

コムギ近縁種 *Dasypyrum villosum* と *Thinopyrum intermedium* における rRNA 遺伝子の Multicolor FISH

袁 文業* · 富田因則* · 孫 善澄** · 安室喜正*

平成 12 年 6 月 30 日受付

*鳥取大学農学部生物生産学講座, **山西省農業科学院作物遺伝研究所

Multicolor Fluorescence *in situ* Hybridization of the rRNA Genes in Wheat Relatives, *Dasypyrum villosum* and *Thinopyrum intermedium*

Wen-Ye Yuan*, Motonori Tomita*, Shan-Cheng Sun** and Yoshimasa Yasumuro*

* Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan

** Institute of Crop Genetics, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China

Dasypyrum villosum ($2n = 14, VV$) and *Thinopyrum intermedium* ($2n = 42, E_1E_1E_2E_2XX$) are important wheat relatives providing useful resistant genes for wheat improvement. In this paper, rRNA genes coding 25S-5.8S-18S rRNA and 5S rRNA were visualized on *D. villosum* and *Th. intermedium* chromosomes by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. The 25S-5.8S-18S rRNA genes were localized on the short arm of 1V chromosome, and 5S rRNA genes were on the short arm of 5V chromosome of *D. villosum*. On the other hand, three pairs of the 25S-5.8S-18S rRNA genes and four pairs of the 5S rRNA genes were observed on the *Th. intermedium* chromosomes, in which 2 pairs of chromosomes have both rRNA genes on their short arms.

(Received 30 June, 2000)

Keywords: *Dasypyrum villosum*, *Thinopyrum intermedium*, rRNA gene, multicolor fluorescence *in situ* hybridization, chromosomal localization

結 言

コムギの近縁種 *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy ($2n = 14, VV$) は、うどんこ病抵抗性、立枯病抵抗性、耐旱性などに優れたストレス抵抗性遺伝子源であり、染色体の添加[16, 22], 置換[16]および転座[20]によって *D.*

villosum のクロマチンがコムギゲノムに移入されている。一方、コムギの近縁種 *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & Dewey ($2n = 42, E_1E_1E_2E_2XX$) は、さび病抵抗性、BYDV 抵抗性、耐旱性、耐寒性などの貴重な遺伝子源であり、染色体の添加[9, 17, 18]と転座[25]によって *Th. intermedium* のクロマチンがコムギに移入されてい

る。

コムギ族植物では *Triticum aestivum* [2, 14, 19, 24], *Secale cereale* [1, 2, 5, 14], *Hordeum vulgare* [2, 10, 14, 24], *Aegilops umbellulata* [3, 4], *Thinopyrum elongatum* [6, 7], *Thinopyrum distichum* [7] について rRNA 遺伝子の染色体上の位置が報告されている。これらの rRNA 遺伝子座はコムギゲノムに移入された外来染色体の同定や、コムギ族の起源と進化の解明に利用されている。しかしながら、重要なストレス抵抗性遺伝子源である *D. villosum* では rRNA 遺伝子の数だけが報告されており [11], *Th. intermedium* については rRNA 遺伝子の数と位置の報告はない。

本研究では、rRNA 遺伝子座を *D. villosum* と *Th. intermedium* の染色体の DNA マーカーに利用するため、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子と 5S rRNA 遺伝子を異なる蛍光色素で標識して同時検出する multicolor FISH 法によって、それらの染色体上の数と位置を分析した。

材料及び方法

染色体標本の作製

D. villosum (Syn: *Haynaldia villosa* (L) Schur, 2n = 14, VV) と *Th. intermedium* (Syn: *Agropyron intermedium* (Host) Beauv; *Elytrigia intermedia* (Host) Nevski, 2n = 42, E₁E₁E₂E₂XX) の種子を 25°C で発芽させ、根端 10 mm 程度を切り取って 0°C の氷水中で 24 時間前処理し、ファーナー液 (100% エタノール: 酢酸 = 3:1) で固定した。

