

# 蛍光染色法及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法による 植物病原糸状菌の染色体解析

岡山大学教養部生物学教室 <sup>た</sup>多 <sup>が</sup>賀 <sup>まさ</sup>正 <sup>とき</sup>節 <sup>の</sup>稔  
岡山大学資源生物科学研究所遺伝子解析分野 <sup>むら</sup>村 <sup>た</sup>田

## はじめに

近年、光学顕微鏡レベルでの菌類染色体の観察法の一つとして、蛍光染色法による観察が酵母を中心に試みられ、従来の古典的染色法と明視野顕微鏡の組み合わせでは達成できなかった微小な染色体の識別が可能になってきた。さらに、より最近では、蛍光標識を用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (fluorescence *in situ* hybridization, 略称 FISH) が、これも酵母で報告され始めており、動植物の分野では既に確立されている分子細胞遺伝学的技術が菌類の染色体にも適用できることが実証されている。

これまでのところ、それらの新しい手法を用いた観察例は酵母に偏っており、糸状菌を対象とした報告はほとんどないのが現状である。しかし、両者の染色体の基本構造に本質的な差異はないと考えられ、また、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による核型分析からは大半の糸状菌が酵母より大きい染色体を持っていると推定されるので、酵母で成功した観察手法は植物病原菌を含む多くの糸状菌に対しても威力を発揮すると期待される。

本稿では、植物病原糸状菌の染色体観察や細胞遺伝学的解析に今後必須の手段となるであろう蛍光染色法とその応用である FISH について、筆者らが最近行った研究例を中心に概説する。植物病原糸状菌の染色体に興味を持たれている方々のご参考になれば幸いである。

## I 蛍光染色法による染色体観察

ここでいう蛍光染色法とは、蛍光顕微鏡で観察できるように染色体を蛍光色素で染める手法を指す。これは FISH のように複数の技術を組み合わせた複雑な手法ではないが、糸状菌の微小な染色体の観察にはきわめて有効である。また、染色体標本の作製方法や蛍光顕微鏡による観察方法に関して FISH と共通する点が多く、FISH を実施する際にも不可欠な基礎技術である。そこ

で、II に述べる FISH の基礎として、まず蛍光染色法について説明する。

### 1 蛍光染色法の特徴

蛍光染色法では、蛍光色素を染色体 DNA に結合させることによって染色体を染色する。したがって、蛍光染色による染色体像とは、多重にコイル化し折り畳まれた DNA 繊維の蛍光像と考えてよい。

蛍光染色法の利点は、ギムザ染色やオルセイン染色など従来の染色法が持つ欠点、すなわち、染色の特異性及び染色感度の限界 (どこまで微小な染色体を染色して可視化できるか) が不明であること、初心者では安定した染色結果を得にくいこと、試料作製や染色に手間がかかること、といった諸点が解消され、特異的で鋭敏な染色が比較的容易に行えることである。さらに、多重染色や生体染色が可能であることも利点としてあげられる。一方、欠点としては、蛍光の減衰のため長時間の観察が困難であることが最大の問題であったが、現在では減衰を抑制する試薬の添加や画像解析装置の発展により、この点はほぼ解決されている。

染色方法は、染色原理に基づき次の二つに大別できる。一つは、未変性の染色体 DNA に直接結合する蛍光色素を用いる方法で、色素分子はおののの性質に基づいて DNA 分子にインターカレート (intercalate) したり、イオン結合によって結合する。したがって、染色は色素溶液に標本を浸漬するだけで達成され、多重染色も容易に行える。他の方法は、Schiff 試薬に pararosaniline や acriflavine などの蛍光色素を用い、DNA を Feulgen 染色する方法である。この場合、蛍光色素は加水分解で脱プリン化した DNA に対し共有結合で結合する。この染色方法は、特異性が高く、DNA 量の測定にも利用できる反面、加水分解処理などの操作を必要とし、多重染色や生体染色も困難である。蛍光染色法として菌類で広く用いられているのは前者の染色法である。

染色に使用する色素は、DNA (あるいは RNA を含めた核酸) に特異的に結合すること、特定の波長で励起され強い蛍光を発すること、さらに、蛍光の減衰が抑制可能であることなどの諸性質を併せ持つものが望ましい。核酸染色性の色素は多いが、この条件を満たして実際に

Fluorescence Staining and Fluorescence *in situ* Hybridization for Chromosome Analysis of Plant Pathogenic Fungi.

