

原 著

花粉の遊離アミノ酸と発芽におけるその挙動

原 彰*・加藤正人*・船隈 透*

Free amino acids in some pollens and their behaviors during in vitro germination

Akira Hara,* Masato Kato* and Tooru Funaguma*

(受付：1984 May 27)

緒 言

花粉は富裕な細胞である。細胞の水分含量を20%以下におさえ、代謝を抑制したうえで、多量の糖質を貯蔵し、強力な酵素群を準備し、発芽に備えている。発芽の際に著しい変動があるという意味では、アミノ酸も栄養貯蔵体の1つとして数えられるだろう。

花粉のアミノ酸については、多数の報告^(1,2)があるものの、調べられた植物種が限られており、同種の植物間でも気候や栄養条件が異なれば、存在するア

ミノ酸の質、量ともに差がみられるらしい。花粉が植物の他の組織細胞と比べて特徴的であるのは、プロリンの存在である。プロリンは花粉中に最も普遍的に多量に含まれているアミノ酸であるが、その役割は細胞壁グリコペチドの形成^(3,4)や稔性との関連⁽⁵⁾から議論されている。

本稿では、ソテツ、マツ、スギ、ガマ、トウモロコシ、ライ麦の成熟花粉中の遊離アミノ酸プールとマツおよびガマの花粉については、発芽におけるアミノ酸の変動をアミノ酸アナライザーによって分析した結果を報告する。

* 名城大学農学部生物化学教室

* 〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山

* 花粉のアミノ酸と発芽による挙動

Amino acids in pollens and behaviors during germination

Abbreviations (略語)

Asp : aspartate, Thr : threonine, Ser : serine,

Asn : asparagine, Glu : glutamate, Pro : proline,

Gly : glycine, Ala : alanine, Val : valine,

Cys : cysteine, Met : methionine, Ile : isoleucine,

Leu : leucine, Tyr : tyrosine, Phe : phenylalanine,

Lys : lysine, His : histidine, Arg : arginine

* Faculty of Agriculture, Meijo University,

* Tenpaku-ku, Nagoya, Japan 〒468

実験材料および方法

1. 花粉

ソテツ花粉は1975年7月鹿児島県西表市馬毛島で採取、マツ花粉は1983年5月愛知県刈谷市愛知教育大学構内で採取、スギ花粉は1983年3月愛知県春日井市名城大学附属農場で採取、ガマ花粉は1983年6月愛知県愛知郡日進町で採取、トウモロコシ花粉は1980年6月、ライ麦花粉は同年4月、いずれも名古屋市天白区の名城大学構内で採取した。

これらの花粉は室温で1日乾燥させた後、 -20°C 以下に保存して実験に供した。

2. 試料の調製と遊離アミノ酸分析法

花粉250 mgを1%ピクリン酸液5 ml中にけん濁させ、テフロン-ガラスホモゲナイザーで15分間処理した後、 $8,000\times g$ で10分間遠心分離した。上清をDowex 2×8 Cl-型のカラム(1×8 cm)に通し、カラムからの溶出液が10 mlになるまで0.02 N HClで洗浄した後、溶出液のpHを1 N LiOHで7.0に調整し、室温に4時間放置した。次いで1 N HClでpH 2.0に調整した後、0.25 M クエン酸リチウム緩衝液(pH 2.2)を加えて15 mlとし、東洋メンブランフィルターTM-4(0.2 μ)に通した。得られたろ液の70 μ lについて柳本高速アミノ酸分析装置LC 8型で分析した。

カラムは生体成分分析用カラムYanapakAC-1011(4×250mm) Li型を使用し、570 nm および440 nmの2波長でニンヒドリン発色アミノ酸の検出を行った。1回の分析に約4時間を要した。

3. 培養花粉の遊離アミノ酸分析法

マツ花粉の培養には3%シュクロース、100単位のナイスタチンおよび50 ppmのクロラムフェニコールを含む1.5%寒天培地を使用し、またガマ花粉の培養には1.5%寒天のみの無糖培地を使用した。

それぞれの培地(直径20 cm シャーレ)に500 mgの花粉を散布し、一定時間毎に花粉を集めて1%ピ

クリン酸液にけん濁させた。以下の処理は2項に準じて分析試料を得、その50 μ lについてアミノ酸分析装置で分析した。カラムはタンパク質構成アミノ酸分析用カラム(4×125 mm) Na型を使用した。この場合1回の分析に約1時間を要した。

