

## テッポウユリ花粉発生過程における アミロプラストの発達と花粉粒内分布

鍋谷 真範・田中 一朗

横浜市立大学理学部環境理学科  
〒236 横浜市金沢区瀬戸 22-2  
(1995年3月31日 受理)

### Amyloplast Development and Distribution during Pollen Development in *Lilium longiflorum*

Masanori NABEYA and Ichiro TANAKA

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

The development of amyloplasts and their distribution during pollen development in *Lilium longiflorum* were investigated by periodic acid Schiff (PAS) and DAPI double staining with semi-ultrathin section of samples, which were embedded in Technovit resin. Amyloplasts with starch granules were not detected in microspores just after liberation from tetrads, although fluorescent spots showing plastid nuclei were clearly demonstrated by DAPI staining. Soon after the displacement of microspore nucleus from the center to one pole of the ellipsoidal microspore, amyloplasts were randomly detected in the cytoplasm of the vacuolated microspore. The amyloplasts rapidly increased in number and size, and were distributed in whole cytoplasm at the first microspore mitosis. Just after the cytokinesis, however, amyloplasts were only detected in the vegetative cell cytoplasm. Thus, exclusion of plastids from the generative cell cytoplasm occurred at the first microspore mitosis, which was typical unequal cell division. The exclusion of plastid DNA from the generative cell was also ascertained by southern hybridization with isolated generative cell. Possible mechanism of plastid exclusion from the generative cell was discussed in relation to maternal inheritance of plastids in this lily.

**Key words:** Amyloplast, generative cell, plastid nuclei, maternal inheritance, *Lilium longiflorum*

#### 緒 言

高等植物の花粉発生過程における色素体の動態は、

花粉発生に要するエネルギー代謝や細胞質遺伝に関連して、すでに多くの研究がなされている。なかでもデンプン粒の生成を伴うアミロプラストの発達には主に電

子顕微鏡を用いて詳しく調査されており、その発達時期は植物種によって変異があるものの、一般には小胞子分裂後の栄養細胞質に多く出現し、雄原(生殖)細胞質には含まれないことが報告されている<sup>(1, 2)</sup>。この原因として、小胞子分裂直前の小胞子で色素体の不均等分布が見いだされており<sup>(3, 4)</sup>、色素体が雄原細胞に分配されないことが結果的に色素体の母性遺伝につながると考えられている。一方、色素体核を含むオルガネラ核は DNA 特異的蛍光色素の DAPI を用いて観察することが可能であり、両性遺伝種では雄原細胞や精細胞にオルガネラ核の存在を示す蛍光スポットが存在するのに対し、母性遺伝種ではこれらの雄性配偶子細胞に蛍光スポットが認められないことが明らかにされている<sup>(5)</sup>。本研究で材料としたテッポウユリでもすでにアミロプラストの発達過程や雄原細胞の発達過程でのオルガネラ核の消失の報告があるが<sup>(2, 6)</sup>、花粉粒内での色素体(核)の分布に関しては、ユリ花粉が非常に大型であるとともに厚い外壁をもつためか十分明らかにされていない。

そこで本研究では、テクノビット樹脂包埋の準超薄切片を用いることで、テッポウユリ花粉発生過程におけるアミロプラストの発達とその花粉粒内分布を光学顕微鏡で調査するとともに、DAPI 染色を併用することでオルガネラ核の動態も併せて調査した。さらに、花粉プロトプラストから単離した雄原細胞を用いてオルガネラ DNA の分子生物学的検出も試みた。

## 実験方法

### 1. 材料

実験材料として、約 25°C の温室内で球根栽培したテッポウユリ (*Lilium longiflorum* cv. Georgia) を使用した。このテッポウユリでは、蕾の長さと同程度の花粉発生ステージの間に密接な相関関係があることがすでに知られている<sup>(7)</sup>。本研究では、減数分裂後の各発生段階にある小胞子(蕾長 30mm - 65mm)と小胞子分裂後の二細胞性花粉(蕾長 65mm - 開花 3日後)を、あらかじめ酢酸カーミン染色によって発生ステージを確認した後、実験材料とした。

### 2. 方法

試料は、0.2M ショ糖を含む NS 緩衝液<sup>(8)</sup>で pH 7.6 に調整した 1% グルタルアルデヒドで 1 時間固定した。NS 緩衝液で 20 分、3 回洗浄後、試料を 1% 寒天中に固めエタノール系列で脱水後、黒岩ら

