

カラマツの新条に存在するジベレリン 様物質について (予報)

橋 詰 隼 人 (鳥取大学農学部造林学研究室)

Gibberellin-like Substances in New Shoots of *Larix leptolepis* (Preliminary Report)

Hayato HASHIZUME

(Laboratory of Silviculture, Faculty of Agriculture, Tottori University)

1965年9月15日受理

緒 言

イネの馬鹿菌病菌の代謝産物であるジベレリンはここ数年間のめざましい研究の結果、高等植物に広く存在することが明らかになり¹⁾²⁾、植物の生長に重要な植物ホルモンとみなされるようになった。現在まで 11 種類のジベレリンの構造が明らかにされ、高等植物からは少なくとも 4 種類のジベレリン (A₁, A₅, A₆, A₈) が分離されている。ジベレリンおよびその類似物質は広く植物界に分布しているが、村上³⁾⁴⁾によるとウリ科、マメ科、ヒルガオ科、ムクロジ科、ノウゼンハレン科のように「よじのぼり植物」を多く含む科の種子に多量に含まれている。本木植物ではミカンの徒長枝からジベレリン A₁ が単離された⁵⁾。またニセアカシア、ネムノキ、イヌエンジュ等のマメ科植物の未熟種子⁶⁾、リンゴの完熟種子⁷⁾、モモの若い果実⁸⁾ 等でジベレリン様物質が報告されている。しかし、林業上重要な裸子植物では KATO⁹⁾ 等が *Juniperus chinensis* の漿果で、斎藤・柴草¹⁰⁾ がトマツの芽でその存在を報告しているにすぎない。一方、外部から与えたジベレリンは多くの林木の茎の伸長を促進するが、とくにスギ科やヒノキ科の樹種では花芽分化を顕著に促進する。これらのことから、針葉樹においてもジベレリン様物質が重要な植物ホルモンとして存在しているものと推考される。本研究は北海道大学留学中に行なったものである。研究に際し御指導を賜わり、また色々便宜を計って下さった斎藤教授、武蔵助教授

に感謝の意を表する。

材料および実験方法

1. 材 料

材料は北海道大学農学部構内苗畑に植栽されている 10~15 年生のカラマツから採取した。8 月 10 日に生長している当年生葉条の先端 2~3 cm をつみとり、ジベレリン様物質の抽出に用いた。

2. 抽出と分離

ジベレリン様物質の抽出、分離は HAYASHI⁹⁾ 等の方法を応用して行なった (図-1)。すなわち、試料 700g (生重) をすりつぶし、1,200ml のメタノールを加え、0~2°C で 24 時間抽出した。抽出液を濾別し、さらに 80%メタノール 1,200ml で同様に 24 時間抽出した。メタノール抽出液はブフナー漏斗で濾過後、減圧下でメタノールを除き、少量の水溶液とした。水溶液は重炭酸ソーダで pH7.5 に調節し、酢酸エチルで数回振出して中性物質を分離した。酢酸エチル層は 1% 硫酸溶液で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧で濃縮して中性分画 (F-I) とした。1% 硫酸溶液層は苛性ソーダで pH7.5 とし、酢酸エチルで振出して塩基性分画 (F-II) とした。中性物質抽出後の重曹溶液層は磷酸で pH2.5 とし、酢酸エチルで数回振出して酸性分画とした。酸性分画は減圧で酢酸エチルを除き、HAYASHI⁹⁾ 等の方法により粉末セルロースのカラム (3×25 cm) の上端にお

