

(学術資料)

アニリンブルー蛍光法による花粉管壁カロース量の測定

小林 里子・花田 俊男・中村 紀雄

横浜市立大学理学部環境理学科 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2
(2001年4月13日 受理)Determination of Callose Content in the Tube Wall of
Angiosperm Pollen by Fluorometry with Aniline Blue Dye

Satoko KOBAYASHI, Toshio HANADA and Norio NAKAMURA

*Department of Environmental Science, Faculty of Science,
Yokohama City University, Yokohama, 236-0027 Japan*

To determine easily the callose content in the pollen tube wall, aniline blue-fluorometry was used to assess β -1,3-glucans, curdlan, laminaran and callose extracted from *Camellia japonica* pollen tubes as a standard. Each fluorescence intensity for these glucans was different, and that for laminaran was very weak: it was probably due to the low degree of polymerization of laminaran, and thus the callose from *C. japonica* pollen was adopted as a standard. The callose contents in the tube walls of four angiosperm pollen species were determined, and in *C. japonica* pollen, the callose content accounted for 70% of the dry weight of the tube wall. Also, the effects of some chemicals on callose synthesis in the pollen tube of *C. japonica* were examined, but no changes in the callose content of the tube wall were detected.

Key Words : aniline blue, β -1,3-glucan, callose, fluorometry, pollen tube

緒 言

被子植物の花粉管壁の主成分は β -1,3-グルカンであるカロースである^(1, 2)。タバコ花粉のカロース合成酵素は界面活性剤によりその活性が促進されることが報告されている⁽³⁾。花粉に界面活性剤を与えた場合、それは管壁カロースの合成に影響し、管壁形成そして管伸長に影響すると考えられる。このようなことを確かめるためには花粉管カロースの量的変化を調べる必要がある。 β -1,3-グルカンの簡便な定量法として、アニリンブルー色素を用いた蛍光測定がしばしば用いられるが、色素は β -1,3-グルカンだけに特異的に反応するわけではない⁽¹⁾。また β -1,3-グルカンに特異性の高い微量定量法が開発され⁽⁴⁾、その試薬も市販されているが高価である。そこで安価で簡便なカロースの定量方法として、アニリンブルーを用いた蛍光法を

検討して、それに基づき数種の花の管壁カロース量の測定を試みた。またツバキ花粉管カロース量に及ぼす種々の物質の影響を調べたのでその結果について報告する。

材 料 と 方 法

前報⁽⁵⁾に準じてツバキ (*Camellia japonica*)・サザンカ (*C. sasanqua*)・チャ (*C. sinensis*) 花粉は開花直前の花から集め、テッポウユリ (*Lilium longiflorum*) とその他の花粉は開花後の葯から集めた。0.1M ショ糖-1.3% 寒天培地を基本培地とし、花粉を培地上に直線状に置床して25°Cで24時間培養し、伸長した管の長さを測定した。ユリ花粉を培養する場合は1.6mMのホウ酸を、サザンカでは0.5mg/mlのBSA(牛血清アルブミン)を花粉管伸長促進剤と

して基本培地に添加した。

カロース量測定に際しては、伸長した花粉管をカミソリで花粉粒部分と花粉管部分に切り分けた⁽²⁾。花粉管部分については全花粉管の平均管長を測定した後、花粉管を回収した。花粉粒部分については花粉管の基部が残っている花粉粒を管伸長した花粉のもののみならずその数を測定し、これよりカロース量測定に用いた花粉管の本数を求めた。カロース量測定試料は、培地から回収した花粉管をホモゲナイザー管にとり、これに 0.1N 第二リン酸ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11) を加えて磨砕して調製した。カロース量の測定は、試料液 1ml, 第二リン酸ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11) 2ml, 0.001% 脱色アニリンブルー液 100 μ l を全透過の無蛍光石英セルに取り、十分に混合してから RF 540 型分光蛍光光度

