

Distribution of Specific DNA Sequences in Plant Genomes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/46422

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN

1999

16

植物ゲノムにおける 特定DNA配列の分布

(課題番号 01540562)

平成2年度科学研究費補助金 一般研究(C)

研究報告書

平成3年3月

研究代表者 矢倉公隆

(金沢大学教育学部 助教授)

金沢大学図書

平成2年度科学研究費補助金
一般研究（C）
研究成果報告書

<研究組織>

研究代表者 矢倉公隆（金沢大学教育学部生物学教室）

<研究経費>

平成元年度	1,500 千円
平成2年度	400 千円
計	1,900 千円

<研究発表>

学会誌等

Localization by in situ hybridization of repeated sequences homologous to Vicia faba BamHI families in genomes of two wild Vicia species, V.angustifolia and V.hirsuta . （準備中）

算番号

1

8000-12806-3

研究成果

I 研究目的

近年遺伝子工学の技術がめざましく発達するにともなって、多くの生物種からさまざまな遺伝子あるいは特定DNA配列が単離されそれらの構造および機能が明らかにされてきている。しかし、これらの配列のゲノム内での分布様式、すなわちどの染色体のいかなる位置に存在するかということは特に植物においてあまり解析が成されていない現状である。

本研究は、クローン化した植物の特定DNA配列がゲノム内でどのような分布をしているかを、in situ ハイブリダイズ法によって明らかにしようとする事を目的とした。本研究で解析の対象とした植物の特定DNAは、ソラマメ (*Vicia faba*) 由来の高度反復配列およびタバコ (*Nicotiana tabacum*) ゲノムより単離した自己複製能をもった配列 (Autonomously Replicating Sequence: ARS) であり、ソラマメ高度反復配列に関しては、ソラマメ属の野生種であるカラスノエンドウ (*V. angustifolia*) とスズメノエンドウ (*V. hirsuta*) ゲノムにおける分布を、タバコ ARS に関しては、その相同配列が存在することが確かめられたのでソラマメ (*V. faba*) ゲノムにおける分布を解析することとした。

II 材料と方法

<1>顕微鏡プレパラートの作成

ソラマメ、カラスノエンドウあるいはスズメノエンドウの種子を一昼夜水に浸したのちペーパータオルまたはバーミキュライトの上にまいた。暗黒中、27℃で数日間置き生じた根を先端から4~5mmの所で切りとり0.1%のコルヒチン溶液中で4~5時間処理した後、エタノール/酢酸(3:1)混液で固定した。固定後根端を蒸留水で洗って固定液を除いてから0.2%ペクトリアーゼと0.5%セルラーゼR-10を含む酵素液に浸し37℃、2時間処理をし、組織をマセレートした。スライドガラスの

上で根端の分裂組織の部分をカミソリあるいは柄付き針を使って取り出し、45%酢酸を滴下、カバーガラスをかぶせた後押しつぶし法で細胞を広げた(1)。スライドガラスをドライアイスの上のせ2~3分後カバーガラスをすばやくスライドガラスからはがしとり、無水アルコール中に1時間置き脱水した。脱水処理後スライドガラスは風乾しプローブを塗布するまでデシケーター内で4℃下で保存した。

<2>プローブの調製

プローブの調製には次の3つのクローンを用いた。すなわち、ソラマメの高度反復配列の一つであるBamHIファミリーのうち250bp配列及び1500bp配列のクローン(2)と、タバコから単離したARSのクローン(3, 4)であった。これらのクローンからプラスミドを調製し、前者2つに関しては制限酵素BamHI、後者はEcoRIで消化し組み込んだインサートをベクターから切り離した。制限酵素処理をしたプラスミドDNAは次にアガロースゲル電気泳動にかけた後、それぞれインサートに相当するDNAバンドの部分をゲルから切り出した。切り出したゲルのブロックを20倍に希釈した電気泳動用緩衝液を満たした透析チューブの中に封じ込め、DNAを電気泳動的にゲルから透析チューブ内の緩衝液中に溶出した。溶出後、DNAを含んだ透析チューブ内の緩衝液を取り出しフェノール抽出を数回繰り返しDNAを精製した。DNAをエタノール沈澱した後遠心によって回収した。得られたクローンDNAは、放射性同位元素を含む3種のヌクレオチド($^3\text{H-dATP}$ 、 $^3\text{H-dCTP}$ 、 $^3\text{H-dTTP}$)及び大腸菌DNAポリメラーゼIを用いたニックトランスレーション法によって標識した(5)。

