

原 著

花粉発生の細胞遺伝学的研究〔I〕

生殖核（精核）形成の機構

田中一朗*・伊藤道夫**

Cytogenetical Studies on Pollen Development [I]

On the mechanism of formation of generative nucleus (sperm nuclei)

Ichiro TANAKA* and Michio ITO**

(受付：1984年8月13日)

まえがき

被子植物の花粉発生では、重複受精にあずかる配偶子として精核を形成することが遺伝的に重要である。葯から飛散する成熟花粉には、種によってすでにこの精核を有する三核性花粉とまだ精核をもたない二核性花粉とが存在するが、二核性花粉中の生殖核は花粉管伸長後短時間で精核へと分裂することから、この二核性花粉と三核性花粉の違いは単に生殖核の分裂時期の違いに起因するものであって、基本的には両者は同じであると考えられる。そこで、花粉発生では、まず第1に精核を形成し得る生殖核を形成することが重要である。

生殖核は減数分裂後遊離した一核性花粉細胞（花粉小孢子）の半数性体細胞分裂によって生じるが、

この分裂は典型的な不等細胞分裂であることが古くから知られている^{1,2,3,4)}すなわち、核分裂が細胞の一端に偏って起こり、核分裂後隔膜形成体が細胞の外側に近い方の終核をとり囲むようにして形成され、大小の2細胞を生じる。分裂後、小さな細胞中の核が生殖核に、一方が栄養核に分化する。このことから、生殖核の形成にとっては一核性花粉細胞の核の位置、さらには分裂後の2核の位置が非常に重要であると推定される。

一般に、生殖核・栄養核は形態的に、また染色性の差によって明らかであるだけでなく、機能的にも大きく異なっている。すなわち、生殖核は続いてDNA合成をして分裂し精核を形成するのに対して、栄養核は以後分裂をすることがない。したがって、1個の核に由来する2核のうち、生殖核だけはDNA合成

* 横浜市立大学文理学部生物教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2

* Department of Biology, Yokohama City University, 22-2, Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan

** 名古屋大学理学部生物学教室 〒464 名古屋市千種区不老町

** Department of Biology, Faculty of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan

機能をもつよう遺伝的に調節されていることになる。

今回、一核性花粉細胞の核が機能をもつ生殖核を形成するまでの挙動と DNA 合成との間に特別な関係があることを見出したので、その結果について報告するとともに、生殖核の形成、さらには機能発現の機構について考察する。

実験材料と方法

材料として、温室内で育てられたテッポウユリ (*Lilium longiflorum* c. v. Georgia) を使用した。テッポウユリでは、蕾の長さと同様の花粉の発生とが相関関係をもつので、蕾の長さを測ることによって発生時期を知ることができる。その相関関係についてはすでに報告した⁽⁵⁾ (図 1)。すなわち、一核性花粉細胞 (uninucleate microspore) 期は蕾の長さ 24~58 mm に相当し、そのうち 24~48.5 mm が細胞周期の G₁ 期、48.5~55 mm が S 期、55~58 mm

