定の誤差が大きいことも併せて明らかになった。特にこの誤差が大きいという問題は、数%-数十%の光合成促進を議論するときには致命的な欠点となる。そこで、光合成促進物質のスクリーニングのために光合成に与える薬剤の直接的な影響が観察でき、さらに測定誤差の少ない新しい簡便なアッセイ系を開発することが必要となった。

近年、植物培養工学の発展とともに、細胞壁を持たないいわゆる裸細胞（プロトプラスト）が色々な植物から調製されるようになった。このプロトプラストは適当な浸透圧の条件下では細胞としての生理活性を維持し、

高分子物質の取り込みや細胞融合などの現象を示し、それらの有効な実験材料となっている。そこで、著者らは植物のプロトプラストを光合成促進物質の検索に用いることが出来ると考え、酸素電極とコムギのプロトプラストを用いた簡便なアッセイ系を構築した。実験の結果、この検定系は各種化合物に対する感受性が高く、測定ごとの誤差が少ないことが明らかになり、この系は光合成促進物質のスクリーニング系として有用であることが確認された。図1-1に実験に用いた検定装置の模式図を示した。酸素電極を内蔵した透明樹脂製の反応槽は、外部に恒温槽から送られる所定温度の水を循環させ反応槽内の温度を一定に保つ。反応槽の上部はすり合わせ栓で外部と遮断し、反応槽の内部をスターラーで攪拌することにより反応液中の酸素濃度を均一に保つ。光源はスライドジェクターを用い、酸素濃度はレコーダーで記録した。

単離したプロトプラストと反応液1mlを検定試薬とともに酸素電極の反応槽に入れ、25℃で2分間攪拌したのち光($1400\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)を照射すると光合成による酸素放出が起こる。そして、この光合成による酸素放出は、約4分後に最大となる。プロトプラストを氷中に保存しておくと約3時間ぐらひは光合成由来の酸素放出速度はほとんど減少しないので、全ての測定をこの範囲内で行うこととした。一回のアッセイは3回の測定によることとし、1回の測定は正確に10分とした。1回目と3回目は検定試薬をいれずに、2回目には検定試薬をいれて酸素放出速度を測定する。活性の判定は、検定試薬投与時とそれをはさむ前後のコントロールの平均値によって判定する。これを3~5回繰り返しその平均値を求めた。図1-2は測定時の実物チャートの一部である。例えばこの図の場合、

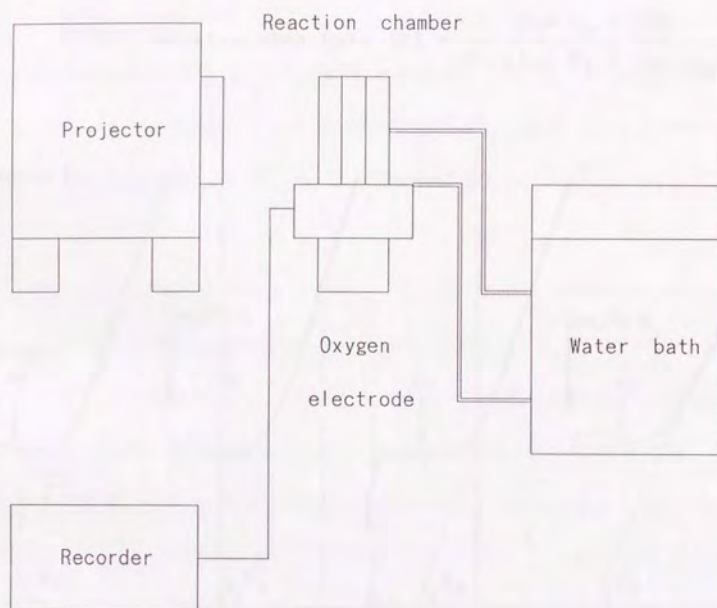


図 1-1 小麦のプロトプラストと酸素電極を用いた光合成促進物質の検定系の概略。恒温槽から送られる 25℃ の水は、酸素電極を内蔵した透明樹脂製の反応槽の外部を循環し、反応槽内の温度を一定に保つ。反応槽は上部をすり合わせの栓でふたをすることによって外部と遮断され、スターラーで均一に保たれた反応液中の溶存酸素濃度はレコーダーに記録される。使用機器の名称及び会社名は以下の通りである。

酸素電極	Hansatech Co. Ltd.
記録計	日立 056 型 卓上記録計
恒温槽	東洋製作所 循環式電子冷熱装置 TE-105
プロジェクター	理化学精機 HILUX-HR

$$\text{Acceleration Rate (\%)} = \frac{\tan \theta_A \times 100}{1/2(\tan \theta_1 + \tan \theta_2)}$$

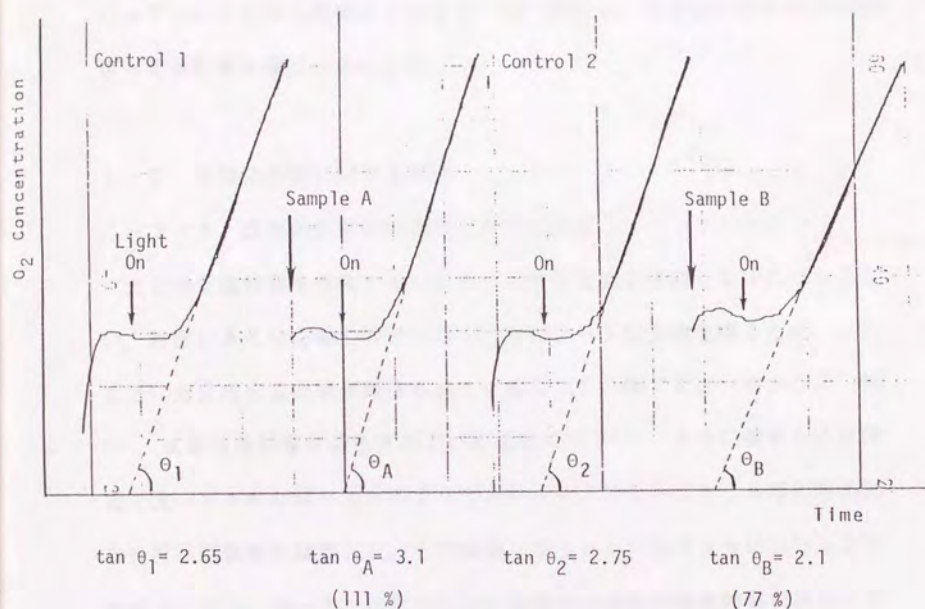


図 1-2 光合成促進物質検定時の実物チャート。単離したプロトプラス
トと反応液 1 ml を検定試薬とともに酸素電極の反応槽に入れ、
25℃で2分間攪拌したのち光 ($1400 \mu E m^{-2} s^{-1}$) を照
射すると光合成による酸素放出が起こる。そして、この光合成
による酸素放出は、約4分後に最大となる。活性の判定は、検
定試薬投与時とそれをはさむ前後のコントロールの平均値によ
って判定する。例えばこの図の場合、サンプルAは11%の促進
を、Bは23%の阻害を示す。

サンプルAは11%の促進を、Bは23%の阻害を示す。特に、促進活性が認められたサンプルについては、他の日に調製したプロトプラストを用いて、繰り返し実験することによりその効果を確認した。また、pH変化により反応液中のCO₂の濃度が変化するので、投与サンプルはHEPESバッファーにとかし厳密にpHを7.6に調製し、反応液中のCO₂の濃度に与える影響を極力小さくした。

1-2 各種化合物に対する検定

1-2-1 既知の生育調節物質に対する検定

光合成促進物質を検索するにあたり検定化合物を合成しなければならない。無数にある化合物の中からいくつかのリード化合物を得るため、これまでに光合成促進効果が報告されているニコチン酸アミド⁸⁾やナフテン酸¹²⁾、成長促進効果が報告されていた塩化コリン^{5,4)}、さらに著者らの研究室で見いだされたN-アリルグリシンやアミノアセトニトリル等の特異的な光呼吸阻害剤を検定した。その結果、表1-1で示すようにコリンとアセチルコリン、N-アリルグリシンに酸素放出速度の促進効果が認められた。これに対して光合成促進効果が報告されているニコチン酸アミドは活性が認められず、ナフテン酸の場合は強い阻害を示した。矮化剤のCCCはコリンのOH基がCIに置換された化合物であるが、活性がなかったのでエタノールアミンが必要と考えこれのN置換体にも注目することにした。そこで以下、エタノールアミンのN置換体、コリンのN置換体、N-置換グリシン類縁体を合成し、これら化合物の酸素放出速度の促進活性を検定した。

Compounds	O ₂ Evolution
Control	100
Choline Chloride	103
Acetylcholine Chloride	103
C C C	97
Nicotinamide	99
Naphthenic Acid	0

表 1-1 いくつかの化合物に対する光合成促進検定の結果。

1-2-2 エタノールアミン類縁体に対する検索

エタノールアミンのN置換第二、第三アミン類縁体の検定結果を表1-2に示す。化合物の濃度は全て10 mMとし、置換基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、アリル、メタリル、等を用いた。検定の結果、アッセイに用いた全ての一置換、二置換エタノールアミン類縁体で酸素放出速度の促進活性は認められず、逆に強い阻害活性が認められた。この阻害活性は、メチルエタノールアミン(1)、アリルエタノールアミン(2)、エチルメチルエタノールアミン(5)等の比較的置換基の小さな化合物では約10-20%であったが、置換基が大きくなるに従って阻害活性が強くなり、メチルメタリルエタノールアミン(9)やジメタリルエタノールアミン(12)等は小麦プロトプラストの酸素放出をほとんど完全に阻害した。

1-2-3 コリン類縁体に対する検索

エタノールアミン類縁体が酸素放出速度の促進活性を示さないことが解ったので、次に弱いながら促進活性を示したコリンの類縁体に関して検定を行った。コリンは4級のエタノールアミンの一種である。まず、モノアルキル置換コリン類縁体について検定をおこなった(表1-3)。エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、s-ブチル、t-ブチルと炭素鎖と構造を変えた置換基を有するコリンの一置換体を合成し検定を行ったところ、エチルコリン(13)で110%と最も強い促進活性を示し、ついでn-プロピルコリン(14)、イソプロピルコリン(15)と活性が弱くなり炭素数4個以上では阻害に転じた。この場合も第二、第三

エタノールアミンの時と同様、炭素鎖が大きくなるほど阻害活性も大きくなり、炭素数16個のヘキサデカンコリン(22)は光合成を完全に阻害した。さらに、ブチルコリンではイソ(17)、ノルマル(16)、セカンダリー(18)、ターシャリーブチル(19)と阻害活性が強くなることが明らかになった。これらの結果から、置換基があまり大きくない方がよいことがわかったので、炭素鎖をあまり大きくせずに置換基をいろいろと置換してみた。まず、一置換体について検定を行なった結果、ハロ置換エチルコリン(クロロエチルコリン(23)、フルオロエチル(24))、メタリルコリン(29)、プロパギルコリン(32)等が小麦プロトプラストの酸素放出速度を10-15%促進した(表5)。さらに、クロロプロピルコリン(25)、アリルコリン(27)、クロチルコリン(28)、ジメチルアリルコリン(30)、とフェニルコリン(33)、ベンジルコリン(34)等も10%前後の酸素放出速度の促進活性を示した。一方、エトキシエチルコリン(26)、1-ブテニルコリン(31)等は小麦プロトプラストの酸素放出速度に対して何等影響を与えないことが明らかになった(表1-4)。

コリンの二置換、三置換類縁体についても検定を行なった(表1-5)。置換基としては、エチル、イソプロピルやアリル基のように、一置換コリン類縁体で酸素放出速度の促進活性が認められた置換基をそれぞれ組み合わせで化合物をデザインした。またそれ以外にも、ピロリジン環(39)、ピペリジン環(40)、モルフォリン環(41)のように環構造を有する化合物も同時に合成し、促進検定を行った。その結果、表1-6で示すように環構造を有する化合物は酸素放出速度に対して何等影響を与えておら

	Compounds		O ₂ Evolution
	No.	R ₁ R ₂	
		Control	100
$\begin{array}{c} R_1 \\ \diagup \\ N-CH_2CH_2OH \\ \diagdown \\ R_2 \end{array}$	1	H CH ₃	80
	2	H CH ₂ CH=CH ₂	86
	3	H CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	45
	4	CH ₃ CH ₃	92
	5	CH ₃ C ₂ H ₅	92
	6	CH ₃ n-C ₃ H ₇	71
	7	CH ₃ n-C ₄ H ₉	35
	8	CH ₃ CH ₂ CH=CH ₂	43
	9	CH ₃ CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	5
	10	C ₂ H ₅ CH ₂ CH=CH ₂	40
	11	CH ₂ CH=CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂	11
	12	CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂ CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	0

表 1-2 エタノールアミン類縁体に対する光合成促進検定の結果。検定物質の濃度はすべて 10 mM とし、データーはコントロールの値を 100 (%) として表示した。コントロールの光合成活性は 90 ~ 130 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$ であった。

No.	Compounds	O ₂ Evolution
	R	
	Control	100
13	C ₂ H ₅	110
14	n-C ₃ H ₇	105
15	i-C ₃ H ₇	103
16	n-C ₄ H ₉	95
17	i-C ₄ H ₉	100
18	s-C ₄ H ₉	92
19	t-C ₄ H ₉	90
20	C(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	87
21	n-C ₈ H ₁₇	78
22	n-C ₁₆ H ₃₃	0

