

新制

農

613

京大附図

植物における染色体解析法の開発と  
その遺伝育種学的利用に関する研究

掛田克行

1991

植物における染色体解析法の開発と  
その遺伝育種学的利用に関する研究

掛 田 克 行

1991

# 目次

緒論	1
第I編 画像解析法を用いた植物染色体の特性解析	3
序説	3
第1章 画像解析法によるオオムギの核型分析	5
第1節 緒言	5
第2節 中期核板像の自動走査	6
1 材料および方法	6
2 結果	7
3 論議	10
第3節 核型およびNバンドパターンの定量的解析	11
1 材料および方法	11
2 結果	13
3 論議	18
第4節 分裂ステージの進行にともなう核型の変化	22
1 材料および方法	22
2 結果	23
3 論議	32
第5節 摘要	33
第2章 画像パラメータ“凝縮型”を用いたイネ体細胞染色体の識別	35
第1節 緒言	35
第2節 材料および方法	35
第3節 結果	36
第4節 論議	40
第5節 摘要	41
第II編 分染法を用いた植物染色体の特性解析	42
序説	42
第3章 オオムギにおけるCおよびN分染法を用いた染色体構造変異の解析	44
第1節 緒言	44
第2節 CおよびNバンドパターンからみたヘテロクロマチンの分化	45
1 材料および方法	45

2	結果	46
3	論議	52
第3節	相互転座系統における切断点の位置決定	55
1	材料および方法	55
2	結果	55
3	論議	61
第4節	摘要	63
第4章	トウモロコシにおけるG分染法の開発	65
第1節	緒言	65
第2節	材料および方法	65
第3節	結果	66
第4節	論議	71
第5節	摘要	74
第Ⅲ編	免疫学のおよび分子生物学的手法を用いた植物染色体の特性解析	76
序説		76
第5章	抗BrdU抗体を用いた植物染色体の複製パターンの解析	77
第1節	緒言	77
第2節	材料および方法	77
第3節	結果	79
第4節	論議	88
第5節	摘要	89
第6章	<i>In situ</i> ハイブリダイゼーションによるイネ rRNA 遺伝子のマッピング	91
第1節	緒言	91
第2節	材料および方法	91
第3節	結果	92
第4節	論議	93
第5節	摘要	95
総括		96
謝辞		100
引用文献		101

## 緒 論

植物の遺伝育種学において従来染色体の研究が果たしてきた役割はきわめて大きい。その応用範囲はゲノム分析法あるいは核型分析法を用いた種分化・系統進化の解明、異数体あるいは転座・欠失等の染色体構造異常をもつ系統を利用した遺伝子地図作製などの基礎的研究から、人為倍数体の作出、染色体部分の置換または添加を利用した近縁種からの有用形質の導入などの実用的研究まで広範な分野にわたっている。しかしながら染色体の解析法についてみると、植物においては現在でも、染色体数の確認、減数分裂期における染色体対合型の観察、染色体の長さや臑比に基づく核型分析などの古典的手法が用いられている場合が多く、この点で分染法をはじめ種々の染色体解析法が高度に発達している動物とは対照的である。

動物においては1970年代初頭における種々の染色体分染法の開発を契機として染色体の研究が飛躍的に発展した。ヒトをはじめ多くの動物種では分染法の利用により全染色体の同定が可能となったほか、染色体の種々の構造変異をごく微細なレベルで検出することが可能となった。このことによりとくにヒトにおいてはきわめて詳細な染色体地図の作製に関する研究が進展した。一方植物においても多くの種で分染法の利用が試みられたが、分染法が有効であるのは一部の種に限られ、バンドが出現する場合にも動物の染色体で観察されるような詳細なバンドパターンは認められなかった(武久1974)。このため植物においてはまだ染色体の同定さえ不完全な種が多く、太糸期分析の可能なごく一部の種を除き、ヒトで行われているような染色体の詳細な解析が困難である。

近年植物の遺伝育種研究においては細胞融合や遺伝子操作等の細胞・分子レベルでの研究が急速に進展している。これに伴い、培養細胞からの再分化植物における染色体変異や体細胞雑種植物における染色体構成の解析、あるいは形質転換植物における導入遺伝子の染色体挿入部位の特定など、多くの場面で染色体調査の重要性が高まっている。また現在様々な植物種において遺伝子のクローニングやRFLPマーカの単離が精力的に行われ、これらを用いた詳細な染色体地図作製の仕事が進行している。染色体地図を完成させるためには、最終的に遺伝子およびRFLPマーカが実際の染色体上のどの部位に位置するかを決定することが必要となるが、そのためには個々の染色体の詳細な解析が不可欠である。また動物では現在、単離・選別した染色体を用いた染色体別遺伝子ライブラリーの作

成（橋本1986）あるいはマイクロディセクションによる特定染色体部分の切り出しとそこから遺伝子クローニング（Lüdecke et al. 1989; Ponelies et al. 1989）等の新しい染色体工学的手法の開発が進んでいる。植物においても将来、このような新手法を利用していくことが期待されるが、その場合にもまず目的とする染色体（部位）を特定できることが前提となる。以上のような現状を考慮すると、植物においてはまず染色体の識別・同定、さらには染色体の微細な構造変異の検出を行うための染色体解析手法の開発が急務といえる。

本研究は以上の観点ならびに現状に基づき、オオムギ、イネ、トウモロコシ等を供試し、植物における新しい染色体解析手法を開発するとともに、それらの手法を用いて植物染色体の形態、構造および機能に関する諸特性を明らかにしようとしたものである。本論文ではまず第Ⅰ編において画像解析法を用いたオオムギの核型分析ならびにイネの体細胞染色体の識別について、つぎに第Ⅱ編において分染法を用いたオオムギおよびトウモロコシの染色体構造の解析について、さらに第Ⅲ編において免疫学的手法を用いた植物染色体の複製パターンの解析ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションによるイネの遺伝子マッピングについて、得られた結果を論述した。

## 第 I 編 画像解析法を用いた植物染色体の特性解析

### 序説

従来植物染色体の調査には標本作製から検鏡、写真作成に至るまで多大の労力と時間が要求され、とくに染色体の観察には長年の経験を積んだ研究者の目あるいはカンといった要素が重視されてきた。一方ヒトにおいては1960年代から染色体検査業務の効率化・省力化を目指して染色体の画像解析に関する研究が続けられ、医療研究機関においては現在ヒト染色体用の自動画像解析装置が実用化されるに至っている (Piper and Lundsteen 1987; Zeidler 1988)。植物の染色体研究においても画像解析法を実用的に利用することができれば、従来から問題であった染色体調査の効率化が大幅に進むとともに、染色体の諸情報に関するより客観的・定量的な解析が可能になると期待される。このような観点に基づき、福井(1985)は植物の染色体を対象とした画像解析システム CHIAS (CHromosome Image Analyzing System) を開発し、染色体測定のための基本プログラムを構築した。本編は画像解析法による染色体調査の効率化、核型およびバンドパターンの定量化、および染色体識別のための新たなパラメータの探索を目的とし、CHIASを用いてオオムギおよびイネの染色体の画像解析を行ったものである。まず第1章ではオオムギを供試し、CHIASによる中期核板像の自動検出から核型およびバンドパターンの測定までの一連の調査を実施し、画像解析法の実用性を検討した。また測定した250個の中期核板における核型のデータを分裂ステージ間で比較し、分裂ステージの進行にともなう核型の変化のパターンを調査した。つぎに第2章ではイネにおいて前中期染色体の凝縮度の違いをCHIASを用いて定量化し、これを新たなパラメータとして体細胞染色体の客観的な識別を行った。

本論に入るに先立ちCHIASによる染色体の解析手順について述べておく。その概略は以下の通りである。まず解析の対象とする染色体像をプレパラート上に見出だす。この過程は自動走査ステージおよび自動焦点装置を用いて自動化することが可能である。適当な染色体像が見つければ、それを顕微鏡に取り付けたTVカメラを通じてアナログ情報として取り込む。写真入力装置を用いて写真から染色体像を入力することも可能である。入力された画像情報はデジタル変換後画像メモリに記憶され、カラーモニター上に写し出

される。画像メモリ中の画像情報はフロッピーディスクに移して記録し、後日解析することができる。染色体画像は1画面あたり512 x 512画素から構成され、各画素は256階調の濃度値(グレイレベル)をもつ。CHIASには画像処理に必要な様々な機能がそれぞれ独立したコマンドとして数10種類用意されており、それらのコマンド群はデータモニター上に表示される。染色体画像の解析はタブレット上でカーソルを操作しながら解析目的に応じて必要なコマンドを選び、各コマンドに適切な条件を与えることによって進めていく。条件設定を終えた一連のコマンド群の配列が決まれば、その手順をプログラムとして登録できる。プログラムは随時呼び出すことができ自動実行も可能である。処理を行った染色体画像はフロッピーディスクに記録するほか、カラーイメージレコーダーを通して写真フィルム上へあるいはプリンター上に打ち出して記録することができる。測定データは通常、測定と同時にデータモニター上に表示させるとともにプリンターに打ち出させて記録する。その他CHIASのシステム構成、ハードウェア、ソフトウェアに関する詳細は福井(1985)およびFukui(1986, 1988)を参照されたい。



## 第1章 画像解析法によるオオムギの核型分析

### 第1節 緒言

Fukui(1986)は染色体画像解析システムCHIASを用いて核板像の取り込みから核型分析の終了までの過程を標準化し、この方法によって植物染色体の調査効率従来よりも大幅に向上し得ることを報告した。本章では、オオムギを用いてCHIASによる中期核板像の自動検出から半自動的核型分析、バンドパターンの測定までの一連の解析を実施し、CHIASの実用性を検討するとともに、そこで得られたオオムギ染色体の諸特性について論述した。

通常染色体調査においては染色体標本から解析の対象とする良好な核板像を探し出す過程にかなりの時間が費やされており、この過程が自動化できれば染色体調査の効率は格段に向上すると考えられる。この観点からまず第2節ではCHIASを用いてプレパラーの自動走査による良好な核板像の自動検出を行い、その効率を検討した。

画像解析法は正確で客観的な定量的情報を大量・迅速に集め得るという点にその特長があり、したがって染色体の長さや腕比、さらにバンドの位置や大きさなどの定量的パラメータの測定にきわめて有効と考えられる。このような観点から、第3節ではCHIASを用いて250個の半数性核板を解析し、オオムギの核型ならびにNバンドパターンを確定するとともに、染色体の長さに加え新たに染色体の画像上の面積および濃度体積を測定し、核型分析におけるこれらの定量的パラメータの有効性について比較・検討した。

染色体の相対長および腕比は異なる分裂ステージ間、例えば太糸期内の早期と晩期の間、あるいは太糸期と体細胞中期の間で変化することが示されており、その原因として各染色体の凝縮率がステージ間で異なることが示唆されている(Ho and Kasha 1974; Luciani et al. 1988)。一方、核型を数値的に表す場合には一般に体細胞中期の染色体が用いられているが、染色体の相対長および腕比が体細胞中期内の分裂ステージ間で変動するかどうかについて詳しく調査した報告はない。そこで第4節では、前節で測定したオオムギの中期250核板を1核板内の総染色体長によって早中期から完全中期までの5つのステージに分類し、各ステージ間での各染色体の相対長および腕比の変化のパターンを調査した。つぎに分裂ステージの進行にともなう各染色体の凝縮率の変化のパターンを数値的に表し、

ステージ間での核型の変化と染色体の凝縮パターンとの関連を調査した。

## 第2節 中期核板像の自動走査

### 1 材料および方法

オオムギ ( $2n=14$ )品種「あまぎ2条」の種子を吸水濾紙を敷いたシャーレに播き、27°Cの光条件下で発根させた。約1 cmに伸長した種子根の根端を切り取り、これを0°Cの蒸留水中で24時間前処理した後、メタノール-酢酸(3:1)で1時間固定した。固定した根端を水洗した後、37°Cの酵素液(4%セルラーゼオノヅカRS、1%ペクトリアーゼY23、75 mM KCl、7.5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、pH4.0)中で40分間解離した。解離した根端は水洗後、スライドガラス上で固定液を滴下しながらピンセットで細かく砕き、続いてスライドガラスをアルコールランプの焰で軽くあぶった後風乾した。染色体標本はSjrensensのリン酸緩衝液(1/15M, pH6.8)で希釈した1%ギムザ液で20分間染色し、水洗・風乾の後、Eukittで封じた。一部の標本については無染色のままカバーガラスをかけ、位相差顕微鏡下で調査した。

自動走査とは顕微鏡ステージが指定した幅で自動的に動くのに対応してCHIASが各視野ごとに核板像の有無を判断することである。ステージの最小移動幅は $0.25\mu\text{m}$ であり、指定したステップ数ごとに自動焦点補正を行うことができる。

自動走査にあたってまず顕微鏡の倍率、走査領域、視野数などの操作条件を設定することが必要である。オオムギの場合、顕微鏡倍率は約25倍(対物レンズ16倍 $\times$ 中間倍率1.6倍=25.6倍)が適当であった。自動走査における走査領域と走査方式は図1-1に示したとおりである。まず18 $\times$ 18mmのカバーガラス内の中央付近に4つの走査領域を定め、各領域それぞれに走査の始点を設けた(図1-1a, b)。つぎに1走査領域を22 $\times$ 22視野に分割し、各視野を左上から右下にかけて順次自動的に走査した(図1-1c, d;なお図1-1cでは視野数は6 $\times$ 6視野に簡略化して示してある)。このとき2つ以上の視野にまたがって存在する核板の取り残しを防ぐため各視野の縦横約1割を重複させて走査した。自動焦点補正は8視野ごとに行った。

視野内に核板像があるか否かの判断は以下のように行った。まず視野の画像の各走査線上の濃度分布曲線をとり、濃度分布曲線の凹凸が激しい走査線をカラーのオーバーレイラ

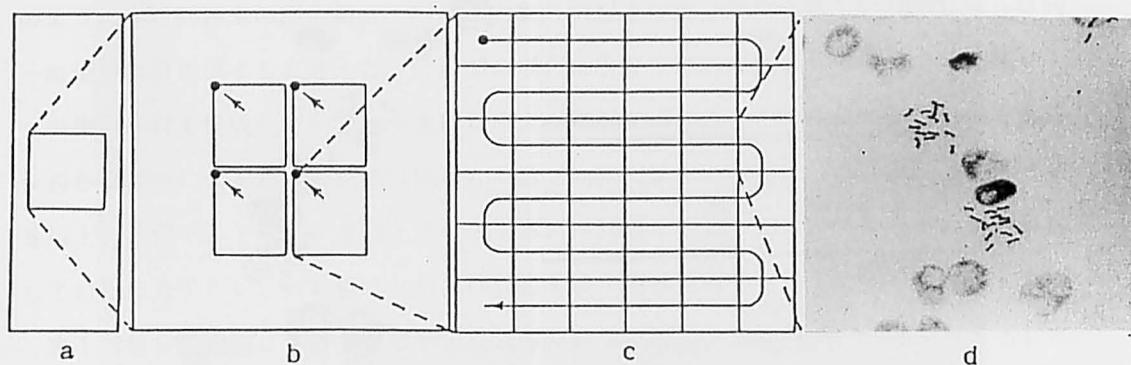


Fig.1-1. Scanning region and process in the autoscanning. (a)Chromosome slide (b)Scanning regions (c)Scanning route of subfields in a scanning region (d) Metaphase plates and nuclei in a subfield.

インで表示する。オーバーレイラインが表示されなければCHIASはその視野内に核板らしき像はないと判断して次の視野に進む。オーバーレイラインが表示されればその視野を画像としてとりこみ、視野内に良好な核板があるか否かの判断を行う。条件に見合う核板があればその核板の重心座標をデータディスクに記録し、次の視野に移る。

自動走査による核板の検出効率を調査するにあたり、染色体数が揃い、かつ染色体どうしの重なりがない核板を良好な核板とした。自動走査終了後、走査領域内の全視野をモニターに写して肉眼による調査を行い、自動走査により良好な核板がどの程度検出されているかを検討した。

## 2 結果

図1-2および図1-3にCHIASによる核板の判定方法を示した。まずオーバーレイラインが表示され核板らしき像があると判断された視野の画像(図1-2a)をノーマリゼーションフィルタで処理して明暗のコントラストを強調した(図1-2b)。この画像より照明ムラ等の歪みを取り除いた後、ある一定の濃度範囲を染色体領域として定め、染色体領域を白(明るさ255)、バックグラウンドを黒(明るさ0)とする2値画像をつくった(図1-2c)。2値画像より50~200画素の面積をもつ粒子を染色体とみなして抽出し、その重心を点として取り出した(図1-2d)。

抽出した染色体(粒子)群が中期核板像であるか否かの判定は以下のように行った。図1-3のように7本の染色体の重心が取り出された場合には、まず各染色体の重心から矢印

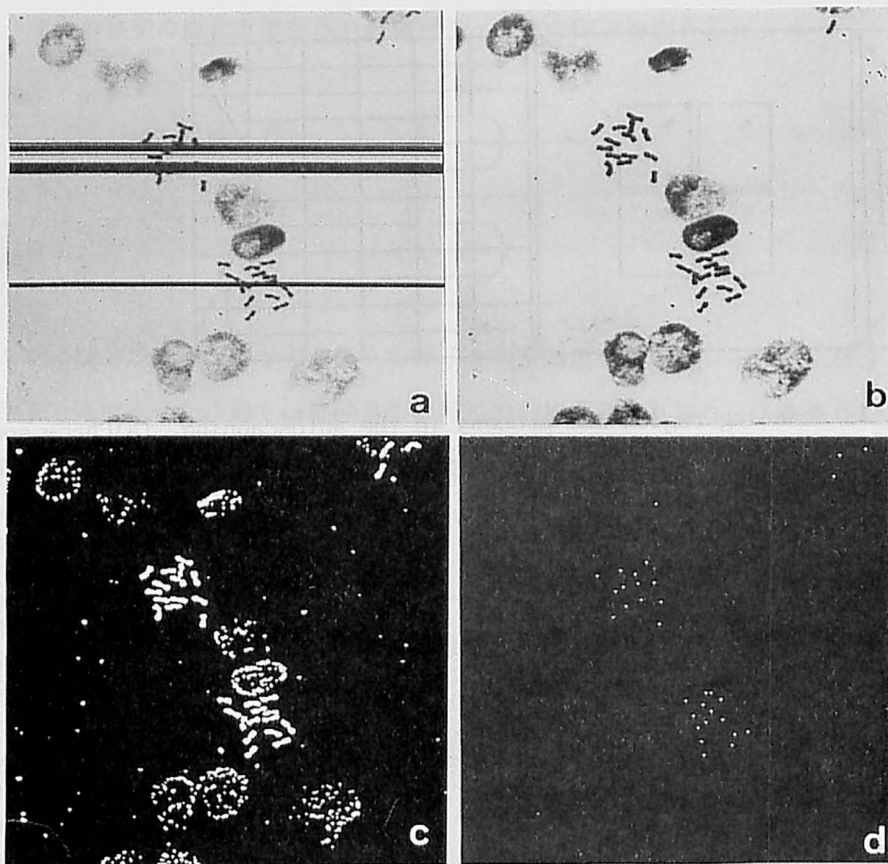


Fig.1-2. Process of the automatic detection of metaphase plates by the CHIAS.  
 A detailed explanation of each step is given in the text.

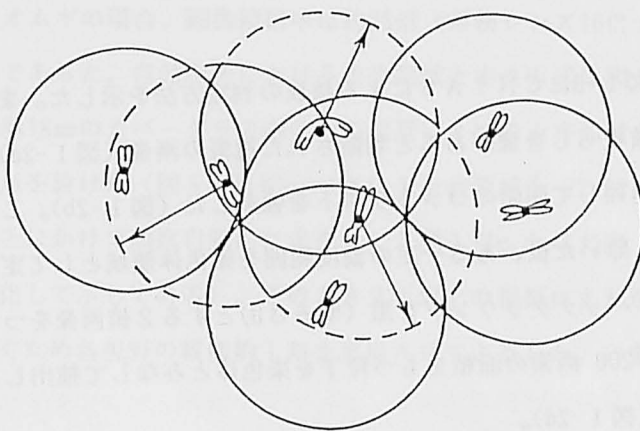


Fig.1-3. Schematic representation of the process for determining metaphase plate by the CHIAS. Explanations are given in the text.

のように半径80画素の円を描き、同一円内に3個以上の重心が含まれていればそれらは同一の染色体群に属すると考えた。この図の場合は破線の円内に含まれる5本の染色体が1つの染色体群を構成している。つぎにこのようにして求めた染色体群が中期核板像であるか否かは群内に含まれる染色体(粒子)の数(n)に基づいて判断した。本実験ではnが5以上、6以上、7以上、8以上、9以上および10以上の各染色体群を中期核板像とみなして自動走査を行い、nの値(nの条件)ごとに中期核板像の自動検出効率を検討した。

表1-1は自動走査によって肉眼判定による良好な核板をどの程度検出できたかを示したものである。ギムザ染色したプレパラートを用いた場合には、肉眼判定による良好な核板375個(5枚のプレパラート合計)のうち、条件1(n=5)では349個の核板(93.1%)を自動検出することができた。とくにプレパラート1および2ではこの条件のもとですべての良好な核板を検出することができた。良好な核板の検出率はnの値が大きくなるにつれて減少し、条件6(n=10)では5枚のプレパラートの平均で74.7%となった。一方無染色のプレパラートを用いた場合には、位相差染色体像のコントラストがきわめて低く、良好な核板の自動検出率は低下した。この場合は条件2(n=7)で最も良い結果が得られ、5枚のプレパラート平均で88.5%の良好な核板を検出することができた。

Table 1-1. Efficiency of metaphase detection by autoscanning

Slide	No. of good metaphases in a stained slide	No. of good metaphases detected by autoscanning						No. of good metaphases in an unstained slide	Good metaphases detected by autoscanning		
		Cond.1* (n=5)	Cond.2 (n=6)	Cond.3 (n=7)	Cond.4 (n=8)	Cond.5 (n=9)	Cond.6 (n=10)		Cond.1† (n=5)	Cond.2 (n=7)	Cond.3 (n=10)
1	68	68	62	64	63	62	42	41	29	36	29
2	67	67	67	67	67	67	61	13	11	10	6
3	83	76	68	63	67	66	60	16	14	16	6
4	83	77	76	79	74	68	59	15	—	14	9
5	74	61	58	60	49	57	58	19	—	16	9
Total	375 (100.0)‡	349 (93.1)	331 (88.3)	333 (88.8)	320 (85.3)	320 (85.3)	280 (74.7)	104 (100.0)	54 (77.1)	92 (88.5)	59 (56.7)

\* Condition (Cond.)1 to condition 6 were applied to the Giemsa-stained slides.

† Conditions 1 to 3 were applied to unstained slides under phase-contrast microscopy.

‡ Values in parentheses are percentages.

つぎに自動走査で検出された像を肉眼で検定した結果を表1-2に示した。自動検出された像の中には良好な核板以外に染色体の重なりのある核板、染色体数が揃っていない核板、前中期や後期の細胞、間期核、ごみなどが含まれていた。n=10の条件では、全検出像に占める良好な核板の割合はギムザ染色像の場合19.9%、無染色像の場合7.2%であった。

Table 1-2. Classification of the metaphase plates detected by autoscanning

Class*	Condition <sup>†</sup>						Condition <sup>‡</sup>		
	1 (n=5)	2 (n=6)	3 (n=7)	4 (n=8)	5 (n=9)	6 (n=10)	1 (n=5)	2 (n=7)	3 (n=10)
Good metaphases	12.1	14.6	17.3	18.1	19.3	19.9	3.8	6.4	7.2
Metaphases with 14 chromosomes	34.9	38.0	41.0	39.1	39.0	40.8	21.9	24.5	24.6
Other metaphases	16.0	14.6	12.3	12.9	12.1	10.3	22.9	22.5	21.7
Prophases and anaphases	16.0	14.2	14.0	14.1	13.7	12.3	6.3	3.6	3.2
Others	21.1	18.6	15.3	15.9	15.8	16.7	45.1	43.0	43.3
Total	100.0 (2887)	100.0 (2274)	100.0 (1930)	100.0 (1765)	100.0 (1661)	100.0 (1408)	100.0 (1404)	100.0 (1446)	100.0 (823)

Note: Data are given in percentages and the numbers in the parentheses are the total number of the objects automatically picked up.

\* Metaphase plates were separately counted as good metaphases, metaphases with 14 chromosomes having overlapping or attached sites, and metaphases with less than 14 chromosomes. Others include nuclei, cytoplasmic debris, etc.

† Giemsa-stained slides. Data are given on the averages of five glass-slide samples.

‡ Unstained slides. Data are given on the averages of three glass-slide samples for n=5 and on those of five glass-slide samples for n=7 and n=10.

n < 10の条件下では、nの値が減少するにつれて良好な核板とは言えない検出像が増加し、全検出像に占める良好な核板像の割合は漸減した。

### 3 論議

ギムザ染色を行ったオオムギの染色体標本ではプレパラート内にある良好な核板の90%以上が自動検出され、CHIASによる自動走査が十分実用に耐えることが示された。ただし良好な核板の検出率および全検出像に占める良好な核板の割合はnの値によりかなり変化するため、研究の目的に応じてnの値を適度に設定する必要がある。例えばプレパラート内の核板数がきわめて少なく、良好でないものも含めてできるだけ多くの核板を検出したい場合にはnの値を小さく設定し、プレパラート内の核板数が多くなるべく良好な核板だけを検出したい場合にはnの値を大きく設定することが適当と考えられる。一方無染色の染色体像を用いた場合には全検出像に占める良好な核板の割合がかなり低くなるのが問題である。これと同様の問題は、染色体とバックグラウンドとのコントラストの差の小さい分染像を用いる場合にも生じることが予想される。こうした問題を解決するためには、染色体画像を取り込む際に用いるテレビカメラの解像度の改良、あるいは画像上でバックグラウンドから染色体を抽出する際に用いるソフトウェアの改良について検討する必

要がある。

### 第3節 核型およびNバンドパターンの定量的解析

#### 1 材料および方法

材料には2条オオムギ品種「New Golden」の半数体植物 ( $n=7$ )を用いた。半数体植物は「New Golden」と *H. bulbosum* との交雑から得られたものであり、農水省農業研究センター（現熱帯農業研究センター）稲垣正典博士より譲渡された。

半数体植物より新鮮な根端を切り取り、それを0℃の蒸留水中で16、20および24時間前処理した後、メタノール-酢酸 (1:1)で1時間固定した。染色体標本は前節で述べた酵素解離-焰乾法により作製した。染色体標本は風乾後、キシレンで封入してカバーガラスをかけ、無染色のまま位相差顕微鏡で観察した。標本から全く重なりのない中期染色体像を選び、その位相差像（顕微鏡倍率2000倍）をCHIASにより画像としてとりこんだ。画像のとりこみ後、N分染法を用いて染色体の同定を行った。N分染処理は Singh and Tsuchiya(1982a)の方法に従って行い、スライドを94℃の1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液で3分間処理した後、30分間水洗し、Sørensenリン酸緩衝液 (1/15M、pH6.8)で1%に希釈したギムザ液にて数時間染色した。

CHIASによる染色体の解析は250核板の位相差染色体画像を用いて行い、N分染法により同定した染色体ごとに各腕とサテライトの長さ、面積および平均濃度を測定した。図1-4はその測定過程を示したものであり、測定手順は以下のとおりである。まず照明ムラを補正した位相差染色体画像（図1-4a）の明暗のコントラストを強調し（図1-4b）、その画像よりある濃度範囲を染色体領域として抽出し、2値画像をつくった（図1-4c）。つづいてメディアンフィルタを用いてバックグラウンドの細かいごみを取り除き、さらに残った染色体以外の部分をカーソルで指示して（図1-4d）完全に取り除いた（図1-4e）。画像の濃度反転を行って最も暗い濃度を255、最も明るい濃度を0とし、濃度の高い部分ほど濃度値が大きくなるようにした。この濃度反転画像から2値画像（図1-4e）中の染色体部分を抽出した後、各染色体を2倍の大きさに拡大した（図1-4f）。つぎに動原体および二次狭窄部位の判別を容易にするため染色体を濃度に応じて15色に着色した。着色画像上

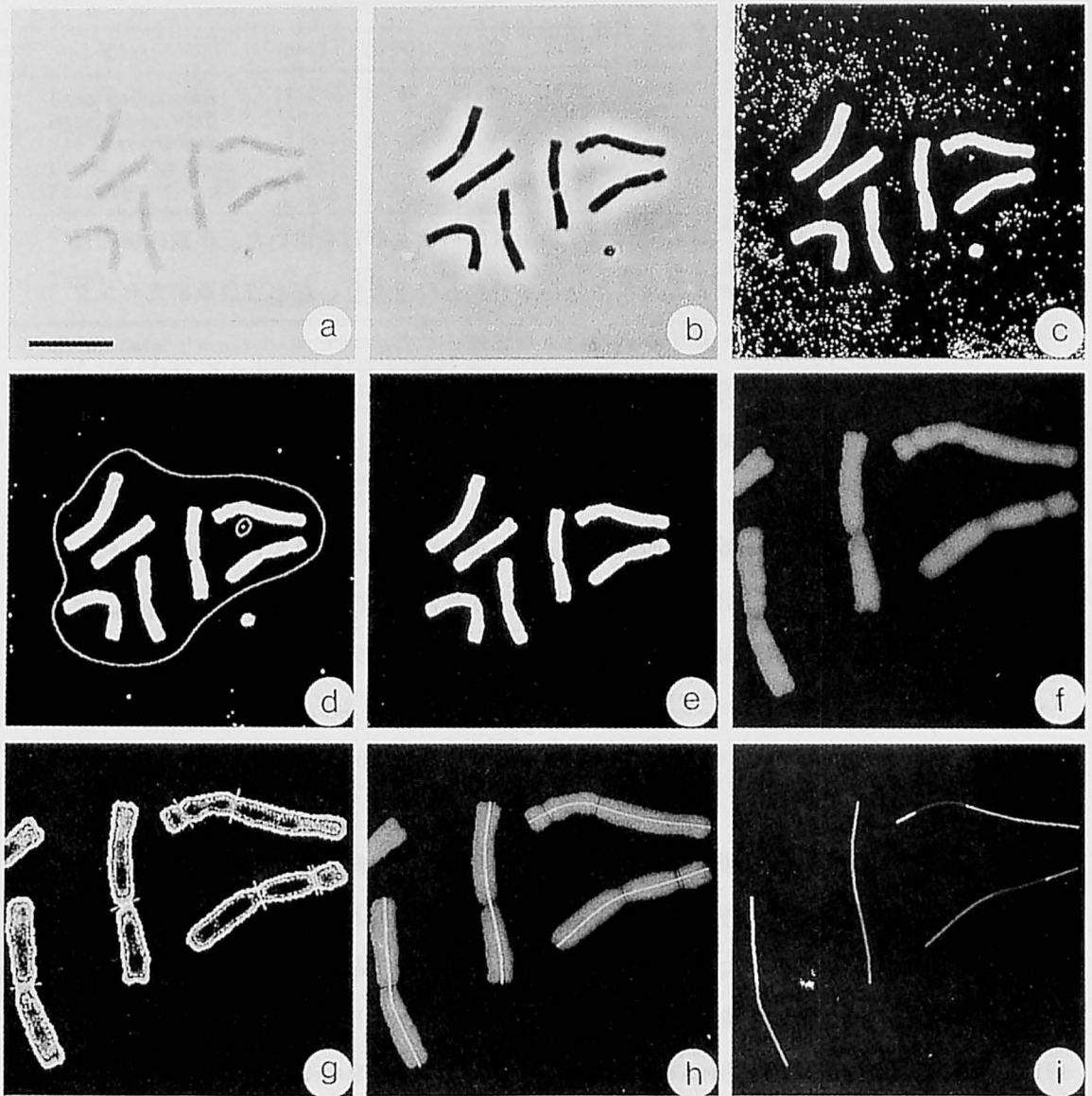


Fig.1-4. Sequential representation of major image analysis steps for the phase-contrast image of a haploid barley chromosome spread. Bar=10  $\mu$ m. A detailed explanation of each step is given in the text.

で動原体および二次狭窄部位に線を引き、染色体を2つの腕あるいは2つの腕とサテライトに分割した(図1-4g)。染色体の長さは染色体中軸部に沿って引いた線(図1-4h)の長さとし、各腕およびサテライトごとに測定した(図1-4i)。染色体の画像上の面積(以下



面積と呼ぶ) および平均濃度の測定も各腕およびサテライトごとに行った。測定終了後、染色体の長さ、面積、濃度体積およびそれらの腕比(短腕/長腕)をパラメータとして核型分析を行った。なお濃度体積とは染色体の面積とその平均濃度の積で示される値、すなわち画像上で染色体を構成している全画素の濃度値を統合した値である。測定データの統計計算はSPSS統計パッケージを用いて行った。

染色体のNバンドパターンの画像解析は20核板の良好なN分染像(図1-5に一例を示す)の染色体画像を用いて以下のように行った。まずノーマリゼーションフィルタを用いてバンドの明暗のコントラストを強調し、ついで各染色体画像を2倍の大きさに拡大した。さらにこの画像を濃度に応じて15色に着色し各バンドの境界を肉眼で判定した後、各バンドおよびインターバンドの長さを染色体中軸線の方向に沿って測定した。

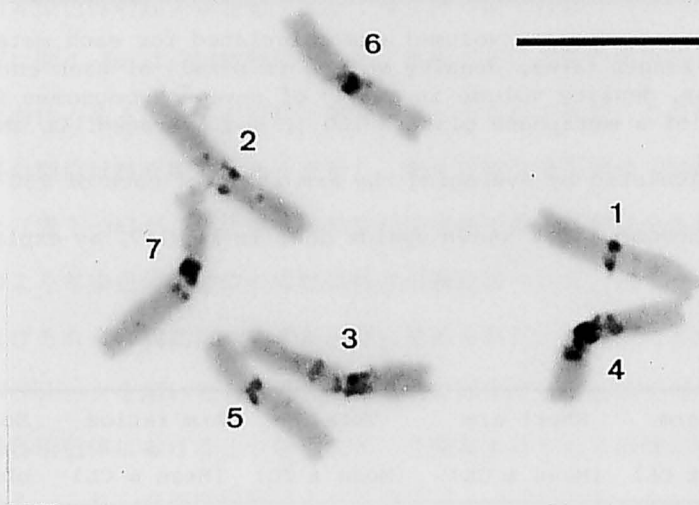


Fig.1-5. N-banded metaphase plate of haploid barley. Banded chromosomes of this quality were used to quantify the banding pattern. Bar=10  $\mu$ m.

## 2 結果

表1-3は長さ(a)、面積(b)および濃度体積(c)の3パラメータ、ならびにそれぞれの腕比について各染色体の250核板の平均値を示したものである。t-検定の結果、3つのパラメータとも多くの染色体間で統計的に有意な差( $\alpha=0.01$ )が認められたが、長さについては第3・第7染色体の間および第4・第7染色体の間で、面積および濃度体積について

Table 1-3. Mean relative values\* of length, area, density volume and their mean arm ratios of the respective chromosomes

a. Length

Chromosome	Long arm (Mean ± CL)	Short arm (Mean ± CL)	Total (Mean ± CL)	Arm ratios† (Mean ± CL)	No. of chromosomes observed
1‡	7.346±0.051	7.135±0.045	14.481±0.072	0.974±0.0086	250
2	8.425±0.058	6.947±0.054	15.371±0.085	0.827±0.0080	250
3	8.348±0.055	6.473±0.048	14.821±0.075	0.777±0.0076	250
4	7.899±0.057	6.403±0.050	14.302±0.082	0.813±0.0079	250
5	7.287±0.052	5.163±0.042	12.449±0.068	0.711±0.0074	250
6	6.988±0.049	6.651±0.047	13.639±0.073	0.954±0.0089	250
6 with sat.	6.959±0.073	4.453±0.059	11.411±0.095	0.642±0.0108	100
Sat	—	2.275±0.045	—	—	100
7	9.079±0.060	5.854±0.050	14.933±0.077	0.647±0.0071	250
7 with sat.	9.264±0.088	4.134±0.095	13.398±0.117	0.447±0.0117	71
Sat	—	1.832±0.048	—	—	71

\* Relative length (area, density volume) was calculated for each metaphase plate by the formula [ length (area, density volume in pixel) of each chromosome / total length (area, density volume in pixel) of seven chromosomes including satellites (sat.) of a metaphase plate x 100 ], and averaged. CL shows 95% confidence limit.

