

低温処理した植物細胞核および 染色体のアンモニア銀反応

Ammoniacal Silver Reaction for Nuclei and Chromosomes of
Trillium kamtschaticum treated with Cold Temperature

内海 俊策

Shunsaku Utsumi

Summary

The postformalin ammoniacal silver reaction (ASR) for basic nuclear proteins was applied to the cold-treated interphase nuclei and mitotic chromosomes of *Trillium kamtschaticum* and observed with the light and electron microscope.

Cold-induced negatively heteropyknotic regions of Feulgen stained metaphase chromosomes were not stained by ASR, too. The possible role of histones in cold-induction of negatively heteropyknotic regions was discussed.

Electron microscopic analysis of the cold-treated interphase nuclei revealed certain characteristic structure which appeared closely associated, at the same time, with a number of chromatin masses. They consisted, structurally, of a distinct meshwork of convoluted 200–300 Å thick fibrils, less dense than the chromatin. The connections between these structures and the adjacent chromatin masses were apparently established by means of fibrils coming out from the chromatin masses. The morphology of these structures appears to correspond exactly to the 'micropuffs' described by Lafontaine (1965) and Esponda and Gimenez-Martin (1971). It might be deduced from this that the cold-treated chromatin mass gives rise to differentiations similar to the puffs in polytene chromosomes. The relation between cold-induced chromatin activities and cold acclimation of plants was discussed.

序 論

核内に存在する真核生物の染色体DNAは塩基性タンパク質であるヒストンと強く結合してヌクレオソーム(nucleosomes)をつくり、それがさらに凝縮してクロマチン(chromatin, 染色質)を形成している(Bradbury *et al.* 1981)。クロマチンは核内で分散しているユークロマチン(euchromatin, 真正染色質)あるいは凝縮したヘテロクロマチン(heterochromatin, 異質染色質)として存在するが、常にヘテロクロマチンとして存在する構成的ヘテロクロマチン(constitutive heterochromatin)を除けばその存在形態は不変的ではなく、可変的である。すなわち、細胞分化や核分化に伴って核の活性化あるいは不活性化がおこることに伴い、クロマチンはヘテロクロマチンからユークロマチンへの変化あるいはその逆の変化がおこる。この変化はクロマチンに結合するヒストン種が変わることによりおこり、活性化されている分散ク

ロマチンは高リジン型ヒストンに富み、不活性化されている凝縮クロマチンは高アルギニン型ヒストンに富んでいるという(Myselski 1970, 1971; Kusanagi and Yanagi 1970)。

種子植物の花粉粒には栄養核と生殖核が分化し、花粉が成熟する間に生殖核はアルギニンに富む塩基性タンパク質が蓄積することにより著るしい異常凝縮を示すとともに、次第に伸長し、三ヶ月形または棒状に変形する(草薙1977; 内海ら未発表)。この変形した生殖核では代謝活性はみられず、栄養核で合成されたアルギニンに富む塩基性タンパク質が生殖核に集積されてクロマチンの凝縮と核の変形がおこる(Fukuda-Yanagi 1975)。また, Kusanagi and Yanagi(1971)は花粉粒内にみられる核分化と同様の現象をキサントドロール(xanthidrol)処理によりニンニク *Allium sativum* の根端分裂組織細胞中に誘起させ、伸長・変形した核ではクロマチンは完全に凝縮して代謝活性がみられないことを報告している。

エンレイソウ属植物では、低温下で細胞が分裂すると中期染色体の特定部位が細くなり塩基性色素に染まらない現象がみられ、分化反応性または退色反応(differential reactivity)とよばれている(芳賀1958)。この退色反応部位はヘテロクロマチンであることが明らかにされている(Darlington and LaCour 1940; Wilson and Boothroyd 1941, 1944)。しかし、静止核についてはまったく調べられていないので、この現象がクロマチンの代謝活性と関連があるかどうかについては不明である。

本研究では、低温処理したオオバナノエンレイソウの細胞核および染色体のアンモニア銀反応(Ammoniacal Silver Reaction, ASR)について光学および電子顕微鏡により観察した。ASRは凝縮したクロマチンを染色し(Arima and Kusanagi 1977), その凝縮クロマチンは分散クロマチンより代謝活性が低いことが知られている(Frenster *et al.* 1963; Sieger *et al.* 1970)。低温処理細胞核にはASRで染色されない特異な分散クロマチン構造が見られた。

