

(短報)

熱量測定による花粉成長の解析

鈴木由臣¹・稲葉 慎²・中村紀雄¹・大河内正一²¹ 横浜市立大学文理学部生物学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸 22-2² 法政大学工学部物質化学科 〒184 小金井市梶野町 3-7-2

(1994年10月18日 受理)

Analysis of Pollen Growth by Calorimetry

Yoshiomi SUZUKI¹, Makoto INABA², Norio NAKAMURA¹
and Shoichi OKOUCHI²¹ Department of Biology, Yokohama City University,
Yokohama, Kanagawa 236, Japan² Department of Materials Chemistry, College of Engineering,
Hosei University, Koganei, Tokyo 184, Japan

Heat evolution associated with the growth of *Camellia japonica* pollen was studied by measuring it electrically with a multiplex calorimeter. Heat evolution increased rapidly during pollen germination and decreased gradually during pollen tube growth. Exogenous sucrose, glucose and fructose accelerated heat evolution during germination and tube growth; these sugars stimulated tube growth but not germination. However, heat evolution during tube growth was depressed in the presence of maltose. These results suggest that heat evolution during pollen growth depends mainly on sugar metabolism associated with the respiration, and that maltose interferes in some way with this metabolic system.

Key words: Calorimetry, *Camellia japonica*, Pollen germination, Pollen tube growth, Sugar metabolism.

花粉の成長は一般に糖の種類や濃度に影響されるが、我々はツバキ花粉の管伸長が多くの花粉の場合と異なり、マルトースにより著しく阻害されること、この現象はツバキ花粉がマルターゼをもたず、マルトースを代謝基質として利用できないためであること、培地にショ糖が存在するとマルトースの阻害作用はみられないことを報告した⁽¹⁾。そしてこのツバキ花粉に特異的なマルトースの阻害作用を調べることは、花粉管伸長機構を明らかにする一助となると考え、マルトース

の作用機構についてさらに検討を行っている。今回は花粉が成長する際に発生する熱量の測定を試み、マルトースの影響を調べた。

ツバキ (*Camellia japonica*) 花粉の採取は前報⁽²⁾ に準じて行い、蕾から取り出した葯を 30°C で開葯させて花粉を集めた。

花粉の培養は 0.1M の糖を含む 1.3% 寒天培地上で行った。ただし、マルトースの場合は 10mM 濃度を用いた。これはこの濃度で 0.1M の場合と同様の花粉

管伸長阻害を示すことと、他の糖と混合した際に培地の糖濃度に大きな変化を与えないようにするためである。花粉管伸長の測定の場合は、アセトンで洗った花粉を培地に直線状に置床し、発芽率の測定の場合は花粉を筆先につけ、個々の花粉ができるだけ重ならないように散布して、花粉を培養した。

成長している花粉の発生する熱量の測定は熱量計 Bio-Thermo Analyzer H-201 (日本医化機器製作所) によって行った。ガラス製試料セル (容量 30ml, 直径 3 cm) に上述の寒天培地 5 ml を加え、その上にアセトンで洗った 10 mg の花粉を散布し、蓋をして直ちに 25°C に保ったアルミニウムブロック (ヒートシンク) の中にセットした。この部分には熱電対が配置されていて、試料セル内で生じた熱量にもとづく試料セルとヒートシンクとの間の温度差を熱起電力として検出する。経時的に 2.5 分間隔で、個々の試料における熱変化を同時測定した。なお、花粉が培養されていない寒天培地のセルをヒートシンクにセットしてからセルの温度が安定するのに約 2 時間を要したが、培地に花粉が散布されると、花粉はすぐに生理的に活性化状態になるので、安定化を待たずにセットと同時に熱量の測定を開始した。

花粉の成長にともなう熱発生は主に呼吸によると考えられ、花粉管伸長時の呼吸に及ぼすマルトースの影響について調べた。花粉の呼吸については、テッポウユリ⁽³⁾、クロマツその他の花粉⁽⁴⁾を用いて、ワールブルグ検圧計による測定が行われている。ただこの検圧計による測定では花粉を液に懸濁させなければならず、また長時間の測定には不向きである。ツバキ花粉は液に懸濁させると急速に発芽能力を失うので、この方法を用いることができなかった。熱量計による測定を試みた理由は、寒天培地を用いることができ、長時間の測定が可能なのである。熱量計による測定は、植物種子の発芽⁽⁵⁾や微生物の増殖⁽⁶⁾の解析に有効であり、花粉の成長解析に応用を試みた。

Fig. 1 に種々の糖培地上で成長した花粉が発生する熱量の変化が示されている (a は代表的な例を示しており、b のような場合もみられた)。各熱量曲線は 3 試料についての平均値を示している。実験においては常にマルトースを含まない糖培地はマルトースを含む培地よりも発生熱量が高いパターンを示した。花粉が培養されていない培地では熱の発生がみられないので、この熱発生は花粉の活動によるものであり、その大部分は呼吸によるものと考えられる。また、どの糖

