Science Journal of Kanagawa University **17**：77-80 (2006)

■短　報■　2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

シロイヌナズナの生殖過程に異常のある変異体の染色体解析

安積良隆 [1,4]　酒井麻未 [1]　黒森　崇 [2]　松永幸大 [3]

Analysis of Chromosome Behavior of *Arabidopsis* Mutants Defective in Reproductive Processes

Yoshitaka Azumi[1,4], Asami Sakai[1], Takashi Kuromori[2] and Sachihiro Matsunaga[3]

[1] Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Plant Functional Genomics Group, RIKEN Genomic Science Center, RIKEN, Yokohama Institute, 1-7-22　Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan
[3] Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita-ku, Osaka, Osaka 565-0871, Japan
[4] To whom correspondence should be addressed. E. mail: yoshitk@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: From *Arabidopsis* mutant collections, more than 30 meiotic mutants have been isolated. However, the molecular mechanism of plant meiosis is still largely obscure. For the purpose of further understanding, we searched for new *Arabidopsis* meiotic mutants. As a results of our collaboration, we found several new mutants, which were defective in reproductive processes. Since our main interest was in meiosis, we selected one meiotic mutant among them, and analyzed its chromosome behavior during meiosis.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, reproduction, meiosis, chromosome, DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole)

序論

生物は一つの個体で永遠に生きていくことはできない。次の世代へと命の引き継ぎを行うため、生殖によって子孫を生み出す。ほとんどの高等生物は雌性配偶子と雄性配偶子が合体（受精）することによって次世代が生み出される有性生殖を行う。受精の際に染色体の倍加が起こるが、世代を通じて染色体数を一定にするために、減数分裂を行い、予め配偶子の染色体数を半減させておく。減数分裂はせっかく二組ある染色体を一組に減らす分裂で、不可欠なものではあるが、一本でも染色体が多かったり少なかったりしても致命的な影響が現れ、大きな危険を伴う分裂である。

減数分裂は一度の染色体の複製の後、二度の分裂が起こる。それぞれ第一分裂、第二分裂と呼ばれ、前期、中期、後期、終期からなる。減数第一分裂の前期は、染色体が細い糸状に見え始める細糸期（レプトテン期）、相同染色体がペアリングし始める合糸期（ザイゴテン期）、完成したシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が互いに接着する太糸期（パキテン期）、シナプトネマ構造が崩壊し染色体がさらに凝縮する複糸期（ディプロテン期）、凝縮がほぼ完成する移動期（ディアキネシス期）の 5 つの時期に分けられる。

減数分裂と体細胞分裂の顕著な違いは第一分裂前期に相同染色体が対合することで、このことが相同染色体の正常な分配の前提条件となる。相同染色体の対合が完成するまでには、テロメアのクラスタリング、相同染色体の並列（alignment, juxtaposition）、減数分裂期相同組み換え、シナプトネマ構造の完成といったプロセスがある。このなかで相同組み換えに関する研究が最も進んでいる。酵母などの研究から相同組み換え反応は SPO11 蛋白質による二本鎖 DNA 切断から開始することが知られている [1)]。その後、一本鎖 DNA 部分が削り出され、その一本鎖が相同染色体の相同部分と組換えを起こし、反応が進むといったモデルが提案されている[2)]。

酵母や動物では *SPO11* 遺伝子はゲノム当たり 1 つしか見つかっていないが、シロイヌナズナでは 3 つの相同遺伝子、*AtSPO11-1*、*AtSPO11-2*、*AtSPO11-3* が存在することが知られている[3)]。