4. アミノ酸の定量法

アミノ酸の定性および定量は外部標準法によって行った。標準アミノ酸として、生体成分分析用カラムでは和光純薬社製のアミノ酸混合標準液AN型とB型(合計40種類の標準物質を含む)を用い、タンパク質構成アミノ酸用カラムでは同社のアミノ酸混合標準液H型(18種類の標準物質を含む)を使用した。

データ処理は、柳本コンピュータ型インテグレーターSystem 1,100によって行った。

実験結果

1. 成熟花粉中の遊離アミノ酸

生体成分分析用カラムによる6種類の植物花粉のアミノ酸の分析結果をTable 1に示した。

ソテツ花粉からは、44種類のニンヒドリン陽性物質が検出され、アミノ酸として27種類が確認された。プロリンが最も多く含まれており、全アミノ酸の40%以上を占めていた。次いで、アラニン、グルタミン酸+アスパラギン(Glu>Asn)、アルギニンが主要なアミノ酸であった。

マツ花粉からは、35種類のニンヒドリン反応陽性物質が検出され、アミノ酸として25種類が確認された。最も多く含まれていたものはプロリンであり、全アミノ酸の50%以上を占めていた。次いでグルタミン酸+アスパラギン(Glu>Asn)、アルギニンが主要なアミノ酸であった。

スギ花粉からは29種類のニンヒドリン反応陽性物質が検出され、アミノ酸として22種類が確認された。最も多く含まれていたのはプロリンであり、全アミノ酸の60%以上を占めていた。調べられた6種類の植物の中で、アミノ酸の総量が極端に少なかった。

ガマ花粉からは、33種類のニンヒドリン反応陽性

Table 1. Composition of free amino acids in some pollens (μ moles/g pollen)

	<i>Cycas revoluta</i>	<i>Pinus thunbergii</i>	<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>Typha latifolia</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Secale cereale</i>
Phosphoserine	0.18	0.24	0.12	0.24	0.26	0.50
Phosphoethanolamine	0	0	0	0.12	0.13	X
Taurine	0.18	0.12	T	0.78	0.19	0.43
Asp	0.24	3.65	0.12	2.28	2.27	2.14
Hydroxyproline	0	0	0	0	T	0
Thr	2.22	1.26	0.12	1.68	2.66	X
Ser	3.05	1.68	0.43	4.67	13.90	X
Asn + Glu	7.37	13.53	1.34	15.81	1.23	6.57
	(Glu > Asn)	(Glu > Asn)	(Glu)	(Glu \gg Asn)	(Glu > Asn)	(Glu > Asn)
Sarcosine	1.20	0	0	0	0	0
α -Aminoadipic acid	0.42	0	0	0.18	0	0
Pro	37.78	39.76	7.04	2.22	51.17	63.07
Gly	1.98	0.24	0.16	0.30	1.10	1.14
Ala	9.04	2.16	0.12	1.26	3.83	9.50
Val	2.63	0.66	0.08	1.02	0.78	2.43
Cys	0.48	0.18	0.28	0.72	0.13	0.14
Cystathionine	T	T	T	T	T	0.14
Met	0.84	T	0.04	T	T	0.21
Ile	0.60	0.54	0.12	0.42	0.19	1.36
Leu	0.78	0.48	0.20	0.54	0.32	1.00
Tyr	0.66	0.30	0.51	0.12	0.13	1.14
β -Alanine	T	T	0	0.18	0.06	0.21
Phe	4.19	T	0.16	0.90	0.39	0.50
γ -Aminobutyric acid	1.14	2.16	0.28	0.60	2.60	4.36
Ethanolamine	0.96	T	T	0.06	2.47	1.29
Ornithine	0.24	0.24	T	0.12	0.06	0.14
Lys	2.46	0.60	0.04	0.24	0.06	0.50
His	0.42	0.18	0.08	0.42	0.13	0.14
l-Methylhistidine	0.78	0.36	0	1.15	1.30	4.21
Arg	6.29	7.19	0.04	0.30	0	0.21
Total	86.13	75.53	11.28	36.33	85.36	101.33

*T: trace amounts, X: not calculated

物質が検出され、アミノ酸として 27 種類が確認された。最も多く含まれていたのはグルタミン酸+アスパラギン (Glu \gg Asn) であり、定量することのできた全アミノ酸の 40%以上を占めていた。次いでセリ

ンが多く、プロリンは約 6%を占めるにすぎなかった。

トウモロコシ花粉については、38 種類のニンヒドリン反応陽性物質が検出され、アミノ酸として 27 種

類が確認された。最も多く含まれていたのはやはりプロリンであり、全アミノ酸の約60%を占めていた。次いでセリンが多く含まれていたが、アルギニンを含んでいないのが特徴であった。

