

# 細胞の細胞化学的観察 I. DNA, RNAおよびタンパク質の染色

Cytochemical observation of cells I. Staining of DNA, RNA, and proteins.

内海俊策

Shunsaku UTSUMI

## はじめに

細胞は生命の最小基本単位であり、地球上に生存する全ての生物は細胞という単位から成り立っている。細胞の構造は原形質と後形質とに分けられる。原形質は細胞の生きている部分で、核と細胞質からできている。後形質は原形質の物質代謝の結果生じた非生活物質ないしはそれにもとづく構造の総称で、細胞壁の他に細胞液を始めとして、澱粉粒・卵黄粒・脂肪粒・種々の結晶体・分泌顆粒・ある種の色素・乳液などがこれに属する。

原形質はさまざまな化学物質が集まって複雑な構造をつくっているが、生物の種類あるいは組織によって成分比にはいくらか違いがみられる。しかし、主要な構成物質としての水、タンパク質、脂質、核酸、炭水化物、無機物質はいずれの細胞にも共通している。これらの内容は、高校の生物学教科書にも取り上げられている。高校生は、これらの内容を文章を通じて理解するようになっているが、実際には暗記する状態であろう。このような内容は、細胞を観察したときに自分の眼で見て確かめることができれば、単なる暗記ではなく、確実に理解できると考えられる。しかし、これまでに、このような眼で確かめる方法を詳しく取り上げた教科書や学生用実験書は見当たらない。今回の研究にあたって、10冊の生物学実験書を調べたが、DNA染色のためのフォイルゲン反応についてふれているのは2冊のみであり、そのうちの1冊が細胞化学という項目をたてていたにすぎない。他の細胞構成成分についての細胞化学的観察についてはまったく取り上げられていない。

細胞の構成成分を細胞を壊さずに定性的または定量的に調べる方法を一般に細胞化学、組織化学的方法という。この方法は細胞内の特定物質の特異呈色反応からアイソトープによるオートラジオグラフ法、顕微分光測光法、免疫抗体蛍光法などがあり、その範囲は広い。しかし、高校では、高価な機器や色素を使用する実験は無理であるとおもわれる。そこで、本実験シリーズでは、高校でも使用可能な色素を用いた呈色反応による細胞化学的方法を試みた。ただし、現在のところ、水と無機物質については細胞化学的な方法で観察することはできない。この方法の対象となるのは核酸、タンパク質等の高分子である。

今回は、タンパク質と核酸(DNA・RNA)を染色する方法を検討した結果について報告する。DNAの染色にはフォイルゲン反応、タンパク質の染色にはファストグリーンFCFを用いた。RNAの染色には新たに酢酸カーミンによる方法を検討した。

## 材料と方法

材料には、ソラマメおよびタマネギの根端細胞を用いた。ソラマメは、種子を一晩水道水中に浸した後、殺菌剤(ピューラックス)で15分間処理し、水道水ですすいでから湿らせたパーミキュライトに播植した。タマネギは、甲高のものを用い、水道水を満たしたビーカーの上に茎の部分が浸るように置き、発根後は熱帯魚用の空気ポンプでビーカー内に空気を補給した。この処理を行うのは水中の酸素が不足すると、根は窒息して細胞分裂がおこらなくなるからである。

活発に成長している根の先端(3cm程度)を切り取り、使用直前に作成した酢酸・アルコール液(1容:3容に混合)に入れ、室温で10~15分間固定した。固定時間は室温ならば3~4時間、冷蔵庫中ならば一晩でもよい。使用するまでは、根を酢酸・アルコール液にいれたまま冷凍庫中に保存した。このように固定した根を以下の方法により染色した。

