

Pachytene 期精母細胞の超微構造と免疫電顕的検討

—減数分裂前 S 期の染色体複製とシナプトネマ構造—

奈良県立医科大学第 2 解剖学教室

西野俊彦

IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF RAT PACHYTENE SPERMATOCYTE —CHROMOSOME REPLICATION IN PRE-MEIOTIC INTERPHASE AND SYNAPTONEMAL COMPLEXES—

TOSHIHIKO NISHINO

The Second Department of Anatomy, Nara Medical University

Received January 29, 1994

Abstract: The synaptonemal complexes (SC_s), the unique organelle of the meiotic prophase nucleus, play important roles in the meiosis-specific events of homologous chromosome pairing, genetic recombination, and chromosome disjunction. Recently the SC_s structure has been actively studied using immunohistochemical technique. However, it is still unknown whether nuclear skeleton in premeiotic interphase basically corresponds with SC_s in meiotic prophase in spite of the resemblance of the shapes in these two structures. Therefore, I studied the meiotic prophase nucleus in rat testis after hypotonic treatment under the electron microscopy. Moreover, the male rat was infused continuously with a low dose bromodeoxyuridine (BrdU) from the tail vein, following a modified Counce-Meyer's microspreading procedure and immunogold labeling was performed in this study. The results were as following: (1)The SC_s are composed of at least two different electron dense granules and chromatin fibers. These granules and fibers form a radial loop in lateral or central elements as hitherto assumed. (2)The replication patterns of autosomal chromatin were similar to those of sex chromatin. (3)Chromosome replications had a time lag between cross of SC_s part and near the SC_s part, indicating that SC_s and nuclear skeleton is different structure organelle. These results suggest that continuous infusion of low dose BrdU is useful for DNA replication study.

Index Terms

rat testis, synaptonemal complexes, chromatin radial loop, nuclear skeleton, bromodeoxyuridine (BrdU), chromosome replication

緒 言

減数分裂前期細胞に見られる特徴的な構造物には synaptonemal complexes(SC_s)の存在が知られている。SC_sは減数分裂期の zygotene 期から diplotene 期にか

けて観察され、染色体の軸に沿った連続構造物で、2本の側方要素とその間にある1本の中心要素からなる。SC_sの末端部は attachment plaques で核膜に付着している。減数分裂前 DNA 合成期(S期)に複製された相同染色体は、減数分裂前期に対合を開始して pachytene 期

で対合を完了して特異的な構造を持った SC_s が形成される。SC_s は相同染色体間における対合の安定化、相同的遺伝子組換えや染色体移動の制御に関与していると言われている¹⁾⁻³⁾。

一方、体細胞分裂細胞の中期染色体では核マトリックスの存在が知られており、核 DNA がループ状に核マトリックスに結合しているとされている⁴⁾⁵⁾。さらに、核マトリックスと染色糸との接合部には特殊な塩基配列を持った DNA が存在し、Scaffold-associated region DNA (SAR-DNA) 又は Matrix-associated region DNA (MAR-DNA) と呼ばれている⁶⁾。中期染色体に於て核マトリックスと SAR-DNA が DNA 複製機序に関与していることが示唆されている⁶⁾⁻⁸⁾。

減数分裂前 S 期染色体の DNA 複製は体細胞分裂染色体の DNA 複製と類似しているとされているが、その後の減数分裂前期への移行のメカニズムについては不明な点が多い。その原因として殊に哺乳動物では減数分裂細胞において、扱いの容易な *in vitro* 培養系が確立されていないこと、精母細胞と支持細胞であるセルトリ細胞間では細胞間相互作用を介していること、ホルモンの影響をうけることなどが解析を困難にしており減数分裂細胞での DNA 複製メカニズムや形態学的な研究は少ない。さらに核マトリックスと SC_s との関係についての報告はみられない。

今回著者はラット精巣を材料として低張処理法を用い減数分裂細胞における SC_s と染色体の関係を電顕的に検討した。さらに DNA 合成細胞核に取り込まれるチミジンのアナログである Bromodeoxyuridine (BrdU) を経静脈的に微量持続投与し、減数分裂前 S 期に合成された染色糸を免疫組織化学的に同定することにより染色体複製様式を観察し、核マトリックスと SC_s の関係について考察を行なった。

材料と方法

A. 低張処理法による精母細胞の電顕的検討

(1) 材料

オリエンタル酵母工業(株)の生後 20 日令の雄 Wistar 系ラットを使用した。

(2) 精母細胞粗分画の作製

ラットをエーテル麻酔下に開腹して、精巣を手早く摘出し、白膜を取り去った。以下の行程はすべて氷冷下で行なった。曲精細管を冷 Eagle's MEM (ニッスイ社) 培地中で切り刻んだ。針のついていない 1 ml のシリコン処理した注射器で pipeting し、曲精細管から細胞を単離した。その結果得られた細胞浮遊液を吸い取り静沈した後、

先端部の細胞のかたまりを捨て、きれいな細胞浮遊液をシリコン処理プラスチック試験管に移し精母細胞の粗分画を作成した。

(3) 低張処理法による試料作製

さらに 75 mM の塩化カリウム溶液で 15 分間処理し 10 mM 塩化ナトリウム、4 mM 塩化マグネシウム、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.3) 中に 0.5 % の NP-40 を含む chromosome isolation buffer で 1 時間処理した。さらに 1 mM 塩化マグネシウムと 2 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中に Triton X-100 が 0.1 % となるように調製して低張処理を 10 分間行なった。その後 1 mM 塩化マグネシウムと 2 mM EDTA を含む 10 mM カコジレート緩衝液 (pH 7.6) に 0.04 % の濃度になるようにグルタルアルデヒドを加えた溶液中に 1 晩放置して固定した⁹⁾。

