

原 著

ツバキ花粉粒壁の糖組成

中 村 紀 雄*

Sugar composition of the pollen grain wall
of *Camellia japonica*

Norio NAKAMURA

(受付：1980年9月29日)

緒 言

花粉管壁の形成は発芽に先だっておこなわれ、花粉管の伸長は内壁(intine)の延長ではない、と考えられるが⁽¹⁾、花粉管の伸長は全内壁または一層の内壁の伸長であるとも考えられている。⁽²⁾⁽³⁾また、これらの説ではどちらも、すべての種類の花粉の生長様式は同じであると考えているが、短かい管しか伸ばせない花粉と、長い管を伸ばす花粉とでは生長様式が異なることも考えられる。どの説をとるにせよ、この問題の解決には、形態学的・細胞化学的に調べるだけでなく、内壁と花粉管壁をそれぞれ分離し、化学的に調べることも必要であろう。しかし、ごく少数の花粉で、内壁⁽²⁾⁽⁴⁾あるいは花粉管壁^{(5)~(7)}だけを分離し、その成分が調べられてはいるが、同じ種類の花粉について、それぞれが分離され、その成分が比較研究されている例はみられない。

内壁だけを分離することは難しいので、先の報

告⁽⁷⁾ではツバキなど5種の被子植物について、花粉粒壁を直接加水分解してその花粉管壁との成分の比較を試みた。この論文では、ツバキ花粉粒壁を Wada ら⁽⁸⁾の方法に従って抽出分画し、各画分の多糖について調べた結果を報告し、すでに調べられているツバキ花粉管壁成分⁽⁹⁾と、さらに詳しい比較をおこなう。

材 料 と 方 法

1. 花粉粒壁の調製

ツバキの花より薬を採取し、乾燥開薬させ、篩 0.105 m/m)を通して集め、1~2年-15°Cで保存しておいた花粉を実験に用いた。

壁の調製に際しては、まず花粉をアセトン、次にクロロホルム-メタノール(1:1 v/v)で洗い、デシケーター中で減圧乾燥させた。この脱脂乾燥花粉を水に懸濁し、テフロンホモゲナイザー管を用いて磨碎した。遠心分離(10,000回転、10分間)して得た

* 横浜市立大学生物学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22の2

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

沈殿を再び水に懸濁し、この操作を5回繰り返して、アセトン、エタノール、エチルエーテルで脱水乾燥させた沈殿物を花粉粒壁標品とした。集めた上清にはトリクロロ酢酸（TCA：終濃度8%）を加えてタンパク質を除いた後、4倍量のエタノールを加えて沈殿を得た（水溶性多糖：WS画分）。

2. 花粉粒壁多糖類の抽出

壁成分の分画は前報⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾と同じ方法により、花粉粒壁標品より順次、ジメチルスルホキシド可溶(DM)画分、0.5%亜硝酸アンモニウム可溶(OX)画分、KOH可溶画分としてヘミセルロースA(HA)とヘミセルロースB(HB)画分を得、これらの分画操作で抽出されなかったものを残査(R)画分とした。

ヘミセルロース画分はさらに水抽出、TCA処理をおこない、熱水可溶画分と熱水不溶画分に分画した。

3. 糖の分析

多糖類の加水分解、中性単糖のガスクロマトグラフィーによる分析は前報⁽¹⁰⁾通りにおこなった。ウロン酸はガルバゾール—硫酸法⁽¹¹⁾で、また糖量はフェノール—硫酸法⁽¹²⁾により測定した。

結果と考察

1. 花粉粒壁多糖の分画

30.780 g (100%)の脱脂乾燥花粉より花粉粒壁標品6.650 g (21.6%)とWS画分0.230 g (0.7%)が得られた。花粉粒壁成分は表1に示されたような割合で各画分に分画され、その全収量は壁標品の35.1%であった。DM画分には壁成分は抽出されなかった。各画分の糖含有量はOX画分で約67%、HB画分では58%と高かったのに比べて、HA画分では僅かに6%にすぎなかった。

花粉管壁の主成分がヘミセルロースであったので、それと比較するために、ヘミセルロース画分についてはさらに精製をおこなった(表1)。HA、HB画分を水抽出(95°C, 1時間、3回抽出)し、水抽出液にはTCAを加え、遠心分離して上清を集め、

Table 1. Yield and sugar content of cell wall fraction from *Camellia japonica* pollen grain.

Fraction ^a	Yield	Sugar content
	% (mg)	%
DM	trace (0) ^b	0
OX	7.5 (461)	66.7
HA	13.7 (843)	5.9
HB	1.9 (117)	57.5
Residue	12.0 (738) ^c	—
HA-s	0.3 (2) ^d	51.4
HA-i	2.4 (12)	2.3
HB-s	37.0 (34)	75.8
HB-i	5.4 (5)	4.9

^a See 'Materials and methods'. DM (dimethylsulfoxide)-and OX (ammonium oxalate)-extractable fractions, HA (hemicellulose-A) and HB (hemicellulose-B) fractions from KOH extract. Hot water-soluble (-s) and -insoluble (-i) subfractions of hemicellulose fractions.

