含硫植物毒

—Malformin とアスパラガス酸 (Asparagusic Acid) について—

入 内 島 忍*

Malformin and Asparagusic Acids as Sulfur-containing
Compounds Having Biological Activities to Plants

Shinobu IRIUCHIJIMA*

Malformins are cyclic pentapeptides which were isolated from the culture filtrate of the fungi of *Aspergillus niger* group as compounds causing curvatures on corn roots and malformations on the stems and petioles of bean plants. Malformin A ($A_1 > A_2$), B ($B_1 + B_2$), and C are known. Malformin A is cyclo-D-cysteinyl-D-cysteinyl-L-valyl-D-leucyl-L-isoleucyl. Malformin has a variety of biological activities: it inhibits adventitious root formation, stimulates abscission, inhibits ethylene- and phytochrome-mediated responses, potentiates and inhibits the effects of 2-chloroethylphosphonic acid, and also stimulates the stem elongation of bean seedlings or cuttings. A palindrome peptide, *enantio*-[5-valine] malformin, which was synthesized chemically, has one-tenth of activities of the natural malformin. Desthiomalformin has no activity showing the importance of the disulfide group of malformin.

Asparagusic acids, 1,2-dithiolane-4-carboxylic acid and its derivatives, were isolated from *Asparagus* as compounds inhibiting lettuce seed germination and lettuce root and hypocotyl elongation. Asparagusic acid interacts with benzyladenine in radish cotyledon growth and lettuce seed germination and inhibits the activities of gibberellic acid and indoleacetic acid. Moreover asparagusic acid, which is structurally similar to lipoic acid, accelerates the biochemical oxidation of α -keto acids which is catalyzed by lipoic acid *in vivo*. The disulfide group and carboxylic acid are important in the activities of asparagusic acid.

著者に与えられたテーマの内容は、「含硫植物毒」である。「含硫植物毒」という言葉はいい得て妙だが、これはかなり特殊な化合物群を指すように見える。すなわち、「植物に対して阻害的な生理活性を有する、農薬以外の含硫化合物」という感じである。そこで、それらに当る化合物としては、著者らが Purdue 大学 Roy W. Curtis 教授のもとに留学中、たずさわっていた Malformin と東北大学北原喜男教授のところで行なわれたアスパラガス酸が考えられるので、この二つに焦点を当ててこれら含硫化合物の意味を考えてみたい。

1. Malformin について

1.1. Malformin の発見、単離、および生理活性

土壌より単離された *Aspergillus niger* 一菌株の培養液を豆の幼苗につけてやると、茎および葉柄に屈曲 (curvature) と奇形 (malformation) が起きることが見出された¹⁾。また、同じものをとうもろこしの種に処理すると、発芽したその幼苗の根に屈曲を引き起すこともわかった²⁾。これら奇妙な現象を引き起す原因物質は、その後、培養液から、活性炭処理、アセトン溶出、溶出液を濃縮したのち水層を有機溶媒抽出、次いでアルミナクロマトグラフィーを行なって単離された³⁾。そして、Malformation (mal=bad, badly) を引き起すものということで、Malformin と命名された (以下 MF と

* 相模中央化学研究所 ()

* Sagami Chemical Research Center ()

省略する)。このようにして得られた MF は、豆の幼苗に塗布してやると、0.1~10 mg/個体でグロテスクな奇形を起し、とうもろこしの種に処理すると、0.01~10 ppm (至適濃度 0.1 ppm) でその幼苗の根に屈曲を起すことが明らかとなった⁴⁾。ほとんどの植物ホルモンが 0.01~0.1 ppm という低濃度でその作用を発現するように、MF も同程度の低濃度でその作用を表わすことは重要である。

さらに、MF は不定根形成を阻害し⁵⁾、離層形成を促進する⁶⁾。また、エスレル (2-クロロエチルホスホン酸、エチレン発生能を有する) の作用に影響を持つ。すなわち、エスレルによって誘導される豆科植物の茎の膨潤および生重量増加を完全に阻害し、一方、エスレルまたはエチレンによって誘導される離層形成を顕著に促進する⁷⁾。このようなことは MF が細胞壁に作用していることを示唆するが、¹⁴C-MF を用いた追跡実験により細胞壁に到達していることがわかっている⁸⁾。また、MF は細胞壁合成を阻害し、細胞壁成分を変化させている証拠がある⁹⁻¹¹⁾。

