

³¹P-NMR 測定によるツバキ花粉の細胞内 pH とリン酸濃度鈴木由臣¹⁾・仁科正実²⁾・松下和弘²⁾・堀 栄太郎²⁾・綿貫知彦³⁾・中村紀雄¹⁾¹⁾ 横浜市立大学生物学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2²⁾ 埼玉医科大学医動物教室 〒350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38³⁾ 神奈川県衛生研究所 〒241 横浜市旭区中尾町52

(1994年4月15日 受理)

Intracellular pH and Inorganic Phosphate Concentration as Measured with ³¹P-NMR Spectroscopy in Growing Pollen of *Camellia japonica*Yoshiomi SUZUKI¹⁾, Masami NISHINA²⁾, Kazuhiro MATSUSHITA²⁾,
Eitaro HORI²⁾, Tomohiko WATANUKI³⁾ and Norio NAKAMURA¹⁾¹⁾ Department of Biology, Yokohama City University, Kanazawa-ku,
Yokohama 236, Japan²⁾ Department of Medical Zoology, Saitama Medical School, Iruma-gun,
Saitama 350-04, Japan³⁾ Department of Environmental Biology, Kanagawa Prefectural Public
Health Laboratories, Asahi-ku, Yokohama 241, Japan

The intracellular pH and inorganic phosphate (Pi) concentration of *Camellia japonica* pollen growing on various sugar media were studied by ³¹P-nuclear magnetic resonance (³¹P-NMR) spectroscopy. In all cases, the cytoplasmic pH of the growing pollen was in the vicinity of neutral pH, and Pi concentrations were in the range of 5 to 17 mM, although there was a tendency for the pollen growing on media containing maltose to have higher concentrations of Pi.

Key words : *Camellia japonica*, Inorganic phosphate, Intracellular pH, ³¹P-NMR spectroscopy, Pollen growth.

緒 言

近年高等植物における解糖系の調節はピロリン酸依存ホスホフルクトキナーゼの活性が高いなど、他の生物とは異なる部分があることが明らかにされつつある⁽¹⁻³⁾。またこれまでに報告された酵素の性質や代謝中間体の細胞内濃度などはピロリン酸依存ホスホフルクトキナーゼやこの酵素の活性化因子であるフルクトース-2, 6-ビスリン酸の発見以前のものであるので、植物細胞の糖代謝調節を知るためにはこの糖リン

酸を含めて代謝中間体の濃度や解糖系酵素の生体内での活性について再検討が必要であろう⁽⁴⁾。このような見地から、我々は成長しているツバキ花粉を用いて糖代謝中間体の細胞内濃度について検討をすすめている。ただその際、リン酸化合物の濃度測定については従来の方法に問題があることが指摘されている^(1, 5)。この研究ではこの点を解決すべく検討をおこなった。つまり、細胞からリン酸化合物を抽出する場合、細胞を破碎して過塩素酸により抽出する方法がよく用いられているが、この方法は細胞を破碎する際に高温

となること、時間がかかりすぎることなどにより、リン酸化化合物が破壊される可能性があることが指摘されている。また植物細胞では液胞が大きく、無機リン酸 (Pi) は細胞質と液胞の両区画に分布するので⁽⁶⁻¹¹⁾、細胞内濃度を知るためには細胞質と液胞の Pi を区別して測定する必要がある。そこで ³¹P-NMR (リン核磁気共鳴) を利用して、細胞を破壊せずに、花粉粒および培地上で成長している花粉に含まれる Pi の量を測定すること、細胞質と液胞の Pi を区別すること、またそれら区画の pH を測定することを試みたので、その結果について報告する。

材料と方法

花粉 — ツバキ (*Camellia japonica*) の未開の蕾から葯を取り出し、24時間 30°C に保って開葯させ、花粉を採取した。使用するまで -20°C で花粉を貯蔵した。

