Yoshikazu KIMOTO: On the vesiculation of bands in salivary gland chromosomes induced by physiological treatments. I. On the heavy bands of *Chironomus* salivary gland chromosomes. Jap. Jour. Genet. **34** (1959): 55-60

処理による唾腺染色体の胞室化 I

Chironomus の唾腺染色体の heavy band について

木 本 義 一

神戸大学理学部生物学教室

昭和 33 年 11 月 4 日 受領

Résumé

Larvae of various stages (5-13 mm. in body length and before pupation) in *Chironomus dorsalis*, were dealt with, and the vesiculation of heavy bands of salivary gland chromosomes, mainly induced by physiological treatment, was studied with the light and phase contrast microscopes (Tiyoda, BM). The treatments were performed prior to aceto-carmine fixation, as follows: (1) glands were exposed for long time (10-12 minutes) to Ringer's solution; (2) treated with N/5 NaCl in weak acid (acetate buffer solution of pH 5); (3) fixed with aceto-carmine in which N/3 NaCl was involved.

The results were discussed on the following three points, in connection with the vesiculation and the chromosomal organization:

1. The vesiculation occurs in each heavy band (band group) in larvae of all stages studied here. This corresponds with the result gotten by Fujii & Kimoto (1955) that the small vesicular bands (bulb formation?) exist in the youngest salivary gland chromosomes (1-3 mm. larvae). This would indicate that the heavy band (band group) is already organized in the youngest salivary chromosome.

2. In large chromosomes, a vesiculated heavy band gives two images; one is dispersed chromatin granules with sharp strings in ordinary microscopy, and another one is phase negative, irregular shaped vesicle in phase microscopy. These images must be attributed to different structural elements. The latter image is possibly due to the optical change in chromosomal matrix. This indicates that the latter can not be any evidence for the chromosomal disruption.

3. Finally, considering cytological characteristics of both doublet (*Drosophila*) and heavy band (*Chironomus* etc.) i. e., the resistance against stretching, and the ability to vesiculate, it is assumed that they have some common role in chromosomal organization.

唾腺染色体の一部の band は、唾腺におけるなんらかの生理的条件に関係して、Balbiani-ring, bulb, puff, あるいはそれに類する胞室化を起こしているとみなされる (Beermann 1956, Breuer & Pavan 1956, 木本 1958 ら) が、なお残余の band の多くも、処理を加えると胞室化する (藤井・木本 1955)。後者の胞室化に対する検討は、前者の機構を知るのに有意義と思えるが、D'Angelo (1946) の顕微注射による観察以外は、ほとんど進められていないようである。Metz (1935, 1937) は固定処法を変えて胞室化をみているが、彼自身、それを前者に属するものとみなしている。

したがって、著者は前報 (藤井・木本 1955) の一部に、*Drosophila virilis* の唾腺染色体について述べた band を胞室化させるための方法を、唾腺染色体に関する 2, 3 の別な現象に適用してみた。ここには、*Chironomus dorsalis* に関する観察に加えて簡単な知見を述べる。

この発表について指導にあたられた神大、藤井祐一教授、有益な暗示を戴いた京大、中村健

児教授，参考資料を貸与下さった京大，新家浪雄教授，また材料について助言を乞うた西京大，徳永雅明教授に深甚の謝意を表する。

材 料 お よ び 方 法

神戸御影附近の山よりで採集した *Chironomus dorsalis* の，体長 5 mm より 13 mm にわたる幼虫，および成熟幼虫（前蛹）を用いた。

胞室化させるには，前報（藤井・木本 1955）に従い，aceto-carminе smear に先だって唾腺を Ringer 氏液に 10~12 分間 放置したり（通常は，唾腺は解剖の所用時間，約 2 分間 Ringer 氏液にさらされる），弱酸性附近（pH 5 の醋酸緩衝液による）で 0.2 N の食塩を働かせたりする方法，および aceto-carminе に 1 N の食塩を約 1/3 混じて smear する方法を用いた。

位相差鏡検（Tiyoda, BM）の場合は，色素の染りを軽くするため，aceto-carminе 添加後，直ちにそれを 45% 醋酸でおきかえた。

観 察

a) 老成唾腺染色体

普通，*C. dorsalis* の成熟幼虫のもつ老成した唾腺染色体は，接近して並ぶ無数の band からなるように見える（藤井・木本 1955）。しかし染色体が carminе に濃染したり，smear によ

