

■原 著■ 2003-2004 年度神奈川大学共同研究奨励助成論文

## Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 法によるシロイヌナズナの花 花粉母細胞での減数第一分裂期染色体の動態解析

安積良隆<sup>1,3</sup> 外山俊士<sup>1</sup> 中村美奈子<sup>1</sup> 豊泉龍児<sup>1</sup> 風間真<sup>1</sup>  
朝倉史明<sup>2</sup> 日野晶也<sup>1</sup> 鈴木秀穂<sup>1</sup>

### Analysis of Chromosome Dynamics during Meiosis I of *Arabidopsis thaliana* Pollen Mother Cells by Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)

Yoshitaka Azumi<sup>1,3</sup>, Takashi Toyama<sup>1</sup>, Minako Nakamura<sup>1</sup>, Ryuji Toyoizumi<sup>1</sup>,  
Makoto Kazama<sup>1</sup>, Nobuaki Asakura<sup>2</sup>, Akiya Hino<sup>1</sup> and Hideho Suzuki<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Laboratory of Biology, Faculty of Engineering, Kanagawa University, Yokohama-City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yoshitk@info.kanagawa-u.ac.jp

**Summary:** Since insertion mutagenesis methods, which enabled us to identify the mutagenized genes routinely, were developed for plants, *Arabidopsis thaliana* has been playing a central role in plant meiosis research. Though several techniques to analyze meiotic chromosome behavior have been introduced into *Arabidopsis* research since Ross *et al.* reported the method to observe male meiotic chromosomes of this plant through light microscope in 1996 (*Chromosome Res.* 4:507-516), intimate analysis of the chromosome behavior has not been accomplished. Taking advantage of the recent development of new nucleotides labeled with fluorescent dyes, we investigated chromosome behavior during male meiosis by multicolor FISH. Telomeres found around nucleoli in premeiotic interphase cells dispersed after entering meiosis, then clustered in a bouquet-like configuration. Statistically, telomeres of homologous chromosomes paired earlier than centromeres, but when respective chromosomes were examined, the telomeres were not always quick to pair. At early prophase I, possibly at around the zygotene stage, the signals from telomeres reduced to less than ten. This reduction suggests that the paired telomeres of homologous chromosomes temporally associate with other telomeres to look for their real partners. When homologous chromosomes separated at anaphase I, telomeres were always last to segregate. This suggested that there was unknown interaction between the telomeres of homologs, connecting them until anaphase I started.

**Keywords:** meiosis, *Arabidopsis thaliana*, homologous chromosome, FISH (fluorescent *in situ* hybridization)

### 序論

減数分裂は特殊な細胞分裂で、一度の染色体複製の後、それぞれ前期、中期、後期、終期からなる第一分裂、第二分裂が連続して二回起こる。その結果として、一つの母細胞から染色体数が半減した細胞が四つ形成される。この減数分裂に特徴的なのは第一分裂の前期で、レプトテン期（細糸期）、ザイゴテン期（合糸期）、パキテン期（太糸期）、ディプロテン

期（複糸期）、ダイアキネシス期（移動期）からなる。レプトテン期には染色体が細い糸状に観察されるようになり、ザイゴテン期に入ると相同染色体の相同部分が部分的に対合（ペアリング）し始める。パキテン期には相同染色体同士が全長にわたって対合し、相同染色体間にシナプトネマ構造（synaptonemal complex）が形成される（シナプシス；synapsis）。

この時、相同染色体間でキアズマが観察されるようになる。ディプロテン期にはシナプトネマ構造は崩壊し、キアズマ以外の部分では相同染色体同士は離れ、凝縮を開始する。ダイアキネシス期には染色体の凝縮が完成する。第一分裂中期には、キアズマによって連結された相同染色体対（二価染色体）が紡錘糸に引かれ、赤道面に整列する。後期に入ると相同染色体同士は互いに別々の極に分配される。第二分裂では体細胞分裂と同様にして、それぞれの複製されている染色体が姉妹染色分体に分かれる（減数分裂の概要に関しては総説を参照）<sup>1-3)</sup>。

相同染色体の対合（ペアリング）とは父方由来と母方由来の相同の染色体同士が何らかの物理的接触を持っている状態を示す。この過程はいくつかの段階に分けることができる。1) テロメアのクラスタリング（予備段階）、2) 相同染色体の並列、3) シナプトネマ構造の構築、4) キアズマによる連結である。減数分裂開始前後の時期にテロメアが核膜の一部に集合した染色体の状態はテロメア集合（telomere clustering）あるいはブーケ配向（bouquet configuration）と呼ばれ、相同染色体の対合を起り易くする働きがあるものと考えられているが、この段階ではペアリングは起こっていない。レプトテン期からザイゴテン期にかけて、相同染色体はある程度の距離を置き、互いに並列する（alignment, juxtaposition）<sup>4)</sup>。減数分裂期組換え反応は SPO11 タンパク質による二本鎖切断によって開始される<sup>5)</sup>。DCM1 と RAD51 の作用の結果できた一本鎖が相同部分の探索に働いていると考えられている<sup>6)</sup>。この並列は離れ過ぎているため、塩基配列性の相同検索は可能と考えられず、相同染色体が何を基準に相手を見つけ出すのかはよく分かっていない。ザイゴテン期に、染色体に軸因子（axial element）が形成され始め、それがパキテン期には連続して側方因子（lateral element）へと発達し、側方因子間に中心因子（central element）が形成されて、シナプトネマ構造となる。組換えが起こった部位ではキアズマが形成される。ディプロテン期にはシナプトネマ構造は崩壊するが、キアズマによって第一減数分裂中期まで相同染色体は相同染色体が連結されている。そのため、広義のペアリングでは並列した状態から第一減数分裂中期の二価染色体の状態を意味するが、通常、並列状態からシナプス状態までを示す。本稿ではペアリングをこの意味で用いている。狭義に用いる場合にはシナプスする前の並列状態のみを示す。

