

原 著

花粉の生化学的研究 XXVIII

アカマツ花粉リボヌクレアーゼの発芽時の活性変動

勝又悌三*・江尻慎一郎*・江幡真規子

Biochemical studies on pollen XXVIII

Changes in ribonuclease activity during germination of the pollen of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.

Teizo KATSUMATA, Shin-ichiro EJIRI and Makiko EBATA

(受付：1984年10月23日)

結 言

花粉の生化学的研究の一部として、花粉発芽時の酵素活性調節機構を検討しているが、すでにヌクレオチド、RNA代謝関連の酵素⁽¹⁻³⁾および preformed mRNA 依存性の酵素⁽⁴⁾が発芽時に活性を増大することを報告した。また前報⁽⁵⁾で完熟アカマツ花粉中には、0.5 M 塩化ナトリウム溶液で振とうすることによって溶出するリボヌクレアーゼ (RNase 2 A、RNase 4 A) と、塩化ナトリウム溶液処理後の破碎花粉から 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) で溶出するリボヌクレアーゼ (RNase 1 B、RNase 2 B、RNase 3 B、RNase 4 B) が存在することを花粉の系で初めて確認し、これらのリボヌクレアーゼの諸性質を報告した。

このたびは、RNase A (表在性リボヌクレアーゼ)

および RNase B (細胞質リボヌクレアーゼ) の発芽時の活性を検討した。

実験方法

1. 試料

前報^(6,7)に準じて調製したアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 完熟花粉および発芽花粉 (3% 寒天、30°C で発芽) を試料とした。

2. 酵素液の調製

完熟花粉 10 g を一定時間発芽させ、10 倍量の 0.5 M 塩化ナトリウム溶液を加え室温で 45 分間振とう後 (この操作で発芽花粉は全く壊れないことを顕微鏡で確認した⁽³⁾) 吸引濾過し、濾液を限外濾過 (Ultra filter UM-10 を使用) で濃縮した。濃縮液を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) に対して透析し、以後前報⁽⁵⁾に準じて DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィ

* 〒 020 盛岡市上田 3-18-8 岩手大学農学部農芸化学科

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020, Japan

一に供し、RNase A 活性測定用酵素液を調製した。0.5 M 塩化ナトリウム溶液で RNase A を溶出させた後の花粉に、10 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) を加え、フレンチプレス破碎 (400~600 kg/cm²) 後遠心分離 (17,000×g, 20 分間) する。得られた上清に硫酸アンモニウムを加えて 0.7 飽和とし、生じた沈殿を遠心分離 (17,000×g, 20 分間) で集め、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) に対して透析し、以後前

報⁽⁵⁾に準じて DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィに供し、RNase B 活性測定用酵素液を調製した。なお完熟花粉についても上記に準じて処理し、酵素液を調製した。

