

1. 研究課題名：植物DNAの自動分離システムの開発
2. 研究機関：倉敷紡績株式会社 技術研究所 (kitahiro@lab.kurabo.co.jp)
3. 研究者：向井忠昭
4. 共同研究者：北廣恒司、柳瀬浩、庭田悟、山本良平（倉敷紡績株式会社・技術研究所）
菊池尚志（農林水産省農業生物資源研究所）
渡邊正己（長崎大学薬学部）
5. 研究期間：平成8年
6. 要約

近年、遺伝子（DNA，RNA）の分離、分析は特殊な技術ではなくごく一般的な実験手法となってきた。しかしながら、これらの操作はルーチンワーク化しており誰でもできる反面、煩雑な操作と多大な時間を必要とする。当然、これらの自動化による研究の効率化が望まれている。同時に、自動化は各操作の標準化にも寄与する。我々は、従来より、遺伝子の自動分離システムの開発を行ってきた。その結果、主として微生物の遺伝子を全自動で分離できるプラスミド自動分離装置PI-100および本装置に適用できる分離用試薬キットを開発し、現在日本国内だけでなく海外でも使用されている。更に、これに次いで、血液DNA、細胞DNAなど動物由来の遺伝子を自動分離できる核酸分離装置NA-1000と試薬を開発した。この装置ではRNAの分離も可能となった。上記のように、DNAおよびRNAの自動分離が可能となってきたが、植物由来の遺伝子については未だ自動分離システムは開発されておらず、植物を対象としている分子生物学者からは自動化が強く望まれている。そこで、植物DNAの自動分離システムの開発に着手した。

植物のDNAを分離するに際しては、動物細胞より強固な構造を持つ組織、細胞を効率よく破碎する必要がある。しかし、自動化を考えた場合、破碎法として液体窒素などを使用する従来法は自動化が難しく、新しい方法の開発が必要である。これについては別途開発を行うこととし、本研究では組織破碎以降の操作を自動化することを第一目標とした。装置としては既存のプラスミド自動分離装置PI-100または核酸分離装置NA-1000の機構を組み合わせることにした。

検討の結果、植物DNAの分離に広く用いられているCTAB法を改良し、試薬分注、攪拌、遠心分離、デカンテーションの装置ブロックを組み合わせることにより自動分離が可能であることが分かった。この方法でイネからDNAを抽出することができた。ただし、従来より行われているCTAB法に比べ、得られるDNAの純度が低いという結果になった。しかし、自動化の基本設計は完成したものと判断される。今後は、純度向上のための改良および得られるDNAがPCR等の分析に使用可能かどうかを検討する予定である。

7. 研究目的

倉敷紡績（株）技術研究所では、プラスミドや染色体DNAなどの自動分離システムの開発を行っており、その結果プラスミド自動分離装置PI-100及び全自動核酸分離装置NA-1000を完成した。これらの装置は、現在国内のみならず海外においても広く使用されており、遺伝子工学等の研究効率の向上に役立っている。

プラスミド自動分離装置PI-100は、プラスミド、コスミド、酵母人工染色体DNA(YAC)、M13 ssDNAおよびDNAを自動で分離できる装置である。処理能力は、プラスミド分離の場合1度に最大160サンプルがセット可能で、1日に約300サンプルを処理できる。一方核酸分離装置NA-1000は、血液、組織および培養細胞といった動物細胞から染色体DNAを分離できる装置で、1度に40サンプルをセットでき、1日の最大処理数は約100サンプルである(表1)。

表1 DNA自動分離装置PI-100及びNA-1000の仕様

| | | PI-100 | NA-1000 |
|----------|---------|----------------------|-----------|
| サンプルセット数 | | 160検体 | 40検体 |
| 使用チューブ | | 専用5連チューブ | |
| ハード仕様 | 移液・廃液方法 | チューブを傾けて行うデカンテーション方式 | |
| | 遠心分離 | 3500rpm(1900xg) | |
| | 攪拌 | 攪拌遠心機 | 攪拌遠心機+攪拌機 |
| | ロボット | X-Y-Z軸移動、開閉式ハンド | |
| | ヒーター | 温度制御不可 | 温度制御可 |
| | 送液装置 | シリンジ; 6試薬 | シリンジ; 8試薬 |

