

シロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期における染色体の挙動について ～共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた3D解析～

安積良隆、羽生真樹、鈴木秀穂

神奈川大学 理学部 生物科学科 〒259-1293 平塚市土屋 2946

要旨

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の減数分裂期の花粉母細胞を共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。PI (propidium iodide) で染色された減数第一分裂前期のレプトテン期、サイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期、ディアキネシス期、さらに減数第一分裂中期、後期、終期、減数第二分裂前期、中期、後期、終期の染色体を観察することができた。得られたデータを3次元的に再構築することによって減数分裂時の染色体の様子を立体的に視覚化することに成功した。

序論

減数分裂は一部の例外を除きすべての真核生物が行う有性生殖に必須の過程で、2倍体 ($2n$) である胞子体が半数体 (n) の配偶体を形成する際に染色体を半減させるために行う特殊な細胞分裂であり、通常の体細胞分裂とは様々な点で異なる。基本的に体細胞分裂では $2n$ の親細胞と $2n$ 娘細胞は同じ遺伝情報を持っており、同じ遺伝形質を有する。減数分裂では親細胞が $2n$ であるのに対し、娘細胞は n で染色体を半分しか持っておらず、たとえそれが受精して $2n$ に戻ったとしても、完全な純系内で交雑しない限り、組換えが起こっているため親細胞と娘細胞の持つ遺伝情報は一致しない。

減数分裂は一度のDNA複製に続いて、二度の分裂が連続して起こり、それぞれ減数第一分裂、減数第二分裂と呼ばれる。それぞれには前期、中期、後期、終期があり、減数第一分裂の前期はさらに5つのサブステージ、レプトテン期 (細糸期)、サイゴテン期 (合糸期)、パキテン期 (太糸期)、ディプロテン期 (複糸期)、ディアキネシス期 (移動期) に分けられる。現在、減数分裂に関する研究は分子遺伝学的な解析が可能な酵母やマウスを中心にして行われている。植物でも古くから減数分裂に関する突然変異体は得られていたが、その原因遺伝子の解析が困難であったことからそれらの変異体の解析はあまり進展しなかった。しかし近年ではシロイヌナズナがモデル植物として注目されるようになり、シロイヌナズナを用いた減数分裂の研究が行われるようになってきた。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) はゲノムサイズが小さいこと、植物体の背丈が低く室温で成長し実験施設内での栽培が容易なこと、世代時間が短いことなどの理由で植物のモデル生物として採用された。実際に多くの研究者に実験材料として用いら

れており、様々な研究が集中的に行われ、植物に関する先端研究の中心となっている。2000年12月にはゲノムの全塩基配列が決定され報告されている。また多くの突然変異体が作成され、遺伝子の染色体上の部位の決定とその遺伝子産物の機能の同定に大きく寄与している。しかしゲノムの小ささは染色体の小ささに反映しており、シロイヌナズナの持つ5組10本を大きさやバンディングパターンで見分けることは難しい。そのため染色体の観察といった細胞生物学的な研究の進展はなかなか見られなかったが、1996年にRossらによって減数分裂期にある花粉母細胞の染色体のほぼ全ステージの様子が報告された。これによって我々はシロイヌナズナの減数分裂期の間には染色体がどのような挙動を示すのかを知ることができるようになった。この方法は細胞壁を消化した花粉母細胞をスライドガラス上に平面的に展開したもので解像度が非常に優れており、染色体の細部まで観察することができる。しかし立体的な細胞が平面上に展開されたものであるため、細胞内の構造物の立体的な位置関係が保持されているわけではない。我々は減数分裂期の染色体のありのままの姿をより良く理解するために、立体構造を保持したままの細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、立体的に視覚化することにした。その結果、花粉母細胞の減数分裂全ステージの染色体の立体像を得ることに成功した。

材料と方法

植物の栽培 バットに吸水させた培養土を広げ、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Landsberg ercra) の種子を蒔き、バットにカバーを被せて4°Cの低温室に三日置いた。その後23°Cの培養室に移し、三日後にカバーをはずして23°C連続光下で育てた。肥料としてMS培地とハイポネックス (ハイポネックスジャパン) を適宜与えた。

固定 Brendaらの方法(1997)に従い、花序を集め、固定液(5mM EGTA, 4% パラホルムアルデヒド, 1×PBS)に移し、5分間の減圧を2度行った後、室温で1時間保温し、1×PMEG (50mM PIPES, 1mM MgSO₄, 5mM EGTA, 1% グリセロール) で2度洗浄して1×PMEG中、4°Cで保存した。

展開 固定した試料から適当な蕾を選抜し、各蕾から葯を一つ取り出してDAPI染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。減数分裂をしている事を確認した後、残りの葯をポリ-L-リシンコートしたカバーガラスの上で解体し、熊谷らの方法(1997)に従って花粉母細胞を展開した。50°Cに温めておいた7% sucrose/0.7%アガロース溶液をかけて被い、アガロースが固まってから酵素液(0.2% cellulase, 0.2% cytohelicase, 1.5% β-glucuronidase, 7% sucrose) をかけ、37°Cで約20分消化した。消化後、洗浄液(1×PBS, 0.05% Triton-X100) で5分間4回洗浄した。

染色 染色液(0.05mg/ml PI, 10mM Tris HCl pH8.0, 10mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 10μg/ml RNaseA) を試料にかけ、30分間置いて核酸を染色し、1×PBS洗浄した。最後に、スライドガラスに載せて封入した。Bio-Radの共焦点レーザー顕微鏡ラ

ディアンズ 2000 を使用し Z 軸方向は 0.5 μm 間隔でデータを採り、同社のレーザーシャープ 2000 で立体画像を構築した。

結果

シロイヌナズナの減数分裂中の花粉母細胞の染色体は、Albini によって電子顕微鏡を使って観察された例もあるが (1994)、一般に最近では Ross らによって開発された光学顕微鏡による観察法が利用される (1996)。Ross らはこの方法によって花粉の減数分裂の全ステージの鮮明な染色体像を得ており、減数分裂の時期を特定するためのスタンダードとして頻繁に参照されている。また多くの研究者によってこの方法が利用されている。しかしこの方法は 3 次元の立体構造をもつ細胞を 2 次元のスライドガラスの表面に展開したもの (展開試料) であるので細胞内の立体的な位置を忠実に反映しているとは言い切れない。我々はより現実に近い減数分裂の様子を把握するため、立体構造を保持した細胞 (共焦点用試料) を共焦点レーザー顕微鏡で解析し、得られたデータから立体像をコンピューターを使って構築することにした。その方法として、まず最初に花序をパラホルムアルデヒドで固定した。その花序をシャーレ上に移し、適当なつぼみを選抜して、実体顕微鏡下でそれらのつぼみを開き、やくの一つを取り出してスライドガラス上に移した。DAPI で染色し蛍光顕微鏡下で観察して、減数分裂中であることが確認されたつぼみの残りのやくをポリ-L-リシンでコートしたカバーガラス上に移し、花粉母細胞を解放した。それをアガロースで被った後、消化酵素で細胞壁を消化し、PI で染色した。それを共焦点レーザー走査顕微鏡で解析した。Fig. 1 はパキテン期の花粉母細胞を真上から見たものである。Fig. 2 は Fig. 1 を回転させたもので、Fig. 3 は各焦点面を並べたものである。本報告では感覚的に捕らえやすい各焦点面を並べた方法で立体的な位置を示す。

花粉母細胞は 1 本の雄しべやくの中に 4 つの花粉母細胞のふさがあり、Fig. 4 はその一つを示したものである。減数分裂に入る前の花粉母細胞ではまだ核膜が残っており、その中に染色糸が分散している様子がわかる。また核小体が存在することが確認された。レプトテン期 (Fig. 5)： 染色体は細い糸状に見えてくる。染色体の複製はすでに終わっているので、細いとは言えそれぞれの染色体は姉妹染色分体からできている。ザイゴテン期 (Fig. 6)： 相同染色体同士が対合を始め、対合した部分は太い糸状に観察される。この時期には核領域と細胞質領域を区別する核膜はすでに見られなくなっている。

パキテン期 (Fig. 1, 2, 3)： シナプトネマコンプレックス (synaptonemal complex) と呼ばれる構造によって相同染色体同士が端から端まで対応する部分で対合し、染色体全体が太い糸状に観察される。

ディプロテン期 (Fig. 7)： 染色体は長軸方向に収縮し始め、さらに太く短くなって

ゆく。ディプロテン期に入るとシナプトネマコンプレックスは急激に分解され、相同染色体間の連結は相同染色体間の組み換えによって生じたキアズマによって支えられている。

ディアキネシス期 (Fig. 8) : 染色体がさらに凝縮するが、染色体は対合した状態を維持している。

減数第一分裂中期 (Fig. 9) : 5組の相同染色体が赤道面に並ぶ。シロイヌナズナの場合、最高度に凝縮している減数第一分裂中期には一対の相同染色体は完全に一体化し一つの塊のように見え、5組の相同染色体を見分けることもできない。この時紡錘体の構成要素であるチューブリンに対する抗体を用いて免疫染色を行うと紡錘体が形成されているのがわかる (Fig. 18 A, B, C)。Fig. 9 では染色体が極方向へ少し引っ張られて伸びている様子がわかる。減数第一分裂中期になると核小体は観察されなくなる。

減数第一分裂後期 (Fig. 10) : それぞれの対の相同染色体は分れてそれぞれ別の極へと移動する。両方の極には5本ずつの染色体が存在する。

減数第一分裂終期 (Fig. 11) : 染色体の極への移動は完了し、紡錘体が消失する。シロイヌナズナの場合、この時点では細胞質分裂は起こらない。

減数第二分裂前期 (Fig. 12) : 核膜が形成され、その中で凝縮していた染色体は一度伸展する。核と核の間にオルガネラバンドが形成されはじめる。

減数第二分裂中期 (Fig. 13) : オルガネラバンドによって分画された二つの娘細胞のそれぞれにおいて5本の染色体が各々の赤道面に整列する。この時それぞれの染色体グループの赤道面は平行ではない。それは減数第一分裂中期と同様にチューブリンに対する抗体で紡錘体を視覚化した場合により明かとなる (Fig. 18 G, H, I, J, K, L)。

減数第二分裂後期 (Fig. 14) : それぞれの染色体は姉妹染色分体に分れ、極へと移動する。

減数第二分裂終期 (Fig. 15) : 染色分体は4つの極に集合し、核を形成する。

四分子期 : 核を中心に細胞質分裂が起こり、4つの花粉四分子が1つの花粉母細胞内に観察される。

これらの各ステージの観察像を1平面に投影し、まとめたものが Fig. 16 である。参考までに消化展開法によって観察される各ステージの染色体像 (DAPI 染色) を Fig. 17 に掲載する。