花粉の培養 — 糖を含む寒天 (1.3%) 培地に、アセトンで洗った花粉を散布し、25°C で6時間培養した。糖はそれぞれ 0.1M のショ糖、グルコース、フルクトースと 10mM のマルトースを使用した。

過塩素酸による Pi の抽出 — 成長している花粉を集めて、冷 6% 過塩素酸 2 ml に懸濁させ、ホモゲナイザー管中で磨砕した後、この液を遠心分離 (15000 × g, 0°C, 30min) して上清を得た。この上清の pH を 3.5-5.0 に調整して遠心分離し、得た上清を凍結乾燥して保存し、測定に際して HEPES-KOH 緩衝液 (pH 7) に溶解して使用した。Pi 量の測定は Fiske-Subbarow 法に準じて⁽¹²⁾ 比色法により行った。

³¹P-NMR 測定 — 日本電子 EX 400 FT-NMR を使用して、共鳴周波数 161.7 MHz でシグナルを 512 または 1024 回積算した。85% リン酸を基準としてシグナルのケミカルシフト値を求めた。花粉を破壊せずに Pi 量を測定する場合には、定量用基準物質として 10mM ヘキサメチルホスホルアミド (HMPA) をキャピラリーチューブにとり、このチューブと試料を一緒に NMR サンプル管 (直径 10mm) に入れた。花粉抽出液の場合には、HMPA (終濃度 1mM) と混合して NMR 管 (直径 5mm) に入れた。

Pi のケミカルシフト値と pH の関係 — 無糖培地

で成長した花粉を集め、蒸留水を加えて破碎した後、遠心分離 (15000 × g, 0°C, 30min) して上清を得た。この上清に KOH または HCl を加えて pH を調整した。それぞれの pH の試料液について ³¹P-NMR 測定を行い、Pi シグナルのケミカルシフト値を pH に対してプロットして標準曲線を作成した。

Pi の細胞内濃度の算出 — 前報告⁽²⁾ に示した仮定に基づいて Pi の細胞内濃度を算出した。つまり、Pi が存在する細胞質は花粉管先端から先端に最も近いカロールス栓までの間に存在し、花粉管は直径 8 μm の円筒とみなして細胞質容積を計算した。また、花粉粒は直径 38 μm の球とみなした。

結果と考察

³¹P-NMR 測定法により、花粉を破壊せずに細胞内のリン (P) を測定することを試みた。葯より出た完全花粉粒をそのまま直接試料管につめ、P を測定した結果が Fig. 1 A に示されている。スペクトルがシャープでないのは、花粉がかなり脱水された状態にあるためであろう。アセトンで洗った花粉について調べた場合には、スペクトルが得られなかった。しかしアセトンで洗った花粉粒を水に懸濁させ、その直後に測定すると無機リン酸 (Pi) を含むピークがみられ (Fig. 1 B)、30分後に測定するとより明瞭な三つのピークが得られた (Fig. 1 C)。これらは糖リン酸、Pi、リン脂質 (リン酸ジエステル) のピークであり、花粉を水に懸濁させた直後では吸水が十分ではなくスペクトルが明瞭ではなかったと考えられる。同時に測定した基準物質の濃度に基づいて求めた花粉粒内の Pi 濃度は 14mM であった。また吸水して発芽過程にあるツバキ花粉粒内には液胞に発達するとおもわれる小胞が観察される⁽¹³⁾。これら小胞にも Pi が存在するかも知れないが、スペクトルからは Pi のピークは一つであり、そしてそれは小胞と細胞質の占める割合からみて細胞質由来のピークと考えられる。花粉を破碎し、その上清と沈澱分画について P のスペクトルを調べたが、ほとんどの Pi は上清液分画に存在した (データは示していない)。セイヨウナシ⁽¹⁴⁾ やテッポウユリ⁽¹⁵⁾ の花粉粒における P の分布が電子顕微鏡 X 線マイクロアナライザーにより分析されており、P は細胞壁ではなく、その大部分が細胞質に存在することが示されている。

