

ノート (Note)

模擬実験を目的とした樹木からの DNA 抽出方法の改良と実施

上野真義^{1)*}、大谷雅人²⁾、吉丸博志³⁾

キーワード：サイエンスコミュニケーション、林木、分子遺伝、模擬実験

広報普及活動は、研究成果を社会に還元し、国民の研究開発への理解を得るための重要な手段であるとともに、国立研究開発法人森林総合研究所(以下「森林総研」と記す。)の第4期中長期目標(農林水産省 2016)における「研究開発成果の最大化に向けた取組」の一環として、科学リテラシーの向上にも寄与すると期待される。森林総研では平成12年に建設された生物多様性解析実験棟の1階にある「森の展示ルーム」にて、標本や研究成果等の一般公開を行っているが、遺伝の研究に関わる展示は現在のところ皆無である。

森林総研(本所:茨城県つくば市)では、春の科学技術週間の「研究所一般公開」や夏休みの「森の展示ルーム公開」といった不特定多数を対象とするイベントの他に、年間を通して様々な立場や目的を持つ見学者を受け入れているが、平成28年8月3日に、文部科学省から「スーパーサイエンスハイスクール」に指定された奈良県の高등학교の生徒、約20名の見学を受け入れる機会があった。そこで、樹木分子遺伝研究領域での研究室見学において、研究成果の簡潔な紹介を行うとともに、遺伝子研究の第一歩である樹木からDNAを抽出する過程を展示し、同時にDNA抽出の模擬実験を体験してもらうことを企画した。研究室で行っている通常のDNA抽出では、溶媒から析出して沈殿となるDNAを視認しづらいため、沈殿が見やすく、なおかつ最小限の沈殿(DNA)を得るための方法を検討した。凍結試料の粉碎およびDNAを含む白色の沈殿が析出する瞬間を体験してもらうことで、森林や樹木を対象とした遺伝研究を記憶にとどめてもらえるように工夫した。本稿では特に、模擬実験と展示を目的とした樹木DNAの抽出方法について検討した結果について報告する。

分子遺伝の研究においてはDNAの抽出は研究の第一歩であり、通常は研究目的から必要とされるDNAの質と量に基づき、それに適した抽出方法が決定される。今回のように展示や体験を目的とするDNA抽出の場合

は、多糖類等を多量に含むような品質の良くないDNAが得られたとしても問題はなく、析出した沈殿が肉眼ではっきりわかることが重要である。そのような目的を満たし、森林総研で1年を通じて入手しやすい材料として、スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)の針葉を選択した(常緑広葉樹のヤブツバキ(*Camellia japonica* L.)の葉を使用して同様の実験を行ったが十分な量の沈殿が得られなかった)。模擬実験を行う2日前の8月1日に、森林総研(茨城県つくば市)の樹木園内に生育する1個体のスギの小枝先端から、雄花を含む針葉の約9gを採取し、液体窒素で凍結してミルサー(IFM-650D、岩谷産業株式会社)で粉碎した。あらかじめ65℃に加熱した、2-メルカプトエタノール(2%)を含むCTAB(cetyltrimethylammonium bromide)抽出液(河原ら 1995)を2本の50 mL容の遠心チューブに15 mLずつ分注しておき、凍結状態にあるスギの針葉粉末(葉さじ3匙分)を各チューブに懸濁した。懸濁液は、10分間、ウォーターバスにて65℃で維持し(途中で一度、転倒混和)、その後にクロロホルムをチューブ1本あたり5 mL加えて十分に混合した後、室温(25℃)にて3,000 rpmで10分間の遠心分離を行った。遠心後の上清が白濁していたため、上清をさらに、6本の5 mL容チューブに4 mLずつ分注し、0.8 mLのクロロホルムを加えてよく混合し、室温(25℃)にて14,000 rpmで10分間の遠心分離を行った。透明になった上清(粘性が高いので全てを回収しない)の3 mLを5 mL容チューブに移し、-20℃に冷却したイソプロパノールを2 mLを加えて転倒混和し、白色の沈殿が得られることを確認した。このような抽出法で得られた沈殿にはDNAが含まれることがわかっている(河原ら 1995 および Fig. S1)。残りの上清も同様に3 mLずつ5 mL容チューブに移し、-20℃にて保存した。これらのチューブを模擬実験の直前に室温で放置して解凍し、DNA抽出の模擬実験で使用した。DNA抽出過程を展示するために、スギの針葉粉末を懸濁したCTAB抽

