

ユリ科ツクバネソウ染色体上のリボソーム遺伝子の位置の検出

著者	宮本 旬子
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要. 地学・生物学
巻	29
ページ	177-183
別言語のタイトル	The Detection of the rDNA locus on Chromosomes of <i>Paris tetraphylla</i> A. Glay, Liliaceae
URL	http://hdl.handle.net/10232/00000488

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

宮本 旬子

(1996年9月10日受理)

The Detection of the rDNA locus on Chromosomes of
Paris tetraphylla A. Gray, Liliaceae

Junko MIYAMOTO

Abstract

The 5.8S+25S ribosomal RNA gene (rDNA) locus on the chromosomes of *Paris tetraphylla* A. Gray (Liliaceae) was detected by the fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The somatic chromosome number of *P. tetraphylla* is 10. The basic chromosome number is 5. A set of chromosomes of a haploid genome consists of three metacentric chromosomes, a submetacentric chromosome and an acrocentric chromosome. The signals of the 5.8S+25S rDNA locus appeared at the satellite of the acrocentric chromosome of each genome. The satellite of the acrocentric chromosomes of *P. tetraphylla* showed DAPI-banding positive, C-banding positive, and N-banding positive. The DAPI-positive region includes A-T rich repeated sequences. The C-positive region is constitutive heterochromatin. The N-positive region is a nucleolar organizing region (NOR). In conclusion, the 5.8S+25S rDNA locus is on the A-T rich constitutive heterochromatic regions near the NOR on the acrocentric chromosomes of *P. tetraphylla*.

Key words: 5.8S+25S rDNA, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), nucleolar organizing region (NOR), *Paris tetraphylla*

緒 言

ツクバネソウ *P. tetraphylla* は北海道南西部・本州・四国・九州の主に山地帯落葉広葉樹林内と奥尻島・モネロン島・屋久島に生育する多年生草本である。染色体数は通常 $2n=10$, 基本数 $x=5$ で 2 倍体 ($2x$) である。体細胞染色体は 3 対の中部動原体型染色体, 1 対の次中部動原体型染色体, および二次狭窄を持つ 1 対の端部動原体型染色体から構成されている (Gotoh 1933, Haga 1934, Hara 1969, Kayano 1961, Kurabayashi 1952, Stow 1935, Suzuki and Yoshimura 1986)。Kurabayashi (1952), Noda (1963) は本種を用いて低温処理あるいは前処理後の染色による分染を試み, 次中部動原体型染色体および端部動原体型染色体にバンドが現れることを報告した。Miyamoto and Kurita (1990), Miyamoto *et al.* (1991), Miyamoto *et al.* (1992) は, 構成的異質染色質 (constitutive heterochromatin) を選択的に濃染する C バンド分染法によるバンドパターンとその変異の解析をおこなった。その結果, 次中部動原体型染色体の短腕末端, 端部動原体型染色体の二次狭窄部の両側および長腕介在部に大型の C バンド濃染部が現れることが明らかになった。また蛍光色素である 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた染色を試みたところ, 次中部動原体型染色体の短腕末端には DAPI 陽性の強蛍光部と DAPI 陰性の弱蛍光部の両方が存在し, 端部動原体型染色体の二次狭窄部の両側および長腕介在部には弱蛍光部が存在していることが明らかになった (宮本・栗田, 1994)。Uchino and Wang (1996) は低温処理分染と C バンド分染の結果を比較した。

近年, 染色体上での遺伝子の位置を検出する方法として, *in situ* ハイブリダイゼーション法が広く用いられるようになった。この方法は, スライドガラス上に展開された染色体 DNA に対して標識した特定の DNA 断片を DNA の相補性を利用して分子雑種形成させ, 顕微鏡下でその位置を検出するものである。既知の DNA 断片をプローブとし *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなえば, 異質染色質部位の遺伝子レベルの異同を検証することができる。本研究ではツクバネソウ *P. tetraphylla* の中間期核および分裂期染色体に対して広義の反復配列の一つであり異なる分類群間でも塩基配列の相同性が極めて高いと言われるリボゾーム RNA の遺伝子の一部をプローブとする蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) を試みた。

材料と方法

鹿児島県産のツクバネソウ *P. tetraphylla* 1 個体から採取した根端の体細胞分裂組織を実験材料として用いた。またプローブとしてはソラマメ *Vicia faba* L. の 5.8 S+25 S リボゾーム RNA の遺伝子 (5.8 S+25 S rDNA) を含む 3.8 kb の DNA 断片 (Kato *et al.* 1990) を用いた。実験方法は Fukui *et al.* 1994 の方法を改変して次のようにおこなった。

