

培養細胞と再生植物の染色体観察法

西林 双龍*

1. はじめに

培養過程で起きる体細胞変異などの遺伝学的現象の解析や細胞融合後の染色体の挙動などを知る上で培養細胞や再生植物の染色体解析結果は一つの貴重な情報となる。ここではサスペンションないしカルスと再生植物における染色体観察法について記述したい。

2. 染色体観察法

従来の染色体観察はおしつぶし法によってなされていた。おしつぶし法は文字どおり材料をスライドガラス上で強くおしつぶして染色体をひろげて見る方法である。しかし、この方法では染色体がかならずしも一平面にひろがらず材料によっては解析しづらいものがでてくる。著者は小型染色体をもつイネ、ブラシカ属植物、ニンジンのサスペンションないしカルス、再生植物で酵素解離法による染色体の解析を行ってきた。ここではおもにこれらの染色体観察法について説明したい。

染色体の標本作製は前処理、固定、水洗、酵素処理、水洗、細胞の解離、風乾ないし火炎、染色、からなっている。

(1) 前処理：サスペンション細胞ないしカルスの一部を 0.1% コルヒチンで 8°C, 3~4 時間処理する。再生植物の場合は根端約 1mm を切り取って 2mm 8-ハイドロキシキノリンで 8~20°C, 4~5 時間処理する。

(2) 固定：材料を 4~5°C のエタノール酢酸溶液 (3:1) で 1 時間以上固定する。

(3) 水洗：D. W. で 2~3 回水洗。

(4) 酵素処理：イネの根端やサスペンション細胞、カルスの堅い材料では 4% セルラーゼオノズカ RS (Yakult), 1% ベクトリアーゼ Y-23 (Seishin Pharmaceutical), 7.5 mM KCl, 7.5 mM EDTA, pH 4.0 の酵素液で 37°C, 30 分~3 時間処理する。

(5) 水洗：D. W. で 1~2 回水洗。

(6) 解離：材料をスライドガラス上においてエタノール酢酸溶液 (3:1) を数滴上から滴下し、ピンセットで材料を解離する。

(7) 風乾ないし火炎：スライドガラスを室温で風乾ないし火炎で乾かす。この時染色体がひろがる。

(8) 染色：アセトオルセイン¹⁻³⁾ (第 1 図, 第 1 表) ギムザ (第 2 表), 蛍光色素 (エチジュウムブロマイド, DAPI)⁴⁻⁷⁾ (第 2 図, 第 3, 4 表) などで染色する。

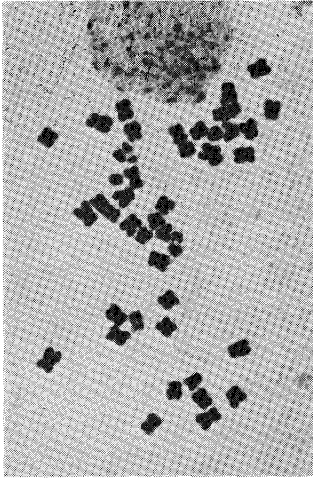
(9) 観察：透過型顕微鏡もしくは落射型蛍光顕微鏡で観察する。

上記の材料の場合、根端の染色体解析には前処理剤として 8-ハイドロキシキノリンが良好だった。一方サスペンションないしカルスでは 8-ハイドロキシキノリンは毒性が強くなりあまりいい結果が得られなかったがコルヒチンを用いると良好な染色体像が得られるようになった。前処理後、材料はただちにエタノール酢酸 (3:1) で 1 時間以上固定された。材料は固定液中で保存がきくので実験を一時中断したい場合にはここで調整することができる。そして、引続き酵素処理を行いたい場合には酵素処理の前に固定液を完全に除去してさらに 2~3 回 D. W. で水洗し酵素処理をする。イネでは、5 種類の酵素の組合せで比較した結果セルラーゼオノズカ RS とベクトリアーゼ Y-23 の組合せが最もよいことがわかった^{1,2)}。また、酵素処理をする時 pH が染色体の構造に影響を与えることがわかり、イネの場合 pH 4.0 が至適で pH が高くなると核と染色体が壊れやすくなった¹⁾。ニンジン、ブラシカ属植物では pH 5.5 でも問題ない。

酵素液をパスツールで取り除いて D. W. で 1~2 回水洗する。そしてスライドガラス上に材料をおいてエタノール酢酸 (3:1) を数滴滴下してピンセットで材料をバラバラにして細胞を分散させそのまま風乾させる。酵素が十分きいている時には風乾で染色体は十分ひろがってくるが、ひろがらない場合にはライターでエタノール酢酸 (3:1) に火をつけて火炎でもって染色体をひろげ

* Soryu NISHIBAYASHI: Methods of Chromosome Observation in Cultured Cells and Regenerated Plants.

