

ユリ科ササユリとヒメサユリの雑種におけるジェノミック in situ ハイブリダイゼーション

| | |
|----------|--|
| 著者 | 宮本 句子 |
| 雑誌名 | 鹿児島大学理学部紀要=Reports of the Faculty of Science, Kagoshima University |
| 巻 | 30 |
| ページ | 85-88 |
| 別言語のタイトル | The genomic in situ hybridization (GISH) in a hybrid between <i>Lilium japonicum</i> Thunb. And <i>L. rubellum</i> Baker, Liliaceae. |
| URL | http://hdl.handle.net/10232/00010007 |

ユリ科ササユリとヒメサユリの雑種におけるジェノミック *in situ* ハイブリダイゼーション

宮本 旬子

(Received September 10, 1997)

The genomic *in situ* hybridization (GISH) in a hybrid between *Lilium japonicum* Thunb. and *L. rubellum* Baker, Liliaceae.

Junko MIYAMOTO

Keywords : genomic *in situ* hybridization, GISH, *Lilium japonicum*, *Lilium rubellum*, hybrid

Abstract

Chromosomes of a hybrid between *Lilium japonicum* Thunb. and *L. rubellum* Baker, Liliaceae, were analysed by the genomic *in situ* hybridization (GISH). The chromosomes of the hybrid were prepared by enzymatic maceration. The total genomic DNA of the parental species was extracted and used as probes. The non-labelled DNA of *L. rubellum* was hybridized, then, the labeled DNA of *L. japonicum* was hybridized on the chromosomes of the hybrid. As a result, the somatic chromosome number of the hybrid was $2n=24$. Twelve of a set of chromosomes were stained brightly and showed strong FITC signals. The others stained darkly. In conclusion, the somatic chromosomes consisted of twelve chromosomes which originated from *L. japonicum* and twelve from *L. rubellum*.

緒 言

In situ ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法によって、標識した DNA 断片等のプローブをこれと相補的に結合する組織や染色体標本上の DNA に分子雑種形成させ、目的とする遺伝子等の組織や染色体上での位置を顕微鏡下で検出することができる。近年、細胞中の全ジェノミック DNA をプローブとする方法はジェノミック *in situ* ハイブリダイゼーション (Genomic *in situ* hybridization, GISH) 法と呼ばれ、植物の雑種染色体の由来の解析や染色体構造変異の検出に用いられてきた。例えば、Le *et al.* (1989) はコムギとライムギの雑種における転座の検出を行い、Leitch *et al.* (1990) はイネ科の異質倍数体内の異なるゲノム

を識別した。Mukai and Gill (1991), Mukai *et al.* (1993) は全 DNA や特定の反復配列をプローブとしてコムギ等のゲノム組成の分析を行った。両親間のゲノムの相同性が高い個体もしくは系統間の雑種では、標識した一方の親の全 DNA がすべての染色体 DNA に結合するため由来別の識別は困難であるが、標識した一方の親の全 DNA と標識しないもう一方の親の全 DNA を 1:2 から 1:100 の割合で混合しプローブとすることでゲノム間の相違を識別することができる場合がある (Mukai 1997)。本研究ではユリ科ユリ属 *Lilium japonicum* ($2n=24$) と *L. rubellum* ($2n=24$) の種間雑種において、まず標識しない一方の親の全 DNA を染色体 DNA に対して短時間分子雑種形成させ、その後これと同量のもう一方の親の全 DNA を標識して分子雑種形成させ、雑種

個体の染色体の由来別の識別を試みた。

材料と方法

ユリ科ササユリ *L. japonicum* Thunb. 栽培品, 新潟県産ヒメサユリ (オトメユリ) *L. rubellum* Baker, およびこの2種を人為的に交雑した雑種第1代各1個体を材料とした。材料の葉から抽出した標識していないヒメサユリ *L. rubellum* の全DNAとビオチン標識したササユリ *L. japonicum* の全DNAを順に雑種個体の染色体標本に分子雑種形成させ, 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (Fukui 1994, 宮本 1996) を改変して以下のように検出を行った。

(1) ササユリ *L. japonicum* とヒメサユリ *L. rubellum* の新鮮な葉0.5gを凍結磨砕し, 2% CTAB[CH₃(CH₂)₁₅N(CH₃)₃]Br/100mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone を加え65°C30分保温した。

