

## ミョウガ花粉のポレニプラスト化

小波本直忠\*・宮田重文\*・宮平寿\*・福田俊一郎\*

Pollenioplast Production from the Pollen of *Zingiber mioga* Roscoe

Naotada KOBAMOTO\*, Sigefumi MIYATA\*, Hisasi MIYAHIRA\*

and Shunichiro FUKUDA\*

\* Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-01, Japan

The amount of the polleniplasts (pollen protoplasts) produced by an enzymatic method from the mature pollen of *Zingiber mioga* Roscoe was 4%. An immersion of the pollen into 1 M hydrochloric acid could not produce polleniplasts, while heating the system at 120°C gave the amount of polleniplasts of 23%. The combined method of an acid-heating treatment and an enzymatic treatment increased the value to 44%.

By an acid-heating treatment, the degradation of intine was greater than that of plasma membrane or exine. By the combined method, the degradation occurred mainly on intine and partly on exine, leading to the removal of exine.

Obtained polleniplasts maintained some functions of plasma membrane such as responding toward variations in the osmotic pressure of a bathing solution and showing their adhesion and fusion.

## 緒 言

花粉が物理的および化学的に安定な外壁で保護されていることは古くから知られている。この外壁の安定性に寄与している物質は、スポロポレニンとよばれ、強酸や強アルカリによる処理に対しても安定であるため、近年、注目を受け、多くの研究が進められている<sup>(1,2)</sup>。しかし、スポロポレニンの理化学的諸性質および生合成の経路の解明は、いまだ充分になされていない。これは、花粉の外壁を純粋な形で取り出すことが困難であったことに一因があり、この物質の研究を進めるうえで、まず、試料となる外壁の回収率を高める必要が

ある。

一方、花粉の外壁および内壁を除去した、原形質膜を伴った細胞質、いわゆる花粉のプロトプラスト(これをポレニプラスト、pollenioplast、と命名する)、は一倍体(半数体)の染色体を有するため、植物の遺伝子操作における核内への遺伝子導入に際して適当な材料となり得ることが予想される。

前述のように、葉肉組織などの細胞壁に比べて花粉の外壁は化学的に安定であるため、従来の細胞壁分解酵素法によってポレニプラストを単離<sup>(3)</sup>することは困難であり、何らかの工夫が必要とされている。

そのような工夫の一つとして、Bajaj<sup>(4)</sup>は、ペチュ

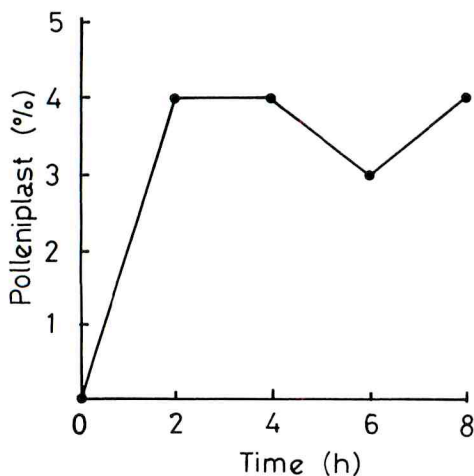
ニア (*Petunia hybrida*) とアvena (*Avena sativa*) の花粉に対して、細胞壁分解酵素法を用いるために、まず、外壁を除去するのに圧搾や振動の操作を加えることを試みたが、ポレニプラスト化率は低かった。それ以後、ポレニプラスト化に関する報告は多くない。

本研究では、ミョウガ (*Zingiber mioga* Roscoe) の成熟花粉から外壁およびポレニプラストを分離する方法として、従来の酵素的手法に前処理として塩酸加熱による操作法を開発したので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 細胞壁分解酵素によるポレニプラスト化

冷アセトン中で貯蔵したミョウガ *Zingiber mioga* Roscoe) の成熟花粉をパスツールピペットを用いて試験管に2滴 (50,000個) とり、アセトンを揮発させ、粉末状に乾燥した後、さらに70%エタノールで洗浄して十分に乾燥させたものを試料 (乾燥試料) として用いた。乾燥試料に細胞壁分解酵素 (10g / 1セルラーゼ、オノズカR-10, 2g / 1マセロザイムR-10, 0.1g / 1ペクトリアーゼY-23, 0.6 Mマンニトール pH7) を2 ml加え、湯浴 (30°C) でゆるやかに振とうした。観



**Fig. 1.** Time course of the amount of polleniplasts (pollen protoplasts) produced by enzyme degradation of mioga mature pollens.

