

第5章 細胞・分子を見る

第1節 細胞周期の各ステージの観察

1.1 植物の染色体標本の作製

【はじめに】 遺伝物質の本体は核酸（DNA）であるが、真核生物の細胞内で遺伝物質は裸の核酸として存在するのではなく、タンパク質などと結合して高次構造をとっている。真核生物の細胞内で、核（動植物）、ミトコンドリア（動植物）、葉緑体（植物）の3つの細胞内小器官が遺伝物質を担っている。これらのうち、核内の染色体（chromosome）に含まれる遺伝物質の量が圧倒的に多い。細胞は全ての生物の構造・機能の単位であり、生物の生長、増殖、生殖には細胞分裂が深く関与している。細胞分裂は高度に制御されたイベントの連鎖である。一つの細胞が二つの娘細胞に分裂する際、遺伝物質を正確に分配するための精緻な機構が必要とされる。本実習では特に遺伝物質の担架体としての染色体の構造に注目しながら、植物細胞の分裂の様子を観察する。

【安全上の注意】 標本作製に用いる固定液、酢酸液は皮膚などにつけないように注意し、蒸気を吸入しないようにすること。もし接触した場合にはすぐによく水洗すること。染色液は指などの皮膚をも染色するので、必要ならば指サックなどで防御することが望ましい。沸点の低い酢酸溶液中での加熱は管ビンを揺らしながら注意深く行い、突沸を避けること。

【植物材料】 オオムギ正常系統 *Hordeum vulgare* cv. Betzes ($2n=2x=14$)

【試薬】 酢酸カーミン液（45%酢酸，1～2%カーミン），45%酢酸，メチレンブルー液，封入剤

【器具】 ピンセット，柄付針，カミソリの刃，爪楊枝，アルコールランプ，スライドグラス，カバーグラス，ガーゼ，ろ紙，ドライアイス，プロアー

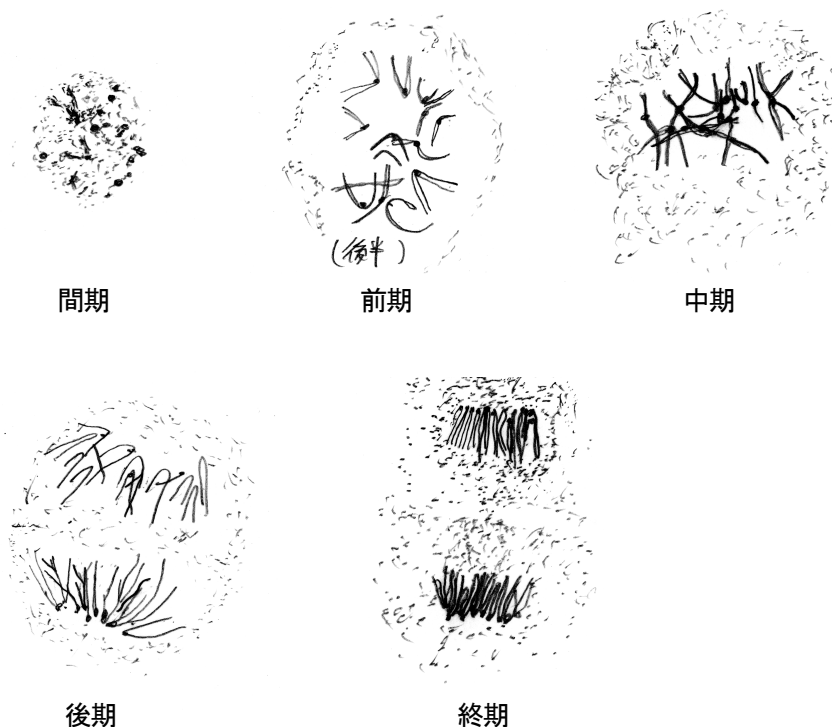
【プレパラートの作成】 固定済みのオオムギ根端を管ビン中の酢酸カーミン液に浸し，5～10分静置する。染色を促進させるため，管ビンを揺らしながらアルコールランプの炎で炙り，軽く沸騰させる（一回だけ）。カーミンで赤黒く濃く染まっている部分が根端分裂組織である。ろ紙上に根端を取り，根冠（先端から約0.5mmの弱く染色されている部分）をカミソリの刃で切り捨てる。さらに，0.5mmほどを切り取り，清浄にしたスライドグラスの上に置く。ここで分裂組織をとりすぎると良い標本を作ることが出来ない。スライドグラスのサンプルに45%酢酸を半滴のせる。清浄にしたカバーグラスを被せ，スライドグラスとカバーグラスの間にカミソリの刃を差し入れる。細い棒状のもの（柄付針，爪楊枝など）でカバーグラスの上から垂直に叩き，細胞をスライドグラスとカバーグラスの間に展開させる。アルコールランプで軽くあぶり（絶対に沸騰させてはいけない），濾紙をのせて，指で垂直に押しつぶす。

