

## 木材中に残存している DNA の 2, 3 の特性

九州大学農学部 白石 進・山中 研二  
青木 伸子

## 1. はじめに

生物細胞中の DNA は、細胞の死後、低分子化が進み、分解される。我々が研究対象とする木材（木部組織）は、辺材の木部柔細胞を除き、大部分は死細胞である。そのため、木材中の DNA をなんらかの指標として利用する場合、木材中に DNA がどのような形で存在しているかについての基礎情報が必要となる。

これまで、木材の樹種鑑定は木材組織学的<sup>3)</sup>、木材化学的<sup>4)</sup>手法によって行われてきた。本研究では、より確実な識別法の確立を目指し、木材中に残存している DNA を指標として利用するための基礎研究として、木材中における DNA の残存状態について調べた。

なお、供試材料は林木育種センター九州育種場および九州大学北海道地方演習林より提供を受けた。ここに厚く御礼申し上げる。

## 2. 材料と方法

## (1) 供試材料

供試材料は、スギ 2 個体（56 年生、62 年生）、ヒノキ 1 個体（62 年生）、クロマツ 1 個体（67 年生）、カラマツ 3 個体（すべて 35 年生）である。

## (2) DNA 抽出

胸高付近から採取した円盤を、樹皮 (B) と木部組織に分けた。木部組織はさらに外側から 5 年輪ごとに分割した。材片は乾燥（60℃で 5 日間）させた後、ウィリールを用いて木粉にした。

DNA 抽出は、次のように行った。木粉 1g を 10ml の抽出液（50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5, 10mM EDTA, 1.3% SDS, 0.5%  $\beta$ -メルカプトエタノール）中に浸漬し、70℃で 45 分間処理した。さらに、7.5M 酢酸アンモニウム溶液（4.5ml）を加え混合した後、30 分間氷冷した。これを遠心分離（5,000rpm, 30min, 2℃）後、上清 6ml を新しいチューブに移し、イソプロパノール（10ml）を加え、-20℃で一晩放置し、遠心分離（5,000rpm, 30min, 2℃）によって DNA を回

収した。得られた DNA を、100  $\mu$ l ~ 1ml の TE 緩衝液（10mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0, 1mM EDTA）で溶解した。

## (3) DNA 量の測定

抽出溶液中の DNA 濃度は、分光光度計を用いて 320nm の吸光度（A320）と 260nm の吸光度（A260）を測定し、次式により算出した<sup>2)</sup>。

$$\text{DNA 濃度 } (\mu\text{g/ml}) = (A260 - A320) \times 50$$

## (4) アガロースゲル電気泳動

木材中の DNA の有無及び低分子化の程度を調べるために、アガロースゲル電気泳動を行い、UV トランスイルミネーター上でエチジウムブロマイドの蛍光を観察した<sup>2)</sup>。

## 3. 結果と考察

図-1 にスギ（56 年生）材中の各年輪階における DNA 量（木粉 1g 当り）を示した。なお、図中の同部位における各点は繰り返し数を示す。

測定値に多少のバラツキが見られるが、木材中の全ての部分で、DNA が残存していることが確認された。また、その量は辺材部で多く心材部で少ない傾向が見られた。図-2 にクロマツ（67 年生）、図-3 にヒノキ（62 年生）の結果を示す。スギ同様、両樹種においても DNA 量は辺材部分で多く、心材部分で少ない傾向が確認された。しかし、カラマツでは、分光光度計による紫外領域での測定を阻害する物質を含み、正確な測定が困難であったので、DNA 量の算出は行わなかった。

次に、電気泳動の結果について述べる。図-4 (a) にスギの結果を示した。対照として用いたスギ成葉 DNA では、高分子領域から低分子領域にわたって DNA が存在していることが確認された。一方、材では高分子領域で存在せず、低分子領域でその存在が確認された。またその量は辺材部分で多く、心材部分で少なくなっていた。これは、分光光度計によって得られた DNA の材中分布の結果と一致している。他の 3 樹種でも同様の結果が得られた。さらに抽出 DNA 溶液を RNA 分解酵素