- (1) 5.8S+25S rDNA を含む 3.8 kb の DNA 断片を, ランダムなヘキサヌクレオチドプライマーと Klenow 断片を用いた標識キット (ニッポンジーン社, DNA Labelling Kit) を使って Biotin-11-dUTP を取り込ませ, 標識した。
- (2) 50% Formamide の 2 xSSC 溶液に標識した DNA が 10 ng/ml の濃度になるように溶解した。
- (3) 90℃で 10 分間加熱処理することにより標識した DNA を熱変性し, 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。
- (4) 分裂組織を含む長さ 5 mm 前後の根端を 15℃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。
- (5) 根端を4℃の酢酸エタノール (Acetic acid : Ethanol = 1 : 3) 中で12時間固定した後、蒸留水に数分間浸潤した。
 - (6) 根端を4% Cellulase と 1% Pectolyase 混合溶液を用いて38℃において90分分解離した後、蒸留水に数分間浸潤した。
 - (7) 酢酸メタノール (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後、凍結保存した。
 - (8) 解凍後、70℃のドライオープン内で60分間乾熱処理をおこなった。
 - (9) 核や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、スライドウォーマー (Fisher 社, Slide Warmer) 上で37℃で60分間保温した。
 - (10) 2XSSC, 70% Ethanol, 95% Ethanol, 99% Ethanol で満たした染色瓶に室温で順次5分ずつ浸潤した。
 - (11) 次に67℃の70% Formamide 溶液, -20℃の70% Ethanol, -20℃の95% Ethanol, -20℃の99% Ethanol に順次5分ずつ浸潤した後、風乾した。
 - (12) このスライドガラスに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、37℃で15時間インキュベートした。
 - (13) カバーガラスを取り、37℃において 2 xSSC, 50% Formamide, 2 xSSC, 4 xSSC 中で10分ずつ順次洗浄した。
 - (14) 5% Bovine Serum Albumin を含む BT (0.05% Polyoxiethylenesorbitan monolaurate を含む 100 mM 炭酸水素ナトリウム NaHCO₃) 溶液を滴下して37℃で5分間保温した。
 - (15) 20mg/ml Avidin-FITC (Boehringer Mannheim 社) 溶液を滴下し、37℃の湿室内において60分間保温した。
 - (16) 37℃の BT 溶液中で30分間洗浄した。
 - (17) 5% Goat Serum-BT 溶液を滴下し、37℃で5分間保温した。
 - (18) 1mg/ml Biotinylated Anti-Avidin D (Vector 社) を滴下し37℃の湿室内において60分間保温した。
 - (19) 37℃の BT 溶液中で30分間洗浄した。
 - (20) 5% Bovine Serum Albumin-BT 溶液を滴下し、37℃で5分間保温した。
 - (21) 5mg/ml Fluorescein Avidin DCS (Vector 社) を滴下し37℃の湿室内において60分間保温した。
 - (22) 37℃の BT 溶液中で30分間洗浄した後、2 xSSC 中に浸潤した。
 - (23) 1,4-Diazabicyclo [2. 2. 2] octane を含む蛍光退色防止剤 (Molecular Probes 社, Slow Fade TM-Light Antifade Kit) 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。
 - (24) G 励起および B 励起光フィルターを装着した蛍光顕微鏡 (Optiphot, Nikon) にて観察し、高感度白黒フィルム (Kodak 社, T-MAX, ASA 1600) を用いて撮影した。

結果と考察

本研究に用いたツクバネソウ *P. tetraphylla* の体細胞染色体数は $2n=10$ であった。体細胞中期染色体は大型の中部動原体型染色体、中型の中部動原体型染色体、次中部動原体型染色体、

二次狭窄を有し付随体（サテライト）を持つ端部動原体型染色体，および小型の中部動原体型染色体各 1 対ずつの計 5 対 10 本の染色体から構成されていた。相同染色体 5 対からなるので，基本数 $x = 5$ の 2 倍体であった。ソラマメ由来の 5.8S および 25S rDNA を含む DNA 断片をプローブとする FISH をおこなったところ，中間期核には 1 対 2 個の FITC シグナル（白矢印）が現れた（図 1）。また前中期から中期の染色体の核板においては，1 対の端部動原体型染色体の二次狭窄近傍に 1 箇所ずつ合計 2 個の FITC シグナル（白矢印）が現れた（図 2）。

