

■原 著■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 消化後固定法によるシロイヌナズナの減数分裂期染色体の調製

安積良隆<sup>1,2,3</sup> 笹本浜子<sup>2</sup>

Preparation of Meiotic Chromosomes of *Arabidopsis thaliana*  
by Digest-and-Fix Method

Yoshitaka Azumi<sup>1,2,3</sup> and Hamako Sasamoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Meiosis is an essential process for the production of gametes, and it consists of one round of chromosome replication and two rounds of mitosis. During meiosis, the chromosome number must be accurately halved, or subsequent generations produced by fertilization of gametes with irregular numbers of chromosomes will become aneuploids, which are lethal in most cases. This accuracy is guaranteed by homologous chromosome synapsis and even segregation. Therefore, synapsis and the following segregation are prerequisites for the production of normal gametes and the next generation. The molecular mechanism of chromosome control during meiosis of plants remains unclear. Unknown components such as ncRNA may be involved. In order to elucidate components of this mechanism, a new method of intact chromosome preparation is necessary. We explored the Digest-and-Fix method, which consists of two steps. First, digestion of pollen mother cells with cell wall-digesting enzymes while keeping their plasma membrane intact, and second, simultaneous fixing and spreading of chromosomes with Farmer's solution onto slide glasses.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, meiosis, pollen mother cell, chromosome, cell wall

### 序論

体細胞分裂では1回の染色体複製の後、1度だけ有糸分裂が起こり、母細胞と娘細胞の染色体数は等しいが、減数分裂では1回の染色体複製の後、連続して2回の有糸分裂が起こるため、染色体数が半減する。植物ではこの分裂により、染色体数 $2n$ の孢子体から染色体数 $n$ の配偶体世代が作り出され、この中で精細胞と卵細胞といった配偶子が形成される。これらの雌雄の配偶子の受精によって、前世代と同じ $2n$ の染色体をもつ次世代が生み出されるわけであるが、正常な染色体数の次世代が生み出されるためには、減数分裂時に正確に1組の染色体を有するように染色体数が半減されなければならない。このしくみは世代を通じて染色体数を維持する上で非常に重要である。

植物を材料とする減数分裂の研究でも、染色体の

構造観察は古くから行われてきた。1890年ごろ、E. A. Strasburger や J. L. Guignard らは、ユリ科の植物で減数分裂時に相同染色体が対合・分離し、染色体数が半減する様子を光学顕微鏡を用いて観察した。この染色体の挙動が、後に遺伝子と呼ばれるメンデルの要素の挙動と一致することから、遺伝子は染色体上に存在するとする染色体説が提唱された。電子顕微鏡が開発され、詳細な染色体の構造解析が進み、動物、真菌類、植物で減数分裂期には相同染色体間にシナプトネマ複合体と呼ばれる構造が形成されることも明らかとなった<sup>1-3)</sup>。

1980年ごろ、シロイヌナズナがモデル植物に採用されて、シロイヌナズナでも減数分裂期染色体の観察が盛んに行われるようになった。Ross らは固定した花粉母細胞の細胞壁をサイトヘリカーゼなどを用

いて消化し、物理的障壁が除去され自由となった染色体をスライドガラスに平面的に薄く貼り付けた後に DAPI で染色するという減数分裂期染色体の観察法を開発した<sup>4)</sup>。この方法は簡便で、染色体をスライドガラス表面に広く薄く貼り付けるので、染色体全体を光学顕微鏡でも高精細に観察することができる。シロイヌナズナで減数分裂期相同組み換えに異常が生じるものやシナプトネマ複合体が形成されないものなどの減数分裂変異体が数多く単離され、この方法で染色体が解析された<sup>5-9)</sup>。変異体の原因遺伝子が同定され、減数分裂時に特異的に発現し、減数分裂に不可欠な遺伝子の解析も進められている。ゲノムプロジェクトの完了や変異体などの遺伝的資源の蓄積、転写産物や遺伝子産物の網羅的な解析<sup>10)</sup>などがあって、減数分裂に必要な遺伝子の解析は今も進められている。

