

氏 名 (本籍)	あさ 浅	かわ 川	ゆき 征	お 男 (長野県)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	博	第 8 6	号
学位授与年月日	昭和 4 6 年 3 月 2 5 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻			
学位論文題目	矮性つるなしいんげんにおける外部から 与えたジベレリンA ³ の代謝生産物につ いて			
論文審査委員	(主 査)	教授 玉利勤治郎	教授 藤原彰夫	
			教授 山下恭平	
			助教授 尾田義治	

論 文 内 容 要 旨

ジベレリンの生理作用に関しては、豊富な研究報告がなされ、多くのことが明らかにされているが、作用機構および“Primary Site of Action”に関してはほとんど理解されていない。植物体内にとり込まれたジベレリン (Gibb) が、どの器官に局在し、細胞内のどの部分に存在するか、^{として特に} 又どんな物質に変化するかが本研究の目的である。GAs に感受性の高い矮性つるなしいんげんの苗を実験植物とし、Wilzbach法によりラベルされた³H-GAs を用いて本実験を行った。

I 植物体内にとり込まれた³H-GAs に由来する³H の分布

i) 植物器官における分布

木綿糸法により³H-GAs を莖から強制的にとり込ませた植物体について生長の盛んな先端、初生葉+莖、根の各器官に分け、経時的に放射能の分布を調べた。結果はTable 1 に示す。

Table 1

Total and Unit Weight of RI Activities in Plant
Organ

	Days after Treatment of GA							
	2		4		6		8	
	Total	Unit%	T	U	T	U	T	U
Upper Part	22.0	21.8	21.1	12.6	19.4	9.2	13.9	7.0
Leaf and Stem	77.3	76.8	78.3	86.0	79.9	89.2	85.6	92.0
Root	0.7	1.4	0.6	1.4	0.7	1.6	0.5	1.0

木綿糸法の場合、 $^3\text{H-GA}_3$ の吸収は 24 時間で完了しており、処理後 24 時間目の植物体の重量比と放射能活性の比がほぼ等しく、経時的に明確な変化が観察されなかつた。 Gibb を極少量与えた場合には、分裂生長の盛んな幼組織に集ることが知られているが、大量に与えた場合には、植物体の地上部に限なく分布し、各器官の間の相互移行、特に葉および莖に含まれる放射能活性物質の生長部への移行は行われていないようである。このことは GA_3 処理数日後に生えてくる本葉が Chlorosis していないことから支持される。

ii) 植物細胞内における $^3\text{H-GA}_3$ に由来する ^3H の分布

近年迄 Gibb が細胞の核、膜、顆粒あるいは原形質のどの部分に存在するのか明確に理解されていながつた。又、 Gibb が作用を発現する時、与えた時の化学構造で効いているのか、あるいは低分子物質や高分子物質と結合していわゆる Bound Gibb の形で作用しているのかについて、いくつかの推定はなされているが、実験的には明確に理解されていない。最近、 Gibb と核酸代謝との関連に注目されはじめ、核酸合成を促進したり、新しい核酸を合成することが報告されている。 $^3\text{H-GA}_3$ 処理を行つた幼植物について、Fig 1 のように細胞分画を行なつて放射能を測定した。特に核内に GA_3 がとり込まれているかどうかを詳しく検討するため、核を蔗糖濃度勾配遠心分離法で精製を行つた。又、核内 Deoxyribonucleoprotein 画分、RNA、10万×g 上清 Protein をそれぞれ分画し、放射能を測定した。

Fig 1

Subcellular Fractionation

Tissue of Plant Organ

Glass Homogenizer
0.05 M Tris Buffer (pH 8)
Containing
0.25 M Sucrose
0.01 M EtSH
0.001 M MgCl_2

