

原 著

花粉の生化学的研究 XXIV

トウモロコシ花粉ミトコンドリアの酵素

勝又悌三*¹・菅原日出男*²・早坂讚造*³

北澤慶子*¹・由利マリ子*¹

Biochemical studies on pollen XXIV

Mitochondrial enzymes of the pollen of *Zea Mays* L. var. *indentata*

Teizo KATSUMATA*¹, Hideo SUGAWARA*², Sanzo HAYASAKA*³,

Keiko KITAZAWA*¹ and Mariko YURI*¹

(受付：1981年9月3日)

緒 言

花粉の生化学的研究の一部として、花粉発芽時の酵素活性調節機構を検討しているが、糖質代謝関連酵素⁽¹⁻⁴⁾リボヌクレアーゼ⁽⁵⁾酸性、中性プロティナーゼ⁽⁶⁾リパーゼ⁽⁷⁾アデニル酸シクラーゼ⁽⁸⁾などが発芽時に活性を増大することを認めた。このように花粉の発芽時には花粉粒内および花粉管での多様な、活発な代謝が考えられるので、前報では裸子植物のアカマツ花粉⁽⁹⁾被子植物のカボチャ花粉⁽¹⁰⁾を用い、エネ

ルギー供給に関与するミトコンドリアの酵素を追究し、両花粉についてこれら酵素の発芽時の活性増大を認めた。

このたびは、すでに糖質代謝関連酵素⁽¹⁻³⁾を調べてあるトウモロコシ花粉について細胞分画法を検討後、ミトコンドリア画分についてイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDHと略記)、コハク酸デヒドロゲナーゼ(SDHと略記)、およびチトクロームオキシターゼ(CytOxと略記)の発芽時の活性を検討した。

*¹ 〒020 盛岡市上田3-18-8 岩手大学農学部農芸化学科

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate, Japan

*² 〒114 東京都北区十条台1-6-42 科研化学株式会社

Kaken Chemical Co., Ltd., Kita-ku, Tokyo, Japan

*³ 〒980 仙台市本町1-4-39 宮城県中央児童相談所

Child Guidance Clinic "Miyagiken Chūō Jidō Sōdanjo", Sendai, Miyagi, Japan

実験方法

1. 試料

前報^(1,11)に準じて調製したトウモロコシ(*Zea Mays* L. var. *indentata*) 完熟花粉および発芽花粉(5% ショ糖—2%寒天、20~22°Cで発芽)を試料とした。

2. 花粉の細胞分画法

前報⁽⁹⁾に準じ、homogenizing medium (0.5 M ショ糖を含む 0.05 M リン酸緩衝液、pH 7.5、以下単に ショ糖溶液と略記)を用いて whole homogenate を調製し、これから核、デンプン、ミトコンドリア、ミクロソーム画分の分画を行ったが、ミトコンドリア画分の調製にはさらに 15,000~23,000 g、20 分の遠心分離を用いた。

3. 窒素、RNA リン、DNA リンの定量

分画法を検討するため前報^(9,11)に準じてそれぞれ定量した。

4. デンプンおよびミトコンドリアの染色

前報⁽⁹⁾に準じて染色し顕微鏡観察を行った。

5. 電子顕微鏡観察

前報⁽⁹⁾に準じて電子染色を行い、日立 HS 7 型電子顕微鏡で観察 (12,000 倍) した。

6. 酵素液の調製

前報⁽⁹⁾に準じて各画分を 0.5 M ショ糖溶液に懸濁し、酵素量と反応量が直線関係を示すように前記 ショ糖溶液で希釈して (図中に特記しないときは希釈しない) 用いた。

7. 酵素活性の測定

(1) IDH : 前報⁽⁹⁾に準じて測定し(本報では pH 8.0 で測定)、酵素単位を算出した。また活性と pH の関係を検討した予備実験では前報⁽⁹⁾同様ツンベルグ法も併用した。

