

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## ソメイヨシノの花粉母細胞の減数分裂期染色体の顕微鏡観察

安積良隆<sup>1,2,4</sup> 早津 学<sup>3</sup>

### Microscopic Observation of Pollen Mother Cell Chromosomes at Meiosis of Flowering Cherry 'Somei-yoshino'

Yoshitaka Azumi<sup>1,2,4</sup> and Manabu Hayatsu<sup>3</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> Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata City, Niigata 951-8510, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Flowering cherry 'Somei-yoshino' was obtained as a hybrid between 'Edo-higan' and 'Ohshima-sakura' about 150 years ago, and since then it has been a very popular plant in Japan. In addition to cherry-blossom viewing, Somei-yoshino trees contribute foodstuffs, fuel, smoking material, etc. Because of its popularity and resource value, a wide variety of biological analyses of this tree have been conducted. Regarding its chromosome organization, the chromosome number and genome DNA sequence have already been determined. However, meiotic chromosome behavior in their meiocytes with two genomes of different species remains to be revealed. In this research, we collected and enzymatically digested their buds, and spread chromosomes on glass slides. The chromosomes were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and we observed them using a fluorescent microscope. As the results of observation of the pollen mother cells at meiosis, we found totally paired chromosomes at pachytene and eight bivalents at metaphase I, suggesting that homeologous chromosomes paired normally in Somei-yoshino meiocytes after about 5.5 million years of independent evolution.

**Keywords:** Somei-yoshino, meiosis, chromosome, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

## 序論

日本のサクラの野生種は、2018年に報告されたクマノサクラを含めて10又は11種類が認められている<sup>1,2)</sup>。これらの変異種である自生種が約100種、日本国内に生育している。これ以外に、交配によって作成された栽培種が200種以上知られている。日本ではサクラは非常に人気の高い樹木である。観賞用、あるいは食材、燻製の燻材などの用途のために里山や公園など、あちこちに植えられる。ソメイヨシノ（染井吉野、学名 *Cerasus × yedoensis* (Matsum.) Masam. et Suzuki 'Somei-yoshino') は母株をエドヒガン（江戸彼岸、*Cerasus itosakura* (Sieb.) Masam. & Suzuki f. *ascendens* (Makino) H. Ohba & H. Ikeda)、父株をオオシマザクラ（大島

桜、*Cerasus speciosa* (Koidz.) H. Ohba, 1992) とする交配によって作出された栽培品種である。江戸時代末期から明治時代初期にかけて、現在の東京都豊島区にあった染井村で育成されたと考えられている。現在、日本及び諸外国でソメイヨシノとして植栽されているサクラは、この交配によって作成されたソメイヨシノが原木で、これから接ぎ木や挿し木で殖やされたクローンであることが判明している<sup>3)</sup>。

サクラではその有効性のため、細胞生物学的な研究が数多く行われている。細胞分裂には体細胞分裂と減数分裂があるが、体細胞分裂の解析から、ソメイヨシノの染色体数は  $2n=16$  であることが明らかにされている<sup>4)</sup>。また、ソメイヨシノ以外の200種余



図1. 本研究で用いたソメイヨシノ. 2021年3月31日に撮影したもの.

りのサクラの染色体数も調べられている<sup>9)</sup>. さらに、ソメイヨシノのゲノムDNAの塩基配列も解読されている<sup>9)</sup>. 減数分裂は減数第一分裂前期、中期、後期、終期、減数第二分裂前期、中期、後期、終期、四分子期に分けられ、さらに減数第一分裂前期は、細糸期、合糸期、太糸期、複糸期、移動期に分けられる。合糸期には相同染色体が対合し始め、太糸期には相同染色体がシナプトネマ複合体を介して全長にわたって対合するのが通常の2倍体で見られる現象である。ソメイヨシノではエドヒガンの染色体とオオシマザクラの染色体の、同祖関係にある染色体が対合することになる。これまでのところ、ソメイヨシノで減数分裂期の各ステージの染色体の様子が観察されたことはない。本研究では、ソメイヨシノの花粉母細胞における減数分裂期染色体の観察法を検討し、細胞壁を消化後に蛍光染色する方法で染色体の観察に成功したので、それについて報告する。

