

原 著

花粉粒壁糖組成の発芽期における変化

中村紀雄*・鈴木 恕**

Changes in sugar composition of pollen grain wall during germination

Norio NAKAMURA* and Hiroshi SUZUKI**

(受付：1983年10月31日)

緒 言

材 料 と 方 法

テッポウユリ・ツバキなどの花粉の発芽は、花粉粒内壁が伸展しておこる⁽¹⁾のではなく、発芽に先だって内壁と細胞膜の間に新しく壁層が形成され、それが発芽溝(孔)より現出することである^(2~4)。この新しい壁層は花粉管壁と連続しているので^(2,3)、その主成分は β -1, 3-グルカンか、あるいは新しい壁を花粉管1次壁とみれば、ペクチン物質であることが考えられる。ツバキ花粉粒の内壁の主成分もペクチン物質であるから⁽⁵⁾、新しい壁層の主成分がペクチンであれば、それは内壁と区別しにくく、光学顕微鏡により細胞化学的に調べただけでは、発芽は内壁の伸展とみることになるかも知れない。花粉発芽の機構を説明するためには、いろいろの面からの検討が必要であり、この研究では、発芽に先だって形成される壁の成分について化学的な面から検討を行った。

イ. 花粉粒壁の調製

吸水を同調させるために、アセトン処理⁽⁶⁾したツバキ花粉 (*Camellia japonica*) を使用した。壁の調製に際しては、まず水で3分間およびショ糖(0.15 M)一寒天(1.2%)培地上で30分間花粉を培養した。培養後、花粉を4%硫酸液に懸濁し、Instant Pollen Tube (IPoT)⁽⁶⁾を形成させた。IPoTを遠心分離(10,000回転、5分間、0°C)して集め、これを水に懸濁し、再び遠心分離した。この操作を4回繰り返して硫酸を除いたのち、水を加え、フレンチプレス(1,200~1,500 kg/cm²)でIPoTを破碎した。IPoT破碎液を遠心分離し、沈殿については、さらに水・80%エタノール・アセトン・クロロホルムメタノール(1:1 V/V)・エチルエーテルで洗浄、脱水を行い、粉末状標品を得、これを花粉粒壁(PW)標品とした。上澄液については、これにエタノールを50%になるように加え、1晩放置後遠心分離して沈殿

* 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学生物学教室

** 〒305 茨城県新治郡桜村 筑波大学生物科学系

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

** Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305, Japan.

を得た。沈殿を 80 %エタノール・アセトン・クロロホルム-メタノール・エチルエーテルで洗い、乾燥させ、水溶性多糖 (WS) 標品とした。

2. 花粉粒壁多糖類の抽出

壁成分の分画は前報⁽⁷⁾に準じた方法により、PW 標品より、順次、蔥酸アンモニウムに可溶なペクチン物質 (PS) 画分、KOH に可溶な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つたものを残渣 (RE) 画分とした。RE 画分は α -セルロース画分にあたるが、この場合、この画分には花粉外壁成分も含まれる。

3. 糖の分析

多糖類の加水分解、中性糖のガスクロマトグラフィーによる分析は前報⁽⁷⁾通りに行った。ウロン酸はガラクチュロン酸を標準としてカルバゾール-硫酸法⁽⁸⁾で、また総糖量はグルコースを標準としてフェノール-硫酸法⁽⁹⁾により測定した。

結 果

吸水直後と発芽直前の花粉の壁成分を比較するために、3 分および 30 分間培養した花粉より壁成分を抽出した。アセトン処理花粉からの PW と WS 標品の収量(乾重量)は、吸水後の花粉では PW 22.4 %、WS 16.7 %、発芽前の花粉では PW 51.0 %、WS 4.8 %であった。表 1 に示すように PW 標品をさらに PS・HA・HB・RE 画分に分画したときの各画分の収量は、糖含量で比較した場合、PS が最も多く、吸水後と発芽前とでは大きな違いがみられた。RE 画分についても違いがみられたが、ヘミセルロース画分についてはほとんど差がみられなかった。

PW、WS 標品を加水分解した時の糖組成が表 2 に示してある。PW について吸水後と発芽前とを比較すると、僅かにウロン酸量に差がみられる他は、ほとんど同じであった。WS については吸水後と発芽前で違いがみられたが、吸水後花粉についての WS と