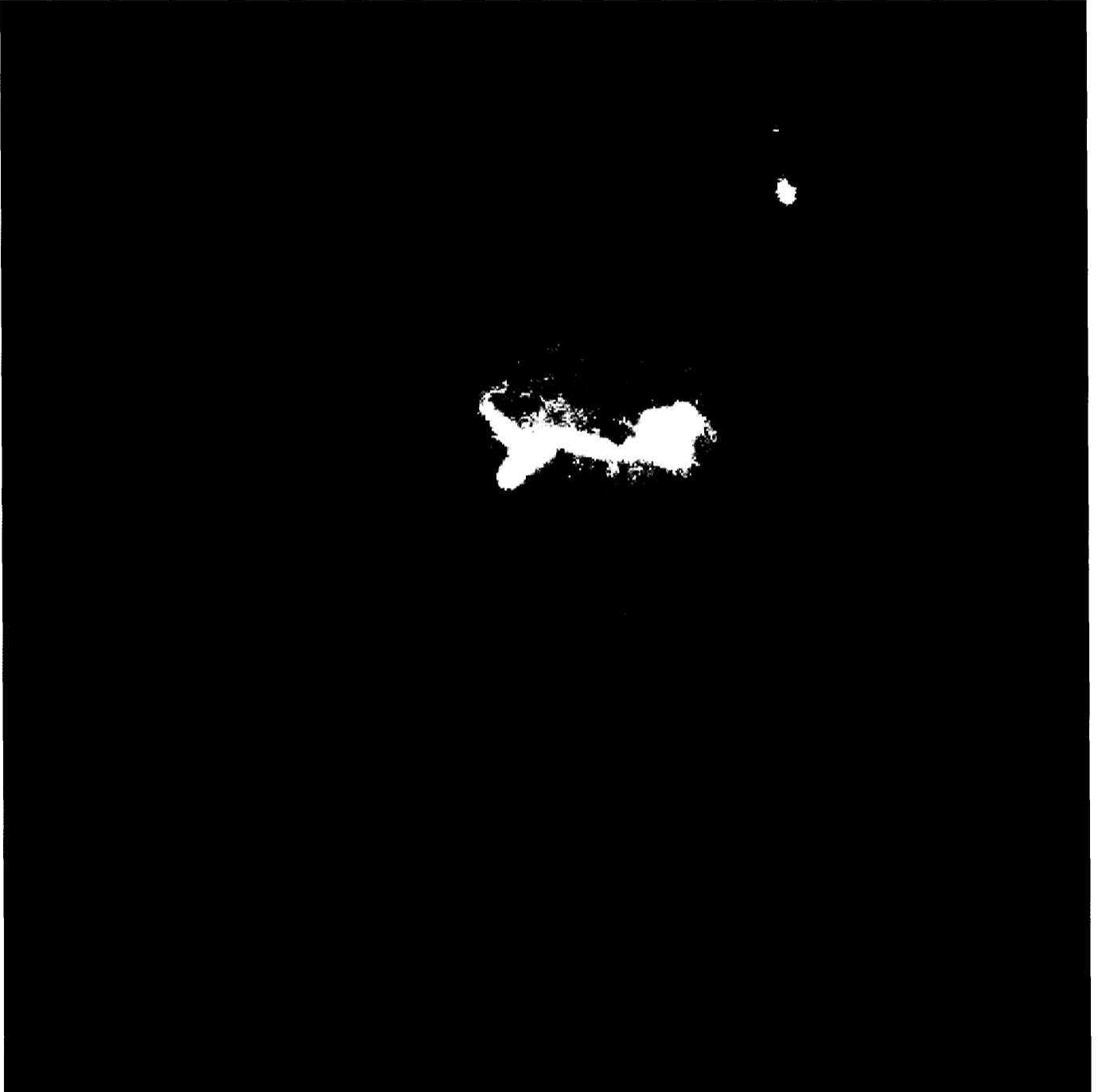


Figure 1 パキテン期の花粉母細胞を真上から観察したもの。

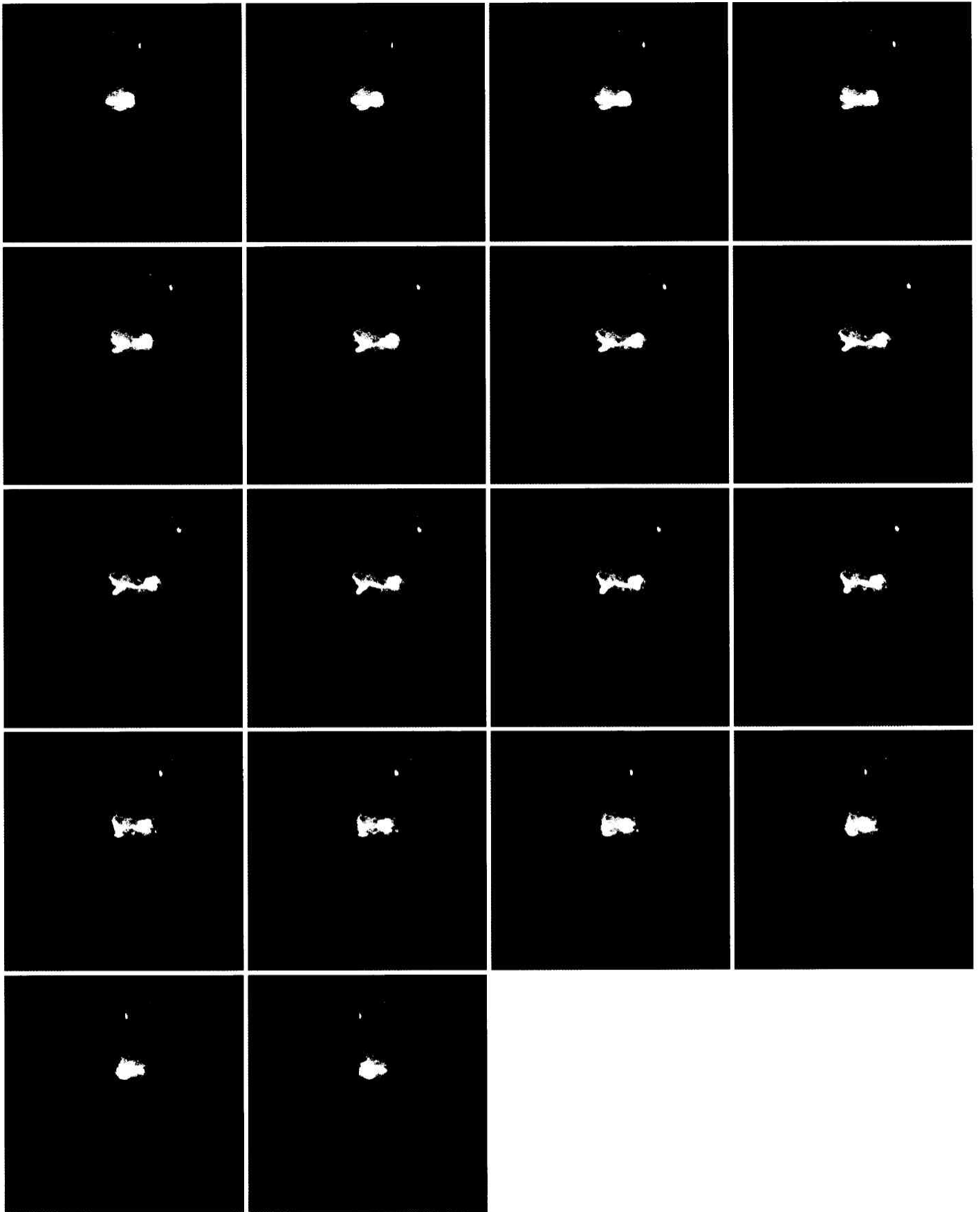


Figure 2 Fig. 1 の立体画像を水平方向に5度ずつ回転させたもの。

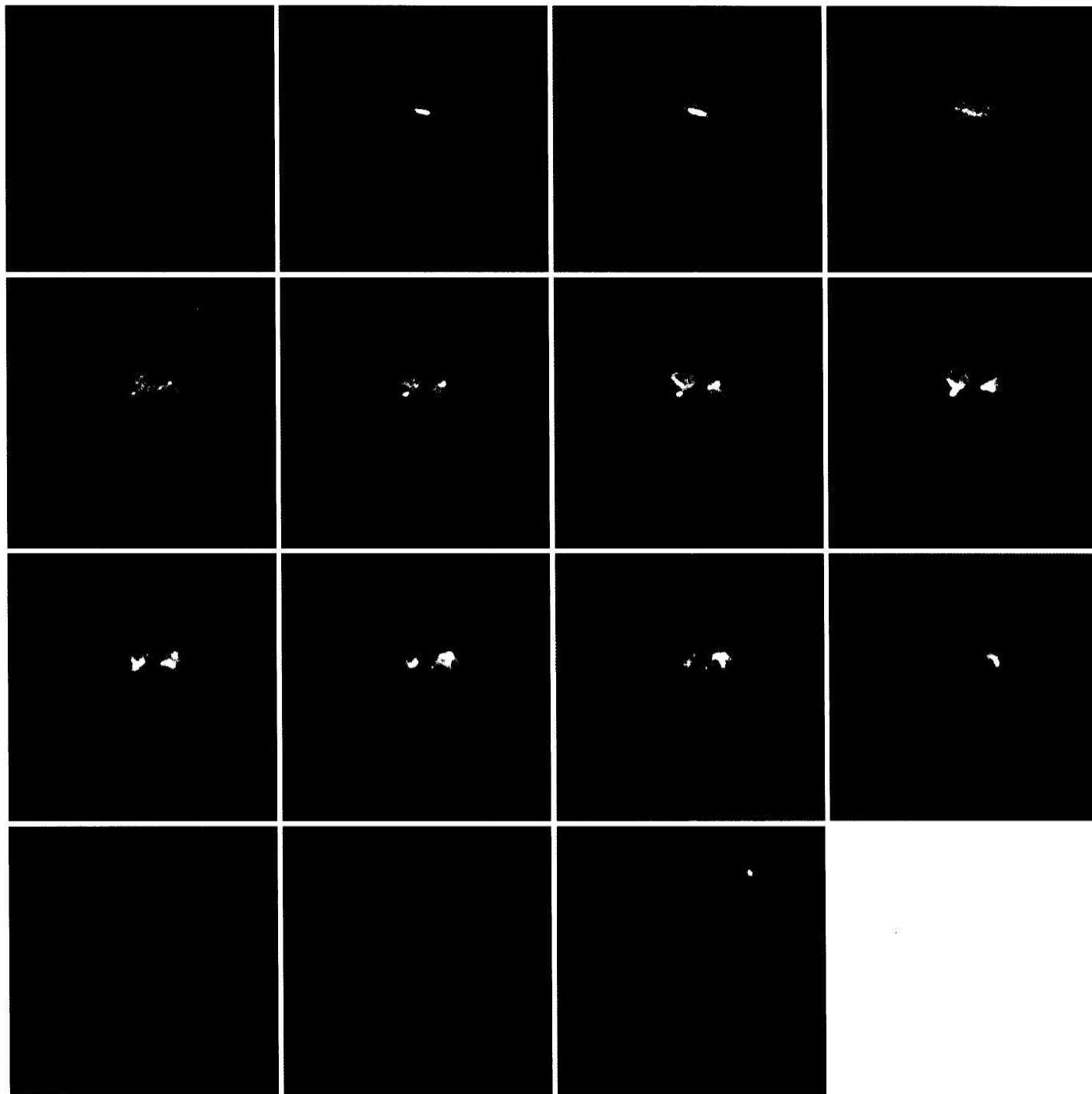


Figure 3 Fig. 1 の立体像を $0.5\mu\text{m}$ おきに底面から観察したもの。

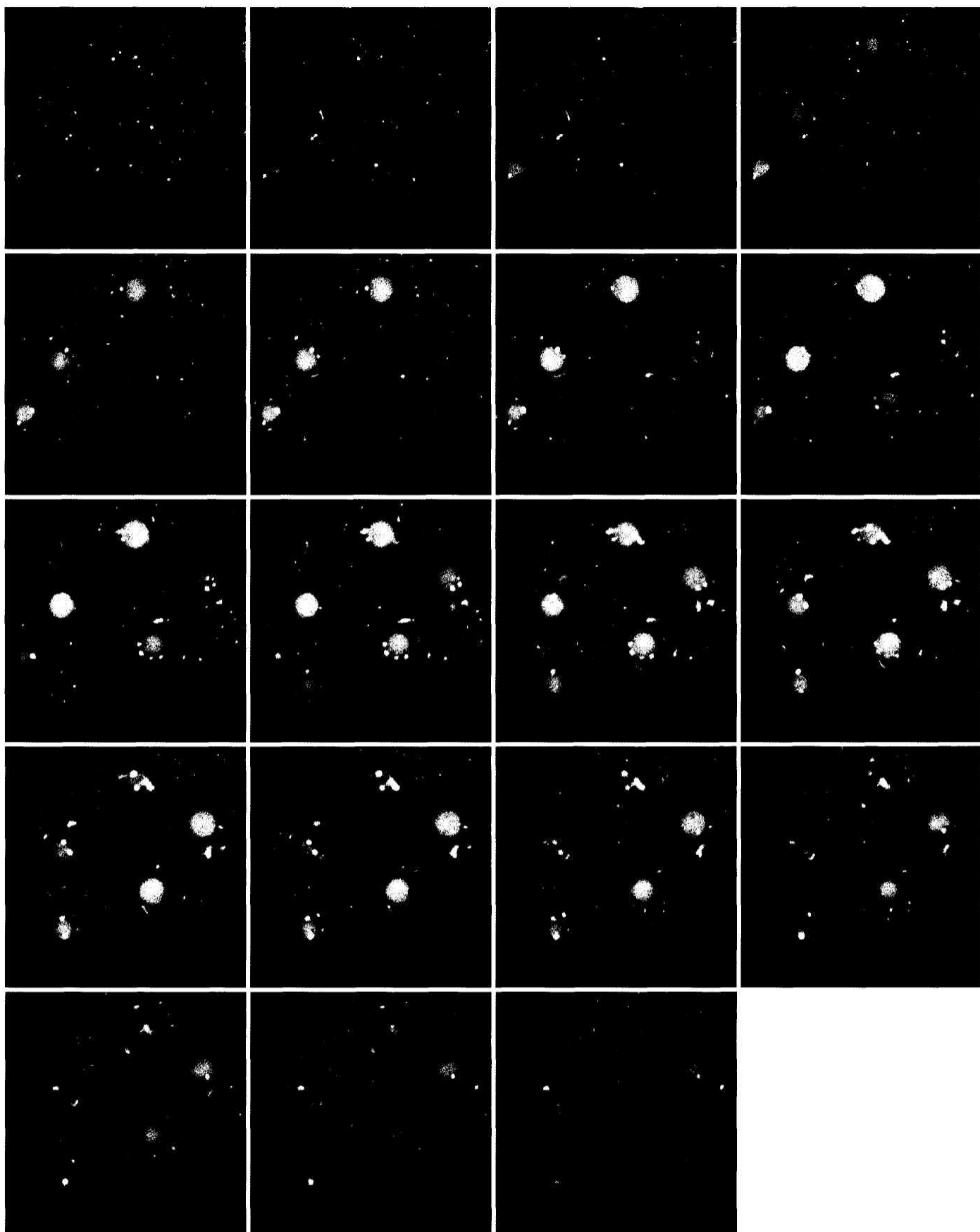


