クロマツの受精及び前胚の細胞化学的研究

島 村 環*

Tamaki SHIMAMURA*: Cytochemical Studies on the Fertilization
and Proembryo of *Pinus Thunbergii*

1956 年 6 月 30 日受付

裸子植物の卵核及び前胚の核は形が大きいのみならず特殊の構造であり、受精前後の染色質の出現消長は特異なもので従来注目されている。筆者は 1935 年にイチョウ、ソテツの受精前後の核のフォイルゲン反応を研究して発表した。其後核酸の研究、細胞化学の発達に伴ない再検討の必要を生じた。材料の関係から先づクロマツについてイチョウ、ソテツの場合と比較して核内容の変化を細胞化学的に調べその結果をここに報告する。この研究の発表に際して、名古屋大学理学部生物学教室の太田敏久、高尾昭夫両氏の協力によること、又写真は両氏の撮影によることを記し、ここに両氏に感謝の意を表す。

材料及び研究方法

クロマツ *Pinus Thunbergii* は名古屋大学理学部構内の丘陵に自生せるものの前年受粉した穂果を 1953-1955 年に亘り 6 月中旬から下旬に採集した。材料は胚珠だけをとり出して直ちに固定した。固定液はカルノア液、ブアン液、テリエスニクツキ液、昇汞アルコール混液 (50%エタノール 100 c. c. 氷醋酸 10 c. c. 昇汞 8 gr) を用いた。

材料は固定後、水洗、脱水、パラフィン封入し、ミクロトーム切片にした。切片は 10~15 μ 。染色はフォイルゲン染色、パイロニン・メチールグリーン染色及びトルイディンブルー染色を行った。

フォイルゲン反応の加水分解時間は 5~15 分。シッフの試薬には 10~30 時間入れたが共に時間の長短による発色の影響は認められなかった。パイロニン・メチールグリーンは市販のものを柴谷 (1952) の方法により精製調合したものをを用いた。

トルイディンブルーは約 1% 溶液を使用した。更に酵素リボヌクレアーゼによる消化実験を併用して染色した。

観 察

中心細胞： 卵核と腹溝細胞核とを分裂によって生ずる成熟した中心細胞核の核糸 (レティキュラム) はフォイルゲン反応正である (第 1 図)。分裂前期に染色体が核内で著しくよく染色するが、染色体以外の核物質は反応負である。中期の染色体はフォイルゲン染色で鮮かに染まる。核内に紡錘体が見られ分裂像以外の核内容は細胞質に消えて行く (第 2 図)。

腹溝細胞、卵細胞： 腹溝細胞核と卵核とは最初形小さく核物質はフォイルゲン反応正である (第 3 図)。卵核は次第に大きさを増して卵細胞の中心へ向つて降下する。この際フォイルゲン反応は次第に弱くなる。核が形大となるに伴ない、染色体以外の物質が増加するためフォイルゲン反応は負となる。十分に成熟した受精直前の卵核はフォイルゲン反応は完全に負である。又トルイディンブルー染色では周囲の細胞質及び蛋白質胞 (ホーフマイスター体) は染色するが、核内容は染色しない。パイロニン・メチールグリーン染色でも卵核はメチールグリーンで緑色には染らなくて淡赤色である。これに対し頸細胞核と胚乳 (雌性配偶体) の核は明瞭にフォイルゲン反応正である (第 2 図)。腹溝細胞核は細胞質と共に次第に退化して第 4 図に示す如く痕跡を留める様になる。

受精： 受精は癒合核の時期のみを観察したのであるが、雌雄両核共に核内容はフォイルゲン反

* 名古屋大学理学部生物学教室 Biological Institute, Faculty of Science, Nagoya University Nagoya, Japan.

反応である。たゞ両核の接触した境はしばしば反応正である如く染色した(第6図)。両核が癒合して境が見られなくなった時期のあるものは第5a, 5b図に見られる如く雄核の部分にも雌核の部分にも明瞭に染色された紐状の染色糸が見られる。即ちフォイルゲン反応正である。この期に至って突如として染色性の紐状体が出現するのは驚くべきことである。しかし大部分の残りの核内容は負である。受精後の第一回核分裂の前期, 中期(第7図, 第8図)を見るに染色体は判然と個性を示して来る。前期は長くねじれた細い紐状で明かにフォイルゲン反応正である。雌雄両方の染色体が区別出来るゴノメリなる現象は見られない。染色体以外の他の核内容は全部反応負で細胞質と区別することは困難である。但し位相差顕微鏡を用いるとこれを区別することが出来た。中期では分裂像は大きいが癒合核の大きさに比べると全く一小部に過ぎない。そこで癒合核内物質の大部分は細胞質に消えて行く。