ツバキ花粉を液体培地に懸濁させて長時間成長させることは困難であり、管伸長時の Pi を調べる際には寒天培地上で花粉を成長させた。成長した花粉を水や糖液に懸濁させると吸水環境が変わるためか原形質吐出をおこしたので、寒天糖培地より集めた成長花

粉を液には懸濁せずに直接 NMR 測定試料管につめて、直ちに測定した。試験管に寒天斜面培地をつくり、その全表面に花粉を散布し、成長している花粉についてそのままの状態でも測定することも試みたが明瞭なスペクトルを得ることができなかった。

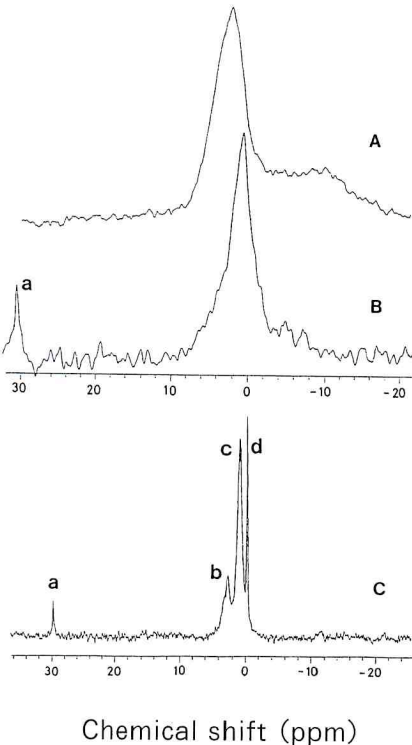


Fig. 1. ^{31}P -NMR spectra of *Camellia Japonica* pollen grains.

Intact pollen grains (A) and pollen grains washed with acetone (B and C) were examined using NMR spectroscopy. Pollen grains washed with acetone were either used immediately after being suspended in acetate buffer (pH3.8) (B), or incubated in HEPES buffer (pH7.0) for 30 min (C). Chemical shift is given in ppm from 85% orthophosphate.

a: hexamethylphosphoramidate, an external reference; b: sugar phosphate; c: inorganic phosphate; d: phosphodiester compound.

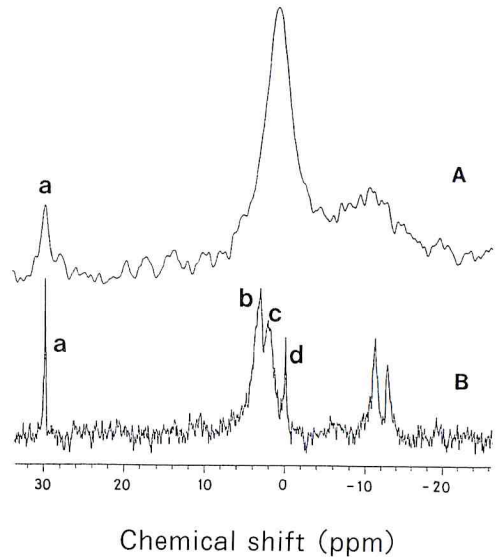


Fig. 2. ^{31}P -NMR spectra of intact growing pollen and pollen extract of *Camellia Japonica*.

(A) Pollen grains were incubated on fructose-agar medium for 6 hr at 25 °C. The growing pollen collected was loaded into a NMR sample tube and immediately analyzed.

(B) Pollen extract was prepared from pollen grown on a sugar-free medium for 6 hr. a: hexamethylphosphoramidate, an external reference; b: sugar phosphate; c: inorganic phosphate; d: phosphodiester compound.