【検鏡】 低倍率（対物レンズ10倍）で観察し，分裂期の細胞があるかを確認する。個々の細胞がスライドグラス上によく展開していればよい。

【永久プレパラートの作成】 作製した標本をドライアイス上に5分以上静置し，急速冷凍する。カミソリの刃を用いて素早くカバーグラスをはがし，直ちに室温の45%酢酸液に浸ける。ここまでの処置を迅速に行わないと，標本が溶解してスライドグラス上に残らない。室温の酢酸液に浸けておく時間は任意。42℃に設定した45%酢酸液に，スライドの標本面がビーカーの側面に

向くようにして浸漬する。3分間静置した後、スライドを引き上げブロアーで風乾する。標本領域にメチレンブルー染色液を適量滴下し、別のスライドグラスでカバーする。10分ほど静置した後、水道水でスライドグラスをよく洗浄し、ブロアーで標本面の水滴を飛ばす。標本面以外の水滴はペーパータオル等で拭う。乾燥したスライドに、封入剤をごく微量（少ないほど良い）滴下し、清浄なカバーグラスを載せる。平坦な場所に標本をおき、カバーグラス上に重しをのせて乾固するまで放置する。

【検 鏡】 まず、低倍率（対物レンズ10倍）で観察し、細胞周期の間期、対細胞分裂期の各ステージ（前期、中期、後期、終期）があるかを確認する。それぞれのステージの細胞が見つければ、100倍の油浸レンズで検鏡し、特に細胞分裂期の核、染色体の形態に留意しながらスケッチをする。『レポート課題 細胞周期の各ステージ（間期、分裂期の前期・中期・後期・終期）のスケッチと、各ステージにおける染色体（染色質）の様態の記述』



1. オオムギの間期核、分裂期各ステージの染色体像のスケッチ

第2節 体細胞分裂中期染色体像の観察

2.1 酢酸カーミン押しつぶし法による植物染色体標本の作製

【はじめに】 染色体は細胞分裂中期において最も凝縮し、個々の染色体に特有の形状をとる。したがって、この時期において、種・属特有の染色体の数と形状を最も明確に観察することが出来る。一つの生物の核型 (karyotype) は、その種の全染色体について、①それぞれの長さ、②動原体 (一次狭窄) の位置、③付随体および二次狭窄の有無・数・位置、④異質染色質部・真正染色質部の分布、⑤染色小粒・末端小粒の形状・大きさ・数、⑤各種染色体分染法によって生ずる帯状模様 (バンド) の形状・数・位置などを基に決定される。植物の体細胞分裂中期染色体像の観察には、大量かつ容易に資料を調整できる根端もしくは花序の分裂組織を用いる。細胞分裂の進行を分裂中期で停止するにはコルヒチンなどの薬剤を使う方法と、氷水による低温処理法がある。ここでは、最も簡便でムギ類をはじめとした多くの植物種に適応可能な氷水による前処理法と酢酸カーミン押しつぶし法による染色体標本の作成法を紹介する。

【安全上の注意】 標本作製に用いる固定液、酢酸液は皮膚などにつけないように注意し、蒸気を吸入しないようにすること。もし接触した場合にはすぐに良く水洗すること。染色液は指などの皮膚をも染色するので、必要ならば指サックなどで防御することが望ましい。沸点の低い酢酸溶液中での加熱は管ビンを揺らしながら注意深く行い、突沸を避けること。

