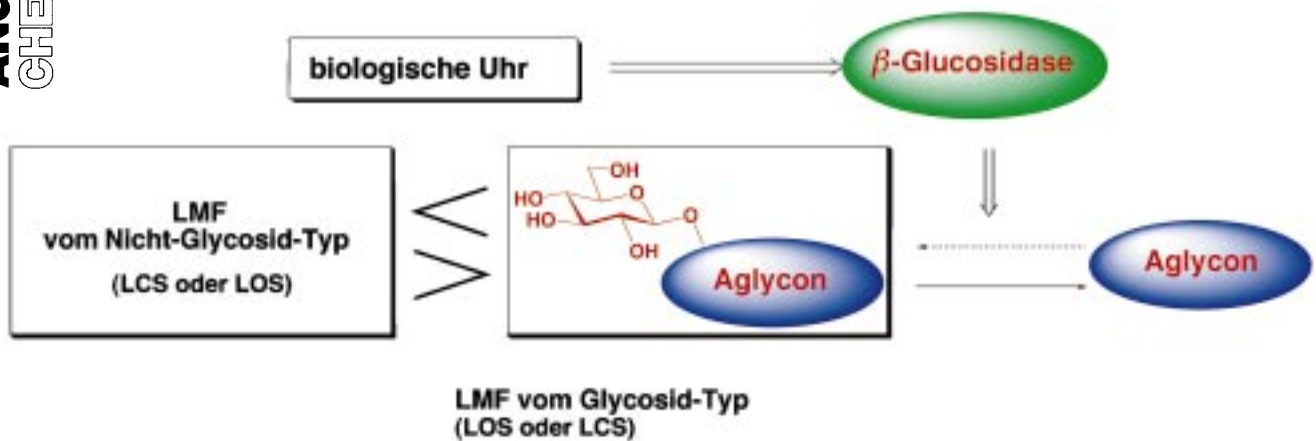




Das Öffnen und Schließen der Blätter von Pflanzen wie *Mimosa pudica* wird durch eine biologische Uhr gesteuert.

Dabei spielt β -Glucosidase eine entscheidende Rolle; durch die Aktivierung dieses Enzyms wird die zirkadiane Rhythmik, die bei der Blattbewegung beobachtet wird, initiiert.



Chemie und Biologie der Blattbewegungen

Minoru Ueda und Shosuke Yamamura*

Die Blätter von *Mimosa pudica* L. sind bekannt für ihre schnelle Bewegung nach Berührung. Erst kürzlich konnten wir aus dieser Pflanze in geringen Mengen einen Reizstoff isolieren, der aus drei verschiedenen Komponenten besteht (Kalium-L-malat, Magnesium-*trans*-aconitat sowie ein Dimethylammoniumsalz). Viele Pflanzen klappen ihre Blätter abends zusammen, als ob sie sich schlafen legen würden, und früh am Morgen öffnen sie diese wieder (nyktinastische Blattbewegung). Diese zirkadiane Rhythmik wird durch

die biologische Uhr der Pflanzen gesteuert. Durch umfangreiche Untersuchungen an anderen nyktinastischen Pflanzen konnte eine Vielzahl an „Leaf-Opening-Substances“ (LOSs) und „Leaf-Closing-Substances“ (LCSs) isoliert werden. Bei Experimenten mit diesen bioaktiven Substanzen fanden wir heraus, dass die Blattbewegung solcher Pflanzen durch das regulierte Verhältnis von LOSs zu LCSs initiiert wird. Das Konzentrationsgleichgewicht zwischen den beiden „Leaf-Movement-Factors“ (LMFs) kehrt sich

im Laufe des Tages um. Der glycosidische LMF wird durch β -Glucosidase hydrolysiert, deren Aktivität durch die biologische Uhr gesteuert wird. Durch die Aktivierung der β -Glucosidase wird die zirkadiane Rhythmik, die bei der Blattbewegung beobachtet wird, initiiert.

Stichwörter: Bioorganische Chemie • Glycosidasen • Glycoside • Pflanzenphysiologie • Phytochemie

1. Einleitung

Pflanzen sind fest verwurzelt und können daher nicht selbstständig ihren Standort wechseln. Dennoch verhalten sie sich nicht statisch, sondern reagieren auf viele Faktoren mit sichtbarer Bewegung, die mit oder ohne Dehnung der Zellen einhergeht, z.B. auf Licht oder Dunkelheit, Temperatur, Feuchtigkeit und auch chemische Substanzen, die durch allelopathische Verbindungen repräsentiert werden. Die Pflanzenbewegung wird hauptsächlich in drei Klassen eingeteilt: 1. Tropismus (durch äußere Reize bestimmte gerichtete Bewegung), 2. Nastie (durch Reiz ausgelöste Bewegung ohne Beziehung zur Richtung des Reizes) und 3. Taxis (durch Reiz ausgelöste Bewegung in Richtung auf den Reiz oder von ihm weg). Besonders die Bewegungen von *Mimosa pudica* L. (Abbildung 1) und *Dionaea muscipula* (Venusfliegenfalle), die zum Typ 2 gehören, sind sehr bekannt.

1880 veröffentlichte Charles Darwin, bekannt durch sein bedeutendes Buch „On the Origin of Species“, ein weiteres wertvolles und umfangreiches Buch mit dem Titel „The Power of Movement in Plants“.^[1] Es basiert auf Experimen-

ten, die er zusammen mit seinem Sohn Francis an mehr als dreihundert verschiedenen Pflanzenarten einschließlich nyktinastischer wie *Mimosa pudica* durchgeführt hat. In der Pflanzenphysiologie führten ihre genialen Experimente zur Entdeckung des Phototropismus und in der Phytochemie zur Entdeckung von Auxin, dem ersten Pflanzenhormon der sechs bekannten Klassen in höheren Pflanzen: Auxine, Ethylen, Gibberelline, Cytokinine, Abscisinsäuren und Brassinolide. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Blattbewegung nyktinastischer Pflanzen einschließlich *Mimosa pudica*, *Albizia julibrissin* und *Cassia mimosoides* erhalten.

Dieser Aufsatz konzentriert sich auf eine Vielzahl bioaktiver Verbindungen, die mit der Blattbewegung der Pflanzen zusammenhängen. Die Blattbewegung der Pflanzen kann in zwei Kategorien aufgeteilt werden: die schnelle seismonastische Bewegung, die bei wenigen Pflanzen beobachtet wird, und die langsame nyktinastische Bewegung. Sie tritt bei nyktinastischen Pflanzen auf, deren Blätter sich nachts zusammenfallen und tagsüber entsprechend einer zirkadianen Rhythmik mit einer Periode von ungefähr 24 Stunden wieder entfalten (Abbildung 2).

Eine nyktinastische Blattbewegung wird bei fast allen Leguminosen (Hülsenfrüchtlern) beobachtet. Diese periodische Blattbewegung, die durch eine innere biologische Uhr gesteuert wird, kann bei anhaltendem Tageslicht oder kontinuierlicher Dunkelheit erfolgen.^[2] Die Suche nach dem Ursprung der biologischen Uhr geht zurück auf die sorgfältige

[*] Prof. S. Yamamura, Dr. M. Ueda
Department of Chemistry
Faculty of Science and Technology
Keio University, Hiyoshi, Yokohama 223-8522 (Japan)
Fax: (+81) 45-563-5967
E-Mail: yamamura@chem.keio.ac.jp



Abbildung 1. Die schnelle Blattbewegung von *Mimosa pudica* L.

Beobachtung der nyktinastischen Blattbewegung von *M. pudica* im 18. Jahrhundert.^[26] Ein französischer Wissenschaftler fand heraus, dass *M. pudica* ihre Blätter tagsüber ausstreckt („Wachphase“) und nachts zusammenfaltet („Schlafphase“), sogar wenn die Pflanze in einer Höhle bei dauernder Dunkelheit gehalten wurde. Nachdem Bünning in Deutschland das Konzept der biologischen Uhr entwickelt und erweitert hatte, konnte nun nachgewiesen werden, dass eine biologische Uhr in allen lebenden Organismen von den Prokaryonten bis hin zum Menschen existiert. So verschiedene Phänomene wie die nächtliche rhythmische Biolumineszenz des Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* und der Jetlag nach Flugreisen werden auf eine innere Uhr zurückgeführt.

Zusätzlich zur nyktinastischen Bewegung zeigt vor allem die Pflanze *Mimosa pudica* eine seismonastische Bewegung. Dieses aufregende biologische Phänomen hat seit dem 4. Jahrhundert v. Chr. viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Die 2000 Jahre alte Geschichte der Erforschung der Bewegung von *M. pudica* wird auch in einem ausgezeichneten Übersichtsartikel von Schildknecht erwähnt.^[3]

2. Reizstoffe in *Mimosa pudica*

Berührt man die Pflanze *Mimosa pudica* L., so schließt sie ihre Blätter sehr schnell, eines nach dem anderen, und zwar in einer Bewegung, die der von Tieren ähnelt. Nach Behandlung mit Ether reagiert die Pflanze nicht mehr auf einen Reiz. Die schnelle Blattbewegung wird nur bei der *Mimosa*-Familie, bei *Biophyllum* und *Dionaea muscipula* beobachtet. Dieses erstaunliche Phänomen hat sowohl Biologen als auch Chemiker dazu veranlasst, den Mechanismus der Blattbewegung von Mimosaceae zu untersuchen. Dabei ist eine der inter-

Shosuke Yamamura erhielt 1958 sein Diplom an der Universität Nagoya, wo er unter Anleitung von Professor Koji Nakanishi arbeitete, und nach seiner Dissertation bei Professor Yoshimasa Hirata promovierte er dort 1963. Nach einem Postdoc-Aufenthalt am Massachusetts Institute of Technology von 1964 bis 1966 war er bis 1967 Forschungsassistent an der Universität Nagoya. Als Assistenzprofessor für Pharmazie (bis 1978) und dann als Ordentlicher Professor (bis 1980) war er an der Meijo-Universität in Nagoya tätig. Seitdem ist er Professor für Chemie an der Keio-Universität in Yokohama. Zu seinen Forschungsinteressen gehören die Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese (unter anderem mit elektrochemischen Methoden) biologisch aktiver Verbindungen, vor allem aber auch die genaue Untersuchung von deren biologischer Wirkung. Yamamura erhielt 1992 den Preis der japanischen chemischen Gesellschaft und 1999 den Fukuzawa-Preis.



S. Yamamura



M. Ueda

Minoru Ueda wurde 1965 in Nagoya (Japan) geboren. 1989 schloss er sein Studium an der Konan-Universität ab und ging dann zu Professor Toshio Goto an die Universität Nagoya (Diplom in Agrarwissenschaften 1991). 1994 promovierte er dort bei Professor Minoru Isobe und wurde im selben Jahr Assistenzprofessor an der Fakultät für Naturwissenschaften und Technologie an der Keio-Universität in Yokohama. Seine Forschungsinteressen sind bioaktive Naturstoffe und deren bioorganische Eigenschaften. In diesem Jahr wurde ihm der Preis für junge Chemiker von der japanischen chemischen Gesellschaft verliehen.



Abbildung 2. *Albizzia julibrissin* DURAZZ. tagsüber (links) und bei Nacht (rechts).

essantesten Fragestellungen, wie das Stimulans von der Stimulationsstelle an andere Orte transportiert wird.

Houwink^[4] und Shibaoka^[5] konnten elektrophysiologisch unterschiedliche Geschwindigkeiten für die Reizleitung beobachten. Das Stimulans, das im Xylemsaft transportiert wird,

ruft eine Antwort im benachbarten Gewebe in Form eines Variationspotentials (s-wave; „s“ für „slow“) hervor. Nach Schildknecht löst entweder der Signalstoff selbst oder das durch ihn erzeugte Variationspotential ein schnelles Aktionspotential aus (m- oder r-wave; „m“ für „middle“, „r“ für „rapid“), das dem langsameren Variationspotential vorauslaufen kann.^[3] Unabhängig von der Wirkungsweise können einige Stimulantien direkt oder indirekt mit einer Motorzelle wechselwirken.

