

(原著論文)

スギ花粉におけるペクチン分解酵素 (Cry j 2) の 花粉管伸長に果たす役割

平塚 理恵^{*}・寺坂 治

東京慈恵会医科大学自然科学教室生物学的研究室 〒182-8570 東京都調布市国領町 8-3-1
(2012年3月27日 受付, 2012年7月9日 受理)

Role of pectinase Cry j 2 during pollen tube growth in *Cryptomeria japonica*

Rie HIRATSUKA and Osamu TERASAKA

Division of Biology, Department of Natural Science, Jikei University School of Medicine,
Kokuryo 8-3-1, Chofu, Tokyo 182-8570, Japan

Cry j 2 is the major allergenic protein of *Cryptomeria japonica* pollen. The protein is considered to play important roles both in pollen tube germination and in pollen tube growth because it has pectinase activity. In the present study, we examined the in vivo localization of Cry j 2 and pectins in the pollen tube and the nucellus to clarify the role of the pectinase. Just after pollination, Cry j 2 was localized only in the intine. During pollen tube growth, however, it was distributed within the cytoplasm of the pollen tube, and also in the pollen tube wall, the middle lamella, and in the nucellar cells that came into contact with a pollen tube.

De-esterified pectins were localized in nucellar cell walls and methyl-esterified pectins were localized in nucellar cell walls and the middle lamella. Our findings indicate that Cry j 2 is synthesized within the pollen grain and the pollen tube, and that subsequently Cry j 2 is secreted to the nucellus via the pollen tube wall. Furthermore, Cry j 2 degrades pectins of the nucellar cell wall and the middle lamella to facilitate pollen tube growth. The absence of Cry j 2 in the pollen tube wall in vitro also indicates that interaction between the pollen tube and the nucellus is necessary to induce the secretion of Cry j 2.

Key Words: *Cryptomeria japonica*, pollen tube, Cry j 2, pectin, pectinase

緒 言

種子植物の花粉管は精細胞を卵細胞に運搬し、受精を成立させる重要な役割を持ち、この過程は花粉管受精と呼ばれている。被子植物では種により柱頭で発芽した花粉管が、花柱の誘導組織内を伸長する場合と花柱溝の表面に沿って伸長する場合があり、前者は中実花柱 (solid style)、後者は中空花柱 (hollow style) と呼ばれている。花粉管の通路となるこれらの組織は花粉管の伸長に必要であり、栄養供給、誘導、接着などの多様な役割を果たしていると考えられている^(1,2)。中空花柱を持つテッポウユリでは、花柱溝の表面に分

布するペクチンと stigma/stylar cysteine-rich adhesin (SCA) と呼ばれるタンパク質が、花粉管と花柱溝の表皮細胞との接着に働くことが報告されている⁽³⁾。中実花柱では、ペチュニアの誘導組織の細胞外マトリックスに含まれるペクチンが、花粉管伸長に必須であるカルシウムの貯蔵に関与すること⁽⁴⁾、タバコの誘導組織に沿って分布するアラビノガラクトナンタンパク質の一種である transmitting tissue-specific (TTS) タンパク質が、花粉管の伸長や誘導に関与することが示唆されている⁽⁵⁾。一方、タバコやペチュニアの花粉管では、ペクチン分解酵素が産生されることが報告されている⁽⁶⁻⁹⁾。ペクチンには、細胞間に発達する中層で細胞

^{*} E-mail: hiratsuka@jikei.ac.jp

間接着を制御する働きや中層や細胞壁の構造を維持する働きがあることから、花粉管は自らが生産したペクチン分解酵素により、誘導組織のペクチンを分解することで花粉管の伸長のためのスペースを確保し、その伸長を促進させると考えられている。

裸子植物は被子植物と異なり花柱を形成せず、花粉は珠心頂端で発芽し、花粉管は珠心組織内を雌性配偶体に向かって伸長する。珠心には被子植物のような特殊化した通路はなく、珠心全域が花粉管の通路となる。多くの裸子植物では、花粉管の伸長に伴い管周囲の珠心細胞が退化することが報告されている^(10,11)。我々もアカマツにおいて、珠心の細胞死が花粉管伸長のためのスペースと栄養物の確保に働くことを明らかにしている^(12,13)。

スギ花粉では主要アレルゲンの1つとして Cry j 2 が知られている。中村ら⁽¹⁴⁾は、*in vitro*の実験により、Cry j 2 は花粉内のデンプン粒内のみに分布し、それ以外の部位には分布しないことを示し、発芽や花粉管伸長にほとんど関与しないと考えており、その機能については今日まで明らかにされていない。しかしながら、Cry j 2 は植物の細胞壁に存在するペクチンを分解するポリガラクトナーゼ活性を持つことが明らかとなっており⁽¹⁵⁾、珠心組織のペクチンの分解により、花粉管伸長に関与する可能性が考えられる。また、ペクチン分解酵素が機能するためには基質となるペクチンの存在が必須であり、*in vivo*における両者の解析が必要である。

本研究では、スギの *in vivo* での花粉管における Cry j 2 の分布およびその基質となるペクチンの珠心組織内における分布について解析を行い、Cry j 2 の花粉管伸長における役割について考察した。