PW の糖組成はほとんど同じであった。PW は抽出操作過程で WS 分画へ混入しやすく、この場合も、そのことが考えられる。

PW の各画分の糖組成が表 3 に示してある。PS 画分について吸水後と発芽前とを比較してみると、ラムノース・アラビノース・ガラクトース・ウロン酸量に違いがみられる。ただアラビノースを 1 とした時の糖組成比をみると、ウロン酸量のみに著しい変化がみられ、他の糖については、ほとんど差がなかった。以下同様に、アラビノースを 1 とした時の糖含有比で比較してみると、RE 画分では発芽前花粉でグルコースが多いなど、各糖の間で若干の差がみられたが、PS 画分におけるような著しい違いはみられなかった。HA・HB 画分についても、HA ではマンノース、HB についてはガラクトースなどに僅かの違いがみられたが、どの糖についても大きな変化は認められなかった。

各画分共通して、アラビノース・ガラクトース・ウロン酸量が多く、キシロース・マンノース・グルコース・ミオイノシトール量は少なかった。RE 画分を除いては、各画分のラムノース・アラビノース・ガラクトースの比はほぼ同じで、吸水後と発芽前とでは変化はみられなかった。また RE 画分だけは、グルコースの含量比が高いなど、他の画分の糖組成と異なっていた。

考 察

花粉の発芽過程、つまり吸水後から発芽までの間に、内壁と細胞膜の間に新しく壁層が形成されるが、この壁の成分を知るために、吸水直後と発芽直前の花粉の壁成分について調べ、両者の比較を行った。発芽過程においては、内壁成分の糖組成や糖レベルに変化はおこらず、また新たに形成された壁の成分が内壁の成分と異なっていれば上述の比較により、ある種の糖レベルの増加が認められた場合、それは新たに形成された壁の成分に由来すると考えることができる。そこで、ここでは、内壁成分には著しい変化はおこらないとみなし、まずは比較を行ってみ

Table 1. Yield of cell wall fractions from *Camellia japonica* pollen grains*

IPoT**	Sample	Yield			
		Dry weight		Carbohydrate amount	
		mg	%	mg	%
A	PW***	1032.0	(100)	60.9	(100)
	PS	78.1	(7.6)	23.1	(37.9)
	HA	222.8	(31.6)	6.7	(11.0)
	HB	57.8	(5.6)	14.2	(23.3)
	RE	241.0	(23.3)	9.9	(16.3)
B	WS	1003.0		46.1	
	PW	2690.5	(100)	217.9	(100)
	PS	611.7	(22.7)	111.9	(51.4)
	HA	578.0	(21.5)	24.9	(11.4)
	HB	240.2	(8.9)	60.5	(27.8)
	RE	359.7	(13.4)	19.4	(8.9)
	WS	402.6		14.1	

* Pollen grain wall (PW) and water-soluble polysaccharide (WS) were prepared from instant pollen tubes (IPoTs)⁽⁶⁾

** IPoTs were obtained by treatment with 4% sulfuric acid from the pollen grains incubated on water for 3 min (A) or on 0.15 M sucrose for 30 min (B). Germination: A 0%, B 14.8%; IPoT formation: A 100%, B 77.2%.

*** PW was fractionated into pectic substance (PS), hemicellulose A (HA), hemicellulose B (HB) and residue (RE).

Table 2. Sugar composition by weight percent of pollen grain wall preparation and water-soluble polysaccharide fraction from *Camellia japonica* pollen

Sugar	Pollen grain wall (PW)				Water-soluble polysaccharide (WS)			
	IPoT				IPoT			
	A	B	A	B	A	B	A	B
	%	%	%	%	%	%	%	%
Rhamnose	0.5(9.6)	0.36*	0.7(9.0)	0.38	0.9(10.8)	0.40	0.2(3.6)	0.18
Arabinose	1.3(26.9)	1.00	1.9(23.6)	1.00	2.3(27.1)	1.00	1.3(20.2)	1.00
Xylose	0.2(3.3)	0.12	0.1(1.9)	0.08	0.2(2.0)	0.07	0.1(1.2)	0.06
Mannose	0.5(9.1)	0.34	0.5(6.6)	0.28	1.0(11.6)	0.43	1.5(22.9)	1.13
Galactose	1.5(30.1)	1.12	2.4(30.0)	1.27	2.3(28.0)	1.03	2.2(33.4)	1.65
Glucose	0.1(1.8)	0.07	0.4(4.4)	0.19	0.1(0.9)	0.03	0.2(2.4)	0.12
myo-Inositol	0.1(1.1)	0.04	0.1(1.4)	0.06	0.1(1.7)	0.06	0 (0)	0
Uronic acid	0.9(18.1)	0.67	1.8(23.1)	0.98	1.5(17.9)	0.66	1.1(16.3)	0.81
Total	4.9(100)		8.0(100)		8.3(100)		6.6(100)	
Sample weight	14.6 mg		20.9 mg		15.8 mg		5.1 mg	

