

■原 著■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

シロイヌナズナに対する倍数化処理の減数分裂期染色体に及ぼす影響に関する研究

岩元明敏¹ 杉山宗隆² 安積良隆^{3,4}

Effect of Polyploidizing Treatment on Chromosome Behavior during Meiosis of *Arabidopsis thaliana*

Akitoshi Iwamoto¹, Munetaka Sugiyama² and Yoshitaka Azumi^{3,4}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Gakugei University, Koganei-City, Tokyo 184-8501, Japan

² Botanical Gardens, Graduate School of Science, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0001, Japan.

³ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

Abstract: We observed chromosome behavior during meiosis of *Arabidopsis thaliana* just after polyploidization. Two strains of *A. thaliana*, Columbia (Col) and Landsberg *erecta* (*Ler*), were treated with colchicine to induce polyploid lines, and the treated generations were analyzed. Flow cytometric analysis revealed that a tetraploid line was obtained from the treated Col and an octoploid line from the treated *Ler*. Meiotic chromosomes of pollen mother cells of these polyploid lines were visualized by DAPI staining and observed. Both lines underwent meiosis as normal, as did most of the established tetraploid lines on the whole. At metaphase I, however, their numbers of bivalent chromosomes were fewer than expected and chromosome alignment of the octoploid was occasionally disturbed. There was no significant difference between the fertility of diploid and tetraploid, but that of octoploid was significantly reduced, which might be correlated with the disturbance of chromosome configuration.

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

序論

植物においては、基本染色体が倍加することによって生じた高次倍数体が多く分類群で普遍的に見られ、種分化と関連があることが多くの研究により示唆されている¹⁾。したがって、倍数化が植物に与える影響を明らかにすることは、植物の進化を考える上で重要なテーマの1つである。

倍数化は様々な面で植物の成長を向上させ、一般的には植物体の環境適応能力の増大させると考えられている²⁾。一方、動力学的な解析により、倍数化によって、確かに細胞体積を増大させる能力は高まるが、細胞分裂の能力は染色体が倍加した分だけ低下していることが示唆されている³⁾。これらのことから、植物の倍数化と成長変化との関連性を解明するため

には、倍数体の細胞分裂時における染色体の動態を明らかにする必要がある。

これまでも倍数体の染色体に関する研究は数多く行われており、例えば染色体の精査による倍数体の起源の推定⁴⁾、倍数化にともなうゲノム構造の変化の解析⁵⁾などが精力的に進められている。しかし、こうした染色体の研究は、交雑起源と考えられる異質倍数体に焦点が当てられているものが大半であり、同質の染色体が倍加した場合に染色体がどのような動態を示すのかは十分に明らかになっていない。

我々はこれまでにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の Columbia (Col)、Landsberg *erecta* (*Ler*) それぞれの野生型系統にコルヒチンによる同

質倍数化処理を行い、4倍体系統を作出した。そして、この4倍体が数世代経て安定化したところで、減数分裂している細胞について、正確な染色体数、及びその動態を調べ、2倍体との比較を行った⁶⁾。

減数分裂は、受精によって起こる染色体倍加に備えて、予め染色体数を半減させ、染色体数を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し、稔性にも違いが生じる。減数分裂では1回だけ染色体が複製された後、2回の有糸分裂が起きる。それぞれ第一分裂、第二分裂と呼ばれ、体細胞分裂と同様に前期、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（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。第一分裂中期には相同染色体が連結して形成される二価染色体が赤道面に並び、第一分裂後期でその相同染色体同士が分離して、核相としては n となる。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。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、倍数体の染色体数を確認する上でも重要である。

倍数化した植物体においては、相同染色体も倍加するため、対合する相手が複数存在することになる。すなわち、上述した第一減数分裂中期において、1つの染色体が2つあるいは3つの相同染色体と対合して、異常を起こす可能性があると考えられる。しかし、倍数化してから数世代後の植物体の解析結果では、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2倍体の染色体と同じような挙動を示し、減数分裂過程を正常に終了していることが分かった⁶⁾。つまり、倍数化後、数世代を経て安定した植物体では、第一減数分裂の中期で特に混乱が見られなかった。このことから、倍数化が安定する過程で、相同染色体同士が何らかの認識を行い、正常に減数分裂を終了させるためのシステムが形成されることが予測された。

