真正蜘蛛類の染色体観察法

五十嵐 広 明*・近 藤 昭 夫

東邦大学 理学部 生物学教室

Synopsis

IGARASHI, Hiroaki* and Akio, KONDO (Department of Biology, Faculty of Science, Toho University, Funabashi, Chiba 274, Japan): The chromosome observation techniques for spiders. *Acta arachnol.*, **27**(Special number): 157-166 (1977).

Various cytological techniques were employed for the examination of spider chromosomes of 18 different species in 17 genera from 11 families to make more detailed chromosome observations possible. The hypotonic pretreatment aceto-orcein squash method yielded favorable preparations of cells in all the stages of meiosis for almost all the species. The modified acetic acid dissociation air-drying method was found to be suitable for spermatogonial metaphase.

A C-banding technique used for *Theridion tepidariorum* and *Oxyopes sertatus* revealed dark stained centromeric regions in all the autosomal pairs and the X-chromosomes, indicating the presence of constitutive heterochromatin in these centromeric regions of the chromosomes of both species.

真正蜘蛛類の染色体に関する報告は多数あり、WALLACE (1900) 以来 MITTAL (1967) までの研究で、およそ 270 種に及ぶ真正蜘蛛類の染色体が観察されてきた。しかしながら、これらの観察は、REVELL (1947) を除き、切片法もしくは切片法と押しつぶし法の併用でなされたため、染色体数の決定、性染色体の観察にはある程度有効であったが、個々の染色体の形態の詳しい観察（特に精原細胞分裂中期に於ける）には適していなかった。

著者らは、MAKINO and NISHIMURA (1952) 以後開発された方法のいくつかを、原法に改良を加えて導入することにより、染色体のより詳細な観察を可能にすることが出来た。

また、最近個々の染色体の識別に有効な分染法がいろいろ知られてきたが、このうち構造的異質染色質を特異的に染色するC-バンド法は、核型の進化の研究に有効な分染法であると考えられているので、この方法が蜘蛛の染色体に常に用いることが出来るようになれば、真正蜘蛛類の核型進化の研究が更に発展する可能性があり、このC-バンド法に関しても、二、三検討を加えた。

方法とその検討

1. 低張液処理押しつぶし法

MAKINO and NISHIMURA (1952) の水処理押しつぶし法以来、前処理として低張液処理を行なうことにより、染色体の重なりあいも少なく、形態も明瞭に観察されるようになった。標本作成手順は IMAI (1966) の方法に改良を加えて行なった。

すなわち、(1) 生理食塩水の2倍希釈液中で精巣を摘出し、ホロースライドに移し、低張液で10~15分間処理する。(2) 低張液を完全に取り除いた後、1%酢酸オルセインを滴下し、直ちに柄付針で精巣

* 現所属：東邦大学 医学部 第2解剖学教室

Present address: 2nd Department of Anatomy, School of Medicine, Toho University, Omori, Tokyo 143, Japan.

を細かく砕き、25～35分間室温放置する。(3) 精巢小片と染色液の懸濁液をホロスライドからピペットで吸い取り、通常のスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて押しつぶす。

従来、真正蜘蛛類ではごく一部の種を除き端部動原体染色体であるといわれていたが、動原体の位置が確認出来たのはチャスジハエトリ *Plexippus paykulli* とミスジハエトリ *P. setipes* の2種のみであり (SUZUKI, 1954), 大部分は棒状染色体が観察されるにとどまっていた。

低張液処理酢酸オルセイン押しつぶし法を11科17属18種に試みた結果、ほとんどの種で鮮明な染色体像を得ることが出来、特にオオヒメグモ *Theridion tepidariorum* に良い像を得ることが出来た。オオヒメグモは既に精原細胞分裂中期に於いて、22本の棒状染色体が観察されていた (SUZUKI, 1954) が、この方法による染色体像は、染色体どうしの重なりあいがほとんどないほどに良く広がり、個々の染色体の輪郭も明瞭で動原体も観察され、22本のすべての染色体が小さい腕をもった端部動原体染色体であることがわかった (図1)。更に相同染色体を求め、大きさの順に並べた結果、2本のX染色体の一方であると考えられる特に短い染色体を高い確率で確認することが出来、またもう一方の大きいX染色体が識別出来る場合もあった (図2)。