材料と方法

材 料

本研究には東京都町田市で生育するスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) の発達諸段階の雌花を用いた。

方 法

1. エポキシ樹脂による包埋

2% グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Sciences 社) により 4℃ で 1 晩、前固定した。PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4, シグマ社) による洗浄後、2% 四酸化オスミウム (日新 EM 社) により 4℃ で 1 時間、後固定した。エタノール・アセトンシリーズにより脱水し、Spurr 樹脂 (ポリサイエンス社) で包埋・重合した。

2. 花粉管長の測定

樹脂包埋した胚珠から厚さ 2μm の連続切片を作製した。切片をスライドガラス上に載せ、トルイジンブルー染色を行い、顕微鏡用デジタルカメラ DP25 (オリンパス社) を用いて花粉管の長さを測定した。測定には分岐した花粉管のうち最も長い管を用い、発達段階ごとに 2-4 本の花粉管について測定した。

3. 免疫染色法

1) 抗 体

脱エステル化ペクチンに対するモノクローナル抗体である JIM5、メチルエステル化ペクチンに対するモノクローナル抗体である JIM7 は中村紀雄博士より分与していただいた。抗 Cry j 2 ポリクローナル抗体は生化学バイオビジネス社のものを使用した。

2) 蛍光染色法

試料を PBS で調製した 3.7% パラホルムアルデヒドによって 4℃ で 1 晩固定した。エタノールシリーズで脱水し、テクノビット 7100 樹脂 (Kalzer 社) で包埋した。1μm の厚さの切片を作製し、スライドガラス上で 1% BSA を含む PBS で 30 分以上ブロッキングを行った。1次抗体で 4℃、1晩処理した。PBS で洗浄後、1/40 に希釈した FITC 標識の 2 次抗体により 37℃ で 1 時間処理した。その後 PBS で洗浄し、1μg/ml の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で核染色を行った。

3) 免疫電顕法

試料を 4% パラホルムアルデヒドと 0.5% のグルタルアルアルデヒドの混合液により 4℃、1晩固定した。エタノールシリーズで脱水後、LR ホワイト樹脂 (London Resin 社) により包埋し、重合を行った。ウルトラミクロトームにより超薄切片を作製し、ニッケルグリッド上に載せ、1% BSA を含む PBS 中で 30 分以上ブロッキングを行った。1次抗体で 4℃、1晩処理した後、PBS 中で 6 回洗浄した。1/40 に希釈した 2 次抗体 (10 または 15nm gold colloid) により室温で 1 時間処理した。その後 PBS と蒸留水でそれぞれ 6 回ずつ洗浄し、酢酸ウランと鉛による二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (HITACHI H-7000) にて観察を行った。

結 果

花粉の発達と花粉管の伸長

Fig. 1 はスギ花粉の発達過程を示す。東京では 10 月頃に減数分裂によって生じた小胞子が不等分裂を行

い、管細胞と生殖細胞を形成し成熟花粉となる (Fig. 1A-C). 分裂中の花粉の細胞質は、細胞壁によって非常に圧縮された状態であるが、人為的に外壁を除去すると細胞質が膨潤し、小型の生殖細胞とそれを取り囲む大型の管細胞が明瞭に観察された (Fig. 1D). 生殖細胞の核の染色質は管細胞のそれに比べて分散が弱い。成熟した花粉は次年の3月初旬より飛散し、受粉する。スギの珠心は花粉室を形成しない (Fig. 2A). 花粉は珠心近傍に到達した後、吸水し外壁を脱いだ。内壁は2層に区別でき、膨潤した外層により珠心頂端に接着した (Fig. 2B). 外層はその後徐々に退化し、それに伴い珠心頂端の数層の細胞が細胞死を遂げた。外層が完全に消失した花粉はやがて発芽し、内層は花粉管に発達し、退化した珠心内を伸長した (Fig. 2C). 花粉管は分岐しながら2ヶ月間で約 $300\mu\text{m}$ 伸長し (Fig. 2D), 花粉管に接した珠心細胞は順次細胞死を遂げた。また、分岐した花粉管の間には太さや長さの顕著な差は見られなかった。この頃、生殖細胞が分裂して中心細胞と柄細胞が形成され、それらは分岐した花粉管の基部にまで進入し花粉管核と集合した。柄細胞は細胞質を失い柄細胞核となり、花粉管核と常に隣接し (Fig. 2E 矢印), 中心細胞はその後方に位置した。その後、3者はともに多分岐したうちの1本の花粉管 (生殖花粉管と呼ぶ) 内に移動した (Fig. 2E). 花粉管核と柄細胞核は大きさや染色質の形態が酷似しており、両者の区別は困難であった。また、これらの核周辺か

ら花粉管先端に向かって多くのミトコンドリアや色素体などのオルガネラを含む細胞質が存在したが、基部側では液泡が発達していた。5月下旬、雌性配偶体には造卵器が形成され (Fig. 3 矢印), それと同調して生殖花粉管が雌性配偶体に向かって伸長を開始した (Fig. 2F). しかし、その他の管は $300\mu\text{m}$ の長さからほとんど変化しなかった。生殖花粉管は他の管 (直径約 $25\mu\text{m}$) より太く (直径約 $65\mu\text{m}$), その伸長速度は急激に高まった。生殖花粉管は6月上旬に雌性配偶体に到達し、中心細胞を造卵器室に放出した。中心細胞は分裂し、2個の精細胞を形成した (Fig. 2G).

