

岡山理科大学構内の植物における倍数性の研究報告

2015年3月31日作成

岡山理科大学理学部生物化学科 竹内 直樹

経緯・目的

2014年7月初旬12号館前のサクラの木(写真1)は、同じ木の葉であるにもかかわらず、葉の大きさが明らかに違うものが多いことを友人の指摘から発見した(写真3)。植物学専門の先生に伺ったところ、細胞の倍数化が起こっているのではないかと指摘をされた。その時、自分自身非常に興味を抱いたことを覚えている。倍数化とは、1細胞内に2セット以上のゲノムが存在する現象のことであり、植物の種分化における顕著な特徴である。被子植物の50%近く、シダ植物では90%以上が倍数体と推定されている。近縁種に2倍体と倍数体がある場合には、両者は異なった生態的環境に適応し、倍数体の方がより過酷な環境に適応的であることが多い。また、倍数体では植物体のサイズが大きくなることも知られている。ほとんどの作物は倍数体起源である。

そこで、その木で起こっている現象が何であるのかを突き止めたいと思い、総合機器センターの自由研究テーマに応募した。なぜなら、フローサイトメーターという機器を用いれば本当に倍数化が起こっているのかどうか証明することができるからである。そして、研究を進めるうえで、倍数化のメカニズムや原因等にも踏み込んで研究できればと考えている。また、この研究を通して実験者の研究技術や知識を磨くとともに、研究の楽しさを伝えていければと考えている。



写真1：12号館前のサクラの木



写真2：1号館前のサクラの木



写真 3 :

右 : 12 号館前の大きな葉のサクラの葉
 中央 : 右と同じ木の中でも小さめの葉
 左 : 1 号館前の普通のサイズのサクラの葉

原理

核の単離溶液中で植物組織をカミソリで切り刻むことにより、核が遊離される。これを蛍光色素で染色し、染色した核の蛍光強度の違いにより、DNA 含量の差異を検出する。核の蛍光強度から DNA 含量の差異を調べるにはフローサイトメーター (FCM) を用いる。

《フローサイトメーター》

フローサイトメーターは細胞などの粒子 1 個ずつから、大きさなどの形態の情報、ならびに、DNA/RNA 蛍光染色や、タンパクなどを蛍光抗体で染色した蛍光の情報を 1 秒間に数千個以上の速度で取得し、それらの相関を解析するヒストグラムを作成する。さらに目的の細胞集団などを 1 秒間に数千個以上の速度で分取することが可能な装置で、生命工学や臨床検査などの分野において、重要な役割を果たす装置としてなくてはならないものとなった。

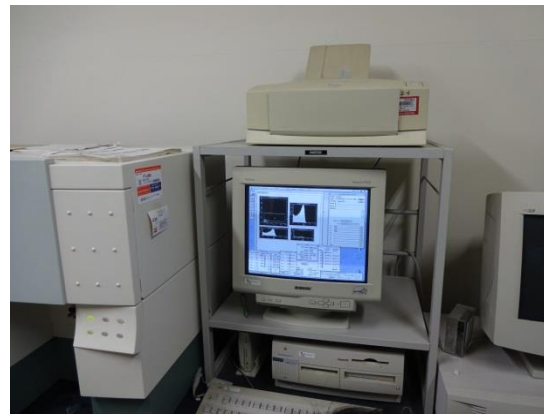


写真 4 : 総合機器センターにあるフローサイトメーター(日本 BD 社製 FACS Calibur)

《サイトメトリーとは》

サイトメトリー (Cytometry) とは、短時間 (数秒から数分) に多量 (数千個から数百万個) の細胞を 1 個ずつ定量測定する統計的精度の高い細胞測定法である。その測定装置をサイトメーター (Cytometer) と呼ぶ。光や光センサーなどを用いて、細胞を観察し、細胞ごとの複数の測定情報から相関解析と統計解析を行う。さらに、細胞を分取することも可能である。

《フローサイトメトリーの原理》

フローサイトメトリーシステムは、一点に集められたレーザー光をフローセルの中心を通過する細胞に照射し、そこから生じる散乱光と、蛍光を同時に測定する。測定結果は、相関ヒストグラムとして示される。これらのヒストグラムを解析することによりサンプルの特性を明らかにできる。そして、これらの特性に基づいて、2 種類から 6 種類の細胞集団を同時に試験管やマルチウェルプレート分取することができる。フローサイトメーターの測定原理は、以下の 5 つに分けることができる(図 1)。