By Masatoki TAGA and Minoru MURATA

染色体用に使用されている色素となると、かなり限定される。

菌類で最もよく用いられている色素は、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) である。DAPI は特に蛍光強度が強いため、微小染色体の観察には不可欠となっており、その染色特異性は、分子が2本鎖DNAの小溝(minor groove)に入り込み、塩基対A-Tと特異的にイオン結合することによる。DAPI 以外では、DNAや2本鎖化したRNAにインターカレートする propidium iodide (PI) も用いられる。acridine orange や mithramycin は核染色に用いられてきたが、染色体には使用されていない。

染色後の試料を蛍光顕微鏡で観察する際の原理や操作は、蛍光抗体法などの蛍光観察法と同様である。

## 2 体細胞染色体の観察

菌糸や分生子などの体細胞の分裂時に現れる体細胞染色体(somatic chromosome, mitotic chromosome)は、染色体サイズが極端に小さいことや、染色体の凝縮・分離が核膜の存在下で起こること、さらに細胞が固い細胞壁で保護されていることなどが障害となり、観察は難しいとされてきた。しかし、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)や以下に述べる数種の植物病原糸状菌では、染色体標本作製技術の工夫や蛍光染色法の導入によって詳細な観察が可能となってきた。

分裂酵母での観察は、京都大学の柳田らのグループによって行われたが、これは蛍光染色法を用いて菌類の体細胞染色体を詳細に観察したおそらく最初の例である(Umesono et al., 1983)。紙面の都合上、その紹介は省くが、温度感受性変異体と蛍光染色法を駆使した彼らの一連の研究は、糸状菌を材料とする場合にも参考にすべき点が多い。

ここでは、筆者らが行った植物病原糸状菌の観察例について、その方法と結果を紹介する。

### (1) 観察方法

#### 1) 染色体標本の作製 (FISHにも共通)

筆者らは、白根らの方法(Shirane et al., 1988)を用いて、灰色かび病菌(*B. cinerea*)、トマトアルターナリア茎枯病菌(*Alternaria alternata* tomato pathotype)、*Nectria haematococca* 菌(不完全世代:*Fusarium solani*)の染色体標本作製している。その手順を図-1に示した。

本方法の原理は、分生子発芽管細胞の破裂を利用して染色体を細胞外に放出し、スライドガラス上に広げるといったものである。細胞の破裂は、スライドガラス上に付着した発芽管を固定液(酢酸-メタノール混液)に浸漬

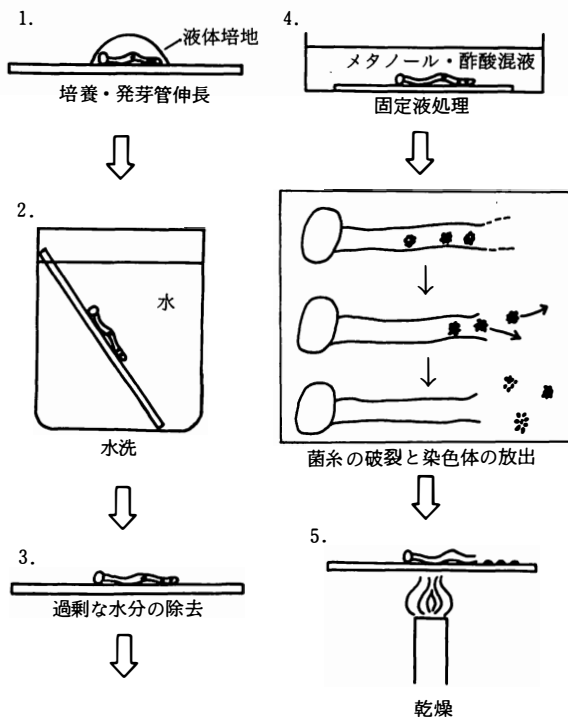


図-1 染色体標本の作製手順

- 新鮮な胞子をスライドガラス上の液体培地中で発芽させる。培養は、供試菌の種類ごとに条件の検討が必要である。*B. cinerea*では、胞子濃度 $5 \times 10^6$ /ml、暗黒下23°Cで7.5時間培養する(PDB使用)。
- 蒸留水に浸漬しスライドガラスを軽く振って培地と未発芽胞子洗い流す。発芽胞子は、付着したままスライドガラス上に残す。
- 蒸留水から引き上げ、ペーパータオルや濾紙で過剰な水分を吸い取る。
- メタノール・酢酸混液に浸漬し、室温下30分間静置する。この過程で染色体が細胞から放出されスライドガラス上に固定される。混液の組成は*B. cinerea*で99%メタノール:氷酢酸=9:1、*A. alternata*と*N. haematococca*で17:3である。
- 火炎を軽くくぐらせて乾燥させる。

したときに起き(白根, 私信), 放出された染色体はこの固定液によって化学的に固定されるとともに、スライドガラス上に付着する。同一核由来の染色体は、集団になって広がるので、核の染色体構成を調べることが可能となる。

標本作製の最大のポイントは、固定液中のメタノールと酢酸の混合比である。白根(私信)及び筆者らの経験では、メタノールの割合が最適値より高いと細胞の破裂率は向上するものの、放出される染色体が破壊されやすくなる。逆に、その割合が低いと破裂率が低下し、染色体がほとんど放出されなくなる。

