

(原著論文)

カロース栓の形成と内方成長

小林 里子・花田 俊男・中村 紀雄

横浜市立大学理学部環境理学科 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2
(2001年2月20日 受付, 2001年4月13日 受理)Callose Plug Formation and Plug Ingrowth in the Pollen Tubes Grown *in vitro*.

Satoko KOBAYASHI, Toshio HANADA and Norio NAKAMURA

*Department of Environmental Science, Faculty of Science,
Yokohama City University, Yokohama, 236-0027 Japan*

The time-course of callose plug formation and plug ingrowth in *Camellia japonica* pollen tubes was followed by differential interference microscopy, and the effects of detergents and other chemicals on plug formation and plug ingrowth were examined. The callose plugs were formed at regular distance intervals during pollen tube growth, but not after the tube stopped growing. The number of plugs formed was strongly correlated with tube length, and plug formation was not influenced by any chemicals examined. In contrast, plug ingrowth proceeded even after tube growth had remarkably reduced or stopped and that of plugs formed in the vicinity of the center region of the growing tube was most active. Plug ingrowth was promoted by detergents, CHAPS and digitonin, and also by trypsin. These results suggest that the mechanism of plug formation differs from that of plug ingrowth, although both processes are closely related to callose synthesis. The results obtained in *C. japonica* pollen were compared with those for other pollen of other species, and the differences among species were discussed in terms of callose plug formation.

Key Words : callose plug, callose synthesis, detergent, plug ingrowth, pollen tube

緒 言

被子植物の花粉では、花粉管伸長に伴いカロース栓が形成され、管内が塞がれて管先端側サイトソル領域と花粉粒側のサイトソルのない領域に仕切られる。形成されたカロース栓では管先端と花粉粒部分方向へカロース栓の二次的成長(内方成長)がみられる。そしてカロース栓の形成と内方成長に関して、光学顕微鏡によるカロース栓の数や形状についての観察⁽¹⁻³⁾また電子顕微鏡によるカロース栓の微細構造⁽⁴⁾やその成分の免疫学的局在性の観察⁽⁵⁻⁷⁾が報告されているが、これらのメカニズムは明らかではない。またカロース栓の主成分はカロースであり⁽⁸⁾、その形成にはカ

ロース合成が密接に関係していると考えられる。しかし花粉のカロース合成に関しては多くの報告⁽⁹⁻¹³⁾がみられるが、カロース合成とカロース栓形成の関係は明らかではない。一般にカロース合成は植物組織が傷ついたり、菌に感染した時など生理的条件が悪化したときにみられる。またタバコ花粉を用いて、界面活性剤が膜やカロース合成酵素に直接あるいは間接的に作用することでカロース合成を促進することが報告⁽¹¹⁻¹³⁾されている。そこでこれら知見を参考に、この研究ではカロース栓形成とその内方成長機構を明らかにする一助とするために、まず種々の花粉のカロース栓形成と内方成長を詳しく比較観察し、次に界面活性剤や花粉管伸長促進物質がカロース栓形成やその内

方成長にどのような影響を与えるかを検討した。

材料と方法

1. 花粉

ツバキ (*Camellia japonica*)・チャ (*Camellia sinensis*)・サザンカ (*Camellia sasanqua*)・アメリカデイゴ (*Erythrina crista-galli*) の開花前の花から葯を集め、開葯させた後、篩 (0.35mm メッシュ) を通して花粉のみを集めた。花粉はシリカゲルとともに使用まで -25°C で保存した。テッポウユリ (*Lilium longiflorum*)・カノコユリ (*Lilium speciosum*)・キンギョソウ (*Antirrhinum majus*)・タバコ (*Nicotiana sanderae*)・メマツヨイグサ (*Oenothera biennis*) の花粉は、開花した花の葯から採取して直ちに使用した。

2. 花粉の培養

基本培地として 0.1M ショ糖 -1.2% 寒天培地を使

用した。さらに管伸長促進物質として、ユリ花粉ではホウ酸 (1.6mM) を、ツバキとサザンカ花粉では牛血清アルブミン (BSA, 0.5mg/ml) を基本培地に添加した。

3. 花粉管の観察

スライドガラス上にスチロール樹脂製の四角い枠 (21 × 29 × 3mm) を載せ、その中に培地を作成し、培地上に花粉を薄く線状に置床し、カバーガラスを被せて、成長した花粉管を微分干渉顕微鏡で経時的に観察した。観察は、花粉が発芽するまでは 10 分おきに、発芽から培養 8 時間までは 30 分おきに、8 時間後 12 時間までは 1 時間おきに、その後 20 時間までは 2 時間おきに行なった。花粉管、カロース栓、花粉管幅の長さの測定にはマイクロメーターを使用し、観察の度毎に発芽した 5 本の花粉管について測定し、観察を 3-7 回くり返した。