(2) Chloroform : Isoamylalcohol (24 : 1) を混和し12000rpmで15分間遠心分離した。

(3) 液層に10%CTAB/0.7M NaCl を加え, Chloroform : Isoamylalcohol (24 : 1) を混和し, 12000rpmで15分間遠心分離した。

(4) 上層に1% CTAB/50mM Tris-HCl (pH8.0) 10mM EDTA を加え, 20°C60分静置後8000rpmで10分間遠心分離した。

(5) 沈殿に TE バッファーを加えた後, 冷 Ethanol により DNA を沈殿させ乾燥後滅菌水に溶解した。

(6) RNase 処理を行った後, 再度冷 Ethanol 処理により沈殿させ, 0.1mg/mlになるように乾燥後滅菌水に溶解した。

(7) Hexanucleotide-primer と Klenow 断片を用いたランダムプライマー法による標識試薬類 (DNA Labelling Kit, Nippongene, Japan) を用いて, ササユリ *L. japonicum* の全DNAに biotin-11-dCTP を取り込ませ標識した。

(8) ヒメサユリ *L. rubellum* およびササユリ *L. japonicum* のDNAがそれぞれ10ng/mlの濃度になるように別々に50% Folmamide の2xSSC溶液に溶解した。

(9) 90°Cで10分間熱変性し, 氷冷してハイブリダイゼーション用プローブ溶液とした。

(10) 分裂組織を含む長さ3mmの根端を15°Cの0.1% Colchicine 溶液中で6時間前処理した後, 蒸留水に数分間浸潤した。

(11) 4°CのAcetic acid-Ethanol (1 : 3) 中で12時間以

上固定した。

(12) 20°Cの70% Ethanol と蒸留水に各10分間浸潤した。

(13) 4% Cellulase Onozuka RS (Yakult, Japan), 1% Pectolyase (Seishin Pharmaceutical Co., Japan), 0.3% Macerozyme R-200 (Yakult, Japan) 混合溶液を用いて38°Cにおいて1時間解離した。

(14) 洗浄後, Acetic acid-Methanol (1 : 3) を滴下しながら分裂組織をスライドガラス上に展開した。

(15) -20°Cの冷凍庫内に保存し, 使用時には解凍後, 70°Cで2時間乾熱処理を行った。

(16) 染色体が付着したスライドガラスに100mg/ml RNase 溶液を滴下し, 37°Cで1時間保温した。

(17) 2XSSC で洗浄後, 67°Cの70% Folmamide 溶液, -20°Cの70% Ethanol, -20°Cの95% Ethanol, -20°Cの99% Ethanol に順次5分間ずつ浸潤した後, 風乾した。

(18) (17) の染色体標本に(8)で熱変性した標識していないヒメサユリ *L. rubellum* のDNAを含むハイブリダイゼーション用プローブ溶液を滴下し, 37°Cで30分間保温した。

(19) 2XSSC で5分間洗浄後, (7)で標識し(8)で熱変性したササユリ *L. japonicum* のDNAを含むハイブリダイゼーション用プローブ溶液を滴下しカバーガラスをかけてシールした。

(20) 70°Cで2分加熱後, 37°Cで18時間保温し分子雑種形成させた。

(21) カバーガラスを取り, 37°Cにおいて2xSSC, 50% Folmamide, 2xSSC, 4xSSC 中で10分ずつ順次洗浄した。

(22) 5% Bovine Serum Albumin を含むBT (0.05% Polyoxiethylenesorbitan monolaurate を含む100mM 炭酸水素ナトリウム NaHCO₃) 溶液を滴下して37°Cで5分間保温した。

(23) 20mg/ml Avidin-FITC (Boehringer Mannheim, USA) 溶液を滴下し, 37°Cの湿室内において1時間保温した。

(24) 37°CのBT溶液中で30分間洗浄した。

(25) 5% Goat Serum-BT 溶液を滴下し, 37°Cで5分間保温した。

(26) 1mg/ml Biotinilated Anti-Avidin D (Vector Laboratories, USA) を滴下し37°Cの湿室内において1時間保温した。