Die eigentliche Blattbewegung wird durch das Ein- oder Ausströmen von Wasser in bzw. aus der Zelle erklärt, was durch Ionenströme vor allem von Kaliumionen angetrieben wird.^[6] Das Bewegungsorgan des Pflanzenblattes ist der Pulvinus (das Blattgelenk). Zwei Zellgruppen sind im Pulvinus angeordnet, die Flexor- und Extensorzellen oberhalb bzw. unterhalb des zentralen Zellgewebes. Die Flexorzelle schwillt an und die Extensorzelle schrumpft, um den Pulvinus zu krümmen und das Blatt oder Blättchen zu biegen oder zusammenzufalten, wohingegen die Flexorzelle schrumpft und die Extensorzelle anschwillt, um den Pulvinus wieder zu begradigen. Biologen haben gezeigt, dass die Pulvinarzellen beim Schrumpfen Kaliumionen freisetzen und beim Anschwellen Kaliumionen aufnehmen. Während eines vollständigen Blattbewegungszyklus fließen mehr als 60 % der gesamten Kaliumionen innerhalb des Pulvinus von der Flexor- zur Extensorseite und wieder zurück.^[7] Kaliumionen dringen über verschiedene Kanäle, die unterschiedlich reguliert werden, in die Pflanzenzelle ein und aus ihr heraus.^[8] Lange Zeit wusste man aber nichts über die Signale, mit denen eine biologische Uhr die nyktinastisch regulierte Blattbewegung über eine Zustandsänderung der K^+ -Kanäle steuern könnte.

Vor kurzem konnte die Wasserverteilung im Pulvinus von *M. pudica* durch ein NMR-Bildgebungsverfahren sichtbar gemacht werden. Dabei wurde gezeigt, dass nach der Stimulation einer *Mimosa*-Pflanze Wasser in der unteren Hälfte des Hauptpulvinus verschwand. Das vorher in diesem Bereich vorhandene Wasser wird anscheinend zur oberen Hälfte des Hauptpulvinus transferiert. Ein Wasserfluss in Verbindung mit einer Bewegung von *Mimosa* wurde auch durch ein nichtinvasives NMR-Bildgebungsverfahren visualisiert.^[9]

1916 erhielt Ricca deutliche Hinweise darauf, dass einige mit der Blattbewegung zusammenhängende Stimulantien in der *Mimosa*-Pflanze enthalten sind.^[10] Grundlage dafür waren seine eigenen genialen Experimente an zwei Teilen eines durchtrennten Triebes der *Mimosa*-Pflanze, die über ein mit Salzwasser oder Wasser gefülltes Glasröhrchen miteinander verbunden waren. Seitdem haben viele Wissenschaftler versucht, die Stimulantien von *M. pudica* zu lokalisieren, und eine Vielzahl bioaktiver Verbindungen, von denen einige in Abbildung 3 gezeigt sind, wurden aus der *Mimosa*-Pflanze isoliert.^[3, 11–14]

Außerdem wurden viele herkömmliche Aminosäuren detektiert, von denen L-Glutaminsäure **1** interessanterweise periodische Schließ- und Öffnungsbewegungen in Intervallen von 5 bis 10 Minuten hervorruft, obwohl sie erwiesenermaßen kein echter Reizstoff der *Mimosa*-Pflanze ist.^[12] In diesem Zusammenhang ist es recht interessant, dass Nakajima et al. elektrophysiologische Versuche mit der Stängeloberfläche

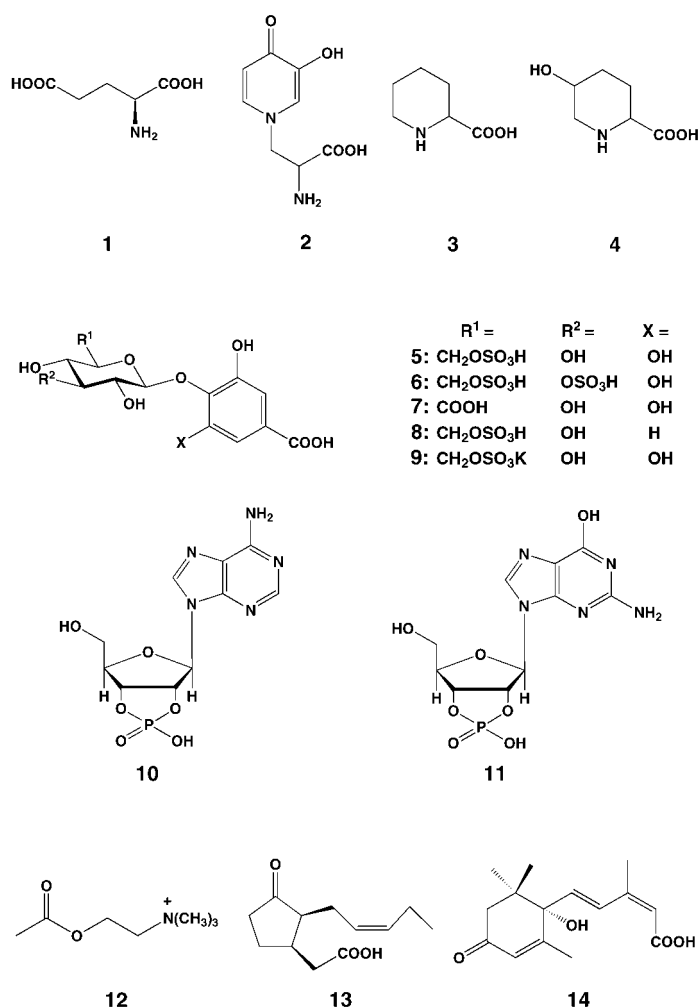


Abbildung 3. Substanzen, die als Leaf-Movement-Factors von *M. pudica* isoliert wurden.

von *M. pudica* durchgeführt haben, bei denen Natrium-L-glutamat als aktive Verbindung, die für den starken Impuls verantwortlich ist, identifiziert wurde; D-Glutamat war dagegen nicht aktiv.^[15] Die in Abbildung 3 gezeigten Stickstoffheterocyclen 2–4 standen nicht mit der Blattbewegung in Zusammenhang.^[11, 12]

Ihre großen Bemühungen bei der Suche nach den echten Leaf-Movement-Factors (LMFs) von *M. pudica* führten Schildknecht et al. im Jahre 1983 schließlich mit der Isolierung und Strukturaufklärung von vier Leaf-Movement-Factors zum Erfolg: K-PLMF 1 5, K-PLMF 2 6, S-PLMF 7 und M-LMF 8 aus *M. pudica*, *Acacia karroo*, *Oxalis stricta* u. a.^[16] K-PLMF 1 5 wurde als eine stellvertretende Verbindung von Schildknecht et al. synthetisiert.^[17] Sowohl natürliche als auch synthetische Proben zeigten eine Blattfaltungsaktivität bei einer Konzentration von 10^{-4} g L⁻¹. Außerdem erhielten Schildknecht et al. einige cyclische Nucleotide als „Leaf-Movement-Cofactors“ (10 und 11).^[3] Auf der Grundlage dieser Experimente schlugen sie schließlich vor, dass die LMFs 5–8, die so genannten Turgoline, eine neue Klasse der Pflanzenhormone zur Steuerung der nyktinastischen und seismonastischen Bewegungen darstellen. K-PLMF 1 5 mit einer freien Sulfatfunktion erscheint aber fragwürdig, da diese

Verbindung in unseren sorgfältig durchgeführten Experimenten nicht als freie Säure, sondern als Kaliumsalz aus *M. pudica*, *Cassia mimosoides* und anderen isoliert wurde.^[18] Das Kaliumsalz 9 war in Bezug auf das Zusammenfallen der Blätter von *M. pudica* aktiv, seine Aktivität (ungefähr 10^{-1} g L⁻¹) war aber sowohl in natürlichen als auch synthetischen Proben sehr gering^[19] und konnte bei Blättern anderer nyktinastischer Pflanzen gar nicht beobachtet werden. Umrath et al. 1984 erbrachten den Beweis, dass 5 nicht der wirkliche Reizstoff von *M. pudica* ist.^[20]

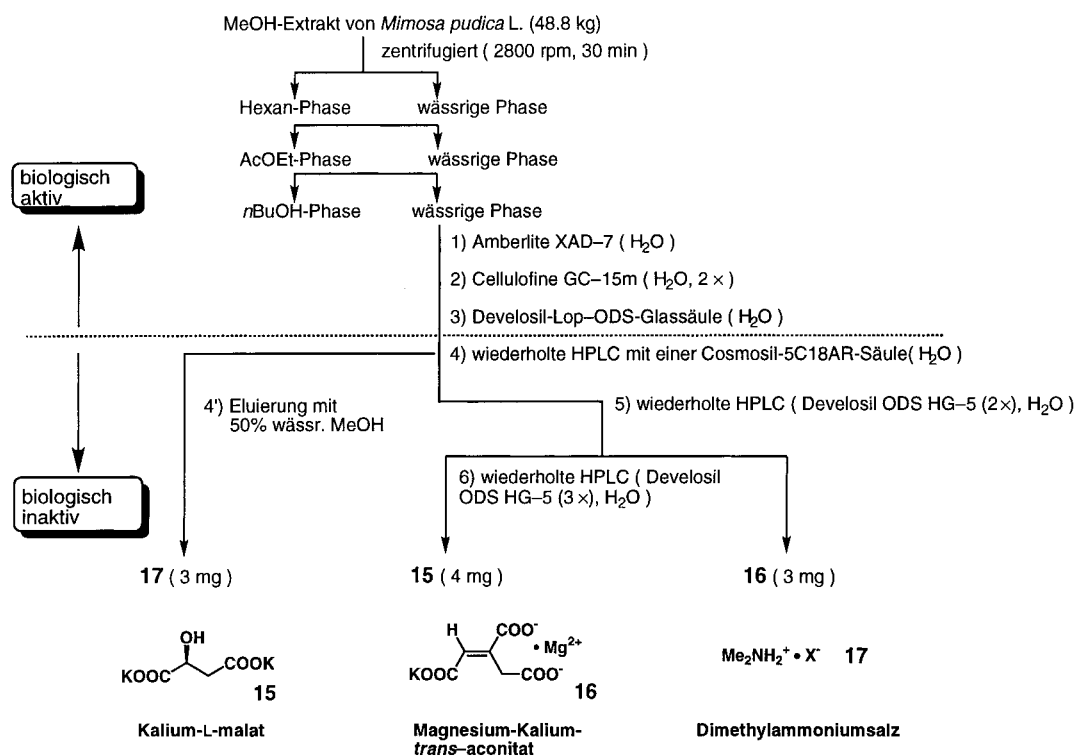
Umrath et al. extrahierten die Fiederblätter von *M. pudica* mit siedendem Wasser und chromatographierten die wässrigen Extrakte an Sephadex-LH-20-Säulen mit Methanol/Wasser (92:8) als mobiler Phase. Sie erhielten zwei bioaktive Fraktionen (die Substanzen E und G)^[20] mit einem Aktivitätsverhältnis von 80% für E und 20% für G, wobei β -Glucosidase gegenüber erstgenannter nicht wirksam war und das Versetzen mit β -Glucosidase bei G zu einem Aktivitätsverlust führte. Dieses Ergebnis zeigte, dass die hauptsächliche „Leaf-Closing-Substance“ (LCS) E, die als Reizstoff von *M. pudica* bestimmt wurde, nicht Verbindung 5 ist, deren Struktur aus einem β -glycosidisch mit Gallussäure verbundenem D-Glucose-Derivat besteht. Außerdem berichteten sie, dass die Substanz E eine instabile Oxysäure ist, die ihre Blattfaltungsaktivität bei weiterer Reinigung vollständig verlor.^[20] Somit schien es unmöglich, eine so instabile Substanz aus *M. pudica* zu isolieren. Trotzdem konnten wir kürzlich eine Lösung für dieses Problem finden, das man schon seit dem letzten Jahrhundert zu lösen versucht hatte.^[21]

Der Methanol-Extrakt von *M. pudica* wurde basierend auf dem von uns entwickelten Bioassay (Abbildung 4), der dem Fitting-Hess-Schildknecht-Test ähnelt, vorsichtig aufgetrennt.



Abbildung 4. Bioassay zur Detektion der Substanz, die die schnelle Blattbewegung von *M. pudica* induziert.

