

養殖ノリの葉緑体DNA抽出方法の検討

谷田圭亮^{*1*2}・増田恵一^{*1}

Isolation of Chloroplast DNA from Cultured Susabi-nori *Porphyra yezoensis*

Keisuke TANIDA^{*1*2} and Keiichi MASUDA^{*1}

養殖ノリは、従来からそれぞれの地域、漁場で選抜育種が繰り返され、その結果、地方品種を含めると非常に多くの養殖品種が存在するようになった。さらに、最近ではバイオテクノロジー技術の発展にともない、新しい品種開発の方法が確立しつつある。しかし、これらの養殖品種は必ずしもその特性が正確に把握されているとはいえず、品種数の多さがかえって養殖現場における適正品種の選択に混乱を招いているのが現状である。今後、ますます品種開発が進むことが予測されるが、養殖現場での効率的な品種の選択、新しく開発された品種の評価、あるいは遺伝資源としての品種の保存を行っていくためには、養殖ノリの品種を正確に評価するための方法の確立が必要である。

養殖ノリの品種は、従来、葉体の形、大きさ、色、厚み、生殖細胞形成のしかた等の形態的な違いをみることによって区別されていた¹⁾が、これらの形態は葉体の生育する環境要因の影響を大きく受けるため、明確な品種の評価法とはなり得ていない。その後、染色体数やアミノ酸の分析、あるいはアイソザイム遺伝子の分析といった手法が開発されてきたが、品種間の変異の幅は非常に小さく、これらの方法では種間の遺伝的変異が検出された例がある^{2,3)}に過ぎず、品種の評価法として満足できるものであるとは言えない。⁴⁻⁶⁾

近年の藻類における葉緑体DNA (cpDNA) を用いた研究の発展にともない、⁷⁻¹⁰⁾これが遺伝的変異を検出するための有効な指標となることが期待される。また、

最近になってアマノリ類において葉体から作出したプロトプラストを利用して、細胞壁由来の多糖類の混入を極力抑えた上でcpDNAを抽出する方法が紹介されている。^{11,12)}本試験では、これらの方法を改変しつつ、葉体あるいは糸状体から簡易な方法でcpDNAサンプルを得ることを試みた。

材料と方法

ノリ葉緑体DNAの抽出は、

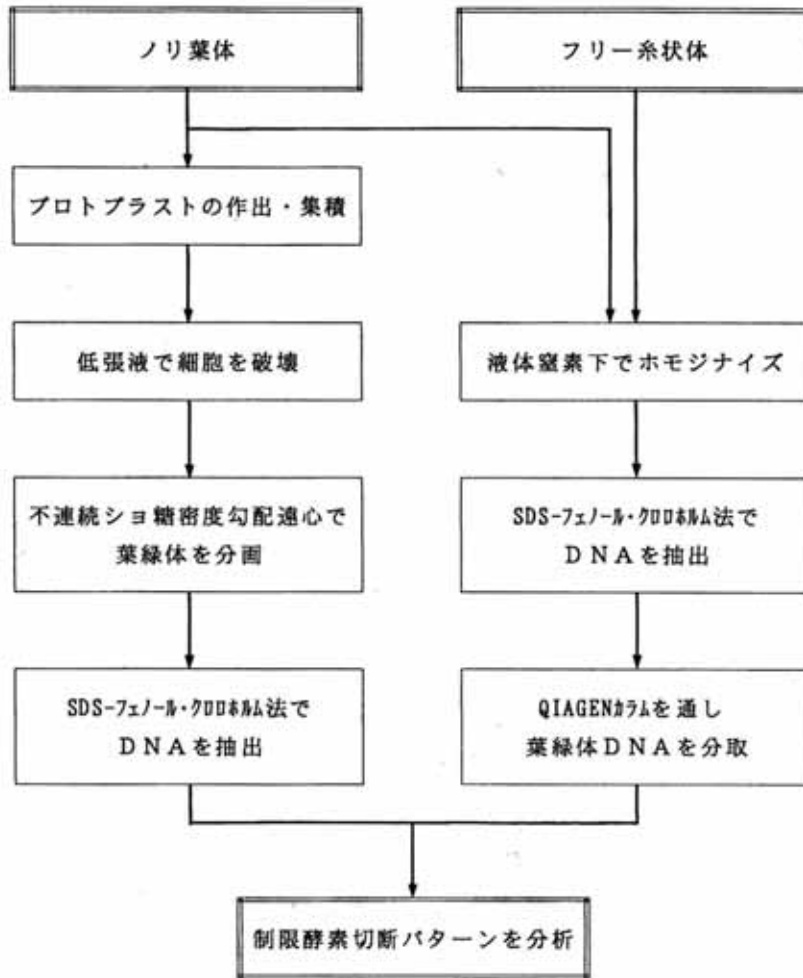
- 1) ノリ葉体からプロトプラストを作出し、葉緑体を分離した後にDNAを抽出する。
- 2) ノリ葉体をホモジナイズし、核DNAを含む全DNAを抽出した後に葉緑体DNAを精製する。
- 3) ノリのフリー糸状体をホモジナイズし、全DNAを抽出後葉緑体DNAを精製する。