† Arm ratio was calculated by averaging the arm ratio of each of 250 chromosomes.

‡ Idiogram of chromosome 1 was shown upside down in Fig.1-7, as explained in the text.

b. Area

Chromosome	Long arm (Mean ± CL)	Short arm (Mean ± CL)	Total (Mean ± CL)	Arm ratios (Mean ± CL)	No. of chromosomes observed
1	7.372±0.062	7.143±0.058	14.516±0.092	0.973±0.0116	250
2	8.406±0.066	6.968±0.063	15.373±0.101	0.831±0.0089	250
3	8.330±0.067	6.518±0.058	14.848±0.096	0.785±0.0088	250
4	7.939±0.068	6.524±0.058	14.463±0.100	0.825±0.0087	250
5	7.292±0.064	5.172±0.055	12.465±0.094	0.712±0.0088	250
6	7.109±0.056	6.569±0.056	13.678±0.088	0.927±0.0095	250
6 with sat.	7.097±0.088	4.282±0.067	11.379±0.132	0.605±0.0092	100
Sat	—	2.313±0.054	—	—	100
7	9.048±0.072	5.612±0.051	14.660±0.088	0.623±0.0076	250
7 with sat.	9.229±0.130	3.815±0.091	13.044±0.147	0.415±0.0122	71
Sat	—	1.808±0.064	—	—	71

Table 1-3. (Continued)

## c. Density volume

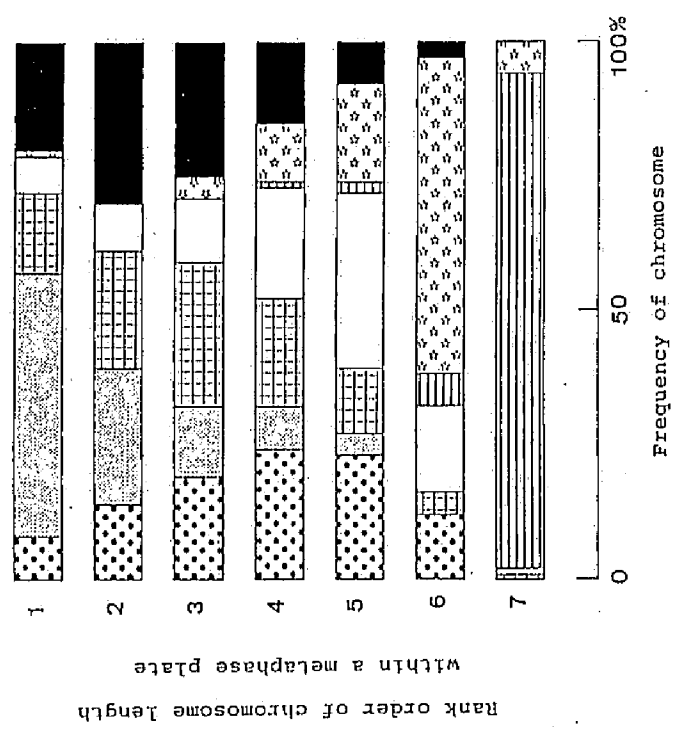
Chromosome	Long arm (Mean $\pm$ CL)	Short arm (Mean $\pm$ CL)	Total (Mean $\pm$ CL)	Arm ratios (Mean $\pm$ CL)	No. of chromosomes observed
1	7.373 $\pm$ 0.065	7.125 $\pm$ 0.062	14.499 $\pm$ 0.095	0.971 $\pm$ 0.0116	250
2	8.348 $\pm$ 0.069	6.966 $\pm$ 0.069	15.314 $\pm$ 0.107	0.837 $\pm$ 0.0099	250
3	8.335 $\pm$ 0.070	6.572 $\pm$ 0.064	14.907 $\pm$ 0.102	0.792 $\pm$ 0.0098	250
4	7.943 $\pm$ 0.071	6.592 $\pm$ 0.061	14.535 $\pm$ 0.103	0.834 $\pm$ 0.0097	250
5	7.264 $\pm$ 0.070	5.218 $\pm$ 0.060	12.483 $\pm$ 0.099	0.722 $\pm$ 0.0103	250
6	7.118 $\pm$ 0.058	6.572 $\pm$ 0.059	13.690 $\pm$ 0.089	0.927 $\pm$ 0.0105	250
6 with sat.	7.119 $\pm$ 0.091	4.304 $\pm$ 0.070	11.424 $\pm$ 0.135	0.606 $\pm$ 0.0098	100
Sat	————	2.286 $\pm$ 0.058	————	————	100
7	8.976 $\pm$ 0.074	5.610 $\pm$ 0.057	14.586 $\pm$ 0.088	0.628 $\pm$ 0.0086	250
7 with sat	9.181 $\pm$ 0.134	3.813 $\pm$ 0.096	12.994 $\pm$ 0.150	0.417 $\pm$ 0.0131	71
Sat	————	1.756 $\pm$ 0.069	————	————	71

は第1・第4染色体の間および第1・第7染色体の間で有意差 ( $\alpha=0.05$ )が認められなかった。つぎに図1-6aは250核板について1核板ごとに各染色体の長さの順位を決定した後、各順位内に占める染色体の種類と頻度を示したものである。この図から明らかなように染色体長の順位は核板間で大きく変動し、例えば第2染色体は250核板の平均値では最長であった(表1-3a)が、第2染色体が最長染色体である核板は全体の約50%にすぎなかった。このような染色体の順位の変動は長さの腕比について(図1-6b)、さらに面積、濃度体積およびそれらの腕比についても同様に認められた。以上のことから明らかなように、いずれのパラメータを用いても各染色体を完全に同定することは不可能であった。

表1-4は各染色体における3つのパラメータ間およびそれらの腕比間の相関係数を示したものである。これらの相関係数はすべて有意 ( $\alpha=0.01$ )であった。長さと同面積間、長さと同濃度体積間、およびそれぞれの腕比間の相関係数はいずれの染色体ともほぼ0.5~0.7の範囲の値を示したのに対し、面積と同濃度体積間およびそれらの腕比間の相関係数は7本の染色体の平均でそれぞれ0.928および0.952と非常に高い値を示した。したがって面積と同濃度体積とは互いに代替可能なパラメータであると考えられた。

つぎに長さ、面積および濃度体積のうちどのパラメータが染色体の識別に最も有効であるかを見出すため、各パラメータに関する分散分析を行った。その結果、表1-5aに示すように、3つのパラメータとも分散比(F)は0.1%水準で有意となったが、F値は長さ、面積、濃度体積の順で大きくなった。これと同様の結果は3つのパラメータの腕比に関し

**a**



- : chromosome 1
- : chromosome 2
- : chromosome 3
- : chromosome 4
- : chromosome 5
- : chromosome 6
- : chromosome 7

**b**

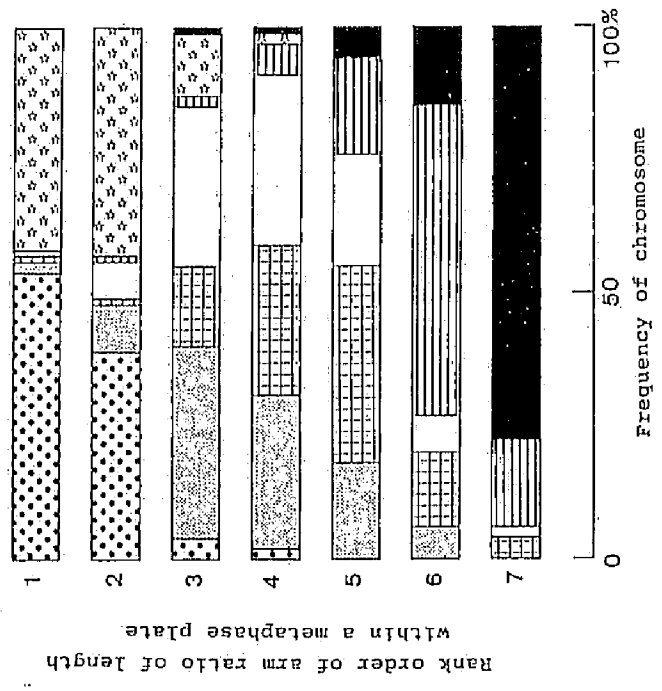


Fig. 1-6. Frequencies of chromosomes 1 to 7 with respect to the rank order of chromosome length(a) and arm ratio of length(b) within a metaphase plate. The lengths of satellites of chromosomes 6 and 7 are involved in their short arms.

Table 1-4. Correlation coefficients between length (L), area (A) and density volume (DV)

a. Total volume

Chromosome	L : A	L : DV	A : DV
1	0.649	0.605	0.915
2	0.682	0.622	0.930
3	0.650	0.619	0.938
4	0.660	0.647	0.940
5	0.699	0.651	0.944
6	0.703	0.641	0.919
7	0.585	0.494	0.912
Average	0.661	0.611	0.928
SE	0.015	0.021	0.005

b. Arm ratio

Chromosome	L : A	L : DV	A : DV
1	0.579	0.583	0.946
2	0.593	0.583	0.955
3	0.666	0.643	0.949
4	0.522	0.502	0.949
5	0.589	0.573	0.962
6	0.621	0.594	0.947
7	0.609	0.593	0.953
Average	0.597	0.582	0.952
SE	0.017	0.016	0.002

でも得られた (表 1-5b)。また 3つのパラメータのうち、最大染色体 (第 2 染色体) と最小染色体 (第 5 染色体) 間の平均値の差は長さにおいて最大となり、各染色体の平均値の信頼区間 ( $\alpha=0.05$ ) の大きさは長さにおいて最小となっていた (表 1-3a)。以上の結果から長さ、面積および密度体積のうち、オオムギ染色体の識別に最も有効なパラメータは長さであると結論された。

図 1-7 はオオムギ染色体の N 分染像のイディオグラムを示したものである。この図では染色体の各腕の長さは 250 核板の相対長の平均値 (表 1-3a)、各バンドの位置および幅は 20 核板の N 分染像の画像解析により得られたデータに基づいている。また 95% 以上の頻度 (調査した 20 本の染色体中 19 本以上) で出現したバンドは安定したバンドとみなして黒のバンドで表し、45% 以上 95% 未満の頻度で出現したバンドは不安定なバンドとみなして線影のバンドとして表した。出現頻度が 45% 未満のバンドは省略した。また安定したバンド

Table 1-5. Analysis of variance of the parameters

## a. Length, area and density volume

Parameter	Source	Sum of squares	D.F.	Mean square	F ratio
Length	Between chromosomes	1428.17	6	238.03	629.112***
	Within chromosomes	659.48	1743	0.378	
	Total	2087.65	1749		
Area	Between chromosomes	1352.02	6	225.34	389.332***
	Within chromosomes	1008.81	1743	0.579	
	Total	2360.84	1749		
Density volume	Between chromosomes	1311.94	6	218.66	351.496***
	Within chromosomes	1084.28	1743	0.622	
	Total	2396.22	1749		

## b. Arm ratios of length, area and density volume

Parameter	Source	Sum of squares	D.F.	Mean square	F ratio
Length	Between chromosomes	21.3455	6	3.5576	868.763***
	Within chromosomes	7.1376	1743	0.0041	
	Total	28.4831	1749		
Area	Between chromosomes	21.5156	6	3.5859	677.691***
	Within chromosomes	9.2229	1743	0.0053	
	Total	30.7385	1749		
Density volume	Between chromosomes	20.4107	6	3.4018	511.391***
	Within chromosomes	11.5944	1743	0.0067	
	Total	32.0051	1749		

間の染色体領域を1つの主領域として定め、各染色体の右横に示すように各バンドおよびインターバンドに領域番号を割り当てた。これらの領域の長さ、動原体から各バンドの中心位置までの距離および各バンドの出現頻度は表1-6に示すとおりである。7本の染色体上で合計38個のバンドの位置と幅が決定され、それらのうち80%以上のバンドは安定して出現するものであった。

## 3. 論議

従来、染色体長や腕比などの定量的データの測定には通常10核板20本程度の染色体が用いられてきた。これに対してCHIASを用いた場合には、染色体写真の作成過程を省き、半自動的な測定を行うことによって従来に比べごく短期間のうちに大量の染色体を解析す

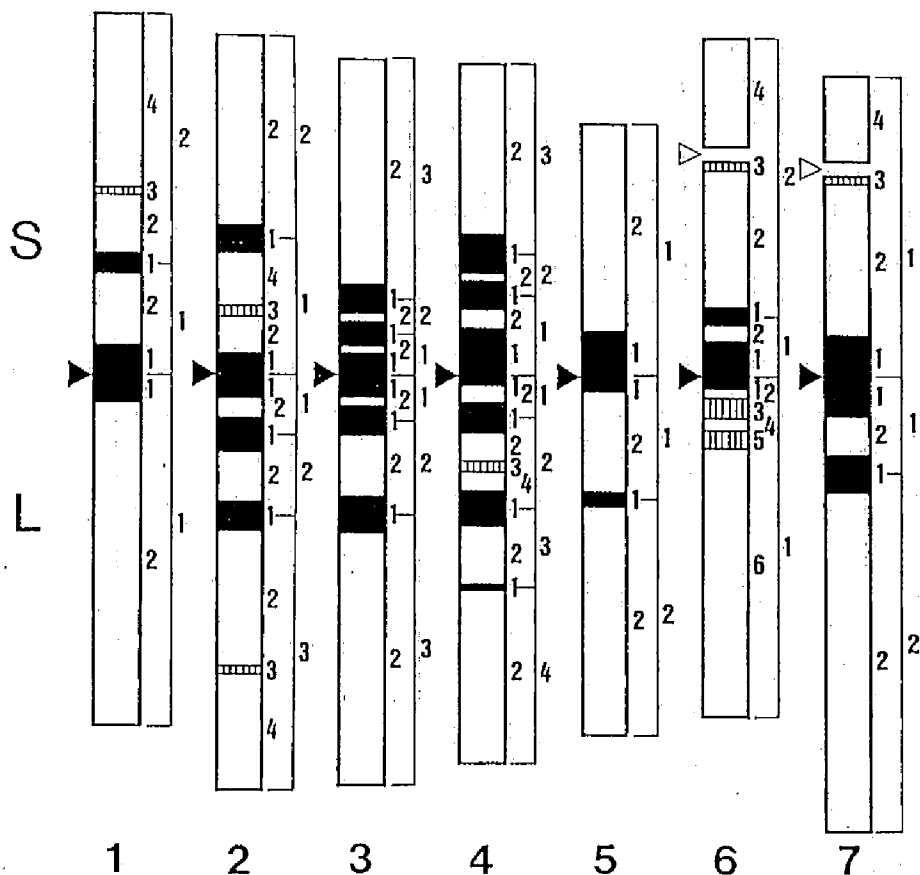


Fig.1-7. Quantitative idiogram of barley chromosomes constructed on the basis of data from 250 metaphase plates and from 20 N-banded plates. The contour of each chromosome and the position of band were based on the former and the latter, respectively. ▷, nucleolar organizing region; ▶, centromere. Closed and hatched bands indicate stable and unstable bands, respectively. S and L, upper and lower arm, respectively.

ることが可能であった。また各パラメータの測定精度もCHIASを用いることによって従来より格段に高まると考えられる。したがって本実験で得られたオオムギの核型に関するデータは250本という大量の染色体の解析に基づく従来にない正確なものであると考えられる。

オオムギにおいては従来、第1染色体の2つの腕の長さの大小関係が問題となっている。すなわち第1染色体は中部動原体型で両腕の長さの差異が小さいため、いずれの腕を長腕、短腕とするかが研究者によって異なっている。本実験では中間部に2つのバンドをもつ腕の方がもう一方の腕よりも長くなった ( $\alpha = 0.001$ ; 表 1-3a および図 1-7 参照)。この結果はLinde-Laursen(1978)、Noda and Kasha(1978)およびIslam(1980)の結果と一致した

Table 1-6. Regions, center position, width and frequencies of N-bands of barley chromosomes\*

	Chromosome 1				Chromosome 2				Chromosome 3				Chromosome 4			
	Region	CP	Width	Freq.	Region	CP	Width	Freq.	Region	CP	Width	Freq.	Region	CP	Width	Freq.
S	2.4	—	35.8	—	2.2	—	39.2	—	3.2	—	46.1	—	3.2	—	35.1	—
	2.3	37.1	1.1	9	2.1	27.3	5.9	19	3.1	15.3	6.5	20	3.1	24.8	8.2	20
	2.2	—	12.1	—	1.4	—	10.5	—	2.2	—	0.6	—	2.2	—	1.5	—
	2.1	22.3	4.3	20	1.3	12.9	2.0	11	2.1	8.5	5.9	20	2.1	16.3	5.9	20
	1.2	—	14.2	—	1.2	—	7.2	—	1.2	—	1.1	—	1.2	—	3.8	—
CEN	1.1	3.0	6.0	20	1.1	2.4	4.7	20	1.1	2.2	4.5	20	1.1	4.8	9.5	20
L	1.1	3.0	6.0	20	1.1	2.4	4.7	20	1.1	2.2	4.5	20	1.1	1.0	1.9	20
	1.2	—	65.3	—	1.2	—	4.1	—	1.2	—	1.7	—	1.2	—	3.3	—
					2.1	12.1	6.7	20	2.1	9.1	5.9	19	2.1	8.4	6.5	20
					2.2	—	10.2	—	2.2	—	12.2	—	2.2	—	5.5	—
					3.1	28.7	6.0	20	3.1	28.1	7.6	20	2.3	18.2	2.1	17
					3.2	—	27.4	—	3.2	—	51.6	—	2.4	—	3.8	—
					3.3	59.6	1.1	10					3.1	26.8	7.5	20
					3.4	—	24.0	—					3.2	—	11.7	—
												4.1	42.8	1.1	19	
												4.2	—	35.6	—	

	Chromosome 5				Chromosome 6				Chromosome 7			
	Region	CP	Width	Freq.	Region	CP	Width	Freq.	Region	CP	Width	Freq.
S					2.4	—	22.8	—				
					2.3	43.5	2.1	10				
					2.2	—	28.3	—	1.4	—	18.3	—
					2.1	12.2	3.8	19	1.3	40.8	1.1	11
		1.2	—	42.4	—	1.2	—	3.1	—	1.2	—	31.6
CEN	1.1	4.6	9.2	20	1.1	3.6	7.2	20	1.1	4.3	8.6	20
L	1.1	1.6	3.1	20	1.1	1.2	2.4	20	1.1	4.1	8.1	20
	1.2	—	20.5	—	1.2	—	2.0	—	1.2	—	7.7	—
	2.1	24.9	2.7	20	1.3	6.3	3.8	13	2.1	19.7	7.9	20
	2.2	—	46.6	—	1.4	—	2.9	—	2.2	—	69.0	—
					1.5	12.9	3.6	17				
				1.6	—	54.9	—					

Note: CP, center position of the band from the centromere; Freq., frequency; CEN, centromere.  
 \* Location of the chromosome 1 is based on the idiogram of Fig.1-7.



が、現在のオオムギ連鎖地図における表記(Singh and Tsuchiya 1982b)とは逆である。しかしながら、連鎖地図における染色体腕の表記の変更は研究者間での混乱を招くと考え、図1-7のイデオグラムでは表1-3aにおける第1染色体の長腕と短腕とを逆にして示してある。オオムギの染色体腕の表記法については今後、L(長腕)、S(短腕)のような長さに基づく表記のシステムを変更した方がよいかもしれない。また本実験において核板内における染色体の長さあるいは腕比の順位が核板間で大きく変動することが示された(図1-6)が、この点に関してはつぎの第4節で詳細に検討する。

長さ、面積および濃度体積はそれぞれ染色体の1次、2次および3次のパラメータである。実験開始当初、次元の高いパラメータほど得られる情報量が多いため、染色体の識別にはこれらのパラメータのうち濃度体積が最も有効であろうと考えられた。しかしながら本実験の結果、染色体の識別には次元の低いパラメータの方が有効であることが明らかとなった。これはパラメータの次元が高くなるに従い、染色体の識別に有効な情報よりも測定誤差の方が増加したためであると推察される。また面積と濃度体積間の相関がきわめて高かったこと(表1-4)から、無染色の位相差染色体像の濃度は染色体間であまり差がないと考えられる。

本実験で得られたオオムギ染色体のNバンドパターンは概ね過去に報告されたパターン(Islam 1980; Linde-Laursen 1981; Singh and Tsuchiya 1982b)と一致していた。しかしながら、例えばIslam(1980)の報告では4L-1.1部位のバンド(図1-7参照)、Linde-Laursen(1981)の報告では2L-3.3、6S-2.3および7S-1.3部位のバンド(図1-7参照)が認められていない。このようなバンドパターンの差異に関しては、本論文第3章第2節で詳細に検討する。

図1-8は第6染色体における染色体の実際の長さとの連鎖分析に基づく図距離(Kleinhofs et al. 1988)とを比較したものである。第6染色体のサテライト、短腕および長腕の長さはそれぞれ全体の17%、33%および51%である(表1-3a)。ところが連鎖地図上ではこれらはそれぞれ全体の48%、12%および40%となり、実際の長さにはサテライトの図距離が大きく、短腕の図距離が小さく算出されている。このような相違はしばしば認められる現象であり、染色体の単位長さ当たりの組換え率が染色体部位により異なるために生じると考えられている。したがって、もしある遺伝子をそれと密接連鎖するマーカーDNAから染色体歩行を行ってクローニングしようとする場合には、両者の間の実際の染色体上の距

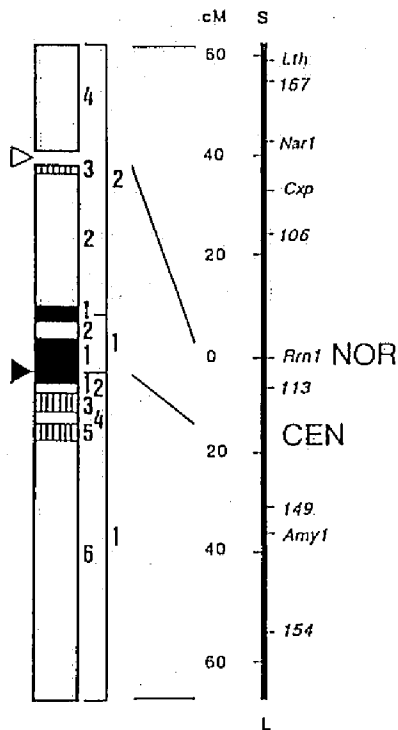


Fig.1-8. Chromosome maps of barley chromosome 6 constructed by the image analysis method and linkage analysis (right hand side, Kleinhofs et al.1988). S,L, NOR, and CEN: short arm, long arm, nucleolar organizing region, and centromere, respectively. Numbers and letters beside the map are restriction fragment numbers and genes. The location of the centromere was based on personal communication from Prof. A. Kleinhofs, Washinton State University.

離に注意を払う必要がある。このような観点から、今後オオムギにおいて遺伝子やDNAマーカーの連鎖地図上の位置と実際の染色体上の位置との対応づけを進める必要があるが、本実験で確立した染色体の定量的なイデオグラムはそのような作業を行う上で基礎になるものと考えられる。

#### 第4節 分裂ステージの進行にともなう核型の変化

##### 1 材料および方法

前節において測定したオオムギの中期 250核板における各染色体および各染色体腕の長さ、ならびに各染色体の長さの腕比（短腕/長腕）のデータを用いて以下の計算を行った。

中期1核板内の全染色体の長さの合計値（実測値、以下総染色体長と記す）は時間とともに一定の割合で減少するとの仮説のもとに、以下の方法でステージ指数を定めた。250核板の総染色体長の分布は平均 $64.9\mu\text{m}$ 、標準偏差  $9.1\mu\text{m}$ の正規分布（レンジ $42.3-95.9\mu\text{m}$ ）に従っていた（ $0.2 < P$ 、Kolomogorov-Smirnov 検定による）。そこでその平

均値と標準偏差に基づいて総染色体長の左側20%から右側20%まで20%ごとに5つの信頼区間を推定し、これらをそれぞれステージ5からステージ1と定めた。すなわちステージ1は中期内の最も早い時期を、ステージ5は中期内の最も遅い時期すなわち完全中期を示すものである。つぎに250個の核板をこれらの5つのステージに分類し、各ステージごとに各染色体(腕)の相対長および腕比の平均値と標準偏差を計算した。また1核板ごとに各染色体の長さおよび腕比の順位を決定した後、ステージ別に各順位内に占める染色体の種類と頻度を調査した。

染色体の凝縮率は以下のように計算した。各染色体の実測値Yは総染色体長をXとすると、 $Y = f(X)$ なる回帰式で表される。染色体の相対凝縮率(RCR)は各染色体長(Y)の減少率と総染色体長(X)の減少率との比で表すことができる。YがXの1次回帰式 $Y = a + bX$ で表され、Xが10%減少するときのYの減少率をRCRとすれば、RCRは

$$RCR = [a + b(X + 0.1X) - (a + bX)] / a + bX \times 10 = bX / a + bX$$

なる式で表すことができる。

## 2 結果

各ステージの総染色体長の範囲と各ステージに含まれる核板数は以下のとおりであった。ステージ1: 72.6-95.9  $\mu\text{m}$ 、44核板; ステージ2: 67.2-72.5  $\mu\text{m}$ 、49核板; ステージ3: 62.7-67.1  $\mu\text{m}$ 、54核板; ステージ4: 57.3-62.6  $\mu\text{m}$ 、60核板; ステージ5: 42.3-57.2  $\mu\text{m}$ 、43核板。

### 分裂ステージの進行にともなう各染色体の相対長および腕比の変化のパターン

図1-9は分裂ステージの進行にともなう各染色体の相対長の平均値の変化を示したものである。分散分析の結果、第7染色体においてステージ間で相対長に有意差( $\alpha = 0.05$ )認められた。第7染色体の相対長は分裂ステージの進行にともない減少し、ステージ3とステージ4、5の間( $\alpha = 0.05$ )、およびステージ1とステージ4、5の間( $\alpha = 0.01$ )で有意差が認められた(LSD検定による)。つぎに第7染色体と第3染色体の相対長を比較すると、250本の平均値では第7染色体の方が第3染色体よりも大きかったが、ステージ4および5では両者はほとんど等しく、とくにステージ4では第7染色体よりも第3染色

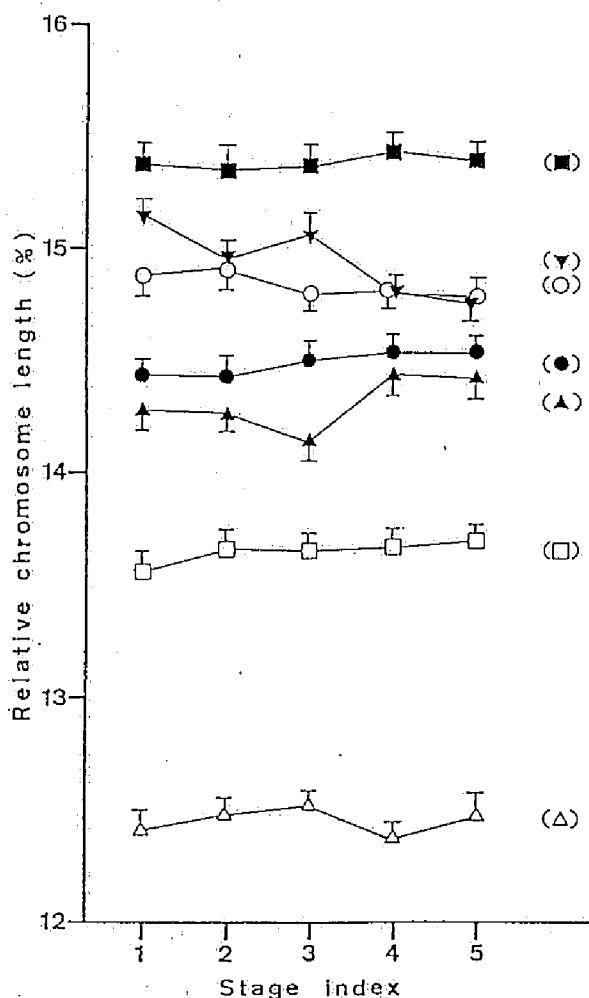


Fig.1-9. Relative length of each chromosome at the five mitotic stages.  
 ●:chromosome 1, ■:chromosome 2, ○:chromosome 3, ▲:chromosome 4,  
 △:chromosome 5, □:chromosome 6, ▼:chromosome 7. Symbols in  
 parentheses indicate the average relative lengths of individual  
 chromosomes in 250 metaphase plates.

体の方が大きくなっていた。このことは、2本の染色体の長さが類似している場合には、両者の長さの大小関係が分裂中期内のステージ間で逆転することがあることを示している。

図1-10は分裂ステージの進行にともなう各染色体腕の相対長の平均値の変化を示したものである。分散分析の結果、ステージ間で相対長に有意差が認められた染色体腕は第4染色体短腕(4S;  $\alpha=0.01$ )、第7染色体長腕(7L;  $\alpha=0.01$ )および第5染色体長腕(5L;  $\alpha=0.05$ )であった。7Lの相対長は分裂ステージの進行にともない減少し、

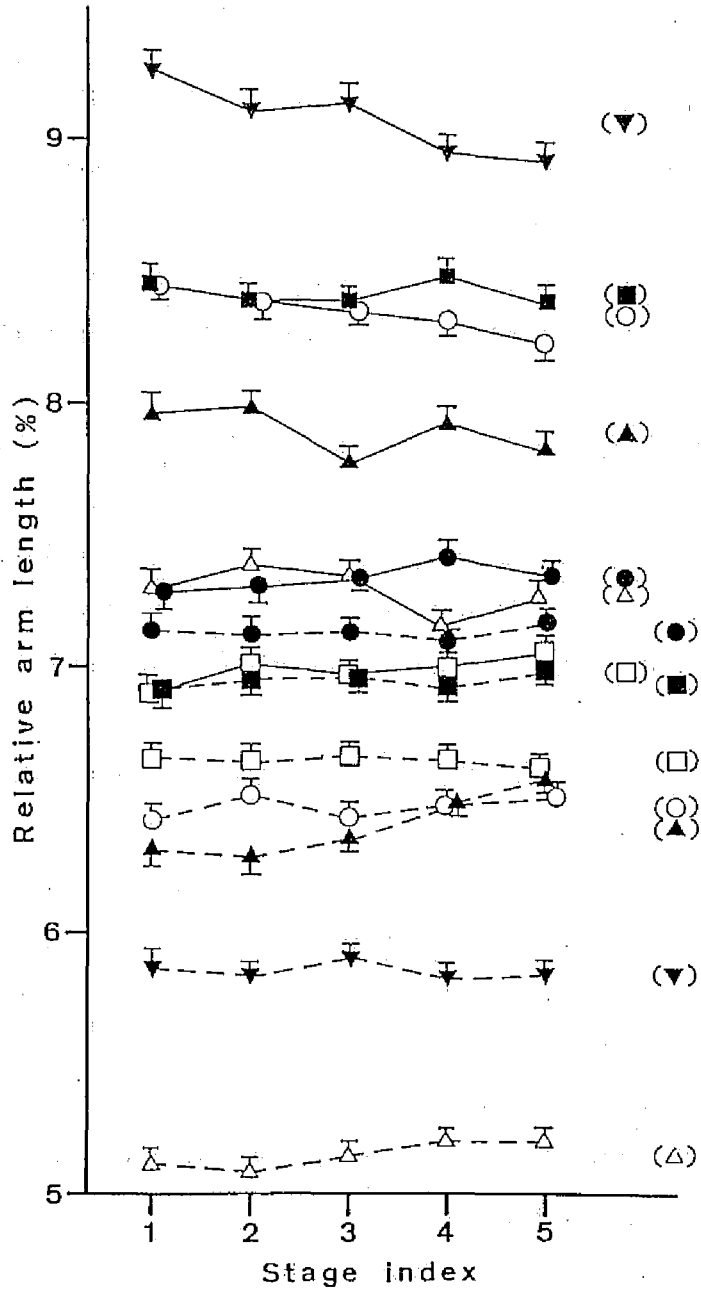


Fig.1-10. Relative length of each chromosome arm at the five mitotic stages. Symbols correspond to the same chromosome numbers shown in Fig.1-9. The solid line and the broken line indicate the long and the short arm of each chromosome, respectively. Symbols in parentheses indicate the average relative lengths of individual chromosome arms in 250 metaphase plates.

ステージ1とステージ4 ( $\alpha=0.01$ )、5 ( $\alpha=0.001$ )の間、およびステージ3とステージ4、5 ( $\alpha=0.05$ )の間で有意差が認められた(LSD検定による)。一方4 Sの相対長は分裂ステージの進行にともない増加し、ステージ1とステージ4 ( $\alpha=0.05$ )、5 ( $\alpha=0.001$ )の間、ステージ2とステージ4 ( $\alpha=0.01$ )、5 ( $\alpha=0.001$ )の間、およびステージ3とステージ5 ( $\alpha=0.01$ )の間で有意差が認められた(LSD検定による)。図1-9で認められた分裂ステージの進行にともなう第7染色体の相対長の減少については、7 Sの相対長がステージ間でほぼ一定であることから、7 Lの相対長の減少により生じたものと考えられる。

長さの類似する染色体腕の間ではそれらの相対長の大小関係がステージ間で様々に変化した。例えば2 Lおよび3 Lの相対長はステージ1から3まではほぼ等しかったが、ステージ4および5では両者に差が認められるようになった。一方6 Sと4 Sの間では分裂ステージの進行にともない両者の長さの差が縮まり、ステージ5ではほとんど差が認められなくなった。また6 S、3 Sおよび4 Sにおける相対長の大小関係をみると、ステージ1~3では6 S > 3 S > 4 Sであったのが、ステージ4では6 S > 3 S  $\geq$  4 Sとなり、さらにステージ5では6 S  $\geq$  4 S  $\geq$  3 Sとなった。また5 Lと1 Lの間でもステージ間で両者の相対長の大小関係が変化した。

図1-11は分裂ステージの進行にともなう各染色体の腕比の変化を示したものである。ステージ間で腕比に有意差が認められた染色体は第4および第5染色体(それぞれ $\alpha=0.001$ および $\alpha=0.01$ 、Kruskal-Wallis検定による)であった。とくに第4染色体の腕比は分裂ステージの進行にともなって増加したが、これは4 Sの相対長の増加(図1-10)によるものと考えられる。また分裂ステージが進むにつれ第3および第7染色体の腕比は増加、第6染色体の腕比は減少する傾向を示した。第2染色体と第4染色体の腕比の大きさはステージ1~3では第2染色体 > 第4染色体であったが、ステージ4および5では全核板における平均値の大きさとは逆に第4染色体 > 第2染色体となった。

以上の結果から、染色体の相対長および腕比は分裂中期内のステージ間で様々に変化し、染色体によってはそれらが分裂ステージの進行にともない増加または減少することが明らかとなった。

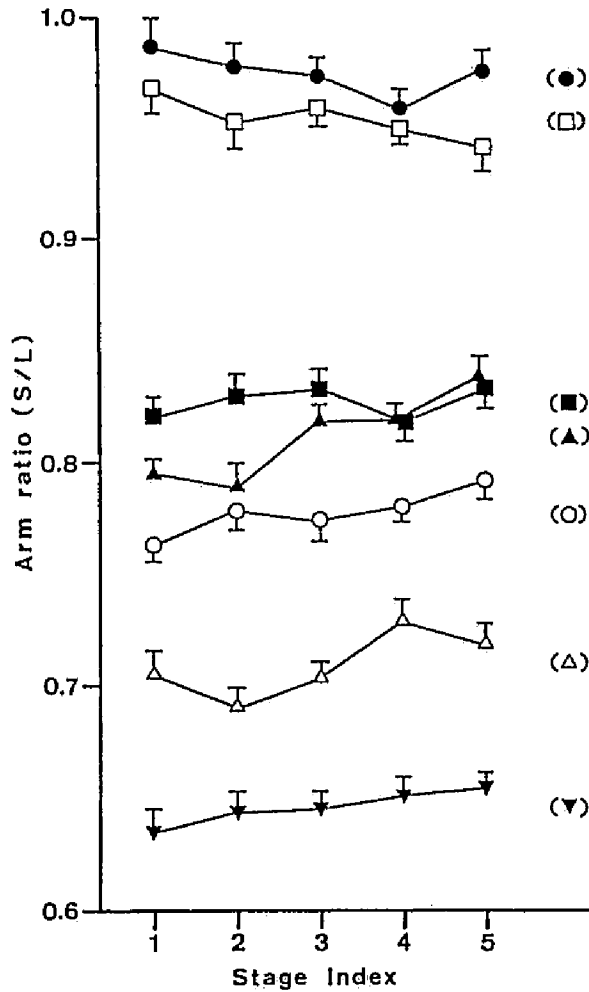


Fig.1-11. Arm ratio of each chromosome at the five mitotic stages. Symbols correspond to the same chromosome numbers shown in Fig.1-9. Symbols in parentheses indicate the average arm ratios of individual chromosomes in 250 metaphase plates.