Der Test muss sorgfältig durchgeführt werden, denn die Blätter reagieren sehr empfindlich auf H⁺-Ionen – die Blätter falten sich bei Zugabe von verdünnter Schwefelsäure (10^{-2} g L⁻¹) zusammen –, Temperatur, Feuchtigkeit usw. Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu erhalten, haben wir den Bioassay im Hochsommer durchgeführt. Das Isolierungsverfahren ist in Schema 1 gezeigt, wobei im vierten Schritt, bei dem HPLC zur Anwendung kommt, jede getrennte Fraktion

Schema 1. Isolierung der Reizstoffe von *M. pudica*.

ihre Aktivität vollständig verlor, wie es Umrath et al. bereits beschrieben.^[21] Der Verlust der Bioaktivität im vierten Schritt erfolgte mit hoher Reproduzierbarkeit, sodass wir annahmen, dass mehrere Komponenten für die Blattfaltungsaktivität erforderlich sind. Deshalb wurden die Fraktionen vorsichtig eine nach der anderen miteinander vereint und durch den *Mimosa*-Test sowie ¹H-NMR-spektroskopisch überprüft. Dabei zeigte sich, dass drei Fraktionen mit der schnellen Bewegung von *M. pudica* in Zusammenhang stehen. Der eigentliche Reizstoff besteht aus drei Komponenten: 1. Kalium-L-malat **15**, 2. Magnesium-trans-aconitat **16** und 3. einem Dimethylammoniumsalz (**17**).

Die Blätter von *Mimosa* falten sich bei Zugabe der Mischung in einer Konzentration von 10⁻⁸–10⁻⁹ M sehr schnell zusammen.^[21] Außerdem sind auch Metallionen für die Aktivität wichtig. Wenn ein Calciumion an Stelle eines Magnesiumions als Gegenion von **16** verwendet wurde, zeigte die resultierende Mischung gar keine Blattfaltungsaktivität. Folglich ist die Mischung aus **15**, **16** und **17** der wahre Reizstoff, der für die schnelle Bewegung von *M. pudica* verantwortlich ist und dessen Aktivität in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Umrath et al.^[20] bei weiterer Trennung und Reinigung verschwindet. Wir nehmen an, dass **15** Umraths instabiler Oxysäure entspricht. Dieser Drei-Komponenten-Reizstoff induziert nur die schnelle Bewegung von *Mimosa*, wohingegen keine langsame Blattbewegung beobachtet wurde.

Parallel zu den „Leaf-Closing-Factors“ (LCFs) untersuchten viele Arbeitsgruppen auch die „Leaf-Opening-Factors“ (LOFs) für die nyktinastische Blattbewegung von *Mimosa*. Besonders Indolyl-3-essigsäure (IAA, „indole-3-acetic acid“) führte zur Blattoffnung von *M. pudica* bei Nacht. In den

Experimenten mit abgetrennten Fiederblättern im Dunkeln induzierte IAA eine optimale Blattoffnung bei Konzentrationen von 3 × 10⁻³ bis 5 × 10⁻⁴ M (niedrigere Konzentrationen waren unwirksam).^[22] Andererseits zeigten Tsurumi et al., dass sich die abgetrennten Fiederchen mit IAA bei 10⁻⁷ bis 10⁻⁴ M öffneten.^[23] Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten ist unklar, doch könnte die hohe Empfindlichkeit der abgetrennten Blättchen gegenüber IAA durch eine direkte Behandlung mit der IAA-Lösung zustande kommen.

Bezüglich der zirkadianen Rhythmik von *M. pudica* nimmt man an, dass IAA für den Pulvinus notwendig sein könnte, um den Effekt der Tag-Nacht-Zyklen oder die Wirkung der biologischen Uhr über eine Regulierung des osmotischen Drucks sowie auch die Erhaltung der Permeabilität der Membranen der Motorzellen des *Mimosa*-Blattgelenks zu manifestieren.^[24] Ferner zeigte Suda, dass Acetylcholin (ACh) **12** zwar das Öffnen der *Mimosa*-Blättchen bei Nacht induzieren konnte, aber nur in hohen Konzentrationen (5 × 10⁻³ M).^[25]

Die aus der *Mimosa*-Pflanze isolierte Jasmonsäure **13** (Abbildung 3) wurde mit der IAA-induzierten Blattoffnung von *Mimosa*-Blättchen in Verbindung gebracht.^[13] Jasmonsäure **13** und Abscisinsäure **14** hemmten beide bei 10⁻⁵ M sowohl die IAA- als auch die lichtinduzierte Öffnung in den Blättchen. Beide werden als Regulatoren der Blattbewegung von *Mimosa* angesehen. Aber wie es schon Umrath und Schildknecht bemerkten,^[21] müssen chemische Substanzen, die die langsamen Blattfaltungs- und Öffnungsbewegungen induzieren und sich von den Pflanzenhormonen unterscheiden, in der *Mimosa*-Pflanze enthalten sein.^[21] Wir werden diese bioaktiven *Mimosa*-Substanzen in Abschnitt 3.2 behandeln. Die Blattbewegung anderer nyktinastischer Pflanzen,

die ihre Blätter entsprechend der zirkadianen Rhythmik frühmorgens öffnen und nachts schließen, scheint viel einfacher als bei *M. pudica* zu sein.

3. Leaf-Movement-Factors in nyktinastischen Pflanzen

Für die Steuerung der nyktinastischen Bewegung wurden Schildknechts Turgorine verantwortlich gemacht, die die Blattfaltung der Pflanzen induzieren.^[3] Wir haben aber gezeigt, dass es sich dabei nicht um Leaf-Movement-Factors handelt und die nyktinastische Bewegung durch eine Substanz reguliert wird, die je nach Pflanzenart unterschiedlich ist. Unsere aktuellen Ergebnisse stimmen mit der Hypothese von Umrath et al. überein, wonach jede Pflanzenfamilie oder -unterfamilie ihren eigenen LMF hat, der nur bei den Pflanzen dieser Familie wirksam ist. Sie konnten diese physiologisch bedeutsame Ansicht allerdings nicht durch die Identifizierung eines Leaf-Movement-Factors untermauern.^[20]

Wir haben versucht, die wirklichen LMFs von nyktinastischen Pflanzen zu isolieren. Ein wichtiges Problem bei Schildknechts chemischen Untersuchungen zur Nyktinastie liegt in der Verschiedenartigkeit der Pflanze, die im Bioassay eingesetzt wird, und der, die für die Extraktion verwendet wird. Sie verwendeten Blätter von *Mimosa* zur Bestimmung der Blattfaltungsaktivität aller nyktinastischen Pflanzen. Wenn Umraths Hypothese richtig ist, muss die im Bioassay verwendete Pflanze mit der extrahierten Pflanze identisch sein. Zur Detektion der LMFs nyktinastischer Pflanzen haben wir einen Bioassay entwickelt, bei dem die Originalblätter verwendet werden. Auch die Bewegungen der Blätter, die von jedem Stängel entfernt wurden und in Wasser eingetaucht wurden, folgten der zirkadianen Rhythmik. Die jungen Blätter der zu untersuchenden nyktinastischen Pflanze wurden in destilliertes Wasser getaucht und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Blätter, die sich am nächsten Morgen wieder öffneten, wurden für den Bioassay eingesetzt. Die Blätter, die sich tagsüber zusammenfalteten, dienten zur Bewertung der Bioaktivität (Abbildung 5).

Die bioaktive Substanz führt wenige Stunden nach Zugabe zum Zusammenfallen der Blätter. Bei der Isolierung bemerkten wir, dass eine nyktinastische Pflanze neben der „Leaf-Closing-Substance“ (LCS) auch eine „Leaf-Opening-Substance“ (LOS) enthält. Daher müssen wir den Leaf-Movement-Factor in zwei Kategorien aufteilen, wobei eine aus der LCS besteht, die das Pflanzenblatt sogar tagsüber schließt, und die andere aus der LOS, die das Pflanzenblatt sogar bei Nacht öffnet.

Das Vorhandensein von LCSs zeigt, dass die nyktinastische Bewegung nicht nur durch eine Konzentrationsänderung des Leaf-Closing-Factors kontrolliert wird, sondern auch durch die kompetitive Wechselwirkung zwischen den Leaf-Closing- und Leaf-Opening-Substanzen. Die Vorstellung von der Koexistenz einer LOS mit einer LCS scheint in Bezug auf das zuvor erwähnte Ergebnis, dass Kaliumionen über unterschiedlich regulierte Ionenkanäle in die Pflanzenzellen eindringen und sie wieder verlassen,^[8] sehr vernünftig.

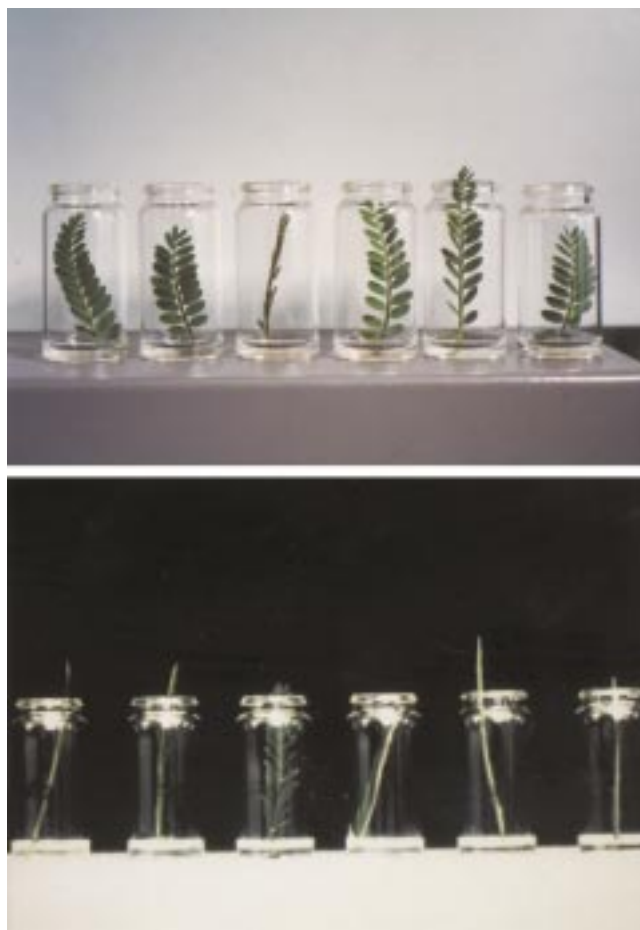


Abbildung 5. Bioassay zur Detektion der für die Nyktinastie verantwortlichen Substanz; Leaf-Closing-Substance (LCS, oben) und Leaf-Opening-Substance (LOS, unten).

3.1. Die Isolierung der Leaf-Movement-Factors

Die schwierigste Aufgabe bei den chemischen Untersuchungen der nyktinastischen Bewegung liegt in der Isolierung der Substanzen, die für die Blattfaltung und -öffnung verantwortlich sind. Die Schwierigkeit bei der Isolierung besteht darin, dass beim Bioassay nur eine schwache biologische Aktivität des Pflanzenextrakts beobachtet wird. Wir vermuteten, dass diese schwache Bioaktivität von der Koexistenz der LOS mit der LCS in der gleichen Fraktion herrührt. Wenn beide in der gleichen Fraktion zusammen vorliegen, sollten sich die jeweiligen Bioaktivitäten gegenseitig aufheben und infolgedessen keine Bioaktivität messbar sein. Alle vorherigen Versuche zur Reinigung der LCS wurden mit einer Kombination aus Gelfiltrationschromatographie und HPLC durchgeführt. Vermutlich schlugen all diese Isolierungsversuche deshalb fehl, weil nicht probiert wurde, die LCS von der LOS zu separieren. Daher ist es äußerst wichtig, diese entgegengesetzt bioaktiven Substanzen im ersten Schritt des Isolierungsverfahrens voneinander zu trennen.

Wir haben versucht, die Polymergelchromatographie zur Trennung der LOS und LCS anzuwenden. Nachdem viele Trennungsbedingungen untersucht worden waren, konnten die beiden Substanzen durch Säulenchromatographie an

Amberlite XAD-7 dank ihrer Polaritätsunterschiede getrennt werden. Das Ergebnis war sehr zufriedenstellend: Die stark polare Leaf-Closing-Substance wurde mit 100 % H₂O eluiert, während die weniger polare Leaf-Opening-Substance mit dem MeOH-haltigen Elutionsmittel eluiert wurde. Der Bioassay lieferte im ganzen Verlauf der Isolierung eindeutige Ergebnisse.

