

in situ ハイブリダイゼーション実験の生物教育への利用

— 親から子へのゲノムの伝達を視覚的に理解させる教材の開発 —

高橋ちぐさ^{*1}

The application of genomic *in situ* hybridization to biological education
- The development of teaching materials to show visually
the two parental genomes in the F1 hybrid -

TAKAHASHI Chigusa^{*1}

キーワード： 教材開発, 属間雑種, 両親のゲノム, 視覚的識別

Key words: development of teaching material, bigeneric hybrid, two parental genomes, visual discrimination

I はじめに

体細胞分裂を扱った教育論文を過去に遡ってみると、多くの研究者によって多数の論文が発表されており、いかにこの単元および実験が中等生物教育において重要視されているかということがわかる。これは同時に、実験実施に困難を覚える分野であるということも示唆していると思われる。これまでに発表されている論文は、体細胞分裂期中期染色体の観察方法に焦点を当てた研究が大半を占めており、その着眼点は共通して、細胞分裂観察教材として適する材料の検討あるいは細胞分裂観察方法に置かれている。そのうち方法論は、ほとんどの場合、染色体を染めやすい染色法の紹介と、分裂指数の高い材料を採取する方法に集中している。

私は、「生命の連続性」を学ぶ上で、細胞分裂における親から子へのゲノム伝達機構を理解することは大変重要なテーマであると考えている。よって、体細胞分裂の観察で、単に細胞の増殖について学ばせるだけに留まらず、また、核型分析において、生物の種における染色体の数と形の一定性を学ばせることだけに留まらずに、この単元の学習を通して、生徒や学生に体細胞の染色体組の中で

^{*1} 鳥取大学教育地域科学部学校教育課程教科教育講座

対をなす染色体のそれぞれは、両親から1個ずつ受け継いだものであるということの理解を図りたいと考えている。

近年、分子生物学・細胞学の分野で、ゲノム解析や、染色体上の特定遺伝子の配置を調べるのに、in situハイブリダイゼーション法が用いられるようになってきている。そのうち、全DNAのプロープとハプテンを結合させた蛍光ゲノミック in situハイブリダイゼーション法を使うと、ゲノム構成の違いを異なる色で染め分けて表すことができるため、観察者は明白に、しかも容易に染色体組のゲノム構成を把握することができる。私は、この画期的な手法である蛍光 in situハイブリダイゼーション法を教育現場でも実際に展開できるようにしたいと考えているが、教育現場の現存設備、実験に要する時間ならびに費用、教師への技術の普及等々、クリアしなければならない問題が多く、まだ実現にいたっていない。

本研究では、ゲノミック in situハイブリダイゼーション法によって得たデータを使って、教育現場で実施できるように、ドライ・ラボによる教材展開を試みた。この教材は、生徒や学生に、属間雑種の体細胞染色体組(2n)において、染色体組を構成する各ゲノム(nとn)の由来を視覚的に理解させるとともに、ゲノム間の相同染色体の識別も可能にし、親から子への生命の連続性の理解へとつなげることを目的とする。

II in situハイブリダイゼーション

1 in situハイブリダイゼーションの原理

in situハイブリダイゼーション法は、形態が保たれた状態で、染色体上あるいは組織切片中の特異的な塩基配列をもつ核酸を、それと相補的な塩基配列をもつ標識されたプロープと特異的にアニーリングさせ、そのプロープの競合箇所を可視化する技術である。この手法を使って、染色体上で、高感度で特定のDNA塩基配列を検出することができる。

in situハイブリダイゼーション技術が開発された当初は核酸の標識は放射性標識以外に方法がなかったため、安全面から設備を擁した研究室での使用しか可能ではなかったが、近年、免疫組織化学的に認識されるハプテン標識を使って安定な非放射性ラベルによるプロープ作成が可能になり、広く一般的に利用可能な手法となってきた。プロープには、クローン化したDNA配列、PCRで増幅したDNA、合成したオリゴヌクレオチドなど特定の遺伝子や断片DNAを用いるほか、生物体から抽出した全DNA(ゲノミックDNA)をプロープとして用いることもでき、研究の目的によって選択する。このうちプロープにゲノミックDNAを用いる方法は、ゲノミック in situハイブリダイゼーション法といわれる。

