[農化 第 37 卷, 第 8 号, p. 439~443, 1963]

花粉の生化学的研究 (第 3 報)*

アカマツ花粉のアミノ酸について

勝 又 悌 三, 斗ヶ沢宣久 (岩手大学農学部農芸化学科)

小 幡 弥 太 郎 (北海道大学農学部農芸化学科)

昭和 37 年 11 月 30 日 受 理

植物の生殖単細胞としての花粉について、その機能発現に関連する諸成分の生化学的研究を行っているが、先に種々の花粉を使用して浸透圧調節、花粉管の伸長などに関与する糖質について検討したが^(1,2)、このたび保存花粉の発芽力と関連し、花粉細胞内成分の変動を明らかにする目的の一部として、アカマツ保存花粉と新鮮花粉について遊離アミノ酸及び蛋白質構成アミノ酸を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 供試料 前報⁽¹⁾に準じて調製した開葯時のアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 花粉 (試料 I, 粗蛋白質 13.25%, 灰分 2.35%) と、1959 年 5 月に調製し、室温で約 2 年保存したもの (試料 II) を供試した。

2. アカマツ花粉の遊離アミノ酸 試料 I 及び II の各 10 g を乳鉢でよく磨砕し、2 週間エーテル脱脂後、75% エタノール 100 ml を加え、マグネチックスターラーでニンヒドリン反応陰性となるまで室温抽出を繰返す。抽出液を合せて濾過、減圧濃縮 (<50°) によって得たシラップを蒸溜水 4 ml にとかし、ペーパークロマトグラフィ (PPC) に供した。展開溶媒は *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (4:1:5) を使用し、標準アミノ酸と並行して行う 1 次元上昇 3 回展開法、及び前記溶媒とフェノール: 水 (4:1, 0.04% 8-オキシキノリン添加) を用いる 2 次元 PPC により行った。発色剤は主としてニンヒドリン (0.1% ブタノール溶液) を用い、必要に応じて特殊試薬を併用した。すなわちヒスチジンの同定には Pauly 反応⁽³⁾を、オキシプロリンの検出にはイサチンのアセトン溶液⁽⁴⁾を、メチオニンの検出にはヨウ化白金酸試薬⁽⁵⁾を用いた。なお γ -アミノ-*n*-酪酸を同定するため、試料 I 及び II の PPC 用供試液をそれぞれ東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) に線状に塗付、展開溶媒 *n*-ブタノール: 酢酸: 水を用いて 2 回展開後、ニンヒドリンで予備発色し、該当するスポット部位を切りとる。細かく切って蒸溜水 10 ml を加え、80°, 10 分間温抽出後濾過し、減圧濃縮によりシラップとして PPC に供した。展開溶媒はルチジン: コリジン: 水 (2:2:1) を用い、標準 α - 及び γ -アミノ-*n*-酪酸と並行して行った。

3. アカマツ花粉の微生物及びグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性 酵母、かびの場合はグルコース加用馬鈴薯寒天培地を、細菌の場合は肉汁寒天培地を用い、1 試料ごとに各 2 枚計 4 枚の寒天平板にそれぞれ試料の 1 白金耳を塗抹接種し、酵母、かびは 27°, 細菌は 37° の恒温器中で 10 日間培養し、適時観察して微生物の存否を確かめた。なお供試料中に存在した微生物は純粋分離を行った後、それぞれ分類学的検索を行った。ついでグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性^(6,7)を調べたが、この際、同酵素の作用により生ずる CO₂ の定量は 37° において 2 側室を有する Warburg 装置を用い、第 2 表に示すごとく対照試験も同時に行った。

4. アカマツ花粉の蛋白質構成アミノ酸 試料 I 及び II の遊離アミノ酸抽出残渣 500 mg をそれぞれとり、20% 塩酸 50 ml を加え、135~140° の油浴中で 30 時間加水分解後、ガラスフィルターで濾過し、濾液に蒸溜水を加えて減圧濃縮乾涸を数回繰返してできるだけ塩酸を除去して得られるシラップを、蒸溜水 1.5 ml にとかし (pH 2.5) PPC に供した。塩酸加水分解中にトリプトファンは完全に、また糖質が共存する場合メチオニンも相当破壊されるので⁽⁸⁾、アルカリ分解を行ってトリプトファン、メチオニンの検索を行った。すなわち遊離アミノ酸抽出残渣のおおの 500 mg に 5 N 苛性ソーダ 50 ml を加え、120~125° の油浴中で 10 時間加水分解後、ガラスフィルターで濾過、濾液を塩酸で中和後、減圧濃縮乾涸し、95% エタノールでニンヒドリン反応陰性となるまで温抽出を繰返す。抽出液を合せて減圧下にアルコールを除去、残渣を蒸溜水 1.5 ml にとかして PPC に

