

## テッポウユリの小孢子母細胞および成熟花粉粒 の細胞壁多糖類

中村紀雄\*・中村澄夫\*\*・鈴木 恕\*\*\*

Cell Wall Polysaccharides of Microspore Mother Cells and Mature Pollen  
Grains of *Lilium longiflorum*

Norio NAKAMURA,\* Sumio NAKAMURA\*\*  
and Hiroshi SUZUKI\*\*\*

\* Department of Biology, Yokohama City University, Yokohama 236, Japan

\*\* Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238, Japan

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

Cell wall polysaccharides of microspore mother cells and mature pollen grains of *Lilium longiflorum* cv. Georgia were studied histochemically and chemically. The wall preparation from microspore mother cells (dyad-tetrad microspores), contaminated by a small amount of tapetal cells, was stained with aniline blue and lacmoid dyes and composed of ca. 60% glucose and 20% uronic acid, indicating that the main polysaccharide of microspore mother cell wall is callose. In contrast, the wall preparation from mature pollen grains was stained with ruthenium red but not lacmoid and composed mainly of uronic acid (50%); glucose content was only 5%. The grain wall preparation was fractionated into pectic substance, hemicellulose A, hemicellulose B and  $\alpha$ -cellulose fractions in yields, based on the mass computed from the total sugar content, of 27, 47, 8 and 18%, respectively. The uronic acid contents of the former three fractions were 66, 55 and 23%, respectively, while their glucose contents were 3, 4 and 19%, respectively. These results suggest that the mature pollen grain wall except the exine parts, is composed mainly of pectic substances and scarcely contains callose.

**Key Words:** Microspore mother cells, Mature pollen grain, Wall component, Callose, Pectic substances.

### 緒 言

被子植物の花粉管細胞壁の主成分は、どの種においてもカロースであることが組織化学的にまた化学的に明らかにされている<sup>(1)</sup>。カロースは小孢子母細胞壁（花粉二分子・四分子のカロース壁）にも見られ、小孢子が花粉粒へと成熟するにつれて分解されて見られなくなり<sup>(2)</sup>、成熟花粉壁には検出されない。このことは主に組織化学

と酵素分解による知見にもとづいている。ただこの場合カロースが検出されても他の成分との量的関係は不明であるので、それが壁成分のどの程度を占めるのかは明らかではない。これらの過程に関しての化学的知見としては花粉壁の単糖組成が知られているにすぎない<sup>(3,4)</sup>。我々は花粉におけるこのようなカロースの消長と関連した細胞壁成分の変化を明らかにするために

\* 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学生物学教室

\*\* 〒238 横須賀市稲岡町82 神奈川歯科大学生物学教室

\*\*\* 〒305 つくば市天王台 筑波大学生物科学系

ユリの花粉母細胞壁の多糖成分について組織化学的に調べるとともに化学的な分析を試み、さらに成熟花粉壁の多糖類を分画して、その構成成分について調べたので結果を報告する。

## 材料と方法

### 1. 小孢子母細胞壁の調製

テッポウユリ (*Lilium longiflorum* cv. Georgia) の蕾 (21~24cm) より葯を集め、その中央で二分し、切り口から葯の内容を押し出して小孢子母細胞 (MMC) 集団 (花粉二分子と四分子の集団、崩壊したタペータム組織の一部を含む) を集めた。

このMMC集団に 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、ガラスホモジナイザー管中で磨砕し、さらにフレンチプレス (1000~1400 kg/cm<sup>2</sup>) で破砕した。破砕物を遠心分離 (20000 × g, 0°C, 30分間) して沈澱を集めた。以後、MMC壁のアニン青による蛍光を指標として、この沈澱物に含まれる壁断片の存在を

確認しながら遠心分離 (20°C, 20分間) を繰り返し 3000~6500 × g, 200~3000 × g, 200 × g で得た沈澱をそれぞれ C-1, C-2, C-3 画分とした。

C-3 画分のみヨード反応もみられたので、この画分についてはさらにアミラーゼ消化を行った。すなわち C-3 画分に蒸留水を加え、沸騰水中に30~60分間保った後、冷却し、緩衝液 (pH 6.9) に溶かした唾液アミラーゼ (Sigma, Type IX-A, 100 units) を加えて反応 (3~4時間, 35°C) させた。ヨード反応でデンプンの消化を確認した後、遠心分離して沈澱を集め、さらに数回水で洗った沈澱をMMC壁標品とした。