2 ゲノミック in situハイブリダイゼーション(GISH)法

本研究に用いたデータを得るために行ったGISH法の概略を述べる。

(1) 染色体標本(スライド)の作成

目的とする個体の分裂細胞をスライドガラス上に拡げる。

(2) プロープの作成

1) スライドガラス上の染色体にハイブリダイゼーション(分子雑種形成)を試みるDNA(プロープ)を用意する。GISHには、両親種と思われる個体から抽出した全DNA(ゲノミック

DNA) がプローブとして用いられる。GISH に用いる全 DNA の抽出は、CTAB 法など一般的な DNA 抽出プロトコール (Murray and Thompson, 1980; 渡辺, 1989; Doyle and Doyle, 1990 等) によればよい。本実験の場合は、両親種それぞれの葉から CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) により抽出した DNA を用いた。

- 2) プローブを標識する。染色体 DNA と雑種形成したプローブを、後で検出できるようにする作業である。本実験では、ビオチン標識を用いた。
- (3) DNA : DNA ハイブリダイゼーション
- 1) (1), (2)が準備できたら、スライドガラス上の染色体 DNA とプローブ DNA を、それぞれに最適な試薬、温度および時間で一本鎖に変性させる。
 - 2) 一本鎖になったスライドガラス上の染色体 DNA に、同じく一本鎖になったプローブ DNA を滴下し、カバーガラスをかけて、一昼夜、染色体とプローブ間で DNA : DNA ハイブリダイゼーションを行う。この間に、プローブ DNA は、染色体 DNA 上の相補的な配列を持つ部位に分子交雑する。
- (4) 洗浄およびハイブリダイゼーション部位の検出 (シグナルの可視化)
- 1) 洗浄 : 雑種形成しなかったプローブや非特異的に付着しているプローブを取り除くために洗浄をおこなう。洗浄条件 (試薬の濃度および温度) は、実験に用いた DNA : DNA 塩基配列の相同性の程度から算出し、適切に設定する (Meincoth and Wahl, 1984)。
 - 2) 分子雑種形成部位の検出 (可視化) : 染色体 DNA に雑種形成した標識プローブに、アビジン結合蛍光色素 (フルオレセイン ; 黄色) を反応させ可視化する。
 - 3) 染色体の非雑種形成部位も可視化するために、対比染色剤 (ヨウ化プロピディウム ; 赤色) で染色する。
 - 4) カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡で観察する。プローブ DNA と分子雑種形成した染色体領域が黄色い蛍光 (ハイブリダイゼーションシグナル) で観察される。一方、非雑種形成領域は対比染色剤の赤色で観察される。

以上、教材化にあたり、各実験過程の持つ分子生物学的な意義を中心に、*in situ* ハイブリダイゼーション実験操作のアウトラインを述べたが、実験操作、必要な試薬・機器およびそれらの入手方法等詳細は、参考文献を参照していただきたい (Wilkinson, 1992; Leitch *et al.*, 1994; 中根・小路, 1995; Takahashi *et al.*, 1997; 高橋, 1998; Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000)。

