サイトカニン活性物質の構造-活性相関に関する研究†

(1990 年度農芸化学奨励賞受賞)

西 川 司 朗

(三重大学生物資源学部)

植物の発芽, 分化, 生長, 開花, 結実などの生理現象は, 光や水, 温度などの物理的因子の他に, 植物ホルモンと呼ばれる内因性の因子によって支配されている。これまでにオーキシン, ジベレリン, エチレン, サイトカニン, アブシジン酸が5つの普遍的な植物ホルモンとして知られている。一方, 内因性の植物ホルモンだけでなく, 植物生長調整物質と呼ばれる一群の外因性の物質を与えることによって, これらの生理現象に顕著な効果を及ぼすことができる。人間の生産活動に伴う緑地や耕地の減少, 急激な人口増加による食糧不足が心配されている現在, 人間にとって有用な植物を自然環境下での生育に任せるのではなく, これらの化合物を用いて人為的にその生育を制御し, われわれの幸福のために役立てることが何よりも必要である。

普遍的な植物ホルモンのなかで, サイトカニンは植物の分裂組織や脱分化細胞の細胞分裂を促進するだけでなく, 側芽の伸長, クロロフィルの保持, 赤色色素の形成, 発芽促進などさまざまな生理現象を引き起こす。

近年, 生理活性発現機構と関連して植物ホルモンを始めとするさまざまな生理活性物質の生体内受容体による認識機構の解明が重要視されている。サイトカニンを含めた植物ホルモンの作用は, その生体内受容体との分子間相互作用が引き金となり, いくつかのシグナル拡大機構を経て生理活性が発現すると考えられている。現在でも, サイトカニンの受容体が何であるかは明らかでない。しかし, 基質の構造を変化させたときに現われる特異的な活性を手掛かりに, それらの分子レベルでの相互作用様式を組み立てることができないものだろうか。相互作用様式から逆に受容体に関する重要な情報を引き

出すことができるものと考えられる。そこで, サイトカニンの相互作用様式を明らかにすることを目的とし, 種々のサイトカニン活性物質の包括的な構造-活性相関の解析を行った。さらに, 解析によって得られた活性誘導体に求められる必須構造に関する仮定に基づいて, 演繹的に新サイトカニンを分子設計した。以下に著者の研究を中心に, 新サイトカニンの分子設計による開発に至るまでの道筋について述べる。

1. N^6 -置換アデニン類の構造-活性相関

カイネチンによるタバコカルス細胞増殖促進作用の発見を契機に, 数多くのカイネチン類縁体の構造-活性相関の研究が行われた。しかし, 定量的な解析が行われなかったために活性に及ぼす構造要因を解析することは難しかった。

現在, 医薬薬を始めとする生理活性物質の定量的構造-活性相関の解析には Hansch-Fujita 法⁽¹⁾が広く用いられている。まず, いくつかの N^6 -置換アデニン類についてタバコカルス試験 (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin No. 38) でのサイトカニン活性をこの方法で初めて定量的に解析し, 立体因子が活性に及ぼす主な因子であることを見出した。また, 尿素誘導体についても解析し, 両者に共通のレセプターマップを描いた⁽²⁾。これらの解析をより確実にし, また異なる生物検定法で求めたサイトカニン活性強度間の相関を調べるために, より多くのさまざまな末端置換基を持つアルキルアデニン誘導体 1 と置換ベンジルアデニン誘導体 2 を用いて定量的な解析を行った。そのために, タバコカルス試験での活性の他にヒモゲイトウ (*Amaranthus caudatus* L.) のベタシアニン色素形成促進活性 (ヒモゲイトウ試験) とレタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes 366) 種子の暗発芽促進活性 (レタス試験) を求めた。これらの生物検定法のなかではヒモゲイトウ試験法が最もバラ

† Structure-Activity Studies on Cytokinin-active Substances.

