

スサビノリフリー糸状体のDNA簡易単離法

岩瀨 光伸・瀨上 哲
(研究部)

Rapid DNA isolation from Free Living concocelis of *Porphyra Yezoensis*

Mitsunobu IWABUCHI, Satoshi FUCHIGAMI*
(Research Department)

形態的な分化に乏しく、環境変異が大きいアマノリ類の種の同定や系統解析にDNA解析技術を利用するための研究が行われ、種の識別に関してはDNA塩基配列の解析が有効であると報告されている。¹⁻³⁾しかし、産業的に重要なことはノリ養殖品種を識別することであり、そのための塩基配列部位はまだ特定されていない。したがって、現段階における品種の識別は、ゲノム全体を解析して多型を検出するRAPD (Random Amplified Polimorphic DNA)法やAFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)法が有効であると考えられる。AFLP法は再現性も高く、今後注目される手法であるが、RIまたはDNAシーケンサーを必要とするため一般的ではない。RAPD法は手法自体は簡便であり、PCR装置等があれば実験可能であり多くの生物種で試みられているが、再現性に問題があるため慎重な条件設定を必要とする。このことから、水溶性多糖類を多く含むアマノリ葉体からCTAB(Cetyltrimethylammonium bromide)法を使ってDNAを単離した場合、塩化セシウム密度勾配超遠心によってDNAを精製しなければ再現性の高いRAPDパターンは得られないとMizukami et al^{4, 5)}は報告している。しかしノリ養殖の現場では100種類を有に越える品種が存在しており、⁶⁾それらをRAPD法によって解析、識別するためのDNAを調整する上で、非常に多くの時間と煩雑な手間を要する塩化セシウム密度勾配超遠心による精製を各サンプルごとに行うことは不可能に近い。

今回我々は、スサビノリフリー糸状体からのDNA単離法について検討を加え、塩化セシウム密度勾配超遠心による精製を行わなくても、再現性の高いRAPDパターンが得られるDNA単離法を確立したので報告する。