サザンハイブリダイズ法に関するプローブとしては、 ^3H 標識に使用するために上記のごとくに調製したソラマメBamHIファミリーの1500bp配列及びタバコARSのDNAの5'末端を、ポリヌクレオチドキナーゼによって ^{32}P で標識したものをを用いた。

<3> in situ ハイブリダイゼーション

in situ ハイブリダイゼーションは、基本的には以前に報告した(6)時の方法にしたがった。4℃でデシケーター内に保存しておいた広げた根端組織を付着したスライドガラスは、70℃に暖めた2×SSC(1×SSC=0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム)中に30分置いた後エタノールシリーズ(70%エタノール中10分処理2回→無水エタノール中5分処理)によって脱水し風乾した。これらのスライドガラスは次に、70℃の3×SSC/50%ホルムアミド溶液に30秒浸した後すばやく冷やした70%エタノールに移し染色体中あるいは核内のDNAを単鎖化するとともにエタノールシリーズで脱水した。このように処理したスライドガラス1枚に対し、30μlのプロープ溶液(1×10⁵cpm ³H-標識DNA、3×SSC、50%ホルムアミド、1×デンハルト液、10%硫酸デキストランおよび100μg/ml サケ精巣DNA)を塗布し37℃で一昼夜インキュベートした。ハイブリダイズ後、スライドガラスを37℃の3×SSC/50%ホルムアミド溶液で4回、2×SSC中室温下で2回洗浄(各々20分間)し、エタノールシリーズで脱水してから風乾した。ハイブリダイズを終えたスライドガラスは、約50%の写真用生乳剤(サクラNR-M2)に数秒浸し、乾燥後デシケーターに納め4℃の暗黒中に3~8週間置いた。適当な時期にデシケーターからスライドガラスを取り出し現像し、さらに7%ギムザ氏液で染色したのち顕微鏡観察ならびに写真撮影を行った。

<4>サザン・ハイブリダイゼーション

ソラマメの高度反復配列BamHIファミリーをプローブとしたサザン・ハイブリダイズに用いた植物は、カラスノエンドウとスズメノエンドウの2種であり、タバコARSをプローブとした解析にはソラマメ、カラスノエンドウ、オオバナノエンレイソウ、キヌガサソウおよびクルマバツクバネソウの5種であった。それぞれの植物の葉から全DNAを調製し、種

々の制限酵素で切断した。制限酵素処理したDNAはアガロース電気泳動にかけ、アルカリ処理、中和後ニトロセルロースメンブレンにDNAを移しとった(7)。メンブレンをベーキングした後³²P標識のプロブをぬり43℃で一昼夜インキュベートした後5×SSC/50%ホルムアミド溶液で4回、2×SSCで2回メンブレンを洗いX線フィルムを重ね感光させた。

III 結果と考察

<1> ソラマメ高度反復配列 BamHIファミリーの他のソラマメ属植物ゲノムにおける存在と分布様式

真核細胞ゲノムには、コピー数が1~数個の遺伝子の他に数百~数万コピーの反復性配列がかなりの割合で含まれる。とりわけ植物には反復性DNA配列が多く含まれゲノムの70~80%を占める例が多い。植物における反復配列の解析はいくつかの種で実施されているが、最近申請者らは、ソラマメ (*Vicia faba*) ゲノムに存在する高度反復配列のうち、ゲノムDNAを制限酵素BamHIで処理しアガロースゲル電気泳動にかけると、スメアなバックグラウンドの中に長さの違ういくつかの不連続なバンドとして検出されるBamHIファミリー群と、ゲノムDNAをHaeIIIで処理後、ほとんど切断されなかったDNA分画 (relic DNA) を回収し、それを別の制限酵素のFokIで切断しアクリルアミドゲル電気泳動にかけると59bpの整数倍のDNA断片のシリーズとして検出されるFokIファミリーに関して一次構造の解析を行った(2, 8)。さらにそれらの配列うち、BamHIファミリーの250bp及び1500bp配列とFokIファミリーに関して、ソラマメゲノム内でどのような分布様式を示すかを*in situ*ハイブリダイズ法によって解析した(6)。その結果、BamHIファミリー群の250bp、1500bpファミリーがともにゲノム内に広く、すなわち全ての染色体に一様に分布するいわゆる分散型高度反復配列であること、またFokI配列に関して

