イネ、アサガオ、サツマイモの根のジベレリン様物質 および植物体での生成部位について*

村 上 浩**

Yutaka MURAKAMI**: Gibberellin-like Substances in Roots of *Oryza sativa*, *Pharbitis nil*, and *Ipomoea batatas*, and the Site of their Synthesis in the Plant.*

Received February 26, 1968

Abstract

Gibberellin-like substances in the root extracts of rice, Japanese morning glory and sweet potato, and in the root exudate of sweet potato were examined by means of paper chromatography and the rice seedling test.

The amounts of gibberellin-like substances in the root extracts of rice, Japanese morning glory and sweet potato were approximately 0.03, 0.5, and 0.25 μg of gibberellin A_3 (GA_3) equivalent per 100 g fresh weight, respectively.

The quantity of gibberellin-like substances obtained from the root exudate of sweet potato was approximately 0.024 μg GA_3 equivalent per 100 ml.

GA_3 was applied to one of the mature leaves of intact sweet potato. The accumulation of gibberellins in the apical bud and little movement into roots were observed.

Available evidence suggests that the root synthesizes gibberellin-like substances and they are translocated to the shoot.

根の主要な機能は、いうまでもなく、外部環境から水と塩類を吸収して、他の器官に供給することである。しかし、根はこのような生理作用のみでなく、地上部の器官の生長に影響を与えるホルモン様物質を供給していると、考えられている^{1,2)}。

ここ 15 年間に、生長発育を始めとして、ジベレリンによって調節されているいろいろの生理現象についての知見が、数多く集積された。さらに、ジベレリンが高等植物に広く存在していることも、次第に明らかになって来た。しかし、根にジベレリンが含まれていることについての直接的な証拠は、地上部の器官に比較して少ない³⁾。

著者は、イネ、アサガオ、サツマイモの根の含水

アセトン抽出物、および、サツマイモの根の出液水に含まれているジベレリンを、ペーパークロマトグラフィーとイネ 苗テストを用いて、調査を行なった。さらに、根に検出されたジベレリンの生成起原を考察するために、サツマイモの苗を用い、外から葉に与えたジベレリン A_3 の植物体内での移動についての実験を行なった。その結果、根においてもジベレリンが生成され、地上部の器官に送られていると、結論された。これらの結果について報告する。

材 料 と 方 法

I. 抽出に用いた根

1. イネ (*Oryza sativa* cv. Norin 29): 苗代に播種後、40 日経った苗を抜き取り、イネ用の水耕液⁴⁾で 1 ヶ月育てた。この苗 95 本から生体重 210g の根がえられた。

2. アサガオ (*Pharbitis nil* cv. Violet): 小豆

* この研究の要は、植物化学調節研究会 第 1 回大会 (東京, 4 月 10 日, 1966) で報告された。

** 農林省農業技術研究所 National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo, Japan.

大のパーミキュライトと腐植土を半分ずつよく混ぜた混合物に、種子を播いた。約 25° のガラス室で、そ菜用の水耕液⁴⁾を灌水して第2本葉期まで育てた。根を切り取り、よく洗った材料とした。100本の苗から生体重 113 g の根がえられた。

3. サツマイモ (*Ipomoea batatas* cv. Norin 1): 塊根の下半分を、井戸水を入れた褐色びんに立て、約 25° のガラス室におくと、細根が生ずる。この細根、470 g (生体重) を材料とした。

II. サツマイモの根の出液水

サツマイモを畑で育てた。9月の末に、地表面から約 10 cm の長さで、つるを切り捨てる。切り口から出液水がにじみ出るから、これを 500 ml のびんを横に寝かせてうける。びんの口は、アルミ箔で被う。2日間に、切り口当り、平均して 30 ml の出液

水をえた。びんは毎日取り替え、出液水は -10° で保存した。

III. 抽出分別法

1. 植物組織: 約 10 倍量の 70% アセトンと共に、ミキサーで摩砕し、1日攪拌する。三枚重ねたガーゼで絞り、残りはもう一度、70% アセトンで抽出する。両抽出物をろ紙でこした後、減圧で濃縮し、アセトンを除く。残留液を 10% の炭酸ソーダ液を加えて pH 8.0 とし、酢酸エチルで 2 回抽出する。水層にリン酸を滴下して pH 2.5 とし、クロロホルムで 3 回抽出。これをクロロホルム分画とする。次に、残りの水層を酢酸エチルで 5 回抽出し、酸性酢酸エチル分画とする。さらに、残りの水層を *n*-ブタノールで 3 回抽出し、*n*-ブタノール分画とする。*n*-ブタノール分画は少量のアモンニア水で中和し、他の分

