

■原 著■

## シロイヌナズナの倍数体の減数分裂期染色体の動態解析

早川 俊<sup>1</sup> 岩元明敏<sup>1</sup> 安積良隆<sup>1,2</sup>

### Analysis of Chromosome Behavior during Meiosis of *Arabidopsis* Polyploid Mutants

Shun Hayakawa<sup>1</sup>, Akitoshi Iwamoto<sup>1</sup> and Yoshitaka Azumi<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Polyploid lines were constructed from several diploid ecotypes of *Arabidopsis thaliana* by colchicine treatment. To confirm their ploidy by counting the chromosome number of the respective cells under a microscope, meiotic chromosomes of pollen mother cells were surface-spread on slide glasses and visualized by DAPI staining. It was clearly indicated that the tetraploid lines assumed by flowcytometry had 20 chromosomes, since 10 pairs of bivalents were observed on the metaphase I plate, and 2 sets of 10 chromosomes on metaphase II plates. As far as we analyzed through light microscopic observation, homologous chromosomes normally synapsed at the pachytene stage, congressed on the metaphase plate at metaphase I, and segregated reductionally to daughter cells at the anaphase I, and sister chromatids were separated to produce tetrads during meiosis II. Putting these results together with their fertility, the constructed tetraploid lines were concluded to undergo meiosis as normally as wild-type diploid plants, though the chromosome number was doubled.

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

#### 序論

通常、二倍体の生物は2組の染色体を保有している。植物では近縁種間の交雑などによって倍数体が生じる。倍数化が起こると植物体自体が大きくなり、生産力が高まることもある。コムギを例に挙げると、現在多く使われている三～五粒系の（パン）コムギは $2n=42$ の染色体を持つ。これはコムギの元となった一粒系のコムギ近縁野生種( $2n=14$ )同士の交雑によって生じた六倍体と考えられている。この例のように倍数性が増加すると生産性や品質が高まる場合があり、一種の育種法として利用されている。しかし交雑による倍数化は効率が悪く、現在ではコルヒチン処理によって核内倍加を誘発する方法が取られている。コルヒチンは染色体解析に用いられる物質であり、紡錘糸の形成を阻害し細胞分裂を中期で停止させる働きをもつ。中期で停止した細胞の中には稀に後期に進むことなく、次のS期に進行するもの

が現れるため、染色体数が倍加した植物を作成することができる。

我々はモデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて、コルヒチン処理により倍数化した植物の正確な染色体数、及びその染色体の動態を調べることにした。シロイヌナズナは $2n=10$ の染色体数を持つ植物で、Landsberg *erecta* (Ler), Columbia (Col) 等、様々なエコタイプが存在する。シロイヌナズナでは数々の分子遺伝学的、細胞生物学的手法が利用できるため、様々な観点から染色体を解析することができる。

減数分裂とは、受精の結果として起こる染色体倍加に備えて、予め染色体数を半減させ、親と同じ染色体数に保つための分裂である。この減数分裂が正常に行われない場合、その後の配偶子形成に大きな影響を及ぼす。減数分裂は一度の染色体の複製の後、

二度の分裂が起こり、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（サイゴテン期）、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。第一分裂中期には連結した相同染色体からなる二価染色体が赤道面に整列する。第一分裂後期には相同染色体が分離し、核相としては  $n$  となる（還元分裂）。第二分裂ではそれぞれの染色体を形成している姉妹染色分体が分離する（均等分裂）。相同染色体が分離する時期や姉妹染色分体が分離する時期は染色体数を精度良く数えることができる。我々は野生型の二倍体 *Ler* と共に、コルヒ

チン処理によって作成された四倍体の *Col* 及び *Ler* の減数分裂期染色体の様子を観察した。これを以下に報告する。

## 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、神奈川県・平塚キャンパス内の植物育成棟内で栽培した。60  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の白色光、14時間10時間の明暗周期、気温24°C、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°Cで保存した。