そこで、本研究では倍数化処理（コルヒチン処理）を行った世代に関して、倍数化が起きていることを確認した上で、その植物体の減数分裂時の染色体を詳細に観察し、これにより倍数化が安定する前の世代の染色体の動態を明らかにすることを目的とした。また、材料として、倍数化後数世代を経て安定化し

ている植物体の解析でも用いた4倍体（Col）に加え、8倍体（Ler）についても作出・観察を行い、より高次の倍数体での染色体の動態も解析した。

材料と方法

倍数化系統の作出

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* L.）の野生型 Columbia (Col)、Landsberg *erecta* (Ler) 両系統の種子を1%スクロース入りMS培地に播種し、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（アガロース0.1%、コルヒチン0.5%）を5 μ lをのせ、蓋を閉じて2日間静置した。コルヒチンゲルを除去してから植物体をバーミキュライトの入ったポットに植え替え、30-60 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ の白色光下（連続明期）、24 $^{\circ}C$ 、湿度60%の条件で、1000倍希釈のハイポネックスを週に一度与えながら栽培した。植え替え後、4-6週間経過した個体の茎葉を採集し、Johnstonetらの方法⁷⁾に従い、チョッピング法によってフローサイトトメーター（Ploidy Analyser PA, Partec）で倍数性を確認した。なお、対象として同じ条件で栽培した無処理の野生型 Col の倍数性も確認した。これによって染色体の倍加が認められた個体の花序を採取し、ファーマー液（Ethanol, Acetic Acid; 3:1）中、室温で一晩置いて固定し、その後は-20 $^{\circ}C$ で保存した。

消化展開法

倍数化が確認された個体の花粉母細胞の染色体試料作製はAzumiらの方法に従った⁸⁾。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 $^{\circ}C$ 3時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4 $^{\circ}C$ 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。薬をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、45 $^{\circ}C$ 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 X 61）で観察した。

稔性の確認

倍数化が確認され、減数分裂の染色体動態の観察を

行った個体について、1つの角果（鞘）あたりに含まれる総種子数と成熟した（稔性があると考えられる）種子の数をそれぞれ無作為に選んだ5つの鞘について測定した。また、成熟した種子数を総種子数で除したものを稔性を示す指標として算出した。また、対照としてコルヒチン処理をしていない野生型（2倍体）、コルヒチン処理をしたが倍数化が確認されなかった個体（2倍体）についても同様の測定を行った。

結果

4倍体植物 (Col) , 8倍体植物 (Ler) の作出と倍数性の確認

コルヒチン処理を行った Col および Ler 系統の植物体について、フローサイトメーターによる倍数性の測定を行ったところ、野生型の Col (図 1 A) と比較して、2C にピークがなく、4C 以降のみピークが見られる植物体 (Col) (図 1 B) と、8C 以降のみピークが見られる植物体 (Ler) (図 1 C) が見つかった。これらはそれぞれコルヒチン処理により倍数化し、4倍体 (Col) および8倍体 (Ler) になった個体であると考えられる。以降の解析では、これらを4倍体、8倍体として用いることとした。

これらの植物体はいずれもコルヒチン処理の影響によって矮性化していたものの、枯死せずに成長を続け、花序を形成し種子をつくった。矮性化が起きているため、倍数化していても倍数化して数世代を経て安定化した個体のように各器官および植物体全体の成長の促進は認められなかった。

4倍体 Col の染色体観察

第一減数分裂において、この4倍体では既にザイゴテン期 (図 2 A) の段階から、2倍体の結果⁶⁾と比較して染色体の量が増えていることが蛍光量から明らかであった。このことはフローサイトメーターでの測定 (図 1 A, B) を裏付けた。この蛍光量の違いはディプロテン期 (図 2 B) になるとより顕著になった。さらに、第一分裂中期においては凝縮した二価染色体が観察され、蛍光量が多かったために明確に本数を数えることはできなかったものの、10本よりは明らかに少なかった (図 2 C)。さらに、その後、第一分裂後期で両極に数本ずつの染色体移動していることが観察された (図 2 D)。

また、第二分裂後期においては、染色体は問題なく分配されており、基本的に正常に減数分裂が進んでいることが確認できた (図 2 E)。

図 1. 野生型植物体及び倍数化処理 (コルヒチン処理) を行った植物体のフローサイトメーターを用いた倍数性の測定結果. (A) 野生型 Col (2倍体). (B) コルヒチン処理した Col (4倍体). (C) コルヒチン処理した Ler (8倍体).

