HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ナス科植物に含まれる生理活性物質とその配糖体成分の化学的研究
Author(s)	田崎, 弘之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第3968号
Issue Date	1991-09-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3059250
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49760
Type	doctoral thesis
File Information	000000246688.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ナス科植物に含まれる生理活性物質とその配糖体成分の化学的研究

田崎弘之

(1)

ナス科植物に含まれる生理活性物質とその配糖体成分の化学的研究

田崎弘之

-----目次-----

緒論　1

第一部　バレイショ塊茎形成誘導物質の化学的研究　9

第一章　合成によるチュベロン酸グルコシドの構造確認　9
第一節　チュベロン酸グルコシド（1）の合成　9
第二節　天然チュベロン酸グルコシドの構造の確認　11
第三節　天然物と合成物との活性の比較　23

第二章　ジャスモン酸誘導体による塊茎形成誘導活性と構造との相関　27
第一節　ジャスモン酸（10）とチュベロン酸（4）　28
第二節　C－1官能基の変換　28
第三節　C－2側鎖の変換　28
第四節　C－3側鎖の変換　30

第三章　1－ジヒドロジャスモン酸メチルの各光学活性体の精製と絶対構造の決定　35
第一節　1－ジヒドロ体（24）の各ジアステレオマーの単離、精製と相対立体配置の決定　36
第二節　各光学活性体の絶対配置の決定　53

第四章　1－ジヒドロジャスモン酸メチルを用いた塊茎形成誘導活性と立体化学の相関　58
第一節　各ジアステレオマー（ラセミ体）の活性比較　58
第二節　各光学活性体での活性比較　62

第五章　ジャスモン酸類のマイクロチューバー生産系への応用

検討　６７
第一節　モデル系の作成　６８
第二節　ジャスモン酸類の無菌茎断片での塊茎形成誘導活性　６９
第三節　ジャスモン酸類の無菌茎断片での塊茎形成誘導法の確立　７０
第六章　塊茎形成過程の考察　７７
第一節　塊茎形成と細胞壁微小管の関係　７７
第二節　塊茎形成時のポリアミン量の変化　８４
第七章　実験部　９１
第一節　機器分析　９１
第二節　黄化徒長茎を用いた塊茎形成誘導活性試験　９２
第三節　無菌茎断片を用いた塊茎形成誘導活性試験　９３
第四節　1-Oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)-cyclopentane-3-acetic acid(1)　の合成　９３
第五節　ジャスモン酸誘導体の調製　９５
第六節　１－ジヒドロ体（２４）の各ジアステレオマーの単離、精製と相対立体配置の決定　１００
第七節　１－ジヒドロ体（２４）の各光学異性体のＰＣＣ酸化　１０２
第八節　マイクロチューバー生産のモデル系　１０３
第九節　培養細胞細胞壁微小管の観察　１０７
第十節　バレイショ無菌茎断片中のポリアミン量の定量　１０８
第二部　ナス科植物の配糖体成分および根外分泌物の化学的研究　１０９
第一章　バレイショ葉メタノール抽出物の不揮発性画分に含まれる配糖体の検索　１１０
第一節　不揮発性画分の調製およびβ－グルコシダーゼ加水分解による遊離アグリコンの同定　１１０

第二章　バレイショ各生育ステージにおける配糖体の量の変動　１１９

第三章　葉たばこ中に含まれるテルペン配糖体　１２７
　第一節　葉たばこ不揮発性成分の分離および酵素を用いた配糖体の検索　１２７
　第二節　ソラナスコン配糖体の単離と構造決定　１２９
　第三節　その他のセスキテルペン配糖体　１３９

第四章　水耕およびれき耕培養によるタバコ根浸出物中のセスキテルペン　１５０
　第一節　水耕法によるタバコ外分泌物質の検索　１５１
　第二節　れき耕法によるタバコ外分泌物質の検索　１５９

第五章　実験部　１６２
　第一節　バレイショ葉メタノール抽出物の分離　１６２
　第二節　バレイショ各生育ステージでの配糖体含量の定量　１６２
　第三節　葉タバコ中のセスキテルペン配糖体の単離　１６３
　第四節　水耕およびれき耕実験　１６８

総括　１７０

謝辞　１７３

引用文献　１７４

略語

BSA	bovine serum albumin
EI-MS	electron impact mass spectrometry
FD-MS	field desorption mass spectrometry
FID	flame ionization detector
FITC	fluoroscein isothiocyanate
GC-MS	a combined system of gas chromatograph-mass spectrometer
HPLC	high performance liquid chromatography
IgG	immunogloblin G
MS培地	Murashige-Skoog 培地
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
ODS	octadecyl silicate
PBS	physiological salt solution
PCC	pyridinium chlorochrlomate
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PPTS	pyridinium p-toluenesulfonate

ABA
GABA

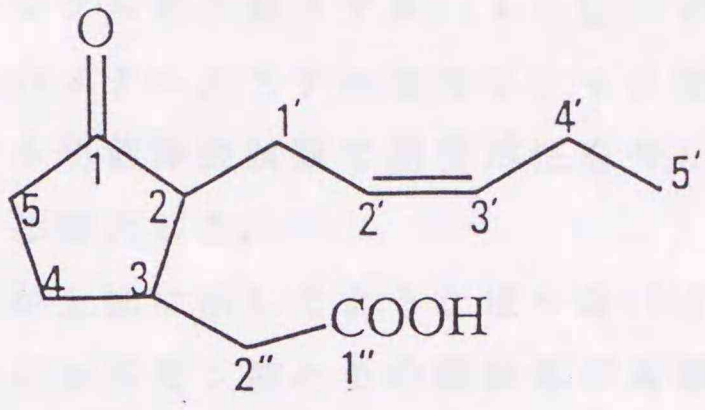
緒論

ナス科植物（Solanaceae）は、ナス（Solanum melongena）、トマト（Lycopersicon esculentum）、タバコ（Nicotiana tabacum）、ペチュニア（Petunia hybrida）などを含み全世界に約９０属２０００種ある[1]。観賞用としてペチュニア、バンマツリフユサンゴ（Solanum psuedo-capsicum）、ルリヤナギ（Solanum glaucophyllum）、ホオズキ（Physalis alkekengi）などがあり、食用としてナス、トマト、トウガラシ（Capsicum annuum）、ピーマン（Capsicum angulosum）、バレイショ（Solanum tuberosum）がある。またアルカロイド含有植物が多くヒヨス（Hyoscyamus niger）、ベラドンナ（Atropa belladonna）、チョウセンアサガオ（Datura metel）、ハシリドコロ（Scopolia japonica）、クコ（Lycium chinese）、イヌホオズキ（Solanum nigrum）等は薬用植物として利用され、高等植物の中でも大きな比重をしめている。その中でタバコ、バレイショ、トマト、ナスといったような栽培作物は人類の生活に深くかかわっている植物である。これら植物の成分の研究は古くからおこなわれ数多くの化学物質の単離同定がなされてきた。

バレイショはジャガイモ属（Solanum）の植物で約１５０種の野生種と８種の栽培種からなる[1]。その生産量がコムギ（Triticum aestivum）、イネ（Oryza sativa）、トウモロコシ（Zea mays）およびオオムギ（Hordeum vulgare）に次ぐ主要作物である。バレイショ塊茎は地下のふく枝先端の次頂部の肥大成長により形成される。ふく枝は長日高夜温条件（塊茎非誘導条件）では伸長を続けるが短日低夜温条件（塊茎誘導条件）では伸長を停止し、塊茎を形成する[2]。Ｇｒｅｇｏｒｙ[3]は塊茎誘導条件により葉内で特異的な塊茎形成物質　”Ｔｕｂｅｒ　ｉｎｄｕｃｉｎｇ　ｓｔｉｍｕｌｕｓ”が形成され、これが塊茎形成を直接誘起するとし、接き木実験によってこれを実証した。幸田らは短日条件下のバレイショ葉から塊茎形成誘導活性を有する物質としてチュベロン酸グルコシドを単離し構造を決定した[4,5]。

チュベロン酸の類縁化合物であるジャスモン酸とその関連化合物は高等植物、糸状菌、昆虫に広く分布する化合物であり、様々な生理活性が報告されている。ジャスモン酸はイネ種子の成長を阻害したり[6]、レタス（Lactuca

scariola）種子の発芽およびその幼胚軸、根の伸長を阻害することが知られている[7]。さらに寒天培地上のツバキ（Camellia japonica）やホウセンカ（Impatiens balsamina）、ユリ（Ecballium elaterium）の花粉の発芽を阻害することから、ジャスモン酸は高等植物の花粉の発芽の調整因子と考えられている[8]。



ジャスモン酸（１０）

また、ジャスモン酸とその関連化合物が老化促進物質であるとする報告もある。アベナ葉を用いたアッセイでジャスモン酸メチルが老化を促進することが報告されている[9、10]。この老化促進効果は光照射下ではＡＢＡよりも強い。ジャスモン酸とジャスモン酸メチルはカイネチンによって引き起こされるアベナ葉の老化抑制を阻害する[9]。　上田らは[11]ジャスモン酸による老化促進作用がＡＢＡと同様であるとしている。

ジャスモン酸はカイネチンによって引き起こされるカルス成長を４５μＭで阻害するが（ＡＢＡの場合４５０μＭ必要）、細胞の肥大阻害は少ない[13]。また、ジャスモン酸とその関連化合物はオーキシンとは関係なくサイトカイニンやジベレリンの作用に関係する細胞の代謝を阻害すると報告されている[12、13]。これはジャスモン酸とその関連化合物が老化のプロモーターであるばかりでなく細胞分裂の阻害剤であることを示している。

ジャスモン酸メチルはラノリン中０．５％濃度か５０μｌの気化物でトマトの成熟時にリコペンの蓄積を阻害しβ－カロテンの蓄積を促進する。この知見はメチルジャスモン酸がノイロスポレンからリコペンへの変換を阻害し、

β－ゼアカロテンとγ－カロテンを経るノイロスポレンからβ－カロテンへの変換を促進することを示唆している[14、15]。

２－エピジャスモン酸メチルとジャスモン酸メチルは果樹害虫ナシヒメシンクイ（Grapholitha molesta Busck）の雄の触覚から単離されている。これらの成分は雌を誘引する物質の協力剤であることがわかっている[16、17]。

ククルビン酸、ククルビン酸メチル、１－O－β－Ｄ－グルコピラノシルククルビン酸とそのメチルエステルはカボチャの種子から単離された[18、19]。これらすべてがイネ幼苗伸長試験で阻害活性を有している。その活性はメチルエステルになると増大した。

これらの化合物が上記に示したような様々なバイオアッセイの系で強い活性を示すことからジャスモン酸とその類縁体が高等植物に広く分布し生理的に重要な役割を持つ新しい型の植物ホルモンではないかと言う説が出ている。Ｂｒｕｃｋｎｅｒら[20]は三つのアミノ酸と結合したジャスモン酸を植物から検出し、既存の植物ホルモン代謝で起きる縮合反応がジャスモン酸の代謝でも存在することを示唆している。

ジャスモン酸類の構造活性相関については以下の報告がある。ジャスモン酸とその類縁化合物の部分構造は老化促進活性を高めるためにはシクロペンタノン環を有し、Ｃ－３位にメチルアセテート、Ｃ－２位に２シス－ペンテニルかn－ペンチル基が必要とされる[12]。（－）－ジャスモン酸とその立体異性体（＋）－２－エピジャスモン酸の様々な生理活性試験においては（＋）－２－エピジャスモン酸のほうが（－）－ジャスモン酸よりわい性稲幼鞘のジベレリンの促進効果を効果的に阻害する[12]。また、ジャスモン酸は、オオムギ、エンバクの芽生えの成長で両方ともクロロフィル、カロチノイドの減少に由来する老化様白化現象を引き起こし、遊離の酸はそのメチルエステルよりも活性が高いと報告されている[21]。

ジャスモン酸の生合成経路についてはＶｉｃｋおよびＺｉｍｍｅｒｍａｎによりリノレン酸からジャスモン酸への酵素的な経路が提唱されている[22、23]。最近、ＶｉｃｋおよびＺｉｍｍｅｒｍａｎは１２－オキソ－フィトジエノ酸（１２－オキソ－ＰＤＡ）のＣ－１３位の側鎖の立体化学だけでなくＣ－１５の二重結合の存在も酵素反応により支配されていると報告している[24]。

以上、バレイショ塊茎形成誘導物質とその類縁化合物ジャスモン酸について概説した。チュベロン酸類の生理活性について調べることは植物の生育機構の理解に役立つのみならず、塊茎形成の人為的制御手法の開発にあたっても役立つと思われる。すなわち、無菌的な組織培養によるマイクロチューバーの大量培養系への適用や、新しい植物成長調節剤の開発をする上で役立つものと考える。

一方、タバコはナス科、ニコチアナ属（Nicotiana）の植物の総称であり現在までに６６種が知られている[25]。そのなかで栽培種は N. tabacum と N. rustica の２種類であるが後者は現在ではほとんどが栽培されておらず栽培種といえば N. tabacum をさす。タバコの成分に関しては、古くから多くの研究者たちの研究対象とされてきた。１９５６年Ｒｏｗｌａｎｄら[26]は黄色種葉たばこの主要成分である炭素数４５の鎖状イソプレン骨格からなる高級不飽和アルコールのソラネソール、ジテルペン炭化水素であるネオフィタジエンを同定した。また、大西ら[27-29]のたばこ香気成分に関する研究では黄色種およびバーレー種葉たばこを水蒸気蒸留して得られた精油成分から６１種類の化合物が同定されている。その後葉たばこばかりでなく煙成分の研究に関しても目ざましい進展がみられ、１９６７年の Ｓｔｅｄｍａｎの総説[30]には１２００種類以上の葉たばこ成分および煙中成分が報告されている。１９７９年の藤森および金子の総説[31]では約８００種類のたばこ香気成分が記載されている。その後、高木[32]によってあらたに１９種の化合物が報告されるなど現在までに９００種類以上の化合物がたばこ香気成分として報告されている。

１９７４年の Ａｎｄｅｒｓｏｎら[33,34]の報告によると、彼らは黄色種葉たばこのアセトン抽出物をβ－グルコシダーゼで加水分解し、その生成物中より、ソラベチボンのヒドロキシ誘導体４種類を単離、構造決定した。また児玉ら[35-39]はこの方法を用いて黄色種葉たばこから１０種類のイオノン関連化合物、５種類のセスキテルペンの配糖体を単離構造、決定している。このような配糖体は、柑橘類のミカン等からフェニルプロパノイド配糖体の単離報告[40]があるものの研究例が少ない。これらテルペン配糖体を含めた不揮

発性成分の研究が立ち遅れているのはこれを分離、精製することが困難であったためと考えられる。以上成分研究が一番行われてきたタバコについて概説した。タバコも含めナス科の未解明な配糖体について研究を進めることはその生理的役割を調べるうえで、また新たな有用物質を得るうえでも重要と考える。

また、バレイショで疫病菌（Phytophlora infestans）感染組織から、リシチン、リシチノール、フィチュベリンなどのファイトアレキシンが単離構造決定[41、42]されている。タバコ植物の場合ＴＭＶ感染によって生成するファイトアレキシンの研究が行われている[43-46]。これらの研究はほとんどが、葉をもちいて行われているが根の組織についてはナスの根に含まれる抗菌物質が調べられているが[47]、研究例が少ない。

本研究においては、第一部においてバレイショ葉から単離構造決定された塊茎形成誘導物質チュベロン酸グルコシドの生理活性について構造活性相関の点からその誘導体について塊茎形成誘導活性を調べその活性型の立体構造について検討を加えた。また塊茎形成時のポリアミン量の変動、塊茎形成誘導活性を有する物質の他の活性を調べた。また、塊茎形成誘導物質の利用法としてマイクロチュバー生産系への適用を試みた。

また第二部では代表的なナス科植物であるタバコ、バレイショについてその配糖体成分について存在を調べ、その単離、構造決定を行うとともに、それらの生育ステージでの量的変動について調べた。また、タバコの水耕、れき耕培養により、タバコ根から分泌される物質の単離、同定を行った。

以上により、分離精製の難しさから未着手であったナス科植物の配糖体成分とそのアグリコンについて化学的な検討を行った。

以下に各章の概要を示す。

第一部

第一章

天然のチュベロン酸グルコシドの側鎖の相対配置の決定と構造確認のため、これを合成した。合成品はジアステレオマー混合物で、これを分離精製しス

ペクトルデータから相対配置を決定し、併せて天然体の相対配置を決定した。さらにこれらの合成品と天然体のバレイショ塊茎形成誘導活性の比較を行うことにより、活性発現と側鎖の立体化学に関連があることを見いだした。

第二章

ジャスモン酸誘導体について塊茎形成誘導の構造活性相関を調べるため、各種誘導体を調製し、これらの活性を調べることにより、ジャスモン酸骨格の３つの部分構造に関して、誘導活性に必須の条件を明らかにした。

第三章

第一章で示唆された側鎖の立体化学と活性との相関を調べるために１－ジヒドロジャスモン酸メチルの８つの光学異性体を分離し、スペクトル解析、化学変換によりそれぞれの絶対構造を決定した。

第四章

側鎖の相対配置で、シス型、トランス型の違いがバレイショ塊茎形成誘導活性に差を示すことを見いだし、これをより明らかにするため第三章で調製した１－ジヒドロジャスモン酸メチルの各光学異性体について活性を比較し、活性発現にそれぞれの側鎖の配置が関与していることを明かにした。

第五章

新しい種いも生産系として期待されるマイクロチューバー大量培養系にジャスモン酸メチルを利用する方法を検討した。その結果、継代培養したバレイショ無菌茎断片の節部にＬ－アスコルビン酸等強い還元性を有する物質をジャスモン酸メチルを同時に添加することにより塊茎形成を誘導することを可能にした。

第六章

チュベロン酸グルコシドによる塊茎形成誘導の機作を調べるため、塊茎形成時に起こる現象について観察、検討した。　塊茎形成が起こる初期の過程

でふく枝先端の細胞壁微小管がいったん消失し塊茎形成が始まるのではないかという考えに基づきバレイショの培養細胞にジャスモン酸メチルを加え、その消失効果を確認した。併せて同様な微小管消失活性を有する数種の除草剤の塊茎形成誘導活性を調べた。除草剤には塊茎形成活性が認められなかった。

また、無菌植物を用いて塊茎形成期における生体内のポリアミン量の変動を調べたところえき芽からの茎の発生初期および塊茎形成初期にそれぞれいったんポリアミン量が最大になりその後減少し、器官分化の際にポリアミンの生成が一時的に増加することを明らかにした。

第二部

第一章

バレイショ葉（男爵）中のチュベロン酸グルコシド以外の配糖体成分の存在について検討し、メタノール抽出物から調製して得た不揮発性画分をβ－グルコシダーゼで処理することにより７つのイオノール配糖体、１つのセスキテルペン配糖体の存在を確認した。イオノール配糖体がタバコ以外にも存在することを明らかにした。

第二章

バレイショ葉中に存在するイオノール配糖体の種類および存在量をバレイショの成長過程に応じた各ステージごとに検討した。その結果、バレイショの成長とともに種類および存在量がともに増加し、最終ステージで急激に増大した。この変化はタバコのイオノール配糖体の場合[48]とよく一致することを明らかにした。

第三章

黄色種葉たばこ中に存在する配糖体成分について調べ６つの新規セスキテルペン配糖体を単離、構造決定した。うち４つのアグリコンはソラナスコン骨格を有する新規化合物であった。これらのアグリコンはすべてタバコのフ

ァイトアレキシンとして知られるセスキテルペンあるいはそのヒドロキシ誘導体であることを明らかにした。

第四章

タバコについてその根から分泌される物質の検索を水耕、れき耕培養により得た培養液を用いて行い、６つの抗菌活性が知られているセスキテルペンを単離、同定した。このうち１つはタバコ葉から初めて見いだされたセスキテルペンであり、根においても葉とは別個にこれらがつくられることを明かにした。

※本論中でのジャスモン酸類の命名法は以下のようにした。

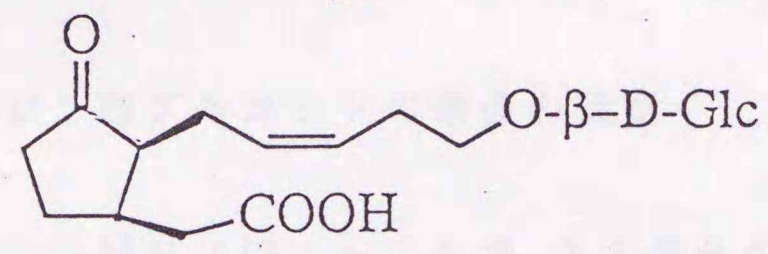
ジャスモン酸の側鎖の立体異性体について、天然物と同じ２R，３S 配置およびその鏡像体 ２S，３R配置のものはエピジャスモン酸と表現し、これらのジアステレオマー ２S，３S および ２R，３Rはジャスモン酸と表現した。また、チュベロン酸の側鎖の立体異性体について、天然物と同じ２R，３S 配置およびその鏡像体 ２S，３R 配置のものはチュベロン酸（ＴＡＧ）と表現し、これらのジアステレオマーはイソチュベロン酸（イソＴＡＧ）と表現した。他の類縁化合物についても同様の表現をした。

第一部　バレイショ塊茎形成誘導物質の化学的研究

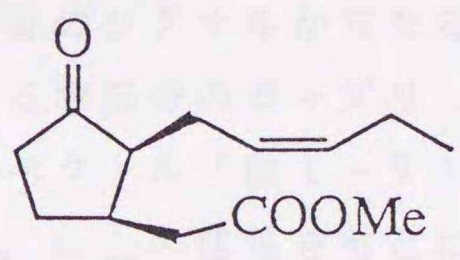
第一章

合成によるチュベロン酸グルコシド（1）の構造確認

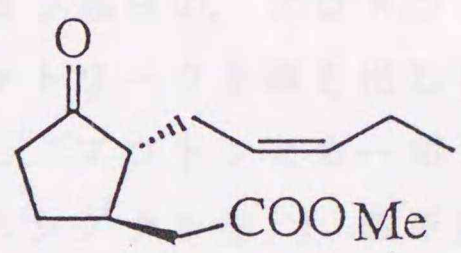
吉原らによりバレイショ葉より単離された塊茎形成誘導物質はスペクトルデータの解析からその構造は　1-oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（tuberonic acid 5'-O-β-D-gulucopyranoside（ＴＡＧ））（1a）と決定されたが、２位と３位の絶対配置は決定されていない。そこでチュベロン酸グルコシド（１a）の塊茎形成誘導活性等の研究に用いるため、および２位と３位の絶対配置を調べるためチュベロン酸グルコシド（1）を合成し、そのスペクトル解析を行った。



TAG(1a)



9a



9b

図１－１　バレイショ塊茎形成誘導物質

第一節

チュベロン酸グルコシド（1）の合成

側鎖の相対配置でシス－トランスの比が約９５：５である　５'－ヒドロキシジャスモン酸メチル（ラセミ体、5）とα-D-bromo-tetraacetyl-glucose

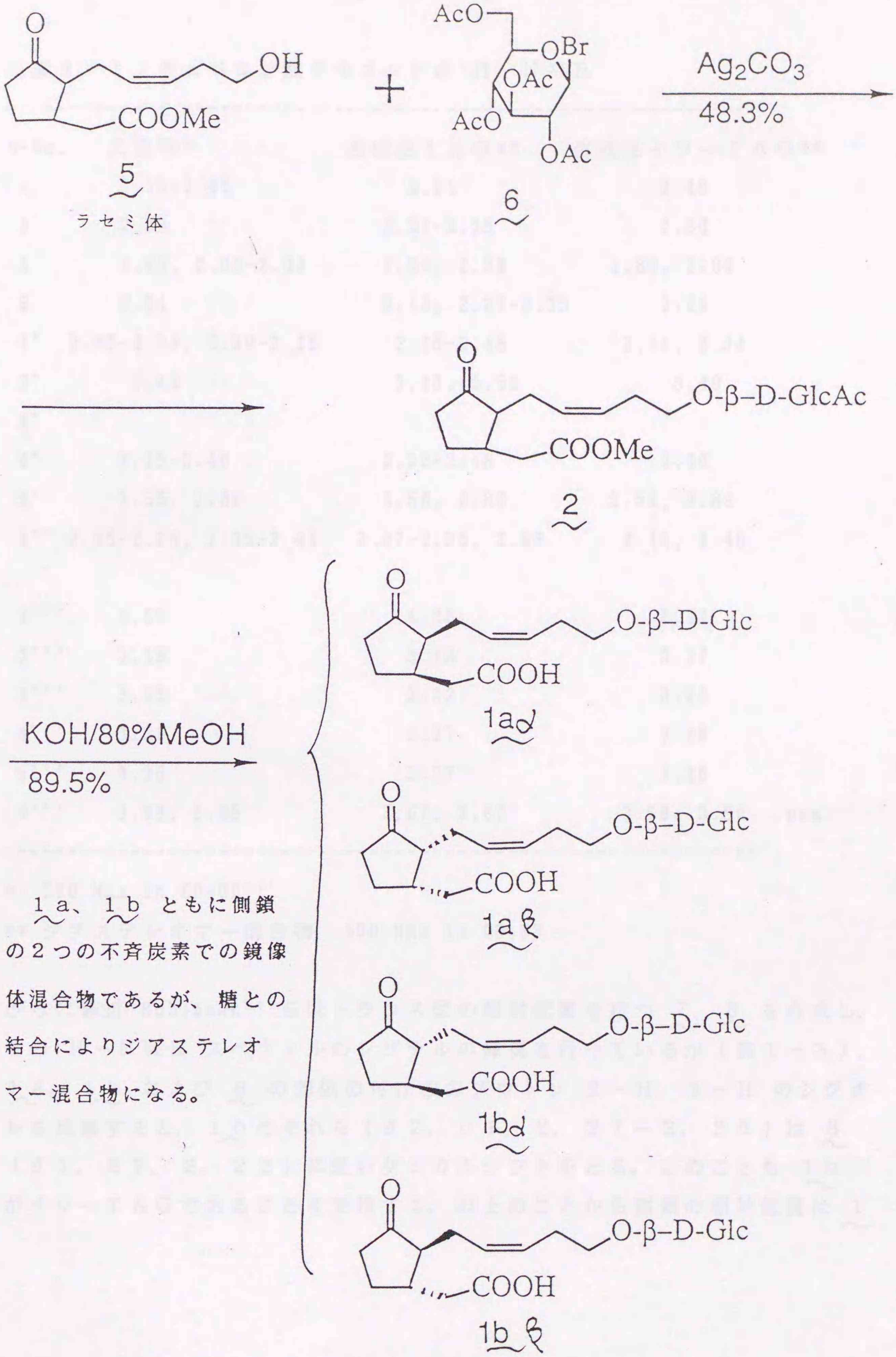
（6）を、Koenigs-Knorr法[52]によりカップリングさせてチュベロン酸メチル－2，3，4，6－テトラ－O－アセチル－β－グルコシド（2）を合成した（図1－2）。反応生成物は、原料の 5 がラセミ混合物であることからグルコシド化により 2 の4つのジアステレオマー混合物となる。次に反応生成物をKOH／80%MeOHに溶解させ、60°Cで加水分解し糖部分のアセチル基およびアグリコンのメチルエステルをはずした後、反応液を希塩酸で中和処理し、さらにイオン交換樹脂カラムにかけ無機塩を除いた。これを高速液体クロマトグラフィー（ODS YMC AM343 40% MeOH）によって精製し、面積比 95：5で検出される2つのピーク成分（1a，1b）を単離した。これらについて次節で述べるNMRによるスペクトル解析を行った。

第二節

天然チュベロン酸グルコシドの構造の確認

1a は^{1}H－NMR（図1－3）で 23個分のプロトンのシグナル、^{13}C－NMR（図1－6）で 18個分のカーボンのシグナルを観測した。^{1}H－NMR COSY スペクトル（500 MHz、CD_3OD）により、プロトン16個分のシグナルからなるアグリコン部分の、プロトン7個分のシグナルからなる糖部分のカップリングのネットワークを導き出した。次にC－H相関スペクトル（図1－7）を測定し、プロトンとカーボンの結合を明らかにした。以上の結果をもとにこれらのシグナルを 1 の平面構造上に帰属させた（表1－1，2）。 1b についても同様の解析を行い、プロトンとカーボンの帰属を行った。

次に 1a と 1b の側鎖の相対配置について検討を加えた。グルコシル化する前の原料 5 （ラセミ体、ジアステレオマー混合物）はトランス型とシス型のジアステレオマーの比率が約95：5であり、このことから反応生成物 1 でもほぼ同じ比率でトランス型とシス型の側鎖の異性体が混在していると考える。すなわち、HPLC分取で得られたメジャーなピーク成分 1b はイソーTAG、マイナーなピーク成分 1a はTAGであると考えた。



1a、1b ともに側鎖の２つの不斉炭素での鏡像体混合物であるが、糖との結合によりジアステレオマー混合物になる。

図１－２　チュベロン酸グルコシド（1）の合成

表１－１　チュベロン酸グルコシドの^{1}Ｈ－ＮＭＲ

H-No.	天然物*	合成品ＴＡＧ**	合成品イソーＴＡＧ**
2	2.35-2.45	2.01	2.46
3	2.80	2.27-2.35	2.80
4	1.88, 2.00-2.05	1.54, 2.23	1.86, 2.09
5	2.24	2.13, 2.27-2.35	2.24
1’	2.05-2.20, 2.30-2.35	2.35-2.48	2.14, 2.34
2’	5.40	5.40, 5.50	5.49
3’			
4’	2.35-2.45	2.35-2.48	2.40
5’	3.55, 3.86	3.56, 3.89	3.56, 3.89
1’’	2.05-2.20, 2.35-2.45	2.27-2.35, 2.68	2.14, 2.46
1’’’	4.26	4.28	4.27
2’’’	3.18	3.18	3.17
3’’’	3.35	3.32	3.33
4’’’	3.26	3.27	3.26
5’’’	3.26	3.27	3.26
6’’’	3.68, 3.88	3.67, 3.87	3.66, 3.86 ppm

*　270 MHz in CD_3OD[54]

** ジアステレオマー混合物、500 MHz in CD_3OD

さらに最近 Bohlmann[53]らはトランス型の相対配置を持つ 7、8 を合成し、その^{1}Ｈ－ＮＭＲ スペクトルのシグナルの帰属を行っているが（表１－３）、1a，1b および 8 の側鎖の付け根のプロトン ２－Ｈ，３－Ｈ のシグナルを比較すると、1b のそれら（δ２．０１、２．２７－２．３５）は 8（δ１．８７、２．２２）に近いケミカルシフトをとる。このことも 1b がイソーＴＡＧであることを支持する。以上のことから側鎖の相対配置は 1

表１－２　チュベロン酸グルコシドの^{13}Ｃ－ＮＭＲ

C-No.	天然物*	合成品ＴＡＧ**	合成品イソＴＡＧ**
1		221.9	221.7
2	54.4	55.1	53.7
3		39.1	37.1
4	27.0	28.2	26.7
5	36.5	38.7	36.3
1’	24.5	26.4	24.2
2’	128.6	128.9	128.4
3’	130.2	128.9	129.7
4’	29.1	29.0	29.1
5’	70.5	70.2	70.2
1’’		39.8	34.9
2’’		176.1	176.4
1”’	104.4	104.3	104.3
2”’	75.4	75.1	75.1
3”’	78.2	77.9	77.9
4”’	72.0	71.6	71.6
5”’	78.4	78.1	78.1
6”’	63.1	62.7	62.8 ppm

*　67.9 MHz in CD_3OD[54)]

** ジアステレオマー混合物、125 MHz in CD_3OD

が２Ｓ，３Ｒおよび２Ｒ，３Ｓ、１ｂ が２Ｓ，３Ｓおよび２Ｒ，３Ｒと結論した（図１－１０）。

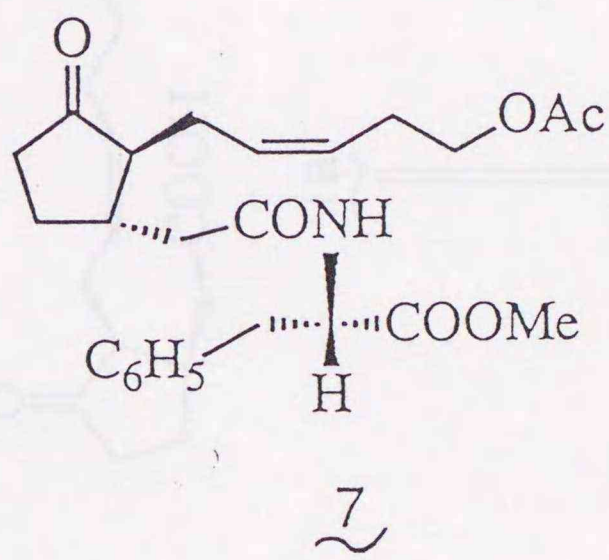
次に、バレイショ葉から単離されたチュベロン酸グルコシド（１）のＮＭＲスペクトルデータと合成物 １ａ、１ｂ のそれらを比較、照合することに

表１－３　チュベロン酸類縁化合物の^{1}Ｈ－ＮＭＲデータ・

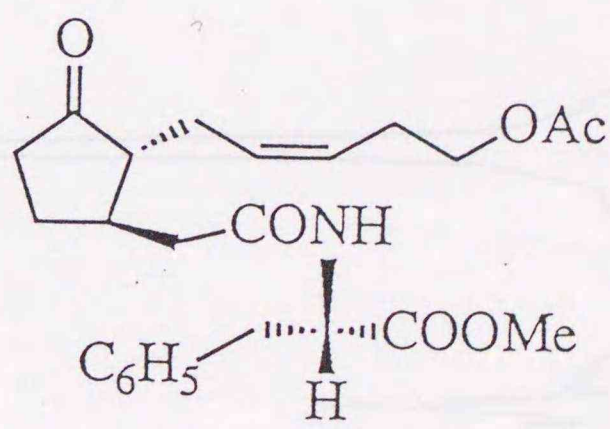
H-No.	7	8
2	1.84	1.87
3	3.30	2.22
4	1.42, 2.10	2.13
5	2.10	2.07
1'	2.35	2.35
2'	5.42	5.44
3'	5.42	5.44
4'	2.35	2.38
5'	4.02, 4.05	4.05
1"	2.35, 2.58	2.32, 2.56

ppm

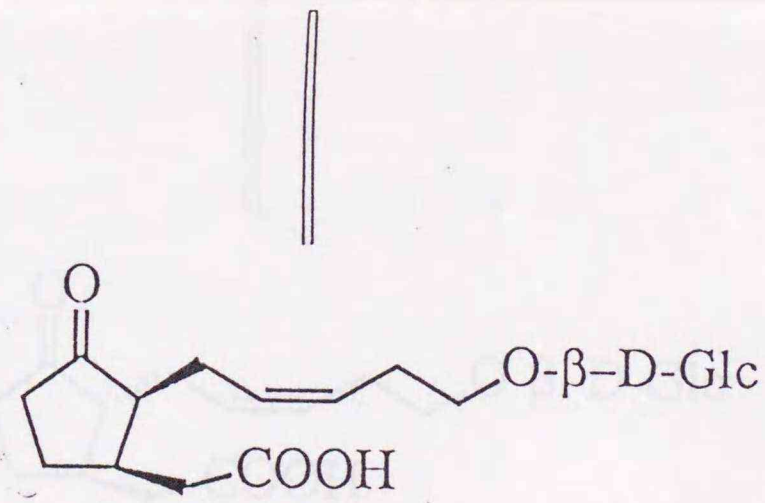
*400 MHz in CDCl3　Bohlmann et al.[53]



7



8



1a

500 MHz in CD_3OD

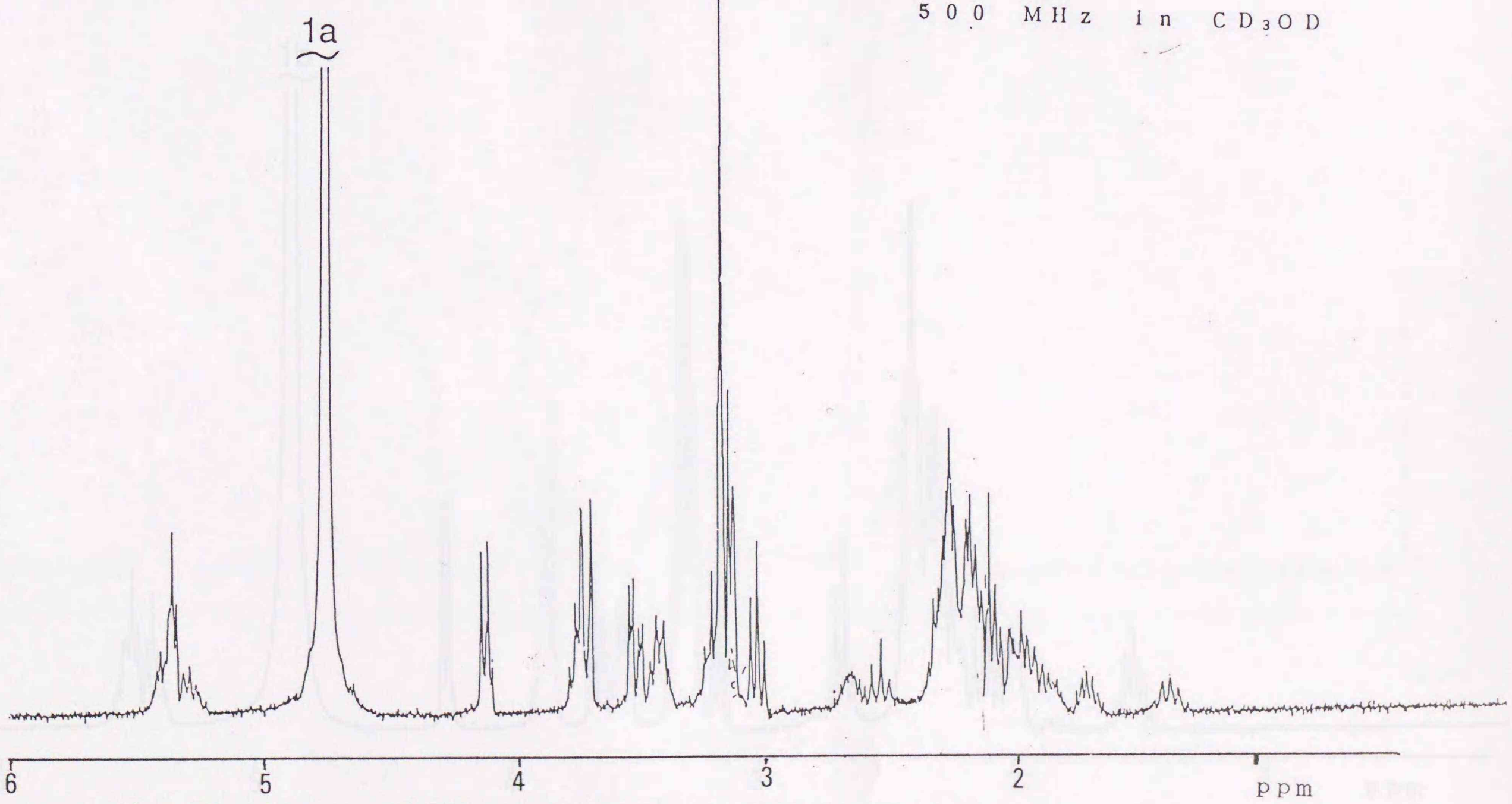
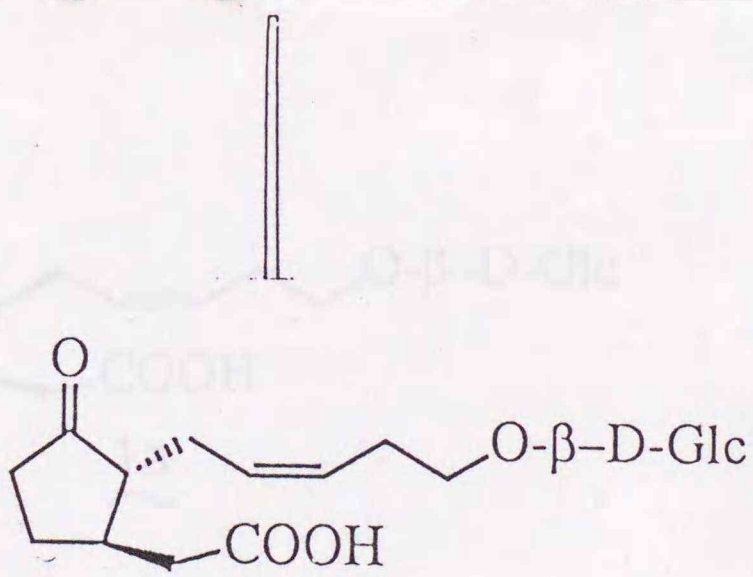


図１－３　チュベロン酸グルコシド（合成品、ＴＡＧ）の^{1}Ｈ－ＮＭＲ



1b

500 MHz in CD_3OD

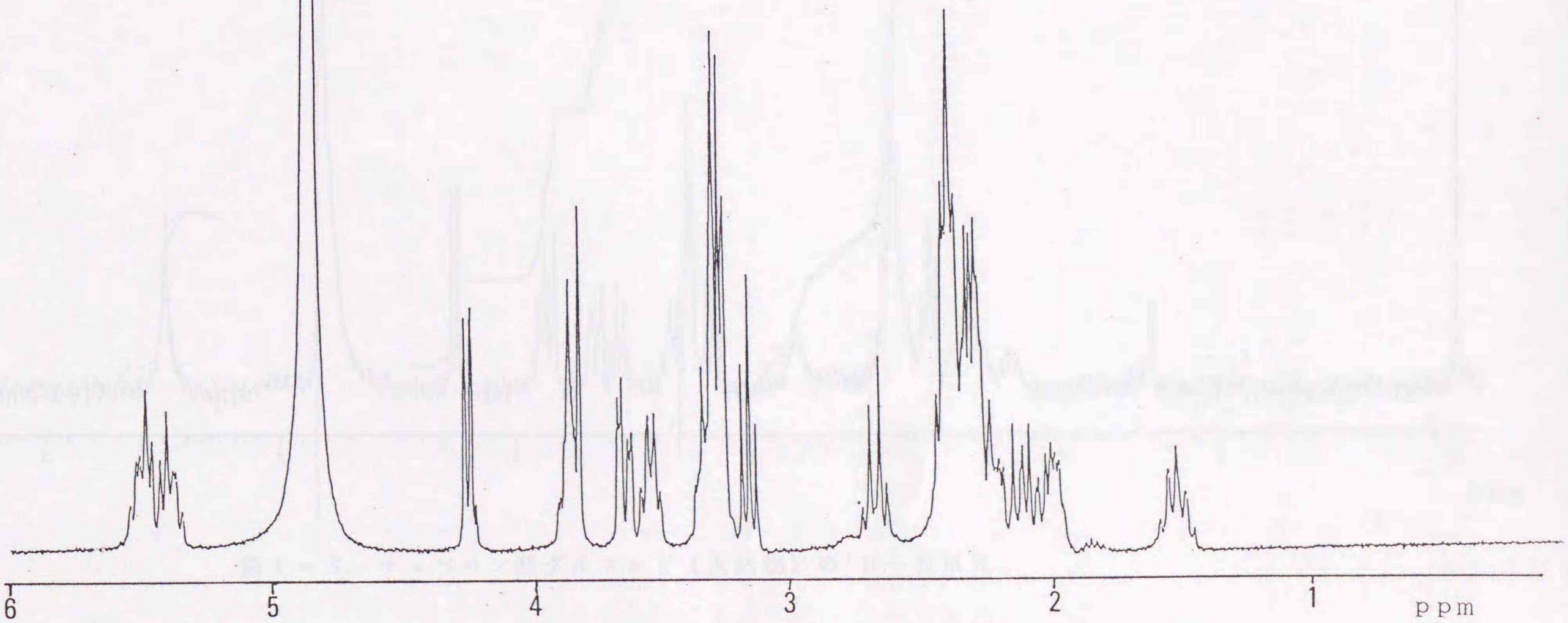
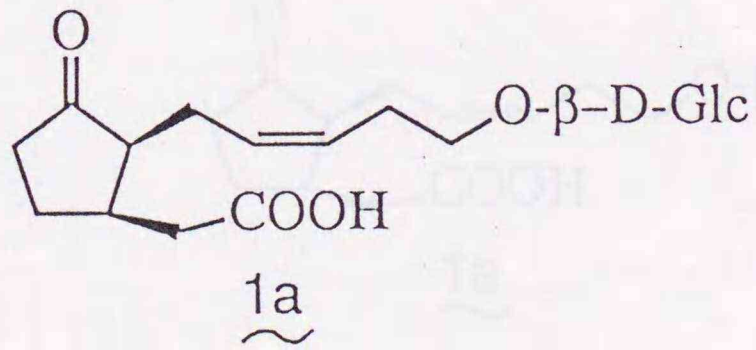
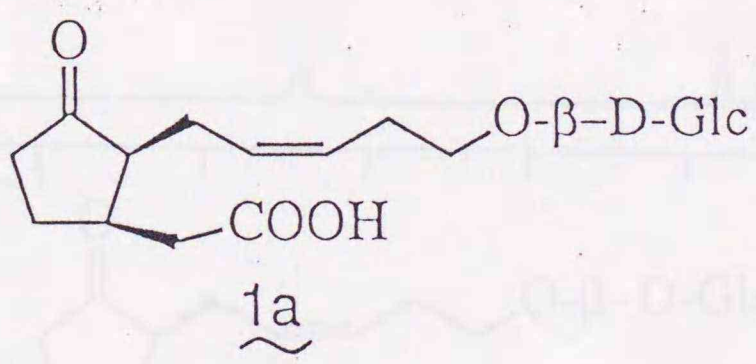


図１－４　チュベロン酸グルコシド（合成品、イソＴＡＧ）の^{1}Ｈ－ＮＭＲ



1a

図１－５　チュベロン酸グルコシド（天然物）の^{1}H－ＮＭＲ



1a

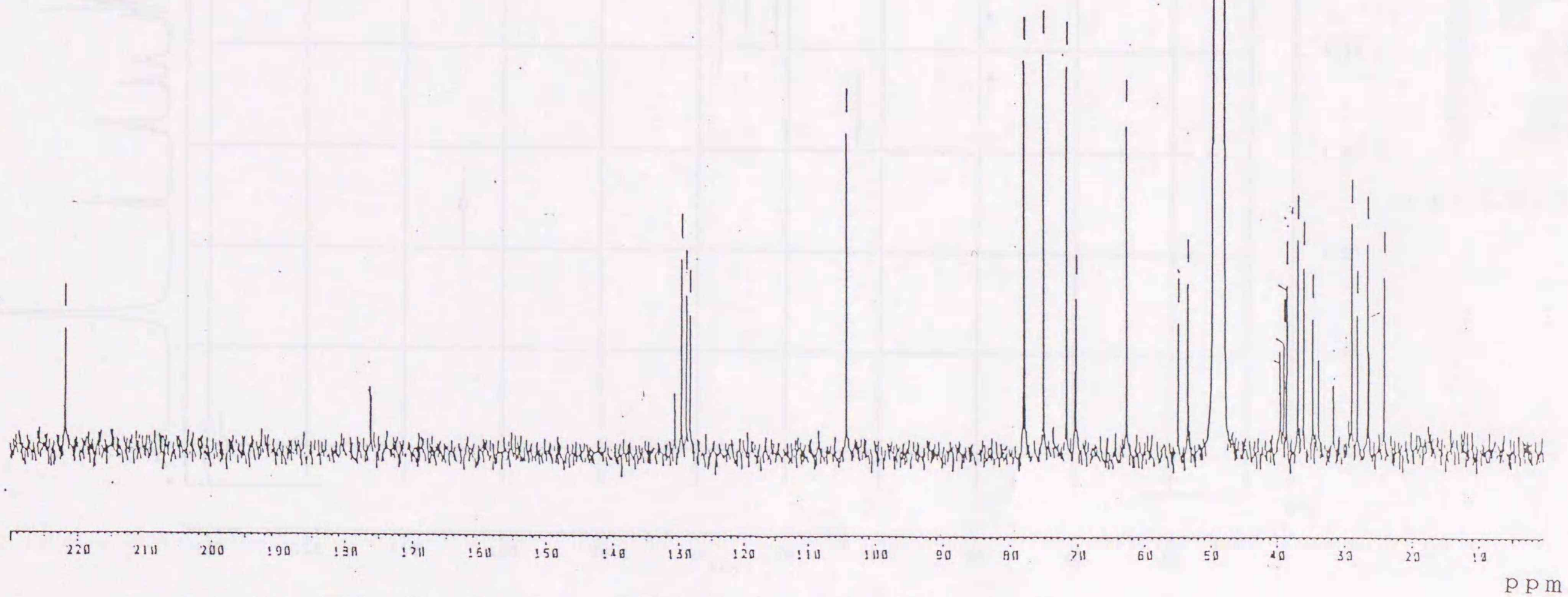


図１－６　チュベロン酸グルコシド（合成品、ＴＡＧ）の^{13}Ｃ－ＮＭＲ

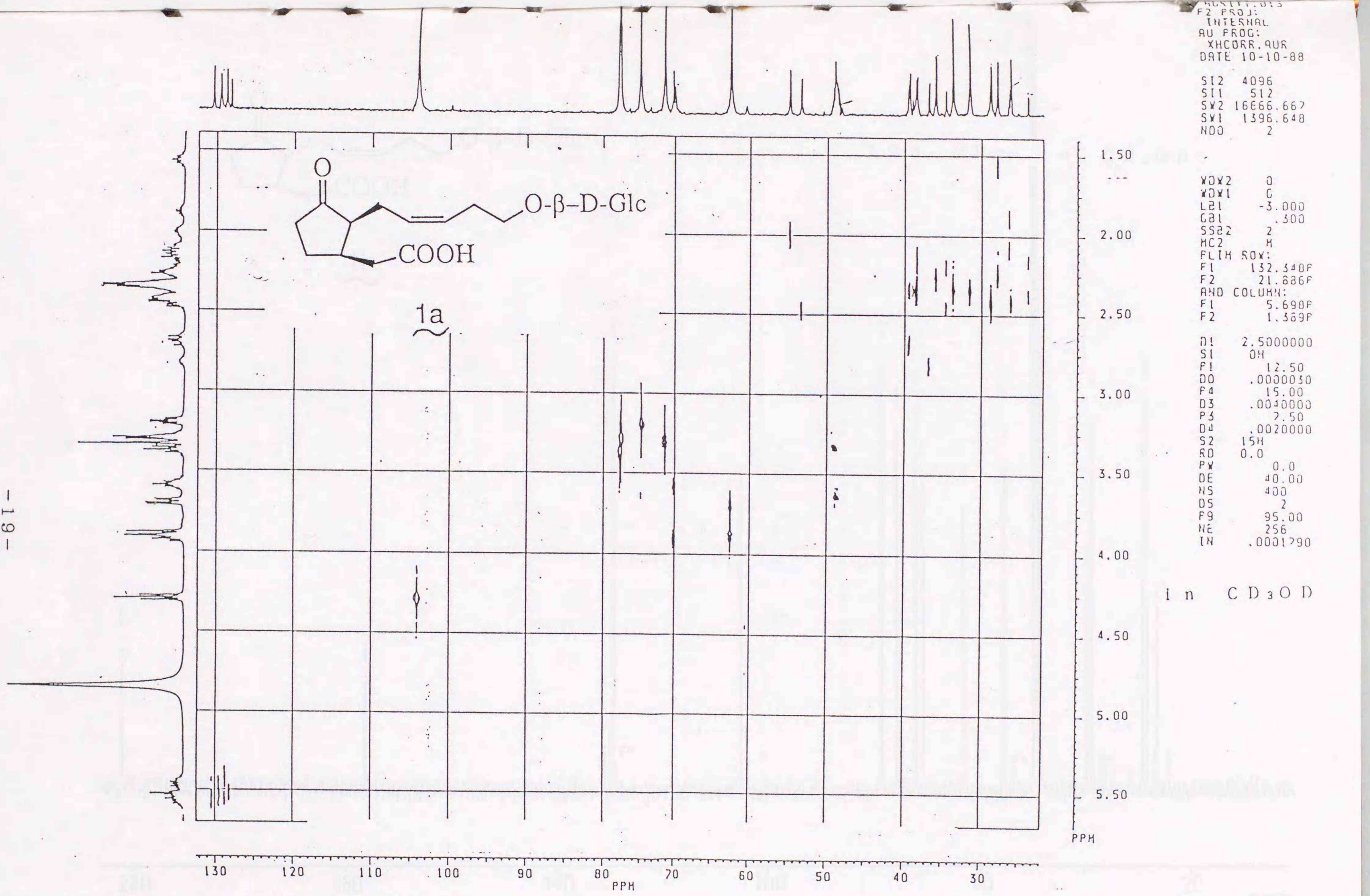
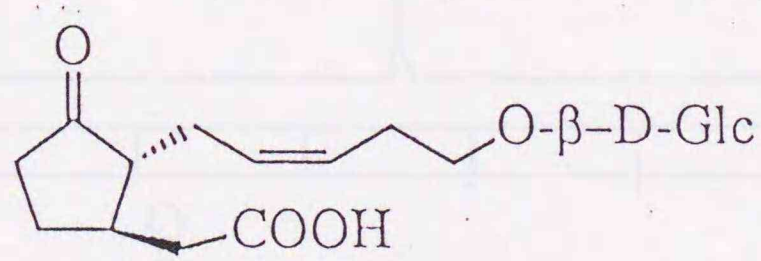


図１－７　チュベロン酸グルコシド（合成品、ＴＡＧ）のＣＨ相関



1b

図１－８　チュベロン酸グルコシド（合成品、イソＴＡＧ）の^{13}Ｃ－ＮＭＲ

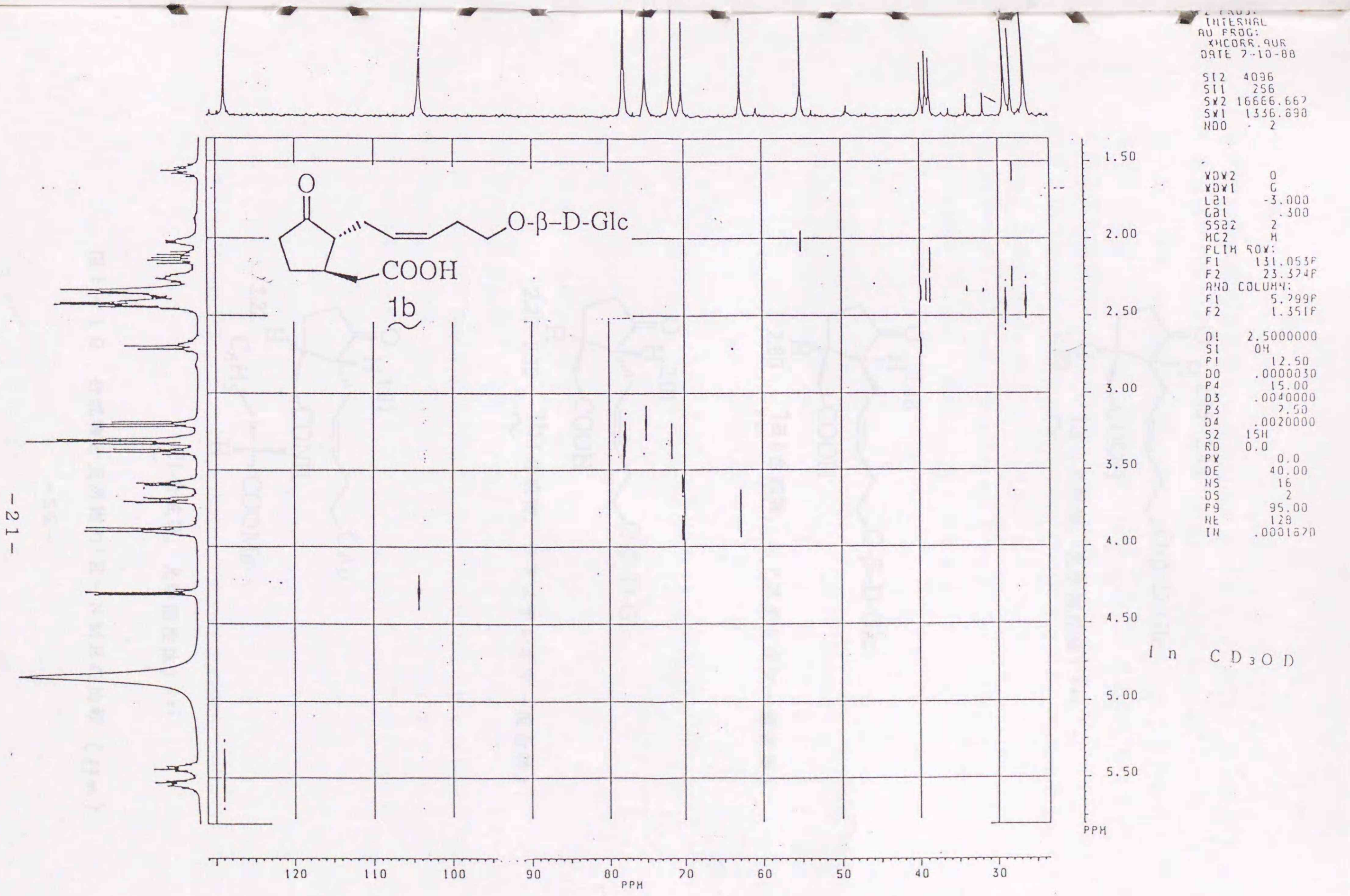
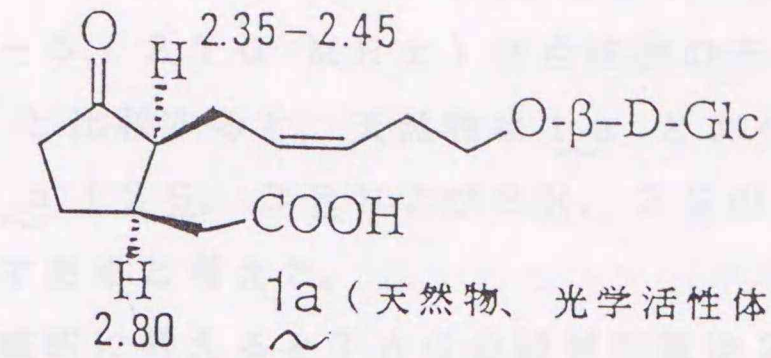
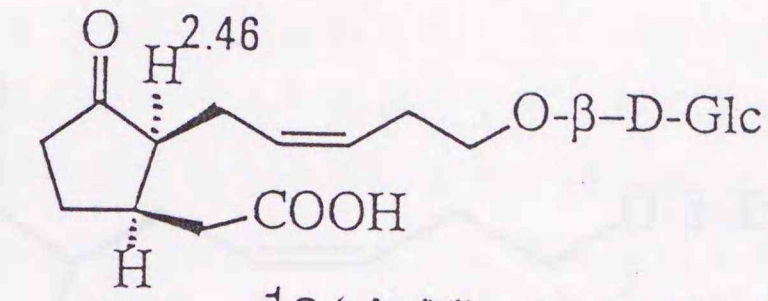


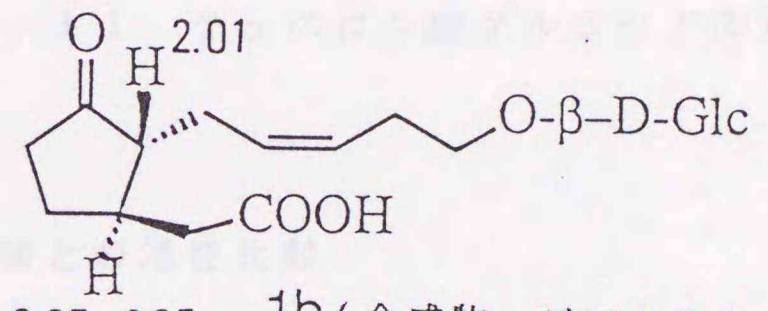
図１－９　チュベロン酸グルコシド（合成品、イソＴＡＧ）のＣＨ相関



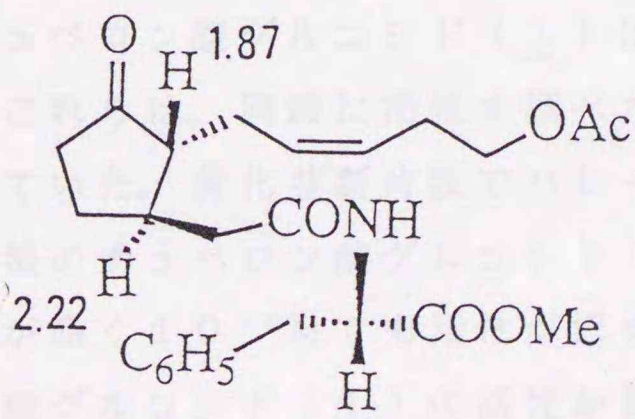
1a（天然物、光学活性体）[54]



1a（合成物、ジアステレオマー混合物）



1b（合成物、ジアステレオマー混合物）



8（合成物、光学活性体）[53]

図１－１０　合成物と天然物の^{1}Ｈ－ＮＭＲの比較（ppm）

より天然物の相対配置を明らかにした。すなわち、天然物の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトル（図１－５、２７０ ＭＨｚ）は合成物のそれら（図１－３，４、５００ ＭＨｚ）と比較すると、天然物は1～a とよく一致する。従って、天然物は合成物 1～a（２S，３Rおよび２R，３Sのジアステレオマー混合物）と同じ相対配置であると考えた。

さらに、生合成的に考えるとＴＡＧの絶対配置は２S，３Rであることが考えられるので天然のチュベロン酸グルコシドの構造を(2S,3R)-1-oxo-2(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)-cyclopentane-3-acetic acid（1～a）であると決定した。

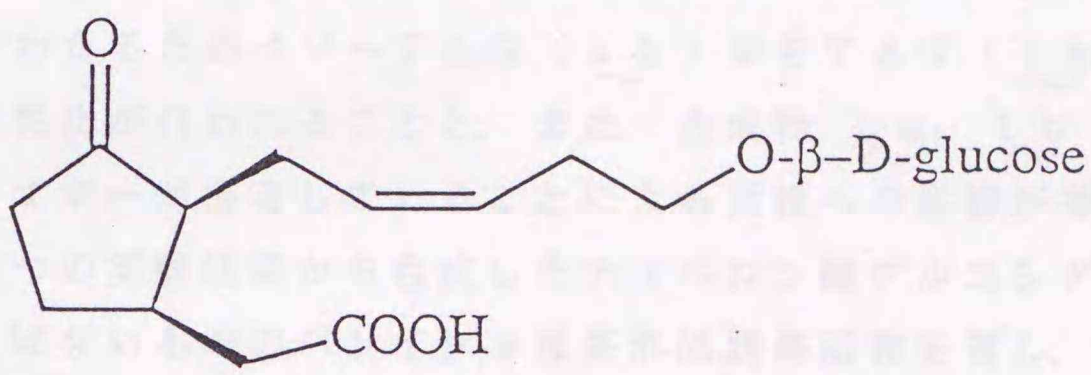


図１－１１　チュベロン酸グルコシドの構造

第三節

天然物と合成物との活性比較

合成チュベロン酸（4～）および合成チュベロン酸グルコシド（1～）について、イソ体９５％混在のままバレイショ塊茎形成誘導活性を無菌茎断片法(実験の部参照）で調べた。この結果（図１－１２）、合成物のチュベロン酸（4～）およびチュベロン酸グルコシド（1～）は10^{-6}Ｍでは活性が認められなかった。またこれらは、同時に活性を調べたジャスモン酸メチル（9～）よりも活性が劣っていた。黄化茎断片法でバレイショ塊茎形成誘導活性を調べた報告では、天然のチュベロン酸グルコシド（1～）はジャスモン酸メチル(9～）よりも活性が高く10^{-8}Ｍでも活性が認められている[55]。今回の実験で合成チュベロン酸グルコシド（1～）の活性が低かった理由として、試験方法

が異なることと、合成物では２位、３位の側鎖の相対配置が天然型と違うイソ体が多く存在し、それに活性がないという可能性を考えた。

そこで、次に高速液体クロマトグラフィーにより分離精製したチュベロン酸グルコシド（1）の側鎖に関する異性体ＴＡＧ（1a、ジアステレオマー混合物）、イソーＴＡＧ（1b、同）について無菌茎断片法を用いて活性の比較を行った。結果を図１－１３に示す。無菌茎断片法ではＴＡＧ（1a）はジャスモン酸メチル（9）と同等の活性を示し、イソーＴＡＧ（1b）よりも若干活性が強かった。幸田らによれば黄化茎断片法でも同様の結果が得られている[55]。これは、活性型が天然物と同じ２S，３Rであることを示唆している。イソ体でも活性が認められ、また活性の差が大きくないのは実験が長時間にわたるためイソーＴＡＧ（1b）からＴＡＧ（1a）へのまたはその逆の異性化が行われることと、また、合成物 1a，1b のそれぞれのジアステレオマーが混在していることによる活性への影響が考えられる。

以上、２つの実験結果から合成したチュベロン酸グルコシド（1）は天然物にはおよばないもののバレイショ塊茎形成誘導活性を有し、天然物と同じ側鎖の相対配置を有するＴＡＧ（1a、ジアステレオマー混合物）がイソーＴＡＧ（1b、ジアステレオマー混合物）よりも活性が強いことが明らかになった。

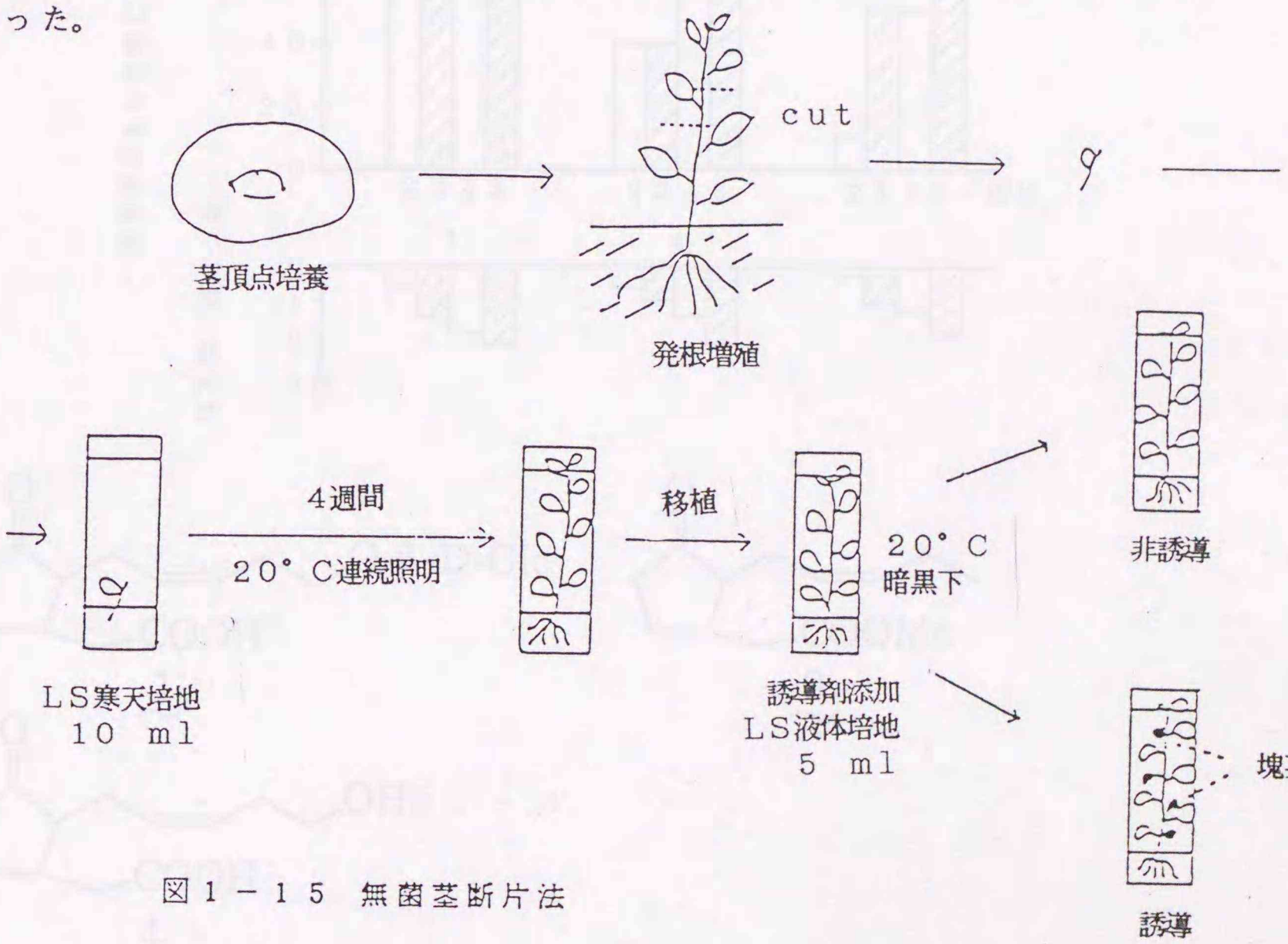
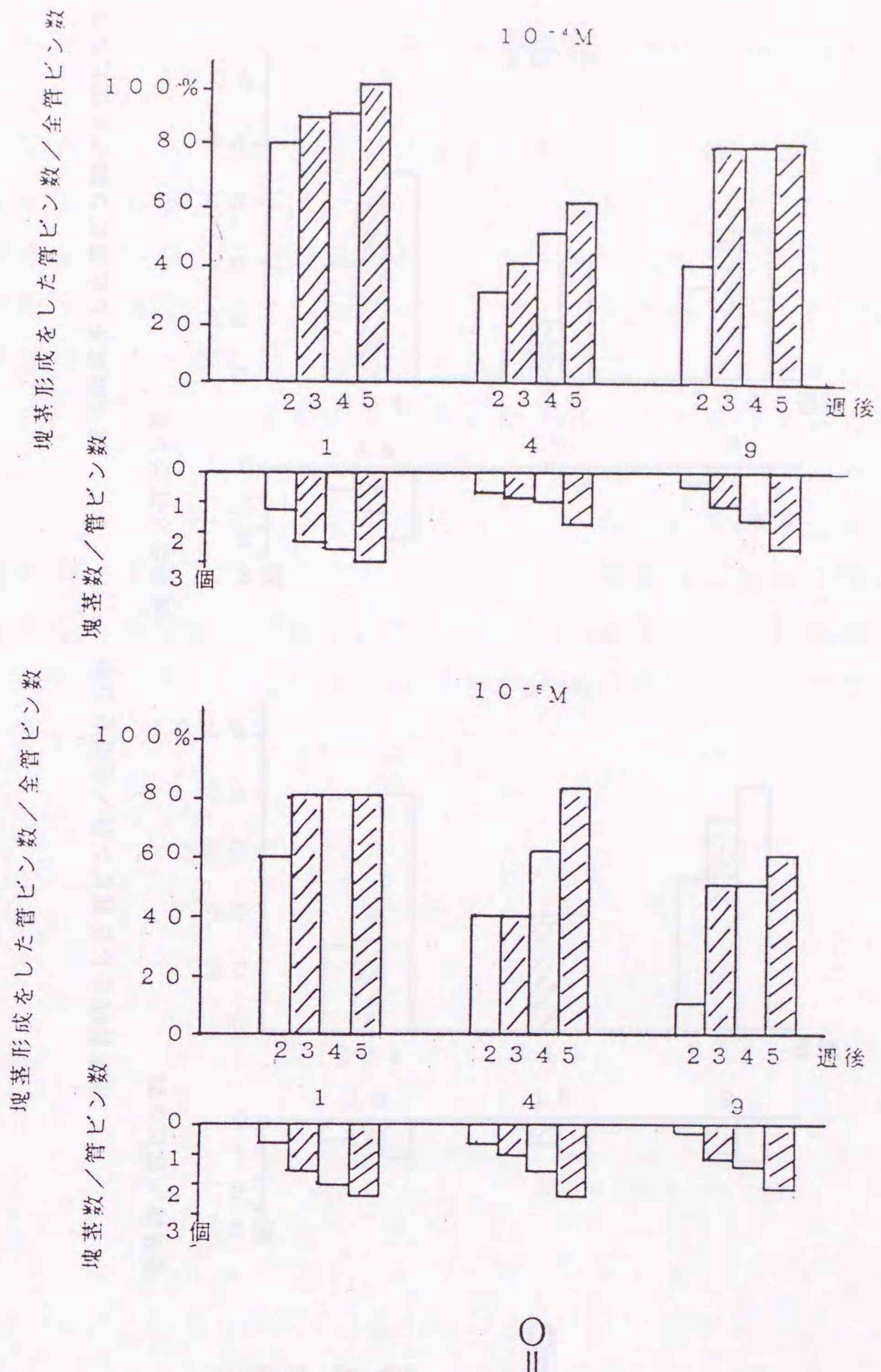
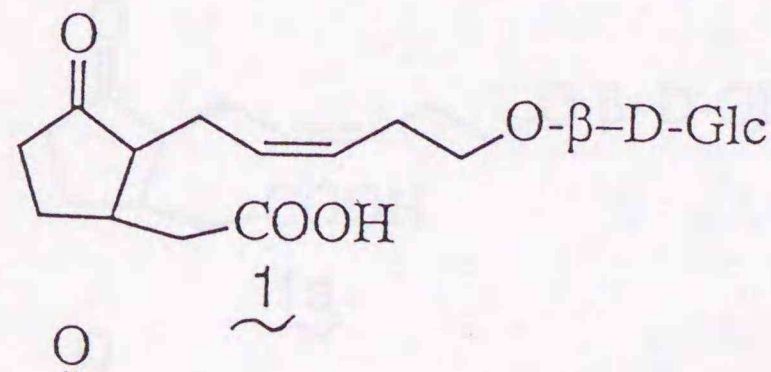