材 料 と 方 法

材料にはオオバナノエンレイソウ *Trillium kamtschaticum* の胚珠を用いた。開花直後の胚珠壁細胞には多数の分裂像がみられる。4月下旬、開花中の花を花梗から切り取り、水に浸した脱脂綿で切口を巻き、10cm幅で長さ18cmのポリ袋に入れて密閉した。密閉するとき口で空気を吹きこみ、水が入らないように入口を輪ゴムで何回も強く巻いておいた。密閉したポリ袋を発砲スチロールに入れた氷水(0℃)の中に沈めて、72時間置いた。72時間後、子房壁をピンセットではがして胚珠を露出させ、あらかじめ冷やしておいた2.5%グルタルアルデヒド(pH 7.0に0.1-Mリン酸緩衝液で調整)で4℃, 20時間固定した。固定材料は蒸留水で30分間(6回交換)洗ってから、アンモニア銀液で10分間(室温)で染色した。アンモニア銀液はVidal *et al.* (1971)の方法で作製したASC(Ammoniacal Silver carbonate)液を用いた。すなわち、10% silver nitrate水溶液75mlと5% sodium carbonate水溶液225mlとの混合液に、液が透明になるまでアンモニア液を徐々に滴下し、かすかに沈澱が残るところで止める。この液に等量300mlの蒸留水を加え、暗所(室温)に保存し、使用直前にろ過する。

染色した材料は蒸留水で30分間(6回交換)水洗後、5分間3%ホルマリン中で銀を還元し、さらに15分間水洗(3回交換)した。水洗後、材料はアルコールシリーズを通して脱水、プロピレンオキサドを経て、Epon812に包埋した。

包埋試料からポーターブラムMT-2型ミクロトームを用いてガラスナイフで作製した超薄切片をホルムバル支持膜を張った電子顕微鏡用グリッドにのせ、未染色のままかあるいは2%酢酸ウラニル水溶液(pH4.9)で1時間電子染色してから観察した。観察は日立電子顕微鏡Hu

-11 (加速電圧75kv)で行なった。

対照として、ポリ袋に密閉して常温(20℃)の水中に72時間置いた花の胚珠を上記と同じ方法で固定、染色、包埋して比較した。

光学顕微鏡観察には、電顕用に固定・染色した材料の一部を包埋せずに残し、これを蒸留水または45%酢酸中で押しつぶし標本を作製した。いずれの液で押しつぶしても染まり方に違いはみられなかった。さらに、低温処理した材料をLaCour 2BE液で20分間(室温)固定し、30分間流水で洗ってから、1 N-HClで60℃、20分間加水分解したのち、10分間水洗した。その後、無色塩基性フクシン(シフの試薬)で4℃、1晩染色し、5分間水洗後、45%酢酸中で押しつぶした。つぎに、ドライアイス上でカバーガラスをはがし、アルコールシリーズで脱水、乾燥後ユーパラルで封入し永久標本にした。