## 材料と方法

### 材料の調製

ソメイヨシノは神奈川県湘南ひらつかキャンパスの陸上競技場南東に植栽されたものを使用した(図1)。2021年3月3日、6日、10日、15日、20日に図2Aに示すような花枝(本研究では多くの花序をつけている短枝を花枝と呼ぶ)を切り取り、実験室に持ち帰った。花枝から通常、4、5個付いている花序を切り離して、実体顕微鏡下で花序の先端から3分の1のところと3分の2のところを剃刀で輪切りにし、その中央部分からピンセットで花芽(蕾)を取り出した(図3)。花芽をファーナー液(75%エタノール、25%酢酸)中に移し、室温で一晩固定した。その後はファーナー液中 $-15^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 染色体標本の作製

固定された花芽を超純水(Milli-Q水)中に移し、15

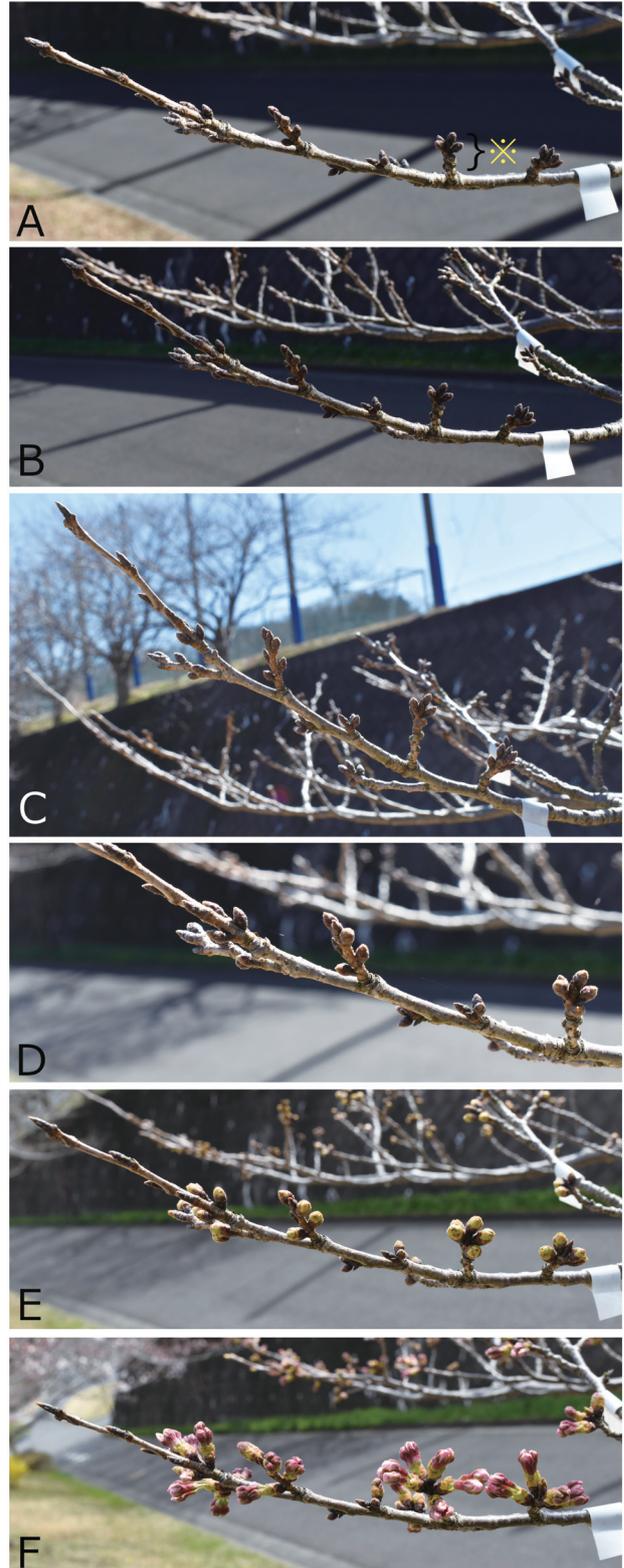


図2. 図1とは別のソメイヨシノの花芽の開花までの様子. A. 2021年2月16日. B. 2月25日. C. 3月3日. D. 3月10日. E. 3月20日. F. 3月26日. ※のような花序をつけた花枝を切り取って実験に用いた.