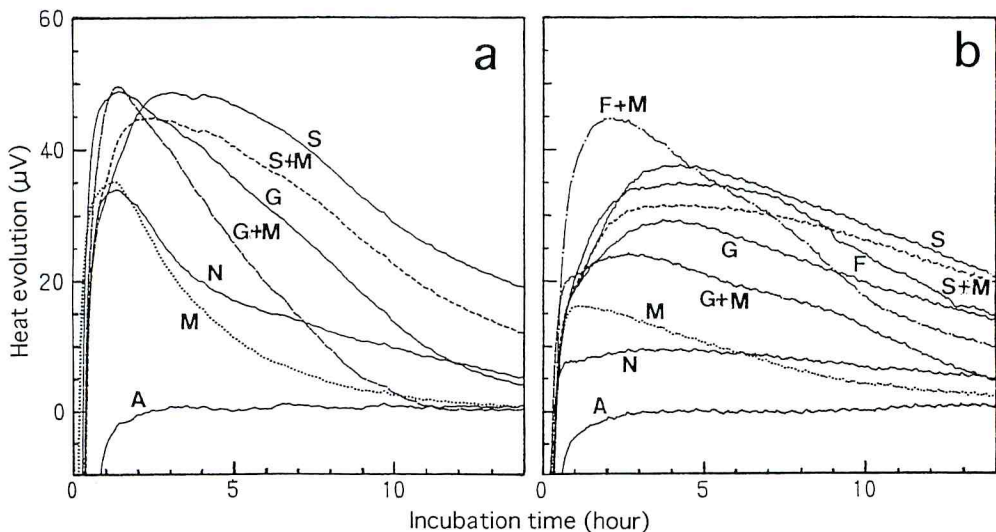


Fig. 1. Thermograms of *Camellia japonica* pollen growth.

Pollen grains were incubated on various agar media containing sugar-free (N), 0.1 M sucrose (S), 0.1 M glucose (G), 0.1 M fructose (F) or 10mM maltose (M); on sugar-free medium (A), pollen grains were not incubated. Heat evolved during pollen growth was measured with a multiplex calorimeter. Figures a and b show the thermogram patterns, which are somewhat different.

培地においても培養 1-4 時間にかけて急速な熱発生がみられ、最も高い値を示した。この時間は発芽時および花粉管伸長初期にあたる。そしてその後の花粉管伸長期には発熱生の減少がみられた。試料セル中で成長している花粉の発芽率や管伸長を直接測定することはできないので、別に発芽率と管伸長を測定した結果が Table 1 に示されている。発芽率は培養 2 時間で、マルトースが共存するフルクトース培地の場合を除いて、どの培地においても約 40% の値を示し、糖の種類による有意な差は認められず、マルトースの影響もみられなかった。しかし発生熱量には糖の種類による影響がみられ、無糖やマルトース培地では他の糖に比べて低い値を示した (Fig. 1)。これは培地の糖が呼吸基質として利用されたためであろう。テッポウユリでは発芽率が糖の種類により影響を受けるが⁽³⁾、ツバキでは花粉粒内に含まれるショ糖を利用して、吸水しさえすれば発芽可能であり⁽¹⁾、外因性の糖の影響は発芽率に大きな影響を与えなかったと考えられる。

花粉管伸長時の熱発生は糖の種類により異なっており (Fig. 1)、花粉管の長さが長い場合には発生した熱量も大きかった (Table 1)。また管伸長期にはどの糖培地においてもマルトースが共存すると熱発生の抑制がみられた。ただショ糖の場合は、マルトースの有無により熱発生に違いがみられたが (Fig. 1)、管伸長は同じであった (Table 1)。さらに培養 4 時間から 10 時間の間、つまりどの培地においても管伸長速度が最も速い時期における熱発生と管伸長速度を比

較してみると (Table 2)、無糖、ショ糖、グルコース培地では熱発生量に違いがみられ、ショ糖培地では無糖培地の約 3 倍の熱発生がみられたが、これらの培地における管伸長速度はほとんど同じであった。しかしマルトースが存在すると、管伸長速度は無糖培地では $\frac{1}{3}$ に、グルコースでは $\frac{2}{3}$ に減少した。ショ糖培地では熱発生は約 15% 減少したが、管伸長速度は影響されず、管伸長が続くことを示している。これはマルトースはショ糖から UDP-グルコースを経て花粉管壁多糖を合成する代謝系を阻害せず⁽⁷⁾、ショ糖が分解されて生じるグルコースとフルクトースを基質とする呼吸に関連した代謝系を抑制することを示しているのかも知れない。呼吸に関連した代謝系の混乱は、これらの単糖から花粉管壁多糖が合成される系にも影響を与えるであろう。

また花粉管が伸長を続けるには、ある一定レベル以上の呼吸の維持が必要であり、グルコースやフルクトースの培地ではマルトースが共存するとやがてそれが維持できなくなり、管伸長速度の減少や停止が早まるのであろう。ツバキ花粉は無糖培地では培養 14 時間位で管伸長が停止するので、その頃の熱発生量はその呼吸レベルの閾値を示しているのかも知れない。ショ糖培地では呼吸が抑制されても、それでもなお高いレベルにあり、管壁多糖の合成も行われるので管伸長が長く維持され、長い花粉管が形成されることになると考えられる。

熱発生が主に呼吸によるものであり、その呼吸がマ

Table 1. Effects of maltose on the pollen germination and tube growth of *Camellia japonica*.