Figure 4 減数分裂に入る直前の花粉母細胞群。

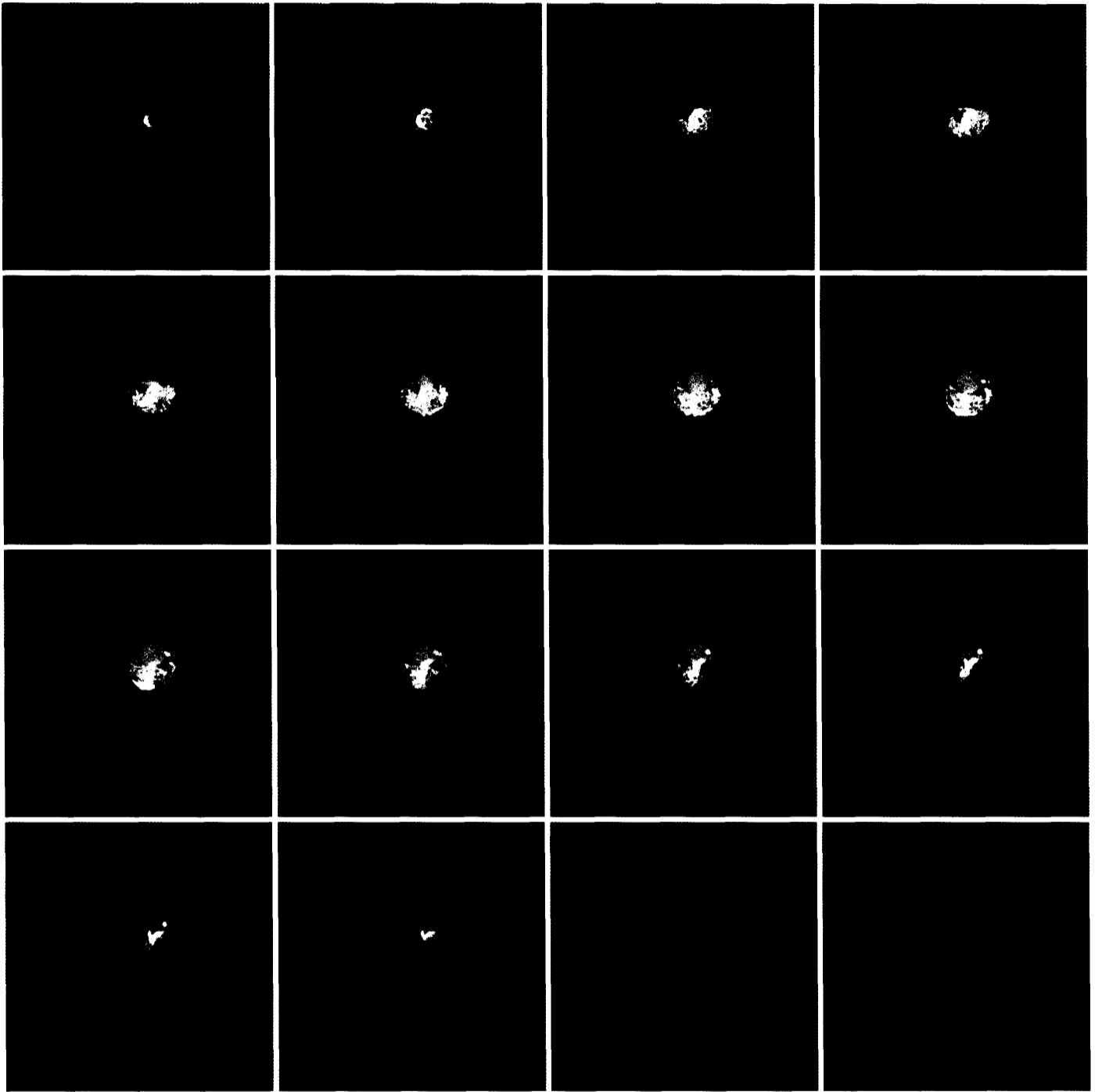


Figure 5 レプトテン期の花粉母細胞。

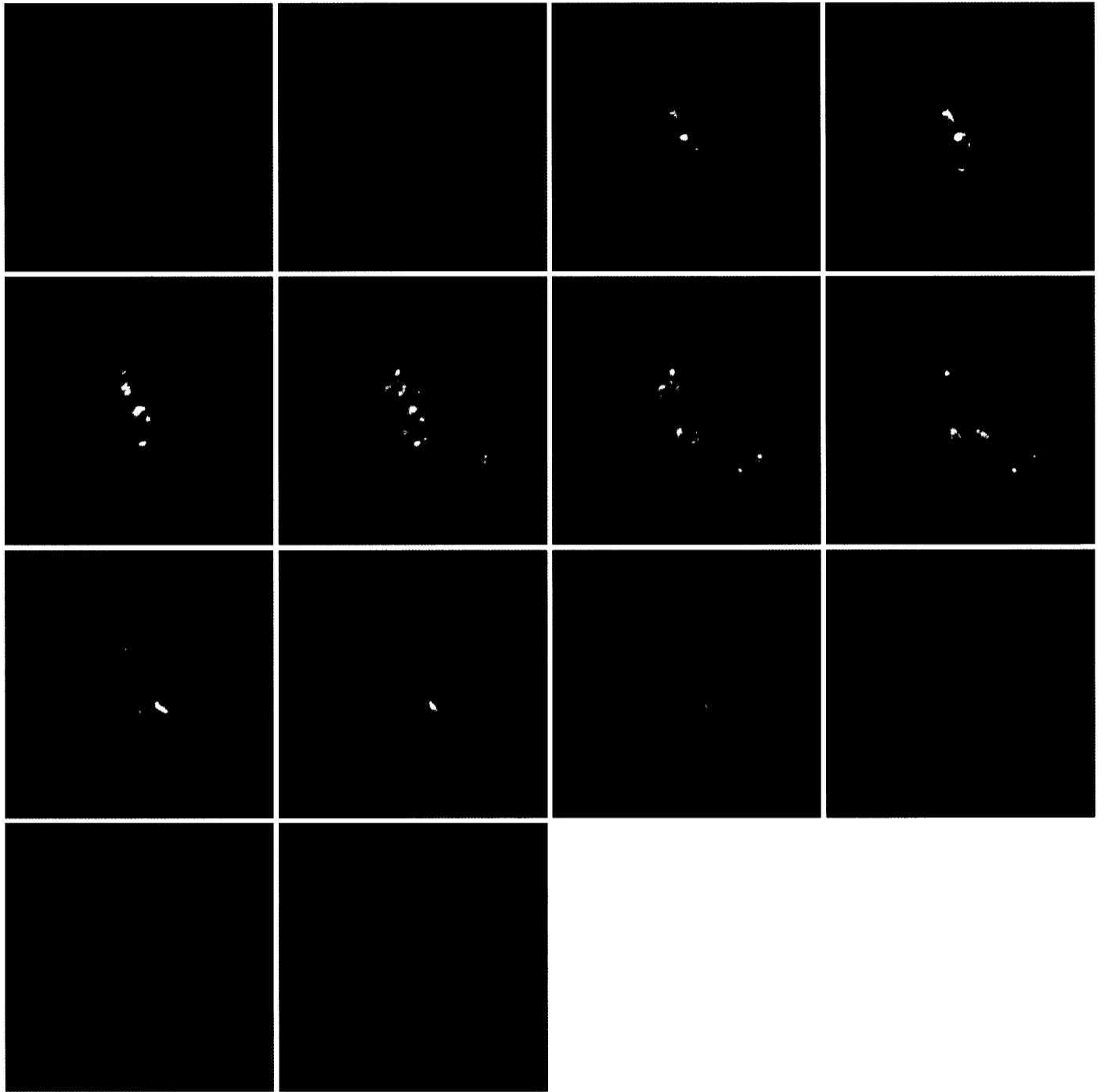


Figure 6 ザイゴテン期の花粉母細胞。

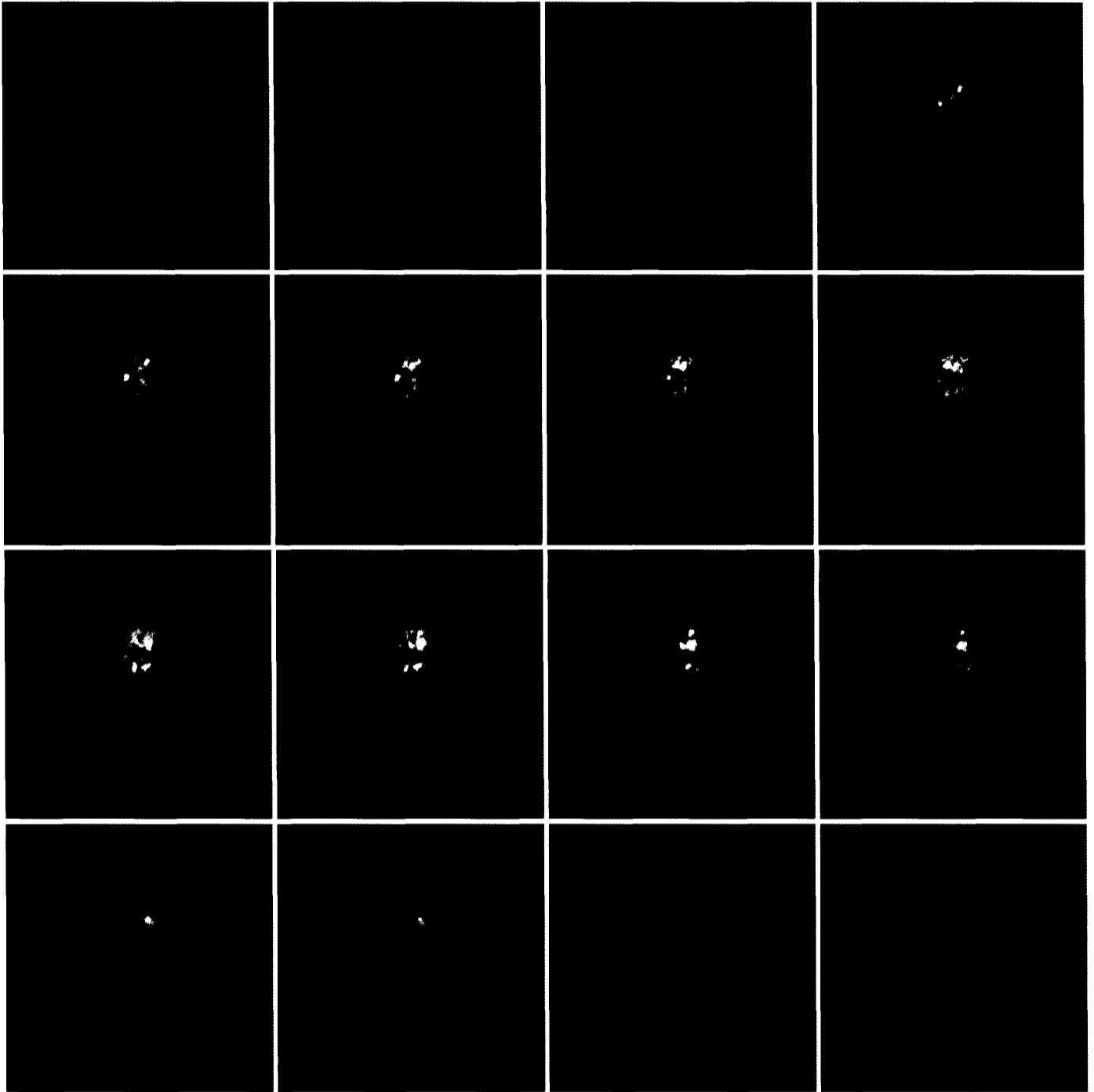


Figure 7 ディプロテン期の花粉母細胞。

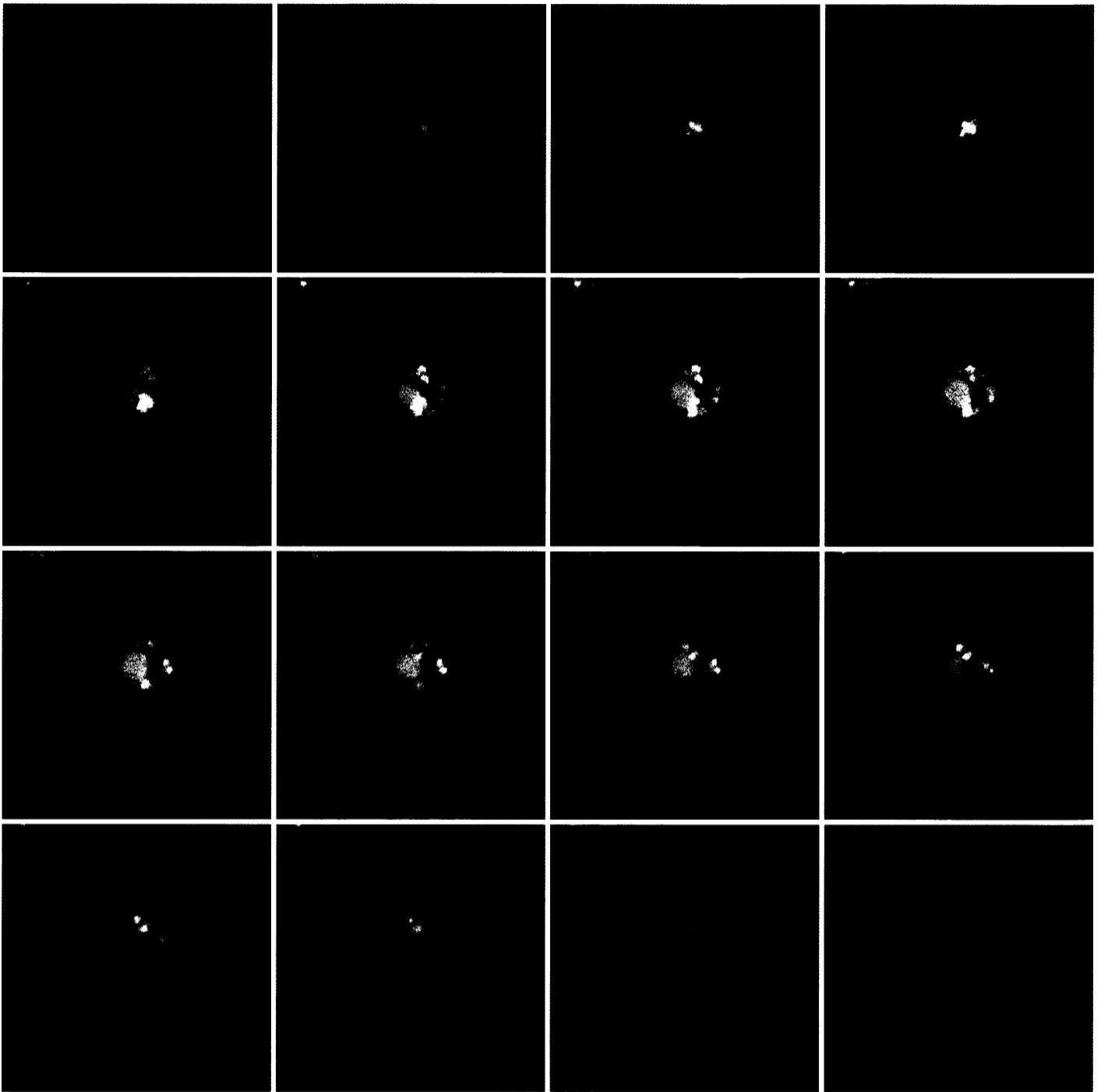