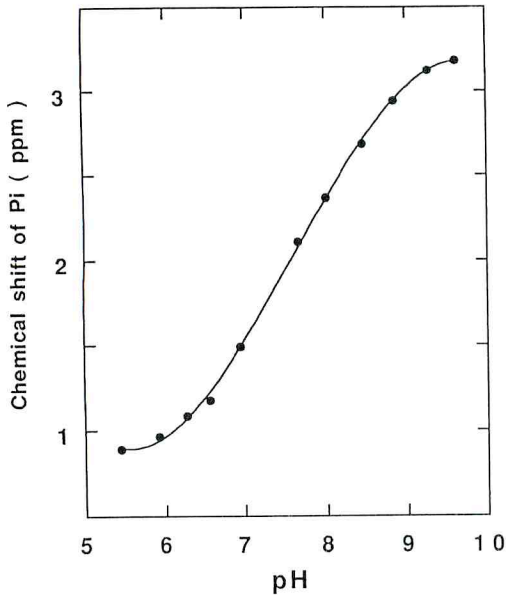


Fig. 3. Calibration curve of pH versus chemical shift of inorganic phosphate.

Fig. 2 A は 6 時間成長させた花粉について非破壊的に P を調べた一例を示している。各種の糖を含む培地で花粉を成長させ、それぞれの場合の P のスペクトルの比較を行ったが、いずれの場合もケミカルシフト 1.4ppm 前後にシャープでない P の主ピークが一つ認められただけで、Pi だけを明確に示すピークを検出することはできなかった。そこで成長した花粉の抽出液のスペクトル (Fig. 2 B) では糖リン酸、Pi、リン脂質由来のピークが認められたので、P の主ピークにはこれらの成分が含まれているとみなし、次善の方法として糖リン酸量とリン脂質量を差し引いた値を Pi 量の値とした。このようにして Pi 量を求め、それに基づいて花粉管の細胞内 Pi 濃度を算出した結果が Table 1 に示されている。花粉管の成長には糖の影響がみられるが、花粉細胞内 Pi 濃度には大きな影響はみられず、その値は 5-17mM であった。植物の体細胞の Pi 濃度としては 1-10mM の値が報告⁽⁵⁾されており、ツバキの花粉細胞もほぼ同じ値であった。ただ、マルトースを含む培地で成長した花粉では、それを含まない培地で成長したものより Pi 濃度が高い傾向がみられた。ショ糖培地の場合も、マルトースにより管伸長は阻害されていないが、Pi 濃度は高くなっていた。また、無糖培地 (Fig.2B) とマ

Table 1. Levels of inorganic phosphate in *Camellia japonica* pollen growing on various sugar media

Methods	Estimated concentration of Pi (mM)							
	Sugar-free	Maltose	Sucrose	Medium +Maltose		Glucose +Maltose	Fructose	Fructose +Maltose
³¹ P-NMR	6.9 (3.0)	15.7 (1.0)	4.8 (4.0)	8.0 (4.0)	11.9 (3.6)	14.5 (1.0)	6.1 (3.0)	16.3 (1.0)
Colorimetry	26.1 (2.5)	38.4 (1.0)	23.2 (4.0)	30.9 (4.0)				

Pollen grains were incubated on agar media containing 0.1M sucrose, 0.1M glucose, 0.1M fructose or 10mM maltose for 6 hr at 25°C. Growing pollen was collected and loaded into a NMR sample tube, and phosphorus in the growing pollen was analyzed by ³¹P-NMR spectroscopy. Otherwise the growing pollen collected was extracted with chilled perchloric acid, and Pi contents were measured by colorimetry according to Fiske-Subbarow's method. Intracellular Pi concentrations were estimated by calculations based on the assumptions described in the previous report⁽²⁾. Figures in parentheses indicate pollen tube length (mm).

