

論 説

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

中村澄夫*・三木壽子*・岩波洋造**

On the mechanisms of callose wall and callose plug formation in germinating pollen.

Sumio NAKAMURA*, Hisako MIKI-HIROSIGE* and Yozo IWANAMI**

カロースはグルコースが β -1,3結合した多糖類の一種⁽¹⁾で、最初、Mangin⁽²⁾によって植物の茎の節板中に顕微化学的に見出された。カロースはアニリンブルー、レゾルシンブルーなどによって染色されることが知られているが⁽³⁾一般にはアニリンブルーのアンモニア水溶液で染めた後に蛍光顕微鏡で見る方法⁽⁴⁾が使われている。カロースは、植物細胞壁の通常の構成成分ではなく⁽⁵⁾上記の染色法を用いた場合に、カロースの沈着がある種の細胞壁に局在して認められる⁽⁶⁾このことから、カロースが sealing ないし plugging agents^(3,7)またある場合には isolating agent⁽⁸⁾として作用していることが考えられている。

一方、花粉においても、その発達の特定の時期にカロースの存在する例がいくつか知られている。すなわち、減数分裂期の小胞子母細胞周囲の壁⁽⁹⁾生殖細胞壁⁽¹⁰⁾花粉管壁^(6,11,12)および花粉管内のカロ-

ス栓などである。花粉管中のカロース栓の形成過程については、古くからかなり多くの研究が行われている⁽¹³⁾そして、カロース栓が三つのタイプに分けられること⁽¹⁴⁻¹⁶⁾その各タイプと植物の種類との関係などが明らかにされた⁽¹⁶⁾しかしながら、これらはいずれも光学顕微鏡での組織化学、偏光および位相差顕微鏡を用いての研究が主で、これまでのところ微細構造レベルでの研究⁽¹⁷⁾はほとんどなされていない。このように花粉管壁の一部を構成するカロース壁およびカロース栓形成の機構については不明な点が多い、

今回著者らは、テッポウユリ、ツバキ、サザンカの花粉を用いて、*in vitro*（前記3種）と *in vivo*（テッポウユリのみ）での、発芽花粉におけるカロース壁およびカロース栓形成について透過電子顕微鏡による研究を行い、若干の知見を得たので報告する。本論文を幾瀬マサ教授退官記念号に寄せる。

* 神奈川県歯科大学生物研究室（〒238 横須賀市稲岡町82）
Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, Inaoka, Yokosuka, Japan

** 横浜市立大学生物学教室（〒236 横浜市金沢区六浦町）
Biological Institute, Yokohama City University, Kanazawa-ku, Yokohama, Japan

材料および方法

テッポウユリ (*Lilium longiflorum*)、ツバキ (*Camellia japonica*) およびサザンカ (*Camellia Sasanqua*) の成熟花粉粒を用いた。*in vitro* の観察では、これらの花粉を培地 (10% 蔗糖、2% 寒天、ホウ酸 100 ppm、硝酸カルシウム 300 ppm) 上にまいて 25°C で培養し、発芽した花粉を 1 時間後 (ツバキ)、2 時間後 (テッポウユリ)、24 時間後 (サザンカ) に固定した。また、テッポウユリについては、吸水前の成熟花粉および培地着生後 10 分の材料も固定した。*in vivo* の観察では、他家受粉したのち、24 時間経過した柱頭組織を切りとり、直ちに固定した。

試料はすべて、3% グルタルアルデヒドおよび 1~2% オスミウム酸 (pH 7.3) を用いて二重固定を行い、その後エタノールシリーズで脱水し、酸化プロピレンで置換後、エポン-アララダイト混液⁽¹⁸⁾ および Spurr の樹脂⁽¹⁹⁾ に包埋した。LKB ウルトラミクロトームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛⁽²⁰⁾ で二重染色をしたのち、JEM-100B 電子顕微鏡で観察した。

結果および考察

(1) カロース壁形成

柱頭や培地上に着生した花粉粒が吸水すると花粉粒内の代謝活性が高まり、特に細胞質内の微細構造に大きな変化がおこることはこれまでに観察されているが⁽²¹⁾ 花粉壁の構造にも発芽と関連すると考えられる変化が生じることが明らかになった。すなわち、テッポウユリの成熟花粉 (吸水前) の花粉壁の構造は図 1 a の通りであるが、培地着生後 10 分の花粉壁には細胞膜と intine³ (内壁 3) の間に新しい層が認められる (図 1 b)。この層は花粉壁全体に見られ、発芽後の花粉管壁と連続している (図 1 c, 1 d)。これに相当する層が、今回、ツバキとサザンカでも観察された。最近、Sedgley⁽¹²⁾ は、avocado pollen を用いてアニリンブルー染色による蛍光顕微鏡観察か

