

(原著論文)

## 裸子植物の花粉管伸長機構 I. アカマツ花粉管における細胞内小胞

平塚 理恵・寺坂 治

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  
(1996年8月26日受付, 10月1日受理)

### Growth of Pollen Tube in Gymnosperms I. The Vesicles in *Pinus* Pollen Tube

Rie HIRATSUKA and Osamu TERASAKA

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

The ultrastructure of growing pollen tubes in *Pinus densiflora* was studied using electron microscopic and anti-clathrin immunofluorescent methods. The tip regions of these elongated pollen tubes filled mainly with vesicles and free ribosomes; the subapical regions with mitochondria, Golgi apparatuses, rough endoplasmic reticulum and lipid bodies; and the basal regions with large vacuoles. The vesicles in the tip regions were composed of 140nm, 75nm and 30nm electron-translucent vesicles and 55nm electron-dense vesicles. Both kinds of vesicles also located in all cortical regions of the tubes. 75nm and 55nm vesicles budded from the trans side of Golgi apparatus and the budded 55nm vesicles showed a structure similar to "clathrin coated vesicle". 30nm and 140nm vesicles were not observed to bud from Golgi apparatus. Some of these four kinds of vesicles located near the cell membrane or fused to it. These vesicles formed coated pits and depressions on the cell membrane itself. Within the tip region, microtubules and microfilaments arranged along the long axis of the tube.

Fluorescence, originated from clathrin, appeared on the uniform-sized vesicles. Some of these vesicles aggregated into clumps. The vesicles were found in the apical and cortical regions of almost all tubes. These results indicated that 55nm vesicles were clathrin-coated vesicles.

**Key words :** Clathrin coated vesicle, Electron microscope, Immunofluorescence, *Pinus densiflora*, Pollen tube

## 緒 言

細胞が成長する過程において、新たに合成された壁物質などの細胞構成成分は細胞内の特定の位置に輸送・分泌され、その過程にはゴルジ装置や、小胞体由来の細胞内小胞が関与する。それらの小胞のうちゴルジ装置由来のものは、発芽部位がクラスリンやコートマーなどのタンパク質によって被覆され、被覆小胞を形成する。動物細胞や酵母を用いた研究より、これらの被覆小胞はクラスリン被覆小胞と非クラスリン被覆小胞に大別され、前者は細胞外からの刺激によって分泌が誘導される物質の輸送に、後者は細胞外からの刺激とは無関係に構成的に分泌される物質の輸送に関与することが知られている。

一方、タバコ、ユリ、ホウセンカ、サクラなどの被子植物の花粉管では、伸長中の先端部に 300nm と 50nm の 2 型の小胞が多数分布し、その内部に多糖類やタンパク質などの細胞壁物質が含まれること<sup>(1, 2)</sup>、ユリの花粉管先端部の細胞膜上にクラスリンが存在すること<sup>(3)</sup>、小胞付近にアクチン纖維や微小管が分布し<sup>(4)</sup>、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D によって小胞の管先端への輸送が阻害されること<sup>(5)</sup>などが報告されている。また、毬果類数種の裸子植物では花粉管先端に小型で電子密度が高い小胞と大型で電子密度の低い小胞の存在が報告されている<sup>(6, 7)</sup>。

筆者らは、アカマツ花粉内にはアクチン-ミオシン系および微小管-キネシン系が存在し、前者は原形質流動や花粉管の伸長に、後者は花粉管伸長の極性に関与していることを明らかにし、花粉管伸長機構における細胞骨格の関与を示唆した<sup>(8, 9)</sup>。しかし裸子植物の花粉管における解析例は少なく、輸送小胞の形態およびそれらがどのような種類のタンパクによって被覆されるのか、また被覆小胞の運動と細胞骨格がどのように関連するのかについてはほとんど解明されていない。

本研究では、アカマツ花粉管を電顕法および抗クラスリン間接蛍光抗体法によって解析し、管の先端部を含む表層部に大きさの異なる 4 種類の小胞が存在し、そのうち約 55nm の小胞がクラスリンによって被覆されることを明らかにした。

## 実 験 方 法

本研究ではアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) の花粉を用いた。採集した花粉は使用時まで 4°C または -81°C で保存した。