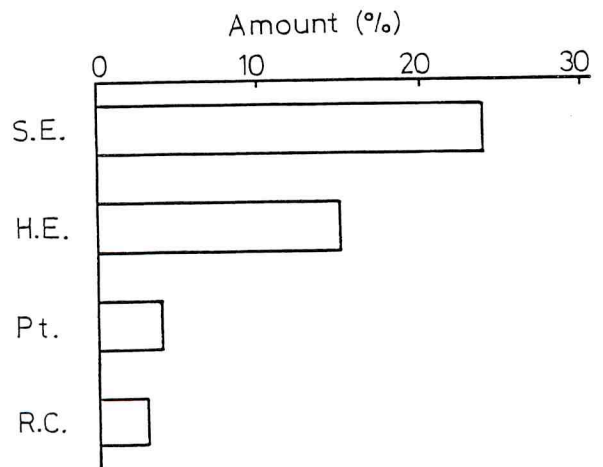
察はインキュベート中2時間ごとに行い、それぞれサンプルを0.5μl 遠沈管にとり上清みを除いて0.6 Mマンニトール液を加え洗浄した後遠沈し、沈殿物中に含まれる約500個の花粉末をスライドガラス上にとり、ポレニプラスト化率を調べた。

#### 2. 塩酸加熱処理と細胞壁分解酵素処理の併用法によるポレニプラスト化

前述の方法で調整したミョウガの乾燥試料に1 M塩酸0.5ml加え、ガスバーナー (120°C) で3秒間加熱処理し、直ちに試験管を流水中で4秒間浸し、ついで、氷水中で30秒間冷却した後、1 M水酸化ナトリウム液で中和した。また、0.6 Mマンニトール液で洗浄して花粉を遠沈させた後、上清みを除き前処理とした。細胞壁分解酵素の処理方法は、すでに前節1.で述べた通りである。光顕により、沈殿した花粉約500個をスライドガラスにとり、ポレニプラスト化率を調べた。

#### 3. 細胞壁分解酵素液の調整

0.6 Mマンニトール液を80mlとり200 mlのビーカーに入れ、セルラーゼオノズカR-10を1g、マセロザイ



**Fig. 2.** Mode of enzyme degradation on mioga mature pollen.

S.E.: pollen with swollen exine, H.E.: pollen with hanging exine due to the partial exposure of intine. Pt.: polleniplasts, C.: ruptured cells.

ムを200mg、ペクトリアーゼを10 mgをそれぞれ加えて、すべてがよく溶けてから、0.6 Mマンニトール液を加えて100 mlとした。

#### 4. 酵素

細胞壁分解に市販の酵素を用いた。すなわち、セルラーゼオノズカR-10、マセロザイムR-10、ペクトリアーゼY-23を近畿ヤクルト(株)から入手して使用した。

#### 5. 漏過器

用いた酵素液の漏過滅菌には、ザルトリウスのポリカーボネイト漏過器SM16510/11を用い、フィルターに、ザルトリウスのセルロースアセテートフィルターSM111 07-47Nを用いた。

## 結 果

### 1. 細胞壁分解酵素法による無処理花粉のポレニプラスト化

ミョウガの乾燥花粉(無処理花粉)に対して細胞壁分解酵素法を用いた場合のポレニプラスト化率はFig. 1に示した通りである。図から明らかなように、酵素の作用は、ポレニプラスト化率からみると、2時間で最高値に達した。この値は、8時間に至っても維持されたが、6時間を過ぎると原形質の部分が収縮することが確認された。これは、長時間の酵素反応が原形質膜の機能に変化を与えたことまたは分解産物が浸透圧に変化を与えたことを示している。