#### 染色体長および腕比に関する各染色体の核板内順位の変化

前節において、1核板内における各染色体の長さの順位は核板間で大きく変動することが示された(図1-6a)。ここでは核板内における染色体長の順位がステージ間でどのように変化するかを調査した。その結果は図1-12に示すとおりである。まず核板内において最長(Rank 1)となる染色体の頻度についてみると、分裂ステージが進むにつれ第2染色体が最長となる核板の割合が増加し、第7染色体が最長となる核板の割合は減少する傾向

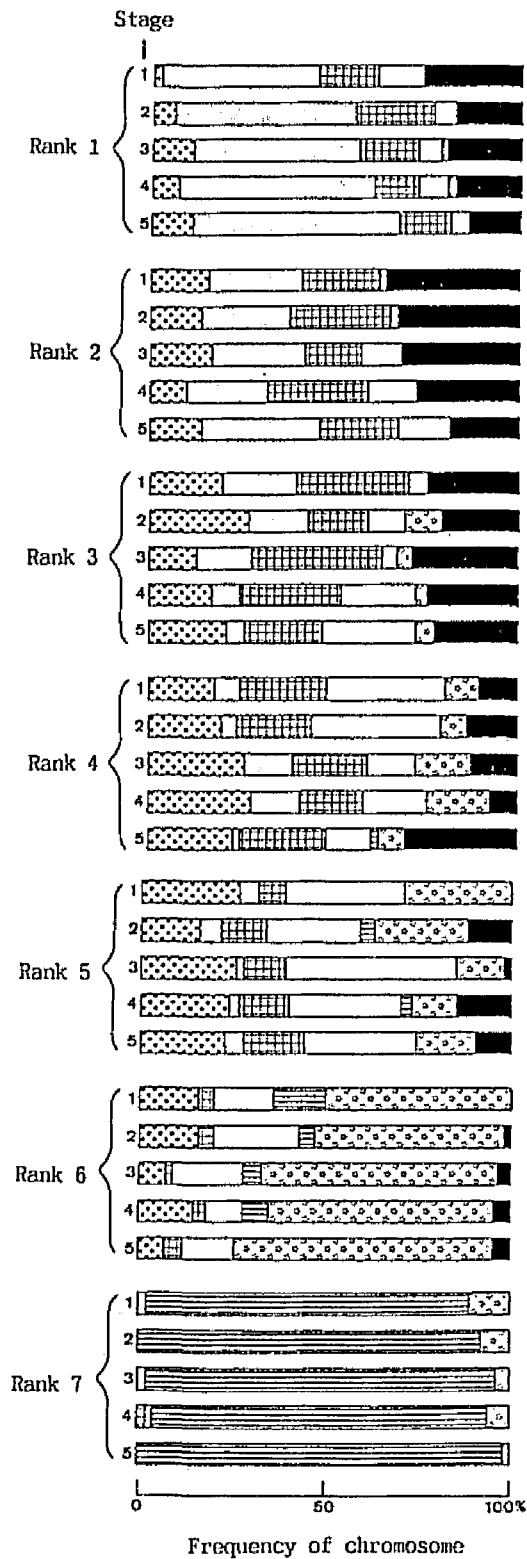


Fig.1-12. Rank order occupation ratio of each chromosome in length at the five mitotic stages. Rank indicates the rank order of chromosome length within a metaphase plate.



が認められる。またRank 2のグラフに示されるように第7染色体が2番目に長くなる核板の割合は分裂ステージが進むにつれ減少する傾向を示した。これらの傾向は、分裂ステージの進行にともない第2染色体の相対長がほぼ一定であるのに対し、第7染色体では相対長が減少すること(図1-9)から生じたものと考えられる。一方第4染色体は250核板の平均値では5番目に長い染色体であった(図1-9)が、分裂ステージが進むにつれこの染色体が2番目および3番目に長くなる核板の割合が増加する傾向が認められた。これは図1-9に示されるように、ステージ4および5において第4染色体と第7および第3染色体との間で相対長の差が縮まっていることに関連していると考えられる。

図1-13は核板内における腕比に関する染色体の順位の変化をステージ別に示したものである。まずRank 1のグラフに示されるように、分裂ステージの進行にともなって第1染色体の腕比が最大となる核板の割合が増加し、第6染色体の腕比が最大となる核板の割合が減少する傾向が認められた。250核板の平均値では第1染色体の腕比が最大となっていた(図1-11)が、ステージ1においては第1染色体よりも第6染色体の腕比が最大となる核板の方が多くなっていた。また第2および第4染色体の間では両者の腕比の大きさがステージ間で逆転した(図1-11)が、このことと対応するようにステージ1から3までは第2染色体の腕比が第3位となる核板の割合が第4染色体のそれを上回り、ステージ4および5では逆に第4染色体が第3位となる核板の割合が第2染色体のそれを上回っていた。

以上の結果から、核板内における染色体長および腕比に関する各染色体の順位は分裂ステージ間で様々に変化すること、さらにそれらの変化のパターンはステージ間での各染色体または染色体腕の相対長の平均値の変化と密接に関連していることが明らかとなった。

#### 分裂ステージの進行にともなう染色体の凝縮率の変化

表1-7に示すように各染色体および各染色体腕の長さはすべて総染色体長に関する1次回帰式で表すことができた。図1-14はこの回帰式に基づいて染色体腕ごとに分裂ステージの進行にともなう相対凝縮率(RCR)の変化のパターンを示したものである(計算式は材料および方法参照)。ここで総染色体長が10%減少するときに長さの減少率が10%より大きくなる染色体腕は $RCR > 1$ 、10%より小さくなる染色体腕は $RCR < 1$ となる。各分裂ステージにおけるRCRは染色体腕間で様々に異なっており、分裂ステージの進行にともなう凝縮率の変化のパターン(凝縮パターン)も大きくなるものからほとんど変化しないもの、小さくなるものまで染色体腕によって様々であった。

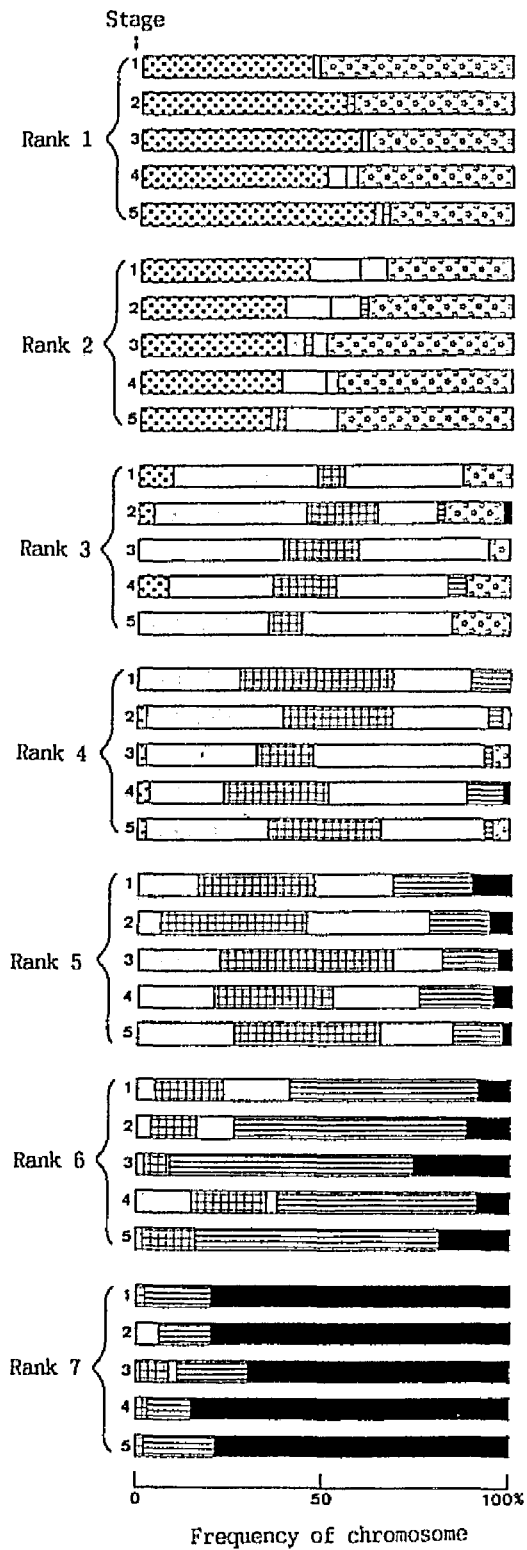


Fig.1-13. Rank order occupation ratio of each chromosome in arm ratio at the five mitotic stages. Rank indicates the rank order of arm ratio within a metaphase plate.

Table 1-7. Regression equations of chromosome ( $Y_T$ ), long arm ( $Y_L$ ) and short arm ( $Y_S$ ) length for the total chromosome length within a metaphase plate ( $X$ )

Chromosome	Regression equation	r
1	$Y_T = 0.2187 + 0.1414X$	0.9598
	$Y_L = 0.2431 + 0.0697X$	0.9208
	$Y_S = -0.0244 + 0.0717X$	0.9385
2	$Y_T = 0.0155 + 0.1535X$	0.9507
	$Y_L = -0.1448 + 0.0865X$	0.9319
	$Y_S = 0.1603 + 0.0670X$	0.9020
3	$Y_T = -0.2165 + 0.1516X$	0.9603
	$Y_L = -0.3234 + 0.0886X$	0.9424
	$Y_S = 0.1070 + 0.0631X$	0.9135
4	$Y_T = 0.2534 + 0.1390X$	0.9463
	$Y_L = -0.0263 + 0.0794X$	0.9208
	$Y_S = 0.2796 + 0.0596X$	0.8961
5	$Y_T = 0.1477 + 0.1222X$	0.9524
	$Y_L = -0.0932 + 0.0743X$	0.9269
	$Y_S = 0.2409 + 0.0479X$	0.8920
6	$Y_T = 0.1708 + 0.1337X$	0.9523
	$Y_L = 0.1566 + 0.0674X$	0.9210
	$Y_S = 0.0142 + 0.0663X$	0.9212
7	$Y_T = -0.6514 + 0.1596X$	0.9658
	$Y_L = -0.5312 + 0.0991X$	0.9465
	$Y_S = -0.1202 + 0.0604X$	0.8983

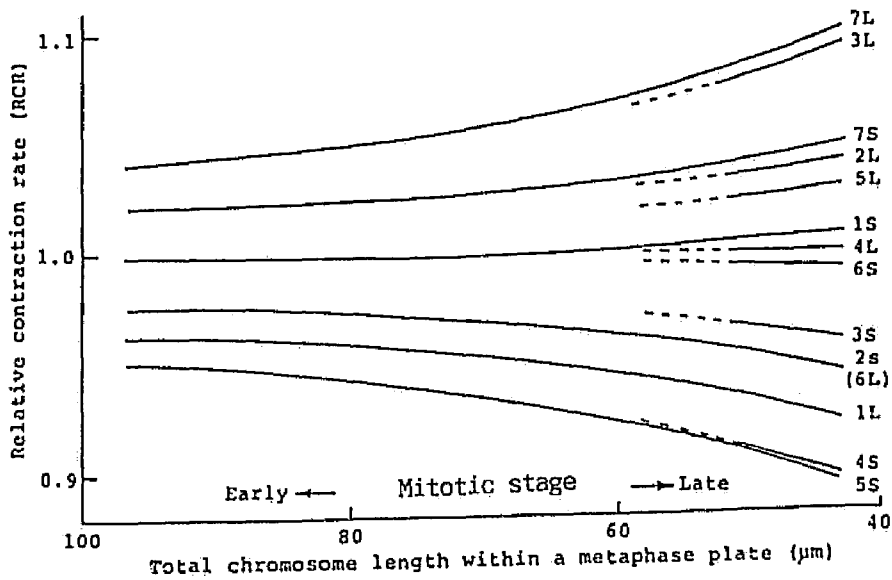


Fig.1-14. Relation between the relative contraction rate in length of chromosome arm (RCR) and the mitotic stage.

### 3 論議

#### 分裂ステージの進行にともなう核型の変化と染色体の凝縮パターンとの関係

本実験の結果、染色体の相対長および腕比、ならびに長さおよび腕比に関する染色体の核板内における順位は分裂中期内のステージ間で様々に変化すること、また染色体の凝縮パターンは染色体腕間で様々に異なることが明らかとなった。ここでは染色体の凝縮パターンが核型の分裂ステージ間の変化に及ぼす影響について考察する。

図1-14における各染色体腕の凝縮パターンは次のように考えられる。まず1S、4Lおよび6Sの3染色体腕はステージ全体にわたって全染色体の平均的な凝縮速度にほぼ一致する凝縮パターン、すなわち平均的凝縮パターンを示す染色体腕と考えられる。一方これら3本の染色体腕より上に位置し、完全中期に近づくにつれRCRが増加する染色体腕（とくに7Lおよび3L）では分裂中期の晩期に凝縮が進み、上記3本の染色体腕よりも下に位置し、完全中期に近づくにつれRCRが減少する染色体腕（とくに4Sおよび5S）では分裂中期の早期に凝縮が進むと考えられる。

7Lおよび3Lの晩期凝縮特性は分裂ステージの進行にともない両染色体腕の相対長が減少する傾向（図1-10）を、また4Sおよび5Sの早期凝縮特性は分裂ステージの進行にともない両染色体腕の相対長が増加する傾向（図1-10）をよく説明するものと考えられる。また第7染色体と第3染色体、2Lと3L、および3Sと4Sの間では双方の相対長の平均値が分裂ステージ間で接近したり入れ替わったりした（図1-9および1-10）が、これらはそれぞれ7L、3Lおよび4Sの特異的な凝縮パターンと密接に結びついた結果と考えられる。つぎに第4および第5染色体では分裂ステージの進行にともない腕比が増加する傾向が認められた（図1-11）が、これは両染色体において長腕が平均的凝縮パターン、短腕が早期凝縮パターンをとることから生じたものと考えられる。また第3および第6染色体の腕比のステージ間での変化（図1-11）も両染色体における長腕と短腕の凝縮パターンの違いから説明することができる。以上のことから、分裂中期内のステージ間で認められたオオムギの核型の変異は単に染色体の変形等により生じる測定誤差の結果ではなく、分裂ステージの進行にともなう各染色体腕の凝縮パターンの違いと密接に関連して生じたものと結論される。

## 染色体間で不均一な凝縮パターンが生じるメカニズム

Ho and Kasha(1974)はアルファルファにおいて太糸期のステージ間で各染色体の凝縮率を比較し、ヘテロクロマチン含量の高い染色体ほど早期に凝縮が進むことを報告している。オオムギにおいてはCバンドパターンからみた場合、最もヘテロクロマチン含量の高い染色体腕は4Sであり(本論文第3章第2節参照)、実際この染色体腕では図1-14に示されるように著しい早期凝縮特性が認められる。しかしながら、他の染色体腕のCバンド含量にはあまり大きな差がなく、染色体腕間の凝縮パターンの差異をすべてそのヘテロクロマチン含量の差異に基づいて説明することは困難である。一方ヒトの染色体においては相対長または腕比が太糸期と体細胞中期の間で大きく変化するものがあり、そのような染色体では体細胞中期染色体のRバンドに相当する部位の凝縮率が2つのステージ間で異なることが示されている(Luciani et al. 1988)。ヒト染色体のRバンド部位はユークロマチンで構成されていること(Bickmore and Sumner 1989)から、オオムギの染色体においてもユークロマチン部位(Cバンド以外の部位)の間で凝縮パターンが異なる可能性が考えられる。例えばオオムギにおいて、もし分裂中期の晩期に特異的に凝縮が進むユークロマチン部位があり、その含量が染色体間で異なっているとすれば、染色体間で凝縮パターンの差異が生じると考えられる。

従来、体細胞中期における染色体の形態は非常に安定なものと考えられ、この分裂期の染色体の相対長および腕比は核型を表す代表的な指標として広く用いられてきた。一方本実験から、染色体の形態は分裂中期内のステージ間においてダイナミックに変化することが明らかとなった。したがって今後、染色体の形態の定量的な解析を行う場合にはこのような染色体のダイナミズムを考慮に入れることが重要と考えられる。

## 第5節 摘要

染色体画像解析システムCHIASを用いてオオムギ染色体の画像解析を行い、以下の結果を得た。

### 1) 中期核板像の自動走査(第2節)

CHIASを用いてプレパラートの自動走査による中期核板像の自動検出を行った。染色体数が揃い、かつ染色体の重なりがない核板を良好な核板として自動検出の効率を検討

した。その結果、ギムザ染色を行った染色体標本を用いた場合には走査領域内の良好な核板のうちの90%以上を自動検出することができ、CHIASによる自動走査が十分実用に耐えることが明らかとなった。一方無染色の染色体標本を用いた場合には全自動検出像に占める良好な核板の割合がきわめて低く（10%以下）なり、この点の改善が必要と考えられた。

## 2) 核型およびNバンドパターンの定量的解析（第3節）

CHIASを用いて250個の半数性核板における各染色体の長さ、画像上の面積および平均濃度を測定した。画像解析法は測定効率、測定精度の両面においてこれら定量的パラメータの測定にきわめて有効であった。染色体の長さ、面積および濃度体積をパラメータとして核型分析を行った結果、染色体の識別にはこれらのパラメータのうち長さが最も有効であることが明らかとなった。250核板における各染色体の相対長と腕比の平均値、ならびに20核板の良好なN分染像におけるバンドパターンの測定データに基づきオオムギ染色体のイディオグラムを確立した。

## 3) 分裂ステージの進行にともなう核型の変化（第4節）

分裂中期における核型の変動パターンを明らかにするため、250個の核板を1核板内の総染色体長に基づき早中期から完全中期までの5つのステージに分類し、ステージ間で染色体の相対長および腕比を比較した。その結果、染色体の相対長および腕比はステージ間で様々に変化し、染色体によってはそれらが分裂ステージの進行にともない増加または減少することが明らかとなった。また1核板ごとに各染色体の長さまたは腕比の順位を決定し、各順位内に占める染色体の種類と頻度を調査した結果、長さおよび腕比に関する各染色体の核板内での順位はステージ間で様々に入れ替わることが明らかとなった。つぎに1核板内の総染色体長の減少率と各染色体長の減少率との比に基づいて染色体の相対凝縮率を算出し、分裂ステージの進行にともなう相対凝縮率の変化のパターン（凝縮パターン）を染色体腕ごとに調査したところ、各染色体腕の凝縮パターンは早期凝縮型から晩期凝縮型まで様々に異なることが明らかとなった。さらに染色体の凝縮パターンは分裂ステージの進行にともなう相対長および腕比の変化と密接に関連していたことから、分裂中期におけるオオムギ核型の変異は単なる測定誤差の結果ではなく、各染色体腕の凝縮率がステージ間で異なることに起因していると結論された。

## 第2章 画像パラメータ“凝縮型”を用いたイネ体細胞染色体の識別

### 第1節 緒言

イネの体細胞中期染色体の大きさは1～2  $\mu\text{m}$ 程度ときわめて小さく、各染色体の形態が互によく類似しているため、通常の核型分析法により染色体の同定を行うことは不可能である。また分染法を用いた場合にも染色体の同定に有用なバンドは得られない。このような理由から長い間イネの体細胞染色体の解析は困難となっていた。一方 Kurata and Omura(1978) は染色体の標本作製法を改良し、前中期の染色体を観察に用いることによって、はじめてすべての体細胞染色体を同定できることを示した。しかしながらこの手法を用いた場合にも、分染マーカーのような各染色体を明瞭・客観的に特徴づける指標が得られなかったため、染色体の同定にはかなりの熟練が必要であった。このような事情からその後もイネの体細胞染色体を客観的に同定する手法の開発が強く望まれてきた。

福井ら(1986b) はイネとほぼ同じ大きさの体細胞染色体をもつハマアカザ (*Atriplex rosea* L.,  $2n=18$ ) において、画像解析法を用いて前中期染色体の濃淡の分布パターンを数量化し、このパラメータ(画像パラメータ“凝縮型”)を用いて全染色体を識別することに成功した。さらに福井・飯島(1987)は同様の手法を用いてイネの前中期染色体を解析し、半数体レベルではすべての染色体を客観的に識別できることを明らかにした。本章はこの画像パラメータ“凝縮型”を用いてイネの二倍体細胞における相同染色体の識別を行い、その有効性を検討したものである。

### 第2節 材料および方法

水稲品種「日本晴」を材料に用いた。種子を30°Cで発芽させ、1～2 cmに伸長した種子根を切り取って、これをリン酸緩衝液(1/15 M, pH6.8)に溶かした0.1%コルヒチン溶液で6°C、3.5時間前処理した後、メタノール-酢酸(3:1)で1時間固定した。種子根を水洗後、根端部分約1 mmを切り取り、酵素液(組成については本論文第1章第2節参照)を入れた1.5 mlエッペンドルフチューブの中に入れ、37°C下で45～60分間解離を行った。酵素解離した根端はチューブの中で水洗後スライドガラス上に載せ、固定液を滴下しながら

ピンセットで細かく砕いた後、風乾した。染色はリン酸緩衝液(1/15 M, pH6.8)で希釈した4%ギムザ液で30分間行った。

染色体の変形が少なくよく拡がった前中期細胞(図2-1)を選んで写真撮影し、3種類の濃さの染色体写真を作成した。このうち適正濃度で焼き付けた写真は肉眼での観察用に用い、濃く焼き付けた写真およびうすく焼き付けた写真はそれぞれ染色体領域の抽出用および染色体の濃度分布測定用の画像としてCHIASに取り込んだ。

図2-2はCHIASによる染色体の解析過程を示したものである。まず各染色体画像の照明ムラを補正し、明暗のコントラストを強調した後、濃い写真の画像を二値化して染色体領域を抽出し(図2-2a)、そこから染色体の輪郭線を取り出してうすい写真画像の上に重ね合わせた(図2-2b)。この画像を2倍の大きさに拡大し、濃度に応じて染色体を色付けた後、動原体部位に線を入れるとともに染色分体中軸部に沿って線を引いた(図2-2c)。各染色分体ごとにこの中軸線下の濃度分布をCHIASにより測定し、図2-2dに示すような濃度分布曲線を得た(濃度分布曲線と交差する3本の縦線は左から短腕末端部、動原体部および長腕末端部の位置を示している)。つぎに染色分体中軸線の長さを各腕ごとに測定し、染色分体の長さを平均して当該染色体の長さとした。以上の方法に基づき細胞分裂ステージの揃った10個の前中期細胞を解析した。

### 第3節 結果

各染色体はそれぞれ濃度分布曲線によって表される固有の凝縮型(CP; Condensation Pattern)を示した。CPに加えて染色体の長さや腕比、および適正濃度で焼き付けた染色体写真を参照することによって、二倍体細胞においても各相同染色体を識別することができた。各染色体の代表的なCPは図2-3に示すとおりであり、図2-4には1前中期核板における各染色体の識別例を示してある。

各染色体の識別の過程を述べると以下のようなものである。サテライト染色体である第10染色体、ならびに次端部染色体である第4および第12染色体はその形態的特徴から肉眼により容易に識別できた。第1～第3染色体は長さにより他の染色体と容易に区別でき、これら3本の染色体間ではまず腕比により第2染色体が他の2本と区別され、第1染色体と第3染色体は長さにより区別された。つぎに第8染色体は長腕に大きな凝縮部を2つもつこと、





Fig.2-1. A prometaphase plate of rice. Bar=5  $\mu$ m.

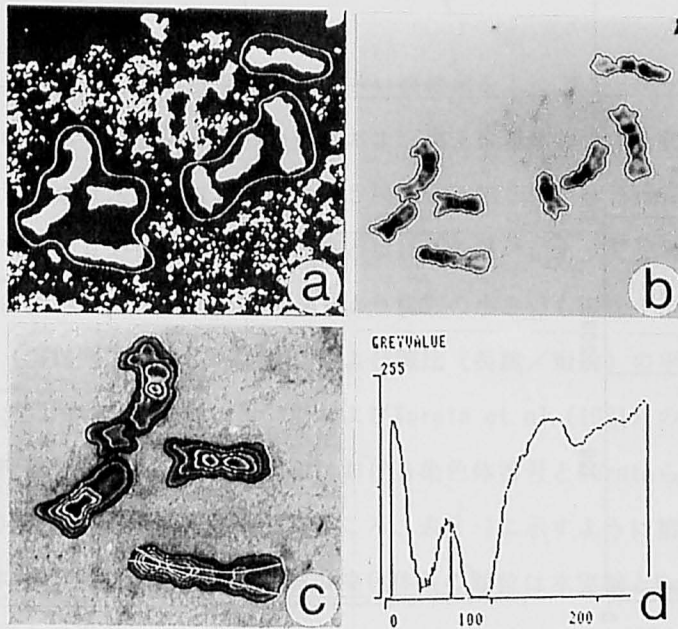


Fig.2-2. Sequential steps of image analysis for rice chromosomes. Explanations are given in the text.

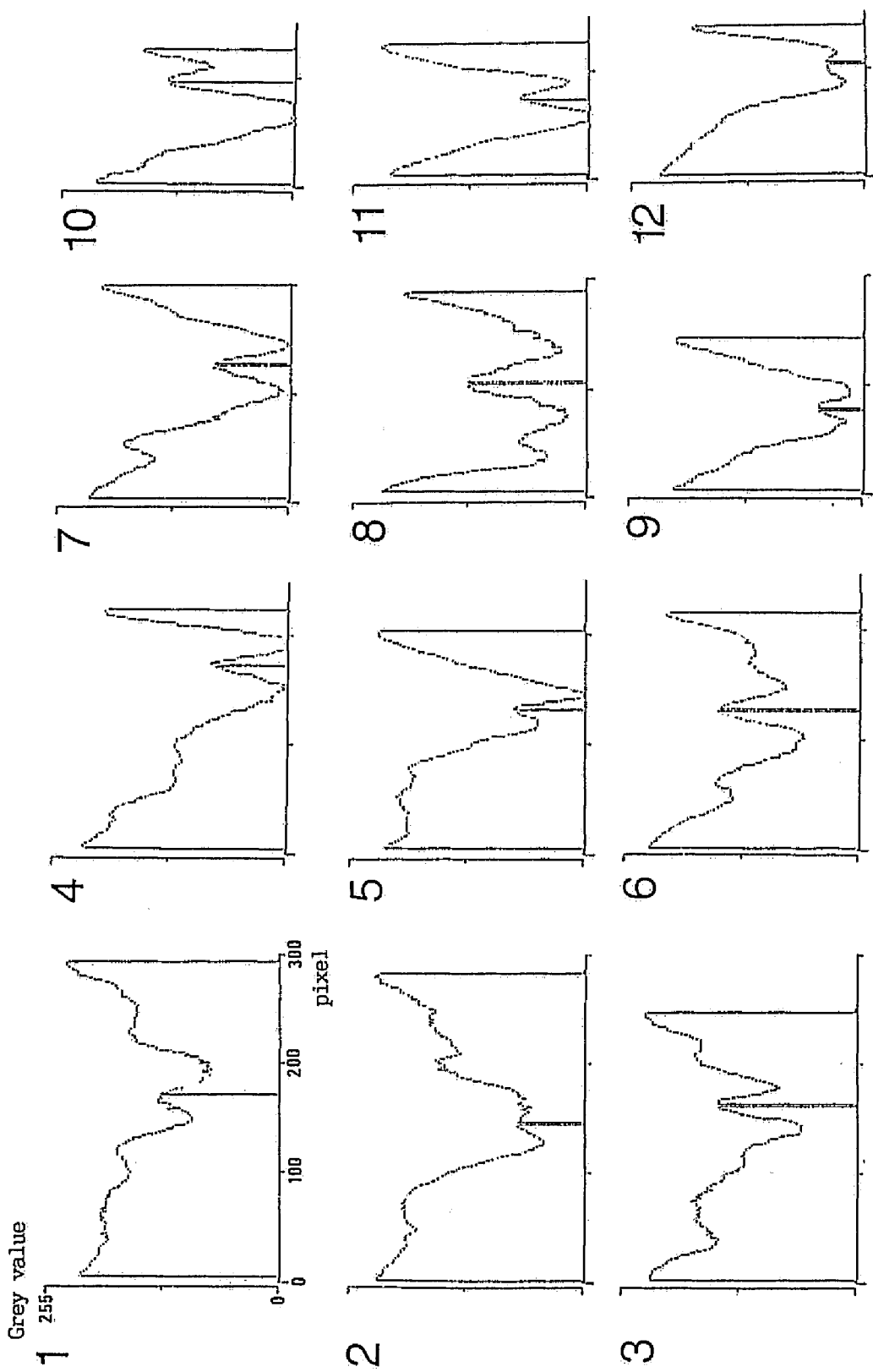


Fig.2-3. Typical CP of each chromosome. No. shows chromosome number.

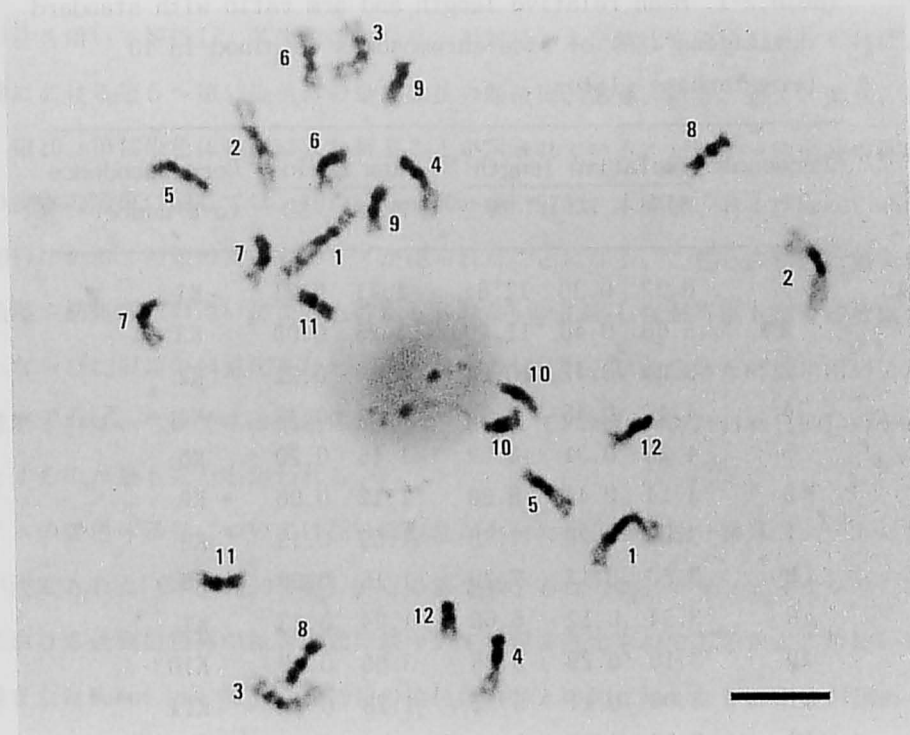


Fig.2-4. Prometaphase plate with identified chromosome numbers. Bar=5  $\mu$ m.

第11染色体は長腕基部に短腕基部よりも大きい凝縮部をもつこと（図2-3）に基づき識別された。残りの4本の染色体のうち、第5および第7染色体の2本と第6および第9染色体の2本は腕比により区別され、さらに第5染色体と第7染色体とは長腕基部の凝縮部の大きさによって、第6染色体と第9染色体とは長さの違いによってそれぞれ区別された。

表2-1は、各細胞から相同染色体のうちより変形の小さいものを1本選び、各染色体について相対長（各細胞内での長さの%）および腕比（長腕/短腕）の平均値を示したものである。なお、Kurata and Omura(1978)およびKurata et al.(1981)の報告における各染色体の形態的特徴を参照しつつ、本実験における染色体番号とKurataらによる染色体番号（K1～K12）との対応関係を検討したところ、表2-1に示すように第2染色体と第3染色体、ならびに第7染色体と第9染色体の染色体長の順位は本実験とKurata and Omura(1978)の報告とで異なっていた。

Table 2-1. Mean relative length and arm ratio with standard deviations (SD) of rice chromosomes obtained in 10 prometaphase plates.

Chromosome	Relative length			Arm ratio		Correspondence to K number*
	Mean	SD	%	Mean	SD	
1	6.32	0.30	12.64	1.71	0.21	K1
2	5.60	0.48	11.20	1.25	0.08	K3
3	5.04	0.42	10.08	1.60	0.21	K2
4	4.49	0.45	8.98	2.91	0.42	K4
5	4.26	0.31	8.52	1.46	0.20	K5
6	4.14	0.41	8.28	1.12	0.06	K6
7	3.89	0.28	7.78	1.59	0.13	K9
8	3.60	0.17	7.20	1.16	0.08	K8
9	3.34	0.12	6.68	1.24	0.13	K7
10	3.19	0.29	6.38	3.85	0.68	K10
11	3.06	0.11	6.12	1.28	0.17	K11
12	3.06	0.27	6.12	1.93	0.34	K12
Total	49.99		99.98			

\* Designation by Kurata & Omura (1978) and Kurata et al. (1981).

