

## 学会賞受賞論文

(業績賞)

# ブラシノステロイドを中心とした天然植物成長調節物質に関する研究

安 部 浩

東京農工大学 応用生物科学科

## Studies on Brassinosteroids and Naturally-Occurring Novel Plant Growth Regulators

Hiroshi ABE

Department of Applied Biological Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8  
Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo, 183-8509, Japan

天然植物成長物質の新たな化学的解明と動態の究明を行い、植物の生物生産と保護の分野における基礎および応用に帰することを目的に研究を行ったものであり、以下にブラシノステロイド、クロロインドール酢酸、およびディスカデニンに関する研究の概要を述べる。

### 1. ブラシノステロイド

ブラシノステロイド(BR)の発見にいたる研究の経路は二つに分けられる。一つは筆者が所属した名古屋大学の丸茂グループによるイスノキ葉に含まれる *Distylium* factorsに関する研究であり、もう一つはアメリカ農務省の Mitchel グループによる西洋アブラナ花粉に含まれる Brassinに関する研究である。Brassin はジベレリン検定法であるインゲン第二節間身長テストを用いてスクリーニングされ、*Distylium* factors は、オーキシン検定法であるイネラミナジョイントテスト(=イネ葉身屈曲テスト、LJT)を用いて精製された。Brassin は、その存在が確認されてから約 10 年の歳月を経た 1979 年、新しい分離精製手段として登場した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いることによって活性物質の単離に成功、X 線結晶構造解析によって化学構造が決定された。そのユニークな構造をもったステロイド化合物は、ブラシノライド(BL, 1)と命名された(Fig. 1)。これを契機に、BL や関連ステロイドが合成され、それらの LJT 活性が確認され、*Distylium* factors が BL 同族体であることが証明された。BL とその同族ステロイドは、ブラシノステロイド(BR)と総称されるようになり、第 6 番目の植物ホルモンとして世界の注目を集め植物成長物質の一つへと発展した。

### (1) イスノキ葉に含まれる *Distylium* factors

イスノキ (*Distylium racemosum* Sieb. et Zucc.) はマンサク科 (Hamamelidaceae) に属する常緑樹で、愛知県安城周辺では垣根に用いられている。この若い新葉や新芽にアブラムシが寄生すると異常成長が起り虫嚢 (insect gall) を形成する。異常成長を引き起こす原因物質の追跡にあたり LJT を用いた。予備実験により、虫嚢のみでなく新鮮葉にも含まれていることが分かり、1966 年に 430 kg の新鮮健全葉を安城周辺から採集し、ドラム缶 7 本に詰めメタノール抽出を 3 回繰り返した。抽出液は濃縮し、常法に従いエチルエーテル可溶中性画分を得た後に、シリカゲルカラム、セファデックス LH-20 ゲルfiltration, シリカゲル TLC、およびアルミナカラムクロマトグラフィーで順次精製することによってシリカゲル TLC 上で 3 種類の活性物質 (*Distylium* factors A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and B と命名) の存在が確認され、それらの収量はそれぞれ 751, 50, 236 μg であった(Fig. 2)<sup>1)</sup>。当時の分析技術では構造解析を行うには、量が余りにも少なすぎたためにそれを断念し、測定可能な範囲での化学的性質、生理活性、および植物界における分布などについて検討を行った。その結果、*Distylium* factors は次に示すような特性を有する物質であることが確認された。

- (a) *Distylium* factors はバニリン硫酸試薬で加熱発色すると、UV 照射により紫色の螢光を呈する。
- (b) *Distylium* factors は LJT において IAA の数百倍も強い活性を示す。
- (c) *Distylium* factors は既知植物ホルモンに比べ幅広い生理活性スペクトラムを有する。
- (d) *Distylium* factors は植物界に広く分布し、既知植物ホルモンと異なる新規植物成長調節物質である。

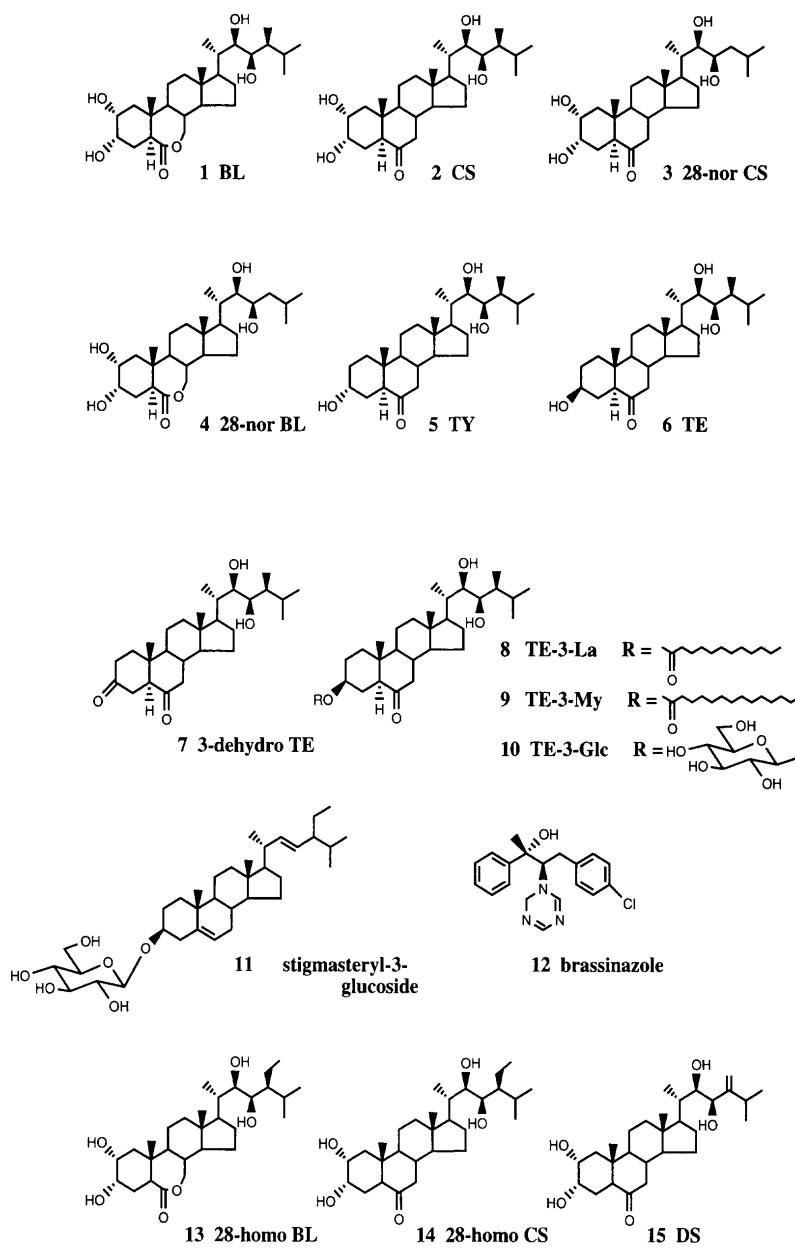


Fig. 1 Naturally-occurring brassinosteroids and related plant growth regulators.

