

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 減数分裂期染色体ライブ観察用のシロイヌナズナ形質転換体の作成とその染色体の動態解析

小柴雅史<sup>1</sup> 落合 優<sup>1</sup> 本村和佳奈<sup>1</sup> 小林 達<sup>1</sup> 古賀皓之<sup>2</sup> 安積良隆<sup>1,3</sup>

Construction of *Arabidopsis* Transformants for Live Cell-imaging of Meiotic Chromosomes and Analysis of their Dynamics

Masashi Koshihara<sup>1</sup>, Yu Ochiai<sup>1</sup>, Wakana Motomura<sup>1</sup>, Taduru Kobayashi<sup>1</sup>  
Hiroyuki Koga<sup>2</sup> and Yoshitaka Azumi<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>3</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

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

**Abstract:** Previously, we developed a line of *Arabidopsis thaliana* transformant for live cell-imaging of meiotic chromosomes by introducing the fusion gene of the histone H2B gene and GFP gene under the control of the *AtDMC1* promoter (DHG). Using a transformant (DHG1 line), we were able to observe meiotic chromosomes in living pollen mother cells (PMCs). In the DHG1 line, the fusion gene was transferred into chromosome 3, and DHG expression was not specific to PMCs, but also observed in also other cells constituting its anther. We need more DHG lines, which are transferred DHG gene into chromosomes other than chromosome 3, and show more PMC-specific expression. We introduced DHG into *A. thaliana* again, and obtained new DHG lines as survivors on selective media. Some lines were actually confirmed to be transformants by PCR analysis for the GFP gene. Three lines were further examined using confocal scanning laser microscopy, and meiotic chromosomes in several stages were clearly observed in their PMCs.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), meiosis, chromosome, green fluorescent protein (GFP), live cell-imaging

### 序論

有性生殖を行う生物の細胞は通常、核内に2組の染色体を有する。これは母方由来の1組の染色体と父方由来の1組の染色体が合わさったものである。この2組の染色体を1組に半減させる減数分裂は、有性生殖生物が半数体である配偶子を生み出すのに必須の過程である。生物種はそれぞれ固有のゲノムを有するが、それは正確に保持されなければならない。染色体数を半減する時に染色体が1本でも過剰であったり不足したりしてはならない。ヒトでは一番小さな染色体である21番染色体が1本余分にあるだけでダウン症が発症することが知られて

いる。減数分裂はそれぞれ前期、中期、後期、終期からなる減数第一分裂と減数第二分裂から構成されるが、染色体数の半減は減数第一分裂の前期に起こる。機構的に染色体の正確な半減を可能にしているのが相同染色体の対合である。全ての相同染色体同士を一度対合させて、それぞれの対に含まれる相同染色体を2つの異なる極に向かって引き離すことで正確に1組の染色体を有する染色体集団が2つできあがる。この時の一番の課題はどのようにして相同染色体同士はお互いを見つけ出し、対をつくるかである。この現象を解析するために多くの研究が行わ

れてきた。古い研究では減数分裂期の染色体の顕微鏡観察が主たるものであったが、分子遺伝学手法の発達により、酵母菌やマウスなどの様々な生物で相同染色体の分配到異常が生じる変異体が数多く単離され、その多くは原因遺伝子も突き止められている。植物でもゲノムが小さなことでシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がモデル生物に選定されて以来、*Atspo11-1*<sup>1)</sup>、*Atspo11-2*<sup>2)</sup>、*solo dancers*<sup>3)</sup> などの多くの減数分裂変異体が単離・解析されている。シロイヌナズナでは古くから減数分裂期染色体の顕微鏡観察が行われていたが<sup>4)</sup>、減数分裂期染色体の光学顕微鏡による精細かつ簡便な観察法が開発されて以来<sup>5)</sup>、この方法は減数分裂変異体の解析に盛んに活用されている。その結果、これらの変異体では原因遺伝子が同定され、その遺伝子が減数分裂期の染色体の形態変化や動態にどのように関わっているかが解明されつつある。しかし、これらの研究では染色体の形態変化・動態は固定された試料を用いて行われてきた。そのため、相同染色体がどのように接近していくかなどの実態は不明であった。近年、シロイヌナズナの生きている花粉母細胞での減数分裂期染色体の観察結果が報告された<sup>6,7)</sup>。我々は先の研究で、減数分裂時に発現する *AtDMC1* 遺伝子の発現調節領域 (pAtDMC1) とヒストン H2B 遺伝子 (H2B) と緑色蛍光蛋白質の遺伝子 (GFP) とを連結して作製した融合遺伝子 (DHG) をシロイヌナズナに導入して、花粉母細胞の減数分裂時の染色体のライブ観察に成功している<sup>8)</sup>。これまでに得られている唯一の DHG 導入性質転換体はゲノム解析の結果、第3染色体に DHG が挿入されたものであることが判明している<sup>8)</sup>。これを我々は DHG1 系統と呼んでいる。DHG 形質転換体と減数分裂変異体とを交配することによって、減数分裂変異体の染色体を可視化することができるが、DHG1 系統の場合、第3染色体に原因遺伝子がある変異体に DHG 遺伝子を導入することは効率が良くないため、他の染色体に DHG 遺伝子が導入された系統を作出することにした。

