

クロマツ花粉の β -グルコシダーゼ

船隈 透・藤垣善昭・原 彰

名城大学農学部生物化学研究室

〒468 名古屋市天白区塩釜口一丁目501番地

(1992年4月21日受理)

 β -Glucosidase from Pollen of *Pinus thunbergii*

Toru FUNAGUMA, Yoshiaki FUZIGAKI and Akira HARA

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of
Agriculture, Meijo University, Tempaku-ku,
Nagoya 468, Japan

β -Glucosidase from pollen grains of *Pinus thunbergii* was detected in both soluble and insoluble fractions. The activity of soluble enzyme was about 2 times higher than that of insoluble enzyme and was kept at a significantly high level during culture of the pollen on an agar medium with or without sucrose. The soluble enzyme was purified to homogeneity as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 76,000. It had an optimum pH of 5.0 and optimum temperature at 50°C. pH- and thermo-stabilities were observed at 6.0-11.0 and below 40°C, respectively. It showed the highest activity for *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (PNPG) and was also fairly active on laminarin and laminaribiose among the substrates tested. The activity for salicin, gentiobiose or cellobiose was lower. Glycerol of 0.1M increased the activity for PNPG by 100% and reduced the activity for laminarin by 50%. The K_m values for PNPG, laminaribiose and laminarin were 0.5mM, 0.4mM and 0.07%, respectively. It acted on laminaribiose to produce transfer products.

Key words: β -Glucosidase from pollen, *Pinus thunbergii*, Pollen germination.

緒 言

植物の雄性配偶体である花粉は、一般に柱頭あるいは寒天培地上に置くと直ちに吸水して発芽し、花粉管を急速に伸長させていく。このダイナミックな形態的变化が短時間に遂行されるためには、エネルギー代謝および花粉管壁合成等が活発に行われる必要がある。

ガマ (*Typha latifolia*) 花粉では、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ⁽¹⁾、UDP-グルクロン酸ピロホスホリラーゼ⁽²⁾、無機ピロホスファターゼ⁽³⁾、フィターゼ⁽⁴⁾、ホスホリラーゼ⁽⁵⁾ およびピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ⁽⁶⁾ の性質等が明らかにされ、発芽および花粉管伸長時の糖代謝に関連する酵素群とそれらの役割についての知見が集積しつつある。それに

対してクロマツ (*Pinus thunbergii* P.) 花粉の発芽および花粉管伸長についての生化学的研究はあまりなされていない。

著者は、クロマツ花粉で β -グルコシダーゼ活性とラミナリン分解活性が他の花粉に比べてかなり高いことを見出した。本論文では、クロマツ花粉の β -グルコシダーゼの精製とその諸性質について述べる。

実験材料および方法

1. 花粉

クロマツ (*P. thunbergii* P.) の花粉は、1991年名古屋市の大高緑地公園において雄花を採取し、室温に5日間放置して遊離してきた花粉を集め、 -20°C に保存した。

2. 試薬類

p -ニトロフェニル β -D-グルコピラノシド (PNPG) とラミナリンは東京化成工業社、カルボキシメチルセルロース (CMC) は和光純薬工業社、サリシン、セロビオースおよびゲンチオビオースはナカライテスク社、アビセル SF セルロース (アビセル) は旭化成工業社、そしてラミナリビオースは Sigma 社から購入した。また CM Bio-Gel A と Bio-Gel HT は Bio-Rad 社製、PBE94、ポリバッファー (94と74) および分子量測定用マーカーは Pharmacia 社製、セルロファイン GCL-1000 sf は生化学工業社製そしてグルコースオキシダーゼ (107単位/mg) とパーオキシダーゼ (252単位/mg) は東洋紡社製を使用した。

3. クロマツ花粉の培養および粗酵素液 (可溶性画分と不溶性画分の酵素液) の調製

直径20cmのシャーレにクロラムフェニコールとマイコスタチン各50 ppm を含む3%寒天培地と3%シュクロースを含む同培地とを調製し、それぞれに500mgの花粉を一様にまき、 30°C で静置培養を行った。経日的に花粉を集めて10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 10mlにけん濁し、テフロンガラスホモジナイザーで破碎 (2000 rpm, 10 min) した後、遠心分離 (12,000 \times g, 10 min) を行った。得られた上清を可溶性画分の酵素液とした。また沈殿は10mlの同緩衝液にけん濁し、同緩衝液に対して十分に透析した後、遠心分離 (12,000 \times g, 10 min) を行った。得られた沈殿を10mlの同緩衝液にけん濁したものを不溶性画分の酵素液とした。

