

(原著論文)

## ムラサキツユクサ葯組織に出現する ミオシン様タンパク質結合顆粒の動態

寺坂 治<sup>1)</sup>・平塚 理恵<sup>1)</sup>・山田 陽子<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京慈恵会医科大学生物化学教室 〒182-8570 東京都調布市国領町 8-3-1

<sup>2)</sup> 日本女子大学理学部物質生物科学科 〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1

(1998年3月3日 受付, 1998年5月8日 受理)

Behavior of Granules Associated with Myosin-like Protein  
during Anther Development of *Tradescantia virginiana* L.

Osamu TERASAKA<sup>1)</sup>, Rie HIRATSUKA<sup>1)</sup> and Yohko YAMADA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Biology, Jikei University School of Medicine, Kokuryo 8-3-1,  
Chofu, Tokyo, 182-8570 Japan

<sup>2)</sup> Department of Chemical and Biological Sciences, Faculty of Science,  
Japan Women's University, Mejirodai 2-8-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8681 Japan

Cytoplasmic granules whose surface was labeled with anti-myosin immunofluorescence (M-granules), were shown to organize tissue-specifically during anther development of *Tradescantia virginiana* L. Small M-granules appeared in microsporocytes and became larger in the tetrad. However, almost no M-granules were found in the tapetum during microsporogenesis. After tetrad segregation, the M-granules disappeared within the microspores. M-granules were first observed in the tapetum at the microspore division stage. These became larger and increased in number 2 days before inflorescence with many of them localized around the pollen grains. The tapetum, including M-granules, disintegrated during the 1.5 to 0.5 days before inflorescence. The fluorescence from M-granules weakened gradually and was not detectable 1 day before inflorescence. On the other hand, small M-granules re-appeared 2 days before inflorescence in the pollen grains. These increased both in size and number and reached maximum levels 0.5 days before inflorescence. Actin fragments were detected with NBD-phalloidin in the tapetum cytoplasm 1.5 days before inflorescence.

PAS and iodo-starch reactions showed that the M-granules in the pollen grain contained starch. However, those in the tapetum contained polysaccharide, but no starch.

These results suggest that M-granules in the tapetum are a nutrient substance for pollen grains, and that the actin-myosin motility system is involved in transporting them pollen grains within the tapetum.

**Key words :** actin, myosin, pollen, tapetum, *Tradescantia virginiana*

## 緒 言

雄性配偶体である花粉は孢子体の一部である葯内においてその周辺組織、特にタペータムとの密接な関連のもとに発達する。タペータムはその形態的特徴によって分泌型、アメーバ型、両者の中間型に分けられ、種固有の方法によって花粉母細胞や花粉粒と接触し哺育細胞としての役割を果たしている。タペータムはそれらに対してオービクル、スポロポレニン前駆物質を含む小胞、ポーレンキットなどを供給し壁成分であるスポロポレニンの形成に関与し、また各種の栄養供給を行なっている。ポーレンキットは受粉時における和合、不和合性にも関与するといわれている。Clémentら<sup>(1)</sup>は分泌型タペータムを有するテッポウユリにおいて、葯の表皮、内被、中間層で形成されたデンブンプがタペータム、小胞子の栄養源となることを報告している。TiwariとGunning<sup>(2)</sup>はアメーバ型タペータムをもつムラサキツユクサ (*Tradescantia virginiana*) の葯の発達過程において、四分子期のタペータムにはスポロポレニン前駆物質の輸送を示唆する小胞体が出現すること、花粉2細胞期には多数の“empty vesicle”が花粉粒に接して形成されること、葯の乾燥につれて花粉粒周辺に脂質が集塊をつくること、開葯時には tryphine (ポーレンキット) が花粉壁に付着することなど、タペータムから花粉粒への各種の物質供給を示唆する観察を行なっている。また、MephramとLane<sup>(3)</sup>は *T. bracteata* のタペータムで形成された多糖類の顆粒が、花粉粒周辺に分布することを電顕像により示している。その他、幾種かにおいて同様の観察がなされている。これらの事実から、タペータムには花粉母細胞や花粉粒に対し各種の物質を供給するための細胞内および細胞間輸送機構が存在することが予想される。タペータムに微小管が存在することが数種の植物で報告されている<sup>(4, 5)</sup>。PaciniとJuniper<sup>(6)</sup>はアメーバ型タペータムをもつ *Arum* (テンナンショウ属植物) において、タペータムの細胞内運動とその葯室内部への侵入の方向付けおよびタペータムの形状維持に微小管が関与すること、TiwariとGunning<sup>(7)</sup>はムラサキツユクサのタペータムをコルヒチン処理すると、スポロポレニン前駆体の分泌活性が阻害されることを報告している。また、*Arum italicum* のタペータムでは液胞が発達し原形質流動がおきることが予想され<sup>(8)</sup>、アクチンの関与が暗示されているが、タペータムの機能的特性と細胞骨格の関連についての解析はほとんどなされていない。一方、花粉細胞側において