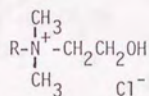


表 1-3 アルキル置換コリン類縁体に対する光合成促進検定の結果。
 検定物質の濃度はすべて 10 mM とし、データーはコントロールの値を 100 (%) として表示した。コントロールの光合成活性は 90 ~ 130 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$ であった。

No.	Compounds R	O ₂ Evolution
	Control	100
23	C ₂ H ₄ Cl	114
24	C ₂ H ₄ F	109
25	C ₃ H ₆ Cl	104
26	C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	100
27	CH ₂ CH=CH ₂	106
28	CH ₂ CH=CHCH ₃	103
29	CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	111
30	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	105
31	CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂	100
32	CH ₂ C≡CH	110
33	C ₆ H ₅	107
34	CH ₂ C ₆ H ₅	105

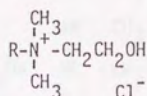


表 1-4 一置換コリン類縁体に対する光合成促進検定の結果。検定物質の濃度はすべて 10 mM とし、データーはコントロールの値を 100 (%) として表示した。コントロールの光合成活性は 90 ~ 130 μmol O₂/mg Chl/h r であった。

No.	Compounds			O ₂ Evolution
	R ₁	R ₂	R ₃	
	Control			100
35	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	96
36	CH ₃	i-C ₃ H ₇	i-C ₃ H ₇	95
37	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	15
38	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	34
39	CH ₃		-C ₄ H ₈ -	96
40	CH ₃		-C ₅ H ₁₀ -	101
41	CH ₃		-C ₂ H ₄ OC ₂ H ₄ -	100
42	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	98
43	i-C ₃ H ₇	i-C ₃ H ₇	i-C ₃ H ₇	96

表 1-5 二置換および三置換コリン類縁体に対する光合成促進検定の結果。検定物質の濃度はすべて 10 mM とし、データーはコントロールの値を 100 (%) として表示した。コントロールの光合成活性は 90 ~ 130 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$ であった。

ず、それ以外の二置換体は逆に酸素放出速度の阻害活性を示した。また、このときの阻害活性はジアリルコリン（３７）、ジベンジルコリン（３８）で認められる様に、置換基が大きくなるに従って阻害活性も大きくなっており、第二、第三エタノールアミンや一置換コリン類縁体で認められた結果と同様な結果を与えた。さらに、トリ置換類縁体（トリエチルコリン（４２）、トリイソプロピルコリン（４３））も酸素放出速度の促進活性を示さなかった。以上の結果から、コリンのモノ置換体にだけ、それも炭素数があまり大きくないコリン類縁体にだけ促進活性があることが明らかになった。

1-2-4 N-置換グリシン類縁体に対する検索

N-置換グリシン類縁体についても同様に小麦プロトプラストの酸素放出速度にあたる影響を調べた。合成した数十種類のN-置換グリシン類縁体の中で一置換体について活性を検討した（表1-6）。この図で示すように、まずグリシン（１）では酸素放出速度の促進効果はほとんど認められなかったが、N-メチルグリシン（２）は約３％前後の弱い促進活性効果を示し、N-アリルグリシン（３）では約１０％の促進活性を示した。

次に二置換のグリシン類縁体についても光合成促進検定を行った（表1-7）。N-置換グリシン類縁体の置換基としてはおもにコリン類縁体で促進活性が認められた化合物を参考にメチル、エチル、アリル、メタリル基を用いた。検定の結果、N-アリル-N-メチルグリシン（５）とN-N-ジメタリルグリシン（９）が約１５％前後の強い促進活性を、N-N-ジメチルグリシン（４）、N-アリル-N-エチルグリシン（６）、N

ーエチルーN-メタリルグリシン(7)、N、N-ジアリルグリシン(8)が10%前後の促進活性をそれぞれ示した。さらに、N-置換グリシン類縁体のエチルエステル体であるN-アリルーN-メチルグリシンエチルエステル(10)とN-アリルーN-エチルグリシンエチルエステル(11)も10%前後の酸素放出速度の促進活性を示しエステル化によっても活性は保持されることが明らかになった。

三置換グリシン類縁体の検定結果、N、N、N-トリメチルグリシン(グリシンベタイン)(12)、N-アリルーN、N-ジメチルグリシン(13)もやはり10%前後の酸素放出速度の促進活性を示し、そのエチルエステル体であるN-アリルーN、N-ジメチルグリシンエチルエステル(14)も13%の促進活性を示した(表1-8)。以上のように、検定に供したほとんどのN-置換グリシン類縁体で酸素放出速度の促進が認められた。

1-3 呼吸に与える影響

植物は一般に、光合成による酸素放出と呼吸による酸素の消費を同時に行う。さらに、小麦のようなC₃型植物では、酸素消費に絡んだ呼吸として光呼吸と暗呼吸がある。特に光呼吸は、1955年にDecker⁵⁵⁾によって発見されて以来多くの研究者により詳しく調べられた。その結果、光呼吸は光照射下でおこり、酸素によって促進され炭酸ガスによって阻害されること、光強度に依存することなどが明らかにされ、現在では図1-3に示すような光呼吸回路が広く認められるようになった。上記で述べたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が、もし光合成を促進せずに

Compound		O ₂ Evolution
R ₁	R ₂	
H	H	101
H	CH ₃	103
H	CH ₂ CH=CH ₂	110
Control		100

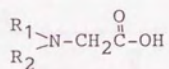


表 1-6 一置換グリシン類縁体に対する光合成促進検定の結果。検定物質の濃度はすべて 10 mM とし、データーはコントロールの値を 100 (%) として表示した。コントロールの光合成活性は 90 ~ 130 μmol O₂/mg Chl/hr であった。

Compound			O ₂ Evolution
R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	H	108
CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	H	114
C ₂ H ₅	CH ₂ CH=CH ₂	H	107
C ₂ H ₅	CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	H	110
CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	H	110
CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	H	115
CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	C ₂ H ₅	108
C ₂ H ₅	CH ₂ CH=CH ₂	C ₂ H ₅	110
Control			100

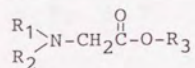


表1-7 二置換グリシン類縁体に対する光合成促進検定の結果。検定物質の濃度はすべて10mMとし、データーはコントロールの値を100(%)として表示した。
コントロールの光合成活性は90~130μmol O₂/mg Chl/hrであった。

Compound				O ₂ Evolution
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	108
CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	H	110
CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	C ₂ H ₅	113
Control				100

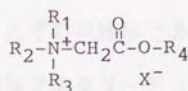
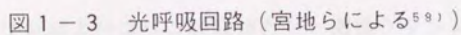


表 1-8 三置換グリシン類縁体に対する光合成促進検定の結果。検定物質の濃度はすべて 10 mM とし、データーはコントロールの値を 100 (%) として表示した。
コントロールの光合成活性は 90 ~ 130 μmol O₂/mg Chl/h r であった。

光呼吸もしくは暗呼吸を阻害しているとすると、見かけの光合成量は促進されることになる。そこで、これら化合物の光合成促進活性を確認する為には光呼吸と暗呼吸に与える影響も測定しなければならない。しかし、酸素放出速度を測定した系は、炭酸ガス源として10 mM、 NaHCO_3 を用いており、かなり高い炭酸ガス濃度になっている。光呼吸は2% CO_2 下ではほぼ完全に阻害されるので、光合成促進物質のスクリーニングに用いた酸素電極と小麦プロトプラストの系では光呼吸はないものと考えられる。そこで、ここでは植物のミトコンドリアで行われる暗呼吸に与える影響だけを検定した。暗呼吸の測定は、常法により単離した小麦のミトコンドリアに検定サンプルを加え、 NADH を電子受容体として、25℃で測定した。表1-9で示すようにコリンとその類縁体であるエチルコリン、アリルコリンとN-置換グリシン類縁体であるN-アリルグリシンとN-アリル-N-メチルグリシン、N-アリル-N、N-ジメチルグリシンはミトコンドリアにおける暗呼吸を阻害しないことが明らかになった。このことから、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体で認められた酸素放出速度の促進は、光合成由来の酸素放出の促進であることが確かめられた。

1-4 光合成の炭酸固定に与える影響

光合成は前述のとおり、光エネルギーを利用して水を分解し化学エネルギーと還元力を得る反応（明反応）と、それを利用し炭酸ガスを固定する反応（暗反応）とに分けられる。小麦プロトプラストの酸素放出速度を促進するコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が、酸素放出速度だけでなく全体の光合成を促進するのであれば、光合成による炭酸固



Compound	O ₂ Consumption Rate
Choline Chloride	100
Ethylcholine Chloride	102
Allylcholine Chloride	100
N-Allylglycine	100
N-Allyl-N-Methylglycine	99
N-Allyl-N,N-Dimethylglycine	100
Control	100

表 1-9 コリンおよびコリン類縁体と N-置換グリシン類縁体がミトコンドリアの呼吸に与える影響。

定も促進されているはずである。そこで、酸素放出速度の促進が認められた化合物について光合成の暗反応に与える影響を調べた。炭酸固定速度を測定するための反応液や温度等の実験方法は、酸素電極法の時と同様にした。単離したプロトプラストを反応液に懸濁し、この懸濁液に検定試薬を投与する。そこに、 ^{14}C ラベルの $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を加え、光照射する事により光合成を開始させ、光合成による炭酸固定量を液体シンチレーションカウンタで測定した。

表1-10に小麦プロトプラストの炭酸固定速度に与える、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の効果を示した。検定試薬としてはコリンとコリン類縁体の中から比較的酸素放出速度の促進活性が強いアリルコリンとエチルコリンを、N-置換グリシン類縁体の中からはN-アリルグリシンとN-アリル-N-メチルグリシンとN-アリル-N、N-ジメチルグリシンを用いた。検定の結果、コリン、エチルコリン、アリルコリン10mM処理で炭酸固定量はそれぞれ105%、106%、106%と促進された。そして、この炭酸固定の促進率は、各検定サンプルを20mMとしたときそれぞれ108%、113%、107%と増大した。

同様にN-置換グリシン類縁体についても検定を行ったところ、各サンプル10mM処理でN-アリルグリシンで108%、N-アリル-N-メチルグリシンで107%、N-アリル-N、N-ジメチルグリシンで106%と小麦プロトプラストの炭酸固定量が促進された。このことから、酸素電極と小麦プロトプラストを用いた検定法により酸素放出速度の促進が確認されたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は、光合成の炭酸固定速度をも促進しており、これら化合物が真の意味での光合成

$(\mu\text{mol CO}_2/\text{mg Chl}/\text{hr})$

Compound	Treatment (mM)		
	0	10	20
Choline	128.6±2.9 (100)	135.1±3.8 (105)	138.9±3.1 (108)
Ethylcholine	103.1±3.5 (100)	109.3±2.9 (106)	116.5±3.9 (113)
Allylcholine	126.3±3.6 (100)	132.9±3.9 (105)	134.6±3.7 (107)

Compound	Concentration	$\mu\text{mol CO}_2/\text{mg chl/hr}$
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-\text{N}-\text{CH}_2\text{COOH}$ H	0mM	135±2.5
	10mM	145±3.4 (108%)
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-\text{N}-\text{CH}_2\text{COOH}$ CH ₃	0mM	145±3.2
	10mM	155±1.5 (107%)
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2\text{COOH}$ CH ₃ Br ⁻	0mM	142±2.8
	10mM	150±1.2 (106%)

表1-10 コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が光合成炭酸固定に与える影響

促進物質であることが確認された。

1-5 散布実験

小麦プロトプラストと酸素電極を用いた光合成促進物質の検定法を用い、光合成促進活性の認められた化合物が、実際無傷植物に対してどのような効果を与えるのかを調べるため小麦幼苗を用いた葉面散布実験を行った。実験の方法は以下のように行った。まず、昼間25℃、夜間20℃に制御された自然光ファイトトン内で発芽後8日間生育させた小麦を対照区と実験区に分ける。実験区には一定濃度になるように水にとかした各検定サンプルを250cm²あたり30ml量を葉面に散布し、対照区にも同一量の水を散布する。散布した小麦幼苗は同一条件で数日間生育させた後、その葉からプロトプラストを調製し酸素電極により光合成速度を測定する。光合成活性は対照区、実験区ともにクロロフィルあたりの光合成として表し、それぞれを比較した。

実験の結果、1000ppmのコリンで処理した小麦の葉から単離したプロトプラストは対照区に比べ2日目で13%、3日目でも11%高い光合成能を示した。そして、コリンのこの促進活性は300ppmでも認められ広い範囲の至適濃度を有することが明らかになった。エチルコリンはコリンと同じ1000ppmでは2日目、3日目ともに阻害活性を示したが、300ppm処理では2日目に11%、3日目に10%の光合成促進活性を示した。さらにアリルコリンもエチルコリンと同じように1000ppm処理では阻害活性を示した。アリルコリンは300ppmでも2日目では弱い阻害活性を示したが、4日目には逆に11%前後の促進活性を

Compounds	(Dose ppm)		μ mole O_2 / mg. chl. hr		
			2 days	3 days	4 days
Choline	(1000)	C*	87.2 \pm 4.5	107.4 \pm 1.7	-
		T*	98.9 \pm 4	119.2 \pm 2.7	-
		(%)	(113.5)	(111)	
Ethylcholine	(300)	C	96.6 \pm 2.1	110.7 \pm 2.2	-
		T	107.4 \pm 2.3	121.9 \pm 2.5	-
		(%)	(111.2)	(110)	
Allylcholine	(300)	C	85.4 \pm 2.5	-	141.1 \pm 3.3
		T	82.9 \pm 4.8	-	157.1 \pm 0.5
		(%)	(97)		(111.3)

