

■ 報告書 ■

## 神奈川県湘南ひらつかキャンパスで見られる草木の染色体を 観察してみようプロジェクト平成 19 年度報告

安田政尚<sup>1</sup> 茂木亜矢子<sup>1</sup> 安積良隆<sup>1,2</sup>

### 2007 Report of the “Let’s Observe Plant Chromosomes Found Shonan Hiratsuka Campus, Kanagawa University” project

Masanao Yasuda<sup>1</sup>, Ayako Mogi<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:** Our laboratory (Azumi laboratory, Kanagawa University) started the project “Let’s Observe Plant Chromosomes Found on Shonan Hiratsuka Campus, Kanagawa University” in April 2007. The objective of this project is to introduce a hidden part of plants, meiotic chromosomes, to the public and to share our interest in plants with the general public. As children are increasingly becoming disinterested in science, we hope that this project will increase their interest in nature and science. This is the first report of our activity. So far, we have succeeded in observing all stages of meiosis in three kinds of plants, *Brassica rapa* L., *Lamium amplexicaule* L., and *Solanum nigrum* L.

**Keywords:** plant chromosome, meiosis, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorescent microscope

## 序論

神奈川県湘南ひらつかキャンパスは平塚市の西北部に位置し、自然豊かな環境にある。このキャンパスには様々な草木が生育している。神奈川県・理学部・生物科学科・安積研究室は、この環境を生かし、植物に対する関心を高め、より深く理解するきっかけを作るべく、身近な植物の染色体を見るというプロジェクトを平成 19 年 4 月より展開することにした。染色体は細胞が分裂する時に観察されるが、細胞分裂には体細胞分裂と減数分裂とがある。減数分裂の方が多くの識別できるステージがあり、変化に富んでいる。全てのステージを観察しようとするのが難しい面もあるが、より多くのステージを観察することができれば、その喜びはひとしおではないかと思われる。減数分裂を行う細胞は、開花する前の花の雄蕊や雌蕊の中にあるので、蕾の見られる時期にしか材料を手に入れることはできないが、冬以外の季節ではいずれかの植物の蕾を入手し、実験を行うことができるので、減数分裂期の染色体を観察することにした。

減数分裂は、子の世代の染色体と親の世代の染色

体の数を一定に維持し、有性生殖を行う生物に必須の過程である。生物にとって危険な行為である染色体数の半減を実行しつつ、生物はこの過程を経ることによって、配偶体を形成する。減数分裂によって生物は有性生殖が可能になり、その種における多様性もたらされた。

植物の雄蕊を構成する葯では、花粉母細胞が成熟すると減数第一分裂と第二分裂を連続的に行い、1 個の花粉母細胞 (2n) から 4 個の花粉小胞子 (n) が作られる。減数分裂の 2 つの分裂はそれぞれ前期、中期、後期、終期からなり、第一分裂前期はさらに 5 つのステージに細分され、減数分裂全体で 12 ステージに分けられる。第一分裂前期のレプトテン期 (細糸期) で細い糸状の染色体が見え始め、続くザイゴテン期 (合糸期) では相同染色体同士がペアリングし始め、ペアリングした部分がレプトテン期より太い糸状の染色体として見られる。ペアリングした部分では相同染色体同士がシナプトネマ構造を挟んで並走している。そして、パキテン期 (太糸期) ではシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が互

いに端から端まで密着する。さらに太い糸状の染色体が見られ、ディプロテン期（複糸期）にはシナプトネマ構造が崩壊するが、キアズマ（交叉）によって連結が保たれた二価染色体の凝縮が起こる。ディアキネシス期（移動期）に染色体の凝縮がほぼ完了し、連結された状態の  $n$  個の二価染色体が赤道面へ移動を始める。第一分裂中期に赤道面への二価染色体の整列が完了する。第一分裂後期に二価染色体を構成する相同染色体は分離し、互いに別々の極への移動を開始する。第一分裂終期に  $n$  個の染色体を持つ 2 個の娘核が形成され、第二分裂へ移行する。第二分裂では各々の染色体を形成する姉妹染色体に分離が起こり、第一分裂で形成された娘核のそれぞれの染色体が分裂し、最終的に 1 個の母細胞から 4 個の娘細胞が生じる。さらに詳しいことは成書<sup>1-3)</sup>を参照していただきたい。