3. 酵素活性の測定

前報⁽⁵⁾に準じて行った。

4. 塩素イオンの定量

Mohr 法を用いて行った。

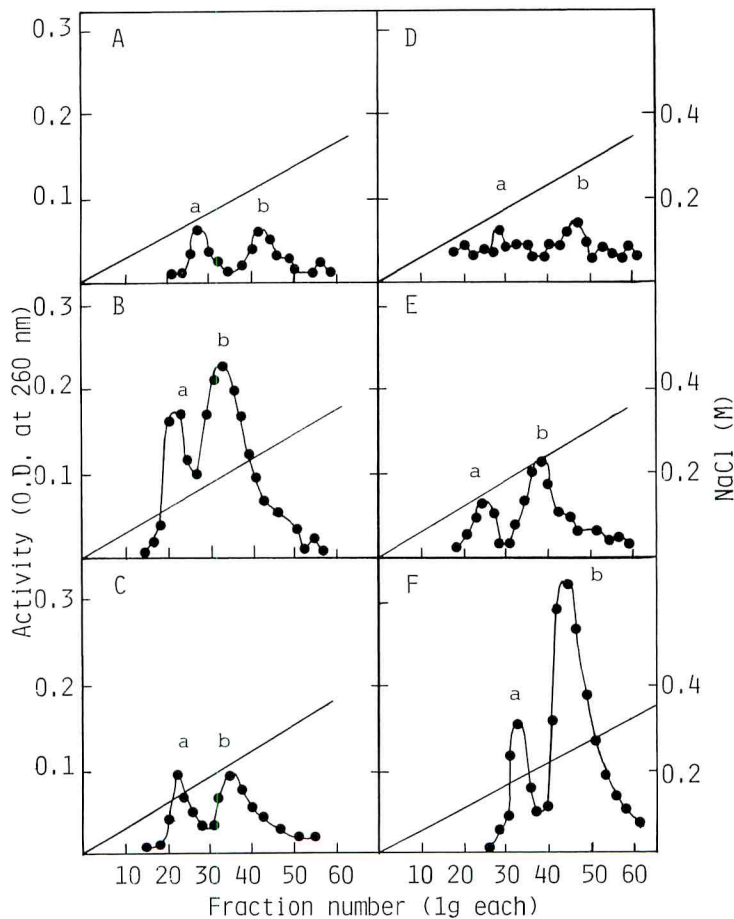


Fig. 1. Changes in RNase A activity during germination of pine pollen.

The dialyzed fraction described in the text was chromatographed on a DEAE-cellulose column (0.7×10.0 cm) according to the previous report⁽⁵⁾, and assayed for RNase activity (●) and NaCl concentration (—). RNase A was extracted from the pollen cultivated on a 3% agar medium at 30°C for the following time: A, 0 hr; B, 1 hr; C, 3 hr; D, 6 hr; E, 12 hr; F, 24 hr. a and b denote RNase 2A and RNase 4A activity, respectively.

結果および考察

前報で報告したが、アカマツ花粉の RNase 2 A と RNase 4 A は、Knox ら^(8,9)が種々の花粉について観察しているように、細胞壁の intine 部分に存在して非常に遊離しやすい存在形態をとっていると考えられる。RNase 2 A と 4 A は DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで、塩化ナトリウム濃度がそれぞれ 0.1 M、0.2 M 付近で溶出する⁽⁵⁾。アカマツ花粉の RNase B は細胞質に存在するものと推定され、RNase 1 B、2 B~3 B、4 B は DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで、塩化ナトリウム濃度が

それぞれ 0.05 M、0.11~0.15 M、0.2 M 付近で溶出する。RNase 2 B~3 B 混合液を 2 回目の上述のクロマトグラフィーに供すると、RNase 2 B と RNase 3 B は塩化ナトリウム濃度がそれぞれ 0.11 M、0.15 M 付近で溶出する⁽⁵⁾。

Fig. 1 に RNase A の発芽時における活性変動を示した。RNase 2 A と RNase 4 A は発芽前期（置床 1 時間）で著しい活性の増大を示すが（Fig. 1 B）、その後徐々に活性を減少し、発芽初期（置床 6 時間）では完熟花粉の活性レベルにまで低下し（Fig. 1 D）、再び増加する（Fig. 1 F）。とくに発芽 24 時間における RNase 4 A の活性増大が著しい。アカマツ花粉の