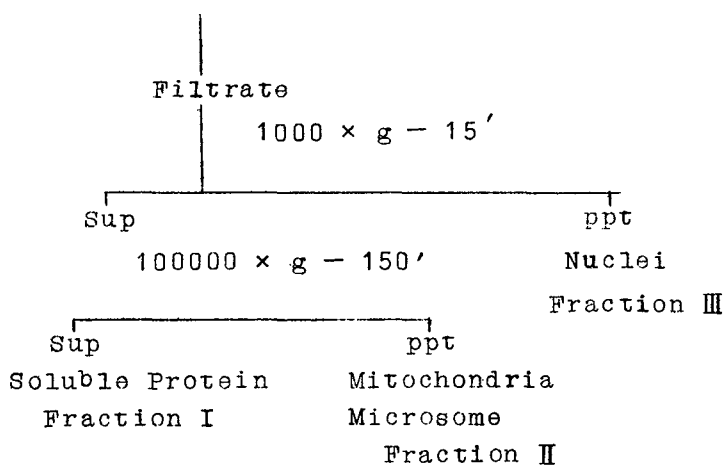


Table 2

Distribution of RI Activities in Subcellular Fraction

Filtrate	Leaf		Upper Part	
	cpm	%	cpm	%
	33000	100	12460	100
100,000 x g - 150' sup	25900	78.5	14560	108.8
100,000 x g - 150' ppt	400	1.2	420	3.4
1,000 x g - 15'	3000	9.1	749	6.0

Table 3

Fraction	RI	Activity
Nuclei		-
Deoxyribonucleoprotein		-
RNA I (Water Layer)		-
RNA II (Phenol ")		-
Protein		-

本実験条件下における結果から $^3\text{H-GA}_3$ に由来する放射能活性物質は、そのほとんどが $10\text{万} \times 9$ 上清畫分に存在していることがわかつた。核内にとり込まれている可能性、核蛋白質、RNA、蛋白質などの高分子物質と結合したいわゆる Bound-Gibb として存在している可能性などが推論されているが、これらを支持するデータは得られなかつた。

II 植物体内にとり込まれた $^3\text{H-GA}_3$ の運命

植物体内における GA_3 から変化した物質に関しては村上が GA_3 を与えたキュウリの葉から $\beta\text{-Glucosyl-GA}_3$ を同定したのが物質を明らかにした唯一の報告である。 $\beta\text{-Glucosyl-GA}_3$ 以外の $^3\text{H-GA}_3$ から変化した物質の分離、およびそれらの Pathway を明らかにした。

