

T. シロイヌナズナ花粉母細胞の減数分裂時の染色体に対する

FISH法の確立

安積良隆、外山俊士、五十嵐聡広、鈴木秀穂

神奈川大学・理学部・応用生物科学科

要旨 染色体を個別に追跡しその挙動を調べることのできる方法、FISH法をシロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂時の染色体に適用することを目的に条件検討を行った。その結果、以下の条件でFISHを行うのが最良と結論された。花序の固定はカルノイ溶液（75%エタノール、25%酢酸）を用い、室温で16時間程度行う。細胞壁とカロース層の消化は0.4%Cellulase、0.4%Pectolyase、0.4%Cytohellicase、1370 U/ml β -Glucuronidaseを用いて37°Cで3時間処理する。スライドガラス上に消化した細胞を展開した後、再度カルノイ溶液で固定する。0.1mg/ml RNaseA で37°C30分間、0.0025%ペプシンで37°C3分間、4%パラフォルムアルデヒドで室温10分間処理した後、エタノールシリーズを通し風乾させる。ビオチン標識したプローブDNAとスライドガラス上の染色体DNAと同時に72°C3分間熱変性させた後、37°C16時間反応させハイブリッドを形成させる。洗浄後、アビジン-FITCを反応させ、ビオチン化抗アビジンDを用いて、シグナルの増幅を行う。なお、本研究においてはBACクローンF10B6よりプローブを作成し用いた。

序論 減数分裂は有性生殖を行って次世代を生み出す生物にとって必要不可欠のプロセスである。生物は有性生殖を行うことによって進化の速度を爆発的に増加させ、病原菌に対する抵抗性を高めたと言われている。そのような利益のある反面、減数分裂は染色体数を2nから1nに半減させるという非常に危険なプロセスを踏まなければならない。この減数分裂のしくみを解き明かすことは非常に興味深く、かつ重要であると考えられる。

シロイヌナズナは植物体自体が小型で実験室内で数多く栽培できること、世代時間が短く1年に何度も実験を行えること、当時知られていた植物の中でゲノムサイズが最も小さかったためゲノム構成も単純でその全塩基配列の決定も容易であろうと考えられたことなどから、1980年ごろからモデル植物として最適であると提唱され始め、以降分子遺伝学的な研究を行う多くの研究者に実験材料として採用された。今日ではゲノムプロジェクトも完了し、全塩基配列が知られている。しかし植物自体の小ささに加え、ゲノムサイズの小ささは染色体そのものの大きさも小さいことを意味し、染色体の観察といった細胞生物学的な研究は困難で壁に阻まれていた。それでもモデル植物としての認知が広がると共に、徐々にではあるが他の動植物の研究で開発された手法がシロイヌナズナの研究に導入されはじめ、1990年代に入ってから、細胞生物学的な研究の進展も加速し始めた。1994年にはAlbiniによって減数第一分裂前期の染色体の電顕像が得られ、染色体の微細な構造

が知られるようになった。

我々はシロイヌナズナの減数分裂に関する突然変異体を用いて減数分裂に関わる遺伝子の同定を進めているが、それらの変異体の表現型を解析し遺伝子産物の機能を推定するには、減数分裂を行っている細胞を、特に染色体を詳しく観察する必要がある。しかしシロイヌナズナでは減数分裂を行っている細胞を同定し、その染色体を観察するという事は容易ではない。1996年に Ross らによってシロイヌナズナの減数分裂中の花粉母細胞における染色体の鮮明な像が消化展開法を用いることによって示されたが、これもさらなる研究の余地を残している。しかもこの方法では染色体の一つ一つを識別することができず、相同染色体同士の相対的位置関係などを明らかにすることはできなかった。一方、ヒトやムギの染色体に対しては染色体上の特定の領域に対するプローブをハイブリダイズさせることによって、特定の染色体を認識することのできる FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 法が開発された。1998年にはシロイヌナズナにおいても Fransz らによって減数第一分裂の細胞に対して FISH法が試みられた。このような状況の下、我々はシロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂時の染色体に対するより効率の良い FISH法の確立を目指して本研究を行った。

材料・方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta*)

クローン

BAC クローン F10B6 (第一染色体 5681318~5814017bp)

試薬類

Cellulase "ONOZUKA" R10 (YAKULT)

Cytohelicase (SIGMA)

Pectolyase (SIGMA)

β -glucuronidase (和光純薬)

Pepsin (和光純薬)

FlexiPrep kit (Amersham Pharmacia Biotech)