8倍体 Ler の染色体観察

4倍体 (Col) と同様に、8倍体 (Ler) においても第一減数分裂のザイゴテン期 (図 3 A) の段階から、2倍体の結果⁵⁾と比較して蛍光が明らかに強く、染色体が倍加していることが示された。また、4倍体

(Col)の結果(図2A)と比較した場合も蛍光量はかなり多く、8倍体化しているというフローサイトメーターでの測定結果を裏付けた(図1B,C)。ディプロテン期(図3B)においても、4倍体(図2B)とはどちらの蛍光量が多いかやや不明瞭だが、2倍体よりは明らかに蛍光量が多いことが確認できた。

第一分裂中期(図3C)においては、2倍体、そして4倍体(図2C)よりも赤道面に並んでいる二価染色体が多いことが観察された。また、4倍体の場合と同様に、蛍光量が多いため正確な本数を数えることができなかつたものの、8倍体化した時の基本染色体数である20本よりは少ないことが確認できた。また、この第一分裂中期では、赤道面に並ばず、不規則な配置になる染色体が見られた(図3C, 白矢印)。こうした不規則な配置は4倍体ではまれにしか見つからず、8倍体は比較的高い頻度で観察された。

その後、第一分裂後期で両極に染色体が移動していることが観察された(図3D)終期では分配された染色体の本数は、蛍光量が多いこともあって正確には数えることができなかつたが、少なくとも4倍体で観察された10本(図2E)より多いことは明らかであった。

また、さらに減数分裂の過程が進んだ第二分裂後

期においては正しく分配された染色体が観察され、全体として減数分裂が正常に行われていることが確認できた(図3E)。

倍数化処理した植物体の稔性

Colにおいては、未処理の野生型(2倍体)と倍数化処理はしたものの倍加しなかつた個体(2倍体)では、総種子数、成熟種子数はほとんど差がなく、稔性についても若干の低下は見られたものの、有意な差ではなかつた(図4A)。これに対し、実際に倍加して4倍体になった植物では、野生型、倍加しなかつた処理個体に比べて全種子数、成熟種子数が大きく低下したが、稔性には有意な差は見られなかつた(図4A)。

一方、Lerについては未処理の野生型(2倍体)に比べて倍数化処理はしたものの倍加しなかつた個体(2倍体)では、全種子数、成熟種子数ともに有意に減少していた。特に成熟種子数の差は大きく、このため稔性も倍数化処理した個体は大幅に低下していた(図4B)。倍数化が起きて8倍体になった個体ではこの低下傾向がさらに大きく、全種子数、成熟種子数はともに野生型はもちろん、倍加しなかつた処理個体よりも有意に低下していた。また、稔性についても同様の傾向が見られた(図4B)。

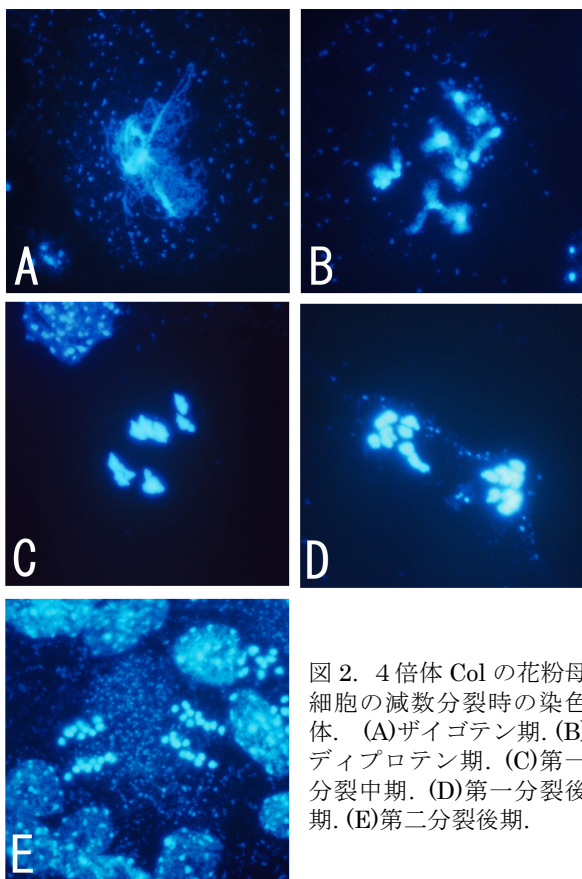


図2. 4倍体 Col の花粉母細胞の減数分裂時の染色体. (A) ザイゴテン期. (B) ディプロテン期. (C) 第一分裂中期. (D) 第一分裂後期. (E) 第二分裂後期.