Nach der Trennung der beiden bioaktiven Fraktionen mit der Aktivität zur Blattfaltung und -öffnung wurde jede bioaktive Fraktion durch Gelfiltrationschromatographie oder MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) an einer Octadecylsilyl(ODS)-Glassäule oder präparative HPLC an einer ODS-Säule getrennt. Besonders die HPLC mit einer Kombination aus drei Säulen ergab eine sehr gute Trennung, die es uns ermöglichte, die Leaf-Closing-Substance zu isolieren. Diese Strategie führte bei der Isolierung mehrerer bioaktiver Substanzen zur Steuerung der Blattbewegung von nyktinastischen Pflanzen zum Erfolg (Abbildung 6).

3.2. Leaf-Movement-Factors von *Mimosa pudica* L.

Eine weitere nyktinastische Blattbewegung von *Mimosa* wurde bisher vernachlässigt, da man glaubte, dass diese – langsame – Bewegung durch die gleichen chemischen Substanzen verursacht wird wie die schnelle Bewegung.^[3] Aus diesem Grund wurden die beiden Blattbewegungen von *Mimosa* oft durcheinander gebracht. Wir haben die tatsächlichen Eigenschaften der Leaf-Movement-Factors von *Mimosa* aufgedeckt und gezeigt, dass die schnelle und die langsame Blattbewegung von *Mimosa* durch unterschiedliche Substanzen verursacht werden.

Unser in Abschnitt 2 beschriebener Drei-Komponenten-Reizstoff induzierte nur die schnelle Bewegung der *Mimosa*-Blätter, und auch bei einer Schwellenkonzentration wurde

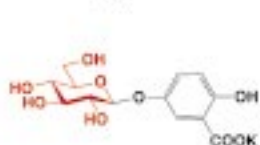
keine Blattfaltung beobachtet. Daher nahmen wir an, dass die bioaktive Substanz, die die nyktinastische Blattbewegung reguliert, auch in *Mimosa* enthalten sein müsste. Wie bereits erwähnt haben Umrath et al. den schwachen Leaf-Closing-Factor G aus *M. pudica* erhalten.^[20] Wir nahmen an, dass die Substanz G die Leaf-Closing-Substance von *M. pudica* ist, die eine Nyktinastie induziert.

Zur Trennung der LMFs wurde ein modifizierter Bioassay verwendet. Wir verwendeten ein *Mimosa*-Blatt, das an der Lamina abgetrennt war, anstelle eines vierfach gefiederten Blattes und führten den Bioassay in einem Glasröhrchen durch, weil sich das *Mimosa*-Blatt bei der langen Dauer des Bioassays schon bei leichtem Wind zusammenfaltet. Diese Methode war nicht so empfindlich wie die vorherige Methode unter Verwendung des vierfach gefiederten Blattes, aber ihre Reproduzierbarkeit war zufriedenstellend.

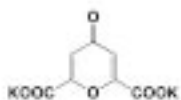
Nach der Trennung mit XAD-7 wurden Fraktionen mit hoher Blattfaltungsaktivität erhalten. Es wurde aber nur die seismonastische Aktivität, die die schnelle Blattfaltung induziert, beobachtet. Wir nahmen an, dass die nyktinastische Aktivität, die die langsame Blattfaltung induziert, durch die hohe Aktivität, die von den Reizstoffen herrührt, überdeckt werden könnte. Für die Detektion der nyktinastischen Blattfaltungsaktivität war es äußerst wichtig, diese beiden Bioaktivitäten voneinander zu trennen (Schema 2).

Basierend auf den Arbeiten von Umrath et al.^[20] haben wir die Gelfiltrationschromatographie mit Toyopearl HW-40S zur Trennung der Reizstoffe und Leaf-Closing-Substances eingesetzt. Wir nahmen an, dass die Reizstoffe Umraths Substanz E entsprechen und die LCS (18) Substanz G.^[27] Auch die LOS aus *M. pudica* wurde isoliert.^[28] Man vermutete, dass die hohe Blattfaltungsaktivität die Bioaktivität der Leaf-Opening-Substance verdeckt. Deshalb wurde die *n*-Butanol-Phase, die fast keine Reizstoffe enthält, durch HPLC getrennt; daraus wurde dann Mimopudin 19 erhalten.

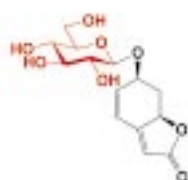
Leaf-Closing-Substances



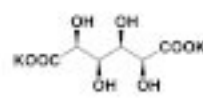
Kalium-5-O- β -glucopyranosylgenistein 18 aus *Mimosa pudica* L.



Kaliumchelidonat 20 aus *Cassia mimosoides* L., *Cassia occidentalis* L.

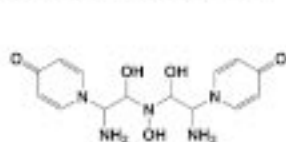


Phyllanthurinolacton 22 aus *Phyllanthus urinaria* L.

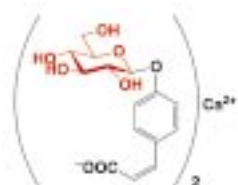


Kalium-o-Idarat 24 aus *Lepedeza cuneata* G. Don

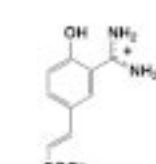
Leaf-Opening-Substances



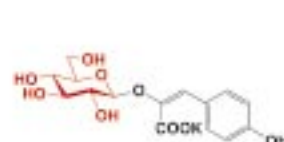
Mimopudin 19 aus *Mimosa pudica* L.



Calcium-4-O- β -D-glucopyranosyl-cis-p-cumarat 21 aus *Cassia mimosoides* L.

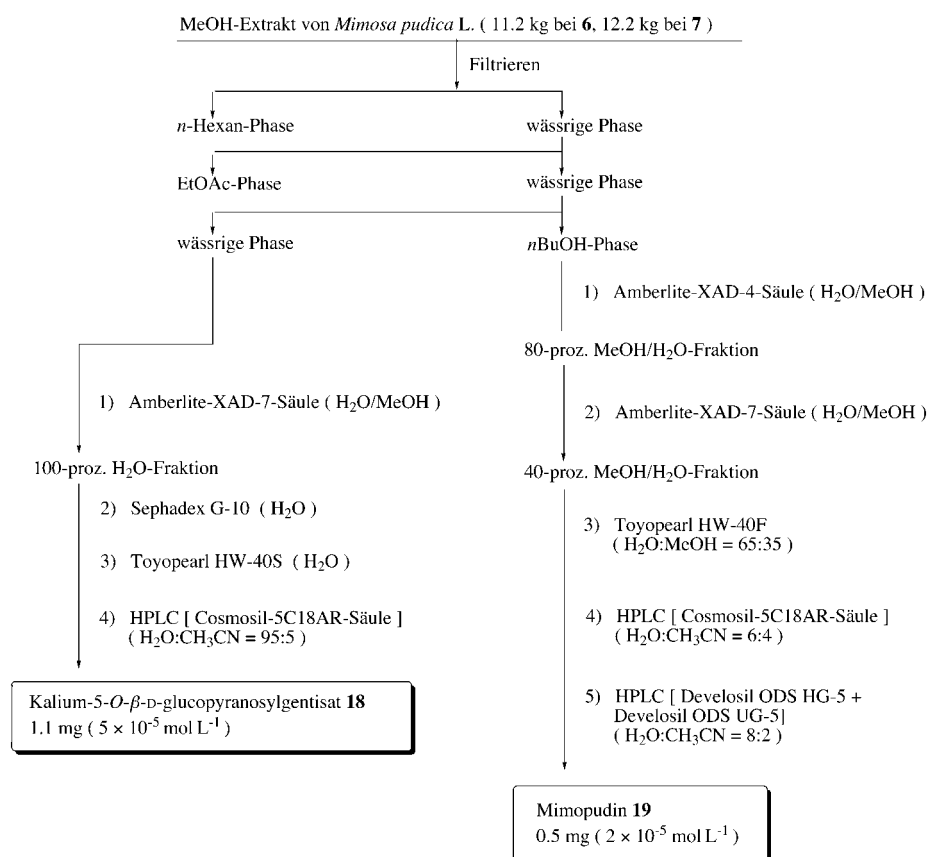


Phyllurin 23 aus *Phyllanthus urinaria* L.



Kaliumlespedezat 25 aus *Lepedeza cuneata* G. Don

Abbildung 6. Vier LMF-Paare von Verbindungen, die die nyktinastische Blattbewegung der Pflanzen steuern. Jedes Paar wurde aus der gleichen nyktinastischen Pflanze isoliert. (Siehe auch Abschnitt 4.)



Schema 2. Verfahren zur Isolierung der Leaf-Closing-Substance (LCS) und Leaf-Opening-Substance (LOS) von *M. pudica*.

Die Strukturen von **18** und **19** wurden NMR-spektroskopisch und ESI-massenspektrometrisch aufgeklärt. **19** war in wässrigen Lösungen instabil und zerfiel leicht zu Pyridon. Bei der Strukturbestimmung von **19** erwies sich ein ESI-gekoppeltes Scan-Experiment als nützlich (Abbildung 7).^[28]

Verbindung **18** war bezüglich der Blattfaltung von *M. pudica* nachts mit 5×10^{-5} M recht wirksam, und **19** war für die

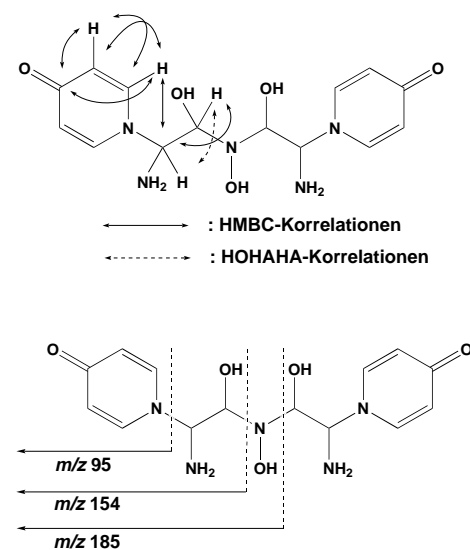


Abbildung 7. Durch HMBC- und HOHAHA-NMR-Experimente (oben) und Scan-gekoppelte ESI-Massenspektrometrie (unten) wurde die Struktur von Mimopudin **19** bestimmt.

Blattöffnung der gleichen Pflanze bei 2×10^{-5} M am Tage wirksam, aber keine von beiden zeigte bei anderen nyktinastischen Pflanzen eine Wirkung. **18** induzierte nur das langsame Zusammenfallen des *Mimosa*-Blattes.^[27]

Interessanterweise reagierten die Blätter von *M. pudica*, die nachts mit **19** offen gehalten wurden, tagsüber bei Berührung auf physikalische Reize. Dies lässt vermuten, dass **19** nur für die Blockierung der langsamen Bewegung zur Blattfaltung wirksam ist, aber nicht für die schnelle seismonastische Bewegung. Wir waren nun in der Lage, diese beiden Blattbewegungen auf molekularer Ebene voneinander zu trennen und zu zeigen, dass die langsame nyktinastische Bewegung von *Mimosa* durch einen anderen Mechanismus als den für die schnelle seismonastische Bewegung initiiert wird.^[28]

Wir waren somit bei der Identifizierung der chemischen Substanzen für die schnelle und langsame Blattbewegung von *Mimosa*, die seit mehr als 80 Jahren diskutiert wurden, erfolgreich.

3.3. Leaf-Movement-Factors von *Cassia mimosoides* L.

Wie schon der Name sagt – *Cassia mimosoides* und *Mimosa* ähneln einander. Dennoch reagieren die Blätter von *C. mimosoides* nicht auf physikalische Reize. Nur die nyktinastische Bewegung kann man bei dieser Pflanze beobachten. Kaliumchelidonat **20** wurde als Leaf-Closing-Substance aus *C. mimosoides* isoliert.^[18] Man hat **20** auch in *Cassia occidentalis* L. gefunden.^[8] Dies weist auf die Universalität des Leaf-Movement-Factors innerhalb der Pflanzengattung hin.

