

ツバキ花粉管の伸長促進物質 II. Good緩衝剤とカルシウムの作用

中村紀雄*・望月桂**・鈴木恕***

Growth Promoters of the Pollen Tube of *Camellia japonica*
II. Stimulated Growth on Good's Buffers and
Cooperation of Calcium

Norio NAKAMURA*, Katsura MOCHIZUKI**
Hiroshi SUZUKI***

* Department of Biology and **Department of Chemistry, Yokohama City
University, Yokohama 236, Japan

*** Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305 Japan

Effects of 19 Good's buffers and related substances on pollen growth were examined. The Good's buffer substances, except ADA and MES, promoted the tube growth of *Camellia japonica* pollen, whereas all inhibited that of *Lilium* hybrid cv. Enchantment, *L. longiflorum* and *Tulipa gesneriana* pollens. ADA and MES, the former inhibiting and the latter little affecting the pollen growth of *C. japonica*, markedly promoted the growth in the presence of calcium.

Taurine, monoethanolamine, diethanolamine and glycinamide promoted the tube growth of *C. japonica*, Morpholine and piperazine, but not acetamide, promoted the tube growth in the presence of calcium.

Key words : Pollen tube growth; Good's buffer; Calcium; Growth promoter.

培地上での花粉の発芽・管伸長を調べる際、しばしばリン酸やクエン酸緩衝液が使用される^(1,2)。しかしこれらはmM濃度以上の高濃度では花粉の成長、とくに花粉管伸長を阻害する⁽¹⁾。我々は前報⁽³⁾で報告したツバキ花粉の管伸長を促進するFII物質(塩基性物質)の影響を調べるため、それらに代わる緩衝剤として生物反応に影響の少ないとされるGoodの緩衝剤⁽⁴⁾の利用を検討した。その結果Good緩衝剤自身がツバキ花粉管の伸長を著しく促進すること、またCa⁺が共存するとその促進効果がさらに高められることを見いだ

したので報告する。

スカシユリ(*Lilium* hybrid cv. Enchantment)とテッポウユリ(*Lilium longiflorum*)の花粉は採取後直ちに使用した。ツバキ(*Camellia japonica*)、リンゴ(*Malus pumila*)、チューリップ(*Tulipa gesneriana*)花粉は-20°Cで1年以上保存しておいたものを使用した。花粉の培養・花粉管伸長の測定は前報⁽³⁾に準じて行い、0.3Mショ糖-1.3%寒天培地を基本培地とし、これにCa(NO₃)₂とGood緩衝液を添加した。緩衝液のpH調整はHClまたは

*** 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学生物学教室*・化学教室**

*** 〒305 つくば市天王台 筑波大学生物科学系

NaOH で行い10 mM液を調製し、これを希釈して使用した。緩衝剤としては pH 6~8 の範囲に緩衝能をもつ19種(表1,2)を使用した。

表1と2はツバキ花粉管の成長に対するGood緩衝剤の影響を示している。いずれも pH 7~8、0.5~3 mM濃度で約120~190%の管伸長促進効果を示した。ただし、ADAとMESは促進作用を示さなかった(表2)。ADAは著しい阻害を示し、3 mMより高い濃度では発芽も見られなかった。MESは時に0.5 mM濃度で110%程度の促進を示したが、いずれの濃

度でもほぼ対照と同じ値を示しめた。しかしこれら促進効果を示さなかったものも、培地にCa²⁺が共存すると著しい促進効果を示した(表2)。調べた緩衝剤すべてに同様の効果が見られ、ADAは5 mM濃度でも管伸長が見られた。Mg²⁺やK⁺にはCa²⁺のような効果は全く見られなかった(図1)。

Ca²⁺は花粉管先端部に存在し⁽⁵⁻⁷⁾、花粉管の伸長に重要な役割を果たしている⁽⁸⁾と考えられる。ツバキ花粉の場合、Ca²⁺それ自身も管伸長に対して僅かに促進作用を示し、その程度は多くの場合120%以下で

Table 1. Effects of Good's buffer substances and several amines on *Camellia japonica* pollen tube growth.

Compound	Pollen tube length, % Control			pH of medium
	Concentration, mM			
	0.5	1	5	
ACES	153	136	87	7.8
	112	108	77	7.0
BES	119	140	110	7.0
DIPSO	136	180	157	7.0
	173	170	111	7.5
EPPS	162	167	113	7.5
HEPES	126	158	122	7.5
HEPPSO	129	157	139	7.5
MOPS	146	140	98	7.0
MOPSO	157	170	148	7.0
PIPES	147	119	62	7.5
POPSO	158	163	96	7.5
TAPS	139	190*	176	7.7
	107	209*	213	7.0
TES	143	178*	161	7.7
Tris	176	178	80	8.0
	102	139*	120	7.0
Glycinamide	160	173	63	8.0
	102	114	91	7.0
Taurine	107	124	159*	7.5
Monoethanolamine	111	128	183*	7.0
Diethanolamine	117	160	204*	7.0

Pollen grains were incubated on sucrose(0.3M)-agar(1.3%) medium containing the test compounds for 20-24 hr at 25°C. The pollen tube length in the control without buffer substances was in a range of 4.4-4.8 mm. *Not 1 or 5 mM but 3 mM.

