

原 著

ツバキ花粉管の伸長促進物質

I 乳成分の花粉管伸長に及ぼす影響

中村紀雄*・碓井裕之*・鈴木 恕**

Growth promoters of the pollen tube of *Camellia japonica*

I Effects of milk substances on pollen tube growth

Norio NAKAMURA*, Hiroyuki USUI*
and Hiroshi SUZUKI**

(受付：1984年10月14日)

緒 言

培地上での花粉管の伸長は雌ずいにおける生長に比べて著しく悪い。したがって、管伸長を促進する物質の検索がおこなわれてきたが、ショ糖がほぼどの花粉に対しても有効である他は、雌ずいにおける生長を再現させ得るような著しい効果をもつ物質は見い出されていない。しばしば培地に添加される硼酸の効果も限られ、ツバキ花粉に対しては無効である。現状においては、花粉の種類に応じて最適培地を検討しなければならぬ。ただ、ツバキ花粉については、ツバキ花粉水抽出液をショ糖培地に加えることにより、ほぼ花柱の長さ(約30mm)に花粉管を伸長させることができる¹⁾この促進作用は抽出液に含まれる蛋白質性物質と低分子物質による²⁾が、物質の同定はまだなされていない。我々はこのツバキ

花粉管伸長促進物質について検討を進めている過程で、乳汁成分がツバキ花粉管伸長に著しい促進効果をもつことを見出し、また、他の花粉への影響も検討したので、それらの結果について報告する。

材料と方法

1. 花 粉

ツバキ花粉は前報¹⁾に準じた方法で、1984年2月～4月に採取し、冷凍庫に保存したものを適時使用した。チャ・リングゴ・サザンカはそれぞれ1977・1974・1974年に採取・保存しておいた花粉を使用し、他は開花当日採取した花粉を直ちに使用した。

2. 花粉の培養と促進物質の活性測定

ショ糖(0.3M)―寒天(1.2%)培地を基本培地としたが、ユリ花粉培養では硼酸100ppm、硝酸カルシウム400ppmをさらに添加した。

* 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学生物学教室

** 〒305 茨城県新治郡桜村 筑波大学生物科学系

* Department of Biology, Yokohama City University, Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan.

** Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Sakura-mura. Ibaraki 305, Japan.

活性測定は花粉管の長さを比較することにより行った。花粉を培地に直線状に置床し、この直線に直角方向に伸長した花粉管を拡大鏡で拡大し、管の長さを測定⁽²⁾した。対照と比べて120%以上の促進がみられた場合を促進活性とみなした。

3. 促進物質の分画

ニド (Nestlé 社) 20 g を蒸留水 (DW) 150 ml に溶かし、YM 10 分子篩膜 (Amicon 社: 分画分子量 10,000 以下) を用い、攪拌・加圧濾過した。セル内に残った液にさらに 100 ml の DW を加え、この操作を繰り返した。最終内液を DW に対して透析し、高分子促進物質 (FI) 標品とした。この標品を Sephadex G-75 で分画すると、活性は V_0 画分にのみ認められた。一方、膜通過液 (総量 180 ml) は 20 ml に濃縮して、または凍結乾燥して低分子促進物質 (FII) 標品とした。

4. イオン交換クロマトグラフィー

FII 標品を Bio-Gel P-2 でゲル濾過分画後、その活性画分を濃縮し、0.5 ml ずつをそれぞれ Dowex 1-x 8 (OH 型)、Dowex 50 W-x 8 (H 型) のカラム (1.2×18 cm) にかき、各カラムの非吸着成分を DW で溶出し、さらに吸着成分を Dowex-1 カラムでは 1 N 蟻酸で、Dowex-50 では 1 N アンモニアで溶出した。いずれの場合も溶出液 100 ml を集め、35°C で減圧乾固した後、DW を加えて溶出物質を溶かし、

液量を 100 ml に調整して活性試験液とした。

5. 蛋白質の定量

蛋白質量は Itzhaki-Gill 法⁽³⁾により、牛血清アルブミンを規準として求めた。

結果と考察

シヨ糖寒天培地に粉末クリーム製品のニドやクリープ (森永製菓) または乳汁 (未調整牛乳および人乳) を添加して、ツバキ花粉の管伸長を観察したところ、著しい促進効果がみられた (表 1)。また管伸長促進は、スジャータ (森永製菓) やマリーム (味の素) についてもみられた。これらはいずれも家畜乳汁を原料とした製品であり、また牛乳・人乳には添加物質は加えられていないので、管伸長促進効果は乳成分によると考えられる。そこでニドを用いて促進物質の抽出を試みた。