^b Yields of fractions from 6.150 g of the pollen grain wall preparation.

^c Yield of water soluble materials from 30.780 g of the mature quiescent pollen grain.

^d Yields of subfractions from 0.838 g of HA fraction and from 0.092 g of HB fraction.

アルコール沈殿物を得た(HAsとHBs画分)。熱水不溶性画分(HAiとHBi)は収量も低く、HA、HB画分に比べて糖含有量もむしろ減少していた。HAs画分は糖含有量が高かったが、収量が非常に低く、これ以上分析はおこなえなかった。HBs画分は糖量も多く、その主成分が多糖であることをしめしている。

これらの結果と花粉管壁の分析結果⁽⁹⁾を比較すると、いくつかの点で大きな違いがみられる。花粉管壁では抽出された画分の収量総計は約90%であり、各画分の糖含有量も30~100%と非常に高かった。この違いは花粉管壁がほとんど多糖で構成されているのに比べて、花粉壁にはタンパク質やその他の成分が多く含まれていることを示している。また抽出操作で最初に得られるDM画分は、花粉粒壁では抽出されず、花粉管壁では収量47%であった。

Table 2. Sugar composition by weight per cent of cell wall fractions from *Camellia japonica* pollen grain.

Sugar	Crude fraction				Sub-fraction
	WS	OX	HA	HB	
Rhamnose	3.0(3.7)	2.4(4.6)	0.1(1.5)	3.6(6.1)	4.4(5.7)
Arabinose	7.6(9.5)	6.5(12.1)	0.3(4.9)	10.0(16.7)	17.2(21.9)
Xylose	0.5(0.7)	0.4(0.8)	0.04(0.8)	0.9(1.6)	3.0(3.8)
β -Methyl-glucoside	0.9(1.1)	0 (0)	0.6(10.3)	0.3(0.6)	0.3(3.8)
Mannose	0.9(1.1)	0.4(0.7)	0.8(13.8)	1.2(2.0)	2.1(2.7)
Galactose	7.1(8.8)	4.4(8.3)	0.3(5.9)	22.3(37.9)	21.7(27.6)
Glucose	3.1(3.8)	1.5(2.8)	0 (0)	5.3(9.0)	7.2(9.2)
<i>myo</i> -Inositol	8.1(10.0)	0.7(1.2)	2.8(47.9)	1.5(2.6)	0.4(0.6)
Uronic acid	49.5(61.3)	37.3(69.5)	0.9(14.9)	13.9(23.6)	22.2(28.2)
Total	80.0(100)	53.7(100)	5.7(100)	59.0(100)	78.5(100)
Sample weight (mg)	6.8	5.4	6.8	6.9	5.4
Sugar recovered (%)	84	80	99	102	104

Figures in parentheses are the percentages of the sugar to the total.

2. 花粉粒壁画分の単糖組成

表2は各画分の多糖の単糖組成をしめしている。WS画分は前報⁽¹⁰⁾でも述べたように、壁成分であるかどうか問題があるが、水溶性多糖とみなし分析をおこなった。WS画分の主成分はウロン酸であり、花粉管壁 WS 画分の組成とは異なっていた。また OX、つまりペクチン画分も主成分はウロン酸であった。HA 画分は糖量が非常に低かったが、加水分解に際してはほぼ 100%回収され、その主成分はミオイノシトールであり、グルコースは検出されなかった。HB と HBs 画分はアラビノース、ガラクトース、ウロン酸が主成分であった。HAs, HAI, HBI 画分は収量または糖含有量が低く、分析しなかった。また表には示されていないが、R 画分（内壁由来の α -セルロースと外壁成分を含む）は加水分解率が低く、糖量として 11%しか回収されなかつたが、その主成分はグルコースであった。

これらの結果も花粉管壁の結果と異なっている。花粉管壁の各画分ではいずれもグルコースが主成分であったが、花粉粒壁ではその量は低く、とくに HA

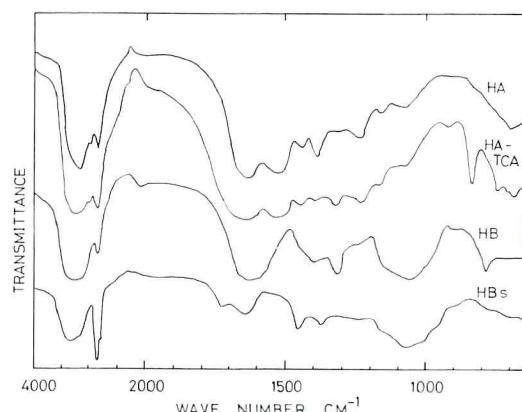


Fig. 1. Infra-red spectra of fractionated hemicellulose polysaccharides from *Camellia japonica* pollen grain.