III 教材展開

1 体細胞分裂中期細胞におけるゲノムの識別

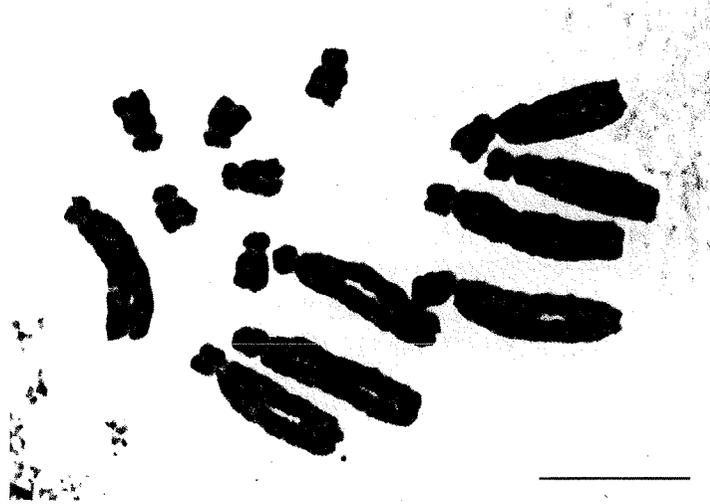


図 1. 属間 F1 雑種, *Gasteria lutzii* × *Aloe aristata* ($2n=14$) の体細胞分裂中期染色体のフォイルゲン染色像。スケールは 10 μ m。

(1) フォイルゲン染色像による核型の確認 (図 1)

フォイルゲン染色法はアセトオルセイン染色法などと同様に従来より広く用いられている染色法である。はじめにフォイルゲン染色像を用いて体細胞分裂期中期染色体組の全体像を把握させる。

本研究には、核型分析に、属間雑種植物を用いた。この個体は、南アフリカに自生するアロエ科の *Gasteria lutzii* を雌親, *Aloe aristata* を雄親として属間交雑し、熟した種子から胚を取り出して寒天培地で培養して作出された。作出は、英国王立キュー植物園でおこなわれ、個体は現在も園内の温室、プリンセス・オブ・ウェールズ・コンサーバトリーで維持されている。

本研究に属間雑種を用いた理由は、分類学的にある程度距離の離れた植物どうしの交雑、すなわち属の異なる植物間の掛け合わせで雑種個体を作ることにより、本実験の目的である一個体内でゲノムの染め分けを可能にするためである。また、アロエの仲間を選択した理由は、染色体数が基本数 $X=7$ と少なく、染色体のサイズも分析しやすい大きさで、教材として適していると判断したためである。

前述のように、両親種は、異なる属, *Gasteria* 属と *Aloe* 属の植物であるが、染色体数がどちらも $2n=14$ で等しい上に、核型 (染色体の大きさ・形) も相似しており、サイズにおいて、*Gasteria* のゲノムを構成する染色体が *Aloe* のゲノムを構成する染色体に比べて、約 20% 大きいという差が認められる (Brandham 1983, 1990)。雑種個体の体細胞染色体数は $2n=14$ で、染色体組はアロエ科の植物の特徴である典型的な二様相を示し、4 対の大きい染色体と、3 対の小さい染色体からなっている (図 1)。

