

アカマツの花粉管先端に偏在するキネシン

寺坂 治・新津 恒良

東京慈恵会医科大学生物学教室
〒182 東京都調布市国領町 8-3-1
(1994年4月7日 受理)

Kinesin Localized in the Pollen Tube Tips of *Pinus densiflora*

Osamu TERASAKA and Tsuneyoshi NIITSU

Department of Biology, Jikei University
School of Medicine, Kokuryo 8-3-1, Chofu,
Tokyo 182, Japan

Kinesin, or kinesin-like protein, a microtubule-based motor protein, was examined in the pollen tubes of *Pinus densiflora* using anti-kinesin immunofluorescence methods. Fluorescence originating from kinesin was identified in the cortical region of a 35 μ m long part of growing tube tips. It had a small granular appearance, which indicated that kinesin was localized on cell granules in the tube tip cortex. No fluorescence appeared in other tube areas or grain. Kinesin was also found polarizingly in two tube tips which were formed by the branching of an originally germinated tube.

From the present results and our previous reports that microtubules were localized in the tip region of *Pinus* pollen tubes, it was suggested that the microtubule-kinesin motility system was present in the pollen tubes of the gymnospermous species.

Key words: Kinesin, *Pinus densiflora*, Pollen tube.

緒 言

近年、植物細胞においても、アクチンとミオシン、微小管と細胞質ダイニン、微小管とキネシンなどによる細胞内運動機構の存在が明らかになってきた。被子植物の花粉内においても、アクチン-ミオシン系の存在が確認され、花粉管の原形質流動や花粉管伸長に関与することが多数報告されている⁽¹⁻⁴⁾。また、花粉管内には微小管が存在しその一部はアクチンと並行し^(5, 6)、両者の間で架橋をつくることが観察され

ている⁽⁷⁾。しかし、微小管形成阻害剤であるコルヒチンによる処理実験では、花粉管の原形質流動や成長はほとんど影響がなく^(8, 9)、花粉管内に存在する微小管の役割についてはほとんど不明であった。

Moscatelli ら⁽¹⁰⁾、Cai ら⁽¹¹⁾ および Cai ら⁽¹²⁾ は、いずれもタバコの花粉管先端部にキネシン様タンパク質が存在することを明らかにした。Cai ら⁽¹²⁾ によると、そのタンパク質は約 100kDa であり、動物細胞におけるキネシン重鎖に相当し、花粉管先端の表層の顆粒上に分布するが、生殖細胞には分布しない。また、

彼らはキネシン様タンパク質の分布域とほぼ重複する領域に微小管が分布することを観察し、被子植物の花粉管には微小管-キネシン運動系が存在することを示唆した。

一方、裸子植物の花粉管は、発芽・伸長速度が著しく遅く、管の一部が肥大したり分枝するなどの、被子植物とは異なるいくつかの特徴をもっているが、その伸長機構に関する研究はほとんど報告されていなかった。筆者らは、これまで、裸子植物の花粉管の伸長機構を解明する目的で、細胞骨格およびそれらに関連したタンパク質の動態を解析してきた。その結果、アカマツ花粉内にはアクチン-ミオシン系が存在し、花粉管内の原形質流動および伸長成長に関与していること、また、微小管が花粉管先端部に偏在し、花粉管の伸長極性の決定に関与していることを報告した⁽¹³⁾。

本研究では、同じアカマツ花粉管先端の表層部にもキネシンまたはキネシン様タンパク質が偏在することが抗キネシン間接蛍光抗体法により明らかとなり、被子植物と同様、裸子植物花粉においても微小管-キネシン運動系の存在が明らかになった。

実験方法

本研究では、アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) の花粉を用い、キネシンの検出は抗キネシン間接蛍光抗体法によって行った。Brewbaker と Kwack の培地⁽¹⁴⁾ により 25°C、4 日間培養した花粉を、50mM リン酸一および二カリウム緩衝液で pH6.9 に調整した 3.7% パラホルムアルデヒドによって 1 時間固定する。固定後、花粉を上記の緩衝液で 40 分間洗浄したのち、各種処理液の浸透性を高めるために 1% セルラーゼ・オノズカ、1% マセロザイムおよび 0.1M ショ糖混合液に 20 分間浸し、花粉管壁を部分的に消化する。花粉を再度、緩衝液により 30 分間洗浄したのち、一次抗体として P B S (phosphate buffered saline, シグマ社) 緩衝液で 500 倍に希釈したマウス・モノクローナル抗キネシン抗体 (シグマ社) に 1 時間浸す。その後、P B S で 30 分間洗浄したのち、二次抗体として P B S で 40 倍希釈したヤギー抗マウス IgG-FITC (Tago 社) に 1 時間浸す。さらに、P B S で 30 分間洗浄したのち、顕微鏡標本を作製し、ニコソ・F X 蛍光顕微鏡により観察した。花粉管の形態観察は同顕微鏡に装着した位相差装置によって行った。