Fig. 3 は受粉から雌性配偶体到達までの花粉管の長さを経時的に測定した結果である。花粉管の伸長速度は一定ではなく、受粉後1~2週間のほとんど伸長しない1期 (9-Mar~21-Mar), 分岐しながら緩やかに約 $300\mu\text{m}$ まで伸長する2期 (21-Mar~30-May), 生殖花粉管のみが急激に約 $600\mu\text{m}$ まで伸長し雌性配偶体に到達する3期 (30-May~4-Jun) に分けられることが示された。

花粉と周辺組織におけるペクチンおよびペクチン分解酵素 (Cry j 2) の分布

葯内で発達中の花粉母細胞および花粉における Cry j 2 の分布を、蛍光抗体法を用いて解析した。その結果、花粉母細胞および花粉からは Cry j 2 の分布を示す緑色の蛍光は検出されなかった (Fig. 4A, B). また、タペータムや葯壁の細胞にも Cry j 2 は分布しなかった。

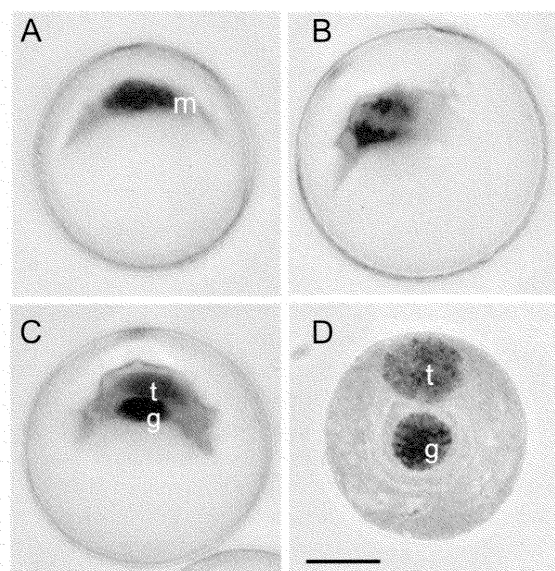


Fig. 1. Pollen grain ontogeny of *Cryptomeria japonica*. Microspore (A), microspore division at anaphase (B), mature stage (C), mature pollen with exine removed (D). m: microspore. t: tube cell. g: generative cell. Bar = $10\mu\text{m}$.

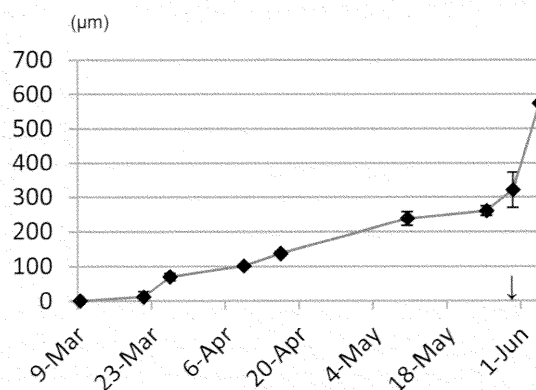


Fig. 3. Graph showing the changes in pollen tube growth rate. A pollen tube hardly grows for approximately 2 weeks from pollination (9 Mar to 21 Mar). Then, the pollen tube grows slowly for approximately 10 weeks (21 Mar to 30 May). After archegonium formation, the reproductive tube begins to grow rapidly and arrives at the female gametophyte (30 May to 4 Jun). The arrow indicates the stage of archegonium formation. Results represent means $\pm$ SD.