現在、我々は、更に用途を拡大するために細胞やウイルスからのRNA分離法の開発を行っているが、DNA分離に関しては、植物からのDNA分離法の開発が残っている。組み換え植物や植物ゲノム解析の研究において、核酸分離の自動化は大きな課題である。そこで、プラスミド自動分離装置PI-100あるいは全自動核酸分離装置NA-1000をベースにして、植物DNA自動分離ソフトおよび試薬キットを開発し、植物DNAの自動分離システムの完成を目指した。

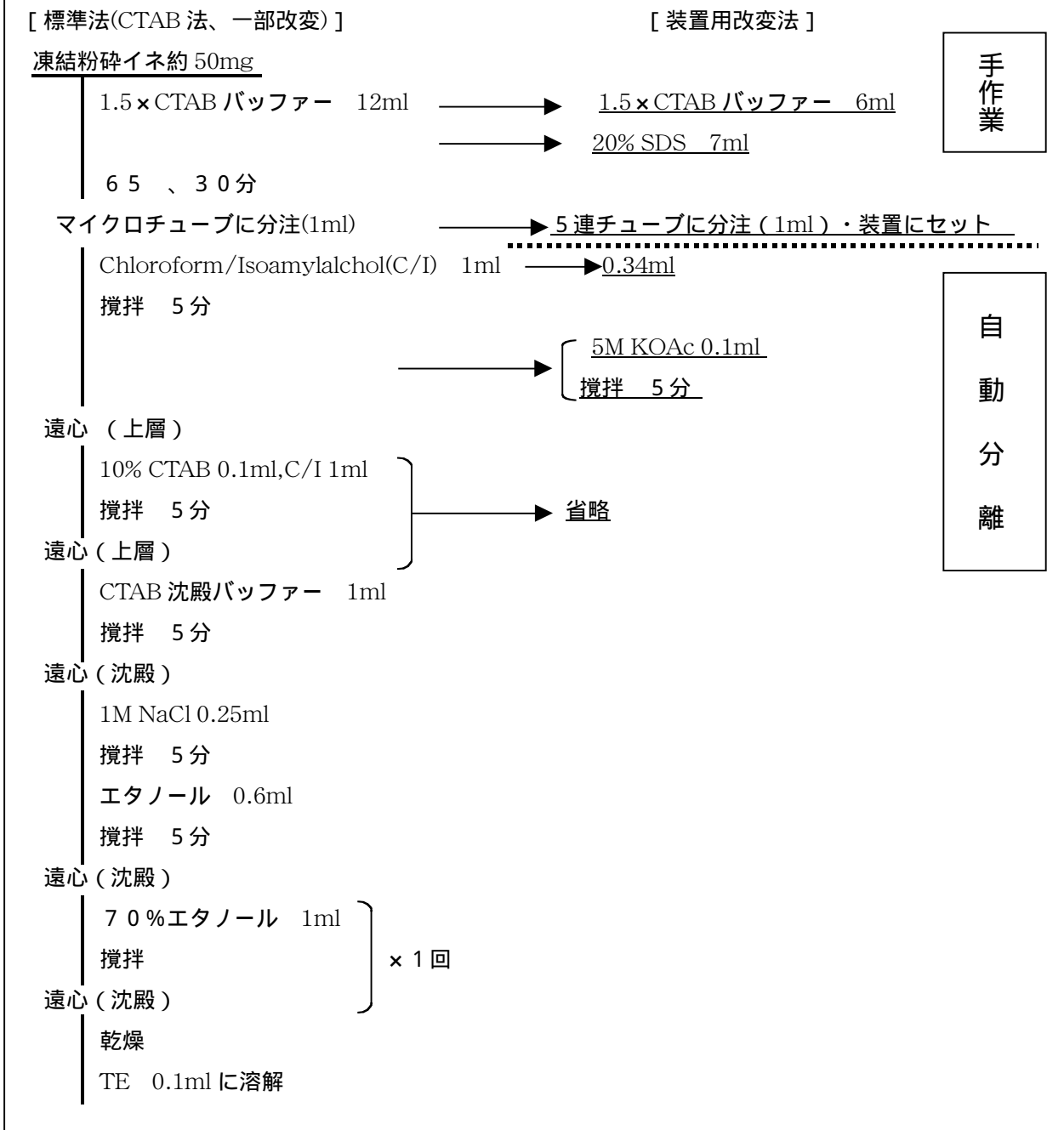
8. 材料と方法

8-1. 植物DNA分離の自動化

我々の自動分離装置はデカンテーションによる液の分離を基本としている。デカンテーションのメリットは、機構が比較的単純であり、また試料のクロスコンタミネーションの危険性が低いことである。しかし、デカンテーションによると上清/沈殿の分離は容易であるが、二層に分かれた液層の上層/下層を分離するのは非常に難しい。既に述べたCTAB法ではクロロホルム処理のステップで液が2層に分離するため、上清をデカンテーションで移す事ができない。このステップは蛋白質などの不純物の除去に効果があり省略することは危険である。従ってデカンテーションを可能にするためクロロホルム処理による変性中間層を固める検討が必要である。また、DNAの分離には遠心分離の操作が必須である。この遠心分離の回転数を低くすることは、装置のコンパクト化および低コスト化に重要である。

そこでCTAB法のクロロホルム処理ステップを中心に改良を行った。改良点は次の通りである(図1)。

図1 CTAB法及び自動分離のための改良法



主な試薬の組成

1.5 × CTAB バッファー : 1.5% CTAB, 75mM Tris-HCl, 15mM EDTA, 1.05M NaCl(pH8)

CTAB 沈殿バッファー : 1.0% CTAB, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA(pH8)