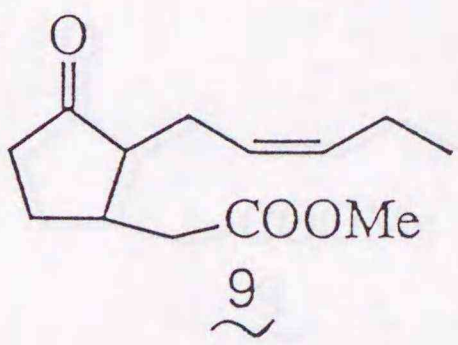
図１－１５　無菌茎断片法

<無菌培養法>

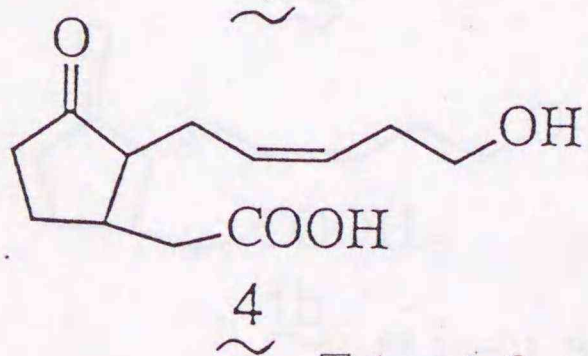




1



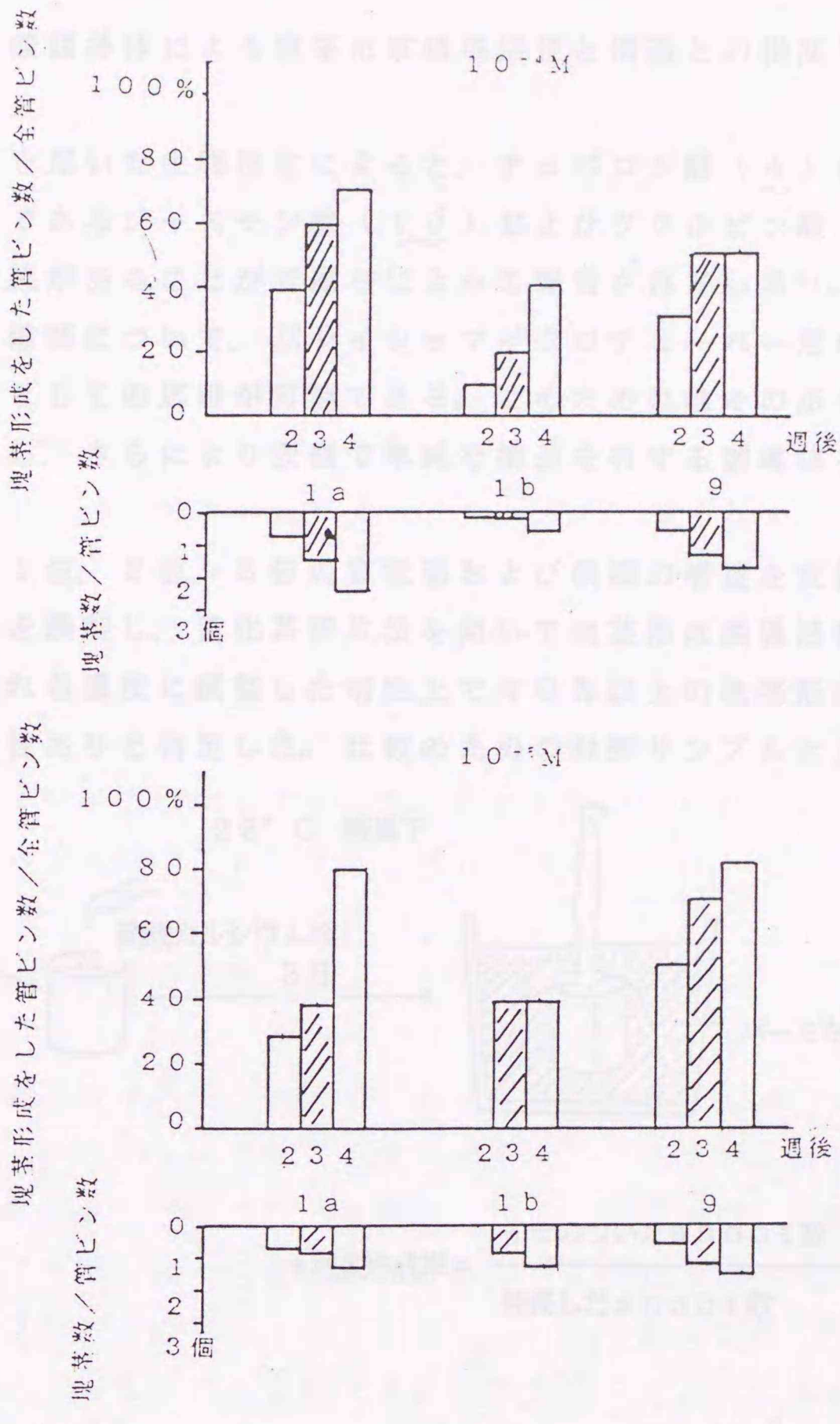
9

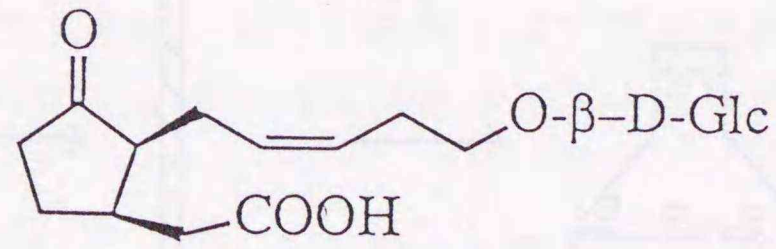


4

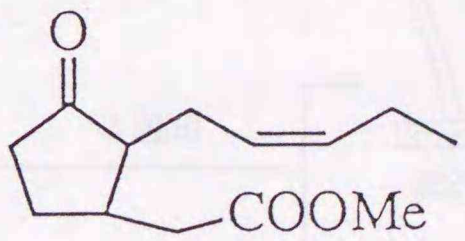
図１－１２　チュベロン酸類の塊茎形成誘導活性

<無菌培地片法>

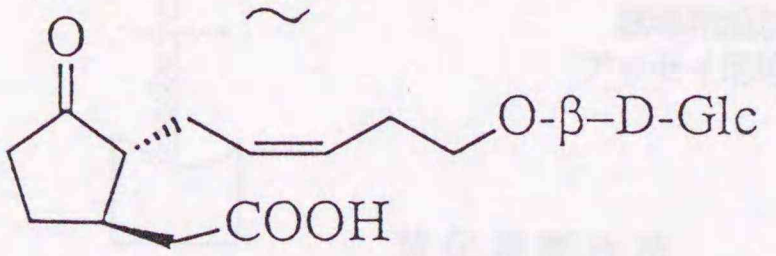




1a



9



1b

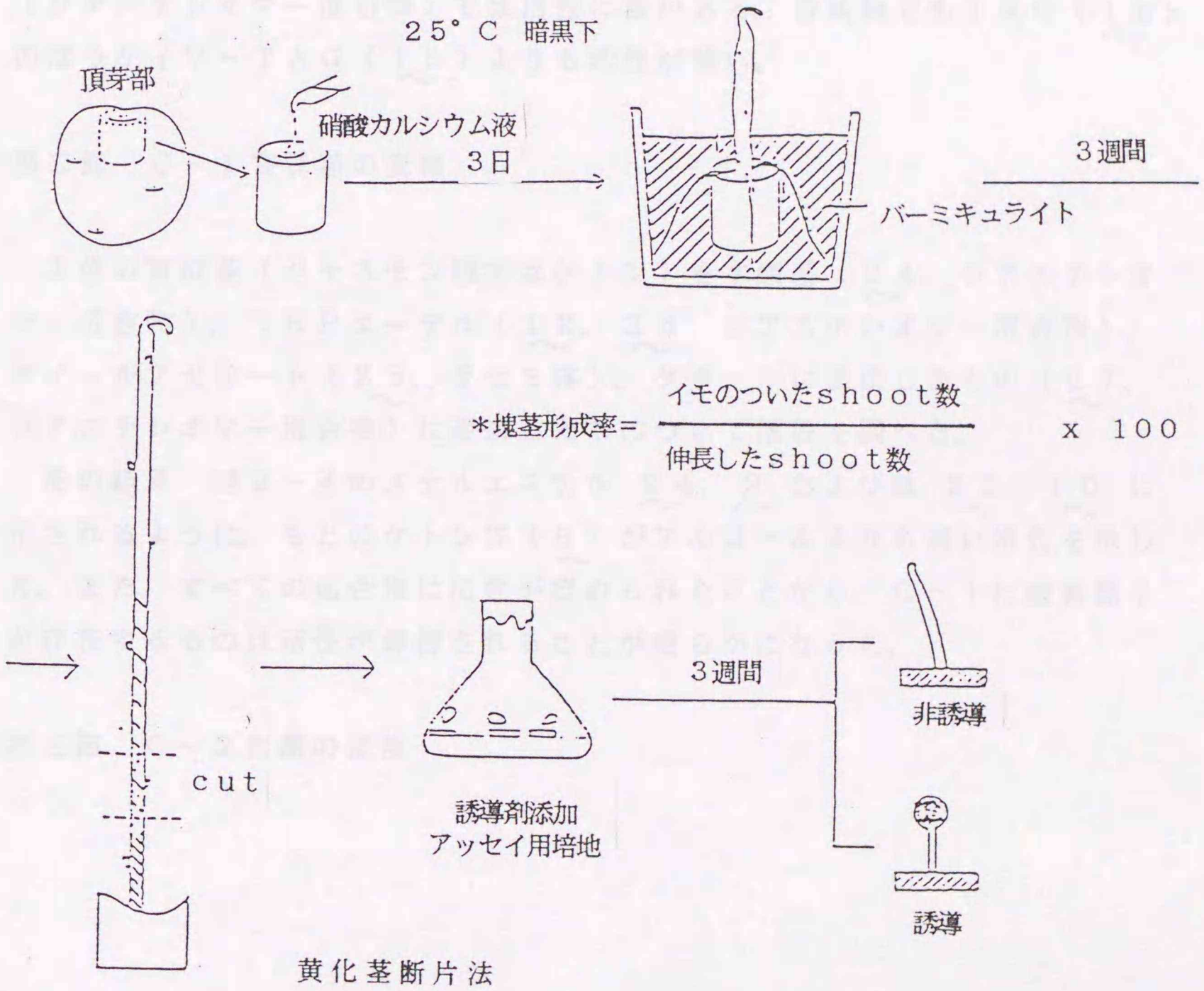
図１－１３　チュベロン酸グルコシドの塊茎形成誘導活性

第二章

ジャスモン酸誘導体による塊茎形成誘導活性と構造との相関[55]

黄化茎断片を用いた生物検定によると、チュベロン酸（4）のみならずその類縁化合物であるジャスモン酸（10）およびククルビン酸（22）も塊茎形成誘導活性があることが吉原らによって報告されている[5]。このことからジャスモン酸類について、バレイショマイクロチューバー形成誘導等の植物生長調節剤としての応用が可能である。このためにはその活性に必須の構造を明らかにし、さらにより安価で単純な構造を有する誘導体を探索する必要がある。

本章では、1位、2位、3位の官能基および側鎖の構造を変換したジャスモン酸誘導体を調製し、黄化茎断片法を用いて塊茎形成誘導活性を比較検討した。それぞれ各濃度に調整した培地上で40％以上の塊茎形成誘導率を示したものを活性ありと判定した。比較のための対照サンプルとしてはジャス



黄化茎断片法

モン酸メチル（9）（合成物　エピ体５％、ジアステレオマー混合物）を用いた。

第一節　ジャスモン酸（10）とチュベロン酸（4）

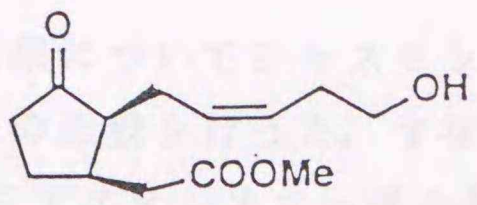
ジャスモン酸類については、従来から植物に対する成長抑制効果や香気の特性でその相対配置と活性の相関についての研究が試みられてきた。例えば山根らはレタス種子発芽抑制試験においてジャスモン酸（10a）のほうがエピジャスモン酸（10b）よりも抑制効果が高いと報告している[7]し、西田およびAcreeは芳香の点でジャスモン酸メチル（9a）のいき値がエピ体の４００分の１であると報告している[49]。しかも 9a のうち天然型の（－）－エピージャスモン酸メチルのみが芳香の主成分であるとしている。チュベロン酸グルコシド（1）について今回得られた結果もこれらの報告と同様に図２－１に示すように天然のチュベロン酸グルコシド（1）と合成物（ジアステレオマー混合物）では活性に差がある。合成物でもTAG（1a）のほうがイソーTAG（1b）よりも活性が強い。

第二節　C－１官能基の変換

１位の官能基（ジャスモン酸ではケトン）を水酸基（24　ジアステレオマー混合物）、THPエーテル（12、26　ジアステレオマー混合物）、エノールアセテート（25、ラセミ体）、ケタールに変換したもの（27、ジアステレオマー混合物）に変換したものついて活性を調べた。

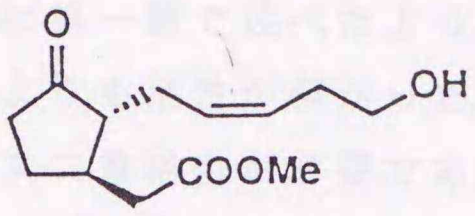
その結果　図２－４のメチルエステル 24、9 および酸 22、10 に示されるように、もとのケトン体（9）がアルコールよりも強い活性を示した。また、すべての化合物に活性が認められたことから、C－１に酸素原子が存在するものは活性が保持されることが明らかになった。

第三節　C－２側鎖の変換



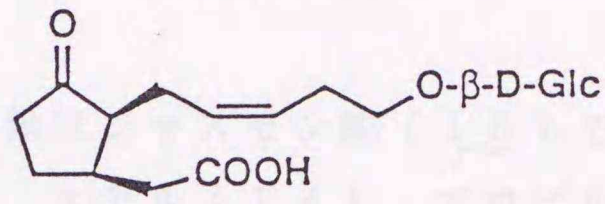
+++

4a



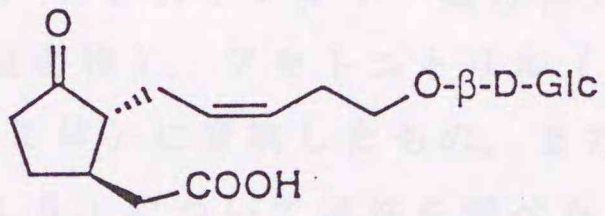
+

4b



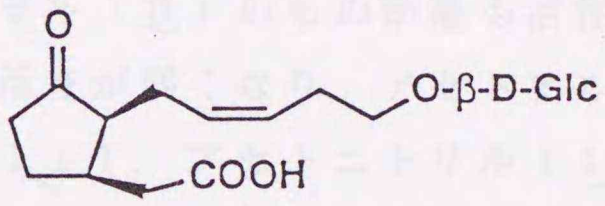
+++

1a（合成品、ジアステレオマー混合物）



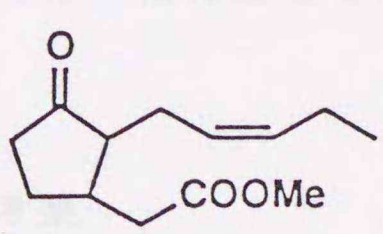
+-

1b（合成品、ジアステレオマー混合物）



++++++

1a（天然物　光学活性体）



++++

9

－ －	活性なし
＋	10^{-4}M 以上で活性あり
＋＋	10^{-5}M
＋＋＋	10^{-6}M
＋＋＋＋	10^{-7}M
＋＋＋＋＋	10^{-8}M

図２－１　黄化茎断片法による塊茎形成誘導活性

Ｃ－２側鎖についてジャスモン酸の２－シスーペンテニル基を変換した化合物の活性の比較を行った。すなわち、二重結合をなくしたもの（２０、２１、２３ ジアステレオマー混合物）について比較検討した（図２－３）。

その結果、二重結合がなくなると活性が消失することが明らかになった。また、すでに第一節で述べたようにＣ－５’に水酸基、グルコースが付いたものは、９よりも活性が弱かった。このことから、活性を有するためには、２’位にシス二重結合が必要であることが明かになった。

第四節　Ｃ－３　側鎖の変換

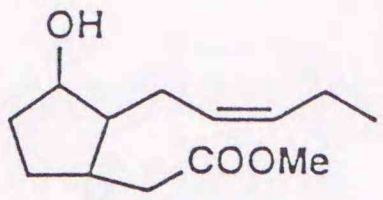
Ｃ－３側鎖はジャスモン酸（１０）では酢酸であるが、これをそれぞれ メチル（９）、エチル（１４）、プロピル（１５）、イソプロピル（１６）のエステルに調製したもの（いずれもジアステレオマー混合物）。また、エタノール（１１ ジアステレオマー混合物）、アセトアルデヒド（１２ ジアステレオマー混合物）、アセトニトリル（１３ 2S, 3R ラセミ体）、ラクトン（１９ ラセミ体）に変換したもの。また、５員環に二重結合を導入した化合物（１７、１８）について活性を調べた。

その結果、図２－２に示されるように、Ｃ－３側鎖が酢酸（１０）かそのメチルエステル（９）のものが最も活性が強かった。またエチルエステル以上になると活性が弱くなり、アセトアルデヒド（１２）では活性が残るがエタノール（１１）、アセトニトリル（１３）では活性がなくなる。このことより、１”位カルボニル基の存在が必須であることが明らかになった。

興味深いことに分子内でラクトン環を形成するもの（１９）は上の条件を満足するものの活性は全くなかった。

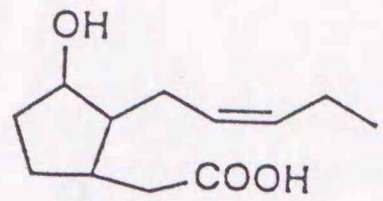
考察

以上、ジャスモン酸メチル（９）についてその構造の３カ所について変換した誘導体を用いてその活性を比較したが、これらをまとめて塊茎形成誘導



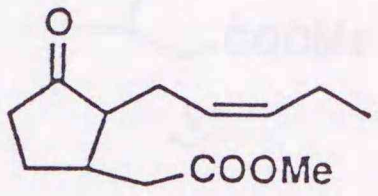
24

++



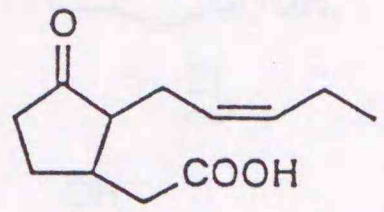
22

++



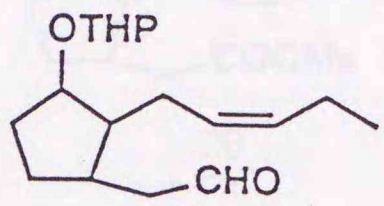
9

++++



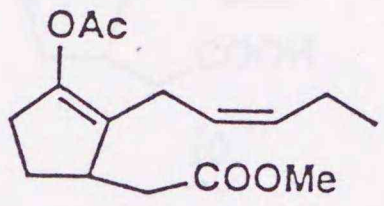
10

++++



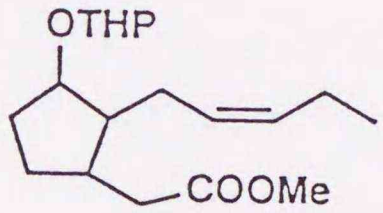
12

++



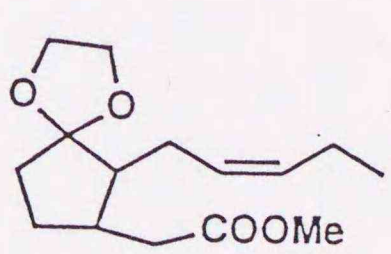
25

+++



26

+++



27

+++

－ －　　活性なし

＋　　10^{-4}M 以上で活性あり

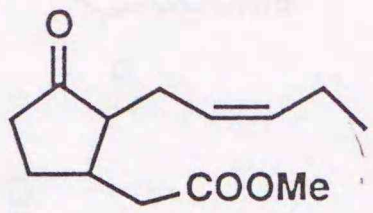
＋ ＋　　10^{-5}M

＋ ＋ ＋　　10^{-6}M

＋ ＋ ＋ ＋　　10^{-7}M

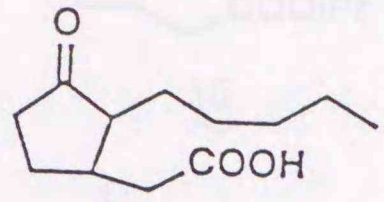
＋ ＋ ＋ ＋ ＋　　10^{-8}M

図２－２　Ｃ－１官能基の変換による活性の変化



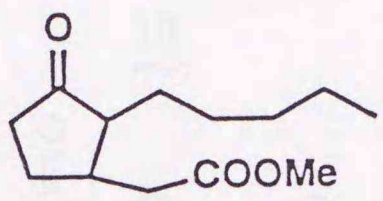
9

++++



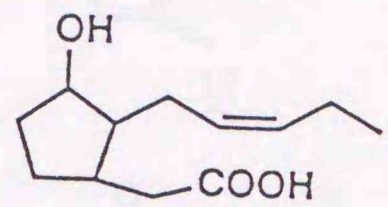
21

--



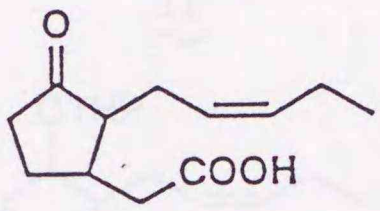
20

+



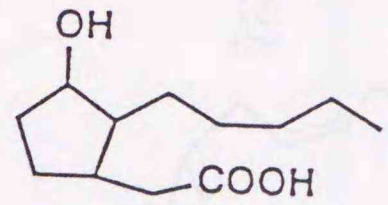
22

++



10

++++

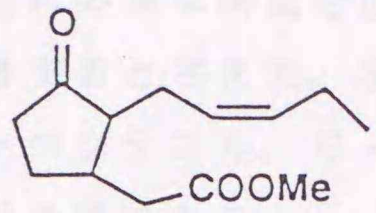


23

--

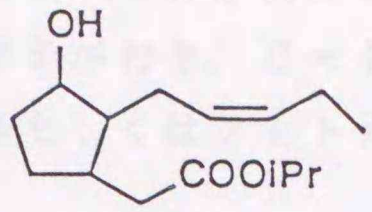
－ －	活性なし
＋	10^{-4}M 以上で活性あり
＋＋	10^{-5}M
＋＋＋	10^{-6}M
＋＋＋＋	10^{-7}M
＋＋＋＋＋	10^{-8}M

図２－３　Ｃ－２側鎖の変換による活性の変化



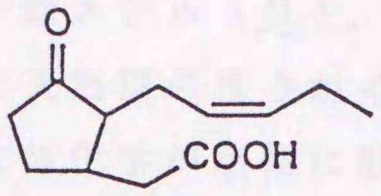
9

++++



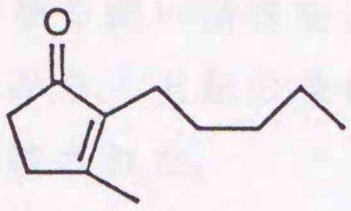
16

+
--



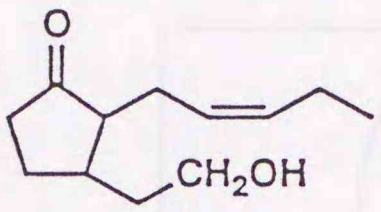
10

++++



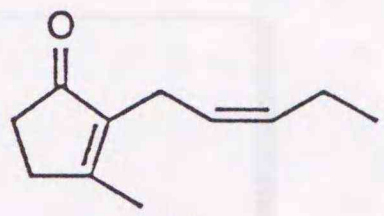
17

--



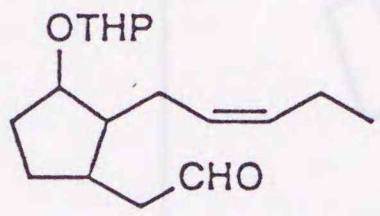
11

--



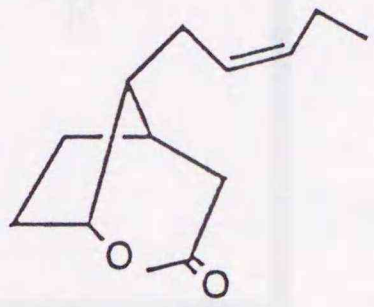
18

--



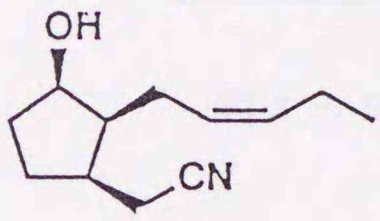
12

++

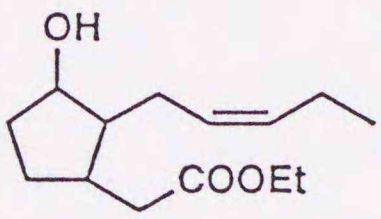


19

--

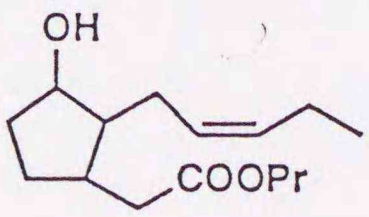


13



14

++



15

++

− −	活性なし
+	10^{-4}M 以上で活性あり
+ +	10^{-5}M
+ + +	10^{-6}M
+ + + +	10^{-7}M
+ + + + +	10^{-8}M

図２－４　Ｃ－３側鎖の変換による活性の変化

活性に必須な構造を図２－５に示すような構造式の条件が満足されれば活性を有すると考えた。すなわち、Ｃ－１に酸素原子が付き、Ｃ－２は２’－シス－ペンテニル、Ｃ－３はアセトカルボニル基もしくはアセトカルボキシル基が必須である。

本章では２３種のジャスモン酸誘導体の活性を調べたが、このうちジャスモン酸メチル（９）、ジャスモン酸（１０）が最も強い活性を持っていた。また天然型のほうがイソ体より活性が強いことから、上記の条件以外に側鎖の立体化学が活性に影響を与えていることが示唆された。

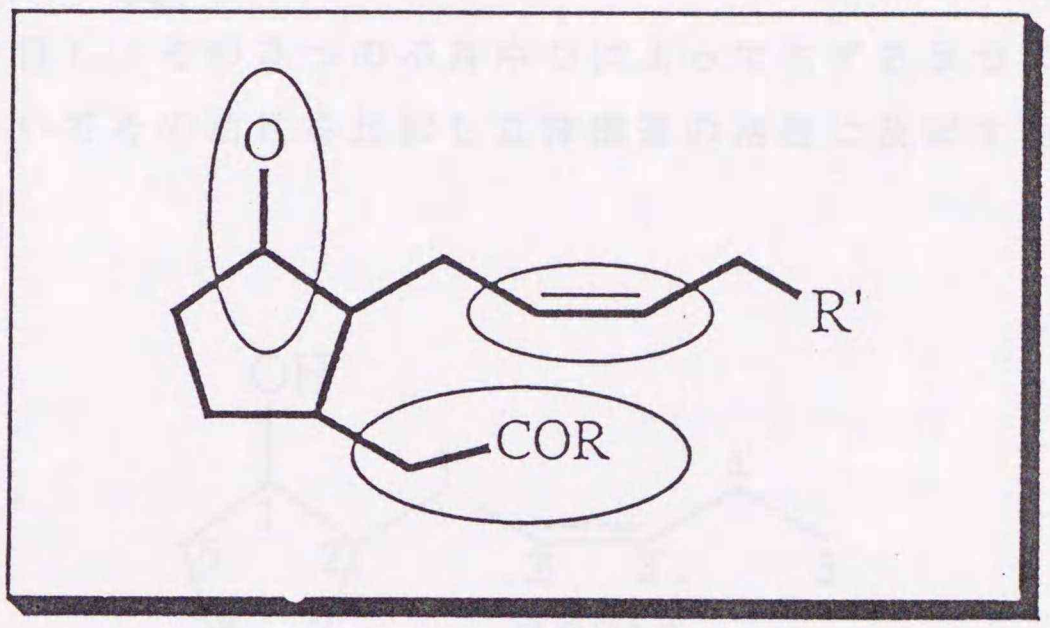


図２－５　塊茎形成誘導活性に必要な構造

第三章

１－ジヒドロジャスモン酸メチル（２４）の各光学活性体の調製と絶対構造の決定[114)]

第二章で述べたように、ジャスモン酸（１０）の側鎖の相対配置の違いで活性に差があることが明らかになった。しかし、１０のシクロペンタノン環の２位のシス－ペンテニル側鎖の配置は、図３－１に示すように異性化平衡状態にあり、このものの異性体を分離して活性を比較することは困難である。そこで、ジャスモン酸（１０）の類縁体である１－ジヒドロ体（２４）にもジャスモン酸（１０）よりは若干弱いがバレイショ塊茎形成誘導活性を有することに着目し、その３つの不斉中心によって生ずる８つの化学的に安定な異性体についてその活性を比較し立体構造の活性に及ぼす効果を調べることにした。

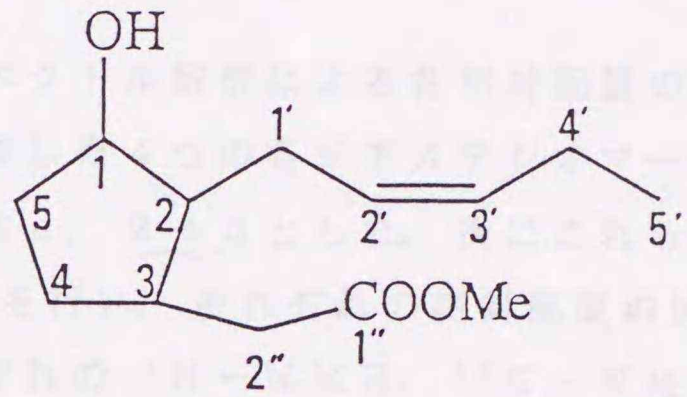


図３－１　１－ジヒドロジャスモン酸メチル（２４）

１－ジヒドロ体（２４）の一異性体であるククルビン酸についてはすでに福井らがその植物成長抑制活性とともにその絶対構造の決定について報告をしているが[57)]、そのほかの異性体については調べられていない。シクロペンタノン環を有する他のジャスモン酸類に比べ側鎖の相対配置が変換しない２４のそれぞれの異性体を分離しその絶対構造を決定したのち、これらの活性を比較することはジャスモン酸類の立体構造と活性との関係を調べるうえで重要と考えた。本章では２４を各ジアステレオマー（ラセミ体）に分離し

てそれぞれの相対立体配置をＮＭＲを用いて決定し、次にこれを光学分割し、各光学活性体の絶対配置を決定することにした。

第一節

１－ジヒドロ体（２４）の各ジアステレオマーの単離、精製と相対立体配置の決定

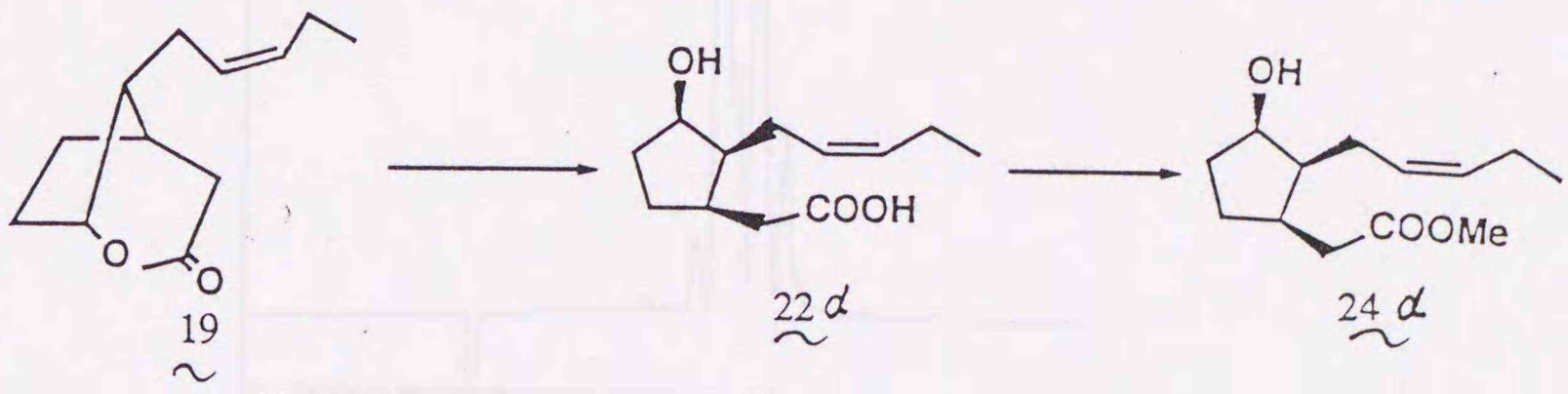
１－１　１－ジヒドロジャスモン酸（２４）の調製および各ジアステレオマーの分離

約５０％のイソ体を含むジャスモン酸メチル（９）を $NaBH_4$ 還元し２４を得た。ついで、図３－１に示すように２４を高速液体クロマトグラフィー（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ＡＭ３２４　８０％　ＭｅＯＨ－H_2O　もしくは　シリカゲル　ＹＭＣ　Ｓ３４３　８０％　ｎ－ｈｅｘａｎｅ－ＥｔＯＡｃ）にて４つのピーク成分を分離、精製した。

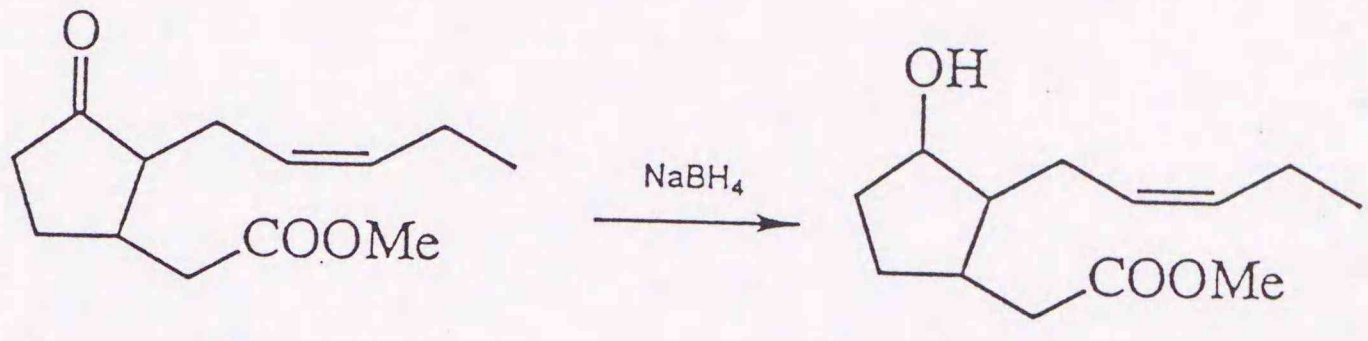
１－２　ＮＭＲスペクトル解析による各相対配置の決定

液クロにより精製した４つの各ジアステレオマーをその保持時間順に２４ａ、２４ｂ、２４ｃ、２４ｄとした。次にこれらについて ^1H－ＮＭＲ，^{13}C－ＮＭＲの測定を行い、それぞれの相対配置の決定を行った。図３－３から３－１０にそれぞれの ^1H－ＮＭＲ，^{13}C－ＮＭＲの１Ｄのスペクトルのチャートを載せた。

これらのうち、２４ｄは割田らが合成した１９[58]を加水分解、メチル化したものとスペクトルデータが一致したのでその相対配置を１Ｓ，２Ｒ，３Ｓと１Ｒ，２Ｓ，３Ｒと決定した。



19　　22α　　24α



9 ～ 24 ～

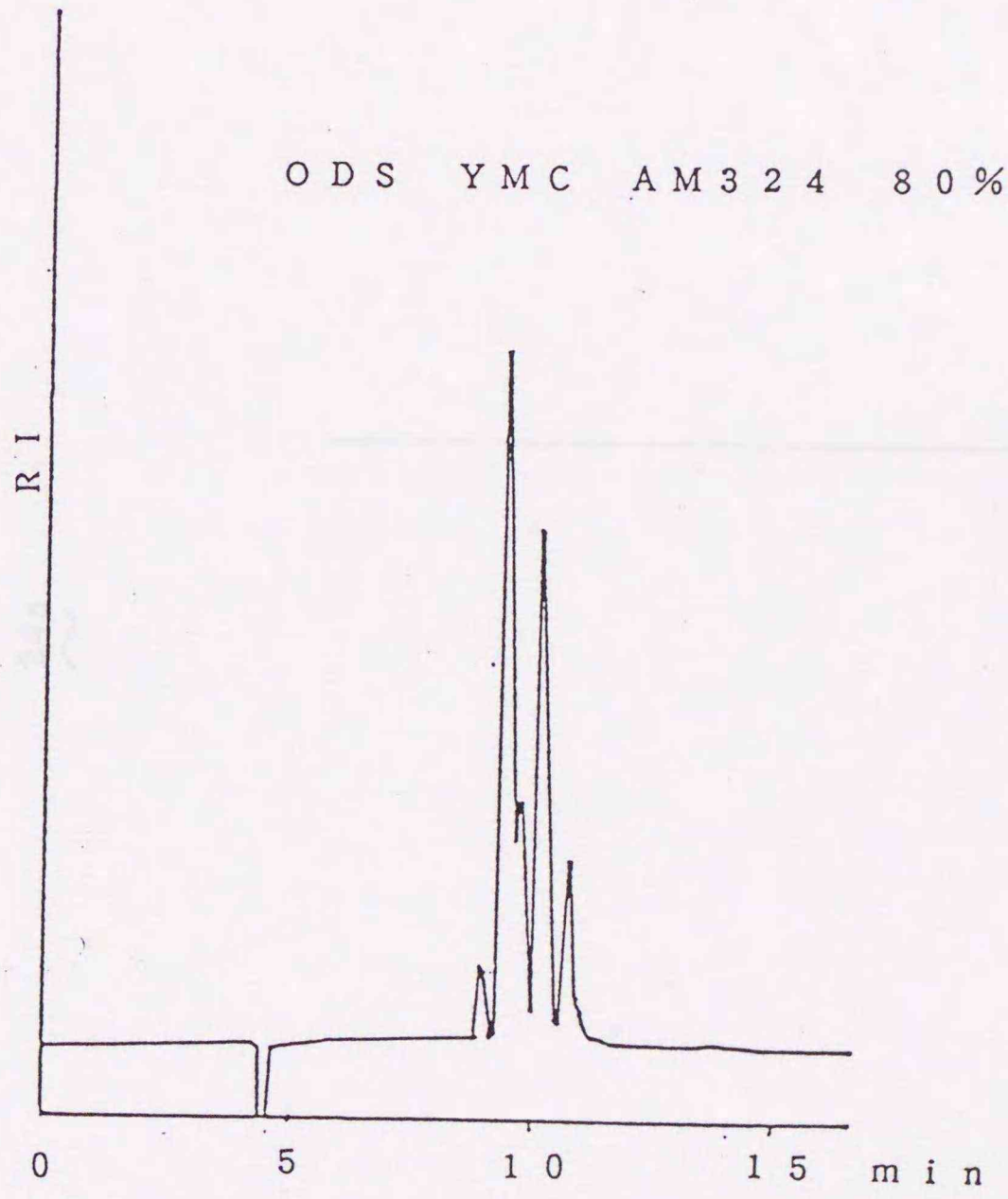
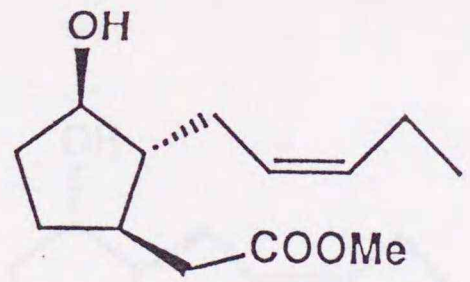


図３－２　24 ～　のＨＰＬＣによる分画



24a

BRUKER

DATE 26-9-89
TIME 11:13

SF 500.135
SFO 500.130
SY 83.0
01 7404.403
SI 32768
TD 32768
SW 3937.008
HZ/PT .240

PW 8.0
RD 2.500
AQ 4.162
RG 10
NS 8
TE 297

FW 5000
02 0.0
DP 63L PO

LB 0.0
GB 0.0
CX 36.00
CY 0.0
F1 6.000
F2 .500
HZ/CM 76.407
PPM/CM .153
SR 5420.89

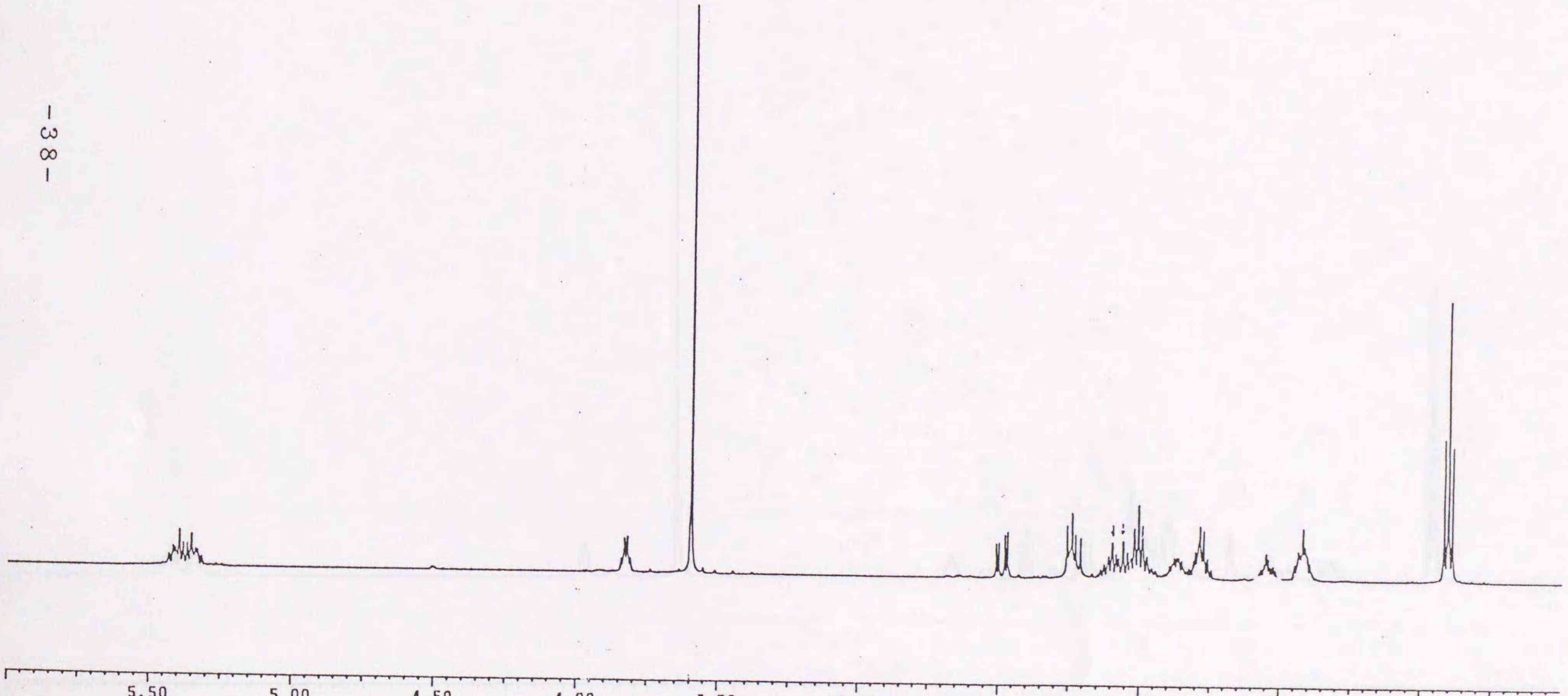
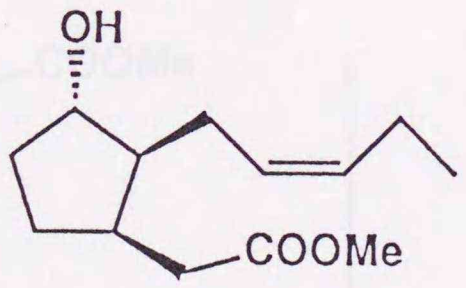


図３－３　24a の ^{1}H－NMR　５００ MHz in $CDCl_3$



24b

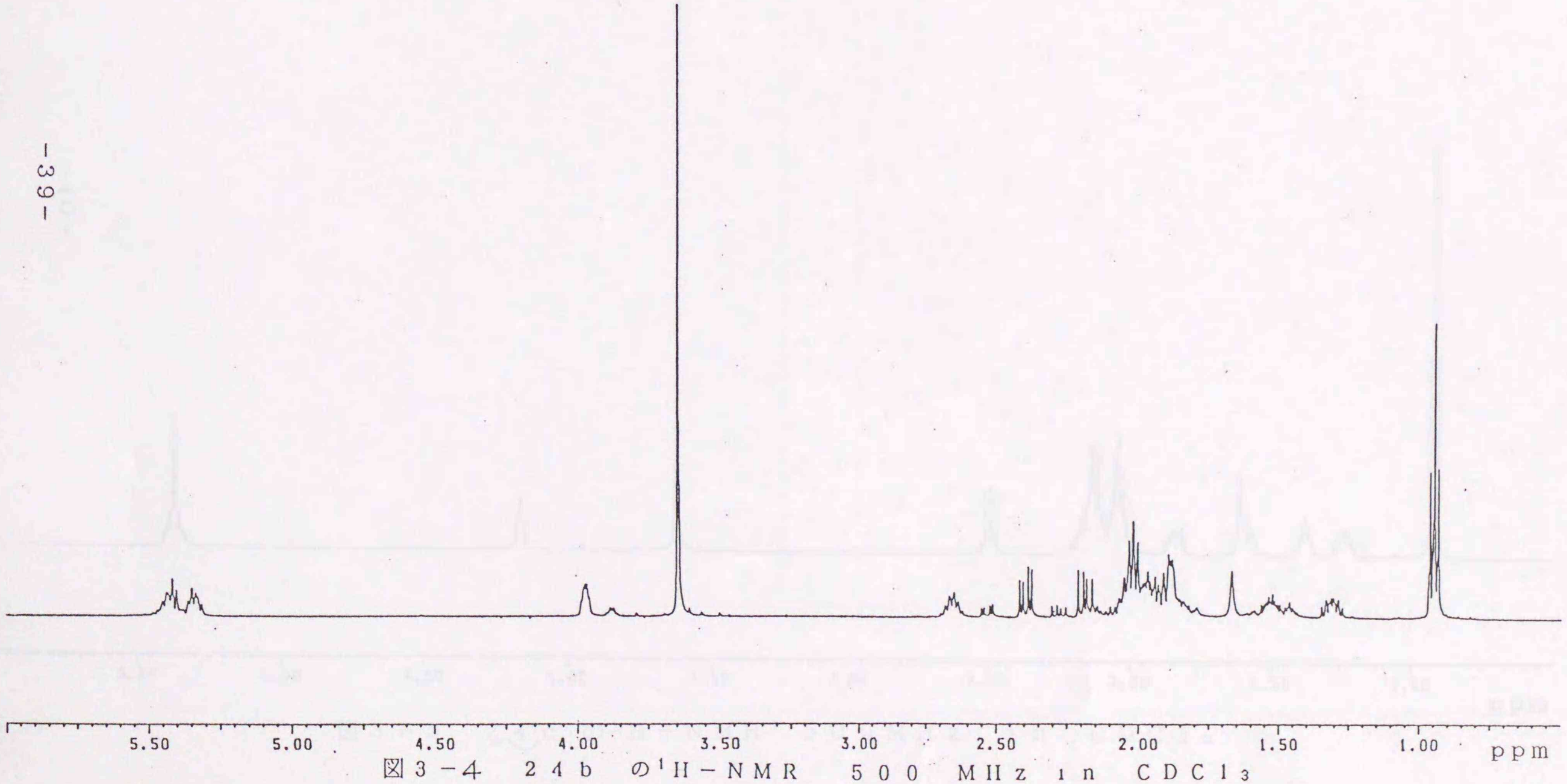
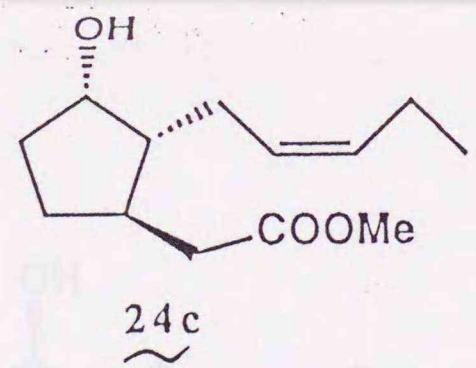
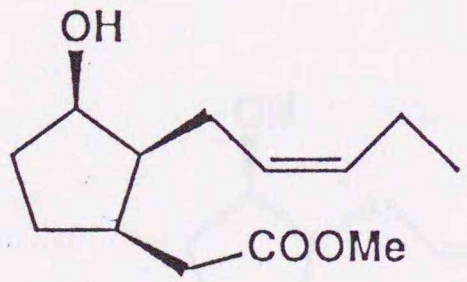


図３－４　２４ｂ　の^{1}Ｈ－ＮＭＲ　５００　ＭＨｚ　ｉｎ　ＣＤＣｌ$_{3}$



24c

図３－５　24c の^{1}H－ＮＭＲ　５００ＭＨｚ　ｉｎ　ＣＤＣｌ$_{3}$



24d

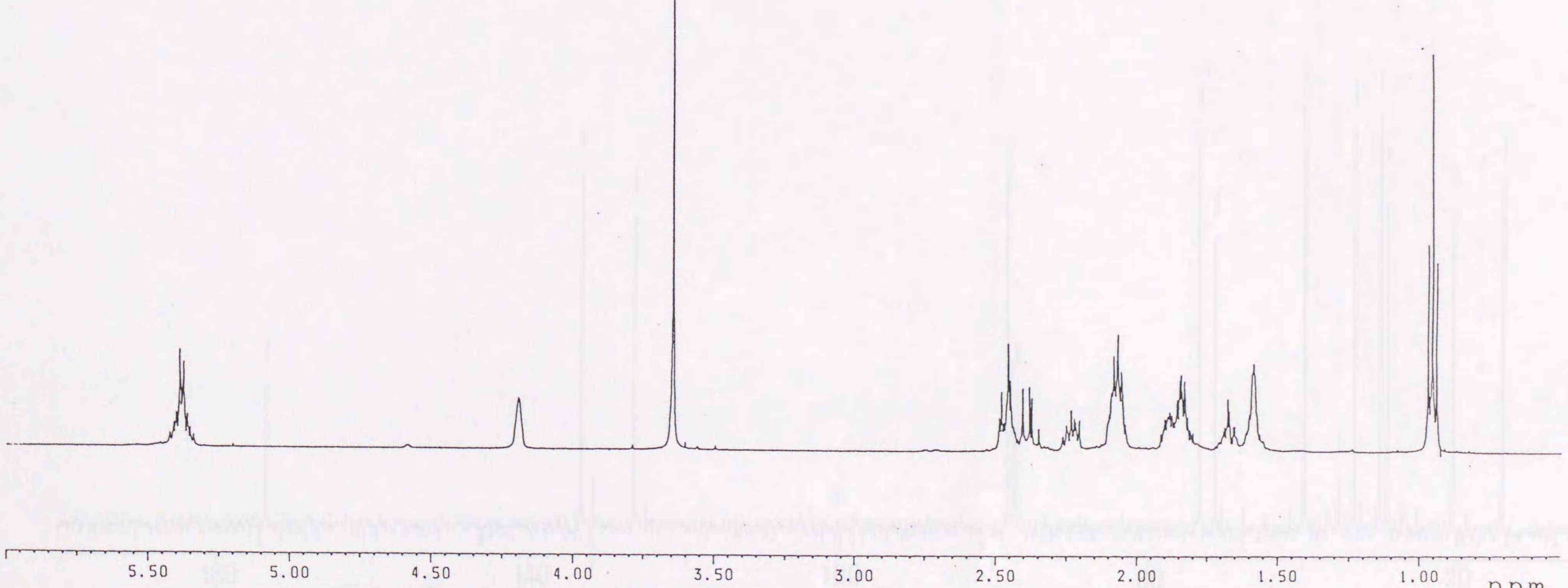
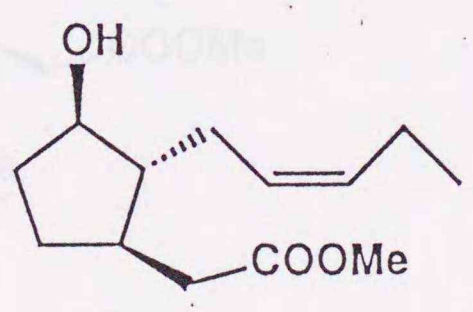


図３－６　24d　の^{1}H－NMR　５００ MHz in $CDCl_3$



24a

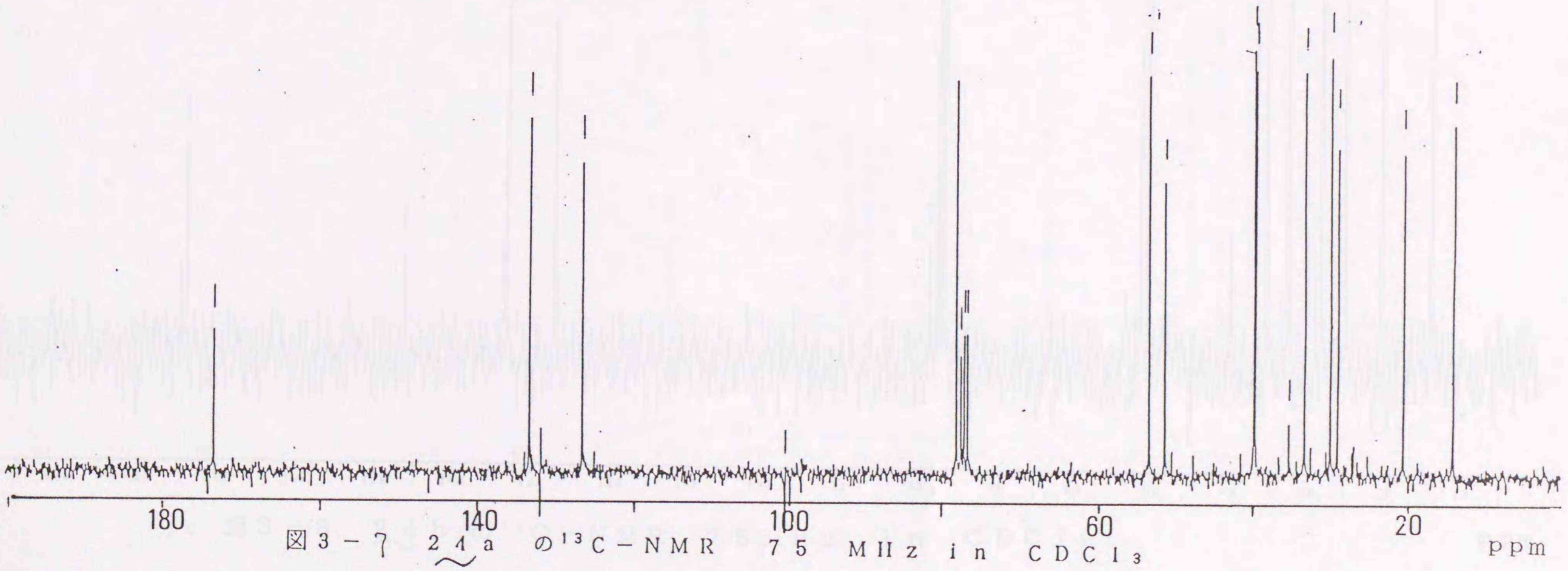
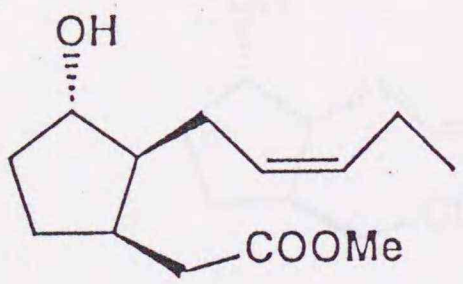


図３－７　24a の ^{13}C－NMR　75 MHz in $CDCl_3$



24b

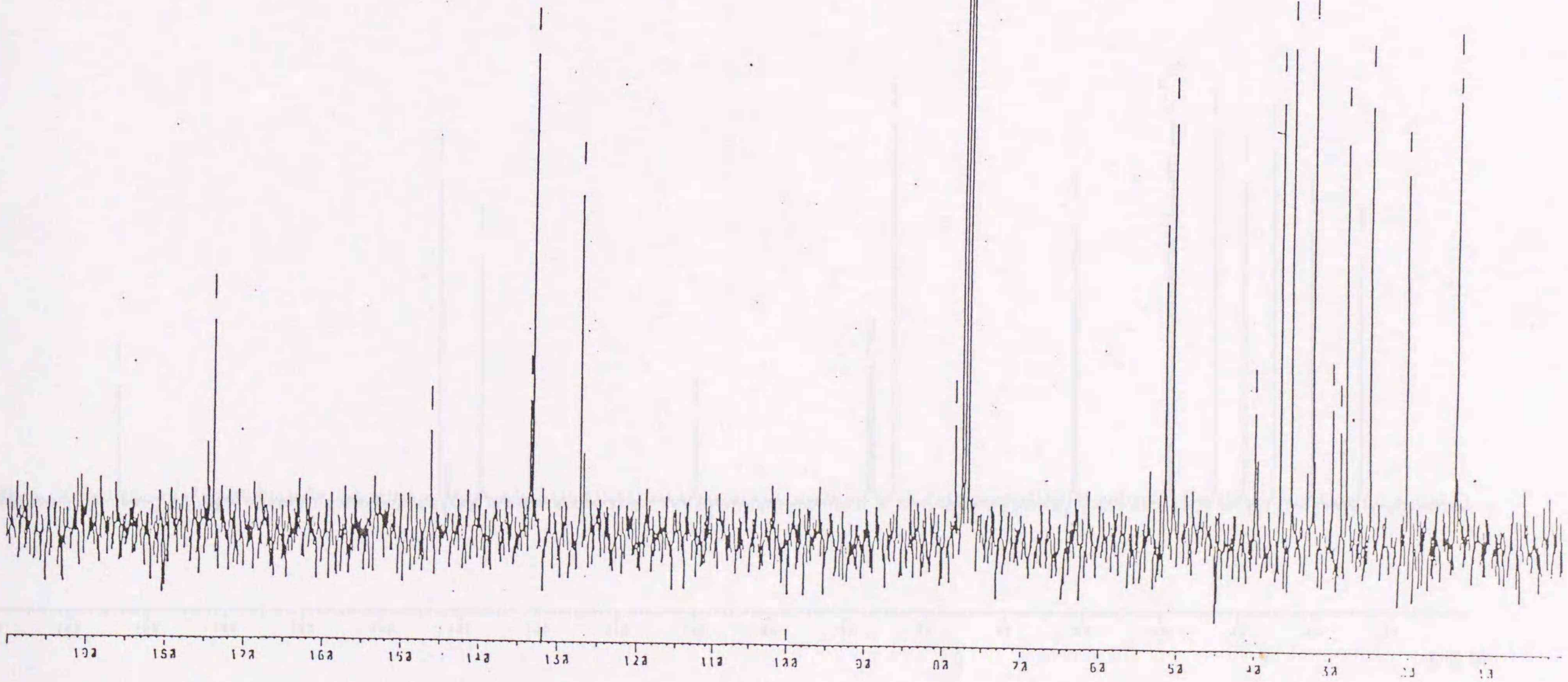
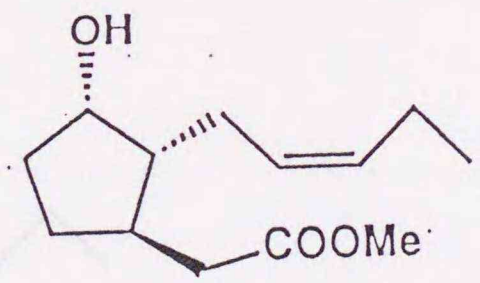


図3－8　24b の ^{13}C－NMR　75MHz　in　$CDCl_3$



24c

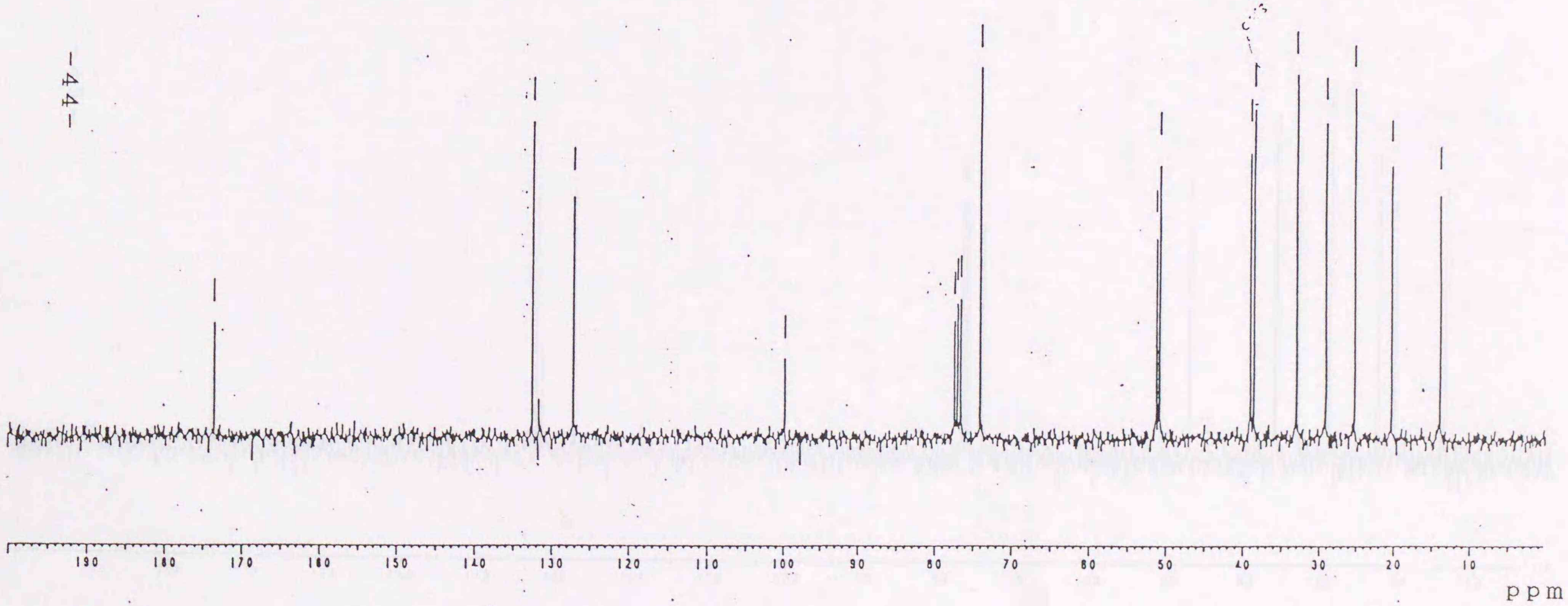
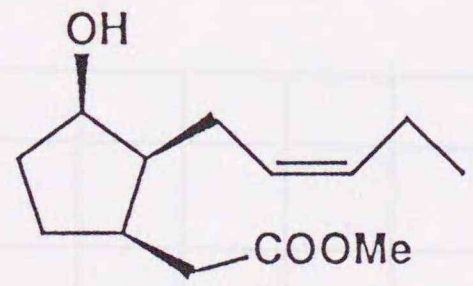


図3－9　24c の ^{13}C－NMR　75MHz　in　$CDCl_3$



24d

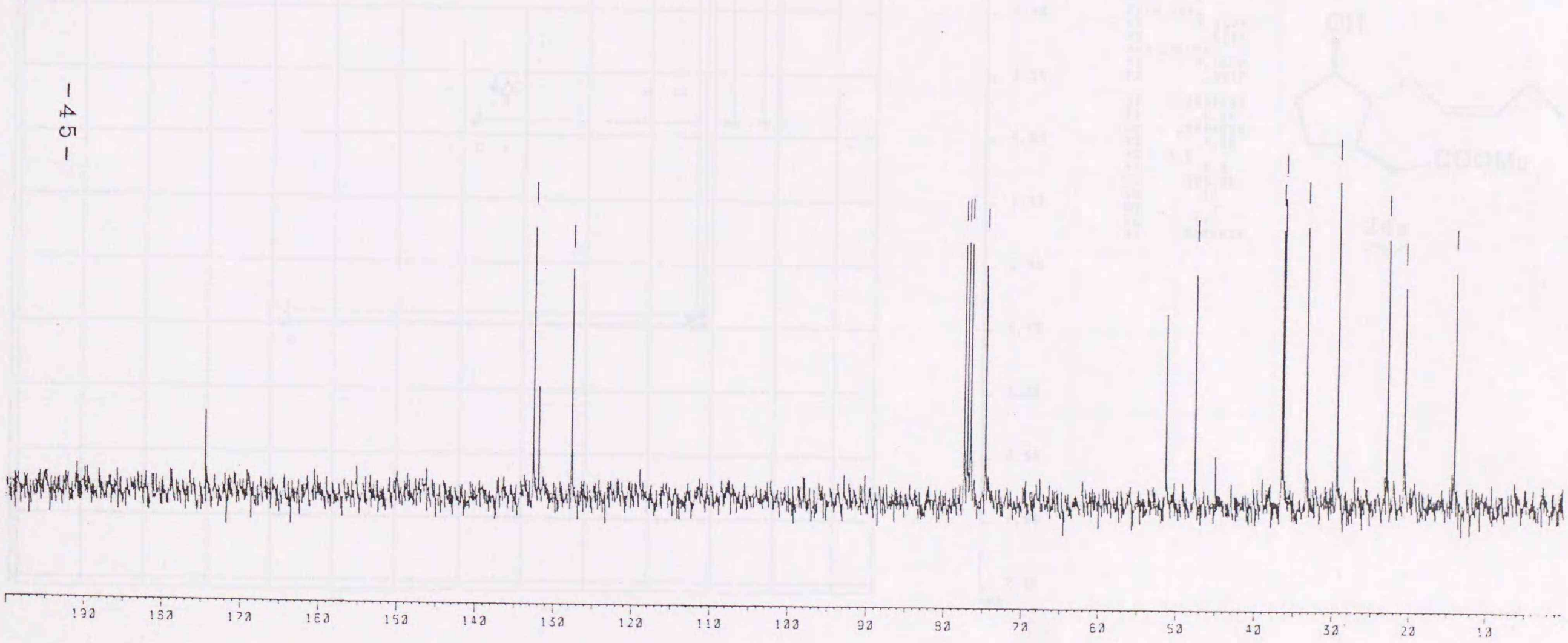
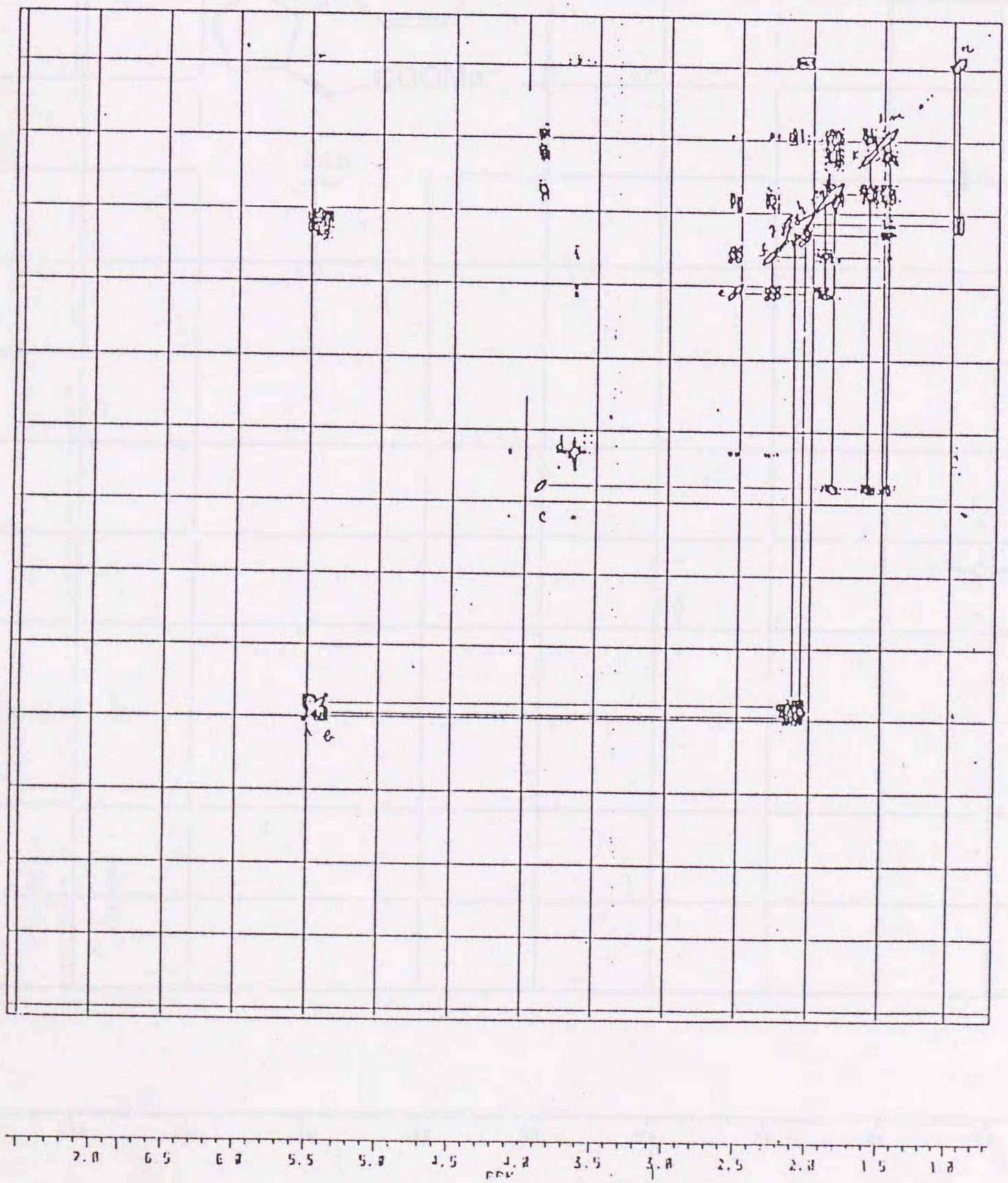
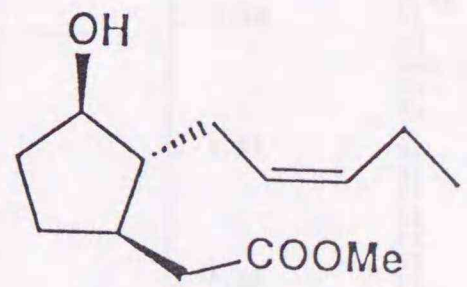


