

原 著

スギ花粉に内在する花粉管伸長阻害物質

岩田 岳・船隈 透・原 彰

Endogenous inhibitor of *Cryptomeria japonica* for pollen tube elongation

Takeshi IWATA, Tooru FUNAGUMA, Akira HARA

(受付：1985年4月21日)

緒 言

裸子植物では受粉から発芽、花粉管伸長に要する時間が被子植物のそれに比べて非常に長いことが観察されている。その上に花粉管伸長終了後直ちには受精に至らず、スギやマツでは受精は翌年行なわれる。さらに、スギ花粉の人工培養による発芽の報告はほとんど無く、通常の培養条件ではほとんど発芽しない。上野(1)はスギ花粉が発芽して内皮を破るまでに7日間を要することを認めている。これらの事実は、スギ花粉の発芽から受精に至るまでの過程が花粉に内在する生理活性物質によって巧妙に調節されている可能性を示唆していると思われる。

スギ花粉に内在する花粉管伸長阻害物質の分離精製を試み、ガマ花粉とツバキ花粉の発芽および花粉伸長に対する影響を調べた結果について報告する。

実験材料および方法

1. 試 料

スギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉は昭和59年3月、名城大学農学部附属農場にて、葯のついたスギ

の枝を伐採後、実験室内で水差しにして放置し、翌日花粉を採取した。花粉は室温で一夜風乾の後、使用時まで -20°C で保存した。

ツバキ (*Camellia japonica*) の花粉は同年4月、同農場にて採取し、使用時まで -20°C で保存した。

ガマ (*Typha latifolia* L.) の花粉は同年5月、愛知県愛知郡日進町にて採取し、室温で一夜風乾した後、使用時まで -20°C で保存した。

2. 阻害物質のバイオアッセイ

バイオアッセイは岩波等(2, 3, 4)の方法を参考にして、少量の試料で行えるようにした。5~50 μl の阻害物質を含む有機溶媒を直径2 cm、深さ2 mmのマイクロプレートに入れ、試料を風乾した。これに10%ショ糖を含む1.5%寒天を100 μl 加え、激しく攪拌し、寒天の水分が蒸発しないように水を満たした容器内で固化させた後、カミソリの刃に花粉を付けて寒天上になるべく均一になるように散布した。インキュベートは 25°C 、湿度90%以上でツバキ花粉については3時間、ガマ花粉については20時間行った。

インキュベーション後、1プレートに対し少なく

とも3枚の写真を撮影して花粉管の長さをコンピューター (NEC PC-8801) に接続したデジタイザー (WACOM CREATOR) を用いて測定し、また発芽率も測定した。

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) およびその検出法

シリカゲル TLC は CHCl_3 および CHCl_3 : 酢酸エチル (1 : 1) の2種類の展開溶媒を使用した。分離した TLC 上の成分は紫外線ランプによる吸収、 I_2 蒸気、10% H_2SO_4 の噴霧、加熱そして1%硫酸第2セリウムを含む10% H_2SO_4 の噴霧、加熱によって検出した。

4. 阻害物質の精製

スギ花粉 1.2 kg をメタノール : 酢酸エチル (8 : 2) 3 l で、室温にて攪拌しながら2昼夜抽出し、濾過した。この操作を4回繰り返した。抽出液は減圧乾固して、水 2.8 l に懸濁し、等量の n-ヘキサンで分配抽出を行った。抽出は、1回について1時間、計4回繰り返した。

明らかな阻害のみられた n-ヘキサン抽出画分についてシリカゲル 60 吸着クロマトグラフィー ($\phi 6 \times 100 \text{ cm} \times 2$ 本) を行った。溶出は CHCl_3 : 酢酸エチ

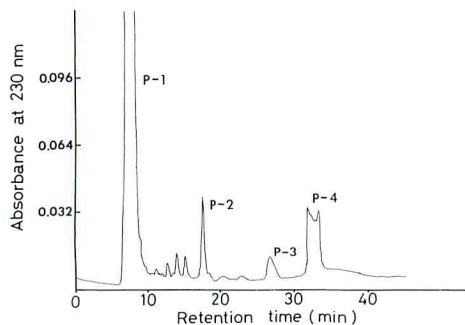


Fig. 1 Separation of fraction 3 from silica adsorption chromatography by HPLC

Fraction 3 was separated by HPLC using a Trirotar-V system with n-hexane : ethanol (100 : 0.2) at a flow rate of 2 ml/min on a YMC-Pack A-024 SIL column (10 \times 300 mm). A portion (60 μ l) of fraction 3 in ethanol was analyzed at a time.