### 2. 成熟花粉粒壁の調製

開葯後の成熟花粉を使用した。アセントおよびクロロホルム-メタノール混液で処理した花粉を水に懸濁し、フレンチプレス (1300~1500 kg/cm<sup>2</sup>, 2回) で破砕した。破砕物を遠心分離 (3000 × g, 25°C, 30分間) して、上清からは前報<sup>(6)</sup> に準じてトリクロロ酢酸

**Table 1.** Histochemical tests of cell wall samples from microspore mother cells and mature pollen grains of *Lilium longiflorum*

Sample *	Staining **						
	CW	AB	TB	RR	L	Zn-I	I
Microspore mother cell							
Fresh wall	+	+	+P	±	+	-	-
Tapetal cell wall	+	-	+P, B	+	-	-	+
C-1 fraction	+	+	+P, B	+	+	-	-
Hemicellulose fraction	+	+	+P	+	+	-	-
Cellulose fraction	+	+	+P		-	+	-
Mature pollen grain							
P-2 fraction	+	+	+P	-	-	-	+
Wall preparation	+	+	+P	+	-	-	-
Pectin fraction	+	±	+B	+	-	-	-
Hemicellulose A fraction	±	±	+P	+	-	-	-
Cellulose fraction	+	+	+P, B	+	-	-	-
References							
Starch ( $\alpha$ -1,4:1,6-glucan) ±		±	+B	±	-	-	+
Curdlan ( $\beta$ -1,3-glucan)	+	+	+P	-	+	-	-
Avicel ( $\beta$ -1,4-glucan)	+	+	+B	-	+	+	-

\* See Table 2.

\*\* Positive (+), negative (-) or doubtful (±) reaction to the reagents : CW, Calcoflour whight ; AB, Aniline blue ; TB, Toluidine blue (Purpule(P) or Blue (B) coloration) ; RR, Ruthenium red ; L, Lacmoid ; Zn-I, Zinc chloride-iodine ; I, Iodine-KI.

**Table 2.** Sugar content of cell wall samples from microspore mother cells and mature pollen grains of *Lilium longiflorum*

Sample*	Total sugar content(%)**	Neutral sugars (% total)	Uronic acids (% total)***
Microspore mother cell			
C-1 fraction	9.7	77.3	22.7
C-2 fraction	32.4	65.4	34.6
Wall preparation	28.8	81.6	18.4
Hemicellulose fraction	1.8	88.9	11.1
Cellulose fraction	4.9	93.9	6.1
Mature pollen grain			
P-1 fraction	42.9	62.4	37.5
P-2 fraction	73.6	94.0	6.0
Wall preparation	24.1	48.5	51.5
Pectin fraction	63.3	41.7	58.3
Hemicellulose A fraction	46.1	21.7	78.3
Hemicellulose B fraction	48.1	58.2	41.8
Cellulose fraction	7.6	96.1	3.9

\* Microspore mother cell (MMC) homogenate was fractionated by centrifugation into C-1 (3000~6500×g), C-2 (200~300×g) and C-3 (200×g) fractions. C-3 was treated with  $\alpha$ -amylase (MMC wall preparation) and fractionated into KOH-soluble (hemicellulose) and -insoluble (cellulose) fractions. Mature pollen grain (MPG) homogenate was fractionated into P-1 (water-soluble polysaccharides), P-2 (200×g supernatant) and P-3 (200×g pellet) fractions. P-3 was treated with  $\alpha$ -amylase (MPG wall preparation) and fractionated into pectin, hemicellulose A, hemicellulose B and cellulose (residue) fractions in yields by weight of 11.4, 27.0, 4.6 and 63.4%, respectively.

\*\* Total sugars as glucose determined by the phenol-sulfuric acid method<sup>(6)</sup>.

\*\*\* Determined by the carbazole-sulfuric acid method<sup>(7)</sup>.