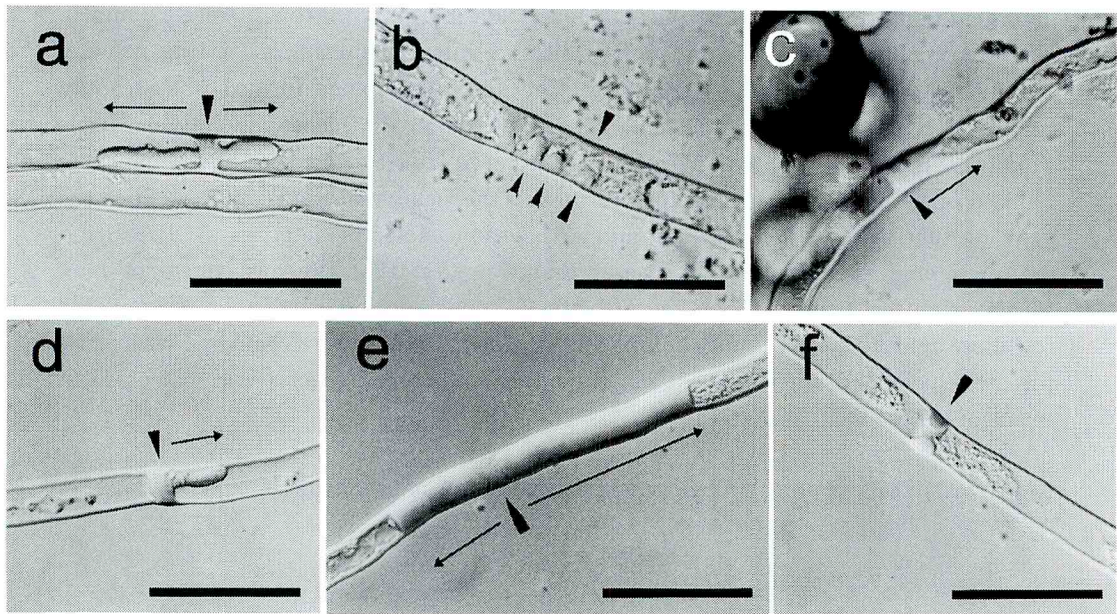


Fig. 1. Callose plug and plug ingrowth in pollen tubes of different species.

Camellia sinensis (a), *Lilium speciosum* (b), *Nicotiana sanderae* (c), and *Camellia japonica* (d-f) pollen grains were incubated on medium containing 0.1M sucrose (a-e) or on sugar-free medium (f); BSA (d, 0.5mg/ml) or CHAPS (e, 100nM) was added to the medium. Formation of callose plugs (arrowheads) in *L. speciosum* was different from those in other species, and the callose plug in the pollen tube grown on the sugar-free medium did not partition the tube cytoplasm perfectly. Arrowheads indicate directions of plug ingrowth. Bar=50 μm

4. 試薬

CHAPS (3-[(3-コラミドピロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート) は同仁化学, BSA は生化学工業, トリプシンはSigma, その他の試薬は和光純薬工業社の試薬を使用した。

結 果

1. カロース栓の形成と内方成長

培地上で成長した被子植物花粉9種の花粉管のカロース栓形成とその形状について観察, 比較した (Fig. 1 a-d). どの花粉においてもカロース栓の形成がみられ, さらに形成された多くのカロース栓で突起状 (Fig. 1a) あるいは管を満たす筒状 (Fig. 1c, e) の内方成長が観察された. ツバキ・チャ・サザンカ・デイゴ・キンギョソウ・タバコ・メマツヨイグサの内方成長の形状はほぼ同じようであったが, テッポウユリとカノコユリ花粉では, 他の花粉に比べてカロース栓形成の様子が異なり, カロース栓の形状が著しく異なっていた (Fig. 1b). Fig. 2 はツバキ花粉管における第8番目に形成されたカロース栓における内方成長の様子を

経時的に観察した結果を示している. カロース栓が形成されると多くのカロース栓でその両側 (花粉粒方向と管先端方向) で内方成長がみられたが, それが片側だけの場合や見られない場合もあった. そして内方成長のみられたカロース栓の付近ではしばしば顆粒を含んだ少量のサイトソルの存在とその流動が観察された (Fig. 2b-f).

