

Q 新パルプ資源植物ケナフ栽培品種 18 種の  
rDNA 領域を用いた系統関係の解析

総合理学研究所

釜野 徳明

理学部生物科学科

鈴木 祥弘

森林伐採は、二酸化炭素を吸収する植物を減少させるばかりか、植物の有機物を大量の二酸化炭素として大気に放出させる。森林伐採は大気中の二酸化濃度上昇の主要因の一つである。森林伐採の目的の一つであるパルプ生産を、荒地や耕作地で行うことができれば、森林伐採を減らすことができる。これにより、二酸化炭素濃度の上昇を低減し、それにとまなう気候変動の抑制に貢献できると考えられる。近年、二酸化炭素排出規制が国家間で検討され、森林伐採を低減する様々な作物が注目されてきた。ケナフは耕作地でのパルプ資源植物として優良な性質を持つ植物である。しかし、ケナフはコスト高などから、実際にパルプとして利用されることが少なく、このため、ケナフを有効に利用するためには、多くの研究すべき問題が残されたままである。申請者らは、世界各国の栽培品種 18 種の種子を独自に収集・栽培しその特性の解析に着手している。その結果、いくつかの品種は各栽培地域に対応した特徴的に有用な性質を持つことが示唆されている。さらに多くの品種について特性を明かにし、その特性を整理することができれば、ケナフに認められた優良な性質を様々な地域で有効に活用できると考えられる。栽培品種間の特性を比較・整理する上で、系統関係を明らかにすることは重要である。しかしながら、原産地であるアフリカより作物として世界中に広まる課程を示した資料は残されておらず、記録からその系統関係を明らかにすることは不可能である。また、DNA 塩基配列を指標とした解析も、ケナフ組織に含まれる多量のポリサッカロイドによる DNA 精製の難しさから、その解析はほとんど行われてこなかった。

本研究では比較的ポリサッカロイドの含有量の少ないケナフ種子を用い、DNA 塩基配列の決定に不可欠な DNA 精製法の確立し、さらに、精製された全 DNA からポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR 法) を用いて、近縁種の系統解析にしばしば用いられる rDNA 領域を増幅した。

世界各地より入手した、ケナフ栽培品種 18 種の種子を冷蔵保存し、必要に応じて使用した。種子 0.15g を 15ml 試験管中で 2.5M 次亜塩素酸ナトリウムに 2 分間浸けた。その後、滅菌水で 4 回洗浄し、次亜塩素酸ナトリウムを完全にのぞいた。この洗浄により、種子の周囲に付着している可能性のある微生物由来の DNA を除去した。洗浄後、乾熱滅菌済みの乳鉢、乳棒中で液体窒素を加えながら種子を十分に

磨り潰した。種子粉末を 5ml の DNA 抽出緩衝液 (10mM Tris HCl pH8.0、150mM NaCl、10mM EDTA、0.1% SDS) に加えよく攪拌した後、50ml の Protainase K 水溶液 (20mg/ml) を加え 55℃ で 1 時間静置した。その後さらに 50ml の Protainase K 水溶液を加え 55℃ で 16 時間静置し、混在するタンパク質を分解した。種子の破片などを含む沈殿物をのぞいた上澄を別のプラスチック試験管に移し、等量の中和フェノールを加え、20 分間ゆっくりと攪拌した。その後、25℃、3500 rpm、10 分間遠心し、変性したタンパク質を除去した水層を別のプラスチック試験管に移し、等量の中和フェノールを加え、さらに 20 分間ゆっくりと攪拌した。25℃、3500 rpm、10 分間遠心し、変性したタンパク質を除去した水層を別のプラスチック試験管に移し、フェノールの代わりにクロロフォルム・イソアミルアルコールの混合液を加えて、同じ作業を繰り返し、水層に残ったフェノールを除去した。この水層を別の試験管に移し、これに二倍体積の 100% 冷エタノールを加えてゆっくりと攪拌し、核酸を含む沈殿を形成させた。これを 4℃、3500 rpm、10 分間遠心し沈殿を集め上澄を除いた後、70% エタノールを加えて攪拌し、再び 4℃、3500 rpm、10 分間遠心し沈殿を集めた。この作業をさらに数回行い、沈殿に含まれる水溶性の不純物を溶解し、核酸の純度を高めた。沈殿を常温常圧で乾燥させた後、適量の Tris 緩衝液 (10mM Tris HCl pH8.0、1mM EDTA) を加え 37℃ で 12 時間以上静置し、完全に溶解させた。以上の方法により CTAB 法、Chelex 法、ガラスビーズ法で不可能だったケナフ DNA を大量に精製することに成功した (図 1)。

