

## クリ緑葉からのゲノムDNAの単離

光 永 伸一郎\*・宮 村 祥 代\*・下 村 正 彦\*\*

(平成15年10月31日受付；平成15年12月12日受理)

### 要 旨

クリの緑葉からゲノムDNAの単離を試みた。DNAの純度を高めるために、抽出に用いる界面活性剤、酸化防止剤、水溶性ポリマ、ポリアミンなどについて検討を加えた。その結果、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) とポリビニルピロリドン (PVP) を用いた方法、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) とPVPを用いた方法、および多糖類除去のための樹脂を用いた方法によりゲノムDNAの単離に成功した。このようにして得られたゲノムDNAは、制限酵素反応やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に利用することが可能であった。

### KEY WORDS

Chestnut クリ Genomic DNA ゲノムDNA  
Isolation 単離

### 緒 言

わが国におけるクリ利用の歴史は古く、縄文時代にさかのぼると考えられている (佐藤1996)。稲作以前の時代、人々は主として身近に自生しているものを摂取し、それを食料とする生活を営んでいた。なかでも、当時、日本を覆っていた落葉樹林や照葉樹林から得られるクリ、クルミ、ドングリなどは、大量のデンプンを含んでいることから、主要なエネルギー源であったと考えられる (江原1988)。

クリはブナ科クリ属の樹木であり、北半球の温暖帯に約12種が分布する。ニホングリ、チュウゴクグリ、ヨーロッパグリ、およびアメリカグリが、その代表である。わが国における栽培は、原生種のシバグリから改良されたニホングリ (*Castanea crenata* Sieb et Zucc.) が中心であるが、一部チュウゴクグリとの種間雑種もみられる。主な栽培品種には国見 (くにみ)、筑波 (つくば)、利平 (りへい)、銀寄 (ぎんよせ)、石鎚 (いしづち) などがあり、北海道 (石狩・日高以南)、本州、四国、九州の広範囲にわたって栽培されている (杉田ら1982)。

これら栽培グリは、品種間において、果実の大きさや形、収穫時期、食味、加工性、樹性などさまざまな違いがあるが、それらについての詳細な研究はなされていない。このような形質の違いを検討する際、DNA解析はたいへん有効な手段である。また、DNA解析はクリ食文化の歴史的背景を解明するうえでも、きわめて重要であると思われる。しかし、木本植物の組織には多量のポリフェノール類や多糖類が含まれており、高純度のゲノムDNAを得ることは難

\* 生活・健康系教育講座

\*\* 石川県農業短期大学・生物生産学科 (園芸生産学・果樹)

しいとされている。そこで、本研究ではクリの緑葉を材料として、純度の高いゲノムDNAを効率よく単離する方法について検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験材料

試薬については、特にことわりのない限り、和光純薬工業の特級試薬を使用した。

植物材料としては、1994年の10月下旬に丹波地方で収穫されたニホングリ・大丹波（おおたんば）の成熟緑葉を、DNA単離のための試料とした。乳鉢に約10gの試料を入れ、液体窒素を加え凍結させた後、乳棒で破碎した。破碎物を小型粉砕器（柴田科学、SCM-40A型）に移し、液体窒素を加えた後、パウダー状になるまで粉砕した。

### 2. ゲノムDNAの単離

#### 1) セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を用いた単離方法

CTABを用いた単離については、番 (1995) の方法に準拠して行った。パウダー状に粉砕したクリ緑葉 8g を 100ml 容三角フラスコに入れ、沸騰直前まで加熱した 1.5×CTAB 緩衝液 [1.5% CTAB, 15mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA), および 1.05M 塩化ナトリウムを含む 75mM トリス緩衝液 (pH8.0)] を 20ml 加え、穏やかに攪拌した。これを 56℃ 湯浴中で 20 分間攪拌 (タイテック, パーソナル-11, 97rpm) した後、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 20ml 加え、室温で 20 分間混和した。