EXTRACTION & SEPARATION OF GIBBERELLIN-LIKE SUBSTANCES

Fig. 1. Procedure for extraction and separation of gibberellin-like substances from roots.

画は、無水硫酸ソーダで脱水した後、それぞれ減圧で濃縮して抽出物とした。第1図に、この抽出分別法を図示した。

2. 出液水: 出液水, 250 ml, を減圧で 100 ml まで濃縮した。これに 10% 炭酸ソーダを加えて pH 8.0 とし、酢酸エチルで 2 回抽出した。残りの水層を、リン酸で pH 2.5 とした。この液を酢酸エチルで抽出して酢酸エチル分画とし、残りの水層を *n*-ブタノールで抽出して、*n*-ブタノール分画をえた。

IV. ペーパークロマトグラフィーとイネ苗テスト

各抽出物を東洋ろ紙 No. 50 (40×40 cm) に帯状に原点につけ、イソプロパノール: アンモニア (28 %): 水 (10: 1: 1) の混液を用い、約 30 cm, 上昇法で展開する。ろ紙を風乾した後、原点から 2 cm ずつの間隔で切り、50%アセトンで、各ろ紙片から下降法により展開物を小ビーカー中に溶出する。溶出物をヘアドライヤーで乾燥させた後に、一定量の 50%アセトン液を加えて溶出物を再び溶解させる。この一定量をイネ苗テスト用の管びんにとり、再び

乾燥させる。これに蒸留水 0.5 ml を加え、発芽した矮性イネ、短銀坊主、の粃 5 粒を植え、浸漬法によるイネ苗テスト⁵⁾を実施した。テストは、32°, 蛍光灯の連続照明下 (約 5,000 ルックス) の植物生育箱で行なった。5 日後の第 2 葉鞘の長さを測定し、結果はヒストグラムであらわした。同時におこなった既知濃度のジベレリン A₃ (GA₃) の伸長促進作用と比較してジベレリンの含量を算出した。

V. サツマイモの葉への GA₃ 処理

サツマイモの苗条を 20 cm の長さで切りとり、そ菜用の水耕液⁴⁾を満たした 500 ml の広口びんにさし、ガラス室におくと、根が発生してくる。よく根が出てから、完全に展開した上から 2 番目の葉の葉身を、1,000 ppm の濃度の GA₃ 水溶液 (GA₃ はカリ塩として水に溶かす) の入ったビーカーに浸した。ビーカーは架台で支え、蒸発を防ぐために、アルミ箔で口をおおった。第 2 図は GA₃ の処理を図解したものである。7 日経ってから、先端の芽の部分、根、水耕液について、ジベレリンを定量した。すなわち、芽 (0.5 g)、根 (3 g) は、それぞれ、70

Fig. 2. Schematic illustration of GA₃-treatment on the leaf of sweet potato.

%アセトン液, 100 ml, にて乳鉢中で摩砕し, ろ過した後のろ液を減圧で約 15 ml まで濃縮した. 水耕液は, そのまま減圧で濃縮した. この濃縮物を pH 7.0 とし, 沈澱は遠心機にかけて除いた. 有機溶媒による分別操作をしなかったこれらの濃縮物は, さらに減圧で濃縮し, ペーパークロマトグラフィーに附し, イネ苗テストを実施した.

結果と考察

I. イネの根

イネの根の抽出物よりえた各分画について, ペーパークロマトグラフィーをおこなった後, イネ苗テストを実施した結果, ジベレリン活性が認められたのは, 酸性酢酸エチル分画のみであった (第3図). ヒストグラム上の活性は, 原点から4番目の No. 4 の部分, Rf 値からみると, 0.2 附近である. 生体重 70 g に相当する抽出物のこの No. 4 の活性は, 既知濃度の GA_3 の伸長促進作用と比較すると, 約 $0.02 \mu g$ の GA_3 に相当する.