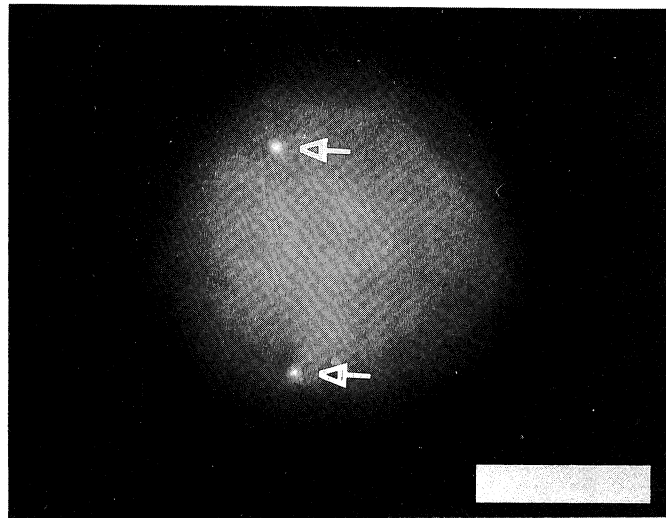


図 1 : ツクバネソウ *Paris tetraphylla* の体細胞分裂中間期核上の 5.8S+25S rDNA の位置を示す 2 個の FITC シグナル（白矢印）。スケールは $10\mu\text{m}$.



図 2 : ツクバネソウ *Paris tetraphylla* の体細胞分裂中期染色体上の 5.8S+25S rDNA の位置を示す 2 個の FITC シグナル（白矢印）。スケールは $10\mu\text{m}$.

ツクバネソウ *P. tetraphylla* の端部動原体型染色体が二次狭窄を有していることは極く初期の核型分析の研究において報告されていた。端部動原体型染色体の短腕側にある二次狭窄に続いて多様な形態を示す付随体（サテライト）が存在するという観察結果もあった（Gotoh 1933, Haga 1934, Hara 1969, Kayano 1961, Kurabayashi 1952, Stow 1935, Suzuki and Yoshimura 1986）。本種において C バンド濃染部は染色体の両腕端部、動原体近傍の介在部、動原体部、次端部動原体型染色体の短腕末端、そして端部動原体型染色体の介在部と短腕と付随体に現れた。このうち中部動原体型染色体の動原体近傍の介在部の濃染部には同一種内の個体間で変異が見られた（Miyamoto and Kurita 1990）。近縁種群の C バンドパターンと比較すると、次端部動原体型染色体の短腕末端と長腕介在部および端部動原体型染色体の長腕介在部の濃染部には種間で変異がある場合があったが、すべての染色体の動原体部、両腕の末端部、および端部動原体型染色体の短腕と付随体は常に濃染された。このように分類群間で変異が見られる濃染部と変異が見られない濃染部では構造的機能的に異なっている可能性が示唆された（Miyamoto *et. al.* 1991, Miyamoto *et. al.* 1992）。C バンド分染による濃染部は構造的異質染色質と呼ばれている。異質染色質は真正染色質に比べて間期細胞核においても強く凝縮しているため塩基性色素で濃く染まる。また異質染色質部位には DNA の高次反復配列と特定の非ヒストン蛋白質等が存在し、S 期後期において複製がおこなわれることが多い（Appels *et al.* 1978, John and Miklos 1979）。ツクバネソウ *P. tetraphylla* の C バンド濃染部にも高次の反復配列が存在する可能性が高い。そこで GC（グアニン-シトシン）塩基対に特異的に結合する無蛍光物質と AT（アデニン-チミン）塩基対に特異的に結合する蛍光色素 DAPI を用いて分染をおこなったところ、次中部動原体型染色体の短腕末端には AT 塩基対局在部位と GC 塩基対局在部位の両方が存在し、端部動原体型染色体の二次狭窄部の両側および長腕介在部には GC 塩基対局在部位が存在していることがわかった。これによりツクバネソウ *P. tetraphylla* の異質染色質部位が塩基対の含有量を異にする複数の部分から構成されていることが明らかになった。分子レベルでの多様な構造を持つ可能性が高まったことになる（宮本・栗田, 1994）。

真核生物の殆どの細胞において核分裂前中期から後期を除いて RNA と蛋白質の複合体である仁（核小体）が現れる。仁形成域（NOR）は分裂中期染色体の二次狭窄部位に相当することが多い。RNA にはリボソーム RNA（rRNA）、トランスファー RNA（tRNA）メッセンジャー RNA（mRNA）等がある。このうち植物の細胞質中の rRNA は大小 2 つのサブユニットからなり、25S, 5S, 5.8S, 18S rRNA 等が含まれている。核内での rRNA の検出を目的とした初期の *in situ* ハイブリダイゼーションおよびその他の研究において仁形成域すなわち多くの場合染色体の二次狭窄付近に rRNA をコードする DNA（rDNA）が存在することが強く示唆されてきた（Rittosa and Spiegelman 1965, Gall and Paudue 1969, John *et al.* 1969）。