また精原細胞の分裂時のみならず、この方法によると還元分裂のさまざまな時期の染色体像も鮮明であり (図3)、また染色体数の多いメガネヤチグモ *Coelotes luctuosus* の還元分裂第一分裂中期でも、染色体が良く広がることが確かめられた (図4)。

このように低張液処理酢酸オルセイン押しつぶし法は、精原細胞および精母細胞の分裂時に染色体を観察するには極めて有効な方法であることがわかったが、オオヒメグモではすべて小さい腕をもった端部動原体染色体であり、更にそれらが大きさの違いはあってもわずかな差の連続したものであるため、個々の染色体の識別は不可能であることがはっきりした。従って、たとえ染色体が明瞭に観察出来ても、

図1 オオヒメグモ 低張液処理押しつぶし法による精原細胞分裂中期像。

図2 オオヒメグモの核型（精原細胞分裂中期）5例 低張液処理押しつぶし法による。

図3 オオヒメグモ 低張液処理押しつぶし法による還元分裂第一分裂中期像。

図4 メガネヤチグモ 低張液処理押しつぶし法による還元分裂第一分裂中期像。

核型進化を知る手がかりにはほとんど成り得ないという結論に達したので、染色体の特定部分を染色する方法、すなわち分染法を施し、個々の染色体の識別を試みることにした。

まず、分染法に用いるためのスライド（染色体がスライドガラスに張り付いたもの）の作成方法（ドライアイス法および酢酸解離空気乾燥法）について検討した。

2. IMAI and KUBOTA のドライアイス法とその変法

IMAI and KUBOTA (1972) はおよそ次のような方法を考案した。すなわち、(1) 試料をコルヒチン-低張液中で摘出した後、30分間低張処理し、(2) 50%酢酸-エタノール中で直ちに試料を細断し、カバーガラスをかけて押しつぶす。(3) カバーガラスの上にドライアイスを2, 3分間のせて凍結させた後、カバーガラスを剥がし、ヘアドライヤーを使って乾燥させ、(4) 氷酢酸に30秒間浸し、再びヘアドライヤーを使って乾燥させ、1%酢酸オルセインで1分間染色した。

著者らはこのうちドライアイスによる凍結を、取り扱いの簡便な凍結マイクロームの凍結装置に代えて用い、同じ凍結効果を得ることが出来た。なお低張液は生理食塩水の2倍希釈液を用い、IMAI and KUBOTA の原法にある氷酢酸の処理は行なわなかった。

またC-バンド法を用いる場合には、アルカリ処理中に染色体が剥離するので、貼付液(0.1%ゼラチン+0.01%カリウムミョウバン)を塗ったスライドガラスを使用した。それでも剥離を防止することは難しかった。

3. 酢酸解離空気乾燥法

空気乾燥法は、哺乳類の培養細胞用に開発されたが、試料が少量しか得られない節足動物用としては不向きであった。CROZIER (1968) はこれに改良を加え、スライドガラスの上で60%酢酸を用いて細胞を解離することにより、細胞の損失を最小限にとどめ、ショウジョウバエとアリの脳神経節や精巣に用いた。この方法では、少量の試料からでも標本が得られるが、欠点としてはコルセミド処理が長いので全過程に2日間を要し、数多くの個体を扱うのには不便なこと、1%クエン酸ナトリウムの低張処理では染色体がうまく広がらないことであった。