(4) 精母細胞の超薄切片の作成

上述のごとく低張処理を行なった精母細胞を定法に従い、さらに 1 % 四酸化オスミウムあるいは 2.5 % グルタルアルデヒドで後固定をおこない、アルコール上昇系列 (50 %, 70 %, 90 %, 95 % および 100 %) で脱水後、Quetol-812 又は LR-gold に包埋した。ダイヤモンドナイフにて 150 nm の超薄切片をマイクロームで作成し酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による二重染色後に透過型電子顕微鏡 (JEL-1200, 日本電子製) で観察した。

対照として低張処理を行なわない精母細胞の粗分画を用いた。

B. BrdU 微量持続投与による精母細胞の免疫電顕的検討

(1) 材料

30 日令の雄 Wistar 系ラット 6 匹の尾静脈から注射用蒸留水で希釈した BrdU (Sigma Co.) をチュービングポンプ (503 S/R, Watson - Marlow Ltd.) を用いて 8.2 ~ 13.6 $\mu\text{g/g/hr}$ で持続的に 24 時間注入した。対照ラット 1 匹には 0.9 % 生理食塩水を持続的に注入した⁹⁾。

(2) 光顕免疫組織化学法

2 匹のラットを BrdU 投与後各々第 1 週目、第 2 週目そして第 3 週目にエーテル麻酔下で屠殺して精巣を取り出した。対照として用いたラットは第 2 週目に標本を採取した。精巣の一部は 1 % グルタルアルデヒドで 1 時間固定した後、OTC コンパウンド (Miles 社製) に包埋して液体窒素で急速凍結した。クリオスタットで 4 μm に薄切後、APS コートしたスライドガラスに貼付し pH 7.4 の 0.1 M 磷酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、0.07 N 水酸化ナトリウム水溶液で 45 秒間処理した。DAKO 社の SABC キットを用いて、精巣内への BrdU の取り込みを

確認した。一次抗体にはBio Cell社のマウス抗BrdU抗体を用い、基質溶液として0.03%過酸化水素を含む0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)を使用した。後染色としてhematoxylin染色を実施した。対照実験には一次抗体に正常マウス血清を用いた。

(3) Counce-Meyer変法⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾を用いた免疫電顕法

前述のごとく作成したBrdU投与後2週目の精母細胞の粗分画を0.03 M塩化マグネシウム、0.09 M塩化ナトリウムになるように調節した溶液(pH 7.3)中においてのちpH 7.3の蒸留水上に全載展開した。展開した精母細胞をホルムバルの膜とカーボン蒸着で補強したニッケルグリッド(150 mesh)に拾い0.1%~0.05%グルタールアルデヒド、0.06% SDSを含む0.5 mM Borate緩衝液(pH 7.3)で3分間固定、あるいは固定の過程を除いたものを0.4% photoflo溶液でそれぞれ15~30秒間洗浄した。得られた標本を十分に乾燥した後、マウス抗BrdUモノクローナル抗体を用いた金コロイド標識間接法を行なった。即ち、ニッケルグリッドをparafilm(American can Co.)上に滴下したマウス抗BrdUモノクローナル抗体に浮遊させ、室温で1時間反応させた。マウス抗BrdUモノクローナル抗体は、1%牛血清アルブミン(BSA)加PBSにて100倍希釈した。1% BSA-PBSで洗浄した後、1% BSA-PBSで50倍に希釈したAmersham社製10 nm金コロイド標識抗マウスIgG抗体を室温で30分反応させ、最後に酢酸ウラニールによる電子染色を施し、日本電子1200 EX透過型電子顕微鏡で観察した。

またCounce-Meyer変法に用いた細胞浮遊液を1%グルタールアルデヒドで10分間固定、スライドガラス上に滴下し十分乾燥させた後0.07 N水酸化ナトリウム水溶液で45秒間処理した後DAKO社のSABCキットを用いて、精細胞内へのBrdUの取り込みを顕微鏡で確認した。一次抗体には凍結切片試料と同じくBio Cell社のマウス抗BrdU抗体を用い、基質溶液として0.03%過酸化水素を含む0.05% DABを使用した。

成 績

A. 低張処理法による精母細胞の電顕的検討

Fig. 1に低張処理を行なわない精母細胞pachytene期の超薄切片ステレオ像を示す。SC_sは径50 nmの二本の側方要素(Fig. 1のLE部)と径20 nmの中心要素(Fig. 2のCE部)から構成されているのが観察された。側方要素には20 nmの分節状構造がみられ、ここから径15~20 nmのクロマチン線維が延びているが、クロマチン線維とSC_sとの接合部は不明瞭であった。これに対し

てFig. 2に示すように低張処理によって、SC_sから20 nmの等間隔で放射状に延びるクロマチン線維が明らかになった。さらに低張処理でクロマチン線維は径10 nmのビーズ状のクロマチンにまで広げられていた。

次に性染色体の低張処理像を示す(Fig. 3)。性染色体はX染色体とY染色体からなり、常染色体と異なる構造を示し非対称であった。SC_sの対合はside by sideあるいはend to endと様々で、非対合部分では中心要素を持たない像であった。性染色体のSC_sは常染色体と同様に側方要素(core axis)から放射状にクロマチン線維が延び、強拡大像ではクロマチン線維は側方要素内で折れかえるループ構造をとっていた(Fig. 3b, ○印)。また側方要素内に電子密度の高い直径20 nmの顆粒が認められた(Fig. 3a 矢頭)。さらに前述の顆粒とは異なる電子密度を示す直径20~25 nmの顆粒もみられた(Fig. 3b 矢印)。常染色体においても2種類の顆粒がSC_s内に観察された。