は、四分子の分離以後小胞子分裂前にかけて、アクチンの mRNA が合成され<sup>(9)</sup>、小胞子分裂期から成熟期までの栄養細胞においてアクチン-ネットワークが発達すること<sup>(10)</sup>、花粉管の発芽、伸長にはアクチン-ミオシン系が重要な役割をはたすことが明らかにされ<sup>(10-13)</sup>、さらに花粉管内原形質流動における被運搬体の種類とミオシンのサブファミリーの種類との関連が詳細に報告されている<sup>(14)</sup>。

本研究では、花粉粒の発達に関連したタペータムにおける細胞内運動機構の解明を目的とし、ムラサキツユクサの発達中の葯を抗ミオシン蛍光抗体法、NBD-フェラシジン法等により観察した。その結果、タペータム、花粉母細胞、花粉粒およびその周辺組織において、表層が抗ミオシン蛍光抗体法によって標識される細胞内顆粒 (M 顆粒) が組織特異的に消長すること、それらの M 顆粒の多くはデンブンプまたはそれ以外の多糖類を含み、タペータムにおける M 顆粒は花粉粒への供給物質であること、さらにタペータム細胞質におけるそれらの輸送にはアクチン-ミオシン運動系が関与することが示唆された。

## 材料および方法

本研究にはムラサキツユクサ *Tradescantia virginiana* L. の葯を用い、各種の観察はテクノビット包埋法により得た厚さ 1.0 μm の切片によって行なった。

テクノビット包埋法：発達諸段階の葯を 50mM リン酸緩衝液により pH 6.8 に調整した 3.7% パラホルムアルデヒドで 4℃、1 晩固定する。固定した試料をアルコール・シリーズによって脱水後、100% アルコールとテクノビット 7100 予備浸漬液との置換を行なう (アルコールと予備浸漬液の 5:1, 3:1, 2:3, 1:5 の各混合液に 20 分間ずつ、100% 予備浸漬液に 2 時間浸ける)。予備浸漬液と硬化剤 II の 15:1 混合液に 4℃、1 晩つけて重合・硬化させる。室温に 1~2 時間放置後、テクノビット 3040 (液剤 1:粉末 3) を加え、4℃で 2 時間放置し、硬化させる<sup>(15)</sup>。

抗ミオシン間接蛍光抗体法：切片試料をカバーガラスに貼りつけて乾燥させた後、PBS (phosphate buffered saline, Sigma 社) で 50 倍希釈したウサギ抗ミオシン IgG (Paesel-Lorei 社) により室温で 1 時間一次抗体標識する。PBS で 30 分間洗浄後、PBS で 3 倍希釈したヤギ抗ウサギ IgG-FITC (Cappel 社) により室温で 1 時間二次抗体標識する。1 μg/ml 4'-6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI) の水溶液で 5 分間核染色し、PBS で 30 分間洗浄する。

ニトロベンゾキサジアゾール (NBD) - フェラシジンによるアクチン染色法：葯からタペータムを花粉粒とともにカバーガラス上に取り出し、3.7% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定後、約 1 時間自然乾燥する。PBS で 30 分間洗浄後、 $-20^{\circ}\text{C}$  のアセトンで 3 分間脱水し、PBS で 10 倍希釈した NBD - フェラシジンで室温、1 時間染色し、PBS で 10 分間洗浄する。

電顕法：グルタルアルデヒド - 四酸化オスミウム固定による常法。

抗ミオシン免疫電顕法：4% パラホルムアルデヒドと 0.1% グルタルアルデヒド混合液により室温で 2 時間固定し、ジメチルホルムアミド・シリーズにより脱水後、LR ホワイト樹脂により包埋する。切片を抗ミオシン抗体 (Sigma 社) により  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩、一次抗体標識し、ヤギ抗ウサギ IgG - 金コロイド (10nm, Amersham 社) により二次抗体標識する。

PAS 反応：0.5% 過ヨウ素酸水溶液で 7 分間処理後、シッフ試薬に 15 分間浸ける。

ヨウ素 - デンプン反応： $\text{I}_2$  - KI 水溶液 ( $\text{I}_2$ ; 1.27%, KI; 2.5%) で 3 分間染色する。

## 結 果

本種の減数分裂期の葯は外側より 1 層の表皮組織、1 層の内被、1 層の中間層、1 ~ 2 層のタペータム組織および花粉母細胞の層から成り立っている。花粉母細胞の間にはタペータム細胞が散在する (図 1 A 2 参照)。発達諸段階の葯を、抗ミオシン間接蛍光抗体法によって観察した。減数分裂細糸期の花粉母細胞の細胞質にはミオシン由来の蛍光を発する顆粒 (以後、M 顆粒と呼ぶ) が形成され、以後の全分裂期を通じてほぼ同量出現する。減数分裂期のタペータムには M 顆粒はほとんど観察されない (図 1 A 1)。花粉母細胞の M 顆粒は直径  $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$  と小型であるが、四分子期には直径  $1.0 \sim 2.0 \mu\text{m}$  の大きさにまで成長する (図 1 B)。一方、タペータムでは四分子期においても M 顆粒はほとんどみられないが、まれに少数出現することがある。四分子期以降、タペータム細胞は互いに融合し、アメーバ状を呈しながら四分子間に侵入し、それらを包み込むように発達する<sup>(2)</sup>。四分子が小孢子へと分離した後、各小孢子から M 顆粒が消失し、小孢子分裂期までの小孢子およびタペータムには M 顆粒はまったく存在しない (図 1 C)。しかし、

