

蛍光抗体法によるヌママムラサキツユクサ生殖細胞紡錘体の解析

寺坂 治・新津 恒良

慈恵医大生物学教室 〒182 調布市国領町8-3-1

Peculiar Spindle Configuration in the Generative Cell of *Tradescantia paludosa* by Immunofluorescence Method

Osamu TERASAKA and Tsuneyoshi NIITSU

*Department of Biology, Jikei University School of Medicine,
Kokuryo, Chofu, Tokyo 182, Japan*

(1989年3月20日 受理)

The peculiar spindle configuration of the generative cells in pollen tubes of *Tradescantia paludosa* was revealed by anti- α -tubulin immunofluorescence methods. The metaphase chromosomes of the species were aligned in some irregular forms without a distinct equatorial plane, in mass, in tandem or in intermediate along the spindle axis. The sister chromosomes, however, divided anti-parallelly during anaphase. The metaphase spindles were constructed along the pollen tube and showed some peculiar configurations corresponding to the chromosome alignments. That including the chromosomes in mass had a leaf-like or otherwise complicated appearance, whereas that with the chromosomes arranged in tandem was extremely elongated. The kinetochore microtubules (k-MTs) developed from the chromosomes arranged irregularly were of different length and it was impossible to distinguish the two half-spindles. The sister chromosomes were made to migrate toward the poles by the k-MTs shortening and the spindle elongation at anaphase, and in the center of the elongated spindle body a small phragmoplast was organized at telophase. No pre-prophase band of MTs was observed during the cell cycle.

From the above results, it was considered that the peculiar spindle configuration of the species was limited by the long and narrow space in the pollen tube or generative cell.

Key words : Generative cell, Immunofluorescence, Microtubule, Spindle, *Tradescantia paludosa*.

緒 言

被子植物の2細胞性花粉の生殖細胞は、花粉管という限られた細長い空間内で分裂し、2個の精細胞を形成する。ユリ科植物など多くの植物の生殖細胞分裂は、一般的な分裂様式であり、中期染色体は花粉管に沿

て形成される紡錘体の軸に垂直な赤道板を形成する。一方、ホウセンカなどある種の植物では、中期染色体が花粉管長軸に沿って1~数列に並ぶにもかかわらず、後期には姉妹染色分体はその軸方向に分離することが報告されていたが、この特異な染色体配列と分裂に対

応する紡錘体の実体は多くの種で不明であり、ホウセンカなどでは紡錘体は存在しないという報告すらあった。⁽¹⁾ Johnston (1941)⁽²⁾ は染色法の改良によって数種の生殖細胞の紡錘体を観察し、不明であるのは方法論上の問題であると指摘した。しかし、彼の観察は通常の分裂様式をもつ種のみであり、特異な種については依然、不明のままであった。筆者らは、すでに抗- α -チューブリン間接蛍光抗体法の導入により、ホウセンカなど数種について、染色体動態に対応した特異な紡錘体構造が存在することを明らかにした。⁽³⁾

本研究では、被子植物の生殖細胞紡錘体の総合的解明の一環として、染色体配列が特異で、紡錘体構造が不明なヌママラサキツユクサの生殖細胞を間接蛍光抗体法により解析した。

材料および方法

本研究は、ヌママラサキツユクサ (*Tradescantia paludosa* Anderson et Woodson) の花粉を Brewbaker と Kwack (1963)⁽⁴⁾ の培地を蔗糖 12%, pH 8.3 に改変した液体培地で培養し、発芽、伸長した花粉管内の生殖細胞を用いる。抗- α -チューブリン間接蛍光抗体法は Wick ら (1981)⁽⁵⁾ の方法に基づいている。