Figure 8 ディアキネシス期の花粉母細胞。

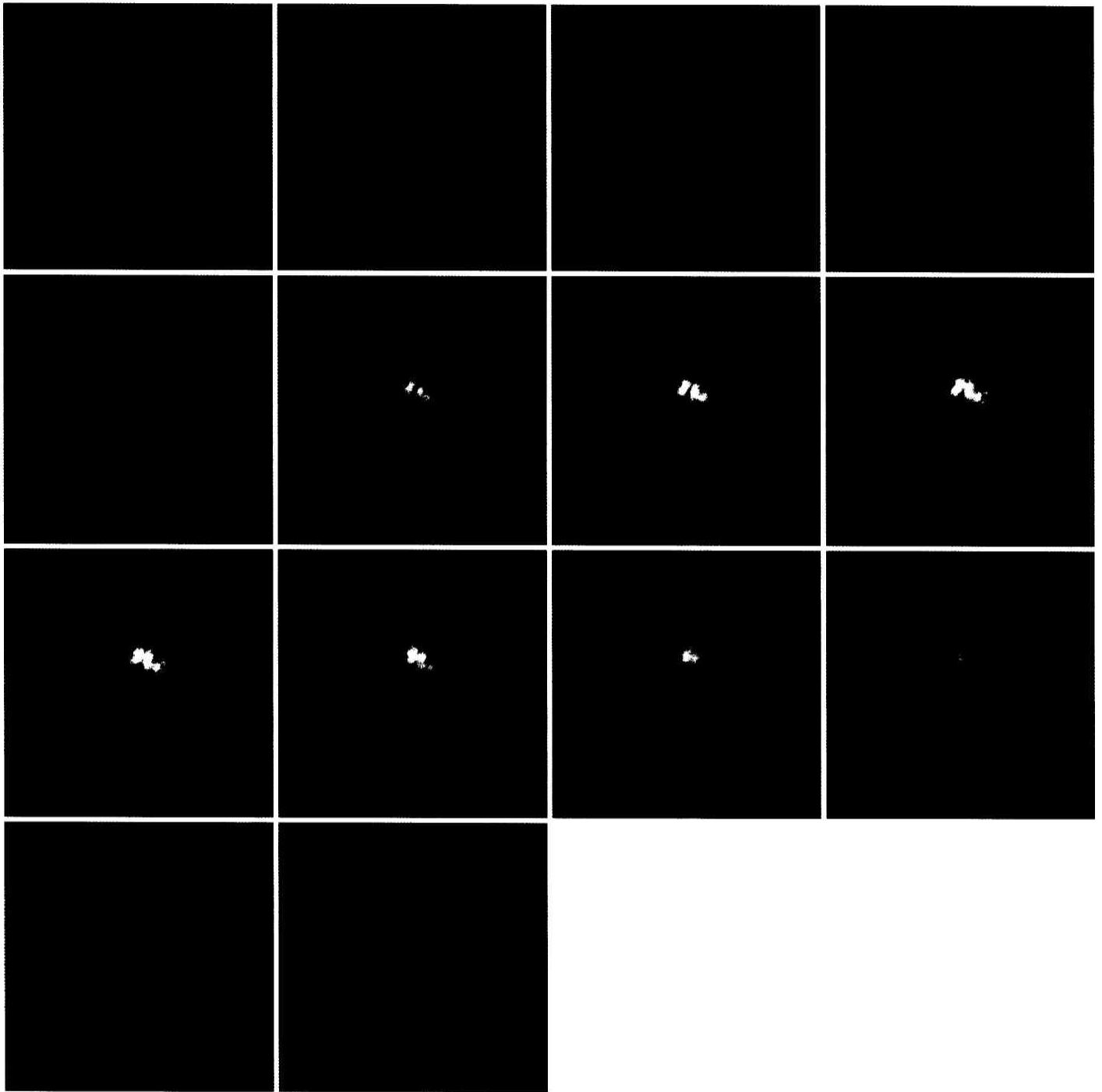


Figure 9 減数第一分裂中期の花粉母細胞。

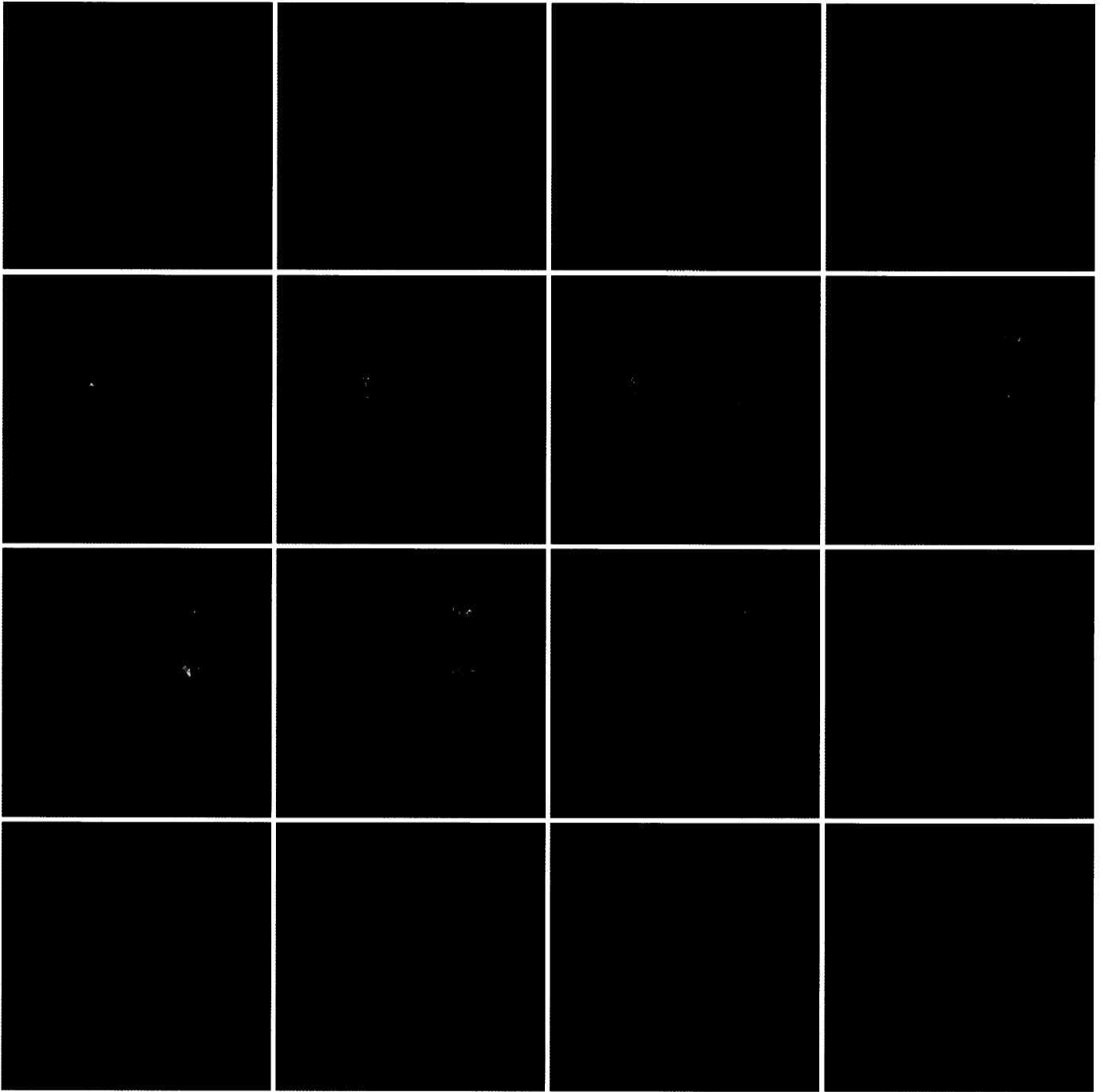


Figure 10 2つの減数第一分裂後期の花粉母細胞。

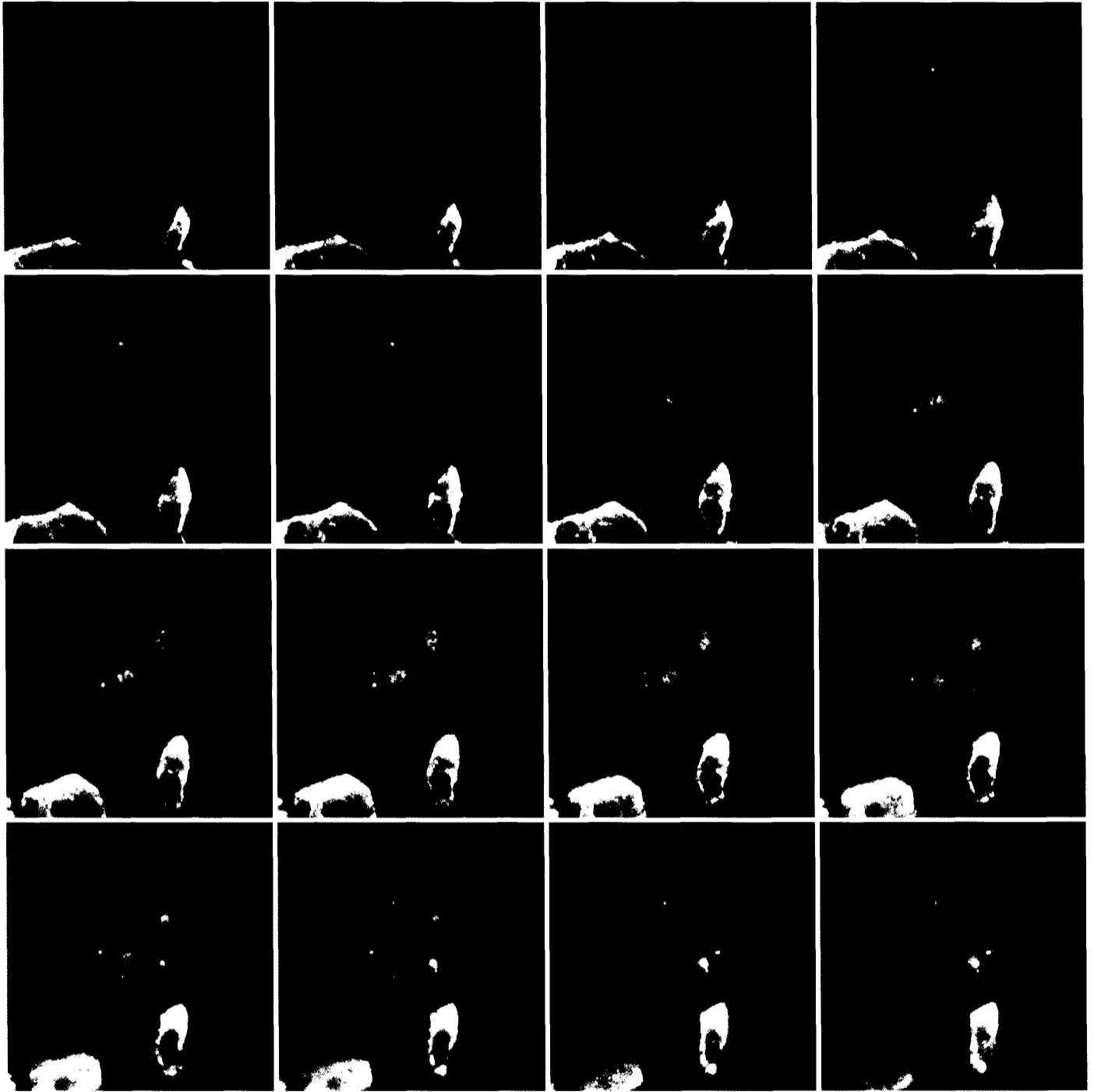


Figure 11 減数第一分裂終期の花粉母細胞。

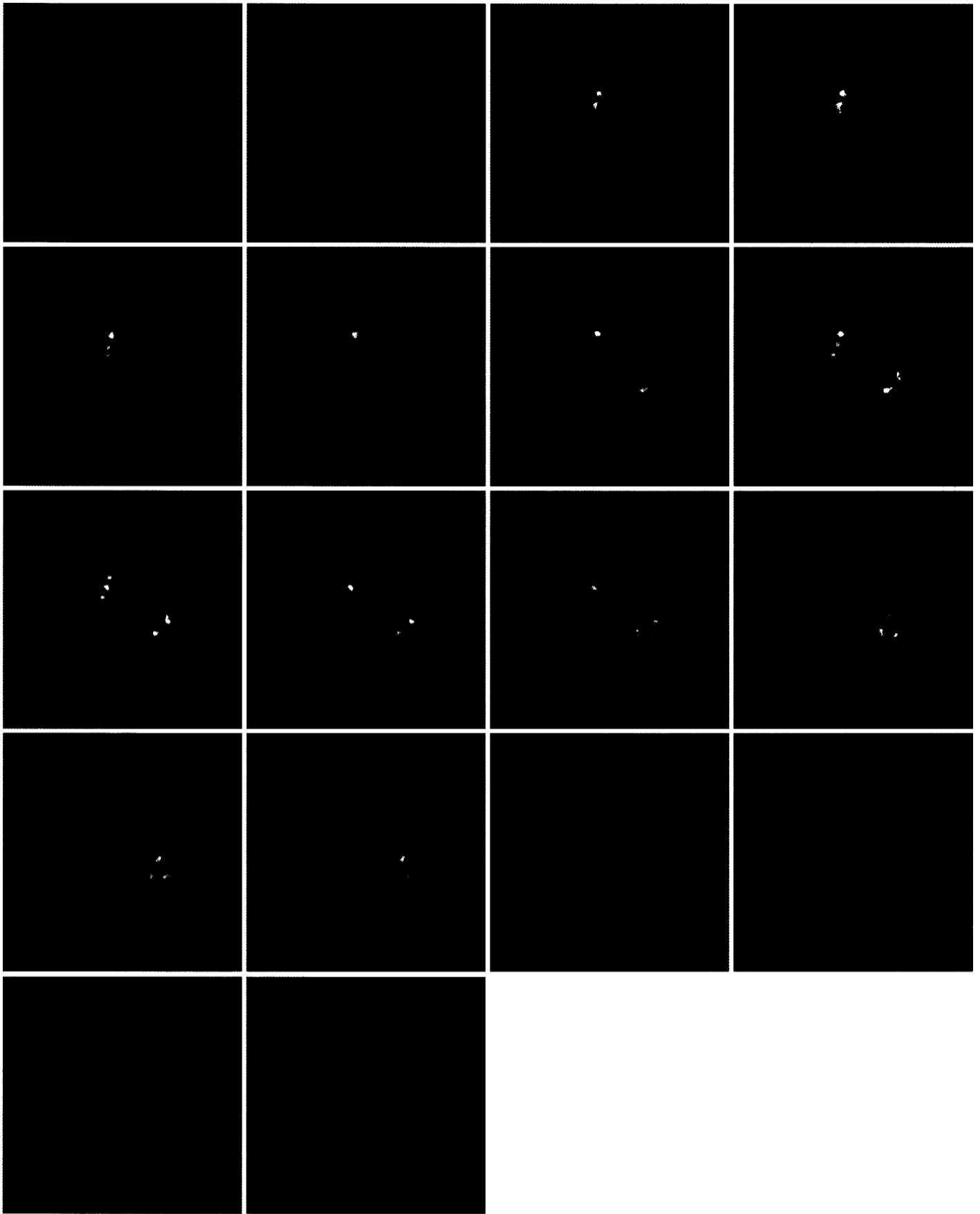