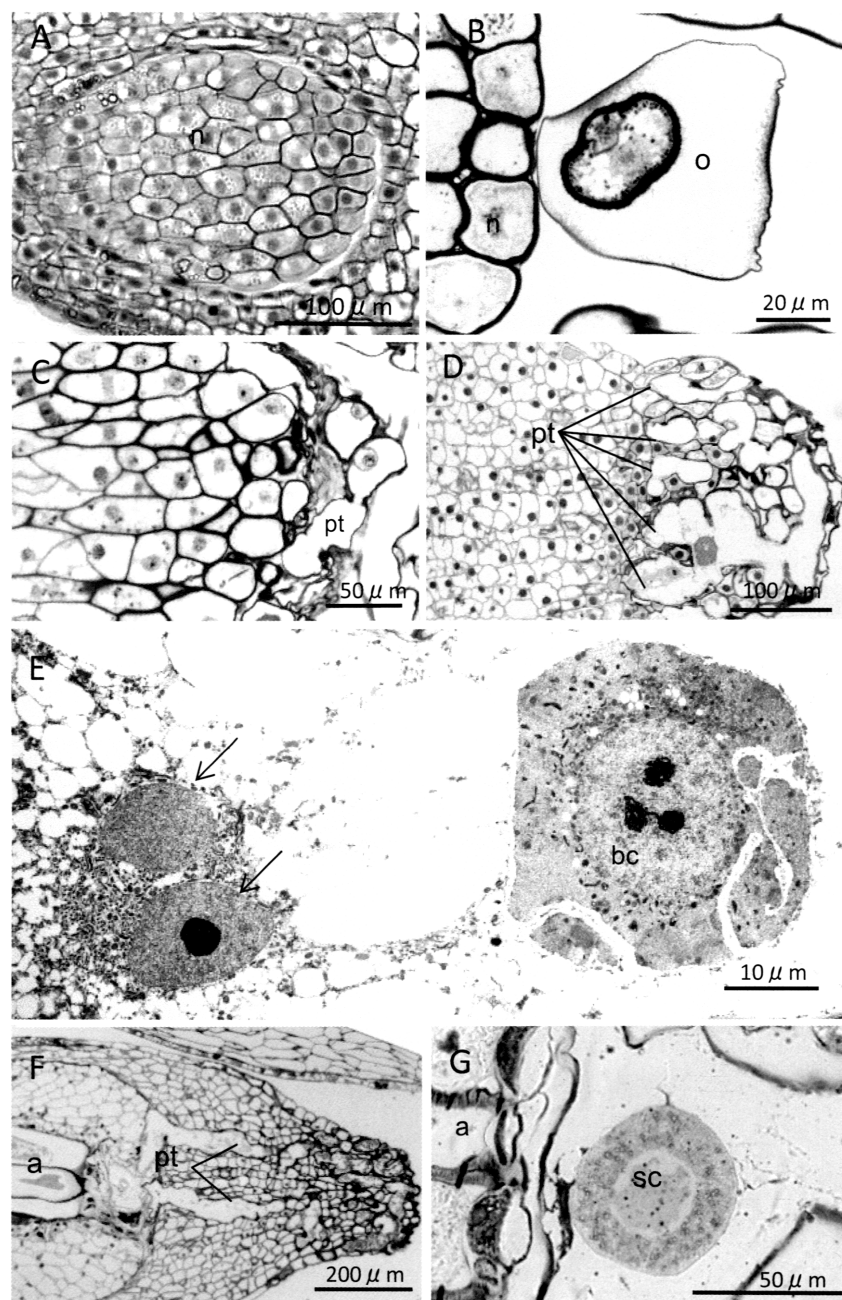


Fig. 2. Pollen germination and pollen tube growth in the nucellus. A - D, F and G, light microscopic image. E, electron microscopic image. Before pollination, the nucellus has no pollen chamber (A). After pollination, the pollen exine is broken by swelling of the intine and the outer layer of intine adheres to the tip of nucellus (B). After germination, pollen tubes grow through the dying nucellus (C), and then grow approximately 300 μm forming multiple branches (D). The tube nucleus, body cell and stalk nucleus move in one of the branches, serving as a reproductive tube (E). The reproductive tube grows by approximately 600 μm and arrives at the female gametophyte (F). The body cell that penetrated the female gametophyte forms two sperm cells. One is shown in G. n: nucellus. o: outer layer of intine. pt: pollen tube. bc: body cell. a: archegonium. sc: sperm cell.