イスノキはマンサク科に属する植物であり、LJTで活性を示すオーキシン由来の物質であろうと考え、マンサク科の学名にちなんで *Hamamelia auxin* と一時期命名した。しかし、植物に共通に含まれる新規植物ホルモン様物質であると確信が得られるようになって、名称はイスノキの学名をとり *Distylium factors* と改称することになった。

## (2) 天然プラシノステロイドの検索

BL のステロイド構造をみて、*Distylium factors* は BL の同族体に間違いないと直感した。そこで、安城周辺から再びイスノキ新鮮葉(16 kg)を採集し、活性物質を抽出精製し、BR 同族体であることを確認することに着手した。先の大量抽出法に改良を加え精製を行った。即ち、酢酸エチル可溶中性物質をシリカゲル、アンバーライト XAD-2、順相シリカゲル分取 HPLC、逆相 HPLC によって順次精製する

ことにより二つの活性フラクションを得た。これをビスマタンボロン酸エステルに誘導したのちに GC-MS 分析に供試し、合成標品と比較することによって同定することに成功した。*Distylium factor A<sub>1</sub>* はカスチステロン(CS, 2)と 28-ノルカスチステロン(28-norCS, 3)の混合物であることが<sup>2</sup>、*Distylium factor B* は BL(1)と 28-ノルブラシノライド(24)の混合物であることが、*Distylium factor A<sub>2</sub>* はタイファステロール(TY, 5)とティアステロン(TE, 6)の混合物であることが確認された<sup>2)</sup>。さらに、TE から TY への 3 位水酸基のエピメリ化の際の生合成中間体として 3-デヒドロティアステロン(3-dehydroTE, 7)が存在することも分かった<sup>3)</sup>。このように、イスノキの *Distylium factors* は BL と 6 種類の同族体であることが確認されたことにより、*Distylium factors* が BR であるとの予想が実験的に証明さ

れた。イスノキ以外の各種植物（キャベツ、チャ、イネ、ユリ、マングビーン、チューリップ、オレンジ、ガマ、クリ、マツなど）からイスノキと同様に、内生 BR を抽出精製し、同定することを試みた。その際に、BR の迅速かつ簡便な検索法を開発した(Fig. 3)。現在、この方法が BR の一般的な検索法として使用されている。この方法により精製して得られた BR フラクションはビスマタンボロネートまたはメタンボロネートトリメチルシリルエーテル誘導体に変換後、GC-MS 分析により同定を行った。その結果、全部で 14 種の化合物の構造を明らかにすることができた。これらのうちの 9 種は新化合物であることがわかった (Fig. 1)。BR が植物界に普遍的に存在すること、植物の組織や器官によって内生 BR の種類が異なることが明かになった

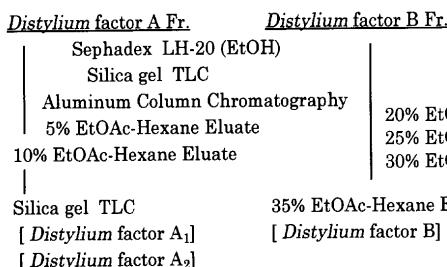
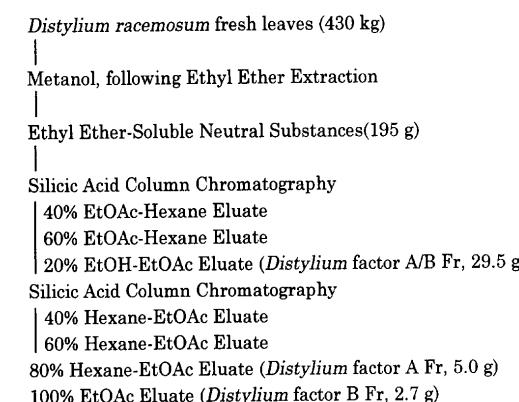
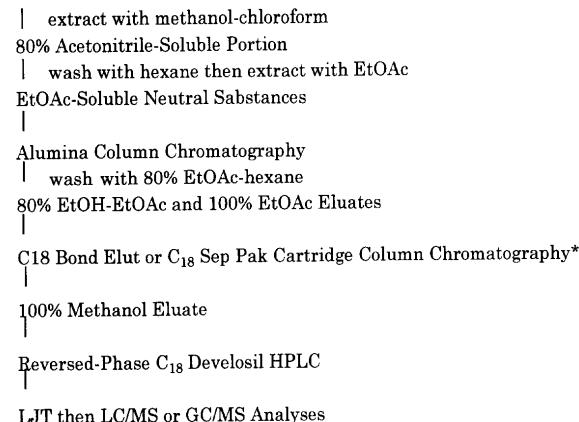


Fig. 2 A purification procedure for *Distylium* factors from fresh leaves of *Distylium racemosum*.

(Table 1)。これらの結果は、BR が植物の成長調節に深くかかわりがある植物ホルモンであることを強く示唆した。

BR は、既知植物ホルモンに比べて内生量が極端に少ないので特徴である(Table 1)。内生 BR の生理作用の研究を進めるうえでは、BR の微量定量分析法の確立が必須である。前述したように、LJT は前田らによってオーキシン検定法として開発されたものであるが、ラミナジョイントは不思議なことに IAA よりも BR に対して超高濃度で特異的に反応することがあきらかとなり (Table 2)，BR のミクロ分析のための生物検定法に改良する必要がある。そこで、各種イネ品種の感度、検定条件などを再検討し、選抜された最適な品種を用いて各種 BR の作用や既知ホルモンとの活性比較を行った。その結果、最も適した品種の一つとしてアルボリオが選抜され、天然物探索は勿論のこと、構造

#### Plant Materials



\* Sample dissolved 80% methanol flows through 1st cartridge column then flows additional 80% methanol through the column. The eluate add water to reduce to 50% methanol concentration then through 2nd cartridge column. After flowing additional 50% methanol then elutes with 100% methanol.

Fig. 3 A simple and rapid procedure for purification of natural free brassinosteroid.

Table 1 Endogenous free brassinosteroids and amounts in higher plants.

Brassinosteroid	Isunoki leaf	Tea leaf	Cabbage seed/sheath	Rice shoot	Mung bean shoot	Lily pollen
Brassinolide	23	4.6	9.4	trace	id.	3.0*
28-Homobrassinolide			trace			
28-Norbrassinolide	156		1.3			
Castasterone	133	110	1.6	13.6	id.	3.0*
28-Homocastasterone		trace	0.1			
Dolichosterone				8.4		
28-Norcastasterone	16	2.0	0.8			180*
Typhasterol	id.	id.				id.
Teasterone	id.	id.				id.
3-Dehydroteasterone	id.					id.

Quantification data presented are underestimates by GC/MS analysis or LJT bioassay. Amounts present ng/kg fresh weight but lily pollen presents  $\mu$ g/kg. id.: identified but not quantified.

Table 2 Comparative activity of brassinolide and IAA in rice lamina inclination test.

