

FISH法を用いた5SrDNAのスギ科樹木染色体上での検出

農水省北陸農業試験場 中村 未樹
 九州東海大学農学部 長野 克也・戸田 義宏
 農水省生物資源研究所 野宮 朝・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、前報⁶⁾においてレーザー光による染色体の微細加工技術を用いたセコイアオスギのNOR (Nucleolar organizing region) 領域の切り出しとその染色体断片の回収方法について報告した。今回は、切りだした染色体断片および核を用いてPCR (Polymerase chain reaction) 法によりダイレクトクローニングおよびダイレクトラベリングを行い、プローブを作製した。さらに、そのプローブを用いてセコイアオスギおよびスギの染色体標本との蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を行った。また、セコイアオスギの核から増幅した5SrDNAについても同様に染色体上での座位の検出を試みたので報告する。

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り、スギ (アヤスギ) は大分県林業試験場より提供して頂いた個体を挿し木により育成し、すでに染色体の核型分析を行った個体である⁴⁾。染色体標本の作製等実験には種子根および根端の成長点分裂細胞を用いた。

(1) rDNAのダイレクロクローニングおよびダイレクトラベリング^{1,7)}

回収した染色体断片および核を Proteinase K (1mg/ml) で55℃, 3時間の処理を行った後、95℃, 10分間の処理により Proteinase Kを失活させた。染色体断片および核を含む Proteinase K水溶液を鋳型として標準PCR法によりrDNAのクローニングを行った。さらに得られたPCR産物を鋳型として、dTTPの70%を Biotin-16-dUTPで置換し2回目のPCRを実施することにより直接rDNAの増幅およびビオチン標識を行った。得られたPCR産物をエタノール沈殿により精製し、FISHのプローブとした。

(2) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法^{2,7)}

染色体の標本は、従来の方法³⁾で前処理、固定を行った後、酵素解離法により作製した。

① 染色体標本をRNase A (3mg/ml) で処理した後、2×SSCで洗浄し、エタノール (70%, 95%, 99%) で脱水し乾燥した。

② ハイブリダイゼーション溶液 (ビオチン化プローブ, ホルムアミド, 2×SSC) を調整し、85~95℃で10分間熱変性させた後、直ちに水中で冷却した。

③ ①の染色体標本に②のハイブリダイゼーション溶液を加え、カバーガラスをかけ、ペーパーボンドで封入したものをサーマルサイクラーを用いて70℃で6分間の熱変性を行った後、37℃で10~12時間のハイブリダイゼーションを行った。

④ カバーガラスを剥離し、40℃の2×SSCで3回、4×SSCで1回それぞれ10分間づつ洗浄した後、5% BSAを含むBT緩衝液でブロッキングを行った。

⑤ 1% BSAを含む4×SSCで調整したAvidin-FITCを加え、パラフィルムをかけ、湿気のある密封箱に入れ、37℃で1時間の処理を行った。

⑥ パラフィルムを剥離し、40℃のBT緩衝液で10分間づつ3回洗浄した後、5%ヤギ血清を含むBT緩衝液でブロッキングを行った。

⑦ 蛍光シグナルを増幅するために2% Bio-Avidinを加え、⑤と同様の処理を行った。

⑧ パラフィルムを剥離し、40℃のBT緩衝液で5分間づつ3回洗浄した後、④で使用したブロッキング溶液でブロッキングを行った。

⑨ 2% Extra-Avidin-FITCを加え、⑤と同様の処理を行った。

⑩ パラフィルムを剥離し、40℃のBT緩衝液で2回、2×SSCで1回それぞれ10分間づつ洗浄した後、PI (6.25 μg/μl) で対比染色した。

⑪ 蛍光顕微鏡下で染色体を観察した後、画像解析装置を用いて染色体の解析を行った。

Miki NAKAMURA (Hokuriku Natl. Agr. Exp. Stn., Niigata 943-01), Katsuya NAGANO, Yoshihiro TODA (Kyushu Tokai Univ., Kumamoto 869-14), Asa NOMIYA, Masamichi NISHIGUCHI (NIAR, Ibaragi 305), Kiichi FUKUI (Hokuriku Natl. Agr. Exp. Stn., Niigata 943-01)