図3－10　24d の ^{13}C－NMR　75 MHz　in $CDCl_3$





24a

図３－１１　24a　の^{1}H－ＣＯＳＹ

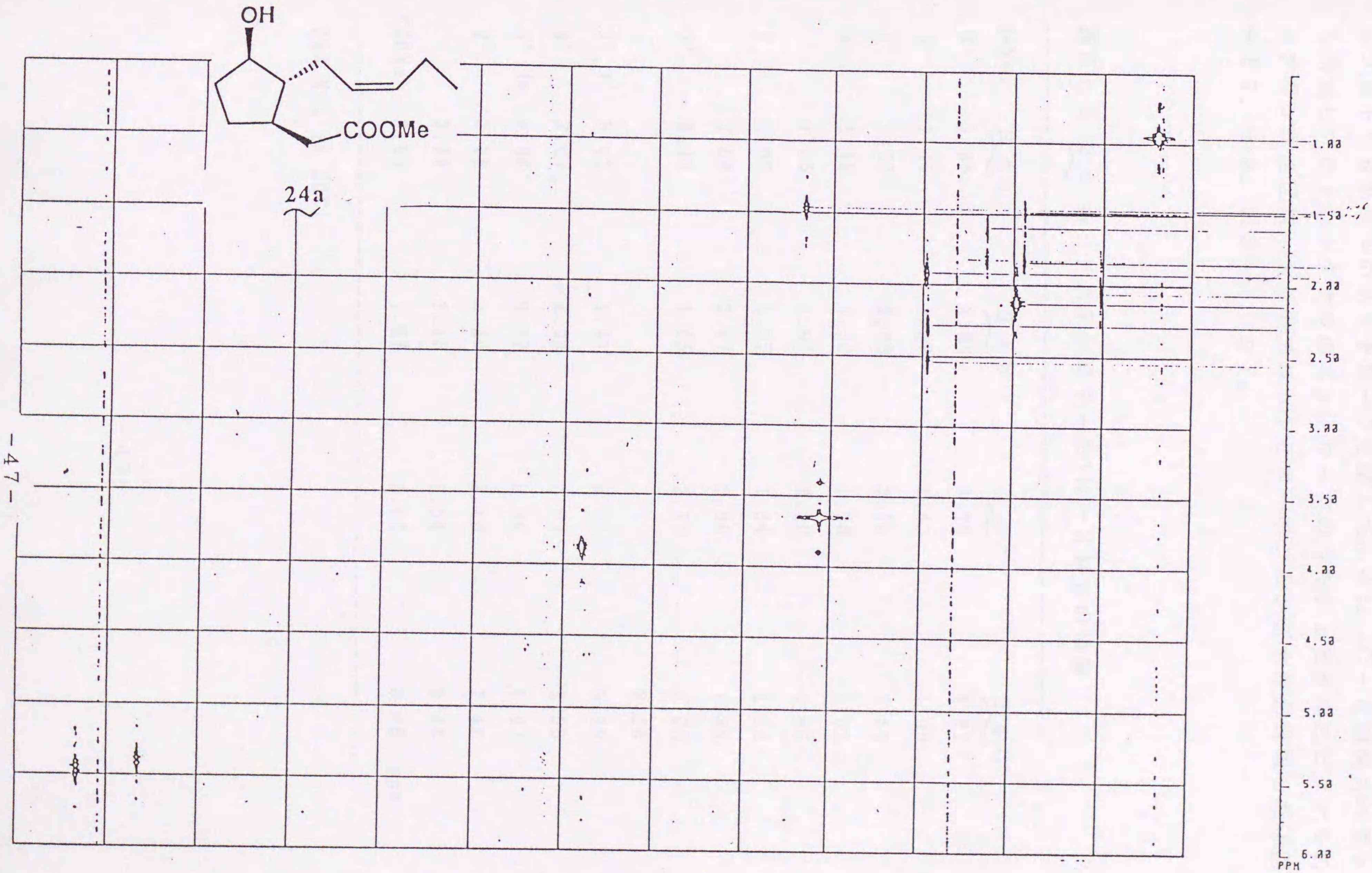


図３－１２　２１ａ　のＣＨ相関

以下、24aを例に相対配置の決定について述べる。まず、それぞれの^{1}H－ＣＯＳＹスペクトルを測定した。これによりカップリングしているすべてのプロトンシグナルのネットワークを結んだ。次に、Ｃ－Ｈ相関スペクトルを測定しプロトンシグナルのネットワークのうちジェミナルとビシナルのカップリングを区別し全てのプロトンとカーボンのシグナルの帰属した（図３－１１、１２、表３－１，２）。

表３－１ 24 各ジアステレオマーの^{1}Ｈ－ＮＭＲの帰属

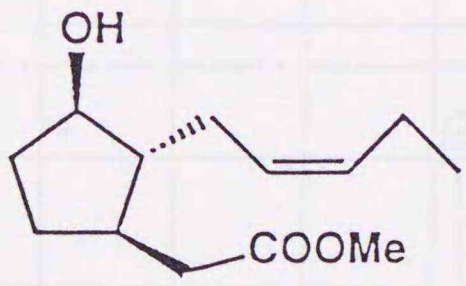
H-No.	24a	24b	24c	24d
1	3.88	3.99	4.20	4.21
2	1.46	1.89	1.43	1.92
3	1.92	2.68	2.16	2.46
4	1.48	1.34	1.28	1.62
	1.85	1.97	2.10	1.86
5	1.60	1.55	1.64	1.68
	1.84	2.07	1.89	1.85
1'	2.13	1.95	2.18	2.08
				2.26
2',3'	5.43	5.41	5.41	5.39
4'	2.07	2.04	2.09	2.08
5'-Me	0.96	0.97	0.96	0.97
2"	2.28	2.20	2.16	2.40
	2.54	2.42	2.54	2.48
COOMe	3.65	3.67	3.67	3.66 ppm

300 MHz in $CDCl_3$

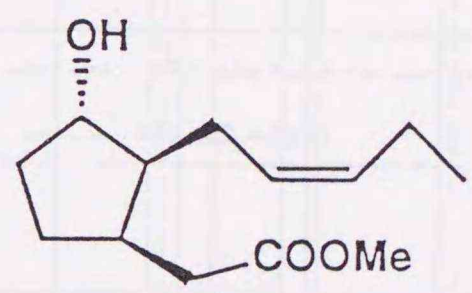
表３－２　２４　各ジアステレオマーの^{13}Ｃ－ＮＭＲの帰属

C-No.	２４a	２４b	２４c	２４d
1	78.0	77.4	74.1	74.7
2	53.4	50.6	50.9	47.7
3	39.8	36.7	38.5	36.5
4	28.9	28.3	29.2	29.4
5	33.1	32.5	33.0	33.4
1’	29.9	25.3	25.3	22.9
2’	126.5	127.1	127.3	127.7
3’	133.2	133.1	132.6	132.5
4’	20.5	20.6	20.5	20.7
5’	14.1	14.1	14.1	14.2
1”	173.5	173.7	173.5	174.7
2”	39.5	35.3	39.0	36.3
OMe	51.3	51.5	51.3	51.7 ppm

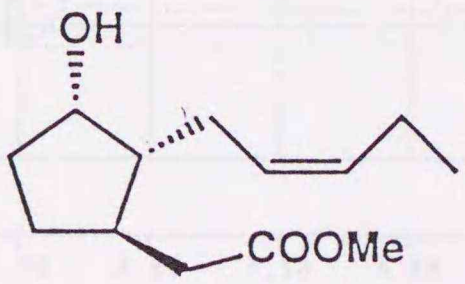
75 MHz in $CDCl_3$



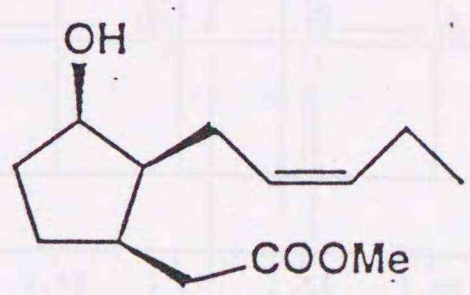
24a



24b



24c



24d

次に、２Ｄ－ＮＯＥ phase sensitive mode の測定を行った（図３－１３）。ＮＯＥの情報から相対立体配置の決定を行った。その結果、２４ａ は図３－１３に示すように １Ｒ，２Ｒ，３Ｒ もしくは １Ｓ，２Ｓ，３Ｓ の相対配置であることを明らかにした。

また、２４ｂ，２４ｃ についても同様の解析を行い、各々の相対立体配置を図３－１４のように決定した。すなわち、液体クロマトで分取したピークを図３－１５に示すように同定した。

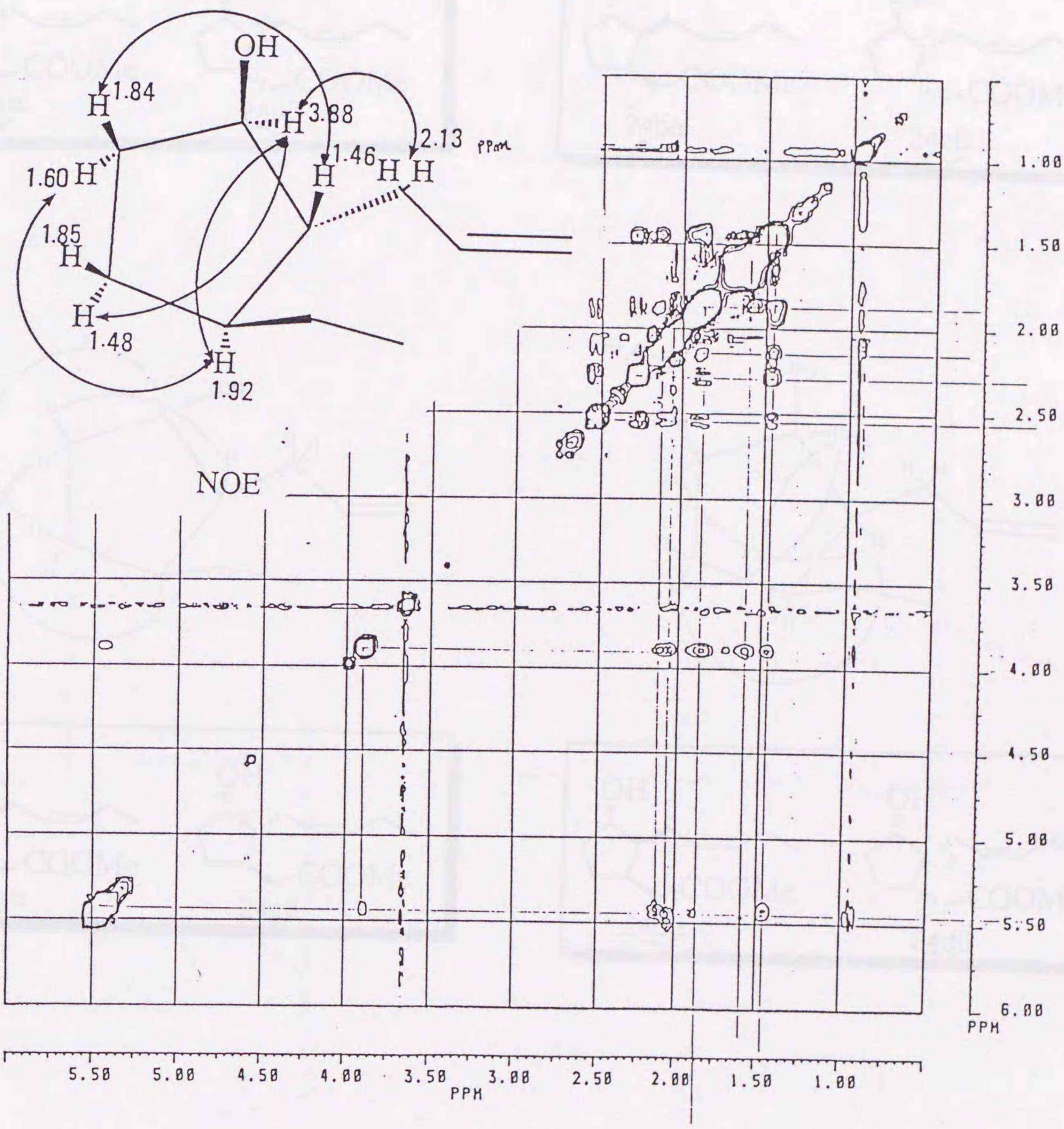
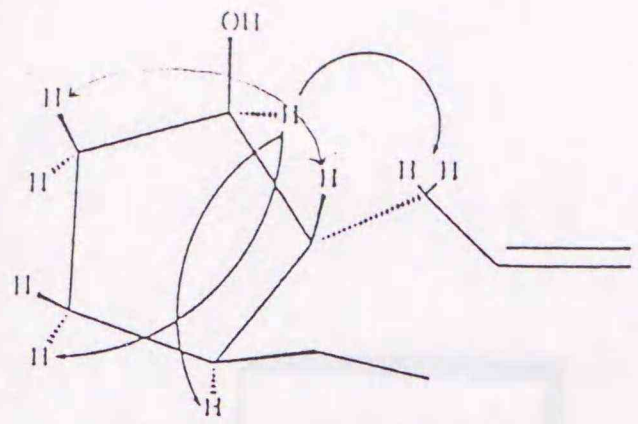


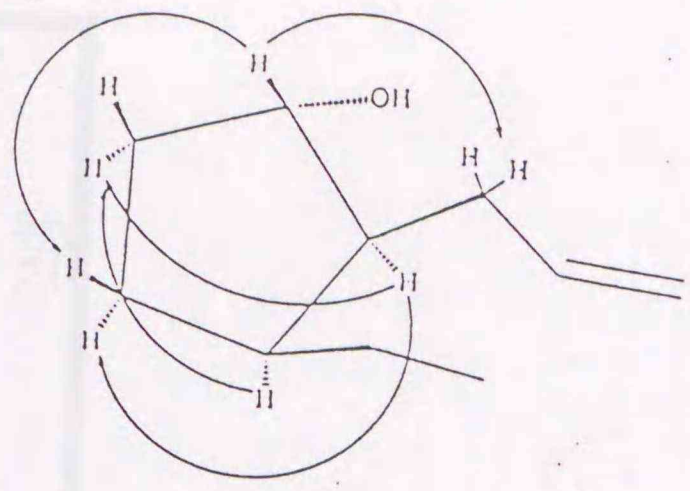
図３－１３　２４ａ の ２Ｄ－ＮＯＥ

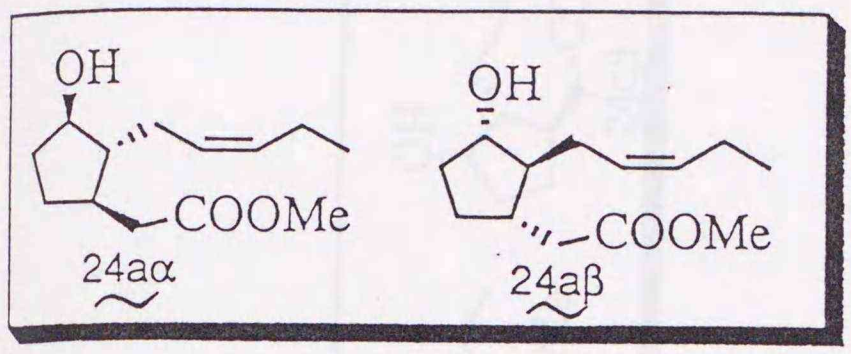
Fr.1

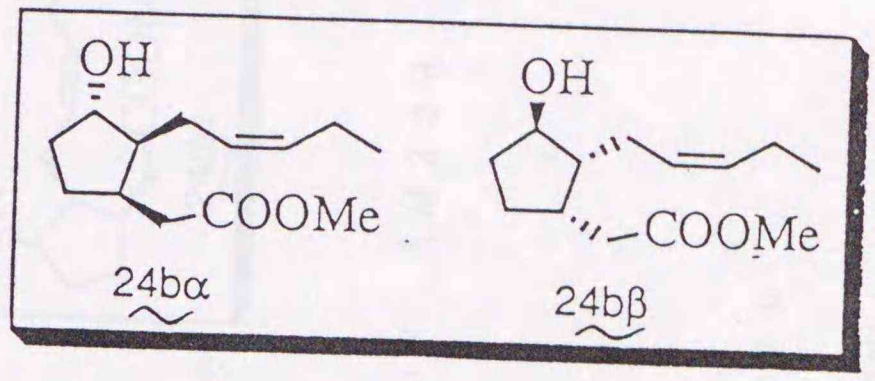


NOE

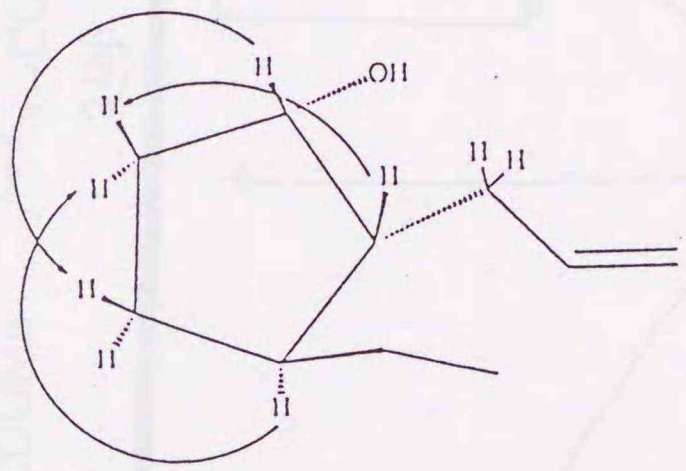
Fr.2



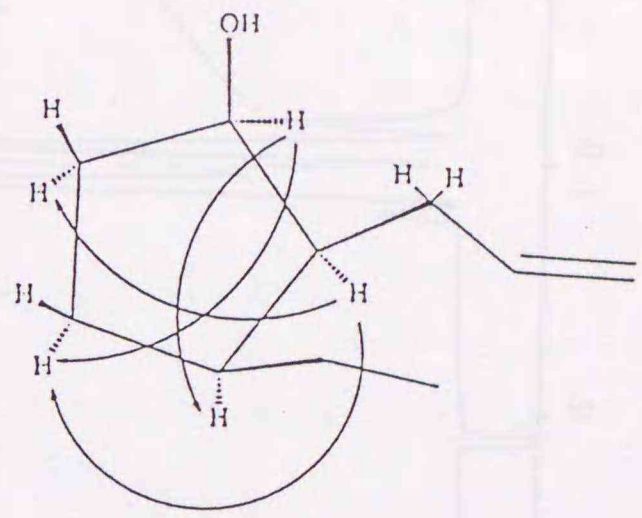


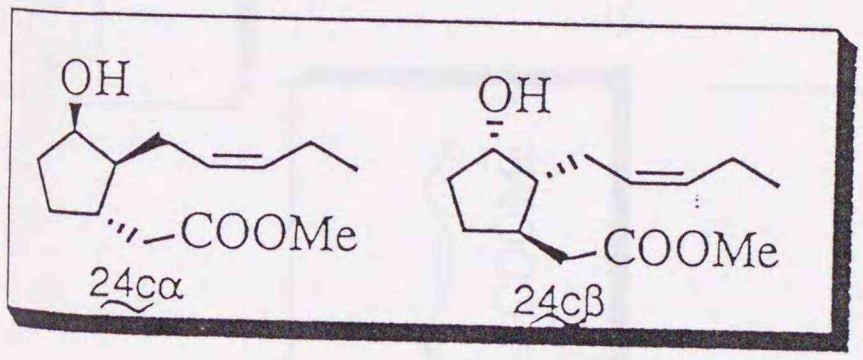


Fr.3



Fr.4





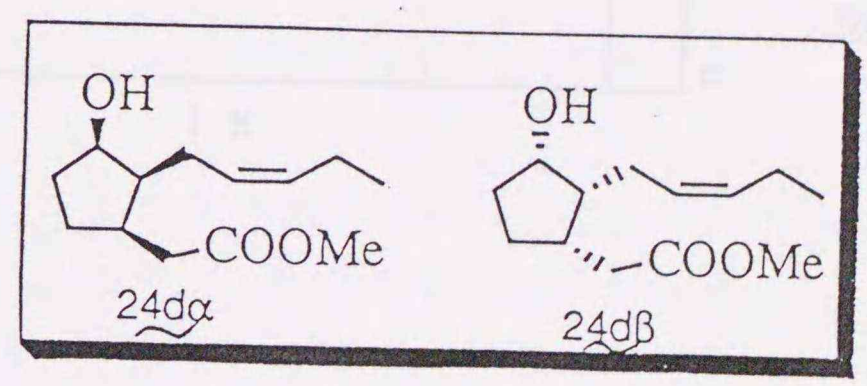


図３－14　24　各ジアステレオマーのＮＯＥ

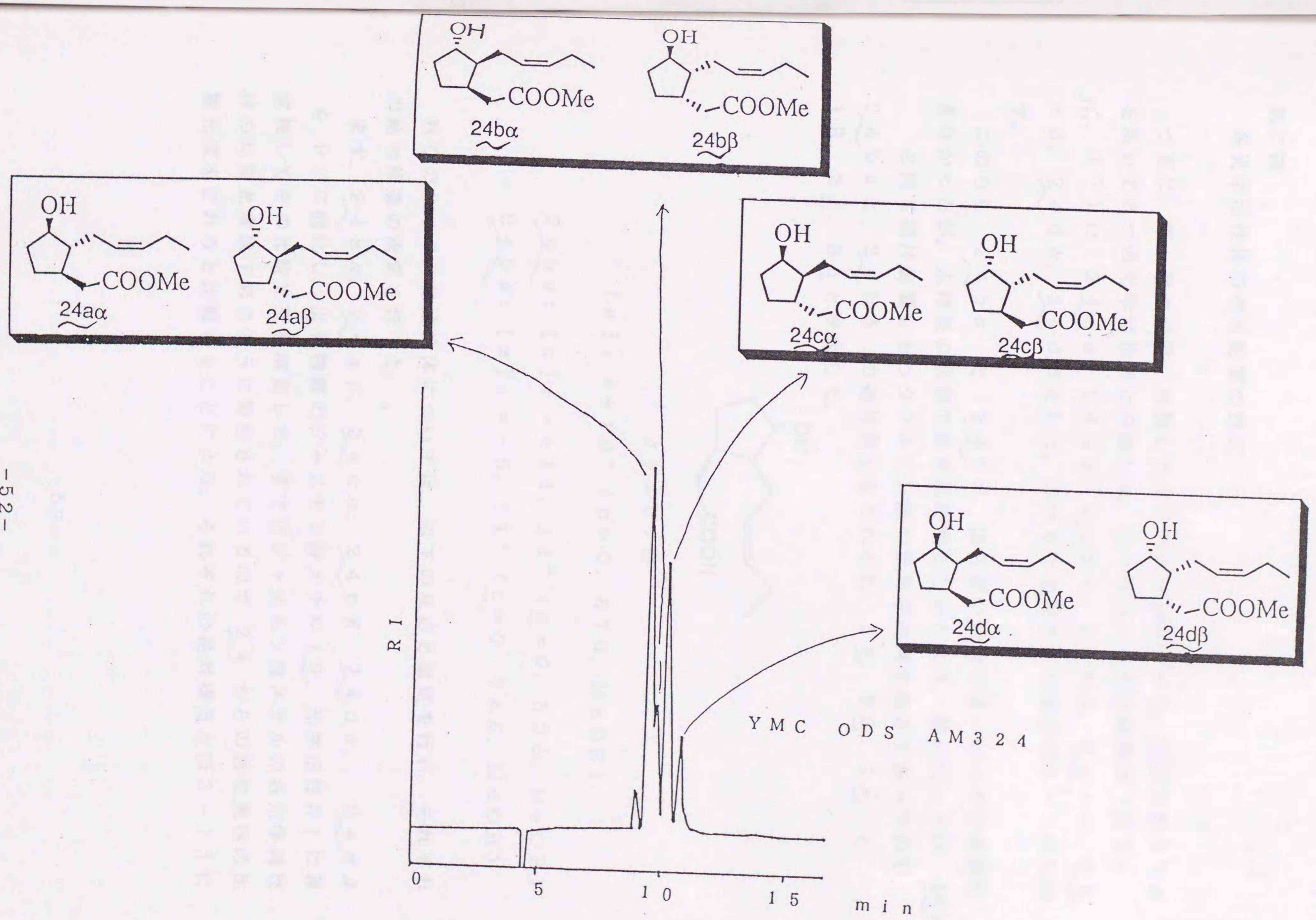


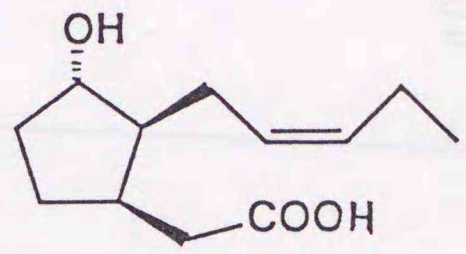
図3－15　24　各ジアステレオマーの同定

第二節

各光学活性体の絶対配置の決定

つぎに、第一節で分離、精製した各ジアステレオマーを、光学分割カラムを用いて８つの光学活性体に分離した。各々について保持時間順（図３－16，１７）に　２４ａα、２４ａβ、２４ｂα、２４ｂβ、２４ｃα、２４ｃβ、２４ｄα、２４ｄβとした。これらの比旋光度の値を図３－１９に示す。

このうち　２４ｂα　と　２４ｂβ　は分離が困難で単一ピークに分割できなかったが。未精製の状態で旋光度を測定したところ、前のピークが、24b と同じ相対配置をもつククルビン酸の旋光度と同じ向きであったので２４ｂαと　２４ｂβ　の絶対構造をそれぞれ　１Ｓ、２Ｓ，３Ｒ　と１Ｒ，２Ｓ，３Ｓと決定した。



ククルビン酸[19]

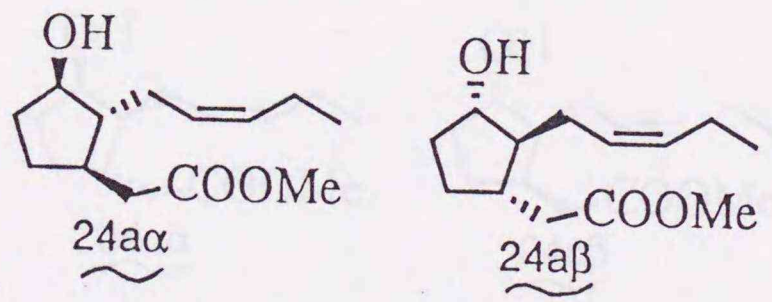
[α]$_D$ ＝＋１０°（ｃ＝０．８７０、ＭｅＯＨ）

２４ｂα：[α]$_D$ ＝＋１１．１１°（ｃ＝０．５２８、ＭｅＯＨ）

２４ｂβ：[α]$_D$ ＝－５．７１°（ｃ＝０．７４６、ＭｅＯＨ）

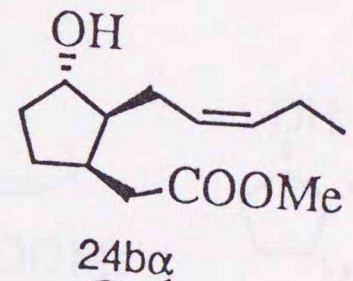
残りの６つの光学活性体については、以下の反応と測定を行い、それぞれの絶対構造の決定を行った。。

まず、２４ａα、２４ａβ、２４ｃα、２４ｃβ、２４ｄα、　２４ｄβを　ＰＣＣ酸化し、出発物質のジャスモン酸メチル（９、光学活性体）に再変換してその比旋光度を測定した。すでにジャスモン酸メチルの各光学異性体の比旋光度は下図のように報告されているので　２４　からの再変換物の比旋光度をこれらと比較することにより、それぞれの絶対構造を図３－１９に

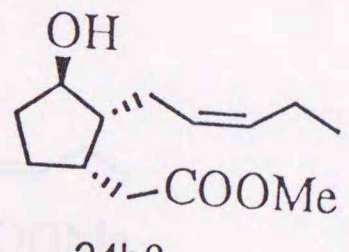


24aα

24aβ



24bα



24bβ

HPLC CHIRALPAK OJ 2% i-PrOH-n-hexane

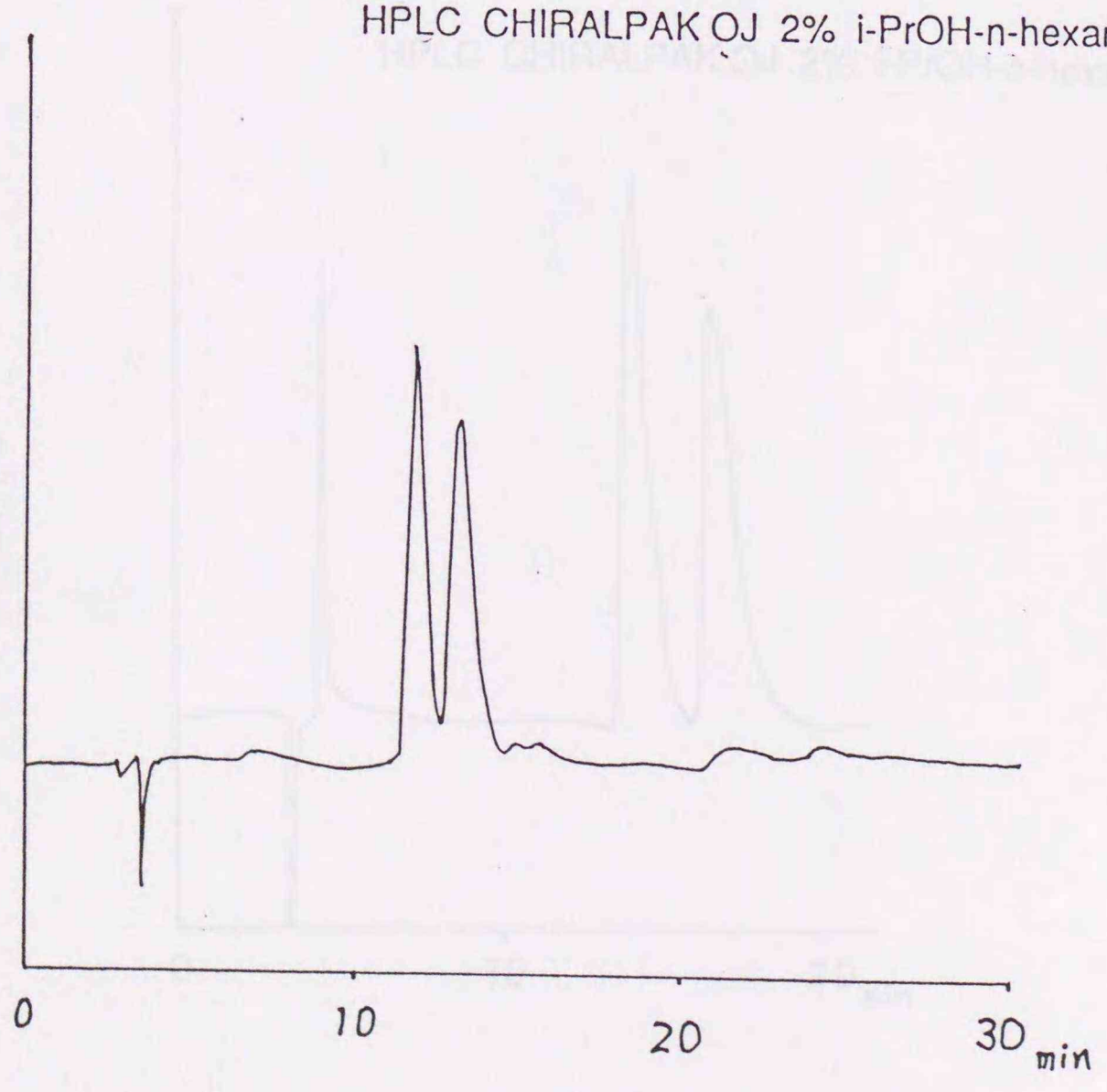
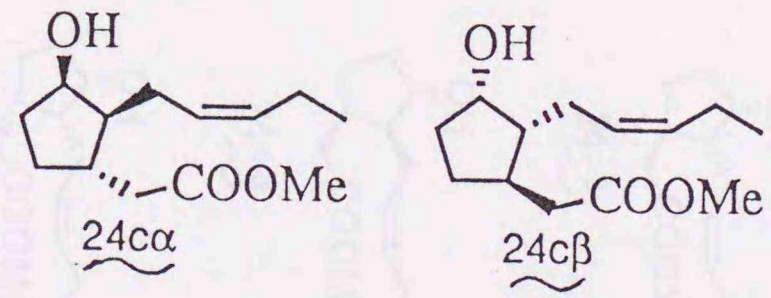


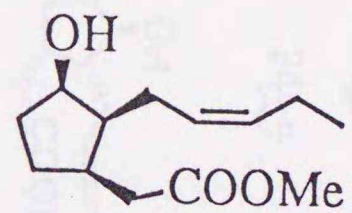


図3－16. 24a と 24b の光学活性体の分離

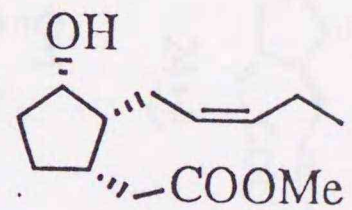


24cα

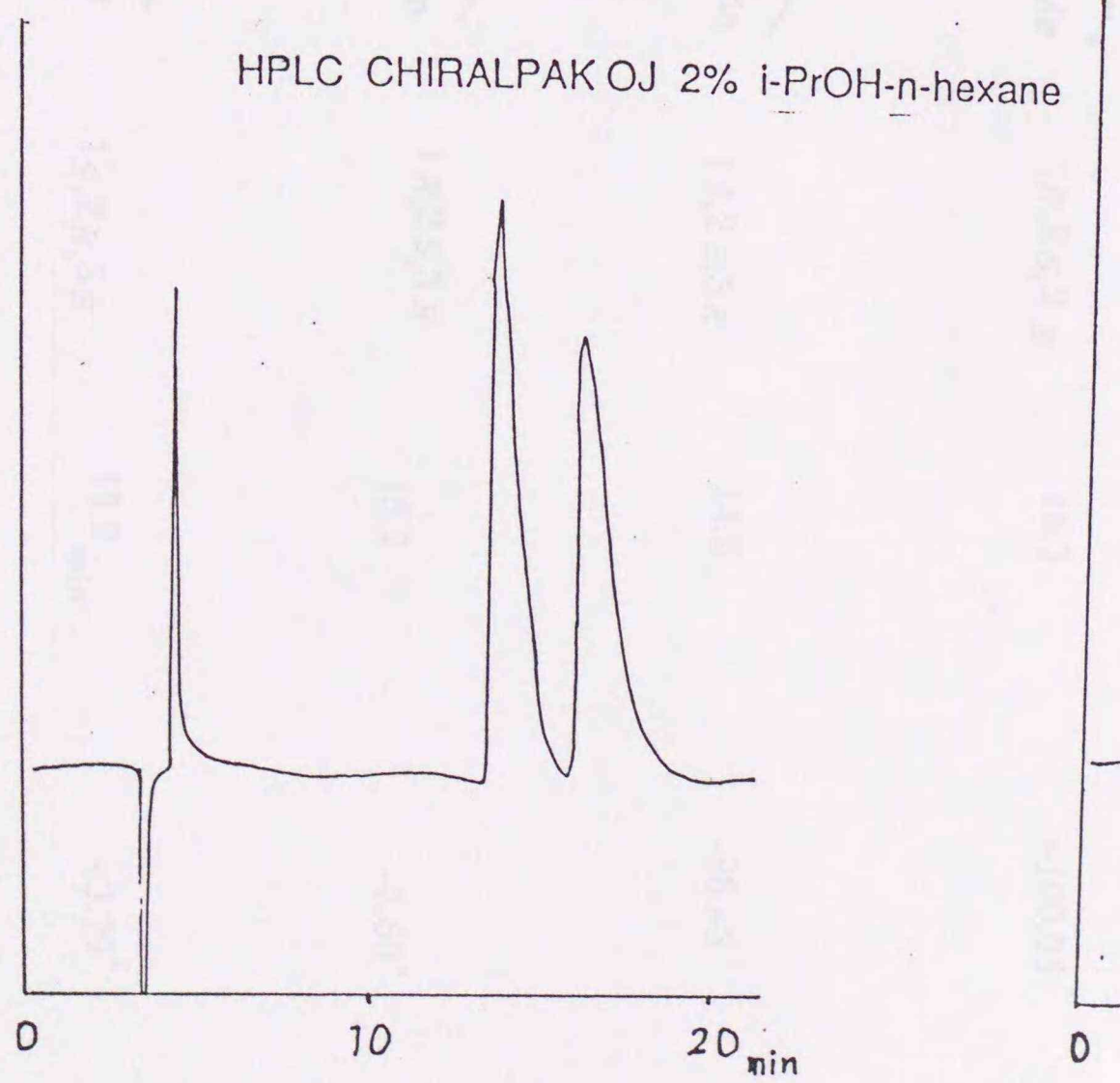
24cβ



24dα



24dβ



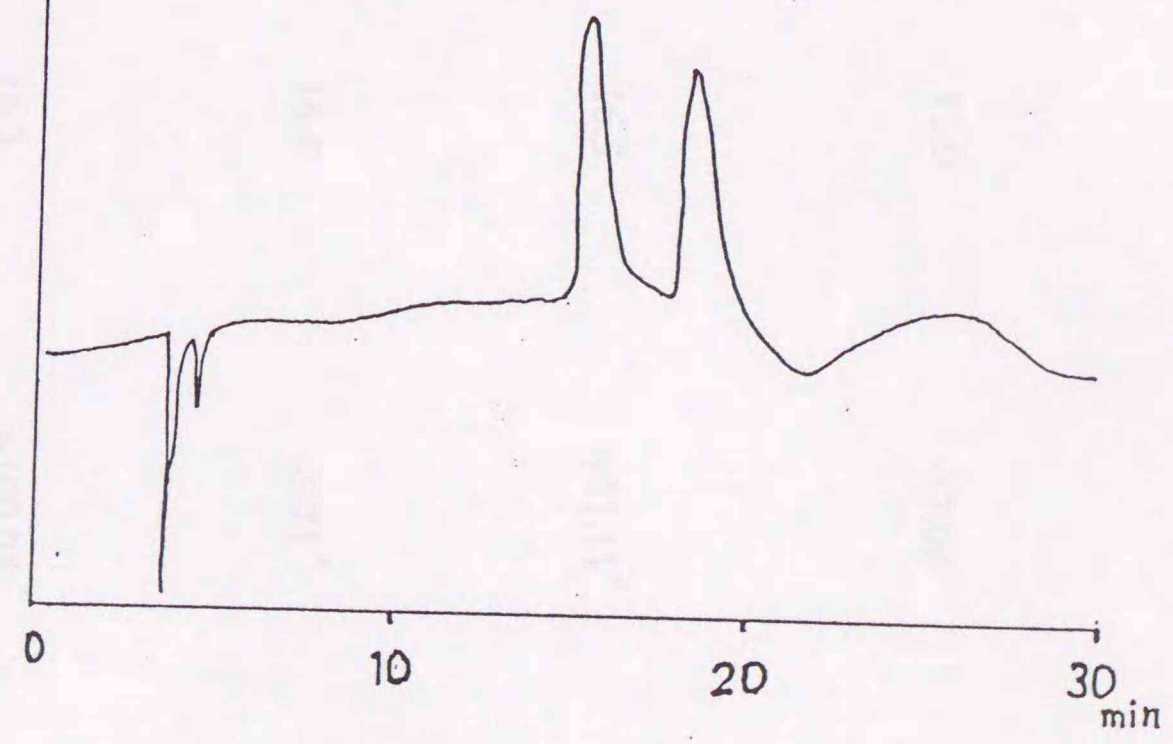


図3－17　24c と 24d の光学活性体の分離

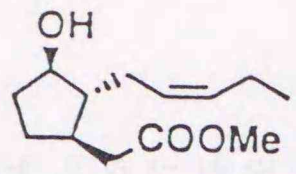
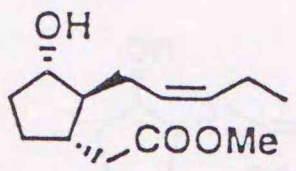
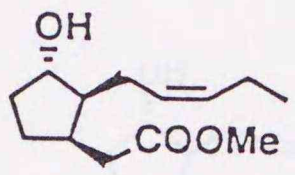
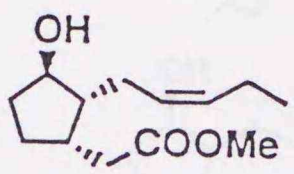
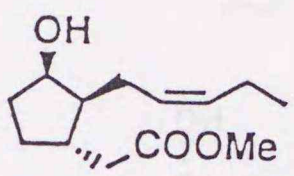
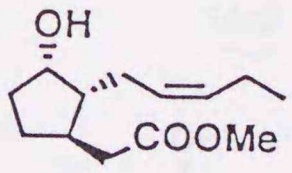
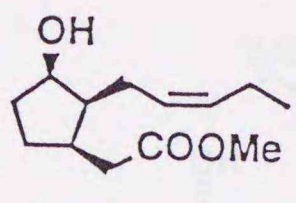
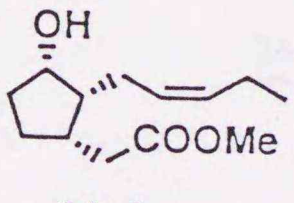
		r.t.	$[\alpha]_D$
 24a-α	1*R*,2*R*,3*R*	11.7	+23.24°
 24a-β	1*S*,2*S*,3*S*	13.0	-17.06°
 24b-α	1*S*,2*S*,3*R*	16.5	+11.11°
 24b-β	1*R*,2*R*,3*S*	16.8	-5.71°
 24c-α	1*R*,2*S*,3*S*	16.3	+100.05°
 24c-β	1*S*,2*S*,3*R*	14.0	-98.43°
 24d-α	1*R*,2*S*,3*R*	15.2	-2.60°
 24d-β	1*S*,2*R*,3*S*	18.2 min	+3.79°

図３－１８　２４の各光学活性体

示すように決定した。

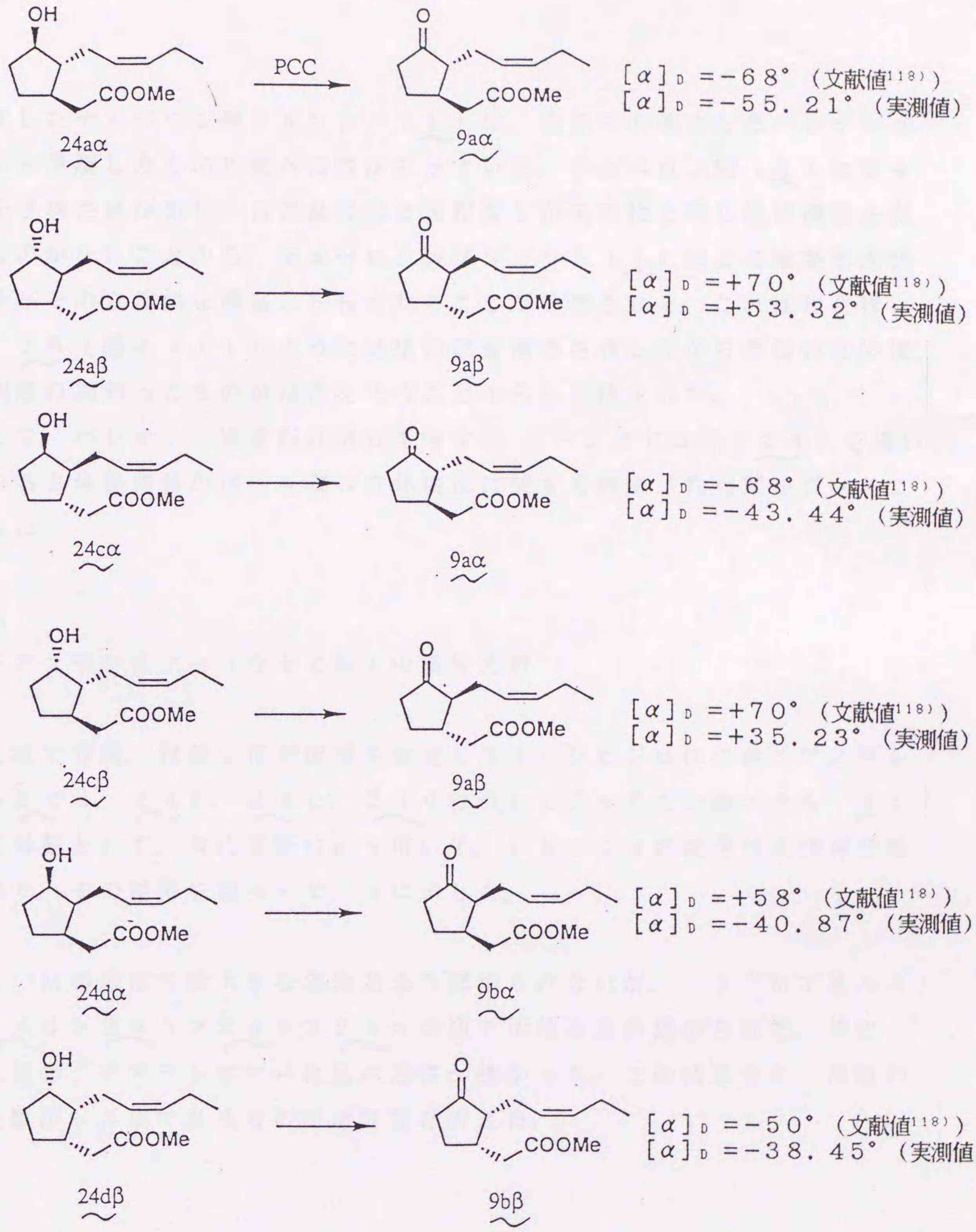


図３－１９　２４ の各光学活性体のＰＣＣ酸化による ９ への再変換

第四章

1－ジヒドロジャスモン酸メチル（24）を用いた塊茎形成誘導活性と側鎖の立体化学との相関[114)]

合成したチュベロン酸グルコシド（1）は、吉原らの報告したバレイショの葉から単離したものに較べ活性が劣っていた。チュベロン酸（4）には4つの光学異性体があり、合成品には2％程度しか天然物と同じ絶対構造を有するものがないことから、チュベロン酸グルコシド（1）による塊茎形成誘導活性がその立体的な構造に左右されることが予想される。これは化合物19、28（図4－1）のように必須の部分構造を有しながら側鎖の立体構造に制限の加わったものが活性を失うことからも支持された。

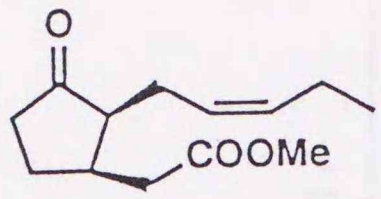
そこで、バレイショ塊茎形成活性を有する1－ジヒドロ体（24）を用いてその各立体異性体の活性を調べ立体構造に関する構造活性相関を調べることにした。

第一節

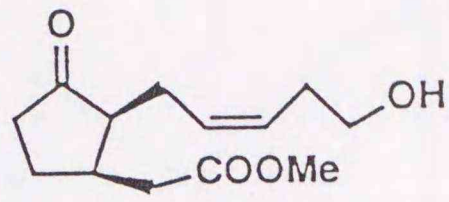
各ジアステレオマー（ラセミ体）の活性比較

第三章で分離、精製し相対配置を決定した1－ジヒドロ体の各ジアステレオマー24a，24b，24c，24dについてジャスモン酸メチル（9）を比較対照として、黄化茎断片法を用いて、バレイショの塊茎形成誘導活性を調べた。その結果を図4－2、3に示した。

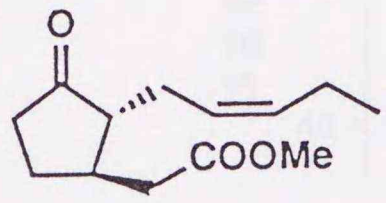
10^{-5}Mの濃度では大きな差はあまり認められないが、10^{-6}Mで比べると　24d＞24b＞24c＞24aの順で活性の差が認められた。特に24dは他のジアステレオマーに比べ活性が強かった。この結果から、側鎖の相対配置がシス型であるものが活性型と考えた。



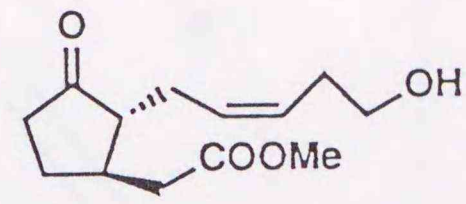
9a ++++



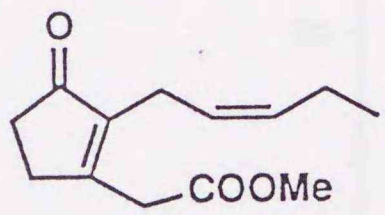
4a +++



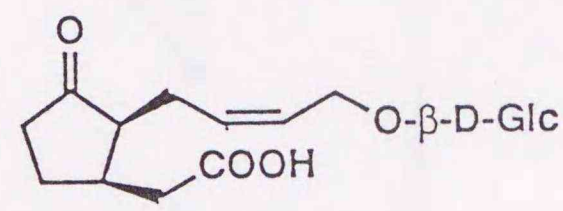
9b +++



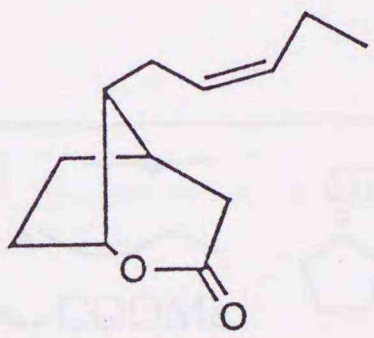
4b +



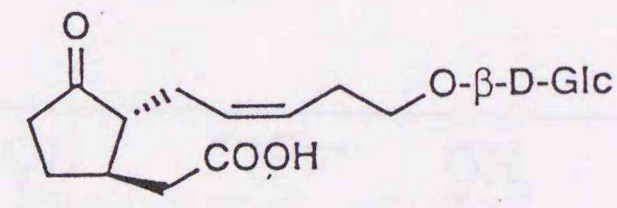
28 ---



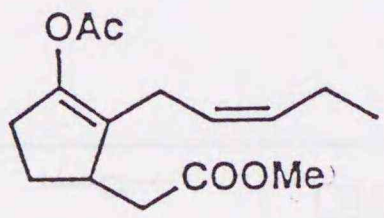
1a +++



19 ---

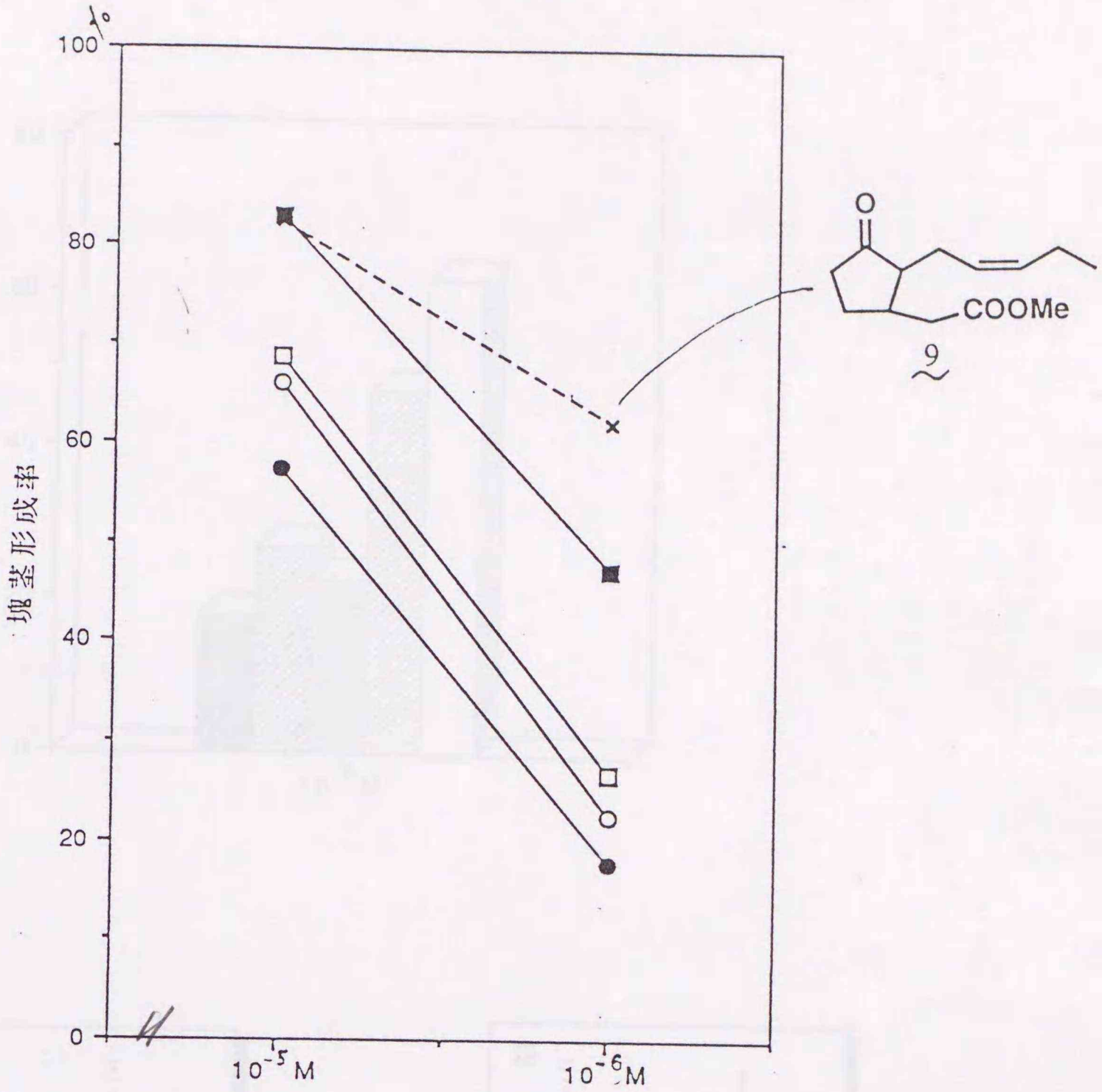


1b +

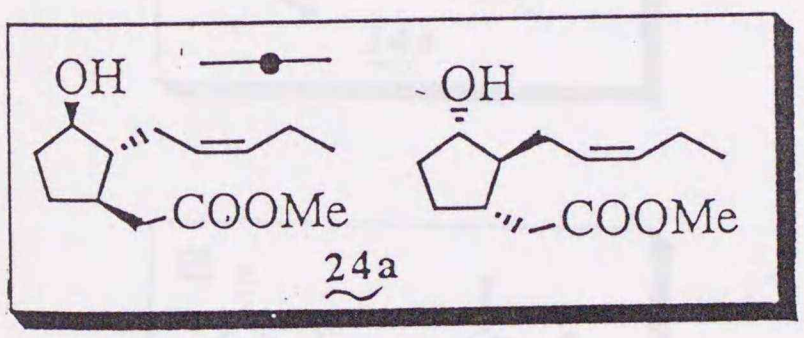


25 +++

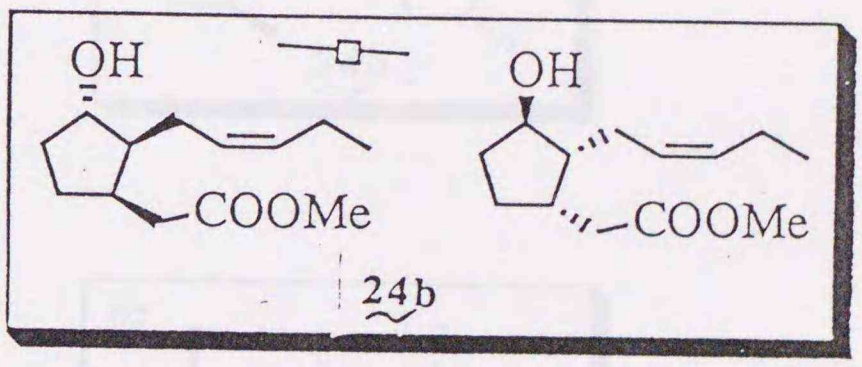
図４－１　ジャスモン酸類の側鎖の立体構造による活性の変化



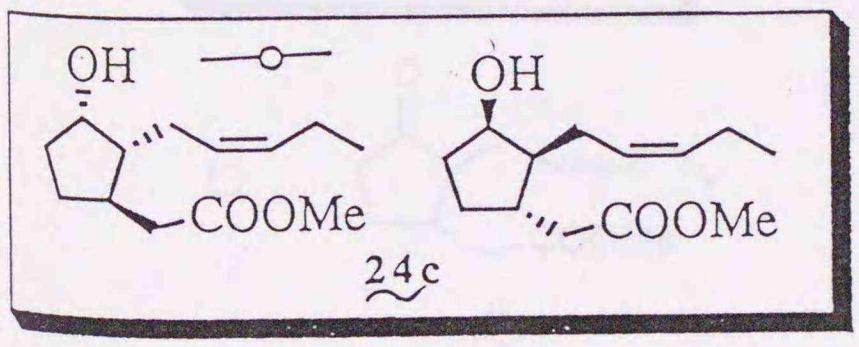
9



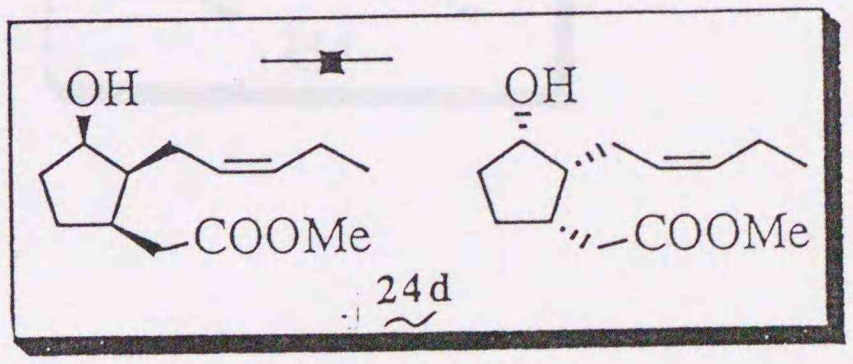
24a



24b

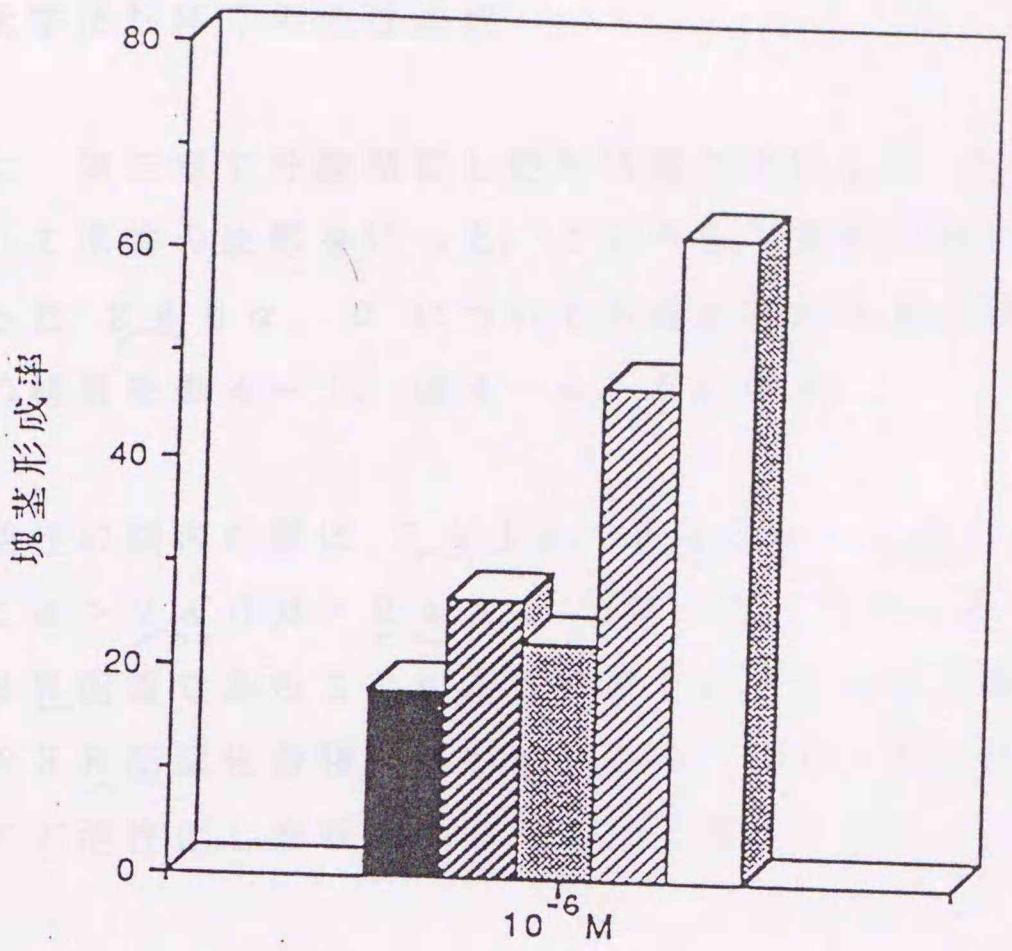


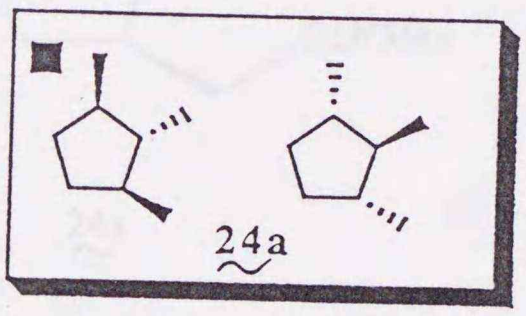
24c

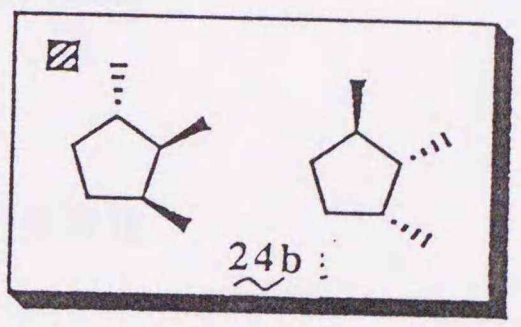


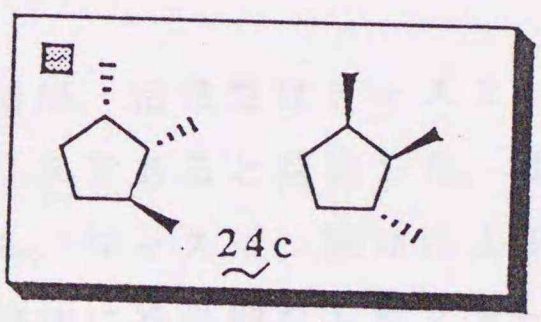
24d

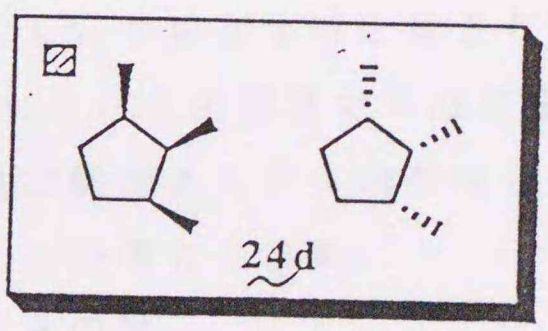
図４－２　24　各ジアステレオマーの塊茎形成誘導活性

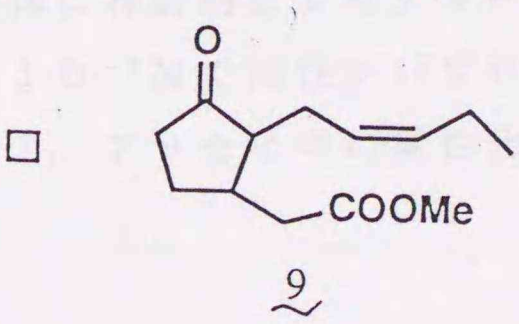












9

図４－３　24　各ジアステレオマー　10^{-6} Mの塊茎形成誘導活性

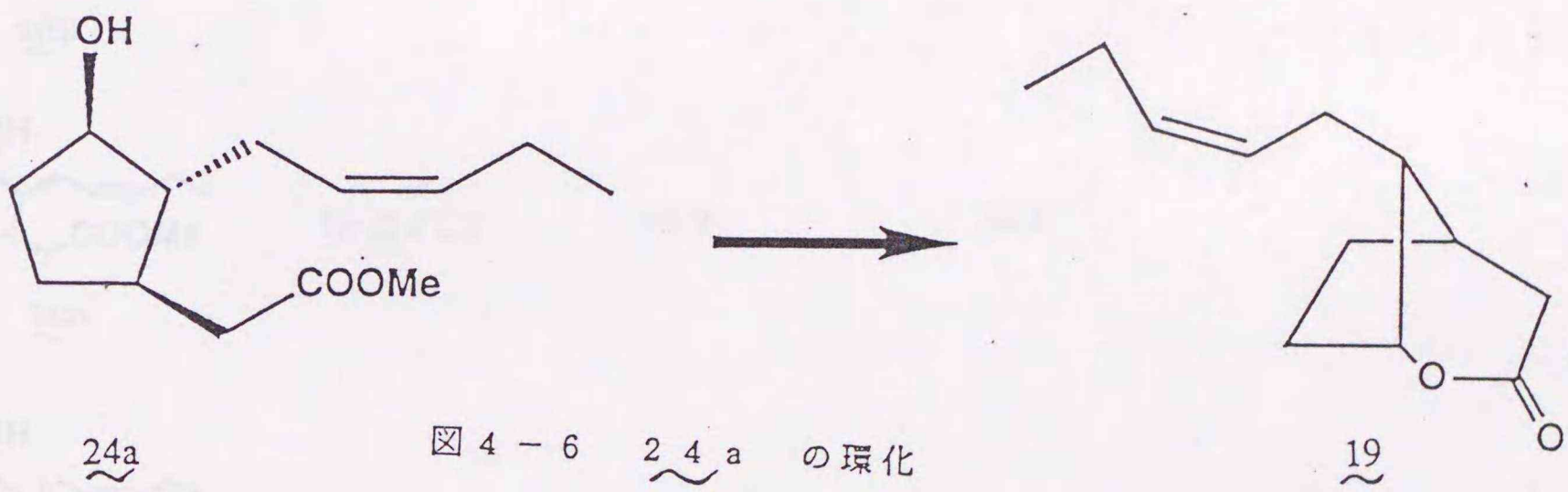
第二節

各光学活性体での活性比較

次に、第三章で分離精製し絶対構造を決定した 2 4 の８つの光学異性体について活性の比較を行った。このうち、光学分割カラムで良い分離ができなかった 2 4 b α、β についても混合物のまま活性を調べた。