1.フロー系

ラミナーシースフローを利用して細胞 1 個ずつの流れを作る。

2.光学検出系

流れの中心を流れる細胞へレーザー光照射し、発生した散乱光と蛍光の測定をする。

3.電気パルス処理系

検出された電気パルス回路で数値化する。

4.データ処理系

各種ヒストグラムを作成し、解析する。

5.ソーティング系

目的細胞の分取をする。

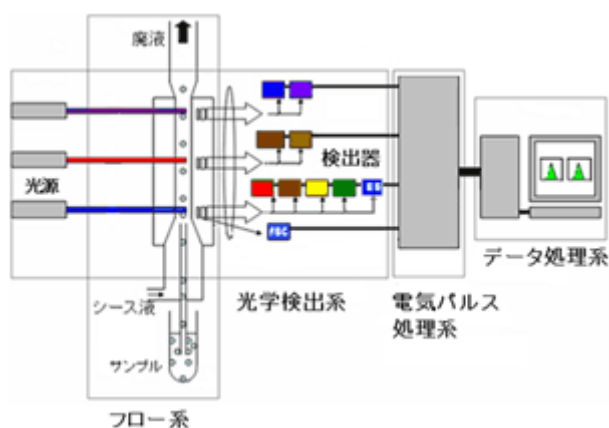


図 1：フローサイトメーターの測定原理

《臭化エチジウム》

臭化エチジウム(図 2)は、化学式が $C_{21}H_{20}BrN_3$ と表される有機化合物の塩である。モル質量は 394.31 で融点は 260～262°C である。エチジウムブロマイド、エチジウムブロミドともよばれ、EtBr やエチプロと略記されることもある。水にはわずかに溶ける (溶解度 5g/100g)。特に DNA

の二本鎖間に挿入されるインターカレーターで、核酸染色剤として分子生物学の分野で頻繁に使われる。紫外線を当てると赤橙色の蛍光を発するが、その強度は DNA に結合することで約 20 倍になる。強い変異原性があり、また皮膚・眼・粘膜などへの刺激性がある。二本鎖 DNA にインターカレートして、DNA の複製や転写を阻害することにより変異原性を示すと考えられている。そのため、取扱いの際には、常にゴム手袋、保護メガネ、白衣を着用し、皮膚や眼に付いた時には大量の水で 15 分以上洗い流す。分子が大きく正電荷を持っているため、皮膚への浸透はそれほど早くない。

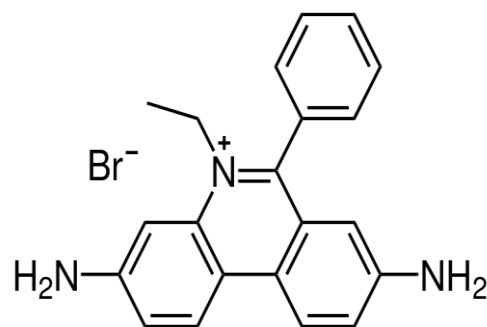


図 2：臭化エチジウム構造

器具・試薬・サンプル

《器具》

- ・フローサイトメーター (写真 4)
- ・カミソリ
- ・ピンセット
- ・シャーレ
- ・マイクロピペット
- ・30～40 μ m メッシュとロート
- ・1～2ml 容ポリエチレンピペット

- ・ PA 用サンプルチューブ
- ・ キムワイブ
- ・ マスク
- ・ ゴム手袋

《試薬》

Chopping buffer 組成 (必要量 2.5ml)

- ・ 50mM Tris-HCl (pH 7.5) {緩衝液}
- ・ 1.0% Triton X-100 {非イオン系界面活性剤}
- ・ 140mM 2-メルカプトエタノール {タンパク質の S-S 結合を切る還元剤}
- ・ 50mM NaHSO₃ {還元剤}

蛍光色素 (必要量 50~100 μL)

- ・ EtBr(臭化エチジウム) 10ng/ml

サンプル固定試薬

- ・ 1%ホルマリン入り PBS (PB、NaCl、ホルムアルデヒド液を用いて調製)

《扱うサンプル》

- ・ 1号館前の普通のサクラの葉(写真 2)
 - ・ 12号館前の倍数化が疑われる巨大なサクラの葉(写真 1、3)
 - ・ 普通の葉と倍数化が疑われるサクラの葉の混合
 - ・ 実験用培養植物のタバコの葉(猪口研究室提供、写真 5)
- それぞれ染色ありと染色なしのサンプルを作製し、計 8 本のサンプルを使用した。