って強く伸ばされたりすると，それらの band の何個かずつが集団（Metz のいわゆる“segment”）をなしているのが観察される。chromatin 粒の埋没部位（すなわち band）の基質は他の部位の染色体基質と異なり，位相差 negative（通常 chromatin 粒や，糸像にはこの光学的性質がない）であるから，この band 群は位相差法によって，それぞれ位相差 negative な幅の広い帯として極めて明瞭にたしかめられ（Fig. 2B, C），なお一部には bulb 様の胞室形成が認められる（Fig. 2B, 下矢印）。Metz が *Sciara* でみている胞室化は，染色体によっては，おびただしく起こっている。しかし，これらは Ringer 氏液に長くつけない（時間不詳）方の材料に見られているので，bulb に類する変北かも知れない。とにかく，*Drosophila* や *Chironomus* の老成染色体においては，処理によって誘起された場合でなければ，かように多くの band が胞室化を起こすことはない。

Fig. 1. A part of the salivary gland chromosomes of *C. dorsalis*, from mature larva. A, the light, and B, the phase contrast (Tiyoda, BM) microscopes. The gland was exposed to Ringer's solution (NaHCO_3 free) for 10 minutes before aceto-carminе fixation (washed with 45% acetic acid).

Drosophila の場合には，処理による doublet 介在部の胞室化が，光学顕微鏡だけによってもはっきりわかった（藤井・木本 1955）。*C. dorsalis* ではそれが困難で，一様に繊細な band が認められるに過ぎないが，位相差法によれば，容易に胞室化が確かめられるようになる（Fig. 1A, B, Fig. 2A）。すなわち，この場合，band (chromatin 粒) は散開してはいるが，胞室像だけから想像せしめられるような“disruption”

Fig. 2. The first chromosome of *C. dorsalis*, from mature larvae. A; vesiculation caused by long (12 minutes) immersion in the Ringer's solution (NaHCO_3 free) before aceto-carmin fixation (45% acetic acid). B and C; prepared by ordinary aceto-carmin (45% acetic acid) method. The upper arrow indicates nucleolus associating chromatin. The lower arrow indicates a bulb. Corresponding band groups are given corresponding letters in these three figures. Phase contrast microscope (BM).

は起こっていない。胞室化によって、band の基質は本来のように光らなくなり、胞室の主に周辺に位相差 negative な性情が残るようになる。

したがって *C. dorsalis* では、普通は老成染色体の band 群の区別のみならず、その胞室化も認めにくいわけで、band 基質の位相差 negative な光学的性情を 把えることによって、それらが容易に判別される。

b) 成熟過程における唾腺染色体

若い染色体では老成染色体と異なり，位相差法にたよらなくても band 群の見分けがつきやすい。また，群をなしてそれに含まれる band の数は成熟幼虫より少ししか認められず，一

Fig. 3. Salivary chromosomes from young larvae. A and B; after dissection in acetate buffer solution (pH 4), gland was smeared with 45% acetic acid, and stained with Toluidin blue-Fuchsin S in the same buffer as above. From a larva of 5.5 mm in length. B, strongly stretched. C; dissected in pH 5 acetate buffer solution and treated with N/5 NaCl, in the same buffer solution before aceto-carmine smear. Band groups are vesiculated. From a larva of 6.5 mm. in length. D; treated with N/3 NaCl in 45 % acetic acid before aceto-carmine smear. Band groups are vesiculated. From a larva of 6 mm. in length.

Fig. 4. The salivary chromosomes of *C. dorsalis*, from a larva of 5 mm. in length. The gland was exposed to Ringer's solution for 10 minutes before aceto-carmine (45 % acetic acid) smear. Phase contrast microscope (BM). IV; the fourth chromosome.

つ一つの群における両端の band のみ目だって見えることが多い。(藤井・木本 1955)。これは外観上，*Drosophila* の doublet に類似しているとも思われる。

処理によって、若い染色体の band 群に胞室化させると、位相差法 (Fig. 4) はもちろん、普通の光学鏡検によってもすぐに認められるような胞室化が起こる (Fig. 3C, D)。また band 群は成熟幼虫と同じく染色体の人為的な伸びに抵抗を示す (Fig. 3 B)。

考 察

前報 (藤井・木本 1955) の一部に、唾腺染色体について、*D. virilis* における doublet の処理による胞室化と、*Chironomus* における成熟過程の変化とを述べた。今、それをも引用して、染色体の organization に関する次の 2, 3 の点にふれる。

1) 唾腺染色体の band 群は、若いものでも老成したものでも (5~13 mm 幼虫および前蛹)、処理によって胞室化する。さらに、螺旋のよく見える時期 (1~3 mm 幼虫) の処理しない染色体にも、小胞状の band (bulb 形成?) がしばしば認められる (前報)。これは初期の唾腺染色体に、すでに band 群構造があることを示している。この点からも、前報に述べたように、初期の螺旋が band 片に切れるという考え (Şengün 1952) には疑いがもたれる。