は、一对のメタセントリック染色体以外、5対の全てのサブテロセントリック染色体の長腕のほぼ中央に局在する事を明らかにしている。

本研究では、これらの反復配列の進化的変異を見るため、ソラマメ属の野生種のゲノムにおける分布様式を解析することにした。まずBamHIファミリーに関して他の種にも存在するかどうかを、カラスノエンドウ及びスズメノエンドウのゲノムDNAを用い、250bpと1500bp配列をプローブとするサザンハイブリダイズ法によって調べた。プローブをこの2種類に絞ったのは、BamHIファミリーを構成するすべての配列が250bp配列と1500bp配列との両方あるいはどちらか一方を含む構造になっているからである。図1-a及び図2-aはそのオートラジオグラフィのパターンを示したものである。カラスノエンドウ、スズメノエンドウ両種のゲノムDNAは共に250bp及び1500bp配列とハイブリダイズしたバンドを生じたことから、相同な配列がこれら2種のソラマメ属の野生種にも存在することが分かった。さらに、2つのプローブで得られたパターンを比較してみると、カラスノエンドウでは、制限酵素によっては一致するバンドもあるがメジャーなバンドが両プローブで異なるものが多い傾向にあるのに対し、スズメノエンドウの場合は、すべての制限酵素に関して250bpと1500bpプローブのパターンが一致した。このことは、少なくともスズメノエンドウゲノムにおいては、すべての250bp相同配列と1500bp相同配列がごく近傍に存在していることを示している。ソラマメゲノムにおいてBamHIファミリーの250bpと1500bp配列が、他の1750bp、2400bpあるいは2600bp配列の中で隣接して存在するものと、250bp配列と1500bp配列としてそれぞれ独立して存在する場合がある(2)ということと、進化的に見てスズメノエンドウがソラマメ属の中ではソラマメより古いタイプの種と考えられている(9)ということと考え合わせると、BamHIファミリーの変異のパターンを考える上で興味深い。すなわち、250bp配列と1500bp配列は古くは互いに隣接した形でのみゲノ

ム内に存在していたものが、進化の過程で分離するものが出てきて別のファミリーを形成するようになったということを暗示している。

次に、ソラマメゲノムにおいては全ての染色体の全長にわたって分散しているBamHIファミリーが、より古いタイプのソラマメ属の野生種ではどのような分布様式をとっているかを*in situ*ハイブリダイズ法によって調べた。1500bp相同配列のカラスノエンドウゲノムでの分布を中期染色体において見ると、カラスノエンドウは6対のサブテロセントリック染色体を持つが、銀粒子は全ての染色体に見出された(図1-d)。この結果は、カラスノエンドウゲノムにおいても、1500bp相同配列が分散型の反復配列として存在するということを示している。一方、静止期核におけるパターンを見ると銀粒子が一ヶ所に局在するのではなく、核内に点在していることが明かであり上の結論を支持している(図1-c)。さらに、染色体における銀粒子の位置を注意深くみると、ほとんどの場合、長腕あるいは短腕のテロメアもしくは動原体付近に見出され、長腕の中間の位置には存在しないか、存在していてもわずかであることが分かった。1500bp配列が全ての染色体の全長にわたって存在しているというソラマメゲノムにおける分布様式とこの結果を対比させて考えると、この配列が進化と共に分散化が強まっていったことが示唆される。

一方、250bp相同配列に関しては静止核における分布のみを調べた。図1-bを見て明らかのように、検出された銀粒子の数は数個と少ないが、やはりこの配列も分散型の反復配列であることが分かった。銀粒子が少ないのはおそらくこの解析に使ったプローブの放射比活性が低いことが原因であり、実際の分布密度を反映したものではないと考えられる。250bp相同配列の少なくとも一部は1500bp相同配列に隣接していることがサザン・ハイブリダイゼーションの結果(図1-a)より明かであることから、より高い比活性のプローブを使用したならおそらく銀粒子の分布密度は1500bp配列をプローブとして得られたパターン(図1-c)と同じくらいになるものと思われる。

