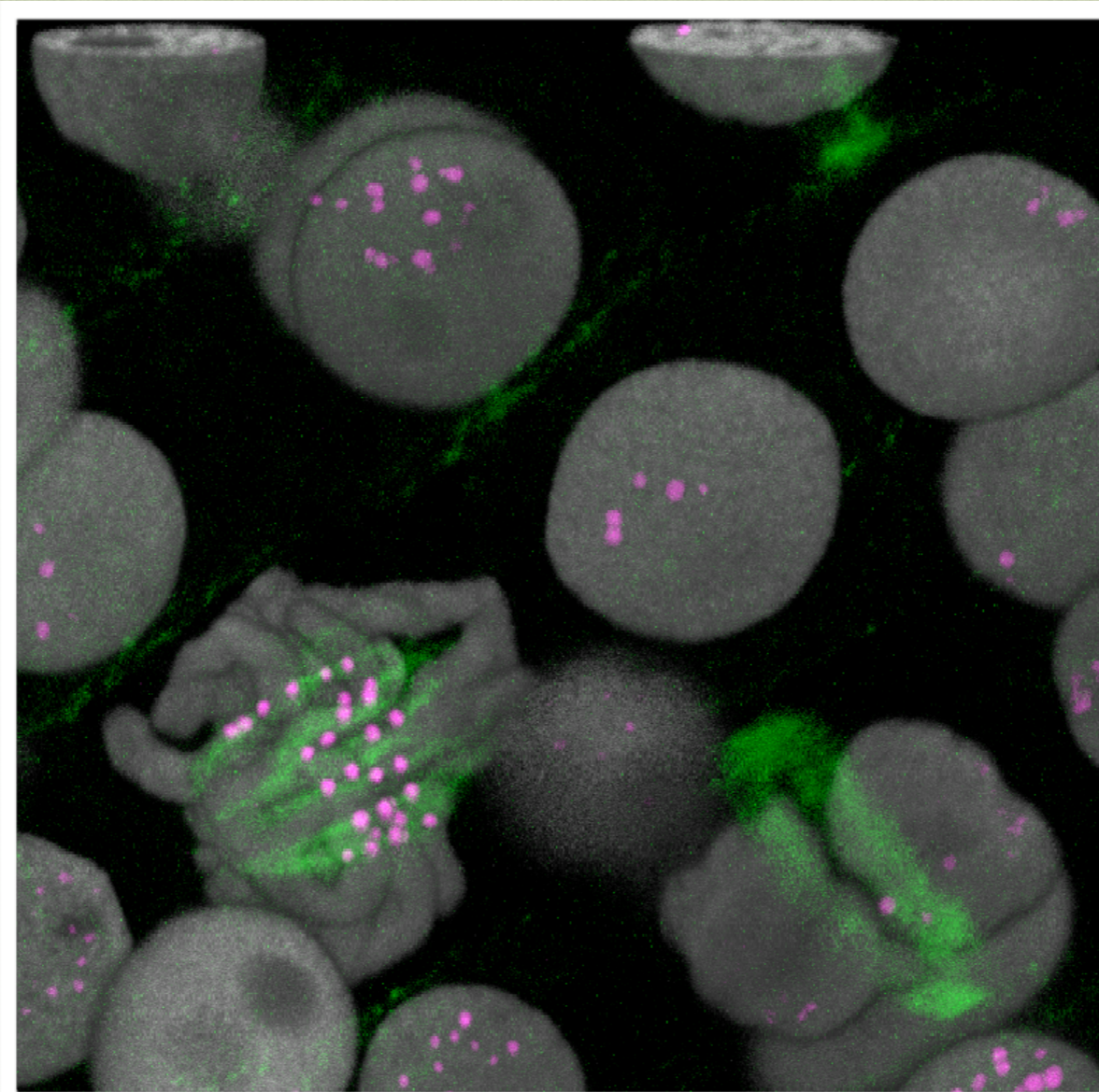


長岐 清孝 著

はじめての染色体

-植物染色体写真集&実験マニュアル-



岡山大学資源植物科学研究所

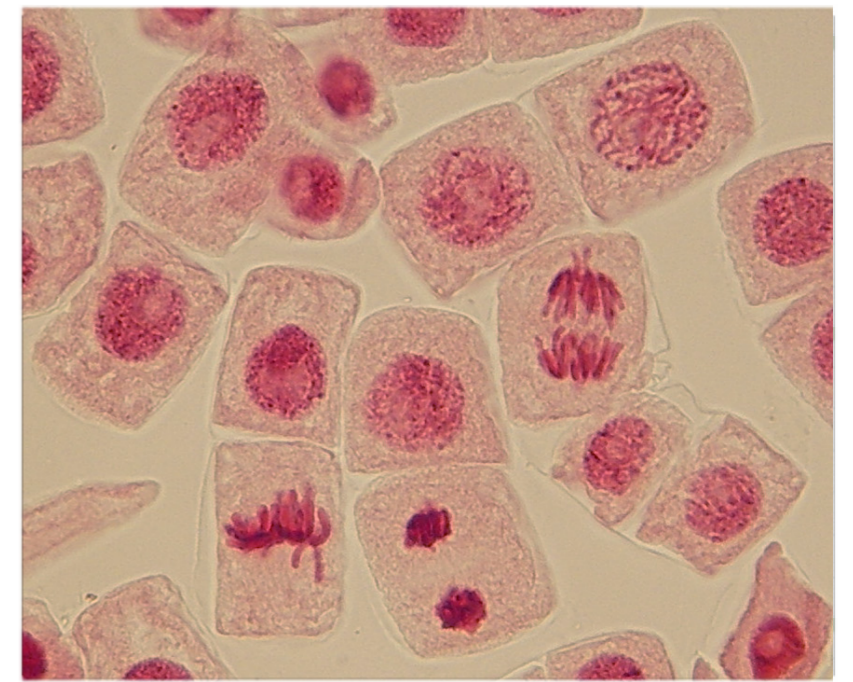
はじめに

「初恋を超える恋には、なかなか出会えない」

これは「中高年が好きなドラマ」に、ありがちなシチュエーションである。この本は、一人の植物細胞遺伝学者（染色体の研究者）が、皆さんの「染色体への出会い」を「生物学の初恋」に変えるために、持ちうる技術とデータを結集して書き上げた。

右の図の写真は「タマネギの細胞分裂」である。おそらく、これと似た写真を教科書で見たり、生物の実験で実際に観察したことがある人もいるだろう。しかし、実際の生物の実験では、「経験の不足」であったり、「材料や実験道具の不具合」だったり、「イマイチ」な結果しか得られないことも多い。

ところで、タマネギが、なぜ「染色体観察」の材料に使われるのか、考えた事があるだろうか？それは、「簡単に、安価に、いつでも手に入ること」、「動物の材料と違い、殺生を伴わないこと（少なくともそう感じること）」、「分裂細胞の頻度も高く、一般的な動植物に比べて大きな染色体をもち、簡易な顕微鏡で観察できること」が理由として挙げられる。これらの「容易さ」のために、「植物の染色体観察」は生物のカリキュラムの早い時期に実施される。

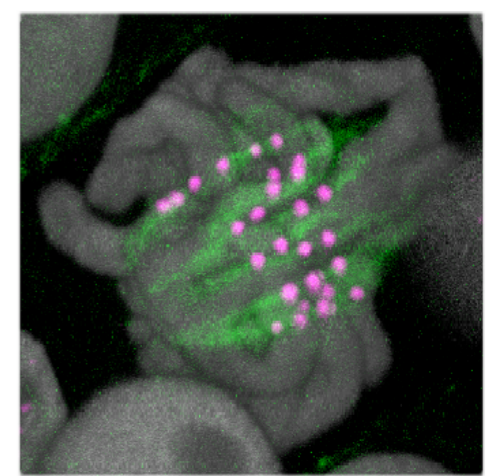
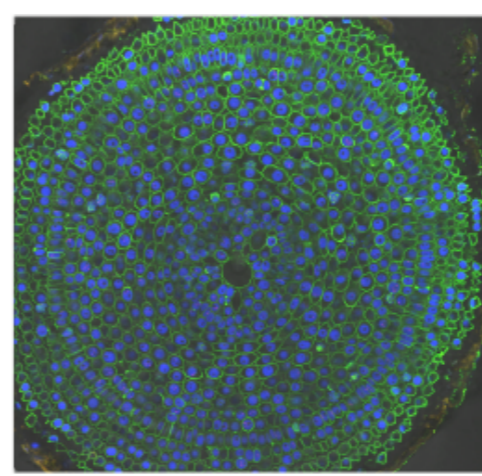
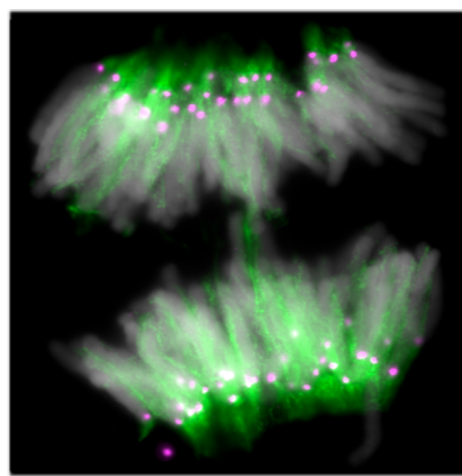
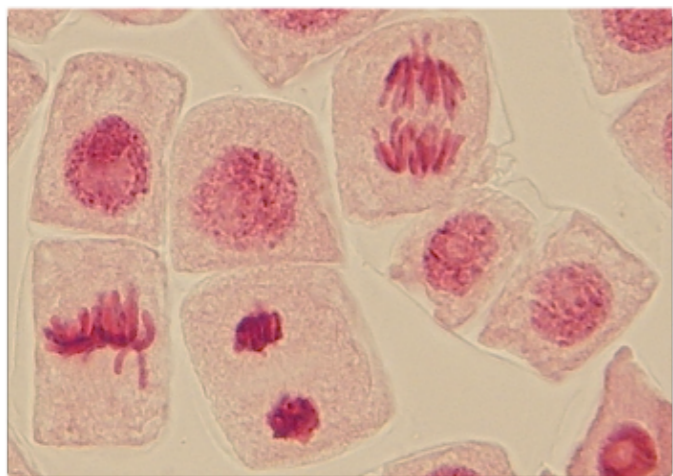


その後、生物の授業が進んで行き、より高度な染色体や細胞分裂のトピックスになると、突然、蛍光を放つ派手な「動物細胞たち」にモデルの座は奪われ、植物の染色体は心の中に「地味な存在」として残ればまだ良い方で、大方の場合には忘れられてしまう。そして、オープンキャンパスなどで染色体観察を体験してもらおうと「あー、そういえば昔、こういうのやりました！うまいかなかったけど・・・」なんて言われてしまう。

これまでも、こんな事にならない様に、多くの先人たちが「植物染色体の観察法」を書籍やウェブを通じてアドバイスしてきた。けれども、「教科書に載っている植物染色体の写真が、動物染色体の写真に比べて地味」と言う点には、植物細胞遺伝学者は私も含めてあまり向き合ってこなかった。そうやって、せっかく「君の生物学の初恋相手」になるチャンスを見す見す逃してきてしまった。

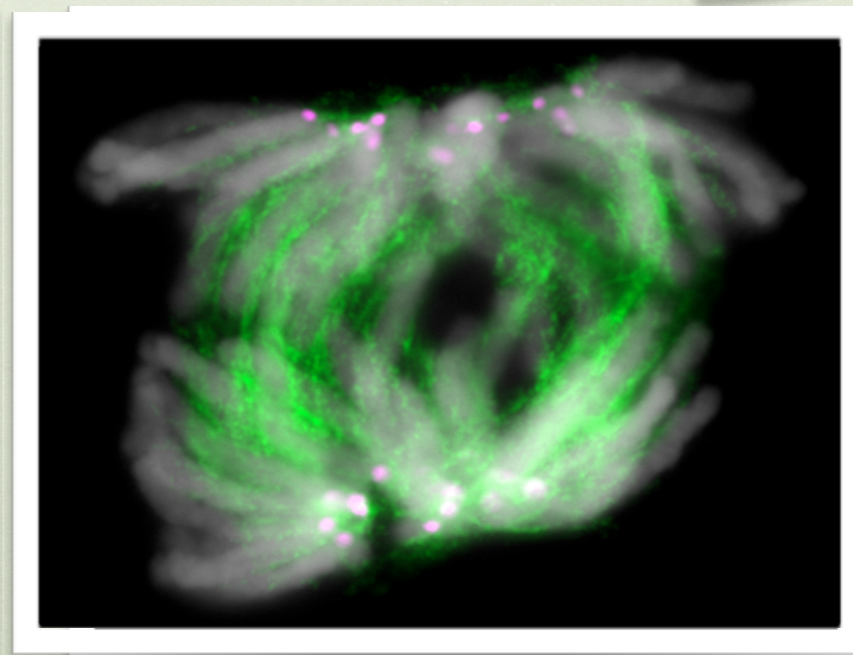
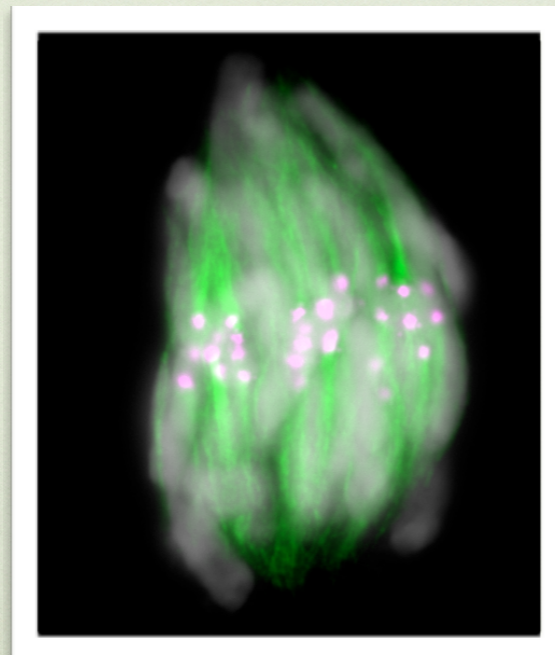
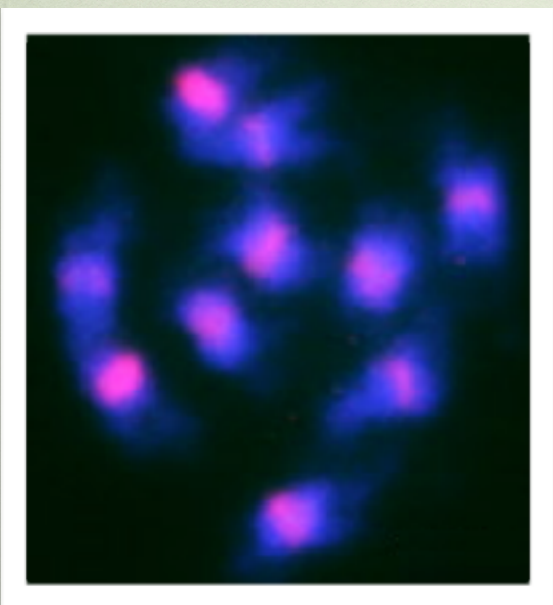
そこで、この本では「地味な植物の染色体も、実は動物の染色体の様に着飾れば、なかなかイケてるんですよ」ってことを「いやいや、動物の染色体では見られない様な事まであるんですよ」ってことを世に広めるために、「チャプタ1」では「プロが撮った写真」を使って、写真集的に「植物染色体の魅力」を存分にアピールしようと思う。

「チャプタ2」では、この魅力的な染色体を「みなさんの手で、実際に観察する方法」を「高校授業級」、「研究室級」、「最先研究室級」に分けて解説した。



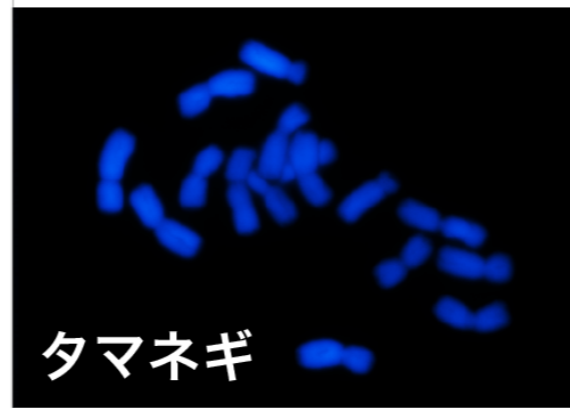
・チャプタ 1・

植物の染色体



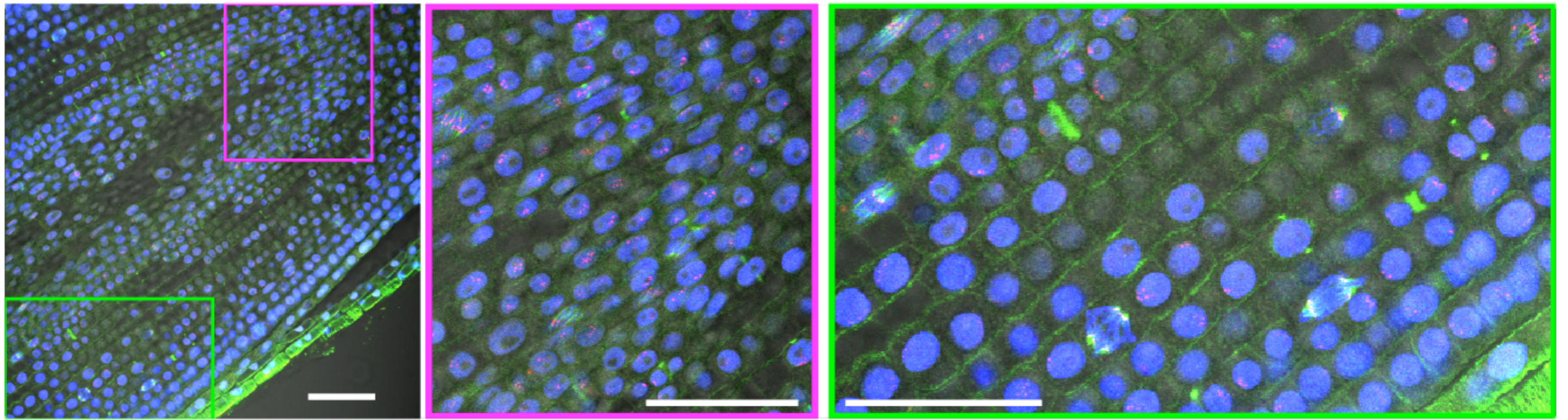
植物のゲノムサイズと染色体

植物は、他の生物分類群に比べて、非常に大きな幅のゲノムサイズ（ゲノムあたりのDNA量）をもつ。最小のゲノムをもつシロイヌナズナの約130 Mb（メガベース=100万塩基対）とユリなどの約120 Gb（ギガベース=10億塩基対）の間には約1千倍の差がある。DNA量の違いは、ほぼそのまま「その生物がもつ総染色体長」に反映されるので、植物の染色体の大きさにはゲノムサイズと同程度のバリエーションがある。



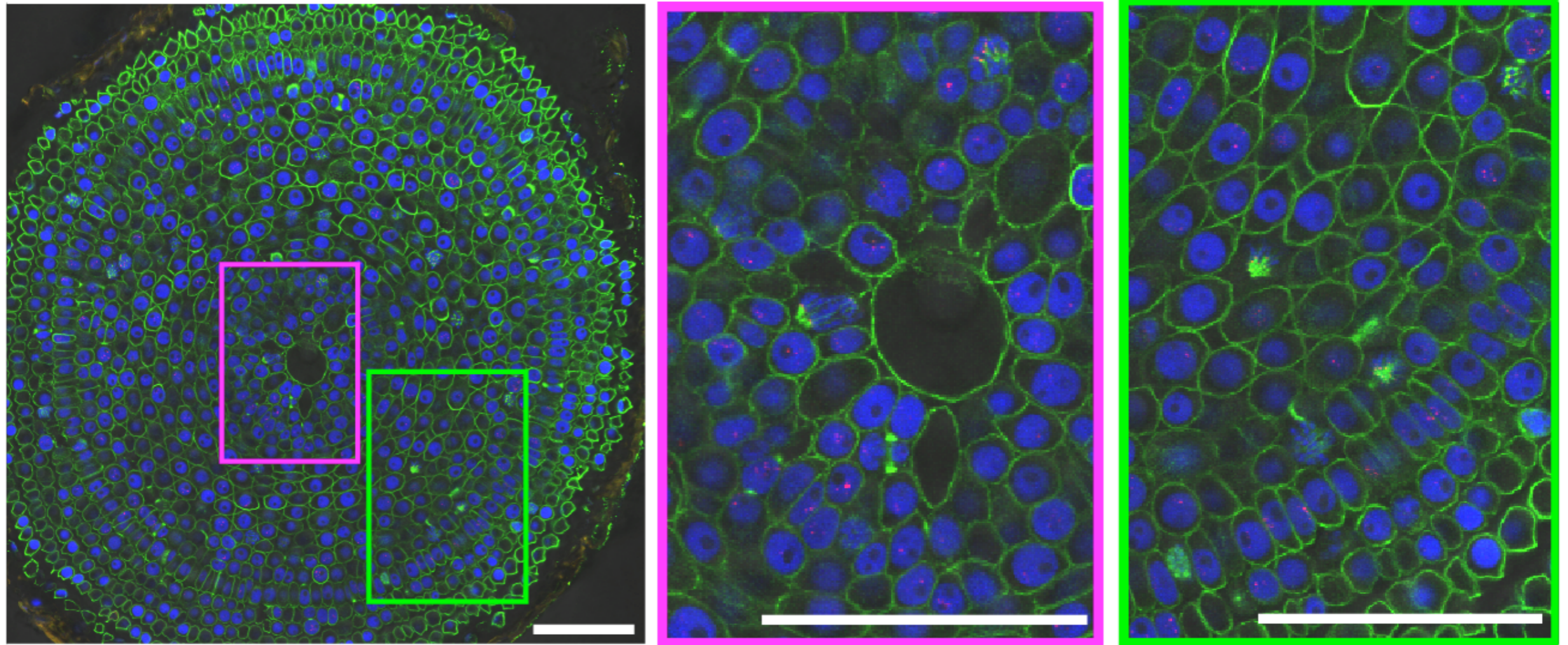
その様な植物の中で、タマネギ（ゲノムサイズは15 Gb）は「分裂細胞の頻度も高く、一般的な動植物に比べて大きな染色体をもち、簡易な顕微鏡で観察できる」ことから、生物学における「植物の染色体観察」の材料として、世界中で使われている。続いては、このタマネギを材料に、「植物の細胞分裂」について見ていこう。

植物の細胞分裂～場所～



細胞分裂は、植物体の全体で起きているわけではない。細胞分裂は、「根の先端（根端）」や「芽」、「花芽」といった「成長中の組織」で多くが起きている。なので、「成長しきった葉」から細胞をとってきて観察してみても、そこには「分裂をしていない（間期）細胞」しか見あたらない。

上の写真は、タマネギの根の先端に近い部分の「縦断面」を拡大したものである（スケールバーは100 μm ）。右上方方向に根端があることを想像すればイメージが湧きやすいかも知れない。教科書的に「分裂細胞がある」とされている「根端分裂組織（マゼンダ四角）」に加えて、「外皮」と「内皮」の間の「皮層（緑四角）」にも多くの分裂細胞（緑色のシグナルを示す）が存在することがわかる。



この写真は、タマネギの根の「横断面」である。「縦断面」と同様に、「根端分裂組織（マゼンダ四角）」と「皮層（緑四角）」に多くの分裂細胞（緑色のシグナルを示す）が存在することが見て取れる。「分裂細胞」が「動物の組織の中」で観察できる例は限られており、ここに示した例は「植物ならではの例」のひとつと言える。次のページでは、この様にして観察した切片から得られた「3次元（3D）画像」を「連続写真」として示す。

連続写真の使い方

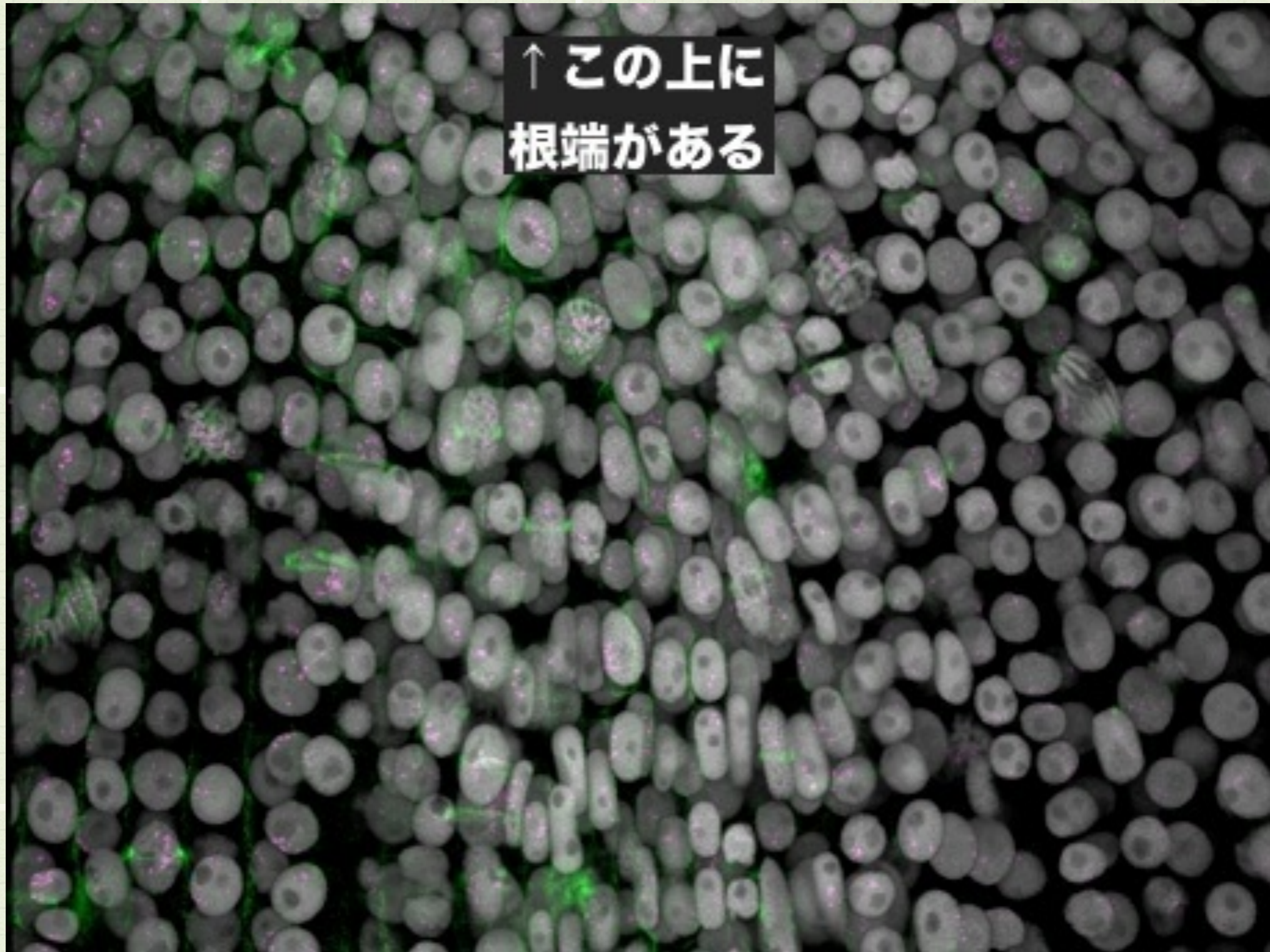
1. 写真をタップすると
フルサイズになる

2. さらに写真をタップすると
1つ先の写真に進む

3. 連射をすれば
動画のように動く！

4. 1つ前の写真に戻るときは
右に向かって1本指でフリック→

連続写真 1.1 連続写真の使い方

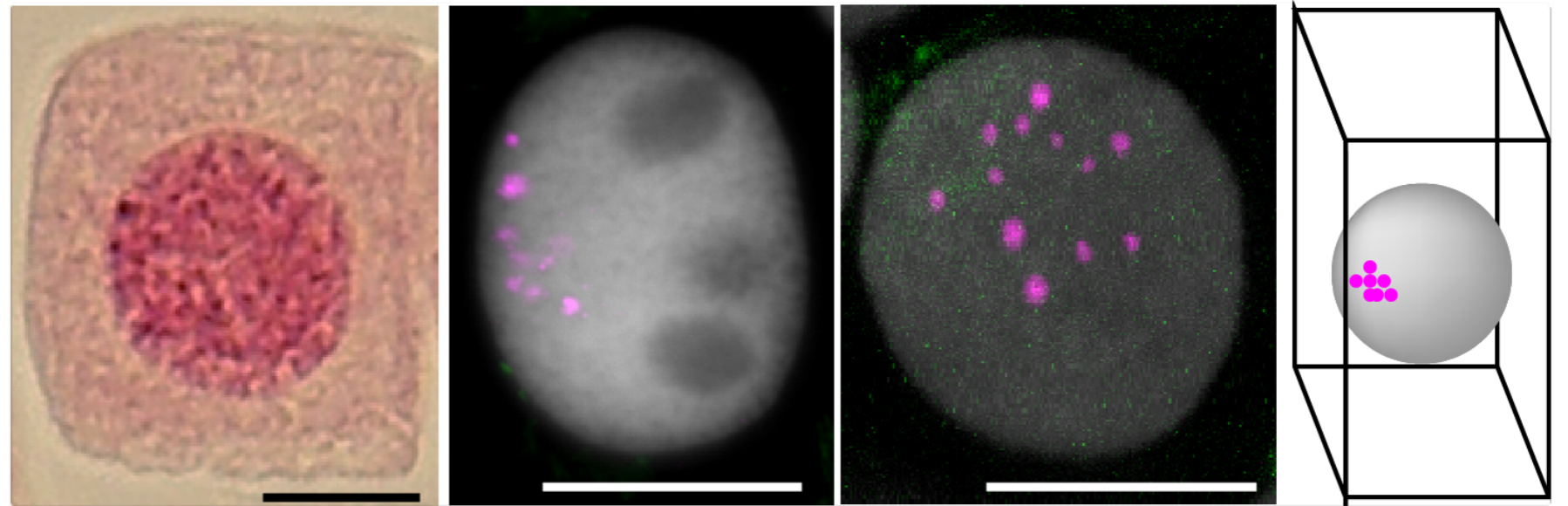


連続写真 1.2 タマネギ根の縦断面における分裂細胞の分布

分裂期の細胞は緑のシグナルを示している。マゼンダは動原体のシグナル。根端は画面上側にある。

植物の細胞分裂～間期～

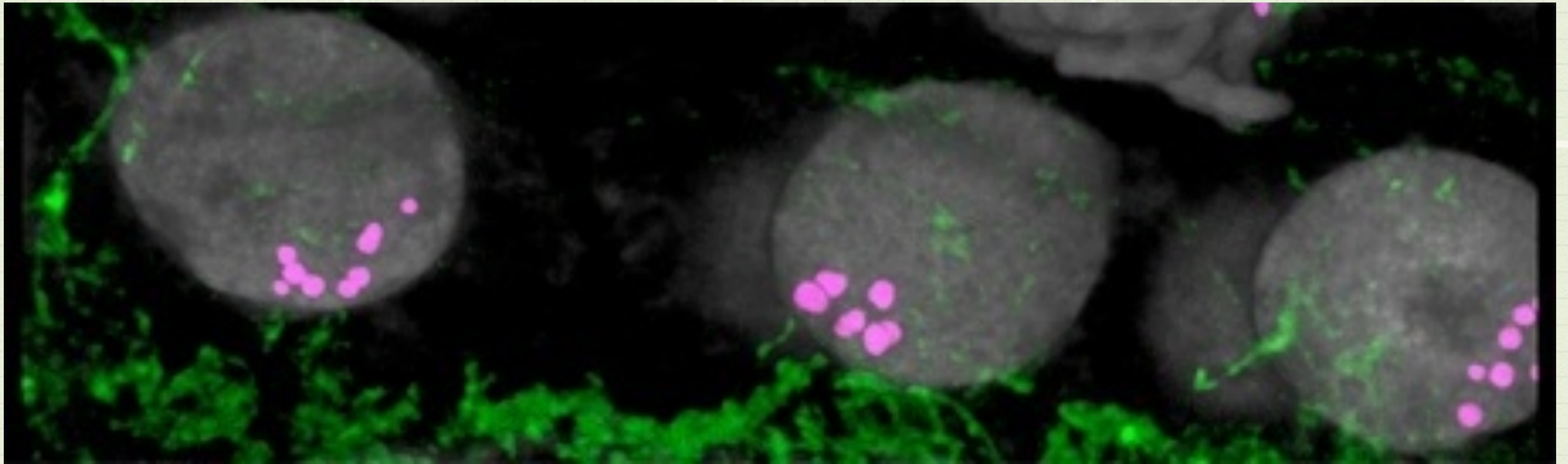
「前の細胞分裂」と「次の細胞分裂」の間の時期を「間期」という。細胞分裂という視点から見ると、「休んでいる時期」の様に見えるが、多くの生命活動は間期の細胞により営まれていることを考えれば、「生物の細胞にとって