前報⁵⁾の第9図に報告してあるように, イネの葉の抽出物の場合も, 根と同じように, No. 4 附近に,

イネ苗テストでジベレリン活性が認められた. この展開液を用いると, GA_3 は Rf 0.65 附近に移動するから, No. 4 の活性は, GA_3 と異なる化合物によるものである. この No. 4 附近の活性物質をろ紙から溶出し, 再び, いろいろな展開液を用いて薄層クロマトグラフィーを行なうと, 活性の一部は, GA_3 と全く同じ Rf 値を示すようになることから, GA_3 の前駆物質ではないかと, 考えられる (未発表). 将来, 検討する必要がある.

著者が今まで調査した結果では, イネの葉のジベレリン含量は, 短銀坊主をテスト植物とすると, 生体重 100 g 当り, $0.1 \sim 0.2 \mu g GA_3$ 当量であった. この実験でイネの根は, 生体 100g 当り $0.03 \mu g GA_3$ 当量のジベレリンを含有していることになるから, 根のジベレリン含量は葉の約 $1/5$ である.

II. アサガオとサツマイモの根

アサガオの根の抽出物についての結果は, 第4図に, サツマイモの根の抽出物についての結果は, 第5図に示した. これらの図は, 酸性酢酸エチルおよびブタノール分画についての結果である. 他の分画, すなわち塩基性の酢酸エチル分画, 酸性のクロ

Fig. 3. Histogram showing gibberellin-like activity of the acidic ethyl acetate fraction from rice roots.

The concentration of each fraction was purified by ascending paper chromatography in the mixture of iso-propanol: ammonia (28%): water (10: 1: 1). The presence and amount of gibberellin-like substances in the eluates from the chromatograms were determined by using the rice seedling test (immersion method). A dwarf variety of rice (Tan-ginbozu) was used as test plants. GA_3 marker shows zone to which this gibberellin migrated in co-chromatography. F.W. refers to fresh weight of root material applied to the chromatogram. This legend also holds for Figures 4-7.

PHARBITIS NIL

Fig. 4. Histograms showing gibberellin-like activity of the acidic ethyl acetate and *n*-butanol fractions from roots of Japanese morning glory.

ロホルム分画では、阻害物が多く、弱いジベレリン活性が認められたに過ぎなかった。

アサガオの根の酸性酢酸エチル分画では、ジベレリン活性は、No. 3~4 (Rf 0.1~0.3) および、No. 7~10 (Rf 0.4~0.7) にみられた。前者の活性は、イネの抽出物の活性と同じ位置である。後者のうち、No. 7~8の活性は、GA₃のRf値に比較するとやや低いRf値である。高橋ら⁹⁾は、最近、アサガオの種子の酸性酢酸エチル分画から、GA₃、GA₅、GA₂₀ (アサガオジベレリン)の単離・同定を報告した。アンモニア性イソプロパノールを用いてペーパークロマトグラフィーをおこなうと、GA₅、GA₂₀は、GA₃とほとんど同じ位置に移動するから (未発表)、第4図のRf 0.6附近の弱い活性、No. 9~10は、これらの化合物によるものであろう。

n-ブタノール分画のジベレリン活性は、No. 2~8 (Rf 0.1~0.6) にわたって認められた。この分画に

は、著者⁷⁾が“水溶性ジベレリン”と名づけ、配糖体のような極性の強い化合物が含まれる。著者⁸⁾が、GA₃をキュウリの葉に与えて作ったGA₃グルコシドは、この溶媒系で展開すると、No. 5~6 (Rf 0.4附近) に検出される。*n*-ブタノール分画のRf 0.4附近の活性は、GA₃グルコシドによるものとおもう。最近、田村ら⁹⁾は、アサガオの種子抽出物の*n*-ブタノール分画から、GA₃グルコシドの単離を報告している。第4図のヒストグラムから分るように、いままでアサガオの種子から田村らによって単離されたものとは異なるRf値のジベレリンが、まだ根にも存在していることは間違いない。

これらのジベレリン量をGA₃当量として計算すると、酢酸エチル分画では、0.25 μg、*n*-ブタノール分画では0.2 μg程度である。第2本葉期のアサガオの地上部のジベレリン含量は、100 g 当り約3 μg GA₃当量であった (未発表)。根のジベレリン含量

IPOMOEA BATATAS

Fig. 5. Histograms showing gibberellin-like activity of the acidic ethyl acetate and *n*-butanol fractions from roots of sweet potato.