今回調べた花粉においては, ユリ花粉を除いてどの花粉でも同じような結果が得られた. したがって以下には最も多く観察, 測定を行なったツバキ花粉の結果を示す.

2. 花粉管伸長とカロース栓形成

基本培地に, ツバキ花粉管の伸長を促進するBSA, カロース合成を促進することが知られているジギトニン, Tween-20 (TW), CHAPS, Triton X-100 (TX), トリプシンを添加して, 花粉管伸長とカロース栓形成への影響を調べた. 培養20時間後のそれぞれの花粉管長とカロース栓数の関係には高い正の相関がみられた (Fig. 3). 界面活性剤の濃度を増加させると管伸長が阻害され, カロース栓数も減少したが, この場合

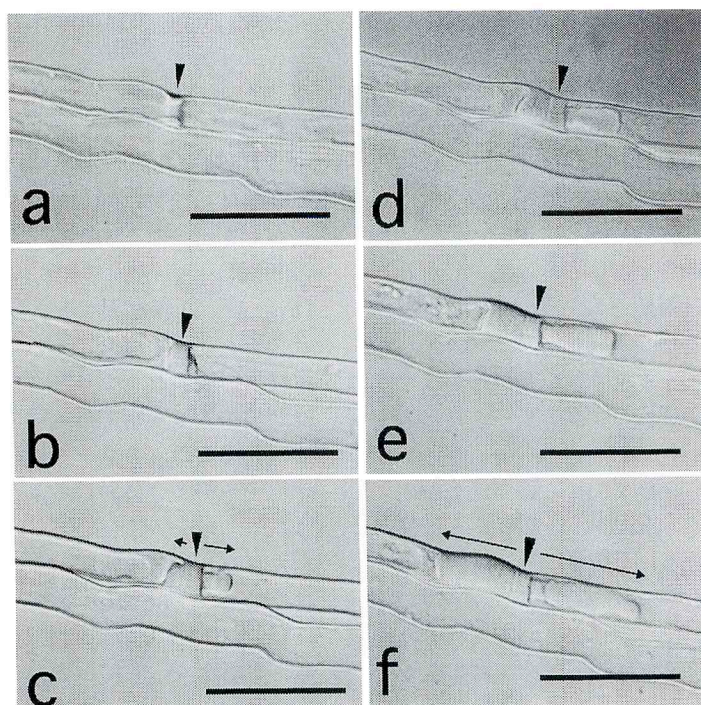


Fig. 2. Time course of callose plug formation and plug ingrowth in the pollen tube of *C. japonica*.

Regarding the eighth callose plug formed (arrowhead), plug ingrowth was examined after the pollen had been incubated on the basal medium for 5h (a), 6h (b), 8h (c), 10h (d), 12h (e) and 16h (f) with a differential interference microscope. Bar = 50 μ m.

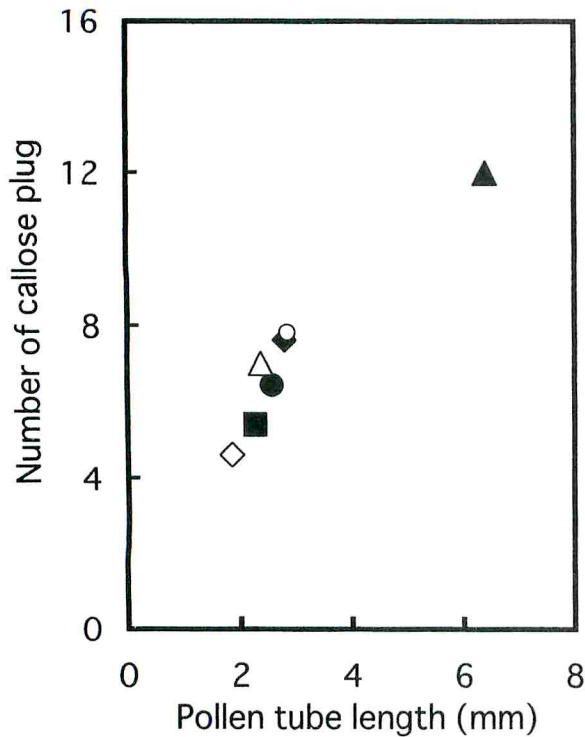


Fig. 3. Effects of chemicals on callose plug formation and tube growth.