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Angle degrees between laminae and sheaths(± : standard error)		
	Control	Brassinolide	IAA
0	93±8		
0.00001		93±2	
0.0001		116±9	
0.001		150±16	
0.01		156±9	
0.1		169±11	
1			91±6
10			90±2
50			124±8

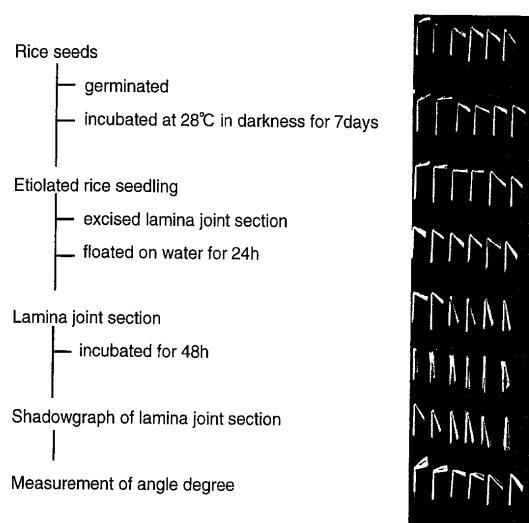


Fig. 4 A method of rice-lamina inclination test for monitoring brassinosteroids.

活性相関などに広く使用されることになった。現在、LJTはBR検索に不可欠なアッセイ法として世界中で広く使用されている(Fig. 4)<sup>4)</sup>。天然から発見されたBRは、現在までに43種にのぼり、その数はさらに増加する傾向にある。植物種や器官部位によって内生BRの種類や量も異なるが、植物界に広く分布し、植物の生理機能に深く関与することが明らかとなった。

天然BRの殆どは遊離型で見つかっているが、複合型のものも数種存在することがわかった。ユリ花粉の内生BRとしてTE, 3-dehydroTE, TY, CS, BLが存在することを明らかにしたが、これら遊離型BRのうち、TEは遊離型として存在するほかに、複合型としても存在することがわかった。GC/MS, LC/MS, NMRデータにより複合体の構造解析を行った結果、TEの3位水酸基にラウリン酸やミリスチン酸が結合したエステル(8, 9)<sup>5)</sup>、同じ水酸基にグルコースが結合した配糖体(10)<sup>6)</sup>を同定、これらの複合体は天然で最初の発見となった。ユリ花粉ではTEのみに複

合体の形成が認められ、他のBRには複合体の形成は認められないという興味深いものであった。

### (3) BRの構造活性相関

天然BRの化学構造は環構造、環上の置換基、側鎖の置換基を眺めても、その構造に多種多様性があることが示された。当然のことながら、構造と活性の相関性に关心がもたらされた。非天然性の合成BRも含めて、先に確立したLJTを用いて構造活性相関を調べた。その結果から、(a) C2 $\alpha$ , C3 $\alpha$ とC22R, C23Rの二組のシス型隣接ジオール基、(b) 24位アルキル置換基、(c) A/Bトランス縮環構造、(d) B環の7-オキザラクトン基又は6-ケトン基の四つの官能基は高活性保持に極めて重要であり、これらの一つでも欠けると活性が激減することがわかった。これらの官能基について詳細に検討して得た結果をまとめたものをFig. 5に示した。

構造活性相関の結果から、天然BRの中ではB環に7-オキザラクトンを有するラクトン型BRが最も活性が強く、その中でもBLが最も活性が強かった。ラクトンが逆向きで、天然には見つかっていない6-オキザラクトンになると活性は激減した。次ぎに強い活性を有するものはB環の6位がケトンになった6-ケトン型BRであり、BLの生合成前駆体と予想されるCSであった。CSは植物組織中に最も広く分布するBRである。天然には6位にケトン基をもたないBRも存在することが確認されているが、6-デオキソ型BRは殆ど活性を示さない。6位にケトン基をもち2位の水酸基が欠けた2-デオキシ型BRであるTYやTEになると大きく活性が低下することもわかった<sup>7,8)</sup>。

A環およびB環における化学構造の変化と生物活性の順位は、BL生合成経路を予測する上で非常に役に立ち、標識化合物を用いた代謝実験により生合成の解明へと展開された。そして、BL生合成については、早期6位酸化経路と後期6位酸化経路の二つの経路が植物に存在することが日本人科学者によって見出されている。また、BLの生合成を欠損したワイ性植物(アラビトプシス、エンドウ)の発見、BL非感受性植物の発見、BL生合成阻害剤ブランナゾール(11)の発見へとBR研究が日本を中心に展開され、さらに遺伝子レベルの研究へと進展している。

### (4) ブラシノステロイドの代謝

生合成研究に比べ代謝研究は遅れていた。BR検索法の確立や構造活性相関の研究と平行してBRの代謝研究を進めた。キュウリ幼植物や培養細胞によるBLの代謝では、BLはエピメリ化と複合体化を受け、その過程は幼植物と培養細胞で共通していた。脂肪酸エステルや配糖体に代謝されるが、それは水酸基が異性化してから形成されることが確認された。残念ながらアグリコン部分の構造決定には至らず、今後の課題として残っている。タイムコースを追った実験から、幼植物ではBL投与6時間で既に代謝が始ま

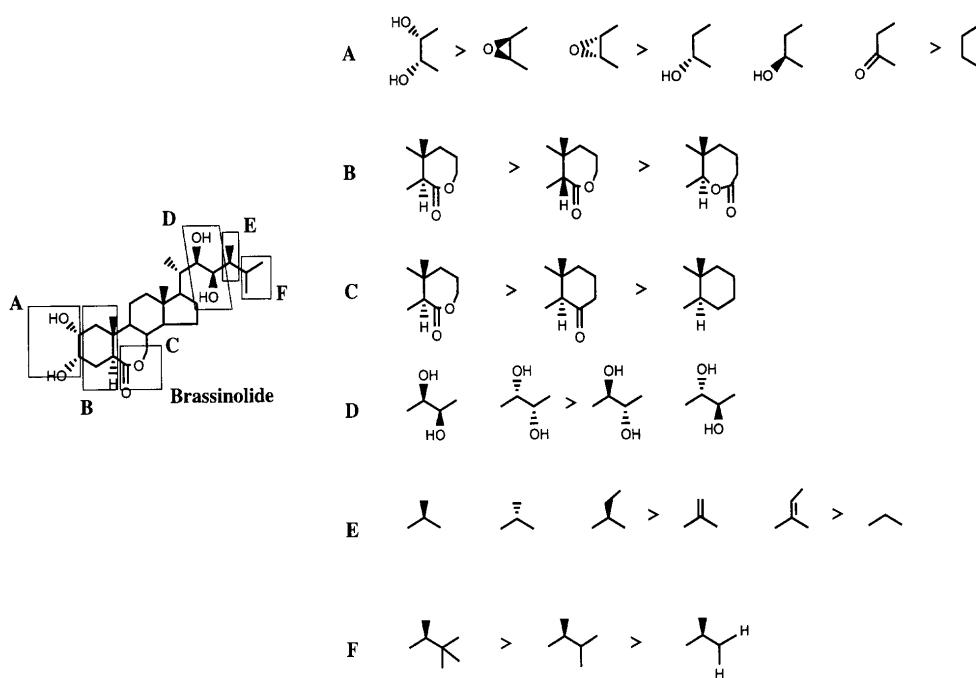


Fig. 5 Structure diversity and structure-activity relationship of brassinosteroids.