結果と考察

(1)染色体のASR

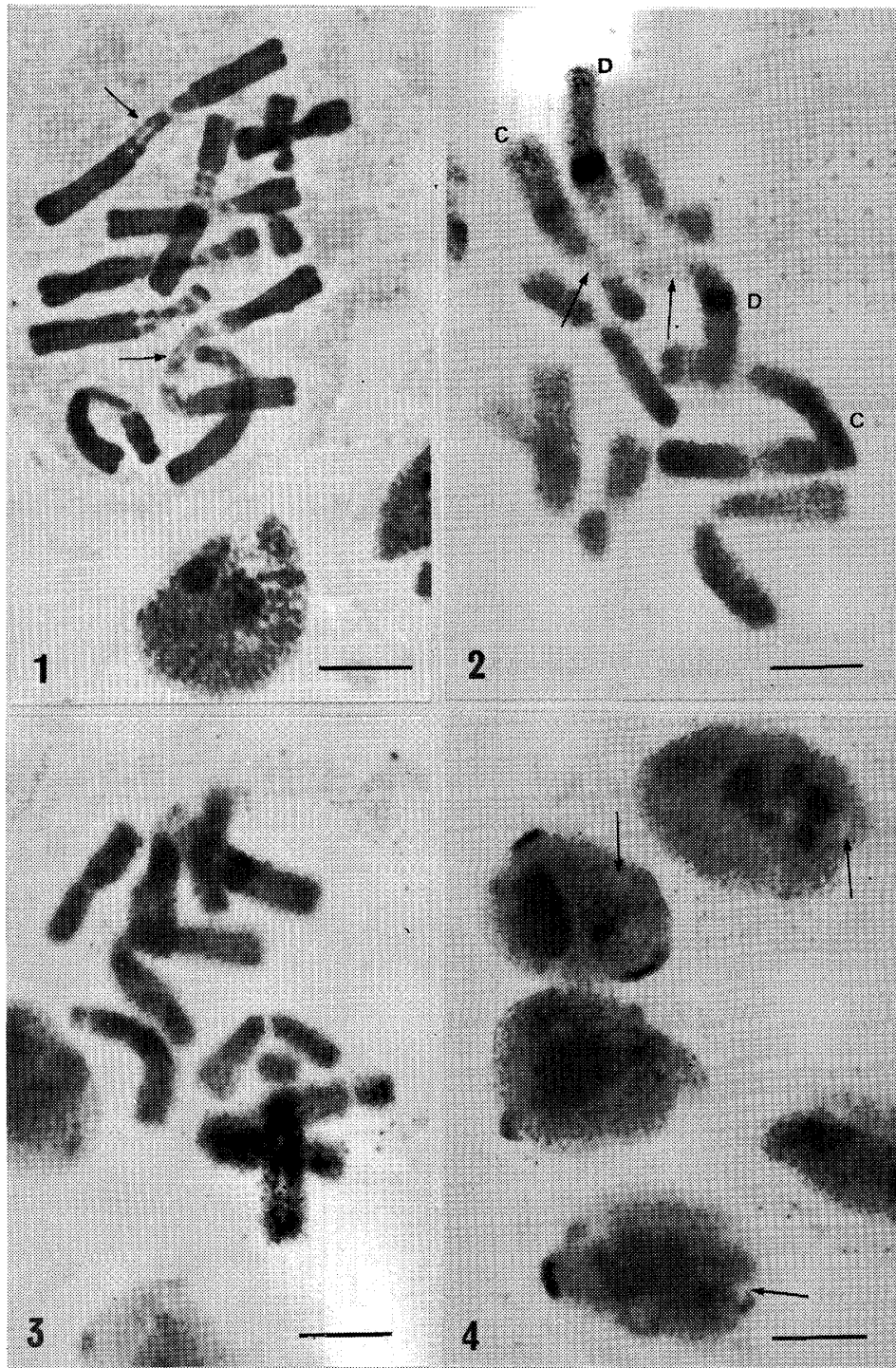
低温処理効果の有無を知るために、まず分裂中期の染色体について調べた。低温処理した中期染色体はホルゲン染色により明らかに退色反応が認められた(Fig.1)。この退色反応部位はASRでも染まらなかった(Fig.2)。一方、常温での分裂中期の染色体は退色反応はみられず、ASRでも一様に黄色に染色された(Fig.3)。染色体の長さも低温処理したものより短かった。これらの結果は、本研究での低温処理が有効であったことを示している。

Figs.2と3にみられるように、オオバナノエンレイソウのC、D染色体には、低温処理で退色反応を示さずASRで黒染されるヘテロクロマチンがある。Utsumi and Takehisa (1974)は、オオバナノエンレイソウには二つのタイプのヘテロクロマチンがあり、1つは低温処理で退色反応を示し、ASRで黄色に染まり、今一つは退色反応を示さず、ASRで黒染されることを示した。ASRは高リジン型ヒストンを黄色に、高アルギニン型ヒストンを黒色に染めることから(Black and Ansley 1964,1966)、彼らは、前者は高リジン型ヒストンに富むヘテロクロマチンであり、後者は高アルギニン型ヒストンに富むそれであると考えている。

ホルゲン染色はDNAを特異的に染色することが知られているが、低温処理によりDNA量は減少しないことから(Woodard and Swift 1964; Woodard *et al.* 1966)、退色反応はヘテロクロマチン部位の染色糸がほとんどラセンを形成しないためにこの部位が凝縮できないことにより生ずると考えられている(Wilson and Boothroyd 1944; Bailey 1949)。中期染色体の形を保持するためにはヒストンが重要な役割を担っていることが知られている(Mirsky *et al.* 1968)。また、本研究において、高リジン型ヒストンに富む部位が退色反応をおこしたことから、特に高リジン型ヒストンが結合するのが阻害されるか、または逆に失われるために染色糸がラセンを形成できないと考えられる。高アルギニン型ヒストンに富む部位はこのヒストンが高リジン型ヒストンの消失を抑制するか、または結合を促進するために退色反応をおこさないのかもしれない。結論については今後の研究に待たねばならないが、いずれが原因にせよ、退色反応にはDNAよりヒストンが強く関与していると考えられる。