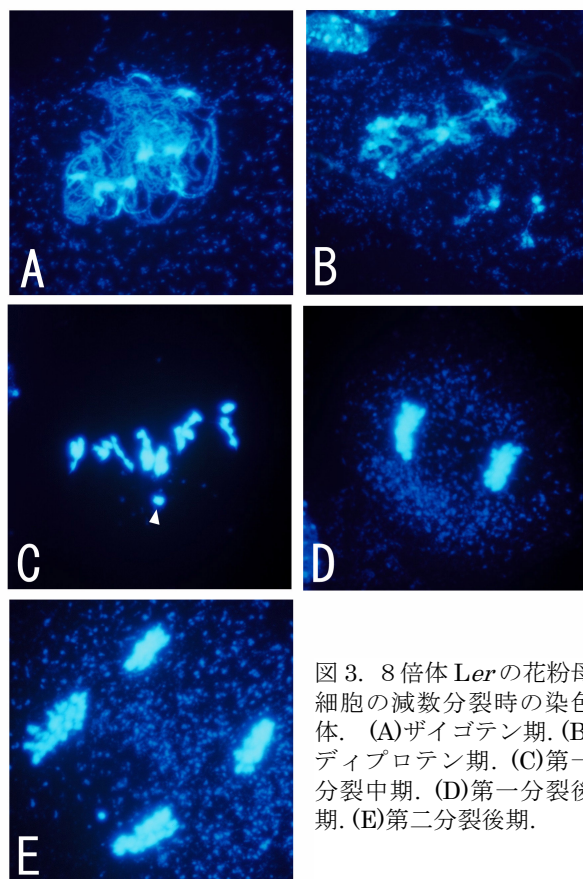


図3. 8倍体 Ler の花粉母細胞の減数分裂時の染色体. (A) ザイゴテン期. (B) ディプロテン期. (C) 第一分裂中期. (D) 第一分裂後期. (E) 第二分裂後期.