ら、上記に相当する層がカロースから出来ていること、未発芽花粉ではこのカロース層が見られないことを報告している。このことから、図 1 b で見られた新しい層には、この段階 (培地着生後 10 分) ではまだカロースが出来上っておらず、発芽時以降にカロース壁へと移行していくものと考えられる (図 1 c, 5 a)。

花粉粒内のカロース壁は intine⁽²²⁻²⁴⁾ と同様にゴルジ小胞 (Golgi vesicles) によって形成されると推察されるが、まだ確証はない。花粉管のカロース壁は後述するカロース顆粒 (callose grains) の融合によって形成されることが今回テッポウユリの花粉管の *in vivo* の観察から明らかになった (図 2)。

しかしながら、花粉管壁がカロースだけから構成されているのではないことは、他の方面からの研究が示している。すなわち、花粉管の先端部でセルロース繊維がランダムに配列しており⁽²⁵⁻²⁷⁾ 先端以外の部分でもセルロース繊維が 2 方向に配列している。^(27, 28) さらに、Roggen and Stanley⁽²⁹⁾ は、花粉粒から花粉管の先端にかけて花粉管壁中のペクチン含量が次第に増加しており、特に先端部分は最大の含有量を示すことを報告している。また、Reynolds and Dashek⁽⁶⁾ は、テッポウユリで、花粉管先端部の callosic glycoprotein の存在は、花粉管の長さに依存し、短い場合 (0.2mm) には存在するが、長い場合 (0.5mm) には存在しないことを明らかにしている。これらのことから、花粉管壁は、Rosen et al.⁽³⁰⁾ がテッポウユリの花粉管先端部で最初に明らかにしたゴルジ小胞による壁形成と、さきのカロース顆粒による非生長部分でのカロース壁形成の両面から形成されていくものと考えられる。

(2) カロース栓形成

カロース栓の形成過程については、これまで光学顕微鏡レベルでくわしく観察され、その形成方法に三つのタイプのあることが明らかにされている。⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ すなわち、比較的薄いカロース栓の板がリング状に花粉管の内側にでき始め、それが生長して管

内を仕切るタイプ (Aタイプ, Bタイプ) と花粉管の一方の側からカロースが沈着して、それが生長して管内を仕切るタイプ (Cタイプ) である。今回、テッポウユリの *in vivo* でのカロース栓形成過程を電子顕微鏡で観察したところ、まず細胞膜に接してその内側にカロース顆粒が集まり、互いに融合してカロース栓が形成されていく (図3)。ここでは未成熟のカロース栓の中にカロース顆粒が認められる (図3 矢印)。図4は、かなり発達したカロース栓であるが、まだ一部しかカロースに移行 (太い矢印) しておらず、カロース顆粒が多く見られる。Cresti and Went⁽¹⁷⁾ は、*in vivo* でのペチュニア花粉管中のカロース栓を電子顕微鏡で観察し、カロース栓が中程度の電子密度の微細な顆粒状物質からできていることを報告しているが、この顆粒がカロース顆粒でまだ完全にカロースに移行していない時期の未成熟なカロース栓と考えられる。図5 bは、サザンカ花粉を *in vitro* で24時間培養した時の花粉管内に形成されたカロース栓である。この場合は、カロース顆粒がほとんどカロースに移行して、成熟したカロース栓 (mature callose plug) が形成されている。

(3) カロース顆粒 (callose grains) の起源

カロース壁およびカロース栓形成に重要な機能をもつカロース顆粒は、最初、Jensen and Fisher⁽³¹⁾ によってワタの花粉管中にその存在が明らかにされたものであるが、その起源については最近まで不明であった。Cresti and Went⁽¹⁷⁾ は、ペチュニア花粉の *in vivo* の研究から、カロース顆粒と粗面小胞体 (RER) とが微細構造的に連続していることを指適して、カロース顆粒が RER と密接な関係にあることを示唆した。今回、テッポウユリの花粉管の *in vivo* の観察から、RER の内腔からカロース顆粒が形成されることが明確になった (図6 a, 6 b)。また、*in vitro* の観察から、lipid bodies からカロース顆粒が形成されると思われる結果が得られている。すなわち、図7は、テッポウユリ花粉管内の壁に近い部分の微細構造であるが、lipid bodies 内にカ

ロース顆粒が認められる (矢印)。また図8 a—8 c は、開口部近くの細胞質の連続切片像である。lipid bodies からカロース顆粒が形成されている様子が見られる (矢印)。Tsinger and Petrouskaya-Baranova⁽³²⁾ は多くの種で *in vitro* でのカロース栓形成の際に lipid が出現すること、そして、その lipid が形態的に完全にこわされて細分化され、続いて脂肪反応がなくなり、カロース反応の試薬で染色されるようになることを報告している。また、lipid が、 β 1.3 および β 1.4 グルカンの合成に関して (33) という報告もある。これらの報告は、今回の lipid bodies からのカロース顆粒形成の結果を支持している。