本研究においてはユリ科ツクバネソウ *P. tetraphylla* の染色体に対してマメ科植物由来の 5.8S+25S rDNA を含む DNA 断片をプローブとする FISH を試みた。その結果、ツクバネソウ *P. tetraphylla* の端部動原体型染色体の二次狭窄近傍にマメ科植物由来の 5.8S+25S rDNA と相同かあるいは極めて類似した塩基配列を持つ遺伝子座が存在することが明らかになった。本種において rDNA のシグナルが特定の染色体部位 1 対 2 箇所にもみ現れたことから、端部動原体型染色体の二次狭窄近傍以外の異質染色質部位には本研究で用いた rDNA とは異なる構造の反復配列があることが示された。以上により過去に分染によって明らかになったツクバネソウ *P. tetraphylla* の異質染色質部位の構造的機能的多様性を確認することができた。

謝 辞

本研究を行なうに当たり金沢大学教育学部矢倉公隆博士よりソラマメ由来の 5.8 S+25S rDNA を含む DNA 断片を分与いただきました。また FISH 法に関しては農林水産省北陸農業試験場の福井希一室長および近江戸伸子研究員に、プローブ DNA の取り扱いに関しては鹿児島大学理学部生物学科の東四郎教授、阿部美紀子助教授および内海俊樹助手に有益な御助言と多大な技術的御協力を賜りました。心から感謝申し上げます。

本研究は平成 5 年度文部省科学研究費補助金（奨励研究（A））「ユリ科植物の染色体におけるリボゾーム遺伝子の位置に関する研究」（課題番号：05740497）による研究成果の一部である。

文 献

- Appels R., Driscoll, C. and Peacock, W. J. 1978. Heterochromatin and highly repeated DNA sequences in Rye, *Secale cereale*. *Chromosoma* (Berl.) **70** : 67-89.
- Fukui, K., Ohmido, N., and Khusu, G. S. 1994. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* **87** : 893-899.
- Gall, J. G. and Paudue, M. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.* **63** : 378-383.
- Gotoh, K. 1933. Karyologische Studien an *Paris* und *Trillium*. *Japanese Journal of Genetics* **8** : 197-203.
- Haga, T. 1934. The comparative morphology of the chromosome complement in the tribe Parideae. *Journal of Faculty of Science, Hokkaido Imperial University* **5** (3) : 1-32.
- Hara, H. 1969. Variation in *Paris polyphylla* Smith with reference to other Asiatic species. *Journal of Faculty of Science, University of Tokyo* **3** (10) : 141-180.
- John, B and Miklos, G. L. G. 1979. Functional Aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International Review of Cytology* **58** : 1-114.
- John, H. A., Birnstiel, M. L. and Jones K. W. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223** : 582-587.
- Kato, A., Nakajima, T., Yamashita, J., Yakura, K., and Tanifuji, S. 1990. The structure of the large spacer region of the ribosomal DNA in *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Plant Molecular Biology* **14** (6) : 983-994.
- Kayano, H. 1961. Mitotic lagging of B-chromosomes in *Paris tetraphylla*. *Chromosome Information Service* **2** : 7.
- Kurabayashi, M. 1952. Differential reactivity of the specific chromosome segments in *Paris*. *Journal of Faculty of Science, Hokkaido University* **5** (6) : 199-209.
- Miyamoto, J. and Kurita, S. 1990. C-band polymorphism in the karyotype of *Paris tetraphylla*. *Cytologia* **55** : 301-313.
- 宮本 旬子・栗田子郎：ツクバネソウとクルマバツクバネソウの染色体の蛍光染色。鹿児島大学理学部紀要

- (地学・生物学) 27 : 263-272.
- Miyamoto, J., Kurita, S. and Fukui, K.. 1991. Image analysis of C-banding patterns in two herbs: *Paris tetraphylla* A. Gray and *P. verticillata* M. v Bieb. (Liliaceae). Japanese Journal of Genetics 66 : 335-345.
- Miyamoto, J., Kurita, S., Z. Gu and H. Li. 1992. C-banding patterns in eighteen taxa of the genus *Paris*, Liliaceae. Cytologia 57 : 181-194.
- Noda, S. 1963. Karyotype and differential reaction in *Paris tetraphylla*. Chromosome Information Service 4 : 6.
- Rittosa, F. M. and Spiegelman, S. 1965. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophilla melanogaster*. Proceedings of National Academy of Science 53 : 737-745.
- Stow, I. 1935. On the correlation between the satellite of chromosomes and the leaf shape in Parideae from Hokkaido. Journal of Faculty of Science, Hokkaido Imperial University 5 (5) : 31-46.
- Suzuki, M and Yoshimura, N. 1986. A study of the chromosome number and karyotype of *Paris tetraphylla* A. Gray. Annual Report of Faculty of Education, Ibaraki University 35 : 33-43.
- Uchino, A. and Wang L. 1996. Comparison of Cold-sensitive and C-banded Segments of chromosomes in *Paris tetraphylla* A. Gray. Cytologia 61 : 321-325.