**Table 3.** Sugar composition\* of cell wall fractions\*\* from microspore mother cells and mature pollen grains of *Lilium longiflorum*

Sugar	Amount, %total					
	MMC			MPG		
	C-1 fraction	C-2 fraction	Wall preparation	P-1 fraction	P-2 fraction	Wall preparation
Rhamnose	3.0	6.8	0.6	2.6	0.2	4.9
Fucose	1.3	0	0.8	1.9	0	1.7
Arabinose	5.6	10.0	1.7	24.7	1.2	15.4
Xylose	1.0	0.7	5.0	13.8	0.9	14.2
Mannose	2.7	1.3	9.5	1.1	0.4	2.0
Galactose	14.3	9.3	0	20.2	0	6.1
Glucose	44.7	41.2	62.6	13.5	94.2	5.1
Inositol	5.1	0	0	0	0	0
Uronic acid	22.3	30.6	19.9	22.2	3.1	50.5
Sample weight, mg	15.7	4.7	2.3	4.6	2.8	4.8
Sugar content, %	6.0	31.6	27.8	32.0	73.8	13.6

\* Analyzed by acid hydrolysis followed by reduction and acetylation and gas-liquid chromatography<sup>(5)</sup>

\*\* See Table 2.

**Table 4.** Sugar composition\* of cell wall fractions\*\* from mature pollen grains of *Lilium longiflorum*

Sugar	Amount, % total			
	Pectin fraction	Hemicellulose A fraction	Hemicellulose B fraction	Cellulose fraction
Rhamnose	4.5	5.3	7.0	14.7
Fucose	1.6	0	3.5	3.9
Arabinose	11.1	5.2	21.8	29.4
Xylose	9.3	26.6	12.8	14.7
Mannose	0.5	1.5	0.7	2.9
Galactose	4.4	2.5	13.0	8.8
Glucose	2.5	4.1	18.6	25.5
Uronic acid	66.1	54.9	22.6	0
Sample weight, mg	3.5	4.5	3.4	6.4
Sugar content, %	36.4	28.5	37.1	1.6

\* See Table 3.

\*\* See Table 2.

処理とアルコール沈澱により水溶性多糖を得た (P-1 画分)。沈澱には水を加え遠心分離を行い、その上清にアンスロン反応がみられなくなるまで操作を繰り返した。こうして得られた沈澱についてさらに遠心分離 (200 × g) を行い、上清を凍結乾燥したものを P-2 画分、沈澱を P-3 画分とした。P-3 画分にはヨード反応がみられたので、さらに前述同様の方法でアマラーゼ消化を行い成熟花粉粒細胞 (MPG) 壁標品を得た。

### 3. 細胞壁多糖類の分画

MMC 壁標品を 24% 水酸化カリウムで抽出 (24 時間、室温)、遠心分離 (11000 × g, 25°C, 20 分間) し、沈澱をセルロース画分、上清に 4 倍のエタノールを加えて得た沈澱をヘミセルロース画分とした。いずれの画分も 75% エタノールによって洗浄後、凍結乾燥した。

MPG 壁成分の分画は前報<sup>(5)</sup>に準じて行い、MPG 壁標品により 0.5% 蓚酸アンモニウム (pH 4.0) 抽出によるペクチン物質画分、24% 水酸化カリウム抽出によるヘミセルロース A (HA) 画分とヘミセルロース B (HB) 画分、残渣であるセルロース画分 (外壁部分も含まれている) を得た。

### 4. 糖と蛋白質の定量分析

壁多糖類の加水分解・中性糖のガスクロマトグラフィ

ーによる分析は前報<sup>(5)</sup>に準じて行った。糖量はフェノール硫酸法<sup>(6)</sup>で、ウロン酸量はカルバゾール硫酸法<sup>(7)</sup>で測定した。また蛋白質量は Itzhaki-Gill のミクロビューレット法<sup>(8)</sup>で求めた。

### 5. 多糖類の組織化学試薬に対する反応

多糖類の顕微鏡検出には以下の色素液を用い、アニリン青とカルコフロア白による反応は蛍光顕微鏡で観察した。β-1, 3-グルカン: 0.5% ラクモイド-50% エタノール液、0.01% アニリン青 (pH 10) 液および 0.05% トルイジン青-1% ホウ酸ナトリウム液、β-グルカン: 0.01% カルコフロア白 M2R New 液、ペクチン: 0.01% ルテニウム赤液、セルロース: 19% 塩化亜鉛-1.2% ヨウ素-6% ヨウ化カリウム液、デンプン: 1% ヨウ素-0.3% ヨウ化カリウム液。

## 結 果

### 1. 細胞壁成分

表 1 に示すように、薬より取り出したままの MMC の壁 (カロス壁) はアニリン青で直ちに染色されて蛍光を放ち、ラクモイドにより青色に染色された。トルイジン青では MMC 細胞質がすぐ染まり、壁はしばらく時間がたってから紫色に染色され、染まらないものも見られた。混入するタペータム組織はアニリン青