一番アクティブな時期」である。しかし、「細胞遺伝学者的視点」で見れば、やはり「退屈な時期」である。

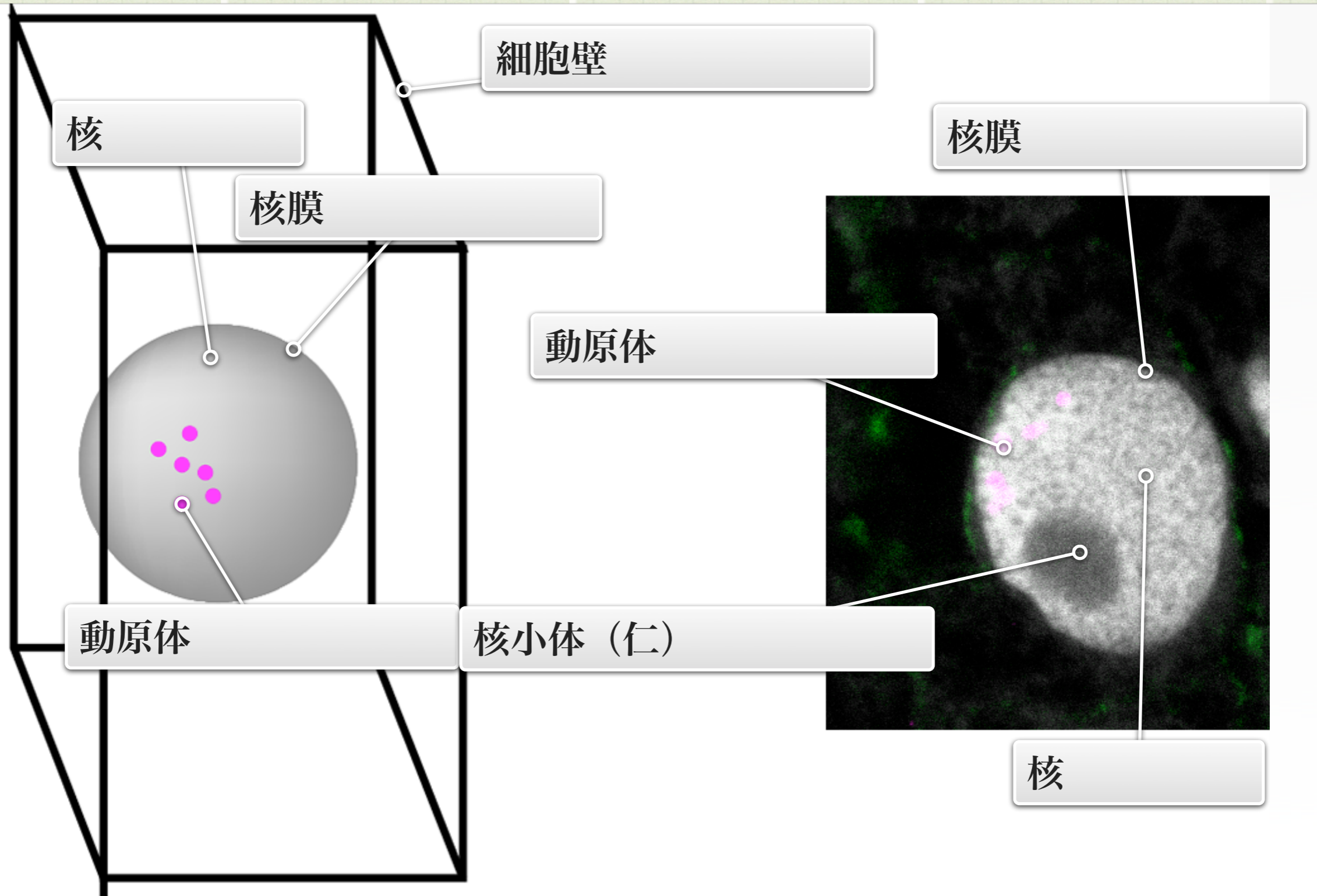
写真は、左から順に「オルセイン染色」、「免疫染色により動原体（マゼンダ）および微小管の成分の1つであるチューブリン（緑）を可視化したもの」、「組織免疫染色による3D解析（色は免疫染色と同じ）」および「組織免疫染色の結果に基づく模式図」（スケールバーは10 μm ）。タマネギの間期核では、動原体が一方に寄って存在しているのが「免疫染色」の写真でわかる。3D化すると「寄っている動原体」は、核の表面だけでなく内側に立体的に存在することがわかる。間期の細胞では、チューブリンが細胞壁にうっすら見られる（組織免疫染色の写真）。

次のページの連続写真は、間期細胞を含む3D回転写真。細胞壁に存在するチューブリンが2D写真よりもよくわかる。



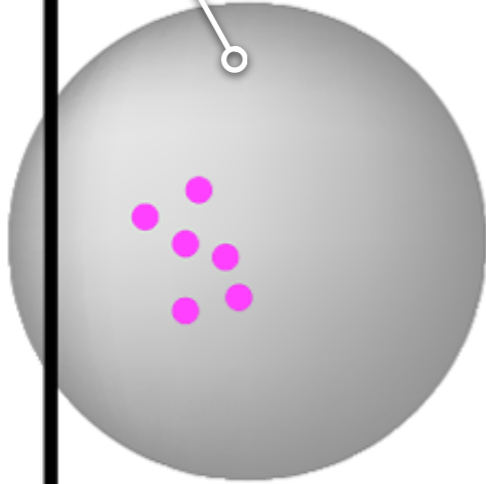
連続写真 1.3 タマネギ間期細胞を含む3D回転写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)



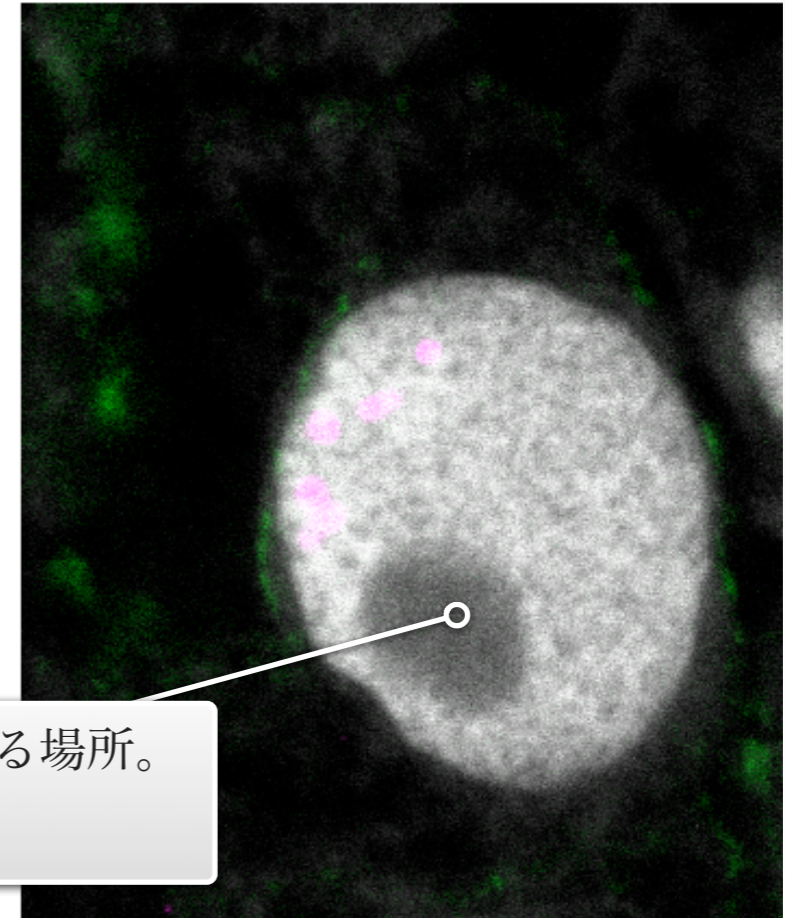
インタラクティブ 1.1 間期植物細胞の構造

遺伝物質である
DNAが入っている
間期に見られる
細胞内器官

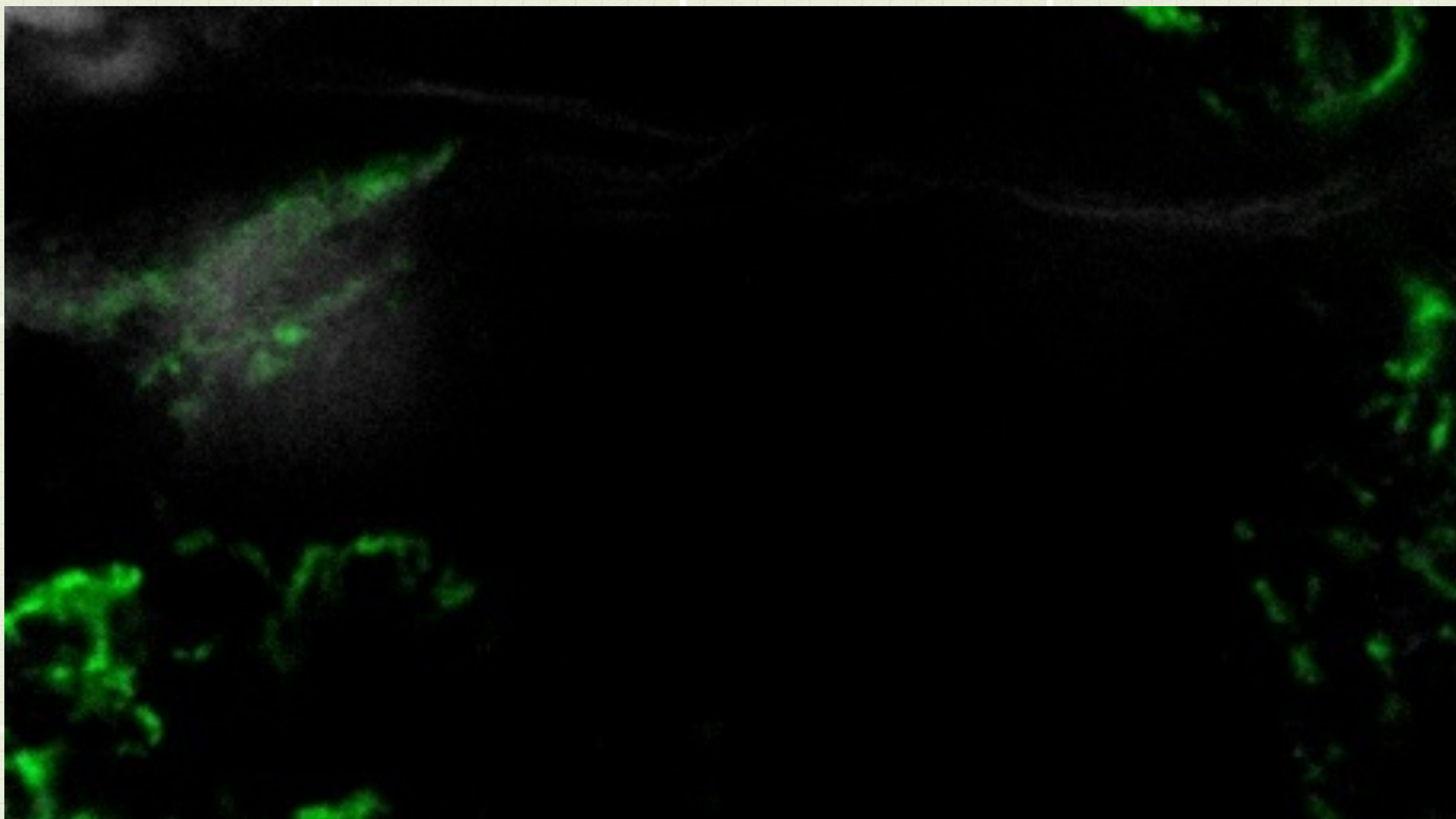


細胞の周りを被っている
植物細胞特有の壁状の構造

リボソームの構築が行われる場所。
空洞のように見える。

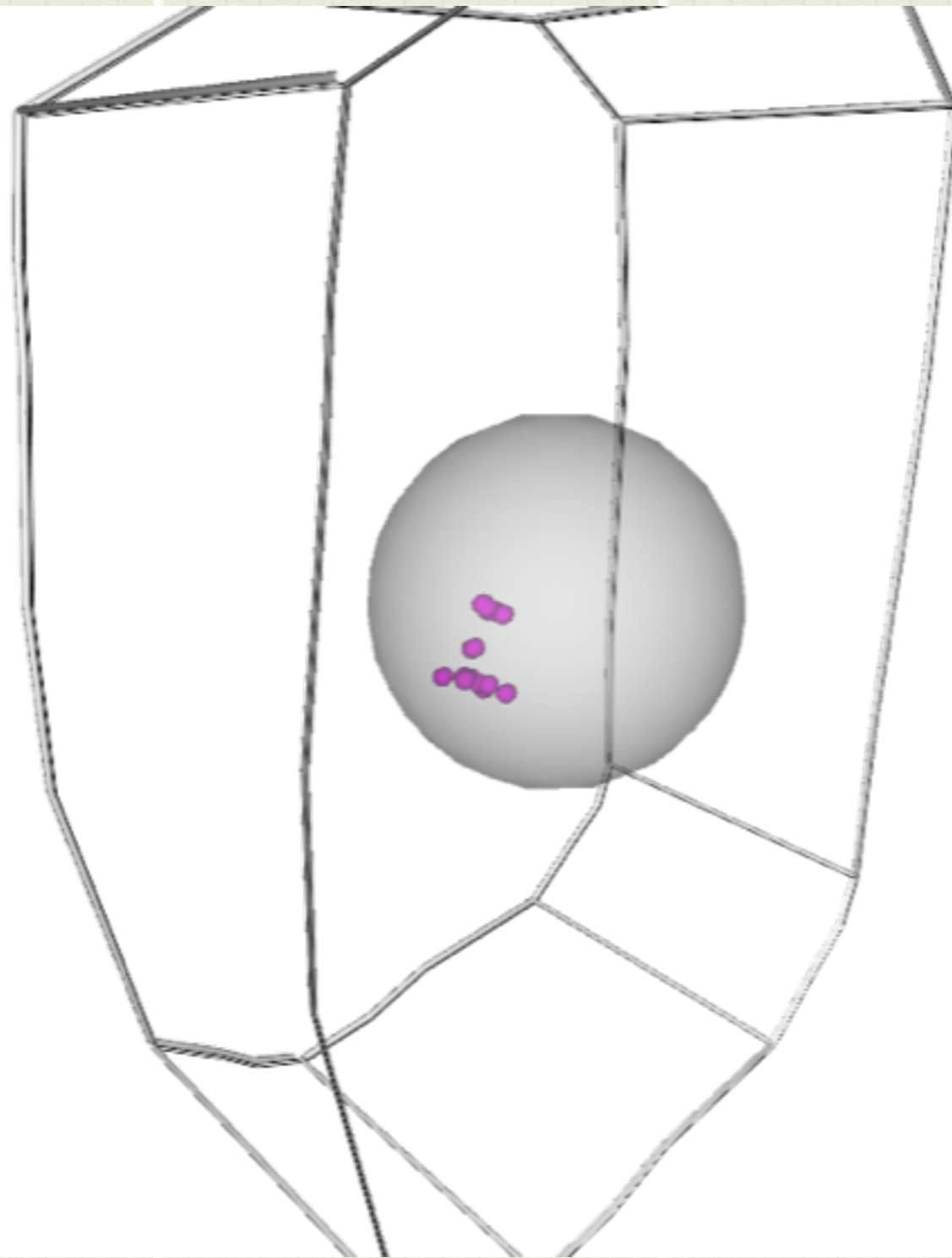


インタラクティブ 1.2 間期植物細胞の構造（復習：名称をあててみよう！）



連続写真 1.4 タマネギ間期細胞を含むスライス写真

マゼンダは動原体、**緑**はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)

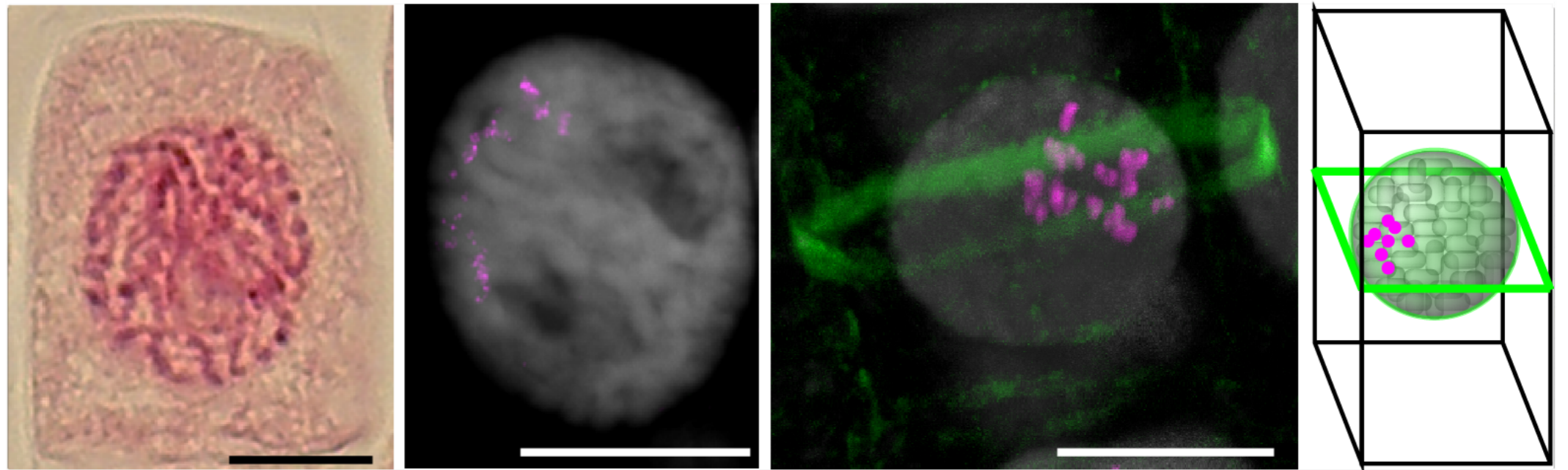


インタラクティブ 1.3 間期細胞の「グリグリできる3Dモデル」

動原体 (マゼンダ)

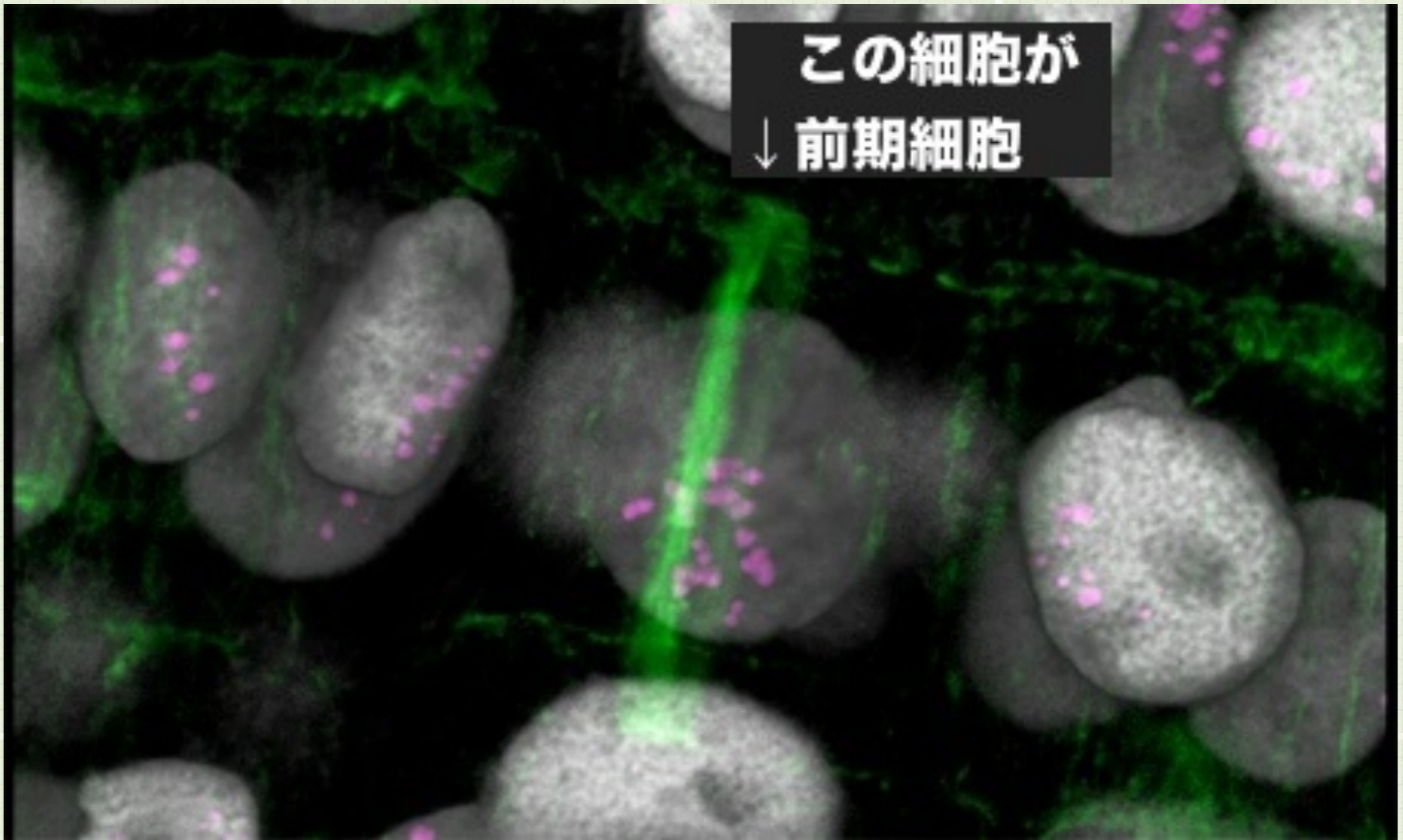
植物の細胞分裂～前期～

「前期」の細胞では、染色体の凝縮が始まる。凝縮し始めた染色体は、「ひも状の構造」として観察される。



動原体は、形成され始めた「くびれ」に位置し、明確な構造となる（免疫染色および組織免疫染色）。組織免疫染色では、チューブリンを含む環状の構造体（前期前微小管束：Preprophase band）が細胞壁に沿って細胞の赤道面が形成されるあたりに観察されるようになる。前期前微小管束は、植物でのみ見られる構造である。チューブリンのシグナルは、前期の核膜にも観察される。

次のページの連続写真は、前期細胞を含む3D回転写真。前期前微小管束が、2D写真よりも明確に見える。

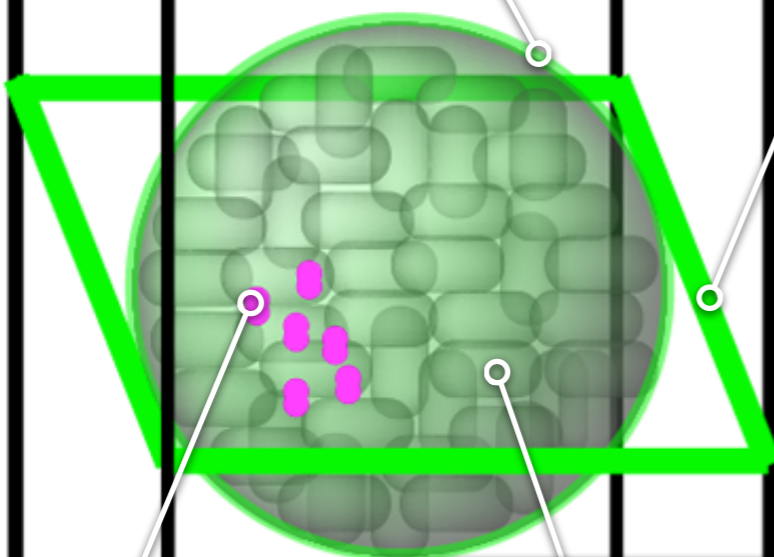


連続写真 1.5 タマネギ前期細胞を含む3D回転写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)