**抗クラスリン蛍光抗体法：**花粉の培養はショ糖濃度を 2% に改変した Brewbaker と Kwack<sup>(10)</sup> の培地により 25°C、2 ~ 4 日行った。発芽・伸長した花粉を、50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 時間固定した。固定後、花粉を前記の緩衝液で 30 分洗浄した後、1% セルラーゼ・オノゾカ、1% マセロザイムおよび 0.1M ショ糖の混合液に 20 分浸し、花粉管壁を部分的に消化した。花粉を緩衝液により 30 分洗浄し、PBS (phosphate buffered saline、シグマ社) 緩衝液で 500 倍に希釈したヤギ・ポリクローナル-抗クラスリン抗体 (ICN ImmunoBiologicals) で 1 時間処理した。試料を PBS で 30 分洗浄した後、PBS で 40 倍に希釈したマウス-抗ヤギ IgG-FITC (ICN ImmunoBiologicals) で 1 時間処理した。さらに PBS で 30 分洗浄した後顕微鏡標本を作製した。観察はニコン・FX 蛍光顕微鏡で行った。

**電顕法：**2 ~ 4 日培養した花粉の一部をグルタルアルデヒド-四酸化オスミウムによる化学固定後アルコール・アセトン系列で脱水・置換し、Quetol 653 に包埋した。また、他的一部を液体ヘリウムによる急速凍結固定後、オスミウム・アセトンで処理し、エポン-アラルダイト樹脂に包埋した。超薄切片作成後、酢酸ウラン-鉛の二重染色を行い電顕観察を行った。

## 実 験 結 果

アカマツの成熟花粉を人工培地中で培養すると、培養開始後 24 時間で約 94% が発芽し、その後約 60 μm / 日の割合で伸長した。なお、発芽率および伸長速度は 4°C および -81°C で保存した花粉ともほぼ同じであったが、4°C 保存の場合は約 6 カ月で発芽率が著しく低下した。-81°C の場合は約 1 年後でも低下は見られなかった。

発芽・伸長した花粉の微細構造を電顕により観察した。Fig. 1 は 3 日間培養した花粉管の電顕写真である。花粉管先端部には主に小胞と遊離のリボソームが存在し、その後方にはミトコンドリア、ゴルジ装置、粗面小胞体、リピッドなどを含む層があり、さらに花粉粒に近い部域には液胞が発達していた。先端部における小胞は被子植物であるユリやタバコなどで観察される小胞に比べると小型であり、量が著しく少なかった (Fig. 2)。しかし本種の花粉管では、先端部における小胞と同じものが先端以外のほぼ全域の細胞膜付近においても観察された。ゴルジ装置は先端部よりわず

かに基部よりの花粉管内部やそれよりさらに基部側の細胞膜にそって分布していた。細胞壁は約1μmの厚さで、先端部では電子密度がほぼ均一な1層からなるが、花粉粒に近い部位では内側が外側に比べて電子密度が高い2層からなっていた。Fig. 3は花粉管最先端部を示しており4種類の小胞：直径140nm以上で電子密度が低い小胞、直径75-100nmで電子密度が低い小胞、直径55-75nmで電子密度の高い小胞、直径約30nmで電子密度の低い小胞が観察された。4種類の小胞ともその一部は先端の細胞膜と隣接または融合していた。細胞膜上には140nm小胞と類似の大きさの陥入が観察された。Fig. 4は先端部よりやや基部側の細胞膜に近い位置でのゴルジ装置および小胞の分布を示している。4種類のうち55nm小胞および75nm小胞がゴルジ装置のトランス面から発芽している。55nm小胞は中心が約30nmの小胞であり、その周辺は小粒状に見える物質によってかご状に被覆され、動物細胞すでに報告されているクラスリンコート様の構造を呈していた。30nm小胞と140nm小胞はゴルジ装置からの発芽は見られなかった。30nm小胞は花粉管の中央部にも分布する。細胞内には花粉管長軸に配向するマイクロフィラメントが観察された。Fig. 5は急速凍結置換法による発芽直後の花粉管先端像である。55nmクラスリン様被覆小胞と75nm小胞が花粉管先端の細胞膜に近接または融合・陥入し(Fig. 5a)，細胞膜上にはクラスリン様の構造体が付着した被覆小孔を形成していた(Fig. 5b)。また、先端部には花粉管長軸にそって微小管が配向していた。

