

原 著

花粉の生化学的研究 XXIX

アカマツ花粉の遊離アミノ酸およびアミノ酸脱水素酵素の発芽時の変動

勝又悌三*・江尻慎一郎*・村中文人*

Biochemical studies on pollen XXIX

Changes in free amino acid contents and some amino acid dehydrogenase activities during germination of the pollen of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.Teizo KATSUMATA*, Shin-ichiro EJIRI* and
Yasuhito MURANAKA*

(受付：1984年10月29日)

緒 言

花粉中の遊離アミノ酸については、多数の報告⁽¹⁻⁴⁾があり、一般に他の植物細胞に比べて多量の遊離プロリンが含まれていることが知られている。このプロリンの役割については、細胞壁グリコペプチドの形成⁽⁵⁾や稔性との関連⁽⁶⁾から議論されているが、近年、花粉の熱ストレスに対する抵抗因子としての働きも報告⁽⁷⁾されている。

筆者らは、花粉の生化学的研究の一部として、アカマツ花粉発芽時に、培地中の糖の有無によってインペルターゼ、リパーゼなどの活性発現に差があること⁽⁸⁾アカマツ花粉の貯蔵中に遊離グルタミン酸が減少し栄養源として代謝されている可能性があること⁽⁴⁾などを報告した。

このたびは、無糖およびショ糖培地での花粉発芽

に伴う遊離アミノ酸の変動と、プロリンデヒドロゲナーゼおよびグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の変動を検討した結果を報告する。

実験方法

1. 試料

前報⁽⁹⁻¹¹⁾に準じて調製したアカマツ(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 完熟花粉および発芽花粉 (50 ppm chloramphenicol および 10 ppm methylbenzimidazole-2-yl-carbamate を含む 3%寒天または 3%寒天-3%ショ糖培地で発芽。250 mg の花粉を使用) を試料とした。

2. 遊離アミノ酸分析法

完熟花粉または発芽花粉を 1%ピクリン酸 20 ml 中にけん濁し、超音波発生装置 (海上電機 T-A-

* 〒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 020, Japan

4280 型)を用いて 2 分間超音波処理した後、10,000×g、5 分間遠心分離した。上清 1 ml を Dowex CG 400 Type I Cl⁻型カラム (0.8×6 cm) に供し、カラムを 0.02 N HCl で溶出し、10 ml の溶出液を集め、溶出液を HCl が完全に除去されるまで、エバポレーターで乾固した。次いでこれをアミノ酸分析機用 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0) 200 μ l に溶かし、10,000×g、5 分間遠心分離を行い、得られた上清 20 μ l について Dionex D 500 型全自動アミノ酸分析機で分析を行った。

カラムは Durrum DC-4 A (0.175×48 cm) Na 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。

3. 酵素液の調製

上記花粉を 20 倍量の抽出溶媒とともにガラスホモジナイザーでよく磨砕し、10,000×g、5 分間の遠心分離を行い、上清を酵素液とした。以上の操作はすべて 5°C 以下で行った。抽出溶媒はプロリンデヒドロ

ゲナーゼ (Pro DH) に対しては 50 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) に対しては 0.1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) を用いた。酵素液は必要に応じて適宜抽出溶媒で希釈し、活性測定に供した。

4. 酵素活性の測定

- (1) Pro DH: Rena らの方法⁽¹²⁾に従い、プロリンの分解に伴って生成する NADH による 340 nm における吸光度の増大を測定して活性を求めた。すなわち、0.33 M プロリン 50 μ l、0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) 2.7 ml、酵素液 200 μ l を含む反応液を 30°C、2 分間プレインキュベートした後、0.16 M NAD 50 μ l を加えて、ただちに 5 分間、1 分ごとに測定した。
- (2) GDH: 相田らの方法⁽¹³⁾に従い、グルタミン酸の分解に伴って生成する NADH による 340 nm にお

Table 1. Changes in free amino acid contents of pine pollen germinated on a 3% agar medium