そこで著者らは、CROZIER の方法に次の4点の改良を加えた。(1) 0.05%コルセミド-生理的塩類溶液処理を0.025%コルヒチン-生理的塩類溶液処理に改め、その処理も摘出した精巣に直接行ない、処理時間は5時間に短縮した。(2) 低張処理を1%クエン酸ナトリウム溶液から0.075 M 塩化カリウム溶液に改め、染色体の広がりを良くした。(3) スライドの乾燥は、原法のようにスライドガラスをあらかじめ暖めておくことはせず、直ちにヘアドライヤーで穏やかに熱を加えて乾燥させた。蜘蛛の場合、原法のようにゆっくり風乾すると染色体の形態が壊れてしまうので、すばやく乾燥させる必要があるが、火災では高温下に染色体をさらすことになるので、すばやく乾燥させることが出来、しかも高温にさらさずにすむヘアドライヤーによる乾燥を行なった。(4) 原法にある酢酸エタノール処理は、スライドに細胞質が少ないので省略した。

すなわち改良法の全過程は次のとおりになる。(1) 摘出した精巣を0.025%コルヒチン-生理的塩類溶液で5時間処理する。(2) 0.075 M 塩化カリウム溶液で15分間低張処理する。(3) 酢酸メタノールで30分間固定する。(4) 精巣をスライドガラスの上に移し、60%酢酸を数滴その上に滴下し、細胞を解離させる。(5) その上に更に酢酸メタノールを数滴落とし、ヘアドライヤーで穏やかに熱を加えて乾燥させる。(6) ギムザ液(メルク社のギムザ原液をM/15 リン酸緩衝液(pH 6.8)で25倍に希釈)で3~5分間染色する。

この改良法はササゲモ *Oxyopes sertatus* およびオオヒメグモの2種の亜成体雄の精巣について行なった。

図5 ササグモ 酢酸解離空気乾燥法による精原細胞分裂中期像および核型。

その結果、染色体標本は、コルヒチン処理の為に染色体どうしが重なりあうことが少なく、適度に収縮し、動原体の位置もかなり明確に観察出来た。また染色体の輪郭も極めて明瞭であった。特にササグモの精原細胞分裂中期に於いて、鮮明な染色体像を多く得ることが出来、21本の染色体のうちほとんどすべてがごく小さい腕をもった端部動原体染色体であることがわかり、また1本のX染色体が最も大きな染色体として常に識別することが出来た(図5)。

4. C-バンド法

最近、PARDUE and GALL (1970) は哺乳類の染色体の構成的異質染色質を特異的に染め分ける方法を開発し、ARRIGHI and HSU (1971) はこの方法を整理して、塩酸、水酸化ナトリウム、SSC 処理を主体とする方法で、構成的異質染色質のみを染め分けることに成功した。これはC-バンド法と呼ばれ、他の分染法などとは異なり押しつぶし法にも適用され、SUMNER (1972) は水酸化ナトリウムの代りに水酸化バリウムを用いることにより、染色体の形態を損なうことの少ない方法に改良した。

(1) ドライアイス法—C-バンド法

C-バンド法としてはいくつかの方法が知られているが、いずれも処理の途中で染色体の形態が損なわれてしまうことが多い。そこで最も再現性の大きいといわれる SUMNER の BSG 法 (SUMNER, 1972) を、ほぼ原法どおり用いた。

図6 オオヒメグモ精原細胞分裂中期のC-バンド IMAI & KUBOTA の方法の変法によるスライドを SUMNER の BSG 法で処理

すなわち、(1) ドライアイス法変法により、スライドを作成する。(2) 0.2 N 塩酸で1時間処理する(室温)。(3) 蒸留水で軽く水洗してから、50°Cに暖めた5%水酸化バリウム水溶液に5分間浸す(原法は5~15分間)。(4) 蒸留水で軽く水洗した後、60°Cに暖めた SSC (0.15 M 塩化ナトリウム-0.015 M クエン酸ナトリウム)で1時間処理する(原法は2×SSC)。(5) 蒸留水で軽く水洗してからギムザ染色する(5分間)。(6) 蒸留水で余分の染色液を除去し、自然乾燥させる。

この方法によると、オオヒメグモの端部動原体染色体の動原体付近および一部の染色体末端が濃染し、真正蜘蛛類の染色体で初めて構成的異質染色質を分染することに成功した(図6)。しかし水酸化バリウム処理中にほとんど染色体が剥離することが多いので、この方法は断念せざるを得なかった。