の方法に従ってテクノビット 7100 樹脂 (Kulzer 社) 中に包埋した<sup>(9)</sup>。

ウルトラミクロトームを用いて厚さ 0.6  $\mu\text{m}$  の準超薄切片を作成し、それをスライドガラス上に付着させた後、以下の過ヨウ素酸リューコフクシン (PAS) 染色を行った。切片を 1% 過ヨウ素酸で 10 分間処理、続いて流水で 5 分間水洗した後、シッフの試薬で 10 分間染色した。その後、亜硫酸水素ナトリウムで 2 分間、3 回洗浄し、さらに 10 分間水洗してから 10% グリセロールで封入し検鏡した。オルガネラ核の蛍光観察は、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の DAPI (4', 6-diaminido-2-phenylindole) 溶液で染色後、UV 励起下で行った。

オルガネラ DNA の検出には、蕾長 150mm の花粉と田中の方法<sup>(10)</sup>に従って単離した雄原細胞を使用した。花粉と雄原細胞のそれぞれから抽出した全 DNA を制限酵素 BamHI で切断し、0.7% アガロースゲルで泳動後、ナイロンメンブレンに転写した。ハイブリダイゼーションは、それぞれジゴキシゲニンでラベルした細胞核特異的 DNA プローブ (コムギのリボソーム RNA 遺伝子を含む 9.0kbp の EcoRI 断片) と色素体特異的 DNA プローブ (コムギの色素体 atpA 遺伝子を含む 12.6kbp の PstI 断片) を用いて 50°C で一晩行い、洗浄後、アルカリフォスファターゼでラベルした抗ジゴキシゲニン抗体によって検出した。

## 実験結果

### 1. アミロプラストの発達過程

テクノビット包埋切片を PAS 染色することによって調査したデンプン粒を含むアミロプラストの発達過程は Fig. 1 に示されている。四分子から遊離直後の小胞子(蕾長 30mm)には PAS によって黒く染色されるデンプン粒はまったく認められなかった (Fig. 1 A)。小胞子の初期発生では、液胞化によって核が細胞の中央から長軸の一端へ移動するが、細胞の周辺部に偏在する細胞質にデンプン粒はまだ認められない (Fig. 1 B)。蕾長が 50mm を過ぎたころになって初めて PAS によって染色されるデンプン粒が認められるようになり (Fig. 1 C)、その後液胞の縮小化とともにデンプン粒は急激に増加・増大し、小胞子分裂直前には細胞質の多くの部分がデンプン粒で占められる (Fig. 1 D)。その際、デンプン粒は細胞全体に見られ、長軸端に位置した核の近傍にも分布していた。小胞子分裂中も同様なデンプン粒の分布が見られたが、分裂



