

植物の運動・光屈性を制御する
鍵化学物質に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
博士（生物科学）学位論文

東郷 重法

寄贈
東郷重法氏

07007045

目次

序章		1
図・表		1 3
第1章	トウモロコシ幼葉鞘の光屈性制御物質	2 2
序論		2 3
材料と方法		2 4
結果と考察		2 6
要約		2 9
図・表		3 1
第2章	トウモロコシ幼葉鞘の光屈性を制御する 鍵化学物質の単離と同定	3 5
序論		3 6
材料と方法		3 7
結果と考察		3 9
要約		4 1
図・表		4 2
第3章	ダイコン下胚軸の光屈性における光誘導性 成長抑制物質raphanusol AとBの役割	4 8
序論		4 9
材料と方法		5 0
結果		5 2

考察		5 3
要約		5 5
図・表		5 6
第 4 章	ヒマワリ下胚軸の光屈性鍵化学物質の探索	6 0
序論		6 1
材料と方法		6 2
結果と考察		6 4
要約		6 7
図・表		6 8
総合考察		7 5
謝辞		8 2
引用文献		8 3

序章

植物の運動

広辞苑では、植物は、運動や感覚の機能を持つ動物と対置され、草や木など、根が生えて固定的な生活をしている生物のことをいうと書かれている。しかし、進化論で有名なC.Darwinとその息子のF.Darwin（1880年）は彼らの著書“The power of movement in plants”の中で、300種を超える植物の様々な運動について膨大な実験を行い、植物が運動することを見出している。一般に、植物の運動は主に1)屈性（tropism）、2)傾性（nasty）、3)走性（taxis）に分けられる。屈性は、刺激の方向に一定の運動をする現象をいい、刺激が光の場合、光屈性（phototropism）といい、刺激が重力の場合、重力屈性（gravitropism）という。また、まきひげの運動も屈性反応であり、接触屈性（thigmotropism）という。これに対して、刺激の方向とは無関係に一定の運動を示す現象を傾性といい、就眠運動、花の開閉運動や食虫植物の運動などが挙げられる。また、藻類などが、光の方向を見分け、時には光源の方向に向かってまっすぐに、逆の場合には光源と反対方向の暗がりに向かってまっすぐに泳ぐ現象は走性という。これらの植物の運動の中で、最も多くの植物学者によって精力的に研究されてきたのが、植物が光の方向に屈曲・成長する現象である“光屈性”である（Fig.0-1）。光屈性の生物学的意味については、光合成のための光エネルギーを葉で効率よく捕捉するために、光に対して葉を垂直に位置させるべく、莖を光方向に屈曲させると考えられている。

光屈性の研究史

Cholodny-Went 説

Möbius(1937年)によれば、光屈性に関して確認される最初の記述は、De Varro (B.C.+100年) によるものである。当時は屈日性(heliotropism)と呼ばれたこの現象は、17世紀から18世紀にかけては、温度や水分の蒸発と関係があると言われてきた(一方向からの光刺激によって光側組織の水分量の減少が起こると考えている研究者は現在も存在する)。しかし、本格的な光屈性の研究は、前述のDarwin父子の“The power of movement in plants”に始まったといっても過言ではない。彼らは地中海沿岸に自生するカナリアクサヨシの芽生えを用いて、その先端に光が当たらないように、先端を切除したり、不透明な帽子(鷲鳥の羽毛根)を被せた場合に光屈性が起こらないことを見出し、“先端が光を感受し、何らかの因子が先端から下部(屈曲する部位)に移動することによって、芽生えが屈曲する”と解釈した(Fig.0-2)。Darwinの実験の是非については後述するが、植物の光屈性を動物の神経伝達機構と対比させて考察しなかったようである。

20世紀に入り光屈性の機構について、二つの相反する仮説が提唱された。その一つはBlaáuwの仮説(1915年)である。彼は、ヒマワリ芽生えを用いて光屈性が光側組織の局所的な成長抑制によって引き起こされることを示した。光屈性において光強度 \times 照射時間が一定であると屈曲の度合いも同じであり、光屈性は光成長反応の差によって説明出来ると主張した。しかし、この仮説は後に必ずしも

植物一般に適応出来ないことが示されたため、彼の仮説は否定的な方向に追いやられた。もう一つは Cholodny-Went の仮説 (Went and Thimann, 1937 年) であり、植物ホルモンのオーキシンが光側組織から影側組織に横移動することによって影側組織の成長が促進され、同時に光側組織の成長が抑制されて光方向に屈曲するというものである。この仮説は最初の植物ホルモン発見の端緒となったこともあり、最近まで多くの研究者によって支持されてきた。Darwin の著書同様、Cholodny-Went 説に重要な影響を与えた古典的な実験がいくつかある。

Paál (1919年) は、アベナ幼葉鞘の先端と下部の間に薄い寒天片を差し込んだときに観察された光屈性が、間に金属片を差し込んだときには起こらなかったことから、寒天片を通過する化学物質が光屈性に重要な役割を演じていると解釈した。Boysen-Jensen ら (1913、1926年) も光屈性に関して多くの実験を行っている。その中で、重要な実験として、雲母片 (物質の移動を妨げる目的で使用) を差し込んだアベナ幼葉鞘の先端部に対して水平あるいは垂直に光を照射したとき、前者では屈曲が見られたが、後者では屈曲が見られなかったという (Fig. 0-3)。これらのことから、芽生えの先端で生成された化学物質が、先端部の光側と影側組織の間で横移動することによって、光屈性が引き起こされると解釈された。これらの実験を発展させたのが Went である。

Went (1928年) はアベナ幼葉鞘の先端部から拡散してくる物質を寒天片に集め、その寒天片の一部を先端部を切除したアベナの芽生えの片側に載せたところ、載せた側と反対方向に屈曲することを見出した。また、この屈曲角度は寒天片に載せたアベナ幼葉鞘の先端

部の数に比例することも分かった。この生物検定法はアベナ屈曲試験といわれ、今日でも植物ホルモンのオーキシンの活性試験に用いられている。彼はまた、アベナ芽生えに片側から光を照射し、先端部を切り取り、雲母片で仕切った寒天片の上に光側と影側組織に二分されるように差し込み、しばらくの間暗黒下に置いた。その後、光側と影側組織の下の寒天片をそれぞれアベナ屈曲試験にかけたところ、影側の方が光側より大きな屈曲を示したことから、成長を促進する化学物質が光側から影側組織に横移動することによって屈曲すると解釈した (Fig. 0-4)。

Wentと同じオランダのUtrecht 大学にいた有機化学者のKöglらが、人の尿からWentの考案したアベナ屈曲試験で活性を示す物質を数種類抽出した。彼らはギリシャ語のauxein (to increase)に因んでauxin(オーキシン)と命名し(1931年)、それらの化学構造を決定した(1934年、Fig. 0-5)。しかし、これらの物質のうち、hetero-auxin(現在のindole-3-acetic acid(IAA)、インドール酢酸)は人尿だけでなく、植物にも存在することが判明したが、他のauxin a、auxin aのlactoneやauxin bは人の尿にも植物にも全く存在しないことがKöglの没後、Vliegenthartら(1966年)や松井と中村(1966年)によって明らかにされ、Köglらの報告したデータは疑問視された。

WentとThimann(1937年)は、一方向からの光照射によって、芽生えの先端部においてオーキシンが組織内を光側から影側へと横移動し、光側組織のオーキシン量の減少によって成長が抑制され、逆に影側組織のオーキシン量の増加によって成長が促進されることで光側へ屈曲すると解釈した。同様な解釈は重力屈性にも当てはまる

こと（重力刺激によって上側から下側組織にオーキシンの移動することによって、上側組織の成長が抑制され、逆に下側組織の成長が促進されることによって芽生えが上側に屈曲する）が、すでに Cholodny（1927年）によって示されていたことから、Wentと Thimann は、光屈性や重力屈性はいずれもオーキシンの偏差分布によって引き起こされるという、Cholodny-Went 説を提唱した（1937年）。その後、Briggs（1957年）が、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性がオーキシンの光側・影側組織の偏差分布によって引き起こされることをアベナ屈曲試験で明らかにし、Cholodny-Went説を支持する論文を発表し、以来、何の疑問もなく、広く信じられてきた。

Cholodny-Went 説への挑戦

オランダの Bruinsma と Knecht ら（1975年）は、世界に先駆けて、植物中に微量にしか存在しないオーキシン（インドール酢酸, IAA）の量を高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography, HPLC）で分離・精製した後に機器分析（インドール酢酸を強い蛍光を発する indolo- α -pyrone に変えて、蛍光分析器によって測定する方法）によって定量する方法を考案した。その結果、ヒマワリ芽生えの光屈性に伴う光側組織と影側組織における IAA 量は全く均等に分布していることが分かった。彼らは、同時に光側組織で中性の成長抑制物質が増量することも明らかにした。つまり、光屈性はオーキシンの偏差分布によって引き起こされるという Cholodny-Went 説では説明出来ず、光側組織で成長抑制物質が生成され、光側組織の成長が抑制されることによって引き起こされると考察し、Blaauw の説を支持した。同時に、彼らはこの抑制物質

を、光によってその生成が誘導されることが知られていた xanthoxin であると報告した。しかし、この xanthoxin をヒマワリ芽生えの片側に投与した場合、投与側に屈曲させることは出来なかった（もし、ヒマワリ芽生えの光屈性を制御する物質であったならば、人為的に濃度勾配を誘導した時、投与側に屈曲する筈である）ことなどから、彼らの主張を認める研究者は多くなかった。しかし、Cholodny-Went 説に疑問を呈したのは Bruinsma らだけではなかった。イギリスの Firn (1980年) は例えオーキシンの横移動が起こったとしても、Went や Briggs らが示したオーキシンの光・影側の分布差（光側：影側=1: 2~3）ではなく、その10倍もの分布差がないと屈曲は引き起こされないことを主張した。

Cholodny-Went 説の復活

Bruinsma ら、Firn ら更に Hasegawa ら（後述）のグループによって、Cholodny-Went 説では光屈性は説明出来ないことが、多くの証拠を基に報告されたのに対して、Cholodny-Went 説を修正した上でこの説の妥当性を主張したのが、MacDonald と Hart (1987年) のグループであった。彼らはオーキシンの感受性の高い表皮組織におけるオーキシン量が問題であるので、刺激側（光屈性の場合、光側に相等する）と反対側（影側）に二分した場合は量的にその差が小さくとも光及び重力屈性は、Cholodny-Went 説で説明出来ると力説した (Fig. 0-6)。

Cholodny-Went 説への再挑戦

MacDonald と Hart 説に対抗して、二つのグループによって精密な

研究報告がなされた。ドイツのWeilerらのグループ（1988年）は免疫学的手法を用いて、光屈性刺激を与えたヒマワリ下胚軸の表皮組織と内部組織におけるIAA量を測定した結果、表皮組織でも内部組織でもIAAは光側と影側で均等に分布していることを明らかにした。SakodaとHasegawa（1989年）は、ダイコン下胚軸を用いて表皮組織と内部組織におけるIAA量をECD-GCで測定した。その結果、Weilerらと同様に、表皮組織でも内部組織でも光側と影側でIAA量は均等に分布していることが明らかになった。つまり、Cholodny-Went説の修正説であるMacDonald-Hartの説も、少なくとも光屈性には適用されないことが判明した。

これらの論文に対して、Cholodny-Went説の信奉者から、1)WentやBriggsらが実験材料として用いたのは、ヒマワリやダイコンといった双子葉植物ではなく、アベナやトウモロコシといった単子葉植物であるということ、2)WentやBriggsらが対象としたオーキシンは拡散性オーキシンであり、WeilerやHasegawaらが測定した抽出性オーキシンではないこと等から、Cholodny-Went説は揺るがないと反論された(Thimann, WentからのBruinsmaとHasegawaへの私信)。

Wentの古典的な実験の検証

これらの反論を受けて、Hasegawaら（1989年）はWentの古典的な実験（1928年）の検証を行った。光屈性刺激を与えたアベナ幼葉鞘の先端から寒天片に拡散してくる光側と影側組織におけるオーキシン量を生物検定法と機器分析を用いて測定した。先ず、拡散物を含む寒天片を、Wentの実験と同様にアベナ屈曲試験に供したところ、光側より影側の方がオーキシン活性が高いことが分かった。この結

果は、Wentの結果とよく一致した。しかし、寒天片に拡散してきた IAA 量を機器分析 (ECD-GC) で測定したところ、光側と影側に含まれる IAA 量は等しいことが分かった。更に、その IAA 量はアベナ屈曲試験の結果から見積もられる IAA 量を大幅に上まっております、光屈性刺激を与えたアベナ幼葉鞘の先端から寒天片に拡散してくる物質にオーキシン活性を抑制する物質が含まれ、光側で特に多いことが示唆された。つまり、Wentは生物検定によって得られたオーキシン活性をオーキシン量としたところに、大きな落とし穴があったことが分かった。Cholodny-Went 説の基盤であるWentの実験が半世紀余り経て、初めて検証され、その解釈に誤りがあったことが判明したのである。

Darwinの実験、Boysen-Jensen らの実験の検証

単子葉植物のカナリアクサヨシの芽生えの先端を切除したり、先端に不透明な帽子で覆ったりすると、光屈性を示さないことから、光刺激を感受する部位は先端部であり、そこから屈曲部位 (下部) に刺激が伝達されるという Darwinの実験が二つのグループによって検証された。Bruinsmaの弟子のFranssenら(1981, 1982年)は、アベナ(カナリアクサヨシと同じ単子葉植物)の幼葉鞘のみならず、クレスやキュウリの芽生えの先端部を切除したり、不透明な帽子で覆ったりしても光屈性が起こることや、屈曲する部位に光が当たらないようにすると光屈性が起こらないこと等を明らかにした。また、Kato-NoguchiとHasegawa(1992年)はダイコン芽生えを用いて、屈曲部位に光が当たらないようにすると光屈性が著しく低下することを明らかにしている。これらの結果から、光屈性において光

を感受する部位は先端部というより、屈曲部位であることが示唆された。Darwinが切除した部位と不透明な帽子の被せ方といった実験操作に問題があったのではないかと考えられている。

芽生えの先端部において、光側と影側組織の間を化学物質（後のオーキシン）が移動することによって光屈性が引き起こされるといふBoysen-Jensenらの実験（1926年）の検証はYamadaら（2000年）によってなされた。Yamadaらは、Boysen-Jensenらの実験と同様に、アベナ幼葉鞘の先端に光に対して垂直に雲母片を差し込み、光側と影側組織の間に化学物質の移動が起きないようにした場合、光屈性が起こるかどうかが、極めて繊細な実験を行った。その結果雲母片を全く差し込まない芽生えと同程度の屈曲を示すことが分かった。更に、彼らは粗雑に雲母片を差し込んだ場合のみ、Boysen-Jensenらの実験結果を再現出来たという。つまり、Boysen-Jensenらの実験はその実験操作に問題があり、誤った結論、解釈を生んだものであることが判明した。

Cholodny-Went説の基盤となるDarwinの実験、Boysen-Jensenらの実験、Wentの実験共に、実験方法や解釈に誤りがあることが分かり、Cholodny-Went説は、少なくとも光屈性には適用されないことが強く示唆された。

光屈性は光側組織の成長抑制のみによって引き起こされる

HasegawaとNoguchiら（1986、1987年）は、ダイコン芽生えを用いて、光屈性は光側組織の成長抑制によってのみ引き起こされ、影側組織の成長促進は全く起こらない（暗黒下で生育させたものと同じ成長をする）ことを、明らかにした。このことは、光側組織の成

長抑制と影側組織の成長促進が相まって光屈性が引き起こされるといふ Cholodny-Went 説と真っ向から対立するものである。Hasegawa と Noguchiらは、この光側組織の成長抑制は光側組織において光照射で増量する成長抑制物質（光誘導性成長抑制物質）によって引き起こされるに違いないと考えた。

光誘導性成長抑制物質

Hasegawaら（1986年）は、ダイコン芽生えに一方向から光を照射し、屈曲し始めた芽生えから下胚軸を切り出し、光側組織と影側組織にカミソリで二分した。それぞれのサンプルをメタノール水溶液で抽出し、酢酸エチル可溶の中性画分を取り出した。それぞれの画分をシリカゲルのカラムクロマトグラフィーで分離し、それぞれの溶出画分をダイコン下胚軸の成長試験に供した。光側組織の抽出物と影側組織の抽出物を比較したところ、二つの画分で光側組織の方が成長抑制活性が強い（成長抑制物質の量が多い）ことが分かった。それぞれの成長抑制活性物質の化学構造を明らかにするために大量の光照射したダイコン芽生えから、上記の二画分から活性物質を分離・精製し、5種類の成長抑制物質を単離し、種々のスペクトル解析から、それらの化学構造を決定した。4つは以前、Hasegawaら（1980, 1981, 1982年）が、ダイコン芽生えの光成長抑制制御物質として単離・同定した raphanusolA, Bと raphanusanins (*cis*体と *trans*体) (Fig.0-7)であることが判明した。残りの一つは新規の化合物として raphanusamide と命名された。これらのうち、raphanusaninsと raphanusamideの化学構造は後に、Haradaら（1991年）、Kosemuraら（1993年）やHasegawaら（2000年）によって修正

されたが、raphanusanins が光屈性刺激によって光側組織で増量し、影側組織や暗黒下での組織では殆ど変動しないことがNoguchiら(1987年)によって明らかにされた。更に、彼らはこれらの成長抑制物質をダイコンの下胚軸の片側にラノリンにまぶして投与した時、暗黒下でも投与側に屈曲することを見出し、ダイコン芽生えの光屈性においてraphanusanins が重要な役割を演じていることを報告している。その後、光屈性制御物質としてのraphanusaninsに関する研究が進み、raphanusaninsの生合成経路(Hasegawaら、2000年、Fig.0-8)や生理作用等(Sakodaら、1991、1992年)が明らかにされた。一方、光屈性の研究において古くから実験材料として用いられてきたアベナやヒマワリ芽生えにおける光誘導性成長抑制物質も明らかにされている。アベナ幼葉鞘からuridine(Hasegawa et al. 2001年)、シロイヌナズナ芽生えからindole-3-acetonitrile(Hasegawa et al. 2004年)、ヒマワリ芽生えからcaprolactam(Hasegawa et al. 1983年)と8-epixanthatin(Yokotani-Tomita et al.1997、1999年)などが単離・同定された(Fig.0-9)。

本研究の目的

しかし、Briggs等多くの研究者が光屈性の研究に用いてきたトウモロコシ芽生えの光屈性が、Cholodny-Went説に従いオーキシンの偏差分布によって引き起こされるのか、あるいはダイコン芽生えやヒマワリ芽生えのようにオーキシンではなく、成長抑制物質の偏差分布によって引き起こされるのかは明らかにされていない。また、ダイコン芽生えやヒマワリ芽生えにおいて、前者ではraphanusanins 以外に、光成長抑制の鍵化学物質として単離・同定

されている raphanusol AとB (Hase and Hasegawa 1982 年、Hasegawa and Hase 1981 年) がダイコン芽生えの光屈性に関与していないのかどうか、更にヒマワリ芽生えから光誘導性成長抑制物質を分離・精製する過程で caprolactum や 8-epixanthatin に較べてはるかに成長抑制活性の強い物質が存在することが確認されているがその本体は明らかにされていない。。そこで、本研究では、トウモロコシ幼葉鞘、ダイコン下胚軸及びヒマワリ下胚軸を用いて、植物の運動の代表的な現象である光屈性を制御する鍵化学物質の本体を解明する目的で研究を行った。

第1章では、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性において、Briggsの古典的な実験の検証を通して、光屈性を制御する物質はオーキシシン (IAA) であるのか、あるいは他の物質であるのか明らかにする。第2章では、第1章で明らかになったトウモロコシ幼葉鞘の光屈性を制御する鍵化学物質の候補物質を探索し、その本体を解明する。第3章では、ダイコン下胚軸の光屈性における、光誘導性成長抑制物質 raphanusol AとB の役割について明らかにする。第4章では、ヒマワリ下胚軸における最も活性の強い光誘導性成長抑制物質の探索とその化学構造を明らかにする。これらの研究を通して、植物の光屈性のメカニズムを光誘導性成長抑制物質のレベルから考察する。

