

スギ科樹木の染色体の微細加工と加工断片の回収

九州東海大学農学部 中村 未樹・長野 克也・戸田 義宏
 農水省生物資源研究所 神杉 泰子・酒井富久美・西口 正通
 農水省北陸農業試験場 福井 希一

1. はじめに

筆者らは、これまでにスギ変異体の核型分析を行い、スギの表現形質と染色体との関係について調査研究を行ってきた。その結果、スギ変異体の中から数種類の染色体の数的変異個体および形態的変異個体^{3,4)}を見いだした。さらに Ag-1 分染を行い、検出された染色体の形態的変異個体がいずれも核小体形成部位 (NOR) の変異であることを明らかにした⁵⁾。

NOR は rRNA の遺伝子 (rDNA) が直列に重複したものであることが核小体の DNA と rRNA との分子交雑によって既に明らかにされている⁶⁾。したがってクローニングした rDNA を染色体 DNA と分子交雑させることで rRNA 遺伝子の染色体上での座位を確認することができる⁶⁾。

そこで、rRNA 遺伝子座位における Ag-1 分染で得られる NOR 活性の有無 (rRNA の前駆体あるいはリボゾームタンパク質の活性) を明らかにすることを目的とし、今回はまず、rDNA のダイレクトクローニングを行うためレーザー光を用いてセコイアオスギ (*Sequoiadendron giganteum* Lindl.) 染色体を微細加工し、NOR 領域の切り出しとその加工断片の回収を試みた結果について報告する。

2. 材料および方法

供試材料のセコイアオスギは、1987年に種苗会社より種子を購入したものである。染色体の観察および微細加工には種子根の成長点分裂組織を用いた。

(1) 染色体標本の作成

根端の前処理および固定は、通常の核型分析法に従った⁷⁾。酵素解離法 (2% セルラーゼ (オノヅカ RS), 0.3% ベクトリアーゼ (Y-23), 1.5% マセロザイム R200, pH4.2, 38°C, 60分) を用いて根端組織を解離した後、35mm φ のプラスチックシャーレ底面に張り付けたポリエステル膜の上に染色体標本を作成し、風

乾した⁸⁾。その後2%ギムザ水溶液で15分間染色を行い染色体の微細加工用の標本とした。

(2) 染色体の微細加工および加工断片の回収

染色体の微細加工および加工断片の回収は、既にオオムギ染色体を用いて開発された方法⁹⁾に従ったが、概要は以下の通りである。

染色体切断用のレーザー照射システムにはセルワークステーション ACAS470 (米国メリディアン社) を用いた。染色体の微細加工を行った後、加工断片をポリエステル膜ごとに切断し、実体顕微鏡下でピンセットを用いて直接 1.5ml マイクロチューブに回収した。

3. 結果及び考察

核型分析の結果、体細胞染色体数は $2n = 22$ であり、染色体の形態は K 染色体 (10 番目) 1 対が Kopfchen (nipple form) の短腕、連結糸および付随体を有するスギ科樹木に特徴的な形態を示す NOR 染色体であった他はすべて中部動原体型染色体であった (図-1)。

レーザー光による染色体の微細加工では、図-2 に示したように NOR 領域のみを切り出し、他の染色体領域を切断焼却した。

図-3 (a~f) は、ギムザ染色を行ったセコイアオスギの体細胞染色体から1つの NOR 領域のみ (図-2) を切り出す過程を示したものである。a は微細加工を施す前の体細胞染色体 ($2n = 22$) であり、b~e は目的以外の染色体領域を順次切断焼却した過程を示した。f はポリエステルの膜自体を切断し、加工断片を回収する過程を示しており、染色体断片はこの膜ごとピンセットで回収した。

今後は切り出した染色体断片を鋳型として PCR 法を実施し、rRNA 遺伝子を増幅すると同時にビオチンで直接標識し、これをプローブとした FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法を用い染色体上での rRNA 遺伝子の座位を決定し、その部位における NOR 活性との関係を明らかにしていきたい。

引用文献

- (1) 福井希一ほか：植物細胞工学, 3, 399~404, 1991
- (2) FUKUI, Kほか：Theor Appl Genet, 84, 787~791, 1992
- (3) 中村未樹ほか：100回日林論, 537~538, 1989
- (4) ——ほか：九州東海大学農学部紀要, 9, 1~8, 1990