り、急速に代謝されることが観察された。BLが植物の初期成長促進の他に、作物の增收効果や耐寒性増強効果、薬害軽減効果、耐病性増強効果といった環境ストレスを軽減する作用をもつことから農業面での実用化に期待が寄せられてきた。しかし、圃場で安定した効果が得にくいため、実用化に至っていない。効果の持続性という点で応用場面で問題になる。代謝実験が示したように、BLが植物体内で急速に代謝されてしまうことが効果が持続しないことの原因になっていると考えられる。BRの実用化には代謝されにくい、持続性のある化合物の開発が必要である。

ユリ花粉に TE の 3 位水酸基に脂肪酸や糖が結合した複合型 BR が存在することは上述した通りである。これら複合体の相互関係をユリ培養細胞を用いた代謝実験により調べた。培養細胞中ではエステル体と配糖体は TE を介して相互変換しあう可逆的な反応であることが確認できた<sup>9)</sup>。ユリ花粉の内生 BR から花粉中での BL 生合成は TE → 3-dehydro → TE → TY → CS ルートで進む早期 6 位酸化経路 (Fig. 6) が存在すると考えられる。ユリ花粉成熟過程におけるエステルの動態を解析すると、エステルは花粉の成熟が進むにつれて減少し、逆に遊離型の TE が増加することが認められた。親油性複合体と親水性複合体が TE を介して可逆的に変換すること、およびこれら複合体が活性型 BR に代謝されることを総合的に考え併せると、TE 複合体形成の生理的意義として、CS や BL といった活性型 BR の生合成の調節のみならず植物組織中の移行や活性型 BR の濃度調節に深い関わりを有することが示唆される興味深い結果が得られた。

先にも述べたように、BLが農業面での実用化に期待が

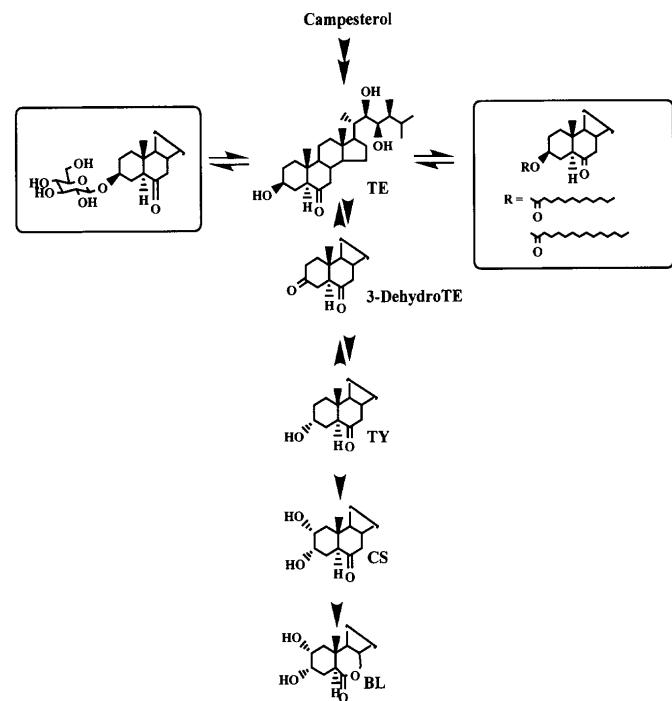


Fig. 6 Metabolic pathway of teasterone in lily cell cultures and endogenous free and conjugated brassinosteroids in lily pollen.

かかっているが、効果が持続しないという欠点があった。近年、持続効果の高い BR が合成されてフィールド試験が実施されている。一方、BL 関連の新しい植物成長調節剤の研究も進められ、BL 共力物質 (12)<sup>10)</sup> や BL 生合成阻害剤ブランシナゾール (11) が発見されている。

このように BR 研究の成果は、ブランシノステロイドが植物界に広く分布することを明らかにすると共に、植物の生

理機能に深く関与することを示したもので、植物成長調節物質として世界で最も注目されるようになった。新植物ホルモン BR の登場は植物の成長調節の制御システムを理解する上で新しいページを拓き、BR による新たな植物生育技術が実現する可能性をもたらしたと言えよう。

## 2. クロロインドールオーキシン

IAA 以外にオーキシン様物質が天然に存在する可能性を示す幾つかの報告がある。*Malus auxin* (リンゴ)、*Acid-fast auxin* (ヒマワリ)、*Auxin 2* (スグリ)、*Accelerator  $\alpha$*  がその例である。オーキシン様活性物質を植物からスクリーニングしている過程で、1934 年の最初の天然オーキシンであるインドール酢酸 (IAA, 18) の発見以来、これに次ぐ第 2 番目の天然オーキシンといえる 4-クロロインドール酢酸 (4-Cl-IAA, 16)<sup>11)</sup> およびそのメチルエステル (17)<sup>12)</sup> を発見した (Fig. 7)。

緑豆 (*Phaseolus mungo*) の hypocotyl swelling test (胚軸伸長テスト) を生物検定に用いて新しい植物生理活性物質の追跡を行っていたとき、エンドウ (*Pisum sativum*) 未熟種子 (276 kg) のメタノール抽出物から分画した酢酸エチル可溶中性画分に、胚軸の伸長を著しく促進する強い活性を有する物質が存在することを見出した。活性の症状としては胚軸の縦伸長が抑制され、横伸長が促進される swelling 現象が観察された。この生物検定法については詳細な報告がないために、この活性がどのような物質によって引き起こされるのか予想できなかった。そこで本物質を単離精製するために、得られた酢酸エチル可溶中性画分をアセトニトリルに溶解後、可溶物を *n*-ヘキサンで数回洗浄してからアルミナカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチ

ル-*n*-ヘキサン系溶媒で段階的に溶出すると、酢酸エチル-*n*-ヘキサン (15: 85) に溶出される結晶性の活性物質を再結することにより僅かに淡褐色したプリズム状の活性物質 (25 mg) を単離することができた。活性物質は炎色反応や MS 分析によりクロロ原子の存在を示し、UV, IR および NMR の各スペクトル分析により、インドール環の 4, 5, 6, 7 位の何れかにクロロ原子が置換したクロロインドール酢酸のメチルエステルと推定することができた。活性物質を加水分解してクロロインドール酢酸に導き、想定される 4 種類のクロロインドール酢酸 (19, 20, 21) は化学合成によつて調製し、遊離酸とそのメチルエステルの融点や各種機器スペクトルデータを比較することによって、活性物質をメチル 4-クロロインドールアセテート (17) であると決定した。

活性物質は、酢酸エチル可溶酸性画分にも存在することが後に判明した。酸性物質のペーパークロマトグラフィー (2-プロパノール: アンモニア: 水 = 8: 1: 1) は二つの活性スポット *Rf* 0.2-0.3, と *Rf* 0.6-0.7 を与えた。後者の低極性物質の *Rf* は 4-Cl-IAA (16) に相当することがわかった。これら酸性物質を精製単離するために酸性画分を上述と同様にアセトニトリルとヘキサンで液々分配して、アセトニトリル層を向流分配 (酢酸エチル-リン酸緩衝液), セファデックス LH-20 クロマトグラフィー, シリカゲル分配クロマトグラフィーで順次精製することにより、活性物質 3.8 mg を純粋に得ることができた。IR, UV, TLC データは 4-Cl-IAA に完全に一致した。高極性部分の物質については、後に服部らによって D-4-クロロトリプトファン誘導体および 4-Cl-IAA の L-アスパルテートであると決定されている<sup>13)</sup>。

