花粉の生理・形態学的研究

第 18 報 トウモロコシの花粉の窒素代謝について

沢 田 義 康*

Yoshiyasu SAWADA*: Physiological and Morphological Studies
on the Pollen Grain Part 18. Nitrogen Metabolism of
the Pollen Grain in *Zea Mays* L.

1959 年 11 月 24 日受付

前報¹⁾にて、*Paris hexaphylla* Chamisso. (クルマバツクバネサウ) の花粉は sucrose agar 培地上で発芽困難であるが、その花粉、および雌ずい組織中に含まれるアミノ酸を、sucrose agar 培地に適量添加することにより、花粉の発芽および花粉管の伸長がいちじるしく促進されることを報告した。

本研究においては、sucrose agar 培地上で同様に発芽困難な *Zea Mays* L. (トウモロコシ) の花粉の発芽に対する、単一ならびに混合アミノ酸添加の影響を検するとともに、この花粉の呼吸におよぼすこれらアミノ酸の影響、さらに花芽生育の時期別にみたアミノ酸、および蛋白態窒素含量の消長、ならびにこの花粉中の transaminase 活性について報告する。

実験材料ならびに実験方法

(1) 供試材料

Sucrose agar 培地上では、発芽が極めて困難な *Zea Mays* L. の一品種「ゴールデン・パンダム」を材料植物としてえらび、花器形成の初期より開花後にいたる各時期の雄ずい、雌ずいおよび苞を材料とした。

(2) 実験方法

予備実験により、花粉の発芽培地としての最適 sucrose 濃度は 15%，最適 agar 濃度は 1%，pH 6.5 であることを確かめた。よって本実験を通じこの条件で、sucrose agar 培地にそれぞれ 0.0005%，0.001% および 0.002% アミノ酸を添加した。他方 aspartic acid, glutamic acid および cysteine

の各アミノ酸と、他の各種アミノ酸との組合せによる 2 種アミノ酸混合添加培地をつくり、これに花粉を播種した。25° で 1 時間培養し、前報¹⁾の方法により、花粉の発芽率を検した。なお使用したアミノ酸は味の素株式会社製のもので、前報¹⁾と同種類のものを用いた。他方、花粉、柱頭および子房に含まれるアミノ酸の種類については、前報¹⁾に準じペーパー・クロマトグラフィにより検索した。つぎに花粉の呼吸の測定²⁾は、sucrose 濃度 15%，各種アミノ酸は 0.0005%，0.001% および 0.002% として約裂開直後の花粉 100 mg を材料として、Warburg 装置により 25° にて 1 時間の酸素消費量を測定し、呼吸量を μ l にて示した。

つぎに花芽形成の初期より開花後にいたる時期別の、蛋白態窒素およびアミノ酸含量の変化については、micro-Kjeldahl 法、および Van Slyke 法により分析し、測定値は試料の生重量 1 g 中に含まれる含量を mg 量で示した。また花粉の transaminase^{3,4,5,6)} 活性の検定には、まず花粉 15 g に蒸溜水 20 cc を加え、乳鉢中でよく磨細し、3000 r.p.m. で 20 分間遠心分離し、上澄液を pH 7.5 の 0.1 M の磷酸塩緩衝液に 48 時間、3~5° で透析した後、これを酵素液として使用した。アミノ基の供与体としては、花粉発芽に供試した各種アミノ酸を用いた。アミノ基の受容体としては、pyruvic acid, α -ketoglutaric acid をいずれも苛性ソーダにて pH 7.5 に中和して使用した。アミノ酸溶液 (0.05 M) α -ketoglutaric acid (0.05 M) 0.5 ml, 0.5 ml に酵素液 1.0 ml を加え、30° で 2 時間反応させた後、沸騰水中に 5 分間入れて反応を停止させた。ついで遠心分離を行ない、上澄液 0.001 ml を東洋濾紙 No. 50 の原点に spot としてつけ、一次元法の