### 1. フォイルゲン反応染色

固定した根を蒸留水で10分間洗浄（蒸留水を3回交換）後、10ml用の管ビンに入れた室温の1N-塩酸中に浸し、これを60±1℃の湯の中に10分間置いて加水分解を行った。この処理を行うときは、穴をあけた発砲スチロールに管ビンを固定して湯の中に浮かべた。（なお、この加水分解は5N-塩酸で室温、15~40分間行う方法もよく用いられる。）塩酸処理した根を10分間水洗（蒸留水を2回交換）後、無色塩基性フクシン液（シフ試薬）中に入れ、室温で2時間以上染色した。染色後、直ちに根を亜硫酸水で30分間（液は2回交換）洗った。次いで、根を水洗（蒸留水を3回交換）した後、1本の根をスライドガラス上に置き、赤紫色に濃く染色された先端部（成長点を含む）だけを残し、他の部分は取り除いた。先端部に45%酢酸を滴下し、その上にカバーガラスをかけてその周囲にはみ出した余分の酢酸をろ紙で吸い取った後、カバーガラスの一端をろ紙片でおさえて鉛筆の削っていない方の端で細胞が一層になるまで軽くたたいた。次いで、二つ折りにしたろ紙の間にはさみ、カバーガラス側を上にして親指で強く押しつぶした。次いで、スライドガラスを液体窒素中で凍結後、カミソリ刃でカバーガラスを剥がした。完全に水滴が乾燥してから、スライドガラスの試料の上に封入剤（オイキット又はユーパラル）を1、2滴おとし、カバーガラスをかけて永久標本を作成した。フォイルゲン染色した標本は光にさらすと退色するので、暗所に保存しなければならない。

#### <無色塩基性フクシン液（シフ試薬）の作成>

500ml三角フラスコに塩基性フクシン1gと蒸留水200mlを入れ、口をパラフィルムで塞いで下からガスバーナーで熱し、沸騰してから約10分間煮沸する（フラスコには10粒程度の沸騰石を入れておく）。液が50℃まで冷えたら、ろ紙（ワットマンNo.1）でろ過する。この液をもう一度50℃まで暖めてから、20mlの1N-塩酸を加えてよく振り攪拌する。さらに、20℃まで冷えたら、異性（メタ）重亜硫酸カリ（ $K_2S_2O_5$ 、ピロ亜硫酸カリともいう）又は無水亜硫酸ナトリウム $Na_2SO_4$ を3g加えてよく振り攪拌後、冷蔵庫に1晩保存する。約24時間後に液の色が無色又はビール色になっていれば使用できる。その後も冷蔵庫に保存し、液の色がピンク色になると使用できないので、新しい液を作成する。なお、市販のものを使用してもよいが、500ml単位で販売されているので、全部使いきる前に変色することがあり、無駄が多い。（シフ試薬の使用期限は約半年間と考えておくとよい。）冷蔵庫に保存しているシフ試薬は室温にもどしてから使用する。

#### <亜硫酸水の作成>

蒸留水200ml、1N-塩酸10ml、10%重亜硫酸ナトリウム水溶液10mlを混合する。

### 2. ファストグリーン染色

1の場合と同じ方法で加水分解を施した根を水洗後、成長点部分をスライドガラス上の45%酢酸中で押しつぶした。このスライドガラスを大型のピンセットではさみ、液体窒素中に入れて凍結させた後、カミソリ刃でカバーガラスをはがした。（液体窒素の代わりに、大きなドライアイスの平面上にスライドガラスを置いて凍結させる方法もあり、この方が一般的である。大きいものが入手できない場合には、小さいものを魔法瓶に半分くらい入れ、さらに99%アルコールをほぼ同じ分量入れてその中にスライドガラスを浸す方法でもよい。また、カバーガラスの片側面に18mm幅のスコッチメンディングテープ（住友3M社）を貼りつけ、テープ面をスライドガラスにあわせて押しつぶすと、カバーガラスは容易に剥がすことができる。）水滴を完全に乾燥させてから、スライドガラスを30、50、70、95%の各アルコールに1分間ずつ浸して脱水後、0.5%ファストグリーンFCF溶液（95%アルコールに溶解した）中で2~3分間染色した。次いで、95%アルコールと99%アルコールで洗浄し、乾燥させた後、上述の封入剤で封入した。

### 3. 酢酸カーミン染色

1の場合と同じ加水分解処理した根を水洗後、成長点部分をスライドガラス上に置き、その上に酢酸カーミンを数滴おとしてからカバーガラスをかけ、そのまま10~15分間置いた。その後、1の場合と同様に押しつぶした。この標本をそのまま観察した。なお、酢酸カーミンは、45%酢酸にカーミンを1%の割合に溶かしたものを用いた。

