

原 著

## ツバキ花粉管壁のペクチン物質

中村紀雄・吉田孝治\*

A pectic substance extracted from the pollen tube wall of *Camellia japonica*.

Norio NAKAMURA and Koji YOSHIDA\*

(受付：1980年3月18日)

## Summary

Pectic substances extracted from the pollen tube wall of *Camellia japonica* were fractionated and purified by column chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration through Bio-gel P-200. A purified substance is composed of rhamnose, arabinose, xylose, galactose, glucose and galacturonic acid which is a major component (ca. 70% of total sugar recovered). Its infra-red absorption spectrum suggests that the carboxyl group of uronic acid residue is partly esterified.

## 緒 言

植物細胞の生長は細胞壁の構造と密接な関係にあると考えられる。近年細胞壁構成多糖類の化学的構造について研究がすすめられ、アメリカズカケノキの培養細胞について細胞壁モデルも提出されている<sup>(1)</sup>。しかし、先端生長細胞であり、しかも植物界で最も速い生長をする花粉に関しては、数種類の花粉粒の壁成分の報告<sup>(2-5)</sup>はみられるが、花粉管壁についてはテッポウユリ<sup>(6)(7)</sup>に関する報告があるにすぎ

ない。花粉管だけを多量に集めることはなかなか困難ではあるけれども、花粉管の伸長機構を明らかにするためには、さらに多くの種類について、花粉管壁の化学的構造を調べ、比較検討する必要がある。

本論文では、ツバキ花粉管壁よりペクチン物質を抽出し、その成分の分析をおこなった結果について報告する。ツバキ花粉管壁の主成分はヘミセルロースである<sup>(8)</sup>が、その化学的構造や他種花粉管壁成分との比較等については別途報告する予定である。

\* 横浜市立大学生物学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2

Department of Biology, Yokohama City University, Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan.

## 実験材料と方法

### 1. 材 料

ツバキ花粉粒を牛血清アルブミン (5 mg/10ml 培地) を含んだショ糖 (0.3 M) -寒天 (1.5%) 培地上<sup>(9)</sup>に、2~3 cm 間隔に、直線状に置床し、25°C で 20~24 時間培養した。花粉管は花粉粒の列に直角方向に 14~17cm 伸長したので、カミソリの刃で花粉管と花粉粒に切り分け、花粉管のみをカバーグラスでかき集め回収した。細胞質成分を除くため花粉管を 80% エタノールで洗ったのち、エタノール、アセトン、エチルエーテルで脱水し、減圧下で乾燥、保存した。

### 2. 花粉管壁多糖類の抽出

壁成分の分画は Wada らの方法<sup>(10)</sup>に準じて行った。その概要は次のようである。

乾燥花粉管を鋏で細かく切り、水を加え、ポッター型テフロンホモゲナイザー管で磨砕した。遠心分離 (10000 回転、10 分) して得た沈殿を粗花粉管壁標品画分とし、上清からはトリクロロ酢酸でタンパク質を除いた後、エタノールを加えて沈殿を得た (水溶性多糖: WS 画分)。次に粗花粉管壁標品から、まずジメチルスルホキシド可溶画分 (DM 画分: 室温、24 時間、2 回抽出) を得、その残渣より 0.5% 蔞酸アンモニウム可溶画分 (粗 OX 画分: 95°C、1 時間、3 回抽出) を、さらにその残渣より KOH 可溶画分 (24 時間、3 回抽出) を得た。そしてこれらの分画操作で抽出されなかったものを  $\alpha$ -セルロース画分とした。抽出画分はいずれも 80% エタノール沈殿物として回収した。

### 3. ガスクロマトグラフィー

多糖類の加水分解は Albersheim らの方法<sup>(11)</sup>に準じて行った。加水分解で生成した単糖に、さらに内部標準物質として  $\beta$ -メチルグルコシドとミオイノシトールを加え、 $\text{NaBH}_4$  で還元し、これらの単糖をアルジトールとした。ピリジン-無水酢酸混液 (1

