

ツバキ花粉管の伸長促進物質 Ⅲ. アミンの作用

中村紀雄*・望月 桂**・鈴木 恕***

*横浜市立大学生物学教室 **横浜市立大学化学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2
***筑波大学生物科学系 〒305 つくば市天王台

Growth Promoters of the Pollen Tube of *Camellia japonica* Ⅲ. Effect of Amines on Pollen Tube Growth

Norio NAKAMURA*, Katsura MOCHIZUKI** and Hiroshi SUZUKI***

*Department of Biology and **Department of Chemistry,
Yokohama City University, Yokohama 236, Japan

***Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305, Japan
(1989年3月22日 受理)

Effects of various kinds of amines on pollen tube growth in vitro were tested. Many linear- and cyclic polyamines promoted the growth of *Camellia japonica* pollen tube on a medium containing MES buffer and the promotion was further enhanced by the presence of calcium. Of these amines, diethylenetriamine was most effective. This triamine promoted the pollen tube growth in other dicots but not in monocots; it strongly inhibited the growth of *Lilium* and *Tulipa* pollens.

Key words: Polyamine, Diethylenetriamine, Putrescine, Pollen tube growth, Growth promoter.

緒 言

前報¹⁾においてツバキの花粉管伸長がグッド緩衝剤およびその関連物質により促進されること、そしてその作用は化合物中のアミン部分による可能性を指摘した。そこで今回約60種のアミン化合物の花粉管伸長

に対する効果について調べたところ、ジアミン・ポリアミンが促進効果を示したので、その詳細について報告する。

花粉の発芽や管伸長に及ぼすアミンの影響としては、プトレッシン・スベルミジン・スベルミンなどの生体

Abbreviations: ADA, *N*-(2-Acetamido) iminodiacetic acid; Bisdioxocyclam, 6,6'-Bis [1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-12,14-dione]; 1,7-CT, 5,7,7,12,14,14-Hexamethyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradeca-4,11-diene; *meso*-1,7-CTH, *meso*-(5,12)-5,7,7,12,14,14-Hexamethyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane; *rac*-1,7-CTH, *rac*-(5,12)-5,7,7,12,14,14-Hexamethyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane; Cyclam, 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane; Dioxocyclam, 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane-12,14-dione; HEPES, *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; MES, 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid; TAE, *N,N,N',N'*-Tetrakis (3-aminopropyl) -1,2-ethanediamine; TAH, *N,N,N',N'*-Tetrakis (3-aminopropyl) -1,6-hexamethylenediamine; TETA, 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane-*N,N',N',N''*-tetraacetic acid.

ポリアミンの影響がベチュニア⁽²⁾・リンゴ^(3,4)・ニチニチソウ⁽⁵⁾・テッポウユリ⁽⁶⁾花粉で調べられており、ニチニチソウ・テッポウユリ花粉の管伸長はポリアミンによって促進されることが報告されている。

材料および方法

ツバキ・セイヨウナシ・リンゴ・チューリップの花粉は長期保存しておいたもの⁽¹⁾を使用した。他の花粉については、開花中の花より直接花粉を採取し、または葯を集め室温で一日放置して開葯させて集めた花粉を、直ちに実験に使用した。

花粉の培養・花粉管伸長の測定は前報⁽¹⁾に準じて行い、0.3 M ショ糖-1.3% 寒天-1 mM MES 緩衝液

(pH 7.0) 培地を基本培地とした。ツバキ・チャの花粉の培養は、その効果が明瞭でないので基本培地に硝酸カルシウムや硼酸を添加せず、その他の花粉の培養は基本培地にさらに硝酸カルシウム (終濃度 1.7 mM)、硼酸 (1.6 mM) を添加して行った。

花粉管伸長の促進・阻害効果の判定は、管長について比較し、標準偏差値および対照花粉管伸長に対して ± 20% 以上の伸長差が認められるかどうかを基準とした。

実験結果

1. 直鎖アミンの影響

モノアミン・ジアミン・ポリアミンの濃度 μM ~

Table 1. Effect of linear amines on the growth of *Camellia japonica* pollen tube