その結果を表４－１、図４－４，５に示す。

活性の強さの順は 2 4 d α、2 4 b α、2 4 c β > 2 4 a α、2 4 b β、2 4 c α > 2 4 d β > 2 4 a β であった。このことから、活性の発現には側鎖が３R配置であることが最適条件であることが判明した。2 4 a α の活性が他の３R配置化合物に較べ低いのは、図４－６に示すようなラクトン化がおきて不活性化した可能性を考えた（図２－２）。



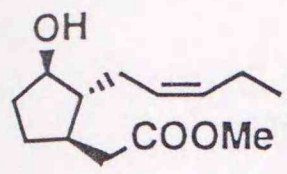
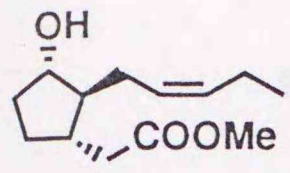
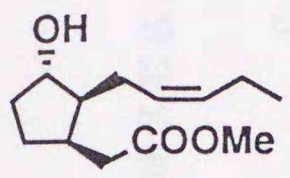
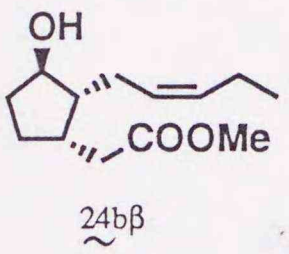
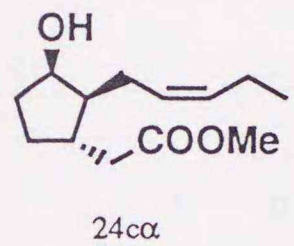
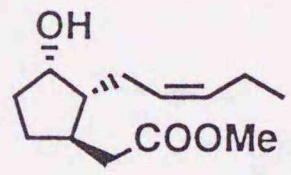
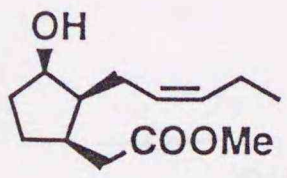
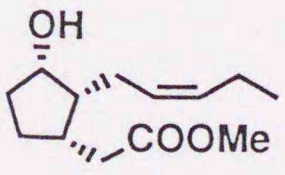
24a　　図４－６　2 4 a　の環化　　19

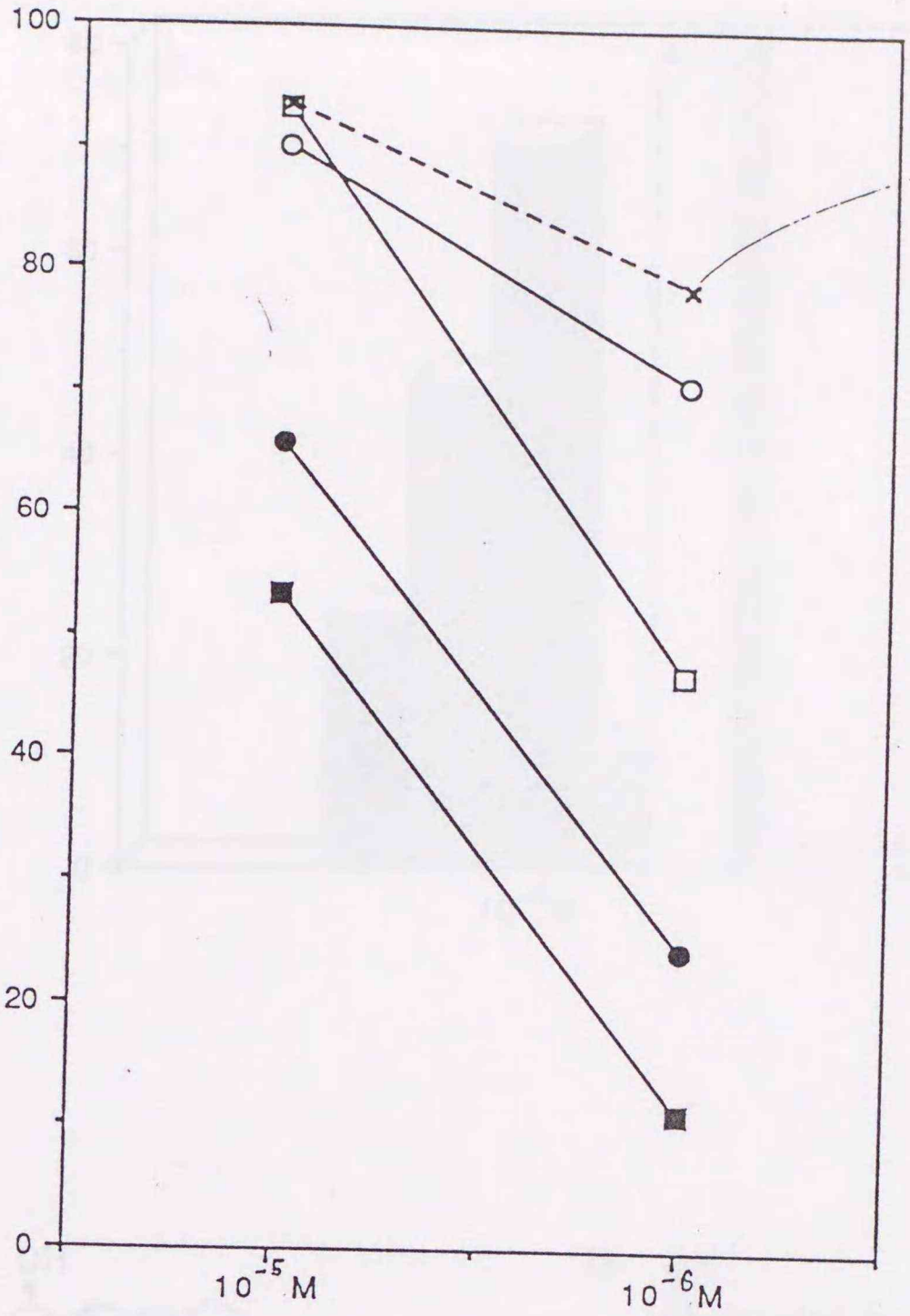
結局、活性型はジャスモン酸類が天然において存在すると考えられる ２S、３Rであると結論した。これが １０$^{-6}$Mという低濃度でも活性を示すことから、ジャスモン酸類による塊茎形成誘導は植物ホルモン的なはたらきで、植物体に特異的なレセプターが存在することが考えられた。

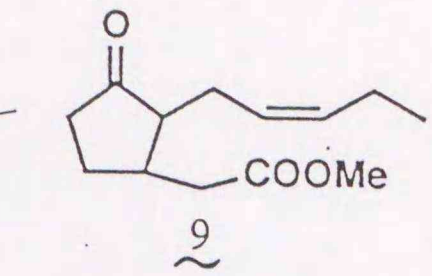
１０$^{-5}$Mで活性がいずれでも認められるのは、

１．アッセイ中の異性化

表４－１　２４　各光学活性体の塊茎形成誘導活性

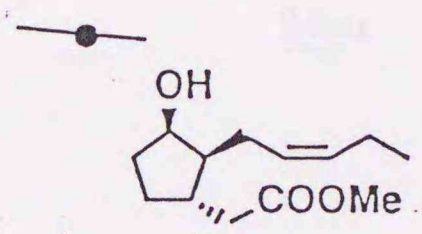
		10^{-5}M	10^{-6}M	
 24aα	1*R*,2*R*,3*R*	68.4	6.7	
 24aβ	1*S*,2*S*3*S*	29.7	6.7	
 24bα	1*S*,2*S*3*R*	93.3	30.0	HPLC分取物混合物
 24bβ	1*R*,2*R*3*S*	66.7	33.3	
 24cα	1*R*,2*S*3*S*	65.9	24.4	
 24cβ	1*S*,2*R*,3*R*	93.3	46.9	
 24dα	1*R*,2*S*3*R*	90.1	70.7	
 24dβ	1*S*,2*R*3*S*	53.3	11.1	
			control 0%	



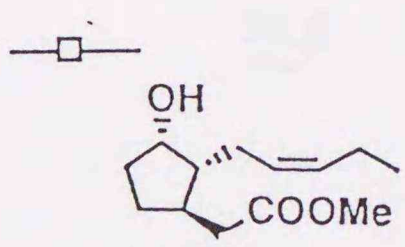


9

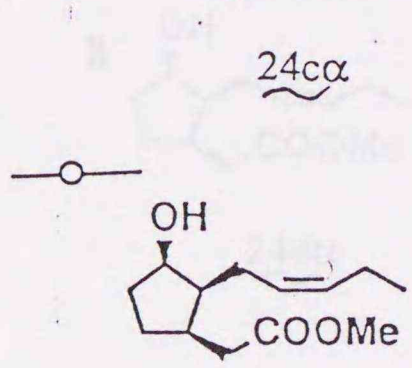
order is otherway round



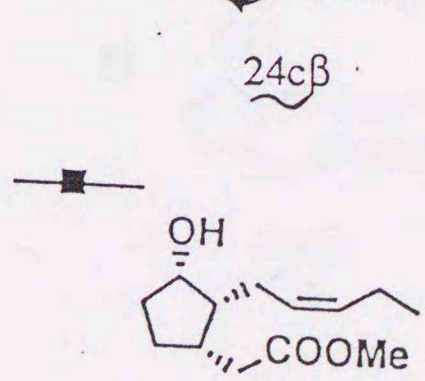
24cα



24cβ

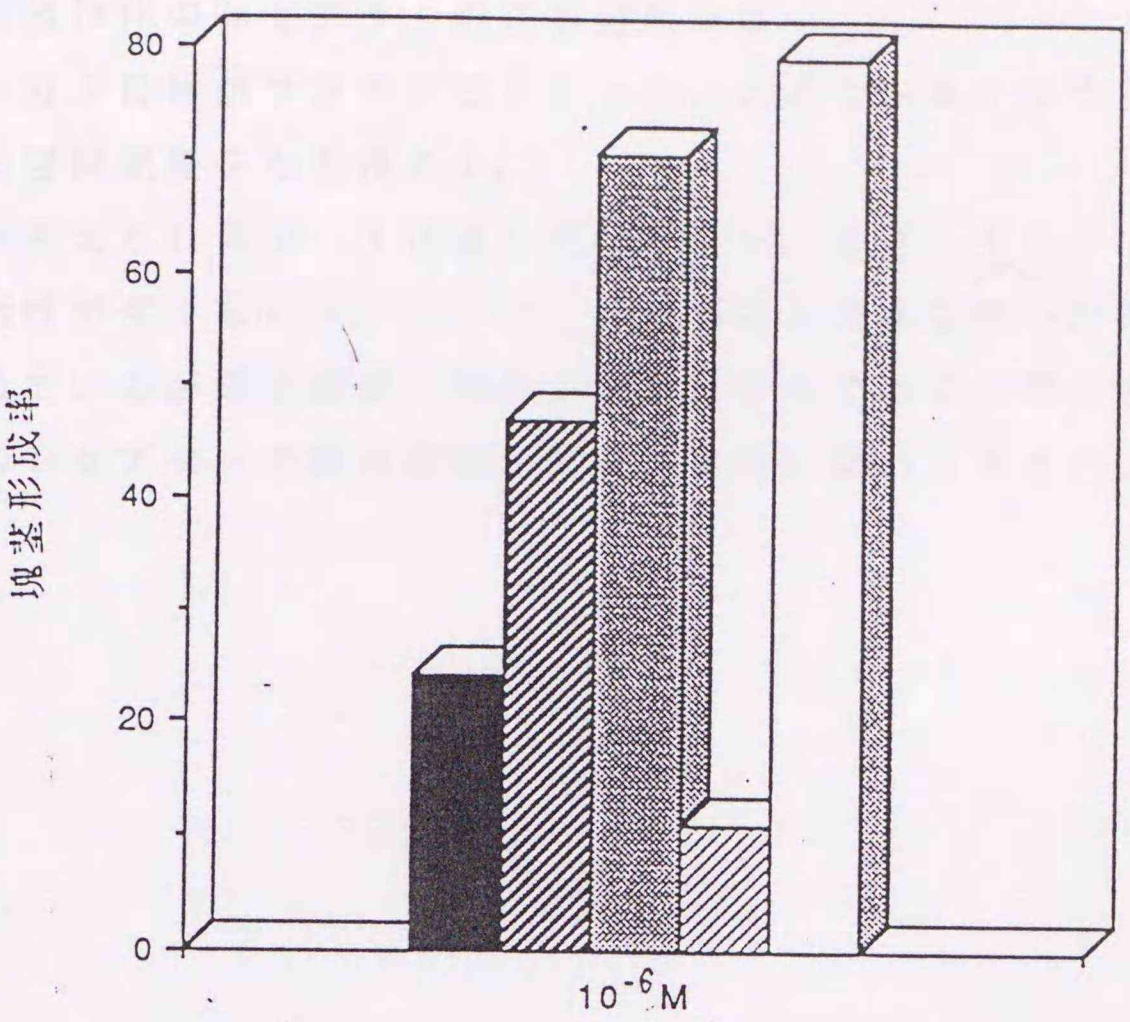


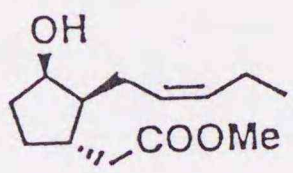
24dα



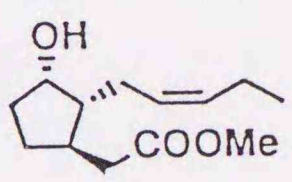
24dβ

図４－４　24　各光学活性体の塊茎形成誘導活性

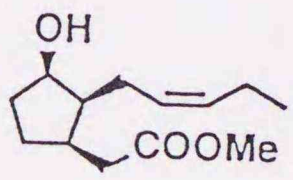


■ 

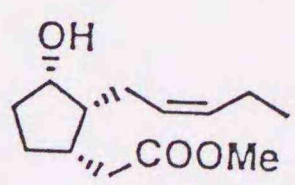
24cα

▨ 

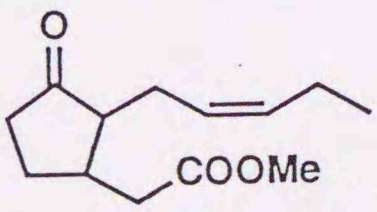
24cβ

▩ 

24dα

▧ 

24dβ

□ 

9

図４－５　24　各光学活性体　10^{-6} Mの塊茎形成誘導活性

2．植物体のレセプターの許容範囲が広い

3．分子自体がフレキシビリティーにとんでいる（エナンチオマー同士でも似た空間配座をもち得る）。

などが考えられるが、1は最も考えがたい。また、19、28のような化合物に活性が全くないが、これは19は構造上大きな違いがあり、28は構造的に似ているが電子密度の移動が大きいからであると考えられ、このことから2のレセプターの許容範囲が広い可能性が高いと考えた。

第五章

ジャスモン酸類のマイクロチューバー生産系への応用検討[115)]

組織培養法を用いてバレイショ塊茎（マイクロチューバー）を生産する方法は、タバコ作物へのポテトモザイクウイルスの感染被害を防ぐためのウイルスフリー株の大量増殖法としてばかりでなく、育種にかかる時間を短縮でき、次世代の種イモ生産技術となりうる可能性を持つことから、ＣＩＰ（国際バレイショ研究所）はじめ世界的に多くの研究がなされている[59-65)]。組織培養による塊茎形成法は、器内で育てた芽や茎を節毎等に分割し、これから発根させた後に移植する発根移植法と器内の茎に直接塊茎を作らせる塊茎形成法とに分けられる。以下無菌的条件が整っている後者の方法について述べる。本法はＷａｎｇおよびＨｕが[60)]初めて種薯としてのマイクロチューバー生産に用いている。その基本的な方法は図５－１に示すように茎頂端培養から分化させて得た継代増殖可能なバレイショの器内植物体（以下、無菌茎断片と呼ぶ）を連続あるいは長日条件下茎葉増殖させ、つぎに高庶糖濃度に調製した新たな培地に移植し連続暗所あるいは短日条件下におくと節の液芽からふく枝（ストロン）が発生しその先に小さな塊茎ができるというものである。この基本的な条件に関して様々な培養条件を細かく検討しさらにタンクレベルでのマイクロチューバーの大量生産が試みられている。また、塊茎形成誘導期に抗ジベレリン剤（例えばＣＣＣ（３０））を添加すると塊茎形成がより多く起こるという報告[59)]もある



ＣＣＣ（３０）

しかしながら、この従来の方法では、培養条件を培地の変更も含め、コストがかかるという問題がある。

この問題を解決するために、黄化茎断片で塊茎形成を誘導をするチュベロン酸（4）をはじめとするジャスモン酸類について、無菌茎断片に塊茎形成を誘導し、大量生産系に利用する可能性を検討した。

第一節

モデル系の作成

ジャスモン酸類の無菌茎断片に対する効果を、簡便に観察し、かつ実際のマイクロチューバー生産系（図５－１）への適用のてがかりとするため、実験室レベルで検討できるモデル系を作成した。

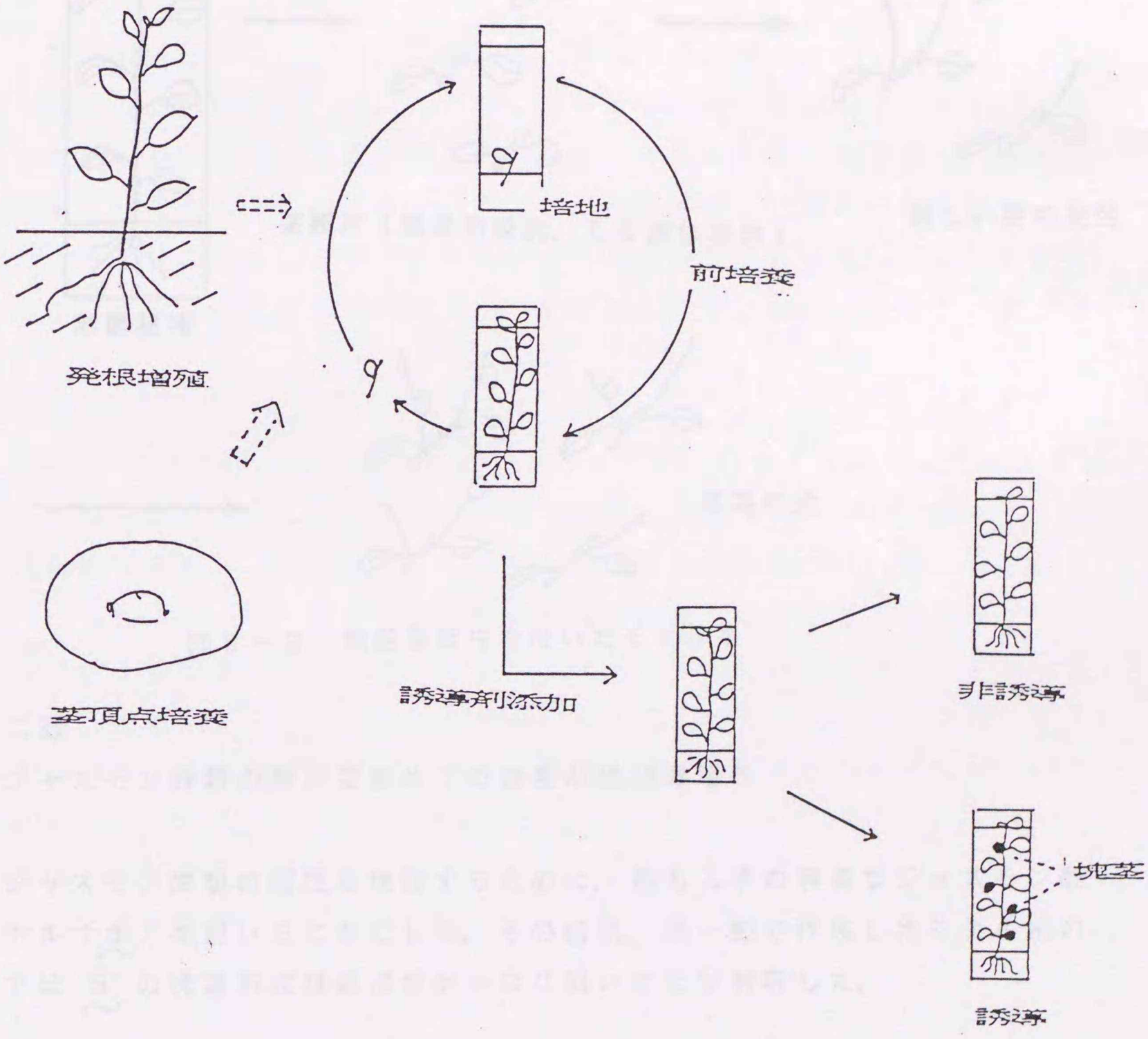


図５－１　マイクロチューバー生産系での塊茎形成誘導剤の利用

マイクロチューバー生産系で塊茎形成誘導剤を利用する場合、なるべく多くのマイクロチューバーを一つの節に作らせる必要があるので、塊茎形成数と新しい茎の発生数の両方が多い条件が重要であると考えた。そこで実験開始後、2、3週後の節からの新しい茎の発生数と、2、3、4週後の塊茎形成数を観察、記録し塊茎形成誘導の適切な条件を検討した。

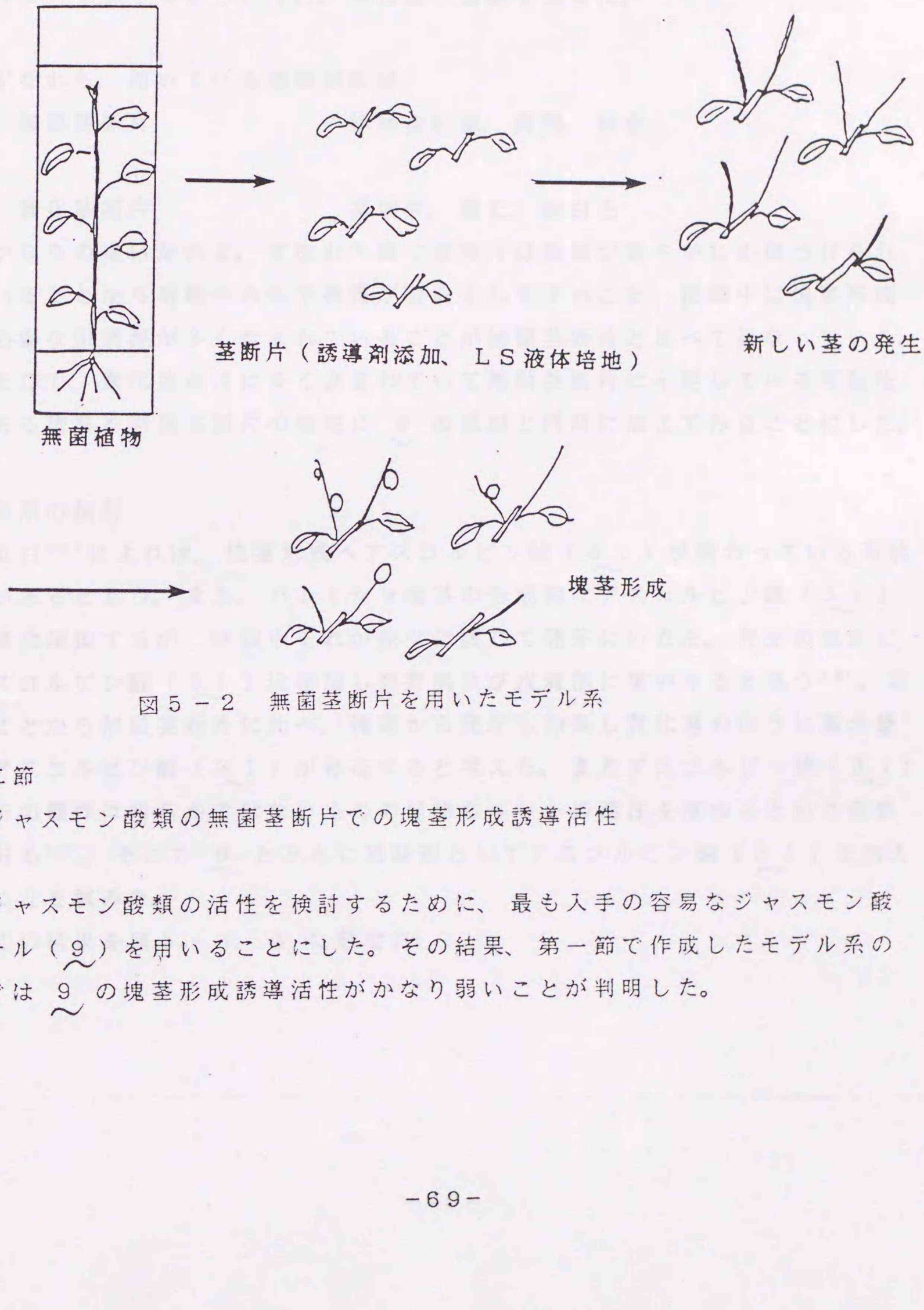


図５－２　無菌茎断片を用いたモデル系

第二節

ジャスモン酸類の無菌茎断片での塊茎形成誘導活性

ジャスモン酸類の活性を検討するために、最も入手の容易なジャスモン酸メチル（9）を用いることにした。その結果、第一節で作成したモデル系の中では 9 の塊茎形成誘導活性がかなり弱いことが判明した。

第三節

ジャスモン酸類の無菌茎断片での塊茎形成誘導法の確立

ジャスモン酸類の構造活性相関を調べる時に用いた黄化茎断片法では、塊茎形成誘導活性が強かったにもかかわらず本法では弱い活性しか示さない原因について以下のように考え、第三節の実験を行った。

すなわち、用いている植物材料は、

無菌茎断片　　植物全組織、貧弱、緑色

黄化茎断片　　茎切片、頑丈、黄白色

とかなりの違いがある。すなわち黄化茎断片は組織があらかじめ傷つけられていることから培地中の化学物質が吸収されやすいこと、組織中に塊茎形成に必要な栄養源が多く含まれていることが無菌茎断片と比べて異なっている。

そこで、黄化茎断片に多く含まれていて無菌茎断片に不足している可能性のある物質を無菌茎断片の培地に 9 の添加と同時に加えてみることにした。

補助剤の検討

坂村[66]によれば、塊茎形成へアスコルビン酸（31）が関わっている可能性があると言う。また、バレイショ塊茎の形成期にアスコルビン酸（31）が漸次増加するが、休眠中それが徐々に減じて発芽にいたる。発芽の直前にアスコルビン酸（31）は増加し発芽部及び皮膚部に集中すると言う[66]。このことから無菌茎断片に比べ、塊茎から発芽し伸長し黄化茎のほうに高含量のアスコルビン酸（31）が存在すると考えた。またアスコルビン酸（31）はその機作は明らかではないものの植物ホルモンの活性を高めるという報告がある[67]。そこで 9 とともに補助剤としてアスコルビン酸（31）を加えることを試みた。

この結果を図５－３、４に載せた。

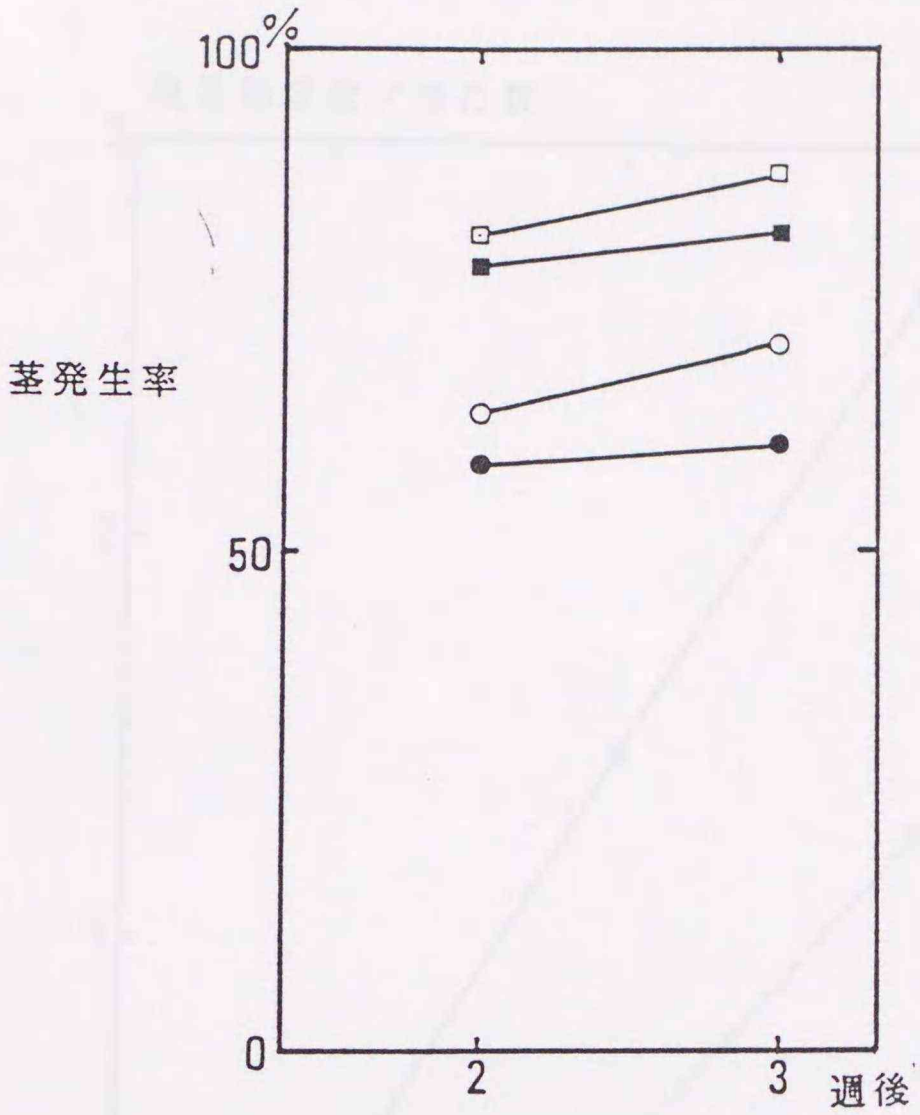


図５－３　無菌茎断片からの新しい茎の発生率

□ 無処理区
■ ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M
● ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸（31） 0.1%
○ アスコルビン酸（31） 0.1%

これにより、補助剤としてアスコルビン酸（31）を 9 とともに用いると塊茎形成誘導活性が強くなることを明らかにした。

また、アスコルビン酸（31）を培地に添加するとそのｐＨが著しく低下するのでその効果がｐＨに依存するかどうかを調べるために希塩酸で同じｐＨに調整した培地（ｐＨ　4．1）で 9 の活性が見られるか調べたが効果は認められなかった。

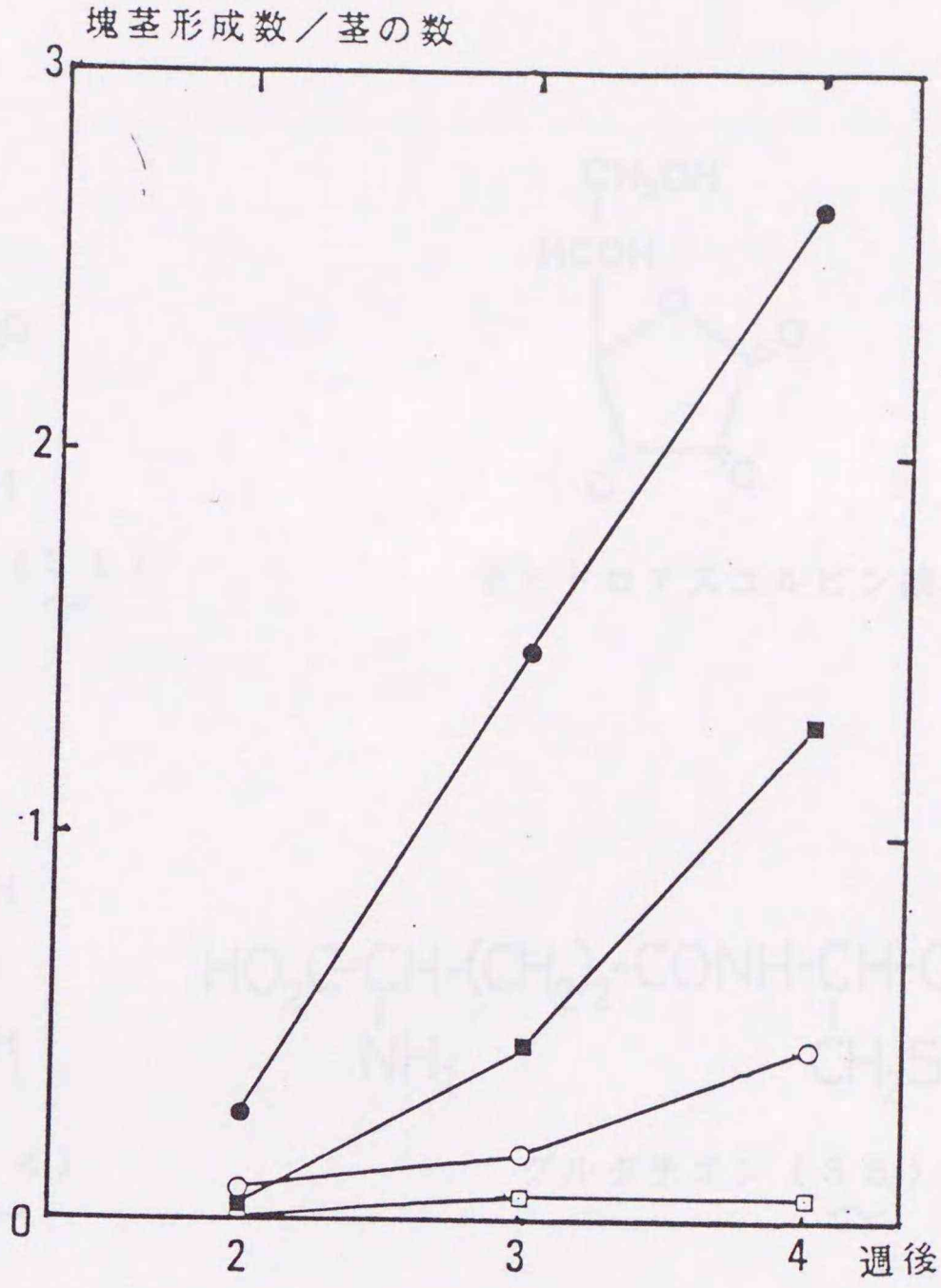
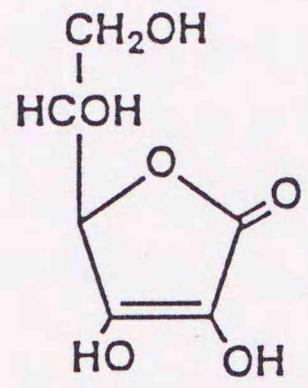


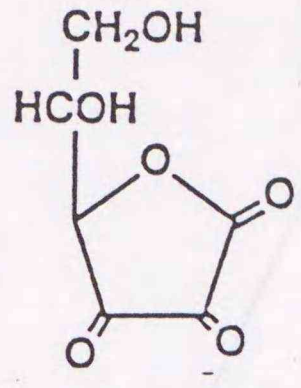
図５－４　無菌茎断片からの塊茎形成数／茎の数

□ 無処理区
■ ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M
● ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸（31） 0．1%
○ アスコルビン酸（31） 0．1%

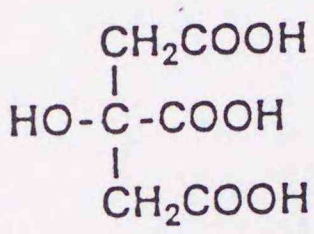
さらにアスコルビン酸（３１）の化学的特徴から還元性を有するもの、生体中に多量に存在する二次代謝産物を選んで同様な効果を有するかどうかを検討した。



アスコルビン酸（３１）



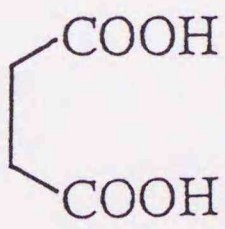
デヒドロアスコルビン酸（３２）



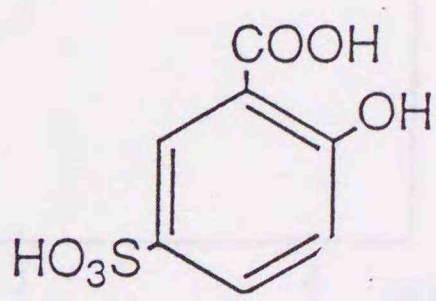
クエン酸（３４）



グルタチオン（３５）



コハク酸（３６）



スルホサリチル酸（３７）

図５－５　補助剤

その結果、アスコルビン酸Ｎａ塩、デヒドロアスコルビン酸（３２）、クエン酸（３４）、グルタチオン（３５）、コハク酸（３６）、スルフォサリチル酸（３７）、にアスコルビン酸（３１）と同様な補助剤としての効果が認められた。

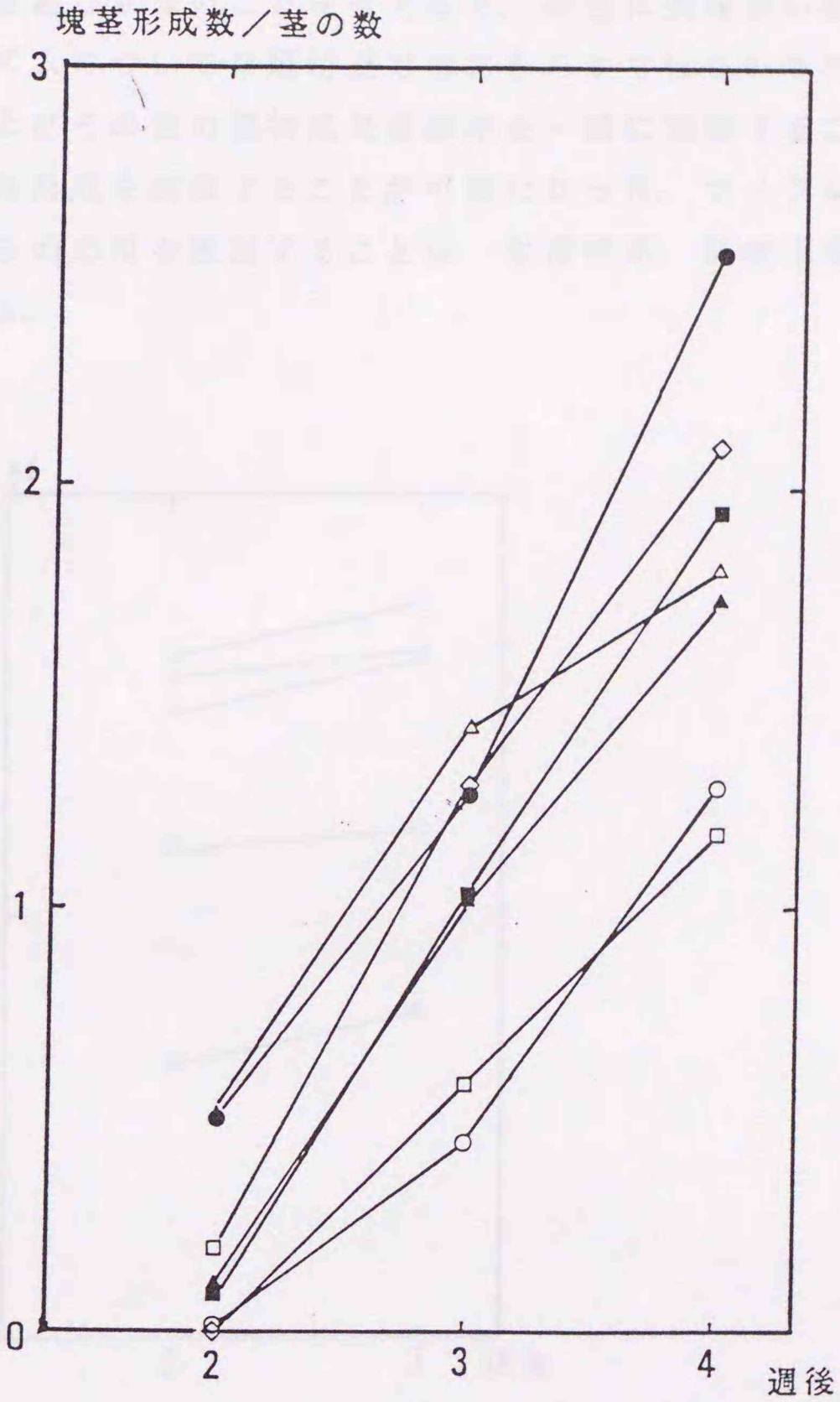


図５－６　各補助剤を加えた時の無菌茎断片からの塊茎形成数／茎の数

○ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M
△ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸Ｎａ塩（３１） ０．１％
□ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ デヒドロアスコルビン酸（３２） ０．１％
● ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ クエン酸（３４） ０．１％
▲ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ グルタチオン（３５） ０．０１％
■ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ コハク酸（３６） ０．１％
◇ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ スルホサリチル酸（３７） ０．０１％

さらに、植物生長調節剤であるカイネチン（40）を加えることにより、図5－7，8に示すように塊茎形成誘導がより促進されることが判明した。ジャスモン酸（10）およびカイネチン（40）が、単独では無菌茎断片に塊茎形成誘導を起こさないことを考えると、非常に興味深い結果と考えた。

このメカニズムについては現時点ではあきらかではないものの、これらの物質を 9 およびその他の植物成長調節剤を一緒に添加することにより無菌茎断片にも塊茎形成を誘導することが可能になった。マイクロチューバー生産系でのこれらの応用を検討することは、生産効率、簡便化を図る上で有用であると考える。

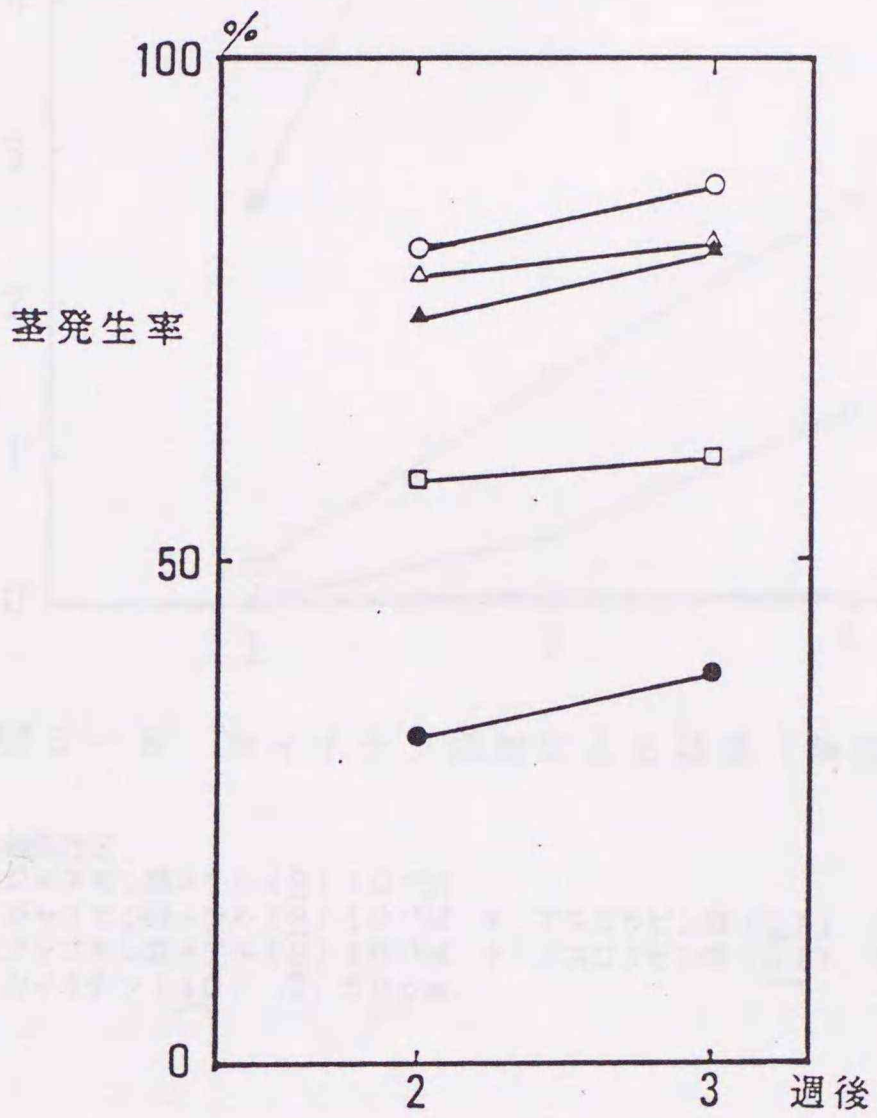


図5－7　カイネチン添加による効果（新しい茎の発生率）

○ 無処理区
△ ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M
□ ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸（31） 0.1%
● ジャスモン酸メチル（9）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸（31） 0.1% ＋ カイネチン（40） 2.5ppm
▲ カイネチン（40） 2.5ppm

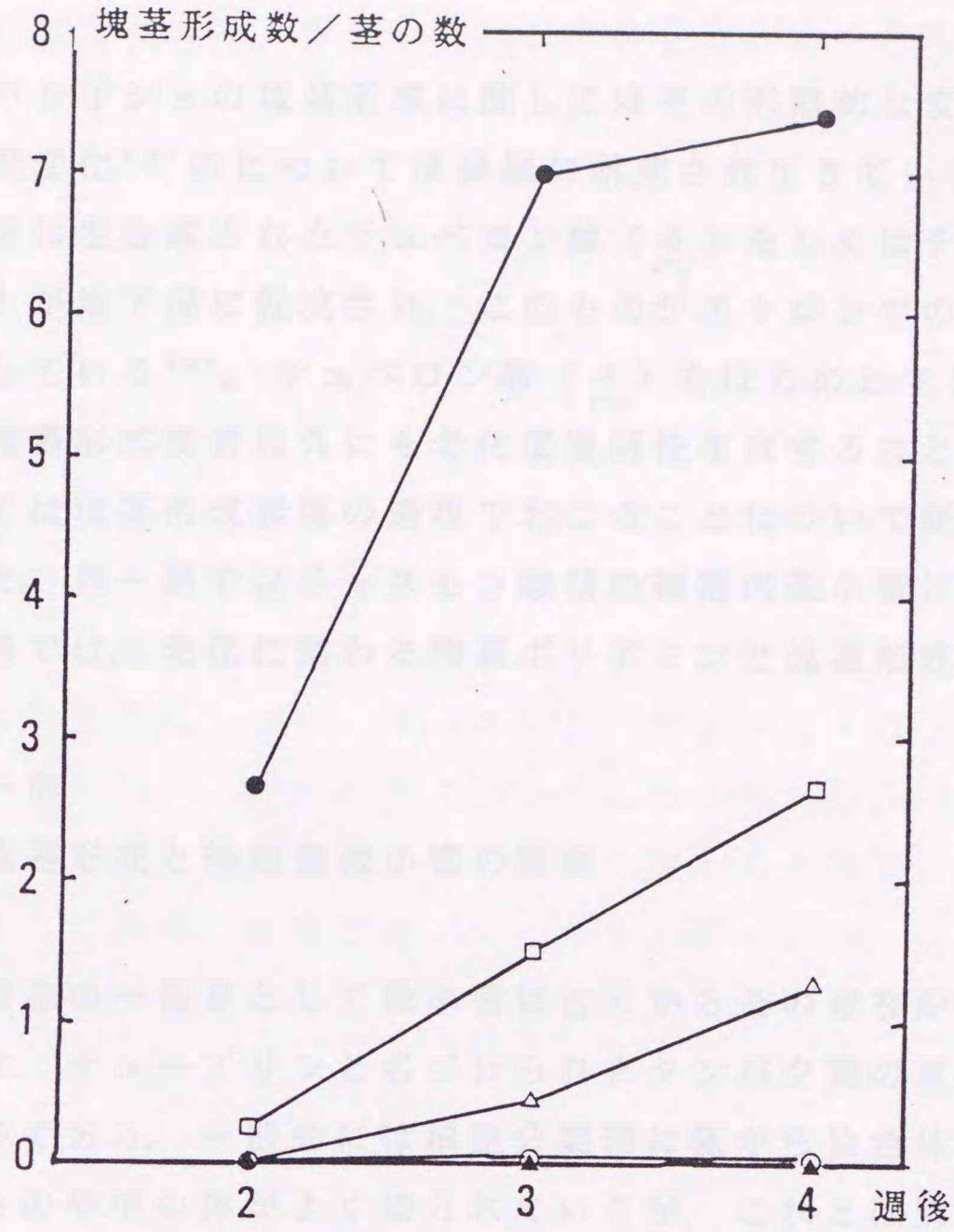


図５－８　カイネチン添加による効果（無菌茎断片からの塊茎形成数／茎の数）

○ 無処理区
△ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M
□ ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸（３１） ０．１％
● ジャスモン酸メチル（９）10^{-4}M ＋ アスコルビン酸（３１） ０．１％ ＋ カイネチン（４０） ２．５ppm
▲ カイネチン（４０） ２．５ppm

第六章

塊茎形成過程の考察

バレイショの塊茎形成に関してはその形態的な変化[68]や代謝系での物質の量的変化[69]のについては詳細に研究されてきている。幸田らは、短日条件下葉中に生合成されたチュベロン酸（4）もしくはチュベロン酸グルコシド（1）が地下部に転流され、このものがストロンでの塊茎形成を誘導すると考察している[70]。チュベロン酸（4）をはじめとするジャスモン酸類については塊茎形成誘導以外にも老化促進活性を有することが報告されている[10]。本章では塊茎形成誘導の過程でおこることについて新しい観点からの考察を試みた。第一節ではジャスモン酸類の細胞内微小管に対する活性を検討し、第二節では、老化に関わる物質ポリアミンと塊茎形成との関係を検討した。

第一節

塊茎形成と細胞壁微小管の関係

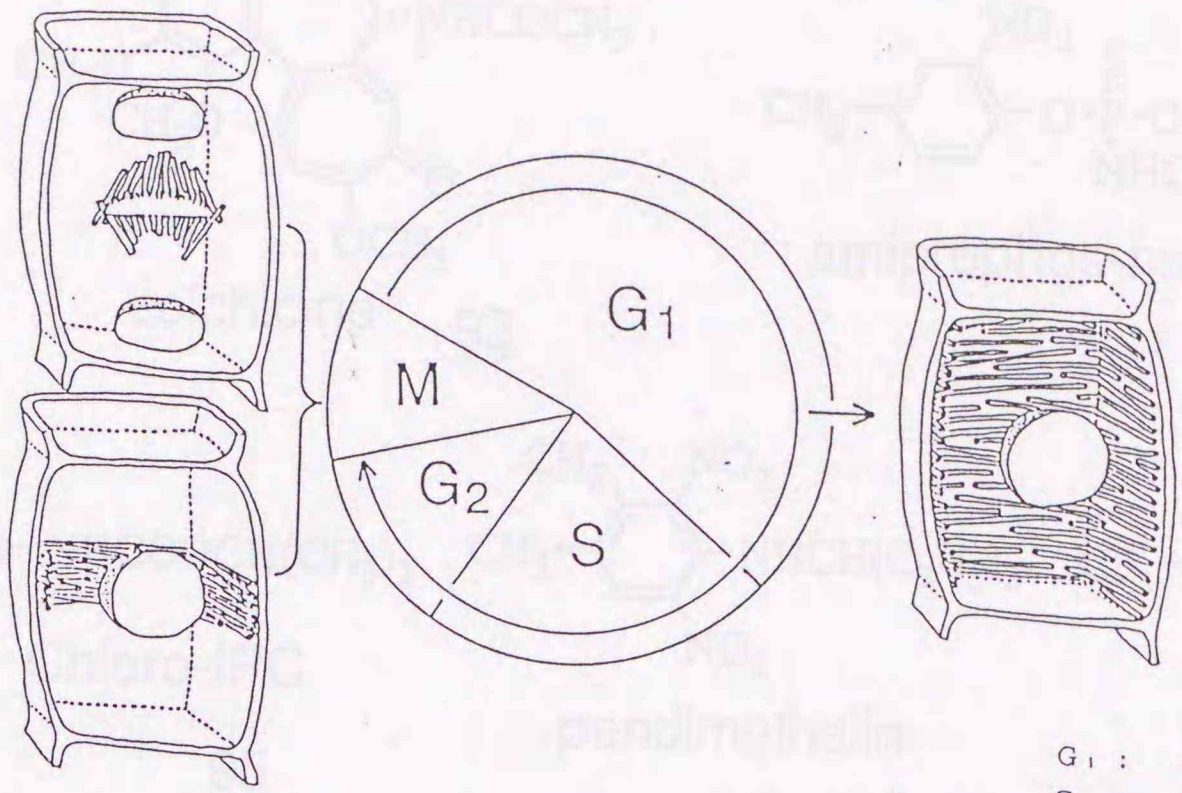
細胞の一器官として微小管は古くからその存在が報告されている。このものは、チューブリンと名づけられたタンパク質の重合した筒状の形態を持つものである。一般的には細胞分裂時に極から染色体に伸びる紡錘体と呼ばれるものや中心体がよく知られているが、これとは別に細胞膜に並ぶ形に存在する細胞壁微小管が存在する。このものは細胞によって細胞長軸に平行あるいは垂直に整然と配向したり、あるいはランダムに配向し、さらには構成タンパクのチューブリンに分解することで消失したりする（図６－１）[71-74]。

細胞壁微小管と細胞の形態との関係についてはいろいろな研究がなされているが、柴岡らは植物ホルモンの微小管にたいする影響と植物の形態の変化に関して次のように報告している。すなわち、ジベレリン（38）は茎の細胞の細胞壁微小管を細胞長軸と直角に並ばせる。軸と直角に並ばされた微小管は、新たに細胞壁の内側に付加されるセルロース微繊維を軸と直角に並ばせる。軸と直角に並ばされたセルロース微繊維は軸と直角方向への細胞の伸長を抑える。その結果、軸方向への伸長が増加する。サイトカイニンは茎の

細胞の細胞壁微小管を細胞長軸と平行に並ばせる。軸と平行に並ばされた微小管は、新たに細胞壁の内側に付加されるセルロース微繊維を軸と平行方向に並ばせる。軸と平行に並ばせられたセルロース微繊維は軸方向への細胞の伸長を抑える。その結果、軸と直角方向への伸長が増加する等、述べている[75]。　またタマネギの鱗茎の形成時に細胞の肥大開始当り微小管の変動が報告されている。すなわち肥大開始前は細胞の長軸に対して直角に配向するが肥大開始とともに次第に特定の方向性を失いやがて完全に消失する[76]。

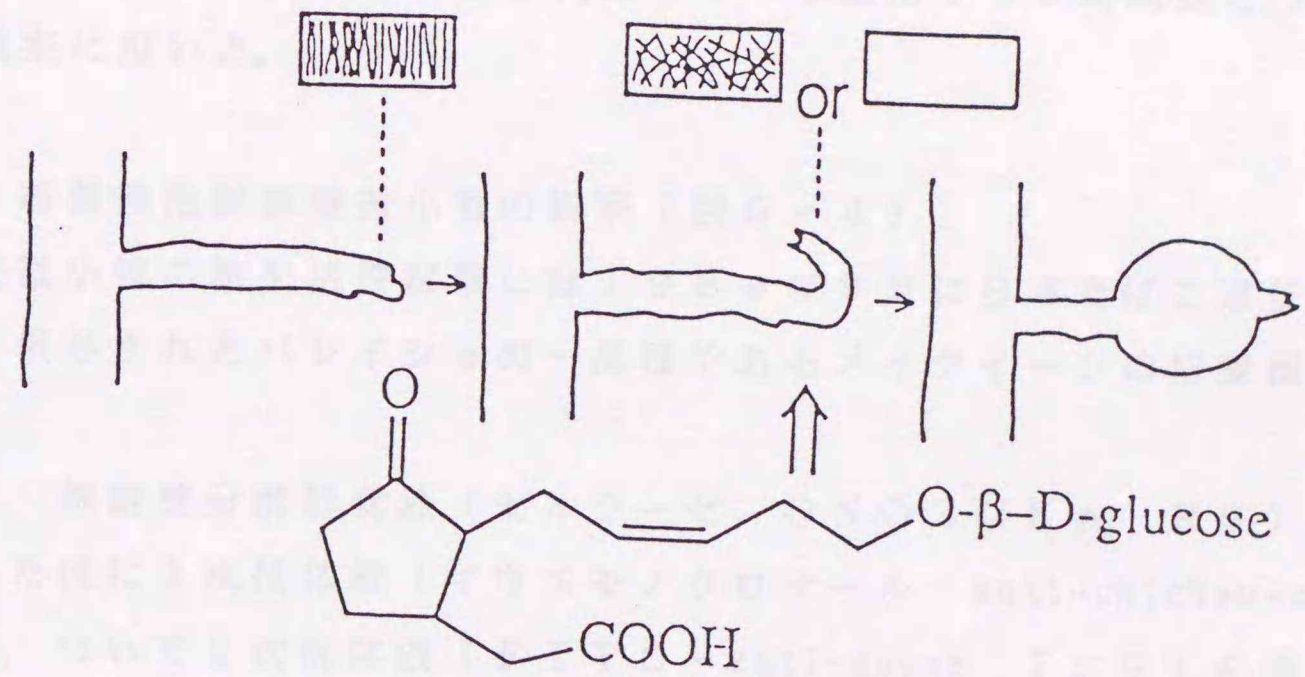
幸田らによれば、バレイショの場合そのふく枝は主茎の地下節部より発生し、その先端にはフック（釣状組織）を有し、塊茎はふく枝次頂部の肥大成長によって形成される[77]。初期の肥大は随部細胞の放射方向への肥大に依存し、やがて旺盛な細胞分裂により肥大部の膨大が顕著になる。これに伴ってフック組織は肥大部分に取り込まれ、休眠芽に変わり塊茎形成が完了する。この場合ジベレリン、オーキシン、サイトカイニン類の量の推移が複雑に関わってくる。　これらのことからジャスモン酸類は微小管に対し何らかの作用を有し、それが塊茎形成の誘導に関わると考えられる。

さらに最近、柴岡らは、ジャスモン酸メチル（9）でタバコ培養細胞ＢＹ－２を処理しその細胞壁微小管を消失することを発見している[78]。すでに、ジャスモン酸メチル（9）がバレイショ塊茎形成誘導活性を有することがわかっている[4]がこの活性と細胞壁微小管を消失させる活性と同じ機作によるものかどうか調べることにした。すなわち塊茎形成時に微小管が消失する過程が存在しそれをジャスモン酸メチル（9）が引き起こすのではないかと（図６－２）考えまずバレイショの培養細胞（メイクイーン）にいくつかの化合物を処理し、細胞壁微小管の消失活性を調べ、さらにバレイショ塊茎形成誘導活性を調べこれを比較することにした。これにより微小管消失と塊茎形成の関係について検討することにした。ジャスモン酸メチル（9）との比較に用いた物質は図６－３に示す。これらはコルヒチン（93）を除いてすべて除草剤[79]であるが、あらかじめチャ花粉管試験[80,81]で花粉の発芽は阻害しないが管の伸長を阻害する物質であることを確認したものを用いた。すなわち、培養細胞に処理しても細胞に対する毒性の低いものを選んだ。



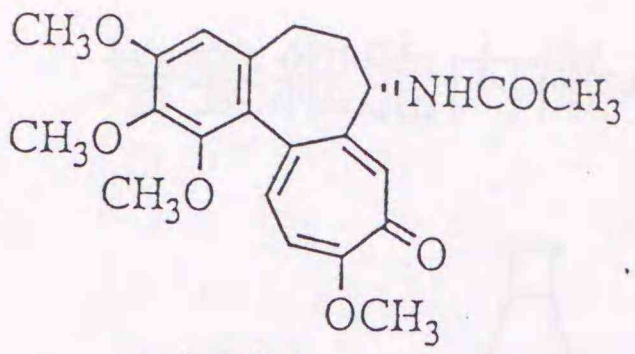
G_1 : DNA合成準備期
S : DNA合成期
G_2 : 分裂準備期
M : 分裂期

図６－１　植物細胞での微小管の分布

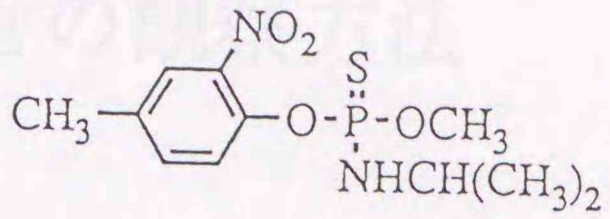


5'-β-D-glucopyranosyloxy-tuberonic acid

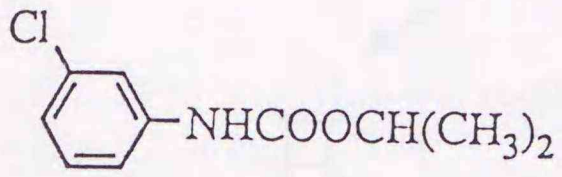
図６－２　塊茎化と微小管の関係（仮説）



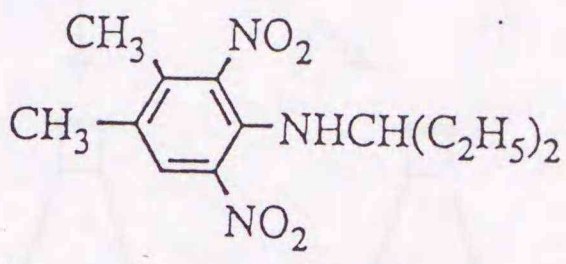
colchicine 93



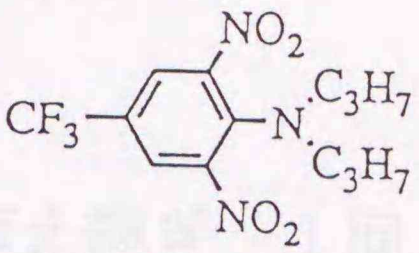
amiprophos-methyl 94



Chloro-IPC 95



pendimethalin 96



trifluralin 97

図６－３　微小管を消失させる物質

１－１　培養細胞の薬剤処理

継代移植後４日目のバレイショ培養細胞を１０$^{-3}$から１０$^{-4}$Ｍの濃度のサンプルのはいったＭＳ培地に移し代え２５°Ｃ暗所で４３時間振とう培養し微小管観察に用いた。

１－２　培養細胞細胞壁微小管の観察（図６－４）

細胞壁微小管の消失活性試験には１９８９年９月に日本たばこ遺伝育種研究所より供与されたバレイショの一品種であるメイクイーンの培養細胞を用いた。

これに、細胞壁分解酵素液（セルラーゼ　ＯＮＯＺＵＫＡ　ＲＳ）を滴下し処理した後に１次抗体液（マウスモノクロナール　anti-chicken-α、β-tublin）、ついで２次抗体液（ＦＩＴＣ－anti-mouse　ＩｇＧ）を滴下し微小管を蛍光染色した。これをスライドグラスにはりあわせ蛍光顕微鏡で微小管を観察した。

結果については表６－１に載せた。

培養細胞内微小管の観察方法

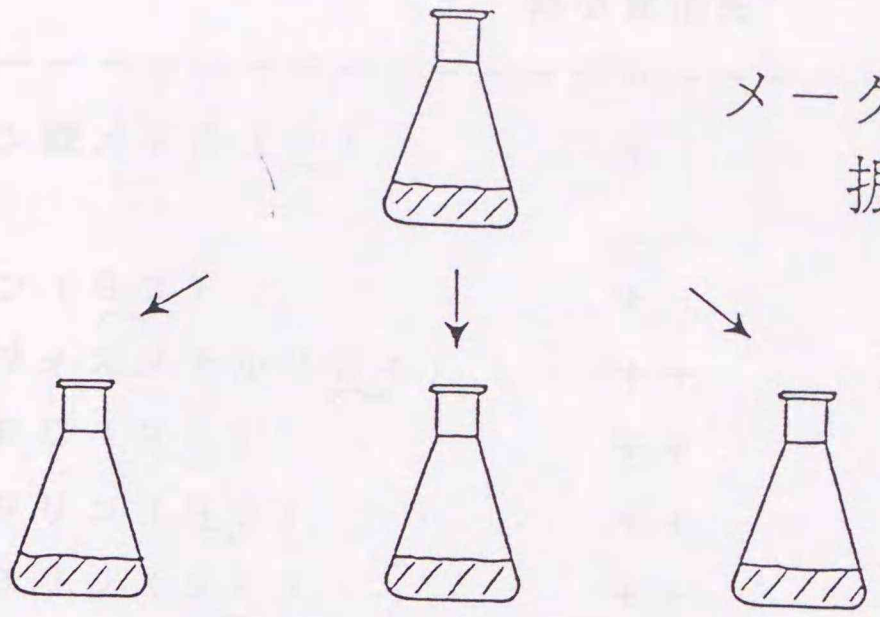


図６－４　培養細胞の微小管観察方法

表６－１　微小管消失と塊茎形成誘導活性

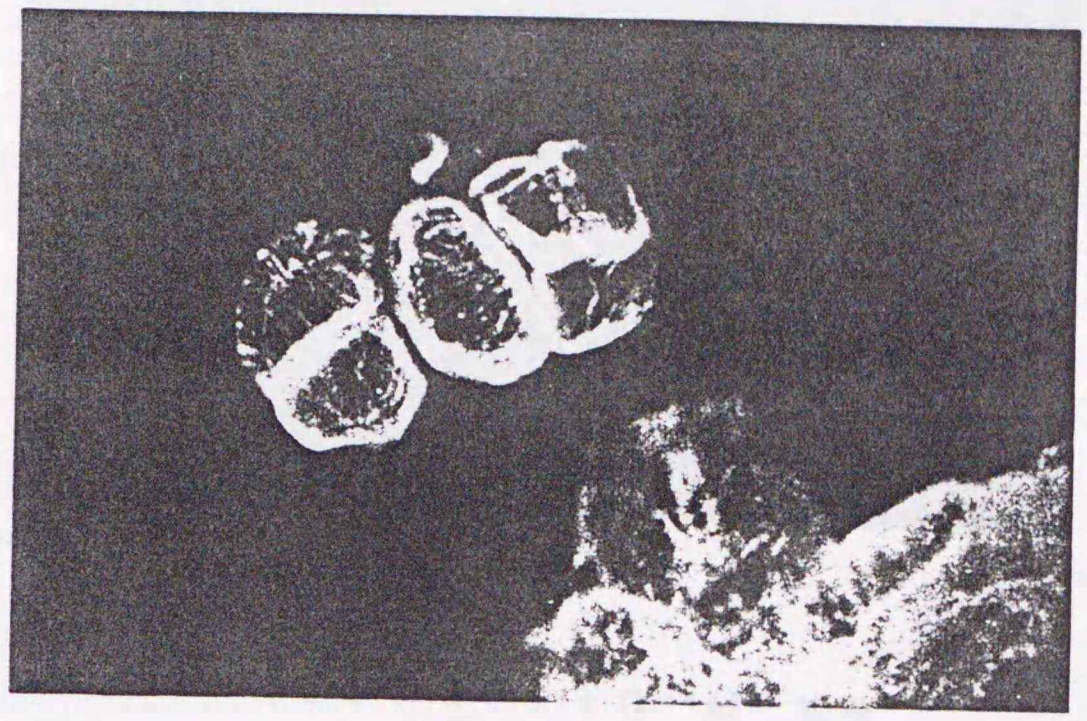
化合物	微小管消失＊	塊茎形成誘導＊＊
ジャスモン酸メチル（９）	＋	＋
コルヒチン（９３）	＋	－
アミプロフォスメチル（９４）	＋＋	－
クロロＩＰＣ（９５）	＋＋	－
ペンジメタリン（９６）	＋＋	－
トリフルラリン（９７）	＋＋	－

＊　10^{-3}M

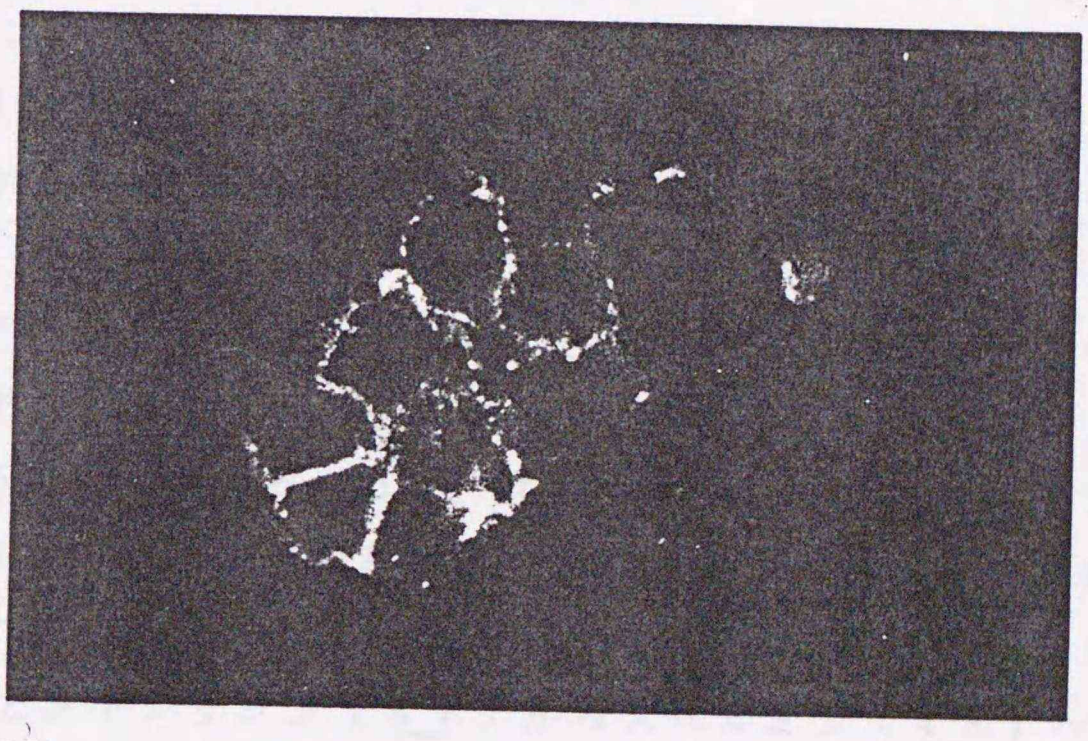
＊＊黄化茎断片法、　10^{-5}M

表６－１で示されるように微小管消失活性は調べたすべての化合物に認められたが、塊茎形成を誘導したのはジャスモン酸メチル（９）のみであった。このことからは培養細胞を用いた系で微小管が消失することと塊茎形成の過程でストロンの先端部近くの細胞で起きる現象との関連はわからないが、微小管が消失することが直接的に塊茎形成とつながりをもたないことが明らかになった。またジャスモン酸メチル（９）は花粉に対して発芽も伸長も阻害しないことが報告されているが、今回の実験でジャスモン酸メチル（９）の微小管消失の機構を含めその生理活性が比較した他の物質とは異なることが明かになった。