植物では上記のような減数分裂期の染色体の観察が古くから行われてきたが、このような染色体の挙動や減数分裂の進行を制御する仕組みについては長らく未解決の問題であった。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) がモデル植物に採用されて以来、植物でも分子生物学的・分子遺伝学的手法が取り入れられるようになり、植物の減数分裂に関しても多くの分子レベルでの研究が行われるようになってきた<sup>4)</sup>。その結果として減数分裂期の相同組換えや対合に必要な遺伝子、あるいはそれらの遺伝子の産物の働きが理解されるようになってきている<sup>5-7)</sup>。

旧来の染色体の観察法に加え、植物染色体の観察・解析を行うための新たな方法も開発されてきている。消化展開法もその方法の 1 つである<sup>8)</sup>。花粉母細胞の細胞壁をサイトヘリカーゼなどの酵素を用いて消化した後、スライドガラスに貼り付けると、平面的で染色体同士の重なりが少ない標本作製することができ、鮮明で再現性の高い染色像が得られる。DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) は紫外線の照射によって励起され、青い蛍光を発する。特に AT を豊富に含む DNA 二重螺旋の小さな溝に特異的に結合し、染色体以外の細胞構成要素にはほとんど結合せず、染色体のみを鮮明に染色することができる。染色条件が簡単で熟練を要せず、誰にでもでき、失敗の少ない染色法である。さらには消化展開された染色体上の個々の領域を蛍光プローブで識別し、追跡調査するための FISH (fluorescent *in situ* hybridization) 法なども開発されている<sup>9)</sup>。

このような背景のもと、本研究室のシロイヌナズナを用いた染色体研究に日常的に使われている簡便な DAPI 染色法を用いて、キャンパス内で見られる

身近な植物の染色体を観察・報告し、植物への関心を高めてもらおうとプロジェクトを開始した。本報告は平成 19 年度安積研究室卒業研究生安田政尚と茂木亜矢子の卒業研究論文<sup>10, 11)</sup>を編集し直したものである。

## 材料と方法

### 植物材料

神奈川県湘南ひらつかキャンパス内で見られる草木を研究対象とし、本年度はアブラナ (*Brassica rapa* L.)、ホトケノザ (*Lamium amplexicaule* L.)、イヌホウズキ (*Solanum nigrum* L.) を使用した。

染色体標本の作成は基本的に Ross らの方法<sup>8)</sup>に従っているが、以下に我々の方法を簡単に説明する。

### 固定

健康に生育している植物の花序（大きな花を形成する植物は蕾）を採取し、ファーマー液（エタノール：酢酸 = 3 : 1）に浸して、常温（25℃）で一晩放置した。その後は -30℃ で保存した。蕾の細胞内色素のため、ファーマー液の色が濃い色に変った場合は -30℃ で保存する前にファーマー液を入れ替えた。

### 減数分裂期の蕾の推定

ファーマー液で固定した花序を Mill-Q 精製水に 10 分間浸した。これを 2 回繰り返した後、実体顕微鏡下で花序から蕾（蕾が大きい場合は葯）を取り出した。スライドガラスに Mill-Q 精製水を適量（基本的には 5  $\mu$ l）垂らし、その中に蕾を置き、解体した。Mill-Q 精製水が乾かないうちに DAPI (1.5  $\times 10^{-3}$   $\mu$ g /  $\mu$ l) (VECTOR) を 5  $\mu$ l 垂らし、その上にカバーガラスを置き、葯を軽く潰した。蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX60) を用いて、紫外線を照射し、観察を行った。未消化であるため立体的に見えるが、減数分裂期の細胞を探し、減数分裂を行っている時期の蕾の大きさを断定した。

### 消化

減数分裂期と考えられる蕾を含む花序を Mill-Q 精製水に 10 分間浸した。これを 2 回繰り返した後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) に 10 分間浸した。これを 2 回繰り返した後、花序を酵素液 (0.4% サイトヘリカーゼ、セルラーゼ、ペクトリアーゼ、800 u/ml  $\beta$ -グルクロニダーゼ) に浸し、15 分間の脱気を 2 回繰り返した。37℃ に 1 時間放置した後、再び 15 分間脱気を行い、再び 37℃ に 2 時間放置した。2 時間後にクエン酸緩衝液に 10 分間浸した。これを