#### 第4節 論議

本実験の結果、イネの二倍体においても良好な前中期染色体像を選べばCPを用いて各相同染色体を識別できることが明らかとなった。ただし二倍体では半数体に比べ、解析に適した染色体像（染色体の変形や重なりが少ないもの）を得ることが格段に難しくなることが問題である。半数体の場合、ポットで生育中の植物体から採取し、前処理を行わず直接固定した根端を標本作製の材料として用いている（福井・飯島1987）が、二倍体ではこの方法によって効率よく良好な前中期細胞を得ることはできなかった。本実験では前処理法として種子根のコルヒチン処理を行ったが、この方法でも良好な染色体像の回収率は低く、この点に関してはさらに検討する必要があると考えられる。

Fukui and Iijima(1991)は品種「コシヒカリ」の半数体の前中期30核板を本実験と同様の手法を用いて解析し、各染色体のCP、相対長および腕比を確定した。それによれば本実験における第5～第12染色体の染色体長の順位は、第6、第5、第7、第9、第8、第11、第10、第12染色体の順に入れ替ることが示されている。したがってイネの体細胞染色体の長さの順位に関しては、Kurata and Omura(1978)、本実験、およびFukui and Iijima(1991)による3種類の異なるデータが得られたことになる。これらの相違は各実験で用いた品種や前処理法の違いによるものかもしれない。しかしながら最も調査核板数の多いこと、ならびに根端の前処理を行わず最も自然の状態に近い染色体を解析に用いていることを考慮すれば、今後イネの染色体長のデータとしてFukui and Iijima(1991)のデータを基準とするのが最も妥当と思われる。

イネの染色体番号については長い間混乱があったが、最近統一番号システムに揃えることが決定された(木下1990参照)。この新システムは「IR36」トリソミックシリーズの太糸期における過剰染色体の長さの順に基づいて決定されたものであるが、この統一番号と本実験またはFukui and Iijima(1991)の染色体番号との間にはかなりの相違が認められる(飯島・福井1991参照)。染色体長の順位は分裂ステージによって様々に変化すること(本論文第1章第4節)から、イネにおいても太糸期と体細胞前中期の間で染色体長の順位が異なる可能性が考えられる。また「IR36」トリソミックシリーズの数系統には過剰染色体の構造異常が指摘されていること(Chung and Wu 1988)から、日本型イネと印度型イネ相互間の異同関係についても再検討する必要があると考えられる。

## 第5節 摘要

画像パラメータ「凝縮型(CP)」を用いてイネ二倍体における体細胞染色体の識別を行った。ギムザ染色を行った良好な前中期核板を選び、これらの染色体写真をCHIASを用いて解析し、各染色体の染色分体中軸部の濃度分布曲線を得た。この濃度分布曲線によって表される染色体の凝縮パターン(CP)、ならびに染色体の長さおよび腕比を比較・検討することにより各相同染色体を客観的に識別できることが明らかとなった。

## 第Ⅱ編 分染法を用いた植物染色体の特性解析

### 序説

Caspersson et al. (1968, 1969)はハムスターおよびソラマメの中期染色体を蛍光色素キナクリンマスタードで染めると染色体の長軸に沿って蛍光強度の差による縞模様（バンド）が観察されることを発見した。この発見を契機として1970年代の前半には次々に新しい染色体の分染法が開発され、多くの動物種では分染法の利用によりはじめて全染色体の同定が可能となった。さらにG分染法をはじめとする高精度の分染法の開発によってごく微細なレベルで染色体の構造変異を検出することが可能となり、このことからとくにヒトにおいては詳細な染色体地図の作製に関する研究が進展した。

一方植物においても動物における報告に基づき多くの染色体分染に関する研究が行われた。しかしながら植物の染色体では一般にバンドが出現するのはヘテロクロマチン部位に限られ、動物の染色体で観察されるような詳細なバンドパターンは認められなかった（武久1974）。このため植物においては、分染法を用いても依然染色体の識別・同定さえ不完全な種が多く、太糸期分析の進んだごく一部の種を除けば個々の染色体の詳細な解析はきわめて困難となっているのが現状である。このような現状を考慮すると、今後植物において分染法を有効に利用していくためには、従来の分染法の精度を向上させること、ならびに新しいタイプの分染法を開発することが重要と考えられる。最初の点に関して、例えばコムギにおいては、C分染法の精度の向上によりかなり詳細なレベルでの染色体の解析が可能となり、それによって種々の染色体部分欠失をもつ系統の同定（Endo 1988）ならびにそれらを利用した詳細な遺伝子マッピングが行われるようになった（Endo and Mukai 1988；Mukai et al. 1990）。つぎに第2点目に関しては、植物においても動物におけるG分染法のように染色体全体にわたって多数のバンドが得られる分染法を開発することが強く望まれる。

本編はこのような観点から染色体の分染に関する以下の2つの実験を行い、得られた結果をまとめたものである。まず第3章ではオオムギにおいてCおよびN分染法の精度の向上を計り、これらを用いてオオムギ染色体のバンドパターンの再検討を行うとともに相互転座系統における切断点の詳細な位置決定を行った。つぎに第4章ではトウモロコシを用

いてG分染法の開発を行うとともに、植物の染色体におけるGバンドの出現様式ならびにG分染の機構について検討した。

### 第3章 オオムギにおけるCおよびN分染法を用いた染色体構造変異の解析

#### 第1節 緒言

オオムギにおいては、1970年代後半に開発されたC分染法により初めてすべての染色体および染色体腕が細胞学的に同定され、形態的に識別される染色体と連鎖群の染色体番号との対応関係が明らかとなった(Linde-Laursen 1975; Noda and Kasha 1978)。またN分染法を用いた調査により、従来Triplo 3 SおよびTriplo 4 Sと称されていたテロトリソミック系統の過剰染色体はそれぞれ3 Lおよび4 Lであることが判明し、第3および第4染色体では連鎖地図における長腕と短腕とが入れ替えられた(Singh and Tsuchiya 1982b)。このような事例に示されるように、CおよびN分染法はオオムギ染色体の有効な解析手段となっている。

オオムギ染色体のバンドパターンに関しては多くの報告がある(Linde-Laursen 1975, 1978, 1981; Noda and Kasha 1978; Islam 1980; Singh and Tsuchiya 1981, 1982a, b; 本論文第1章第3節)が、分染法間または品種・系統間でバンドパターンに変異があるか否かについては研究者間で見解が異なっている。例えば、Islam(1980)およびLinde-Laursen(1981)はN分染法により出現する動原体部位のバンドはC分染法を用いた場合には出現しないことを認めている。また、Linde-Laursen(1978, 1981)、Noda and Kasha(1978)およびIslam(1980)は、特定の品種・系統のみに出現するバンドおよび品種・系統間で大きさや濃度の異なるバンドがあることを報告している。これに対して、Singh and Tsuchiya(1982a, b)はC分染法とN分染法間および品種間でバンドパターンに差異は認められないと述べ、従来報告されたバンドパターンの変異は染色体の分裂ステージの違いあるいは分染処理手順の違いにより生じたものであると結論した。

このような研究者間での見解の相違は、今後オオムギにおいて分染法を用いた染色体の解析、とくに染色体の微細な構造変異の解析を進めていく上で混乱や誤解を招く原因になると考えられる。そこで本章ではまずC分染法およびN分染法について精度向上のための改良を行った後、これらを用いてオオムギ染色体のバンドパターンを再検討し、両分染法間ならびに品種間におけるバンドパターンの変異を詳細に調査した(第2節)。つぎに両



分染法を用いて相互転座系統における切断点の位置決定を行い、これらの分染法が微細な染色体構造変異を検出する上でどの程度有効であるかを検討した（第3節）。

## 第2節 CおよびNバンドパターンからみたヘテロクロマチンの分化

### 1 材料および方法

2条オオムギ4品種「New Golden」、*Shin Ebisu 16*、「Betzes」および「Emir」を材料に用いた。これらの品種は、以前に染色体のCおよびNバンドパターン的一方または両方が調査されている(Linde-Laursen 1975, 1978, 1981; Noda and Kasha 1978; Islam 1980; Singh and Tsuchiya 1981, 1982a, b; 本論文第1章第3節)。

20℃で催芽した種子から約1 cmに伸びた根を切り取り、これを0℃の蒸留水中で16時間前処理した後、ファーマー液(メタノール:酢酸、3:1)で固定し、冷凍庫(-20℃)内で約1週間保存した。染色体標本は酵素解離-空気乾燥法(本論文第2章参照)に従い作製した。

一部のスライドについては0.5%酢酸カーミンで約10分間染色し、よく拡がった中期染色体像を写真撮影した後、45%酢酸で5分間、蒸留水で10分間洗って脱染し、風乾した。

酢酸カーミン染色を行ったスライド、無染色のスライドともに室温で約1週間乾燥させた後、分染処理を行った。C分染法については、Giraldez et al.(1979)の方法を若干変更し、スライドを0.2N HCl-3分間(55℃)、5% Ba(OH)<sub>2</sub>-5分間(25℃)、2xSSC-20分間(55℃)の順で処理した。なおBa(OH)<sub>2</sub>処理に際してはその直前にスライドを扇風機の風で30分から1時間風乾した。N分染法については、Jewell(1981)の方法に従い1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で90℃、3分間の処理を行った。両分染法とも各処理の後、水道水または蒸留水で軽くスライドを水洗した。これらの処理後、スライドは8%ライト液(1/30Mのリン酸緩衝液、pH 6.8で希釈)で1時間染色し、その後軽く水洗し風乾した。なお染色液の濃度および染色時間は、ライト液の品質によりそれぞれ5~10%および30分~2時間の範囲で適宜調節した。

一部のスライドについてはC分染およびN分染の連続処理を行った。すなわち良好なC(N)分染像を写真撮影した後、脱染せず直接N(C)分染処理を行い、同一染色体上で

2つのバンドパターンを比較した。

また、処理手順の違いによってバンドパターンが変化するかどうかを確かめるため、押しつぶし法を用いた標本作製の効果ならびにギムザ液を用いた染色の効果を検討した。押しつぶし法による標本作製は、0.5%酢酸カーミンで30分～1時間染色した根端を用いて、常法に従って行った。ギムザ染色は1/15Mのリン酸緩衝液(pH 6.8)で1%に希釈したギムザ液を用いて1～2時間行った。

## 2 結果

酵素解離—空気乾燥法は1枚のスライドグラス上に多くの良好な染色体像が得られるという点で押しつぶし法よりも有効であった。またライト染色を行った場合には、ギムザ染色を行った場合に比べて各バンドの染色性が向上し、よりコントラストの高い分染像(図3-1)が得られた。しかしながら、このような手法の違いにより各品種のCバンドおよびNバンドの基本的なパターンが変化することはなかった。

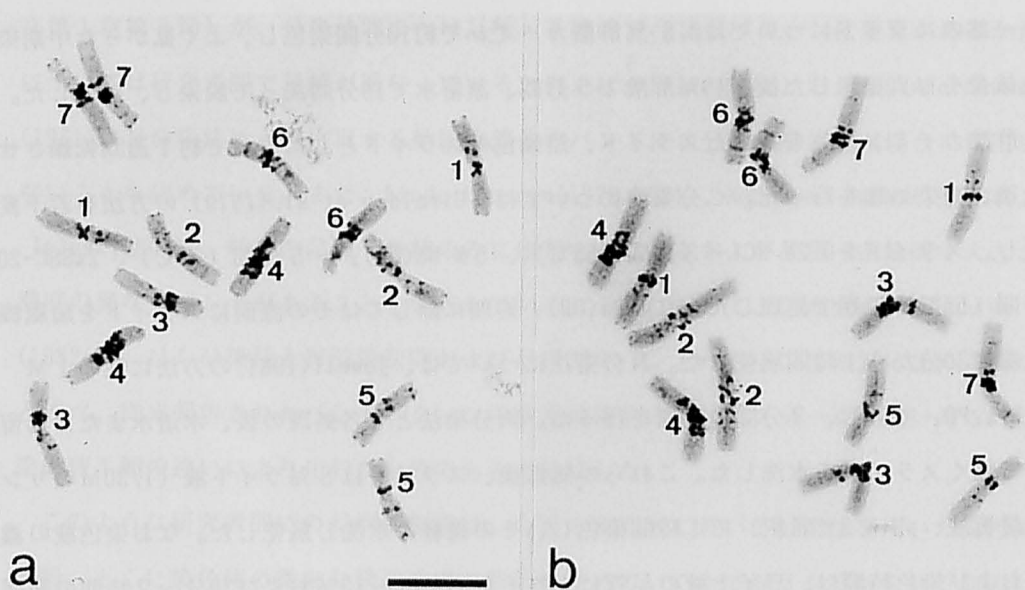


Fig.3-1. Metaphase plates stained by C-banding (a, 'Emir') and N-banding (b, 'Shin Ebisu 16') treatments without earlier acetocarmine staining. Bar=10  $\mu$ m.

図3-2は「New Golden」の酢酸カーミン染色像(a, b)ならびに同一核板のC分染像(c)およびN分染像(d)を示したものである。図3-3は各染色体の酢酸カーミン染色像と分染像とを並べて示したものである。この図から明らかなようにN分染法ではすべての染色体の動原体部位にバンドが出現したが、C分染法ではそのようなバンドは出現しなかった。またN分染法では動原体部位に特異的に出現するダイヤモンド形状の構造(Singh and Tsuchiya 1982a, b)が染まってみえた(例えば図3-3bの第2～第4染色体の動原体部位)のに対し、C分染法では動原体部位に非染色性のダイヤモンド形構造または非染色性のドットが観察されたことから、2つのバンドパターンは動原体部位において異なることが確認された。

図3-4は「Shin Ebisu 16」のC分染像(a)および同一核板をさらにN分染法で処理した染色体像(b)を示したものである。N分染処理後、各染色体の動原体部位にはC分染像には認められない新たなバンドまたは濃染部(図3-4b, 矢印)が出現した。一方N分染処理後にC分染処理を行った場合には、動原体部位のNバンドは消失するかごくうすい痕跡として観察された。

図3-5は4品種の染色体のC分染像(a)およびN分染像(b)を示したものである。各染色体の動原体部位には、N分染法で染まりC分染法では染まらない( $N^+ C^-$ )バンドが全品種に共通して認められた。以上の結果から、オオムギ染色体の動原体部位は $N^+ C^-$ ヘテロクロマチンで構成されていると結論できる。

つぎに、各品種のバンドパターンを比較したところ、両分染法に共通して特定の品種のみ出現するバンド、ならびに大きさおよび濃度が品種間で異なるバンドが認められた(図3-5a, b)。第4染色体長腕(4L)の中間部やや端部よりにあるバンドは「New Golden」および「Betzes」にのみ出現し、5L次端部のバンドは「Emir」にのみ出現した(図3-7参照)。また「New Golden」および「Shin Ebisu 16」の3L中間部のバンドはそれに対応する「Betzes」および「Emir」のバンドよりも大きく濃かった(図3-7参照)。一方、前記2品種の5L中間部のバンドは後記2品種のそれに対応するバンドよりも小さく薄かった(図3-7参照)。

図3-6は早中期から完全中期までの4つの分裂ステージにおける「New Golden」のCバンド(a)およびNバンド(b)のパターンを示したものである。各染色体の動原体バンドは全分裂ステージを通じてN分染法でのみ出現し、C分染法では出現しなかった。つぎに品種

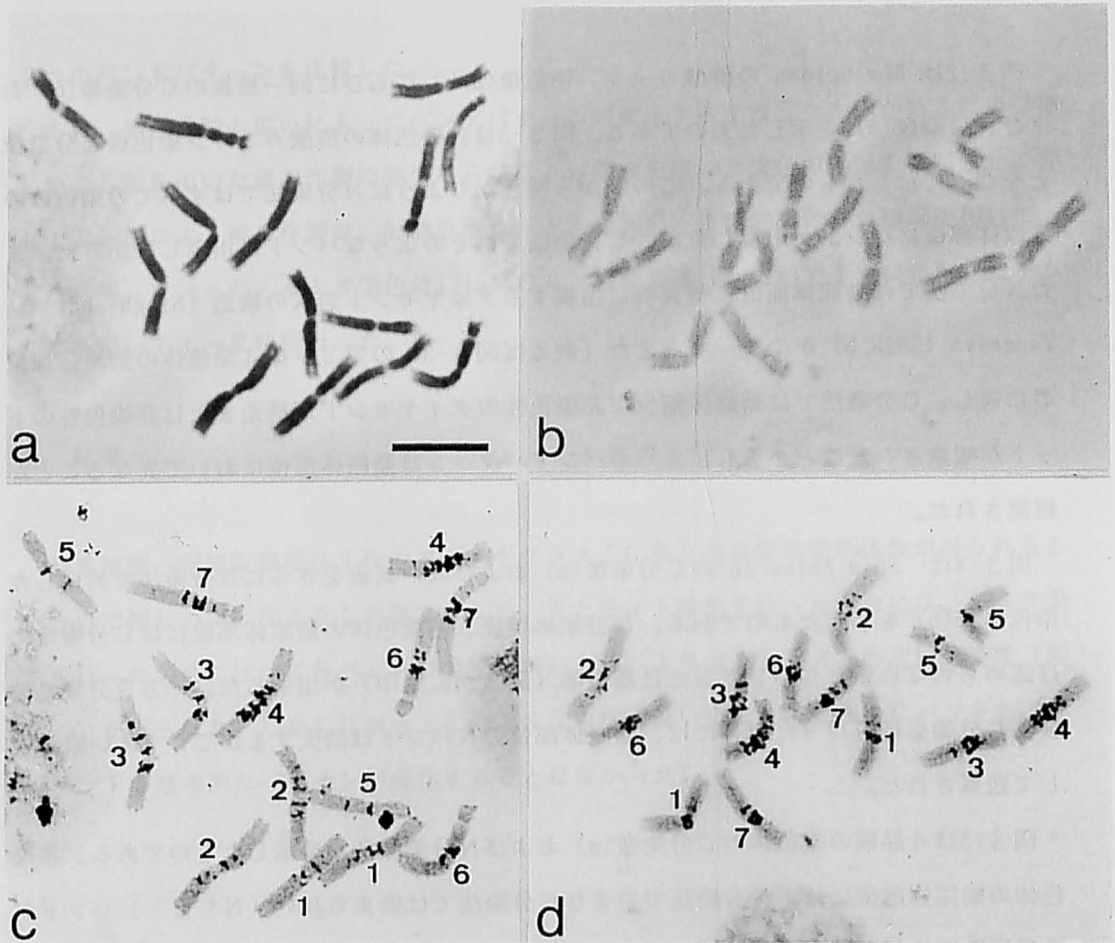


Fig.3-2. Acetocarmine-stained metaphase plates of 'New Golden' (a, b), and the same plates subsequently stained by C-banding (c) and N-banding (d) treatments. Bar=10  $\mu$ m.

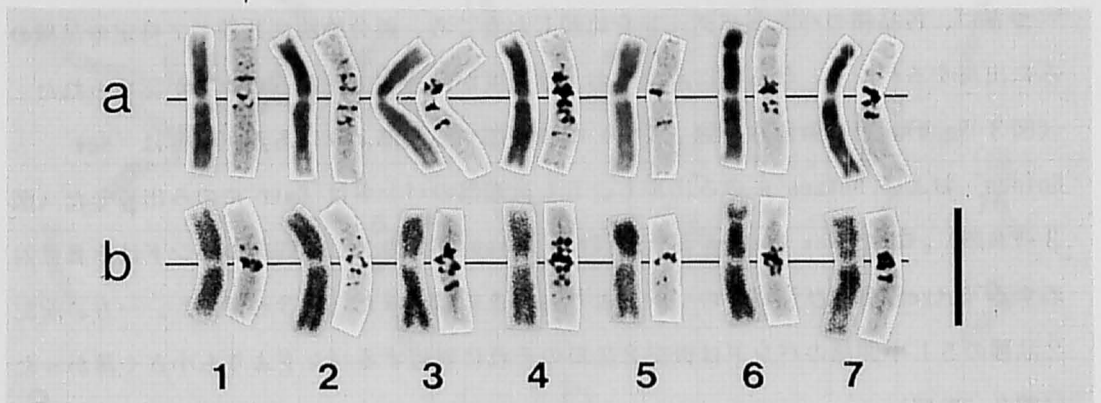


Fig.3-3. Acetocarmine-stained chromosomes (a, b left-hand side) and the same chromosomes subsequently stained by C-banding (a) and N-banding (b) treatments (right-hand side). Individual chromosomes were taken from the plates of Fig.3-2. The horizontal lines indicate the position of the centromere. Assignment of the long and the short arm of chromosome 1 follows Singh and Tsuchiya (1982b). Bar=10  $\mu$ m.

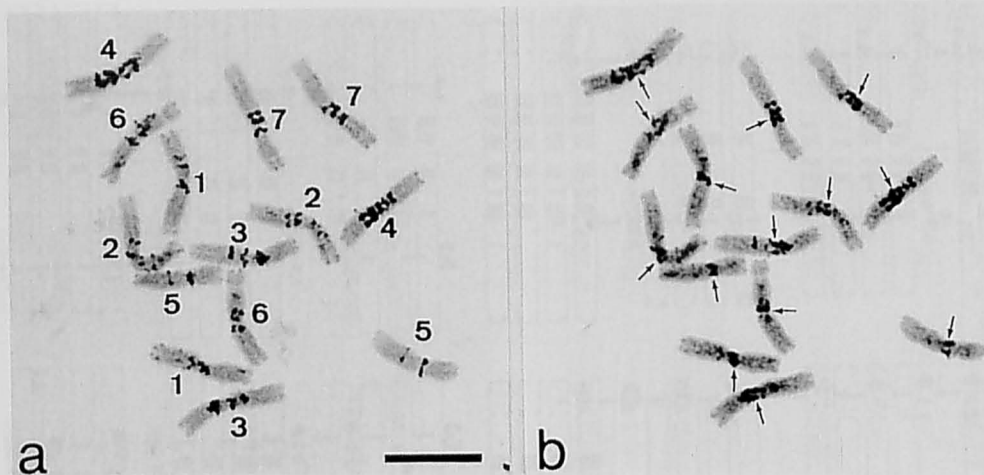


Fig.3-4. Metaphase plate ('Shin Ebisu 16') stained by C-banding treatment (a), and the same plate subsequently stained by N-banding treatment. Bar=10  $\mu$ m.

間で多型を示したバンドについてみると、4 L 中間部のバンドは分裂ステージに関わりなく常に出現し、3 L および 5 L 中間部のバンドは一定の大きさおよび濃度を示した。同様の結果は他の 3 品種においても認められた。これらのことから、オオムギ染色体におけるバンドパターンの変異は分裂ステージによって変化するものではなく、分染法および品種に固有のものであると結論される。

図 3-7 は、4 品種における C バンドパターン (a) および N バンドパターン (b) の変異をまとめ、イデオグラムとして示したものである。図中の各バンドは出現頻度にしたがって 3 種類に分けて示してある (図の説明参照)。なお、バンドパターンの調査には、酢酸カーミン染色を行わずに分染処理を行った核板のうち、図 3-6a および 6b の中央 2 つのレーンの分裂ステージに属する核板を用いた。また、各バンドの位置および幅は原則として 'New Golden' の N バンドパターンの測定結果 (本論文第 1 章第 3 節参照) に基づいて示してある。この図から明らかなように、各バンドの出現頻度は分染法間および品種間で様々に異なっていた。バンドの出現頻度を中心として各染色体の特徴をまとめると以下のようである。

第 1 染色体: 'Shin Ebisu 16' では短腕次端部の C バンドが高頻度 (85%) に出現した。短腕最基部の C バンドは長腕最基部の C バンドよりも大きく観察されることがあった (例えば図 3-5a の 'New Golden' および 'Betzes' 参照) が、これらのバンドの大きさは細胞間でかなり変異したため、どちらが大きいかを明確に決定することはできなかった。長腕末

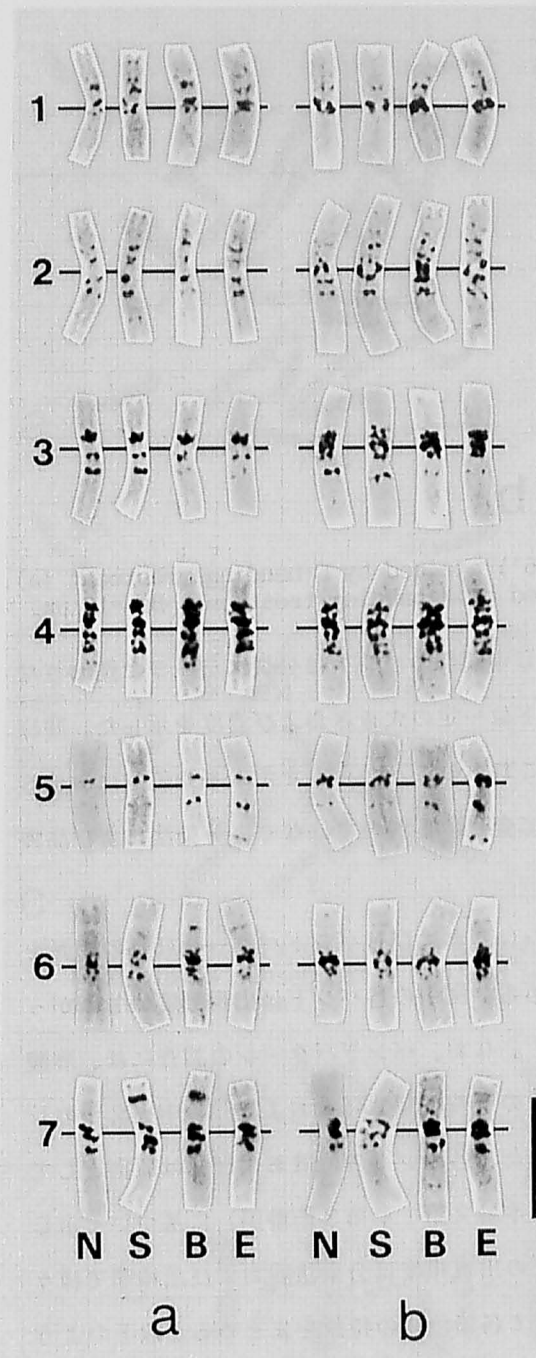


Fig.3-5. C-banded (a) and N-banded (b) chromosomes of four cultivars 'New Golden' (N), 'Shin Ebiisu 16' (S), 'Betzes' (B) and 'Emir' (E). Bar=10  $\mu$ m.

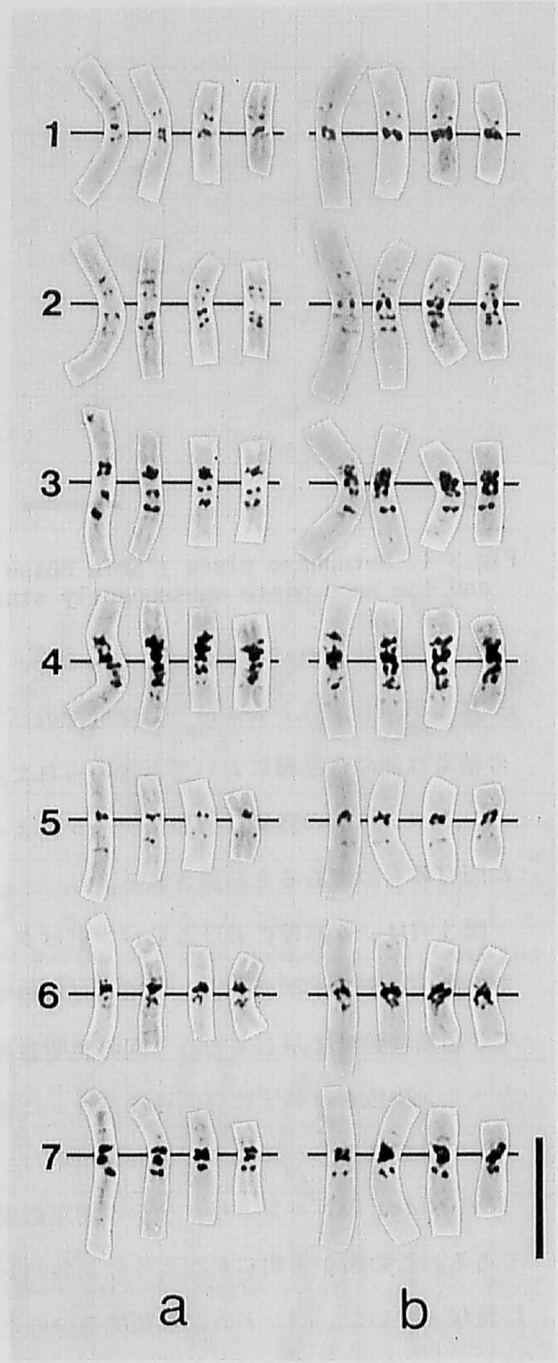


Fig.3-6. C-banded (a) and N-banded (b) chromosomes of 'New Golden' at different mitotic stages from early metaphase (left) to midmetaphase (right). Chromosomes in vertical arrangement are those from a single cell. Bar=10  $\mu$ m.

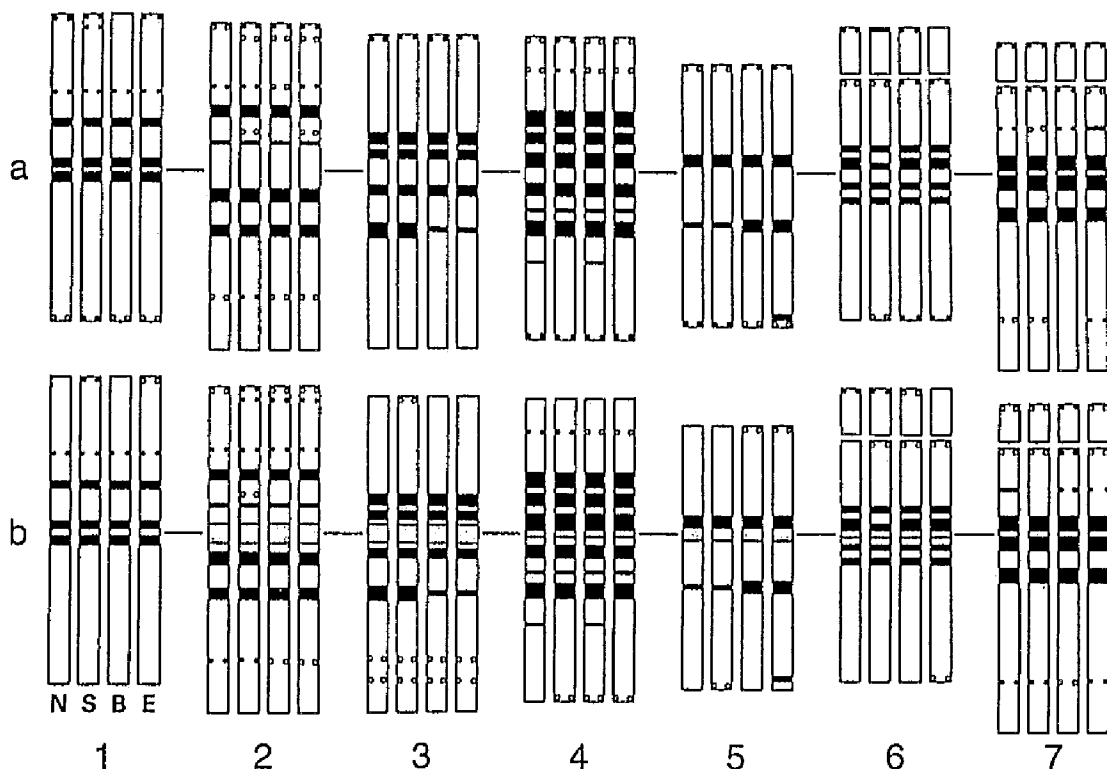


Fig.3-7. Idiogrammatic representation of the C-banding (a) and the N-banding (b) patterns of chromosomes in four cultivars. Each set of four chromosomes is arranged in the order of 'New Golden' (N), 'Shin Ebisu 16' (S), 'Betzes' (B) and 'Emir' (E) from left to right (See the example below Chromosome 1). N-banding specific bands located at the centromeric sites are represented by the dotted parts. Other bands are classified into four groups according to their frequency of appearance. The appearance frequency of each band was obtained by microphotographic analysis of 20 chromosomes from ten quality metaphase plates in each banding technique for each cultivar. Bands with appearance frequencies of 95% and higher, 45% - 94%, and 11% - 44% are depicted as solid bands, solid circles and open circles, respectively. Bands with an appearance frequency of 10% and under are not shown in the idiogram.

端部にはほとんどNバンドは出現しなかった（平均 1.3%、調査した 4 品種80本の第 1 染色体のうち 1 本のみで出現）。

第 2 染色体：どちらの分染法を用いた場合にも長腕末端部にはほとんどバンドが出現しなかった（平均 1.9%）。短腕次端部のバンドはC分染法（平均15%）よりもN分染法（平均44%）においてより高頻度に出現した。

第 3 染色体：どちらの分染法を用いた場合にも長腕末端部にはほとんどバンドが出現しなかった（平均 1.9%）。N分染法では長腕次端部に 2 つの小さなバンドが認められた

(平均44%)が、C分染法ではこれらのバンドはほとんど認められなかった(平均6%)。

第4染色体：短腕次端部に出現するバンドはC分染法(平均26%)よりもN分染法(平均43%)においてより高頻度に出現した。短腕末端部にはほとんどNバンドは観察されなかった(平均5%)。

第5染色体：`Shin Ebisu 16`の長腕末端部のバンドは他の3品種よりも高頻度(C分染法では80%、N分染法では40%)に出現した。

第6染色体：`Shin Ebisu 16`では他の品種に比べ短腕最基部のCバンドが小さくなっていた(図3-5a)。短腕の二次狭窄部に隣接するバンドはN分染法に比べC分染法においてより大きくかつ濃く観察される場合があった。しかしながらこの部位のバンドの大きさは細胞間でかなり変異したため、その大きさに品種間差異があるかどうかを明らかにすることはできなかった。`Emir`のサテライト末端部にはどちらの分染法を用いた場合にもほとんどバンドが出現しなかった(2.5%、C分染法で1本のみ出現)。

第7染色体：どちらの分染法を用いた場合にも長腕の末端部にはバンドが出現しなかった。短腕の二次狭窄部に隣接するバンドについては第6染色体の場合と同様のことが認められたが、図3-5aの`Shin Ebisu 16`および`Betzes`の例に示されるように、C分染法では第6染色体のバンドよりも大きくかつ濃いバンドが認められる場合があった。`Shin Ebisu 16`の短腕中間部のバンドおよび`Betzes`の長腕次端部のバンドはどちらの分染法を用いた場合にもそれぞれ他の3品種よりも出現頻度が低かった。`Shin Ebisu 16`ではN分染法に特異的に出現する動原体部位のバンドが他の品種に比べ大きいように思われた。

### 3 論議

本実験の結果、オオムギ染色体のすべての動原体部位にはN分染法で染まりC分染法では染まらない( $N^+ C^-$ )バンドが出現することが明らかになった(図3-3~6)ほか、図3-7に示すように各染色体の基部における $N^+ C^-$ バンドと $N^+ C^+$ バンドの位置を明確に決定することができた。また、本実験で認められたバンドパターンの品種間差異は、Linde-Laursen(1978)が`Shin Ebisu 16`、`Betzes`および`Emir`のC分染で、またIslam(1980)が`Shin Ebisu 16`および`Betzes`のN分染で得た品種間差異とほぼ一致していた。

Singh and Tsuchiya(1982a, b)は、オオムギの染色体に認められるバンドパターンの変



異は分染処理の手順の違いあるいは染色体の分裂ステージの違いにより生じるもので、ヘテロクロマチン自体の分化によるものではないと結論した。しかしながら、本実験では染色体標本の作製法（酵素解離法または押しつぶし法）あるいは染色液の種類（ライトまたはギムザ染色液）に関わらず、調査した4つの分裂ステージ（図3-6）を通じて各品種のCバンドおよびNバンドの基本パターンは変化しなかった。したがって、オオムギ染色体のバンドパターンの変異は明らかにヘテロクロマチンの分化に基づくものであると結論できる。

本実験で観察されたバンドパターンと過去に報告されたバンドパターン(Linde-Laursen 1978, 1981; Noda and Kasha 1978; Islam 1980; Singh and Tsuchiya 1982b; 本論文第1章第3節)との間には、いくつかの差異が認められる。第1に、Islam (1980)およびLinde-Laursen (1981)の報告ではいくつかの染色体腕の動原体部位にはNバンドが認められていない。これは、Linde-Laursen (1981)も示唆しているように、 $N^+ C^-$  バンドが隣の $N^+ C^+$  バンドと融合し、両者を区別することができなかつたためと推察される。第2に、Linde-Laursen (1978)は2Lの次端部、6Sおよび7Sの二次狭窄隣接部、7Sの最基部、ならびに7Lの基部よりの中間部に出現するバンドの大きさが`Shin Ebisu 16`、`Betzes`および`Emir`の3品種間で異なることを報告しているが、本実験ではこれらのバンドの大きさの品種間差異は明瞭ではなかつた。第3に、Linde-Laursen (1981)は全染色体腕の末端部、2Lの次端部、ならびに6Sおよび7Sの二次狭窄隣接部のバンドはC分染法に特異的な( $N^- C^+$ )バンドであると報告している。しかしながら本実験では2L、3Lおよび7Lの末端バンドを除き、これらの“ $N^- C^+$ ”バンドは、N分染法ではC分染法に比べやや不明瞭な傾向はあったものの、すべて $N^+ C^+$  バンドであることが示された。一方どちらの分染法を用いた場合にも2L、3Lおよび7Lの末端部にはほとんどバンドは認められなかつた。第4に、`New Golden`のNバンドパターン(図3-7b)を以前に調査したパターン(本論文第1章第3節、図1-7)と比較すると、新たなバンドの出現が認められる(例えば2S、3L、4S、7S、7Lのバンド等)とともに、いくつかのバンドでは出現頻度が高まっている(例えば1S、2L、6Lのバンド等)ことがわかる。これは主としてギムザ液の代わりにライト液を用いて染色を行ったことにより、分染精度が向上したためと考えられる。また本実験では染色体の形態の乱れを防ぐため  $NaH_2 PO_4$  の処理温度を94℃から90℃に変更しており、このことも上記のバンドパターンの差異に影響

