

原 著

花粉の生化学的研究 XXIII

アカマツ花粉形成過程における多糖類の変動

勝又悌三^{*1}・中野克彦^{*2}・内藤千春^{*1}

Biochemical studies on pollen XXIII

Change of polysaccharide content during the formation
of pollen in *Pinus densiflora*

Teizo KATSUMATA^{*1}, Katsuhiko NAKANO^{*2} and Chiharu NAITO^{*1}

(受付：1980年9月27日)

緒 言

花粉多糖類の変動については、岩波^(1,2)はムラサキツユクサ花粉粒のデンプンは、花粉の成熟過程で数回にわたり増減するが、とくに減数分裂期に減少し、開花直前に最も多くなり開薬時にほとんど消失することを観察し、ヤマユリ、キンギョソウ、グラジオラス花粉も開花直前にデンプンが多くなり、開花時にこれを消失することを報告している。また志佐ら⁽³⁾はユリの若い蕾の花粉にはデンプンが充満しているが、開花時に糖が多くなること、森ら⁽⁴⁾は多数の被子植物花粉について、開花数日前から開花数日後における花粉粒内のデンプンの消長を調べ、開花時にデンプンが減少しない花粉もあるが、多くの花粉

でデンプンが減少すること、渡辺⁽⁵⁾はイネ花粉が成熟するにつれてデンプンを減少することをそれぞれ報告している。他方ほとんどデンプンを有しないホウセンカ花粉を無糖培地に移すとデンプンを増加し、この花粉を20%ショ糖培地に移すとデンプンは次第に減少し、無糖培地にもどすと再びデンプンが形成されることも知られている⁽⁶⁾。著者らはアカマツ、トウモロコシ、カボチャ花粉の糖質代謝関連酵素の多くが、発芽時に活性を増大することを認めている^(7~11)。以上のことから、花粉の形成過程、開花時および発芽時にわたり、時期的生理要求に応じて明らかに花粉粒内ではデンプン \rightleftharpoons 低分子糖類の転換が行われているものと考えられる。

著者らはアカマツ花粉の形成過程および発芽過程に

^{*1}〒020 盛岡市上田3-18-8 岩手大学農学部農芸化学科

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

^{*2}〒020 岩手県紫波郡都南村東見前3-10-2 北上川上流流域下水道事務所

Sewage Treatment Office of Kitakamigawa Upper Reaches, Tonan-Mura, Iwate, Japan.

おいて、多糖類、DNA、RNA が数回にわたり変動することを定性的に観察したが⁽¹²⁾多糖類は花粉母細胞期に多量に存在し、減数分裂期には一度激減し、1 個の花粉細胞となる頃から増加、開裂寸前に最も多く、飛散時にいくらか減少することを認め、さらにショ糖培地での発芽花粉では花粉管を含めて多糖類が充満することを認めた。ついでアカマツおよびクロマツ花粉の形成過程における DNA の変動を、顕微分光測光法により定量的に比較検討した。⁽¹³⁾このたびは、今まで明らかにされていないアカマツ花粉形成過程における細胞 1 個当りの多糖類含量の変動を、DNA 量の定量に用いた顕微分光測光法により検討した。

この論文は、木原 均博士米寿記念号に寄せたものである。

実験方法

1. 試料

本学部構内のアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) の未熟から完熟に至る雄花を、5 月上旬から 5 月下旬まで採取し、即時固定したものを試料とした。

2. 固定ならびにパラフィン切片の作成

前報⁽¹³⁾に準じて行ったが、切片の厚さは 10, 15, 20, 25 μm のものを作成して定量性を検討した。

3. 染色法

前述のパラフィン切片をスライドグラスごとキシロールに 15 分間浸して脱パラフィンし、新しいキシロールで洗浄後無水エタノール（2 瓶）でキシロールを除き、次に 95, 90, 80, 70, 60% エタノールに順次 5 分間浸し、最後に蒸留水（以下水と略記）で洗い、脱パラフィン切片とした。多糖類の染色には McManus の PAS (periodic acid-Schiff) 反応^{(14), (15)}を用いた。脱パラフィン切片を 0.5 % 過ヨウ素酸溶液で室温 5 分間酸化処理後、水で注意深く洗浄し、ついで Feulgen らの方法に準じて作成した Schiff 試薬^{(13), (16)}（塩基性フクシン 1.5 g を沸騰水 300 ml に溶かして濾過し、50°C に冷却後、メタ重亜硫酸カリウム 3 g と IN 塩酸 15 ml を加えて 24 時間放置し、活性炭 1 g を加えて振盪後濾過する）で染色し、新鮮亜硫酸水 3 瓶で各々 2 分間洗浄後、さらに流水で数分間洗浄した。