によって処理し、アガロース電気泳動分析したところ、図-4 (b) に示すような結果を得た。このことから、木材中に残存している核酸成分はRNAではなく、DNAである。また、これらの分子量をサイズマーカーで推定した結果、大部分が500bps以下で、特に100~400bpsのものが多いことがわかった。このような傾向は、ヒノキ、クロマツ、カラマツにおいても見られた。

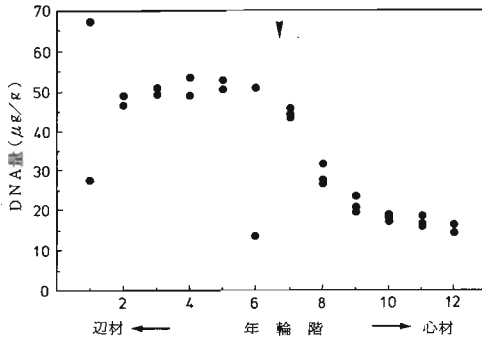


図-1 スギ材中の各年輪階における木粉1g当りのDNA量

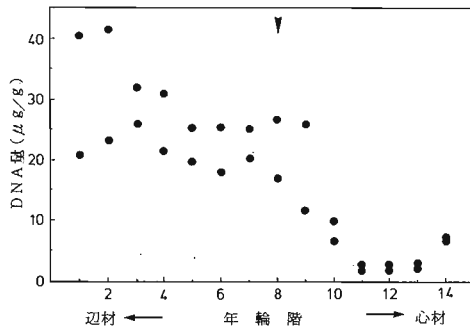


図-2 クロマツ材中の各年輪階における木粉1g当りのDNA量

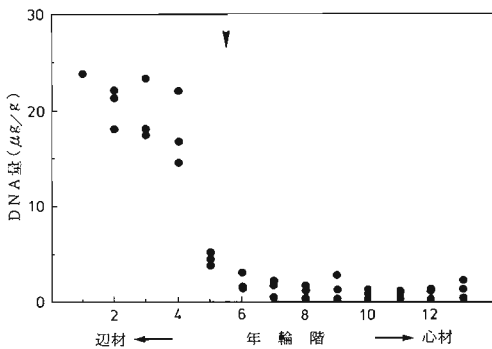


図-3 ヒノキ材中の各年輪階における木粉1g当りのDNA量

以上のことから、木材中にはDNAが残存しており、その量は辺材部分で多く、心材部分で少ないことがわかった。さらに、そのほとんどが500bps以下と極めて低分子化していた。今後、このように木材中に残存しているDNAを指標として利用することによって、新しい樹種鑑定法の確立が可能であると思われる。

引用文献

- (1) 今村博之ほか：木材利用の化学，105~119，共立出版，東京，1983
- (2) MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. : Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 545, Cold Spring Harbor, New York, 1982
- (3) 島地 謙ほか：木材の組織，248~254，森北出版，東京，1976

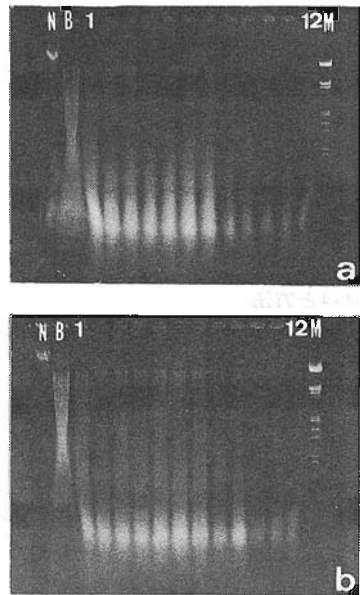


図-4 スギの各部位から抽出したDNAの電気泳動像  
 a : RNA分解酵素処理前  
 b : RNA分解酵素処理後  
 N : スギ成葉DNA  
 B : 樹皮  
 M : サイズマーカー  
 1 → 12 : 辺材 → 心材 (図-1の年輪階に対応)