4. β -グルコシダーゼの活性測定

4 mM PNPG 0.5ml および 50 mM クエン酸-

0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 0.48ml を 37°C に 3 分間保温した後、適当に希釈した酵素液 20 μ l を加え、同温度で反応を開始させた。10分後、0.1 M NaOH 1.5ml を加えて反応を停止させ、遊離した p -ニトロフェノールを 400 nm の吸光度で測定した。酵素の 1 単位は上記条件下において 1 分間に 1 μ mol の p -ニトロフェノールを遊離させるのに必要な酵素量として定義した。この方法を β -グルコシダーゼ測定の標準法とした。

また場合によっては酵素反応で生じた還元糖を Somogyi-Nelson 法⁽⁷⁾またはグルコースオキシダーゼ法⁽⁸⁾によって測定した。この時の酵素の 1 単位は反応条件下において 1 分間に 1 μ mol (二糖類使用の場合には 2 μ mol) のグルコースを与えるのに必要な酵素量として定義した。

5. タンパク質の測定

タンパク質量は、牛血清の γ -グロブリンを標準タンパク質として使用し、Bradford⁽⁹⁾の方法によって測定した。またクロマトグラムでは、280nmにおける吸光度で示した。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法⁽¹⁰⁾に準じて行った。0.1% SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドディスクゲル (0.5 \times 7 cm) を用い、0.1% SDS を含む 50 mM トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) 中で 2 mA/カラムの通電を約 2 時間行った。試料は 2% SDS と 20 mM 2-メルカプトエタノールを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8, A液) に溶かし、加熱処理を行わずに使用した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質はクーマシーブリリアントブルー R で染色し、過剰の色素は 20% メタノールを含む 7.5% 酢酸で除去した。また分子量測定のための SDS-PAGE には 12.5% のポリアクリルアミドスラブゲル (11.5 \times 13.7 cm) を用い、15 mA の通電を約 5 時間行った。試料はあらかじめ A液に溶かし、 100°C で 5 分間加熱した後、使用した。

7. 薄層クロマトグラフィー

試料をシリカゲル 60F₂₅₄ 薄層に塗布し、 n -ブタノール-酢酸- H_2O (3 : 1 : 1, v/v) の溶媒を用いて 2 回展開を行った。それを乾燥させた後、10% H_2SO_4 を噴霧し、 120°C で加熱し、糖を検出した。

8. β -グルコシダーゼの精製

ここでの操作は $0-8^{\circ}\text{C}$ で行った。

クロマツ花粉 50 g を 10 mM トリス-塩酸緩衝液

(pH 7.5) 1800mlにけん濁し、DYNO-MILL (Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik 社製) で破碎した後、遠心分離 (7000 \times g, 10 min) を行い、上清 (1600ml) は同緩衝液に対して透析した。得られた内液には40%飽和になるまで固形硫酸を加え、1時間かくはんした後、遠心分離 (7000 \times g, 10 min) を行った。上清には固形硫酸をさらに70%飽和になるまで加え、1時間かくはんした後、遠心分離 (7000 \times g, 10 min) を行った。沈殿を同緩衝液に溶かした後、同緩衝液に対して透析を行った。得られた内液 (180ml) を50mM クエン酸-0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に対して十分に透析を行い、生じた沈殿は遠心分離 (12,000 \times g, 10 min) を行って除いた。上清は同緩衝液によって平衡化した CM Bio-Gel A のカラム (3.2 \times 3.5cm) にアプライし、同緩衝液300 ml でカラムを洗浄した後、同緩衝液300ml と0.6M NaCl を含む同緩衝液300ml で構成される NaCl の直線的濃度勾配法でタンパク質の溶出を行った。その結果、酵素は NaCl 濃度0.14M 付近に溶出された。活性の認められた画分を集め、25mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 8.3) に対して透析した後、内液 (79ml) を凍結乾燥機により約8 ml に濃縮した。これを再び同緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化した PBE 94 カラム (1 \times 30cm) にアプライし、ポリバッファ-96と74の3 : 7の混合液 (pH 5.0) 300ml を流した。その結果、酵素はpH 8.0-7.5でほとんどが溶出された。活性画分を集め、10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) に対して透析した後、内液 (8 ml) を同緩衝液で平衡化した Bio-Gel HT カラム (2 \times 5 cm) に吸着させた。カラムを同緩衝液50ml で洗浄した後、同緩衝液100ml と0.3M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 100ml とで構成されるリン酸の直線的濃度勾配をかけた。その結果、酵素はリン酸濃度0.2M 付近に溶出された。活性画分を集め、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、内液 (53ml) を凍結乾燥機で約3 ml に濃縮した後、それを50mM NaCl を含む同緩衝液で平衡化したセルロフィン GCL-1000 sf カラム (2 \times 90cm) にアプライし、ゲルろ過を行った。得られた活性画分を集め、それを酵素標品とした。この標品は場合によっては凍結乾燥機で濃縮して使用した。