【植物材料】 オオムギ正常系統 *Hordeum vulgare* cv. Betzes ($2n=2x=14$)

【試 薬】 酢酸カーミン液 (45%酢酸, 1~2%カーミン), 45%酢酸, メチレンブルー液, 封入剤

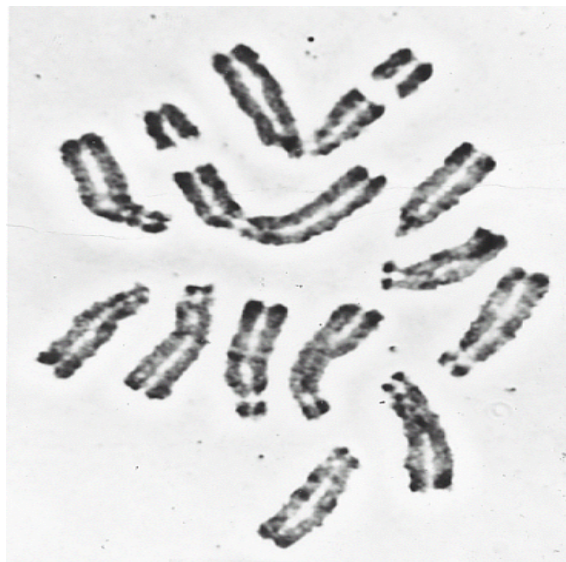
【器 具】 ピンセット, 柄付針, カミソリの刃, 爪楊枝, アルコールランプ, スライドグラス, カバーグラス, ガーゼ, ろ紙, ドライアイス, ブロアー

【プレパラートの作成】

- (I) **種子の発芽** 十分に湿らせた発芽紙 (ろ紙) の上に胚が上になるよう種子を播く。25℃で一晩吸水させ、胚がふくらみ始めたら4℃の冷蔵庫に移す。24時間後、再び25℃に戻し、根が3 cmほど伸びるまで放置する。
- (II) **前処理** 蒸留水を2/3ほど満たした管瓶を氷上に置き、種子から1~1.5 cmに切り取った根端を入れる。通常、ムギ類の種子からは3本の根がまず伸長してくる。これら3本の根端が体細胞分裂の観察に向いている。小さな紙片にサンプル名を鉛筆で記入し、それも管瓶の中に入れる。蓋をして、管瓶をアイスボックス中の氷水に沈め正確に20時間放置する。
- (III) **固定** 氷酢酸 : 95%エタノール = 1 : 3 の固定液を用意し、よく混和して固定用の管瓶に満たす。前処理終了後の根端を一旦ろ紙の上に取り出し余分な水分を除く。直ちに固定液に加え、室温で1日以上固定する。
- (IV) **染色** 酢酸カーミン液 (45%酢酸, 1~2%カーミン) に根端を入れ、室温で1時間もしくは4℃の冷蔵庫で一晩染色する。
- (V) **再固定** 染色後の根端を再び固定液に戻し、再固定する。2週間ほどは冷蔵庫で保存できるが、もっと長期間保存したい場合には冷凍保存する。

(VI) 染色体標本の作製 根端を酢酸カーミン液に 5～10 分浸す。カーミンで濃く染まっているのが分裂組織である。管瓶を緩やかに振りながらアルコールランプで加熱して、充分染色する。酢酸は沸点が低く突沸しやすいので注意深く行う。スライドグラス、カバーグラスはアルコール中に保存しているものをガーゼまたはキムワイプでしっかり拭いて使う。汚れたスライドグラス、カバーグラスを使うと検鏡の妨げとなるので、丹念に清浄すること。スライドグラスに根端をとり、根冠（先端から 0.5 mm ぐらい）を切り捨てる。柄付バリ等で分裂組織を押し出し、45%酢酸を少量滴下する。分裂組織を押し出せない場合には端から 0.5 mm ぐらいをカミソリの刃で切り取りスライドグラスに載せる。分裂組織はほんの少量でかまわない（1 本の根端から 3 枚のスライドを作ることができる）。スライドグラスにカミソリの刃をのせ、カバーグラスをのせる。細い棒状のもの（柄付バリ、爪楊枝など）でカバーグラスの上から軽く叩き細胞をスライドグラスとカバーグラスの間に展開させる。アルコールランプで軽くあぶり（絶対に沸騰させてはいけない）、ろ紙をのせて垂直に押しつぶす。