* Biochemical Studies on Pollen. Part III. Amino Acids of Pollen of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. By Teizo KATSUMATA, Yoshihisa TOGASAWA and + Yataro OBATA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University; + Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

供した。展開溶媒は *n*-ブタノール:酢酸:水 (4:1:5) を用い, 1 次元上昇 3 回展開を行ない, トリプトファンの場合はニンヒドリン発色により, メチオニンの場合はヨウ化白金酸試薬により同定した。蛋白質構成アミノ酸を検索中に認めた未知紅色スポットは, レブリン酸に関係するものか否かを確認する目的で, 花粉 (試料 I 及び II), グルコース, セルロース (東洋濾紙製セルロース粉末) おおのの酸分解液を展開溶媒 *n*-ブタノール:酢酸:水を用い, 標準レブリン酸と並行して PPC (1 次元上昇 1 回展開) を行った。

結果及び考察

花粉の遊離アミノ酸に関しては, Auclair ら⁽⁹⁾がタンポポ, ヤナギ, カエデ, スモモ, ハンノキ花粉, Virtanen ら⁽¹⁰⁾がハンノ

第 1 図 アカマツ花粉の遊離アミノ酸

S: 標準アミノ酸
東洋濾紙 No. 50, 6×40 cm
展開溶媒, *n*-ブタノール:酢酸:水 (4:1:5)
1 次元上昇 3 回展開, 18 時間
ニンヒドリン発色 (●: 発色度微弱)
1. ロイシン 2. フェニルアラニン
3. トリプトファン 4. バリン
5. チロシン 6. γ -アミノ-*n*-酪酸
7. プロリン 8. アラニン
9. グルタミン酸 10. グリシン
11. アルギニン 12. ヒスチジン
13. リジン 14. シスチン

第 3 図 γ -アミノ-*n*-酪酸の同定

S: 標準 α -アミノ-*n*-酪酸 (1)
標準 γ -アミノ-*n*-酪酸 (2)
東洋濾紙 No. 50, 6×40 cm
展開溶媒, ルチジン:コリジン:水 (2:2:1)
1 次元上昇 1 回展開, 30 時間
ニンヒドリン発色

第 2 図 アカマツ花粉の遊離アミノ酸 (試料 I*)

東洋濾紙 No. 50, 40×40 cm
1 次元 *n*-ブタノール:酢酸:水 (4:1:5), 18 時間
2 次元 フェノール:水 (4:1), 30 時間
ニンヒドリン発色
1. シスチン 2. アスパラギン酸 3. グルタミン酸
4. セリン 5. グリシン 6. スレオニン
7. アラニン 8. チロシン
9. バリン, γ -アミノ-*n*-酪酸 10. ロイシン
11. リジン, アルギニン 12. グルタミン 13. プロリン
* 試料 II の 2 次元クロマトグラムではスポット 3 が非常に微弱でスポット 12 が消失する。

第 1 表 アカマツ花粉の遊離及び蛋白質構成アミノ酸

アミノ酸	遊離アミノ酸		蛋白質構成アミノ酸	
	試料 I	試料 II	試料 I	試料 II
アラニン	+	+	+	+
γ -アミノ- <i>n</i> -酪酸	++	++	+	+
アルギニン	++	++	++	++
アスパラギン酸	++	++	++	++
シスチン	+	+	+	+
グルタミン酸	++	+	++	++
グルタミン	+	+	+	+
グリシン	+	+	++	++
ヒスチジン	+	+	+	+
ロイシン	+	+	+	+
リジン	++	++	++	++
フェニルアラニン	+	+	+	+
プロリン	++	++	+	+
セリン	+	+	+	+
スレオニン	+	+	+	+
チロシン	+	+	+	+
バリン	+	+	+	+
未知スポット 1			+	+
未知スポット 2			+	+
トリプトファン*			+	+
メチオニン*			+	+