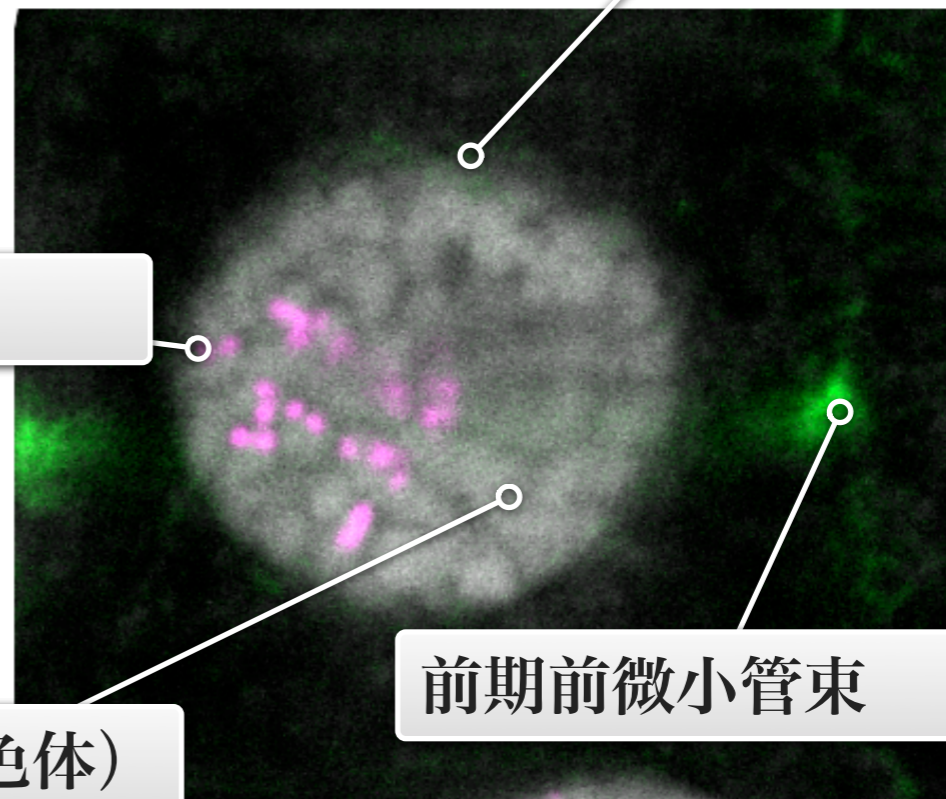
核膜

前期前微小管束



動原体

核膜



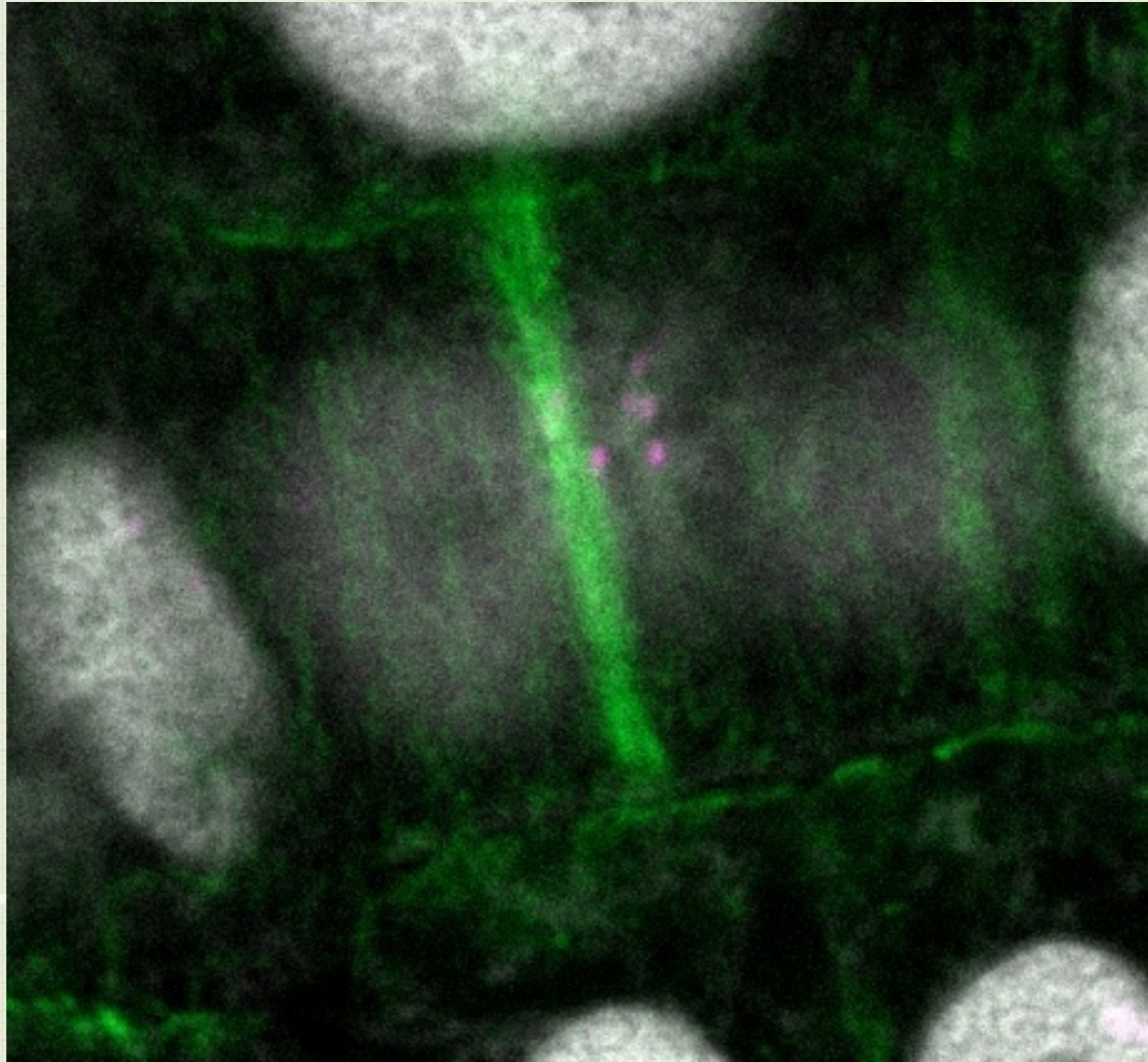
動原体

核 (染色体)

核 (染色体)

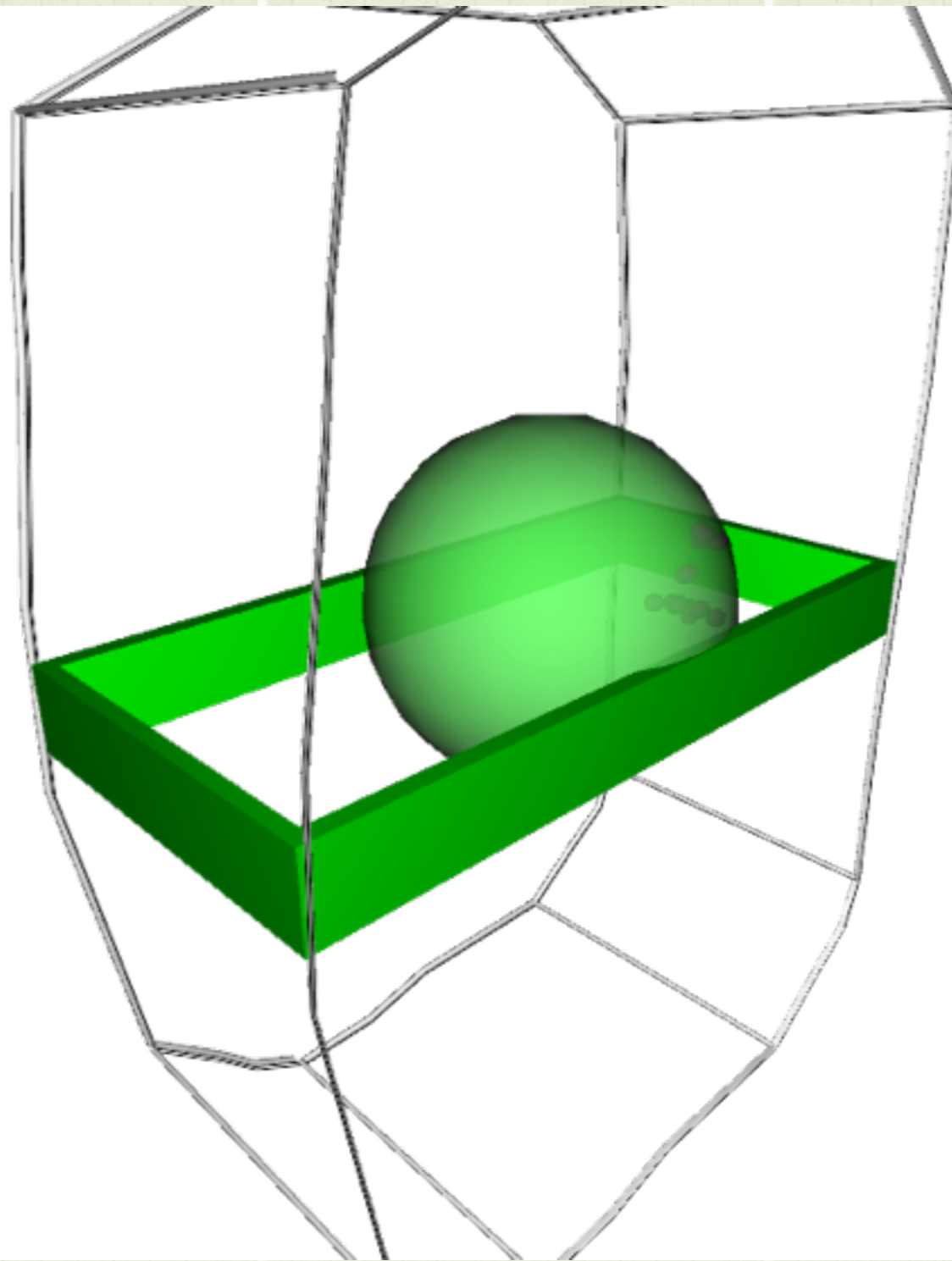
前期前微小管束

インタラクティブ 1.4 前期植物細胞の構造



連続写真 1.6 タマネギ前期細胞を含むスライス写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)

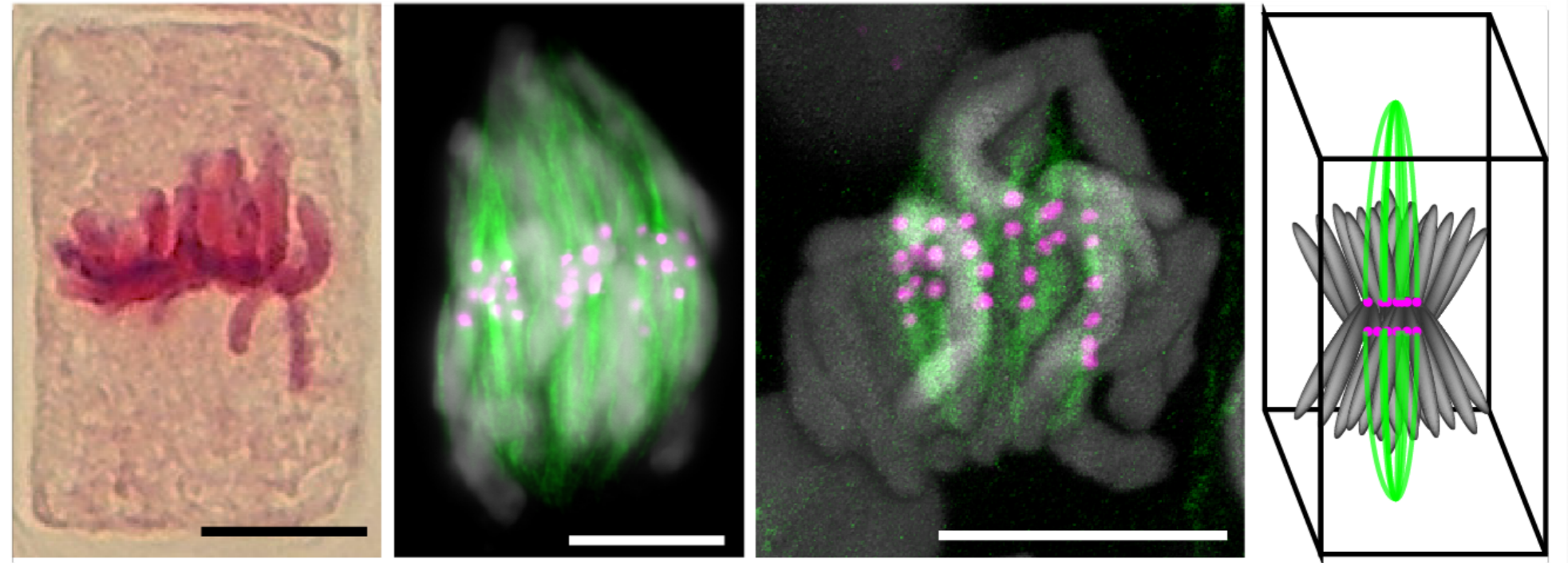


インタラクティブ 1.5 前期細胞の「グリグリできる3Dモデル」

動原体 (マゼンダ)、チューブリン (緑)

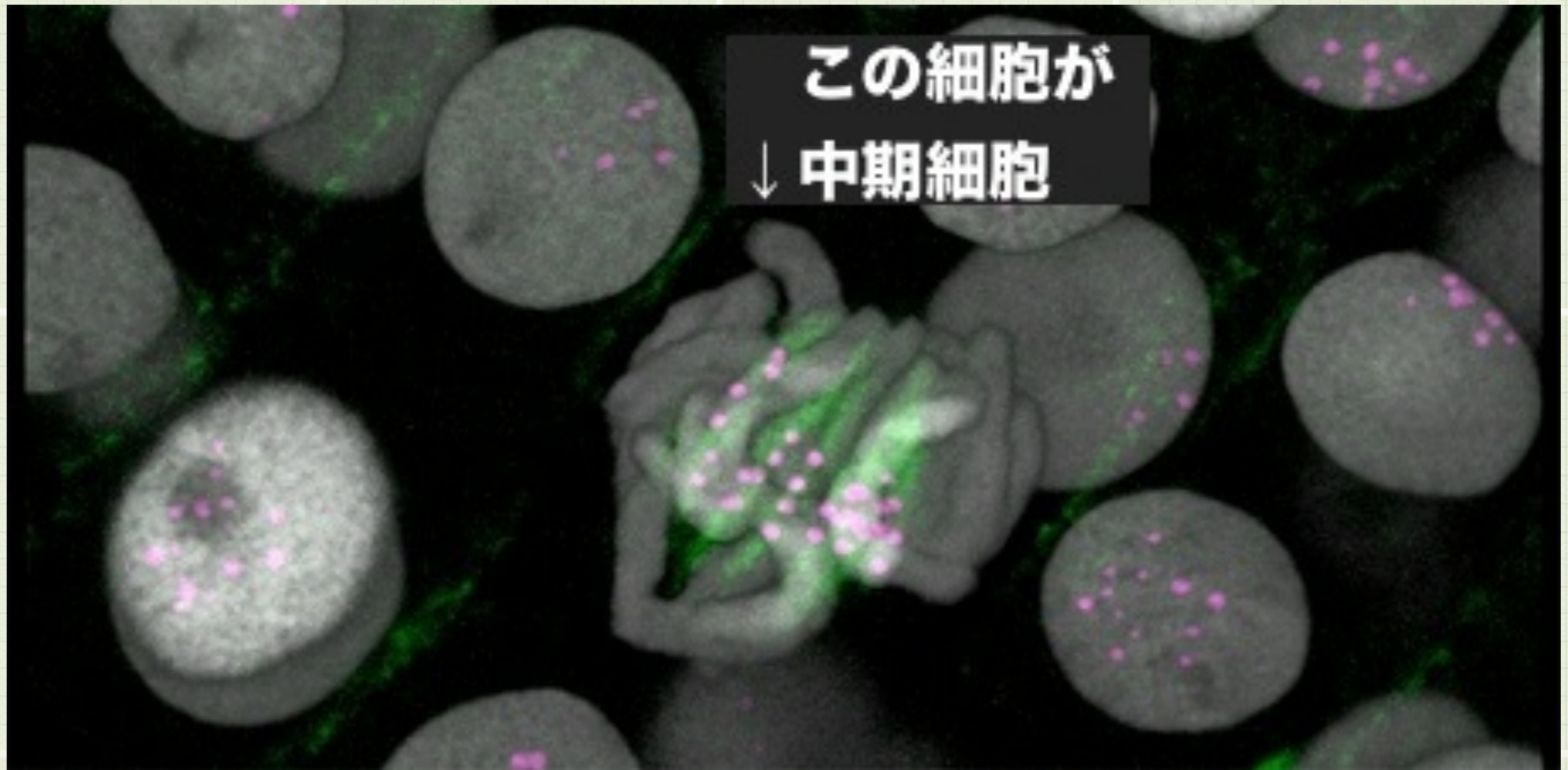
植物の細胞分裂～中期～

「中期」では、前期に凝縮し始めた染色体が、完全に凝縮する。「これぞ染色体！」という染色体が観察できる、細胞遺伝学者が愛して止まない時期である。



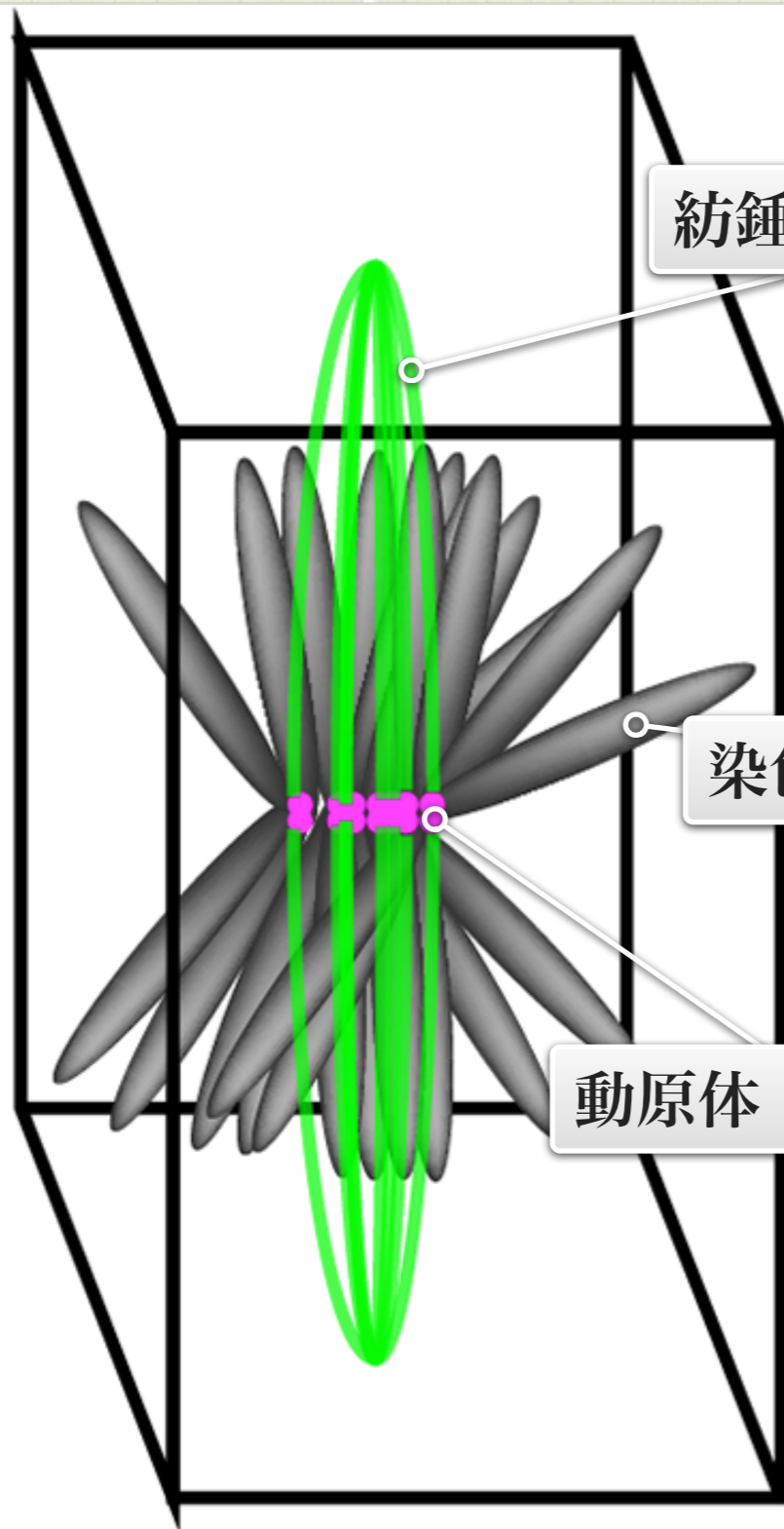
動原体は、両極へ伸びたチューブリンを含む微小管によって捉えられ、赤道面上に整列する。免疫染色や組織免疫染色の写真では、「均等な距離を間に挟んで線対称に整列している動原体」が観察できる。これは、動原体で接着されている姉妹染色分体を微小管が両極から引っばっているために生じる。

次のページの連続写真は、中期細胞を含む3D回転写真。中期細胞の立体構造が、2D写真よりも明確に見える。



連続写真 1.7 タマネギ中期細胞を含む3D回転写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)