良い標本を得るには、中期染色体が高頻度に出現している細胞集団を破裂させることが必要である。動植物では、そのために氷冷やコルヒチンなどの紡錘体形成阻害剤処理によって中期染色体像を強制的に蓄積しているが、病原糸状菌では現在のところ有効な処理方法が確立されていない。したがって、染色体像を増やすには、均一な胞子発芽（核分裂を同調化させるため）と細胞を破裂させるタイミング（分裂中期にある核の頻度が高い時期を選ぶ）が重要である。

本方法が適用できる条件は、核分裂時にクロマチンが凝集して明確な染色体を形成すること、及び胞子発芽管（あるいはその代用物としての菌糸）がスライドガラス上に付着することである。鞭毛菌類や接合菌類では体細胞分裂時にクロマチンが凝集しないとされる種があり（HEATH, 1980）、その場合には本方法は使えない。また、必須条件ではないが、*Botrytis* 属菌のように発芽管細胞が多核で、同調的に核分裂する性質を持つ菌のほうが単核細胞の菌よりも標本中の染色体の出現率が高く、材料として有利である。なお、白根らは上記の菌以外に数種の *Botrytis* 属菌、*Sclerotinia sclerotiorum*、*Venturia nashicola* に対しても本方法が適用できることを確認している（同上文献）。

## 2) 染色

上記の方法で作製した染色体標本は、細胞質の被覆が比較的少なく、蛍光染色はきわめて容易である。

染色は、1  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI を含む蛍光減衰防止液を標本にマウントし、カバーガラスをかけて、室温下 10 分程度暗所保存するだけで完了する。蛍光減衰防止液としては、*p*-phenylenediamine を有効主成分とする Johnson らの処方液（JOHNSON and ARAUJO, 1981）を用いる。また、1,4-diazobicyclo(2.2.2)octane (DABCO) を有効主成分とする減衰防止液（高橋・堀, 1991）も同程度に有効である。

染色には DAPI 以外の色素も使えるが、PI のように DNA と RNA 両方に結合する色素の場合は、前もって RNase で処理し、標本中から RNA を除去しておく必要がある。

## 3) 蛍光観察

落射型蛍光顕微鏡を用い、DAPI 染色標本を U 励起（オリンパス BH2-DMU キューブ使用）で観察する。対物レンズはプレパラートのスキャンに 40 倍、詳細な観察に 100 倍を用いる（いずれも蛍光観察用レンズ）。写真撮影は、ISO 400 のネガカラーフィルムを用い、露出をアンダー気味にして撮る。染色体の本数や形態の分析は、顕微鏡下で実際に見ながら行うことも可能である

が、写真に撮ってプリントの画像をみるほうが簡単で、正確に行える。

## (2) 実例

上記の方法で観察した *B. cinerea* と *A. alternata* の染色体を図-2 及び口絵カラー写真に示す。DAPI 染色による蛍光像は、ギムザ染色像よりも鮮明で、染色体の形態や本数の調査が十分可能であった。特に、形態については、サイズの相違、動原体と推定される狭窄部の存在、さらに突起状の構造（棍棒状の短いものや紐状の長いもの）などが特徴として認められた。これらは今後の核型分析に有用な指標として利用できると考えられる。また、*Botrytis* spp. では、筆者らが観察したと同様の突起構造を白根らが既に報告している（SHIRANE et al., 1988, 1989）が、ギムザ染色像だったためにその実体については不明であった。今回の DAPI 染色の結果から、突起構造は染色体としての凝縮状態から解放されたクロマチンであることが明らかとなった。

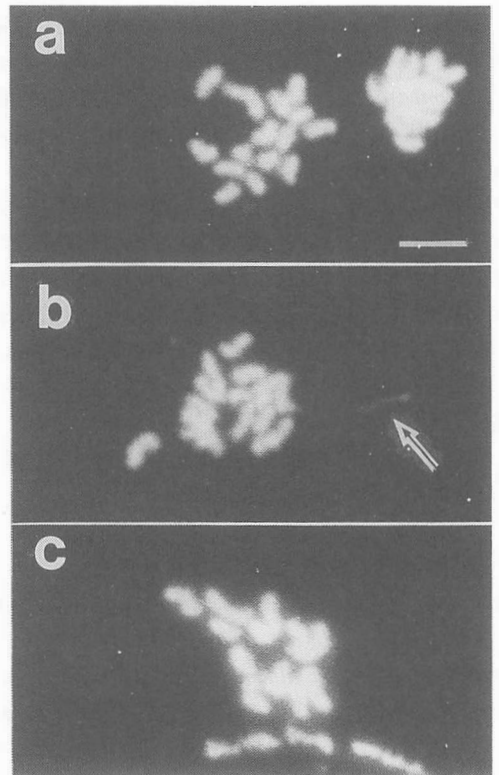


図-2 蛍光染色による染色体像  
DAPI で *B. cinerea* (a, b) と *A. alternata* (c) の染色体を染め、U 励起法で観察した。b 中の矢印は、クロマチンの突起構造を示す。a 中のスケールバーは 2  $\mu\text{m}$  で、b と c にも共通。口絵のカラー写真像も参照のこと。