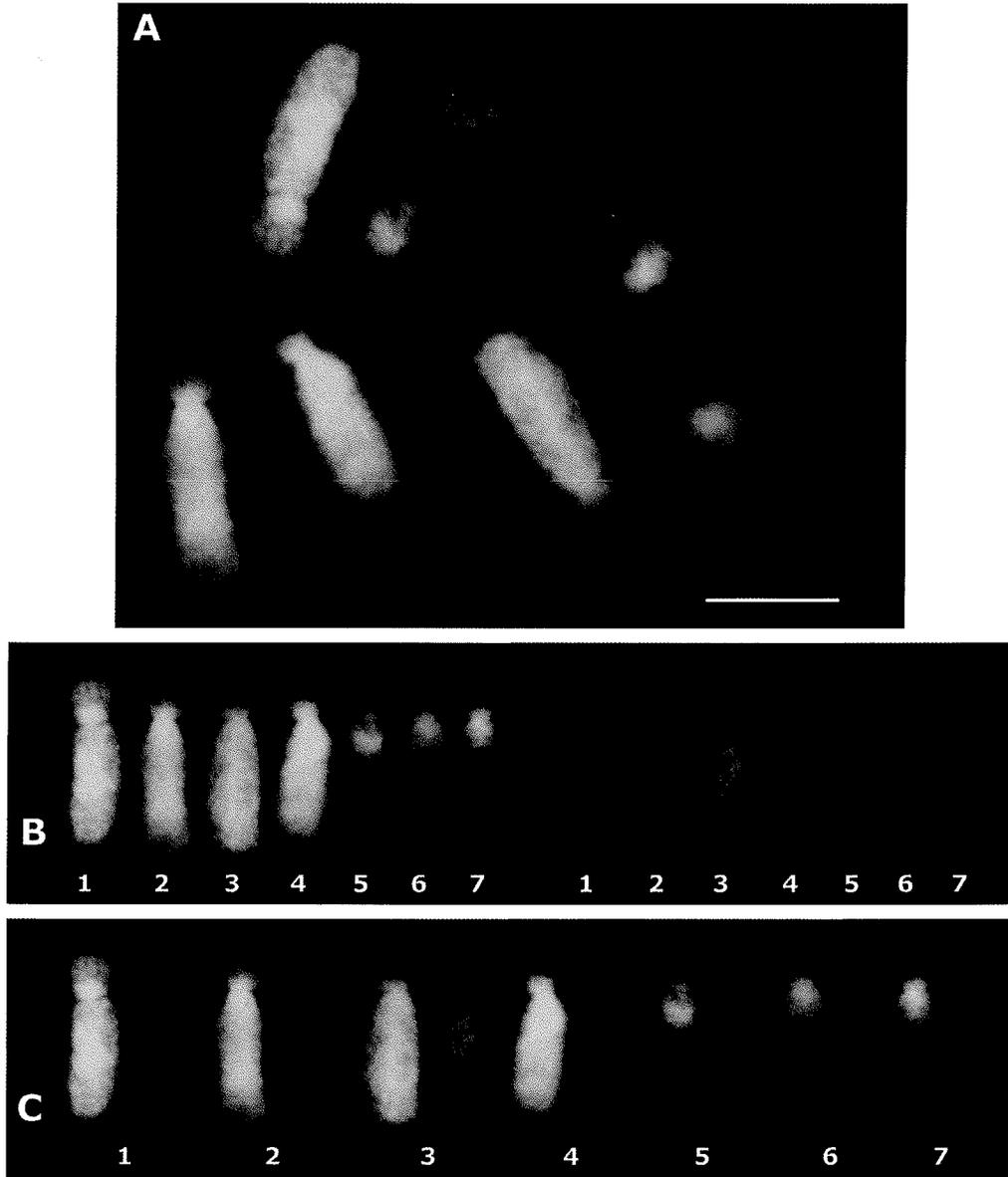


図 2 A—C. 属間 F1 雑種, *Gasteria lutzii* × *Aloe aristata* の体細胞分裂中期染色体の, *Gasteria lutzii* の全 DNA をプローブとしたゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション像。黄色を発色している染色体が, プローブがハイブリダイゼーションした染色体, すなわち, *Gasteria lutzii* 由来の染色体であることを示している。赤色を発色しているのは, *Gasteria lutzii* の全 DNA がハイブリダイゼーションしなかった染色体, すなわち, *Aloe aristata* 由来の染色体であることを示している。 A ; 体細胞分裂中期の蛍光顕微鏡写真像。 B ; *Gasteria lutzii* 由来の染色体 (黄色) と *Aloe aristata* 由来の染色体 (赤) をゲノム別に並べた図。 C ; 相同染色体どうしを対にして並べた図。スケールは 10 μ m。

(2) GISH 像による核型分析 (図 2 A, B, C)