ルの (9 : 1)、(7 : 3)、(5 : 5)、(4 : 6)、そして (3 : 7) の各混合比順にステップワイズ法で行った。溶出物はシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって確認を行ない、同じ成分を有するフラクションを集めた。阻害活性を有する画分、フラクション 1、2 および 3 を得たが、最も比活性の高いフラクション 3 についてシリカゲル HPLC を行った (Fig. 1)。カラムに YMC-Pack A-024 SIL を用い、溶媒として n-ヘキサン : エタノール (100 : 0.2) を流速 2 ml/min で流して、溶出を行った。溶出物は波長 230 nm、Range 0.16 の条件で検出した。各ピークごとに集めて、バイオアッセイを行ったところ、フラクション P-4 がガマ花粉の発芽に対して強い阻害を示した。しかしフラクション P-4 はシリカゲル TLC で複数のスポットを与えたため、YMC-Pack A-012 SIL カラムによる HPLC を行った (Fig. 2)。溶媒はイソオクタン : エタノール (100 : 0.25) を流速 1 ml/min

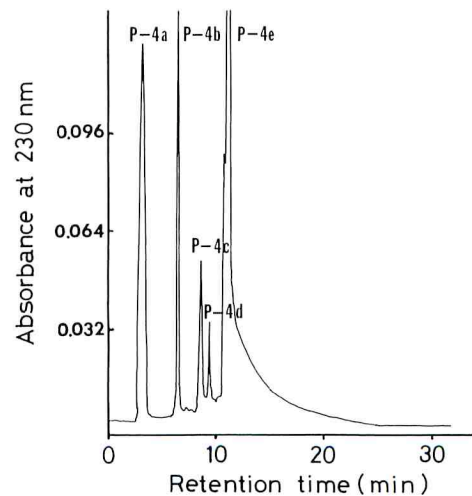


Fig. 2 Separation of fraction P-4 from 1st HPLC (Fig. 1) by HPLC

Fraction P-4 was separated by HPLC using a Trirotar-V system with iso-octane : ethanol (100 : 0.25) at a flow rate of 1 ml/min on a YMC-Pack A-012 SIL column (6 \times 150 mm). A portion (10 μ l) of fraction P-4 in ethanol was analyzed at a time.

で流し、溶出物は波長 230 nm、Range 0.16 の条件で検出した。溶出されたピーク 4 a から 4 e までの主な 5 つのピークのうち、ピーク 4 e を集めたフラクション P-4 e (4.9 mg) に強い阻害が観察された。

結果および考察

n-ヘキサンによる分配抽出物は 15.1 g 得られ、10,000 ppm で阻害活性を示した。シリカゲル 60 によるカラムクロマトグラフィーの結果、溶媒 CHCl₃：酢酸エチル (9 : 1) で溶出されたフラクション 1 (28.5 mg)、CHCl₃：酢酸エチル (7 : 3) で溶出されたフラクション 2 (493.5 mg) および CHCl₃：酢酸エチル (7 : 3)、(5 : 5)、(4 : 6)、そして (3 : 7) で溶出されたフラクション 3 (370.3 mg) が得られた。フラクション 1 と 3 はフラクション 2 より

阻害活性が強く 500 ppm でガマの花粉管伸長を強く抑えたが、量が多いフラクション 3 についてさらに HPLC を行った。

YMC-Pack A-024 SIL カラムによる HPLC 分析 (Fig. 1) では、4 つの主なピークが得られたが、これらの中で阻害活性を示したのはピーク 4 (17.5 mg) のみであり、100 ppm で有効であった。この画分はさらに YMC-Pack A-012 SIL カラムを用いた HPLC によって 5 つの主なピークに分れたが (Fig. 2)、フラクション P-4 e (4.9 mg) だけに阻害活性があった。