* Division of Biology, Asahikawa Branch, Hokkaido Gakuhei University, Hokkaido, Japan.
北海道学芸大学旭川分校生物学教室

ペーパー・クロマトグラフ法により展開させ、各アミノ酸とケト酸との間の **transamination** の有無を検した。

実験結果および考察

(1) 花粉の発芽におよぼす単一ならびに混合アミノ酸添加の影響

まず単一アミノ酸添加培地では、とくに 0.0005% の **aspartic acid**, **cysteine**, **glutamic acid**, **histidine**, **methionine** および **phenylalanine** の添加によりいちじるしい発芽促進がみられた。しかし 0.0002% アミノ酸添加培地では、却って発芽抑制の傾向がみられた(第1表参照)。よって単一アミノ酸添加培地で、顕著な発芽促進がみられた **aspartic acid**, **glutamic acid**, **cysteine** を中心として、他の各種アミノ酸と組合せた2種アミノ酸混合培地を作り、発芽状況を検して第2表に示す結果をえた。まず **aspartic acid** と各種アミノ酸との混合培地では、いずれも単一アミノ酸培地に比較して、いちじるしい発芽促進がみられたが、中でも **alanine**, **arginine**,

第1表 花粉の発芽におよぼす単一アミノ酸の影響

アミノ酸の種類	アミノ酸濃度		
	0.0005%	0.001%	0.002%
Control	7.5%	7.5%	7.5%
Alanine	17.4	8.5	5.0
Arginine	trace	trace	trace
Aspartic acid	48.8	21.0	0
Cysteine	44.1	11.9	0
Cystine	13.1	trace	0
Glutamic acid	37.6	15.2	0
Glycine	8.2	trace	trace
Histidine	13.8	11.5	10.8
Hydroxyproline	10.7	trace	trace
Leucine	9.8	trace	trace
Lysine	10.0	trace	0
Methionine	30.0	trace	trace
Phenylalanine	20.6	6.6	0
Proline	9.1	9.1	9.0
Serine	23.0	9.1	8.3
Threonine	18.0	5.6	0
Tryptophan	trace	trace	trace
Tyrosine	trace	trace	trace
Valine	13.7	trace	trace

第2表 花粉の発芽におよぼす2種アミノ酸混合培地の影響

アミノ酸の種類	アミノ酸濃度		
	0.001%		
	Aspartic acidとの混合培地	Glutamic acidとの混合培地	Cysteineとの混合培地
Control	7.5%	7.5%	7.5%
Alanine	56.9	41.6	39.4
Arginine	54.0	38.3	54.4
Aspartic acid	21.0	53.8	33.5
Cysteine	53.8	11.9	11.9
Cystine	51.0	52.4	43.1
Glutamic acid	33.5	10.0	15.2
Glycine	68.0	47.8	54.4
Histidine	35.8	33.3	38.4
Hydroxyproline	37.6	47.1	32.0
Leucine	42.9	39.5	35.0
Lysine	52.0	37.6	24.0
Methionine	57.5	30.0	38.4
Phenylalanine	41.8	24.3	50.5
Proline	32.5	49.6	42.6
Serine	50.9	61.8	45.8
Threonine	66.5	47.6	60.9
Tryptophan	32.9	63.0	27.6
Tyrosine	35.2	33.6	29.4
Valine	41.0	51.5	45.4

cysteine, **glycine** および **threonine** との組合せの場合に顕著な促進効果がみられた。つぎに **glutamic acid** または **cysteine** と他のアミノ酸との二種混合培地においても、いちじるしい発芽促進がみられた。

以上からも明らかであるごとく、**sucrose agar** 培地上における *Zea Mays* L. の花粉の発芽は、適濃度の単一アミノ酸添加により促進されるが、さらに適当な組合せの二種アミノ酸の混合添加により発芽促進効果は強調される。久保⁷⁾ は、セラチン培地上で、*Zea Mays* L. の花粉の高率の発芽がみられたと報告したが⁸⁾、恐らくセラチンの加水分解によって生ずるある種のアミノ酸の混合的な作用がこれに関与するものと推察される。