	Germination time (hr)					
	0	6	12	18	24	36
Asp	8.14	7.53	15.74	13.80	10.34	10.69
Thr+Ser *	13.28	21.91	21.54	26.76	25.00	35.78
Glu	13.42	7.61	15.70	13.81	10.07	5.16
Pro	40.60	38.46	38.89	42.01	34.67	2.11
Gly	2.04	0.68	1.87	1.52	1.44	1.87
Ala	5.44	4.75	13.22	12.08	11.01	11.83
Val	1.27	1.52	2.98	2.26	2.08	2.37
Met	T	T	0.76	0.28	0.19	0.33
Ile	0.66	0.75	1.87	1.36	1.03	1.24
Leu	0.81	1.04	1.83	1.49	1.10	1.48
Tyr	2.49	1.83	2.47	2.03	1.49	1.27
Phe	0.84	1.14	1.16	0.94	0.56	0.36
His	1.44	1.26	1.71	1.85	1.24	9.55
Lys	2.61	2.82	3.84	4.05	3.21	2.16
Arg	29.52	19.24	22.38	24.07	17.64	8.55
Total	121.83	120.00	145.40	148.31	121.07	94.75

T: trace amounts, *: Mixture of Thr, Ser, Gln, and Asn
Figures denote micromoles per gram pollen.

ける吸光度の増大を測定して活性を求めた。すなわち、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) 1 ml、0.33 M グルタミン酸 0.1 ml、脱塩水 1.5 ml、酵素液 0.2 ml を含む反応液を 30°C、2 分間ブレインキュベートした後、0.5 % NAD 溶液 0.2 ml を加え、(1) に準じて活性を測定した。

実験結果

1. 完熟花粉の遊離アミノ酸組成と発芽に伴う遊離アミノ酸量の変動

アカマツ完熟花粉に含まれる遊離アミノ酸の組成を Table 1 に示した。完熟花粉からは 16 種類 (スレオニン、セリンはグルタミン、アスパラギンなどが混在し分離できないため、混合物として表した) のアミノ酸が検出された。全アミノ酸量は完熟花粉 1 g 当り 122 μ mole、重量にして 1.7 % (w/w) であった。最も多く含まれるアミノ酸はプロリンで、全アミノ酸の 34 % を占め、次いでアルギニン (24 %)、グルタミン酸 (11 %)、アスパラギン酸 (7 %) など

が主要なアミノ酸であった。

3 % 寒天培地 (無糖培地) および 3 % ショ糖-3 % 寒天培地 (ショ糖培地) 上で発芽させた花粉に含まれる遊離アミノ酸量を Table 1 および Table 2 に示した。全アミノ酸量は両培地とも発芽後 12 時間でやや増大し、その後ゆるやかに減少した。最大含量を示すプロリンは、ショ糖培地では発芽 36 時間までほとんど変化を示さなかったが、無糖培地では発芽 24 時間後から減少し、発芽 36 時間後には未発芽の 5 % 以下にまで減少した。次いで多いアルギニンは、両培地とも発芽に伴い徐々に減少し、発芽 36 時間で未発芽の約 25 % まで減少した。グルタミン酸はプロリンと同様無糖培地で減少が著しく、一方、アスパラギン酸はショ糖培地で減少を示した。また、無糖培地においてスレオニンおよびセリン分画のアミノ酸が顕著に増大し、発芽 36 時間後で未発芽の約 3 倍量に達した。他のアミノ酸には、大きな変化はみられなかった。

Table 2. Changes in free amino acid contents of pine pollen germinated on a 3 % agar-3 % sucrose medium