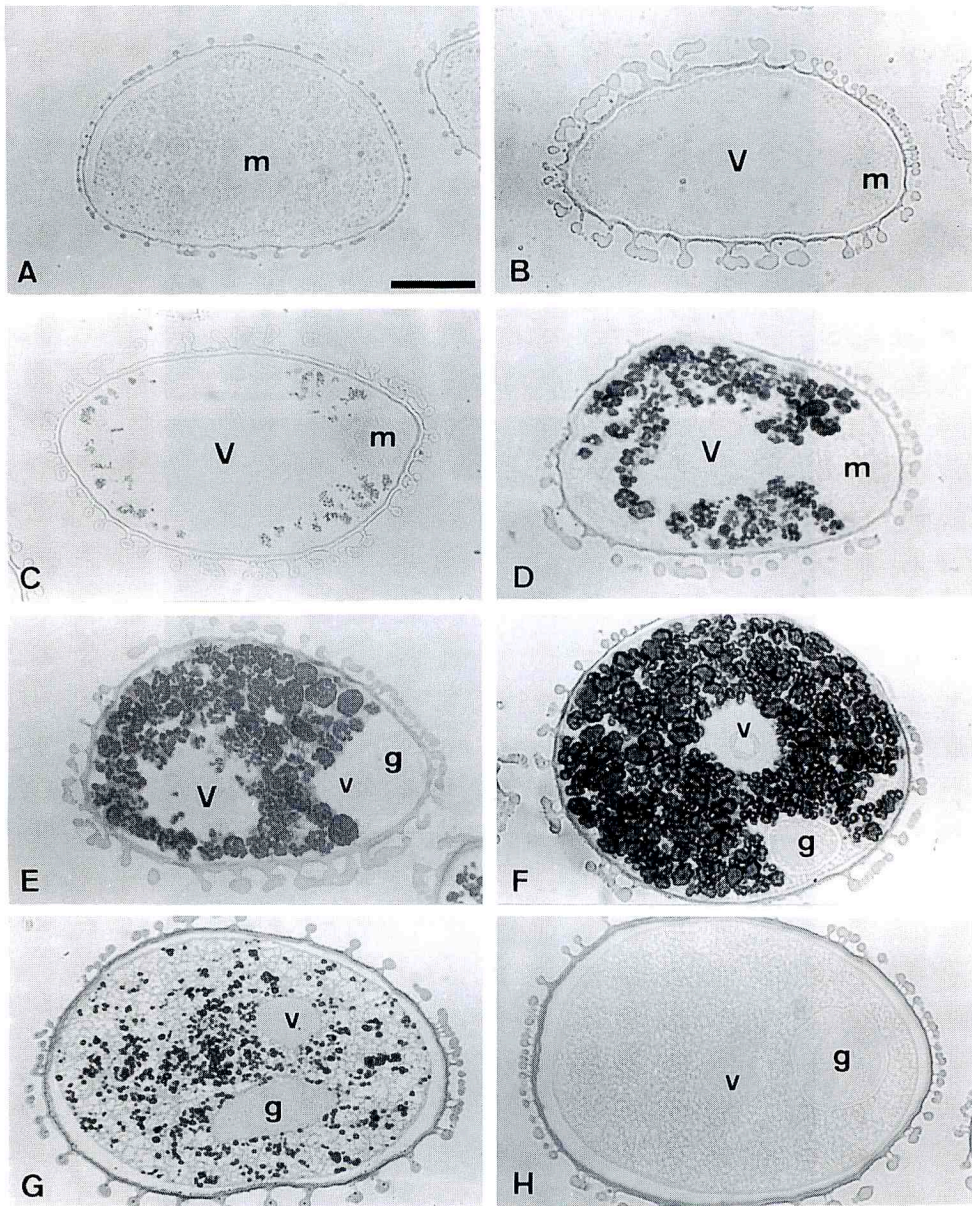


Fig. 1. Development of amyloplasts during pollen development in *Lilium longiflorum*. Starch granules were visualized by PAS staining with semi-ultrathin section of uninucleate microspores (A~D) and bicellular pollen (E~H), which were embedded in Technovit resin. Uninucleate microspores were taken from buds 30mm (A), 40mm (B), 55mm (C) and 65mm (D), and bicellular pollen from buds 65mm (E), 110mm (F), 150mm (G) and from a flower 3 days after anthesis (H). m: microspore nucleus; V: vacuole; g: generative nucleus; v: vegetative nucleus. Bar, 20  $\mu$ m.