$^3\text{H-GA}_3$ 処理した植物を Fig 2 のように分畫した。

Fig 2 Fractionation of Plant

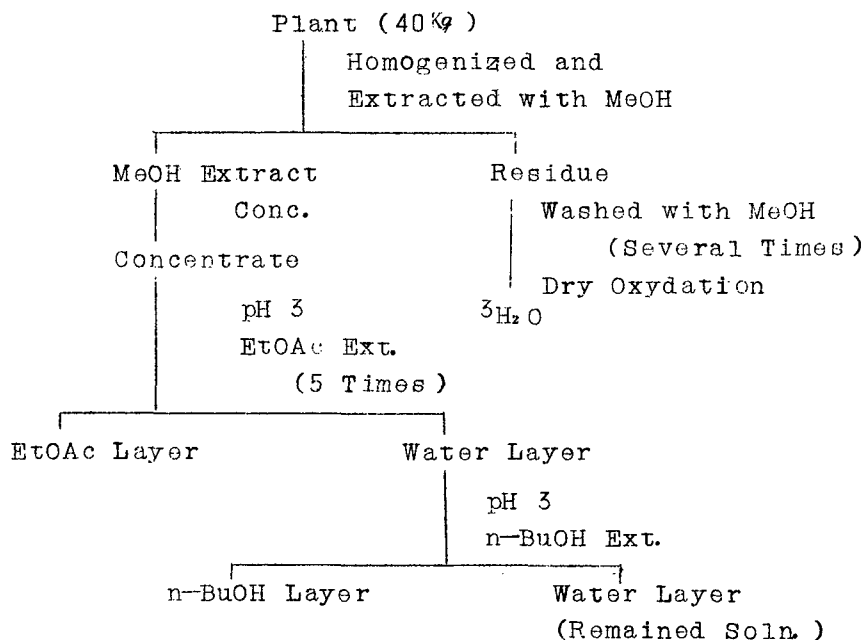


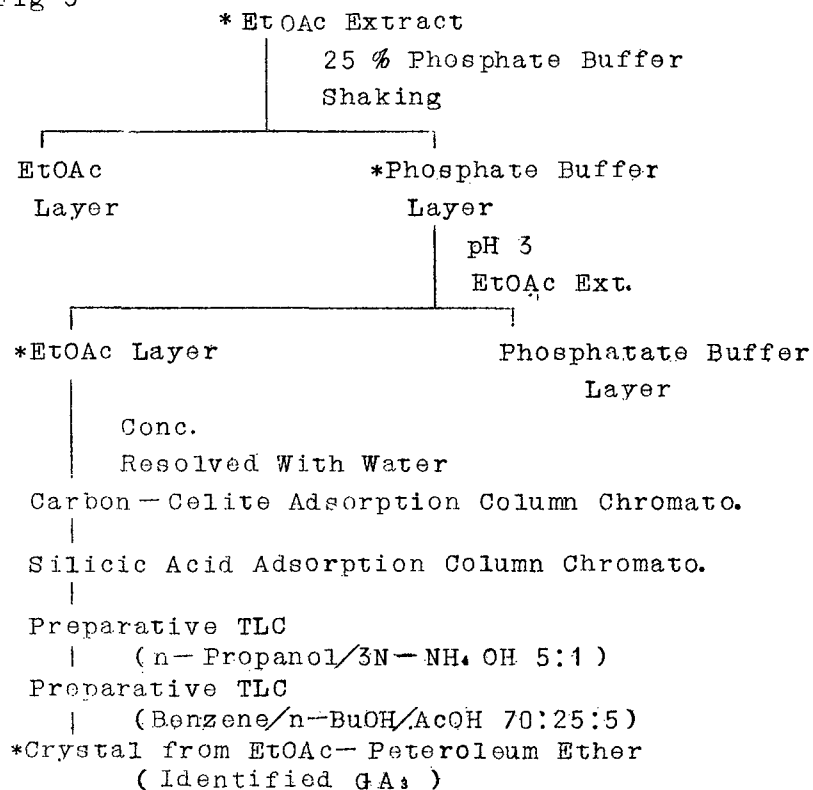
Table 4

Fraction	RI Activity (cpm)
EtOAc Layer	1060
n-BuOH "	2260
Water " (Remained Soln)	147
³ H ₂ O (Residue)	0

EtOAc Layer および n-BuOH Layer 中に含まれる放射能活性物質を分離し、同定を行なった。

i) E+OAc 中の放射能活性物質の分離および同定 (Fig 3)