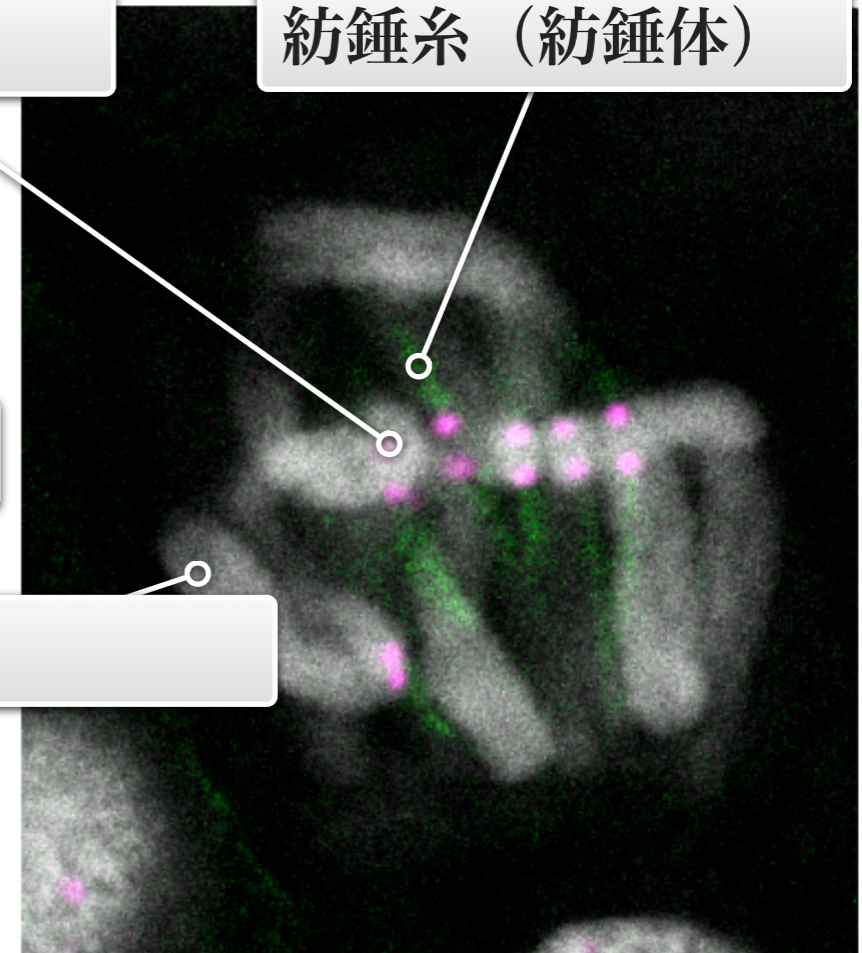


紡錘系（紡錘体）

動原体

染色体

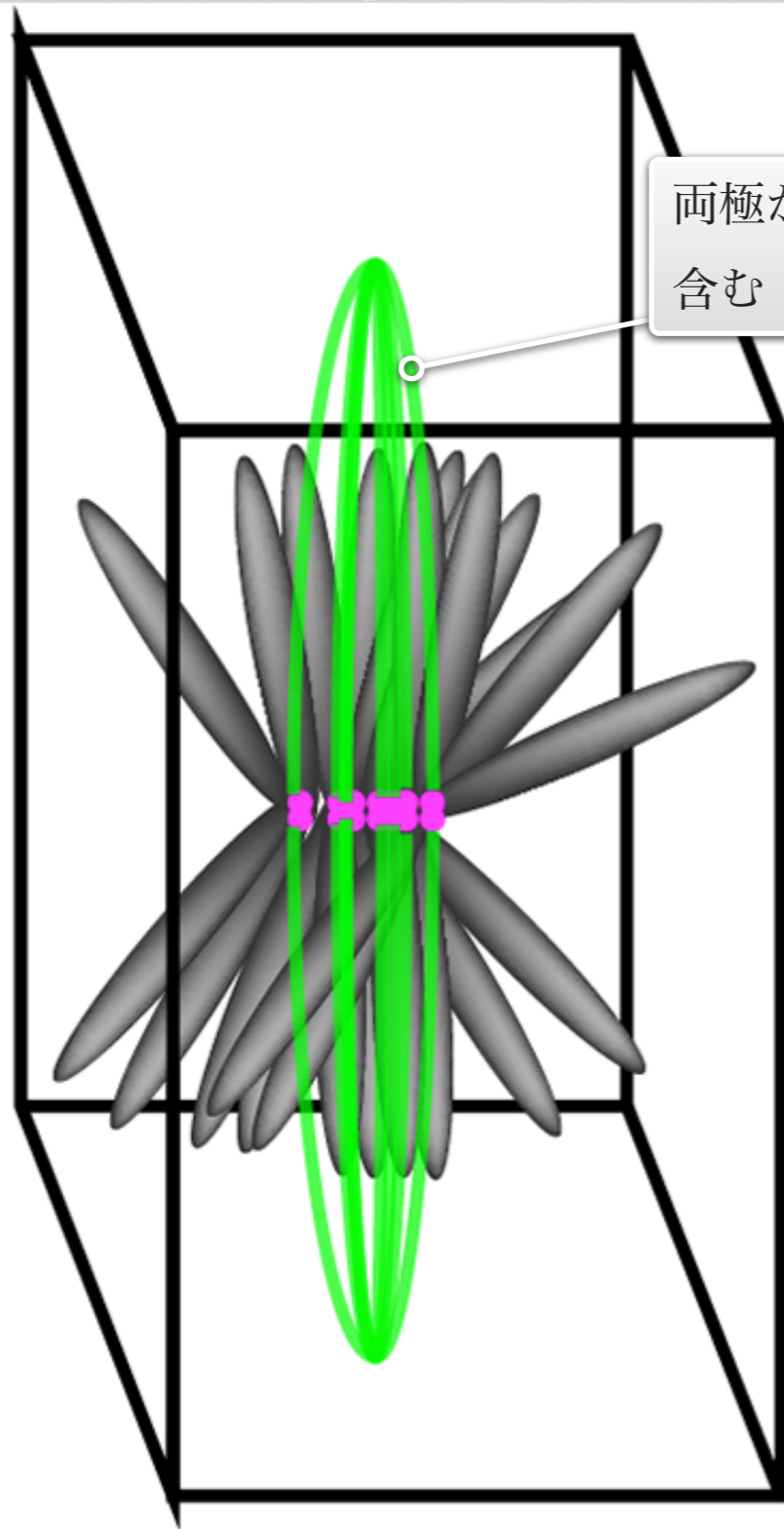
動原体



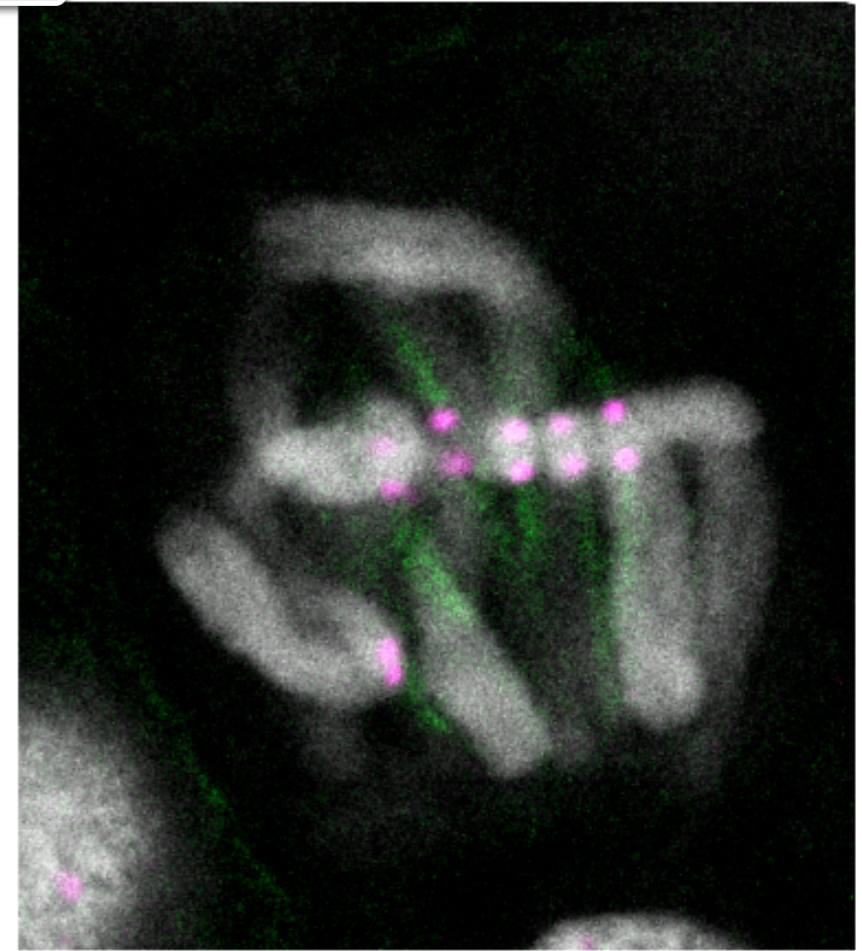
紡錘系（紡錘体）

染色体

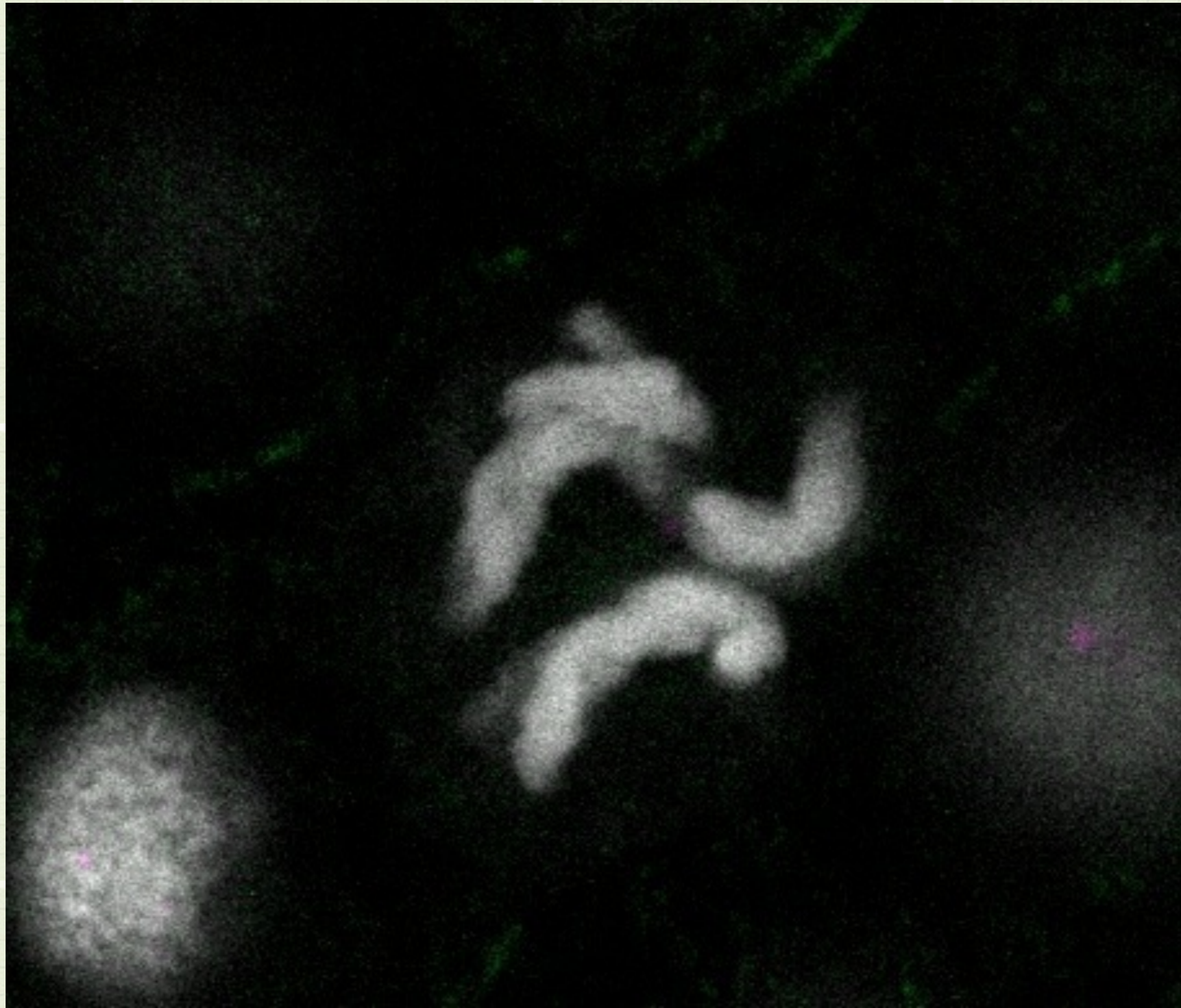
インタラクティブ 1.6 中期植物細胞の構造



両極から伸びたチューブリンを
含む「ひも」

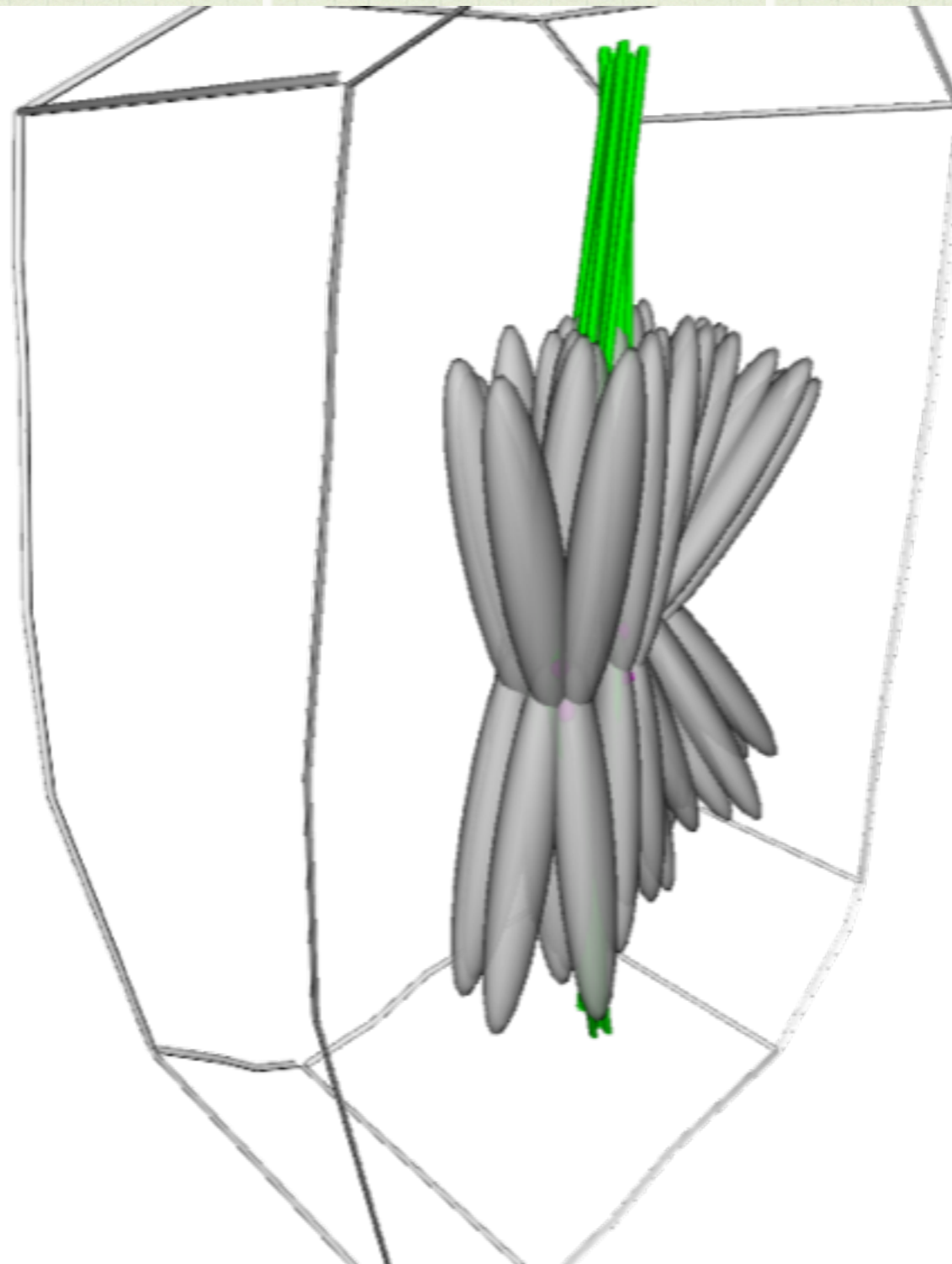


インタラクティブ 1.7 中期植物細胞の構造（復習：名称をあててみよう！）



連続写真 1.8 タマネギ中期細胞を含むスライス写真

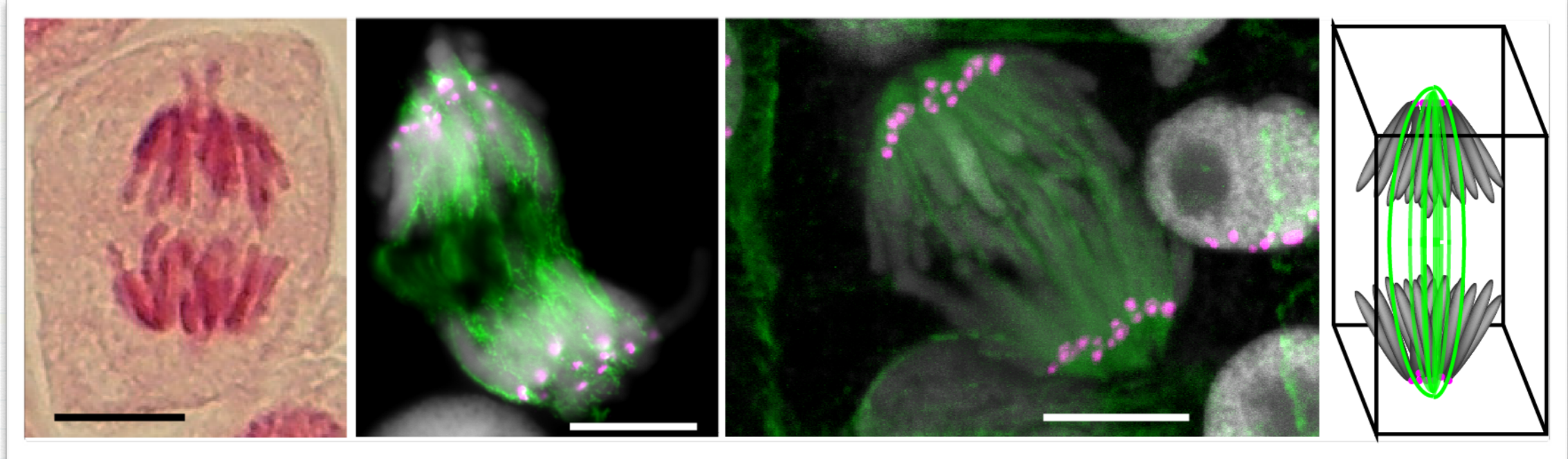
マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)



インタラクティブ 1.8 中期細胞の「グリグリできる3Dモデル」

動原体 (マゼンダ)、チューブリン (緑)

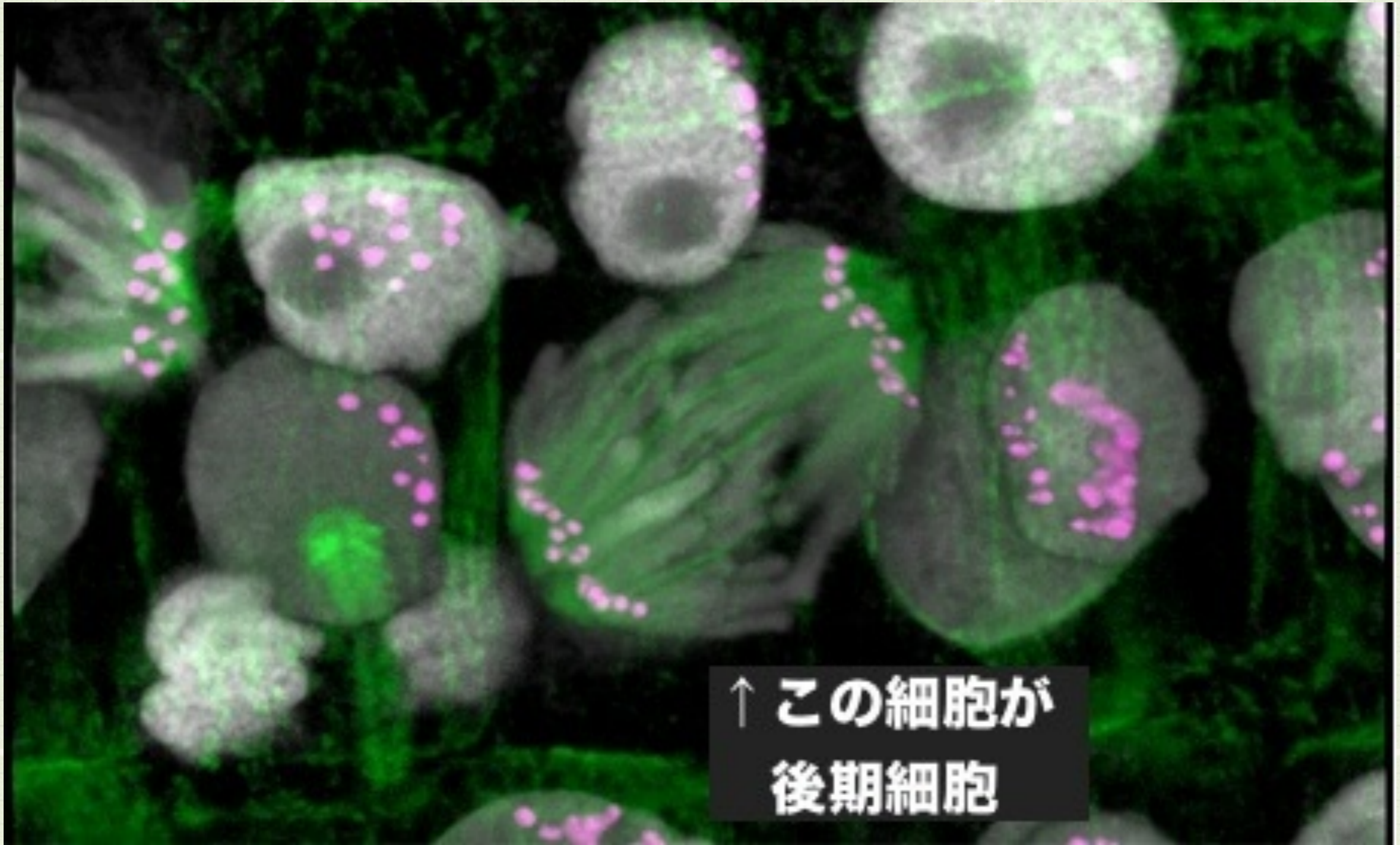
植物の細胞分裂～後期～



「後期」は、「ベリッ！」という音まで聞こえてきそうな、細胞分裂の中で最もダイナミックな時期である。

中期には動原体で接着されていた姉妹染色分体の接着が、後期に入る直前に解除され、姉妹染色分体は微小管に沿って両極へと移動する。免疫染色や組織免疫染色では、「線対称」を維持したまま動原体が両極に移動していく様子が観察できる。

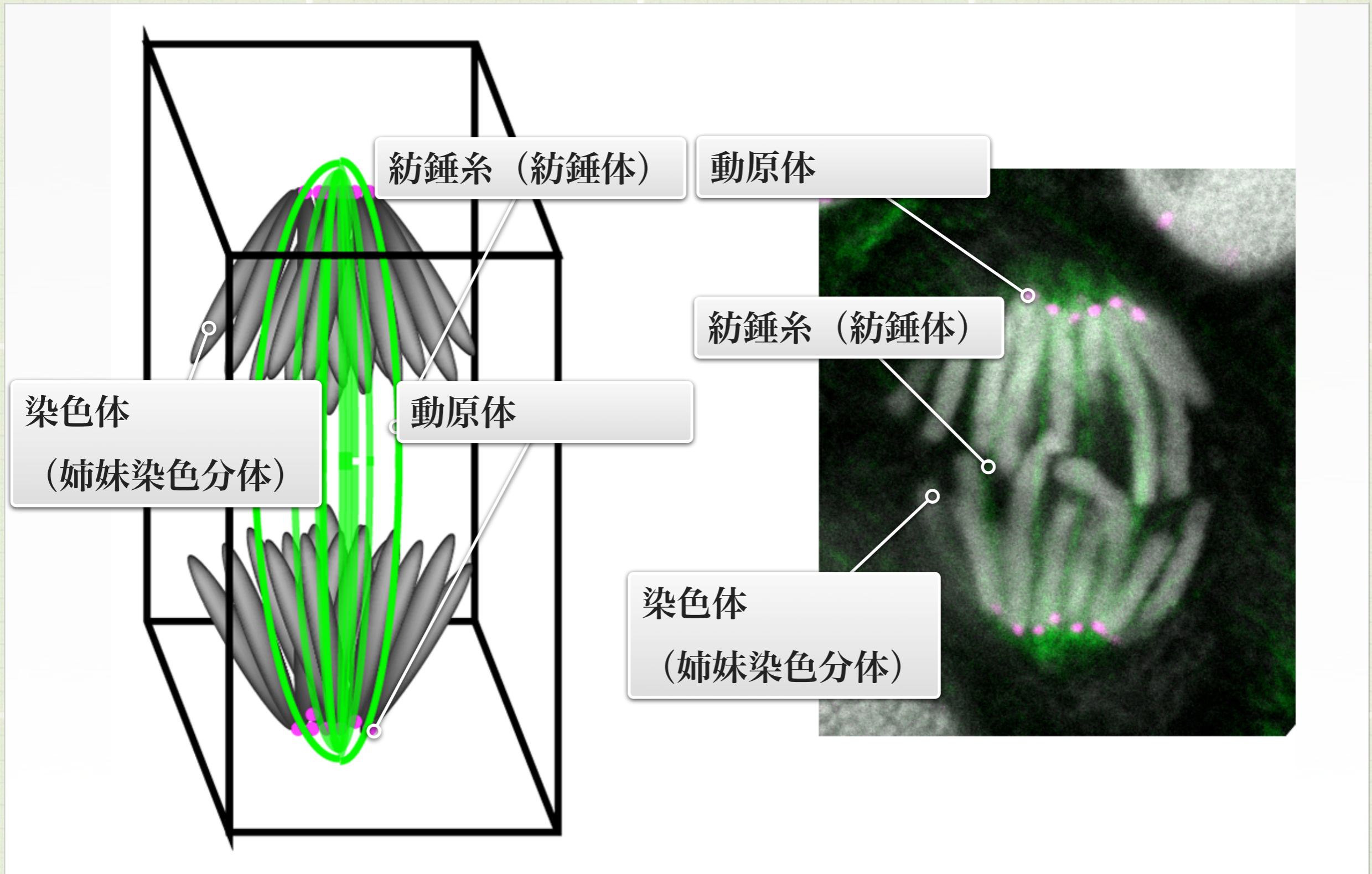
次のページの連続写真は、後期細胞を含む3D回転写真。両極に分かれ行く染色分体の立体構造が、明確に見える。



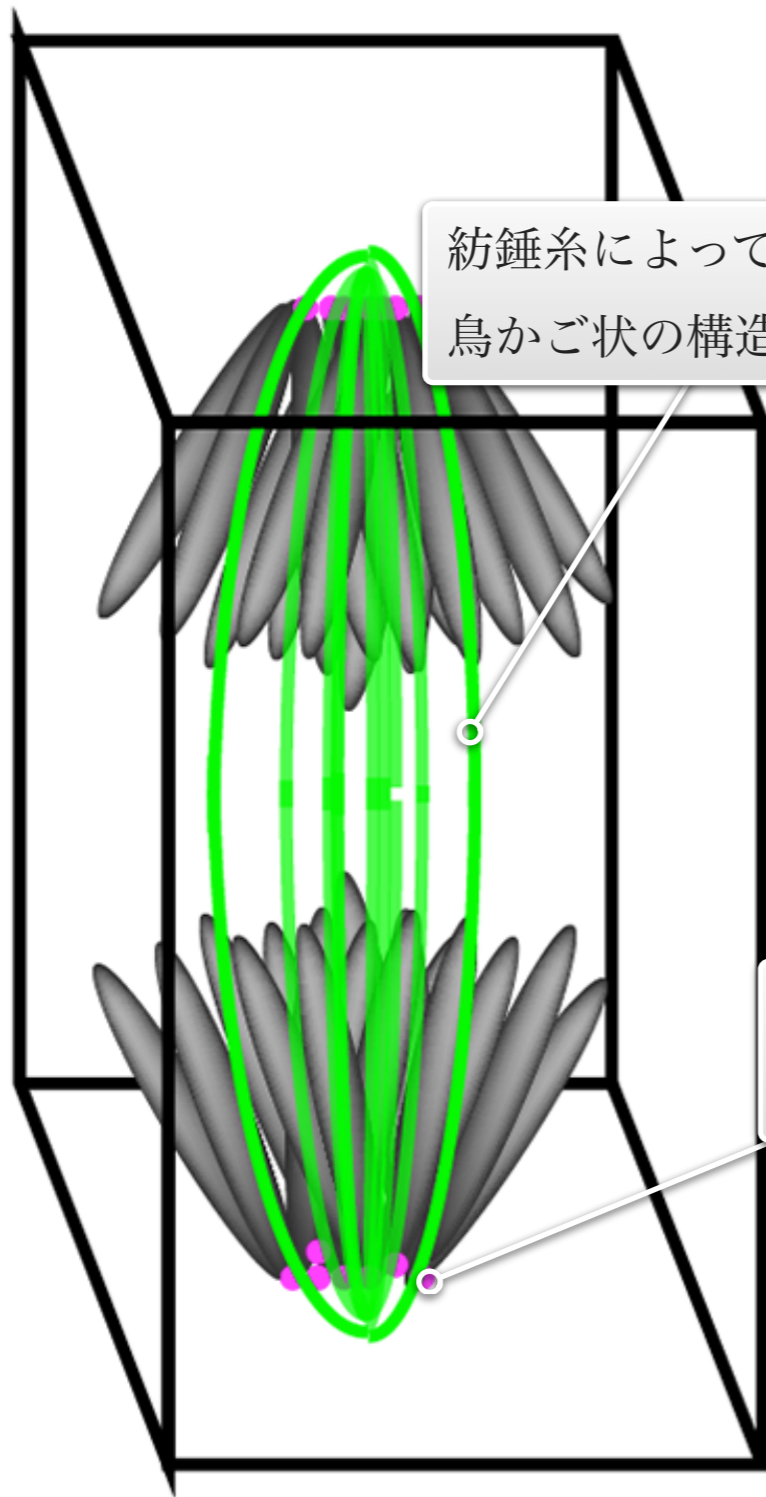
↑ この細胞が
後期細胞

連続写真 1.9 タマネギ後期細胞を含む3D回転写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)

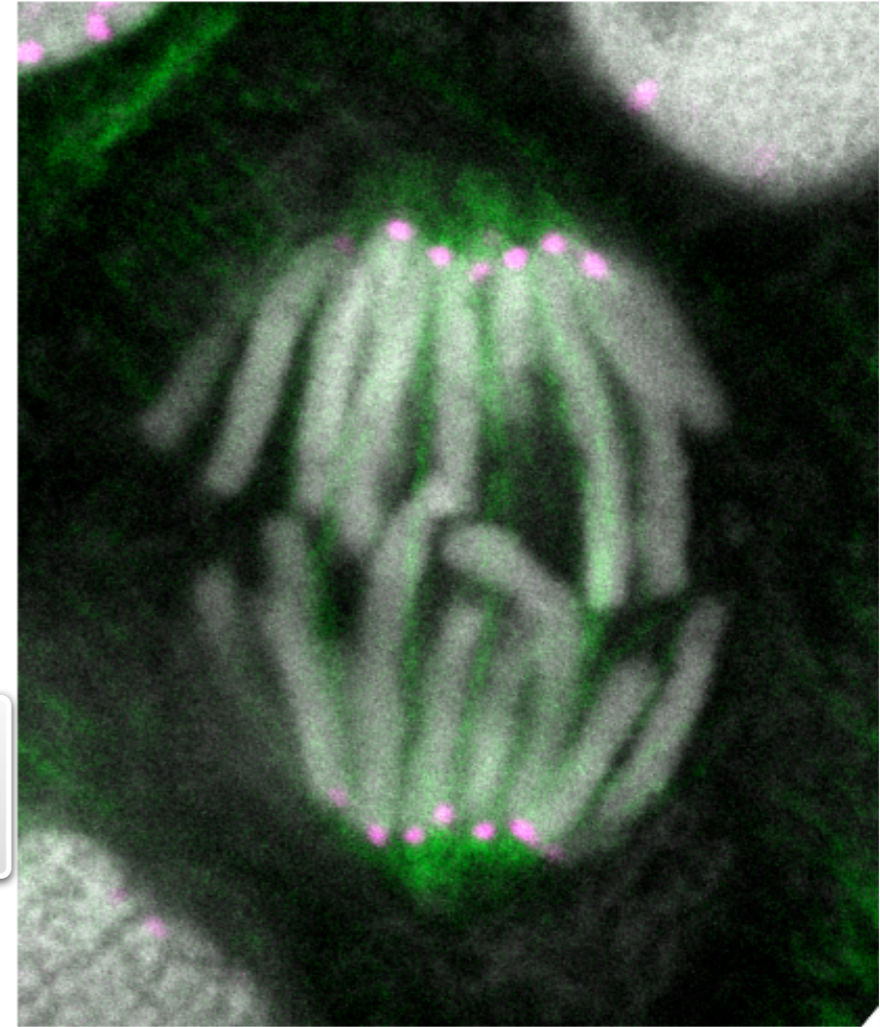


インタラクティブ 1.9 後期植物細胞の構造

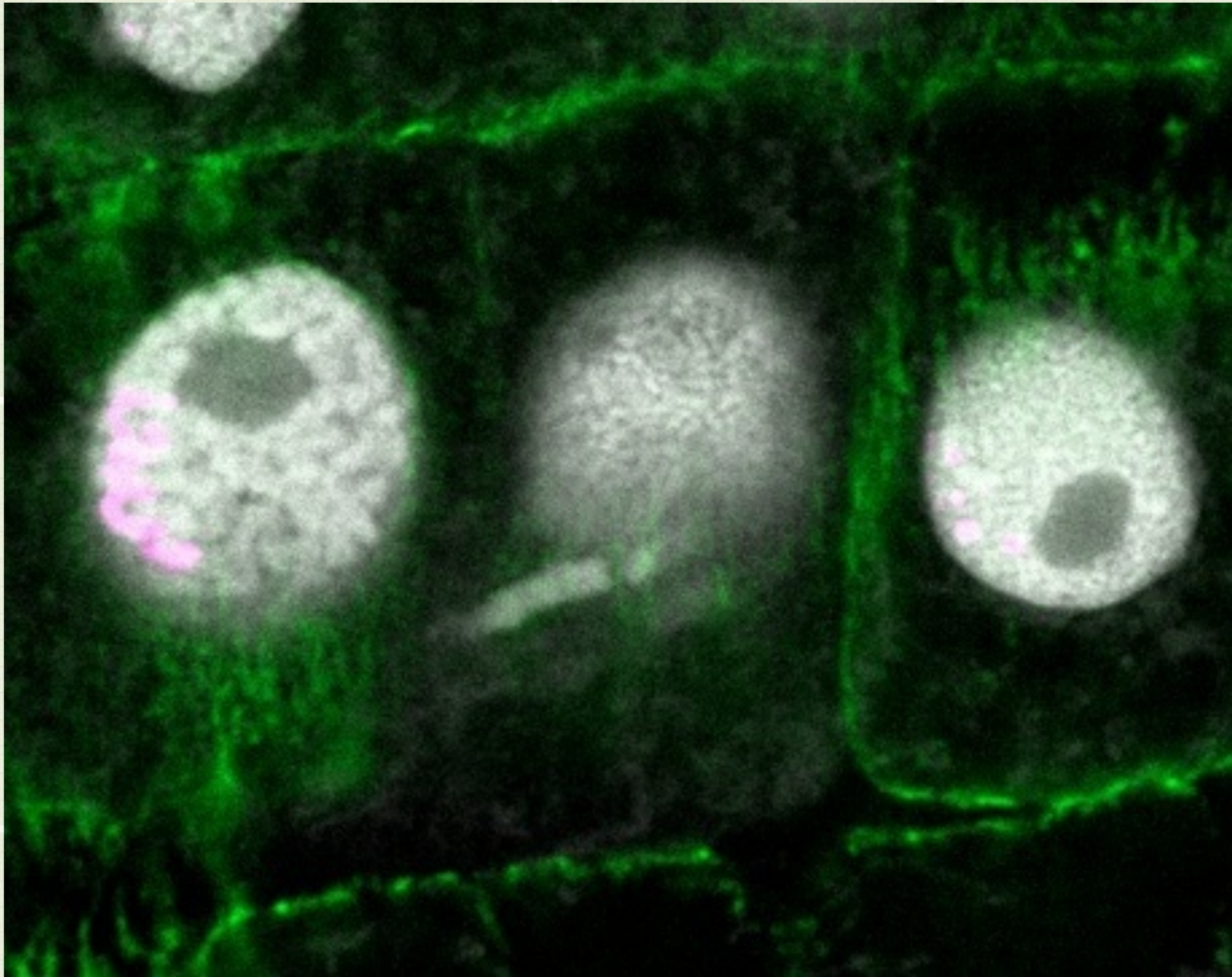


紡錘糸によって形成される
鳥かご状の構造

紡錘糸が付着する
染色体上の領域

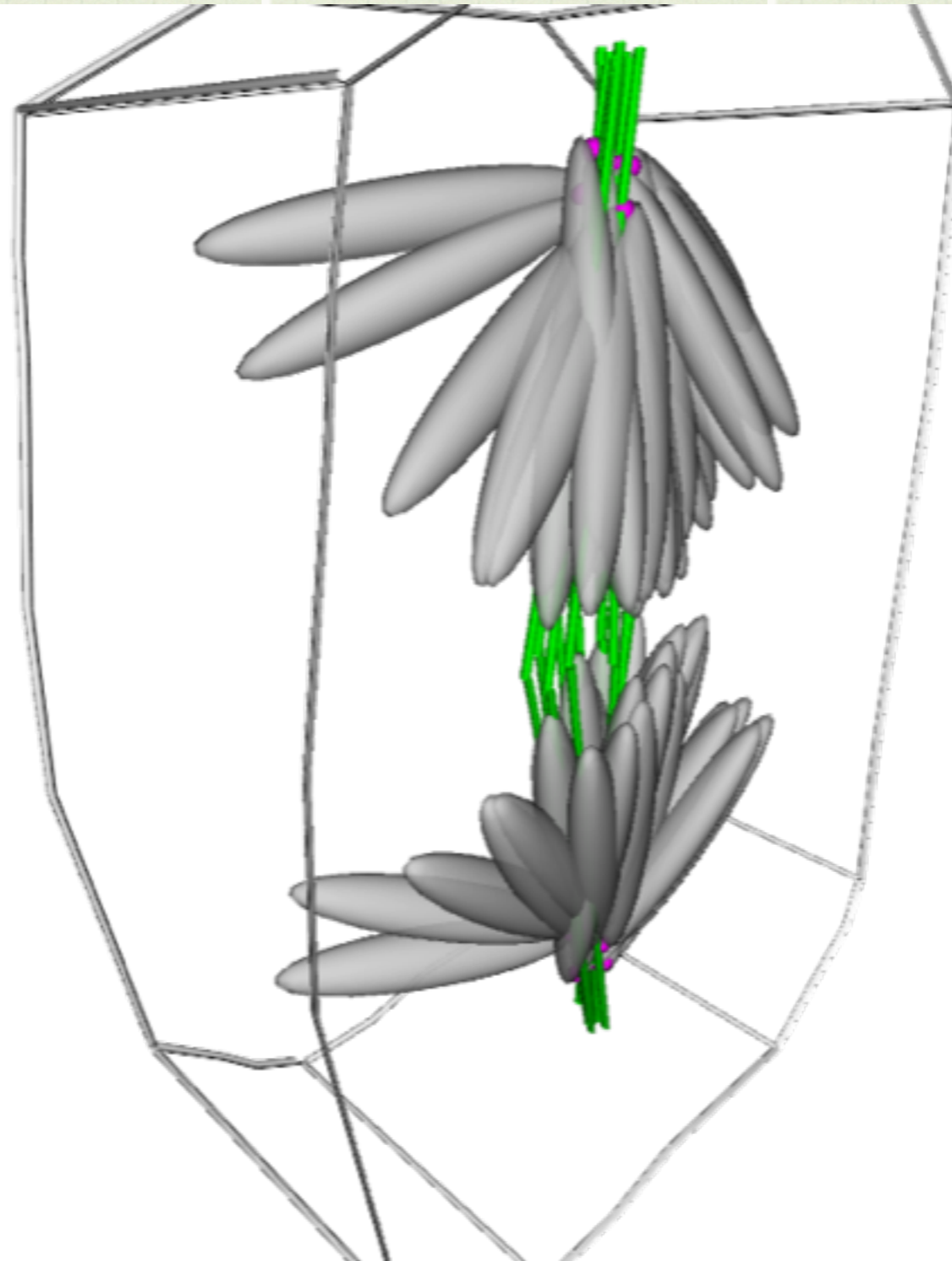


インタラクティブ 1.10 後期植物細胞の構造 (復習: 名称をあててみよう!)



