

植物染色体の姉妹染色分体交換

I. 標本作成法の改良

Sister Chromatid Exchanges in Plant Chromosomes

I. An Improved Method for Differential Staining of Sister Chromatids

内海 俊策・米澤 雅史*

Shunsaku Utsumi, Masashi Yonezawa

Summary

This paper describes an improved FPG method for differential staining of sister chromatids and the preliminary study of sister chromatid exchanges (SCEs) in root tips of *Vicia faba* and *Allium cepa*. Roots were grown for two rounds of DNA replication in BrdU (30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or in BrdU, FdU (0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and Urd (1.221 $\mu\text{g}/\text{ml}$). BrdU-treated roots were immersed in 0.1% colchicine for 3h followed by fixation in acetic alcohol. The roots were macerated for 1h at 37°C in the enzyme solution which contained 4% cellulase (Onozuka R-10) and 4% pectinase (Sigma) dissolved in McIlvaine buffer at pH 4.5. After rinsing in distilled water, a root tip was placed on a clean slide and then squeezed with a needle. After a few drops of fresh fixative were added, the slide was flame dried. The flame dried preparations were stained with the fluorochrome compound 33258 Hoechst (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 0.5 x SSC. The stained preparations were mounted in 0.5 x SSC, the cover-slips being sealed with manicure fluid, and exposed to strong light from a high voltage mercury lamp for 1h and further weak UV-light from a 15 watt sterilizing mercury lamp overnight at 10 cm distance. After removing cover glass, the preparations were heated for 1h at 55°C in 0.5 x SSC and stained for 6 min with 3% Giemsa in 1/15M Sørensen's phosphate buffer (pH 6.8). Finally, the preparations were rinsed, air dried, and mounted with Eukitt.

By the improved FPG method described above, a sufficiently good differentiation between sister chromatids was obtained by growing the roots in the presence of BrdU alone. SCE frequency was proportional to chromosome length: 2.4 per M chromosome and 1.0 per S chromosome, giving a mean number of 11.0 per cell. The addition of FdU to the BrdU solution resulted in a strong increase in the frequencies of SCEs: 5.0 per M chromosome and 1.9 per S chromosome. SCEs were found to occur more frequently in the euchromatic regions than in the heterochromatic ones, including the centromere and telomeric regions. Finally, the occurrence of SCEs involving less than the width of a chromatid is discussed.

*木更津市立木更津第一小学校

諸 言

姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange; SCE) とは、複製によって同一の染色体から生じた相同な染色分体 (姉妹染色分体) が、その相同な一部分を相互に交換する現象である。この現象は、オートラジオグラフ法によるソラマメ *Vicia faba* の染色体の研究から、Taylor (1958) によってはじめて報告された。オートラジオグラフ法では、三重水素 (H^3) で標識されたヌクレオシド (H^3 -チミジン) をソラマメの根端細胞に短時間取りこませて染色体 DNA を標識してから 2 回目の体細胞分裂において、中期染色体を構成する 2 本の染色分体のうち、1 本は放射能で標識され、他の 1 本は標識されないことから姉妹染色分体が区別される。この標識された染色分体と非標識染色分体との間で相同な一部分が入れ換っていたのである。この現象についての広範な研究結果から、Taylor (1958, 1959) は、(1)各染色分体は 1 本の DNA 二重鎖から構成されていること、(2) SCEs は自然に、染色分体を単位として、各細胞分裂で同じ頻度で起こること、(3) SCEs は二重鎖の交換であること、(4)染色分体のサブユニットの結合は同一極性をもつものの間に限られることなど、いくつかの重要な結論に到達した。これらの結論は真核生物染色体の基本構造を理解するうえで重要な意義をもっているので、多くの細胞遺伝学者の注目をひき、その信憑性について長年にわたる論争をひき起こした。その後、オートラジオグラフ法を用いて、多数の SCEs 研究がなされた。その結果、他の多くの生物種においても SCEs が出現することがわかった。しかしながら、染色体 DNA の標識に使われる H^3 自体が SCEs を誘発させるので、SCEs が自然発生するのか、あるいは H^3 からの放射能により誘発されたものかが問題となった。ほとんどの研究者たちは、SCEs のすべてではないが、その大部分は H^3 からの放射能により誘発されたと考えた (Gibson and Prescott, 1972 参照)。現在でも、この問題は完全に解明されているわけではない。

SCEs 研究におけるオートラジオグラフ法の最大の欠点は使用する物質 (H^3) 自体に SCEs 誘発能力のあることであるが、その他にも SCEs の生じた境界部位が不鮮明なために解像力が低いこと、特別な施設を必要とし、手順が複雑で、時間と費用のかかることなどの欠点がある。それゆえ、簡便で、より解像力の高い方法の開発が望まれていた。最近、オートラジオグラフ法に代って、姉妹染色分体を染め分けるきわめて簡便で解像力のすぐれた方法が開発され、SCEs の研究は新しい段階にはいり、飛躍的に発展しつつある。その方法は BrdU 標識法である。

BrdU 標識法の原理は、染色体 DNA の鎖の中のチミン塩基を 5-ブロモウラシル (5-bromouracil) に置換することである。細胞を 5-ブロモデオキシウリジン (5-bromodeoxyuridine, BrdU) を含む培養液中で 2 細胞周期の間培養すると、中期染色体を構成する 2 本の染色分体のうちの 1 本は DNA の 1 本鎖のチミンがブロモウラシルに置換される (これを TB 染色分体とよぶ) のに対し、もう 1 本は DNA の 2 本鎖のチミンがブロモウラシルに置換される (これを BB 染色分体とよぶ)。この染色体を蛍光色素や FPG 法によるギムザ液で染色することにより、蛍光の強弱あるいは染色の濃淡の差として 2 本の染色分体を区別できる。最初にこの方法により姉妹染色分体を区別したのは Huang (1967) である。続いて、Zakharov and Egorina (1972) はチャイニーズハムスターの細胞に 2 細胞周期 BrdU を取り込ませ、BB 染色分体は TB 染色分体よりも長くなり、ギムザ染色により染め分けられることを観察した。塩基類似物質の取り込み量の差による姉妹染色分体の分染は Ikushima and Wolff (1974) により追試され、BrdU のほかにヨードデオキシウリジン (5-iododeoxyuridine) によっても同様の結果が得られている。