(2) SDH : 前報⁽⁹⁾に準じて測定し(本報では最適 pH 8.0 で測定し、Fig. 2 には減少した正味の吸光度変化をプロットした)、酵素単位を算出した。また予備実験ではツンベルグ法⁽⁹⁾も併用した。

(3) CytOx : 前報⁽⁹⁾に準じて測定し (Fig. 2 には減少した正味の吸光度変化をプロットした)、SDH の

場合に準じて酵素単位を算出した。

結果および考察

花粉細胞内顆粒の分画法の検討は、窒素、RNA リン、DNA リンの測定、デンプンおよびミトコンドリア

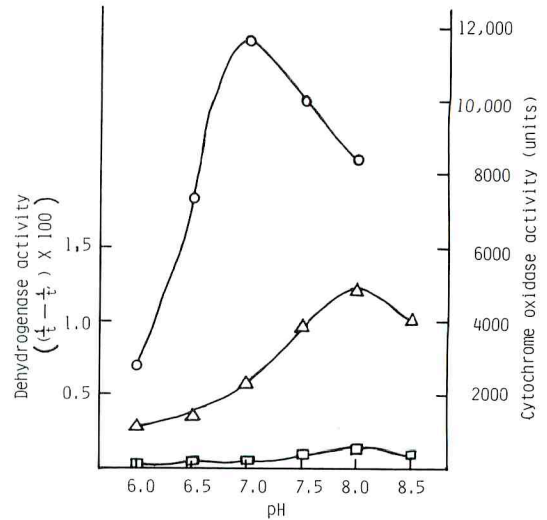


Fig. 1. Effect of pH on isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities.

The dehydrogenase activities were assayed using Thunberg tubes at 37°C. The activities were calculated from the following formula : $(1/t - 1/t') \times 100$, where t is decolorization time (in min) in the presence of added substrate, and t' the endogenous decolorization time (in min). The cytochrome oxidase activity was measured at the indicated pH by the method described previously⁽⁹⁾ using the whole homogenate diluted with 3 volumes of the homogenizing medium, and is expressed as units per g of fresh pollen.

△—△ Isocitrate dehydrogenase

□—□ Succinate dehydrogenase

○—○ Cytochrome oxidase

アの染色、電子顕微鏡観察、前記の酵素活性測定などにより行った。

はじめに予備実験として whole homogenate (0.5 M ショ糖溶液を使用) を用いて、IDH、SDH、CytOx 活性と pH の関係を調べた結果 (Fig. 1)、IDH と SDH は pH 8.0、CytOx は pH 7.0 でそれぞれ最大の活性を示したので、以後の実験はこれらの pH で行った。

IDH は補酵素として、NAD または NADP を必要とすることが知られている。トウモロコシ花粉 IDH の場合ミトコンドリア相当画分 (15,000 g、20 分の遠心画分) を用いて検討した結果、NADP 添加で強い活性を示し、NAD 添加でも NADP に比べて約 27 % の活性を示したが、以後の実験はすべて NADP を添加して行った。

Table 1. Effect of sucrose concentration of homogenizing medium on enzyme activities of whole homogenate

Sucrose concentration (M)	Activity		
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	Succinate dehydrogenase	Cytochrome oxidase
0.25	6,800	500	7,200
0.50	9,600	600	11,600

The activities were measured as described previously⁽⁹⁾ except that the experiments were carried out at optimum pH described under "Materials and Methods", and are expressed as units per g of fresh pollen.