Compound	Structure	Concentration	Tube length	%Control
	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$	mM	mm	
Ethylenediamine	x = 2	0.1	6.4 ± 0.3	145 ± 7
1,3-Propanediamine	x = 3	0.1	5.4 ± 0.2	123 ± 5
Putrescine	x = 4	0.2	7.7 ± 0.4	175 ± 9
Cadaverine	x = 5	0.1	5.8 ± 0.4	145 ± 10
1,6-Hexanediamine	x = 6	0.01	5.1 ± 0.1	116 ± 2
	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_x\text{NH}(\text{CH}_2)_y\text{NH}_2$			
Diethylenetriamine	x = 2, y = 2	0.2	12.0 ± 0.3	273 ± 7
N-(2-Aminoethyl)-1,3-propanediamine	x = 3, y = 2	0.02	4.8 ± 0.6	114 ± 14
Caldine	x = 3, y = 3	0.02	5.0 ± 0.4	128 ± 10
Spermidine	x = 3, y = 4	0.02	5.6 ± 0.3	140 ± 8
	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_x\text{NH}(\text{CH}_2)_y\text{NH}(\text{CH}_2)_z\text{NH}_2$			
Triethylenetetramine	x = 2, y = 2, z = 2	0.03	4.8 ± 0.3	112 ± 7
1,4,8,11-Tetraazaundecane	x = 2, y = 3, z = 2	0.02	4.8 ± 0.3	120 ± 8
1,5,8,12-Tetraazadodecane	x = 3, y = 2, z = 3	0.03	6.3 ± 0.7	158 ± 18
Norspermine (Thermine)	x = 3, y = 3, z = 3	0.02	5.3 ± 0.3	133 ± 8
Spermine	x = 3, y = 4, z = 3	0.01	5.5 ± 0.2	128 ± 7

Pollen grains were incubated on sucrose (0.3 M) -agar (1.3%) -MES buffer (1 mM, pH 7) medium for 20-24 hr at 25°C. The compounds were tested at several concentrations from μM to mM and the data obtained at each optimum are tabulated.

Table 2. Effect of cyclic polyamines on the growth of *Camellia japonica* pollen tube

Compound	Concentration (mM)	Tube length (mm)	%Control
1,7-CT	0.17	6.1±0.3	145± 7
<i>rac</i> -1,7-CTH	0.10	6.1±0.1	153±10
<i>meso</i> -1,7-CTH	0.11	4.8±0.2	100± 4
Cyclam	0.10	6.5±0.5	163±13
Bisdioxocyclam	0.11	5.1±0.5	124±12
[Ni (cyclam)] (ClO ₄) ₂	0.01	4.7±0.2	109± 7
[Cu (cyclam)] (NO ₃) ₂	0.01	5.0±0.2	114± 5
Dioxocyclam	0.14	4.8±0.3	100± 6
TETA	0.11	4.5±0.1	96± 2

Pollen grains were incubated as in Table 1. For formal names and structural formulae of the compounds, see abbreviations and Fig. 1.

mM の範囲について、それらのツバキ花粉管伸長に対する効果を調べた。多くの場合、いずれのアミンも mM 濃度以上の高濃度では、発芽や管伸長を強く阻害したが、表 1 に示すようにジアミン・ポリアミン、とりわけエチレンジアミン・ブトレッシン・カダベリン・ジェチレントリアミン (DETA) ・1,5,8,12-テトラアザドデカン) は顕著な管伸長促進効果を示した。その最適濃度はジアミンでは 100 μM, トリアミンでは 10 μM 程度であった。ただトリアミンで最も顕著な促進効果を示した DETA は 100 μM が最適であった。エチレンジアミンが促進効果を示したにもかかわらず、その構造の末端アミノ基 (R-NH₂) の一つを他の基に代えた化合物であるエタノールアミン (-OH) ・タウリン (-SO₃H) ・n-プロピルアミン (-CH₃) ・β-アラニン (-COOH) ・システアミン (-SH) は促進効果を示さなかった。また 3-アミノ-1-プロパンスルホン酸 [H₂N (CH₂)₃ SO₃H] ・γ-アミノ酪酸 [H₂N (CH₂)₃ COOH] ・4-アミノ-1-ブタノール [H₂N (CH₂)₄ OH] などのモノアミンも促進効果を示さなかった。今回調べたモノアミンでは、アリルアミン (CH₂:CHCH₂NH₂) が 10 μM 濃度で 1.48 倍の促進効果を示した以外は効果が認められなかった。またブトレッシン塩酸塩は顕著な効果を示さ