結 果

1. 花粉の培養に伴う β -グルコシダーゼの活性変動

クロマツ花粉の培養に伴う β -グルコシダーゼの活性変動を調べた。Fig. 1 に示すように、本酵素の活性は可溶性と不溶性のどちらの画分にも見出され、その値は成熟花粉ではほぼ2 : 1の割合であった。可溶性画分の活性は、シュクロース添加培地で培養すると、培養1-3日目に約15%上昇し、その後は減少した。またシュクロース無添加培地では、培養1日目以降活性の上昇が見られた。このように活性は少しの変動は見られたものの培養前の高いレベルをほぼ維持した。一方不溶性画分の活性はシュクロース無添加の培地では、培養1日目ですぐに上昇し、その後は減少したが、5日目でも培養前の約80%であった。しかし、シュクロース添加の培地では、これまでとは異なって培養に伴って低下し続け、5日目には約30%にまで落ち込んだ。同様に培養に伴うラミナリンの分解活性も調べたところ、 β -グルコシダーゼと極めてよく似た挙動を示した。なお不溶性画分を0.8M NaCl を含む10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に4 $^{\circ}$ Cで18時間放置すると、約60%の活性が可溶化した。

2. β -グルコシダーゼの精製

β -グルコシダーゼは、クロマツの成熟花粉から約50倍に精製され、収率は0.3%であった。精製過程の概略を Table 1 に示す。酵素標品を濃縮した後、加熱処理を行わずに SDS-PAGE を行った結果、Fig. 2 に示すようにタンパク質のバンドは1本だけであった。また精製過程を通じてラミナリンの分解活性は、 β -グルコシダーゼのそれと同じ挙動を示した。

3. 酵素の分子量

酵素標品を加熱処理した後、SDS-PAGE を行い、その分子量を推定した。Fig. 3 から、本酵素の分子量は76,000と算出された。

4. 酵素の諸性質

本酵素の諸性質を調べた。Fig. 4 に示すように至適 pH は5.0付近にあり、至適作用温度は50 $^{\circ}$ Cであった。pH 安定性は、測定した領域 (pH 3.0-11.0) のうち、6.0-11.0で認められたが、酸性域のpH 5.0では約60%、pH 3.0では約90%も活性が減少した。熱安定性は40 $^{\circ}$ Cまで認められた。しかし50 $^{\circ}$ Cでは約25%、60 $^{\circ}$ Cではほとんど活性を失った。