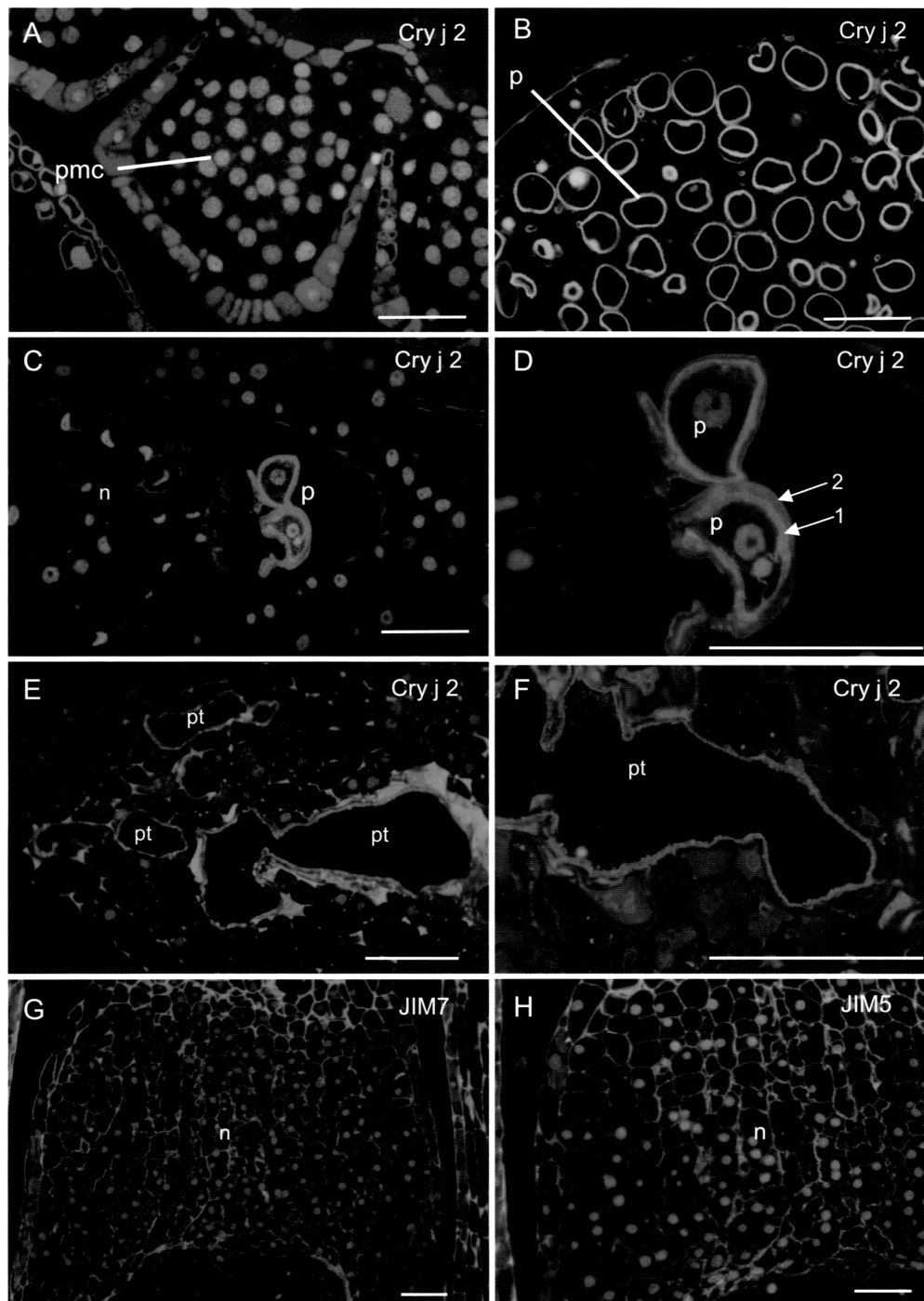


Fig. 4. Immunofluorescence images of the localization of Cry j 2 and pectins in the pollen and the nucellus. Cry j 2 is not detected in the pollen mother cells (A) or in the pollen developing in the anther (B). Cry j 2 appears in the two layers consisting of the intine (C, D). The inner layer (arrow 1) is more intensely stained than the outer layer (arrow 2). Cry j 2 is also localized in the pollen tube wall (E, F). De-esterified pectins (G) and methyl-esterified pectins (H) are localized in nucellar cell walls and the middle lamella. pmc: pollen mother cell. p: pollen. n: nucellus. pt: pollen tube. Bars = 50 μ m.

