

## 花粉管伸長に及ぼすアミン代謝阻害剤の影響

中村紀雄\*・鈴木 恕\*\*

\* 横浜市立大学生物学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸 22-2

\*\* 湘南短期大学 〒238 横須賀市稲岡町 82

Effect of Amine Metabolism Inhibitors on Pollen Tube Growth *in vitro*

Norio NAKAMURA\* and Hiroshi SUZUKI\*\*

\* Department of Biology, Yokohama City University, Yokohama 236, Japan

\*\* Shonan Junior College, Yokosuka 238, Japan

(1990年2月5日受理)

Interactions between ornithine cycle-amino acids or polyamines and canavanine or MGBG (methylglyoxal-bis (guanylhydrazone)) in the tube growth of *Camellia japonica* and *Lilium longiflorum* pollen were studied. Canavanine and MGBG inhibited the tube growth in both species. Canavanine inhibition in camellia pollen tube growth was repressed by arginine, citrulline and ornithine in this order of effectiveness, but not by polyamines. In lily pollen, however, canavanine inhibition was not repressed by arginine and citrulline. On the other hand, MGBG inhibition was not affected by addition of these amino acids and polyamines. These results seem to support our tentative conclusion that stimulation of pollen tube growth by exogenously supplied polyamines may be due to their direct effect on such membrane functions as permeation and vesicular transport, but not due to their effect on such metabolic processes as protein and nucleic acid syntheses.

**Key words** : Arginine, Canavanine, MGBG, Pollen tube growth, Polyamine.

### 緒 言

前報<sup>(1)</sup>において、ジアミン、ポリアミンがツバキの花粉管伸長を促進することを観察し、これらのアミンが細胞膜機能に影響をおよぼすとの知見に照らして、それらが直接膜系に作用する可能性を論じた。しかし、ポリアミンの作用としては多くの機能が推測されており、<sup>(2,3)</sup> ペチュニア、<sup>(4)</sup> リンゴ、<sup>(5)</sup> ニチニチソウ、<sup>(6)</sup> テッポウユリ花粉<sup>(7)</sup>では、ポリアミンが細胞内に取り込まれ、代謝され、核酸合成や蛋白質合成に影響する

ことが考えられている。

またアルギニン (Arg) 単独ではツバキの花粉管伸長に影響が見られないときでも、 $Ca^{2+}$  が共存すると mM オーダー以上の高濃度の Arg は管伸長を促進する。細胞内では Arg はオルニチン (Orn) やアグマチンになり、これらはさらにブトレッシン、スペルミジン、スペルミンに代謝される。したがってこの場合、Arg がポリアミンに代謝され、管伸長に影響を与えたと考えることができる。そこでこの論文では、Arg

のアナログであるカナバニンとポリアミン生成阻害剤であるメチルグリオキサリビスグアニルヒドラゾン (MGBG) の花粉管伸長に及ぼす影響を調べることにより, Arg からポリアミンの生成, そしてポリアミンと花粉管伸長促進作用との関係について検討した。

## 材料と方法

ツバキ花粉は一年間保存しておいたものを, またテッポウユリ花粉は開葯当日のものを使用した。花粉の培養, 花粉管伸長の測定および管伸長促進, 阻害の判定は前報<sup>(3)</sup>に準じて行い, 0.3 M ショ糖 - 1.3% 寒天培地を基本培地とした。実験はすべて, 基本培地の場合, 基本培地に MES 緩衝剤 (pH 7) または硝酸カルシウム (1.7 mM) を加えた場合, 緩衝剤と

Ca<sup>2+</sup> を共に加えた場合の 4 通りについて行い, それぞれについて各種物質の影響を調べた。

寒天は純正化学社, カナバニンと MGBG はシグマ社, その他の試薬は和光純薬工業社製を使用した。

## 結果と考察

### 1. カナバニンの影響

Arg の代謝とポリアミンの代謝について, Fig. 1 に示すような経路が考えられている。ポリアミンがツバキ花粉管の成長に関与しているとするれば, Arg はポリアミンへと代謝され, Arg のアナログであるカナバニンは Arg から Orn やアグマチンの生成を阻害し, その結果ポリアミンの生成を阻害し, 管伸長は阻害されると推測できる。

