

速報

クロマツ当年枝からの良質な RNA の単離*¹

— DNA とポリサッカロイド等の混入の除去—

能勢美峰*² · 白石 進*³

キーワード：RNA 抽出，クロマツ，DNA，ポリサッカロイド

I. はじめに

近年，樹木においても遺伝子発現を網羅的に調べるトランスクリプトーム解析が行われるようになってきており，信頼性の高い結果を得るためには良質な RNA が必要である。しかし，クロマツをはじめとする針葉樹には，フェノール類，テルペノイド，ポリサッカロイドなど多くの二次代謝物が含まれていることと，組織がリグニン化していることから RNA の単離が難しい (6)。また，RNA 溶液にポリサッカロイド等が混入すると，RT-PCR を阻害することが知られている (2)。一方，RNA は RNase によって分解されやすいため，供試材料は採取後すぐに冷凍保存することが望ましいが，樹木は採取するのが野外であることが多く，それが困難な場合が多い。針葉樹から質の高い RNA を得るためにはこれらの問題を解決しなければならない。

そこで本研究では，ポリサッカロイド等を多く含むクロマツの当年枝等から RNA 抽出方法を検討した。これまでにテダマツ (*Pinus taeda*) の木部組織から RNA 抽出に成功したとの報告のある塩化リチウム沈殿法 (1, 5) と，Concert Plant RNA Reagent (invitrogen, 以下 CPRR とする) を用いた 2 つの方法に，いくつかの改良を試みた。また，供試材料保存液を用いた場合の RNA 抽出方法についても検討した。

II. 材料と方法

1. 材料

九州大学構内から供試材料として，クロマツ (*Pinus thunbergii*, 以下マツとする) 成木の当年枝と針葉，およびこれまでの実験で RNA 抽出が容易であるヨモギ (*Artemisia princeps*) の葉を用いた。供試材料の両面に付着した RNase を除去するために RNase Zap Solution (Ambion) を用いた。

供試材料保存液には，RNase を不活性化し組織や細胞内の RNA を安定化させる RNAlater (Ambion) を用いた。マツ当年枝を 5 mm 角に切断し保存液に浸漬した。保存液が供試材料組織に十分浸透するよう 4℃ で一晩インキュベートした後，使用するまでの間 -20℃ で保存した。

2. RNA 抽出

① 塩化リチウム沈殿法 (抽出方法 - 1)

塩化リチウム沈殿法を用いた Alosi (2003) の原法 (1) に従い，1/20 スケールで行った。4 月に採取直後のヨモギの葉とマツ当年枝各 0.15g を液体窒素で乳鉢を用いて粉碎した。酢酸カリウム濃度を原法の 1/3, 2/3, 1, 4/3 倍の 4 通りで抽出した。

② CPRR 原法 (抽出方法 - 2)

CPRR 付属の Small Scale RNA Isolation プロトコールに従い抽出を行った。4 月と 10 月にそれぞれ採取した直後のマツの当年枝と針葉，また 4 月のみヨモギの葉を試料として用いた。さらに追加実験として，10 月に採取直後のマツ当年枝 3 サンプル (1A ~ 1C) を用いて同様の操作を行った。供試材料は全て 0.1g 使用した。

③ CPRR 改良法 1 (抽出方法 - 3)

DNA とポリサッカロイド等を取り除くために抽出方法 - 2 に 2 つの操作を追加した。(1) 抽出方法 - 2 では 1 回だったクロロホルム処理の回数を 2 回に増やした。(2) 得られた RNA 溶液に対し 1/3 量の High-Salt Solution for Precipitation (Takara; 1.2M 塩化ナトリウム，0.8M クエン酸ナトリウム；以下 HSP 処理とする) を加え，イソプロパノール沈殿を行った (2)。10 月に採取直後のマツ当年枝 2 サンプル (2A, 2B) を試料とし，抽出方法 - 2 と抽出方法 - 3 で，得られた RNA の比較を行った。

④ CPRR 改良法 2 (抽出方法 - 4)

保存液に浸漬保存させた供試材料についても CPRR 法で RNA の単離が行えるか確認を行った。供試材料として，10 月に採取し保存液に浸漬させたマツ当年枝 6 サンプル (3A ~ 3F) を用いた。抽出方法 - 3 の操作に加え，RNA の回収率を上げるため，イソプロパノール沈殿の際に Ethachinmate (ニッポンジーン) を 1.5 μ l 加えた。

前述の 4 つの抽出方法で得られた RNA 溶液の一部を 1% アガロースゲルで電気泳動し，RNA の質を目視で評価した (3)。それに加えて，CPRR 法 (抽出方法 - 2, 3, 4) で得られた RNA は，Lane & Spot Analyzer 6.0 (アトー) を用いて，泳動像から DNA とリボソーム RNA (28S, 18S) のバンド蛍光強度を測定し，抽出された核酸量のうち DNA が占める割合 (DNA 混入率) を推定した。また，ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies)