酵素解離法で染色体標本を作製した。根端を酵素液 (2% セルラーゼ オノズカ RS, 1.5% ペクトアーゼ Y-23, 0.3% マセロザイム R-200, 1 mM EDTA, pH 4.2) によって室温で 30 分間解離した。この根端を蒸留水で洗浄後、45% 酢酸を滴下して押し潰し法で染色体標本を作製した。この染色体標本を -80°C で 1 時間凍結し、カバーガラスをはずして自然乾燥後、-20°C で保存した。

染色体標本に 600 μl の 80 μg/ml RNase (SIGMA) / 2 × SSC 溶液を滴下し、カバーガラスをかけて 37°C で 1 時間 RNA を分解した。2 × SSC, 70% エタノール, 95% エタノール, 99% エタノールでそれぞれ 5 分間ずつ洗浄し、室温で 30 分間乾燥させた。

Multicolor FISH 法

In situ ハイブリダイゼーションは Tomita により改良された方法に従った [23, 26]。9 kb のコムギ 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子を含む pTa71 [12] を digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim) で標識し、410 bp のコムギ 5S rRNA

遺伝子を含む pTa794 [13] を biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim) で標識した。

ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド, 2 × SSC, 3 ng/μl biotin-probe DNA, 3 ng/μl dig-probe DNA, 300 ng/μl サケ精子 DNA) を 99°C で 10 分間変性し、氷上で 5 分間急冷した後、染色体標本 1 枚あたりに 15 μl 滴下し、22 × 30 mm のカバーガラスをかけてペーパーバンドで封入した。この染色体標本をサーマルサイクラーで 25°C で 30 分間乾燥し、さらに、82°C で 8 分間染色体 DNA を変性した後、38°C で一晚プローブ DNA との分子雑種を形成させた。ハイブリダイゼーション反応後、染色体標本からカバーガラスをはずし、40°C に保温した 2 × SSC で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、さらに、40°C の 4 × SSC で 10 分間洗浄した。

洗浄後の染色体標本に 600 μl の 5% BSA/BT buffer (0.05% Tween 20, 0.1 M NaHCO₃) を滴下し、38°C のサーマルサイクラーで 5 分間ブロッキングした。1% BSA/4 × SSC に 10% avidin-FITC (Boehringer Mannheim) と 10% anti-dig-rhodamine (Boehringer Mannheim) を含む抗体溶液を 70 μl 滴下し、保温箱の中で 38°C で 60 分間反応させた。反応後、40°C に保温した BT buffer で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、さらに、2 × SSC で 10 分間洗浄した。

さらに、FITC の蛍光シグナルを増幅するため、染色体標本に、まず、600 μl の 5% goat serum/BT buffer を滴下し、38°C で 5 分間ブロッキングさせた。これに 70 μl の 2% biotinylated anti-avidin (Vector Laboratory) / 5% BSA/BT buffer を滴下し、保温箱で 38°C で 60 分間反応させた。これを 40°C に保温した BT buffer で 10 分間ずつ 3 回洗浄した後、染色体標本に 600 μl の 5% BSA/BT buffer を滴下して 38°C で 5 分間ブロッキングさせた。さらに、70 μl の 2% extro-avidin-FITC (Vector Laboratory) / 5% BSA/BT buffer を滴下し、38°C で 60 分間反応させて、biotin-probe の FITC 蛍光シグナルを増幅した。これを 40°C に保温した BT buffer で 10 分間ずつ 2 回洗浄し、さらに、2 × SSC で 10 分間洗浄した。

洗浄後の染色体標本を 1 μg/ml DAPI (Boehringer Mannheim) / メタノールに浸して対比染色し、70 μl の 1% DABCO (Sigma) / グリセロールを滴下してカバーガラスをかけて 4°C で 2 時間放置した後、OLYMPUS 社の蛍光顕微鏡 BX40 蛍光顕微鏡で観察した。WBV フィルターでは染色体が DAPI によって青色に発光し、WIBA フィルターでは pTa794 プローブが FITC によって青色に発光し、WIGV フィルターでは pTa71 プローブが rhodamine によって赤色に発光して観察された。代表的な細胞について、Fuji Color HG1600 フィルムを用いて、上記のフィルターを組み合わせて二次露出法で撮影した。