Shiro NISHIKAWA (Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514)

図 1 定量的構造-活性相関の解析
に用いた N^6 -置換アデニン

ツキが小さく、信頼できる方法であった。一方、物理化学的パラメータには実測した 1-オクタノール/水中の分配係数 $\log P$, Taft の σ^* 値, 6 位の窒素原子とそれに結合する炭素原子の結合軸方向への置換基の最大長 L と最大幅 B_s を用いた。

アルキル誘導体については末端置換基系列ごとに活性の差が認められたので、性質がよく似た末端置換基を持つ化合物ごとに分けて解析した。n-アルキル, イソアルキル, アルコキシアルキル置換誘導体をまとめて解析したとき, 式 (1)~(3) が得られた。いずれの活性も置換基の長さ L と最もよく相関し, $\log P$ や σ^* との相関は見られなかった。 L と B_s との間には高い相関が認め

$$pC(\text{カルス}) = -8.00 + 2.54L - 0.18L^2 \quad (1)$$

$$n=17 \quad r=0.93 \quad s=0.45$$

$$pC(\text{ヒモゲイトウ}) = -6.75 + 1.94L - 0.14L^2 \quad (2)$$

$$n=17 \quad r=0.90 \quad s=0.40$$

$$pC(\text{レタス}) = -6.31 + 1.77L - 0.13L^2 \quad (3)$$

$$n=17 \quad r=0.77 \quad s=0.59$$

られた。一方、置換ベンジル誘導体については *o*-, *m*-, *p*-置換体に分けて解析した。どの異性体の活性も, B_s と最もよく相関した。アルキル誘導体, 置換ベンジル誘導体とも L あるいは B_s との相関が最も良かったことから, N^6 -置換アデニン類のサイトカニン活性には置換基の立体的な形状が最も重要な因子であることが事実になった。一方、異なった 3 種の生物検定で求めた活性値は互いに正に直線的に相関した。先のアルキル誘導体については式 (4), (5) が得られた。定量的構造-活性相関に用いた物理化学的パラメータを加えて解析しても有

意性は認められなかった。これらの結果から、異なった植物の組織や器官中の受容体であっても、サイトカニン $pC(\text{カルス}) = 1.10 + 1.29 pC(\text{ヒモゲイトウ}) \quad (4)$

$$n=17 \quad r=0.96 \quad s=0.32$$

$$pC(\text{レタス}) = -0.27 + 0.90 pC(\text{ヒモゲイトウ}) \quad (5)$$

$$n=17 \quad r=0.88 \quad s=0.43$$

ンの認識機構は良く似ていることが考えられた。また、日数をそれほど要さない、信頼性のあるヒモゲイトウ試験法で活性を求めれば、これらの相関式を用いて他の生物検定での活性値を見積もることができるので、式 (4), (5) は実用的にも迅速なサイトカニンの開発に役立つと思われる。

この研究のなかで、 ω -フェニルアルキル誘導体はメチレン鎖の伸長に伴って、メチレン炭素数の奇数と偶数のときとで活性強度がジグザグに変化する、興味ある“活性の交互性”を示すことを見出した⁽³⁾。原因は明らかではないが、 ω -フェニルアルキル誘導体に特異な現象である。

2. ビリドピリミジン類の構造-活性相関

天然のサイトカニンはすべてアデニン誘導体である。合成サイトカニンとしての N^6 -置換アデニン類の構造-活性相関の研究が一段落した後で、複素環に対する関心からアザおよびデアザプリン誘導体の研究が始まった。また、これと平行してプリンと類似の骨格を持つ、アザナフタレンのような含窒素複素芳香環化合物の活性誘導体の探索も行われた⁽⁴⁾。これらの化合物は天然型サイトカニンに類似していることから、サイトカニン活性とともに、抗サイトカニン活性も期待された。事実、7-デアザプリン誘導体と同様に、ビリド [2, 3-d] ピリミジン誘導体は抗サイトカニン活性を示すことが見出されている^(5,6)。しかしながら、ビリドピリミジンを含むアザナフタレンのサイトカニン活性は、アザプリンやデアザプリンに比べて、系統的に調べられていない。

プリン環のイミダゾール部分を 6 員環に環拡張し、窒素原子を 1 個除くと、形式的にビリドピリミジン 3~6 が、また 2 個除くとキナゾリン誘導体 7 (図 2) が得られる。これらの一連の化合物の活性を比較することにより、アザプリンやデアザプリンの場合のように活性に及ぼす複素環上の窒素原子の役割についての知見が得られると考えた。そこで、化合物 3~7 を合成し、複素環上