B. BrdU持続投与による精母細胞の免疫電顕的検討

BrdU投与群と対照群では体重と精巣の重量には差がなく、BrdU投与による成長障害はみられなかった。Fig. 4にBrdU投与後第1週目から3週目までの1%グルタールアルデヒド固定凍結切片の光顕免疫染色像を示す。第1週目ではBrdUの取り込みは精祖細胞にみられ、第2週目には精母細胞、第3週目には精子細胞にみられ、減数分裂前S期にBrdUを取り込んだ細胞が周期性をもって分化していることが確認された。生理食塩水を投与した対照ラットでは精細胞内にBrdUの染色はみられなかった。さらにBrdU投与後2週間のCounce-Meyer変法時に得られた細胞浮遊液をスライドガラス上に展開した精細胞の光顕免疫染色像では精母細胞の核にびまん性にBrdUの沈着が見られた(Fig. 5)。したがってPachytene期精母細胞のクロマチン線維とSC_sの関係を観察するためにBrdU投与後第2週目のラットを用いてCounce-Meyer変法で免疫電顕を行なった。

Counce-Meyer変法によるPachytene期精母細胞の電顕像を示す(Fig. 6)。常染色体のSC_sでは低張処理切片像と同じく側方要素とそれから放射状に延びるクロマチン線維が観察された。クロマチン線維の太さは10 nmであり、低張処理切片像と同じくビーズ状のクロマチンに広げられていた。常染色体のSC_s部の免疫電顕像(Fig. 7)ではその染色過程でSC_sから延びるクロマチン線維は多少不明瞭になっているが、金粒子の分布はSC_s内部とSC_s周辺部の電子密度の高い部分に特異的に存在し、クロマチン線維に沿ってBrdUが取り込まれていた。さらに側方要素の終末部では根棒状のAttachment plaqueが観察された(Fig. 7のAP部)。BrdU持続投与で常染

色体と性染色体の大部分の SC_sが SC_sとその周辺部に金粒子のびまん性の分布を示したが、写真 8 の矢印に示すように SC_sから 500 nm 離れた領域に金粒子を認めない SC_sも観察された (Fig. 8)。

また、同一 Pachytene 期減数分裂細胞での性染色体への BrdU の取り込みは常染色体と同様にびまん性であり、性染色体と常染色体では DNA 複製時期に違いはみられなかった (Fig. 9 a, b, c)。

考 察

減数分裂前期にみられる SC_sは遺伝子組換え時に相同染色体を安定に対合させるものであり、減数分裂にとって極めて重要なものである。近年精母細胞からの SC_sの単離が試みられており、ポリクロナール抗体やモノクロナール抗体が作成されている¹²⁾⁻¹⁵⁾。

Heyting ら¹⁵⁾はラット精母細胞から SC_sを単離して SC_sを抗原とする数種類のモノクロナール抗体を作成した。その中の II 52 F 10 モノクロナール抗体を用いた免疫電顕法により 30 KD, 33 KD の蛋白質は zygotene 期から diplotene 期までの SC_s側方要素に存在することを明らかにしている¹⁵⁾。さらにこの蛋白は減数分裂細胞にのみ認められ、zygotene 期に新たに合成される事が示唆されている¹⁵⁾。今回の低張処理法を用いた切片像では径 20-25 nm と径 20 nm の電子密度の異なる 2 種類の顆粒が SC_s側方要素内にみられ (Fig. 3 a, b)、少なくとも 2 種類の顆粒が SC_sを構成していることが示唆された。一部のクロマチン線維は側方要素内で折れかえるループ構造を示し、SC_sから放射状に延びていることが観察された (Fig. 3 b)。Coleman ら¹⁶⁾は核酸と親和性のある三塩化インデウムを用いることにより DNA も SC_sの構成成分の一部であることを示唆しており本研究はこの報告を裏づけるものと考えられる。

SC_sに形態学上類似する構造物として近年、体細胞分裂細胞の中期染色体にみられる核マトリックスの存在が挙げられる。中期染色体は核マトリックスに結合して多数のループ状の構造を形成している¹⁷⁾。この核マトリックスとゲノム DNA の結合部には特定の DNA 領域が関与しており、DNA 複製は SAR 又は MAR を中心としてレプリコン単位に進むとされている⁴⁾⁻⁶⁾¹⁸⁾。形態学上類似している SC_sと核マトリックスとの関係を、チミジンのアナログである BrdU を用いて観察した。つまり、DNA 複製期に細胞核内に取り込まれた BrdU を pachytene 期精母細胞で免疫電顕法を用いて確認した。減数分裂細胞の細胞周期に関する研究では近年、チミジンのアナログである BrdU による報告が多く行なわれて

いる⁹⁾¹⁹⁾⁻²⁵⁾。しかしこれまでの報告では標識物質としては DAB を用いており、クロマチン線維と SC_sの関係をみるには不十分であった。本研究では標識物質として金粒子を用いており、両者の関係を一層明らかにしたものと考える。

減数分裂細胞における減数分裂前 DNA 複製は常染色体での DNA 複製と異なり、所要時間が約 24 時間と長く、しかも周囲の細胞と同調して進行することが特徴的である²⁶⁾。BrdU は細胞周期の S 期にある細胞に取り込まれ、DNA の合成や複製の材料として用いられる。精母細胞において染色体の形態を BrdU を用いて行なう場合、精細胞の減数分裂前 S 期に BrdU を取り込ませた後に精母細胞を観察することが必要になる。ところが精祖細胞から精子細胞までの *in vitro* 培養系が確立しておらず、*in vivo* で実験を行なわなければならない。ラットでの精祖細胞から精母細胞までの所要期間についての報告は現在までみられないが凍結切片 (Fig. 4) およびスライド展開標本 (Fig. 5) から pachytene 期精母細胞に BrdU が高率に取り込まれているので、その所要期間は約 2 週間と思われる。

