植物染色体の微細手術と マイクロクロローニング

植物染色体工学の新しい一歩

植物遺伝子の分子レベルでの解析が進むに伴って、ゲノム内に存在する DNA 配列の一次構造のみならず、染色体上の位置が重要な情報となってきた。最近、染色体工学の新しい技術として、マイクロレーザー光を用いた染色体切断および断片回収の系が確立された。このレーザーダイセクション法は、染色体標本さえ得ることができればどのような種にも適応でき、染色体工学への広範囲な応用が期待される。

染色体を直接操作する手法はかなり以前から試みられており、微小針とマイクロマニピュレータを用いて染色体を切断し、かきとるといった方法が 1981 年にジョウジョウバエの唾液腺染色体を用いて発表されている⁽¹⁾。また、1980 年代半ばには、レーザーによる染色体のダイセクションも試行され、ヒトの染色体をいくつかの断片に切ることに成功している⁽²⁾。しかし、これらの操作は手動で行なわれていたために、研究者に多くの熟練と独自の勘を要求し、一般的な技術として実用化することを困難にしていた。また、熟練者でさえ常と同じ領域から染色体断片を切り取り、回収することは簡単なことではない。それに加えて、植物の場合、個々の染色体を客観的に識別・同定することができなかったことも大きな障壁となっていた。

そこで、それらの問題を解決するために、アルゴンイオンレーザーを組み込んだセルワークステーションを用いて染色体を加工する方法が開発された。もともとセルワークステーション、ACAS 470 (米国メリディアン社) はペトリ皿に固定した動物の培養細胞をレーザー照射することにより、蛍光分析を行ったり特定の細胞を選抜するために開発されたものであった。しかし、その操作性、特にレーザー光の強度の調節、照射の位置合わせなどがコンピュータにより補助され非常に扱いやすいことから、染色体の加工にも充分利用できることが筆者らの

検討により明らかになった。そして 1988 年以降、植物染色体の微細加工のための種々の条件が次第に明らかになり、技術的にはほぼ完成されたものとなった。このシステムの特長は、マウスあるいはキーボードを通じてコンピュータが手動操作をサポートし、顕微鏡ステージの移動、レーザー照射の位置設定、レーザー光の強度および出力が適切に制御されることである。

図 1 に、固定されたイネ (図 1-a) およびオオムギ染色体 (図 1-d) を加工する過程を示した。まず、目的とする染色体核板以外の近傍の核や染色体をレーザーで消去する。次に、目的の染色体のみを残し、他の染色体を消滅させる (図 1-b, 1-e)。最後に、イネでは第 4 染色体の凝縮部 (◀) および非凝縮部 (◁) を残した (図 1-c)。また 14 本の染色体を持つオオムギの場合、第 6 染色体のサテライト領域 (◀) および第 7 染色体のセントロメア領域 (◁) のみを残し、その他の領域をすべて蒸発させた (図 1-f)。処理した染色体断片の回収は、特定の座標を中心として八角形に膜を切り出すことにより、染色体断片の載ったポリエステル膜だけを得ることができる。これら一連の操作に要する時間は 10 分程度で、従来報告されているものに比べ格段に短い。また、最適なレーザー光強度を設定すると切り取られる部分の幅は $0.5\mu\text{m}$ にまで微小化できる⁽³⁾。本手法を用いれば染色体のサテライト、セントロメア、テロメア、また特定の領域などどこでも切り出すことが可能である。

微細加工を行なうための染色体上の位置決めには画像解析により得られた情報が有効である。画像解析法によって、定量的な染色体地図の作製が可能となり、目的とする染色体を正確にとらえることができるようになった。これまでに画像解析により、イネ、オオムギ、クレビスなど各種植物の定量的な染色体地図が作成されている⁽⁴⁻⁶⁾。そこで、染色体地図と実際の染色体像から、切

図 1 ■ イネおよびオオムギ染色体の微細手術

a~c: イネ第 4 染色体の微細手術, d~f: オオムギ第 6, 7 染色体の微細手術. バーは 5 μ m.

断する領域と残す領域を決定し、レーザーで不要な部分を消滅させることになる。将来、画像解析法とレーザーダイセクションを統合すれば、全自動化された染色体加工システムも夢ではない。

染色体上の種々の DNA 配列を取り出すことは、すでに PCR 法を用いて行なわれている。たとえば、筆者ら

は微細手術によって切り出されたオオムギ、イネの染色体断片に含まれるリボゾーム RNA 遺伝子の増幅に成功している⁽⁷⁾。これにより染色体上の当該領域の DNA 配列をマイクロクローニングすることも可能となり、コピー数の少ない遺伝子についても近い将来、クローニングすることができると考えられる。染色体微細加工技術の

発展によって、目的とする遺伝情報をもつ特定染色体を自由に加工する方法が早期に確立されることが期待される。

- 1) F. Scalenghe *et al.*: *Chromosoma*, 82, 205 (1981).
- 2) S. Monajembashi *et al.*: *Exp. Cell Res.*, 167, 262(1986).
- 3) K. Fukui *et al.*: *Barley Genet.*, VI, 272 (1991).
- 4) K. Fukui & K. Kakeda: *Genome*, 33, 450 (1990).

- 5) K. Fukui & K. Iijima: *Theor. Appl. Genet.*, 81, 589 (1991).
- 6) K. Fukui & Y. Kamisugi: 投稿中.
- 7) K. Fukui *et al.*: 投稿中.

(福井希一, 近江戸伸子, 神杉泰子*, 峰沢 満**, 石川蘭子*, 酒井富久美*, 北陸農業試験場, *農業生物資源研究所, **北海道農業試験場)

お知らせ

平成4年度 科学技術特別研究員の募集

対象者: 原則として平成4年10月1日現在, 35歳未満で博士号取得または同等の研究能力を有すると認められる者

採用予定人員: 40名程度を予定

採用期間: 原則として平成4年10月1日から採用予定. 通算3年間を限度として年度ごとに評価, 更新

研究費: 年間130~150万円程度支給(その他, 人件費・通勤費を支給)

受入機関: 全国約80の国立試験研究機関

募集締切日: 平成4年4月15日(水) 必着(下記にお問合せの上, 必要書類をご送付下さい)

問合せ先: 科学技術庁 科学技術振興局研究振興課

〒100 東京都千代田区霞が関 2-2-1

電話 03-3581-5271 内線 531 直通 03-3503-0013

(なお, 資料請求および時間外の間合せはテレフォンプランサービス 03-3239-9062 をご利用下さい)

本制度は, 関係予算の成立を前提としており, その事情により変更があり得ますのでその旨ご承知おき下さい。

お知らせ

第8回 “健康と病態におけるカルシウム結合蛋白に関する国際シンポジウム”

(8th International Symposium on Calcium-Binding Proteins in Health and Disease)

日時: 1992年8月23~27日

場所: Davos, Switzerland

主催: Prof. E. Carafoli (Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH))

トピックス: Basic aspects of calcium-protein interaction/ Calcium binding proteins/ Intracellular calcium including oscillations/ Extracellular calcium binding proteins/ Membrane transport of calcium: Pumps, channels, exchangers/ Calcium in the nucleus and in the cell cycle/ Calcium in pathology/ Drugs affecting calcium metabolism.

国内問合せ先: 〒466 名古屋市昭和区鶴舞町 65

名古屋大学医学部薬理学教室内

第8回カルシウムシンポジウム日本事務局

Tel: 052-741-2111 (内 2038), Fax: 052-733-4774