図2 サイトカイン類縁体としてのピリドピリミジンとキナゾリン誘導体

の窒素原子の位置および置換基 R, R' と活性との関係を検討した。

研究を迅速に進めるために、まず N^6 -置換アデニン類で強い活性を示したベンジル基あるいはイソamil基を R に、また水素原子あるいはメチル基を R' に持つ化合物 3~7 をすべて合成した。ヒモゲイトウ試験での結果、ピリド [3,4-d] ピリミジン 5 のみが活性であり、40~100 μM で弱い活性を示した⁽⁷⁾。他の異性体 3, 4, 6 やキナゾリン誘導体 7 は不活性であった^(8,9)。このことから、複素環上の特定の位置に窒素原子が存在することが活性発現に重要であることが明らかになった。ピリド [3,4-d] ピリミジン 5 はコバゾリンとしてすでに知られているが、本研究によってそれらのサイトカイン活性を初めて見出した。化合物 5 の活性ではイソamil誘導体のほうがベンジルアミノ誘導体よりも強い活性を示した。この活性の順序は N^6 -置換アデニン類の場合と明らかに異なる。また、2 位にメチル基を導入すると活性は強くなった。そこで、2-メチル置換体 5 の 4 位にさまざまな置換基を持つ誘導体に系統的に合成し、置換基の効果を詳しく調べ、 N^6 -置換アデニン類のそれと比較した。

同様に、ヒモゲイトウ試験で活性を求めたところ、 N^6 -置換アデニン類とは対照的に、置換ベンジル誘導体は全く活性がなかった。また、平面性の置換基を持つアルキル誘導体を除き、他のアルキル誘導体は弱いか、または不活性であった。これに対し、置換フェニル誘導体は比較的強い活性を示した。合成した化合物のなかで最も強かった *m*-フルオロ置換体はカイネチンと N^6 -ベン

ジルアデニンの中間に位置するくらいの強い活性を示した。また、 ω -フェニルアルキル誘導体活性の交互性を示したが、 N^6 -置換アデニン類とは逆に、メチレン炭素数が偶数のときのほうが奇数のときよりも活性が強くなった⁽³⁾。これらの事実から、ピリド [3,4-d] ピリミジン類は N^6 -置換アデニン類とは異なる置換基効果を持つ、新しい非プリン型サイトカインであることが明らかになった。

3. 6-炭素置換プリン類の構造-活性相関

プリン誘導体であれ、プリン類似骨格を持つ誘導体であれ、これまでに研究されたサイトカイン活性物質の大部分は 6 位置換基の α 位に窒素原子を持つ置換アミノ誘導体である。これに比べて α 位に炭素原子を持つ 6-炭素置換プリン誘導体のサイトカイン活性についての研究はほとんどない⁽¹⁰⁾。これは 1 つには一般的な 6-炭素置換プリン誘導体の合成法^(11,12)が確立されていないことによる。6-炭素置換プリン類は α 位が n 電子を持たない炭素原子で置換されているので、6-位窒素原子の機能を明らかにするうえで重要な化合物と考えられる。

また、6-炭素置換プリン類はコンホーメーションの研究にも重要である。サイトカインは生体内受容体と相互作用し、それが活性発現の引き金反応となると考えられているので、分子の三次元的なかたち、すなわちコンホーメーションも活性に重要である。 N^6 -置換アデニン類のコンホーメーション-活性相関についての研究は主に X 線結晶構造解析^(13~15)や分子軌道計算⁽¹⁶⁾を用いて行われてきたが、これらの研究では N^6 -イソペンテニルア

デニン、カイネチン、 N^6 -ベンジルアデニン、6-フェネチルプリンなど、分子のコンホーメーションが flexible である化合物が用いられているため、結晶状態や孤立した分子の安定なコンホーメーションが活性型、すなわち受容体と相互作用するときのコンホーメーションであるかについては疑問が残る。このような間接的な方法でなく、より直接的に活性と対応させる方法が必要である。そこで、コンホーメーションが制限された rigid なコンホーマーモデルとしての 6-炭素置換プリンの活性と flexible な化合物の活性との比較から、活性型コンホーメーションを特定する方法を思いついた。炭素原子は炭素-炭素単結合だけでなく二重結合や三重結合を形成することができる。これらの多重結合を含む置換基を持つプリン誘導体のコンホーメーションは、結合軸のまわりの回転阻害のためにかなり制限される。二重結合の場合には多置換の二重結合にすることにより、隣接しあう置換基あるいは構造部分との間の立体的反発や電子的反発を利用して、さらにコンホーメーションを制限することができる。このように 6-炭素置換プリン誘導体の場合にはコンホーメーションの自由度が異なる種々の誘導体を合成できるという利点がある。