BrdU 標識法を確立したのは Latt (1973) である。彼は BrdU 置換染色体を蛍光色素ヘキスト 33258 で染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、TB 染色分体は BB 染色分体よりも明るく染色されることを報告した。同様の結果は acridine orange, DAPI(4-6-diamidino-2-phenylindole) などの蛍光色素によっても得られる (Kato, 1977; Latt, 1978 参照)。ヘキストの場合、蛍光顕微鏡下での退色が速いものに対して、acridine orange や DAPI では遅く、鮮明な染め分けがより長く維持される点で優れている。しかしながら、蛍光色素染色では分染された永久標本を作成できないこと、さらに染色分体の末端附近の SCEs がフレアーのために不鮮明であることなどの欠点がある。これらの欠点は蛍光ギムザ (FPG) 法の発達によって克服された。

Perry and Wolff (1974) はヘキストで染色した標本を蛍光に曝したのち、60°C の蒸留水あるいは 2×SSC で 2 時間処理し、ギムザ染色することによって姉妹染色分体を鮮明に染め分けることに成功した。この方法を FPG 法という。彼らは蛍光顕微鏡下で弱い蛍光を発する BB 染色分体がギムザで淡染され、強い蛍光を発する TB 染色分体が濃染されることを確認し、SCEs の頻度は両者でまったく等しいことを見出した。続いて Wolff and Perry (1974) はヘキスト染色した標本を蛍光の代わりに日光で 24 時間露光することで同様の結果を得ている。ヘキストの代わりにメタクロマジー性色素であるチオニンやトルイジンブルーでも同じ結果が得られる (Goto *et al*, 1975)。FPG 法の変法が多くの研究者たちにより行なわれているが、その他にヘキスト染色を省略し、87°C の 1M NaH₂PO₄ (pH8.0) で 10 分間、あるいは 89~91°C の 1M リン酸緩衝液 (pH8.1) で 1 時間処理する方法も開発されている (高山, 1979 参照)。また、バンド法に用いられるトリプシンや尿素処理によっても姉妹染色分体の分染は可能である (Pathak *et al*, 1975)。

染色分体の分染はふつう 2 細胞周期 BrdU を取り込ませたとき生じる TB と BB の染色分体の間で行なわれるが、1 細胞周期 BrdU を取り込ませ、つぎの周期は BrdU 無処理によって生じる TB と TT 染色分体の間でも可能である (Kato, 1974; Korenberg and Freedlender, 1974)。

上記の方法はすべて BB 染色分体が淡染される方法であるが、Takayama and Sakanishi (1977) は 55°C の 20% 過塩素酸処理、あるいは 5 N の塩酸処理によって逆の染め分け、すなわち BB 染色分体が濃染し、TB 染色分体が淡染することを報告している。逆の染め分けは塩基性フクシン染色によっても得られる (Scheres *et al*, 1977)。

FPG 法による植物染色体の SCEs 研究は Kihlman and Kronborg (1975) のソラマメ根端細胞での報告が最初である。その後、タマネギ (Schvartzman and Cortés, 1977)、ライムギ (Friebe, 1978)、オオムギ (Schubert *et al*, 1980) などの根端細胞で観察されている。これらの研究はいずれも *in vivo* の実験であり、SCEs の自然発生の有無を検討するうえで植物は有利な材料である。しかしながら、これらの研究における 1 つの欠点は染色体 DNA 中に BrdU を取り込ませるために 5-fluorodeoxyuridine (FdU) を使用していることである。FdU はチミジル酸合成酵素の活性を阻害し、細胞内のデオキシチミジル酸を欠乏させるために、DNA 鎖への BrdU の取り込みが促進されるが (A.Kornberg, 1974 参照)、一方で植物染色体の構造異常を誘発することも知られている (Kihlman, 1971 参照)。したがって、FdU は SCEs を誘発する可能性があるため、植物材料において FdU を使用しないで姉妹染色分体を分染する方法を開発する必要がある。

著者らは、Kurata and Omura (1978) の開発した引火乾燥法 (flame-dry 法) による植物染色体標本作成法を導入することにより BrdU 単独投与で姉妹染色分体の分染に成功したので、その方法について報告する。この方法を用いることにより、FdU は SCEs の頻度を高める

ことが明らかとなった。

材料と方法

材料には、ソラマメ *Vicia faba* ($2n=12$) およびタマネギ *Allium cepa* ($2n=16$) の根端分裂組織の細胞を用いた。これらの材料は染色体が比較的大きく、数が少いので観察に有利である。ソラマメでは側根を使用した。

2~3cm に伸びた根を BrdU 水溶液 (15, 30, および $60\mu\text{g/ml}$ の各濃度) あるいは BrdU ($30\mu\text{g/ml}$) に FdU ($0.025\mu\text{g/ml}$) とウリジン (Urd, $1.221\mu\text{g/ml}$) を加えた混合液中で、ソラマメは 20°C で43時間、タマネギは 25°C で34時間のそれぞれ2細胞周期培養した。試薬液は22時間後 (ソラマメ)、17時間後 (タマネギ) に新しいものにとり替えた。培養中は空気ポンプにより溶液中に空気を送り、光があたらないように培養器はアルミホイルで覆った。