無処理、ジャスモン酸メチル（９）、コルヒチン（９３）処理の培養細胞内の微小管の観察写真を次ページに示す。



メイクイーン培養細胞　無処理



ジャスモン酸メチル（9～）10^{-4}M　処理



コルヒチン（９３）１０$^{-4}$M　処理

第二節

塊茎形成時のポリアミン量の変化

プトレシン（４１）、スペルミジン（４２）、スペルミン（４３）に代表されるポリアミンは最も多量に存在する生体アミンである。増殖のさかんな細胞に多いこと、核酸との反応性が高いこと、無細胞系で高分子合成に影響を与えることから増殖や分化の過程で何らかの役割を演じていると考えられている[82-87]。動物細胞ではポリアミンはアルギニン（４５）からオルニチン（４６）、プトレシン（４１）を経て合成される。微生物や高等植物はそれ以外にアルギニン（４５）からアグマチンを経てプトレッシン（４１）に至る経路も持っている（図６－５）。生じたプトレッシン（４１）は、２つの異なったアミノプロピル基転移酵素であるスペルミジン合成酵素、スペルミン合成酵素によってスペルミジン（４２）、スペルミン（４３）へと変換される[85]。またプトレッシン（４１）からスペルミン（４３）への経路にはエチレン（４４）の生合成経路（図６－６）がつながっており植物の成長に深く関わっていると考えられ、植物中のポリアミンについてはいくつかの研

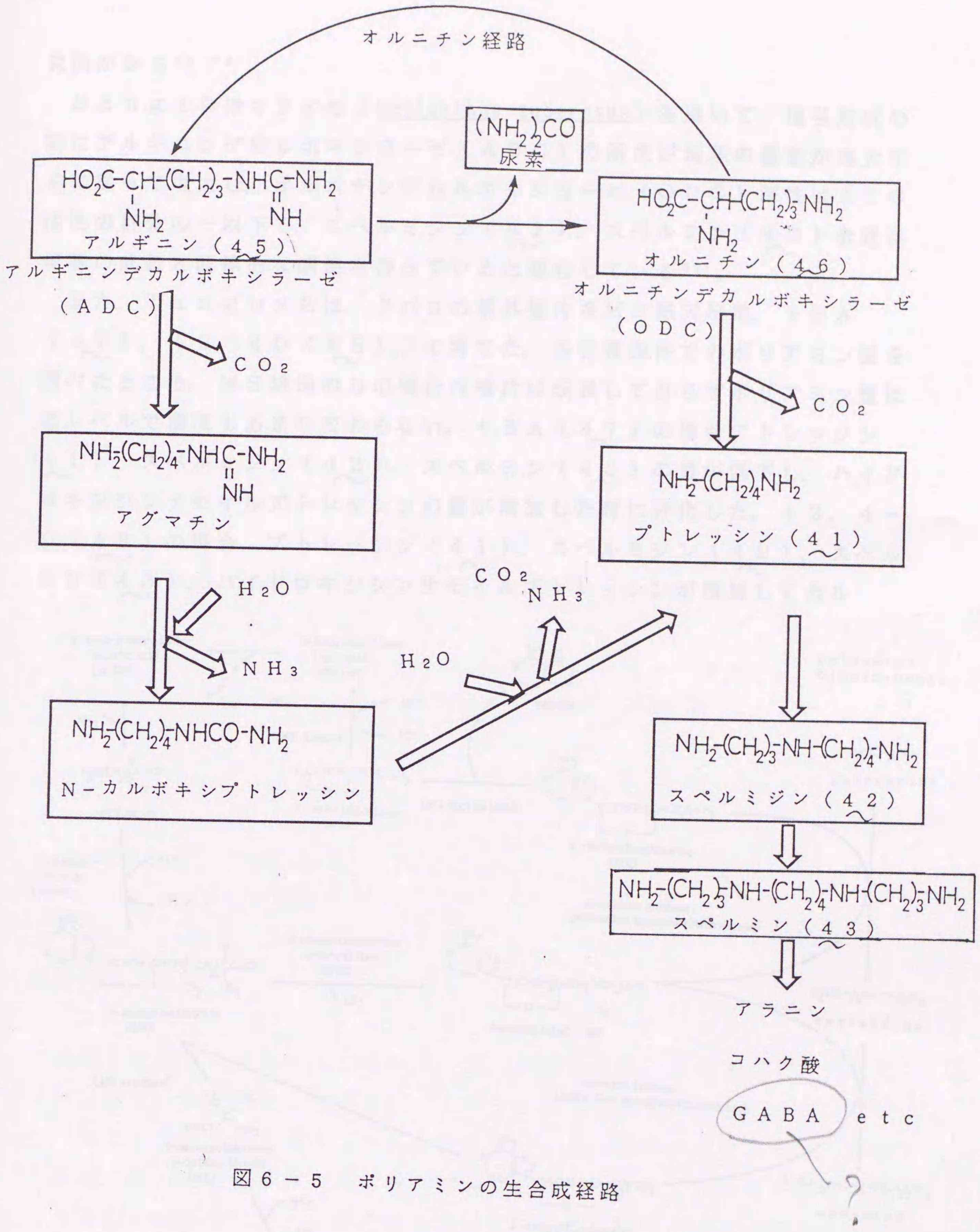


図６－５　ポリアミンの生合成経路

究例がある[88-92]。

Ｂａｎｇｉらはキクイモ（Helianthus tuberosus）を用いて、塊茎形成の間にアルギニンデカルボキシラーゼ（ＡＤＣ）の活性が塊茎の重量が増大するに従って増大し、オルニチンデカルボキシラーゼ（ＯＤＣ）活性はＡＤＣ活性の百分の一以下で、スペルミジン（４２）、スペルミン（４３）含量は塊茎の成長と直線的な関係を持っていると報告している[93]。

また、Ｔａｎｇｕｙらは、タバコの葉外植片をＭＳ寒天培地、＋ＢＡ（４７）、＋２，４Ｄ（４８）、で育てた。各生育条件でのポリアミン量を調べたところ、ＭＳ培地のみの場合外植片は成長しておらずポリアミン量は低レベルで濃度もあまり変わらない。＋ＢＡ（４７）の場合プトレッシン（４１）、スペルミジン（４２）、スペルミン（４３）の量が低下し、ハイドロキシシンナモイルプトレッシンの量が増加した時に分化した。＋２，４－Ｄ（４８）の場合、プトレッシン（４１）、スペルミジン（４２）、スペルミン（４３）、ハイドロキシシンナモイルプトレッシンが増加してカル

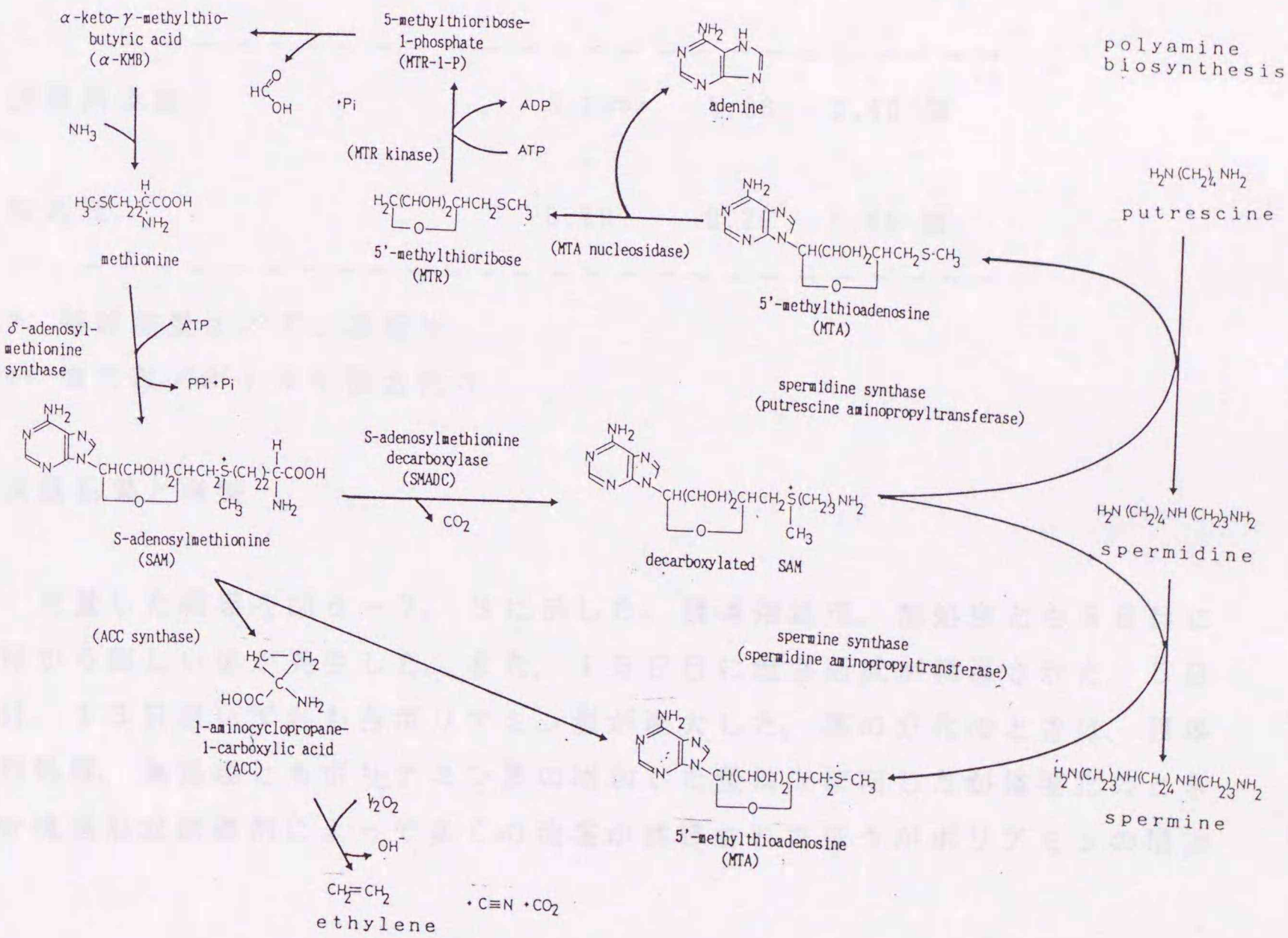


図６－６　ポリアミンと関連する生合成経路[88]

ス増殖が始まる、と報告している[94]。

そこで、バレイショの塊茎形成の場合についてその誘導期においてこれらポリアミン量がどのように変化するか調べ、またジャスモン酸メチル（9）のような塊茎形成誘導活性のある物質を作用させた場合のポリアミン量の変化を検討することにした。バレイショ無菌茎断片を用いた移植時から塊茎形成期までの間のポリアミン量の変化を調べた。

表６－２　移植後の塊茎重量の変化と塊茎数の変化

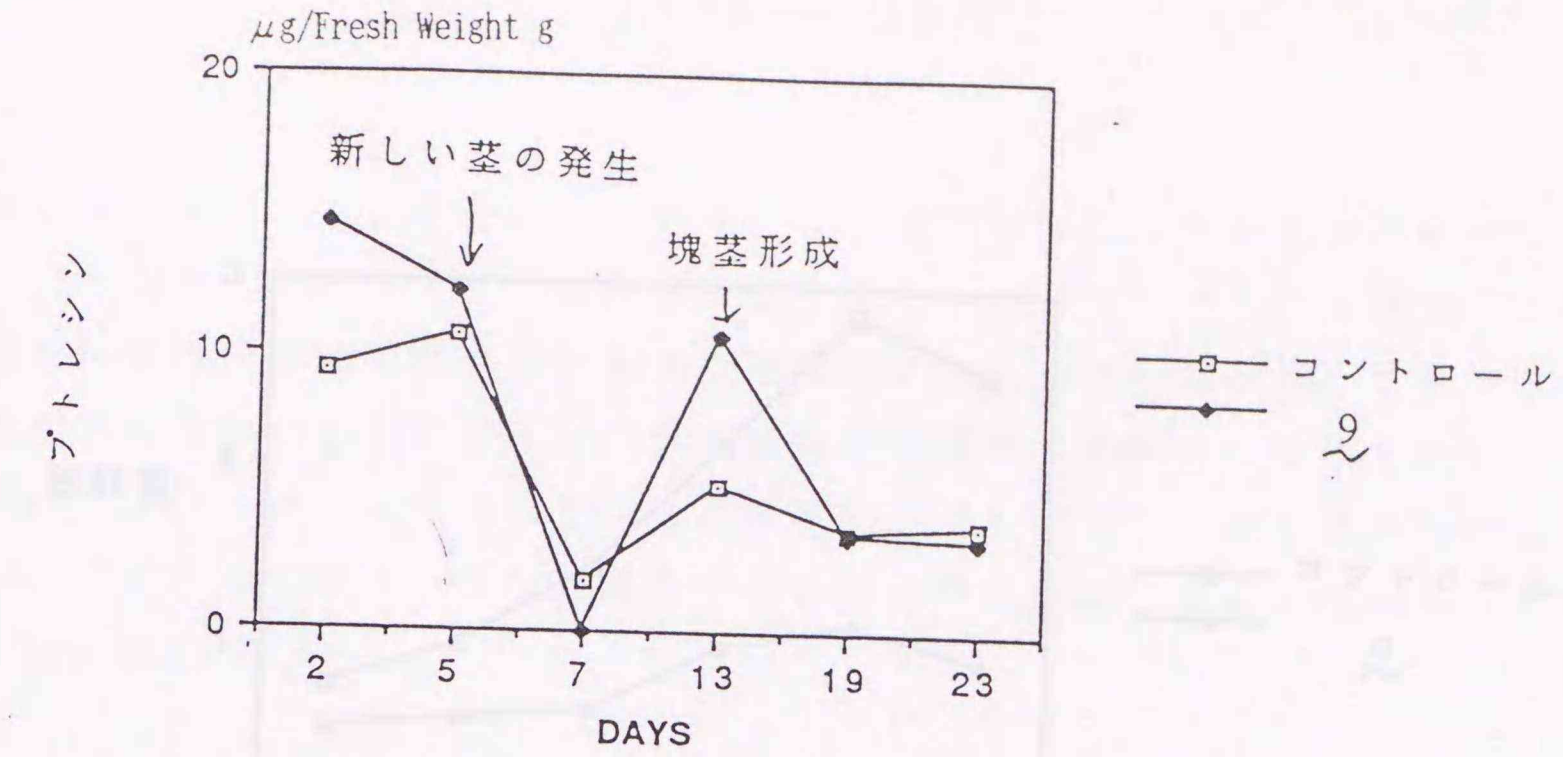
	２	５	７	１３	１９	２３日後
誘導剤添加	0.58*	0.63	0.70	1.04	1.18	0.99 g
無処理	0.81	1.04	1.47	2.14	2.84	2.54 g
誘導剤添加				0.20**	1.86	3.40 個
無処理				0.10	0.29	0.66 個

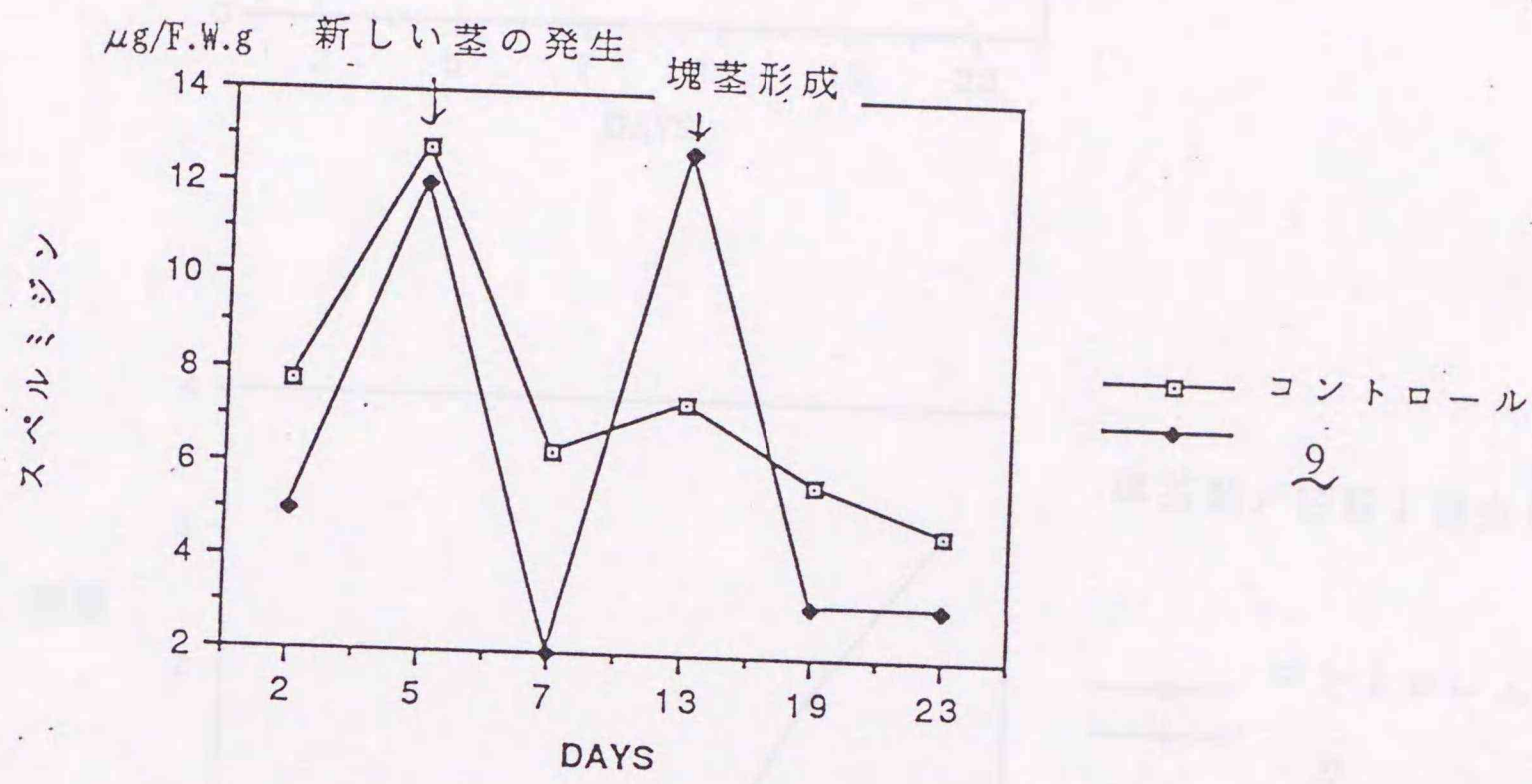
*　新鮮重量ｇ／７ｘ茎断片

**　塊茎数／ボトル１個あたり

実験結果と考察

定量した結果を図６－７、８に示した。誘導剤処理、無処理とも５日目に節から新しい茎が発生した。また、１３日目に塊茎形成が誘導された。５日目、１３日目いずれも各ポリアミン量が増大した。茎の分化のときは、誘導剤処理、無処理ともポリアミン量の増加した量はほぼ同じだが塊茎化のときは塊茎形成誘導剤によって多くの塊茎が誘導されたほうがポリアミンの増加





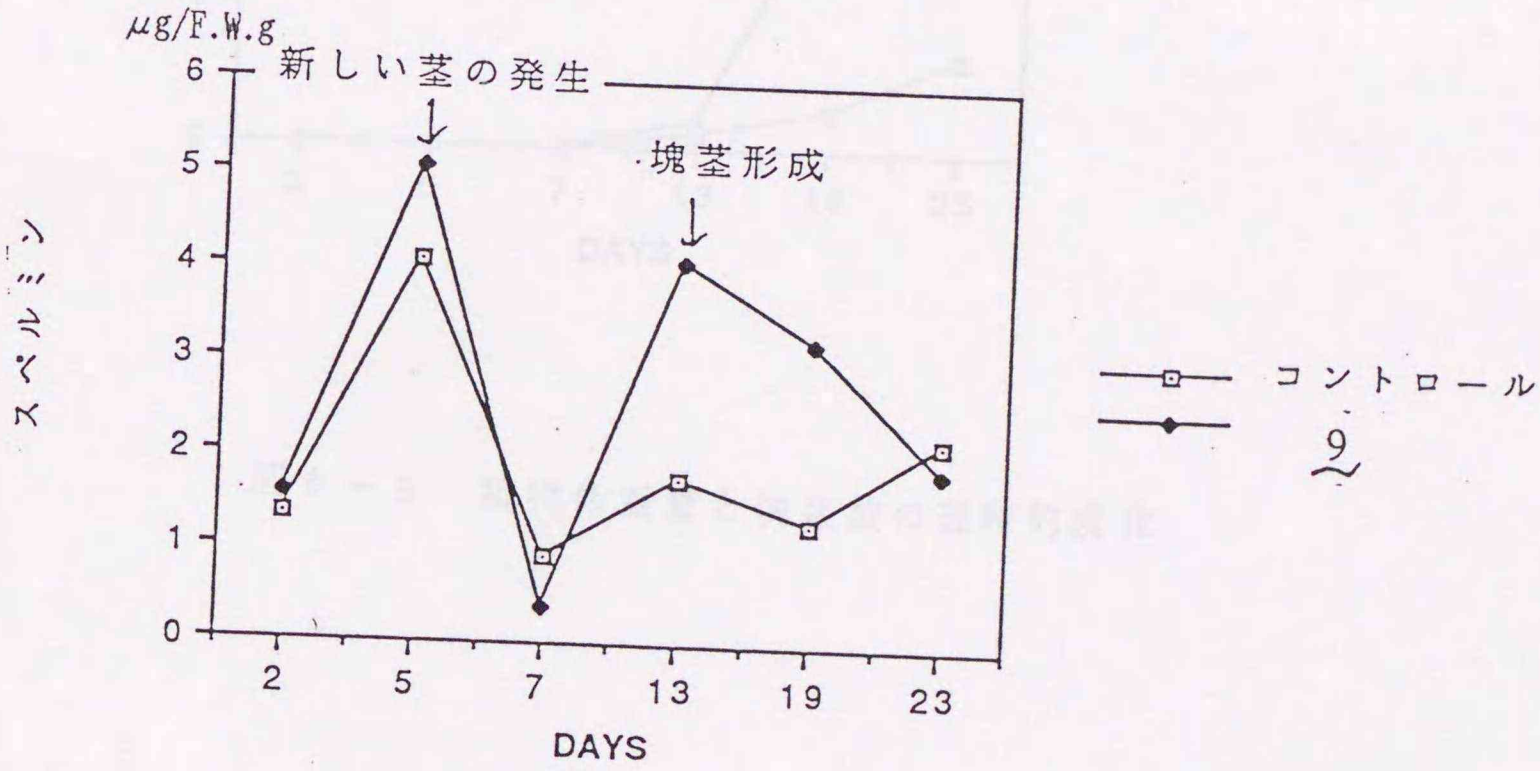
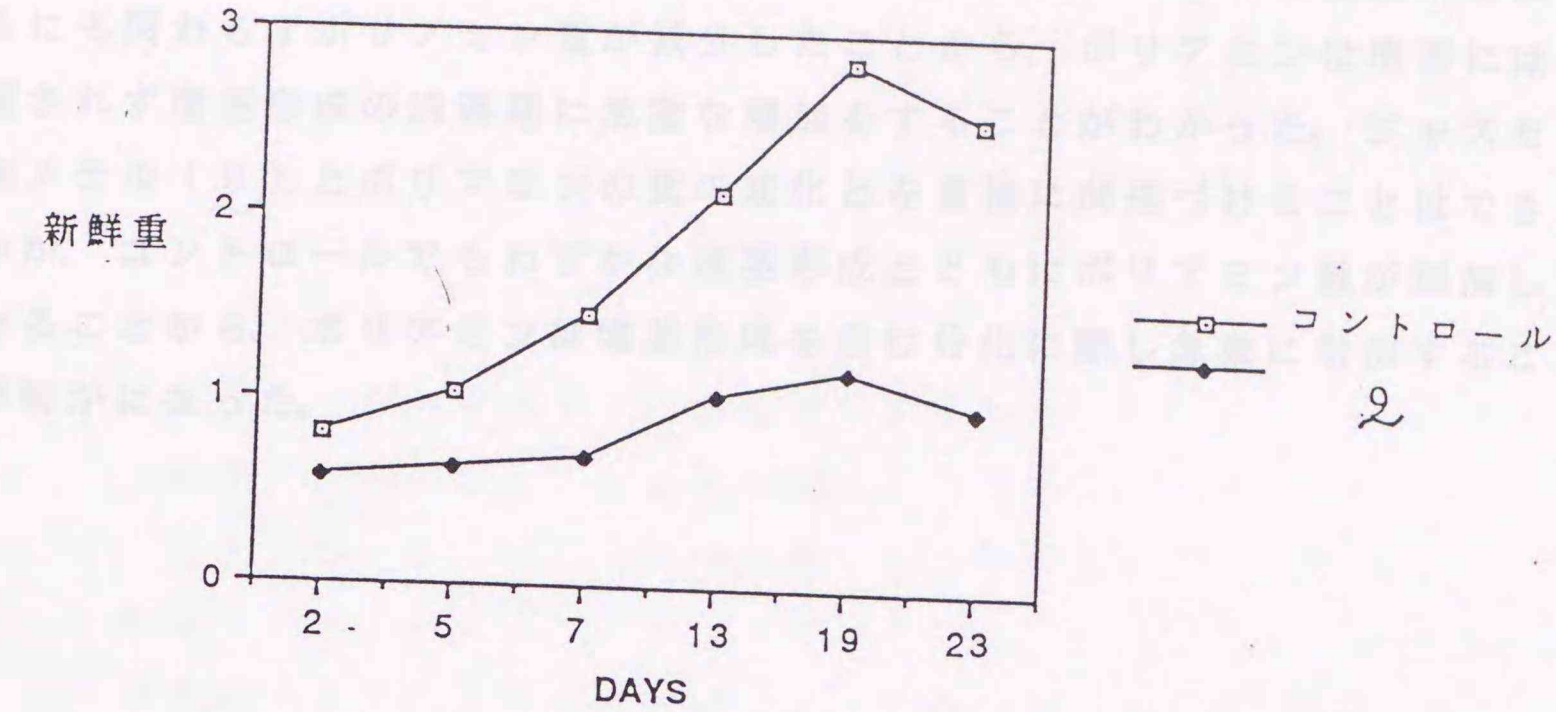


図６－７　塊茎形成期のポリアミン量の変化



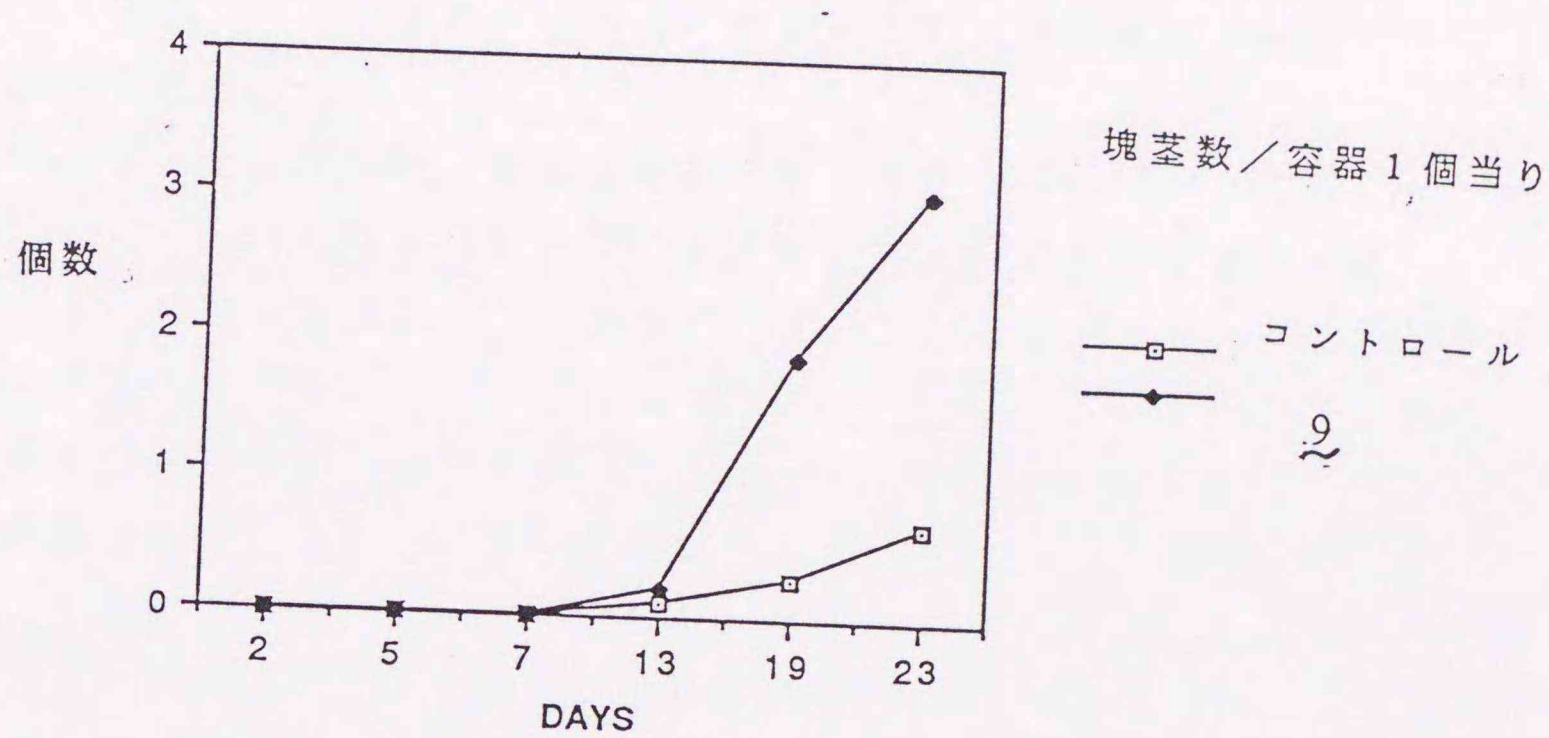


図6－8　植物体重量と塊茎数の経時的変化

は大きかった。１３日目にポリアミン量が最大値を示しその後塊茎が増加するにも関わらずポリアミン量が減少したことから、ポリアミンは塊茎には蓄積されず塊茎形成の誘導期に急激な増加をすることがわかった。ジャスモン酸メチル（９）とポリアミンの量の変化とを直接に関連づけることはできないが、コントロールでもわずかな塊茎形成とともにポリアミン量が増加していることから、ポリアミンは塊茎形成を含む分化に際し急激に増加することが明かになった。

第七章　実験の部

第一節　機器分析

本研究で使用した分析機器は以下のとおりである。

1）　ガスクロマトグラフィー

島津　ＧＣ－７ＡＰＴ（検知部　ＦＩＤ）

島津　ＧＣ－９Ａ　（検知部　ＦＩＤ）

ＨＰ　５９８０　（検知部　ＦＩＤ）

条件

カラム　ｉ）０．２５ｍｍφ　ｘ　５０　ｍ

ＯＶ－１０１　ガラスキャピラリーカラム

ｉｉ）０．２５ｍｍφ　ｘ　５０　ｍ

ＰＥＧ　２０Ｍ　フューズドシリカキャピラリーカラム

ｉｉｉ）０．２５ｍｍφ　ｘ　３０　ｍ

ＤＢ－ＷＡＸ　３０Ｍ　フューズドシリカキャピラリーカラム

キャリヤーガス　Ｈｅ、０．５－１．０ｍｌ／ｍｉｎ

スプリット比　１：１００

注入部温度　ｉ）　２５０°Ｃ

ｉｉ）　２１０°Ｃ

ｉｉｉ）　２１０°Ｃ

2）　質量分析（ＭＳ）

ＨＩＴＡＣＨＩ　Ｍ８０

ＨＩＴＡＣＨＩ　Ｍ２０００

ＨＰ５９７０

4） 核磁気共鳴（ＮＭＲ）

Ｂｒｕｋｅｒ ＡＭ ３００

Ｂｒｕｋｅｒ ＡＭ ５００

5） 高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）

ポンプ部 Ｈｉｔａｃｈｉ ６５５

検知部 Ｓｈｏｄｅｘ ＳＥ－３１

6） 比旋光度測定

Ｊａｓｃｏ ＤＩＰ－１８１

測定波長 ナトリウムＤ線（５４６ｎｍ）

7） クロマトスキャナー

島津クロマトスキャナー ＣＳ ９３０

第二節 黄化徒長茎を用いた塊茎形成誘導活性試験

発芽した塊茎を０．１％次亜塩素酸ナトリウム溶液で１０分間表面殺菌し充分に水洗した。これを２５°Ｃ暗所に１－３週間静置し萌芽させた。これより１芽を有する円柱状組織片（直径２ｃｍ，高さ３ｃｍ）を採取し、この組織片を０．１％次亜塩素酸ナトリウム溶液に３０分間浸せきして表面殺菌した。水洗後、成長点付近の壊死防止のため、数滴の０．１Ｍ硝酸カルシウム溶液を添加した。これを２５°Ｃ暗所湿室に３日間静置し周皮を形成させた後、再度表面殺菌した。この組織片をＨＯＡＧＬＡＮＤ培養液を添加したバーミキュライトに移植し、２５°Ｃ暗所で３週間育成し、長さ約３０ｃｍの黄化徒長茎を得た。この茎の基部第２節より第７節までの部分を用いて、１節をもつ茎断片を調製した。これを１％次亜塩素酸ナトリウム溶液で１時間表面殺菌し、滅菌水で洗浄後両端部を切除し、中央部の１節をもつ茎断片（長さ約１ｃｍ）を器官培養の材料とした。

黄化茎断片培養の培地としては通常改良Ｗｈｉｔｅ培地[56]を基本培地とし

て用いた。前述の方法で得られた茎断片を３個当て１０　ｍｌの培地を含む５０ｍｌ容三角フラスコ中に移植し、２５°Ｃ暗所で３週間培養した。各区５本のフラスコ（茎断片１５片）を用いた。

培養終了後、（肥大または塊茎化した側芽数）／（全側芽数）を算出し、これを塊茎形成率とした。

第三節　無菌茎断片を用いた塊茎形成誘導活性試験

日本たばこ産業遺伝育種研究所より入手した無菌的に発根増殖させた、バレショの茎断片から１節を含む切片を得、これをＬＳ寒天培地上で、２０°Ｃ、連続照明下で培養する。４週間後、この無菌茎からまた一節を含む節片を得同じ操作を行い、無菌茎断片を継代培養する。アッセイには、移植４、５週間目のものを用いた。以下の操作を行った。

使用培地

ｐＨ５．６　３％　ｓｕｃｒｏｓｅ　ＬＳ培地。

使用材料

継代培養している無菌茎断片の培養４週目から５週目のものを用いる（２０°Ｃ明所）。これを　新しく調製した１０ｍｌのＬＳ液体培地のはいった管ビンに移植する。

試料の調製

試料は目的の１００倍の濃度にして（１０％ＭｅＯＨ／Ｈ2Ｏ）作成する。この原液をマイレクスＧＶフィルターにて濾過したのち１００μｌずつ無菌茎断片のはいった管ビンに分注する。各設定区は５反復。

上記の管ビンを２５°Ｃ連続暗所に置き2、３、４、５週後の塊茎形成数を観察、記録した。

第四節　1-Oxo-2(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（1）の合成

Methyl 1-oxo-2-(5'-hydroxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetate（5）3．２ｇを１００ｍｌ三口フラスコに乾燥エーテル３０ｍｌに溶解させて入れ、α-D-tetraacetylbromoglucose（6）６．０ｇ、ついで調製したてのＡｇ$_2$ＣＯ$_3$を加え、窒素気流下室温で撹半した。反応開始後３時間した後α-D-acetobromo-glucose（6）３ｇを追加しさらに２時間撹半した。反応液はシリカゲルカラムにかけ酢酸エチル溶出した。これを減圧下濃縮し7．３ｇの黄色味を帯びた透明なシロップを得た。

このシロップを１０％ＫＯＨ水溶液５０ｍｌに溶かし、室温で一晩放置し、ｐＨ７（１Ｎ塩酸で調整）に保ちながら減圧下濃縮し乾固させこれをメタノールで抽出した。このものを３０％ＭｅＯＨ／Ｈ$_2$Ｏにて逆相ＨＰＬＣ（ＹＭＣ　ｓ３４３、ＡＭ３２４）にて精製を行いカリウム塩で存在する1-oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（1）を 1a ３６ｍｇ、1b ５００ｍｇ得た。さらにそれぞれについて Ｄｏｗｅｘ ５０Ｗｘ４に通し 1a ７ｍｇ、1b ５０ｍｇ を得た。

1-Oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（1a）（天然型　カリウム塩）。

^{1}H-NMR(D_2O)δ：1.80(1H, m), 2.00(1H, m), 2.05(1H, m), 2.15(1H, m), 2.25-2.45(6H, m), 2.55(1H, m), 2.75(1H, m), 3.25(1H), 3.37(1H),3.42(1H), 3.45(1H), 3.70(2H), 3.90(2H), 4.45(1H, d), 5.45-5.60(2H)

^{13}C-NMR(D_2O)δ：22.8(CH_2), 25.5(CH_2), 27.5(CH_2), 35.9(CH_2), 36.9(CH), 37.6(CH_2), 52.9(CH), 61.0(CH_2), 69.9(CH), 70.0(CH_2),73.4(CH), 76.1(CH x 2), 102.5(CH), 127.4(CH), 129.4(CH), 182.0(C), 227.3(C).

1-Oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（1a）（天然型）。

^{1}H-NMR(CD_3OD)δ：1.86(1H, m), 2.09(1H, m), 2.14(2H, m), 2.24(2H, m), 2.34(1H, m), 2.40(2H, m), 2.46(2H, m), 2.80(1H, m), 3.17(1H), 3.26(2H, m), 3.33(1H), 3.56(1H), 3.66(1H), 3.86(1H), 3.89(1H), 4.27(1H, d), 5.49(2H, m).

^{13}C-NMR(CD_3OD)δ : 24.2(CH_2), 26.7(CH_2), 29.1(CH_2), 34.9(CH_2), 36.3 (CH_2), 37.1(CH), 53.7(CH), 62.8(CH_2), 70.2(CH_2), 71.6(CH), 75.1(CH), 77.9(CH), 78.1(CH), 104.3(CH), 129.7(CH), 128.4(CH), 176.4(C), 221.7 (C).

1-Oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（1b）（イソ体　カリウム塩）。

^{1}H-NMR(D_2O)δ : 1.50(1H, m), 2.05 2.25(4H, m), 2.25 2.45(6H, m), 2.55 (1H, m), 3.25(1H), 3.35(1H), 3.40(1H), 3.45(1H),3.65(1H), 3.70(1H), 3.90(2H), 4.45(1H), 5.50(2H).

^{13}C-NMR(D_2O)δ : 25.1(CH_2), 27.1(CH_2), 27.5(CH_2), 38.3(CH_2), 38.7(CH) , 42.8(CH_2),54.6(CH), 60.9(CH_2), 69.9(CH, CH_2), 73.3(CH), 75.9(CH), 76.1(CH),102.4(CH), 181.7(C), 212.1(C).

1-Oxo-2-(5'-β-glucopyranosyloxy-2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetic acid（1b）（イソ体）。

^{1}H-NMR(CD_3OD)δ : 1.54(1H, m), 2.01(1H, m), 2.13(1H, m), 2.23(1H, m), 2.27 2.35(3H, m), 2.35 2.48(4H, m), 2.68(1H, m),　3.18(1H, m), 3.27 (2H, m), 3.32(1H), 3.56(1H), 3.67(1H), 3.87(1H), 3.89(1H), 4.28(1H, d), 5.40 5.50(2H, m).

^{13}C-NMR(CD_3OD)δ : 26.4(CH_2), 28.2(CH_2), 29.0(CH_2), 38.7(CH_2), 39.1 (CH), 39.8(CH_2), 55.1(CH), 62.7(CH_2), 70.2(CH_2), 71.6(CH),75.1(CH), 77.9(CH), 78.1(CH), 104.3(CH), 128.9(CH x 2), 176.1(C), 221.9(C).

第五節

ジャスモン酸誘導体の調製

化合物 4、9、10、13、17、18、19、20、21、22、23、25 は長谷川香料株式会社　割田　博士より供与された。

化合物 1 は第一章で述べた方法で合成した。化合物 11、12、14、

15、16、26、27 は下図に示す方法で調製した。いずれもＧＣ－ＭＳ、ＨＰＬＣにより純度を確認した後活性試験に用いた。

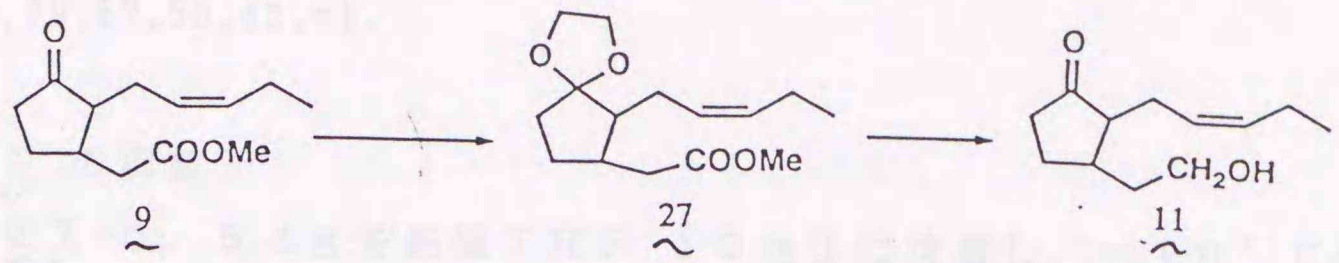


図７－１　誘導体の調製

27 の調製

9 ５ｇとエチレングリコール ５ｇをベンゼン ５０ｍｌに溶解した。これにｐ－ＴｓＯＨ ５０ｍｇを加えた後、５時間半リフラックスした。反応液を濃縮後、シリカゲルカラム（ヘキサン：酢酸エチル ９：１）にかけ ５．４ｇの 27 を得た。（収率 ９０％）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ :0.94(3H, t, J=7.5 Hz), 1.28(1H, m), 1.67(1H, m), 1.72(2H, m), 1.89(1H, m), 2.07(4H, m), 2.19(2H, m), 2.58(1H, dd, J=4.4, 8.7 Hz), 3.63(3H, s), 3.87(4H, m), 5.35(2H, m).

^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ :14.1(CH_3), 20.5(CH_2), 26.4(CH_2), 27.9(CH_2

), 35.1(CH_2), 39.4(CH), 39.9(CH_2), 51.2(CH_3), 51.3(CH), 64.1(CH_2), 64.6(CH_2)117.7(C), 127.6(CH), 132.1(CH), 173.2(C). EI-MS m/z : 268 (M^+),253,239,237,206,200,195,185,171,165,153,127,125,114,100,99,86, 81,79,67,55,43,41.

11 の調製

27 0．５４ｇを乾燥ＴＨＦ １０ｍｌに溶解し、－１０°Ｃに冷却して ＬｉＡｌＨ$_4$ １００ｍｇを加え、その後室温で２時間撹はんした。これを ２Ｎ－ＨＣｌで酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物を シルカゲルカラム（ヘキサン：酢酸エチル ９：１）にかけ ０．３７ｇの 11 を得た。（収率 ９４％）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ:0.87(3H, t, J=7.6 Hz), 1.18(1H, m), 1.40(1H, m),1.55-2.30(10H, m), 2.56(OH, brs), 3.56(2H, m), 3.80(4H, m), 5.28(2H, m). ^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ:14.0(CH_3), 20.3(CH_2), 26.4(CH_2), 27.5(CH_2), 34.1(CH_2), 35.1(CH_2), 39.5(CH), 51.5(CH), 61.0(CH_2) , 63.9(CH_2)64.4(CH_2), 117.6(C), 127.7(CH), 131.6(CH). EI-MS m/z:240 (M^+),209,195,178,172,169,153,143,133,127,114,105,99,86,67,55,43,41.

14 の調製

22 １ｇをエタノール ２０ｍｌに溶解し、これに H_2SO_4 ２ｍｌを加え室温下一晩放置した。これに ＮａＨＣＯ$_3$ 飽和水溶液を加え中和した後、エーテル抽出した。エーテル抽出物を濃縮し １．０４ｇの 14 を得た。（収率 ９２％）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ:0.94(3H, t, J=7.6 Hz), 1.23(3H, t, J=7.1 Hz), 1.45(1H, m), 1.58(1H, m), 1.83(3H, m), 2.09(4H, m), 2.25(1H, dd , J=8.6,15.1 Hz), 2.51(1H, dd, J=4.5,15.1 Hz), 3.86(0.5H, q, J=5.3 Hz), 4.09(2H, q, J=7.1 Hz), 4.18(0.5H, t, J=1.9 Hz), 5.42(2H, m). ^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ:14.2(CH_3 x 2), 20.5(CH_2), 25.4(CH_2, 0.4), 28.9(CH_2, 0.6)29.9(CH_2), 33.2(CH_2), 39.8(CH_2), 39.9(CH), 50.9(CH, 0.4), 53.6(CH, 0.6), 60.2(CH_2), 74.2(CH, 0.4), 78.3(CH, 0.6), 126.7(

CH, 0.6), 127.3(CH, 0.4), 132.7(CH, 0.4), 133.4(CH, 0.6), 173.1(C).
EI-MS m/z:240(M^+),222,195,179,176,166,153,148,134,119,107,105,95,93,83,81,79,68,55,43,41.

15 の調製

22 1gをプロパノール 20ml に溶解し、これに H_2SO_4 2ml を加え室温下一晩放置した。これに $NaHCO_3$ 飽和水溶液を加え中和した後、エーテル抽出した。エーテル抽出物を濃縮し 1.01g の 15 を得た。（収率 84%）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ:0.92(3H, t, J=7.6 Hz), 0.94(3H, t, J=7.6 Hz), 1.45(2H, m), 1.62(3H, m), 1.85(3H, m), 2.09(4H, m), 2.25(1H, dd, J= 8.8,15.1 Hz), 2.54(1H, dd, J=4.9,15.1 Hz), 3.86(0.5H, q, J=5.4 Hz), 4.00(2H, t, J= 6.9 Hz), 4.18(0.5H, t, J= 4.6 Hz), 5.42(2H, m).

^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ:10.3(CH_3), 14.1(CH_3), 20.6(CH_2), 21.9(CH_2), 28.9(CH_2), 30.0(CH_2), 33.2(CH_2), 39.9(CH, CH_2), 53.6(CH), 65.8(CH_2), 74.2(CH, 0.5), 78.3(CH, 0.5), 126.7(CH), 133.4(CH), 173.2(C).
EI-MS m/z:254(M^+),236,195,193,180,176,167,153,148,134,125,119,107,105,95,93,83,79,68,61,55,43,41.

16 の調製

22 1gをイソプロパノール 20ml に溶解し、これに H_2SO_4 2ml を加え室温下一晩放置した。これに $NaHCO_3$ 飽和水溶液を加え中和した後、エーテル抽出した。エーテル抽出物を濃縮し 0.84g の 16 を得た。（収率 70%）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ:0.94(3H, t, J=7.6 Hz), 1.20(6H, d, J=6.3 Hz), 1.45(1H, m), 1.59(1H, m), 1.82(3H, m), 2.10(4H, m), 2.27(1H, m), 2.50(2H, m), 4.19(1H, q, J=1.9 Hz), 4.97(1H, q, J= 6.3 Hz) 5.42(2H, m). ^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ:14.1(CH_3), 20.5(CH_2), 21.8(CH_3 x 2), 25.4(CH_2), 30.0(CH_2), 33.1(CH_2), 39.1(CH_2), 39.5(CH), 51.4(CH),

74.2(CH), 78.3(CH), 127.3(CH), 132.7(CH), 173.5(C). EI-MS m/z 254 (M^+),236,195,193,153,151,138,134,125,119,107,105,93,83,81,79,68,55, 43,41.

2~6 の調製

2~4 5gを乾燥ジクロロメタン 50mlに溶解し、ジヒドロピラン 5g を加えた。これに PPTS 100mgを加え、室温で一晩放置した。反応液に酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、濃縮した。これをシリカゲルカラム（ヘキサン：酢酸エチル 9：1）にかけ 5.2gの 2~6 を得た。（収率 76%）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ:0.90(3H, t, J=7.5 Hz), 1.48(7H, m), 1.52-1.89(5H, m), 1.90-2.25(5H, m), 2.46(1H, m), 3.43(1H, m), 3.59(3H, s), 3.81(1H, m), 4.51(1H, m), 4.75(0.5H, m), 4.81 0.5H, m), 5.34(2H, m). ^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ:14.4(CH_3), 19.9(CH_2), 20.8(CH_2), 25.7(CH_2 x2), 30.0(CH_2), 30.9(CH_2), 31.2(CH_2), 39.8(CH), 40.4(CH_2), 51.5(CH, CH_3), 63.1(CH_2), 80.9(CH), 100.6(CH), 126.9(CH), 133.1(CH), 173.7(C). EI-MS m/z:310(M^+), 226,208,195,177,152,139,134,119,107, 101,93,85,79,67,57,43,41.

1~2 の調製

2~6 1gを乾燥 THF 20mlに溶解し、−10°Cに冷却して $LiAlH_4$ 180mgを加え、その後室温で3時間攪はんした。反応液に 0.1N−HClを加えて中和した後、酢酸エチル抽出した。抽出物を濃縮後乾燥ジクロロメタン 10mlに溶解し、これに PCC 0.7gを加え、室温下3時間攪はんした。反応液をシリカゲルに通して吸引濾過し、濾液を濃縮して 0.65gの 1~2 を得た。（収率 72%）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 270 MHz)δ:0.91(3H, t, J=7.3 Hz), 1.49(7H, m), 1.57-1.89(5H, m), 2.00(4H, m), 2.08-2.61(2H, m), 3.44(1H, m), 3.83(1H, m) 4.59(1H, m), 4.91(1H, m), 5.37(2H, m), 9.70(1H, s).

^{13}C-NMR($CDCl_3$, 67.5 MHz)δ:14.5(CH_3), 20.0(CH_2), 20.9(CH_2 x 2), 25.7

(CH_2 x 2), 30.9(CH_2 x 2), 31.3(CH_2), 37.6(CH), 51.7(CH), 63.1(CH_2), 80.8(CH) 94.8(CH), 126.8(CH), 133.3(CH), 202.8(CH). EI-MS m/z: 280 (M^+),196,162,134,119,109,101,95,92,85,67,57,43,41.

第六節

１－ジヒドロ体（2～4）の各ジアステレオマーの単離、精製と相対立体配置の決定

・１－ジヒドロジャスモン酸メチル（2～4）の調製および各ジアステレオマーの分離

約５０％のエピ体を含むジャスモン酸メチル（9～）１ｇを５０ｍｌのＴＨＦに溶解しこれに１６０ｍｇのＮａＢＨ$_4$を加え、Ｎ$_2$気流下、室温でケトンの還元を行った。ＴＬＣで原料の消失を確認してからこれに酢酸エチル１００ｍｌを加え、さらに水１００ｍｌを加え分液ロートに移しかえ反応物の抽出を行った。同量の酢酸エチルで２回抽出を行った後、これを水で三回洗浄し、酢酸エチル層を減圧下濃縮し１．０２５ｇの無色のシロップを得た。これをＧＣ－ＭＳ分析し、2～4の生成を確認した（ピーク数４本）

ついで、図３－１に示すように2～4をＨＰＬＣ（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ＡＭ３２４　８０％　ＭｅＯＨ－Ｈ$_2$Ｏ　もしくは　シリカゲル　ＹＭＣ　ｓ３４３　８０％　n－ｈｅｘａｎｅ－ＥｔＯＡｃ）にて４つのピーク成分を分離、精製した。

Methyl (1R, 2R, 3R)-および(1S, 2S, 3S)-1-hydroxy-2-(2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetate（2～4a）.

(1R,2R,3R)-,24aα　[α]$_D$=23.24'(c=0.22 MeOH)

(1S,2S,3S)-,24aβ　[α]$_D$=-17.6'(c=0.238 MeOH)

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ: 0.96(3H, t), 1.46(1H, m), 1.48(1H, m), 1.60(1H, m), 1.84(1H, m), 1.85(1H, m), 1.92(1H, m), 2.07(2H, m), 2.13(2H, m), 2.28(1H, m), 2.54(1H, m), 3.65(3H, s), 3.88(1H, m), 5.43(2H, m).

^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 14.1(CH_3), 20.5(CH_2), 28.9(CH_2), 29.9(CH_2), 33.1 (CH_2), 39.5(CH_2), 39.8(CH), 51.3(CH_3), 53.4(CH), 78.0(CH), 126.5(CH) , 133.2(CH), 173.5(C).

Methyl (1S, 2S, 3R)-および(1R, 2R, 3S)-1-hydroxy-2-(2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetate（２４ｂ）.

(1S,2S,3R)-,24bα [α]$_D$=11.11'(c=0.528 MeOH)

(1R,2R,3S)-,24bβ [α]$_D$=-5.71'(c=0.746 MeOH)

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 0.97(3H, t), 1.34(1H, m), 1.55(1H, m), 1.89(1H, m), 1.95(2H, m), 1.97(1H, m), 2.04(2H, m), 2.07(1H, m), 2.20(1H, m), 2.42(1H, m), 2.68(1H, m), 3.67(3H, s), 3.99(1H, m), 5.41(2H, m).

^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 14.1(CH_3), 20.6(CH_2), 25.3(CH_2), 28.3(CH_2), 32.5 (CH_2), 35.3(CH_2), 36.7(CH), 50.6(CH), 51.5(CH_3), 77.4(CH), 127.1(CH) , 133.1(CH), 173.7(C).

Methyl (1R, 2S, 3S)-および(1S, 2S, 3R)-1-hydroxy-2-(2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetate（２４ｃ）.

(1R,2S,3S)-,24cα [α]$_D$=100.5'(c=0.261 MeOH)

(1S,2R,3R)-,24cβ [α]$_D$=-98.43'(c=0.346 MeOH)

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 0.96(3H, t), 1.28(1H, m), 1.43(1H, m), 1.64(1H, m), 1.89(1H, m), 2.09(2H, m), 2.10(1H, m), 2.16(2H, m), 2.18(2H, m), 2.54(1H, m), 3.67(3H, s), 4.20(1H, m), 5.41(2H, m).

^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 14.1(CH_3), 20.5(CH_2), 25.3(CH_2), 29.2(CH_2), 33.0 (CH_2), 38.5(CH), 39.0(CH_2), 50.9(CH), 51.3(CH_3), 74.1(CH), 127.3(CH) , 132.6(CH), 173.5(C).

Methyl (1R, 2S, 3R)-および(1S, 2R, 3S)-1-hydroxy-2-(2'-(Z)-pentenyl)cyclopentane-3-acetate（２４ｄ）.

(1R,2S,3R)-,24dα [α]$_D$=-2.60'(c=0.449 MeOH)

(1S,2R,3S)-,24dβ [α]$_D$=2.79'(c=0.528 MeOH)

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 0.97(3H, t), 1.62(1H, m), 1.68(1H, m), 1.85(1H, m), 1.86(1H, m), 1.92(1H, m), 2.08(3H, m), 2.26(1H, m), 2.40(1H, m), 2.46(1H, m), 2.48(1H, m), 3.66(3H, s), 4.21(1H, m), 5.39(2H, m).
^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 14.2(CH_3), 20.7(CH_2), 22.9(CH_2), 29.4(CH_2), 33.4(CH_2), 36.3(CH_2), 36.5(CH), 47.7(CH), 51.7(CH_3), 74.7(CH), 127.7(CH), 132.5(CH), 174.7(C).

第七節　１－ジヒドロ体（２４）の各光学異性体のＰＣＣ酸化

２４ａα

２４ａα　２．７ｍｇを乾燥ジクロロメタン　１ｍｌに溶解し、これにＰＣＣ　１０ｍｇを加え室温下２時間撹はんした。反応液を一度シリカゲルに通した後、高速液体クロマトグラフィー（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ＡＭ３２４　８０％ＭｅＯＨ）にかけ、２．１ｍｇの９ａα　を得た。

［α］$_D$＝－５５．２１°（ｃ＝０．４２、ＭｅＯＨ）

２４ａβ

２４ａβ　２．４ｍｇを乾燥ジクロロメタン　１ｍｌに溶解し、これにＰＣＣ　１０ｍｇを加え室温下２時間撹はんした。反応液を一度シリカゲルに通した後、高速液体クロマトグラフィー（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ＡＭ３２４　８０％ＭｅＯＨ）にかけ、１．８ｍｇの９ａβ　を得た。

［α］$_D$＝＋５３．３２°（ｃ＝０．３６、ＭｅＯＨ）

２４ｃα

２４ｃα　１．２ｍｇを乾燥ジクロロメタン　１ｍｌに溶解し、これにＰＣＣ　１０ｍｇを加え室温下２時間撹はんした。反応液を一度シリカゲルに通した後、高速液体クロマトグラフィー（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ＡＭ３２４　８０％ＭｅＯＨ）にかけ、０．５ｍｇの９ａα　を得た。

［α］$_D$＝－４３．４４°（ｃ＝０．１０、ＭｅＯＨ）

24cβ

24cβ 1．6mgを乾燥ジクロロメタン 1mlに溶解し、これにPCC 10mgを加え室温下2時間撹はんした。反応液を一度シリカゲルに通した後、高速液体クロマトグラフィー（ODS YMC AM324 80% MeOH）にかけ、0．7mgの 9aβ を得た。

$[\alpha]_D = +35.23°$（c=0．14、MeOH）

24dα

24dα 4．3mgを乾燥ジクロロメタン 1mlに溶解し、これにPCC 10mgを加え室温下2時間撹はんした。反応液を一度シリカゲルに通した後、高速液体クロマトグラフィー（ODS YMC AM324 80% MeOH）にかけ、3．2mgの 9bα を得た。

$[\alpha]_D = +40.87°$（c=0．64、MeOH）

24dβ

24dβ 5．7mgを乾燥ジクロロメタン 1mlに溶解し、これにPCC 10mgを加え室温下2時間撹はんした。反応液を一度シリカゲルに通した後、高速液体クロマトグラフィー（ODS YMC AM324 80% MeOH）にかけ、4．2mgの 9bβ を得た。

$[\alpha]_D = -38.45°$（c=0．84、MeOH）

第八節　マイクロチューバー生産のモデル系作成

使用培地

前培養では pH5・6，0・8%寒天，3% sucrose LS培地。アッセイに用いる培地は pH5．6，3% sucrose LS培地。

使用材料

継代培養している無菌茎断片の培養4週目から5週目のものを用いる（20°C 明所）。これを、頂端部および根に近い部分を切除したのち2節ご

とに切断する。

試料調製

カルチャーボトルに２０ｍｌの培養液を分注しオートクレーブにかけておく。　試料は目的の１００倍の濃度にして（１０％ＭｅＯＨ／Ｈ2Ｏ）作成する。この原液をマイレクスＧＶフィルターにて濾過したのち２００μｌずつ分注する。このカルチャーボトルに、２節に切断した無菌茎断片を７つずついれ、塊茎形成を観測する。　各設定区は５反復（節数で　計７０）

上記のカルチャーボトルを２５°Ｃ、暗所下に置いた。その結果、２－３日後、各節（側芽）から新しい茎が発生した。さらに塊茎形成誘導が行われ新しい茎上に塊茎がついた。この塊茎数を調べ、以下に示すように塊茎の数／発生した茎数を２、３、４週後に、茎発生率を算出した。

新しい茎の発生率

試料	週後	
	2	3
無処理	81.4	87.6
ジャスモン酸メチル（9） １０$^{-4}$M	78.4	81.9
9 １０$^{-5}$M	95.7	98.6
9 １０$^{-4}$M ＋ アスコルビン酸（３１）0.1 %	58.3	60.5
9 １０$^{-5}$M ＋ ３１ 0.1 %	64.3	68.6
9 １０$^{-6}$M ＋ ３１ 0.1 %	68.6	72.9
9 １０$^{-4}$M ＋ ３１ 0.1 % ＋ カイネチン（４０）2.5 ppm	32.9	38.6
9 １０$^{-5}$M ＋ ３１ 0.1 % ＋ ４０ 2.5 ppm	54.3	58.6
9 １０$^{-4}$M ＋ ３１ ナトリウム塩 0.1 %	73.8	76.7
9 １０$^{-4}$M ＋ デヒドロアスコルビン酸（３２）0.1 %	72.9	72.9
9 １０$^{-4}$M ＋ クエン酸（３４）0.1 %	65.2	67.1
9 １０$^{-4}$M ＋ グルタチオン（３５）0.01 %	75.1	76.0
9 １０$^{-4}$M ＋ ３５ 0.001 %	72.2	75.0
9 １０$^{-4}$M ＋ コハク酸（３６）0.1 %	73.6	73.6
9 １０$^{-4}$M ＋ スルホサリチル酸（３７）0.01 %	71.5	71.5
9 １０$^{-4}$M ＋ カテコール 0.001 %	78.6	82.9
9 １０$^{-4}$M ＋ ＣＣＣ（３０）0.05 %	67.1	67.1
9 １０$^{-4}$M ＋ m－クマル酸 0.01 %	83.6	84.3
9 １０$^{-4}$M ＋ システイン 0.05 %	45.7	50.0
9 １０$^{-4}$M ＋ デヒドロ酢酸 0.01 %	57.1	57.1
9 １０$^{-4}$M ＋ ＤＭＳＯ 0.1 %	68.6	71.4
9 １０$^{-4}$M ＋ エピカテキン 0.001 %	80.0	81.4

ジャスモン酸 10⁻⁴M + フマル酸 0.1 %	48.6	48.6
ジャスモン酸 10⁻⁴M + グルコン酸ナトリウム 0.1 %	76.4	77.2
ジャスモン酸 10⁻⁴M + ヒドロキシプロリン 0.01 %	75.7	75.7
ジャスモン酸 10⁻⁴M + マレイン酸 0.1 %	0	0
ジャスモン酸 10⁻⁴M + マレイン酸 0.001 %	68.6	68.6
ジャスモン酸 10⁻⁴M + シュウ酸 0.1 %	0	0
ジャスモン酸 10⁻⁴M + シュウ酸 0.001 %	81.4	85.7
ジャスモン酸 10⁻⁴M + α－ケトグルタル酸 0.1 %	2.9	4.3
ジャスモン酸 10⁻⁴M + α－ケトグルタル酸 0.001 %	78.6	80.0
ジャスモン酸 10⁻⁴M + 酒石酸 0.1 %	10.0	10.0
ジャスモン酸 10⁻⁴M + 酒石酸 0.01 %	80.0	84.3
アスコルビン酸（31）0.1 %	63.6	70.5
31 ナトリウム塩 0.1 %	75.0	80.4
CCC（30）0.05 %	82.9	87.1
m－クマル酸 0.01 %	78.6	84.3
30 0.005 % + 31 0.1 %	67.9	71.4
クエン酸（34）0.1 %	80.0	84.3
グルコン酸ナトリウム 0.1 %	74.3	88.6
グルタチオン（35）0.01 %	78.6	84.3
カイネチン（40）2.5 ppm	74.3	81.4
マレイン酸 0.005 % + 31 0.1 %	75.7	75.7
コハク酸（36）0.1 %	72.9	78.6
スルホサリチル酸（37）0.01 %	74.3	78.6
pH 4．5 HCl添加	60.5	62.3

塊茎の数／発生した茎数

試料	週後 2	3	4
無処理	0.018	0.049	0.049
ジャスモン酸メチル（9）10⁻⁴M	0.020	0.446	1.287
9 10⁻⁵M	0	0	0
9 10⁻⁴M +アスコルビン酸（31）0.1 %	0.267	1.481	2.640
9 10⁻⁵M + 31 0.1 %	0.444	0.833	1.944
9 10⁻⁶M + 31 0.1 %	0.208	0.784	0.784
9 10⁻⁴M + 31 0.1% +カイネチン（40）2.5ppm	2.605	7.032	7.402
9 10⁻⁵M + 31 0.1 % + 40 2.5 ppm	2.105	4.876	5.119
9 10⁻⁴M + 31 ナトリウム塩 0.1 %	0.516	1.428	1.801
9 10⁻⁴M +デヒドロアスコルビン酸（32）0.1 %	0.196	0.588	1.176
9 10⁻⁴M +クエン酸（34）0.1 %	0.511	1.277	2.555

9 10⁻⁴M +グルタチオン（35）0.01 %	0.114	1.015	1.729
9 10⁻⁴M + 35 0.001 %	0	1.048	2.095
9 10⁻⁴M +コハク酸（36）0.1 %	0.097	1.068	1.941
9 10⁻⁴M +スルホサリチル酸（37）0.01 %	0	1.299	2.098
9 10⁻⁴M +カテコール 0.001 %	0	0.172	1.034
9 10⁻⁴M +CCC（30）0.05 %	0	0	0
9 10⁻⁴M +m－クマル酸 0.01 %	0	0.085	0.932
9 10⁻⁴M +システイン 0.05 %	0.313	0.286	0.571
9 10⁻⁴M +デヒドロ酢酸 0.01%	0.250	0.500	1.001
9 10⁻⁴M +DMSO 0.1 %	0	0.200	0.200
9 10⁻⁴M +エピカテキン 0.001 %	0.179	0.176	0.527
9 10⁻⁴M +フマル酸 0.1 %	0	0	1.470
9 10⁻⁴M +グルコン酸ナトリウム 0.1 %	0	0.740	1.018
9 10⁻⁴M +ヒドロキシプロリン 0.01 %	0	0.189	0.377
9 10⁻⁴M +マレイン酸 0.1 %	0	0	0
9 10⁻⁴M +マレイン酸 0.001 %	0	0.208	0.833
9 10⁻⁴M +シュウ酸 0.1 %	0	0	0
9 10⁻⁴M +シュウ酸 0.001 %	0	0	0.667
9 10⁻⁴M +α－ケトグルタル酸 0.1 %	0	3.322	9.967
9 10⁻⁴M +α－ケトグルタル酸 0.001 %	0	0.536	0.536
9 10⁻⁴M +酒石酸 0.1 %	0	7.143	7.143
9 10⁻⁴M +酒石酸 0.01 %	0	0	0.508
アスコルビン酸（31）0.1 %	0.075	0.169	0.439
31 ナトリウム塩 0.1 %	0.095	0.267	0.666
CCC（30）0.05 %	0	0	0
m－クマル酸 0.01 %	0	0	0
30 0.005 % + 31 0.1 %	0.579	0.650	1.100
クエン酸（34）0.1 %	0	0	0.169
グルコン酸ナトリウム 0.1 %	0	0.161	0.161
グルタチオン（35）0.01 %	0.182	0.678	0.847
カイネチン（40）2.5 ppm	0	0	0
マレイン酸 0.005 % + 31 0.1 %	0	0	0.755
コハク酸（36）0.1 %	0	0	0
スルホサリチル酸（37）0.01 %	0	0	0
pH 4．5 HCl添加	0	0	0.133

第九節　培養細胞細胞壁微小管の観察

継代移植後４日目のバレイショ培養細胞を１０$^{-3}$から１０$^{-4}$Ｍの濃度のサンプルのはいったＭＳ培地に移し代え２５°Ｃ暗所で４３時間振とう培養し微小管観察に用いた。

細胞壁微小管の消失活性試験には１９８９年９月に日本たばこ遺伝育種研究所より供与されたバレイショの一品種であるメイクイーンの培養細胞を用いた。このものを２５°Ｃ暗所で１２５rpmで振とう培養し一週間ごとに植え継いだ。新たに植え継いでから３－４日後に培養液中所定濃度になるよう試料を無菌的に加え、さらに１－２日おいた。この後ピペットで一部取り、遠沈（９００ｒｐｍ　φ２６ｃｍ、５分）し上澄みを捨てた後、３．７％ホルマリン溶液（５０ｍＭリン酸緩衝液　ｐＨ７）で１時間、室温で固定する。これをリン酸緩衝液で２回洗浄した後、あらかじめ１ｍｇ／ｍｌポリ－Ｌ－リジン（シグマＰ１５２４　Ｍ．Ｗ．３０万以上）を４ｕｌ塗り付けたカバーグラスにピペットで滴下しつける。余分な水を捨てた後、次の細胞壁破壊操作に進む。

細胞を塗布したカバーグラスをミニシャーレにいれこれにデタージェント液（１％　Ｎｏｎｉｄｅｔ　５０ｍＭ　リン酸緩衝液　５ｍＭ　ＥＧＴＡ　０．５ｍＭ　ＰＭＳＦ　１μｇ／ｍｌ　ｌｅｕｐｅｐｔｉｎ）を全面が浸る程度加え３０分放置した。デタージェント液をピペットで除いてから、酵素液（１％　セルラーゼ　ＯＮＯＺＵＫＡ　ＲＳ．　０．０５％　ペクトリアーゼ　５０ｍＭリン酸緩衝嬰　５ｍＭ　ＥＧＴＡ　０．５ｍＭ　ＰＭＳＦ　１μｇ／ｍｌ　ｌｅｕｐｅｐｔｉｎ）を加え１０分間放置し細胞壁を破壊し染色しやすくする。　５０ｍＭ　リン酸緩衝液で５回洗浄した後、次の抗体染色を行う。

１次抗体液（１／５００希釈 マウスモノクロナール ａｎｔｉ－ｃｈｉｋｅｎ－α－ ａｎｄ β－ｔｕｂｌｉｎ／ＰＢＳ　ｐＨ７．３　０．１％ＢＳＡ　０．１％NaN_3）を１０μｌ滴下し３０分室温に置く。リン酸緩衝液で５回洗浄後、２次抗体液（１／１０希釈 ＦＩＴＣ－ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ抗体）を１０ｕｌ滴下し３０分間放置した。

さらにリン酸緩衝液で洗浄後、これをスライドグラスにはりつけ蛍光顕微鏡で微小管を観察した。

第十節　バレイショ無菌茎断片中のポリアミン量の定量

試料調整

継代培養後一か月のバレイショ無菌茎断片を用いて実験を行った。すなわち塊茎形成を誘導するジャスモン酸メチル（9）10^{-4} M、0．1％アスコルビン酸（31）の入った20ml LS培養液を入れたカルチャーボトルに頂芽部および基部を除いた2節を含む茎断片を7本ずつ移植した。対照として塊茎形成誘導剤を加えないものを用意した。誘導剤処理、無処理ともに15ずつ用意し処理開始後、経時的に2個ずつカルチャーボトル内の植物体を取り出し水を除いてから重量を量った。またボトル1個あたりの塊茎数を記録した。集めた茎断片はそれぞれ凍結保存した。

ポリアミンの定量法

凍結保存した試料　1－2gに1mlの5％（v／v）冷$HClO_4$を加えすりつぶしてから1時間冷暗所に放置した。抽出液から50－100μlを5mlの蓋付サンプル管に移し、これに200μlの飽和$NaHCO_3$水溶液、400μlのダンシルクロリド（7.5 mg/ml in acetone）を順次加え、短い間撹半した後反応液を室温で暗所に一晩放置した。次に過剰のダンシルクロリドをこわすために反応液に　100μlのプロリン水溶液（100 mg/ml）を加え撹はんし30分間放置した。反応液に500μlのベンゼンを加えダンシル化したポリアミンを抽出した。これは－20°Cで保存可能であった。プトレシン（41）、スペルミヂン（42）、スペルミン（43）の標品についても同様の操作をおこない検量線を作成し定量計算に用いた。