(2)静止核のASR

常温下においた細胞をASRで染色すると、核は全体に黄色に染まり、その中に黒色または濃褐色に濃染された染色中心(chromocenter)がみとめられた(Fig.4)。核小体(仁)は染色されなかった。低温処理した細胞核でも同様であった。しかし、光顕ではこれ以上の詳しい構



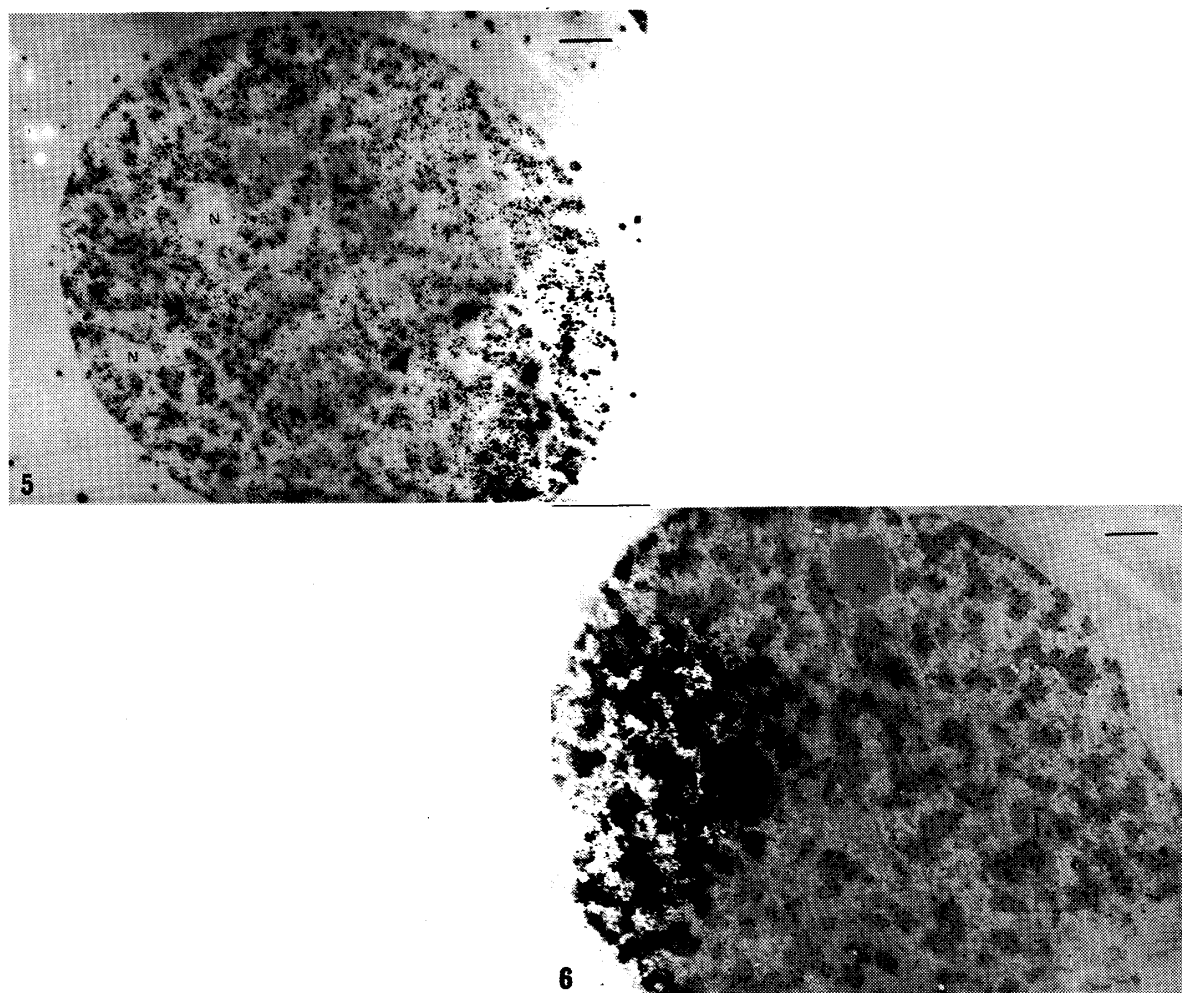
Figs.1 and 2. Microphotographs of Feulgen(1) and ASR(2) squashes of cold-treated chromosomes showing negatively heteropycnotic regions(arrows). Line scale= $10\mu\text{m}$.