ライ麦花粉については、43種類のニンヒドリン陽性物質が検出され、アミノ酸として23種類が確認されたが、アミノ酸の総量が最も多かった。プロリンが全アミノ酸の60%以上を占めており、次いでアラニン、グルタミン酸+アスパラギン (Glu>Asn) の順で多く含まれていた。

2. マツおよびガマ花粉の培養における遊離

アミノ酸の変動

タンパク構成アミノ酸分析用カラムによる培養花

粉中の遊離アミノ酸の分析結果を Table 2 および Table 3 に示した。

マツ花粉においては、最大含量を示すプロリンは培養24時間(わずかに発芽が観察される)ではあまり減少しなかったが、花粉管が十分に伸長した72時間後には、15%にまで大きく減少した。2番目に含量の多いグルタミン酸も、培養72時間で40%以下にまで減少した。ガマ花粉と異なって、ある程度の含量を示すアスパラギン酸、トレオニン、アラニン、アルギニンのいずれも減少の度合が大であった。従ってマツ花粉培養におけるアミノ酸総量の減少は、ほとんど全ての種類のアミノ酸の減少に起因するものである。

一方、ガマ花粉においては最大含量を示すグルタ

Table 2. Changes of free amino acid contents during germination of *Pinus thunbergii* pollen (μ moles/g pollen)

	Culture time (hr)		
	0	24	72
Asp	3.43	0.95	<0.95
Thr + UK	3.18	0.35	<0.35
Ser	1.15	0.73	<0.73
Glu	7.83	5.85	2.88
Pro	12.48	10.75	1.92
Gly	0.15	0.10	0.18
Ala	1.40	0.40	0.42
Cys	0	0	0
Val	0.40	0.08	0.12
Met	T	T	T
Ile	0.40	0.05	0.06
Leu	0.40	0.08	0.06
Tyr	0.33	0.10	0.06
Phe	0.15	0.43	0.48
Lys	1.01	0.28	0.13
His	0.15	0.05	0.06
Arg	3.33	1.50	T

T : trace amounts, UK : unknown amino acid

Table 3. Changes of free amino acid contents during germination of *Typha latifolia* pollen (μ moles/g pollen)

	Culture time (hr)			
	0	0.5	1.0	2.0
Asp	3.20	2.05	1.08	0.73
Thr	2.10	2.45	2.95	2.80
Ser	2.80	3.38	3.30	3.18
Glu	11.88	8.80	5.38	3.23
Pro	1.55	1.78	1.30	1.45
Gly	0.40	0.55	0.75	0.55
Ala	2.75	2.45	2.23	2.10
Cys	T	T	T	0.05
Val	0.65	0.50	0.55	0.93
Let	T	T	0.15	0.15
Ile	0.30	0.20	0.20	0.53
Leu	0.40	0.25	0.25	0.83
Tyr	0.05	T	0.10	0.33
Phe	0.40	0.35	0.35	0.55
Lys	0.39	0.38	0.59	1.18
His	1.05	1.05	1.10	1.28
Arg	0.70	0.65	0.70	0.58

T : trace amounts

ミン酸の変動が著しく、時間とともに減少し、僅か2時間の培養（花粉管は十分に伸長している）で30%以下となった。2番目に多い含量を示すアスパラギン酸も、グルタミン酸と同様の減少パターンを示した。しかし、他のアミノ酸はほとんど変化を示さず、2時間培養によるアミノ酸総量の減少は、グルタミン酸とアスパラギン酸の減少に依存するものである。なお、プロリンは明らかな変化が認められなかった。

生体成分分析用カラムと比較すると、タンパク構成アミノ酸分析用カラムでは、分析時間は約1/4に短縮できるが、非タンパク質性ニンヒドリン陽性物質が個々のアミノ酸の溶出位置にオーバーラップしている可能性があるために多少の誤差を考慮しなければならぬ。

考 察

6種類の植物の花粉について遊離アミノ酸を分析したが、裸子植物であるソテツ、マツ、スギと単子葉被子植物であるガマ、トウモロコシ、ライ麦との間に明確に区別できる特徴は認められなかった。全体的特徴として、①どの植物の花粉でも40%以上を占める1種類のアミノ酸（ガマ花粉ではグルタミン酸、他はすべてプロリン）が存在する、②量的に多く含まれているアミノ酸の種類は限られており、プロリン、グルタミン酸以外は、アラニン、セリン、アスパラギン酸が目立つ程度である、③タンパク構成アミノ酸以外のアミノ酸含量は少ない、ことがあげられる。