	Germination time (hr)					
	0	6	12	18	24	36
Asp	8.14	10.01	9.89	6.58	6.29	2.63
Thr+Ser *	13.28	16.41	15.50	19.86	17.65	10.41
Glu	13.42	17.71	20.54	16.00	13.74	12.06
Pro	40.60	37.80	47.55	39.02	41.56	41.70
Gly	2.04	0.66	1.24	1.10	1.13	1.57
Ala	5.44	5.61	8.76	9.21	9.10	11.87
Val	1.27	1.43	1.82	2.03	1.95	2.72
Met	T	T	0.27	T	0.28	0.33
Ile	0.66	0.98	0.82	1.13	1.00	1.23
Leu	0.81	1.51	1.39	1.26	1.29	2.16
Tyr	2.49	2.04	1.88	1.37	1.14	1.01
Phe	0.84	0.68	0.81	0.84	0.87	0.86
His	1.44	2.05	2.13	2.09	1.85	0.56
Lys	2.61	3.04	3.21	3.18	2.89	2.09
Arg	29.52	25.64	22.48	18.39	14.28	7.59
Total	121.83	125.57	138.27	122.06	115.02	98.79

T: trace amounts, *: Mixture of Thr, Ser, Gln, and Asn
Figures denote micromoles per gram pollen.

2. 花粉発芽に伴う Pro DH および GDH 活性の変動

無糖培地およびシヨ糖地での花粉発芽に伴う Pro DH 活性の変動を Fig. 1 に示した。無糖培地では活性はやや減少した後徐々に増大し、発芽 36 時間では未発芽の約 1.8 倍の活性を示した。一方シヨ糖培地での活性は、発芽 18 時間で未発芽の約 1.5 倍まで増大した後ゆるやかに減少し、発芽 36 時間ではほぼ未発芽花粉と同程度の活性を示した。

無糖培地およびシヨ糖培地での花粉発芽に伴う GDH 活性の変動を Fig. 2 に示した。無糖培地では活性は発芽 18 時間後から急激に増大し、発芽 36 時間で未発芽の約 3.3 倍に達した。活性はその後すみやかに減少したが、発芽 48 時間後においても未発芽の約 2 倍の活性を保っていた。一方シヨ糖培地においてはこのような活性の著しい変動はみられず、活性は徐々に増大して発芽 36 時間後に、未発芽の約 1.6

倍のレベルに達した。

考 察

完熟アカマツ花粉のアミノ酸組成は他の多くの花粉で報告⁽¹⁻³⁾されているように、プロリンが最も多く、次いでアルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸などに富んでいることが示された。花粉発芽に伴う遊離アミノ酸の変動に関する報告は少ないが、原ら⁽¹⁴⁾はマツ (*Pinus thunbergii*) 花粉を 3%シヨ糖培地で 72 時間培養し、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニンなどが著しく減少することを報告している。また Zhang ら⁽¹⁵⁾はペチュニア花粉で、培地に加えた ¹⁴C-プロリンが花粉内に取り込まれ TCA 回路に入るが、他のアミノ酸には転換されないことを報告している。

アカマツ花粉発芽に伴う遊離アミノ酸、Pro DH および GDH 活性の変動を無糖培地とシヨ糖培地で比較

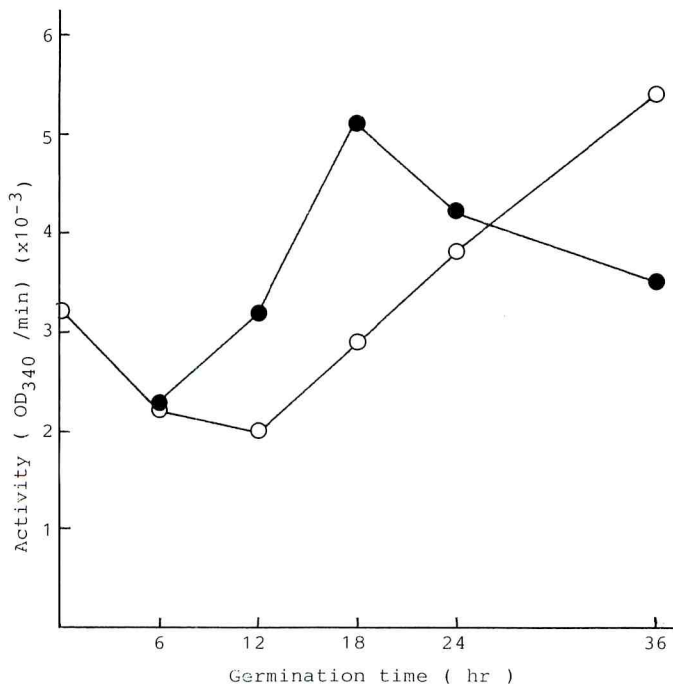


Fig. 1. Change in proline dehydrogenase activity during germination of pine pollen.