一連の 6-炭素置換プリン類合成の重要な鍵化合物は 6-アルキニルプリン誘導体 **9** である。化合物 **9** をパラジウム-銅触媒⁽¹⁷⁾を用いる 6-ハロプリン **8** と末端アセチレンとのカップリング反応により簡便に合成した⁽¹⁸⁾ (スキーム 1)。また、6-ハロプリン **8** の 9 位をアセチル化す

る方法により収率をかなり向上させた⁽¹⁹⁾。6-ビニルプリンの合成法^(20,21)はいくつか知られているが、いずれも二置換ビニルプリン誘導体の合成にしか使えず、本研究で必要な三置換ビニルプリン誘導体 **10**, **11** を合成できない。そこで、化合物 **9** にハロゲン化水素などを付加させ、 β 位が置換された (Z)-**10** および (E)-6-ビニルプリン **11** を得た^(22,23)。置換基の種類によっては **10** のみしか得られないが、そのような場合には光異性化反応で **11** に導いた。6-*trans*-スチリルプリン **10** (X=H) は日中室内でも容易にその幾何異性体に光異性化するので、この方法で *cis*-体を合成した⁽²⁴⁾。Flexible なコンホーマーモデルである 6-アルキルプリン誘導体 **12** も化合物 **9** の接触還元により容易に得られた。このようにして一般的な 6-炭素置換プリン誘導体の合成法を確立した。

ヒモゲイトウ試験におけるこれらの 6-炭素置換プリン誘導体のサイトカニン活性は (Z)-体 **10** > アルキル体 **12** > (E)-体 **11** > アルキニル体 **9** の順に低下し、(Z)-体 **10** は相当する置換基を持つ N^6 -置換アデニンとはほぼ同じくらいの強い活性を示した。化合物 **10**, **11** にはともに α 位二重結合とかさ高い β 位置換基が存在する。化合物 **10** では β 位置換基と 7 位窒素原子との立体的および電子的反発のために、また化合物 **11** では立体的反発のためにコンホーメーションが制限されるので、これらはそれぞれ *anti-transoid* 型および *anti-cisoid* 型のコンホーマーモデルと考えられる (図 3)。化合物 **10** が相当する置換基を持つ N^6 -置換アデニンとはほぼ同じくらい

スキーム 1 6-炭素置換プリン誘導体の合成

図3 N^6 -置換アデニンのコンホメーション

の活性を示したので、anti-transoid 型を活性型コンホメーションと推定した。また、11 が中程度の活性であったことから、cisoid 型もかなり活性に寄与していることが初めて明らかになった⁽²⁴⁾。これらの他に、 α 位二重結合による置換基配向効果が活性発現に重要であることを見出した⁽²⁵⁾。活性に及ぼす6位の窒素原子の役割として、従来水素結合が考えられているが、置換基配向効果による可能性もあると思われる。

4. 分子設計

生理活性物質の構造-活性相関の研究を行う目的は大きく分けて2つある。1つには活性発現に必要な最小限の構造を迫るためであり、もう1つにはそれをもとにより強力あるいは望ましい活性を持つ新化合物を創造するためである。サイトカイニンについて言えば、これまでに数多くの研究が行われてきたが、活性発現に必要な最小限の構造あるいはそれに近い分子構造が確認されたとは言い難い。従来の研究がアデニンやその類縁体および N -アルキル、 N -アシル誘導体中心であったことにもよるのであろう。活性発現に必要な最小限の構造を抽出するためには、架橋原子や置換基の異なるプリン型サイトカイニンだけでなく、非プリン型の化合物⁽²⁶⁾についても構造と活性との相関に関する知識を増す必要がある。

このような観点に立ち、これまでに行ってきたプリン型および非プリン型サイトカイニンの構造-活性相関で得られた結果をもとに、新しい非プリン型サイトカイニ

ンを分子設計することにした。

まず、サイトカイニンの構造を側鎖置換基、架橋原子、複素芳香環に大きく3つに分け、これまでに行った構造-活性相関の結果を解析し、それぞれについてサイトカイニン活性の発現に必要な3種の基本的な構造要件を抽出した。

- i) 疎水性で平面性の置換基であること。
- ii) 置換基を特定の方向に配向させる架橋原子であること。
- iii) 特定の位置に電子密度の高い窒素原子を持つ複素芳香環であること。