* C = Control, T = Treatment

Compound	Concentration	μ mol O_2 /mg chl/hr	
		2 days	3 days
N-Allylglycine	0ppm	108 \pm 1.2	90 \pm 2.1
	300ppm	122 \pm 3.7	101 \pm 2.9
		(114%)	(110%)
N-Allyl-N-methylglycine	0ppm	101 \pm 2.3	91 \pm 2.1
	300ppm	115 \pm 1.9	100 \pm 1.7
		(113%)	(110%)

表 1-11 コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の葉面散布による光合成への影響

示した（表 1-11）。一方もうひとつの光合成促進物質である N-置換グリシン類縁体のいくつかに対しても同様な実験を行った。表 1-11 で示すように N-アリルグリシンと N-アリル-N-メチルグリシンともに 300 ppm 処理によりコントロールに比べ 2 日目で 13-14%、3 日目で 10% の光合成促進活性を示した。

1-6 光合成促進物質の構造活性相関

これまでに述べたように、化学的手段による光合成促進を目的として、広範な化合物についてスクリーニングを行ったところ、コリンおよびコリン類縁体と N-置換グリシン類縁体のいくつかに光合成促進活性のあることを見いだした。そこで、これまで報告したエタノールアミン類縁体と N-置換グリシン類縁体について、その化学構造と光合成促進活性との相関関係についてまとめてみた（表 1-12）。

エタノールアミンとその一置換体、二置換体ともにその R₁、R₂ 基に関係なく小麦プロトプラストの光合成を阻害した。しかしエタノールアミンのアルコール部位がカルボン酸に置換されたグリシンでは促進活性は認められなかったが、その一置換体、二置換体ともにその置換基の炭素数 5 個以下で光合成促進活性が認められた。また、エタノールアミンの第四アンモニウム塩であるコリンおよびコリン類縁体は光合成促進活性を有し、グリシン類縁体の第四アンモニウム塩であるベタイン類でも促進活性は認められた。このように第二および第三エタノールアミンでは活性が認められずエタノールアミンの第四アンモニウム塩だけに活性が認められること、またグリシン類縁体では第二、第三アミンと第四アンモニウム塩ともに光

Ethanolamine Analogues		Glycine Analogues	
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	—	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2\text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	+
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{R}_1 \end{array}$	—	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2\text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{R}_1 \end{array}$	+
$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{R}_2 \end{array}$	—	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2\text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{R}_2 \end{array}$	+
$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{R}_2-\text{N}^{\pm}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{R}_3 \end{array} \quad \text{X}^-$	+	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{R}_2-\text{N}^{\pm}-\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{R}_3 \end{array} \quad \text{X}^-$	+

表 1-1-2 光合成促進物質の構造活性相関。表中の+は光合成促進活性を有することを意味し、-は逆に光合成阻害活性を有することを意味する。さらに、±は光合成になんの影響も与えなかったことを意味する。

合成促進活性が認められることが明らかになった。光合成に強い阻害活性を示すエタノールアミン類縁体の水酸基がカルボキシル基に置換されただけで、光合成促進活性を示すということは非常に興味もたれる。

1-7 まとめおよび考察

化学的手段による光合成促進を目的として小麦プロトプラストと酸素電極を用いた簡単なアッセイ系を構築した⁵⁶⁾。このアッセイ系は、簡便であるにもかかわらず、測定誤差が非常に少なく検定試薬の効果を短時間で感度良く測定できることが明らかになった。そしてこの検定法を用いて広範な化合物について検定を行った結果、コリンおよびコリン類縁体⁵⁶⁾とN-置換グリシン類縁体⁵⁷⁾のいくつかが小麦プロトプラストの酸素放出速度を10-20%促進することが明らかになった。この酸素放出速度の促進活性は、これら化合物をインタクトな植物に葉面散布してその葉身より単離したプロトプラストでも確認されることも同時に明らかになった。これに対して、植物の生育促進効果と光合成促進効果が報告されているニコチン酸アミドやナフテン酸は小麦プロトプラストの酸素放出速度に対して何等影響を与えないか、または阻害を示した。このように、小麦プロトプラストでの酸素放出速度の促進が認められたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が実際に光合成を促進しているかどうかを確認するため、これら化合物が光合成の炭酸固定と暗呼吸に与える影響を調べた結果、これら化合物は炭酸固定速度も促進するが、暗呼吸には何等影響を与えないことが明かとなった。以上の結果、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は光合成の特異的な促進物質であることが確認された。現

在まで、植物の光合成やそれにともなう成長を促進する物質はいくつか報告されているが、このように、光合成促進物質を直接検索しその効果を確認したのは初めての例である。

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のその構造と活性の間には1-6で述べたような興味深い相関関係がある。エタノールアミンの一、二置換体では阻害活性を示したが、この阻害は置換基の炭素数が大きくなるほど強くなる傾向を示した。また、光合成促進活性が確認された一置換のコリン類縁体でもこの傾向が認められ、炭素数5個以上の置換基では阻害活性を示した。さらに、同じ炭素数の置換基の中でもその立体構造によって阻害の強さが異なることも明らかになった。炭素数4個のブチルコリンにおいて、n-ブチルコリンとi-ブチルコリンはプロトプラストの光合成に対してほとんど影響を与えないが、s-ブチルコリンとt-ブチルコリンは弱い阻害活性を示す。さらに、コリンの二置換体と三置換体においては光合成促進活性を有する化合物が認められなかったことから、光合成促進活性を示す為にはある程度の分子の立体特異性と親水性度を持つことが必要とされるのであろう。一方、もう一つの光合成促進物質であるN-置換グリシン類縁体では、コリン類縁体で認められたような炭素数と活性との変化ははっきりとは認められなかった。たとえば、コリン類縁体の中では比較的強い阻害を示したジアリルコリン(37)と同じようにアリル基2個を置換基として持つN-置換グリシン類縁体のN、N-ジアリルグリシンは、逆に光合成を促進する。このような違いがコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の光合成促進活性の作用のメカニズムの違いによるものなのか、分子の電子的、立体的性質の違いによる

もののなかは明らかではないが、1-6で述べたような分子の塩基性の強さと光合成の活性との相関関係と相まって、新しい光合成促進物質を合成していく上で有意義な情報を与えるものと考ええる。化合物の構造と活性を議論するとき、これら化合物の濃度の問題も生じる。ここで用いた光合成促進物質のスクリーニングでは、化合物の濃度を全て10 mMに統一しているので、光合成促進活性が認められなかった化合物や光合成阻害活性を示した化合物に関しても、もっと希釈することにより促進活性が認められる可能性もある。しかし、阻害活性が認められた主な化合物について、濃度を変えて検定を行ったが、促進活性を確認できなかった。

この様に、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体では、構造上の相違があるにも関わらず、同じ様な光合成促進活性を有することは非常に興味深いことである。しかし、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が有する光合成促進の作用機作が同じなのかどうかは、ここまでの研究では明らかではない。そこで、この問題の解決を含め、生化学的、植物生理学的な解析が必要となる。

第二章

コリン類縁体と N-置換グリシン 類縁体の代謝研究

第二章 コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の代謝研究

生物がその生命現象を維持し、種々の生命現象を発現していくことは、生体成分の不断な代謝や合成を伴う。植物細胞における生体成分は、常に合成と分解を繰り返し代謝回転している。こうした生体成分の動的状態こそ、生命活動を支える大きな原動力の一つであり、従ってある現象のメカニズムを調べるときは、色々な生体成分の構造や生物学的機構を理解しておくことはもちろん、それらの合成と分解の機構について深く理解しておく必要がある。第一章で述べたようにコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は小麦プロトプラストの光合成を促進する。さらに、これら化合物はインタクトな植物に対しても生長促進活性を有し、甘藷、蔬菜類、穀類等で生長促進と生重量の増加が報告されている⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾。

このように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が興味深い生理活性を有することが明らかになって行くにつれ、その作用機作に対する興味も膨らんでいく。さらに、光合成促進活性の作用機作を明らかにすることは、新しい光合成促進物質の開発やその適用作物の拡大等においても重要な問題である。そこで、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のもつ光合成促進活性の作用機作解明を目的として、まずこれら化合物の植物体内への取り込みと、その代謝について研究した。第二章では、¹⁴Cラベルのコリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンを用いた小麦プロトプラストと緑藻類の *Chlamydomonas reinhardtii* への取り込みとその代謝について報告する。

2-1 小麦プロトプラストへの取り込み

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の代謝を調べる前に、酸素電極と小麦プロトプラストを用いた光合成促進物質の検定法において、検定化合物がどの程度プロトプラスト内へ取り込まれているのかを調べることにした。まず、検定化合物としては比較的光合成促進活性が強く、圃場試験でも促進活性が認められたコリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンを選んだ。コリン¹⁴Cラベル化合物はNEN社から購入し、それ以外の化合物のラベル化合物は合成した。検定化合物と常法により単離した小麦プロトプラストを反応液中でインキュベートし、プロトプラストにこれら化合物を取り込ませる。そして、一定時間ごとにプロトプラストを遠心分離で集め、細胞表面に非特異的に吸着したラベル化合物を洗い落とした後、細胞内への取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した⁶¹⁾。

実験の結果明らかになった、コリン、アリルコリン、ベンジルコリンの小麦プロトプラスト内への取り込みのタイムコースを図2-1に示した。コリンおよびアリルコリンはプロトプラスト内へ速やかに取り込まれ、その取り込み量は約三時間後に平衡に達した。また、そのときの最大取り込み量も、コリンとアリルコリンではほとんど同じ値を示した。ベンジルコリンもコリンやアリルコリンと同様に小麦プロトプラスト内へ取り込まれるが、その取り込み量が約2時間後に平衡に達することと、その最大取り込み量がコリン及びアリルコリンの取り込み量に比べるとかなり少ないということが異なっていた。一方、N-アリルグリシンでも同様な実験を行った。その結果は、図2-2に示した。この図で示すように、N-アリル

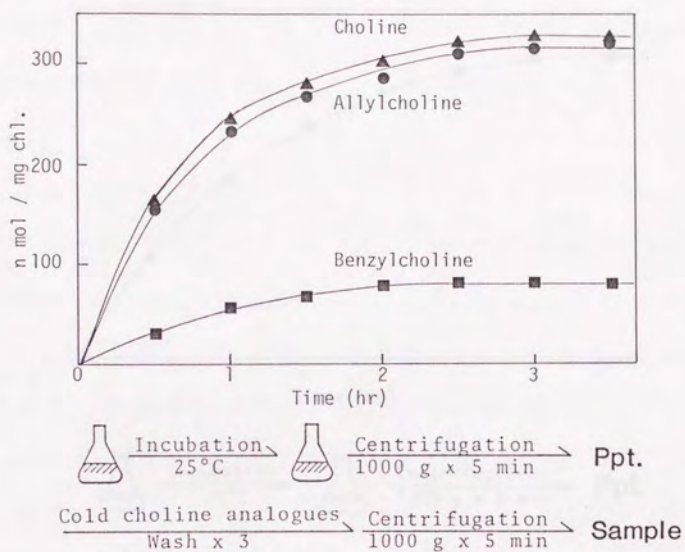


図 2-1 小麦プロトプラストにおけるコリン、アリルコリン、ベンジルコリンの取り込み。
プロトプラストの濃度は、 $0.1 \text{ mg Chl} / \text{ml}$ である。

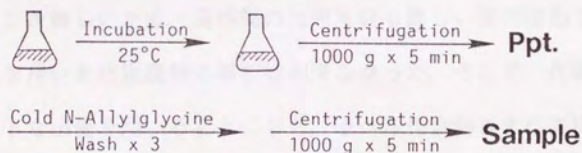
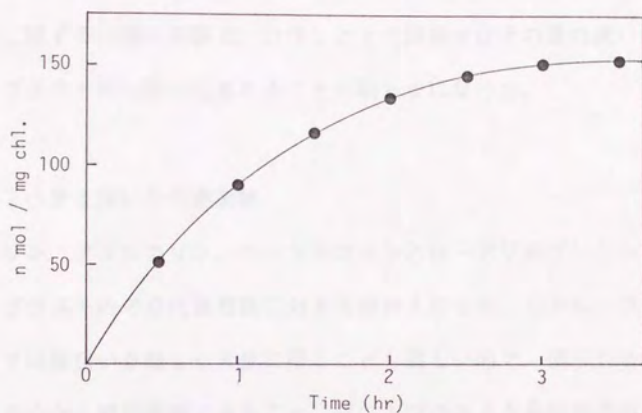


図 2-2 小麦プロトプラストにおける N-アリルグリシンの取り込み。
プロトプラストの濃度は、0.1 mg chl / ml である。

グリシンも細胞内へ速やかに取り込まれ、その取り込みも約3時間後に平衡に達するというコリンおよびアシルコリンと同じような挙動を示したが、最大取り込み量は約 150 nmol/mg chl であり、コリンおよびアシルコリンの取り込み量に比べると約半分であった。このように、取り込みに関する一連の実験で、コリンとその類縁体はその量の違いはあれプロトプラスト内へ取り込まれることが明らかになった。