BrdU を取り込ませた根は0.1%コルヒチンに室温、3時間浸漬して中期細胞を集めたのち、酢酸アルコール (1:3) 中で固定した。固定した根端をマッキルベイン緩衝液 (pH4.5) に溶かした4%セルラーゼ・オノズカ R-10と4%ペクチナーゼ (シグマ社) の混合酵素液中で、 $35\sim 37^\circ\text{C}$ 、1時間処理により解離した。次に、解離した根端を軽く水洗したのち、1本をスライドガラス上に置き、有柄針で細かく砕いた。砕いた根端片の上に2, 3滴の新鮮な酢酸アルコールを落とし、ただちにアルコールランプの炎にかざして燃やした。これにより染色体はあまりちらばることなく一層に拡がりスライドガラスに附着した。以上のような染色体標本作成法を引火乾燥 (フレームドライ) 法とよぶ。この染色体標本を $0.5\times\text{SSC}$ ($0.075\text{M NaCl}+0.0075\text{M Na}_3\text{-citrate}$) に溶解したヘキスト 33258 ($5\mu\text{g/ml}$) で25分間染色した。染色後、標本を $0.5\times\text{SSC}$ ですすぎ、同じ液を試料上に滴下してからカバーガラスをかけ、その周囲をマニキュアで封じた。この標本を水銀灯照明装置 (オリンパス社) からの波長 $320\sim 470\text{nm}$ の光で約 10cm の距離から1時間照射し、さらに殺菌灯 (15W) で1晩照射した。その後、カミソリ刃でカバーガラスをはずし、標本を 55°C の $0.5\times\text{SSC}$ 中で1時間処理した。処理した標本は $1/15\text{M}$ ゼーレンゼンのリン酸緩衝液 (pH6.8) ですすぎ、同じ緩衝液で稀釈した3%ギムザ液 (メルク) で6分間染色した。続いて、蒸留水ですすぎ、空気乾燥したのち、ユーキットで封じ永久標本とした。

結果と考察

I. 姉妹染色分体分染法の改良

Perry and Wolff (1974) により、動物染色体の姉妹染色分体を簡便でしかも明瞭に染め分けることができ、さらに永久標本として保存できる方法として確立された FPG 法を、はじめて植物染色体に適用したのは Kihlman and Kronborg (1975) である。彼らは、ソラマメの染色体を BrdU で標識し、FPG 法により分染に成功した。その際、彼らは植物細胞への BrdU の取り込み量はきわめて少いので、チミジル酸合成酵素阻害剤である FdU を同時添加してチミジル酸の合成を抑制し、その代りに BrdU を十分に取り込ませることが、鮮明な分染を得るために必要であると述べている。その後に発表された植物染色体における SCEs 研究はすべてこの方法を用いている (Kihlman, 1975; Schwartzman and Cortés, 1977; Schwartzman *et al.*, 1978; Kihlman *et al.*, 1978; Kihlman and Sturelid, 1978; Schwartzman *et al.*, 1979; Schubert *et al.*, 1979; Schubert *et al.*, 1980)。しかしながら、FdU は染色体異常を誘発することが知られているので (Kihlman, 1971)、SCEs を誘発すると考えられる。したがって、SCEs が生細胞内で自然発生するかどうかを検討するには FdU の影響を調べておく必要がある。動

物染色体における SCEs 研究では、多くの場合、BrdU 単独投与で標識が行なわれているが、FdU を同時添加しているものもある (Kato, 1977)。しかし、これらの研究は培養細胞で行なわれたものであり、しかも FdU が SCEs 誘発にどの程度関与しているかは十分に検討されていない。

本研究では、まず Kihlman and Kronborg (1975) の方法を追試したが、押しつぶし法では鮮明な分染が得られなかった。BrdU に FdU を添加した場合にはやや不鮮明ながら分染は得られたが、BrdU 単独投与ではまったく分染は得られなかった。押しつぶし法で比較的良好な分染がみられたのは細胞質から完全に飛び出した染色体においてであり、細胞質の中に残っている染色体には分染がみられなかった。このことは細胞質の存在が分染の妨げとなっていることを示唆している。

1978年、Kurata and Omura は細胞質がほぼ完全に取り除かれた状態で、しかも重ならず染色体組をスライドガラス上に拡げることができるフレームドライ法を開発した。この方法と FPG 法を組合せることにより、細胞質が取り除かれ、ほとんど重ならず分散し、鮮明に分染された染色体組が多数得られた (Figs. 1 and 2)。この結果は、BrdU 単独投与、FdU 同時添加のいずれの場合も同じであった。フレームドライはスライドガラスに染色体を強く接着させるので、その後の種々の処理過程での染色体の剥離はほとんどみとめられなかった。染色体のよく拡がった良好な標本をつくるには、スライドガラス上で解離した根端を有柄針で砕くとき乾燥させないこと、および表皮をピンセットで取り除いておくことが大切である。

蛍光色素ヘキスト 33258 の濃度は Kihlman and Kronborg (1975) の用いた $0.5\mu\text{g/ml}$ より高めることによりコントラストの良い分染が得られた。しかしながら、すべての標本で鮮明な分染を得るためには、BrdU の濃度によってヘキストの濃度を増減させる必要があった。本研究においては、BrdU 濃度が $15\sim 30\mu\text{g/ml}$ と $60\mu\text{g/ml}$ とでは、ヘキスト濃度は前者で $2.5\mu\text{g/ml}$ 、後者では $5\mu\text{g/ml}$ で鮮明な分染が得られた。