抽出液は無蛍光のシリカゲルプレート（20 X 20 cm）に1・5cm以上の間隔で3－9μlずつスポットしてヘキサン：酢エチ　3：2の展開溶媒で展開した。展開したシリカゲルプレートは島津クロマトスキャナー　CS－930にて測光定量した。（313nm 励起　フィルター　No．1）

第二部　ナス科植物の配糖体成分および根外分泌の化学的研究

高等植物中には低極性のテルペン類等の化合物が配糖体として存在することが報告されている[34、40]。ナス科では、第一部で述べたバレイショ葉から単離されたチュベロン酸のグルコシド[5]、カボチャの種子から単離されたククルビン酸のグルコシド[57]等の植物成長調整活性を有するジャスモン酸類の配糖体の単離報告がある。また、タバコからは児玉らが９種のイオノール類と６種のセスキテルペンの配糖体について単離し構造を報告している[35-39]。これらのうちイオノール類は遊離のアグリコンとしてはたばこの重要なフレーバーであるが、配糖体の形でもたばこにかけると香喫味を改善すると言う報告もある[96]。またセスキテルペン類の配糖体のアグリコンはタバコのストレス化合物[97]でありタバコ立枯れ病菌（Pseudomonas solanasearum）およびタバコ野火病菌（P. tabacci）に対して抗菌活性を有することが知られている[97]。しかし配糖体になると抗菌活性を失ってしまう[97]。また興味深いことに温室で栽培されたタバコ葉中にはイオノール配糖体のみでセスキテルペン配糖体は検出されない[48]。反対に外界からのストレスを受けやすい圃場で栽培したものに検出される[48]。これらの化合物の生理的な役割については単離された化合物も少ないため未だに不明である。ナス科植物の配糖体について研究を進めることはその生理的役割を調べるうえで、また新たな有用物質を得るうえでも重要と考える。

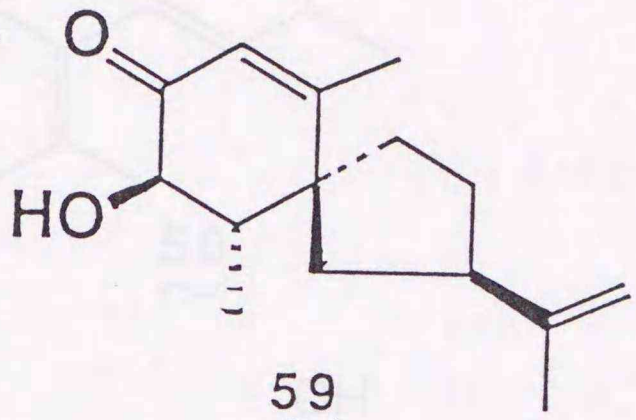
また、バレイショで疫病菌（Phytophthlora infestans）感染組織から、リシチン、リシチノール、フィチュベリンなどのファイトアレキシンが単離構造決定[41、42]されている。タバコ植物の場合ＴＭＶ感染によって生成するファイトアレキシンの研究が行われている[43-46]。これらの研究はほとんどが、葉をもちいて行われているが根の組織についてはナスの根に含まれる抗菌物質が調べられているが[47]、研究例が少ない。

第二部では代表的なナス科植物であるタバコ、バレイショについてその配糖体成分について存在を調べ、その単離、構造決定を行うとともに、それらの生育ステージでの量的変動について調べた。また、タバコの水耕、れき耕培養により、タバコ根から分泌される物質の単離、同定を行った。

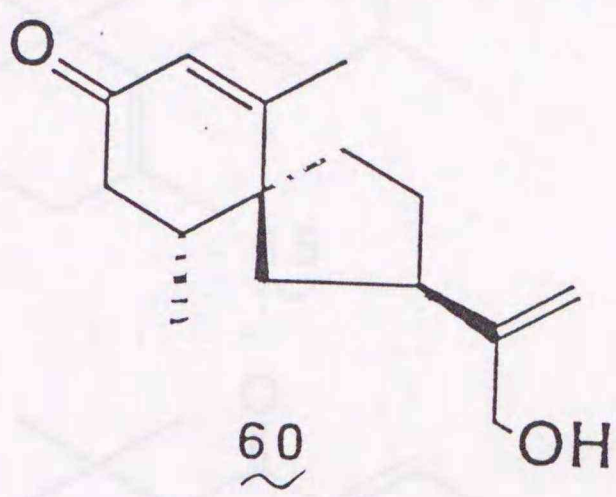
第一章

バレイショ葉メタノール抽出物に含まれる配糖体の検索[116)]

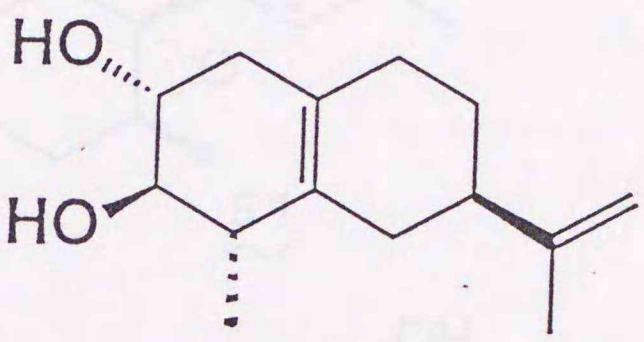
すでに、同じナス科であるタバコ葉中に含まれるテルペンの配糖体（59～63）を児玉らがいくつか単離、構造決定しているので（図1－1，2）、この方法をもとにしてバレイショ葉の不揮発性画分から配糖体を検索することにした。



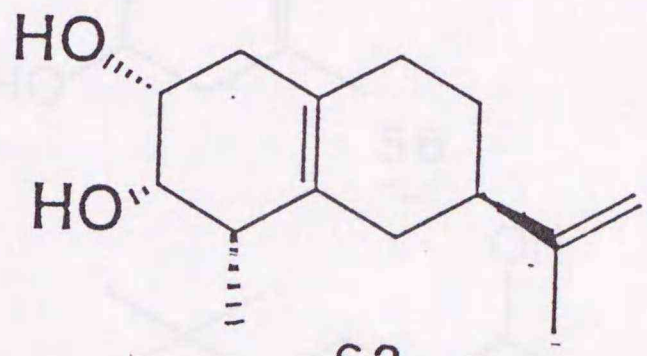
59



60



61



62

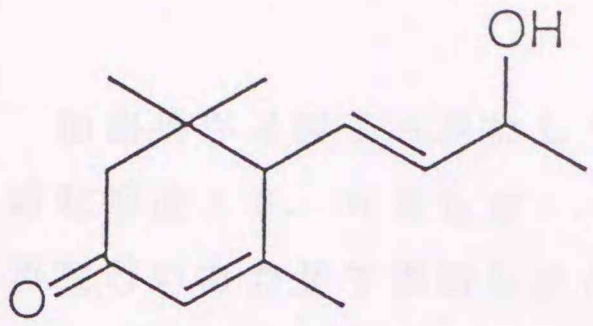


63

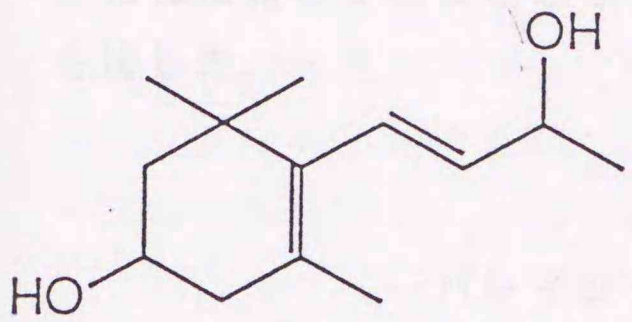
図1－1　葉たばこ中のテルペン配糖体のアグリコン

第一節

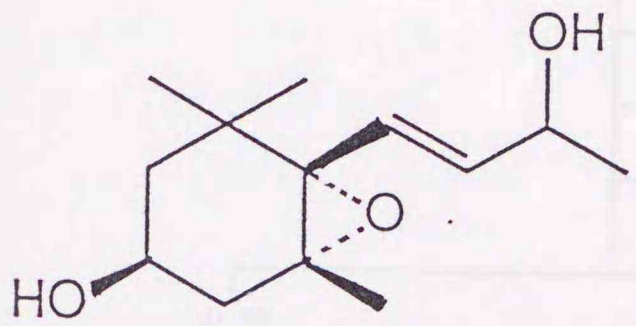
不揮発性画分の調製およびβ－グルコシダーゼ加水分解による遊離アグリコンの同定



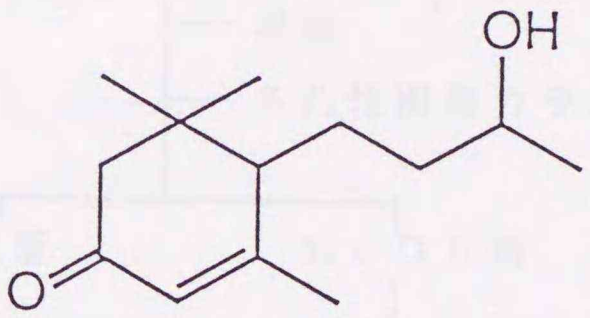
49



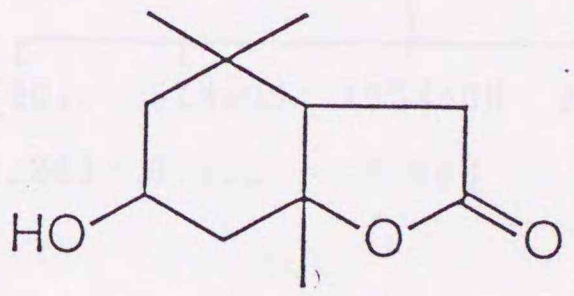
50



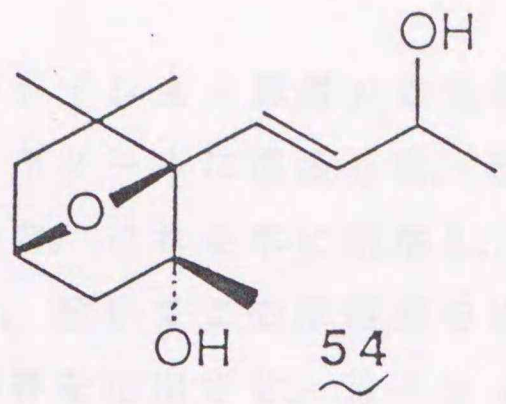
51



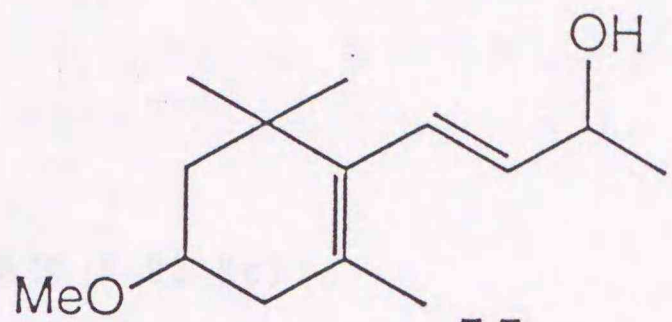
52



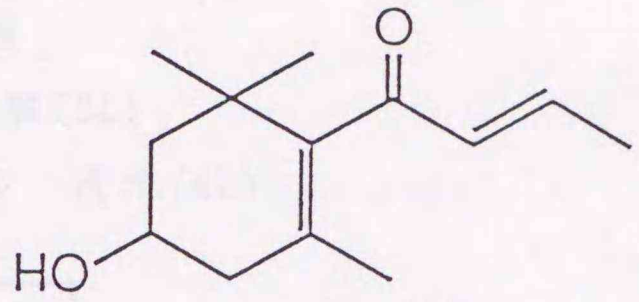
53



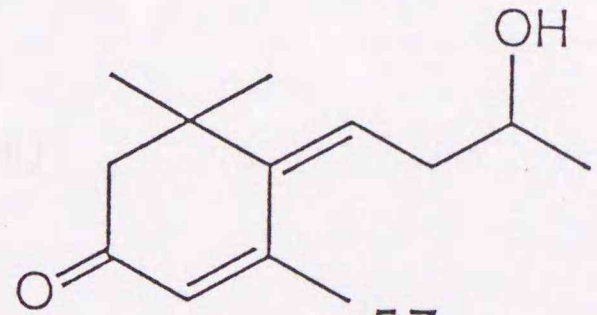
54



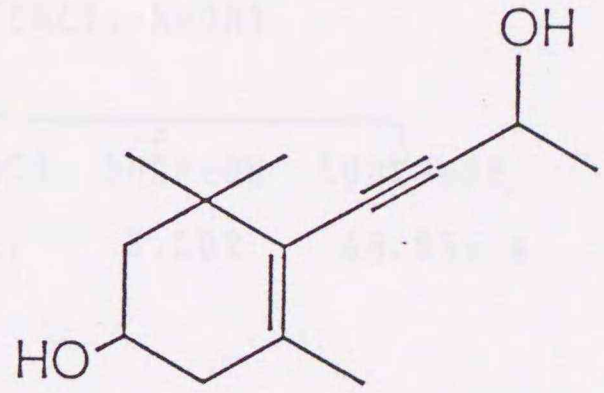
55



56



57



58

図 1－2　葉たばこ中のイオノン配糖体のアグリコン

抽出操作は図１－３にしたがって行った。バレイショ（男爵）の生葉を凍結乾燥後（６．０２Ｋｇ）、ただちに７０％メタノールに浸漬した。浸漬は再度行いあわせて濃縮しメタノール抽出物を得た。これを水に溶解し、水溶液を酢酸エチルで洗浄して脂溶性成分を除いた。続いてこの水溶液を濃縮後、多孔性樹脂カラムに吸着させ蒸留水で遊離の糖等を溶出させ、後メタノールを流した。

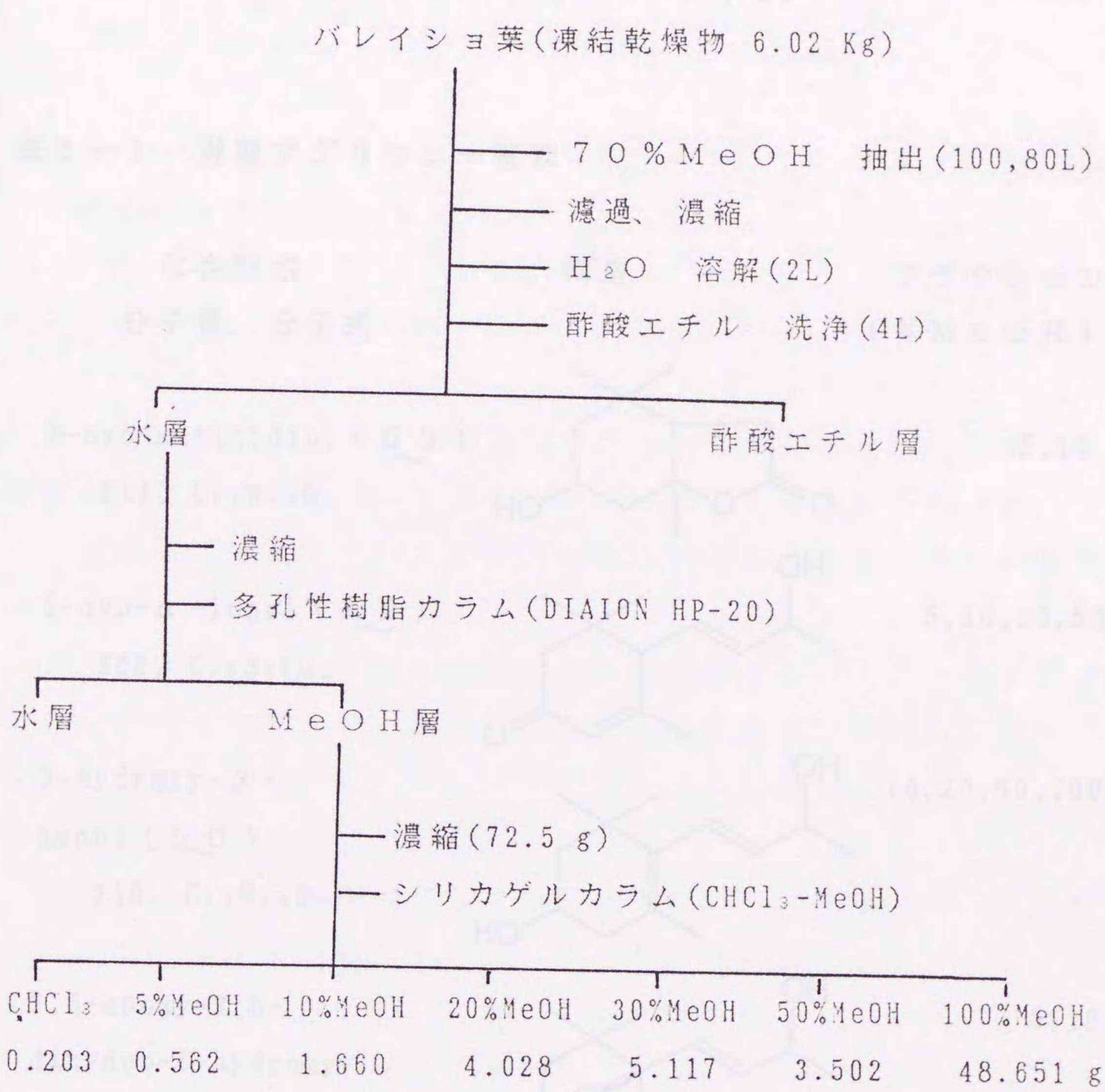
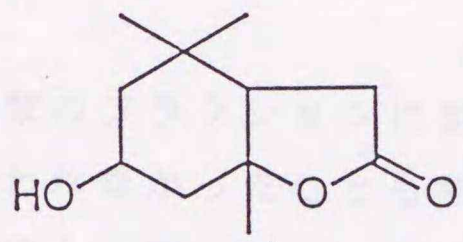
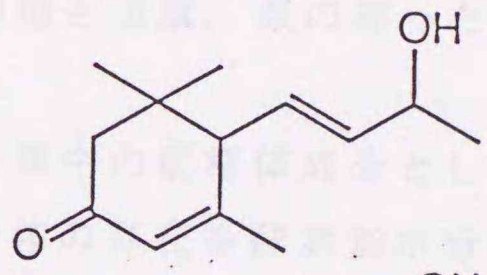
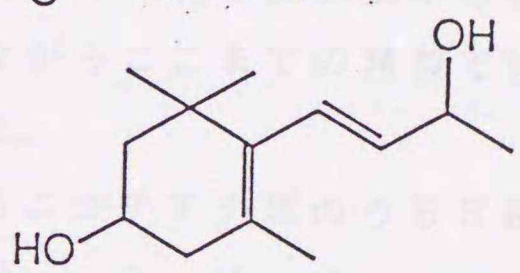
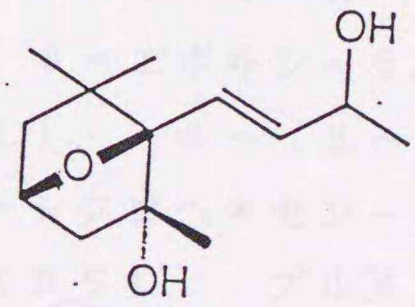


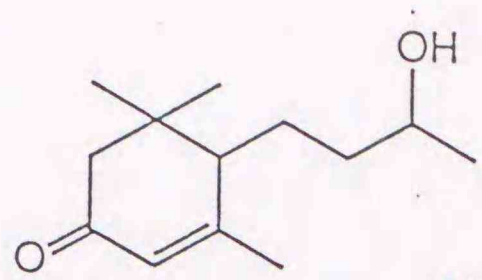
図１－３メタノール抽出物の分画

このメタノール溶出画分をβ－グルコシダーゼで加水分解し遊離したアグリコンをジアゾメタンでメチル化処理した後キャピラリーＧＣ－ＭＳで分析した。このアグリコン画分のマスクロマトグラムを図１－５に示す。このメタノール溶出画分をシリカゲルを充填したカラムに吸着させ、クロロホルムとメタノールの混合溶媒でメタノールの濃度を5、１０、２０、３０、５０、１００％と順次変化させて極性の低い順に溶出させた。各溶出画分をβ－グルコシダーゼで加水分解し、それぞれの遊離アグリコンをキャピラリーＧＣ－ＭＳで分析した。この結果を表１－１に示す。

表１－１　遊離アグリコン一覧表

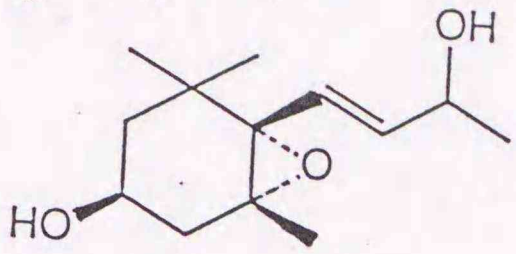
化合物名 分子量、分子式	構造	フラクション （％ＭｅＯＨ）
3-oxo-actinidiol（５３） 214, $C_{11}H_{18}O_3$		5,10
3-oxo-α-ionol（４９） 208, $C_{13}H_{20}O_2$		5,10,30,50
3-hydroxy-β-ionol（５０） 210, $C_{13}H_{20}O_2$		10,20,50,100
3,6-epoxy-3,6-dihydro-5-hydroxy-β-ionol（５４） 226, $C_{13}H_{22}O_3$		5,10

Blumenol C (5 2)
210, $C_{13}H_{22}O_2$



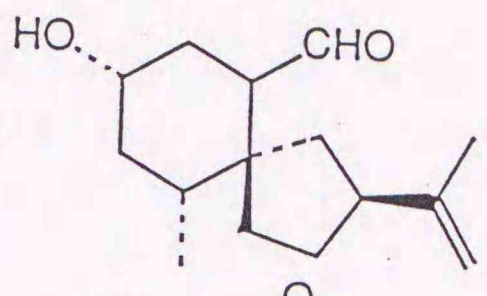
5,10

3-hydroxy-5,6-
epoxy-β-ionol (5 1)
226, $C_{13}H_{22}O_3$



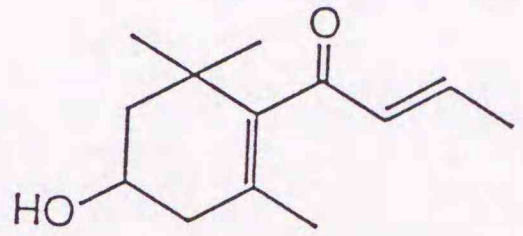
20,30

lubimin (6 4)
236, $C_{15}H_{24}O_2$



30

3-hydroxy-β-
damascone (5 6)
208, $C_{13}H_{20}O_2$



30,50

表１－１でアグリコンが複数のフラクションにまたがって同定されているのは配糖体の分離がうまく行われなかったことも考えられるが、主にアグリコンが同じでもグルコースの結合位置、数の違った化合物が存在するためと考えた。

以上のようにバレイショ生葉中の配糖体成分として７つのイオノン配糖体と１つのセスキテルペン配糖体の存在を酵素加水分解物のＧＣ－ＭＳ分析により明らかにした。しかしながらここまでの精製ではＴＡＧ（１）の存在を確認することはできなかった。

児玉らはタバコ植物のうちニコチアナ属のうち８種についてその生葉に含まれる配糖体成分の分析を行い、３－オキソ－α－イオノール（４９）、ブルメノール　Ｃ（５２）、　５，６－エポキシ－５，６－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－β－イオノール（５１）、　４－（３－ヒドロキシブチリデン）－３，５，５－トリメチル－２－シクロヘキセン－１－オン（５７）、　３－ヒドロキシ－β－ダマスコン（５６）、　ブルメノール　Ａの６種のイオノン系配糖体の分布を調べている。そしてこれらイオノン系配糖体が異なっ

DB－WAX　30M　150－210°C　3°C／min

He　キャリヤー

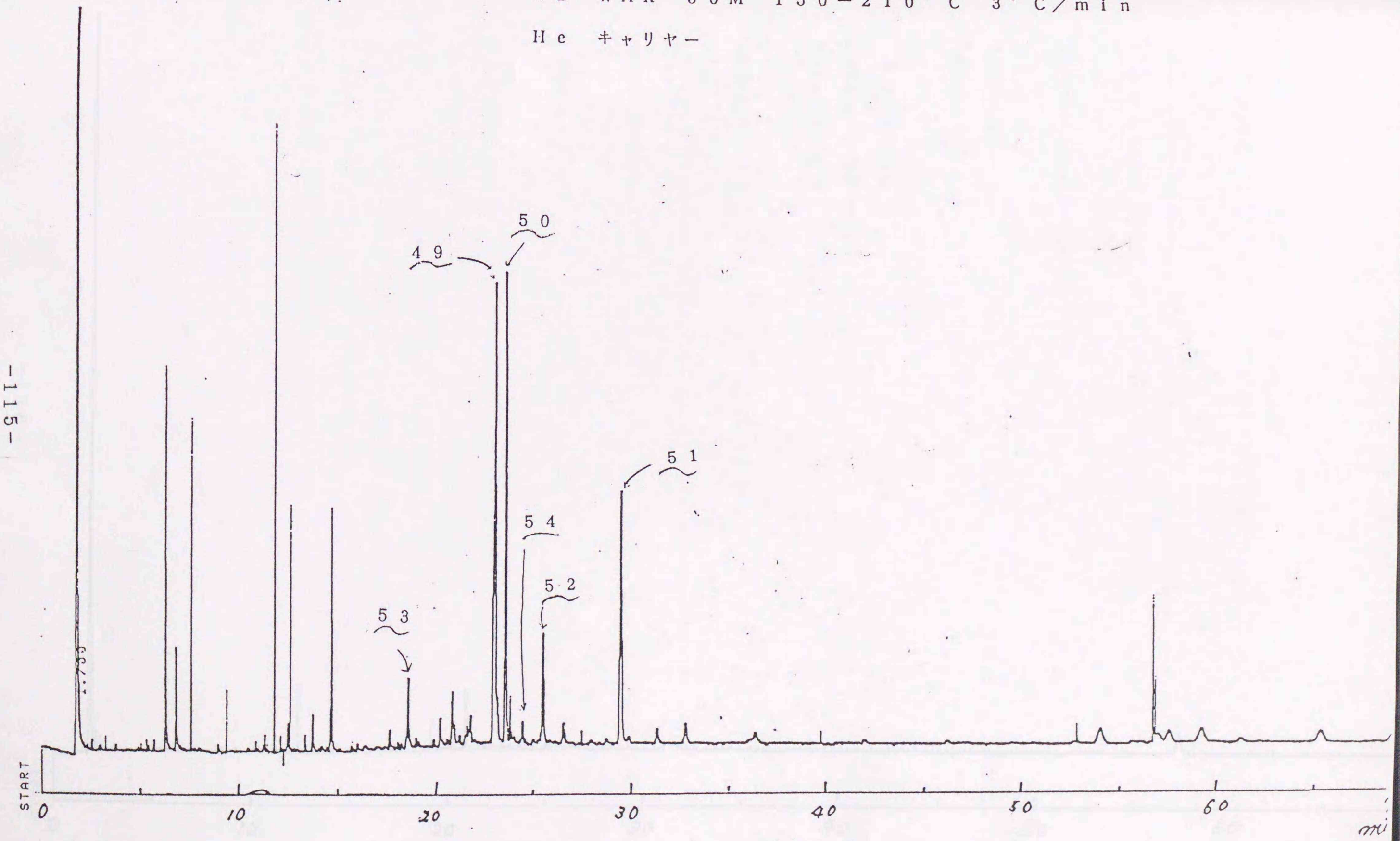


図 1－5　遊離アグリコンのガスクロマトグラム

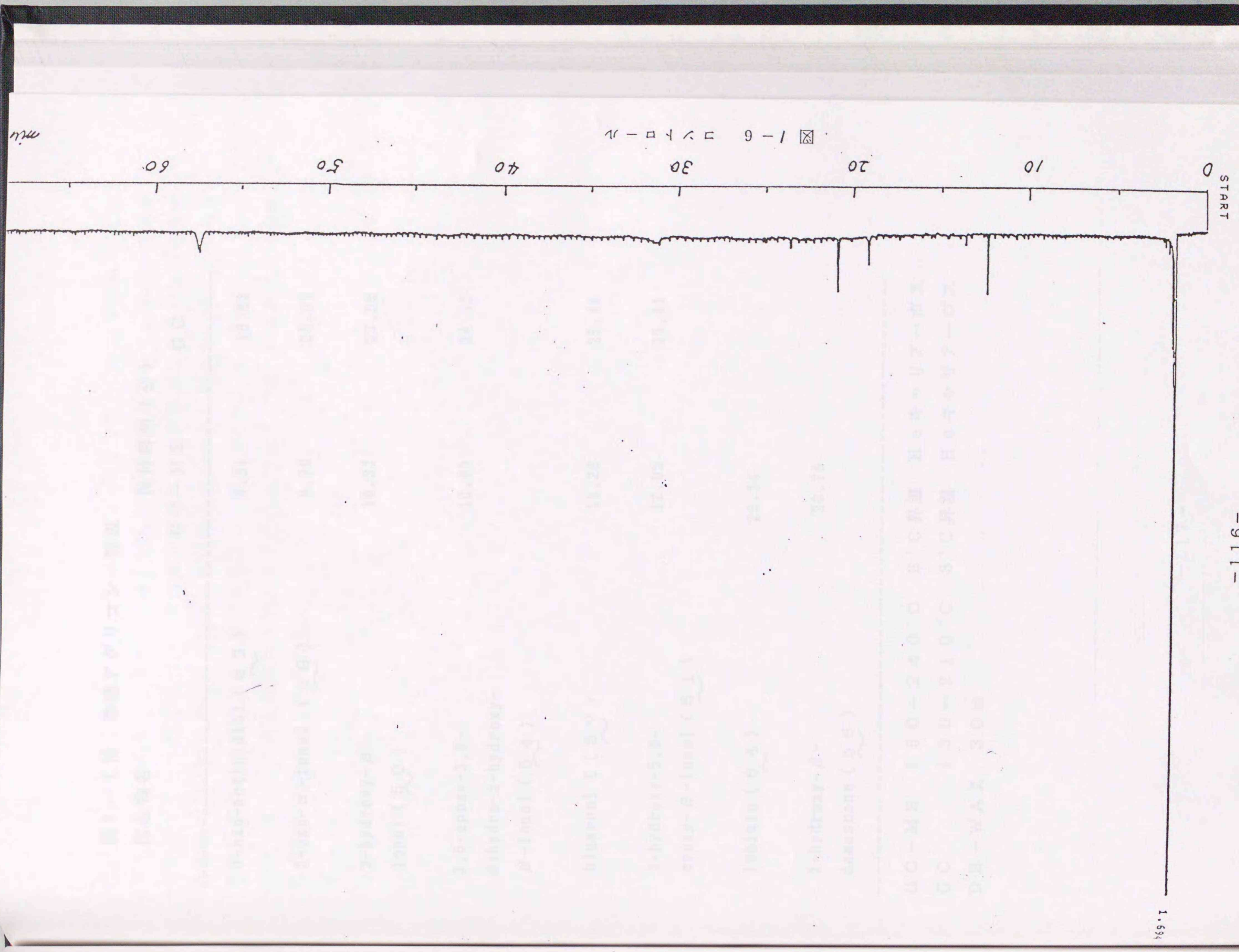


図 1－6　コントロール

表１－１補　遊離アグリコン一覧表

化合物名	保持時間（分） GC－MS	GC
3-oxo-actinidiol（５３）	6.84	18.63
3-oxo-α-ionol （４９）	9.70	23.01
3-hydroxy-β-ionol（５０）	10.33	23.56
3,6-epoxy-3,6-dihydro-5-hydroxy-β-ionol（５４）	10.65	24.43
blumenol C（５２）	11.28	25.46
3-hydroxy-5,6-epoxy-β-ionol（５１）	12.95	29.41
lubimin（６４）	20.34	
3-hydroxy-β-damascone（５６）	20.78	

GC－MS　１５０－２４０'C　３'C昇温　Ｈｅキャリアーガス
GC　　１５０－２１０'C　３'C昇温　Ｈｅキャリアーガス
ＤＢ－ＷＡＸ　３０ｍ

た分布をしていることを報告している[48]。同時にタバコの生葉中に遊離の形でイオノン系化合物がほとんど存在しないことも確認されているが、本実験でのバレイショ葉メタノール抽出物の酢酸エチル可溶部のＧＣ－ＭＳ分析でも遊離の形で存在するイオノン系化合物は検出されなかった。イオノン系化合物は同じナス科のクコに存在することが報告されている[95]が、これらのことからイオノン系配糖体はニコチアナ属のみでなく、広くナス科植物の生葉に存在していると考えられる。

第二章

各生育ステージにおける配糖体の量の変動[116)]

児玉はタバコの生育ステージおよび着葉位置の配糖体成分の量的変動を調べ、生育ステージが進むにしたがって量が増大していくことを報告している。そこで前章で述べたようにタバコと同じようにイオノール配糖体が多く含まれていることが判明したバレイショについても生育ステージごとの配糖体成分の量的変化について調べた。

萌芽した男爵薯１４鉢を通常の栽培により日本たばこ産業遺伝育種研究所（静岡県磐田市）の温室で１９８９年６月１日に移植し生育させた。図２－１，２を参考にして５つの生育ステージに区切りそれぞれ成長過程の異なる地上部、地下部（除種薯）、種薯の区分別に３ないし４鉢ずつ採集しすぐに凍結保存した。すべて採集がすんだ後これらを凍結乾燥しメタノール抽出した。収量は表２－１に載せた。

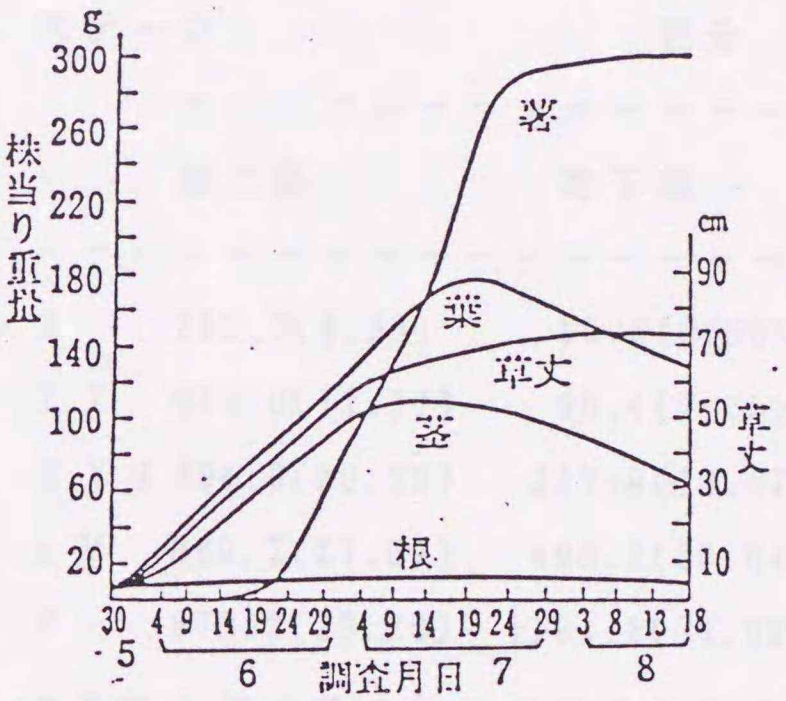


図 2－1 ジャガイモの各部の生育経過
（川上 1948）
品種岩手4号 1944年4月23日植付 66)

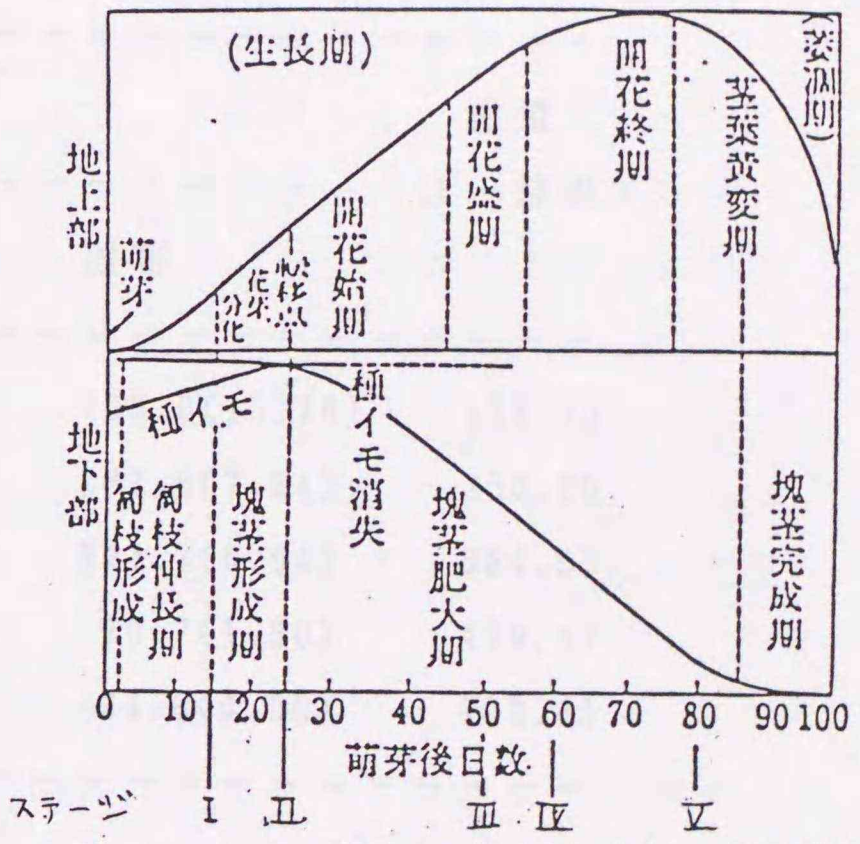


図 2－2 ジャガイモの地上部の生長，および地下部の発達
萌芽後日数の目盛りは環境条件や品種によって異る 66)

表２－１　男爵薯の栽培

ステージ	採集日		鉢数
	移植時（６月１日）		
Ｉ	１５日後	６月１６日	4
ＩＩ	２５日後	６月２６日	4
ＩＩＩ	５０日後	７月２１日	3
ＩＶ	６０日後	７月３１日	3
Ｖ	８０日後	８月２０日	3

表２－２　各生育ステージにおいて採集した植物体の重量

ステージ	区分			重量（一鉢当）
	地上部	地下部	種薯	
Ｉ	235.7(4.38)	50.0(0.86)	168.6(10.76)	155.73
ＩＩ	641.0(12.37)	96.4(1.65)	287.6(7.64)	256.25
ＩＩＩ	994.0(30.25)	347.9(18.07)	321.7(6.94)	554.53
ＩＶ	869.2(27.67)	498.2(28.64)	70.7(1.50)	479.37
Ｖ	878.3(29.20)	1194.2(89.69)	34.8(0.50)	702.43

生重量　g

（）内は一鉢当りの乾物重量　g

表２－３　各生育ステージの採集植物メタノール抽出物の重量

ステージ	区分			総重量（一鉢当）
	地上部	地下部	種薯	
Ⅰ	0.477	0.101	1.293	1.871
ⅠⅠ	1.253	0.176	1.154	2.583
ⅠⅠⅠ	4.187	0.683	1.767	6.637
ⅠⅤ	4.160	1.100	0.212	5.472
Ⅴ	6.256	1.365	0.089	7.710

一鉢当りの重量　g

各ステージにおける各区分の全生重量と一鉢当りの乾物重量を、表８－２に示した。地上部はステージⅠⅠⅠに最大に達し後一定になるが、地下部は種薯の重量に反比例して増加する。一鉢当りでの総重量はステージⅠⅤで一度減少してからさらに増加している。ついで、アグリコンの定量を行った。

各ステージにおいて遊離したアグリコンの量を表２－４に示した。いずれの試料の場合においてもコントロールからはアグリコンの遊離は見られなかった。またチュベロン酸（４）については検出できなかった。

表２－４に見られるように遊離アグリコンとして５３、４９、５０、５４、５２、５１の６種類のイオノン関連化合物が検出されたが４９、５０、５２、５１はいずれのステージの試料からも検出され総体的に４９、５０の存在量が最も多い。

図２－５に示すように４９、５０の存在量の経時変化をしめしたが、ステージⅠⅠでいちど減少した後増加し塊茎肥大後ステージⅤに急劇に増加する。これはタバコでその主要なアグリコン　４９　が生長時に増加着らい時にいったん減少し摘芯時に急劇に増加するのによく似ている（図２－６）。２種の植物の生育ステージをパラレルに比較できないがそれぞれの配糖体含量の

表２－４　各ステージにおいて遊離したアグリコン（地上部）

ステージ	53	49	50	54	52	51
I	-	6.42	1.95	-	10.61	0.26
II	-	3.18	1.85	0.26	3.56	0.21
III	-	6.27	4.71	0.99	7.94	1.04
IV	-	9.90	9.69	1.46	9.38	1.55
V	12.04	115.40	127.33	6.24	20.70	49.70

μg／g　dry　wt. leaves.
-　not　detected
（53）：３－オキソ－アクチニジオール、（49）：３－オキソ－α－イオノール、（50）：３－ハイドロキシ－β－イオノール、（54）：３，６－エポキシ－３，６－ジヒドロ－５－ヒドロキシ－β－イオノール、（52）：ブルメノール C、（51）：３－ハイドロキシ－５，６－エポキシ－β－イオノール

最も多い生育ステージＶ（移植後バレイショ８０日）、ステージＩＶ（移植後タバコ８６日）についてそのアグリコンの量の比較をしその差異を検討した（表２－５）。

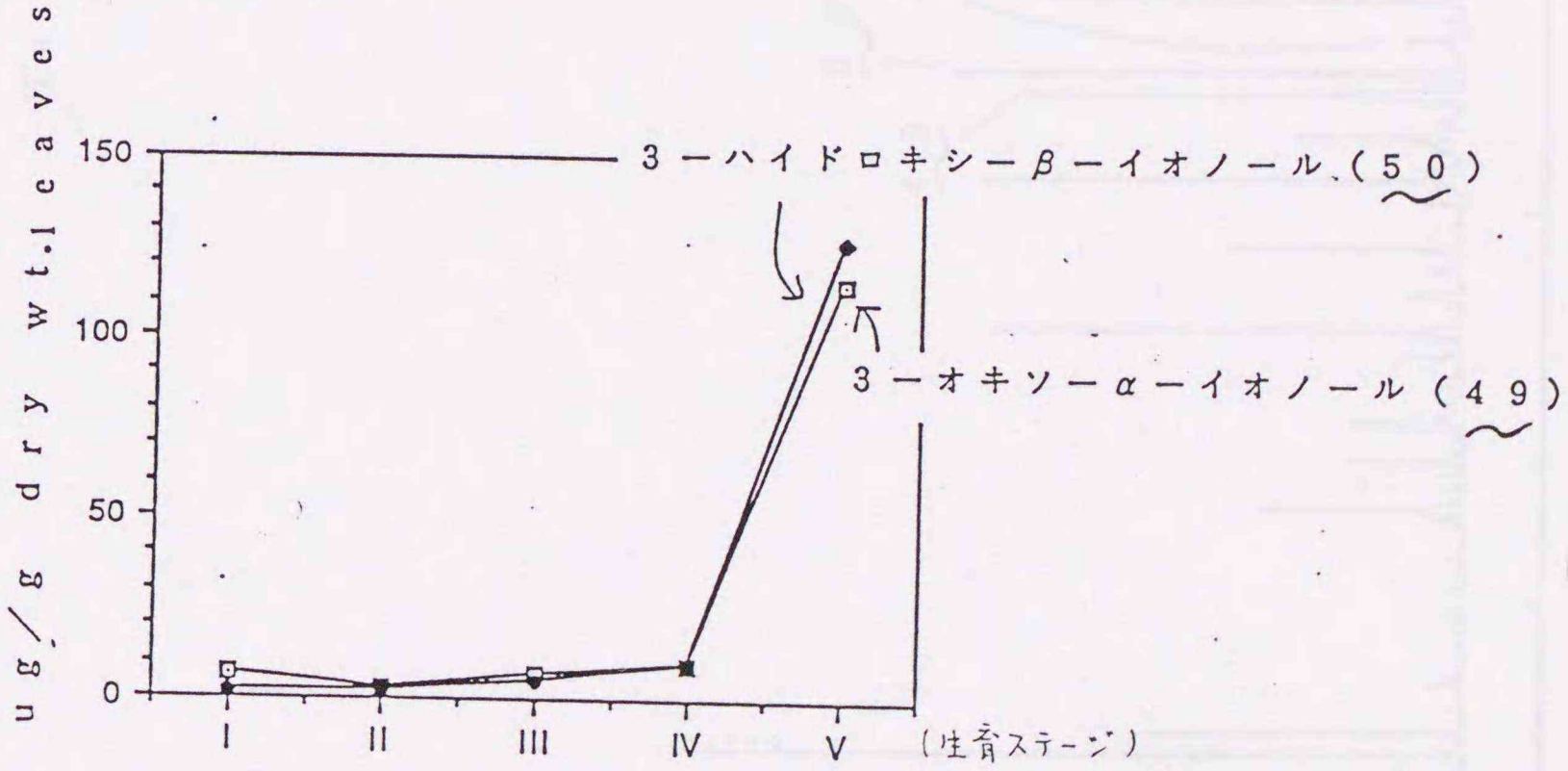


図２－５　アグリコンの経時変化（バレイショ葉）

DB－WAX　30M　150－210°C　3°C／min

He　キャリヤー

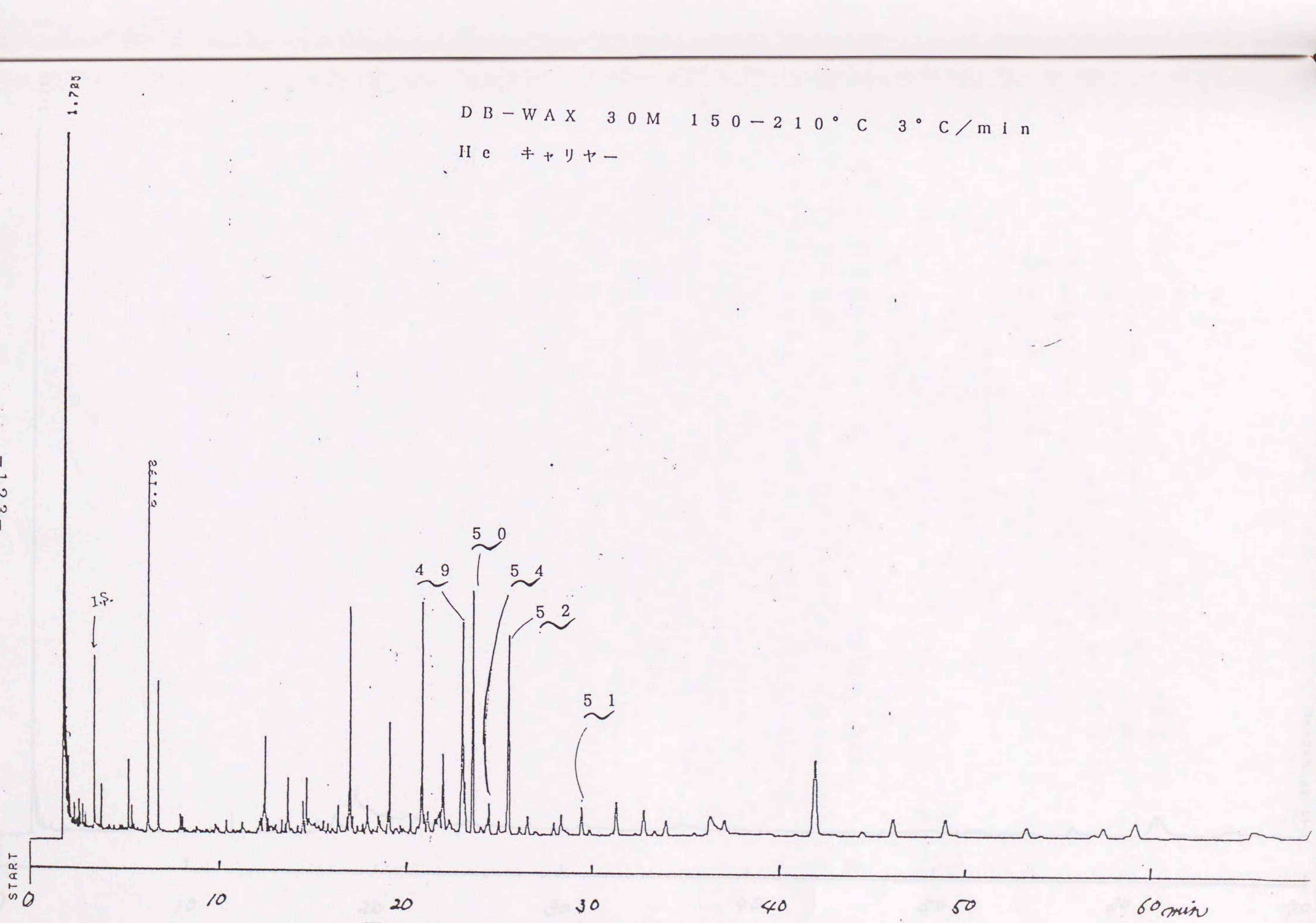


図2－3　移植60日後地上部　遊離アグリコンのガスクロマトグラム

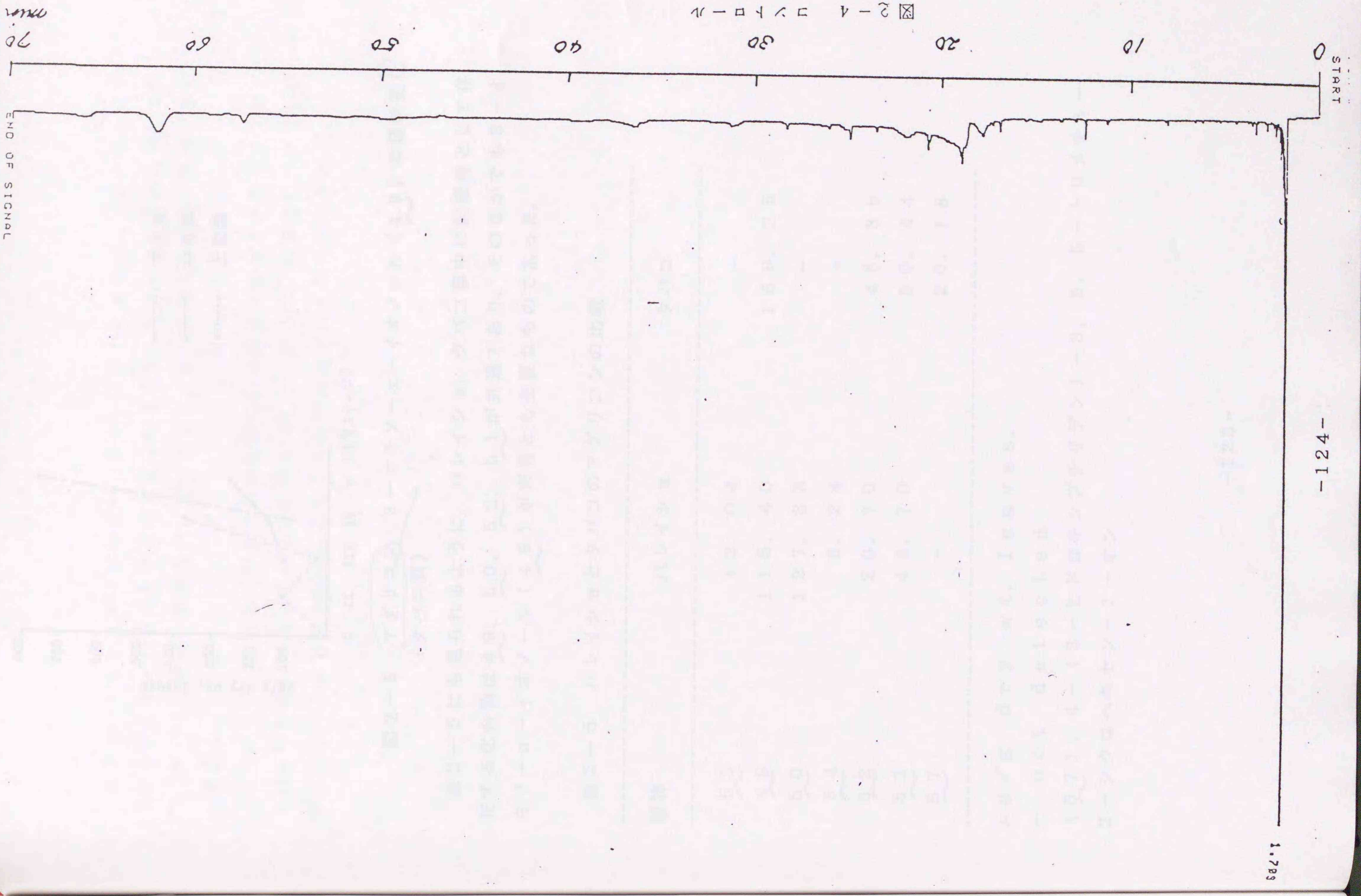


図 2－4　コントロール

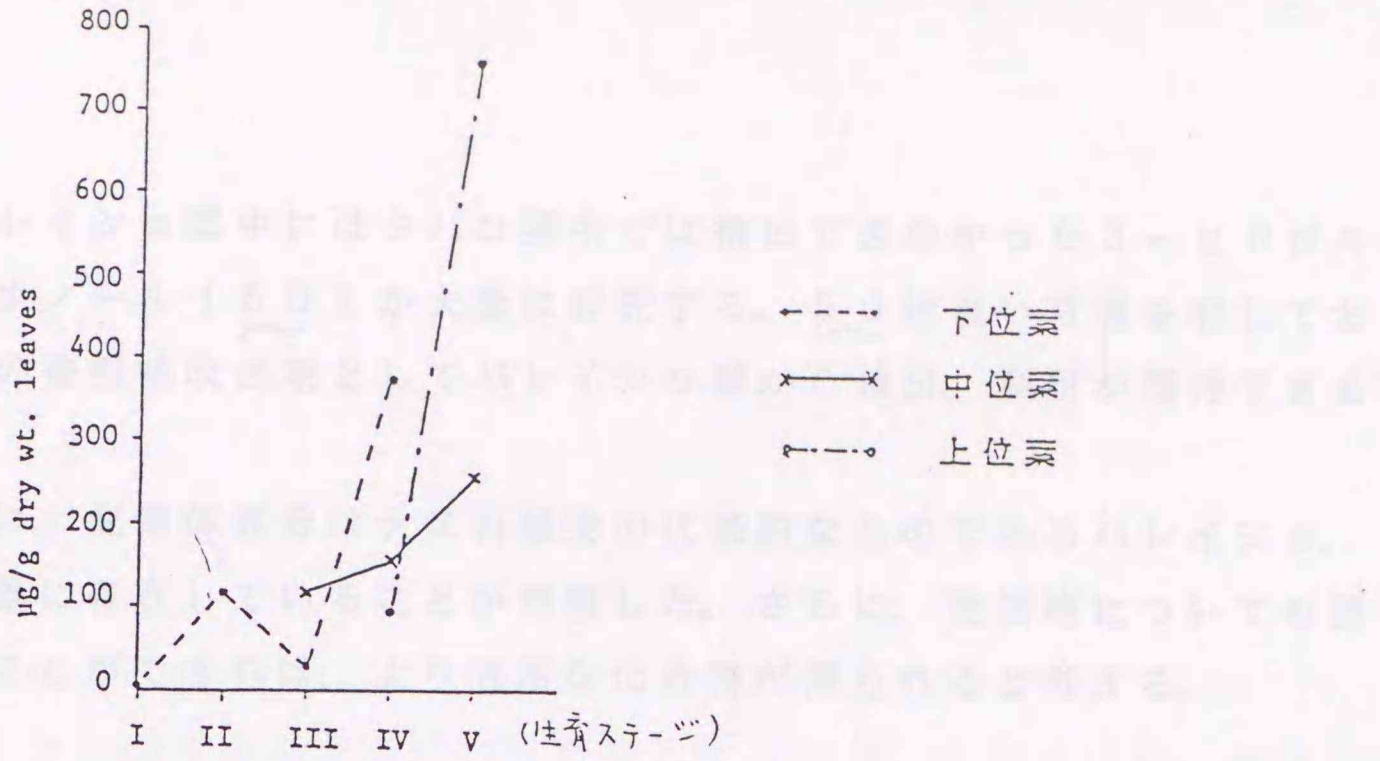


図２－６　アグリコン　３－オキソ－α－イオノール（４９）の経時変化
（タバコ葉）

表２－５にも見られるように、バレイショ、タバコ葉中に配糖体として存在する化合物は４９、５０、５２、５１が共通であり、そのなかでも３－オキソ－α－イオノール（４９）が両者とも主要なものであった。

表２－５　バレイショとタバコのアグリコンの比較

植物	バレイショ	タバコ
５３	１２．０４	－
４９	１１５．４０	１６６．２５
５０	１２７．３３	－
５４	６．２４	－
５２	２０．７０	４５．８８
５１	４９．７０	５０．４４
５７	－	２０．１８

μg／g dry wt. leaves.
－ not detected
（５７）：４－（３－ヒドロキシブチリデン）－３，５，５－トリメチル－２－シクロヘキセン－１－オン

また、バレイショ葉中にはタバコ葉中では検出できなかった3－ヒドロキシ－β－イオノール（５０）が大量に存在する。５０は良い芳香を有しており、タバコの香喫味改良剤としてバレイショ葉から抽出、利用が期待できると考える。

このように、配糖体成分はナス科植物の代表的なものであるバレイショ、タバコに多量に存在していることが判明した。さらに、他植物についても探索を試みることができれば、より有用な化合物が得られると考える。

第三章

葉たばこ中に含まれるテルペン配糖体

第一節

葉たばこ不揮発性成分の分画および酵素を用いた配糖体の検索

児玉らの方法[48]をもとに図３－１に示す方法を用いて配糖体の単離を行った。すなわち米国産黄色種葉たばこ（ＯＣＬ）の乾燥物をＭｅＯＨに浸漬し抽出したものを減圧濃縮し、水とヘキサンで分配した後水層をｎ－ブタノールで抽出した。このものを減圧濃縮後、多孔性樹脂ＨＰ－２０にかけ水で遊離の糖等を溶出させた後エタノールを流し溶出してくる画分を集め濃縮した。これを水とエーテルで分配し、水層を活性炭カラムにかけさらにシリカゲルカラムにかけた。こののち高速液体クロマトグラフィー、誘導体化を行って配糖体の単離を行い、６種のアセチル化物 ６７（6 mg）[111]、７０（32 mg）[111]、７３（3 mg）[112]、７６（2 mg）[112]、８２（35 mg）[113]、８６（10mg）を単離した。（図３－１）。

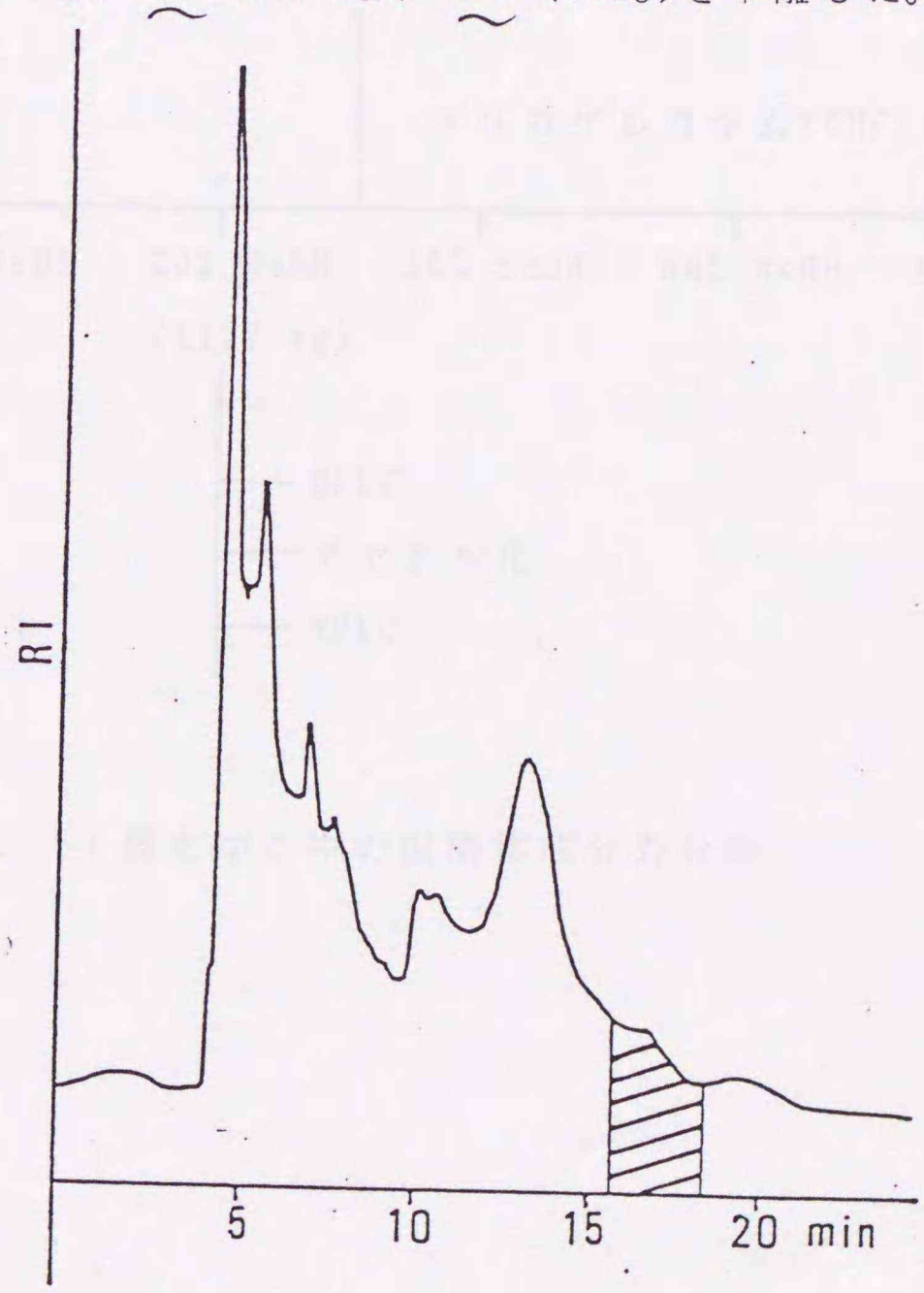


図３－２　アセチル化処理した配糖体成分のＨＰＬＣ

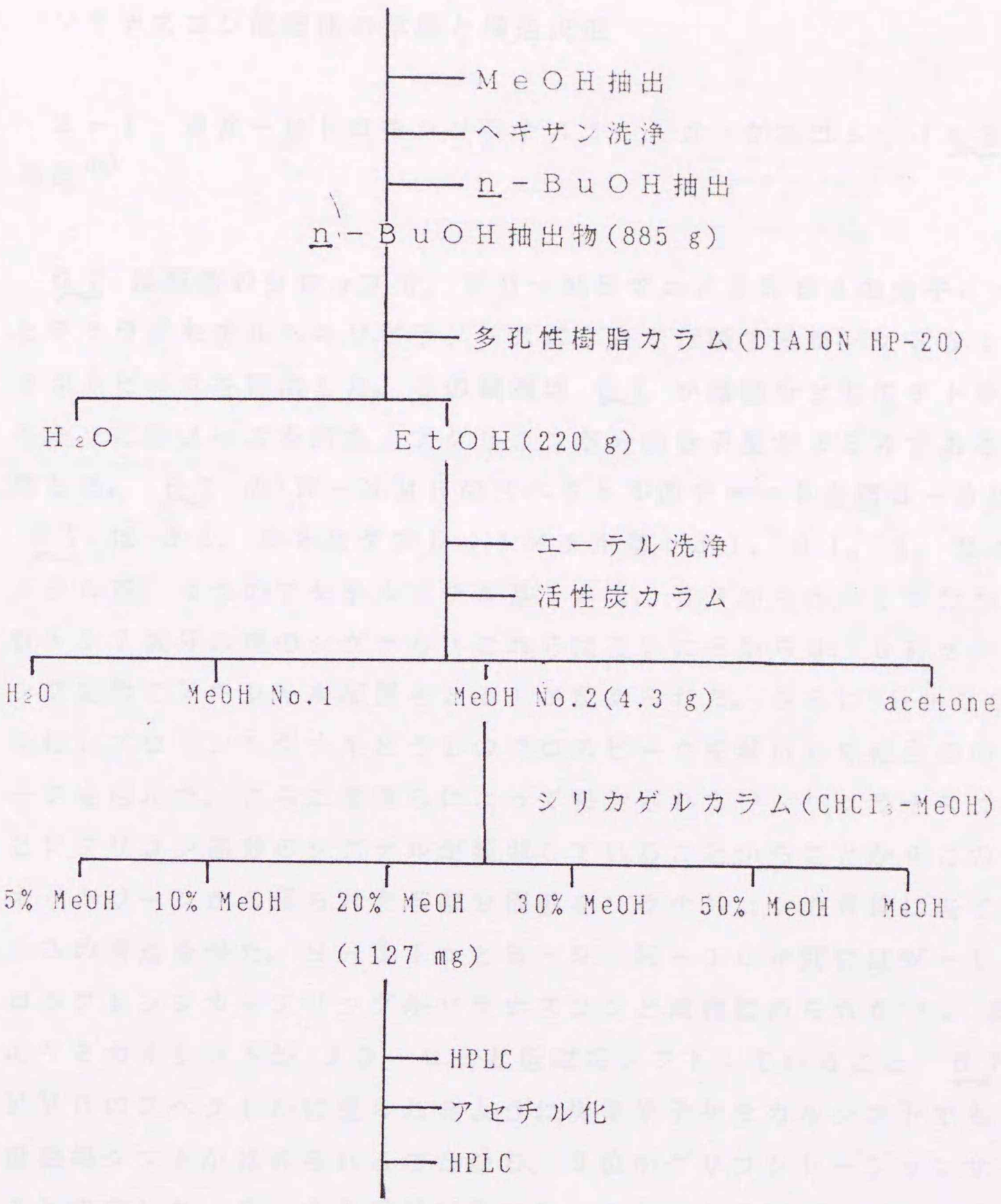


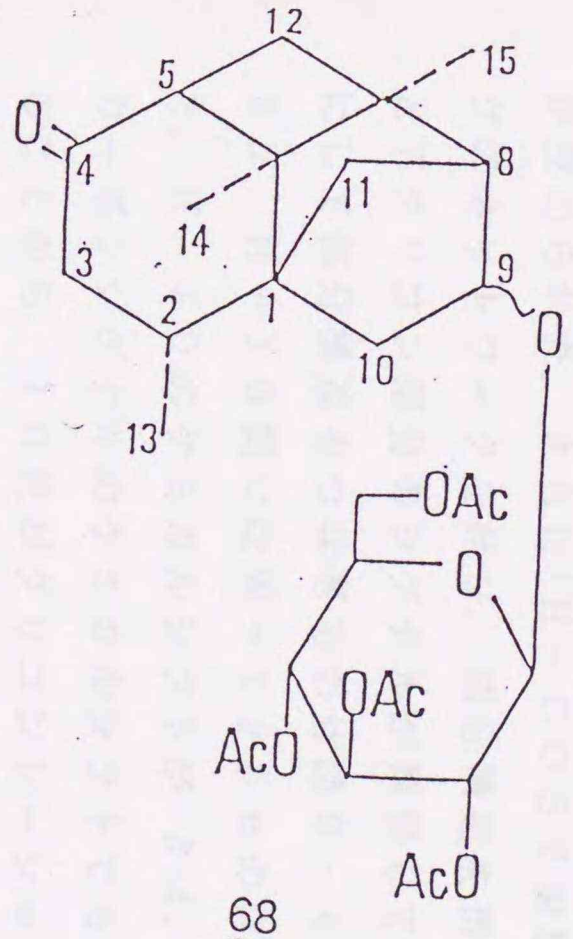
図３－１葉たばこ中の配糖体成分の分画

第二節

ソラナスコン配糖体の単離と構造決定

２－１　９β－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコシド（６８）の構造決定[111)]

６７は無色のシロップで、ＦＤ－ＭＳでｍ／ｚ５６４の分子イオンピークとテトラアセチルヘキソピラノースの存在を示唆するｍ／ｚ３３１のフラグメントピークを観測した。この観測は６７が糖部分としてテトラアセチルヘキソピラノースを持ち、アグリコン部分の分子量が２３４であることを示唆した。６７の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルのチャートを図３－３に示した。６７はδ１．０８にダブレットメチル基、δ１．０１，１．２４に核間のメチル基、４つのアセチルメチル基、δ３．６６から５．１７にかけてのプロトン７個分の糖のシグナル（これらは互いに８から９．９Ｈｚのカップリング定数でアキシャル配置をとる）が認められた。さらに^{1}Ｈ－ＣＯＳＹ実験を行いプロトンシグナルどうしのクロスピークを解析して結合ののネットワークを結んだ。さらに藤森らによって報告された[98, 99)]ソラナスコン（６６）とアグリコン部分のシグナルが類似していることからことからこのプロトンネットワークから得られた各部分構造をソラナスコンの骨格に当てはめ図９－３の構造を得た。Ｈ－１１αとＨ－９、Ｈ－１０α間にはＷ－ｔｙｐｅのロングレンジカップリングがソラナスコンと同様認められた[99)]。またＨ－９のケミカルシフトがδ３．９６と低磁場シフトしていること、６７の^{13}Ｃ－ＮＭＲのスペクトルに見られるように炭素原子ケミカルシフトでもＣ－９の低磁場シフトが認められることから、９位がグリコシレーションサイトであると決定した。Ｈ－９の相対配置はＨ－１１αとのＷ－ｔｙｐｅのロングレンジカップリングが認められたことからからα配置と決定した。これらのことから６７は９β－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコピラノシルーテトラアセテートと決定した。したがって、アセチル化する前の構造は９β－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコピラノシド（６８）と決定した。