ペアリングとキアズマ形成は減数第一分裂時に、対を成す相同染色を別々の娘核に均等に分配するの

に必須の過程である。不均等に分配されると正規の染色体数を持たない配偶体（植物の場合は胚のう細胞と花粉細胞）ができることになり、不稔となる。酵母や動物では対合が起こらないとパキテンチェックポイントが働き、そこで細胞分裂が停止するが<sup>7)</sup>、植物の場合は対合が起こらなくても細胞分裂は進行する。キアズマができない場合も染色体が無秩序に分配され、不稔の配偶体を形成する<sup>8-9)</sup>。相同染色体がペアリングするまでの過程は種によって多少特異性がある。分裂酵母では第一分裂前期の始めに、テロメアが集合して引率するホーステイル運動が見られる<sup>10)</sup>。ホーステイル運動は分裂酵母に特有のもので、他の種では報告されていないが、テロメアの集合は減数分裂前間期あるいは第一減数分裂前期に普遍的に観察される<sup>11)</sup>。

減数分裂の研究は酵母やマウス等の様々な生物を材料に行われている。植物でも古くから花粉母細胞の減数分裂の様子が観察されている。しかし減数分裂中の細胞を多量に集めるのが困難などの理由で、植物を材料とする減数分裂の研究は他の生物のそれに比べると大きく遅れをとってきた。ゲノムサイズが小さい、世代時間が短い、小型で実験室内での栽培が容易等の実験材料として有利な特徴を持つシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がモデル植物に採用され、形態観察も詳しく行われた<sup>12)</sup>。様々な研究方法がこの植物を材料として進められるようになり、いわゆる、タギング法と呼ばれる挿入変異体作製法が開発された<sup>13-14)</sup>。

シロイヌナズナのゲノムの全塩基配列が決定されたこともあって、この方法は変異した遺伝子の同定を著しく簡略化し、これによってそれまで困難であった、変異体の変異遺伝子の同定が実験室レベルで可能となった。近年にはシロイヌナズナから、この方法によって多くの減数分裂変異体が作製され、それらの遺伝子が同定されている<sup>15)</sup>。つまりそれぞれの挿入変異体の表現型の原因を遺伝子にもとめることが可能となったわけである。イネでもレトロトランスポゾンを利用したタギング法が開発されており<sup>16-17)</sup>、減数分裂変異体が報告されている<sup>18-19)</sup>。これ以外の植物では、まだタギング法による変異体作製例は報告されていない。

減数分裂の目的は相同染色体を別々の娘細胞に分配することであるが、この過程を解析するには染色体を個別に観察することが必須である。シロイヌナズナのゲノムサイズは半数体当たり約1億3千万塩基対で<sup>20)</sup>、染色体は他の生物に比べ非常に小さい。染色体が最も凝縮した分裂中期の染色体では縦横の区別もつかなくなる。花粉母細胞の減数分裂の染色

体の様子を観察するために、細胞壁を消化した後、染色体をスライドガラス上に展開して、DAPI で染色し観察するという方法が開発された（消化展開法）<sup>20</sup>。この方法では、従来の押しつぶし法より遥かに解像度の高い染色体像が得られ、減数第一分裂の前期の各ステージも見分けることができる。その後、展開された染色体に対し、染色体の各領域に特異的なプローブをハイブリダイズさせ、そのプローブを蛍光によって検出する方法（FISH; fluorescent *in situ* hybridization）がこの植物の減数分裂期染色体の観察に導入された<sup>22-23</sup>。この方法により染色体を個別に追跡することができるようになり解析精度が一段と向上した。さらに最近ではプローブ分子を直接、蛍光標識できるようになり、以前よりも鮮明なシグナルが得られ、操作も単純化されたため、今後、減数分裂期の染色体解析もより詳細に行われるようになるものと考えられる。

シロイヌナズナから減数分裂に関する挿入変異体が単離されるようになったが、減数分裂期の染色体の挙動に関して基準となるものがまだ確立されていない。我々は野生型のシロイヌナズナを実験材料とし、テロメアとセントロメアに焦点を絞って、これらの動態を明らかにすべく FISH 法を用いて実験を行った。

## 材料と方法

### シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Landsberg) は、神奈川大学平塚キャンパス植物育成棟内で、気温 24°C、湿度 60%、光強度約 60  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗 14 時間 10 時間周期の条件下で、栄養源としてハイポネックスとムラシゲ・スクーク培地を週に一度、交互に与えながらロックウール上で栽培した。

### 消化展開法

播種後 6 週間程度のシロイヌナズナより、つぼみを次々と生産している健康な花序を採取し、Ross らの方法に従って染色体試料を準備した<sup>21</sup>。まず、採取した花序を酢酸エタノール（1 : 3）溶液に室温で 16 時間程度置くことによって、細胞を固定した。水で 10 分間 2 回洗浄した後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 4.5）で同様に洗浄した。サイトヘリカーゼ（Sigma）、ペクトリアーゼ（Kikkoman）、セルラーゼ（Yakult）を 0.4%（w/v）含むクエン酸緩衝液中で、最初に減圧して酵素を組織内に浸潤させてから、37°C で 3 時間保温した。クエン酸緩衝液で先と同様に洗浄後、花序をシャーレ上に滴下された 60% 酢酸中に移した。つぼみを単離し、減数分裂中の花粉母