試料を 50ml 容遠心管に移し、低速遠心機 (トミー精工, RL-130) で 3,500rpm, 20 分間、室温で遠心分離した後、上層を新しい 50ml 容遠心管にデカンテーションで移した。これに 10% CTAB 溶液を 2ml 加えて混和した。続いて、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 20ml 加え、ロータリーシェイカーを用いて室温で 20 分間転倒混和した。

低速遠心機で 2,800rpm, 20 分間、室温で遠心分離した後、上層を新しい 50ml 容遠心管に滅菌した駒込ピペットで移した。試料と等量の CTAB 沈殿緩衝液 [1% CTAB および 10mM EDTA を含む 50mM トリス緩衝液 (pH8.0)] を加え、十分に混和した。低速遠心機で 3,000rpm, 20 分間、室温で遠心分離した。

沈殿に 5ml の 1M 塩化ナトリウム、および 5μl の RNase 溶液 (10mg/ml) を加え、56℃ 湯浴中で溶解させた。これに -20℃ に冷却した 99.5% エタノールを 10ml 重層し、析出した DNA を滅菌したパスツールピペットに巻きつけて回収した。DNA を 70% エタノールで 7 分間 (2 回), 続いて 99.5% エタノールで 5 分間洗浄し、軽く風乾させた。2ml の 1/10 TE [トリス-EDTA; 0.1mM EDTA を含む 1mM トリス緩衝液 (pH8.0)] を入れた 15ml 容遠心管に DNA を入れ、溶解した。

#### 2) CTAB とポリビニルピロリドン (PVP) を用いた単離方法

成書に従い (杉浦 1989), CTAB と PVP を用いた単離を試みた。パウダー状に粉砕したクリ緑葉 5g を 50ml 容ビーカーに入れ、70℃ に加温した 2×CTAB 緩衝液 [2% CTAB, 20mM EDTA, 1.4M 塩化ナトリウム, および 1% PVP を含む 0.1M トリス緩衝液 (pH8.0)] を 10ml 加え、十分に混和した。55℃ 湯浴中で 20 分間静置した後、クロロホルム/イソアミルアルコール

(24:1) を10ml加え、室温で30分間混和した。

低速遠心機で2,800rpm, 15分間、室温で遠心分離した後、上層を50ml容遠心管に滅菌した駒込ピペットで移した。クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を10ml加え、室温で10分間混和した後、低速遠心機で2,800rpm, 15分間、室温で遠心分離を行い、上層を回収した。

下層については1×CTAB緩衝液 [1% CTAB, 10mM EDTA, 0.7M塩化ナトリウム, および0.5% PVPを含む50mMトリス緩衝液 (pH8.0)] を10ml加え、同様の遠心操作を行い上層を回収した。

このようにして回収した2つの上層を、1本の新しい50ml容遠心管に入れ、そこに全容の1/10に相当する10% CTAB溶液を加えて転倒混和した。これに等量の沈殿用緩衝液 [1% CTAB, 10mM EDTAを含む50mMトリス緩衝液 (pH8.0)] を加え、約1時間転倒混和した後、低速遠心機で2,800rpm, 20分間、室温で遠心分離を行った。

沈殿に5mlの1M NaCl-TE [1M塩化ナトリウム, 1mM EDTAを含む10mMトリス緩衝液 (pH8.0)] を加え、55℃湯浴中に20分間静置した後、イソプロピルアルコールを5ml加えて転倒混和した。続いて、低速遠心機で2,800rpm, 20分間、室温で遠心分離を行い、DNAを沈殿させた。

沈殿に70%エタノールを5ml加えた後、低速遠心機で2,800rpm, 20分間、室温で遠心分離を行い、上清を除いた。これに2mlのTE [トリス-EDTA; 1mM EDTAを含む10mMトリス緩衝液 (pH8.0)] を加え、沈殿が溶けるまで55℃湯浴中でインキュベートした。0.3mlのRNase溶液 (10μg/ml) を加え、さらに30分間インキュベートした。