ここで注目されるのは、今回観察されたカロース顆粒の起源や花粉管中に存在する数に関しての *in vivo* と *in vitro* の差である。すなわち、カロース顆粒が *in vivo* では粗面小胞体から形成されるが、lipid から形成される結果は観察されていない。一方、*in vitro* では lipid から形成されるが、粗面小胞体から形成される像は見られない。また、花粉管中のカロース顆粒の数も *in vivo* では *in vitro* にくらべて著しく多い。その他、*in vivo* の花粉管中 (今回先端部付近は観察していない) には、ゴルジ体やテンブレン粒がほとんど見られなかった (図6 a, 6 b) 点も注目される。このことは、Cresti and Went⁽¹⁷⁾ の結果とも一致している。このような *in vivo* と *in vitro* の差は、両方の栄養分の代謝系の差とも密接に関係すると考えられるので、今後これらのことをふまえて、カロース顆粒の起源、カロース壁およびカロース栓形成の機構をさらに明確にしたい。

要 約

テッポウユリ、ツバキ、サザンカの花粉を用いて *in vitro* と *in vivo* での、発芽花粉におけるカロース壁およびカロース栓形成について透過型電子顕微鏡による研究を行い、次の結果を得た。

1) 花粉粒が吸水するとまもなく、細胞膜と intine の間に新しい層が形成され、発芽時になってカロース

壁へと移行していくと考えられる。この壁は花粉壁全体に見られ、発芽後の花粉管壁と連続している。

2) 前述の花粉粒内の新しい層は、ゴルジ体起源と推察されるが、発芽後、花粉管壁の主要な構成体となるカロース壁は、カロース顆粒から由来する。

3) 花粉管壁は、先端部でのゴルジ小胞による壁形成と、カロース顆粒による非生長部分での壁形成(カロース壁形成)の両面から形成されるものと考えられる。

4) カロース栓形成に関しては、まず細胞膜に接し

てその内側にカロース顆粒が集まり互に融合してその内側にカロース栓が形成されていく。未成熟なカロース栓の内部には、多くのカロース顆粒が認められるが、しだいにカロース顆粒およびその内部の繊維構造が消失すると共にカロースの沈着が起こり、最後に大部分カロースの堆積物となってカロース栓が完成する。

5) *in vivo* と *in vitro* でカロース顆粒の起源に差が認められた。すなわち、*in vivo* では粗面小胞体起源、*in vitro* では lipid bodies 起源であった。

Summary

1. After the water absorption of the pollen grain on a culture medium or a stigma papilla, a new layer which continues on the pollen tube wall in future is formed between the intine and the cell membrane. This layer seems to change to the callose wall on the germination.
2. It is assumed that the new layer in the pollen grain is formed from the vesicles derived from Golgi vesicles, but the callose wall which largely composes the pollen tube wall is derived from the callose grains.
3. The pollen tube wall seems to be formed in two regions. Namely one is the wall formation at the tip from the Golgi vesicles and the other is the wall formation (callose wall formation) at the non-growing region from the callose grains.
4. The callose plug is formed by the fusion of a lot of callose grains in contact with the cell membrane. Then the plug develops by the deposition of callose derived from the callose grains with fibrous structure.
5. On the callose grain formation, a difference is observed between the materials *in vivo* and *in vitro*. That is, the callose grains seem to be derived from the rough endoplasmic reticulum *in vivo*, and from the lipid bodies *in vitro*.

引用文献

- 1) Aspinal, G.O. and G. Kessler(1957) : *Chemistry Ind.* **77**, 1296.
- 2) Mangin, L.(1890) : *Compt. Rend. Acad. Sci.* **110**, 644.
- 3) Currier, H.B.(1957) : *Amer. J. Bot.* **44**, 478.
- 4) Linskens, H.F. and K. Esser(1957) : *Naturwissenschaften* **44**, 16.
- 5) Bonner, J. and J.E. Varner(1965) : *Plant Biochemistry*, Academic Press, New York.
- 6) Reynolds, J.D. and W.A. Dashek(1976) : *Ann. Bot.* **40**, 409.