図2-bは、1500bp配列をプローブとしたスズメノエンドウ休止期核における *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を示したものであるが、カラスノエンドウの場合と同様に銀粒子が核全体に分布しており、スズメノエンドウゲノムにおいても1500bp相同配列が散在型反復配列として存在していることが明かとなった。250bp配列をプローブにしたときも同様に核内に点在しており、250bp相同配列も散在型反復配列であることが示された(図2-c)。サザン・ハイブリダイゼーションの結果から明らかなように、250bp及び1500bp相同配列はスズメノエンドウゲノム内では全て隣接しているので、*in situ* ハイブリダイゼーションによって得られる銀粒子の分布密度は、250bp配列のプローブと1500bp配列のプローブの場合で等しいことが予想される。しかし、図2-bとcを比較すると、図2-cの250bp配列プローブで見られる銀粒子の数が少ない傾向にある。これは、得られた250bp配列プローブの放射比活性が1500bp配列のものより低いことに起因するものと考えられる。

<2> タバコ由来のARSの相同配列の他の植物における分布。

真核細胞由来のDNA断片で酵母菌の細胞内で複製能をもつ配列が自己複製能をもつ配列、ARS (Autonomously Replicating Sequence)、としてさまざまな真核細胞から単離同定されている(10, 11)。ARSはそれぞれの真核細胞ゲノムにおいてDNAの複製の起点として働いていると考えられている。植物においても、タバコから単離され塩基配列が明らかにされている(3, 4)。もし、ARSが、DNAの複製という細胞が営む基本的な反応において機能するものであるのならば、進化的に安定な配列ではないかと考えられる。そこで本研究では、タバコから単離されたARSと相同なDNA配列が他の植物において存在するのか、もし存在するとしたらゲノム内でどのような分布をしているのかを調べた。まず、タバコARSをプローブにしたゲノミックサザン・ハイブリダイゼーション

を行ったところ、使用した植物の全てに相同な配列が存在することが分かった（図3-a）。その中で、ソラマメについて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、タバコARSと相同な配列の分布をみた。今のところ信頼できる確実な結果は得られていないが、傾向として、銀粒子が各染色体に存在することを示唆するパターンが多く得られた。図3-bはその一例である。クリアな結果が得にくい原因として、1) サザン・ハイブリダイゼーションのパターン（図3-a）より明かであるが、ソラマメに存在するタバコARSと相同な配列とタバコARSとの相同性の度合いがあまり高くない、2) 1)に加えて、*in situ* ハイブリダイゼーションに用いたプローブの比活性が（1）の不利な点をカバーしうる程には高くなかった、等が考えられる。今後は、さらに比活性の高いプローブを得られるようにするか、タバコARSと相同な配列をソラマメから単離してそれをプローブとして用いることによって確かなデータを得ることが課題となろう。そして、その配列の染色体における位置を知ることによって、染色体レベルでのDNAの複製起点の位置あるいは分布が明らかになるものと思う。

参考文献

- (1) Hutchinson J., Flavell R.B. and Jones J. (1981) Physical mapping of plant chromosomes by in situ hybridization. In Genetic engineering (eds. Setlow J.K. and Hollander A. Vol 3:207-222 Plenum Press
- (2) Kato A., Yakura K. and Tanifuji S. (1985) Sequence analysis of Vicia faba highly repeated DNA: the BamHI repeated sequence families. Plant Molecular Biology 5:41-53
- (3) Uchimiya H., Ohtani T., Ohgawara T., Harada H., Sugita M. and Sugiura M. (1983) Molecular cloning of tobacco chromosomal and chloroplast DNA segments capable of replication in yeast. Mol. Gen. Genet. 192:1-4
- (4) Ohtani T., Kiyokawa S., Ohgawara T., Harada H. and Uchimiya H. (1985) Nucleotide sequences and stability of a Nicotiana nuclear DNA segment possessing autonomously replicating ability in yeast. Plant Molecular Biology 5:35-39
- (5) Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. (1982) Enzymes used in molecular cloning. In Molecular Cloning pp97-148 Cold Spring Harbor Laboratory
- (6) Yakura K., Kato A. and Tanifuji S. (1987) Cytological localization of highly repeated DNA sequences, the FokI sequence family and BamHI sequence families, in Vicia faba chromosomes. Jpn. J. Genet. 62:325-332
- (7) Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517

- (8) Kato A., Yakura K. and Tanifuji S. (1984) Sequence analysis of Vicia faba repeated DNA, the FokI repeat element. Nucl.Acids Res. 12:6415-6426
- (9) Chooi W.Y. (1971) Variation in nuclear DNA content in the genus Vicia. Genetics 68:195-211
- (10) Stinchcomb D.T., Thomas M., Kelly J., Selker E. and Davis R.W. (1980) Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4559-4563
- (11) Chan C.S.M. and Tye B. (1980) Autonomously replicating sequences in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6329-6333

