植物ホルモン「サイトカイニン」の 構造展開と分子標的

サイトカイニンとは

一般に、高等生物の細胞や組織は、培地の中に十分な栄養素が含まれていてもそれだけでは成長を永続的に持続することができない。動物細胞の場合には、培地の中に、栄養素に加えて増殖因子と呼ばれる複数の微量成分が細胞分裂に必要で、そのために増殖因子のソースとしてウシ胎仔の血清などを栄養培地に添加することが多い。植物の組織・細胞培養においては、その成長を維持するために、多くの場合、オーキシシンとサイトカイニンと総称される2種類の植物ホルモンが添加される。

オーキシシンはインドール酢酸に代表される植物ホルモンであるが、植物の組織培養における役割は、おおむね個々の細胞自体を伸長させ大きくさせることにある。一方、サイトカイニンは植物細胞の分裂を促進する植物ホ

ルモンであって、“植物の細胞分裂誘起物質”と呼ぶこともできる。

植物の組織片を培養しようとする時、組織片はいったん脱分化して無定形の細胞塊となって成長する。この細胞塊をカルスという。オーキシシンのみの存在では植物組織片は脱分化しない。カルスの脱分化状態を維持し、これを増殖させるためには、サイトカイニンとオーキシシンの存在が必要である。サイトカイニンのみの存在ではカルスは再分化し、元の植物体を再生することができる(図1)。すなわち、サイトカイニンは植物細胞の分裂と分化を決定的に制御するホルモンであり、概念的には動物におけるステロイドホルモンやレチノイドと同様に扱える、たいへん重要な生理活性物質なのである。

図1 ■ 植物ホルモン「サイトカイニン」の作用

⇒ は培地にオーキシシンを添加したことを示し、→ はサイトカイニンを添加したことを示す。

ココナッツミルク中のサイトカイニン

1. 歴史的背景

サイトカイニンとは、植物の組織培養技術の発展に伴ってその概念が確立してきたものである。多くの先達が植物の組織培養技術を開発しようとした当初には、動物細胞の培養技術におけるウシ胎仔血清に対応するような増殖因子のソースが探索されたに違いない。1939年にアデニンが葉組織の緑色素の維持に若干有効であることが見いだされたが、真の意味でサイトカイニン活性と呼べるものの発見は、1942年の Overbeek 氏によるココナッツミルクの植物組織培養における有効性の発見である⁽¹⁾。言うまでもなく、ココナッツミルクとはココヤシ種子の中にある、飲用にも供される甘い液体である。当然、ココナッツミルク中に存在するサイトカイニンの化学的実体の追求が行なわれた。1952年、Shantz と Steward はココナッツミルクの分離を行ない、サイトカイニン活性物質の結晶を得、1955年にはその構造を *N,N'*-ジフェニルウレア (DPU) と決定した (図2)⁽²⁾。しかし、DPU はサイトカイニン活性が弱い上に、分離操作中の混入物質ではないかとの疑問も多く、ココナッツミルク中の DPU の存否は今もって解決していない。

一方、同じく 1955年、Miller 氏は DNA のオートクレーブ分解物中から強力なサイトカイニン活性を有するアデニン誘導体を見だし、これをカイネチンと命名した (図2)。しかし、カイネチンは植物体に存在するものではなく、天然からのサイトカイニンとしては、(DPU を別として) 1963年、Letham がトウモロコシの未熟種子から同定した、やはりアデニン誘導体であるゼアチンが初めてである (図2)。1970年代に入ってココナッツミルク中にもゼアチンやそのリボシドの存在が確認されている。

しかし、ゼアチン (およびそのリボシド) にしても

DPU (もし本当にココナッツミルク中に存在するとして) にしても、そのココナッツミルク中の報告含量は、元のココナッツミルク自体のサイトカイニン活性全体のわずかに 1% 未満が説明できるに過ぎない。では、ココナッツミルクのサイトカイニン活性の主たる本体はどのような化合物であろうか。