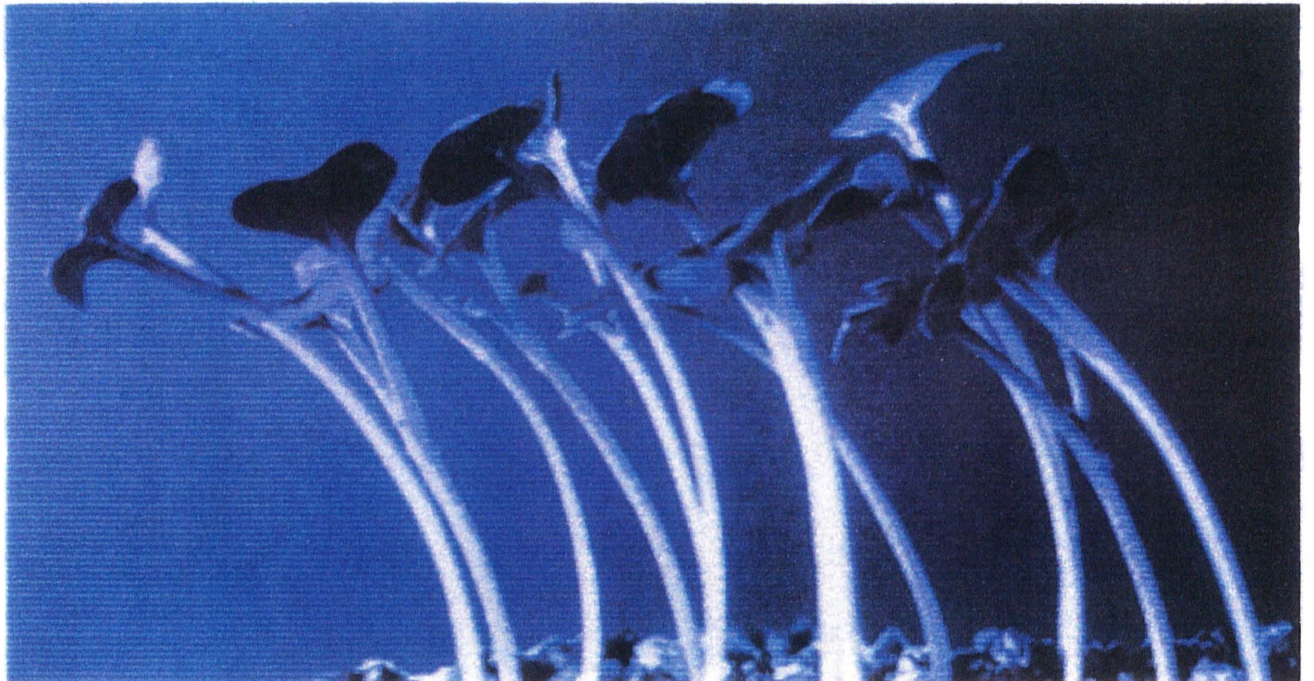
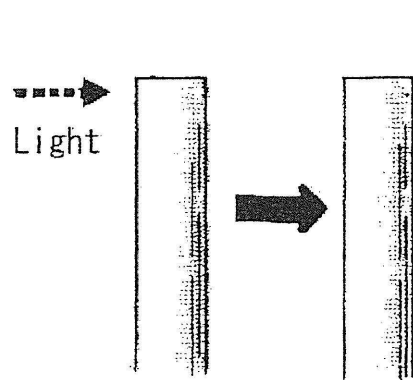
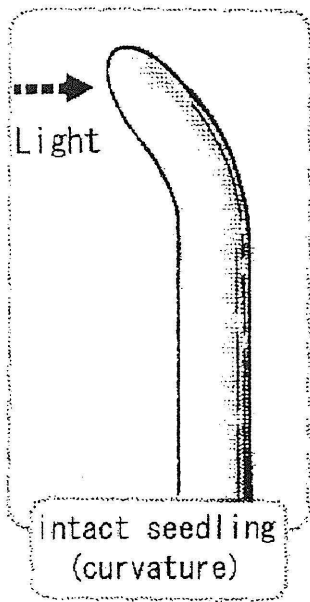


Fig.0-1 Phototropism : Radish seedlings bending toward light from left side.



no curvature

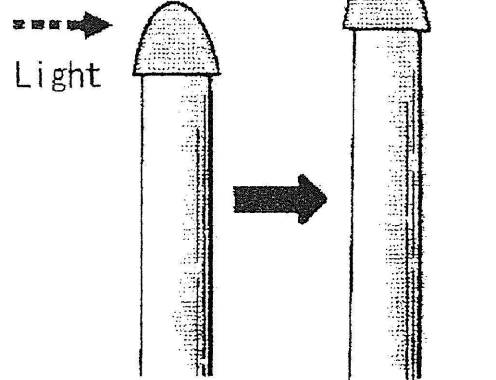


Fig.0-2 Darwin's experiment (1880)

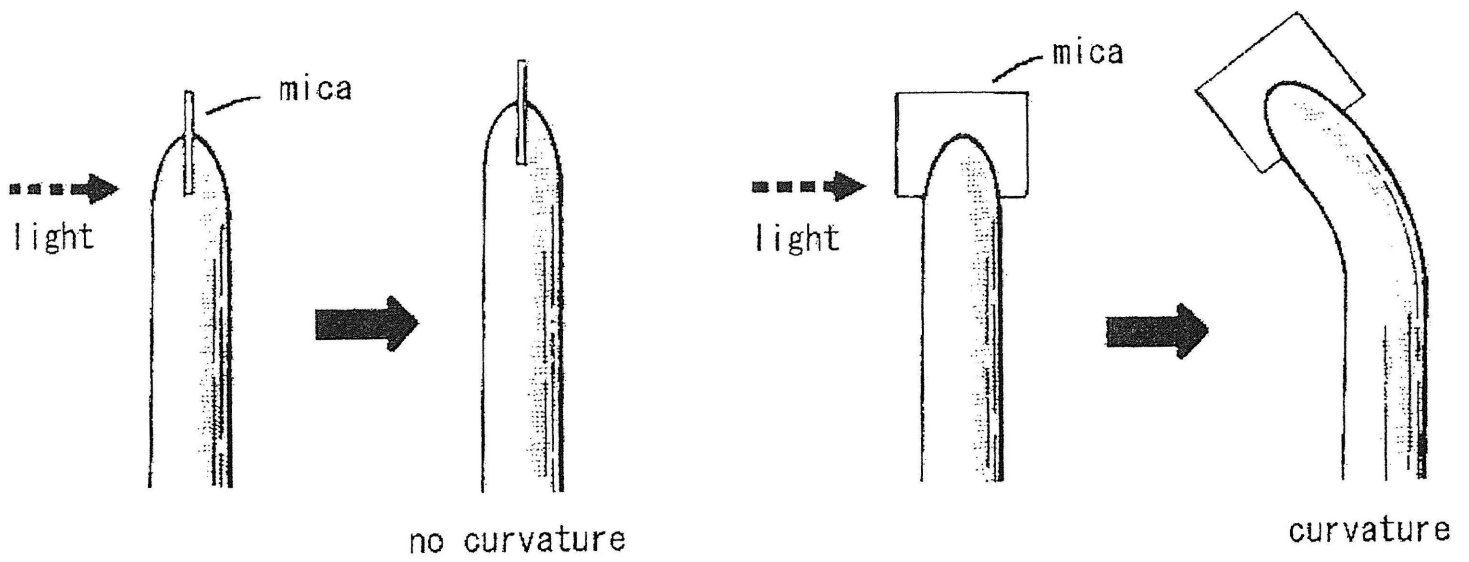
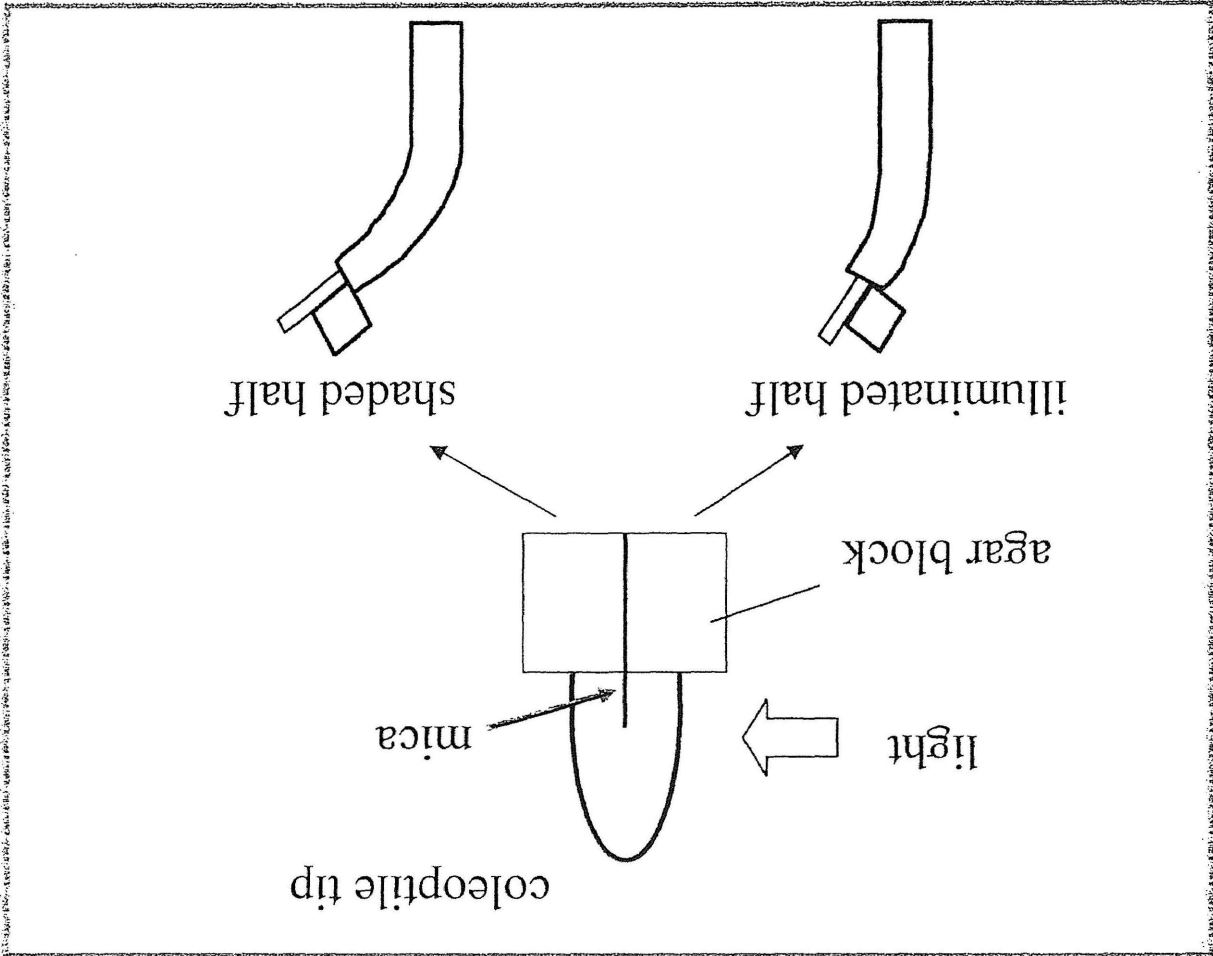
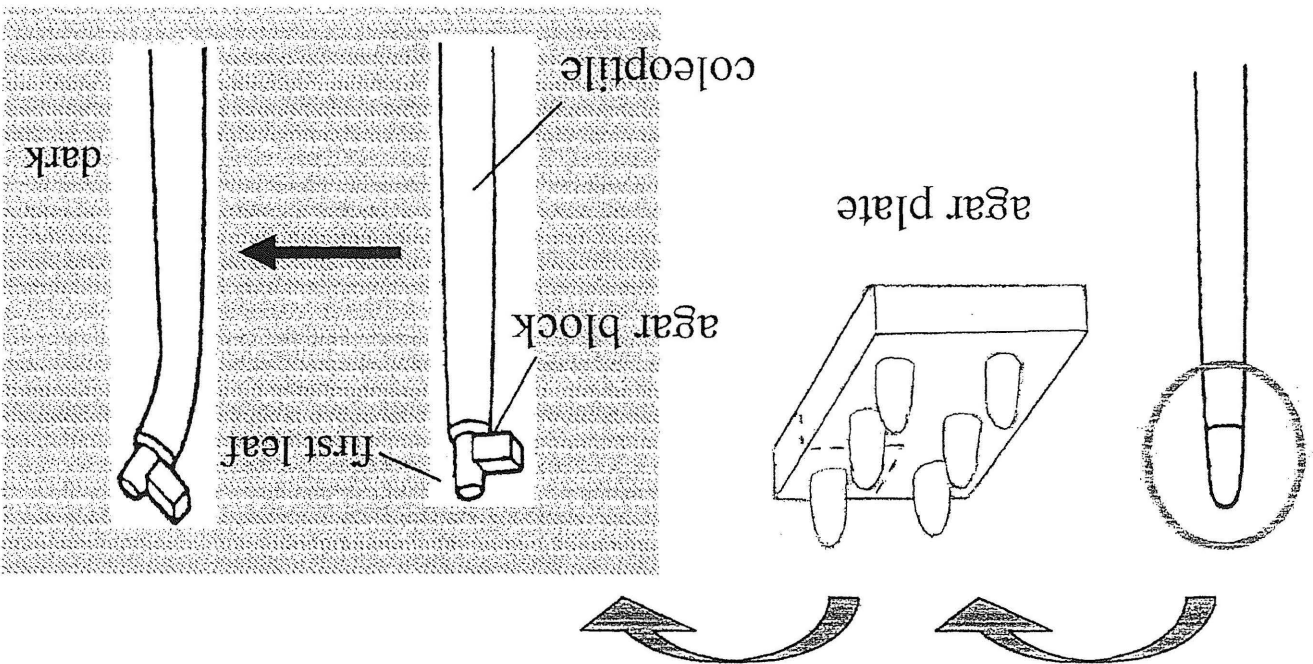


Fig.0-3 Boysen-Jensen and Nielsen's experiment (1926)

Fig. 0-4 Went's experiment (1928)

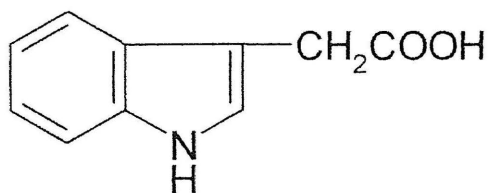


(*Avena coleoptile* curvature test)

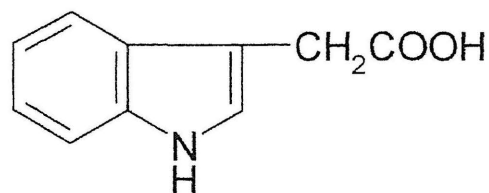


Kögl et al. (1934)

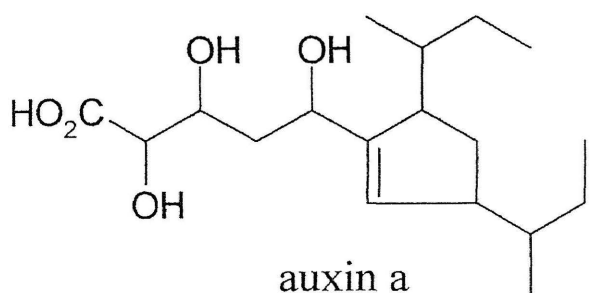
Vliegenthart (1966)



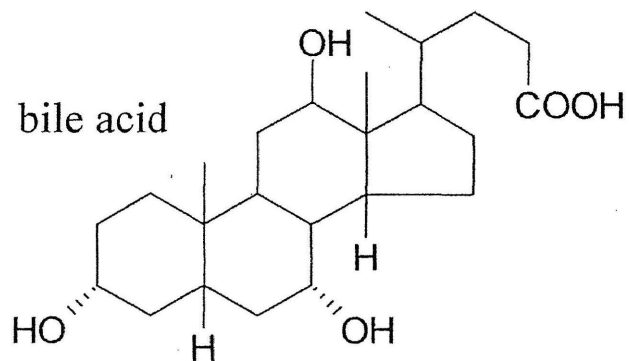
hetero-auxin



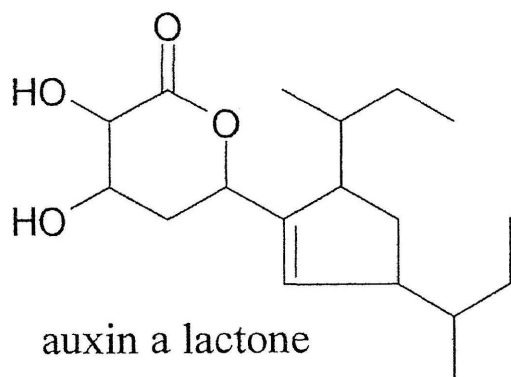
hetero-auxin



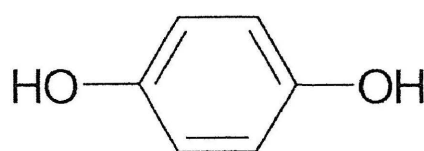
auxin a



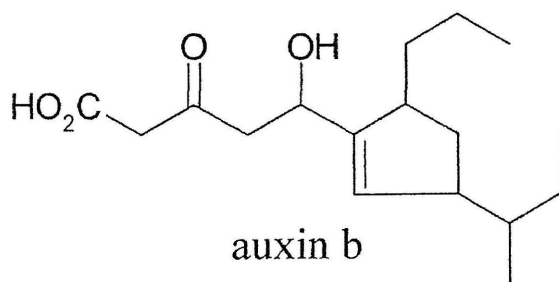
bile acid



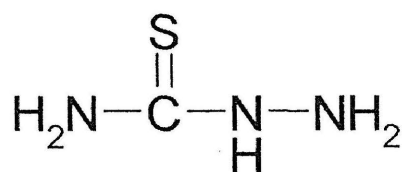
auxin a lactone



hydroquinone



auxin b



thiosemicarbazide

Fig.0-5 Auxins isolated and identified by Kögl et al. (1934)

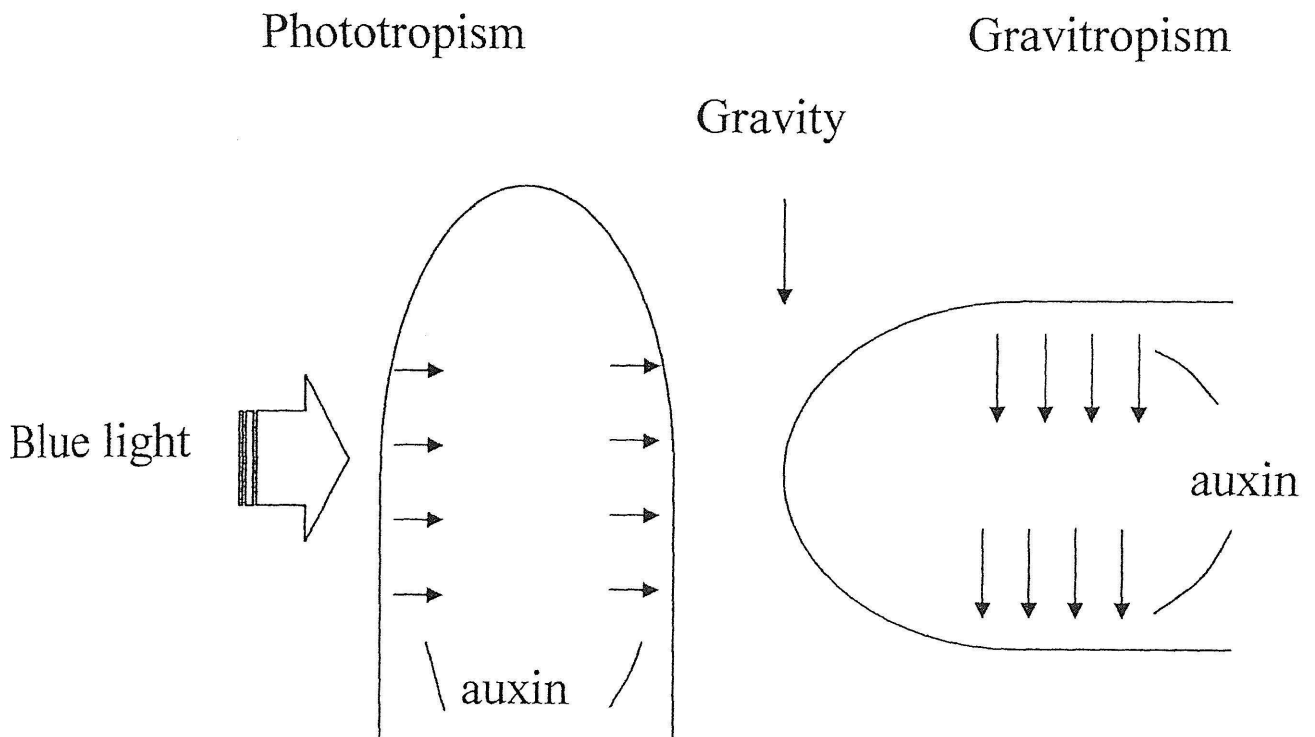
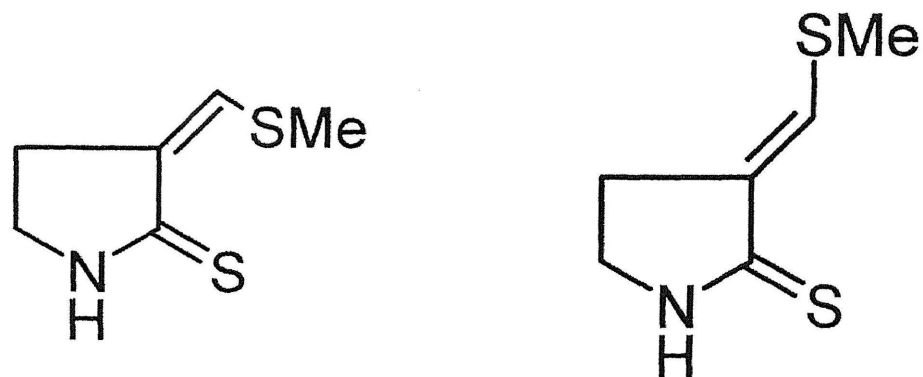


Fig.0-6 MacDonal and Hart theory (1987)
 “New light on the Cholodny-Went theory”

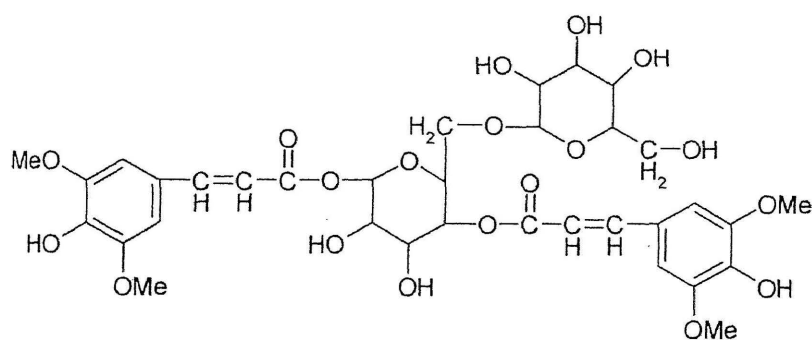


cis-Raphanusanin

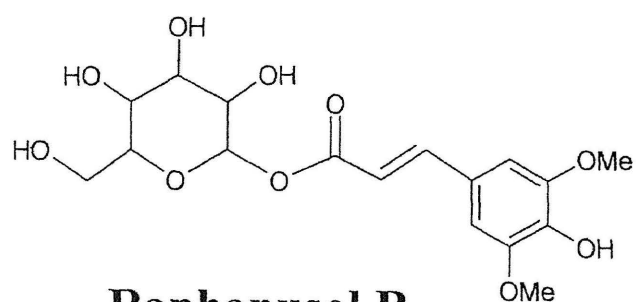
trans-Raphanusanin



4-MTBI



Raphanusol A



Raphanusol B

Fig.0-7 Light-induced growth inhibitors isolated from de-etiolated radish seedlings.