写真 5 : 使用したタバコの葉

方法

実際に実験を始めたのが 12 月であり、サンプルであるサクラの葉が落葉してしまうため、予め 9 月に葉を採取した。そして、採取した葉を液体窒素で凍結させてから、タッパーに入れて -83°C の冷凍庫で保存した。

以下に実験手順を記す。

- 1) 葉 1 枚 2 cm²以上を準備する。古い葉は不適である。
- 2) 葉の中央を走る太い葉脈(中肋)を除き、カミソリで刻みやすい大きさにする。
- 3) シャーレに葉を置き、chopping buffer 1ml 加え、葉を湿らせる。
- 4) カミソリ(新しい刃を用いる)で葉を細かく刻む。極端に刻みすぎるとノイズが増える(写真 6)。
- 5) chopping buffer を 1ml 加え、30~40 μm のメッシュを通す。
- 6) 1000rpm 2 分遠心後に上清を除去する(写真 7)。
- 7) chopping buffer を 500 μl 程度加え懸濁する。

- 8) EtBr を最終濃度 10ng/ml になるように加える(0.5 μ L/500 μ L)。
- 9) 約 30 分放置する。
- 10) 溶液の入った容器を光が入らないようにアルミホイルで包む。
- 11) 1000rpm で 2 分遠心後に上精を除去する。
- 12) 1%ホルマリン入り PBS を加え、ピペティングする。(サンプルの固定)
- 13) 容器をアルミホイルで包み、遮光し、測定まで冷蔵庫で保存する。
- 14) 翌日、総合機器センターにて、フローサイトメーターを用いて測定する。
- 15) 結果をまとめ、植物に倍数化が起きているのか検討する。

*葉の大きさは、全ての葉において面積が 10 cm^2 (5×2)になるようにした。

*混合サンプルは面積比で 1:1 になるように調製した。

*懸濁において、今回は染色あり・なし・混合サンプルを調製しなければならなかったため、500 μ L の Chopping buffer をそれぞれに加え、懸濁した。ただし、タバコの葉については混合サンプルを作製しなかった。



