

資料

モクレン科植物（シデコブシ、コブシ、タムシバ）の 葉組織を用いたDNA抽出法の検討

中島美幸・坂井至通

キーワード：シデコブシ、タムシバ、コブシ、DNA、CTAB法、抽出キット

I はじめに

植物種の分類方法として、花、葉、花序、など種に特徴のある形質をマーカーとする形態分類がリンネの二名法以来用いられてきた (Dandy, 1978, Nooteboom, 1985)。しかし、近年、種特異の遺伝子配列が、各個体の形態的特徴のように環境の影響を受けないことや統計処理が容易であることなどの利点があるため、従来の形態分類と比較しながら遺伝子系統分類が発展してきた (Johnson, et al., 1996, Manos and Steele, 1997, Nooteboom, 2000)。モクレン科植物においても、遺伝子 (以下DNA) の特異領域をマーカーに用いた研究が発達し、DNA系統分類 (Azuma et al., 1999, 2001, Kim et al., 2001) や集団遺伝学的解析に (河原ら, 1995) 応用されてきている。

一般に、植物のDNA抽出は、液体窒素で凍結した材料を粉碎し、抽出緩衝液中 (界面活性剤と還元剤と保護剤を含む) で細胞膜を破壊しながらDNAを溶出し、エタノールなどでDNAを特異的に析出させて単離するCTAB法が広く用いられている (Doyle and Doyle, 1990)。この方法は、モクレン科、バラ科、カエデ科などの木本植物の葉組織にも利用されたが、多くの木本科植物にはDNAの単離を阻害するポリフェノールや多糖類が多く含まれるため (河原ら, 1995)、DNA抽出が困難とされてきた。村上ら (1995) や Khanuja et al. (1999) によって、木本科植物の効率的なDNA抽出法が検討されているが、試験操作の簡便性や少材料からのDNA抽出などまだ改良すべき点も多く残されている。

近年、植物や菌体、動物などの様々な材料に対応したDNA抽出用の抽出キット (以下抽出キットという) が幾つか開発されてきており、これらの抽出キットはいずれも添付の試薬を使い、指示されたプロトコールに従って操作すれば、簡単に高純度でDNAを抽出できるという利点が記載されている。吉沢・大坪 (1997) は、抽出キット (ISOPLANT, 日本ジーン社製) を用いた米一粒からのDNA抽出法を紹介してい

る。しかし、抽出キットに添付された試薬類の組成について公開されておらず、木本植物からのDNA抽出に対しては、それぞれの抽出キットをもちいて用いて適応性の比較検討が必要である。そこで、モクレン科のシデコブシ、タムシバ、コブシを対象に、状態の異なる葉組織 (乾燥葉、生葉、冬芽) を材料として、抽出キットによるDNA抽出を試み、その有用性について検討した。

II 材料および方法

1. 材料

1-1. 供試材料

DNA抽出材料として、シデコブシ、タムシバ、コブシの冬芽 (2003年4月採集)、生葉 (2003年7月採集)、乾燥葉を用いた。冬芽および生葉は、採取後、実験に供試するまで-30℃にて凍結保存した。乾燥葉は2003年7月に採取した生葉の一部を風乾したものをを用いた。

1-2. 抽出キット

抽出キットは、Nucleon Phytopure (アマシャムライフサイエンス社製)、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製)、ISOPLANT II (日本ジーン社製) の3種類を用いた。

2. 方法

2-1. 抽出キットによる抽出

凍結保存した冬芽および生葉は、乳鉢に入れ液体窒素で凍結し乳棒でかき混ぜながら粉碎し、それぞれ約100mgを、また乾燥葉はその約40mgを、抽出キットに添付されたプロトコールに従って (付表)、抽出操作を行った。

2-2. アガロースゲル電気泳動によるDNAの確認と濃度測定

各抽出キットの操作から得られた溶液中のDNAは、

抽出液10 μ lを2%アガロースゲルに注入し、50Vで2時間電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色し、UV照射下でDNAの確認を行った。