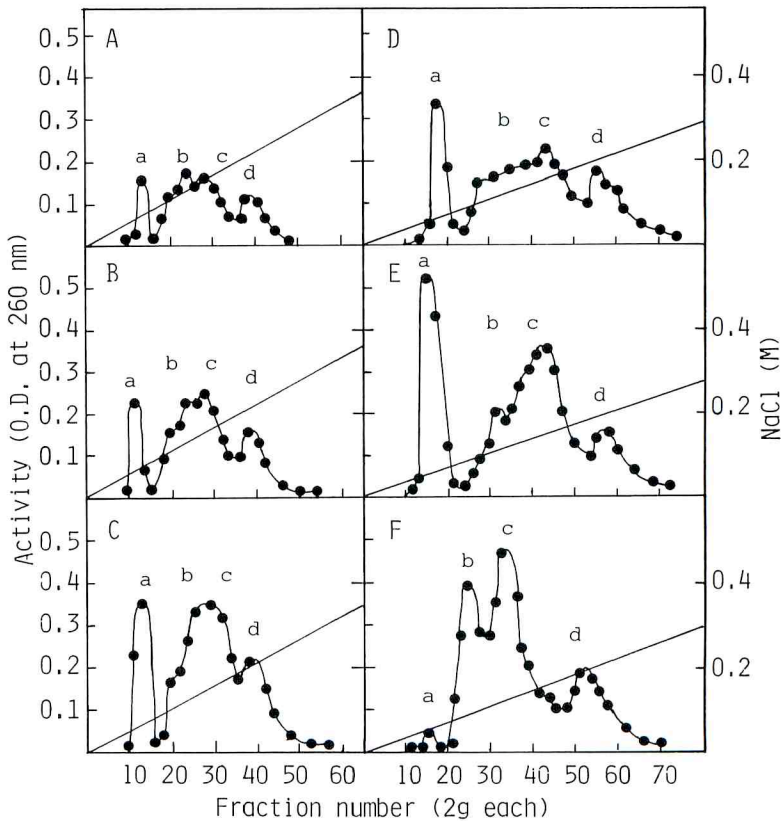


Fig. 2. Changes in RNase B activity during germination of pine pollen.

The dialyzed fraction described in the text was chromatographed on a DEAE-cellulose column (0.7×10.0 cm) according to the previous report⁽⁵⁾. Symbols A-F represent the same as in Fig. 1. a, b, c, and d denote RNase 1B, RNase 2B, RNase 3B, and RNase 4B activity, respectively.

RNase はすべて endonuclease として作用するが、RNase 2 A は酵母 RNA を分解して 5'-AMP、5' UMP、5'GMP を生成し、RNase 4 A は 2'、3'-サイクリック AMP (以下 2'、3'-cAMP のように略記する)、2'、3'-cUMP、2'、3'-cGMP、2'、3'-cCMP (少量) を生じる⁽⁵⁾ のように作用特異性の異なる RNase 2 A と RNase 4 A が、発芽時に異なった活性変動を示すことは興味深い。

Fig. 2 に RNase B の発芽時における活性変動を示した。RNase 1 B は発芽が進むにつれて活性を増大するが (Fig. 2 B~2 E)、発芽 24 時間で著しく活性が低下する (Fig. 2 F)。RNase 2 B と RNase 3 B は発芽前期 (置床 1~3 時間) に活性を増大し (Fig. 2 B、2 C)、発芽初期 (置床 6 時間) に若干活性が減少するが、発芽が進むにつれて再び活性を増大する (Fig. 2 E、2 F)。一方 RNase 4 B は 24 時間の発芽の間注目すべき活性の変動を示さなかった。なお、RNase 1 B、2 B、3 B は酵母 RNA を分解して 5'-AMP、5'

-UMP、5'-GMP を生成し、RNase 4 B は 2'、3'-cAMP、2'、3'-cUMP、2'、3'-cGMP、2'、3'-cCMP (少量) を生じる⁽⁵⁾

エンドウマメ子葉^(10,11) トウモロコシ胚盤⁽¹²⁾ オオムギ胚盤⁽¹³⁾ ササゲ種子⁽¹⁴⁾ などの RNase は、発芽が進むにつれて活性を増大することが報告されているが、アカマツ花粉の場合 RNase 2 A、4 A および RNase 1 B、2 B、3 B 活性が、発芽時に明らかに増減することを花粉の系で初めて明らかにした。アカマツ花粉の個々の RNase の発芽時における真の機能は明らかでないが、RNase A と RNase B の発芽時の活性変動の比較から、表在性 RNase A では RNA を分解して 2'、3'-サイクリックヌクレオチドを生成する RNase 4 A が、また細胞質に存在すると考えられる RNase B では RNA を分解して 5'-ヌクレオチドを生成する RNase 1 B、2 B、3 B が発芽時により重要な役割をもつことが推定される。