【永久プレパラートの作成と検鏡】 第 1 節と同様に、低倍率で分裂期染色体の存在が確認できたら、永久プレパラートを作成する（前節のプロトコル参照）。検鏡の手順は、まず低倍率（10 倍）でよく展開した体細胞分裂中期染色体を探し、ステージを動かさぬよう注意しながら高倍率の対物レンズにし、染色体を観察する。良い染色体標本では、低倍率で染色体数を数えることができる。さらに高倍率で観察すると、一次狭窄（動原体）、二次狭窄（仁形成部位、NOR: Nucleolus Organizer Region）が確認できる。オオムギの染色体は動原体を染色体のほぼ中央に持つ中部動原体染色体（metacentric chromosome）、もしくは次中部動原体染色体（submetacentric chromosome）である。染色体の長腕と短腕の比に留意して染色体を観察する。染色体の重ならない良い中期染色体像が得られたらスケッチする。『レポート課題 体細胞分裂中期染色体像のスケッチと、氷水による前処理の効果の考察』



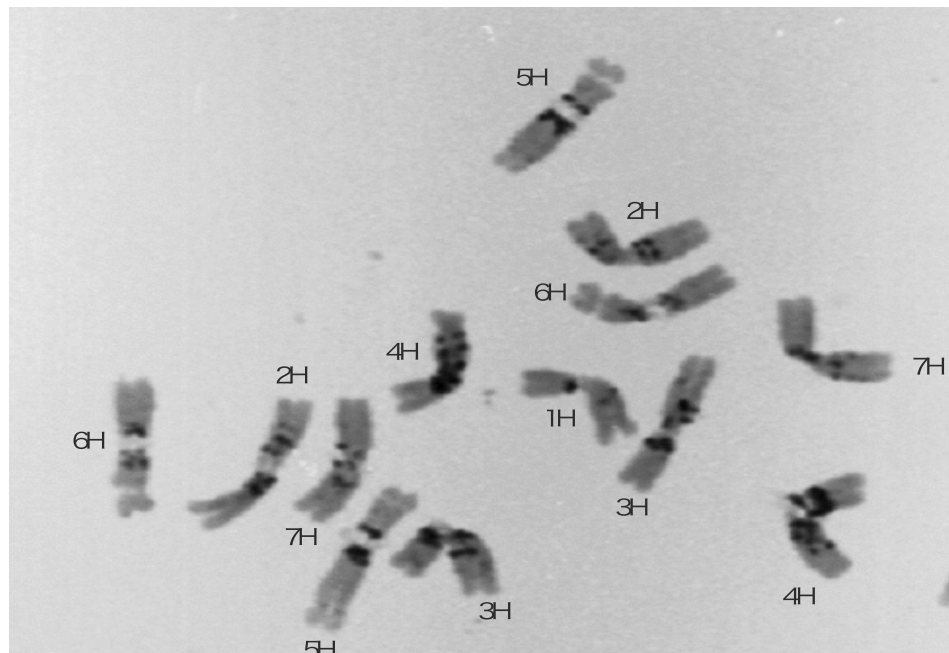
1. ソラマメの体細胞分裂中期染色体像と染色体の模式図

付録 1 染色体分染法 —N-バンド分染法—

【N - バンディング】 染色体上の異質染色質の検出には様々な染色体分染法が用いられる。オオムギ染色体を N-バンド法と呼ばれる分染法で染め分けると、染色体特異的な縞模様が得られる。この縞模様（バンドパターン）を元に、オオムギの各染色体を同定することが出来る。以下に