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

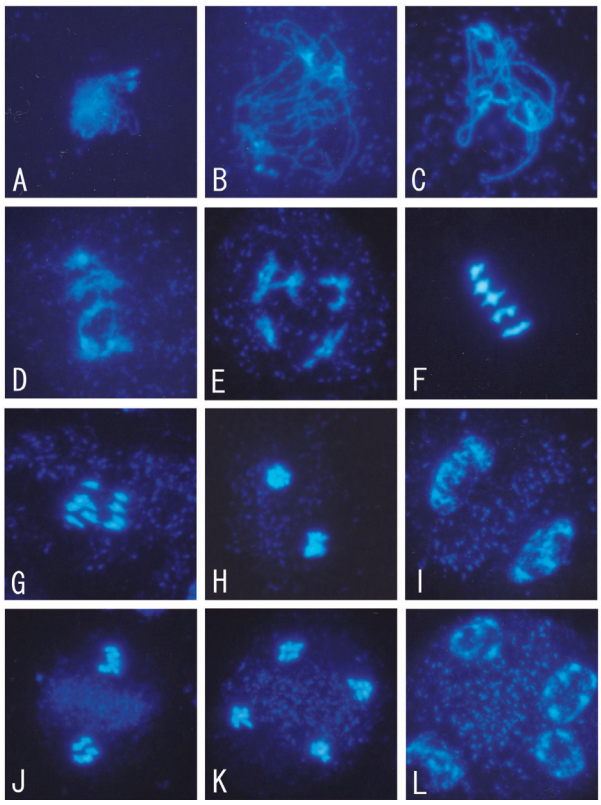

Fig. 1. 野生型シロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期染色体像. 野生型のシロイヌナズナの花序を採取し，ファーマー液で固定した後，適当な大きさの蕾を選び，消化展開法によって染色体試料を作製した. 染色体は DAPI で染色した. A; レプトテン期, B; ザイゴテン期, C; パキテン期, D; ディプロテン期, E; ディアキネシス期, F; 第一分裂中期, G; 第一分裂後期, H; 第一分裂終期, I; 第二分裂前期, J; 第二分裂中期, K; 第二分裂後期, L; 第二分裂終期.

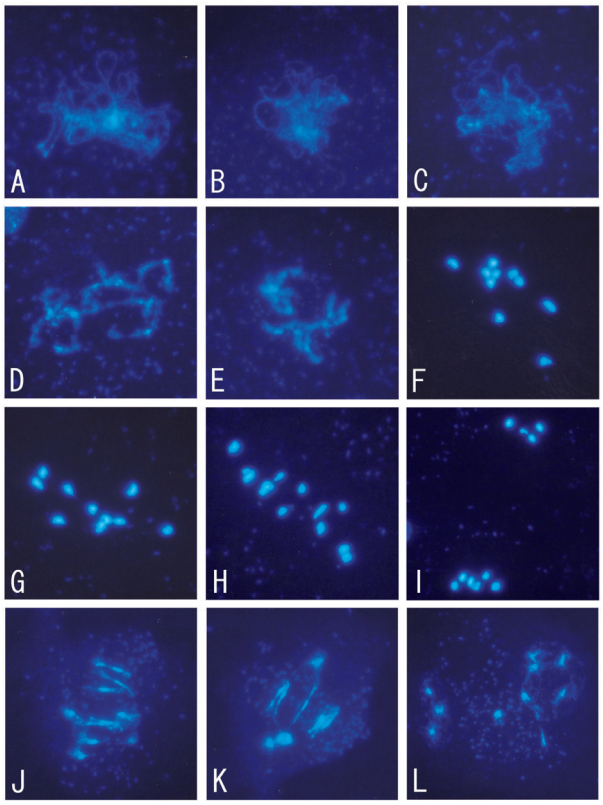

Fig. 2. *atspo11-2* 変異体の花粉母細胞の減数分裂期染色体像. 野生型の場合と同様に，*atspo11-2* の花序を採取し，消化展開法によって染色体試料を作製した. A-C; レプトテン期からザイゴテン期, D-E; ディプロテン期, F-G; ディアキネシス期, H; 第一分裂中期, I; 第一分裂後期, J-K; 第一分裂終期, L; 第二分裂前期.

AtSPO11-1 は実際に相同組み換えの開始に必要で、この遺伝子の変異体では相同染色体の対合が起こらないことが知られている[4]。*AtSPO11-3* の変異体では栄養生長に異常が見られることから体細胞分裂時に機能していると考えられている[5]。*AtSPO11-3* との類似性から *AtSPO11-2* も体細胞分裂に関与すると考えられていたが、まだ実際には調べられていなかった。そこで我々は *AtSPO11-2* の変異体を入手し、その表現型を解析したところ、相同染色体の対合に必須であることが判明した。