これまでに述べてきた生理活性は、MF がまさしく「含硫植物毒」であることを示している。しかしながら最近促進作用をも有することが発見された¹²⁾。豆の幼苗 (seedling) および地上部を切り取ったもの (cutting) の茎の生長を促進する。この促進作用は緑色の苗に対しても白化した (etiolated) 苗に対しても見出されるが、前者に対し特に顕著である。そして、これらの現象は光照射下で行なう時のみ観察され、暗所では観察されないことは興味深い。また、MF は、シャーレの中で溶液に浮べられた 2 cm の茎に対しては伸長作用をみせないが、試験管の中で垂直に立てられた茎に対しては伸長作用を持つことは面白い。

ヒドロキシプロリンおよびプロリンは、植物細胞壁のヒドロキシプロリン高含有蛋白質であるエクステンシン (extensin) の生合成に重要なアミノ酸であるが、MF の持つ生長促進作用と根に屈曲を起す作用が、ヒドロキシプロリンによって阻害され、プロリン添加によって回復するのは興味深い¹³⁾。このことは、MF の生理活性がヒドロキシプロリン高含有蛋白質の役割に関係していることを意味するものと考えられる¹³⁾。

1.2. MF の構造と生理活性 *Aspergillus* 属より単離された MF には、MF A および B が知られている。A は *Asp. niger* 56-39 および 58-883 より得られ、A₁ と A₂ の 87:13 の混合物である。B は *Asp. niger* 56-30 より得られ B₁ と B₂ のほぼ 1:1 の混合物である¹⁴⁾。この中で MF A₁ が最も良く研究されていて、その構

造は長らく、cyclo-D-Cys-L-Val-D-Cys-D-Leu-L-Ile と信じられていたが、その合成品に生理活性がほとんどないことは疑問として残されていた¹⁵⁾。ところが最近、L-Val と D-Cys を入れ換えた構造 cyclo-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Ile (1)、が提出され、その合成品に天然物と同等の生理活性が見られることから、(1) が正しい構造であると思われる¹⁶⁾。A₁ 以外の MF はその

Table 1 Amino Acid Composition of Malformin
A₁, A₂, B₁, and B₂

A ₁	Cys : Val : Leu : Ile (2 : 1 : 1 : 1)
A ₂	Cys : Val : Leu or Ile (2 : 2 : 1)
B ₁	Cys : Val : Leu : Allo-Ile (2 : 1 : 1 : 1)
B ₂	Cys : Val : Leu (2 : 2 : 1)

構成アミノ酸がやや異なる (表 1) が、基本構造は同じ環状のペントペプチドと思われ、A₂ 以外はほぼ同様の生理活性を有する。

MF 様活性はその他の微生物の培養液にも見い出される¹⁷⁾が、同じ *Asp. niger* group の *Asp. ficuum*, *Asp. awamari*, および *Asp. phoenicis* から MF A (A₁ > A₂) が単離された¹⁸⁾。また最近、MF A の 5 位の Ile が Leu に変わった MF C が単離された。A と同等の活性を有する¹⁹⁾。

MF の誘導体としては、ジスルフィド結合が還元された、還元型 MF (SH-MF) (2) とジスルフィド結合が酸化された、酸化型 MF (SO₃H-MF) が知られている。前者は MF の 1/10 の活性を有し、後者には活性が認められない。また、MF 活性を阻害する化合物としては、L-システイン、グルタチオン、2,3-ジメルカプトプロパノールなどのチオール類、アスコルビン酸、二亜硫酸ナトリウムなどの還元剤、および *p*-クロロ水銀安息香酸、マレイン酸ヒドラジドなどの SH 試薬が知られている。また、還元型 MF と拮抗的に働く化合物としては、アスコルビン酸、二亜硫酸ナトリウムなどの還元剤、*p*-クロロ水銀安息香酸、マレイン酸ヒドラジドなどの SH 試薬、および 2,3-ジメルカプトプロパノールがある。L-システイン、グルタチオンは作用を示さない。2,3-ジメルカプトプロパノールの拮抗作用は、MF に対してよりも還元型 MF に対してより強く作用する。これらのことから、MF によって引き起される奇妙な生育阻害作用は、グルタチオン、L-システインなどが関係した酸化還元系に異常をきたすことから、また一部は、生育に必須なチオール化合物 (ジヒドロキサ酸など) が関係した生合成過程に作用することから発生してくるものと考えられる²⁰⁾。