は、茎葉の約 $\frac{1}{6}$ である。

サツマイモの根の酸性酢酸エチル分画のヒストグラムでは、ジベレリン活性が No. 2~7 (R_f 0.1~0.5) に現れた。また、*n*-ブタノール分画では、No. 2~5 (R_f 0.1~0.5) に認められた。サツマイモの場合には、アサガオに比較して、阻害物が多く、テストに使用したイネ苗の生育が害された。特に *n*-ブタノール分画の No. 1, No. 9~10, No. 14~15 では、イネ苗が枯死してしまった。そのために、ジベレリン活性がはっきり現れなかった恐れがある。しかし、ヒストグラムでみたジベレリン活性の傾向は、アサガオの場合に似ている。

サツマイモの根のジベレリン含量は、 GA_3 当量として、酢酸エチル分画では、生体 95 g 当り約 0.2 μg 、*n*-ブタノール分画では、80 g 当り約 0.05 μg であった。サツマイモの苗条の先端部 5 cm のジベ

レリン含量は、生体重 100 g 当り約 5 $\mu g GA_3$ 当量であった（未発表）から、サツマイモの根のジベレリン含量は、イネやアサガオと同じように、苗条に比較して少ない。

Radley¹⁰⁾ は、エンドウの根のジベレリン含量について、矮性エンドウでテストし、生体 100 g 当り 0.02~0.09 $\mu g GA_3$ 当量と計算した。Butcher¹¹⁾ は、トマトの根の抽出物を矮性エンドウ、トウモロコシ d_1 , d_5 でテストし、生体 100 g 当り 0.015~0.2 $\mu g GA_3$ 当量と報告している。イネの根 100 g 当りのジベレリン含量は 0.03 $\mu g GA_3$ 当量であり、アサガオやサツマイモでは、0.3~0.5 $\mu g GA_3$ 当量であったから、アサガオやサツマイモは、イネの約 10 倍もジベレリン含量が高い。アサガオなどのヒルガオ科植物の種子は、他の植物に比較して、ジベレリンが多く含まれていることを、著者¹²⁾ はすで

に報告した。根についても同じことが言える。

III. サツマイモの根の出水水

サツマイモの根から2日間にえられた出水水, 250 ml (7びん) についてのジベレリン活性の結果は, 第6図に示した。酢酸エチル分画では, No. 3~5 (Rf 0.1~0.3), No. 7~8 (Rf 0.4), *n*-ブタノール分画では, No. 2 (Rf 0.1), No. 6 (Rf 0.4) に低い活性が認められた。ペーパークロマトグラム上のこれらの活性の位置は, 第5図の根の抽出物の活性の位置によく似ている。出水水 250 ml のジベレリン含量は, 酢酸エチル分画で 0.04 μg , *n*-ブタノール分画で 0.02 μg の GA_3 に相当する程度の量である。この量をサツマイモ1株当りで計算すると, 2日間に排出した 36 ml の出水水に, 約 0.009 μg GA_3 当量のジベレリンが含まれていたことになる。

今まで, 根の出水水中のジベレリン量を測定した幾つかの報告がある。Phillips & Jones¹³⁾ によると, ヒマワリの出水水, 500 ml のジベレリン量は, 矮性エンドウの切片テストで 0.5 μg GA_3 当量であ

る。Carr ら¹⁴⁾ によると, カサババピナス (*Lupinus albus*), エンドウ, ツリフネ (*Impatiens glandulifera*) の出水水 0.1 ml には, トウモロコシ d_1 の伸長促進から, 0.01 μg GA_3 当量以上のジベレリンが含まれていた。最近の Skene¹⁵⁾ のブドウの実験では, オオムギ胚乳テストを用いると, 品種 Black Corinth で, 出水水 1 l 当り 0.07 μg GA_3 当量, 品種 Thompson Seedless で 0.14~0.33 μg であった。しかし, 後者の品種について, トウモロコシ d_5 テストを用いると, 0.004 μg GA_3 当量と, 低かった。