また Table 2 に示すように、本酵素の活性は2価

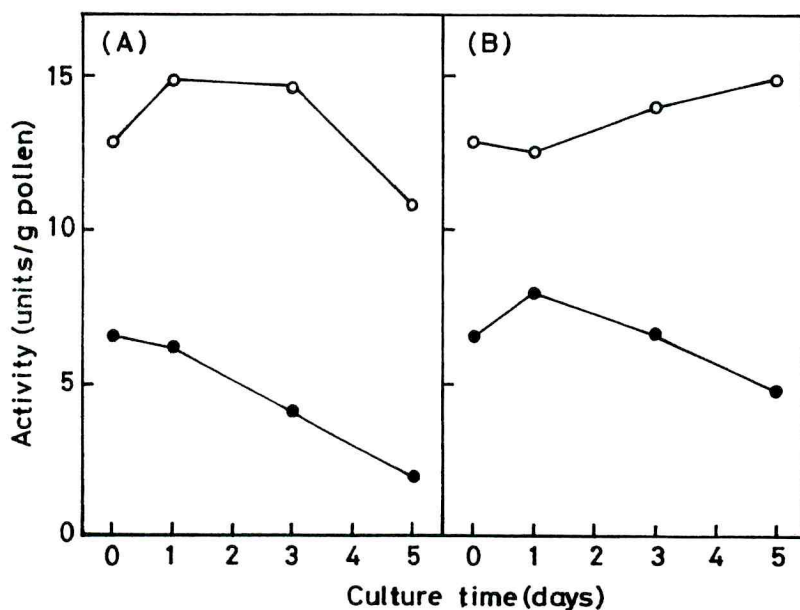


Fig. 1. Changes in β -glucosidase activity of soluble and insoluble fractions obtained from *Pinus* pollen cultured on an agar medium with or without sucrose. Five hundred mg of *Pinus* pollen grains were cultured on 3% agar medium with or without 3% sucrose at 30°C for the indicated times, harvested in 10 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and disintegrated for 10 min with a teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 12,000 \times g for 10 min. The supernatant was used as soluble fraction. The precipitate was suspended in 10 ml of the buffer, dialyzed thoroughly against the buffer and centrifuged at 12,000 \times g for 10 min. The precipitate was suspended in 10 ml of the buffer and its suspension was used as insoluble fraction. (A), medium with sucrose; (B), medium without sucrose; (O), activity of soluble type; (●), activity of insoluble type.

Table 1. Summary of purification of β -glucosidase

Step	Vol. (ml)	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	1600	3740	192	0.0513	100
Ammonium sulfate fractionation	180	1310	62.1	0.0474	32.3
CM Bio-Gel A	79.0	20.9	19.8	0.947	10.3
PBE 94	8.00	1.61	12.1	7.52	6.30
Bio-Gel HT	53.0	0.339	4.93	14.5	2.60
Cellulofine GCL-1000 sf	14.8	0.024	0.642	26.8	0.334

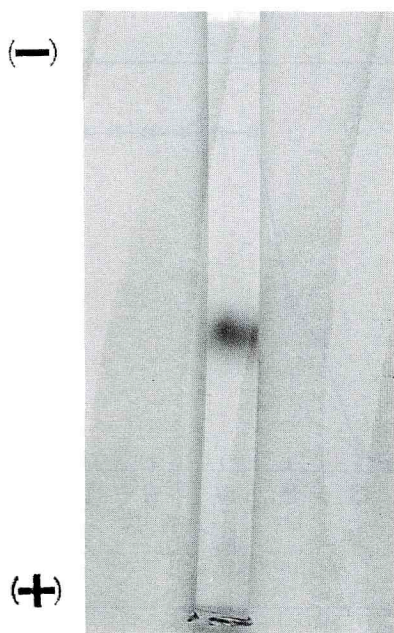


Fig. 2. SDS-PAGE of the purified enzyme.

The purified enzyme was concentrated. Then 10 μ g of the enzyme was added to a solution of 50 μ l containing 2% SDS, 0.5 μ mol of phosphate (pH6.8), 1 μ mol of 2-mercaptoethanol and 15% sucrose, and put on a 7.5% polyacrylamide disc gel containing 0.1% SDS. Electrophoresis was done with a current of 2mA/gel for 2hr in 50mM Tris-glycine (pH8.3) containing 0.1% SDS. After electrophoresis, protein was stained with Coomassie brilliant blue R.