エンドウ *Pisum sativum* の未熟種子には、新しいオーキシンとしてクロロインドール酢酸関連のホルモンが分布していることが確認された。4-Cl-IAA は緑豆胚軸伸長テストやアベナ子葉鞘伸長テストなどにおいて IAA よりも非常に強い活性を示した。IAA よりも強い活性を示すことは、植物体中で酸化分解を受け難く安定であることが実証されている。植物活性が強く、かつ植物体中で難分解性であるオーキシンの発見は新しい植物成長調節剤開発のリード化合物に利用され、合成新オーキシン 5,6-Cl<sub>2</sub>-IAA (22) や新アンチオーキシン 5,7-Cl<sub>2</sub>-IAA (23) の創薬へと結びつき、前者は発根促進剤として農業場面への開発が計られている<sup>14)</sup>。

## 3. 自己胞子発芽阻害因子 Discadenine

細胞性粘菌の胞子発芽はいくつかの内生因子および環境因子が関与して制御調節されているが、植物病原菌の胞子発芽にもよくみられるように、内生因子の一つとしてこの生物の胞子には自己の胞子発芽を制御する因子 (self-

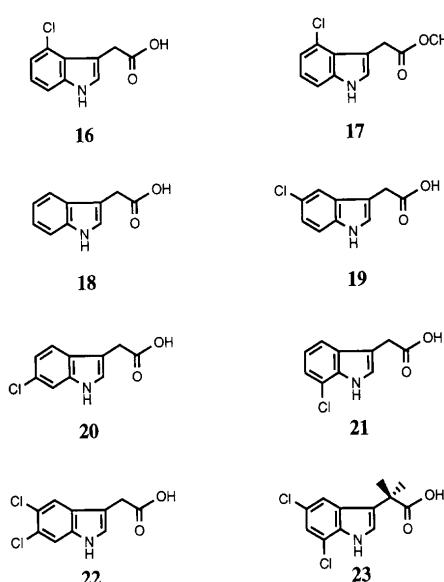


Fig. 7 Chemical structures of 4-chloroindolyl-3-acetic acid and its related compounds.

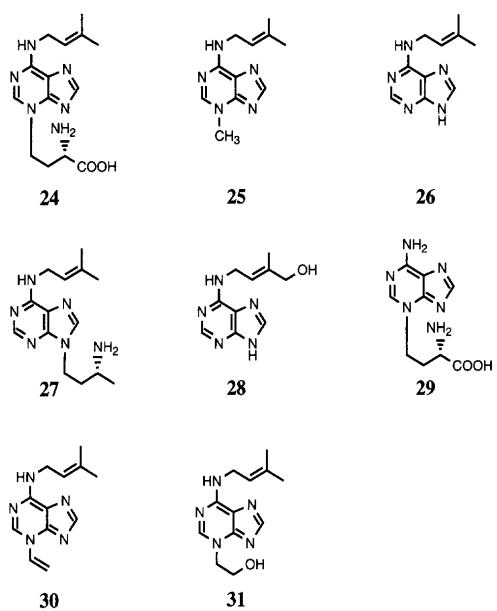


Fig. 8 Chemical structures of discadenine and its related compounds.

inhibitor)が存在し、この因子が発芽制御を行っていることが知られている。本研究はこの抑制因子の化学的本体を明らかにし、ディスカデニン (discadenine, 21)<sup>15)</sup> と命名した (Fig. 8)。

### (1) Discadenine の単離と構造決定

2万枚のペトリ皿にキイロタマホコリカビ *Dictyostelium discoideum* を大量培養し、得られた胞子を 80% エタノールで抽出した。エタノール抽出物は、水透析後、透析外液をアンバーライト XAD-2 のカラムに通し、吸着された物質を含水エタノールで溶出した。20~50% エタノール溶出画分をさらに Sephadex LH-20 のカラムにかけ精製し、無色針状の discadenine を 15 mg 単離した。Discadenine は呈色反応、UV および MS などのデータから 3-メチル-6-(3-メチル-2-ブテニルアミノ) プリン (25) と非常に似た挙動を示し、またニンヒドリン反応が陽性であることから 6-(3-メチル-2-ブテニルアミノ) プリン (2iPA, 26) に  $\alpha$ -アミノ酸が結合した構造をもつことが示唆された。 $\alpha$ -アミノ酸部分の構造は  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルと  $^{13}\text{C}-\text{H}$  カップリングの様子から  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$  であることがわかり、discadenine の平面構造が推定できた<sup>15)</sup>。

以上、discadenine の化学構造は主として物理化学的諸性質に基づいて明らかにされたが、化学合成によって最終的に確認することができた。合成したラセミ型 discadenine は UV, TLC, IR は天然物によく一致した<sup>16)</sup>。また、両者の旋光分散曲線 (ORD) と市販の L- $\alpha$ -メチオニンおよび L- $\alpha$ -ホモセリンおよびこれらアミノ酸のラセミ混合物の ORD との比較実験によって確認された。Discadenine の分子中のアミノ酸部分は S-アデノシル-L-メチオニンから転位される事実から、アミノ酸部分の不斉  $\alpha$ -炭素の立体配置は L 型を

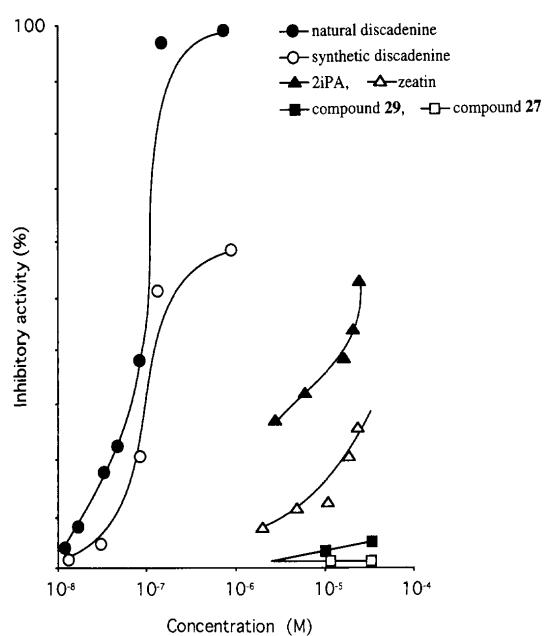


Fig. 9 Inhibitory activity of discadenine and its related compounds on the spore germination of *Dictyostelium discoideum*.