C. japonica pollen grains were incubated on basal medium (●) containing BSA (▲, 0.5 mg/ml), digitonin (○, 10nM), Tween-20 (△, 100ppm), CHAPS (■, 100nM), Triton X-100 (◇, 1ppm) or trypsin (◆, 5 μ g/ml) at 25°C for 20h.

も管長とカロース栓数の関係は同じであった。しかし無糖培地で成長した花粉は対照と同じ管伸長 (2.7 \pm 0.1mm) を示したが、カロース栓数 (3.7 \pm 0.4ヶ) は減少し、形成されたカロース栓は管を塞がなかった (Fig. 1f)。また管長 1mm 以下では管を塞ぐカロース栓の形成はみられなかった。

カロース栓は管伸長に伴い形成され、管伸長が停止するとその形成も停止した (Fig. 4)。このことは基本培地に物質を添加した場合も同様で、管伸長が停止した後にカロース栓の形成がみられることはなかった。最初のカロース栓が形成されると、次に形成されるカロース栓との間隔は栓が形成される毎に徐々に大きくなり、一次関数的に増加するというカロース栓間隔の広がり規則性がみられた (Fig. 5)。このようなカロース栓間隔が徐々に大きくなる規則性は物質を添加した場合も対照と同様にみられ、対照との有意差はみられなかった。(図において誤差の記入は省略。ただ BSA と Tween-20 の間ではそれぞれの値について標準偏差の重なりはみられなかった)。花粉管基部末端

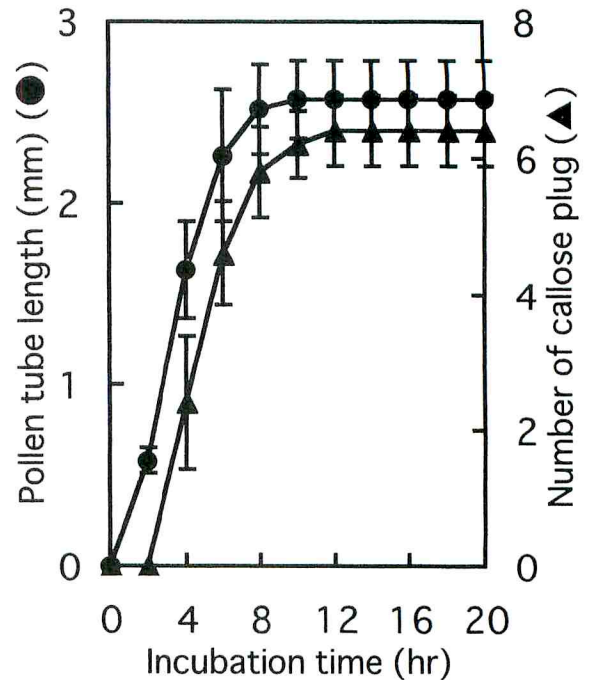


Fig. 4. Time course of callose plug formation and tube growth in *C. japonica* pollen.

Callose plugs were formed during pollen tube growth on basal medium, but not after tube growth had stopped.

(花粉粒発芽孔部) と最初に形成されたカロース栓との間隔は花粉毎に異なりさまざまな値をとり、最も誤差が大きかった。また第1番目と2番目のカロース栓の間隔はどの花粉でも最も短く、誤差も小さかった (Fig. 5)。同様なカロース栓間隔の規則性は、サザンカ・チャ花粉の場合にもみられ、デイゴ花粉では第1番目に形成されたカロース栓以降のすべてのカロース栓間隔がほぼ一定である規則性がみられた。しかしユリ属花粉では、カロース栓の間隔はしばしば変化し、ツバキやデイゴにおけるような規則性はみられなかった。

カロース栓形成時間、つまりカロース栓が形成されはじめて (Fig. 2-a) から、それが完全に管を塞ぐ (Fig. 2-b) までの時間を測定した。Fig. 6はジグニンの影響を示している。この場合対照よりも1ヶ多くのカロース栓が形成されたが、対照と同様に管伸長が活発な時に形成されたカロース栓ではどのカロース栓においてもその形成時間は約 1.5 - 2 時間であった。そして管伸長速度が減少するに伴い形成されたカロース栓ではその形成時間は長くなった。基本培地で成長した花粉では、調べた物質はカロース栓形成時間に影響を与えず、物質の添加により形成が早く始まったり、