発芽花粉を抗クラスリン蛍光抗体法によって染色した。その結果、発芽直後から伸長したものまでほとんどすべての花粉管内にクラスリン由来の蛍光が観察された。Fig. 6は発芽直後の花粉におけるクラスリンの分布を示している。クラスリン由来の蛍光は小さな顆粒状を呈し、ほぼ均一な大きさであるが、数個の小顆粒が集合して大きな塊状をなすものもあった。顕微鏡の焦点を花粉管の中央にあわせるとクラスリン蛍光は花粉管の先端部で観察され、先端以外の花粉管内や花粉粒ではほとんど検出されなかった(Fig. 6a)。焦点を管表層部にあわせるとクラスリン蛍光は管全域に観察された(Fig. 6b)。Fig. 7は伸長した花粉管の表層部に焦点を合わせた像であり、クラスリン蛍光は花粉管全域に出現する。これらの事実はクラスリンは花粉管表層部に分布する小胞上に遍在することを示している。花粉を1次抗体である抗クラスリン抗体で処理せず、2次抗体のみで染色した場合には蛍光は観

察されなかった。

## 考 察

クラスリン被覆小胞は、植物ではこれまでソラマメの葉やセイヨウカボチャの胚軸などの種々の細胞において報告されているが<sup>(11, 12)</sup>、今回、裸子植物の一種のアカマツ花粉管の表層部にも存在することが抗クラスリン間接蛍光抗体法によって明らかになった。

クラスリンは、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスの際の小胞の発芽・形成に関与するタンパク質の一つであり、小胞内に含まれる物質の種類によって選択的に結合し、小胞形成後小胞から離脱し再利用されることが多い動物細胞において報告されている。しかし植物細胞における機能については、細胞内小胞輸送の機構とともに十分には解明されていない。健果類の花粉管内には電子密度の高い小型の顆粒および、内部に分散状の纖維性物質を含む大型の顆粒が観察されているが、アカマツの花粉管では30, 55, 75, 140nmの4種類の大きさの小胞が観察された。それらのうちの55nm小胞の微細構造は小胞を周辺物質が取り囲むかご状構造を呈し、Orciら<sup>(13)</sup>がチャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いて報告したクラスリン被覆小胞の構造とよく類似していた。55nm小胞の被覆構造はFig. 4においては小粒の集合体として観察されたが、すでに報告されているクラスリン被覆の三次元的構造はトリスケリオンでできた多面体格子状構造である<sup>(14)</sup>。また、クラスリン様被覆小胞は、ゴルジ装置表面、細胞膜上およびその間の細胞質中に分布し、ゴルジ装置の多くは花粉管先端の小胞の層の後方と管周辺部に分布した。これらの分布域は蛍光抗体法によるクラスリン由来の蛍光の分布域と一致していた。以上のことから55nm小胞はクラスリン被覆小胞であることが示唆された。動物細胞での報告に基づくと、この55nm小胞のうちゴルジ装置のトランス面から出芽するものはエキソサイトーシス、細胞膜と融合したものはエンドサイトーシスとして機能し、また、細胞質中のものは、いずれかの過程において形成されたものであると推測される。また、ゴルジ装置トランス面から出芽している75nm小胞は非クラスリン小胞と考えられ、4種類の小胞のうち最も多く花粉管全域の細胞膜と融合することから、花粉管における小胞輸送において重要な役割を果たしていると思われる。一方、ゴルジ装置からの出芽が観察されない30nm小胞はその大きさと分布より、クラスリン被覆小胞か