まずエタノール、メタノール、80%メタノール、n-ブタノール、アセトン、ベンゼン、エチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム-メタノール、酢酸エチルによる抽出を試みたが、有機溶媒画分は活性を示さず、水画分にのみ活性が検出された。このように促進物質は水溶性であることが判明したので、次にニド水溶液の Sephadex G-75 によるゲル濾過分画を行った (図 1)。活性は V_0 画分と分画外低分子画分に認められた。人乳を同様に分画した場合も、

Table 1. Effects of creaming powder and milk on the pollen tube growth of *Camellia japonica*

Sample	Concentration (mg/10 ml medium)		
	0	2	20
Nido	5.1±0.8 (mm)	8.8±0.6	13.0±0.3
Creap	5.1±0.8	5.1±0.5	12.4±0.4
	Concentration (ml/10 ml medium)		
	0	0.1	1.0
Human milk	4.7±0.3 (mm)	14.2±0.4	8.8±1.2
Cow's milk	4.0±0.2	14.0±0.2	9.8±0.9

Pollen grains were incubated on 0.3 M sucrose-1.2% agar plate (SAP) medium supplemented with creaming powder (Nestlé's "Nido" and Morinaga Seika's "Creap") or milk for 24 hr at 25°C.

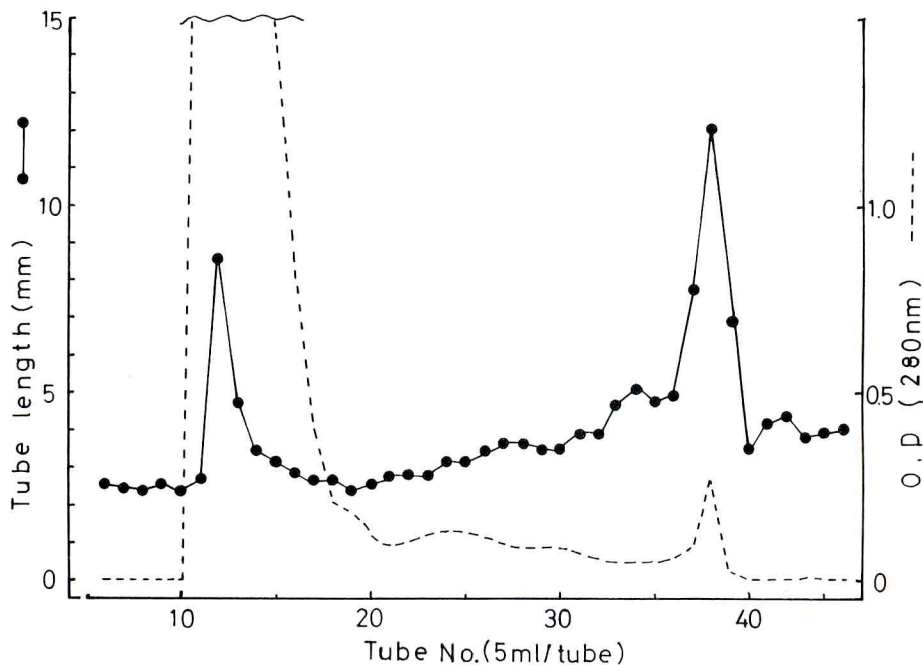


Fig. 1. Gel filtration of "Nido" on Sephadex G-75.

An aqueous solution of "Nido" (100 mg in 2 ml) was applied onto a Sephadex G-75 column (1.8×80 cm, $V_0=60$ ml) and eluted with water at a rate of 50 ml per hr. An appropriate volume of each fraction was tested for promotion of the tube growth of *Camellia japonica* pollen by adding to the SAP medium and incubating for 36 hr at 25°C.