その後、L-システインや β -メルカプトエタノールな

どのチオール類 (3) が, MF のジスルフィド結合と化

学的に反応して付加化合物 (4) を与えることが見い出された (式 [1])²¹⁾。(4) は MF より不溶性であり, MF の約 1/10 の活性を持つ。チオール類が MF の活性を阻害することは, 少なくともその一部は, このように不溶性で活性の低い付加化合物 (4) を与えることにあって考えられる。すなわち, MF のジスルフィド結合はかなりの反応性を有し, MF の活性発現に重要な働きをしていることは確かであろう。そして, *in vivo* においてもグルタチオンなどの生体反応に重要なチオール類や細胞壁などの蛋白質のチオール基と反応することが充分考えられる。また, Desthiomalformin すなわち MF のジスルフィド結合が還元的に除去された, cyclo-D-Ala-D-Ala-L-Val-D-Leu-L-Ile (5) が合成されたが, 活性が全く認められなかった²²⁾ことは, 上に述べてきたことを支持する。

1.3. MF の立体配座 (conformation) と生理活性

MF は, 溶媒, 温度, pH などによって, 溶解性, 旋光度, 生理活性の異なる種々の異性体に変化する (図 1)。このような変化は立体配座が変わるために起きると考え

Fig. 1 Isomers of Malformin

られている²³⁾。まず, 天然物 (立体配座 I) を 1% 炭酸水素ナトリウム水溶液の中で加熱すると, III が沈澱してくる。I および III はトリフルオロ酢酸に溶かして 1 週間放置すると, 共通の異性体 IV に変化する。I および III は, 液安・ナトリウムで処理すると共通の還元型 MF (SH-MF) に変化する。還元型 MF を DMSO 中ヨウ素で酸化すると, MF I と Isomalformin を与える。後者は前者と同様, 液安・ナトリウムによって還元型 MF になる。さらに, MF を DMF 中加熱すると立体配座 II が得られるが, II は酢酸エチルから沈澱させると I に戻る。これら立体配座が異なると考えられている異性体は, 生理活性を始め諸性質が異なる (表 2)²³⁾。

還元型に MF も上に述べたような種々の異性体が存在することが知られている²¹⁾。

Table 2 Biological Activity, Optical Rotation, and Solubility of Isomers of Malformin

	Optimum conc. for corn-root curvatures	$[\alpha]_D$	Solubility in DMF and DMSO
Malformin			
Conformation I	0.1 ppm	-18°	Soluble
II	0.1	-18°	Soluble
III	2~10	+150°	Scarcely soluble
IV	0.5~1.0	+62°	Scarcely soluble
Isomalformin	2~10	+15°	Scarcely soluble

1.4. enantio-[5-Valine] Malformin の合成と生理活性

一般的に, 環状ペプチドの retro-enantio 体 (DL が逆のアミノ酸を有し, 巻き方が逆のもの), は逆の逆であるために天然物に酷似してくるので活性を持つようになることは gramicidin S や enniatins など知られている。M. Bodanszky ら²⁴⁾は, enantio-Malformin A₁ (6) の 5 位の D-Ile を D-Val に変えた, enantio-[5-Valine]Malformin (7) を合成した。(7) は, 原料アミノ酸が手に入りやすく合成しやすいだけでなく, 面白いペプチドである。すなわち, Palindrome ペプチド (どち

らから読んでも同じになるタケヤブヤケタなどの, 回文ペプチド) となっている。また, MF A₂ や B₂ は Val を 2 個持っている (表 1) ので, それらの (retro)-enantio 体とも

考えられる。生理活性試験の結果、MF の 1/10 の活性を有することがわかったことは面白い²³⁾。

1.5. MF の「含硫植物毒」としての意義 これまでに述べてきたように、MF は種々の奇妙な生理作用を有すると同時に、生長促進作用をも有するのでただ単なる「含硫植物毒」とはいいいにくい。生体内においては、L-システイン、グルタチオン、ジヒドロリポ酸、蛋白質などのチオール基を有する化合物および L-システイン、酸化型グルタチオン、リポ酸、蛋白質などのジスルフィド類が重要な役割を果たしているが、MF の作用はそれらと何らかの関係を有していることは確実であろう。MF のジスルフィド基は他のチオール類と反応する性質を持つと共に、そのジスルフィド基が還元された SH-MF では 1/10 の活性を持ち、硫黄が除去された Desthiom-alformin では活性がないことは、MF のジスルフィド基が重要であることを示す。そして、MF は主として植物の細胞壁に影響を与え、それによって、屈曲、奇形、生長促進などの作用を発現しているように思える。

MF は抗菌性を有するので、単なる抗生物質的な代謝産物であるという考え方もあると思う。しかしながら、たまたま、植物生理学者のもとで生理活性物質として単離されたこともあって、植物生理学的に非常に良く研究された。その結果、これまでに紹介してきたように、種々の興味深い化学的、生理学的性質を持つことが明らかになった。その意味で誠に不思議な化合物であるというのが筆者の実感である。