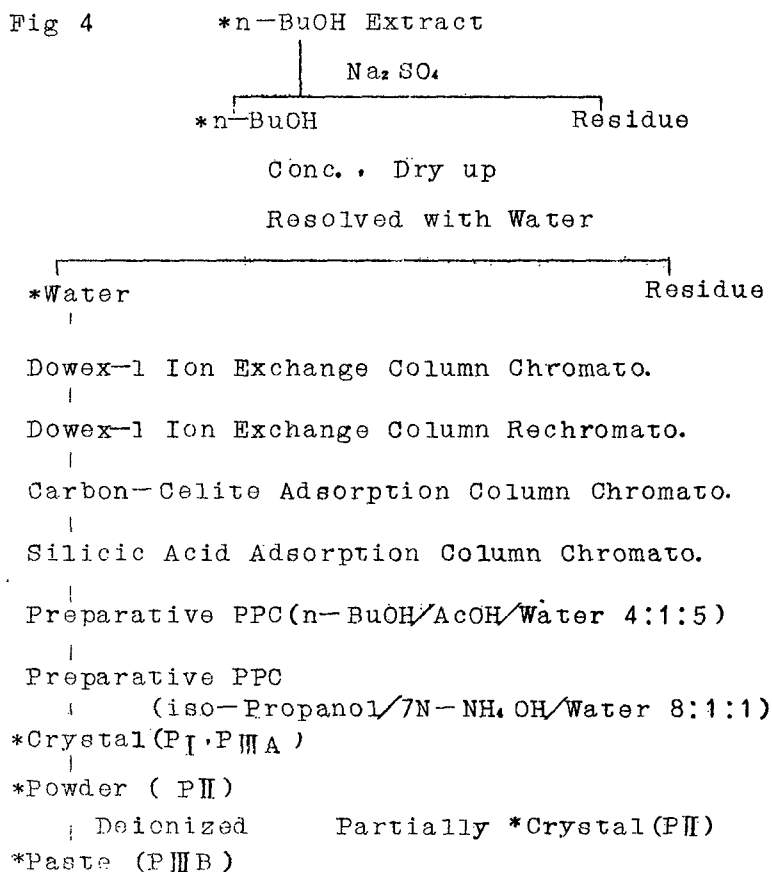
Fig 3



上記の各クロマトグラフィーによつてGA₃以外のRI活性物質は全く認められなかつた。得られた放射能活性物質の結果は、MP, IR, 数種の展界溶媒を変えたTLCおよびそのメチルエステルのTLCでGA₃であることを確認した。

ii) n-BuOH 中の放射能活性物質の分離および同定 (Fig. 4)

Fig. 4



上記の方法でDowex 1 Column Chromato を行うと放射能活性の強い3つの画分 (PI, PII, PIII) に分画された。それぞれのFractionについて再びDowex -1 により再クロマトを行い、単一なPeakであることを確認してから以下の操作により放射能活性物質を分離した。

○ P I の分離および同定

上記の方法に従い分離操作を行い、メタノール溶液より P I のアンモニウム塩の結晶を得た。上記の各種クロマトグラフィーにおいて P I 以外の放射能活性物質は認められなかつた。P I - アンモニウム塩を脱塩し、同定を行った。

Fig 5

Identification of P_I

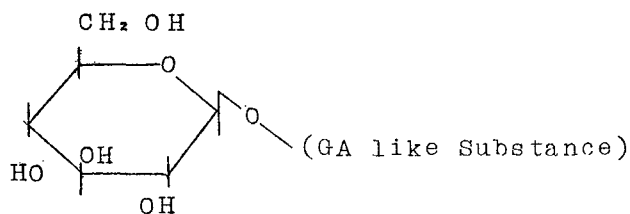
MP (Crystal NH₄ Salt) 147 - 152°

IR (cm ⁻¹)	3340	-OH
	1760	γ -Lactone
	1710	-COOH
	980	β -Glucoside Bond

NMR (τ)	8.71	GA : CH ₃
	5.47 } 5.38 }	Glu : C1' -H
	5.05 } 4.93 }	GA : =CH ₂
	4.26 } 4.20 }	GA : C ₃ -H

Enzyme Treatment

TLC	GA like Spot
PPC	Glucose



○ P II の分離および同定

P I と同様操作を行い、アンモニウム塩を脱塩した後、メタノールより結果を得た。

Fig 6

Identification of P II

MP (Crystal)		178-180°
IR (cm ⁻¹)	3400	-OH
	1760	<i>r</i> -Lactone
	1710	-COOH
	980	β -Glucoside Bond
NMR(7)	8.70	GA : CH ₃
	7.35	GA : C 10-H
	6.75	{ GA : C 10A-H Glu: C 2' -H
	6.02	Glu: H
	5.68	GA : C 2-H
	5.40	Glu: C 1' -H
	5.03	GA : C 3-H
	5.43	GA : =CH ₂
	4.20	GA : C 4-H

NMR of PII(Me-Ester) Acetate

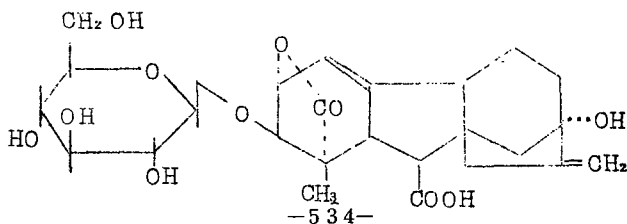
Not shifted to lower field, indicating that C-2 and C-1' are connected as a glycosidic linkage.