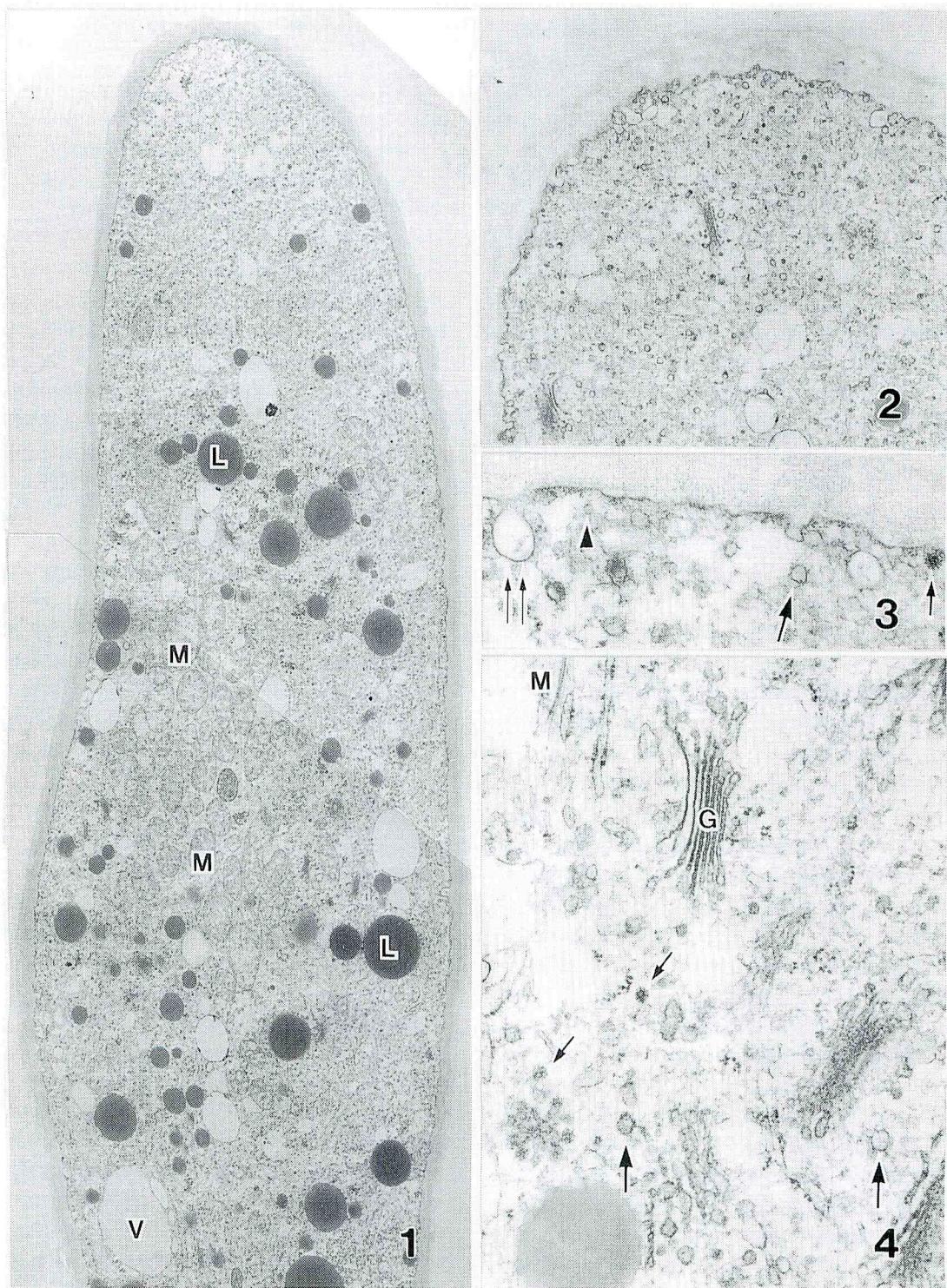




Fig. 1-5. The ultrastructure of pollen tubes in *P. densiflora*.

Fig. 1. Longitudinal section of an elongated pollen tube. The cytoplasm shows a zonal organization : a tip region with vesicles and free ribosomes ; a subapical region with mitochondria, Golgi apparatuses, rough endoplasmic reticulum, lipid bodies ; and a basal region with vacuoles. L : lipid body, M : mitochondria, V : vacuole  $\times 4,260$ .

Fig. 2. The tip region contained many vesicles and a few Golgi apparatuses.  $\times 11,360$ .

Fig. 3. High magnification micrograph of the apical region. Four different sized vesicles are found : 140nm (double arrow), 75nm (large arrow), 55nm (small arrow) and 30nm (arrow head) in diameter. Some of them are located near the cell membrane or fused to it.  $\times 41,700$ .

Fig. 4. The subapical region near the lateral wall of the tube. 75nm (large arrow) and 55nm (small arrow) vesicles are budded from the trans side of Golgi apparatus. 55nm vesicles showed structures like "clathrin-coated vesicle". 30nm vesicle are found around the Golgi apparatus. G : Golgi apparatus, M : microfilament.  $\times 35,500$ .