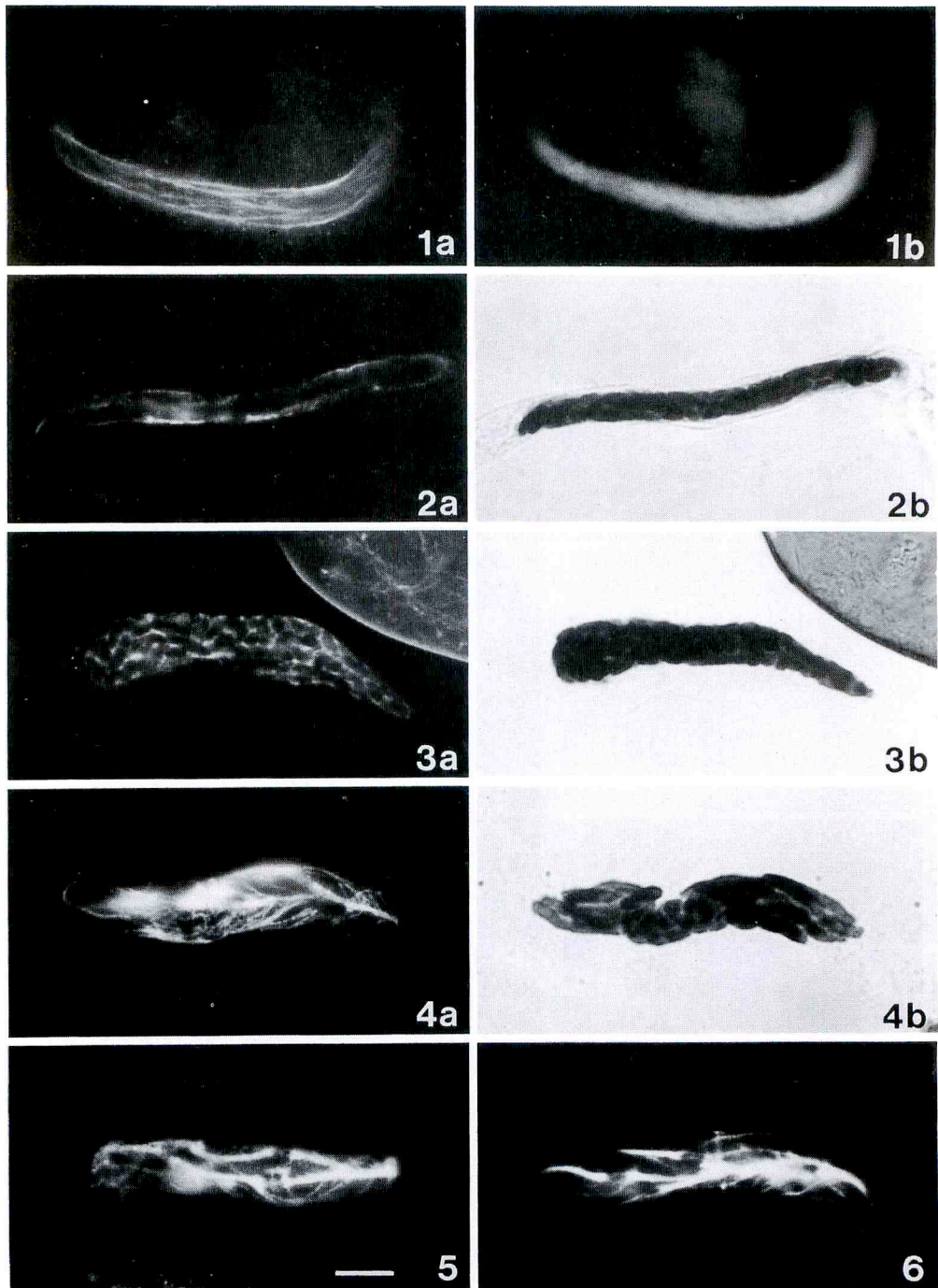
花粉管が発芽、伸長中の花粉を培養開始後、20分毎に 3.7% パラホルムアルデヒド液で 1 時間固定する。固定液は、5 mM EGTA を含む 50 mM リン酸緩衝液で pH 6.8 に調整する。花粉は各処理ごとにリン酸緩衝液で 10~30 分間それぞれ洗浄する。0.1% ポリレーリンであらかじめコーティングしたカバーガラス上で花粉を空気乾燥させたのち、1% セルリシン液で 20 分間花粉管壁を消化し、-10°C の 50% メタノールで 10 分間処理する。微小管安定化緩衝液 (1% トリトン X-100, 0.1 M PIPES, 2 mM EGTA, 1 mM 硫酸マグネシウム, 0.4 M マンニトール, pH 6.9) で 30 分間洗浄後、一次および二次抗体でそれぞれ 37°C で 1 時間ずつ標識する。一次抗体は、リン酸緩衝液 (PBS, Sigma 社) で 1,000 倍に希釈し