## 材料と方法

### シロイヌナズナ形質転換体の作出

既報<sup>7)</sup>の通り、形質転換体の作出を行った。植物育成棟にて、野生型シロイヌナズナの種子を園芸用の土に播種し、3日間4℃に置いた後、肥料としてハイポネックスを与えながら、気温22℃、16時間明期・8時間暗期の光環境下で、5週間ほど栽培した。一度摘芯を行った後、Tiプラスミド中にDHG遺伝子を有するアグロバクテリウムを減圧浸潤法により感染させた。このシロイヌナズナから種子を採集し、

ハイグロマイシンとカナマイシンをそれぞれ50 µg・mL<sup>-1</sup>の濃度で含むムラシゲ・スクーグ培地で栽培・選抜した。選抜されたT1世代の植物から得られた種子を同じ組成の選抜培地で栽培し、得られた植物体を用いて、染色体の観察を行った。

### PCR解析

シロイヌナズナのゲノムDNAは葉からDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用して精製した。GFP遺伝子を増幅するPCRでは、このゲノムDNAを鋳型とし、GFP遺伝子増幅用のプライマーとして730 sGFP Fw Primer (AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG) と731 sGFP Rv Primer (GGTGTCTCTGCTGGTAGTGGTC) とを、酵素としてはPrimeSTAR Max DNA Polymerase (TAKARA BIO) を使用した。PCRプログラムとしては、94℃5分の後、94℃30秒、55℃30秒、72℃30秒のサイクルを30回行い、最後に72℃で10分間保温して、反応を終了した。