前報⁽⁹⁾で述べた理由から、homogenizing medium として 0.25 M、0.5 M ショ糖溶液を用い、whole homogenate を調製し前記の酵素活性を測定した結果 (Table 1)、0.5 M ショ糖溶液の場合 0.25 M に比べて IDH および CytOx はかなり、SDH は若干強い活性を示すので以下すべて 0.5 M ショ糖溶液を用いて細胞分画を行った。

前報⁽⁹⁾に準じてミトコンドリア画分 (15,000 g、20 分) を分離後、ミクロソーム画分 (105,000 g、60 分) を調製し SDH、CytOx 活性を測定した結果、全 SDH

活性の 11.6 %、全 CytOx 活性の 4.1 % を検出した。これらの活性からみて、ミクロソーム画分へのミトコンドリアの混入が予想される。そこで遠心力を変えてミトコンドリア画分を分離後、次に得られるミクロソーム画分中の SDH、CytOx 活性を検討した結果、23,000 g、20 分の遠心分離により完全にこれらの酵素活性が検出されなくなるので、ミトコンドリアの分画には 23,000 g、20 分の遠心分離を用いた。このミトコンドリアの分画条件は前報⁽¹⁰⁾のカボチャ花粉の場合と一致している。

Table 2. Distribution of nitrogen, ribonucleic acid-P and deoxyribonucleic acid-P among subcellular fractions isolated from the pollen

Fraction	Nitrogen		RNA-P		DNA-P	
	(mg)*	(%)	(μ g)*	(%)	(μ g)*	(%)
Whole homogenate	29.89	100	235.0	100	111.0	100
Nuclei	5.76	19.2	59.1	25.1	102.1	91.0
Starch	0.78	2.6	20.8	8.8	0	0
Mitochondria	1.75	5.9	19.8	8.4	0	0
Microsomes	3.17	10.6	46.2	19.7	0	0
Supernatant	18.04	60.3	81.0	32.6	0	0

* Contents per g of fresh pollen

各画分について窒素、RNA リン、DNA リン含量を測定した結果 (Table 2)、窒素は核画分、上清画分に多量に分布している。RNA リンはアカマツ花粉⁽⁹⁾カボチャ花粉⁽¹⁰⁾の場合に比べて全般的に多く、ミトコンドリア中の含量はこれらの花粉に比べて約 3~

4 倍多い。DNA リンは核画分のみ検出された。近年ミトコンドリア⁽¹²⁾クロロプラスト⁽¹³⁾などにも DNA が存在することが知られてきたが、今回のトウモロコシ花粉の分画法ではアカマツ花粉⁽⁹⁾カボチャ花粉の場合と同様に核外 DNA は検出されなかった。

Table 3. Distribution of enzyme activities among subcellular fractions isolated from the pollen

Fraction	Activity					
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase		Succinate dehydrogenase		Cytochrome oxidase	
	(units)	(%)	(units)	(%)	(units)	(%)
Whole homogenate	9,600	100	600	100	11,600	100
Nuclei	0	0	40.0	6.7	1,680	14.5
Starch	0	0	15.0	2.5	360	3.1
Mitochondria	140	1.5	486.0	81.0	8,880	76.5
Microsomes	0	0	0	0	0	0
Supernatant	8,800	91.7	0	0	0	0

The activities were measured same as in Table 1, and are expressed as units per g of fresh pollen.

次に各画分をヨウ素染色した結果、核、デンプン画分では明らかに陽性であったが、ミトコンドリア、ミクロソーム相当画分はほとんど反応を示さず、これらの画分にはデンプンの混入はほとんどないと考えられる。ミトコンドリア相当画分を Janus Green B で染色すると薄い青黒色に染まり、活発なブラウン運動を行う多数の顆粒がみられまた電子顕微鏡観察ではミトコンドリア特有の構造が認められ、一方ミクロソーム画分にはミトコンドリアの混入は認められなかった。なお細胞顆粒を分画しないで細胞化学的にミトコンドリアを観察した例は、フクロナデシコ⁽¹⁴⁾アカバナクンシラン⁽¹⁵⁾チョウセンヤマナラシ⁽¹⁶⁾テッポウユリ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ツバキ⁽²⁰⁾ヤマユリ⁽²¹⁾スイートピー⁽¹⁹⁾ツルボ⁽²²⁾シクラメン⁽²²⁾などの花粉について多数報告されている。

一方酵素活性を測定した結果 (Table 3)、NADP 特異性 IDH 活性は大部分上清画分に検出されたが、ミトコンドリア相当画分にも 1.5% 認められ、アカマツ花粉⁽⁹⁾カボチャ花粉⁽¹⁰⁾の場合と同様にこの酵素