Infra-red analysis was done with pressed discs of the polysaccharides with KBr.

HA-TCA : The precipitate fraction obtained from hemicellulose A solution by adding of TCA. See the text and Table 1.

画分には大きな違いがみられる。ただ HBs 画分はよく似た組成を示している。

3. 花粉粒壁ヘミセルロースの赤外線 (IR) 吸収スペクトル

図1はヘミセルロース画分のIRスペクトルを示している。HAの精製に際してTCA処理により多量の沈殿(HA-TCA画分、糖含有量3.4%)が得られたので、HAと比較のためにそのスペクトルも示してある。HA画分は糖量が低く、IRスペクトルも多糖類のパターンとは大分異なっている。そして $1500\sim1600\text{cm}^{-1}$ にタンパク質由来と思われるピークがみられ、HA-TCA画分のスペクトルもHAとほぼ同じようなパターンをしめした。一方、HBとHBsでは1640にまた $900\sim1200\text{cm}^{-1}$ にかけてブロードなピークがみられる。HBs画分では 1720cm^{-1} にエステル化カルボニル基、1640と 1450cm^{-1} にカルボキシレート由来のピークがみられる。またHBsでは他ではみられない 2850cm^{-1} に非常に大きな吸収がみられ、この多糖が部分的にメチル化されていることを示している。

花粉管壁HB画分は单糖組成、IRパターンとも花粉粒壁のHBと大へん似た結果をしめしたが、HBsでは 2850cm^{-1} の吸収に大きな違いがみ

られている(未発表)。

花粉粒壁は内壁と外壁から構成されている。この実験では内壁だけを分離して、その成分を調べたのではないが、花粉粒壁の外壁成分(スプロポレニンなど)は一連の分画操作では抽出されずにR画分に残ると考えられ、得られた壁成分は内壁由来とみなすことができよう。そしてその内壁多糖と花粉管壁多糖の比較から、とくにDM、HA画分の多糖に大きな違いがみられた。花粉管壁では両画分の多糖はカロース($\beta-1, 3$ -グルカン)であり、壁の主成分であったが、内壁からはカロースは抽出されなかつた。このことはカロースが花粉の生長にともない合成され、管壁成分となることを化学的に裏づけたことになり、またツバキ花粉管の伸長はたんなる内壁の伸展ではないことをしめしている。ただカロースは花粉管先端部には存在せず、管壁形成における役割は管先端部で形成された柔軟な1次壁を裏打ち補強することにあると考えられる。⁽⁹⁾管先端部分の成分はペクチン物質やHBs多糖などと類似していると考えられるので、内壁成分のペクチン物質やHB画分多糖と管壁成分との関連性についてはさらに研究する必要があろう。

Summary

The wall material of *Camellia japonica* pollen grain was fractionated successively into ammonium oxalate (pectic substance), KOH-extractable hemicellulose A, hemicellulose B and the residue (α -cellulose) fractions in yield of 7.5, 13.7, 1.9 and 12.0%, respectively. Sugar composition of each fraction was analyzed by gas liquid chromatography. The main component of hemicellulose A was myo-inositol but its sugar level was very low. Pectic substance and hemicellulose B fractions gave high sugar levels and were composed of arabinose, galactose, and uronic acid.

The pollen grain wall polysaccharides detected, which were probably originated from the intine, were compared with the pollen tube wall polysaccharides; especially the sugar level and composition of hemicellulose A of the grain wall were different from those of the tube wall and also callose, $\beta-1, 3$ -glucan, was not extractable from the grain wall.

引 用 文 献

- (1) D. A. Larson (1965) Am. J. Botany **52**, 139-154.
- (2) J. Heslop-Harrison (1979) Ann. Bot. **49**, supplement 1-66.
- (3) J. Heslop-Harrison (1975) Pro. R. Soc. London. B. **190**, 275-299.
- (4) A. Hara, H. Yamashita and A. Kobayashi (1977) Plant and Cell Physiol. **18**, 381-386.
- (5) W. J. VanDerWoude, D. J. Morré and C. E. Bracker (1971) J. Cell Sci. **8**, 331-351.
- (6) W. Herth, W. W. Frank, H. Bittiger, A. Kuppel and G. Keilich (1974) Cytobiol. **9**, 344-367.
- (7) N. Nakamura and H. Suzuki. Phytochemistry (in press).
- (8) S. Wada and P. M. Ray (1978) Phytochemistry **17**, 923-931.
- (9) N. Nakamura, K. Yoshida and H. Suzuki. Plant and Cell Physiol. (in press).
- (10) 中村紀雄, 吉田孝治. (1980) 花粉誌 **25**, 11—16.
- (11) T. Bitter and H. H. Muir (1962) Anal. Biochem. **4**, 330-334.
- (12) M. Dubois, K. A. Gillens, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Anal. Chem. **28**, 350-356.