N-バンド法の手順を記す。

- (I) **染色体標本の酢酸処理** 本節の 2.2 の方法に従って染色体標本を作製する。ただし、根端を酢酸カーミン中で加熱してはいけない。また、スライドガラス、カバーガラスは特に注意してキムワイプで清浄にすること。スライドは作成後すばやくドライアイスで冷凍する必要がある。良いスライドが作成できたら教官か TA に確認してもらい、カバーガラスの外縁がわかるようダイヤモンドペンでスライドガラスに傷を入れる（左上と右下の 2 ヶ所）。ドライアイス上で冷凍したスライドから剃刀の刃で、カバーガラスを剥がしとり、直ちに室温の 45%酢酸液に浸ける。酢酸液に浸けるまで手早く行い、絶対に解凍させてはいけない（折角、展開した染色体標本がスライドガラスから流れてしまう）。約 42℃にした 45%酢酸液にスライドの標本側がビーカーの側面に向くよう入れ、3 分間静置する。時間になったら、スライドを引き上げ、室温で乾燥させる。
- (II) **N-バンド分染法** 風乾後のスライドを 93℃に加熱したリン酸二水素ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1M 溶液で 1.5 分処理する。時間が来たら、プレパラートを素早く水洗し、ライト（またはギムザ）染色液に入れる。適当な染色が得られるまで、液中につけておく（気温等の条件で染色時間は変わるため、随時、検鏡して染色の具合を確認する）。染色されたスライドは水洗し、ブローアを用いて乾燥させる。



1. オオムギ染色体の N-バンド分染像

付録2 FISH 法による DNA 配列の座乗位置の特定

【はじめに】 遺伝子、DNA配列が染色体上のどこに存在しているか（座乗位置）を特定する方法は、連鎖分析に基づく遺伝地図作成などさまざまある。細胞遺伝学レベルでも、DNA配列を何らかの方法で標識し、染色体の相補的なDNA鎖と分子雑種を形成させた後、標識分子を検出することで、DNA配列がどの染色体のどの部分に座乗するか決定することが可能である。この方法のメリットは、配列の存在様式を顕微鏡下で直接的に可視化できることにある。本実習では、蛍光 (fluorescence) *in situ* hybridization (FISH) 法で、染色体の基本的な構成要素である動原体、テロメア、仁形成体特異的反復配列のオオムギ染色体上での存在様式を観察する。

【安全上の注意】 標本作製に用いる固定液、酢酸液は皮膚などにつけないように注意し、蒸気を吸入しないようにすること。もし接触した場合にはすぐに良く水洗すること。染色液は指などの皮膚をも染色するので、必要ならば指サックなどで防御することが望ましい。染色体の対比染色に用いるヨウ化プロピジウムは発ガン性があるので取り扱いに注意する。万一、皮膚に接触した場合には直ちに、大量の水道水で洗い流すこと。

【植物材料】 オオムギ正常系統 *Hordeum vulgare* cv. Betzes ($2n=2x=14$)

【試薬】 酢酸カーミン液 (45%酢酸, 1~2%カーミン), 45%酢酸, ハイブリダイゼーション液, ディゴキシゲニン標識済みプローブ液, 2X SSC, 蒸留水, 抗体溶液, 対比染色液 (ヨウ化プロピジウム水溶液), 抗退色剤入り封入剤

【器具】 ピンセット, 柄付針, カミソリの刃, 爪楊枝, アルコールランプ, スライドグラス, カバーグラス, ガーゼ, ろ紙, ドライアイス, ブローア, ダイヤモンドペン, インキュベーター (37°C), ウォーターバス (42°C), ヒーティングブロック (80°C), 湿室, ピペッター

FISH 用染色体標本の作製

【押しつぶし法による染色体標本の作製】 前節 (第2節) と同様の方法で染色体標本作製する。ただし、酸性条件下での加熱により染色体 DNA が過剰に断片化されるのを避ける必要があるため、管ビン中の根端をアルコールランプで加熱してはいけない。良いスライドが出来れば、サンプル領域を明確にするため、カバーグラスの左上と右下二ヶ所にダイヤモンドペンで印をつける。ドライアイス上に5分以上静置した後、カバーグラスを剥離させ直ちに室温の45%酢酸溶液に浸漬する。各自少なくとも1枚のスライドを作成する。

【スライドの酢酸処理】 室温の45%酢酸に使っているスライドを、標本面がビーカーの側面に向くように注意しながら42°Cの45%酢酸溶液に3分間浸漬する。浸漬後のスライドは、室温で十分乾燥させる。