は可溶性と不溶性の 2 つの異なった存在形式をとっているようである。SDH、CytOx 活性はミクロソーム、上清画分には見出されず、ミトコンドリア相当画分に SDH 活性の 81%、CytOx 活性の 76.5% が検出された。核画分に SDH 活性の 6.7%、CytOx 活性の 14.5% を検出したが、これはミトコンドリアの混在によるものかどうか今後の検討課題である。デンプン画分にも若干これらの活性を認めたが、これはミトコンドリアの混在のためと考えられる。

以上の諸結果から、トウモロコシ花粉のミトコンドリア (23,000 g 遠心画分) は比較的よく分画されていると考えられる。さらにショ糖密度勾配遠心法⁽²³⁾によりミトコンドリア画分を精製することが望ましいが、一般に精製とともに呼吸活性は急激に低下することが知られているので⁽²³⁾以下の発芽花粉の実験にもすべてこのミトコンドリア調製法を適用した。

発芽時の酵素活性を検討した結果 (Fig. 2)、IDH、SDH、CytOx について完熟花粉に比べて発芽花粉でそれぞれ 1.6、2.1、1.3 倍の活性増大が認められた。

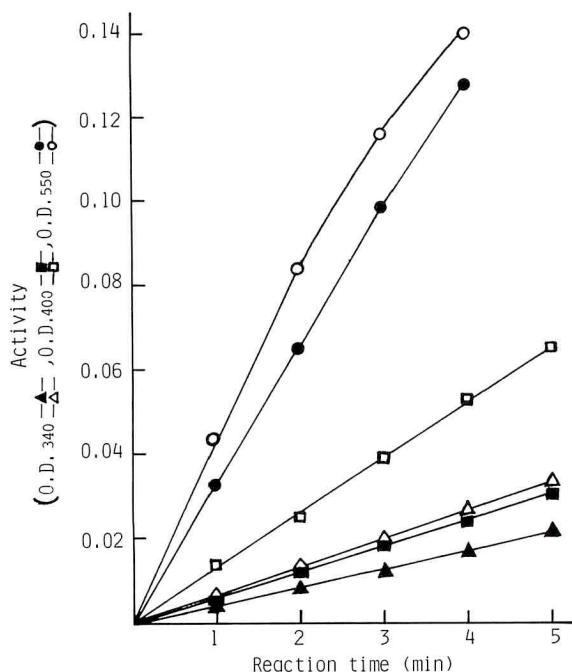


Fig. 2. Changes in NADP-specific isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities during germination of the pollen.

The activities were measured as described previously,⁽⁹⁾ except that the experiments were carried out at optimum pH described under "Materials and Methods."

- ▲—▲ (matured pollen)
- △—△ (germinated pollen)

NADP-specific isocitrate dehydrogenase activity of the mitochondrial fraction

- (matured pollen)
- (germinated pollen)

Succinate dehydrogenase activity of the mitochondrial fraction diluted with 3 volumes of the homogenizing medium

- (matured pollen)
- (germinated pollen)

Cytochrome oxidase activity of the mitochondrial fraction diluted with 9 volumes of the homogenizing medium