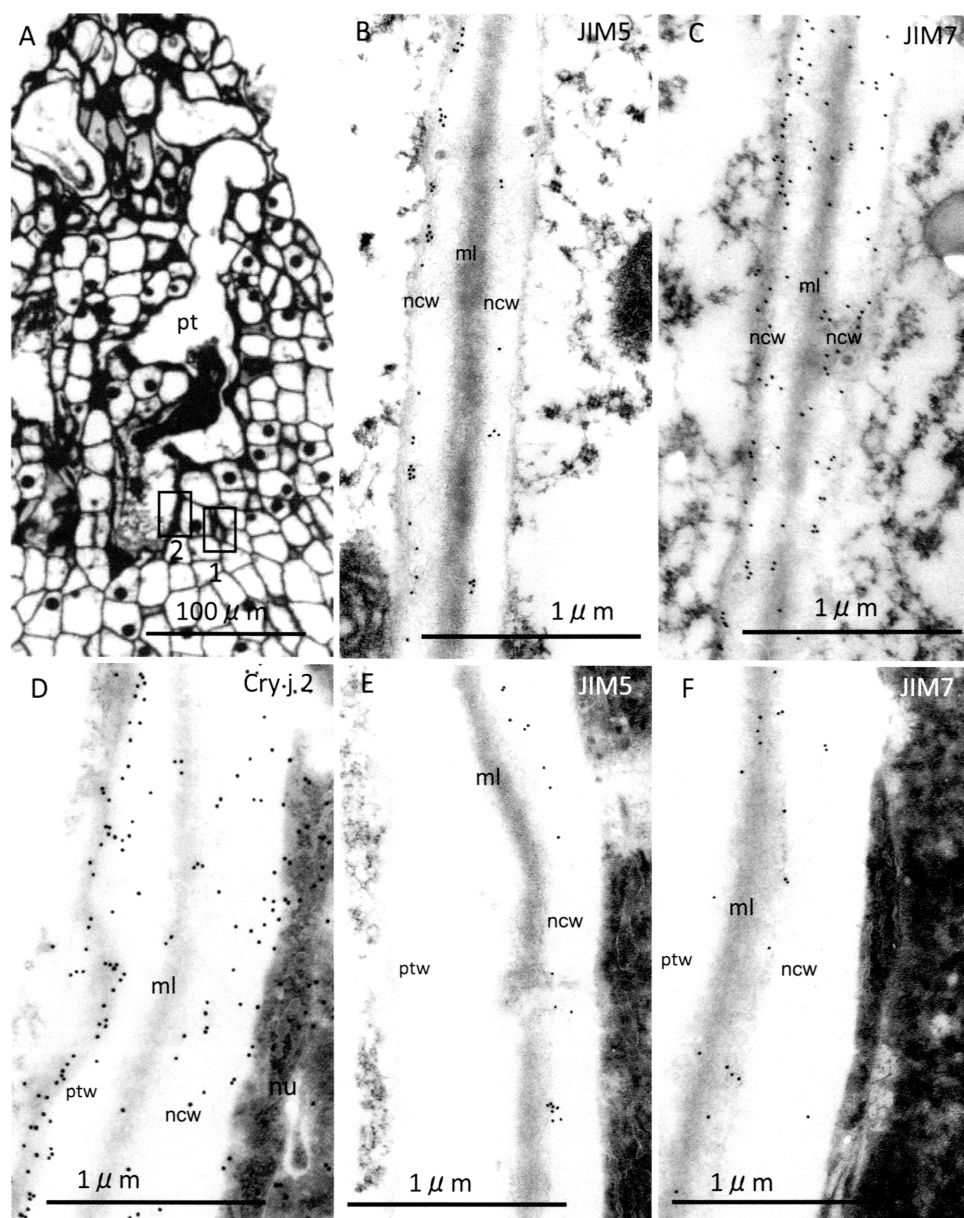


Fig. 5. Immunoelectron microscopic localization of Cry j 2 and pectins in the pollen tube and the nucellus. A, Pollen tube growing in the nucellus. Square 1 shows an area in which two nucellar cells are in contact. Square 2 shows the contact area between a pollen tube and nucellar cell. B - C, The distribution of pectins in square 1. De-esterified pectins are localized in nucellar cell walls (B) and methyl-esterified pectins are localized in nucellar cell walls and the middle lamella (C). D - F, The localization of Cry j 2 and the pectins in areas within square 2. Cry j 2 is detected in the cytoplasm of the pollen tube, the tube wall, the middle lamella, and the nucellar cell wall and its cytoplasm (D). The de-esterified pectins are localized in the nucellar cell wall (E) and the methyl-esterified pectins are localized in the nucellar cell wall and the middle lamella (F). pt: pollen tube. ncw: nucellar cell wall. ml: middle lamella. ptw: pollen tube wall.

しかし、受粉し外壁を脱いだ花粉においては、膨潤し珠心に接着した花粉内壁において Cry j 2 が観察された (Fig. 4C, D)。内壁内層 (Fig. 4D 矢印 1) は外層 (Fig. 4 矢印 2) に比べ、より強く染色された。また、受粉した花粉では、珠心と直接接触しない場合でも、その内壁において、同様な Cry j 2 の分布が観察された (データは示していない)。伸長中の花粉管において、分岐した全ての花粉管の壁は Cry j 2 によって標識された (Fig. 4E, F)。一方、珠心組織には Cry j 2 はほとんど検出されなかった。

珠心におけるペクチンの分布について、メチルエステル化ペクチンを認識する JIM7 抗体、脱エステル化ペクチンを認識する JIM5 抗体により解析した。その結果、両者ともに珠心全域において細胞壁または中層に分布した (Fig. 4G, H)。

Cry j 2 およびペクチンのより詳細な分布を明らかにするため、免疫電顕法による観察を行った (Fig. 5)。Fig. 5A は珠心とその中を伸長中の花粉管を示し、1 で示した囲みは珠心細胞間を、2 で示した囲みは珠心細胞と花粉管の接触部位を示している。珠心細胞間において、Cry j 2 はほとんど検出されなかったが、脱エステル化ペクチンは主として細胞壁に分布し中層にはほとんど分布せず (Fig. 5B)。また、メチルエステル化ペクチンは細胞壁と中層に分布した (Fig. 5C)。一方、花粉管と珠心細胞の接触部位では、Cry j 2 は花粉管、特に細胞膜付近の細胞質と管壁で顕著に検出され、さらに、進入した花粉管の壁と接する中層および珠心細胞にも分布することが観察された (Fig. 5D)。花粉管と接した珠心細胞は細胞質が凝縮し電子密度が高く、細胞死を起こしていた。また、脱エステル化ペクチンおよびメチルエステル化ペクチンはともに花粉管では検出されなかったが (Fig. 5E, F)、花粉管と接した中層にメチルエステル化ペクチンが、珠心細胞壁には脱エステル化ペクチンおよびメチルエステル化ペクチンが分布していた (Fig. 5E, F)。コントロールとして 1 次抗体抜きで処理した場合、Cry j 2、メチルエステル化ペクチンおよび脱エステル化ペクチンのすべてにおいて、金コロイドによる標識は見られなかった (データは示していない)。

考 察

花粉の発芽と花粉管の伸長

スギ花粉における受粉から雌性配偶体への到達にいたる *in vivo* でのスギ花粉管の伸長過程はその伸長速度に基づいて 3 期に分けられることが明らかになった。受粉直後の 1 期では、外壁を脱いだ花粉は一度膨張した花粉内壁により珠心頂端に接着した。その後内壁外