なお、個々の染色体は、2本の姉妹染色分体から構成されているはずであるが、蛍光染色像にはそれを示す縦裂像はみつからなかった。これは、姉妹染色分体が密接しており、光学顕微鏡の分解能では識別できないためと思われる。

### 3 減数分裂染色体の観察

減数分裂染色体 (meiotic chromosome) は一般的に体細胞染色体より大きく、空間的にも広がって配置しているので、観察は体細胞染色体よりも容易である。ところが、蛍光染色による減数分裂染色体の詳細な観察は、筆者らの知る限り出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) とアカパンカビ (*Neurospora crassa*) についてしか報告がない。

出芽酵母では、空気乾燥法で作製した第一分裂中期二価染色体の DAPI 標本について詳細な蛍光顕微鏡観察が行われた (KUROIWA et al., 1984, 1986)。その結果、一般の植物染色体の千分の一のオーダーのサイズ (PFGE 分析で染色分体当たり約 200 kb) しかない最小染色体すら DAPI 染色によって観察できることが実証されるとともに、蛍光強度から個々の染色体や核小体形成体 (仁形成体, NOR) の DNA 量も推定された。そこで用いられた染色体標本作製方法や DNA の定量方法は、植物病原糸状菌でも十分利用できると思われる。実験手法に関しては詳しい邦文解説がある (中村・黒岩, 1987; 宮川, 1988)。

一方、アカパンカビについては、acriflavin を Schiff 試薬に用い、Feulgen 染色法で減数分裂染色体が観察された (RAJU, 1986)。この染色法を使えば、従来の染色法では十分染まらなかった複糸期や間期 I, II, III の染色体が明瞭に観察でき、さらに染色体数の決定も正確に行えることが明らかにされた。

## II FISH

*in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH) は、標識した核酸プローブを細胞や染色体などの標本中の核酸と直接ハイブリダイズ (分子雑種形成) させ、プローブと相補的な塩基配列を持つ核酸の存在部位を検出する方法である。FISH とは、ISH の手法のうち特に、ハイブリダイズした非放射性プローブを蛍光シグナルで検出するタイプのものをいう。

FISH は現在、高等動植物の遺伝子マッピングや染色体の構造解析に頻用され、染色体を対象とする研究には不可欠の手法となっている。ところが、FISH の菌類における利用はまだ始まったばかりで、報告としては酵母と筆者らが行った病原糸状菌の例があるのみである。

### 1 原理と特徴

FISH は互いに異なる分野で確立された技術が組み合わさった複合的な手法である。すなわち、染色体標本の作製、標識 DNA プローブの作製、ハイブリダイゼーション、蛍光染色、蛍光抗体法的観察といった細胞遺伝学や分子遺伝学領域の技術が融合して FISH が成立している。これらのうち、根幹となるのはもちろんハイブリダイゼーションであるが、その原理や操作はサザンブロットハイブリダイゼーション法などの他の分子雑種形成法と同じである。ハイブリダイゼーションを含め FISH を構成する各技術については、それぞれの分野の実験書等を参考にさせていただくとして、ここでは ISH の一手法としての FISH の特徴を中心として説明する。

まず、FISH と他の ISH との関係について述べる。ISH にはいくつかの手法があるが、一般的には、プロ-

表-1 FISH に用いられる代表的な標識-検出系

標識用ヌクレオチド	検出	
	1段階	2段階
ビオチン-7-dATP " -11-dCTP " -11-dUTP " -14-dATP " -16-dUTP (ニックトランスレーション, ランダムプライマー) <sup>○</sup>	アビジン-蛍光色素 <sup>ⓐ</sup> (ストレプトアビジン-蛍光色素)  ヤギ抗ビオチン	—  ロバ抗ヤギ- 蛍光色素 <sup>ⓐ</sup>
ジゴキシゲニン-16-dATP " -16-dUTP (ニックトランスレーション, ランダムプライマー) <sup>○</sup>	抗ジゴキシゲニン- 蛍光色素 <sup>ⓐ</sup> マウス抗ジゴキシゲニン	— ヤギ抗マウス- 蛍光色素 <sup>ⓐ</sup>
アセチルアミノフルオレン (AAF) (グアニン残基の直接的修飾) <sup>○</sup>	マウス抗 AAF	ヤギ抗マウス- 蛍光色素 <sup>ⓐ</sup>
蛍光色素 <sup>ⓑ</sup> -4-dUTP " -11-dUTP " -12-dUTP " -15-dATP (ニックトランスレーション, ランダムプライマー) <sup>○</sup>	—	—

<sup>ⓐ</sup>: フルオレセインイソチオシアネート (FITC), amino methyl coumarine acetic acid (AMCA), ローダミン, テキサスレッドなど。

