

論 説

花粉の生化学的研究 XV III * 1

カボチャ花粉ミトコンドリアの酵素

勝又悌三*2・菅原日出男*3・早坂讃造*4

高橋慶子*5・由利マリ子*2

Biochemical studies on pollen XVIII

Mitochondrial enzymes of the pollen of *Cucurbita maxima*

Teizo KATSUMATA*2, Hideo SUGAWARA*3, Sanzo HAYASAKA*4,

Keiko TAKAHASHI*5 and Mariko YURI*2

結 言

花粉の生化学的研究の一部として、花粉発芽生理の酵素化学的研究を行なっているが、糖質代謝関連酵素^(1~4)、リボヌクレアーゼ⁽⁵⁾、酸性、中性プロテイナーゼ⁽⁶⁾などが発芽時に活性を増大することを認めた。花粉の発芽時には花粉粒内および花粉管での活発な代謝が考えられるので、前報⁽⁷⁾で裸子植物のアカマツ花粉ミトコンドリアの酸化還元酵素を追究

し、これら酵素の発芽時の活性増大を認めた。

このたびは被子植物のカボチャ花粉の細胞分画法を検討後、ミトコンドリア画分についてイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH と略記)、コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH と略記) およびチトクロームオキシダーゼ (CytOx と略記) の発芽時の活性を検討した。

この論文は、上野実朗教授定年退官記念号に寄せたものである。

* 1 著者らはこの論文を謹んで斗ヶ沢宣久博士の御霊前に捧げます。

* 2 〒020 盛岡市上田三丁目 18 番 8 号 岩手大学農学部農芸化学科

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate, Japan

* 3 〒114 東京都北区十条台一丁目 6 番 42 号 科研化学株式会社

Kaken chemical Co., Ltd., Kita-ku, Tokyo, Japan

* 4 〒982 仙台市向山三丁目 6 の 18 精神薄弱児収容施設「宮城県亀亭園」

Residential Facility for the Mentally Retarded Children "Miyagiken Kiteien", Sendai, Miyagi, Japan

* 5 〒020 盛岡市内丸 19 の 1 岩手医科大学医学部放射線医学講座

Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Iwate, Japan

実験方法

1. 試料

前報^(1,8)に準じて調製したカボチャ(*Cucurbita maxima* Duch.)完熟花粉および発芽花粉(20%ショ糖-3%寒天、20~22°Cで発芽)を試料とした。

2. 花粉の細胞分画法

前報⁽⁷⁾に準じて homogenizing medium (0.5 Mショ糖を含む 0.05 Mリン酸緩衝液、pH 7.5、以下単にショ糖溶液と略記)を用いて whole homogenate を調製し、これから核、デンブレン、ミトコンドリア、ミクロソーム画分の分画を行なったが、ミトコンドリア画分の調製にはさらに 15,000~23,000 g、20分の遠心分離を用いた。

3. 窒素、RNA リン、DNA リンの定量

分画法を検討するため、各画分について窒素はマイクロエルダール法により、RNA リンと DNA リンは前報⁽⁸⁾に準じてそれぞれ定量した。

4. デンブレンおよびミトコンドリアの染色

デンブレンはヨウ素染色法⁽⁹⁾、ミトコンドリアは Janus Green B により染色^(10,11)し、顕微鏡観察(ミトコンドリアの場合は位相差顕微鏡を併用)を行なった。

5. 電子顕微鏡観察

前報⁽⁷⁾に準じて電子染色を行ない、日立 HS 7 型電子顕微鏡で観察(12,000 倍)した。

6. 酵素液の調製

各画分を以下のように 0.5 Mショ糖溶液に懸濁して用いた。すなわち核画分は 5 ml、デンブレン画分は 3 ml、ミトコンドリア、ミクロソーム画分は 2 ml に懸濁し、酵素量と反応量が直線関係を示すように前記ショ糖溶液で希釈して(図中に特記しないときは希釈しない)用いた。