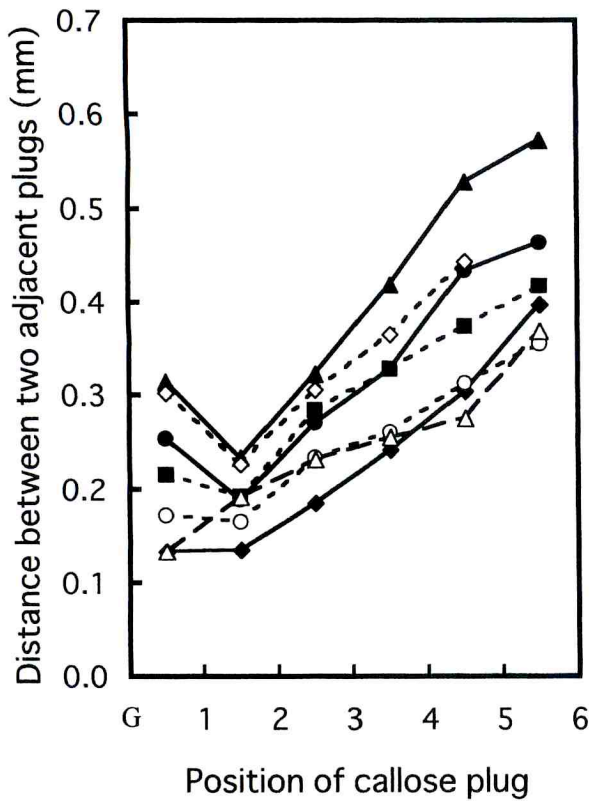


Fig. 5. Effects of chemicals on callose plug formation.

C. japonica pollen grains were incubated on basal medium (●) containing BSA (▲, 0.5mg/ml), digitonin (○, 10nM), Tween-20 (△, 100ppm), CHAPS (■, 100nM), Triton X-100 (◇, 1ppm) or trypsin (◆, 5μg/ml) at 25°C for 20h. After the first plug had formed in the germinated pollen, the distance between two adjacent plugs increased at constant intervals with pollen growth; the distance between the aperture of the grain (G) and the first plug fluctuated considerably in each pollen species.

形成時間が短縮されることはなかった。

3. 花粉管伸長とカロース栓内方成長

Fig. 7は5番目に形成されたカロース栓の内方成長を測定した結果である。カロース栓の内方成長は培養6時間後から始まり、花粉管の伸長速度が減少し、管の伸長が停止した後も続いていた。基本培地で成長した花粉管を20時間後に観察すると、管伸長した管のほぼ中央部付近のカロース栓で最も大きな内方成長がみられた (Fig. 8)。内方成長は花粉粒方向と管先端方向への両方向へみられたが、すべての花粉において、最初に形成されたカロース栓では花粉粒方向への成長

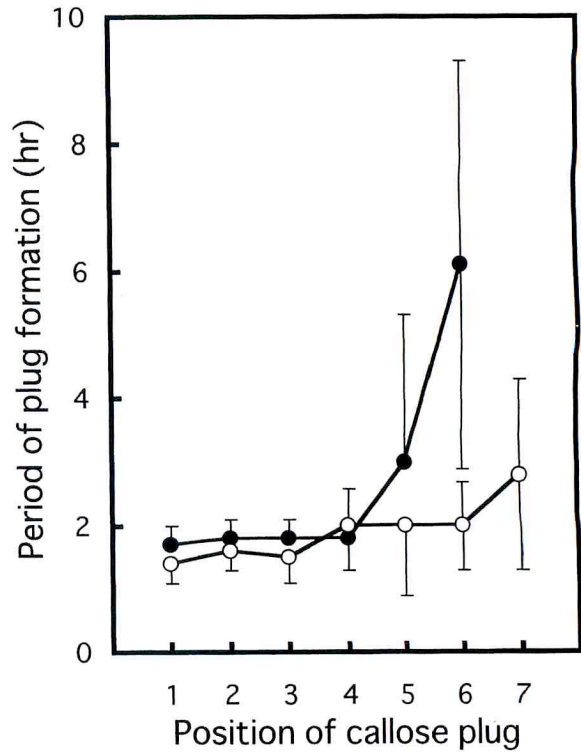


Fig. 6. Period of callose plug formation.

C. japonica pollen were incubated on basal medium (●) or medium containing digitonin (○, 10nM). Position numbers were assigned in order of callose plug formation. In each callose plug, the period was measured from the beginning of plug formation until the partition of the tube by the plug had formed.