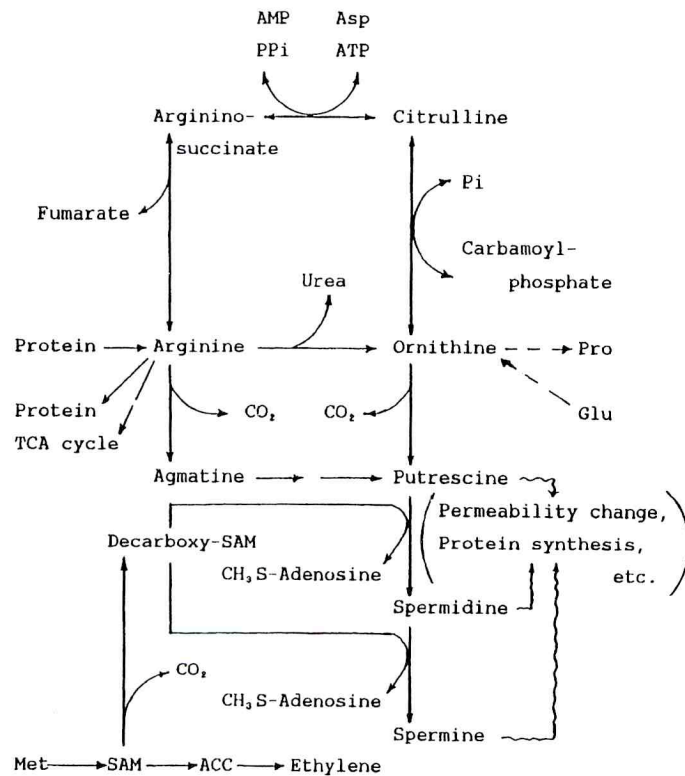


Fig. 1. Metabolic pathways of arginine and polyamines. SAM, S-Adenosylmethionine; ACC, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid.

Table 1 に示すようにカナバニンはツバキの花粉管伸長を強く阻害し、0.01 mM で約 50% の阻害を示した。ツバキ花粉は MES 緩衝剤と  $\text{Ca}^{2+}$  の存在により著しい管伸長促進を示すが、<sup>(9)</sup> この場合もカナバニンにより強く阻害された。

カナバニンによる阻害が Orn 回路阻害ひいてはポリアミン生成阻害であるなら、回路物質やその前駆物質を供給することによりその阻害を抑制できると考えて、関連アミノ酸の影響を調べた (Table 2)。 $\text{Ca}^{2+}$  が存在すると 1 mM 以上の高濃度の Arg は管伸長を促進した。なお表には示していないが、Arg 単独 (基本培地での管伸長  $4.8 \pm 0.2$  mm) ではその濃度を増しても管伸長には影響はみられなかった。また MES 緩衝剤が存在すると  $\text{Ca}^{2+}$  が存在しても Arg による促進効果はみられなかった。これは MES と  $\text{Ca}^{2+}$  が共存すると管伸長が著しく促進されるので、他の物質の影響が明確に現れないためと考える。このことは他のアミノ酸について調べた場合も同様であった。したがって表には  $\text{Ca}^{2+}$  のみを添加した場合の結果を示した。0.01 mM カナバニンによる阻害は Arg