これらの要件が満たされたときに強い活性が現われるものと期待される。ここで、*trans*-スチリル基は要件 i), ii) を満たし、最適な置換基の1つと考えられる。したがって、*trans*-スチリル基で置換された、要件 iii) を満たす複素芳香族誘導体が新サイトカイニンの候補となりうる。著者は分子設計に際し、炭素置換複素芳香族誘導体に着目した。

N^6 -ベンジルアデニンのベンジルアミノ基を *trans*-スチリル基に置き換えると 6-*trans*-スチリルプリン 10 ($X=H$) となるが、両者の活性はほとんど変わらない。さらに、後者のイミダゾール部分をスキーム2のように切断すると、2位、5位あるいは6位が置換されたさまざまな 4-*trans*-スチリルピリミジン誘導体が得られる。新サイトカイニン分子設計の第一段階として、4-スチリルピリミジンをリード化合物に選び、これらの置換基を種々変化させ、構造の最適化を計った。これまでに4-置換アミノピリミジン誘導体のサイトカイニン活性がタバコカルス試験で調べられているが⁽²⁷⁾、強い活性を持つ誘導体は得られていない。

6-炭素置換プリンの場合とほぼ同様のルートにより、2-置換-4-スチリルピリミジン誘導体を市販の 2,4-ジクロロピリミジン 13 より3段階で簡便に合成することができた(スキーム3)。ここでのポイントは位置選択的なカップリング反応による 14 の合成であった。カップリング反応では専ら目的とする4-アルキニル体 14 が生成した。化合物 14 のアミノ化で得られた 15 は、酸性条件下や塩基性条件下でハロゲン化水素、メルカプタン、アルコールと反応し、 β -置換 4-スチリルピリミジン誘導体 16, 17 を与えた。

ヒモゲイトウ試験でこれらのサイトカイニンの活性を求めた(表1)⁽²⁸⁾。電子供与性の2位置換基は活性を増

スキーム 2 新サイトカイニンの分子設計

スキーム 3 4-スチリルピリミジン誘導体の合成

大させたが、塩素原子のような電子吸引性の置換基は完全に活性を消失させた。立体的に小さなアミノ基が2位置換基として最も適していた。β位に置換基が存在すると、置換基の電子供与性、吸引性にかかわらず、活性が著しく増大した。β位置換基にはある程度のかさ高さが必要であり、エトキシ基のときに最も強く、*N*⁶-ベンジルアデニンの約5倍に相当する強力な活性が現われた。また、代表的4-スチリルピリミジン誘導体についてタバコカルス試験を行ったが、ヒモゲイトウ試験とタバコカルス試験における両者の活性の相関から予想されるように、それらはいずれも活性を示した⁽²⁸⁾。

おわりに

プリン型および非プリン型サイトカイニンの構造-活性相関の解析から得られた、活性に必要な基本構造に関する仮定に基づいて新サイトカイニンを分子設計し、構造的により簡単で強力な活性を持つピリミジン誘導体を見出すことができた。今後、等電子的および等立体的構

表 1 4-スチリルピリミジン誘導体の
サイトカイニン活性

4-スチリル R'	ピリミジン X	幾何構造	ヒモゲイトウ試験での活性 C _{0.1μM} BA, μM*
H	H	(E)	69
Cl	Cl	(Z)	Inactive
NH ₂	H	(E)	52
"	"	(Z)	52
NH ₂	Cl	(Z)	0.36
"	"	(E)	0.51
NH ₂	Br	(Z)	0.064
"	"	(E)	1.4
NH ₂	OMe	(Z)	0.19
"	"	(E)	1.3
NH ₂	OE _t	(Z)	0.020
"	"	(E)	0.035
NH ₂	SMe	(Z)	0.26
"	"	(E)	0.59

* 0.1 μM の *N*⁶-ベンジルアデニンと同じ色素量を与える各サンプル濃度。

造変換によりサイトカイニンの構造をどこまで簡略化できるかについては、相互作用様式とも関連し、興味を持たれる。筆者らが合成した化合物のなかには蛍光性と活性を併せ持つ誘導体はいくつかある。また、蛍光性でなくとも容易に同位体標識可能な誘導体がある。今後のサイトカイニンの生理活性発現機構の研究はどれ1つをとっても容易でないが、このときにこれらの機能性サイトカイニンの利用が大いに役立つものと思われる。