* (株)植物工学研究所 (〒227 横浜市緑区鴨志田 1000) Plantech Research Institute, 1000 Kamoshida, Midori-ku, Yokohama, 227



第1図 アセトオルセイン染色されたキャベツ-ハクサイ (X-線処理) 非対称融合由来再生植物の染色体 ($2n=45$)³⁾

第1表 アセトオルセイン染色法¹⁻³⁾

- 1) スライドガラスの試料部分に 1~2% のアセトオルセイン染色液を滴下
- 2) カバーガラスをかけて室温で 10 分以上染色し観察

アセトオルセイン染色液: 45% 酢酸溶液 100 ml にオルセイン 1~2g を少し温めて溶かし濾過して使用

第2表 ギムザ染色法

- 1) スライドガラスをリン酸緩衝液で希釈した 5~10% のギムザ染色液で室温で 5~10 分染色
- 2) D. W. ないしリン酸緩衝液で数回水洗
- 3) 風乾
- 4) キシレンで封入して観察

リン酸緩衝液 (pH 6.8): 1/15 M Na_2HPO_4 と 1/15 M KH_2PO_4 とを 1:1 に混合して使用

第3表 エチジュウムブロマイド (EB) 染色法^{4,5)}

- 1) スライドガラスの試料部分に緩衝液-N に溶かした 100 $\mu\text{g/ml}$ EB 溶液を 1~2 滴滴下
- 2) カバーガラスをかけて室温で 10 分以上染色しグリーン励起光 (546 nm) で観察

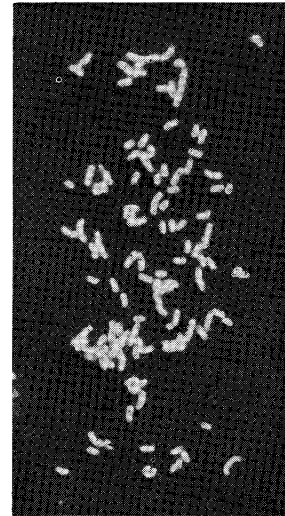
緩衝液-N (pH 6.8): 77 mM Na_2HPO_4 , 11 mM citrate, 7.5 mM KCl, 1 mM EDTA, 50% グリセリン

る。しかし、火炎でやる場合は強力すぎて染色体が壊れることがある。また、燃えかすが出て汚れの原因にもなりできれば風乾で染色体をひろげた方がいいようである。

第4表 DAPI 染色法^{5,7)}

- 1) スライドガラスの試料部分に緩衝液-NS に溶かした 1% グルタルアルデヒド溶液を 1 滴滴下
- 2) さらに緩衝液-NS に溶かした 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 溶液を 1 滴滴下
- 3) カバーガラスをかけて室温で 10 分以上染色し UV 励起光 (365 nm) で観察

緩衝液-NS (pH 6.8): 20 mM Tris-HCl, 0.25 M ショ糖, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 0.8 mM PMSF, 0.05% 2-メルカプトエタノール



第2図 エチジュウムブロマイド染色されたヒネ (イネとヒエの細胞融合) カルス細胞の染色体 ($2n=\text{ca. } 120$)⁴⁾

染色色素にはアセトオルセイン、ギムザ、蛍光色素 (エチジュウムブロマイド、DAPI) などがある。アセトオルセインは染色体に膨らみをもたせるので小型染色体の解析には適している (第1図)³⁾。ただし、染色液のゴミが出やすいのとプレパラートの保存がむずかしいのが難といえる。ギムザ染色はアセトオルセイン染色より染色体が少し縮んだ状態で染色され、染色が濃い場合には一次狭窄が不明瞭になることがある。ギムザ染色ではある程度長期にプレパラートの保存ができ、また脱染して別の色素で染色もできる。蛍光色素での染色は、アセトオルセイン、ギムザなどで染まりが悪い材料などに使用すると染色体がはっきり観察できることがある。イネ、ヒエ、ヒネの培養細胞では非常にはっきりと染色体が観察できた^{4,5)}。黒岩等 (1982)⁶⁾ が開発したオリンパスの落射型蛍光顕微鏡 BH-RFK を使用するとこれらの染色

体が強蛍光で観察された (第2図)⁴⁾.

(1990年6月12日受理)

文 献

- 1) Nishibayashi, S., 1985. *Jpn. J. Breed.*, **35** (Suppl. 1) : 318-319.
- 2) Nishibayashi, S., J. Kaeriyama, 1986. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **3** : 31-34.
- 3) Yamashita, Y., R. Terada, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1989. *Theor. Appl. Genet.*, **77** : 189-194.
- 4) Terada, R., J. Kyojuka, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **210** : 39-43.
- 5) Nishibayashi, S., Y. Hayashi, J. Kyojuka, K. Shimamoto, 1989. *Jpn. J. Genet.*, **64** : 355-361.
- 6) Kuroiwa, T., S. Kawano, S. Nishibayashi, C. Sato, 1982. *Nature*, **298** : 481-483.
- 7) Nishibayashi, S., S. Kawano, T. Kuroiwa, 1987. *Cytologia*, **52** : 599-614.