ハイブリダイゼーション

【ハイブリダイゼーション液の調整】 ①リボゾーム RNA 遺伝子, ②動原体特異的反復配列, ③テロメア配列のそれぞれを PCR 法でディゴキシゲニン (DIG) で標識 (ラベル) したものをプローブとして用いる。PCR 法による、DNA の DIG ラベル法については、実習中に解説する。あらかじめ次ページのように混合したハイブリダイゼーション液を配布する。

ハイブリダイゼーション液（各自 10 μ l，スライド 1 枚分）

20X SSC	1 μ l
Deionized formamide	5 μ l
滅菌蒸留水	0.5 μ l
50% Dextran sulfate	2 μ l
10 mg/ml Salmon sperm DNA	0.5 μ l
合計	9 μ l

この液に各自が選んだプローブ溶液（1 μ l）を加え、混和する。ハイブリダイゼーション液は粘張性が高いのでピペッターのチップを用いて液を丹念に混和すると良い。2 種類のプローブを加えても良いが、その場合には各プローブ 0.5 マイクロリットルとする。

【ハイブリダイゼーション】 スライドの標本面を上にして机の上に置く。各スライドに 10 μ l のハイブリダイゼーション液を滴下する（気泡ができないように注意する、できた場合にはピンセットの先などでつぶす）。プラスチックフィルムを静かにのせ、80°C のヒーティングブロック上で 2 分間加熱する（染色体 DNA、プローブ DNA の同時変性）。加熱後、湿度を保てる密閉容器中に静置し、37°C で一晩インキュベートする。

ハイブリダイゼーションシグナルの免疫化学的検出

【原理】 はじめに、染色体上のターゲットとなる DNA 配列に結合しなかったプローブ分子を洗浄する。次に、染色体 DNA にハイブリダイズしたプローブ分子を免疫化学的に検出する。プローブはディゴキシゲニン（DIG）分子で標識されているが、そのままの状態では検出できない。そこで、DIG に特異的に結合する抗 DIG 抗体を用いてプローブを検出する。この抗体には、さらに蛍光物質である Fluorescein が結合している。Fluorescein は 450nm 波長の光を当ててことで緑色蛍光を発生させる。したがって、緑色蛍光の存在でプローブ分子の存在を確認することになる。染色体自体は蛍光を発生しないので、DNA に特異的に結合する蛍光色素の一つであるヨウ化プロピジウム（赤色）で全染色体を染色する（対比染色）。落射蛍光顕微鏡（Epifluorescent microscope）で 2 色の蛍光（プローブがハイブリダイズした緑黄色の領域とそれ以外の赤色の染色体）を観察する。

【実験操作上の注意】 指定されたステップ以外でスライドを乾燥させると高いバックグラウンドの元となるので、注意すること。検鏡には油浸レンズを用いる。オイルが油浸レンズ以外のレンズに付着しないよう注意する。蛍光物質は励起光を浴びると蛍光を発生しながら崩壊していく（不可逆的反応）。蛍光顕微鏡の光路のシャッターをこまめに閉じて、シグナルが退色してしまわぬよう注意すること。

【非結合プローブの除去】 スライドを 2X SSC に浸け、プラスチックフィルムを浮かび上がらせ、除去する。ハイブリダイゼーション液が拡散するよう、時々攪拌し 10 分間インキュベートする。次に、ここのスライドを洗浄瓶に入った蒸留水でしっかり洗い流し、標本領域の水滴をブローアで飛ばす。標本領域以外はペーパータオルで拭ってかまわない。

【抗 DIG 抗体による免疫科学的検出】 20 μ l の抗体液（抗 DIG 抗体を含む）を滴下し、プラスチックフィルムで覆う。湿室中、37°C で 30 分間インキュベート[抗原（プローブ中の DIG）－抗体（抗 DIG 抗体）反応]。