写真 6 : 葉を細かく切断している様子。

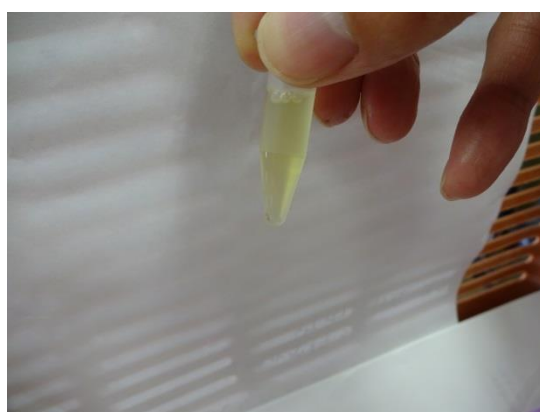


写真 7 : 遠心して採取できた核のサンプル

結果

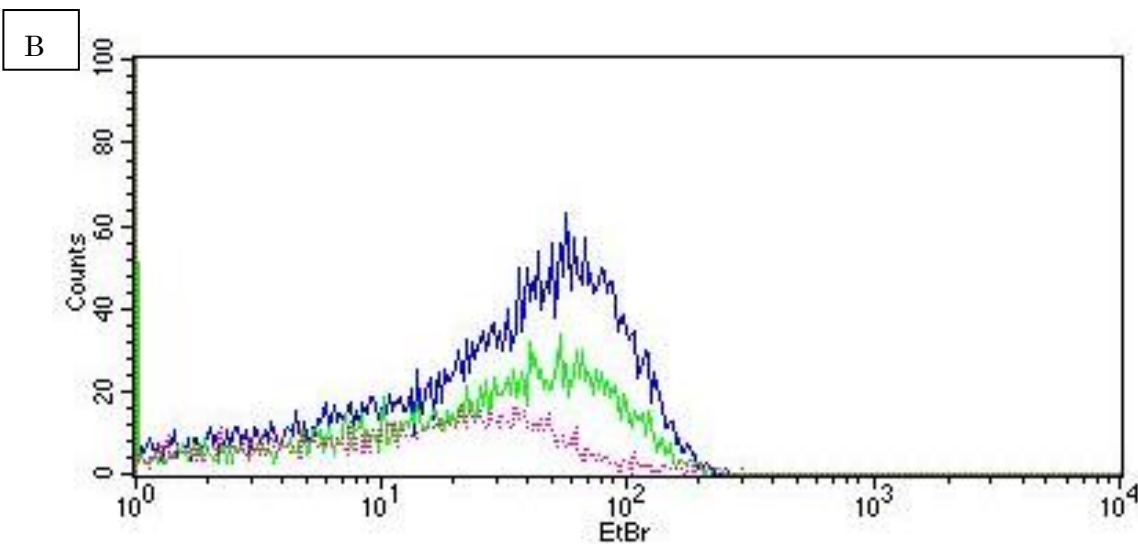
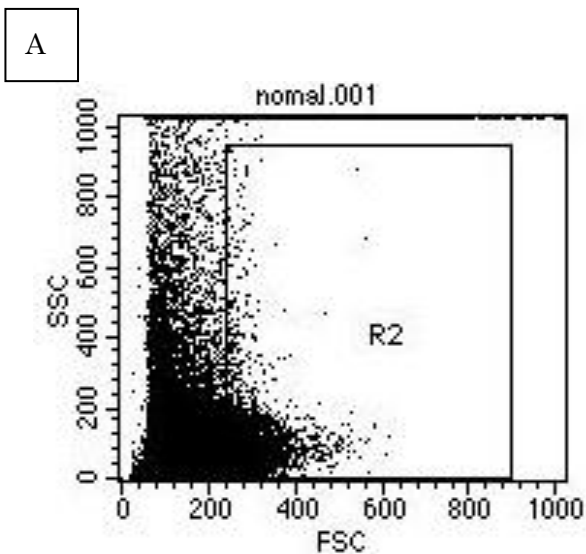
測定結果は、図 3 に記してある。染色において、EtBr (10ng/ml) で染色したが、染まりが薄かったため、EtBr (1000ng/ml) を 2 μ L 加え再染色し測定した。

図 3 の A は、全体のサンプルの測定結果を表している。グラフの X 軸は大きさ、Y 軸は複雑さを表している。グラフ中、左端の縦長に出ているピークはゴミ等に反射して出た結果であると考えられ、正確な値ではない。そこで、R2 の区画のみを切り出し、ピックアップした(図 3、B)。ここでのグラフは、X 軸に蛍光強度(1 個あたりの EtBr

の蛍光強度)、Y軸に細胞数を表している(以下、同様)。そうすると、それぞれのサンプルでピークの違いが見られた。染色なしのサンプルは、染色ありのサンプルと比較してきちんと染色できたか確認するために測定した。その結果、図3のC、D、Eより、染色なしの紫色のピークと染色ありの緑色のピークが測定できた。よって、それぞれ別の箇所にピークが出たことから EtBr での染色は問題なくできたと考えられる。

染色ありのサンプルにおいて、普通のサクラの葉と倍数化が疑われるサクラの葉では、抽出された細胞数が前者の葉の方が多かったものの、EtBr のピークの位置は同じであった。これより、倍数化を証明することが難しい結果となった。

また、タバコの葉は抽出量が少なかったものの、サクラのピークよりも蛍光強度のピークが少し低めに出た。



Key	Name	Parameter	Gate
—	nomal.002	FL1-H	G2
—	big.004	FL1-H	G2
.....	tabaco.006	FL1-H	G2

普通の葉

倍数化が疑われる葉

タバコの葉

(いずれも染色ありのピークで比較)