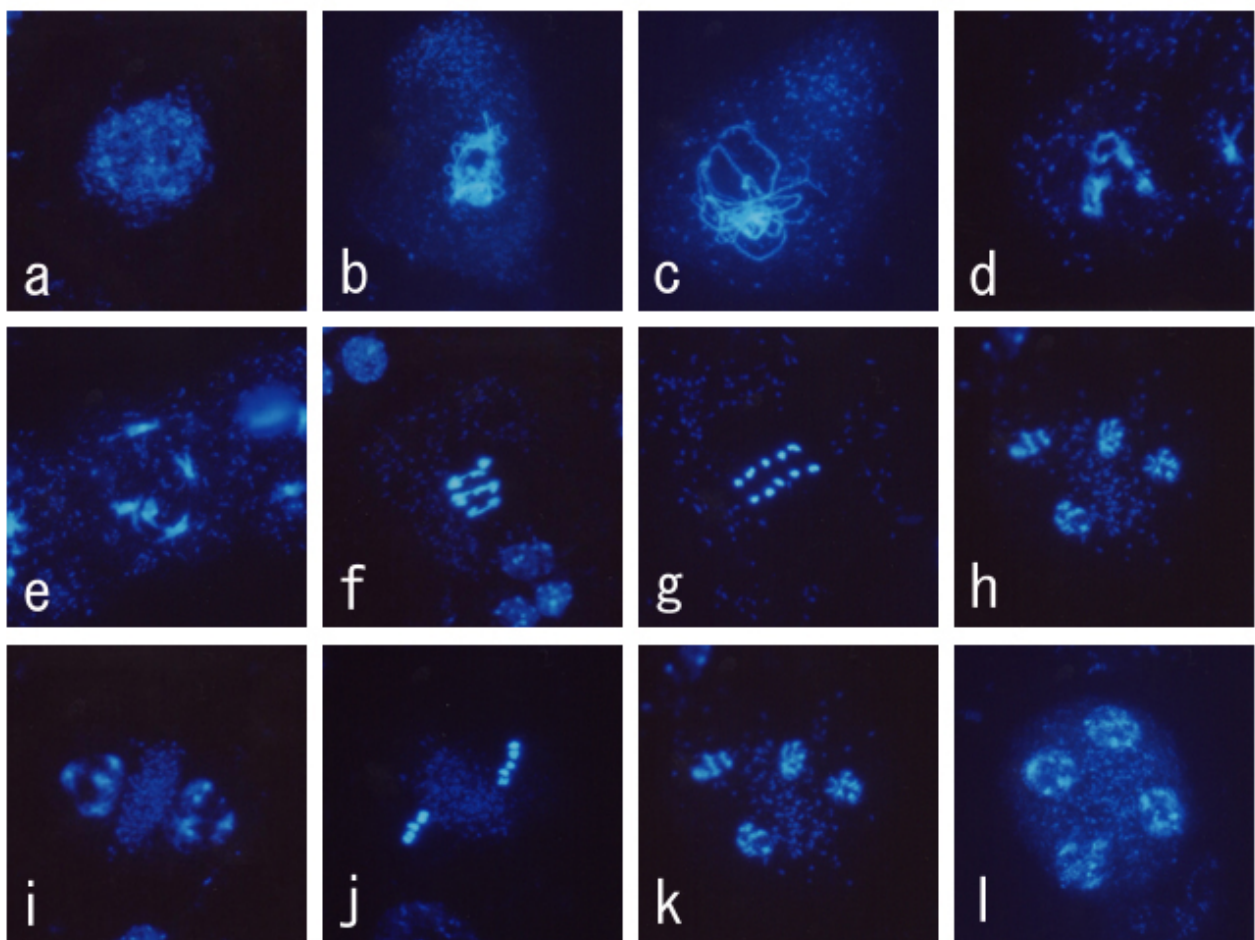


図1. 二倍体シロイヌナズナ (*Ler*) の花粉母細胞の減数分裂期の染色体. 野生型シロイヌナズナの花序を採取し、ファーマー液で一晩固定した。適当な大きさの蕾を選んで消化展開法で試料を作成し、DAPIで染色して蛍光顕微鏡で観察した。a. レプトテン期, b. サイゴテン期, c. パキテン期, d. ディプロテン期, e. ディアキネシス期, f. 第一分裂中期, g. 第一分裂後期, h. 第一分裂終期, i. 第二分裂前期, j. 第二分裂中期, k. 第二分裂後期, l. 第二分裂終期。