### 3) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) とPVPを用いた単離方法

パウダー状に粉碎したクリ緑葉1gを、6mlのDNA単離緩衝液 [50mM EDTA, 550mM塩化ナトリウム, および1% PVPを含む0.1Mトリス緩衝液 (pH8.0)] を入れた遠心管に移した。これに800μlの10% SDS溶液を加えて穏やかに混和した後、68℃湯浴中で30分間静置した (15分に1回穏やかに混和)。

7.5M酢酸アンモニウム溶液を3ml加えて穏やかに混和した後、30分間水中に静置した。高速遠心機 (日立工機, 20PR-52D) で15,000rpm, 20分間、4℃で遠心分離を行い、上清を新しい遠心管に回収した。続けて、高速遠心機で17,000rpm, 20分間、4℃で遠心分離を行い、上清を新しい遠心管に回収した。

上清と等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、室温で30分間穏やかに混和した後、高速遠心機で15,000rpm, 15分間、18℃で遠心分離を行った。上層を新しい遠心管に回収し、等量のイソプロパノールを加えて十分に混和した。室温で30分間静置した後、高速遠心機で15,000rpm, 20分間、18℃で遠心分離を行った。

沈殿を風乾させた後、400μlのTEを加えた。65℃で10分間インキュベートし、DNAを溶解させた。これを新しい1.5ml容マイクロチューブに移し、2μlのRNase溶液 (10mg/ml) を加えて5分間インキュベートした後、37℃でさらに30分間インキュベートした。40μlの3M酢酸ナトリウム溶液を加えて十分に混和した後、99.5%エタノールを1ml加えて室温で10分間静置した。

微量高速遠心機 (トミー精工, MRX-150) で14,000rpm, 10分間、18℃で遠心分離を行っ

た。沈殿に70%エタノールを1ml加えた後、微量高速遠心機で14,000rpm, 5分間, 18℃で遠心分離を行った。沈殿を風乾させた後, 200 $\mu$ lのTEを加えて65℃で10分間インキュベートし, DNAを溶解させた。

#### 4) 多糖類除去のための樹脂を用いた単離方法

樹脂を用いた単離については, 市販のゲノムDNA精製キット (アマシャム, Nucleon PhytoPure, Code RPN8511) を用いて行った。パウダー状に粉碎したクリ緑葉1gを15ml容遠心管に移し, 4.6mlの試薬1を加えて十分に混和した。これに3.2 $\mu$ lの $\beta$ -メルカプトエタノールと, 9.2 $\mu$ lのRNase溶液 (10mg/ml) を加えて十分に混和した後, 37℃湯浴中で30分間インキュベートした。

続いて, 1.5mlの試薬2を加えてよく混和した後, 65℃湯浴中で10分間, 時々混和しながらインキュベートした。20分間水中にて急冷した後, -20℃に冷却したクロロホルムを2ml加えて十分に混和した。これに200 $\mu$ lのPhytoPure樹脂を加え, 10分間転倒混和した。低速遠心機で1,300rpm, 10分間, 室温で遠心分離し, 上清を新しい15ml容遠心管に移し, -20℃に冷却したイソプロパノールを等量加えて穏やかに転倒混和した。

析出したDNAを滅菌したパスツールピペットに巻きつけて回収した。DNAを70%エタノール, 続いて99.5%エタノールで洗浄し, 軽く風乾させた後, 1mlのTEに溶解した。

#### 5) 酸化防止剤とポリアミンを用いた単離方法

酸化防止剤とポリアミンを用いた単離については, 向井・山本 (1995) の方法に準拠して行った。パウダー状に粉碎したクリ緑葉50mgを1.5ml容マイクロチューブに入れ, 氷冷した単離緩衝液 [10%ポリエチレングリコール, 0.35Mソルビトール, 0.5%スベルミジン, 0.5%スベルミン, 0.5% $\beta$ -メルカプトエタノールを含む0.1Mトリス緩衝液 (pH8.0)] を500 $\mu$ l加えて攪拌した。微量高速遠心機で15,000rpm, 10分間, 4℃で遠心分離を行い, 上清を除いた。