(2) 花粉の呼吸におよぼすアミノ酸の影響

花粉の呼吸におよぼす 0.0005% の各種アミノ酸の影響については、第3表に示すごとく、**arginine**, **glutamic acid**, **leucine**, **methionine**, **phenylalanine**

第3表 花粉の呼吸におよぼすアミノ酸の影響

アミノ酸の種類	アミノ酸濃度		
	0.0005%	0.001%	0.002%
Control	μLO_2 1349.00	μLO_2 —	μLO_2 —
Alanine	1393.14	1481.03	846.30
Arginine	2105.00	1307.00	894.73
Aspartic acid	1438.50	1393.80	1171.80
Cysteine	1360.13	1176.30	880.00
Cystine	1359.76	1387.00	1329.82
Glutamic acid	1997.29	1228.20	1156.00
Glycine	1523.61	1472.86	1153.14
Histidine	1539.00	1246.70	987.35
Hydroxyproline	1323.19	1088.56	917.90
Leucine	1614.48	1410.00	876.86
Lysine	1550.24	1202.85	1192.78
Methionine	1643.90	1142.49	973.71
Phenylalanine	1749.00	1341.62	897.00
Proline	1622.50	1100.00	962.28
Serine	1718.75	1270.15	863.10
Threonine	1636.18	1341.60	1235.10
Tryptophan	1605.62	1388.75	1304.72
Tyrosine	1501.25	1213.03	1199.76
Valine	1423.13	1109.60	1185.98

および threonine の各アミノ酸の添加により、呼吸はいちじるしく増加した。さらにアミノ酸濃度を 0.001% に高めると、呼吸はやや減少したが、しかし control に比すると、わずかながら花粉の呼吸は促進された。さらにアミノ酸濃度を増加した 0.002% では、いずれのアミノ酸添加の場合も花粉の呼吸は急激に減退した。このことは濃度の高いアミノ酸の添加により、花粉の発芽も抑制されることと、何らかの関係があるごとく思われる。他方、低濃度のアミノ酸の添加により花粉の呼吸増加をみた種類のアミノ酸は、また同時に、その添加により花粉の発芽はいちじるしく促進さ

れる。このことは、sucrose agar 培地にこの種類のアミノ酸を添加することにより、ある種の呼吸系を通じて物質代謝を促進し、これが花粉の発芽のエネルギー源となり、花粉の発芽促進を結果するものと考えられる。

(3) 雄ずいおよび雌ずいに含まれるアミノ酸の種類、ならびに含量と、transaminase 活性

Zea Mays L. の開花 18 日前の時期より、開花後にいたる時期別の花器内アミノ酸含量の変化は第 1 図の如くである。すなわち開花 10 日前頃より、雄ずいの形成進展にともなう、顕著なアミノ酸含量の増加がみられ、開花当日にアミノ酸の蓄積も最大に達し、ここに雄ずいの充実をみるが、しかし、葯裂開後は急激に減少した。つぎに雌ずいのアミノ酸含量の変化についてみると、開花 6 日前より子房中に急激な増量がみられ、開花 3 日後に最大量を示した。また苞についてみると、花芽形成の進展にともない、次第にアミノ酸含量の増加がみられ、開花当日を最高として、以後減退した。

つぎに、このようなアミノ酸含量の消長を示した雄ずい、および雌ずいの開花当日におけるアミノ酸の種類についてみると、いずれの組織にも alanine, arginine, glutamic acid, leucine, phenylalanine および serine の各種が多量に含有される。しかもこの場合花粉、および雌ずいに共通したアミノ酸が含有される。

第1図 開花前後における雄ずい、および雌ずい内のアミノ酸含量

●——● 葯, ●.....● 子房, ○.....○ 苞.