細胞を含むと考えられるつぼみ（長さが 0.3~0.5 mm 程度のもの）を選んだ。スライドガラス（Matsunami S2441）上に 5  $\mu\text{L}$  の 60% 酢酸を滴下し、そこにつぼみを移した。つぼみを先端の鋭利な針（自作のタングステンニードル）で解剖し、雄しべ以外をキムワイプで酢酸とともに吸い取った。葯を潰して花粉を展開した後、再び酢酸を 5  $\mu\text{L}$  滴下し、45°C のホットプレート上で 1 分間加温した。氷冷した酢酸エタノールを周りに滴下し、ゆっくりと混和した後、液を捨て、スライドガラスを風乾した。

### プローブの調製

染色体の特定領域に対するプローブは、その領域を含む BAC クローンを ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) より入手し、DNA は FlexiPrep DNA Purification Kit (Amersham) を用いて精製して、鋳型として用いた。8 種類の制限酵素 *EcoRI*, *EcoRV*, *EcoT22I*, *PstI*, *SalI*, *DraI*, *ClaI*, *HaeIII*, *ScaI* (タカラバイオ) で断片化した後、30 枚のスライドガラスに対し、2  $\mu\text{g}$  の DNA を使用し、Arexa Fluor DNA Labeling Kit (Invitrogen) を用いてプローブを作製した。テロメアに対するプローブは TTTAGGGx 6 と CCCTAAA x 6 のプライマーのみで PCR を行い、その産物を鋳型とし、Cy3 (Amersham) あるいは Cy5 (Amersham) を含み、先ほどと同じプライマーを用いる PCR 反応によって、プローブを作製した。それぞれのプローブはエタノール沈澱後、ホルムアミドに溶解し、等量の 20% デキストラン / 4x SSC 溶液を加えて用いた。

### FISH

風乾したスライドガラスをもう一度、酢酸エタノール溶液に 30 分間浸し固定後、風乾した。0.1 mg/ml RNase A で 37°C 30 分間処理し、2xSSC 溶液で 2 回洗浄後、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の Pepsin (和光) で 37°C 2 分間処理した。2xSSC 溶液で 2 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間処理した。2xSSC 溶液で 3 回洗浄し、70%、90%、99.5% エタノールに順次 3 分間ずつ浸した後、乾燥させた。風乾した 1 枚にスライドガラスに、20  $\mu\text{L}$  の割合でプローブ溶液を滴下した。パラフィルムで被った後、72°C で 2 分間加温し、プローブと染色体 DNA を熱変性させ、37°C で 16 時間保温した。50% ホルムアミド / 2xSSC 溶液、2xSSC、1xSSC で 37°C 20 分間、洗浄した。5  $\mu\text{L}$  の 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DAPI 溶液 (Vector) を滴下し、カバーガラスで被った。オリンパス蛍光顕微鏡 BX61 を用いて観察した。PROVIA F100 (FUJI Film) に撮影し、プリントしたものをスキャナーで

取り込み、Photoshop (Adobe) で加工した。

## 結果

### 減数分裂前間期～レプトテン期

減数分裂が始まる時期にテロメアが核膜のある領域に集まる現象が様々な生物で知られている (ブーケ配向)。様々な生物でこの時点で相同染色体間のテロメアのペアリングが始まると報告されている。シロイヌナズナでは減数分裂前の花粉母細胞やその他の体細胞で、テロメアは核小体の周辺部分に分布することが報告されている<sup>20)</sup>。まず、シロイヌナズナにおけるテロメアの減数分裂開始後の挙動を調べることを目的に実験を始めた。TTTAGGG の繰り返し配列からテロメアに対するプローブを作製し、FISH を行った。第一減数分裂が始まる前の間期の細胞で、20 近くのシグナルが核小体領域に観察され、報告されているようにテロメアの核小体周辺部への分布を確認することができた (図 1A の緑色シグナル)。テロメアの配列は第一染色体のセントロメア近傍にも存在することが知られている<sup>25-26)</sup>。その配列はテロメアプローブに対し強く反応し、核小体以外ところで観られる強いシグナルはその配列からのものと考えられる。レプトテン期に入るとテロメアは核小体から離れ、一度分散した (図 1B, C, D)。その後、レプトテン期からザイゴテン期にかけて、テロメアは比較的狭い領域に集合した (図 2E, F)。これがシロイヌナズナにおけるブーケ配向と考えられる。

次にテロメアのペアリングについて調べるため、テロメア付近の各染色体に特異的な領域を有する BAC クローンよりプローブを調製し FISH を行った。減数分裂前間期では相同染色体のテロメアからのシグナルは多くの場合、離れており、ペアリングは起こっていないものと考えられる。レプトテン期の細胞ではシグナルが隣接している場合 (シグナルが並んで、あるいは一つに融合してみえるもの) もあったが、シグナルが別々の場所で観察される場合の方が多かった (図 2A, B 赤色シグナル)。ザイゴテン期では多くの細胞でシグナルが隣接して観察されたことからペアリングが進行しているものと考えられる (図 2C, D)。パキテン期ではいつもシグナルが隣接して観察されており、これはこの時期ですでに全相同染色体間でシナプシスが完成していることを示している。ディプロテン期の細胞では、シグナルは多くの場合は並んで観察されたが、少し離れたところに観察される場合もあった。これは DAPI 染色した染色体像からも分かるが、この時期では相同染色体同士でもキアズマ以外の部分では連結されていないのを示している。