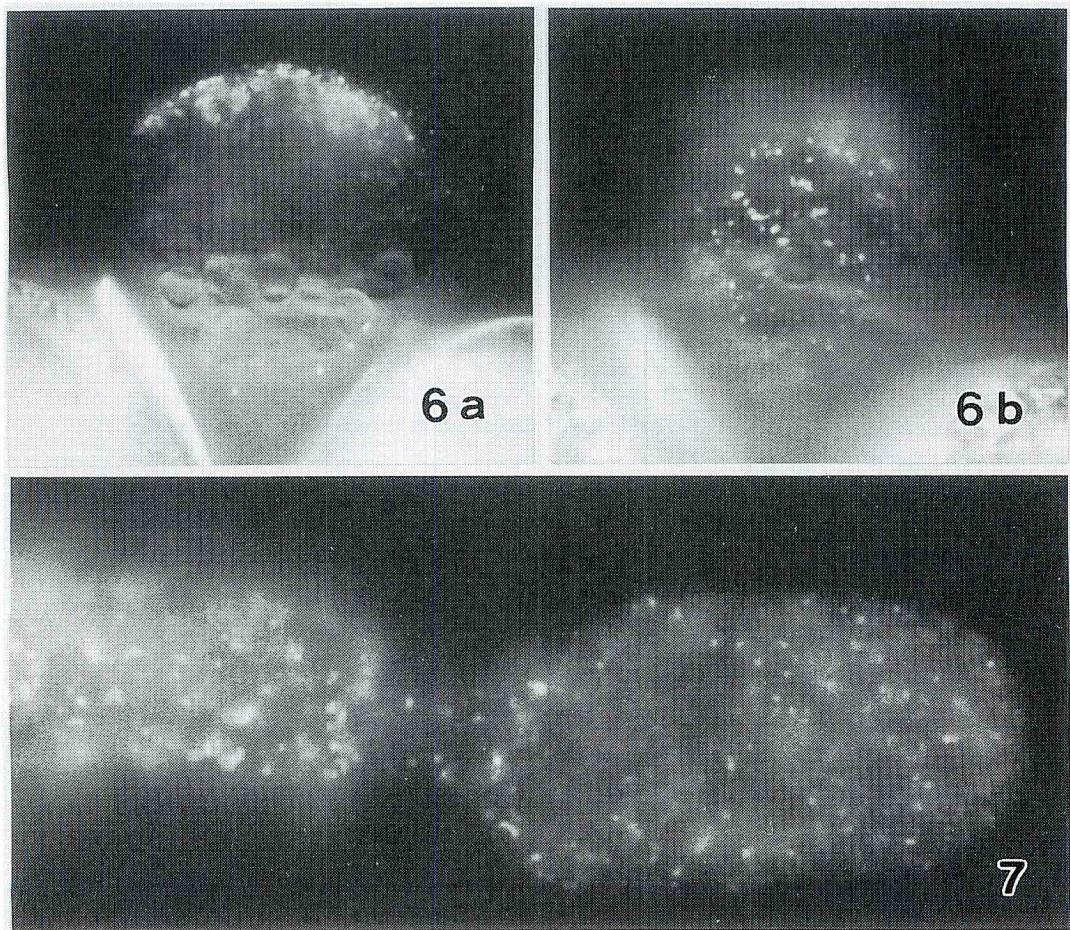
Fig. 5. The apical region of a just-germinated tube fixed by rapid freezing. a ; the 55nm (small arrow) and 75nm (large arrow) vesicles and coated pits are located on or near the cell membrane.  $\times 29,400$ . b ; a high magnification photograph of the coated pit.  $\times 67,500$ .

らクラスリンが離脱した小胞であるか、または、粗面小胞体から出芽しゴルジ装置シス面に移動中の小胞であると考えられる。最も大型の140nm小胞はゴルジ

装置から発芽せず細胞膜陷入として観察されるが多く、エンドサイトーシスに関与する小胞であることを示唆している。

花粉管の先端付近において花粉管長軸にそって配向する微小管およびマイクロフィラメントが観察された。これらのことは Picton と Steer<sup>(7)</sup> および Terasaka と Niitsu<sup>(8)</sup> の報告と一致している。また Pfeffer ら<sup>(10)</sup> は、脳細胞よりクラスリン被覆小胞を単離すると、小胞にチューブリンが結合して得られることを報告している。これらの事実より、花粉管における小胞それ自身の細胞内移動には微小管やアクチンなどの細胞骨格が関与していると考えられる。

アカマツ花粉管には花粉管伸長に関与すると思われる 4 種類の小胞が観察されたが、これらの小胞は被子植物のユリなどにおける小胞と比較すると明らかに小型で少量であった。このことは裸子植物花粉管の伸長速度が被子植物花粉管に比べて著しく遅い事実とよく一致している。また、これらの小胞が花粉管の側壁にそって分布することは花粉管の二次成長を可能にするが、このことは裸子植物の花粉管が被子植物のそれに比べて太くその先端または側部より分枝する<sup>(8, 9)</sup> 事實をよく支持している。



Figs. 6 and 7. Anti-clathrin immunofluorescence staining of just germinated (Fig. 6) and elongated (Fig. 7) pollen tubes.