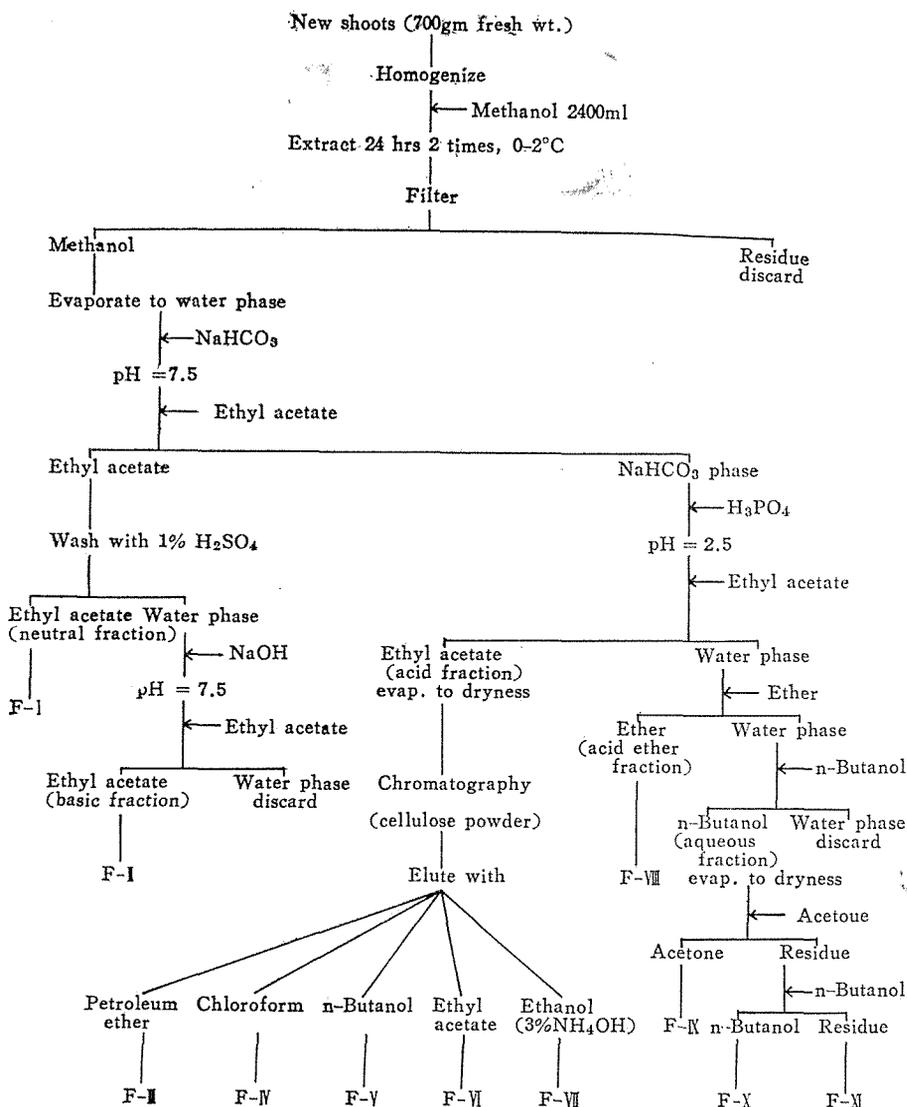


図-1. シベレリン様物質の抽出と分離の方法
 Fig. 1. Method for extraction and separation of gibberellin-like substances from larch shoots.

き、各々 300ml の石油エーテル、クロロホルム、n-ブタノール、酢酸エチル、エタノール (3% NH₄OH を含む) で順次展開してシベレリン様物質を溶出した (F-III ~ F-VI)。先の酸性物質を抽出した後の水層はエーテル、n-ブタノールで順次振出して、酸性エーテル分画 (F-VIII) および水溶性分画とした。n-ブタノール層は無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧下で乾固し、アセトン可溶部 (F-IX)、n-ブタノール可溶部 (F-X)、n-ブタノール不溶部 (F-XI) に細分した。

これらの各分画は濃縮後東洋紙 No. 50 の一端につけ、一次元上昇法により室温で約 25cm 展開した。展開溶媒は主として イソプロパノール/アンモニア/水 (8 : 1 : 1) を用いたが、本溶媒で直接展開するとシベレリン様物質と抑制物質がよく分離せず、そのため生物試験でシベレリン様物質が検出されない分画、すなわち F-I, F-V ~ F-VII, F-IX, F-X は最初イソブタノール/メタノール/水 (80 : 5 : 15) で展開し、展開紙を Rf 0 ~ 0.5 と Rf 0.5 ~ 1.0 の部分に 2 分し、それぞれを最初分画の抽出に

用いた溶媒で溶出して、ふたたびイソプロパノール-アンモニア/水 (8:1:1) で展開した。

3. 生物試験

ジベレリン様物質の検出は村上¹⁰⁾のイネ苗試験法により行なった。展開後風乾したる紙は原点から先端までを10等分し、各切片を直径3cm、高さ7cmの管びんにいれ、蒸留水を2ml加えた。これに発芽直後の子葉鞘が1mm前後に伸びたイネの芽ばえを7個ずつ植え付け、ポリエチレンでおおった。管びんは27~28°Cの恒温器にいれ、自然日長で7日生長させた後第2葉鞘の長さを測定した。検定に用いたイネ品種は農林22号である。

実験結果

1. ジベレリンと天然抑制物質との関係

イネ苗試験法でジベレリンを測定する場合、抽出物中に抑制物質が混在するとジベレリンの作用が打ち消される場合がある。針葉樹には天然の抑制物質とりわけ inhibitor β が多量に含まれているので、カラマツ葉条から抽出した inhibitor β がジベレリンの作用にどのような影響をおよぼすか実験した。