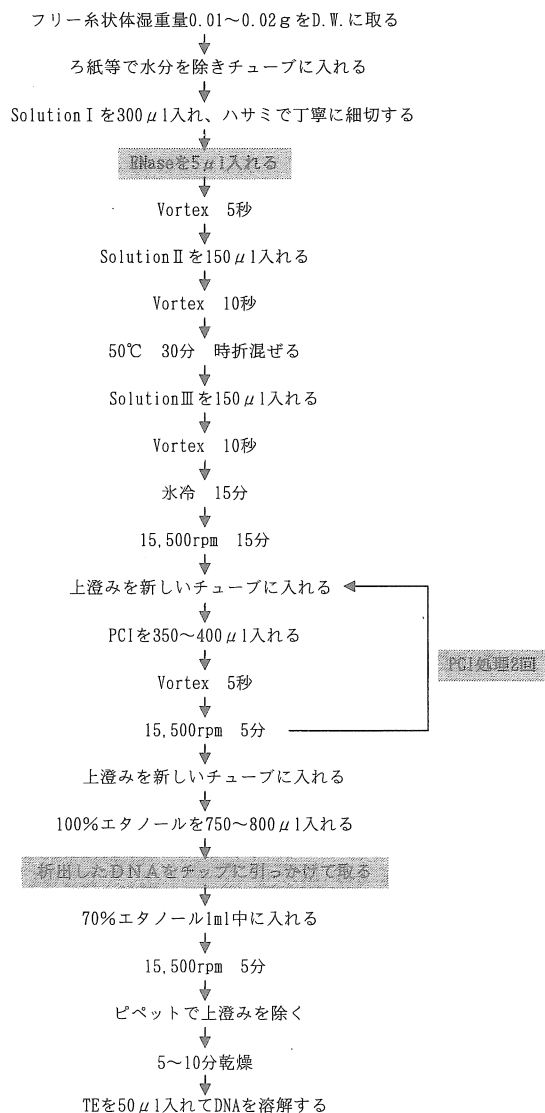


図1 フリー糸状体からのDNA単離プロトコール
網掛けが改変部位

* 有明海研究所

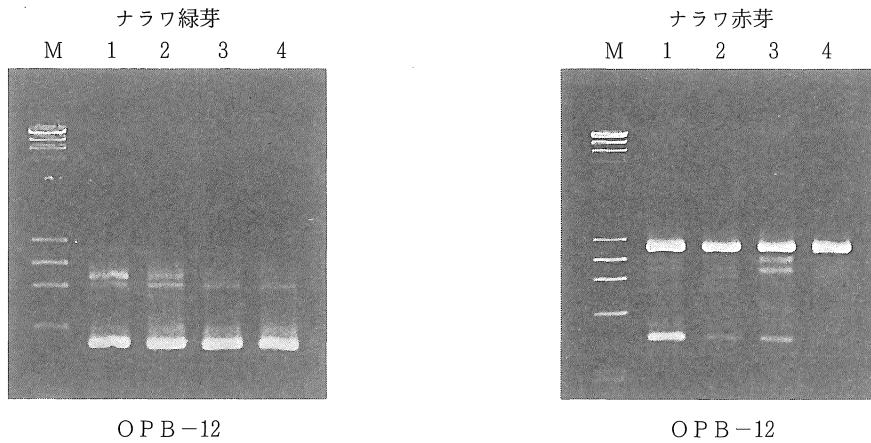


図2 遠心分離によって回収したDNAのRAPDパターン
M : マーカー 1~4 : DNA単離回数

材料及び方法

スサビノリ系の品種であるナラワ緑芽、ナラワ赤芽及び福岡1号のフリー糸状体からDNAを単離した。単離にはニッポンジーン社のISOPLANTを使用し、単離プロトコールは検討の結果、図1のように改変した。

ISOPLANTに添付されているプロトコールとの主な改変点は、RNaseをSolution Iに加えること、PCI処理を2回行うこと、そしてエタノール添加後に析出したDNAをチップに引っかけて回収することの3点である。

このプロトコールで単離したDNAの対照として、100%エタノール添加処理までは全く同様とし、エタノール添加後のDNA回収を、一般的な回収法である遠心分離によって行ったDNAを用意した。チップによる回収、遠心分離による回収のいずれについても各品種ごとに4回行って、同一品種4サンプルのDNAが同じRAPDパターンを示すかどうかでDNAの質を判断した。

さらに福岡1号に関しては、遠心分離によって回収したDNAを塩化セシウム密度勾配超遠心により精製し、同様にRAPD処理を行って比較した。超遠心による精製は、DNA溶液1mlあたり1.0gの塩化セシウムと20 μ l/mlの10mg/mlエチジウムブロマイド溶液を加え、ベックマンNVT65.2ローターで55,000r.p.m., 15時間遠心を行った。紫外線照射下でDNAバンドを回収し、水飽和ブタノールで3回処理してエチジウムブロマイドを取り除き、エタノール沈殿によって精製DNAを得た。

RAPD処理はオペロンランダムプライマーKIT Bのプライマー、TaKaRaTaqポリメラーゼと添付のdNTP及びバッファを用いた。PCR反応条件はパーキンエルマー社Gene Amp PCR System9700により、92 $^{\circ}$ C 1分、37.5

$^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして45サイクルを行った。PCR後、2.0%アガロースゲルで電気泳動を行い、RAPDパターンを調べた。

結 果

改変プロトコールによるDNAの収量は品種によって差は認められたが、1.5mlチューブ1本当たり約0.02gのフリー糸状体を使用して1~4 μ gであった。A260/280の値はほぼ1.9~2.0、多糖類含量の目安となるA234/260は約0.5で、不純物であるタンパク質と多糖類の混入は少ないと判断された。

遠心分離によって回収したナラワ緑芽とナラワ赤芽のDNAをプライマーOPB-12 (CCTTGACGCA) で処理した結果を図2に示した。4回の単離DNAのRAPDパターンは、どちらの品種も大きな違いは認められなかったが完全には一致しなかった。しかし、チップで回収したDNAをプライマーOPB-12、OPB-15 (GGAGGGTGT) 及びOPB-17 (AGGGAACGAG) で処理した結果は、図3に示したようにナラワ赤芽、ナラワ緑芽ともに4回の単離DNAのRAPDパターンはすべて一致した。

福岡1号から遠心分離によって回収したDNA、超遠心によって精製したDNA及びチップにひっかけて回収したDNAをOPB-11 (GTAGACCCGT) 及びOPB-12のプライマーで処理したRAPDパターンを図4に示した。チップによって回収したDNAではどちらのプライマーでも4回の単離DNAにRAPDパターンの違いは全く認められなかった。遠心分離による回収を行ったDNAと超遠心による精製を行なったDNAでは、明瞭な主バンドの位置、濃淡に違いは認められなかったが、薄いバンドには若干の違いが認められた。