: 1 v/v) 中でアルジトールをアセチル化 (30°C、17 時間反応) した後、減圧下でアセチル化剤を除いた。生成したアセチル化アルジトールを塩化メチレンに溶かし、ガスクロマトグラフィー試料とした。分析は日立 163 型ガスクロマトグラフィーにより、3% ECNSS-M (担体 Gas Chrom Q) ガラスカラム (0.3×100cm) を用いて行った。ピーク面積はタケダ理研 TR-2217 積分器で測定した。

## 結果と考察

### 1. 花粉管壁多糖類の分画

図 1 は培養発芽花粉と花粉管壁より抽出した各多糖類画分をアニリンブルー染色後、蛍光顕微鏡観察した結果を示している。発芽花粉は花粉粒壁と花粉管壁およびカロス栓に蛍光がみられた (A)。図には示していないが、花粉管先端部分では蛍光がみられない場合が多かった。粗花粉管壁標品は花粉管壁とカロス栓部分に蛍光がみられた (B)。 $\alpha$ -セルロース画分中には図のような構造物が多くみられた (D)。蛍光を発している部分はカロス栓部分であり、抽出画分過程において、カロス栓の多くは抽出されなかったものと思われる。またヘミセルロース抽出画分である DM 画分 (C) と、図には示していないが、やはりヘミセルロース画分であるアルカリ抽出画分には蛍光がみられた。ペクチン物質抽出画分である OX と WS 画分には蛍光はみられなかった。ただ粗 OX 画分では時に微粒状蛍光がみられる場合があった。

今回の各抽出画分の収量は乾燥花粉管量に対して WS 画分は 4%、また粗花粉管壁標品量に対して DM、OX (透析後)、アルカリ抽出、 $\alpha$ -セルロース画分はそれぞれ 43、10、10、19% であった。

### 2. OX 画分と WS 画分のペクチン物質

粗 OX 画分 (1.769g) を流水に対して 24 時間透析した後、エタノール沈殿物 (0.489g) を得た。透析画分 (0.1g) を 0.5% EDTA を含んだトリス-塩酸緩衝液 (10mM、pH8.0) に溶かし、同じ緩衝液で平

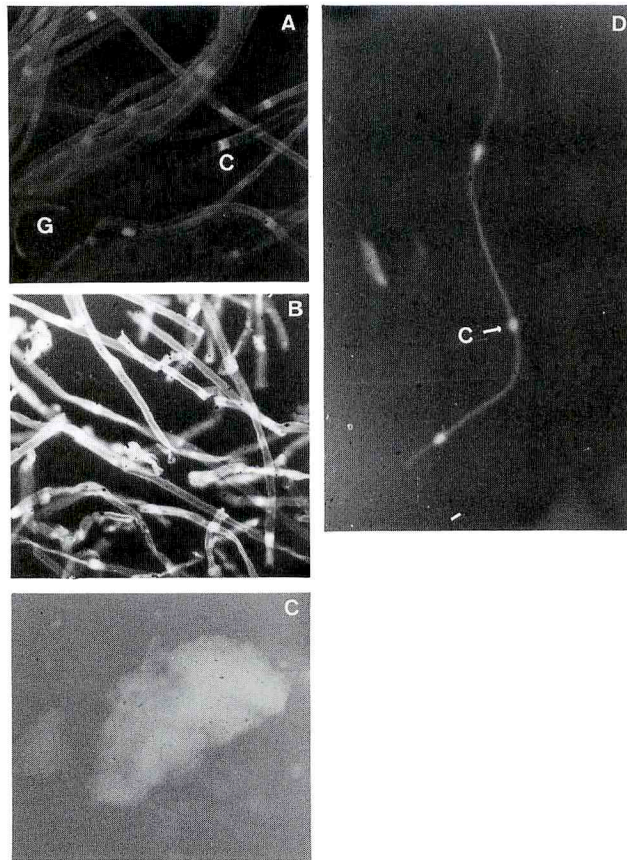


Fig. 1. Fluorescence light micrographs of pollen tube wall material stained with aniline blue.