カラマツ葉条 700g のメタノール抽出物の酸性分画をイソブタノール/メタノール/水 (80:5:15) で展開し、抑制部分 (Rf0.7~0.8) を切り取り、メタノールで溶出した。メタノール溶出液は濃縮してろ紙につけ、イソプロパノール/アンモニア/水 (8:1:1) で再展開した。展開ろ紙の抑制部分 (Rf0.7~0.8) を切り取り、メタノールで再溶出し、メタノールを除去して粗 inhibitor β をえた。これを別に用意してあるジベレリン溶液 (濃度0, 0.1, 1 および 10 μ g/ml) 2ml を含む管びんに 1,000 μ g ずついれ、イネ苗試験に供した。対照として inhibitor β を加えないものを同様にテストした。27~23°C で5日培養し、調査した結果は図-2の如くである。

第2葉鞘の伸長は対照区ではジベレリンの濃度の増加にともない急激に増大した。しかし、inhibitor β 添加区はジベレリンの作用が抑制され、伸長量の増加は緩慢であった。対照に対する伸長率はジベレリンの濃度の増加にともない減少している。すなわち、inhibitor β の阻害度はジベレリンの濃度が増加する程大となる。

2. ジベレリン様物質と抑制物質の分離

前の実験で、イネ苗試験法では抑制物質が共存するとジベレリンの作用が打ち消される。したがって、生物試

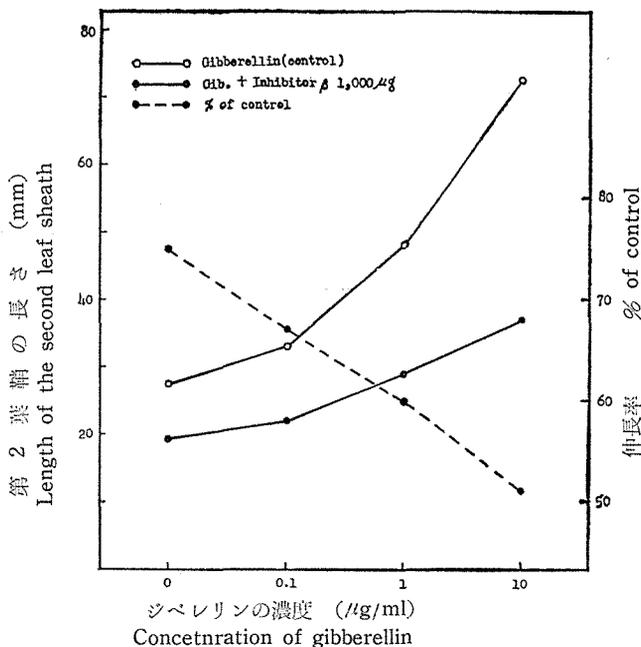


図-2. ジベレリンの作用におよぼす inhibitor β の影響
Fig 2. Effect of acid inhibitor β of larch shoots on the gibberellin action.

験の試料からあらかじめ抑制物質を除去しておく必要がある。ジベレリンはクロロホルムに殆んど不溶であるが馬鈴薯やアサガオの抑制物質は易溶である。それ故、岡沢¹¹⁾ や村上¹²⁾ は抽出物の酸性分画の水溶液をエーテル振出前にクロロホルムで振出して抑制物質を分離している。筆者も同様の実験を行なったが、カラマツ抽出物の酸性分画の inhibitor β はクロロホルムで殆んど振出されなかった。そこでペーパー・クロマトグラフィーによる分離を試みた。抽出物にジベレリン A₃ を添加し、次の3種類の溶媒で展開した。(a) イソプロパノール/アンモニア/水 (8:1:1), (b) n-ブタノール/アンモニア/水 (100:3:18), (c) イソブタノール/メタノール/水 (80:5:15)。

いずれの展開液においてもジベレリン A₃ と inhibitor β は完全に分離できなかった。しかし、展開液 (c) でジベレリン A₃ は Rf0.3~0.6, inhibitor β は Rf 0.5~0.8 で認められた。そこで Rf0.5 でクロマトグラムを2分し、Rf 0~0.5の部分(分画-I)と Rf0.5~1.0の部分(分画-II)を別々にメタノールで溶出し、再び (a) 液で展開した。生物試験の結果、大部分のジベレリン様物質は分画-Iで、inhibitor β は分画-IIで検出された。しかし、展開液 (c) では展開温度や抽出物の影響でジベレリン A の Rf 値が変動する場合があ