小孢子分裂期に入ると、タペータムのほぼ全域に大小の M 顆粒が出現し始める (図 1 D)。タペータムにおけるそれらの分布はほぼ均一であり、顕著な偏在性はみられない。分裂中の小孢子や若い花粉粒では依然、M 顆粒はほとんど観察されない。小孢子分裂後 2 ~ 3 日が経過した開花 2 日前の葯のタペータムでは、M 顆粒は大型化し、数も増加して花粉粒を取り囲むように発達する (図 1 E)。また、中間層と接する膜に沿っても多数の M 顆粒が分布する。M 顆粒の蛍光像は多くがリング状を呈し、抗ミオシン抗体が顆粒の表層部に結合していることを示している (図 2 A)。しかし、一部の顆粒ではリング状の蛍光のさらにその内側が円形に染色される特異な形態を示している (図 2 B)。図 2 C はこの時期のタペータムおよび花粉粒の電顕像である。電子密度が低い多数の顆粒が花粉粒外壁に沿って密集し、その一部が外壁の隙間に侵入している。また、図 2 D は抗ミオシン免疫電顕像であり、金コロイド粒子が電子密度の低い顆粒の表層付近に分布し、ミオシン様タンパク質の顆粒表層への局在性が示されている。一方、開花 2 日前の少数の花粉粒においても小型の M 顆粒が出現し始める。開花 1.5 日前になるとタペータムにおける M 顆粒からの蛍光の強さが低下し、M 顆粒が小型化してみえる (図 3 A 1)。同時期のタペータムを位相差顕微鏡により観察すると、花粉粒周辺には依然として多数の顆粒が分布するが、一部の顆粒は崩壊し細粒化し始めていることがわかる (図 3 A 2)。しかし、中間層に接する膜付近には依然として明瞭な M 顆粒が残っている。図 3 B はこの時期のタペータムの細胞質を示す電顕像である。細胞質には液胞が増加しポーレンキットが形成され始め、退化の進行を示唆している。この時期の花粉粒では M 顆粒は小型であるが数が増加する。開花 1 日前のタペータムでは、花粉粒に近接して分布していた顆粒はさらに細粒化し数も減少する。これらの細粒からはミオシン由来の蛍光はほとんど生じない。一方、花粉粒では M 顆粒はやや大型化し数もさらに増加する (図 3 C)。開花 0.5 日前には花粉粒の M 顆粒の量はほぼ最大に達する。花粉粒中の M 顆粒は栄養細胞の細胞質に局在し雄原細胞内には存在しない。タペータムではもはや細粒もほとんど消失している (図 3 D)。この時期の花粉粒では、外壁に透明な顆粒が付着することが位相差顕微鏡により観察されるが、これらは電顕観察によりポーレンキットであることが確かめられた (図 4 A)。ポーレンキットは抗ミオシン抗体によってはまったく標識されない。