さらに BrdU 投与方法としては、腹腔内投与、錠剤の皮下移植あるいは静脈投与などの方法が用いられているが、細胞周期を厳密に検討する際には BrdU 微量を持続的に投与することが必要といわれている⁹⁾。今回の方法で用いた BrdU 24 時間の尾静脈からの微量持続投与では BrdU の血中濃度が微量でかつ一定に保たれることにより、S 期にある殆どの細胞に障害を与えることなく BrdU を取り込ませることができたと考えられる。

予備実験として行なった低張処理による固定、包埋標本の切片像では BrdU を取り込んだ細胞の同定は困難であった。これは BrdU が固定、包埋等の操作過程で不活性化されたためと考えられた。従って本研究では従来から行なわれている全載展開法を改良して BrdU の同定を行なった。

大部分の pachytene 期精母細胞の SC_sでは、BrdU の取り込みはびまん性に SC_sの周辺部のクロマチン線維上にみられた (Fig. 7)。しかし一部の SC_sでは SC_sから 500 nm 離れた領域に BrdU の取り込みがみられず、BrdU の染色様式に違いが観察された (Fig. 8)、これは染色体複製が SC_s隣接部では周期的にずれを生じていることを示す現象と思われる。一般に前減数分裂細胞における DNA 複製様式は、体細胞分裂細胞の DNA 複製様式に相当すると考えられている²⁷⁾。一方、減数分裂細胞における DNA 複製は減数分裂前 S 期でほとんどが複製を完了するがごく一部の DNA は減数分裂期まで複製が遅

れ、複製完了後もニックやギャップが pachytene 期まで残っていることが知られている²⁸⁾²⁹⁾。今回の観察では写真7に示すように、BrdUを標識した金粒子がSC_s近傍に存在しないものが認められ、その逆にSC_s近傍だけに限られたものは観察できなかった。従って、今回の成績は、DNA複製開始時にはSC_sは存在しないのではあるが、後にSC_sが出現する部位からDNA複製が開始するものではないことを免疫電顕法を用いて明らかにしたものと云えよう。さらに、SC_sを構成する蛋白が減数分裂前期のzygotene期からdiplotene期で特異的に見られること¹⁵⁾。S期でのDNA複製は核マトリックスから開始される⁶⁾という報告があり、核マトリックスとSC_sとは異なるものであると考えられる。

さらにFig. 9に示すように同一細胞で常染色体と性染色体の間では複製時期の違いはみられなかった。オスの減数分裂細胞ではXクロマチンは不活性化されていると考えられている³⁰⁾が、性染色体の複製時期については多数の報告³¹⁾³²⁾があり、統一した見解は得られていない。最近、Bielenskaら²⁵⁾の報告によれば常染色体と性染色体の真正クロマチンの複製はS期前期に同時期に始まるとしている。今回のわれわれの研究では常染色体と性染色体ではBrdUの取り込みはびまん性に見られその染色様式の違いは見られず、Bielenskaら²⁵⁾の報告を支持するものと考えられた。

結 語

今回の観察によって以下の事が明らかになった。

1. 低張処理法による pachytene 期染色体では、側方要素から延びるクロマチン線維はループ構造を形成しており、その接合部の間隔はほぼ同じであった。さらにクロマチン線維はSC_s側方要素に入り込み、SC_s構成成分の一部であることが切片像と BrdU を用いた免疫染色像で明らかになった。
2. SC_sの側方要素を構成していると思われる直径20~25 nmと20 nmの電子密度の異なる2種類の顆粒がみられた。
3. BrdUの持続的微量投与によって精母細胞にBrdUの取り込みが認められた。全載展開法とイムノゴールド法を併用することで、SC_s隣接部の減数分裂前S期におけるDNA複製時期は周辺部より遅れていることが明らかになった。従って減数分裂前期に出現するSC_sと減数分裂前S期に出現する核マトリックスとは異なるものであることが示唆された。
4. 性染色体と常染色体ではDNA複製時期の違いはみられなかった。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なるご指導、御校閲を賜った恩師山本浩司教授に心より感謝いたしますとともに、御助言、御校閲を賜った第1解剖学教室高楠彰教授、第1内科学教室土肥和紘教授に深謝いたします。また本研究を御援助下さった東京女子医科大学第2解剖学教室神田尚俊講師、本学第2解剖学教室坪 功子講師ならびに教職員各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第67回解剖学会近畿地方会(1991年12月、大阪)、第25回日本臨床電子顕微鏡学会総会(1993年9月、松本)において発表した。

文 献

- 1) Moses, M. J.: The relationship between the axial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a salamander (*Plethodon cinereus*). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 633, 1958.
- 2) Gillies, C. B.: The synaptonemal complex in higher plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2: 81, 1984.
- 3) von Wettstein, D., Rasmussen, S. W. and Holm, P. B.: The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18: 331, 1984.
- 4) Berrios, M., Osherooff, N. and Osherooff, N.: *In situ* localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4142, 1985.
- 5) Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. S. and Liu, L. F.: Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 100: 1706, 1985.
- 6) Cook, P. R.: The nucleoskeleton and the topology of replication. *Cell* 66: 627, 1992.
- 7) Rattner, J. B.: Integrating chromosome structure with function. *Chromosoma* 101: 259, 1992.
- 8) Opstelten, R. J. G., Clement, J. M. E. and Wanka, F.: Direct repeats at nuclear matrix-associated DNA regions and their putative control function in the replicating eukaryotic genome. *Chromosoma* 98: 422, 1989.
- 9) Kanda, N. and Kato, H.: Analysis of crossing over in mouse meiotic cells by BrdU labelling technique. *Chromosoma* 78: 113, 1980.