Biotin-High Prime (Roche)

Avidin-FITC complex (Roche)

BlockAce (大日本製薬)

Biotinylated anti-Avidin D (VECTOR)

Ross らの消化展開法

播種後 3~4 週間経過したシロイヌナズナの花序をカルノイ溶液を用いて室温で一晩固定する。滅菌水、10mM Citrate buffer pH4.5 を用いて 5 分間 2 回づつ、計 4 回洗浄する。

上記のバッファーに溶解した消化酵素 (0.3%cellulase、0.3%pectolyase、0.3%cytohelicase) を用いて 37℃ 1～2時間細胞壁・カロースを消化する。バッファーで洗浄後、一つの花序をスライドガラス上の 60%酢酸中に移し、つぼみを大きさの順に並べる。つぼみの長さが 0.3～0.6mm のものを選び、新しいスライドガラス上に移す。つぼみを 60%酢酸中で切開し、やくを取り出し、残りの組織片等をキムワイプで除く。45℃で1分間保温した後、カルノイ溶液 (75%エタノール、25%酢酸) を用いて再度固定し、風乾させる。

有山・稲沢の標準的な F I S H 法

スライド標本を 70℃の 70%ホルムアミド、2 x S S C 溶液中で変性後、-20℃の 70%エタノール中に移して急冷する。100%エタノール中に移した後、風乾させる。標識したプローブDNAを 100%ホルムアミドに溶解し 75℃で 10 分間熱変性した後、等量の 20%硫酸デキストラン、4 x S S C を加える。密閉室箱中で一晩ハイブリダイゼーションを行う。37℃の 50%ホルムアミド/ 2 x S S C、室温の 2 x S S C、1 x S S C、4 x S S C で洗浄する。1%BlockAce/ 4x S S C に 15 μg/ml になるように Avidin-FITC を希釈し、40分間 37℃で反応させる。4 x S S C、4 x S S C/ 0.05% TritonX-100、4 x S S C で洗浄後、D A P I で対比染色を行い蛍光顕微鏡で観察する。

Stevenson らのスライドの前処理

スライド標本をカルノイ溶液 (75%エタノール、25%酢酸) に 30 分間浸し、固定する。0.1mg/ml の RNaseA で 37℃ 30 分間処理し、2 x S S C で 2 回洗浄する。0.0025% ペプシン/ 10mM HCl で 37℃ 3 分間処理し、2 x S S C で 2 回洗浄する。4%パラホルムアルデヒドで 10 分間室温で処理し、2 x S S C で 3 回洗浄する。エタノールシリーズを通し、風乾させる。

森島のシグナル増幅法

有山・稲沢の方法に従って、ハイブリダイゼーションを行った後、4%BlockAce/ 4 x S S C でブロッキングを行う。Avidin-FITC を反応させ、4 x S S C、4 x S S C/ 0.05% TritonX-100、4 x S S C で洗浄した後、1 μg/ ml Biotinylated anti-Avidin D を 37℃で 1 時間反応させる。先と同様に洗浄後、再び、Avidin-FITC を反応させ、洗浄する。D A P I で対比染色を行い蛍光顕微鏡で観察する。

結果の解析法

顕微鏡はオリンパスBX-60を用い、D A P I による染色体像はWUフィルターを用い、F I T C のシグナルはW I Bフィルターを用いて観察した。同じ領域のD A P I 染色体像とF I T C のシグナルを別々にスライドフィルム PROVIA 100 (富士フィルム) に撮影した。それぞれをプリントした後、スキャナーで取込み、Photoshop の画像ファイルとし、合成した。

結果

条件検討1 鑄型DNAの大きさ プローブ合成の鑄型となるBACクローンDNA F10B6 は、合成されたプローブが 500 塩基以下となるようあらかじめ制限酵素で切断する必要がある。①EcoRI PstI SalI XhoI、②EcoRI PstI SalI XhoI ClaI Hae III、③ClaI HaeIII HindIII DraI、④HaeIII DraI の4つの組み合わせで消化を行い消化断片の大きさを調べた (Figure 1)。①の場合は小さくなりすぎていた。②の場合も③の場合も消化が不十分と考えられた。④の消化が適切と考えられた。実際にFISHを行った場合でも④で最も良い結果が得られた。