沈殿に氷冷した溶解緩衝液 [0.35Mソルビトール, 0.5%スベルミジン, 0.5%スベルミン, 0.5% $\beta$ -メルカプトエタノールを含む0.1Mトリス緩衝液 (pH8.0)] を250 $\mu$ l加えて十分に攪拌した後, 10%*N*-ドデカノイルサルコシン酸ナトリウム (サルコシル; 和光純薬一級) を25 $\mu$ l加えて室温に10分間放置した。250 $\mu$ lの2 $\times$ CTAB溶液 [2% CTAB, 20mM EDTA, 1.4M塩化ナトリウム, および0.5% $\beta$ -メルカプトエタノールを含む0.1Mトリス緩衝液 (pH9.5)] を加え, 65℃湯浴中で10分間インキュベートした。クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を500 $\mu$ l加え, 穏やかに攪拌した後, 微量高速遠心機で15,000rpm, 10分間, 室温で遠心分離を行った。

水層を新しい1.5ml容マイクロチューブに回収し, 等量のイソプロパノールを加えた。穏やかに攪拌した後, 微量高速遠心機で15,000rpm, 10分間, 室温で遠心分離を行った。沈殿に70%エタノールを100 $\mu$ l加えた後, 微量高速遠心機で15,000rpm, 10分間, 4℃で遠心分離を行った。続いて, 沈殿に99.5%エタノールを100 $\mu$ l加えた後, 微量高速遠心機で15,000rpm, 10分間, 4℃で遠心分離を行った。沈殿を風乾させた後, 20 $\mu$ lのTEを加えてDNAを溶解させた。

### 3. ゲノムDNAの電気泳動と定量

各種方法を用いて単離したゲノムDNAについては、電気泳動による確認を行った（杉浦1989）。単離した試料5 $\mu$ lに6 $\times$ 色素液（30%グリセロール、0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール）を1 $\mu$ l加え、1%アガロースゲル（Agarose L 03「TaKaRa」, Code 5003）を用いて100Vで電気泳動した。

また、成書に従い試料の定量を行った（杉浦1989）。定量は1 $\mu$ g/mlエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルを作成し、その上に段階希釈したDNA試料を添加した。濃度が既知の標準試料との比較のもとに、ゲノムDNAの濃度を定量した。

### 4. 制限酵素反応とポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

#### 1) 制限酵素反応

ゲノムDNAの制限酵素反応は、市販の制限酵素キット（TaKaRa, *Sau*3A I, Code 1082A）を用いて行った。制限酵素1 $\mu$ l（8U/ $\mu$ l）、添付の10 $\times$ 緩衝液1 $\mu$ l、およびゲノムDNA（ $\sim$ 1 $\mu$ g）に蒸留水を加え総量10 $\mu$ lとしたものを、1.5ml容マイクロチューブに入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた（村松1990）。反応後の試料に2 $\mu$ lの6 $\times$ 色素液を加え、1%アガロースゲルを用いて100Vで電気泳動した。

#### 2) PCR

PCRは市販のPCRキット（TaKaRa *Ex Taq*, Code RR001A）を用いて行った。添付の10 $\times$ 緩衝液2 $\mu$ l、添付のdNTP混合液1.6 $\mu$ l、20 $\mu$ Mフォワードプライマー1 $\mu$ l、20 $\mu$ Mリバースプライマー1 $\mu$ l、およびゲノムDNA（ $\sim$ 200ng）に蒸留水を加え総量20 $\mu$ lとしたものを、0.5ml容マイクロチューブに入れ、最後に*Taq*ポリメラーゼ0.1 $\mu$ l（5U/ $\mu$ l）を加えた。この反応液を94 $^{\circ}$ Cで3分間熱変性させた後、94 $^{\circ}$ Cの熱変性を1分間、40 $^{\circ}$ Cのアニーリングを1分間、72 $^{\circ}$ Cの伸長反応を2分間のサイクル反応を40回繰り返した。続いて、72 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、伸長反応を終了させた。