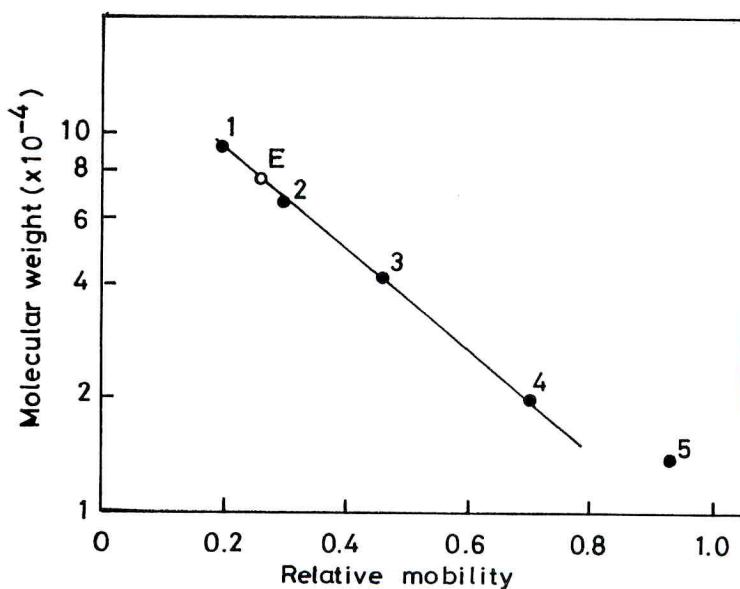


Fig. 3. Estimation of molecular weight of the purified enzyme. The enzyme of 10 μ g was added to the same solution as described in Fig.2, boiled for 5min, put on a 12.5% polyacrylamide slab gel and electrophoresed with a current of 15mA for 5hr. After electrophoresis, protein was stained and the molecular weight was estimated. The standard proteins used were phosphorylase b (1, mol. wt. 94,000), bovine serum albumin (2, mol. wt. 67,000), ovalbumin (3, mol. wt. 43,000), soybean trypsin (4, mol. wt. 20,100) and α -lactalbumin (5, mol. wt. 14,400). E, the purified enzyme.