2-2 小麦を用いた代謝実験

コリン、アシルコリン、ベンジルコリンとN-アシルグリシンの小麦プロトプラスト内での代謝経路に対する解析を行った。しかし、プロトプラストでは取扱いが難しく大量に得ることも難しいので、得られる代謝産物の量が少なく解析困難であること、プロトプラストを長時間活性の高い状態で保存するのが難しいため、長時間の代謝実験も難しい等の理由で、プロトプラストを用いた代謝産物の解析は出来なかった。そこで、代謝実験にはインタクトな小麦を用いることにした。ラベル化合物はすべて根から吸収させ、そのままコイットロン内で一定期間生育させる。ラベル化合物を取り込んだこの小麦を、クロロホルム/水/メタノール中で抽出し、水/メタノール層とクロロホルム/メタノール層に分けた。以後、前者を親水性画分、後者を脂溶性画分とし、それぞれに含まれる代謝産物について解析を行なった。

2-2-1 水溶性画分に含まれるコリン代謝産物の解析

まずコリン代謝産物の水溶性画分について解析を行った。最初の精製段

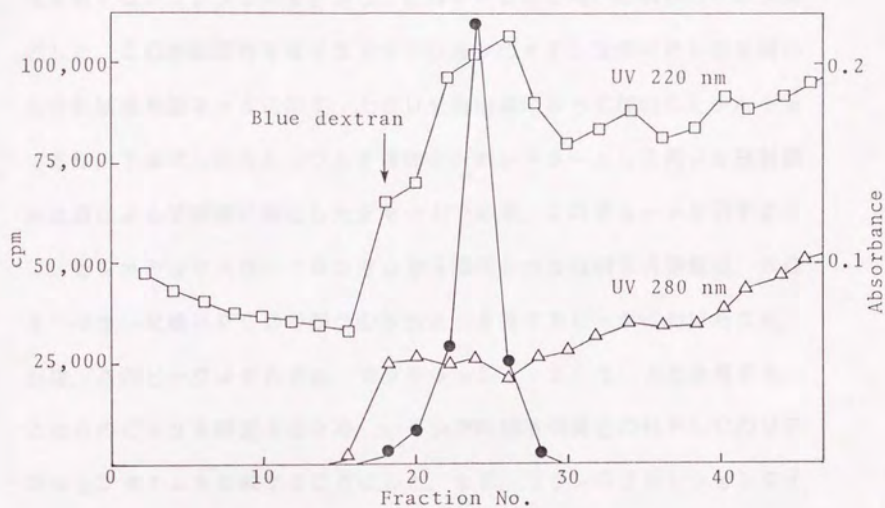


図 2-3 コリン水溶性代謝産物のセファデックス G-10 による解析。
 (●) が放射能活性、(□) と (△) がそれぞれ 220 nm と
 280 nm の吸収を示す。

階であるセファデックスG-10カラムで、一つのフラクションより放射活性が回収された(図2-3)。このクロマトグラフにおける放射能のモニターは、液体シンチレーションカウンターを用いた。そして、この放射活性を有するフラクションを分取し、次のHPLCを用いた解析のサンプルとした。この放射活性を有するフラクションのイオン交換HPLCを用いた分析結果を図2-4に示す。上はUV検出器によって検出したチャートであり、下はフッ化カルシウムを個体シンチレーターとして用いた放射能検出器によって同時に検出したチャートである。このチャートが示すように、セファデックスG-10カラムから回収された放射活性物質は、SCX-イオン交換HPLCで四つの放射活性を有するピークにわけられた。以後、このピークはそれぞれ、フラクション1, 2, 3, 4と命名する。これらのピークを同定するため、いくつかの標準物質とのHPLCのリテンションタイムを比較することにした。まず、コリンのリテンションタイムを調べこれらのピークと比べたところ、フラクション4とリテンションタイムが一致し、フラクション4はまだ代謝されていないコリンであると決定された。コリンは一般に、植物体の葉緑体内で酸化され、ベタインになることが知られており^{6,2)}、残りのピークのうちどれかがベタインである可能性がある。そこで、¹⁴Cベタインを酵素的に合成し、そのリテンションタイムを比較したところ、フラクション3がベタインと一致し、このフラクションはベタインであることが判明した。さらに、このフラクション3, 4を分取しそれぞれNMR解析を行なったところ、標品のスペクトルと完全に一致し、フラクション3, 4はそれぞれベタインとコリンであることが裏付けられた。一方、フラクション1と2についてはこれ以上の情

報が得られなかったので、さらにNH₂カラムにより精製を行い、単一のピークとして回収することが出来た。まず、フラクション1の精製物をそれぞれ¹H-NMR, ¹³C-NMRで構造を解析したところ、グルコースであることが判明した。さらに、フラクション2を¹H-NMRで解析したところ、コリンと似たようなスペクトルが得られた。しかし、この物質はコリンに比べると2位のメチレンプロトンが低磁場シフトしており、その近傍に電気陰性度の比較的大きい分子の存在が示唆された。一般的に、植物体内における物質の修飾反応としてグルコシレーションとホスホリレーションが知られている。そこで、フラクション2の精製物に関して³¹P-NMRで構造解析を行ったところ、リン酸エステルの存在が明らかになりフラクション2はホスホリルコリンの可能性が示唆された。このことを確かめるため、標品の¹H-NMRスペクトルとフラクション2のスペクトルの比較を行なった。その結果、両者は完全に一致し、この化合物はホスホリルコリンと同定された。

次に、各ピークの時間ごとの相対比を調べてみた(図2-5)。グルコースと同定されたフラクション1は、コリン取り込み後4時間までは検出できなかったが、6時間後からその量は徐々に増え、48時間後には全放射活性中の約10%に達した。ホスホリルコリンと同定されたフラクション2は、取り込み後2時間で50%の存在比を示し、48時間後でも40%の存在比を示した。また、ベタインと同定されたフラクション3は、12時間後に最大の存在比を示した後、徐々に減少し48時間後には約10%の存在比を示した。さらに、コリンと同定されたフラクション4は、時間経過とともに減少し48時間後には約40%の存在比を示した。高等植

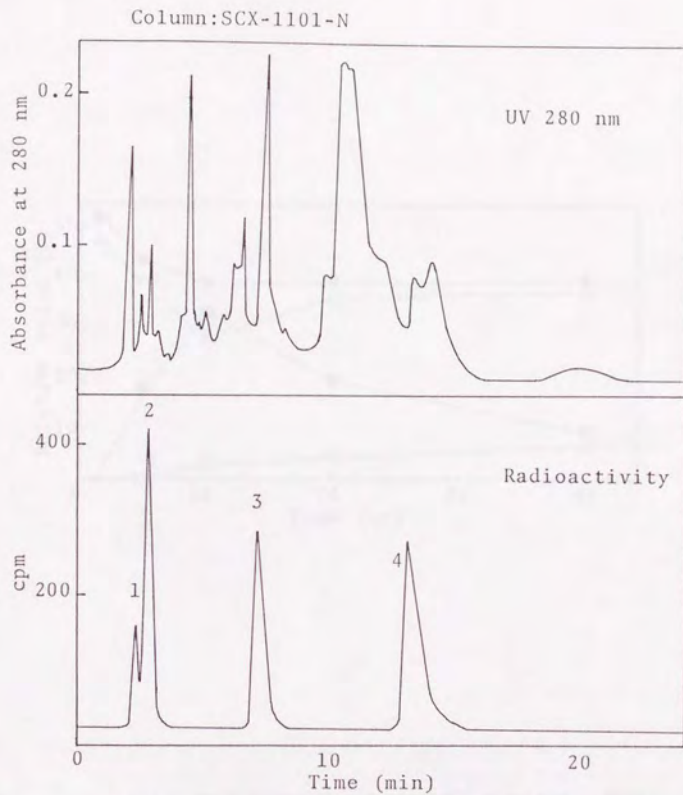


図 2-4 陽イオン交換HPLCを用いたコリン水溶性代謝産物の解析。
 上のチャートが280nmの吸収を示し、下のチャートが放射
 能活性を示す。下のチャートのピーク番号はそれぞれ、1. グ
 ルコース、2. ホスホリルコリン、3. ベタイン、4. コリン
 と同定された。

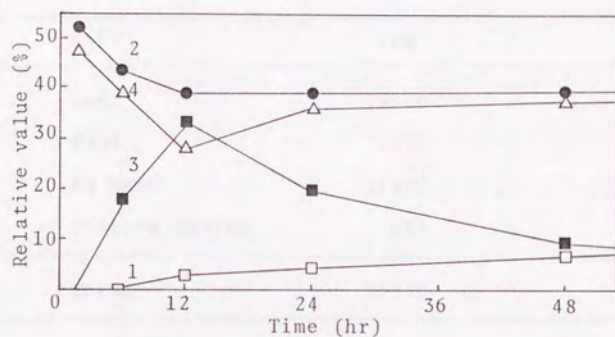


図 2-5 コリン水溶性代謝産物の各時間ごとの存在比。相対比(%)は全放射活性中の各化合物が占める割合で表わした。図中の番号はそれぞれ、1. グルコース、2. ホスホリルコリン、3. ベタイン、4. コリンを示す。

Part	Cpm	%
Leaf	19500	50
Root	7000	18
6N NaOH	11400	29
Culture medium	950	3
Total	38850	100

表 2-1 代謝実験系における各部分の放射能存在比。小麦幼苗は100 ppmのラベルコリン(74 kBq/20 ml)を含んだ20 mlの水耕液中で生育される。そして、この水耕液中に通常大気を10 cc/minの速度で吹き込み、そこからでてくる空気を6N-NaOHに通しCO₂をトラップする。それぞれの部分は液体シンチレーションカウンターで放射能量を測定した。

物の一般的な代謝から、フラクション1のグルコースはコリンが分解されて生じた $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を、植物が光合成により固定することによって生じたものと考えられた。この事を確認するため、この検定によって生じる $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の量を測定してみた。表2-1に48時間後のこの検定系の各部分（葉、根、培養液、大気）に含まれる放射エネルギーを測定した結果を示した。この表で明らかに、大気中に比較的多量の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ （6N-NaOHでトラップされた $^{14}\text{C}\text{O}_2$ ）が存在しており、これが放射活性を有するグルコースの生成原料であることが示唆された。さらに、検定時に空気を常に循環させ $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を大気中から除去することにより、 ^{14}C -グルコースは検出されなくなった。このような事実から、 ^{14}C -グルコースはコリンの直接の代謝産物ではなく、放出された $^{14}\text{C}\text{O}_2$ から合成されたものであることが明らかになった。

2-2-2 水溶性画分に含まれるアリルコリン、ベンジルコリン代謝産物の解析

次に、アリルコリンとベンジルコリンについてもコリンと同様にインタクトな小麦の根から吸収させ、その植物をクロロホルム/水/メタノールで抽出し、水溶性画分と脂溶性画分に分けて分析した。まず、アリルコリンとベンジルコリン代謝産物の水溶性画分をセファデックスG-10カラムにかけたところ、両代謝産物とも一つのフラクションに放射能活性が回収された。この放射能活性を有するフラクションを分取し、陽イオン交換HPLCによる解析を行なった。まず、アリルコリン代謝産物について解析を行なったところ、図2-6で示したように、アリルコリンでは放射活

性を有するふたつのピークが確認され、それぞれフラクション 1, 2 と命名した。このうちフラクション 2 は、標準サンプルとのリテンションタイムの比較により代謝されていないアリルコリンと同定された。フラクション 1 に関してはコリンの代謝を考慮すると、アリルコリンの酸化されたペタイン系の化合物かまたは、アリルコリンがリン酸化された化合物かのどちらかが考えられた。そこで、このフラクションを分取し NH_2 カラムを用いた順相 HPLC でさらに精製し、各種 NMR の解析を行なった。その結果、この放射活性を有するアリルコリンの代謝産物はホスホリルアリルコリンと同定された。

一方、ベンジルコリン代謝産物も同様に解析した (図 2-6)。HPLC のクロマトグラムから明らかなように、ただ一つのフラクションにだけ放射能活性が認められ、このピークは、ベンジルコリンのリテンションタイムと一致した。さらに、このフラクションが単一物質であることを確認するため、このフラクションを分取し、 NH_2 カラムを用いて精製を行ない、 ^1H -NMR で構造解析を行なった。その結果、投与後 72 時間では、ベンジルコリンの代謝産物は水溶性画分にはないことが明らかになった。

2-2-3 水溶性画分に含まれる N-アリルグリシン代謝産物の解析

N-アリルグリシンの代謝産物についても同様に解析した。N-アリルグリシンの代謝産物も水溶性画分と脂溶性画分に分けて解析した。この水溶性画分をセファデックス G-10 カラムにかけたところ、一つのフラクションから放射活性が回収された。さらに、このフラクションを水溶性画分の陽イオン交換 HPLC で分析したところ、放射能を有するフラクショ