PCR後の反応液10 $\mu$ lに2 $\mu$ lの6 $\times$ 色素液を加えた後、1%アガロースゲルを用いて100Vで電気泳動を行いDNAの増幅を確認した。増幅が確認できない場合には再度PCRを行った。その際の反応液20 $\mu$ lの組成は、添付の10 $\times$ 緩衝液2 $\mu$ l、添付のdNTP混合液1.6 $\mu$ l、20 $\mu$ Mフォワードプライマー1 $\mu$ l、20 $\mu$ Mリバースプライマー1 $\mu$ l、蒸留水14.3 $\mu$ l、および*Taq*ポリメラーゼ0.1 $\mu$ lとし、これに1回目の反応液2 $\mu$ lを加えて同様のサイクル反応を行った。

プライマーとしては、イネゲノムDNAをもとに設計したリボゾームDNA（rDNA）増幅用のものを用いた（Takaiwa *et al.* 1984, Takaiwa *et al.* 1985a, Takaiwa *et al.* 1985b）。その配列は、25S rDNAの場合はフォワードプライマー5'-AGGAGTCTGACATGCGTGCGA-3'、リバースプライマー5'-TCTTAATCGACCAACACCCTTTGT-3'、17S rDNAの場合はフォワードプライマー5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'、リバースプライマー5'-TCCTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'、5.8S rDNAの場合はフォワードプライマー5'-ACACGACTCTCGGCAACGGA-3'、リバースプライマー5'-GCGTGACGCCAGGCAGGCG-3'である。これらプライマーのセットによって増幅されるDNA断片の大きさは、それぞれ25S rDNAが約570bp、17S rDNAが約1260bp、5.8S rDNAが約160bpである。

## 結果と考察

### 1. ゲノムDNAの単離方法の検討

クリ緑葉は、試料としてはたいへん入手しやすいが、そこには多量のポリフェノール類や多糖類が含まれている。緑葉から高純度のゲノムDNAを単離するためには、これらを除去することを第一に考えなければならない。

そこでまず、ニホングリ・大丹波品種の緑葉を材料として、植物ゲノムDNAの単離方法としては最も一般的なCTABを用いた方法によりDNAの単離を試みた(番1995)。これは陽イオン性の界面活性剤CTABのもつ選択的な沈殿効果を利用したものである。CTABと核酸の複合体は、塩濃度が0.5Mより低くなった場合にのみ沈殿を生ずる。そこで、塩濃度を保持した状態で、CTABとタンパク質/多糖類の複合体をクロロホルム/イソアミルアルコール処理により除去した後、塩濃度を低下させCTABと核酸の複合体を析出させるというのがこの手法の原理である(Ausubel *et al.* 1987)。イネ、タバコなどの場合、この方法により効率的にDNAが単離されることが確認されているが、クリ緑葉の場合はDNAを回収することはできなかった。

そこで、CTABを用いた前述の手法に非イオン性の水溶性ポリマPVPを加え、再度単離を試みた(杉浦1989)。DNAを抽出する際の緩衝液に低濃度(1%以下)のPVPを加え単離を進めたところ、ゲノムDNAを単離することができた(図1, レーン1)。PVPは核酸やタンパク質などの高分子と複合体を形成することが知られており、この性質を利用して高分子の選択的な分別精製などに利用されている(堀尾1994)。また、水溶液中において、高分子を他分子から保護する作用があることも知られているが(堀尾1994)、ゲノムDNA単離の過程でPVPのいかなる作用が効果的であったかについては現時点では不明である。

次に、細胞の溶解に用いる界面活性剤を陰イオン性のSDSに変更して、ゲノムDNAの単離を試みた。SDSは特にタンパク質の変性に有効と考えられている(堀尾1994)。1%のPVP存在下で抽出を行ったところ、この方法によってもゲノムDNAを単離することができた(図1, レーン2)。この結果から、SDSはCTABと同様に、クリ緑葉からのゲノムDNA単離に有効であることが明らかになった。また、この場合もPVPが効果的に作用したものと推測できる。PVPはゲノムDNAの回収率を低下させるとの報告もあるが(向井・山本1995)、クリ緑葉についてはその影響はないものと思われる。