- (5) ——ほか：九州東海大学農学部紀要, 10, 67~74, 1991
- (6) ——ほか：日林九支研論, 45, 31~32, 1992
- (7) PARDUE, M. L. and J. G. GALL : Science, 168, 1356~1358, 1970
- (8) 内宮博文, 田仲司昌, 杉浦昌弘編著：植物細胞工学マニュアル, 164~168, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1984

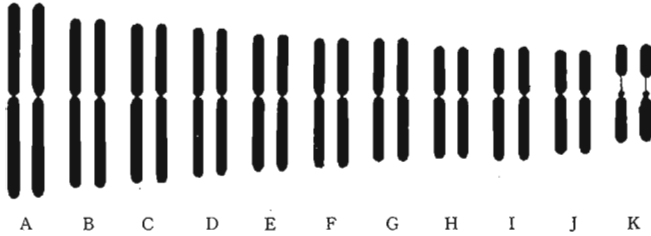


図-1 セコイアオスギ (2n = 22) の核型模式図

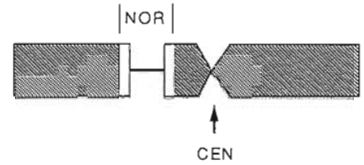


図-2 K染色体のレーザー加工模式図
 NOR : 核小体形成部位
 CEN : 動原体
 : 切除される染色体領域

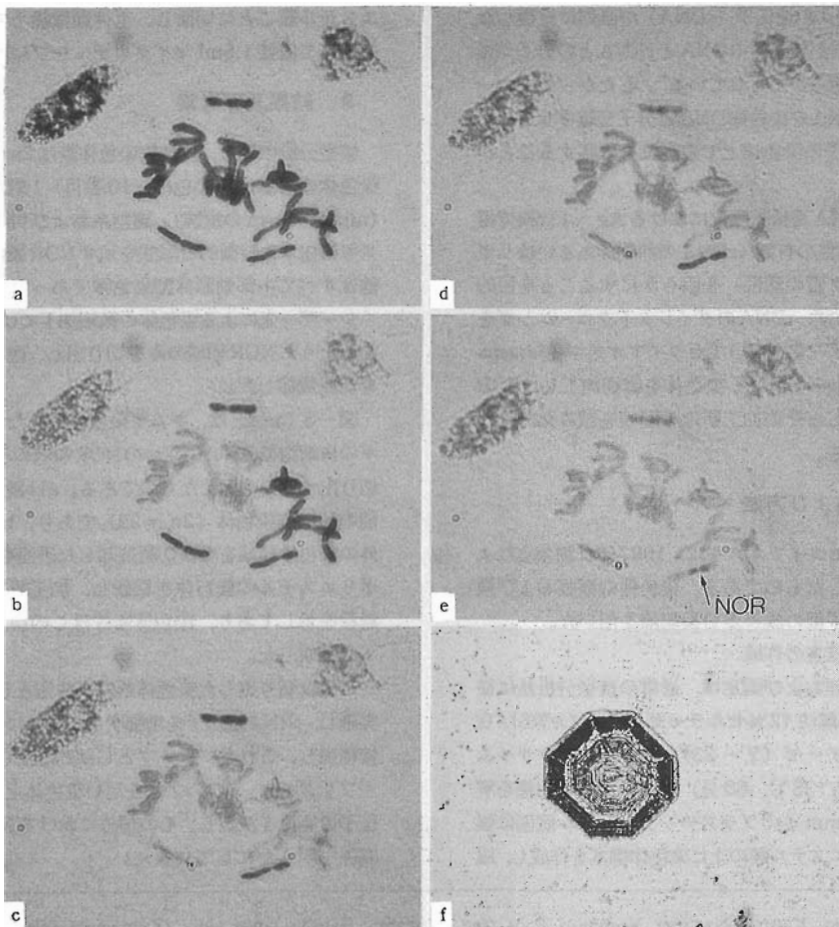


図-3 セコイアオスギ染色体 NOR 領域の切り出し
 a : 原染色体像 b~e : NOR 領域の切り出し
 f : クッキーカッター法で八角形に切り抜かれたポリエステル膜 (直径約2mm)