Figure 12 減数第二分裂前期の花粉母細胞。

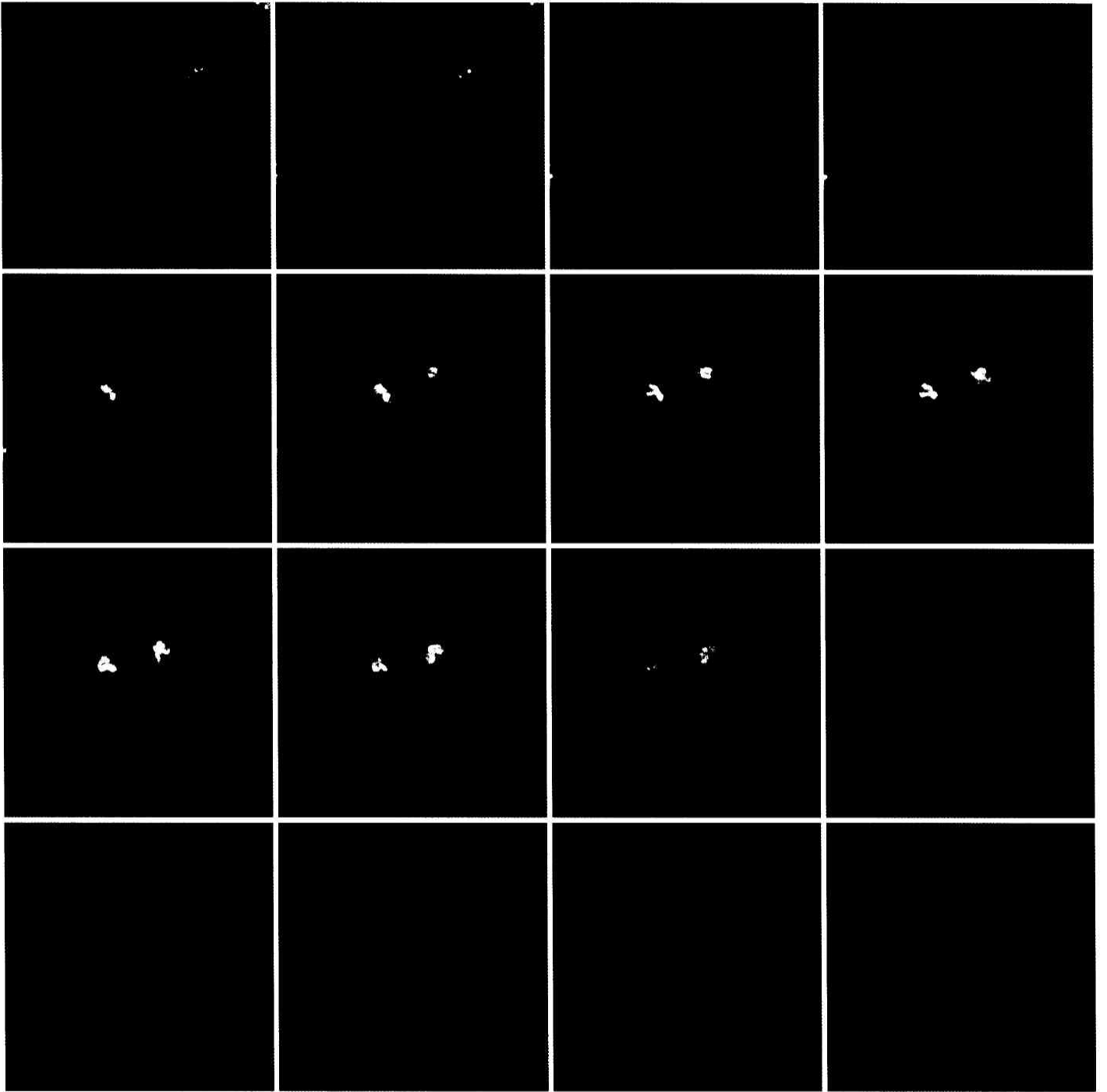


Figure 13 減数第二分裂中期の花粉母細胞。

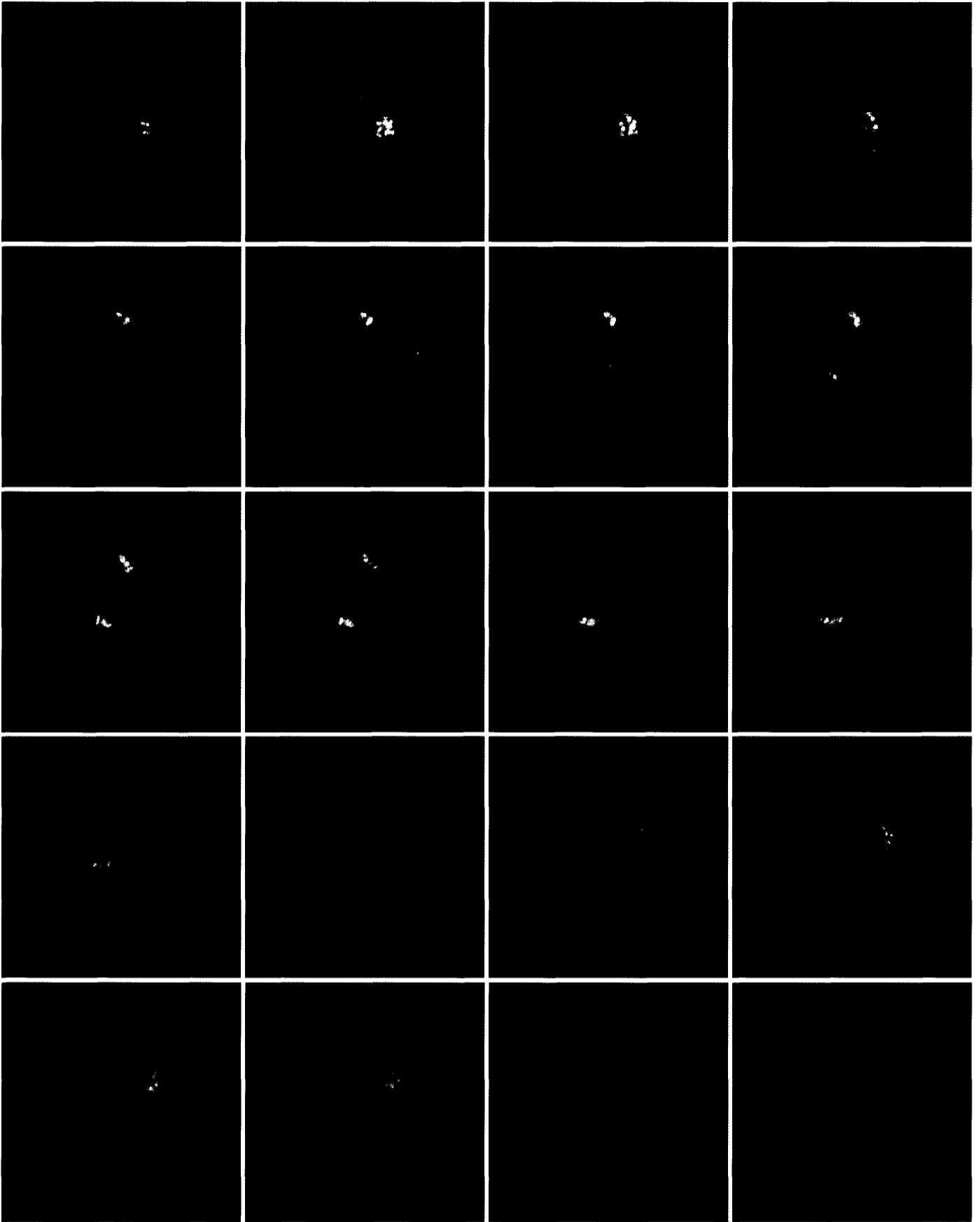


Figure 14 減数第二分裂後期の花粉母細胞。

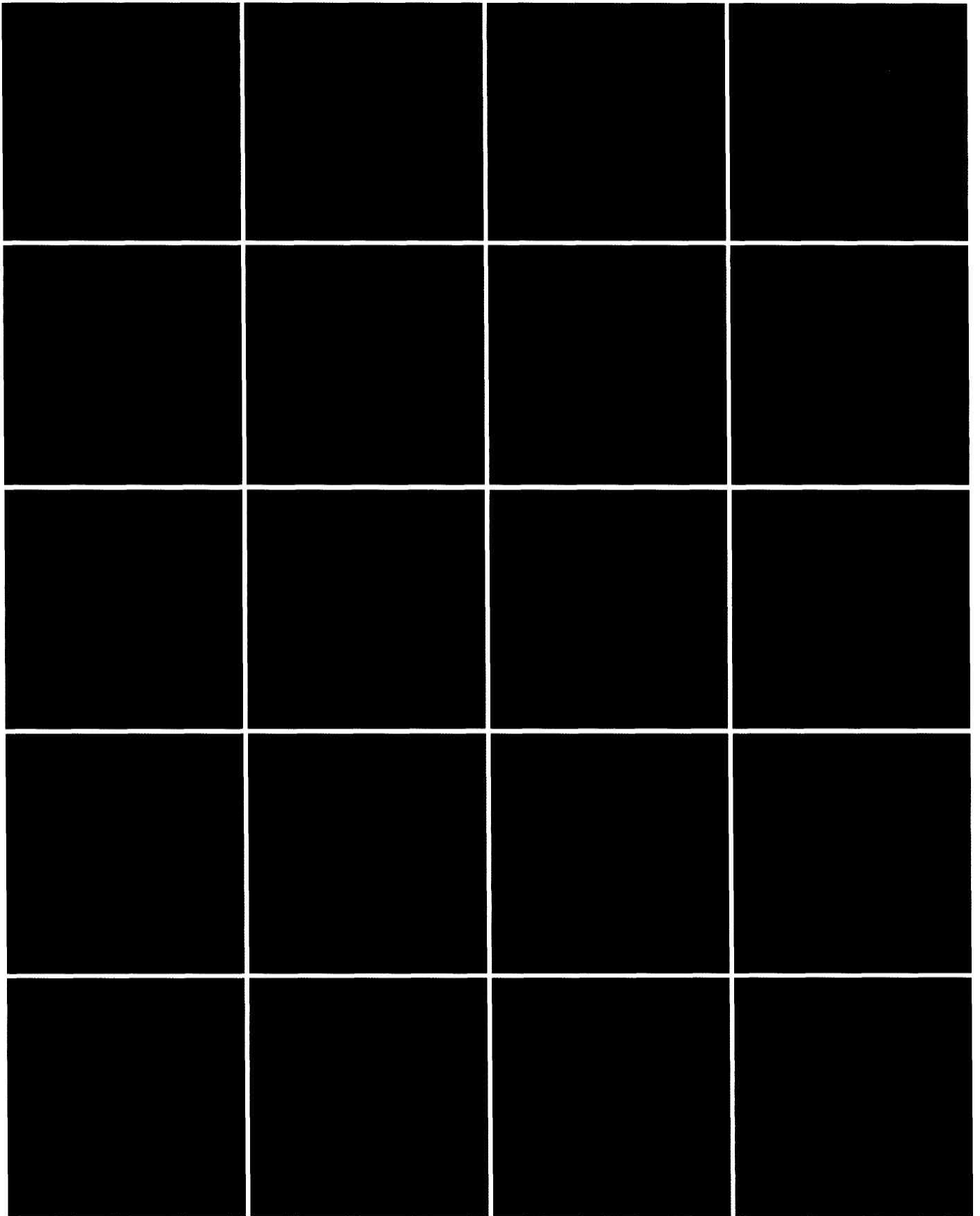


Figure 15 減数第二分裂終期の花粉母細胞。

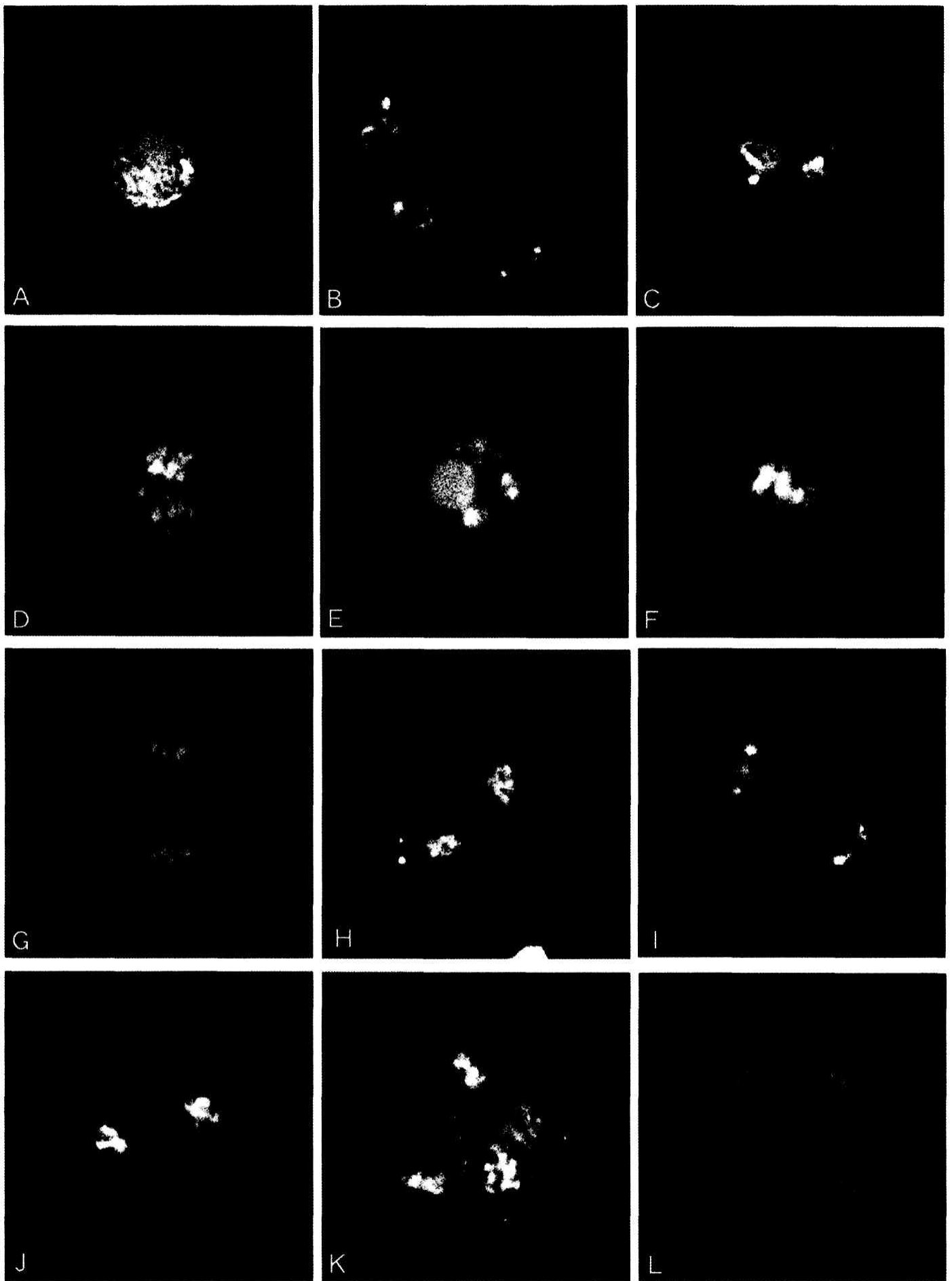