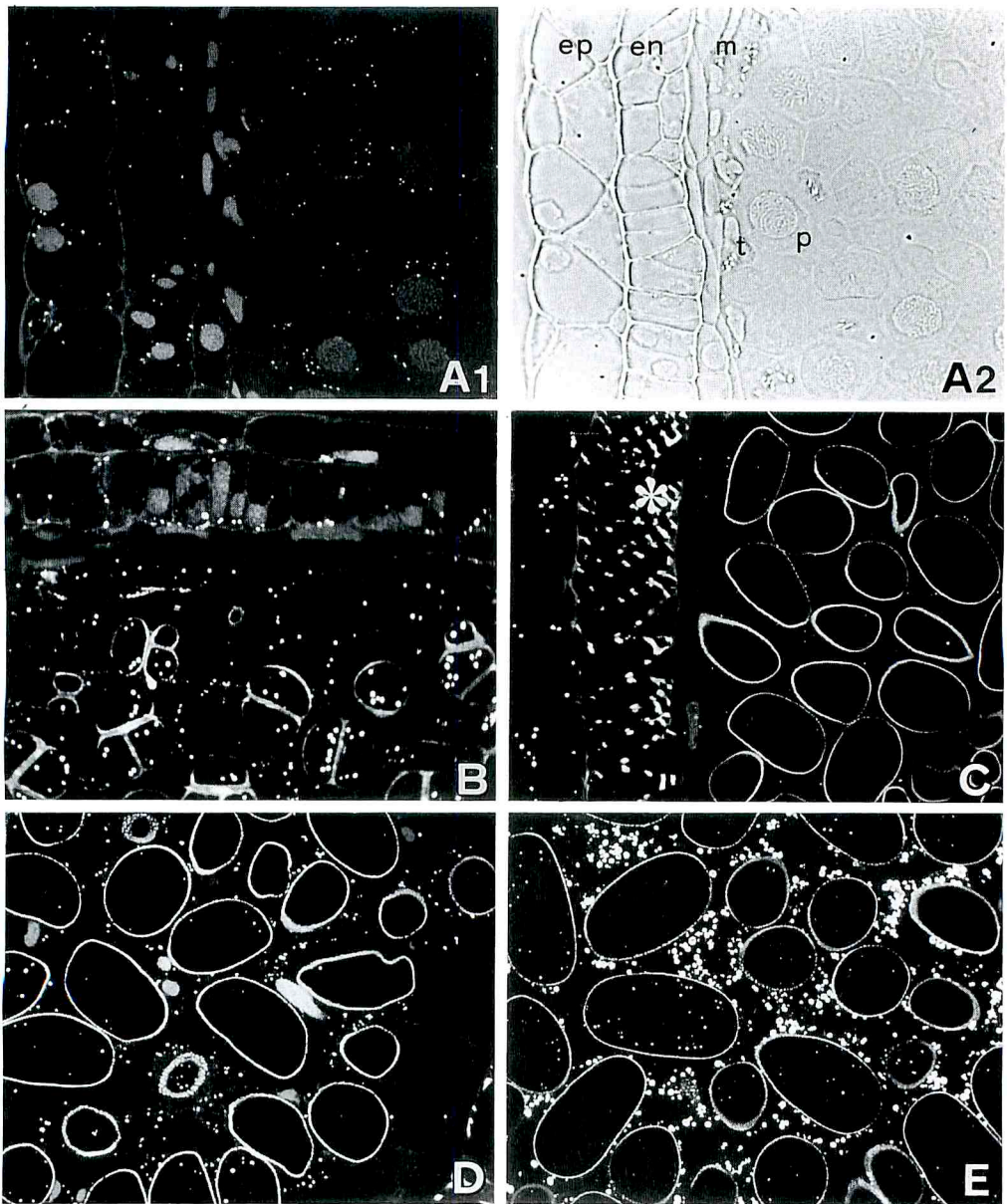


Fig. 1. M-granule distribution in anther during leptotene to 2 days before inflorescence. A1. Leptotene. There are small M-granules in the epidermis (ep), endothecium (en) and microsporocytes (p), but none are observed in the middle layer (m) and tapetum (t). A2. Phase contrast micrograph of same figure as A1. B. Tetrad where M-granules become large. C. Pre-microspore division. M-granules are absent both in the tapetum and microspores. The asterisk in the endothecium shows thickening cell walls stained non-specifically. D. Stage during microspore division. Here, small M-granules appear in the tapetum. E. 2 days before inflorescence. M-granules in the tapetum increase in size and number. Also, small M-granules re-appear in some pollen grains.  $\times 350$ .