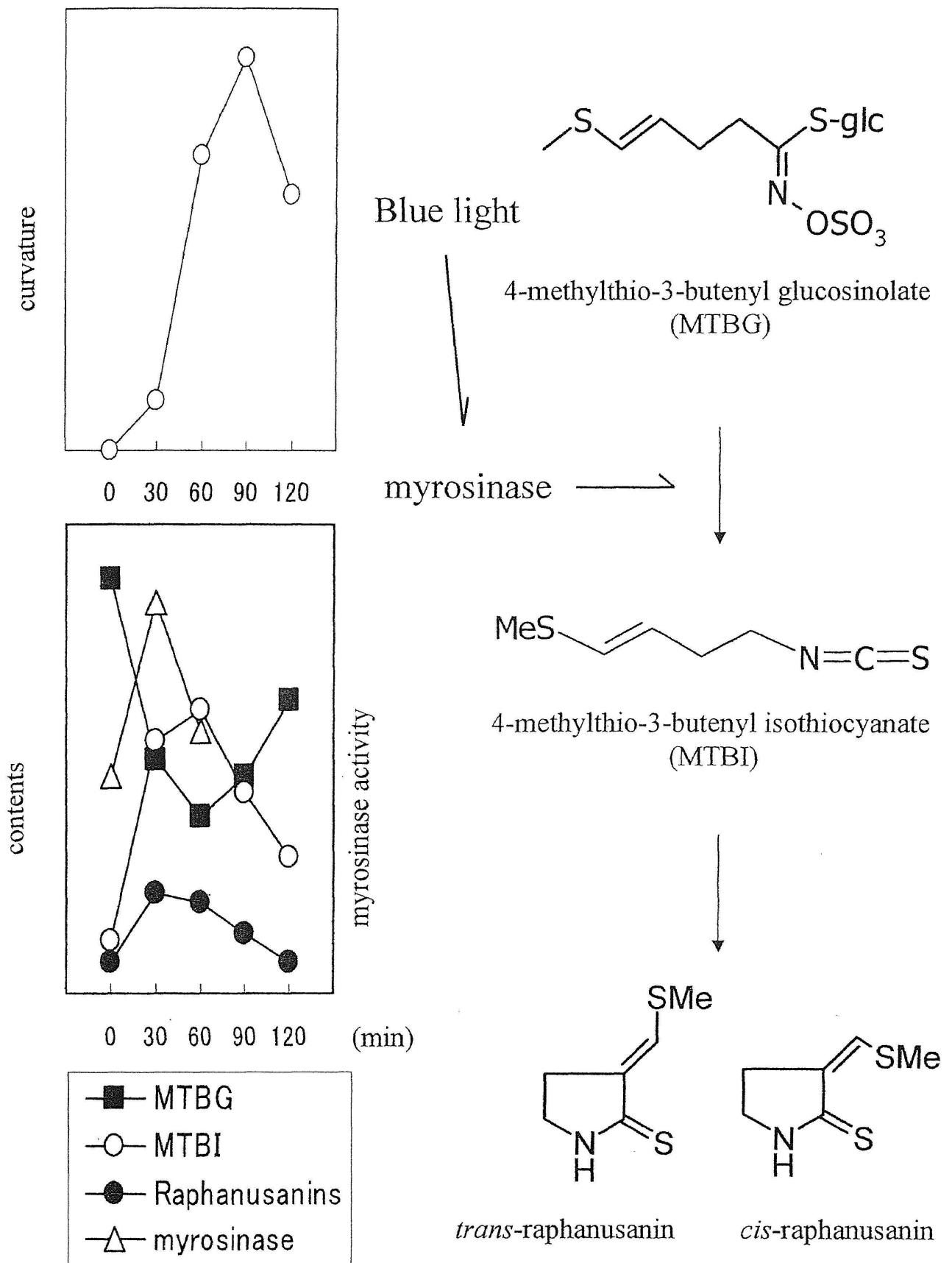
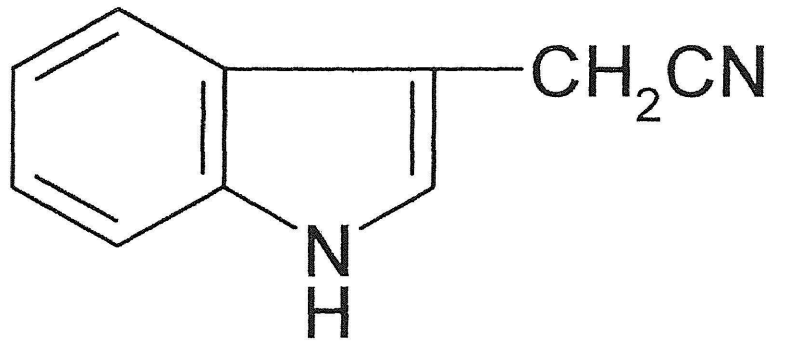
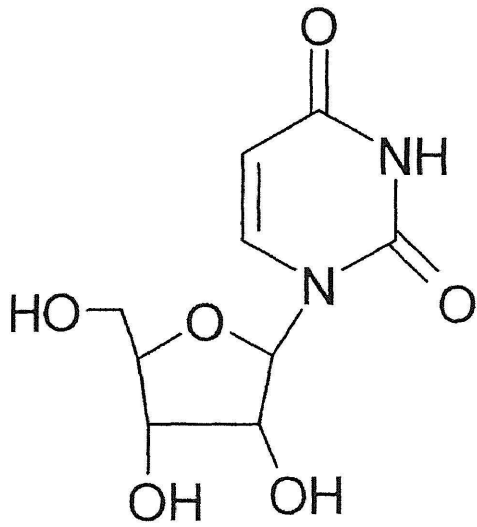


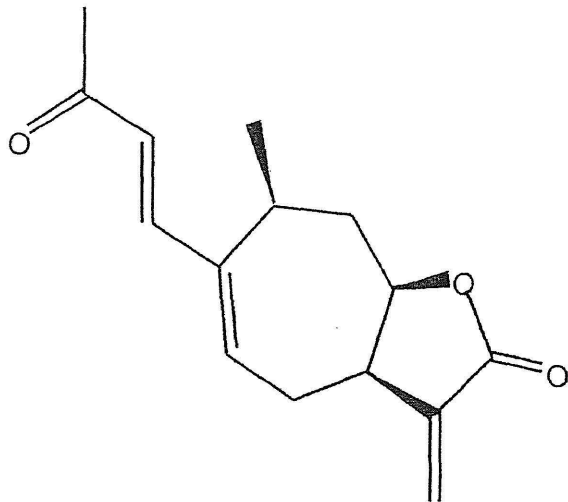
Fig.0-8 Hypothetical model for the biosynthesis of MTBI and raphanusanins in radish hypocotyls in response to blue light illumination.



indole-3-acetonitrile
(Arabidopsis)



uridine
(oat)



8-Epixanthatin
(sunflower)

Fig.0-9 Phototropism-regulating substances

第 1 章 トウモロコシ幼葉鞘の光屈性制御物質

序 論

高等植物の茎の光屈性に関して、1975年にBruinsmaらがヒマワリ下胚軸の光屈性においてオーキシシン (IAA) が光側・影側組織で不均等には分布していないことを機器分析で見出して以来、ダイコン (Hasegawa and Sakoda 1988)、ヒマワリ (Feyerabend and Weiler 1988)、アベナ (Hasegawa et al. 1989)、エンドウ (Hasegawa and Yamada 1992) 等の芽生えの光屈性において、抽出性あるいは拡散性の IAA は光側・影側組織で均等に分布し、IAA に感受性の高い表皮組織と低い内部組織間の IAA の移動も起こっていない (表皮組織でも内部組織でも光側と影側で IAA 量は均等に分布していた) ことが明らかにされている。また、これらの植物では、オーキシシン活性を抑制する物質が光側組織で増量することによって、光側組織の成長が抑制され、光方向に屈曲すると報告されている (Hasegawa et al. 1989, Bruinsma and Hasegawa 1990)。

しかし、Briggsらは1957年にトウモロコシ幼葉鞘を用いて、先端から寒天片に拡散してきた物質を精製せずに直接アベナ屈曲試験に供し、その屈曲角だけからオーキシシン量を算出し、影側の方が光側の2から3倍であるとした。即ち、光によってオーキシシンが光側から影側に横移動し、その結果、影側のオーキシシン量が増加することで影側の成長が促進されて、光方向に屈曲すると考えた。これらの研究結果をもって、Cholodny-Went 説でトウモロコシ幼葉鞘の光屈性は説明出来ると主張した。

Cholodny-Went 説は、実験材料としてアベナやトウモロコシの幼葉鞘を用い、アベナ屈曲試験という、成長促進物質と成長抑制物質

が混在した場合、必ずしも促進物質であるオーキシンのみの活性が発現するとは考えられない試験法によって得られた結果に基づいたものである。従って、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性がCholodny-Went説によって説明出来るのかどうか、Briggsらの実験(1957)の検証を通して、考察する必要がある。本研究では、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性に伴うIAA量の分布について、Briggsらと同様にアベナ屈曲試験でオーキシン活性を調べると同時に、機器分析を用いてオーキシン(IAA)量を定量し、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性を制御する鍵化学物質の正体を解明する。

材料と方法

実験材料

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Golden Cross Bantam 70, Sakata Seed Co., Yokohama, Japan) の種子を、暗黒下で24時間流水中で浸漬し、その後蒸留水で湿らせた濾紙の上に蒔き、25℃赤色光 ($0.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, λ_{max} 655nm, half-band width 17 nm) 下で24時間培養した。赤色光照射は中胚軸の成長を抑えるために行った。発芽した種子を更に25℃暗黒下で48時間生育させ、幼葉鞘の長さが2.5 から3 cmのものを全ての実験に用いた。光屈性刺激は、4日令の芽生えに青色光 ($0.8 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, λ_{max} 448nm, half-band width 43nm) をスリットを通して5秒間(一次屈曲)あるいは連続的(二次屈曲)に照射した。

オーキシン拡散実験

暗黒下で育成したトウモロコシ幼葉鞘（長さ2.5 から3 cm）の先端部 4mmをカミソリで切り取り、直ちにカミソリで仕切った寒天片（3% 寒天、2 x 2 x 26 mm³）上に光側・影側が二分されるように差し込んだ。実験操作は薄暗い赤色光（0.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）で行い、15分以内で完了するようにした。その後、直ちに一方向からスリットを通して青色光を幼葉鞘の先端部全体に当たるように照射した。各寒天片を二分し、一方（8個のブロック）を直ちにアベナ屈曲試験に供した。アベナ屈曲試験は、試験の2時間前にアベナ芽生えの幼葉鞘の先端部（2~3 mm）をカミソリで切り取り、中央にある本葉を引き抜き、幼葉鞘の切断面から2 mm程度突き出すようにした。拡散物を含んだ寒天片を、幼葉鞘の切断面の片側に載せ、25℃ 暗黒下で十分湿度を保ち、2時間培養した。アベナ幼葉鞘の屈曲角を、予め既知量のIAAを寒天片に含ませ、アベナ屈曲試験に供した時の投与屈曲曲線から、IAA量に換算した。残った寒天片は機器分析を用いたIAA量の測定まで、ドライアイスで凍結後、-20℃で凍結保存した。

機器分析によるIAAの定量

トウモロコシ幼葉鞘先端の光側あるいは影側から寒天片に拡散してきた物質中に存在するIAA量をFig.1-1に示された方法によって測定した。26本のトウモロコシ幼葉鞘の先端半分（光側、影側、暗黒対照）からの拡散物を含む凍結した寒天片を、ドライアイスと共に乳鉢中で注意深く粉碎し、80%の冷アセトン水溶液を70 ml入れ、寒天中に含まれている物質を抽出した。抽出物を濾過後、濾液を減圧下35℃で濃縮し、0.1 Mのtartaric acidでpHを3.5に調

節し、等量の石油エーテルで3回振出した。水層を等量のエチルエーテルで3回振出し、エチルエーテル層に等量のpH 8.0の K_2HPO_4 で3回振出した。水層を2 NのHClでpHを3.5に調節し、再び等量のエチルエーテルで3回振出した。エチルエーテル層に無水 Na_2SO_4 を加え脱水した後、減圧下で濃縮・乾固した。このサンプルを CH_3CN に溶解し、HPLC (Wakopak C_{18} , 20 % CH_3CN in pH3.5, 20 mM CH_3COONa buffer, 2 ml/min) に供した。IAAのピークは保持時間7.2分に現れた。なお、抽出過程におけるIAAの回収率を求めるために、indole-3-propionic acid (IPA) の一定量をサンプルの抽出時に加えた (Akiyama et al. 1983)。IPA (Rt. 15.2 min)の回収率から、サンプル中のIAAの回収率を求め、IAAのピーク面積からIAA量を算出した。HPLCにおいてIAAとしたピークを分取し、ジアゾメタンでメチル化後、GC-MSに供し、IAAのメチルエステルであることを確認した。また、分取したものを寒天片 ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) に付着させ、アベナ屈曲試験に供したところ、HPLCで定量した量にほぼ匹敵するIAAの活性を示した。

結果と考察

パルスあるいは連続光照射による光屈性の経時的変化

Fig.1-2 は5秒間 (一次屈曲) あるいは120分間 (二次屈曲) の光屈性刺激に伴うトウモロコシ幼葉鞘の屈曲の経時的変化を示す。一次屈曲及び二次屈曲共に、光照射開始後30分で屈曲が見られ、90分以降では二次屈曲の方が一次屈曲より大きな屈曲を示すことが分かった。暗黒下では全く屈曲は見られなかった。

光屈性に伴うオーキシンの経時的変化

1) 生物検定によるオーキシンの定量

Fig. 1-3 は一次、二次屈曲におけるトウモロコシ幼葉鞘先端部の光側と影側から寒天片に拡散してきたオーキシンの経時的変化を、アベナ屈曲試験によって調べたものである。一次屈曲及び二次屈曲共に、拡散してきたオーキシン量は時間経過に伴って増量した。影側と光側におけるオーキシンの量は30分頃から見られ、60分以降では明確な差が認められた。暗黒下におけるオーキシン量は影側と光側のほぼ中間の値を示した。光屈性に伴い、影側のオーキシン量が増加し（暗黒下と比較して）、光側のオーキシン量は減少するという結果は、Briggs(1957, 1963)の結果と良く一致し、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性は光側と影側におけるオーキシンの偏差分布によって生じるというCholodny-Went説で十分説明出来る。

2) 機器分析によるオーキシンの定量

ヒマワリやダイコン下胚軸の光屈性において、オーキシン量を機器分析で定量した場合、光側と影側でオーキシン量は均等に分布していることが報告されている (Bruinsma et al. 1975, Feyerabend and Weiler 1988, Sakoda and Hasegawa 1989)。更に、アベナ幼葉鞘の光屈性では、光屈性刺激を与えた幼葉鞘の先端部から拡散してくるオーキシン量をアベナ屈曲試験で定量した場合、影側の方が光側より多くのオーキシン量を含んでいたが、機器分析でオーキシン量を測定した場合、オーキシン量は光、影側で均等に分布し、生物検定による定量はオーキシン活性の度合いを示したものであり、オ

オーキシンの量を示していないことが示唆されている (Hasegawa et al. 1989)。トウモロコシ幼葉鞘の光屈性の場合も、アベナ幼葉鞘と同様な危険性が考えられることから、機器分析を用いてオーキシンの定量を行った。その結果をTable 1-1 に示した。定量に用いたサンプルはいずれも屈曲が進行しつつある光屈性刺激後50分のものであるが、一次屈曲、二次屈曲共に同様な結果が得られた。

寒天片に拡散してきたオーキシン量をアベナ屈曲試験による屈曲角から換算した場合、Fig.1-3 と同様に、影側のオーキシン量は光側のオーキシン量の約2倍であることが分かった。しかし、中性画分（オーキシンを含まない）を除き、酸性画分（オーキシンを含む）中のオーキシン量をアベナ屈曲試験に供した場合、オーキシン量は光側と影側で均等に分布していることが分かった。更に、この画分におけるオーキシン量を機器分析を用いて測定したところ、オーキシン量は光側と影側で均等に分布していることが明らかになった。つまり、アベナ幼葉鞘の場合と同様にトウモロコシ幼葉鞘の光屈性においても、オーキシンの活性は影側の方が光側より高いが、オーキシンの量は光・影側で均等に分布しており、オーキシンの活性を抑制する物質が影側より光側に多いことが示唆された。また、寒天片に拡散してきた物質を直接、アベナ屈曲試験に供した場合は影側で高いオーキシン活性を示したが、拡散物から中性画分を除いた場合は光側・影側でオーキシン活性は等しかったことから、光で増量するオーキシン活性抑制物質は中性画分に存在することも示唆された。光誘導性の成長抑制物質については、ダイコン下胚軸から raphanusanins, MTBI (Hasegawa et al. 1986, 2000) や raphanusols (Hasegawa and Hase 1981, Hase and Hasegawa 1982)

が、アベナ幼葉鞘から uridine (Hasegawa et al. 2001) が、ヒマワリ下胚軸から caprolactam (Hasegawa et al. 1983) と 8-epixanthatin (Yokotani-Tomita et al. 1999) が、シロイヌナズナ下胚軸から indole-3-acetonitrile (Hasegawa et al. 2004) が単離・同定されている。トウモロコシ幼葉鞘の光誘導性成長抑制物質は上記の物質と同様に中性物質であることが予想される。この物質の本体については、次の章で述べる。

要約

光屈性刺激を与えたトウモロコシ幼葉鞘の先端部から寒天片に拡散してくるオーキシンの光側・影側における分布が、アベナ屈曲試験と機器分析を用いて調べられた。光屈性反応が進行中である光屈性刺激50分後の拡散物を含む寒天片を精製せずに直接、アベナ屈曲試験に供したところ、影側のオーキシン活性は光側の活性の約2倍であることが、一次及び二次いずれの屈曲でも確認された。しかし、拡散物を精製後、機器分析でオーキシン (IAA) 量を測定したところ、IAA は一次・二次いずれの屈曲でも、光・影側で均等に分布していることが判明した。IAA が均等に分布していることは、HPLCで精製し、IAA に相等するピークの活性をアベナ屈曲試験に供した場合でも確認された。これらの結果は、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性は IAA の不均等な分布によって引き起こされるのではなく、Cholodny-Went 説では光屈性は説明出来ないことが示唆された。更に、光側のオーキシン活性の低下はオーキシンの活性を抑制する物