Fig. 6a. The focus is adjusted on the internal position of the tube ; and in 6b on the cortical region of the same tube shown in 6a.  $\times 1,320$ .

Fig. 7. The focus is adjusted on the cortical region of an elongated tube. The fluorescence caused by the clathrin showed a spherical appearance and localized throughout the cortical regions.  $\times 1,640$ .

## 要 約

裸子植物の一種、アカマツの花粉管伸長機構の解明を目的として、その微細構造を電顕法および抗クラスリン間接蛍光抗体法によって解析した。

花粉管先端部には主に小胞と遊離のリボソームが存在し、その後方にはミトコンドリア、ゴルジ装置、粗面小胞体、リピッドを含む層が、さらに花粉粒に近い部域には液胞が発達していた。先端部における小胞は電子密度の低い直径30nm、75-100nm、140nmの小胞、および電子密度の高い55-75nm小胞からなり、それらは他の全域の表層付近にも分布する。それらのうち55nmと75nmの小胞がゴルジ装置トランクス面から出芽し、前者はクラスリン様被覆構造を示した。また、4種類の小胞は細胞膜と隣接・融合し、細胞膜上にはクラスリン様被覆小孔や細胞膜陷入が観察された。先端部付近には微小管、マイクロフィラメントが管の長軸にそって配向していた。

クラスリン由来の蛍光が、発芽直後から伸長したほとんどのすべての花粉管内の先端部および全表層部で観察された。蛍光は小さな顆粒状を呈し、ほぼ均一な大きさであるが、数個の小顆粒が集合して大きな塊状を形成することがあった。以上より、55nm小胞はクラスリン被覆小胞であることが示唆された。

## 引 用 文 献

- (1) Mascarenhas, J. P. : Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *The Plant Cell.* 5, 1303-1314 (1993).
- (2) Cresti, M., S. Blackmore and J. L. van Went : Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Springer-Verlag pp.190-193 (1992).
- (3) Blackbourn, H. D. and A. P. Jackson : Plant clathrin heavy chain : sequence analysis and restricted localisation in growing pollen tubes. *J. Cell Sci.* 109, 777-787 (1996).
- (4) Lancelle, S. A. and P. K. Hepler : Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma*. 167, 215-230 (1992).
- (5) Pierton, J. M. and M. W. Steer : Determination of secretory vesicle production rates by dictyosomes in pollen tubes of *Tradescantia* using cytochalasin D. *J. Cell Sci.* 49, 261-272 (1981).
- (6) Pettitt, J. M. : Pollen tube development and characteristics of the protein emission in conifers. *Annals of Botany.* 56, 379-397 (1985).
- (7) Dawkins, M. D. and J. N. Owens : In vitro and in vivo pollen hydration, germination, and pollen-tube growth in white spruce, *Picea glauca* (Moench) Voss. *Int. J. Plant Sci.* 154, 506-521 (1993).
- (8) Terasaka, O. and T. Niitsu : Differential roles of microtubule and actin-myosin cytoskeleton in the growth of *Pinus* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 7, 264-272 (1994).
- (9) 寺坂 治・新津 恒良：アカマツの花粉管先端に遍在するキネシン。花粉誌 40, 1-6 (1994).
- (10) Brewbaker, J. and B. H. Kwack : The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* 50, 859-865 (1963).
- (11) Robinson, D. G. and H. Depta : Coated vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 53-99 (1988).
- (12) Depta, H., H. Freundt, D. Hartmann and D. G. Robinson : Preparation of a homogeneous coated vesicle fraction from bean leaves. *Protoplasma.* 136, 154-160 (1987).
- (13) Orci, L., B. S. Glick and J. E. Rothman : A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin : Its possible role in protein transport within the golgi stack. *Cell* 46, 171-184 (1986).
- (14) Pfeffer, S. R., D. J. Drubin, and R. B. Kelly : Identification of three coated vesicle components as alpha and beta tubulin linked to a phosphorylated 50-kD polypeptide. *J. Cell Biol.* 97, 40-47 (1983).