2) *Chironomus* においては成熟後の胞室化は、位相差法などの方法によらねばわかりにくい。位相差 negative な性質は、胞室化すると、band 群をなすそれぞれの band から消失し、主に胞室の周辺に残る。染色体の破壊を思わせるかような像に反して、普通の光学顕微鏡では、分散した chromatin 粒や糸像がそれと無関係に認められる。これは一般の場合といえども、胞室像が基質の方の変化に左右される可能性の少なくないことを示しており、胞室像から直ちに染色体の "disruption" あるいは "disorganization" を想定する (Metz 1933, Poulson & Metz 1938) のは必ずしも妥当でないことを意味するように思われる。

3) *Drosophila* の doublet と、*Chironomus* や *Sciara* の、heavy band ないし thick band などとよばれる構造との間に考えられる、極めて類似した細胞学的性情の一つは、それらが染色体ののびに対して示す抵抗性であり、これはすでに、Bridges (*D. melanogaster*), Buck (*Chironomus*), Metz (*Sciara*) などにより報告された。今一つは、自然に、あるいは処理によって胞室化することで、すでに Metz (*Sciara*) により、また著者らにより前報 (*D. virilis*) およびここ (*C. dorsalis*) に確かめられた。doublet と heavy band とは、共に、染色体の何か類似した organization を反映するものとして、顧みる必要はあろう。

処理による胞室化は、もちろん、染色体の常態ではない (前報) が、bulb 形成やそれに類する胞室形成の機構の一部と関聯をもつ可能性が考えられるから、なお将来の検討を要する。

摘 要

1) *C. dorsalis* の体長 5~13 mm 幼虫および、成熟幼虫 (前蛹) の唾腺染色体の heavy band (band 群) に、胞室化を誘起させ、固定したものを、光学並びに位相差顕微鏡によって検討した。

2) 処理により若い唾腺染色体の heavy band が胞室化することから考えて、もっと初期に見られる小胞状の band は、すでにその時期に、後期における heavy band に対応する構造が存在することを示すものと思われる。

3) 太い染色体の基質の胞室変化は、位相差法で染色体の disruption を思わせるような像をあらわし、それとは別に、光学鏡検では分散した糸や chromatin 粒がその部分に認められる。これは、胞室像から染色体の破壊を考えることの危険性を示している。

4) 胞室化や人為的な伸びに対する抵抗性から doublet (*Drosophila*) と heavy band とは、何か類似の分化様式をあらわすものでないかと推定される。

引 用 文 献

- Beermann, W. 1956. Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spr. Harb. Sympos. Quant. Biol. **21** : 217-232.
- Breuer, M.E. and Pavan, C. 1956. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma **7** : 371-386.
- Bridges, P.N. 1942. A new map of the salivary gland 2L-chromosome of *Drosophila melanogaster*. Jour. Hered. **33** : 403-408.
- Buck, J.B. 1942. Micromanipulation of salivary gland chromosomes. Jour. Hered. **33** : 1-10.
- D'Angelo, E.G. 1946. Micrururgical studies on *Chironomus* salivary gland chromosomes. Biol. Bull. **90** : 71-87.
- 藤井祐一・木本義一 1955. 唾腺染色体の構造について. 動物学雑誌 **64** : 28-38.
- 木本義一 1958. ユスリカ唾腺染色体の胞室形成について. 染色体 **34-36** : 1225-1231.
- Metz, C.W. 1935. Structure of the salivary gland chromosomes in *Sciara*. Jour. Hered. **26** . 177-188.
- 1937. Defficiencies and structural variations within the giant chromosomes in relation to the problem of gene structure. Proc. Nat. Acad. Sci. **23** : 137-142.
- 1938. Structure of the "puffed" regions in giant salivary gland chromosomes in *Sciara*. Genetics **23** : 159-160.
- and Laurence, E.G. 1937. Studies on the o-rganization of the giant gland chromosomes of Diptera. Quart. Rev. Biol. **12** : 135-151.
- Poulson, D.F. and Metz, C.W. 1938. Studies on the structure of nucleolus-forming regions and related structures in the giant salivary gland chromosomes of Diptera. Jour. Morph. **63** : 363-395.
- Şengün, A. 1952. Über die Zahl der Spiralwindungen, der Blöckchen und der sekundären Querbänder. Cytologia **17** : 1-5.