濃度が高くなるにつれて緩和され、Arg 濃度 0.1 mM 以上においては阻害がみられなくなった。その上、このような条件下ではカナバニンが存在した場合の方がむしろ管伸長が促進される傾向がみられ、別の実験では対照の 1.5 倍に及ぶこともあった。Orn とシトルリン (Cit) を添加した場合もアミノ酸濃度が高くなるにつれてカナバニンによる阻害は緩和されたが、その程度は Arg より遥かに低かった。グルタミン酸はカナバニンによる阻害に対しては影響を与えなかった。これらの結果は、Arg から Orn を経てプロレシジンが生成される経路はツバキ花粉ではポリアミン生成の主経路ではないことを示唆している。この経路が働いていれば、Orn の添加は Arg と同様にカナバニン阻害を緩和するはずであるが、その効果は小さく、Citの方が Orn より効果が大きかった。Arg > Cit > Orn の順でカナバニン阻害の緩和がみられたことは、カナバニン阻害からの管伸長の回復には Arg が必要で、それは Orn 回路により補われたこと、またプロレシジン生成は Orn からではなく、アグマチンから生じる可能性を示している。しかし、アグマチン (0-

Table 1. Effect of canavanine and MGBG on pollen tube growth in *Camellia japonica*

Additions	Tube length, mm (%Control)			
	Concentration of canavanine or MGBG, mM			
	0	0.01	0.1	1
Canavanine	$4.8 \pm 0.2$ (100)	$2.7 \pm 0.3$ (56)	$0.7 \pm 0.1$ (15)	$0.7 \pm 0.2$ (15)
+ 1 mM MES (pH 7)	$4.4 \pm 0.5$ (92)	$2.7 \pm 0.4$ (56)	$0.8 \pm 0.1$ (17)	$0.7 \pm 0.1$ (15)
+ 1.7 mM Ca ( $\text{NO}_3$ ) <sub>2</sub>	$5.8 \pm 0.4$ (121)	$3.3 \pm 0.3$ (69)	$1.4 \pm 0.1$ (29)	$0.5 \pm 0.1$ (10)
+MES+Ca ( $\text{NO}_3$ ) <sub>2</sub>	$10.5 \pm 0.3$ (219)	$5.3 \pm 0.4$ (110)	$1.2 \pm 0.3$ (25)	$0.6 \pm 0.2$ (13)
MGBG	$4.7 \pm 0.4$ (100)	$4.4 \pm 0.4$ (94)	$2.5 \pm 0.2$ (53)	0
+MES	$4.1 \pm 0.2$ (87)	$3.9 \pm 0.2$ (83)	$2.2 \pm 0.2$ (47)	0
+Ca ( $\text{NO}_3$ ) <sub>2</sub>	$5.9 \pm 0.2$ (129)	$5.7 \pm 0.3$ (121)	$5.4 \pm 0.2$ (115)	$1.6 \pm 0.2$ (34)
+MES+Ca ( $\text{NO}_3$ ) <sub>2</sub>	$10.0 \pm 0.3$ (213)	$9.9 \pm 0.5$ (211)	$10.2 \pm 0.5$ (217)	$1.9 \pm 0.1$ (40)

Pollen grains were incubated on a basal medium, sucrose (0.3 M)-agar (1.3%), with or without additions for 20-24 hr at 25°C. MGBG: methylglyoxal-bis (guanyl-hydrazone).

Table 2. Interaction between arginine or metabolically related amino acids and canavanine or MGBG in the tube growth of *Camellia japonica* pollen

Additions	Tube length, %Control				
	Amino acid concentration, mM				
	0	0.01	0.1	1	10
Arginine	100 ± 3 (5.9 ± 0.2)	100 ± 3	100 ± 3	107 ± 8	136 ± 5
+Canavanine	57 ± 4	88 ± 7	107 ± 9	123 ± 15	134 ± 9
+MGBG	100 ± 6	100 ± 7	98 ± 4	94 ± 4	115 ± 6
Ornithine	100 ± 3 (6.4 ± 0.2)	97 ± 4	97 ± 6	127 ± 8	91 ± 8
+Canavanine	52 ± 5	47 ± 3	53 ± 5	87 ± 5	68 ± 3
+MGBG	100 ± 6	100 ± 6	111 ± 6	130 ± 6	94 ± 17
Citrulline	100 ± 3 (6.2 ± 0.2)	100 ± 3	95 ± 3	103 ± 6	100 ± 5
+Canavanine	50 ± 3	52 ± 5	70 ± 5	116 ± 5	100 ± 3
+MGBG	100 ± 5	100 ± 5	98 ± 5	123 ± 4	112 ± 4
Glutamic acid	100 ± 3 (6.2 ± 0.2)	98 ± 5	97 ± 4	94 ± 2	55 ± 3
+Canavanine	50 ± 3	41 ± 2	42 ± 5	44 ± 3	42 ± 2
+MGBG	100 ± 7	100 ± 4	93 ± 4	84 ± 4	34 ± 2