たマウス・モノクローナル抗- α -チューブリン抗体 (Amersham 社)、二次抗体は、PBS で 40 倍希釈したヤギ-抗マウス IgG-FITC (Tago 社) を用いる。標識した花粉を 100 mg/ml トリエチレンジアミンと 50% 無蛍光グリセリンを含む PBS で封入した後、ニコソ位相差蛍光顕微鏡 (Microphoto-FX) により観察する。観察した生殖細胞のより正確な分裂時期を決定するため、抗体による標識後、1 μ g/ml DAPI 液、または蛍光観察後 1% 酢酸オルセイン液を用いて染色体または核を再染色する。

実験結果

本種の成熟花粉粒は 2 細胞性である。生殖細胞は栄養細胞内で著しく伸長し、核周辺に存在するわずかな細胞質内には、長い微小管が細胞長軸に沿って多数配向している。栄養細胞には構築された微小管はほとんどなく、細胞質全体が弱い蛍光を発する (Fig. 1)。

培養開始後、約 40 分で生殖細胞は花粉管内へ移動する。この時期の生殖細胞は、早い分裂前期であり、それまで細胞質全体に配向していた微小管は消失し、核膜近辺に局在する。根端細胞においてみられるような Pre-prophase band は観察されない (Fig. 2)。培養開始後 3 時間の前期細胞では、微小管は集塊状をなす染色体の間に断片的に観察される (Fig. 3)。4~5 時間になると、前中期から中期の細胞が出現する。本種の中期染色体は $n=6$ で、17.3~14.3 μ m と大型である。それらの多くは典型的な赤道板を形成せず、狭い空間に密集するもの、花粉管に沿って不規則なタンデム状に並ぶもの、その中間型のものなど多様な配列が観察される。また、低頻度ではあるが、培養過程で、花粉管が異常に肥大することがあり、その場合の中期染色体はほぼ通常の赤道板を形成する。⁽⁶⁾ 紡錘体はその染色体配列に対応した構造となり、多様で特異な形状となる。Fig. 4~7 にそれぞれの例を示す。染色体が密集する細胞の紡錘体内では、動原体系微小管束 (k-MTs) やそれらの数本が集まった太い束が形成され、その束より細い微小管が葉脈状に分枝する



Figs. 1-9. Mitotic figures during the generative cell division in *Tradescantia paludosa*. Figures a and 5, 6, 9: MTs labeled by FITC (immunofluorescence). 1b, 7b, 8b: nucleus or chromosomes stained by DAPI and 2b, 3b, 4b: by aceto-orcein. Bar, 10 μ m.

Fig. 1. Generative cell in the matured pollen grain.

Figs. 2 and 3. Prophase cells in the pollen tubes.

Figs. 4-6. Metaphase cells with the chromosomes arranged in mass.