さらに、正確なDNA濃度を知るために、波長260nmの吸光度(O.D値)をUV分光光度計(ベックマン社製)を用いて測定し(田村, 2001)、これに核酸吸光度係数0.05を掛けて、DNA濃度(ng/ μ l)を算出した。

2-3. PCR増幅

DNA抽出液を用いて、PCR増幅を行った。DNA抽出液0.5 μ lに対し、PCR反応液(1 \times buffer, 100 μ M dNTP, 0.5 μ Mプライマー, 0.1U Taqポリメラーゼ)を加えて、20 μ lとした。温度条件は、予備加熱95 $^{\circ}$ C 3分に続き、94 $^{\circ}$ C30秒, 40 $^{\circ}$ C30秒, 72 $^{\circ}$ C 1分のサイクルを45回、さらに72 $^{\circ}$ C 8分の後4 $^{\circ}$ Cとした。

PCR産物は、2%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅を確認した。

III 結果および考察

1. 抽出キットによるDNA抽出

Nucleon Phytopure(アマシャムライフサイエンス社製)は、SDS-KCl存在下でDNAを水相に加溶させ、レジンクロロホルムで多糖類などを除去し、イソプロパノール抽出によってDNAを回収する方法である。また、ISOPLANT IIは、バッファー中に含まれる塩化ベンジルによって細胞内の膜構造を破壊し、DNAを水相に溶出し、エタノール抽出によって回収する方法である。また、細胞溶解時に、1%NaBH₄を添加することで、ポリフェノールの酸化を抑制することができる。

Nucleon PhytopureおよびISOPLANT IIでは、抽出最終段階で、溶液に等量のイソプロパノールやエタノールを加えて混和させる。DNAはアルコール類に溶けないことから、DNAが溶液中に溶出している場合は、アルコール類を加えると、DNAは白い繊維状の沈殿物となって析出してくるので、この段階でDNAが抽出されたことを確認することが出来る。しかし、乾燥葉を抽出に用いたところ、すべての樹種において褐色に着色した沈殿物が現れた。

一方、DNeasy Plant Mini Kitは、バッファー中に含まれるグアニジウム塩酸塩によって細胞内の膜構造を破壊した後、専用のスピニングカラムにDNAを特異的に吸着させ、TEバッファー中に溶出して取り出す方法である。本抽出キットでは、エタノールによる析出過程を経てもDNAは沈殿物となって現れることがほとんどなく、可視条件でのDNAの確認はできず、最終段階で得られたDNA溶液は、乾燥葉、生葉、冬芽すべてにおいて、無色透明であった。

葉組織からのDNA抽出では、抽出作業中にポリフェノール類の酸化が進んで、DNA沈殿物が褐色に着色する可能性があるため、抽出キット添付のバッファーには、抗酸化剤として2-メルカプトエタノールを0.5~1.0%の濃度になるように添加する。しかし、乾燥した材料では、常温で長い間空気にさらされて、組織に含まれるポリフェノールの酸化がすでに進んでいたと考えられる。また、Nucleon PhytopureとISOPLANT IIは、遠心分離によって未破砕物やタンパク質を沈殿させて不純物を除去するが、DNAが溶出している水相には、酸化したポリフェノール類が残っていて、十分な精製が出来なかったと考えられる。