2. 分離と構造決定

筆者らは、ココナッツ 250 個から得られる 67.45 l のココナッツミルクからサイトカイニンの分離を行なった。分離にはその指標となる生物検定系が必要である。サイトカイニン活性の検定には、タバコの髄カルスの成長促進活性試験が定量性・再現性に優れている。本検定系での、用いたココナッツミルクの至適濃度 (カルスの成長を最も良く促進する濃度) は 5% (v/v) である。ココナッツミルクをポリスチレン XAD-2 カラム、セファデックス LH-20 カラム、次いで逆相 ODS カラムによる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と順次分離を進め、最終的に主たるサイトカイニン活性物質として G_3A_2ZR と名づけた単一の化合物 160 mg が得られた。本分離では、DPU もゼアチンも確実な形で検出することはできなかった。

G_3A_2ZR の単離・精製に成功したのは 10 年ほど前のことであるが、当時はこれを構造決定することができなかった。近年の 2 次元 NMR を用いた構造解析法の進歩、高分解能 FAB (fast atom bombardment)-MS/MS スペクトルや光学活性カラム HPLC による糖分析法の進歩が G_3A_2ZR の構造決定を可能にした。小林久義、森崎尚子、多胡義孝らによって G_3A_2ZR の構造解析がなされ、その構造を、14-*O*-{3-*O*-[β -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-アラビノフラノシル]-4-*O*- α -L-アラビノフラノシル- β -D-ガラクトピラノシル}-トランス-ゼアチン-D-リボシドと決定した (図3)⁽³⁾。平面構造の提出には CH-COSY (correlated spectroscopy) や HMBC (hetero nuclear multiple bonds correlation) という 2 次元 NMR の手法と高分解能 FAB-MS/MS が、糖部分の α/β 配位の決定には HMBC が威力を発揮した。糖の同定は、その絶対

図2 ■カイネチン、ゼアチンと DPU の構造

図 3 ■ ココナッツミルク中の主たるサイトカイニン G_3A_2ZR の構造

配置も含めて G_3A_2ZR を加水分解後に既知の糖誘導体とし、これを標品とガスクロマトグラフィーや光学活性カラム HPLC で比較することによって確実な形で行なうことができた。

G_3A_2ZR のタバコの髄カルスを用いたサイトカイニン活性試験における至適濃度は $5 \mu M$ である。したがっ

て、その含量から、 G_3A_2ZR は元のココナッツミルクのサイトカイニン活性の少なくとも 20% 以上を単品で説明できることになり、 G_3A_2ZR はココナッツミルク中の主たるサイトカイニンであるといえる。

サイトカイニンの構造展開

G_3A_2ZR は構造的にはゼアチンの誘導体であり、筆者らの実験ではココナッツミルク中の DPU の存否問題について確実な解答を与えることはできなかった。しかし、DPU は弱いながらも確実にサイトカイニン活性をもつ。過去において、岡本、磯谷、首藤らは、ゼアチンを含むアデニン型のサイトカイニンと DPU との構造的関連（図 4）を念頭に、構造的にはウレア型に属する強力な合成サイトカイニンを多数開発した。なかでもピリジルウレア誘導体である 4PU 30 は優れた合成サイトカイニンであって、「フルメット」の商標で市販もされている。詳細は首藤の総説^(4,5)があるので割愛するが、特に薬学雑誌⁽⁴⁾には 4PU 30 処理によって大きくなったリンゴやブドウの美しいカラー写真も掲載されており、

図 4 ■ ウレア型サイトカイニンとアデニン型サイトカイニンの構造的関連性
() 内の+はサイトカイニン活性の強度を表す。

R ₁	R ₂	至適濃度 (M)	R ₁	R ₂	至適濃度 (M)
H	H	4.7×10^{-7}	NHCOCH ₃	H	1.9×10^{-7}
CH ₃	H	4.1×10^{-7}	CN	H	4.2×10^{-9}
Cl	H	4.0×10^{-9}	CH ₃	CH ₃	4.0×10^{-6}
Br	H	3.4×10^{-9}	Cl	CH ₃	3.8×10^{-9}
F	H	4.3×10^{-9}	Cl	Cl	$10^{-13} \sim 10^{-9}$
CF ₃	H	3.6×10^{-9}	Cl	OCH ₃	$10^{-9} \sim 10^{-8}$
NH ₂	H	4.4×10^{-6}	OCH ₃	OCH ₃	3.7×10^{-8}
OCH ₃	H	4.1×10^{-8}	Br	Br	$10^{-13} \sim 10^{-9}$
OH	H	4.0×10^{-7}	F	F	3.8×10^{-8}