層は徐々に縮小し、それに伴い花粉周辺の珠心細胞は細胞死を遂げていった。内壁外層がほぼ完全に消失すると内壁内層は花粉管として発芽し、退化した珠心細胞間を伸長し始めた。このことから、内壁外層には珠心細胞の細胞死を誘導する物質が含まれ、外層の消失とともに放出されたその物質によって珠心細胞は退化し、花粉管が伸長を開始する場を作りだしたと推測される。2 期では花粉管は多分岐しながら緩やかな速度で伸長し、花粉管と接触した珠心細胞は順次細胞死を遂げていった。伸長中の花粉管について、Lawson⁽¹⁶⁾ は枝分かれすることなく 1 本の花粉管が伸長すると述べているが、Singh ら⁽¹⁷⁾ と横山⁽¹⁸⁾ は分岐すると報告しており、本研究の結果と一致した。また、横山⁽¹⁸⁾ は珠心の頂端と雌性配偶体の間には、肥厚した細胞壁をもつ 2-4 層の細胞が存在し、花粉管がその細胞層を通過するまでに受粉から受精に要する期間の 84% を費やすと述べている。彼はその細胞層が花粉管の進入にとって物理的な障害になると考えているが、今回の観察ではそのような細胞層は観察されなかった。分岐した管の間には長さや直径にほとんど差はなかった。我々はアカマツの分岐した花粉管が、細胞死した珠心細胞から放出された小胞を取り込み、伸長のためのエネルギーとして利用する吸器的役割を果たしていることを報告している⁽¹³⁾。スギにおいても分岐したすべての花粉管は細胞死した珠心組織から効率的に栄養を取り込むための吸器的役割を果たすと推測される。分岐した花粉管の 1 本に中心細胞、柄細胞核、花粉管核が一团となって移動し、この花粉管はその後生殖花粉管としても機能する。花粉管内では花粉管核と柄細胞核は常に隣り合って花粉管先端側に位置し、中心細胞はその後方に配置しており、横山⁽¹⁸⁾ と同様の結果が得られた。また、アカマツの花粉においても花粉管核、中心細胞、柄細胞が集合した後、1 本の花粉管に移動することから⁽¹³⁾、3 者の間には互いの配置を維持する構造が存在すると推測される。被子植物では花粉管核と 2 個の精細胞は、共通の膜系に包まれた複合体 (male germ unit) を形成することが知られているが、同様の構造が裸子植物においても存在するのかもしれない。3 期では花粉管核、柄細胞核および中心細胞が進入した花粉管が生殖花粉管となり、雌性配偶体における造卵器の形成と同調して急激な伸長を遂げた。一方、その他の分岐した花粉管は 300 μ m 以上伸長することはなかった。我々はアカマツにおいては、雌性配偶体の成熟と生殖花粉管の分化・伸長の間には密接な関連性があることを報告しており⁽¹³⁾、Owens ら⁽¹⁹⁾ も *Pinus contorta* で雌性配偶体と花粉管の協調的発達を調整する因子の存在を示唆している。また、被子植物では *Alnus firma*, *Alnus sieboldiana*⁽²⁰⁾,

Fagus japonica⁽²¹⁾において、受粉から受精までの期間、花粉管が胚嚢の発達と協調しながら断続的に伸長することが報告されている。スギにおいても花粉管核、柄細胞核および中心細胞の集合、生殖花粉管の分化・伸長および雌性配偶体の成熟の間には密接な相互関係があると推測される。

花粉管伸長におけるペクチン分解酵素の役割

ペクチン分解活性を持つ Cry j 2 は、発達中の花粉母細胞や若い花粉および珠心組織では発現せず、受粉後、花粉内壁のみにはじめて出現する。その後伸長中の花粉管壁および花粉管と接した中層や珠心細胞に多量の Cry j 2 が分布した。これらのことから Cry j 2 は花粉管で合成されたのち花粉管壁を経て中層や珠心細胞に分泌されることが示唆された。中村ら⁽¹⁴⁾の *in vitro* の実験では、Cry j 2 は花粉管壁では検出されなかったことから、Cry j 2 の花粉管からの分泌には受粉が必須であり、花粉と胚珠の相互関係によって誘導されると推測される。一方、受粉した珠心の頂端から2-3層の珠心細胞および伸長した花粉管に接した珠心細胞が細胞死を遂げた。Cry j 2 はペクチン分解酵素活性を持つことから、珠心組織の細胞壁や中層を構成するペクチンを分解することで、細胞間の接着や細胞壁の強度を弱め、細胞の死を誘導したと考えられる。今回の実験では、メチルエステル化の程度の異なる2種類のペクチンについてその分布を解析した。その結果、珠心全域の細胞壁に脱エステル化ペクチンとメチルエステル化ペクチンが、中層にメチルエステル化ペクチンが検出された。このことからスギにおいては、中層に分布するメチルエステル化ペクチンは細胞同士の接着に関与すると考えられる。一方、脱エステル化ペクチンは、カルシウムの介在によりペクチン同士が架橋することで硬さを増すことから、細胞壁の構造の維持やカルシウムの貯蔵に機能するものと推測される。Cry j 2 によるこれらのペクチンの分解は、細胞間接着を弱め、細胞壁を軟化することで花粉管伸長のスペースを確保するほか、脱エステル化ペクチンを分解することでカルシウムを放出させ、それによって花粉管伸長を促進すると推測される。以上のことから、スギにおける Cry j 2 の発現は、花粉管の伸長に重要な役割を果たすことが示唆された。