り、本法はなお検討の余地がある。

各分画の生物試験の結果は図-3~4の如くである。

3. 新条に存在するジベレリン様物質

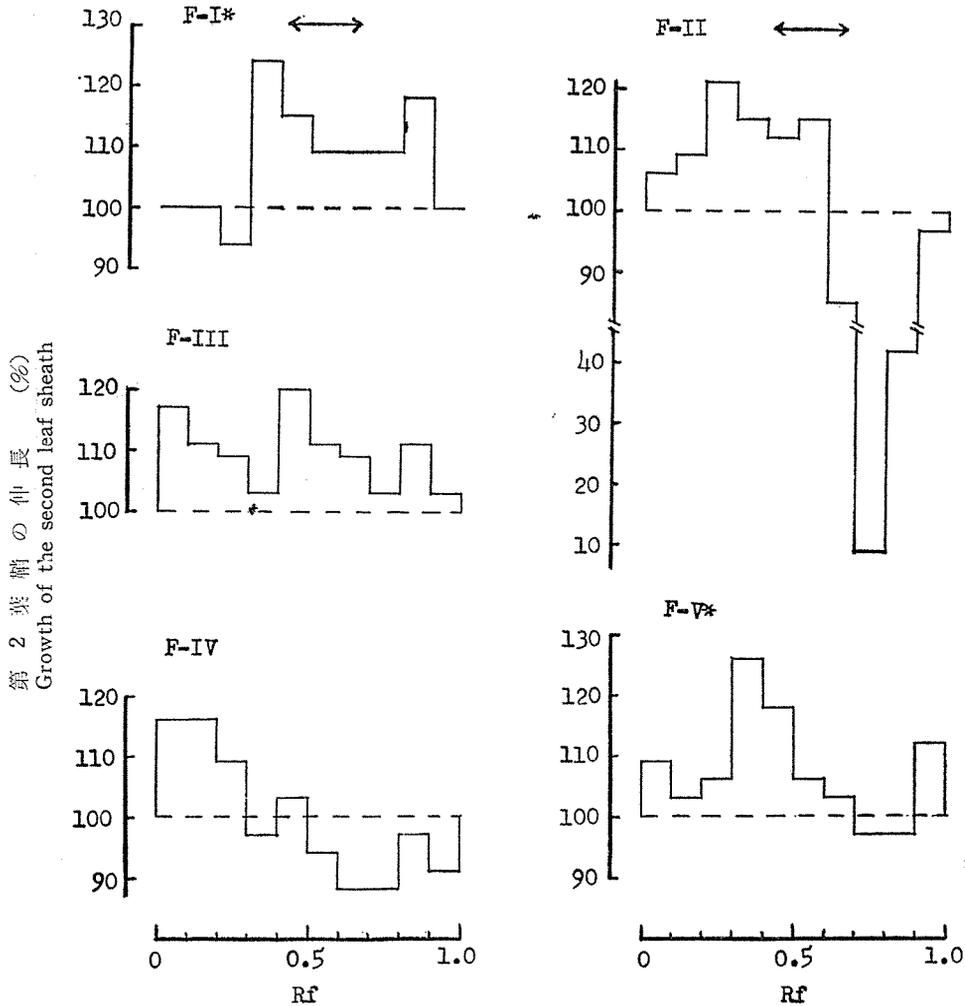


図-3. カラツ葉条の抽出物に含まれるジベレリン様物質の生物試験
 F-I.—中性分画。F-II.—塩基性分画。F-III.—酸性石油エーテル分画。F-IV.—酸性クロロホルム分画。F-V.—酸性n-ブタノール分画。点線は対照区の生長を、矢印はジベレリンAの位置をしめす。

展開溶媒、イソプロパノール/アンモニア/水 (8:1:1)。※印を付した分画はイソブタノール/メタノール/水 (80:5:15) で展開後 Rf 0~0.5の部分を生出し、イソプロパノール/アンモニア/水で展開した。

Fig. 3. Response of rice seedlings to gibberellin-like substances in extracts from larch shoots.

F-I.—Neutral fraction. F-II.—Basic fraction. F-III.—Acid petroleum ether fraction. F-IV.—Acid chloroform fraction. F-V.—Acid n-butanol fraction.

Broken lines denote water controls. Arrows at the top of the histograms indicate the position of gibberellin A. Developing solvent, isopropanol/ammonia/water(8:1:1). F-I, F-V~F-VII, F-VIII and F-IX were first chromatographed with isobutanol/methanol/water (80:5:15), and the part of Rf 0~0.5 of the chromatogram was eluted and rechromatographed with isopropanol/ammonia/water.

