

蛍光染色法を用いた定量的な花粉の生存濃度 (Viability) 測定法の開発

○高橋広美、青柳秀紀 (筑波大院・生命環境)

【目的】 植物の繁殖力の評価や貯蔵後の花粉品質の評価等において、花粉の Viability の正しい評価は重要である。現在、花粉の Viability の測定法として、Fluorescein diacetate (FDA)を用いた蛍光染色法が用いられている。非蛍光物質である FDA は非極性のため、容易に細胞膜を透過し、細胞内のエステラーゼにより加水分解され、蛍光性の極性物質 Fluorescein (FRC) に変換される。細胞膜が intact である生存花粉では FRC が花粉内に保持され、黄緑色の蛍光を発する。一方、細胞膜が intact でない非生存花粉では花粉内に FRC が保持されないため蛍光を発しない。従来の FDA による花粉の Viability の測定は蛍光顕微鏡を用いて、生存花粉数と総花粉数を計数し生存率 (%) を算出している。しかしながら、従来法は定性的で生死の判別に個人差が含まれる。また、時間経過に伴い、細胞膜が intact でない非生存花粉から FRC やエステラーゼが漏出し、外部で蛍光を発するため、生死の判別がさらにあいまいになる (画像解析を行う際にも大きな誤差が生じる)。

この現状を踏まえ、本研究では、従来法の問題点を排除した花粉の Viability (生存活性) 評価手法および花粉の生存濃度の定量的測定法の開発を試みた。

【方法および結果】 花粉のモデルとして、スギおよびヒノキの花粉を実験に用いた。FDA 原液 (2 mg/ml-acetone) を pH 調整した 0.5 M マンニトール溶液に懸濁し、染色液を作成した。pH と FRC の蛍光強度の関係を調べた結果、pH 8 以上では FDA が非酵素的に蛍光を発するようになり、pH 7 以下になると FRC の蛍光強度が減少し、pH 5 より低い範囲では蛍光が消失した。pH に対する FRC の蛍光特性と、intact な細胞膜を有する生存花粉は、細胞外の pH を変化させても細胞内の pH は一定に維持される点に着目し、FRC の蛍光が消失する pH に調整した FDA 溶液を用いて Viability の評価を行うことにより、花粉の外部に存在する FRC の蛍光を消失させ、生存花粉内にのみ存在する FRC の蛍光を捉える方法を考案した。実際に pH 4.5 の FDA 溶液を用い顕微鏡観察した結果、外部の溶液の蛍光を抑制し、生存花粉のみの蛍光を観察することが可能であった。

花粉の生存濃度を定量的に測定するために、FDA 反応後、花粉を十分に 0.5 M マンニトール溶液で洗浄した。その後ガラスビーズを用いて花粉を破碎し、遠心分離を行うことで、花粉内の FRC を取り出し、pH 7.3 の条件下 (pH と FRC の蛍光強度の関係から最適条件を設定) で、蛍光光度計 (Ex=485~495 nm, Em=515~525 nm) を用いて蛍光強度を測定した。本法を用いて種々の条件下で測定した結果、スギとヒノキの生存花粉濃度と蛍光強度との間にはそれぞれ直線関係が得られ、蛍光強度の値に基づき生存花粉濃度を客観的に評価することが可能となった。

現在、本法を用いて、様々なストレス物質が花粉の Viability に及ぼす影響について検討中である。