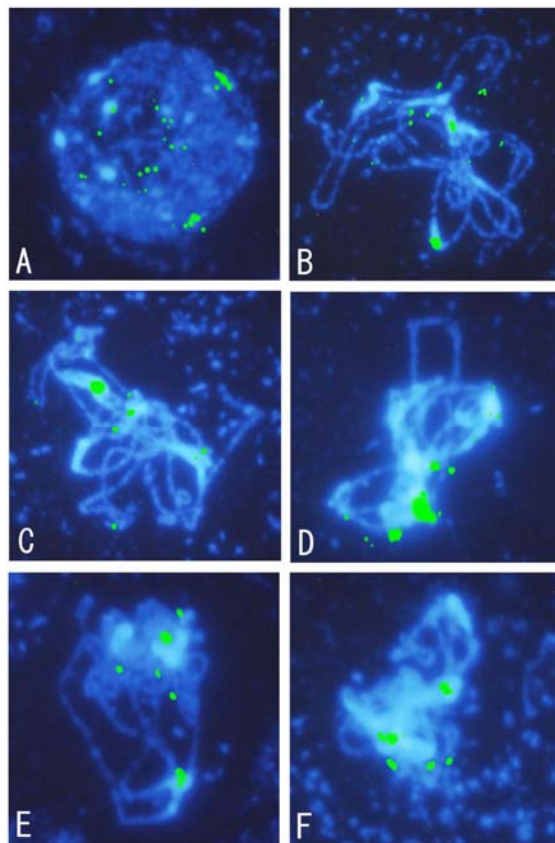


図 1. テロメア配列に対するプローブを用いた FISH. 各染色体の末端にあるテロメアの繰り返し配列に対するプローブを材料と方法に記述したように蛍光標識して準備した。これを、スライドガラス上に展開したシロイヌナズナの花粉母細胞の染色体に対して、ハイブリダイズさせた。A は減数分裂前間期の細胞。B~F は第一減数分裂前期の初期 (レプトテン期からザイゴテン期) の細胞。青白く光っているものが DAPI で染色した核 (A) あるいは染色体 (B~F)。緑の点がテロメア繰り返し配列からのシグナルを表すが、第一染色体のセントロメア付近にもテロメア繰り返し配列が存在し、強いシグナルとして現れる。

シロイヌナズナのセントロメアの構造は完全に解明されているわけではないが、10 本の染色体のセントロメアには共通の繰り返し配列が含まれている。セントロメアから少し離れた領域に対するプローブを用いれば、各染色体のセントロメアを識別し、個別に追跡することができる。そのような領域を含む BAC クローンよりプローブを準備してセントロメアの挙動について調べた。減数分裂前間期の細胞ではほとんどの場合、セントロメアは大きく離れて存在していた。レプトテン期の細胞では割合は少ないが、シグナルが隣接して観察されるものが現れ始め、ペアリングが始まっているのを示している (図 3A, B)。ザイゴテン期には多くのシグナルが隣接して観察されることから、すでに染色体の多くの部分でペアリングが起こっているのがわかる (図 3C, D)。パ

キテン期には全てのシグナルが同じ部位で並んで観察された。ディプロテン期の細胞ではシグナルが少し離れて観察されるものがあるため、セントロメア付近の領域でもディプロテン期には互いに解離しているものと考えられる。この後、相同染色体のセントロメア同士は互いに異なる極に面することになるが、この時にセントロメア同士が物理的に接着しているのかどうかは分かっていない。

染色体の広がりに対するテロメアあるいはセントロメアのシグナル間の距離の割合を 10 段階に分類し、グラフにしたものが図 4 である。テロメアに関してはレプトテン期に入ると約 40%のものがペアリングしているのが解る。しかしこの時期、セントロメア領域ではまだ 20%程度しかペアリングしていない。この結果から統計的にテロメアのペアリングはセントロメアのペアリングに先行していると予想される。

染色体の末端部分からファスナーを閉めるようにペアリングが進むように考えられているが、実際にそのようにペアリングが進行するのかどうかを、て見られた (図 5)。テロメアのみあるいはセントロメア付近の領域に対するプローブとセントロメア付近の領域に対するプローブを同時に用いて調べてみた。ザイゴテン期のものでは多くの場合、テロメア部分でもセントロメア部分でもペアリングしていた。レプトテン期のものでは様々な組み合わせがのみがペアリングしている場合や、両方がペアリングしている、あるいは両方もペアリングしていない場合が見られた。この結果は個々の染色体を観察