分間静置して、固定液を洗浄した。もう一度、超純水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)の溶液中に移し、15分間静置した。もう一度、新たな

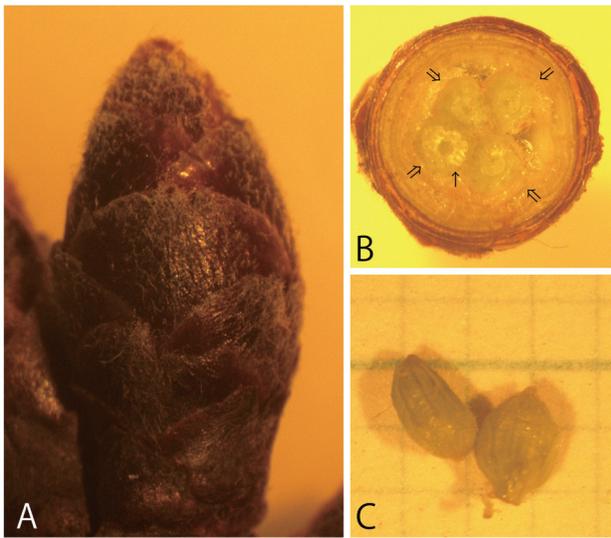


図3. 花芽の取り出し過程。A. 2021年3月3日に切りとった花枝の花序の1つ。B. 花序を中央付近で輪切りにしたもの。この花序には4つの花芽が含まれていた。4つの⇒は4つの花芽を指す。→は花芽の中の葯の一つを指している。C. 同じ花枝の別の花序から取り出した花芽。

クエン酸緩衝液に15分間静置した後、花芽を酵素液(0.4%セルラーゼ”onozuka”RS (YAKULT)、ペクトリアーゼ Y23 (協和化成)、サイトヘリカーゼ (Sigma)、800 u/mL  $\beta$ -グルクロニダーゼ (FUJIFILM)) 中に移した。15分間の脱気を2度行った後、37°Cに2時間静置した。この後、15分間の脱気と37°Cで2時間静置を2回繰り返した。酵素液をクエン酸緩衝液に置換し、15分間静置した。さらに新しいクエン酸緩衝液中に15分間静置したのち、もう一度新しいクエン酸緩衝液に置換し、冷蔵庫で保存した。

消化された花芽の1つをスライドガラス上の30  $\mu$ Lの60%酢酸中に移し、実体顕微鏡下で解体し、雄蕊をがく片、花弁、雌蕊から分離し、雄蕊以外の部分を60%酢酸ごと、キムワイプで拭き取った。20  $\mu$ Lの60%酢酸をもう一度滴下し、葯をつぶして花粉母細胞を放出させた。45°Cのホットプレート上に1分間保温した後、氷冷したファーナー液をスライドガラス上の試料を囲むように滴下して、細胞をスライドガラスに付着させ、ファーナー液をキムタオル上に捨てた後、スライドガラスをスライドガラス立てに立てかけて室温で風乾させた。7  $\mu$ Lの1.5  $\mu$ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, VECTOR) を滴下し、カバーガラスをかけた後、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX60) を用いて観察した。デジタルカメラ (オリンパス DP80) で画像を取得し、Photoshop CC2018 (Adobe) で作図を行った。