### 消化展開法

花粉母細胞の染色体試料作製は Azumi らの方法に従った<sup>1)</sup>。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°C 3 時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4°C 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°C 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 B X61) で観察した。

### コルヒチン処理による 4 倍体系統の作出

GMA 培地プレート上にシロイヌナズ Col と Ler の野生株の種子を播種し、無菌的に育てた。3 枚目の本葉が展開し始めたところで、プレートの蓋を開けて植物体の茎頂にコルヒチンゲル (低融点アガロース 1%、コルヒチン 0.5%) を 5  $\mu$ l をのせ、蓋を閉じて三日間静置後、コルヒチンゲルを除去してから植物体をパーミキュライトの入ったポットに植え替えた。そのまま育成し、四つ又、五つ又状のトリコムが多く観察された個体から種子を採集した。この種子を播種・育成して葉を採集し、Johnstonet らの方法<sup>2)</sup>に従い、チョッピング法を用いてフローサイトメーター (Ploidy Analyser PA) で倍数性を調べ、四倍体の選抜を行った。少なくともコルヒチン処理後第三世代までは同様の方法で倍数性を調べ、染色体の倍加が安定していることを確認した上で、四倍体系統として実験に用いた。

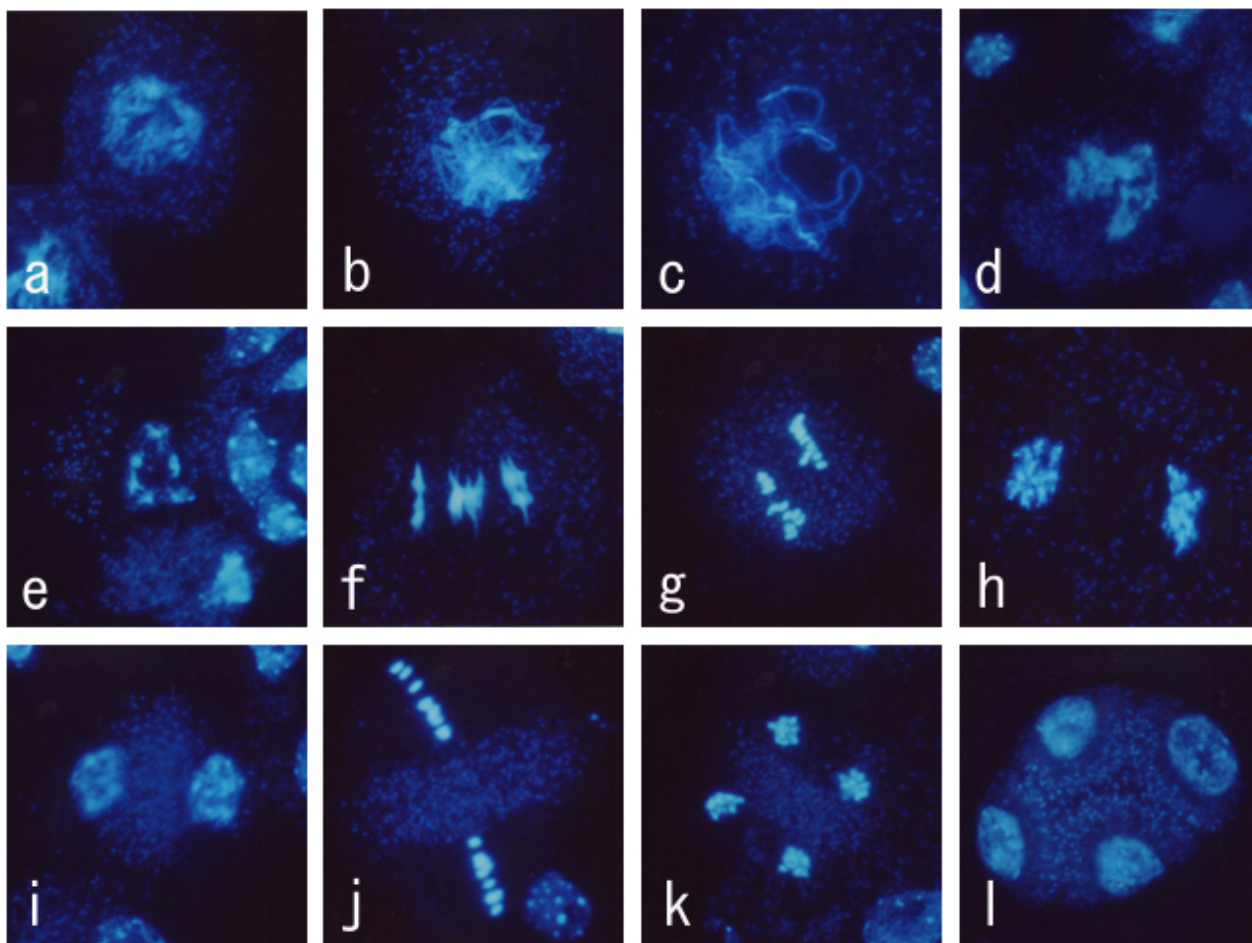