7. 酵素活性の測定

(1) IDH：前報⁽⁷⁾に準じて測定し(本報では最適 pH 8.0 で測定)、1 分間に吸光度を 0.001 だけ増加させる酵素活性を 1 単位とした。また活性と pH の関係を検討した予備実験では前報⁽⁷⁾同様ツンベルグ

法^(12,13)も併用した。

(2) SDH：前報⁽⁷⁾に準じて測定し(本報では最適 pH 7.0 で測定し、Fig.3 には減少した正味の吸光度変化をプロットした)、1 分間に吸光度を 0.001 だけ減少させる酵素活性を 1 単位とした。また予備実験ではツンベルグ法^(12,13)も併用した。

(3) CytOx：前報⁽⁷⁾に準じて測定し(本報では最適 pH 6.5 で測定し、Fig.3 には減少した正味の吸光度変化をプロットした)、SDH の場合に準じて酵素単位を算出した。

結果および考察

著者らは花粉細胞内顆粒と酵素活性について検索中であるが、そのためには花粉細胞内顆粒の分画法を検討する必要がある。分画法の検討は、窒素、RNA リン、DNA リンの測定、デンブレンおよびミトコンドリアの染色、電子顕微鏡観察、前記の酵素活性測定などにより行なった。

はじめに予備実験として Whole homogenate (0.5 Mショ糖溶液を使用)を用いて、IDH、SDH、CytOx 活性と pH の関係を調べた結果 (Fig.1)、IDH は pH 8.0、SDH は pH 7.0、CytOx は pH 6.5 でそれぞれ最大の活性を示したので、以後の実験はこれらの pH で行なった。

IDH は補酵素として、NAD または NADP を必要とするが、アカマツ花粉の場合は NADP に特異的であった⁽⁷⁾。カボチャ花粉 IDH の場合いずれを要求するかを、ミトコンドリア相当画分 (15,000 g、20 分の遠心画分)を用いて検討した結果、NAD 添加のときはほとんど活性がなく明らかに補酵素として NADP を要求することが解ったので、以後の実験はすべて NADP を添加して行なった。

一般に細胞分画の場合、生化学的活性の研究には 0.25 Mショ糖液を、形態学的研究には 0.88 Mショ糖液を用いているが、近年両者の研究を同時に行なうため 0.5 Mショ糖液も使用されている。そこで homogenizing medium として 0.25 M、0.5 Mショ糖溶液を用い、whole homogenate を調製し前記の

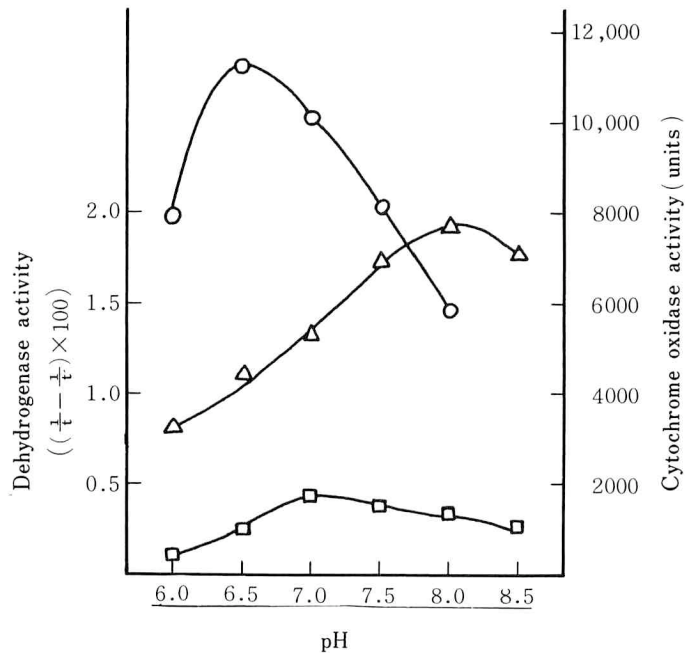


Fig. 1. Effect of pH on isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities.