<sup>ⓑ</sup>: フルオレセイン

<sup>○</sup>: プローブへの導入方法

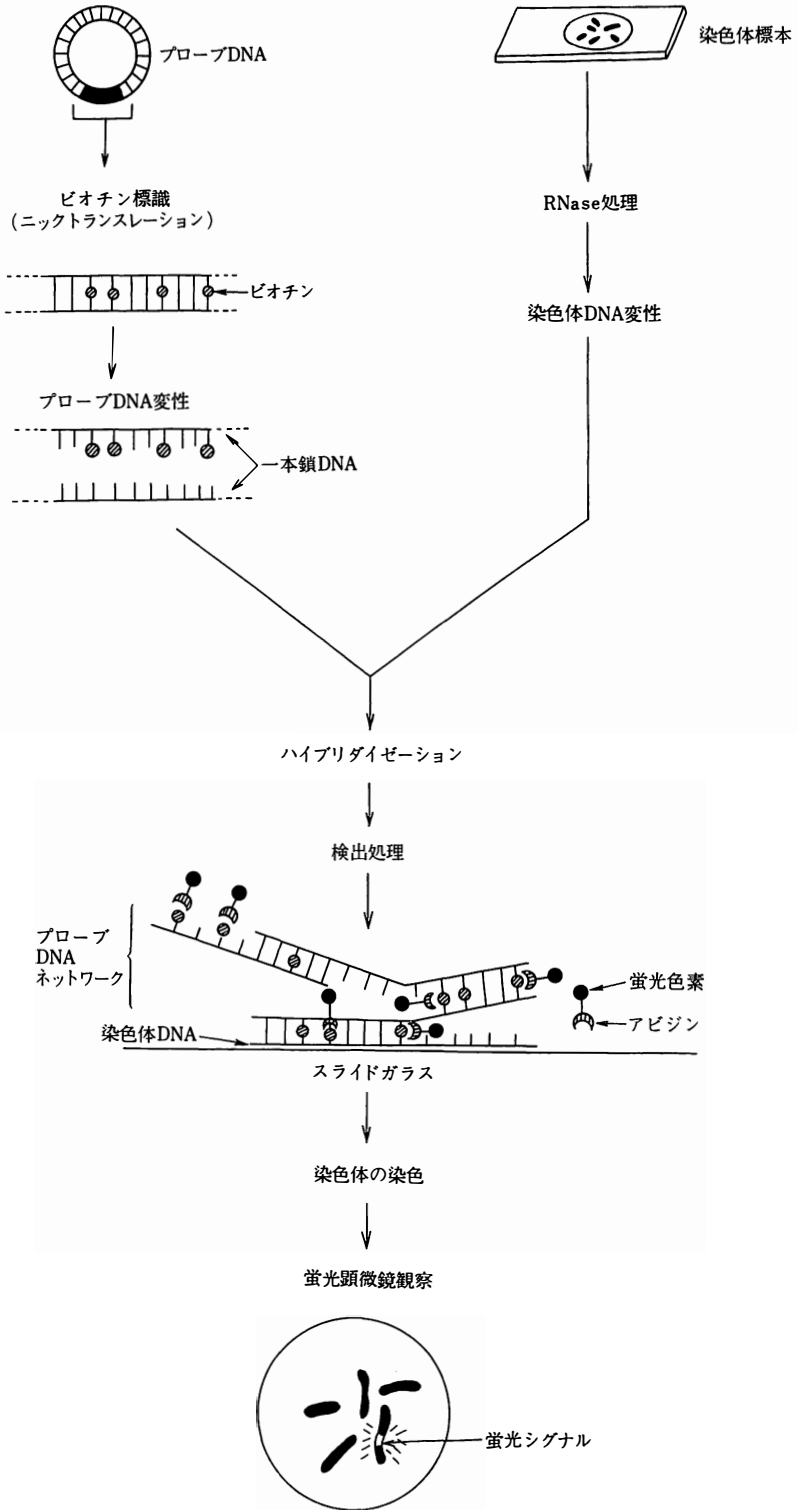


図-3 ビオチン-アビジン系を用いた FISH の概略 (文献 13)より改変)

ブの標識に放射性同位元素 (RI) を使うか、あるいは非放射性化合物 (非 RI) を使うかによって二つに分類される。前者の RI 法は、ハイブリダイズした標識プローブ (通常  $^3\text{H}$  標識) から出た  $\beta$  線の飛跡を乳剤に感光させ、出現した銀粒子を観察する方法である。この方法は検出感度は高いが、RI 設備を必要とすることや検出に長時間を要すること、さらにはシグナルの位置が不確実でノイズが出やすいといった難点がある。一方、後者の非 RI 法には、検出シグナルとして蛍光を用いる蛍光法、すなわち FISH と、酵素の発色反応による色素沈着を利用する酵素法があるが、いずれもハイブリダイズした部位上に直接シグナルを出現させる方法である。非 RI 法は、RI 法と比べてやや検出感度が落ちるといわれるが、RI 設備を必要とせず、短時間で精度の高い分析結果が得られるという長所があり、最近の ISH の実験にはこの非 RI 法が多用される。特に、染色体を対象とした ISH についていえば、FISH の使用が圧倒的に多い。