ほぼ同じ結果が得られた。

ツバキ花粉抽出液の活性成分の1つは蛋白質であること、また牛血清アルブミンがツバキ花粉の管伸長を著しく促進すること⁽¹⁾などから、 V_0 画分の活性物質も蛋白質であることが考えられる。そこで分子篩膜で分画した FI 標品についてプロナーゼ(科研化学)処理(表2)、熱処理(図2)を行ってみたところ、いずれの場合も活性の低下がみられた。乳成分の主蛋白質であるカゼインとラクトアルブミン(Sigma社)について活性を調べたが、ツバキ花粉の管伸長促進はみられず、サザンカ花粉に対しても僅な効果しかみられなかった(図3)。したがって乳中の活性物質は少なくともこれらの蛋白質ではない。現在さらにこの活性物質について検討を行っている。

一方、低分子活性画分については、それを減圧濃

縮したのち、Bio-Gel P-2カラムによるゲル濾過分画を行ってみた(図4)。活性は糖類(ラフィノース)溶出位置付近にのみみられ、その部分ではUV吸収はみられないか、ごく僅かであった。また分子篩膜通過液(FII標品)をBio-Gel P-2で分画した場合も同じ結果が得られた。このように高分子活性物質以外にも、低分子活性物質の存在が明らかになったので、さらにFII標品中の活性物質の性質について、若干の検討を行った。

Bio-Gel P-2活性画分を集めて濃縮した後、活性物質のイオン交換樹脂への吸着性を調べた(表3)。活性物質はDowex-1に吸着せず、Dowex-50に吸着したので、塩基性であると考えられる。この物質はアンモニアで溶出され、その凍結乾燥標品の活性はFII標品の約10倍であった。しかし溶出は完全では

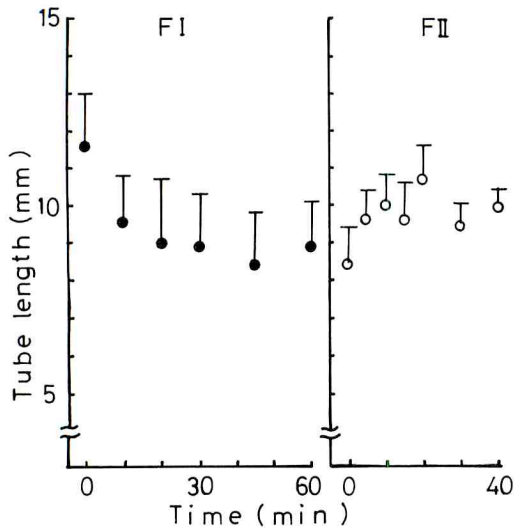


Fig. 2. Effect of heat-treatment on the activity of FI and FII fractions from "Nido".

Fractions (see the legend to Table 2), FI (1.3 mg as protein/10 ml) and FII (0.3 mg liophilizate in 10 ml water), were heated in a boiling water bath for various periods. Each sample was assayed for the promoter activity as in Fig. 1 but after incubation for 24 hr.

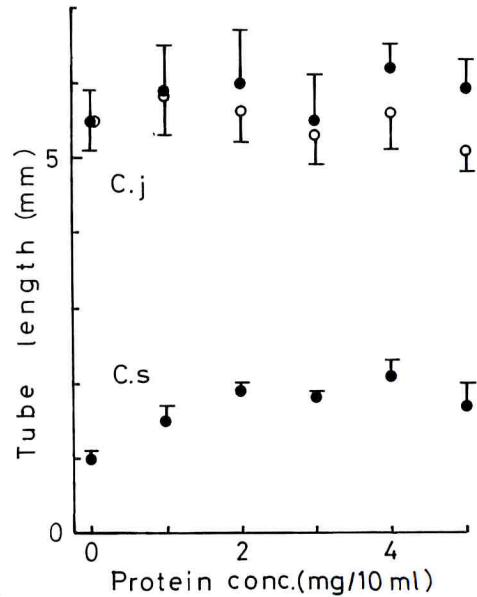


Fig. 3. Effect of milk-proteins on the tube growth of *Camellia* pollens

Camellia japonica (C. j) and *C. sasanqua* (C. s) pollen grains were incubated on SAP medium supplemented with casein (○) or lactalbumin (●) for 20 hr at 25°C.