材料と方法

実験植物

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の野生型及びその変異体は、神奈川大学・平塚キャンパス内の植物育成棟内で栽培した。60 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ の白色光、14 時間 10 時間の明暗周期、気温 24℃、湿度 60% の条件下で、ハイポネックスと MS 培地を交互に、週に一度与えながら栽培した。播種後、5－7 週間目の植物の花序を採取し、ファーマー液（Ethanol, Acetic Acid; 3:1）中、室温で 20 時間程度置くことによって固定した。その後は-20℃で保存した。

消化展開法

花粉母細胞の染色体試料作製は Azumi らの方法[6]に従った。固定した試料を 10 mM クエン酸緩衝液（pH4.5）中で洗った後、cytohelicase（Sigma）、cellulase “ONOZUKA” R-10（Yakult）、pectolyase（Kikkoman）（各 0.4%（w/v））を含む同緩衝液中、適宜脱気をしながら、37℃3 時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4℃で保存した。

消化した花序をシャーレ上の 60%酢酸中に移した後、適当な大きさの蕾を取り出し、同じく 60%酢酸を滴下したスライドガラス上で解剖した。葯をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、45℃のホットプレート上に 1 分間静置した。氷冷したファーマー液を周囲に滴下し、緩やかに混和させた後、ファーマー液を捨て、スライドを乾燥させた。DAPI 溶液

（Vector）を滴下し、カバーガラスを載せた後、顕微鏡（オリンパスＢＸ61）で観察した。

結果

ET3962（*atspo11-2-1*）

SALK 研究所のトランスポゾンタギングラインの中に *AtSPO11-2* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されている株 ET3962 を見い出した。そこでこの株を取り寄せ、表現型を解析することにした。

栄養成長期においては野生型と同じく良く生長し、葉の形状・枚数、草丈、生長速度などに特に異常は見つからなかった。生殖成長期においても、萼、花弁、雄しべ、雌しべの花器官の分化では、形状や数に異常は見られなかった。しかし、この変異体の鞘は発達せず、種子はほとんど得ることが出来なかった。生殖細胞に異常があることが予想されたので、花粉母細胞における減数分裂時の染色体を観察することにした。

atspo11-2-1 の染色体観察

野生型のシロイヌナズナの染色体像に関しては Ross らの詳しい報告がある[7]。細胞壁を消化した後、スライドガラス上に染色体を展開する消化展開法によって染色体試料を作製し、我々も同様の観察結果が得られた。第一分裂前期では、糸状に染色体が観察され始めたレプトテン期（Fig.1A）、ペアリングが起きていると予想されるザイゴテン期（Fig.1B）、対合が完成したパキテン期（Fig.1C）、シナプトネマ構造が崩壊してゆく過程のディプロテン期（Fig.1D）、凝縮がほぼ完成したディアキネシス期（Fig.1E）などが観察された。

この変異体でも、減数分裂期に入り、レプトテン期の染色体は数多く観察することができたが（Fig.2A-C）、ザイゴテン期のものはごくわずかしか見られなかった。パキテン期の染色体は全く見られなかった。初期のディプロテン期の染色体でははっきりとした異常を確認することはできなかったが（Fig.2D,E）、凝縮が完了したディアキネシス期のものでは、ほとんどの場合 10 個の染色体を確認することができた（Fig.2F,G）。このことは相同染色体同士が分離しており、一価染色体の状態で存在していることを示している。

第一分裂中期には各染色体は一価のまま赤道面付近に接近してくるが（Fig.1H）、安定せず、整列することはなかった。ある染色体は、いずれかの極に早くから移動してしまい、ある染色体は第一分裂終期になっても赤道面付近に停滞した（Fig.1J,K）。野生型のシロイヌナズナでは染色体は両極に 5 本ずつ分配されるのに対し、この変異体では 4：6 に分配されたり（Fig.1I）、7：3 とか 8：2 に分配されるものもあった。さらには赤道面付近にいくつかの染色体が残ってしまい、二極以外のところにも染色体が分布し多極化するものもあった（Fig.1L）。中には、第一分裂中期から後期にかけて一価染色体が姉妹染色体に分裂してしまっていると考えられるものも観察された。これらのことは、相同染色体がキアズマによって連結された二価染色体となっていないためと考えられる。