68

1'-H anomeric J = 8.0 Hz

500 MHz in $CDCl_3$

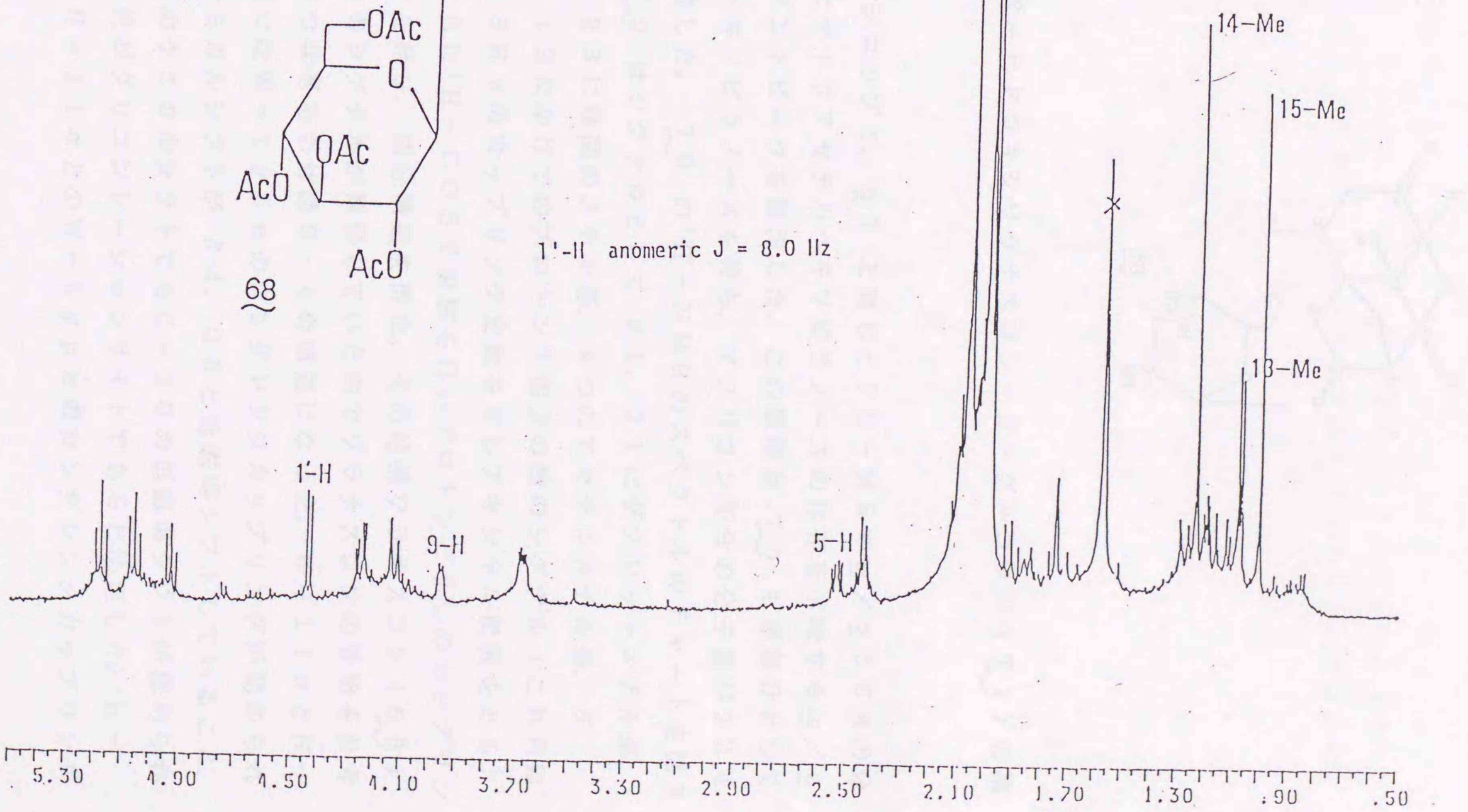
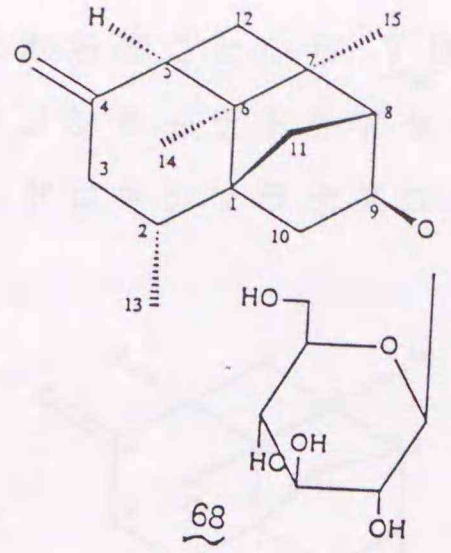


図3－3　68 の ^1H－NMR　500MHz　in　$CDCl_3$

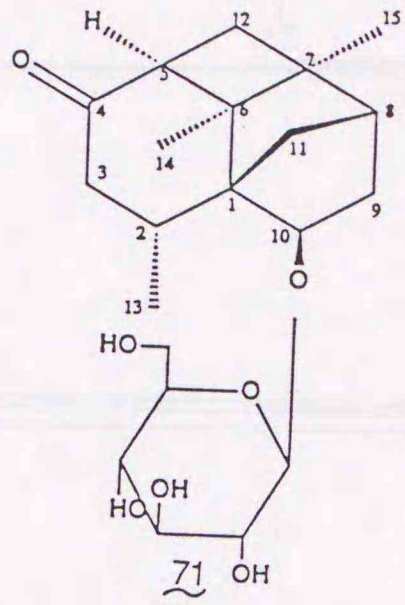


68

２－２　１０β－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコシド（７１）の構造決定[111)]

７０は無色のシロップで、６７と同じくＦＤ－ＭＳでｍ／ｚ５６４の分子イオンピークとテトラアセチルヘキソピラノースの存在を示唆するｍ／ｚ３３１のフラグメントピークを観測した。この観測は７０も糖部分としてテトラアセチルヘキソピラノースを持ち、アグリコン部分の分子量が２３４であることを示唆した。７０の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルのチャートを図３－４に示した。７０はシグナルとしてδ１．２１にダブレットメチル基、δ０．９６，１．２３に核間のメチル基、４つのアセチルメチル基、δ３．６４から５．１９にかけてのプロトン７個分の糖のシグナル（これらは互いに８から９．８Ｈｚのカップリング定数を示しアキシャル配置をとる）が認められた。さらに^{1}Ｈ－ＣＯＳＹ実験を行いプロトンどうしのカップリングのネットワークを結び、部分構造を得た。その結果ソラナスコン（６６）とアグリコン部分のシグナルが類似していたのでソラナスコンの骨格を参考にして部分構造をつなぎあわせ図９－４の構造になった。Ｈ－１１αとＨ－９α、Ｈ－１０間にはＷ－ｔｙｐｅのロングレンジカップリングが認められた。Ｈ－１０のケミカルシフトがδ４．０５と低磁場シフトしていること、カーボンシグナルのケミカルシフトでもＣ－１０の低磁場シフトが認められることから、１０位がグリコシレーションサイトであると決定した。Ｈ－１０の相対配置はＨ－１１αとのＷ－ｔｙｐｅのロングレンジカップリング

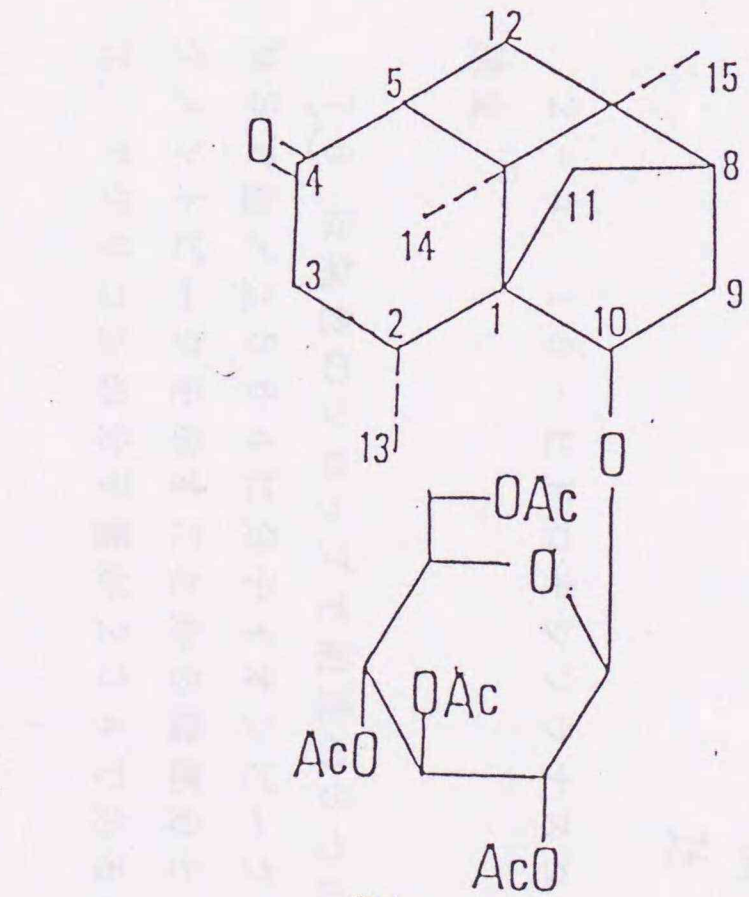
からα配置と決定した。これらのことから 70 は10β-ヒドロキシソラナスコン-β-グルコピラノシル-テトラアセテートと決定した。すなわちもとの構造は 10β-ヒドロキシソラナスコン-β-グルコピラノシド(71)と決定した。



71

2-3 13-ヒドロキシソラナスコン-β-グルコシド(74)の構造決定[112)]

73 は無色のシロップでFD-MSでm/z564に分子イオンピークを示し、さらにm/z331のテトラアセチルヘキソースの特徴的なフラグメントピークを示した。73 が糖部分としてテトラアセチルヘキソピラノースを有し、アグリコンの分子量が234であることを示唆した。73 の^{1}H-NMRのスペクトルのチャートを図3-5に示した。73 は^{1}H-NMRでδ1.01、δ1.24に核間メチル、4つのアセチルメチル、δ3.67, 3.71にハイドロキシメチル基のシグナルが観測され、δ3.6から5.3にかけてカップリング定数が7.8から9.8Hzのアキシャルカップリングをする糖部分のリングプロトンに由来するシグナルも観測された。糖のアノメリックプロトン(δ4.49)のカップリング定数が8Hzであることから 73 はアセチル化されたβ-グルコシドであることが判明した。このことは 73 がNH$_3$-MeOH処理で脱アセチルされ、さらにβ-グルコシダーゼでアグリコンとグルコースに加水分解されることからも支持され



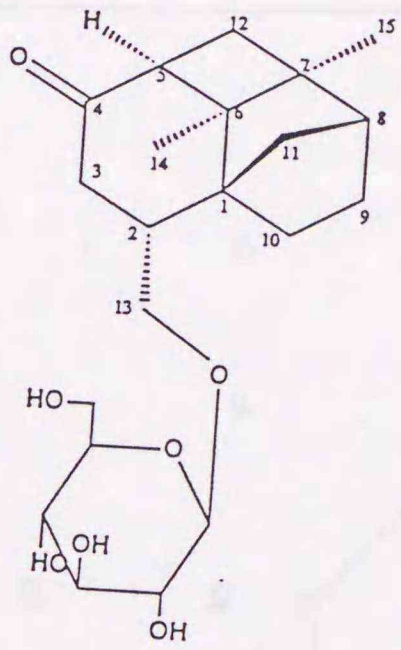
71

1'-H anomeric J = 8.0 Hz

図３－４ 71 の^{1}H－NMR ５００MHz in CDCl$_{3}$

た。

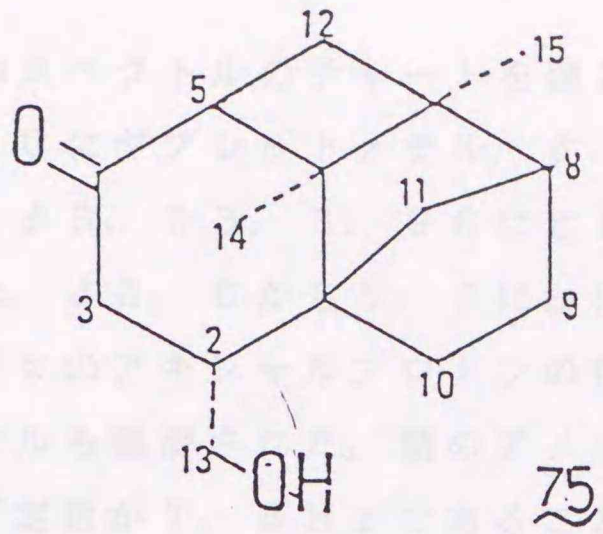
7～4 の酵素加水分解により得られたアグリコン 7～5 は ＥＩ－ＭＳで m／z ２３４に親ピークを与え、さらにＨＲ－ＭＳによって分子式 $C_{15}H_{22}O_2$が与えられた。このもののプロトンＮＭＲのスペクトルはソラナスコン（6～6）とよく似ていた。ソラナスコン（6～6）の１５位のメチル基に相当するシグナルが 7～5 ではない代わりにδ３．６７、３．７１のヒドロキシメチル基のシグナルが観測された。このことと 7～5 の分子量がソラナスコン（6～6）よりも１６多いことから 7～5 はソラナスコンが一カ所水酸化を受けた構造と考えた。さらにプロトン同士のシフト相関を調べ（図３－５）、7～5の構造を１３－ヒドロキシソラナスコンと決定した。7～5 の相対配置はＮＯＥ実験によりソラナスコン（6～6）と同じであることが判明した。故に配糖体の構造は １３－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコピラノシド（7～4）と決定した。



7～4

２－４　１５－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコシド（7～7）の構造決定[112)]

7～6 は無色のシロップで前述の３つのソラナスコン配糖体と同様にＦＤ－ＭＳで m／z ５６４に分子イオンピークを示し、さらに m／z ３３１のフラグメントピークを示すことから糖部分としてテトラアセチルヘキソピラノース、アグリコンの分子量が２３４であることが示唆された。7～6 の ^1H－



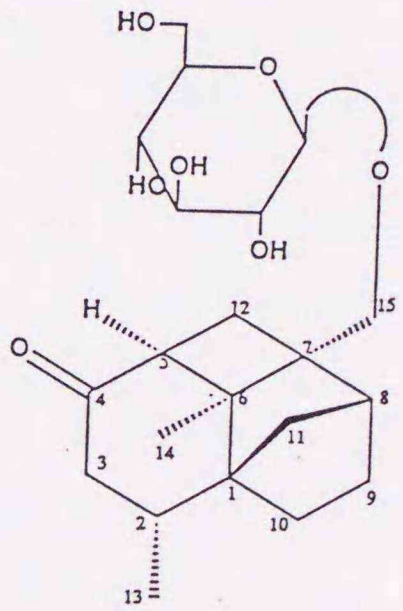
75

図3－5　75　の^{1}H－NMR　500 MHz　in　CDCl$_3$

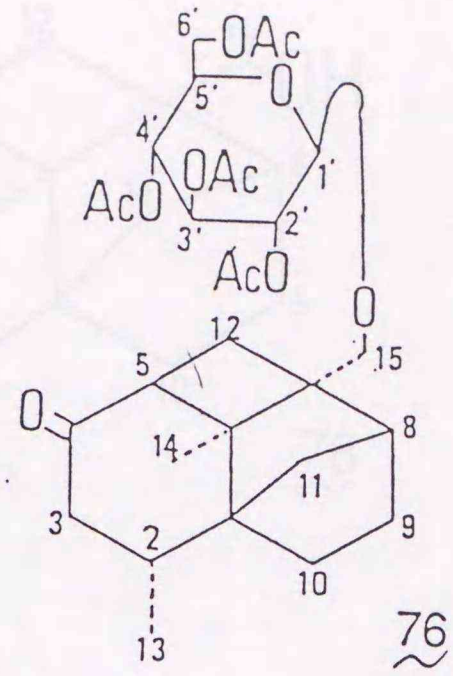
^{1}H－COSY　-135-

ＮＭＲのスペクトルのチャートを図３－６に示した。７６は^{1}Ｈ－ＮＭＲでδ１．１０にダブレットメチル、δ１．３３に核間メチル、４つのアセチルメチル、δ３．５３，３．９６にヒドロキシメチル基に由来するシグナルが観測され、δ３．６から５．３にかけてカップリング定数が７．８から９．８Ｈｚのアキシャルプロトンの存在を示唆する糖部分のリングプロトンのシグナルも観測された。糖のアノメリックプロトン（δ４．４９）のカップリング定数が７．８Ｈｚであることから７６はアセチル化されたβ－グルコシドであることが判明した。このことは７６がＮＨ$_3$－ＭｅＯＨ処理で脱アセチルされ、さらにβ－グルコシダーゼでアグリコン（７８）に加水分解されることからも支持された。

このアグリコン７８はＥＩ－ＭＳでｍ／ｚ２３４に分子イオンピークを与え、さらにＨＲ－ＭＳによって分子式$C_{15}H_{22}O_2$が与えられた。７８の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルのチャートを図３－７に示した。このもののスペクトルはソラナスコン（６６）とよく似ていた。異なるのはソラナスコン（６６）の１５位のメチル基に相当するシグナルがない代わりにδ３．７７のヒドロキシメチル基のシグナルが有ることであった。このことと７８の分子量がソラナスコンよりも１６多いことから、７８はソラナスコン（６６）が一カ所水酸化を受けた構造と考えた。さらにプロトン同士のシフト相関を調べ（図３－７）、７８の構造を１５－ヒドロキシソラナスコンと決定した。７８の相対配置はＮＯＥ実験によりソラナスコンと同じであることが判明した。故にこの配糖体の構造は１５－ヒドロキシソラナスコン－β－グルコピラノシド（７７）と決定した。



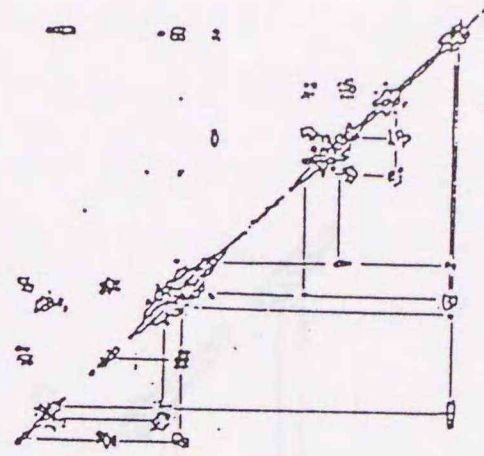
７７



76

FD-MS m/z 564 (M^+)

$[\alpha]_D$ -14.0 (c=0.08, EtOH)



H-1' anomeric J=7.80 Hz

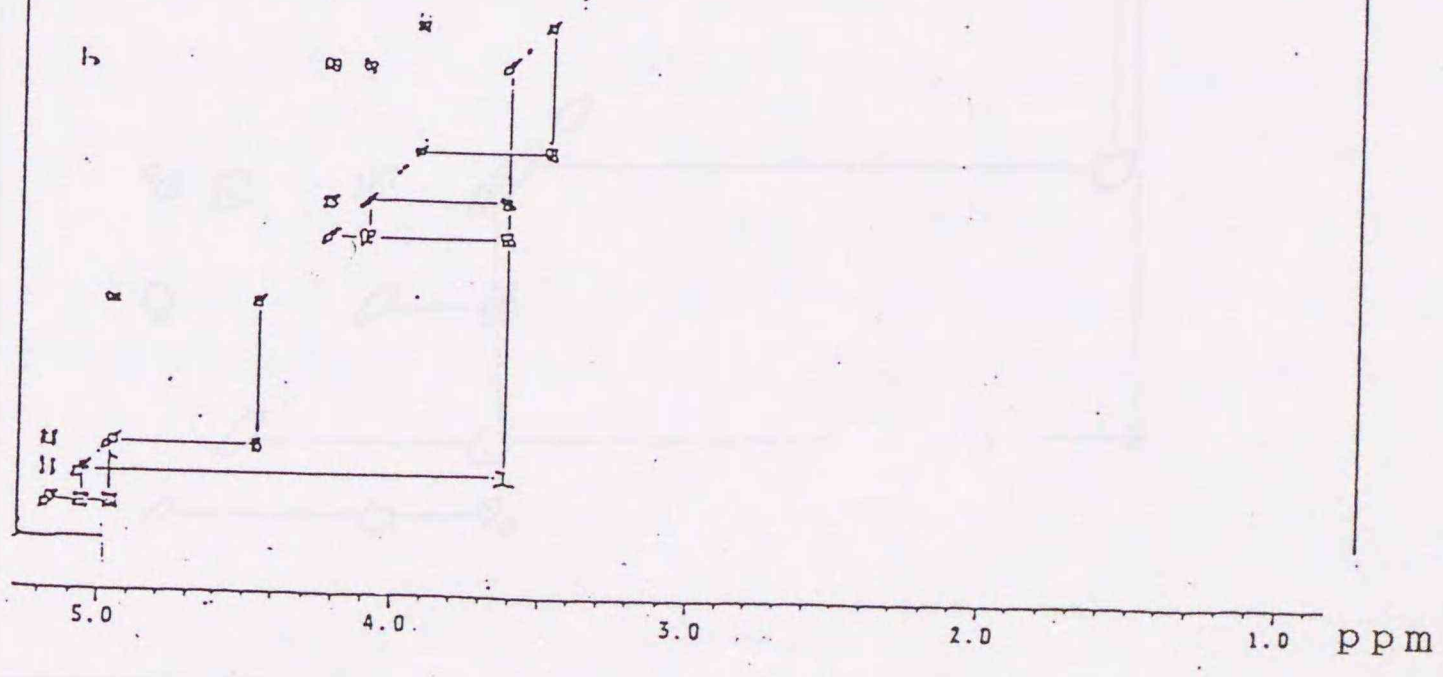
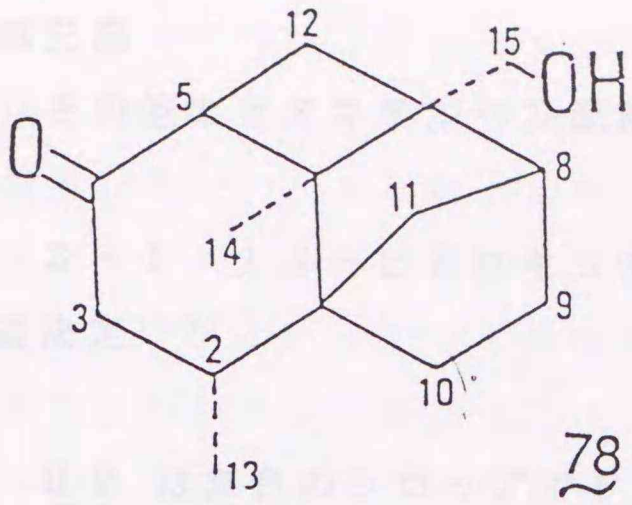


図3-6 76 の ^{1}H-NMR 500MHz in $CDCl_3$



78



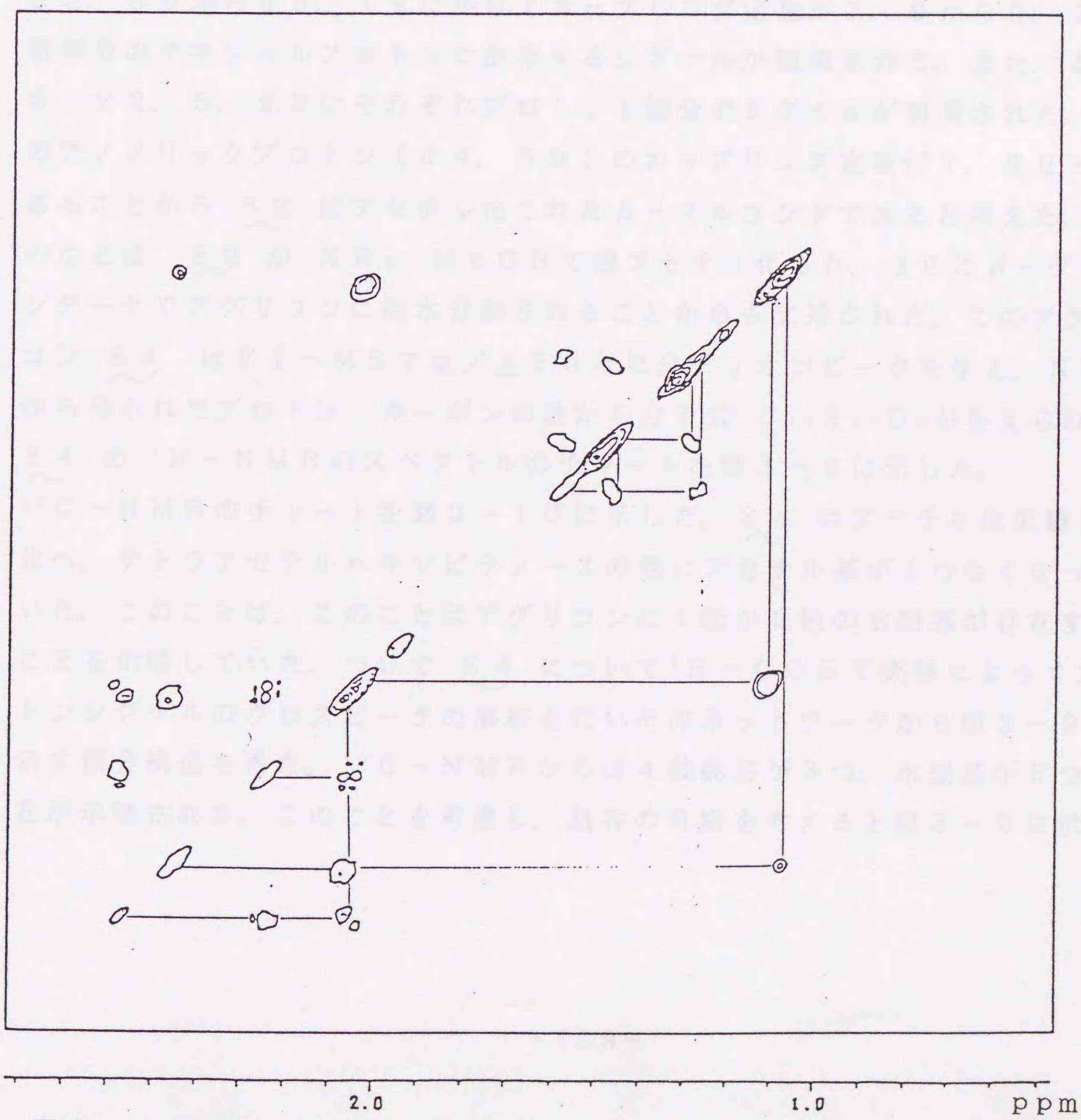


図3－7　78 の ^{1}H－NMR　500 MHz in $CDCl_3$

第三節

その他のセスキテルペン配糖体

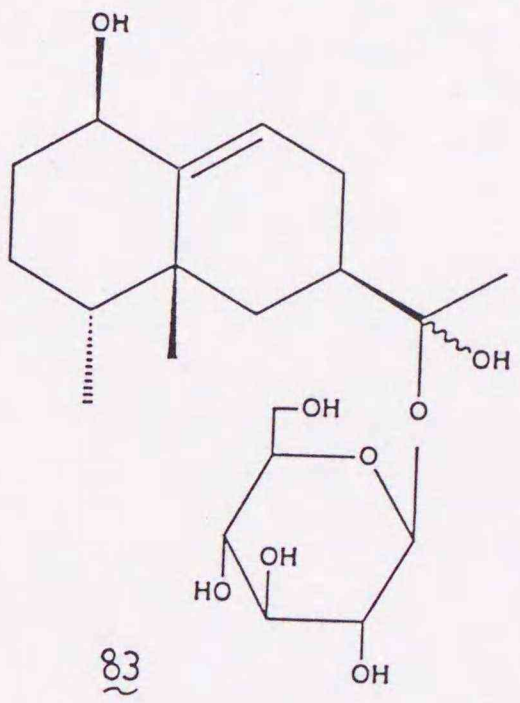
３－１　１β－ヒドロキシデブネイオール－β－グルコシド（８３）の構造決定[113)]

８２は無色のシロップでＦＤ－ＭＳでｍ／ｚ６２６に分子イオンピークとｍ／ｚ３３１のフラグメントイオンピークを示した。このことから８２は糖部分としてテトラアセチルヘキソピラノースを有し、アグリコンの分子量が２９６であることを示唆した。８２の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルのチャートを図３－８に示した。８２は^{1}Ｈ－ＮＭＲでδ０．９２にダブレットメチル、δ１．０４、１．２２に核間のメチル、５つのアセチルメチル、δ３．４０、３．７７にヒドロキシメチル基に由来するシグナルが観測され、δ３．６９からδ５．１８にかけてカップリング定数が７．９から９．７の糖部分のアキシャルプロトンに由来するシグナルが観測された。また、δ５．２２、５．９３にそれぞれプロトン１個分のシグナルが観測された。糖のアノメリックプロトン（δ４．５０）のカップリング定数が７．９Ｈｚであることから８２はアセチル化されたβ－グルコシドであると考えた。このことは８２がＮＨ$_{3}$－ＭｅＯＨで脱アセチル化され、さらにβ－グルコシダーゼでアグリコンに加水分解されることからも支持された。このアグリコン８４はＥＩ－ＭＳでｍ／ｚ２５４に分子イオンピークを与え、ＮＭＲから得られたプロトン、カーボンの数から分子式 $C_{15}H_{22}O_{2}$が与えられた。８４の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルのチャートを図３－９に示した。

^{13}Ｃ－ＮＭＲのチャートを図３－１０に示した。８４はアセチル化配糖体に比べ、テトラアセチルヘキソピラノースの他にアセチル基が１つなくなっていた。このことは、このことはアグリコンに１級か２級の水酸基が存在することを示唆していた。ついで８４について^{1}Ｈ－ＣＯＳＹ実験によってプロトンシグナルのクロスピークの解析を行いそのネットワークから図３－９に示す部分構造を得た。^{13}Ｃ－ＮＭＲからは４級炭素が３つ、水酸基が３つ存在が示唆された。このことを考慮し、既存の骨格を考えると図３－９に示す

１位、１１位、１２位に水酸基のはいったエレモフィラン骨格がこの部分構造と適合した。この平面構造はＷｈｉｔｅｈｅａｄが N. tabacum から単離報告した[100] １－ヒドロキシ－β－デブネイオール（８４）と一致した。デブネイオール類は最初にＴＮＶに感染した N. debnyi から抗菌活性を有するセスキテルペンとして単離構造決定された[101]。このものは、天然にはめずらしいトランスエレモフィラン骨格を有する。８４は N. tabacumのカルスからもファイトアレキシンとして単離され[102]、その後、３環性のもの[103]、酸化されたものが単離構造決定されている[100]。ついでＮＯＥ測定を行い図３－１１に示す結果を得、８４の相対配置がずのようであることを確認した。また、１位の水酸基の相対配置は図３－１２に示すようにエレモフィラン型の骨格を有するもので８４に類似のものについてその^{1}Ｈ－ＮＭＲの特徴的なシグナルのケミカルシフトを比較検討した。９１ａ、９１ｂの１位水酸基の付け根のプロトンのケミカルシフトのうち８４のそれは（δ４．２３）、１βヒドロキシ体の９１ｂと近いこと、３位のアキシャルプロトンのケミカルシフトがδ２．３４と１位水酸基とシスーアキシャルの関係にあって低磁場シフトしていることから８４は１β－ヒドロキシデブネイオールと同定した。

したがってこの配糖体の構造を１β－ヒドロキシデブネイオール－β－グルコシド（８３）と決定した。

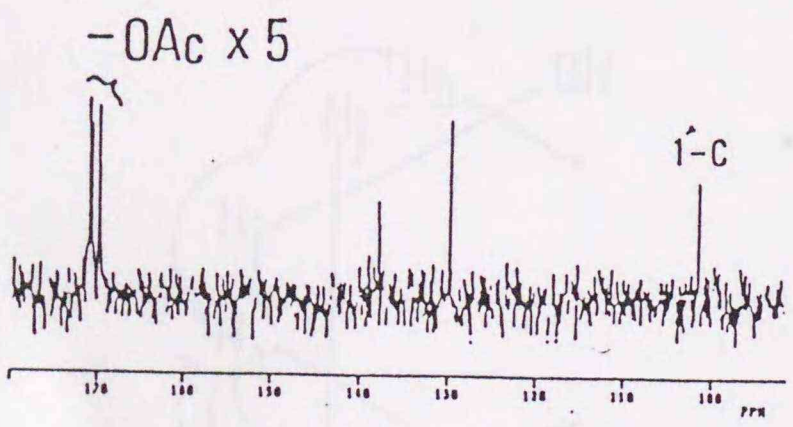


８３

３－２　メトキシフィチュベロール－β－グルコシド（８６）の構造決定

125 MHz ^{13}C-NMR

in $CDCl_3$



colorless oil

FD-MS m/z 626 (M^+)
331 (tetraacetylated hexose unit)

$C_{31}H_{46}O_{13}$

500 MHz ^1H-NMR

in $CDCl_3$

図3－8 82 の ^1H－NMR 500 MHz in $CDCl_3$

500 MHz ^{1}H－NMR
in $CDCl_3$

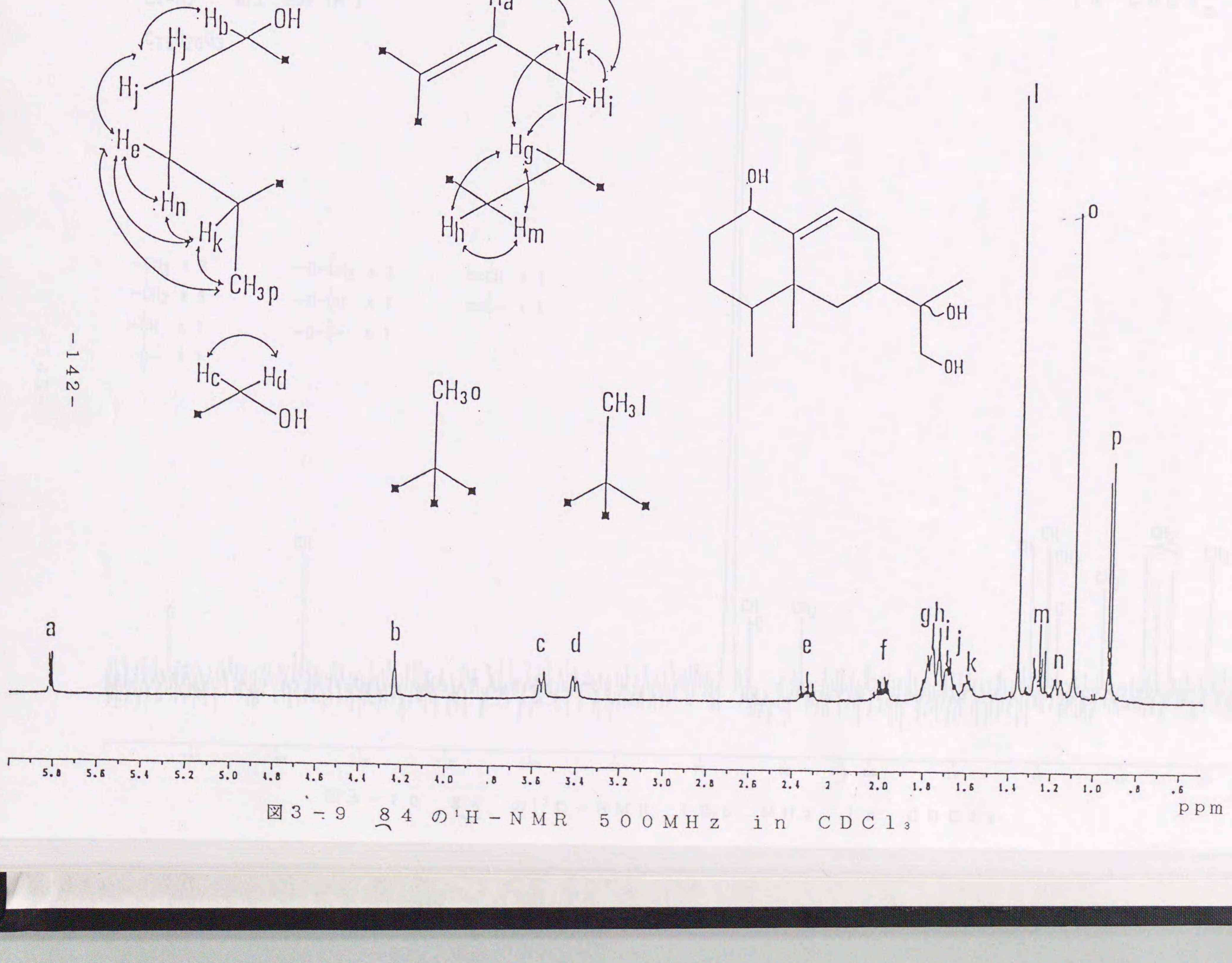


図３－９　84 の ^{1}H－NMR　500MHz　in $CDCl_3$

colorless oil

EI-MS m/z 254 (M^+)

$C_{15}H_{26}O_3$

$-CH_3$ x 3
$-\overset{|}{C}H_2$ x 5
$-\overset{|}{C}H$ x 1
$-\overset{|}{C}-$ x 1

$-O-\overset{|}{C}H_2$ x 1
$-O-\overset{|}{C}H$ x 1
$-O-\overset{|}{C}-$ x 1

$=\overset{|}{C}H$ x 1
$=\overset{|}{C}-$ x 1

125 MHz ^{13}C-NMR

in $CDCl_3$

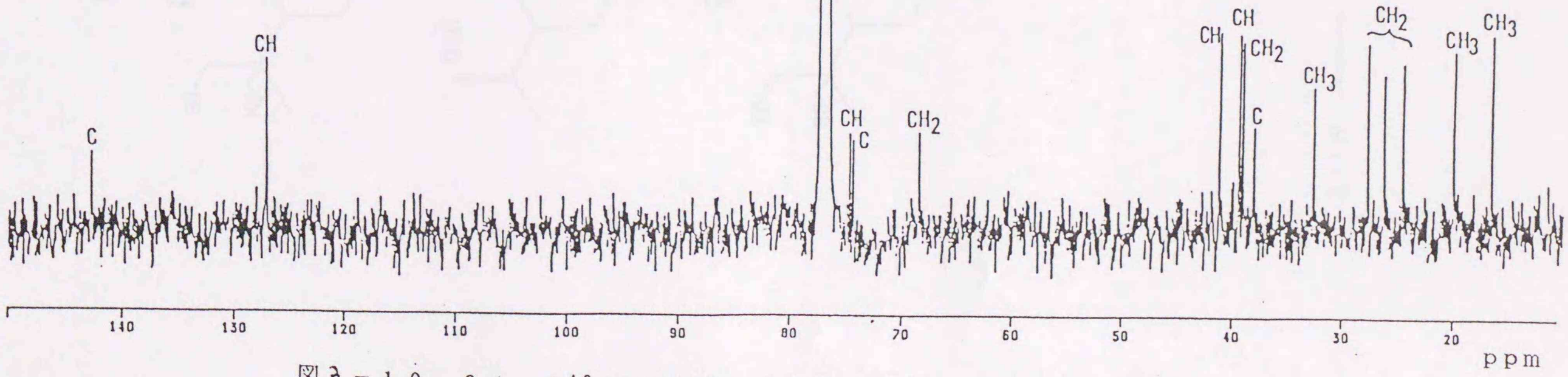


図3－10 84 の ^{13}C－NMR 125 MHz in $CDCl_3$

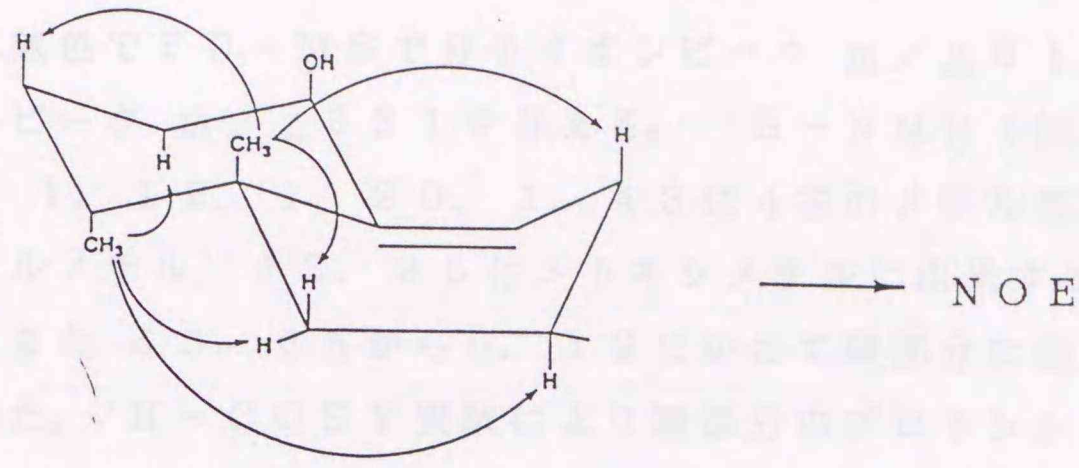


図３－１１　８４　のＮＯＥ

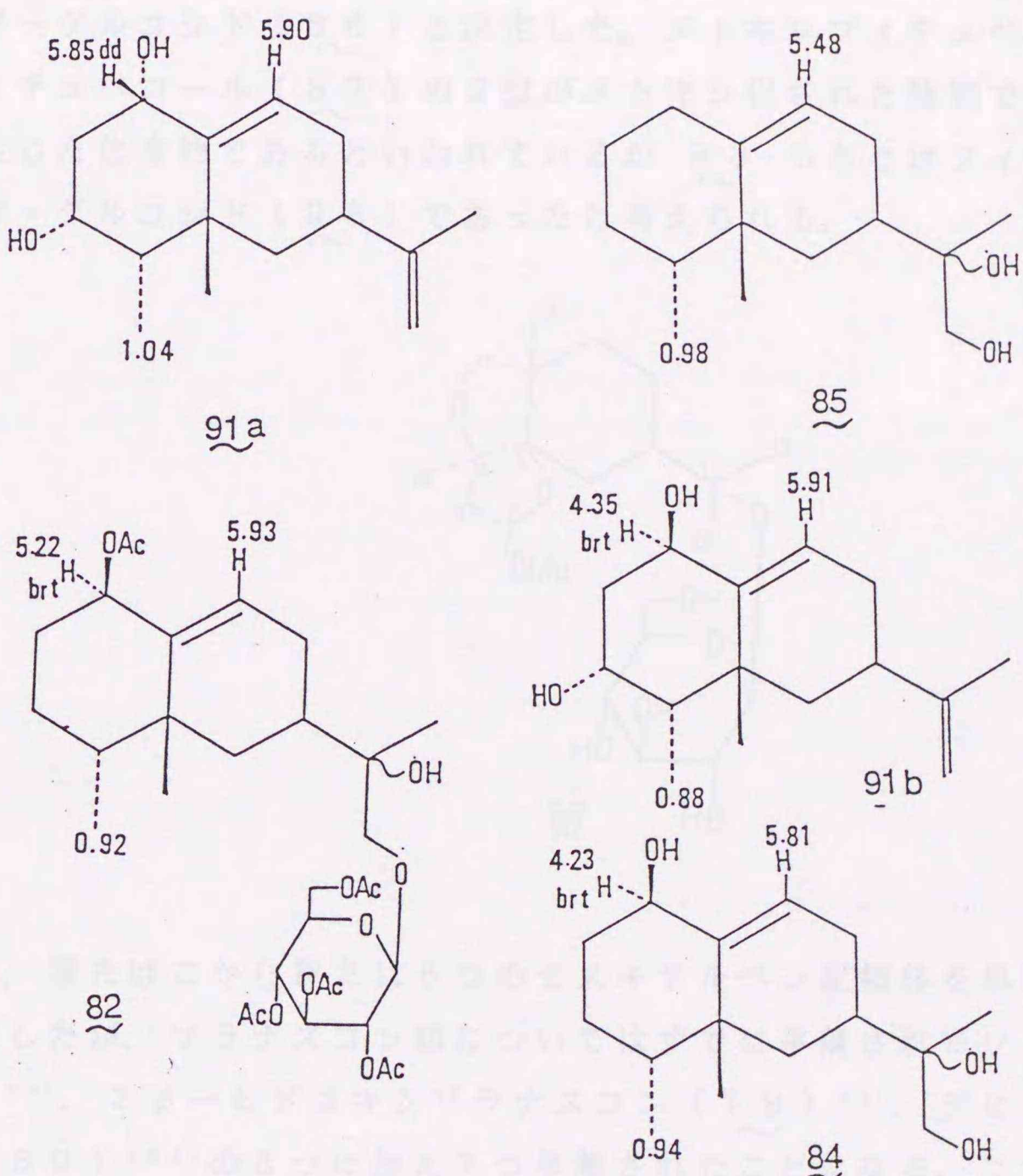
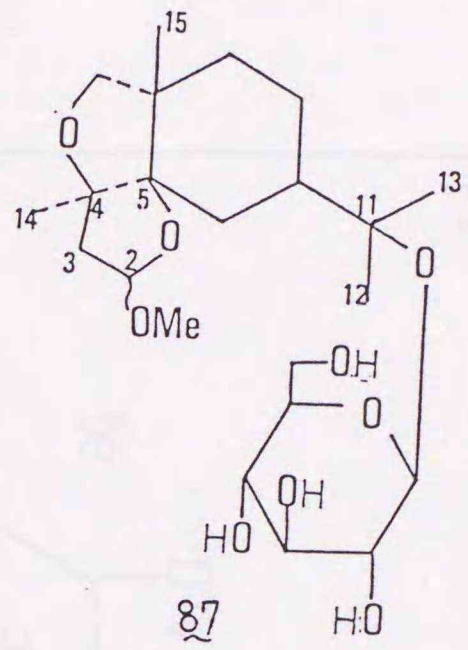


図３－１２　８２　の類縁化合物

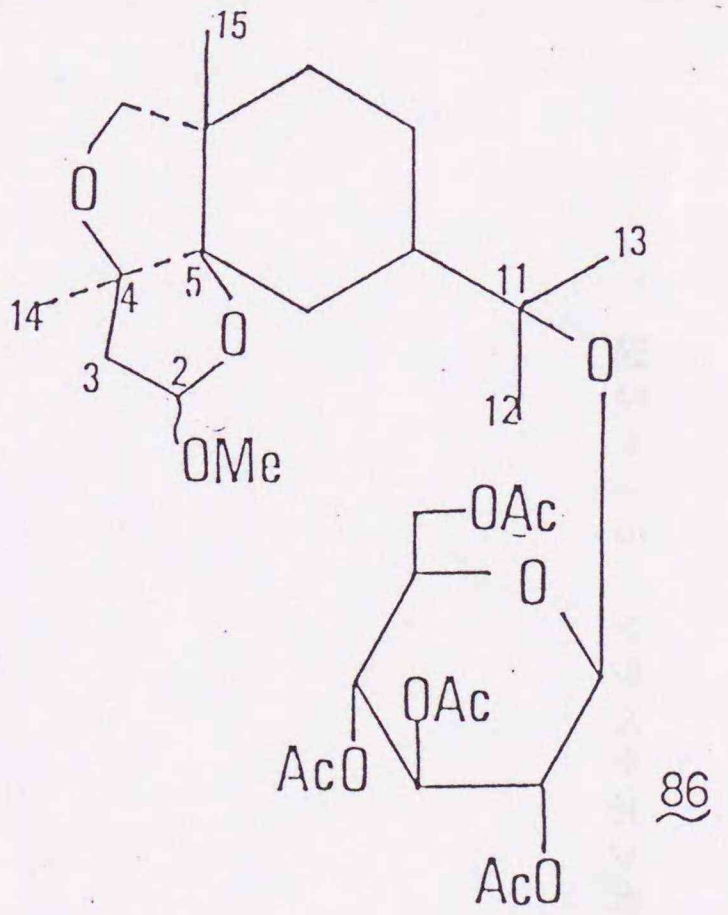
化合物 86 は無色でFD－MSで分子イオンピーク m／z６１４ とフラグメントイオンピーク m／z３３１を与える。 ^{1}H－NMR（図３－１３）では δ１．０２、１．１２、１．２０、１．４３に４本のメチル基のシグナル、４つのアセチルメチル、δ３．３５にメトキシメチルに由来するシグナルが観測された。また δ３．６５から５．１９にかけて糖部分に由来するシグナルが観測された。^{1}H－COSY実験により糖部分のプロトンシグナルを帰属し、糖のアノメリックプロトンのカップリング定数が７．９Hzであったことから糖部分はβ－グルコシドであると考えた。^{1}H－NMRの残りのシグナルと 86 の分子イオンピークから逆算した分子量２８４は高木らが単離した[32] メトキシフィチュベロール（88）の^{1}H－NMRのスペクトルとほぼ一致した。このことからこの配糖体の構造をメトキシフィチュベロール－β－グルコシド（86）と決定した。メトキシフィチュベロール（88）はフィチュベロール（87）の２位がメトキシ化された物質で抽出、精製過程で生じた化合物であるといわれているが 88 もともとはフィチュベロール－β－グルコシド（98）であったと考えられる。



87

考察

以上、葉たばこから新たに６つのセスキテルペン配糖体を単離しその構造を決定したが、ソラナスコン類についてはすでに単離されたソラナスコン（66）[98]、３β－ヒドロキシソラナスコン（79）[99]、デヒドロソラナスコン（80）[104]の３つに加え７つ単離されたことになる。これらの^{13}C－



86

OMe

1'-H anomeric J = 7.9 Hz

500 MHz in $CDCl_3$

図3－13　86 の^{1}H－NMR　500MHz　in　$CDCl_3$

ＮＭＲの比較表をそれぞれ表３－１に示した。

これらのうち 6̃6 や 7̃9 はその前駆体のソラベチボン（8̃1）、３－ヒドロキシソラベチボン（5̃9）を光環化することにより[98、99]生成することが報告されているが、今回単離した １５－ヒドロキシソラナスコン（7̃8）についても １３－ヒドロキシソラベチボン（6̃0）をメタノール中で光照射することによりほぼ定量的に 7̃8 に変換されることを確認した （図３－１４）。図３－１５に示すように、ＡからＥまでマークした位置に水酸基のあるソラベチボンが、いままでに単離されたソラナスコンに変換されるが現在までにＢ、ＤとＥの位置に水酸基のあるソラベチボンの存在は確認されていない。このことからソラナスコンの水酸化、配糖体化はソラベチボンからの変換後に行われる可能性が考えられた。

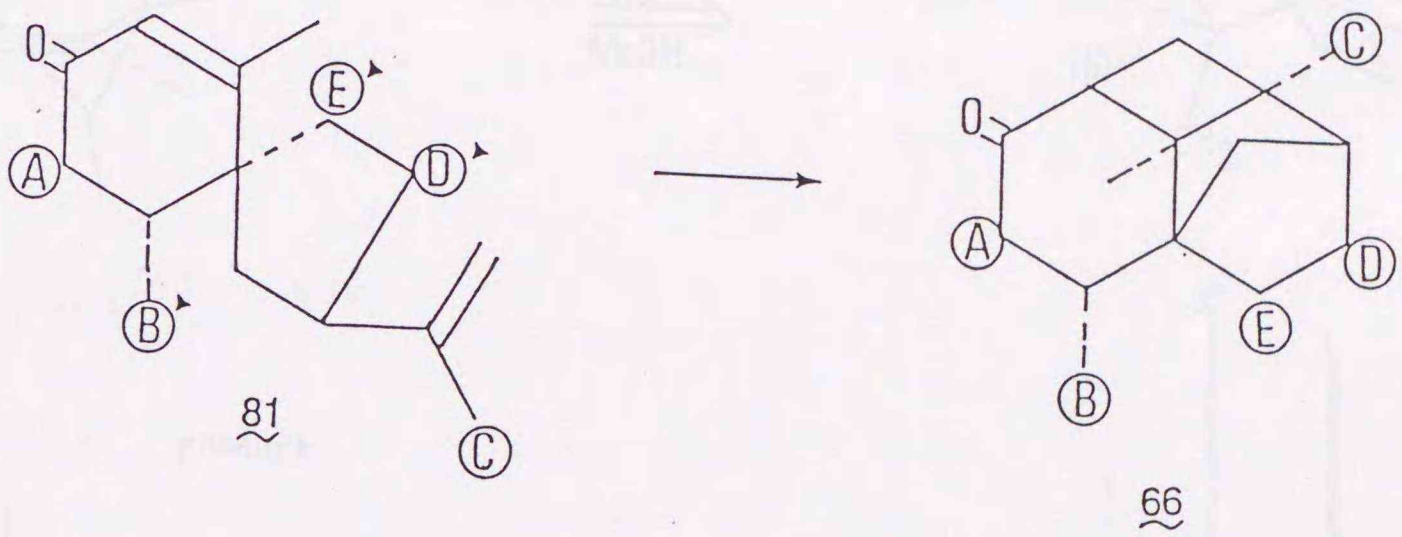
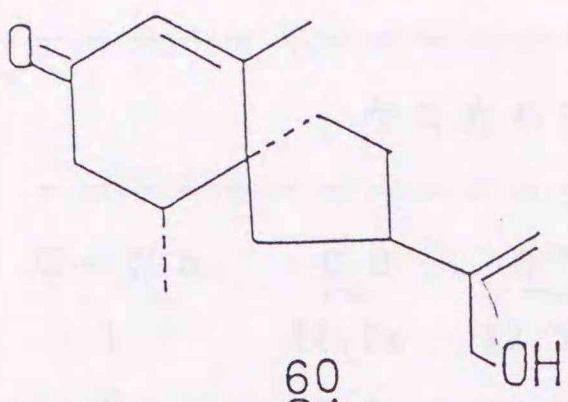


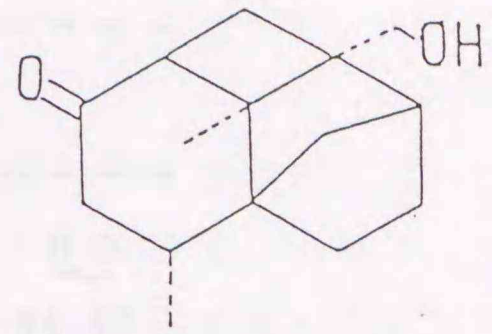
図３－１５　ソラベチボン骨格からソラナスコン骨格への変換



60

13-Hydroxysolavetivone

III

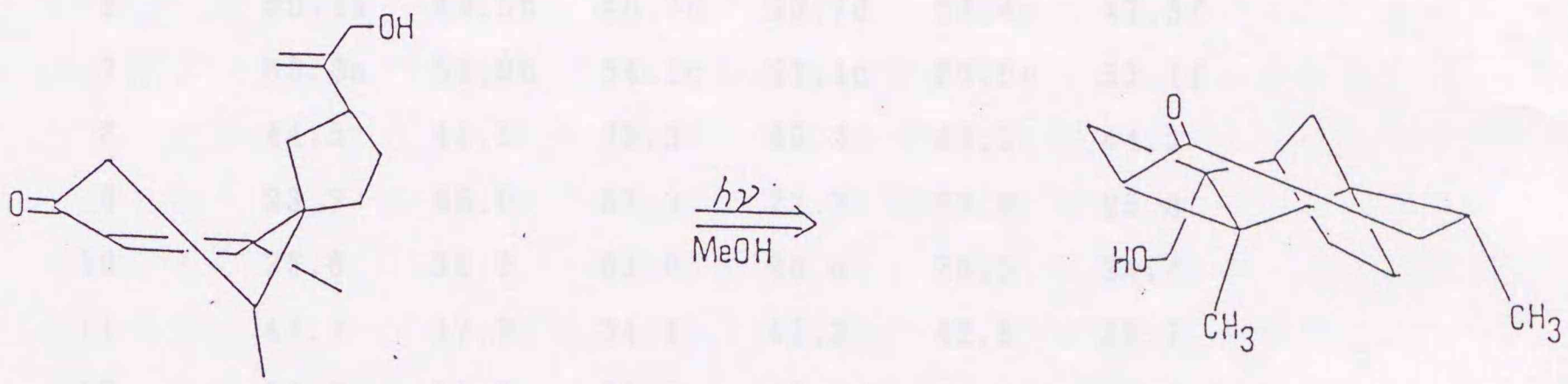


78

15-Hydroxysolanascone

(P-2)

III



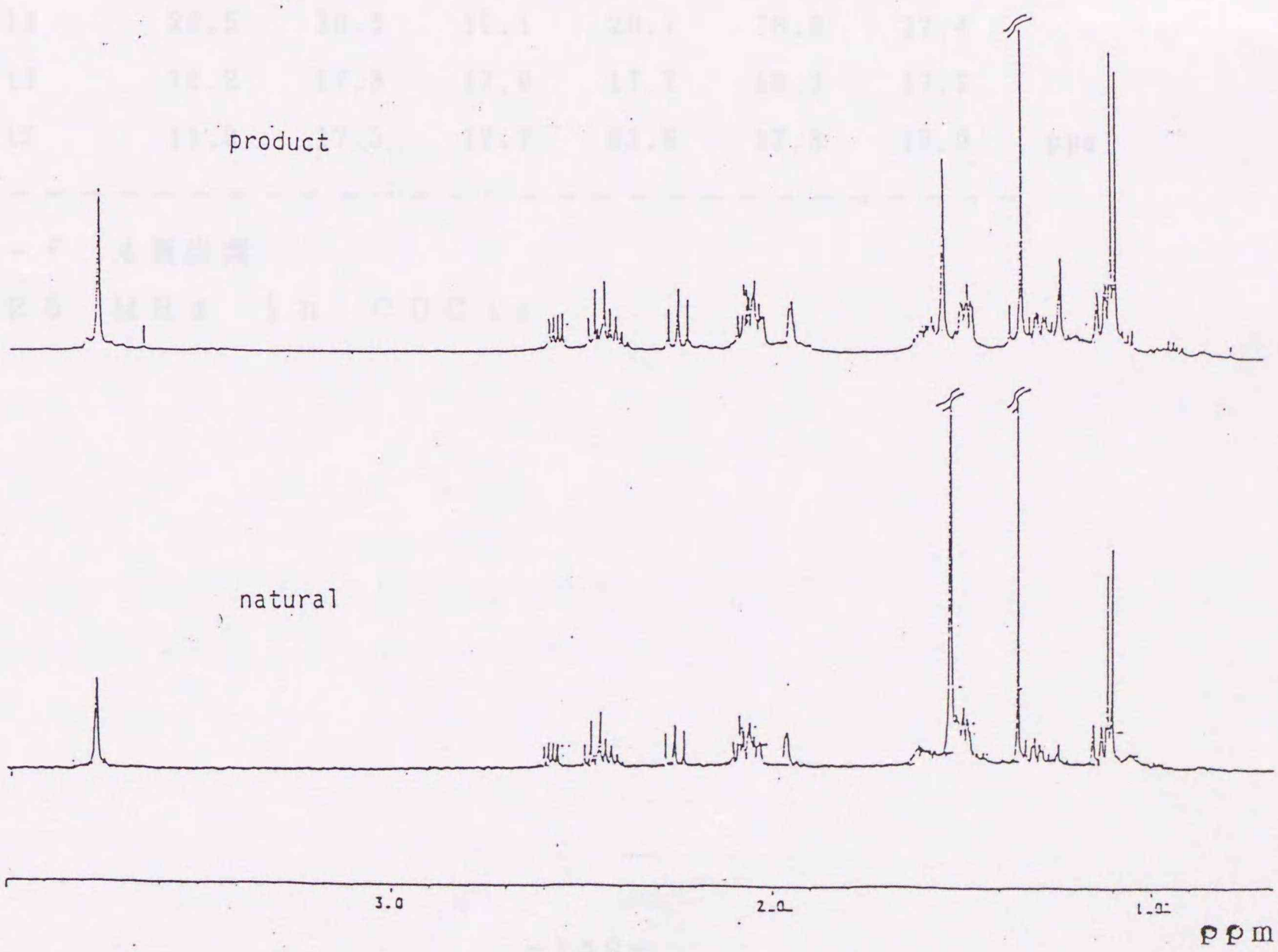


図３－１４　60 から 70 への光環化

表３－１　ソラナスコン類の^{13}Ｃ－ＮＭＲ　ケミカルシフト

	ケミカルシフト					
C－No.	66	67	70	77	79	80
1	46.2a	43.3b	45.1c	50.3d	46.2e	44.6f
2	37.3	36.5	33.4	36.8	45.0	165.6
3	46.7	46.2	46.5	46.5	88.5	126.6
4	219.3	213.4	213.5	213.6	213.6	202.1
5	49.1	48.6	48.0	49.4	48.2	47.0
6	50.1a	49.5b	48.7c	50.7d	50.4e	47.5f
7	50.8a	50.9b	54.1c	51.1d	50.9e	53.1f
8	44.5	49.5	43.3	40.2	44.3	44.3
9	23.7	68.0	37.3	23.2	23.0	25.8
10	26.6	39.0	61.8	26.6	26.5	24.4
11	43.3	37.0	34.4	43.2	42.9	36.7
12	34.8	34.6	33.8	30.6	33.8	48.4
13	20.5	20.5	19.1	20.7	18.0	22.4
14	18.2	17.8	17.9	17.7	18.3	17.9
15	17.8	17.5	17.7	63.6	17.8	17.9 ppm

a－f　４級炭素

１２５　ＭＨｚ　ｉｎ　ＣＤＣｌ$_3$

第四章

水耕およびれき耕培養によるタバコ根浸出物中のセスキテルペン[117]

高等植物の根からは、ある種の化学物質が分泌され根圏の微生物に対して制御をしているという考えのもとでの物質探索はいくつかの植物で行われてきた[105]。Ｔａｎｇら[106、107]は、Bigalta limpograss をれき耕培養し途中に吸着樹脂カラムをつけた培養液循環装置を用いて樹脂に吸着したアレロパシー物質の同定を行っている。ナス科の栽培植物はとくに連作障害の原因のひとつとしてがこの根からの外分泌物質ではないかと考えられている[105]。そこでナス科の代表的な栽培植物であるタバコについてその根の外分泌物質について検索を行うことにした。タバコについてはニコチン（９０）が根で生合成され葉に移行し集積することが接き木実験等によって調べられている[108]。また清水らによりタバコ根端培養の実験が行われ、ニコチン（９０）をはじめとするアルカロイド類及びアミノ酸類の培養液中での存在が報告されている[109、110]。しかし、培養液中に存在する疎水性化合物や、さきに述べた葉たばこ中から単離したテルペン配糖体のような親水性の中性化合物は調べられていない。

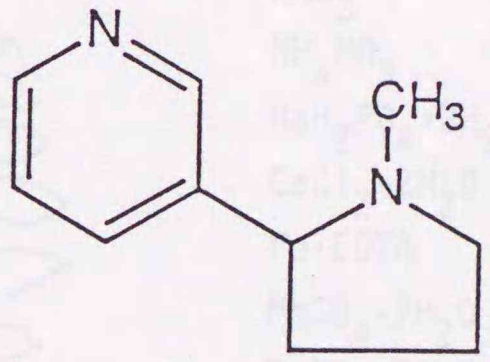


図４－１　ニコチン（９０）

本章では新たにタバコ根の外分泌物質の検索を行うために、水耕およびれき耕培養法を用い、６つのセスキテルペンを単離、同定した。

第一節

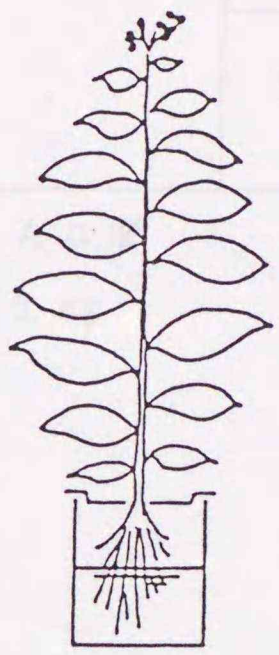
水耕法によるタバコ外分泌物質の検索

水耕法を用いた実験で根の外分泌物質の検索を行うために２つの条件を設定した。水耕法と培地組成は下図に示す。

実験Ｉは、４ｌの水耕ポットに２ｌの水耕液を入れ播種１カ月後のタバコＢＹ－４品種を１本ずつ１０器設置した。これを１日おきに水耕液を更新し古いものをＨＰ－２０樹脂をつめたカラムに通した。さらに１カ月半後、立ち枯れ病菌培養液（ＣＰＧ培地）を各　２００ｍｌ加えた後同様に１日おきに水耕液を取り替え別のＨＰ－２０樹脂のつまったカラムに通した。

実験ＩＩは、Ｉと同様に水耕栽培し、タバコ移植１カ月後に１０器のうち８本にＩと同様に立ち枯れ病菌培養液を各２００ｍｌ加えその後１カ月間１日おきに水耕液を更新し、古い水耕液をＨＰ－２０樹脂のつまったカラムに、菌接種のものと未接種のものを別々に通した。

水耕栽培：



Nicotiana tabacum, BY—4

培養液組成 (mg／l)	
KNO_3	85.86
NH_4NO_3	80.36
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	43.96
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	104.86
Fe・EDTA	6.57
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	30.57
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.44
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.50
H_3BO_3	0.57
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.04
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.03

タバコ立枯病菌（Pseudomonas solanacearum）

図４－２　タバコの水耕栽培

結果

実験Ⅰ

健全期（１カ月半　５００１）、接種後（２週間　２００１）のＨＰ－２０樹脂吸着物は、メタノールでカラムから溶出させ、これを濃縮後酢酸エチル、n－ブタノール、水の三層に分配した。（図４－３）、各層の抗菌活性（立ち枯れ病　Ｕ－７菌株）およびチャ花粉管伸長阻害活性を調べたところ健全期、接種後ともに酢酸エチル層とn－ブタノール層に活性が認められた。

そこで健全期と接種後の酢酸エチル層をそれぞれＨＰＬＣ（ＹＭＣ　ＡＭ３２４　逆相）にかけ、図４－４に示す６つのセスキテルペンを単離した。これらの構造はＭＳ、ＮＭＲによって同定した。