Pine pollen was germinated at 30°C on a 3% agar medium (○), or 3% agar-3% sucrose medium (●).

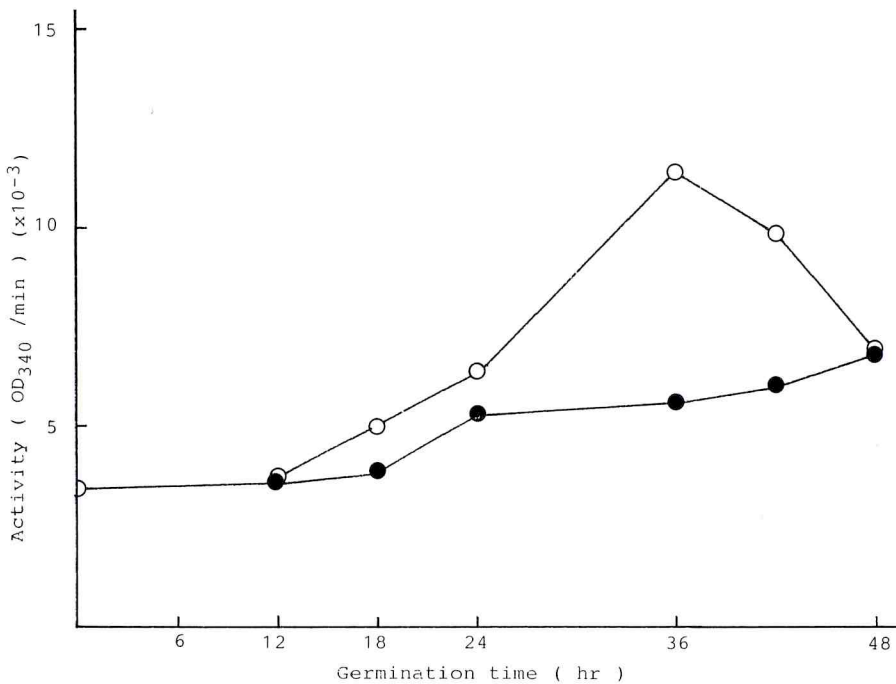


Fig. 2. Change in glutamic acid dehydrogenase activity during germination of pine pollen.

Pine pollen was germinated at 30°C on a 3% agar medium (○), or 3% agar-3% sucrose medium (●).

すると以下のことが指摘できる。(1)無糖培地発芽花粉では発芽24時間からグルタミン酸、プロリンの著しい減少がみられるが、ショ糖培地では著しい減少はみられず、ほぼ未発芽時の量が保たれる。(2)無糖培地発芽花粉では発芽18時間後からProDH活性が増大する一方、ショ糖培地発芽花粉では発芽18時間で約50%活性が増大するが、その後は徐々に減少する。(3)GDH活性も、無糖培地発芽花粉では発芽24時間から36時間にかけて未発芽の3倍以上に増大したが、ショ糖培地発芽花粉では、約1.6倍に増大するにとどまった。このような結果は、花粉が培地中の糖を栄養源として利用できる場合、プロリンやグルタミン酸などのアミノ酸を栄養源として利用しないが、培地から糖が供給されない場合は花粉内のグルタミン酸の利用に加えプロリンをグルタミン酸、 α -ケトグルタル酸を経てTCA回路に取り込み、発芽および花粉管伸長に必要なエネルギー源および炭

素源として利用している可能性を示唆している。

アカマツ花粉中で2番目に多いアルギニンの役割については、無糖とショ糖の両培地で同様の減少を示すことから、エネルギー源としてより窒素の供給源として働いている可能性が考えられる。