*Camellia japonica* pollen was used. (A) Germinated pollen grains and pollen tubes. (B) Crude pollen tube wall preparation. Wall polysaccharides were extracted and fractionated from this preparation. (C) DM fraction material. This material, which contains hemi-cellulose, was extracted from the wall preparation (B) with dimethylsulfoxide. (D)  $\alpha$ -Cellulose fraction material. The callose plugs remain in the pollen tube fragment although the tube wall polysaccharides were removed with chemicals.

C ; callose plug, G ; pollen grain ( $\times 100$ ).

衡化させた DEAE-セルロースカラム (Whatman DE32, 1.9 $\times$ 17cm) にかき、NaCl 濃度勾配により分画した。図2はその結果を示している。溶出により3つのピークが得られ、それぞれの画分を集めて減圧濃縮し、透析後、エタノール沈殿物 (OX-I、II、III) を得た。OX-IIのピークは検出されないこともあり、結局 0.489g の透析 OX 画分から、OX

-I、OX-II、OX-III画分それぞれの収量は62.5、1.6、202.2mgであった (回収率 54.4%)。OX-III画分については、さらに EDTA を含む酢酸緩衝液 (20mM、pH 5.5) に溶かし、Bio-gel P-200 カラム (2.6 $\times$ 37.0cm) にかき、同じ緩衝液でゲル濾過溶出した。多糖は  $V_0$  画分に1つのピークとして検出され、回収率は 50%であった。



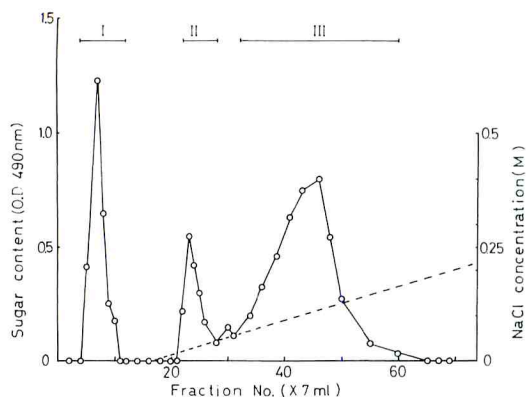


Fig. 2. DEAE-cellulose chromatography of pectic substances extracted from the pollen tube wall of *Camellia japonica*.

The sample (0.1g) was applied on a column (1.9×17cm) of DEAE-cellulose and washed 10mM Tris-HCl buffer containing 0.5% EDTA, pH 8.0. The column was then eluted with a linear NaCl gradient. The sugar content was determined by the phenol-sulfuric acid method [15]. ○——○ : sugar content, ----- : NaCl concentration.

次に、これら画分の精製の程度を調べるため濾紙電気泳動を行った(図3)。OX-III画分は単一のスポットとして検出されたので、ほぼ単一種のペクチン物質を含むものと思われる。

表1はペクチン物質の単糖組成をガスクロマトグラフィーで分析した結果を示している。WS画分は精製しておらず、また花粉管壁由来の物質であるかどうか検討の余地もあるが、一応ウロン酸含量が多いので、水溶性ペクチン物質とみなし、その単糖組成を調べた。いずれの画分でもアラビノース、ガラクトース、グルコース、ウロン酸が多く検出されたが、これらの糖の割合は異なっており、WS画分ではアラビノース、ガラクトース、OX-I画分ではグルコース、アラビノース、OX-III画分ではウロン酸が主成分であった。ただOX-IIIは加水分解

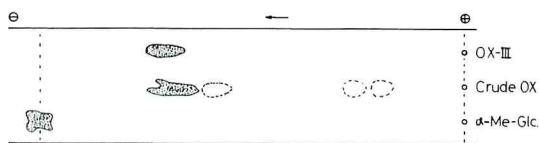


Fig. 3. Borate electrophoregram of pectic substances.