The dehydrogenase activities were assayed using Thunberg tubes at 37°C. The activities were calculated from the following formula: $(1/t - 1/t') \times 100$, where t is the decolorization time (in min) in the presence of added substrate, and t' the endogenous decolorization time (in min). The cytochrome oxidase activity was measured at the indicated pH by the method described previously⁽⁷⁾ using the whole homogenate diluted with 3 volumes of the homogenizing medium, and is expressed as units per g of fresh pollen.

- △—△ Isocitrate dehydrogenase
- Succinate dehydrogenase
- Cytochrome oxidase

酵素活性を測定した結果 (Table 1)、0.5 M ショ糖溶液の場合 0.25 M に比べて IDH はかなり、CytOx は若干強い活性を示すので以下すべて 0.5 M ショ糖溶液を用いて細胞分画を行なった。

前報⁽⁷⁾のアカマツ花粉の細胞分画法に準じてミトコンドリア画分 (15,000 g、20 分) を分離後、ミクロソーム画分 (105,000 g、60 分) を調製し SDH、CytOx 活性を測定した結果、全 SDH 活性の 10.8%、全 CytOx 活性の 9.0% を検出した。これら

の活性からみて、ミクロソーム画分へのミトコンドリアの混入が予想される。そこで遠心力を変えてミトコンドリア画分を分離後、次に得られるミクロソーム画分中の SDH、CytOx 活性を検討した結果 (Fig.2)、23,000 g、20 分の遠心分離により完全にこれらの酵素活性が検出されなくなるので、ミトコンドリアの分画には 23,000 g、20 分の遠心分離を用いた。

Table 1. Effect of sucrose concentration of homogenizing medium on enzyme activities of whole homogenate

Sucrose concentration (M)	Activity		
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	Succinate dehydrogenase	Cytochrome oxidase
0.25	9200	730	11,090
0.50	16,000	700	11,200

The activities were measured as described previously⁽⁷⁾, except that the experiments were carried out at optimum pH described under "Materials and Methods", and are expressed as units per g of fresh pollen.

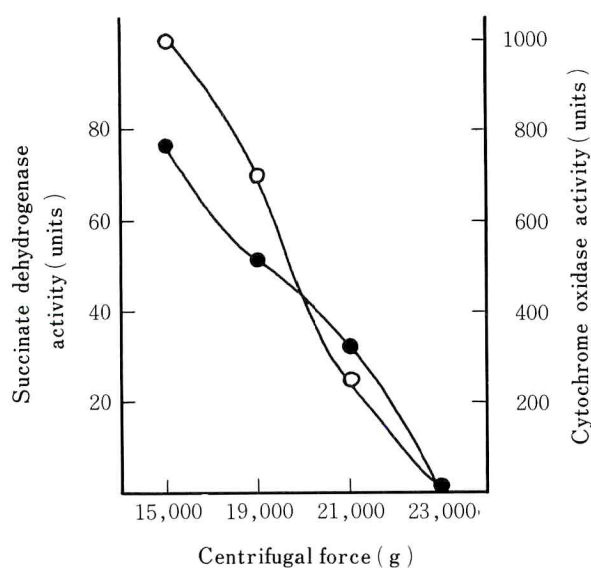


Fig. 2. Succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in microsomal fraction.

After the mitochondrial fraction was sedimented at the indicated centrifugal force, the microsomal fraction was prepared from the corresponding supernatants as described previously⁽⁷⁾. The activities were measured as described previously⁽⁷⁾, except that the experiments were carried out at optimum pH described under "Materials and Methods", and are expressed as units per g of fresh pollen.