細胞壁分解酵素法による無処理花粉のポレニプラスト化率は4%であり、この値は極めて低いといえる。有為なポレニプラストの単離を行うためには、花粉の外壁を物理的または化学的方法により前処理して除去する必要があると考えられた。

Fig. 2で示したように、花粉壁に変化が見られたものの中では、外壁が破壊された細胞、破壊された外壁の裂け目から部分的に出かかった細胞、ポレニプラスト、そして、破断された細胞の順にそれらの発生率が減少した。以上のことは、この系でのポレニプラスト化の過程が、上述の順に進むことを示唆するものと

思われる。

### 2. 塩酸処理

花粉を1 M塩酸に浸漬しても形態的には何ら変化は認められなかった。ポレニプラスト化も起こらなかった(Fig. 3. A)。

### 3. 塩酸加熱処理

1 M塩酸中で乾燥試料を急速に3秒間加熱することにより、花粉は膨潤し、外壁を剥離したり、さらにポレニプラスト化して(Fig. 3. B-F)、23%の高いポレニプラスト生産性を示した(Fig. 4)。

またFig. 4に示したように、外壁を伴った細胞、ポレニプラスト、破断された細胞、および内壁を伴った細胞の順に出現率が減少した。以上のことから、塩酸加熱処理では、外壁や原形質膜に比べて内壁が分解を受けやすいことが推測される。無処理花粉の10%に細胞破断の起こることが示された。

### 4. 細胞壁分解酵素法による塩酸加熱処理花粉のポレニプラスト化

ポレニプラスト単離能を高めるために、乾燥試料に1 M塩酸加熱による前処理を行い、ついで、細胞壁分解酵素法によるポレニプラスト化率について調べた結果をFig. 5に示した。塩酸加熱処理をした花粉に酵素液を添加すると、75分後で44%に達するポレニプラスト化の最高値が認められた。このように、塩酸加熱前処理は、細胞壁分解酵素法によるポレニプラスト生産性を倍加することが確認された。酵素作用時間を75分より長くした場合には、ポレニプラストの出現率は低下するが、これは原形質が液胞化して、細胞破断が進むためと思われる。特に、24時間作用させると、全てのポレニプラストに液胞が認められるようになった。

Fig. 6から明らかなように、外壁を伴った細胞、ポレニプラスト、破断された細胞、および内壁を伴った細胞の順に出現率は減少する。以上のことから、おもに塩酸加熱前処理法により外壁を剥離した細胞(Fig. 3. C)は、酵素により内壁が効果的に分解されてポレニプラスト化し(Fig. 3)、さらに外壁の剥離も酵素により促進されることが推測される。一方、細胞の破