C-banding

C-banding は Gill らの方法[15]に従った。C-banding 処理後、染色体標本を $2\times$ SSC で 1 時間、45% 酢酸で 2 分間、さらに、 $2\times$ SSC で 5 分間洗浄し、つづいて 70% エタノール、95% エタノール、99% エタノールでそれぞれ 5 分間ずつ脱水した。これを室温で 30 分間乾燥した後、上記の Multicolor FISH 法を行った。

結 果

Multicolor FISH 法 によって、digoxigenin で標識した 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子プローブは rhodamine により赤色の蛍光シグナルとして観察され、biotin で標識した 5S rRNA 遺伝子プローブは FITC により黄緑色の蛍光シグナルとして観察された。また、これらの rRNA 遺伝子プローブとハイブリダイゼーションしていない染色体部分は青色を呈した。

D. villosum 染色体上における rRNA 遺伝子の multicolor FISH 分析

D. villosum では、第 1 図の *a* と *b* に示すように、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子は附随体を持つ Sat 染色体の短腕にある仁形成部位 (NOR) に 1 カ所検出された。また、5S rRNA 遺伝子は別の染色体の短腕末端近くに 1 カ所検出された。蛍光シグナルは 5S rRNA 遺伝子より 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が強かった。C-banding 法によって、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が附随体を持つ 1V 染色体の短腕に座乗し、5S rRNA 遺伝子は 5V 染色体の短腕末端に座乗することがわかった(第 1 図: *c*)。

Th. intermedium 染色体上における rRNA 遺伝子の multicolor FISH 分析

Th. intermedium では、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が 3 カ所に検出され(第 1 図: *d*)、5S rRNA 遺伝子は 4 カ所に検出された(第 1 図: *e*)。25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子を短腕末端に持ち、5S rRNA 遺伝子を同じ短腕の 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子より動原体側に持つ染色体が 2 対あった。この他、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子だけを短腕に持つ染色体が 1 対あり、5S rRNA 遺伝子だけを短腕に持つ染色体が 2 対あった。このうち、5S rRNA 遺伝子の 1 カ所はほかの 3 カ所より蛍光シグナルが微弱だった。

考 察

Multicolor FISH では複数の DNA プローブの染色体上のハイブリダイゼーションシグナルを異なる蛍光色で同時

に検出することができる。本研究では *D. villosum* と *Th. intermedium* について、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子と 5S rRNA 遺伝子の数と位置を解析した。*D. villosum* では、さらに C-banding 法を行うことによって、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子座が 1V 染色体の仁形成部位 (NOR) に一致することが明らかとなり、5S rRNA 遺伝子は 5V 染色体の短腕に座乗することが分かった。今後、C-banding 法だけでは困難を要する 4V と 5V の区別[8] が 5S rRNA 遺伝子座の検出によって容易になる。

Th. intermedium は六倍体でかつ染色体が小さく、染色体の同定が困難であり、rRNA 遺伝子は *Th. intermedium* 染色体の有効なマーカーになる。*Th. intermedium* ($E_1E_1E_2E_2XX$) には *Th. elongatum* の E ゲノム由来するゲノムが存在し[6]、*Th. elongatum* の 5ES と 6ES に 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が座乗している[6, 7]。従って、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が座乗する *Th. intermedium* の 3 種類の染色体には第 5 同祖群と第 6 同祖群の染色体が含まれていると予想される。