(2) 酢酸解離空気乾燥法—C-バンド法

これも SUMNER の BSG 法を用いてみたが、水酸化バリウム処理で染色体の形態が著しく損なわれてしまった。分染法のひとつにG-バンド法があるが、これでは前処理として、アルコールを通すと染色体の形態がよく保たれるということが知られている(LEE *et al.*, 1972)ので、SUMNER の BSG 法を更に改良し次のようにした。

すなわち、(1) スライドを、70%エタノール、95%エタノール、100%エタノールに各15分間ずつ通す。(2) 0.2 N 塩酸で30分間処理する(室温)。(3) 軽く水洗してから50°Cに暖めた5%水酸化バリウム水溶液に3~4秒間浸す。(4) 水洗する。(5) 2×SSC (pH 7)で1時間処理する(60°C)。(6) 軽く水洗してからギムザ染色する(5分間)。

その結果、ササグモでは、21本のすべての染色体の動原体付近がギムザ液に濃染し、この部分に構成

図7 ササグモ精原細胞分裂中期のC-バンド 酢酸解離空気乾燥法によるスライドを SUMNER の BSG 法で処理

的異質染色質が存在することがわかったが、X染色体を含むすべての染色体の他の部分には、構成的異質染色質が存在しないことが示された（図7）。オオヒメグモでも22本のすべての染色体の動原体付近が濃染し、この部分に構成的異質染色質が存在することがわかったが、全体が濃染するような染色体は観察出来なかった。オオヒメグモはササグモよりも染色体の形態が損なわれやすく、再現性には問題があるが、一部の染色体の末端部分も濃染することがあり、動原体付近以外の部分にも構成的異質染色質をもつ染色体の存在する可能性がある。

なお、酢酸解離空気乾燥法によるスライドに、SUMNER の原法を用いると、染色体の形態が損なわれてしまい、ギムザ液に対する染色性も完全に失われた。著者らはオオヒメグモの火炎乾燥法によるスライドに SUMNER の原法を用いて良い標本を得たことがあるが、酢酸解離空気乾燥法による染色体はC-バンド法の処理で破壊されやすいという結論を得たので、まず水酸化バリウム処理時間を極端に短縮した。結果は、良い像も得られたが、それでも染色体の形態が破壊されてしまうものも多かった。ヒトの染色体では pH 8 の SSC で染色体が膨潤し、染色性が低下するが、pH 7 では良い標本が得られる（McKENZIE and LUBS, 1973）ことがあるので、pH 7 の SSC を用いてみたが、pH 8 の時と結果は変わらなかった。またスライド作成後、C-バンド法をほどこすまでに1週間以上おくと、染色体に

アルカリ処理に対する抵抗性が生じるという報告があるが (FOREJT, 1973), これは蜘蛛では, スライド作成後 4, 5 日おいてから C-バンド法をほどこした場合に効果が認められた.

考 察

真正蜘蛛類の染色体については, 古くから数多くの研究が行なわれてきたが, 染色体数の決定と性染色体による性決定機構の決定に主眼がおかれ, これらは固定切片法や通常の押しつぶし法でもその目的が達成出来たために, 染色体の形態を詳しく観察するための標本作成方法の技術的發展がおくれていた. しかし真正蜘蛛類の染色体と系統との関係は興味深い問題であるので (SUZUKI, 1954), 個々の常染色体, 精原細胞分裂中期での X X O 型の性染色体の識別が望まれていた.

まず低張液処理酢酸オルセイン押しつぶし法の一部改良法により, さまざまな分裂時に於いてすぐれた染色体像を得ることが出来た. 特に還元分裂時の染色体像にすぐれていたが, 精原細胞分裂中期像にもすぐれており, オオヒメグモの精原細胞分裂中期に於いて, 2 本の性染色体のうち的一方が確実に識別出来たことは, 性決定機構の進化を考えるうえで, まず第一歩をふみ出したものと考えられる.