花粉の IDH に関しては Dickinson ら⁽²⁴⁾がユリ花粉について活性を認め、花粉の SDH に関しては、ヤマユリ^(25,26)ヤナギ⁽²⁷⁾ムラサキツユクサ⁽²⁷⁾テッポウユリ⁽²⁷⁾キク⁽²⁸⁾トウモロコシ⁽²⁹⁾タヌキマメ (*Crotalaria juncea*)⁽³⁰⁾マツ (*Pinus roxburghii*)^(31,32)などの花粉について活性が認められ、とくにトウモロコシ花粉⁽²⁹⁾では fertile pollen のミトコンドリア内 SDH 活性が sterile pollen に比べて強いことが知られている。花粉の CytOx に関しては、ヤマユリ^(25,33)サツマイモ⁽³⁴⁾タヌキマメ (*Crotalaria juncea*)⁽³⁵⁾トウモロコシ⁽³⁶⁾などの花粉について活性が認められ、またトウモロコシ⁽³⁷⁾ペチュニア⁽³⁸⁾などの花粉で花粉管先端部で CytOx 活性が強いこと、ミヤマズミ⁽³⁹⁾クロスグリ⁽³⁹⁾トウモロコシ⁽⁴⁰⁾などの花粉で fertile pollen では CytOx 活性が強く、sterile pollen ではパーオキシダーゼ活性が強いことなどが報告されている。以上のように完熟花粉についての報告が多く、発芽時の活性とくに単離したミトコンドリアの酵素活性についての知見はほとんどみられない。

花粉発芽の最初の過程が何であるかむずかしい問題であるが、前報^(9,10)でアカマツおよびカボチャ花粉ミトコンドリアの酵素についても認めたように、少なくともその一つはミトコンドリアの酵素系が活性化されることと思える。前報^(2,3)で明らかにしたようにトウモロコシ花粉は発芽時にインペルターゼ、ヘキソキナーゼ活性などを増大するが、この時期は多量のエネルギー供給を必要としているのでこれら諸酵素の活性増大と平行して、ミトコンドリア内のトリカルボン酸サイクル、呼吸系に関与する酵素がその活性を増大してエネルギー供給にに応じているものと推論する。

要 約

トウモロコシ花粉の細胞分画法を検討後、とくにミトコンドリア画分についてイソクエン酸、コハク酸デヒドロゲナーゼおよびチトクロームオキシダーゼの発芽時の活性を検討し次の結果を得た。

(1) 細胞分画を行ったが DNA は核画分に存在し、コハク酸デヒドロゲナーゼおよびチトクロームオキシダーゼ活性はほとんど 23,000 g 遠心画分に検出された。この 23,000 g 遠心画分は Janus Green B 染色、ブラウン運動観察、電子顕微鏡観察、酵素活性などからミトコンドリア画分と推定した。

(2) ミトコンドリア画分の NADP 特異性イソクエ

ン酸デヒドロゲナーゼ(上清画分にも存在する)、コハク酸デヒドロゲナーゼ、チトクロームオキシダーゼは発芽時にいずれもその活性を増大した。

本研究の一部は文部省科学研究費によって行ったものであり厚く感謝の意を表す。

文 献

- (1) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：日本農芸化学会誌（農化），**42**，1—7（1968）。
- (2) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化，**42**，8—12（1968）。
- (3) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化，**42**，13—17（1968）。
- (4) 勝又悌三・鈴木寿直・(故)斗ヶ沢宣久：日本花粉学会会誌（花粉誌），**16**，29—36（1975）。
- (5) 勝又悌三・江尻慎一郎・田村藤二郎・佐々木裕子：日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 162（1975）。
- (6) 勝又悌三・江尻慎一郎・大久保陽一：花粉誌，**17**，17—27（1976）。
- (7) S. Ejiri, H. Abe and T. Katsumata: Agric. Biol. Chem., **41**, 2091—2092（1977）。
- (8) T. Katsumata, N. Takahashi and S. Ejiri: Agric. Biol. Chem., **42**, 2161—2162（1978）。
- (9) 勝又悌三・栗谷川義夫・遠藤文子・菅原日出男・早坂謙造：農化，**50**，607—612（1976）。
- (10) 勝又悌三・菅原日出男・早坂謙造・高橋慶子・由利マリ子：花粉誌，**18**，11—18（1976）。
- (11) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・太田達郎：農化，**41**，178—183（1967）。
- (12) 若林一彦：蛋白質核酸酵素，**19**，1178—1189（1974）。
- (13) 菊池忠寿・石田政弘：蛋白質核酸酵素，**19**，1195—1207（1974）。
- (14) J. Heslop-Harrison: Grana Palynologica, **4**，7—24（1963）。
- (15) B. Gullvag: Grana Palynologica, **5**，253—264（1964）。
- (16) J. R. Rowley and G. Erdtman: Grana Palynologica, **7**，517—567（1967）。
- (17) H. G. Dickinson: Grana, **11**，117—127（1971）。
- (18) D. Southworth and D. B. Dickinson: Grana, **20**，29—35（1981）。
- (19) 三木壽子・中村澄夫：花粉誌，**19**，11—19（1977）。
- (20) 岩波洋造：花粉誌，**15**，3—15（1975）。
- (21) 中村澄夫：花粉誌，**16**，11—21（1975）。
- (22) 岡田 力・中澤 潤：花粉誌，**22**，1—9（1978）。
- (23) 名和義彦・旭 正：蛋白質核酸酵素別冊，生体膜実験法上，共立，p. 304—311（1974）。
- (24) D. B. Dickinson and M. D. Davies: "Pollen development and physiology," ed. by J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, p. 190—193（1971）。
- (25) K. Okunuki: Acta Phytochim., **11**，27—64（1939）。
- (26) K. Okunuki: Acta Phytochim., **11**，65—80（1939）。
- (27) R. Lundén: Grana Palynologica, **1**，3—19（1956）。

