

花粉外膜と孢子壁の形態形成の機構解明に関する研究

Pattern formation and substructure of sporoderms

代表研究者 香川大学教育学部生物学教室助教授 高橋正道
Assoc. Prof., Dept. of Biol., Faculty of Education, Kagawa Univ.
Masamichi TAKAHASHI

協同研究者 千葉大学教養部生物学教室助手 上原浩一
Res. Assoc., Dept. of Biol., Coll. of Liberal Arts and Science, Chiba Univ.
Kouichi UEHARA

The sporoderm development was studied using high resolution scanning electron microscopy, with attention to the initial developmental process and its substructural constitution. A new model of sporoderm pattern determination by invaginated plasma membrane is reinforced in the present study. Microspore plasma membrane invaginates and takes a form of the reticulate pattern within the callosic tetrad envelope. The initial pattern of plasma membrane corresponds to the mature sporoderm ornamentation. Fibrous threads are initiated on the protuberant sites on the plasma membrane and successively accumulated and tangled with each other. The threads are associated with 10–20 nm globular materials that gradually increase in size and number. The present study suggests that the sporoderm consists of the association of fibrous threads and globular materials. The fibrous threads would function as receptor and/or skeleton of developing sporoderm.

研究目的

種子植物やシダ植物の花粉粒および孢子は、多様な表面模様や発芽装置などの複合的な形質の集合体であり、しかも各分類群を特徴づける安定した独自性を示すことで知られている。花粉には、網目模様、穿孔紋、線条紋、突起状紋などの、それぞれの植物分類群を特徴づける多様な表面模様と発芽口の数と構造で類型化される種々のタイプがある。さらに、花粉には、減数分裂後の4分子期に決まる極性がある。4分子とは、4個の小孢子がカロース層によって包まれている状態であり、花粉外膜のパターン決定の重要な時期でもある。4分子の配列には、正四面体、十字形、正方形、線形などのタイプが存在している。これらの4分子の中心点から各小孢子の中心を結ぶ放射線を極軸と呼ぶ。4分子の中心点に近い面を向心極と言い、その反対側の面を遠心極と呼んでいる。花粉の発芽口は、4分子期の段階で規則的な位置

に形成される。例えば、裸子植物や単子葉植物およびモクレン科などの一部の双子葉植物にみられる単溝型花粉では、花粉外膜が未発達な広い発芽溝が遠心極面にできる。一方、多くの双子葉植物でみられる三溝型花粉では、花粉粒の極軸と平行して、等間隔に3個の発芽口が形成される。このように、発芽溝が形成される位置が異なるので、遠心極面にできる発芽溝をサルクスと呼び、赤道面に位置しているものをコルプスとして区別する場合もある。減数分裂後の4分子の段階で、花粉粒の規則的な極性が決まることになる。

さらに、花粉粒はその集合状態と発芽口の数、構造の違いによって、類型化される。一般には、個々の花粉粒が分離している単粒型が多いが、ツツジ科植物に広くみられる四集粒、アカシアの仲間にも多い多集粒や、ガガイモ科植物やラン科植物の花粉塊などもある。また、発芽口は、溝、孔、溝孔などに類型化される。花粉の形と発芽口の形

状、数、位置によって花粉型が決まる。代表的なものをあげれば、無口粒、単溝粒、単孔粒、三溝粒、三孔粒、三溝孔粒、多孔粒、散溝粒などがある。これらの多様な花粉にみられる微細形態は、光学顕微鏡が作られた17世紀以来、植物群の類縁・進化・系統関係を明らかにする重要な手がかりとして注目されてきた。これらの特徴を示す花粉外膜は、スプロポリネンと呼ばれる化学的に安定な物質からできている。そのために過去に生育していた植物の多くの花粉が化石として残っている。