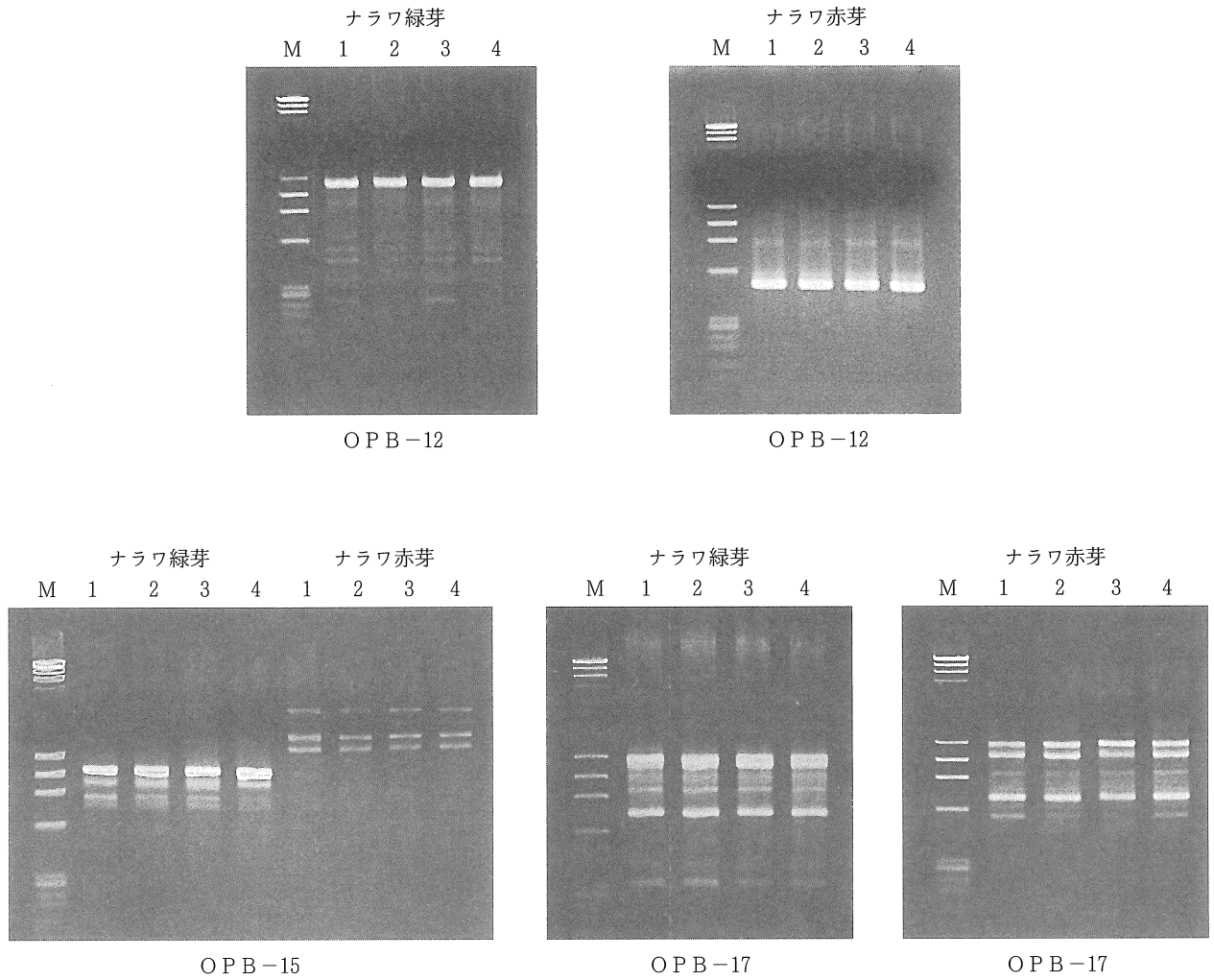


図3 チップに引っかけて回収したDNAのPAPDパターン
M: マーカー 1~4: DNA単離回収

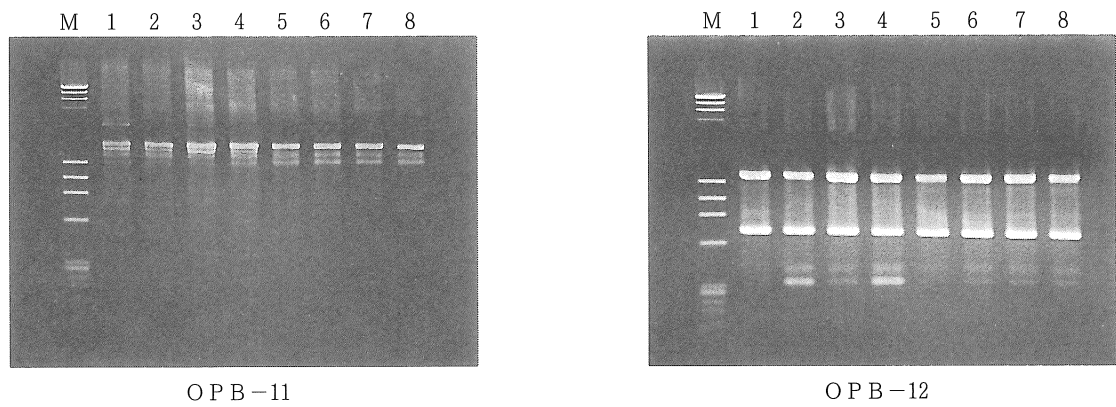


図4 福岡1号のRAPDのパターンの比較
M: マーカー 1・2: 遠心分離によって回収したDNA
3・4: 塩化セシウム密度勾配によって精製したDNA
5~8: チップに引っかけて回収したDNA