- 10) 堀口元生：ラット精母細胞核のSC核型分析。奈医誌。37：358, 1986.
- 11) Counce, S. J. and Meyer, G. F. : Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in locusta spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. *Chromosoma* 44 : 231, 1973.
- 12) De Martino, C., Capanna, E., Nicotra, M. R. and Natali, P. G. : Immunochemical localization of contractile proteins in mammalian meiotic chromosomes. *Cell Tissue Res.* 213 : 159, 1980.
- 13) Dresser, M. E. : The synaptonemal complex and meiosis: an immunocytochemical approach. *in* Meiosis (Moens, P. B., ed). Academic Press, New York, p245, 1987.
- 14) Heyting, C., Dietrich, A. J. J., Redeker, E. J. W. and Vink, A. C. G. : Structure and composition of synaptonemal complexes, isolated from rat spermatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 36 : 307, 1985.
- 15) Heyting, C., Moens, P. B., van Raamsdonk, W., Dietrich, A. J. J., Vink, A. C. G. and Redeker, E. J. W. : Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat. *Eur. J. Cell Biol.* 43 : 148, 1987.
- 16) Coleman, J. R. and Moses, M. J. : DNA and the fine structure of synaptic chromosomes in the domestic rooster (*Gallus domesticus*). *J. Cell Biol.* 23 : 63, 1964.
- 17) Marsden, M. P. F. and Laemmli, U. K. : Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17 : 849, 1979.
- 18) Jackson, D. A. : The organization of replication centres in higher eukaryotes. *Bio Essays* 12 : 87, 1990.
- 19) Speit, G. and Vogel, W. : Detection of bromodeoxyuridine incorporation in mammalian chromosomes by a bromodeoxyuridine antibody. II. Demonstration of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 94 : 103, 1986.
- 20) Latos-Bielenska, A., Hameister, H. and Vogel, W. : Detection of BrdU incorporation in mammalian chromosomes by a BrdU antibody. III. Demonstration of replication patterns in highly resolved chromosomes. *Hum. Genet.* 76 : 293, 1987.
- 21) Vogel, W., Autenrieth, M. and Speit, G. : Detection of bromodeoxyuridine incorporation in mammalian chromosomes by a bromodeoxyuridine antibody. I. Demonstration of replication patterns. *Hum. Genet.* 72 : 129, 1986.
- 22) Vogel, W., Austenrieth, M. and Mehnert, K. : Analysis of chromosome replication by a BrdU antibody technique. *Chromosoma* 98 : 335, 1989.
- 23) Vogel, W., Mehnert, K. and Pents, S. : Demonstration of chromosome replication by BrdU antibody technique and electron microscopy. *Hum. Genet.* 84 : 237, 1990.
- 24) Latos-Bielenska, A., Trautmann, T. and Vogel, W. : Visualization of DNA in pachytene by monoclonal antibodies against BrdU reveals synaptonemal complex-like structures. *Cytogenet. Cell Genet.* 54 : 24, 1990.
- 25) Latos-Bielenska, A. and Vogel, W. : Demonstration of replication patterns in the last premeiotic S-phase of male Chinese hamsters after BrdU pulse labeling. *Chromosoma* 101 : 279, 1992.
- 26) Holm, P. B. : The premeiotic DNA replication of chromosome pairing during the zygotene stage of meiosis in *Lilium longiflorum* (Thunb.). *Carlsberg Research Communications* 42 : 510, 1985.
- 27) Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carri, M. T. and Marilley, M. : A relationship between replication size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature* 298 : 100, 1982.
- 28) Hotta, Y., Ito, M. and Stern, H. : Synthesis of DNA during meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 56 : 1184, 1966.
- 29) Hotta, Y. and Stern, H. : Analysis of DNA synthesis during meiotic prophase in *Lilium*. *J. Molecular Biol.* 55 : 337, 1971.
- 30) Monesi, V. : Differential rate of ribonucleic acid synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse. *Chromosoma* 17 : 11, 1965.
- 31) Odartchenko, N. and Pavillard, M. : Late DNA replication in male mouse meiotic chromosomes. *Science* 167 : 1133, 1970.
- 32) Allen, J. W. : BrdU-dye characterization of late

replication and meiotic recombination in Ar- 189, 1979.
menian hamster germ cells. Chromosoma 74:

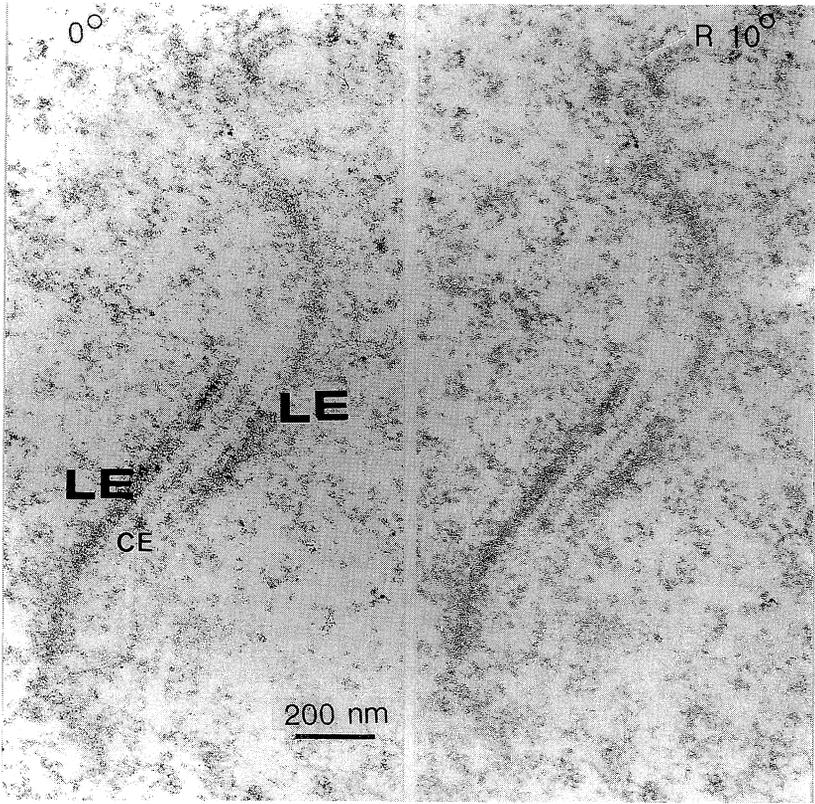


Fig. 1. Stereo picture of rat pachytene spermatocyte under the thin sectioned electron microscopy. A pair of lateral elements (LE) and one central element (CE) composed synaptonemal complexes. The chromatin fibers are not clear. Stained on Uranyl acetate and Pb. X 50,000