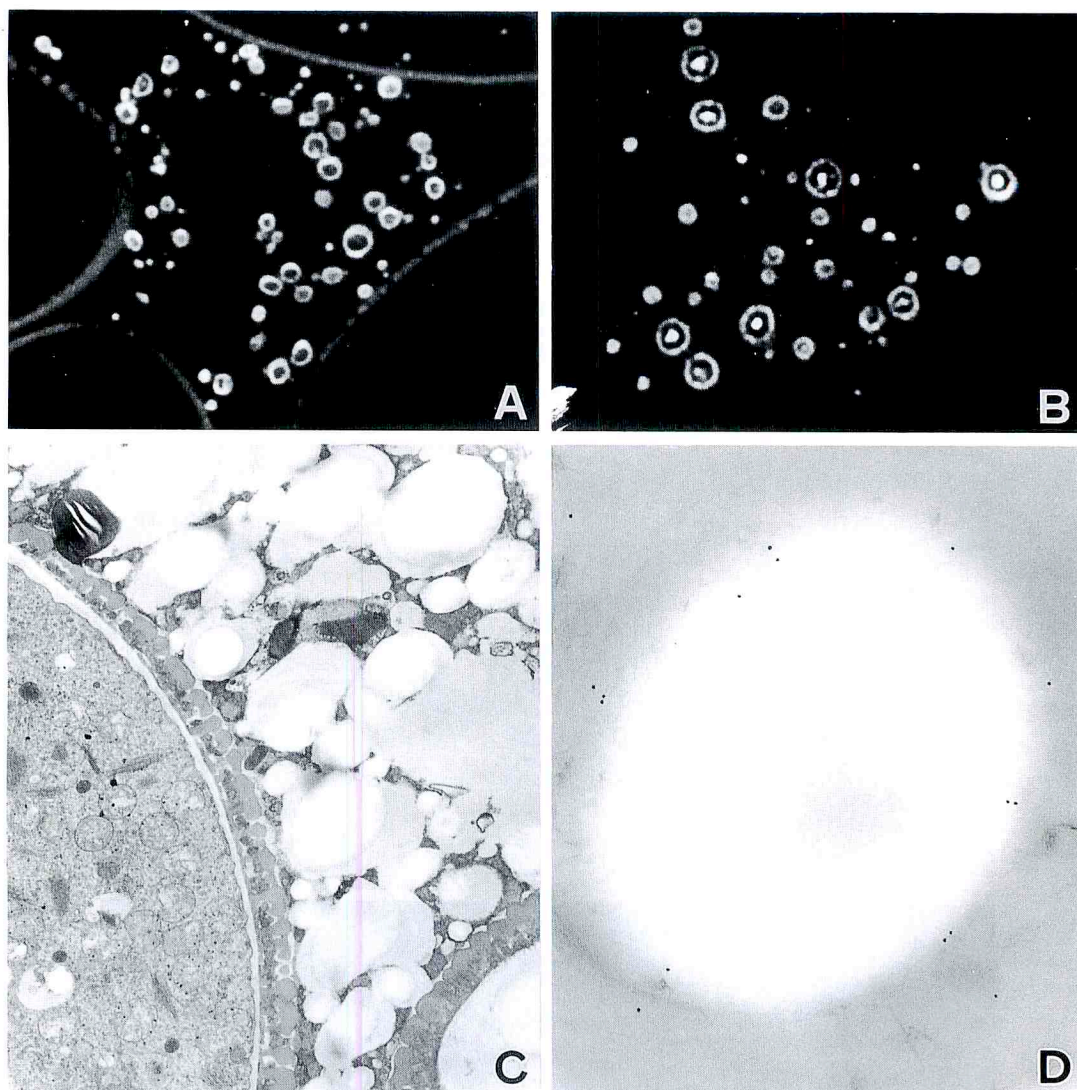


Fig. 2. M-granules. A and B. Surface (A) and inner region (B) stained with immunofluorescence. C. Electron micrograph of electron-lucent granules localized around pollen grain. D. Anti-myosin immuno-electron micrograph of granule. The surface is labeled with gold particles.

A, B:  $\times 1500$ . C:  $\times 9000$ . D:  $\times 43,400$ .

薬の表皮組織では、細糸期から開花1日前までの全過程を通じて少数の大型M顆粒が観察されるが、開花0.5日前には消失する。内被では細糸期から四分前期に少数出現するが、内被細胞の細胞壁にラセン状の肥厚構造が現われる小孢子期には消失し、それ以後は出現しない。中間層では全過程を通じてM顆粒はまったく観察されない(図1A-1C)。また、薬隔組織で

は全過程を通じて多数の大型のM顆粒が形成されるが、維管束部の細胞には全過程を通してまったく存在しない。なお、切片試料を抗ミオシンIgG(一次抗体)による処理をせずに抗IgG-FITC(二次抗体)のみで染色した場合、すべての時期のすべての組織において顆粒は蛍光標識されない(図4B)。