- 7) Mohan Ram, H.Y. and R. Nath(1964) : *Phytomorphology* **14**, 414.
- 8) De Fossard, R.A.(1969) : *Bot. Gaz.* **130**, 10.
- 9) Waterkeyn, F.(1962) : *LaCellula* **62**, 225.
- 10) Gorska-Brylass, A. (1967) : *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **36**, 419.
- 11) Alves, L.M., Middleton, A.E. and D.J. Morre(1968) : *Proc. Indiana Acad. Sci.* **77**, 144.
- 12) Sedgley, M.(1979) : *J. Cell Sci.* **38**, 49.
- 13) Iwanami, Y. and T. Yamoto(1978) : *The Bulletin of the Yokohama Municipal University Society. Natural Science* **29** (2).
- 14) Biblioff-Preisser(1917) : *Beih. Bot. Zentralbl.* **1**, 459.
- 15) Brink, R.A.(1924) : *Amer. J. Bot.* **6**, 351.
- 16) Gotoh, K.(1931) : *Mem. Fac. Sci. Agr. Taihoku Imp. Univ.* **3**, 61.
- 17) Cresti, M. and J.L. van Went(1976) : *Planta* **133**, 35.
- 18) Johnson, U.G. and K.R. Porter(1968) : *J. Cell Biol.* **38**, 403.
- 19) Spurr, A.R.(1969) : *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31.
- 20) Reynolds, E.(1963) : *J. Cell Biol.* **17**, 208.
- 21) Miki-Hirosige, H. and S. Nakamura(1972) : *Proceedings of the 37th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan.* p.52.
- 22) Heslop-Harrison, J.(1968) : *Port. Acta. Biol.* **10**, 235.
- 23) Echlin, P. and H. Godwin(1969) : *J. Cell Sci.* **5**, 459.
- 24) Nakamura, S.(1979) : *J. Electron Microsc.* **28**, 275.
- 25) Okelley, J.C. and P.H. Carr(1954) : *Amer. J. Bot.* **41**, 261.
- 26) Muhlethaler, K. and H.F. Linskens(1956) : *Experientia* **12**, 253.
- 27) Sassen, M.M.A.(1964) : *Acta Bot. Neer.* **13**, 175.
- 28) Dashek, W.V.(1966) : *Ph.D. Thesis, Marquette Univ., Milwaukee, Wisconsin.*
- 29) Roggen, H.P.J.R. and R.G. Stanley(1971) : *Physiol. Plant.* **24**, 80
- 30) Rosen, W.G., Gawlik, S. R., Dashek, W.V. and K.A. Siegesmund(1964) : *Amer. J. Bot.* **51**, 61.
- 31) Jensen, W.A. and D.B. Fisher(1968) : *Planta*, **78**, 158.
- 32) Tsinger, N.V. and T.P. Petrovskaya-Baranova(1967) : *Sov. Plant Physiol.* **14**, 404.
- 33) Brett, C.T. and D.E. Northcote(1975) : *Biochem. J.* **148**, 107.

Key to abbreviations

CaG	: callose grain	L	: lipid body
Cap	: callose plug	M	: mitochondrion
CaW	: callose wall	N 1	: nexine 1
CM	: cell membrane	N 2	: nexine 2
G	: Golgi body	RER	: rough endoplasmic reticulum
GV	: Golgi vesicle	S	: starch grain
I 1	: intine 1	Se	: sexine
I 2	: intine 2		
I 3	: intine 3		

Explanation of Figures

- Fig. 1a. Section showing the stratification of the mature pollen wall in *Lilium longiflorum*. x24,000
- Fig. 1b. The view of the pollen wall after ten minutes water absorption. A new layer(callose wall in future) is seen between the intine 3 and the cell membrane(thick arrow). x24,000
- Fig. 1c. Pollen wall in the aperture region. The callose wall continues on the pollen tube wall. x7,500
- Fig. 1d. The view of the tip region of the pollen tube. A lot of Golgi vesicles and lipid bodies are seen. x4,500
- Fig. 2. Longitudinal section of the pollen tube in *Lilium longiflorum* which is cultured *in vivo* for 24hr. A lot of callose grains are shown in the pollen tube. Several callose grains(arrow) fusing with the pollen tube wall(callose wall) can be seen. x12,000
- Fig. 3. The view showing callose plug formation from the callose grains(arrows). The plug is formed by the fusion(arrow 2) of a lot of callose grains in contact with the cell membrane (arrow 1). x6,000
- Fig. 4. Immature callose plug which contain a lot of callose grains(thin arrows) and a deposit of callose(thick arrow). x12,000
- Fig. 5a. The view of the aperture region in *Camellia Sasanqua* which is cultured *in vitro* for 24hr. x4,000
- Fig. 5b. Longitudinal section of mature callose plug of the same materials as Fig. 5a. x5,000
- Fig. 6a. Pollen tube cytoplasm of *Lilium longiflorum in vivo* showing the callose grain formation by the rough endoplasmic reticulum(RER). Intracisternal spaces of RER are continuous with the callose grains(arrows). x30,000
- Fig. 6b. Cross section of the same region as Fig. 6a. Several callose grains(arrows) which are formed from the intracisternal spaces of RER. x16,000
- Fig. 7. Pollen tube cytoplasm of *Lilium longiflorum in vitro* showing the callose grain formation-(arrows) from lipid bodies. x24,000
- Fig.8a-c. Serial sections showing the callose grain formation(arrows) from lipid body. x24,000