Modification of DNA extraction protocol and the exhibition for tree species

Saneyoshi Ueno^{1)*}, Masato Ohtani²⁾ and Hiroshi Yoshimaru³⁾

原稿受付:平成28年8月23日 原稿受理:平成28年11月22日

1) 森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域

2) 兵庫県立大学自然・環境科学研究所

3) 森林総合研究所企画部広報普及科

* 森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI),

1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan; e-mail: saueno@ffpri.affrc.go.jp

出液、クロロホルムを加えた状態の懸濁液、遠心分離により DNA を含む上清が分離した状態の遠心チューブ、および DNA を含む白色沈殿をそれぞれ準備した (Fig. 1 A) および B))。

模擬実験においては、はじめに DNA 抽出のしくみについて資料 (Fig. 1 C)) を用いて説明を行った。この際、使用する試薬には劇物が含まれるため取扱いに注意が必要なことや、それらの試薬は施錠できる保管庫に保管していることを説明した。次に、実際にスギの針葉を凍結して粉碎するところを実演し、常緑照葉樹のヤブツバキと落葉広葉樹のカエデ (*Acer* sp.) の葉を液体窒素で凍結し、2 名の希望者に軍手を着用の上で乳鉢と乳棒で粉碎をしてもらった。その後の実験操作は予め準備した展示品を示しながら説明し、最後に、解凍して氷上に静置しておいた前述の上清 (3 mL) の入った 5 mL 容チューブに氷で冷却したイソプロパノールを 2 mL 加えた。5 mL 容チューブを見学者に回覧して転倒混和するように指示し、DNA を含む白色の沈殿が析出してくる瞬間を観察してもらった。なお見学者に回覧した 5 mL 容チューブの溶液は 2-メルカプトエタノールを含み劇物に相当するためすべてを回収し所定の方法で廃液として処理した。

ヒトをはじめとして、すべての生物に存在する遺伝物質である DNA を実際に見て確かめることができるため、DNA 抽出実験は多くの人の興味の対象となると考えられる。DNA 抽出実験は高等学校の生物の教科書 (浅島ら 2013) にも登場し、家庭用食器洗剤を界面活性剤として利用する方法が紹介されているだけでなく、子供向けの市販 DNA 抽出キット (Table S1) も存在し、夏休みの自由研究やオープンキャンパスなどでは定番の実験になっているが、樹木試料からの DNA 抽出は夾雑物も多く簡単なキットによる処理にはなじまないことも多い。実際にもし本稿で報告した DNA 抽出の過程を説明しながら全て行くと 1 時間から 2 時間程度の時間を要し、その間に待ち時間も長い。しかし模擬実験として予め用意しておくことで、説明を行ったとしても約 15 分程度の時間で一通り終わることが可能である。さらにサンプルを懸濁した DNA 抽出液の遠心分離後の上清をはじめ、展示用の抽出液などは、冷凍保存が可能であるため、事前に準備をしておくことで見学などの要望に柔軟に対応することも出来る。危惧される点として、保存中に緑色の抽出液が酸化を受け黄褐色に変色してしまうことが考えられるが、CTAB 抽出液に加える 2-メルカプトエタノール (酸化防止剤として機能する) の濃度を上げることで回避できるのではないかと考えられる。本稿では通常の DNA 抽出で用いる濃度 (0.4 %) よりも高い濃度 (2 %) で 2-メルカプトエタノールを使用したためか、懸濁した抽出液が黄褐色に変色することはなかった。なお、2% の 2-メルカプトエタノールを含む溶液は毒物及び劇物指定令 (平成 28 年 7 月 1 日政令第 255 号により一部改