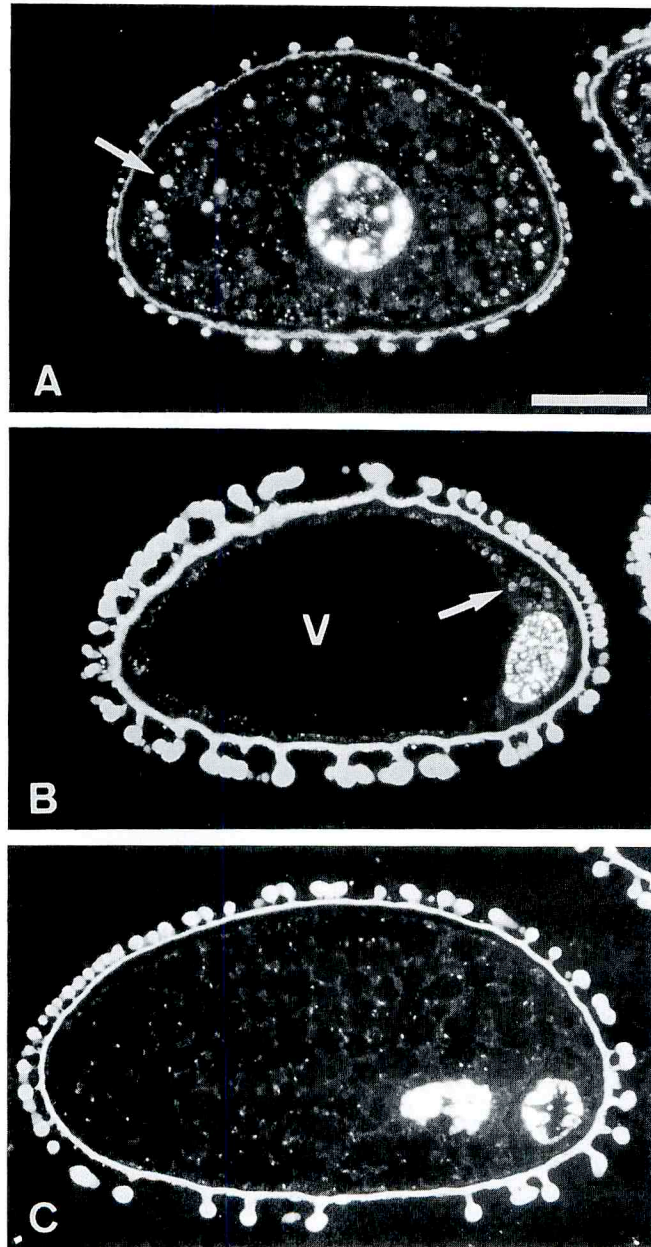


Fig. 2. Distribution of organelle nuclei in uninucleate microspores (A and B) and bicellular pollen (C) of *Lilium longiflorum*. Organelle nuclei were visualized by DAPI staining with the same samples as Fig. 1. Arrows (the larger fluorescent spots) show plastid nuclei. The smaller spots in A show mitochondrial nuclei. Bar, 20  $\mu$ m.



直後の雄原細胞にはデンプン粒がまったく認められなかった (Fig. 1 E). 小孢子分裂後, 栄養細胞質では引き続きデンプン粒の増加が見られ, 雄原細胞が栄養細胞の一端から離れ細胞質中に遊離するころその量は最大となり, 花粉はデンプン粒で満たされた状態となる (Fig. 1 F).ところが, その後雄原細胞が栄養細胞質中で特有の紡錘形をとるところになると, デンプン粒の減少・縮小が見られ (Fig. 1 G), 開花 3 日後の成熟花粉においては栄養細胞質にデンプン粒はまったく認められなかった (Fig. 1 H). 一方, 雄原細胞質においては二細胞性花粉の発達を通してデンプン粒はまったく見られなかった.

## 2. 染色体核の動態

デンプン粒の観察と並行して行った DAPI 染色によるオルガネラ核の観察結果は Fig. 2 に示されている. Fig. 1 A の小孢子では, 細胞中央部の核を示す蛍光の他に, 大小 2 種類の蛍光スポットが区別され, そのうち小さなスポットが細胞質全体にランダムに分布しているのに対し, 大きなスポットは細胞の周辺部に局在していた (Fig. 2 A). 小孢子核が長軸端に移動した Fig. 1 B の細胞でも同様に大小 2 種類のスポットが確認された (Fig. 2 B) が, デンプン粒が観察され始める時期には, 大きなスポットは見られず, 小さなスポットのみとなった. 小孢子分裂終了後には, 小さなスポットが栄養細胞質のデンプン粒間に散在しているのが観察された (Fig. 2 C) が, 小さなスポットは雄原細胞にも少数存在しているのが確認された.

## 3. サザン法による色素体 DNA の検出

花粉と雄原細胞に存在する全 DNA を核特異的のプロンプと色素体特異的のプロンプを用いて検定したサザンハイブリダイゼーションの結果は Fig. 3 に示されている. 対照とした核特異的のプロンプでは, 花粉と雄原細胞の双方で 3 本のバンドが検出された (Fig. 3 A) が, 色素体特異的のプロンプを用いた場合には, 花粉において 4 本のバンドが検出されたのに対し, 雄原細胞では相当するバンドが確認できなかった (Fig. 3 B).