Natürliches und synthetisches **20** induzierte tagsüber das Zusammenfallen der *Cassia*-Blätter bei 10^{-6} – 10^{-7} M. Interessanterweise zeigten sowohl das entsprechende Natriumsalz als auch die freie Säure keine Bioaktivität. Ebenso zeigten Kaliumacetat, Kaliumoxalat und das Kaliumsalz von Phloroglucin keine Blattfallungsaktivität in der Pflanze. Also sind beide, das Kaliumion und das Chelidonat, für die Bioaktivität notwendig. Kaliumchelidonat **20** spielt als „Turgorin“ eine wichtige Rolle bei der Blattbewegung der nyktinastischen Pflanzen *C. mimosoides* und *C. occidentalis*.

Auch Calcium-4-*O*-β-D-glucopyranosyl-*cis-p*-cumarat **21** wurde als Leaf-Opening-Substance aus *C. mimosoides* isoliert.^[29] Wurden stark polare Lösungsmittel bei der Isolierung verwendet, so verlor **21** seine Bioaktivität, da die Gegenkationen, die vom Carboxylat von **21** abdissozieren, während des Trennprozesses mit polaren Lösungsmitteln gegen andere

Kationen ausgetauscht werden. Wir konnten die Dissoziation der Carboxylatgruppe durch Verwendung apolarer Lösungsmittel bei der Isolierung von **21** unterdrücken. **21** öffnete die Blätter von *C. mimosoides* nachts bei einer Konzentration von 4×10^{-6} M. Das Kaliumsalz von **21**, das zusammen mit **21** isoliert wurde, zeigte keine biologische Aktivität, und Calciumacetat war erst bei 1×10^{-2} M wirksam. Also waren beide, das Calciumion und sein Gegenion, für die Bioaktivität von **21** erforderlich.

3.4. Leaf-Movement-Factors von *Phyllanthus urinaria* L.

Phyllanthurinolacton **22**^[30] und Phyllurin **23**^[31] wurden als Leaf-Closing- bzw. Leaf-Opening-Substance aus der nyktinastischen Pflanze *Phyllanthus urinaria* L. isoliert, die zur *Euphorbiaceae*-Familie gehört. Da andere LCSs aus der Familie der *Fabaceae* (Schmetterlingsblütler) isoliert wurden, wäre es interessant, die Unterschiede in der chemischen Struktur der LMFs zwischen diesen beiden Pflanzenfamilien zu untersuchen. Aufgrund der Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Pflanzenfamilien unterscheiden sich die Strukturen der bioaktiven Substanzen sehr von denen anderer nyktinastischer Pflanzen, die zu den Hülsenfrüchtlern (Leguminosen) gehören.

Die Strukturen von **22** und **23** wurden durch 2D-NMR-Experimente aufgeklärt. Die absolute Konfiguration von **22** wurde auf der Grundlage der Totalsynthese von Mori et al.^[32, 33] bestimmt. Sie synthetisierten auch alle möglichen Stereoisomere in Bezug auf die Diolgruppierung des Aglycons. Bioaktivität wurde nur bei der natürlichen *syn*-(6*S*,7*aR*)-Form nachgewiesen. Tagsüber war Phyllanthurinolacton **22** bei der Blattfaltung von *P. urinaria* bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M wirksam und Phyllurin **23** bei der Blattöffnung bei 5×10^{-5} M.

3.5. Leaf-Movement-Factors von *Lespedeza cuneata* G. DON.

Kalium-D-idarat **24** wurde als LCF^[34] isoliert, und sowohl Kaliumlespedezat **25** als auch Kaliumisolespedezat (**28**, Diastereomer von **25**) wurden mit dem Bioassay für die Blätter von *C. mimosoides* als LOS^[35] von *L. cuneata* identifiziert.

Wegen der Steifheit des Stängels wurde die Probenlösung nur schlecht von den Blättern von *L. cuneata* transportiert, weshalb der Bioassay nicht angewendet werden konnte. Wir verwendeten die Blätter von *C. mimosoides* an Stelle der von *L. cuneata*, um diese experimentelle Erschwernis zu überwinden. Die Bioaktivitäten von **24**, **25** und **28** waren mit 5×10^{-7} M am Tage recht spezifisch für die Blätter von *C. mimosoides*.

Die Konfiguration von **24** wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten und der Bioaktivität mit denen verschiedener Kaliumtetrahydroxydicarboxylate, die aus D-Hexosen hergestellt wurden, bestimmt. Alle anderen Diastereomere sind biologisch inaktiv oder nur sehr schwach aktiv.^[34] Die Bioaktivität von **24** ist also in Bezug auf die Konfiguration spezifisch.

Die Verbindungen **25** und **28** waren die ersten Leaf-Opening-Substances, die aus nyktinastischen Pflanzen isoliert wurden. Zur Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurden verschiedene Analoga von **25** synthetisiert und durch den Bioassay untersucht (Abbildung 8).^[36] Die Bioaktivitäten der Natriumsalze und freien Säuren waren so hoch

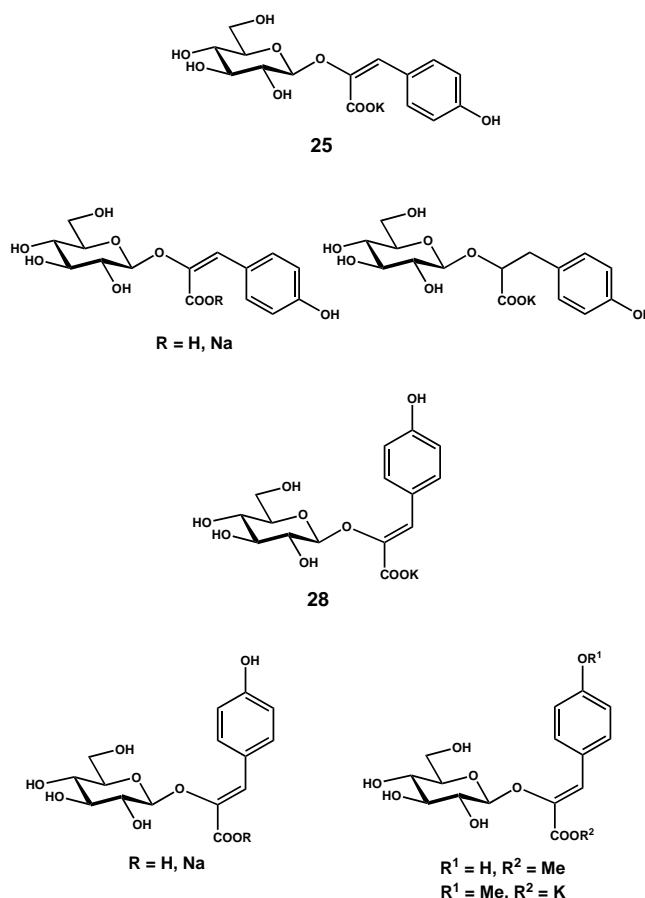
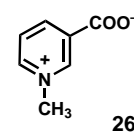


Abbildung 8. Kaliumlespedezat **25**, Kaliumisolespedezat **28** und ihre Analoga.

wie die der natürlichen Stoffe. Interessanterweise führten 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure **29** und ihr Kaliumsalz **30** bei einer Konzentration von 10^{-4} M sogar nachts zur Öffnung der Blätter. Außerdem zeigte sich bei Variation der Zuckereinheit in **25** fast die gleiche Bioaktivität wie für **25**.^[37] Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass eines der für die Blattöffnungsaktivität wichtigsten Strukturelemente eine 4-Hydroxyphenylpyruvateinheit in der Enolform ist.^[36, 37] Die Zuckereinheit dient nur zur Verbesserung der Löslichkeit und Stabilisierung der Doppelbindung an der Enolfunktion.

3.6. Trigonelline aus *Aeschynomene indica*

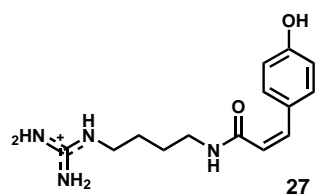
Wir haben Trigonellin **26** als Leaf-Closing-Factor der nyktinastischen Pflanze *Aeschynomene indica* isoliert.^[38] **26** war bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M beim Zusammenfallen der Blätter von *A. indica* wirksam.



Trigonellin **26** soll auch ein G2-Faktor sein, der in den Keimblättern von Gartenerbsen vorkommt und die Hemmung des Zellwachstums sowohl in den Wurzeln als auch in den Trieben in der G2-Phase des Zellzyklus fördert.^[39] **26** fördert die Hemmung des Zellwachstums in der G2-Phase in 40% aller Wurzelzellen. In Abwesenheit von **26** wird diese Zellpopulation in der G1-Phase gehalten. Tramontano et al. berichteten, dass **26** das erste chemisch identifizierte „Hormon“ sei, das den Zellzyklus in Pflanzen oder Tieren steuert.^[39c] Diese Ergebnisse sind sehr interessant im Hinblick auf die Beziehung zwischen dem Zellzyklus und der biologischen Uhr.

3.7. *cis-p*-Cumaroylagmatin, die Leaf-Opening-Substance in *Albizia julibrissin* DURAZZ

Die nyktinastische Blattbewegung des Seidenbaums, *Albizia julibrissin* DURAZZ, ist als schnelle Bewegung der *Mimosa*-Blätter bekannt. Wir haben *cis-p*-Cumaroylagmatin **27** aus *A. julibrissin* als Leaf-Opening-Substance isoliert.^[40] Unter Einwirkung von **27** (5×10^{-6} M) blieben die Blätter geöffnet. Wir konnten außerdem zeigen, dass eine unbekannte Leaf-Closing-Substance im Extrakt dieser Pflanze enthalten ist.



Es ist interessant, dass *A. julibrissin* nur das thermodynamisch instabile *Z*-Isomer und nicht das *E*-Isomer enthält. *cis-p*-Cumaroylagmatin **27** und sein *trans*-Isomer wurden aus Agmatin und *cis-p*-Cumarsäure synthetisiert.^[41] Synthetisch hergestelltes **27** weist die gleiche Aktivität auf wie eine Probe von natürlichem **27**, und das synthetische *trans*-Isomer von **27** führte bei hohen Konzentrationen (1×10^{-3} M) zur Öffnung der Blätter von *A. julibrissin*.

4. Allgemeine Eigenschaften der Leaf-Movement-Factors (LMFs)

Man ging lange Zeit davon aus, dass Turgorin, ein für die Blattfaltung verantwortliches Pflanzenhormon, das allen nyktinastischen Pflanzen gemeinsam ist, die nyktinastische Blattbewegung steuert. Es zeigte sich aber, dass sich die Leaf-Closing-Substances (LCS) der nyktinastischen Pflanzen voneinander unterscheiden. Es gibt auch Leaf-Opening-Substances (LOS), die mit den LCSs bei der Steuerung der Blattbewegung nyktinastischer Pflanzen konkurrieren.

Es ist von größter Bedeutung, dass die Bioaktivität aller Leaf-Movement-Factors spezifisch für die jeweilige Pflanze ist; diese Substanzen waren bei anderen nyktinastischen Pflanzen unwirksam. Entgegen Schildknechts Theorie hat jede nyktinastische Pflanze ihre eigenen Leaf-Opening- und

Leaf-Closing-Substances, und die Nyktinastie wird nicht durch Pflanzenhormone, sondern durch diese spezifischen Verbindungen gesteuert.

Wichtig ist auch, dass sowohl LCS als auch LOS aus einer nyktinastischen Pflanze isoliert wurden, wie es im Fall von *Mimosa pudica*,^[27, 28] *Cassia mimosoides*,^[18, 29] *Lespedeza cuneata*^[34, 35] und *Phyllanthus urinaria* gezeigt wurde.^[30, 31] Einer der beiden LMFs ist immer ein Glycosid (siehe Abbildung 6). Es gibt zwei Arten von nyktinastischen Pflanzen, wobei die eine eine glycosidische Leaf-Closing-Substance (z.B. bei *M. pudica* und *P. urinaria*) enthält und die andere eine glycosidische Leaf-Opening-Substance (z.B. bei *C. mimosoides* und *L. cuneata*).

Die Leaf-Opening-Substances unterscheiden sich in ganz bestimmten Aspekten von Indolyl-3-essigsäure (IAA), von der man annahm, dass sie die Blattöffnung nyktinastischer Pflanzen induziert:^[22] 1. Die Bioaktivität der Leaf-Opening-Substances (ca. 1×10^{-6} M) war viel größer als die von IAA ($> 1 \times 10^{-4}$ M). 2. Die Bioaktivität der LOS war für die Pflanzengattung spezifisch, die von IAA hingegen unspezifisch.