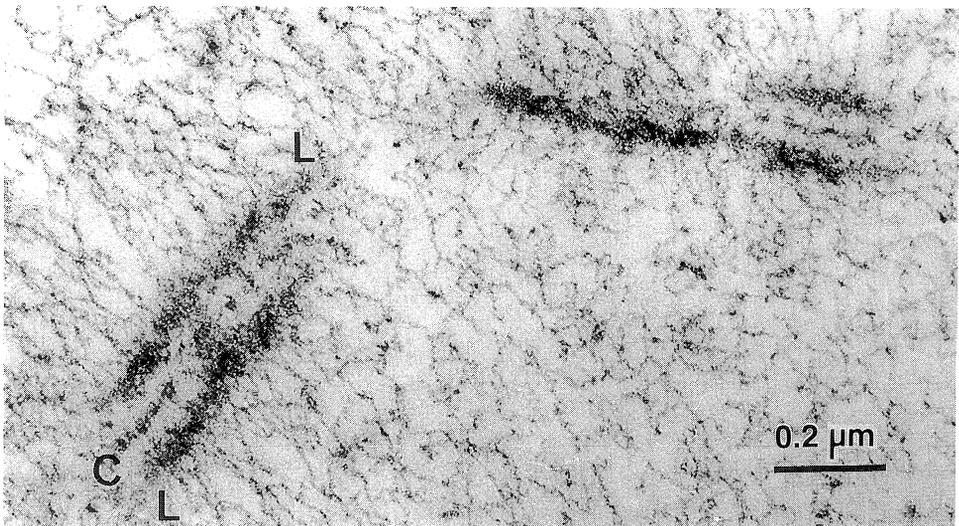


Fig. 2. Ultrathin section of rat pachytene spermatocyte prepared by a hypotonic treatment. The same structure as Fig. 1, lateral element (L) and central element (C), are observed. A series of chromatin-loops, which stretch radial from the lateral element, are clearly seen. X 72,000

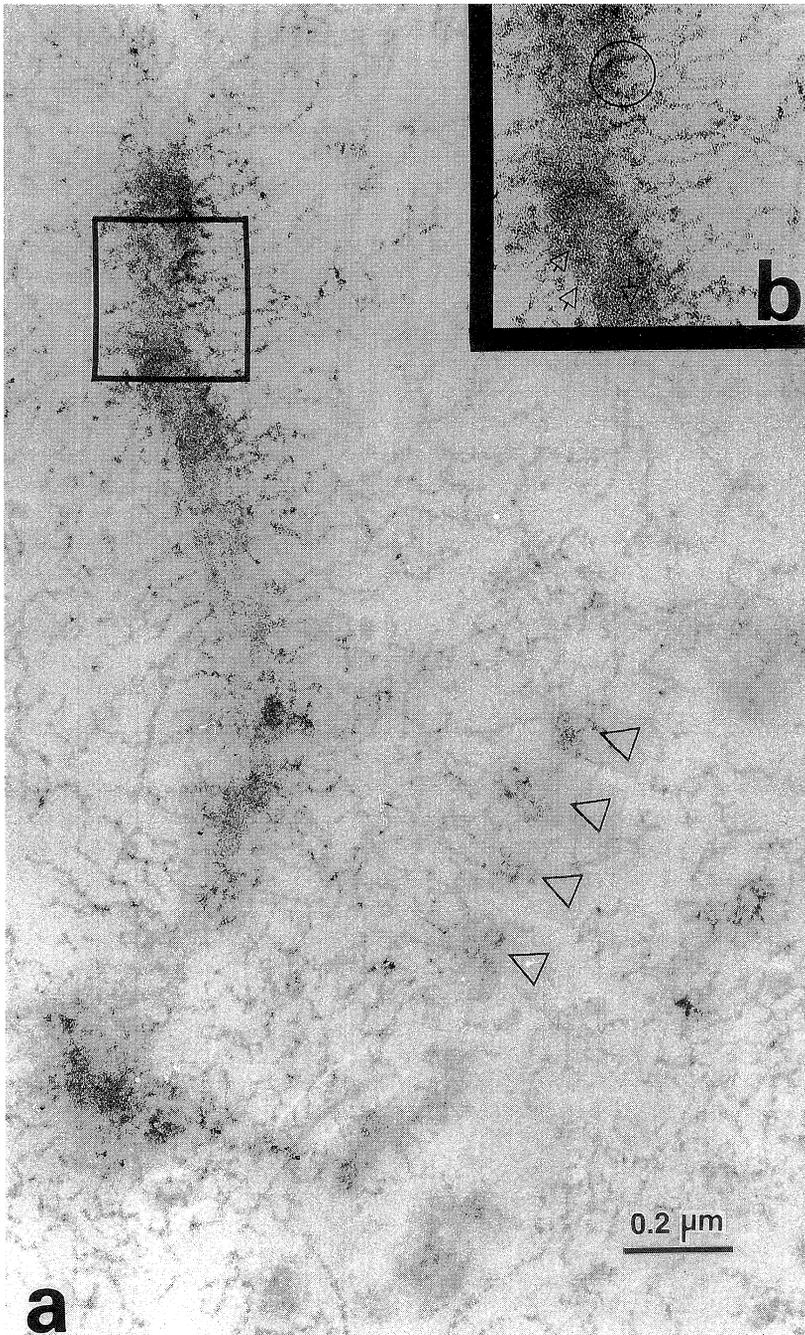


Fig. 3a. Electron micrograph of rat pachytene spermatocyte treated with hypotonic solution. X 80,000

Fig. 3b. Area within the rectangle, at higher magnification of Fig 3a, shows the chromatin fibers creep into the X axis and make up a radial loop. X 100,000
The heterogeneous X axis is composed of at least two differential electron dense granules (open arrows and open arrowheads).