* Figures indicate the weight ratio of each sugar to arabinose.

Table 3. Sugar composition by weight percent of cell wall fractions from *Camellia japonica* pollen grains

Sugar	Pectic substance fraction (PS)				Residue fraction (RE)			
	IPoT				IPoT			
	A	B			A	B		
	%	%	%	%	%	%	%	%
Rhamnose	3.5(10.1)	0.37*	1.8(7.4)	0.38	0.2(10.6)	1.18	0.1(9.0)	0.99
Arabinose	9.6(27.6)	1.00	4.6(19.4)	1.00	0.1(9.0)	1.00	0.1(9.2)	1.00
Xylose	0.5(1.6)	0.06	0.2(1.0)	0.05	0.1(3.9)	0.43	0.04(2.7)	0.29
Mannose	0.5(1.4)	0.05	0.2(0.8)	0.04	0.1(6.5)	0.72	0.1(6.3)	0.68
Galactose	11.9(34.2)	1.24	5.2(21.9)	1.13	0.2(11.9)	1.32	0.2(10.9)	1.18
Glucose	1.5(4.2)	0.15	0.9(3.6)	0.19	0.4(22.9)	2.53	0.4(28.3)	3.08
myo-Inositol	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
Uronic acid	7.3(21.0)	0.76	10.9(45.9)	2.37	0.5(35.2)	3.91	0.5(33.7)	3.66
Total	34.8(100)		23.9(100)		1.6(100)		1.5(100)	
Sample weight	4.2 mg		4.9 mg		19.9 mg		24.7 mg	

Sugar	Hemicellulose A fraction (HA)				Hemicellulose B fraction (HB)			
	IPoT				IPoT			
	A	B			A	B		
	%	%	%	%	%	%	%	%
Rhamnose	0.4(8.7)	0.36*	0.3(7.2)	0.29	2.4(8.2)	0.36	2.6(10.3)	0.38
Arabinose	1.1(24.2)	1.00	1.1(24.5)	1.00	6.6(22.8)	1.00	6.9(27.1)	1.00
Xylose	0.3(5.8)	0.24	0.2(4.1)	0.17	0.9(3.2)	0.14	0.5(2.0)	0.07
Mannose	0.3(5.8)	0.24	0.5(11.8)	0.48	1.1(3.7)	0.16	1.1(4.2)	0.15
Galactose	1.2(27.9)	1.15	1.0(23.1)	0.94	13.1(44.9)	1.97	9.8(38.9)	1.44
Glucose	0.2(4.0)	0.17	0.2(5.0)	0.20	3.1(10.7)	0.47	1.5(5.7)	0.21
myo-Inositol	0.04(1.1)	0.05	0.03(0.7)	0.03	0 (0)	0	0.2(0.7)	0.03
Uronic acid	1.0(22.5)	0.93	1.1(23.5)	0.96	1.9(6.5)	0.29	2.8(11.2)	0.40
Total	4.9(100)		4.7(100)		29.1(100)		25.5(100)	
Sample weight	20.7 mg		24.7 mg		3.6 mg		6.6 mg	

* Figures indicate the weight ratio of each sugar to arabinose.