一方、DNeasy Plant Kitでは、DNA溶解相をカラ

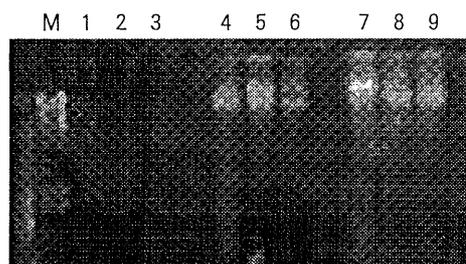
表-1 UV分光光度計によるDNA濃度測定結果

状態	抽出キット 種	Nucleon		DNeasy		ISOPLANT	
		O.D.260	濃度 (ng/ μ l)	O.D.260	濃度 (ng/ μ l)	O.D.260	濃度 (ng/ μ l)
乾燥葉	シデコブシ	0.739*	36.95	0.222	11.10	1.682*	84.08
	コブシ	1.338*	66.90	0.029	1.45	1.704*	85.20
	タムシバ	0.088*	4.40	0.010	0.50	0.594*	29.70
生葉	シデコブシ	1.620	81.00	0.557	27.85	1.350	67.50
	コブシ	1.360	68.00	0.118	5.90	0.400	20.00
	タムシバ	1.204	60.20	0.142	7.10	1.931	96.55
冬芽	シデコブシ	1.855**	371.00	0.521**	104.20	0.774**	154.80
	コブシ	2.370	118.50	1.011	50.55	1.417	70.85
	タムシバ	1.961	98.05	0.669	33.45	2.071	103.55

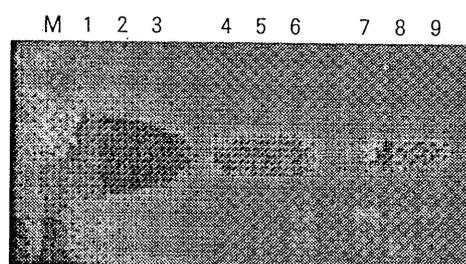
表中の数値は、各種4個体の平均値を表す。

*: 抽出液が着色していたことを表す。

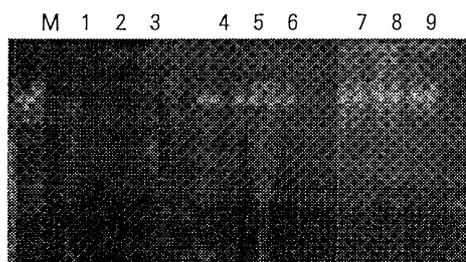
** : 試料溶液を4倍希釈したときのO.D.値を表す。



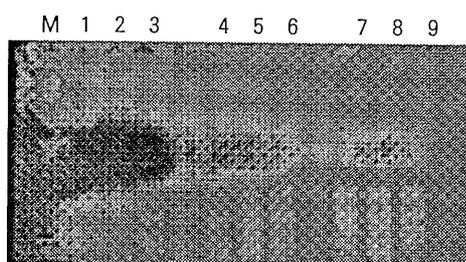
Nucleon Phytopure



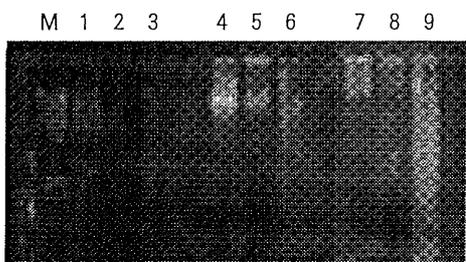
Nucleon Phytopure



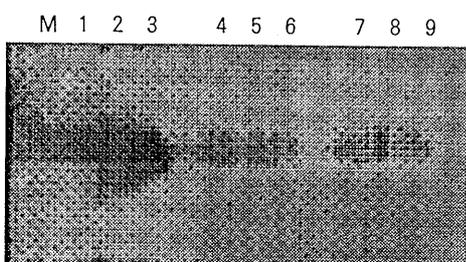
DNeasy Plant Mini Kit



DNeasy Plant Mini Kit



ISOPLANT II



ISOPLANT II

写真-1 2%アガロースゲル電気泳動による抽出DNAの確認
M: マーカー (λ DNA/HindIII), 1: シデコブシ乾燥葉, 2: コブシ乾燥葉, 3: タムシバ乾燥葉, 4: シデコブシ生葉, 5: コブシ生葉, 6: タムシバ生葉, 7: シデコブシ冬芽, 8: コブシ冬芽, 9: タムシバ冬芽