## 結果

### ソメイヨシノの減数分裂の時期

図1に示すソメイヨシノから2021年3月3日、6日、10日、15日、20日に花枝(図2A)を切り取って採集し、花芽(蕾)の固定を行った。2021年の場合、3月中旬まで花序は鱗片に包まれていたが(図2A-D)、3月20日ごろ花序が開き始め(図2E)、3月26日ごろ、それぞれの花序から多くの場合3つ、あるいは4つの花が開き始めた(図2F)。それぞれの日に採集した花枝から花序(図3A)を切り離し、輪切りにして(図3B)、中から花芽を取り出した(図3C)。3月3日に採集したものでは、花芽の軸方向の大きさは1.2~1.8 mmで、平均1.49 mmであった。実体顕微鏡での観察では葯は未熟な状態であった。3月6日のものでは、花芽の大きさは1.8~2.5 mmで、平均2.00 mmであった。3月10日のものでは、花芽の大きさは2.0~2.5 mmで平均2.34 mmであった。3月15日の花芽は、花序を切断した時に花芽の一部を切ってしまうため、大きさの測定はできなかった。葯は黄色身を帯びており、すでに花粉ができていたことが予想された。

消化した細胞を観察すると、3月3日のものでは、減数分裂前間期の核(図4A, B)が非常に多く観察され、ごく一部に減数第一分裂(第一分裂)前期の細糸期、合糸期、太糸期、複糸期の染色体(図4C-J)が観察された。3月6日のものでは、減数分裂前間期の核も見られたが、第一分裂前期の細糸期、合糸期、太糸期、複糸期、移動期、第一分裂中期、後期、終期の染色体が多く観察された(図5A-E)。3月10日のものでは、減数分裂前間期の核はほとんど観察されなかった。稀に合糸期の染色体や花粉も観察されたが、第一分裂中期から減数第二分裂(第二分裂)終期の染色体が中心であった。3月15日のものでは、ごく稀に第一分裂後期や第二分裂前期の染色体も観察されたが、ほとんど全て花粉となっていた。

### 花粉母細胞の減数分裂期染色体

サクラは1つの花に30以上の雄蕊を有するためか、1つの蕾からの1枚のスライド標本をつくるが、ソメイヨシノの場合、1枚のスライド標本中に非常に多くの花粉母細胞とタペート細胞が観察された。そのため、おそらくサクラは全般に、花粉母細胞の減数分裂期染色体の観察は、時期さえ分かれば、比較的容易と言える。また、消化に関しては、もっと良い組合せがあるかも知れないが、今回用いた消化酵素の組合せで良好な結果が得られた。減数分裂前間期の花粉母細胞の核では、染色体は網目状に観