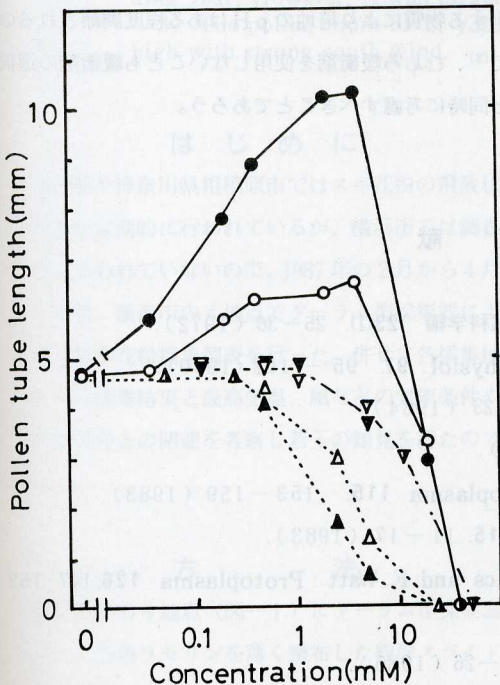
Abbreviations: ACES, N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid; ADA, N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid; BES, N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; Bicine, N,N-Bis-(2-hydroxyethyl) glycine; Bis-Tris, Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane; DIPSO, 3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl) amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid; EPPS, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid; HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HEPESO, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; MES, 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid; MOPS, 3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid; MOPSO, 3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid; PIPES Piperazine N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid); POPSO, Piperazine-N, N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid); TAPS, N-Tris-(hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulfonic acid; TAPSO, 3-[N-(Tris-hydroxymethyl) methylamino]-2-hydroxypropanesulfonic acid; TES, N-Tris(hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid; Tricine, Tris-(hydroxymethyl) methylglycine; Tris, Tris(hydroxymethyl) aminomethane.

Table 2. Effects of Good's buffer substances and related compounds with or without calcium on *Camellia japonica* pollen tube growth.

Compound	Pollen tube length, mm(%Control)				pH of medium
	Concentration, mM				
	0	0.5	1	5	
ADA	5.1 ± 0.4 (100)	3.2 ± 0.3 (63)	1.3 ± 0.3 (25)	0	7.0
ADA+ Ca	4.9 ± 0.5 (96)	8.0 ± 0.5 (157)	8.0 ± 0.5 (90)	1.5 ± 0.3 (29)	7.8
Bicine	5.1 ± 0.4 (100)	9.5 ± 0.5 (186)	7.7 ± 0.3 (151)	5.1 ± 0.3 (100)	7.8
Bicine + Ca	5.0 ± 0.5 (98)	12.1 ± 0.5 (237)	12.8 ± 0.4 (251)	10.7 ± 0.3 (210)	7.0
Bis-Tris	4.8 ± 0.4 (100)	6.5 ± 0.3 (135)	6.2 ± 0.4 (129)	4.2 ± 0.2 (88)	7.0
Bis-Tris + Ca	6.8 ± 0.3 (142)	11.7 ± 0.3 (244)	11.4 ± 0.4 (238)	8.3 ± 0.3 (173)	7.0
MES	4.4 ± 0.3 (100)	4.5 ± 0.3 (102)	4.5 ± 0.4 (102)	3.7 ± 0.3 (84)	7.0
MES + Ca	5.7 ± 0.4 (130)	9.8 ± 0.4 (223)	9.4 ± 0.2 (214)	8.5 ± 0.3 (193)	7.8
Tricine	5.5 ± 0.4 (100)	7.7 ± 0.6 (140)	6.8 ± 0.5 (124)	5.6 ± 0.4 (102)	7.8
Tricine + Ca	5.3 ± 0.5 (100)	11.5 ± 0.5 (209)	11.4 ± 0.3 (207)	9.1 ± 0.2 (165)	7.1
Acetamide	6.1 ± 0.3 (100)	6.2 ± 0.4 (102)	5.5 ± 0.4 (90)	6.2 ± 0.3 (102)	7.0
Acetamide + Ca	5.9 ± 0.3 (96)	6.3 ± 0.6 (103)	5.6 ± 0.5 (92)	6.2 ± 0.3 (102)	7.0
Molpholine	4.2 ± 0.2 (100)	4.1 ± 0.3 (102)	4.3 ± 0.2 (102)	4.4 ± 0.2 (105)*	7.0
Molpholine + Ca	5.7 ± 0.2 (136)	7.3 ± 0.4 (174)	8.2 ± 0.3 (195)	6.0 ± 0.4 (143)*	7.1
Piperazine	4.2 ± 0.2 (100)	3.9 ± 0.5 (93)	3.0 ± 0.2 (71)	2.0 ± 0.2 (48)*	7.1
Piperazine + Ca	6.1 ± 0.3 (145)	7.4 ± 0.3 (176)	7.4 ± 0.4 (176)	6.2 ± 0.2 (148)*	7.1

Pollen grains were incubated as in Table 1, but 2mM Ca(NO₃)₂ was added where indicated.