2 回繰り返した後、4°Cで保存した。蕾の消化はこれを基本にして蕾の大きさと形状を考慮し、酵素液の濃度と消化時間を調整した。

### 染色体標本の作成と観察

実体顕微鏡下で消化した花序を解体し、蕾を取り出した。このとき、減数分裂期の観察を容易にするため、蕾の萼や花弁などを取り除き、なるべく葯だけを取り出した。予め 60% 酢酸で洗ったスライドガラスに 60% 酢酸を 5  $\mu$ l 垂らし、その中に取り出した蕾を置き、潰した。ただし、スライドガラスに垂らす 60% 酢酸は植物の蕾の大きさに応じて変更する。スライドガラス上の蕾の残渣を取り除いた後、スライドガラスを 45°Cのホットプレートの上に置いた。約 1 分後にスライドガラスをホットプレートから降ろし、予め氷冷しておいたファーマー液で数回にわけて洗った。ファーマー液で洗った後、スライドガラスを立て掛けて乾かした。乾いたスライドガラスに DAPI を 5  $\mu$ l 滴下し、カバーガラスを被せ、軽く潰して、四辺をマニキュアで封入した。

蛍光顕微鏡を用いて紫外線照射下で DAPI を励起させ、染色体を観察した。観察した染色体の中から減数分裂期の細胞を撮影する。

### 結果

神奈川県湘南ひらつかキャンパス内には春から秋にかけて、様々な種類の草本・木本の植物の花を見ることができる。本年度は実験材料として蕾を集め易い草本植物に挑戦してみた。

#### アブラナ *Brassica rapa* L.

湘南ひらつかキャンパスでは 4 月ごろアブラナ(ナタネとも呼ばれる)の黄色い花が、バスの通る外周道路沿いや圃場などに咲いているのをよく目にする。観賞用あるいは肥料とする油粕をとるために植えられたものであるが、学外でも様々なところで見られる非常に身近な植物である。アブラナの染色体を示した時、多くの人がアブラナの花を容易に思い浮かべることができ、親近感があって興味を抱きやすいのではないかと考え、これを観察してみることにした。アブラナはアブラナ科アブラナ属に属する。一般にアブラナ科の植物は 4 枚の花弁を持ち、それが十字架のような形をとることから、以前は十字花科と呼ばれていた。アブラナ属の黄色い花を咲かせる植物は、ナノハナと呼ばれている。

観察に適した蕾の大きさは、消化した状態で縦の長さがおおよそ 1.0 mm から 1.5 mm であった。また、同一の蕾内でも葯の大きさが異なり、蕾よりも葯の

大きさが指標となるとわかり、その大きさは縦の長さがおおよそ 0.7 mm から 1.1 mm であった。

減数第一分裂前期の細糸期に入ると糸状の染色体が観察され始めた。強く光っている領域があり、この部分は DAPI 染色だけでは確認できないがセントロメア領域ではないかと考えられる。合糸期になると、相同染色体間の対合が進行し、染色体の一本一本がはっきりと見え始め、太糸期には対合が完成する。この時期に相同染色体間の組換え反応が進んでおり、その結果として相同染色体間で乗り換え(交叉)が起きているものと考えられる。複糸期になると染色体の長軸方向の凝縮が著しくなり、相同染色体が交叉部分で連結されたまま、太く、短くなる。凝縮が完了する移動期には、幾つかの染色体で交叉している部分も観察することができた。第一分裂中期には 10 対の相同染色体が赤道面に整列し、後期には相同染色体が分離し、極への移動を開始した。終期には極への移動は完了し、染色体は脱凝縮して核を形成した。第一分裂終了時に細胞質分裂が起こる連続型の減数分裂と、細胞質分裂が起こらない同調型の減数分裂があるが、アブラナの場合は同調型であった。第二分裂前期には再び染色体は凝縮して見え始め、中期には 2 つの赤道面に整列した。後期には姉妹染色体が分離し極へ移動した。終期には 4 つの極に染色体が集合し、やがて核を形成した。この後、細胞質分裂が起こり、1 つの花粉母細胞中に 4 つの花粉小胞子が見られる四分子が形成された。

#### ホトケノザ *Lamium amplexicaule* L.

湘南ひらつかキャンパスでは 4 月から 6 月ごろにかけてあちこちで、ホトケノザの花が咲いているのを見ることができる。シソ科オドリコソウ属の越年草で、道端や田畑のあぜなどによく見られる雑草である。

ホトケノザの蕾は葉と茎の間に、茎を中心に円状に非常に小さな蕾が生じ、葉に包み込まれている。このため、植物体の先端を含めて 3 段までの蕾の周囲を取り巻く葉を含めて採取した。