要 約

アカマツ花粉を用い、0.5 M 塩化ナトリウム溶液で振とうすることによって溶出するリボヌクレアーゼ (RNase A と命名) と、塩化ナトリウム溶液処理後に破碎花粉から溶出するリボヌクレアーゼ (RNase B と命名) の発芽時の活性を検討し、次の結果を得た。

- (1) RNase 2 A と RNase 4 A は発芽前期 (置床 1 時間) で著しい活性の増大を示すが、その後徐々に活性を減少し、発芽後期 (12~24 時間) に再び活性を増大した。とくに発芽 24 時間で RNase 4 A が著しい活性の増大を示した。
- (2) RNase 1 B は発芽が進むにつれて活性を増大するが、発芽 24 時間で活性が激減した。RNase 2 B と RNase 3 B は発芽前期 (置床 1~3 時間) に活性を増大し、発芽初期 (置床 6 時間) に若干活性を減少するが、発芽後期 (12~24 時間) に再び活性を増大した。RNase 4 B はほとんど発芽時の活性変動を示さなかった。
- (3) 以上の結果から、表在性 RNase 4 A および細胞質に存在すると考えられる RNase 1 B、2 B、3 B が発芽時により重要な役割をもつことを推定した。

本研究の一部は文部省科学研究費 (総合研究 A、No. 59340041 および No. 59340045) によって行ったものであり厚く感謝の意を表す。

文 献

- (1) T. Katsumata, N. Takahashi and S. Ejiri: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2161—2162 (1978).
- (2) 小笠原正美・江尻慎一郎・勝又梯三：日本農芸化学会東北支部，北海道支部合同学術講演会講演要旨集 p. 5 (1980).
- (3) 勝又梯三・江尻慎一郎・伊藤まき子・小野寺文也：岩手大学農学部報告，**16**，61—79 (1983).
- (4) 勝又梯三・江尻慎一郎・阿部秀夫：日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 228 (1979).
- (5) T. Katsumata, S. Ejiri, T. Tsushida, T. Otaki and M. Yaegashi: *Jpn. J. Palyn.*, **28**, 1—14 (1982).
- (6) 斗ヶ沢宣久・勝又梯三・太田達郎：日本農芸化学会誌（農化），**41**，178—183 (1967).
- (7) 勝又梯三・斗ヶ沢宣久：農化，**42**，1—7 (1968).
- (8) R.B. Knox and J. Heslop-Harrison: *Nature*, **223**, 92—94 (1969).
- (9) R.B. Knox and J. Heslop-Harrison: *J. Cell Sci.*, **6**, 1—27 (1970).
- (10) G.R. Barker and J.A. Hollinshead: *Biochem. J.*, **103**, 230—237 (1967).
- (11) G.R. Barker, C.M. Bray and T.J. Walter: *Biochem. J.*, **142**, 211—219 (1974).
- (12) J. Ingle and R.H. Hageman: *Plant Physiol.*, **40**, 48—53 (1965).
- (13) L. Ledoux, P. Galand and R. Huart: *Exp. Cell Res.*, **27**, 132—136 (1962).
- (14) H.C. Kapoor: *Phytochemistry*, **20**, 2617—2619 (1981).

Summary

The changes in the activities of ribonuclease A (RNase A) and B (RNase B) during the germination of the pollen of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. were studied. RNase A is defined as the components which are released from the cell-surface of the pollen with 0.5 M sodium chloride solution. RNase B is the components which are obtained from the residual fraction of the 0.5 M sodium chloride extraction by disruption with a French Press.

1. The activities of RNase 2A and RNase 4A increased rapidly at an early stage of germination (1 hr) and decreased with the lapse of germination time (3~6 hr), and then increased again at a later stage (12~24 hr). It was noteworthy that the activity of RNase 4A markedly increased at 24 hr of germination.
2. The activity of RNase 1B increased with the lapse of germination time (1~12 hr) and markedly decreased at 24 hr of germination. The activities of RNase 2B and RNase 3B increased at an early stage of germination (1~3 hr) and after the temporary decrease at 6 hr of germination increased again at a later stage (12~24 hr). The noticeable change in the activity of RNase 4B was not observed during germination.
3. The results described in this report suggest that RNase 4A which may be associated with the intine and RNase 1B, 2B, 3B which may be localized in the cytoplasm, may play a crucial role in the process of germination.