これまでの花粉外膜のパターンの形成過程に関する研究は、イギリスのヘスロップ・ハリソンらを中心に透過型電子顕微鏡を用いて行われてきた。その結果、花粉外膜の形成は、減数分裂後の4分子期の段階で、カロス層に包まれた小孢子細胞の周囲で開始することが明らかにされている。ヘスロップ・ハリソン博士は、1969年に、小孢子の周囲に繊維状のプライムエキシン (Prime-xine) が形成され、これが鋳型的に機能し、そこに形成されるプロバキュウラ (Probacula) の分布状態によって花粉外膜の基本パターンが決定される、と言うプライムエキシン説を提唱してきた。このモデルに従って、プロバキュウラの形成される位置を細胞内部から規定していると想定される細胞内小器官について、これまでいくつかの提案がなされてきたが、その後の研究によって、いずれも確証が得られていない。このプライムエキシンの概念は、その後の花粉外膜形成の研究に大きな影響を与えてきた。一方において、スエーデンのストックホルム大学のローレー博士は、1975年に、プライムエキシンの問題点をすでに指摘していたが、一般には相変わらずプライムエキシンの用語が使用されてきており、混乱が続いている。用語上だけの混乱ならば問題はそれほど深刻でないが、この「プライムエキシン」の用語は花粉の外膜パターン形成機構の解明を妨げている。一方、シダ植物においては、分類群の違いによって異なる形成過程をたどることが報告されている。

私どもは、被子植物とシダ植物に含まれるいくつかの分類群について、それぞれの独立した研究

として、これまでに花粉外膜および孢子壁のパターン形成過程を詳しく追跡することを試みているなかで、プライムエキシンの実体が不明瞭なことや、プロバキュウラ的位置がパターン決定に関与していることが確認できないことから、プライムエキシン説に疑問を持つようになった。これまでの研究の中から、被子植物に見られる多様な花粉外膜の構造パターン形成には、細胞膜による普遍的な初期パターン決定と、その後の発育段階でいくつかの異なる独自の機構が関わっていると言う新たな可能性を提示してきた。また、シダ植物のヒカゲノカズラ植物の孢子壁のパターン形成の研究にとり組んできた。これまで独自の研究として発展させてきた到達点を踏まえ、新たな研究プロジェクトとして、4分子期の細胞表層および初期外膜のサブストラクチャーに焦点をあてて、初期パターン決定に関与している細胞膜の局的分化の普遍性および機構を明らかにし、さらに種子植物およびシダ植物における分類群によって独自性がみられる小孢子期におけるパターン形成機構の解明をめざした。

これらの研究は、多様な花粉外膜および孢子壁のパターン決定過程を追跡することにより、微細なレベルでの多様性の普遍的な発現機構の解明をめざすと言う新しい着想に基づいている。花粉外膜と孢子壁の多様な表面模様様のパターンは細胞の表層系にできる特異的分化として位置づけており、しかも、分類群を特徴づける花粉および孢子のパターン決定機構にみられる独自性に注目していることに、この研究の特徴がある。

研究経過

研究材料として、野外で自生している種子植物の中から、花粉外膜がそれぞれ独自の構造と表面模様をもっているジャケツイバラ属植物、ブーゲンビリア属植物、アイポモプシス属植物、シキミ属植物、コウホネ属植物を用いた。また、シダ植物の代表的な分類群であるトクサ属植物、ミズニラ属植物、ヒカゲノカズラ属植物やハナヤスリ科植物を用いた。一般に、種子植物は1年間に一度だけ、それぞれの植物で特定の時期に減数分裂および花粉形成を行う。このため、野外での予備調

査を重ねながら、減数分裂の時期を明らかにしていった。特定されたそれぞれの植物の減数分裂の時期を逃さないようにサンプルの採集につとめた。なかには、手に入りにくい種類や、減数分裂の時期を特定できなかったものもあったが、当初の目的のほとんどの材料は研究に有効な時期のものが得られた。

ブーゲンビリア属植物の花粉粒は網目模様をもつ三溝孔粒型であり、外膜に明確な柱状体構造があるという特徴があり、アイボモプシス属植物の花粉は、特異的な線条紋の表面模様をもっており、コウホネ属植物の花粉の表面には多くの針状突起がある。また、トクサ属植物の胞子は、特異的な弾糸をもっており、ミズニラ属植物、ヒカゲノカズラ属植物およびハナヤスリ科植物の胞子はそれぞれ独特の表面パターンを有している。これらの植物について小孢子母細胞の減数分裂期から成熟花粉および胞子に至る形成過程に見られる小孢子および発達しつつある花粉の表層構造系の変化を超高分解能走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡を用いて微細構造のレベルで追跡した。特に、エタノール凍結切断法を積極的に適用することに成功し、超高分解能走査型電子顕微鏡によって、初期パターン形成時の3次元的なレベルでの超ミクロ構造の解析に成功した。具体的には、小孢子母細胞から成熟花粉および胞子にいたる雄蕊あるいは小孢子嚢を急速凍結固定および化学固定した。脱水処理後、凍結切断面を作製し、超高分解能走査型電子顕微鏡にて、連続的な発育段階に従って花粉外膜のパターンが決定されていく過程を3次元的に解析した。一方、サンプルを通常の方法で樹脂に包埋し、ウルトラミクロトームで超薄切片を作製した。電子染色後、透過型電子顕微鏡にて観察した。さらに、蛍光抗体法を用いて初期パターン形成に関与していると推定される微小管およびフィラメントの分布パターンを明らかにしようと試みた。これには、4分子期に厚く包んでいるカロース壁によって、蛍光物質が注入できないというやっかいな問題で悩まされた。さらに光学顕微鏡の分解能の限度をはるかに越えているミクロなレベルでの現象なので、現在のところ、