した場合、ペアリングは必ずしも染色体の末端から始まるのではなく、内部領域から始まる場合もあることを意味している。

### 五星分布状態 (Five Star Configuration)

テロメアに対するプローブを用いて FISH を行った時に、ザイゴテン期と考えられる時期にシグナルの数が予想外に減少するのが観察された。シロイヌナズナのゲノムは 10 本の染色体の染色体から構成されており、それらの両末端にテロメアが存在するので、20 のシグナルが観察されるはずである。減数分裂が開始される前には約 20 のシグナルが観察される (図 1A)。減数分裂が始まると相同染色体がペアリングを始めるため、シグナルの数が減少する。完全にペアリングした状態では染色体は 5 本のように見え、10 のシグナルが観察されるようになる。ところがザイゴテン期と考えられる細胞で、シグナルが 10 以下に、ある時期では 5 ないし 6 に減少するのが見つかった (図 1 E, F)。この五つの明るい星の様に輝くシグナルが非常に印象的であるので我々はこの染色体の状態を五星分布状態と呼んでいる。一つのシグナルは第一染色体のセントロメア付近のテロメア様の配列から発せられたものと考えられる。シグナルの強度から二つ以上のテロメアがそれぞれの部位に集まって、一時的に結合しているものと考えられる。この現象はペアリングした各染色体対のテロメアが染色体内で、あるいは他の染色体と結合している可能性を示唆している。パキテン期に入るとテロメアのシグナルの数は再び約 10 に復帰した。

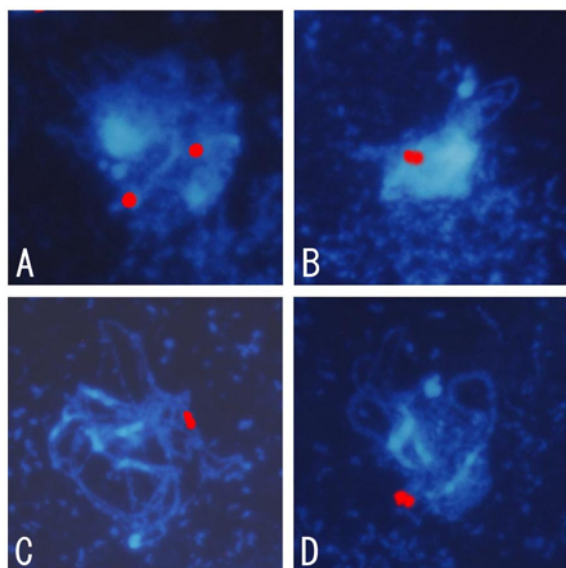


図 2. テロメア付近の配列に対する FISH. 第 4 染色体のテロメア付近の領域 (F22I13) に対するプローブを用いて図 1 と同様に FISH を行った. A, B はレプトテン期, C, D はザイゴテン期と思われる細胞. 赤い点がシグナルを表す.

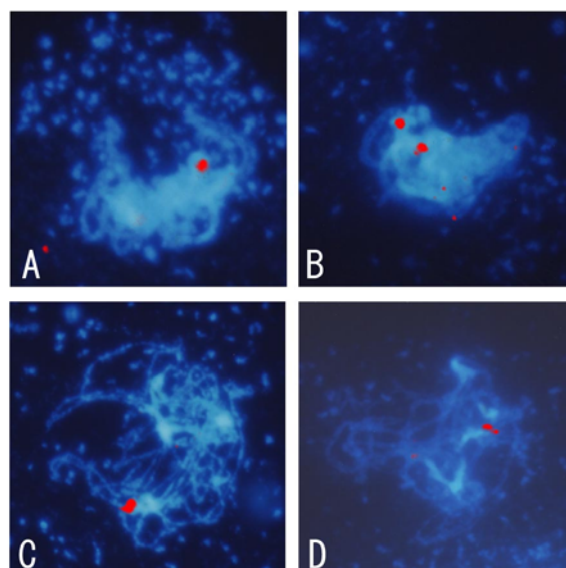


図 3. セントロメア付近の配列に対する FISH. 第一染色体のセントロメア付近の領域 (F12A4) に対するプローブを用いて図 1 と同様に FISH を行った. A, B はレプトテン期, C, D はザイゴテン期と思われる細胞. 赤い点がシグナルを表す.

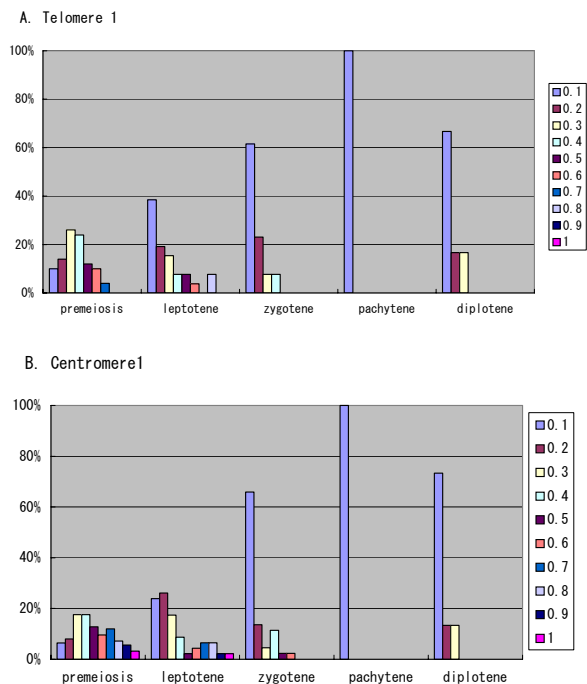


図 4. セントロメアとテロメアのペアリングの比較. 第一染色体のセントロメア付近の領域 (F12A4) とテロメア付近の領域 (F22A17) に対するプローブを用いて FISH を行った. 得られたシグナル間の距離の細胞の大きさに対する割合をグラフに表した.