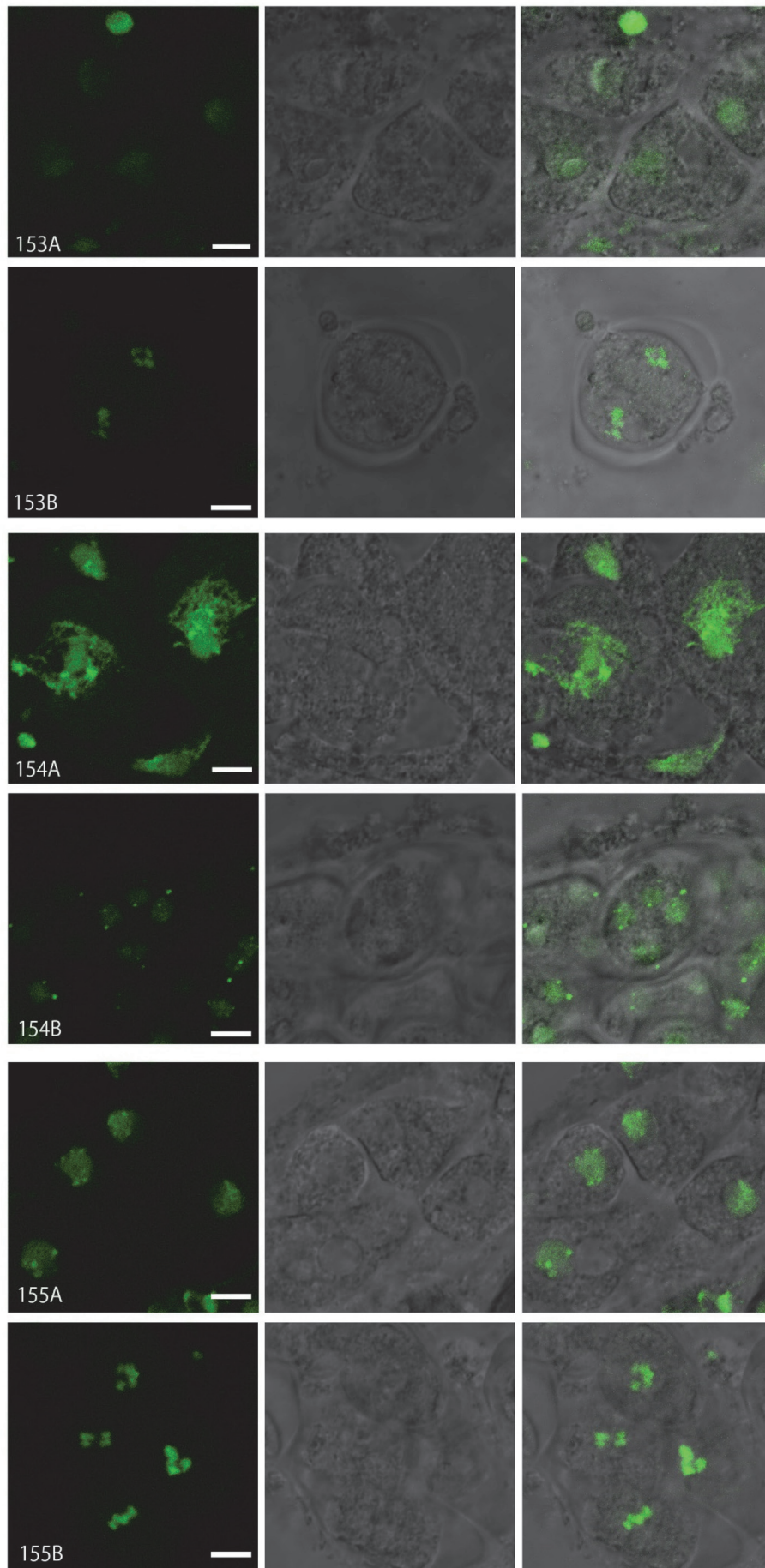
### 染色体の観察

選抜されたものの中からDHG遺伝子の存在が確認されたシロイヌナズナの花序を切り取り、実顕微鏡で観察しながら、花序から適当な大きさの蕾を取り出し、蕾からがくを取り除いた。残りの部分をスライドガラスに載せ、水道水を0.1 mL程度、蕾の周りに滴下した後、カバーガラスを被せ、ろ紙で挟み、転圧ゴムローラーを引くことで葯の中から花粉母細胞を押し出した(押し出し法)。GFPからの緑色蛍光は共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss LSM700)で取得し、PhotoshopとImage Jを用いて、作図を行った。

## 結果

### 遺伝子組換えシロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期染色体の観察

すでに報告した通り、DHG遺伝子が導入されたシロイヌナズナで減数分裂期染色体のライブ観察に成功している。その形質転換体系統(DHG1)ではDHG遺伝子は第三染色体に挿入されていた。これ以外の染色体にDHG遺伝子が導入された形質転換体の作成が望まれたため、新たに形質転換体の作成を行った。形質転換体を選抜する培地で、21の個体が生き残り、それらを土壌に移しかえて栽培した。生育した個体ごとに分けて種子を収集した。暫定的にDHG151からDHG171の系統名を与えた(DHG160は栽培中に枯死し、種子は得られなかった)。枯死した1個体以外は順調に成長し、現在、それらの種子(T2世代)が保存されている。枯死したもの以外は



栄養成長段階においても、生殖成長段階においても、肉眼で見る限り形態的異常は認められなかった。これらのうち、DHG151～158からゲノムDNAを調製し、GFP遺伝子に対するPCR解析を行ったところ、どれもGFP遺伝子を有することが判明した。これらの8つの個体から得られた種子から植物を育て、本研究では順調に成長した3つの系統の染色体観察の結果を報告する。

DHG153、154、155の3つの系統のT2世代で、それぞれ複数の植物体で観察を行った。いずれの個体でもFig.1が示すように、GFP融合ヒストンにより減数分裂期染色体が共焦点レーザー顕微鏡画像として明確に捕捉された。また、花粉母細胞から四分分子を経て花粉となるまでの過程において、顕微鏡観察的にも形態に異常は認められなかった。Fig.1の153Aでは細糸期、153Bでは第二分裂中期の染色体が観察されている。154Aでは複糸期、154Bでは四分分子期の染色体が観察されている。155Aでは細糸