実験結果

アカマツの成熟花粉粒を人工培地内で培養すると、培養後 1 日目には約 94% が発芽し、4 日目には花粉管が約 300 μm の長さに伸長する。これらの花粉のうち、85% は花粉管は 1 本であるが、15% では花粉管の先端付近が 2 本、まれに 3 本以上に分枝する。分枝する花粉管の割合は培養の継続時間ともなって増加する。花粉管の直径は約 20–25 μm であるが、全長にわたって均一な太さではなく、部分的に肥大することもある。花粉管核は培養 2 日目以後に花粉管内に移動するが、生殖細胞は培養期間中、移動することなく、花粉粒内にとどまっている。発芽花粉内におけるキネシンの動態を蛍光抗体法によって観察した。その結果、発芽直後から十分に伸長したもので、ほとんどすべての花粉管の先端部にキネシン由来の蛍光が観察された。Fig. 1 および 2 は培養 4 日目の花粉におけるキネシンの分布を示したものである。キネシンは花粉管の先端の約 35 μm の範囲に分布し、先端以外の花粉管内および花粉粒にはまったく検出されない (Fig. 1-A)。キネシン由来の蛍光は先端の花粉管壁に近い表層部において小さな顆粒状を呈し、また、小顆粒が集合してやや大きい顆粒状となることもある。先端中央付近では蛍光は不定形である (Fig. 1-B, C)。このことは、キネシンが花粉管の先端表層部の細胞顆粒上に分布することを示唆している。先端付近にはしばしば花粉管核が位置し、まれに、その表面に弱い蛍光が観察されることがある (Fig. 1-C)。しかし、この蛍光は、キネシンが直接核膜上に分布することによるのか、または、キネシンが分布した多数の小顆粒が核膜上に付着したことによるのかは不明である。花粉管内にとどまっている生殖細胞上には、キネシンはまったく検出されない。

分枝しはじめた花粉管の先端では、キネシンの分布も二極化しはじめ (Fig. 1-D)、分枝が進行した花粉管では、それぞれの先端部にキネシンが明瞭に偏在する (Fig. 1-E)。先端部が 3 本 (Fig. 2-A) または 4 本 (Fig. 2-B) に分枝した場合でも、キネシンは常に花粉管先端部にのみ偏在し、それ以外の部分では検出されない。

なお、花粉を一次抗体である抗キネシン抗体で前処理することなく、F I T C で標識した二次抗体のみで直接染色した場合には、すべての花粉において、蛍光はまったく観察されない。