植物のProDHについては、コムギ⁽¹⁶⁾カボチャ⁽¹⁷⁾などで精製され、諸性質が検討されているが、花粉ではMalikら⁽¹⁸⁾が*Crotalaria juncea*花粉で発芽に伴う活性の増大を報告しているのみである。アカマツ花粉のProDHは、カボチャなどで報告されると同様に、pH10以上の高い至適pHを示した。しかしながら、活性発現の調節を含めた諸性質の検討は今後の課題である。

GDHは多くの植物^(19,20)花粉⁽²¹⁾で存在が認められ、その多形性や、様々な物質による活性の調節が知られている。アカマツ花粉GDHは、培地の条件により、活性の発現に著しい差が生じ、特に無糖培地発芽花

粉での活性増大が著しいことから、培地からの栄養源の供給の有無によって活性の発現が調節されると推定できる。

花粉が通常発芽し、花粉管を伸長する花柱内の環境は安定していると考えられるにもかかわらず、花粉が外界の条件に対応して酵素活性を調節していることはきわめて興味深い。

要 約

アカマツ花粉発芽時の遊離アミノ酸量の変動およびプロリンデヒドロゲナーゼ (Pro DH) とグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) 活性の変動を、無糖およびショ糖培地発芽花粉で比較検討し次の結果を得た。

- (1) 完熟花粉の遊離アミノ酸は、花粉 1 g 当り 122 μ mole 含まれ、最も多いアミノ酸はプロリンで全アミノ酸の 34 % を占め、次いでアルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸が多かった。
- (2) 花粉発芽に伴い、無糖培地発芽花粉ではプロリン、グルタミン酸およびアルギニンが著しく減少したが、ショ糖培地発芽花粉ではアルギニンのみに減少が認められた。
- (3) Pro DH 活性は、無糖培地発芽花粉では発芽 18 時間後から増大したが、ショ糖培地発芽花粉では、発芽 18 時間で一時増大した後減少した。
- (4) GDH 活性は、無糖培地発芽花粉では発芽 36 時間で未発芽の 3.3 倍まで増大し、その後減少した。一方、ショ糖培地発芽花粉では活性はゆるやかに増大し、発芽 36 時間で未発芽の約 1.6 倍に達した。
- (5) 以上の結果から、遊離のプロリンおよびグルタミン酸は、外界からエネルギー源が供給されない場合発芽時の花粉管伸長に必要なエネルギー源または炭素源として利用されていることを推定した。

本研究の一部は文部省科学研究費 (総合研究 A、No. 59340041 および No. 59340045) によって行ったものであり、厚く感謝の意を表す。

また methylbenzimidazole-2-yl-carbamate を御恵与下さった日本ソーダ株式会社に深く感謝致します。

文 献

1. 岩波洋三: 花粉学, 講談社サイエンティフィック, p. 67-69 (1980).
2. E. Duhoux and P.T. Anh Thu: *Physiol. Plant.*, **50**, 6-10 (1980).
3. A.V. Gorobets, V.A. Bandyukova, D.K. Shapiro, L.V. Anikhimovaskaya and T.I. Narizhnaya: *Khim. Prir. Soedin.*, **5**, 672-673 (1981).
4. 勝又悌三・斗ヶ沢宣久・小幡弥太郎: *農化*, **37**, 439-443 (1963).
5. W.V. Dashek, R.H. Thomson, D.M. Hayward and H.I. Harwood: *Amer. J. Bot.*, **59**, 649 (1972).
6. J. Tupy: *Biologica Pl.*, **5**, 154-160 (1963).
7. H.Q. Zhang and A.F. Croes: *Plant Cell Environ.*, **6**, 471-476 (1983).
8. S. Ejiri, H. Abe and T. Katsumata: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2091-2092 (1977).
9. 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・太田達郎: *農化*, **41**, 178-183 (1967).
10. 勝又悌三・斗ヶ沢宣久: *農化*, **42**, 1-7 (1968).
11. 府川博文・江尻慎一郎・勝又悌三: 日本農芸化学会大会講演要旨集 p.226 (1983).