蛍光抗体法による染色した後に細胞骨格の分布状態の変化の構造解明をすることでパターン形成に関連している証拠となる良い結果が得られていない。さらに初期パターン形成期における細胞膜の局在的分化の実体を明らかにするために4分子期の細胞を無固定急速凍結し、フリーズ・フラクチャーおよびフリーズ・エッチングをしてレプリカ膜を作製することを試みた。これによって、パターン化している細胞膜の内部構造を明らかにすることができた。さらに、細胞表層のデープ・エッチングを行うことで、パターン決定に関与していると推定される細胞膜とそれを裏打ちしている細胞骨格との関連を探った。さらに、この手法によって、形成初期のプロテクツムとプロバキュラの内部超微細構造を解明をめざし、小孢子期における多様な花粉外膜の形成過程を微細構造的に明らかにすることを期待した。この手法による研究は現在も続けられている。以上の結果から得られた資料に基づいて、総合的に解析することによって、種子植物の花粉およびシダ植物の多様な表面模様のパターン決定機構における普遍性と分類群による独自性を解明しようとした。まだ、未解明の部分や現在継続中の分野も残っているが、超高分解能走査型電子顕微鏡の威力によって下記のような成果をおさめることができた。

研究成果

一般に被子植物の花粉外膜は、外層と内層からできている。さらに、外層は上部表層突起、外表層、柱状体と脚層に分けられる。内層は、外層と電子密度の相違から区別できる層であり、発芽口の周囲で厚くなっている場合が多い。花粉外膜に相当するものとして、裸子植物の花粉やシダ類の胞子だけでなく、ソウ類や粘菌までがスポロポリネン様の細胞壁をつくることが知られている。これらの胞子壁などが、被子植物の花粉に見られる層構造と相同なものか否かは現在のところ未だ解明されていない。ジャケツイバラはマメ科植物の一種であり、4~6月に黄色い花を咲かせる。この植物の花粉は、網目模様であり、被子植物の広くみられる明瞭な柱状体をもっている。この基本的な花粉外膜構造をもっているジャケツイバラの花

粉外膜のパターン形成の研究を行った。その結果、花粉外膜の初期パターンが波状化した原形質膜によって決定されることが明らかになった。この段階は、繊維状の「プライムエキシン」が確認される段階よりもかなり以前の状態である。原形質膜が波状化することによって外表層に相当するパターンをつくりあげていたのである。原形質膜が内部の小胞と癒合して陥入するのか？あるいは、微小管や微小繊維が関与している可能性も考えられる。さらに、日立の電解放射型超高分解能走査型電子顕微鏡 S-900 によって、パターン化した原形質膜の表面に原外層に相当する 5-10 ナノメートルの繊維状のサブストラクチャー構造物が現れてしだいに絡み合うようにして原外層が形成されることが明らかになった。従来の超薄切片法での透過型電子顕微鏡による観察だけでは解明することができなかった、3次元的な構造変化の状態が明らかにされたのである。原外層に続いて原柱状体が内側につくられ、それに伴って波状していた原形質膜が平滑に変化する。

ブーゲンビリアの網目模様である花粉外膜も同様なパターン形成過程をたどることが解明された。以上のことから、花粉外膜の基本的な表面模様を構成している外層のパターンは原形質膜によって決定されることの普遍性が示唆された。

以上のように基本的な外表層のパターンは 4 分子初期に原形質膜によって決められる。ところが、上部表層突起は全く別の段階で形成されることがアイボモプシス属植物とアオイ科植物を用いた研究で明らかになった。従来は、上部表層突起は、単なる外表層の変化したものとしか考えられていなかった。アオイ科植物は、多くの針状突起が散在している大型花粉をつくることで知られている。この科の花粉外膜のパターン形成過程を追跡したところ、4 分子期に微細な網目模様である外表層の基本パターンが形成されるが、針状突起は 4 分子のカロース層が崩壊した後の小胞子期に入ってから形成されることが明らかにされた。しかも形成期の針状突起は、周囲に同心円状のラメラ構造に囲まれていると言う特徴を示した。つまり、針状突起は外部から付加的に形成されてい