FISH では、いくつかのプローブ標識-検出系が用いられる (表-1) が、そのうち最も頻用されるのは、ピオチン-アビジンの 1 段階反応の系である。この系では、ピオチン化ヌクレオチドをニックトランスレーション法やランダムプライマー法でプローブ DNA に導入し、検出にはピオチンと特異的に結合するアビジンを利用する。アビジンにはあらかじめ FITC やローダミンなどの蛍光色素を結合させてあるので、励起光照射によってピオチンとアビジンの結合領域から蛍光シグナルが発せられ、結果として蛍光顕微鏡下でプローブと標的 DNA のハイブリダイズ部位を確認できる。その概略を図-3 に示した。ピオチン-アビジン以外の系では、プローブの標識は同様に行うが、検出に抗原抗体反応を利用するジゴキシゲニン-抗ジゴキシゲニン抗体系もよく用いられる。また、最近ではヌクレオチドに直接蛍光色素を付加した化合物 (例えば、フルオレセイン-15-dATP) が開発され、これをプローブに取り込ませた場合、特別な検出操作は不要である。

表-1 中の 2 段階反応は、試料中の標的 DNA の反復数が少ないなどの理由で 1 段階反応では弱いシグナルしか得られないときに、シグナルの増幅のために使用する。rRNA 遺伝子のように 1 か所で高度に反復する配列については、1 段階反応で十分である。

非 RI 法としての FISH の長所は前述したが、他の手法にはない FISH の大きな利点は、複数の標識-検出系を組み合わせることで多様な解析を行えることである。例えば、二つの異なるプローブについてそれぞれ異なる標識-検出系 (蛍光シグナル色も異なる) を適用し、同時に

ハイブリダイズさせることにより、試料中での二つの標的部位の位置関係を一度の実験で解析することが可能になる。これは、2 色標識 FISH と呼ばれるが、さらに 3 色以上の標識も可能で、これら多色標識 FISH は動植物の遺伝子マッピングの研究において複数の遺伝子の染色体上での位置関係の解析に重用されている。このほか、染色体の全体を標識するペインティング法 (chromosome painting) やゲノム特異的配列の検出に有効な *in situ* サプレッションハイブリダイゼーション法 (suppression hybridization) など次々と新しい応用手法が開発されている。

## 2 体細胞染色体への応用

菌類の体細胞染色体については、分裂酵母と筆者らが扱った病原糸状菌で FISH による観察が行われた。

分裂酵母では、rRNA 遺伝子 (rDNA)、動原体配列、テロメア隣接配列の三つをプローブとし、ジゴキシゲニン-抗ジゴキシゲニン抗体系の 1 あるいは 2 段階反応が使われた (UZAWA and YANAGIDA, 1992; FUNABIKI et al., 1993)。標識蛍光色素はテキサスレッド、ローダミン、フルオレセインである。これは、菌類における FISH の最初の適用例であり、rDNA が座上する染色体の同定や核分裂時の動原体、テロメアの行動の解析が分裂酵母で可能となった。

筆者らは、I で述べた *B. cinerea* と *A. alternata* の体細胞染色体に対して rDNA をプローブとする FISH を行い、この手法が植物病原糸状菌にも適用できることを示すとともに、供試菌の染色体や核型についていくつかの新知見を得ることができた (TAGA and MURATA, submitted)。以下には、筆者らの実験方法と結果について述べる。

### (1) 実験操作

FISH の手順の概略は図-3 に示したとおりである。それぞれの操作は次のように行う。

#### 染色体標本の作製

- ① I の蛍光染色用の標本作製法と同じ方法で乾燥標本を作る。
- ② DNase-free RNase (2 × SSC に溶解, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を適量標本に滴下, 湿室内で 37°C 下, 1 ~ 2 時間処理する。
- ③ 2 × SSC で洗浄, 次いでエタノールシリーズ (70% - 85% - 99%) にそれぞれ 5 分間浸漬して脱水した後, 風乾してハイブリダイゼーションに供試する。

注) : FISH 用の標本としては、染色体ができるだけ裸出していることが望ましい。筆者らが用いている白根らの方法はこの点で優れている。なお、分裂酵母ではス

フェロプラスト化した固定細胞を破裂させず、そのまま用いている。

#### 標識プローブの作製

いくつかの標識用市販キットが利用できるが、筆者らはニックトランスレーション法で biotin-14-dATP を導入する BioNick Labelling System (GIBCO BRL) を使用している。

① TE で希釈したプローブ DNA (全量 1  $\mu\text{g}$ ) を用い、キットの処方に従って反応させる。

② 反応後の溶液をエタノール沈殿処理し ( $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 晩, あるいは  $-80^{\circ}\text{C}$  で 30 分以上), プローブに取り込まれなかったヌクレオチドを除く。