これらの結果から判断すると, 用いた材料やバイオアッセイによって, 出水水中のジベレリン含量にかなりの差がみられる。しかし, 根の出水水にジベレリンが含まれており, これが地上部に送られていることは確かである。

IV. サツマイモの葉に与えた GA_3 の移動

根の抽出物や出水水に存在していたジベレリンの生成器官を類推するために, サツマイモの葉に GA_3

Fig. 6. Histograms showing gibberellin-like activity of the acidic ethyl acetate and *n*-butanol fractions from the root exudate of sweet potato.

Fig. 7. Histograms showing gibberellin-like activity of the 70% acetone extracts from apical buds, roots, and culture solution, after GA_3 was fed to one of the mature leaves of sweet potato.

を与えたのちに、茎の先端の芽、根、および水耕液に含まれるジベレリンの検出を行なった。すでに実験方法の項 (V) で記したように、用いた材料は少量であったから、有機溶媒による分別操作を省いた。

結果を第7図に一括した。芽では、生体重 0.5 g の一つの芽の組織に、約 1.5 μg GA_3 当量もジベレリンが検出できた。一方、根では、3 g のなかに、0.02 μg GA_3 当量以下であり、水耕液では検出されなかった。もち論、 GA_3 で処理しない苗の場合には、この程度の少量の芽や根を用いてイネ苗テス

ト (浸漬法) を実施したのでは、ジベレリン活性を検出できなかった (未発表)。すなわち、すでに成熟展開した葉に与えた GA_3 は地上部の芽の方に移動し、根にはあまり集まらない。

第7図の芽のヒストグラムをみると、ジベレリン活性のある場所、Rf 0~0.3, Rf 0.4~0.6, Rf 0.8附近は、Rf 0.6 附近を除いて、いずれも、 GA_3 のクロマトグラム上の位置と一致しない。葉に与えた GA_3 が、植物体中で他の化合物に変化したことを暗示している。すでに著者⁸⁾ は、サツマイモを含む幾つかの

植物について、葉の切片を GA_3 の水溶液に浮かしておくと、 GA_3 配糖体の生成することを報告した。Rf 値からみると、No. 4 にみられる高い活性は、そのような配糖体によるのであろう。 GA_3 の植物体内転流における配糖体化の役割は、今後、研究しなければならない問題である。

^{14}C のジベレリンを使用して、植物体中のジベレリンの移動を研究した報告が二三ある。Zweigら¹⁶⁾によると、ハナササゲ (*Phaseolus multiflorus*) の芽ばえの子葉の着いた節や葉に与えた ^{14}C のジベレリンは、茎の先端に集り、時間が経つにつれて、根にも移動した。トウモロコシでは、葉に与えた ^{14}C ジベレリンは根に移動しなかった。エンドウを用いた McComb¹⁷⁾ の実験では、成熟した葉に与えた ^{14}C ジベレリンの根への移動はほとんどみられず、若い葉に集った。これらの結果からも、地上部に与えたジベレリンは、あまり地下部に移動しないと考えられる。多くの実験から、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸のような生長調節物質を葉に与えた場合には、主として地上部に集り、根には移行しにくい、と一般に言われている¹⁸⁾。 GA_3 もこのような一般論に従うようである。

最近、Jones & Phillips¹⁹⁾ は、寒天片への拡散法によって、ヒマワリの根の先端からジベレリンを検出した。Sitton ら²⁰⁾ は、ヒマワリの根の出液水には、切断後4日間もジベレリン活性が認められること、および、根端の切片は、2- ^{14}C mevalonate を GA_3 の前駆物質である (−)-kauren-19-ol^{21,22)} に変えうることを確めた。これらの報告は、根、特にその先端は、ジベレリン生成の一つの場所であることを示している。