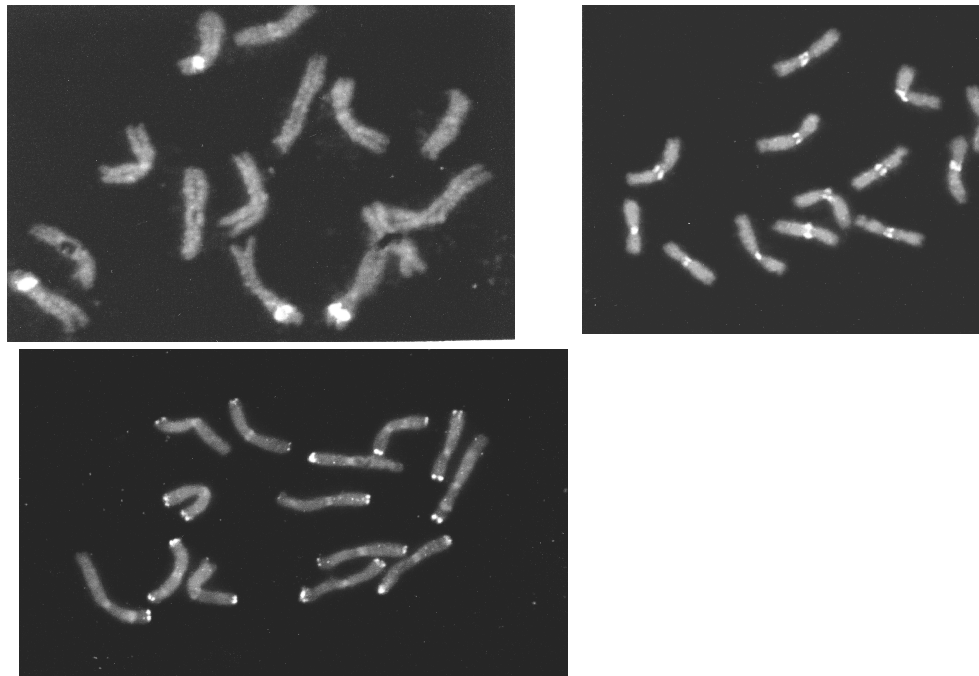
【非結合抗体の除去】 洗浄瓶に入った蒸留水でしっかりとスライドを洗い流し、ブロアーで標本領域を乾燥させる。スライドの裏面の水滴はペーパータオルなどでふき取る。

【対比染色】 対比染色剤のヨウ化プロピジウム (PI) を $50\mu\text{l}$ 滴下し、標本領域を覆う。5分間静置した後、洗浄瓶に入った蒸留水でよく洗浄する。再び、パフアーで水滴を吹き飛ばし、標本領域を乾燥させる。抗退色液を 1 滴 (約 $10\mu\text{l}$) 滴下し、カバーガラスを静かにのせる (気泡が入らないように注意する)。十分、抗退色液が広がったら、ろ紙をのせて、軽く押しつぶす。

【検 鏡】 落射蛍光顕微鏡でシグナルの観察をする。用いるフィルターは次の 3 種類。

FITC 用フィルター	Fluorescein の発生する緑色蛍光 (プローブの可視化)
PI 用フィルター	PI の発生する赤色蛍光 (染色体の対比染色)
ダブルパスフィルター	緑色、赤色蛍光の同時観察

励起光発生装置からの光を励起光フィルターで分光し、目的の蛍光物質に特有の励起光のみを取り出す。蛍光物質は励起光を受け、基底状態から励起状態に遷移する。励起状態から再び基底状態に戻る際に、特有の波長の光 (蛍光) を放出する。蛍光フィルターは特有の波長の光のみを透過させる。実際にサンプルを観察する際には、対比染色の PI 用フィルターを用いて低倍率でよく展開した中期染色体像を探す。次に、フィルターキューブをダブルパス用に切り替えて、シグナルが存在するか確認する。良い標本が得られれば、高倍率 (60 倍もしくは 100 倍) に切り替えて、写真撮影を行う。画像の記録は通常のカラーフィルムを装着した顕微鏡用カメラでの撮影、または CCD カメラでのデジタルデータの取り込みで行う。



1. オオムギ染色体のリボゾーム RNA 遺伝子、動原体特異的反復配列、サブテロメア配列プローブを用いた FISH 像 (明るい白色がシグナル)