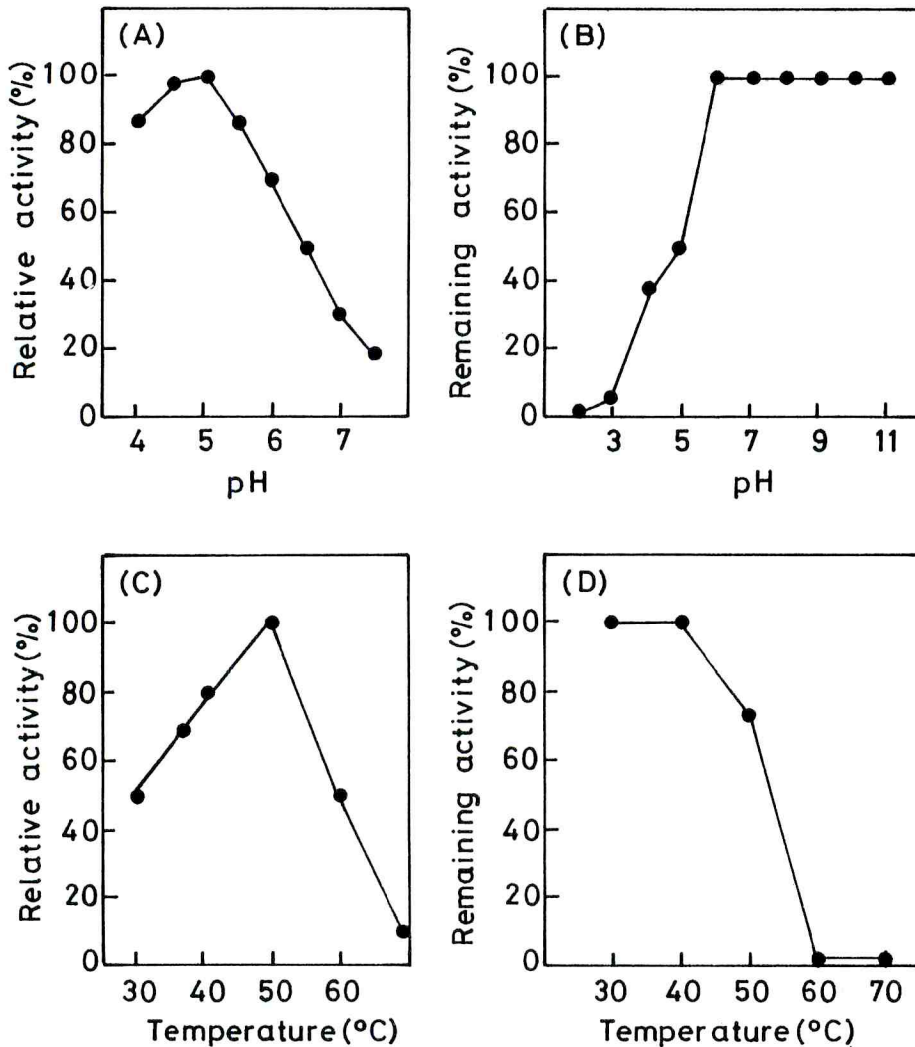


Fig. 4. Effects of pH and temperature on the enzyme activity. (A), Effects of pH on activity. Activity was measured under the standard assay conditions except for the buffers at indicated pHs. Buffers used were 50mM citric acid-0.1M sodium phosphatase. (B), Effects of pH on stability. Enzyme was kept in some buffers at 4°C for 24hr and the remaining activity was measured under the standard assay conditions. Buffers used for keeping the enzyme were 50mM citric acid-0.1M sodium phosphate (pH 2.5-8.0) and 50mM boric acid · KCl-50mM sodium carbonate (pH 8.0-11.0). (C), Effects of temperature on activity. Activity was measured under the standard assay conditions except for the reaction temperature indicated. (D), Effect of temperature on stability. Enzyme was incubated at various temperatures at pH5.0 for 10min and rapidly cooled in an ice-bath. Then the remaining activity was measured under the standard assay conditions.

Table 2. Effect of reagents on β -glucosidase activity

Reagents (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
ZnCl ₂	105
CaCl ₂	104
MgCl ₂	104
CuSO ₄	103
KCl*	102
NaCl*	102
Glycerol*	192

* Reagents of 0.1 M were added.

Table 3. Substrate specificity of β -glucosidase

Substrate	Relative activity (%)
PNPG ¹	100
Salicin ²	6.8
Laminaribiose ³	14.9
Gentiobiose ⁴	9.0
Cellobiose ⁵	8.0
Laminarin ⁶	20.7
Avicel ⁷	0.7
CMC ⁸	0.6

Substrate was used at 2 mM for 1-5 and 0.4% for 6-8. Activity was measured by the glucose oxidase method.

金属イオン, KCl および NaCl の影響をほとんど受けなかったが, グリセロールの存在下で約2倍に上昇した.

5. 酵素の作用特性

本酵素の基質に対する作用特性を調べた. Table 3 に示すように本酵素は PNPNG を最もよく分解し, 続いてラミナリンおよびラミナリビオースに対して高い活性を示した. その他ゲンチオビース, セロビオースおよびサリシンも分解した. しかしアビセルと CMC に対してはほとんど作用しなかった. ラミナリンの分解活性は0.1Mグリセロールで約50%阻害された. また PNPNG, ラミナリビオースおよびラミナリンに対する本酵素の*K_m*値はそれぞれ0.5mM, 0.4 mMおよび0.07%であった. 次に, 本酵素をラミナリビオースとラミナリンに作用させた後, その分解物を薄層クロマトグラフィーによって調べた. Fig. 5 に示すようにラミナリビオースは5時間反応でほぼ完全に分解された. しかし産物はグルコースだけでなく, これらより移動度の小さいところに本酵素の転移反応でできたと思われるスポットがいくつか見出された. またラミナリンの分解物は2時間反応では, グルコースとラミナリビオースの他にトリオース以上の糖が検出されたが, 5時間反応ではさらに種々の大きさの糖が生産されることが分かった.

考 察

β -グルコシダーゼは植物体に広く分布しており, セルロース代謝への関与の他, タバコではカビに対する自己防御を担っていると言われている⁽¹¹⁾. またエジプト豆では本酵素はリグニン形成に関与しているとされている⁽¹²⁾. さらに Rosenfield らは西洋ナンシ花粉中の β -グルコシダーゼを阻害すると花粉管の伸長が抑制されることから, この酵素は花粉管の伸長に重要な働きをしていると述べている⁽¹³⁾.

クロマツの成熟花粉にはかなりの量の β -グルコシダーゼが存在した. しかもそれは可溶性と不溶性の2つの型でほぼ2:1の割合で存在し, 不溶性の酵素はNaClで可溶化することが分かった. このことは本酵素が花粉の不溶性部分にイオン結合的に結合していることを示唆している. 原らはソテツ花粉の不溶性のインベルターゼがNaClで可溶化し, 精製していくにつれて不安定化するが, ペクチン質を与えると複合体をつくって安定化することなどから, この酵素はイオン結合で細胞壁に結合していると述べている^(14,15). またキュウリ⁽¹⁶⁾やトウモロコシ⁽¹⁷⁾の β -グルコシダーゼは細胞壁に存在することが報告されている.