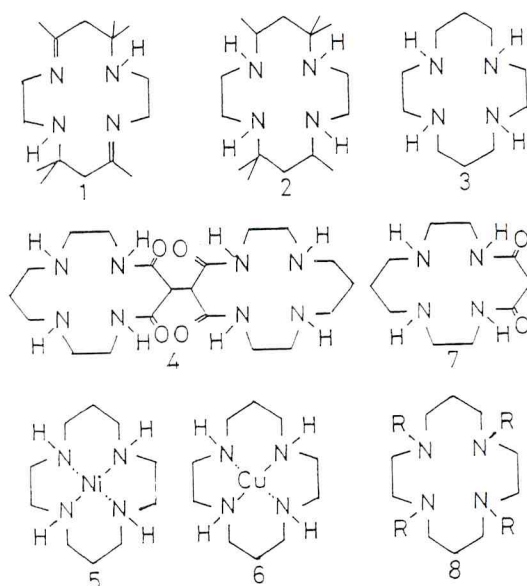


Fig. 1. Structure of the cyclic polyamines tested.

- 1, 7-CT
- rac*-1,7-CTH (*meso*-1,7-CTH)
- Cyclam
- Bisdioxocyclam
- [Ni (cyclam)]²⁺
- [Cu (cyclam)]²⁺
- Dioxocyclam
- TETA (R; -CH₂COOH)

なかった。表 1 に示した以外のジアミン・ポリアミンではペンタエチレンヘキサミン・N,N-ビス (3-アミノプロピル) メチルアミン・1,4-ビス (3-アミノプロピル) ピペラジン・TAE・ストレプトマイシン

Table 3. Synergistic promotion of the growth of *Camellia japonica* pollen tube by diethylenetriamine (DETA) and other compounds

Additions	Tube growth (% control)			
	DETA (mM)			
	0	0.05	0.1	0.5
None	100	109	115	109
+1.7 mM Ca (NO ₃) ₂	138	143	147	183
+ 1 mM MES (pH 7)	100	129	182	156
+MES +Ca	169	196	236	258
+ 1 mM ADA (pH 7)	72	—	134	—

Pollen grains were incubated on sucrose (0.3 M) -agar (1.3%) medium with or without additions for 20 -24 hr at 25°C.

が10 μ M濃度で、そして4- (3-アミノプロピル) モルホリン・テトラエチレンペンタミン・TAH・アグマチンが100 μ M濃度で1.2~1.5倍の促進効果を示した。

塩基性アミノ酸はすべて効果を示さなかった。

促進作用を示さなかったモノアミンのうち、タウリ

ン・ β -アラニン・システアミン・トリエタノールアミン・4-アミノ-1-ブタノールおよびアルギニンは、MES緩衝液を使用せず、水酸化カリウムや硝酸で中和してその作用を調べたところ1.2~1.58倍の促進効果を示した。またアグマチンによる促進率もこの場合1.2倍から1.5倍になった。

Table 4. Effect of DETA on the pollen tube growth in monocots

Pollen	Tube length (mm)		
	Control	+0.25 mM DETA	%Control
<i>Lilium longiflorum</i>	4.3 \pm 0.5	3.2 \pm 0.4	74
<i>Lilium</i> hybrid cv. Enchantment	4.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	18
<i>Tulipa gesneriana</i>	0.9 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2	33
<i>Clivia miniata</i>	4.4 \pm 0.3	4.8 \pm 0.5	109
<i>Crinum asiaticum</i>	5.9 \pm 0.6	4.4 \pm 0.7	75
<i>Agapanthus umbellatus</i>	3.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.6	103
<i>Tradescantia paludosa</i>	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	133
<i>Ornithogalum virens</i>	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	100
<i>Lycoris radiata</i>	3.6 \pm 0.6	3.9 \pm 0.7	108
<i>Zephyranthes candida</i>	2.1 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	133
<i>Hosta undulata</i>	3.6 \pm 1.5	5.3 \pm 1.0	147

Pollen grains were incubated on sucrose (0.3 M) -agar (1.3%) -MES buffer (1 mM, pH 7) medium containing 1.7 mM calcium nitrate and 1.6 mM boric acid.