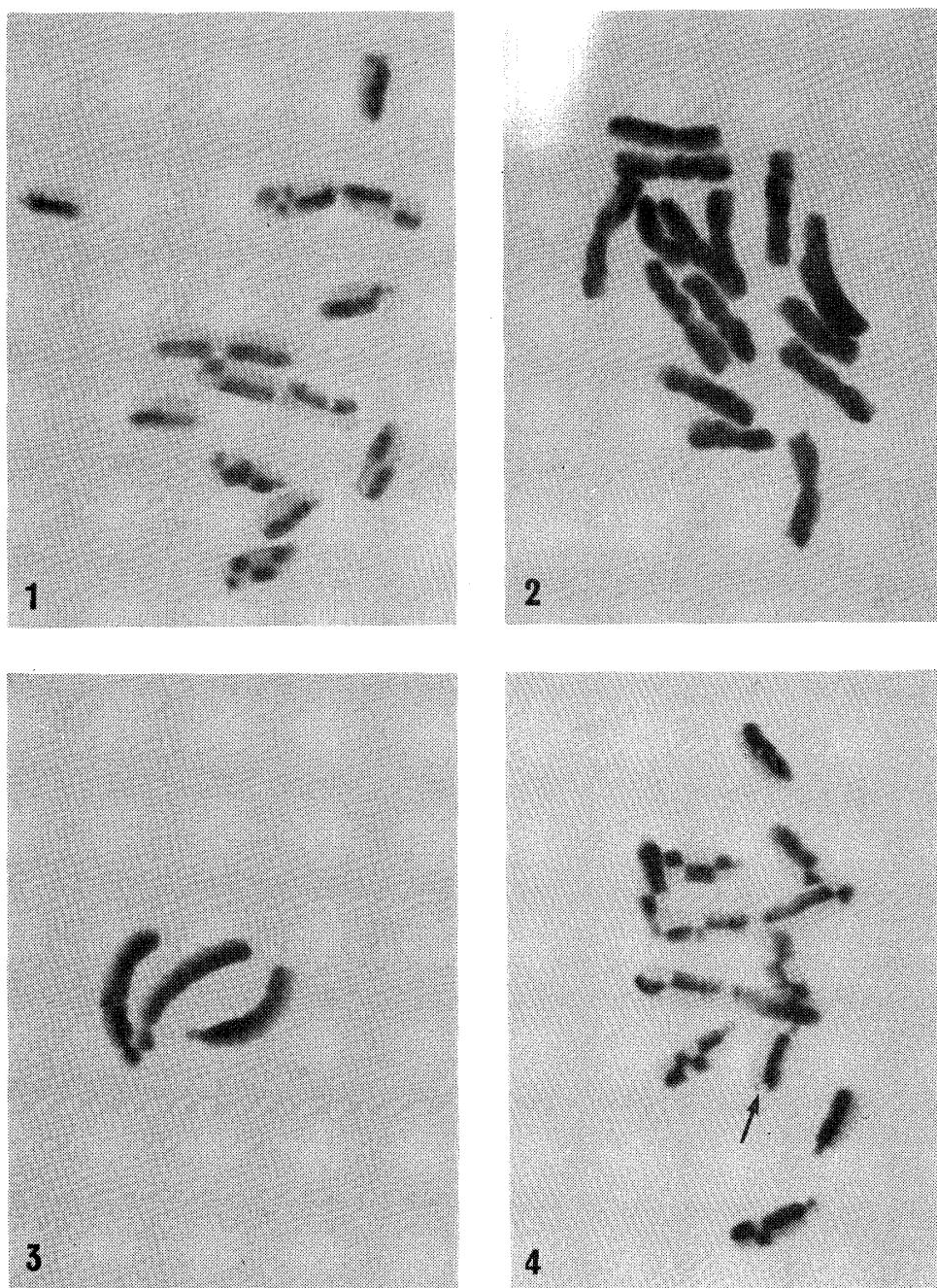
光照射条件としては、水銀灯からの強い光で 1 時間照射したのち、さらに殺菌灯による近距離からの 1 晩照射で良い結果が得られた。水銀灯のみ、あるいは殺菌灯のみの照射では時間を変えても良い結果は得られなかった。長時間照射の場合には、カバーガラスの周囲をマニキュアで封じることで乾燥を防ぐことができるうえ、温室を必要としないため近距離からの照射が可能となった。SSC 処理法についてはとくに改良する必要はなかった。

以上の改良 FPG 法により、ソラマメ (Fig. 1)、タマネギ (Fig. 2) とともに染色体が重ならず拡がり、鮮明に姉妹染色分体分染された像を多数得ることができた。最近、押しつぶし法と FPG 法により、BrdU 単独投与したタマネギの染色体で姉妹染色分体分染に成功した例が報告されている (González-Gil and Navarrete, 1982)。このことは、染色体が細胞質の無い状態でよく拡がっていれば BrdU 単独投与でも植物染色体での良好な姉妹染色分体分染が可能であることを示している。しかし、押しつぶし法では、染色体が飛散しやすく、染色体組のそろった像が少い欠点があり、定量的研究にはフレームドライ法の方が効率的に優れている。

BrdU を多く含む BB 染色分体は、染色体の短縮に際し、TB 染色分体より染色糸のラセン化がゆるやかになるため両染色分体の長さが異なってくる。そのため、短縮の著しい TB 染色分体は内側に、BB 染色分体は外側に配列して彎曲する (高山, 1979)。本研究においても、淡染の染色分体は外側に、濃染の染色分体は内側にあって彎曲している (Fig. 3)。したがって、本研究で用いた改良 FPG 法による分染は BB 淡染型であると考えられる。

以上のように、ソラマメ、タマネギのいずれにおいても姉妹染色分体分染が得られたが、タマネギはソラマメより染色体数が多く、各染色体対に特徴がなく区別が困難である。それゆえ、

以下の問題についての実験はソラマメを用いて行なった。



Figs. 1-4. Metaphase chromosomes of *Vicia faba* (1, 3, 4) and *Allium cepa* (2) stained by the improved FPG technique after incubating in BrdU alone for two rounds of replication. *Vicia* chromosomes in Fig. 3 demonstrate that lightly stained BB chromatids are longer than deeply stained TB chromatids due to different condensation between both chromatids. M chromosomes of *Vicia* in Figs. 1 and 4 have three C-bands (H-segments), one in the long arm adjacent to the centromere and two in the short arm. Arrow in Fig. 4 points to sister subchromatid exchanged segment.

II. SCEs 頻度に及ぼす BrdU および FdU の効果

Table 1 は、SCEs の出現頻度に及ぼす BrdU 濃度および FdU の影響についてまとめたものである。ソラマメの染色体組は、最長で大きな附随体と二次狭窄（仁形成部）をもつ次中部

動原体型染色体 (M染色体) の1対とM染色体の約半分の長さの次端部動原体型染色体 (S染色体) の5対からなる。5対のS染色体はほぼ同形・同大で通常の染色法では区別が困難である。それゆえ、MとS染色体に大別して、それぞれの染色体当りの SCEs 頻度を調べた。MとS染色体当りの長さの比は1:0.44である (Michaelis and Rieger, 1959)。Table 1 (a, b, e) において、MとS染色体間の染色体当りの SCEs の比(ほぼ1:0.4)は染色体長の比にほぼ一致している。このことは、SCEs の出現頻度が染色体の長さにはほぼ比例していることを示している。同様の結果は動物染色体においても報告されている (Kato, 1977参照)。