響を及ぼしていると考えられる。もっとも、この処理温度の変更にもなうバンドパターンの変化は、Jewell(1981)が報告しているような顕著なものではなかった。

本実験で観察された $N^+ C^-$ 型のヘテロクロマチンは、コムギ連 (*Triticaceae*) の種においては新しい型のヘテロクロマチンと考えられる。コムギ染色体の仁形成部(NOR)には、 $NaH_2 PO_4$  の処理温度を下げることにより $N^- (C^-)$ 型から $N^+ (C^-)$ 型に変化する特殊なヘテロクロマチンのあることが認められている (Jewell 1981)が、これを除けばコムギ(Gill 1987)、ライムギ(Schlegel and Gill 1984)および *Elymus* (Morris and Gill 1987)においては、 $N^+ C^+$ 型および $N^- C^+$ 型の2種類のヘテロクロマチンが報告されているだけである。Gill(1987)はこのような2種類のヘテロクロマチンが生じる機構について、C分染法では全種類のヘテロクロマチンが染まるのに対してN分染法ではピリミジン配列に富む特定のヘテロクロマチンのみが染まるためであると推察している。オオムギにおいても $N^+ C^+$ 型のヘテロクロマチンがピリミジン配列に富む反復DNAからなることが示唆されている (Dennis et al. 1980) が、 $N^- C^+$ 型のヘテロクロマチンの形成機構については新たな説明が必要である。

Burkholder(1988)は、C分染処理の効果は主として染色体の非分染領域からのDNAやタンパク質の選択的な除去であるとしている。この考えに基づけば、オオムギの染色体ではC分染処理後は動原体部位にあるDNAやタンパク質の大部分が除去されていることになる。しかしながら、C分染後のN分染処理によって新たなバンドが出現すること (図3-4) を考慮すると、オオムギ染色体の動原体部位にはC分染処理後もまだ何らかの染色体物質が残っており、その構造がN分染処理によって変化し染色性をもつようになるのではないかと考えられる。したがって $N^+ C^-$ 型のヘテロクロマチンの形成にはクロマチンの選択的除去ではなく染色体構造の変性が関与しているものと考えられる。N分染処理によって特異的に染まる染色体物質は Buys and Osinga(1982)が示唆するように、リン酸タンパク質の一種かもしれない。

ヘテロクロマチンの品種間多型に関しては様々な要因が考えられる。例えば“Emir”に特異的な5 L次端部のバンドは *H. distichum* var. *laevigatum* の1品種から導入されたと考えられている (Linde-Laursen et al. 1982)。その他の要因として、特定の染色体領域での反復DNA配列の増幅、不等交叉、染色体の構造変異等が考えられるが、これらの解明にはさらに細胞学的ならびに分子生物学的な研究が必要と考えられる。

### 第3節 相互転座系統における切断点の位置決定

#### 1 材料および方法

実験材料には6条オオムギ品種「竹林茨城1号」に由来する相互転座ホモ系統(T S系統、牧野 1987)および2条オオムギ品種「Bonus」に由来する相互転座ホモ系統を用いた。T S系統は $\gamma$ 線、熱中性子線および $\alpha$ 線照射後代より選抜・育成された系統であり、本実験には原品種との交雑F<sub>1</sub>植物における染色体対合の観察から1つの相互転座をもつことが確認されている48系統を供試した。この48系統中35系統では転座染色体既知の相互転座テスターとの検定交雑により転座染色体が同定されているが、全系統とも転座染色体腕および切断点は未決定である(牧野 1987)。一方「Bonus」由来の系統はオオムギ相互転座の「World Collection(Ramage 1971, 1972, 1974, 1975)」として保存されている系統であり、本実験には第4染色体を含む6種類の相互転座(T1-4, T2-4, T3-4, T4-5, T4-6 およびT4-7)の各a~p系統の中から「Bonus」に由来する系統を計58系統選んで供試した。染色体標本の作製ならびにCおよびN分染処理は前節で述べた方法に従って行い、原品種と各転座系統の間で染色体のバンドパターンを比較した。

#### 2 結果

図3-8は「竹林茨城1号」のC分染染色体像(a)および「Bonus」のN分染染色体像(b)を示したものである(各染色体の(N)バンドパターンのイデオグラムについては図3-11(「竹林茨城1号」)および図3-13(「Bonus」)参照)。両品種ともに各染色体の動原体部位にはN分染法に特異的なバンドが認められ、その他のバンドは両分染法に共通して認められた。2L、3Lおよび7Lの末端部にはほとんどバンドが出現しなかった。また、両品種のバンドパターンには前節で用いた4品種のバンドパターン(図3-7参照)にはない新たな変異が認められた。すなわち「竹林茨城1号」では3L基部のバンドの欠失と5S次端部における新たなバンドの出現が認められ、「Bonus」では2L次端部のバンドおよび第6染色体のサテライトの末端バンドが欠失していた。

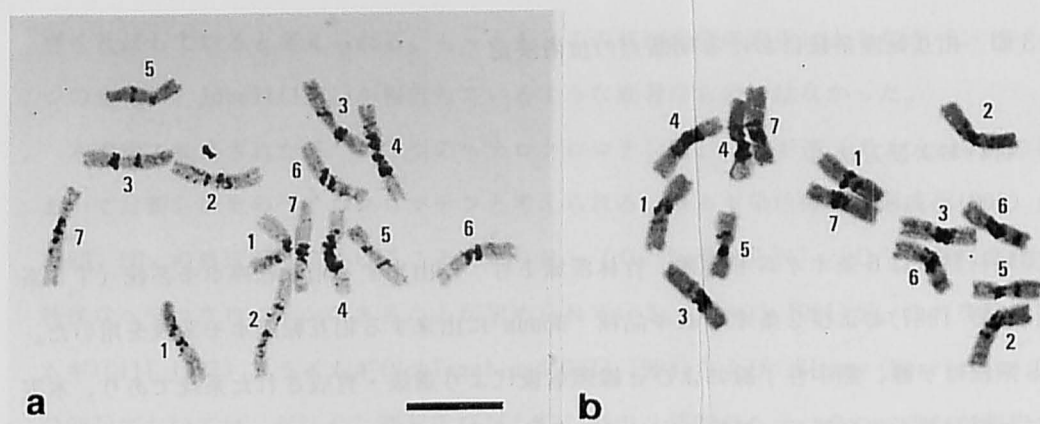


Fig.3-8. C-banded chromosomes of 'Chikurin-ibaraki No.1' (a) and N-banded chromosomes of 'Bonus' (b). Bar=10  $\mu$ m.

T S系統については、原品種と各系統間で染色体のバンドパターンおよび長さを比較した結果、図3-9に示すように48系統中42系統で転座染色体腕および切断点が明らかとなった。図3-10は6系統における転座染色体の分染像およびイデオグラムを例示したものである。各系統において同定された転座染色体の種類は、牧野(1987)が転座テスターを用いて同定した結果と一致した。また転座染色体が決定されていなかった13系統のうち10系統(図3-9の\*印の系統)では新たに転座染色体(腕)および切断点を決定することができた。一方転座染色体既知のT S 2、15および18の3系統では転座染色体腕および切断点を決定することができなかった。以上の結果が示すように、T S系統にはT 3-7を除くすべての相互転座が揃っていることが判明した。

T S系統において同定された相互転座のうち最も多かったのはT 2-5、つぎに多かったのはT 2-4とT 4-6で、それぞれ6系統(T S 6, 7, 10, 21, 36 および70)および4系統(T 2-4; T S 17, 26, 32および37、T 4-6; T S 13, 15, 33および34)において観察された。転座染色体腕の組み合わせでは、短腕と短腕、短腕と長腕、および長腕と長腕の組み合わせがそれぞれ8系統、16系統および18系統観察され、長腕間の相互転座が多く生じる傾向が認められた。またT 2-5では6系統中5系統が長腕間の転座、T 1-2では2系統とも短腕間の転座、T 1-3では2系統とも短腕(1 S)と長腕(3 L)の間の転座というように、相互転座の種類によって転座染色体腕の組み合わせが偏る場合が認められた。

図3-11はT S系統における切断点の分布を各染色体ごとにまとめたものである。図中( )内の数字は染色体の切断がその長さに比例してランダムに起こると仮定したときの期待切断頻度を表している。期待切断頻度と比較して、第2および第5染色体の切断頻度は

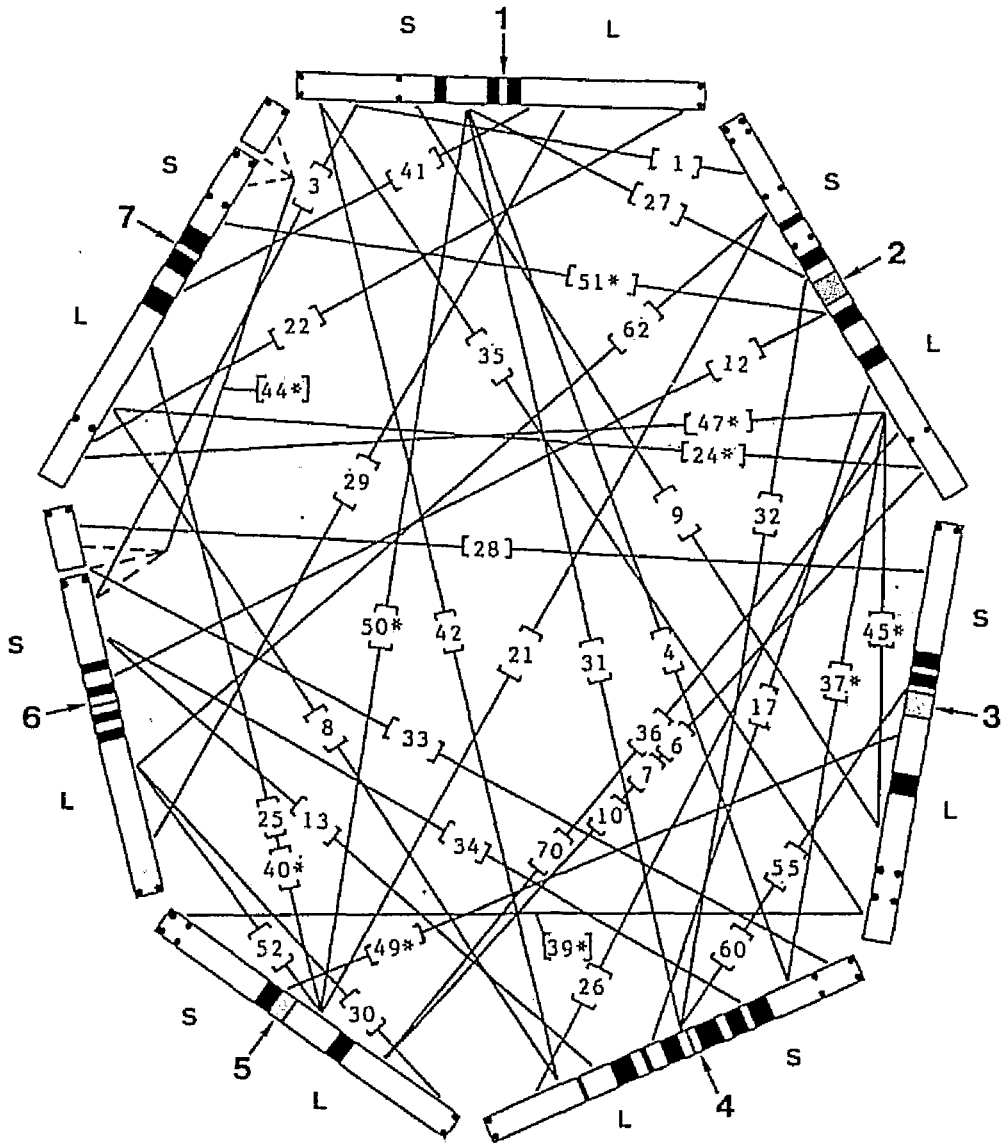


Fig.3-9. Breakpoints in the reciprocal translocation lines derived from 'Chikurin-ibaraki No.1'. Figure in the bracket indicates TS line number. The asterisked lines had not so far been identified for the translocation chromosomes. Six lines (TS 2,14\*,15,18,43\* and 48\*) could not be identified for the breakpoints in this study. TS 44 could have the breakpoints at the satellite, the NOR or the distal interband of short arm in chromosome 6 and the same corresponding position in chromosome 7. L, S and an arrow show long arm, short arm and centromere of each chromosome, respectively. N-banding specific band at each centromeric site is represented by a dotted band.

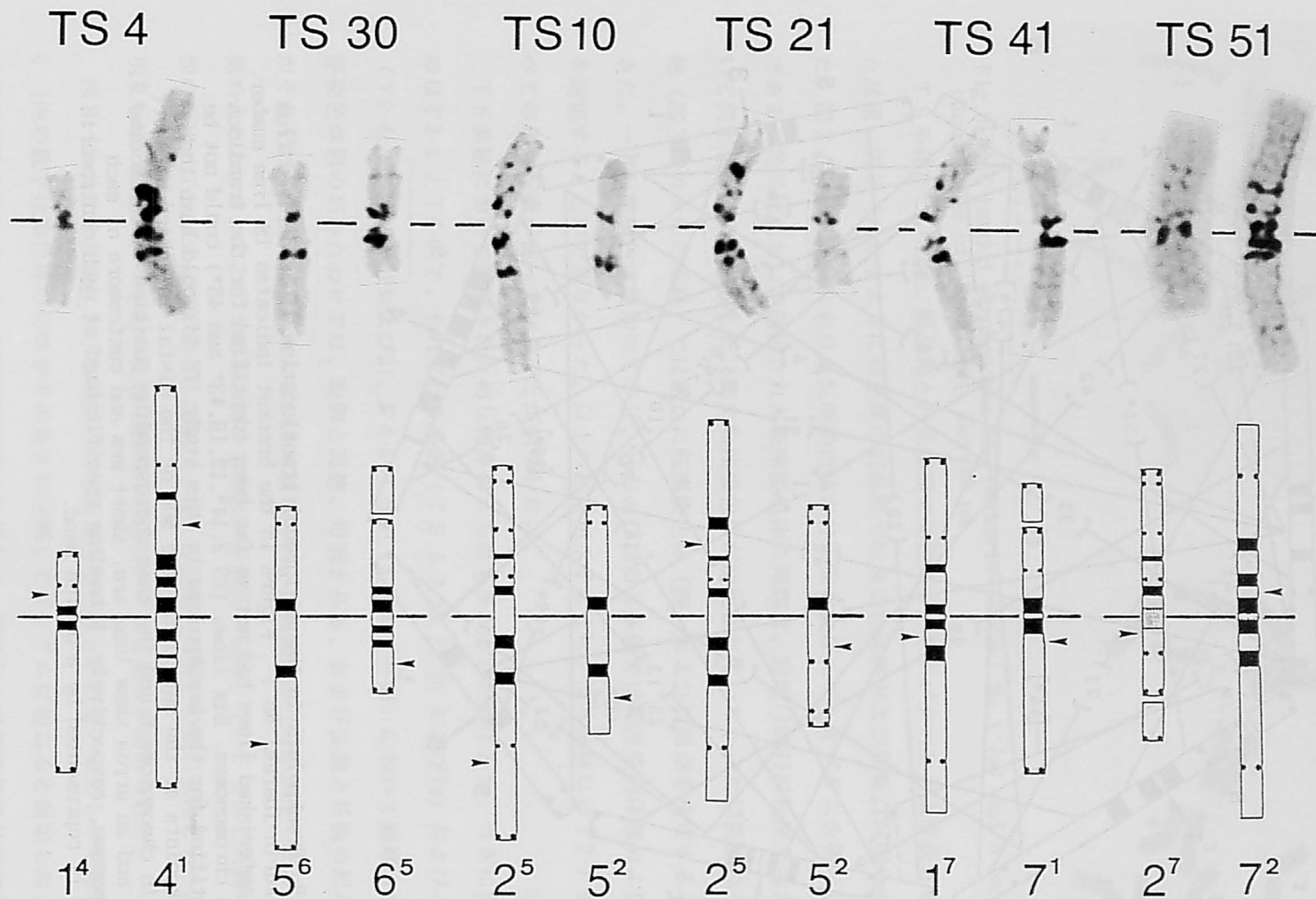


Fig.3-10. Translocation chromosomes and their idiograms in six TS lines. C-banded chromosomes are demonstrated in TS 4,30,10,21 and 41, and N-banded chromosomes in TS 51. Arrowheads indicate breakpoints.

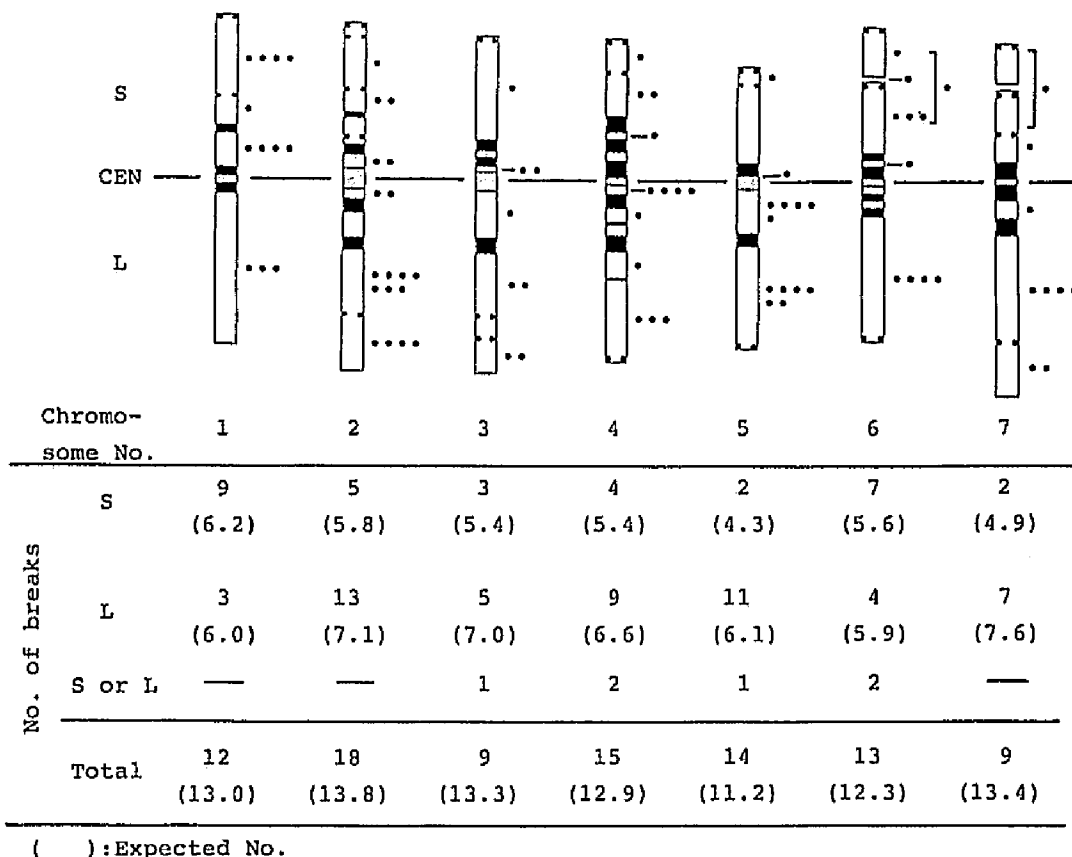


Fig.3-11. Distribution of breakpoints in TS lines. Number in the parenthesis shows expected number of breaks which was calculated assuming that the occurrence frequency of breaks is proportional to chromosome length.

高く、第3および第7染色体の切断頻度は低かった。また第1染色体では短腕、第2、第4および第5染色体では長腕における切断頻度が高かった。さらにすべての切断点はインターバンド（バンド間の領域）内に存在していた（TS49の5Sの切断点は基部の2つのバンドの境界部にある）。一方、全染色体に共通して切断頻度の高い領域（例えば染色体基部、染色体端部等）は認められず、動原体部位での切断も全く認められなかった。

TS32（T2-4）、TS55およびTS60（T3-4）の3系統では、転座染色体の切断点が動原体部位にあるのかその近傍部位にあるのかは、C分染法では決定することができなかった。しかしN分染法では、動原体部位に出現したN分染法特有のバンドの大きさを指標として切断点を決定することができた。すなわち図3-12に示すように、第2染色体と第4

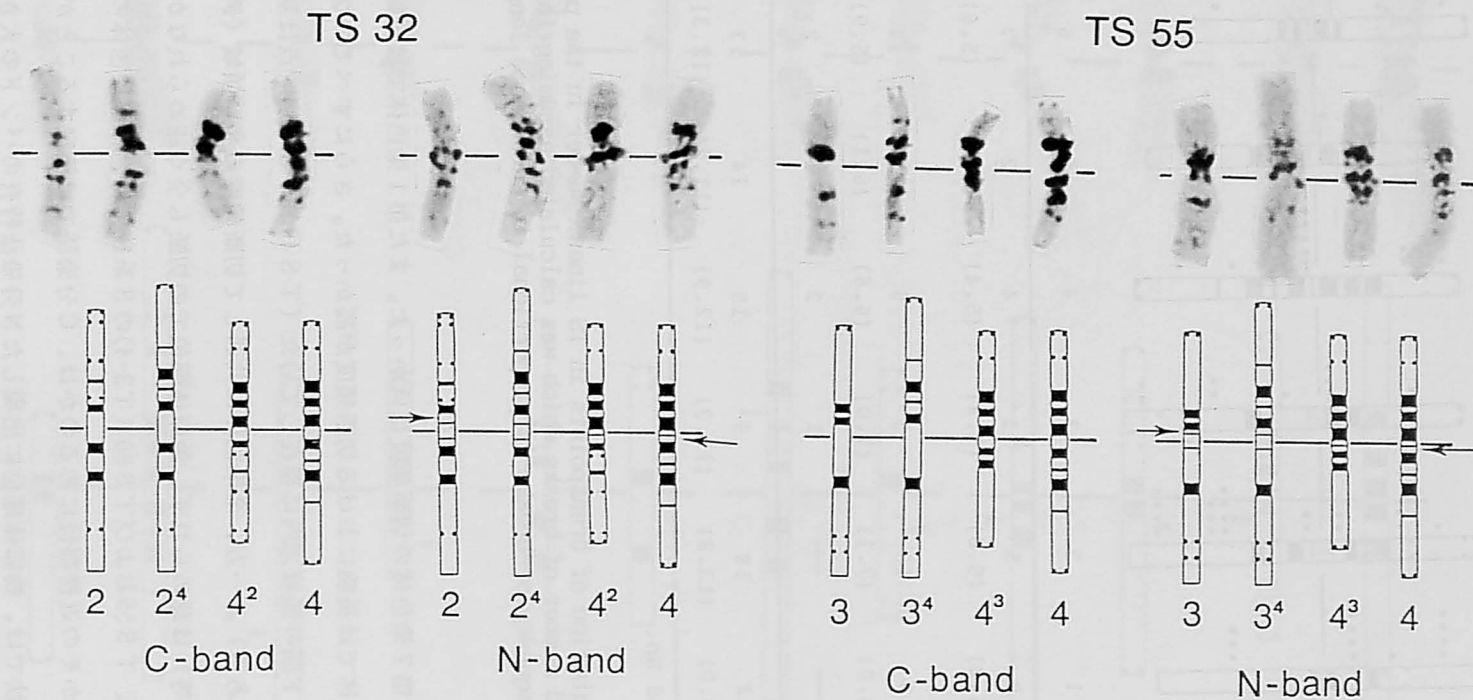


Fig.3-12. C-banded and N-banded translocation chromosomes and their idiograms in TS 32 and TS 55. The original chromosomes of 'Chikurin-ibaraki No.1' are arranged on both sides in each four chromosome set for reference. Arrows indicate breakpoints.



染色体の間、ならびに第3染色体と第4染色体の間で動原体部位のNバンドの大きさが異なっているが、T S 32およびT S 55(60)における各転座染色体はすべて原品種の染色体と同じ大きさの動原体バンドをもっていたことから、これらの系統の切断点は動原体バンドの外側にあると考えられた。

つぎに“Bonus”由来の相互転座系統については、T S 系統と同様の調査から、図3-13aに示すように58系統中48系統で転座切断点が明らかとなった。このうちT 3-4jを除く47系統はすべて記載どおりの相互転座であったが、T 3-4jは第2染色体と第7染色体間の相互転座(T 2-7, 2しと7しでの切断)であることが明らかとなった。転座染色体腕の組み合わせに関しては特別の傾向は認められず、各染色体の切断点は基部から端部まで広く分布していた。図3-13bは第4染色体における切断点の分布をまとめたものである。第4染色体を大きく4つの部位に分け各部位の切断頻度とその期待頻度とを比較したところ、切断点の分布はランダムでなく、短腕端部よりのユークロマチン部位での切断頻度がとくに高い傾向が認められた。またどの相互転座においてもインターバンド内に切断点が集中する傾向(全94個の切断点のうち90個)があったが、T 1-4b、T 2-4dおよびT 2-4iの3系統ではC(N)バンド内における切断が認められた。一方、動原体での切断は全く認められなかった。

### 3 論議

オオムギにおいては従来数多くの相互転座系統が作出されてきたが、太糸期分析が困難なこと(Singh and Tsuchiya 1975)から、切断点の明確な決定は困難であった。本実験ではCまたはN分染法を用いて相互転座系統の体細胞染色体を解析し、その結果調査した106系統のうち90系統で切断点の位置を決定することができた。この成績から、本実験で用いたCおよびN分染法は、オオムギにおける転座切断点の同定その他微細な染色体構造変異の検出にきわめて有用であると考えられる。またこれに付言するならば、減数分裂前期における染色体の対合部位は分裂ステージの違いやクロマチンの種類によって変化する(Moses and Poorman 1981; Ashley 1988; Naranjo et al. 1989)ので、一般に転座切断点の位置決定には太糸期染色体の対合点よりも体細胞染色体のC(N)バンドを指標とする方が確実と考えられる。

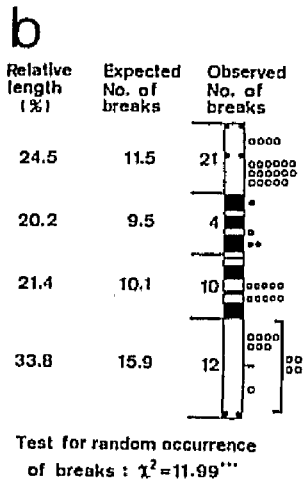
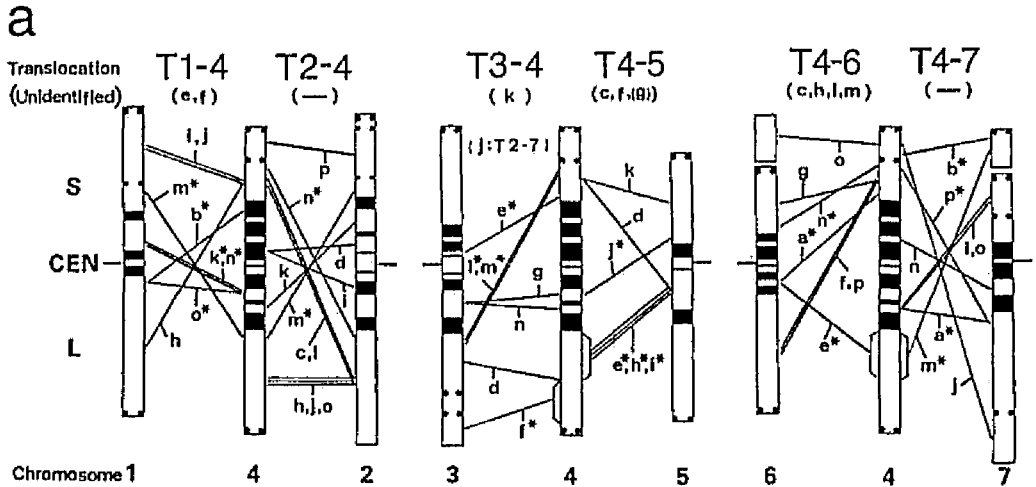


Fig.3-13. (a) Breakpoints in the reciprocal translocation lines derived from 'Bonus'. In asterisked lines, the exact location within interband region could be identified for their breakpoints. (b) Distribution of breakpoints in chromosome 4. Expected number of breaks was calculated assuming that the occurrence frequency of breaks is proportional to chromosome length.

前節で示したようにオオムギの各染色体の動原体部位にはN分染法で特異的に出現するバンドが認められるが、このバンドは動原体付近にある切断点の位置を正確に決定する上で有効な指標となることが示された(図3-12)。従来、オオムギにおいては核型分析法により動原体での切断によると判定された相互転座が多いが、N分染法を用いればこれらの切断点が動原体にあるのか、その近傍部位にあるのかを正確に決定できると考えられる。

Linde-Laursen(1988)は"World Collection"その他の相互転座系統計70系統を用いて本実験と同様の調査を行い、切断点の決定できた52系統においてすべての切断点がインターバンド内にあることを報告した。本実験でも大部分の切断点がインターバンド内に集中していたこと(図3-11および3-13)から、オオムギでは染色体の切断もしくは癒合がC

(N) バンド以外の領域で起こりやすいことが示唆される。

染色体切断の頻度が染色体部位間で異なる例は様々な種において報告されている。例えばタマネギ(Rieger et al. 1977; Döbel et al. 1978) およびヒト(Seabright 1973; Kaina 1977)においては、染色体の切断がギムザバンド(タマネギではCバンド、ヒトではGバンド)とインターバンドとの境界部分で起こりやすいことが示唆されている。一方オオムギにおいては第4染色体を例にとると、図3-13bに示されるように、バンドとインターバンドとの境界部は両腕基部の2つの領域で多くなっているが、必ずしもこれらの領域で染色体切断の頻度が高くなる傾向は認められなかった。つぎにトウモロコシ(Jancey and Waldon 1972)およびトマト(Gill et al. 1980)においては、動原体近傍部での切断頻度が高いことが報告されている。しかしながら本実験では、動原体近傍部または染色体の基部で切断頻度が高くなる傾向は認められなかった。

切断点既知の相互転座系統は遺伝子の物理的マッピングを行う上で有用である。例えば同一染色体腕内の異なる位置に切断点をもつ系統を用いて転座分析を行えば、染色体腕内における遺伝子の位置を決めることが可能である。また本実験では、形態的に容易に識別できる種々の転座染色体、例えば第6および第7染色体のサテライト部分が他の染色体に転座した染色体、非対称な相互交換によって長さや腕比が極端に変化した染色体等が同定された(図3-10)が、このような転座染色体は *in situ* ハイブリダイゼーションにより遺伝子の染色体上の位置を決定する場合に有用と考えられる。

#### 第4節 摘要

##### 1) CおよびNバンドパターンからみたヘテロクロマチンの分化(第2節)

オオムギ染色体におけるバンドパターンの変異について再検討するため、4品種の染色体のCおよびNバンドパターンを調査した。まずすべての品種において各染色体の動原体部位にはN分染法で染まりC分染法では染まらない(N<sup>+</sup> C<sup>-</sup>)バンドが出現し、2つのバンドパターンは動原体部位で異なることが明らかとなった。つぎに両分染法に共通して特定の品種にのみ出現するバンドや濃淡および大きさが品種間で異なるバンドが認められ、オオムギ染色体のバンドパターンには明瞭な品種間差異のあることが明らかとなった。さらに早中期から完全中期までの4つの分裂ステージにおける染色体のバンドパターンを調

査したところ、各品種におけるCバンドおよびNバンドの基本パターンは分裂ステージ間で変化しないことが示された。このことからオオムギ染色体におけるバンドパターンの変異は分染法および品種に固有のものであり、ヘテロクロマチン自体の分化に基づくものであると結論された。最後にオオムギにおけるヘテロクロマチン分化の機構について考察した。

## 2) 相互転座系統における切断点の位置決定 (第3節)

「竹林茨城1号」および「Bonus」に由来する相互転座系統計106系統を供試し、CおよびN分染法を用いて転座染色体の切断点の詳細な位置決定を行った。各相互転座系統と原品種の間で染色体のバンドパターンおよび長さを比較した結果、106系統中90系統で転座染色体腕および切断点を決定することができ、本実験で用いたCおよびN分染法がオオムギにおける微細な染色体構造変異の検出にきわめて有用であることが示された。転座切断点の染色体上の分布は均一でなく、大部分の切断点はインターバンド内に存在していた。一方全染色体に共通して切断頻度の高い染色体領域は認められなかった。動原体近傍の切断点の詳細な調査にはN分染法で特異的に出現する動原体部位のバンド(N<sup>+</sup>C<sup>-</sup>)が有効な指標となることがわかった。

## 第4章 トウモロコシにおけるG分染法の開発

### 第1節 緒言

動物においてはCaspersson et al. (1968, 1969)によるQ分染法の開発を契機として、1970年代前半に種々の染色体分染法が次々に開発された。これらの中でもG分染法は、簡便な処理により安定的にバンドが得られ、1本の染色体あたりに得られるバンドの数がきわめて多いという点でとりわけ利用価値の高いものであった。例えばヒトにおいては、G分染法によりはじめて全染色体が同定された(Sumner et al. 1971) ほか、きわめて詳細なレベルでの染色体の解析が可能となり、現在ではGバンドパターンに基づいて細かく区分された染色体上に数千の分子マーカーや遺伝子が位置づけられている (McAlpine et al. 1987)。

植物においては現在、C分染法、N分染法、蛍光分染法等の分染法が様々な種で利用されているが、これらの分染法では通常動物染色体のGバンドパターンに比肩し得る高精度のバンドパターンが得られない。このため植物では、太糸期分析の進んだ一部の種を除き染色体の詳細な解析が立ち遅れており、今なお染色体の同定さえ不完全な種が少なくない。このような事情から、植物細胞学の分野では長い間G分染法の確立が強く望まれてきた。

1980年代に入って植物の染色体にもGバンド様のバンドパターンが出現することが報告されるようになり(Kurata et al. 1981; Drewry 1982; Murata and Orton 1984)、以来植物において安定したG分染法を確立するための研究が続けられてきた(Chen et al. 1986; Zhu et al. 1986; 福井ら1986a)。こうした状況の中で筆者もいくつかの植物種を用いてG分染法の開発を試みたが、その結果、トウモロコシにおいて高精度のG分染法を確立することに成功した。本章ではこの手法開発に関する実験結果をとりまとめるとともに、植物の染色体におけるGバンドの出現様式ならびにG分染の機構について考察した。

### 第2節 材料および方法

トウモロコシの自殖系統<sup>+</sup>0h43<sup>+</sup>を材料に用いた。種子を湿ったパーミキュライトを入れた小さなビニールポットの中で32℃、光条件下で約2日間インキュベートし催芽させた。

各催芽種子から1~2 cmに伸ばした根の根端を切り取って0.05%のコルヒチン溶液または10 ppmの臭化エチジウムを含む同溶液で25°C、2時間前処理を行った。つづいて根端を25°CのOhnukiの低張液(55mM KCl, 55mM NaNO<sub>3</sub>, 55mM Cl<sub>2</sub>, COONa, 10:5:2; Ohnuki 1968)で30分から1時間処理した後、ファーマー液(メタノール-酢酸、3:1)を用いて冷凍庫内(-20°C)で1~4日間固定した。染色体標本は酵素解離-空気乾燥法(本論文第2章参照)により作製した。ただし酵素液の組成は2%セルラーゼRS、2%マセロザイムR200、pH 4.2とし、解離時間は20~60分間とした。位相差顕微鏡を用いて染色体のよく拡がったスライドを選び、これらを37°Cのインキュベータ内で約2日間風乾したのち分染処理に用いた。

G分染処理は以下の手順に従って行った。まず風乾したスライドをリン酸緩衝液(1/15 M, pH6.8)で希釈した2%グルタルアルデヒド溶液で25°C、10分間処理して固定し、後水洗した。つづいてスライドをPBS(NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/l, pH7.2)に溶解した2%トリブシン(Merck社, Art. 8367)溶液で25°C、10分間、またはTris-HCl緩衝液(20mM, pH8.0)に溶解した0.02%SDS溶液で25°C、2~5分間処理した。処理後は軽く水洗した後、リン酸緩衝液(1/30 M, pH6.8)で希釈した5%ライト液(和光純薬工業社)で5分間染色した。

なお"0h43"の染色体におけるノブの数と位置を調べるため、中期染色体のC分染処理を行った。この場合、根端の前処理は0°Cの蒸留水中で20時間行い、C分染処理はChow and Larter(1981)の方法を変更して以下のように行った。風乾したスライドを5%Ba(OH)<sub>2</sub>溶液で室温、6分間、つづいて0.1N HClで室温、30秒間、さらに2xSSCで60°C、1時間処理し、水洗後、2%ライト液で30分~1時間染色した。

G分染、C分染いずれについても、鮮明な分染像を選びネオパンFフィルム(富士写真フィルム社)を用いて写真撮影した。バンドパターンの解析は、染色体画像解析システムCHIASを用いて写真から入力した染色体画像を用いて行った。

### 第3節 結果

図4-1は前中期(aおよびb)および早中期(c)の染色体における典型的なG分染像を示したものである。図4-1aはトリブシン処理、図4-1bおよび1cはSDS処理を行って得ら

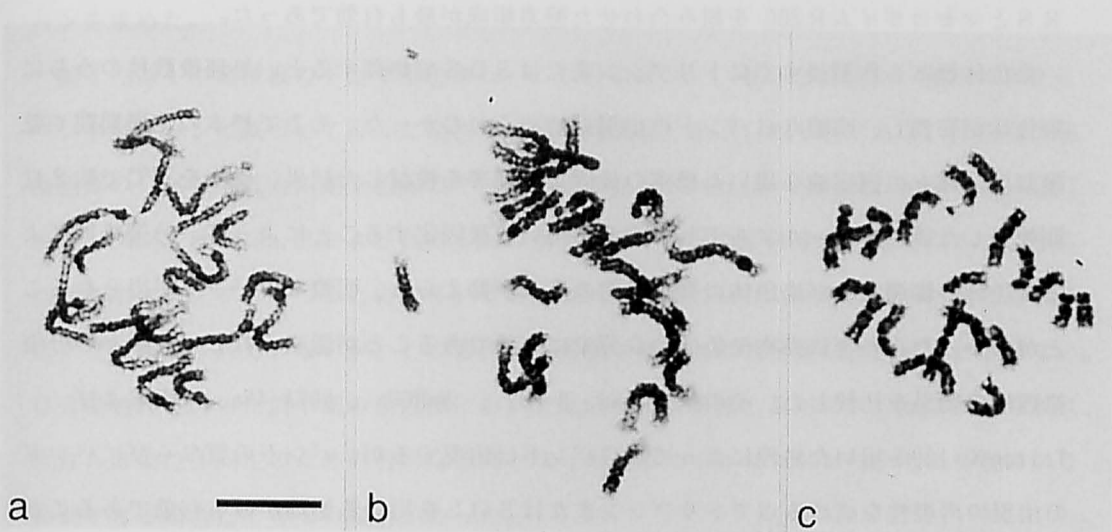


Fig.4-1. Photomicrographic images of G-banded maize chromosomes. (a) Prometaphase plate treated with trypsin. (b) Prometaphase plate treated with SDS. (c) Early metaphase plate treated with SDS. Bar=10  $\mu$ m.