前胚: 第一分裂の結果生じた娘核は小さいが次第に大きさを増し第二回分裂を行なって(第9図)遊離の四核を生ずる。この四核も生長するに従い核内容はフォイルゲン反応負の物質で充される。この遊離核は四つ共に形大きくなり次第に卵細胞の底部へ降下する。底部に到着して分裂前期に入れば、核内にフォイルゲン反応正なる細い糸状の染色体がフォイルゲン反応負なる核物質で充されて居る核内に散在する様に出現する(第10図)。この状態はイチョウの場合に一局部に塊状となつて染色体が出現するのと異なる。この散布した染色体は紡錘体が形成せられるに従つて核板に排列する様になる(第11図)。紡錘体は核内に由来するもので核内物質の大部分は細胞質に消えて行く(第12図)。娘核は最初形小さく次第に大きくなる(第13図)。四遊離核が底部に達する頃、核の周囲にヘマトキシリン、パイロニン等の色素で濃く染色する顆粒が見られる。このものゝ出現はマツの前胚に見られる一特徴である(第12, 14図)。この顆粒の化学的性質は次の如くして決定した。フォイルゲン反応負である(第10, 11, 13図)、パイロニン・メチルグリン染色で赤、トルイディンブルーで紫藍色(第12, 14図)、ミロン反応で橙赤色、酵素リボヌクレアーゼで消化すると、ミロン反応を除き上記色素で染色しなくなる。以上

の結果からベントース核酸と結合している蛋白質(ヌクレオプロテイン)であると考ええる。この顆粒は第三回核分裂の際に核の周囲に明瞭に存在して居るが(第12図)、前胚が四細胞層になる際には最先端の胚細胞層にのみ著しく見られる(第15図)。フォイルゲン染色は、上記の前胚四細胞層の先端胚細胞層の核は形小さく鮮かに染色して反応正なることを示すが、上部へ向つて各層の核は形大きく次第に染色弱く殆んど反応負と見られる。第16図にては胚細胞の核がフォイルゲン反応正に対して懸垂糸層の核は反応が弱いことが示されて居る。

以上前胚の各期にてフォイルゲン反応正なることはデスオキシリボ核酸の還元性にて染色することを示し、DNAの所在を示す。パイロニン・メチルグリンの染色ではDNAは緑色、PNAは赤色に染色する。染色体は緑色で紡錘体は赤色であった。

考 察

筆者は1935年にソテツ、イチョウの卵核及び雄核に於いてチモ核酸をフォイルゲン反応で検出出来ないことを報告した。今回クロマツの卵核、雄核に於いても同様デソキシリボ核酸をフォイルゲン染色又はパイロニン・メチルグリン染色方法では検出されぬ結果を得た。この事実は如何に解釈するか。

Schnarf (1941) は次の如く見ている。

核の著しい増大にかゝらず染色質の量の増加はこれに伴わない。又染色される物質の構造が若しかすると非常に繊細になってその染色の部分吾等が見られない程になると云う。筆者の観察の範囲ではフォイルゲン反応負と云うことは顕微鏡下で、ある特定の形態を有するよく染色されるものが見られないことを意味する。デスオキシリボ核酸(DNA)があつても顕微鏡下で観察出来ない程度に分散して居る場合、容積の増大した卵核について定量的にDNAを分析しない限りDNAの存否を如何ともいえない。切片の材料の面積に対して微量に分散されて居るとすればフォイルゲン反応は検出手段としては不適當でありDNAなしと断言出来ない。

受精卵の癒合核に出現する染色性の紐状体及び核分裂前期、中期の染色体は如何に巨大な核で

あっても必ずフォイルゲン反応正として見られるから、ある一定量の DNA が集まれば顕微鏡下に観察できるのである。

最近同位元素を用いる実験によれば核内物質は絶えず新陳代謝して入替って居ることが証明されて居る。この DNA の糖が一時可逆的化学変化して居りデスオキシリボースの特性である還元作用が失われる時期があるとも考えられるし、また必ずしも終始一貫して同じ糖の存在を必要としないとも考えられる。しかしこの推論は何等実験的根拠のあるものでなく顕微化学的観察の範囲外である。

次に癒合核から前胚の各期の核内に於ける DNA の量的変化である。この現象は顕微鏡下の観察からも強調し得られるものである。受精後の第一回核分裂の分裂像及び染色体の大きさ、長さは続く第二回、第三回の分裂像及び染色体に比して大きく分裂毎に染色体の形、大きさ、長さは減少して居る。イチョウの前胚に於てこの現象の見られることを筆者は報告して居る。生物の体細胞核の DNA の量は一定であるといわれて居るが、前胚の核の如く巨大な核が次第にその容積を分裂毎に減じて行く場合 DNA の量のみが変化なく一定であるとは考えられない。事実染色体の大きさは分裂毎に小さ