という3種の方法によって行った。操作の概要は第1図に示した。

試験に供したフリー糸状体は、兵庫県立水産試験場で保存しているものを用いた。また、ノリ葉体は同一のフリー糸状体から採苗し、室内で培養した200mgから1g (湿重量) のものであった。

*1 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Minami-Futami, Akashi 674)

*2 現所属：兵庫県保健環境部環境局水質課 (Water Quality Division, Environment Bureau, Public Health and Environment Department, Hyogo Prefectural Government, Chuoh-ku, Kobe 650)



第1図 ノリ葉緑体DNA抽出方法の概要

葉体からプロトプラストを作出し葉緑体を分画した後にDNAを抽出する方法

①プロトプラストの作出

ノリ葉体1個体から既報⁴⁾に従い、プロトプラストを作出した。

プロトプラストの作出は、まず酵素液1:1%パバイン(SIGMA, Lot. 125F-8110)で20℃、30min振盪処理した後に滅菌海水で洗浄し、次に酵素液2:2%AAP(Abalone Acetone Powder, SIGMA, Lot. 58F-9620)+0.01%アルカリヘミセルラーゼ(WAKO, Lot. LGK7255)で10~20minごとにボルテックスミキサーで攪拌しながら酵素反応させ、プロトプラストの作出を確認した時点で処理を停止した。その後、20 μ mのナイロンメッシュで濾過し、プロトプラストおよび混入するスフェロ

プラストを集積し、希釈洗浄した。

②葉緑体の集積

得られたプロトプラストおよびスフェロプラストを低張液(0.2M マンニトール, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 滅菌海水ベース, pH8.5)中で破壊し、20-45-60%不連続ショ糖密度勾配液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA: Buffer A ベース)上に重層し、3800rpm、4℃、30minで遠心し、葉緑体を分画した。葉緑体は一部45%層に移行したが、ほとんどは20%層から回収された。

葉緑体はBuffer Aで希釈洗浄を行った。

③葉緑体DNA(cpDNA)の抽出

葉緑体は1mlのBuffer Aとともにエッペンドルフチューブ(2.0ml容)に収容した。SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を最終濃度3%になるように加え、葉緑

体が十分に溶解するまで室温で静置した。その後、等量のTE飽和フェノール溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0: Buffer Bに溶解)を加え、よく振盪してから20°C、3000rpm、10minの遠心分離を行い、水層(上層)を回収した。次に、等量のフェノール・クロロホルム溶液(TE飽和フェノール:クロロホルム=1:1)を加えてよく振盪し、20°C、3000rpm、10minの遠心分離により、水層(上層)を回収した。この操作を2~3回繰り返して、得られた水層に等量のクロロホルム(1/24容のイソアミルアルコールを含む)を加え、同様の操作を2回行った。得られた水層に最終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)および冷却したエタノールを2倍量加え、-80°Cで1時間静置した。その後、4°C、10000rpmで15min遠心分離をして、cpDNAの沈澱を得た。この沈澱を80%エタノールで洗浄し、真空乾燥器中で乾燥し、適当量のBuffer Bで溶解したものを電気泳動用試料とした。