減数第二分裂に関しては、各染色体が姉妹染色体に分離し、細胞質分裂が起こって花粉小胞子が作られると言った点では、ほぼ正常に進行していると考えられる。しかし、第一分裂で染色体が多極化しているため、第二分裂では細胞内の不特定の部位で姉妹染色体への分離が起こり、異数体（polyad）が形成された。異数体から形成された花粉小胞子は規定の染色体を有さず、この変異体では種子がほとんど形成されないことから、ほとんどの花粉は稔性を持たないものと考えられる。

討論

AtSPO11-2 は相同染色体の対合に必要である

SPO11 遺伝子は古細菌の DNA topoisomerase VI の A サブユニットと相同性があり、古細菌のそれは B サブユニットと共同で体細胞分裂時の DNA 複製に関わる。酵母や昆虫、脊椎動物では B サブユニット遺伝子は存在せず、*SPO11* 遺伝子は、減数分裂時の二本鎖 DNA 切断に特異的に関わっている。シロイヌナズナでは 3 つの A サブユニットのホモローグ（*AtSPO11-1*、*AtSPO11-2*、*AtSPO11-3*）と 1 つの B サブユニットのホモローグが存在する。AtSPO11-1 蛋白質はすでにシロイヌナズナでも減数分裂期の二本鎖切断に関わっていることが知られている[4]。AtSPO11-3 は DNA 複製に関わるとの私信を得ている[5]。B サブユニットの有無と機能の保存性との関連は興味深い。酵母では失われてしまった働きが植物で保存されているというのは、一見矛盾しているように思えるかも知れないが、酵母の祖先は複製に関わる機能をもった *SPO11* を保有していたが、その機能は進化の過程で他の遺伝子に取って代わられ、*SPO11* は減数分裂期の機能のみを維持しているのかも知れない。

AtSPO11-2 蛋白質に関しては、その機能に関する報告はまだ無かったが、B サブユニットと結合し得るといった情報から、AtSPO11-3 と同様の働きをするのではないかと考えられていた。しかし、今回の研究で *atspo11-2* 変異体では相同染色体のペアリン

グが全く起きないことが明らかにされ、AtSPO11-1と同様に、減数分裂期の DNA の二本鎖切断をするというのがその働きではないかと推測される。酵母や動物での実験により二本鎖切断が起こらないと相同染色体のペアリングが生じないことが明らかにされているので、ペアリングに至る二本鎖切断以外の段階で働いている可能性も完全には否定できないが、*AtPO11-2* は二本鎖切断に必要な遺伝子と考えられる。

AtSPO11-1 と *AtSPO11-2* の変異体はそれぞれ単独の変異で相同染色体のペアリング障害を起こすことから、AtSPO11-1 蛋白質も AtSPO11-2 蛋白質も共に存在することが二本鎖切断に必要で、片方の遺伝子でも欠損すると二本鎖切断は起こらないことがわかる。古細菌の DNA topoisomerase VI は AABB サブユニットからなる四量体であるが、これから類推すると AtSPO11-1 と AtSPO11-2 の遺伝子産物が二量体あるいは四量体を形成している可能性が考えられる。しかし、酵母や動物では *SPO11* 遺伝子は一つしか見つかっていない。動物や酵母では何らかの補助因子が働いていることも考えられるが、一つの遺伝子産物が多量体を形成することもあるのであろうか？あるいは二本鎖切断用の SPO11 が多量体を形成するというのは、植物特有の現象なのであろうか？今後のこの分野の研究の発展が期待される。

文献

1) Keeney S, Giroux CN and Kleckner N (1997) Meiosis–specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375-384.
2) 坪内英生 (2003) 出芽酵母で明らかになった減数分裂期の相同染色体分配メカニズム. *実験医学* **21** (No. 5 増刊): 700-707.
3) Hartung F and Puchta H (2000) Molecular characterization of two paralogous *SPO11* homologues in *Arabdiospsis thaliana*. *Nucleic Acid Res.* **28**: 1548-1554.
4) 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.
5) Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J and Roberts K (2002) DNA topoisomerase VI is essential for endoduplication in *Arabidopsis. Curr. Biol.* **12**: 1782-1786.
6) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence *in situ* hybridization procedure applicable to whole stages of male maiosis of *Arabidopsis thaliana. Chromosome Sci.* **5**: 1-6.
7) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana. Chromosome Res.* **4**: 507-516.