

花粉からの生殖細胞の単離

田 中 一 朗

横浜市立大学文理学部生物学教室 〒236 横浜市金沢区瀬戸 22-2

Isolation of Generative Cells from Pollen

Ichiro TANAKA

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

(1989年10月18日 受理)

A simple method for isolating large quantities of intact generative cells from pollen of three liliaceous plants is described. First, large numbers of pollen protoplasts were enzymatically released from pollen grains and separated from the undigested exines using Percoll discontinuous density gradient centrifugation. When they were gently disrupted mechanically, spindle-shaped generative cells were released from the vegetative cell cytoplasm. They were washed and collected in large quantities through the filtration or centrifugation procedures. The isolated generative cells, though their original cell shape was gradually changed in an artificial medium, were all intact.

Key words : Generative cell, Pollen protoplast, Liliaceae.

はじめに

被子植物の二細胞性(二核性)花粉中に存在する生殖(雄原)細胞は、柱頭で花粉が発芽後花粉管中で2個の精細胞に分裂することにより、最終的には重複受精にあずかる雄性配偶子を形成するという遺伝的に重要な機能を有するが、一方でその存在様式・形態は細胞として非常に特殊である。すなわち、生殖細胞は一核性花粉細胞の不等細胞分裂によって小細胞として形成されるが、しばらくすると大細胞である栄養細胞の細胞質によって取り囲まれ、栄養細胞に寄生した状態になる。言い換えれば、生殖細胞は「いれこ」の細胞

である(Fig. 1)。さらに、生殖細胞並びに生殖核はその後の発生過程で大きく変形することも知られている。こうした生殖細胞の形成・発達の過程は電子顕微鏡では比較的詳細に調べられているが、光学顕微鏡レベルでの観察は少なく、また生理的側面はほとんど明らかにされていない。花粉が厚い外壁を有すること、並びに生殖細胞の存在様式の特異性が研究上の障害になっていたと推察される。

最近、テッポウユリの花粉では外壁・細胞壁を除去した花粉プロトプラストの単離が可能になった⁽¹⁾ことで、それらを用いて intact な生殖細胞を大量に得る

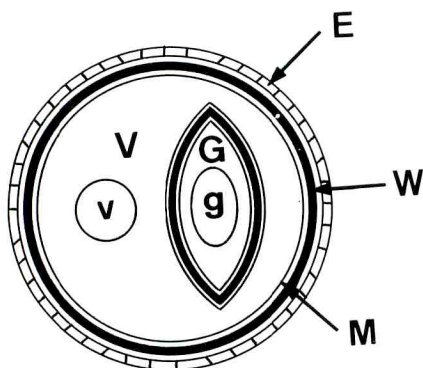


Fig. 1. Bicellular pollen of angiosperms. E, pollen exine; W, cell wall; M, cell membrane; G, generative cell; V, vegetative cell; g, generative nucleus; v, vegetative nucleus.

ことができるようになった。⁽²⁾ この手法は簡単であるとともに、他のユリ科植物の花粉にも適用可能だったので、生殖細胞の研究上有用と考えられる単離法をここに紹介する。

花粉プロトプラストの単離

Intact な生殖細胞を大量に単離するためには、まず花粉プロトプラストの調製が必要である。外壁を有する花粉をそのまま破碎した場合、多くは生殖細胞の破壊を招く。ここに紹介する3種のユリ科植物、テッポウユリ (*Lilium longiflorum*)、チューリップ (*Tulipa gesneriana*)、オオバナノエンレイソウ (*Trillium Kamtschaticum*) では、開花直前の花粉をマセロザイム R-10 (1%) とセルラーゼオノズカ R-10 (1%) を含む培養液 (0.5 M ショ糖を含む White の溶液、pH 5.8) で処理すると、約1-2時間で花粉プロトプラストが直接外壁から遊離してくる (Fig. 2A, B)。その際、抜殻の外壁の溶解はほとんどみられないので、花粉プロトプラストは外壁の存在しない発芽孔 (溝) を通じて遊離すると予想される。遊離した花粉プロトプラストは、0.5 M のショ糖を含む White の溶液で洗浄後、適当な濃度 (材料によってやや異なるが 15-30%) のパーコールの密度勾配