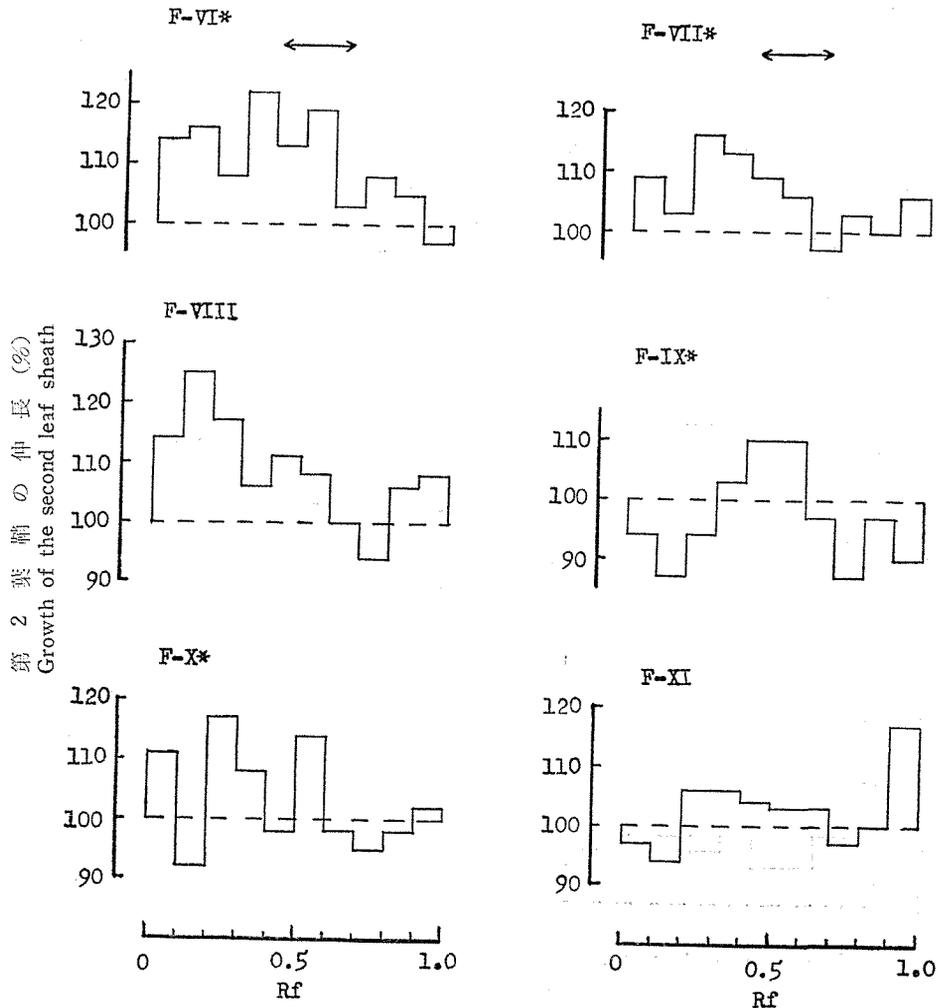


図-4. カラマツ葉条の抽出物に含まれるジベレリン様物質の生物試験

F-VI. — 酸性酢酸エチル分画。 F-VI. — 酸性エタノール分画。 F-VIII — 酸性エーテル分画。
F-IX. — 水溶性分画, アセトン可溶部。 F-X. — 水溶性分画, n-ブタノール可溶部。 F-XI.
— 水溶性分画, n-ブタノール不溶部。

Fig. 4. Response of rice seedlings to gibberellin-like substances in extracts from larch shoots.

F-VI. — Acid ethyl acetate fraction. F-VII. — Acid ethanol fraction. F-VIII. — Acid ether fraction. F-IX. — Aqueous fraction, acetone soluble. F-X. — Aqueous fraction, n-butanol soluble. F-XI. — Aqueous fraction, n-butanol insoluble. Other descriptions are the same as those in Fig. 3.

ただし、F-I, F-V~F-VII, F-IX, F-Xは直接アンモニア性イソプロパノールで展開すると抑制物質のためジベレリン様物質が検出できないので、前述の如くイソブタノール/メタノール/水で展開後 Rf 0~0.5 の部分を溶出し、アンモニア性イソプロパノールで再展開した。

中性分画 (F-I) では2つの促進帯がみられるが、

Rf0.3~0.4 の促進帯が顕著である。塩基性分画 (F-II) では、Rf0~0.6 に促進帯があるが、Rf0.2~0.3 の作用力が最も大である。酸性分画では、石油エーテル分画 (F-III) で少なくとも2つ (Rf0~0.1, 0.4~0.5), クロロホルム分画 (F-IV) で1つ (Rf0~0.2), n-ブタノール分画 (F-V) で1つ (Rf0.3~0.5), 酢酸エチル分画 (F-VI) で3つ (Rf0~0.2, 0.3~0.4, 0.5

~0.6), エタノール分画 (F-VII) で1つ (Rf0.2~0.3) の促進帯がみられた。酸性エーテル分画 (FVIII) では Rf 0~0.3 に促進帯がみられる。水溶性分画では, n-ブタノール可溶部 (F-X) で2つ (Rf0.2~0.3, 0.5~0.6), n-ブタノール不溶部 (F-XI) で1つ (Rf0.9~1.0) 促進帯がみられた。