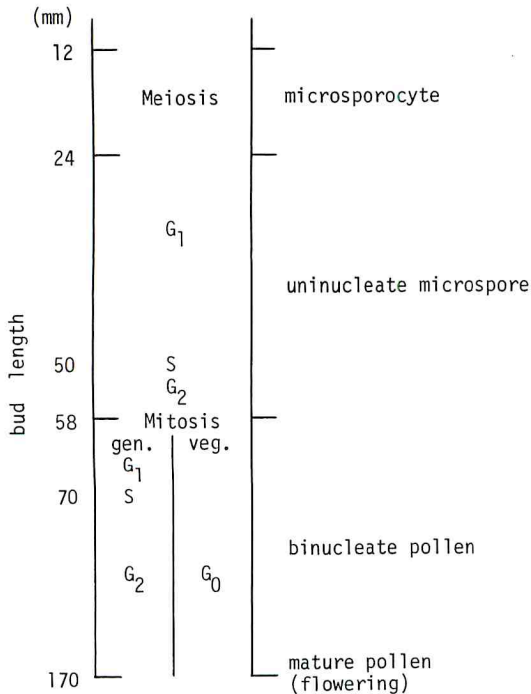


図 1 テッポウユリの蕾の長さと同様の花粉形成過程における細胞周期の進行との関係

が G₂ 期、58 mm が分裂期である。二核性花粉であるテッポウユリでは、58 mm 以降開花に至るまでが生殖核 (generative nucleus)・栄養核 (vegetative nucleus) をもつ二核性花粉 (binucleate pollen) 期となる。ただし、この関係は栽培条件、温度、植物体における蕾の位置により多少変動するため、必要に応じてその相関関係を調べるとともに、常に植物体の第 1~2 番目の蕾 (通常植物体は 5~7 個の蕾をつける) を実験に使用した。

まず、各時期の一核性花粉細胞、二核性花粉をフォイルゲン染色し、核・染色体の位置とその形態について詳しく調査した。テッポウユリの花粉細胞、花粉は厚い外壁をもち、核の正確な観察が困難な場合が多かったので、通常は押しつぶしにより原形質体を外壁の外に出させた後観察した。次に、DNA 合成期にある細胞を調べるために、各時期の細胞を葯から取り出し、10 μ Ci/ml の ³H-チミジン (spec. act. 20 Ci/mM) を含む培養液⁽⁶⁾中で 2 時間培養した。そのオートラジオグラフのため、カルノア液で固定後、フォイルゲン染色した細胞を Sakura NR-M 2 乳剤で被覆し、4°C で 1 カ月放置した。露光後 D-19 で現像し、ユーパロールで永久標本とした。

実験結果

(1) 発生の進行に伴う核の位置、形態の変化

減数分裂直後の一核性花粉細胞の核は、だ円形の細胞のほぼ中央部に位置し、押しつぶしたとき円形状に観察される (図 2 A)。蕾の長さが 33 mm を過ぎると、核は細胞の長軸方向の一端に位置し、細胞膜と接するようになる (図 2 B)。この核の移動は約 33 mm の蕾中でほぼ同調して、しかも非常に短期間で起こる。一端に移動した核はしばらくの間やはり円形状であるが、蕾の長さが 45 mm を過ぎると、核はその一端でだ円形に変形し、細胞膜と広く接触するようになる (図 2 C)。この変形は一時的なもので、蕾の長さが 50 mm を過ぎると、核は再び円形状に戻り、さらに細胞膜から遊離する (図 2 D)。したがって、55 mm の蕾中の細胞では核と細胞膜の接触はみ