ることになる。上部表層突起と外表層では、パターン形成の時期も形成機構も異なっている。

アイボモプシス属植物の花粉の表面模様は、線条紋である。4 分子期にできる原外表層のパターンは小孔紋であるが、4 分子解離後の小胞子期に原外層の外側が局部的に肥厚して線条紋である花粉外膜ができあがるということが明らかにされてきた。つまり、形態的には異なっているが、線条紋を構成している部分は形成過程の上からは上部表層突起と相同である。上部表層突起は花粉形質の中では変化しやすいところでもある。

コウホネの花粉は、大型の針状突起をもつ単溝型花粉である。この種の花粉外膜のパターン形成過程を追跡した結果、この針状突起は、上部表層突起と形成時期が異なっており、針状突起は 4 分子初期にカロースの中に伸長していくように形成されることが明らかになった。外観的には類似している針状突起にも上部表層突起と相同でないものがあることを示唆している。

シダ植物については、トクサ属植物に特異的な弾糸の形成に微小管が関与していることを示唆する結果が得られている。また、ヒカゲノカズラ属では、初期パターンが原形質膜によって規定されることが明らかになった。その他の植物については現在のところ得られたデータを解析しつつある。

以上の成果をまとめると、花粉外膜の初期パターンは原形質膜によって形成されることを普遍化できることが確認された。しかも、その後の小胞子期における付加的な形成過程によって、マイクロなレベルでの多様性の発現が認められることも明らかになった。花粉外膜が繊維状と顆粒状のサブストラクチャーからできているという新見解は各方面から注目されている。

今後の課題と発展

植物が陸上で生育するのに、通導組織や細胞壁の発達などの工夫がされている。花粉は配偶子を運ぶマイクロな器官である。空中という植物にとって危険な環境の中で、乾燥と紫外線から大切な配偶子を守るために、花粉粒は、その周囲にスポロポレニン (Sporopollenin) と呼ばれる特異な物質

から成る花粉外膜とセルロースからできている内膜に包まれている。だが、この物質の化学構造について未だ明らかにされていない。私どもは、現在この高分子の化学構造の解明に関する研究に取り組んでいるが、酸にもアルカリにも強い極めて安定したこの物質の化学的解明は、新素材の研究に影響を与える可能性が強い。

花粉の基礎研究は、化石花粉のデータから過去の植生が明らかにされたり、人類の民俗学的な研究に貢献することが期待されている。さらに、現生植物の微細な花粉形質の多様性を解明することは、植物の類縁・系統関係を明らかにする有力な新情報を提供することになるであろう。花粉形質の変異から種分化の過程や倍数性の出現を予想することもできる。また、花粉形態が受粉機構といかに関連づけられるのかも、興味深い問題である。特に、二型花と花粉の形態変異など繁殖様式の問題とも関係していて、今後の展開におおいに期待できる分野である。近年、1億年以上も昔に生育していた原始的被子植物のものと推定される植物の花粉化石が見つかった。しかもその植物の果実化石も発見されている。まさに植物の進

化というドラマがマイクロな花粉によって解きあかされつつある。

花粉のパターン形成機構というナノメーターの世界でマイクロな現象を解明することは、生物界に共通する発分化の機構を解明するという本質的な問題を含んでいる。これらのマイクロな現象の解明により、人間の英知がマイクロの世界に広がることを意味しており、マイクロのレベルでの機械の開発にも役立つであろう。21世紀はまさにこれらの可能性が現実のものとなっていく時代として位置づけられるだろう。ただし、それには、日々の目立たない地道な基礎研究の積み重ねがどうしても必要である。

最後になりますが、これらの研究に絶大な御支援をいただいた日産科学振興財団の皆様から感謝の意を表します。

発表論文リスト

- Takahashi, M. (1992): Development of spinous exine in *Nuphar japonicum* DC. (Nymphaeaceae). *Rev. Paleobot. Palynol.*, 75: 317-322.
- Takahashi, M. (1993): Exine initiation and substructure in *Caesalpinia japonica* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Am. J. Bot.*, 80: 192-197.