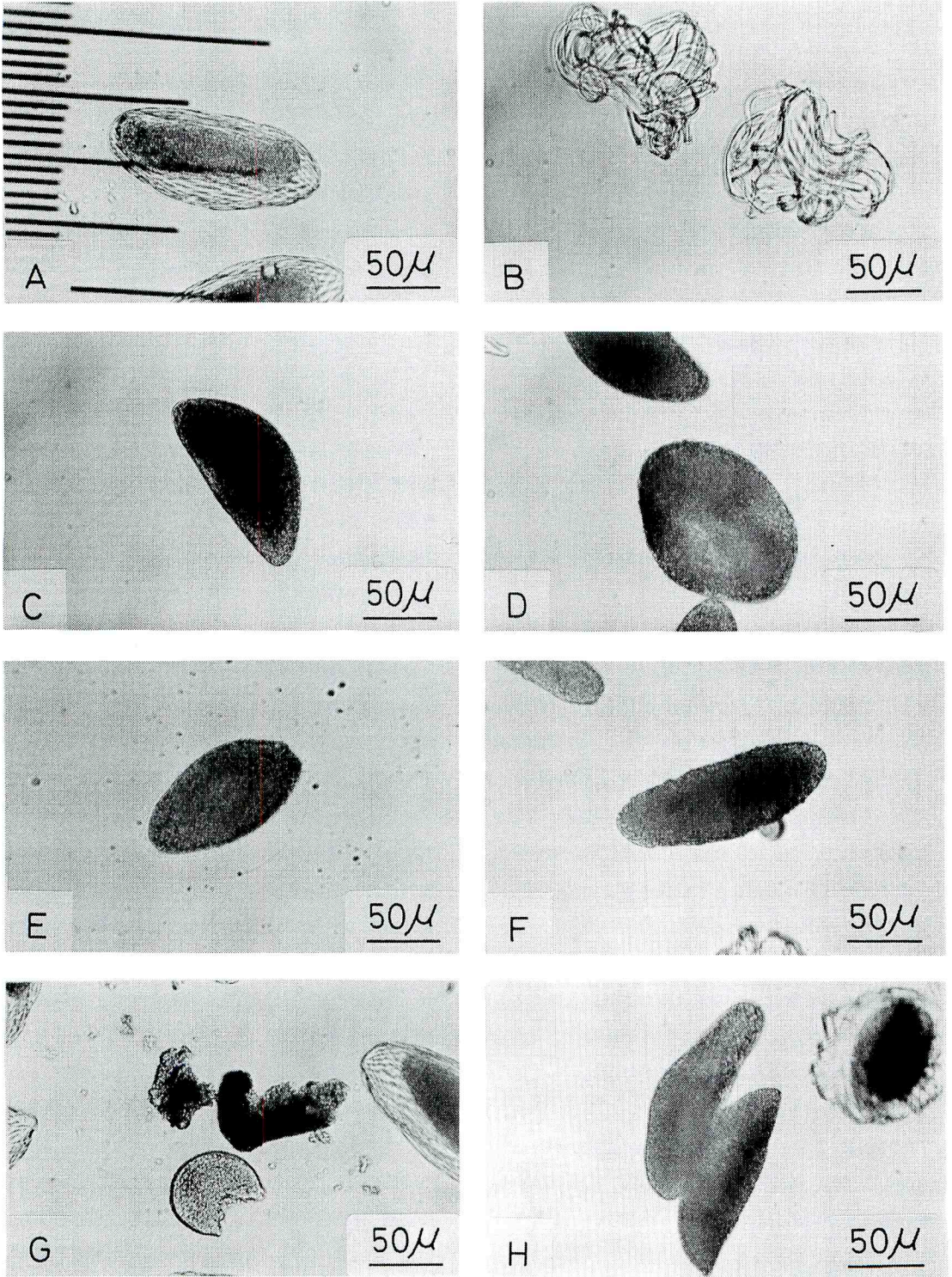


Fig. 3.

断は塩酸加熱処理法によって得られた値より増加せず酵素による影響は無いものと思われる。

併用法および塩酸加熱処理法で得たポレニプラストは、水溶液の浸透圧変化に反応を示した。たとえば、1 M 塩酸液 (Fig. 3. D) から 0.6 M マンニトール液 (Fig. 3. F) へ移すと内壁を伴った細胞 (Fig. 3. C, F) と同様に収縮し、さらにポレニプラストを 0.6 M マンニトール液 (Fig. 3. F) から蒸留水へ移すと急速な膨潤による細胞破断が起こった (Fig. 3. G)。また、ポレニプラスト間の接着および融合が酵素処理操作中に起こることもみられた (Fig. 3. H)。以上のことから、このポレニプラストは原形質膜の機能の一部は保有していることが示された。

## 考 察

成熟花粉は、普通の植物細胞と同様に、原形質膜、細胞質、核を持っているが、他の植物細胞との相違点の一つは花粉細胞が内壁および外壁に包まれていることである。花粉の内壁は、おもに、ペクチンとセルロースからできている。外壁は、スプロポレニンが主成分とし、脂質、リグニンおよびセルロースなどからなる化学的に安定な性質を持っていて、王水中でも分解を受けないことが知られている<sup>(1,2)</sup>。