遠心によって外壁と容易に分別できるので、精製されたプロトプラスト集団として単離される (Fig. 2C, D)。単離した花粉プロトプラスト内での生殖細胞の存在並びに形態は不明瞭だが、それを DNA 特異的蛍光色素の DAPI (1 mg/l) で染色し、蛍光顕微鏡の UV 下で観察すると、蛍光のより強い楕円形の生殖核とほぼ円形の栄養核の二核が含まれていることがわかる (Fig. 2E, F)。

生殖細胞の単離

生殖細胞は、花粉プロトプラストの細胞膜を破壊することによって遊離するはずである。しかしながら、界面活性剤などを用いた化学的な膜破壊は、遊離した生殖細胞をも同時に破壊する。従って、intact な生殖細胞の単離には温和な機械的手法が用いられる。得られた花粉プロトプラスト集団を上記の培養液中で、低速 (2000-3000 rpm) のワーリングブレンダーにかけると、あるいはビベッティングすると、花粉プロトプラストの細胞膜が破れ、紡錘形をした生殖細胞が栄養細胞質の細胞小器官や貯蔵物質からなる顆粒などとともに遊離する (Fig. 3A)。破壊力が強すぎると、当然ながら生殖細胞も壊れ、生殖核が露出することになる。洗浄後、花粉プロトプラストの精製の場合と同様、適当な濃度 (20-40%) のパーコールの密度勾配遠心や適当な孔径 (20-50 μm) のナイロンメッシュで濾過することにより、大量の生殖細胞を集めることができる (Fig. 3B)。

遊離直後の生殖細胞は、予想以上に極端な紡錘形をしており、尾部ともいえる両端が明瞭に観察される (Fig. 3C, E)。また、DAPI 染色により、生殖核は単離前とほぼ同様の形態を示すとともに、相対的な生殖細胞の細胞質量も推定できる (Fig. 3D, F)。

以上のように、この手法によって intact な生殖細胞を大量に単離できるが、生殖細胞の特異的な形、すなわち紡錘形は残念ながら上記の培養液中では長らく維持させられない。単離生殖細胞はしばらくすると紡錘形から楕円形へ、さらにはほぼ球形へと自然に変化