葉体をホモジナイズし抽出した全DNAから葉緑体DNAを精製する方法

①全DNAの抽出

ノリ葉体1個体を液体窒素下で粉状になるまでホモジナイズし、Buffer Aを5ml加え、10ml遠沈管に収容した。最終濃度3%になるようにSDSを加え、1mgのプロテナーゼKを加えて50°C、4h静置し、さらに1mgのプロテナーゼKを加えて1晩静置し、溶液が透明になるまで十分に溶解した。

その後は、葉緑体からのDNA抽出法に準じ、フェノール・クロロホルム法により全DNAを抽出した。

②葉緑体DNAの精製

Buffer Bに溶解した全DNAをQIAGEN-tipカラム(QIAGEN Inc., USA)に充填し、プロトコル¹⁰⁾に従い、塩濃度の異なるBufferで目的とするcpDNAを溶出した。これを再びエタノール沈澱として、適当量のBuffer Bで溶解したものを電気泳動用試料とした。

糸状体をホモジナイズし抽出した全DNAから葉緑体DNAを精製する方法 ノリ糸状体約1g(水切り重量)を用いて、葉体のホモジネートからDNAを抽出する方

法に準じ、全DNAを抽出した後、cpDNAを精製した。これについてもBuffer Bに溶解したものを電気泳動用試料とした。

以上の3種の方法によってそれぞれ2ロットずつの試料を作成した。

いずれの方法でもcpDNAが抽出されているかどうかを確認するため、0.8%アガロース(フナコシ, Lot. 80728)・エチジウムブロマイドゲルで水平サブマリン型電気泳動装置(コスモバイオ MUPID-2)によって電気泳動を行った。

また、それぞれの試料をRNase処理した後、6塩基認識の制限酵素であるEcoRIによる切断片についても同様に電気泳動を行った。泳動用Bufferは、第1表に示した組成で、使用時に5倍希釈とした。得られた切断片の検出は、トランスイルミネータ(フナコシ TM-20)で確認し、写真による解析を行った。また、cpDNAの塩基対数を推定するために同一ゲル上でλDNAのHindIII切断片をサイズマーカーとした。

第1表 電気泳動用Buffer組成(×5)

Tris	54 g
Boric Acid	27.5 g
EDTA	4.65 g
up to 1 liter	

結果

それぞれの方法で抽出したcpDNA試料のアガロースゲル泳動像を第2図に示した。

ノリ葉体から葉緑体を分画し、DNAを抽出する方法によって得られた1ロットを除いて、いずれの方法で抽出した場合においてもRNAと考えられるスメアーバンドがみられた。cpDNAはそれぞれのロットで1本のバンドとして確認された。

RNase処理後、EcoRIで切断したそれぞれのcpDNAのアガロースゲル泳動像を第3図に示した。

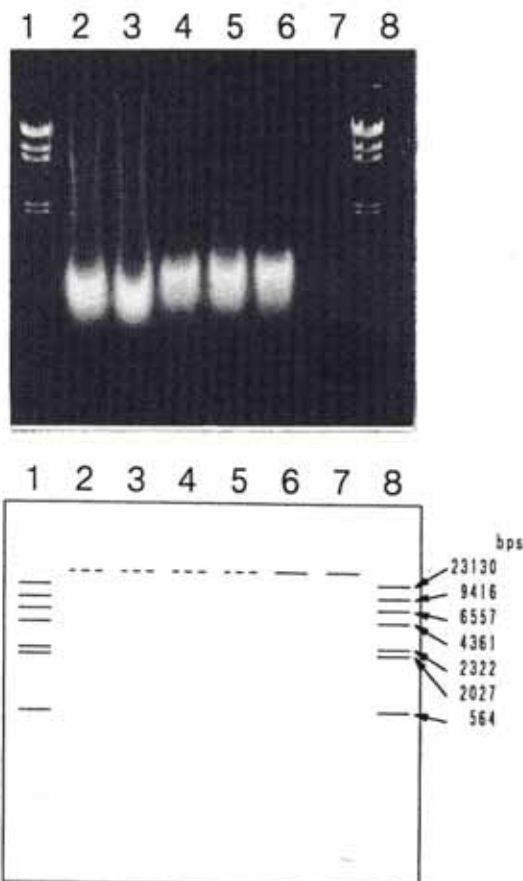
ノリ葉体から葉緑体を分画し、抽出したcpDNAおよび葉体のホモジネートから抽出したDNAを精製して得たcpDNAについては、RNase処理によりスメアー