考 察

ISOPLANTを使用して本報告で示した改変プロトコールに従ってフリー糸状体から単離したDNAは、福岡1号、ナラワ緑芽及びナラワ赤芽の3品種において、複数のプライマーでRAPDパターンが一致し、非常に質の高いことが明らかとなった。

この改変プロトコールによって不純物の少ない高品質のDNAが得られた理由として次の2点が考えられた。

第1は、材料にフリー糸状体を使用したことである。フリー糸状体中の多糖類含量についての報告はないが、おそらくフリー糸状体は、葉体に比較して多糖類の含有量が少ないものと推測され、そのため不純物の少ないDNAを得ることができたと考えられた。また現在、品種の流通はもっぱらフリー糸状体で行われていることから、品種識別、系統解析の研究を行なう材料としてはフリー糸状体の方が葉体よりも適当であると考えられる。

第2には、最終段階のDNAの回収において、チップを使用してDNAを引っかけて回収することである。チップを使用せず遠心によりDNAを沈殿させて回収した場合でも、超遠心を行なったサンプルのRAPDパターンと大きな違いは見られず再現性はかなり高いと判断されたが、図2に示したように一部再現性の低いものも認められた。それらのものでもチップで回収することによってRAPDパターンの再現性は高まったことから、この操作はDNAの質的な向上に有効であると考えられた。

また改変プロトコールに従った場合、DNA単離に要する時間は2～3時間と比較的短時間であり、多数のサンプルでも同時に処理が可能であった。植物の代表的なDNA単離法であるCTAB法によってフリー糸状体からDNAを抽出した場合、その単離時間は約4～5時間を要する。多くのサンプルを調査するためには、DNA単離はできるだけ短時間であることが要求され、その点からも有効な単離法であると考えられる。

本報告では品種ごとのRAPDパターンの多型性について考察は加えていない。しかし、図3を見ても分かるように、ナラワ緑芽、ナラワ赤芽との間でRAPDパターンに相違が認められた。また図3と図5のOPB-12のパターンを比較しても明らかな違いが認められた。このことから、RAPD法によって品種の識別が可能であると推測され、今後多くの品種を調査することによって、品種識別や系統解析に必要なデータが得られると期待される。

要 約

- 1) スサビノリフリー糸状体からニッポンジーン社のISOPLANTを使用してDNAを抽出した。抽出プロトコールはフリー糸状体に適するように改変した。
- 2) 改変プロトコールによって単離した糸状体DNAのRAPDパターンは、非常に再現性が高かったことから、DNAに含まれる不純物は少なく、質的に高いことが分かった。
- 3) DNAの単離時間は、2～3時間と従来の方法に比べて2分の1程度であり、多くのサンプルからDNAを単離するのに適していると考えられた。

文 献

- 1) Y.Mizukami,H.Kito,Y.Kaminishi,N.Murase and M.Kunimoto : Nucleotide Sequence Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacer Regions of Cultivated(Cultivars)and Field-Collected Thalli of *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Science* 65, 5,788-789(1999).
- 2) M.Kunimoto,H.Kito,D.P.Cheny,Y.Kaminishi and Y.Mizukami : Discrimination of *Porphyra* species based on Small subunit ribosomal RNA gene. *Journal of Applied Phycology*, 11,211-216 (1999).
- 3) 國本正彦 : アマノリ属の遺伝的多様性. *海洋と生物* 21, 24,308-312(1999).
- 4) Y.Mizukami,H.Kito,M.Kunimoto and M.Kobayashi : Effect of DNA preparation from laver (*Porphyra yezoensis*)Thalli on reproducibility of RAPD(random amplified polymorphic DNA)patterns. *Journal of Applied Phycology*. 10,23-29 (1998).
- 5) Y.Mizukami,M.Okauchi,H.Kito and M.Kobayashi : Discrimination of Laver Cultivars with RAPD Makers. *Fisheries Science* 62, 4 ,547-551 (1996).
- 6) 岩淵光伸 : 利用されている品種の問題について. *西海区ブロック藻類分類研究会報*, 第6号, pp.13-16(1989).