4. 封入

前報⁽¹³⁾に準じて行った。

5. 多糖類量の測定

前報⁽¹³⁾の DNA 量の測定に準じ、オリンパス光学製顕微分光度計 [Microspectrophotometer (以下 MSP と略記)] A—IV 型を用いて多糖類量の測定を行った。すなわち、今日 Patau ら^{(17), (18)}の二波長法が最も分光誤差が少ないとされているため、この方法を多糖類の測定にも用いた。二波長法では、被測定物質あるいは染色色素の最大吸収波長 (λ_2) と、その波長で示される吸光度の 1/2 の吸光度を示す波長 (λ_1) を求め、 λ_1 , λ_2 の 2 つの波長で同一箇所を 2 回測定し、その各々が示す透過率 T_1 , T_2 から計算式によって被測定物質を任意量 (mt) として求める。測定条件としては、接眼レンズ 5 倍、対物レンズ 10 倍、コンデンサーレンズ 10 倍を用い、スリット幅は使用ピンホールの大きさが完全な形を保てるように入射 1 mm、中間および出射スリット 0.25 mm として以後この幅は固定する。測定に用いる二波長は、比較的均一に染色された試料（厚さ 15 μm の切片を使用）を用い、ピンホール像が試料の直径の 1/3 程度のものを用いて吸収特性曲線 (Fig. 1) を作成し、これから決定した。

結果および考察

はじめにマツ属の花粉形成の概略を述べる。マツ属の薬の発生⁽¹⁹⁾は、若い小胞子葉の原表皮およびその下の下表皮細胞に始まる。下表皮細胞は分裂して上下 2 層に分かれ、上の層からは分裂によって薬の側壁が作られ、下の層からは花粉母細胞 (pollen mother cell) およびじゅうたん細胞になる造胞組織 (sporogenous tissue) が作られる。造胞組織の最外部からはじゅうたん細胞層ができる、その組織の内部の細胞群から花粉母細胞群ができる。この花粉母細

胞の各々が生長して減数分裂を行って四分子 (tetrad) になり、四分子は各々分離して1個の花粉粒 (小胞子、microspore) になる。小胞子はやがて気囊を有するようになる。花粉核は最初二分して大核と小核を作るが (第1回前葉体分裂、first prothallial division)、この小核は間もなく消滅する。次に大核が分裂して第二の大、小の2核を作るが (第2回前葉体分裂、second prothallial division)、この小核もやがて消滅してしまう。著者ら⁽¹³⁾はアカマツ、クロマツ花粉では、前葉体分裂は2回であることを確認した。大核の方はさらに分裂してより小さい生殖核 (generative nucleus) と大きい栄養核 (vegetative nucleus) を形成する。

多糖類定量のためPAS染色をした花粉を用い、480 nm から 570 nm まで吸光度を測定した結果 (被測定物質のないところで同様にブランクを測定して吸光度を補正した) を Fig. 1 に示したが、多糖類に対する PAS 染色の場合の二波長は、 $\lambda_1=494$ nm、 $\lambda_2=550$ nm であった。次に花粉粒内で多糖類

が比較的多くなる時期のものを選び、厚さ 10、15、20、25 μm の切片を 20 分間染色して吸光度を測定した結果、20 μm 以上になると Lambert-Beer の法則の適用が疑問視され、花粉粒1個分の多糖類を定量するためには連続切片法が必要になった。連続切片の場合、枚数が少ない方が同一細胞をみつけ易く、正確度が増すという点から切片の厚さを 15 μm とすることにした。なお、この厚さで切るとアカマツ花粉は、飛散時の粒径の一番大きい時で3~4枚になる。さらに 15 μm 切片について染色時間を検討したが、20 分間染色で最大の吸光度を示すので、PAS 反応の染色時間は 20 分間とした。

アカマツ花粉の母細胞の段階から飛散直前までのものについて、連続切片法で多糖類を測定した結果を Table 1 に示した。なお、測定試料は各段階 1~2 個であり、数値的信頼性は充分とはいえないが、多糖類変動の傾向をみることができる。さらに試料の採取月日を追って多糖類量の変動をみると Fig. 2 のようになる。

PAS 反応は、単純多糖類、ムコ多糖類、糖タンパク質、糖脂質などの検出に広く用いられているものである。PAS 反応陽性物質に対する MSP を用いた定量化については、Fand ら⁽²⁰⁾が脳下垂体ホルモン中の糖タンパク質含量と吸光度が比例することを

Table 1. Change of polysaccharide content, in arbitrary unit, during the formation of pollen in *Pinus densiflora*