第4表 花粉, および雌ずいに含まれる遊離アミノ酸

アミノ酸の種類	花 粉	柱 頭	子 房
Alanine	卅	卅	卅
Arginine	卅	+	卅
Aspartic acid	+	+	+
Cysteine	—	—	—
Cystine	—	—	—
Glutamic acid	卅	卅	卅
Glycine	+	—	—
Histidine	—	—	—
Hydroxyproline	+	+	+
Leucine	+	+	卅
Lysine	+	+	+
Methionine	—	±	+
Phenylalanine	+	+	卅
Proline	+	+	+
Serine	卅	卅	+
Threonine	卅	+	卅
Tryptophan	—	—	+
Tyrosine	+	+	+
Valine	+	+	卅
Unidentified	+	+	+

Sarkar⁸⁾ らは *Zea Mays* L. の花粉中には遊離のアミノ酸と, 蛋白の加水分解によるものをあわせ 12 種のアミノ酸を報告したが, 本実験においては, 遊離アミノ酸として 14 種と, 不詳の種類 1 種がみられた (第4表参照). しかもこれらの中で花粉, 柱頭, 子房に共通して多量含有される種類のアミノ酸は, いずれも花粉の発芽を促進し, かつ花粉の呼吸を増加させることは興味がふかい. なお花芽の形成進展に伴うアミノ酸の種類の時期別による消長を明らかにするため, 開花 18 日前の雄ずいと開花当日の雄ずいについて分析したところ, 全く同一種類のアミノ酸が検出された. このことは, アミノ酸含量の消長は, 種類の増減によらず, ある限られた種類のアミノ酸の量的変化によるものであることを示す. また開花期に雄ずい中に含まれる蛋白態窒素を加水分解して構成アミノ酸の種類を検討したところ, 遊離アミノ酸と同一種のものがみとめられた.

つぎに花粉に含まれるアミノ酸相互間における transamination について検討し, 第5, 6表に示す結果をえた. これよりみると glutamic acid と aspartic acid および glutamic acid と alanine と

第5表 各種アミノ酸と α -ketoglutaric acid とより glutamic acid の生成

アミノ酸の種類	生成 glutamic acid の spot の比較値
Alanine	卅
Arginine	±
Aspartic acid	卅
Cysteine	—
Cystine	±
Glycine	±
Histidine	—
Hydroxyproline	—
Leucine	±
Lysine	±
Methionine	±
Phenylalanine	±
Proline	—
Serine	±
Threonine	—
Tryptophan	±
Tyrosine	±
Valine	±
Control	—

±の記号は glutamic acid の spot がかすかにみとめられることを示す.

第6表 各種アミノ酸と pyruvic acid より alanine の生成

アミノ酸の種類	生成 alanine の spot の比較値
Arginine	—
Aspartic acid	±
Cysteine	—
Cystine	±
Glutamic acid	卅
Glycine	±
Histidine	—
Hydroxyproline	—
Leucine	±
Lysine	±
Methionine	±
Phenylalanine	±
Proline	±
Serine	±
Threonine	±
Tryptophan	±
Tyrosine	±
Valine	±
Control	—

±の記号は alanine の spot がかすかに認められることを示す.

の間の transaminase の活力が最も高く、その他のアミノ酸と pyruvic acid, または α -ketoglutaric acid との transaminase の活力も弱いながらみとめられた. Albaum および Cohen⁹⁾ によると発芽燕麦中における glutamic acid と aspartic acid との transaminase 活性は、発芽の初期に強く、ついで、めばえでの全蛋白含量の増大が起ることを報告している。つぎに述べる花芽内における蛋白態窒素含量の消長にも、同様にこの transaminase 活性が関係することが考えられる。