Figs.3 and 4. Microphotographs of ASR squashes of metaphase chromosomes (3)and interphase nuclei(4) of the non-treated cells. 3.No negatively heteropycnotic regions are seen. 4.Some chromocenters in each nucleus are darkly stained, but nucleolus(N)is not stained(arrows). Line scale= $10\mu\text{m}$.

造については不明である。ホイルゲン染色した場合でも静止核において退色反応がおこっているかどうかはわからない(Fig.1参照)。

Fig.5は常温の細胞核をASRのみで染色した場合の電顕像である。ASRの生成物である銀粒子がほぼ核内全体に分布しているが、核小体またはカリオソーム(染色仁)と考えられる部位には銀粒子がみられない。しかし、この写真ではクロマチンと銀粒子の分布との関係が明確ではない。Fig.6は同じ常温下の細胞核をASRと酢酸ウラニルで染色したものである。銀粒子は高電子密度の凝縮したクロマチン上に分布し、低電子密度の分散したクロマチン、核質部、核小体およびカリオソームには分布していないことが明確に観察された。Haapala and Nygren(1973)はタマネギ *Allium cepa* の根端分裂組織細胞をASRで染色して電顕観察を行った結果、凝縮クロマチン以外に核小体も染色されたと報告している。しかし、本研究では核小体はまったく染色されなかった。この相反する結果の原因については明らかではないが、1つの要因はアンモニア銀液の作製法のちがいかもしれない。彼らはBlack and Ansley(1964)の方法で、本研究ではVidal *et al.*(1971)の方法でそれぞれ染色液を作製している。

(2)静止核のASR



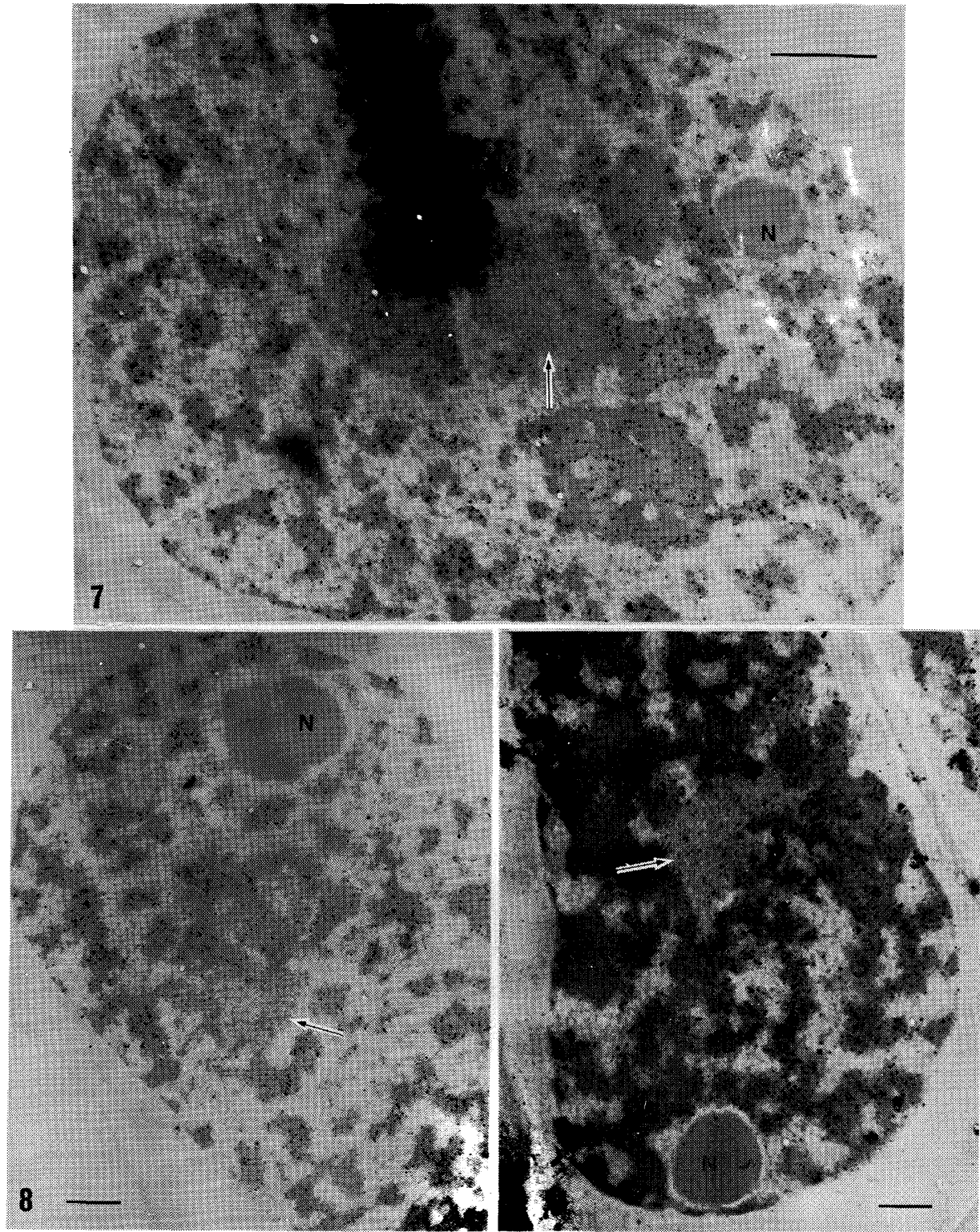
Figs.5 and 6. Electronmicrographs of the non-treated interphase nucleus after ASR only(5)and post-stained by uranyl acetate(6). 5. ASR deposits are distributed in nucleus, excepting nucleolus(N)and karyosome(K),but the relation between chromatin and ASR deposit is unclear. 6. ASR deposit is observed mainly in the dense chromatin. Line scale=1 μ m.