根系は、茎の生長因子 (Caulocaline) を生産し、道管を通して地上部の茎葉に送り出している、との仮説を Went¹⁾ が始めて明確な形で提案した。根に存在しているジベレリンが、その生理作用や今まで記述した証拠から、Went の言う生長因子の一つであると考えられよう。これに関連して、 GA_3 水溶液を水稻の穂揃期直後に茎葉に散布すると、葉の緑色の黄化がおくれ、葉の水分含量も多く、光合成能力の低下も少ない、などのいわゆる老化防止の作用がみられる、との山田ら^{23,24)} の観察は、興味を引くものである。水稻は、この時期頃から根の生理機能が著しく低下する²⁵⁾。根系の劣えたジベレリン生

産を外からので GA_3 補った結果、老化防止的な現象が葉に現れたと、解釈できるであろう。

摘 要

1. イネ苗テストによって、イネ、アサガオ、サツマイモの根の含水アセトン抽出物に、ジベレリンの存在が確認された。アサガオ、サツマイモの根は、イネの根の約 10 倍もジベレリンを含んでいた。根は、地上部の茎葉に比較して、生体重当りのジベレリン含量が少く、その $1/5 \sim 1/20$ 程度である。
2. サツマイモの根の出液水、100 ml 当り、0.024 $\mu g GA_3$ 当量のジベレリンが検出された。
3. サツマイモの苗を用いた GA_3 の植物体中での移動についての実験結果、および、 ^{14}C -ジベレリンを用いた他の研究者の結果から、根のジベレリンは、根で生成されたものと結論した。
4. 根は、茎葉の生長因子の一つであるジベレリンの供給源であることについて考察した。

文 献

- 1) Went, F. W., Plant Physiol, 18: 51 (1943).
- 2) Bonner, J., and Galston, A. W., Principles of Plant Physiology, p. 346 (W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1952).
- 3) Murakami, Y., Shokubutsu Seiri 4: 189 (1965).
- 4) Kasugai, S., Nippon Dojohiryogaku Zasshi 13: 669 (1939).
- 5) Murakami, Y., Bot. Mag. Tokyo 79: 315 (1966).
- 6) Takahashi, N., Murofushi, N., Yokota, T., and Tamura, S., Tetrahedron letters No. 12, 1065 (1967).
- 7) Murakami, Y., Bot. Mag. Tokyo 75: 451 (1962).
- 8) ———, ibid. 74: 424 (1961).
- 9) Tamura, S., Takahashi, N., Yokota, T., Murofushi, N., and Ogawa, Y., Planta 78: 208 (1968).
- 10) Radley, M., Nature 191: 684 (1961).
- 11) Butcher, D. N., J. Exptl. Botany 41: 272 (1963).
- 12) Murakami, Y., Bot. Mag. Tokyo 72: 438 (1959).
- 13) Phillips, I. D. J., and Jones, R. L., Planta 63: 269 (1964).

- 14) Carr, D. J., Reid, D. M., and Skene, K. G. M.,
ibid. **63**: 382 (1964).
- 15) Skene, K. G. M., ibid. **74**: 250 (1967).
- 16) Zweig, G., Yamaguchi, S., and Mason, G. W.,
Advances in Chemistry Series **28**: 122 (Amm. Chem. Soc., Washington, 1961).
- 17) McComb, A. J., Ann. Bot. N.S. **28**: 669 (1964).
- 18) Mitchell, J., and Linder, P. J., Residue
Reviews, Vol 2: 51 (Gunther, F. A. Ed., Springer Verlag, Berlin, 1963).
- 19) Jones, R. L., and Phillips, I. D. J., Plant
Physiol. **41**: 1381 (1966).
- 20) Sitton, D., Richmond, A., and Vaadia, Y.,
Phytochem. **6**: 1101 (1967).
- 21) Dennis, D. T., and West, C. A., J. Biol.
Chem. **242**: 3293 (1967).
- 22) Verbiscar, A. J., Cragg, G., Geissmann,
T. A., and Phinney, B. O., Phytochem. **6**:
807 (1967).
- 23) Yamada, N., Personal communication.
- 24) Osada, A., Shokubutsu No Kagakuchou-
setsu **1**: 145 (1966).
- 25) Baba, I., and Takahashi, Y., Sakumotsu
Seiri Kouza, Vol 2: p. 269 (Togari, Y.,
Yamada, N. and Hayashi, T. Ed., Asakura
Shoten, Tokyo, 1960).