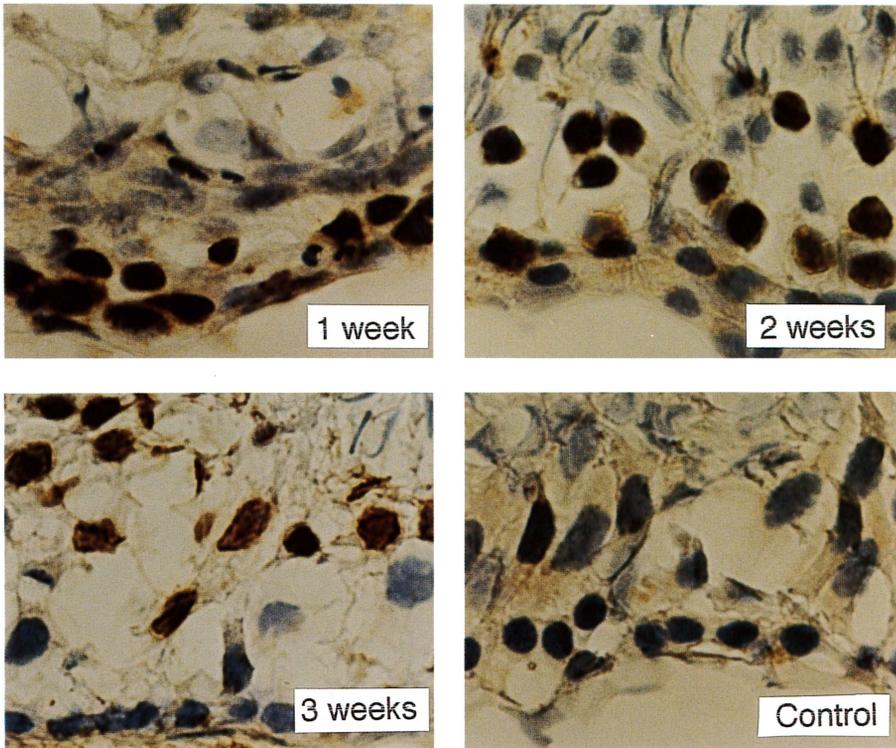


Fig. 4. Immunohistochemical findings of rat testis treated with anti-BrdU monoclonal antibody. Positive staining is found in spermatogonia at 1 week after injection of BrdU. The primary spermatocytes are reacted at 2 weeks, while the spermatids are reacted with anti-BrdU at 3 weeks. The control rat, injected with sodium chloride solution, shows no positive reaction. X 160

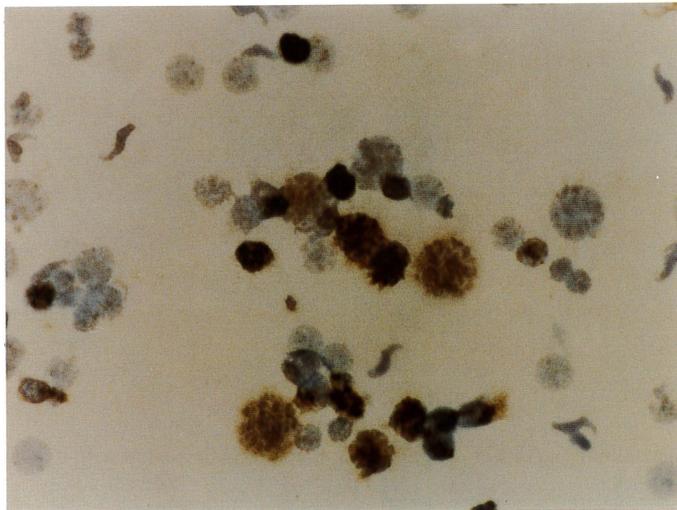


Fig. 5. Immunohistochemical staining of spermatocyte nucleus, at 2 weeks after injection of BrdU, prepared by a modified Counce-Meyer's spreading. The primary spermatocytes, largest nucleus, show diffuse stainings. In some of them, dot-like staining pattern is observed. X 320