③ 沈殿した DNA を乾燥後, 10~20  $\mu\text{l}$  の TE に溶解して  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存 (1 年程度の長期保存可能)。

注: プローブ DNA は, ベクター部分を含んでいた方がハイブリダイズ時のネットワーク形成の効率が良く, シグナルが大きくなるので観察しやすい。

#### ハイブリダイゼーション

別々に変性させたプローブと染色体標本をハイブリダイズさせる方法もあるが, 筆者らは簡便法である同時変性法を用いている。

① 次の組成のハイブリダイゼーション溶液を準備する。

	液量 ( $\mu\text{l}$ )	最終濃度
脱イオン化ホルムアミド	50	50% (v/v)
50% (w/v) 硫酸デキストラン	20	10% (w/v)
20 $\times$ SSC	10	2 $\times$ SSC
超音波処理済サケ精子 DNA	1	100 ng/ $\mu\text{l}$
ビオチン標識プローブ (25~100 ng/ $\mu\text{l}$ )	8~19	2~20 ng/ $\mu\text{l}$

② スライドガラスの標本部分に 15  $\mu\text{l}$  のハイブリダイゼーション溶液を載せ, カバーガラス (18 $\times$ 32 mm) をかぶせる。

③ ラバーセメントでカバーガラスの周囲をシールし, 30 分程放置する。

④ 78~80 $^{\circ}\text{C}$  のホットプレートで 1.5 分間加熱し, プローブと染色体の DNA を変性させる。

⑤ 湿室に入れ, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 12~15 時間インキュベートする。

#### 検出

① ラバーセメントをピンセットではぎ取り, カバーガラスを 2 $\times$ SSC 中ではずす。

② 37 $^{\circ}\text{C}$  の 50% (v/v) ホルムアミド - 2 $\times$ SSC に 10 分間浸漬。

③ 2 $\times$ SSC に移し, 室温下 10 分間静置。これをもう

一度繰り返す。

④ 0.05% (v/v) ツイーン 20 - 4 $\times$ SSC に移し, 室温下 5 分間静置。

⑤ ブロッキング液 (3% BSA - 4 $\times$ SSC) を 200  $\mu\text{l}$  載せ, 室温下 5 分間静置。

⑥ ブロッキング液を軽く切った後, アビジン-FITC (ブロッキング液で 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調整したもの) を 40  $\mu\text{l}$  載せ, カバーガラスをかける。

⑦ 湿室に入れ, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートする。

⑧ カバーガラスをはずし, 0.05% ツイーン 20 - 4 $\times$ SSC に浸漬, 遮光下室温で 5 分間洗浄。これを 4 回繰り返す。

⑨ 2 $\times$ SSC ですすいだ後, 染色液 (DAPI と PI いずれも 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 蛍光減衰防止液で調整) を載せ, カバーガラスをかけて遮光下 30 分間染色。蛍光減衰防止液は I で述べたと同じ Johnson らの処方液を用いる。

#### 蛍光顕微鏡観察

① U 励起で DAPI 染色像を観察し, 良い染色体像を探す。

② B (オリンパス BH 2-DMB キューブ使用) または IB 励起 (同 BH 2-DMIB) に切り替え FITC のシグナル (黄色) と PI 染色した染色体 (赤色) を観察する。

③ 写真撮影は I と同様に行う。

#### (2) 実例

*B. cinerea* と *A. alternata* の体細胞染色体に対して FISH を適用した。プローブとしては名古屋大学の柘植らによって Bluescribe M 13 (Stratagene) にクローン化されたナシ黒斑病菌 (*A. alternata* Japanese pear pathotype) の rDNA (T<sub>SUG</sub>E et al., 1989) を用いた。この rDNA のクローニングはいくつかの断片に分けて行われているが, 筆者らが用いたプラスミド (2 種類を混合使用) 中には, 反復単位のうち, 28 S, 5.8 S 及び転写される介在配列の全領域, さらに 18 S 領域の半分以上が含まれている。

FISH の結果, プローブは両菌の染色体 DNA とよくハイブリダイズし, 明瞭な FITC のシグナルを観察することができた (口絵写真参照)。口絵において黄色の部分が FITC によるシグナルであり, 両菌のゲノム中での rRNA 遺伝子クラスターの存在部位を示している。シグナルの形状は, 両菌とも短い棍棒状のものから数珠玉様を呈する長い紐状のものまで変異があったが, どのシグナルも小さい 1 本の染色体の先端付近から出ている。これらの観察結果は, 両菌のゲノムには rRNA 遺伝子クラ

スター、つまり NOR が一つしか存在せず、しかも核分裂時には、その部位のクロマチンが高度の凝縮状態から解放されてダイナミックに変化していることを示している。また、蛍光染色で観察されたクロマチンの突起構造は NOR であることも明らかである。なお、NOR が凝縮状態から解放されているということは、rRNA 遺伝子が転写状態にあることを示唆しており、菌類では高等動物とは異なり核分裂中にも核小体が存続するという細胞学的知見と符合する。

