

技術ノート

DAPI 染色法による酵母染色体の観察

宮 川 勇*

近年, DNA と特異的に結合する蛍光色素, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた染色法と, 強力な励起光を発する高分解能蛍光顕微鏡の開発により, 従来観察が不可能であった超微量 DNA を含む高等動植物, 藻類, 菌類などのオルガネラ核の観察が可能になった。ミトコンドリアや色素体の分裂, 増殖, 分化のしくみや母性遺伝の機構について現在多くの新しい知見が得られつつあるのは, この蛍光顕微鏡法の開発によるところが大きい¹⁾。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は遺伝学の材料として長い歴史をもつ微生物で, 特に近年遺伝子工学の分野で多くの研究者に利用されている。すでに染色体上に 500 以上の遺伝子がマッピングされている。しかし, このように酵母が真核生物の基本的機能の解明のためきわめて有用な生物であるにもかかわらず, その細胞遺伝学的研究は大きく立ち遅れている。そのおもな理由は, 酵母細胞が堅い細胞壁をもっていること, 細胞核 DNA 量がソラマメ (1.9×10^{-11} g/半数体の核) やムラサキツユクサ (3.0×10^{-11} g/半数体の核)²⁾ などの高等植物よりも 10^{-8} オーダーも低く, 半数体核当たり 2.5×10^{-14} g³⁾ と微量であること, 体細胞染色体が非常に密に詰まっていることなどによる。この細胞核当たりの DNA 量は, 大腸菌の約 6 倍にすぎない。

しかし, 筆者らは最近, 酵素的に細胞壁を除去したスフェロプラストの同調的減数分裂誘導と, 高感度 DAPI 蛍光染色法を組み合わせ, 酵母減数分裂核中に 16 本の二価染色体を観察することに成功している³⁾。

超微量 DNA 染色と定量法については別誌¹⁾に詳しく紹介されているので, 本稿ではスフェロプラストの調製法, 染色体標本の作製法, DAPI 染色法について筆者らが行っている方法について具体的に解説していきたい。

1. 酵母の培養と大小細胞の分離

1) 二倍体細胞 (G 2-2 株) を 3.6% トマトジュースを

添加した Burkholder 培地で 30°C, 32 時間振盪培養し, 定常期初期まで増殖させる。

2) 減数分裂の同調性を上げるために, 出芽痕 (bud scar) を 1 つ以上もつ大型細胞を分画する。このために, 菌体の懸濁液を 300~500 g で 1 分間遠心して大型細胞を沈殿に回収するという操作を 10 回以上繰り返す。出芽痕は calcofluor white M2R (20 µg/ml) で染色して観察するが, この操作で 85% 以上の大型細胞が得られる。

2. スフェロプラストの調製³⁾

大型細胞を 0.2 M 2-mercaptoethanol を含む P buffer (25 mM K-phosphate buffer, pH 7.5, 0.8 M KCl) 中で 30°C, 15 分間処理する。P buffer で 2 回洗浄後, 3×10^7 cells/ml の菌濃度で P buffer に懸濁し, ザイモリアーゼ 100 T を 150 µg/ml の濃度で加える。この条件で 30°C, 15 分インキュベートすると 100% の細胞がスフェロプラストになり, 低浸透圧で容易に破裂するようになる。

3. 減数分裂の誘導³⁾

スフェロプラストができたら P buffer で 2 回洗浄後, ごく少量の同液に懸濁し, すばやく 100 ml の三角フラスコに加えた 10 ml の孢子形成培地 (15 mM K-acetate, 50 mM K-phosphate buffer, pH 6.9, 0.6 M sorbitol) へ 3×10^7 cells/ml の菌濃度で植菌する。30°C で振盪培養を行う。

4. 減数分裂核の DAPI 染色⁴⁾

1) 培養から経時的に一定量を取り, 1% グルタルアルデヒドで室温, 20 分固定する。DAPI の蛍光の退色を抑える効果がある NS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 0.05% 2-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF) で試料を洗って少量の同液に懸濁する。

2) 固定試料 3 µl をスライドガラス上にのせる。

3) NS buffer に溶かした DAPI (1 µg/ml) の染色液を 3 µl 加え, カバーガラスをかけて, 濾紙で挟んで上から軽く試料を押しつぶし, 10~20 分室温に放置し染色する。

* Isamu MIYAKAWA: Observation of Yeast Chromosomes by DAPI Staining Technique.