図 5 ■ピリジルウレア誘導体の構造活性相関

ぜひ一度参照していただきたい。

図 5 には 4PU 系のサイトカイニンの構造活性相関を示した。要点のみ記すと、①ピリジル部の α 位に電子吸引基を導入した化合物に強力な活性が見いだせる。至適濃度が 10^{-13} M のオーダーという、驚異的に強い合成サイトカイニンも開発されている。② 4PU 骨格のサイトカイニン活性に及ぼす置換基効果は Hansch-Fujita 法による解析で定量的に示すことができる。置換基のパラメーターとして Hammett の σ_m 値 (置換基の電子吸引・供与性を定量的に示す指標) を用いると、相関係数 $r=0.930$ という良好な相関関係が見いだされ、至適濃度 C (M) と σ_m 値との関係は、

$$-\log C = 4.62 (\pm 1.39) \sigma_m + 6.36 (\pm 0.42)$$

という式で表わすことができる。

ところで、強力なサイトカイニン活性を有する種々の 4PU 誘導体は、ウレア型とアデニン型のサイトカイニンの間に図 4 に示した構造的関連を直感したことによって開発されてきたものであった。この構造的関連は生物学的見地からも支持される。すなわち、①これまで調べられたすべての生物検定系において、ウレア型とアデニン型のサイトカイニンの間でその生物作用は区別できない、②それらの各々の型に属するサ

イトカイニンアンタゴニストは、互いにウレア型サイトカイニンによる活性もアデニン型サイトカイニンによる活性も同じように抑制する。このことは、ウレア型サイトカイニンもアデニン型サイトカイニンも同一のメカニズムによって、すなわち同一のレセプターに互いに競争的に結合することによって作用を発揮することを示唆している。

サイトカイニンの分子標的

サイトカイニンは植物細胞の分裂と分化を決定的に制御する。このことは、サイトカイニンが植物細胞の分裂と分化に関わる特異的遺伝子の発現を制御することを意味している。強力なサイトカイニンではその活性発現の至適濃度が 10^{-13} M のオーダーであり、この濃度は、サイトカイニンが基本的には 1 細胞あたりに 1 分子で作用を発揮し得ることを示している。

サイトカイニンはその分子量が高々 300 にも満たない、それ自身のもつ情報量は決して多くはない小分子である。そのサイトカイニンが、わずかに 1 分子で、膨大な情報をもちながら一見均一の繰り返し構造をもつ超巨大分子である遺伝子 DNA の中の、ある特定の遺伝子を認識してその発現を制御するのである。そのための分子機構としては、サイトカイニンのもつ情報を散逸することなく、かつ、それを増幅して特異的遺伝子の認識に結びつける受容体を想定せざるを得ない (図 6)。

図 6 ■想定できるサイトカイニンの分子作用機構
CSBP: サイトカイニン特異的結合タンパク質

筆者らは 10 年ほど前に、サイトカイニンの分子標的として、それ自身がサイトカイニン依存的な特異的転写調節因子として機能する受容体の存在を論理的に予想した⁽⁶⁾。想定される受容体が満足すべき規範として次の 3 点が設定できる。すなわち、①サイトカイニンの作用濃度から見て、1 植物細胞あたりに数千分子程度の含量で存在する、②前項で述べたように、ウレア型サイトカイニンにもアデニン型サイトカイニンにも、さらにはそれらの型に属するサイトカイニンアンタゴニストにも共通して互いに競合的に結合する、③その結合定数が活性発現の至適濃度に見合う、この 3 点である。