2. アスパラガス酸およびその誘導体について

アスパラガス酸類は MF とは異なり 高等植物 (アスパラガス) より単離された。非常に生長の激しい部分から単離された「含硫植物毒」であるという点で興味深い。これから述べるように単なる「含硫植物毒」ではない。アスパラガス酸類に関する研究は、MF とは異なり日本において行なわれたためよく紹介されている²⁵⁾。従って、ここでは「生物活性含硫化合物」特集の一部としての「含硫植物毒」という立場から、概括的に紹介するにとどめたい。

2.1. アスパラガス酸類の発見、単離、および構造決定 白化アスパラガス (地上部 10~15 cm) をメタノール抽出し分画すると、エーテル抽出酸性部に強い生理活性 (レタスの発芽と、根および胚軸の生長阻害) が認められた。薄層クロマトグラフィーによって分離すると、Rf 0.20~0.90 に活性が認められ、上から順に、Rf 0.70 S-Acetyldihydroasparagusic acid (8), Rf 0.65 Asparagusic acid (9), Rf 0.55 Dihydroasparagusic

acid (10), Rf 0.31 Asparagusic acid-*anti*-S-oxide (11), Rf 0.25 Asparagusic acid-*syn*-S-oxide (12), が得られた。そして、主として、NMR, Mass, 元素分析,

別途合成により構造決定された。

2.2. アスパラガス酸類の生理活性

2.2.1. レタスの発芽、根および胚軸の生長に対する作用 アスパラガス酸 (9) は、 10^{-8} M という低濃度でレタスの種子の発芽をわずかに阻止し、 10^{-3} M では非常に強く阻止する。レタスの根の生長に対しては、 10^{-8} M でわずかに阻害作用をあらわし、 10^{-4} M ではほとんど完全に阻害する。胚軸の生長については、 10^{-6} M で影響が現われ 10^{-3} M で完全に阻止する。このような作用は、アブシジン酸によく似ているが、一般的にアブシジン酸の方がやや強い阻害作用を持つ。また、アスパラガス酸と構造が類似した、 α -ケト酸の生体酸化反応の補酵素として知られるリポ酸 (13) は、アスパラガス酸に比べ、はるかに弱い阻害作用を持つことも明らかになった。

2.2.2. ベンジルアデニン、ジベレリン、およびインドール酢酸との相互作用 ベンジルアデニンとの相互作用は二十日大根の子葉の生重増加について調べられたが、アスパラガス酸 $7 \times 10^{-5} \sim 10^{-6}$ M の添加は生重量を増加し、明らかに相互作用があることが認められた。ジベレリンについては、アスパラガス酸 7×10^{-8} M の添加で、ジベレリンのレタス胚軸伸長作用を抑制する。インドール酢酸については、 $7 \times 10^{-4} \sim 10^{-6}$ M の添加でアベナ幼穂の生長を抑制する。

2.2.3. α -ケト酸 (ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸) の生体内酸化に対する作用 アスパラガス酸類 (9, 10, 8) は、 α -ケト酸の生体内酸化反応の補酵素として知られているリポ酸類 (13, 14, 15) と構造上よく似ている。そこでリポ酸との関係が調べられた。リポ酸欠損株であ

る *Streptococcus faecalis* 10 CI の生育に対する効果を調べてみると、リポ酸の場合は 10^{-9} M の添加で非常に良く生育するのに対し、アスパラガス酸 10^{-9} M の添加はわずかに生育を促進するのみであった。しかし、濃度を 10^{-5} ~ 10^{-4} M まで上げると非常に良く生育するという極めて興味深い結果が得られた。すなわち、発芽や生長を阻害する物質として単離されたアスパラガス酸が、高濃度とはいえ、リポ酸と同様の作用を持つことは重要である。しかも、MF とは異なり、高等植物の生長の激しい部分から単離されているので、生体反応と深くかかわっているものと考えられる。さらに、ピルビン酸の酸化に対する作用が調べられたが、アスパラガス酸はリポ酸の 56~70% の活性を持つことが明らかになった。またアスパラガス酸類(9のメチルエステル, 8, 10)もかなりの活性を有する。

2.3. アスパラガス酸類の意義 アスパラガスにおいてアスパラガス酸が生長点に局在しているという事実は、アスパラガス酸がアスパラガスの生長にとって非常に重要であることを示す。そして、生長阻害物質として単離されたアスパラガス酸が生長阻害作用と共に、促進作用をも有していることは興味深い。特に、 α -ケト酸の生体内酸化反応に関与しているリポ酸との構造類似性および代替性は注目に値する。アスパラガス酸も、MF と同じように、そのジスルフィド結合が活性に強く関係していることが確実であるので、同じ「生物活性含硫化合物」として生理活性発現に何らかの関係があるかもしれない。最近、アスパラガスの根から殺線虫性物質としてアスパラガス酸が単離されたことは面白い²⁶⁾。