近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が様々な生理現象に関与していることが明らかになり、その重要性が増してきている。酵母菌では減数分裂期の相同染色体の対合に ncRNA が必要であることが示されている<sup>11)</sup>。また、植物でも phasiRNA と呼ばれる植物特有の ncRNA が減数分裂に必要な可能性が示されている<sup>12,13)</sup>。様々な要素の関連が示唆されてきているが、依然として減数分裂期の染色体やシナプトネマ構造などの構成因子がすべて明らかになっているわけではない。

これまでの観察法では花粉母細胞を固定したのち、細胞壁消化酵素を用いて細胞壁を取り除き、染色体をスライドガラスなどに付着させて観察するものである。消化酵素を働かせている間に、消化酵素に混入している様々な酵素が細胞内に侵入し、タンパク質や RNA が分解され、染色体の構成要素が失われる可能性がある。未知の構成要素の局在を検出するための方法として我々は固定しないで生きた花粉母細胞の細胞壁を取り除いて、固定と同時に染色体をスライドガラス上に平面的に付着させ、染色体構成要素を高精細に解析する方法の開発を試みた。

## 材料と方法

### シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta*) は培養土に播種し、神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの植物育成棟内で栽培した。24°C、14 時間明期 10 時間暗期の光周期の蛍光灯下、1 週間に 1 度、ハイポネックスを肥料として与えた。

### 細胞壁の酵素処理

実体顕微鏡下でシロイヌナズナの花序から、1 mm

以下の蕾を取り出し、萼片をできるだけ切除した。萼を除いた蕾を、ホールスライドガラスに用意した 100  $\mu$  L の各種濃度の細胞壁消化酵素を含む溶液に沈めた。消化酵素はセルラーゼ RS (ヤクルト)、マセロザイム R10 (ヤクルト)、ペクトリアーゼ (協和化成)、ヘミセルラーゼ (シグマ H-2125)、ドリセラゼ 20 (協和発酵工業) を使用した。密閉できるプラスチックの箱の中にスライドガラスを並べ、所定の時間室温 (20°C 前後) に置き、消化を行った。

### 染色体標本の作製と顕微鏡観察

消化後の花粉母細胞の様子を観察する場合は、所定の時間が経過した時点で一部の蕾をスライドガラスに移し、針で葯を破壊した後、カバーガラスを被せ、顕微鏡観察を行った。

染色体標本を作製する場合は、消化し終えた蕾をスライドガラス上の 3  $\mu$  L の 60% 酢酸溶液に移し、葯を潰して花粉母細胞をスライドガラス上に拡散させた。5  $\mu$  L の 60% 酢酸溶液を追加して、45°C のホットプレート上に 1 分間置いた。ファーナー液 (エタノール: 酢酸、3:1) を滴下することで、染色体を固定した。風乾後、1.5  $\mu$  g/ml DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (VECTOR) で染色して、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX61) で観察し、デジタルカメラ (オリンパス DP80) で記録した。

## 結果

減数分裂期染色体の微細構造・構成成分をできるだけ保持した減数分裂期染色体試料を準備する方法として消化後固定法の開発に挑んだ。従来の方法とは違い、細胞膜を破壊しないで細胞壁を消化し、半プロトプラスト化した細胞を調製し、それを固定すると同時にスライドガラスに貼り付ける方法を試すことにした。

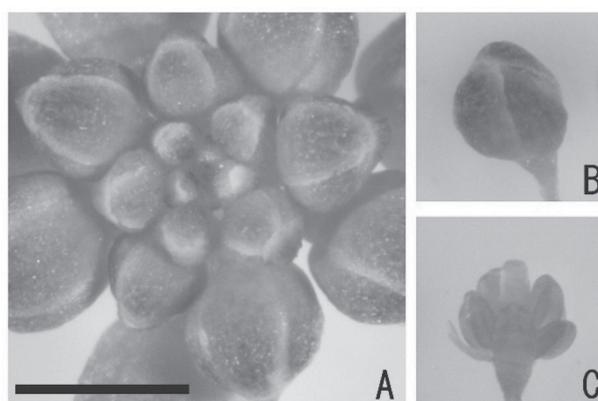


図 1. シロイヌナズナの蕾. A. 健康なシロイヌナズナの花序. B. 花序から蕾を取り出した状態. C. 取り出した蕾から萼を取り除いたもの. スケールバー, 1 mm.