開花1.5日前の薬を用い、NBD-ファラジジン法

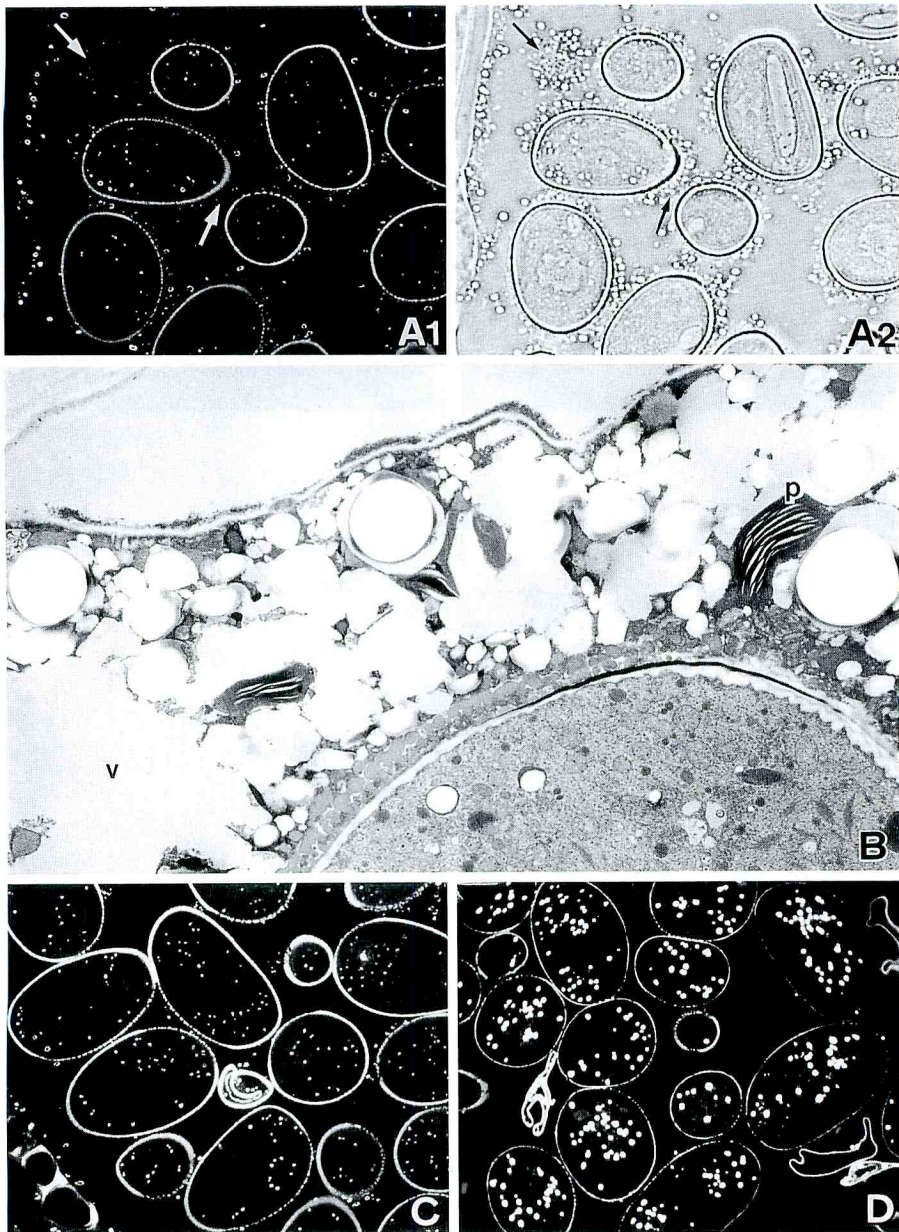


Fig. 3. M-granule distribution in anther during 1.5 to 0.5 days before inflorescence. A1. 1.5 days before inflorescence. A2. Phase contrast micrograph of same figure as A1. The granules surrounding the pollen grain begin to disintegrate and M-granule fluorescence in the tapetum weakens subsequently (arrows). B. Electron micrograph of tapetum cytoplasm 1.5 day before inflorescence. Vacuoles (v) and pollenkitts (p) form in tapetum. C and D. 1 day and 0.5 days before inflorescence. M-granules in the pollen grain become larger and increase in number, although in the tapetum they decrease extremely (C) and are not detectable (D). A, C, D :  $\times 350$ . B :  $\times 12,700$ .

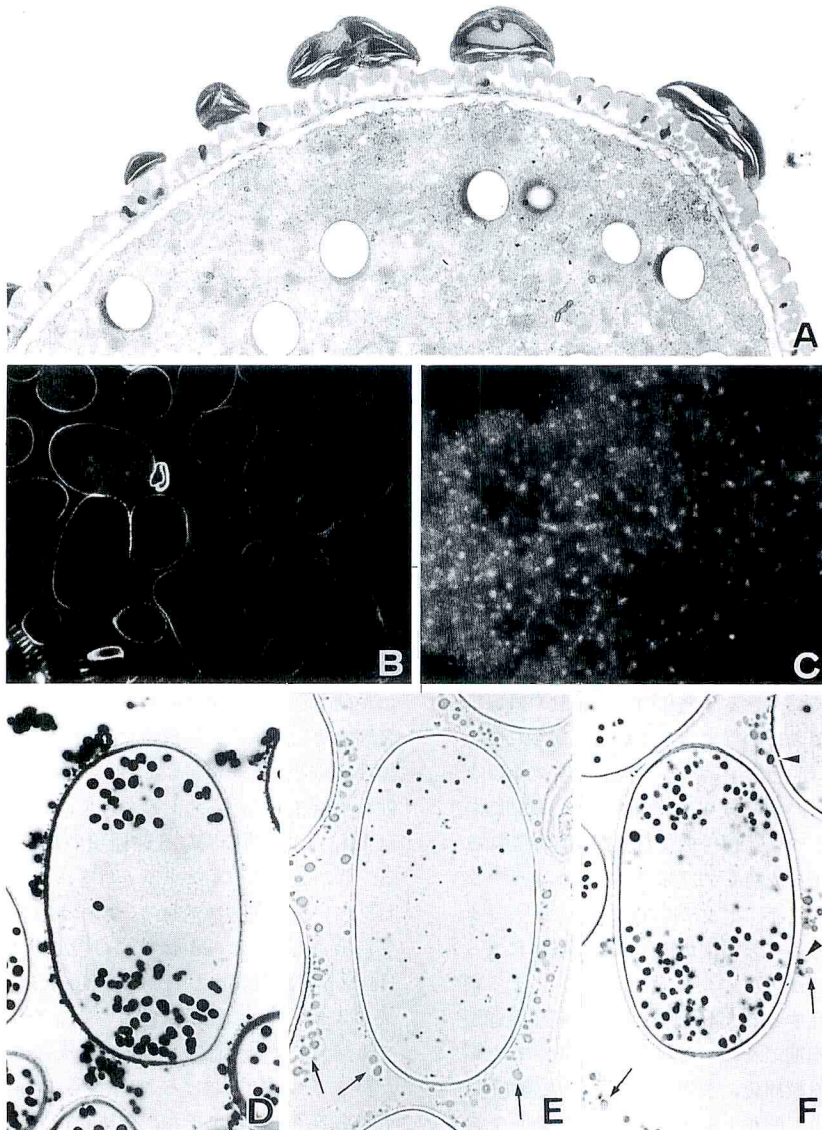


Fig. 4. A. Electron micrograph of pollen kits organized on pollen grain exine 0.5 days before inflorescence. B. Immunofluorescence figure of anther 2 days before inflorescence with staining of only second antibody fluorescein conjugated without anti-myosin IgG as first antibody. No M-granule is detected in the tapetum or pollen grains. C. Actin stained with NBD-phalloidin in tapetum cytoplasm 1.5 days before inflorescence. D. PAS reaction of anther 1 day before inflorescence. Granules in both the tapetum and pollen grains are stained positively. E and F. Iodo-starch reactions of anther 2 days (E) and 1 day (F) before inflorescence. The granules in the pollen grain are stained, but those in the tapetum are not stained (arrows). The dark appearance of some granules in the tapetum (arrowheads) results from light refraction. A :  $\times 10,000$ . B :  $\times 350$ . C :  $\times 1500$ . D, E, F :  $\times 1000$ .