☒ 1

a

B E H

B E H



1

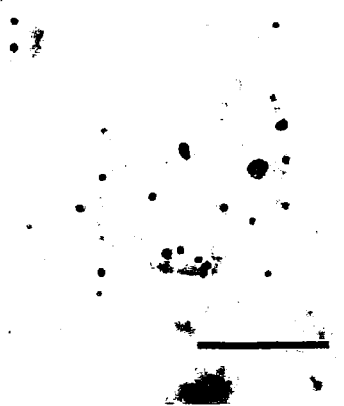


2

b



c



d

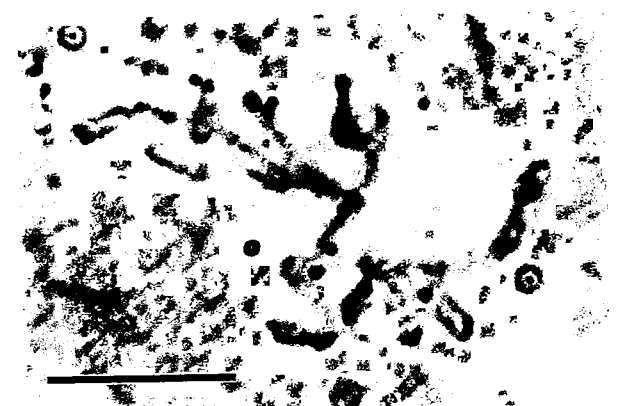
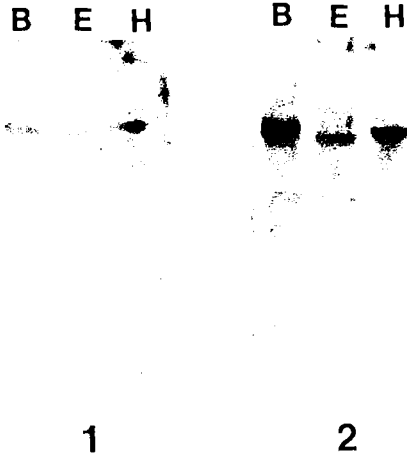
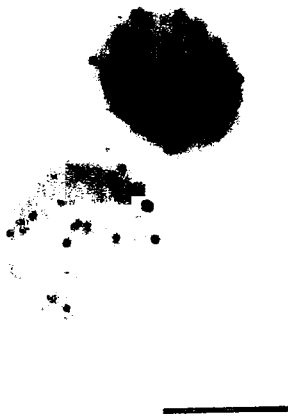


图 2

a



b



c



☒ 3

a



b



図の説明

図1

250bp及び1500bp BamHIファミリーのカラスノエンドウゲノムにおける存在と分布。a:ゲノミックサザン・ハイブリダイゼーション。カラスノエンドウの全DNAをBamHI (B)、EcoRI (E) およびHindIII (H) で消化した後、アガロースゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロースメンブレンにDNAを移しとった。それらのプロットとソラマメのBamHIファミリーの1500bp (1) と250bp配列 (2) を³²Pで標識したものをプローブにハイブリダイズさせた。b、c、d: *in situ*ハイブリダイゼーション。³Hで標識したソラマメの250bp BamHIファミリー配列 (b)、1500bp配列 (c、d) をプローブとした、休止期核 (b、c) 及び中期染色体 (d) におけるパターン。写真下に示された横棒はすべて10μmを表す。

図2

250bp及び1500bp BamHIファミリーのスズメノエンドウゲノムにおける存在と分布。a:ゲノミックサザン・ハイブリダイゼーション。スズメノエンドウの全DNAを制限酵素で消化後、サザン・ハイブリダイゼーションを行った。シンボル、数字の持つ意味は図1-aと同じ。b、c: *in situ*ハイブリダイゼーション。ソラマメ1500bp配列 (b) 及び250bp配列 (c) をプローブとした休止期核におけるパターン。横棒は10μmを表す。

図3

タバコARS相同配列の他の植物ゲノムにおける存在と分布。

a: ゲノミックサザン・ハイブリダイゼーション。ソラマメ(1)、カラスノエンドウ(2)、オオバナノエンレイソウ(3)、キヌガサソウ(4)及びクルバマツクバネソウ(5)の全DNAをEcoRIで消化した後、³²Pで標識したタバコARSをプローブとしたサザン・ハイブリダイゼーションを行った。b: *in situ*ハイブリダイゼーション。³H標識したタバコARSをプローブにソラマメ染色体における分布をみた。横棒は10 μmを表す。