図 2. 四倍体 *Ler* の花粉母細胞の減数分裂期染色体. a. レプトテン期, b. ザイゴテン期, c. パキテン期, d. ディプロテン期, e. ディアキネシス期, f. ; 第一分裂中期, g. 第一分裂後期, h. 第一分裂終期, i. 第二分裂前期, j. 第二分裂中期, k. 第二分裂後期, l. 第二分裂終期.

## 結果と討論

### 四倍体 Col, Ler の植物体の成長

四倍体の植物は栄養成長期においては二倍体と同じく良好に成長し、成長速度に違いは見られなかった。葉の形・枚数、草丈も二倍体と同じで異常は見られなかったが、四倍体の茎の太さや葉の大きさは二倍体のものより増大していることがわかった。生殖成長期においても、萼、花卉、雄蕊、雌蕊の花器官の分化では、形や数に異常は見られなかったが、四倍体の角果は、二倍体と比較して明らかに大きく成長していた。

### 二倍体 Ler の染色体観察

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た。二倍体シロイヌナズナの減数分裂期染色体に関しては Ross らの報告<sup>3)</sup>以降、減数分裂変異体を含めいくつかの報告がある<sup>4,5,6)</sup>。概略を説明すると以下のようになる。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。また、第一分裂中期から第二分裂終期までの相同染色体が分離し脱凝縮してゆく様子も観察される (Fig.1f~l)。第一分裂中期 (Fig.1f) では、どの細胞においても赤道面に整列した 5 組の二価染色体が、第二分裂中期 (Fig.1j) ではオルガネラバンドによって隔てられた 5 本ずつの染色体が鮮明に観察される。

### 四倍体 Ler の染色体観察

第一減数分裂において、この四倍体ではレプトテン期を見ても二倍体のものより染色体の量が増えていることは蛍光量から明らかであった。レプトテン期 (Fig.2a)、ザイゴテン期 (Fig.2b)、パキテン期 (Fig.2c) と分裂が進むにつれ染色体量の違いがよ