* Not 5mM but 3mM.

**Fig. 1.** Effects of cations on *Camellia japonica* pollen tube growth.

Pollen grains were incubated on the medium containing Ca(NO₃)₂ (○), MgCl₂ (△) or KNO₃ (▽) in the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of MES buffer (1mM, pH 7.0) for 24 hr at 25°C.

あった。しかし対照の値が低いとき(管伸長4~5mm)にはさらに高い値を示す傾向が見られ、図1にその例を示した。濃度0.2~4mMの範囲で促進効果がみられ、mM濃度では約140%の促進が、さらにMESが共存すると約220%の促進が見られた。Ca²⁺による促進作用の程度が変動する原因は不明であるが、保存花粉を用いた場合に大きな変動がみられ、採取直後の花粉(管伸長6~8mm)を用いた場合は促進効果が見られた場合でもその値は120%以下であった。

ツバキ以外の花粉に対する Good 緩衝剤の影響を表3に示した。スカシユリ花粉の管伸長はどの緩衝剤によっても著しく阻害され、5mM濃度では発芽も阻害された。テッポウユリ・チューリップ花粉の管伸長も同様に阻害された。リング花粉では有意の促進は見られなかったが、ユリ花粉のような著しい阻害も見られなかった。また、これら花粉ではCa²⁺が共存しても管伸長促進は見られなかった。

タウリン・モノエタノールアミン・ジエタノールアミン・グリシンアミド・アセトアミド・モルフォリン・ピペラジンは Good 緩衝剤と共通の化学構造をもつ。これらのツバキ花粉の成長に対する影響を調べたところ、タウリン・モノエタノールアミン・ジエタノール

Table 3. Effects of Good's buffer substances on lily and apple pollen tube growth.

Compound	Pollen tube length, % control				pH of medium
	Lily		Apple		
	0.5mM	3mM	1mM	3mM	
MES	87	29	77	77	7.0
MOPSO	59	20	57	38	7.0
HEPES	27	—	92	85	7.0
TAPSO	35	10	86	67	7.9
Tris	49	16	115	54	7.5

Pollen grains of *Lilium* hybrid cv. Enchantment and *Malus pumila* were incubated as in Table 1 but 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was added; the tube lengths in controls were 4.9 ± 0.6 and 2.1 ± 0.2 mm for lily and apple pollens, respectively.

ールアミンは促進効果を示し、グリシンアミドは pH 8 の時促進効果を示した (表 1)。アセトアミドは成長に影響せず、モルフォリン・ピペラジンは Ca^{2+} が共存する時促進効果を示した (表 2)。これらの物質と Good 緩衝剤の構造およびそれらの管伸長促進効果について比較してみると、炭素鎖の長い方が効果が強い傾向がみられ、促進効果を示すには SO_3H 基・ COOH 基は必要なく、N は必須であると考えられる。おそらく、アミンとして作用を示すものと思われる。また、Good 緩衝剤の化学的性質や管伸長作用の特異性は F

II 物質⁽³⁾と大変似ており、構造上においても F II 物質との共通性があるのかも知れない。

花粉の成長を調べる際、緩衝剤の使用についてはどの花粉に対しても影響のないものが望まれるけれどもユリ花粉の成長を阻害するなど Good 緩衝剤についてもその使用については注意が必要である。花粉から浸出する物質により培地の pH はある程度調節されるので⁽²⁾、むしろ緩衝剤を使用しないことも緩衝剤の選択と同時に考慮すべきことであろう。

引用文献

- (1) 岩波洋造・高梨征雄・中村紀雄：横浜市立大学論叢 自然科学編 23(1). 25—36 (1972).
- (2) A. Speranza and G. L. Calzoni : Z. Pflanzenphysiol. 97. 95—102 (1980).
- (3) 中村紀雄・碓井裕之・鈴木 恕：花粉誌 30(2). 17—23 (1984).
- (4) 今村寿明・斉藤幹彦：化学の領域 40. 79—91 (1976).
- (5) H. D. Reiss, W. Herth and E. Schnepf : Protoplasma 115. 153—159 (1983).
- (6) J. M. Picton and M. W. Steer : Protoplasma 115. 11—17 (1983).
- (7) H. D. Reiss, G. W. Grime, M. Q. Li, J. Takacs and F. Watt : Protoplasma 126. 147—152 (1985).
- (8) J. M. Picton and M. W. Steer : Planta 163. 20—26 (1985).

(受理日 1988年3月29日)