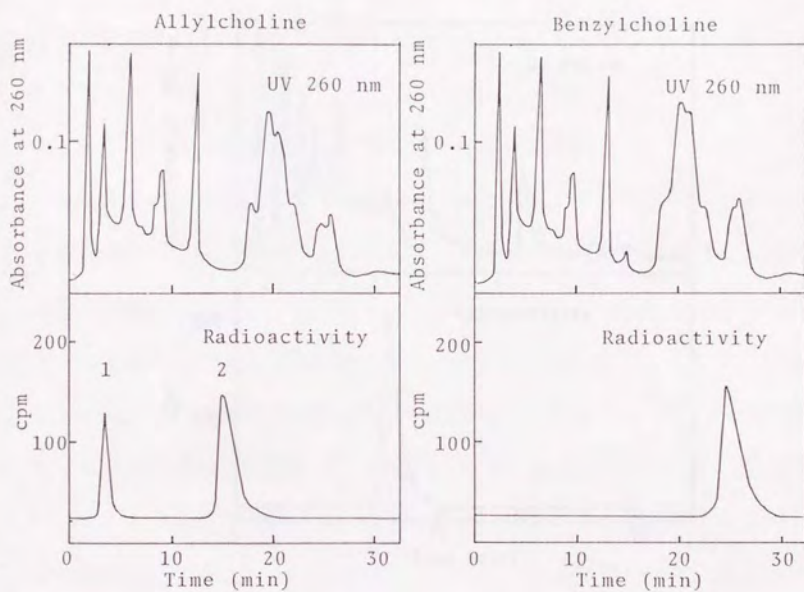


図 2-6 陽イオン交換HPLCを用いたアリルコリンとベンジルコリン水溶性代謝産物の解析。上のチャートが260nmの吸収を示し、下のチャートが放射能活性を示す。アリルコリンを解析したチャート中の番号は、それぞれ1. ホスホリルアリルコリン、2. アリルコリンを示す。

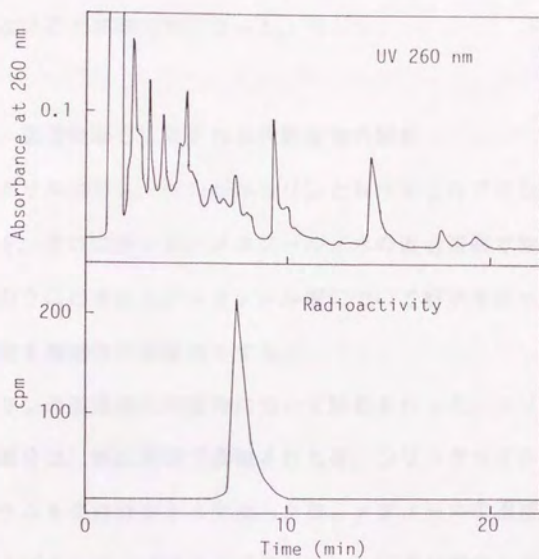


図 2-7 陽イオン交換HPLCを用いたN-アシルグリシン水溶性代謝産物の解析。上のチャートが260 nmの吸収を示し、下のチャートが放射能活性を示す。

ンはただ一つだけであった（図2-7）。このピークは、N-アリルグリシンの標準サンプルとリテンションタイムが一致しており、 $^1\text{H-NMR}$ 解析によってもN-アリルグリシンであることが確認された。この結果は、N-アリルグリシンはベンジルコリンと同じく、水溶性を示すような代謝産物を生じないことが明らかになった。

2-2-4 脂溶性画分に含まれる代謝産物の解析

コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンを取り込ませた小麦を、クロロホルム/メタノール/水の混合溶媒で抽出した後、この抽出物のクロロホルム/メタノール層について解析を行った。以下、この代謝産物を脂溶性代謝産物とする。

まず、コリンの脂溶性代謝産物について解析を行った。コリンの代謝産物の脂溶性画分は、減圧蒸留で濃縮された後、シリカゲルゲルカラムで分析した。カラムをクロロホルムで洗った後、メタノールの濃度を20%ずつ段階的に上げるステップワイズグラジエントにより溶出した。その結果、放射能活性はメタノール100%の溶出フラクションに回収された。この放射活性を有するフラクションを濃縮し、次の段階の順相HPLCにより解析を行った。DIO Lカラムを用いた順相HPLC解析の結果、一つのフラクションにだけ放射能活性が認められた（図2-8）。この物質の構造を解析するため、一般的なコリンの代謝から予想される各種標品とのリテンションタイムの比較実験を行ったところ、この物質は標品のホスファチジルコリンとリテンションタイムが一致した。さらに、分取、精製されたこの化合物に対する ^1H 、 $^{13}\text{C-NMR}$ のスペクトルは、標品のホスファ

チジルコリンのスペクトルと一致した。この結果から、コリン代謝産物の脂溶性画分に見いだされた物質はホスファチジルコリンであると同定された。

アリルコリン代謝産物の脂溶性画分に対しても同様な解析を行った。アリルコリンの脂溶性画分も最初のシリカゲルカラムにかけ、ステップワイズグラジエントによる溶出を行ったところ、コリンと同じようにメタノール100%のフラクションにだけ放射能活性が認められた。このフラクションをD10Lカラムを用いた順相HPLCで解析を行った結果、やはり一つのフラクションにだけ放射能活性が回収された。このピークは標品のホスファチジルコリンとリテンションタイムが一致せず、リテンションタイムの比較からはこの化合物の構造を同定することが出来なかった。しかし、カラムでの挙動やそのほかの物性からホスファチジルコリン類似物質であると推定し、各種機器分析による解析を行った。まず、この物質の¹H-NMRスペクトル解析において、ホスファチジルコリンと非常に良く似たスペクトルを示した。さらに、このスペクトルからアリル基の存在も示唆され、この物質はホスファチジルアリルコリンであることが推定された。この構造を確認するため、この物質をアルカリ加水分解し、得られた放射能活性を有する水溶性画分についてNMR解析を行ったところ、アリルコリンが検出され、やはりアリルコリンの脂溶性代謝産物はホスファチジルアリルコリンであると決定した(図2-9)。

ベンジルコリンの場合は、脂溶性画分からは放射活性が認められず、これら化合物の代謝産物の中には脂溶性物質は存在しないことが明らかになった。さらに、脂溶性分画を順相HPLCで解析した結果、コリンやアリ

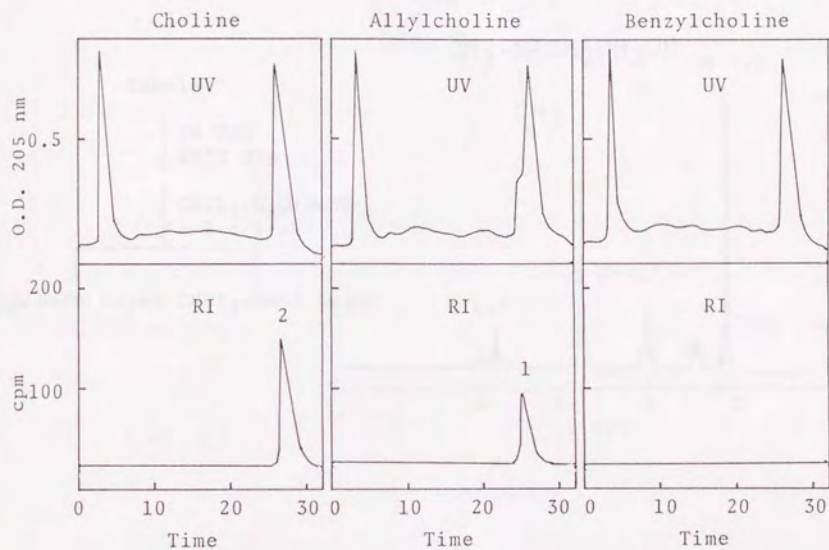


図 2-8 順相HPLCによるコリン、アリルコリン、ベンジルコリン脂溶性代謝産物の解析。上のチャートが205nmの吸収を示し、下のチャートが放射能活性を示す。下のチャート中の番号は、それぞれ、1. ホスファチジルアリルコリン、2. ホスファチジルコリンを示す。

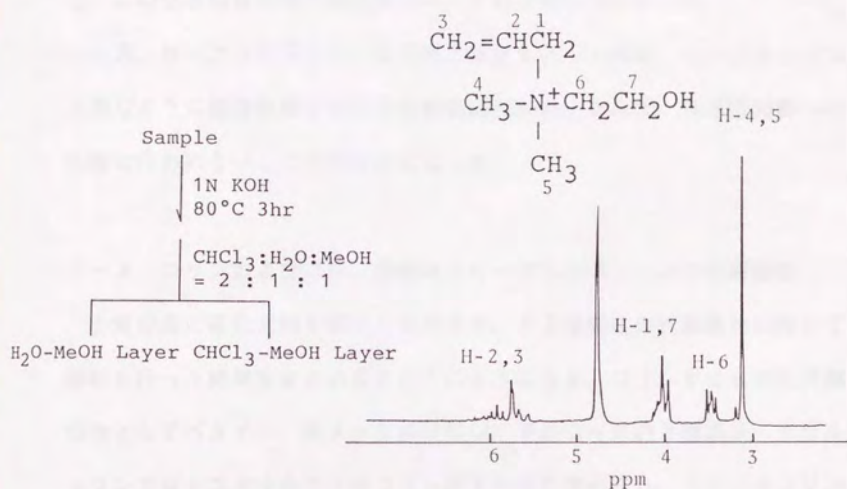


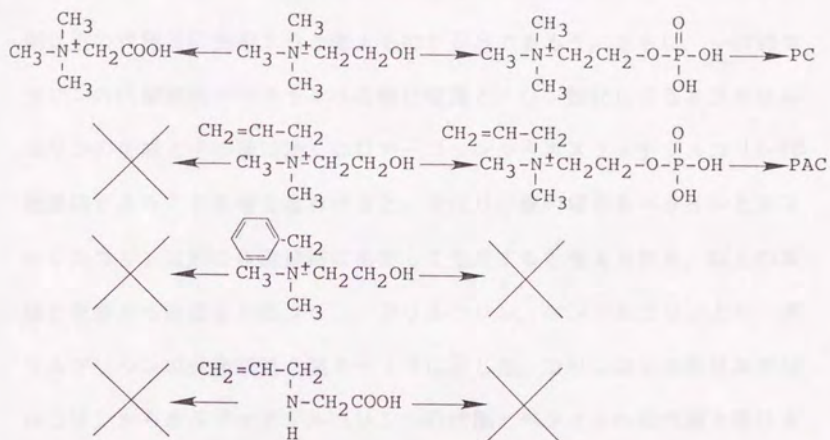
図 2-9 アリルコリン脂溶性代謝産物の加水分解と放射活性を有するその分解物の¹H-NMRスペクトル。アリルコリン代謝産物をアルカリ加水分解した後、放射活性を有する水溶性物質を測定した。

ルコリンで認められたようなホスファチジルコリン分画の放射化は認められず、やはりベンジルコリンコリンは溶性物質に代謝されないことが明らかになった（図2-8）。この結果と水溶性画分での解析と考え合わせると、この化合物は何等代謝を受けないことが明らかになった。

一方、N-アリルグリシンも同様に解析を行った結果、ベンジルコリンと同じように脂溶性画分からは放射能活性が検出されず、脂溶性物質への代謝は行われないことが明らかになった。

2-3 コリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンの代謝経路

小麦幼苗に各化合物を根から吸収させ、72時間後の代謝産物に対して解析を行った結果をまとめると以下のようになる。コリンでは水溶性代謝産物としてベタイン、ホスホリルコリン、グルコースの3種類が、アリルコリンではホスホリルアリルコリンがそれぞれ検出され、ベンジルコリンコリンとN-アリルグリシンでは放射活性を有する化合物は検出されなかった。さらに、脂溶性画分の解析によってコリン代謝産物としてホスファチジルコリンが、アリルコリンの代謝産物としてホスファチジルアリルコリンがともに検出され、ベンジルコリンとN-アリルグリシンでは代謝産物が検出されなかった。代謝経路を決定するにあたりアリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンでは問題がないが、コリンの場合は少々考察を要する。グルコースは前述のように、コリンが完全分解され CO_2 になったものを、植物体が光合成により再固定することにより生じたものであるから代謝経路の考察からは除外される。ホスホリルコリンとベタインの相互関係はこの実験からは明らかではないが、代謝産物の時間ごとの相



PC : Phosphatidylcholine

PAC : Phosphatidylallylcholine

図 2-10 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンの小表における代謝経路。図中の×は代謝反応が起こらないことを意味する。

対比（図 2-5）を見ると、代謝の初期にホスホリルコリンが選択的に生成し、その後ベタインが生成されてくることが分かる。コリンが一度リン酸化されて、その後リン酸がはずれベタインに酸化される経路は生理学的に考え難く、ベタインへの代謝とリン酸化によるホスホリルコリンへの代謝は別の代謝系に由来すると考えるのが妥当であろう。さらに、一般的なコリンの代謝経路がベタインへの酸化経路と、リン酸化によるホスホリルコリンの生成とその後に続く CDP-コリンからホスファチジルコリン代謝経路があることを考え合わせると、やはり小麦の場合もベタインとホスホリルコリンは別の代謝経路に由来して生成すると考えられる。以上の実験と考察から決定されたコリン、アリルコリン、ベンジルコリンと N-アリルグリシンの代謝経路を図 2-10 に示した。コリンはホスホリルアリルコリンからホスファチジルコリンへの代謝とベタインへの代謝を受けることが明らかになった。アリルコリンはホスホリルアリルコリンからホスファチジルアリルコリンへの代謝だけを受け、ベタインへの代謝は受けないことが明らかになった。一方、ベタインと N-アリルグリシンは植物体に取り込まれはするものの、何等代謝を受けずそのままの形で蓄積することが明らかになった。コリン、アリルコリンとベンジルコリンの示す光合成促進活性の作用機作がすべて同じであるならば、これらの代謝産物が活性を有しているのではなく、コリンおよびコリン類縁体そのものが活性を有しているということを示唆している。一方、N-アリルグリシンは何等代謝を受けないことから、やはり代謝産物ではなくそのものが光合成促進活性を示していると思われる。