連続写真 1.10 タマネギ後期細胞を含むスライス写真

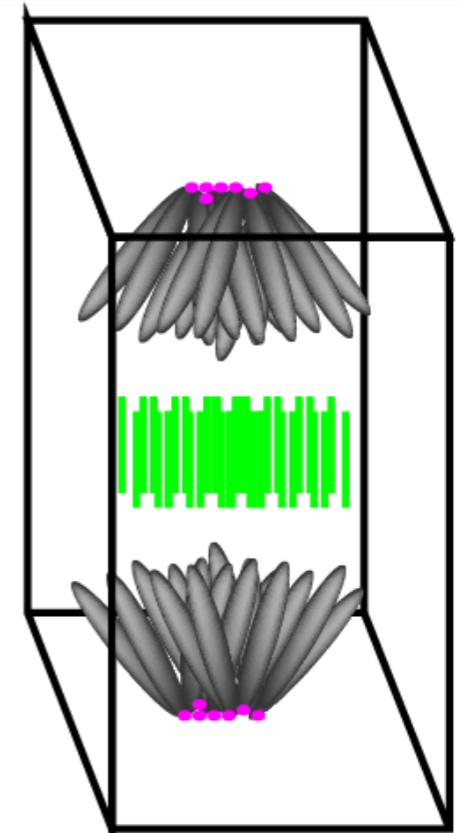
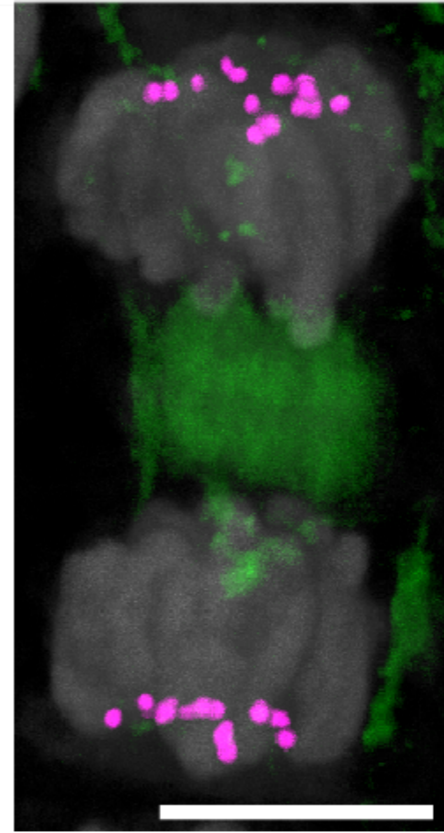
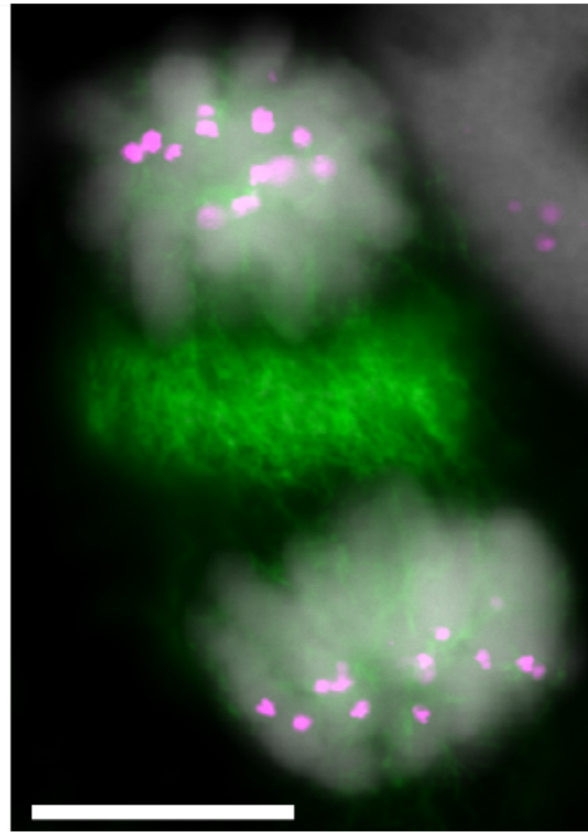
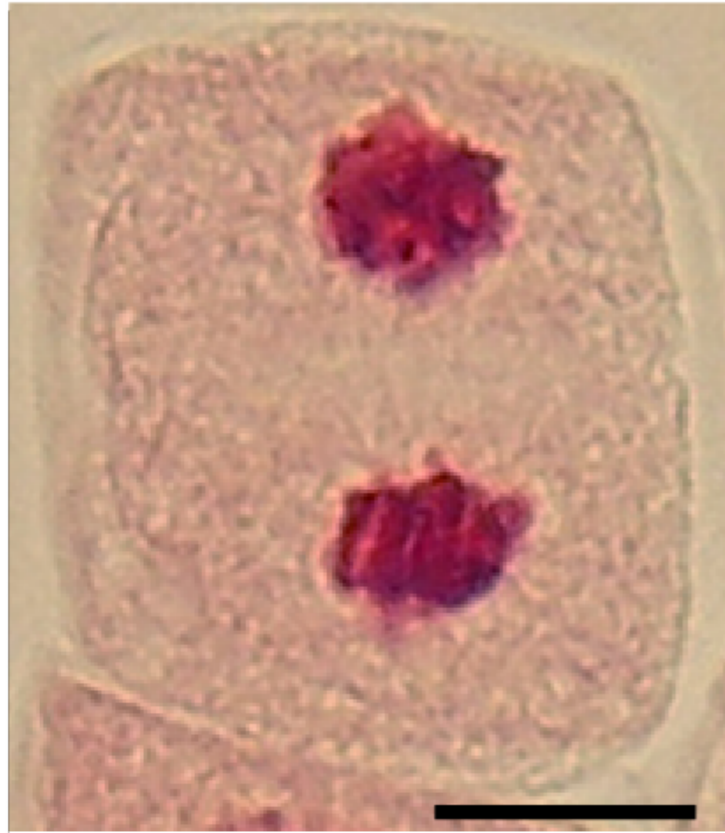
マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)



インタラクティブ 1.11 後期細胞の「グリグリできる3Dモデル」

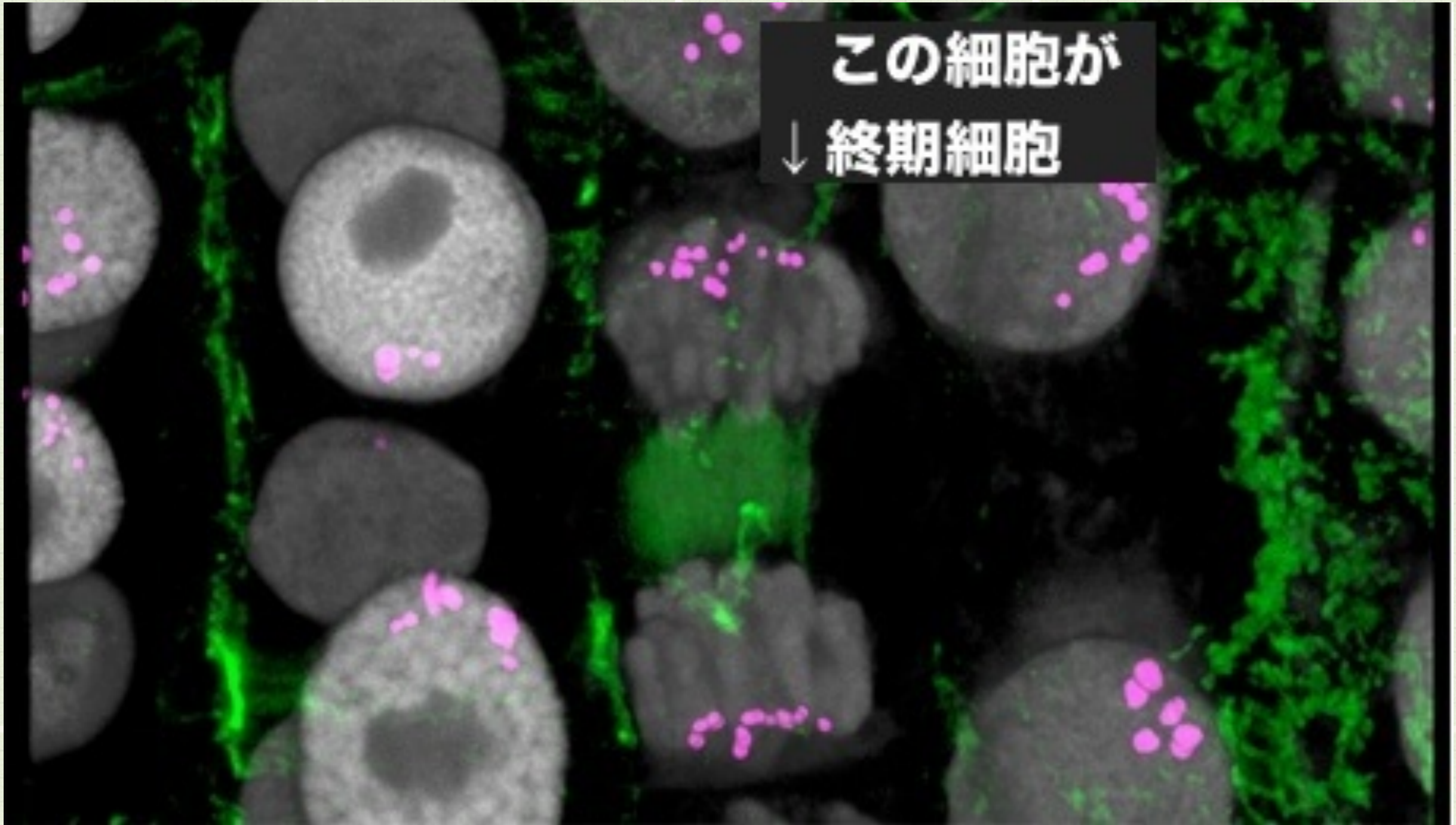
動原体 (マゼンダ)、チューブリン (緑)

植物の細胞分裂～終期～



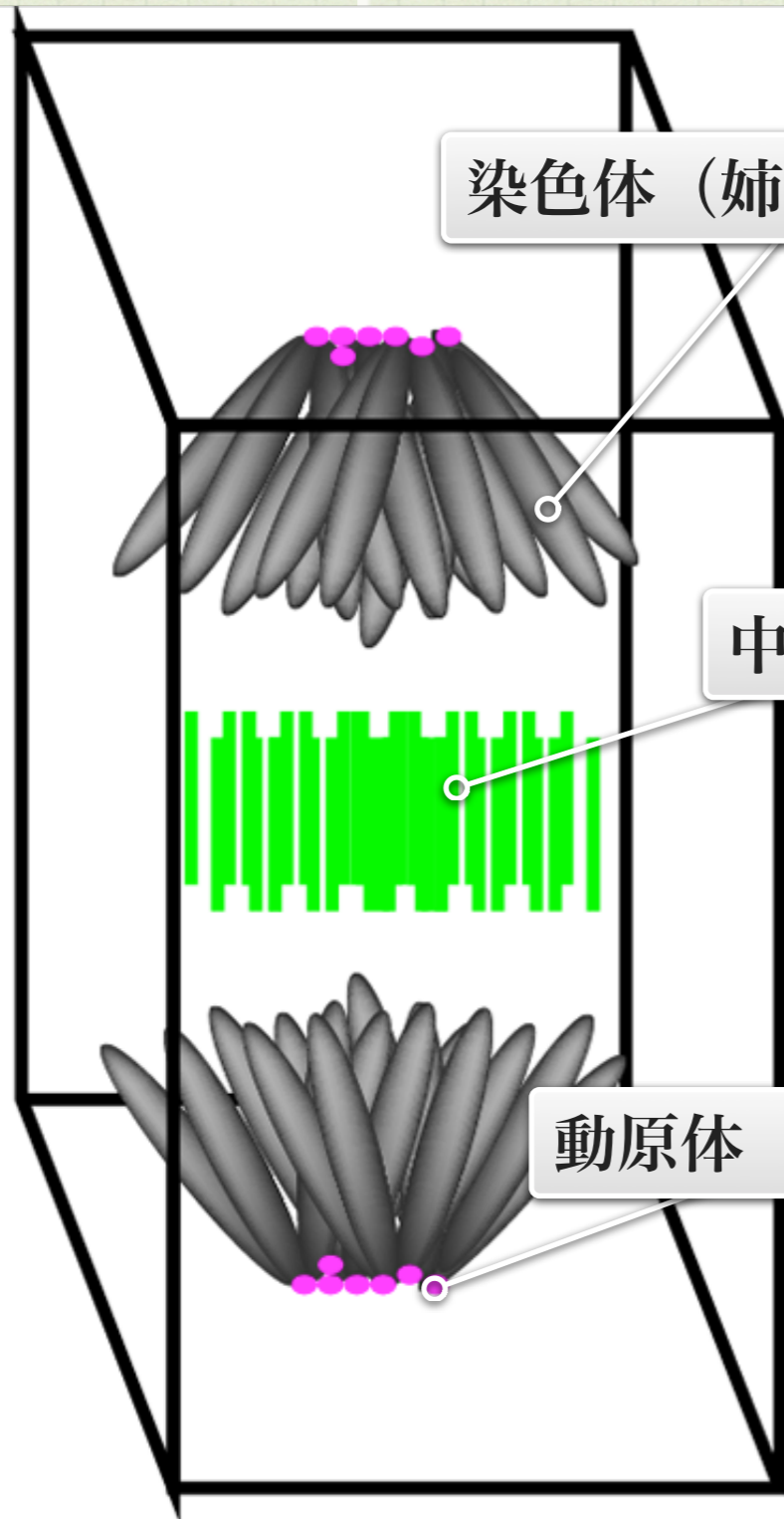
「終期」では、後期で両極に分かれた姉妹染色分体の凝縮が解け始め、段々と染色体の形が不明確になってくる。微小管もほとんど見えなくなり、チューブリンのシグナルは「赤道面だった場所」に「中央体」として見られ始める（免疫染色および組織免疫染色）。

次のページの連続写真は、終期細胞を含む3D回転写真。



連続写真 1.11 タマネギ終期細胞を含む3D回転写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)



染色体（姉妹染色分体）

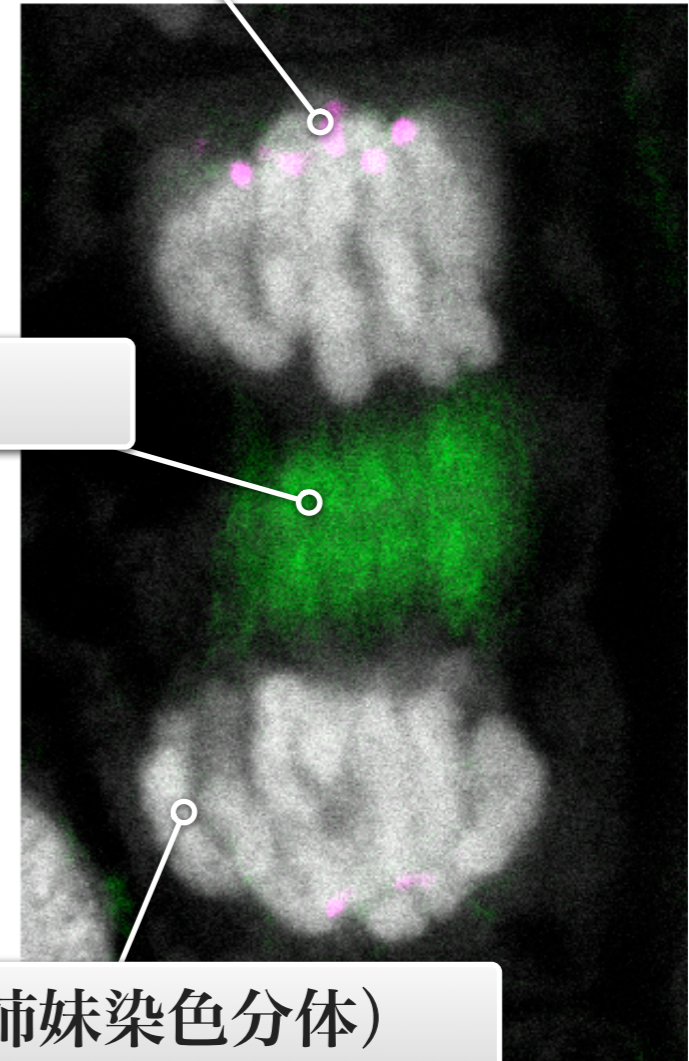
中央体

動原体

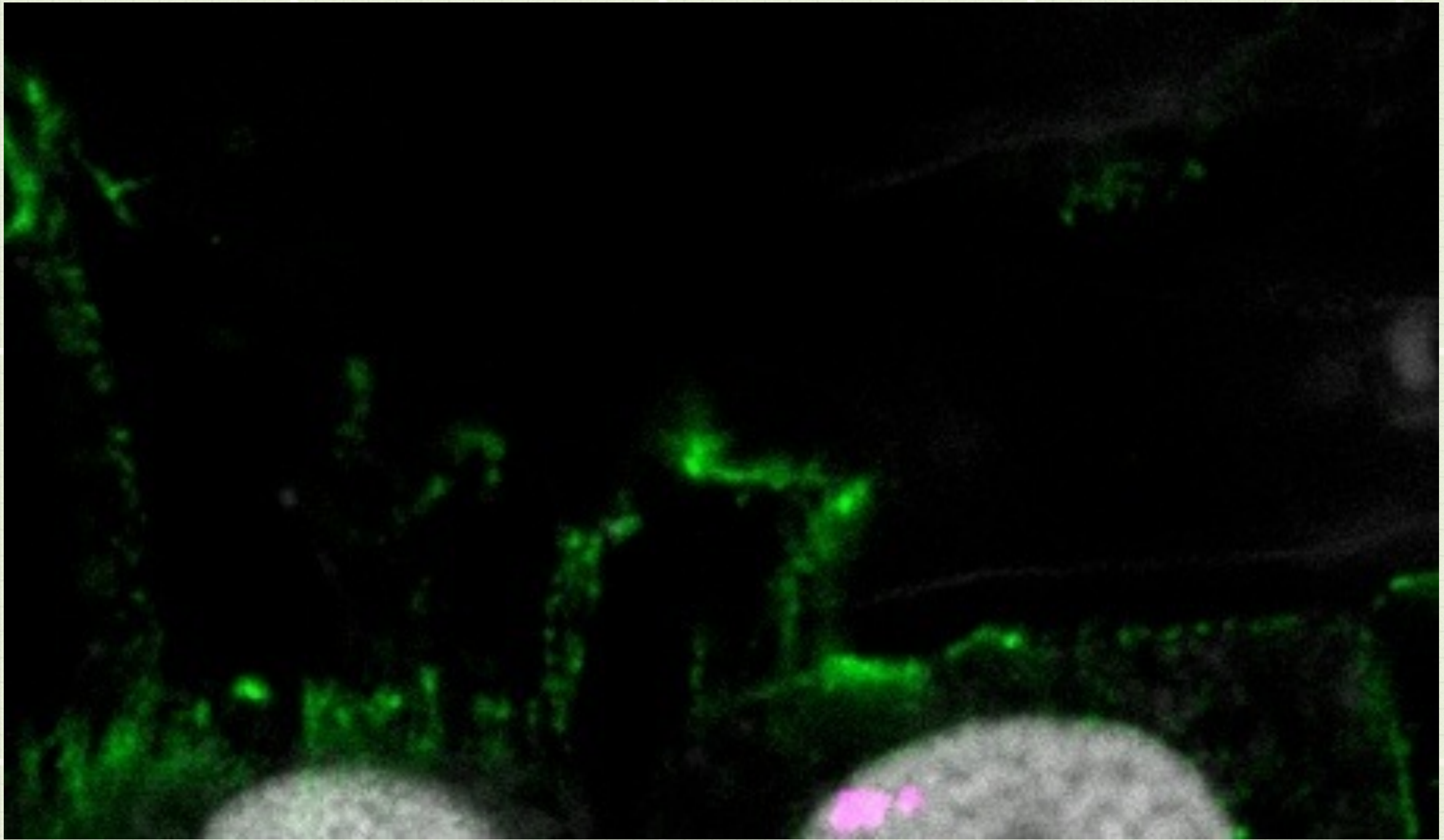
動原体

中央体

染色体（姉妹染色分体）

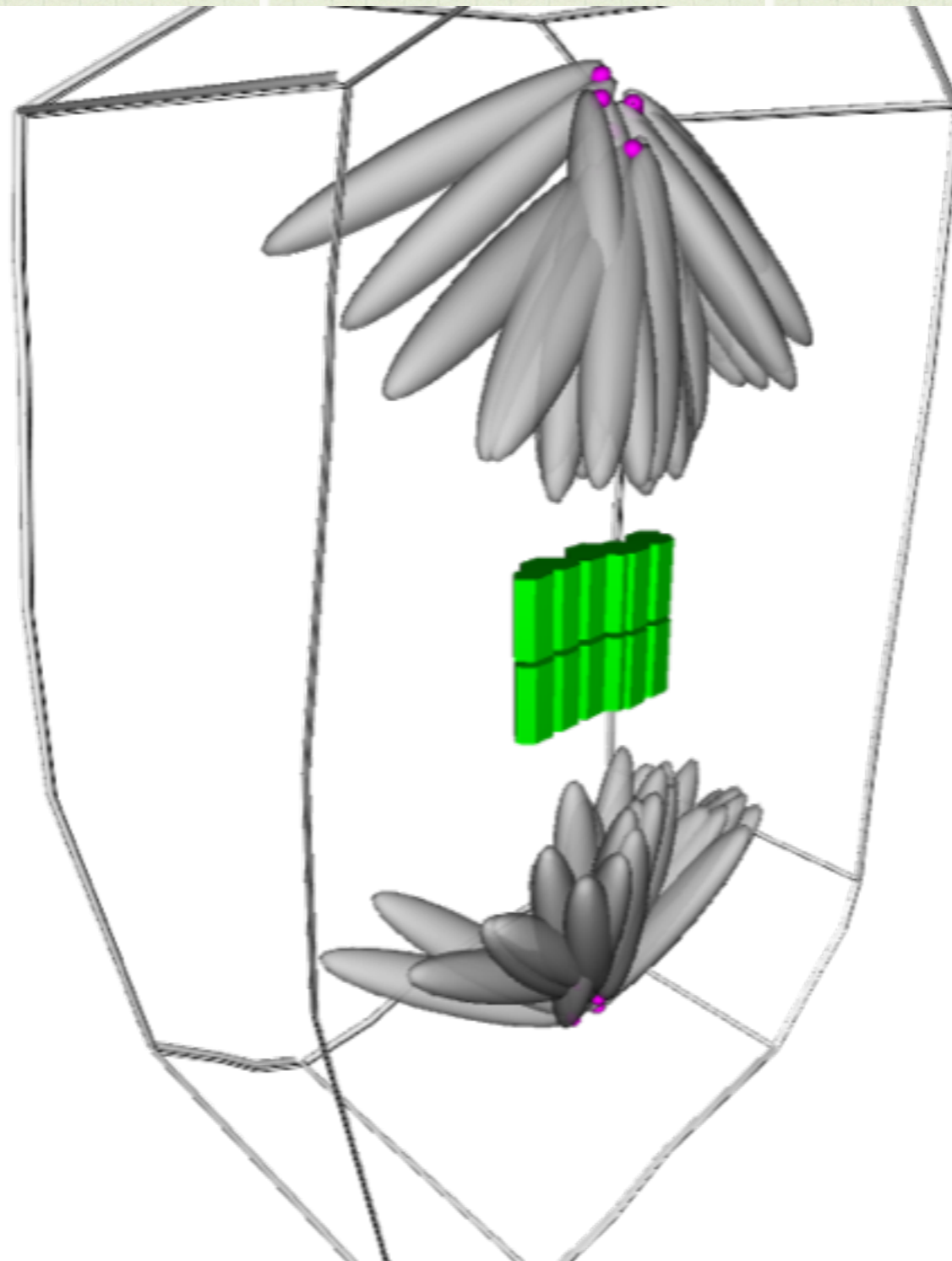


インタラクティブ 1.12 終期植物細胞の構造



連続写真 1.12 タマネギ終期細胞を含むスライス写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)