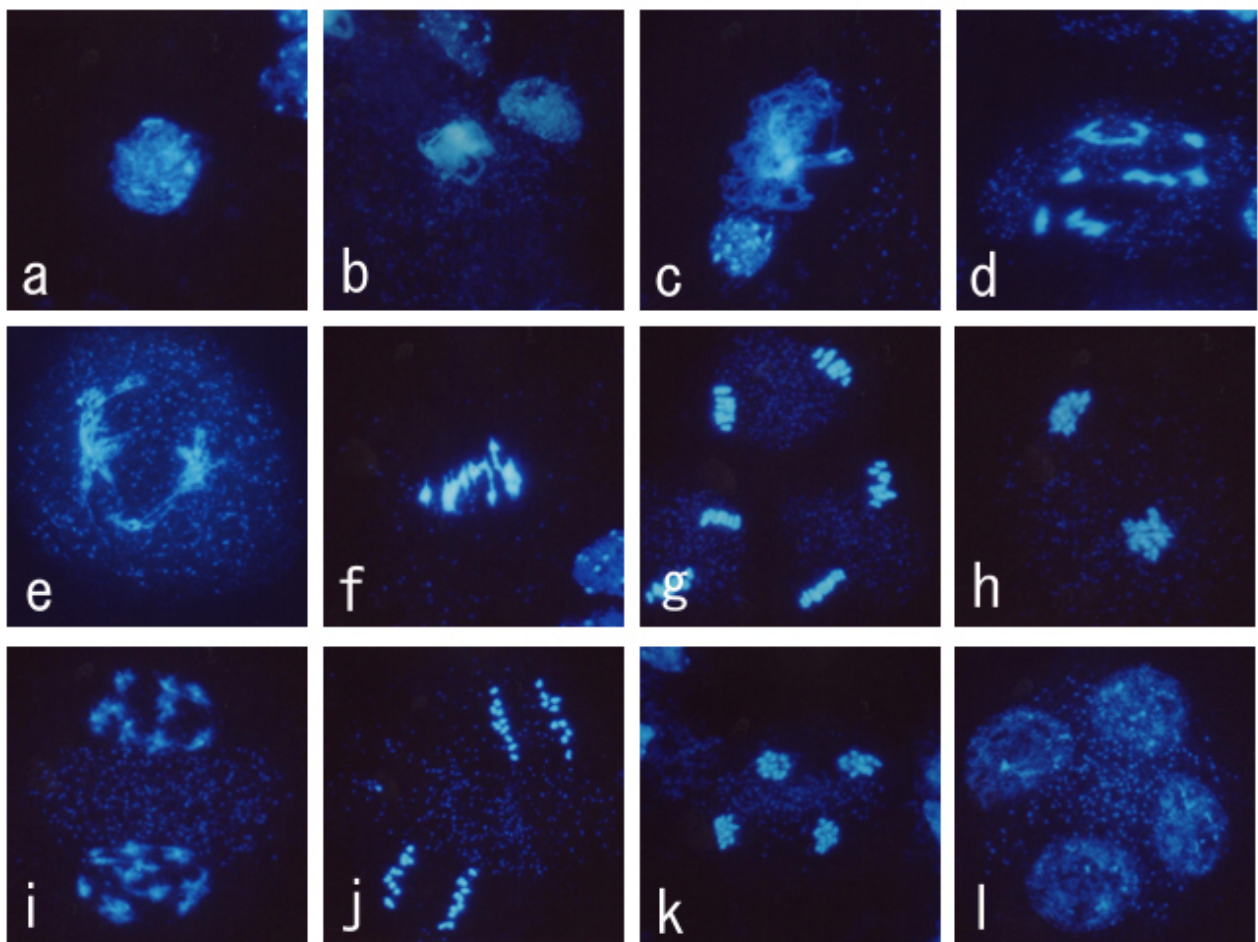


図 3. 四倍体 Col の花粉母細胞の減数分裂期染色体. a. レプトテン期, b. ザイゴテン期, c. パキテン期, d. ディプロテン期, e. ディアキネシス期, f. 第一分裂中期, g. 第一分裂後期, h. 第一分裂終期, i. 第二分裂前期, j. 第二分裂後期初期, k. 第二分裂後期, l. 第二分裂終期.