ホトケノザでは減数分裂期の細胞を観察できる蕾の大きさは 0.6~0.8 mm であった。この蕾は葯が固定と消化した後では透明である。葯が赤色または白色を呈している蕾ではすでに花粉が形成されている。ホトケノザの花粉は楕円形で、緑色に呈した分厚い細胞壁が観察できる。

ホトケノザの花粉母細胞が行う減数分裂はアブラナと同様、一般的に知られている過程を経ることがわかった。細糸期では細胞の全体に非常に細い糸状の染色体が複雑に絡み合っていて広がり、合糸期と太糸

期を経て、太く見える対合した染色体部分が多くなり、細胞中央に集合していくように見えた。複製期では糸状の染色体がさらに太く、短くなっていった。移動期には高度に凝縮し、相同染色体が9つの対をつくっているのが観察された。第一分裂中期には相同染色体は赤道面に並び、後期に入ると次第に分離し、終期には分かれた染色体は別々の極へ到達した。第二分裂前期では、第一分裂終期の後半に起きる脱凝縮した染色体が、それぞれの娘核で再び凝縮が起こる。ただし、第二分裂中期で、それぞれの娘核の赤道面に並んだ。第二分裂後期では青い帯が十字に見られ、第二分裂終期で4つの娘核が形成された。ホトケノザの減数分裂も第一分裂後に細胞質分裂が起こらない同調型であった。

ホトケノザの染色体数は調べた限り文献には記載されておらず、今回得られた移動期から第一分裂後期の染色体像から、ホトケノザの染色体数を  $2n = 18$  と断定した。

#### イヌホウズキ *Solanum nigrum* L.

ナス科ナス属の日本全土の畑や道端に自生する、丈が 20~60 cm に生長する一年草植物である。キャンパス内では夏から秋にかけてイヌホウズキの花を見ることができる。茎の途中に花序を出し、直径 7~10 mm の白い花を 4~8 個つける。萼は杯形で 5 裂し、花冠は白色、皿形で深く 5 裂し、反返る。開花した花の葯は黄色で雌蕊の柱頭を囲むように存在する。液果は直径 6~7 mm の球形で若いうちは緑色だが、成熟すると光沢のない黒色となる。有毒である。名前はホオズキやナスに似ているが役に立たないことに由来する。別名バカナスとも呼ばれる。

蕾の消化は基本とする酵素液の濃度で行った。未消化で蕾の花粉母細胞を観察することで、蕾 1.5~2.0 mm で減数分裂期の細胞を観察できた。蕾 1 個の細胞を広げた 1 枚のプレパラートから最大で 9 段階の減数分裂期ステージが観察できた。従って、1 個の蕾の中で花粉母細胞の減数分裂の進行は同調性が非常に低い。観察した細胞では、染色体数が多く、染色体同士が重なり、イヌホウズキの染色体数を断定することが困難であった。文献にはイヌホウズキの染色体は  $2n = 24$ 、あるいは 72 と紹介されているが、実際に観察したイヌホウズキの染色体の数はおよそ  $2n = 60$  であった。減数分裂期の染色体はアブラナやホトケノザと同様の減数分裂期の挙動を示した。減数分裂の進行は第一分裂前期の細糸期には複雑に絡み合った糸状の染色体が広範囲に広がり、太糸期にかけて次第に太くなり、ほぼ凝縮が完了した染色体を移動期に見ることができた。第一分

裂中期に赤道面に相同染色体が一行に並び、次第に分離を始め、2 個の娘核を形成した。第二分裂で姉妹染色体が分離し、4 個の娘細胞が形成された。イヌホウズキも第一分裂後に細胞質分裂が起こらない同調型であった。染色体像がぼやけている部分があり、通常の濃度での消化では完全には花粉母細胞の細胞壁を消化することはできなかった。