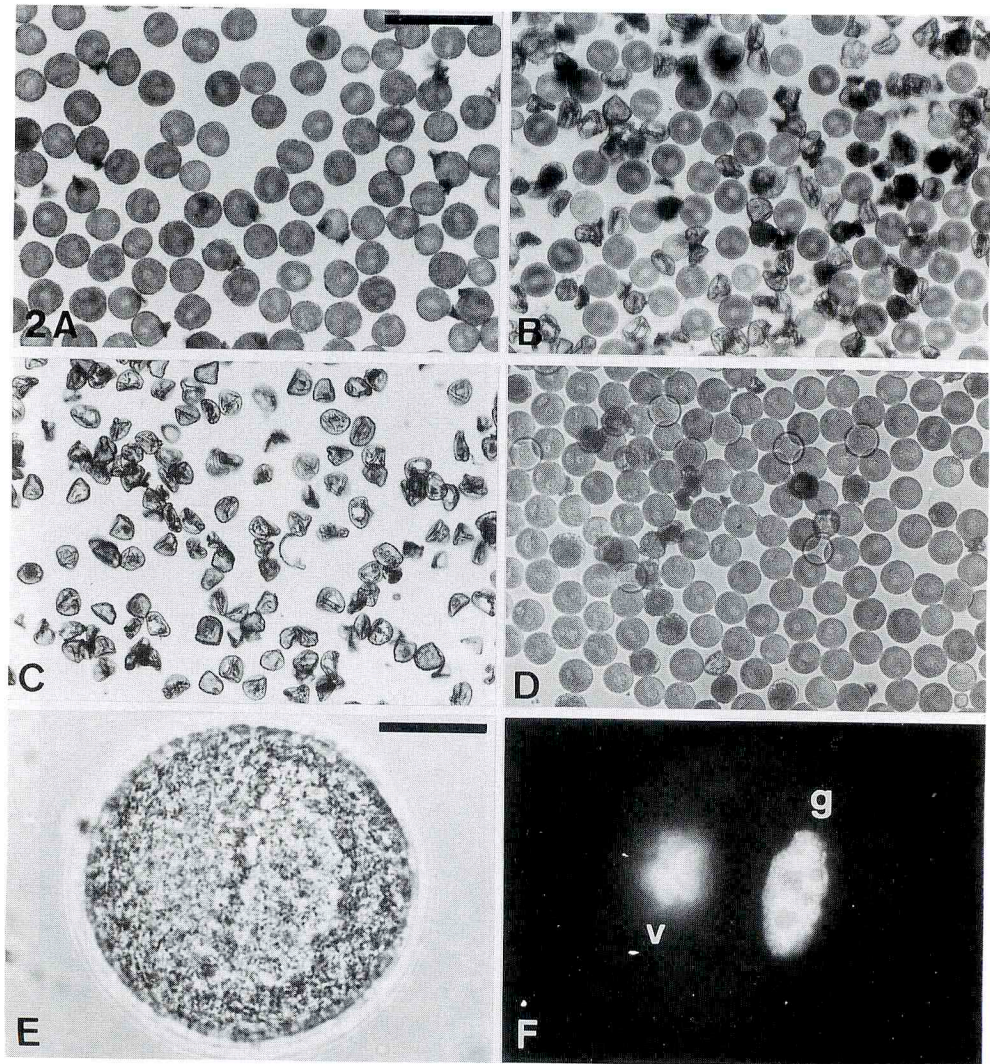


Fig. 2. Isolation of pollen protoplasts in *Tulipa gesneriana*. A and B show the release of pollen protoplasts from the pollen exine. C and D show the separation of the pollen protoplasts (D) from the exines (C). E and F show a freshly isolated pollen protoplast under brightfield optics (E) and fluorescence microscopy (F), after staining with DAPI. Bars=200 μm (A-D), 25 μm (E and F).

する (Fig. 3G, H). ただ, これらの形の変化した生殖細胞も細胞壁を有しており, また生理活性をもつことは FDA (フルオレセイン二酢酸) 染色などにより確かめられている.

おわりに

生殖細胞の性質を調査するうえでの単離系の利点は明白である. 特に, 生殖細胞が幾層もの壁や膜によって保護されているため従来不十分だった光学顕微鏡下での観察においては, 単離生殖細胞を用いて, その遺