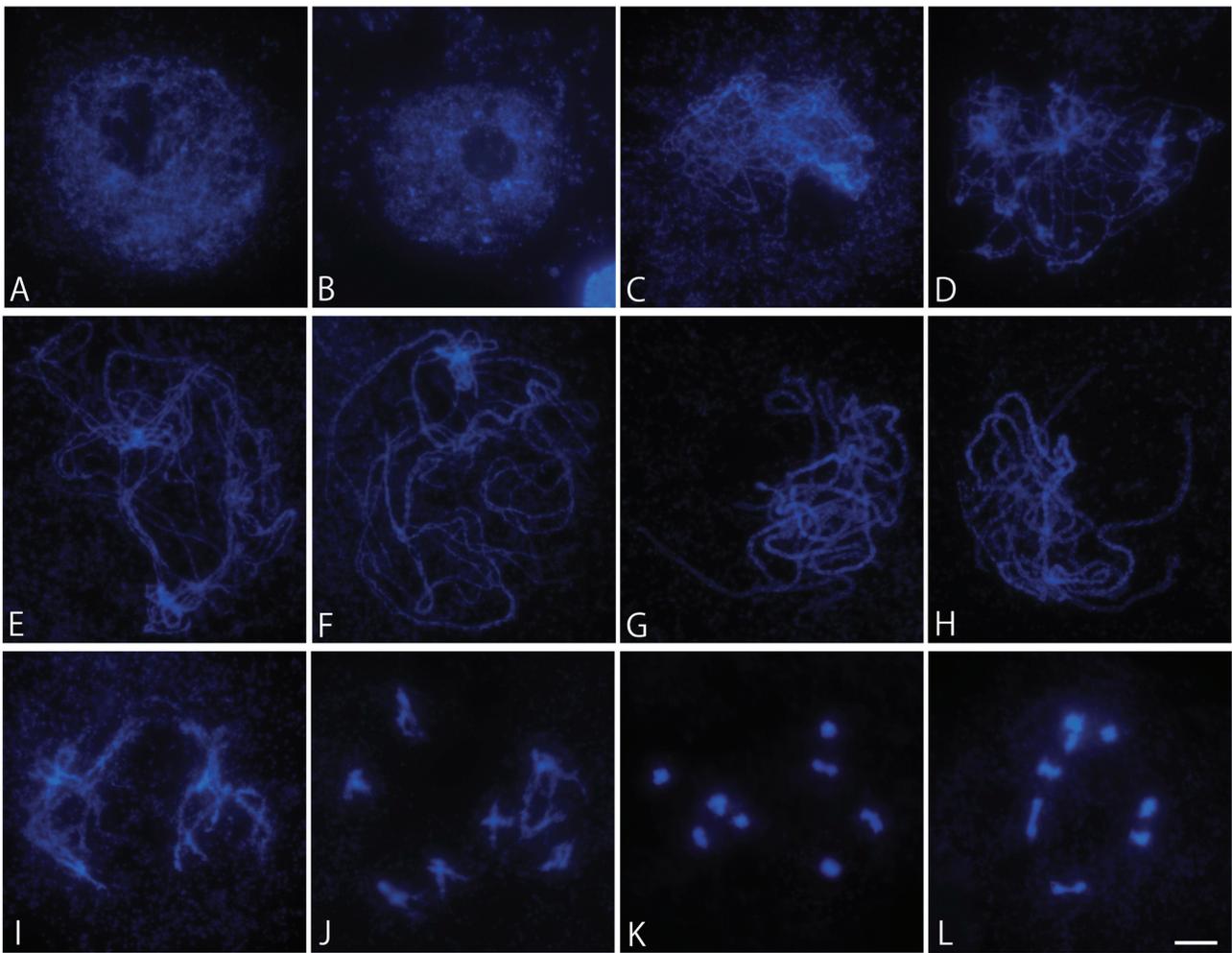


図4. 花粉母細胞の減数分裂前中期の核と減数第一分裂前期の染色体. A, B. 減数分裂前中期の核. C, D. 細糸期. E, F. 合糸期. G, H. 太糸期. I, J. 複糸期. K, L. 移動期. スケールバー, 5  $\mu\text{m}$ .

察された。通常1つの核に1つの核小体と思われる、染色体が存在しない領域が観察された（図4A, B）。花粉母細胞は花芽を構成する他の細胞と比べると大きな核を有しているが、ソメイヨシノの場合、花粉母細胞を取り囲むタペート細胞も大きな核を有しており、識別に注意が必要であった。図4C, Dのような細い糸状の染色体が観察されるものは細糸期と判断した。部分的に染色体が対合しているものは合糸期と判断した（図4E, F）。染色体の片方の末端からもう一方の末端まで全体で対合している染色体が見られるものは太糸期と判断した（図4G, H）。部分的に不對合を起こしているような領域は観察されなかった。対を成しながら凝縮している様子が観察されたものは複糸期と判断した（図4I, J）。8つの凝縮した二価染色体が分散して観察されるものを移動期と判断した（図4K, L）。8つの二価染色体が反対方向に引っ張られながら、ほぼ中央辺りに帯状に並んでいるものは第一分裂中期と判断した（図5A, B）。太糸期から第一分裂中期までの間に相同染色体が離れてしまう異常は観察されなかった。8つ