コムギ族植物では、*T. aestivum* [2, 14, 19, 24]、*S. cereale* [1, 2, 5, 14]、*H. vulgare* [2, 10, 14, 24]、*Ae. umbellulata* [3, 4]、*Th. elongatum* [6, 7]、*Th. distichum* [7] で rRNA 遺伝子の染色体上の数や位置が報告されている。*T. aestivum* では、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が 1B と 6B 染色体に座乗し[2]、5S rRNA 遺伝子は A、B、D ゲノムの第 1 同祖群と第 5 同祖群のすべての染色体の短腕に存在している[21]。*S. cereale* では、1R 染色体の短腕に 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子と 5S rRNA 遺伝子が座乗し[2]、5RS と 3RS にも 5S rRNA 遺伝子が座乗している[1]。一方、*H. vulgare* と *Th. elongatum* では、25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子が第 5 同祖群と第 6 同祖群の染色体に座乗し、5S rRNA 遺伝子は第 1 同祖群の染色体に座乗している[2, 7, 10]。本研究では、*D. villosum* は、*T. aestivum*、*S. cereale* と同様に第 1 同祖群の染色体に 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子を持つが、1V には 5S rRNA 遺伝子が検出されなかった。以上のように、コムギ族植物における rRNA 遺伝子の数と位置は異なっており、*D. villosum* の rRNA 遺伝子座はコムギ族植物の起源と進化の解明の新しい情報になると考える。

謝 辞

本研究を行うにあたり、pTa71 と pTa794 を頂いた John Innes Centre の J. S. Heslop-Harrison 博士に御礼申し上げる。また、ご協力頂いた馬 有志博士に御礼申し上げます。本研究費の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員奨励費: ID. P99332) によった。