条件検討2 材料の固定法 播種後3~4週間経過した、野生型のシロイヌナズナの花序を①60%エタノール、30%クロロホルム、10%酢酸、あるいは②75%エタノール、25%酢酸の2種類のカルノイ溶液で固定した。①で固定した場合にはペプシン処理をしても細胞が何か膜状のものに覆われていたが、②で固定した場合にはそのような膜状のものは消化されており、シグナルを鮮明に検出することができた。このことから固定には75%エタノール、25%酢酸のカルノイ溶液を用いることにした。

条件検討3 細胞壁・カロースの消化 固定された花序は滅菌水、10mM クエン酸バッファ (pH4.5) で2回ずつ洗浄後、消化酵素液①0.3%セルラーゼ、0.3%ペクチナーゼ、0.3%サイトヘリカーゼ、②0.4%セルラーゼ、0.4%ペクチナーゼ、0.4%サイトヘリカーゼ、③0.4%セルラーゼ、0.4%ペクチナーゼ、0.4%サイトヘリカーゼ、1370 U/ml β -グルクロニダーゼを用いて 37°C 3時間消化した。①の場合も②の場合も消化が不十分であった。③の酵素液を用いた場合が最も良い結果が得られた。

条件検討4 スライド標本の前処理 RNaseA 処理とパラフォルムアルデヒド処理は、これを行うことによってバックグランドを低下させることができた。ペプシン処理は花粉母細胞を覆う何か膜状のものを消化するのに必須であった。標準的に37°C 3分間行ったが、同じ条件で行っても消化に過不足が生じることがあり、実験の都度反応時間を補正してやる必要がある。

条件検討5 プローブDNA及び染色体DNAの変性条件 プローブDNAを100%ホルムアミド中75°Cあるいは80°Cで10分間、染色体DNAを70%ホルムアミド70°C、74°Cあるいは76°Cで変性させてみた。プローブDNAは高温で変性させると凝集した。染色体DNAはどの温度で変性させてもスライドガラスから染色体DNAが剥がれるようなことはなかったが、このプローブDNAと染色体DNAを別々に変性させる方法では強いシグナルは得られなかった。プローブを50%ホルムアミド/10%硫酸デキストラン/2xSSC溶液に溶解しスライド標本上に広げた後、スライド標本を72°Cのホットプレート上に3分間置き、両方のDNAを同時に変性させる方法を試した。この方法によって結果は大きく改善された。

条件検討6 シグナルの増幅 ビオチン化抗アビジンDによるシグナルの増幅は、顕著にシグナルを増強した。この処理を行わなくても、まれにシグナルを検出することはできたが、この処理を行うことによって強いシグナルを再現性良く得ることができた。

条件検討のまとめ 以上の条件について検討した結果、Figure 2 に示すような信頼性の高いシグナルを得ることが可能となった。Figure 2 DAPI はいくつかのディプロテン期の染色体を示している。Figure 2 FITC は FITC のシグナルを示しており、シグナルを識別しやすくするためにシグナルの色を赤に変更し染色体像と重ねたものが Figure 2 合成である。Figure 2 FITC が示すようにそれぞれの細胞で一つないし二つのシグナルが得られた。シグナルの数の違いは相同染色体同士的位置関係によるもので、離れている場合には二つ、非常に近い場合には一つのように観察された。これからわかるように先の条件で行われた FISH法はバックグラウンドも低く、再現性の非常に高いものであった。条件検討の結果を総合すると、BACクローン F10B6 をプローブとするシロイヌナズナの減数分裂中の花粉母細胞の染色体に対するFISH法としては以下に示した方法が最良であった。

プローブ合成の鋳型DNAとなるBACクローンDNAは大腸菌より FlexiPrep kit を用いて精製した。プローブは Biotin High Prime kit を用いて 37℃で2時間反応を行い、ビオチン標識した。その際 20 μ l の反応液に対して 0.5~1.0 μ g の DraI HaeIIIで切断されたクローンDNAを用いた。有山・稲沢の方法に従い、反応終了後10分間70℃で処理し反応を止めた。反応液に8M酢酸アンモニウム 2.4 μ l、10 μ g/ μ l Calf thymus DNA 2.0 μ l、10 μ g/ μ l Yeast tRNA 2.0 μ l、エタノール 79 μ l を加え-20℃で一晩静置した。

シロイヌナズナの花序は75%エタノール、25%酢酸のカルノイ溶液を用いて室温で16時間固定した。その後-20℃で保存した。

Rossらの方法を参考にして、固定した花序を滅菌水、10mMクエン酸バッファー(pH4.5)で5分間2回ずつ洗浄後、消化酵素液0.4%セルラーゼ、0.4%ペクチナーゼ、0.4%サイトヘリカーゼ、1370 U/ml β -グルクロニダーゼを用いて37℃3時間消化した。10mMクエン酸バッファー(pH4.5)で5分間2回洗浄後、4℃で保存した。