#### 討論

湘南ひらつかキャンパス内にはおそらく何百種もの自生あるいは植栽された植物が生育していると思われる。本年度は 3 種類の植物について減数分裂の全ステージの染色体を観察することができた。この他にも、タイワンユリ (*Lilium formosanum* A.Wallace)、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、メマツヨイグサ (*Oenothera biennis* L.)、ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.)、ハハコグサ (*Gnaphalium affine* D.Don) などについても挑戦してみたが、全ステージを揃えるに至っていない。神奈川県湘南ひらつかキャンパス内で採取したアブラナは染色体数が  $2n=20$  であったことから(図 1)、日本在来種である *Brassica rapa* L. ver. *nippo-oleifera* であることを確かめることができた。ホトケノザに関しては、未同定と思われる染色体数を、本年度の研究により  $2n = 18$  と断定することができた(図 2)。イヌホウズキに関しては、花粉母細胞の細胞壁の消化の難しさと染色体数の多さのため、染色体数の同定に至っていない(図 3)。文献的にも様々な染色体数が報告されており、ゲノムの倍数化が起こりやすい植物なのかもしれない。キャンパス内に生育しているイヌホウズキが単一の染色体数を保持するものかどうかに興味を持たれる。消化の条件を検討してより良い染色体像を得られるようにし、この点をさらに調べてみたいと考えている。

DAPI を用いた染色は、染色自体は非常に簡便であるが、観察するのに蛍光顕微鏡が必要である。中学校や高等学校の理科室には装備されていないのが普通ではないかと考えられるので、そういった場所でこういった実験を実施するのは難しいと思われる。しかし、最近では様々な大学で高大連携と称し高校などに開かれた態勢をとってきているので、実際に実験を希望する場合には大学と相談すると良いと思う。神奈川県では 1 日体験入学、オープンキャンパス、学園祭などの時に多くの研究室が研究室を一般に公開し、話をする機会を設けている。大いに活用していただきたい。

DAPI 染色法は、蛍光顕微鏡といった機材が必要はあるが、誰がどの植物の染色体に対して実験を行っ

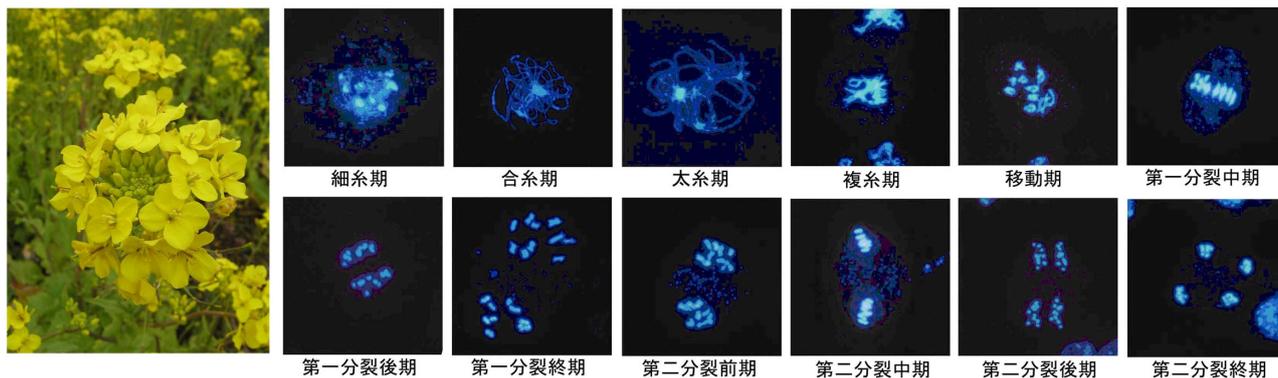


図 1. アブラナ *Brassica rapa* L. ver. *nippo-oleifera* の花と花粉母細胞で見られる減数分裂期染色体. 染色体の数は  $2n=20$  であった.