Table 2. Effect of protease-treatment on the activity of FI fraction from "Nido"

Sample	Pollen tube length (% control)	
Native FI	11.7±0.8 (mm)	(266)
Pronase-treatmentd FI	7.2±0.2	(164)
Pronase	5.3±0.2	(120)
Water	4.4±0.6	(100)

"Nido" (20 g in 150 ml water) was fractionated by ultrafiltration (Amicon YM10) into the excluded and permeated fractions. The former was dialyzed against distilled water (high-molecular fraction, FI) and the latter was concentrated to 20 ml or liophilized (low-molecular fraction, FII). The activity of FI for promoting the tube growth of *C. japonica* pollen was eluted with water at V_0 from a Sephadex G-75 column (cf. Fig. 1). See Fig. 4 for gel filtration pattern of FI.

FI (1.3 mg as protein/10 ml) was digested with 4.3 mg pronase E (Kaken Kagaku) for 18 hr at 30°C and assayed for the promoter activity as in Fig. 1 but after incubation for 26 hr.

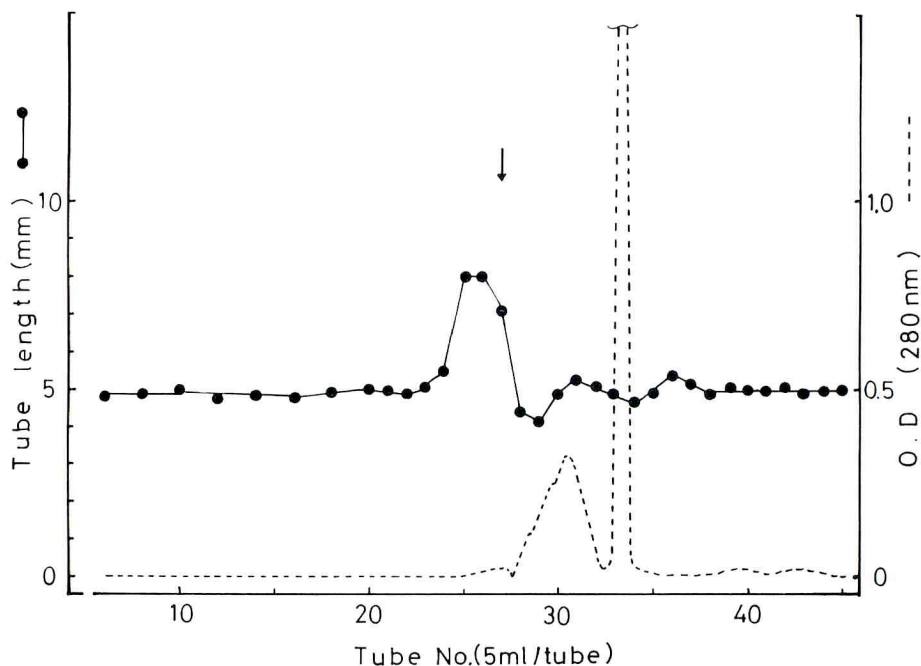


Fig. 4. Gel filtration of FII from "Nido" on Bio-Gel P-2 column.

The concentrated FII (1 ml, see the legend to Table 2) was applied onto a Bio-Gel P-2 column (1.8×81 cm) and eluted with water at a rate of 20 ml per hr. Each fraction was assayed for the promoter activity as in Fig. 1. The arrow indicates the position where raffinose was eluted.

Table 3. Ion-exchange chromatography of the promoting factor in FII fraction from "Nido"

Test solution	Dowex-1		Dowex-50	
	adsorbed	unadsorbed	adsorbed	unadsorbed
+1 ml	3.8±0.1 (mm)	4.5±0.2	5.7±0.3	3.7±0.1
+3 ml	3.5±0.1	5.1±0.2	8.9±0.4	3.0±0.1
+5 ml	2.8±0.1	5.7±0.2	10.1±0.3	2.4±0.1
Water (10 ml)	3.5±0.1	3.3±0.1	3.5±0.1	3.3±0.1

The concentrated active fraction (0.5 ml) obtained by gel filtration of FII (Fig. 4) was applied onto either Dowex-1 or Dowex-50 column (1.2×18 cm) and eluted with water (unadsorbed fraction). The adsorbed fraction was eluted from each column with N HCOOH or N NH₄OH. Each sample was evaporated to dryness in vacuo at 35°C, redissolved in 100 ml water and was assayed for the promoter activity as in Fig. 1 but after incubation for 23-28 hr.