計 (島津製作所) を用いて、励起光波長を 305nm とし、測定波長 430nm のときの蛍光強度を測定した。

花粉管の重さの測定に際しては、アセトン処理した花粉を用いた。花粉 0.1g を基本培地に均一に散布し、24 時間培養した後すべての発芽花粉を集めて、80% エタノールで、ついで無水エタノールで脱水し、遠心分離 (10000 \times g, 10 分) して得た沈澱を GTO-200 グラスチューブオープン (柴田科学機器工業) で 24 時間、70 $^{\circ}$ C で減圧乾燥した後、その重さを測定し、発芽花粉の重さとした。また花粉 0.1g を培養せずと同様の処理をしたものを花粉粒の重さとした。そして発芽花粉の重さから花粉粒の重さを引いたものを花粉管の重さとみなした。ツバキ花粉はほぼ 100% 発芽したので 0.1g 当たりに含まれる花粉粒数を管伸長した花粉数とみなして花粉管一本当たりの重さを求めた。

多糖類標品の中性糖量は、フェノール-硫酸法⁽⁶⁾により求めた。

CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate) は同仁化学、ラミナランは東京化成、ポリガラクトuron酸は Sigma, BSA は生化学工業、レモンペクチンとその他の試薬はすべて和光純薬工業製の試薬を使用した。

結果と考察

1. 蛍光分析法によるカロース定量の検討

アニリンブルー法による β -1,3-グルカンの定量測定について検討した。励起光波長と測定光波長の検討を行い、いくつかの蛍光ピークがみられたが、蛍光強度から励起波長は 305nm, 測定波長は 430nm とした。Fig. 1A に β -1,3-グルカンであるカードラン (重合度約 500), ツバキ花粉管から抽出したカロース (重合度約 20-100), ラミナラン (重合度約 20) の検量線を示した。いずれの多糖の場合も糖濃度が 300 μ g までは濃度に比例して蛍光強度が増加したが、これら多糖の同じ濃度 (重量およびグルコース単位量としても同じ) における蛍光強度には違いがみられた。この違いは多糖の重合度の違いと関係⁽¹⁾していると考えられる。またラミナランは値が大変低かった。ラミナランはしばしばカロース基準物質として用いられるが、蛍光法による測定には適していないと考えられる。またこの方法ではポリガラクトuron酸 (フェノール-硫酸法で同じ量のグルコースを測定した場合の約 30% の値を示した) や寒天の場合、蛍光はほとんど測定されなかったが、キトサン (フェノール-硫酸法では反応がみられなかった) は高い値を示し、セルロース (アビセル粉末) もラミナランと同程度の蛍光強度を示した (Fig. 1B)。データは示していないが、花粉粒やレモンペクチン標品 (フェノール-硫酸法で同

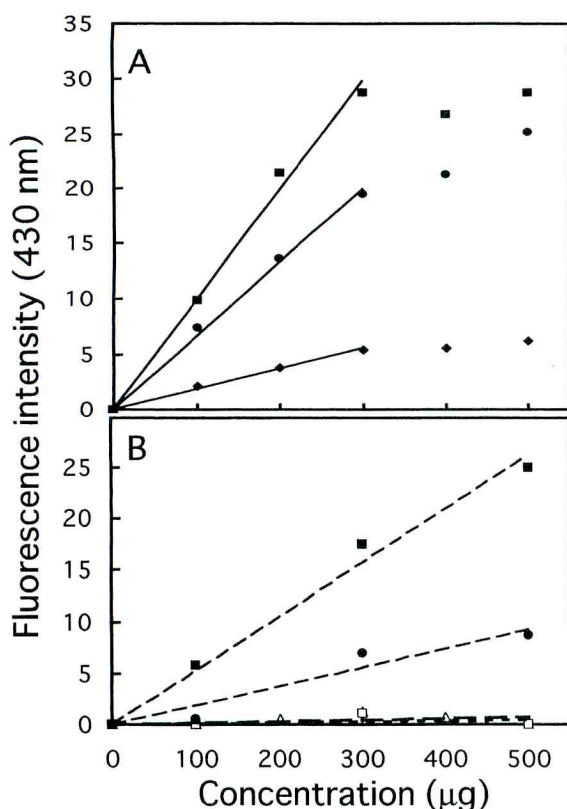


Fig. 1. Fluorescence intensity of β -1,3-glucans and glycans by aniline blue-fluorometry.

A : Solid lines mean β -1,3-glucans, curdlan (■), callose from *C. japonica* pollen (●), and lamiranan (◆).

B : Dashed lines mean other glycans, chitosan (■), pectin from lemon (●), polygalacturonic acid (△), and agar (□).

Table 1. Callose contents in the tube walls of angiosperm pollen.