れた分染像である。2つの処理法の違いにかかわらず、前中期では染色体全体にわたって細かいドット状のGバンドが得られた(図4-1a および1b)。これらのGバンドは染色体の端部では基部や中間部に比べやや薄くなっていた。また大きなノブのある部位はG分染処理により濃染し、場合によっては膨潤してみえることもあった。分裂ステージが進むにつれバンドパターンは次第に粗になり(図4-1c)、完全中期には染色体全体がほぼ均質に染まるようになった。

前処理、標本作製、分染処理等の各過程で行った種々の試験の結果は以下に述べるとおりである。まず、前処理にコルヒチンまたは臭化エチジウムを含むコルヒチンを用いた場合には多くの前中期細胞が集積し、染色体の形態も良好であったが、8-ヒドロキシキノリン(2 mM)または冷水(8~10°C)を用いた場合には前中期染色体の細かい構造が乱れることが多かった。また、低張処理にOhnuki(1968)の溶液を用いた場合には鮮明なバンドが得られやすかったが、KCl(75mM)を用いた場合にはバンドの形態が乱れることが多く、ときにはごく細かいバンドが染色分体上にランダムに生じることがあった。つぎに、染色体標本を酵素解離-空気乾燥法により作製した場合には、染色体の拡がりがよく、染色体を覆っている細胞質も除去されるため、押しつぶし法を用いた場合よりも分染処理の効果が高まり、より鮮明なGバンドが得られた。またいくつかのセルラーゼおよびペクチナーゼの酵素の効果については、組織の解離および染色体の微細構造の保持の両面でセルラーゼ

R SとマセロザイムR200 を組み合わせた酵素組成が最も有効であった。

染色体標本作製後すぐにトリプシンまたはSDSで処理すると、処理後数秒のうちに染色体が膨潤し、明瞭なGバンドの出現は認められなかった。そこで標本の乾燥期間や乾燥温度、種々の固定液を用いた標本の後固定処理等を検討した結果、標本を37°Cで約2日間乾燥した後グルタルアルデヒド溶液を用いて後固定することによって、分染処理による染色体の膨潤および染色体の微細構造の乱れが抑えられ、明瞭なGバンドが得られることがわかった。つぎに動物染色体のG分染に有効であることが認められている種々の分染処理液の効果を比較した。その結果、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、EDTA-4Na、尿素およびTriton X-100を用いた処理によってもGバンドは出現するが、バンドの質ならびにバンドの出現の再現性を高める点でトリプシンまたはSDSを用いる処理が最も有効であることが明らかとなった。またバンドのコントラストを高める上でライト染色液はギムザ染色液よりも有効であった。

図4-2は画像処理によるGバンドパターンの解析過程を示したものである。まず染色体写真をCHIASにとりこみ、照明ムラ等を補正した(図4-2a)後、輪郭強調フィルタを用いてバンドの明暗のコントラストの高い染色体画像を作出した(図4-2b)。この画像をメディアンフィルタで処理して平滑化した後2倍の大きさに拡大し、各染色分体の中軸部に沿って線を引いた(図4-2c)。この中軸線の長さを染色体腕ごとに測定するとともに、中軸線下の濃度分布曲線(本論文第2章参照)のパターンに基づき各染色体のバンドパタ

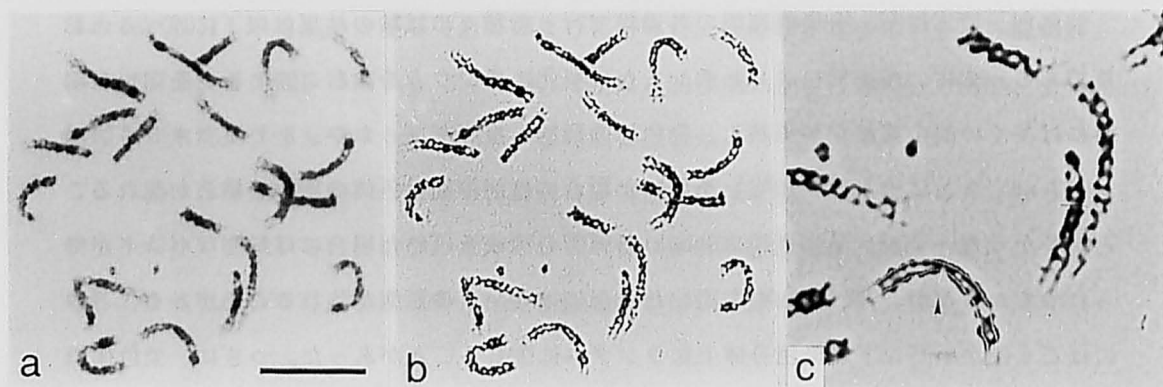


Fig.4-2. Sequential process of image manipulation of G-banded chromosomes in a prometaphase plate. (a) Original chromosome image after correction of light fluctuations and noises. (b) Enhancement of the contrast of the original image by treatment with a digital filter. (c) Twofold enlarged chromosome image of a part of Fig.4-2b. Mid-ribs of each sister chromatid of a chromosome 5 indicated by an arrowhead were traced interactively with overlay lines. Bar indicates 10  $\mu\text{m}$  in (a) and (b), and 5  $\mu\text{m}$  in (c), respectively.



ーンを求めた。

図4-3は1中期核板のギムザ染色像(a)、C分染像(b)、ならびに長さ、腕比およびCバンドパターンに基づいて行った染色体の同定結果(c)を示したものである。体細胞中期染色体のCバンドは太糸期染色体のノブに対応すること(Aguiar-Perecin and Vosa 1985)から、「0h43」は2L, 4L, 5Lおよび7Lに1対の大きなノブ、6Lに中程度の大きさのノブ、さらに9Sに小さなノブをもつことになる。なおChughtai and Steffensen(1987)の報告では2Lにノブは観察されていないが、この報告と本実験の結果との不一致の原因は定かではない。G分染処理を行った前中期の染色体においては9Sのノブを除く5対のノブは常に濃染され、これらは染色体同定のための有用な指標となった。9Sの小さなノブについては核板により判別できる場合とできない場合があった。

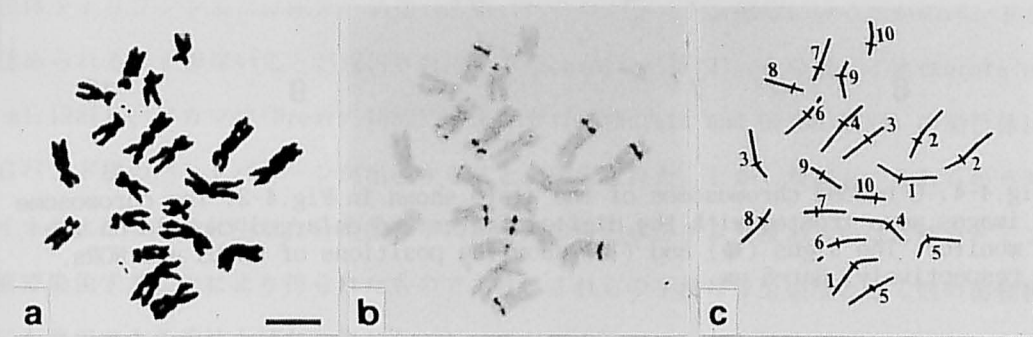


Fig.4-3. Chromosome identification by the C-banding technique. (a) Giemsa-stained chromosomes at metaphase. (b) C-banded chromosomes. (c) Chromosome diagram with chromosome number. Bar=5  $\mu$ m.

図4-2bのG分染像について、染色体のバンドパターン、ノブの位置、長さおよび腕比に基づき染色体の同定を行ったところ、図4-4に示すようにすべての相同染色体組を同定することができた。Gバンドパターンは各相同染色体間で概ね一致していた。ただしいくつかの染色体、とくに長い方の染色体(第1~第4染色体)では、対応する染色体腕の間でバンドの数が一致しない場合が認められた。これはおそらく相同染色体の間でも凝縮の程度が異なり、一方の染色体では他方の染色体に比べてバンドの融合が進んでいるためと考えられる。

つぎに核板間ならびに分染処理法間でGバンドパターンを比較した。図4-5は4つの異なる核板(A~D)における第3、第7および第8染色体のバンドパターンを示したものであり、AおよびCはトリプシン処理、BおよびDはSDS処理を行った核板の染色体を

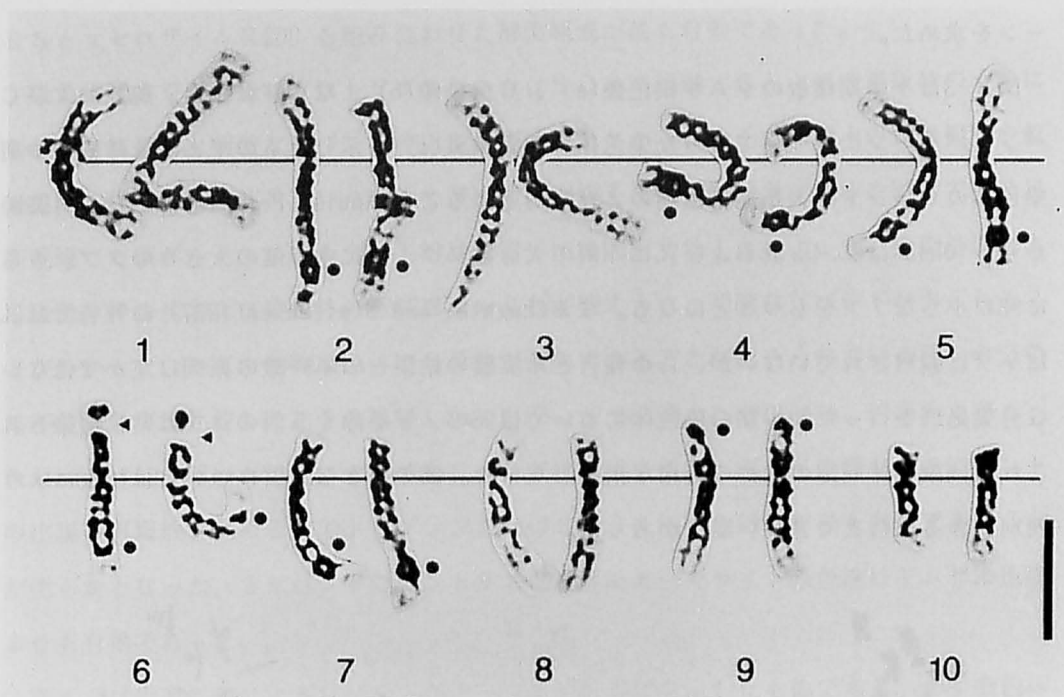


Fig.4-4. G-banded chromosomes of the plate shown in Fig.4-2. The chromosome images were treated with the digital filter and enlarged twofold on the monitor. The signs (●) and (▶) show the positions of knobs and NORs, respectively. Bar=5  $\mu$ m.

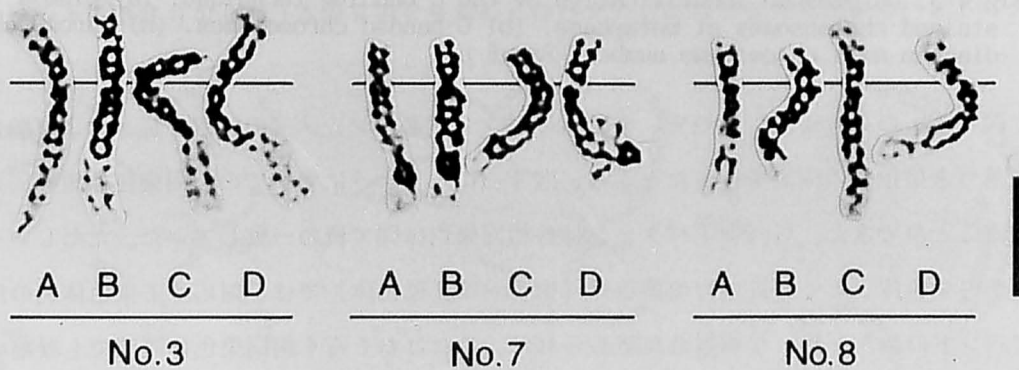


Fig.4-5. Comparison of the G-banding patterns of chromosomes 3,7 and 8 obtained from four different plates and by two different methods. A, B, C and D are selected from the plates of Figs.4-2, 4-1a and 4-1b, and the plate not shown, respectively. Bar=5  $\mu$ m.

示している。各染色体とも2つの処理法の違いに関わりなく4本の相同染色体間でほぼ同様のバンドパターンが認められた。バンドの数および位置に関しては各相同染色体間でいくつかの細かい差異が認められたが、これらの差異は染色体の凝縮程度の差によるバンドの融合あるいは染色体の折れ曲がりによるバンドの位置の移動に起因するものと考えられる。

#### 第4節 論議

##### 植物染色体のG分染に関する技術上の問題点と本実験の成果

植物染色体のG分染に関する初期の研究では、*Trillium*, *Fritillaria*, *Crepis*等の染色体をトリプシンまたは尿素で処理しても、ヘテロクロマチン部位にいくつかのバンドが認められるにすぎないことが報告されている(Schweizer 1973)。その後、イネ(Kurata et al. 1981)、アカマツ(Drewry 1982) およびセロリ(Murata and Orton 1984)の染色体にGバンド様のバンドパターンが出現することが報告された。しかしながら、それらのうちイネおよびセロリに生じた分染像は単に前中期の染色体をギムザ液あるいは酢酸カーミン液で染色することにより得られたものであり、これらの手法はG分染法として他の植物種にも適用できる手法とはなり得なかった。またアカマツに生じた分染像はトリプシン処理により得られたものではあるが、そのバンドパターンはバンドの質および1本の染色体あたりに出現するバンドの数において、哺乳類の染色体のGバンドパターンとはかなり異なるものであった。1980年代の後半に入ると、いくつかの予備試験から植物の染色体にも多数の細かいGバンドが出現することが示唆されるようになり(福井ら1986; Chen et al. 1986; Zhu et al. 1986)、さらにマツおよびユリ(陳1988)、*Vicia hajastata* (Wang and Kao 1988)、ライムギ(Yang and Zhang 1988)においては高精度のG分染法が報告されるようになった。

本実験で新たに開発されたG分染法の諸特徴のうち、バンドの精度を高める上で、ならびにG分染法を多くの植物種に適用する上で重要と考えられる点は以下の3点に要約できる。第1点はOhnuki(1968)の溶液を用いた根端の低張処理である。ヒトにおいてはこの低張処理によって染色体のマクロコイル(らせん)構造が出現することが報告されている(Ohnuki 1968; Rattner and Lin 1985)。Gバンドとマクロコイル構造との間には密接な

関連のあること(Takayama 1976、詳しくは後述)から、植物の染色体ではこの低張処理がGバンドの生成に有効に作用すると考えられる。第2点は酵素解離-空気乾燥法を用いた染色体標本の作製である。この方法は、押しつぶし法よりも有効に細胞質を除去し染色体を採出させるため、トリプシンまたはSDSの処理効果が高まり、バンドの鮮明度が大幅に向上したものと考えられる。第3点はグルタルアルデヒド溶液を用いた標本の後固定である。グルタルアルデヒドは染色体タンパク質のアミノ酸残基の間に架橋を作ることによって、トリプシン処理またはSDS処理に対する染色体の耐性を強化すると考えられる。

Gバンドパターンの解析には画像処理法が有効であった。とくに輪郭強調フィルタを用いた処理によりバンドの明暗のコントラストが著しく向上し、各バンドの識別、染色体端部の薄いバンドの視覚化、染色分体の交差箇所の同定などがきわめて容易となった(図4-2)。画像処理法はGバンドの位置や幅の定量化にも有効であると考えられる。

#### 植物染色体におけるG分染の機構

動物においてはG分染機構の解明に関して数多くの研究がなされたきた(Comings 1978; Burkholder 1988)。ここではそれらの知見を参照しつつ、植物染色体のG分染の機構について考察してみたい。

哺乳類においては一般にGバンドは太糸期染色体の染色粒に対応するものと考えられている(Okada and Comings 1974; Luciani et al. 1975; Jagiello and Fang 1980)。Greilhuber(1977)は当時植物の染色体にGバンドが認められない原因について、植物では哺乳類に比べて体細胞中期染色体の凝縮率(染色体の単位長さあたりのDNA量)がかなり高く、体細胞中期には太糸期の染色粒構造が光学顕微鏡の解像度以下になっているためと考えた。これに対してAnderson et al.(1982)およびBennett et al.(1983)は動物植物間で染色体の凝縮率に有意な差はないことを示し、Greilhuber(1977)の仮説に否定的な見解を示した。この点に関して、本実験では明瞭なGバンドは凝縮程度の小さい前中期の染色体に出現し、凝縮の進んだ完全中期の染色体にはほとんど出現しなかったことから、染色体の凝縮率とGバンドの出現とは無関係ではないように思われる。また最近、植物種によっては組織の固定方法により核DNA量の測定値に大きな誤差が生じることが指摘されている(Greilhuber 1988)。したがってGreilhuber(1977)の仮説の妥当性を確かめるため

には、各植物種の核DNA量を再検討し、さらに体細胞分裂期の前中期から完全中期までの異なるステージにおける染色体の凝縮率を各動植物種間で比較することが必要と考えられる。

動物においてはさらに i) 染色体のマクロコイル構造、ii) 染色体DNAの塩基組成、iii) 染色体DNAの複製時期、およびiv) 非ヒストン系の染色体タンパク質がGバンドの生成に関与していると考えられている(Burkholder 1988、総説参照)。これら4つの点と植物染色体のG分染機構との関連について以下に考察する。

i) Takayama(1976)はチャイニーズハムスターにおいてトリプシン処理の時間を徐々に延ばすことによって、染色体のマクロコイル構造が次第にGバンド構造に変化することを示した。本実験でも、画像処理を行うことによって、トウモロコシのG分染像にらせん様の構造を見出すことができた(図4-2b および2c)。したがって、動物、植物ともGバンドの形成には、G分染処理によるマクロコイル構造の形成または変化が重要な役割を果たしていると考えられる。ただし本実験を含め植物の染色体で報告されているGバンドは、大部分がドット状の形態を示す点で動物染色体のGバンドとは異なっており、両者の間には何らかの構造上の差異がある可能性が示唆される。

ii) 哺乳類では一般に、DNAのAT塩基対に特異的に結合する蛍光色素で染色体を染めるとGバンドのパターンときわめて類似のパターン(Qバンドパターン)が観察されることから、Gバンド部位はAT塩基対に富むDNAで構成されていると考えられている(Schweizer 1981)。また最近ヒトの染色体ではGバンド領域に特異的に分布する反復DNA配列が同定され、この配列がAT塩基対に富むことが明らかになった(Korenberg and Rykowski 1988)。一方、植物の染色体を特定のDNA塩基対に結合する蛍光色素で染めた場合には、比較的大きなヘテロクロマチン部位にのみバンドが出現すること(Schweizer 1976)から、植物では哺乳類のようなDNAの塩基組成の違いに基づく染色体の細かい分化は生じていないと考えられてきた。トウモロコシの染色体においてGバンド領域のDNAの塩基組成に特異性があるかどうかについては今後検討する必要がある。

動物の核ゲノムはGC%を異にする数種類の長い(>300kb)DNA領域(isochore)から成り立っており(Berbaridi et al. 1985)、isochoreのヘテロ性が大きい(GC%が大きく異なるisochoreをもつ)種ほど染色体のGバンドパターンが鮮明化することが報告されている(Medrano et al. 1988; Schmid and Guttenbach 1988)。一方、植物においては一般にA

T塩基対に富むisochoreの比率が高く、isochoreのヘテロ性は小さいこと、ならびにこのようなisochoreの特長は動物種の中ではGバンドの出現しにくい魚類や両生類などの特長と類似していることが示されている(Matassi et al. 1989)。ただしトウモロコシについては調査された植物種中、最もisochoreのヘテロ性が大きく、またGC%の高いisochoreを多く含むことが示されている(Matassi et al. 1989)。これらのことから、植物においても核ゲノムのisochore構造と染色体のGバンド構造との間には密接な関連があり、各種ごとにisochore構造の違いによりGバンド出現の難易性も異なるものと考えられる。

iii) 哺乳類における染色体DNAの複製時期はS期の前半と後半の2つの時期に大別され、後期複製を行う染色体領域はGバンド部位に、前期複製を行う領域はRバンド(Gバンド淡染部)部位に相当することが報告されている(Holmquist et al. 1982)。植物においては、例えばライムギ(Lima-de-Faria and Jaworska 1972) およびソラマメ(Däbel et al. 1978)の染色体では後期複製部位がそれぞれ染色体端部および中間部のCバンド部位に対応し、タマネギでは後期複製部位が染色体全体にわたって分布する(Cortés and Escalza 1986)ことが報告されているが、染色体の複製パターンとバンド構造との関連は明らかではない。この点については本論文第5章で述べる。

iv) 動物の染色体においては、G分染処理による非ヒストンタンパク質の変性または除去によって染色体とギムザ液の結合様式が変化する結果、Gバンドが生じると考えられている(Burkholder and Duczek 1980, 1982)。最近ヒトおよびマウスの染色体ではGバンド部位に特異的に分布する非ヒストンタンパク質が単離され、その特性解析が進んでいる(Disney et al. 1989)。植物においても、ヒストン除去後の染色体にまったく可視的な変化が認められないことから、Gバンドの生成には非ヒストンタンパク質が関与していることが示唆されている(Yang and Zhang 1988)。

以上述べてきたように、植物の染色体には高精度のGバンドが出現するが、その出現様式は動物染色体のGバンドとは異なることから、動物植物間でGバンドの構造には差異のある可能性が示唆される。今後植物染色体のG分染機構に関する研究を進めることにより、植物に特異的な染色体の構造特性が明らかになることが期待される。

## 第5節 摘要

トウモロコシを用いて高精度のG分染法を確立することができた。本章ではその成果をとりまとめるとともに、植物染色体のGバンドの出現様式ならびにG分染の機構について検討した。

酵素解離-空気乾燥法を用いて作製した染色体標本をトリプシンまたはSDSで処理することによって、前中期の染色体全体にわたって明瞭なGバンドが出現した。高精度のGバンドを再現性よく得るためには、Ohnuki溶液を用いた根端の低張処理、酵素解離-空気乾燥法による標本作製およびグルタルアルデヒド溶液を用いた標本の後固定処理が有効であり、バンドパターンの解析には画像処理法を用いるのが有効であった。トウモロコシ染色体のGバンドは前中期には細かいドット状を呈し、分裂ステージが進むにつれ粗になり、完全中期にはほとんど出現しなくなった。このような特長は、従来報告された植物染色体のGバンドにほぼ共通に認められるものであるが、動物染色体のGバンドの特長とはかなり異なっていることから、両者のGバンドの構造には差異のある可能性が高い。そこで、従来の諸報告を参照しつつ、動物植物間でGバンドの生成機構を比較・検討した。

### 第Ⅲ編 免疫学のおよび分子生物学的手法を用いた植物染色体の特性解析

#### 序説

これまでの各章では画像解析法および分染法を用いた染色体の形態特性の解析に関する研究について論述してきた。一方、今後植物の染色体研究においては、形態レベルでの研究だけでなく、染色体の構造および機能に関する分子レベルでの研究やクローン化された遺伝子(DNA)の染色体上へのマッピングに関する研究を進展させていくことが重要と考えられる。本編はこのような観点から、植物における染色体DNAの複製パターンの解析を行い、*in situ*ハイブリダイゼーションによる遺伝子マッピングのための手法開発を試みたものである。まず第5章では、DNA合成期(S期)に取り込ませたBrdUの染色体上での分布を免疫学的に検出する手法を確立し、これを用いて植物における染色体複製の特長ならびに染色体のバンド構造と複製パターンとの関係を調査した。つぎに第6章では、イネにおいてビオチン標識DNAをプローブとしてRIを用いない*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、その有効性を検討した。



## 第5章 抗BrdU抗体を用いた植物染色体の複製パターンの解析

### 第1節 緒言

動物においては、チミジンのアナログである5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)をS期の種々の時期に取り込ませ、BrdUを取り込んだ染色体部位と取り込んでいない染色体部位とを染め分けることによって染色体DNAの複製パターンを調べることができる。哺乳類の染色体では、このような複製バンド法を用いてGバンド領域のDNAがS期の後半に、Rバンド領域(Gバンド淡染部に相当)のDNAがS期の前半に複製することが明らかになっている(Dutrillaux et al. 1976; Holmquist et al. 1982)。一方両生類の染色体においては、G分染法を用いても哺乳類の染色体に認められるような詳細なバンドパターンは出現しない(Schmid and Guttenbach 1988)が、複製バンド法を用いるときわめて詳細なバンドパターンが出現することが報告されている(Kuro-o et al. 1986, 1987)。このように動物では複製バンド法は染色体の複製パターンの解析に加え、G、Q、C等のバンドが出にくい染色体に新たなバンドを出現させる手法として有効であることが示されている。

植物においては、一部の種で、<sup>3</sup>H-チミジンを用いたオートラジオグラフィ法により染色体の複製パターンの調査が行われてた(Tanaka 1965; Lima-de-Faria and Jaworska 1972)が、この手法では複製シグナルの検出感度が低く、複製パターンの詳細な解析は困難であった。一般に、動物で用いられている高精度の複製バンド法を植物の染色体に適用することは困難であるが、最近谷口ら(1989)および谷口・近藤(1990a, b)は、植物の染色体に取り込ませたBrdUを検出する手法として、抗BrdU抗体を用いた免疫学的な手法(Gratzner et al. 1975; Gratzner 1982)が有効であることを報告している。本章はこの免疫学的な手法を用いてオオムギ、ライムギ、マカロニコムギおよびイネにおける染色体複製のパターンを調査し、植物における染色体複製の特長ならびに染色体のバンド構造と複製パターンとの関係を明らかにしようとしたものである。

### 第2節 材料および方法

植物材料にはオオムギ品種「竹林茨城1号」、ライムギ自殖系統「2a」、マカロニコム

ギ品種「Stewart」およびイネ品種「日本晴」を用いた。イネ以外の3植物種については、種子根が約1 cmに伸長した幼植物を供試して25℃暗黒条件下で1～50 µg/mlのBrdU溶液に根の部分30分間浸漬し、15分間水洗した後、湿った濾紙を敷いたシャーレに移し、BrdU処理終了時から10時間後まで1～2時間おきに根端を採取した。採取した根端は0℃の蒸留水中で16時間前処理を行った後、ファーマー液で固定した。イネについても種子根が約1 cmに伸長した幼植物を供試したが、上記3植物種の場合とは異なり、種子根を30℃暗黒条件下で、50～100 µg/mlのBrdU溶液に10分間浸漬し、15分間水洗した後、湿った濾紙を敷いたシャーレに移し、BrdU処理終了後1～5時間の各時間まで30℃でインキュベートした後、直接、または前処理として8℃で5時間インキュベートした後、根端を採取しファーマー液で固定した。なお、各植物種とも一部の個体については、BrdU処理終了後すぐに前処理を行った後根端を固定した。染色体標本は酵素解離-空気乾燥法(本論文第2章参照)により作製した。酵素液の組成は2%セルラーゼRS、1%ペクトリアーゼY23、pH 4.0とした。

染色体上のBrdUの検出は、モノクローナル抗BrdU抗体およびビオチン-ストレプトアビジンシステムを用いた酵素抗体法により行った。まず一晚風乾した染色体標本を55℃、0.1 N塩酸で10分間処理して染色体DNAを1本鎖に変性した後、冷水(4℃)で軽くすすぎ、ついで4℃のトリス緩衝液(50mM, pH 7.6)で5分間洗浄した。つぎに抗体の非特異反応をブロックするため、ウサギ正常血清(DAKO社製、トリス緩衝液で5倍に希釈)を各標本あたり50 µlずつ滴下してカバーグラスで封じ、イネでは5分間、他の3種では15分間反応させた。カバーグラスをはずした後、同様の方法でマウスモノクローナル抗BrdU抗体(DAKO社製、トリス緩衝液で200倍に希釈)と標本とを20分間反応させた。反応終了後、トリス緩衝液中で標本からカバーグラスをはずし、つづいて標本をトリス緩衝液に5分間、0.05% Tween 20を含むトリス緩衝液に30秒間、トリス緩衝液に10分間の順で浸漬し洗浄した。つぎに2次抗体としてビオチン化ウサギ抗マウスイムノグロブリン(DAKO社製、トリス緩衝液で200倍に希釈)を用いて、1次抗体と同様の方法で30分間標本と反応させ、洗浄した。つづいて同様の方法により標本をパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(DAKO社製、トリス緩衝液で約80倍に希釈)と30分間反応させ、洗浄した。さらに標本に0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む0.05% DAB(ジアミノベンジジン4塩酸塩)溶液(トリス緩衝液で希釈)を滴下し、イネでは30分間、他の3種では15分間暗所に置いて発色反応を行った。

この後、標本は4℃のトリス緩衝液で軽くすすいだ後、イネでは4%ギムザ液で30分間、他の3種では1%ギムザ液で5分間染色した。

各植物種の中期染色体（イネでは前中期染色体を含む）について、BrdU処理後の時間の経過にともなう複製シグナルの分布パターンの変化を調査した。とくにオオムギにおいては、BrdU（10 $\mu$ g/ml）処理終了時から0、2、4、6、8および10時間後の各時間にそれぞれ4本（2個体から2本ずつ）の根端を用いて合計500個以上の中期細胞を調査し、種々の複製パターンの出現頻度を調査した。

オオムギ、ライムギおよびマカロニコムギにおいては染色体のC分染処理も行った。材料の調整および分染処理は本論文第3章第2節で述べた方法に従った。

### 第3節 結果

本実験で用いた免疫学的な手法により、供試したすべての植物種の染色体および中間期核において明瞭な複製シグナルを検出することができた。図5-1はオオムギ細胞における複製シグナルを例示したものであり、S期にBrdUが取り込まれた核および染色体は茶色に、取り込まれていない核および染色体は紫色に染まって観察される。またバックグラウンドのノイズシグナルはきわめて少なかった。ネガティブコントロールとしてBrdUのかわりにチミジンで処理した根端を用いた場合、および無処理の根端を用いた場合には、ポジティブなシグナルは認められなかった。各植物種ごとに複製パターンの特長を述べると以下のようである。

#### オオムギ

図5-2はオオムギの中期染色体に認められた種々の複製パターンを示したものである。オオムギにおいては、主として染色体基部に複製部位をもつもの（I型、a）から、染色体基部から中間部（II型、b）、染色体全体（III型、c）、染色体端部から中間部（IV型、d）および主として染色体端部（V型、e）に複製部位をもつものまで概ね5種類の複製パターンが認められた。また複製シグナルをもたない細胞（f）はBrdU処理時にS期以外の細胞周期にあった細胞、姉妹染色分体の片方に複製部位をもつ細胞（g）はBrdUを取り込んだ後、細胞周期を一周しつぎのM期にはいった細胞と考えられる。

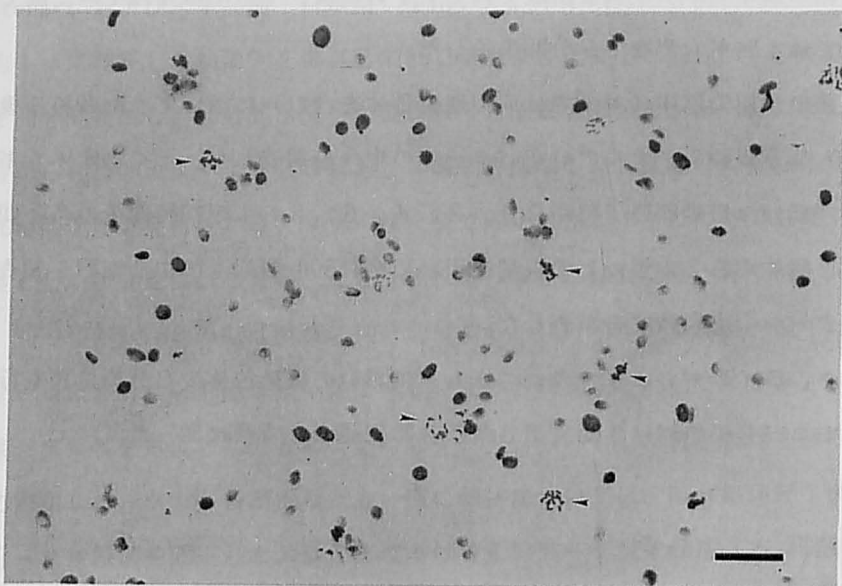


Fig.5-1. Replication signals detected by an anti-BrdU antibody in metaphase plates (indicated by arrowheads) and interphase nuclei of barley. Bar=10  $\mu$ m.