Figure 16 減数分裂期の染色体の様子をまとめたもの。A: レプトテン期、B: ザイゴテン期、C: パキテン期、D: ディプロテン期、E: ディアキネシス期、F: 減数第一分裂中期、G: 減数第一分裂後期、H: 減数第一分裂終期、I: 減数第二分裂前期、J: 減数第二分裂中期、K: 減数第二分裂後期、L: 減数第二分裂終期。

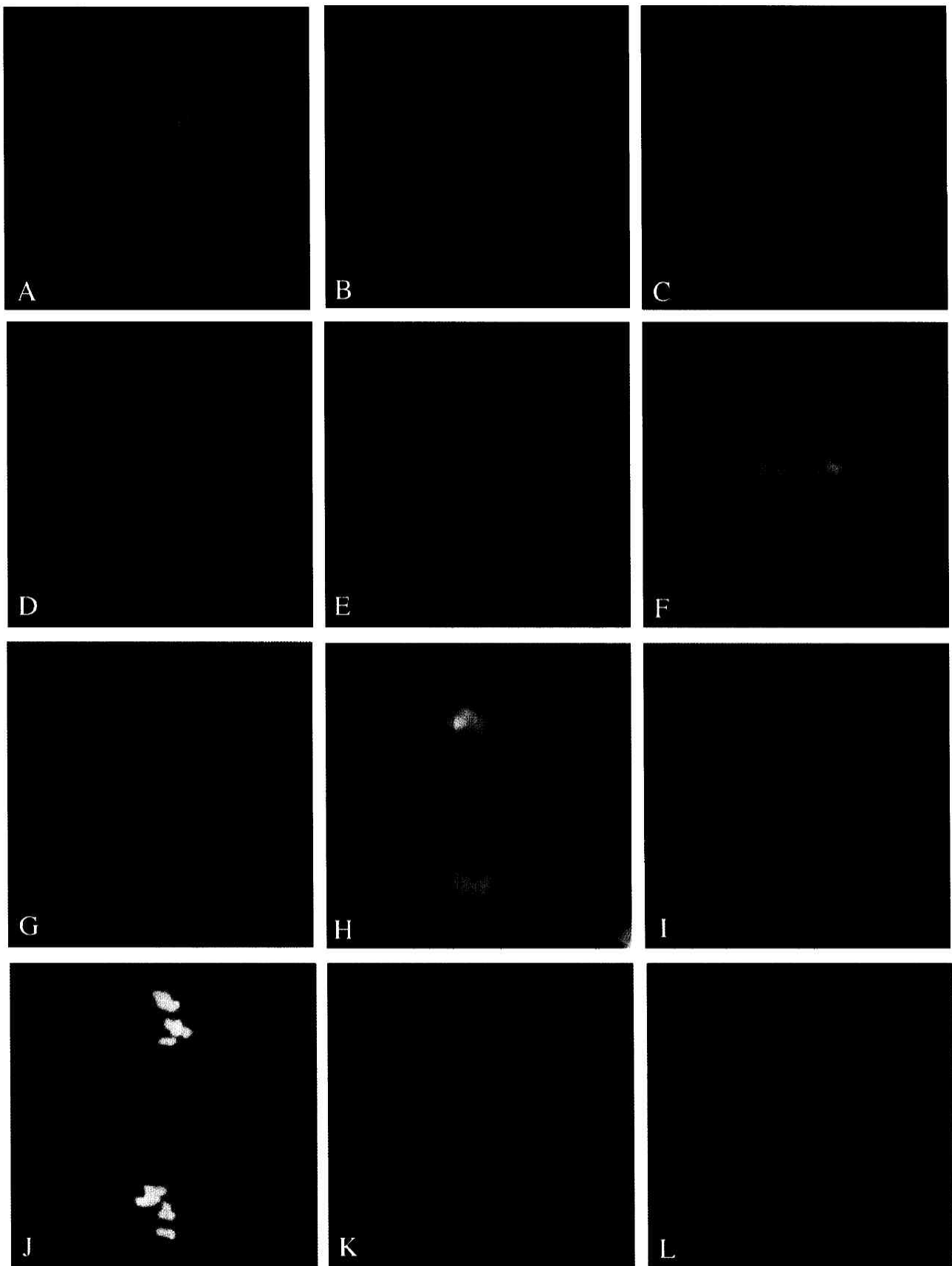
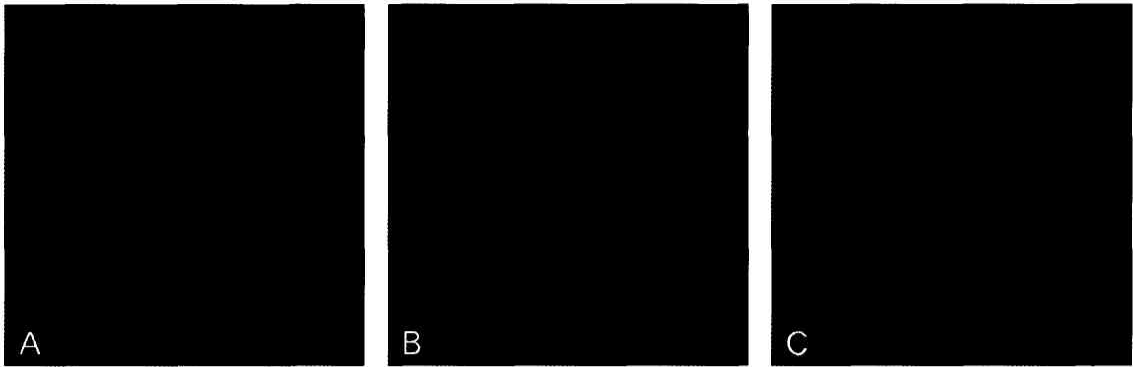
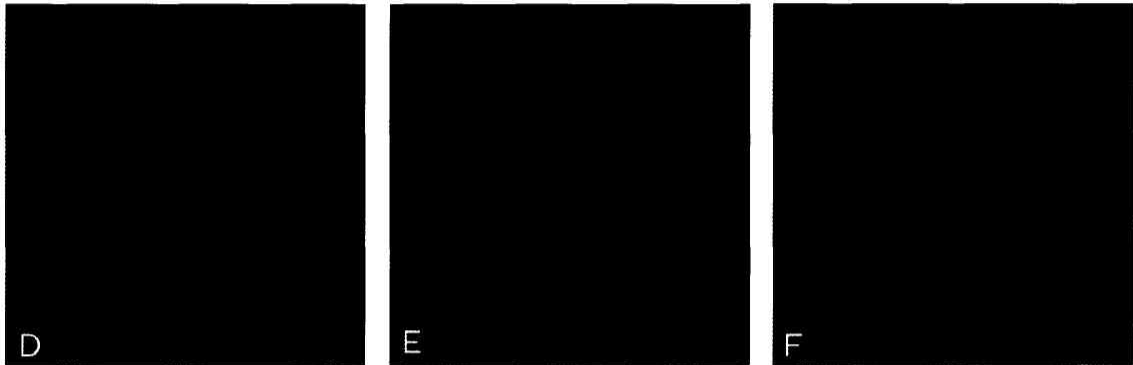


Figure 17 Rossらの消化展開法 (1996) に従って準備されたシロイヌナズナの減数分裂中の花粉母細胞の染色体を蛍光顕微鏡を用いて観察したもの。花粉母細胞の細胞壁をサイトヘリカーゼ、ペクトリアーゼ、セルラーゼ及び β -グルクロニダーゼを用いて消化し、プロトプラスト化したものをスライドガラス上に平面的に展開し、染色体をDAPIで染色した。A:レプトテン期、B:ザイゴテン期、C:パキテン期、D:ディプロテン期、E:ディアキネシス期、F:減数第一分裂中期、G:減数第一分裂後期、H:減数第一分裂終期、I:減数第二分裂前期、J:減数第二分裂中期、K:減数第二分裂後期、L:減数第二分裂終期。