Table 5. Effect of DETA on the pollen tube growth in dicots

Pollen	Tube length (mm)		
	Control	+0.25 mM DETA	%Control
<i>Camellia japonica</i>	7.9±0.9	13.4±0.1	170
<i>Camellia japonica</i> *	4.7±0.2	11.8±0.1	251
<i>Camellia sinensis</i> *	4.2±0.3	8.0±0.9	190
<i>Camellia sasanqua</i>	5.7±0.3	8.4±0.3	147
<i>Impatiens balsamina</i>	2.2±0.1	2.7±0.2	123
<i>Hydrangea macrophylla</i>	0.7±0.0	1.3±0.1	186
<i>Lagerstroemia indica</i>	2.6±0.1	5.0±0.4	192
<i>Campsis grandiflora</i>	0.7±0.2	3.0±0.4	429
<i>Platycodon grandiflorum</i>	0.8±0.04	5.1±0.2	638
<i>Citrus limon</i>	0.8±0.1	1.1±0.1	138
<i>Nicotiana rustica</i>	1.1±0.2	1.8±0.3	163
<i>Gardenia jasminoides</i>	5.0±0.4	6.9±1.0	138
<i>Hypericum chinense</i>	0.8±0.1	0.9±0.1	113
<i>Erythrina crista-galli</i>	6.5±0.5	8.6±0.4	132
<i>Pyrus communis</i>	0.4±0.1	1.2±0.3	300
<i>Malus pumila</i>	1.0±0.0	2.5±0.4	250
<i>Aquilegia flabellata</i>	0.3±0.1	0.4±0.04	133
<i>Paeonia suffruticosa</i>	0.7±0.5	1.1±0.2	157
<i>Paeonia albiflora</i> *	0.9±0.1	1.7±0.1	189
<i>Petunia hybrida</i>	0.6±0.2	0.9±0.1	150
<i>Rhaphiolepis umbellata</i> *	1.4±0.2	2.0±0.1	143
<i>Pittosporum tobira</i> *	1.8±0.2	2.2±0.1	122
<i>Epiphyllum hybrid</i>	2.8±0.4	2.5±0.5	89

Pollen grains were incubated as in Table 4; in cases asterisked, calcium nitrate and boric acid were omitted.

ツバキ花粉に対して促進効果を示したジアミン・ポリアミンもテッポウユリ花粉の成長には阻害作用を示した。

また、芳香族アミンは促進効果を示すものは見いだせなかった。

2. 環状ポリアミンの影響

直鎖テトラアミンに対応する環状ポリアミンの影響を調べた (表2, 図1). 1, 7-CT・*rac*-1, 7-

CTH・Cyclam がいずれも 100 μ M 濃度でツバキ花粉管伸長を促進した。Cyclam に Ni や Cu を配位結合させた Ni-cyclam や Cu-cyclam は効果を示さなかった。また、1, 7-CTH についてはラセミ型が促進効果を示したにもかかわらずメソ型は影響を示さなかった。

ツバキで促進効果を示した環状ポリアミンはテッポウユリ花粉の成長を阻害した。

3. ジエチレントリアミン (DETA) の作用

今回調べたアミンの中で DETA が最も顕著な管伸長促進効果を示したので、その生理学的な性質について調べた。

MES と HEPES 緩衝液を用いて最適 pH を求めたところ、pH 7～7.5 で最も顕著な管伸長が見られ、DETA による管伸長促進率も最も高かった。表 3 に示すように、DETA の促進効果は MES 緩衝液を用いた場合に顕著に見られ、Ca によっても効果が高められた。Ca が共存する場合は DETA の最適濃度が高まる傾向がみられた。K や Mg は Ca のような影響を示さなかった。これらのことは葯より採取直後の花粉についても調べたが、保存花粉の場合と違わなかった。

