

Ipomoea 属カルスのサイトカイニン生産

杉山民二・齋田雄樹・入江夕子・橋爪 斌

東京農工大学農学部農芸化学科
(〒183 府中市幸町 3-5-8)

(1988年4月12日受付)

(1988年6月27日受理)

サツマイモ塊根部からは, zeatin (Z), ribosylzeatin ((9R)Z), N⁶-isopentenyladenosine ((9R)iP) および 9-glucosylzeatin ((9G)Z) とともに 9-glucosyl-N⁶-isopentenyladenine ((9G)iP) が新規サイトカイニン (CK) として単離された^{1,2)}. [9G]iP は塊根部の全 CK レベルの約 67% を占めること, またサツマイモの近縁野生種にも高いレベルで存在することより *Ipomoea* 属植物の特徴的な CK と考えられる³⁾. その後, ジャガイモ塊茎部にも [9G]iP が同定されたが, そのレベルは塊根部の約 10⁻¹ 程度であった⁴⁾. [9G]iP の異性体である [7G]iP は, タバコ培養細胞における N⁶-isopentenyladenine (iP) の代謝産物として同定されているが⁵⁾, [9G]iP の生合成あるいは iP, [9R]iP などとの代謝的関連性については明らかとなっていない.

われわれは, [9G]iP の生合成および代謝を培養細胞において調べるために, まず *Ipomoea* 属カルスの内生 CK, 特に [9G]iP の生産性について検討した. 本研究では, 重水素標識 CK を内部標準 (IS) とする GC/SIM 法^{6,7)} により, *Ipomoea* 属カルス (4 株) の CK を同定・定量した.

カルスは, サツマイモ栽培種 (*Ipomoea batatas* Lam, cv. Kohkei No. 14) の塊根部 (K-14 T) と茎葉部 (K-14 S), また, サツマイモの近縁野生種である *I. batatas* 13-1 の茎葉部 (13-S) および *I. trifida* Don K-123 の茎葉部 (K-123) より, 0.5 ppm 2,4-D 含有 MS 寒天培地で誘導し, 0.5 ppm 2,4-D と 0.1 ppm カイネチン含有 MS 寒天培地上で 27°C 暗黒下で培養した. それらのカルスは培養 30 日間で 100 ml エレンマイヤーフラスコあたり約 5~6 g fw に成長した. 内生 CK の分析には, 約 10 カ月間継代培養してきたカルスを用い, その量は新鮮重量で K-14 T が 290 g, K-14 S が 410

g, 13-S が 246 g および K-123 が 580 g である.

これらのカルスを別々に 99% エタノールに 4~5°C で 1 週間浸漬し, 濾別後, さらに 70% エタノールで 2 回抽出した. そのエタノール抽出液に IS として重水素標識 Z-d₅ 1.54 μg, [9R]Z-d₅ 2.8 μg, [9G]Z-d₅ 3.7 μg, [9R]iP-d₆ 1.82 μg および [9G]iP-d₆ 2.5 μg を添加した. 次いで, Fig. 1 に示すスキームにより各 IS を回収・精製し, IS 相当画分 (IS とともに内生 CK を含む) を調製した. 本画分をトリメチルシリル (TMS) 誘導体とした. Table 1 に示したイオンを多重イオン検出器を付置した島津 LKB-9000 ガスクロマトグラフ・質量分析計により選択的にモニター (SIM) した. ガスクロマトグラフィ (GC) 条件は Fig. 2 に記載した.

K-14 T カルスのエタノール抽出液から回収した各 IS 相当画分の GC/SIM クロマトグラムを Fig. 2 に示した. 各クロマトグラム上のピークは MS スペクトルを測定することにより同定された. 内生量は, IS のイオンに対する内生 CK のピーク高の比を求め, その値をあらかじめ作製した検量線により IS 中の d₀ 体の割合を補正して求めた. カルスの内生 CK 量を Table 2 にまとめた.