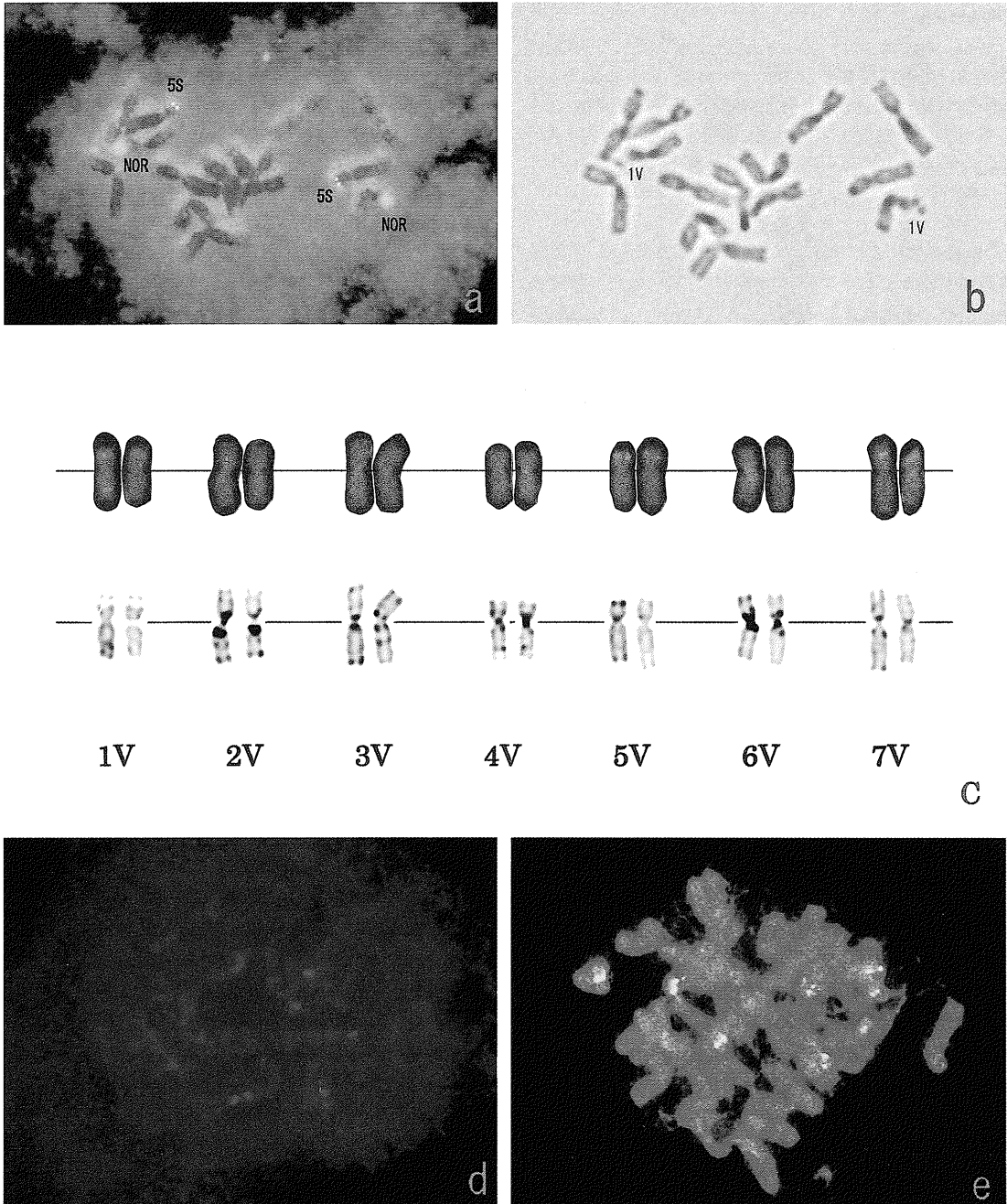


図1. 染色体蛍光 in situハイブリダイゼーション法による *D. villosum* と *Th. intermedium* における 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子座と 5S rRNA 遺伝子座の検出。 **a**: *D. villosum* において rhodamine で検出された 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子座と FITC で検出された 5S rRNA 遺伝子座。 **b**: **a** と同じ細胞で 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子は Sat を持つ 1V 染色体短腕の NOR サイトに一致する。 **c**: *D. villosum* 染色体の C-banding と Multicolor FISH。 1V 染色体短腕の NOR サイトの 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子座と 5V 染色体短腕の 5S rRNA 遺伝子座。 **d** と **e**: *Th. intermedium* の 3 対の染色体における 25S-5.8S-18S rRNA 遺伝子座と 4 対の染色体における 5S rRNA 遺伝子座。