ツバキ花粉管伸長はグッド緩衝剤の一つである ADA により阻害されたが、⁽⁴⁾ DETA が共存すると管伸長はむしろ促進された。これは Ca の作用と類似している。⁽⁴⁾

表 4 と 5 に DETA の各種花粉の管伸長に対する効果を示した。DETA の 0～0.5 mM 濃度範囲について調べ、0.25 mM 濃度での管伸長について比較した。DETA は単子葉植物花粉に対しては、タマスダレを除いて明瞭な促進効果を示さず、とくにユリとチューリップの花粉管の成長を著しく阻害した (表 4)。これに対して、多くの双子葉植物花粉に対して促進効果を示し、クジャクサボテンを除いて阻害されるものはなかった (表 5)。なお、アガパンサス花粉では DETA 濃度が高くなるにつれ、一定周期の波状形を呈した伸長花粉管が多く観察された。

考 察

DETA は最も顕著な花粉管伸長促進効果を示したが、それが生体に存在するとの報告はなく、また生体への作用も調べられていない。サトウダイコンの根ディスクの細胞膜の透過性について約 55 種もの直鎖ポリアミンおよびその関連物質の影響が調べられているが、⁽⁸⁾ この場合も DETA の作用は調べられておらず生体への影響は不明である。この実験では DETA

が MES 緩衝剤存在下で花粉管伸長を著しく促進すること、ADA による管伸長の阻害を回復させることが明らかにされた。また、その作用は前報⁽¹⁾で報告したツバキ花粉管伸長に対するグッド緩衝剤と Ca の働きの場合と大変類似していることが分かった。ただグッド緩衝剤・Ca・DETA が共存するとき最も著しい促進効果を示すことは、DETA の作用が Ca と全く同じ作用ではないことも示している。また DETA は双子葉植物花粉に対して促進効果を示し、単子葉植物花粉に効果がない傾向が見られたことは、その作用機構を考える上で注目すべきであろう。

プトレッシン・スベルミジン・スベルミンなどの生体ポリアミンは、植物の場合多くの系で様々な機能を示す。^(9,10) 成長に伴う内因性ポリアミンのレベルの変化や外因性ポリアミンの影響などから、細胞伸長にはプトレッシンの寄与が推測されているが、^(10,11) それがどのように作用するのかは不明である。膜の透過性、^(8,12-14) 膜の安定化、^(12,13,15) 膜での β -1, 3-グルカンの合成⁽⁶⁾などは細胞成長と関係しており、多くの材料でポリアミンの影響が調べられている。

花粉の成長とポリアミンについては、リンゴ花粉⁽⁹⁾の発芽過程におけるポリアミンのレベル変化が報告されている。また外因性ポリアミンの影響として、ペチュニア花粉⁽²⁾でスベルミンが管伸長を約 5% 促進すること、そしてリンゴ花粉⁽⁴⁾でスベルミジンが Ca と同様の作用をもち、花粉から培地への蛋白質の浸出と発芽率の低下を防ぐことが報告されている。そして最近ニチニチソウ花粉⁽⁵⁾でスベルミジンが管伸長を 1.2 倍、テッポウユリ花粉⁽⁶⁾ではプトレッシンが管伸長を 1.07 倍、スベルミジンが 1.2 倍促進することが報告された。

生体ポリアミンはツバキ花粉管伸長に対して促進効果を示した。その結果は Ca が共存した場合プトレッシンでは約 1.93 倍、スベルミンで 1.5 倍になった (データは示していない)。ニチニチソウ・テッポウユリ花粉の管伸長促進は Ca・硼酸存在下で調べられ、その効果は有意とされている。^(5,6) しかし、いずれの