- (28) Y. Tsukamoto and S. Matsubara : *Plant Cell Physiol.*, **9**, 227—235 (1968).
- (29) A. N. Palilova, Z. I. Loseva and N. S. Mikulich : *S-kh. Biol.*, **12**, 38—41 (1977) ; *C. A.*, **86**, 136453h (1977).
- (30) C. P. Malik and A. Kapur : *Indian J. Exp. Biol.*, **17**, 650—652 (1979).
- (31) A. K. Dhawan and C. P. Malik : *Phytochemistry*, **18**, 2015—2017 (1979).
- (32) A. K. Dhawan and C. P. Malik : *Plant Cell Physiol.*, **20**, 675—678 (1979).
- (33) K. Okunuki : *Acta Phytochim.*, **11**, 249—260 (1940).
- (34) F. W. Martin : *Phyton*, **25**, 97—102 (1968) ; *C. A.*, **71**, 36397q (1969).
- (35) M. B. Singh, C. P. Malik and D. Sharma : *J. Palynol.*, **12**, 151—159 (1976).
- (36) L. S. Watrud, J. R. Laughnan, S. J. Gabay and D. E. Koeppel : *Can. J. Bot.*, **54**, 2718—2725 (1976).
- (37) P. M. Pyl'nev and P. Diakonov : *Dokl. Mosk. Sel'skokhoz. Akad.*, **1961**, 163—170 ; *C. A.*, **58**, 7133d (1963).
- (38) K. Schloesser : *Z. Botan.*, **49**, 266—288 (1961) ; *C. A.*, **57**, 14188c (1962).
- (39) N. P. Chuvashina and V. K. Mel'nikov : *Fiziol. Rast.*, **11**, 330—333 (1964) ; *C. A.*, **62**, 3071c (1965).
- (40) A. N. Dmitrieva, I. M. Polyakov and O. E. Khavzhinskaya : "Geterozis-S-kh. Rast. Ego Fiziol. Biokhim. Biofiz. Osn." ed. by N. V. Turbin, Kolos, Moscow p. 148—155 (1975) ; *C. A.*, **87**, 98976s (1977).

Summary

Subcellular fractions were prepared from the pollen of *Zea Mays*, and the mitochondrial fraction was assayed for NADP-specific isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities. DNA-P was mainly localized in the nuclear fraction, and succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in the fraction sedimented at $23,000 \times g$ for 20 min. The particulate fraction sedimented at $23,000 \times g$ was presumed to be the mitochondrial fraction from the staining with Janus Green B, their Brown's movement, electron microscopic appearance and enzyme activities. Both dehydrogenases and cytochrome oxidase activities in the mitochondrial fraction increased during the germination of the pollen on sucrose-agar medium.