要 約

スギ花粉症の主要アレルゲンである Cry j 2 はそのペクチン分解酵素活性によって周辺組織を分解し、花粉の発芽や花粉管伸長に関与すると推測されている。本研究では花粉粒と花粉管およびその通路となる珠心

における Cry j 2 とその基質であるペクチンの分布について *in vivo* で解析を行った。その結果、Cry j 2 は受粉直後では花粉内壁近傍に、花粉管伸長後は花粉管の細胞質、花粉管壁、花粉管と接した中層および珠心細胞の細胞壁や細胞質で観察された。一方、脱エステル化ペクチンは珠心細胞の細胞壁に、メチルエステル化ペクチンは細胞壁と中層に分布した。以上の結果から花粉管の細胞質で合成された Cry j 2 は花粉管壁を経て細胞外に分泌されること、分泌された Cry j 2 は珠心の細胞壁や中層に存在するペクチンを分解することで細胞間接着を弱め、珠心組織を軟化し、花粉管の伸長を容易にすることが示唆された。また、Cry j 2 は *in vitro* において花粉管壁には出現しないことから、その分泌には受粉によって生じる花粉と胚珠との相互作用が必要であることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、抗体を分与していただいた中村紀雄先生に心より感謝いたします。

引用文献

- (1) Crawford, B.C.W. and M.F. Yanofsky: The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. *Curr. Biol.* 18, 972-978 (2008).
- (2) Lord, E.M. and S.D. Russell: The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 81-105 (2002).
- (3) Mollet, J.-C., S.-Y. Park, E.A. Nothnagel and E.M. Lord: A Lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell* 12, 1737-1749 (2000).
- (4) Lenartowska, M., M.I. Rodríguez-García and E. Bednarska: Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort. *Planta* 213, 182-191 (2001).
- (5) Cheung A.Y.: Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. *Trends Plant Sci.* 1, 45-51 (1996).
- (6) Kroh, M. and M.W. Loewus: Pectolytic enzyme activity from *Nicotiana tabacum* pollen. *Phytochemistry* 17, 797-799 (1978).
- (7) Mu, J.-H., J.P. Stains and T.-h. Kao: Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* 25, 539-544 (1994).
- (8) Dearnaley, J.D.W. and G.A. Daggard: Expression of a

- polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. *Sex. Plant Reprod.* 13, 265-271 (2001).
- (9) Jiang, L., S.-L. Yang, L.-F. Xie, C.S. Puah, X.-Q. Zhang, W.-C. Yang, V. Sundaresan and D. Ye: *VANGUARD1* encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *Plant Cell* 17, 584-596 (2005).
- (10) Owens, J.N. and S.J. Morris: Cytological basis for cytoplasmic inheritance in *Pseudotsuga menziesii*. I. Pollen tube and archegonial development. *Amer. J. Bot.* 77, 433-445 (1990).
- (11) Choi, J.-S. and W.E. Friedman: Development of the pollen tube of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae) and its evolutionary implications. *Amer. J. Bot.* 78, 544-560 (1991).
- (12) Hiratsuka, R., Y. Yamada and O. Terasaka: Programmed cell death of *Pinus* nucellus in response to pollen tube penetration. *J. Plant Res.* 115, 141-148 (2002).
- (13) Hiratsuka, R. and O. Terasaka: Pollen tube reuses intracellular components of nucellar cells undergoing programmed cell death in *Pinus densiflora*. *Protoplasma* 248, 339-351 (2011).
- (14) 中村澄夫・佐藤文孝・中村紀雄：スギ花粉アレルゲン Cry j 1 と Cry j 2 の発芽花粉における局在性. 花粉誌 50, 15-22 (2004).
- (15) Ohtsuki, T., Y. Taniauchi, K. Kohno, S. Fukuda, M. Usui and M. Kurimoto: Cry j 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy* 50, 483-488 (1995).
- (16) Lawson, A.A.: The gametophytes, fertilization and embryo of *Cryptomeria japonica*. *Ann. Bot.* 18, 417-444 (1904).
- (17) Singh, H. and J. Chatterjee: A contribution to the life history of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Phytomorphology* 13, 429-445 (1963).
- (18) 横山敏孝：スギにおける胚の形成と球果の成長. 林誌研報 277, 1-20 (1975).
- (19) Owens, J.N., S.J. Simpson and M. Molder: Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo, and seed development. *Can. J. Bot.* 60, 2071-2083 (1982).
- (20) Sogo, A. and H. Tobe: Intermittent pollen-tube growth in pistils of alders (*Alnus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8770-8775 (2005).
- (21) Sogo, A. and H. Tobe: Delayed fertilization and pollen-tube growth in pistils of *Fagus japonica* (Fagaceae). *Amer. J. Bot.* 93: 1748-1756 (2006).