消化した花序の一つをスライドガラス上の60%酢酸中に移し、つぼみを一つずつ切り離し並べた。つぼみの長さが0.3~0.6mmを選び、一つ一つを別々のスライドガラス上に移した。つぼみからやくを取り出し、不必要な組織片をキムワイプで拭いた後、やくをつぶして花粉母細胞を放出させた。45℃1分間保温した後、75%エタノール、25%酢酸のカルノイ溶液でスライドガラスに固定し、風乾させた。

Stevensonらの方法に従いスライド標本の前処理を行った。スライド標本をカルノイ溶液(75%エタノール、25%酢酸)に30分間浸し、再度固定した。0.1mg/mlのRNaseAで37℃30分間処理し、2xSSCで5分間2回洗浄した。0.0025%ペプシン/10mM HClで37℃3分間処理し、2xSSCで5分間2回洗浄した。4%パラホルムアルデヒドで10分間室温で処理し、2xSSCで5分間3回洗浄した。70%、80%、100%のエタノールシリーズを通し、風乾させた。

エタノール沈殿させたプローブDNAを20分間14000rpmで遠心し、上澄みを除いた。150 μ lのホルムアミドに溶解後、150 μ lの20%硫酸デキストラン/4xSSCを加えた。37 $^{\circ}$ Cのホットプレート上に置かれたスライド標本1枚につき20 μ lずつ分配しパラフィルムで覆った。72 $^{\circ}$ Cで3分間加熱し、プローブDNAと染色体DNAの変性を行った。密閉室箱中に置き37 $^{\circ}$ Cで一晩保温した。

パラフィルムを剥がす間、一時的に2xSSC溶液中に置いた後、37 $^{\circ}$ Cの50%ホルムアミド/2xSSC、室温の2xSSC、1xSSCで15分間ずつ洗浄し、4xSSC溶液中に保存した。森島の方法に従ってシグナルの増幅を行った。4%BlockAce/4xSSCで15分間ブロッキングを行った。1%BlockAce/4xSSCに15 μ g/mlになるようにAvidin-FITCを希釈し、1時間37 $^{\circ}$ Cで反応させた。4xSSC、4xSSC/0.05%TritonX-100、4xSSCで15分間ずつ洗浄後、1 μ g/ml Biotinylated anti-Avidin Dを37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。先と同様に4xSSC、4xSSC/0.05%TritonX-100、4xSSCで15分間ずつ洗浄後、再び、15 μ g/mlのAvidin-FITCを1時間反応させ、4xSSC、4xSSC/0.05%TritonX-100、4xSSCで15分間ずつ洗浄した。2xSSC溶液中に一時的に置いた後、0.5 μ g/mlのDAPIで対比染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。

観察結果 Figure 3 zygotene の染色体像から、減数第一分裂前期のザイゴテン期では一部の染色体は相同染色体同士対合しているが、FISHのシグナルからF10B6が相当する第一染色体の一部分はそれほど隣接していないことが理解できる。大部分の相同染色体はF10B6が相当する部分のように、それほど近い部位に位置するわけではないということが推測される。

パキテン期には染色体像から相同染色体同士は対合しているのがわかり、シナプトネマコンプレックスが形成されているように考えられる。FISHのシグナルが隣接していることから、相同染色体同士は同じ遺伝子をコードする領域同士で結合しているのがわかる (Figure 3 pachytene)。

ディプロテン期にはシナプトネマコンプレックスは分解され、相同染色体はキアズマ部分と動原体の部分でお互いに接着していると考えられている。Figure 3 diplotene のシグナルも離れており、それを裏付けている。染色体像から染色体に太い部分と細い部分があるのがわかり、太い部分では染色体が高じ構造を形成しながら凝縮していく様子がうかがえる。

染色体が高度に凝縮したダイアキネシス期には、シグナルが隣接して存在することから再び相同染色体の対応する部分同士は非常に近くに位置するようになることがわかる (Figure 3 diakinesis)。

減数第一分裂中期もシグナルが非常に隣接していることから、相同染色体が対を成したまま赤道面に並んでいるのが理解できる (Figure 3 metaphase I)。