(4) 雄ずいおよび雌ずいに含まれる蛋白態窒素含量

花芽の形成ならびに開花にともなう蛋白態窒素含量の変化について分析し、第2図に示す結果をえた。まず雄ずいについてみると、花芽形成の進展に伴ない急激な蛋白態窒素の蓄積がおこり、開花時に最高値がみられた。このことは、Howlett¹⁰⁾ がりんごについて、花芽の時期から花瓣落下の時期までの全窒素量を測定し、花芽時に比し、満開時には3倍の蓄積がみられたと報告している。本実験における花粉内のアミノ酸含量の増量と相まって、他の組織より可溶態の形で花粉内に転流してきた窒素が、蛋白態窒素の形で貯蔵され、花粉の充実、さらには花粉発芽の準備を整えるものと考えられる。つぎに子房、苞についてみると、これら両器官の生育に伴ない、蛋白態窒素含量はかえって急激に減退する。このことは開花期に花芽内アミノ酸含量が急増する事実を考慮すると、蛋白態窒素は葯、子房内で可溶態窒素の形となり花粉の発芽、伸長に用いられることが考えられる。

要 約

(1) Sucrose agar 培地上で発芽が困難な *Zea*

第2図 開花前後における雄ずい、および雌ずい内の蛋白態窒素含量

●——● 葯, ●.....● 子房, ○.....○ 苞

Mays L. の花粉は、培地に適当なアミノ酸を添加することにより、発芽がいちじるしく促進される。さらに適当な組合せの2種のアミノ酸を混合添加した培地では、発芽はさらにいちじるしく促進される。

(2) 花粉の発芽を促進する種類のアミノ酸は、また花粉の呼吸を増大させる。このことは、これらアミノ酸の添加により、花粉内の物質代謝が高まり、ひいては花粉の発芽を促進するものと考えられる。

(3) 上記のような特質をもつアミノ酸は、開花当日ないし開花後の雄ずい、ならびに雌ずいに集中的に蓄積する。かつこのような種類のアミノ酸は、雄ずい、および雌ずいに共通して含有され、しかも、花芽形成の時期別にみても、このようなアミノ酸の種類には変化がみられず、ただ量的消長があることを確かめた。

(4) *Zea Mays L.* の花粉内に transaminase 活性のあることを確認した。glutamic acid と aspartic acid および glutamic acid と alanine との間の transaminase の活力が最も顕著であった。

本研究にさいして、いろいろと御指導をいただいた、北海道大学農学部田川隆教授に深謝の意を表す。また実験にさいしては、味の素株式会社食品研究室戸井文一博士より種々御援助をいただいた。記して深く謝意を表わす。

文 献

- 1) 沢田義康, 植雑, **71** : 218 (1958). 2) Hellmers, H., and Machlis, L., Plant Physiol. **31** : 284 (1956). 3) 村上 浩・林 武, 日農化, **31** : 468 (1957). 4) Cammarata, P.S., and Cohen, P.P., J. Biol. Chem. **187** : 439 (1950). 5) Green, D.E., Leloir, L.F., and Necita, V., ibid. **161** : 559 (1950). 6) 常岡健二・原田 尚, 最新医学, **13** : 191 (1958). 7) 久保 淳, 植雑, **71** : 282 (1958). 8) Sarkar, B.C.R., Witter, S.H., Luecke, R.W., and Sell, H.M., Arch. Biol. Chem. **22** : 353 (1949). 9) Albaum, H.G., and Cohen, P.P., J. Biol. Chem. **149** : 19 (1943). 10) Howlett, F.S., Cornell University, Agricult. Exptl. Station, Memoir. **99** (1926).

Summary

1. The pollen grain of *Zea Mays* L. germinates poorly on sucrose agar medium. By the addition of some kinds of amino acids to the culture medium either independently or by mixing with favourable combinations, however, the pollen germination was much enhanced.
2. Addition of the amino acids which accelerated the pollen germination caused the increase of the pollen respiration as compared with that of the control.
3. The amino acids which increased the germination and the respiration of the pollen grain, were found to be common to both the pollen grain and the pistil of this plant.
4. Enzyme transaminase was ascertained to be present in the pollen grain. In particular, the transamination reactions between glutamic acid and aspartic acid, and between glutamic acid and alanine were found to be active.
5. The amino acid content in the male and female flowers increased gradually as the flower bud matured. The maximum content was observed immediately after the time of anther dehiscence and thereafter the content decreased gradually.