Table 1 The effect of 5- bromodeoxyuridine(BrdU) and 5- fluorodeoxyuridine(FdU) on sister chromatid exchanges(SCEs) in root tips of *Vicia faba*

Treatment No.	Concentration of BrdU ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Pre-treatment	Post-treatment	SCEs per Chromosome	
		22 h	21 h	M	S
a	15.0	BrdU	BrdU	2.5	0.9
b	30.0	BrdU	BrdU	2.4	1.0
c	30.7	BrdU+FdU	dThd*	3.1	1.4 (1)
d	30.0	BrdU+FdU	BrdU+FdU	5.0	1.9
e	60.0	BrdU	BrdU	4.0	1.7

*dThd = thymidine,

(1) Kihlman and Kronborg(1975)

SCEs 頻度は BrdU が一定の濃度を越えると急激に増加した (Figs.1 and 4)。BrdU の濃度が15および30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では染色体当りの SCEs 頻度は変わらないが、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では約2倍に増加した (Table 1 a, b, e)。このことは BrdU 自体が SCEs 誘発の原因になっていることを示唆している。すでに、動物染色体においては BrdU の処理濃度の増加に伴って SCEs 頻度が増加することは知られている。Kato (1974) は2細胞周期 BrdU で標識したチャイニーズハムスター細胞で、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の BrdU では処理濃度の増加に伴い SCEs 頻度は増加するが、0.1~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度域では一定であると報告している。同様に、ヒトの培養リンパ球において、低濃度の頻度はほぼ一定である (Latt, 1974)。Kato (1977) は女性胎児由来の細胞を0.05~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の BrdU で処理した結果、0.1~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では SCEs 頻度はまったく変わらないが、0.05~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲でわずかな低下を認めた。しかし、その低下は有意ではなく、用いた BrdU の全濃度域において SCEs は一定であると彼は考えている。このように、BrdU 低濃度域で SCEs 頻度が一定となることは、BrdU の誘発効果から独立して SCEs が生じることを示唆し、SCEs が自然発生することをうかがわせる。しかし、Wolff and Perry (1974) は CHO 細胞を用いて、0.25 μM (0.077 $\mu\text{g}/\text{ml}$) から1 μM (0.307 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の BrdU 濃度域で SCEs 頻度は急激に増加し、それ以上の濃度ではゆるやかに増加することを観察し、BrdU 標識法で認められる SCEs は、すべて BrdU によって誘発された可能性のあることを述べている。これらの相反する結果については十分な説明がなされていないが、培養細胞を用いる実験では培養基、細菌汚染などの条件により結果が左右され易いので、より正確な解析を行なうためには生体内 (*in vivo*) での実験が望ましい。Tice *et al* (1976) はラットに BrdU を静脈から継続注入し、骨髄細胞における BrdU と SCEs の関係を求めた。最低濃度の1.9 $\mu\text{g}/\text{g wt/h}$ から7 $\mu\text{g}/\text{g wt/h}$ の濃度範囲で SCEs 頻度は一定となり、それ以上の濃度では上昇する。同様の結果は、マウスの精原細胞および骨髄細胞で得られている (Kanda and Kato, 1979 a, b)。これらの知見は、BrdU の低濃度域で SCEs 頻度が一定となる点で自然発生 SCEs の存在を示唆するものである。しかし、

BrdU の投与量と SCEs 頻度との正確な関係を求めにくいいため、自然発生 SCEs がどのくらいの頻度で生じているかは不明である。植物の根は、動物の組織にくらべて、BrdU 処理が容易で、その投与量と SCEs 頻度との関係が正確に把握できるので、生体内実験に有利な材料である。本研究においては、3段階の BrdU 濃度を用いたにすぎないので、自然発生 SCEs がどのくらい生じているかについては今後の詳細な研究を待たねばならない。

FdU を加えた場合、BrdU 単独投与の場合と比較して SCEs 頻度が増加した。Table 1(b, d) にみられるように、BrdU 濃度が $30.0\mu\text{g/ml}$ のとき、単独投与での SCEs 頻度はM染色体当り2.4、S染色体当り1.0であるが、FdU を加えたときの SCEs 頻度は、M染色体当り5.0、S染色体当り1.9であり、ほぼ2倍に増加している。Table 1(c) は Kihlman and Kronborg (1975) が BrdU($30.7\mu\text{g/ml}$) を FdU とともに1細胞周期取り込ませ、続く2回目の細胞周期では正常なチミジンを与えたときの SCEs 頻度(M染色体当り3.1、S染色体当り1.4)であるが、ほぼ等濃度($30.0\mu\text{g/ml}$) の BrdU を2細胞周期取り込ませた本実験の結果 (Table 1b) より明らかに高い。BrdU を1細胞周期より2細胞周期取り込ませたほうが、SCEs 頻度は高くなることが知られている (Wolff and Perry, 1974; Schwartzman and Cortés, 1977)。したがって、以上の結果は、FdU が SCEs を増加させていることを示していると考えられる。

III. 染色体上の SCEs の分布

ソラマメの染色体はC分染法によって異質染色質(H)部がしま模様の濃染部(C分染部)としてみとめられる (Takehisa and Utsumi, 1973)。本研究においても、改良 FPG 法により、SCEs とともにM染色体に明瞭なC分染が認められた (Figs. 1, 4)。それゆえ、M染色体上の SCEs の分布とH部との関係を調べた。その結果を Fig. 5に示した。観察した染色体数は106本である。一次および二次狭窄(仁形成)部を含めたC分染部位の SCEs 頻度は $18/106$ (17%) で、真正染色質(E)部の $88/106$ (83%) より非常に低い。すなわち、H部よりE部において SCEs が多く生ずることが明らかになった。M染色体腕を6つの部位に区分して、それぞれの部位における SCEs の頻度分布をみると、部位5でもっとも多く、以下4, 1, 6, 2, 3の順で次第に少なくなっている。また、動原体部位(C)、仁形成部(N)はさらに低い頻度で SCEs が生じている。部位3は2つのC分染(H)部があるにもかかわらず SCEs 頻度は低い。部位4は1本のC分染(H)部があり、部位3より SCEs 頻度は高いが、H部の無い部位5より低い。このことは、SCEs がHとE部の境界域で優先的に生ずるものではないことを示している。以上の結果から、SCEs は染色体上でH部とは関係なく、非任意的にE部に多く生ずることが明らかとなった。