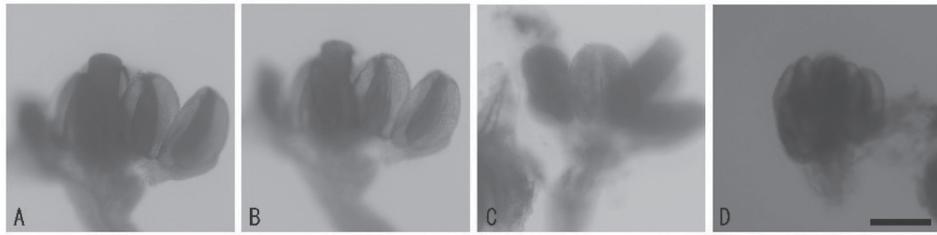


図 2. 酵素処理を行った葯. A. 消化前の蕾, B. 0.5 h 処理した蕾のもの. C. 4 h 処理した蕾のもの. D. 14 h 処理した蕾のもの. スケールバー, 0.2 mm.

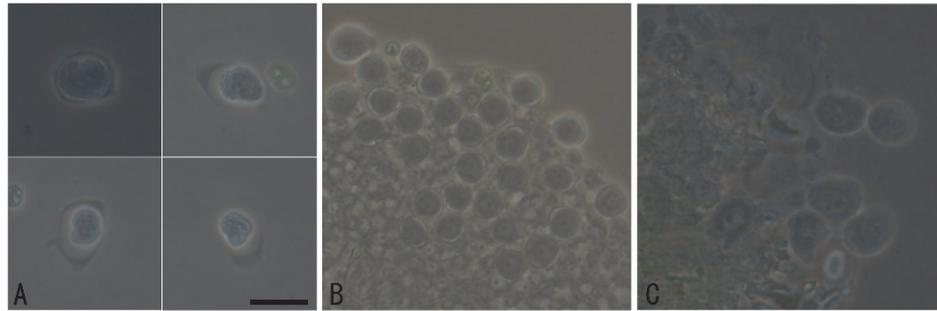


図 3. 消化した蕾の花粉母細胞. A. 0.5 h 処理した蕾のもの. B. 4 h 処理した蕾のもの. C. 14 h 処理した蕾のもの. スケールバー, 20  $\mu$ m.

図 1A のようなシロイヌナズナの花序を集め、花粉母細胞が減数分裂を行っていると思われる大きさの蕾を選抜した。萼が残っていると消化酵素が葯中に侵入しにくいと考え、先端の鋭利な針を用いて、蕾から萼を除くことにした (図 1 C)。葯が露出した状態の蕾を酵素液に沈めた。使用する酵素としては 2017 年の安積と笹本の研究結果<sup>14)</sup>を踏まえ、セルラーゼ RS、ヘミセルラーゼ、ペクトリアーゼ、マセロザイム、ドリセラゼ 20 などを試した。予備的な実験では様々な酵素を試したが、最終的にはセルラー

ゼ RS、ヘミセルラーゼ、ペクトリアーゼを使用することにし、濃度と処理時間を変えて消化を行った。高濃度短時間処理 (0.5 h 処理; 4%セルラーゼ RS、4%ヘミセルラーゼ、2%ペクトリアーゼ、1 M ソルビトール、0.5 時間)、中濃度処理 (4 h 処理; 1%セルラーゼ RS、1%ヘミセルラーゼ、0.5%ペクトリアーゼ、1 M ソルビトール、4 時間)、低濃度長時間処理 (14 h 処理; 0.4%セルラーゼ RS、0.4%ヘミセルラーゼ、0.2%ペクトリアーゼ、1 M ソルビトール、14 時間) など条件で花粉母細胞の細胞壁を消化した。図 2 に