クロマツの成熟花粉はシュクロースの添加および無添加の寒天培地上に置くと約1日で発芽し, それから徐々に花粉管を伸長させていく. その際可溶性型の β -グルコシダーゼの活性は, 培地中のシュクロースの有無にかかわらず, あまり大きい変化は観察されな

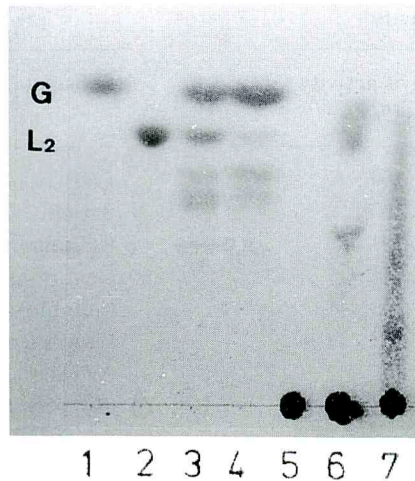


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of the product from laminaribiose and laminarin by the enzyme. The reaction mixture of 90 μ l contained 4.5 μ mol of citric acid-9 μ mol of sodium phosphate (pH 5.0), substrate (2.2mM laminaribiose or 1% laminarin) and 0.017 unit of the concentrated enzyme. Incubation of each reaction mixture was done at 37°C. Samples of 20 μ l were taken at indicated times, boiled for 3min, spotted on a Silica gel 60 F₂₅₄ plate and developed with *n*-butanol-acetic acid-water (3:1:1, v/v). Sugar was detected by heating at 120°C after spraying with 10% H₂SO₄ on the plate. G, position of glucose; L₂, position of laminaribiose; 1, glucose (standard) ; 2, laminaribiose (standard) ; 3, product from laminaribiose incubated with enzyme for 2 hr; 4, product from laminaribiose incubated with enzyme for 5 hr; 5, laminarin; 6, product from laminarin incubated with enzyme for 2 hr.; 7, product from laminarin incubated with enzyme for 5 hr.

かった。それに対して不溶性型酵素の活性は成熟花粉で可溶性型の約半分であり、しかもシュクロース添加培地で培養すると著しく減少した。従って可溶性型の酵素の方が、花粉の発芽および花粉管伸長時のエネルギー補給あるいは花粉管壁の多糖合成の基質の提供等において積極的な役割を果たしているように思われる。そこで本酵素を精製し、性質の検討を行った。その結果、クロマツ花粉の可溶性の酵素は均一に精製され、分子量は SDS-PAGE の結果から76,000と推定された。これはパパイヤの酵素 (54,000, 67,000)⁽¹⁸⁾よりも大きかったが、*Penicillium herquei* series, *Aspergillus aculeatus* および *Mucor miehei* 酵素 (122,000-250,000)⁽¹⁹⁻²¹⁾よりも小さかった。本酵素活性は金属イオンによる影響をほとんど受けなかったが、基質によってグリセロールの効果が異なっていた。即ちグリセロールは β -グルコシダーゼ活性を約100%上昇させるが、ラミナリン分解活性を約50%阻害した。1つの酵素が基質を違えるとどうしてこのような差が

生じるかについては興味のあるところである。また本酵素は PNPG を最もよく分解し、その他ラミナリンのような多糖類、ラミナリビオース、ゲンチオビオース、セロビースのような二糖類およびサリシンも分解したが、なかでもラミナリンとラミナリビオースに対する活性が高かった。そこでこれらに対する K_m 値を測定したところ、本酵素は PNPG に対して0.5 mM、ラミナリビオースに対して0.4 mMそしてラミナリンに対して0.07%であり、この値はパパイヤの酵素の K_m 値⁽¹⁸⁾に匹敵した。本酵素はこのように β -1, 3-結合を有する糖に対して高い活性と親和性を示すことが分かった。しかも本酵素によるラミナリビオースの分解物を調べたところ、産物はグルコースだけでなくラミナリビオースより大きいと思われる糖が検出された。そしてこの転移反応はかなり低濃度の基質の存在下 (mM のオーダー) でも起こることが分かった。このことは本酵素が分解反応だけでなく転移反応も行い、壁多糖合成のプライマーとなるようなオリゴ糖を