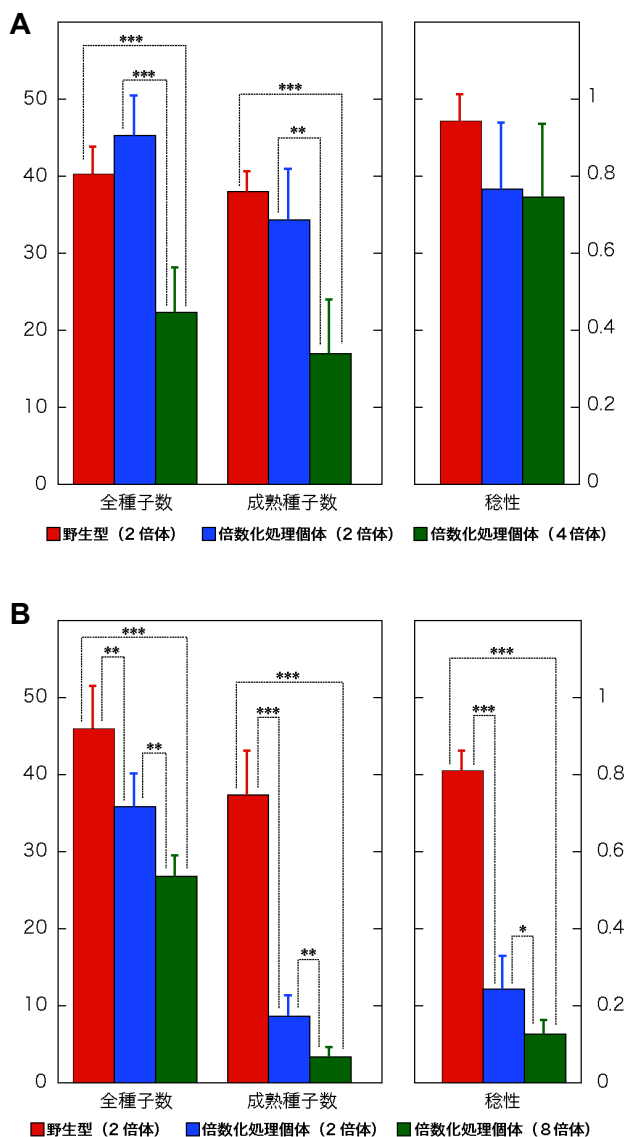


図 4. 倍数化世代の種子数と稔性. 倍数化処理をしていない個体(赤), 倍数化処理したが倍数化していない個体(青), 倍数化処理した個体(緑). 点線と記号はそれぞれの群を比較した t 検定の結果を示す. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05. バーは標準偏差 (n = 5). (A) Col の全種子数, 成熟種子数, 稔性.(B) Ler の全種子数, 成熟種子数, 稔性.

討論

安定化した倍数体との染色体の挙動の違い

これまでに解析をおこなった倍数化してから数世代を経た倍数体(安定化倍数体)の減数分裂時における染色体の動態⁶⁾と同様に、今回解析をおこなった倍数化処理世代の倍数体においても、減数分裂の過程には大きな混乱はなく染色体の整列、分配が行われていることが分かった。しかし、第一分裂中期について、安定化世代の4倍体では基本的に倍加した10本の二価染色体が観察されたのに対し、倍数化処

理世代では4倍体、8倍体ともに倍加した数(10本および20本)の二価染色体が明確には見られず、基本的にそれより少ない数の染色体が赤道面に整列している様子が観察された。

このことは相同染色体を認識するメカニズムが倍数化世代と安定化世代では異なる可能性を示唆している。今後、染色体の動態をより精査し、いくつかのマーカーを用いたFISH解析も行うことによってこの点が明らかになっていくと期待される。

稔性と倍数性との関連

Colの結果から、4倍体では倍数化によって、全種子数と成熟種子数が大きく低下し、雌蕊の形成に影響が出ていることが示された。一方で、稔性にはほとんど変化がなかったことから、配偶体形成に関しては影響がないと考えられる。また、Lerの結果から、8倍体については全種子数、成熟種子数がともに減少したことに加え、稔性についても有意な低下が見られた。このことから、8倍体では配偶体の形成にも影響が出ていることが示唆される。4倍体と8倍体の間で、全体的な減数分裂に大きな違いはなかったが、第一分裂中期で赤道面に並ばない不規則な染色体が8倍体では4倍体よりも比較的高い頻度で観察されており、これが稔性に影響を及ぼしていることも考えられる。

しかし、野生型と倍加しなかった倍数化処理個体を比較すると、Colでは両者に大きな差がなかったのに対し、Lerでは処理個体で全種子数、成熟種子数、稔性全てが有意に減少していた。このことから、Lerの方がColに比べてコルヒチンによる倍数化処理の影響を受けやすく、稔性への影響も異なる可能性がある。したがって、今回の解析だけでは、稔性の低下が高次倍数化による影響であると判断することはできない。同じ系統で4倍体、8倍体、さらに高次の倍数体を作成し、倍数化が進むことによって減数分裂、稔性それぞれにどのような影響を与えるかを明らかにする必要がある。

謝辞

本研究は神奈川県総合理学研究所共同研究助成(課題:シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 同質倍数体の生理および遺伝的特性の解析)のもとに行われた。

文献

- 1) Soltis DE, Soltis PS and Tate JA (2003) Advances in the study of polyploidy since *Plant speciation*. *New Phytol.* **161**: 173-191.
- 2) Donald A Levin (1983) Polyploidy and novelty in

- flowering plants. *Am. Nat.* **122**: 1-25.
- 3) Iwamoto A, Satoh D, Furutani M, Maruyama S, Ohba H and Sugiyama M (2007) Insight into the basis of root growth in *Arabidopsis thaliana* provided by a simple mathematical model. *J. Plant Res.* **119**: 85-93
 - 4) Lim KY, Matyasek R, Kovarik A and Leitch AR (2004) Genome evolution in allotetraploid Nicotiana. *Biol. J. Lin. Soc.* **82**: 599-606
 - 5) Scheid OM, Afsar K and Paszkowski J (2003) Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet.* **34**: 450-454.
 - 6) 早川俊, 岩元明敏, 安積良隆 (2007) 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. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **18**: 71-75
 - 7) Johnston JS, Bennett MD and Price HJ (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei *Am. J. Bot.* **86**: 609-613
 - 8) 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