4. 2,3のジベレリン様物質の性質

中性分画の Rf0.3~0.5 の促進帯および酸性n-ブタノール分画の Rf 0.3~0.5 の促進帯をそれぞれメタノールで溶出し, メタノール除去後前者に1% emulsin

(β glucosidase) (pH4.6) を加え, 30°Cで24時間加水分解した。後者は1 N HCl で1時間100°Cで加水分解した。分解の終わった水層は pH2.5 に調節し, 酢酸エチルで振出した。酢酸エチル層は濃縮後ろ紙につけ, アンモニア性イソプロパノールで展開した。残りの水層は pH7.0 とし, 濃縮後 n-ブタノール/酢酸/水 (4:1:2) で展開した。別に水溶性分画の n-ブタノール不溶部の Rf0.9~1.0 の促進帯を 50%メタノールで熱時抽出し, アンモニア性イソプロパノールで展開した。

生物試験の結果は 図-5 の如くである。中性分画の加水分解物の酸性分画では Rf 0~0.1 と 0.8~1.0 に

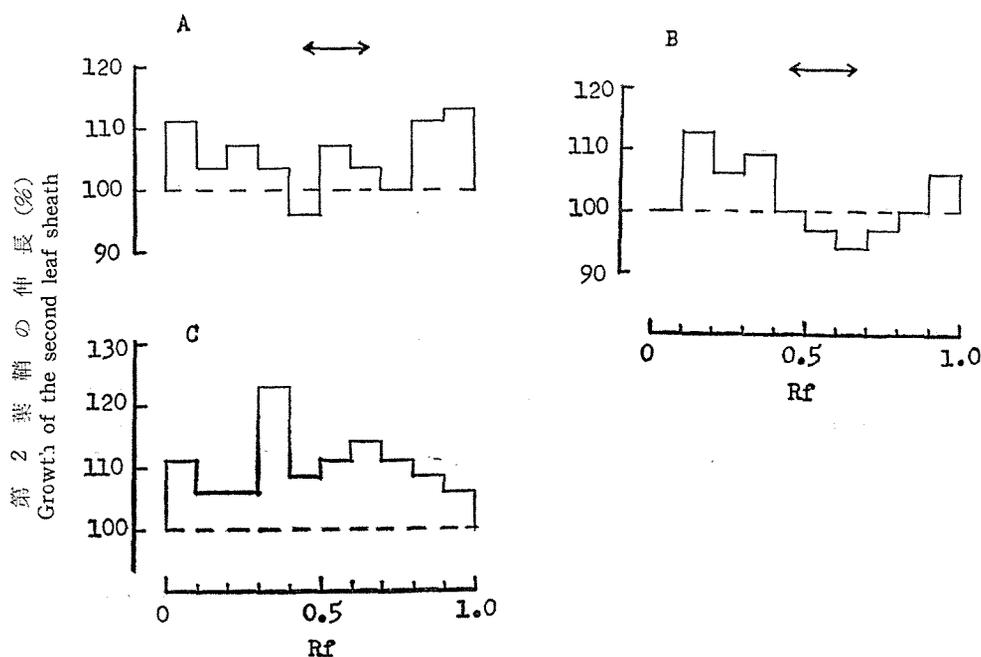


図-5. 加水分解あるいは溶出によるジベレリン様物質の変化

- 中性分画のRf0.3~0.5の促進帯を emulsin で加水分解したもの。
- 酸性n-ブタノール分画のRf0.3~0.5の促進帯を 1N HClで加水分解したもの。
- 水溶性分画のRf0.9~1.0の促進帯を50%メタノールで熱時抽出したもの。展開溶媒, イソプロパノール/アンモニア/水 (8:1:1)。

Fig. 5. Changes of gibberellin-like substances caused by hydrolysis or eluation.

- Hydrolysis products from an active zone of Rf 0.3~0.5 in neutral fraction. The eluate of the active zone was hydrolyzed with emulsin at 30°C for 1 day.
- Hydrolysis products from an active zone of Rf 0.3~0.5 in acid n-butanol fraction. The eluate of the active zone was hydrolyzed with 1 N HCl at 100°C for 1 hour.
- Eluates from an active zone of Rf 0.9~1.0 in aqueous fraction. The active zone was eluted with boiling 50% methanol. Developing solvent, isopropanol/ammonia/water (8:1:1).