図5-3はBrdU処理後の時間の経過にともなう各複製パターンの出現頻度の変化を示したものである。なお図中横軸の時間はBrdU処理終了後の25°Cでのインキュベート時間を表しており、その後の0°Cでの前処理時間は含まれていない。またI型とII型の細胞、およびIV型とV型の細胞の出現頻度は込みにして示してある。BrdU処理後すぐに根端の前処理を行った場合（BrdU処理後0時間）には複製部位をもつ中期細胞は認められなかった。処理後1時間目にまずI型とII型（主としてI型）の細胞の出現が認められ、処理後2時間目には両型の細胞の出現頻度は全中期細胞の58.1%（I型：32.4%、II型：25.7%）を占めた。つづいて処理後4時間目にはIII型の細胞が頻出した（68.9%）。またIV型およびV型の細胞はそれぞれ処理後4時間目および6時間目から現れはじめ、両者の出現頻度はともに6時間目に最高（IV型：13.3%、V型：13.8%）となった。BrdU処理後早い時期に出現した複製シグナルはS期の晩期に、遅い時期に出現した複製シグナルはS期の早期に複製を行ったものと考えられる。したがってオオムギでは概ね染色体の端部から複製が始まり、つづいて中間部、基部の順に複製が進行すると考えられる。

図5-4は中期染色体におけるCバンドパターンと晩期複製パターンとを比較したものである。第1～第4染色体は晩期複製パターンに基づいて識別することは困難であった。Cバンドパターンと晩期複製パターン（I型）とは類似していたが、両パターンは必ずしも

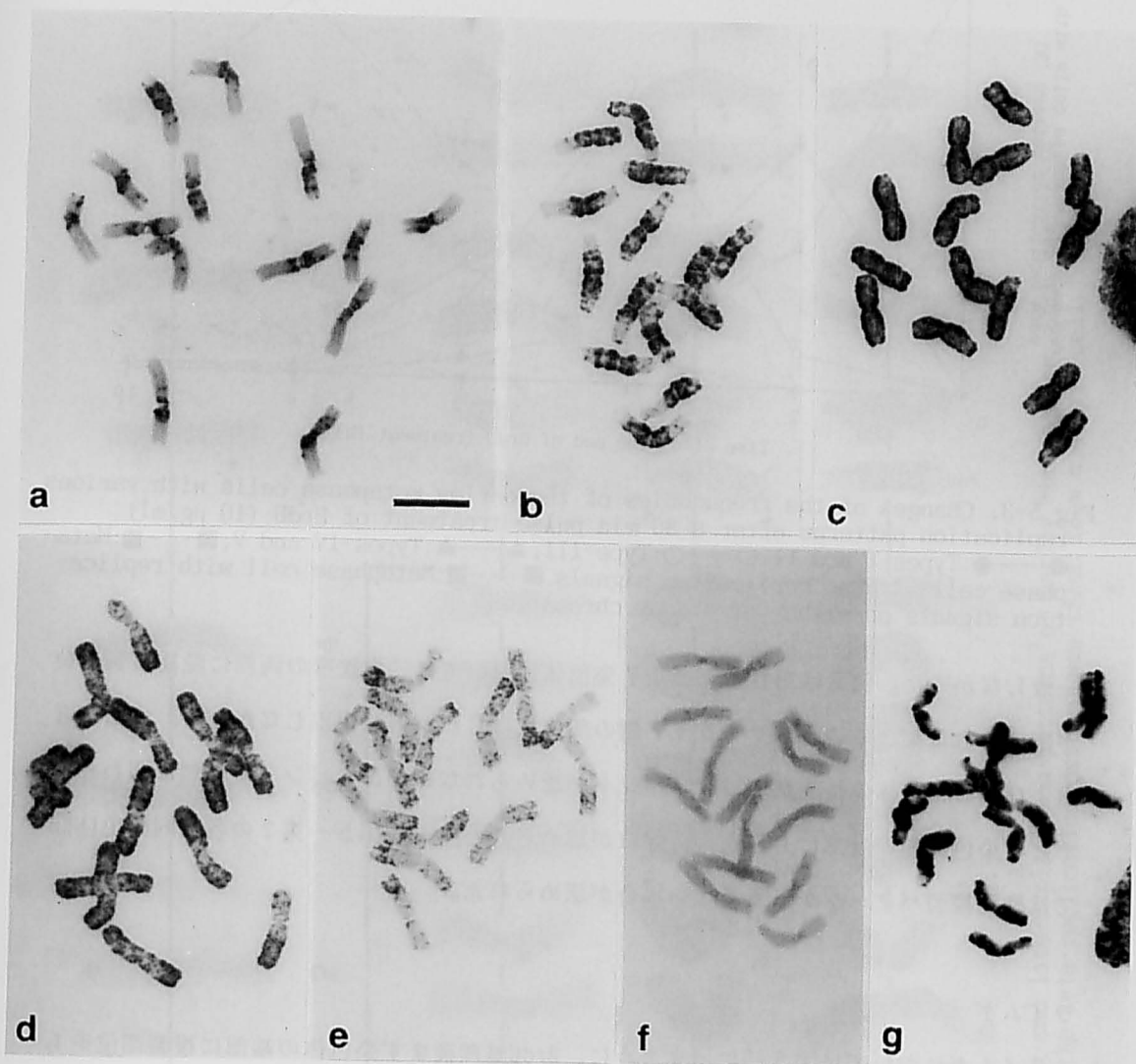


Fig.5-2. Replication patterns of barley chromosomes. (a)Type-I (b)Type-II (c) Type-III (d)Type-IV (e)Type-V (f)Metaphase cell with no replication signals (g)Metaphase cell with replication signals on either of sister chromatids. Bar=10  $\mu$ m.

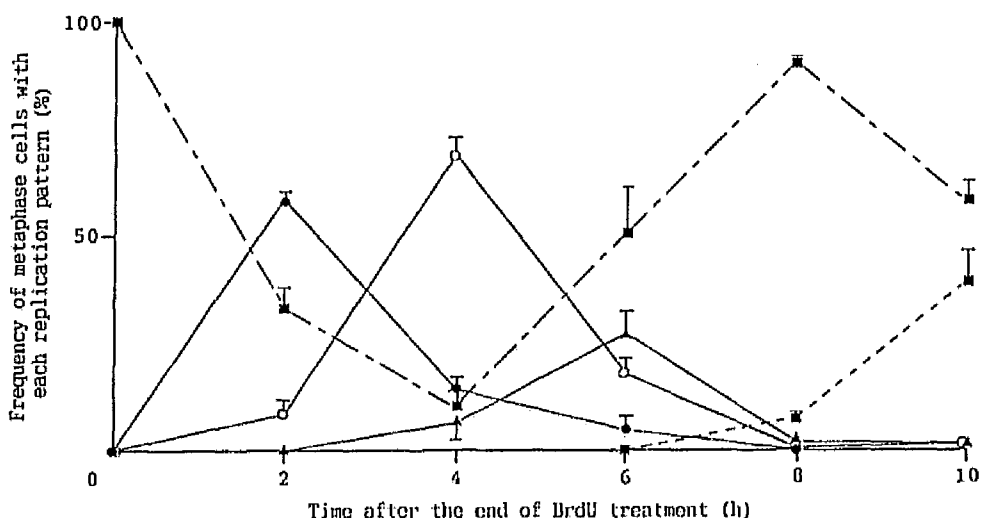


Fig.5-3. Changes of the frequencies of the barley metaphase cells with various replication patterns after a 30 min pulse treatment of BrdU (10  $\mu\text{g/ml}$ ). ●—●:Types-I and II, ○—○:Type-III, ▲—▲:Types-IV and V, ■---■:Meta-phase cell with no replication signals, ■-----■:Metaphase cell with replication signals on either of sister chromatids.

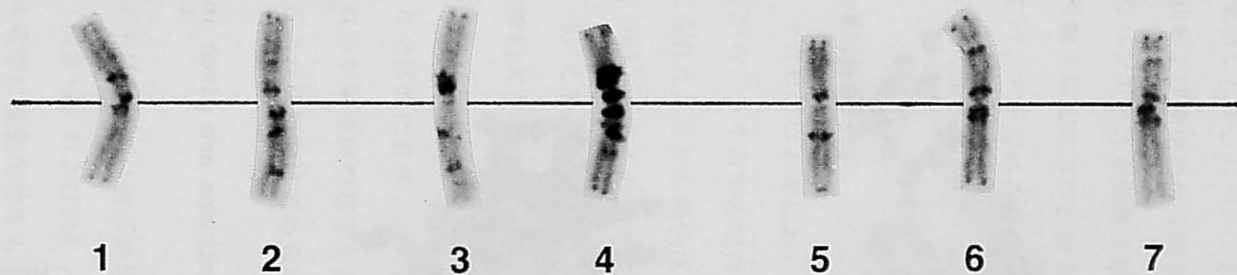
一致しなかった。例えば第6および第7染色体においては二次狭窄の両側に晩期複製部位が認められたが、このうちサテライト側の部位にはCバンドは出現しなかった。また第3および第5染色体の長腕基部にはCバンドが認められないが、Cバンドの有無に関わりなくどの染色体腕の基部にも晩期複製部位が認められた。また第5～第7の各相同染色体間では晩期複製パターンが一致しない場合が認められた。

### ライムギ

ライムギにおいては図5-5に示すように、BrdU処理後まず染色体の端部に複製部位をもつ細胞 (a)が認められ、つぎに染色体端部と基部に大きな複製部をもつ細胞 (b)、さらに染色体全体 (c)および染色体中間部 (d)に複製部をもつ細胞が出現した。この結果からライムギではオオムギの場合とは異なり、染色体の中間部、基部、端部の順に複製が進行すると考えられる。

図5-6に各染色体のCバンドパターンを示した。ライムギの染色体は短腕に大きなサテライトをもつ染色体(1R)、中部動原体型(腕比1.0-1.3)の染色体(2R, 3R, 7R)、次中部よりの位置に動原体(腕比1.4-1.7)をもち長腕に二次狭窄をもつ染色体(4R, 6R)および次中部よりの位置に動原体をもち二次狭窄をもたない染色体(5R)の4群に大別された。オオムギ

Barley  
C-banded  
karyotype



Late-  
replication  
pattern

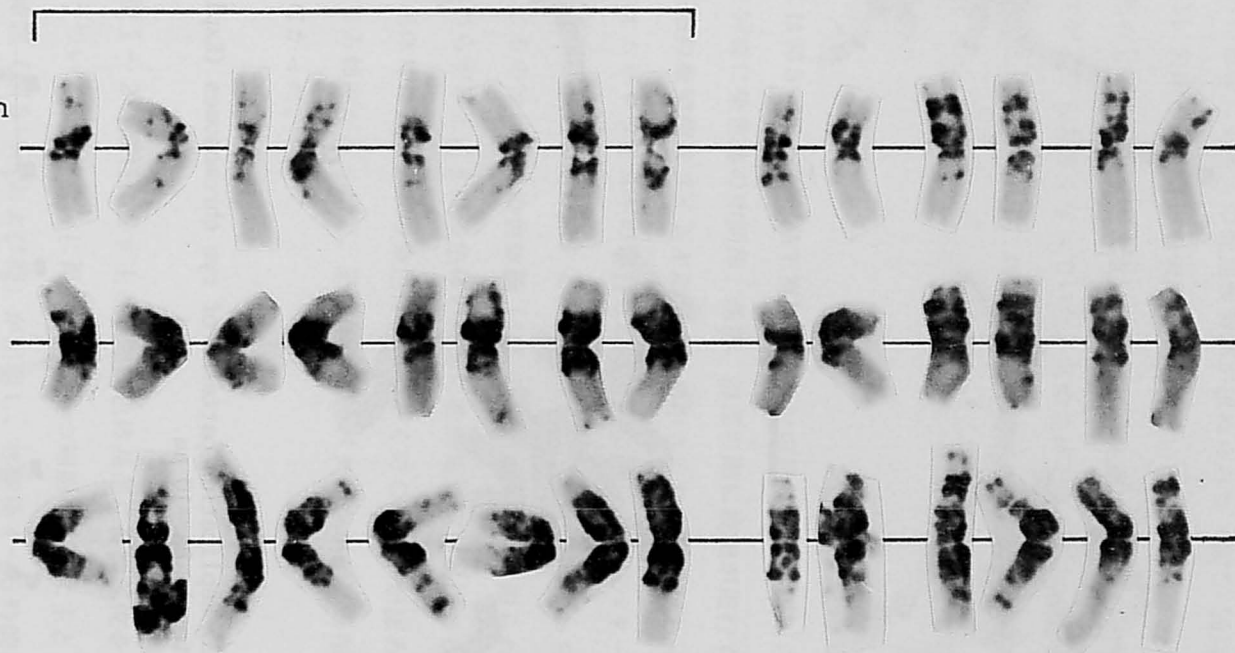


Fig.5-4. C-banding and late-replication patterns of barley chromosomes. Each set of 14 chromosomes in the late-replication pattern was taken from a single cell.

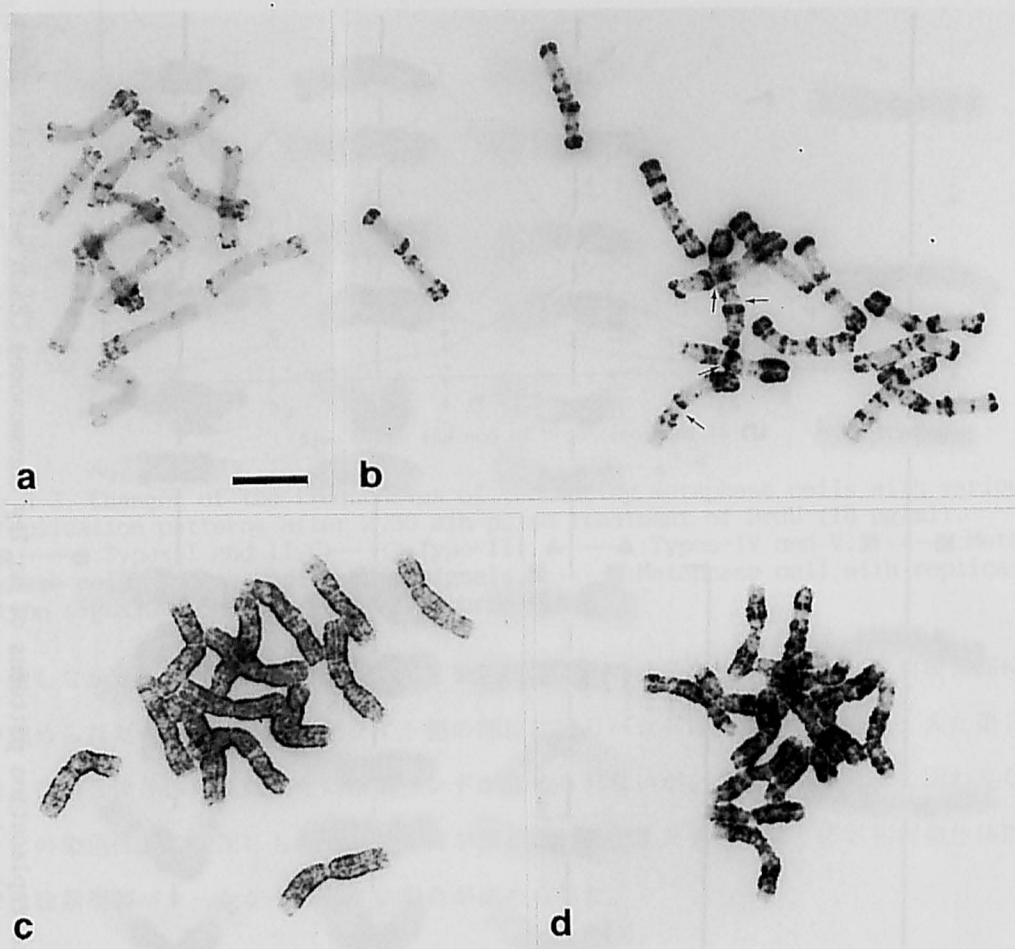


Fig.5-5. Replication patterns of rye chromosomes (Explanations are given in the text). Bar=10  $\mu$ m.

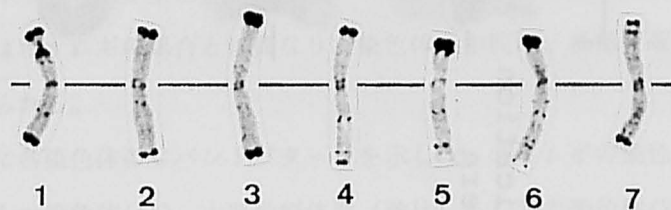


Fig.5-6. C-banded chromosomes of rye.



の場合と同様に、ライムギ染色体のCバンド、とくに末端部のCバンドは晩期複製の傾向を示したが、Cバンド以外の部位にも多くの晩期複製部が認められた(図5-5b)。とくに4Rおよび6R染色体(図5-5b 矢印; 動原体部も矢印で示されている)では、長腕末端部のCバンドの方が短腕末端部のCバンドよりも大きいのに対し、晩期複製部については逆に短腕末端部の方が長腕末端部よりも大きくなっていった。各染色体とも動原体の両側に淡いCバンドが認められるが、染色体によってはこれらの複製時期が長腕と短腕とで異なっていた(図5-5b)。

#### マカロニコムギ

マカロニコムギにおいては図5-7a~7dの順で複製パターンの経時変化が認められたことから、ライムギの場合と同様に染色体の中間部、基部、端部の順に複製が進行すると考えられた。ただし染色体基部の複製部はライムギに比べやや小さくなる傾向があった(図5-7b)。一方この種ではオオムギやライムギの場合とは対照的に、Cバンドパターン(図5-8)と晩期複製パターン(図5-7aおよび7b)とが全く異なっていた。すなわち端部に比較的大きなCバンドが生じるのは一部の染色体腕(1BS, 1BL および7BL)に限られていたが、Cバンドの有無にかかわらずほとんどの染色体の端部に晩期複製部位が認められた。また全体的にBゲノムの染色体にはAゲノムの染色体よりも多くのCバンドが認められ、それらが染色体の基部に集まる傾向があったが、染色体の複製パターンがゲノム単位で異なるような傾向は認められなかった。

#### イネ

イネにおいてはBrdU処理後1~2時間目にまず主として染色体基部に複製部位をもつ細胞(図5-9a および9b)、つづいて染色体全体に複製部位をもつ細胞ならびに主として染色体端部に複製部位をもつ細胞(図5-9c および9d)が出現し、処理後4~5時間目には複製シグナルをもつ染色体はほとんど認められなくなった。このことからイネにおいてはオオムギの場合と同様に、概ね染色体の端部が早期複製、基部が晩期複製を行うことが示唆された。ただし染色体間、とくに長い染色体(第1~第3染色体)と短い染色体の間では、染色体複製の開始時期あるいは完了時期が異なっているようであった。また前中期染色体における晩期複製部位(図5-9a)はギムザ染色により濃染する凝縮部位(図5-9下部

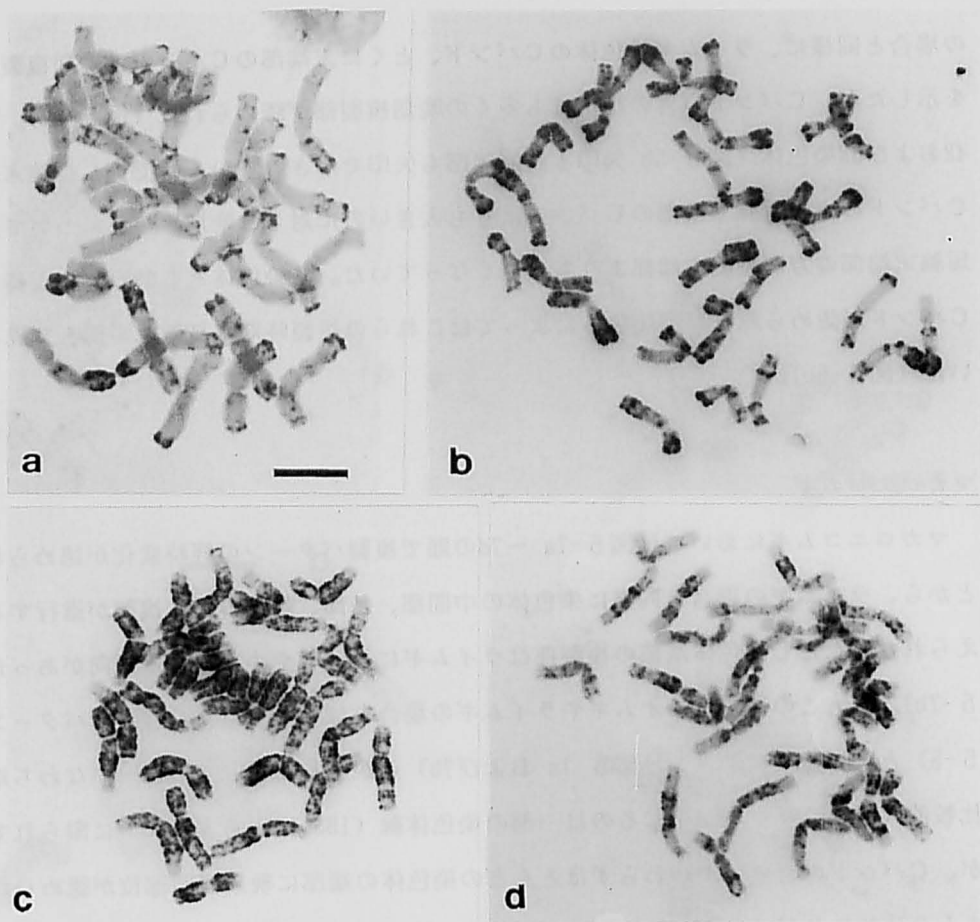


Fig.5-7. Replication patterns of the chromosomes of durum wheat (Explanations are given in the text). Bar=10  $\mu$ m.

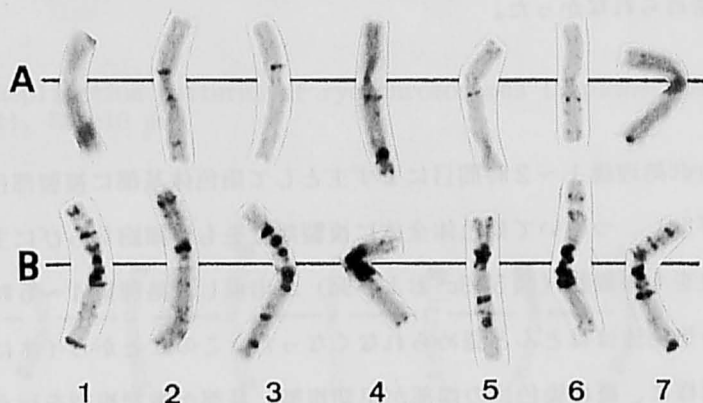
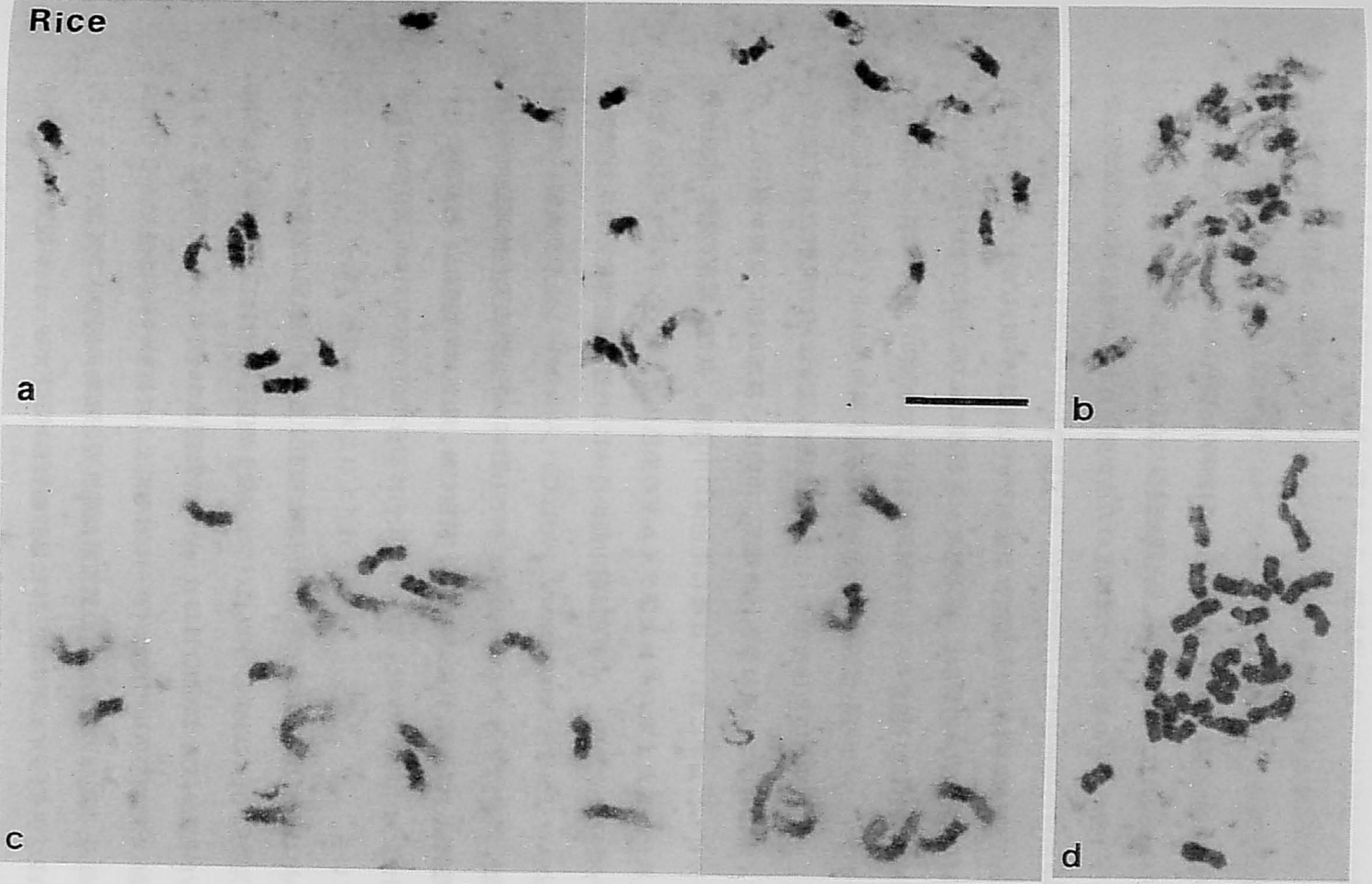


Fig.5-8. C-banded chromosomes of durum wheat.



Rice

a

b

c

d

Giemsa-stained  
karyotype

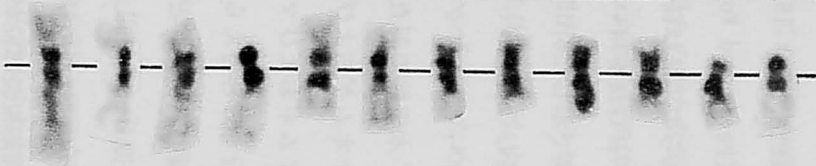


Fig.5-9. Replication patterns of rice chromosomes (a-d: Explanations are given in the text; Bar=10  $\mu$ m), and Giemsa-stained karyotype at prometaphase.

参照) にほぼ対応していた。

#### 第4節 論議

哺乳類においてはBrdUを取り込んだ染色体部位を特異的に染め分ける方法として、蛍光染色法(Laat 1974)あるいは蛍光染色後、紫外線照射およびギムザ染色を行うFPG法(Perry and Wolf 1974)などの簡便かつ高精度の方法が開発されている。しかしながらこれらの手法は従来植物の染色体には有効でなく、本実験でもオオムギおよびイネにおいてFPG法を用いた予備試験を行ったが明瞭な複製シグナルは認められなかった。一方本実験で示したBrdUの免疫学的な検出法は、検出感度がきわめて高く、比較的短時間で処理が済むことから、植物染色体の複製パターンの解析手段として従来の<sup>3</sup>H-チミジンを用いたオートラジオグラフィ法よりもはるかに有用といえる。

本実験で調査した植物種の染色体複製のパターンは大きく2つに分けられた。すなわちオオムギおよびイネにおいては概ね染色体の端部、中間部、基部の順に複製が進行し、ライムギおよびマカロニコムギにおいては概ね染色体の中間部、基部、端部の順に複製が進行すると考えられた。またオオムギおよびライムギの染色体ではCバンドパターンと晩期複製パターンとが類似しており、イネでは前中期染色体における凝縮部位と晩期複製部位とがほぼ一致していた。一方、マカロニコムギではCバンドパターンと晩期複製パターンとの間に対応は認められず、オオムギやライムギでもCバンド以外の染色体部位に多くの晩期複製部位が認められた。これらの結果は、植物では、染色体の複製は、どの種においても基部、端部または中間部等の比較的大きな染色体部分単位でそれぞれ同調的に起こることを示唆している。

哺乳類においては1本の染色体上にS期の前期に複製する部位と後期に複製する部位とが交互に細かく並び、前者はRバンド(Gバンド淡染)部位、後者はGバンド部位に対応することが明らかとなっている(Dutrillaux et al. 1976; Holmquist et al. 1982)。本実験で明らかとなった植物染色体の複製パターンはそのような複製パターンとはかなり異なっていることから、染色体の複製時期の調節系は哺乳類と植物の間で大きく異なっていることが示唆される。一方ライムギの染色体には詳細なGバンドパターンが観察されている(Yang and Zhang 1988)が、本実験ではそれと類似の複製パターンは認められなかった。

このことから、哺乳類の場合とは異なり、植物染色体のGバンドは必ずしも一定の時期に複製を行うものではないことが示唆される。哺乳類においては遺伝子の複製時期がその機能と密接に関連し、活性のある遺伝子は早期複製を行い、その多くがRバンド領域に存在すると考えられている(Bickmore and Sumner 1988)。もしこれが植物にもあてはまるとすれば、例えばオオムギの場合、機能遺伝子の多くが染色体端部に集中していることになる。今後植物においても、このような遺伝子機能と染色体構造との関連についての解明が進むことが期待される。

最後に染色体の複製バンドはCバンド等の分染マーカーが得られない場合の新たな染色体マーカーとして利用し得ると考えられる。例えば種間雑種においても両親の染色体の複製パターンが大きく異なる場合には、複製バンドは両親の染色体を識別するための1つの有効な指標になると考えられる。ただし複製バンドを用いて個々の染色体を識別しようとする場合には、BrdU処理前の細胞周期の同調化など一定のバンドパターンを得るための手段について新たに検討する必要がある。

## 第5節 摘要

植物における染色体複製のパターンおよび染色体のバンド構造と複製パターンとの関係を明らかにするため、オオムギ、ライムギ、マカロニコムギおよびイネを供試し、S期の種々の時期に取り込ませたBrdUの染色体上の分布パターンを免疫学的手法を用いて調査した。種子根をBrdUで処理した後、経時的に採取・固定し、各根端から染色体標本を作製した。染色体上のBrdUの検出はモノクローナル抗BrdU抗体およびビオチン-ストレプトアビジンシステムを用いた酵素抗体法により行った。

オオムギにおいては、主として染色体基部（Ⅰ型）に複製部位をもつものから、染色体基部から中間部（Ⅱ型）、染色体全体（Ⅲ型）、染色体端部から中間部（Ⅳ型）および主として染色体端部（Ⅴ型）に複製部位をもつものまで概ね5種類の複製パターンが観察された。これらの複製パターンはBrdU処理後経時的にⅠ型からⅤ型の順に頻出したことから、オオムギでは概ね染色体の端部から複製が始まり、つづいて中間部、基部の順に複製が進行すると考えられた。また同様の調査から、イネではオオムギ同様概ね染色体の端部が早期複製、基部が晩期複製を行うが、ライムギおよびマカロニコムギでは染色体の中間部に

続いて基部が複製し、最後に染色体端部が複製することが明らかとなった。つぎにイネでは前中期染色体の凝縮部位が晩期複製部位とほぼ一致し、オオムギおよびライムギでは染色体のCバンド部位の多くが晩期複製の傾向を示した。しかしながら、マカロニコムギでは染色体端部の晩期複製部位とCバンド部位とはほとんど対応せず、またオオムギやライムギでもCバンド以外の部位に多くの晩期複製部位が認められた。

以上の結果から、植物では、染色体の複製は、どの種においても基部、端部または中間部等の比較的大きな染色体部分単位でそれぞれ同調的に起こること、ならびにこのような複製パターンの特長は哺乳類等の動物における染色体複製の特長とはかなり異なるものであることが示唆された。

## 第6章 *In situ*ハイブリダイゼーションによるイネ rRNA 遺伝子のマッピング

### 第1節 緒言

*In situ*ハイブリダイゼーションは核酸の相補的な結合を利用して目的とする遺伝子の染色体上の位置を染色体標本上で直接検出する手法であり、ヒトやマウスの遺伝子マッピングにおいて多大な成果を挙げている。近年植物においても、クローン化された遺伝子の染色体上へのマッピング (Huang et al. 1988; Simpson et al. 1988; Clark and Karp 1989) をはじめ、形質転換植物における導入遺伝子 (DNA) の染色体挿入部位の解析 (Ambros et al. 1986; Mouras et al. 1987)、種属間雑種におけるゲノム特異的な反復配列をプローブに用いた両親染色体の識別 (Lapitan et al. 1986; Leitch et al. 1990; Xu et al. 1990) など様々な場面でこの手法が有効に利用されるようになってきている。

イネにおいてはこれまで *rbcS* 遺伝子 (Wu et al. 1986)、28S リボソーム (r) RNA (Fukui et al. 1987)、57kd貯蔵タンパク質遺伝子 (倉田ら1987) およびグルテリン遺伝子 (鈴木ら1987) をプローブに用いた *in situ* ハイブリダイゼーションが報告されているが、いずれの場合にも明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが得られているとは言い難い。これは、イネでは染色体のサイズがきわめて小さいこと、およびオートラジオグラフィによるバックグラウンドのノイズシグナルが多いことが原因と考えられる。一方、最近コムギにおいては、ピオチンで標識した DNA をプローブとして RI を用いない *in situ*

*in situ* ハイブリダイゼーションが行われ、この場合にはバックグラウンドのノイズシグナルが非常に少なく、きわめて明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが得られることが報告されている (Rayburn and Gill 1985)。そこで本章ではイネにおいてピオチン標識した rRNA 遺伝子をプローブに用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、その有効性を検討した。

### 第2節 材料および方法

植物材料には日本型イネ品種「日本晴」、仁染色体を過剰染色体としてもつ「日本晴」

のトリソミック系統 (Hタイプ; large grain)、印度型イネ品種「IR36」およびタバコ品種「サムソン」を用いた。染色体標本は酵素解離-空気乾燥法 (本論文第2章参照) に従い作製した。

プローブDNAにはイネの rRNA 遺伝子のスペーサー領域を含む8.4kb 断片 (国立遺伝学研究所佐野芳雄博士より提供された) を用いた。プローブDNAはビオチン化dUTPを用いてランダムプライマー法により標識した。3日~1週間風乾した染色体標本を70%ホルムアミド/2xSSC 溶液で67°C、2分間処理した後、-20°Cのエタノールシリーズ (70%、95%および99%) に5分間ずつ浸漬し、風乾した。プローブ反応液 (0.1ng/ $\mu$ l ビオチン標識DNA、50%ホルムアミド、10%硫酸デキストラン、2xSSC、サケ精子DNA) は100°Cで10分間煮沸した後0°Cで5分間急冷した。各染色体標本に15 $\mu$ lのプローブ反応液を滴下し、カバーガラスで封じた後、標本を37°Cの湿室中で3~6時間インキュベートした。反応終了後、染色体標本は室温の2xSSCで5分間、37°Cの2xSSCで10分間、室温の2xSSCで5分間、0.1% Triton X-100を含む室温のPBSで2分間、室温のPBSで5分間、順次洗浄した。つぎに0.6%の Detek I - 西洋ワサビパーオキシダーゼ複合液 (Enzoバイオケミカル社) を染色体標本に滴下し、カバーガラスで封じた後、標本を37°Cの湿室中で30分間インキュベートした。染色体標本は2xSSCで5分間、0.1% Triton X-100を含むPBSで2分間、PBSで5分間、順次室温にて洗浄した後、暗所で0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む0.05% DAB (3,3'-ジアミノベンジジン4塩酸塩) 溶液 (PBSに溶解) と20分間反応させた。反応終了後、染色体標本はPBSで30秒間洗浄した後7%ライト液 (1/15Mリン酸緩衝液、pH6.8で希釈) で5~15分間染色した。ハイブリダイゼーションシグナルの観察は位相差顕微鏡を用いて行った。

### 第3節 結果

図6-1は「日本晴」の二倍体(a) および仁染色体を過剰染色体にもつトリソミック系統(b)の前中期染色体における rRNA 遺伝子のハイブリダイゼーションシグナルを示したものである。二倍体では2箇所、トリソミック系統では3箇所の明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが仁染色体の二次狭窄近傍部に認められた。このことから、「日本晴」においては rRNA 遺伝子が仁染色体の NOR (仁形成部位) に位置していることが確認さ



れた。またこの図から明らかなようにバックグラウンドのノイズシグナルはきわめて少なく、処理による染色体の変形もごく少なかった。これらの点については、染色体標本作製後数日間（3日～1週間）乾燥させること、ならびにホルムアミド処理の時間および染色体とプローブDNAとの反応時間を短くすること（それぞれ2分間および3～6時間）によって良好な結果が得られた。

「IR36」を用いた場合には図6-2に示すように多くの細胞で2箇所以上の染色体部位にハイブリダイゼーションシグナルが観察された。シグナルの数は細胞間で様々に異なっていたが、多くの場合、2個の大きいシグナルと2～8個の小さいシグナルが観察された。

またタバコにおいてイネと同じプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、図6-3に示すように明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが認められた。このことはイネとタバコの rRNA 遺伝子の塩基配列に相同性のあることを示すとともに、本実験で用いた手法がイネ以外の植物種にも適用可能なことを示すものと考えられる。

#### 第4節 論議

イネにおいてビオチン標識した rDNA をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、従来の R1法 (Fukui et al. 1987) に比べ、プローブの検出感度が格段に高まることが明らかとなった。さらにこの手法は操作が容易で短時間に済むという点で R1法よりも有効と考えられる。

印度型のイネにおいては通常、日本型イネにも共通に認められる2染色体に加えさらにもう1対の染色体上に二次狭窄が観察されることから、合計2対の染色体に NOR が存在すると考えられている (Wu et al. 1985)。一方本実験の結果は、印度型のイネ（「IR36」）では rRNA 遺伝子がこれらの2対の NOR 以外の様々な染色体部位にも散在していることを示すものと考えられる。

近年イネにおいては核遺伝子のクローニング (Wu 1988, 1989, 1990) や RFLP マーカーの単離 (斎藤ら 1989; McCouch et al. 1988) が急速に進んでいる。イネの染色体地図を完成させるためには、遺伝子や分子マーカーの連鎖地図上の位置と実際の染色体上の位置とを対応づけることが必要である。*In situ* ハイブリダイゼーションはこのような対応づけを行う上で有力な手段になると考えられる。ヒトの *in situ* ハイブリダイゼーションにおいて

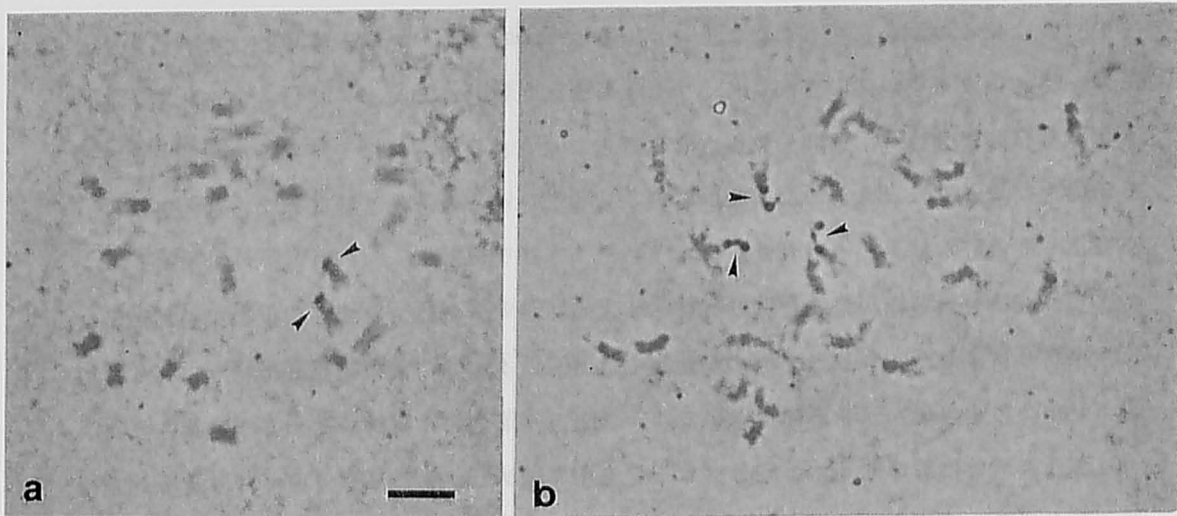


Fig.6-1. Localization of rRNA genes by in situ hybridization with a japonica type variety 'Nipponbare' (a) and the trisomic line carrying the nucleolar chromosome as the extra chromosome (b). Arrowheads indicate hybridization signals. Bar=5  $\mu$ m.