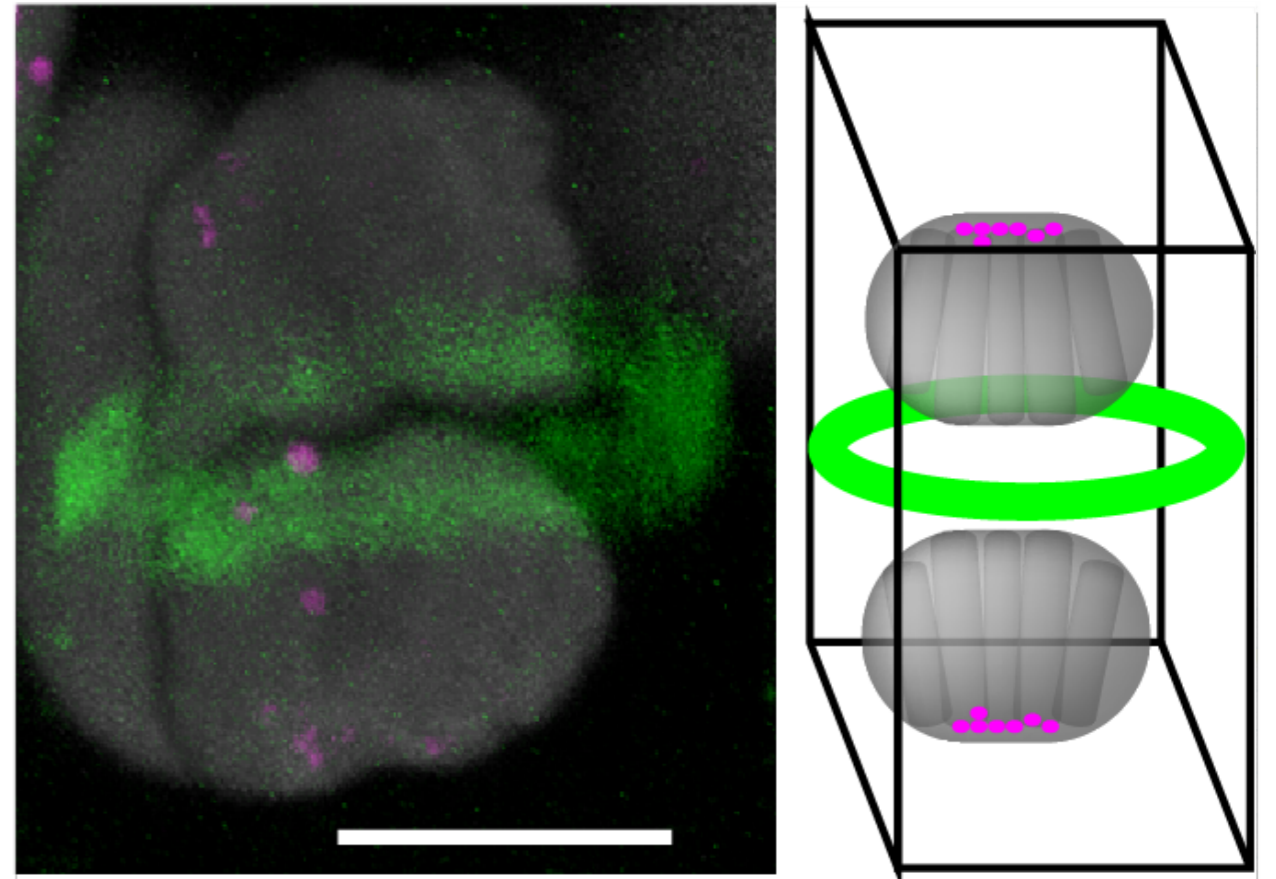
インタラクティブ 1.13 終期細胞の「グリグリできる3Dモデル」

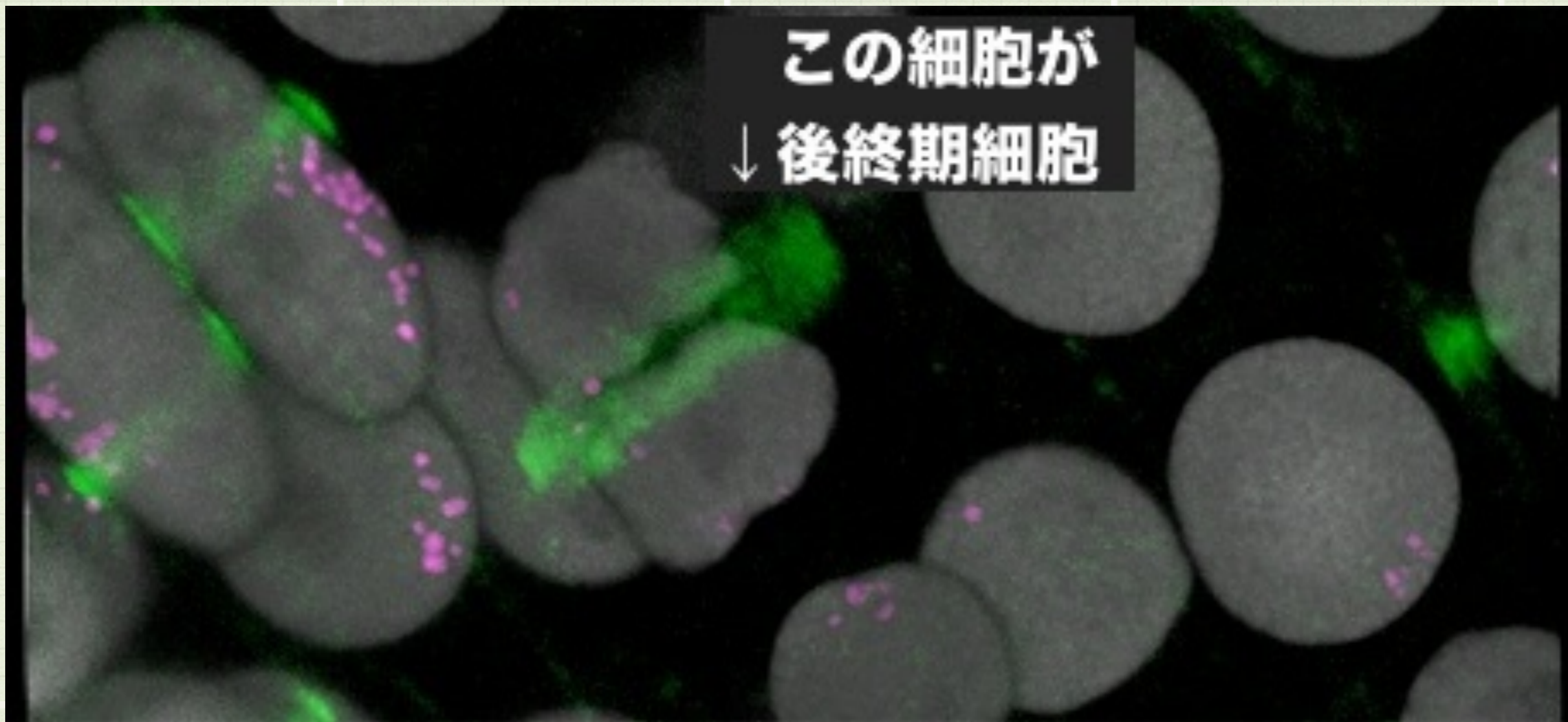
動原体 (マゼンダ)、チューブリン (緑)

植物の細胞分裂～後終期～

「終期の終わり（後終期）」には、チューブリンのシグナルは、「明確な二重環状構造（隔膜形成体微小管）」を示し、やがて消えてゆく。さしずめ、この輪は「細胞分裂の終わりを告げる、儂い打ち上げ花火」の様である。この構造は、細胞を展開する段階で壊れてしまうのか、免疫染色では観察できない、組織免疫染色によってのみ明確に観察できる構造である。前期前微小管束と似たようなリングが3D画像では観察されるが、それが「前期細胞の赤道面にあるのか」または「終期細胞の赤道面だった場所にあるのか」によって、これらは明確に区別できる。

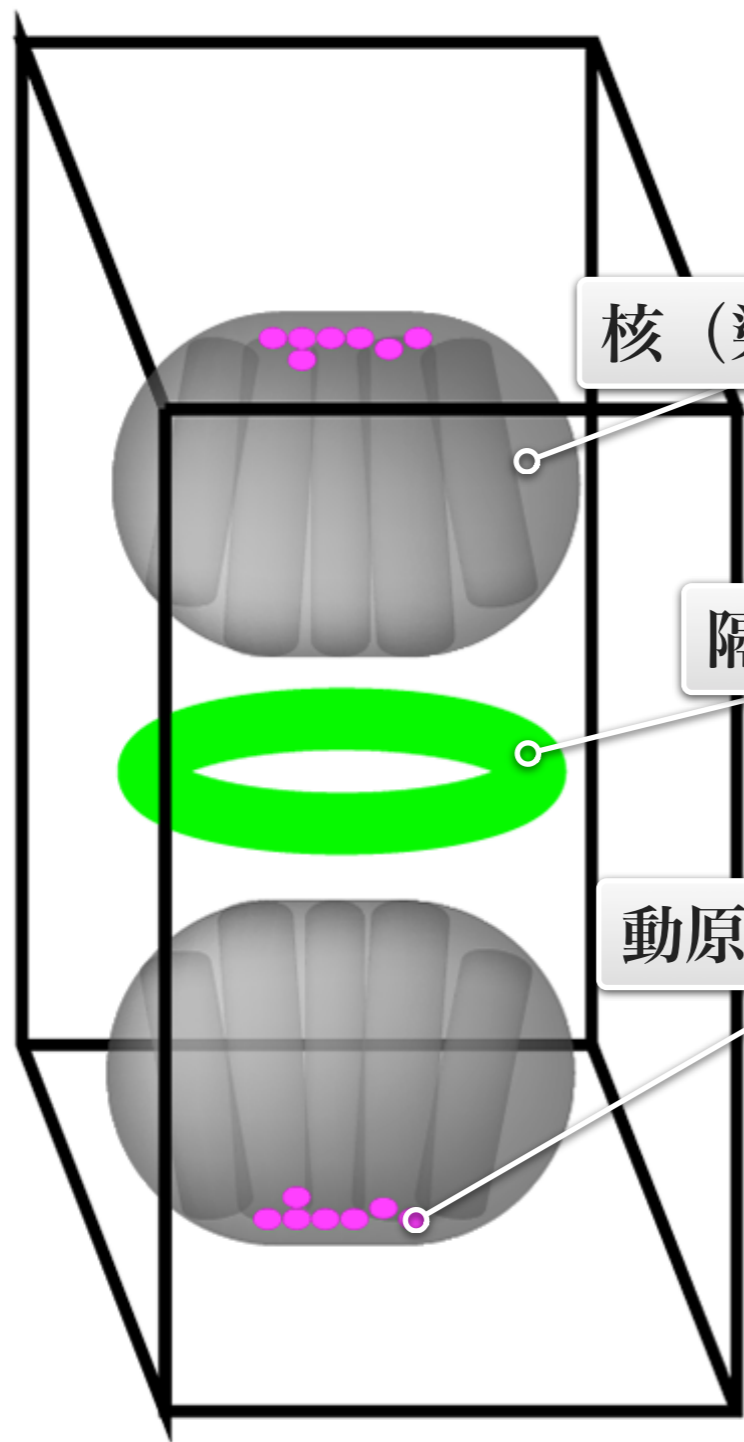
次のページの連続写真は、後終期細胞を含む3D回転写真。





連続写真 1.13 タマネギ後終期細胞を含む3D回転写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)



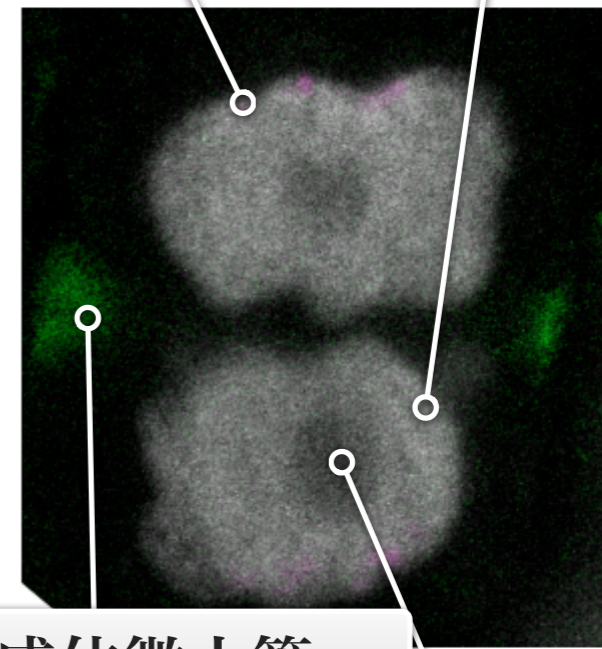
核 (染色体)

隔膜形成体微小管

動原体

動原体

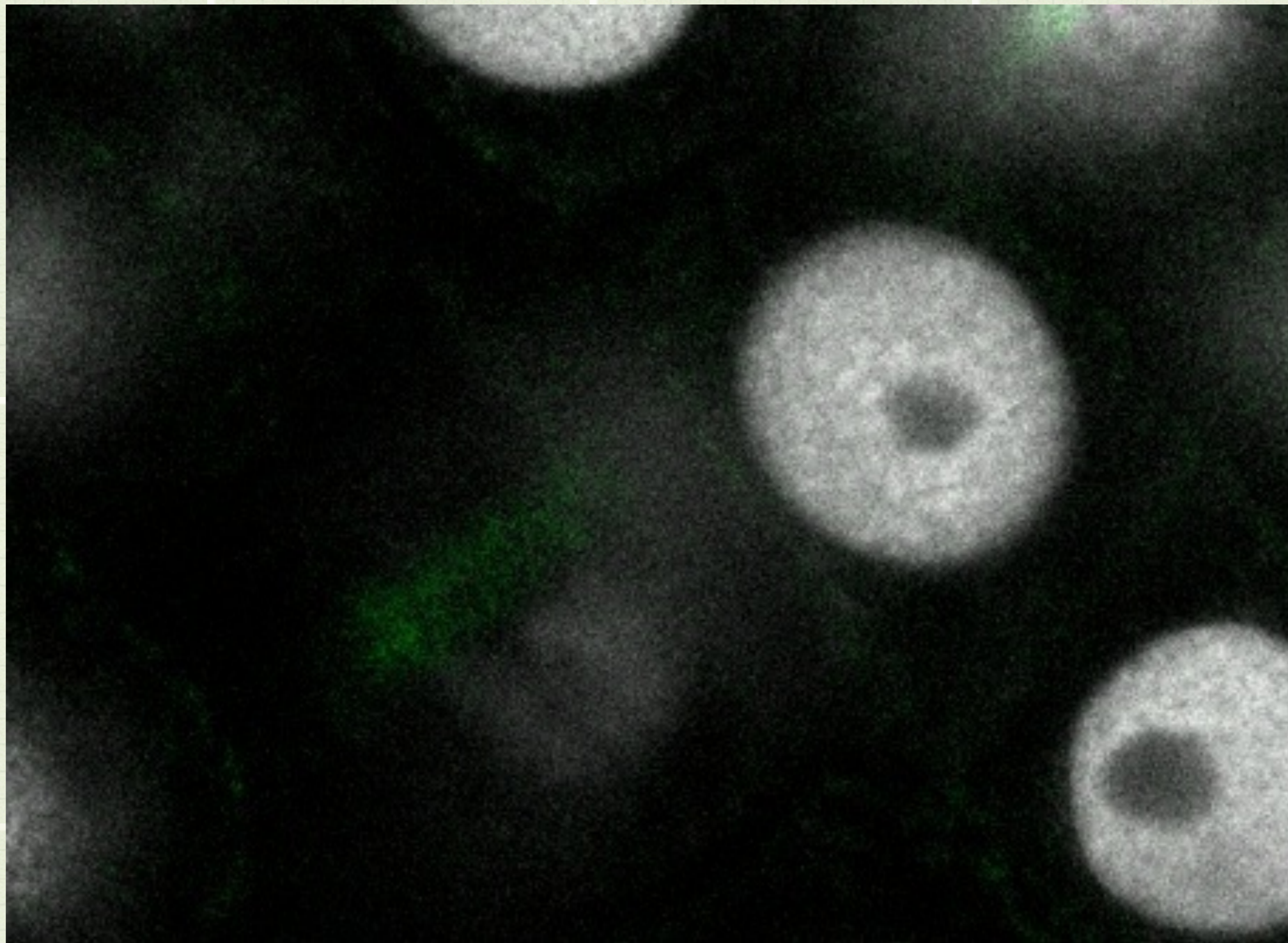
核 (染色体)



隔膜形成体微小管

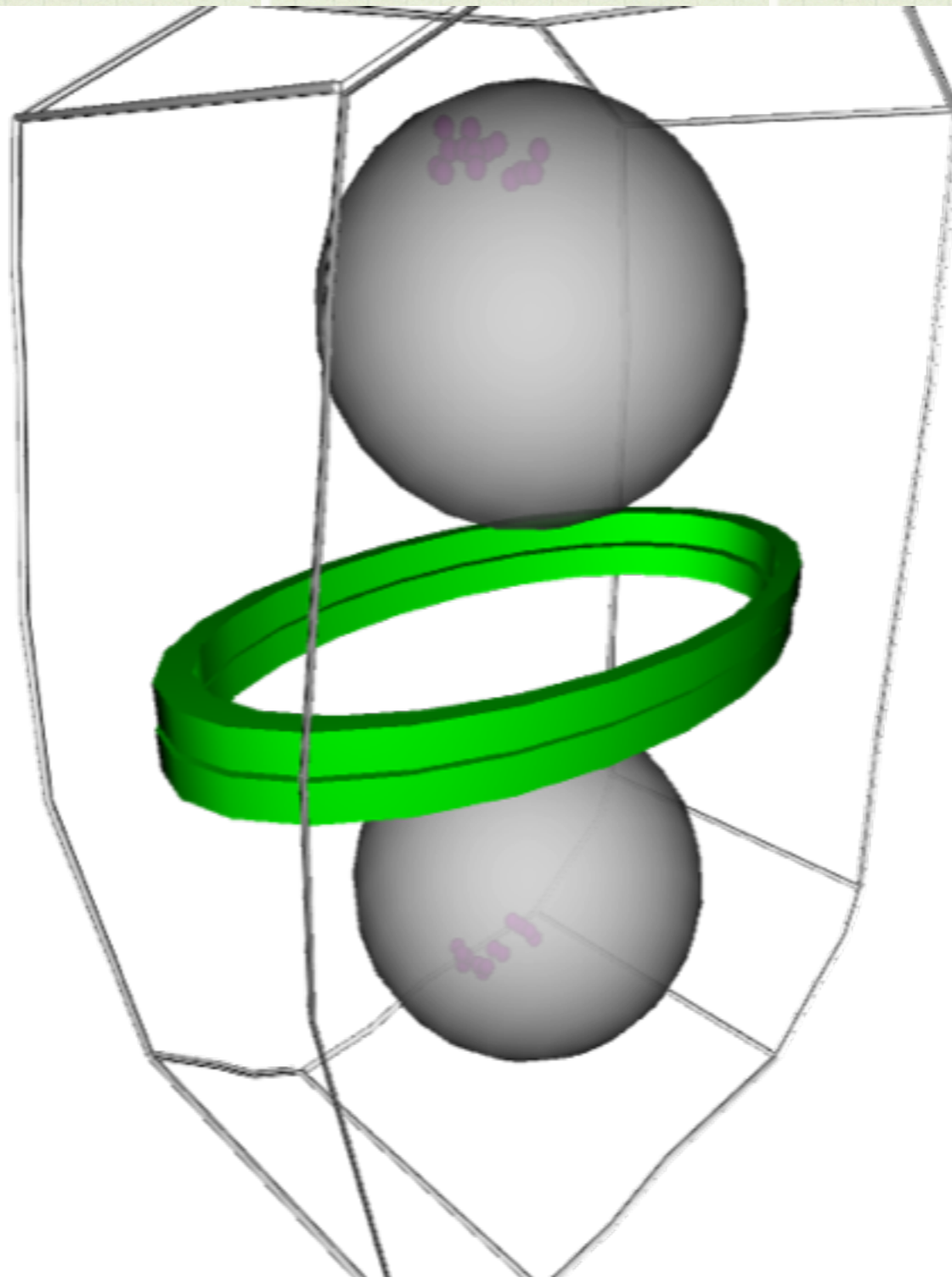
核小体 (仁)

インタラクティブ 1.14 後終期植物細胞の構造



連続写真 1.14 タマネギ後終期細胞を含むスライス写真

マゼンダは動原体、緑はチューブリンを示す。(タップ:すすむ、右へフリック:もどる)

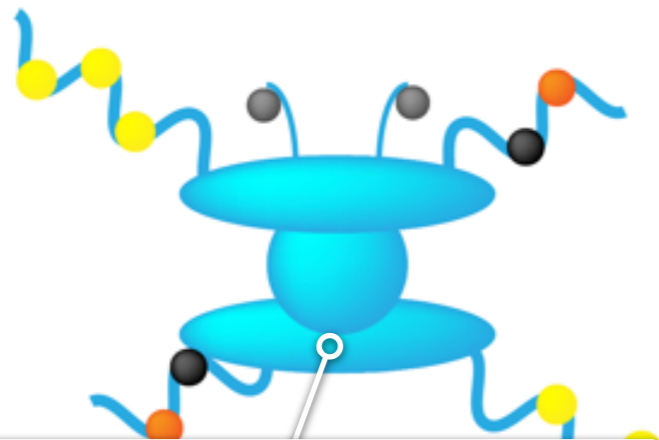


インタラクティブ 1.15 後終期細胞の「グリグリできる3Dモデル」

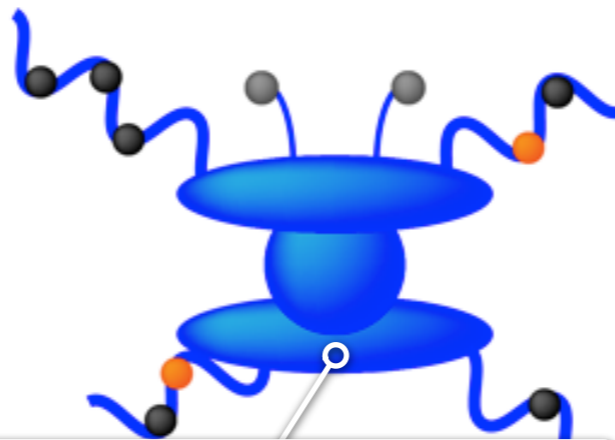
動原体 (マゼンダ)、チューブリン (緑)

ぬっく 3 兄妹と学ぶ「細胞のスゴ技」

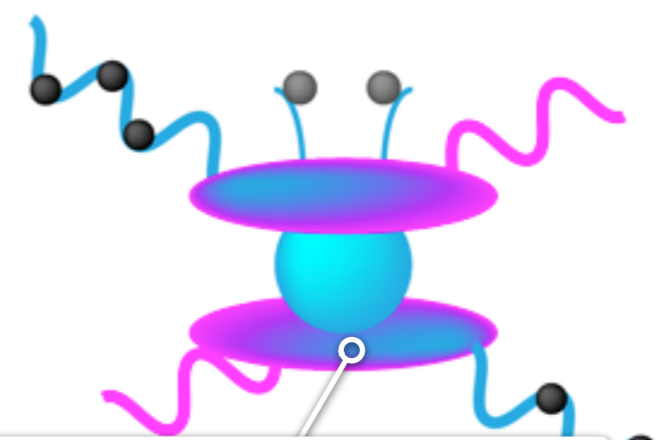
「植物の細胞分裂」で使われている「細胞のスゴ技」と「スゴ技に関わるタンパク質」について、謎のキャラクター「ぬっく 3 兄妹」とともに考えながら学んでみよう！



あっく・ぬっくれおそーむ

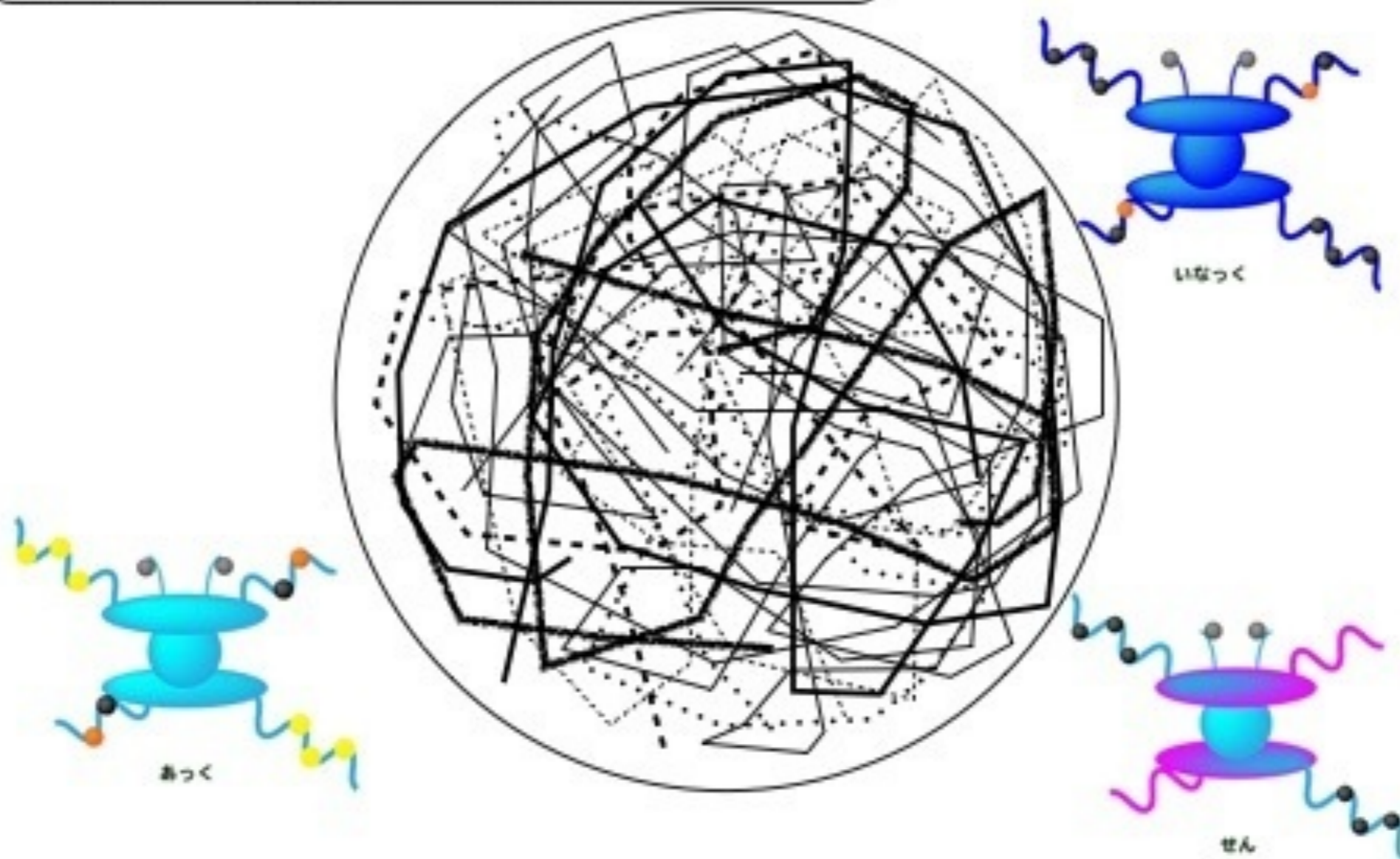


いなっく・ぬっくれおそーむ



せん・ぬっくれおそーむ

この丸の中には、何種類の線が、
何本ずつ入っているかな？



インタラクティブ 1.17 DNAを染色体へ圧縮！

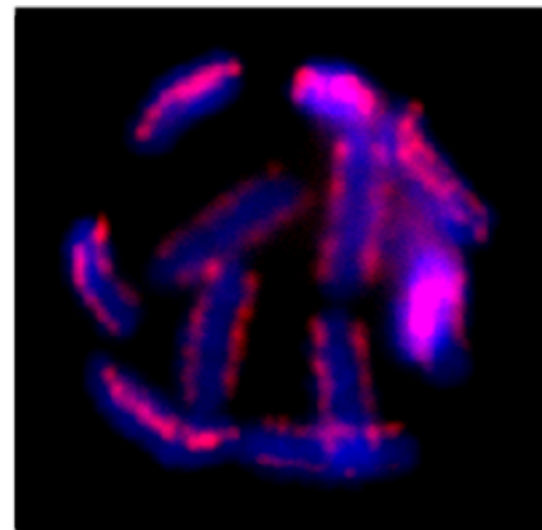
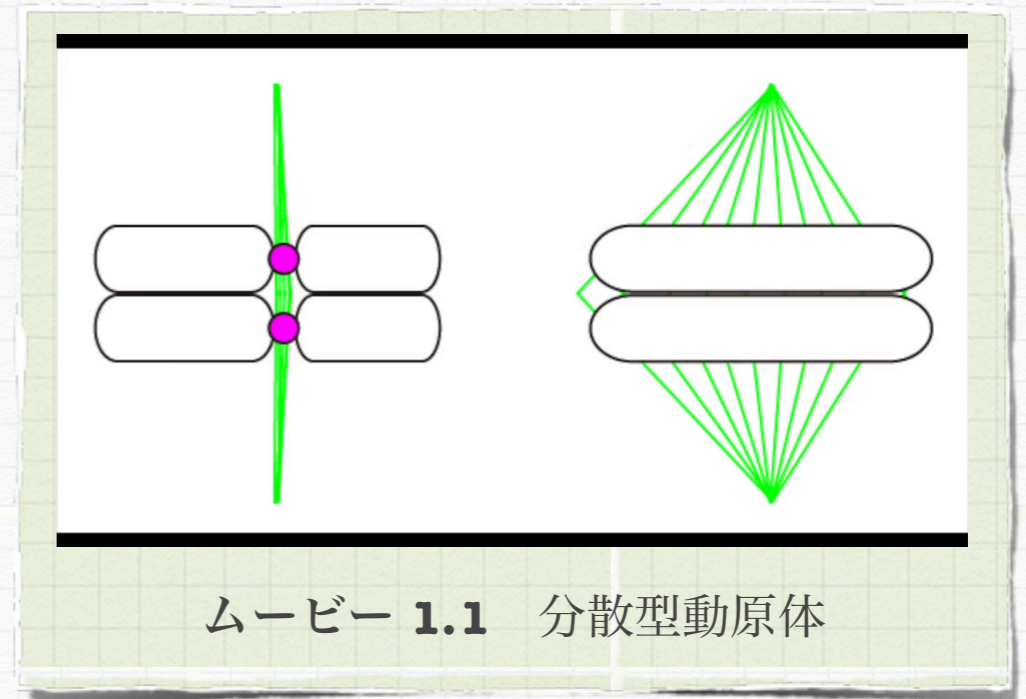
変わり者～分散型動原体～