しかし同時に, 常染色体は通常の標本では個々に識別出来ないことも明らかになったので, 更に別の方法へと発展させることが必要になった.

そこで染色体の分染法が必要となるが, 種々ある分染法のうち, 構成的異質染色質を特異的に染める C-バンド法 (PARDUE and GALL, 1970; ARRIGHI and HSU, 1971) を試みることにした. C-バンド法を選んだ理由は, 第一に節足動物の染色体にも用いることが出来ることである. すなわち, C-バンド法以外の方法を節足動物に用いて成功したという報告はないが, C-バンド法はバッタの 1 種 *Acridium japonicum* (TAKAGI, 1971) やカの 1 種 *Aedes albopictus* (BIANCHI *et al.*, 1971) などでは既に成功している.

第二に, C-バンド法により鳥類の W 染色体 (STEFOS and ARRIGHI, 1971), ヒトの Y 染色体 (ARRIGHI and HSU, 1971), クマネズミの Y 染色体 (YOSIDA and SAGAI, 1975), 更にバッタの 1 種 *Tettigidea lateralis* の X 染色体 (FONTANA and VICKERY, 1975), バッタの 1 種 *Myrmeleotettix maculatus* の X 染色体 (GALLAGHER *et al.*, 1973) が識別されていることである.

そして第三は, 核型の進化の大きな原因となると考えられている centric fusion, centric fission, dissociation などが動原体を含んで起こるので, これらの経過をたどるには, C-バンド法がかなり有効であるということである (FONTANA and VICKERY, 1975).

そこでまず, ドライアイス法変法と C-バンド法を組合せてみたが, 真正蜘蛛類の染色体上に構成的異質染色質を染め分けることが出来るという結論以上のことは得られなかった.

次に酢酸解離空気乾燥法によるスライドを, C-バンド法をほどこさずに直接ギムザ染色すると, よい染色体像が得られた. これは特に精原細胞分裂中期像にすぐれており, 染色体どうしの重なりあいもほとんどなく, 染色体の輪郭も明瞭であり, また蜘蛛の種を問わずにより標本が得られた. 今後真正蜘蛛類の精原細胞分裂中期に於ける染色体を記載する際には, この方法が最も適していると考えられる.

更に, 酢酸解離空気乾燥法によるスライドに C-バンド法を用いた結果, ヒトやクマネズミの X 染色体などと同様に, 蜘蛛の X 染色体も動原体付近のみしか濃染せず, この C-バンド法により X 染色体を識別しようとする試みは成功しなかった. XO 型 (ササグモ) と XXO 型 (オオヒメグモ) を各 1 種ずつ観察したのみではあるが, おそらく真正蜘蛛類の X 染色体の動原体付近以外の場所に, 構成的異質染色質が多量に存在することはないであろうことが示唆された.

なお、酢酸解離空気乾燥とC-バンド法の組合せによる場合、常により標本を得ることが出来るC-バンド法の完成には至らなかった。この作成過程の完成が真正蜘蛛類の核型進化の研究の当面の課題であるといえよう。

要 約

1. 低張液処理押しつぶし法を真正蜘蛛類の11科17属18種に試みた結果、ほとんどの種で鮮明な染色体像を得ることが出来、この方法は特に精原細胞分裂中期および還元分裂のさまざまな時期の染色体像にすぐれていた。

2. 低張液処理押しつぶし法により、オオヒメグモ *Theridion tepidariorum* 雄の22本の染色体がすべて小さい腕をもった端部動原体染色体であることがわかり、2本のX染色体の一方と考えられる短い染色体が確認出来た。

3. IMAI and KUBOTA の方法および酢酸解離空気乾燥法を原法に改良を加えて使用し、そのうち特に酢酸解離空気乾燥法は精原細胞分裂中期の染色体像にすぐれていた。

4. IMAI and KUBOTA の方法および酢酸解離空気乾燥法に改良を加えた方法によるスライドに、SUMNER の BSG 法を用いた結果、オオヒメグモ、ササグモ *Oxyopes sertatus* の染色体の動原体付近が濃染し、この部分に構成的異質染色質が存在することがわかった。