なく、強く樹脂に吸着する傾向がみられたので、溶出条件については現在さらに検討している。このように部分純化した標品は、pH 10.2 にして 24 時間放置しても活性の低下はみられなかったが、pH 3 以下にして放置した場合には活性が失われ、酸に対して不安定であることを示した。また熱に対しては安定であった (図 2)。

表 4 はニドと部分純化した FII 活性物質の花粉管伸長に対する影響をみたものである。ニド、FII 物質ともに発芽率には影響しなかった。ニドはとくにツバキ属、サルスベリ、マルバウツギ、クンシラン、エニシダなどの花粉に対して著しい管伸長促進効果をしめしたほか、数種類の花粉に対しても若干の効果をしめしたが、テッセン、テッポウユリ、ヤマユ

Table 4. Effects of "Nido" and a partially purified preparation of FII on pollen tube growth

Pollen	Pollen tube length (mm)		
	Control	+Nido	+partially purified FII
<i>Camellia japonica</i>	4.0±0.1	12.6±0.3	8.8±0.5
<i>Camellia sasanqua</i>	1.1±0.1	5.4±0.1	2.0±0.1
<i>Camellia sinensis</i>	4.0±0.3	11.6±0.1	9.4±0.2
<i>Punica granatum</i>	0.5±0.03	0.7±0.1	0.6±0.04
<i>Lagerstroemia indica</i>	3.2±0.2	5.2±0.2	4.2±0.4
<i>Deutzia sieboldiana</i>	0.3±0.03	1.0±0.02	0.8±0.01
<i>Clivia nobilis</i>	2.8±0.3	6.1±0.2	4.3±0.5
<i>Campsis grandiflora</i>	0.3±0.1	0.4±0.04	1.0±0.1
<i>Pittosporum tobira</i>	1.5±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1
<i>Cytisus scoparius</i>	2.4±0.03	5.3±0.2	5.6±0.2
<i>Kerria japonica</i>	0.9±0.1	1.3±0.1	1.9±0.1
<i>Salix gracilistyla</i>	1.7±0.1	2.9±0.2	1.9±0.3
<i>Magnolia denudata</i>	2.3±0.2	2.9±0.2	2.2±0.2
<i>Rhaphiolepis umbellata</i>	2.6±0.1	2.5±0.1	2.8±0.1
<i>Malus halliana</i>	1.7±0.1	1.7±0.1	1.8±0.1
<i>Malus pumila</i>	2.4±0.1	2.8±0.2	0.4±0.1
<i>Malus prunifolia</i>	2.2±0.3	1.9±0.4	1.6±0.1
<i>Clematis patens</i>	0.5±0.03	0.6±0.03	0.4±0.01
<i>Clematis florida</i>	1.0±0.2	0.7±0.1	0.6±0.1
<i>Tradescantia paludosa</i>	0.7±0.2	0.8±0.2	0.4±0.2
<i>Tradescantia reflexa</i>	2.2±0.2	2.8±0.2	2.2±0.1
<i>Tulipa gesneriana</i>	5.6±0.3	7.2±0.5	4.6±1.4
<i>Lilium longiflorum</i>	5.6±0.2	4.8±0.2	2.0±0.03
<i>Lilium auratum</i>	4.3±0.1	3.3±0.3	<0.1

Pollen grains were incubated for 20-24 hr at 25°C on SAP medium containing "Nido" (10 mg) or a preparation (0.3 mg) partially purified from FI fraction (see the legend to Table 2.) by gel filtration and Dowex-50 chromatography and lyophilized. As to the medium for *Lilium* pollens, boric acid (100 ppm) and Ca (NO₃)₂ (400 ppm) were further added.