Table 2. Measurement of pH in growing pollen of *Camellia japonica* with ^{31}P -NMR spectroscopy

	Sugar-free	Maltose	Sucrose	Medium				
				Sucrose + Maltose	Glucose	Glucose + Maltose	Fructose	Fructose + Maltose
Chemical shift of Pi (ppm)	1.476 ±0.243	1.410 ±0.311	1.348 ±0.202	1.715	1.233	1.473	1.142	1.323
pH	6.90	6.82	6.72	7.20	6.52	6.90	6.36	6.66

Pollen grains were incubated on the agar media containing various sugars and the chemical shifts of Pi of the growing pollen collected were measured using ^{31}P -NMR spectroscopy (see Table 1).

Intracellular pH was determined from the NMR spectra by utilizing the calibration curve of the relationship between the chemical shift of Pi and the titration pH (Fig. 3).

ルトース培地で成長した花粉の抽出液について NMR 測定したときの Pi 量は、それぞれ 12 と 17mM であった。そしてこれらの NMR 測定により求めた Pi 量は花粉抽出液について比色法で求めた Pi 量より低い値であった (Table 1)。比色法の場合もマルトースが存在すると Pi 量が高い傾向がみられた。マルトースはツバキ花粉の管伸長に対して特異な阻害作用を示す⁽¹⁵⁾が、これらの結果はその作用機構を考える際に考慮すべきことであろう。

抽出液の NMR 測定による Pi 量は、直接 NMR 測定した場合と比色法により求めた場合 (Table 1) との中間の値を示した。このことは Pi 量を求めるのに、抽出方法と比色定量法についてさらに検討する必要があることを示している。抽出法については、とくに細胞の破碎方法に改良の余地があると考え、体細胞試料についてよく用いられる方法で、試料を液体窒素で凍らせ機械的に迅速に破碎する方法を成長花粉に応用してみた。しかし花粉が微細なため破碎されず、この方法は有効ではなく、結局、冷過塩素酸液を加えて磨砕する方法を用いた。また比色法により求めた Pi 量は NMR 測定の場合より高い値を示したが、この理由は不明である。ツバキ花粉にはこの比色法における Pi の発色に影響する物質が含まれていて高い値が得られたことなどが考えられるが、このことについては検討を加えず、NMR 測定の方が Pi に対する特異性が高いと考え、それによって得られた値を細胞内 Pi 値により近い値であると判断した。

^{31}P -NMR における Pi のケミカルシフトと pH は密接な関係にある。Fig. 3 は花粉抽出液の pH と Pi ケミカルシフトの関係を示しており、Pi のケミカル

シフトを知ることにより、花粉細胞内の pH を知ることができる。スペクトルの主ピークを Pi のピークとみなしたときの、そのケミカルシフトが Table 2 に示されている。同じ糖培地で成長した花粉の場合でもそれらの値に変動がみられ、マルトース培地で成長した花粉の場合、その値は 0.946-1.82ppm の間に存在して平均は 1.41ppm であり、標準曲線 (Fig. 3) より求めた細胞内 pH は 6-7.4 で、平均は pH 6.8 であった。他の糖の場合のケミカルシフトの変動の範囲もマルトースの場合における変動の範囲内にあり、糖の種類による影響は認められなかった。得られたすべてのケミカルシフトの値の平均は $1.408 \pm 0.237\text{ppm}$ で、pH は 6.8 であった。したがって成長している花粉の細胞内の pH はほぼ中性付近にあると考えられる。成長している花粉管では、カロース栓が形成され管内が細胞質のある部分と無い部分に仕切られ、細胞質は常にカロース栓と管先端の間のみ存在する。ツバキ花粉管の場合、この細胞質部分にはこれまで光学および電子顕微鏡によっては明確な液泡が殆ど観察されず、液泡が存在するとしてもそれらは小さく、量的にも少ないと考えられる。このことは大きな液泡が観察される体細胞の場合とは異なっている。したがって得られた値は細胞質の pH 値を示していると思われる。ヤエナリの根端細胞⁽¹¹⁾やフラスモの細胞質⁽⁹⁾においては pH 7.2-7.4 とツバキ花粉と同じような pH 値が報告されている。またこれらの細胞の液泡の pH は 5.4-6.3 であり、細胞質の pH よりもより酸性の値が報告されているので、このことからツバキ花粉の pH は細胞質の pH を示していると考えられる。