やラクモイドでは染色されず、トルイジン青では部分により紫色と青色に染色された。MMC 細胞質はルテニウム赤で直ちに赤く染まったが、壁の染色は明確ではなかった。壁標品の調製に際してMMC 壁はMPG 壁に比べて容易に破碎された。MMC壁画分の収量はMMC集団の生重量に対してC-1画分(凍結乾燥標品重量として)約1%、C-2画分0.2%、MMC壁標品0.4%と非常に僅かであった。集め得たMMCの重量が僅かであったので、混入しているタペータム細胞壁を除くための特別の操作は行わず、遠心分離による分画とアニリン青染色によるMMC壁断片の存在の確認を行うことでC-1~C-3画分を回収した。したがって各画分にはタペータム細胞由来の成分が混入していると考えられるが、染色性の違いと壁断片の形からMMC壁とタペータム細胞壁の区別は容易で、その観察からはデンプン粒を除去したC-3画分にはタペータム細胞由来の壁成分の混入は少ない。C-1画分はアニリン青蛍光をもつ微小粒子が含まれており、これはカロース壁の断片と思われる。またこの画分はルテニウム赤でも染色された。MMC壁のルテニウム染色が明確でなかったのに対して、MMC壁標品からアルカリ抽出で分画されたMMCヘミセルロース画分はルテニウム赤で染色される部分がみられた。セルロース画分はアニリン青蛍光は見られたが、ラクモイドとルテニウム赤では染色されなかった。

MPG壁から分画されたP-1とP-2画分の収量はアセトン処理花粉の乾重量に対してそれぞれ0.3、0.1%であり、MPG壁標品は9%であった。MPG壁標品はカルコフロア白やアニリン青染色で蛍光が見られ、トルイジン青で紫色に染まり、ラクモイドでは染色されず、ルテニウム赤で強く染色された。MPG壁からのペクチン・HA・HB・ $\alpha$ -セルロース画分の収量はそれぞれ11.4・27.0・4.6・63.4%であった(セルロース画分には外壁部分が含まれている)。どの画分もルテニウム赤で染まり、ラクモイドでは染色されなかった。ペクチンとHA画分はアニリン青の蛍光が弱く、とくにHAはカルコフロア白の蛍光も弱

かった。

## 2. 細胞壁画分の糖成分

MMC壁画分の糖含量を表2に示す。C-1画分では約10%と少なく、C-2画分とMMC壁標品は約30%であった。そして糖の70~80%が中性糖であった。蛋白質はC-1・C-2・MMC壁標品それぞれ4.0・14.0・29.5%であった。C-1画分は糖と蛋白質以外の成分が多い。またMMC壁標品をヘミセルロースとセルロースに分画することを試みたが、回収された各画分の糖含量は非常に低く十分な分画は行えなかった。

MMC壁画分の糖組成を表3に示した。どの標品も主成分はグルコースであり、ウロン酸は20~30%であった。C-1画分でのみオイノシトールが検出されたが、それは壁成分ではないと考えられる<sup>(9)</sup>。一般に花粉粒壁成分ではウロン酸が検出されるとアラビノースとガラクトースの割合が高く検出されるが<sup>(3,4,10)</sup>、MMC壁標品の場合はガラクトースが検出されず、アラビノース量も僅かであった。

MPG壁は破碎されにくく、また得られた各画分は加水分解を受けにくく、MMC壁成分の場合に比べて各標品の加水分解後の糖回収率は60~80%と低かった(表2,3)。MPG壁画分の糖含量を表2に示した。MPG壁標品、そのペクチン画分とHA画分では50%以上がウロン酸であり、MMC壁では中性糖が主であったのとは異なっていた。P-1画分の単糖組成はアラビノース・ガラクトース・ウロン酸が主成分であり(表3)、蛋白質量は32%であった。この画分の糖組成はHB画分とよく似ており、HB画分の蛋白質量は52.7%であった。ツバキ花粉粒の場合<sup>(4)</sup>も同様であり水溶性多糖として抽出される成分はHB画分と密接な関係があるのかも知れない。P-2画分はC-2画分に対応する画分であるが、殆どがグルコースであった。しかしこの画分はヨード反応を示し、デンプンの混入が考えられる。収量が少ないのでそれ以上の精製は行わなかった。MPG壁標品の主成分はウロン酸であり、

グルコースは僅かであった。収量と糖含量から求めたMPG壁各画分の糖量はペクチン・HA・HB・セルロース画分それぞれ壁総糖量に対して27・47・8・18%であった。