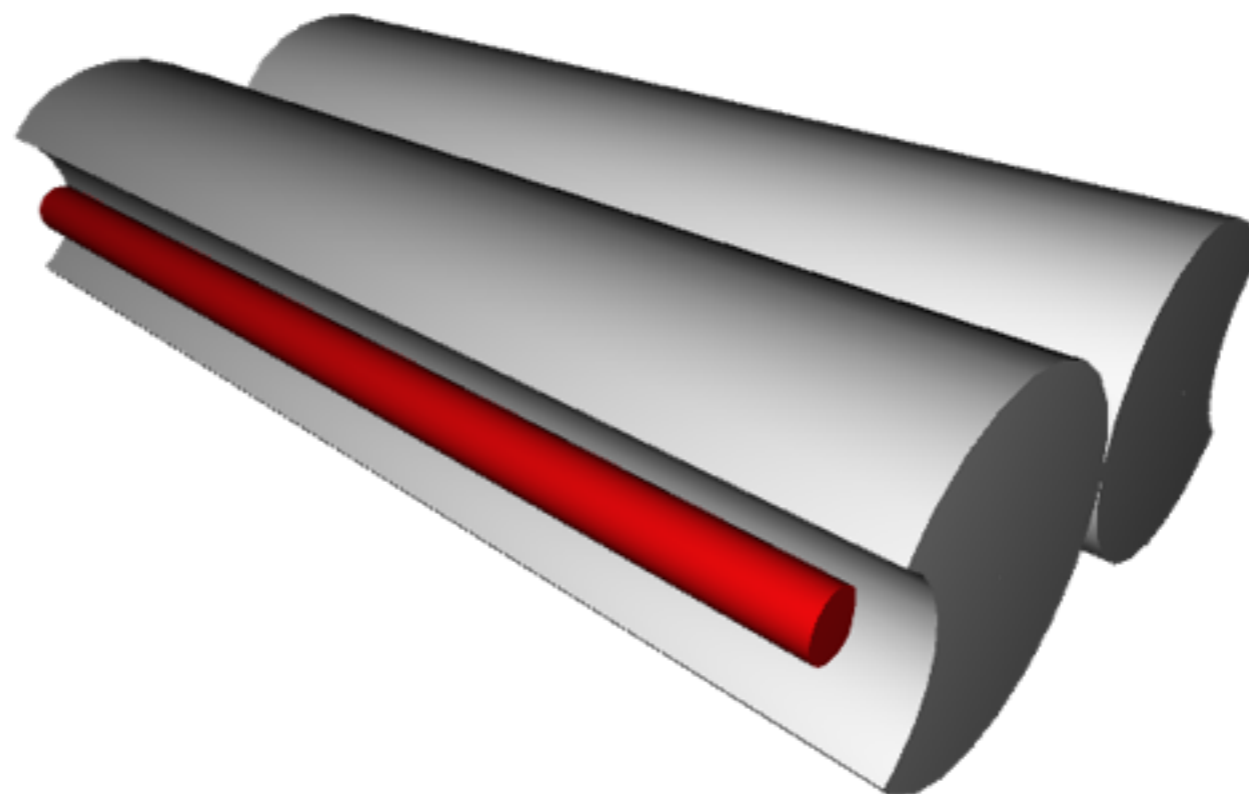
普通の染色体には、1本に1箇所、くびれの位置に動原体がある。ところが、左の図の様な「くびれの無い」、「全体が動原体の様に、平行に引っばられていく染色体」が70年以上も前から見つかった。その構造は分からなかったけれど、この様な動原体は「分散型動原体」と呼ばれてきた。

とっても不思議なことだが、こんな変な動原体をもつ染色体は、一部の植物だけでなく線虫、カイコなど異なる生物界に「ぽつり、ぽつり」と見つかった。つまりは、進化の過程で「独立に」、「何度も」こんな変なものが現れているらしい。

この染色体の分子的解析は、モデル生物である線虫で、初めに行われた。この解析で、「染色体の端から端まで、線状の動原体があること」が分かった。後に、植物では私たちのグループが「ルズラ」という種（スズメノヤ

リの近縁種）を用いて、その構造を明らかにした。ルズラの分散型動原体の構造は、線虫のそれとよく似ていたが、ルズラの方が染色体が大きいことから、その染色体構造を明確に見て取ることができた。その動原体は、「くびれの代わりに染色体の横に出来た溝」に沿って形成されていた（次のページの3Dモデルを参照）。



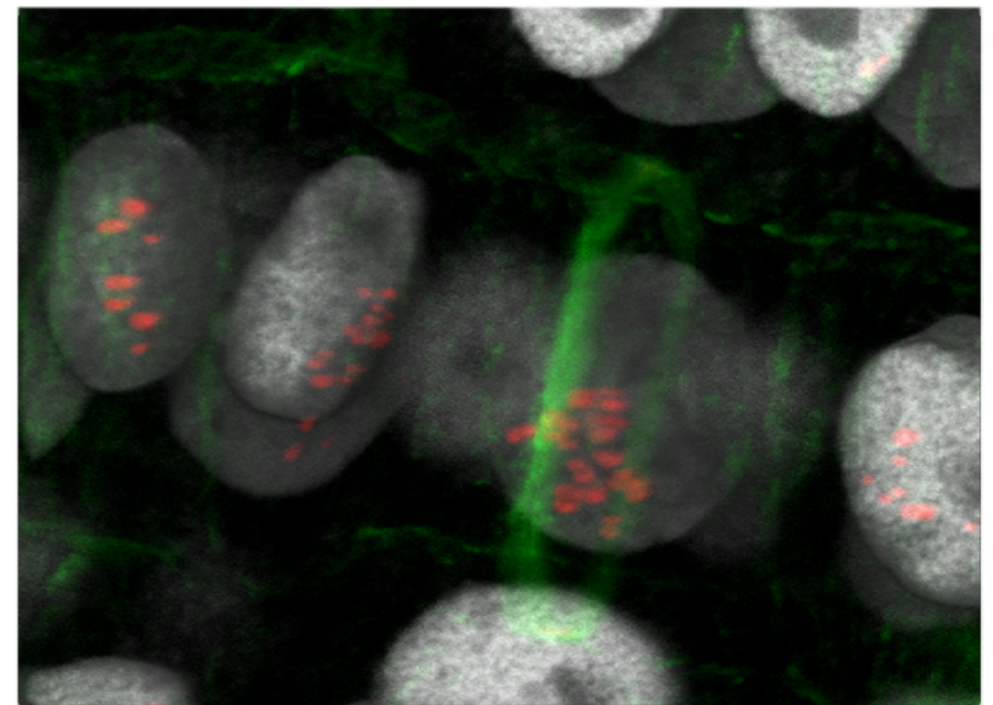
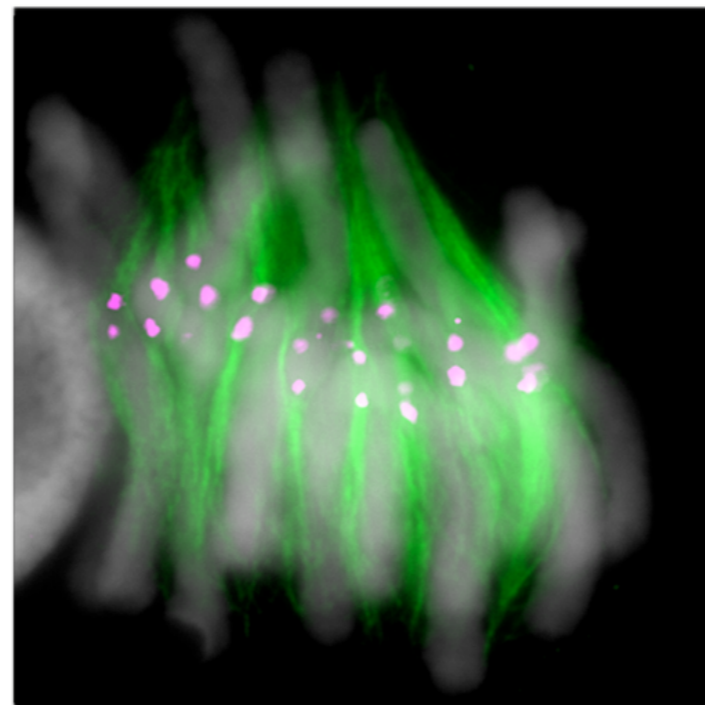
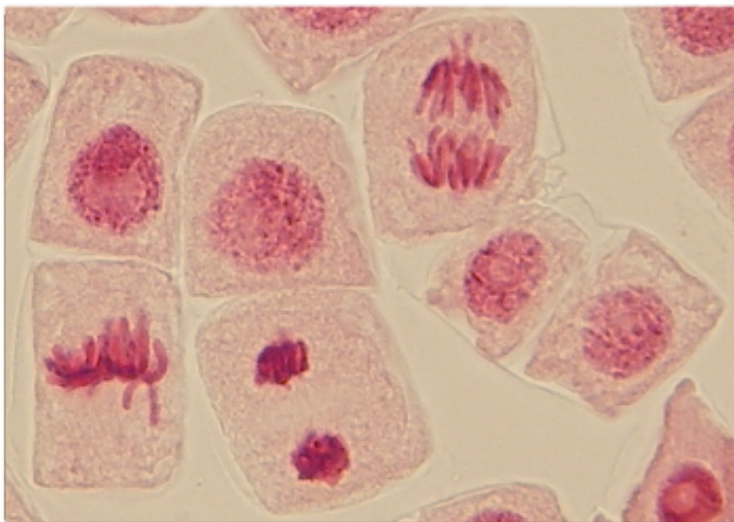
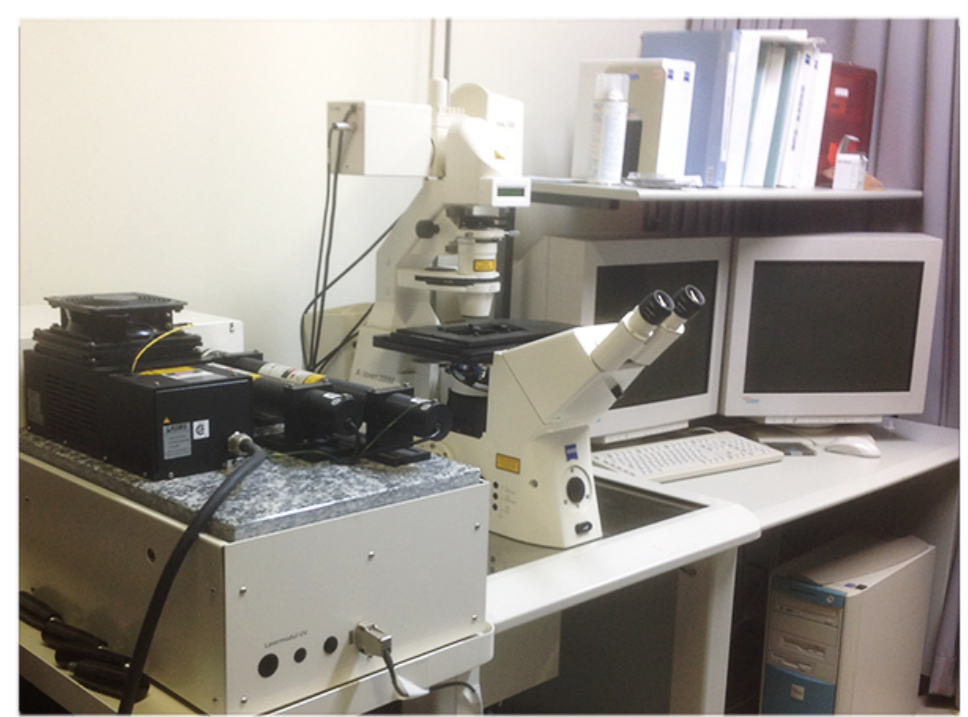
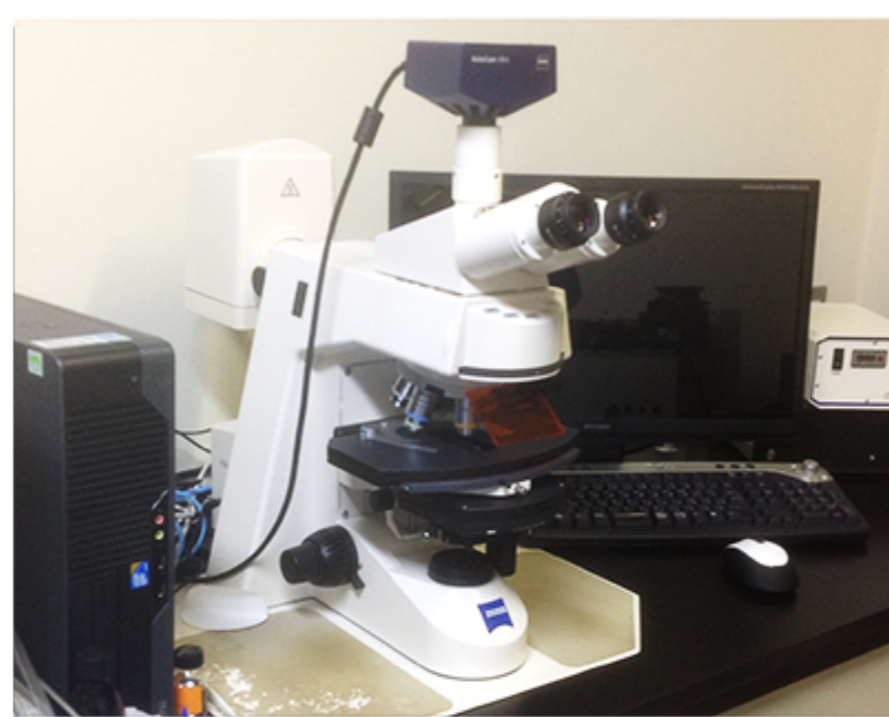
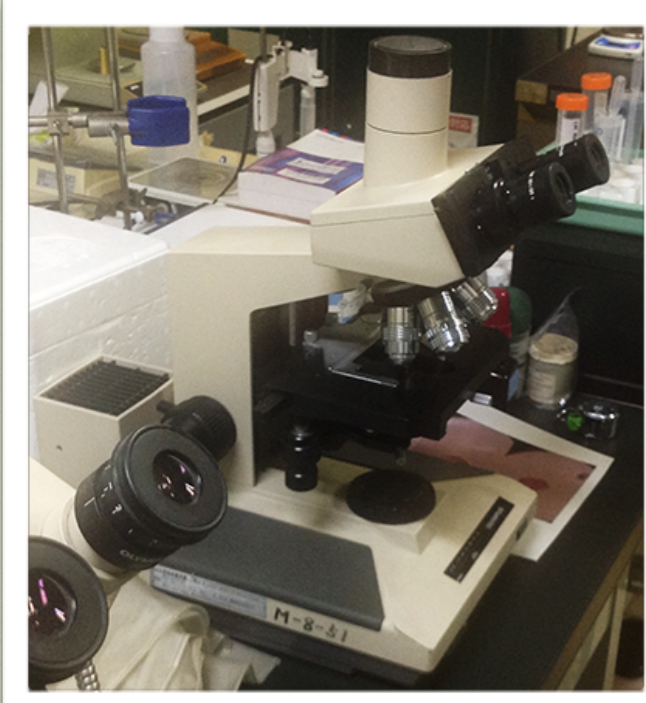


インタラクティブ 1.18 ルズラ染色体の「グリグリできる3Dモデル」

動原体 (赤)

・チャプタ 2・

植物染色体の観察



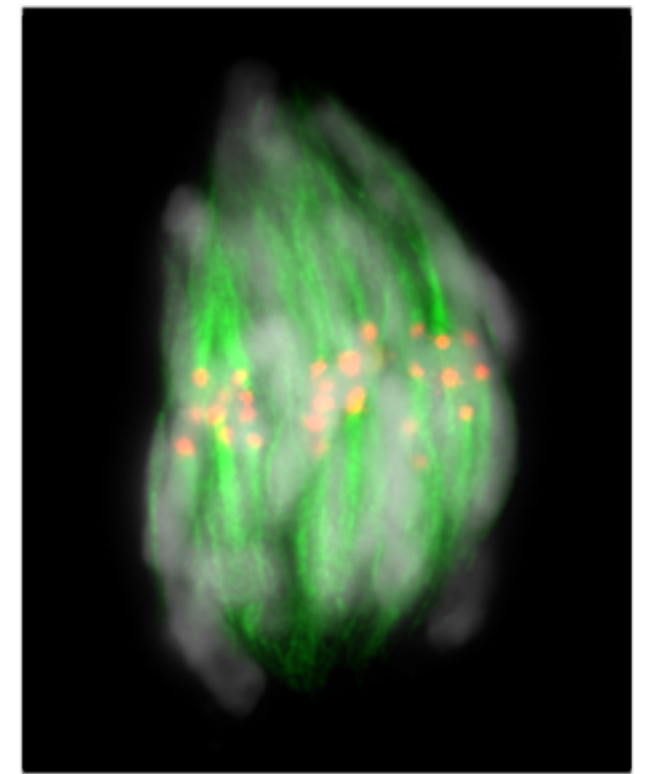
材料

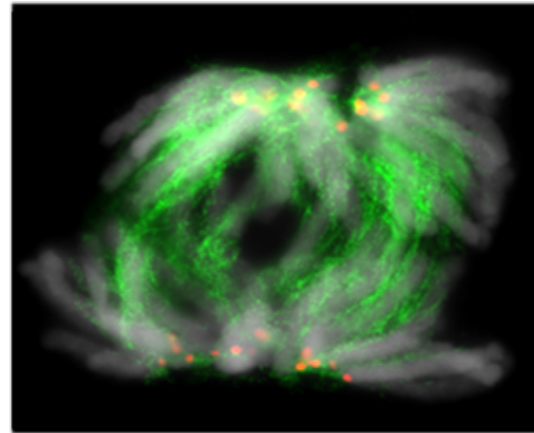
生物学のすべての実験に言える事かもしれないが、「染色体の観察」においても「材料選び」は重要なポイントである。染色体を観察するためには、分裂細胞を多く含む「元気に成長している組織」を得る事が重要である。これさえできれば、「実験の成功」の半分は約束された様なものである。



では、実際にどのような材料を用いればいいのか？もちろん、自分の研究目的から研究対象が限定されてしまう場合は、その材料を使わなければ仕方がないが、高校の授業の様に「ある程度自由が利く場合」には、月並みだがネギ属植物を材料としてお勧めする。その理由は、「安い」、「入手が容易」、「染色体が大きい」、「分裂細胞を多く含む組織が簡単に用意できる」などである。そうすると、教科書に載っている事からタマネギとなりがちだが、これが少々「くせもの」なのである。なぜかというところ、

「最近のタマネギは、根が出にくい」のである。私たちが、タマネギを材料にする場合は、複数の店舗から購入する様にしている。もちろん、「種タマネギ」が入手できれば確実なのだが、時期が限られる。新タマネギは、「休眠」といって根が出にくい状態にあるので、染色体観察のためには決して買ってはならない。





そこで「オススメ！」なのが、ニンニクである。それも、「田子のニンニク」の様な高級品ではなく、「中国産の安物」が良い。これまで、中国産の安物ニンニクで根が出なかったケースは、0%である。それも、横から串刺しにして、水に鱗茎の下3分の1を浸けておけば、次の日には根が出ている。もう、実験の日が迫っているのに根のでないタマネギにヒヤヒヤする必要は無い。ニンニクの根は、タマネギの根に比べると少しだけ細いが、分裂細胞が十分含まれるので問題ない。しかも、タマネギの動原体の検出に使っている抗体は、そのままニンニクに利用可能である。

上では「水に鱗茎の下3分の1を浸けて」と書いたが、この方法だと根が窒息気味で多少分裂細胞の割合が低くなる。「酸素供給」と「その後のゴミ残留の少なさ」を考慮するとバーミキュライトに植えるのが、ベターな方法と言える。ただし、組織免疫染色に使うときだけは、「ゴミの残留がまったくない」水耕栽培の方が良い。その辺を考えると、「エアレーションをしながらの水耕栽培」が、ベストの方法かも知れない。



オルセイン染色～高校授業級～

試薬

- ・酢酸オルセイン液（または酢酸カーミン液）
- ・45%酢酸

器具

- ・管瓶（直径 2 cm、高さ 5 cm程度ガラスビン）
- ・ピンセット
- ・濾紙
- ・60°Cのお湯
- ・スライドガラス
- ・安全カミソリ
- ・柄付き針
- ・18 x 18 mmカバーガラス
- ・つつき棒（割り箸等を鉛筆削りで削って作製する。または、消しゴム付き鉛筆の消しゴム部分を使う）

染色体標本の作製

染色体標本の作製法は植物種によって適した前処理法、固定法、標本の作製法がある。今回は、「ネギ類を材料に用いた押しつぶし法」の例を述べつつ、他の例については、その度に説明を加える。まずは、「実験操作の概要」を先に説明し、その後「詳細な実験ステップ」について説明する。

実験操作の概要

前処理（細胞周期の全ての時期を見たいときには不要）

前処理とは標本における中期細胞の割合を増やすために行う操作である。チャプタ1で解説したように、細胞中の染色体DNAは間期核では一部の領域を除いて伸びた状態にある。私たちがイメージする染色体の形をとっているのは中期のみである。そのため、「いわゆる染色体」を観察するためには、この時期の細胞の割合を増やす必要がある。しかし、反対に「細胞周期の各時期を全て見たい場合」には、この処理は不要である。中期細胞を増やすためには、紡錘糸の形成を阻害し細胞を後期へ移行しないようにするのが一般的である。普通、コルヒチンやキノリンなどの薬剤がこのために使われる。低温に強い植物（ネギ類やムギ類など）では、 0°C で紡錘糸の合成が阻害されるので、この現象を利用してムギ類では 0°C 、20時間の前処理を行う。この低温処理法は、暖かい気候で育つ植物（イネやトウモロコシなど）では低温生育傷害が起きてしまうので適用できない。

固定

生物の実験では、「組織や細胞を生物の中にあるのに近い状態で保存する操作」の事を「固定」という。植物の染色体観察の固定には、通常エタノール：酢酸 = 3 : 1の固定液が使われる。ネギ類やムギ類の場合3日から1週間程度の固定が、標本作りに適している。

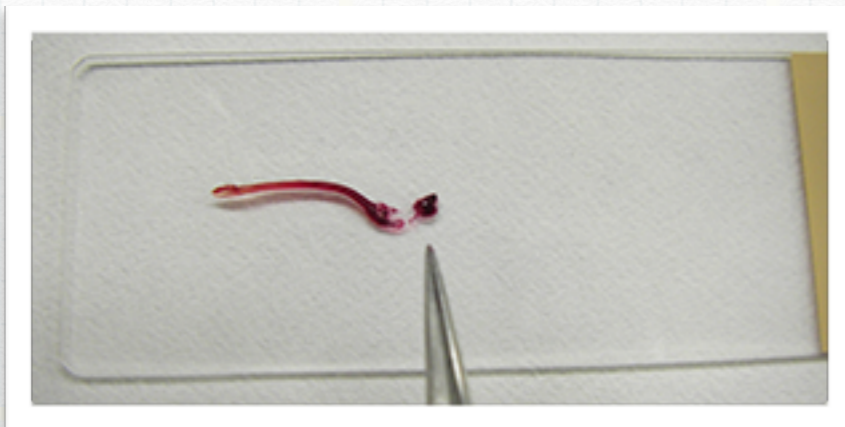
解離および染色体の展開

細胞と細胞の間の接着をはずし、バラバラにすることを「解離」という。また、細胞および細胞内の染色体をスライドガラス上に広げる操作を「展開」という。押しつぶし法では、45%酢酸や薄い塩酸で細胞を解離させた後、サンプルを押しつぶすことにより物理的な力によって細胞壁を破壊し染色体を展開する。酵素解離方では、セルラーゼやペクトリアーゼなどの細胞壁分解酵素によって細胞壁を加水分解して解離させ、解離した細胞を空気乾燥法により展開する。ネギ類およびムギ類では主に押しつぶし法が用いられる。

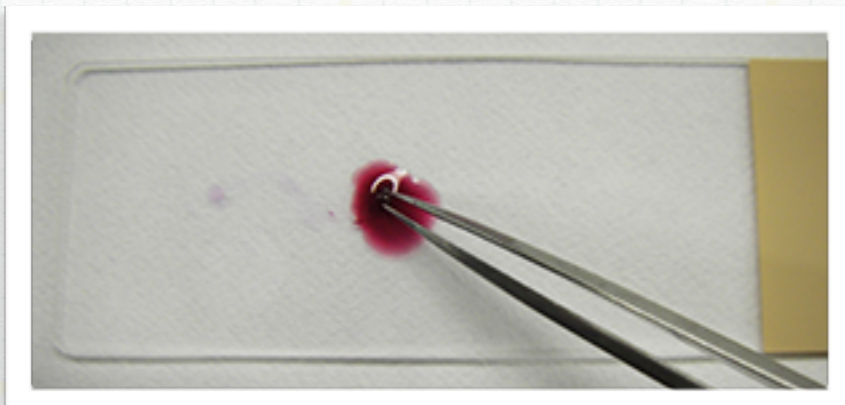
押しつぶし法の詳細

「前処理」（必要な場合）および「固定」は、「概要」で述べた方法により、あらかじめ済ませておく。

1. 管瓶に45%酢酸を入れ、その中に根を浸ける。
2. 管瓶を60°Cのお湯に10分間浸ける。
3. 管瓶に酢酸カーミン液を2-3滴入れ、その中に根を浸け、30分放置する。
4. 根端をスライドガラスの上に載せ安全カミソリ（またはピンセット）で根端を切り取る。

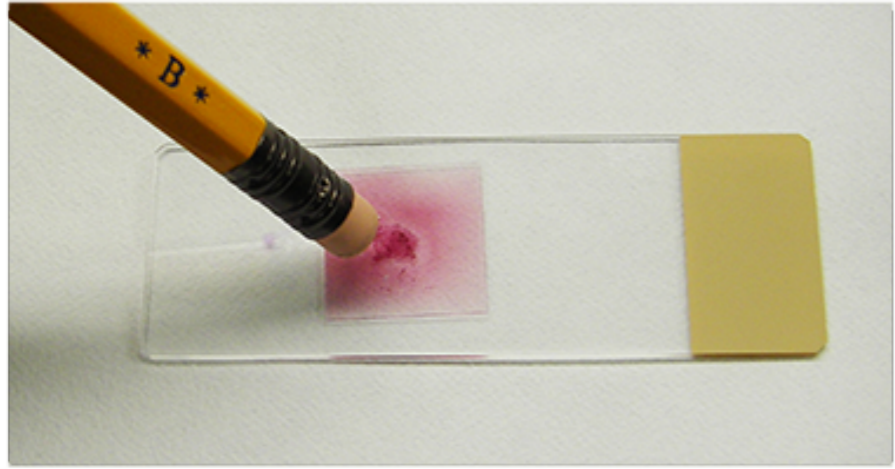


5. 切り取った根端をピンセットで挟みつぶし粉々にする。

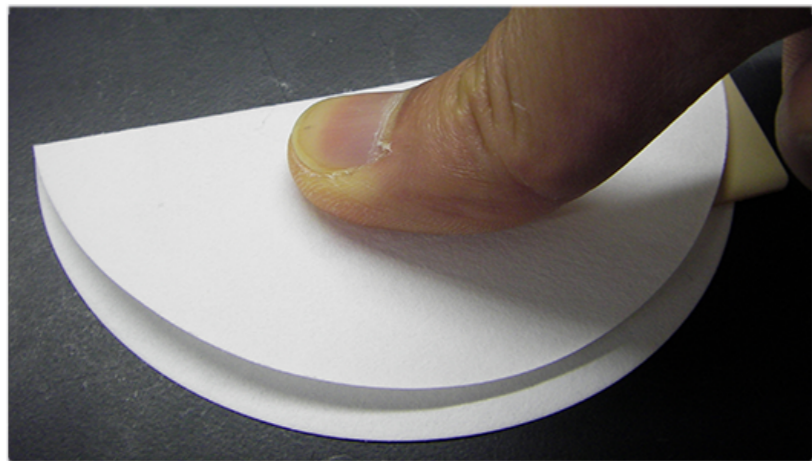


6. 45%酢酸を1滴たらし18 x 18 mmカバーガラスをかぶせる。

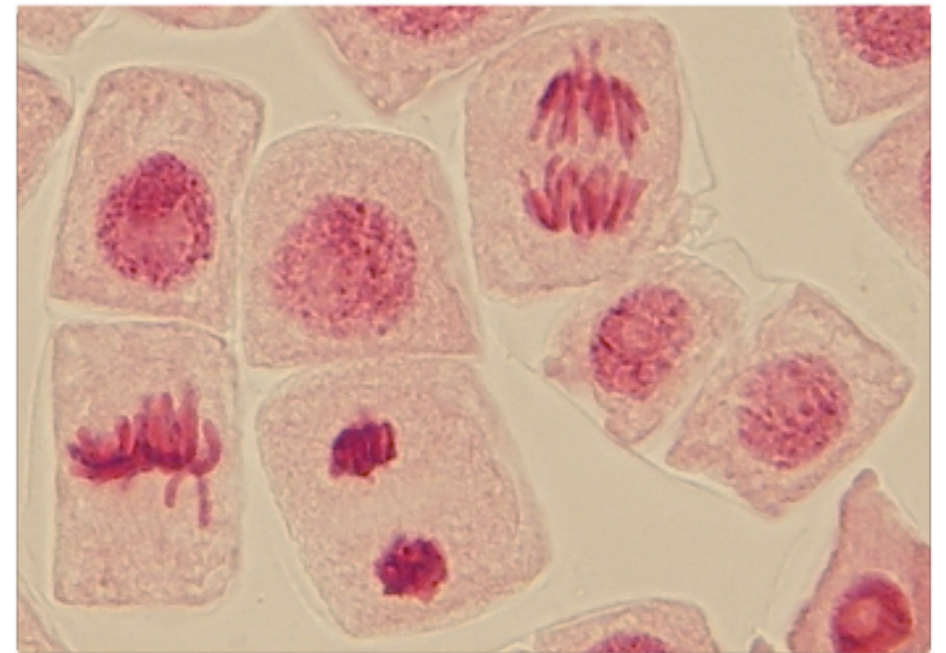
7. カバーガラスの上からつつき棒で軽く数回たたくことにより細胞を拡散させる。



8. 濾紙（2枚）を二つ折りにした間にスライドガラスを置き細胞の載っている部分を親指で押しつぶす（この際にずらしたり、ひねったりしてしまうと細胞が丸まってしまう）。



9. 顕微鏡で観察する。



蛍光免疫染色～研究室級～

試薬

- ・微小管固定バッファー (MTSB)