L-Tryptophan, das auch als schwache LOS aus einigen nyktinastischen Pflanzen isoliert wurde,^[28, 31] war ähnlich wie IAA bei Konzentrationen von 1×10^{-4} M an den Blättern aller nyktinastischen Pflanzen wirksam. Die Bioaktivität von L-Trp wird IAA zugeschrieben, die als wichtiger Metabolit von L-Trp bekannt ist. Der Bioassay wurde durch Zugabe der Probenlösung um 11.00 Uhr vormittags ausgeführt und die Bioaktivität über die Öffnung der Blätter um 21.00 Uhr geprüft. Die lange Dauer, die zur Bestimmung der Blattöffnungsaktivität notwendig war, ist somit für den Abbau von L-Trp zu IAA ausreichend. Daher dürfte L-Trp keine wirkliche LOS sein. Außerdem haben diese LMFs sechs Eigenschaften gemeinsam:

1. Die Menge ist immer sehr gering; einige Milligramm der LMFs wurden aus ca. 10 kg Pflanzenmaterial isoliert.
2. Bei einer Konzentration von ungefähr 10^{-6} – 10^{-7} M zeigen alle bioaktiven Substanzen ihre Wirkung nur bei den Pflanzen, aus denen sie stammen. Diese Konzentration ist fast die gleiche wie die von bekannten Pflanzenhormonen wie IAA und Gibberellin.
3. Die Bioaktivität aller LMFs ist für die Pflanze, aus der sie isoliert wurden, spezifisch.
4. Alle Leaf-Closing-Substances haben eine gemeinsame physiologische Eigenschaft. Sie konkurrieren mit IAA bei 10^{-6} M, aber um einen kompetitiven Zustand zu erreichen, sind viel höhere Konzentrationen an IAA erforderlich (ca. 10^{-4} M), als dem natürlichen Anteil von IAA in einem Pflanzenkörper entspricht.
5. Die Bioaktivität dieser Verbindungen hängt von ihrer Konfiguration ab. Optisch aktives **22** und **24** waren die einzigen bioaktiven Substanzen unter ihren Stereoisomeren. Dies lässt vermuten, dass ein spezifischer Rezeptor am Prozess der Signaltransduktion durch diese Substanzen teilnimmt.
6. Die Leaf-Opening-Substance konkurriert mit der Leaf-Closing-Substance (Tabelle 1 und 2). Wenn die Konzentration der LCS größer war als die der LOS, wurden die Blätter am Tage geschlossen und umgekehrt.

Tabelle 1. Die kompetitive Wechselwirkung zwischen **20** und **21**.^[a]

	Konzentration von 20 [mol L ⁻¹]	Verhältnis von 20 zu 21					Kontrollprobe
		1:0	1:0.2	1:1	1:5	0:1	
Tagsüber	1 × 10 ⁻³	--	--	++	++	++	++
	1 × 10 ⁻⁶	--	--	++	++	++	
Nachts	1 × 10 ⁻³	--	--	+-	++	++	--
	1 × 10 ⁻⁶	--	--	--	++	++	

[a] Die Skala reicht von „vollständig geöffnet“ (+ +) bis „vollständig geschlossen“ (– –).

Tabelle 2. Kompetitive Wechselwirkung zwischen **24** und **25**.^[a]

	Konzentration von 24 [mol L ⁻¹]	Verhältnis von 24 zu 25					Kontrollprobe
		1:0	1:0.5	1:1	0.5:1	0:1	
Tagsüber	1 × 10 ⁻⁴	--	--	--	++	++	
	1 × 10 ⁻⁵	--	--	+-	++	++	
	1 × 10 ⁻⁶	--	--	+-	++	++	
Nachts	1 × 10 ⁻⁴	--	--	++	++	++	
	1 × 10 ⁻⁵	--	--	+-	+	++	--
	1 × 10 ⁻⁶	--	--	+-	+-	++	

[a] Die Skala reicht von „vollständig geöffnet“ (+ +) bis „vollständig geschlossen“ (– –).

5. Chemische Steuerung der Blattbewegung in nyktinastischen Pflanzen

Vom chemischen Standpunkt betrachtet ist die wichtigste Frage, wie eine biologische Uhr die nyktinastische Blattbewegung durch diese Verbindungen steuert. Wir haben zwei Leaf-Movement-Factors mit entgegengesetzten Bioaktivitäten aus der gleichen nyktinastischen Pflanze isoliert. Dies war überraschend und lässt sich nicht mit der Theorie von Schildknecht vereinbaren.^[3] Die Entdeckung der Leaf-Opening-Substances von nyktinastischen Pflanzen veranlasste uns zur Annahme, dass die nyktinastische Blattbewegung durch eine kompetitive Wechselwirkung zwischen Leaf-Closing-Substance und Leaf-Opening-Substance gesteuert wird. Es konnte gezeigt werden, dass LOS und LCS tatsächlich miteinander konkurrieren. Wie oben beschrieben, wurden vier Paare von LMFs aus den vier Pflanzen *Mimosa pudica* L., *Lespedeza cuneata* G. DON, *Cassia mimosoides* L. und *Phyllanthus urinaria* L. isoliert (Abbildung 6). Wir gingen davon aus, dass sich die Konzentration dieser beiden „Gegenspieler“ im Laufe eines Tages ändert.

Außerdem haben wir die wichtige Entdeckung gemacht, dass Pflanzenextrakte aller tagsüber und nachts gesammelten nyktinastischen Pflanzen entgegengesetzte Bioaktivitäten zeigten; die ersten führten zur Blattöffnung, die letzteren zur Blattfaltung.^[41–44] Die Bioaktivität des Pflanzenextrakts reflektiert den Zustand der gesammelten Blätter; so zeigte der Extrakt mit den geschlossenen Blättern Blattfaltungsaktivität.

Vermutlich werden diese bioaktiven Substanzen nicht gespeichert, sondern mit der Zeit metabolisiert. Die enzymatische Umwandlung beim Metabolismus müsste durch eine biologische Uhr gesteuert werden. Daher sollten uns die chemischen Untersuchungen dieser Umwandlung einen wichtigen Hinweis dafür liefern, wie die Blattbewegung durch eine biologische Uhr chemisch gesteuert wird.

Als Beispiele diskutieren wir in den folgenden beiden Abschnitten den chemischen Mechanismus für die Steuerung der Nyktinastie von *Lespedeza cuneata* G. DON^[42] und *Phyllanthus urinaria* L.^[44]

5.1. Die chemische Steuerung der Nyktinastie in *Lespedeza cuneata* G. DON

Die Extrakte von Blättern von *L. cuneata*, die tagsüber (ungefähr um 10.00 Uhr) und abends (ungefähr um 19.00 Uhr) gesammelt wurden, wiesen eine entgegengesetzte Bioaktivität auf; genauer gesagt, zeigte der erste Extrakt eine Blattöffnungsaktivität und der andere eine Blattfaltungsaktivität. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich in diesen beiden Extrakten umgekehrte Konzentrationsverhältnisse von **24** zu **25** (oder **28**, dem *cis*-Isomer von **25**) finden.^[41, 42] Eine HPLC-Analyse ergab, dass der Extrakt der tagsüber gesammelten Blätter die doppelte Menge an **25** und **28** enthielt wie der Extrakt der nachts gesammelten Blätter (Tabelle 3). Diese doppelte Konzentrationserhöhung von **25**

Tabelle 3. Quantitative HPLC-Analyse der Konzentration an **25**, **28** und **29** in tagsüber und nachts gesammelten Exemplaren von *Lespedeza cuneata* G. DON.

Zeitpunkt	Konzentration [mol L ⁻¹]		
	25	28	29
Tagsüber	2.7 × 10 ⁻⁵	4.1 × 10 ⁻⁵	2.5 × 10 ⁻⁵
Nachts	2.7 × 10 ⁻⁵	1.8 × 10 ⁻⁵	1.2 × 10 ⁻⁴

und **28** reicht aus, um die Bioaktivität des Extrakts aus dem Vergleichsexperiment zwischen **24** und **25** umzukehren. Wie in Tabelle 2 gezeigt ist, wechselwirkt Kalium-D-Idarat **24**, eine Leaf-Closing-Substance aus *L. cuneata*, kompetitiv mit Kaliumlespedezat **25**, einer Leaf-Opening-Substance der gleichen Pflanze. Wenn die Konzentration von **24** höher war als die von **25**, waren die Blätter tagsüber geschlossen und umgekehrt. Demnach werden sowohl **25** als auch **28** abends metabolisiert und morgens biosynthetisiert.

Außerdem haben wir herausgefunden, dass sich die Konzentrationen von **25** und **28** in der Pflanze zu der von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure **29** umgekehrt proportional verhalten (Tabelle 3). Die Wirksamkeit von **29** (5 × 10⁻⁵ M) betrug etwa ein Hundertstel von der von **25** (und **28**) bei beginnender Blattöffnung (8 × 10⁻⁷ M). Der Extrakt der nachts gesammelten Blätter enthielt die fünffache Menge an **29** des Extrakts der tagsüber gesammelten Blätter. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass **25** morgens aus **29** biosynthetisiert wird und abends durch enzymatische Hydrolyse zu **29** metabolisiert (und damit deaktiviert) wird (Abbildung 9). Der Mechanismus der Zellkontraktion bei der nyktinastischen Blattbewegung ist unklar, aber wir nehmen an, dass er der seismonastischen Bewegung von *Mimosa* ähnelt.^[45]

Dieses neue Modell zur Regulierung der Blattbewegung wird durch Messungen der β -Glucosidase-Aktivität des ungereinigten Enzyms gestützt, das aus tagsüber und nachts gesammelten Pflanzen hergestellt wurde.^[42, 43] Wir haben die

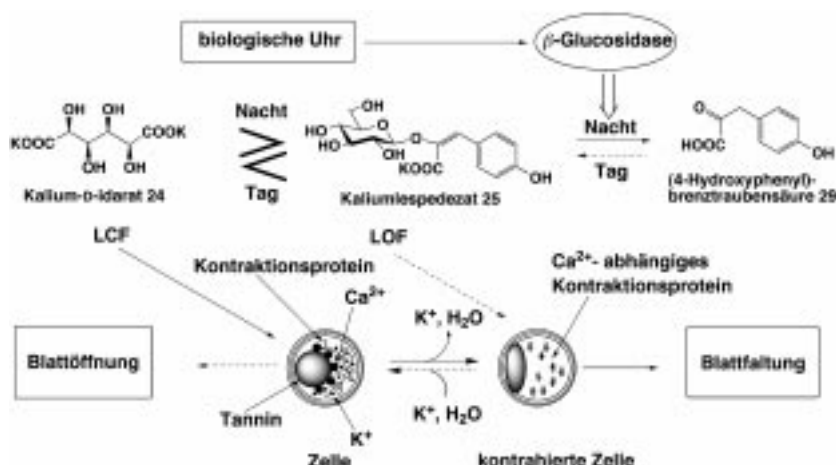
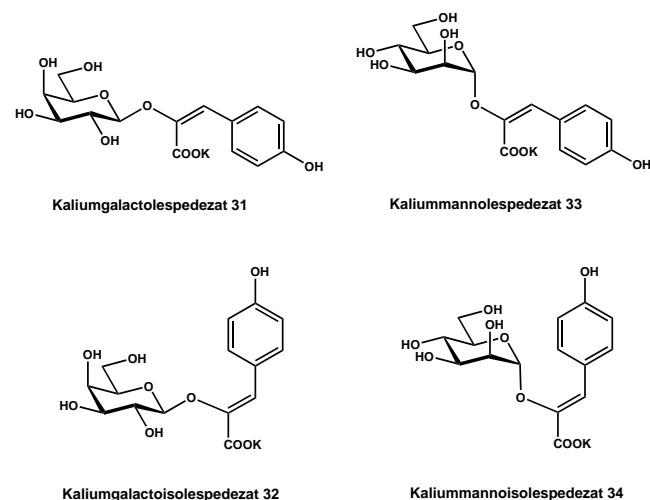


Abbildung 9. Die chemische Steuerung der Nyktinastie in *Lepedeza cuneata* G. DON.