質が共存し、幼葉鞘先端部の光側から寒天片に多量に拡散してくることを意味する。

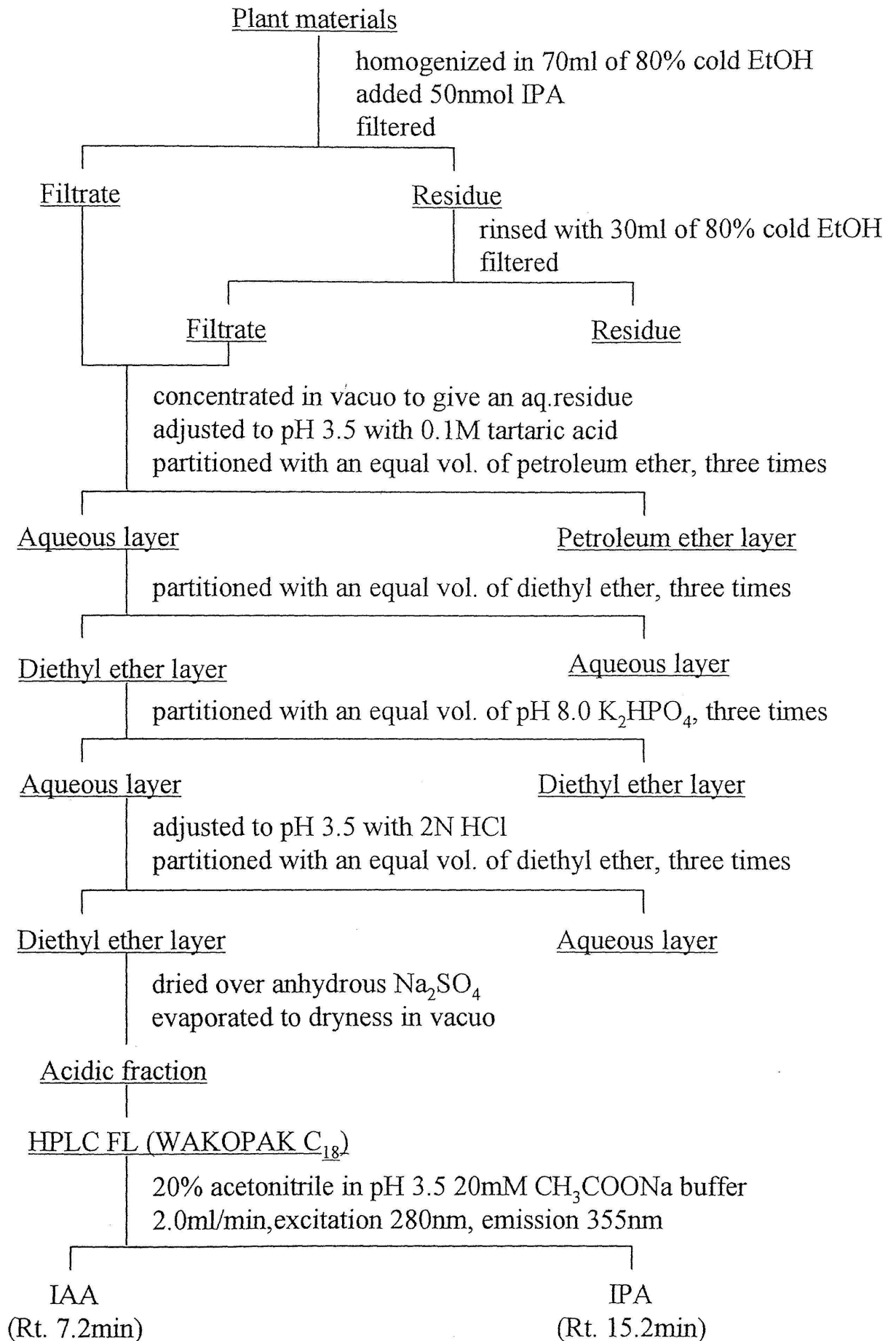


Fig.1-1 Flow diagram for extraction, purification and quantification of IAA

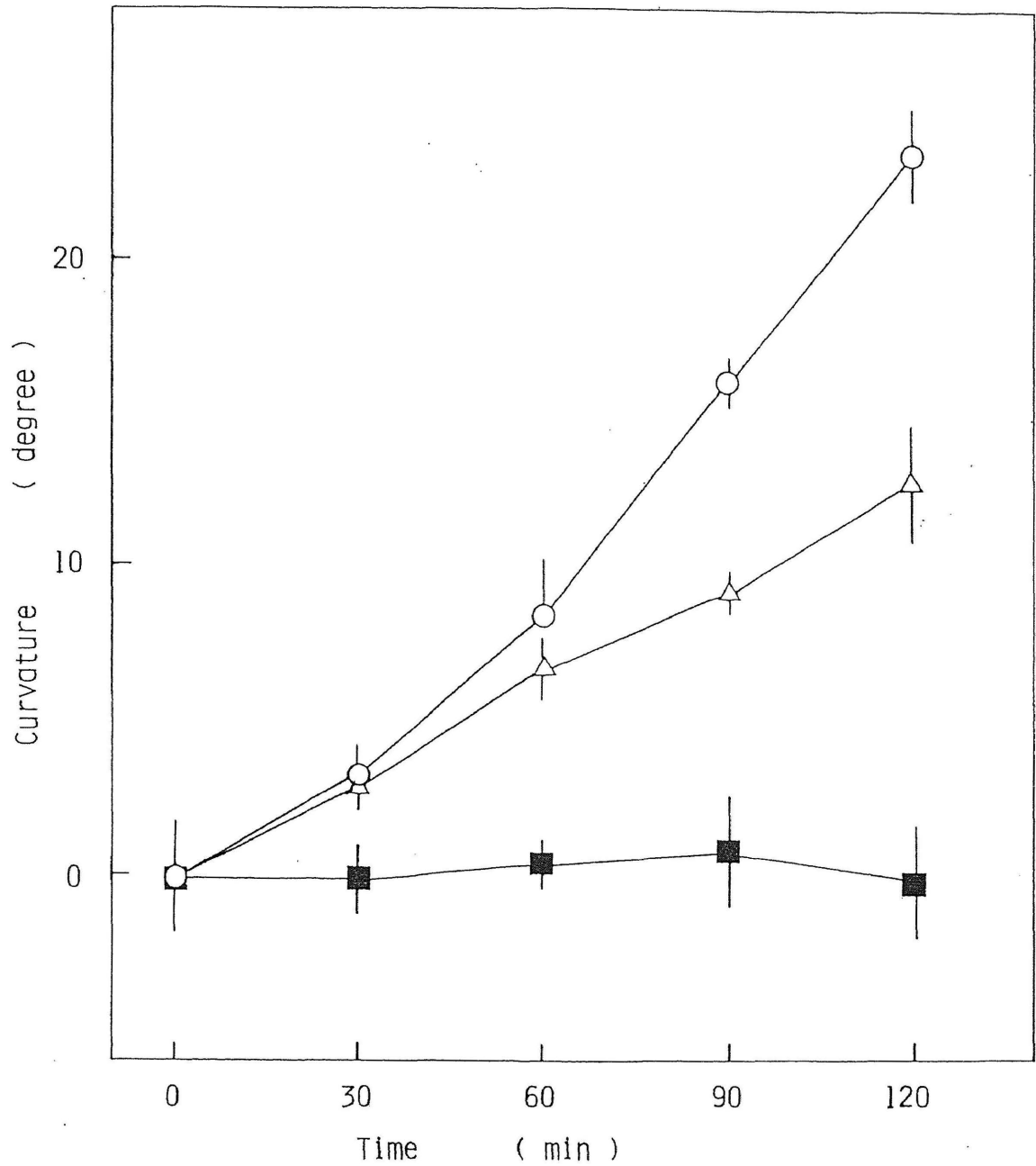


Fig.1-2 Time course of phototropic curvatures induced by unilateral illumination of blue light for 5 s (Δ : first positive curvature) or continuously (\circ : second positive one). \blacksquare : Dark control. Bars indicate SE.

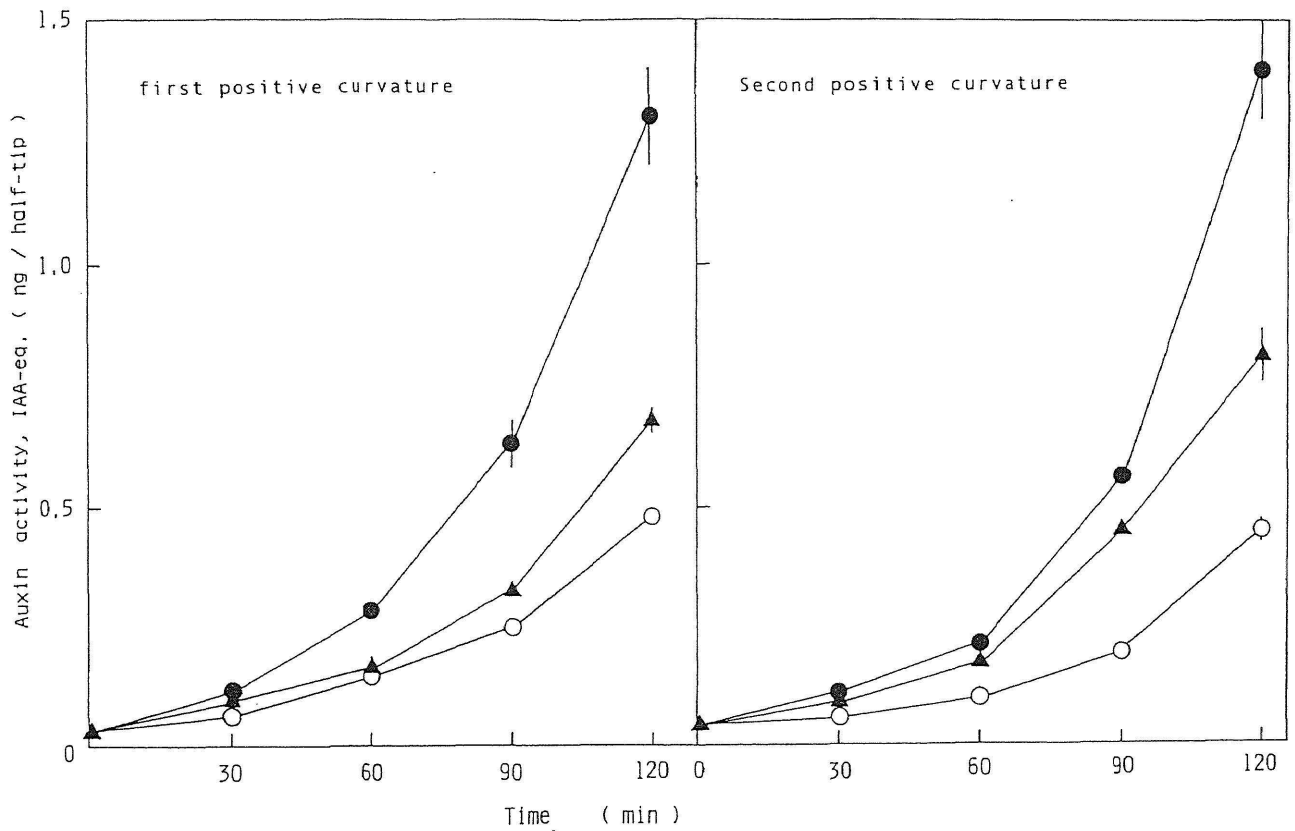


Fig.1-3 Time course of distribution of auxin activity diffusing from phototropically stimulated coleoptile tips as calculated from *Avena* curvature test at the first (left) and second (right) positive curvatures. The experiments were done independently. ○: Lighted half-tips, ●: Shaded half-tips, ▲: Dark control, half-tips. Bars indicate SE.

Table1-1 Distribution of auxin activity and of IAA in agar blocks after 50 min diffusion from lighted and shaded half-tips of maize coleoptiles unilaterally illuminated with blue light for 5 s (first positive curvature) or 50 min (second positive curvature). The auxin activity was directly determined with the *Avena* curvature test without purification. The amount of IAA was determined by physicochemical assay and by the *Avena* curvature test following purification of HPLC. Each value is the mean of 5 experiments \pm SE.

Agar block from half-tips	First positive curvature			Second positive curvature		
	Auxin activity	IAA (pg/half-tip)		Auxin activity	IAA (pg/half-tip)	
	IAA-eq. (pg/half-tip)	Physicochemical assay	Biological assay	IAA-eq. (pg/half-tip)	Physicochemical assay	Biological assay
Control	140 \pm 8	143 \pm 18	140 \pm 14	142 \pm 10	138 \pm 19	129 \pm 15
Shaded	167 \pm 16	147 \pm 13	141 \pm 11	150 \pm 8	145 \pm 11	138 \pm 7
Lighted	87 \pm 4	151 \pm 15	138 \pm 11	68 \pm 6	142 \pm 16	140 \pm 5

第 2 章 トウモロコシ幼葉鞘の光屈性を制御する 鍵化学物質の単離と同定

序 論

光屈性において、オーキシンIAAが光側・影側組織で均等に分布することがヒマワリ下胚軸 (Bruinsma et al. 1975, Feyerabend and Weiler1988)で見出されて以来、ダイコン下胚軸 (Sakoda and Hasegawa1989)、アベナ幼葉鞘 (Hasegawa and Sakoda1988, Hasegawa, Sakoda and Bruinsma1989)、エンドウ上胚軸 (Hasegawa and Yamada1992) などでも、種々の機器分析や免疫学的方法によってオーキシンの偏差分布は見られないことが明らかにされてきた。更に、第1章で明らかになったように、トウモロコシ幼葉鞘でIAAは光側・影側組織で均等に分布することが分かった。一方、ダイコン下胚軸の光屈性では、成長抑制物質のraphanusaninsが光側組織で増量し、片側投与によって投与側に屈曲することから、これらの光誘導性成長抑制物質が光側で生成され、光側組織の成長が抑制されることによって引き起こされることが報告されている (Hasegawa et al. 1986, Noguchi and Hasegawa 1987, Sakoda et al. 1988)。また、アベナ幼葉鞘の光屈性も光誘導性のオーキシン活性抑制物質の偏差分布によって引き起こされることも明らかにされている (Hasegawa and Sakoda1988, Hasegawa et al.1989)。しかしながら、光屈性の研究で古くから用いられてきた植物材料のうち、トウモロコシ幼葉鞘においては、中性の光誘導性成長抑制物質が光側組織で増量することが、第1章で示されたものの、その化学構造は明らかではない。

そこで、第2章ではトウモロコシ幼葉鞘における光誘導性成長抑制物質の探索を行い、その化学構造と生物活性の解明を行った。

材料と方法

抽出と単離

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv Golden Cross Bantam 70, Sakata Seed Co., Yokohama, Japan) の種子を24時間暗黒下で流水中で膨潤させ、蒸留水で湿らせた濾紙上で25℃、赤色光 ($0.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, $\lambda_{\text{max}} 655 \text{ nm}$) 下で24時間培養した。赤色光の照射は中胚軸の成長を抑制するためである。発芽したトウモロコシ種子を暗黒下で更に48時間25℃で培養した。幼葉鞘の長さが約3cmの芽生えを白色光 ($2 \text{ W}/\text{m}^2$, Natural Daylight, Toshiba Co.) 下で2時間25℃で培養した。約1.2 kgのトウモロコシ芽生えのシュート部分を採取し、蒸留水で洗浄後、 -20°C で凍結した。凍結した材料をホモジナイザーを用いて、80% 冷アセトン水溶液3.6 lで粉砕し、抽出した。濾過した抽出物をロータリーエバポレータを用いて、減圧下35℃で濃縮した。濃縮液を0.1 M リン酸でpHを3に調整した後、等量の酢酸エチルで3回振出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した後、減圧下35℃で濃縮・乾固した。濃縮物 (10 g) をシリカゲル (Wako gel C-200, Wako Chemical Industries, Japan) のカラムに供した。溶出溶媒はヘキサン-酢酸エチルの溶媒系で酢酸エチル濃度を10% ずつ上昇させ (各溶媒共300 ml) 最後はメタノール (900 ml) で溶出した。

生物活性はアベナ屈曲試験を用いて検定した。アベナ幼葉鞘の先端2 mmを切除し2時間後、 10^{-5}M IAA と検定サンプルを含む3% 寒天片 ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) をアベナ幼葉鞘の切除面の片側に載せた。全て

の実験操作は薄暗い赤色光の下で行った。暗黒下、25℃で2時間静置した後、幼葉鞘の屈曲角を測定した。

オーキシン阻害活性は60-100%酢酸エチル溶出画分とメタノール溶出画分で検出された。活性画分をまとめて、再度シリカゲルのカラムクロマトグラフィー（クロロホルム-メタノールの溶媒系で、メタノール濃度を20%ずつ上昇（各溶媒共300 ml））に供した。抑制活性は40-60%メタノール溶出画分で検出された。次に、この活性画分を減圧下35℃で濃縮後、シリカゲルのセップパックカートリッジカラム（Waters）に供した。溶出はヘキサン-酢酸エチル溶媒系で、酢酸エチル濃度を10%ずつ上昇（10 ml）させ、最後はメタノールで行った。活性は60-80%酢酸エチル溶出画分と100%メタノール溶出画分に検出された。前者の画分を減圧下35℃で濃縮後、濃縮物（400 mg）をTLC（Kiesel gel 60 GF₂₅₄, MeOHで前洗浄, 0.5 mm厚さ、展開溶媒：クロロホルム-酢酸（19：1）とヘキサン-酢酸エチル（2：3））で分離し、活性区分をメタノールで溶出し、濃縮した。黄色の油状の活性物質（15 mg）を最終的にHPLC（C₁₈-100 A, 19 mm x 15 cm, Waters, 水-メタノール（2：1）、3 ml/min）で分離・精製を行った。活性画分（*R_t* 27-30 min）を減圧下35℃で濃縮し、3.8 mgの針状結晶を得た。

活性物質の生物検定

アベナ幼葉鞘の先端5 mmの切片を、様々な濃度のIAAと単離した活性物質を含む1%シュークロース水溶液（pH 5.4）に浮かべ、25℃暗黒下で6時間培養し、アベナ幼葉鞘切片の長さを測定した。

チモシー (*Phleum pratense* L.) とヒモゲイトウ (*Amaranthus caudatus* L.) の種子を、試験液 0.5 ml を含むペトリシャーレ (3 cm) に入れ、暗黒下 25°C で 3 日間培養し、それぞれのシュートと根の長さを測定した。実験はいずれも 2 回繰り返した。

結果と考察

オーキシン活性抑制物質を光の下で生育させたトウモロコシシュートから単離した。マススペクトロメトリーから分子式は $C_8H_7NO_3$ であることが分かった。 1H NMR のスペクトル (Table 2-1) から、3 個の methoxyl proton (δ 3.81)、3 個の methine proton (δ 6.72, 6.84, 6.96) と 1 個の NH proton (δ 8.55) の存在が明らかになった。 ^{13}C NMR のスペクトル (Table 2-1) から、OMe (δ 57.2, C-8), =CH- (δ 98.8, C-7), =CH- (δ 111.4 or 111.8, C-4 or C-5), >C= (δ 126.0, C-3a), >C= (δ 146.9, C-7a), >C= (δ 158.3 or 158.6, C-2 or C-6) の存在が明らかになった。NOE 実験において、 δ 3.81 (OMe) への照射によって C-5 のプロトンの強度が 6.4%、C-7 のプロトンの強度が 8.2% 上昇し、 δ 8.55 (NH) への照射によって C-4 のプロトンの強度が 0.53% 上昇することが分かった。これらのデータから、6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA、Table 2-1, Fig. 2-1) であると同定した。

この化合物は既にトウモロコシや小麦から抗菌活性物質として発見されていた (Virtanen et al. 1956)。更に、光の下で生育したトウモロコシ芽生えから小麦の根の成長を抑制する物質としても単離・同定されていた (Wilkins et al. 1974)。しかし、MBOA がトウ

モロコシのシュートからアベナ屈曲試験でオーキシン活性抑制物質として取り出されたのは本研究が最初である。

単離・同定されたMBOAの生物活性について、アベナの幼葉鞘の屈曲試験と切片伸長試験を用いて調べた。この物質はオーキシンによって誘導されるアベナ幼葉鞘の屈曲を 6×10^{-7} M以上の濃度で抑制し、その抑制活性は極めて高いことが分かった (Fig. 2-2)。この抑制活性は、オーキシンの存在下でのみ現れ、オーキシンが共存しないと活性を示さないことも分かった (Fig. 2-3)。Fig. 2-4 は、アベナ幼葉鞘切片をIAA とMBOAの混合液あるいはIAA のみで処理した後、3 時間目でIAA あるいはMBOAを添加した時のアベナ幼葉鞘切片の伸長の経時的変化を示す。オーキシンとMBOAの共存によって引き起こされる伸長抑制はオーキシンの添加によって回復することが分かった。更に、オーキシンによる伸長がMBOA添加によって抑制されることも明らかになった。これらの結果から、MBOAはアンチオーキシンであることが示唆された。Venis と Watson (1978) は、benzoxazolinone 類がオーキシンのレセプターにオーキシンが結合することを阻害する可能性を報告している。更に、トウモロコシ芽生えにおけるMBOA量が光照射によって増量することも報告されている (Wilkins et al. 1974)。従って、MBOAがトウモロコシ幼葉鞘の光屈性に重要な役割を演じていることが示唆される。

一方、benzoxazolinone 類が、菌類や昆虫に対する穀類の抵抗性に関係していることがKlunら (1970) によって報告されている。無傷の植物においてbenzoxazolinone 類は配糖体として存在し、細胞のダメージ、例えば病原菌による攻撃や損傷等によって酵素的に放出される。MBOAはチモシーやヒモグイトウの成長、特に根の成長を

抑制することも分かった (Fig. 2-5)。これらの結果から、MBOAはトウモロコシ幼葉鞘の光屈性に重要な役割を演じているだけでなく、植物対微生物、植物対昆虫や植物対植物といった生物相互作用にも関与していることが示唆される。

要約

オーキシン活性抑制物質が光照射したトウモロコシのシュートから単離され、その化学構造がスペクトル解析から6-methoxy-2-benzoxazolinone(MBOA)であることが明らかになった。MBOAはアベナ屈曲試験でオーキシンによって誘導される屈曲と、アベナ切片伸長試験でオーキシン誘導の伸長をいずれも低濃度で抑制することが分かった。オーキシン存在下でMBOAによって誘導される成長抑制はオーキシンの添加によって回復した。これらの結果から、MBOAは高活性のアンチオーキシンであることが示唆された。また、MBOAはチモシーやヒモゲイトウのシュートと根の成長も抑制することが分かった。