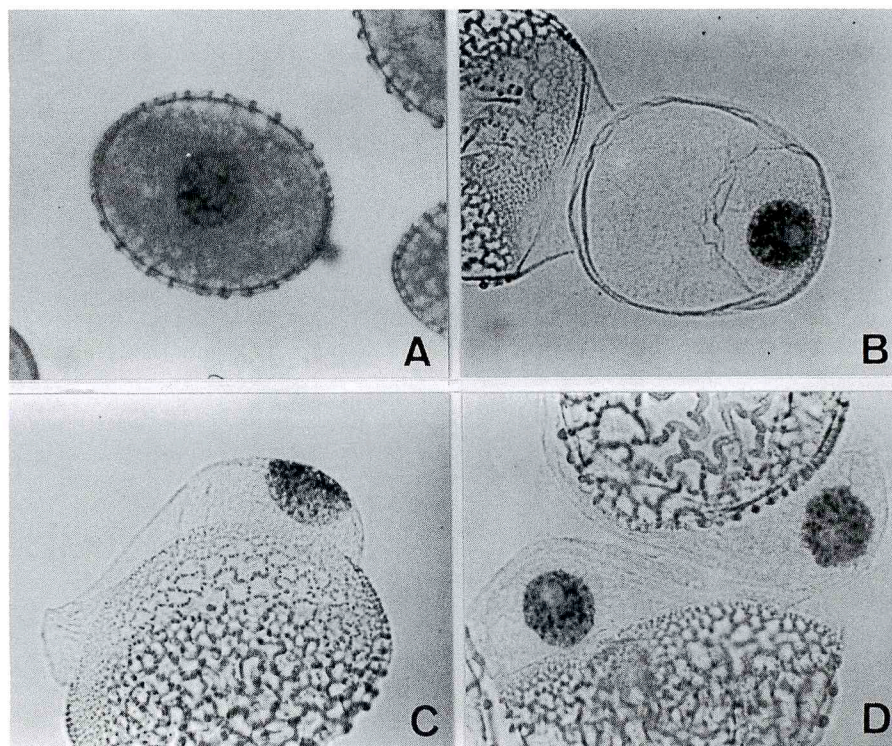


図2 テッポウユリの一核性花粉細胞の発生に伴う核形態の変化。蕾の長さ 30 mm (A)、35 mm (B)、45 mm (C)、55 mm (D)

られないが、核は細胞の一端に偏ったままである。

核分裂は約 58 mm の蕾中の細胞で始まり、紡錘体は細胞の長軸方向に形成される(図 3 A、B)。その際、後期では、紡錘体の一方の極が細胞膜に接するかのように観察される(図 3 C)。続く終期では、終期核の一つ(将来の生殖核)が細胞膜と接触している(図 3 D)。この接触部位は予め中間期核が接触していた部位と一致する。

分裂直後の 2 核はいずれもほぼ円形であるが、2 核間にはすでに大きさ、染色性において差が認められ、生殖核は小さく濃く染色されるのに対し、一方の栄養核は薄くて大きい(図 3 E)。蕾の長さが 65 mm を過ぎると、生殖核は一端に移動し、そこでだ円形に変形して細胞膜と広く接触するようになる(図 3 F)。

この接触部位も一核性花粉細胞の中間期核が前もって接触していた部位と一致する。一方、栄養核は染色性がさらに弱まり、不定形に変形するが、細胞膜との接触はまったく認められない。この生殖核と細胞膜との接触も一時的で、生殖核はやがて細胞膜より離れて円形に戻る。続いて、生殖核を含む生殖細胞は花粉内膜より離れて栄養細胞中に浮遊した状態となり、しばらくして成熟花粉になる。この過程では生殖核が生殖細胞質中で再びだ円形に変形した状態が長く続く。

(2) DNA 合成期核の特徴

上記の花粉発生過程では、2 度の DNA 合成が起こることがすでに知られている^(6,7) 1 回は一核性花粉細胞の S 期であり、後の 1 回は二核性花粉の生殖核で