Pollen grains were incubated on an agar (1.3%) medium containing 0.1M sucrose, 0.1M glucose, 0.1M fructose or 10mM maltose at 25°C. Parentheses indicate % germination after 2h - incubation.

Incubation time(h)	Pollen tube length (mm)							
	Sugar-free (37.6)	Maltose (32.4)	Sucrose (39.0)	Medium Sucrose + Maltose (37.5)	Glucose (41.4)	Glucose + Maltose (39.6)	Fructose (42.9)	Fructose + Maltose (66.0)
2	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.6±0.2	0.6±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1
4	0.8±0.1	0.7±0.1	1.4±0.2	1.4±0.2	1.1±0.1	1.1±0.2	1.0±0.1	0.8±0.2
6	2.4±0.3	1.4±0.2	3.4±0.3	3.3±0.2	3.1±0.2	2.1±0.3	2.6±0.3	2.0±0.3
10	4.3±0.3	2.0±0.3	5.6±0.4	5.4±0.4	4.9±0.3	3.7±0.5	4.9±0.3	2.7±0.4
14	5.2±0.3	2.5±0.4	6.9±0.3	6.6±0.4	6.0±0.3	4.0±0.4	6.0±0.4	3.0±0.4

Table 2. Effects of exogenous sugars on heat evolution during *Camellia japonica* pollen tube growth. The rates of heat evolution (***) and tube growth (****) were calculated from the data of 4 to 10h-incubations in Fig. 1 and Table 1. *Maltose concentration is 10mM.

Medium (0.1M) *	Heat evolution (J h ⁻¹) **	Tube growth (mmh ⁻¹) ****
Sugar-free	1.2×10^{-5}	0.6
Maltose	0.6×10^{-5}	0.2
Sucrose	3.5×10^{-5}	0.7
Sucrose + Maltose	3.0×10^{-5}	0.7
Glucose	2.4×10^{-5}	0.6
Glucose + Maltose	1.4×10^{-5}	0.4

ルトースにより抑制されるならば、発芽過程における熱発生も抑制されるはずであるが、測定された熱量からはむしろ促進される場合もみられた (Fig. 1b). 発芽過程、つまり花粉が吸水してから発芽に至る過程でおこる変化は、脱水された状態にあった花粉粒が吸水によってその体積を増大させ、原形質の流動が始まり、呼吸など代謝系の活動が開始されるなど、いずれも急激な変化であり、これらは熱発生と密接に関係しているよう。マルトースは呼吸を抑制するがその作用は強いものではなく、この段階での熱発生への影響の割合は小さいのかも知れない。

マルトースは通常花粉細胞内には含まれておらず、また培地から取り込まれてもマルターゼによりグルコースに分解されてしまい、これらの花粉ではマルトースとしての作用はみられない。しかし、ツバキ花粉はマルターゼをもたないため、細胞内に取り込まれたマルトースはマルトースとして作用し、花粉管伸長阻害や熱発生抑制に関係する。そして上述のような花粉管伸長機構の一端の説明が可能となるが、その作用機構についてはさらに詳細に検討する必要がある。

引用文献

- (1) Nakamura, N. and H. Suzuki : Inhibition of *Camellia japonica* pollen tube growth by maltose. *Plant Cell Physiol.* 26, 1011 - 1018 (1985).
- (2) Nakamura, N. : Physiological studies on the pollen growth of *Camellia japonica* L. in vitro. *J. Yokohama City Univ., Biol. Ser.* 5, 1 - 100 (1978).
- (3) Dickinson, D. B. : Permeability and respiratory properties of germinating pollen. *Physiol. Plant.* 20, 118 - 127 (1967).
- (4) 森 隆也・浜島繁隆 : 花粉に関する研究 II. 貯蔵花粉の呼吸について. *愛知学芸大学研究報告* 8, 42 - 46 (1959).
- (5) Yamaguchi, T., Y. Tsukamoto and K. Takahashi : Calorimetry as an analytical tool for germination tests of plant seeds. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 15, 381 - 386 (1990).
- (6) 高橋克忠 : 熱測定の微生物制御系への応用. *防菌防黴* 13, 271 - 276 (1986).
- (7) Amano, K. and N. Nakamura : Sucrose synthase from *Camellia japonica* pollen : properties and possible roles in sucrose metabolism. *Jpn J. Palynol.* 39, 31 - 39 (1993).