第一分裂中期～後期

第一減数分裂中期には相同染色体が連結したまま赤道面に整列する。セントロメアに紡垂糸が結合し、対をなす相同染色体を別々の極に分配する準備が行われる。この時キアズマによる相同染色体をつなぎ止めようとする力と染色体を両極に引き離そうとする紡錘体からの力が拮抗する。この時の染色体の様子を示すのが図 6 である。染色体は中央に結び目を持ち、両方から引っ張られているロープのような外見をしていることが多い。テロメアに対するプローブをハイブリダイズさせた場合に第一染色体のセントロメアからのシグナルと考えられるもの以外は赤道面付近に観察された。キアズマのみで連結されている場合にはキアズマから遠い方のテロメアは近い方のテロメアよりかなり離れて存在してもよさそうである。しかしこれまで観察した限りでは常にテロメアのシグナルは赤道面付近に残っているように見られた。テロメアに対するプローブを用いた場合は染色体を区別することができず、判然としないため、テロメア付近の領域を標識して、特定の染色体のテロメアの存在部位について調べた。すると両極に引っ張られている相同染色体間で、シグナルはいつも中央付近に観察された (図 6A, B)。これは相同染色体同士がテロメア部分でなんらかの結合をしていることを示している。この結合が第一減数分裂中期

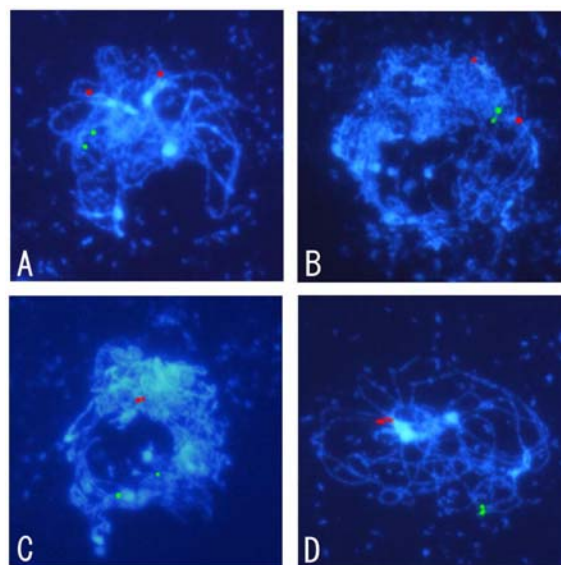


図 5. セントロメア付近の配列とテロメア付近の配列に対するプローブを同時に用いた FISH. 第一染色体のセントロメア付近の領域 (F12A4) とテロメア付近の領域 (F22A17) に対するプローブを用いて、レプトテン期からサイゴテン期の細胞に対して、マルチカラー FISH を行った. 緑の点が テロメア近辺領域に対するシグナルを、赤い点が セントロメア近辺領域に対するシグナルを表す.

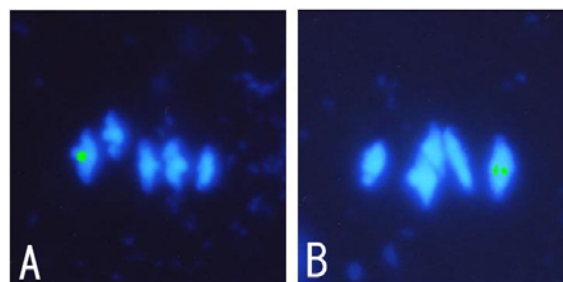


図 6. 第一減数分裂中期の細胞に対する FISH. 花粉母細胞の減数第一分裂中期の赤道面に整列している染色体に対して、第五染色体のテロメア付近の領域 (K21L13) に対するプローブを用いて FISH を行った. 緑の点がシグナルを表す.

において相同染色体同士を最後までつなぎ止める役割を果たしているものと推論することができる。

討論

蛍光標識された高感度のプローブ分子を容易に作成することができるようになって、FISH の作業工程が簡略化され、多くの試料を観察し、染色体の動態を詳しく調べることができるようになった。このような技術の進歩を利用して、モデル植物であるが、染色体が小さく細胞生物学的な解析が難しいシロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期の染色体の動態を調べることにした。

シロイヌナズナですでに報告されている減数分裂前のテロメアの核小体周辺への分布が確認された。

染色体に特異的なテロメア近辺領域に対するプローブを用いた実験は、この時期ではシグナルが並んで観察される細胞はごく一部であることを示していた。レプトテン期と考えられる細胞でも、約 60% の細胞ではテロメア付近の領域は離れて存在している (図 4)。ザイゴテン期に入るとペアリングするテロメア近辺領域の割合はずっと増加する。この時期に様々な生物でブーケ配向が観察されている。植物でもトウモロコシ、オートムギ、ライムギ、コムギなどでもペアリングの起こる時期にブーケ配向が観察されている<sup>27-30)</sup>。しかしシロイヌナズナでは明確なブーケ配向が見られない。ゲノムがシロイヌナズナと比べると巨大で染色体が長く、反復配列の多いトウモロコシ等の植物ではミスマッチを防ぐために染色体の両末端をそろえて並べるといった、ペアリングの準備を整えておくことが重要なのかも知れない。そして端からペアリングを進めるという方法は合理的と考えられる。それに比べゲノムが小さく染色体も短いシロイヌナズナでは、相同染色体同士が互いに相手を見つけるのが比較的容易なため、染色体の端からとは限らず、様々な部分からペアリングが起こるのかも知れない。実際に実験結果として、テロメア付近の領域がペアリングしていない染色体でセントロメア付近の領域がペアリングしているのが観察されている。シロイヌナズナではザイゴテン期にブーケ配向様のテロメアの分布も観察されるが、染色体のペアリングにおける重要性が低いのかも知れない。シロイヌナズナで見られるものや他の生物で見られるブーケ配向がどのような分子基盤に立って構築されているのかが明らかにされれば、シロイヌナズナの場合と比較が可能となり、その関連性には興味を持たれる。