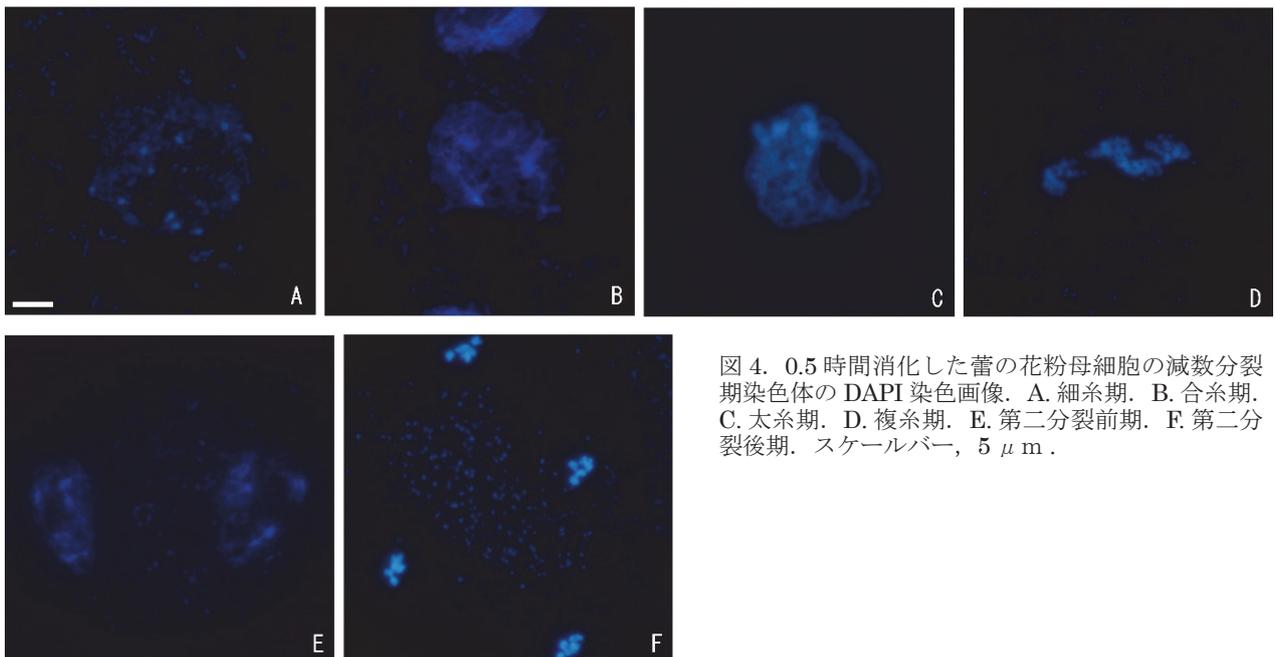


図 4. 0.5 時間消化した蕾の花粉母細胞の減数分裂期染色体の DAPI 染色画像. A. 細糸期. B. 合糸期. C. 太糸期. D. 複糸期. E. 第二分裂前期. F. 第二分裂後期. スケールバー, 5  $\mu$ m.