有していることが後の生合成実験において証明されている。

### (2) Discadenine および関連化合物の生理活性

天然 discadenine は 0.1~1.0  $\mu\text{M}$  の濃度で自己の胞子発芽を完全に阻害するのに対し、合成によって得られた ( $\pm$ )-discadenine は天然物質の半分の活性を示すのに過ぎなかったことは、分子中に含まれるアミノ酸部分の絶対配位が L 型であれば活性タイプであり、D 型では不活性であることを示している (Fig. 9)<sup>17)</sup>。さらに、2iPA (26) の 3 位に置換することなく 9 位に置換した位置異性体 (27) は、10  $\mu\text{M}$  でも阻害活性を示さなかったことから、アミノ酸の結合位置も絶対配位と共に活性発現に重要な役割を果たしていることが明らかである。一方、アミノ酸部を欠いた 2iPA (26) や zeatin (28) は 10~50  $\mu\text{M}$  で、30~50% の阻害活性を示したのに対し、イソペンテニル側鎖を欠いた化合物 (29) やアミノ酸の代わりにメチル基を導入した化合物 (25) は共に不活性であった。サイトカイニンのうちでは 2iPA や zeatin は弱いながらも阻害活性を示したが、ベンジルアデニンやカイネチンは全く活性を示さず、このことは植物カルスに対するサイトカイニン活性と粘菌に対する胞子発芽阻害活性との間には相関性がないことを示している。Discadenine の生物活性を粘菌以外の糸状菌の胞子発芽や細菌細胞の増殖に対して調べたが、26~33  $\mu\text{M}$  の濃度でも阻害効果は全く認められず、本物質が自己生産菌の胞子細胞に特異的に作用することを示した。

一方、Discadenine がサイトカイニン活性を示すことを、タバコカルスを用いた実験で証明した<sup>18)</sup>。このサイトカイ

Table 3 Discadenine contents in cellular slime molds and its inhibitory activity on spore germination.

Cellular slime mold Species	Discadenine contents ( $\mu\text{g}/100 \text{ plates}$ )	Inhibition ratio (%) Discadenine concentration 1 ppm	Inhibition ratio (%) Discadenine concentration 10 ppm
<i>Dictyostelium discoideum</i>	298	92	—
<i>Dictyostelium purpureum</i>	11	86	—
<i>Dictyostelium mucoroides</i>	7	98	—
<i>Polysphondylillum violaceum</i>	n.d.	0	0
<i>Polysphondylillum pallidum</i>	n.d.	1	0

n.d.: not detected.

ニン活性が discadenine 自身によるものか、酵素的に分解を受けて遊離な 2iPA が生成して活性発現したものを調べるために、2iPA のプリン環の 3 位にメチル基、ビニル基、ヒドロキシエチル基を導入した化合物を合成し、それらのサイトカイニン活性を測定した。ヒドロキシエチル化合物(31)は discadenine とほぼ同等な活性を示し、メチル(25)およびビニル(30)化合物はカイネチンと同等かそれ以上の活性を示した。以上の結果から、discadenine および 3 位置換 6-(3-メチル-2-ブテニルアミノ) プリンはそのもの自身で活性を有するものであって、分解を受けて活性を示すものでないことが分かった。

### (3) Discadenine の分布と作用特異性

細胞性粘菌は現在まで約 30 種類が見出されており、その中ではタマホコリカビ (*Dictyostelium*) 属とカビモドキ (*Polysphondylillum*) 属が代表的なものである。Discadenine がキイロタマホコリカビ *D. discoideum* 以外の細胞性粘菌にどの程度存在し、またそれによって阻害作用を受けるのか興味がもたれた。ムラサキタマホコリカビ *D. purpureum*、タマホコリカビ *D. mucoroides*、ムラサキカビモドキ *P. violaceum*、シロカビモドキ *P. pallidum* を供試菌に選び discadenine の分布と作用を調べた (Table 3)。その結果、含有量に種間差はあるが、キイロタマホコリカビが属する *Dictyostelium* 属の 2 種には discadenine が存在するが、属が異なる *Polysphondylillum* 属の 2 種にはその存在が確認されなかった。さらに、4 種類の胞子発芽に対する discadenine の阻害活性を測定すると、discadenine を産生できる菌のみが阻害された<sup>19)</sup>。Discadenine の阻害作用を受ける粘菌は、それ自身で阻害因子を合成できる能力をもっている *Dictyostelium* 属に特異的に作用するものであるといえる。Discadenine 感受性粘菌は集合因子である cAMP 感受性粘菌と全く一致することになり、cAMP から discadenine が合成される系で発生分化の制御の鍵を握っていると予想された。

Discadenine は胞子発芽を抑制する機能を有すると同時に、植物細胞の分裂促進活性も併せもつ新しいタイプの生理活性物質として注目を集め、植物病原菌の自己発芽阻害

物質の研究を刺激するとともに、それまで明白でなかったサイトカイニン類の生合成経路が、この生物を用いて初めて実証されたことになり、植物における生合成経路を解明する有力な手掛かりを与えたことになった。

本研究の遂行にあたり、名古屋大学名誉教授であり、本学会会長でありました丸茂晋吾先生にはプラシノステロイド研究の端緒となりました *Distylium* factors 研究を行った大学院時代から今日に至るまで貴重なご指導、ご鞭撻を賜りました。また、岡崎基礎生物学研究所の服部宏之先生には *Distylium* factors 研究で苦楽を共にしながら励ましていただきました。東京工業大学名誉教授池川信夫先生、筑波大学教授田仲可昌先生には、共同研究を通して様々なご教示、ご協力をいただきました。また、富士薬品工業株式会社には有益な化合物のご恵与をいただきました。厚く御礼を申しあげます。

最後に、東京農工大学農学部生物制御化学(旧農薬化学)研究室に所属した学生諸君や先生方には研究全般を通して並々ならぬご協力、ご支援がありました。ここに深く感謝の意を表しますと共に苦楽を共にした人達と受賞の喜びを分かち合いたいと思います。

### 引用文献

- 1) S. Marumo, H. Hattori, H. Abe, Y. Nonoyama & K. Munakata : *Agric. Biol. Chem.* **32**, 528 (1968)
- 2) H. Abe & S. Marumo : *Am. Chem. Soc. Symposium Series* **474**, 18 (1991)
- 3) H. Abe, C. Honjo, Y. Kyokawa, S. Asakawa, M. Natsume & M. Narushima : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 986 (1994)
- 4) K. Wada, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita, K. Nakamura, M. Uchiyama & K. Mori : *Agric. Biol. Chem.* **48**, 719 (1984)
- 5) S. Asakawa, H. Abe, N. Nishikawa, M. Natsume & M. Koshioka : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1416 (1996)
- 6) K. Soeno, Y. Kyokawa, M. Natsume & H. Abe : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 702 (2000)
- 7) S. Takatsuto, N. Yazawa, N. Ikekawa, T. Morishita & H. Abe : *Phytochemistry* **22**, 1393 (1983)
- 8) S. Takatsuto, N. Ikekawa, T. Morishita & H. Abe : *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 211 (1987)
- 9) K. Soeno, Y. Kyokawa, M. Natsume & H. Abe : *J. Pesticide Sci.* **25**, 117 (2000)
- 10) Y. Kyokawa, H. Abe, M. Natsume & M. Koshioka : *J. Pesticide Sci.* **21**, 209 (1996)
- 11) S. Marumo, H. Abe, H. Hattori & K. Munakata : *Agric. Biol. Chem.* **32**, 117 (1968)

- 12) S. Marumo, H. Abe, H. Hattori & K. Munakata : *Nature* **219**, 959 (1968)
- 13) H. Hattori & S. Marumo : *Planta* **102**, 85 (1972)
- 14) 片山正人 : 植物の化学調節 **26**, 11 (1991)
- 15) H. Abe, M. Uchiyama, Y. Tanaka & H. Saito : *Tetrahedron Lett.* **42**, 3807 (1976)
- 16) M. Uchiyama & H. Abe : *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1549 (1977)
- 17) 安部 浩 : 植物の化学調節 **16**, 1819 (1977)
- 18) T. Nomura, Y. Tanaka, H. Abe & M. Uchiyama : *Phytochemistry* **16**, 1819 (1977)
- 19) H. Abe, K. Hashimoto & M. Uchiyama : *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1295 (1981)

**略歴**

安部 浩

生年月日 : 1942 年 9 月 18 日

最終学歴 : 名古屋大学大学院農学研究科

農芸化学専攻修士課程修了

趣味 : 溪流釣, 鮎釣

**Society Awards 2001**

(on prominent achievement)

## Studies on Brassinosteroids and Naturally-Occurring Novel Plant Growth Regulators

In the course of searching for new natural plant growth regulators which may be attributed to the crop production and plant protection, the author discovered novel three kinds of substances, named brassinosteroids, chloroindole auxins and discadeneine, respectively. This paper reports the abstracts regarding their isolation, chemical structures, structure-activity relationship and physiological activity.