図 2 は、ゲノミック in situ ハイブリダイゼーション (GISH) 法で、両親のうち雌親にあたる *Gasteria lutzii* の全 DNA をプローブとして雑種個体の染色体組にハイブリダイゼーションさせた像である。プローブ DNA を黄色の蛍光色素と結合させているので、黄色を発色している染色体は、プローブ DNA と分子雑種形成したことを示す。すなわち、*G. lutzii* 由来の染色体 (ゲノム) であり、14 個の染色体のうち 7 個が認められた。他の 7 個の染色体は対比染色剤で赤く染まっていて、*G. lutzii* が分子雑種形成をしなかったことを示し、雄親の *Aloe aristata* 由来の染色体 (ゲノム) であることがわかる。対照実験として、*Aloe aristata* の全 DNA をプローブとして雑種個体の染色体組にハイブリダイゼーションさせると、赤色・黄色逆の染め分け結果が得られた。以上、ゲノミック in situ ハイブリダイゼーション法により、*G. lutzii* × *A. aristata* F1 雑種個体の 14 個の染色体が、一方の親 *G. lutzii* 由来の 7 個と他方の親 *A. aristata* 由来の 7 個に視覚的に識別された。

(3) 2 ゲノムの抽出 (図 2 B)

- 1) 生徒・学生に、図 2 A を配布し、通常の核型分析作業の時と同様に、14 個の染色体を 1 個ずつ切り抜かせる。
- 2) 切り抜いた染色体を、黄、赤それぞれの色別に長さの順に並べさせる。並べた例を図 2 B に示す。この作業で、染色体組が *G. lutzii* 由来のゲノム (図 2 B, 黄色染色体 1-7) と、*A. aristata* 由来のゲノム (図 2 B, 赤色染色体 1-7) に分けられる。

2 ゲノム間で相同染色体対の識別 (図 2 C)

次に、図 2 B を使って、相同染色体識別作業に移る。図 2 B に並べられた各々のゲノムは大きさの順に並んでいるので、順番に *G. lutzii* 由来のゲノム (図 2 B, 黄色染色体 1-7) から 1 個、*A. aristata* 由来のゲノム (図 2 B, 赤色染色体 1-7) から 1 個と染色体を選んで対を作っていくことにより相同染色体対が抽出され、認識できる。相同対どうしでペアを作って並べた例を図 2 C に示す。

IV 考察

1 ゲノムの視覚的識別によってもたらされる生命の連続性の理解

1 個の体細胞に含まれる染色体は“生物の種によって数と形が一定している”。そして“体細胞の染色体組は、相同染色体によって構成されている”ということは、体細胞分裂期中期の染色体組の核型を実際に観察し、生徒あるいは学生自らが相同染色体を見つけ出すことができ初めて理解が図れると考える。そして、これを理解することが、“相同染色体対を成す各々の染色体が両親すなわち別々の親から由来していること”の理解へとつながる。

しかしながら、実際には、従来の観察法によって得られる染色体像では、染色体組から相同対を見つけ出すことは、経験の浅い生徒や学生にとってはかなり難しいことであり、指導する側の現場の教師からも、わかりやすく、取り扱いやすい教材を求められていた。私たちは、本研究と並行して、教育現場の現有設備で実施できる従来の染色法でゲノムの理解を図る教材の可能性を

探って、従来の展開とは視点を変えた核型分析の教材化を試みている。その一つは、キツネノボタン *Ranunculus silerifolius* Leveille の F1 雑種作出し、親と雑種第一代の二世代の核型を比較しながら分析する方法であるが、ゲノムの理解および相同染色体の認識をさせるという目的において、従来の一世代だけを用いた教材に比べて、より効果があった。本研究では、ゲノム構成の違いが異なる色で表されるため視覚的に理解することが容易な *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて得られたデータを利用することにより、さらに明白かつ容易に相同染色体の持つ意義の理解を導くことが可能な教材を展開して、生命の連続性の理解への礎を築くことを提案した。GISH を用いたことで、両親のゲノムが、単にぬり絵的な着色ではなく、科学的根拠に基づいた色分けによりはっきり区別できた。

in situ ハイブリダイゼーション法は分子生物学的手法であるが、実験過程の各ステップの持つ意義はシンプルかつ明解であるので、生徒や学生が DNA について基本的な知識さえ持っていれば、十分理解できると考える。よって、教材提供対象が、DNA について学習済みの高校生物Ⅱ履修者や大学生ならば、これまでの知識を基にして *in situ* ハイブリダイゼーション法の原理から始めることができる。また、DNA について事前に学習していない生徒や学生に対しても、DNA についての基礎的な学習を含めて教授する時間的な余裕がありさえすれば、授業展開が可能であると判断する。