生成しうる可能性を示す。ツバキ花粉の発芽は、花粉の内壁が伸びておこるのではなく、発芽の前に内壁と細胞膜の間に新しく壁が形成され、それが発芽孔から現れてくると考えられており⁽²²⁾、新しく形成された花粉管内壁の成分のほとんどがカロースとペクチンであると報告されている⁽²³⁾。クロマツ花粉でも著者はアニリンブルー染色⁽²⁴⁾でカロースの存在を確認している。従ってこのことと精製した β -グルコシダーゼの作用特性とを考え合わせると、本酵素の役割の1つは花粉の発芽および花粉管の伸長における β -1, 3-グルカン代謝への関与にあるように思われる。

引用文献

- (1) Hondo, T., A. Hara and T. Funaguma: The purification and some properties of the UDP-glucose pyrophosphorylase from pollen of *Typha latifolia*. *Plant Cell Physiol.* **24**, 61-69 (1983).
- (2) Hondo, T., A. Hara and T. Funaguma: Purification and properties of UDP-glucuronate pyrophosphorylase from pollen of *Typha latifolia* Linne. *Plant Cell Physiol.* **24**, 1535-1543 (1983).
- (3) Hara, A., K. Kawamoto and T. Funaguma: Inorganic pyrophosphatase from pollen of *Typha latifolia*. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1475-1482 (1980).
- (4) Hara, A., S. Ebina, A. Kondo and T. Funaguma: A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3539-3544 (1985).
- (5) Iwata, T., T. Funaguma and A. Hara: Purification and some properties of two phosphorylases from *Typha latifolia* pollen. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 407-412 (1988).
- (6) Funaguma, T., K. Fuzisawa, K. Yamaguchi, Y. Tohma, K. Kawahara and A. Hara: Pyrophosphate dependent phosphofructokinase from pollen of *Typha latifolia*. *Sci. Rept. Fac. Agr., Meijo Univ.* **28**, 29-34 (1992).
- (7) Somogyi, M.: Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23 (1952).
- (8) Dey, P. M. and J. B. Harborne: "Methods in Plant Biochemistry", Vol. 2, Carbohydrates pp.12-14 Academic Press London (1990).
- (9) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- (10) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- (11) Edreva, A. M. and I. D. Georgieva: Biochemical and histochemical investigations of α - and β -glucosidase activity in an infectious disease, a physiological disorder and in senescence of tobacco leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **17**, 237-243 (1980).
- (12) Hosel, W., E. Surholt and E. Borgman: Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chick pea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* **84**, 487-482 (1978).
- (13) Rosenfield, C. -L. and Ph. Matile: Glycosidases in pear pollen tube development. *Plant Cell Physiol.* **20**, 605-613 (1979).
- (14) Hara, A., M. Yamamoto, Y. Horita and T. Watanabe: Invertase of cell walls from cycad pollen. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* **8**, 27-37 (1972).
- (15) Hara, A., A. Sakamoto and A. Kobayashi: Stabilization of invertase at the cell-wall site of cycad pollens by complex-formation with pectic substances. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2287-2289 (1974).
- (16) Katsumi, M. and Y. Yamamoto: The relationship of some glycosidases to the endogeneous and IAA induced growth of light grown cucumber hypocotyls. *Physiol. Plant.* **45**, 45-50 (1979).
- (17) Donald, J. H. and J. N. Donald: Partial purification of endo- and exo- β -D-glu-

- canase enzymes from *Zea mays*. Seedlings and their involvement in cell-wall auto-hydrolysis. *Planta* 151, 206-214 (1981).
- (18) Hartmann-Schreiner, J. and P. Schreiner: Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit. *Phytochemistry* 25, 2271-2274 (1986).
- (19) Funaguma, T. and A. Hara: Purification and properties of two β -glucosidase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. *Agric. Biol. Chem.* 52, 749-755 (1988).
- (20) Sakamoto, R., M. Arai and S. Murao: Enzymic properties of three β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus* No. F-50. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1283-1290 (1985).
- (21) Yoshioka, H. and S. Hayashida: Relationship between carbohydrate moiety and thermostability of β -glucosidase from *Mucor miehei* YH-10. *Agric. Biol. Chem.* 45, 571-577 (1981).
- (22) 中村紀雄: ツバキ花粉粒壁の糖組成. *花粉誌* 26, 33-37 (1980).
- (23) Nakamura, N., M. Mori and H. Suzuki: Chemical characterization of the callose plug isolated from *Camellia japonica* pollen tube *Plant Cell Physiol.* 25, 233-238 (1984).
- (24) Kao, Y. O. and J. Baer: Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17, 298-302 (1968).
-