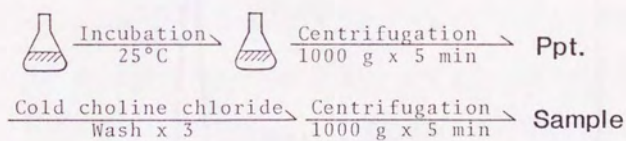
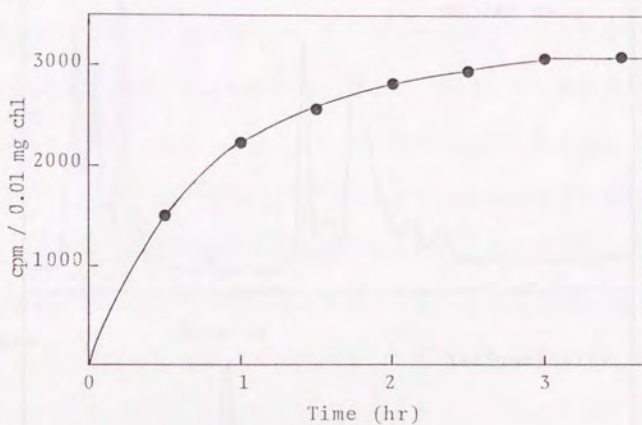


図 2-11 *Chlamydomonas reinhardtii* におけるコリンの取り込み。プロトプラストの濃度は、 0.1 mg Chl/ml である。

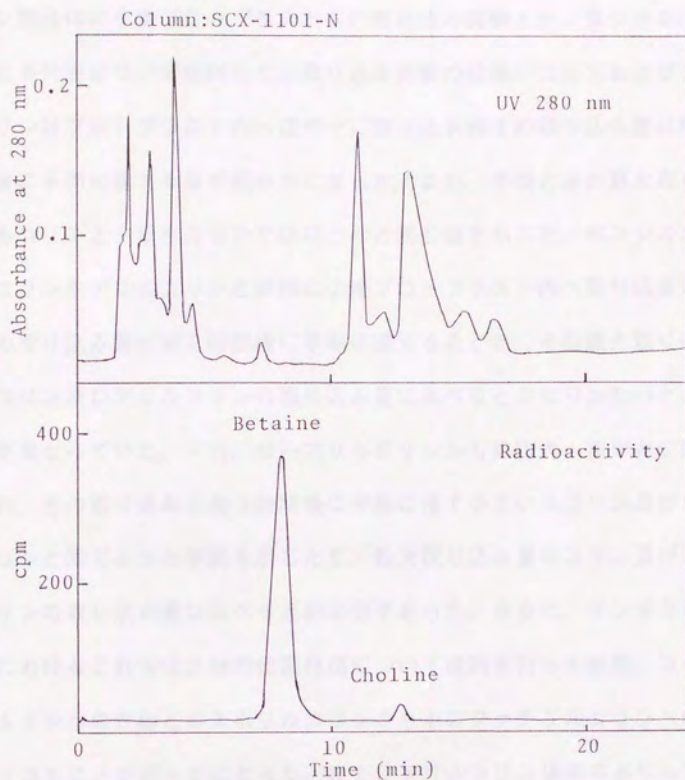


図 2-12 陽イオン交換 HPLC を用いたコリン水溶性代謝産物の解析。
 上のチャートが 280 nm の吸収を示し、下のチャートが放射能活性を示す。

2-4 まとめ及び考察

光合成促進活性の認められたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の小麦プロトプラストへの取り込み実験とインタクトな小麦における代謝について検討した。取り込み実験の結果、コリンおよびアリルコリンはプロトプラスト内へ速やかに取り込まれその取り込み量は約三時間後に平衡に達する事が明らかになった。また、そのときの最大取り込み量もコリンとアリルコリンではほとんど同じ値を示した。ベンジルコリンもコリンやアリルコリンと同様に小麦プロトプラスト内へ取り込まれるが、その取り込み量が約2時間後に平衡に達することと、その最大取り込み量がコリン及びアリルコリンの取り込み量に比べるとかなり少ないということが異なっていた。一方、N-アリルグリシンも細胞内へ速やかに取り込まれ、その取り込みも約3時間後に平衡に達するというコリン及びアリルコリンと同じような挙動を示したが、最大取り込み量はコリン及びアリルコリンの取り込み量に比べると約半分であった。さらに、インタクトな小麦におけるこれら化合物の代謝経路について検討を行った結果、コリンはベタインへの代謝とホスホリルコリンからホスファチジルコリンへの代謝をうけることが明らかになった。また、アリルコリンはホスホリルアリルコリンからホスファチジルアリルコリンへの代謝だけをうけ、ベタインへの代謝は受けないことが明らかとなり、ベンジルコリンとN-アリルグリシンはなんら代謝を受けないことが明らかとなった。コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の代謝を議論するとき、微生物の影響を考察する必要がある。なぜならば、インタクトな小麦を用いた上記の代謝実験は無菌状態で行なっておらず、微生物による分解もあり得るからであ

る。そこで、対照実験として微生物による分解についても検討した。実験方法は、インタクトな小麦の根を切りとり各検定サンプルの入った水耕液に3時間つける。その後、この根を取り除き、代謝実験と同じ条件で微生物を繁殖させ72時間後の代謝産物を分析した。実験の結果、微生物によって分解された $^{14}\text{C O}_2$ は検出されるものの、小麦でみとめられたような代謝産物は一つも検出されなかった。このことは、小麦でみとめられた各代謝産物は微生物由来のものでなく、小麦体内で代謝された結果生じたものであることが確認された。

ベタインは植物が高塩濃度にさらされたとき、細胞の浸透圧調節のため体内に蓄積されることが知られている。赤沢⁶³⁾らは、このように細胞内に蓄積されたベタインが好塩細菌のRuBpCase/Oxse (Rubisco)の活性を高めているという報告をしている。高等植物でもコリンが酸化されてベタインになることにより光合成促進活性を示している可能性があるが、プロトプラストへの短時間の打ち込み実験で活性が確認できること、さらにコリン以外ではベタイン類への酸化はおきないことなどを考え合わせると、このような可能性は少ないものと考えられる。ベタインは、高等植物では葉緑体でコリンから合成されることが知られており⁶²⁾、さらにこのコリンの酸化には光が関与していることも知られている。実際、光合成の電子伝達系の阻害剤であるDCMUやdiaminodurene等を葉緑体に投与し光合成電子伝達系を阻害すると、コリンの酸化が阻害されるということが知られており、コリンの酸化が光合成、とくに光合成明反応の光化学系I、IIと密接な関係を持つことが示唆されている^{62) 64)}。このことは、コリンが植物内へ取り込まれベタインに変換される過程が、コリンの示す

光合成促進活性に関係する可能性を示唆する。しかし、コリン類縁体であるアリルコリンやベンジルコリンではベタインへの変換が認められないので、コリン類縁体での光合成促進活性の作用機作が全て同じであるならば、上述の可能性は否定される。コリンの酸化と関連して、これら化合物の示す光合成促進活性に対するもう一つの議論が出来る。コリンがベタインに酸化されるとき酸素を消費する。コリンよりアリルコリン、ベンジルコリンやN-アリルグリシンの方がより大きな光合成促進活性を示す理由として、コリンがベタインに酸化されるとき酸素を消費するので、その結果光合成由来の酸素放出速度がコリンでは見かけ上低く抑えられているのではないかという可能性に対する議論である。そこで、この酸素の消費量について測定し、果たしてコリンがベタインに変換されるさいに消費される酸素の量が光合成の酸素放出速度に影響を与えうるかどうかを測定した。測定の結果、この酸素の消費量は非常に少なく、コリン及びコリン類縁体の示す光合成由来の酸素放出速度には影響しないことが明らかになった。

光合成促進活性と取り込みや代謝の活性の相関性を議論するにあたり、他の植物体での代謝や光合成促進活性を調べることは有益であると思われる。そこで、緑藻類の*Chlamydomonas reinhardtii*をもちいて、これら化合物が細胞の生育や光合成に与える影響と体内への取り込みやその代謝について調べた。近年、コリンと同じ様に高等植物で生育促進活性が報告されているトリアコンタノール (Triaccontanol)^{65) 66)} が*Chlamydomonas reinhardtii*の生育と光合成、特に光合成のK_ey酵素であるR_uB_pC_as_e/O_xs_eの活性を促進すると報告されている^{67) 68) 69)}。そこで先ず、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が*Chlamydomona*

*s. reinhardtii*の生育と光合成に与える影響を調べた。その結果、これらの化合物は生育には影響を与えておらず光合成にも影響を与えていないことが明らかになった。このことは、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体はトリアコンタノールとは生育促進活性の作用機作が異なる可能性を示唆する。また、図2-11には小麦プロトプラストでおこなった取り込み実験と同様にして測定した*Chlamydomonas reinhardtii*でのコリンの取り込み結果を示した。この図が示すように、コリンは*Chlamydomonas reinhardtii*でも、小麦プロトプラストとほとんど同じ取り込みパターンを示した。さらに、コリン類縁体の代謝産物について調べた結果、検定に用いた化合物のほとんどが代謝されないが、唯一コリンだけがベタインに代謝されることが明らかになった(図2-12)。なぜ、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が*Chlamydomonas reinhardtii*では光合成促進活性と生育促進活性を示さないのかは明らかではないが、このような代謝経路の違いが関係する可能性も考えられる。

最近、ホスファチジルコリンによって細胞の膜ATPase活性が上昇することが見いだされた⁷²⁾。このことは、コリンを投与することにより細胞内ホスファチジルコリンの濃度が上昇し、光合成電子伝達系に密接に関わるATPaseの一種のCF₁を活性化することにより光合成が促進されている可能性を示唆する。さらに、葉緑体のホスファチジルコリンをリパーゼで消化すると光合成電子伝達系が阻害されることが報告されており、ホスファチジルコリンと光合成が密接に関係していることも明らかになっている^{71) 72) 73)}。

このように、コリンおよびコリン類縁体とN-アシルグリシンの細胞内

取り込みの挙動とその代謝が明らかになり、これら化合物の有する光合成促進活性の作用機作を解明するための重要なデータが与えられた。しかし、その作用機作に関しては未だ議論の域を脱せず、この問題を解決するためには他の方法を検討することが必要である。

第三章

コリン類縁体およびN-置換グリシン類縁体と植物ホルモンとの相互作用

第三章

コリン類縁体およびN-置換グリシン 類縁体と植物ホルモンとの相互作用

第三章 コリン類縁体およびN-置換グリシン類縁体と

植物ホルモンとの相互作用

これまで述べたように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のいくつかが小麦プロトプラストの光合成を促進することが明らかになった。さらに、これら化合物の小麦プロトプラスト内への取り込みと代謝経路を明らかにし、これら化合物の代謝産物が光合成促進活性を示しているのではなくこれら化合物自身が活性を示しているということも明らかにし、これら化合物が有する光合成促進活性の作用機作について種々の論議が出来るようになった。一方、光合成促進活性の認められたコリンはインタクトな植物体に対してもいろいろな生物活性を有することが知られている。その一例として、甘藷の肥大効果、各種植物の生育促進効果、発根促進効果、根の成長促進効果や果実の脱落防止効果等が上げられる。このうち、コリンの有する発根促進や根の生育促進、さらには果実の脱落防止効果は光合成促進効果と直接関係しているとは考え難く、それよりも植物ホルモンの活性に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が植物ホルモン活性にどのような影響を与えているか検討する必要がある。この章では代表的な光合成促進物質と各種植物ホルモンとの相互作用について述べる。

3-1 ジベレリンとの相互作用

植物病原菌 *Gibberella fujikuroi* の代謝産物として単離されたジベレリンは植物の伸長効果をはじめ、発芽促進、単為結実促進、加水分解酵素の賦活化、開花促進など広範な生理活性を有する。コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の各種植物ホルモンの相互作用を検討するに当たり、まず、ジベレリンの活性に与える効果を検定した。一般に、ジベレリンの検定を行なうに当たっては、各種検定系でジベレリンに対する感度の差があること、ジベレリンが高活性を示すための構造的特徴はそれぞれの検定系で異なることなどを念頭にいれ充分検討する必要がある。とくに、ジベレリンと他の化合物の相互作用を検討しようとした場合、その感度とともに検定誤差の少ないことがその検定系に要求される。著者は、矮性トウモロコシを用いた検定法⁷⁴⁾や矮性イネの短銀坊主を用いた検定法を検討して、取扱やすく比較的アッセイ期間の短い短銀坊主を用いることにした。短銀坊主を用いる検定としては点滴法⁷⁵⁾と浸漬法⁷⁶⁾がよく知られており、特に浸漬法は操作が簡単で検定サンプルが多い時には有効である。事実、この検定法を用いてジベレリン共力物質である(一)ーベスタロチンが単離、同定されている⁷⁷⁾。そこで、まず短銀坊主を用いた浸漬法によりコリンのジベレリン活性に与える影響を調べた。その結果、コリン単独ではジベレリン様活性は示さないが、コリンが存在することによりジベレリンの活性を強める傾向が認められた。しかし、浸漬法では測定誤差が比較的大きいため、その効果を確認することはできなかった。測定誤差が比較的小さい点滴法を用いてさらに検討を行なった。検定サンプル