Pollen grains were incubated on the basal medium containing 1.7 mM calcium nitrate for 20–24 hr at 25°C. Canavanine, 0.01 mM; MGBG, 0.5 mM. Figures in parentheses indicate the tube length (mm) in controls. The tube length in the basal medium was 4.8–5.0 mm.

10 mM 濃度範囲) による管伸長は 0.01 mM カナバニン存在下で対照の 60% を越えることはなく、強く阻害された (データは示していない)。

また表には示していないがプトレッシン、スベルミジンもカナバニンによる阻害をまったく抑制できなかった。ジエチレントリアミン (DETA) はツバキ花粉の管伸長を著しく促進するが、<sup>(4)</sup> 生体ポリアミンと同様にカナバニンによる阻害を抑制できなかった。

以上の結果は Arg からポリアミンが生成され、そのポリアミンが管伸長促進に関与している可能性は少ないことを示している。

## 2. MGBG の影響

Table 1 に示すように MGBG はツバキの花粉管伸長を阻害した。しかし、阻害の程度はカナバニンの場

合より弱く、 $\text{Ca}^{2+}$  がない場合は、0.1 mM で 50% の阻害を示し、1 mM では発芽も阻害したが  $\text{Ca}^{2+}$  が共存する場合、1 mM でも 30–40% の管伸長がみられた。MGBG は S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素を阻害することにより、スベルミジン、スベルミンの細胞内レベルを低下させることが知られている (Fig 1)。<sup>(10,11)</sup> ポリアミンが核酸や蛋白質合成に影響を与え管伸長を促進するとすれば、そしてそのアミンがスベルミジン、スベルミンであるとすれば、MGBG よりそれらの生成は阻害され、管伸長は阻害される。またプトレッシンが管伸長に関与しているのであれば、MGBG は影響しないと推測できる。培地にプトレッシン、スベルミジンを添加しても、MGBG の阻害作用は弱められることなく、DETA の場合も同様であった (Table 3)。前報<sup>(4)</sup> と異なり、プトレッシン、

スベルミジンに管伸長促進効果がみられなかったが、これも MES と  $\text{Ca}^{2+}$  による促進のため、ポリアミンの効果ははっきりしなかったためと考えられる。スベルミジンが管伸長に関与しているのであれば、その濃度を増加させることで MGBG による阻害を緩和できると推測できるが、そのような結果は得られなかった。またプトレッシンが管伸長に関与していれば、アミノ酸の供給はプトレッシンのレベルを上昇させ、管伸長に影響すると考えられるが、Table 2 に示すように管伸長に特別の変化はみられなかった。また表には示していないが 1 mM MGBG を加えた場合も、Arg 濃度 0–1 mM のとき 60%、10 mM のとき 70% の管伸長が認められた。

これらの結果も特定のポリアミンの細胞内レベルが変化し、蛋白質合成などに影響するといった経過で、管伸長が促進される可能性は少ないことを示している。ただ MGBG にはポリアミン生成阻害の他に、ミトコンドリアの機能阻害、DNA ポリメラーゼ阻害や膜透過性に影響すること、<sup>(10)</sup> エチレン生成に関与するこ