### 1. Brassinosteroids

Brassinosteroid (BR) is a sixth natural plant hormone that plays an essential regulatory role in plant growth and development. In history, there are two independent studies at the beginning of BR researches : one was brassin (1970), a crude extracts from *Brassica napus* pollen by USDA group in the USA, and another was *Distylium* factors (1968) from *Distylium racemosum* leaves by Nagoya University group in Japan. An active substance contained in brassin was isolated and identified to be brassinolide that is the first BR clarified in plant kingdom. Following to the discovery of BL *Distylium* factors were successively identified to be the mixture of BL and its analogues. BR is an unique steroid, exhibiting a specific biological activity. BR can be regarded as the most important discovery in the field of plant growth regulation.

#### (1) *Distylium* factors in fresh leaves of *Distylium racemosum*

*Distylium racemosum* leaves Sieb. et Zucc., known as "Isunoki" in Japanese, is an evergreen tree belonging to the family *Hamamelidaceae*. It is well known that several varieties of aphids form insect galls on the young, fresh leaves or buds of this tree. The attacked leaf soon begins to swell and to form a quite small gall and the

insect gall on the leaf rapidly grows and enlarges. *Distylium* factors research was begun in an effort to identify the substance which induces the abnormal growth, swelling and expansion observed during insect gall formation. An active substance was found in the neutral fraction of methanol extracts of the insect galls when bioassayed by means of a rice-lamina inclination test (LJT), which had been established as an auxin bioassay. A preliminary experiment revealed the presence of the active substance not only in the insect galls but also in fresh healthy leaves of *Distylium racemosum*. MeOH extracts of the leaves (430 kg) were separated by usual way to give an ethylacetate-soluble neutral substance. That was chromatographed on a silica gel column, Sephadex LH-20 gel filtration, Silica gel TLC, and Alumina column affording *Distylium* factors A<sub>1</sub> (751 µg), A<sub>2</sub> (50 µg) and B (236 µg), respectively. The amounts were too small to technically perform their structural determination by means of spectroscopic analysis at that time. Their chemical characteristics, biological activities and the universality of distribution provided the following significant information.

*Distylium* factors : (1) are detectable as a purple spot under UV light after spraying 0.5% vanillin-sulfuric acid and heating ; (2) are a few hundred times more active than IAA in LJT ; (3) possess a broad spectrum of biological activities compared with the known plant hormones ; and (4) are distributed widely in the plant kingdom.<sup>1)</sup>

#### (2) Search for naturally-occurring brassinosteroid in plants

Immediately after the structural determination of BL, BL and homoBL were chemically synthesized. Their dramatically strong activity in LJT strongly suggested

that *Distylium* factors might be BR. We reinvestigated to isolate and to identify *Distylium* factors from various plant sources using LJT. The ethyl acetate-soluble neutral fraction partitioned from Isunoki fresh leaves (16 kg) was purified by successive chromatographic separations on silica gel, Amberlite XAD-2, and on silica gel for preparative HPLC, repeated HPLC on Fuji ODS-Q3 and on Develosil ODS-5 to afford the active substances, which were identified to be BL, norbrassinolide, castasterone, norcastasterone, teasterone (TE), typhasterol and 3-dehydroteasterone. Reinvestigation proved the *Distylium* factors to be a mixture of seven kinds of BRs.<sup>2,3)</sup> The LJT bioassay, which was extremely sensitive and specific to BR, was modified as a micro-quantitative analytical method for BR bioassay.<sup>4)</sup> Search for BR using the LJT bioassay, coupled with the microanalytical techniques using GC/MS and LC/MS, led to the identification of fourteen BRs, nine compounds among them were new congeners, with structural variations from diverse plant species and plant tissues. BR presented in all parts of vegetative tissues of plants, the amounts in the tissues were less than one  $\mu\text{g}$  in one kilogram fresh weight, and endogenous BR differed among plant species and plant tissues.

### (3) Structure-activity relationship of brassinosteroid

An investigation on structure-activity relationship with LJT indicated that BR activity required: (a) Two pairs of vicinal diol at C $2\alpha$ , C $3\alpha$  and C $22R$ , C $23R$ . Removal of one hydroxyl group from the A-ring extremely reduced activity. (b) One alkyl substituents at C-24, which enhanced activity compared with unsubstituted hydrogen. (c) The A/B *trans* ring junction. All of natural BRs were the *trans* fused A/B ring junction. (d) The B-ring of 6-ketone or its 7-oxa lactone. The B-ring variation divides natural BR into three groups, so that 7-membered B-ring lactone (6-oxo-7-oxa lactone), 6-membered B-ring ketone (6-ketone or 6-deoxo) and lack of 6-oxo group, the latter 6-deoxo BR was extremely low in activity so the oxygen is essential for activity. Among them, the 6-oxo-7-oxa lactone exhibited the highest activity. Unnatural regiosomeric 7-oxo-6-oxa lactone was strikingly less active than the corresponding 7-oxa-lactone. The structural variation at the A-ring and the B-ring and their comparative biological activity have led to postulate two hypothetical pathway for biosynthesis of BL.

### (4) Metabolism of brassinosteroid

A variety of modified BRs were detected in metabolic studies of BL and its biosynthetic intermediate TE with plant seedlings or plant cultured cells, including epimerization, esterification and glucosylation. Metabolism of BL indicated epimerization of the C $2$  or C $3$  hydroxyl occurring prior to glucosylation in cucumber seedlings and cell cultures. Metabolism of TE by lily cultured cells showed glucosylation and esterification at 3 $\beta$ -

position, being identified as 3-*O*- $\beta$ -D-glucosyl TE, 3 $\beta$ -lauryl TE and 3 $\beta$ -myristyl TE, which had been already found in the lily pollen.<sup>5,6)</sup> Acyl and/or glucosyl conjugation should be a reversible reaction.<sup>7)</sup> The TE conjugates might be a storage form or a transport form of free TE, being involved in regulation of the level of biosynthetic intermediate in BL biosynthesis.

As mentioned above, research on BR started with the discovery of *Distylium* factors and brassin. Recent researches is growing rapidly and advancing in the knowledge of biosynthesis and metabolism, and also molecular genetic analysis are opening a new insight in the physiology. BR is an essential hormone for regulation of plant growth and development. BR can be regarded as the most important discovery in the field of plant growth regulation. BR and related compounds will be made available in a near future for crop production and plant protection as a new type of plant growth regulator.