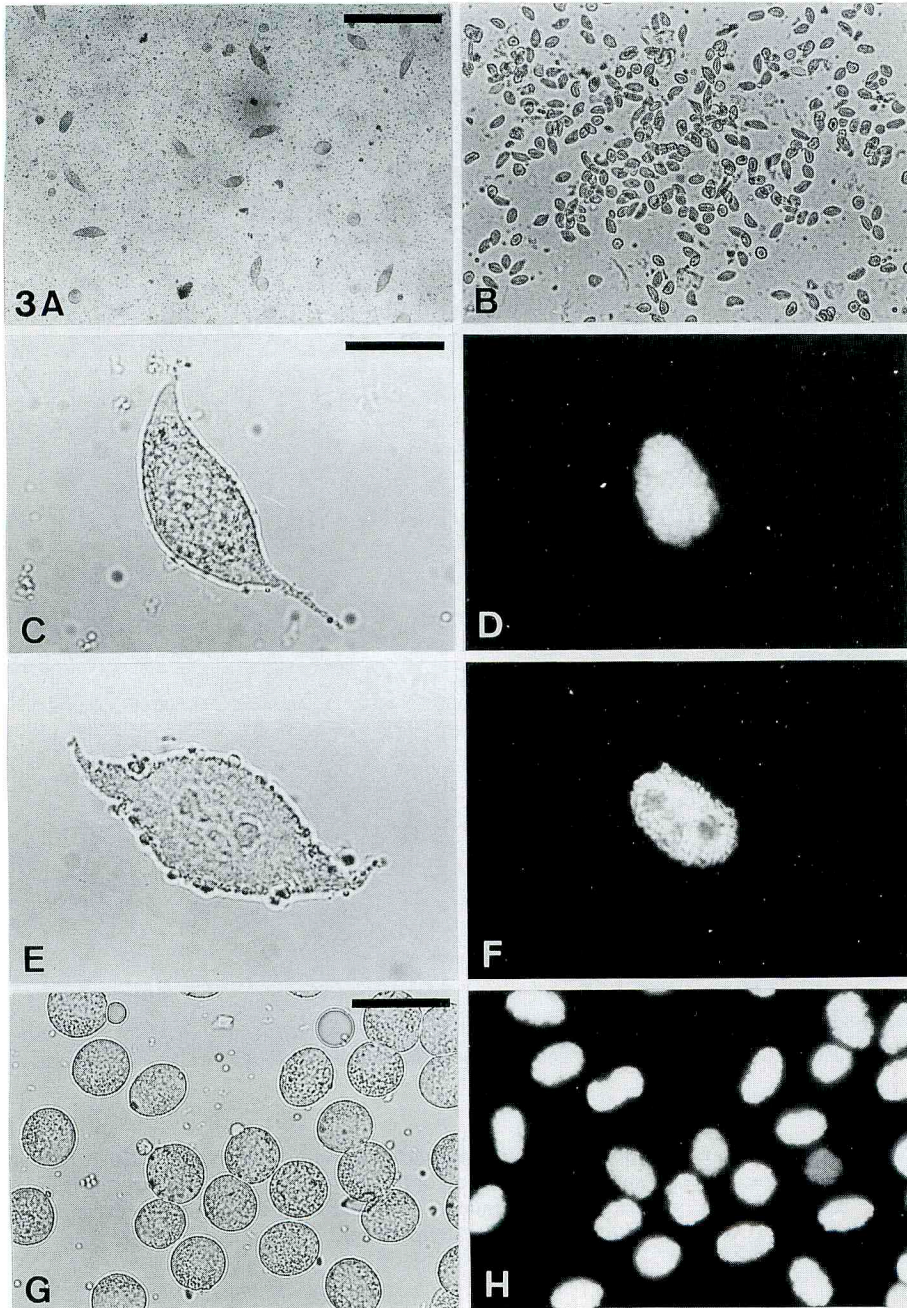


Fig. 3. Isolation of generative cells from pollen protoplasts. A, Release of generative cells from the vegetative cell cytoplasm by disruption of pollen protoplasts of *Lilium longiflorum*; B-F, Freshly isolated generative cells of *Trillium Kamtschaticum* (B), *Lilium longiflorum* (C and D) and *Tulipa gesneriana* (E and F); G and H, Generative cells of *Lilium longiflorum* soon after the isolation. A, B, C, E and G, brightfield optics; D, F and H, fluorescence microscopy, after staining with DAPI. Bars = 200 μm (A and B), 25 μm (C-F), 50 μm (G and H).

伝的性質、細胞骨格系などがすでに明らかにされつつある。⁽³⁾ また、大量に単離できるので、その生理的・生化学的特性の調査も今後可能と思われる。いずれにしても、被子植物の生殖細胞は、雄性配偶子の前駆細胞であることから、今後単離系の利用が高等植物の受精機構解明の一助となることを期待している。

なお、本稿の写真の一部は本学学生長野真砂、森川奈都子両氏の協力によるものである。

引用文献

(1) Tanaka, I., C. Kitazume and M. Ito : The

isolation and culture of lily pollen protoplasts. *Plant Sci.* **50**, 201-211 (1987).

(2) Tanaka, I. : Isolation of generative cells and their protoplasts from pollen of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* **142**, 68-73 (1988).

(3) Tanaka, I., S. Nakamura and H. Miki-Hirosige : Structural features of isolated generative cells and their protoplasts from pollen of some liliaceous plants. *Gamete Res.* (*in press*).

