

CCCで代表される4級アミノエー4型の growth retardant について得られた2,3の生物学的知見について述べる。

(1) 植物における水とイオンの取り込み、移動に対する影響

若い大麦の芽ばえにおける水の取り込み、移動に対するCCCの影響は先づ Potometer を用いて調べられた。一本の芽ばえを根だけが閉鎖室にある鉢に密封し、根による水の取り込みにつれて培養液の容量が減少するとき、その変化量を側管中の気泡の移動により計量した。第1表に示す如く $10^{-4}M$ の CCC で2日前前処理した芽ばえの水の取り込み量は無処理区の30~40%に、また $10^{-3}M$ の処理により20~30%に低下する。この事実から Xylem exudate の計量によっても確かめられた。すなわち芽ばえを種子の約1cm上、即ちで切り、出てくる exudate をガラス細管であるその総量を一定時間後に計測すると第2表、如くなる。この表では P_2^{32} を培養液 ($4 \times 10^{-4}M$ $CaSO_4$) に添加してから4時間後に切り以後5時間の間にあつめられた exudate 量とその比活性 (P_2^{32}) とが示されてある。 $10^{-4}M$ および $10^{-3}M$ の CCC で2日前前処理することにより、Potometer の場合と同様水の移動速度は無処理区、20~30%に低下する。一般に Exudation が根圧の指標と考えられること、および気孔数やその開口が CCC で影響を受ける (綿を被験植物として用いた) ことなどから、CCC による水の移動の抑制は主に根圧を低下させるためにおこるものと考えられる。また第2表において P_2^{32} の exudate 中の比活性が殆んど変化しないことから、水の移動に因りても保水力としての水の移動速度がほぼ律速的であることが推察される。さらに P_2^{32} の根および葉への

Table 1 Water uptake by Barley Seedlings

Time hr	CCC concn. in $4 \times 10^{-4}M$ $CaSO_4$		
	0	$10^{-4}M$	$10^{-3}M$
	ml water uptake	% control	% control
1.5	0.037	32	21
3.5	0.095	31	21
5.5	0.158	37	25
7.5	0.215	38	27
20.5	0.490	40	28

Table 2 Exudation by Decapitated Barley Seedlings

CCC treatment	Exudate collected	P_2^{32} a. in exudate
M	μl	c/s/ μl
0	46	18
10^{-4}	12	13
10^{-3}	10	15

Table 3 P_2^{32} Distribution in Barley After 24 hours.

Treatment	Leaf (% control)	Root (% control)
with $4 \times 10^{-4}M$ $CaSO_4$ Culture		
0	100	100
CCC, $10^{-4}M$	25	90
$10^{-3}M$	16	198
$10^{-2}M$	3	396
NalI $10^{-2}M$	220	324
Mannitol $10^{-2}M$	78	108
with 0.1 strength Hoagland Nutrient		
0	100	100
CCC $10^{-4}M$	55	41
$10^{-3}M$	9	15
$10^{-2}M$	5	12

とり込みに対する CCC の影響をしるべき表に示す興味ある結果を得た。すなわち根へのとり込みはとくに高濃度の CCC により促進される場合があるが、これは同じモル濃度の NaCl 添加によっても惹き起され得る salt effect である反面 P^{32} 葉へのとり込み (移動) の CCC による顕著な抑制現象は一般に salt effect や osmotic effect とは異なり、CCC 特異のものであることが示された。他のイオンの移動についても同様なことが観察された (表 4)。

Table 4. Effect of $10^{-3}M$ CCC on Ion Uptake from 0.1 Strength Hoagland Nutrient

Ion	Ion uptake as % control	
	Leaf	Root
$P^{32}O_4^{---}$	9	15
$S^{35}O_4^{--}$	5	5
Cl^{36-}	8	86
Na^{22+}	16	105
Rb^{86+}	18	56
Ca^{45++}	5	73

(2) 植物の choline phosphokinase に対する影響 (in vitro)