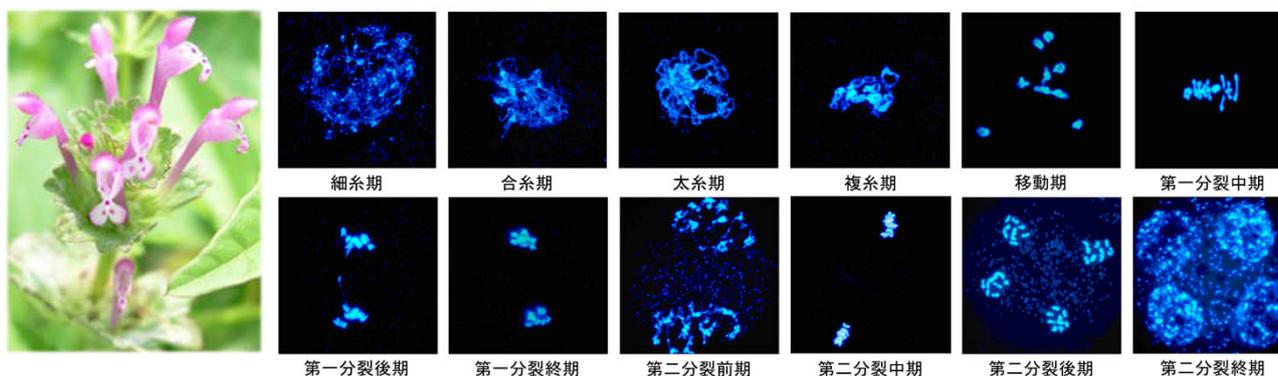


図 2. ホトケノザ *Lamium amplexicaule* L. の花と花粉母細胞で見られる減数分裂期染色体. 染色体の数は  $2n=18$  で合った.

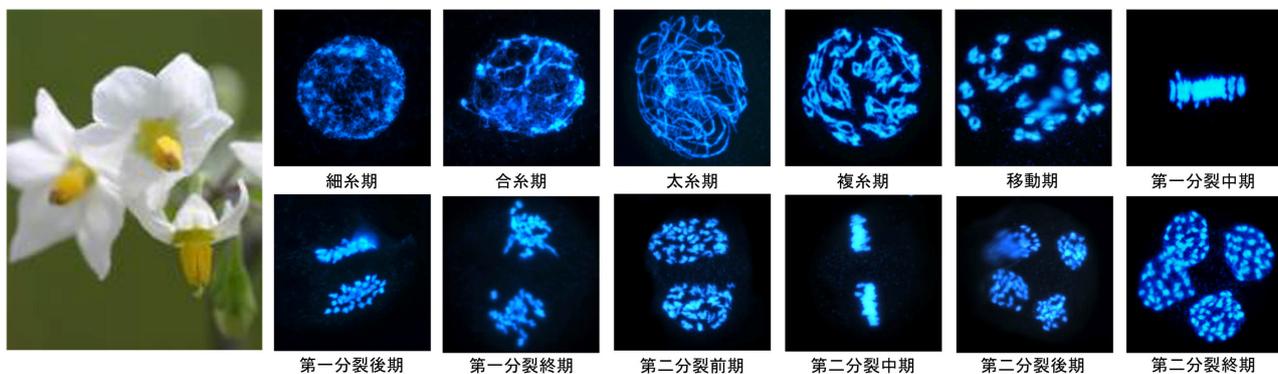


図 3. イヌホウズキ *Solanum nigrum* L. の花と花粉母細胞で見られる減数分裂期染色体. 染色体の数はおよそ 60 であった.

でも、同等の再現性の高い染色体像を得ることが出来る。従って、異なる実験者が異なる場所で実験を行ったとしても、結果を比較することが可能である。現段階では湘南ひらつかキャンパス内の植物を材料に実験を行っているが、将来的には多くの人にこのプロジェクトに参加していただき、様々な場所の可能な限り多くの植物の染色体を比較することができれば、もっともっと面白くなっていくものと期待している。

### 謝辞

本プロジェクトを支えてくれた平成 19 年度の安積研究室の卒業研究生の早川俊君、西久保研太君、近藤裕輔君、松本一恵さんに、この場を借りてお礼を申し上げます。

### 文献

- 1) 堀田康雄 (1988) 減数分裂と遺伝子組換え. 東京大学出版会, 東京.
- 2) Bhojwani SS and Bhatnagar SP; 足立泰二、丸橋亘

- 訳 (1995) *植物の発生学. 植物バイオの基礎*. 講談社, 東京.
- 3) 田中一郎 (1999) *よくわかる遺伝学 - 染色体と遺伝子*. サイエンス社, 東京.
  - 4) Azumi Y (2005) 挿入変異体から得られた植物の減数分裂の分子機構に関する最近の知見について. *Plant Morphology* **16**:31-60.
  - 5) Azumi Y, Liu D, Zhao D, 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.
  - 6) 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.
  - 7) Kuromori T, Azumi Y, Hayakawa S, Kamiya A, Imura Y, Wada T and Shinozaki K (2008) Homologous chromosome pairing is completed in crossover defective *atzip4* mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**: 98-103.
  - 8) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1999) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
  - 9) 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.
  - 10) 安田政尚 (2008) 2007年度植物の減数分裂期染色体画像データベースの構築. *神奈川大学理学部生物科学科卒業論文*.
  - 11) 茂木亜矢子 (2008) 簡便な減数分裂期染色体観察法の開発に関する研究. *神奈川大学理学部生物科学科卒業論文*.