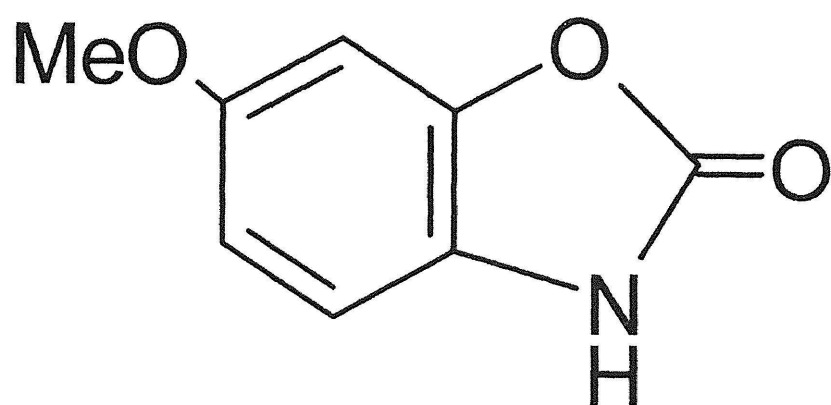


Fig. 2-1 Structure of isolated growth inhibitor

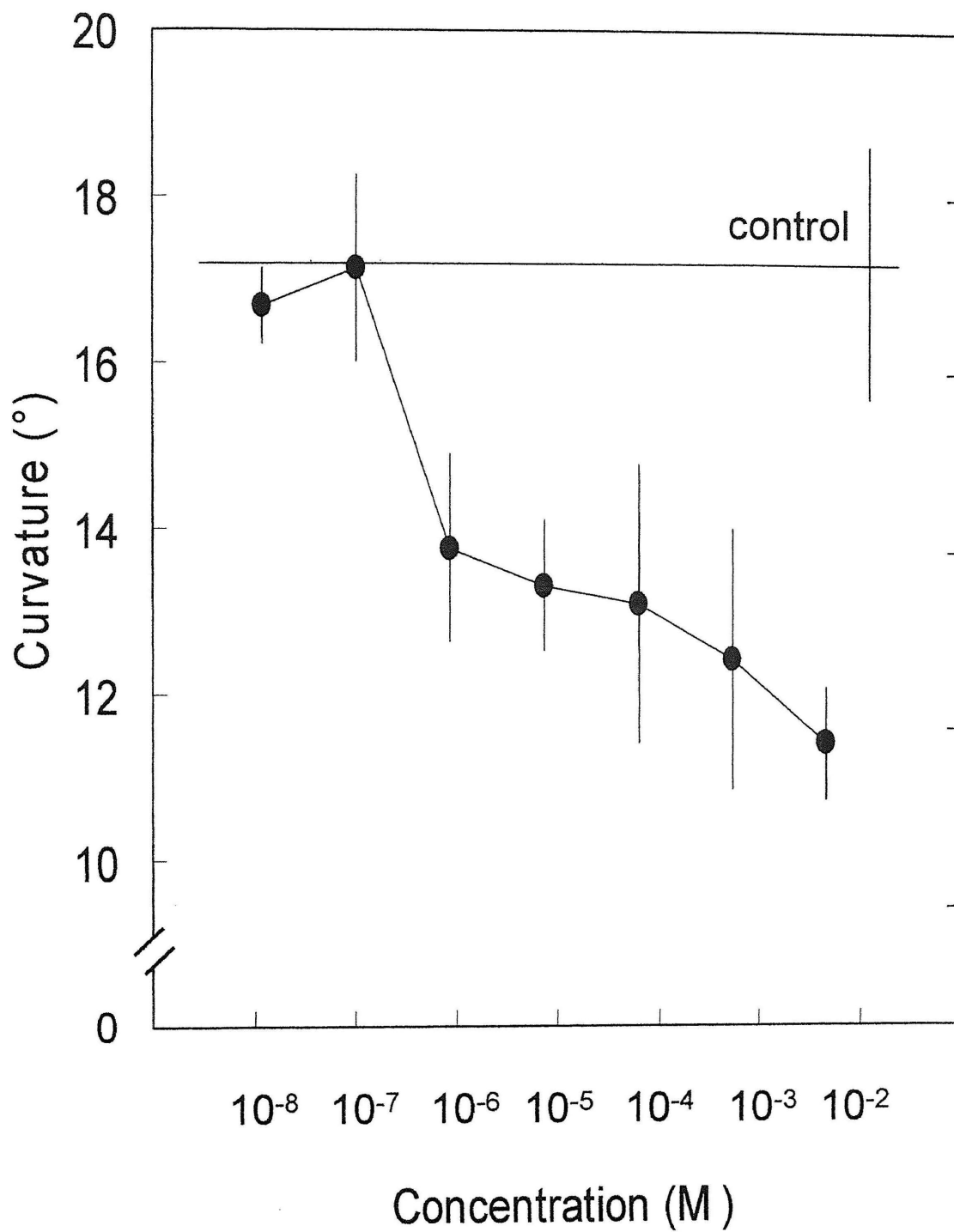


Fig. 2-2 Effect of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the auxin-inducing bending of coleoptiles of etiolated *Avena* seedlings. Each value is the average of 8 measurements; bars indicate s.e.

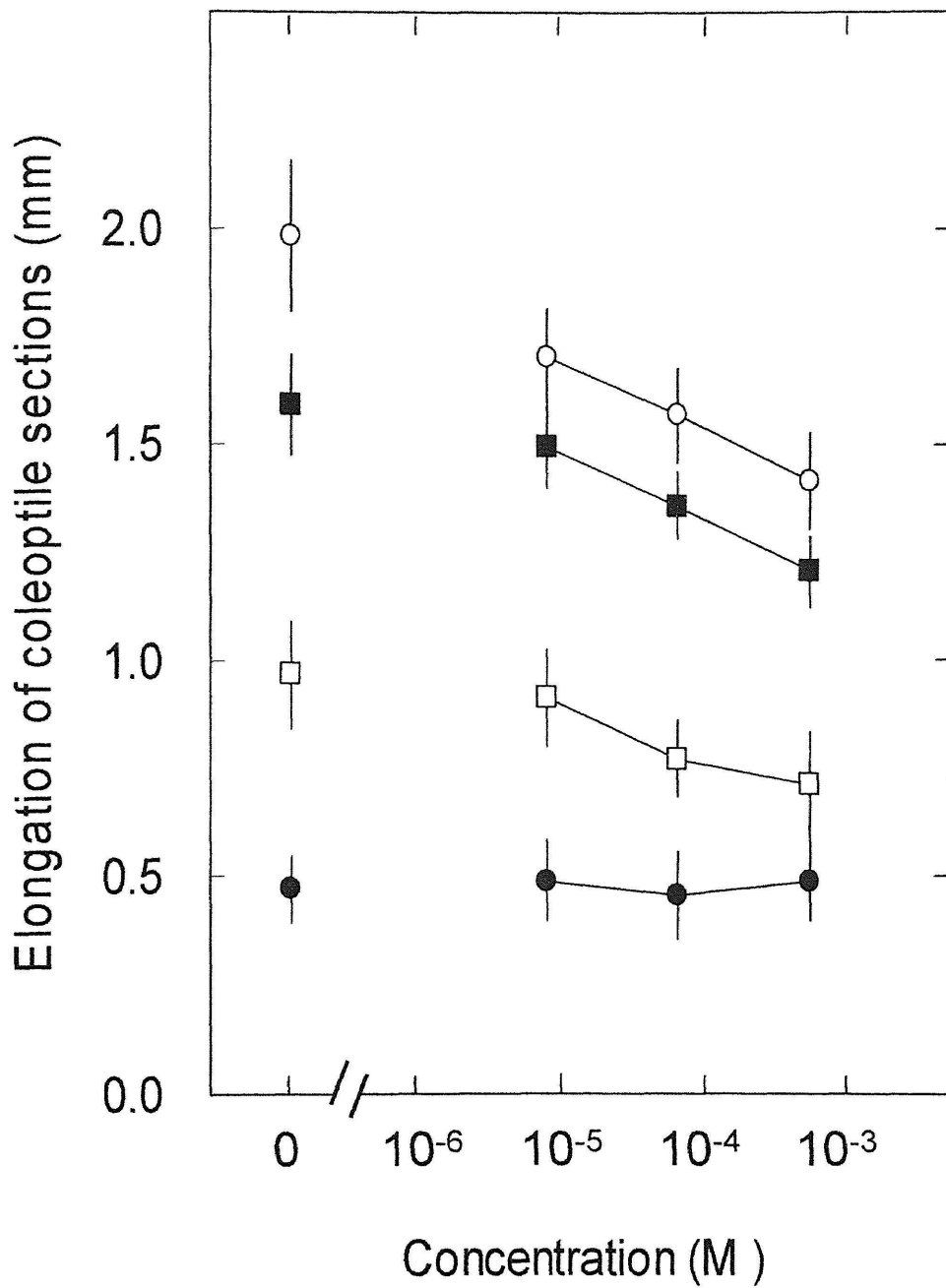


Fig. 2-3 Effect of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the elongation of etiolated *Avena* coleoptile sections. (○), 10⁻⁵M IAA; (■), 10⁻⁶M IAA; (□), 10⁻⁷M IAA; (●), control. Each value is the average of 10 measurements; bars indicate s.e.

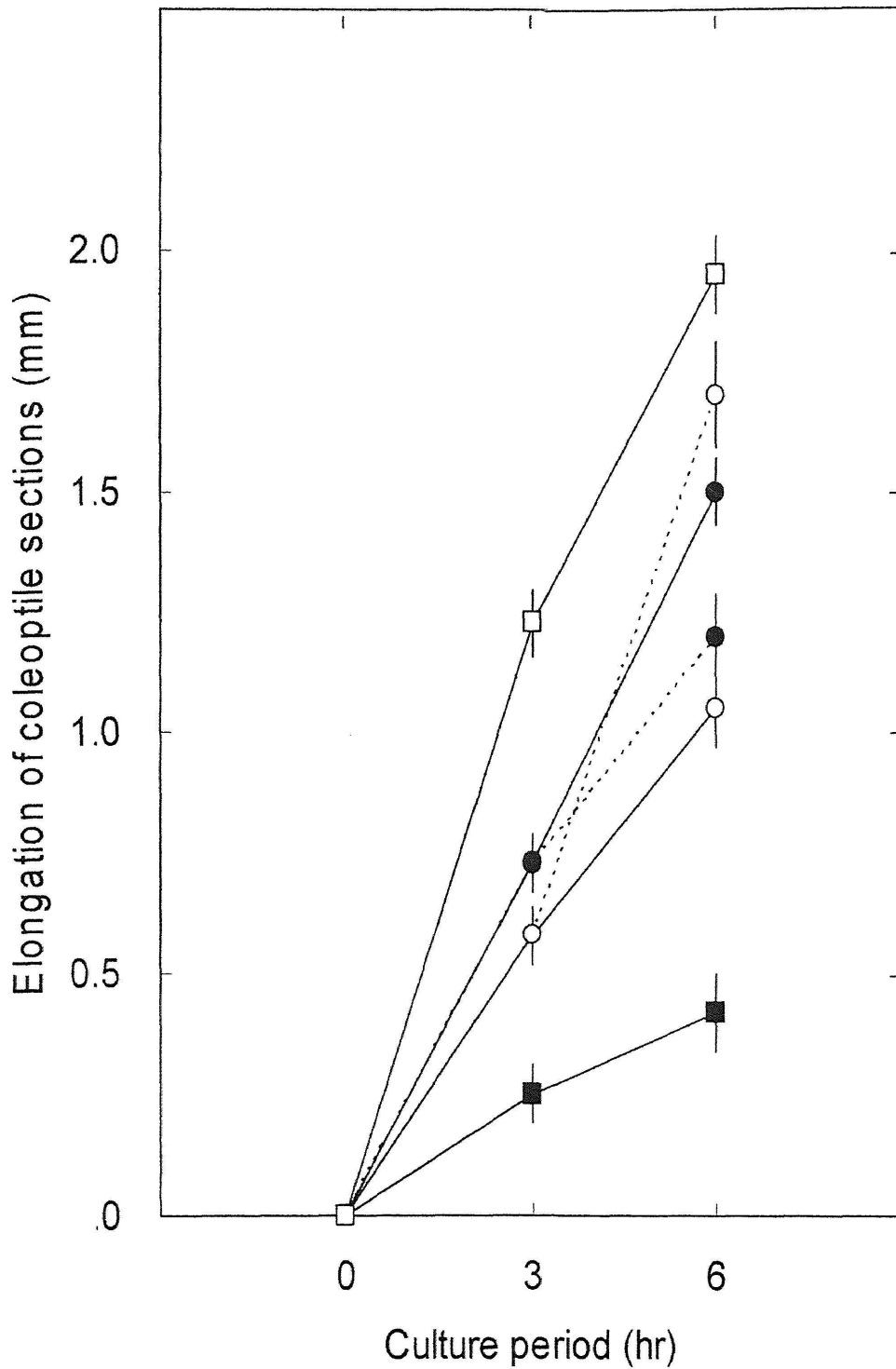


Fig. 2-4 The time course of elongation of etiolated *Avena* coleoptile sections preincubated for 3 hr with IAA (10^{-6} M, —●—) or mixed medium (—○—) containing IAA (10^{-6} M) and 6-methoxy-2-benzoxazolinone (6×10^{-4} M), then 6-methoxy-2-benzoxazolinone (6×10^{-4} M, - -●- -) or IAA (10^{-5} M, - -○- -) was added to the soln, respectively. (—□—), 10^{-5} M IAA; (—■—), control. Each value is the average of 10 measurements; bars indicate s.e.

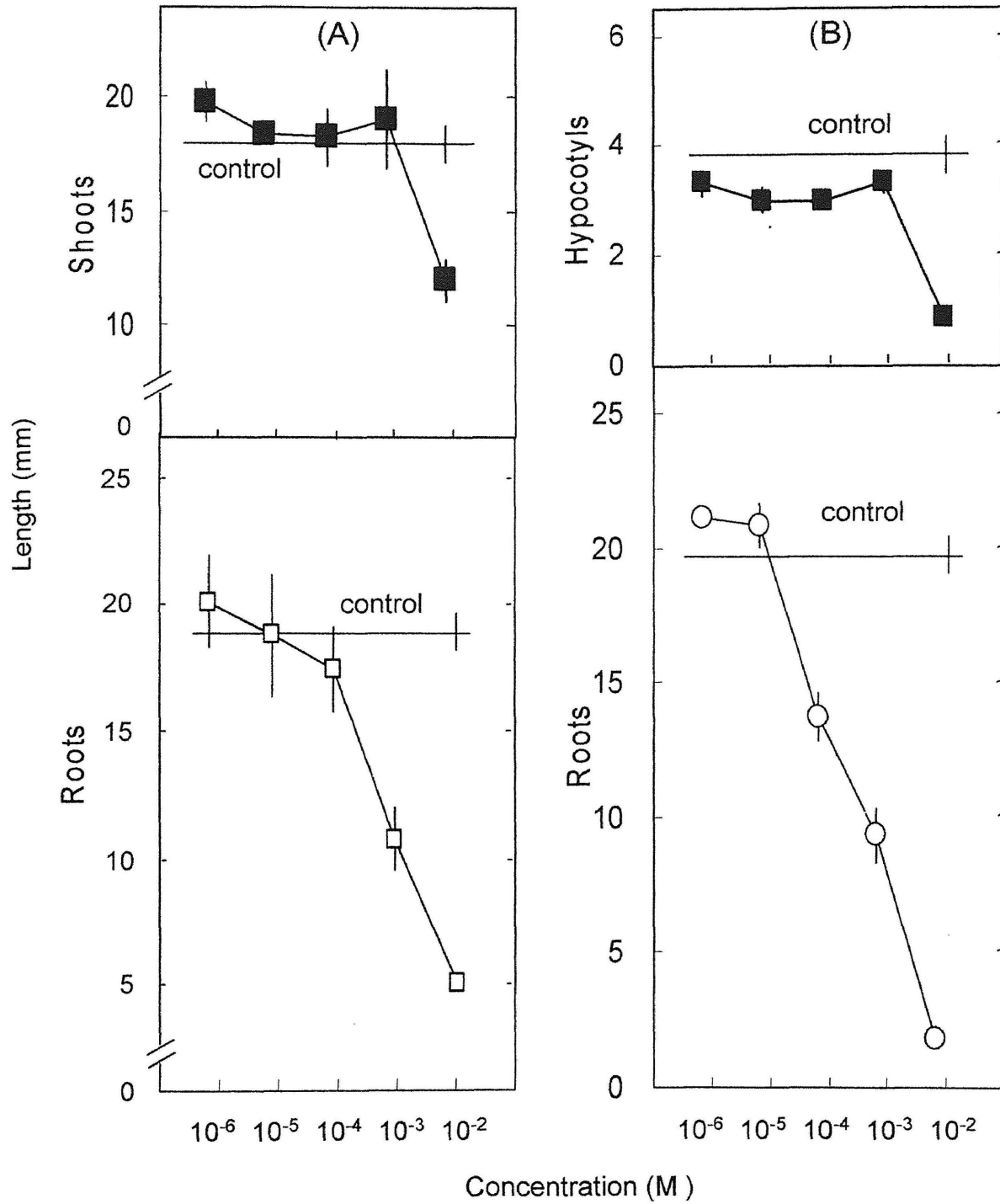
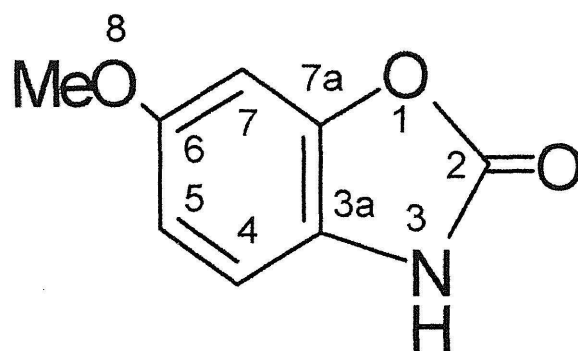


Fig. 2-5 Effect of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the elongation of the shoots or hypocotyls and roots of etiolated timothy grass (A) and *Amaranthus* (B) seedlings. Each value is the average of 10 measurements; bars indicate s.e.

Table 2-1 ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts (δ values from TMS) and multiplicities of isolated growth inhibitor

Atom	^1H (in CDCl_3)	^{13}C (in CD_3OD)
1	-	-
2	-	158.3 or 158.6
3	8.55 <i>br s</i>	-
3a	-	126.0
4	6.96 <i>d</i> (8.30)	111.4 or 111.8
5	6.72 <i>dd</i> (8.30, 2.45)	111.8 or 111.4
6	-	158.6 or 158.3
7	6.84 <i>d</i> (2.45)	98.8
7a	-	146.9
8	3.81 <i>s</i>	57.2

J (Hz) in parentheses.



第 3 章 ダイコン下胚軸の光屈性における光誘導性
成長抑制物質 raphanusol A と B の役割

序 論

これまで、ダイコン下胚軸において上方からの光照射によって引き起こされる成長抑制（光成長抑制）に関与する成長抑制物質として、 $1-\beta, 4\text{-di-}O\text{-}(4\text{-hydroxy-}3, 5\text{-dimethoxycinnamoyl})\text{gentio-}$ biose (raphanusol A と命名、Fig.3-1) (Hasegawa and Miyamoto 1980, Hase and Hasegawa 1982), $1-\beta\text{-}O\text{-}(4\text{-hydroxy-}3, 5\text{-dimethoxycinnamoyl})\text{-D-glucose}$ (raphanusol B と命名、Fig.3-1) (Hasegawa and Hase 1981)、更に raphanusanins (Hasegawa et al. 1982) や 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (4-MTBI) (Hasegawa et al. 2000) 等が単離・同定されている。これらのうち、raphanusanins と 4-MTBI については、ダイコン下胚軸の光成長抑制だけでなく、光屈性にも重要な役割を演じていることが多くの証拠から明らかにされている (Hasegawa et al. 1986, Noguchi et al. 1986, Noguchi and Hasegawa 1987, Hasegawa et al. 1987, Sakoda et al. 1988, Hasegawa et al. 2000)。しかし、raphanusanins や 4-MTBI と同じ上方からの光照射によってダイコン下胚軸で増量する成長抑制物質である raphanusols の光屈性における役割に関しては全く報告がない。ダイコン下胚軸は赤色光照射によってその成長が著しく抑制されるが、その時 raphanusol A と B が増量することが Hasegawa ら (1980、1981、1982) によって報告され、彼らはこれらの成長抑制物質はフィトクローム制御の下胚軸の成長抑制に重要な役割を演じていると考察した。

raphanusols が、青色光受容色素の phototropin や cryptochrome 制御の光屈性に関与するのかどうか明らかにすることを目的に、一

方向からの短時間の光照射によって誘導される一次屈曲、長時間照射によって誘導される二次屈曲及びその中間（屈曲が見られない）を示す様々な光屈性に伴うraphanusolsの光側と影側組織における含量を機器分析で調べた。更に、raphanusolsをダイコン下胚軸の片側に投与した場合、暗黒下でも投与側に屈曲するかどうか、についても研究を行った。

材料と方法

植物材料

桜島ダイコン (*Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *gigantissimus* Makino)の種子を、トレイに敷いた湿った濾紙の上に蒔き、25℃暗黒下で3日間培養した。下胚軸の長さが揃った芽生えを、湿ったパーミキュライトの入っている小型トレイに植え換えた。これらの操作は薄暗い緑色光 ($0.03 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)で行い、更に25℃暗黒下で1日培養した。

光屈性刺激

4日令のダイコン黄化芽生え（下胚軸長、約4 cm）に一方向から青色光（half-band width 43 nm, λ_{max} 448 nm）を30秒、5分あるいは50分間照射した。青色光は青色の亚克力板（Kyowalite PG, Kyowa Gas Chemical Industry Corp., Japan）と青色蛍光灯（National High Light S, National Corp., Japan）を組み合わせ、3 cmのスリットを通して照射した。光照射は植物のレベルで $0.46 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の強さで芽生え全体に行った。実験には少なくとも20本の