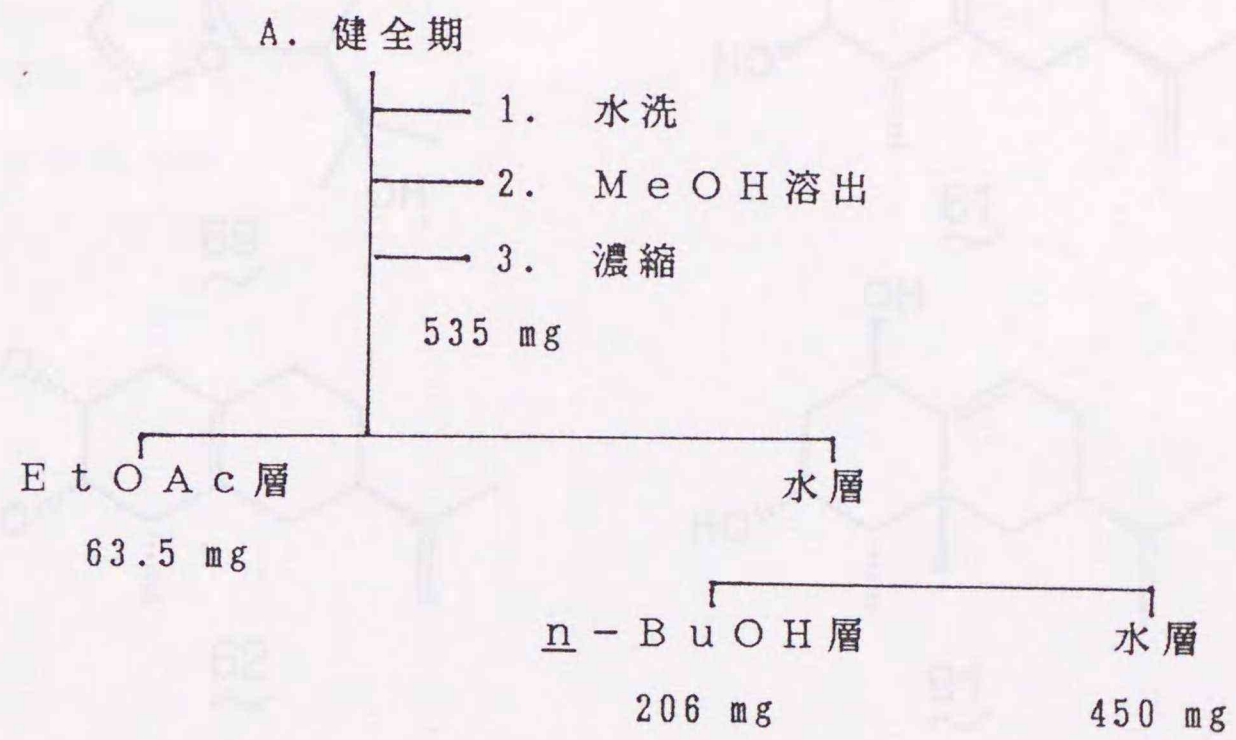


図４－３ａ　ＨＰ－２０吸着物の分画（健全）

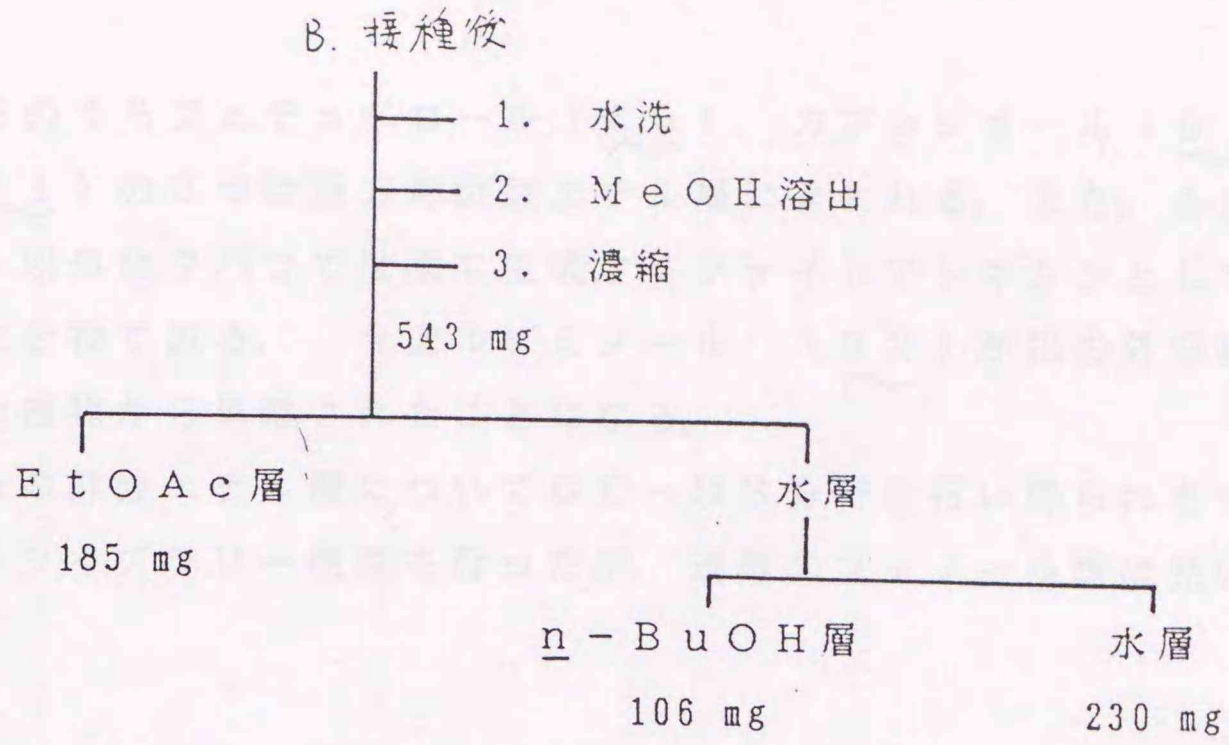


図４－３ｂ　ＨＰ－２０吸着物の分画（接種）

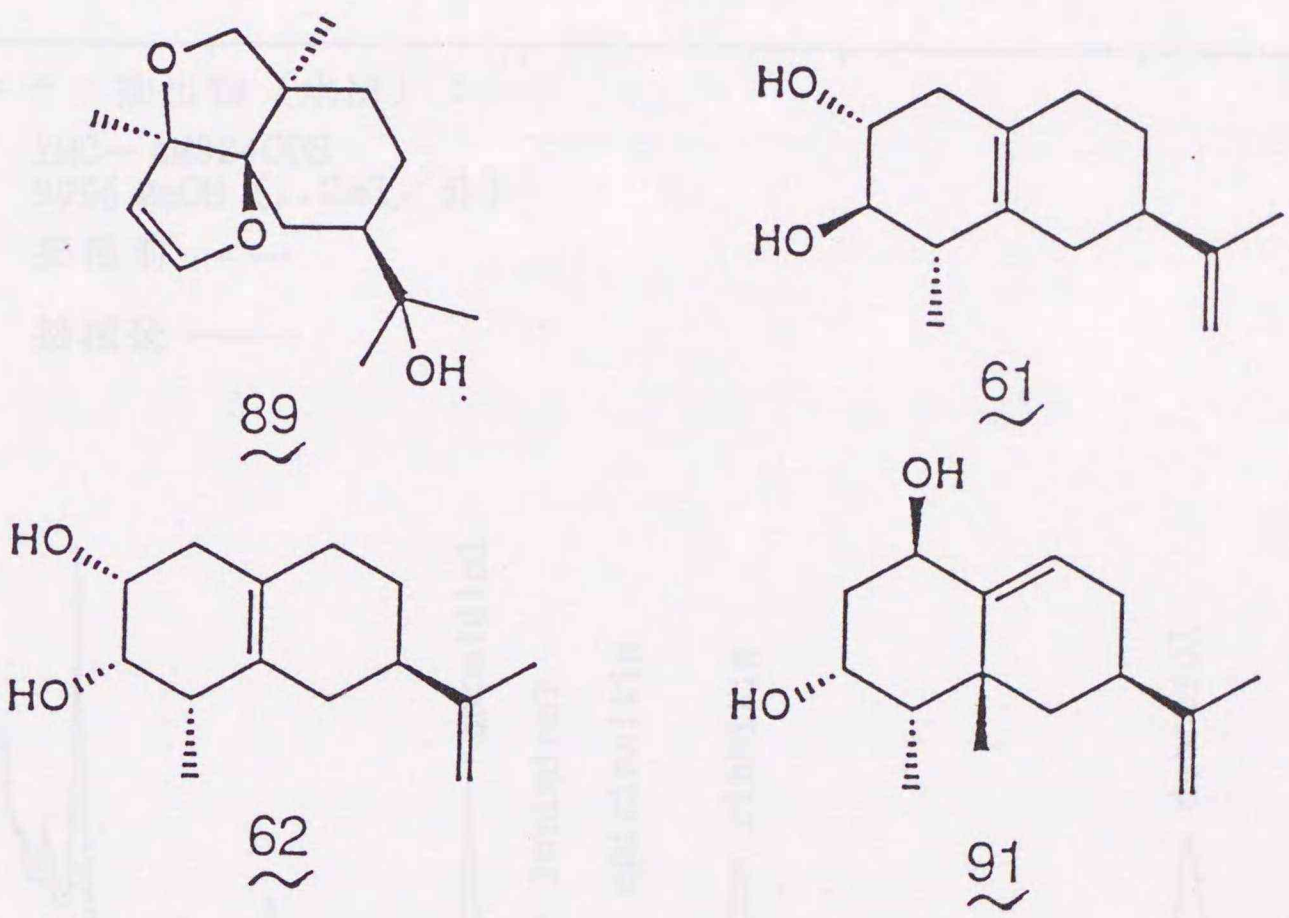
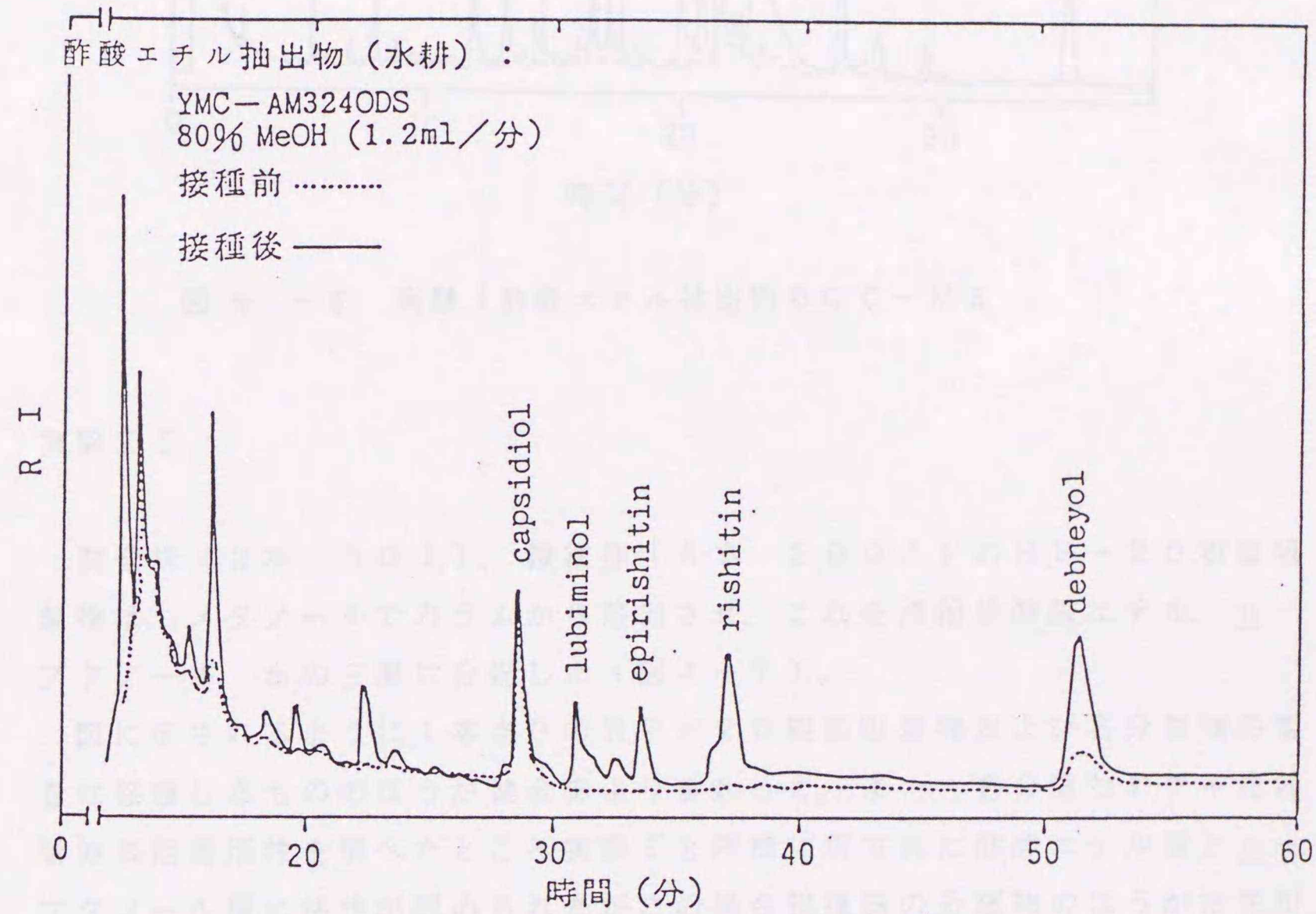


図　4－4　根分泌物中のセスキテルペン

これらのうちフュチュベロール（８９）、カプシジオール（９１）、リシチン（６１）の３つは両方の酢酸エチル層に含まれる。また。ルビミノール（９２）以外はタバコでは葉で生成するファイトアレキシンとして単離されている化合物である。　今回ルビミノール　（９２）が根の外分泌物質としてタバコ植物から単離されたことになる。

接種後の酢酸エチル層についてＧＣ－ＭＳ分析を行い得られたデータについてＭＳライブラリー検索を行ったが、遊離のフェノール類は見いだされなかった。



図．４－５　実験Ｉ酢酸エチル抽出物のＨＰＬＣ

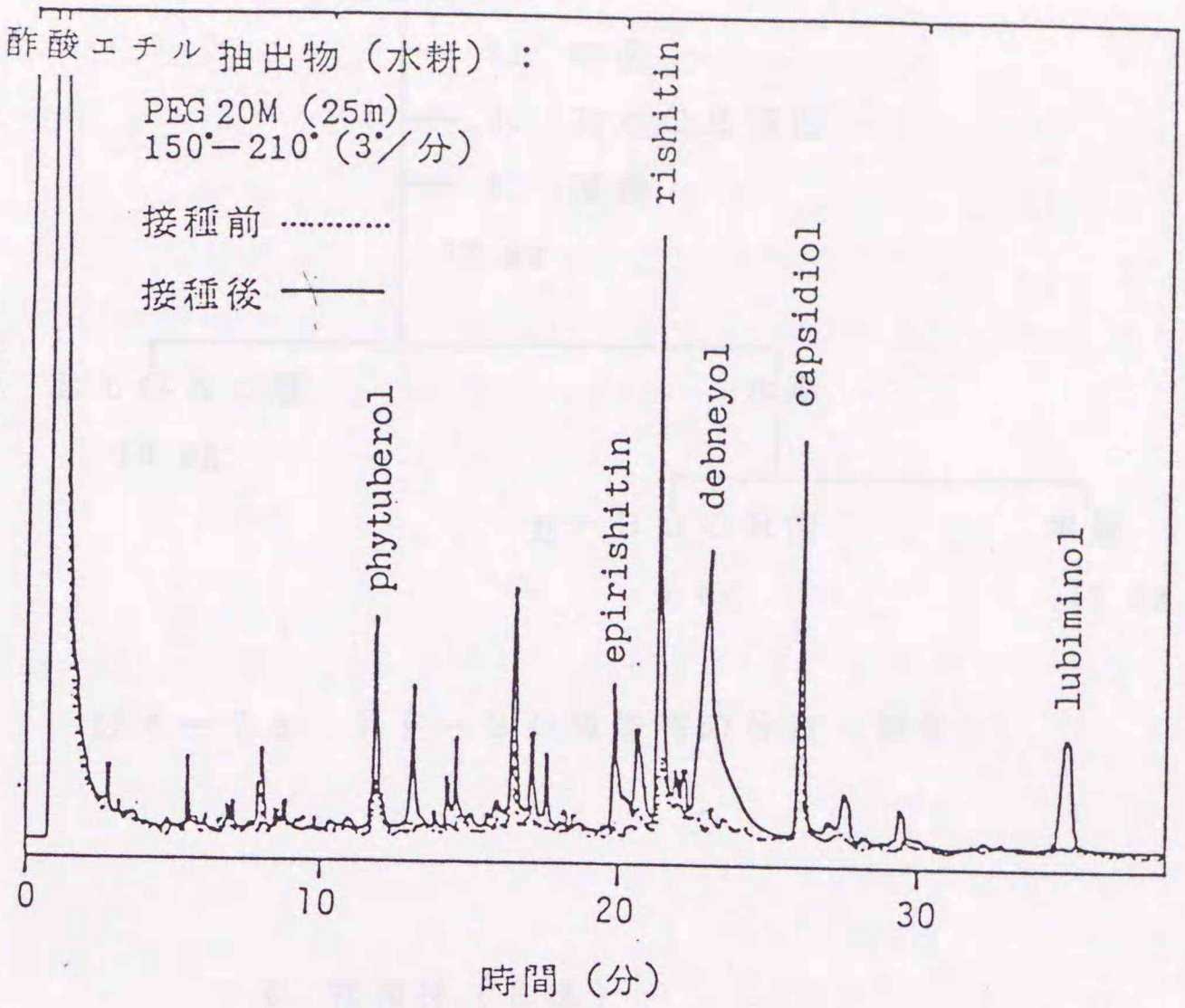


図４　－６　実験Ｉ酢酸エチル抽出物のＧＣ－ＭＳ

実験ＩＩ

健全株（２本　５０ｌ）、接種株（８本　２００ｌ）のＨＰ－２０樹脂吸着物は、メタノールでカラムから溶出させ、これを濃縮後酢酸エチル、n－ブタノール、水の三層に分配した（図４－７）。

図に示されるように１本当りのＨＰ－２０樹脂吸着物および各分画物の重量は接種したもののほうが健全株より多かった。また、各分画物のチャ花粉管伸長阻害活性を調べたところ実験Ｉと同様に両方共に酢酸エチル層とn－ブタノール層に活性が認められたがこの場合接種株の分画物のほうが活性が高かった。

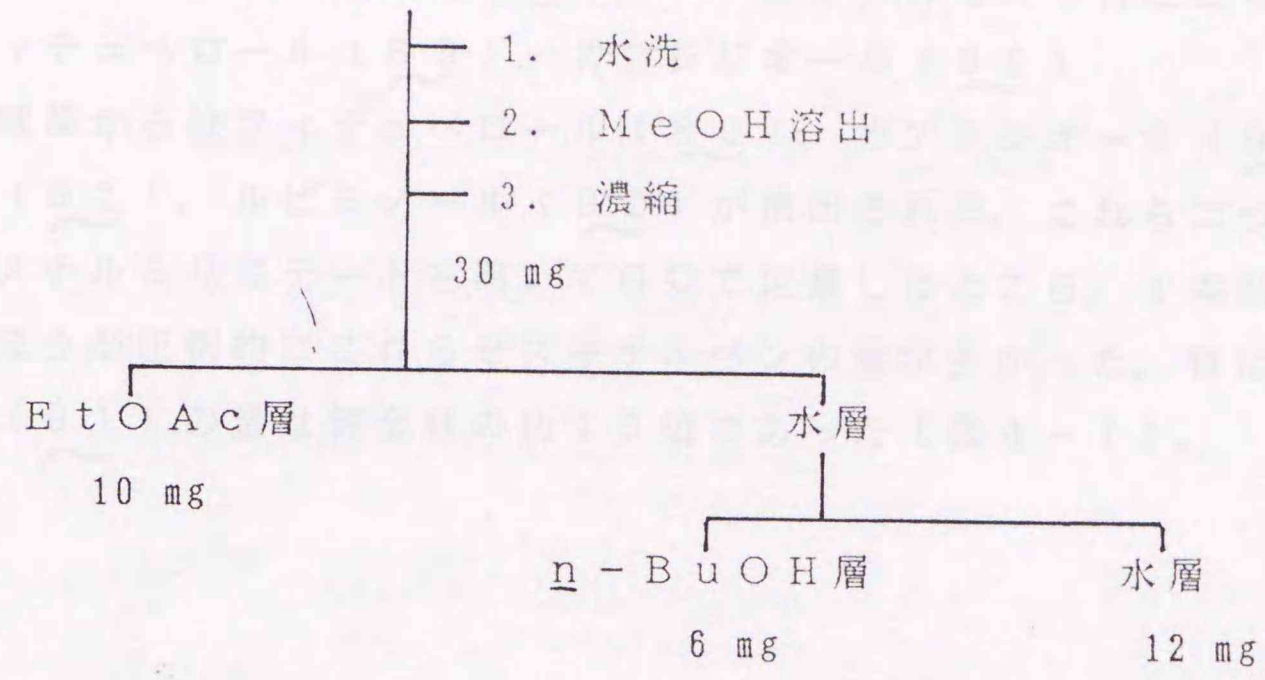


図４－７ａ　ＨＰ－２０吸着物の分画（健全）

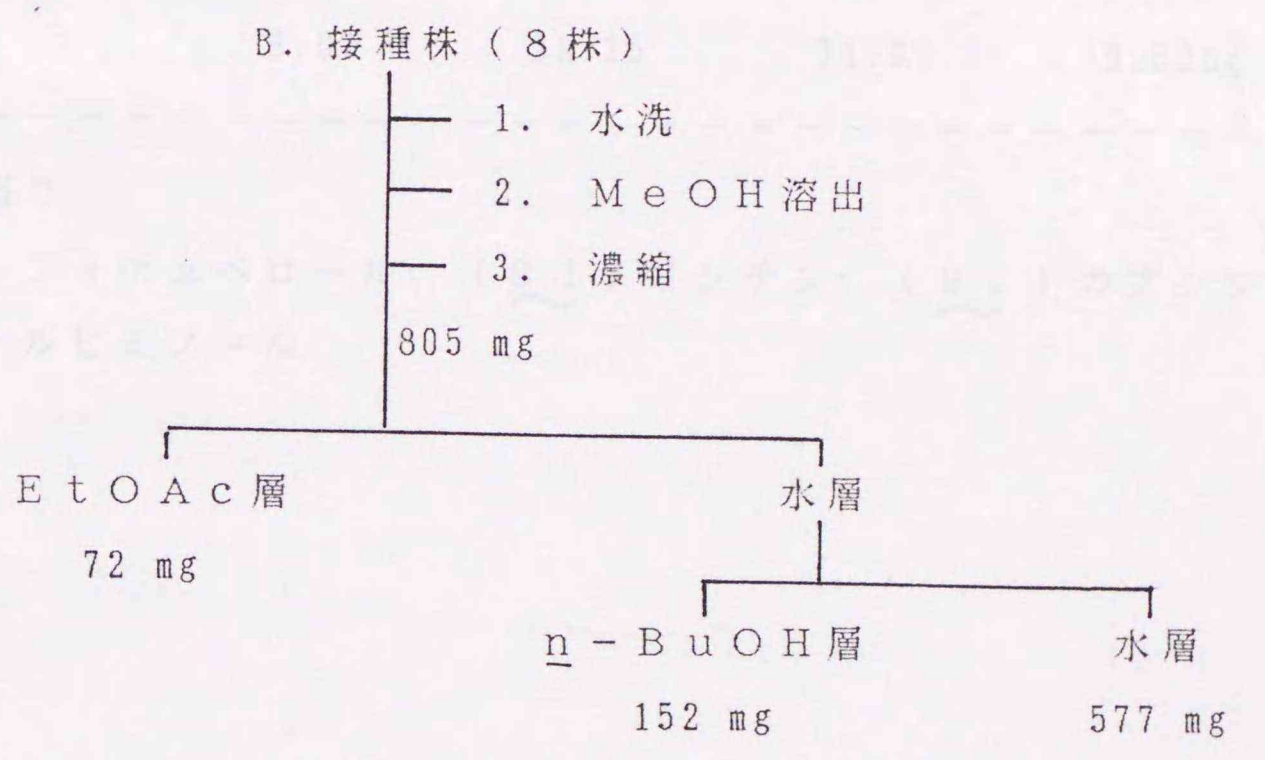


図４－７ｂ　ＨＰ－２０吸着物の分画（接種）

次に両方の酢酸エチル層についてＧＣ－ＭＳ分析を行ったところ健全株からはフィチュベロール（８９）、カプシジオール（９２）
が、接種株からはフィチュベロール（８９）、カプシジオール（９２）、リシチン（６１）、ルビミノール（９２）が検出された。これらについて内部標準にメチルミリステートを用いてＧＣで定量したところ、１本当りでは接種株のほうが圧倒的にこれらセスキテルペンの量が多かった。特にカプシジオール（９１）の量は健全株の約１５倍であった（表４－１）。

表４－１　実験ＩＩ　健全株と接種株の分泌セスキテルペン

	８９	６１	９１	９２
健全	3.97	-----	4.74	----
接種	8.07	30.35	74.91	9.52ug

＊一株当り

（８９）フィチュベロール：（６１）リシチン：（９１）カプシジオール：
（９２）ルビミノール

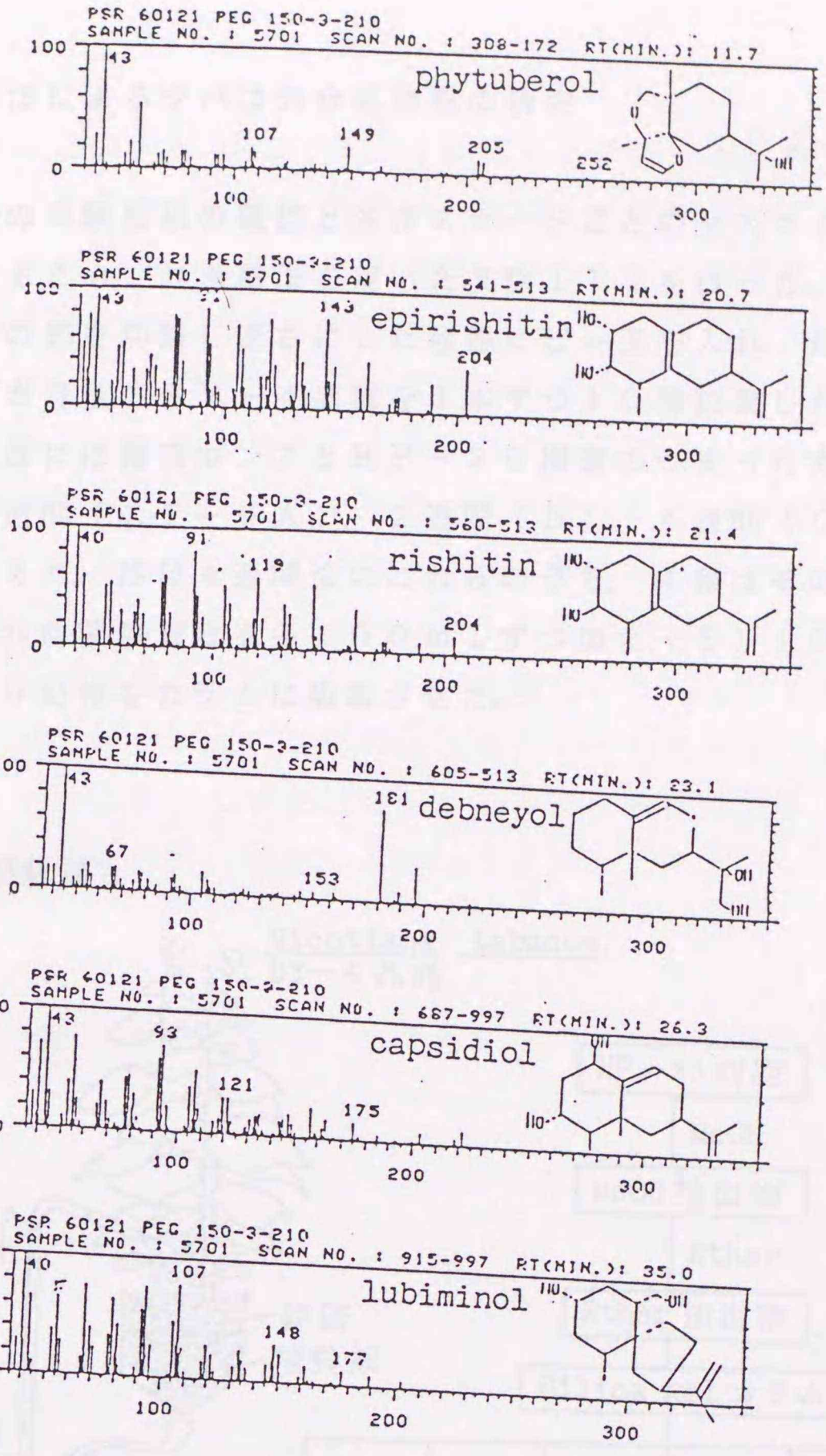


図 4－8　分泌セスキテルペンのマススペクトラム

第二節

れき耕法によるタバコ外分泌物質の検索

水耕法の実験結果の確認と生育ステージごとのセスキテルペン生成量の変化を調べるため、れき耕法を用いた実験ＩＩＩを行った。　実験ＩＩＩは、ガロン瓶の底を切断し逆さにした容器にビー玉を入れ、約１１の水耕液を加え播種１カ月後のＢＹ－４品種を１本ずつ１０器設置しれき耕栽培した。各れき耕装置には循環ポンプとＨＰ－２０樹脂のつまったカラムを取り付け、移植後１週間（ステージＡ）、２週間（Ｂ）、４週間（Ｃ）ごとにカラムを取り替えた。移植４週間後にこれらのうち、４器はそのまま（Ｄ）、６器に立ち枯れ病菌培養液を各１００ｍｌずつ加え（Ｅ）１０日間さらに栽培を行い根の分泌物をカラムに吸着させた。

礫耕栽培:

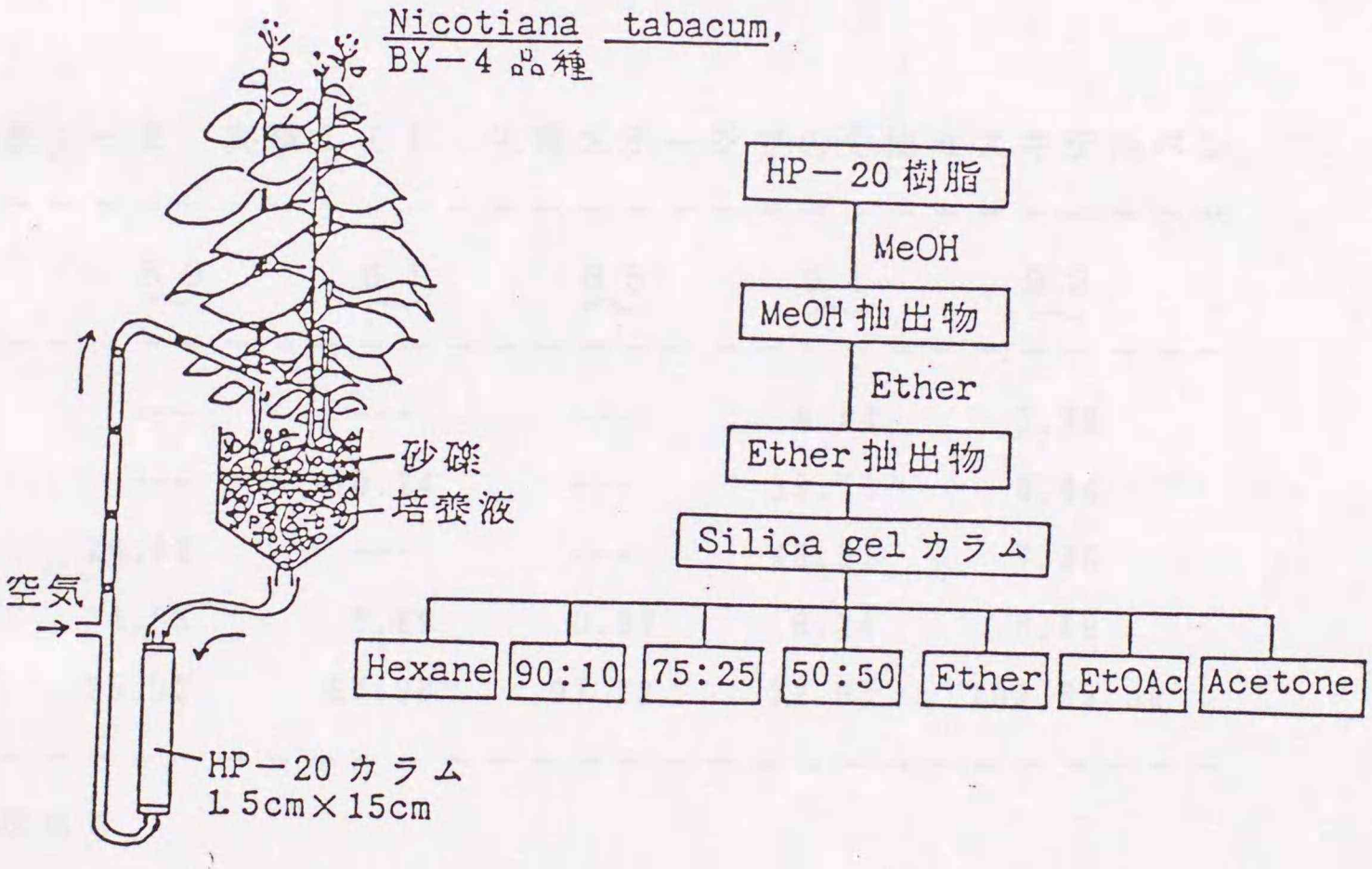


図４－９　タバコのれき耕栽培

結果

各ステージA，B，C，D，EのHP－20樹脂吸着物はメタノールでカラムから溶出させ、これを濃縮後、酢酸エチル、n－ブタノール、水の3層に分配した。このうち酢酸エチル層をシリカゲルに吸着させたのち、エーテルで溶出させ以後の分析に用いた。

次に各ステージの酢酸エチル層についてGC－MS分析を行ったところ初期はカプシジオール（91）とルビミノール（92）の2つが検出され、生育が進むに従って、フィチュベロール（89）がついでリシチン（61）、デブネイオール（85）が検出された。健全株と接種株のセスキテルペンの種類は同じであった。これらについて内部標準にメチルミリステートを用いてガスクロで定量したところ、生育が進むにしたがって量が増加し、最終ステージDでは減少した。また接種したもの（E）のほうが健全株よりも圧倒的にこれらセスキテルペンの量が多かった。特にデブネイオールの量は健全株の200倍近くであった。（表4－2））

表4－2　実験III　生育ステージでの分泌セスキテルペン

	89	61	85	91	92
A	---	---	---	6.44	3.79
B	---	10.24	---	19.71	6.44
C	26.92	---	---	43.51	7.36
D	4.83	0.89	0.57	6.34	6.49
E	25.52	87.98	97.73	72.83	103.69 ug

＊一株当り

（89）フィチュベロール：（61）リシチン：（85）デブネイオール：
（91）カプシジオール：（92）ルビミノール

A：移植後１週間

B：Ａより２週間

C：Ｂより４週間

D：Ｃより１０日間

E：Ｃより立ち枯れ病菌培養液添加１０日間

以上のようにタバコ根の外分泌物質として抗菌活性が知られているセスキテルペンを単離した。これらはタバコの葉から単離されたセスキテルペンと量比も種類も異なるものであった。とくにルビミノール（９２）はタバコから初めて単離された物質であり、葉とはべつに根に独自のセスキテルペンの生合成系が存在することが考えられた。これらは、生育の後期、立ち枯れ病菌の接種後急激に増加していることから外部からのストレスによって生成したと考えられる。これら抗菌活性を有する化合物が根圏の微生物に何らかの影響を与えていることが考えられた。

第五章　実験の部

第一節　バレイショ葉メタノール抽出物の分画

１９８９年度７月北海道大学農場にて採集したバレイショ（男爵）の生葉約６５Ｋｇを凍結乾燥後（６．０２Ｋｇ）、ただちに７０％メタノール１００１に浸漬した。これをガーゼ濾過したのち減圧濃縮した。浸漬は再度行いあわせて濃縮しメタノール抽出物を得た。これを２Ｌの水に溶解し、水溶液を酢酸エチル２Ｌで３回洗浄して脂溶性成分を除いた。続いてこの水溶液を濃縮後、多孔性樹脂カラムＤＩＡＩＯＮ　ＨＰ－２０（３Ｌ）に吸着させ蒸留水で遊離の糖等を溶出させ、後メタノールを流した。

このメタノール溶出画分をβ－グルコシダーゼで加水分解し遊離したアグリコンをジアゾメタンでメチル化処理した後キャピラリーＧＣ－ＭＳで分析した。このメタノール溶出画分をシリカゲルを充填したカラムに吸着させ、クロロホルムとメタノールの混合溶媒でメタノールの濃度を５、１０、２０、３０、５０、１００％と順次変化させて極性の低い順に溶出させた。各溶出画分をβ－グルコシダーゼで加水分解し、それぞれの遊離アグリコンをキャピラリーＧＣ－ＭＳで分析した。

第二節　バレイショ各生育ステージでの配糖体含量の定量

萌芽した男爵薯１４鉢を通常の栽培により日本たばこ産業遺伝育種研究所（静岡県磐田市）の温室で１９８９年６月１日に移植し生育させた。図２－１，２を参考にして５つの生育ステージに区切りそれぞれ成長過程の異なる地上部、地下部（除種薯）、種薯の区分別に３ないし４鉢ずつ採集しすぐに凍結保存した。すべて採集がすんだ後これらを凍結乾燥しメタノール抽出した。

アグリコンの定量は以下の方法により行った。各ステージにおける各区分ごとの凍結乾燥試料のメタノール抽出物１００ｍｇを０．１Ｍ酢酸緩衝液

１０ｍｌに溶解し内部標準としてオクチルーβーグルコシド１００μｇを加えた。この溶液をジクロロメタン１０ｍｌで２回洗浄して脂溶性成分を除いた後、５ｍｌずつ２つにわけ、一方のみβーグルコシダーゼ５ｍｇを加え他方をコントロールとした。両方ともに３８°Ｃで１８時間インキュベートしたのち、それぞれをジクロロメタン１０ｍｌで２回抽出して遊離したアグリコンを得た。この抽出物をＧＣ，ＧＣ－ＭＳで分析した。また、アグリコンの定量はＧＣ上のピーク面積から内部標準物質から遊離したオクチルアルコールのピーク面積と比較して行った。

第三節　葉タバコ中のセスキテルペン配糖体の単離

米国産黄色種葉たばこ（ＯＣＬ）の乾燥物４．７ＫｇをＭｅＯＨに浸漬し抽出したものを減圧濃縮し、水とヘキサンで分配した後水層をn－ブタノールで抽出した。このものを減圧濃縮後、多孔性樹脂ＨＰ－２０にかけ水で遊離の糖等を溶出させた後エタノールを流し溶出してくる画分を集め濃縮した。これを水とエーテルで分配し、水層を活性炭カラムにかけさらにシリカゲルカラムにかけた。こののち高速液体クロマトグラフィー、誘導体化を行って配糖体の単離を行った。いずれの分画の場合も配糖体の存在を確認するため、βーグルコシダーゼを用いたモニタリング[48]を行った。すなわち各画分の１００ｍｇを０．１Ｍ酢酸緩衝液２０ｍｌに溶かしこれを等量の酢酸エチルで２度洗浄した後、１０ｍｌずつに分け、片方にβーグルコシダーゼ（ベーリンガーマンハイム社製）１０ｍｇを加え３８°Ｃ、１８時間インキュベートして加水分解し、遊離アグリコンを酢酸エチルで抽出した。他方はβーグルコシダーゼを加えずに同様の条件でインキュベートして酢酸エチル抽出し、コントロールとした。この抽出物をＧＣ－ＭＳ分析を行い、既知のアグリコンとは異なるものが含まれる画分について次の精製のステップに進んだ。

すなわち、シリカゲルカラムの２０％ＭｅＯＨ溶出画分をさらに高速液体クロマトグラフィー（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ｓ３４３，Ａ３１４　移動相６０％ＭｅＯＨ／H_2O））で分画した。そのうち、さきに述べた酵素によるモニタ

リングでセスキテルペン配糖体の含まれると予想されたフラクションを分取後、アセチル化したものを再度高速液体クロマトグラフィー（ＯＤＳ　ＹＭＣ　ＡＭ３２４　移動相　８０％ＭｅＯＨ／Ｈ２Ｏ）により分離、精製を行い、６種のアセチル化物 6̃7 (6 mg)、 7̃0 (32 mg)、 7̃3 (3 mg)、 7̃6 (2 mg)、 8̃2 (35 mg)、 8̃6 (10mg) を単離した。

9β-Hydroxysolanascone-β-glucopyranoside tetraacetate (6̃7) .
$[\alpha]_D$=-10.55' (c=0.15, EtOH). ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 1.01(3H, s), 1.08(3H, d, J=6.9 Hz), 1.21(1H, dd, J=1.6, 11.1 Hz), 1.24(3H, s), 1.29(1H, dd, J=3.1, 13.4 Hz), 1.75(1H, d, J=1.6 Hz), 1.86(1H, d, J=11.1 Hz), 1.91(1H, dd, J=11.9, 12.8 Hz), 2.00(3H, s), 2.03(3H, s), 2.04(1H, dd, J=3.8, 12.1 Hz), 2.05(3H, s), 2.07(1H, d, J=13.4 Hz), 2.08(3H, s), 2.09(1H, dd, J=5.8, 12.8 Hz), 2.43(2H, m), 2.53(1H, dd, J=5.8, 11.9 Hz), 3.66(1H, ddd, J=2.4, 4.7, 9.9 Hz), 3.96(1H, m), 4.19(2H, m), 4.43(1H, d, J=8.0 Hz), 4.92(1H, dd, J=8.0, 9.9 Hz), 5.05(1H, dd, J=9.7, 9.9 Hz), 5.17(1H, dd, J=9.7, 9.9 Hz).
^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 17.5(CH_3), 17.8(CH_3), 20.5(CH_3), 21.7(CH_3 x 4), 34.6(CH_2), 36.5(CH), 36.5(CH), 37.0(CH_2), 39.0(CH_2), 43.3(C), 46.2(CH_2), 48.6(CH), 49.5(CH), 49.5(C), 50.9(C), 68.0(CH), 169.1(C), 169.4(C), 170.3(C), 170.6(C), 213.4(C).
FD-MS m/z : 564(M^+), 331.

10β-Hydroxysolanascone-β-glucopyranoside tetraacetate (7̃0)
$[\alpha]_D$=-20.93' (c=0.41, EtOH). ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 0.96(3H, s), 1.21(3H, d, J=6.4 Hz), 1.23(3H, s), 1.28(1H, dd, J=5.1, 13.8 Hz), 1.38(1H, d, J=11.3 Hz), 1.73(1H, dd, J=5.1, 11.3 Hz), 1.78(1H, d, J=11.3 Hz), 1.84(1H, dd, J=5.9, 13.8 Hz), 1.89(1H, dd, J=12.0, 12.7 Hz), 1.99(3H, s), 2.00(3H, s), 2.01(3H, s), 2.04(2H, m), 2.05(3H, s), 2.47(1H, dd, J=6.0, 12.0 Hz), 2.51(2H, m), 3.64(1H, ddd), 4.05(1H, brd, J=

5.9 Hz), 4.19(2H, m), 4.45(1H, d, J=8.0 Hz), 4.93(1H, dd, J=8.0, 9.8 Hz), 5.08(1H, dd, J=9.4, 9.7 Hz), 5.18(1H, dd, J=9.7, 9.8 Hz). ^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 17.7(CH_3), 17.9(CH_3), 19.1(CH_3), 20.6(CH_3 x 4), 33.4(CH), 33.8(CH), 34.4(CH_2), 37.3(CH_2), 43.3(CH), 45.1(C), 46.5(CH_2), 48.0(CH), 48.7(C), 54.1(C), 61.8(CH), 169.4(C), 169.6(C), 169.8(C), 170.5(C), 213.5(C).
FD-MS m/z : 564(M^+), 331.

13-Hydroxysolanascone-β-glucopyranoside tetraacetate (73).
$[\alpha]_D$=-12.0°(c=0.05, EtOH). ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 1.01(3H, s), 1.11(1H, m), 1.24(3H, s), 1.31(1H, m), 1.42(2H, m), 1.60(1H, m), 1.73(1H, m), 1.90(1H, m), 2.10(1H, m), 2.12(1H, m), 2.24(1H, m), 2.52(1H, m), 2.54(1H, m), 2.57(1H, m), 3.67(1H, ddd, J=2.7, 4.7, 10.1 Hz), 3.71 (2H, ddd, J=2.7, 4.7, 12.4 Hz), 4.19(2H, m), 4.88(1H, d, J=8.0 Hz), 4.97(1H, dd, J=8.0, 9.4 Hz), 5.07(1H, dd, J=9.4, 10.1 Hz), 5.18(1H, dd, J=9.4, 9.4 Hz). FD-MS m/z : 564(M^+), 331.

13-Hydroxysolanascone (75).
$[\alpha]_D$=+6.84°(c=0.05, EtOH). ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 1.02(3H, s), 1.13(1H, m, J=12.5 Hz), 1.26(3H, s), 1.36(1H, m), 1.48(3H, m), 1.70(1H, brs), 1.92(1H, dd, J=11.9, 13.2 Hz), 2.09(1H, m), 2.13(1H, dd, J=6.0, 13.2 Hz), 2.26(1H, dd, J=11.9, 16.8 Hz), 2.51(2H, m), 2.55(1H, m), 3.73(2H, m).
EI-MS m/z : 234(M^+), 203, 176, 133, 91. HR-MS m/z : 234.1594; calcd. 234.1619 for $C_{15}H_{22}O_2$.

15-Hydroxysolanascone-β-glucopyranoside tetraacetate (76).

$[\alpha]_D$=-14.0'(c=0.08, EtOH). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$)δ :1.10(3H, d, J= 6.7 Hz), 1.10(1H, m), 1.30(1H, m), 1.33(3H, s), 1.47(2H, m), 1.59(1H, m), 1.96(1H, m), 2.04(2H, m), 2.10(1H, m), 2.24(1H, dd, J=12.0, 13.0 Hz), 2.43(1H, m), 2.45(1H, m), 2.52(1H, dd, J=6.0, 12.0 Hz), 3.53(1H, d, J=9.7 Hz), 3.67(1H, m, J=2.6, 4.5, 9.8 Hz), 3.96(1H, d, J=9.7 Hz), 4.14(1H, dd, J=2.6, 12.3 Hz), 4.26(1H, dd, J=4.5, 12.3 Hz), 4.49(1H, d, J=7.8 Hz), 4.99(1H, dd, J=7.8, 9.4 Hz), 5.08(1H, dd, J=9.5, 9.8 Hz), 5.19(1H, dd, J=9.4, 9.5 Hz).

FD-MS m/z : 564(M^+), 331.

15-Hydroxysolanascone (7 8) .

$[\alpha]_D$=+13.03'(c=0.056, EtOH). ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 1.13(3H, d, J=7.1 Hz), 1.14(1H, m), 1.31(1H, m), 1.36(3H, s), 1.51(2H, m), 1.62(1H, m), 1.97(1H, m), 2.05(2H, m), 2.09(2H, m), 2.27(1H, dd, J=12.1, 12.2 Hz), 2.45(1H, m), 2.48(1H, m), 2.59(1H, dd, J=6.0, 12.1 Hz), 3.77(2H, s).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$)δ : 17.7(CH_3), 20.7(CH_3), 23.2(CH_2), 26.6(CH_2), 30.6 (CH_2), 36.8(CH), 40.2(CH), 43.2(CH_2), 46.5(CH_2), 49.4(CH), 50.3(C), 50.7(C), 51.1(C), 63.6(CH_2), 213.6(C).

EI-MS m/z : 234(M^+), 206, 178, 137, 91. HR-MS m/z : 234.1639; calcd. 234.1619 for $C_{15}H_{22}O_2$.

1β-hydroxydebneyol-β-glucopyranoside tetraacetate (8 2) .

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 0.92(3H, d, J=7.1 Hz), 1.04(3H, s), 1.19(H, m), 1.22 (3H, s), 1.55(H, m), 1.72(H, m), 1.98(6H, s), 2.00(3H,s), 2.01(3H, s), 2.07(3H, s), 1.91-2.24(H, m), 3.40(1H, d, J=9.9 Hz), 3.69(1H, ddd, J=2.4, 5.1, 9.5 Hz), 3.77(1H, d, J=9.9 Hz), 4.13(1H, dd, J=2.4, 12.2 Hz), 4.21(1H, dd, J=5.1, 12.2 Hz), 4.50(1H, d, J=7.9Hz), 4.99

(1H, dd, J=7.9, 9.7 Hz), 5.05(1H, dd, J=9.7, 9.7 Hz), 5.18(1H, dd, J=9.5, 9.7 Hz), 5.22(1H, brt, J=2.7 Hz), 5.93(1H, d, J=6.5 Hz). (C_6D_6): 0.99(3H, d, J=7.2 Hz), 1.06(3H, s), 1.07-1.34(H, m),1.38(3H, s), 1.56(H, m), 1.65 -1.99(H, m), 1.71(3H, s), 1.73(3H, s), 1.76 (3H, s), 1.77(3H, s), 1.81(3H, s), 2.29(1H, m), 3.33(1H, d, J=9.9 Hz), 3.35(1H, ddd, J=2.4, 5.1, 9.9 Hz), 3.69(1H, d, J=9.9 Hz), 4.11 (1H, dd, J=2.3, 12.2 Hz), 4.23(1H, dd, J=5.1, 12.2 Hz), 4.24(1H, d, J=8.0 Hz), 5.21(1H, dd, J=9.5, 9.8 Hz), 5.28(1H, dd, J=8.0, 9.5 Hz), 5.42(1H, dd, J=9.8, 9.9 Hz), 5.47(1H, brt, J=2.6 Hz), 6.03(1H, dd, J=5.4, 6.2 Hz)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): 17.0, 20.4, 20.6, 21.7, 22.6, 25.5, 26.1, 26.4, 31. 8, 38.1, 38.9, 39.5, 40.9, 61.9, 68.4, 71.4, 71.8, 72.7, 73.3, 76.2 , 101.4, 129.6, 137.5, 169.4, 170.19, 170.6 (C_6D_6): 17.7, 20.7, 2 1.1, 21.7, 26.4, 27.0, 27.3, 32.7, 38.9, 39.9, 40.3, 41.9, 62.3, 62. 4, 72.4, 72.8, 73.5, 73.6, 76.6, 78.0, 102.4, 130.8, 138.1, 169.4, 1 69.6, 169.8, 170.5. FD-MS m/z 626(M^+), 331.

1β-hydroxydebneyol (8 4) .

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 0.94(3H, d, J=7.1 Hz), 1.10(3H, s), 1.17(1H, m, J= 2.1, 4.4, 13.8 Hz), 1.28(1H, m), 1.36(3H, s), 1.60(1H, m, J= 2.1, 7.1 Hz), 1.65-1.81(5H, m), 1.99(1H, m, J=3.4, 7.0, 15.5 Hz), 2.34(1H , m, J=4.6, 13.8 Hz), 3.40(1H, brd), 3.56(1H, brd), 4.23(1H, brs), 5.81(1H, dd, J= 1.6, 7.0 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): 16.8(CH_3), 20.3(CH_3), 24.9(CH_2), 26.6(CH_2), 28.1 (CH_2), 33.0(CH_3), 38.2(C), 39.3(CH_2), 39.6(CH), 41.4(CH), 68.5(CH_2) , 74.4(C), 74.7(CH), 126.8(CH), 142.3(C).

Methoxyphytuberol-β-gulucopyranoside tetraacetate (8 6) .

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ : 1.02(3H, s), 1.12(3H, s), 1.19(1H, m), 1.20(3H, s), 1.43(3H, s), 1.50(4H, m), 1.69(2H, m), 1.98(3H, s), 1.99(3H, s), 2.00(3H, s), 2.05(3H, s), 2.15(2H, m), 3.35(3H, s), 3.43(1H, d, J=7.7 Hz), 3.65(1H, ddd, J=2.5, 5.6, 10.0 Hz), 3.92((1H, d, J=7.7 Hz), 4.07(1H, dd, J=2.5, 12.0 Hz), 4.19(1H, dd, J=5.6, 12.0 Hz), 4.64(1H, d, J=7.9 Hz), 4.86(1H, d, J=5.1 Hz), 4.95(1H, dd, J=7.9, 9.7 Hz), 5.00(1H, dd, J=9.5, 9.7 Hz), 5.19(1H, dd, J=9.5, 10.0 Hz).

^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ : 17.0, 20.6, 20.7, 21.2, 21.9, 25.2, 25.7, 30.8, 34.5, 44.5, 44.6, 48.2, 55.3, 62.4, 68.8, 71.5, 71.6, 73.0, 80.1, 90.8, 94.8, 95.2, 103.3, 169.1, 169.4, 170.3, 170.6.

FD-MS m/z 614(M^+), 331.

第四節　水耕および れき耕実験

実験Ｉは、４ｌの水耕ポットに２ｌの水耕液を入れ播種１カ月後のタバコＢＹ－４品種を１本ずつ１０器設置した。これを１日おきに水耕液を更新し古いものをＨＰ－２０樹脂をつめたカラムに通した。さらに１カ月半後、立ち枯れ病菌培養液（ＣＰＧ培地）を各　２００ｍｌ加えた後同様に１日おきに水耕液を取り替え別のＨＰ－２０樹脂のつまったカラムに通した。

実験ＩＩは、Ｉと同様に水耕栽培し、タバコ移植１カ月後に１０器のうち８本にＩと同様に立ち枯れ病菌培養液を各２００ｍｌ加えその後１カ月間１日おきに水耕液を更新し、古い水耕液をＨＰ－２０樹脂のつまったカラムに、菌接種のものと未接種のものを別々に通した。

健全期（１カ月半　５００ｌ）、接種後（２週間　２００ｌ）のＨＰ－２０樹脂吸着物は、メタノールでカラムから溶出させ、これを濃縮後酢酸エチル、n－ブタノール、水の３層に分配した。各層の抗菌活性（立ち枯れ病　Ｕ－７菌株）およびチャ花粉管伸長阻害活性を調べたところ健全期、接種後ともに酢酸エチル層とn－ブタノール層に活性が認められた。

そこで健全期と接種後の酢酸エチル層をそれぞれＨＰＬＣ（ＹＭＣ　ＡＭ

３２４　逆相）にかけ、６つのセスキテルペンを単離した。これらの構造はＭＳ、ＮＭＲによって同定した。

実験ＩＩは、健全株（２本　５０ｌ）、接種株（８本　２００ｌ）のＨＰ－２０樹脂吸着物は、メタノールでカラムから溶出させ、これを濃縮後酢酸エチル、n－ブタノール、水の３層に分配した。

実験ＩＩＩは、ガロン瓶の底を切断し逆さにした容器にビー玉を入れ、約１ｌの水耕液を加え播種１カ月後のＢＹ－４品種を１本ずつ１０器設置しれき耕栽培した。各れき耕装置には循環ポンプとＨＰ－２０樹脂のつまったカラムを取り付け、移植後１週間（ステージＡ）、２週間（Ｂ）、４週間（Ｃ）ごとににカラムを取り替えた。移植４週間後にこれらのうち、４器はそのまま（Ｄ）、６器に立ち枯れ病菌培養液を各１００ｍｌずつ加え（Ｅ）１０日間さらに栽培を行い根の分泌物をカラムに吸着させた。

各ステージＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄ，ＥのＨＰ－２０樹脂吸着物はメタノールでカラムから溶出させ、これを濃縮後、酢酸エチル、n－ブタノール、水の３層に分配した。このうち酢酸エチル層をシリカゲルに吸着させたのち、エーテルで溶出させ以後の分析に用いた。

ナス科植物（Solanaceae）は、ナス、トマト、タバコ、ペチュニアなどを含み全世界に約９０属２０００種ある。観賞用としてペチュニア、バンマツリフユサンゴ、ルリヤナギ、ホオズキなどがあり、食用としてナス、トマト、トウガラシ、ピーマン、バレイショがある。またアルカロイド含有植物が多くヒヨス、ベラドンナ、チョウセンアサガオ、ハシリドコロ、クコ、イヌホオズキ等は薬用植物として利用され、高等植物の中でも大きな比重をしめている。その中でタバコ、バレイショ、トマト、ナスといったような栽培作物は人類の生活に深くかかわっている植物である。これら植物の成分の研究は古くから行われ数多くの化学物質の単離同定が成されてきた。著者は本研究においてナス科植物の配糖体成分についてその存在と生理活性を明らかにすることを目的として、代表的なナス科植物であるバレイショ、タバコから一連のイオノールおよびセスキテルペン配糖体の単離、構造決定を行うとともに、チュベロン酸グルコシドの生理活性について検討した。すなわち、第一部においてバレイショ葉から単離構造決定された塊茎形成誘導物質チュベロン酸グルコシドの生理活性について構造活性相関の点からその誘導体について塊茎形成誘導活性を調べその活性型の立体構造について検討を加えた。また塊茎形成時のポリアミン量の変動、塊茎形成誘導活性を有する物質の他の活性を調べた。塊茎形成誘導物質の利用法としてマイクロチュバー生産系への適用を試みた。第二部では代表的なナス科植物であるタバコ、バレイショについてその配糖体成分について存在を調べ、さらに根から分泌される物質の存在を調べた。

まず、チュベロン酸グルコシド（ＴＡＧ）の構造確認のため、これを合成し２種類のジアステレオマー混合物を得た。これを高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）にて分離精製後、合成品と天然物の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルデータを比較検討し天然物の側鎖の立体化学を２Ｓ，３Ｒと決定した。合成したチュベロン酸グルコシドの塊茎形成誘導活性はＴＡＧのほうがイソーＴＡＧよりも強かった。さらに合成した類縁体の塊茎形成誘導活性を比較し、塊茎形成誘導は３カ所の必須部分構造と側鎖の立体化学により左右されるこ

とが明らかにした。そこで、３つの不斉中心によって８つの光学異性体が生ずるククルビン酸メチル（methyl 1-hydroxy-2-(2'-(Z)-pentenyl) cyclopentane-3-acetate）をジャスモン酸メチルから調製し、ＨＰＬＣにて４つのジアステレオマーに分離精製し、各種ＮＭＲスペクトルの測定からそれぞれの相対配置を決定した後、光学分割カラムを用いて８つの光学活性体に分離した。これらについてジャスモン酸メチルへの再変換物の比旋光度を測定し各絶対構造を決定した後、塊茎形成誘導活性を比較した。　その結果、２S、３R体がもっとも活性が高かった。このことから、ジャスモン酸の立体化学が塊茎形成誘導活性に関与することを明かにした。

新しい種いも生産系として期待されるマイクロチューバー大量培養系にジャスモン酸メチルを利用する方法を検討した。その結果、Ｌ－アスコルビン酸等強い還元性を有する物質をＬＳ液体培地にジャスモン酸メチルと同時に添加することにより、継代培養したバレイショ無菌茎断片の節部に塊茎形成を誘導することを見いだした。

チュベロン酸グルコシドによる塊茎形成誘導の機作を調べるため、塊茎形成時に起こる現象について観察、検討した。　塊茎形成が起こる初期の過程でストロン先端の細胞壁微小管がいったん消失し塊茎形成が始まるのではないかという考えに基づきメイクイーンの培養細胞にジャスモン酸メチルを作用させた。その結果、微小管に対する消失効果が確認された。

また、無菌植物を用いて塊茎形成期における生体内のポリアミン量の変動を、プトレシン、スペルミジン、スペルミンについて調べたところ、塊茎形成初期にそれぞれいったんポリアミン量が増加しその後減少し、器官分化の際にポリアミンの生成が一時的に増加することが明らかになった。

バレイショ葉（男爵）中の配糖体成分の存在について検討した。バレイショ葉のメタノール抽出物から調製して得た不揮発性画分をβ－グルコシダーゼで処理して遊離したアグリコンをＧＣ－ＭＳ分析により検索し、３－オキソ－アクチニジオール、３－オキソ－α－イオノール、３－ヒドロキシ－β－イオノール、３、６－エポキシ－３、６－ジヒドロ－５－ヒドロキシ－β－イオノール、ブルメノール　C、３－ヒドロキシ－５、６－エポキシ－β－イオノール、３－ヒドロキシ－β－ダマスコンの７つのイオノール配糖

体、ルビミンの配糖体の存在を確認した。これらは遊離のアグリコンとしては検出されなかった。イオノール配糖体がナス科でタバコ以外にも存在することが明らかになった。

バレイショ葉中に存在するイオノール配糖体の種類および存在量をバレイショの成長過程に応じた各ステージごとに検討した。その結果、バレイショの成長とともに種類および存在量がともに増加し、最終ステージで急激に増大した。この結果はタバコのイオノール配糖体の経時変化と種類は異なるがよく一致していた。

黄色種葉たばこ中に存在する配糖体成分について調べ６つの新規セスキテルペン配糖体を単離、構造決定した。うち４つのアグリコンはソラナスコン骨格を有する新規化合物であった。これらのアグリコンはすべてタバコのファイトアレキシンとして知られるセスキテルペンあるいはそのヒドロキシ誘導体であった。

タバコについてその根から分泌される物質の検索を水耕、れき耕、根端培養により得た培養液を用いて行い、抗菌活性が知られている６つのセスキテルペンを単離、同定した。このうち１つはタバコ葉から初めて見いだされたセスキテルペンであり、根には葉とは別の生合成系でこれらがつくられることが示唆された。

配糖体成分はその分離精製の難しさもあって比較的最近まで未着手であったが、本研究ではナス科のテルペン配糖体に関する知見を得ることができた。また、バレイショ塊茎形成誘導物質チュベロン酸グルコシドに代表されるジャスモン酸類の生理活性と立体化学の関係を明かにするとともに、これをマイクロチューバー生産系に利用する技術を開発し確立させた。

謝辞

本研究を行うにあたり、御助言と御鞭撻を賜りました北海道大学市原耿民教授並びに水谷純也教授、吉原照彦助教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の実施を許可され、有益なご指導と御助言を賜りました日本たばこ産業株式会社　植物開発研究所横浜センター所長　藤森　嶺博士、医薬研究所副所長　大西昭男博士、生命科学研究所児玉　久博士、はじめ社員の皆様に、そのほか緒先輩方に厚くお礼申し上げます。また、本研究にあたり、ご協力くださいました北海道大学　幸田泰則助教授、東京大学　宝月袋造助教授、長谷川香料割田泰裕博士に深謝いたします。

おわりにあたり、帯広畜産大学　坂村貞雄学長には一貫した御指導、御鞭撻を賜りましたことを心より感謝致します。

引用文献

1) "Encyclopedia of Horticulture" ed. by Seibundo(1978).

2) Y. Okazawa, Proc. Crop. Sci. Soc. Japan,28,129(1958).

3) L. Gregory, Amer. J. Bot.,43,281(1956).

4) Y. Koda, E. A. Omer, T. Yoshihara, H. Shibata, S. Sakamura and Y. Okazawa, Plant Cell Physiol.,29,1047(1988).

5) T. Yoshihara, E. A. Omer, H. Koshino, S. Sakamura, Y. Kikuta and Y. Koda, Agric. Biol. Chem., 53,2835(1989).

6) H. Yamane, J. Sugawara, Y. Suzuki, E. Shimamura and N. Takahashi,Agric. Biol. Chem.,44,2857(1980).

7) H. Yamane, H. Takagi, H. Abe, T. Yokota and N. Takahashi, Plant & Cell Physiol.,22,689(1981).

8) H. Yamane, H. Abe and N. Takahashi, Plant & Cell Physiol.,23, 1125(1982).

9) J. Ueda and J. Kato, Plant Physiol.,66,246(1980).

10) J. Ueda and J. Kato, Z. Pflanzenphsiol, Bd.,103S.,357(1981).

11) J. Ueda, J. Kato, H. Yamane and N. Takahashi, Physiol. Plant., 52,305(1981).

12) S. Tsurumi and Y. Asahi, Physiol. Plant.,64,207(1985).

13) J. Ueda and J. Kato, Physiol. Plant.,54,249(1982).

14) M. Saniewski and J. Czapski, Experientia,39,1373(1983).

15) J. Czapski and M. Saniewski, Cartenbauwissenschaft, 50(1).s.,35 (1985).

16) T. C. Baker, R. Nishida and W. Roelofs, Science,214,1359(1981).

17) R. Nishida, T. C. Baker and W. L. Roelofs, J. Chem. Ecol.,8,947 (1982).

18) K. Kosimizu, H. Fukui, S. Usuda and T. Mitsui, "Plant Growth Substances 1973" Hirokawa Publishing Co.,p86(1974).

19) H. Fukui, K. Koshimizu, Y. Yamasaki and S. Usuda, Agric. Biol. Chem.,41,189(1977).

20) C. Bruckner, R. Kramell, G. Schneider, H. Knofel, G. Sembdner and K. Schreiber, Phytochemistry,25,2236(1986).

21) O. Miersh, A. Meyer, S. Vorkefeld and G. Sembdner, J. Plant Growth Regul.,5,91(1986).

22) B. A. Vick and D. C. Zimmerman, Plant Physiol.,64,203(1979)

23) B. A. Vick and D. C. Zimmerman, Biochem. and Biophysical Res. Commun.,III,470(1983).

24) B. A. Vick and D. C. Zimmerman, Plant Physiol.,75,458(1984).

25) N. T. Burbidge, Aust. J. Bot., 8,342(1960).

26) R. L. Rowland, P. H. Latimer and J. A. Giles, J. Am. Chem. Soc., 78,4680(1956).

27) I. Onishi and K. Yamazaki, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan,20,68 (1956).

28) I. Onishi, M. Nagasawa, H. Tomita and T. Fukuzumi, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan,22,17(1957).

29) 大西勳、永沢正敏、富田英夫、福澄哲夫、高原広康、砂川恵津子、専売中研 研究報告、９８，４５（１９５８）。

30) R. L. Stedman, Chem. Rev.,68,153(1968).

31) 藤森嶺、金子肇、日本農芸化学会誌、５３、１２９５（１９７９）。

32) 高木義和、学位論文、京都大学（１９８２）。

33) R. C. Anderson and D. M. Gunn, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1977,27.

34) R. C. Anderson, D. M. Gunn and J. A. Gibson, 特開昭５２－１８８３５。

35) H. Kodama, T. Fujimori and K. Kato, Agric. Biol. Chem.,45,941 (1981).

36) H. kodama, T. Fujimori and K. Kato. Agric. Biol. Chem.,46,1409 (1982).

37) H. Kodama, T. Fujimori and K. Kato, Phytochemistry,23,583(1984)

38) H. Kodama, T. Fujimori and K. Kato, Phytochemistry,23,690(1984)

39) H. Kodama, T. Fujimori and K. Kato, Agric. Biol. Chem.,49,2537 (1985).

40) Y. Matsubara, A. Sawabe, Y. Iizuka and K. Okamoto, J. Jpn. Oil Chem Soc.,37,13(1988).

41) D. T. Coxon, R. F. Curtis, K. R. Price and B. Howard, Tetrahedron lett.,2363(1974).

42) K. Tomiyama, T. Sakamura, N. Ishikawa, N. Sato and N. Katsumi, Phytopathology,58,116(1968).

43) R. S. Burden, J. A. Bailey and G. G. Vincent, Phytochemistry,14 221(1975).

44) J. A. Bailey, R. S. Burden and G. G. Vincent, Phytochemistry,14 597(1975).

45) T. Ito, T. Takahashi, Y. Oshima, H. Takusari and S. Odagiri, Agric. Biol. Chem., 43,413(1979).

46) T. Fujimori, R. Uegaki, Y. Takagi, S. Kubo and K. Kato, Phytochemistry,(1979).

47) 長瀬洋、吉原照彦、市原耿民　日本農芸化学会大会講演要旨集（１９９０）ｐ３０７。

48) 児玉久、学位論文、東京工業大学（１９８４）。

49) R. Nishida and T. E. Acree, J. Agric. Food Chem.,32,1001(1984).

50) R. Nishida, T. E. Acree and H. Fukami, Agric Biol. Chem.,49, 769(1985).

51) R. K. Hill and A. G. Edwards, Tetrahedron,21,1501(1965).

52) W. Koenigs and E. Knorr, Chem. Ber.,34,957(1901).

53) F. Bohlmann, P. Wegner and J. Jakupovic, Tetrahedron,40,2537 (1984).

54) E. A. Ｏｍｅｒ、学位論文、北海道大学（１９８８）。

55) Y. Koda, Y. Kikuta, H. Tazaki, Y. Tsujino, S. Sakamura and T. Yoshihara, Plant Cell Physiol., in press.

56) Y. Okazawa, J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.,55,267(1967).

57) 福井宏至、日本農芸化学会誌、５４、ｐ１０６７（１９８０）。
58) 割田泰裕、高木恵一、北原武、阿部正樹、森謙治、第３０回テルペンおよび香料学会講演要旨集（１９８８）。
59) J. Bryan, M. T. Jackson, M. Quevedo and N. Melendez, CIP, peru,1(1983).
60) P. Wang and C. Hu, Am. Potato J.,59,33(1982).
61) R. Estrda, P. Tovar and J. H. Dodds, Plant Cell, Tissue and Organ Culture,7,3(1986).
62) G. Hussey and N. J. Stacey, Ann. Bot.,48,787(1981).
63) G. Hussey and N. J. Stacey, Ann. Bot.,53,565(1984).
64) P. Tovar, R. Estrada, L. S. Rentschler and J. H. Dodds CIP Circular,13,1(1985).
65) G. Wattimena, B. Mccown and G. Weis, Am. Potato J., 60,27(1983).
66) 坂村徹、植物生理学、裳華房（１９５８）
67) N. J. Chinoy "The Role of Ascorbic Acid in Growth, Differentiation and Metabolism of Plants" ed. by Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publisher, The Hague(1984).
68) 岡沢養三、「生育のステージと生理、生態」　農業技術体系　農文協
69) Y. Okazawa, shokubutu no kagakuchousetu,14,67(1979).
70) Y. Koda, J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.,16,82(1988).
71) C. W. Lloyd, A. R. Slabas, A. J. Powell and S. B. Lowe, Planta, 147,500(1980).
72) I.N. Roberts, C. W. Lloyd and K. Roberts, Planta,164,439 (1985).
73) S. M. Wick and J. Duniec, J. Cell Biol.,97,235(1983).
74) S. M. Wick R. W. Seagull, M. Osborn, K. Weber and B. Gunning, J. Cell Biol.,89,685(1981).
75) H. Shibaoka, Plant Cell Physiol.,67,255(1974).

76) H. Shibaoka, shokubutu no kagakuchousetu,19,2(1984).
77) Y. Koda and Y. Okazawa, Japan J. Crop Sci.,52,592(1983.
78) 阿部道生、日本植物学会第５４回大会要旨集(1989)。
79) P. S. Collis et al., Science,202,440(1978).
80) S. Konishi and H. Yokota, Plant Cell Physiol.,21,255 (1980).
81) F. W. Martin, Plant Physiol,49,924(1972).
82) Y. Takeda, K. Samejima, K. Nagano, M. Watanabe, H. Sugita and Y. Kyogoku, Eur. J. Biochem.,130,383 (1983).
83) L. J. Marton and D. R. Morris, "Inhibition of Polyamine Metabolism", ed. by P. P. McCann et al., Academic Press, London,1987,p79.
84) A. Raina, T. Eloranta, R. J. Pajula, R. Mantijarvi and K. Tumoi, "Polyamines in Biochemical Research", ed. by J. M. Gaugas, Wiley,1980,p35.
85) C. W. Tabor and H. Tabor, "The Physiolgy of Polyamines" Vol. II, ed. by U. B. Bachrach and Y. M. Heimer, CRC Press, 1989,p63.
86) A. E. Pegg and P. P. McCann, Am. J. Physiol.,243,212(1982).
87) O. Heby, G. D. Luck and J. Schindler, "Inhibition of Polyamine Metabolism", ed. by P. P. McCann et al., Academic Press, London 1987,p165.
88) R. D. Slocum, R. Kaursawhney and A. W. Galston, Archives of Biochemistry and Biophysics,235,283(1984).
89) T. A. Smith, Phytochemistry,12,2093(1973).
90) T. A. Smith and G. R. Best, Phytochemistry,16,841(1977).
91) P. Torrigiani, V. Scoccianti and N. Bagni, Physiol. Planta., 74,427(1988).
92) S. Chatterjee, N. Maitra, B. Ghosh and S. P. Sen, Plant Cell

Physiol.,29,1207(1988).

93) N. Bangi, P. Barbieri and P. Torrigiani, J. Plant Growth Regul. 2,177(1983).

94) J. M. Tanguy, C. Martin, M. Paynot and N. Rossin, Plant Physiol.,88,600(1988).

95) 三内明美、学位論文、北海道大学。

96) 児玉久、たばこ日本,７２, ５６（１９８６）。

97) H. Kodama, T. Fujimori, H. Tanaka and K. Kato, Agric. Biol. Chem.,

98) T. Fujimori, R. Ksuga, H. Kaneko, S. Sakamura, M. Noguchi, A. Furusaki, N. Hashiba and T. Matsumoto, J. Chem. Soc., Chem. Commun.,563(1978).

99) H. Kodama, T. Fujimori and K. Kato, Agric. Biol. Chem.,48,3131 (1984).

100) I. M. Whitehead, D. F. Ewing and D. R. Threlfall, Phytochemistry,27,1365(1988).

101) R. S. Burden, R. S. T. Loeffler, P. M. Rowell, J. A. Beiley and M. S. Kemp, Phytochemistry,25,1607(1986).

102) D. G. Watson, D. S. Rycrft, I. M. Freer and C. J. W. Brooks, Phytochemistry,24,2195(1985).

103) R. S. Burden, P. M. Rowell, J. A. Bailey, R. S. T. Loeffler, M. S. Kemp and C. A. Brown, Phytochemistry,24,2191(1985).

104) S. Nisikawaji, T. Fujimori, S. Matsushima and K. Kato, Phytochemistry,24,2445(1985).

105) E. L. Rice "Allelopathy" 2nd ed., Academic press, Orlando,1984.

106) C. S. Tang and C. Young, Plant Physiol.,69,155(1982).

107) G. A. Stevens and C. S. Tang, J. Chem. Ecol.,11,1411(1985).

108) 長谷川浩、植雑、５１、３０６（１９３７）。

109) M. Noguchi,Y. Shimizu and A Tamaki, Agric. Biol. Chem.,24,626 (1961).

110) 清水義治、原口信夫、玉置英之助、 専売研究所速報、１０５、２８１（１９６３）。

111) H. Tazaki, H. Kodama, A. Ohnishi and T. Fujimori, Agric. Biol. Chem., 53,3037,(1989)

112) H. Tazaki, H. Kodama, T. Fujimori and A. Ohnishi, Agric. Biol. Chem.,50, 2231(1986)

113) H. Tazaki, H. Kodama, T. Fujimori and A. Ohnishi, Agric. Biol. Chem.,submitted.

114) H. Tazaki, T. Fujimori, K. Koda and T. Yoshihara, Agric. Biol. Chem.,in preparation.

115) 田崎弘之、辻野泰子、松木知子、吉原照彦、幸田泰則、特開平２－９２２１９（１９９０）、特開平２－９２２０。

116) H. Tazaki and T. Fujimori, Agric. Biol. Chem.,in preparation.

117) H. Tazaki, A. Ohnishi and T. Fujimori, Agric. Biol. Chem., in preparation.

118) T. E. Acree, R. Nishida and H. Fukami, J. Agric. Food Chem., 33,425(1985).

ARCHIVE COPY

inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19