ツバキの花粉粒は液に懸濁させても細胞が原形質吐

出をおこすことはなく、発芽前の状態にある花粉の細胞内 Pi 量を NMR 測定により求めることができたが、花粉管を伸ばした花粉については実験上の制約から、かならずしも明確な値を得ることができなかった。このことについては、今後ツバキ花粉とは性質の異なる花粉を用いるなどしてさらに検討する必要がある。

要 約

いろいろな糖培地で成長したツバキの花粉細胞内の pH とリン酸量を ^{31}P -NMR (リン核磁気共鳴) 法により調べた。いずれの糖培地で成長した花粉も、細胞質の pH は中性付近にあり、無機リン酸濃度は 5-17 mM であった。ただ、マルトースを含む培地で成長した花粉はその他の糖培地で成長した花粉より無機リン酸濃度が高い傾向がみられた。

文 献

- (1) Kubota, K. and H. Ashihara: Identification of non-equilibrium glycolytic reactions in suspension-cultured plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1036**, 138-142 (1990).
- (2) Nakamura, N., Y. Suzuki and H. Suzuki: Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from pollen: properties and possible roles in sugar metabolism. *Physiol. Plant.* **86**, 616-622 (1992).
- (3) Sung, S.-J. S., D.-P. Xu, C. M. Galloway and C. C. Black, Jr.: A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. *Plant Physiol.* **72**, 659-654 (1988).
- (4) 芦原 担: ピロリン酸依存ホスホフルクトキナーゼ. *化学と生物* **28**, 764-766 (1990).
- (5) Stitt, M.: Fructose-2, 6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 153-185 (1990).
- (6) 伊藤 治: ^{31}P -NMR による植物代謝活動の in vivo 測定. *植物の化学調節* **27**, 103-109 (1992).
- (7) Lee, R. B. and R. G. Ratcliffe: Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with ^{31}P -NMR. *J. Exp. Bot.* **260**, 587-598 (1993).
- (8) Martin, J. B., R. Bligny, F. Rebeille, R. Douce, J. J. Leguay, Y. Mathieu and J. Guern: A ^{31}P nuclear magnetic resonance study of intracellular pH of plant cells cultivated in liquid medium. *Plant Physiol.* **70**, 1156-1161 (1982).
- (9) Mimura, T. and Y. Kirino: Change in cytoplasmic pH measured by ^{31}P -NMR in cells of *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Physiol.* **25**, 813-820 (1984).
- (10) 三森文行: NMR による生体の非破壊計測. *化学と生物* **28**, 668-675 (1990).
- (11) Nakamura, Y., T. Ogawa, K. Kasamo, M. Sakata and E. Ohta: Changes in the cytoplasmic and vacuolar pH in intact cells of mung bean root-tips under high-NaCl stress at different external concentrations of Ca^{2+} ions. *Plant Cell Physiol.* **33**, 849-858 (1992).
- (12) Hara, A., T. Hondo and T. Funaguma: A simple assay method for determination of NDP-glucose pyrophosphorylase. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 413-414 (1983).
- (13) Nakamura, N.: Physiological studies on the pollen growth of *Camellia japonica* L. in vitro. *J. Yokohama City Univ. Biol. Ser.* **5**, 1-100 (1973).
- (14) Stanley, R. G. and H. F. Linskens: Pollen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 127-128 (1974).
- (15) Yamada, Y.: The distribution of ions in the pollen grain of *Lilium longiflorum* by scanning electron microscope with X-ray detector system. *Bot. Mag. Tokyo* **86**, 229-233 (1973).
- (16) Nakamura, N. and H. Suzuki: Inhibition of *Camellia japonica* pollen tube growth by maltose. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1011-1018 (1985).