## 2. Chloroindole auxins

In screening work to find new auxins or auxin-related compounds in plants, we observed that the methanol extracts from immature seeds of *Pisum sativum* exhibited fairly strong growth promoting activity, when assayed by hypocotyl swelling of *Phaseolus mungo*. Preliminary experiment suggested the presence of a new auxin because of its faint coloration against the Ehrlich reagent and fairly strong activity more than IAA in the hypocotyl swelling test. The active principle was extracted according to the usual procedure to give the neutral fraction which is soluble in acetonitrile and insoluble in hexane. It was chromatographed on an alumina column, and the biologically active fraction was eluted with ethyl acetate-hexane (15 : 85). After repeated recrystallization, the active substance (25 mg) was obtained as slightly brownish prisms, mp 122°C. This substance was positive for the Beilstein test, a molecular ion at *m/z* 223 along with 30% intensity of P+2, UV and  $^1\text{H}$  NMR data strongly suggesting that methyl chloroindole acetate. The active substance was hydrolyzed to the free acid which was coincident with the reported value of either 4- or 6-chloro derivative. The substance isolated from immature seeds and its hydrolyzed acidic substance were completely identical with the synthesized 4-Cl-IAA and its methyl ester, respectively, with respect to the IR and UV spectra, and biological activity.<sup>8)</sup> 4-Chloro derivative exhibited auxin activity comparable to that of methyl indoleacetate in the *Avena* first internode and section tests. It was noteworthy that chlorine containing organic compound was found in higher plant as a plant hormone.

PPC (isoPrOH : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O = 8 : 1 : 1) of the acidic fraction separated from the methanol extracts detected two active substances at *Rf* s 0.2–0.3 and 0.6–0.7, respec-

tively. The latter *Rf* corresponded to that of free 4-Cl-IAA. The acidic substance was purified by means of the counter current distribution, Sephadex LH-20 gel filtration chromatography, and silicic acid partition chromatography to give 3.8 mg of crude crystals, which was identical to a synthetic sample of 4-Cl-IAA with respect to IR, UV, *Rf* values on TLC and biological activity.<sup>9)</sup> As methyl ester of 4-Cl-IAA might have been an artifact derived from the acid 4-Cl-IAA. Acetone was used for extraction of immature seeds instead of methanol. The measurement of their auxin activity using the hypocotyl swelling test showed that there is no appreciable difference between acetone and methanol extracts in the activity of the neutral and acidic fractions. 4-Cl-IAA was the second natural auxin since the discovery of IAA in 1934. 4-Cl-IAA was higher activity than IAA in several known bioassay systems and the duration of its biological activity in treated plant was fairly longer than that of IAA. From these results many kinds of chloroindole derivatives were synthesized and their biological activity was measured using various bioassay systems. Some of them are undertaken to the field test as a root initiator or root growth promoter.

### 3. Discadenine

The cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* has come to get many attentions from a point of view of a model system for studying the mechanisms of development and differentiation. Spore germination is the first developmental event in the life cycle of this organism. This process is regulated by a germination inhibitor as a self-inhibitor. When the spore density becomes very high, germination will not take place at all. The isolation and characterization of this type of substance will be very important because such substances will be offer a clue to unveil so complicated germination mechanism in fungi. To isolate and characterize the spore germination inhibitor named discadenine, *Dictyostelium discoideum* was cultured with *Aerobacter aerogenes* on agar plates. Spores harvested from twenty thousands of Petri plates were extracted with 80% ethanol. The dialyzate of its concentrated extracts was passed through an Amberlite XAD-2 column and eluted with aqueous ethanol. The activity appeared in fractions of 20–50% ethanol in water. The active fractions were chromatographed on Sephadex LH-20 using 80% ethanol as the elutant, to give about 15 mg of colorless needles of discadenine.

The UV spectra of discadenine resemble closely those of a model compound N<sub>6</sub>, 3-disubstituted adenine moiety, 3-methyl-6-(3-methyl-2-butenylamino)purine. Peak assignments of <sup>13</sup>C NMR of discadenine were straightforward together with the additional information about the structure from <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H spin couplings. These results indicated that discadenine is 3-(3-amino-3-carboxy-

propyl)-6-(3-methyl-2-butenylamino)purine.<sup>10)</sup> The structure was finally confirmed by comparison with its synthetic compound.<sup>11)</sup> Discadenine is the first natural purine derivative possessing  $\alpha$ -amino acid residue on the 3-position of the purine ring.

Discadenine completely inhibited the germination of its own spores at the concentration of 10<sup>-6</sup> M. Besides its pronounced spore germination inhibitory activity, discadenine exhibits significant cytokinin activity in the tobacco callus bioassay. Identification of discadenine have drawn much attention to study on spore germination inhibitors contained in pathogenic fungi. The presence of discadenine was recognized in all species of the genus *Dictyostelium*. The highest content was found in the strain *D. discoideum*, and much smaller content in *D. purpureum* and *D. mucoroides*. However, no discadenine was detected in the genus *Polysphondylium*; *P. violaceum* and *P. pallidum*. When tested for effect on spore germination, discadenine effectively inhibited that of the spore of all species of the genus *Dictyostelium*, whereas two species of the genus *Polysphondylium* were not inhibited. These results showed that discadenine is a genus-specific spore germination self-inhibitor for *Dictyostelium*<sup>12)</sup> and that there is a certain correlation between discadenine and cAMP in *Dictyostelium*, because discadenine inhibits spore germination of the species of cellular slime molds in which an aggregation factor is cAMP.

### REFERENCES

- 1) S. Marumo, H. Hattori, H. Abe, Y. Nonoyama & K. Munakata : *Agric. Biol. Chem.* **32**, 528 (1968)
- 2) H. Abe & S. Marumo : Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications (ACS Symp. Series 474) eds. by H. G. Cutler, T. Yokot & G. Adam : *Am. Chem. Soc.*, USA 18 (1991)
- 3) H. Abe, C. Honjo, Y. Kyokawa, S. Asakawa, M. Natsume & M. Narushima : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 986 (1994)
- 4) K. Wada, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita, K. Nakamura, M. Uchiyama & K. Mori : *Agric. Biol. Chem.* **48**, 719 (1984)
- 5) S. Asakawa, H. Abe, N. Nishikawa, M. Natsume & M. Koshioka : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1416 (1996)
- 6) K. Soeno, Y. Kyokawa, M. Natsume & H. Abe : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 702 (2000)
- 7) K. Soeno, Y. Kyokawa, M. Natsume & H. Abe : *J. Pesticide Sci.* **25**, 117 (2000)
- 8) S. Marumo, H. Abe, H. Hattori & K. Munakata : *Agric. Biol. Chem.* **32**, 117 (1968)
- 9) S. Marumo, H. Hattori, H. Abe & K. Munakata : *Nature* **219**, 959 (1968)
- 10) H. Abe, M. Uchiyama, Y. Tanaka & H. Saito : *Tetrahedron Lett.* **42**, 3807 (1976)
- 11) M. Uchiyama & H. Abe : *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1549 (1977)
- 12) H. Abe, K. Hashimoto & M. Uchiyama : *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1295 (1981)