ずつの染色体が反対方向に分かれていく様子が観察されるものは第一分裂後期と判断した（図5C, D）。もっと多くの染色体が個別に凝縮したり、中央付近に並んだり、分離しているものは、それぞれ体細胞分裂の前期、中期、後期と判断した。8つずつの染色体が紡錘体の極付近に移動し終えたものは第一分裂終期と判断した（図5E）。1つの細胞内に2つの核あるいは染色体グループがあるものを第二分裂前期と判断した（図5F, G, H）。8つ染色体を含む2つの染色体グループが集合しているものを第二分裂中期と判断した（図5I, J）。それぞれの染色体グループで染色体が姉妹染色体に分離し、移動している途中のものを第二分裂後期と判断した（図5K, L）。細胞内の4カ所で、染色体が脱凝縮して核を形成しつつあるものを第二分裂終期と判断した（図5M）。他にも、1つの細胞壁の中に4つの花粉小胞子が含まれる四分子期のものや、その小胞子が放出されて花粉へと成熟段階にあるものなどが観察された。

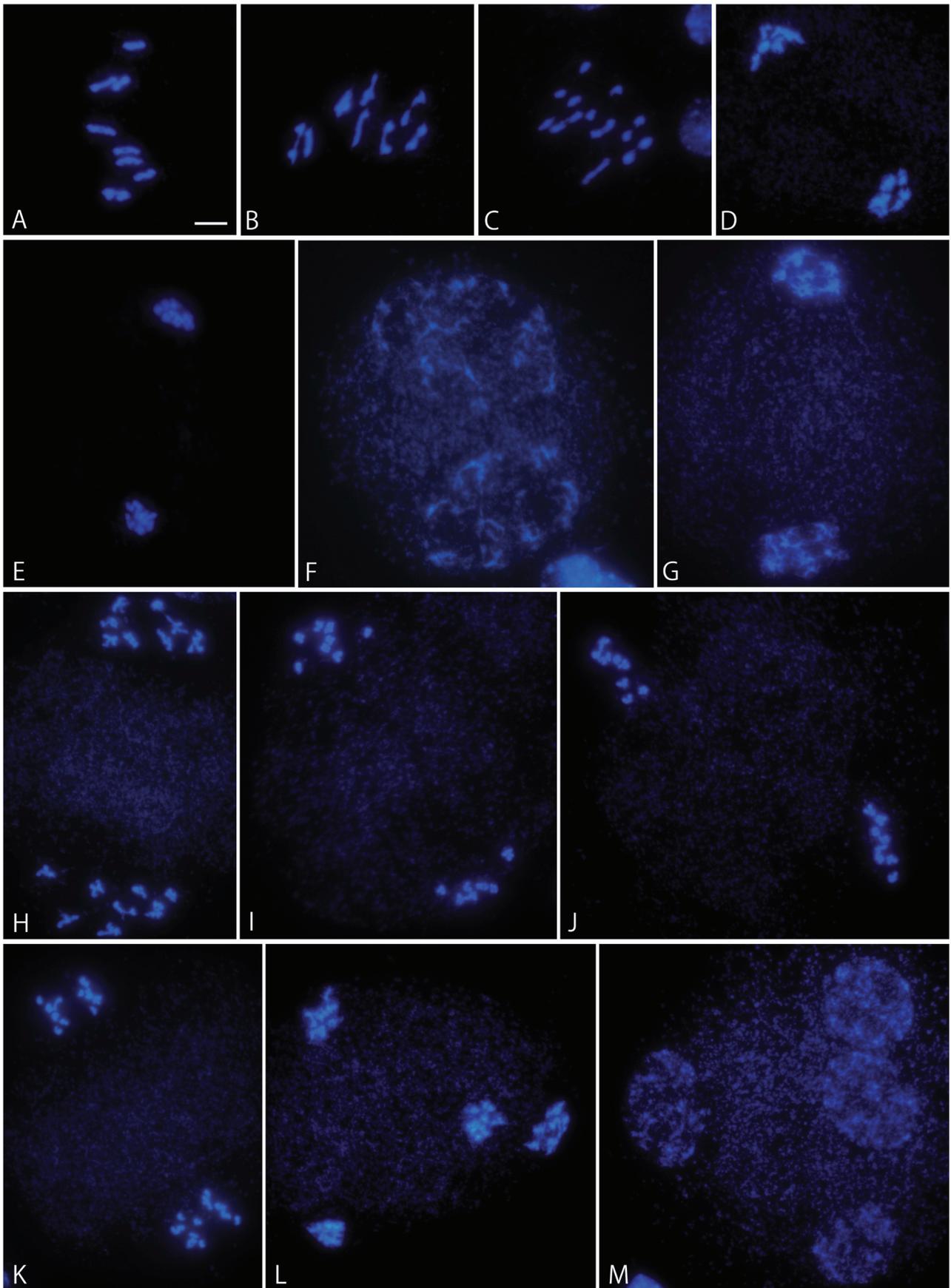


図 5. 花粉母細胞の減数第一分裂中期から減数第二分裂終期の花粉母細胞の染色体. A, B. 第一分裂中期. C, D. 第一分裂後期. E. 第一分裂終期. F, G, H. 第二分裂前期. I, J. 第二分裂中期. K. 第二分裂後期. L, M. 第二分裂終期. スケールバー, 5  $\mu$ m.

## 討論

試料採集日とその花芽で起きている減数分裂の時期をまとめると表1のようになった。3月3日に採集した花枝の花芽の葯では、減数分裂前間期の細胞が多くみられ、3月6日の花芽の葯では主に第一分裂期の花粉母細胞が見られた。3月10日のものでは第二分裂の細胞が多く、3月15日のものでは花粉ばかりが観察された。これらの観察から、2021年の神奈川県平塚市近辺のソメイヨシノでは3月6日から10日ぐらいの間に花粉母細胞の減数分裂が盛んに行われていたと考えられる。