弱い促進帯がみられるようである。酸性n-ブタノール分画の加水分解物では Rf0.1~0.2 にわずかに促進がみられる。

水溶性分画の熱メタノール抽出物では Rf0.3~0.4 にかなり顕著な促進帯がみられた。また Rf 0~1.0 および 0.6~0.7 附近にも促進の傾向がみられる。中性分画

および酢酸 n-ブタノール分画の加水分解物の酸性エチル振出後の水層の展開クロマトグラムはアンモニア性硝酸銀により糖類の検出を試みたが、加水分解により遊離した糖類は認められなかった。

考 察

イネ苗試験法でジベレリンを検出する場合、共存する抑制物質はジベレリンの作用を阻害する。一般に針葉樹は抑制物質を多量に含んでおり、あらかじめ試料から化学的にそれを除去しておかなければ生物試験で良好な結果がえられない。しかし、抑制物質に対する感受性の低い試験法で測定することも考えられる。KOSHIMIZU¹³⁾等はタケのジベレリン様物質は強力な抑制物質のためイネ苗試験法では検出できないので、矮性トウモロコシを使用している。抑制物質の分別法および生物試験の方法については今後さらに検討しなければならない。

高等植物からジベレリン様物質を抽出した報告は無数にあるが^{1~2)}、裸子植物物では *Juniperus chinensis*⁷⁾ トドマツ⁸⁾ で報告されているにすぎない。前の実験でカラマツの新条抽出物には中性分画で2種類 (Rf0.3~0.4, 0.8~0.9), 塩基性分画で1種類 (Rf0.2~0.3), 酸性分画で少なくとも3種類 (Rf0~0.2, 0.3~0.5, 0.5~0.6), 水溶性分画で2種類 (Rf0.2~0.3, 0.9~1.0) のジベレリン様物質が認められた。中性ジベレリン様物質は HAYASHI⁹⁾等, MURAKAMI¹⁵⁾ によって報告されているが、カラマツでみられる Rf0.3~0.4 の物質は HAYASHI⁹⁾ 等が馬鈴薯塊茎で報告している potato factor I, あるいは村上¹⁶⁾ が植物組織で生合成したジベレリン A₃ グルコシドと Rf 値が大体一致する。また斎藤等はトドマツの芽の中性分画で Rf0.2~0.4⁸⁾ の促進帯を報告している。potato factor I は化学処理により酸性ジベレリン (Rf0.4~0.6) に転化する¹⁷⁾。ジベレリン A₃ グルコシドは加水分解によりジベレリン A₃ とグルコースに解離する。カラマツの中性ジベレリン様物質は emulsin 分解の結果、ジベレリン A₃ グルコシドではないようである。

酸性分画中、石油エーテル分画の促進物質は既知ジベレリンとは異なる。既知ジベレリンは石油エーテルに不溶である。石油エーテル可溶のジベレリン様物質は HAYASHI⁹⁾ 等が馬鈴薯塊茎で報告している。ジベレリン A₅ と A₇ は pH2.5~5.0 でクロロホルムに部分的に溶解するが⁹⁾、カラマツ葉条のクロロホルム分画の促進物質 (Rf0~0.2) はジベレリン A₅, A₇ よりも Rf 値が低い。n-ブタノール分画および酢酸エチル分画の Rf0.3~0.5 の物質と酢酸エチル分画の Rf0~0.2 の物質は

それぞれ OGAWA¹⁸⁾ の報告している *Pharbitis factor* II よび III に該当する。後者はトドマツの芽でもみられる⁸⁾; これらはまた MURAKAMI¹⁹⁾ の報告している水溶性ジベレリンと Rf 値が一致するが、抽出方法からして別のもと思われる。これらの Rf 中位および低位のジベレリン様物質の本体は明らかにされていない。酢酸エチル分画の Rf0.5~0.6 の物質は OGAWA¹⁸⁾ の *Pharbitis factor* I に該当し、トドマツの芽でも報告されているが⁸⁾、これはジベレリン A と Rf 値が一致する。酸性エーテル分画の Rf 低位の促進物質はいかなるものか不明である。

水溶性分画の Rf0.2~0.3 および 0.9~1.0 の物質は MURAKAMI¹⁹⁾ の水溶性ジベレリンとはことなる。しかし、前者は OGAWA¹⁸⁾ の報告している水溶性分画の1物質と Rf 値が大体一致する。Rf0.9~1.0 の物質は熱メタノールで溶出し、再びクロマトグラフィーで分離すると Rf0.3~0.4 に促進作用がみられる。これは MURAKAMI の水溶性ジベレリンの1つと Rf 値が一致する。溶出と再クロマトグラフィーによる物質の転化はオーキシンでしばしばみられる^{20~22)}。かようなオーキシンを "interconvertible auxin" と称しているが、上述のような変化はこの現象によくにている。本実験においては、一部分画で抑制物質を除くために溶出と再クロマトグラフィーを実施したので、このような転化したジベレリン様物質が含まれているかも知れない。なお、最近 gibbane 環をもたない kaurenoides や helminthosporol のような物質がジベレリンの bioassay で活性をしめすことが報告されているので²⁾ 本実験で検出されたジベレリン様物質の中にそのようなものが含まれている可能性も十分考えられる。