## 考 察

本研究では, 細胞質の遺伝様式が母性遺伝型であることが知られているテッポウユリの花粉発生過程における色素体の動態を, テクノビット樹脂包埋の準超薄切片においてデンプン粒と色素体核を同時観察するこ

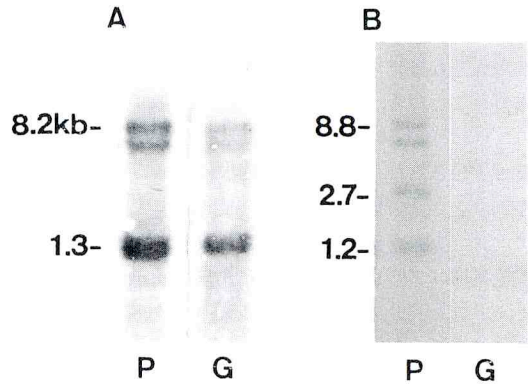


Fig. 3. Nuclear (A) and plastid (B) DNA in bicellular pollen (P) and isolated generative cells (G) of *Lilium longiflorum*. BamH 1 - digested total pollen DNA (P) and total generative cell DNA (G) were hybridized with the probes which contained nucleotide sequences of nuclear rRNA (A) and plastid atpA (B). Numbers indicate the molecular sizes in kb of the hybridized fragments of DNA.

とによって解析した.

被子植物の花粉発生過程では (原) 色素体からデンプン粒を含むアミロプラストへの分化が共通して見られているが, その時期ならびに形成されたアミロプラストのその後の発生は種によって大きく異なっている. スイレンなどでは, 花粉母細胞においてすでに多くのデンプンを含むアミロプラストが観察され, それらの減数分裂中での不均等分布が報告されている<sup>(11)</sup>. 一方, テンジクアオイでは, 小孢子分裂後の二細胞性花粉において初めて (原) 色素体からアミロプラストへの分化が起こる<sup>(12)</sup>. それに対して, テッポウユリでは小孢子期の後期, 小孢子分裂前にアミロプラスト化が認められたが, この結果は三木・中村による電子顕微鏡観察の結果と一致する<sup>(2)</sup>. 電子顕微鏡観察では二細胞性花粉になるとデンプン粒の PAS 反応性が消失することが報告されているが, 本光学顕微鏡観察では, デンプン粒は恒常的に PAS 陽性であると判断され, 成熟花粉における PAS 陰性はデンプン粒から脂肪球への変換によるものと推察された<sup>(2)</sup>.

DAPI 染色による蛍光観察では、色素体からアミロプラストへの分化に伴い、色素体核の縮小が示された。従来、花粉母細胞期に観察される大小2種類の蛍光スポットについては、大きな方が色素体核、小さな方がミトコンドリア核であると推察されている<sup>(6, 13)</sup>。この大きな蛍光スポットは小さなスポットの集合体であったことから、小さなスポットに分散することにより、(原)色素体からアミロプラストへの分化が起こると予想された。色素体核の縮小によって色素体核とミトコンドリア核の判別は不可能となったが、同時にアミロプラスト化が起こったことから、二重染色によって色素体(アミロプラスト)に由来する蛍光スポットとミトコンドリアに由来する蛍光スポットをおおよそ推測することが可能であった。

その結果、小孢子分裂直後の二細胞性花粉における栄養細胞はアミロプラスト化した色素体とミトコンドリアを両方含むのに対し、雄原細胞はミトコンドリアのみを含むことが推察された。雄原細胞の細胞質中にアミロプラストのみならず、色素体も存在しないことは分子生物学的手法によっても裏付けられた。

以上、テッポウユリの細胞質遺伝では、小孢子分裂時にまず色素体が雄原細胞から排除される可能性が示されたが、その機構については推測の域を出ない。同様な現象がみられるハウセンカなどでは、小孢子分裂前に色素体の明らかな極性が見られている<sup>(3)</sup>が、テッポウユリでは分裂中までアミロプラストの極性は不明確であった。しかしながら、アミロプラストの雄原細胞への侵入は妨げられており、分裂前、分裂中を通して何らかの細胞学的排除機構が予想される。候補の一つとして細胞骨格のアクチンが挙げられてはいる<sup>(14)</sup>が、一方で小孢子分裂における微小管の関与もいくつか示されている<sup>(15, 16)</sup>。いずれにしても、典型的な不等細胞分裂である小孢子分裂は、その後の遺伝子発現すなわち機能を大きく異にする2つの雄原細胞と栄養細胞を形成するのみならず、直接的に細胞小器官の構成を異にする二細胞を形成しており、本研究はその一例を示したものとえよう。

## 要 約

テッポウユリの花粉発生過程におけるアミロプラストの発達ならびにその花粉粒内での分布を、テクノビット樹脂包埋の準超薄切片を用いてPASとDAPIで二重染色し観察した。花粉四分子から遊離直後の小孢子には、色素体核を示す蛍光スポットが見られたが、