パキテン期には相同染色体同士は並列状態よりもさらに接近し、お互いをシナプトネマ構造と呼ばれるタンパク質等からなる構造によって結び付け、シナプシスと呼ばれる状態となる。端から端まで全ての相同染色体対で対合が完成すると、ディプロテン期にはシナプトネマ構造は崩壊し、組換えを起こしたキアズマ部分を残して、相同染色体同士は少し離れるようになる。ステージが進行するに連れ、染色体は凝縮を進め、シロイヌナズナではダイアキネシス期の二価染色体は完全に一体化して二本の染色体からできているようには思えない。この時、相同染色体同士はキアズマ部分では連結しているが、それ以外の部分ではどのようなになっているのかよく解っていない。ダイアキネシス期の染色体ではテロメア付近の領域に対するプローブはほとんどの場合、並んで観察される。さらに第一分裂中期の染色体では

染色体がセントロメアに付着した紡錘糸によって引っ張られているのがわかるが、相同染色体を最後まで結び付けているのはテロメアであるように思われる (図 6)。体細胞分裂では TRF1 をリボシル化する酵素が関連する、姉妹染色分体のテロメアを互いに結び付けている構造を切断するしくみがあることが報告されている<sup>31)</sup>。減数分裂期の相同染色体のテロメア間にも何らかの物理的な結びつきがあることをこの実験結果は示している。ディプロテン期には相同染色体のセントロメア領域は互いに物理的に接着している様には見えないが、第一分裂中期に両極からの紡錘糸が別々のセントロメア上に構築されたキネトコアに結びつくには、相同染色体のセントロメアは背中合わせに接着している必要があると考えられる。ダイアキネシス期の間にセントロメア間で何らかの結合が構築された可能性がある。ダイアキネシス期にはテロメア領域やセントロメア領域を含む、染色体の様々な部分でシナプトネマ構造が崩壊した後に、相同染色体間で再結合が起きているのかもしれない。第一分裂中期の終わりになると紡錘糸に引っ張られ、セントロメアは既に離れてしまっている。これらのことから、第一分裂中期から後期にかけての相同染色体の分離は、まずセントロメア領域で起こり、次にキアズマが解消されて、最後にテロメア部分が解離するのではないかと考えられる。しかしシロイヌナズナでのキアズマの解消がいつ起こるのかは詳しく調べられておらず、相同染色体間の様々な部位で再結合が起きているとも考えられる。ダイアキネシス期に既に解消されている可能性も考えられる。

テロメアの五星分布状態は何のためにあるのかを想像することすら難しい。テロメアのクラスタリング (ブーケ配向) がさらに進行して、テロメア同士が結合した状態とも考えられるが、これまでのところ、このテロメア同士の結合が染色体内の結合 (染色体の両末端の結合) なのか、染色体間の結合なのか明らかではない。それぞれの染色体のテロメアを異なる色の蛍光で標識して調べる必要がある。テロメアには様々な働きがあると考えられている。テロメアが染色体末端部分での染色体複製とか、染色体末端の保護を可能にしている。減数分裂時に関してはよく調べられていないが、体細胞分裂期のテロメアは T-loop configuration と呼ばれる特殊な構造をしている<sup>32)</sup>。テロメラーゼや TRF1 などの様々なタンパク質等が複合体を形成し、テロメアに結合している<sup>33-34)</sup>。減数分裂に入った細胞では既に染色体の複製は終了しているため、五星分布状態が複製に関与しているとは考えにくい。テロメアのクラスタリン

グは相同染色体のペアリングに寄与しているかも知れないが、それ以上テロメアを結合させる意味を推測するのは難しい。染色体内でテロメア結合した場合、染色体はリング状になるが、これが真の姿であったとしても、その意味は何であろうか。特殊な機構により、相同染色体のペアリングに貢献している可能性が考えられる。テロメアがその相同である本来のパートナーを探索する過程で、他のテロメアと一次的に結合しているのかも知れない。セントロメアに関してもセントロメア同士が互いに引き合い、ペアリングの手助けをしているという報告がある<sup>39)</sup>。著者らもキアズマのできないシロイヌナズナの変異体で相同染色体同士が並んでいるのを観察している。様々な方法でペアリングをより確実なものにする仕組みになっているのかも知れない。パキテン期にはテロメアは五星分布状態から解放されて、10 近くのシグナルが観察される。ディプロテン期には相同染色体のテロメア同士も離れるが、ダイアキネシス期、第一分裂中期には前述のしくみによって相同染色体同士のテロメアはまた結合しているように観察される。テロメアは減数分裂期の各ステージに合わせて異なる成分からなる構造によって結合したり解離したりしていると推測できる。減数分裂期の染色体の挙動にはまだ意義の不明なものが多く、それらがそれぞれの役割を果たしながら、減数分裂という複雑な過程を遂行していると考えられる。

植物では、トウモロコシやムギ類で FISH 法や間接免疫蛍光法などによる減数分裂期の染色体の動態研究が盛んに行われている。同じ植物でも単子葉植物であるトウモロコシと双子葉植物であるシロイヌナズナでは、様々な点で異なることが明らかとなった。しかしこの違いは、多くの単子葉植物や双子葉植物で減数分裂期染色体の研究が行われているわけではないので、シロイヌナズナあるいはトウモロコシの特殊な事情によるものであるのかも知れない。というのも、トウモロコシのゲノムは非常に巨大で、シロイヌナズナのゲノムは非常にコンパクトである。この違いが大きく影響しているのかも知れない。比較的ゲノムサイズの小さいイネなどでも減数分裂期染色体の解析が進むことが望まれる。