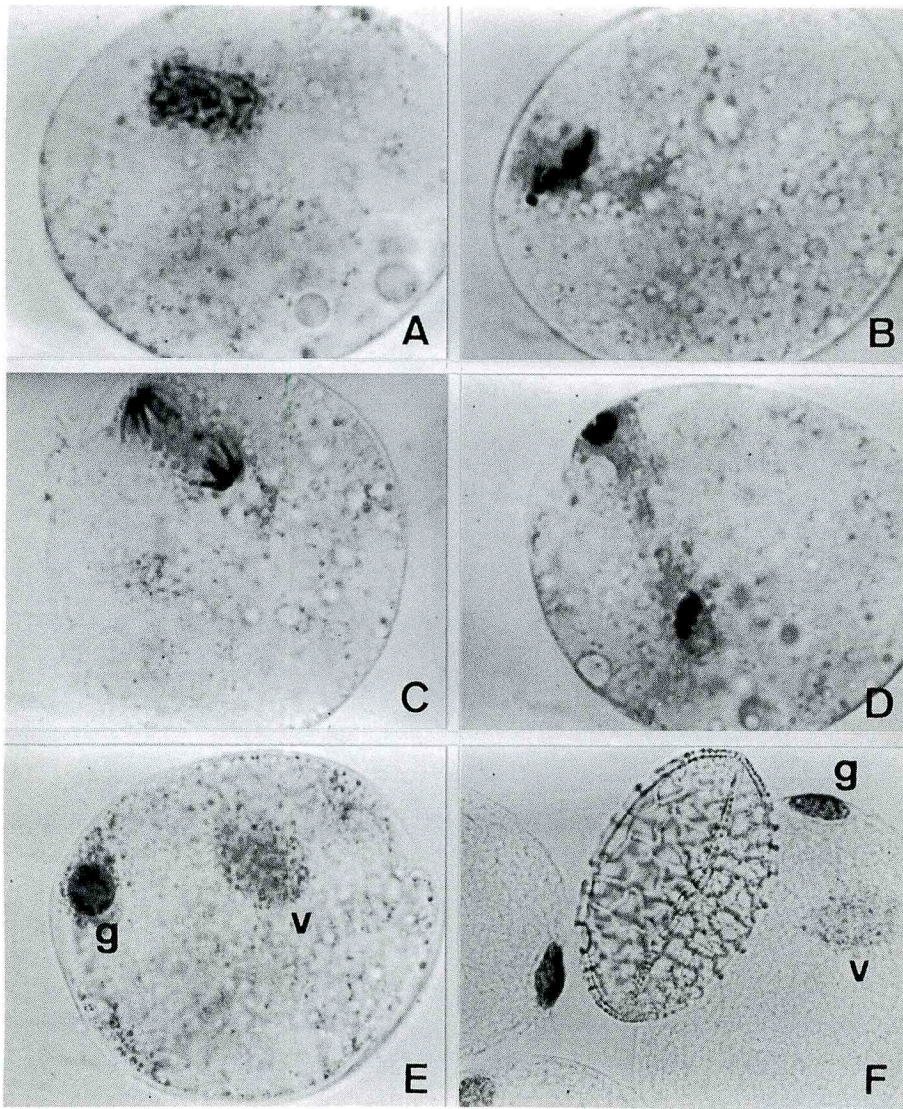


図3 テッポウユリの一核性花粉細胞の核分裂過程と二核性花粉の核形態の変化。蕾の長さ 58 mm (A前期、B中期、C後期、D終期)、60 mm (E)、65 mm (F)、g 生殖核、v 栄養核

起こる。今回のオートラジオグラフの結果においても、有意な銀粒子をもつ核は、50 mm 前後 (48~54 mm) の蕾中の一核性花粉細胞の核と 70 mm 前後 (65~75 mm) の蕾中の二核性花粉の生殖核だけであった。

一核性花粉細胞のラベル核は、48 mm の蕾中で、核が細胞の一端で円形に変形し細胞膜と広く接触

した状態でまず検出された (図 4 A)。この時期には変形したラベル核とともにラベルされない変形核も同時に多く存在する。続いて、蕾の長さが 50 mm を過ぎると、変形核に加えて円形で細胞膜に接する核や、さらに細胞膜から離れた核においても銀粒子は検出される。ところが、55 mm 以降の一端に位置する核では有意な銀粒子は認められなかった。