は根から吸収させ、ジベレリンは50%アセトン溶液とした後、地上部に点滴した。ジベレリンはGA₃を用いた。

まず、コリンについて短銀坊主の第二葉鞘の伸長に与える影響を調べた。図3-1で示すように、コリンだけを短銀坊主に処理した場合、1-100 mg/lの濃度範囲でジベレリンが示すような伸長促進活性を示さず、1000 mg/lの濃度では逆に伸長阻害活性を示した。しかし、1 mg/l、10 mg/lの濃度のGA₃とコリンを同時に処理した結果、コリンの濃度1-100 mg/lでジベレリンの活性を若干促進することが確かめられた。しかし、この促進作用もコリンが1000 mg/lの濃度では逆に阻害作用に転じた。エチルコリンについても同様な実験を行なったところ、コリンと同じようにエチルコリン単独(1-100 mg/l)では短銀坊主の第二葉鞘の伸長にはなんら影響を与えず、1000 mg/lの濃度では阻害作用を示すことが明らかとなった。しかし、ジベレリンと同時に処理することによってジベレリンの有する伸長促進活性を強める効果が認められた。興味深いことに、エチルコリンの示すジベレリンに対する共力作用は、コリンが示す作用に比べ強いものであった(図3-2)。アリルコリンについても同様な検討を行なった。その結果、コリンやエチルコリンと同じようにアリルコリン単独では伸長促進活性を示さないが、ジベレリンと同時に投与するとジベレリンの作用を強める作用が認められた(図3-3)。アリルコリンによるこの活性はエチルコリンと同じ程度のものであったが、コリンやエチルコリン異なって、共力活性を示す濃度は10 mg/lまでであり、アリルコリン100 mg/l処理では共力作用は失われ、逆に伸長阻害作用を示すことも同時に明らかになった。

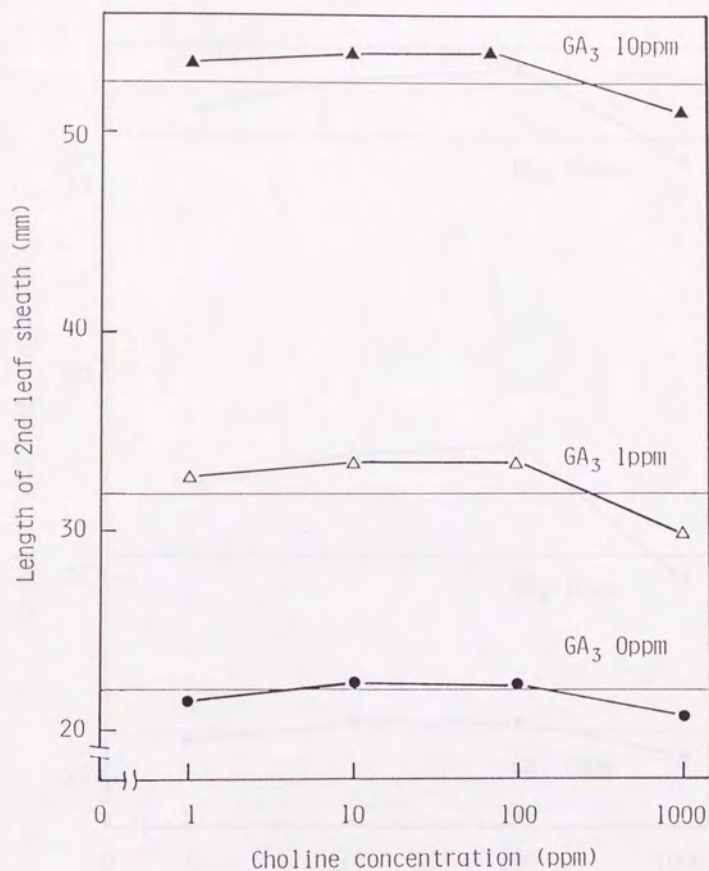


図 3-1 矮性イネ短銀坊主の第 2 幼鞘の伸長に与えるコリンの効果。下から、コリン単独投与、GA₃ 1ppm 同時投与、GA₃ 10ppm 同時投与時の第 2 幼鞘の伸長。

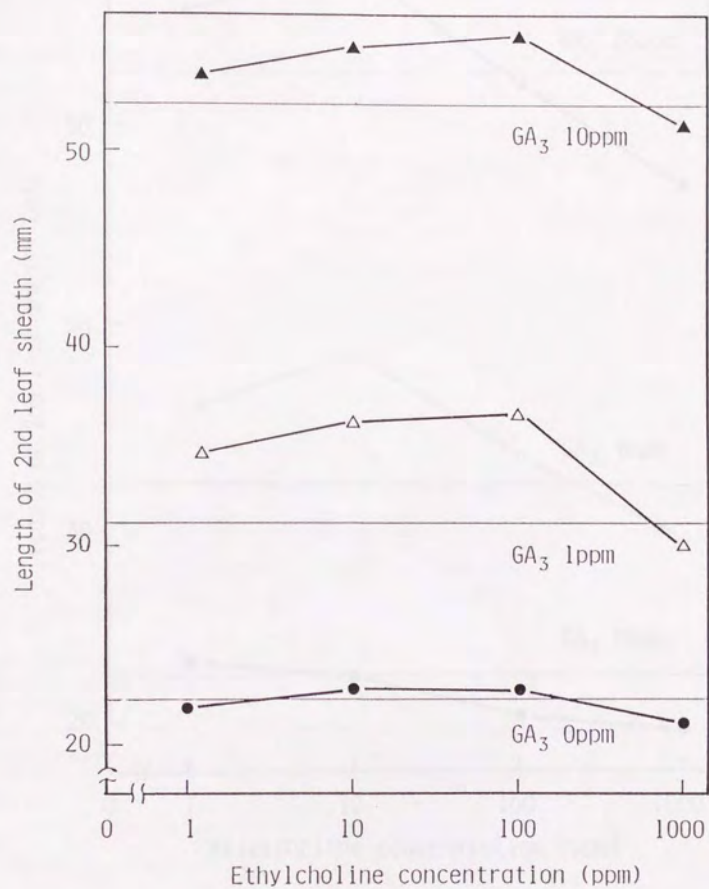


図3-2 矮性イネ短銀坊主の第2幼鞘の伸長に与えるエチルコリンの効果。下から、コリン単独投与、GA₃ 1ppm同時投与、GA₃ 10ppm同時投与時の第2幼鞘の伸長。

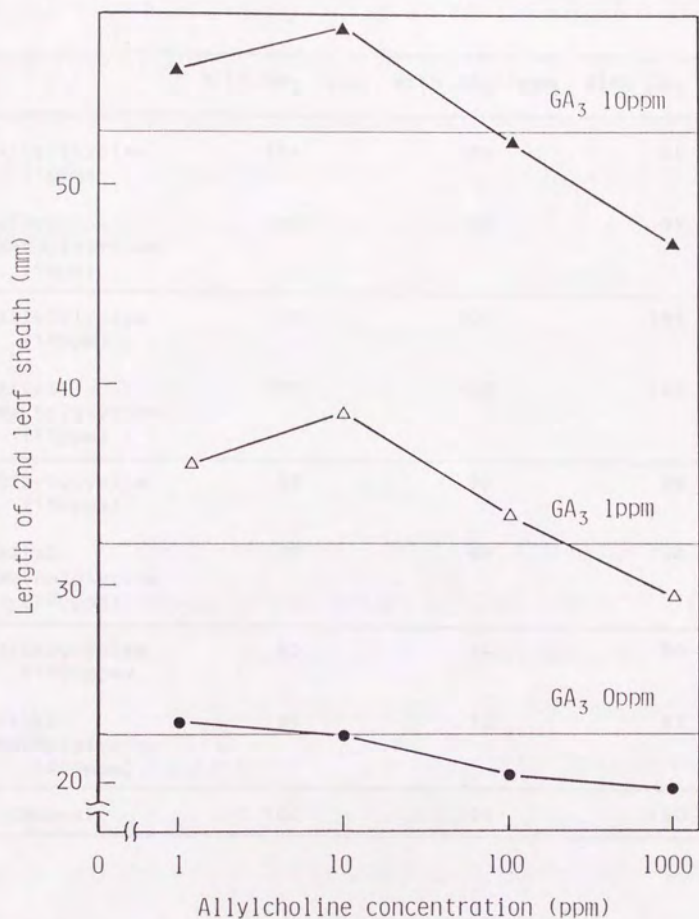


図 3-3 矮性イネ短銀坊主の第 2 幼鞘の伸長に与えるアリルコリンの効果。下から、コリン単独投与、GA₃ 1 ppm 同時投与、GA₃ 10 ppm 同時投与時の第 2 幼鞘の伸長。

	With GA ₃ 0ppm	With GA ₃ 1ppm	With GA ₃ 10ppm
N-Allylglycine (1ppm)	101	100	98
N-Allyl- N-Methylglycine (1ppm)	100	99	99
N-Allylglycine (10ppm)	98	100	101
N-Allyl- N-Methylglycine (10ppm)	101	102	100
N-Allylglycine (100ppm)	98	99	98
N-Allyl- N-Methylglycine (100ppm)	97	99	98
N-Allylglycine (1000ppm)	85	90	80
N-Allyl- N-Methylglycine (1000ppm)	80	78	82
Control	100	100	100

表 3-1 矮性イネ短銀坊主の第2幼鞘の伸長に与えるN-アリルグリシンとN-アリル-N-メチルグリシンの効果。表中のデータはそれぞれのコントロールの示す伸長を100としてそれとの相対比で示した。

一方、もう一つの光合成促進物質であるN-置換グリシン類縁体のいくつかについてもこのような作用が認められるかどうか検討してみた。N-置換グリシン類縁体としてはN-アリルグリシン、N-アリル-N-メチルグリシンを用いた。検定の結果表3-1で示すように、これら化合物は、単独投与でジベレリン様活性を示さず、さらに、コリンおよびコリン類縁体で認められたようなジベレリンとの同時投与によるジベレリン活性の促進も認められなかった。この結果、ジベレリンとの共力活性を有するのはコリン類縁体だけであり、コリン類縁体の中でもエチルコリンとアリルコリンがその活性が強いことが明らかになった。

3-2 サイトカイニンとの相互作用

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の植物ホルモン活性に与える影響を調べるため、次にサイトカイニンの活性に与える影響を調べた。サイトカイニンは植物において、細胞分裂誘起、葉切片、子葉の生長拡大、葉の老化防止等の幅広い生理活性を有する化合物群の総称である。これまで構築されたサイトカイニンの検定法は、これら化合物が非常に幅広い生物活性を示すということと相俟ってたくさんの方が知られている。ここでは、サイトカイニンの検定法としてタバコカルスを用いた細胞生育検定⁷⁸⁾⁷⁹⁾⁸⁰⁾、ダイコン葉の老化阻止検定⁸¹⁾、キュウリ子葉の生長拡大検定⁸²⁾⁸³⁾を用いることとした。まず、タバコカルスを用いた細胞生育検定を行なった。検定濃度は各サンプルとも $1-100\text{ mg/l}$ とし植物ホルモンはナフタレン酢酸 2 mg/l を加え、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のサイトカイニンに与える影響を検定する場合は、さら

	With BA 0ppm	With BA 0.1ppm
Choline (1ppm)	98	100
Ethylcholine (1ppm)	100	95
Allylcholine (1ppm)	97	98
N-Allylglycine (1ppm)	101	102
Choline (10ppm)	102	95
Ethylcholine (10ppm)	97	96
Allylcholine (10ppm)	92	98
N-Allylglycine (10ppm)	100	99
Choline (100ppm)	100	94
Ethylcholine (100ppm)	92	93
Allylcholine (100ppm)	94	98
N-Allylglycine (100ppm)	99	95
Control	100	100

表 3-2 コリン、エチルコリン、アリルコリンと N-アリルグリシンがタバコカサの生長に与える影響。検定期間は 4 週間とし、表中のデータはそれぞれのコントロールを 100 として、それとの相対比で示した。

にベンジルアデニンを0. 2 mg / l 加えた。検定期間は一ヶ月とした。検定の結果、表3-2で示すようにコリン、エチルコリン、アリルコリンとN-アリルグリシンの1-100 mg / l 処理において、タバコカサの生育促進効果が認められなかった。さらに、ベンジルアデニンとの同時投与においてもベンジルアデニンの活性になんの影響も与えなかった。

次に、キュウリ子葉の生長に与える影響を検討してみた。投与サンプルの濃度や種類は上記の実験と同様である。その結果、これも検定したすべての化合物で単独投与によるサイトカニン活性もサイトカニンとの同時投与による相加作用も示さないことが明らかになった(表3-2)。

さらに、ダイコン葉のクロロフィル退色検定においてもコリン、エチルコリン、アリルコリン、とN-アリルグリシンは何等影響を与えないことが分かった。しかし、コリン類縁体であるベンジルコリンは単独投与の1-10 mg / l において弱いながらサイトカニン様活性が認められた。しかし、この活性はベンジルアデニンとの同時投与では観測できなくなり、この活性が内生のベンジルアデニンの活性を強めるために起こるのではなく、ベンジルコリンが本来有する活性であることが示唆された。

3-3 オーキシンとの相互作用

オーキシンは植物ホルモンの中でも最初に発見されたホルモンであり、茎や幼葉鞘の伸長生長を引き起こす作用や、様々な生理現象に関与した作用を有することが知られている。コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のオーキシン様活性の有無と各種オーキシンとのインタラクションを調べるため、アベナを用いた検定を行なうこととした。アベナを