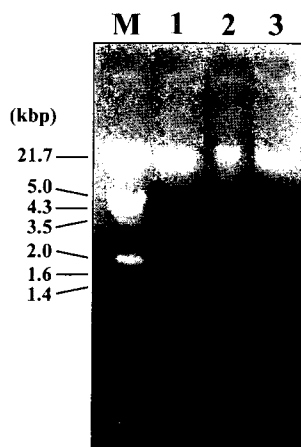


図1 クリ緑葉(品種:大丹波)から単離したゲノムDNA  
M: DNA分子量マーカー(ペーリンガー・マンハイム, DNA分子量マーカーⅢ), 1: CTABとPVPを用いて単離したDNA, 2: SDSとPVPを用いて単離したDNA, 3: 多糖類除去のための樹脂を用いて単離したDNA。

植物のゲノムDNA単離のためには、いくつかのキットが市販されているので、それらを利用することができれば、実験の再現性は高くなる。そこで、アマシャム社から販売されているNucleon PhytoPureキットを用いてDNAの単離を試みた。このキットは、従来のカリウム/SDS法と多糖類を効率的に除去する特殊な樹脂（PhytoPure樹脂）とを組み合わせたもの、とのことであるがその詳細については言及されていない。キットを用いた場合もゲノムDNAを単離することは可能であった（図1，レーン3）。この結果は、クリ緑葉からのゲノムDNAの単離において、多糖類の除去が重要なポイントであることを改めて示唆している。

木本植物からのゲノムDNAの単離については、酸化防止剤（ $\beta$ -メルカプトエタノール）と、ポリアミン（スぺルミジン，スぺルミン）を用いた別の方法が知られている（向井・山本1995）。これらの因子はDNAの構造を安定化するものと考えられている。本法の原理は、酸化防止剤とポリアミンの存在下において、まず、水溶性ポリマであるポリエチレングリコール（PEG）で多糖類を除き、次に陰イオン性の界面活性剤サルコシルでDNAを抽出するというものであるが、クリゲノムDNAを単離することはできなかった。

以上、5種類の単離方法のうち、3種類の手法を用いてクリ緑葉からゲノムDNAを単離することができた。これらの結果から、クリ緑葉DNAの抽出の際には、水溶性ポリマと界面活性剤の存在が必要であり、その選択には注意が必要であるということが明らかになった。なお、各方法における緑葉試料1gからのDNAの回収率は、CTABとPVPを用いた場合が13 $\mu$ g、SDSとPVPを用いた場合が3 $\mu$ g、多糖類除去のための樹脂を用いた場合が16 $\mu$ gであった。

## 2. 制限酵素反応とPCR

上述の3種類の方法で単離したクリ緑葉ゲノムDNAを、制限酵素*Sau*3A Iを用いて分解したところ、いずれの場合も完全分解されることが確認された（図2）。よって、いずれの方法で単離したゲノムDNAについても、ゲノムライブラリー作製等の目的に利用できるものと思われる。

次に、これらDNAを鋳型としてPCRを行った。植物ゲノムに共通して存在するrDNAについて、イネゲノムDNAの配列をもとに設計したプライマーを用いて、目的DNA断片の増幅を試みた（図3）。その結果、多糖類除去のための樹脂を用いて単離したDNAについてのみ、増幅を確認することができた（図3，レーン3）。よって、この方法で単離したゲノムDNAについては、Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）法などのPCRを利用した解析に利用できるものと考えられる。RAPD法は操作が迅速・簡便であり、これを利用することによりクリ品種間における比較・検討も進展するものと思われる。

CTABとPVP、およびSDSとPVPを用いて単離したゲノムDNAにおいて、PCRによるDNA断片の増幅が観察されなかった理由については不明であるが、単離されたDNAの質に何らかの問題があったものと推測される。したがって、これらのゲノムDNAについては、RAPD解析などへの利用は不適当であると考えられる。