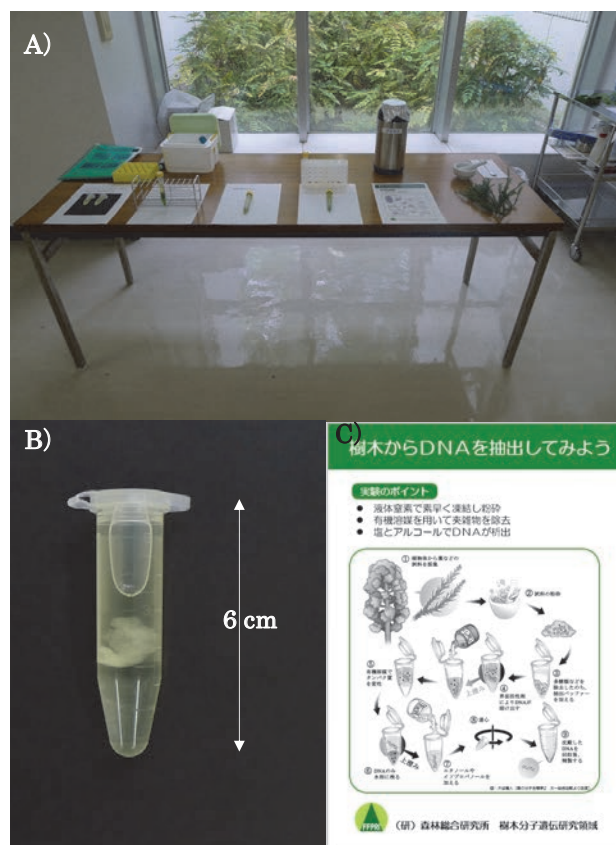


Fig. 1. DNA 抽出の模擬実験での事前準備。A) 模擬実験台の全景、B) 5 mL 容チューブに析出した DNA を含む白色の沈殿、C) 説明用の配付資料 (A4 サイズで印刷)

Bench setting and prepared items for simulative DNA extraction experiment. A) Full view of whole bench setting. B) White precipitates containing DNA in a 5 mL tube. C) Explanatory materials distributed on A4 paper.

正) から劇物に相当すると考えられるため、取り扱いと管理に注意を要する。今回の模擬実験は、業務で使用している設備の整った実験室で行い、使用する薬品の危険性を説明した上で、希望者に液体窒素を用いたサンプルの粉碎や、チューブの転倒混和による DNA の沈殿の生成を体験してもらった。液体窒素によるサンプルの粉碎においては、凍傷を防ぐ目的で軍手を使用してもらったが、更に安全性を高めるためには革手袋や防護メガネを着用することが考えられる。また、DNA を含むチューブを転倒混和させる際に、溶液が漏出した場合に備え、チャック付きポリ袋にチューブを入れた上で体験に供する方法もあると考えられる。

通常業務で行う DNA 抽出は、1.5 もしくは 2 mL 容のチューブを用いて行うことが多いが、DNA の沈殿を観察することは困難である。逆に 15 mL 容や 50 mL 容のチューブを使用することで多量の沈殿を析出させて観察することも可能であるが、必要な試薬や廃液の量も増加してしまう。本稿では必要な試薬や廃液を極力減らす

ことも考えた DNA 抽出の模擬実験の準備手順、および DNA を含む沈殿の析出を観察するために 5 mL 容のチューブを使用することを考案し、見学者の来訪時に実践することによって、改良した DNA の抽出法が模擬実験と展示に有用であることを示した。

引用文献

浅島 誠・市石 博・伊藤 元己・可知 直毅・上村 慎治・久力 誠・小林 設郎・小林 秀明・小林 裕光・西駕 秀俊・新免 輝男・杉山 宗隆・長山 隆男・新田 光昭・長谷川 真理子・広瀬 敬子・深川 治・藤原 晴彦・宮下 直・山本 高之・東京書籍株式会社 (2013) 生物基礎. 東京書籍, 45.

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.

農林水産省 (2016) “国立研究開発法人森林総合研究所 中長期目標” http://www.maff.go.jp/j/corp/dokuhou/pdf/shinrin_mokuhyo.pdf (参照 2016-08-12).

補足電子資料

以下はオンライン版のみの掲載となります。

<http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/bulletin/440/index.html>

Fig. S1. 抽出した DNA の 2 % アガロースゲル電気泳動像 (臭化エチジウム染色)

Agarose gel (2 %) image of extracted DNA with ethidium bromide staining

Table. S1. 市販されている子供向け DNA 抽出キット
DNA extraction kits for children that are available in the market