はみられなかった。そしてこれら内方成長の伸長方向や内方成長するカロース栓の数を増加させることに對して、添加物質は影響を与えなかった。

しかし、CHAPSなどの界面活性剤とトリプシンは内方成長物の形状に影響し (Fig. 1e)、内方成長を促進した (Fig. 9)。内方成長はすべてのカロース栓で常に生じるわけではなく、しかも添加物質により、その形状や長さへの影響が異なっていたので、形成されたすべての内方成長物を円柱とみなしてその体積を求め、管内のすべての内方成長物の総体積量を内方成長活性値として、比較をおこなった (Fig. 9)。とりわけCHAPS、ジギトニン、トリプシンは著しい活性促進を示し、CHAPSは100nMのとき最も効果が大きかった (Fig. 10)。BSAは内方成長に関して、その形状についても (Fig. 1d)、活性についても対照と同様であり、全く影響を与えなかった。

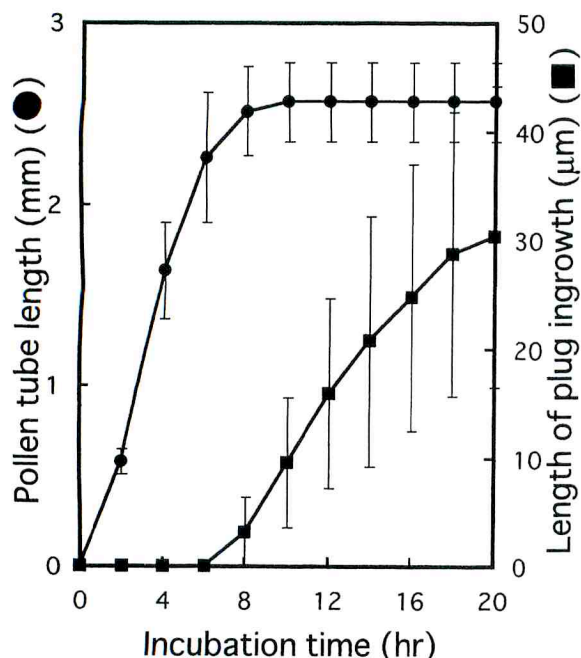


Fig. 7. Time course of tube growth and plug ingrowth in *C. japonica* pollen.

The plug ingrowth of the fifth plug formed was observed. Note that the plug ingrowth starts at about 6h of incubation and also further continues after the tube growth has stopped.

考 察

カロース栓形成の様子は、その形状から幾つかのタイプに分けられている^(1, 2)。すでに指摘があるように^(1, 2)、この研究においても、ユリ属花粉の場合は、カロース栓の形状が異なり、形成された栓に対してさらに直角方向へ二次的肥厚する内方成長が見られないなど、他の花粉と異なっていた。ツバキとテッポウユリではカロース栓や管内層に対するカロース抗体の反応が異なること⁽⁷⁾、報告された種々の花粉のカロース栓の形状⁽²⁾、そして今回の9種の花粉の結果を考慮すると、カロース栓形成は双子葉と単子葉の花粉では異なるのかも知れない。またテッポウユリでは、雌ずいで伸長した和合と不和合花粉管のカロース栓形成の様子は異なり、不和合花粉管のカロース栓形成は培地で成長した花粉管の場合と同様であった⁽¹⁴⁾。ユリ花粉あるいは単子葉花粉のカロース栓形成については報告が少なく、さらに検討が必要と考えられる。

カロース栓は管伸長時のみに形成され、管伸長活性との密接な関係がみられた。形成されたその数はほぼ2×管長(mm)個として示され、この関係はどの花粉でも同じであり⁽¹⁵⁾、これまでに報告された花

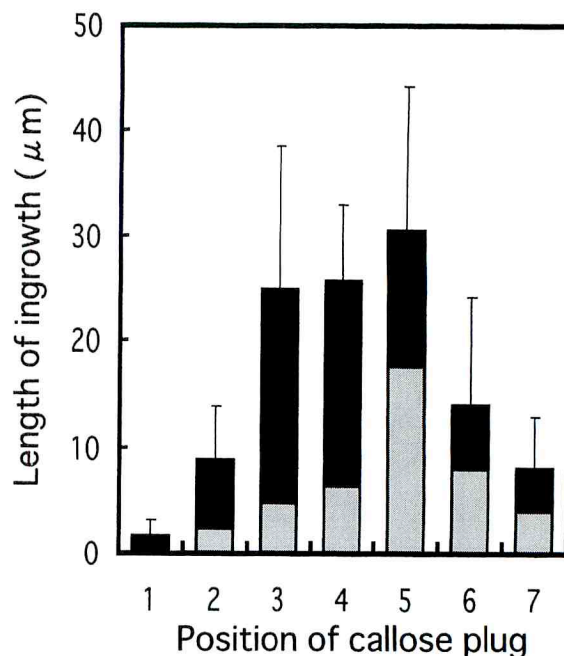


Fig. 8. Activity of callose plug ingrowth in *C. japonica* pollen.