によりタペータムにおけるアクチン染色を行なった。その結果、花粉粒を取り囲むタペータムの細胞質内にアクチン由来の蛍光像が多数観察された(図4C)。それらは粒状または短い針状を呈しており、アクチンのフィラメント状構造が断片化したものと思われる。

M 顆粒の化学的組成を調べるため、全過程の葯組織に対してPASおよびヨウ素-デンプン反応を行なった。その結果、タペータムを除く花粉粒およびその他のすべての組織に出現するほとんどの顆粒がPAS反応、ヨウ素-デンプン反応に対して陽性であり、それらの顆粒がデンプンを含むことを示す(図4D)。一方、タペータムの顆粒はPAS反応に対し陽性であるが、ヨウ素-デンプン反応には陰性であることから、この顆粒はデンプン以外の多糖類を含むことが明らかになった(図4E, F)。

## 考 察

多くの種子植物の花粉にはアクチン-ミオシンおよび微小管による細胞内運動系が発達し、特に前者は花粉管の発芽、伸長における活発な原形質流動や雄原細胞、花粉管核の運動に関与することが広く知られている<sup>(11, 14, 16, 17)</sup>。本研究に用いたムラサキツユクサのタペータムはアメーバ型であり、細胞壁を失った細胞が融合し、巨大化しつつ花粉母細胞や若い花粉粒を包み込みそれらの発達を支持している<sup>(2)</sup>。このタペータム組織においてもまた、アクチンが存在し、タペータム内に形成される多くの顆粒が抗ミオシン抗体によって標識されることから、アクチン-ミオシンによる細胞内運動系が存在することが示唆された。葯の発達過程で、花粉2細胞期のタペータム全域に形成された顆粒が、やがて花粉粒周辺に密集するのはこの運動系によると考えられる。開花1.5日前から0.5日前までのタペータムにおいてM 顆粒からの蛍光が失われ、同時に顆粒が崩壊し、やがて消失することから、アクチン-ミオシン系によって花粉粒周辺に運搬されたM 顆粒が分解し、それにともないミオシンが離脱または分解するものと考えられる。さらに、タペータムにおける顆粒の消失にともなって花粉粒内のM 顆粒が増加することから、タペータム内で分解した顆粒成分は花粉粒外壁または花粉粒内部に取り込まれ、花粉粒内部に取り込まれた物質は再びM 顆粒を形成し、花粉粒に発達したアクチンとともにアクチン-ミオシン系を形成すると推測される。なお、本研究ではタペータムの細胞質においてフィラメント状のアクチンは観察

されなかったが、これはアメーバ化し巨大化したタペータムを、完全な形の細胞としてスライドガラス上に取出し標本化することができなかったためにアクチンが断片化したか、またはタペータムの崩壊に先行してF-アクチンも早い時期に崩壊した可能性が考えられる。また、多くのM 顆粒では、その蛍光像より、ミオシン様タンパク質は顆粒表層部に結合することが明らかである。しかし、一部のM 顆粒では表層に加えて内部が染色される。この特異な染色パターンとM 顆粒構造との関連については現在まで明らかになっていない。

タペータムに出現するM 顆粒のうち、花粉粒周辺に密集するもの多くは、その電顕像よりTiwariとGunning<sup>(2)</sup>が観察した“empty vesicle”によく類似し、中間層に隣接して分布するM 顆粒はClémentら<sup>(1)</sup>がテッポウユリで報告した前ユーピッシュ体に類似している。さらに、これらのM 顆粒はPASおよびヨウ素-デンプン反応の結果からデンプン以外の多糖類であり、一方、花粉粒内のM 顆粒はデンプン粒であることが明らかとなった。PaciniとJuniper<sup>(6)</sup>は晩期小胞子の外壁周辺部と退化しつつある中間層に発達する三角状の突起構造“spines”がPAS反応に陽性であることを報告しており、本研究結果との類似性が示唆されている。したがって、葯全体に出現したM 顆粒には性質の異なる数種類の顆粒が含まれている。しかし、ポーレンキットはタペータムの崩壊、即ちタペータム内アクチン-ミオシン運動系の崩壊に伴って形成されるためM 顆粒には含まれない。また、Heslop-HarrisonとHeslop-Harrison<sup>(18)</sup>はオオズメノテッポウの花粉管において、アミロプラストがミオシンによって標識されることを報告している。したがって、本種におけるM 顆粒もまたアミロプラストである可能性があるが、本研究におけるM 顆粒の電顕像からは、アミロプラスト構造は観察されなかった。

これまで花粉を含めて植物ミオシンに関する多くの研究が報告されているが<sup>(11)</sup>、それらのほとんどが動物材料から得られた抗ミオシン抗体によって行なわれたものであり、これらの結果は植物と動物におけるミオシンの分子的類似性を暗示している。本研究もまた、一次抗体にはウサギ-抗ウシ-ミオシン抗体を使用している。一方、Yokotaら<sup>(19)</sup>はテッポウユリから得られた170kDaのミオシンは、動物材料から得られた抗ミオシン抗体によっては標識されないことを報告し、動物と植物におけるミオシンの非類似性を示唆