写真-2 抽出DNAを用いたPCR増幅の結果
M: マーカー (λ DNA/HindIII), 1: シデコブシ乾燥葉, 2: コブシ乾燥葉, 3: タムシバ乾燥葉, 4: シデコブシ生葉, 5: コブシ生葉, 6: タムシバ生葉, 7: シデコブシ冬芽, 8: コブシ冬芽, 9: タムシバ冬芽

ムのメンブレン膜に何度も通過させて、洗浄を繰り返す方法であるため、無色透明のDNA溶液が得られたと考えられる。

2. アガロース電気泳動によるDNAの確認

抽出キットによって得られたDNA溶液を2%アガロースゲル電気泳動した結果、すべての種の生葉、冬芽からの抽出液では、紫外線照射下においてバンドが検出された。このことは、抽出液中にDNAが含まれていることを表している。しかし、乾燥葉ではバンドが検出されず、DNAが確認されなかった(写真-1)。

2-1. DNA濃度の測定

UV分光光度計を用いて、DNA濃度を測定したところ、2%アガロース電気泳動では、DNAを全く確認することができなかった乾燥葉でもO.D.値を示した

(表-1)。抽出キット間で比較すると、Nucleon PhytopureとISOPLANT IIで得られたDNA溶液のO.D.値はそれぞれ0.088~1.338, 0.594~1.682であり、DNeasy Plant Kitからの抽出液(O.D.=0.010~0.222)よりも高いO.D.値を示した。これは、DNA濃度の違いというよりはむしろ、前者2つの抽出キットから得られたDNA溶液が着色していたため、吸光度に影響し、正確な濃度を測定出来なかったと考えられた。また、O.D.値は冬芽で最も高く、正確なO.D.値を得るためには、試料液を4倍に希釈して測定する必要がある。その結果、O.D.値によるDNA濃度は冬芽で最も高かった。このことは、若い組織におけるDNA量が古い組織よりも多いことを表している。

2-2. PCR増幅

DNA抽出液をテンプレートとして、コモンプライ

マー (CMN-B12) を用いてPCR増幅させたところ、すべての生葉、冬芽で、紫外線照射によってバンドが検出され、DNAの増幅が確認された(写真-2)。しかし、Nucleon PhytopureとISOPLANT IIでは、乾燥葉からの増幅はまったく確認できなかった。吉沢・大坪(1997)は、紫黒米や赤米からのDNA抽出液では、アントシアニンなどの色素物質のために、PCRが進まないことを報告している。このことから、抽出液が着色したDNAは遺伝解析に適さないことが考えられた。一方、無色透明の抽出液が得られたDNeasy Plant Kitでは、すべての種において乾燥葉のDNA増幅が確認できた。このことは、2%アガロースゲル電気泳動ではDNAを確認できなかった乾燥葉にも、PCR反応で十分増幅可能なDNAが抽出されていることを示していた。Kim et al. (2001)は、葉緑体DNAシーケンスを用いたモクレン科植物の分子系統分類における、シリカゲルで乾燥させた葉からのDNA抽出に、DNeasy Plant Mini Kitを用いており、本抽出キットが乾燥材料からのDNA抽出に有用であることを示唆していた。さらに、今回の結果によって、長期間空気中にさらされて保存状態が悪かった乾燥葉からのDNA抽出も可能であることがわかった。

以上のことから、生葉および冬芽などの新鮮な組織は、抽出キットを用いることで、少量の材料から、ゲノム解析に利用可能なDNAを抽出できることがわかった。また、DNeasy Plant Kitを用いれば、乾燥葉を材料とすることも可能であることがわかった。