Stage	Polysaccharide content per cell
Pollen mother cell	1018.76*
Tetrad	279.85*
Microspore interphase	601.42*
First prothallial division prophase	1290.60
First prothallial division telophase	985.23*
Second prothallial division prophase	1296.08
Second prothallial division telophase	1026.24
Pollen mitotic division prophase	1782.94
Mature pollen	1505.60
Just before the dehiscence of the anther	1481.31

* Average of 2 cells

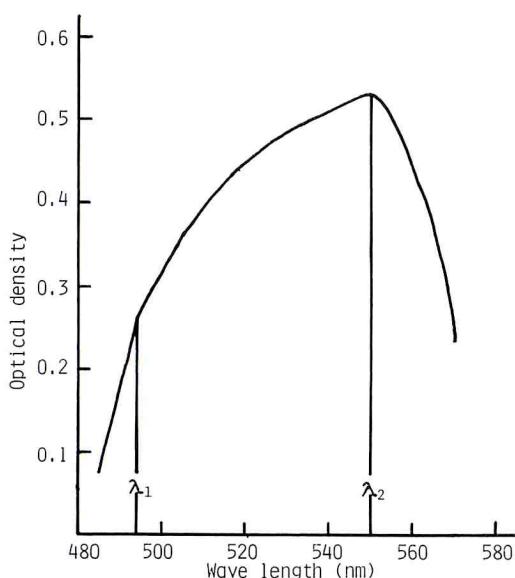


Fig. 1. Absorption curve for PAS-stained pollen sectioned at 15 μm.

λ_1 : 494 nm

λ_2 : 550 nm

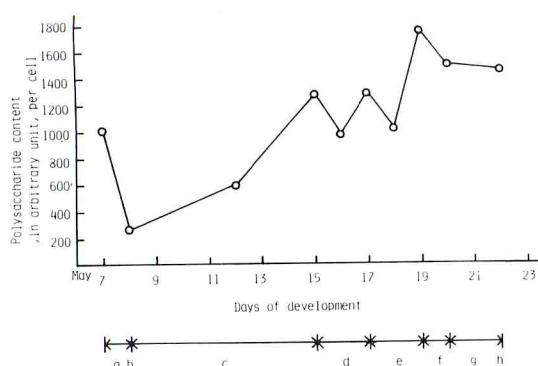


Fig. 2. Change of polysaccharide level during the formation of pollen in *pinus densiflora*.

- a : Meiosis
- b : Tetrad
- c : Microspore interphase
- d : First prothallial division
- e : Second prothallial division
- f : pollen mitosis
- g : Mature pollen
- h : Just before the dehiscence of the anther

報告し、高原ら^(21,22)はイヌの汗腺でムコ多糖類およびグリコーゲンの定量を報告し、Gahrton⁽²³⁾はヒト白血球内の PAS 反応陽性物質の定量を報告している。