フラクション P-4 e の存在下にガマ花粉とツバキ花粉の培養を行い、それに基づいて発芽率および花粉管伸長度を測定した (Fig. 3 および 4)。Fig. 3 に示すように、フラクション P-4 e はわずか 5 ppm の濃度で、ガマ花粉の発芽率を 38 % まで低下させ、50 ppm の

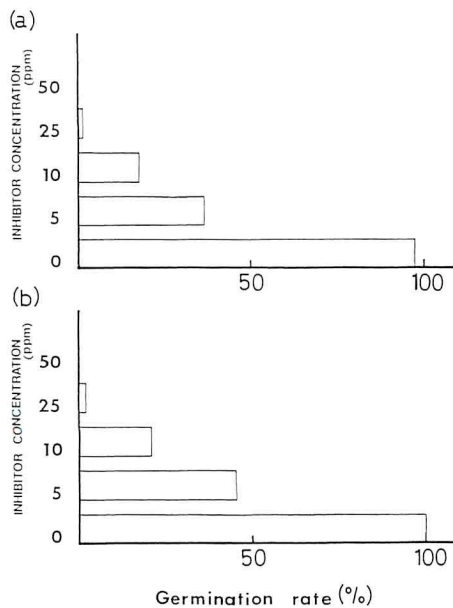


Fig. 3 Effect of fraction P-4e on germination of *Typha latifolia* (a) and *Camellia japonica* (b) pollens

Bioassay was done according to the methods described in Materials and Methods. Germination rate was calculated using three different photographs per one plate with each indicated concentration of P-4e.

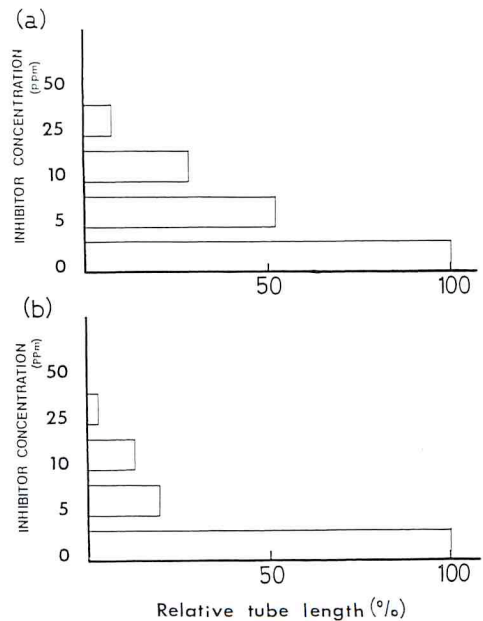


Fig. 4 Effect of fraction P-4e on pollen tube elongation of *Typha latifolia* (a) and *Camellia japonica* (b) pollens

Tube length of the germinated pollens was measured using the same photographs as indicated in Fig. 3 and denoted as per cent to the tube length of the control pollen.

濃度では、完全に発芽を阻害した。また、ツバキ花粉についても、ガマ花粉とほぼ同様な結果が得られた。

一方、花粉管伸長に関しては Fig. 4 に示すように、ツバキ花粉の方により強い阻害が観察され、5 ppm の濃度でコントロールに比べて 25 % 以下にまで花粉管伸長が抑制された。この時、花粉管の先端部分が丸く膨張するのが観察された。

フラクション P-4 e について UV スペクトル、質量分析および NMR スペクトルを測定したが試料が純品でなかったため構造決定には至らなかった。しかし質量分析の結果、分子量は 300 以下であることが推察された。

フラクション P-4 e についてさらに HPLC による分子ふるいを行い、純度を上げようとしたが、分離が不十分であった。

現在なおこの阻害物質の単離について検討中であるが、フラクション P-4 e はこれまでに報告されている花粉管の伸長阻害物質の中でアブサイシン酸に匹敵する活性を有しているように思われる。Shibuya 等 (5) が報告したマツ花粉の内在性物質である植物ホル