## 3. さまざまなクリ品種からのゲノムDNAの単離

上述のとおり、ニホングリ・大丹波を用いてゲノムDNAの単離方法について検討した結果、多糖類除去のための樹脂を用いることにより、制限酵素反応およびPCRに利用可能なDNAを単離できることが明らかになった。そこで、Nucleon PhytoPureキットを用いて、さまざま

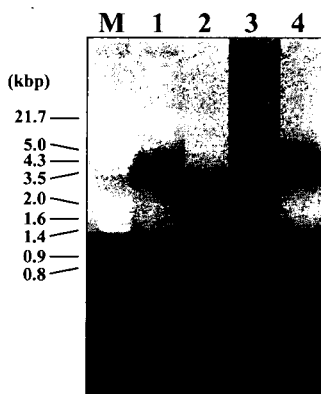


図2 クリ緑葉（品種：大丹波）から単離したゲノムDNAの制限酵素処理

M：DNA分子量マーカー（ベーリンガー・マンハイム、DNA分子量マーカーⅢ）、1：制限酵素処理していないゲノムDNA（CTABとPVPを用いて単離したもの）。2：CTABとPVPを用いて単離したDNA、3：SDSとPVPを用いて単離したDNA、4：多糖類除去のための樹脂を用いて単離したDNA

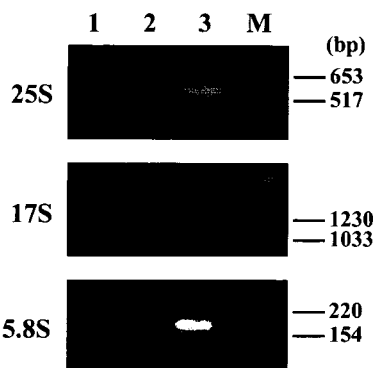


図3 クリ緑葉（品種：大丹波）から単離したゲノムDNAを鋳型としたPCR

M：DNA分子量マーカー（ベーリンガー・マンハイム、DNA分子量マーカーⅢ）、1：CTABとPVPを用いて単離したDNA、2：SDSとPVPを用いて単離したDNA、3：多糖類除去のための樹脂を用いて単離したDNA。

なクリ品種の緑葉からDNAの単離を試みた。

植物材料としては、ニホングリの筑波（農水省育成品種，1994年9月下旬収穫），とげなしグリ（山形県産，収穫時期不明），および石鎚（農水省育成品種，1992年10月上旬収穫），日中雑種の倉方甘グリ（民間育種，1994年9月中旬から下旬収穫）と利平（岐阜県産，1994年9月中旬から下旬収穫），チュウゴクグリのホウジ360（茨城園芸試験場，収穫時期不明）の6品種を用いた。

単離したDNAを電気泳動で確認したところ（図4），倉方甘グリについては大丹波と同様なバンドパターンを確認することができたが（図4，レーン4），その他の品種については明確



なバンドは得られず、収束した染色パターンが観察された。明確なバンドパターンが得られなかった理由としては、単離したDNAに夾雑物が含まれていることが考えられる。ゲルのスロット付近に集中した染色がみられることから、夾雑物によるゲノムDNAの凝縮が生じているものと推測される。

この結果は、同じ手法を用いても良質のDNAを単離できる場合と、そうでない場合があることを示している。一般に、植物ゲノムDNAを単離する場合、若い植物体を用いるほうが良いとされているが、これは多糖類やポリフェノール類の含量が少ないからである (Ausubel *et al.* 1987)。良質のゲノムDNAが得られるか否かについては、植物材料の生育状況や保存状態によるところも大きいものと思われる。