Table 5 Purification of choline Phosphokinase of Spinach Leaves

Fraction	Total Unit (μ moles/hr)	Specific Activity (U/mg. Protein)
Crude sap	51	.002
$(NH_4)_2SO_4$ fr.	22	.012
Dialysate	27	.022
DEAE fr.	4	.054

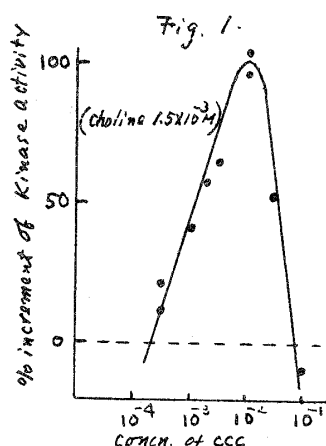


Table 6 Effect of Various Compounds on Spinach choline Phosphokinase

Addition	Relative Activity
none	100
$NaF 10^{-2}M$	34
NaN_3 "	70
PLMB "	31
Iodoacetate "	43
Cysteine "	97
Glutathione "	93
CCC "	207

酵素レベルでの CCC の作用を知るために choline 関連の酵素 (CCC は choline derivative であり、従ってその酵素の competitive inhibitor として働く可能性を先づ考えた) について予試験を行った。CCC が植物由来の choline phosphokinase ($choline + ATP \rightarrow p\text{-choline} + ADP$ と触媒する) に対して活性促進作用をもつことを見出した。この酵素は酵母 (Wittenberg & Kornberg 1953), や豆科種子 (Ramasarma & Wetter 1957) に存在することが知られているが、今回しるべきは 3 葉植物体においても、ほうれん草葉、かぼちゃ茎葉、たばこ葉、大麦茎葉および根中に分布していることが認められた。実験は主にほうれん草葉から得られた酵素標品を用いて行われた。

Table 7 Effect of CCC on Yeast choline Phosphokinase

Addition	Relative Activity
none	100
CCC ($10^{-2}M$)	84

すなわち表 5 に示すように Mg^{++} , Tris (pH 7.8) の存在下で sap を得、以下順次硫酸アンモニウム ($28 \sim 37g/100ml$)、その透析液、そして DEAE セロースカラム透析 (Tris pH 8.0, $0.15M$ NaCl 流出部) を得、主にこの透析液を酵素標品として以下の実験に使用した。反応は $1,2\text{-}^{14}C\text{-choline}$ ($1.3mc/mm$) と ATP と基質として 30° で行われ、paper chromatography により反応停止液中の顕微鏡下で検出。未反応物質を分離、液体シンチレーションカウンタで計測を行って

て反応速度を算出した。^{基礎}Cholineは唯一の反応生成物として p-choline を与え、又用いた酵素標品中に p-choline の phosphatase 活性は認められなかった。リン酸供与体としては ATP が specific であり至適 pH は 9~10, また Mg^{2+} ion を要求し $ATP/Mg = 1$ のとき最大の活性を示す等の性質は、いづれも酵母由来の Kinase と同一であった。

さて CCC を示すこの酵素活性に対する^{CCCの}促進効果は表および図に示されている。図で明かなようにこの促進効果については CCC の至適濃度が存在する。しかもこの CCC の至適濃度は基礎 choline の濃度^{濃化}と共に変動する。一定の choline 濃度についてはその 5~10 倍の CCC モル濃度のとき促進効果は極大となった。次に興味ある事実は表 7 表で示すように、酵母由来の Kinase に対しては CCC は何等促進効果をもたないことである。かぼちや茎葉から得た Kinase に対してはほしれんそう葉由来の酵素に対するのと同様に活性促進を示すという事実を考慮するならばこの CCC 効果はやはり特異的なものとも思われる。最後に、ほしれんそう酵素の活性に対する CCC の各種誘導体の効果を表 6 表に示した。Plant growth retardant として活性の強い物質はいづれも酵素活性促進を行なうに反して、retardant として不活性な物質は全く Kinase の活性促進効果を示さず。このことは CCC が示すところの *in vivo* とこの *in vitro* の二つの活性が相互に密切な関連をもつことを示すものであろう。