作り方：

1. 1.5 g PIPES, 0.19 g EGTA, 0.13 g MgSO₄ 7H₂Oおよび0.5 g KOHを800 mlの蒸留水に溶かす。
 2. KOHを使ってpHを7.0に調整する。
 3. 蒸留水により液量を1000 mlに調整する。
- ・ 3% (w/v) パラフォルムアルデヒド in MTSB (4°C保存。実験には調整後1週間以内のものを用いる。

廃液は、ホルマリン廃液として処理する。)

作り方：

1. 10 mlのMTSBを80°Cに温める。
2. 0.3 g パラフォルムアルデヒドを加え、沸騰しないように溶かす (湯煎が望ましい。ドラフト内で行う) 。

• 10 x PBS緩衝液

作り方：

1. 80 g NaCl, 2 g KCl, 35.8 g Na₂HPO₄ 12H₂Oおよび2.4 g KOHを800 mlの蒸留水に溶かす。
2. HClを使ってpHを7.4に調整する。
3. 蒸留水により液量を1000 mlに調整する。

• PBS緩衝液

作り方：

1. 10 x PBS緩衝液を蒸留水で10倍希釈する。

• 1% (w/v) cellulase, 0.5% (w/v) pectolyase in PBS buffer (-20°C保存)

作り方：

1. 0.1 g Cellulase Onozuka RS (ヤクルト薬品工業) および50 mg Pectolyase Y-23 (盛進製薬) を
10 mlのPBS緩衝液に溶かす。

- 4 x TNB (-20°C保存)

作り方：

1. 4 ml 1 M Tris-HCl (pH7.5), 0.35 g NaCl, 0.2 g Blocking reagent (Roche) を蒸留水で10 mlにメスアップする。

- 1次抗体反応液 (保存不可)

作り方：

1. 4 x TNBを蒸留水で4分の1に希釈し、スライドあたり100 μ lのTNB溶液を作る。

2. ウサギ抗AfiCENH₃抗体およびマウス抗 α チューブリン抗体 (SIGMA T6199) を1 μ lずつ加える。

- 2次抗体反応液 (保存不可)

作り方：

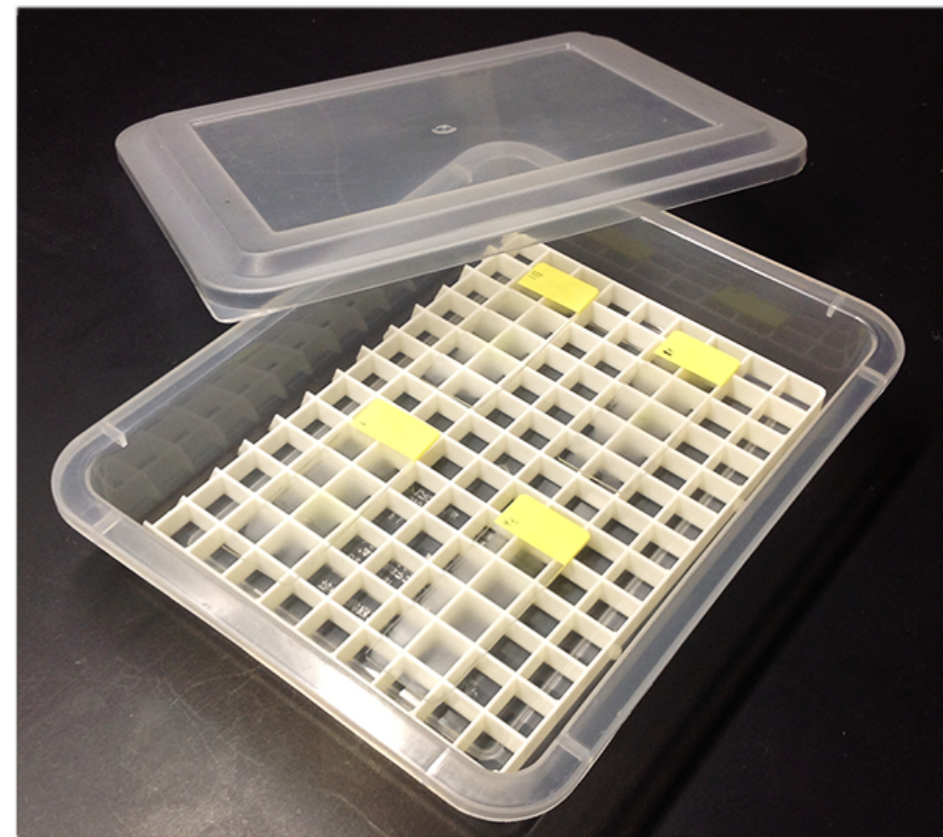
1. 4 x TNBを蒸留水で4分の1に希釈し、スライドあたり100 μ lのTNB溶液を作る。

2. 抗ウサギAlexa Fluor 555抗体 (Invitrogen) と抗マウスAlexa Fluor 488抗体 (Invitrogen) を1 μ lずつ加える。

- Prolong antifade gold (Invitrogen)

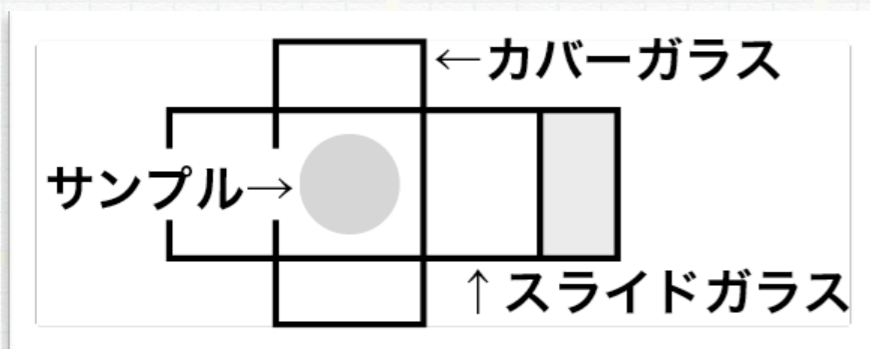
器具

- PLLコートスライドガラス (MASTUNAMI S7441等)
- ピンセット
- 安全カミソリ
- 濾紙
- 24 x 40 mmカバーガラス
- 染色瓶
- 25 x 25 mmパラフィルム
- 湿箱 (プラスチック容器にスノコを入れたもの。写真参照)
- 22 x 22 mmカバーガラス



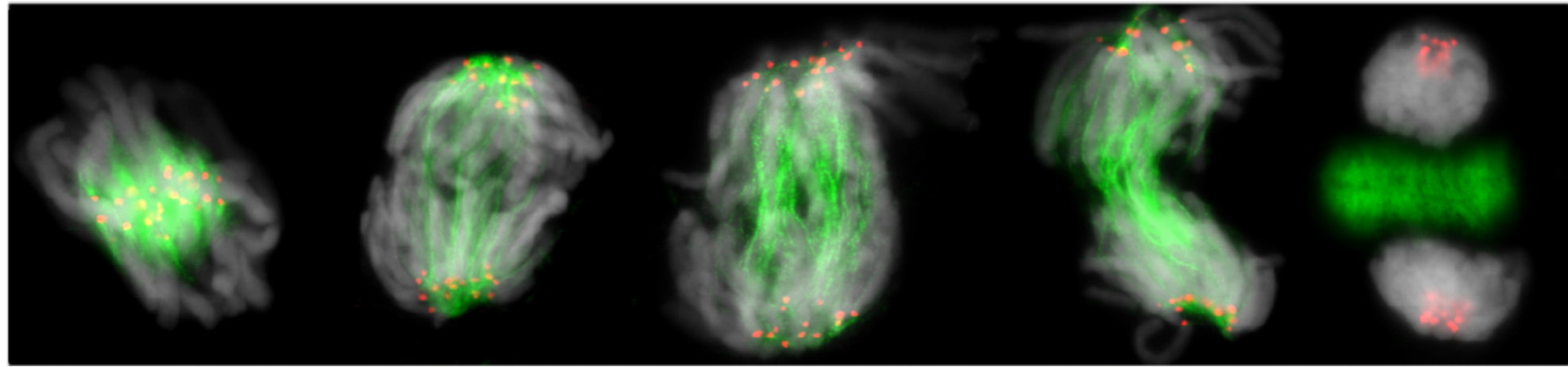
実験操作 (Nagaki et al. 2004 & 2012に基づく)

1. 2 cm程度に切断した根端を 3% (w/v) パラフォルムアルデヒド in MTSB中、室温で20分間固定する。
2. 溶液を取り除き (ホルマリン廃液として処理すること)、PBS緩衝液で10分間ずつ 2回洗浄する。
3. 根端分裂組織を切り出し、1% (w/v) cellulase, 0.5% (w/v) pectinase in PBS buffer中、37°Cで 1時間処理する。
4. 溶液を取り除き、PBS緩衝液で10分間ずつ 2回洗浄する。
5. スライド 1枚あたり 5 μ lのPBS緩衝液を加え、消化された根端分裂組織を緩衝液に懸濁する。
6. PLLコートスライドガラスに 5 μ lの懸濁液を載せる。
7. 24 x 40 mmカバーガラスを図のように十字状にかぶせ、濾紙に挟み込み押しつぶす。



8. カバーガラスをはぎ取り、スライドを染色瓶中のPBS緩衝液に浸ける。
9. 100 μ lの 1次抗体反応液をスライド上のサンプルに加え、25 x 25 mmに切断したパラフィルムで被う。
10. スライドを蒸留水を入れた湿箱に入れて、4°Cで一晩反応させる。

11. パラフィルムを取り除き、スライドを染色瓶中でPBS緩衝液により洗浄する（3回）。
12. 100 μ lの2次抗体反応液をスライド上のサンプルに加え、25 x 25 mmに切断したパラフィルムで被う。
13. スライドを蒸留水を入れた湿箱に入れて、37°Cで1時間反応させる。
14. パラフィルムを取り除き、スライドを0.1 μ g/ml DAPI in PBS bufferに10分間浸ける。
15. スライドを染色瓶中でPBS緩衝液により洗浄する。
16. スライドを染色瓶中で蒸留水により洗浄する（3回）。
17. 37°Cでスライドを乾燥させる。
18. 5 μ lのProlong antifade gold (Invitrogen) をスライド上のサンプルに載せ、
22 x 22 mmカバーグラスでカバーする。
19. 37°Cで30分間インキュベートする。
20. 蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡で観察する。



組織免疫染色～先端研究室級～

試薬

- ・微小管固定バッファー (MTSB)

作り方：

1. 1.50 g PIPES, 0.19 g EGTA, 0.13 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および 0.50 g KOH を 800 ml の蒸留水に溶かす。
2. KOH を使って pH を 7.0 に調整する。
3. 蒸留水により液量を 1000 ml に調整する。

- ・ 3% (w/v) パラフォルムアルデヒド in MTSB (4°C 保存。実験には調整後 1 週間以内のものを用いる。

廃液は、ホルマリン廃液として処理する。)

作り方：

1. 10 ml の MTSB を 80°C に温める。
2. 0.3 g パラフォルムアルデヒドを加え、沸騰しないように溶かす (湯煎が望ましい。ドラフト内で行う)。

• 10 x PBS緩衝液

作り方：

1. 80 g NaCl, 2 g KCl, 35.8 g Na₂HPO₄ 12H₂Oおよび2.4 g KOHを800 mlの蒸留水に溶かす。
2. HClを使ってpHを7.4に調整する。
3. 蒸留水により液量を1000 mlに調整する。

• PBS緩衝液

作り方：

1. 10 x PBS緩衝液を蒸留水で10倍希釈する。

• 5% (w/v) 低融点寒天 in PBS buffer

作り方：

1. 0.5 g 低融点寒天を10 mlのPBS緩衝液に溶かす。

- 0.1% (w/v) pectolyase and 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS

作り方：

1. 10 mg Pectolyase Y-23（盛進製薬）を10 mlのPBS緩衝液に溶かす。
2. 30 μ lのTriton X-100を加える。

- 5% (w/v) BSA in PBS

作り方：

1. 0.5 g BSAを10 mlのPBS緩衝液に溶かす。

- 1次抗体反応液（保存不可）

作り方：

1. 目的の1次抗体を適切な濃度になるように、1穴あたり150 μ lのPBS緩衝液に加える（適正濃度が不明な場合は、1/100希釈から試してみる）。

・ 2次抗体反応液（保存不可）

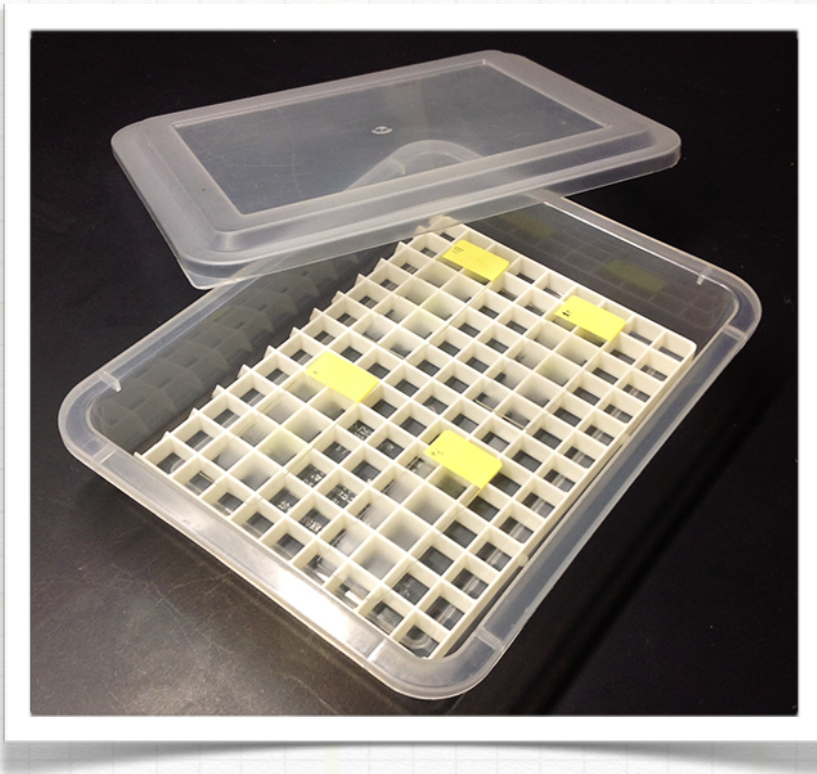
作り方：

1. 2次抗体を適切な濃度になるように、1穴あたり150 μ lのPBS緩衝液に加える。

（Alexa Fluor抗体の場合は1/300～3000希釈が良い）。

器具

- Microslicer (LinearSlicer PRO10; Dosaka EM)
- 疎水性コートスライドガラス (MATSUNAMI SF17380等)
- 22 x 22 mmカバーガラス
- 湿箱 (プラスチック容器にスノコを入れたもの。写真参照)



実験操作 (Yamaji & Ma 2007を改変)

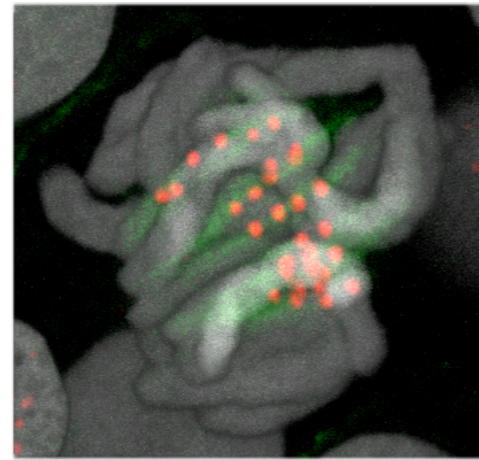
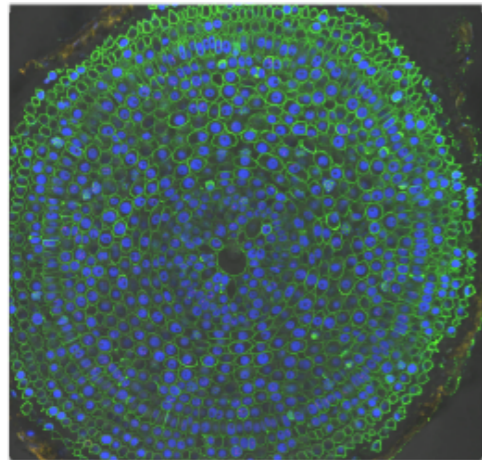
1. 2 cm程度に切断した根端を 3% (w/v) パラフォルムアルデヒド in MTSB中、室温で20分間固定する。
2. 溶液を取り除き (フォルマリン廃液として処理すること)、PBS緩衝液で10分間ずつ2回洗浄する。
3. シャーレ中、40°Cの5% (w/v) 低融点寒天 in PBS bufferに根を沈め包埋する。
4. 4°Cで寒天を硬化させる。
5. Microslicer (LinearSlicer PRO10; Dosaka EM)を用いて、厚さ100 μm の切片を切り出す。
6. 疎水性コートスライドガラスの上に保持したPBS緩衝液中に切り出した切片を浮かべる。



疎水性コートスライドガラス：
黒色部分が疎水性コートされており
白い円内に 300 μl 程度の溶液を保持可能

7. PBS緩衝液を取り除き、150 μl の0.1% (w/v) pectolyase and 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBSを加える。
8. スライドを湿箱中、30°Cで2時間保温する。
9. 酵素液を取り除き、300 μl のPBS緩衝液により洗浄する (3回)。
10. 150 μl の5% (w/v) BSA in PBSを加え、室温で10分間ブロッキングする。
11. ブロッキング液を取り除き、150 μl の1次抗体を含むPBS緩衝液を加える。

12. スライドを湿箱中、室温で一晩保温する。
13. 1次抗体液を取り除き、300 μ lのPBS緩衝液により洗浄する（3回）。
14. 150 μ lの5% (w/v) BSA in PBSを加え、室温で10分間ブロッキングする。
15. ブロッキング液を取り除き、150 μ lの2次抗体を含むPBS緩衝液を加える。
16. スライドを湿箱中、室温で2時間保温する。
17. 2次抗体液を取り除き、DNA染色色素（0.1 μ g/ml DAPI等）を含むPBS緩衝液 300 μ lにより10分間染色する。
18. 染色液を取り除き、300 μ lのPBS緩衝液により洗浄する（3回）。
19. 10 μ lの退色防止剤を加え、22 x 22 mm カバーガラスをかぶせる。
20. カバーガラスの4辺とスライドガラス間の隙間をマニユキアにより封印する。
21. 共焦点レーザー顕微鏡により観察する。



ふろく～染色体実験豆知識～

表 1. 染色体染色法と染色原理

染色原理	染色法	特徴
染色体を構成するタンパク質への 非特異的な物理的吸着	酢酸カーミン 酢酸オルセイン ギムザ染色液	染色体以外のもの (デンプンや油体、他器官にあるタンパク質) も 染まってしまう。
DNAに反応 (塩基組成に関係なし)	フォイルゲン染色	アルデヒド基を化学的に染める。細胞内から生じる アルデヒド基の多くは染色体DNA由来なので、 染色体DNAを「ほぼ定量的」に染める。
DNAに反応 (AT塩基対特異的)	DAPI ヘキスト キナクリン キナクリンマスタード	AT塩基対特異的に色素が吸着し、 AT塩基対を多く含む染色体領域が濃く、 AT塩基対含量が低い領域は薄く染色される。
DNAに反応 (GC塩基対特異的)	クロモマイシンA3 ミスラマイシン	GC塩基対特異的に色素が吸着し、 GC塩基対を多く含む染色体領域が濃く、 GC塩基対含量が低い領域は薄く染色される。

・チャプタ 3・

CREDIT

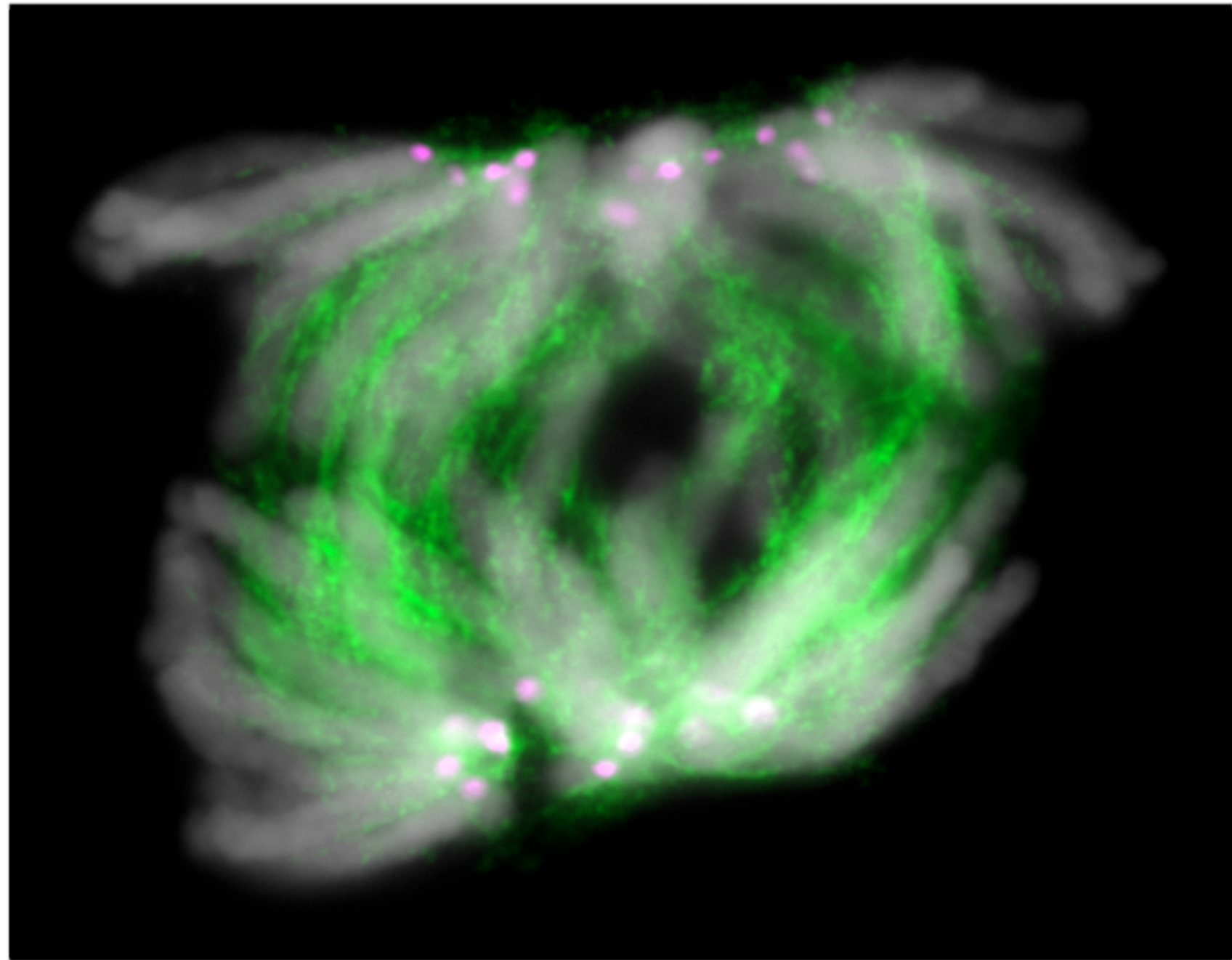


Image Credit

オルセイン染色写真：柴田洋

シロイヌナズナ、タマネギ、クロユリのDAPI染色写真：柴田洋、横田悦子

免疫染色写真：長岐清孝

組織免疫染色写真：山地直樹、長岐清孝

3Dモデル：長岐清孝

オルセイン染色実験写真：柴田洋

References

1. Nagaki K, Yamamoto M, Yamaji N, Mukai Y, Murata M (2012) Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histone H3 antibody in *Allium*. PLOS ONE 7(12): e51315.
2. Nagaki K, Kashiwara K, Murata M (2005) Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. Plant Cell 17: 1886-1893.
3. Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, Talbert PB, Kim M, et al. (2004) Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. Nature Genetics 36: 138-145.
4. Yamaji N, Ma JF (2007) Spatial distribution and temporal variation of the rice silicon transporter Lsi1. Plant Physiol 143: 1306-1313.
5. Hirano T (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. Current Biology 15: R265-R275.
6. Joti Y, Hikima T, Nishino Y, Kamada F, Hihara S, Takata H, Ishikawa T, Maeshima K (2012) Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. Nucleus 3: 404-410.

Contact

この電子教材書籍「はじめての染色体」に関する最新情報は

「Facebookページ：はじめての染色体 (<http://www.facebook.com/Hajimetenosensyokutai>) 」または

「Twitter：はじめての染色体 (@hajimetenosen) 」で入手可能です。

また、御意見、御要望も受付中です。この電子教材書籍は皆様の御意見を反映してより良いものへと進化します。

長岐 清孝

E-mail: nagaki@rib.okayama-u.ac.jp

所属：国立大学法人岡山大学・資源植物科学研究所、核機能分子解析グループ

住所：〒710-0046 岡山県倉敷市中央2丁目20番1号 岡山大学資源植物科学研究所 核機能分子解析グループ

核機能分子解析グループWebsite： <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/nucleus/index-j.html>

岡山大学資源植物科学研究所Website： <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/index-j.html>

染色体に興味を持ち、意欲のある大学院生を募集中！

Special Thanks

- この本の演出および操作性の改善のために御意見いただいた、岡山大学資源植物科学研究所・核機能分子解析グループの方々に感謝！
- ともすると一般の方に対して難解な表現になりがちな私の文章を改善するために協力し、「家庭のための時間」を削って本書の執筆に没頭した私を支えてくれた家族に感謝！
- β テスターとして多くのiPadモデル上での動作確認をお手伝いいただいた牛島幸一郎博士にも感謝！
- 「見やすい色」について御指摘くださった白石直樹氏にも感謝！

加えて、web上でiBooksの作製法、動画の編集法、3Dファイルの作製法を解説してくださった方々に、感謝！

これらの解説が無ければ、おそらくこの本はありきたりな「紙の本を電子化しただけの電子書籍」となってしまっただろう。

最後に、なによりもこの電子書籍を実際に皆さんに届けるための、iPad、iBooks author、MacおよびOSXといった環境を作り上げた故スティーブ・ジョブスとアップルという「夢を現実にする会社」に最大の敬意を表す。

(存命中には間に合わなかったが、私はあなたの目指した「未来の教科書」を作れたのだろうか?)

おわりに

みんなが、「夜空の星を愛でる様に、染色体を愛でる」そんな、世界を作りたい。これは、私の目標である。本来、科学とは「美しいものに心を奪われ、それを観察すること」そして「自然の仕組みを理解すること」から始まった。ところが、昨今は「それは何の役に立つのですか？」が、科学の成果に対する「常套句」である。「これができるれば、ガンの治療に・・・」とか、「食料問題の解決に・・・」とか、「地球温暖化の防止に・・・」とか、「科学者自身が積極的に発言する」場合もあるし、「マスコミが勝手に、そういう発言にしてしまう」場合もあるが、ほとんどの場合「遠い未来に関係あるかもしれない」程度の事が「主目的」の様に語られることが多い。

その度に、私はあるエピソードを思い出し、「みんなが、夜空の星を愛でる様に、染色体を愛でる。そんな、世界を作りたい」と思うのである。そのエピソードというのは、私の母校である横浜市立大学での、当時の学長と「大学のパトロン」である当時の横浜市長の問答である。この当時の学長は、私が大学院生だったときには、いつでも純粋に科学を語り、分野外の学生にも物理学の面白さを伝える講義をしてくださった。この「純粋な科学者」に対して、当時の横浜市長は、うかつにも歴代市長が歴代学長を訪問したときに放つ「この大学でやっている研究は、横浜市に何の役に立つんですか？横浜市民の税金を使っているんだから、もっと、横浜市に役立つことをしてください」という台詞を言い放ってしまったのである。普通の学長なら、上に書いてある様な返答の常套句とともに「さらに、横浜市の役に立つ様にごがんばります」などと返答するところだったろうが、この学長は「私たちが、人類がワクワクする様な自然の謎を解き明かし、その内容を綴った論文の所属欄にYokohamaって書いてあることが最大の貢献です」と答えた。

このエピソードには、今の科学を取り巻く問題が集約されている気がする。こんな時代だからこそ、実験科学者は「実験事実に基づいたワクワクを提供するエンターティナー」でなければならぬと思う。そうすれば、現在解離してしまっている「最先端の科学で出来ること（出来てしまうこと）」と「一般人の科学リテラシー（理解）」の間の溝を徐々にではあるが埋めていくことが出来ると信じている。そのときにきっと、皆さんが「基礎科学で生物の仕組みを理解する事」の大切に気付いてくれると思う（ちなみに、私も「綺麗だから」と言うだけで染色体の研究をしているわけではなく、「生物の仕組み」を理解するために研究している）。だから、私はこの本で自分の研究対象である「染色体のワクワク」を皆さんに届けようと思った。そうすれば、「鉄腕アトム」や「ガンダム」にワクワクした人々が「ASIMO」を走り回らせている様に、「キャプテン翼」のワクワクが日本のサッカーを世界レベルに引き上げた様に、「染色体のワクワク」でも何かが変わると信じている。故スティーブ・ジョブスは、「世界を変えられると信じて行動した人達だけが、本当に世界を変えることができた」と言っていた。だから、私も「それを信じること」から始めようと思う。

皆さんが「夜空の星を愛でる様に、染色体を愛でる」ことを願いながら

2012年12月8日

著者：長岐 清孝