TE : 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA(pH8)

なお、装置での分離における遠心操作は、3,500rpm(1,900xg)で行った。

8-2. 植物組織の破砕法の検討

最初に述べたように、現在行われているDNA分離の前処理としての植物組織の破砕法は自動化にはなじまない方法である。例えば、液体窒素による組織の凍結および物理的な粉碎は装置としては可能であるが、この方法で多数の試料を連続的に処理するには試料間のクロスコンタミネーション等多くの問題がある。

このような点および開発期間を考慮して、本研究では、最初に述べたように植物組織破砕後のステップについて自動化を検討した。しかし、破砕のステップも自動化できれば、より完成度の高い装置になることは言うまでもない。そこで、組織の破砕法について予備的な検討を行った。

ここで、装置化に適した組織の破砕法の条件としては以下の項目が挙げられる。

- 1) 試料の連続処理が可能であること。
- 2) 機構のサイズが極端に大きくないこと。
- 3) 試料間のクロスコンタミネーションがないこと。
- 4) 破砕した試料の移送が容易であること。
- 5) 可能ならば高温・高圧を必要としない方法であること。

1)、3)および4)の条件を考えると、各試料を入れたチューブ内で破砕できるのが理想である。また、2)の条件を考えるとコンプレッサーを用いるような方法は避けたい。これらの条件を満たすものとして、酵素による組織の溶解法が考えられる。酵素による反応であれば、基本的には常温・常圧であり5)の条件も満たす。そこで、特に植物の細胞壁を分解すると予想される酵素について検討した(7)。

9. 結果

9-1. 植物DNA分離の自動化

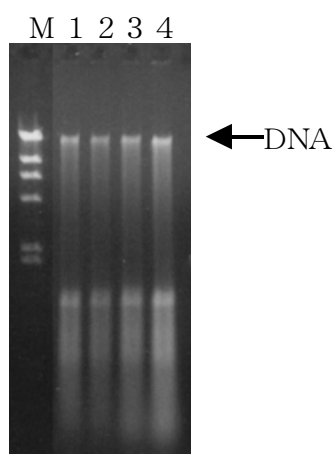


図2. イネDNA電気泳動写真

- M : *Hind* III マーカー
- 1~3 : 装置分離
- 4 : 手作業分離 (CTAB 法)