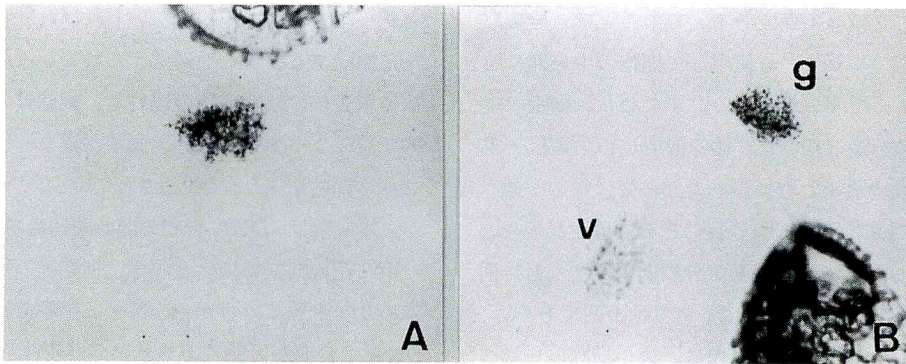


図4 テッポウユリの一核性花粉細胞と二核性花粉の³H-チミジンオートラジオグラフ。蕾の長さ48 mm (A)、65 mm (B)、g 生殖核、v 栄養核

一方、二核性花粉の生殖核における銀粒子も、生殖核がだ円形に変形し、細胞膜と広く接触した後に初めて検出された(図4 B)。ラベル核はこの変形核だけでなく、以後は円形の核もラベルされるが、生殖細胞が花粉内膜から離れ、栄養細胞中に浮遊した時期以降は、核形態によらず、銀粒子は検出されなかった。

考 察

以上の結果から、一核性花粉細胞の核、二核性花

粉の生殖核はいずれも特定の時期に細胞の一端でだ円形に変形し、細胞膜と広く接触することが明らかにされた。オートラジオグラフの結果は、その現象がいずれもG₁後期からS期の初めにかけて起こることを示した(図5)。これらの核は最終的には被子植物の雄性配偶子である精核を生ずる核なので、その挙動の意義を生殖核(精核)形成の機構と関連づけて考察すると次のようになる。

まず、一核性花粉細胞の核が細胞の一端に位置することは不等細胞分裂、そして生殖核・栄養核の分

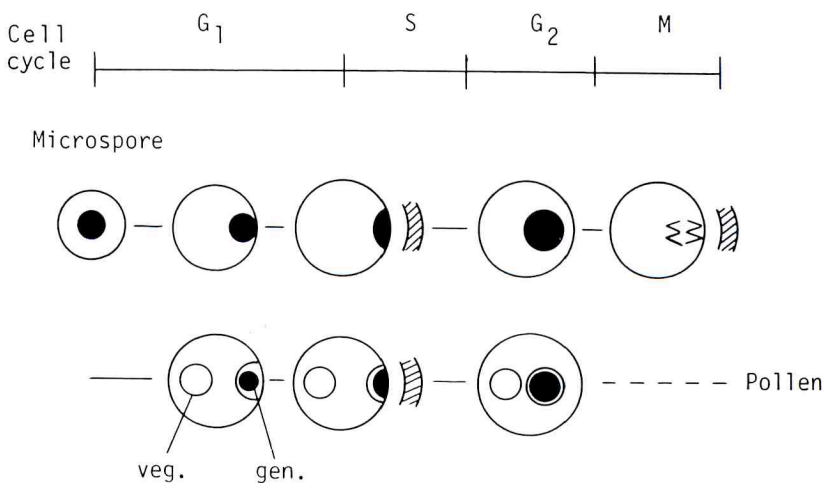


図5 花粉形成過程における核形態の変化、DNAの合成と生殖核の形成(模式図)

化にとって必須の条件である。このことは、分裂期核の位置をコルセミドを使用して細胞の中央部に戻すことによって明らかである⁽⁸⁾すなわち、細胞の中央部での核分裂は均等な2核を形成し、生殖核・栄養核の分化を誘導しない。したがって、核の一端への移動は将来の不等細胞分裂にとって重要な現象といえる。しかし、この移動が分裂期よりずっと以前のG₁中期に起こる必然性については不明である。

オートラジオグラフの結果は、核が細胞の一端へ移動後、さらにだ円形に変形し、一端の細胞膜と広く接触した後にDNA合成が始まることを強く示唆した。また、この一端は将来の生殖核が形成される位置と一致することから、単にDNA合成の開始を誘導するだけでなく、生殖核の形成を支配する部位であることも予想された。