動物染色体における SCEs は、H部で頻度が高いという報告と (Natarajan and Klásterská, 1975)、HとE部の境界に高頻度に生ずるといふものもある (Carrano and Wolff, 1975)。しかし、H部よりE部において SCEs 頻度が高いという報告が多い (Galloway and Evans, 1975; Hsu and Pathak, 1976)。タマネギの染色体でも、C分染部や後期複製DNAを有する部分では SCEs は少ないという (Schvartzman and Cortés, 1977)。本研究の結果はこれらの報告を支持している。

SCEs の頻度は一般的には染色体の長さに比例するが、上述のように染色体内あるいは染色体間でばらつきがみられる。これまでの結果はなかば矛盾しているが、異質染色質部やその他の特定部位での SCEs の起こりやすさは、種差あるいはこれらの部位に含まれるDNAの組成や塩基配列のちがいを反映しているのかもしれない。HとE部の結合部位での SCEs の多発要因とともに、染色体間および染色体内の不均等 SCEs 分布の要因の解明は今後の問題である。

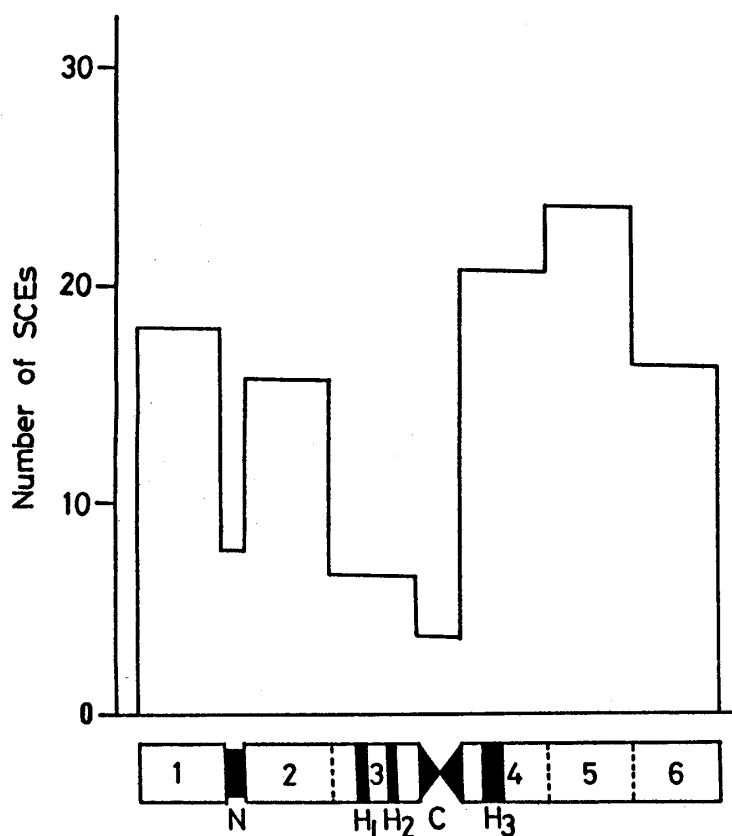


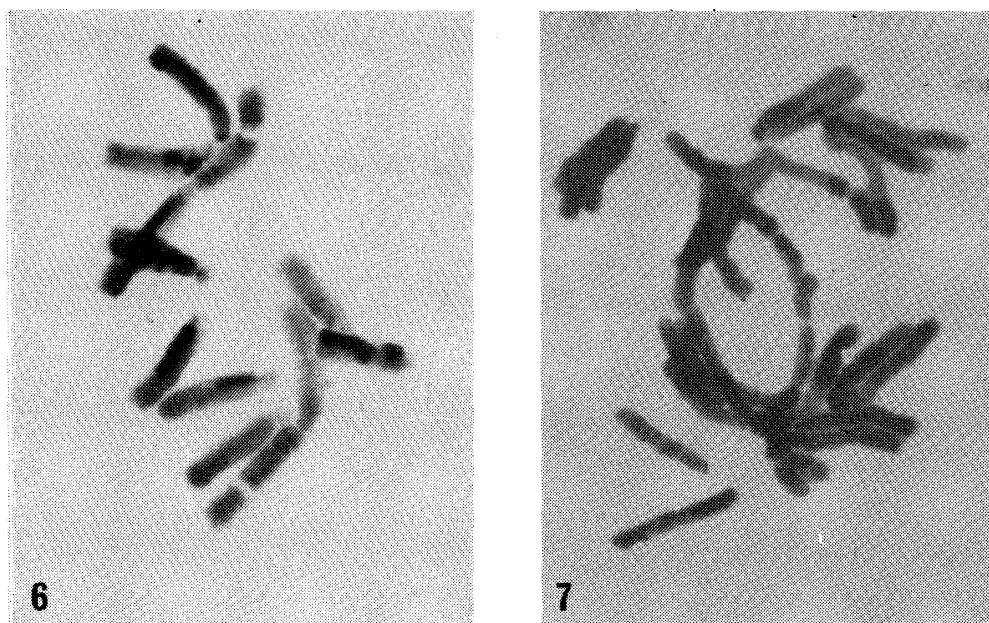
Fig. 5. Distribution pattern of SCEs over the 8 segments of M chromosome in *Vicia faba* after incorporation of BrdU (30.0 $\mu\text{g/ml}$) alone for two rounds of replication. N: nucleolar organizing region. H₁~H₃: heterochromatic regions. C: centromere.