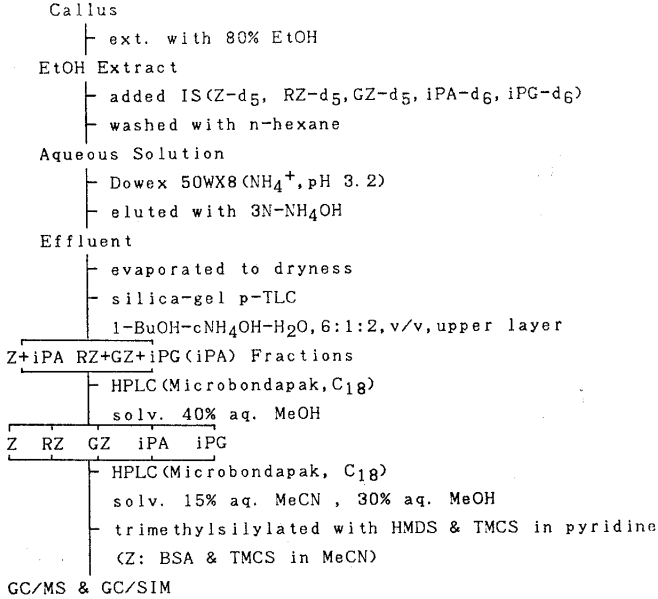
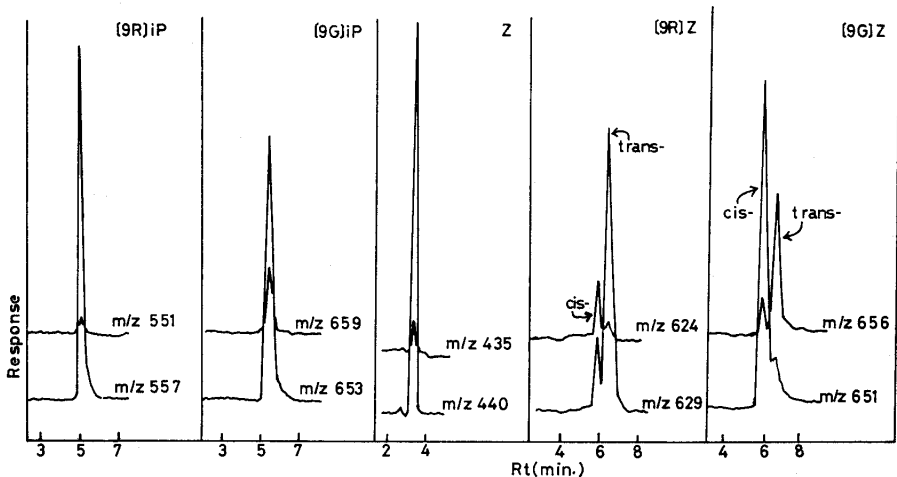
K-14 T カルスは [9G]iP を 3.6 μg/100 g fw 生産し, この生産量は, サツマイモ塊根部のレベル 5.5 μg/100 g fw に匹敵していた. さらに, 他のカルスにおいても [9G]iP の生産が確認された. cis-[9G]Z が [9G]iP と同程度生産されていることもわかった. [9G]iP および [9G]Z という 9-glucosyl 型 CK が, いずれのカルスにおいても, 全 CK レベルの 82% 以上を占めていた. 一方, [9R]Z は 14~20 ng/100 g fw と低レベルであり, cis-異性体が大部分を占めていた. 活性型 CK である [9R]Z と Z の内生量は脱分化にとも

Table 1 Ions monitored for quantitative measurements.

Compound	Ion identity	<i>m/z</i>	
		Unlabeled	Standard
[9R]iP-3 TMS	M ⁺	551	557
[9G]iP-4 TMS	M ⁺	653	659
Z-3 TMS	M ⁺	435	440
[9R]Z-4 TMS	(M-15) ⁺	624	629
[9G]Z-5 TMS	(M-90) ⁺	651	656

なって母植物の $10^{-1} \sim 10^{-2}$ に低下した。[9G]Z は、これまで日々草などのクラウンゴール細胞で同定・定量されているが⁸⁻¹⁰⁾、正常培養細胞における [9G]Z さらには [9G]iP の同定・定量は初めてである。

[9G]Z は [9R]Z あるいは Z のグルコシル化反応により生成する¹¹⁾。また、[9G]iP も同様な反応により iP あるいは [9R]iP から生成すると考えられる。クラウンゴール細胞における [9R]Z と Z の総レベルに対する [9G]Z のレベル比は 0.8~2.5 である。一方、K-

**Fig. 1.** Procedures for the separation of cytokinins from the callus.**Fig. 2.** SIM chromatograms of [9R]iP, [9G]iP, Z, [9R]Z and [9G]Z fractions recovered from extracts of K-14T callus.