The plug ingrowth elongated toward the tip side (black area) and/or grain side (gray area) of the growing tube and it was not observed in the grain side of the first plug formed.

粉^(2, 3)の場合もこの関係で示すことができる。しかし無糖培地やツバキ花粉のマルトース培地の場合(データは示していない)では、カロース栓の形成は開始されるもの、管を仕切るまで発達することはまれであった。花粉管内を塞ぐカロース栓の形成には、管伸長に利用できる糖の供給が必要と考えられる。

カロース栓の位置がどのように決まるのかはさらに調べなければならないが、カロース栓の間隔には規則性がみられ、これは管伸長時に一定間隔で何らかの生理的变化がおこることを示しているのかも知れない。また花粉管とカロース栓の主成分はカロースであるので、管伸長やカロース合成に影響する物質は、カロース栓形成にも影響し、カロース栓を多く形成したり、間隔を乱れさせたりすることを予想したが、界面活性剤やトリプシンはそのような影響を示さなかった。ただBSAはカメラ属花粉の管伸長を促進し、カロース栓の間隔を長くする傾向がみられた。とくにBSAが存在すると、最後に形成されたカロース栓から管先端までの距離は対照の2-4倍長くなった(データは示されていない)。しかしBSAは、管長とカロース栓数との関係、カロース栓の形成時間や間隔の規則性などに対しては明瞭な影響を示さなかった。

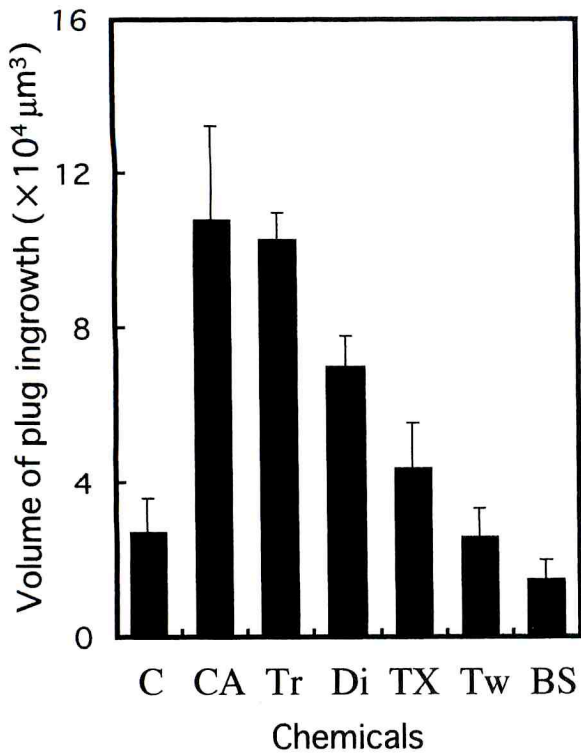


Fig. 9. Effects of chemicals on plug ingrowth in *C. japonica* pollen.

C, control ; CA, CHAPS (100nM) ; Tr, trypsin (5 $\mu\text{g/ml}$) ; Di, digitonin (10nM) ; TX, Triton X-100 (1ppm) ; Tw, Tween-20 (100ppm) ; BS, BSA (0.5mg/ml). The activity of plug ingrowth was indicated as the volume of the plug ingrowth formed because besides the length, the shape and width of the plug ingrowth also were affected by chemicals ; the shape of the plug ingrowth was regarded as cylinder-like and the volume of the plug ingrowth was estimated.