### 3 減数分裂染色体への応用

スライドガラス上に広げた出芽酵母のパキテン (太糸) 期染色体標本に対して、ピオチン-アビジン系とデコキシゲニン-抗デコキシゲニン抗体系を利用した 2 色標識 FISH を適用した例がある (SCHERTHAN et al., 1992)。プローブとして rDNA と第 5 染色体特異的配列、標識蛍光色素にはテトラメチルローダミン B と FITC を用いている。彼らの研究以外には、菌類での減数分裂染色体に対する報告は見当たらない。

### おわりに

菌類、とりわけ植物病原糸状菌では、染色体に関する知見の蓄積に乏しく、研究対象としている菌の染色体数すら確定していないことも多い。しかし、遺伝子の行動や個体あるいは種として保持している遺伝情報の総体

(ゲノム) が染色体という構造に基盤を置いている以上、染色体に関する知見の必要性は明白である。本稿で紹介した蛍光染色法や FISH は、菌類におけるこの状況を打開するための強力な武器となるはずである。今後、多くの研究者がこれらの手法を試み、より洗練された技術へと改良されることを期待する。

### 引用文献

- 1) FUNABIKI, H. et al. (1993) : J. Cell Biol. 121 : 961~976.
- 2) HEATH, I. B. (1980) : Int. Rev. Cytol. 64 : 1~80.
- 3) JOHNSON, G. D. and G. M. ARAUJO (1981) : J. Immunol. Methods 43 : 349~350.
- 4) KUROIWA, T. et al. (1984) : Exp. Cell Res. 153 : 259~265.
- 5) ——— et al. (1986) : ibid. 165 : 199~206.
- 6) 宮川 勇 (1988) : 植物組織培養 5 : 47~49.
- 7) 中村宗一・黒岩常祥 (1987) : 蛋白質核酸酵素. 別冊 No. 30 : 140~149.
- 8) RAJU, N. B. (1986) : Mycologia 78 : 901~906.
- 9) SCHERTHAN, H. et al. (1992) : Chromosoma 101 : 590~595
- 10) SHIRANE, N. et al. (1988) : Phtopathology 78 : 1627~1630
- 11) ——— et al. (1989) : ibid. 79 : 728~730.
- 12) TAGA, M. and M. MURATA : submitted.
- 13) 高橋永一・堀 雅明 (1991) : ラボマニュアルヒトゲノムマッピング (堀 雅明・中村祐輔編), 丸善, 東京, p128.
- 14) TSUGE, T. et al. (1989) : Curr. Genet. 16 : 267~272.
- 15) UMESONO, K. et al. (1983) : ibid. 7 : 123~128.
- 16) UZAWA, S. and M. YANAGIDA (1992) : J. Cell Sci. 101 : 267~275.

### 新刊紹介

#### 「天敵農薬—チリカブリダニその生態と応用—」

森 樊須 編

A 5 版, 130 頁, 定価 2,400 円

日本植物防疫協会 1993 年 10 月発行

本書は、編者の森 樊須博士はじめ、チリカブリダニ研究の第一線で活躍中の斎藤 裕・古橋嘉一・中尾弘志・芦原 亘各氏の共著によるものである。書名の「天敵農薬」という言葉は、従来使用されている「生物農薬」と同義に用いられており、本書の中で「天敵として害虫の数を減らす能力が抜群であっても、何か他の理由でその土地に土着できない生物」を、農薬のようにあらかじめ生産しておいて「適宜放飼するという利用法」であると定義されている。欧米では生物農薬 (biotic insecticide) という言葉が、*Trichogramma* の利用などで見られる大量放飼 (inundative release) に限定して用いられているので、それとの混同を避ける意味から、チリカブリダニなどの接種的放飼 (inoculative release) をも含む

周期的放飼全般を指す言葉として、妥当な用法と思われる。

本書の内容は、副題にあるとおり、主としてチリカブリダニの生態とその農業的利用に関するものであり、天敵の増殖販売を計画している企業の技術者や、現場でそれを利用する農業従事者の手引書としても役立つようにとの配慮からか、極めて平易な文章で書かれている。まず、ハダニの被害と従来の防除法についての紹介に始まり、ハダニとその有力天敵カブリダニの研究史、チリカブリダニの生態的特徴と農業的利用に関する基礎知識、その増殖・利用方法、施設園芸における利用試験の実例と問題点などを含む。中でも注目されるのは、著者らが独自に開発し、目下特許申請中の大量増殖技術の詳細を解説している点である。天敵農薬の開発を目指しているわが国の各企業が、この技術をさらに改良して本天敵農薬の国産化を実現させる上で、本書は大いに参考になる。また各都道府県の研究者・技術者や農業従事者にとっても、本天敵利用の実用化と普及に役立つものと確信する。  
(九州大学農学部 村上陽三)