3. 結 語

編集委員会より与えられた「含硫植物毒」というテーマは、かなり特殊なものでありそれに当る化合物は数少ない。しかし、*Aspergillus* 属より単離された MF とアスパラガスから得られたアスパラガス酸類は、それぞれ興味深い性質を持っている。前者が、*Asp. niger* に汚染された玉ねぎに見い出される²⁶⁾とはいえ、微生物の代謝産物であって、生物特に高等植物の正常な生育には無関係であると思われるのに対し、後者が高等植物の生長点に見い出されることは対照的である。この二つの化合物を同列に並べて議論することは、もともと無理なことだと思う。しかし、今まで紹介してきたように、両者共にジスルフィド結合がその活性に重要な影響をおよぼし一見阻害的に働くにもかかわらず生長促進作用をも持っているという共通点がある。

(昭和52年1月20日受理)

有益なご助言をいただいた名古屋大学丸茂晋吾先生に感謝致します。また、本稿を通読いただき有益なご助言をして下さった東京大学高橋信孝先生に感謝致します。

文 献

- 1) R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **33**, 17 (1958)
- 2) R.W. Curtis, *Science*, **128**, 661 (1958)
- 3) N. Takahashi, R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **36**, 30 (1961)
- 4) R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **36**, 37 (1961)
- 5) R.W. Curtis, G. Fellenberg, *Plant & Cell Physiol.*, **13**, 715 (1972)
- 6) R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **43**, 76 (1968)
- 7) R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **47**, 478 (1971)
- 8) D. Ciarlante, R.W. Curtis, *Plant & Cell Physiol.*, **17**, 509 (1976)
- 9) R.W. Curtis, O. Kandler, *Plant Physiol.*, **42**, 669 (1967)
- 10) R.W. Curtis, *Plant & Cell Physiol.*, **10**, 203 (1969)
- 11) S. Izhar, J. Bevington, R.W. Curtis, *Plant & Cell Physiol.*, **10**, 687 (1969)
- 12) R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **57**, 365 (1976); W.W. John, R.W. Curtis, *Experientia*, **30**, 1392 (1974)
- 13) T.J. Buckhout, R.W. Curtis, *Nature*, **260**, 435 (1976)
- 14) S. Takeuchi, M. Senn, R.W. Curtis, F.W. McLafferty, *Phytochem.*, **6**, 287 (1967)
- 15) S. Marumo, R.W. Curtis, *Phytochem.*, **1**, 245 (1961); K. Isono, R.W. Curtis, *Phytochem.*, **3**, 277 (1964)
- 16) M. Bodanszky, G.L. Stahl, *Bioorg. Chem.*, **4**, 93 (1975); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2791 (1974)
- 17) R.W. Curtis, H. Tanaka, *Appl. Microbiol.*, **15**, 1519 (1967)
- 18) S. Iriuchijima, R.W. Curtis, *Phytochem.*, **8**, 1397 (1969)
- 19) R.J. Anderegg, K. Biemann, G. Büchi, M. Cushman, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3365 (1976)
- 20) S. Suda, R.W. Curtis, *Plant Physiol.*, **39**, 904 (1964)
- 21) S. Iriuchijima, R.W. Curtis, *Phytochem.*, **9**, 1199 (1970)
- 22) M. Bodanszky, J.B. Henes, *Bioorg. Chem.*, **4**, 212 (1975)
- 23) K. Anzai, R.W. Curtis, *Phytochem.*, **4**, 713 (1965)
- 24) M. Bodanszky, G.L. Stahl, R.W. Curtis, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2857 (1975)
- 25) 柳川弘志, 加藤忠弘, 北原喜男, 植物の化学調節 **8**, 31 (1973); 第2回有機イウリン化合物討論会講演要旨集, p. 24, 1974, 東京; 柳川弘志, 加藤忠弘, 北原喜男, 高橋成人, 植物化学調節研究会, 昭和47年度大会研究発表記録集, p. 40, 1972, 東京
- 26) M. Takasugi, Y. Yachida, M. Anetani, T. Masamune, K. Kegasawa, *Chem. Lett.*, **1975**, 43
- 27) R.W. Curtis, W.R. Stevenson, *J. Tuete. Appl. Microbiol.*, **28**, 362 (1974)