MS of PII(Me-Ester)-OSTM m/e 882

Enzyme Treatment

TLC iso-GA₃
PPC Glucose

NMR, MS and TLC of Aglycone are agreed with iso-GA.



P IIIは PPC (n-BuOH/ACOH/watrec 4:1:5) 迄は Single Spot だったが、最後の PPC(iso-propanol/7N-NH₄OH/water 8:1:1) で、二つの Peak に分れた。Rf の大きい方を P III A、小さい方を P III B とした。

○ P III A の分離および同定

Fig 7

Identification of P III A

MP(Crystal NH₄Salt) 166-168°

IR(cm ⁻¹)	3400	-OH
	1760	<i>γ</i> -Lactone
	1710	-COOH
	980	β -Glucoside Bond
NMR(τ)	8.66	CH ₂
	7.38	GA : C 10-H
	6.78	GA : C 10A-H
	6.62	Glu: H
	6.12	Glu: H
	5.69	GA : C2-H
	5.47	Glu: C 1'-H
	5.07	} GA :
	4.78	
	3.94	GA : C3-H
	3.62	GA : C4-H

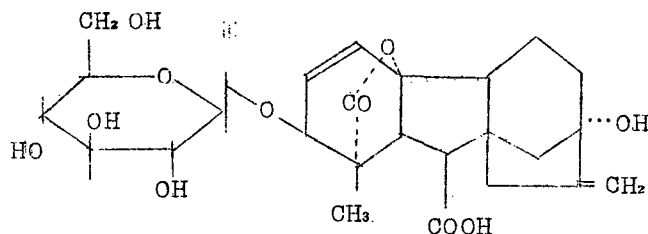
MS of P III A (Me-Ester)-OSTM m/e 882

Enzyme Treatment

TLC GA₃

PPC Glucose