(27) 37°CのBT溶液中で30分間洗浄した。5% Bovine Serum Albumin-BT 溶液を滴下し, 37°Cで5分間保温した。

(28) 5mg/ml Fluorescein Avidin DCS (Vector Lab-

oratories, USA) を滴下し37°Cの湿室内において1時間保温した。

(29) 37°CのBT 溶液中で30分間洗浄した後, 2xSSC 中に浸潤した。

(30) 1, 4-diazabicyclo [2.2.2] octane を含む蛍光退色防止剤 Slow Fade TM-Light Antifade Kit (Molecular Probes Inc., USA) を添加した0.1mg/ml Propidium Iodide の Glycerol 溶液を滴下し, カバーガラスをかけて封入した。

(31) G励起フィルターを装着した蛍光顕微鏡 (Optiphoto, Nikon) にて観察し, 高感度フィルム (Kodak, T-MAX, ASA1600) を用いて撮影した。

(32) 染色体画像をパーソナルコンピュータ Macintosh Quadra 840 AV (Apple, USA) に取り込み, ソフトウェア Image を用いて染色体の輪郭を抽出した。各染色体について白黒256階調の明暗の程度を調べた。

結果と考察

日本産のササユリ *L. japonicum* の染色体数は $2n=24$ または36, ヒメサユリ *L. rubellum* 染色体数は $2n=24$ である (Ogihara, R. 1975, Roy et al. 1988)。ササユリ *L. japonicum* の DNA を標識プローブとする雑種の体細胞染色体における GISH の結果を示した。体細胞染色体は $2n=24$ で, そのうち12本は黄緑色の強蛍光を示し他の12本は弱蛍光を発した。白黒写真では前者が白く, 後者が灰色を呈した (図1)。これをパーソナルコンピュータに取り込みソフトウェア Image を用いて染色体の輪郭を抽出した。画像を白黒256階調で表示し各染色体の明暗の程度を調べた。白を1, 黒を256とすると, 各々の画素について23以上61以下の範囲の値を示す染色体と168-193の範囲の値を示す染色体があった。前者を白 (白ヌキ), 後者を黒で表示させたところ, 白い染色体が12本と黒い染色体が12本になった (図2)。

方法の(18)において標識していないヒメサユリ *L. rubellum* の全 DNA を雑種個体の染色体標本にまず分子雑種形成させた。ヒメサユリ *L. rubellum* の DNA 断片は雑種個体の染色体のうち, ササユリ *L. japonicum* 由来の染色体の DNA より相同性が高いと考えられるヒメサユリ *L. rubellum* 由来の染色体の DNA により強く結合したと考えられる。方法の(7)ではササユリ *L. japonicum* の全 DNA を Biotin-11-dCTP を用いて標識した。これを(19)において雑種個体の染色体標本に接触させ, (20)での熱変性によって DNA を1本鎖にした後, 18時間保温して分子雑種形成を行った。この時, 標識した

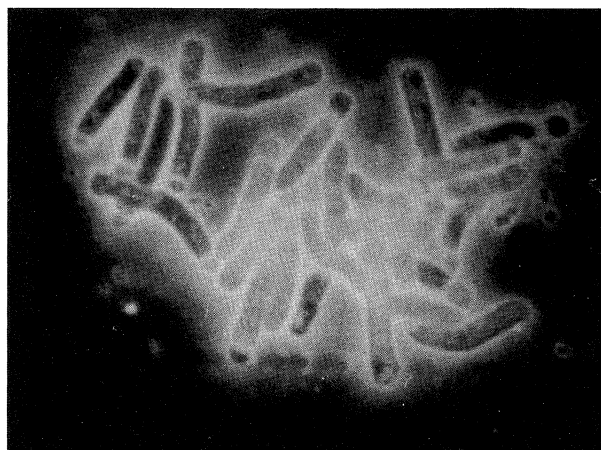


図1: ササユリ *L. japonicum* x ヒメサユリ *L. rubellum* 雑種 ($2n=24$) の染色体に対して, 無標識のヒメサユリ *L. rubellum* の DNA と標識したササユリ *L. japonicum* の DNA 断片を順に分子雑種形成させた。スケールは10 μ m。