くなって居り DNA の量も一定でなく次第に減ずることは当然と思われる。

前胚核の大きさの減少に関係して、染色体以外の核物質についての変化がある。今仮に分裂像（紡錘体と染色体を含む）に関係する核内物質と其他の残余の部分形成する核内物質と二つに分けて考えてみると、今前者を *idiochromatin* と呼び後者を *trophochromatin* と呼べば核の大きさ大なる時には *trophochromatin* は相当量あり、核が小さくなればその量を著しく減ずる。その割に分裂像は小さくならぬ。換言すれば前胚核の容積の減少は主として *trophochromatin* の量の減少で *idiochromatin* も量を減ずるが比較的減少の割合は前者に比して著しくない。かく二様な *chromatin* を考える *dualism* 的な考えは当を得ないかも知れないが、一つの仮定を提出して見た。四つの遊離核が底部へ降下した頃から核の周囲に多く出現する PNA の豊富な顆粒はペントース核蛋白であると考えられる。このものは将来新しい細胞群が形成される活潑に分裂する核の周囲に見られる。例えば四細胞層形成前、胚細胞形成の最先端の細胞層に特に見られる。最早や分裂せぬ最上層の核の周囲及び蓄微層には見られぬことは注目を惹く。

Summary

1. At an early stage, the newly formed egg nucleus and the ventral canal cell nucleus are Feulgen positive.
2. When the egg nucleus increases in size, it becomes Feulgen negative.
3. In the fused nucleus both the female and male parts are Feulgen negative except the contact part of both nuclei which is Feulgen positive.
4. In some fused nuclei thread-like chromatin filaments show a positive Feulgen reaction, in both female and male parts.
5. In the prophase of the proembryo long thread-like chromosomes are scattered in the nuclear cavity which is Feulgen negative.
6. The nuclei of proembryo decrease their size after every nuclear division. The chromosomes have the same tendency, therefore the quantity of DNA of each nucleus is not constant and it seems that it gradually decreases according to the growth of the proembryo.
7. Granules, rich in pentose nucleic acid, appear around the nuclei of the proembryo before the four-tier stage and embryo formation.

References

- 1) Schnarf, K., Embryologie der Gymnospermen. Handb. d. Pflanzenanat. X (1933). 2) ———, Vergleichende Cytologie des Geschlechtsapparates der Kormophyten. Monogr. z. vergleichende Cytol. I (1941). 3) Shimamura, T., Bot. Mag. Tokyo 45: 525-530 (1931). 4) ———, Cytologia 6: 465-473 (1935). 5) Sibatani, A., Cytologia 16: 315 (1952). 6) Tischler, G., Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Häfte. Kernteilung und. Kernverschmelzung. Handb. d. Pflanzenanat. II (1951).

Explanation of figures 1-4. *Pinus Thunbergii*. Cut off of the ventral canal cell, Feulgen nucleal reaction.

Fig. 1. Central cell nucleus before division showing the nuclear reticulum faintly Feulgen positive.

Fig. 2. Metaphase, chromosomes are strongly Feulgen positive while spindle is Feulgen negative.

Fig. 3. Egg nucleus and ventral canal cell nucleus are Feulgen positive.

Fig. 4. Egg nucleus increases in size gradually, moves down and becomes Feulgen negative. In the upper part the degenerate ventral canal cell is shown. $\times 430$.

Explanation of figures 5a-9. *Pinus Thunbergii*. Feulgen nuclear reaction.

Fig. 5a. 5b. Consecutive sections of fused nucleus, the thread-like chromatin filaments show Feulgen positive. The most part of nuclear content is Feulgen negative.

Fig. 6. Fused nucleus showing both male and female parts are Feulgen negative except the contact part of both nuclei which is stained.

Fig. 7. Prophase of first division, long slender chromosomes are Feulgen positive.

Fig. 8. Metaphase of first division, chromosomes arranged on the nuclear plate.

Fig. 9. Anaphase of second division, mitotic figure is much smaller than that of the first division. $\times 430$.

Explanation of figures 10-16. *Pinus Thunbergii*. Proembryo. Fig. 10. Prophase of four nuclear stage, chromosomes are scattered in the nuclear substance which is Feulgen negative. Chromosomes are Feulgen positive. Fig. 11. Early metaphase of mitosis of four nuclei. Scattered chromosomes, going to arrange on the nuclear plate. Fig. 12. Third division of proembryo. Toluidin blue staining. The granules around the nuclei including mitotic figure are well stained. Fig. 13. Telophase of third division. Feulgen nuclear reaction, the granules around mitotic figure are Feulgen negative while the daughter nuclei are Feulgen positive. Figs. 14, 15. Toluidin blue staining shows the distribution of pentose nucleic acid rich granules in different stages of proembryo. Fig. 16. Suspensor cell and two embryo cells showing the different staining reaction of the nuclei. Feulgen nuclear reaction.