生殖核・栄養核の分化の機構の説明としては、これまで不等細胞分裂による細胞質の量的、質的な差がその後の核の分化を導くと一般に考えられている。実際に、細胞質は生殖細胞と栄養細胞とで顕著な差があることが光顕・電顕観察で認められており^(3,4)また生殖細胞にはRNAが極めて少ないこともわかっている^(9,10)ところが一方では、分裂の後期や終期ですでに核分化の徴候(2核間の染色性の差)が現れる種もある⁽¹¹⁾ことから、細胞の一端で起こる核分裂の機構自体が生殖核・栄養核の分化と直接関係している可能性も十分考えられる。もしそうなら、この接触部位は紡錘体の1つの極を維持し、生殖核形成にとって重要な役割をもつ部位といえるかもしれない。すでに述べたコルセミドの効果⁽⁸⁾は、この接触を乱すことで説明できる。

一方、分裂後の生殖核・栄養核の機能は大きく異なり、生殖核が続いてDNA合成を行うのに対し、栄養核はDNAの合成を行わず、代りにRNA、タンパク質などの合成能が生殖核に比べて高い^(12,13)このこ

とから栄養核は、花粉管核とも呼ばれ、花粉管の伸長に機能する核と一般に考えられている。この生殖核・栄養核の機能発現の違いも、細胞質の量的、質的な差によって支配され、両核が異なる塩基性核タンパク質をもつことで説明されている^(4,15,16)しかしながら本実験は、DNA合成の開始を誘導する部位は、一核性花粉細胞の場合と同様、細胞膜の特定の位置にあり、生殖核だけがその部位と接触できるためにDNAの合成が可能であるという可能性を示した。この機構が生殖核の精核への分裂を可能にすると思われる。したがって、細胞膜の特定部位は、生殖核の形成に関与するとともに、DNA合成能を支配することによって、生殖核の機能発現にもかかわりあっているといえそうである。

DNA合成の開始が核と細胞膜との広い接触のもとで起こる機構については現在のところまったく不明である。ただ、³H-チミジンを30分間与えた pulse-label の結果は、DNA合成が細胞膜との接触部から始まる可能性を示した⁽⁷⁾したがって、一旦DNA合成が始まると、広く接触する必要はなくなり、核は円形に戻り、さらには細胞膜から離れるのではないかと推定される。48 mm や 54 mm、また 65 mm や 75 mm の蕾の labeling index の低さは、このDNA合成に伴う核の挙動が1つの約内においても低い同調性によると説明できる。

DNA合成を終了した生殖核が生殖細胞中で再びだ円形に変形するのは、まったく別の現象であり、この変形には塩基性核タンパク質や微小管が関与しているらしい^(15,18)

最後に、核の移動や変形の機構については不明であるが、テッポウユリの減数分裂後の一核性花粉細胞は葯から取り出して培養しても正常な生殖核、さらには精核を形成する^(19,20)ことから、減数分裂終了以前にその制御機構の関与が示唆される。

要 約

テッポウユリの花粉発生に伴う核形態の変化を、特に DNA 合成との関係で調べ、次の結果を得た。

- 1) 一核性花粉細胞の発達に伴う顕著な現象は細胞内での間期核の移動である。花粉細胞周期の G₁ 中期に、核はだ円形細胞の中央から長軸方向の一端へ移動する。
- 2) 一端へ移動した核は、G₁ 後期になると、円形からだ円形に変形し、一端の細胞膜と広く接触する。³H-チミジンを使用したオートラジオグラフの結果は、一核性花粉細胞の DNA 合成がだ円形に変形した状態で始まることを示した。一旦 DNA 合成が始まると、核は円形に戻り、さらに細胞膜から遊離する。
- 3) 一核性花粉細胞の核分裂は細胞の一端に偏って起こり、紡錘体の 1 つの極は長軸方向の一端の細胞膜に接する。分裂後生殖核はその一端に形成される。
- 4) 生殖細胞周期の G₁ 後期に、生殖核は円形からだ円形に変形し、一端の細胞膜と広く接触する。オートラジオグラフの結果は、生殖核の DNA 合成が一核性花粉細胞の核と同様にだ円形に変形した状態で始まることを示した。一方、二核性花粉の栄養核はラベルされなかった。
- 5) 一核性花粉細胞や二核性花粉の長軸方向の一端にある細胞膜は生殖核の形成や、さらに精核の形成に重要な役割を果していることが推察される。