Detection of 5SrDNA in TAXODIACEAE Chromosomes by FISH

3. 結果および考察

染色体断片から増幅した 45SrDNA をプローブとして、セコイアオスギおよびスギの染色体標本と FISH を行った結果、中期染色体、間期核にそれぞれ2個ずつの蛍光シグナルが観察され、さらにその蛍光シグナルはいずれもスギ科樹木の特徴的な形態の染色体、すなわち付随体を有する染色体の連結糸部分 (NOR) であった (図-1a, b, c, d)。このことから、レーザー光による染色体の微細加工により目的とする DNA がクローニングされたことが明らかとなった。同時に染色体上での rRNA 遺伝子の座位が明らかとなり、これまで銀染色法 (Ag-I 法) により報告されている^{5,6)} NOR の位置および数、核小体数と一致していることが証明された。また、セコイアオスギの核からクローニングした 5SrDNA をプローブとしてスギの染色体標本と FISH を行った結果、NOR 染色体上に 45SrDNA とほぼ同じ部位に蛍光シグナルが検出された (図-1-e にはマルチカラー FISH の結果を示した)。

これまで他の数種の植物においては一般的に 45SrDNA と 5SrDNA は独立して染色体上に存在していることが報告されており、スギの rDNA が構造的に

あるいは分子進化的に他の植物種とは異なっている可能性が示唆された。

以上のように今回はまず、反復数の大きい rDNA を対象として染色体上での座位の検討を行った。今後は、RFLP 等で既に明らかとなっている遺伝子についても FISH 法等を応用し、染色体上での正確な座位を決定することで、スギ染色体の定量的な地図作成も可能であると考えられる。

引用文献

- (1) FUKUI, K.ほか: Genome, 37, 1, 105~111, 1944
- (2) FUKUI, K.ほか: Theor. Appl. Genet, 87, 8, 893~899, 1994
- (3) 中村末樹ほか: 九州東海大学農学部紀要, 9, 1~8, 1990
- (4) ——— ほか: 九州東海大学農学部紀要, 10, 67~74, 1991
- (5) ——— ほか: 日林九支研論, 45, 31~32, 1992
- (6) ——— ほか: 日林九支研論, 47, 93~94, 1994
- (7) Nakamura, M., Fukui, K.: 印刷中
- (8) 戸田義宏ほか: 101 回日林論, 495~496, 1990

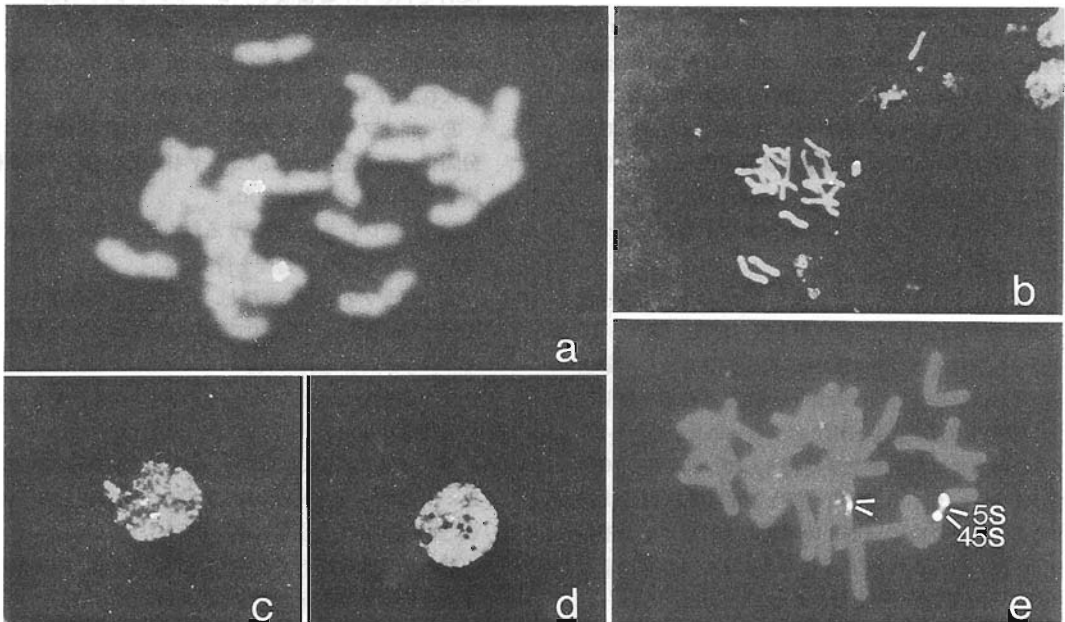


図-1 セコイアオスギ, スギの蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

a; セコイアオスギ中期染色体像(×120)

d; スギ間期核

b; スギの中期染色体像(×40)

e; スギ中期染色体像(×100), マルチカラー FISH

c; セコイアオスギ間期核