次に、これらDNAを鋳型としたPCRを行ったところ、とげなしグリ、石鎚、倉方甘グリ、お

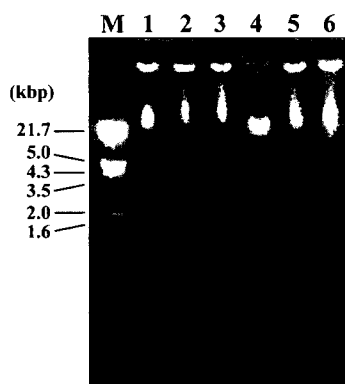


図4 さまざまなクリ品種から単離したゲノムDNA

M: DNA分子量マーカー (ペーリンガー・マンハイム, DNA分子量マーカーⅢ), 1: 筑波, 2: とげなしグリ, 3: 石鎚, 4: 倉方甘グリ, 5: 利平, 6: ホウジ360。

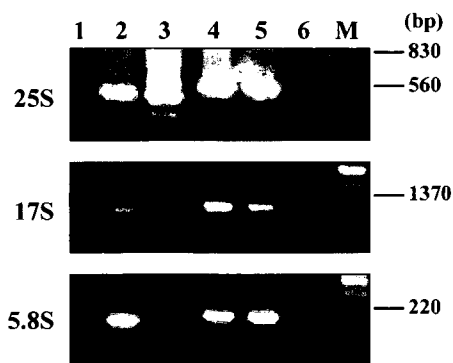


図5 さまざまなクリ品種から単離したゲノムDNAを鋳型としたPCR

M: DNA分子量マーカー (ペーリンガー・マンハイム, DNA分子量マーカーⅢ, もしくはⅥ), 1: 筑波, 2: とげなしグリ, 3: 石鎚, 4: 倉方甘グリ, 5: 利平, 6: ホウジ360。

よび利平については、目的DNA断片の増幅を確認することができた(図5)。したがって、これらの品種については単離されたDNAの質はともかく、PCRを用いた解析には利用可能であることが確認された。

## 引用文献

- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York.
- 番 保徳 (1995) イネのDNA・RNA単離法, "植物のPCR実験プロトコール", 秀潤社, 東京. 30-36.
- 江原絢子 (1988) 植物性食品の文化, "食生活と文化", 石川寛子編著, 弘学出版, 川崎. 65-88.
- 堀尾武一 (編) (1994) 蛋白の溶解度の差による分画 (分別沈殿), "蛋白質・酵素の基礎実験法", 南江堂, 東京. 93-117.
- 向井 譲・山本直樹 (1995) 木本植物のDNA・RNA単離法, "植物のPCR実験プロトコール", 秀潤社, 東京. 54-58.
- 村松正實 (編) (1990) 制限酵素の使い方, "ラボマニュアル遺伝子工学", 丸善, 東京. 36-39.
- 佐藤洋一郎 (1996) 縄文クリ園と縄文農耕. 遺伝50 (9): 12-13.
- 杉田浩一・堤 忠一・森 雅史 (編) (1982) "新編日本食品事典", 医歯薬出版, 東京.
- 杉浦昌弘 (編) (1989) ゲノムライブラリーの作製, "クローニングとシーケンシング・植物バイオテクノロジー実験マニュアル", 農村文化社, 東京. 250-284.
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura (1984) The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* 12(13): 5441-5448.
- Takaiwa, F., K. Oono, Y. Iida and M. Sugiura (1985a) The complete nucleotide sequence of a rice 25S rRNA gene. *Gene* 37: 255-259.
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura (1985b) Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA. *Plant Mol. Biol.* 4: 355-364.

## Isolation of Genomic DNA from the Chestnut Leaf

Shin-ichiro MITSUNAGA\*, Sachiyo MIYAMURA\* and Masahiko SHIMOMURA\*\*

### ABSTRACT

We have developed the genomic DNA isolation procedure for the chestnut leaf. The factors affecting yield, such as detergents, reductants, water-soluble polymers, and polyamines are discussed. Isolated DNA is suitable for the restriction enzyme reaction and polymerase chain reaction (PCR).

---

\* Division of Physical Education, Technology Education and Home Economics : Department of Home Economics Education

\*\* Department of Horticulture, Ishikawa Agricultural College