* アルカリ分解液について検出

キ, シラカバ, ハシバミ, カシ, ヤナギ, ライムギ花粉, Hatanono⁽¹¹⁾ がクロマツ花粉, Iwanami⁽¹²⁾ がオニユリ, ホウセンカ, トウモロコシ, キキョウ, マツバボタン, グラジオラス花粉についてそれぞれ報告しているが, アカマツ花粉の遊離アミノ酸を検索した結果は第 1~2 図, 第 1 表に示すごとく, 試料 I に著明なグルタミン酸, プロリンのはかアラニン, アルギニン, アスパラギン酸, シスチン, グリシン, リジン, セリン及び微量のグルタミン, ヒスチジン, ロイシン, スレオニン, チロシン, バリンを検出した。試料 II にはグルタミンは検出されず, またグルタミン酸が非常に少ないこと以外試料 I と全く同じであり, 長期室温保存でグルタミン酸が激減することを認めた。第 1 図スポット 6 は α -または γ -アミノ-*n*-酪酸に相当するスポ

ットであるが、3回展開でも2次元 PPC (第2図スポット9) でも、両者いずれか同定不可能であった。展開溶媒としてルチジン：コリジン：水を用いる標準 α - 及び γ -アミノ- n -酪酸との並行 PPC の結果は第3図に示すごとく、試料 I, II についていずれも γ -アミノ- n -酪酸のみを確認した。Auclair ら⁽⁹⁾ はヤナギ及びタンポポ、ヤナギ、カエデ、スモモ、ハンノキなどの混合花粉の遊離アミノ酸中 α -アミノ- n -酪酸を認めているが、アカマツ花粉の場合は明かに γ -アミノ- n -酪酸のみを認めた。Okunuki^(7,13) は花粉に次式のごとくグルタミン酸の脱炭酸を行う酵素を見出し、広く高等植物に分布していることを明らかにしているが、アカマツ花粉の場合もグルタミン酸 $\rightarrow$ γ -アミノ- n -酪酸の系が考えられる。

試料 I に多いグルタミン酸が室温放置で激減することを知ったが、これは微生物の作用によるものか、または花粉細胞内酵素 (グルタミン酸デカルボキシラーゼ、トランスアミナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼなど) の作用によるものかを追究する手段の一つとして、微生物の検索を行った結果、かびは形態学的性質及び培養上の諸性質からそれぞれ *Geotrichum candidum* Link (Syn. *Oospora lactis* (Fres.) Saccardo, ちちかび) 及び *Alternaria tenuis* Nees (互生菌) の記載^(14~16) と一致し、細菌は形態学的性質、生理学的性質及び培養上の諸性質から *Bacillus subtilis* Cohn emend. Prazmowski (枯草菌) の記載⁽¹⁷⁾ と一致することを認めた。すなわち試料 I 及び II について、いずれもかびはちちかび、互生菌の集落を1こづつ認め、細菌は枯草菌の集落をおおの1こ観察したのみで、酵母は全く認められなかった。結局1白金耳の試料に極く微量のちちかび、互生菌、枯草菌を認めたのみで、水分10%程度の花粉ではこれらの微生物は主として resting cell として存在しているものと思われる。グルタミン酸デカルボキシラーゼ活性は第2表に示すごとく対照試験も同時に行ない、その差と

第2表 グルタミン酸デカルボキシラーゼ測定用反応液組成

	温圧計	試料 I の対照	試料 II の対照	試料 I	試料 II
主室 { 酵素液*1 { 燐酸 buffer (0.1 M, pH 5.8) H ₂ O	2.4 0.1	0.5 ml 1.4	0.5 ml 1.4	0.5 ml 1.4	0.5 ml 1.4
側室 I { グルタミン酸*2 { 燐酸 buffer		0.5	0.5	0.5	0.5
側室 II 2 N 硫酸*3		0.1	0.1	0.1	0.1
容器定数 kCO ₂		1.64	1.70	1.57	1.59

*1 試料 I 及び II 各々 500 mg をよく磨砕し、0.1 M 燐酸 buffer (pH 5.8) 5 ml で

3時間冷抽出後濾過した濾液。

*2 最終濃度 0.01 M になるように 0.1 M 燐酸 buffer (pH 5.8) にとかしたものを。

*3 反応終了 (120 分) 後貯留 CO₂ を発生させるため混合する。

して第4図に示した。その結果、試料 I では図のような活性を認めたが、試料 II ではほとんど認められず、長期室温保存中に失活したものと思われる。試料 II の遊離グルタミン酸減少の原因の一つとして、グルタミン酸デカルボキシラーゼによる γ -アミノ- n -酪酸への変化も考えられる。