Pollen grains were incubated on basal medium at 25°C for 24 hr. Callose contents were determined by aniline blue-fluorometry using the callose from *C. japonica* pollen as a standard.

Pollen	Tube length (mm) (A)	Callose content / tube (ng) (B)	B / A	Tube diameter (μm)
<i>Camellia japonica</i>	7.3 \pm 0.3	8.6 \pm 0.9	1.2	12.2
<i>Camellia sasanqua</i>	6.6 \pm 0.2	9.3 \pm 1.0	1.4	11.4
<i>Camellia sinensis</i>	8.2 \pm 0.6	15.6 \pm 1.9	1.9	9.0
<i>Lilium longiflorum</i>	5.6 \pm 0.2	10.4 \pm 1.0	1.9	24.5

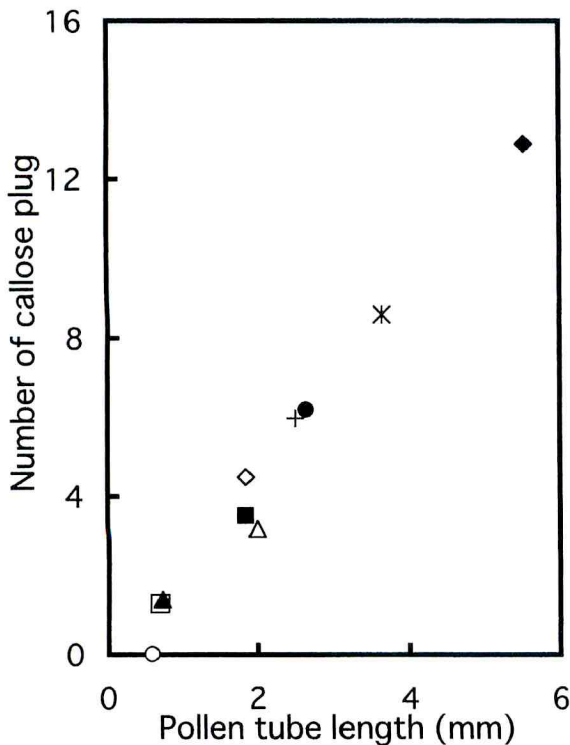


Fig. 2. Relationship of pollen tube length to the number of callose plugs in different pollen species.

Camellia japonica (●), *C. sinensis* (■), *C. sasanqua* (◆), *Erythrina crista-galli* (◇), *Punica granatum* (○), *Lilium longiflorum* (+), *L. speciosum* (△), *Antirrhinum majus* (□), *Nicotiana sanderae* (▲), and *Oenothera biennis* (*) pollen were incubated on the basal medium at 25°C for 20hr.

じ量のグルコース測定した場合の約40%の値を示した)も測定に影響を与えた。これら β -1,3-グルカン以外のものが示した蛍光は試料物質の自家蛍光やアニリンブルーの反応特異性に原因があると考えられ、レモ

ンペクチン標品はペクチン以外の多糖を含んでいるのかも知れない。またこの方法ではアニリンブルーの濃度が蛍光強度に大きく影響した。これらのことはアニリンブルー蛍光測定法における注意すべき点であろう。

2. 花粉管壁のカロース量

培地で成長した花粉から花粉管だけを集めて、その1本当たりのカロース量を求めた結果をTable 1に示した。被子植物花粉管はセルロースを非常にわずかし含み(7)、キトサンを含まないので、アニリンブルー蛍光法でカロースだけを測定することが可能と考えて、カロースの検量線としてはツバキ花粉管カロースの検量線(Fig. 1A)を使用してカロース量を求めた。また、Fig. 2に示すように、種々の花粉の花粉管1本当たりのカロース栓の数は、ツバキで得られた結果(8)と同様に管伸長と相関しており、ある種でカロース栓が多く形成されるといった種による違いはみられず、カロース栓の多少がカロース量に大きく影響することはないと考えられる。したがってカロース量を求めるに際して、種が違って同じ長さの花粉管について比較すればよいと考えられる。