Table 8 Effect of CCC derivatives on spinach choline phosphokinase (concn: $10^{-2} M$)

Addition	Relative Activity
None	100
○ $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2Cl \cdot Cl^-$	228
○ $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2Br \cdot Br^-$	195
● $(CH_3)_2NCH_2CH_2Br \cdot HBr$	89
○ $(CH_3)_3N^+CH_2CH=CH_2 \cdot Cl^-$	141
● $(CH_3)_2NCH_2CH=CH_2 \cdot HCl$	76
○ $(CH_3)_3N^+CH_2CH=CH_2 \cdot Cl^-$	124
○ $(CH_3)_3N^+CH_2CH(S-CH_2) \cdot Cl^-$	178
○ $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$	205
● $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_3 \cdot HBr$	110

○ active
● inactive } as growth retardant

(3) ジベレリン生成に及ぼす阻害作用

1963 年 Kende らは CCC や AMO-1618 が *Fusarium moniliformae* (*Gibberella fujikuroi*) のジベレリン合成を特異的に阻害することと報告した。これは growth retardant の作用機作を解く新しい手がかりとすべき重要な発見である。演者らはこれを追証確認すると共に、これから^{相関}4級アミン系化合物の1価のカチオンとしての性質と生物学的活性とにどのような^{相関}関係があるかを調べようとして、最も simple な1価カチオンとなつた無機塩 (Cl^- 型) の作用について実験を行った。potato-glucose 培地に24時間培養した *G. fujikuroi* の culture に一定量の塩を入れ、さらに48時間培養したその培養液中のジベレリンを抽出、分析し TLC 法で Gibberellic acid の半定量を、又イネを用いた Bioassay (村上氏法)

でジベレリンの定量を行った。表9にその結果を示す。0.15MのLiCl, CsClはこの菌のジベレリン生成を著しく阻害する一方、同濃度の生理的食塩水の濃度のKCl, NaClの存在は無影響であった。この菌の菌体重量をみると、とくにCs⁺の添加では菌体重量の減少がみられる。このことはジベレリン生成にはむしろCs⁺の影響がspecificなものではなく、むしろ菌の生育にはむしろ阻害の二次的効果である可能性を暗示している。そこでこの傾向を

とくために、4日間培養（既にジベレリン生産を完了に行いつ、ある菌の洗脱菌体をBuffer（1% glucoseを含む）にsuspendして得る静菌条件下で再度カチオンの影響を調べた。その結果表10表に示したように、静菌条件下に於いてもLi⁺とCs⁺は明らかにGibberella fujikuroiのジベレリン生成の阻害を行う。他方K⁺, Rb⁺, Na⁺, NH₄⁺の各1価カチオンは有意な効果を示さなかった。つまり特定の1価カチオンだけがこの生合成系に対してspecificな阻害効果（生育における阻害の二次的効果などという意）をもつことが明らかになった。そしてこのことはこの菌のジベレリン生合成系に於けるinhibitorとしてのCCCやAMO-1618が実際に特定の1価カチオンとして作用することを強く示唆している。カビでみられたこれらの事実が高等植物におけるCCC様物質が示すgrowth retardant作用の機作と結びつくことは今後の問題である。

Table 10 Effect of Univalent Cations on Resting Cells of *Gibberella fujikuroi*

Addition	-	KCl	NaCl	NH ₄ Cl	LiCl	CsCl	RbCl
Gibberellin formed (mg/100ml suspension)	30	27	17	24	4	4	36

Salt concn: 0.15M

Inoculum: 35mg in dry wt./20ml.

以上に述べた3つの知見を中心としてCCC型のgrowth retardantの作用機作について若干の考察を行うつもりである。

なほ上記の実験のうちカビに関する部分は当研究所の田中実氏と、他はミシガン州立大のTolbert研においてDr. A. F. Goldkeとの共同で行われた。これらの諸氏に厚く感謝する次第である。