*¹ Nose, M. and Shiraishi, S. : Isolation of high-quality RNA from current year shoot of Japanese black pine.*² 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. and Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581*³ 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

で核酸濃度、A260/A280比と A260/A230比を測定した。

Ⅲ. 結果と考察

酢酸カリウム量の異なる4通りの塩化リチウム沈殿法(抽出方法-1)を用いて、採取直後のマツ当年枝とヨモギの葉からRNA抽出を行った。得られたRNAの泳動像より、ヨモギでは酢酸カリウムの量が増えるほどRNAの収量が減少したのに対して、逆にマツでは増加した(図-1A, B)。このヨモギとマツの違いは、植物種や組織によってポリサッカロイドの量など、細胞中の成分組成が異なるためだと推定された。原法の高濃度の酢酸カリウムは、ポリサッカロイド等の含有量の高い植物から不純物を除去しRNAの収率を挙げるために用いられている(1, 4)。そのため、ポリサッカロイド等の含有量の高いマツでは酢酸カリウム量が増えるに伴って、RNAの収量が上がったと考えられた。一方、ポリサッカロイド等の不純物の含有量がマツよりも少ないと推定されるヨモギの場合、高濃度の酢酸カリウムはRNA収量を減少させたと思われる。また、マツでは18Sに対して28Sのバンド蛍光が著しく弱く、RNAの分解が起こったと予想された。その理由としては、組織に内在するRNaseに加えて、今回のように野外から採取した試料を用いた場合にはRNaseの混入が多かったことが考えられた。また、この塩化リチウム沈殿法は操作が複雑

で使用する試薬が多いこと、全行程に2日間かかることから、操作の途中でRNaseが混入するリスクも大きいと考えられた。塩化リチウム沈殿法で用いたRNase阻害剤では、これらRNaseの働きを抑えることができなかったと推定された。さらに、DNAの混入も多いことから、この方法によるマツ当年枝からの良質なRNAの抽出は難しいと考えられた。

そこで、CPRR付属のプロトコールに従ったRNA抽出を行った。この方法は、全行程を約半日で終わることができ、また塩化リチウム沈殿法に比べステップ数が少なく操作が簡便であることからRNaseの混入が少ないと考えられた。抽出方法-2を用いてヨモギとマツ(共に4月採取)からRNA抽出を行ったところ、抽出方法-1を使用した場合とは異なり、劣化の少ない良質なRNAが得られた(図-2A)。これはCPRR溶液に、十分なRNase阻害剤が含まれているためだと推定された。マツ針葉と当年枝については、泳動像からはDNAの混入も確認できなかった。10月採取のマツ針葉と当年枝から同様の方法で抽出を行ったところ、針葉からはDNAの混入の少ないRNAが得られたが、当年枝ではわずかであるがDNAの混入がみられた(図-2B)。このことは、マツ当年枝3サンプル(1A~1C)を用いた分析でも確認された(表-1)。Lane & Spot Analyzer 6.0を用いて3サンプルの泳動像から核酸量を定量したところ、当年枝基部断面積における木部面積が占める割合が高いほど、DNA混入率が高

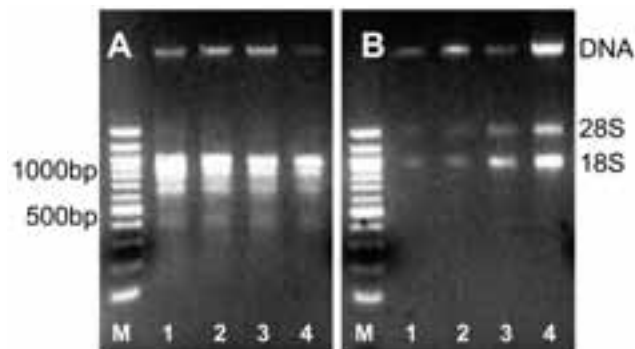


図-1. 抽出方法-1で単離したRNAの泳動像
(A) 採取直後のヨモギの葉のRNA
1-4; それぞれの酢酸カリウム濃度を原法の1/3, 2/3, 1, 4/3倍で抽出
(B) 採取直後のマツ当年枝のRNA
1-4; それぞれの酢酸カリウム濃度を原法の1/3, 2/3, 1, 4/3倍で抽出
M: 100bp DNA ladder

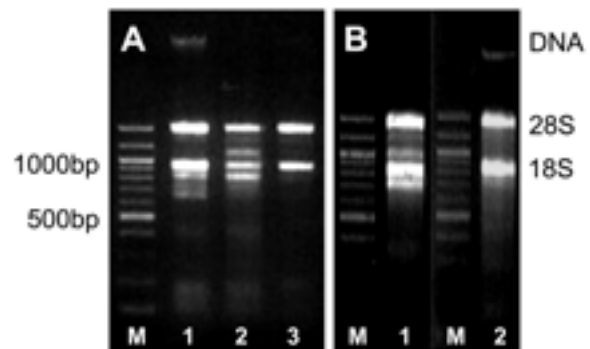


図-2. 抽出方法-2で単離したRNAの泳動像
(A) 4月に採取したサンプル
1; 採取直後のヨモギ
2; 採取直後のマツ針葉
3; 採取直後のマツ当年枝
(B) 10月に採取したサンプル
1; 採取直後のマツ針葉
2; 採取直後のマツ当年枝
M: 100bp DNA ladder