IV. 半染色分体様交換 (sister subchromatid exchange, SsCE)

植物染色体の SCEs 研究において、染色分体の幅より小さい単位の交換が生ずることがソラマメ (Kihlman and Kronborg, 1975) やタマネギ (Schvartzman and Cortés, 1977) で報告されている。本研究においても、低い頻度ながら SsCE が観察された (Fig. 4)。これはきわめて小さい単位の交換なので顕微鏡下では点状の SCEs としてみられる。SsCE は植物染色体においてのみ観察されているもので、これまでに多数の研究が行なわれたにもかかわらず動物染色体ではまったくみとめられていない。したがって、植物染色体特有の現象であると考えられる。しかし、動物染色体に SsCE がみられないのは染色体当りの DNA 含量が少ないからであり (Schvartzman and Cortés, 1977)、植物染色体の SsCE は染色体の同じコイル内できわめて近接して生じた SCEs であると考えられている (Kihlman, 1975; Schvartzman *et al.*, 1978)。

真核生物の染色体を構成している染色糸の数については、(1)単糸説と(2)複糸説とがある (Wolff, 1969; Prescott, 1970)。多くの細胞学者達は単糸説を支持している。しかし、植物染色体では、複糸構造を観察している報告は多数みられる。Trosko and Wolff (1965)、Wolfe and Martin (1968) はホルマリン固定したソラマメの染色体を抽出し、トリプシン処理することにより、染色分体が 2 本の染色糸から構成されていることを示した。Martin (1968) はソラマメとタマネギで同様の結果を得ている。さらに、Bajer (1965) はアフリカ産赤ユリ *Haemanthus* の生きた胚乳細胞で半染色分体の存在を認めている。したがって、植物染色体に生じる SsCE は、複糸構造を示す 1 つの証拠と解釈することも可能である。一方、動物染色体で SsCE がみら

れないのは、動物染色体が単糸構造であることを示唆しているのかもしれない。最近の多数の研究が、動物、とくに哺乳動物の染色体は単糸構造であることを報告している (Bak *et al*, 1977; Adolph, 1980)。しかし、植物染色体が単糸構造であると考えられる報告もあるし (Taylor, 1958, 1959), 動物染色体が複糸構造であるという結果も出されている (Stubblefield, 1973)。したがって、SsCE が複糸構造を示すものであるかどうかについての結論は今後の研究を待たねばならない。



Figs. 6 and 7. Metaphase (6) and anaphase (7) cells of *Vicia faba* stained by the similar method to one in Figs. 1-4. Approximately half chromosomes in Fig. 6 represent isostaining patterns. Cell in Fig. 7 demonstrates that segregation of chromatids is random.

V. 同位標識 (isolabeling or isostaining) 染色体

H^3 -チミジンで短時間処理したユリ科の一種 *Bellevaria* の染色体をオートラジオグラフ法で調べていた Taylor (1958) は、処理後 2 回目の分裂期 (M_2) で、両方の染色分体が同時に標識されることをはじめて報告した。のちに Peacock (1963) によってこの現象は isolabeling とよばれ、染色体の構造および SCEs の形成機構にさまざまな問題をなげかけてきた。isolabeling は BrdU 標識法による観察では isostaining とよばれる (Schubert *et al*, 1979)。本研究においても、ソラマメで多数の isostaining がみられた (Fig. 6)。isostaining は標識中の 1 回目もしくは 2 回目の DNA 複製中での BrdU の取り込み量が染色体の一部で少ないためか (Brøgger, 1975), あるいは 1 回目の複製の途中から BrdU を取り込んだため (Schubert *et al*, 1979) と解釈されている。本研究では、43 時間取り込ませたが、ソラマメの細胞周期は 16~17 時間 (Kihlman *et al*, 1978) という測定結果も報告されているので、おそらく BrdU を 3 細胞周期取り込んだ細胞に isostaining がみられたと考えられる。この解釈は isostaining の大部分が淡染型であることから支持される。Kato (1974) はアルキル化剤のエチルメタンサルフォネイトで処理したチャイニーズハムスターの染色体において、 H^3 -オートラジオグラフ法では isolabeling が増加するが、BrdU 標識法ではみとめられないことから、isolabeling はオートラジオグラフ法の解析力を越えた多数の SCEs の形成によるものと解釈している。このことは H^3 -BrdU により標識された染色体のオートラジオグラムとギムザ染色像との比較により実証さ

れた (Wolff and Perry, 1974)。Peacock (1963) によれば, isolabeling は染色体の複糸構造を仮定すると解釈できるという。動物染色体では複糸説は否定されているが, SsCE の現象ともあわせて植物染色体では今後も追求すべき問題であるとおもわれる。

改良 FPG 法は, 中期染色体のみならず, 前期および後期の染色体も良好に分染した (Fig. 7)。後期染色体の分染は, 細胞分裂における染色体の分離機構の研究に非常に有効な方法を提供した (内海・西村, 1982)。今後の発展が期待される分野である。