### 4. フォイルゲン反応とファストグリーンによる二重染色

1の方法によりフォイルゲン染色した根をスライドガラス上に押しつぶした後、液体窒素で凍結してカバーガ

ラスを剥がした。水滴が乾燥してから、スライドガラスを2と同じ方法により脱水、染色、乾燥、封入を行った。

## 結果と考察

以下の染色結果は、ソラマメとタマネギでまったく同じであった。

### 1. フォイルゲン反応染色

この染色法により、染色体と細胞核が赤紫色に染色された(図1)。しかしながら、細胞質と仁(核小体)などその他の部分は染まらなかった。図1の細胞核の白くぬけている部分が仁である。

フォイルゲン反応は、R.Feulgen とH.Rossenbeck(1924)によりDNA検出の細胞化学反応として工夫された。細胞を60°Cの1N-塩酸中で加水分解して、シフ試薬(無色塩基フクシン液)を作用させると、DNA分子中のプリン塩基(アデニン、グアニン)の特異的遊離によって生じたデオキシリボースのアルデヒド基がフクシンと反応して赤紫色を発する。したがって、赤紫色に染まった染色体や核(実際には染色質)にDNAが存在することがわかる。この染色は非常に鮮明で、核と染色体にDNAが存在することは一目瞭然に理解できる。したがって、染色体や核の観察にはきわめて適した染色法といえる。

さらに、厳密な条件を設定して標本を作成すれば、580nm~585nmの可視光線顕微分光測光によってDNA含量の相対値の定量も可能である。正確には、他の染色法、紫外線吸収測光、DNA分解酵素(DNase)処理実験を併用することが肝要である。とくに、加水分解の時間を著しく長くすると、ほかの多糖類の分解による呈色反応(PAS反応)がおこるので、注意が必要である。また、DNAを染めるときでも、固定液によって加水分解の時間が異なるので、固定液を変えた場合は予備テストをおこなって最適時間を調べておかなければならない。ちなみに、酢酸を含む固定液では60°Cで10分間前後、ホルマリンを含む固定液では15分前後の加水分解が必要である。いずれの時間も室温の塩酸に根を入れた管ピンを60°Cの湯の中に浮かべてから引き上げるまでの間を示したものである。