と<sup>(12)</sup>などが知られており、これらの作用も管伸長に影響しているかもしれない。

### 3. テッポウユリ花粉に対する影響

テッポウユリ花粉の管伸長に対するポリアミンの影響は、促進<sup>(7)</sup>と阻害<sup>(1)</sup>の報告があり、明確ではない。そこで、ポリアミンの代わりに塩基性アミノ酸の影響を調べ、さらにカナバニン、MGBG の影響を調べた (Table 4)。管伸長は高濃度の Arg によって、またカナバニンによっても阻害された。カナバニンによる管伸長阻害は Arg や Cit の添加によっては緩和されず、ツバキ花粉の場合と著しく異なっていた。MGBG も管伸長を阻害し、この阻害に対して Arg の添加は影響を与えなかった。MGBG の阻害はカナバニンによる阻害よりも大きく、この点もツバキの場合と著しく異なっていた。

### 4. アミンと花粉管伸長促進

リング花粉<sup>(5)</sup>において Arg からポリアミンが生成

Table 3. Interaction between polyamines and MGBG in the tube growth of *Camellia japonica* pollen

Additions	Tube length, %Control				
	Amine concentration. mM				
	0	0.001	0.001	0.1	1
Putrescine	100 ± 3 (8.8 ± 0.3)		103 ± 7	103 ± 7	105 ± 5
Putrescine+MGBG	73 ± 3		75 ± 3	70 ± 3	80 ± 2
Spermidine	100 ± 2 (9.6 ± 0.2)	99 ± 4	101 ± 4	59 ± 3	
Spermidine+MGBG	65 ± 2	64 ± 2	75 ± 3	58 ± 3	
DETA	100 ± 3 (9.1 ± 0.3)	108 ± 4	112 ± 3	127 ± 5	
DETA+MGBG	68 ± 2	67 ± 1	71 ± 1	79 ± 3	
Agmatine*	100 ± 4 (5.7 ± 0.2)		109 ± 7	118 ± 5	144 ± 11
Agmatine*+MGBG**	104 ± 6		96 ± 4	104 ± 7	139 ± 7

Pollen grains were incubated on the basal medium containing MES buffer (1 mM, pH 7) and calcium nitrate (1.7 mM) for 20–24 hr at 25°C. \*MES buffer was omitted from the medium. MGBG: 0.1 mM or \*\*0.5 mM. DETA: diethylenetriamine. Figures in parentheses indicate the tube length (mm) in controls.

Table 4. Interaction between arginine or citrulline and canavanine or MGBG in the tube growth of *Lilium longiflorum* pollen

Additions	Tube length, mm (%Control)			
	Amino acid concentration, mM			
	0	0.1	1	10
Arginine	8.1 ± 1.2 (100)	8.5 ± 0.4 (104)	7.6 ± 0.5 (93)	0.7 ± 0.3 (9)
+Canavanine	3.4 ± 1.7 (41)	4.5 ± 1.2 (55)	4.4 ± 1.4 (54)	0.1 >
+MGBG	3.0 ± 0.3 (37)	3.6 ± 0.3 (44)	3.2 ± 0.4 (39)	0.6 ± 0.4 (7)
Citrulline	8.3 ± 0.6 (100)	8.4 ± 0.6 (101)	8.1 ± 0.7 (98)	8.1 ± 0.8 (98)
+Canavanine	3.9 ± 1.1 (47)	4.8 ± 0.5 (58)	4.7 ± 1.1 (57)	5.1 ± 0.9 (61)

Pollen grains were incubated on the basal medium containing 1.7 mM calcium nitrate and 1.6 mM boric acid for 20–24 hr at 25°C. Canavanine or MGBG: 0.1 mM.