ツバキとサザンカはほぼ同じような値を示したが、チャは管長1mm当たりのカロース量が多く、管直径が小さいことを考え合わせると管壁のカロース量(密度)はツバキやサザンカよりも多いことが推測される。テッポウユリはツバキに比べて、管直径は倍であるが管長当たりのカロース量は1.6倍程度であり、管壁のカロース量が少ないことが推測される。また基本培地で成長したツバキの花粉管(管壁)一本当たりの乾重量は12.3ngであったので、カロース量8.6ngは管重量の約70%を占めることになる。化学分析などから花粉管壁の多糖のおよそ80%はカロースであると推測されており(9)、得られた値はほぼそれに近い値であった。カロース量測定に際しては、花粉管部分だけを試料とし、カロース基準標品としては花粉壁からカロースを抽出して標品とするか、カロースと同じ重合度をもつ β -1,3-グルカンを用いるべきであろう。

Table 2はツバキ花粉管のカロース量に及ぼす化学

Table 2. Effects of chemicals on tube growth and callose synthesis in *C. japonica* pollen.

Figures in parentheses indicate the incubation time of pollen or the concentration of substances added to the medium.

Chemicals	Tube length (mm) (A)	Callose content / tube (ng) (B)	B / A
Control (24hr)	7.3 ± 0.3	8.6 ± 0.9	1.2
Control (7hr)	4.6 ± 0.1	5.0 ± 0.7	1.1
BSA (0.5mg / ml)	13.2 ± 0.9	14.9 ± 2.2	1.1
Digitonin (10nM)	9.0 ± 0.5	9.2 ± 1.3	1.0
CHAPS (100nM)	7.1 ± 0.8	6.3 ± 0.5	0.9
Ca(NO ₃) ₂ (2mM)	7.9 ± 0.3	9.2 ± 1.3	1.2
Ca(NO ₃) ₂ (20mM)	4.2 ± 0.2	4.0 ± 1.0	1.0

物質の影響を調べた結果を示している。基本培地上で最も活発に管伸長をしている時期（培養7時間）と管伸長が停止した時期（培養24時間）での管長当たりのカロース量は同じであり、成長段階の違いによる影響はみられなかった。BSAは管伸長を促進したが、カロース量に対しては影響を与えなかった。カルシウムはカロース合成に関与することが知られているが⁽¹⁰⁾、調べた濃度においては管伸長に影響がみられたものの、花粉管カロース合成には影響はみられなかった。ジギトニンとCHAPSは膜やカロース合成酵素に直接的あるいは間接的に作用してカロース合成を促進する⁽³⁾。そして我々もこれらがツバキ花粉管カロース栓のイングロース（内部成長）を促進することを観察しているが、これら界面活性剤によるカロース量についての影響はみられなかった。イングロースはカロース合成を伴っているが、その増加量は管壁カロース量に比べて僅かであるので検出されなかったものと考えられる。

引用文献

- (1) Stone, B. A. and A. E. Clarke : Chemistry and Biology of (1→3)-β-Glucans. La Trobe University Press, Australia 803pp (1992).
- (2) Nakamura, N., K. Yoshida and H. Suzuki : Hemicellulose of the tube wall of *Camellia japonica*. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1383-1390 (1980).
- (3) Li, H., A. Bacic and S. M. Read : Activation of pollen tube callose synthase by detergent. *Plant Physiol.* **114**, 1255-1265 (1997).
- (4) Tamura, H., Y. Arimoto, S. Tanaka, M. Yoshida, T. Obayashi, and T. Kawai : Automated kinetics assay for endotoxin and (1,3)-β-glucan in human blood. *Clinica Chimica Acta.* **226**, 109-112 (1994).
- (5) Nakamura, N., A. Fukushima, H. Iwayama and H. Suzuki : Electrotropism of pollen tubes of camellia and other plants. *Sex Plant Reprod.* **4**, 138-143 (1991).
- (6) Dubois, M., K. A. Gilles, J. J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356 (1971).
- (7) Nakamura, N. and H. Suzuki : Cellulose and callose of the pollen tube wall of *Camellia japonica*. *Phytochemistry* **22**, 2517-2519 (1983).
- (8) 中村紀雄・鈴木 恕：ツバキ花粉の生長とカロース栓形成. *花粉誌* **27**, 35-39 (1981).
- (9) Rae, A. L., J. Harris, A. Bacic and A. E. Clarke : Composition of the cell wall of *Nicotiana glauca* Link et Otto pollen tubes. *Planta* **166**, 128-133 (1985).
- (10) Kaus, H : Callose biosynthesis as a Ca²⁺-regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *J. Cell Sci. Suppl.* **2**, 89-103 (1985).