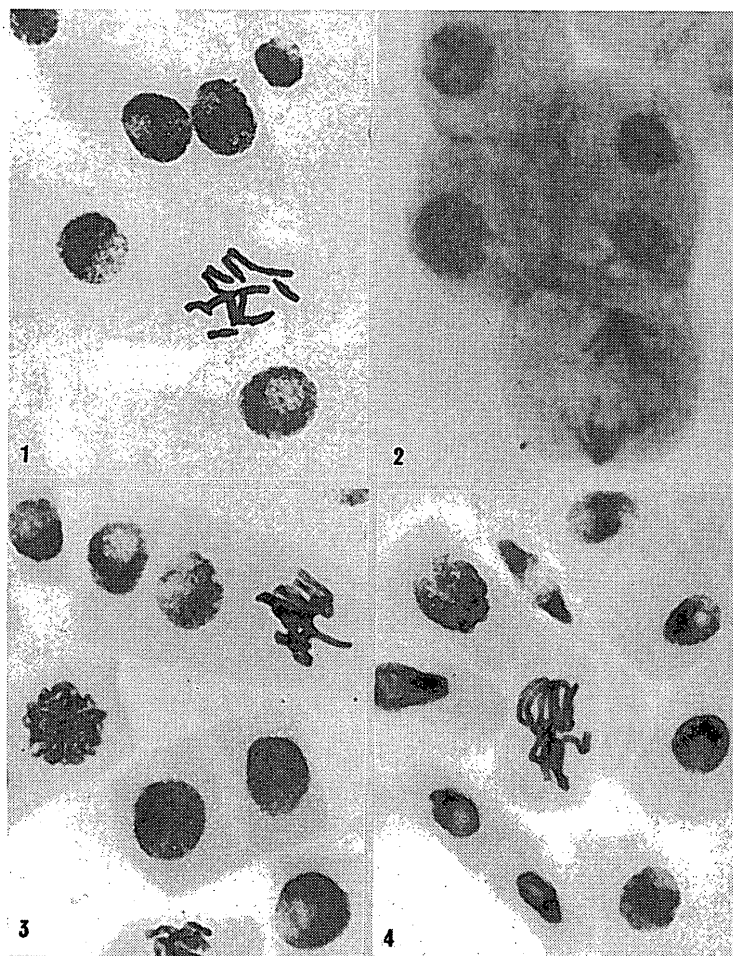


図1. フォイルゲン反応で染色したソラマメの根端細胞。

図2. ファストグリーンで染色したソラマメの根端細胞。

図3. 酢酸カーミンで染色したソラマメの根端細胞。

図4. フォイルゲン反応とファストグリーンで二重染色したソラマメの根端細胞。

## 2. ファストグリーンFCF染色

この染色では、核、染色体が濃い青色に、細胞質、仁は薄い青色に染まった(図2)。図2の写真では仁の部分が白くぬけているように見えるが、実際には薄い青色に染まっている。しかし、核と細胞質間のコントラストが悪いので、この色素を細胞の観察に単独で用いるのは適切ではない。なお、図の細胞に白く丸い小粒がみられるのは脱水が不十分のために生じた水泡である。永久標本にする場合は、封入する前に十分に乾燥しておく必要がある。

ファストグリーンFCFはタンパク質一般を染色する。したがって、染色された部分には、タンパク質が存在することを示す。ただし、固定液に含まれる酢酸は細胞(核と染色体)からヒストン(塩基性タンパク質で、+に荷電している)の50%以上を除去することが知られているので、本実験で染色されるのは大部分が非ヒストンタンパク質であると考えられる。ヒストンを染める方法は別にあるので、その方法と結果については次の機会に報告する予定である。

## 3. 酢酸カーミン染色

この染色では、核と染色体が濃赤色に、細胞質と仁が薄赤色に染色された(図3)。写真では仁の部分が白くぬけているように見えるが、実際には薄赤色に染まっている。同様の結果は酢酸オルセインでも得られることはよく知られている。なお、細胞内にみられる白丸状の小粒は水泡である。

カーミンやオルセインはどんな物質を染めるのであろうか。両者はともに塩基性色素の仲間である。塩基性色素は助色団中にアミノ基、イミノ基などをもち、溶液中では(+)に荷電するので、(-)に荷電している好塩基の細胞構成成分(染色体や核の染色質)と親和性がある。染色体や核(染色質)の構成成分の中で(-)に荷電しているのはDNAとRNAのリン酸基であり、このリン酸基にカーミンやオルセインが静電的に結合することによりDNAとRNAが赤く染まると考えられる。しかし、DNAを染めるフォイルゲン反応では染色体と核が染色され、細胞質と仁は染まらないことから、カーミンで細胞質と仁が染まるのは、そこにRNAが存在するためと考えられる。細胞質には伝令RNA、転移(運搬)RNA、およびリボソームに含まれるリボソームRNAが存在することはよく知られている。結論として、酢酸カーミンはDNA、RNAの両方を染色するといえる。

## 4. フォイルゲン反応とファストグリーンの二重染色

この二重染色では、核(染色質)と染色体が青紫色に染まり、細胞質と仁が青色に染色された(図4)。写真では、仁の部分が白く抜けてみえるが、実際には薄青色に染まっている。この方法は、酢酸カーミン染色と比べて核と細胞質が異なる色調に美しく染め分けられ、細胞や染色体の形がよくわかるので、細胞や細胞分裂の観察に適している。そのうえ、DNAとタンパク質の存在する部分を眼で確認でき、しかも、永久標本が作成できるという利点もある。我々は、学生実験でこの標本を学生自身に作成させて観察させているが、美しく観察や理解がしやすいと好評である。学生実験では、このように学生が喜んで観察することが大切である。自ら興味をもって実験することはきわめ鮮明な印象を残すからである。