た。

吸水後と発芽前の花粉の壁成分の有意な違いは、PS画分の収量とその糖組成にだけ認められた。とくに糖組成において、アラビノースを1としたときの各糖の量比を比べると、ウロン酸量のみに違いがみられた。このことは新しく形成された壁の成分がペクチン物質を主成分としていることを示していると思われる。新しい壁層は花粉管壁と連続しており、⁽³⁾花粉管壁の主成分であるカロース(β -1,3-グルカン)^(7,10)がこの壁の成分として含まれることも予想さ

れたが、各画分ともグルコース量はごく僅かであり、大きな量的変化はみられなかった。そして花粉管の生長部域である管先端部分にはカロースは少なく、ペクチンが多く存在する⁽¹¹⁾ことを考えあわせると、新しい壁は花粉管の1次壁と同一であるとみなしてよいかも知れない。おそらく、ツバキ花粉の発芽・管伸長は、「花粉粒が吸水して発芽するまでの間にペクチン物質を主成分とする1次壁がつくられ、それが発芽孔より出現し花粉管となり、この柔軟な壁に、その後合成されたカロースが内側より付着し、裏打

ち補強されることにより、花粉管が伸長していく」という過程をとるのであろう。ある程度花粉管を伸ばした花粉の花粉粒部分を調べるならば、その壁成分としてカロースが検出されよう。

壁標品の調製に際して IPoT を利用した。その理由は IPoT 形成率から、発芽前の花粉であってもその花粉の発芽能を推定できること⁽⁶⁾、また硫酸処理により花粉粒内壁と外壁の分離がおき⁽⁶⁾、そのことから内壁の破碎が容易になり、細胞質成分の除去も充分に行えると考えたからである。表 1 に示すように、発芽直前とみなした培養 30 分の花粉のうち約 20 % は典型的な IPoT を形成しなかった。しかもその一部を 2 時間培養したときの発芽率は 80.7 % であった。何らかの原因で 20 % の花粉はその時点で発芽能を失いつつあったと考えられる。したがって、すべての花粉が発芽直前の状態に同調していれば、壁成分の変化はさらに明確に検出できたかも知れない。ただ壁成分を調べるに際しては、硫酸処理の影響がみられた。

前報⁽⁵⁾でツバキ完熟静止花粉の壁成分について報告したが、これと今回の吸水直後の花粉の壁成分を比較すると、硫酸処理することにより、各画分の糖含量が減少し、とくにミオイノシトールとウロン酸量が減少する傾向がみられた。硫酸処理の有無の他にも、抽出分画操作に違いがあり、両者を単純に比較することはできないが、違いの理由としては細胞の破碎の程度や抽出分画過程での水溶性多糖の損失などが関係しているのかも知れない。また 4 % 硫酸処理はごく短時間であり、この処理による多糖の分解は少ないと考えられるから、ミオイノシトールの減少は、この糖が壁構成多糖の成分ではないことをしめしているのかも知れない。

このように硫酸処理による影響はみられるけれども、吸水直後と発芽直前の花粉の壁成分についての比較は可能であり、発芽過程においてペクチン物質が増加すると結論できると思われる。

Summary

Pollen walls prepared from *Camellia japonica* pollen grains immediately after absorbing water and just before germination were studied by fractionation into pectic substance, hemicellulose A, hemicellulose B and residue fractions and analysis of their sugar composition. A significant difference was found only in the yield and sugar composition of the pectic substance fraction. Uronic acid content in this fraction from the pollen just before germination was higher than that from the pollen after absorbing water, although there were no or little changes in the other sugar contents. These results suggest that pectic substance is synthesized as the main component of the wall newly formed between the intine and the cytoplasmic membrane during pollen germination.

References

1. J. Heslop-Harrison (1979) Ann. Bot. **49**, suppl. 1, 1–66.
2. H. Miki-Hiroshige and S. Nakamura (1982) J. Electron Microsc. **31**, 51–62.
3. S. Nakamura, H. Hiroshige and Y. Iwanami (1982) Amer. J. Bot. **69**, 538–545.
4. S. Nakamura, H. Hiroshige and Y. Iwanami (1979) Jpn. J. Palynol. **24**, 33–44.
5. N. Nakamura (1980) Jpn. J. Palynol. **26**, 33–37.
6. N. Nakamura (1978) J. Yokohama City Univ. Biol. Ser. **5**, 1–100.

- 7 . N. Nakamura and H. Suzuki (1980) Plant and Cell Physiol. **21**, 1383—1390.
- 8 . T. Bitter and H. H. Muir (1962) Anal. Biochem. **4**, 330—334.
- 9 . M. Dubois, K. A. Gillens, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Anal. Chem. **28**, 350—356.
10. N. Nakamura and H. Suzuki (1983) Phytochemistry (in press).
11. H. P. Roggen and R. G. Stanley (1971) Physiol. Plant. **24**, 80—84.