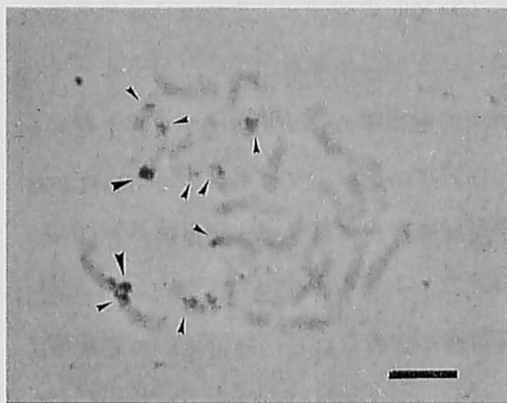


Fig.6-2. Localization of rRNA genes by in situ hybridization with a indica type variety 'IR36'. Arrowheads indicate hybridization signals. Bar=5  $\mu$ m.

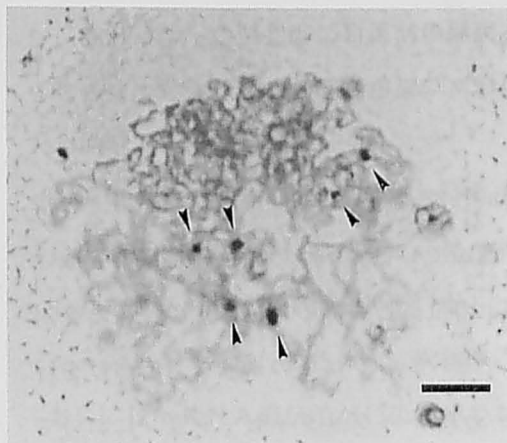


Fig.6-3. In situ hybridization of rDNA of rice to tobacco chromosomes at prophase. Arrowheads indicate hybridization signals. Bar=5  $\mu$ m.

は現在、1 kb以下のプローブDNAでも検出できることから、イネにおいても *in situ* ハイブリダイゼーションにより単一コピー遺伝子やRFLPマーカーをマッピングすることは可能と思われる。ただしその場合にはプローブの検出感度をさらに向上させるとともに、体細胞前期または太糸期などの長い染色体を用いることが必要となるかもしれない。

*In situ* ハイブリダイゼーションは染色体の識別・同定的手段としても有用である。例えばトマトにおいては、ある特定の反復配列DNAをプローブに用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行うと、ハイブリダイゼーションシグナルの数と位置が染色体間で異なり、そのパターンからすべての染色体を同定できることが示されている (Lapitan et al. 1989)。またイネにおいては *in situ* ハイブリダイゼーション後の各染色体の識別が大きな問題となるが、もし染色体識別用のDNAプローブがあれば、これとマッピングを目的とする遺伝子DNAのプローブとを異なる方法で標識し、これらを同時に染色体にハイブリダイズさせる (Cremer et al. 1988) ことにより、遺伝子DNAの所属染色体を決定することができると考えられる。このようにイネの分子・細胞遺伝学研究において *in situ* ハイブリダイゼーションはきわめて利用価値の高い手法と考えられ、今後本実験で確立した手法の幅広い応用が期待される。

## 第5節 摘要

イネにおいてピオチン標識した rRNA 遺伝子をプローブに用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、その有効性を検討した。その結果、RI 標識したプローブを用いた場合に比べ、バックグラウンドのノイズシグナルはきわめて少なく、プローブの検出感度が格段に高まることが明らかとなった。日本型イネにおいては、仁染色体の二次狭窄近傍部に明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが認められたことから、rRNA 遺伝子が仁染色体の仁形成部位 (NOR) に位置することが確認された。一方印度型イネにおいては、仁染色体以外の染色体にもいくつかの小さなハイブリダイゼーションシグナルが認められたことから、日本型イネとは異なり rRNA 遺伝子が様々な染色体部位に散在していることが示唆された。

## 総括

植物においては染色体の同定が不完全な種が多く、また染色体の微細な構造変異の検出は一部の種を除ききわめて困難となっている。本研究はこのような現状に基づき、オオムギ、イネ、トウモロコシ等を供試し、画像解析法、分染法等の新しい染色体解析法の開発を行うとともに、それらの手法を用いて植物染色体の形態、構造および機能に関する諸特性を明らかにしようとしたものである。得られた結果の概要は以下のとおりである。

### 1. 画像解析法によるオオムギの核型分析（第1章）

オオムギを供試し、染色体画像解析システムCHIASを用いて中期核板像の自動検出から核型およびバンドパターンの測定までの一連の調査を実施し、画像解析法の実用性を検討した。

まず、プレパラートの自動走査による中期核板像の自動検出を行った。染色体数が揃い、かつ染色体の重なりがない核板を良好な核板として自動検出の効率を検討した。その結果、ギムザ染色を行った染色体標本を用いた場合には走査領域内の良好な核板のうちの90%以上を自動検出することができ、CHIASによる自動走査が十分実用に耐えることが明らかとなった。

つぎに、CHIASを用いて250個の半数性核板における各染色体の画像上の長さ、面積および平均濃度を測定した。画像解析法は測定効率、測定精度の両面においてこれら定量的パラメータの測定にきわめて有効であった。染色体の長さ、面積および濃度体積をパラメータとして核型分析を行った結果、染色体の識別にはこれらのパラメータのうち長さが最も有効であることが明らかとなった。250核板における各染色体の相対長と腕比の平均値、ならびに20核板の良好なN分染像におけるバンドパターンの測定データに基づきオオムギ染色体のイディオグラムを確立した。

さらに、分裂中期における分裂ステージの進行にともなう核型の変動パターンを明らかにするため、250個の核板を1核板内の総染色体長に基づき早中期から完全中期までの5つのステージに分類し、ステージ間で染色体の相対長および腕比を比較した。その結果、染色体の相対長および腕比はステージ間で様々に変化し、染色体によってはそれらが分裂ステージの進行にともない増加または減少すること、また長さおよび腕比に関する各染色

体の核板内での順位はステージ間で様々に入れ替わることが明らかとなった。つぎに1核板内の総染色体長の減少率と各染色体長の減少率との比に基づいて染色体の相対凝縮率を算出し、分裂ステージの進行にともなう相対凝縮率の変化のパターン（凝縮パターン）を染色体腕ごとに調査した。その結果、各染色体腕の凝縮パターンは早期凝縮型から晩期凝縮型まで様々に異なり、さらに染色体の凝縮パターンはステージの進行にともなう相対長および腕比の変化と密接に関連していることが明らかとなった。このことから、分裂中期におけるオオムギ核型の変異は単なる測定誤差の結果ではなく、各染色体腕の凝縮率がステージ間で異なることに起因していると結論された。

## 2. 画像パラメータ”凝縮型”を用いたイネ体細胞染色体の識別（第2章）

画像パラメータ”凝縮型（CP）”を用いてイネ二倍体における体細胞染色体の識別を行った。ギムザ染色を行った良好な前中期核板を選び、これらの染色体写真をCHIASを用いて解析し、各染色体の染色分体中軸部の濃度分布曲線を得た。この濃度分布曲線によって表される染色体の凝縮パターン（CP）、ならびに染色体の長さおよび腕比を比較・検討することにより各相同染色体を客観的に識別できることが明らかとなった。

## 3. オオムギにおけるCおよびN分染法を用いた染色体構造変異の解析（第3章）

オオムギ染色体のバンドパターンの変異について再検討するため、4品種の染色体のCおよびNバンドパターンを調査した。まずすべての品種において各染色体の動原体部位にはN分染法で染まりC分染法では染まらない（ $N^+C^-$ ）バンドが出現し、2つのバンドパターンは動原体部位で異なることが明らかとなった。つぎに両分染法に共通して特定の品種にのみ出現するバンドや濃淡および大きさが品種間で異なるバンドが認められ、オオムギ染色体のバンドパターンには明瞭な品種間差異のあることが明らかとなった。さらに各品種におけるCバンドおよびNバンドの基本パターンが早中期から完全中期までの分裂ステージ間で変化しなかったことから、バンドパターンの変異は分染法および品種に固有のものであり、ヘテロクロマチン自体の分化に基づくものであると結論された。

つぎに、「竹林茨城1号」および「Bonus」に由来する相互転座系統計106系統を供試し、CおよびN分染法を用いて転座染色体の切断点の詳細な位置決定を行った。その結果、106系統中90系統で転座染色体腕および切断点を決定することができ、本実験で用いたC

およびN分染法がオオムギにおける微細な染色体構造変異の検出にきわめて有用であることが明らかとなった。転座切断点の染色体上の分布は均一でなく、大部分の切断点はインターバンド内に存在していた。一方全染色体に共通して切断頻度の高い染色体領域は認められなかった。動原体近傍の切断点の詳細な調査には、N分染法で特異的に出現する動原体部位のバンド(N<sup>+</sup> C<sup>-</sup>)が有効な指標となることがわかった。

#### 4. トウモロコシにおけるG分染法の開発(第4章)

トウモロコシを用いて高精度のG分染法を確立するとともに、植物染色体のGバンド構造の特性について検討した。

酵素解離-空気乾燥法を用いて作製した染色体標本をトリプシンまたはSDSで処理することによって、前中期の染色体全体にわたって明瞭なGバンドが出現した。高精度のGバンドを再現性よく得るためには、Ohnuki溶液を用いた根端の低張処理、酵素解離-空気乾燥法による標本作製、およびグルタルアルデヒド溶液を用いた標本の後固定処理が有効であった。トウモロコシ染色体のGバンドは前中期には細かいドット状を呈し、分裂ステージが進むにつれ粗になり、完全中期にはほとんど出現しなくなった。このような特長は、従来報告された植物染色体のGバンドにほぼ共通に認められるものであるが、動物染色体のGバンドの特長とはかなり異なっていることから、両者のGバンドの構造には差異のある可能性が高い。そこで、従来諸報告を参照しつつ、動物植物間でGバンドの生成機構を比較・検討した。

#### 5. 抗BrdU抗体を用いた植物染色体の複製パターンの解析(第5章)

植物における染色体複製の特長ならびに染色体のバンド構造と複製パターンとの関係を明らかにするため、オオムギ、ライムギ、マカロニコムギおよびイネを供試し、S期の種々の時期に取り込ませたBrdUの染色体上の分布パターンを抗BrdU抗体を用いた免疫学的手法により調査した。BrdU処理後の複製パターンの経時的な変化に基づき、オオムギでは概ね染色体の端部から複製が始まり、つづいて中間部、基部の順に複製が進行すると考えられた。また同様の調査から、イネではオオムギ同様概ね染色体の端部が早期複製、基部が晩期複製を行うが、ライムギおよびマカロニコムギでは染色体の中間部、基部、端部の順に複製が進行することが示された。つぎにイネでは前中期染色体の凝縮部位が晩期複製部

位とほぼ一致し、オオムギおよびライムギでは染色体のCバンド部位の多くが晩期複製の傾向を示した。しかしながら、マカロニコムギでは染色体端部の晩期複製部位とCバンド部位とはほとんど対応せず、またオオムギやライムギでもCバンド以外の部位に多くの晩期複製部位が認められた。

これらの結果から、植物では、染色体の複製は、どの種においても基部、端部または中間部等の比較的大きな染色体部分単位でそれぞれ同調的に起こること、ならびにこのような複製パターンの特長は哺乳類等の動物における染色体複製の特長とはかなり異なるものであることが示唆された。

#### 6. *In situ* ハイブリダイゼーションによるイネ rRNA 遺伝子のマッピング (第6章)

イネにおいてビオチン標識した rRNA 遺伝子をプローブに用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、その有効性を検討した。その結果、R1 標識したプローブを用いた場合に比べ、バックグラウンドのノイズシグナルはきわめて少なく、プローブの検出感度が格段に高まることが明らかとなった。日本型イネにおいては、仁染色体の二次狭窄近傍部に明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが認められたことから、rRNA 遺伝子が仁染色体の仁形成部位 (NOR) に位置することが確認された。一方印度型イネにおいては、仁染色体以外の染色体にもいくつかの小さなハイブリダイゼーションシグナルが認められたことから、日本型イネとは異なり rRNA 遺伝子が様々な染色体部位に散在していることが示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始懇切なる御指導と激励を賜った京都大学教授山縣弘忠博士に心から感謝する。また画像解析法をはじめ多くの実験技術を御教示して頂き、惜しめない援助を頂いた農水省北陸農業試験場（前農業生物資源研究所）福井希一博士に深く感謝する。さらに数々の御助言や御援助を頂いた京都産業大学教授米澤勝衛博士、農水省農業生物資源研究所原田久也氏、同農業研究センター牧野徳彦博士、同熱帯農業研究センター稲垣正典博士、神戸大学教授渡辺邦秋博士、Risø National Laboratory（デンマーク）I. Linde-Laursen博士、ならびに京都大学育種学研究室の諸兄、農業生物資源研究所適応性遺伝子研究室の諸兄に対し厚く御礼申し上げる。



## 引用文献

- Aguiar-Perecin DEMLR, Vosa CG (1985) C-banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. *Heredity* 54:37-42
- Ambros PF, Matzke MA, Matzke AJM (1986) Detection of a 17kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 94:11-18
- Anderson LK, Stack SM, Mitchell JB (1982) An investigation of the basis of a current hypothesis for the lack of G-banding in plant chromosomes. *Exp Cell Res* 138:433-436
- Ashley T (1988) G-band position effects on meiotic synapsis and crossing over. *Genetics* 118:307-317
- Bennett WD, Heslop-Harrison JS, Smith JB, Ward JP (1983) DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals. *J Cell Sci* 63:173-179
- Bernardi G, Olofsson B, Filipinski J, Zerial M, Salinas J, Cuny G, Meunier-Rotival M, Rodier F (1985) The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science* 228:953-958
- Bickmore WA, Sumner AT (1989) Mammalian chromosome banding - an expression of genome organization. *Trend Genet* 5:144-148
- Burkholder GD (1988) The analysis of chromosome organization by experimental manipulation. In: Gustafson JP, Appels R (eds) *Chromosome structure and function. Impact of new concepts*. Plenum Press, New York London, pp 1-52
- Burkholder GD, Ducek LL (1980) Proteins in chromosome banding. I. Effect of G-banding treatments on the proteins of isolated nuclei. *Chromosoma* 79:29-41
- Burkholder GD, Ducek LL (1982) The effect of chromosome banding techniques on the proteins of isolated chromosomes. *Chromosoma* 87:425-435
- Buys CHCM, Osinga J (1982) A relation between G-, C-, and N-band patterns as revealed by progressive oxidation of chromosomes and a note on the nature of N-bands. *Genetica* 58:3-9
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49:219-222
- Caspersson T, Zech L, Modest EJ, Foley GE, Wagh U, Simonsson E (1969) Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 58:128-140
- 陳瑞陽 (1988) 高等植物数種における染色体Gバンド分染 特に川百合において. 染色体 II - 50:1635-1651
- Chen R, An Z, Song W, Li X, Su J (1986) A preliminary study on the G-bands of chromosomes in some plants. *J Wuhan Bot Res* 4:111-118
- Chow C, Larter EN (1981) Centromeric banding in maize. *Can J Genet Cytol* 23:255-258
- Chughtai SR, Steffensen DM (1987) Knob composition of commercial inbred lines.

Maize Genet Coop Newslett 61:96-98

Chung WC, Wu HK (1988) Structural changes involving extra chromosome observed in IR36 Triplo series and their identification. Rice Genet Newsl 5:47-54

Clark M, Karp A (1989) Physical mapping of the B-hordein loci on barley chromosomes by *in situ* hybridization. Genome 32:925-929

Comings DE (1978) Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. Ann Rev Genet 12:25-46

Cortés F, Escalza P (1986) Analysis of different banding patterns and late replicating regions in chromosomes of *Allium cepa*, *A. sativum*, and *A. nigrum*. Genetica 71:39-46

Cremer T, Testin D, Hopman AHN, Manuelidis (1988) Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by *in situ* hybridization with chemically modified DNA probes. Exp Cell Res 176:199-220

Dennis ES, Gerlach WL, Peacock WJ (1980) Identical polypyrimidine-polypurine satellite DNAs in wheat and barley. Heredity 44:349-366

Disney JE, Johnson KR, Magnuson NS, Sylvester SR, Reeves R (1989) High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes. J Cell Biol 109:1975-1982

Döbel P, Schubert I, Rieger R (1978) Distribution of heterochromatin in a reconstructed karyotype of *Vicia faba* as identified by banding- and DNA-late replication patterns. Chromosoma 69:193-209

Drewry A (1982) G-banded chromosomes in *Pinus resinosa*. J Hered 73:305-306

Dutrillaux B, Couturier J, Richer CL, Viegas-Ptquignot E (1976) Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. Chromosoma 58:51-61

Endo TR (1988) Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. J Hered 79:366-370

Endo TR & Mukai Y (1988) Chromosome mapping of a speltoid suppression gene of *Triticum aestivum* L. based on partial deletions in the long arm of chromosome 5A. Jpn J Genet 63:501-505

福井希一 (1985) 画像解析法を用いた植物染色体の識別・同定. 細胞 17:145-149

Fukui K (1986) Standardization of karyotyping plant chromosomes by a newly developed chromosome image analyzing system (CHIAS). Theor Appl Genet 72:27-32

Fukui K (1988) Analysis and utility of chromosome information by using the chromosome image analyzing system, CHIAS. Bull Natl Inst Agrobiol Resour 4:153-176

福井希一・飯島加奈子 (1987) 染色体情報の解析・利用に関する研究 18. 凝縮様式、C P を用いたイネ染色体の同定. 遺伝学雑誌 62:515

Fukui K, Iijima K (1991) Somatic chromosome map of rice by imaging methods. Theor Appl Genet 81:589-596

- 福井希一・掛田克行・伊藤紀美子 (1986a) 染色体情報の解析・利用に関する研究 14. *Atriplex patula* における高解像のG様バンド. 第37回染色体学会講演要旨集:24
- 福井希一・向井康比己・掛田克行 (1986b) 染色体情報の解析・利用に関する研究 15. 染色体同定のための新しい指標としての凝縮様式. 遺伝学雑誌 61:574
- Fukui K, Kakeda K, Hashimoto J, Matsuoka S (1987) In situ hybridization of <sup>125</sup>I labelled rRNA to rice chromosomes. Rice Genet Newsl 4:114-116
- Gill BS, Burnham CR, Stringam GR, Stout JT, Weinheimer WH (1980) Cytogenetic analysis of chromosomal translocations in the tomato: Preferential breakage in heterochromatin. Can J Genet Cytol 22:333-341
- Gill BS (1987) Chromosome banding methods, standard chromosome band nomenclature, and applications in cytogenetic analysis. In: Heyne EG (ed) Wheat and wheat improvement, 2nd edn. Am Soc Agron, Madison, WI, pp 243-254
- Giraldez R, Cermeño MC, Orellana J (1979) Comparison of C-banding pattern in the chromosomes of inbred lines and open pollinated varieties of rye. Z Pflanzenzücht 83:40-48
- Gratzner HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A (1975) The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. Exp Cell Res 95:88-94
- Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218:474-475
- Greilhuber J (1977) Why plant chromosomes do not show G-bands. Theor Appl Genet 50:121-124
- Greilhuber J (1988) "Self-tanning" - a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. Plant Syst Evol 158:87-96
- 橋本雄之 (1986) 染色体のソーティングと遺伝子ライブラリー. 蛋白質・核酸・酵素 31: 1451-1462
- Ho KM, Kasha KJ (1974) Differential chromosome contraction at the pachytene stage of meiosis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Chromosoma 45:163-172
- Holmquist G, Gray M, Porter T, Jordan J (1982) Characterization of Giemsa dark- and light-band DNA. Cell 31:121-129
- Huang PL, Hahlbrock K, Somssich ES (1988) Detection of a single-copy gene on plant chromosomes by in situ hybridization. Mol Gen Genet 211:143-147
- 飯島加奈子・福井希一 (1991) イネ染色体. 客観的識別・同定法の確立と細胞学的地図の作成. 植物細胞工学 3:6-12
- Islam AKMR (1980) Identification of wheat-barley addition lines with N-banding of chromosomes. Chromosoma 76:365-373
- Jagiello G, Fang JS (1980) A pachytene map of the mouse oocyte. Chromosoma 77: 113-121

- Jancey RC, Walden DB (1972) Analysis of pattern in distribution of breakage points in the chromosomes of *Zea mays* L. and *D. melanogaster* meigen. Can J Genet Cytol 14:429-442
- Jewell DC (1981) Recognition of two types of positive staining chromosomal material by manipulation of critical steps in the N-banding technique. Stain Technol 56:227-234
- Kaina B (1977) The action of N-methyl-N-nitrosourea on non-established human cell lines in vitro. II. Non-random distribution of chromatid aberrations in diploid and Down's cells. Mut Res 43:401-413
- 木下俊郎 (1990) イネの染色体番号について. 育種学雑誌 40:383
- Kleinhofs A, Chao S, Sharp PJ (1988) Mapping of nitrate reductase genes in barley and wheat. In: Miller TE, Koebner RMD (eds) Proc 7th Int Wheat Genet Symp, Vol 1. Inst Plant Sci Res, Cambridge, UK, pp 541-546
- Korenberg JR, Rykowski MC (1988) Human genome organization: Alu, Lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. Cell 53:391-400
- Kurata N, Omura T (1978) Karyotype analysis in rice I. A new method for identifying all chromosome pairs. Jpn J Genet 53:251-255
- Kurata N, Iwata N, Omura T (1981) Karyotype analysis in rice II. Identification of extra chromosomes in trisomic plants and banding structure on some chromosomes. Jpn J Genet 56:41-50
- 倉田のり・高牟禮逸朗・鈴木完明・田中国介 (1987) *In situ* ハイブリダイゼーションを用いたイネ貯蔵タンパク遺伝子の座乗染色体決定. 育種学雑誌 37(別冊2):300-301
- Kuro-o S, Ikebe C, Kohno S (1986) Cytogenetic studies of Hynobiidae (Urodela). IV. DNA Replication bands (R-banding) for the genus *Hynobius* and the banding karyotype of *Hynobius nigrescens* Stejneger. Cytogenet Cell Genet 43:14-18
- Kuro-o S, Ikebe C, Kohno S (1987) Cytogenetic studies of Hynobiidae (Urodela). VI. R-banding patterns in five pond-type *Hynobius* from Korea and Japan. Cytogenet Cell Genet 44:69-75
- Laat SA (1974) Microfluorometric analysis of deoxyribonucleic acid replication kinetics and sister chromatid exchanges in human chromosomes. J Histochem Cytochem 22:478-491
- Lapitan NLV, Sears RG, Rayburn AL, Gill BS (1986) Wheat-rye translocations: Detection of chromosome breakpoints by *in situ* hybridization with a biotin-labeled DNA probe. J Hered 77:415-419
- Lapitan NLV, Ganai MW, Tanksley SD (1989) Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TGRI satellite repeat. Genome 32:992-998
- Leitch AR, Mosgöller W, Schwarzacher T, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1990) Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. J Cell Sci 95:335-341
- Lima-de-Faria A, Jaworska H (1972) The relation between the chromosome size gradient and the sequence of DNA replication in rye. Hereditas 70:39-58

- Linde-Laursen I (1975) Giemsa C-banding of the chromosomes of 'Emir' barley. *Hereditas* 81:285-289
- Linde-Laursen I (1978) Giemsa C-banding of barley chromosomes I. Banding pattern polymorphism. *Hereditas* 88:55-64
- Linde-Laursen I (1981) Giemsa banding patterns of the chromosomes of cultivated and wild barleys. In: Gall HPK (ed) *Barley genetics IV. Proc 4th Int Barley Genet Symp.* Edinburgh University Press, Edinburgh, pp 786-795
- Linde-Laursen I (1988) Giemsa C-banding of barley chromosomes V. Localization of breakpoints in 70 reciprocal translocations. *Hereditas* 108:65-76
- Linde-Laursen I, Doll H, Nielsen G (1982) Giemsa C-banding patterns and some biochemical markers in a pedigree of European barley. *Z Pflanzenzücht* 88:191-219
- Luciani JM, Morazzani WR, Stahl A (1975) Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. *Chromosoma* 52:275-282
- Luciani JM, Guichaoua MR, Cau P, Devictor B, Salagnon N (1988) Differential elongation of autosomal pachytene bivalents related to their DNA content in human spermatocytes. *Chromosoma* 97:19-25
- Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthenke B (1989) Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338:348-350
- Matassi G, Montero L, Salinas J, Bernardi G (1989) The isochore organization and the compositional distribution of homologous coding sequences in the nuclear genome of plants. *Nuc Acid Res* 17:5273-5290
- 牧野徳彦 (1987) オオムギの相互転座系統の作出と4価染色体行動の遺伝的解析. 放射線育種場研究報告 7:69-107
- McAlpine PJ, Van Cong N, Boucheix C, Pakstis AJ, Doute RC, Shows TB (1987) The 1987 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee. *Cytogenet Cell Genet* 46:29-101
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76:815-829
- Medrano L, Bernardi G, Couturier J, Dutrillaux B, Bernardi G (1988) Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma* 96:178-183
- Morris KLD, Gill BS (1987) Genomic affinities of individual chromosomes based on C- and N-banding analyses of tetraploid *Elymus* species and their diploid progenitor species. *Genome* 29:247-252
- Moses MJ, Poorman PA (1981) Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. II. Synaptic adjustment in a tandem duplication. *Chromosoma* 81:519-535
- Mouras A, Saul MW, Essad S, Potrykus I (1987) Localization by in situ hybridization of a low copy chimaeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. *Mol Gen Genet* 207:204-209

- Mukai Y, Endo TR, Gill BS (1990) Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J Hered* 81:290-295
- Murata M, Orton TJ (1984) G-band-like differentiation in mitotic chromosomes of celery. *J Hered* 75:225-228
- Naranjo T, Roca A, Goicoechea PG (1989) Comparison between synaptonemal complexes at pachytene and chromosome association at metaphase I in heterozygotes for a "nonreciprocal" translocation of rye. *Genome* 32:983-991
- Noda K, Kasha KJ (1978) A proposed barley karyotype revision based on C-band chromosome identification. *Crop Sci* 18:925-930
- Ohnuki Y (1968) Structure of chromosomes. I. Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes. *Chromosoma* 25:402-428
- Okada T, Comings DE (1974) Mechanisms of chromosome banding. III. Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of meiotic chromosomes. *Chromosoma* 48:65-71
- Perry P, Wolf S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158
- Piper J, Lundsteen C (1987) Human chromosome analysis by machine. *Trend Genet* 3:309-313
- Ponelies N, Bautz EKF, Monajembashi S, Wolfrum J, Greulich KO (1989) Telomeric sequences derived from laser-microdissected polytene chromosomes. *Chromosoma* 98:351-357
- Ramage RT (1971) Translocations and balanced tertiary trisomics. *Barley Genet Newsl* 1:74-80
- Ramage RT (1972) Translocations and balanced tertiary trisomics. *Barley Genet Newsl* 2:135-137
- Ramage RT (1974) Translocations and balanced tertiary trisomics. *Barley Genet Newsl* 4:111-113
- Ramage RT (1975) Translocations and balanced tertiary trisomics. *Barley Genet Newsl* 5:76-83
- Rattner JB, Lin CC (1985) Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell* 42:291-296
- Rayburn AL, Gill BS (1985) Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered* 76:78-81
- Rieger R, Michaelis A, Schubert I, Kaina B (1977) Effects of chromosome repat-  
 terning in *Vicia faba* L. II. Aberration clustering after treatment with chemical mutagens and X-rays as affected by segment transposition. *Biol Zbl* 96:161-182
- 斎藤彰・矢野昌裕・河瀬真琴・岸本直己・田中辰美・吉村智美・酒井富久美・中川原捷洋 (1989) イネ核DNAのRFLP 1. genomic DNAライブラリーから得たRFLPプローブについて. *育種学雑誌* 39(別冊1):242-243

- Schlegel R, Gill BS (1984) N-banding analysis of rye chromosomes and the relationship between N-banded and C-banded heterochromatin. *Can J Genet Cytol* 26: 765-769
- Schmid M, Guttenbach M (1988) Evolutionary diversity of reverse(R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97:101-104
- Schweizer D (1973) Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. *Chromosoma* 40:307-320
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324
- Schweizer D (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum Genet* 57:1-14
- Seabright M (1973) High resolution studies on the pattern of induced exchanged in the human karyotype. *Chromosoma* 40:333-346
- Simpson PR, Newman MA, Davies DR (1988) Detection of legumin gene DNA sequences in pea by in situ hybridization. *Chromosoma* 96:454-458
- Singh RJ, Tsuchiya T (1975) Pachytene chromosomes of barley. *J Hered* 66:165-167
- Singh RJ, Tsuchiya T (1981) Identification and designation of barley chromosomes by Giemsa banding technique: a reconsideration. *Z Pflanzenzücht* 86:336-340
- Singh RJ, Tsuchiya T (1982a) An improved Giemsa N-banding technique for the identification of barley chromosomes. *J Hered* 73:227-229
- Singh RJ, Tsuchiya T (1982b) Identification and designation of telocentric chromosomes in barley by means of Giemsa N-banding technique. *Theor Appl Genet* 64: 13-24
- Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA (1971) New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol* 232:31-32
- 鈴木完明・高岩文雄・田中国介・蓬原雄三・倉田のり (1987) イネ染色体別遺伝子ライブラリー作製のための、マーカー遺伝子選別と、*in situ* ハイブリダイゼーション。育種学雑誌 37(別冊2):302-303
- Takayama S (1976) Configurational changes in chromatids from helical to banded structures. *Chromosoma* 56:47-54
- 武久慎 (1974) 植物染色体バンディング。細胞 6:363-374
- Tanaka R (1965)  $H^3$ -thymidine autoradiographic studies on the heteropycnosis, heterochromatin and euchromatin in *Spiranthes sinensis*. *Bot Mag Tokyo* 78:50-62
- 谷口研至・近藤勝彦・田中隆荘 (1989) 酵素抗体法によるクレピス (*Crepis capillaris*, 2n=6) の染色体複製。第40回染色体学会講演要旨集 :21
- 谷口研至・近藤勝彦 (1990a) *Crepis capillaris* の複製バンド。第55回植物学会講演要旨集 :175
- 谷口研至・近藤勝彦 (1990b) 酵素抗体法によるネギ (*Allium fistulosum*) の複製バンド。遺伝学雑誌 65:465

- Wang HC, Kao KN (1988) G-banding in plant chromosomes. *Genome* 30:48-51
- Wu HK, Chung MC, Chen MH (1985) Karyotype analysis of cultivar IR36. *Rice Genet Newsl* 2:54-57
- Wu HK, Chung MC, Xie Y, Wu R (1986) Chromosomal localization of rice *rbst* genes. *Rice Genet Newsl* 3:117-119
- Wu R (1988) Report of the committee on genetic engineering. *Rice Genet Newsl* 5: 22-24
- Wu R (1989) Report of the committee on genetic engineering (molecular analysis of rice genes). *Rice Genet Newsl* 6:32-37
- Wu R (1990) Report of the committee on genetic engineering (molecular analysis of rice genes). *Rice Genet Newsl* 7:68-77
- Xu J, Procunier JD, Kasha KJ (1990) Species-specific *in situ* hybridization of *Hordeum bulbosum* chromosomes. *Genome* 33:628-634
- Yang XF, Zhang ZL (1988) *In situ* induction of G-bands and macrocoils in plant chromosomes. *Hereditas* 109:45-51
- Zeidler JP (1988) Automated chromosome analysis. *Nature* 334:635
- Zhu F, Wei J, Fu J, Li L (1986) High resolution banding in chromosomes of *Triticum monococcum*. In: Proc 1st Int Symp Chromosome Eng Plants, Xian, pp 226-227