- Succinate dehydrogenase
- Cytochrome oxidase

Table 2. Distribution of nitrogen, ribonucleic acid-P and deoxyribonucleic acid-P among subcellular fractions isolated from the pollen

Fraction	Nitrogen		RNA-P		DNA-P	
	(μ g)*	(%)	(μ g)*	(%)	(μ g)*	(%)
Whole homogenate	34.29	100	230.0	100	122.0	100
Nuclei	8.41	24.5	50.8	22.1	108.0	88.5
Starch	1.69	4.9	2.5	1.1	3.3	2.7
Mitochondria	1.58	4.6	5.8	2.5	0	0
Microsomes	1.67	4.9	42.5	18.5	0	0
Supernatant	20.62	60.1	126.6	55.0	0	0

* Contents per g of fresh pollen

Table 3. Distribution of enzyme activities among subcellular fractions isolated from the pollen

Fraction	Activity					
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase		Succinate dehydrogenase		Cytochrome oxidase	
	(units)	(%)	(units)	(%)	(units)	(%)
Whole homogenate	16,000	100	700	100	11,200	100
Nuclei	0	0	80.0	11.4	1540	13.8
Starch	0	0	13.5	1.9	306	2.7
Mitochondria	160	1.0	588.0	84.0	8740	78.0
Microsomes	0	0	0	0	0	0
Supernatant	15,120	94.5	0	0	0	0

The activities were measured same as in Table 1, and are expressed as units per g of fresh pollen.

各画分について窒素、RNA リン、DNA リン含量を測定した結果 (Table 2)、窒素は核画分、上清画分に多量に分布している。RNA リンは核、ミクロソーム、上清画分に多く、ミクロソーム画分の RNA リンがミトコンドリア相当画分のそれより 7.4 倍も多いことなど、動物肝臓に類似の傾向を示している。DNA リンはほとんど核画分のみ検出されたが、デンブ画分の 2.7% は核の混入と思われる。近年ミトコンドリア⁽¹⁴⁾、クロロプラス⁽¹⁵⁾などに

も DNA が存在することが知られてきたが、今回のカボチャ花粉の分画法ではアカマツ花粉⁽⁷⁾の場合と同様に核外 DNA は検出されなかった。

次に各画分をヨウ素染色した結果、核、デンブ画分では明らかに陽性であったが、ミトコンドリア、ミクロソーム相当画分はほとんど反応を示さず、これらの画分にはデンブの混入はほとんどないと考えられる。ミトコンドリア相当画分を Janus Green B で染色すると薄い青黒色に染まり、活発な

ブラウン運動を行なう多数の顆粒がみられまた電子顕微鏡観察ではミトコンドリア特有の構造が認められ、一方ミクロソーム画分にはミトコンドリアの混入は認められなかった。なお細胞顆粒を分画しないで細胞化学的にミトコンドリアを観察した例は、フクロナデシコ⁽¹⁶⁾、アカバナクシラン⁽¹⁷⁾、チョウセンヤマナラシ⁽¹⁸⁾、テッポウユリ⁽¹⁹⁾、ツバキ⁽²⁰⁾、ヤマユリ⁽²¹⁾などの花粉について多数報告されている。

一方酵素活性を測定した結果 (Table 3)、NADP 特異性 IDH 活性は大部分上清画分に検出されたが、ミトコンドリア相当画分にも 1% 認められ、アカマツ花粉⁽⁷⁾の場合と同様にこの酵素は可溶性と不溶性の 2 つの異なった存在形式をとっているようである。SDH、CytOx 活性はミクロソーム、上清画分に