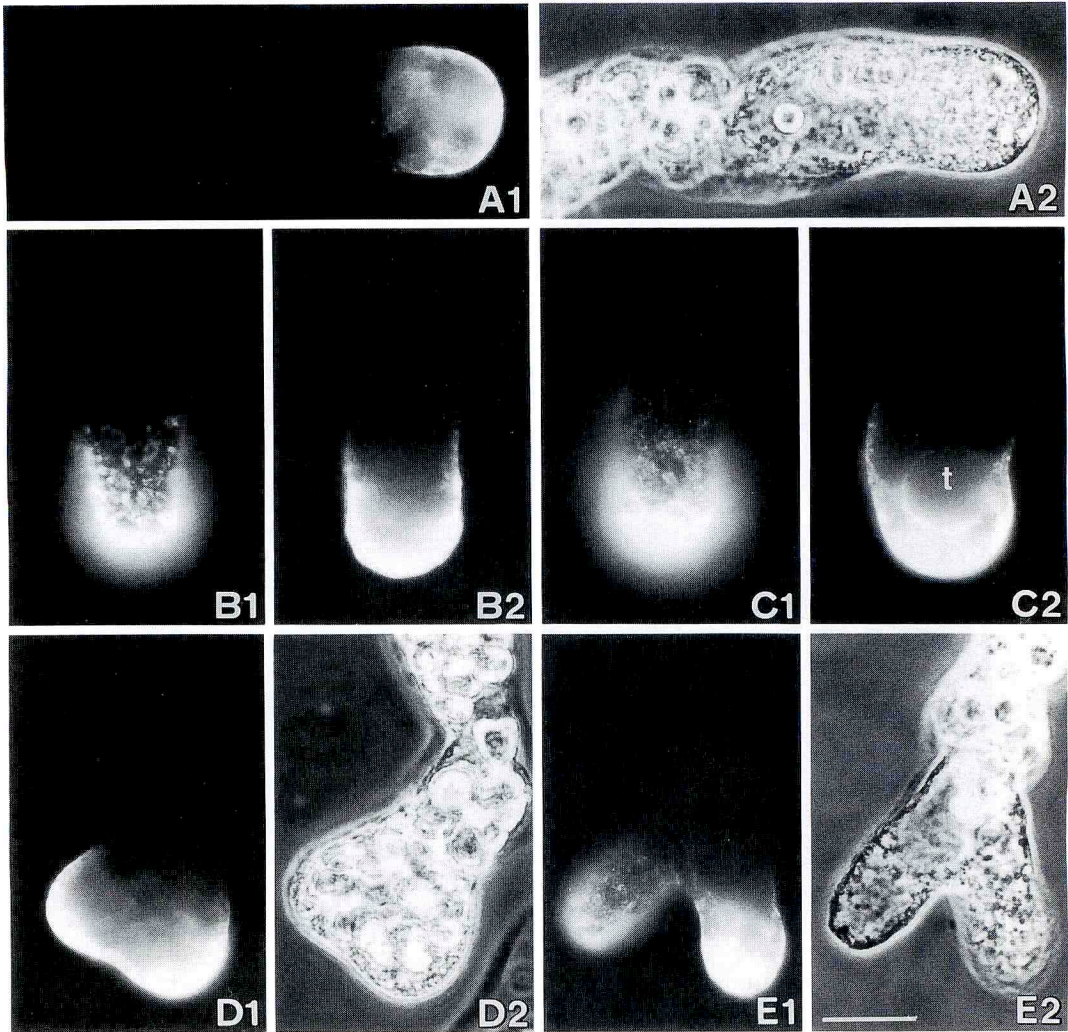


Fig.1. Immunofluorescence staining of kinesin in the pollen tubes of *P. densiflora*.

A1: Kinesin localized in the tip region of the elongated tube. Kinesin fluorescence was not found in any other tube areas. B1 and C1: Kinesin fluorescence figures focused on the cortical region of the tube tips. B2 and C2 are focused on the inside of the same tubes as B1 and C1, respectively. The fluorescence in B1 and C1 shows granular appearances. D1 and E1: Kinesin in tube tips just beginning to branch (D1) and having branched (E1). A2, D2 and E2: Phase contrast microscopic figures of the same tubes as A1, D1 and E1, respectively. t: Tube nucleus. Bar, 20 μ m.

考 察

本研究では、微小管モーター・タンパク質の一種であるキネシンまたはキネシン様タンパク質が、アカマツ花粉管の先端表層部にのみ偏在することが、抗キネ

シン間接蛍光抗体法によって明らかになった。キネシンの花粉管における分布域は、筆者ら⁽¹³⁾がすでに報告したアカマツ花粉管における微小管の分布域に比べて狭いが、両者はほとんど重複している。花粉管先端部におけるキネシンと微小管の重複した分布は、す