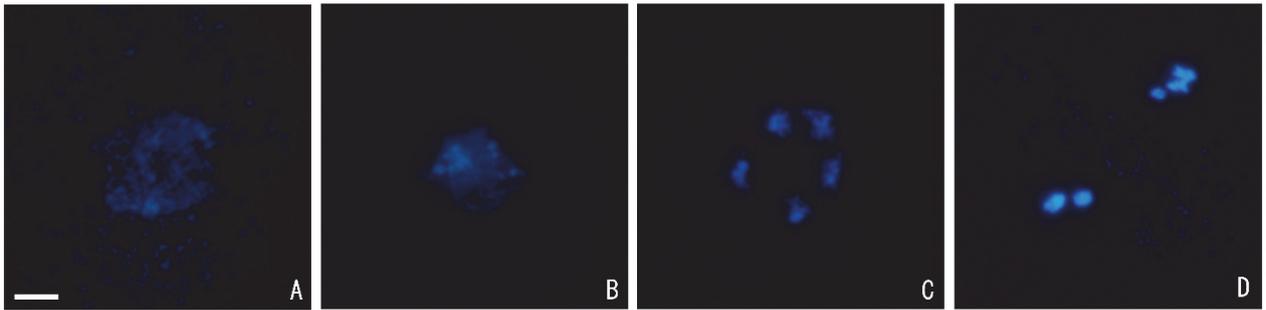


図 5. 4 時間消化した蕾の花粉母細胞の減数分裂期染色体の DAPI 染色画像. A. 細糸期. B. 合糸期. C. 移動期. D. 第二分裂中期. スケールバー, 5  $\mu\text{m}$ .

示すように、上記の 0.5 h、4h、14h 処理後のどの薬も処理前の形状を保っていた。植物の地上部の表皮細胞の外側にはクチクラ層が形成されるので、薬の表面もクチクラ層に覆われていると考えられ、これらの酵素ではクチクラは消化されなかったと考えられる。そのため薬の外見は維持されたものと思わ

れる。それぞれの処理後、薬をスライドガラス上でつぶして細胞を顕微鏡で観察したところ、図 3 のように様々な程度に細胞壁が消化された花粉母細胞が観察された。酵素処理によって、全ての花粉母細胞が壊れてしまうことが、最悪の結果であるが、どの処理においても、壊れてしまった花粉母細胞もあつ