することが示されている。Fig. 1 に示した代謝経路はツバキ花粉にも存在し、生成したポリアミンは蛋白質合成などに関与していると考えられる。しかし、カナバニンと MGBG を用いた実験からは、プトレッシン、スペルミジンといった特定のポリアミンが管伸長の促進に関与していると考えられる結果は得られなかった。おそらく、通常は花粉の Arg およびポリアミン代謝経路に関係する物質の濃度は低く、管伸長促進を示すような高濃度にはならないのであろう。高濃度ポリアミンが培地から供給されたとき、ポリアミンは細胞膜など膜系に直接的に作用し、管先端領域での膜の安定化、透過性、膜形成などに影響を与え、管伸長促進を導くものと考えられる。そして DETA や塩基性アミノ酸も管伸長を促進することから、特定のポリアミンの生成が代謝に影響して管伸長を促進するのではなく、与えたポリアミンは単にアミン（多価カチオン）として作用し、Ca<sup>2+</sup> はそれらの作用と密接なかかわりをもつ<sup>(12)</sup>と考えられる。

ツバキとテッポウユリ花粉ではアミンに対する反応が異なっているが (Table 2 と 4), 両者の間で代謝経路に大きな違いがあるとは考えにくい。むしろこれらの間には、例えば細胞膜の性質などに違いがあり、それに対するアミンの影響が異なるため、管伸長の違

いとして現れるのかもしれない。カナバニンの存在は Arg 濃度を高めることになり、その高濃度 Arg がアミンとして膜系に作用する時、両花粉間では反応が異なるため、ツバキでは管伸長の促進に、テッポウユリでは阻害になるのではないかと考えられる。

## 要 約

ツバキとテッポウユリ花粉の管伸長は Arg 代謝阻害剤であるカナバニンと SAM 脱炭酸酵素阻害剤である MGBG により阻害された。ツバキ花粉の場合、カナバニンによる管伸長阻害は Arg, Cit, Orn を加えると緩和され、阻害緩和の程度は Arg > Cit > Orn の順に大きかった。ポリアミンにはこのような働きはみられなかった。ユリ花粉では、Arg や Cit を加えてもカナバニンによる管伸長阻害を緩和できなかった。また MGBG による管伸長阻害は両花粉とも、アミノ酸やポリアミンを加えても緩和することができなかった。以上の結果から、花粉管伸長のポリアミンによる促進は、アミンが蛋白質合成などに影響を与えるためおこるのではなく、直接的に膜系に作用する結果であると考えられる。おそらくツバキとテッポウユリでは膜系の性質に違いがあり、アミンの影響が異なるのであろう。

## 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 III. アミンの作用. 花粉誌 **35**, 13-20 (1989).
- (2) 趙 秀采：ポリアミンの生理作用. 植物の化学調節 **19**, 25-33 (1984).
- (3) 山川敏郎：ポリアミンの生化学 (II). *The Chemical Times* **3**, 5-7 (1985).
- (4) Linskens, H. F., A. S. L. Kochuyt and A. So: Regulation der nucleinsäuren-synthase durch polyamine in keimenden pollen von *Petunia*. *Planta* **82**, 111-122 (1968).
- (5) Bagni, N., P. Adamo, D. Sarafini-Fracassini and V. R. Villanueva: RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* **68**, 727-730 (1981).
- (6) Prakash, L., P. John, G. M. Nair and G. Prathapasenan: Effect of spermidine and methylglyoxal-bis (guanyl-hydrazone) (MG-BG) on *in vitro* pollen germination and tube growth in *Catharanthus roseus*. *Annal. Bot.* **61**, 373-375 (1988).
- (7) Rajam, M. V.: Restriction of pollen germination and tube growth in lily pollen by inhibitors of polyamine metabolism. *Plant Sci.* **59**, 53-56 (1989).
- (8) 中村紀雄・確井裕之・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).
- (9) 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. 花粉誌 **34**, 59-62 (1988).
- (10) 中島邦夫・樋廻博重：ポリアミン代謝阻害剤 (阻害剤研究法, 日高弘義 編) 共立出版 pp. 234-247 (1985).
- (11) 山川敏郎：ポリアミンの生化学 (III) *The Chemical Times* **3**, 1-16 (1985).
- (12) Saftner, R.: Effect of organic amines on  $\alpha$ -aminoisobutyric acid uptake into the vacuole and on ethylene production by tomato pericarp slices. *Plant Physiol.* **75**, 485-491 (1989).