今後の検討が必要である。核小体の銀染色法として、近年、50%硝酸銀水溶液で染色する方法が盛んである(内海ら 1981)。しかし、この方法では主に非ヒストンタンパク質が染色される。

低温処理した細胞核においても、銀粒子は凝縮クロマチンに分布し、分散クロマチン、核質部、核小体およびカリオソームにはみとめられなかった(Figs.7 and 8)。さらに、顕著なクロマチン構造の変化がみとめられた。すなわち、それは凝縮クロマチンの一部が分散し、ASRの銀粒子が分布していない構造部分である(Fig.7)。この部分は凝縮クロマチンより電子密度が低く、網目状に集まった200~300 Åの微小繊維から構成されている。この微小繊維は凝縮クロマチンとつながっている。Fig.8では、Fig.7よりゆるやかに分散した微小繊維の網目状構造がみられるが、やはり微小繊維は凝縮クロマチンと結合している。分裂前期の核でも同様の構造がみられるが、銀粒子は静止核にくらべると多少分布していた(Fig.9)。

このクロマチンの網目状構造はタマネギ *Allium cepa* の根端細胞(Lafontaine 1965)および花粉(Esponda and Gimenez-Martin 1971)の核内で観察されたマイクロパフ(micro-puff)とよばれる構造と類似している。酵素消化実験と細胞化学的研究から、マイクロパフはクロマチン構造が分散状に変化したもので、RNA合成を行なっている部位であることが明らかとなり、多糸染色体のパフに相当する構造であると考えられている(Lafontaine 1965; Lafontaine and Lord 1969; Esponda and Gimenez-Martin 1971)。ASRの銀粒子は凝縮クロマチンに分布し、分散クロマチンにはみとめられないことはムラサキツユクサ *Tradescantia reflexa* の花粉粒核で観察されている(Arima and Kusanagi 1977)。同様の結果が本研究においてもみとめられた。静止核の凝縮クロマチンは分散クロマチンより代謝活性が低い(Frenster *et al.* 1963; Sieger *et al.* 1970)。動物の精子核では、クロマチンは完全に凝縮し、代謝活性がみられない(Gledhill *et al.* 1966; Marushige and Dixon 1969, 1971)。ムラサキツユクサの花粉粒内で分化している生殖核と栄養核のうち、生殖核は伸長変形してクロマチンは異常凝縮し、代謝活性が見られない(草薙 1977)。また、ニンニク *Allium sativum* の根端細胞をキサントドロール(xanthidrol)で処理すると、二核細胞が誘導され、そのうちの一つは生殖核のように伸長変形し、代謝活性もみられないという(Kusanagi and Yanagi 1971)。以上の諸知見を総合すると、低温処理細胞核にみられたマイクロパフ様構造は低温によって誘導されたクロマチンの活性化部位であると推論される。