## 5. 総合考察

DNAの染色法には、フォイルゲン反応の他に、ガロシアン・クロム明バン、メチルグリーン、トルイジンブルー、メチレンブルーなどによる染色法がある。前二者は、DNAの定量にも用いられているが、後二者はメタクロマジー(異調染色性)を示し、DNAとRNAを異なる色調で同時に染めるので、必ずしもDNA特異的染色法とはいえない。フォイルゲン反応は他の染色法に比べて操作がもっとも簡便であり、染色性もよいので、高校レベルでDNAの存在を確認させるには適している。

一般に、RNAの染色はむづかしく、DNAに対するフォイルゲン反応のような特異的染色法は確立されていない。RNAの染色法としては、アズールB、トルイジンブルー、メチレンブルー、ピロニンYによる染色法が知られているが、これらの方法は対照実験を必要とするような手間暇がかかるうえに、常に同じ結果が得られるとは限らないので、高校レベルでの使用は難しい。これに対して、酢酸カーミンやオルセインは中学校でも使用されているごく普通の染色剤であり、使用上の問題点もほとんど無いので、新しいRNAの染色法として提案したい。しかし、RNAの定量の使用できるかどうかは不明であり、今後の検討を要する。

タンパク質の染色剤には、ファストグリーンの他に、ナフトールイエローS、ビーブリッヒスカーレット、ク

マジブリアントブルー、硝酸銀などが使用されている。さらに、特定のアミノ酸を特異的に染色することによってタンパク質を染める方法も知られている。しかし、これらの方法は操作が煩雑であったり、パラフィン切片にしか適用できない等の制約があり、高校の教育現場で使用するには適しない。近年、硝酸銀が仁および染色体上の仁形成部の特異的染色法に応用されている。この染色法の検討結果については、今後発表の予定である。

なお、二重染色法として、DNAとRNAを染め分けるメチルグリーン・ピロニン法が知られており、唾腺染色体の観察に時折用いられることがある。唾腺染色体は高校でよく取り上げられる観察テーマであるが、観察にはもっぱら酢酸カーミン染色が用いられ、メチルグリーン・ピロニン染色はほとんど用いられていない。しかし、この方法で染色がうまくいくとDNAは青色に、RNAは赤色に染め分けられ、染色体上のRNA合成部位であるパフ(puff)を観察できて、さらに美しい標本が得られるので、今後おおいに活用すべきである。そこで、この方法の有用性についても今後検討する予定である。

謝辞—本研究にあたって、材料の栽培、固定、染色標本の作成に協力していただいた高橋正人、石塚悟史の両君に感謝いたします。

### 参 考 図 書

- Biological Stain Commission編(金子勝治・新井義夫訳), Staining Procedures (第4版), 藤田企画出版, 1985, 埼玉
- W.G.B. Casselman著, Histochemical Technique, John Wiley & Sons Inc, 1959, London
- 福田重夫・新津恆良・佐藤やす子・田口茂敏・渡辺宗孝著, 生物科学実験法, 東京教学社, 1982, 東京
- F. ゲルテンボス著, 染色体のしくみとはたらき, サイエンス社, 1981, 東京
- 西山市三編, 細胞遺伝学研究法, 培風館, 1961, 東京
- 日本生物教育会編, 生物の実験・観察(第46回日本生物教育会東京大会記念誌第一分冊), 1991, 東京
- 山下孝介・上野益三著, 生物学実験ノート, 養賢堂, 1963, 東京

### 摘 要

細胞内におけるDNA, RNA及びタンパク質の存在する部位を調べる方法(いわゆる細胞化学的方法)について検討した。

DNAの染色にはフォイルゲン反応が、タンパク質の染色にはファストグリーン染色が適切であることが判明した。また、酢酸カーミンは、DNAとRNAを染色することを明らかにした。さらに、フォイルゲン反応とファストグリーンによる二重染色は、DNAとタンパク質を一つの細胞内で異なる色調によって同時に観察でき、しかも美しい標本ができるので細胞の観察には単独染色より有効であることを示した。