IV まとめ

CTAB法によるDNA抽出は、若い葉組織は細胞壁が未発達で、細胞に占める核酸の割合が大きい展開直後の葉に最も適している。しかし、植物標本や漢方薬原料などを遺伝解析の対象とする場合には、展開から時間が経った古い葉組織や、長期間空気中にさらされて乾燥した組織が材料となるため、DNA抽出にCTAB法を用いると、DNAは全く抽出されないことがあった。このため、乾燥した葉組織だけでなく、根や茎といった葉以外の組織からのDNA抽出が必要となり、材料の部位や状態に依存しない効率的なDNA抽出法の検討が望まれていた。

本実験から、従来のCTAB法ではDNA抽出が不可能であった乾燥葉からも、適切な抽出キットを用いることで、DNAを抽出することが可能であることがわかった。しかし、抽出キットに含まれている試薬類の組成の詳細が明らかになっていないことやコストがかかること(50検体で2~3万円)などの欠点も残されてい

る。また、今回のように、抽出キット付属のプロトコールに従った抽出法では、抽出キットの種類によっては十分なDNAを得られないこともある。しかし、プロトコールに改変を加えるなどして沈殿物の着色を最大限に除去することができれば、抽出キットを使用しなくても乾燥した古い葉からのDNA抽出への道が開けてくると思われる。

引用文献

- Azuma, H., Thien, L. B., Kawano, S. (1999) Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of floral scents. *Journal of Plant Research* 112 : 291-306.
- Azuma, H., Garcia-Franco, J. G., Rico-Gray, V., Thien, L. B. (2001) Molecular phylogeny of the Magnoliaceae : the biogeography of tropical and temperate disjunctions. *American Journal of Botany* 88 : 2275-2285.
- Dandy, J. E. (1978) A revised survey of the genus *Magnolia* together with *Maglietia* and *Michelia*. (Magnolias. Treseder, N. G. [ed.] Faber and Faber, London) 29-37.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13-15.
- 河原孝行, 村上哲明, 瀬戸口浩彰, 津村義彦 (1995) 野生植物からのDNA抽出と解析への道. *日本植物分類学会報* 11 : 13-32.
- Johnson, L. A., Schultz J. L., Soltis, D. E., Soltis, P. S. (1996) Monophyly and generic relationships of Polemoniaceae based on *matK* sequences. *American Journal of Botany* 83 : 1207-1224.
- Khanuja, S. P. S., Shasany, A. K., Darokar, M. P., Kumar, S. (1999) Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Report* 17 : 1-7.
- Kim, S., Park, C-W., Kim, Y-D., Suh, Y. (2001) Phylogenetic relationships in family Magnoliaceae inferred from *ndhF* sequences. *American Journal of Botany* 88 : 717-728.
- Manos, P. S., Steele, K. (1997) Phylogenetic analyses of "higher" Hamamelididae based on

- plastid sequence data. American Journal of Botany 84 : 1410-1419.
- 村上哲明, 瀬戸口浩彰, 河原孝行, 津村義彦 (1995) PCR法の植物系統学への応用. (植物のPCR実験プロトコール. 島本功, 佐々木卓治編, 秀潤社. 東京). 147-152.
- Nooteboom, H. P. (1985) Notes on Magnoliaceae with a revision of *Pachylarnax* and *Elmerrillia* and the Malesian species of *Manglietia* and *Michelia*. Blumea 31 : 65-121.
- Nooteboom, H. P. (2000) Different looks at the classification of the Magnoliaceae. Proc. Internat. Symp. Fam. Magnoliaceae 2000 : 26-37.
- 田村隆明 (2001) DNA取扱いの基本. (改訂遺伝子工学実験ノート. 上. 田村隆明編, 180pp. 羊土社. 東京). 19-36.
- 吉橋忠, 大坪研一 (1997) 米一粒からのDNA抽出法 (新版植物のPCR実験プロトコール. 島本功, 佐々木卓治編, 216pp. 秀潤社. 東京). 63-66.