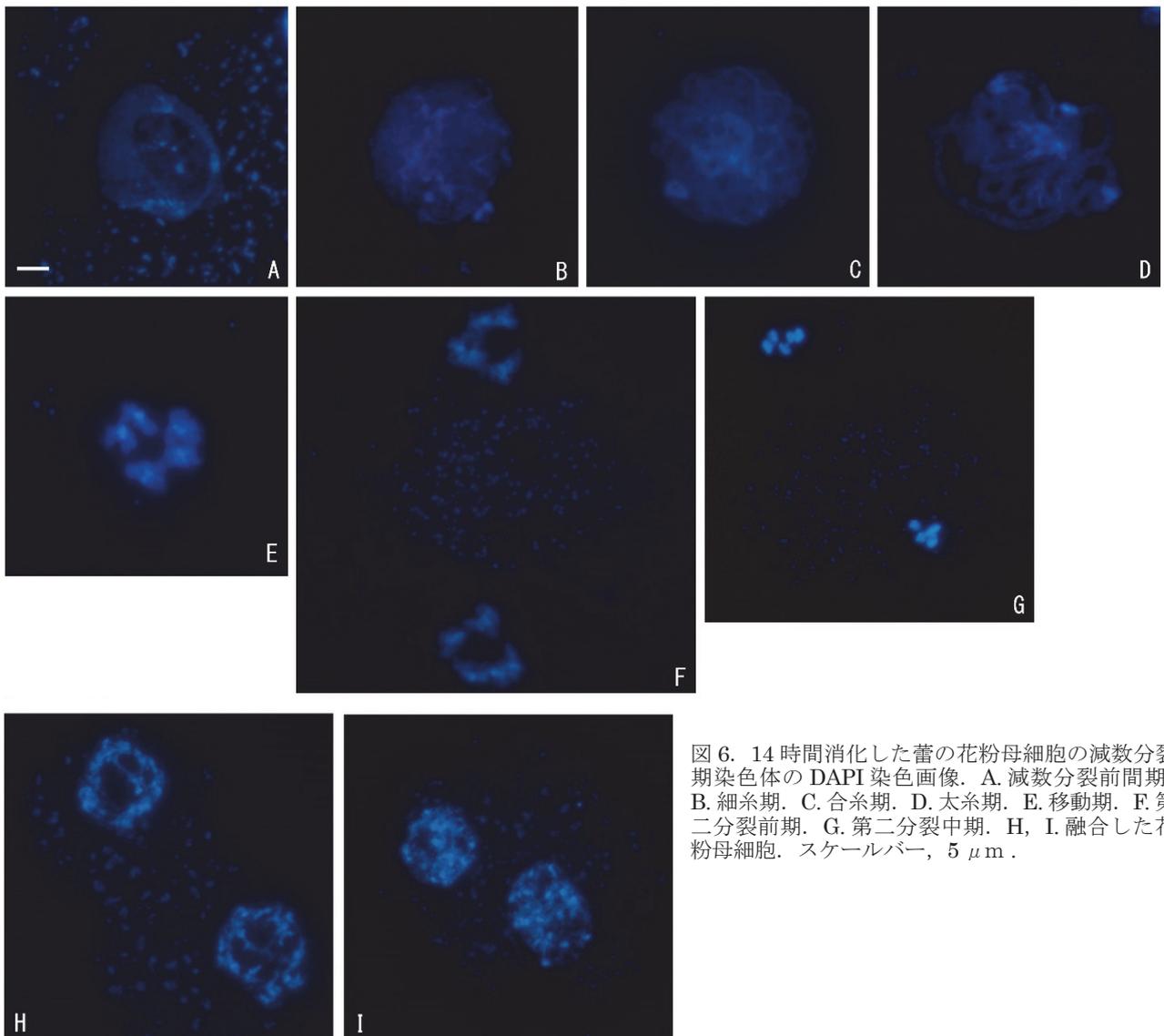


図 6. 14 時間消化した蕾の花粉母細胞の減数分裂期染色体の DAPI 染色画像. A. 減数分裂前間期. B. 細糸期. C. 合糸期. D. 太糸期. E. 移動期. F. 第二分裂前期. G. 第二分裂中期. H, I. 融合した花粉母細胞. スケールバー, 5  $\mu\text{m}$ .

たかも知れないが、壊れていない花粉母細胞が多数見られたので、これらの条件で消化を行い、染色体を観察することにした。

消化後の薬をスライドガラス上で破壊し、花粉母細胞をスライドガラスに貼り付け、DAPI 染色して、染色体の観察を行った。0.5 h、4 h、14 h 処理のどの処理においても、減数第一分裂から第二分裂の様々なステージの染色体が鮮明に観察された。このことから、3つのすべての処理において適度に細胞壁が消化された花粉母細胞が存在したことがわかる(図4、5、6)。0.5 h 処理では、一枚のスライドガラスに比較的多数の細胞が観察されたが、14 h 処理のスライドガラスでは観察された細胞の数は比較的少数であった。すべての処理において1枚のスライドガラスに幅広いステージの花粉母細胞が観察された。また、どの処理でも鮮明な減数分裂期染色体を観察することができたが、染色体は凝縮の程度が低く、弛緩しているような印象であった。14h 処理のものでは、融合しているように思われる細胞が散見された(図6 H、I)。長時間処理すると細胞膜が露出した細胞同士の融合が起こるものと思われる。

## 討論

減数分裂期染色体の構造・要素を知るため、できるだけ生細胞中の状態を維持した染色体を調製する方法の開発を試みた。細胞膜を壊さずに細胞壁を消化して、プロトプラストに近い状態にして、固定と同時に染色体をスライドガラスに貼り付ける方法の開発を行った。セルラーゼ RS、ヘミセルラーゼ、ペクトリアーゼを使用することで花粉母細胞の細胞壁を十分消化することができ、減数分裂期染色体を観察できることが明らかになった。観察された染色体は、固定してから消化する Ross らの方法で観察されたものと比べると、やや弛緩している印象があった。対合している相同染色体も少し距離があるように思えた。先に固定する方法では、通常、ファーナー液で1晩固定するのにに対し、本研究の方法では固定は数分程度で終わる。固定時間の差が染色体像に現れたのかも知れない。長時間の固定は過度の凝縮を引き起こすのかも知れないし、短時間の固定は不十分であるかも知れない。短時間の固定と長時間の固定と、どちらがより良く生細胞での状態を反映しているかは、さらなる検討を要する。