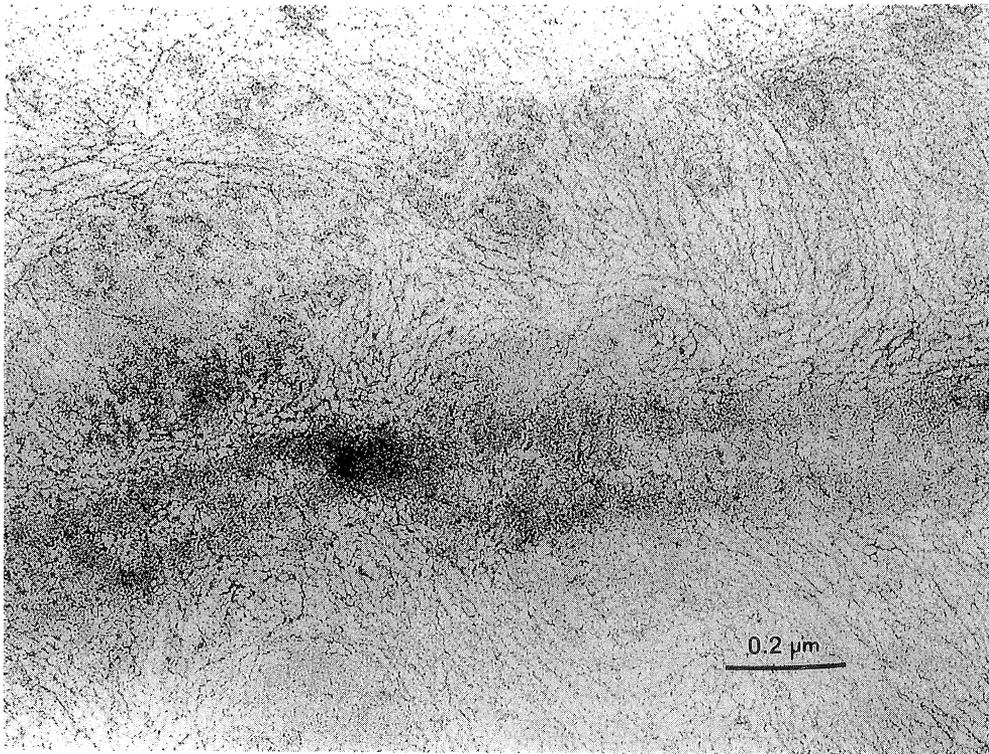


Fig. 6. Electron micrograph of pachytene spermatocyte, at 2 weeks after injection of BrdU, prepared by a modified Counce Meyer's spreading. Chromatin fibers and synaptonemal complexes are seen similar to Fig. 2. X 80,000

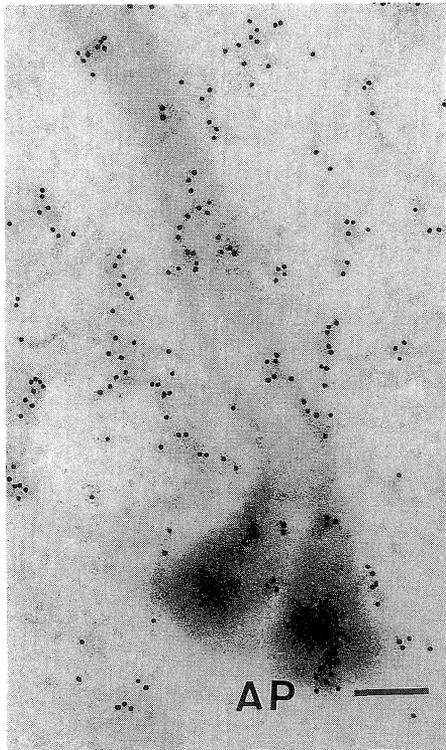


Fig. 7. Show the typical findings of immunogold staining of pachytene spermatocyte with anti-BrdU monoclonal antibody. The chromatin fibers which incorporate BrdU are observed around and within the synaptonemal complexes. Attachment plaque (AP) is observed in the end of the lateral element. Bar=200 nm X 50,000

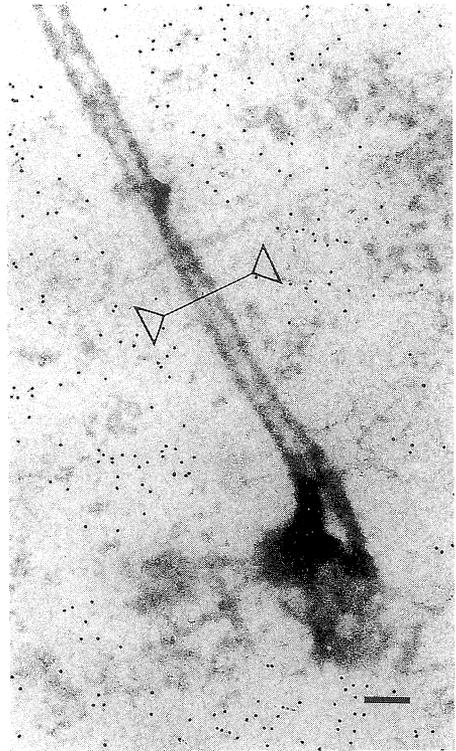


Fig. 8. Immunogold labeling of pachytene spermatocyte at 2 weeks after injection of BrdU. The staining pattern is different from Fig. 7. The gold particles are not detected within 500 nm from the synaptonemal complexes (arrows). Bar=200 nm X 32,000

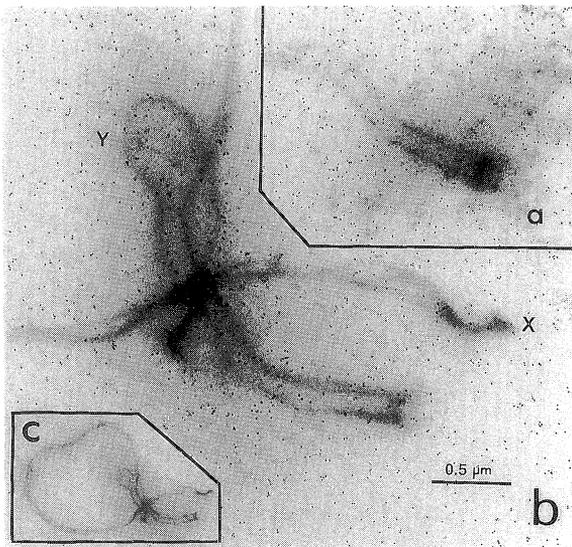


Fig. 9. Immunogold staining of the autosomal chromatin (Fig. 9a, X 20,000) and XY pair (Fig. 9c, X 4,500) in the same pachytene spermatocyte at 2 weeks after injection of BrdU. Fig. 9b shows the high magnification of Fig 9c (X 20,000). The immunogold labeling pattern of the XY chromatin (Fig. 9b) is similar to that of the autosomal chromatin (Fig. 9a).