芽生えを用いた。下胚軸の屈曲角と光側・影側組織の成長率を照射後60分と90分に高感度フィルムを用いて撮影し、そのネガフィルムから測定した。最大屈曲は90分で見られた。光側と影側組織の成長率を測定するために、イオン交換樹脂ビーズ (Amberlite XAD-2) をラノリンにまぶして、薄暗い緑色光の下で、芽生えのフックの下0cmと2cmの両側(光側と影側に相等)に付着させた。ビーズ間の長さをネガフィルムから測定した。

raphanusol AとBの定量

実験には、光屈性刺激を加えた下胚軸10本を照射後60分でサンプリングした。芽生えのフックの下0~2cmの下胚軸切片を薄暗い緑色光の下で、カミソリを用いて光側と影側に二分した。二分した下胚軸切片を直ちに100%冷アセトンに入れ、切片の重量を測った後、-20℃で抽出時まで保存した。

サンプルをドライアイスの粉末と一緒に乳鉢中で粉碎し、サンプル重量の50倍量の70%冷アセトンで0℃で30分抽出した。抽出液をToyo No.1濾紙で濾過をし、残さを30倍量の冷アセトンで洗った。濾液を合わせ、減圧下30℃で濃縮し、水溶液に1/10量のK-phosphate buffer (pH7.8, 1M)を加え等量の酢酸エチルで3回振出した。中性画分を無水Na₂SO₄で脱水後、減圧下30℃で乾固した。これを40%メタノール水溶液10mlに溶かし、更に40%メタノール水溶液で前処理したC₁₈セップパックカートリッジカラム(Waters)に供し、40%メタノール水溶液10mlで溶出した。溶出液を減圧下35℃で乾固し、最終的にはHPLC (Wakopak C₁₈, Wako Pure Chemical Industries, Japan, H₂O : CH₃OH =3:2, v/v, 1.2

ml/min, 333 nm detector, λ_{\max} of raphanusol A and B: 333 nm) で分離し、定量した。raphanusol AとBの保持時間は7.5分と2.5分であった。各ピークの面積を測定し、それぞれの標準曲線から raphanusol AとB量を算出した。なお、定量時における raphanusol AとBの損失量を計算するために、単離・同定した raphanusol AとBの一定量をサンプルの抽出時（サンプル量は半分）に加えた。全体の回収率（約70%）をもとに raphanusol AとBの量を算出した。全ての実験は3回繰り返した。

raphanusol AとBの片側投与

raphanusol AとBの片側投与によって屈曲が誘導されるかどうか、4日令の黄化ダイコン芽生えを用いて実験を行った。1、0.3あるいは0 μg の単離・同定された raphanusol AとBを1 mgのラノリンにまぶし、6本の芽生えのフックの下0から2 cmの片側に付着させた。同時にイオン交換樹脂ビーズをフックの下0から2 cmの両側に付着させた。高感度フィルムを用い、片側投与後、2時間で撮影した。屈曲角と、投与側と反対側の上下のビーズ間の長さをネガフィルムから測定した。実験は3回繰り返した。

結果

Table 3-1は3段階の光照射による下胚軸の屈曲角と光側・影側組織の成長率を示したものである。最大の屈曲は光照射90分で見られた。14 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の青色光照射は所謂、1次屈曲であり、138 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ は無屈曲 (indifferent phototropic response)で、1380

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ は二次屈曲を示した。影側の成長率はいずれの光屈性においても暗黒下対照と殆ど変わらなかった。一方、光側組織の成長率は抑制された。屈曲と成長抑制のパターンは以前、Sakodaら（1988）によって報告された結果と良く似ていた。つまり、光屈性の程度は光側組織の成長抑制の度合いによることが分かった。

一次屈曲、無屈曲及び二次屈曲での下胚軸の光側・影側組織中の raphanusol A と B の含量を Fig.3-2 に示した。サンプリングは光屈性刺激開始後、まだ、屈曲が進行している時間帯の60分で行った。影側組織における含量はいずれの屈曲においても、暗黒下の含量と殆ど同じであった。逆に、一次及び二次屈曲において光側組織の raphanusol A と B の含量は影側組織の含量より多く、特に二次屈曲における光側と影側の含量の差は極めて大きかった。一方、無屈曲では光側と影側組織における raphanusol A と B の含量は等しかった。

raphanusol A と B の内生量の偏差分布をもたらす片側投与が、下胚軸の偏差成長を引き起こし、屈曲を誘導するかどうか調べた (Table 3-2)。ラノリンのみでは全く屈曲を引き起こさなかった。しかし、予想したように、raphanusol A も B も、投与側の成長を抑制し、下胚軸の投与側への屈曲を誘導することが分かった。屈曲の度合いは投与された濃度に依存していた。raphanusol A はモルレベルでは raphanusol B とほぼ同じ活性を示した。投与濃度が高い時に限って投与側と反対側の成長も抑制されたが、低濃度では殆ど成長は抑制されなかった。

考察

高等植物の光屈性は、光誘導性の成長抑制物質の局所的な蓄積によって引き起こされ、オーキシンの量が均等に分布していることは、多くの研究者によって示されてきた。ヒマワリの緑化下胚軸では、オーキシンの偏差分布は起こらないことが、Bruinsmaら (1975) や Feyerabend and Weiler (1988) によって明らかにされている。逆に、光屈性刺激によって、光側組織で中性の成長抑制物質が増量することが報告されている (Thompson and Bruinsma 1977, Franssen and Bruinsma 1981, Shen-Miller et al. 1982, Hasegawa et al. 1983)。

黄化及び緑化したダイコン下胚軸において、一方向からの青色光によって誘導される一次屈曲、無屈曲、二次屈曲が成長抑制物質 raphanusanins の偏差分布によって引き起こされることが示されている (Hasegawa et al. 1986, Noguchi et al. 1986, Noguchi and Hasegawa 1987, Hasegawa et al. 1987, Sakoda et al. 1988, Bruinsma and Hasegawa 1989, Bruinsma et al. 1989, Hasegawa et al. 2000)。オーキシンは一次屈曲でも二次屈曲でも、光側と影側組織で均等に分布し、更に表皮組織と内部組織との間でオーキシンが移動するということが全く起こらないことが、Sakoda and Hasegawa (1989) によって報告されている。

アベナ幼葉鞘においては、抽出性の IAA も拡散性の IAA も光側と影側組織で均等に分布し、光側組織で成長抑制物質が増量することも分かっている (Hasegawa and Sakoda 1988, Bruinsma and Hasegawa 1989, Bruinsma et al. 1989, Hasegawa et al. 1989)。

本研究の結果 (Tables 3-1 and 3-2, and Fig. 3-2) から、光屈性刺激を受けた下胚軸における raphanusol A と B の偏差分布が下胚軸の偏差成長と良く一致し、更に raphanusol A と B はフィトクローム介在の光成長抑制だけでなく、フォトトロピンやクリプトクローム制御の光屈性においても重要な役割を演じていることが結論付けられる。

従って、ダイコン下胚軸の光屈性は raphanusanins に加えて raphanusol A と B の偏差分布によっても引き起こされることが示唆された。

要約

機器分析を用いて、光屈性刺激を60分与えたダイコン下胚軸の光側と影側組織における成長抑制物質 raphanusol A と B の分布を調べた。光屈性刺激60分では、一次屈曲でも二次屈曲でも光屈性は進行中である。一次屈曲と二次屈曲いずれの場合も、raphanusol A と B は光側組織で増量し、無屈曲では僅かな増量が見られただけであった。一方、影側組織における raphanusol A と B は一次及び二次屈曲いずれも暗黒下とほぼ同じ含量を示した。raphanusol A と B を下胚軸の片側に投与した場合、投与側の成長が反対側の成長より顕著に成長を抑制することにより、投与側に屈曲させることも明らかになった。

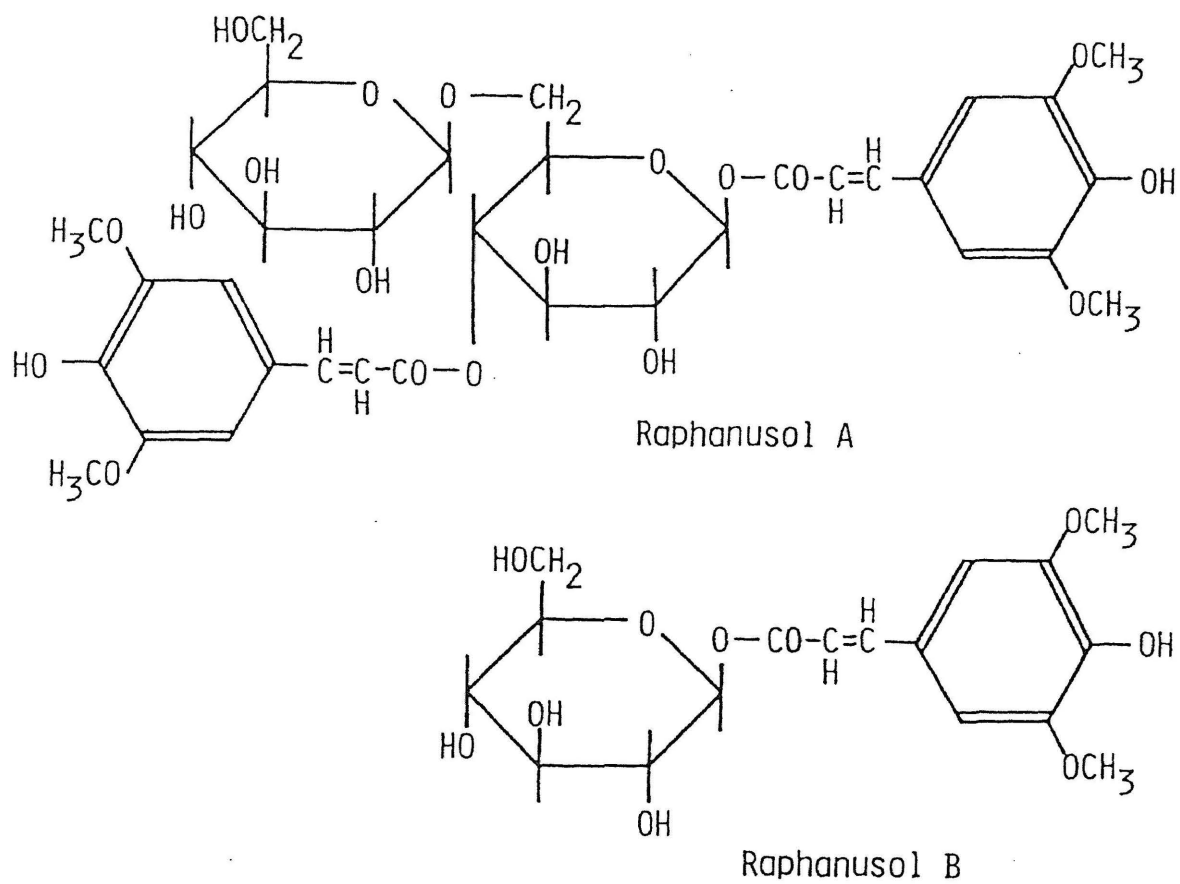


Fig.3-1 Chemical structures of raphanusol A and B.

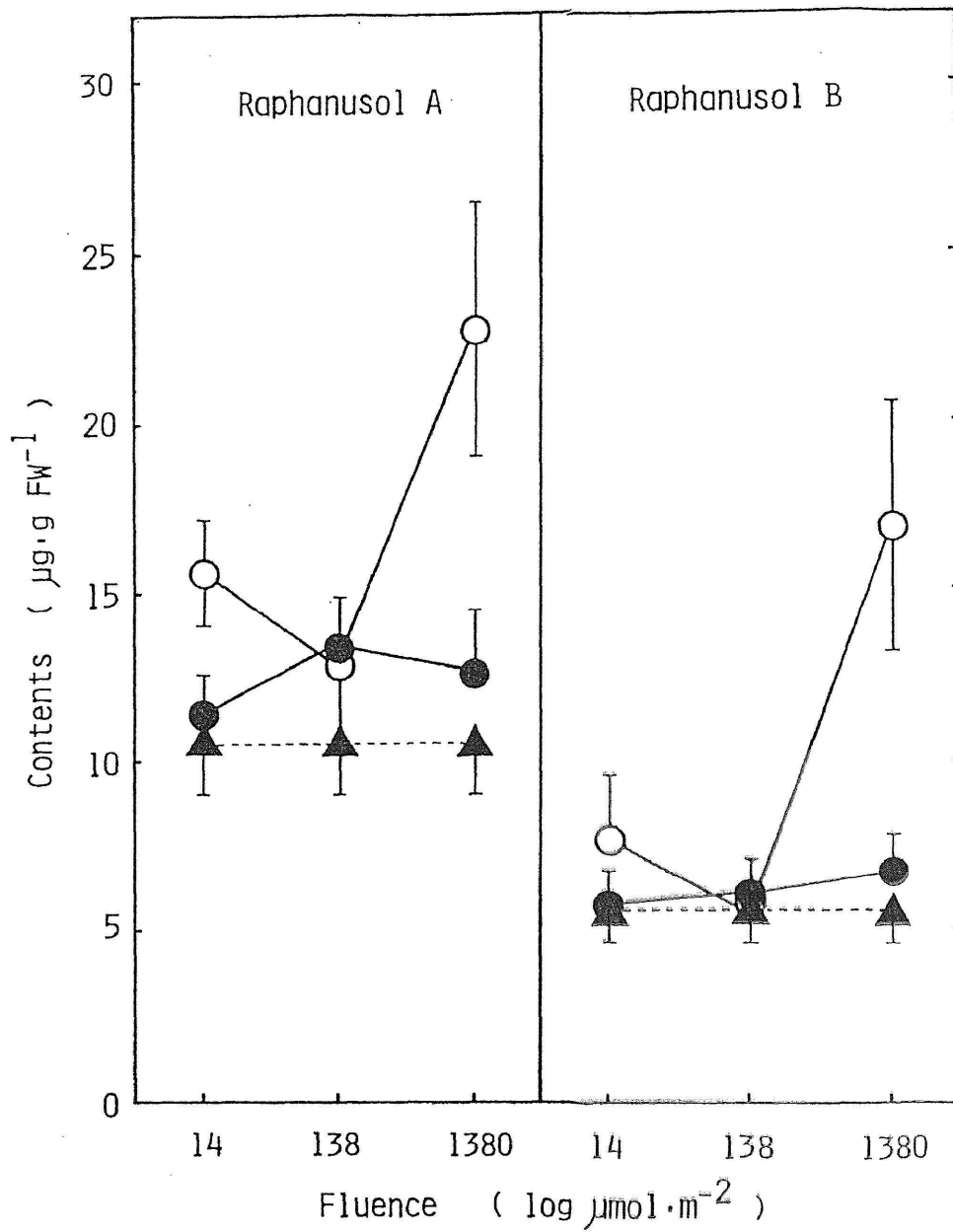


Fig.3-2 Lateral distribution of raphanusol A and B in the lighted (○) and shaded (●) sides, and in the halves of dark control (▲) of radish hypocotyls 60 min after the start of phototropic stimulation. Bars indicate SE.

Table3-1 The bending degrees and the growth rates of the dark control and unilaterally illuminated radish hypocotyls. Elongation was determined 60 min after the start of phototropic stimulation. Each value is the mean of 10 observations \pm SE.

Phototropism (fluence)	Curvature ($^{\circ}$)		Elongation increment (mm)	
	60 min	90 min	Lighted side	Shaded side
Dark control	0 ± 1	1 ± 1	0.95 ± 0.05	0.98 ± 0.04
First positive ($14 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$)	7 ± 2	15 ± 3	0.70 ± 0.06	0.91 ± 0.04
Indifferent ($138 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$)	3 ± 1	8 ± 1	0.89 ± 0.07	1.00 ± 0.07
Second positive ($1380 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$)	17 ± 2	31 ± 2	0.32 ± 0.10	0.99 ± 0.11

Table3-2 Effects of raphanusol A and B , applied to one side of etiolated radish hypocotyls, on hypocotyls curvature and the growth rates of applied and opposite sides. The curvature and the growth rates were measured 2 h after unilateral applications of 1.0, 0.3 or 0 μ g inhibitor per seedling. Average values of 6 seedlings.

Inhibitor	Curvature (degree)	Elongation increment (mm)	
		Applied side	Opposite side
Plain lanolin	0.8 \pm 1.0	1.25 \pm 0.15	1.29 \pm 0.17
Raphanusol A (0.3 μ g)	5.0 \pm 2.8	1.04 \pm 0.05	1.21 \pm 0.13
(1.0 μ g)	8.8 \pm 0.8	0.62 \pm 0.04	0.89 \pm 0.11
Raphanusol B (0.3 μ g)	6.8 \pm 1.2	0.89 \pm 0.16	1.06 \pm 0.17
(1.0 μ g)	11.5 \pm 1.6	0.60 \pm 0.11	0.89 \pm 0.04

第4章 ヒマワリ下胚軸の光屈性鍵化学物質の探索

序 論

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) 芽生えは古くから光屈性の研究に用いられてきた (Shibaoka 1961, Gillespie-Pickard and Thimann 1964, Leopold 1966, Bruinsma et al. 1975, Franssen et al. 1981, Yokotani-Tomita et al. 1997)。 *Helianthus* の語源は、helio が太陽で、anthos は花を意味し、太陽に似た花が太陽に向かって開くからであるといわれている。Went はアベナ屈曲試験を用いて、光側より影側でより多くのオーキシンが拡散することを見出し、光屈性は影側においてオーキシンが蓄積することによって光側に屈曲するという Cholodny-Went 説を提唱した (Went and Thimann 1937)。それ以来、この説が広く信じられてきた。しかし、蛍光分析法や免疫学的方法を用いて、二つのグループがヒマワリ下胚軸の光屈性において抽出性及び拡散性のオーキシンが光側と影側で均等に分布していることを報告した (Bruinsma et al. 1975, Feyerabend and Weiler 1988)。更に、Bruinsma のグループはオーキシンではなく、光誘導性の成長抑制物質の偏差分布が光屈性に重要であることを指摘した (Bruinsma et al. 1975)。それ以来、光誘導性の成長抑制物質の探索研究が盛んに行われるようになった。ヒマワリ下胚軸の光誘導性成長抑制物質として、caprolactam (Hasegawa et al. 1983) と 8-epixanthatin (Yokotani-Tomita et al. 1997) が光照射したヒマワリの芽生えから単離・同定された。これらの成長抑制物質の探索において、caprolactam や 8-epixanthatin より活性の高い未知の物質が存在することが明らかにされていた。そこで、本研究では青色光照射したヒマワリ下胚軸か

ら青色光で増量する成長抑制物質を取り出し、更にヒマワリ下胚軸の光屈性における役割を調べた。

材料と方法

光屈性刺激

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) の種子を蒸留水で湿らせたパーミキュライトの入ったトレイに蒔き、25℃ 暗黒下で3日間培養した。発芽種子を薄暗い緑色光 ($0.01 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 下で、湿らせたパーミキュライトの入った小さなトレイ (6.4 x 14.5 x 3.5 cm) に移し替え、25℃ 暗黒下で2日間培養した。光屈性刺激は、一列に並べた長さの揃った黄化芽生えに青色光 ($\lambda_{\text{max}} 448 \text{ nm}$) を100分照射した。光強度は植物レベルで $0.05 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。光照射は芽生え全体に行った。下胚軸の屈曲は赤外線イメージング系で10分間隔で撮影した。芽生えのイメージングはリアルタイムでモニターし、記録した。実験操作は薄暗い緑色光の下で行った。光屈性刺激開始後、0、20、30、60分で光屈性刺激を受けた下胚軸65本をサンプリングした。フックの下0から1.5 cmの下胚軸切片を切り取り、薄暗い緑色光の下で光側と影側組織にカミソリを使って二分した。二分した下胚軸を直ちに液体窒素で凍結し、次の実験まで-40℃で凍結保存した。凍結したサンプルをホモジナイザーを用いて50 mlの80% アセトン水溶液で粉碎し、抽出した。濾過後、抽出液を減圧下40℃で濃縮・乾固した。サンプルをメタノールに溶解し、HPLC (TSK gel, ODS-100V, Tosoh, Japan, 4.6 x 150 mm, 35% CH_3CN in H_2O , 1 ml/min, detector at 205 nm) に供した。一方向から連続し

て青色光をヒマワリの芽生えに照射し、20分後、下胚軸の光側と影側組織、及び暗黒対照における物質量の分布パターンをそれぞれのピークの面積から算出し、比較した。全ての実験は3回繰り返した。

青色光誘導性成長抑制物質の単離

5日令の黄化芽生え（下胚軸の長さが約3.5～4 cm）に青色光（ λ_{max} 448 nm, $0.05 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）を30分間照射した。青色光を照射したヒマワリ下胚軸（3.2 kg fresh weight）をサンプリングし、液体窒素で凍結し、 -40°C で保存した。凍結したサンプルをホモジナイザーを用いて5倍量の80%アセトンで抽出し、抽出液を濾過した後、減圧下 40°C で濃縮・乾固した。濃縮物を C_{18} セットアップパックカートリッジカラム（Waters）に供した。溶出は蒸留水中のメタノール濃度を0%から100%まで、20%（40 ml）ずつ上げて行った。光側と影側組織の抽出物のHPLCクロマトグラムで明確な量的差が見られたピーク3本（Fig. 4-2）が含まれる60%と80%溶出区分（5.84g）をまとめ、 C_{18} セットアップパックカートリッジカラムで分離・精製を繰り返した。クレス根成長試験（成長抑制活性物質の簡便な生物試験法として広範に使用されている）で最も高い成長抑制活性を示した60%溶出区分（147.4 mg）をHPLC（ODS-120A, Tosoh, Japan, 7.8 x 300 mm, 37% CH_3CN in H_2O , 2 ml/min, detector at 205 nm）に供した。成長抑制活性を示した溶出物（Rt. 20-22 min, 11 mg）を更にHPLC（ODS-120A, Tosoh, Japan, 7.7 x 300 mm, 0-10min; 37% CH_3CN in H_2O , 10-20 min; linear gradient from 37% to 60%