Fig. 1. DHG 遺伝子導入シロイヌナズナ系統 DHG153, 154, 155 の花粉母細胞の染色体観察. 押し出し法により得られた各 DHG 系統の植物の花粉母細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した. 右端はヒストン H2B:GFP により可視化された染色体像. 中央は明視野観察による花粉母細胞像. 右端は染色体像と花粉母細胞像を重ねたもの. 153A, B: DHG153 系統の植物の花粉母細胞の観察像. A: 細糸期, B: 第二分裂中期. 154A, B: DHG154 系統の植物の花粉母細胞の観察像. A: 複糸期, B: 四分分子期. 155A, B: DHG155 系統の植物の花粉母細胞の観察像. A: 細糸期, B: 第一分裂中期. スケールバー: 5  $\mu$ m

期、155Bでは第一分裂中期の染色体が観察されている。Fig.1に示した以外にも、各系統、様々なステージで染色体が観察されている。いずれの系統においても、細糸期から染色体が強い蛍光が発せられるようになり、四分子期まで観察された。染色体の凝縮度が増す、第一分裂中期と第二分裂中期では、特に明るい染色体像が得られた。いずれの系統においても、花粉母細胞以外の葯の細胞の染色体も蛍光を発しているのが観察された。

## 討論

先に得られていた DHG1に加えて、本研究によって20の系統(DHG151~171)が、選抜培地で生き残った形質転換体として得られた。DHG151~158については、GFP遺伝子を対象とするPCR解析によって、実際にDHG遺伝子が導入された形質転換体であることが確かめられている。残りの系統についても、形質転換体であるかどうかを調べる必要がある。遺伝子導入が確認された系統のT2世代の植物をそれぞれで数個体栽培し解析を行ったが、そのうち比較的成長状態が良く、まとまった観察結果が得られたのはDHG153、154、155だけで、本研究ではこれらについて報告したが、今後、他の系統も順次解析を進めていく予定である。T2世代には導入遺伝子をホモ接合型に有する場合とヘテロ接合型に有する場合があるが、現在のところ、それぞれの植物がDHG遺伝子をホモ接合型で有するかヘテロ接合型で有するかは調べられていない。系統間の違いを議論する上で、DHG遺伝子の導入部位の情報は重要である。その導入部位を明らかにするには、各系統のゲノム解析を行い、導入部位に対するPCR解析を行って、導入部位を確認しなければならない。導入部位が決定されれば、何番染色体に挿入されているのが判明し、各植物体がホモ接合かヘテロ接合かを調べられるようになる。ホモ接合個体同士を比較することで、減数分裂期染色体がGFPにより、よりよく可視化されているものを選抜できる。DHG1は第3染色体にDHGが組み込まれているが、第3染色体以外に組み込まれた系統を選別できれば、今後の交配実験に役立つものと考えられる。*AtDMC1*遺伝子の第1イントロンを加えた遺伝子上流域約2000塩基対の領域は花粉母細胞特異的な遺伝子発現を誘導すると報告されているが<sup>9)</sup>、その領域を用いたDHG遺伝子の発現はどの系統においても、花粉母細胞でも発現するが花粉母細胞特異的ではない。解析精度・感度を高めるために、発現の花粉母細胞特異性を高めることも今後の課題である。

## 謝辞

本研究は、研究課題「減数分裂期染色体ライブ観察用のシロイヌナズナ形質転換体の作成とその染色体の動態解析」に対する2022年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS 202205)を受けて行いました。ここに謝意を表します。

## 文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
- 6) Prusicki, M. A., Keizer, E. M., van Rosmalen, R. P., Komaki, S., Seifert, F., Müller K., Wijnker, E., Fleck, C. and Schnittger A. (2019) Live cell imaging of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Elife* **8**: e42834.
- 7) Valuchova S, Mikulkova P, Pecinkova J, Klimova J, Krumnikl M, Bainer P, Heckmann S, Tomancak P and Riha K (2020) Imaging plant germline differentiation within *Arabidopsis* flowers by light sheet microscopy. *Elife.* **9**: e52546.
- 8) Shibata M, Nakagawa S, Shimizu M, Koga H, Fujita M, Nakagawa T and Azumi Y (2022) Time-Lapse Analysis of chromosome behavior in *Arabidopsis thaliana* pollen mother cells using *pAtDMC1:H2B:GFP* fusion gene showed chromosome movement and conformational change at meiosis. *Cytologia.* **87**(4): 313-318.
- 9) Klimyuk VI and Jones JD (2002) *AtDMC1*, the *Arabidopsis* homologue of the yeast *DMC1* gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant J.* **11**(1):1-14.