The dry test sample was dissolved in 0.4 N NaOH at a concentration of 2% and applied to the anodal end of a 7×57cm strip of glass filter paper soaked in 0.1 M Na tetraborate, pH 9.2. Electrophoresis was performed at 500v(9v/cm) for 5 hr in a Toyo HPE-406 electrophoresis apparatus. After electrophoresis this paper was dried and sprayed with *p*-anisidine solution [10] or naphthoresorcinol-phosphate reagent [16], then heated at 100-120°C for 10 min to detect polysaccharides.  $\alpha$ -Methylglucoside was used as a marker for electroosmotic flow. Major components were marked by coarse stippling.

後の単糖の回収率が低かった。回収率が高い場合には幾分組成の割合は変化するかも知れない。ウロン酸の種類については、各画分を部分加水分解した後、Geeらの方法<sup>(12)</sup>に準じて、アビセル薄層クロマトグラフィーにより同定を試みた。そして Rf 値がガラクトuron酸と同じであったこと(Rf 値: 試料いずれも 0.16、対照ガラクトuron酸 0.16、グルクロン酸 0.21)、また酸処理によるラクトン形成(対照グルクロノラクトン Rf 値 0.82)がみられなかったことから、WSとOX画分に含まれるウロン酸はガラクトuron酸と同定した。

これまでにトウモロコシ、クロマツ、オニユリ、カボチャの花粉粒壁<sup>(2)</sup>のペクチン物質の単糖組成が調べられており、これらの花粉では、グルコース、アラビノース、ガラクトースが主成分であった。ま

Table 1. Sugar composition of pectic substances extracted from the pollen tube wall of *Camellia japonica*.

Sugar	% of Total sugar recovered*		
	WS	Fraction OX—I	Fraction OX—III
Rhamnose	7.1 (0.64)	4.3 (0.14)	1.6 (0.06)
Arabinose	29.3 (2.63)	24.5 (0.80)	8.3 (0.32)
Xylose	1.3 (0.12)	0.9 (0.03)	0.5 (0.02)
Mannose	0.4 (0.04)	trace ( - )	0.0 ( - )
Galactose	29.8 (2.68)	19.0 (0.62)	7.3 (0.28)
Glucose	17.5 (1.57)	31.6 (1.03)	11.7 (0.45)
Uronic acid	14.6 (1.31)	19.6 (0.64)	70.7 (2.73)
Total	100. (8.99)	100. (3.26)	100. (3.86)
Sample weight (mg)	12.4	3.9	7.2
% Solubilized	100.	100.	69.4
Recovery as % of:			
(a) amount solubilized	72.5	83.6	50.0
(b) sample	72.5	83.6	72.0

\*Number in parentheses are mg sugar recovered.

Gas-liquid chromatography was carried out by using a Hitachi 163 gas chromatograph. Separation was made at a gas flow rate of 40 ml nitrogen per min on a column (0.3×100 cm) containing 3% of ECNSS-M on Gas Chrom Q (100-120 mesh) at 175°C. Uronic acid was determined by the carbazole method [14].

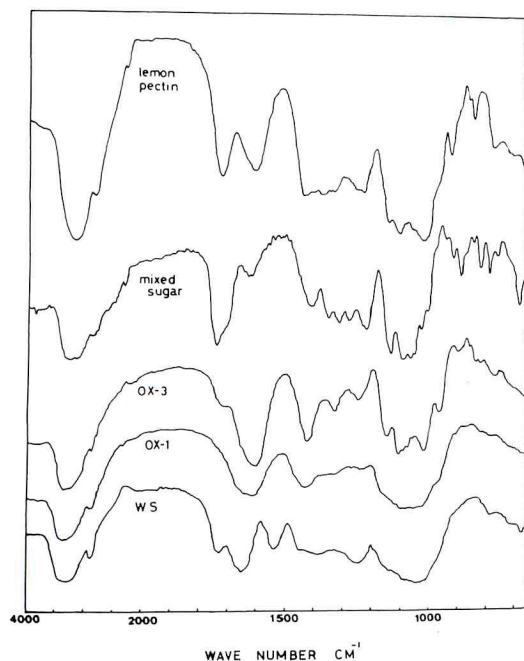


Fig. 4 Infra-red spectra of pectic substances (KBr tablet).