謝辞 本研究に際し, 紫外線照射のための超高压水銀灯照明装置を使用させて下さった千葉大学教育学部, 鈴木健二教授に感謝の意を表します。

References

- Adolph, K.W.(1980). *Chromosoma* 76, 23.
 Bajer, A.(1965). *Chromosoma* 17, 291.
 Bak, A.L., Zeuthen, J., and Crick, F.H.C.(1977). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75, 1595.
 Brøgger, A.(1975). *Hereditas* 79, 311.
 Carrano, A.V., and Wolff, S.(1975). *Chromosoma* 53, 361.
 Friebe, B.(1978). *Microscopic Acta* 81, 159.
 Galloway, S.M., and Evans, H.J.(1975). *Cytogenet. Cell Genet.* 15, 17.
 Gibson, D.A., and Prescott, D.M.(1972). *Exp. Cell Res.* 74, 397.
 González-Gil, G., and Navarrete, M.H.(1982). *Chromosoma* 86, 375.
 Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H., and Sugiyama, T.(1975). *Chromosoma* 53, 223.
 Hsu, T.C., and Pathak, S.(1976). *Chromosoma* 58, 269.
 Huang, C.C.(1967). *Chromosoma* 23, 162.
 Ikushima, T., and Wolff, S.(1974). *Exp. Cell Res.* 87, 15.
 Kanda, N., and Kato, H.(1979a). *Exp. Cell Res.* 118, 431.
 Kanda, N., and Kato, H.(1979b). *Chromosoma* 74, 299.
 Kato, H.(1974a). *Nature* 251, 70.
 Kato, H.(1974b). *Exp. Cell Res.* 89, 416.
 Kato, H.(1977). *Int. Rev. Cytol.* 37, 55.
 Kihlman, B.A.(1971). *Advanc. Cell Molec. Biol.* 1, 59.
 Kihlman, B.A., and Kronborg, D.(1975). *Chromosoma* 51, 1.
 Kihlman, B.A., Natarajan, A.T., and Andersson, H.C.(1978). *Mutat. Res.* 52, 181.
 Kihlman, B.A., and Sturelid, S.(1978). *Hereditas* 88, 35.
 Korenberg, J.R., and Freedlender, E.F.(1974). *Chromosoma* 48, 355.
 Kornberg, A.(1974). "DNA Synthesis", W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1974.
 Kurata, N., and Omura, T.(1978). *Jap. J. Genet.* 53, 251.
 Latt, S.A.(1973). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 70, 3395.
 Latt, S.A.(1974). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 71, 3162.
 Latt, S.A.(1978). *Genetics, suppl.* 92, 83.
 Martin, P.(1968). In "Replication and Recombination of Genetic Materials" (W.J. Peacock and R.D.Brock, eds.) pp.93-104. Australian Academy of Science,

Canberra.

- Michaelis, A., and Rieger, R.(1959). *Züchter* 29, 354.
 Natarajan, A.T., and Klásterská, I.(1975). *Hereditas* 79, 150.
 Pathak, S., Stock, A.D., and Lusby, A.(1975). *Experientia* 31, 916.
 Peacock, W.J.(1963). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 49, 793.
 Perry, P., and Wolff, S.(1974). *Nature* 251, 156.
 Prescott, D.M.(1970). *Adv. Cell Biol.* 1, 57.
 Scheres, J.M.J.C., Hustinx, Th. W.J., and Rutten, F.J.(1977). *Exp. Cell Res.* 109, 466.
 Schubert, I., Sturelid, S., Döbel, P., and Rieger, R.(1979). *Mutat. Res.* 59, 27.
 Schubert, I., Künzel, G., Bretschneider, H., and Rieger, R.(1980). *Theor. Appl. Genet.* 56, 1.
 Schwartzman, J.B., and Cortés, F.(1977). *Chromosoma* 62, 119.
 Schwartzman, J.B., Cortés, F., and Lopez-Saez, J.F.(1978). *Exp.Cell Res.* 114, 443.
 Schwartzman, J.B., Postigo, R., and Cutiérrez, C.(1979). *Chromosoma* 74, 317.
 Stubblefield, E.(1973). *Int. Rev. Cytol.* 35, 1.
 高山 奨(1979). *染色体* 11—13, 362.
 Takayama, S., and Sakanishi, S.(1977). *Chromosoma* 64, 109.
 Takehisa, S., and Ustumi, S.(1973). *Experientia* 29, 120.
 Taylor, J.H.(1958). *Genetics* 43, 515.
 Taylor, J.H.(1959). *Proc.Int.Congr.Genet.*, 10th, 1958 Vol. 1, p.63.
 Tice, R., Chaillet, J., and Schneider, E.L.(1976). *Exp. Cell Res.* 102, 426.
 Trosko, J.E., and Wolff, S.(1965). *J. Cell Biol.* 26, 125.
 内海俊策・西村安正(1982). *日本植物学会第47回大会研究発表要旨集* p.296.
 Wolff, S.(1969). *Int. Rev. Cytol.* 25, 279.
 Wolff, S., and Perry, P.(1974). *Chromosoma* 48, 341.
 Wolfe, S.L., and Martin, P.G.(1968). *Exp. Cell Res.* 50, 140.
 Zakharov, A.F., and Egolina, N.A.(1972). *Chromosoma* 38, 431.

摘 要

本論文は、植物細胞における姉妹染色分体の分染法の改良と姉妹染色分体交換 (SCEs) についての予備的研究について報告したものである。ソラマメおよびタマネギの根を5-ブロモデオキシウリジン (BrdU, 30.0 μ g/ml) 単独液あるいは BrdU, 5-フロロデオキシウリジン (FdU, 0.025 μ g/ml) およびウリジン (Urd, 1.221 μ g/ml) の混合液中で2細胞周期培養した。培養した根を0.1%コルヒチン液に3時間浸したのち、酢酸アルコールで固定した。その根をpH4.5のマッキルベイン緩衝液に溶解した4%セルラーゼ(オノズカ R-10)と4%ペクチナーゼ(シグマ)の混合酵素液で、37°C, 1時間解離した。解離した根を蒸留水で洗い、1本をスライドガラス上にとり根端のみを有柄針で砕いた。その根端片の上に新しい酢酸アルコール液を2~3滴おとし、アルコールランプの炎で燃して乾燥した(フレームドライ法)。このスライドガラスを0.5 \times SSCに溶解した蛍光色素ヘキスト33258 (5 μ g/ml) で25分間染色した。0.5 \times SSCで洗ってから、同じ液をのせ、カバーガラスの周囲をマニキュアで封じたのち、超高圧水銀灯の強い光で1時間、続いて15Wの殺菌灯で1晩10cmの距離からスライドガラスを照射した。カ

バーグラスをはがしたのち、スライドグラスは55°Cの0.5×SSC中で1時間熱した。その後、1/15Mのゼーレンゼンりん酸緩衝液(pH6.8)で稀釈した3%ギムザ液で6分間染色し、蒸留水ですすぎ、自然乾燥後ユーキットで封入し永久標本とした。

上述の改良 FPG 法により、BrdU 単独投与した根端細胞において鮮明な姉妹染色分体と SCEs が観察できた。その結果、SCEs 頻度は染色体の長さに比例して生ずること、および FdU を加えると SCEs 頻度が約 2 倍に増えることが明らかとなった。さらに、SCEs は動原体部位や 仁形成部を含めた異質染色質部位より真正染色質部位で高頻度に生ずることがわかった。最後に、植物細胞にのみ観察される半染色分体様交換 (SsCE) の出現する意味について考察した。