本報告では、ミョウガ花粉の外壁と内壁を除去し、ポレニプラストを単離する方法を検討した。

細胞壁分解酵素法によるミョウガの無処理花粉のポレニプラスト化率は低いことが確認された (Fig. 1, 2)。これは、ミョウガ花粉の場合、外壁の主成分で

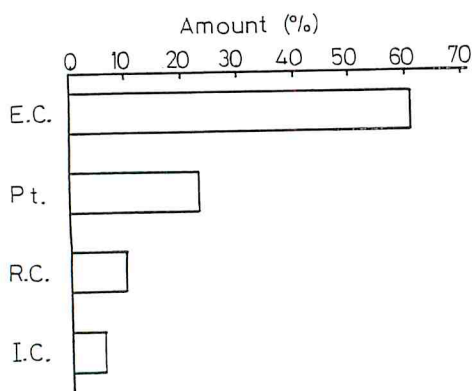
あるスプロポレニンがセルロースより多く存在し、ポレニプラスト化を阻止していることが考えられる。

Bajaj (1983)<sup>(4)</sup> は、物理的方法である圧搾や振動によって花粉の外壁を剥離させ、内壁を酵素によって溶解させ、ポレニプラストを単離した。しかし、その単離率は24時間の反応後に25%であり、細胞融合や遺伝子導入を行なうためには低い値である。それゆえ、単離率を高めることが必要と考えられる。従って、花粉のポレニプラスト化における外壁を除去する操作が要求され、効果的な前処理法の確立が望まれる。

そこで、著者等は、花粉の外壁にセルロースも存在することから考えて、セルロースやペクチンの分解に用いられる塩酸処理法による花粉のポレニプラスト化を試みたが、形態的には全く変化はみられなかった (Fig. 3. A)。しかし、さらに短時間急速に加熱操作を行うことによって、外壁の構造を軟弱にし、あるいは外壁を剥離させ得ることがわかった (Fig. 3. B)。つまり、花粉の多くは、ポレニプラストになり (Fig. 3. D, F)、あるものは内壁を伴った細胞として残った (Fig. 3. C, E, 4)。このような強烈な反応操作の過程で、原形質膜破断の可能性も考えられる。しかし、実験結果は、外壁が熱に対して強いことと、内壁の存在が緩衝効果を示し、高熱処理に対してかえって原形質膜を保護することを示唆している。また、いくらかの細胞破断は、ポレニプラストの単離効率を高めるためには止むを得ないものであった。

このような塩酸加熱前処理を行い、さらに細胞壁分解酵素を作用させる併用法により、ミョウガ花粉のポ

**Fig. 3.** Mioga mature pollens. A : intact pollen in 1 M hydrochloric acid solution, B : empty exine shells released by an acid-heating treatment, C : intine-enclosed cell freed by an acid-heating treatment, D : polleniplasts produced by an acid-heating treatment, E : intine-enclosed cell freed by an acid-heating treatment and placed in 0.6M mannitol solution, F : polleniplasts produced by an acid-heating treatment and placed in 0.6M mannitol solution, G : ruptured cell (polleniplast) formed by the combined method of an acid-heating treatment and an enzymatic treatment and replaced from 0.6M mannitol solution into distilled water, H : adhered polleniplasts formed by the combined method of an acid-heating treatment and an enzymatic treatment



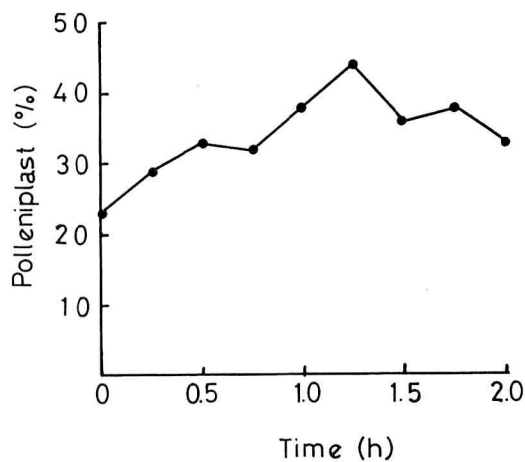
**Fig. 4.** Mode of acid-heating degradation of mioga mature pollen. E.C.: pollen cells with exine, Pt.: polleniplasts, R.C.: ruptured cells, I.C.: cells with intine.