CH₃CN in H₂O, 2 ml/min, detector at 205 nm) に供した。最も成長抑制活性の高いピーク C の保持時間は 19-22 分であった。このピーク (2.5mg) を最終的に HPLC (ODS-120A, Tosoh, Japan, 7.8 x 300 mm, 35% CH₃CN in H₂O, 2ml/min, detector at 205 nm) で分離・精製を行った。保持時間 27.6-28.2 分の溶出区分を減圧下 40℃ で濃縮・乾固し、1.1 mg の物質を得た。

スペクトル解析

¹H and ¹³C NMR スペクトルは Varian Unity INOVA 600 spectrometer (in CD₃OD at δ_H 3.35 ppm and δ_C 49.8 ppm) で分析した。FABMS は JMS-SX102/GCG spectrometer で分析した。8-epixanthatin は Yokotani-Tomita らの論文 (1997) を参考にして単離し、¹H and ¹³C NMR スペクトルデータから 8-epixanthatin であることを確認した。

新たに単離・同定した成長抑制物質と 8-epixanthatin の生物活性試験

一枚の濾紙を敷き、そこに 0.5 ml の試験液が入っているペトリシヤールに クレス (*Lepidium sativum* L.) の種子を 10 個入れ、25℃ 暗黒下で 26 時間培養し、根の長さを測定した。

結果と考察

光屈性刺激は一方向から青色光を連続して与えた。Fig. 4-1 から屈性刺激の開始後20分からヒマワリ下胚軸が光方向に屈曲し始めたことが分かる。Fig. 4-2 は光屈性刺激20分後における下胚軸の光側と影側組織の抽出物のHPLCクロマトグラムを示す。光側と影側でいくつかのピークで差が認められた。その中で、少なくとも3本のピーク（ピークA, B, C）がクレス根成長試験で成長抑制活性を示した。それらのうち、最も極性の低いピーク（ピークC, Rt. 7.7 min）が最も強い成長抑制活性を示した。そこで、ピークC (1.1 mg)を青色光照射したヒマワリ下胚軸 (3.2 kg fresh weight)から単離した。

分子式は $C_{21}H_{28}O_7$ であることが、HRFAMS (pos.) [m/z 415.1717 calcd. for $C_{21}H_{28}O_7Na$, 415.1732]によって決定された。 ^{13}C NMRから、4個のacetylenic carbons at δ_c 80.2 (C-7), 76.5 (C-5), 75.8 (C-4), and 69.9 (C-6)、6個のdisubstituted olefins at δ_c 139.7 (C-14), 138.0 (C-1), 135.1 (C-10), 127.5 (C-9), 116.7 (C-2) and 115.2 (C-15)、1個のacetal carbon at δ_c 100.9 (C-1')、6個のoxymethines at δ_c 78.2 (C-4'), 78.1 (C-3'), 74.9 (C-2'), 71.6 (C-5'), 64.3 (C-8), and 63.8 (C-3)、1個のoxymethylene carbon at δ_c 62.8 (C-6') と3個のmethylenes at δ_c 38.8 (C-12), 34.3 (C-13), and 28.2 (C-11) (Table 4-1) の存在が明らかになった。更に、 1H NMRスペクトルから8個のolefinic protons の存在も確認された (Table 4-1) 。二重結合 (C-9,10) の λ -geometry はH-9 とH-10間の 1H - 1H カップリング定数 ($J_{9,10}=7.8$ Hz)と、H-9 とH-10間のNOESY correlation から類推された。 1H - 1H COSYスペクトルはC-1 to C-3, C-8 to C-15, C-1' to C-6' connectivitiesを示した。糖成分

は H-1' to H-3' and H-5' and H-4' to H-3' and H-5' の NOESY correlations と $^1\text{H}-^1\text{H}$ カップリングコンスタントから β -glucose であることが分かった。anomeric proton (H-1') と C-8 (δ_c 64.3) 間の HMBC correlation は、glucose moiety が O-8 と結合していることを示した。これらのスペクトルデータから、新たに単離した成長抑制物質は 8-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-hydroxy-1,9,14-pentadecatriene-4,6-diyne (ヒマワリの学名に因んで helian と命名) と同定された (Fig. 4-3)。

helian と 8-epixanthatin の生物活性を クレス根成長試験で比較した。helian が 2.6×10^{-6} mol/l 以上の濃度で成長抑制活性を示したのに対して、8-epixanthatin は 1.2×10^{-4} mol/l 以上の濃度でしか活性を示さなかった。クレス根成長試験で 50% 抑制活性を示す EC_{50} をそれぞれの投与反応曲線から算出した。Table 4-2 から明らかのように、helian の活性は 8-epixanthatin の 38 倍もの高活性を示した。caprolactam の EC_{50} は文献 (Hasegawa et al. 1983) から算出したが、helian や 8-epixanthatin より低く、その EC_{50} は 3.3×10^{-3} mol/l であった。

光屈性刺激後 20 分でのヒマワリ下胚軸の光側と影側組織における helian の内生量を機器分析で調べた (Table 4-3)。光側の helian 量は影側や暗黒対照の約 1.6 倍であった。これらの結果から、新たに単離・同定した青色光で誘導される helian はヒマワリ下胚軸の光屈性で重要な役割を演じている可能性が高いことが示唆された。このことは、光屈性がオーキシンではなく、光側と影側組織における光誘導性のオーキシン活性抑制物質の偏差分布によって引き起こされるという、Bruinsma-Hasegawa 説を支持するものである。なお、ピ

ーク A と B の単離と構造解析は今後の問題である。

要約

新規の青色光誘導性成長抑制物質を青色光照射したヒマワリ下胚軸から単離し、 ^1H と ^{13}C NMR スペクトル及びHRFABMS から8-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-hydroxy-1,9,14-pentadecatriene-4,6-diyne(ヒマワリの学名 *Helianthus* に因んでhelianと命名)と同一定した。helianはクレス根成長試験で 2×10^{-6} mol/l以上の濃度で成長抑制活性を示した。helianは、光屈性刺激を与えたヒマワリ下胚軸の光側組織で影側組織より高い含量を示した。これらの結果から、新規の成長抑制物質helianはヒマワリ下胚軸の光屈性に重要な役割を演じていることが示唆された。

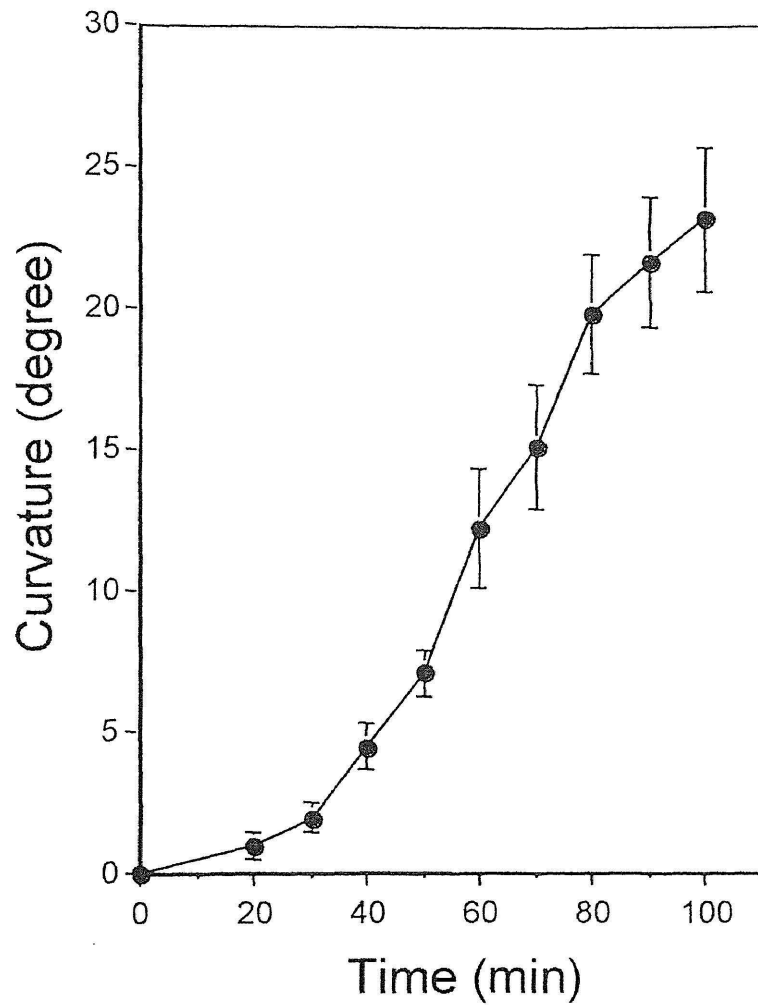


Fig. 4-1. Time course of phototropic response of etiolated sunflower hypocotyls to continuous, unilateral blue illumination. Values are means of 20 seedlings \pm SE.

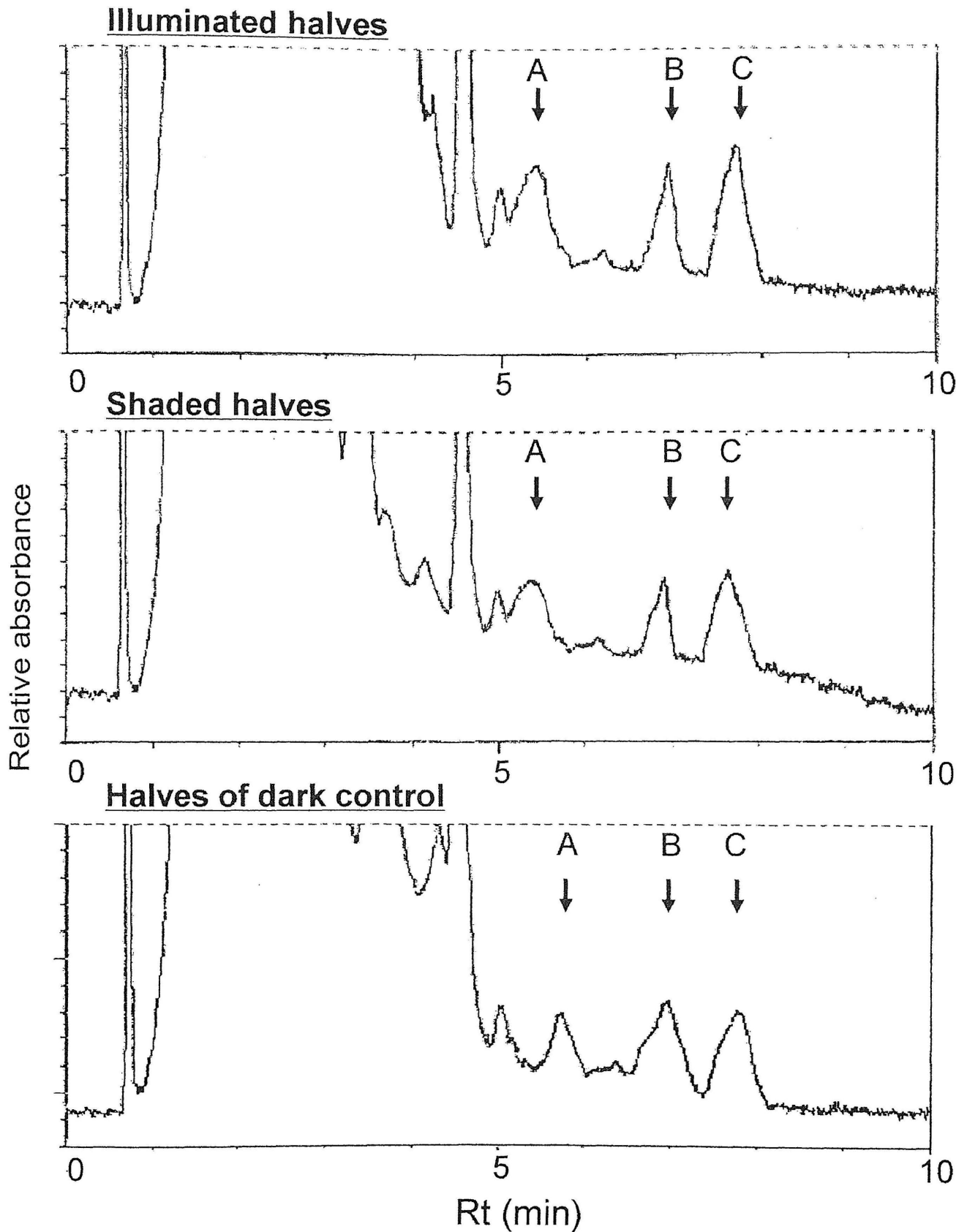


Fig. 4-2. HPLC chromatograms extracts from illuminated and the shaded halves of sunflower hypocotyls at 20 min after onset of continuous, unilateral blue illumination, and in the other halves of dark control. The experiments were repeated three times.

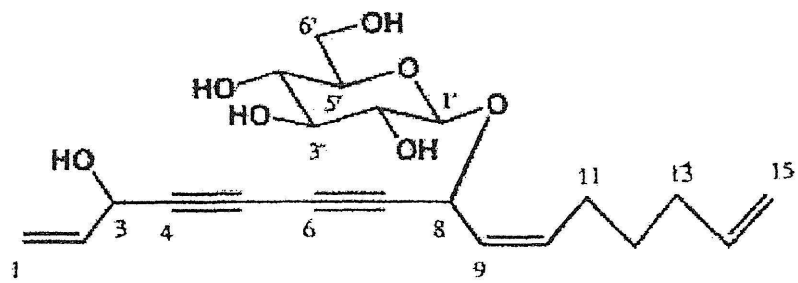


Fig. 4-3. Chemical structure of Compound 1.

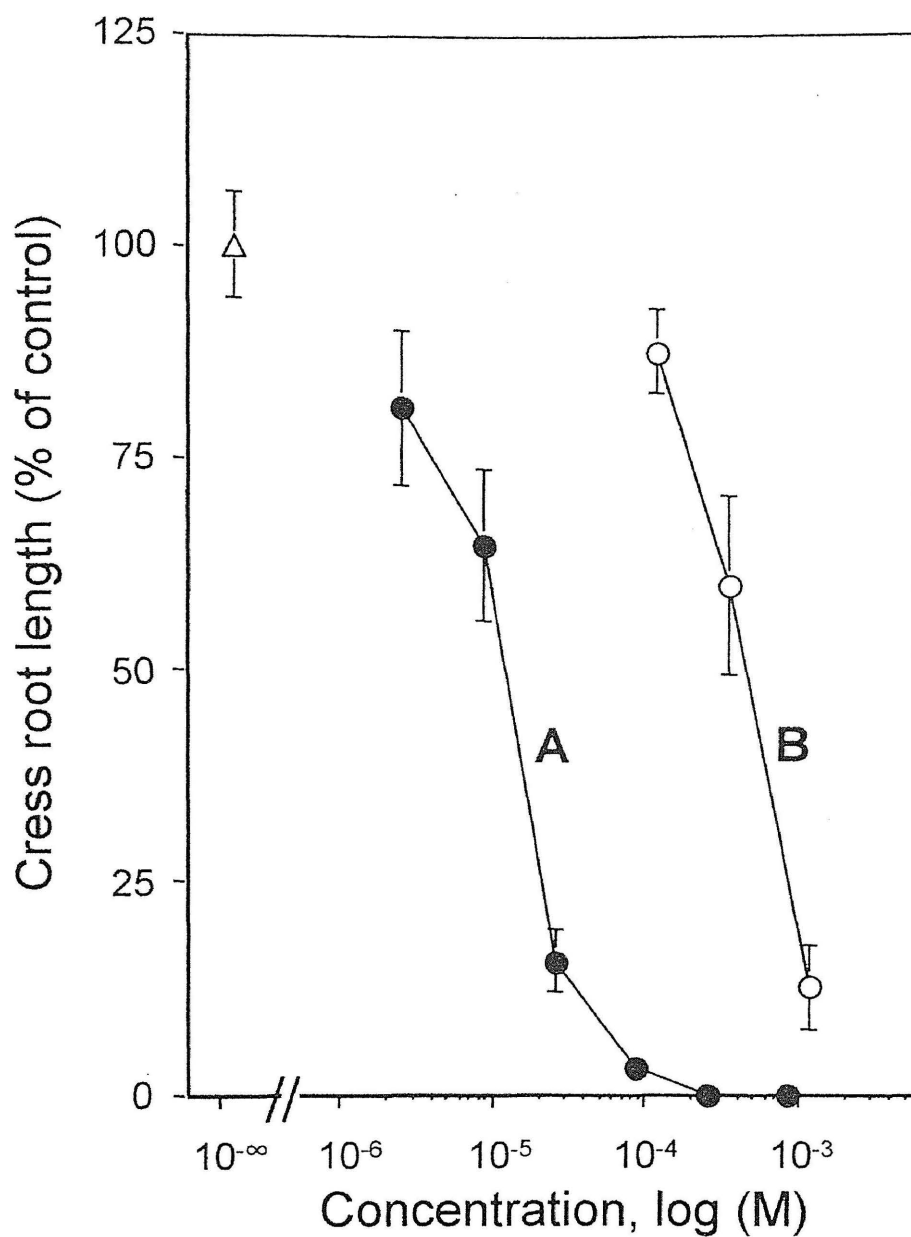


Fig. 4-4. Effects of the isolated 1 and 8-epixanthatin on the cress root growth. A: isolated 1, B: 8-epixanthatin, Control (open triangle). Each value is the mean of 10 seedlings \pm SE. These experiments were repeated three times and the results were similar.

Table 4-1. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts (values from TMS) and multiplicities of compound **1**.

Atom	^{13}C (in CD_3OD , 150 MHz)	^1H (in CD_3OD , 600 MHz)
1(a)	116.7	5.44 (1H, <i>dd</i> , $J = 17.4$ and 1.2 Hz)
(b)		5.24 (1H, <i>dd</i> , $J = 10.2$ and 1.2 Hz)
2	138.0	5.95 (1H, <i>ddd</i> , $J = 15.6$, 10.2 and 5.4 Hz)
3	63.8	4.88 (1H, <i>m</i>)
4	75.8	
5	76.5	
6	69.9	
7	80.2	
8	64.3	5.58 (1H, <i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)
9	127.5	5.59 (1H, <i>dd</i> , $J = 8.4$ and 7.8 Hz)
10	135.1	5.67 (1H, <i>dt</i> , $J = 7.8$ and 7.2 Hz)
11	28.2	2.22 (2H, <i>m</i>)
12	38.8	2.19 (2H, <i>m</i>)
13	34.3	2.13 (2H, <i>m</i>)
14	139.7	5.87 (1H, <i>ddt</i> , $J = 17.4$, 10.8 and 7.2 Hz)
15(a)	115.2	5.06 (1H, <i>dd</i> , $J = 17.4$ and 1.8 Hz)
(b)		4.99 (1H, <i>dd</i> , $J = 10.2$ and 1.8 Hz)
1'	100.9	4.64 (1H, <i>d</i> , $J = 7.8$ Hz)
2'	74.9	3.24 (1H, <i>dd</i> , $J = 8.4$ and 7.8 Hz)
3'	78.1	3.43 (1H, <i>dd</i> , $J = 10.8$ and 8.4 Hz)
4'	78.2	3.32 (1H, <i>m</i>)
5'	71.6	3.30 (1H, <i>m</i>)
6'(a)	62.8	3.93 (1H, <i>dd</i> , $J = 11.7$ and 1.8 Hz)
(b)		3.71 (1H, <i>dd</i> , $J = 11.7$ and 6.0 Hz)

Table 4-2. Inhibitory activity of the isolated 1, 8-epixanthatin and caprolactam.

Compounds	EC ₅₀ /M
Isolated 1	1.2 X 10 ⁻⁵ a)
8-Epixanthatin	4.6 X 10 ⁻⁴ a)
Caprolactam	3.3 X 10 ⁻³ b)

a) EC₅₀ represents the concentration of samples, which cause 50% inhibition of the root growth of cress seedlings.

b) The EC₅₀ of caprolactam is estimated from the dose-response curve against cress hypocotyl growth test, obtained by Hasegawa et al. (1983).

Table 4-3. The content of endogenous **1** in the illuminated and the shaded halves of sunflower hypocotyls unilaterally exposed to blue light for 20 min, and the content in the halves of dark control. Average data from three independent experiments in duplicate.