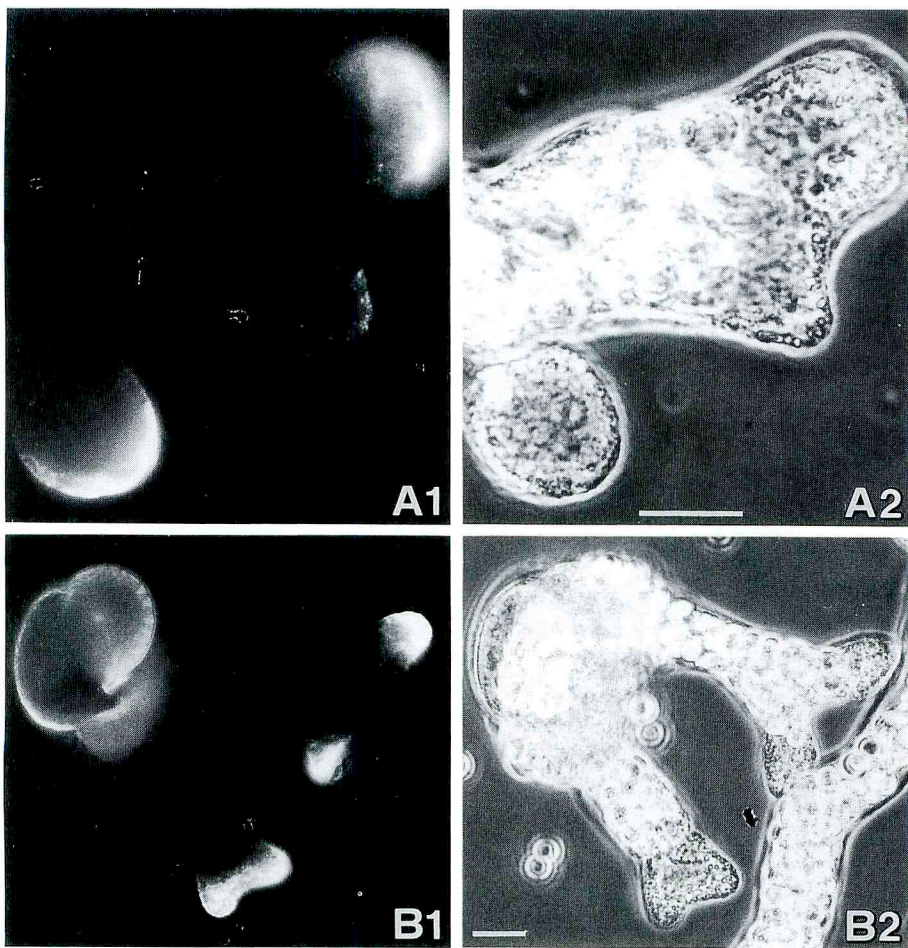


Fig.2. Immunofluorescence staining of kinesin in the multi-branched pollen tubes of *P. densiflora*. A1: Kinesin in pollen with three branched tubes, and B1; with four branched tubes. A2 and B2: Phase contrast microscopic figures of the same pollen as A1 and B1, respectively. Bar, 20 μ m.

でに Cai ら⁽¹²⁾ によって被子植物の一種のタバコ花粉において報告されており、裸子植物の一種であるアカマツ花粉における今回の研究結果とよく一致している。これらの結果より、被子および裸子植物を含む顕花植物の花粉には、微小管-キネシンにもとづく細胞内運動系が存在する可能性が示唆される。

アカマツ花粉を微小管形成阻害剤であるコルヒチンを含む培地で培養すると、花粉管は成長を続けるものの、先端部の伸長極性が失われ、著しく肥大したり、多分枝する⁽¹³⁾。また、本研究によって観察されたキネシン由来の蛍光は小顆粒状を呈し、キネシンは先端表層部の細胞顆粒上に分布することを示している。以

上の結果から、本種の花粉管先端部には細胞膜や細胞壁の前駆物質などを含む顆粒が分布し、それらが微小管-キネシン運動系によって成長中の頂端部へ向けて誘導されることにより、花粉管は一定の方向へ伸長すると考えられる。しかし、本種の花粉管は、自然条件下においても分枝することがあり、この伸長極性は、花粉管内に生じたなんらかの原因によって、比較的容易に分極化すると考えられる。筆者らはまた、アカマツ花粉の頂端部を除くほぼ全域にアクチン-ミオシン運動系が存在し、花粉内の原形質流動および花粉管成長に関与することを報告した⁽¹³⁾。すなわち、アカマツ花粉には、アクチン-ミオシンおよび微小管-キネ

シンよりなる二種類の細胞内運動系が異なる領域に存在し、前者は花粉管の成長、後者は成長における方向の決定という異なる役割を分担している。また、これら二種類の運動系は、被子植物の花粉においても報告されており、顕花植物の花粉に共通して存在すると考えられる。