Pectic substances (WS, OX—I and OX—III) were extracted from the pollen tube wall of *Camellia japonica*.

Mixed sugar contains two monosaccharides, galacturonic acid (80%) and arabinose (20%).

たスギ花粉粒内壁<sup>(5)</sup>からは精製されたペクチンが得られ、定量的分析がなされているが、その主成分はガラクトースであり、ラムノースも多く検出されている。テッポウユリ花粉管壁<sup>(6)</sup>のペクチン物質画分の主成分はアラビノースとグルコースであり、ガラクトースは多くない。ツバキの単糖組成はこれらの花粉とは異なるようである。

図4はペクチン物質の赤外線吸収スペクトルを示している。比較のためにレモン製ペクチン（和光純薬）およびガラクチュロン酸（80%）とアラビノース（20%）の混合糖のスペクトルも示してある。OX-III画分では1610と1420 $\text{cm}^{-1}$ にカルボキシレート、また1720 $\text{cm}^{-1}$ に小さな肩ピークとしてエステル化カルボニル基の存在が示されている。レモンペクチンのスペクトルパターンはOX-IIIに似ているが、1710 $\text{cm}^{-1}$ のピークが明瞭であり、OX-IIIペクチンより多くのウロン酸カルボキシル基がエステル化していることを示している。またスギ花粉粒内壁

のペクチンも部分的にエステル化されていることが報告されている<sup>(5)</sup>。

細胞壁の構成多糖類のうち、ペクチン質が細胞生長の制御に関与しているという説がある<sup>(13)</sup>。とくに双子葉植物の細胞壁ではペクチンの含量が高く、多糖の鎖の中のカルボキシル基が隣接した鎖の中のカルボキシル基とカルシウムイオンで架橋をつくり、あるいはメチルエステル化されることが、壁の流動性、つまり伸長に影響すると考えるわけである。花粉管の伸長においてもペクチンの役割としてこのようなことが考えられるかも知れない。ただ花粉管の場合、生長様式がこれらの細胞とは異っており、また壁成分も異なっている。さらに詳しく壁の化学的構造を調べたうえで、このような考えが花粉管の生長にあてはまるかどうか検討する必要がある。

本稿を終えるにあたり、貴重な助言とご教示を下さった横浜市立大学化学教室、中川淑郎教授に深謝致します。

## 引用文献

- (1) K. Keegstra *et al* (1973) *Plant Physiol.*, **51**, 188—196.
- (2) 斗ヶ沢宣久他 (1962) 岩手大学農学部報告, **6**, 6—10.
- (3) H. O. Bouveng (1965) *Acta Chem. Scand.*, **19**, 953—963.
- (4) H. O. Bouveng (1965) *Acta Chem. Scand.*, **19**, 100—1005.
- (5) A. Hara *et al* (1977) *Plant and Cell Physiol.*, **18**, 381—386.
- (6) W. J. VanDerWoude *et al* (1971) *J. Cell. Sci.*, **8**, 331—351.
- (7) W. Herth *et al* (1974) *Cytobiol.*, **9**, 344—367.
- (8) 中村紀雄 (1978) 日本植物学会第43回大会研究発表記録, p. 83.
- (9) N. Nakamura (1978) *J. Yokohama City Univ. Biol. Ser.*, **5**, 56—59.
- (10) S. Wada and P. M. Ray (1978) *Phytochemistry*, **17**, 923—931.
- (11) P. Albersheim *et al* (1967) *Carbohydr. Res.*, **5**, 340—345.
- (12) M. Gee and M. McCready (1957) *Anal. Chem.*, **29**, 257—258.
- (13) 山本良一 (1976) *化学*, **31**, 206—212.
- (14) T. Bitter and H. H. Muir (1962) *Anal. Biochem.*, **4**, 330—334.
- (15) M. Dubois *et al* (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350—356.
- (16) 友田正司 (1968) *生物化学実験法 XI*, p. 33, 共立出版