山口大学理学部 (〒753 山口市大字吉田 1677-1)

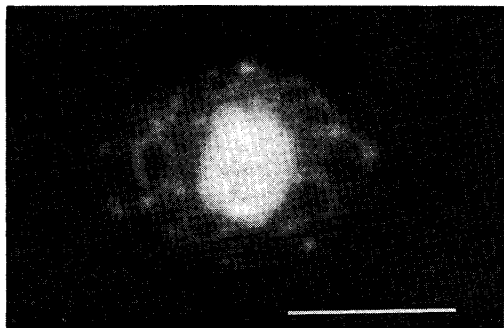
Faculty of Science, University of Yamaguchi (1677-1, Yoshida, Yamaguchi)

4) オリンパス BHS-RFK 落射蛍光顕微鏡で、対物レンズ UVFL 100, 334 nm 励起フィルター, 420 nm 吸収フィルターを用いて観察する。UV 励起光により DAPI は青白い蛍光を発する。

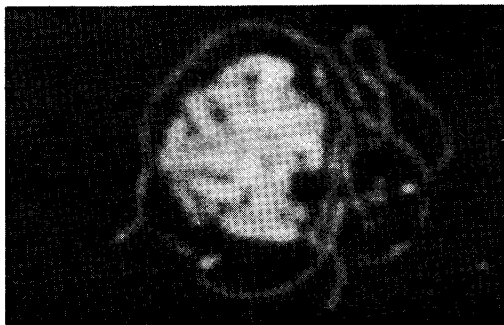
このスフェロプラストを用いる方法では、有壁細胞を用いた観察(第1図)よりはるかに核の形態が観察できるようになる(第2図)。減数分裂核のクロマチンがしだいに凝縮し、4時間程で核の内部に細い紐状の構造が現われ、それがやがて太くなっていく様子が観察できる(第2図)⁴⁾。細胞質には紐状になったミトコンドリア核様体も鮮明に観察できる。しかし、この方法では染色体化がおこっていることは十分確認できるが、個々の二価染色体を識別して数えることは難しい。そこで、細胞質を十分に分散させ、核膜を破壊して個々の染色体を観察するために、固定前の処理、固定、標本作製を次のように変えて行く。

5. 染色体標本の作製³⁾

1) 細胞が第1減数分裂前期太糸期から中期のステージに達する 6~8 時間目の培養液を経時的に 1 ml ずつ分取する。



第1図 減数分裂前期太糸期-中期の細胞をグルタルアルデヒドで固定後、DAPI 染色した。bar は 5 μ m (第2~4 図も同じスケール)。



第2図 第1図と同時期(培養8時間)のスフェロプラストをグルタルアルデヒドで固定後、DAPI で染色した⁴⁾。

2) 染色体の広がりをよくするために、この培養液にザイモリアーゼ 100 T (150 μ g/ml), 0.2 M 2-mercaptoethanol を加え、30°C, 15 分間インキュベートする。

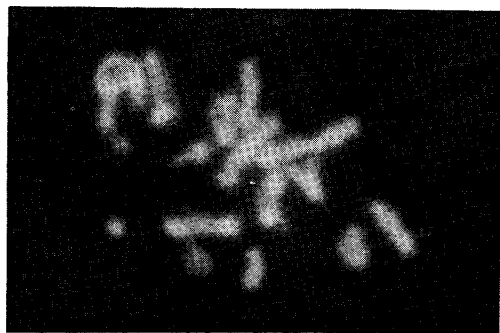
3) スフェロプラストをエッペンドルフチューブで 1400 $\times g$, 3 分間遠心し、上清を除いた後、2 ml のカルノア固定液 (99% エタノール-氷酢酸=3:1 v/v) を加える。5~10 分間室温に放置後固定液を遠心で除き、固定した細胞を 1 ml の固定液に再懸濁する。カルノア固定液は使用直前に調製する。

4) 1 滴の懸濁液を 0°C に冷やしたスライドガラスに落とし、スライドガラスをすばやく火焰に通して固定液を燃焼乾燥させる。

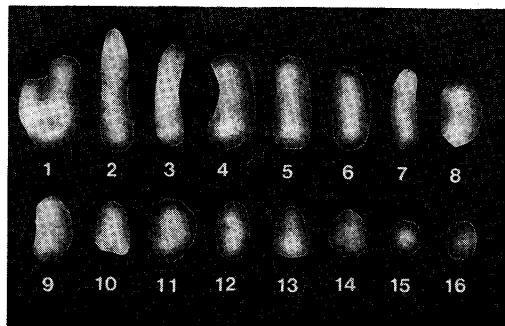
5) 前項で述べたように、0.5~1 μ g/ml の DAPI 液で染色して UV 励起光下で観察する。