MPG壁を分画した各標品の糖組成を表4に示した。ペクチン画分はウロン酸が主成分であり、糖以外は蛋白質であった。HA画分もウロン酸が主成分であり、グルコースは4%にすぎず、蛋白質も約3%であった。セルロース画分は加水分解されにくく、また外壁成分が殆どであるので加水分解した後回収された糖は2%に過ぎず、主成分はアラビノースとグルコースであった。

## 考 察

カロース ( $\beta$ -1,3-グルカン)はアニリン青に染まるが、アニリン青で染まるものがカロースとはかぎらない。多糖類の組織化学の不充分な点は染色特异性が高くないことである。そこでこの実験では組織化学の知見を化学的分析結果と対応させることにより、壁成分について検討した。

カロースの検出にはアニリン青・ラクモイド・トルイジン青色素を用いた。これら色素の壁標品に対する反応は一致しない部分もみられたが、デンブン・カードラン・アビセル粉末に対しての反応は一致しており(表2)、ラクモイドの染色がみられた標品に対してはアニリン青・トルイジン青とも染色した。そしてこれら色素の反応がみられた標品の主成分はいずれもグルコースであった。またこのグルコースはトリフルオロ酢酸分解により生じたものであり、セルロース由来

のものは少ないと考えられる<sup>(11)</sup>。したがってMMC壁は主成分のカロースと少量のペクチン物質と蛋白質から構成されていると考えられる。電顕による観察からは、小孢子母細胞(四分子)の内側の壁(細胞板由来)は二層成分に区別され、この時期にルテニウム赤で染色すると中層のみが強い染色性を示し、外層が主にカロース(ほとんど無構造)で中層はペクチン物質(繊維構造)から出来ていることが推定されている<sup>(12)</sup>。セルロース画分にセルロースの染色反応がみられたが、化学的には確認できなかった。

これに対してMPG壁に関してはどの画分についても、ラクモイド反応がみられず、グルコース量も僅かであった。またルテニウム赤に強く染まりウロン酸が多く検出された。カロースが存在するとすれば主にHA画分に抽出されるが<sup>(5)</sup>、この画分のグルコース量は非常に僅かであった。HA画分の総糖量はMPG壁総糖量の約半分を占めるがその主成分はウロン酸であり、このことからMPG内壁の主成分はペクチン物質であり、カロースは存在したとしてもごく微量であると考えられる。セルロースについてもカロースと同様であろう。

以上の分析の結果は、花粉小孢子壁に存在するカロースはそれが花粉粒へと成熟する過程で分解を受け、成熟花粉粒には殆ど存在しないという従来の知見を確実にするものである。そして花粉成熟過程ではスポロポレニンによる花粉外壁の形成と並行してペクチン物質と少量のヘミセルロースおよび蛋白質からなる内壁成分が合成されると考えられる。

## 引 用 文 献

- (1) 中村 紀雄: 横浜市立大学論 自然科学編 38(2), 181-195 (1988)
- (2) Stanley R. G. and H. F. Linskens: Pollen pp. 13-23. Springer-Verlag, Berlin, 1974.
- (3) Nakamura N. and H. Suzuki: Phytochemistry 20, 981-984 (1981).
- (4) 中村 紀雄: 花粉誌 26, 33-37 (1980).
- (5) Nakamura N., K. Yoshida and H. Suzuki: Plant and Cell Physiol. 21, 1383-1390 (1980).

- (6) Dubois M. , K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers and F. Smith : Anal. Chem. **28**. 350 — 356 (1956).
- (7) Galambos J. T. : Anal. Biochem. **19**. 119 — 132 (1967).
- (8) Itzhaki R. F. and D. M. Gill : Anal. Biochem. **9**. 401 — 410 (1964).
- (9) 中村 紀雄、鈴木 恕 : 花粉誌 **29**. 33—38 (1983).
- (10) Kochibe N. , Y. Kamiya and S. Hagiwara : Sci. Reports Fac. Edcat. Gunma Univ. **30**. 25—29 (1981).
- (11) Mankarios. A.T., C. F. G. Jones, M. C. Jarvis, D. R. Threlfall and J. Friend : Phytochemistry **18**. 419 — 422 (1979).
- (12) Nakamura S. and H. Miki—Hirosige : J. Ultrastruct. Res. **80**. 302 — 311 (1982).

(受理日 1988年9月27日)