なバンドは消滅した。しかし、糸状体のホモジネートから抽出したDNAより精製したcpDNAについては、RNase処理によっても消化されないバンドが残っており、これは多糖類の除去が十分でなかったものと推察される。

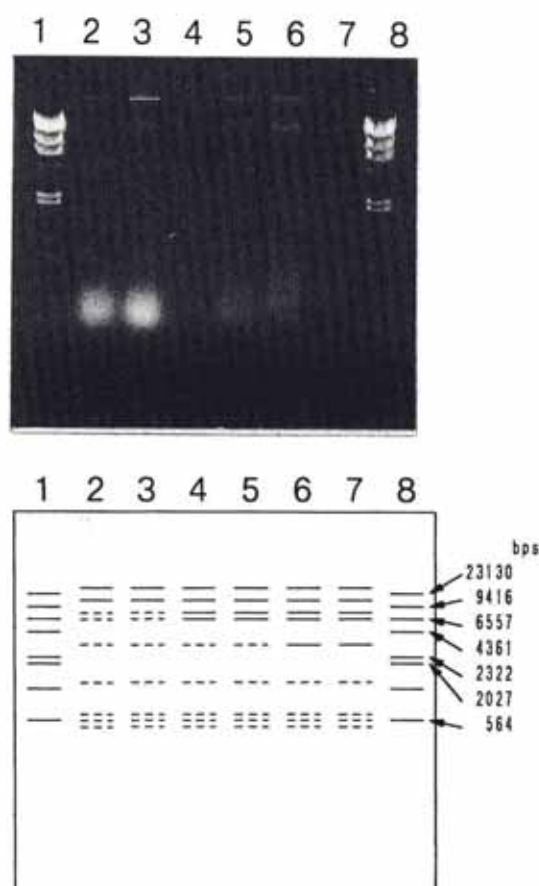
それぞれのcpDNAにおけるEcoRI切断片は、同一

の位置にバンドがみられた。約32kbpsに1本、約12kbpsに1本、7~8kbpsに2本、約3kbpsに1本、約1kbpsに1本、さらに1kbps以下に3本のバンドが確認された。

これらの結果からノリ葉緑体DNAのサイズは約65kbpsと考えられた。



第2図 3種の 방법으로抽出したノリ葉緑体DNA
1, 8: サイズマーカー
2, 3: 糸状体すりつぶしによる抽出
4, 5: 葉体すりつぶしによる抽出
6, 7: プロトプラストから抽出



第3図 抽出した葉緑体DNAのEcoRIによる切断像
1, 8: サイズマーカー
2, 3: 糸状体すりつぶしによる抽出
4, 5: 葉体すりつぶしによる抽出
6, 7: プロトプラストから抽出

考察

本試験では、1) 葉体からプロトプラストを作出し葉緑体を分画した後にDNAを抽出する方法、2) 葉体をホモジナイズし抽出した全DNAから葉緑体DNAを精製する方法、および、3) 糸状体をホモジナイズし抽出した全DNAから葉緑体DNAを精製する方法という3

種の方法によってcpDNAの抽出方法を検討した。

いずれの方法においても、cpDNAを抽出することは可能であり、このcpDNAの制限酵素切断パターンの解析により、養殖ノリ品種の評価が可能であることが示唆された。

現在、養殖ノリ品種の保存はもっぱらフリー糸状体によって行っているため、このフリー糸状体を材料として、

cpDNAの抽出ができれば養殖ノリ品種の評価、管理が極めて容易になることが考えられる。しかし、本試験でのフリー糸状体のホモジネートからcpDNAを抽出する方法では、細胞壁由来の多糖類と考えられるコンタミネーションが多く、どのようにしてこれを除去するかという問題点が残されている。