Blätter von *L. cuneata* gesammelt und aus dem Acetonextrakt pulverförmige Proben präpariert.^[46] **25** und **28** haben wir als Substrate des Enzyms eingesetzt und produziertes **29** durch HPLC-Analyse des Rohenzym quantitativ analysiert. Eine β -Glucosidase-Aktivität konnte nur in der Probe gefunden werden, die aus der abends gesammelten Pflanze hergestellt wurde (Tabelle 4). Also wird das Konzentrationsgleichgewicht zwischen **24** und **25** (oder **28**) durch die Hydrolyse von **25** (und **28**) zu **29** umgekehrt (Abbildung 9).

Interessanterweise waren die von uns hergestellten künstlichen Leaf-Opening-Substances (Schema 3), die Zuckerderivate **31**–**34** von **25**, mit einer Wirksamkeit von 8×10^{-7} M im Bioassay genauso effektiv wie **25**.^[37, 47] Die Blattöffnungsak-



tivität von **25** reichte nur zwei Tage, danach faltete sich das Blatt nachts wieder zusammen. Dagegen hielt die Aktivität von **31**–**34** auch nach einer Woche noch an. Dies lässt vermuten, dass **25** durch β -Glucosidase vollständig zu **29** hydrolysiert wurde, das Enzym aber **31**–**34** nicht hydrolysieren konnte. Auch die Bedeutung von β -Glucosidase bei der Regulierung der Nyktinastie wird durch dieses Ergebnisse bestätigt.^[37, 47]

Wir schlagen ein neues Modell für die Regulierung der nyktinastischen Bewegung in *L. cuneata* vor: Die enzymatische Umwandlung der LMFs **25** und **28** zu **29** kehrt das

Konzentrationsgleichgewicht zwischen **24** und **25** (und **28**) um, wobei eine biologische Uhr die Blattbewegung über die Aktivierung oder Exprimierung des für diesen Schritt betreffenden Enzyms steuern sollte.

5.2. Chemische Steuerung der Nyktinastie in *Phyllanthus urinaria* L.

Unsere Untersuchung^[44, 48] zur nyktinastischen Bewegung von *L. cuneata* ergab, dass die nyktinastische Blattbewegung durch eine biologische Uhr gesteuert wird, und zwar über die Regulierung der Aktivität von β -Glucosidase, die die Leaf-Opening-Substance dieser Pflanze hydrolysiert. Dagegen hat

Tabelle 4. Umwandlung von **25** zu **29** durch das ungereinigte Enzym.

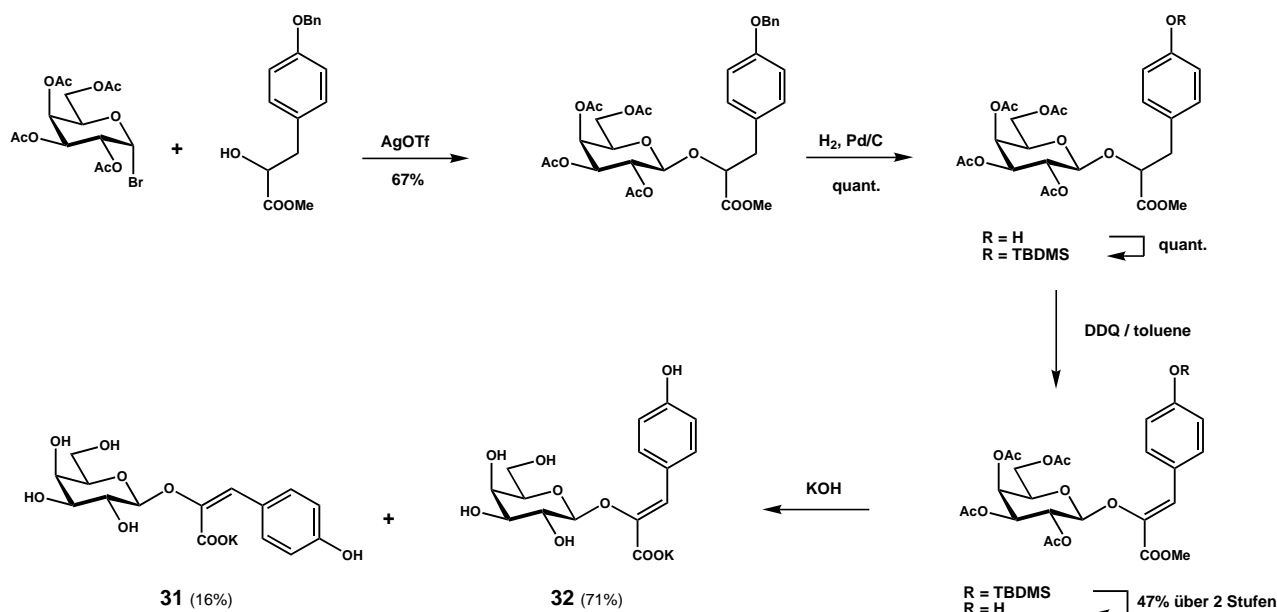
Bedingungen	Konzentration [mol L ⁻¹]	
	25	29
a) Rohenzym (aus tagsüber gesammelten Blättern) + 25	1.0×10^{-3}	n. b. ^[a]
b) Rohenzym (aus tagsüber gesammelten Stängeln) + 25	1.0×10^{-3}	n. b.
c) Rohenzym (aus nachts gesammelten Blättern) + 25	1.0×10^{-3}	2.2×10^{-3}
d) Rohenzym (aus tagsüber gesammelten Stängeln) + 25	1.0×10^{-3}	n. b.
e) Rohenzym (aus tagsüber gesammelten Blättern) + Puffer	1.0×10^{-3}	n. b.
f) Puffer + 25	1.0×10^{-3}	n. b.

[a] Nicht bestimmt.

P. urinaria eine glycosidische Leaf-Closing-Substance, sodass in dieser Pflanze ein anderer Mechanismus ablaufen sollte.

Wir haben sechs Extrakte aus der Pflanze *P. urinaria*, die im Abstand von vier Stunden im Laufe eines Tages gesammelt wurden, hergestellt und dabei gefunden, dass die Extrakte der tagsüber und nachts gesammelten Pflanzen entgegengesetzte Bioaktivitäten aufwiesen; die tagsüber gesammelten Pflanzen zeigten eine Blattöffnungsaktivität und hielten die Blätter sogar nachts geöffnet, während die nachts gesammelten Pflanzen eine schwache Blattfaltungsaktivität zeigten und die Blätter sogar tagsüber geschlossen blieben (Tabelle 5). Die Bioaktivität des Pflanzenextrakts spiegelt den Zustand der gesammelten Blätter im Laufe eines Tages wider: Der Extrakt der Pflanzen, die bei zusammengefalteten Blättern gesammelt wurden, zeigte eine Blattfaltungsaktivität und umgekehrt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich das Konzentrationsgleichgewicht zwischen **22** und **23** im Pflanzenkörper im Laufe eines Tages umkehrte.

Wir haben **22** und **23** durch HPLC quantitativ analysiert, um die interne Konzentrationsänderung über einen Tageszyklus zu messen. Die dafür benötigten Pflanzenextrakte wurden im Abstand von vier Stunden im Laufe eines Tages angefertigt. Die quantitative Analyse gelang dank der relativ geringen Polaritäten von **22** und **23**. Wir stellten fest, dass der Gehalt an **23** im Laufe des Tages fast konstant war, während sich der an **22** beträchtlich veränderte (Tabelle 6). Der



Schema 3. Chemische Synthese von Kaliumgalactolespedezat **31** und Kaliumgalactoisolespedezat **32**. Ac = Acetyl, AgOTf = Silber-Trifluormethansulfonat, Bn = Benzyl, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon.

Tabelle 5. Bioaktivität der Blätterextrakte aus *P. urinaria*.^[a]

Uhrzeit bei der Sammlung (Zustand der Blätter)	Tagsüber	Nachts
0:00 (– –)	–	– –
4:00 (– –)	–	– –
8:00 (+ +)	++	+
12:00 (+ +)	++	+
16:00 (–)	–	– –
20:00 (– –)	–	– –

[a] Extrakte wurden im Abstand von vier Stunden hergestellt; Konzentration: 0.1 g L^{-1} . Die Skala reicht von „vollständig geöffnet“ (+ +) bis „vollständig geschlossen“ (– –).

Tabelle 6. Quantitative HPLC-Analyse der Konzentration von **22**, **23** und **35** in Blätterextrakten aus *P. urinaria*.^[a]

Uhrzeit bei der Sammlung	Konzentration [mol L^{-1}]			
	22	23	35	23:22
0:00	3.1×10^{-4}	7.8×10^{-4}	1.4×10^{-3}	2.5
4:00	1.1×10^{-4}	9.1×10^{-4}	1.4×10^{-3}	8.3
8:00	0.6×10^{-4}	8.3×10^{-4}	1.5×10^{-3}	13.8
12:00	0.5×10^{-4}	9.7×10^{-4}	1.5×10^{-3}	19.4
16:00	0.9×10^{-4}	8.2×10^{-4}	1.4×10^{-3}	9.1
20:00	5.0×10^{-4}	7.6×10^{-4}	1.4×10^{-3}	1.5

Die Extrakte wurden im Abstand von vier Stunden hergestellt.

Extrakt der um 8.00 Uhr morgens gesammelten Pflanzen enthielt ungefähr zehnmal so viel **22** wie der von um 12.00 Uhr gesammelten Pflanzen. Da die Blätter von 4.30 Uhr bis 16.30 Uhr geöffnet blieben und sich im Verlauf des übrigen Tages zusammenfalteten, ist davon auszugehen, dass die Konzentration der LCS vor dem Zusammenklappen der Blätter ansteigt und sinkt, bevor sie sich wieder öffnen.

Für die Desaktivierung von **22** gibt es zwei plausible Mechanismen: die Hydro-

lyse des Esters oder der glycosidischen Bindung. Es stellte sich heraus, dass der Gehalt an Phyllanthursäure **35** (der Phyllanthurinolacton **22** entsprechenden offenkettigen Säure) im Tagesverlauf konstant bleibt (Tabelle 2). Damit wurde gezeigt, dass **22** im Pflanzenkörper nicht durch Hydrolyse der Esterbindung zersetzt wurde. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass **22** ähnlich wie im Fall von *L. cuneata* zu seinem Aglycon hydrolysiert wird (Abbildung 10).

Die HPLC-Analyse ergab, dass der Gehalt an **22** tagsüber nur ein Zwanzigstel desjenigen von **23** betrug und nachts auf die Hälfte desjenigen von **23** anstieg. Das Vergleichsexperiment zwischen **22** und **23** stand im Einklang mit diesem Ergebnis. Wenn der Gehalt an **24** die Hälfte des Gehalts von **23** betrug, war das Blatt geschlossen, aber bei einem Zwanzigstel der Konzentration von **23** öffnete sich das Blatt (Tabelle 7). Somit kann der Unterschied in der Bioaktivität zwischen den Pflanzenextrakten auf den Unterschied im Gehalt der Leaf-Closing-Substance **22** zurückgeführt werden.

Die hier geschilderten Ergebnisse liefern den vollständigen Mechanismus für die chemische Steuerung der Nyktinastie. Die Umwandlung von **22** in sein Aglycon über die Aktivierung einer β -Glucosidase sollte durch eine biologische Uhr gesteuert werden. Es sollte noch erwähnt werden, dass sich

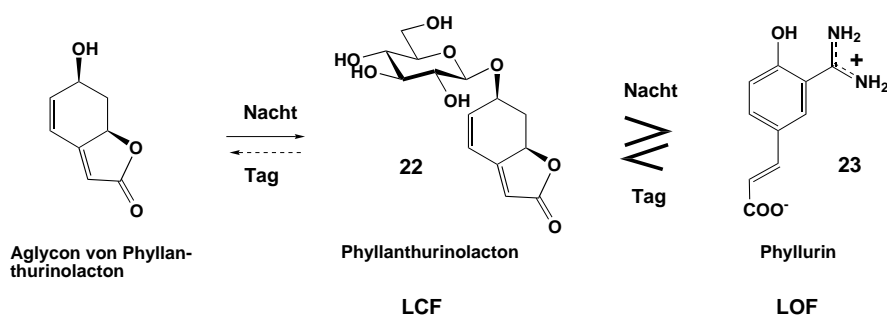


Abbildung 10. Modell zur chemischen Steuerung der Nyktinastie in *Phyllanthus urinaria* L.