引用文献

- 1) Alonso-blanco, C., Pendas, A. M., Garcia-Suarez, R., Roca, A., Goicoechea, P. G. and Giraldez, R. : Physical mapping of 5S rDNA reveals a new locus on 3R and unexpected complexity in a rye translocation used in chromosome mapping. *Chromosoma*, 103:331-337 (1994)
- 2) Appels, R., Gerlach, W. L., Dennis, E. S., Swift, H. and Peacock, W. J. : Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in Cereals. *Chromosoma (Berl.)*, 78:293-311 (1980)
- 3) Badaeva, E. D., Friebe, B. and Gill, B. S. : Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome*, 39:1150-1158 (1996)
- 4) Castilho, A. and Heslop-Harrison, J. S. : Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome*, 38:91-96 (1995)
- 5) Cuadrado, A., Ceoloni, C. and Jouve, N. : Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence in situ hybridization. *Genome*, 38:1061-1069 (1995)
- 6) Dvorak, J., Lassner, M. W., Kota, R. S. and Chen, K. C. : The distribution of the ribosomal RNA genes in the *Triticum speltooides* and *Elytrigia elongata* genomes. *Can. J. Genet. Cytol.*, 62:628-632 (1984)
- 7) Fominaya, A., Molnar, S., Kim, N. S., Chen, Q., Fedak, G. and Armstrong, K. C. : Characterization of *Thinopyrum distichum* chromosomes using double fluorescence in situ hybridization, RFLP analysis of 5S and 26S rRNA, and C-banding of parents and addition lines. *Genome*, 40:689-696 (1997)
- 8) Friebe, B., Cermenio, M. C. and Zeller, F. J. : C-banding polymorphism and the analysis of nuclear activation in *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy, its added chromosomes to hexaploid wheat and the amphiploid *Triticum dicoccum-D. villosum*. *Theor. Appl. Genet.*, 73:337-342 (1987)
- 9) Friebe, B., Mukai, Y., Gill, B. S. and Cauderon, Y. : C-banding in situ hybridization analyses of *Agropyron intermedium*, a partial wheat X *Ag. intermedium* and amphiploid, and six derived chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.*, 83:589-596 (1992)
- 10) Fukui, K., Kamisugi, Y. and Sakai, F. : Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes. *Genome*, 37:105-111 (1994)
- 11) Galasso, I., Blanco, A., Katsiotis, A., Pignone, D. and Heslop-Harrison, J. S. : Genomic organization and phylogenetic relationships in the genus *Dasypyrum* analysed by Southern and in situ hybridization of total genomic and cloned DNA probes. *Chromosoma*, 107:53-61 (1997)
- 12) Gerlach, W. L. and Bedbrook, J. R. : Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl. Acids Res.*, 7:1869-1885 (1979)
- 13) Gerlach, W. L. and Dyer, T. A. : Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucl. Acids Res.*, 8:4851-4865 (1980)
- 14) Gill, B. S. and Appels, R. : Relationships between *Nor*-loci from different *Triticeae* species. *Pl. Syst. Evol.*, 160:77-89 (1987)
- 15) Gill, B. S., Friebe, B., and Endo, T. R. : Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 34:830-839 (1991)
- 16) Liu, D. J., Chen, P. D., Pei, G. Z., Wang, Y. N., Qiu, B. X. and Wang, S. L. : Transfer of *Haynaldia villosa* chromosomes into *Triticum aestivum*; in *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, ed. Miller, T. E. and Koebner, R. M. D., Cambridge (1988) pp. 355-361
- 17) Ma, Y. Z., Nakata, N., Tomita, M. and Yasumuro, Y. : Development of common wheat-*Agropyron intermedium* chromosome addition lines; in *Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp.*, ed. Li, Z. S. and Xin, Z. Y., Beijing (1993) pp. 379-383
- 18) 馬 有志・富田因則・中田 昇・安室喜正 : 普通コムギに添加された *Agropyron intermedium* 染色体の同定に使用できる *Ag. intermedium* に由来する反復 DNA 配列 350 bp ファミリー. *育種学雑誌*, 44:183-189 (1994)
- 19) Mukai, Y., Nakahara, Y. and Yamamoto, M. : Simultaneous discrimination of the three genomes

- in hexaploid wheat by multicolor fluorescence in situ hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 36:489-494 (1993)
- 20) Qi, L. L., Cao, M. S., Chen, P. D., Li, W. L. and Liu, D. J. : Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat. *Genome*, 39:191-197 (1996)
- 21) Roder, M. S., Sorrells, M. E. and Tanksley, S. D. : 5S ribosomal gene clusters in wheat: pulsed field gel electrophoresis reveals a high degree of polymorphism. *Mol. Gen. Genet.*, 232:215-220 (1998)
- 22) Sears, E. R. : Addition of the genome of *Haynaldia villosa* to *Triticum aestivum*. *Am. J. Bot.*, 40: 168-171 (1953)
- 23) Tomita, M. : Cloning and chromosomal localization of a new mobile DNA element distributed in the rye genome; in Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp., Vol. 1 Keynote Addresses and Oral Presentations, ed. Slinkard, A. E., Saskatoon (1998) pp. 24-28
- 24) Xin, Z. Y. and Appels, R. : Occurrence of rye (*Secale cereale*) 350-family DNA sequences in *Agropyron* and other *Triticeae*. *Pl. Syst. Evol.*, 160: 65-76 (1988)
- 25) Xin, Z. Y., Brettell, R. I. S., Cheng, Z. M., Waterhouse, P. M., Appels, R., Banks, P. M., Zhou, G. H., Chen, X. and Larkin, P. J. : Characterization of a potential source of barley yellow dwarf virus resistance for wheat. *Genome*, 30:250-257 (1988)
- 26) Yuan, W. Y., Tomita, M., Sun, S. C. and Yasumuro, Y. : Identification of multi-alien genome carrying different powdery mildew resistant genes from rye and *Haynaldia villosa* into wheat genome. *Genes Genet. Syst.*, 73:377-384 (1998)