また、本試験におけるEcoRI切断片を解析することにより、養殖ノリにおけるcpDNAのサイズは約65kbpであると推察された。本試験では制限酵素による切断片の検出時に、明瞭に検出できなかったバンドが存在する可能性があり、このことを考慮したとしても、ノリcpDNAのサイズは、Sivji¹¹⁾の結果(185kbp)ほどには大きくないものと思われる。

要約

養殖ノリの葉緑体DNAを抽出するための方法を検討した。

ノリ葉体からプロトプラストを作出し、低張液中で細胞を破壊した後に葉緑体を分画し、DNAを抽出する方法、ノリ葉体および糸状体を液体窒素下でホモジナイズし、全DNAを抽出した後に葉緑体由来のDNAを精製するという方法によって、それぞれ葉緑体DNAを抽出した。

いずれの場合も制限酵素による切断パターンをみるためには十分な量のDNAを抽出することができたが、特に葉体および糸状体を液体窒素下でホモジナイズして抽出したDNAには不純物のコンタミネーションが目立ち、このままでは制限酵素切断片が明瞭に検出できないため、さらに手法の改良が必要であると考えられた。

また、制限酵素切断パターンから類推したノリ葉緑体DNAのサイズは、約65kbp程度であり、Sivjiの結果(185kbp)とは大きく異なっていた。

文献

- 1) (社)日本水産資源保護協会：昭和55年度種苗特性分類調査報告書，(社)日本水産資源保護協会，東京，1981.
- 2) Y. Fujio, P. L. G. Kodaka, M. Hara and K. Akiyama : Electrophoretic variants characteristic of heterozygotes in haploid laver *Porphyra* sp., *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**(6), 969-974 (1988).
- 3) バトリシア L. ヒル小高・藤尾芳久：ノリ3種の遺伝的類縁関係，水産育種，**15**, 31-34 (1990).
- 4) P. L. G. Kodaka, M. Hara, K. Akiyama and Y. Fujio : Genetic differences between natural and cultured population of *Porphyra yezoensis*, *Tohoku J. Agr. Res.*, **38**, 7-34 (1988).
- 5) 兵庫県立水産試験場：プロトプラストを利用した養殖ノリの地域適合品種の開発，平成3年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書，1992.
- 6) 兵庫県立水産試験場：プロトプラストを利用した養殖ノリの地域適合品種の開発，平成4年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書，1993.
- 7) S. R. Fain, L. D. Druehl and D. L. Baillie : Repeat and single copy sequences are differentially conserved in the evolution of kelp chloroplast DNA, *J. Phycol.*, **24**, 292-302 (1988).
- 8) L. J. Coleman : The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations, *J. Phycol.*, **24**, 357-368 (1988).
- 9) N. Li and R. A. Cattolico : Chloroplast genome characterization in the red alga *Griffithsia pacifica*, *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 343-351 (1987).
- 10) J. Aldrich and R. A. Cattolico : Isolation and characterization of chloroplast DNA from the marine chromophyte, *Olisthodiscus luteus* : Electron microscopic visualization of isomeric molecular forms, *Plant Physiol.*, **68**, 641-647 (1981).
- 11) M. S. Sivji : Organization of the chloroplast genome in the red alga *Porphyra yezoensis*, *Curr. Genet.*, **19**, 49-54 (1991).
- 12) S. Araki, T. Sakurai, T. Oohusa and N. Sato :

Comparative restriction endonuclease analysis of rhodoplast DNA from different species of *Prpbyra* (Bangiales, Rhodophyta), *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 477-480 (1992).

13) 岡内正典・水上譲：プロトプラストを用いたアマノ

リ葉緑体DNAの抽出, 平成5年度日本水産学会春季大会講演要旨集 646, 1993.

14) QIAGEN Inc.: The Qiagenologist-application protocols- 2nd edition, QIAGEN Inc., 1990.