モンのアブサイシン酸は 1~10 ppm でレタス種子の発芽を抑えている。また、Kobayashi 等 (6, 7) が報告した安息香酸は、50 ppm でツバキ花粉の発芽率を 13 % しか阻害せず、また TLC の挙動からもフラクション P-4 e とは異なっている。さらに Dehydrochorismic acid (7) は発芽を抑制せず花粉管伸長だけを抑制するのに対し、フラクション P-4 e は発芽および発芽した花粉管の伸長を共に強く抑制した。

植物界全般に存在する p-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテキュ酸、p-クマル酸、フェルラ酸、バニリン酸、t-ケイ皮酸、クロロゲン酸、そしてコーヒー酸などのフェノール性物質もフラクション P-4 e ほどの活性を示さなかった。

本研究は、日本私学振興財団の学術研究振興資金によるご援助により行われた。

謝 辞

本研究の遂行に終始適切な御指導並びに御助言を与えて下さいました名城大学薬学部機器分析学教室の鈴木真言教授並びに原田健一講師に深謝致します。

文 献

1. 上野実朗：日本花粉学会誌 No. 14 (1974) P. 26
2. 岩波洋造：花粉学 (1980) 講談社
3. R. G. Stanley, H. F. Linskens: Pollen: Biology Biochemistry Management (1974) pp. 67-72. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
4. Yozo Iwanami: Acceleration of the growth of *Camellia sasanqua* pollen by soaking in organic solvent Plant Physiol. (1973) 52, 508-509.
5. Tsuyoshi Shibuya, Makoto Funamizu, Yoshio Kitahara: Abscicic acid from *Pinus densiflora* pollen Phytochemistry (1978) 17, 322-323.
6. Satoshi Kobayashi, Tetsuo Ozawa, Hiroshi Imagawa: Endogenous inhibitors for pollen germination and pollen tube elongation in *Pinus densiflora* Sieb, et Zucc, Agric. Biol. Chem. (1981) 45, 1519-1521.
7. Satoshi Kobayashi, Tetsuo Ozawa, Hiroshi Imagawa: Dehydrochorismic acid from *Pinus densiflora* pollen Agric. Biol. Chem. (1982) 46, 845-847.

Summary

The endogenous inhibitor for pollen tube elongation and germination was found in *Cryptomeria japonica* pollen. The inhibitor, fraction P-4e, was purified from 1.2 Kg of *Cryptomeria japonica* pollen by extracting with methanol : ethylacetate (8 : 2) followed by silica adsorption chromatography and silica adsorption HPLC, however it was not yet pure.

It strongly inhibited the tube elongation and germination of *Typha latifolia* and *Camellia japonica* pollens at a concentration of 5ppm.



第30回国際養蜂会議

The XXXth International Apicultural Congress

昭和60年10月11日～16日 於 愛知県名古屋市公会堂

	午 前	午 後	夜	博 覧 会
10月9日(水)				基礎小間設営
10月10日(木)	登 録 (登録は11日、12日、13日も行います。)			出品者小間設営出品物搬入
10月11日(金)	開 会 式 ・ 総 会	花粉媒介学分科会 ミツバチ病理学分科会	ジャパナイト	開幕 (正午)
10月12日(土)	花粉媒介学分科会 ミツバチ病理学分科会	発展途上国分科会 アピモンディア理事会	映 画 上 映	博覧会
10月13日(日)	ミツバチ生物学分科会 養蜂技術分科会	ミツバチ生物学分科会 養蜂技術分科会	ス ラ イ ド 上 映	博覧会
10月14日(月)	見 学 旅 行 (バ ス)			休館日
10月15日(火)	ミツバチ治療学分科会 養蜂経済分科会	ミツバチ治療学分科会 養蜂経済分科会	映 画 上 映	博覧会
10月16日(水)	分 科 会 (総 括)	総 会 ・ 閉 会 式	サヨナラパーティー	博覧会 (正午まで)
10月17日(木)				出品物搬出 小間撤去

全てのセッションに同時通訳が付きます。

主催

第30回国際養蜂会議組織委員会
社団法人日本養蜂はちみつ協会

後援

日本花粉学会