レニプラスト化の効率を高めることができた。併用法における酵素作用の効果は、外壁の一部(セルロース)および内壁を分解することにより、ポレニプラストの出現を促進することに見られたが、原形質膜の崩壊による細胞破断への影響は少なかった (Fig. 4, 6)。

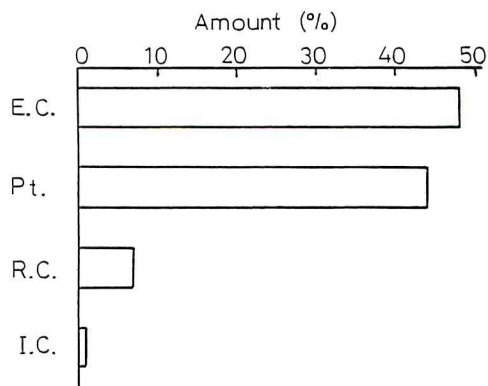
細胞壁分解酵素法のみによるポレニプラスト化率に比べて、併用法は前者の11倍のポレニプラスト化率を達成した。

この併用法を用いることにより、供試花粉の形態や外壁の厚さなどに差はあるにしても、各種花粉のポレニプラスト化操作の簡素化、特に、細胞壁分解酵素の反応時間の短縮化が可能となる。

得られたポレニプラストは、内壁を伴った細胞に見られると同様に外液の浸透圧の変化に対して収縮と膨潤を示し、さらに接着や融合などの原形質膜の独特な機能の一部を保有することが認められた。また、これらの機能に関連する原形質膜の基礎的な生理現象の発現能力も残存していることが推測されるが、塩酸加熱処理を経てを他のどのような生理機能が残在してい



**Fig. 5.** Time course of the amount of polleniplasts produced by the combined method of an acid-heating treatment and an enzymatic treatment from mioga mature pollen.



**Fig. 6.** Mode of pollen degradation by the combined method of an acid-heating treatment and an enzymatic treatment for 1.25 h. E.C.: pollen cells with exine, Pt.: polleniplasts, R.C.: ruptured cells, I.C.: cells with intine.

るかを解明することは今後の本研究室の興味ある研究課題である。

最後に、花粉は低温の有機溶媒中で長期間の保存ができ<sup>(5,6)</sup>また他組織の細胞に比べて大きな体積を持つため、花粉を用いることにより細胞融合および遺伝子導入の操作が容易となり得ることが期待される。ポレニプラスト化の研究は、この面でも寄与できるものといえよう。

## 要 約

細胞壁分解酵素法によるミョウガ (*Zingiber mioga* Roscoe) 無処理花粉のポレニプラスト (polleniplast, 花粉プロトプラスト) 化率は極めて低く、4%であった。1M塩酸処理法ではポレニプラスト化は認められなかったが、1M塩酸中で急速に

加熱することにより、23%のポレニプラストが得られた。さらに、塩酸加熱処理法と細胞壁分解酵素処理法を併用することにより、ポレニプラスト化率を44%に高めることができた。

塩酸加熱処理法では、内壁が原形質膜および外壁に比べて分解を受けやすいことが示唆された。さらに、塩酸加熱処理法と酵素処理法の併用では、内壁が主に分解され、外壁は一部分解を受けて外壁剥離が促進された。

得られたポレニプラストは浸漬水溶液の浸透圧の変化に対する感受性、ポレニプラスト間の接着や融合などの原形質膜機能を有することが認められた。

## 引 用 文 献

- (1) 岩波洋造：花粉学、講談社サイエンティフィック、東京、58—62 (1982).
- (2) Southworth, D. : Am. J. Bot. **61**. 36—44 (1974).
- (3) 平井篤志、宮内博文、杉浦昌弘：植物細胞育種入門、学会出版センター、東京、21—31 (1983).
- (4) Bajaj, Y. P. S. : Intern. Rev. Cytol. Suppl. **16**. 113—114 (1983).
- (5) Iwanami, Y. : Plant Cell Physiol. **13**. 1139—1141 (1972).
- (6) Iwanami, Y. and N. Nakamura : Stain Technol. **47**. 137—139 (1972).

(受理日 1986年9月30日)