花粉のプロリンの役割について、Dashekらの報告^(3,4)は説得力がある。彼らは細胞壁の可塑性にはヒドロキシプロリンを含む糖ペプチドが関与しているという、Lamptonが提称したいわゆる“extensin”説⁽⁶⁾に着目した。そして外生的なプロリンが細胞質のペプチド結合型ヒドロキシプロリンから、細胞壁構成

ペプチドへと変化する事、それはグリコペプチドであること、およびプロリンのヒドロキシル化を阻害（可塑性の阻害）すれば、管伸長が2倍程度促進されることを認めている。Yi-qinらは *Lilium longiflorum* の成熟花粉と発芽花粉との細胞壁タンパク質とを比較し、アミノ酸組成では発芽花粉の方がヒドロキシプロリン含量が増加することを認め、またSDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析によって、特に糖ペプチドに差が著しいことを認めている⁽⁷⁾。これらの結果は、花粉中のプロリンが、ヒドロキシプロリンへと変換し、花粉管の糖ペプチド中に取り込まれていることを示している。しかしながら、細胞壁中のヒドロキシプロリン量は0.9-1.6%である⁽⁷⁾から、遊離状態では40%以上を占めるプロリンの量的な異常さは、これによって完全に説明可能とは思われない。

プロリン含量の少ないガマ花粉では、プロリンの供給はどのように行われているのであろうか。ガマ花粉では、グルタミン酸が最も多く含まれており、発芽によって減少した一部分は、プロリンの合成経路であるグルタミン酸 γ -セミアルデヒド \rightarrow ピロリン5-カルボン酸を経てプロリンへ転換されているのかも知れない。

マツおよびガマ花粉のどちらも培養中にグルタミン酸の大きな減少を示したが、グルタミン酸は貯蔵中にも減少することがトウモロコシ⁽⁸⁾やマツ花粉⁽⁹⁾で報告されている。この事実はグルタミン酸が α -ケトグルタル酸へ転換され、トリカルボン酸回路で代謝される、栄養貯蔵体の意味もあるように思われる。

花粉の貯蔵中にアミノ酸の減少があるならば、筆者らの使用した花粉での分析結果は、新鮮花粉での結果と差があるかも知れない。ガマ花粉は貯蔵によって、花粉管伸長が遅れてくるが、貯蔵中のアミノ酸量の変化と、発芽や花粉管伸長との関連も興味ある課題である。

参考文献

- (1) Stanley, R.G. and H.F. Linskens 1974 Pollen : Biology Biochemistry Management, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York : 154-159
- (2) 岩波洋三 1980 花粉学. 講談社サイエンティフィック : 67-69
- (3) Dashek, W.V., H.I. Harwood and W.G. Rosen 1970 The significance of a wall-bound, hydroxyproline-containing glycopeptide in lily pollen tube elongation, Pollen : Development and Physiology, London Butterworths, Heslop-Harrison (Ed.) : 194-200
- (4) Dashek, W.V., R.H. Johnson, D.M. Hayward and H.I. Harwood 1972 Lily pollen proline and hydroxyproline *Amer. J. Bot.* **59** : 649
- (5) Tupý, J. 1963 Free amino acids in apple pollen from the point of view of its fertility *Biologia Pl.* **5** : 154-160
- (6) Lamport, D.T.A. 1970 Cell wall metabolism *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21** : 235-270
- (7) Li Yi-qin, A.F. Croes and H.F. Linskens 1983 Cell-wall proteins in pollen and roots of *Lilium longiflorum* : Extraction and partial characterization *Planta* **158** : 422-427
- (8) Linskens, H.F. and P.L. Pfahler 1973 Biochemical composition of maize (*Zea mays* L.) pollen III. Effect of allele×storage interactions at the waxy (wx), sugary (su₁) and shrunken (sh₂) loci on the amino acid content *Theor. Appl. Genet.* **43** : 49-53
- (9) 勝又悌三、斗ヶ沢宣久 1963 花粉の生化学的研究(第3報) アカマツ花粉のアミノ酸について 農化 **37** : 439-443

Summary

The composition of free amino acids from pollen grains of 3 gymnosperm plants and 3 angiosperm plants was analyzed. The total contents of amino acids were 11 μ moles/g of *Cryptomeria japonica* pollen with the smallest value and 101 μ moles/g of *Secale cereale* pollen with the largest value. In all plants tested one predominant amino acid above 40% of the total amino acids, proline for 5 plants and glutamic acid for *Typha latifolia*, was detected. Relatively high alanine, serine, or aspartic acid amounts were also found, but the amounts of nonproteinous amino acids were generally low levels.

During germination all amino acids present in substantial amounts decreased in *Pinus thunbergii* pollen, while only glutamic acid and aspartic acid contents changed remarkably in *Typha latifolia* pollen.