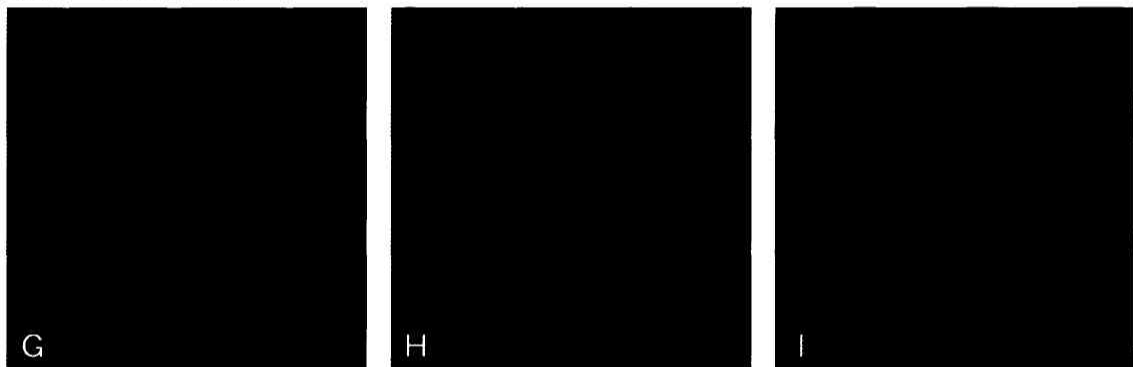
減数第一分裂中期



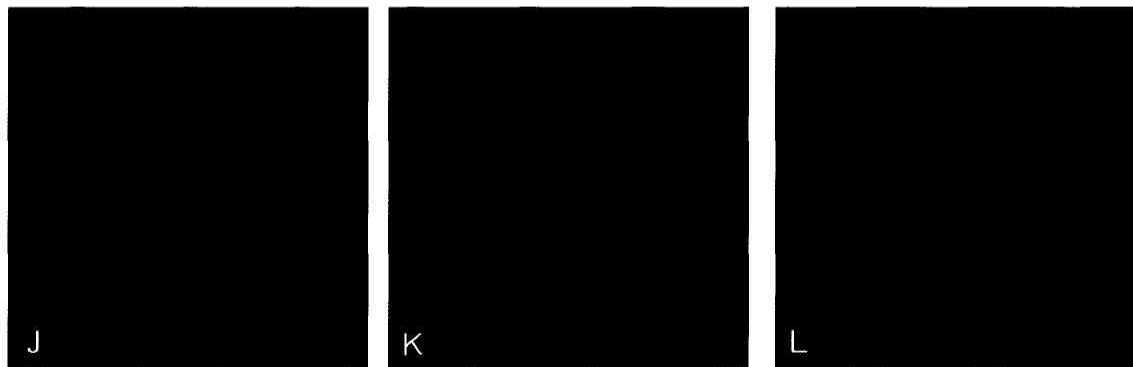
減数第一分裂後期



減数第二分裂中期



減数第二分裂後期



DAPI

FITC

Merged

Figure 18 シロイヌナズナ花粉母細胞の減数分裂時の紡錘体。一次抗体としてラビットから準備したマウスの β -チューブリンに対する抗体を、二次抗体としてFITCで標識された抗ラビットIgG抗体を用いて紡錘体を視覚化した。DAPIで染色された染色体はA（減数第一分裂中期）、D（減数第一分裂後期）、G（減数第二分裂中期）、J（減数第二分裂後期）に示す。B、E、H、Kはそれぞれの時期の紡錘体を示し、C、F、I、Lはそれぞれの時期の染色体像と紡錘体像を重ね合わせたもの。

考察

我々は本研究において共焦点レーザー走査顕微鏡を用いてシロイヌナズナの減数分裂期にある花粉母細胞の染色体の様子を観察するのに成功した。シロイヌナズナのゲノムは約 150 Mbp と非常に小さく、従って染色体も非常に小さく、特に減数分裂期にある染色体の観察は困難であった。そのためシロイヌナズナの研究に細胞生物学的な方法を導入するに時間がかかっていたが、1996 年の Ross らの研究を境にシロイヌナズナでもこの方面の研究が進むようになった。我々も Ross らによって開発された消化展開法を使ってシロイヌナズナの減数分裂期の染色体の解析を行ってきたが、その研究によって得られたノウハウをもとに、今回立体的な像を観察することにした。その結果、消化展開法によって準備された染色体像とは異なることがわかった。消化展開法によって準備された染色体はスライドガラスの表面に広く展開しているため、染色体の細部まで観察することができる (Fig. 17) が、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した実際の染色体はそれほど空間的に広がっているものではないことがわかる。共焦点レーザー走査顕微鏡によって得られた像は解像度においては消化展開法によって得られた像に劣るところがあるが、細胞内での立体的な配置を保存しているため、タンパク質その他の細胞内での局在性を調べるには非常に有利な方法であると考えられる。Fig. 18 のように β -チューブリンに対する抗体を用いて免疫組織化学的な方法と組み合わせることによって、この場合では、紡錘体の形態、消長する時期などを調べることができる。このように、シロイヌナズナの染色体がいかに小さくとも、細胞内の立体構造を保持したままで観察することが可能であることが示された。

減数分裂と体細胞分裂とは様々な点で大きく異なっているが、まずは減数分裂では相同染色体同士が対合し、組換えが起こることである。相同染色体同士のシナプトネマコンプレックスを介した対合に先立ち、相同染色体同士のペアリングはレプトテン期に始まっていると考えられている (Zickler and Kleckner, 1998)。酵母ではテロメアが核膜の内膜上で集合し、ブーケと呼ばれる状態になる。これが相同染色体同士のペアリングを起りやすくしているのではないかと考えられている。しかしシロイヌナズナでは核膜は減数分裂に入ると早い時期に消失し、テロメアはレプトテン期に入る前から核小体と結合し、ある範囲内に集合していると報告されている (Armstrong ら、2001)。本研究でも、テロメア部分であるかどうかは不明であるがシロイヌナズナの染色体は核小体の存在するレプトテン期からディアキネシス期の減数第一分裂前期においては核小体となんらかの接触が保たれている様子が観察される。シロイヌナズナでは核小体が相同染色体のペアリングに重要な働きをしているものと考えられる。核小体は rDNA の反復した部分に、転写産物である rRNA が蓄積し、リボゾームが形成されている小胞と考えられている。減数分裂期にはパキテンチェックポイントに関わる *Tem1*、*Dot1*、*Pch2* などの遺伝子産物が核小体に一時的に蓄積することが知られている (Shou ら、1999 ;

San-Segundo and Roeder, 1999 ; San-Segundo and Roeder, 2000)。これらの遺伝子産物は時期がくると核小体から放出されてすばやく機能するのではないかと考えられており、これらのことから減数分裂期には核小体は単なるリボゾーム生産工場としてだけでなく、相同染色体のペアリングやチェックポイント機能などの多くの役割を果たしているものと考えられる。

ペアリングをした相同染色体間にはシナプトネマコンプレックスが構成され、ザイゴテン期やパキテン期の対合した部分の相同染色体は、共焦点レーザー走査顕微鏡レベル（光学顕微鏡レベル）では一体化し、太いひも状部分として見えるのみである。電子顕微鏡を用いた展開試料の観察では相同染色体間にセントラルエレメントとラテラルエレメントと呼ばれる構造体が作られ、それによって相同染色体が結び付けられている様子がうかがえる（Albini, 1994）。展開試料に対しては FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) を行うことができ、そのような実験を行った場合には相同染色体が対合している部分ではシグナルが並んで観察でき、染色体の一本一本を光学顕微鏡レベルでも識別することは可能である（Azumi ら, 2001）。

ディプロテン期とディアキネシス期の共焦点レーザー走査顕微鏡像からシナプトネマコンプレックスが崩壊し相同染色体は解対合しても、キアズマによって相同染色体のペアリングは維持されたままであることが展開試料の観察よりも明確にわかる。減数第一分裂中期には赤道面に染色体が整列する。展開試料においても赤道面に並んでいる様子が観察され、中期以降の染色体の様子を展開試料と共焦点用試料を比べてみても立体的な配置には重要な差異は存在しないと考えられる。しかし染色体の形状については、共焦点用試料は展開試料と違い全体にずんぐりした形状をしているのがわかる。展開試料では展開した時にスライドガラス表面に引っ張られ、形状が歪められたと考えられる。

減数第二分裂では姉妹染色分体が分離する。酵母などを用いた研究により複製された染色分体はコヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体によってつなぎ止められていることが分かっている（Michaelis ら, 1997）。ディプロテン期にはシナプトネマコンプレックスは崩壊し相同染色体間を物理的に繋いでいるのはキアズマであると考えられるが、コヒーシンも相同染色体間のペアリングを維持するのに重要な働きをしている（渡辺, 2000 ; 渡辺, 2002）。減数分裂時に特異的なコヒーシンとして Rec8 が知られており、この遺伝子の産物により染色体の体細胞的な均等分裂が起こるか、減数分裂的な還元分裂が起こるかが決定される（Watanabe and Nurse, 1999）。減数第一分裂が終了した時点で大部分のコヒーシンは分解されるが、減数分裂に特異的なコヒーシンがセントロメア領域に存在し続け、姉妹染色分体の結合を維持している。減数第二分裂時にこのコヒーシンが分解され、姉妹染色分体が分離する。シロイヌナズナでも減数分裂特異的なコヒーシンの遺伝子 *SYN1* が単離され、その機能が調べられている（Bai ら, 1999）。*SYN1* に対する抗体を用いて *SYN1* タンパク質の局在性に関する研究を抗 β -チューブリン抗

体を用いた実験と同様の手法で明らかにするという研究を筆者らは Makaroff との共同研究で行っている。SYN1 タンパク質の減数分裂細胞内での立体的配置やその消長の時期を共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた実験により明らかにすることができれば、染色体の還元的分離と均等分離を制御するしくみをより詳しく調べることができると考えられる。

これまでシロイヌナズナの減数分裂中の染色体の解析は主に花粉母細胞を用いて行われてきた。Ross らの報告 (1996) により花粉母細胞における減数分裂中の染色体の全貌を知ることができたが、本研究ではより実体に近い染色体の様子を明らかにすることができた。最近では Armstrong らによって卵母細胞の減数分裂中の染色体に対する解析が進められている (2001)。将来、卵母細胞と花粉母細胞における減数分裂中の染色体の様子を、消化展開法、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた方法、さらには電子顕微鏡を用いた方法によって得られた結果を基に比較検討することができるようになれば、我々の減数分裂に関する知識をより深めていくことができるものと考えられる。

本研究は 2001 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金の助成を受けて行われた。

参考文献

- 熊谷 史、馳澤盛一郎 (1997) 植物細胞工学シリーズ 6, 植物の細胞を見る実験プロトコール、132-139、秀潤社
- 渡辺嘉典 (2000) 染色体接着因子コヒーシン. 細胞工学 19, 547-555
- 渡辺嘉典 (2002) 減数分裂の S 期の役割. 蛋白質 核酸 酵素 47, 45-50
- Albini S.M. (1994) A karyotype of the *Arabidopsis thaliana* genome derived from synaptnemal complex analysis at prophase I of meiosis. Plant J. 5, 665-672
- Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. (2001) Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. J. Cell Science 114, 4207-4217
- Armstrong, S. J. and Jones, G. H. (2001) Female meiosis in wild-type *Arabidopsis thaliana* and in two meiotic mutants. Sex. Plant Reprod. 13, 177-183
- 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
- Bai, X., Pierson, B. N., Dong, F., Xue, C. and Makaroff, C. A. (1999) Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. Plant Cell 11, 417-430

- Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91 35–45
- Peirson, B. N., Bowling S. E. and Makaroff, C. A. (1997) A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11, 659–669
- Roeder, G.S. (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Dev* 11, 2600–2621
- Ross K.J., Fransz P. and Jones G.H. (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* 4, 507–516
- San-Segundo, P. and Roeder G. S. (1999) Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97, 313–324
- San-Segundo, P. and Roeder G. S. (2000) Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control. *Mol. Biol. Cell* 11, 3601–3615
- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W. S., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H. and Deshaies, R. J. (1999) *Cell* 97, 233–244
- Watanabe, Y. and Nurse, P. (1999) Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400, 461–464
- Zickler, D. and Klenkner, N. (1998) The leptotene–zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32, 619–697