こうして体細胞分裂における相同染色体の持つ意味を確実に理解することが、減数分裂独特の現象である「対合」の意味を理解することへとつながり、それが減数分裂過程を経て相同染色体が別々の配偶子へ分配される意義の理解へと発展し、親から子供への生命の連続性の理解へとつながると考える。すなわち、相同染色体の持つ本来の意義を理解することが、生命の連続性を理解する出発点となると考える。

2 学生の反応

本教材を、鳥取大学教育地域科学部 学校教育課程一年生対象の講義、理科教育内容学研究で実際に展開してみた。受講学生のうち約半数は高等学校で生物を選択していた学生で、残り半数は生物未履修の学生であった。受講後、学生からは、F1 個体の染色体組を構成するゲノムが、両親の2ゲノムに識別されたことで、親から子へのゲノムの伝達をはっきりと理解できたとの感想を得た。それと共に、事前のこちらの予想をはるかに超えて、作業を進めて行く過程で学生の間からは感嘆の声があがった。これは一つには、科学の先端にふれ、純粋に喜び、感動したということと、さらには、先端科学の利用により、これまでの“だろう”とか“らしい”までしかわからなかった世界から、明白に“である”と事実としてとらえることができる世界が展開したことに、確固たる手応えを感じたということであった。作業に模式図などではなく、実際に顕微鏡下で観察された像を使ったことも、授業効果があがった大きな要因であったと考察する。

謝辞

本研究の一部、ゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション実験は、英国王立キュー植物園ジョドレル研究所にて行った。機会を与えて下さった研究所所長をはじめ、ご協力いただいた皆様方に深く感謝いたします。また、本研究の一部は、文部省科学研究費、基盤研究 (C) No.13680201 の補助を受けた。

参考文献

- Brandham, P. E. (1983). Evolution in a stable chromosome system. *In* Kew Chromosome Conference II (eds. Brandham, P.E. and Bennett, M.D.), pp. 251-260, George Allen & Unwin, London.
- Brandham P. E. (1990). Meiotic crossing-over between sites on opposite sides of the centromeres of homeologues is frequent in hybrid Aloaceae. *Genome* 33: 170-176.
- Doyle, J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. and Leitch, I. J. (1994). *In situ* hybridization: a practical guide. BIOS Scientific Publishers LTD., Oxford.
- Meincoth, J. and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilised on solid supports. *Annals Biochem*, 138 : 267-284.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Schwarzacher, T. and Heslop-Harrison, P. (2000). Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers LTD., Oxford.
- Takahashi, C., Leitch, I. J., Ryan, A., Bennett, M. D. and Brandham, P. E. (1997). The use of genomic *in situ* hybridization (GISH) to show transmission of recombinant chromosomes by a partially fertile bigeneric hybrid, *Gasteria lutzii* x *Aloe aristata* (Aloaceae), to its progeny. *Chromosoma* 105: 342-348.
- 渡辺格 監修: 植物バイオテクノロジー実験マニュアル クローニングとシーケンス. pp.252-264, 農村文化社 (1989).
- Wilkinson, D. G. (1992). *In situ* Hybridization: A practical Approach. Oxford University Press, Oxford.
- 高橋ちぐさ (1998). 植物染色体ペインティング - GISH 法のすすめ -. 生物の科学「遺伝」第 52 巻 (8 号) : pp. 51-56, 裳華房 (東京).
- 中根一穂・小路武彦 監訳 (1995). *In situ* ハイブリダイゼーション (MEDSi バイオ実験法シリーズ). メディカル・サイエンス・インターナショナル (東京).