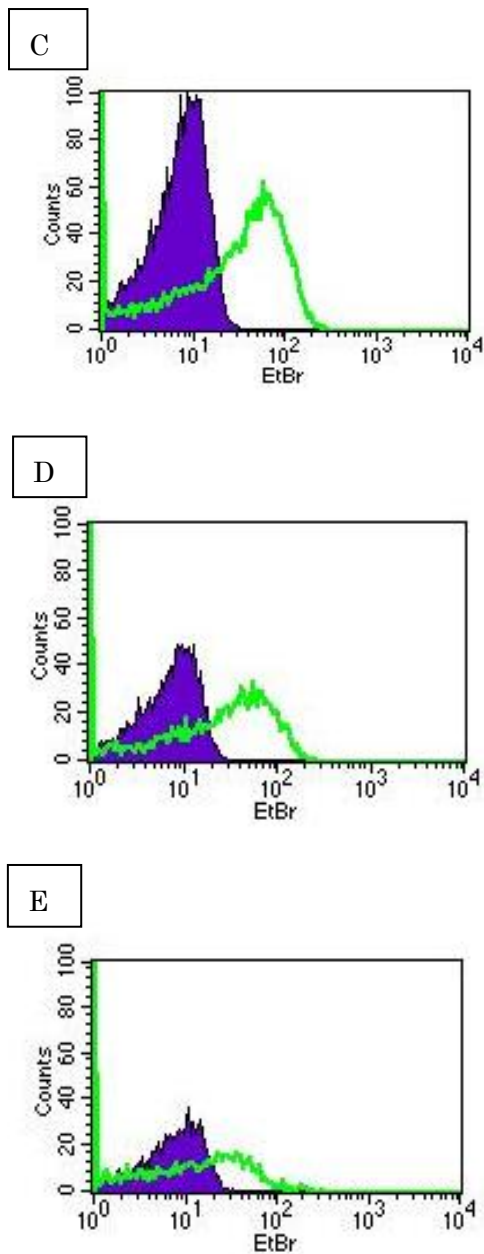


図 3 :
 A…全体のサンプルの測定結果
 B…R2 の区画範囲だけを選択し、ヒストグラムで表したもの
 C…普通の葉のピークのヒストグラム
 D…倍数化が疑われる葉のピークのヒストグラム
 E…タバコの葉のピークのヒストグラム
 *C、D、E : 染色なし…紫色のピーク、
 染色あり…緑色のピーク

考察

FACS の測定結果(図 3)より、それぞれのサンプルにおいて細胞数の違いは顕著に表れたものの 1 個あたりの EtBr の蛍光強度はあまり変化が見られなかった。このことから倍数性が証明することが難しくなり、核以外のものを観察していた可能性が高い。これは、タバコとサクラのゲノムサイズを比較すると、タバコは 4221-4646Mbp、サクラは 685Mbp であったことから、タバコの方がはるかに大きいことが分かる。よって、本来であれば FACS の結果は、サクラの葉よりもタバコの葉の方がピークの位置が高く(右よりにシフトして)出ていなければならないということである。

この結果を踏まえ、核を遊離する段階で問題があったと考え、Chopping してからきちんと染色されているか蛍光顕微鏡を用いて観察する実験を行った。

サンプルは倍数化が疑われるサクラの葉を用いた。染色する用としない用とでサンプルを分けるようにしたため、500 μ L を半分にして 250 μ L ずつエッペンチューブに入れた。したがって、Chopping buffer を 250 μ L に対し、EtBr を 2.5 μ L 加えた。これを蛍光顕微鏡で観察するもあまり蛍光を確認できず、1000 倍希釈(10000ng/ml)の EtBr を 2.5 μ L 加え、再観察した。

また、ヘキスト(Hoechst 33258、 $C_{25}H_{27}Cl_3N_6O=533.88$ 、図 4)という別の試薬を用いても観察してみた。この試薬は二本鎖 DNA の AT 配列の副溝に結合することから、DNA の検出・定量に利用される。水に可溶で、比較的毒性がなく、細胞透過性があるため、細胞染色によく用いられる。

また、UV 光で励起し、青色に観察できるのが特徴である。

観察した結果、1%ホルマリン入り PBS で固定したサンプルも問題なく観察できたことから、固定は問題がなかったことがうかがえる。

写真 11 から分かるように一部切断されている細胞があったものの、写真 8、9、10 のように細胞から核が遊離できていないものの方が圧倒的に多かった。また、写真 10 より、ピンクのテトラポットのような細胞中に黄色い円があるのが分かる。この円が核である。核の周りは核以外の細胞内小器官などが蛍光していると考えられる。このことから、FACS の測定結果が思うように得られなかった原因は、核がうまく遊離できず、EtBr の非特異的染色による蛍光が測定時に影響を及ぼしたことがうかがえる。よって、核を遊離する段階等で問題があると考えられ、今後改善していく必要がある。

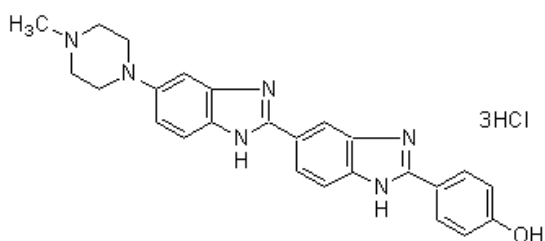


図 4 : ヘキスト(Hoechst 33258)構造



写真 8: 倍数化が疑われる細胞(励起光なし、EtBr 染色)