MS of Aglycone is agreed with GA₃



○ P II Bの分離および同定

Fig 8

Identification of P III B

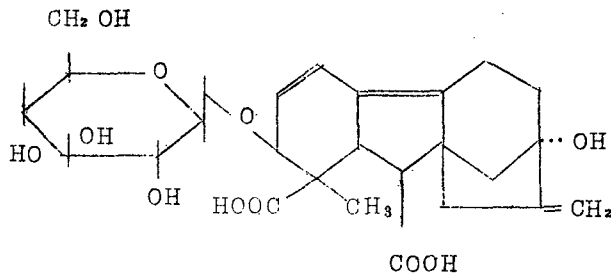
UV 257.5 m μ

Chromatographic Behavior is agreed with
Gibberellenic Acid

Enzyme Treatment

TLC like Gibberellenic Acid

PPC Glucose

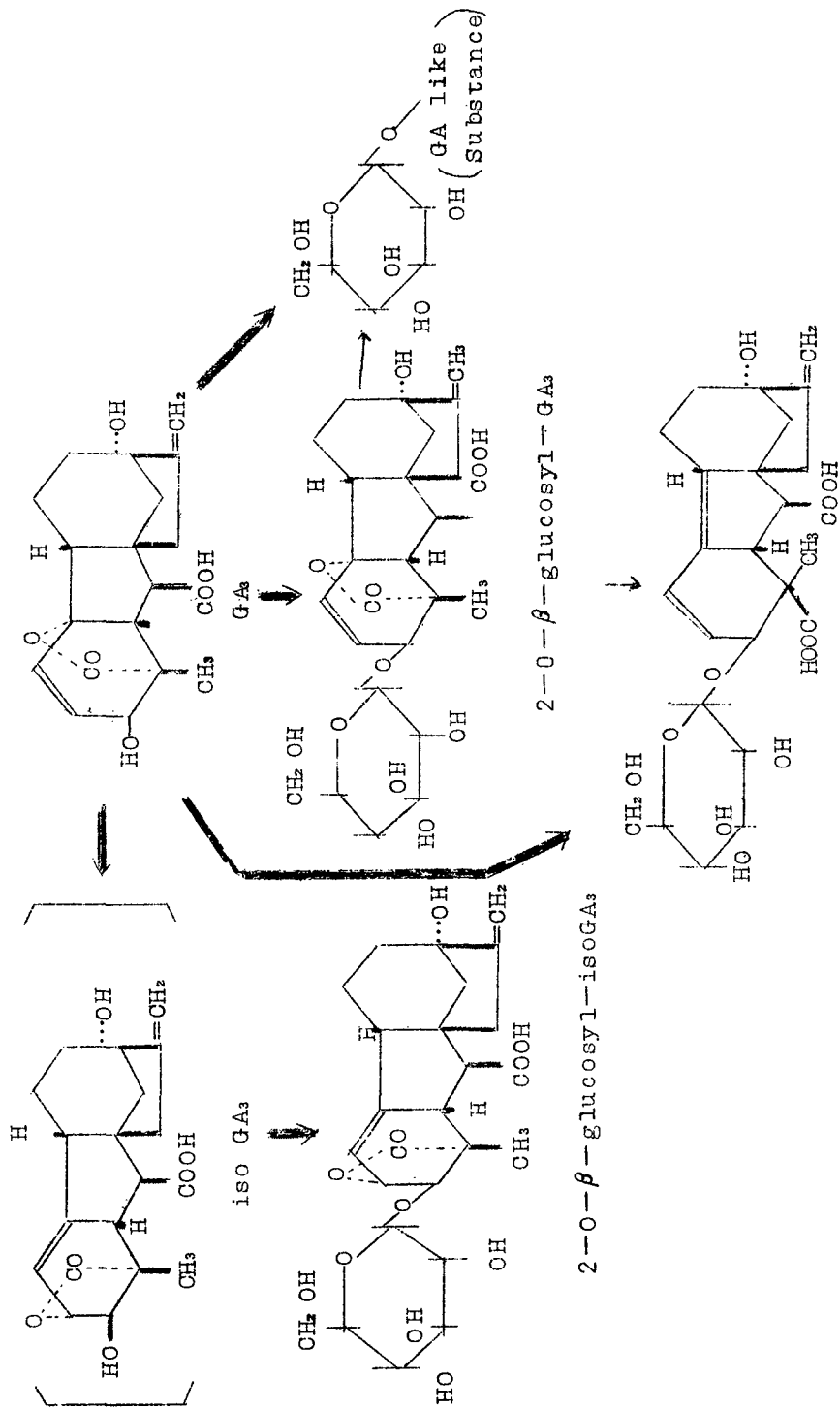


iii) P I, P II, P III A, P III B および GA₃ との相互移行について

P I, P II, P III A および P III B をそれぞれ木綿糸法によりつるなしいんげんの苗に与え、数日後、植物から放射能活性物質を抽出した。P I, P II, P III B は他の放射能活性物質への変化は全く観察されなかつた。P III A は P I および P III B に変化することがわかつた。又、これら P I, P II, P III A, P III B は GA₃ に戻らなかつた。

別に ³H-GA₃ を植物に与え、P I, P II, P III A, P III B の生成を経時的に追つてみると、これらの物質はいずれも徐々に増加しつつあり、経時的に顕著な増減は観察されなかつた。これらのことから、P I, P II, P III A, P III B はいずれも GA₃ から直接生産されるものと思われる。