本研究は固定された細胞の染色体の分布状態を調べたもので、生きた細胞の動きのある染色体を観察したものではない。それゆえ本研究によって提案された染色体の挙動というものは必ずしも正しいとは言いきれない。シロイヌナズナの減数分裂期の染色体はもっと複雑怪奇な運動をしているのかも知れない。それを明らかにするには生きた細胞を経時的に追跡することが必要であるが、残念ながら花粉の減

数分裂の様子を観察した例は報告されていない。今後は、生きた花粉母細胞の細胞内の様子を観察するシステムの開発が望まれる。

## 謝辞

本研究は神奈川県共同研究奨励助成を受けて、行われました。お礼申し上げます。また顕微鏡写真のプリントに関して、カメラのキタムラ平塚店の方々に多大な御協力を頂きました。ありがとうございます。

## 文献

- 1) Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **11**: 2600-2621.
- 2) Zickler D and Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 603-754.
- 3) Bhatt AM, Canales C and Dickinson HG (2001) Plant meiosis: the means to 1N. *Trends Plant Sci.* **6**: 114-121.
- 4) Page SL and Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* **301**: 785-789.
- 5) 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.
- 6) Bishop DK (1994) RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* **79**: 1081-1092.
- 7) Roeder GS and Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* **16**: 395-403.
- 8) Armstrong SJ, Caryl AP, Jones GH and Franklin FC (2002) Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica. *J. Cell. Sci.* **115**: 3645-3655.
- 9) 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**: 3081-3095.
- 10) Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M and Hiraoka Y (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* **264**: 270-273.
- 11) Harper L, Golubovskaya I and Cande WZ (2004) A bouquet of chromosomes. *J. Cell Sci.* **117**: 4025-4032.
- 12) Bowman J (1994) Arabidopsis. An Atlas of Morphology and Development, Springer-Verlag, New York.
- 13) Aarts MG, Dirkse WG, Stiekema WJ and Pereira A (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in Arabidopsis. *Nature* **363**: 715-717.
- 14) Sundaresan V, Springer P Volpe T, Howard S, Jones JD, Dean C, Ma H and Martienssen R (1995) Patterns of gene action in plant develop-



- ment revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* **9**: 1797-1810.
- 15) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物雄性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川県大学総合理学研究所年報 2003*. pp.41-80.
  - 16) Agrawal GK, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Miyao A, and Hirochika H (2001) Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel ostatic gene. *Plant Physiol.* **125**: 1248-1257.
  - 17) Izawa T, Ohnishi T, Nakano T, Ishida N, Enoki H, Hashimoto H, Itoh K, Terada R, Wu C, Miyazaki C, Endo T, Iida S and Shimamoto K (1997) Transposon tagging in rice. *Plant Mol. Biol.* **35**: 219-229.
  - 18) Nonomura K, Nakano M, Fukuda T, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H and Kurata N (2004) The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *Plant Cell* **16**: 1008-1020.
  - 19) Nonomura KI, Nakano M, Murata K, Miyoshi K, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H and Kurata N (2004) An insertional mutation in the rice PAIR2 gene, the ortholog of Arabidopsis ASY1, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis. *Mol Genet. Genomics* **271**: 121-129.
  - 20) Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
  - 21) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
  - 22) Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC, Torres-Ruiz RA and Jones G (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**: 867-876.
  - 23) 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 Science* **5**: 1-6.
  - 24) Armstrong SJ, Franklin FC and Jones GH (2001) Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* **114**: 4207-4217.
  - 25) Richards EJ, Goodman HM and Ausubel FM (1991) The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3351-3357.
  - 26) Haupt W, Fischer TC, Winderl S, Fransz P and Torres-Ruiz RA (2001) The centromere1 (CEN1) region of *Arabidopsis thaliana*: architecture and functional impact of chromatin. *Plant J.* **27**: 285-296.
  - 27) Carlton PM and Cande WZ (2002) Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation. *J. Cell Biol.* **157**: 231-242.
  - 28) Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA and Cande WZ (2000) Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J. Cell Sci.* **113**: 1033-1042.
  - 29) Martinez-Perez E, Shaw P, Reader S, Aragon-Alcaide L, Miller T and Moore G (1999) Homologous chromosome pairing in wheat. *J. Cell Sci.* **112**: 1761-1769.
  - 30) Mikhailova EI, Sosnikhina SP, Kirillova GA, Tikhonov OA, Smirnov VG, Jones RN and Jenkins G (2001) Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.). *J. Cell Sci.* **114**: 1875-1882.
  - 31) Dynek JN and Smith S (2004) Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* **304**: 97-100.
  - 32) Riha K and Shippen DE (2003) Telomere structure, function and maintenance in *Arabidopsis*. *Chromosome Res.* **11**: 263-275.
  - 33) Evans SK, Bertuch AA and Lundblad V (1999) Telomeres and telomerase: at the end, it all comes together. *Trends Cell Biol.* **9**: 329-331.
  - 34) Chang W, Dynek JN and Smith S (2003) TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes Dev.* **17**: 1328-1333.
  - 35) Kemp B, Boumil RM, Stewart MN and Dawson DS (2004) A role for centromere pairing in meiotic chromosome segregation. *Genes Dev.* **18**: 1946-1951.