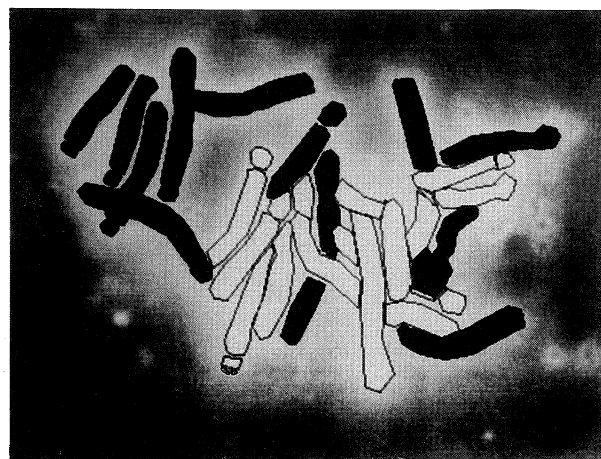


図2: 図1の画像を解析し, 強蛍光を示した染色体を白 (白ヌキ), 弱蛍光を示した染色体を黒で表示した。白で表示した染色体はササユリ *L. japonicum*, 黒で表示した染色体はヒメサユリ *L. rubellum* 由来と考えられる。

ササユリ *L. japonicum* の DNA 断片はササユリ *L. japonicum* 由来の染色体の DNA より強く結合したと考えられる。ササユリ *L. japonicum* とヒメサユリ *L. rubellum* に共通しているかあるいは極めて相同性が高い遺伝子配列が存在した場合は, ササユリ *L. japonicum* 由来の染色体の DNA に無標識のヒメサユリ *L. rubellum* の DNA が, ヒメサユリ *L. rubellum* 由来の染色体の DNA にササユリ *L. japonicum* の DNA が結合する可能性がある。しかし全体としてはプローブ自身とより相同性の高い染色体部位に結合するプローブ DNA が多い。(23)において Avidin に蛍光色素 FITC を結合した Avidin を Biotin と結合させることで Biotin を取り込んだプローブ DNA の存在を蛍光顕微鏡下で可視化することができるが, (26)(28)において抗 Avidin 抗体を用いて蛍光シグナルを強化し, 蛍光の強弱のコントラ

ストを高めた。結果として染色体によって FITC の蛍光強度に差が現れた。これは染色体によって 2 種の DNA 断片の雑種染色体への結合に量的な差があることを意味する。以上から強蛍光を発した 12 本の染色体はササユリ *L. japonicum* 由来、弱蛍光を発した 12 本の染色体はヒメサユリ *L. rubellum* 由来であると結論した。

謝 辞

本研究を行なうに当たり、*in situ* ハイブリダイゼーション法に関しては農林水産省北陸農業試験場福井希一博士、近江戸伸子博士、愛媛大学日詰雅博博士、大阪教育大学向井康比己博士、および北海道大学宍戸理恵子氏に有益な御助言を賜わった。また DNA プローブの調整に関しては鹿児島大学東四郎博士、阿部美紀子博士および内海俊樹博士に御協力戴いた。

本研究は平成 6 年度文部省科学研究費補助金（奨励研究 (A) 「ユリ科キヌガサソウ 8 倍体種の染色体組成の解析」(課題番号：06740645) による研究成果の一部を含む。

文 献

- Fukui, K., Ohmido, N., and Khusu, G. S. 1994. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 87 : 893-899.
- Le, H. T., Armstrong, K. C., and Miki, B. 1989. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7 : 150-158.
- Leitch, A. R., Mosgoller, W., Schwarzacher, T., Bennett, M. D., and Heslop-Harrison, J. S. 1990. Genomic hybridization to sections of nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J. Cell. Sci.* 95 : 335-341
- 宮本旬子. ユリ科ツクバネソウ染色体上のリボゾーム遺伝子の位置の検出 (The detection of the rDNA locus on chromosomes of *Paris tetrphylla* A. Gray, Liliaceae). 鹿児島大学理学部紀要 (地学・生物学) 29 : 177-183.
- Mukai, Y. 1997. *In situ* hybridization. *In Plant Chromosomes : Laboratory methods* (eds. Fukui, K. & Nakayama, S.), pp. 155-170, CRC Press, FL. USA.
- Mukai, Y. and Gill, B. S. 1991. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome* 34 : 448-452.
- Mukai, Y., Nakahara, Y., and Yamamoto, M. 1993. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 36 : 489-494.
- Ogihara, R. 1975. Karyotype of *Lilium japonicum* Thunb. from Miyazaki prefecture in Japan. *Kromosomo* 100 : 3136-3141.
- Roy, S. C., Ghosh, S., and Chattejee, A. 1988. A cytological survey of eastern Himalayan plants, II. *Cell Chromosome Res.* 11 : 93-97.
- Sen, S. 1978. Intraspecific differentiation in Karyotype in *Lilium*. *Cytologia* 43 : 305-315.