観察される細胞の数は、スライド毎に違いはあったが、固定してから細胞壁を消化する方法と比べると少ない印象であった。これは、スライドガラスに付着する細胞は細胞壁を除かれたもので、消化後固定法では蕾ごとに薬に侵入する酵素の量に違いがあ

り、その量によって、多くがプロトプラスト化する蕾もあればそうでない蕾もあり、貼りつく花粉母細胞の数にばらつきがでると考えられる。酵素はクチクラ層を通過できないため、気孔や何らかの原因でできた傷口などから侵入すると考えられるが、侵入口の多寡によって違いが生じると推察される。

固定を先に行う方法では、比較的同じステージの花粉母細胞が1つのスライドガラスに観察されたが、本研究の消化後固定法では1枚のスライドガラス上に、つまり1つの蕾由来の試料に多くのステージの花粉母細胞が観察された。これは消化中もステージが進行するが、消化処理によって様々なステージで進行が停止したためではないかと考えられる。さらに、長時間の消化を行うと、細胞融合が起こったのではないと思われる多核の細胞も見られた。

これらのことを総合すると、短時間高濃度で処理した方が生細胞の状態に近く、ステージが揃った試料を得やすいと考えられる。観察される細胞の数は固定を先に行う方法と比べると少ないかも知れないが必要な数の細胞は十分観察することができた。本研究では固定にファーナー液を使用した。パラフォルムアルデヒドなどを用いた固定を行えば、観察したいターゲットによっては、より良い結果が得られる可能性がある。RNA の分解の程度を調べる必要があるが、DNA や RNA を主たる観察対象とする場合は本研究に使用した方法は非常に適していると考えられる。

## 謝辞

本論文の一部は、2018年度神奈川大学総合理学研究共同研究助成(RIIS201806)を受けて行われた。記して感謝する。

## 文献

- 1) Moses MJ (1958) The relation between the axial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a salamander (*Plethodon cinereus*). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 633-638.
- 2) Zickler D (1973) Fine structure of chromosome pairing in ten Ascomycetes: meiotic and premeiotic (mitotic) synaptonemal complexes. *Chromosoma* 40: 401-416.
- 3) Albini SM, Jones GH and Wallace BM (1984) A method for preparing two-dimensional surface-spreads of synaptonemal complexes from plant meiocytes for light and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 152: 280-285.
- 4) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* 4: 507-516.
- 5) Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001) AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic

- recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589-600.
- 6) Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* **21**: 3081-3095.
  - 7) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**: 206-216.
  - 8) Bai X, Peirson BN, Dong F, Xue C and Makaroff CA (1999) Isolation and characterization of SYN1, a RAD21-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant cell* **11**: 417-430.
  - 9) Higgins JD, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Jones GH and Franklin FC (2005) The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev.* **19**: 2488-2500.
  - 10) Zhang B, Xu M, Bian S, Hou L, Tang D, Li Y, Gu M, Cheng Z and Yu H (2015) Global Identification of Genes Specific for Rice Meiosis. *PLoS One* **10**: e0137399.
  - 11) Ding DQ1, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M and Hiraoka Y (2012) Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science* **336**: 732-736.
  - 12) Komiya R1, Ohyanagi H, Niihama M, Watanabe T, Nakano M, Kurata N and Nonomura K. (2014) Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J.* **78**: 385-397.
  - 13) Xia R, Chen C, Pokhrel S, Ma W, Huang K, Patel P, Wang F, Xu J, Liu Z, Li J and Meyers BC (2019) 24-nt reproductive phasiRNAs are broadly present in angiosperms. *Nat. Commun.* **10**: 627.
  - 14) 安積良隆, 笹本浜子 (2017) 高等植物の花粉母細胞のプロトプラスト化と染色体観察に関する研究. *神奈川大学理学誌* **28**: 85-92.