GC conditions: 1.5% OV-1, 30 ml/min. He, column temp. 240°C ([9R]iP) 270°C ([9G]iP), 215°C (Z), 260°C ([9R]Z) and 270°C ([9G]Z).

Table 2 Cytokinins found in the calluses.

Cytokinin	Found ($\mu\text{g}/100\text{ g fw}$)			
	K-14T	K-14S	13-S	K-132
(9R)iP	0.029	0.0077	0.058	0.023
(9G)iP	3.62	0.44	1.27	0.38
Z cis-+ trans-	0.040	n. d.	0.029	n. d.
(9R)Z cis-	0.16	0.163	0.091	0.126
trans-	0.033	0.008	0.081	0.015
(9G)Z cis-	2.72	0.59	a	0.385
trans-	0.37	n. d.	a	n. d.

* Measurements not made.

14 T, K-14 S および K-123 のカルスにおける同比は、それぞれ 12, 3.5 および 2.7 である。さらに、これらのカルスの (9G)iP/(9R)iP の比も高い値を示す。各カルスではグルコシル化反応の活性が高いことが示唆される。したがって、9-glucosyl 型 CK は、*Ipomoea* 属カルスの高いグルコシル化反応により盛んに合成され、そして液胞などの器官に区画化され蓄積されることが考えられる。

以上、*Ipomoea* 属カルスでは (9G)iP, (9G)Z, (9R)Z, (9R)iP が同定・定量された。特に、K-14 T の (9G)iP 生産能は、サツマイモ塊根部のものに匹敵することを確認した。したがって (9G)iP の生合成および代謝研究にサツマイモカルスが利用できることがわかった。

最後に、カルス (K-14 S, 13-S, K-123) を分与して頂

いた小林 仁博士 (農水省農業生物資源研究所) に深く感謝致します。

文 献

- 1) Hashizume, T., S. Suye, T. Sugiyama, 1982. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 663-665.
- 2) Hashizume, T., S. Suye, T. Soeda, T. Sugiyama, 1982. *FEBS*, **144**: 25-28.
- 3) Sugiyama, T., S. Suye, T. Hashizume, 1983. *Agric. Biol. Chem.*, **47**: 315-318.
- 4) Hashizume, T., S. Suye, T. Sugiyama, 1985. *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 387-390.
- 5) Laloue, M., C. Terrine, J. Guern, 1977. *Plant Physiol.*, **59**: 478-483.
- 6) Hashizume, T., T. Sugiyama, M. Imura, H. T. Cory, M. F. Scott, J. A. McCloskey, 1979. *Anal. Biochem.*, **92**: 111-122.
- 7) 杉山民二, 橋爪 斌, 1982. *化学と生物*, **20**: 760-764.
- 8) Horgan, R., L. M. S. Palni, I. Scott, B. McGaw, 1981. In "Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins" (ed. by Guern, J., C. Peaud-Lenoel), p. 56-65, Springer-Verlag, Berlin.
- 9) Scott, I. M., G. C. Martin, R. Horgan, J. K. Heald, 1982. *Planta*, **154**: 273-276.
- 10) Palni, L. M. S., R. E. Summons, D. S. Letham, 1983. *Plant Physiol.*, **72**: 858-863.
- 11) Letham, D. S., L. M. S. Palni, 1983. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **34**: 163-197.

Summary

Occurrence and Levels of Cytokinins in the Calluses of *Ipomoea* Species Plants

Tamizi SUGIYAMA, Yūki NIEDA, Yuhko IRIE and Takeshi HASHIZUME

Laboratory of Bio-organic Chemistry, Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan

The presence and levels of zeatin, ribosylzeatin, 9-glucosylzeatin ((9G)Z), N⁶-isopentenyladenosine and 9-glucosyl-N⁶-isopentenyladenine ((9G)iP) were determined in calluses of sweet-potato plant (*Ipomoea batatas* Lam cv. kohkei No 14) and its wild species (*I. batatas* 13-1 and *I. trifida* Don) by mass spectrometry using deuterium-labeled standards. The levels of (9G)iP and (9G)Z were, respectively, 3.6 μg and 2.7 μg per 100 g fw of the callus derived from the tuberous root of sweet-potato.