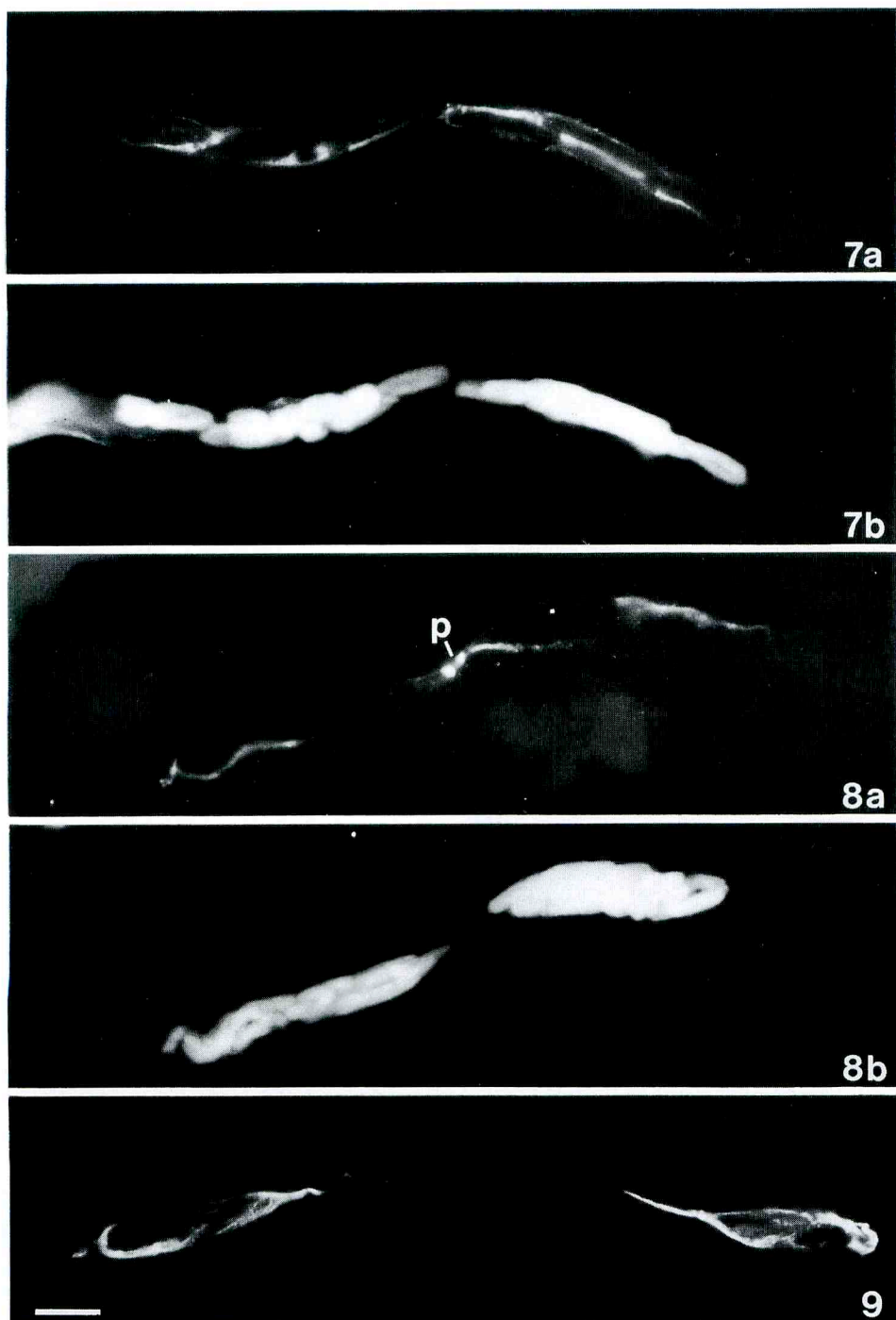


Fig. 7. Metaphase cell with the chromosomes arranged in tandem. Individual k-MTs were distinctly identified.

Fig. 8. Late anaphase cell. p, phragmoplast.

Fig. 9. Two sperm cells.

(Fig. 4-6). 染色体がタンDEM状に配列する細胞では紡錘体は著しく伸長し、各染色体から発達する個々のk-MTsが明瞭に識別される。k-MTs以外の微小管が紡錘体周辺部にわずかに発達する (Fig. 7). いずれの場合も、紡錘体軸は花粉管長軸方向に形成されるが、分裂極の位置および半紡錘体同士は明瞭には判別できない。また、各染色体の動原体部位による特定の平面即ち、赤道板の形成は観察されない。姉妹染色体の後期移動はk-MTsの短縮と紡錘体の伸長によって行なわれる。極方向への移動距離は、各染色体ごと大きく変異する。伸長した紡錘体の中央部は細くくびれ、その位置に非常に小型の隔膜形成体が発達し、細胞板を形成する (Fig. 8). 分裂した2娘細胞は、細長い尾状の突出部をもつ紡錘形であり、その長軸に沿って微小管が配向する (Fig. 9).⁽⁷⁾