これまでに幾つかのサイトカイニン結合タンパク質が報告されているが、それらはいずれもここで述べたサイトカイニン受容体としての規範を満足するものではない。最近永田らは、モヤシ（黄化ヤエナリ芽生え）の中に上記のサイトカイニン受容体としての規範を満足するサイトカイニン特異的結合タンパク質 CSBP の存在を明らかにした⁽⁷⁾。同一もしくは類似の CSBP はタバコ髓カルスやホウレンソウ葉、ジャガイモ芽、黄化ダイコン胚軸などにも確認されている。

CSBP は、強力なウレア型サイトカイニンである 4 PU 30 の ³H ラベル体を用いることによって初めて確認できた。CSBP は 4 PU 30 に対して結合定数 $K_d = 4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ という強い結合活性を有し、ゼアチンをはじめとするアデニン型サイトカイニンや DPU などのウレア型サイトカイニン、それらのアンタゴニストと互いに競合的に、それらの活性発現濃度に見合った強度で結合する。

モヤシ中の組織レベルでの CSBP の分布をみると、CSBP は細胞の分裂・分化が盛んであると思われる部位、すなわち葉から上胚軸および根部分に含量が高く、その含量は平均して 1 細胞当たり約 3,000 分子である。CSBP の分子量は測定方法によって異なるが、少なくとも 20,000 を下ることはなく、おそらく 40,000~60,000 程度であろう。細胞レベルでの分布をみると、モヤシでは細胞質、核分画ともほぼ同量に検出されるが、細胞分画法によって結果が異なり、実験手技的な問題があるかも知れない。タバコ髓カルスより調製したプロトプラストでは、CSBP 活性は 98% 以上が核分画に存在し、CSBP は本来核内タンパク質もしくは核内移行性タンパク質ではないかと考えている。

CSBP はそのサイトカイニンに対する結合選択性、組織ならびに細胞レベルでの分布など、すべての点においてサイトカイニン受容体として機能することを期待させるタンパク質であり、図 6 のスキームを念頭においての研究を展開している。

*

半世紀ほど前に、植物組織培養技術の開発研究の過程で重要性が指摘されたココナツミルク中のサイトカイニンについて、ようやくその化学的実体の追求が実を結んだと考えている。並行して 30 年ほど前から岡本、磯谷、首藤らによって開始されたサイトカイニンの構造展開研究も、4 PU 30 の開発、その農園芸技術への応用といった形で実を結んだ。さらに 4 PU 30 の開発は、サイトカイニンの作用機構に対して分子レベルでメスを入れるプローブを提供したことになり、CSBP の発見という形で開花したと思っている。CSBP のクローニングを通じて、サイトカイニン研究が植物生理の最重要課題である植物細胞の分裂と分化の制御機構解明に寄与することを期待している。

- 1) J. van Overbeek, M. E. Conklin & A. Blakeslee : *Am. J. Bot.*, 29, 472 (1942).
- 2) E. M. Shantz & F. C. Steward : *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 6133 (1952), 77, 6351 (1955).
- 3) 小林久芳, 森崎尚子, 多胡義孝ら : 投稿中.
- 4) 首藤紘一 : 薬学雑誌, 114, 577 (1994).
- 5) K. Shudo : "Cytokinins : Chemistry, Activity, and Function", ed. by D. W. S. Mok and M. C. Mok, CRC Press, Boca Raton, 1994, p. 35.
- 6) 岡本敏彦, 首藤紘一, 橋本祐一 : "サイトカイニンの化学, 生物活性およびその応用", 文部省昭和 58 年度科学研究費補助金 (総合研究 A) 研究成果報告書 (課題番号 56390005), 1984, p. 68.
- 7) R. Nagata, E. Kawachi, Y. Hashimoto & K. Shudo : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 543 (1993).

(橋本祐一^{*1}, 永田龍二^{*1}, 首藤紘一^{*2}, ^{*1}東京大学分子細胞生物学研究所, ^{*2}東京大学薬学部)