こんなにあります, アレルゲン

アレルギー抗原(アレルゲン)の種類は無数といわれています。これに備えるために、「多品種少量生産」という経済的ニ律背反に敢えて取り組んでいます。長くて苦しいアレルギー性疾患診療の一助として!

A list of ALLERGEN EXT. "TORII" For scratch and intradermal testings

- | | | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| I. House dust preparation | Sand borer | Bracken |
| House dust | Mackerel | (7) Fruits |
| II. Pollens | Pacific saury | Almond |
| Pine, red | Cod | Strawberry |
| Humulus japonicus | Half-dried Bonito | Japanese persimmon |
| Chrysanthemum | Yellow tail | Cherry |
| Japanese cedar | (5) Shellfishes | Japanese pear |
| Ragweed | Short-neck clam | Banana |
| Goldenrod | Squid | Grape |
| Orchard grass | Lobster | Apple |
| Pinus thunbergii | Crab | Apricot |
| Flag | Clam | Fig |
| Spinach | Abalone | Japanese chestnuts |
| III. Foods | Sea-urchin | Bitter orange |
| (1) Cereals | Oyster | Summer orange |
| Barley | Octopus | Loquat |
| Pice flour | (6) Vegetables | Citrus junos |
| Buckwheat flour | Azuki beans | (8) Others |
| Bread | Kidney beans, dried | Yeast, Baker's |
| Wheat flour | Soybeans, immature | Cocoa |
| Konnyaku flour | Cucumber | Soy sauce |
| Maize flour | Arrow-head | Laver |
| Glutinous rice flour | Burdock | Hope |
| (2) Eggs and Milks | Sweet potato | Undaria pinnatifida |
| Whole egg | Peas with pod, immature | Koji |
| Egg white | Champignon | Kelp |
| Milk (Cow's) | Ginger | Chocolate |
| Cheese | Broadbeans, immature | Hijikia-fusififormis |
| Egg yolk | Bamboo shoot | Miso |
| Quail's egg | Red pepper | IV. Epidermals |
| Milk (skimmed) | Eggplant | Dog hair |
| (3) Meats | Carrot | Cow's leather |
| Rabbit | Welsh onion | Chicken feather |
| Whale | Japanese butterbur | Hog hair |
| Pork | Japanese honeywort, blanchings | Rabbit hair |
| Smoked Bacon | Bakeri garlic | Cattle hair |
| Beef | Wasabia japonica | Cat hair |
| Chicken | Asparagus | Sheep wool |
| Mutton | Aralia cordata | V. Miscellaneous |
| (4) Fishes | Cabbage | Flax |
| Jack mackerel | Ginkgo seeds | Silk |
| Iwashi | Pepper | Japanese cedar (wood) |
| Bonito | Sesame seeds | Tatami |
| Flatfish | Taro | Kapok |
| Salmon | Lentinus edodes | Sandal-wood |
| Shark | Potato | Wheat straw |
| Sea-bream | Celery | Cotton |
| Flying fish | Japanese radish | Rice plant, dried |
| Flounder | Onion | Newspaper |
| Tuna | Tomato | Buckwheat chaff |
| See-eel | Allium tuberosum greens | Tea ground |
| Eel | Garlic | Japanese cypress (wood) |
| Barracuda | Lotus | Pine (wood) |
| | Spinach | Rice chaff |
| | Peanuts | Smoke (cigarette) |
| | Head lettuce | |

"トリイ"のアレルゲン各種についての適応症、用法・用量、使用上の注意等については製品添付の説明書をご参照ください。

製造
発売元



鳥居薬品株式会社

東京都中央区日本橋本町3-3

ALG 5312