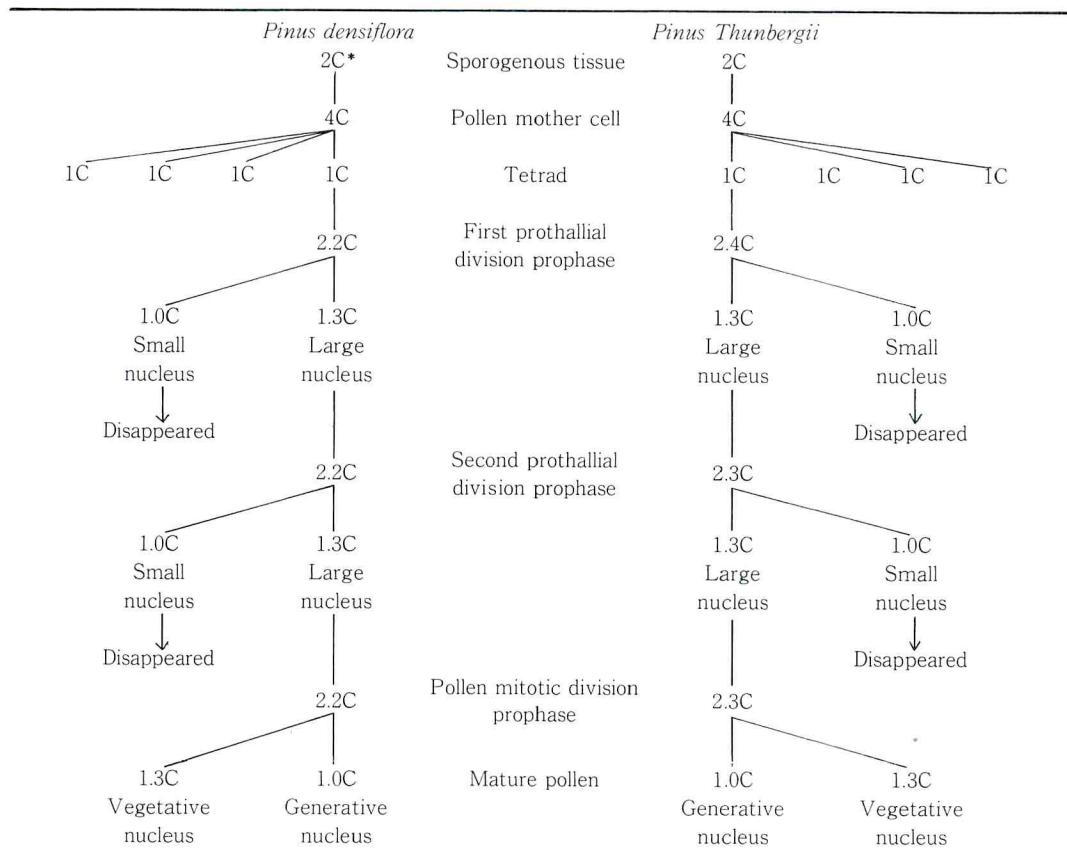
植物細胞中の PAS 反応陽性物質には、デンプン、セルロース、ヘミセルロースなどがある。しかしながらアカマツ花粉形成過程においては、著者ら⁽¹²⁾の核酸および多糖類変動に関する定性実験で、デンプンのヨウ素反応と PAS 反応が同じような傾向を示す観察結果を得ていることから、花粉粒内の PAS 反応陽性物質は大部分がデンプンと考えられるので、以下の PAS 反応陽性物質を多糖類と呼ぶことにする。Fand ら⁽²⁰⁾、高原ら^(21,22)、Gahrton⁽²³⁾らはいずれも、組織内の 1 部分を 1 枚の切片にとり定量したもので、1 個の細胞全体についての報告ではない。アカマツ花粉の場合、Lambert-Beer の法則が適用される連続切片法(切片の厚さ 15μm)によって同一

細胞を捲り、個々のものを定量し、その総和を細胞 1 個当りの多糖類量とした。なお、その他の測定条件は前報⁽¹³⁾の DNA 定量に準じて行えるので、多糖類の定量法としては以上の検討で適当と考えられる。

アカマツ花粉形成過程における多糖類の変動を Table 1, Fig. 2 に示したが、花粉母細胞の段階で貯えられた多糖類は、四分子期には減数分裂エネルギー源および構成成分の素材などに用いられるためか急激に減少し、ほとんど消費される。小胞子中間期に再び徐々に合成がおこり、第 1 回前葉体分裂前期まで貯えられ、この時の貯蔵量の約 24%が第 1 回前葉体分裂時のエネルギー源などとして消費されるらしく、この消費分は第 2 回前葉体分裂前期までに合成され、同分裂時に貯蔵量の約 21%が消費される。第 2 回前葉体分裂が終ると、多糖類は、急激に合成され、花粉核分裂前期には前葉体分裂前期の多糖類の約 1.4 倍量が貯えられる。ついでおこる花粉核分裂に際しては、貯蔵量の約 16%が減少する。このようにして完熟花粉(mature pollen)ができる、この花粉は間もなく飛散花粉となるが、飛散時に多糖類はわずかながら減少する。これは多糖類の一部が、エネルギー源などに使われ易い低分子糖類に変わるものと考えられる。これらの結果は、著者ら⁽¹²⁾のアカマツ花粉形成過程における多糖類変動の定性的観察結果とよく一致している。以上のこととは、連続切片法を MSP 法と併用することにより、花粉細胞についても PAS 反応を用いた多糖類の定量が可能であることを示している。

アカマツ、クロマツ花粉形成過程の DNA 量の変動⁽¹³⁾をまとめて Table 2 に示したが、アカマツ花粉 DNA に対応して多糖類の変動を追ってみる。まず減数分裂直前には DNA 量は 4 C [DNA 量は任意単位であり、C は DNA class の略^(13,24)]となり、多糖類は細胞内に充満している。四分子期には DNA は四等分され、多糖類は前述のように減少する。小胞子中間期には DNA は徐々に合成されるが、多糖類も同様に合成される。第 1 回前葉体分裂前期

Table 2. Relative deoxyribonucleic acid content, in arbitrary units, during the formation of pine pollen



* The value of DNA class is decided tentatively, being DNA amount of each nucleus of the tetrad as a standard.