表-1. 抽出方法-2を用いて単離されたマツ当年枝のRNA

サンプル名	木部面積の割合*	核酸量 (ng)	DNA 混入率 (%)	A260/A280比	A260/A230比
1A	0.56	2077	36.3	2.1	0.6
1B	0.48	4742	13.1	2.1	2.2
1C	0.27	1144	5.6	2.2	1.9

*: 枝の基部断面積で木部面積の占める割合

表-2. マツ当年枝からのRNA抽出方法の比較

サンプル名	抽出方法	核酸量 (ng)	DNA 混入率 (%)	A260/A280比	A260/A230比
2A	2	22780	15.8	1.9	1.2
	3	1893	3.8	2.1	2.9
2B	2	8529	17.4	2.0	0.9
	3	6399	11.0	2.1	2.1

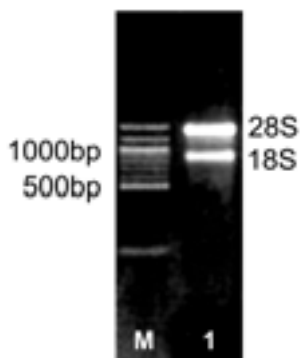


図-3. 抽出方法-4で単離したRNAの泳動像
1: 10月に採取したマツ当年枝を保存液に浸漬したサンプル3FのRNA
M: 100bp DNA ladder

かった(表-1)。これは、4月の針葉のまだ伸びていない当年枝では代謝が活発であった細胞が、その後、代謝が鎮静化し、10月では相対的にDNAの割合が高くなった可能性が示唆された。また、DNA混入率の高かったサンプル1Aでは、A260/A230比の値は0.6と低かった(表-1)。低いA260/A230比の値は、ポリサッカロイドの混入を示唆している(6)。

抽出方法-3では、DNAやタンパク質を取り除くためにクロロホルム処理の回数を増やし、ポリサッカロイド等を取り除くためにHSP処理を追加した。その結果を表-2に示す。抽出方法-2に比べて抽出方法-3におけるサンプル2Aとサンプル2BのDNA混入率はそれぞれ12.0%と6.4%減少し、A260/A230比はそれぞれ1.7と1.2上昇した。このことから、得られる核酸量は減少したものの、マツ当年枝においてDNAやポリサッカロイド等の混入が少ない良質なRNAの単離には、この2つの操作が有効であることが示唆された。A260/A280比も2.0程度であることから、タンパク質等の混入も少ないと考えられた。

保存液に浸漬したマツ当年枝の6サンプル(3A~3F)についても、抽出方法-4を用いて良質なRNAの単離に成功した。泳動像からはDNAの混入は認められず、A260/A280とA260/A230の平均値はそれぞれ2.2と1.9を示した(図-3, 表-3)。これにより、保存液を使用した場合でもCPRR法によって良質なRNAの単離が可能であることが確認され、冷凍保存やRNA抽出が採取後すぐに行うことのできない野外のサンプルについてもRNA分析が可能であることが確認された。

表-3. 抽出方法-4を用いて単離した保存液に浸漬したマツ当年枝のRNA

サンプル名	核酸量 (ng)	A260/A280比	A260/A230比
3A	2812	2.1	1.9
3B	1002	2.2	1.9
3C	2115	2.2	2.1
3D	374	2.1	1.6
3E	2782	2.2	2.2
3F	1215	2.3	1.8
平均値	1717	2.2	1.9

IV. まとめ

マツ当年枝からRNA抽出を行う場合、RNA回収率を高めるとともに、DNAとポリサッカロイドの混入を減らす必要がある。CPRR原法に、クロロホルム処理の回数を2回に増やすこととHSP処理を追加することにより、種々のRNA分析に使用可能な良質なRNAを得ることが可能になった。また、保存液に浸漬させたサンプルであってもCPRR法を用いた抽出が可能であることが確認された。

引用文献

- (1) Alosi, C. (2003) http://dendrome.ucdavis.edu/protocols/rna_from_needles.html.
- (2) Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995) *Bio Techniques* 19: 942-945.
- (3) 星野真一・細田直 (2008) 培養細胞からのRNA抽出. (RNA実験ノート(上)). 稲田利文・塩見春彦編, pp187, 羊土社, 東京). 39-41.
- (4) Hughes, D. W. and Galau, G. (1988) *Plant Molecular Biology Reporter* 6: 253-257.
- (5) Lorenz, W. W. and Dean, J. F. D. (2002) *Tree Physiology* 22: 301-310.
- (6) Mattheus, N. *et al.* (2003) *Phytochemical Analysis* 14: 209-215.

(2008年12月6日受付; 2009年1月30日受理)