している。そのため、本研究においては動物材料にもとずく抗ミオシン蛍光抗体法によって標識された物質をミオシン様タンパク質と表している。このミオシン様タンパク質の特性を解明するため、目下生化学的解析に着手している。

## 要 約

ムラサキツユクサの発達中の葯組織において、表層が抗ミオシン蛍光抗体法によって標識される細胞内顆粒 (M 顆粒) が組織特異的に消長することが明らかになった。花粉母細胞では小型の M 顆粒が形成され、四分母期には大型の M 顆粒に発達する。減数分裂期中のタペータムでは M 顆粒はほとんど観察されない。四分母の分離後、M 顆粒は小孢子からも消失する。小孢子分裂期において、はじめてタペータムのほぼ全域に小型の M 顆粒が出現し、開花 2 日前までに大型化した多数の M 顆粒が花粉粒周辺に局在する。しかし、開花 1.5 日前以後、M 顆粒からの蛍光は弱まり、1 日前には消失する。それとともに顆粒は崩壊し、開花 0.5 日前にはほぼ消失する。一方、花粉粒では開花 2 日前に小型の M 顆粒が再び出現し、その後大きさと数を増し、0.5 日前には最大量に達する。NBD-ファラジジン法により開花 1.5 日前のタペータムの細胞質でアクチンが検出された。また、花粉粒中に出現する M 顆粒の多くはデンプンを含むが、タペータム中の M 顆粒はデンプン以外の多糖類を含むことが PAS 反応およびヨウ素-デンプン反応により明らかになった。

以上より、本種のタペータムにおいて形成される M 顆粒は、花粉粒に対する供給物質の一種であること、また、それらのタペータム内輸送にはアクチン-ミオシン運動系が関与する可能性が示唆された。

## 引 用 文 献

- (1) Clément, C., L. Chavant, M. Burrus and J. C. Audran : Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. *Sex. Plant Reprod.* 7, 347-356 (1994).
- (2) Tiwari, S. C. and B. E. S. Gunning : An ultrastructural, cytochemical and immunofluorescence study of postmeiotic development of plasmodial tapetum in *Tradescantia virginiana* L. and its relevance to the pathway of sporopollenin secretion. *Protoplasma* 133, 100-114 (1986).
- (3) Mepham, R. H. and G. R. Lane : Formation and development of the tapetal plasmodium in *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* 68, 175-192 (1969).
- (4) Steer, M. W. : Differentiation of the tapetum in *Avena*. The cell surface. *J. Cell Sci.* 25, 125-138 (1977).
- (5) Pacini, E. and B. E. Juniper : The ultrastructure of pollen-grain development in the olive (*Olea europaea*). 2. Secretion by the tapetal cells. *New Phytol.* 83, 165-174 (1979).
- (6) Pacini, E. and B. E. Juniper : The ultrastructure of the formation and development of the amoeboid tapetum in *Arum italicum* Miller. *Protoplasma* 117, 116-129 (1983).
- (7) Tiwari, S. C. and B. E. S. Gunning : Colchicine inhibits plasmodium formation and disrupts pathways of sporopollenin secretion in the anther tapetum of *Tradescantia virginiana* L. *Protoplasma* 133, 115-128 (1986).
- (8) Pacini, E. : Tapetum and microspore function. In S. Blackmore and R. B. Knox (eds.), *Microspores (evolution and ontogeny)*. Academic Press pp.213-237 (1990).
- (9) Stinson, J. R., A. J. Eisenberg, R. P. Willing, M. E. Pe, D. D. Hanson and J. P. Mascarenhas : Gene expressed in the male gametophyte of flowering plants and their isolation. *Plant Physiol.* 83, 442-447 (1987).
- (10) Terasaka, O. and T. Niitsu : Actin dynamics during pollen ontogeny of *Tradescantia paludosa*. *Jpn. J. Palynol.* 38, 37-49 (1992).
- (11) 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).
- (12) Mascarenhas, J. P. and J. Lafountain :

- Protoplasmic streaming, cytochalasin B, and growth of the pollen tube. *Tissue Cell* 4, 11-14 (1972).
- (13) Perdue, T. D. and M. V. Parthasarathy : In situ localization of F-actin in pollen tubes. *Eur. J. Cell Biol.* 39, 13-20 (1985).
- (14) Miller, D. D., S. P. Scordilis and P. K. Hepler : Identification and localization of three classes of myosins in pollen tubes of *Lilium longiflorum* and *Nicotiana glauca*. *J. Cell Sci.* 108, 2549-2563 (1995).
- (15) 黒岩晴子 : 植物の胚発生研究へのテクノビット包埋技術の応用. *Plant Morphology* 3, 43-47 (1991).
- (16) 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).
- (17) Tirlapur, U. K., C. Faleri and M. Cresti : Immunoelectron microscopy of myosin associated with the generative cells in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. Sex. *Plant Reprod.* 9, 233-237 (1996).
- (18) 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).
- (19) Yokota, E., A. R. McDonald, B. Liu, T. Shimmen and B. A. Palevitz : Localization of a 170 kDa myosin heavy chain in plant cells. *Protoplasma* 185, 178-187 (1995).
-