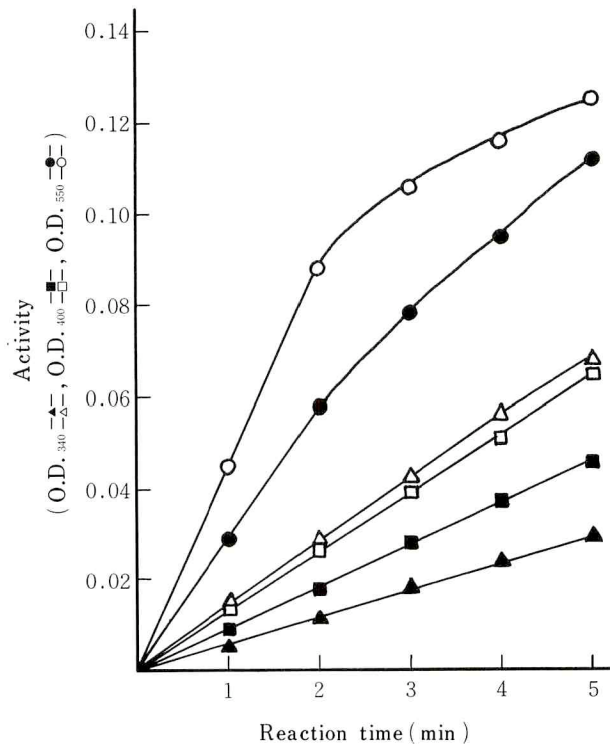


Fig. 3. Changes in NADP-specific isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities during germination of the pollen.

The activities were measured as described previously⁽⁷⁾, except that the experiments were carried out at optimum pH described under "Materials and Methods".

- | | |
|-------------------------|--|
| ▲—▲ (matured pollen) | } NADP-specific isocitrate dehydrogenase activity of the mitochondrial fraction |
| △—△ (germinated pollen) | |
| ■—■ (matured pollen) | } Succinate dehydrogenase activity of the mitochondrial fraction diluted with 3 volumes of the homogenizing medium |
| □—□ (germinated pollen) | |
| ●—● (matured pollen) | } Cytochrome oxidase activity of the mitochondrial fraction diluted with 9 volumes of the homogenizing medium |
| ○—○ (germinated pollen) | |

は見出されず、ミトコンドリア相当画分に SDH 活性の 84%、CytOx 活性の 78%が検出された。核画分に SDH 活性の 11.4%、CytOx 活性の 13.8%を検出したが、これはミトコンドリアの混在によるものかどうか今後の検討課題である。デンプン画分にも若干これらの活性を認めたが、これはミトコンドリアの混在のためと考えられる。

以上の諸結果から、カボチャ花粉のミトコンドリア (23,000 g 遠心画分) は核画分、デンプン画分などが除かれて比較的良好に分画されていると考えられる。さらにショ糖密度勾配遠心法⁽²²⁾によりミトコンドリア画分を精製することが望ましいが、一般に精製とともに呼吸活性は急激に低下することが知られているので⁽²²⁾以下の発芽花粉の実験にもすべてこのミトコンドリア調製法を適用した。

発芽時の酵素活性を検討した結果 (Fig.3)、IDH、SDH、CytOx について完熟花粉に比べて発芽花粉でそれぞれ 2.4、1.4、1.5 倍の活性増大が認められた。

完熟花粉の IDH、SDH、CytOx に関しては多数の報告⁽²³⁻²⁹⁾があるが、発芽時の活性とくにミトコンドリアの酵素活性についての知見はほとんどみられない。花粉発芽の最初の過程が何であるかむづかしい問題であるが、前報⁽⁷⁾で裸子植物のアカマツ花粉ミトコンドリアの酵素について認めたように、少なくともその一つはミトコンドリアの酵素系が活性化されることと思える。前報^(2,3)で明らかにしたようにカボチャ花粉は発芽時にインペルターゼ、ヘキソキ

ナーゼ活性などを増大するが、この時期は多量のエネルギー供給を必要としているのでこれら糖質代謝関連酵素の活性増大と平行して、ミトコンドリア内のトリカルボン酸サイクル、呼吸系に關与する酵素がその活性を増大してエネルギー供給に應じているものと推論する。

要 約

カボチャ花粉の細胞分画法を検討後、とくにミトコンドリア画分についてイソクエン酸、コハク酸デヒドロゲナーゼおよびチトクロームオキシダーゼの発芽時の活性を検討し次の結果を得た。

(1) イソクエン酸デヒドロゲナーゼは NADP に特異的であった。

(2) 細胞分画を行なったが DNA は主として核画分に存在し、コハク酸デヒドロゲナーゼおよびチトクロームオキシダーゼ活性はほとんど 23,000 g 遠心画分に検出された。この 23,000 g 遠心画分は Janus Green B 染色、ブラウン運動観察、電子顕微鏡観察、酵素活性などからミトコンドリア画分と推定した。