デンプン粒を含むアミロプラストは認められなかった。小孢子核が細胞の中央から長軸端へ移動後まもなくして、アミロプラストが液胞化した小孢子の細胞質中にランダムに認められるようになった。アミロプラストはその後急激にその数や大きさを増し、小孢子分裂時にはほぼ細胞質全体に分布するようになった。ところが、小孢子分裂後にはアミロプラストは栄養細胞質のみに分布していた。このように、雄原細胞からの色素体の排除は典型的な不等細胞分裂である小孢子分裂時に起こった。雄原細胞における色素体DNAの欠如は単離した雄原細胞を用いたサザンハイブリダイゼーションによっても確かめられた。雄原細胞からの色素体排除機構が母性遺伝との関係で考察されている。

## 謝 辞

本研究で使用したDNAプローブを提供して下さった横浜市立大学木原生物学研究所荻原保成助教授に深謝する。

## 引用文献

- (1) Rodriguez-Garcia, M. I. and A. Garcia: Differentiation of the plastid population during microsporogenesis and the development of the pollen grain in the Liliaceae. *Biol. Cell.* 33, 63-70 (1978).
- (2) Miki-Hirosige, H. and S. Nakamura: Growth and differentiation of amyloplasts during male gamete development in *Lilium longiflorum*. In D. L. Mulcahy and E. Ottaviano (eds.), *Pollen: biology and implications for plant breeding*. Elsevier pp. 141-147 (1983).
- (3) van Went, J. L.: Unequal distribution of plastids during generative cell formation in *Impatiens*. *Theor. Appl. Genet.* 68, 305-309 (1984).
- (4) Schröder, M. -B.: Ultrastructural studies on plastids of generative and vegetative cells in Liliaceae. 3. Plastid distribution during the pollen development in *Gasteria verrucosa* (Mill.) Duval. *Protoplasma* 124, 123-129 (1985).
- (5) Kuroiwa, T.: The replication, differen-

- tiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.* 128, 1-62 (1991).
- (6) Miyamura, S., T. Kuroiwa and T. Nagata: Disappearance of plastid and mitochondrial nucleoids during the formation of generative cells of higher plants revealed by fluorescence microscopy. *Protoplasma* 141, 149-159 (1987).
- (7) Tanaka, I., T. Taguchi and M. Ito: Studies on microspore development in liliaceous plants. I. The duration of the cell cycle and developmental aspects in lily microspores. *Bot. Mag. Tokyo* 92, 291-298 (1979).
- (8) Kuroiwa, T., S. Nishibayashi, S. Kawano and T. Suzuki: Visualization of DNA in various phages (T 4,  $\chi$ , T 7,  $\phi$  29) by ethidium bromide epi-fluorescent microscopy. *Experientia* 37, 969-971 (1981).
- (9) Kuroiwa, T., M. Fujie, T. Mita and H. Kuroiwa: Application of embedding of samples in Technovit 7100 resin to observations of small amounts of DNA in the cellular organelles associated with cytoplasmic inheritance. *Appl. Fluoresc. Technol.* 3, 23-25 (1991).
- (10) 田中一郎: 花粉からの生殖細胞の単離. 花粉誌 35 (2), 47-51 (1989).
- (11) Rodkiewicz, B., E. Duda and J. Bednara: Organelle aggregations during microsporogenesis in *Nymphaea*. *Flora* 183, 397-404 (1989).
- (12) Sodmergen, Y. Y. Luo, T. Kuroiwa and S. Y. Hu: Cytoplasmic DNA apportionment and plastid differentiation during male gametophyte development in *Pelargonium zonale*. *Sex. Plant Reprod.* 7, 51-56 (1994).
- (13) Tanaka, I.: Microtubule-determined plastid distribution during microsporogenesis in *Lilium longiflorum*. *J. Cell Sci.* 99, 21-31 (1991).
- (14) Hagemann, R. and M. -B. Schröder: The cytological basis of the plastid inheritance in angiosperms. *Protoplasma* 152, 57-64 (1989).
- (15) Terasaka, O. and T. Niitsu: Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. II. Microtubule dynamics associated with the unequal cell division. *Bot. Mag. Tokyo* 103, 133-142 (1990).
- (16) Brown, R. C. and B. E. Lemmon: Pollen development in orchids. 3. A novel generative pole microtubule system predicts unequal pollen mitosis. *J. Cell Sci.* 99, 273-281 (1991).
-