植物種子の休眠を打破するために低温処理を行なうと、モクセイ科のトネリコの仲間である *Fraxinus excelsior* の胚の幼根分裂組織細胞核では核小体構造が変化し、容積が増大するとともに、総RNA量が増加するという(Villiers 1972)。同様の結果はカバノキ科のハンバミの仲間である *Corylus avellana* の子葉細胞を低温処理した場合にも報告されている(Wood and Bradbeer 1967)。この場合には、低温処理の初期にはRNAの全画分が増加し、後期にはr-RNAが急激に増えるという。オオバナノエンレイソウでは、RNA代謝についての生化学的研究は行なわれていないが、低温処理した胚珠壁細胞核では常温下の細胞核より核小体の数が増加する(内海ら 1981)。しかし、この植物の核小体形成部は染色体末端にあり、一般に染色体末端は核膜に結合していると考えられている。本研究で観察されたマイクロパフ様構造は核膜附近に存在しないこと、および前期染色体でもみられたことなどから退色反応をおこしている部位であると考えられる。低温処理したエンレイソウの一種 *Trillium grandiflorum* (Braselton 1973)、バイモの仲間 *Fritillaria lanceolata* やツルボの一種 *Scilla sibirica* (LaCour and Wells 1974) の中期染色体を電顕で観察すると、退色反応をおこしている部位はクロマチン部位より電子密度の低い微小繊維の網目状構造を示す。低温処理で活性化される部位は核小体およびr-RNAとは直接関連していないと考えられる。



Figs.7-9. Electronmicrographs of a part of cold-treated nucleus at interphase (7,8)and at prophase(9) after ASR and uranyl acetate stain. 7.and 8.Note the micropuff-like structure closely linked to the dense chromatin(arrow).

9. A micropuff-like structure enveloped in chromatin masses is seen (arrow). N=nucleolus. Line scale=1 μ m.

常緑樹であるヒメツゲ *Buxus microphylla* の葉の細胞では秋から冬にかけて低温に順応する間に、主としてr-RNAと膜結合の可溶性タンパク質が増加し、DNAには変化がみられない(Gusta and Weiser 1972)。さらに、暖温にさらすと低温抵抗性は急速に失われ、新たな核酸合成が急増するという。低温に順応する間にRNAとタンパク質の量が増加することは落葉樹の生きている樹皮でも報告されている (Simonovitch *et al.* 1967; Li and Weiser 1967)。このように、低温にさらされた植物細胞は低温という環境に順応するために必要なタンパク質を合成すると考えられる。エンレイソウ属は多年生植物であり、0℃下で越冬し減数分裂を行なう。同様に、越冬後に花芽形成を行なう二年生植物のソラマメでも、根端細胞を低温処理すると中期染色体は退色反応を示し(Takehisa 1973)、静止核ではマイクロパフ様構造が観察される(内海 未発表)。小麦では、春播き、秋播きいずれの系統でも低温処理したときにのみ退色反応部位がみとめられる(Mechelke 1955)。したがって、これらの植物において、低温処理により現われる退色反応とマイクロパフ様構造は低温順応に必要なタンパク質の合成に関連しているのではないだろうか。しかし、結論は今後の研究にまたねばならない。

謝辞—材料のオオバナノエンレイソウを提供して下さった北海道大学理学部助教授金沢甫博士に感謝いたします。また、電子顕微鏡観察にあたって、御指導いただいた慶応義塾大学法学部教養課程生物学教室の松本二郎教授にお礼申し上げます。