(3) ミトコンドリア画分の NADP 特異性イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、チトクロームオキシダーゼは発芽時にいずれもその活性を増大した。

本研究の一部は文部省科学研究費によって行なったものであり厚く感謝の意を表す。

文 献

- 1) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：日本農芸化学会誌 (農化)、42、1 (1968)。
- 2) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化、42、8 (1968)。
- 3) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化、42、13 (1968)。
- 4) 勝又悌三・鈴木寿直・故斗ヶ沢宣久：花粉誌、16、29 (1975)。
- 5) 勝又悌三・江尻慎一郎・田村藤二郎・佐々木裕子：日本農芸化学会大会講演要旨集 p.162 (1975)。
- 6) 勝又悌三・江尻慎一郎・大久保陽一：花粉誌、17、17 (1976)。

- 7) 勝又悌三・栗谷川義夫・遠藤文子・菅原日出男・早坂謙造：農化、50、607 (1976)。
- 8) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・太田達郎：農化、41、178 (1967)。
- 9) 葛西千春・宮 慶一郎・勝又悌三・斗ヶ沢宣久：岩手大学農学部報告、8、89 (1966)。
- 10) 須田正巳・原 勝：標準生化学実験法、文光堂、p.389 (1953)。
- 11) 緒方規矩雄：酵素研究法 3、朝倉、p.112 (1957)。
- 12) 石本 真：酵素研究法 1、朝倉、p.606 (1955)。
- 13) Y. Oota, Y. Yamamoto and R. Fujii : J. Biochem., 40, 187 (1953)。
- 14) 若林一彦：蛋白質 核酸 酵素、19、1178 (1974)。
- 15) 菊池忠寿・石田政弘：蛋白質 核酸 酵素、19、1195 (1974)。
- 16) J. Heslop-Harrison : Grana Palynologica, 4, 7 (1963)。
- 17) B. Gullvag : Grana Palynologica, 5, 253 (1964)。
- 18) J. R. Rowley and G. Erdtman : Grana Palynologica, 7, 517 (1967)。
- 19) H. G. Dickinson : Grana, 11, 117 (1971)。
- 20) 岩波洋造：花粉誌、15、3 (1975)。
- 21) 中村澄夫：花粉誌、16、11 (1975)。
- 22) 名和義彦・旭 正：蛋白質 核酸 酵素 別冊、生体膜実験法上、共立、p.304 (1974)。
- 23) D. B. Dickinson and M. D. Davies : "Pollen development and physiology", ed. by J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, p. 190 (1971)。
- 24) K. Okunuki : Acta Phytochim., 11, 27 (1939)。
- 25) K. Okunuki : Acta Phytochim., 11, 65 (1939)。
- 26) R. Lunden : Grana Palynologica, 1, 3 (1956)。
- 27) Y. Tsukamoto and S. Matsubara : Plant Cell Physiol., 9, 227 (1968)。
- 28) K. Okunuki : Acta Phytochim., 11, 249 (1940)。
- 29) P. M. Pyl'nev and P. Diakonov : Dokl. Mosk. Selskokhoz. Akad., 1961, 163; Chem. Abst., 58, 7133d (1963)。

Summary

Subcellular fractions were prepared from the pollen of *Cucurbita maxima*, and the mitochondrial fraction was assayed for isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities. The isocitrate dehydrogenase required NADP for its reaction. DNA-P was mainly localized in the nuclear fraction, and succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in the fraction sedimented at $23,000 \times g$ for 20 min. The particulate fraction sedimented at $23,000 \times g$ was presumed to be the mitochondrial fraction from the staining with Janus Green B, their Brown's movement, electron microscopic appearance and enzyme activities. Both dehydrogenases and cytochrome oxidase activities in the mitochondrial fraction increased during the germination of the pollen on sucrose-agar medium.