花粉蛋白質構成アミノ酸に関しては、Sarkar ら⁽¹⁸⁾ がトウモロコシ花粉、

Bathurst⁽¹⁹⁾ が草類花粉のアミノ酸を定量し、Weaver ら⁽²⁰⁾ がヤナギ、カシ、ヒエンソウ花粉、Auclair ら⁽⁹⁾ がタンポポ、ヤナギ花粉及びタンポポ、ヤナギ、カエデ、スモモ、ハンノキの混合花粉についてそれぞれ定性的に報告している。著者らは遊離アミノ酸抽出残渣を用いて酸分解、アルカリ分解を行ない、蛋白質構成アミノ酸を検索した。酸分解の結果は第5~6図、第1表に示すごとく、試料 I 及び II に著明なアラニン、グルタミン酸、グリシンのほかアルギニン、アスパラギン酸、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、チロシン、バリン及び微量のシスチン、ヒスチジン、プロリンを検出した。さらにグリシンとグルタミン酸の間にニンヒドリンではじめ橙黄色を呈し、室温放置でしだいに紅色に変化する未知スポット2こ (第5図スポット15, 16) を検出した。アミノ酸の定量に際し、食物中糖質の存在下に塩酸で加水分解し、Dowex 50-X8 カラムでアミノ酸を分別

第4図 アカマツ花粉のグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性

○—○ 試料 I 振盪回数 100 回/分
△—△ 試料 II "

第5図 アカマツ花粉蛋白質
構成アミノ酸

S: 標準アミノ酸
東洋濾紙 No. 50, 6×40 cm
展開溶媒, n-ブタノール: 酢酸: 水
(4:1:5)
1 次元上昇 3 回展開, 18 時間
ニンヒドリン発色
1~14. 第1図に同じ
15. 未知スポット 1
16. 未知スポット 2

第6図 アカマツ花粉蛋白質構成アミノ酸 (試料 I*)

東洋濾紙 No. 50, 40×40 cm
1 次元 n-ブタノール: 酢酸: 水 (4:1:5), 18 時間
2 次元 フェノール: 水 (4:1), 30 時間
ニンヒドリン発色
1. シスチン 2. アスパラギン酸 3. グルタミン酸
4. セリン 5. グリシン 6. スレオニン
7. アラニン 8. チロシン 9. バリン
10. ロイシン, フェニルアラニン 11. リジン, アルギニン
12. 未知スポット 13. プロリン
* 試料 II の 2 次元クロマトグラムも同様である。

する場合, ニンヒドリンで赤色を呈する区分が得られ^(21~24), Schram ら⁽⁸⁾はこの区分はセルロース, グルコース, ラクトースなどを含む物質の加水分解に際して生ずるレブリン酸に由来するものと報告している. 花粉, グルコース, セルロースのおのの酸分解液を標準レブリン酸と並行して PPC を行い, ニンヒドリン発色の結果, いずれもレブリン酸と同じ R_F 0.83 の位置に黄褐色のスポットを生じたが, 別に花粉の場合未知紅色スポット (R_F 0.22

~0.24) を生じ, 明らかにレブリン酸とは異なることを認めた. またアルカリ分解の結果は第1表に示すごとく, 試料 I, II いずれの場合もトリプトファン, メチオニンの微量を検出した.

蛋白質構成アミノ酸をみると, 遊離アミノ酸に見出された γ -アミノ-n-酪酸, グルタミン (もし存在していたとしても加水分解によりグルタミン酸に変化) は認められず, 新たにフェニルアラニン及び未知スポット 2 を認め, さらにアルカリ分解液中に微量のトリプトファン, メチオニンを検出した. プロリンは遊離状態で多いが, 蛋白質構成アミノ酸中にはごく微量しか認められず, 逆にアラニン, グリシン, ロイシン, スレオニン, チロシン, バリンなどが多い.

要 約

開薬時及び室温 2 年間保存のアカマツ花粉 (前者を試料 I, 後者を試料 II とする) について, 遊離アミノ酸, 蛋白質構成アミノ酸及び微生物, グルタミン酸デカルボキシラーゼ活性などを検索し次の結果を得た.