減数第一分裂後期にはそれぞれの相同染色体は別々の極へが分かれていく様子が伺える (Figure 3 anaphase I)。

考察

シロイヌナズナはゲノムサイズが小さいなどの利便性からモデル植物として採用されたが、植物自体が小さいため、タンパク質を分離・精製してその性質を調べるといった生化学的な研究には全く不向きであった。またその研究の歴史はムギやトウモロコシやダイズといった実用性の高い植物と比べると決して古いものではなく、細胞内の構造を顕微鏡下で観察し調べるといった細胞生物学的研究の蓄積も少なかった。シロイヌナズナはもっぱら突然変異体を作成してその遺伝子を単離する分子遺伝学的な研究の材料とされたが、変異の表現型を詳しく調べて行くにはどうしても細胞生物学的な手法が不可欠であると認識され、他の動植物で開発された技法の移植が試みられた。1994年に Albini によって減数第一分裂前期の染色体の電子顕微鏡像が発表されシロイヌナズナの染色体の微細な構造が知られるようになった。1996年には Ross らによって花粉母細胞の減数分裂全ステージの染色体像が発表され、減数分裂中の染色体の挙動が具体的にイメージされるようになった。しかしこの時点ではまだ染色体の一つ一つを識別することはできず、どの染色体がどこにいるのかはわからなかった。シロイヌナズナの減数分裂中の染色体に対しても FISH法が導入されて、1998年には Fransz らによって第一減数分裂前期の染色体に対する FISH 像が発表された。この他にも FISH の報告例はあるにはあるがいずれも、コピー数の多い rDNA をターゲットにするもので、シングルコピーの遺伝子をターゲットにするものではなく汎用性が低い。本研究で我々が採用したプローブはシングルコピーの遺伝子をターゲットとするもので、我々が開発したこの方法は他のどの遺伝子にも応用されうるといふ点で非常に重要であると考えられる。

これまで染色体は染色によって染色体上にバンドを形成させ、それによって染色体を識別してきた。しかしシロイヌナズナの染色体は非常に矮小でバンドを形成させるなどの識別は不可能であった。しかし、FISHを行うことによって染色体の識別が可能となり、染色体の挙動に対する調査も一段階高い次元で行うことができた。我々は花粉母細胞の減数第一分裂のほぼ全過程でシグナルを検出するのに成功し、これによって減数分裂を通じて相同の第一染色体同士がどのような位置関係をとるのかを理解することができた。今回我々は F10B6 という第一染色体に対するプローブを用いたが、他の染色体に特異的なプローブを用いれば他の染色体の挙動を調べることも可能であり、将来各染色体の挙動が明らかにされるものと考えられる。