場合も促進は20%程度であり、テッポウユリ花粉については我々の実験では有意な管伸長促進効果は認められなかった。

また、ツバキ花粉管伸長に対してグッド緩衝剤とブトレッシンの効果は相加的であり(データは示していない)、グッド緩衝剤とDETAの効果は相乗的であった(表3)。

これまで生体ポリアミンによる明瞭な花粉管伸長促進が見られず、今回の実験で促進効果が見られたのはグッド緩衝剤を用いたことが関係していると思われる。グッド緩衝剤は代謝への影響が少ないとされ、¹⁰⁾ その作用としては膜系への影響が考えられる。MES緩衝剤それ自身はツバキ花粉の成長に促進も阻害も示さないが、¹¹⁾ ポリアミンと何らかの相互作用を示し、花粉管先端部分での膜形成・膜の透過性・膜の安定化などに寄与するのではないかと思われる。

環状ポリアミンの影響を調べた理由も、それらが花粉中には存在せず細胞内で代謝されにくいと考えられ、また作用を及ぼす場合、おそらく膜系に影響をあたえるであろうと考えたことによる。しかし調べたアミンがすべて同じ作用を示すかどうかは不明であり、膜への作用も考えられる作用機作の一つにすぎない。アミンの作用機構についてはさらに検討しなければならない。

引用文献

- (1) 中村 紀雄・望月 桂・鈴木 恕：ツバキ花粉管の伸長促進物質 II. Good 緩衝剤とカルシウムの作用. *花粉誌* **34**, 59-62 (1988).
- (2) Linskens, H. F., A. S. L. Kochuyt and A. So: Regulation der nucleinsäuren-synthase durch polyamine in keimendem pollen von *Petunia*. *Planta* **82**, 111-122 (1968).
- (3) Bagni, N., P. Adamo and D. Serafini-Fracassini: RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* **68**, 727-730 (1981).
- (4) Spranza, A., G. L. Calzoni and N. Bagni : Effect of exogenous polyamines on in vitro germination apple pollen. *Pollen : Biology and implications for plant breeding* (eds. by D. L. Mulcahy and E. Ottaviano). pp. 21-27. Elsevier Science Publishing, New York (1983).
- (5) Prakash, L., P. John, G. M. Nair and G. Prathapasanen : Effect of spermidine and methylglyoxal-bis (guanyl-hydrazone) (MGBG) on *in vitro* pollen germination and tube growth in *Catharanthus roseus*. *Annal. Bot.* **61**, 373-375 (1988).
- (6) Rajam, M. V.: Restriction of pollen germination and tube growth in lily pollen by inhibitors of polyamine metabolism. *Plant Sci.* **59**, 53-56 (1989).
- (7) 中村 紀雄・碓井 裕之・鈴木 恕：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. *花粉誌* **30**, 17-23 (1984).
- (8) Srivastava, S. K. and T. A. Smith : The effect of some oligo-amines and guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochemistry* **21**, 997-1008 (1982).
- (9) Galston, A. W. : Polyamines as modulations of plant development. *BioScience* **33**, 382-388 (1983).
- (10) 趙 秀采：ポリアミンの生理作用. *植物の化学調節* **19**, 25-33 (1984).
- (11) Cho, S. -C. : Enhancement by putrescine of gibberellin-induced elongation in hypocotyls of lettuce seedlings. *Plant Cell Physiol.* **24**, 305-308 (1983).
- (12) Naik, B. I. and S. K. Srivastava : Effect of polyamines on tissue permeability. *Phytochemistry* **17**, 1885-1887 (1978).
- (13) Naik, B. I., V. Sharma and S. K. Srivastava : Interaction between growth regulator and

- polyamine effects on membrane permeability. *Phytochemistry* **19**, 1321-1322 (1980).
- (14) Pistocchi, R., N. Bagni and J. A. Creus : Polyamine uptake in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* **84**, 374-380 (1987).
- (15) Popovic, R. B., D. J. Kyle, A. S. Cohen and S. Zalik : Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stressinduced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol.* **64**, 721-726 (1979).
- (16) Kauss, H. and W. Jeblick : Synergistic activation of 1, 3- β -glucan synthase by Ca^{2+} and polyamines. *Plant Sci.* **43**, 103-107 (1986).
- (17) 今村 寿明・斉藤 幹彦 : グッド緩衝剤 ～新しい pH 緩衝剤の開発と発展～. *化学の領域* **40**, 79-91 (1976).
-