(1) 遊離アミノ酸として試料 I では著明なグルタミン酸, プロリンのほかアラニン, γ -アミノ-n-酪酸, アルギニン, アスパラギン酸, シスチン, グリシン, リジン, セリン及び微量のグルタミン, ヒスチジン, ロイシン, スレオニン, チロシン, バリンを検出した. 試料 II ではグルタミンは検出されず, グルタミン酸が非常に少ないこと以外は試料 I と全く同様である (第1~3 図, 第1表).

(2) 長期室温保存によるグルタミン酸減少の原因を追究する手段の一つとして試料 I 及び II の微生物を検索したが, 両者ともちかび, 互生菌, 枯草菌のごく微量を認めたのみで, 乾燥花粉ではおそらく resting cell として存在するものと思われる. グルタミン酸デカルボキシラーゼ活性は試料 I にのみ認められ (第4 図), 花粉の室温保存中遊離グルタミン酸減少の原因の一つとして, グルタミン酸デカルボキシラーゼによる γ -アミノ-n-酪酸への変化も考えられる.

(3) 蛋白質構成アミノ酸としては試料 I 及び試料 II とともに著明なアラニン, グルタミン酸, グリシンのほかアルギニン, アスパラギン酸, ロイシン, リジン, フェニルアラニン, セリン, スレオニン, チロシン, バリン及び微量のシスチン, ヒスチジン, プロリン, トリプトファン, メチオニンを検出し, さらにニンヒドリンで橙

黄色から紅色に変化する2この未知スポットを認めた(第5, 6図, 第1表)。

本研究の一部は文部省科学研究費によったものであることを付記して感謝の意を表します。

本研究の要旨は昭和37年4月, 日本農芸化学会大会で講演した。

- (1) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子 : 本誌, **35**, 623 (1961).
- (2) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子 : 岩手大農報, **6**, 6 (1962).
- (3) T. Mann, E. Leone : *Biochem. J.*, **53**, 140 (1953).
- (4) A. Saifer, I. Oreokes : *Science*, **119**, 124 (1954).
- (5) G. Toennies, J. J. Koeb : *Anal. Chem.*, **23**, 823 (1951).
- (6) 石川芳典, 小幡弥太郎 : 本誌, **29**, 689 (1955).
- (7) K. Okunuki : *Bot. Mag.*, **51**, 270 (1937).
- (8) E. Schram, J. P. Dustin, S. Moore, E. J. Bigwood : *Anal. Chim. Acta*, **9**, 149 (1953).
- (9) J. A. Auclair, C. A. Jamieson : *Science*, **108**, 357 (1948).
- (10) A. I. Virtanen, S. Kari : *Acta Chem. Scand.*, **9**, 1948 (1955).
- (11) K. Hatano : *Bull. Tokyo Univ. Forests*, **48**, 149 (1955).
- (12) Y. Iwanami : *J. Yokohama Municipal Univ.*, **116**, 124 (1959).
- (13) K. Okunuki : *Acta Pytochim.*, **13**, 155 (1943).
- (14) J. C. Gilman : "A Manual of Soil Fungi", 2 Ed., Iowa State College Press, 1957.
- (15) H. L. Barnett : "Illustrated Genera of Imperfect Fungi", 2 Ed., Burgess Publ. Co. 1960.
- (16) Y. Sasaki : *J. Fac. Hgr. Hokkaido Univ.*, **49**, 121 (1950).
- (17) R. S. Breed et al. : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7 Ed., William & Wilkins Co., 1957.
- (18) B. C. R. Sarkar, S. H. Wittwer, R. W. Luecke, H. M. Sell : *Arch. Biochem.*, **22**, 253 (1949).
- (19) N. O. Bathurst : *J. Exptl. Botany*, **5**, 253 (1954).
- (20) N. Weaver, K. A. Kuiken : *J. Econ. Entomol.*, **44**, 635 (1951).
- (21) P. Soupart, S. Moore, E. J. Bigwood : *J. Biol. Chem.*, **206**, 699 (1954).
- (22) J. Close, E. L. Adriaens, S. Moore, E. J. Bigwood : *Bull. soc. chim. biol.*, **35**, 985 (1953).
- (23) J. P. Dustin, C. Czajkowska, S. Moore, E. J. Bigwood : *Anal. Chim. Acta*, **9**, 256 (1953).
- (24) J. P. Dustin, E. Schram, S. Moore, E. J. Bigwood : *Bull. soc. chim. biol.*, **35**, 1137 (1953).