要 約

カラマツ葉条のメタノール抽出物をいくつかの分画にわけ、ペーパークロマトグラフィーとイネ苗試験法を併用してジベレリン様物質が含まれているか否かを調べた。

アンモニア性イソプロパノールで展開した場合、中性分画で2種類 (Rf0.3~0.4, 0.8~0.9), 塩基性分画で1種類 (Rf0.2~0.3), 酸性分画で少なくとも3種類 (Rf0~0.2, 0.3~0.5, 0.5~0.6), 水溶性分画で2種類 (Rf0.2~0.3, 0.9~1.0) のジベレリン様物質が認められた。これらのうち酸性分画の1種類 (Rf0.5~0.6) はジベレリン A と Rf 値が一致する。水溶性分画の Rf0.9~1.0 のジベレリン様物質は熱メタノール溶出、再クロマトグラフィーにより別のジベレリン様物質に転

化するようである。

イネ苗試験法でジベレリンを測定する場合、カラマツ葉条に含まれる inhibitor β はジベレリンの作用を阻害した。

引用文献

- 1) PHINNEY, B. O. : Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 411~436, 1960.
- 2) 村上 : 植物生理, 4, 189~204, 1965.
- 3) MURAKAMI, Y. : Bot. Mag. Tokyo, 72, 36~43, 1959.
- 4) ———— : Bot. Mag. Tokyo, 72, 438~442, 1959.
- 5) KAWARADA, A. and SUMIKI, Y. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 23, 343~344, 1959.
- 6) HIRONO, Y., OGAWA, Y. and IMAMURA, S. : Plant and Cell physiol. 1, 81~89, 1960.
- 7) KATO, J., PURVES, W.K. and PHINNEY, B.O. : Nature, 196, 687~688, 1962.
- 8) 齊藤・柴草 : 日林北海道支部講集, 13, 79~84, 1964.
- 9) HAYASHI, F., BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT, S. and RAPPAPORT, L. : Plant physiol. 37, 774~780, 1962.
- 10) MURAKAMI, Y. : Bot. Mag. Tokyo, 70, 376~382, 1957.
- 11) 岡沢 : 自作紀, 28, 129~133, 1959.
- 12) MURAKAMI, Y. : Bot. Mag. Tokyo, 74, 241~247, 1961.
- 13) KOSHIMIZU, K., IWAMURA, H., MITSUI, T. and OGAWA, Y. : Nature, 196, 1306~1307, 1963.
- 14) HAYASHI, F. and RAPPAPORT, L. : Nature, 195, 617~618, 1962.
- 15) 村上 : 日本植物生理学会シンポジウム, 6, 62~65, 1955.
- 16) MURAKAMI, Y. : Bot. Mag. Tokyo, 74, 424~425, 1961.
- 17) HAYASHI, F. and RAPPAPORT, L. ; Plant physiol. 37 (suppl.) 36~37, 1962.
- 18) OGAWA, Y. : Plant and Cell Physiol. 4, 217~225, 1963.
- 19) MURAKAMI, Y. : Bot. Mag. Tokyo, 75, 451~452, 1962.
- 20) AUDUS, L. J. and GUNNING, B. E. S. : Physiol. Plantarum, 11, 685~697, 1958.
- 21) GUNNING, B.E.S. : Nature, 192, 661~662, 1961.
- 22) FAWCETT, C.H. : Ann. Rev. Plant physiol. 12, 345~363, 1961.

Summary

The present investigation was undertaken to ascertain whether the natural gibberellin is contained in the larch plant or not. Gibberellins were extracted with cold methanol from larch shoots, separated by paper chromatography, and bioassayed by rice seedling method. Solutions of isopropanol/ammonium hydroxide / water (8 : 1 : 1 v/v) and isobutanol / methanol / water (80 : 5 : 15 v/v) were used as developing solvents.

When developed with ammoniacal isopropanol, gibberellin-like activity was found at Rf 0.3~0.4 and Rf 0.8~0.9 in neutral fraction and at Rf 0.2~0.3 in basic fraction, respectively. In acid fraction, at least three zones of gibberellin-like activity were found at Rf 0~0.2, Rf 0.3~0.5 and Rf 0.5~0.6. The active zone of Rf 0.5~0.6 corresponded to the Rf value of gibberellin A. Two similar active zones were also seen at Rf 0.2~0.3 and Rf 0.9~1.0 in aqueous fraction. The substances existing in an active zone of Rf 0.9~1.0 seemed to be converted into other gibberellin-like substances when eluted and rechromatographed. Inhibitor β obtained from larch shoots inhibited the action of gibberellin on rice seedlings.