	Illuminated half	Shaded half	Control half
1 (ng/half-hypocotyl)	10.4 ± 0.8	6.5 ± 0.1	6.4 ± 0.1

総合考察

植物の運動のうち、最も代表的な現象である光屈性は、Darwin (1880) の著書 "The power of movement in plants" 以来、多くの生物学者とりわけ植物生理学者によって研究がなされてきた。光屈性の生物学的意味は、光合成のための光エネルギーを効率良く捕捉するために、葉を光方向に垂直に位置させるべく茎を光側に屈曲させるのであろうと考えられている。

光屈性は影側組織の成長促進と影側組織の成長抑制によって引き起こされるといわれている。光側から影側組織に植物ホルモンのオーキシンが横移動する結果、影側のオーキシン量が増加し、反対に光側のオーキシン量が減少するために影側組織の成長が促進され、光側組織の成長が抑制されるというものである (Cholodny-Went 説、Went and Thimann 1937)。この考えは、Went (1928) や Briggs (1957, 1963) の実験結果によって強く支持される。しかし、Went や Briggs らによるオーキシンの定量は、アベナ屈曲試験によってのみ行われ、その屈曲角からオーキシン量に換算したものである。もし、サンプル中にオーキシンの他に、オーキシンの活性を抑える物質が混在した場合は、屈曲角からオーキシン量を換算することは出来ない。これまで、ヒマワリ下胚軸、アベナ幼葉鞘やダイコン下胚軸の光屈性において、拡散性及び抽出性のオーキシンは光側と影側で全く等しいことが報告されている (Bruinsma et al. 1975, Feyerabend and Weiler 1988, Sakoda and Hasegawa 1989, Hasegawa et al. 1989)。しかし、古くから光屈性の研究で実験材料として用いられてきたトウモロコシ幼葉鞘の光屈性に伴うオーキ

シン (IAA)の分布を機器分析によって調べた研究はない。一方、ダイコン下胚軸やシロイヌナズナ下胚軸等の光屈性において、光側と影側組織の成長率が精密に調べられ、暗黒対照の成長率と影側組織の成長率は殆ど変わらず、光側組織の成長抑制のみによって光屈性が引き起こされることが分かっている (Noguchi and Hasegawa 1987, Hasegawa et al. 1987, Hasegawa et al. 2004)。従って、オーキシンが光側から影側に横移動するという Cholodny-Went 説に基づく、影側組織の成長促進については全く根拠はない。これらの報告から、トウモロコシ幼葉鞘を用いた Briggs の実験 (1957, 1963) を検証することは、光屈性がオーキシンの光側から影側への横移動によって生じるという、Cholodny-Went 説の妥当性を考察する上で極めて重要である。

そこで、第 1 章では、トウモロコシ幼葉鞘を用いて Briggs (1957, 1963) の古典的な実験を検証した。光屈性に伴うオーキシンの挙動を調べるのに、Briggs と同様にアベナ屈曲試験を用いると同時に、機器分析を用いてオーキシン (IAA) の定量を行った。その結果、生物検定でオーキシンの活性を調べ、更にその活性からオーキシンの量を換算した場合、影側のオーキシン量は光側のそれの約 2 倍であった (Fig. 1-2, Table 1-1)。この結果は Briggs の実験結果と良く一致した。しかし、機器分析でオーキシン量の分布を測定した場合、オーキシンは光側と影側で均等に分布していることが分かった (Table 1-1)。更に、中性画分を除いた酸性画分 (オーキシンが含まれる) のオーキシン活性を生物検定で調べたところ、オーキシン活性は光側と影側で等しかった (Table 1-1)。つまり、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性は光側と影側におけるオーキシンの不均等

な分布によってではなく、中性画分におけるオーキシシン活性抑制物質が光側で増量することによって引き起こされることが強く示唆された。従って、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性も、ヒマワリやダイコンの下胚軸やアベナ幼葉鞘等の光屈性と同様に、Cholodny-Went 説では説明出来ず、光側で生成される成長抑制物質によって光側組織の成長が抑制され、光方向に屈曲するという Bruinsma-Hasegawa 説 (1990) によって説明出来ることが示唆された。

第1章でトウモロコシ幼葉鞘の光屈性において、光側組織で生成される中性の成長抑制物質が重要な役割を演じていることが示唆された。そこで、第2章では、その光誘導性成長抑制物質の本体を解明する目的で、単離と同定を行った。光照射した大量のトウモロコシ幼葉鞘を有機溶媒で抽出し、酢酸エチル可溶の中性画分を得、種々のクロマトグラフィーを駆使して単離することに成功した。この物質の¹H及び¹³C NMRのスペクトルから、6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA)と同定した (Fig. 2-1)。この物質は抗菌活性物質 (Virtanen et al. 1956)や植物成長抑制物質 (Wilkins et al. 1974)としてトウモロコシ等から単離・同定されていた。しかし、光照射によってトウモロコシ幼葉鞘で増量することや、光屈性に関与する物質としては、初めての知見である。更に、この物質はアベナ幼葉鞘切片の成長試験において、オーキシシンと拮抗する活性を有していることも新たに明らかになった (Fig. 2-2, 3, 4)。また、この光誘導性成長抑制物質の探索において、MBOAの他に強い成長抑制活性物質の存在が確認された。この物質は後に、Hasegawa et al. (2004) によって、2,4-dihydroxy-7-methoxy-2(*H*)1,4-benzoxazin-3-4(*H*)-one (DIMBOA)であることが明らかにされ、更に

MBOAと共にDIMBOAもトウモロコシ幼葉鞘の光屈性において光側組織で増量し、光側の成長抑制に寄与していることも明らかにされた。また、彼らはこれらの物質をトウモロコシ幼葉鞘の片側に投与した場合、投与側に屈曲することや、 β -glucosidaseの活性の上昇やこの遺伝子発現が青色光照射によって高まり、DIMBOAの前駆物質(DIMBOA-glc, 不活性型)から活性型のDIMBOA次いでMBOAが生成されることも明らかにした(Hasegawa et al. 2004, Jabeen et al. 2006)。従って、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性はオーキシンが影側で増量することによって引き起こされるのではなく、光側組織でDIMBOAやMBOAが増量することによって光側組織の成長が抑制され、光側に屈曲することが強く示唆された。

第3章では、ダイコン下胚軸の光屈性を制御する生理活性物質について研究を行った。ダイコン芽生えに上方から光照射した場合、その下胚軸の成長は著しく抑制される(Hasegawa and Miyamoto 1978)。この下胚軸の光成長抑制に関与する成長抑制物質として、raphanusols (Hasegawa and Hase 1981, Hase and Hasegawa 1982, Fig. 3-1) や raphanusanins (Hasegawa et al. 1982)、4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (4-MTBI) (Hasegawa et al. 2000) が単離・同定されている。このうち、raphanusanins と 4-MTBIについては、光屈性に伴う光側・影側組織における分布、これらの片側投与実験、更にこれらの物質の生成経路等について研究され、これらの物質がダイコン下胚軸の光屈性に重要な役割を演じていることが報告されている(Hasegawa et al. 2000, Yamada et al. 2002)。しかし、raphanusanins 等と同様に、ダイコン下胚軸の光成長抑制を制御する成長抑制物質 raphanusols については、光

屈性に関与するのかどうか、全く明らかにされていない。そこで、ダイコン下胚軸の光屈性に伴う raphanusols の光側と影側組織における分布と活性について調べた。片側から照射する青色光の強度を変え、一次屈曲、無屈曲 (indifferent)、二次屈曲において光側と影側組織中の raphanusol A と B の量を機器分析で測定したところ、屈曲のみられる一次と二次屈曲において光側組織で raphanusol A, B 共に暗黒や影側組織に比較して高い値を示した (Fig. 3-2)。また、一次及び二次屈曲における光側と影側組織の成長率を調べたところ、いずれも光側組織の成長抑制のみが認められた (Table 3-1)。更に、raphanusol A と B をそれぞれ内生量レベルでダイコン下胚軸の片側に投与した場合、投与側の成長が抑制されて、投与側に屈曲することも分かった (Table 3-2)。従って、これらの結果から、ダイコン下胚軸の光屈性は raphanusanins や 4-MTBI だけでなく、raphanusols が光側組織で増量し、その結果、光側組織の成長が抑制され、屈曲するということが強く示唆された。

Bruinsma et al. (1975) が、光屈性は Cholodny-Went 説では説明出来ないということ初めて機器分析を用いて報告した。彼らが実験材料として用いたのがヒマワリ下胚軸であった。ヒマワリ下胚軸の光屈性において、オーキシンは光側と影側組織で均等に分布し、更に光側組織で成長抑制物質が増量することで光側組織の成長が抑制され、屈曲するというものであった。その後、その光側組織で増量する成長抑制物質の探索が行われ、caprolactam (Hasegawa et al. 1983) と 8-epixanthatin (Yokotani-Tomita et al. 1997, 1999) が単離・同定された。しかし、これらの物質の精製過程でより強い成長抑制活性を示す物質が存在することが確認されて

いたものの、その本体は不明であった。そこで、第4章では、その高い成長抑制活性を有する物質の単離・同定することを目的に研究を行った。青色光を照射した大量のヒマワリ下胚軸を有機溶媒で抽出し、抽出物を種々のクロマトグラフィーを駆使して、高活性の成長抑制物質を単離することに成功した。 ^1H 及び ^{13}C NMR やHRFAMSのスペクトル解析から、8-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-hydroxy-1,9,14-pentadecatriene-4,6-diyneと同定した (Hasegawa et al. 2006)。この新規化合物 (ヒマワリの学名 *Helianthus* に因んで *helian* と命名) は以前、ヒマワリから単離・同定した caprolactam や 8-epixanthatin よりはるかにその成長抑制活性が高いことと、光屈性刺激で光側組織で増量すること等が明らかになった。従って、ヒマワリ下胚軸の光屈性は *helian* を中心に、caprolactam や 8-epixanthatin 等が一方向からの光刺激によって、光側組織で増量することによって引き起こされることが示唆された。

本研究によって、トウモロコシ幼葉鞘、ダイコン下胚軸更にヒマワリ下胚軸の光屈性もオーキシンの偏差分布ではなく、光側組織における光誘導性成長抑制物質の増量によって引き起こされることが明らかになり、Cholodny-Went説ではなく、Bruinsma-Hasegawa説によって光屈性が説明出来ることが示唆された。また、本研究によって明らかにされた成長抑制物質を初め、これまでに発見された光誘導性成長抑制物質は、アベナ幼葉鞘 (uridine) を除いて植物の種類によって異なることが明らかにされた。高等植物一般に見られる光屈性が植物の種類によって異なる成長抑制物質によって制御されることに、疑問を感じる向きがあるかも知れないが、植物の種類によって形が異なったり、生活環を異にすることから、最終的に偏差

成長をもたらす物質が植物に固有であるとしても不思議ではないのではないか。また、これまで発見されてきた光誘導性成長抑制物質の多くが、抗菌活性をもつことから、一方向からの光をストレスとして感応してこのような物質を生成しているのではないだろうか。もし、そうであるとしたら、これらの光誘導性成長抑制物質をベースとした農薬や医薬としての応用展開が期待される。

謝 辞

本稿の遂行にあたり、筑波大学大学院生命環境科学研究科生命産業科学専攻、長谷川宏司教授から終始適切な御指導と御鞭撻を賜りました。ここに謹んで感謝致します。

また、生命環境科学研究科生命産業科学専攻、佐竹隆顕教授、久島繁教授ならびに繁森英幸助教授には、本論文をまとめるにあたり、御丁寧な御助言を頂きました。深く感謝致します。更に、生命環境科学研究科生物機能科学専攻、山田小須弥博士並びに同研究科生命産業科学専攻、長谷川剛博士には、本研究の遂行及び本論文作成にあたり、終始適切な御指示を頂きました。ここに深く感謝致します。北海道大学農学部、水谷純也名誉教授、慶応義塾大学理工学部、山村庄亮名誉教授並びに同大学法学部、小瀬村誠治教授には、終始御丁寧な御指導を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

Blaáuw, A. H. (1909) Die Perzeption des Lichtes. Rec. Trav. Bot. Neerl., 5, 209-372.

Blaauw, A. H. (1919) Licht und Wachstum. II. Z. f. Bot., 7, 465-532.

Boysen-Jensen, P. (1913) Über die Leitung des phototropischen Reizes in der *Avena*-koleoptile. Ber. d. Bot. Ges., 31, 559-566.

Boysen-Jensen, P. and Nielsen, N. (1926) Studien über die hormonalen Beziehungen zwischen Spitze und Basis der *Avena*-koleoptile. Planta 1, 321-331.

Briggs, W. R., Tocher, R. D. and Wilson, J. F. (1957) Phototropic auxin redistribution in corn coleoptiles. Science 126, 210-212.

Briggs, W. R. (1963) Mediation of phototropic responses of corn coleoptiles by lateral transport of auxin. Plant Physiol., 38, 237-247.

Bruinsma, J., Karssen, C. M., Benschop, M. and Dort, J. B. van (1975) Hormonal regulation of phototropism in the light-

grown sunflower seedlings, *Helianthus annuus* L.: immobility of endogenous indole-3-acetic acid and inhibition of hypocotyl growth by illuminated cotyledons. J. Exp. Bot., 26, 411-418.

Bruinsma, J. and Hasegawa, K. (1989) Phototropism involves a lateral gradient of growth inhibitors, not of auxin. A review. Environ. Exp. Bot., 29, 25-36.

Bruinsma, J. and Hasegawa, K. (1990) A new theory of phototropism - its regulation by a light-induced gradient of auxin-inhibiting substances. Physiol. Plant., 79, 700-704.

Cholodny, N. (1927) Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. Biol. Zentralbl., 47, 604-626.

Darwin, C. and Darwin, F. (1880) The power of movement in plants. J. Murray, London, UK.

Feyerabend, M. and Weiler, E. W. (1988) Immunological estimation of growth regulator distribution in phototropically reacting sunflower seedlings. Physiol. Plant., 74, 185-193.

Firn, R. D. and Digby, J. (1980) The establishment of tropic

curvatures in plants. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 31, 131-148.

Franssen, J.M. Cooke, S.A., Digby, J. and Firn, R.D. (1981) Measurements of differential growth causing phototropic curvature of coleoptiles and hypocotyls. *Z.Pflanzenphysiol.*, 103, 207-216.

Franssen, J.M., Firn, R.D. and Digby, J. (1982) The role of apex in the phototropic curvature of *Avena* coleoptiles: positive curvature under conditions of continuous illumination. *Planta*, 155, 281-286.

Hase, T. and Hasegawa, K. (1982) Raphanusol A, a new growth inhibitor from Sakurajima radish seedlings. *Phytochemistry*, 21, 1021-1022.

Hasegawa, K. and Miyamoto, K. (1980) Raphanusol A: a new growth inhibitor of light-grown radish seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 21, 363-366.

Hasegawa, K. and Hase, T. (1981) Raphanusol B: a growth inhibitor of light-grown radish seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 22, 303-306.

Hasegawa, K., Shiihara, S., Iwagawa, T. and Hase, T. (1982)

and Yamamura, S. (1992) An auxin-inhibiting substance from light-grown maize shoots. *Phytochemistry*, 31, 3673-3676.

Hasegawa, T., Togo, S., Hisamatsu, Y., Yamada, K., Suenaga, K., Sekiguchi, M., Shigemori, H. and Hasegawa, K. (2006) Isolation and structure elucidation of a potent growth inhibitor, helian, from blue light-illuminated sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Phytochemistry* (in press).

Hasegawa, T., Yamada, K., Kosemura, S., Yamamura, S. and Hasegawa, K. (2000) Phototropic stimulation induces the conversion of glucosinolate to phototropism-regulating substances of radish hypocotyls. *Phytochemistry*, 54, 275-279.

Hasegawa, T., Yamada, K., Kosemura, S., Yamamura, S., Bruinsma, J., Miyamoto, K., Ueda, J. and Hasegawa, K. (2001) Isolation and identification of a light-induced growth inhibitor in diffusates from blue light-illuminated oat (*Avena sativa* L.) coleoptiles tips. *Plant Growth Regul.*, 33: 175-179.

Hasegawa, T., Yamada, K., Shigemori, H., Goto, N., Miyamoto, K., Ueda, J. and Hasegawa, K. (2004) Isolation and identification of blue light-induced growth inhibitor from light-grown

Arabidopsis shoots. Plant Growth Regul., 44, 81-86.

Hasegawa, T., Yamada, K., Shigemori, H., Miyamoto, K., Ueda, J. and Hasegawa, K. (2004) Isolation and identification of phototropism-regulating substances benzoxazinoids from maize coleoptiles. Heterocycles, 63, 2707-2712.

Hoshi-Sakoda, M., Usui, K., Ishizuka, K., Kosemura, S., Yamamura, S. and Hasegawa, K. (1994) Structure-activity relationships of benzoxazolinones with respect to auxin-induced growth and auxin-binding protein. Phytochemistry, 37, 297-300.

Jabeen, R., Yamada, K., Shigemori, H., Hasegawa, T., Hara, M., Kuboi, T. and Hasegawa, K. (2006) Induction of β -glucosidase activity in maize coleoptiles by blue light illumination. J. Plant Physiol., 163, 538-545.

Kato-Moguchi, H. and Hasegawa, K. (1992) The site of reception of phototropic stimulation and the occurrence of growth inhibitors in radish seedlings. J. Plant Physiol., 139, 755-757.

Kögl, F. and Haagen-Smit, A. J. (1931) Über die Chemie des Wuchsstoffs. Proc. Kon. Akad., Wetensch Amsterdam, 34, 1411-

1416.

Kosemura, S., Yamamura, S. and Hasegawa, K. (1993) Chemical studies on 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from roots of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) in connection with raphanusanins, phototropism-regulating substance of radish hypocotyls. *Tetrahedron Lett.*, 34 (3), 481-484.

Kosemura, S., Yamamura, S., Anai, T. and Hasegawa, K. (1994) Chemical studies on 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one in connection with 6-methoxy-2-benzoxazolinone, an auxin-inhibiting substance of *Zea mays* L. *Tetrahedron Lett.*, 35, 8221-8224.

Lam, Shue-Lock, Leopold, A.C. (1966) Role of leaves in phototropism. *Plant Physiol.*, 41, 847-851.

MacDonald, I.R. and Hart, J.W. (1987) New light on the Cholodny-Went theory. *Plant Physiol.*, 84, 568-570.

中村輝子、松井正直 (1989) 合成オーキシンβラクトンの生理活性. *植物の化学調節*, 24, 42-48.

Paál, A. (1914) Über phototropische Reizleitungen. *Ber. D. Bot. Ges.*, 32, 499-502.

Paál, A. (1919) Über phototropische Reizleitung. Jahrbuecher für Wissenschaftliche Botanik, 58, 406-458.

Pickard, B. G. (1985) Roles of hormones in phototropism. *In : Hormonal Regulation of Development III. Role of Environmental Factors* (Edited by R. P. Pharis and D. M. Reid), 10, pp365-417, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Pickard, B. G. and Thimann, K. V. (1964) Transport and distribution of auxin during tropic response. II. The lateral migration of auxin in phototropism of coleoptiles. *Plant Physiol.*, 39, 341-350.

Sakoda, M., Matsuoka, T., Sando, S. and Hasegawa, K. (1988) Phototropism in hypocotyls of radish. V. Lateral distribution of *cis*- and *trans*-raphanusanins and raphanusamide in various phototropisms induced by unilateral broad blue light. *J. Plant Physiol.*, 133, 110-112.

Sakoda, M. and Hasegawa, K. (1989) Phototropism in hypocotyls of radish. VI. No exchange of endogenous indole-3-acetic acid between peripheral and central cell layers during first and second positive phototropic curvatures. *Physiol. Plant.*, 76, 240-242.

Sakoda, M., Hase, T. and Hasegawa, K. (1990) A growth inhibitor, 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione from light-grown radish seedlings. *Phytochemistry*, 29, 1031-1032.

Sakoda, M., Hasegawa, K. and Ishizuka, K. (1991) The occurrence in plants of the growth inhibitors, the raphanusanins. *Phytochemistry*, 30, 57-61.

Sakoda, M., Hasegawa, K. and Ishizuka, K. (1992) Mode of action of natural growth inhibitors in radish hypocotyl elongation - influence of raphanusanin on auxin-mediated microtubule orientation. *Physiol. Plant.*, 84, 509-513.

Shibaoka, H. (1961) Studies on the mechanism of growth-inhibiting effect of light. *Plant Cell Physiol.*, 2, 175-197.

Tamimi, S.M. (2004) Uridine and the control of phototropism in oat (*Avena sativa* L.) coleoptiles. *Plant Growth Regul.*, 43, 173-177.

Togo, S. and Hasegawa, K. (1991) Phototropic stimulation does not induce unequal distribution of indole-3-acetic acid in maize coleoptiles. *Physiol. Plant.*, 81, 555-557.

Virtanen, A. I., Hietala, P. K. and Wahlroos, Ö. (1956) An antifungal factor in maize and wheat plants. Suomen Kemistrilehti B., 29, 143.

Virtanen, A. I., Hietala, P. K. and Wahlroos, Ö (1957) Antimicrobial substances in cereals and fodder plants. Arch. Biochem. Biophys., 69, 486-500.

Wahlroos, Ö. and Virtanen, A. I. (1959) The precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. Acta Chem. Scand., 13(9), 1906-1908.

Went, F. W. (1928) Wuchsstoff und Wachstum. Rec. Trav. Bot. Neerl., 15, 1-116.

Went, F. W. and Thimann, K. V. (1937) Phytohormones. MacMillan Co., New York, USA.

Yamada, K., Hasegawa, T., Minami, E., Shibuya, N., Kosemura, S., Yamamura, S. and Hasegawa, K. (2002) Induction of myrosinase gene expression and myrosinase activity in radish hypocotyls by phototropic stimulation. J. Plant Physiol., 160, 255-259.

Yamada, K., Nakano, H., Yokotani-Tomita, K., Bruinsma, J., Yamamura, S. and Hasegawa, K. (2000) Repetition of the classical Boysen-Jensen and Nielsen's experiment on phototropism of oat coleoptiles. *J. Plant Physiol.*, 167, 323-329.

Yamamura, S. and Hasegawa, K. (2001) Chemistry and biology of phototropism-regulating substances in higher plants. *The Chemical Record* 1, 362-372.

Yokotani-Tomita, K., Kato, J., Kosemura, S., Yamamura, S., Kushima, M., Kakuta, H. and Hasegawa, K. (1997) Light-induced, auxin-inhibiting substance from sunflower seedlings. *Phytochemistry*, 46, 503-506.

Yokotani-Tomita, K., Kato, J., Yamada, K., Kosemura, S., Yamamura, S., Bruinsma, J. and Hasegawa, K. (1999) 8-Epixonathatin, a light-induced growth inhibitor, mediates the phototropic curvature in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Physiol. Plant.*, 106, 326-330.