DAPI 染色像の写真撮影は、撮影レンズ NFK 6.7 $\times$ LD, フィルムはフジネオパン 400, 露出時間 30~50 秒で撮影し、現像はバンドールで ASA 1200 くらいまで増感現像する。

このようにして作製した染色体標本を用いて、第3図に示すような 16 本の分離した二価染色体を観察することができる^{3,5)}。現在のところ減数分裂期染色体の詳細な核型を示すことは難しいが、16本の二価染色体をその



第3図 減数分裂前期太糸期-中期の二価染色体。スフェロプラストをカルノア液で固定後染色体標本作製し、DAPI で染色した⁵⁾。



第4図 16本の酵母二価染色体。

大きさと形に従って第4図のように並べることができる。

二価染色体のネガを、コンピューター NOVA (Nippon Data General) と組み合わせた Joyce-Loebl MK 3C ミクロデンシトメーターを使って 620 nm で二次元的にスキャンして、染色体当りの DNA 量を求めたのが第1表である。酵母の半数体当りの核 DNA 量が $250 \times 10^{-16} \text{ g}$ であるので、最大の二価染色体は $155 \times 10^{-16} \text{ g}$ であり、最小の染色体は $14 \times 10^{-16} \text{ g}$ の DNA 量という値になる。最小の染色体は T4 フェージの約7倍という超微量 DNA 量に相当する。Mortimer らは、筆者らの得た各染色体の DNA 量と遺伝子地図から求めた染色体の大きさの相関関係を調べ、高い直線的相関があることを示している⁶⁾。

第3,4図で示すように、一番大きい染色体は減数分裂前期にしばしばリング状に観察されるが、筆者らはこのリング部分が核小体形成部位 (NOR) であることを、クロマイシン A₃ 染色、銀染色、クローン化した *Zygosaccharomyces berilii* の rDNA をプローブとして用いた *in situ* hybridization 法により明らかにした。そして、この NOR 部位の DNA 量を超高感度テレビカメラを備えた画像処理装置 (VIMPCS) で測定し、核小体形成部位が 118 コピーの rRNA 遺伝子ユニットを含むことを明らかにしている⁶⁾。

以上述べてきたように、DAPI 染色法を用いることにより、単位染色分体当りの平均 DNA 量が高等植物染色体よりも 10^{-3} オーダー以上も小さい酵母の減数分裂二価染色体の観察が可能である。細胞の培養法やスフェロプラストの調製、染色体標本の作製法など strain や生物種によりそれぞれ工夫が必要であると思うが、DAPI 染色-高感度蛍光顕微鏡法は、菌類、藻類など超微量 DNA をもつ染色体の研究や高等動物染色体の微

第1表 酵母二価染色体の DNA 量⁶⁾

染色体 ナンバー	平均銀粒子密度 (%) ±標準偏差	二価染色体当りの DNA 量 ($\times 10^{-16} \text{ g}$)
1	15.5±2.1	155
2	11.1±2.0	111
3	9.1±0.3	91
4	8.1±0.5	81
5	7.4±0.3	74
6	7.0±0.4	70
7	6.7±0.5	67
8	6.1±0.5	61
9	5.9±0.6	59
10	5.4±0.3	54
11	5.0±0.4	50
12	4.5±0.6	45
13	3.5±0.4	35
14	2.2±0.2	22
15	1.6±0.5	16
16	1.4±0.5	14

細構造観察のためのきわめて有効な手段であると思われる。
(1987年12月21日受理)

文 献

- 1) 中村宗一, 黒岩常祥, 1987. 蛋白質核酸酵素, 別冊 No. 30, p. 140.
- 2) 柳田友道, 1981. 微生物科学 2, 学会出版センター, 東京.
- 3) Kuroiwa, T., H. Kojima, I. Miyakawa, N. Sando, 1984. Exp. Cell Res., **153**: 259.
- 4) Miyakawa, I., H. Aoi, N. Sando, T. Kuroiwa, 1984. J. Cell Sci., **66**: 21.
- 5) Kuroiwa, T., S. Miyamura, S. Kawano, M. Hizume, A. Toh-e, I. Miyakawa, N. Sando, 1986. Exp. Cell Res., **165**: 199.
- 6) Mortimer, R. K., D. Schild, 1985. Microbiol. Rev., **49**: 181.