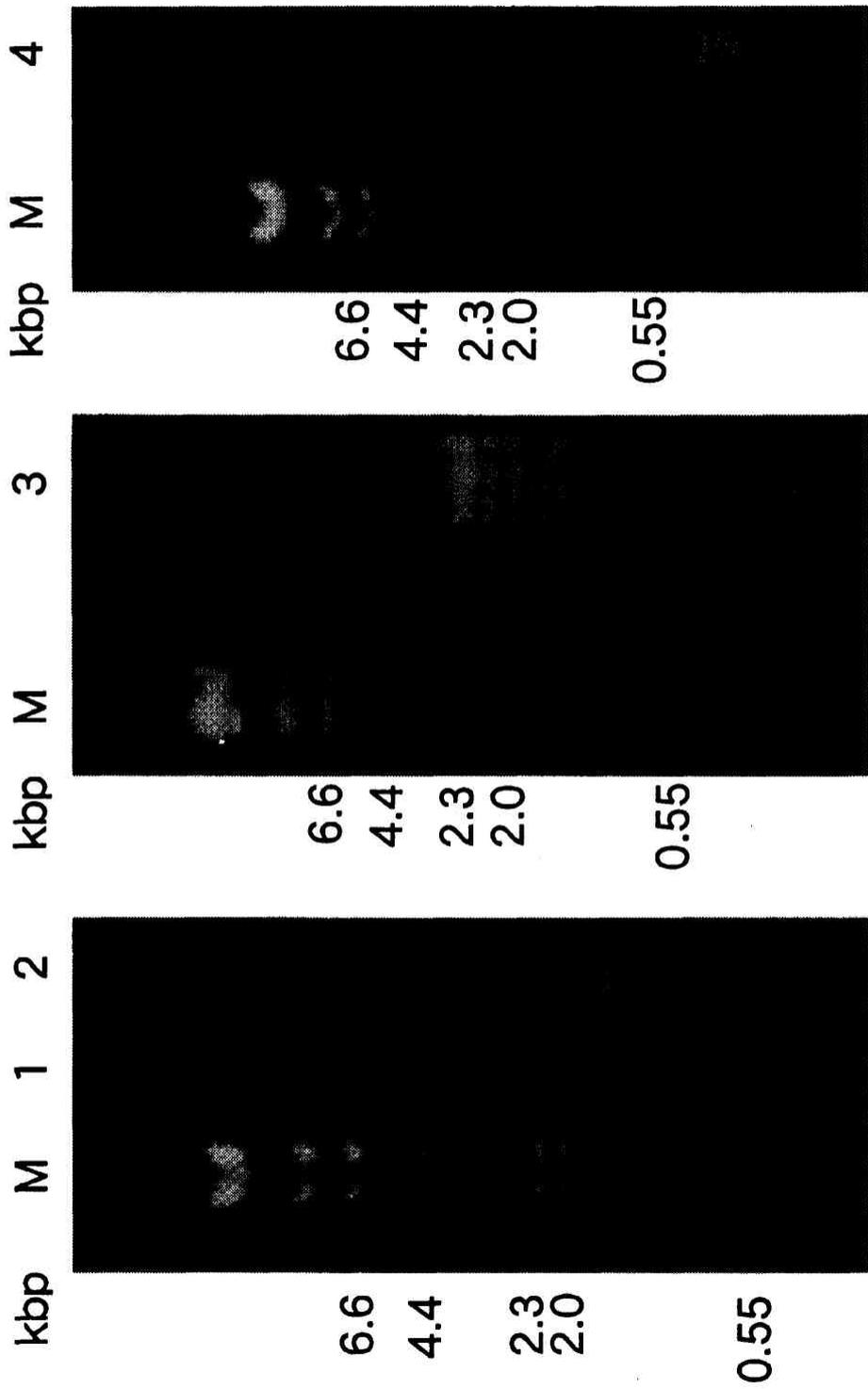
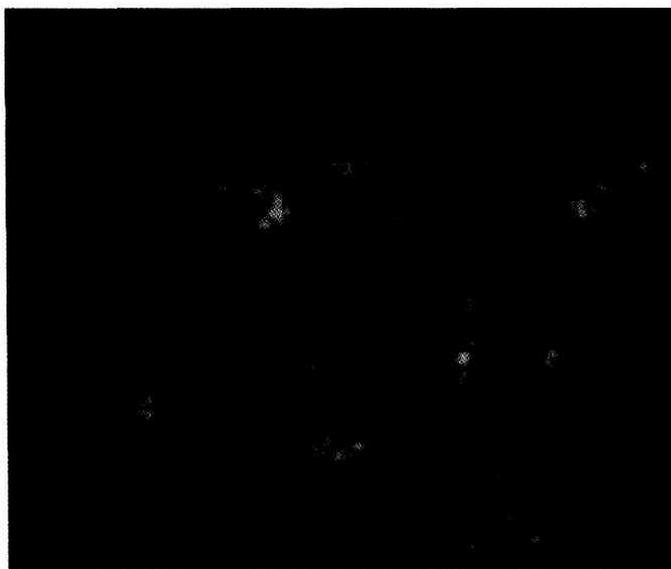
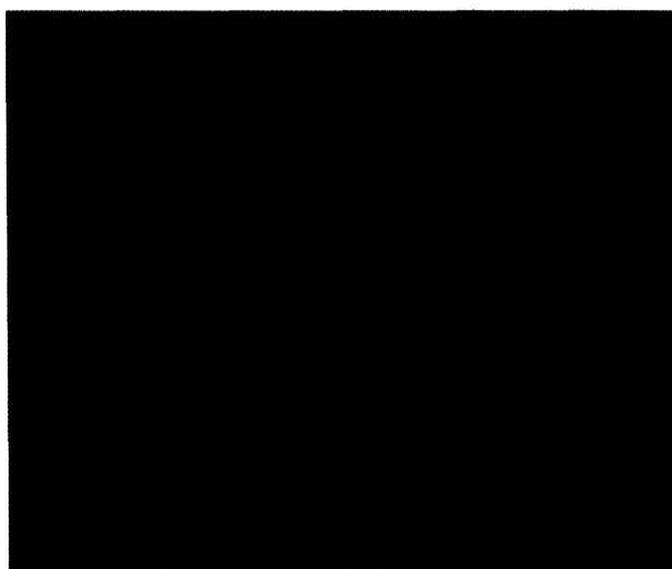