り顕著となり、第一分裂中期において約 10 本の凝縮した二価染色体を数える事ができた (Fig.2f)。その後、第一分裂後期から終期にかけて両極に 10 本ずつの染色体移動しているのが確認された (Fig.2g~h)。これらのことは二倍体のもつ 10 本の染色体が全てそろって倍加していることを裏付けている。染色体の分配に異常は確認されなかった。

第二分裂中期から後期にかけて、二倍体では 5 本ずつの染色体が整列し姉妹染色体に分離するのに対し、この変異体では 10 本ずつの染色体が整列し、姉妹染色体に分離するのが確認された (Fig.2j)。第二分裂後期で移動を完了した染色体は終期 (Fig.2l) で正確な四分子体を形成した。

他の特徴としては、染色体数の違いからか四倍体の花粉母細胞は二倍体のそれと比較してかなり大きいということであった。この四倍体はその後、野生型よりも大きな角果を付け、種子は正常に発芽した。

#### 四倍体 Col の染色体観察

四倍体 *Ler* と同様に、減数第一分裂前期から二倍体と比較して染色体の量は明らかに多いのが見て取れた (Fig.3a~e)。第一分裂中期のほとんどの細胞で 10 組の二価染色体が観察され (Fig.3f)、分離などに顕著な異常は観察されなかった。

減数第二分裂では中期から後期にかけて (Fig.3j~k) 姉妹染色体が紡錘糸に分離していく様子が観察され、このときの染色体数は 40 本であった。終期 (Fig.3l) には四分子体を形成し減数分裂を完了したことから、第二分裂の染色体の挙動も四倍体 *Ler* と同様であると考えられる。

この四倍体は成長すると四倍体 *Ler* よりさらに長大な角果を作り、種子は正常に発芽した。

#### まとめ

二倍体 *Ler*、四倍体 *Ler*、及び四倍体 Col の減数分裂期染色体を比較・解析した。第一分裂中期に細胞の赤道面に集まった染色体については、二倍体と四倍体の *Ler*、及び四倍体 Col の染色体数以外に目立った違いが見られなかった (二倍体で約 5 組、四倍体ではいずれも 10 組の二価染色体)。第一分裂後期には同じ数の染色体が両極へ正確に分配された。また、第二分裂中期においても二倍体と四倍体の間では染色体数の違い (二倍体では染色体は 5 本ずつ、四倍体では染色体は 10 本ずつ) 以外には特に相違

が見られなかった。終期に形成される四分子はそれぞれ正常な 4 つの小孢子となっていることが観察された。さらにこれらの四倍体は *Ler*、Col のいずれでも発芽可能な種子を付ける。これらの事から、コルヒチン処理によって倍加した染色体は減数分裂時に二倍体の染色体と同じように挙動を示し、減数分裂過程を正常に終了していると考えられる。すなわち、1 つの核相  $2n$  の母細胞から 4 つの核相  $n$  の娘細胞が形成されるという減数分裂の機能には染色体数が単純に倍加しても影響は無いものと考えられる。四倍体では相同染色体が対合するとき、対合する相手が複数存在することになり、一つの染色体が 2 つあるいは 3 つの相同染色体と相同組換えを起こす可能性もあるように思えるが、混乱が生じないのはなぜだろうか。3 つ以上の染色体が絡むようなキアズマができないようにする仕組みがあるのならば、非常に興味深い。

#### 謝辞

倍数体の作出については東京大学の杉山宗隆博士に御助力頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。本研究は神奈川大学総合理学研究所協同研究助成のもとに行われました。

#### 文献

- 1) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence *in situ* hybridization procedure applicable to whole stages of male meiosis of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Sci.* **5**: 1-6.
- 2) Johnston JS, Bennett MD and Price HJ (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei *Am. J. Bot.* **86**: 609-613.
- 3) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
- 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) 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.
- 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**: 3081-309.