本研究では、近縁種間の系統解析にしばしば用いられる核ゲノム上の rDNA 領域を対象に、DNA の増幅を行った。rDNA 領域は 5' 端側よりリボソーマル RNA をコードする 18S、5.8S、26S が繰り返し数百回列ぶ。この 18S と 5.8S の間には ITS1、5.8S と 26S 間には ITS 2、26S と 18S 間には NTS の非コード領域が存在する。これらの非コード領域は、変異が実際の rRNA に反映しないことから、非常に多様性に富み変化が大きい。アオイ目の植物数種のこの領域における既知の DNA 塩基配列を利用し、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR 法) の出発点となるプライマーを設計した (表 1)。酵素として Taq DNA polymerase (Premix Ex Taq、TaKaRa, Japan) を選択し、PCR Thermal Cycler (PCR thermal Cycler PERSONAL、TaKaRa, Japan) を用いて、様々な条件で反応を行った。DNA 増幅の有無はアガロース電気泳動で確認した。その結果、一定の条件で反応を行うことで、上記の精製 DNA とプライマーで rDNA 領域を増幅することに成功した (図 3)。反応条件は種ごとに異なることも明らかになった。この増幅した DNA をシークエンス反応の鋳型として用い、ITS1 と ITS2 領域を現在解析中である。

表1 ケナフ rDNA 増幅のため設計したプライマー

	5'	3'
18SF1	TAG GGT TCG ATT CCG GAG AG	
26SR1	TTC GCG CCA CTG GCT TTT CA	

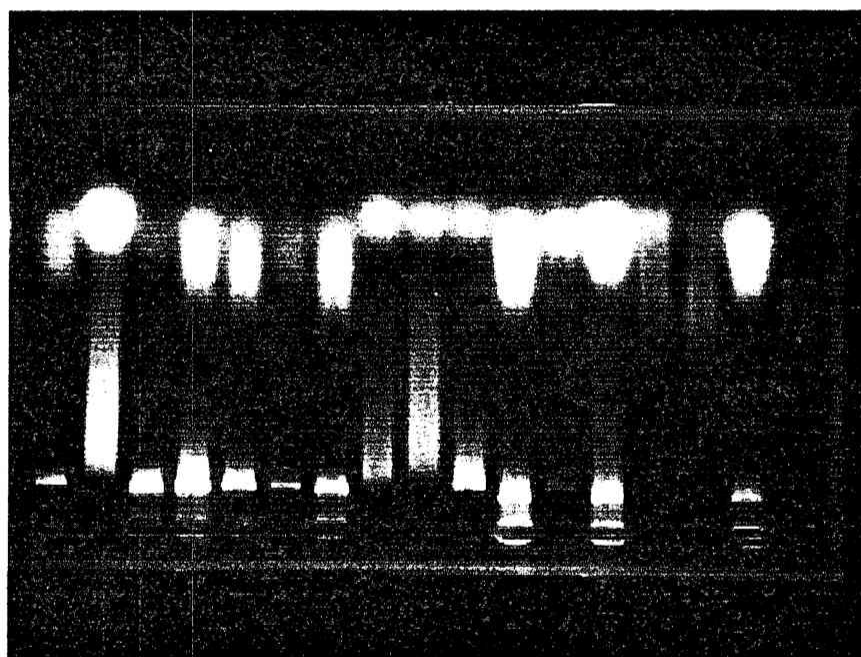


図1 精製されたDNAの電気泳動写真  
(最左のレーンは分子量マーカー)

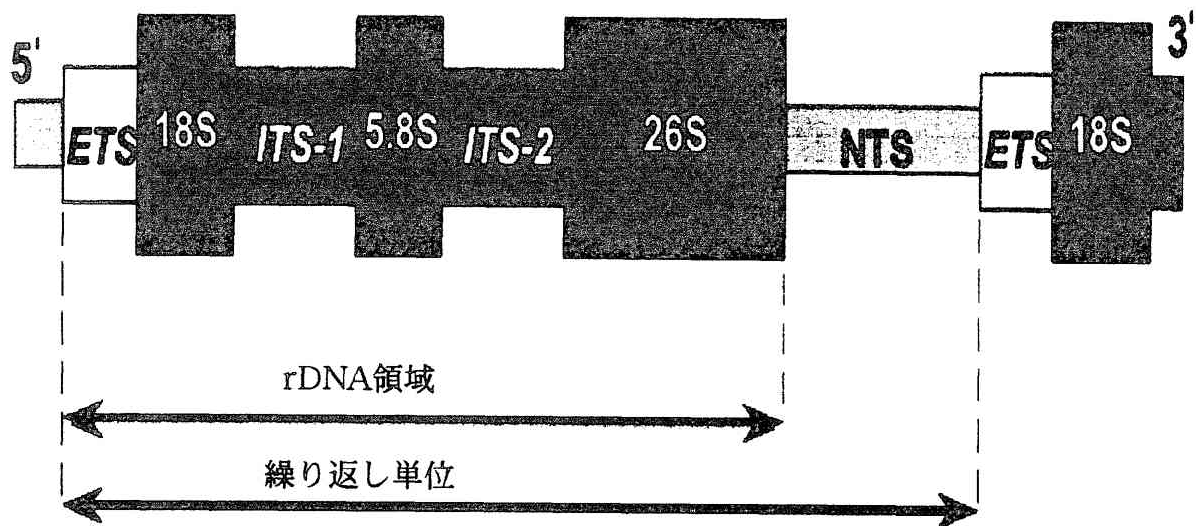


図2 rDNA 領域の構成



図3 PCRにより増幅されたケナフの rDNA 領域 (18SF1—26SR1)  
 鋳型には *Hibiscus sabdariffa* L. cultivar Kaew Yai より抽出された全 DNA を用いた