3月20日頃に開花していたので、開花の2週間以上前から減数分裂は開始しているものもあると思われる。さらなる検証が必要であるが、花粉母細胞の減数分裂を観察する場合は、開花予想日の2週間以上前から試料採集を始めることが必要と考えられる。天候などの関係で、開花予想日にずれが生じる可能性も考えられるので、ソメイヨシノの場合、3月1日ぐらいから3月15日ぐらいの間に、2日ないし3日おき程度で試料を採集すれば、減数分裂を詳しく観察できると予想される。

花芽の大きさと減数分裂のステージの関係では、花芽の大きさが1.4 mm以下では、ほとんどの花粉母細胞は減数分裂前間期であった。1.5～1.9 mmのものでは、減数分裂前間期のものから複糸期のものが主に観察された。2.0～2.5 mmのものでは太糸期から減数第二分裂終期までの様々なステージの染色体を観察することができた。1つの花芽由来のスライド標本で様々なステージの花粉母細胞が観察されたので、一つの花芽の中にある30以上の雄蕊の間では減数分裂の進み具合には差があるものと推測される。しかし、同じ雄蕊由来と思われる密集した花粉母細胞では同じステージのものが見られたので、葯内では同調性は高いと考えられる。

連鎖地図による解析からもっと複雑な過程をたどったのではないかという説もあるが<sup>7)</sup>、ソメイヨシノは約150年前に、母株エドヒガンと父株オオシマザクラの交雑種として誕生したとされる。その際に、エドヒガンのゲノムとオオシマザクラのゲノムが受精を通じて融合してソメイヨシノの細胞核が形成された。エドヒガンのゲノムとオオシマザクラのゲノムは約550万年前に種分化を起こしたことが示されており<sup>8)</sup>、ゲノムを構成するDNAの塩基配列は、550万年分の変異を蓄積していたはずである。交雑時、エドヒガンとオオシマザクラの対応する染色体同士は相同染色体ではなく、同祖染色体の関係にあったといえる。ソメイヨシノは誕生時に、これらの同祖関係の染色体を1つの核内に持ったわけであるが、それ以来ソメイヨシノは接ぎ木などの無性生殖で殖