本研究の大部分は三重大学農学部農薬化学研究室（現在、生物資源学部生理活性化学研究室）において行われたものである。新しい研究テーマへの糸口を大学院講義で授けて下さり、また、終始ご指導頂いた熊澤善三郎三重大学名誉教授、柏村直樹教授、および小川幸持教授に厚くお礼申し上げます。また、研究の一部は京都大学農

学部農薬化学研究室において行われ、京都大学名誉教授中島稔先生、藤田稔夫教授および岩村倣助教授のご指導を賜った。これらの先生方に深く感謝いたします。さらに、本研究にご協力をいただいた三重大学農薬化学研究室の卒業生の皆様にお礼申し上げます。

- (1) C. Hansch and T. Fujita : *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1616 (1964).
- (2) H. Iwamura, T. Fujita, S. Koyama, K. Koshimizu and Z. Kumazawa : *Phytochemistry*, **19**, 1309 (1980).
- (3) S. Nishikawa, Z. Kumazawa, N. Kashimura, Y. Nishikimi and S. Uemura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2243 (1986).
- (4) Y. Torigoe, M. Akiyama, M. Hirobe and T. Okamoto : *Phytochemistry*, **11**, 1623 (1972).
- (5) Iwamura, S. Murakami, J. Koga, S. Matsubara and K. Koshimizu : *Phytochemistry*, **18**, 1265 (1979).
- (6) H. Iwamura, N. Masuda, K. Koshimizu and S. Matsubara : *Plant Sci. Lett.*, **20**, 15 (1980).
- (7) S. Nishikawa, Z. Kumazawa, N. Kashimura, S. Maki and Y. Nishikimi : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 495 (1986).
- (8) S. Nishikawa, Z. Kumazawa, N. Kashimura, S. Maki and Y. Nishikimi : *Bull. Fac. Agric. Mie Univ.*, **71**, 89 (1985).
- (9) S. Nishikawa, S. Maki, Z. Kumazawa and N. Kashimura : *Bull. Fac. Agric. Mie Univ.*, **71**, 89 (1985).
- (10) T. R. Henderson, C. R. Frihart, N. J. Leonard, R. Y. Schmitz and F. Skoog : *Phytochemistry*, **14**, 1687 (1975).
- (11) V. Nair and S. D. Chamverlin : *J. Org. Chem.*, **50**, 5069 (1985).
- (12) A. Matsuda and T. Ueda : *Nucleosides & Nucleotides*, **6**, 85 (1987).
- (13) M. Soriano-Garcia and R. Parthasarathy : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1062 (1975).
- (14) A. K. Chwang, M. Sundaralingam and N. J. Leonard : *Acta Cryst.*, **B 37**, 294 (1981).
- (15) Z. R. Korszun, C. Knight and C-M. Chen : *FEBS Lett.*, **243**, 53 (1989).
- (16) J. Kaneti and E. Karanov : *Chem. Biol. Interactions*, **43**, 73 (1983).
- (17) K. Sonogashira, T. Tohda and N. Hagi-hara : *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 4467.
- (18) S. Koyama, Z. Kumazawa and N. Kashimura : *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **11**, 41 (1981).
- (19) S. Nishikawa, H. Mizutani, Z. Kumazawa and N. Kashimura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2377 (1986).
- (20) A. Hampton : *J. Heterocyclic Chem.*, **11**, 255 (1974).
- (21) E. C. Taylor and S. F. Martin : *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 8095 (1974).
- (22) S. Koyama, H. Kondo, Z. Kumazawa, N. Kashimura and R. Nishida : *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **12**, 35 (1982).
- (23) S. Nishikawa, Z. Kumazawa, N. Kashimura, H. Mizutani and H. Kondo : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3353 (1985).
- (24) S. Koyama, Z. Kumazawa, N. Kashimura and R. Nishida : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1859 (1985).
- (25) S. Nishikawa, Z. Kumazawa, H. Mizutani and N. Kashimura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1089 (1986).
- (26) P. L. Cavender, C. M. Green and S. B. Mack : *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1076 (1988).
- (27) S. Takahashi, T. Yatsunami, K. Shudo, T. Okamoto, K. Yamada and Y. Isogai : *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2286 (1978).
- (28) S. Nishikawa, E. Hayashi, Z. Kumazawa and N. Kashimura : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3387 (1989).