要 約

アカマツの花粉管先端部に微小管モーター・タンパク質の一種であるキネシンまたはキネシン様タンパク質が偏在することを抗キネシン間接蛍光抗体法によって明らかにした。キネシン由来の蛍光は花粉管の先端約35 μ mの間の花粉管壁に近い表層部に出現し、小顆粒状を呈する。先端以外の花粉管内および花粉粒内ではまったく検出されない。このことは、キネシンが花粉管の先端表層部の細胞顆粒上に分布することを示唆している。また、本種の花粉管には発芽後、その先端が分枝するものがあるが、分枝の開始にともないキネシンの分布も分極化し、分枝が進行したそれぞれの花粉管の先端にはキネシンが偏在する。

以上の実験結果および筆者らがすでに報告した本種の花粉管先端部に微小管が存在する事実より、裸子植物の一種であるアカマツの花粉管内には、微小管-キネシン運動系が存在することが明らかになった。

引 用 文 献

- (1) Kohno, T., S. Chaen and T. Shimmen: Characterization of the translocator associated with pollen tube organelles. *Protoplasma* 154, 179-183 (1990).
- (2) Tang, X., P.K. Hepler and S. P. Scordilis: Immunochemical and immunocytochemical identification of a myosin heavy chain polypeptide in *Nicotiana* pollen tubes. *J. Cell Sci.* 92, 569-574 (1989).
- (3) Heslop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison: Myosin associated with the surfaces of organelles, vegetative nuclei and generative cells in angiosperm pollen grains and tubes. *J. Cell Sci.* 94, 319-325 (1989).
- (4) Palevitz, B.A. and B. Liu: Microfilaments (F-actin) in generative cells and sperm: an evaluation. *Sex. Plant Reprod.* 5, 89-100 (1992).
- (5) Lancelle, S.A. and P.K. Hepler: Association of actin with cortical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. *Protoplasma* 165, 167-172 (1991).
- (6) Pierson, E. S., H. M. P. Kengen and J. Derksen: Microtubules and actin filaments co-localize in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. and *Lilium longiflorum* Thunb. *Protoplasma* 150, 75-77 (1989).
- (7) Lancelle, S.A., M. Cresti and P.K. Hepler: Ultrastructure of the cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of *Nicotiana glauca*. *Protoplasma* 140, 141-150 (1987).
- (8) Franke, W.W., W. Herth, W. J. Van Der Woude and D.J. Morr e: Tubular and filamentous structures in pollen tubes: Possible involvement as guide elements in protoplasmic streaming and vectorial migration of secretory vesicles. *Planta* 105, 317-341 (1972).
- (9) Heslop-Harrison, J., Y. Heslop-Harrison, M. Cresti, A. Tiezzi and A. Moscatelli: Cytoskeletal elements, cell shaping and movement in the angiosperm pollen tube. *J. Cell Sci.* 91, 49-60 (1988).
- (10) Moscatelli, A., A. Tiezzi, R. Vignani, G. Cai, A. Bartalesi and M. Cresti: Presence of kinesin in tobacco pollen tube. In: Cresti, M., P. Gori and E. Pacini (eds). Sexual Reproduction in Higher Plants. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, pp. 205-209 (1988).
- (11) Cai, G., A. Bartalesi, A. Moscatelli, C.D. Casino, A. Tiezzi and M. Cresti: Microtubular motors in the pollen tube of *Nicotiana tabacum*. In: Ottaviano, E., D.L. Mulcahy, M.S. Gorla and G.B. Mulcahy (eds). Angiosperm Pollen and Ovules. Springer-Verlag, New York

- Berlin Heidelberg London Paris Tokyo
Hong Kong Barcelona Budapest, pp. 218-
223 (1992).
- (12) Cai, G., A. Bartalesi, C. D. Casino, A.
Moscatelli, A. Tiezzi and M. Cresti: The
kinesin-immunoreactive homologue from
Nicotiana tabacum pollen tubes: Bio-
chemical properties and subcellular local-
ization. *Planta* 191, 496-506 (1993).
- (13) Terasaka, O. and T. Niitsu: Differential
roles of microtubule and actin-myosin
cytoskeleton in the growth of *Pinus* pollen
tubes. *Sex. Plant Reprod.* (1994). (in
press).
- (14) Brewbaker, J. and B.H. Kwack: The essen-
tial role of calcium ion in pollen germina-
tion and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.*
50, 859-865 (1963).
-