12. A.B. Rena and W.E. Splittstoesser : *Phytochemistry*, **13**, 2081—2084 (1974).
13. 相田 浩・大石邦夫・朝井勇宣 : *農化*, **34**, 70—77 (1960).
14. 原 彰・加藤正人・船隈 透 : *花粉誌*, **30**, 31—36 (1984).
15. H.Q. Zhang and A.F. Croes : *Planta*, **159**, 46—49 (1983).
16. M. Mazelis and R.K. Creveling : *Phytochemistry*, **13**, 599—604 (1974).
17. A.B. Rena and W.E. Splittstoesser : *Phytochemistry*, **14**, 657—661 (1975).
18. C.P. Malik, M.B. Singh and A. Kapur : *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **169**, 621—623 (1976).
19. A. Ehmke and T. Hartmann : *Phytochemistry*, **17**, 637—641 (1977).
20. W. Nauen and T. Hartmann : *Planta*, **148**, 7—16 (1980).
21. C.P. Malik and K. Arvind : *Indian J. Exp. Biol.*, **17**, 650—652 (1979).

Summary

Changes in free amino acid compositions, proline dehydrogenase activity, and glutamate dehydrogenase activity during the germination of pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) pollen were analyzed. One gram of ungerminated pollen contained 122 micromoles of amino acids. The dominant amino acids were proline, arginine, glutamic acid, and aspartic acid and the contents in the ungerminated pollen were about 34%, 24%, 11%, and 7% of the total amino acids, respectively. When the pollen was germinated on an agar medium without added sucrose, proline and glutamic acid decreased at a later period of germination (36 hr). In the presence of added sucrose, however, both amino acid did not decrease at all. Proline dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities were also greatly affected by the addition of sucrose to the medium. In the absence of added sucrose, proline dehydrogenase activity increases gradually in the later period of germination and about two-fold increase in the activity was observed at 36 hr of germination. In the presence of added sucrose, however, 1.6-fold increase in activity was observed at 18 hr and then it decreased. In the presence of sucrose, glutamate dehydrogenase activity increased gradually and only 1.6-fold increase in the activity was observed at 36 hr of germination, whereas in the absence of sucrose about 3.3-fold increase in the activity was observed at 36 hr.

These results suggest that proline and glutamic acid are used as an energy source or a carbon source for the pollen tube elongation when exogenous nutrient was not supplied.

○ 第3回国際空中生物学会議 (1986年8月)



3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON AEROBIOLOGY

AUGUST 5-8 1986, BASÉL, SWITZERLAND

Administrative Secretariat
P.O. Box 182
CH-4013 Basel, Switzerland

空中生物学は各国とも盛んに行われている。花粉学はとくに重視されている。カナダ・カルガリー大学でのVI IPCでも盛んに話題になった。バーゼルはライン河にのぞむ風光明媚な古都である。

トピックスとして Allergology (アレルギー)、Microbiology, Environment, Biometeorology and Aeropalynology, Methods など。

○ IBRA 国際ミツバチ研究協会

玉川大学ミツバチ科学研究所では IBRA 援助への協力を求めている。日本花粉学会員各位の関連研究分野でもあるので宜しく。

玉川大学から次の文書が来ている。

1984・2・10

国際ミツバチ研究協会 (IBRA) 援助にご協力いただけませんか

玉川大学ミツバチ科学研究所

International Bee Research Association (IBRA) の活動については「ミツバチ科学」誌上にご紹介しておりますが、昨年末まで代表として献身的なお世話をしてくられたエバ・クレイン博士が、財政的に苦しい IBRA に対して皆様からのご援助をと、アピールされています (ミツバチ科学 5 巻 1 号参照)。

既に何人かの方からはご芳志をいただいておりますが、今回クレイン博士の来日にあたり、私共 IBRA と永年交流をしております立場から、広く皆様にご案内お願い致したく存じます。

お寄せいただく金額はご自由で結構ですが (めどとして 1 口 4,000 円を考えております)、ご協力者は個々のお名前を添えて IBRA に送金し、後日そのご報告をさせていただきます。送金は IBRA 日本地域幹事をしております松香光夫宛 (郵便振替東京 6-6780) お振り込みいただきますと有難く存じます。