写真 9: 倍数化が疑われる細胞(励起光あり、EtBr)

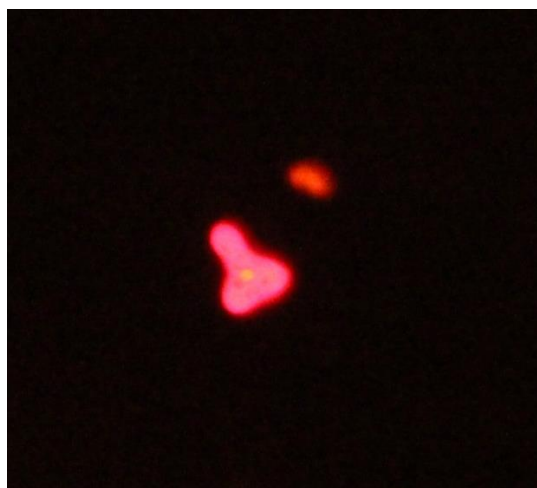


写真 10: 倍数化が疑われる細胞の核(励起光あり、EtBr 染色)

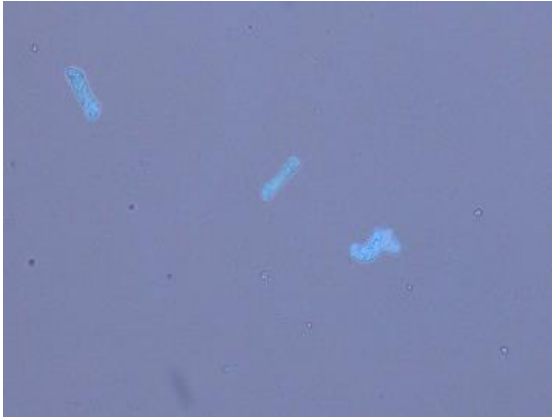


写真 11: 倍数化が疑われる細胞(励起光あり、Hoechst 染色)

今後の課題

これからの課題としては、以下のようなことが挙げられる。

- ・生のサクラの葉を使用しての実験。
- ・染色時間の増加。
- ・葉の切断方法の改善。
- ・Chopping buffer の組成と調製法の再検討。
- ・EtBr の濃度の検討(EtBr の波長で観察すると核以外に蛍光する細胞内小器官などがあること)。

これからの取り組み

今回の研究では、冬季で短期間(9月～12月)行ったこともあり、十分な実験を実施できず、生のサクラの葉を使うことができなかった。また、試薬の調製も検討が必要である。よって、12号館前のサクラの木が倍数性であるかどうかを証明するには、今回の実験の課題を改善した上で再実験が必要である。

参考文献

- 核染色

http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_recepehnhucleifluoro.pdf#search='Hoechst%E3%81%A8%E3%81%AF (2015年3月現在)

- サイトメトリードットコム

http://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple_4.html (2014年11月現在)

- 臭化エチジウム

<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E8%87%AD%E5%8C%96%E3%82%A8%E3%83%81%E3%82%B8%E3%82%A6%E3%83%A0>
(2014年11月現在)

- 同仁化学製品

<http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr7.nsf/codelist/H341?OpenDocument>
(2015年3月現在)

- 倍数性進化

http://www.fais.or.jp/okada/okada-past/f_tokutei/tokutei/studyA05.html (2015年3月現在)

- 中内啓光 (1998) 『フローサイトメトリー自由自在』株式会社秀潤社

- T.A.BROWN 著 西郷薫 監訳 (1999) 『分子遺伝学 第3版』株式会社東京化学同人

- JAROSLAV DOLEZEL and JAN BARTOS. 2005. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95:99-110.

- K.Arumuganathan and E.D. Earle. 1991. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter* Volume 9(3):208-218.

謝辞

本研究を始めるにあたり、様々なご指導をしていただいた総合機器センターの船本利春先生をはじめ、生物化学科の猪口雅彦先生、臨床生命科学科の山崎勤先生には実験を行う上で大変お世話になり、誠にありがとうございました。

また、共同実験者である生物化学科の伊藤祐介さん、同学科の徳岡直登さんには実験に協力していただき、本当に心強かったです。ありがとうございました。

そして、本研究で使用する試薬や実験方法を色々とお質問をさせていただいた日本ベクトン・ディッキンソン株式会社の二俣吉樹様には大変感謝いたします。

改めまして、本研究にご協力をしていただいたすべての皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。