りに対しては阻害を与えた。これに対して FII 物質はツバキ属、マルバウツギ、ノウゼンカズラ、エニシダ、ヤマブキの花粉に対して著しい促進をしめしたが、リンゴ、テッセン、ヤマユリ、テッポウユリの管伸長を強く阻害した。ツバキ花粉抽出液もツバキ属花粉に対して著しい促進効果をしめすが、ユリに対しては阻害をしめした⁽¹⁾

ここに示した乳成分の花粉管伸長作用については、まず生理的意義が問題にされるかも知れない。しかし、その有効物質の性質はいくつかの点でツバキ花粉抽出液の促進物質と類似しており、物質的にはこれらが同種のものである可能性がある。また花粉に

含まれる促進物質の研究を進めるに際して、多量の試料を採取するのが容易でないのに対し、入手し易い乳汁を対象とすれば作用物質の同定も期待される。そしてこのモデル物質を手掛かりとして、花粉や雌ずいの促進物質を検討することができるかも知れない。花粉管伸長促進物質に関する近年の報告は少ない。ツバキ花粉に関する報告の他には、チャ花粉がナタネ油粕水抽出液で⁽⁴⁾アーモンド・ナシ花粉がカルモジュリンで促進される⁽⁵⁾との報告、また柱頭液の効果を検討した報告⁽⁶⁾があるにすぎず、さらに多くの花粉について促進物質の検索が必要であろう。

Summary

The activity for promoting pollen tube growth occurred in commercial milk product such as creaming powder and artificial cream and also in natural cow's and human milk. The active factors in the creaming powder, Nido (Nestlé), were water-soluble and not extractable with organic solvents. They were fractionated into high-molecular (FI) and low-molecular (FII) fractions by ultrafiltration (Amicon YM 10). The activity of FI decreased by heat- or pronase-treatment, hence at least an active substance in FI may be proteinous. However, both casein and lactalbumin did not show any activity. The activity of FII was found in the cationic fraction and was heat-stable and acid-unstable. The major factor in this fraction has a molecular weight of about 600. A preparation partially purified from FII by ion-exchange chromatography stimulated tube growth of pollens of *Camellia* and several other plants but inhibited tube growth of *Lilium* pollens.

References

1. N. Nakamura (1978) J. Yokohama City Univ. Biol. Ser. 5 (1): 1-100.
2. Y. Iwanami (1957) Bot. Mag. Tokyo 70: 146-149.
3. R.F. Itzhaki and D.M. Gill (1964) Anal. Biochem. 9: 401-410.
4. S.Konishi and H. Yokota (1980) Plant and Cell Physiol. 21: 255-263.
5. V.S. Polito (1983) Pollen: Biology and implication for plant breeding (eds. D.L. Mulcahy and E. Ottaviano). P. 53-60. Elsevier Science Publishing Co., Now York.
6. M.K. Kandasamy and M.Vivekanandan (1983) Plant Sci. Lett. 32: 343-348.

○ XV IBC 第15回国際植物学会議（日本・1993）

上記の件について、日本植物学会の沼田会長から次の書面が参りましたので御紹介します。国際会議を日本で開くことは学界のために大いに意義のあることです。国際花粉学会議を日本で開くようにと話のあるのは第8回（1992）です。XV IBCはその翌年です。我々としても慎重に考えて協力したいものです。

昭和59年5月31日

日本花粉学会会長殿

日本植物学会
会長 沼田 真

拝 啓

時下ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。

突然お便りいたしますが、同封コピーの通り、次回の第14回国際植物学会議（西ベルリン）の Secretary, W. Greuter 教授から東京大学理学部の古谷雅樹教授あてに書簡がよせられ、第15回の International Botanical Congress（1993年）を日本でという申し出がありました。古谷教授から返信コピーとともに日本植物学会会長と日本学術会議の今堀宏三会員にご連絡をいただきました。

本学会としては常任評議員会で検討をはじめましたが、この Congress は植物学に関連する基礎および応用の全分野を網羅する会議であり、植物学に関連するすべての学会の協調なくしては開催不可能と考えます。

アジア地域ではまだ開催されていないことから前向きに検討すべきであると判断していますが、近來日本で開かれているいろいろな国際会議にくらべ、その規模は大きく、経費、会場などを考えますと必ずしも楽観視して承諾することは出来ません。場合によっては関連する学会の代表者に集っていただいて検討することも必要かと考えています。

貴学会におかれても、上記の件について慎重にご審議いただきご意見をおよせいただきたく存じます。

10年程先の1993年のこととはいえ、出来るだけ早くご意見をとりまとめ、何らかの結論を出したいと思っておりますので、ご多忙のことと存じますが、ご高配下さいますようお願い申し上げます。

敬 具