Figure 1 F10B6の制限酵素処理。M ; 分子重量マーカー、1 ; Clal HaeIII HindIII DraI、
2 ; EcoRI PstI Sall XhoI Clal HaeIII、3 ; EcoRI PstI Sall XhoI、4 ; HaeIII DraI

DAPI



FITC



合成

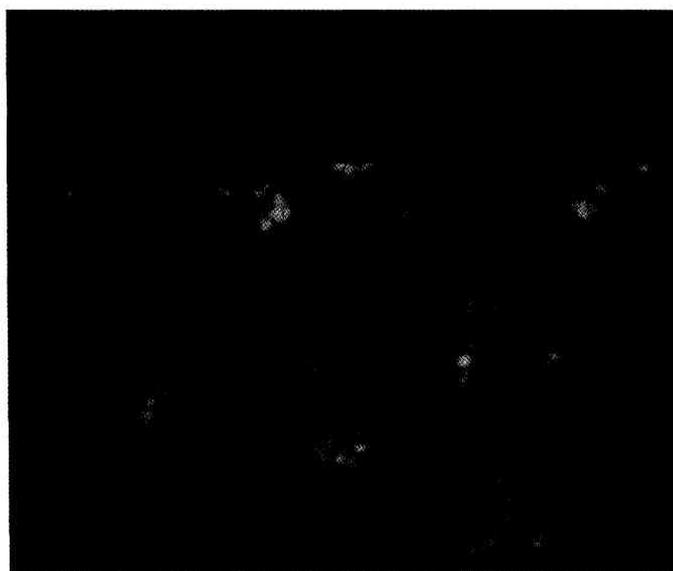
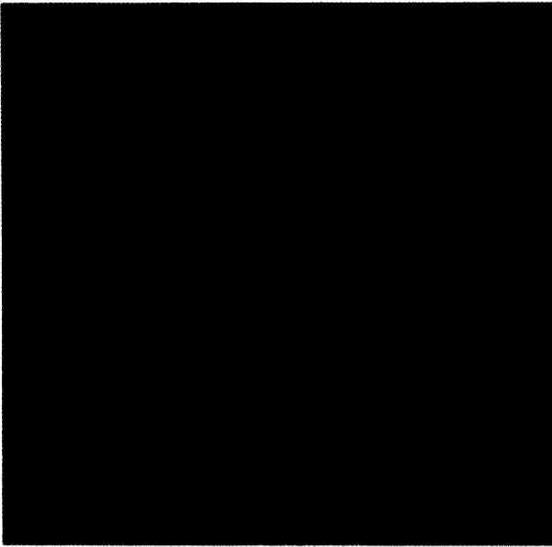
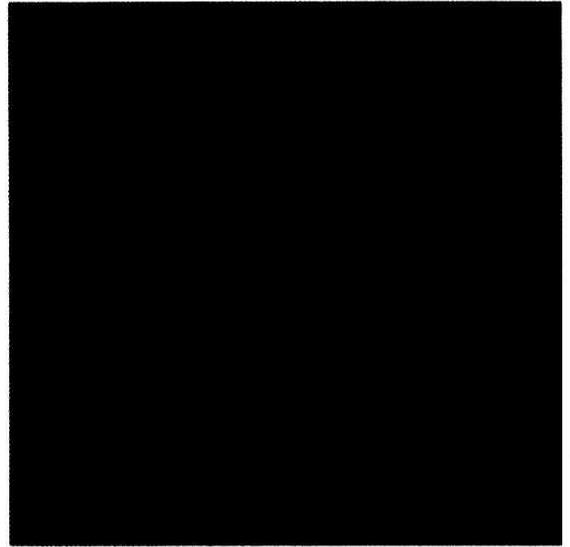