カロース栓形成に対して化学物質は影響を示さなかったが、その内方成長に対してはCHAPS、ジグトニン、トリプシンが促進効果を示した。これらの物質はカロース合成を活性化、促進することが知られており⁽¹⁾、内方成長の促進はその為と考えられる。またカロース合成と関係しているカロース栓形成が影響を受けなかった理由としては、カロース栓形成の過程においては、管伸長活性と関連したカロース栓形成部位を決める段階があり、そこにはこれらの物質は作用せず、そしてこの過程を経なければカロース合成は関連しないことが考えられる。内方成長は管伸長停止後も長時間続くので、その際のカロース合成は管伸長活性とは関連せず、これらの物質はカロース合成のみに作用して促進

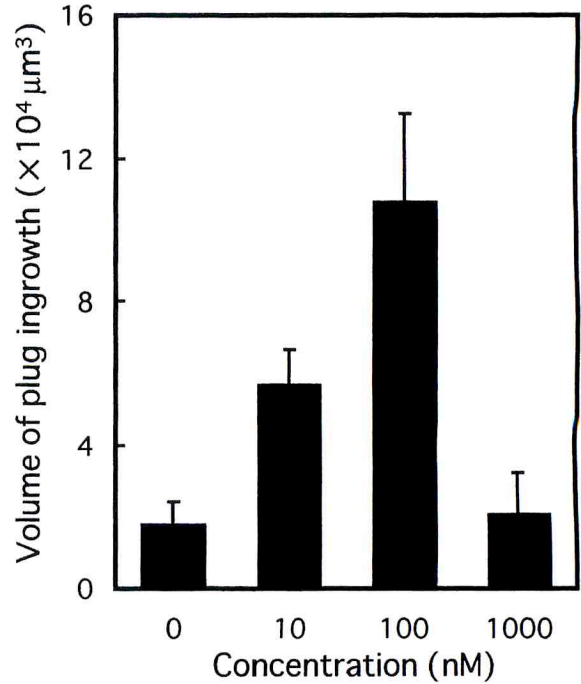


Fig. 10. Effect of CHAPS concentration on plug ingrowth in *C. japonica* pollen.

効果を示したと考えられる。現在カロース栓を単離し、*in vitro*で内方成長とこれら物質の影響を観察することを試みている。

引用文献

- (1) Gotoh, K. : Physiological researches on pollen, with special reference to the artificial germination of Gramineae pollen. *Mem. Fac. Sci. Agr. Taihoku Imp. Univ.* 3, 61-199 (1931).
- (2) 岩波洋造・矢本恒夫：花粉管内のカロース栓の研究 (I) 花粉管にできるカロース栓の数と形について。 *横浜市大論叢* 29, 1-23 (1978).
- (3) 中村紀雄・鈴木 恕：ツバキ花粉の成長とカロース栓形成。 *花粉誌* 27, 35-40 (1981).
- (4) 中村澄夫・三木寿子・岩波洋造：発芽花粉におけるカロース壁およびカロース栓形成の機構。 *花粉誌* 24, 33-44 (1979).
- (5) Fergauson, C., T. T. Teeri, M. Siika-aho, S. M. Read and A. Bacic : Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206, 452-460 (1998).
- (6) Hasegawa, Y., S. Nakamura and N.

- Nakamura : Immunocytochemical localization of callose in the germinated pollen of *Camellia japonica*. *Protoplasma* **194**, 133-139 (1996).
- (7) Hasegawa, Y., S. Nakamura, E. Uheda and N. Nakamura : Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms. *Grana* **39**, 46-55 (2000).
- (8) Nakamura, N., M. Mori and H. Suzuki : Characterization of the callose plug isolated from *Camellia japonica* pollen tube. *Plant Cell Physiol.* **25**, 233-238 (1984).
- (9) Schlüpmann, H., A. Bacic and S. M. Read : A novel callose synthase from pollen tubes of *Nicotiana*. *Planta* **191**, 470-481 (1993).
- (10) Schlüpmann, H., A. Bacic and S. M. Read : Uridine diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana alata* Link et Otto. *Plant Physiol.* **105**, 659-670 (1994).
- (11) Li, H., A. Bacic and S. M. Read : Activation of pollen tube callose synthase by detergents. *Plant Physiol.* **114**, 1255-1265 (1997).
- (12) Turner, A., A. Bacic, P. J. Harris and S. M. Read : Membrane fraction and enrichment of callose synthase from pollen tubes of *Nicotiana alata* Link et Otto. *Planta* **205**, 380-388 (1998).
- (13) Li, H., A. Bacic and S. M. Read : Role of a callose synthase zymogen in regulating wall deposition in pollen tubes of *Nicotiana alata* Link et Otto. *Planta* **208**, 528-538 (1999).
- (14) 長谷川義和・中村紀雄・中村澄夫：発芽花粉のカロース層とカロース栓の成分. 日本花粉学会第39回大会講演要旨. p.11 (1998).
- (15) 小林里子・花田俊男・中村紀雄：アニリンブルー蛍光法による花粉管壁カロース量の測定. 花粉誌 (2001, 印刷中)
-