にDNAは2.2 Cとなり、これは1.3 Cの大核と1.0 Cの小核に分裂するが、この間多糖類は約24%減少する。1.3 Cの大核は急激なDNA合成により第2回前葉体分裂前期に2.2 Cとなり、再び1.3 Cの大核と1.0 Cの小核に分裂するが、この間多糖類は約21%減少する。ついで花粉核分裂前期にDNAは2.2 Cとなるが、多糖類は四分子期以後の最大値を示し、2.2 CのDNAが1.3 Cの栄養核と1.0 Cの生殖核に分裂する際多糖類は約16%減少する。このようにDNAと多糖類には明らかな量的相関関係がみられる。

要 約

アカマツ花粉形成過程における多糖類量の変動をPAS染色ならびに顕微分光測光法により検討し、次の結果を得た。

1. 花粉細胞を15μmの連続切片とし、PAS染色後顕微分光測光法により、細胞1個当りの全多糖類の定量が可能であることを示した。
2. 花粉形成過程における多糖類の合成は、それぞれ小胞子中間期、第2回前葉体分裂直前、花粉核分裂直前に行われる。また多糖類は減数分裂時に激減し、第1回および第2回前葉体分裂時、花粉核分裂時にそれぞれ約24%, 21%, 16%減少する。

終りに臨み、実験操作ならびに論文作成に御助言下さいました本学部宮 慶一郎教授に深く感謝致します。

また本研究の一部は文部省科学研究費によって行ったものであり、厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 岩波洋造：植雜，**69**, 91—95 (1956).
- 2) 岩波洋造：花粉学大要，風間書房，p. 36—39 (1971).
- 3) 志佐 誠・加藤幸雄：植物生殖生理学，誠文堂新光社，p. 124 (1962).
- 4) 森 隆也・坂野順子・高橋元子・武内儀子：愛知学芸大学研究報告，**9**, 155—167 (1960).
- 5) 渡辺光太郎：京都家政短大紀要，第**13**集，26—41 (1974).
- 6) 岩波洋造：植雜，**67**, 134—137 (1954).
- 7) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：日本農芸化学会誌，**42**, 1—7 (1968).
- 8) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：日本農芸化学会誌，**42**, 8—12 (1968).
- 9) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：日本農芸化学会誌，**42**, 13—17 (1968).
- 10) 勝又悌三・鈴木寿直・故斗ヶ沢宣久：日本花粉学会会誌，第**16**号，29—36 (1975).
- 11) Ejiri, S., H. Abe and T. Katsumata : Agric. Biol. Chem., **41**, 2091—2092 (1977).
- 12) 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—101 (1966).
- 13) 勝又悌三・中野克彦・内藤千春・立花民子・田中信子：岩手大学農学部報告，**14**, 303—317 (1979).
- 14) リゾン, L. (今泉 正訳)：組織化学および細胞化学，白水社，p. 158—161, p. 362—371, p. 684 (1962).
- 15) McManus, J. F. A. : Nature, **178**, 914—915 (1956).
- 16) 岡本耕造・上田政雄・前田隆英・水谷 昭：顕微鏡的組織化学，医学書院，p. 161—162 (1965).
- 17) Patau, K. : Chromosoma, **5**, 341—362 (1952).
- 18) 永田哲士：信州医学雑誌，**15**, 148—157 (1968).
- 19) 猪野俊平：植物組織学，内田老鶴園，p. 500—508 (1954).
- 20) Fand, S. B. and B. Thorell : J. Cell Biol., **13**, 239—247 (1962).
- 21) 高原 斎・加藤嘉太郎：日畜会報，**35**, 123—130 (1964).
- 22) 高原 斎・加藤嘉太郎：九州大学農学部学芸雑誌，**22**, 207—221 (1966).
- 23) Gahrton, G. : J. Histochem. and Cytochem., **14**, 45—48 (1965).
- 24) Taylor, J. H. and R. O. McMaster : Chromosoma, **6**, 489—521 (1954).

Summary

Polysaccharide content of cells in various developmental stages of the pollen grain in *Pinus densiflora* was determined by means of cytophotometric measurements of the PAS (periodic acid-Schiff) reaction, using 15 μm thick serial sections.

Polysaccharide synthesis occurs at different specific periods characteristic for each of the succeeding divisions : microspore interphase, pre-prophase of second prothallial division and pre-prophase of pollen mi-

tosis. On the other hand, polysaccharide content decreased markedly during meiosis, and decreased about 24%, 21% and 16%, in the first- and second-prothallial divisions and in the pollen mitosis, respectively.

Change of polysaccharide level during various stages of anther development was nearly correlative to change of DNA level.