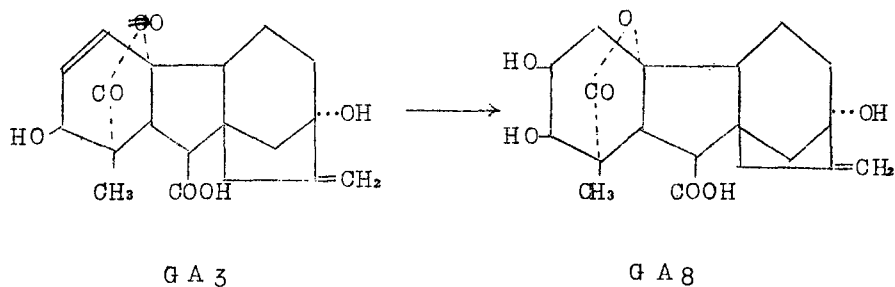
Fig 9



2-O-β-glucosyl - gibberellic acid

植物に吸収された GA₃ が GA₃ 以外の Gibb に変化をしていないことがわかった。このことは B. O. Phinney の推定している Gibb の Metabolic Map の GA₃ → GA₈ の変化の可能性は存在しないことを明らかにした。

Fig 10



GA₃ は植物体内において Glucose と結合し、分離された 4 つの Glucoside はいずれも再び Glucose と Aglycone に切断されないことから、これらの変化は多量の GA₃ の解毒作用と思われ、GA₃ の Stock の型のものではないと思われる。これら 4 種の Glucoside はいずれも生理活性が認められない。

審査結果の要旨

ジベレリンの生理学的および生化学的研究は豊富になされており、多くのことが明らかにされているが、外部から与えたジベレリンが植物体内でたどる運命、代謝に関しては、研究報告が少なくあまり明らかにされていない。植物体内にとり込まれたジベレリンが、植物体のどの器官に存在するか、又細胞内のどの部分に局在するのか、そして特にどのような経路を経てどのような代謝物が生成するかを明らかにしたのが本研究である。

植物体内に多量の³H-GA₃を吸収させたところ、³Hは植物体の地上部に隅なく分布しており、細胞レベルでは細胞顆粒にはとり込まれておらず、ほとんど大部分が原形質に存在していることがわかった。又デオキシリボ核蛋白質やRNAあるいは蛋白質などの生体高分子と結合している可能性も極めて薄いことがわかった。

³H-GA₃処理植物から、種々のカラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーの分離手段を用いて放射能活性物質の分離を試みた結果、ジベレリン類を含む酢酸エチル画分中からは未変化のGA₃以外の物質は含まれていないことがわかった。この結果からGA₃は他のナンバーのジベレリンやジベレリン様物質に変化していないことを明らかにした。GA₃の代謝生産物を含むn-ブタノール画分からは3種類の結晶と1種類の粉末を分離した。これらの物質およびその誘導体についてIR, NMR, MS等のスペクトラムおよびクロマトグラフィーなどを行って化学構造を検討した結果、GA₃の代謝生産物は2-O-β-glucosyl-isogilberellic acid, 2-O-β-glucosyl-gilberellic acid, 2-O-β-glucosyl-gilberellenic acid, およびもう1種類のジベレリン様物質のグルコไซด์であることがわかった。

これらの4種類の代謝生産物の生成過程および相互移行を調べた結果、GA₃からこれからの代謝生産物への生成経路はそれぞれ独立に直通的な経路があると思われた。2-O-β-glucosyl-isogilberellic acid, 2-O-β-glucosyl-gilberellic acid, およびもう1種類の代謝生産物は最終産物であるが、2-O-β-glucosyl-gilberellic acidは2-O-β-glucosyl-gilberellenic acidともう1種類の代謝生産物に変化することがわかった。又、これら4種類の代謝生産物は植物体内においていずれもGA₃には戻っていないこともわかった。以上の結果からGA₃とその代謝生産物生成に関するMetabolic Mapを作成した。更に明らかにされた代謝生産物の役割等に関していくつかのDiscussionをしている。

以上、本研究は2-O-β-glucosyl-gilberellic acidがGA₃の代謝物として知られている点を除いて、この他の結果は全て新知見であり、ジベレリンの植物体内における代謝に関する研究に新知見を与えたもので、学位を授与するに充分価値あるものと断定した。