表1. 各試料採集日の花芽の大きさと、その中で観察されるステージ

	花芽の大きさ		観察されるステージ	
	範囲	平均	範囲	多く見られるステージ
3月3日	1.2～1.8	1.49	減数分裂前間期～複糸期	減数分裂前間期
3月6日	1.8～2.5	2.00	減数分裂前間期～第一分裂終期	細糸期～太糸期
3月10日	2.0～2.5	2.34	合糸期～第二分裂終期	第一分裂中期～第二分裂終期

花芽の大きさの単位は範囲も平均も mm である。

やされてきたので、現存しているソメイヨシノの細胞は体細胞分裂のみ行っており、減数分裂は経験していない。6倍体コムギのように3つの同祖関係のゲノムが核内に存在する場合、減数分裂時に同祖染色体間では対合は起こらず、相同染色体間でのみ対合が起きる。同祖染色体間の対合を抑制する遺伝子も報告されており<sup>9)</sup>、異質倍数体では同祖染色体間対合を防ぐしくみがあるのかも知れない。本研究のソメイヨシノの減数分裂期染色体の観察では、対合に異常は見られなかったので、ソメイヨシノのようなサクラの雑種では同祖染色体の対合を排除するしくみは働いていないのかも知れない。ソメイヨシノでは少なくとも花粉母細胞での減数分裂は正常に進行し、形態的には問題のない花粉が形成されているようであった。胚嚢母細胞での減数分裂がどのように進行しているかは今回の研究では調べていない。約550万年の間、別々に進化した同祖染色体が、およそ150年前にソメイヨシノの細胞の中で同居することになりながら、それ以来、対合することのない体細胞分裂だけを経験していても、毎年、雄蕊の中で花粉母細胞が分化し減数分裂が起きた時、同祖関係にある染色体が正確に対合することは非常に興味深い。この対合のしやすさがサクラで雑種ができやすい理由の一つかも知れない。他のオオシマザクラとエドヒガンの交配種や、他のサクラの交配種についても減数分裂の様子を調べてみたい。

## 謝辞

本研究は、研究課題「高等植物の減数分裂期染色体の電子顕微鏡等を用いた形態解析」に対する2020年度神奈川県総合理学研究所共同研究助成(RIIS202005)を受けて行いました。ここに謝意を表します。

## 文献

- 1) Katsuki T (2017) Taxonomy and identification by

- morphology for Japanese flowering cherries. *Tree and Forest Health* **21**: 93-104.
- 2) Katsuki T (2018) A New species, *Cerasus kumanoensis* from the Southern Kii Peninsula, Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* **69**: 119-133.
  - 3) Innan H, Terauchi R, Miyashita NT and Tsunewaki K (1995) DNA fingerprinting study on the intraspecific variation and the origin of *Prunus yedoensis* (Someiyoshino). *Jpn. J. Gene.* **70**: 185-196.
  - 4) Oginuma K and Tanaka R (1976) Karyomorphological studies on some cherry trees in Japan. *J. Jpn. Bot.* **51**: 104-109.
  - 5) Iwatsubo Y, Kawasaki T and Naruhashi N (2002) Chromosome numbers of 193 cultivated taxa of *Prunus* subg. *Cerasus* in Japan. *Journal of Phytogeography and Taxonomy* **50**: 21-34.
  - 6) Shirasawa K, Esumi T, Hirakawa H, Tanaka H, Itai A, Ghelfi A, Nagasaki H and Isobe S (2019) Phased genome sequence of an interspecific hybrid flowering cherry, 'Somei-Yoshino' (*Cerasus yedoensis*). *DNA Res.* **26**: 379-389.
  - 7) 鶴田燃海, 王 成, 加藤珠理, 向井 譲 (2017) 連鎖地図を利用した染色体ごとの解析による '染井吉野' の起源推定の試み. *日林誌* **99**: 210-214.
  - 8) Gill KS, Gill BS, Endo TR and Mukai Y (1993) Fine physical mapping of Ph1, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics* **134**: 1231-1236.