Tabelle 7. Kompetitive Wechselwirkung zwischen **22** und **23**.^[a]

	<i>c</i> (22) [mol L ⁻¹]	Verhältnis 22:23						Kontrollprobe
		1:0.5	1:1	0.5:1	1:5	1:10	1:20	
Tagsüber	1 × 10 ⁻⁴	--	--	--	--	++	++	++
Nachts	1 × 10 ⁻⁴	--	--	--	--	--	++	--

[a] Die Skala reicht von „vollständig geöffnet“ (++) bis „vollständig geschlossen“ (--).

die Konzentration von glycosidischen bioaktiven Stoffen sowohl bei *L. cuneata* als auch bei *P. urinaria* im Laufe des Tages änderte. In beiden Pflanzen könnte ein ähnlicher Mechanismus ablaufen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen ihnen besteht darin, dass im Fall von *P. urinaria* die glycosidische Leaf-Closing-Substance durch die β -Glucosidase hydrolysiert werden sollte.

5.3. Der allgemeine Mechanismus für die Regulierung der Nyktinastie durch eine biologische Uhr

Wir haben gezeigt, dass die Regulierung aller nyktinastischen Blattbewegungen mit einem einzigen Mechanismus erklärt werden kann, wobei nämlich entweder die LCS oder die LOS ein Glycosid ist, das durch eine β -Glucosidase deaktiviert wird; deren Aktivität wird wiederum durch eine biologische Uhr gesteuert.^[21, 44] Unser allgemeines Modell für die Regulierung der Blattbewegung ist in Abbildung 11 gezeigt. Nach diesem Modell gibt es zwei Arten von Pflanzen: die eine zeichnet sich durch eine glycosidische LOS aus, die

abends durch die Aktivierung einer β -Glucosidase deaktiviert wird, und die andere enthält eine glycosidische LCS, die morgens durch eine aktivierte β -Glucosidase deaktiviert wird.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Man hat lange angenommen, dass die Blattbewegung in nyktinastischen Pflanzen durch ein gewöhnliches Pflanzenhormon gesteuert würde. Unsere Ergebnisse widersprechen aber dieser Theorie. Wir stellen hier eine neue Theorie zur chemischen Steuerung der nyktinastischen Blattbewegung auf: Die nyktinastische Blattbewegung wird durch das Konzentrationsgleichgewicht zweier bioaktiver Stoffe, der Leaf-Opening- und Leaf-Closing-Substance, gesteuert, das sich im Tagesverlauf entsprechend dem Rhythmus der biologischen Uhr der Pflanze umkehrt. Die biologische Uhr reguliert dieses Gleichgewicht über die Steuerung der β -Glucosidase-Aktivität.

Unsere Leaf-Movement-Factors, deren Konzentrationen sich entsprechend einer zirkadianen Rhythmik ändern, halten wir für natürliche chemische Signale, die die Blattbewegung in nyktinastischen Pflanzen unter physiologischen Bedingungen steuern. Sie könnten als Werkzeug genutzt werden, um den Mechanismus der Blattbewegung zu verstehen. Unsere vorliegenden Ergebnisse könnten die Forschung in diesem Bereich von der Pflanzenphysiologie zur bioorganischen Chemie weiterführen.

Für ihre finanzielle Unterstützung sind wir dem japanischen Ministerium für Bildung, Wissenschaft, Sport und Kultur, der „Asahi Glass Foundation“ und dem Ministerium für Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft zu großem Dank verpflichtet.

Eingegangen am 8. März 1999 [A 330]
Übersetzt von Dr. Karin Gumbiowski, Wallenhorst

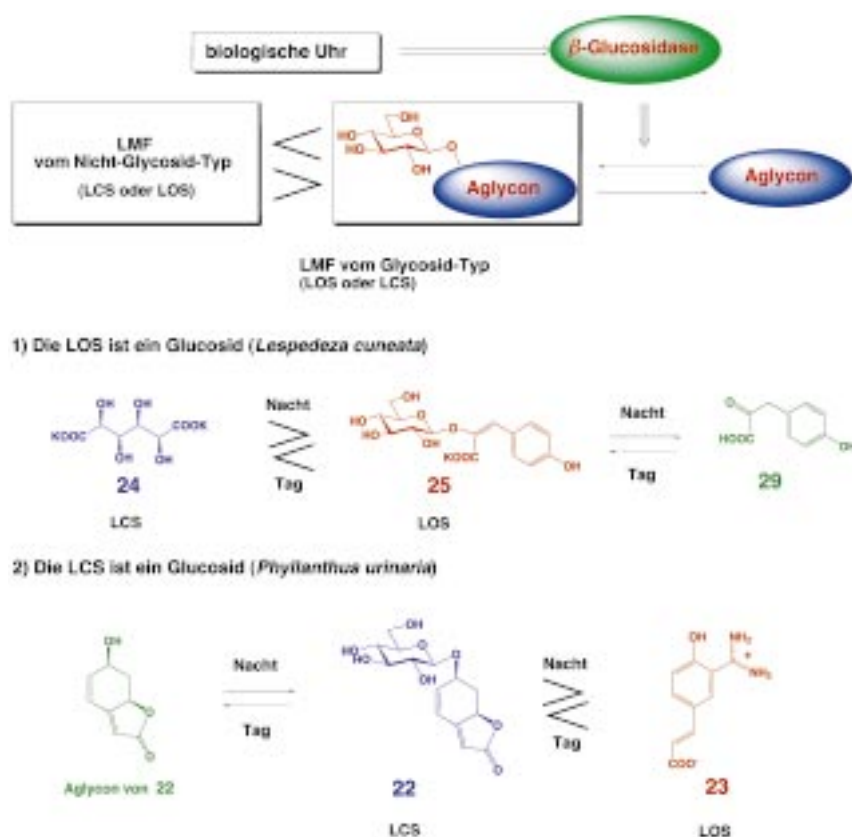


Abbildung 11. Modell für den allgemeinen Mechanismus der chemischen Steuerung der Nyktinastie.

- [1] C. Darwin, *The Power of Movement in Plants*, John Murray, London, **1880**.
- [2] E. Bünning, *The Physiological Clock*, 3. Aufl., English University Press, London, **1973**.
- [3] H. Schildknecht, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 689–704; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 695–710.
- [4] A. L. Houwink, *Recl. Trav. Bot. Neerl.* **1945**, 32, 51–91.
- [5] T. Shibaoka, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1969**, 20, 165–184.
- [6] C. G. Cote, *Plant Physiol.* **1995**, 109, 729–734.
- [7] R. L. Satter, R. C. Garber, L. Khairallah, Y.-S. Cheng, *J. Cell. Biol.* **1982**, 95, 893–902.
- [8] Y. Lee in *The Pulvinus in Motor Organ for Leaf Movement* (Hrsg.: R. L. Satter, H. L. Gorton, T. C. Vogelmann), American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, **1990**, S. 130–141.
- [9] T. Tamiya, T. Miyazaki, H. Ishikawa, N. Iriguchi, T. Maki, J. Matsumoto, T. Tsuchiya, *J. Biochem.* **1988**, 104, 5–8.
- [10] U. Ricca, *Nuovo G. Bot. Ital. (Nuovo Ser.)* **1916**, 23, 51–170.

- [11] A. F. Bickel, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 326–327.
- [12] H. Schildknecht, B. Tauscher, M. Pesh-Imam, W. Beltle, P. Kunzelmann, D. Schneider, *Z. Naturwiss. Med. Grundlagenforsch.* **1978**, 65, 125–129.
- [13] S. Tsurumi, Y. Asahi, *Physiol. Plant* **1985**, 64, 207–211.
- [14] J. L. Bonnemain, G. Roblin, J. Gaillochet, P. Fleurat-Lessarf, *C. R. Soc. Biol. Ser. D* **1978**, 286, 1681–1686.
- [15] S. Nakajima, C. Aoki, M. Okamoto, N. Baba, J. Iwasa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, 57, 1976–1977.
- [16] H. Schildknecht, W. Bender, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 634–635; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 617.
- [17] H. Schildknecht, K. Schumacher, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 22, 2501–2514.
- [18] E. Miyoshi, Y. Shizuri, S. Yamamura, *Chem. Lett.* **1987**, 511–514.
- [19] H. Toshima, Y. Shizuri, S. Yamamura, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [20] W. Bielenberg, H. Esterbauer, M. Hayn, K. Umrath, *Phyton* **1984**, 24, 1–10.
- [21] M. Ueda, S. Yamamura, *Tetrahedron* **1999**, 55, 10937–10948.
- [22] a) S. Watanabe, T. Shibaoka, *Plant Cell Physiol.* **1983**, 24, 641–647; b) S. Watanabe, K. Umrath, *Phyton* **1983**, 23, 49–54.
- [23] S. Tsurumi, Y. Asahi, S. Suda, *Bot. Mag.* **1985**, 98, 89–97.
- [24] N. Morimoto, C. Shichijo, S. Watanabe, S. Suda, T. Hashimoto, *Physiol. Plantarum* **1986**, 68, 196–200.
- [25] a) S. Suda, *Chem. Regul. Plants* **1984**, 19, 116–122; b) Y. Momonoki, *Chem. Regul. Plants* **1995**, 30, 49–61.
- [26] Du Fay, „Observation botanique“ in *Histoire de L'Academie Royale des Sciences*, Paris, **1729**, S. 35.
- [27] M. Ueda, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2981–2984.
- [28] M. Ueda, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 353–356.
- [29] M. Ueda, T. Ohnuki, S. Yamamura, *Phytochemistry* **1998**, 49, 633–635.
- [30] M. Ueda, T. Shigemori-Suzuki, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6267–6270.
- [31] M. Ueda, M. Asano, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9731–9734.
- [32] K. Mori, G. Audran, Y. Nakahara, M. Bando, M. Kido, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 575–578.
- [33] G. Audran, K. Mori, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 57–62.
- [34] M. Ueda, T. Ohnuki, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2497–2500.
- [35] H. Shigemori, N. Sakai, E. Miyoshi, Y. Shizuri, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3991–3994.
- [36] H. Shigemori, N. Sakai, E. Miyoshi, Y. Shizuri, S. Yamamura, *Tetrahedron* **1990**, 46, 383–394.
- [37] M. Ueda, Y. Sawai, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3757–3760.
- [38] M. Ueda, M. Niwa, S. Yamamura, *Phytochemistry* **1995**, 39, 817–819.
- [39] a) D. G. Lynn, K. Nakanishi, S. L. Patt, J. L. Occolowitz, S. Almeida, L. S. Evans, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7759–7760; b) L. S. Evans, M. S. Almeida, D. G. Lynn, K. Nakanishi, *Science* **1979**, 203, 1122–1123; c) W. A. Tramontano, C. M. Hartnett, D. G. Lynn, L. S. Evans, *Phytochemistry* **1982**, 21, 1201–1206; d) W. A. Tramontano, D. G. Lynn, L. S. Evans, *Phytochemistry* **1983**, 22, 673–678; e) D. G. Lynn, D. H. Lewis, W. A. Tramontano, L. S. Evans, *Phytochemistry* **1984**, 23, 1225–1230.
- [40] M. Ueda, C. Tashiro, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3253–3256.
- [41] M. Ueda, Y. Sawai, Y. Shibasaki, C. Tashiro, T. Ohnuki, S. Yamamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 2133–2137.
- [42] T. Ohnuki, M. Ueda, S. Yamamura, *Tetrahedron* **1998**, 54, 12173–12184.
- [43] M. Ueda, T. Ohnuki, S. Yamamura, *Chem. Lett.* **1998**, 179–180.
- [44] M. Ueda, M. Asano, Y. Sawai, S. Yamamura, *Tetrahedron* **1999**, 55, 5781–5792.
- [45] H. Toriyama, M. J. Jaffe, *Plant Physiol.* **1972**, 49, 72–81.
- [46] H. Watanabe, S. Watanabe, R. Nakajima, J. H. Moon, K. Shimokihara, J. Inagaki, H. Etoh, T. Asai, K. Sakata, K. Ina, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, 57, 1101–1106.
- [47] M. Ueda, S. Sawai, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3757–3760.
- [48] M. Ueda, M. Asano, Y. Sawai, S. Yamamura, *Tetrahedron* **1999**, 55, 5781–5792.