引 用 文 献

- 1) Brumfield, R.T. (1941): Amer. J. Bot. 28, 713.
- 2) Sax, K. and L. Husted (1936): Amer. J. Bot. 23, 606.
- 3) Heslop-Harrison, J. (1968): J. Cell Sci. 3, 457.
- 4) Sanger, J.M. and W.T. Jackson (1971): J. Cell Sci. 8, 289.
- 5) Tanaka, I., Taguchi, T. and M. Ito (1979): Bot. Mag. Tokyo 92, 291.
- 6) Taylor, J.H. and R.D. McMaster (1954): Chromosoma 6, 489.
- 7) Hotta, Y. and H. Stern (1963): Proc. Natl. Acad. Sci. 49, 648.
- 8) Tanaka, I. and M. Ito (1981): Protoplasma 108, 329.
- 9) La Cour, L.F. (1949): Heredity 3, 319.
- 10) Jalouzot, R. (1969): Exp. Cell Res. 55, 1.
- 11) Terasaka, O. and R. Tanaka (1974): Bot. Mag. Tokyo 87, 209.
- 12) Takats, S.T. (1968): J. Cell Biol. 38, 509.
- 13) Reynolds, T.L. and V. Raghavan (1982): Protoplasma 111, 177.
- 14) Martin, P.G. (1960): Heredity 14, 125.
- 15) Arima, T. and A. Kusanagi (1977): Protoplasma 91, 343.
- 16) Thiebaud, C.H. and F. Ruch (1978): Histochem. 57, 119.
- 17) Tanaka, I. and M. Ito (in preparation).
- 18) Sanger, J.M. and W.T. Jackson (1971): J. Cell Sci. 8, 303.
- 19) Tanaka, I. and M. Ito (1980): Plant Sci. Lett. 17, 279.
- 20) Tanaka, I. and M. Ito (1981): Plant & Cell Physiol. 22, 149.

Summary

Nuclear morphology during the development of microspore and pollen in the lily, *Lilium longiflorum* was examined with special reference to DNA synthesis. Results are as follows.

1. A clear cytological change correlated with microspore development is the displacement of the interphase nucleus in the uninucleate microspore. The displacement of nucleus occurs from the center towards the longitudinal periphery of the elliptical cell at the mid-G₁ phase of the microspore cell cycle.
2. At the late-G₁ phase the shape of displaced nucleus changes from circular to elliptical to be widely attached with cell membrane near the longitudinal periphery. Autoradiographic study using ³H-thymidine showed that DNA synthesis began in the transformed nuclei. During DNA synthesis the transformed nuclei return to circular and are detached from cell membrane.
3. Nuclear division in microspore is a polar one, and one pole of spindle seems to exist at cell membrane near the longitudinal periphery. The generative nucleus is formed near this periphery.
4. At the late-G₁ phase of the generative cell cycle the shape of generative nucleus changes from circular to elliptical to be widely attached with cell membrane near this periphery. Autoradiographic study showed that DNA synthesis began in this transformed generative nuclei, as in microspore nuclei. On the other hand, the vegetative nucleus in the binucleate pollen was not labeled.
5. It is assumed that cell membrane near the longitudinal periphery of the microspore and pollen has important role in the formation of generative nucleus and two sperm nuclei.

○ 新著紹介 三木順一著 スミレ事典

日本の野生スミレ約 100 種の総カラーの単行本。月刊さつき研究社発行。希望者は下記へ

〒 679—22 兵庫県神崎郡福崎町福崎新 178 三 木 順 一

○ 第 30 回国際養蜂学会議

名古屋市公会堂で 6 日間にわたり盛大に挙行される。日本花粉学会々員・会友の多くの参加を望む。

昭和 60 年 10 月 10 日～16 日 玉川大学ミツバチ研究会