用いた検定法には古典的なアベナ屈曲法(Avena curvature test)⁸⁴⁾やアベナ子葉鞘伸長検定法(Avena straight growth test)⁸⁵⁾をはじめとする多数の方法があるが、操作が比較的簡単で感度もよいアベナ子葉鞘伸長検定法を用いることにした。まずコリンについて検定を行なったところ、図3-4で示すように、コリン1-100 mg/lの単独投与でアベナ子葉鞘の伸長に対して何の影響も与えないことが分かった。さらに、コリンの1000 mg/l処理においてはアベナの伸長を抑制することも同時に分かった。また、コリンとインドール酢酸を同時に投与した結果、インドール酢酸0.1 mg/l、1 mg/lの両方ともコリンによる共力作用は認められず、逆にコリン1000 mg/lの同時処理においてインドール酢酸の活性は阻害された。また、エチルコリンとアリルコリンに対しても同様な実験を行なった結果、コリンと同様に単独処理では伸長活性が認められず高濃度で阻害が現われることが分かった。さらに、インドール酢酸との同時投与においてもインドール酢酸活性を強めることはなく、やはり高濃度で活性を阻害した。この活性の阻害はエチルコリンとアリルコリンでは異なる濃度を示した。即ち、エチルコリンコリンで阻害活性が認められるのは1000 mg/lであるが、アリルコリンはその10倍薄い100 mg/lですでに阻害が認められる。この阻害の濃度は、ジベレリン検定の時に現われた阻害濃度とコリン、エチルコリン、アリルコリンともに同じであった。一方、N-置換グリシン類縁体のうちで代表的化合物のN-アリルグリシンも同様な検討を行なったところ、単独投与でも同時投与でもアベナの伸長には影響を与えないことが明らかになった。

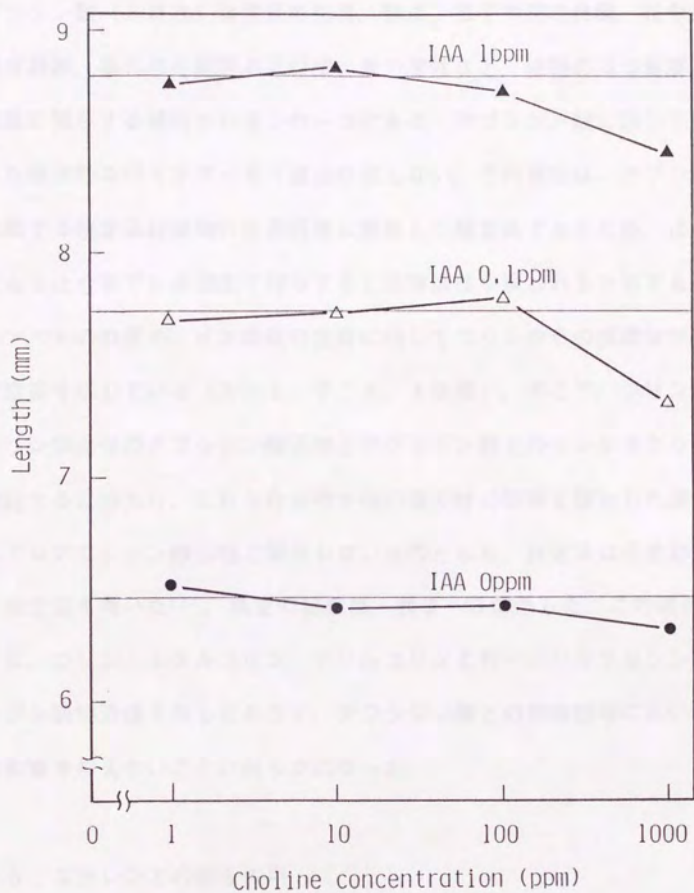


図 3-4 アベナ子幼鞘の伸長に与えるコリンの効果。下から、コリン単独投与、インドール酢酸 0.1 ppm 同時投与、インドール酢酸 1 ppm 同時投与時の子幼鞘の伸長。

3-4 アブシジン酸との相互作用

アブシジン酸 (ABA) は果実の生育、熟成、種子や芽の休眠、花や果実の器官脱離、葉の気孔開閉および根の重力屈性など、植物の持つ重要な生理現象に関与する植物ホルモンの一つである。アブシジン酸に対して確立された標準的なバイオアッセイ法は存在しない。その理由は、アブシジン酸に関する検定法は植物の生長阻害に着目した検定法であるため、ほとんどどんな化合物でも高濃度で投与すると阻害活性が現われるためである。実際、アベナの伸長や、イネ幼苗の生育に対してコリンやその類縁体が高濃度で阻害を示している (3-1、2、3、4 参照)。そこで、コリンおよびコリン類縁体のアブシジン酸活性とアブシジン酸とのインタラクションを検討するに当たり、これら化合物が他の検定時に阻害を現わした濃度に関してはアブシジン酸活性と関係しないものとした。検定法は小麦幼葉鞘切片検定法を用いた⁸⁶⁾。検定の結果は、表 3-3 に示した。この図が示すように、コリン、エチルコリン、アリルコリンと N-アリルグリシンはアブシジン酸様活性を有しておらず、アブシジン酸との同時投与においても何等影響を与えないことが明らかになった。

3-5 エチレンとの相互作用

エチレンは、ほとんどすべての植物組織で生成され、果実の熟成促進、黄化エンドウ幼植物の三重反応 (茎の水平方向への屈曲成長、伸長成長の制御と伸長帯の膨大成長) の誘起、葉柄の上偏成長の誘起等の広範な生理作用を示している。このように幅広い生理活性を有するエチレンであるが、これらの反応性を利用した検定法は現在全く利用されていない。そこで、

	ABA 0ppm	ABA 0.01ppm	ABA 0.1ppm	ABA 1ppm
Choline (1ppm)	101	100	102	98
Ethylcholine (1ppm)	99	98	100	101
Allylcholine (1ppm)	100	101	98	99
N-Allylglycine (1ppm)	103	98	95	97
Choline (10ppm)	102	99	99	98
Ethylcholine (10ppm)	103	100	102	100
Allylcholine (10ppm)	98	97	96	99
N-Allylglycine (10ppm)	100	99	101	97
Choline (100ppm)	94	98	100	102
Ethylcholine (100ppm)	92	93	100	99
Allylcholine (100ppm)	94	97	96	98
N-Allylglycine (100ppm)	99	100	98	102
Control	100	100	100	100

表 3-3 コリン、エチルコリン、アリルコリンと N-アリルグリシンが小麦幼葉鞘の伸長に与える影響。表中のデータはそれぞれのコントロールを 100 として、それとの相対比で示した。

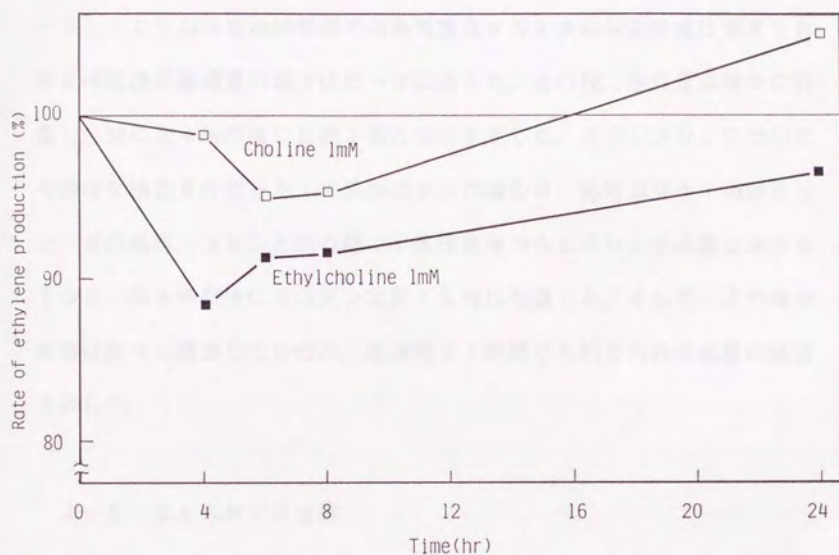


図 3-5 オーキシンで誘導されるエチレンの生成量に与えるコリンとエチルコリンの効果。エチレン量の相対比はコントロールの量を100%として算出した。

オーキシンで誘導されるエチレンの生成に与えるコリン、エチルコリンの影響について検討してみた。ヤエナリ下胚軸を切りとり、10 mMコリンとインドール酢酸を含んだ被検液中に浮かべ、一定時間ごとに放出されるエチレンの量をガスクロマトグラフィーで分析した⁸⁷⁾。検定の結果(図3-5)、コリン10 mM処理では処理直後からエチレンの生成は抑えられ、約6時間後に生成量の減少はピークに達した。その後、生成量は徐々に回復し、逆に24時間後には約1割の増加を示した。エチルコリンについても同様な検定を行なった。エチルコリンの場合は、処理濃度を1 mMとした。その結果、コリンと同じ様に、処理直後からエチレン生成量は減少してゆき、約4時間後にその減少は約15%にも達した。そして、この減少傾向は徐々に回復したものの、処理後24時間でも約5%の生成量の阻害を示した。

3-6 まとめおよび考察

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のいくつかについて、植物ホルモン活性と各種植物ホルモンとの相互作用について検討を行なった。まず、矮性のイネである短銀坊主の第二葉鞘の伸長に与える影響を調べた結果、コリン単独投与では伸長になんら影響を与えないが、GA₃との同時投与によりジベレリンの活性を強めることが明らかになった。さらに、エチルコリンとアリルコリンもコリンと同様、単独投与では影響を示さないが、GA₃との同時投与によりジベレリン活性の増強作用が認められた。しかしこの増強活性は、コリンとエチルコリンの1000 mg/l、アリルコリンの100 mg/l投与では、逆に阻害活性に転じた。一方、

N-アリルグリシンは単独投与でもG A₃との同時投与においてもなんの活性も示さず、同じ光合成促進検定で見つかったコリン類縁体とは異なる活性を示した。コリンとエチルコリンは、ヤエナリにおけるエチレン生成にも影響を与えた。コリン、エチルコリンともに処理後エチレンの生成量は抑えられるが、その後徐々に回復しコリンでは24時間後に逆にエチレンの生成量は増加していた。そのほかの植物ホルモン検定法では、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の単独投与でも、各種植物ホルモンとの同時投与でもなんの影響も認められなかった。しかし、ベンジルコリンだけがサイトカイニン検定により弱いサイトカイニン様活性が認められた。なぜベンジルコリンだけがサイトカイニン様活性を有するのだろうか。この問題に対して以下のような可能性が考えられる。その一つは、ベンジルコリンの有するサイトカイニン様活性は、サイトカイニンであるベンジルアデニン等との構造上の類似性により発現されているという考え方と、コリン類縁体はほとんど（またはすべて）本来的にサイトカイニン様活性を有するが、ベンジルコリンでは特にその活性が強くてこの検定で検出されたという考え方である。サイトカイニンを始めとする植物ホルモンの作用機作が完全に解明されていない現在、この問題を解決することは困難である。将来、植物の情報伝達機構が明らかになったとき、はじめてこの問題は解決するだろう。

これまでに、G A₃共力物質として(-)-Pestalotine⁷⁷⁾, Hydragenol⁸⁸⁾, Dihydroconiferyl alcohol⁸⁹⁾等が報告されているが、光合成促進活性を有するコリンおよびコリン類縁体がG A₃の活性を強めると言うことは、また興味深い現象である。この章の冒頭でも述べたように、コリンおよびコ

リン類縁体は直接光合成促進活性とは関係無いと思われる甘藷の肥大効果、各種植物の生育促進効果、発根促進効果、根の成長促進効果や果実の脱落防止効果等の活性を有する。特に、コリンによって引き起こされる発芽促進効果、伸長促進効果等は、コリンがジベレリンの活性を強める作用を有することを考え合わせると、この生物活性について合理的な説明が出来る。すなわち、ジベレリンはその作用として発芽促進、伸長促進活性を有しているので、コリンが植物の内生ジベレリンに作用し、その活性を強めることにより上記の生物活性を示しているということである。

コリンはエチレンの生成量にも影響を与えている。上記のように、コリンは果実の脱落防止や生花の老化防止効果があることが知られている。エチレンは植物の老化と密接な関係を持っており、コリンがエチレンの生成量に作用してこのような活性を示している可能性がある。

植物ホルモンの中で、サイトカイニン は植物の老化による光合成の低下を抑制することが知られている。コリン類縁体やN-置換グリシン類縁体の光合成促進活性の作用機作を考えると、これら化合物がサイトカイニン活性に影響を及ぼすことにより、光合成の低下を抑制することによって見かけ上光合成を促進している可能性は否定できない。しかし、ベンジルコリンを除いてサイトカイニン活性に対し影響を及ぼしていないことから、この可能性は少ないものとする。

このように、コリンおよびコリン類縁体が植物ホルモン活性に影響を与えていることが明らかになった。もちろん、植物における生理作用は、各種植物ホルモンが総合的に作用した結果であり、ある特定の植物ホルモンだけで複雑な植物の生理作用を説明することは出来ない。しかし、コリン

およびコリン類縁体が各種植物ホルモンの活性に影響を及ぼしていることから、この植物ホルモンに対する作用がコリン類縁体の示す多様な生理活性の一因になっていることは間違いないであろう。

第四編

コリン類縁体およびN-置換 グリシン類縁体が光合成栄養細胞に 与える影響