花粉管、即ち、極度に伸長した栄養細胞内には、その伸長の程度と部位により、微小管の異なる構築が観察される。発芽直後の花粉管内には、構築された微小管はほとんど存在しない。数100 μm 以上伸長したものは、先端部の数10 μm には微小管はなく、それより花粉粒に近い基部側には多数の長い微小管が花粉管長軸に沿って直線的に配向する。しかし、さらに花粉粒側の基部では、波状のやや太い束となり、部分的に断片化する。十分に伸長した花粉管の基部では断片化が進み、微小管はほとんど消失する。また、分裂中の生殖細胞周辺の花粉管内でも微小管はほとんど存在しない。

考 察

生殖細胞や花粉管内に微小管が存在することは、従来より電顕法^(8,9)および蛍光抗体法^(10,11)によって多くの被子植物で立証され、その存在の仕方は、本種における観察結果とほぼ一致している。しかし、生殖細胞分裂における微小管の動態についてはほとんど不明のままであった。

ヌマムラサキツユクサの生殖細胞分裂では、本種に特異な染色体配列と分裂の様式があり、それに対応す

る特異な紡錘体構造が、抗- α -チューブリン間接蛍光抗体法により、全分裂過程を通じ明らかになった。この特異な構造は、すでに報告したホウセンカやエビネなどと同様、その種がもつ染色体の数および大きさと花粉管または生殖細胞空間との相関により決定される。したがって、紡錘体の形状は種または細胞固有である。⁽⁹⁾ 花粉粒内での小孢子分裂においても、細胞内での核の偏在が紡錘体の非対称性を誘起することが報告されている。^(12,13) これらの事実から、紡錘体構造は空間的制約によって可変することを示している。

根端細胞などでは、分裂直前から前期にかけてPre-prophase band (PPB)⁽⁴⁾が形成され、将来の紡錘体軸または新たに形成される細胞板の位置を予示する。本種やこれまで用いたすべての被子植物の生殖細胞では、全細胞周期を通じてPPBは観察されなかった。⁽⁹⁾ また、減数分裂および小孢子分裂においても観察されず (未発表)、少なくとも、本種における全雄性配偶子形成過程では、PPBは形成されないことが明らかになった。

引用文献

- (1) Raghavan, T. S., K. R. Venkatasubbaan and H. D. Wulff: *Cytologia* **9**, 389-392 (1939).
- (2) Johnston, G. W.: *Amer. J. Bot.* **28**, 306-319 (1941).
- (3) Terasaka, O. and T. Niitsu: *Bot. Mag. Tokyo* **102**, 143-147 (1989).
- (4) Brewbaker, J. and B. H. Kwack: *Amer. J. Bot.* **50**, 859-865 (1963).
- (5) Wick, S. M., R. W. Seagull, M. Osborn, K. Weber and B. E. S. Gunning: *J. Cell Biol.* **89**, 685-690 (1981).
- (6) Kamizyô, A. and N. Tanaka: *Pollen Sci.* **No. 18**, 13-28 (1984).
- (7) Palevitz, B. A. and M. Cresti: *Protoplasma* **146**, 28-34 (1988).
- (8) Cresti, M., F. Ciampolini and R. N. Kapil: *J.*

- Submicrosc. Cytol.* **16**, 317–326 (1984).
- (9) Lancelle, S. A. M., M. Cresti and P. K. Hepler:
Protoplasma **140**, 141–150 (1987).
- (10) Derksen, J., E. S. Pierson and J. A. Traas:
Europ. J. Cell Biol. **38**, 142–148 (1985).
- (11) Pierson, E. S., J. Derksen and J. A. Traas:
Europ. J. Cell Biol. **41**, 14–18 (1986).
- (12) Hagerup, O.: *Hereditas* **24**, 94–96 (1938).
- (13) Burgess, J.: *Protoplasma* **69**, 253–264 (1970).
- (14) Pickett-Heaps, J. D. and D. H. Northcote: *J. Cell Sci.* **1**, 109–120 (1966).
-