References

- Arima, T., and Kusanagi, A.: *Protoplasma* 83, 297 (1975)
 Bailey, P. C.: *Bull. Torrey Bot. Club* 76, 319 (1949)
 Black, M. M., and Ansley, H. R.: *Science* 143, 693 (1964)
 Black, M. M., and Ansley, H. R.: *J. Histochem. Cytochem.* 14, 177 (1966)
 Bradbury, E. M., Maclean, N., and Matthews, H. R.: *DNA, Chromatin, Chromosomes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1981)
 Braselton, J. P.: *Protoplasma* 76, 97 (1973)
 Darlington, C. D., and LaCour, L. F.: *Jour. Genet.* 40, 185 (1940)
 Esponda, P., and Gimenez-Martin, G.: *Experientia* 27, 855 (1971)
 Frenster, J., Allfrey, V. G., and Mirsky, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 1026 (1963)
 Fukuda-Yanagi, T.: *Thesis of Dr. of Sci. Hokkaido University* (1975)
 Gledhill, B. L., Gledhill, M. P., Rigler, R. Jr., and Ringertg, N. R.: *Exp. Cell Res.* 41, 652 (1966)
 Gusta, L. V., and Weiser, C. J.: *Plant Physiol.* 40, 91 (1972)
 Haapala, O. K., and Nygren, T.: *Histochemie* 34, 257 (1973)
 芳賀 忿: 細胞化学シンポジウム 第7集, 101 (1958)
 草薙昭雄: 続細胞学大系3 (小川・黒住・小池・佐藤編) 植物細胞学, 朝倉書店, 東京 (1977)
 Kusanagi, A., and Yanagi, T.: *Protoplasma* 69, 279 (1970)
 Kusanagi, A., and Yanagi, T.: *Protoplasma* 72, 119 (1971)
 Lafontaine, J. G.: *J. Cell Biol.* 26, 1 (1965)
 Lafontaine, J. G., and Lord, A.: *in Handbook of Molecular Cytology* (ed. A. Lima-de-Faria; North Holland Publishing Company, Amsterdam, London (1969)

- LaCour, L.F., and Wells, B.: J. Cell Sci. 14, 505 (1974)
- Li, P.H., and Weiser, C.J.: Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86, 723 (1967)
- Marushige, K., and Dixon, G.H.: Develop. Biol. 19, 397 (1969)
- Marushige, K., and Dixon, G.H.: J. Biol. Chem. 246, 5799 (1971)
- Mechelke, F.: Kulturpflanze 3, 127 (1955)
- Mirsky, A.E., Burdick, C.J., Davidson, E.H., and Littau, V.C.: Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 592 (1968)
- Sieger, M., Pera, F., and Schwarzacher, H.: Experientia 26, 103 (1970)
- Simonovitch, D., Gfeller, F., and Rheaume, B.: in Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. (ed. Asahina, E.), Intern. Conf. Low Temp. Sci. August 14-19, 1966. Institute Low Temp. Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan (1967)
- Takehisa, S.: Mutation Res. 17, 267 (1973)
- 内海俊策・高瀬玲子・作田紀恵・的場緑: 千葉大学教育学部紀要 第30巻第2部, 113 (1981)
- Utsumi, S., and Takehisa, S.: Exp. Cell Res. 86, 398 (1974)
- Vidal, O.R., Aya, T., and Sandberg, A.A.: Stain Technol. 46, 89 (1971)
- Villiers, T.A.: New Phytol. 71, 153 (1972)
- Wilson, G.B., and Boothroyd, E.R.: Canad. J. Res. C. 22, 105 (1944)
- Wood, A., and Bradbeer, J.W.: New Phytol. 66, 17 (1967)
- Woodward, J., and Gorovsky, M., and Swift, H.: Science 151, 215 (1966)
- Woodward, J., and Swift, H.: Exp. Cell Res. 34, 131 (1964)

摘 要

低温処理したオオバナノエンレイソウの静止核および染色体のアンモニア銀反応について光学および電子顕微鏡により調べた。アンモニア銀は核内の塩基性タンパク質を特異的に染色することが知られている。

低温処理した染色体は特定部位でホイルゲン反応で染まらない退色反応を示すが、この部位はアンモニア銀反応によっても染まらなかった。この結果から、低温処理により退色反応が誘起されるに当たってヒストンがいかなる役割をもっているかについて考察した。

低温処理した静止核の微細構造を電子顕微鏡で調べた結果、未処理細胞の静止核ではみられない特異な構造が認められた。その構造はとぐろ状に巻いた直径200~300 Åの微小繊維がからまった網目状構造をしており、電子密度はクロマチンより低い。しかし、この構造は隣接クロマチンから突出している微小繊維と明らかにつながっている。これらの形態はLafontaine (1965) や Esponda and Gimenez-Martin (1971) によって報告されているマイクロパフ (micropuffs) の構造ときわめて類似している。これらの知見から、クロマチンは多糸染色体のパフ (puffs) に似た構造を取りうると考えられた。この構造的類似に基づいて、低温処理によって誘起されるクロマチン活性化と植物の低温順応との関係について論議した。