Figure 2

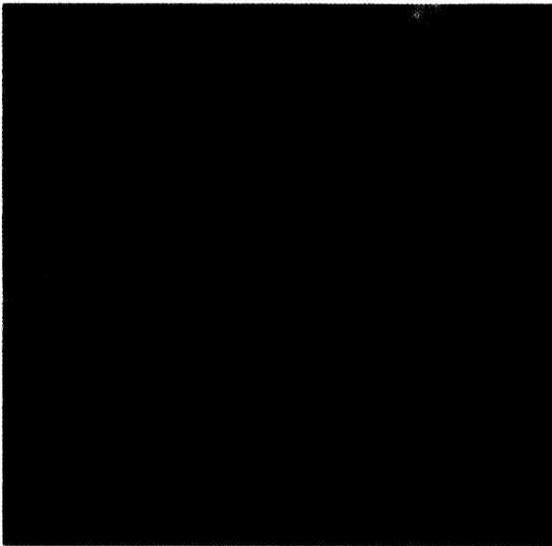
zygotene



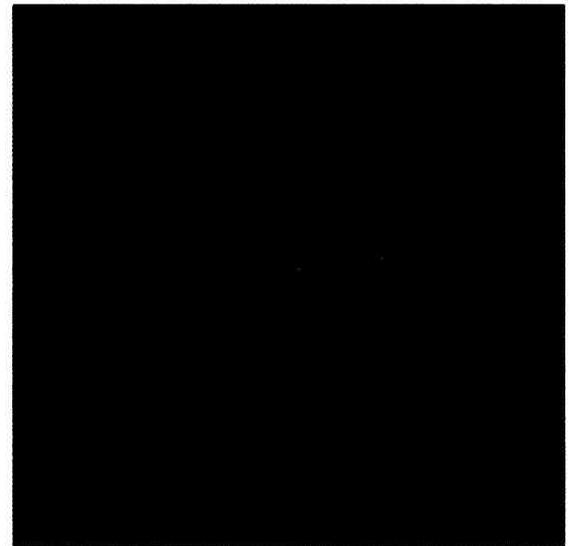
pachytene



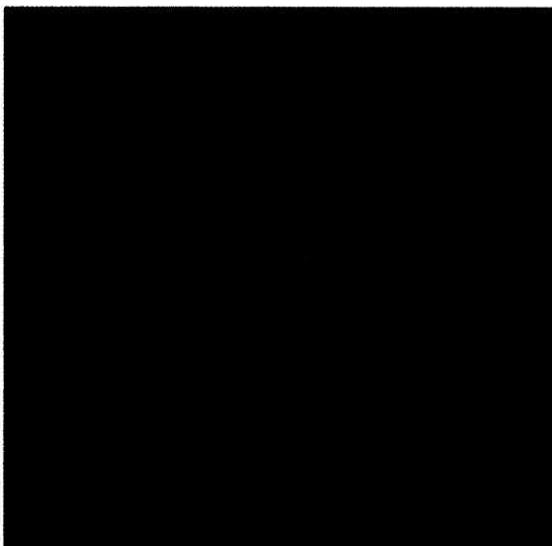
diplotene



diakinesis



metaphase I



anaphase I

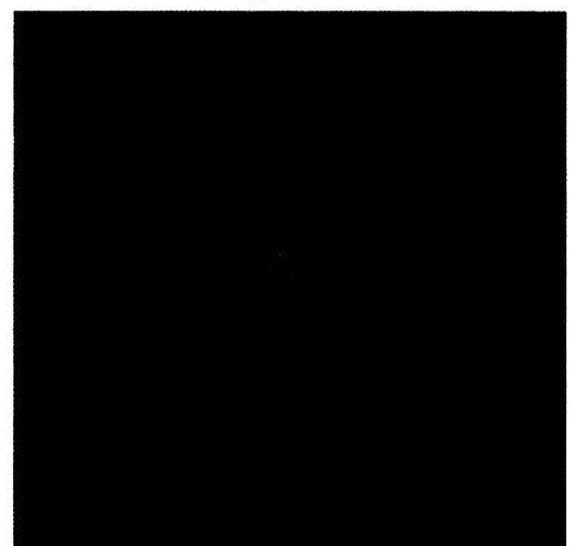


Figure 3

参考文献

有山武志、稲沢穰治 (1997) 臨床FISHプロトコル 阿部達生監修 細胞工学別冊 64-71、秀潤社

森島陽一 (1997) 臨床FISHプロトコル 阿部達生監修 細胞工学別冊 75-78、秀潤社

S.M.Albini (1994) A karyotype of the *Arabidopsis thaliana* genomederived from synaptonemal complex analysis at prophase I of meiosis. *5*, 665-672

P.Fransz, S.Armstrong, C.Alonso-Blanc, T.C.Fischer, R.A.Terres-Ruiz and G.Jones (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**, 867-876

K.J.Ross, P.Fransz and G.H.Jones (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* **4**, 507-516

M.Stevenson, S.J.Armstrong, B.V.Ford-Lloyed, and G.H.Jones (1998) Comparative analysis of crossover exchange and chiasmata in *Allium cepa* x *fistulosum* after genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Research*, **6**, 567-574