5. ササグモでは鮮明なC-バンドが得られたが、1本のX染色体を含む21本のすべての染色体の動原体付近のみが濃染し、この部分のみに構成的異質染色質が存在することが示唆された。

6. C-バンド法により性染色体を識別しようとする試みは成功しなかったが、オオヒメグモの染色体の一部には、動原体付近以外の染色体末端が濃染するものがあるようであり、C-バンド法は真正蜘蛛類の核型の進化を考える上で、ある程度有効な方法であることが示唆された。

引 用 文 献

- ARRIGHI, F.E. and T.C. HSU, 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, **10**: 81-86.
- BIANCHI, N.O., B.H. SWEET and J. AYRES, 1971. Heterochromatin in cells derived from *Aedes albopictus* (SKUSE) mosquito tissue culture. *Exptl. Cell Res.*, **69**: 236-239.
- CROZIER, R. H., 1968. An acetic acid dissociation, air-drying technique for insect chromosomes, with aceto-orcein staining. *Stain Techn.*, **43**: 171-173.
- FONTANA, P.G. and V.R. VICKERY, 1975. The B-chromosome system of *Tettigidea lateralis* (SAY). II. *Chromosoma* (Berl.), **50**: 371-391.
- FOREJT, J., 1973. Centromeric heterochromatin polymorphism in the house mouse. *Chromosoma* (Berl.), **43**: 187-201.
- GALLAGHER, A., G. HEWITT and I. GIBSON, 1973. Differential giemsa staining of heterochromatic B-chromosomes in *Myrmeleotettix maculatus* (THUNB.) (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma* (Berl.), **40**: 167-172.
- IMAI, H. T., 1966. The chromosome observation techniques of ants and the chromosomes of Formicinae and Myrmicinae. *Acta Hymenopterol.*, **2**: 119-131.
- IMAI, H.T. and M. KUBOTA, 1972. Karyological studies of Japanese ants (Hymenoptera, Formicidae). III. *Chromosoma* (Berl.), **37**: 193-200.
- LEE, C. L. Y., J. P. WELCH and E. J. T. WINSOR, 1972. Banding patterns in human chromosomes: production by proteolytic enzymes. *J. Hered.*, **63**: 296-297.
- MAKINO, S. and I. NISHIMURA, 1952. Water-pretreatment squash technic. *Stain Techn.*, **27**: 1-7.

- McKENZIE, W.H. and H.A. LUBS, 1973. An analysis of the technical variables in the production of C bands. *Chromosoma* (Berl.), **41**: 175-182.
- MITTAL, O. P., 1967. Karyological studies on the Indian spiders. VII. *Genetica*, **38**: 516-520.
- PARDUE, M.L. and J.G. GALL, 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, **168**: 1356-1358.
- REVELL, S. H., 1947. Controlled X-segregation at meiosis in *Tegenaria*. *Heredity*, **1**: 337-347.
- STEFOS, K. and F.E. ARRICHI, 1971. Heterochromatic nature of W chromosome in birds. *Exptl. Cell Res.*, **68**: 228-231.
- SUMNER, A. T., 1972. A simple technique for demonstrating heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, **75**: 304-306.
- SUZUKI, S., 1954. Cytological studies in spiders. III. *Jour. Sci. Hiroshima Univ.*, Ser. B I, **15**: 23-136.
- TAKAGI, N., 1971. A simple technique to demonstrate the centromeric 'heterochromatin' in the mouse and other animals. *Japan. J. Genetics*, **46**: 361-363.
- WALLACE, L. B., 1900. The accessory chromosome in the spider. *Anat. Anz.*, **18**: 327-329.
- YOSIDA, T.H. and T. SAGAI, 1975. Variation of C-bands in the chromosomes of several subspecies of *Rattus rattus*. *Chromosoma* (Berl.), **50**: 283-300.