表2 C T A B法及び改良法によって得られるDNAの純度及び収量

| 方法 | 操作 | デカンテーションによる移液 | 純度 (OD260/280) | 収量 (μg /イネ1本) |
|----------|-----|---------------|-------------------|------------------------------|
| C T A B法 | 手作業 | 不可 | ~1.8 | 約50 μg |
| 改良法 | 装置 | 可 | ~1.6 | 約30 μg |
| 目標値 | 装置 | 可 | 1.7~1.8 | 100 μg |

図1で示した改良により、1,900xg という低速心力でもクロロホルム処理後の下層が固まり、デカンテーションによる移液が可能となった。これに伴い装置によるDNA分離が可能となった。分離されたDNAをアガロースゲル電気泳動で確認したところ(図2;Lane1~3)、C T A B法による手作業分離分(図2;Lane4)と同様の位置に、染色体DNAを確認できた。

しかし、純度及び収量については、装置で分離したDNAは手作業分離分と比べて若干劣った。

9-2. 植物組織の破砕法の検討

酵素として表3のものを用いて予備検討を行ったところ、ペクチナーゼGが効率よく植物組織を溶解することが分かった。イネの葉を1%ペクチナーゼG(pH4.5)中、50で振とうすると、60分以上の処理で肉眼的に組織の溶解(破壊)が認められ、顕微鏡下ではプロトプラストも観察された。以上のことから、酵素を用いることにより、穏和な条件で植物組織が破砕できることが予想された。

表3 植物組織の溶解に用いた酵素

| 酵素名 | 由来 | 製造元 |
|------------|---|------|
| セルラーゼT4 | <i>Aspergillus niger</i> | 天野製薬 |
| セルラーゼA3 | <i>Trichoderma viride</i> | 天野製薬 |
| ペクチナーゼG | <i>Aspergillus pulverulentus</i> | 天野製薬 |
| ペクチナーゼA | <i>Aspergillus pulverulentus</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> | 天野製薬 |
| マセレーティング酵素 | 微生物 | 大和化成 |

10. 考察

以上、C T A B法を改良することにより植物DNAが自動的に分離できる可能性が示された。装置で分離した際の純度の低下は、クロロホルム添加量の減少および操作の簡略化が原因と思われる。また、収量については我々の結果では標準となるC T A B法でも一般に示されている収量より少ないので、植物体の破砕および細胞溶解のステップで技術的に問題があ

ると予想される。

植物組織の破碎に関しては、酵素を用いる方法が自動化には有望であることが予想された。しかし、この方法には2つの問題点が残されている。現在人手可能なペクチナーゼはすべて微生物由来であり、酵素標品にはDNA分解酵素およびRNA分解酵素が含まれていると予想される。これらを完全に除去した酵素を用意する必要がある。これについては酵素メーカーの協力が必要である。第二の問題点は、酵素による組織の溶解は常温で行うため植物組織由来のDNA分解酵素が抽出されたDNAを分解すると予想されることである。これについては、内因性のDNA分解酵素に対する阻害剤の添加等に対応する必要がある。

11. 今後の展開

プロトコールとしては、今後精製度を上げるための検討を行い、分離したDNAがPCR等の各種実験に使用可能であるか確認する。また装置については、今回の検討では開発用装置を用い、既存の機構（分注器、遠心機等のPI-100, NA-1000に組み込まれている動作ブロック）を組み合わせて処理しており、完全な連続自動処理は行っていない。連続自動処理を行わせるためには植物DNA用に新たな動作ソフトを装置に組み込む必要がある。今回開発した植物DNA分離法はPI-100およびNA-1000のいずれにも組み込み可能であるが、植物DNAの分離に適した攪拌機構、加温機構を持つ装置を新たに開発する方が性能、コスト両面で好ましいと考えられる。

12. 参考文献

- (1) M.G. Murray and W. F. Thompson : Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325 (1980)
- (2) G. Fang, S. Hammar and R. Grumet : A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Bio Techniques* 13, 52-55 (1992)
- (3) J. J. Doyle and J. L. Doyle : A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15 (1987)
- (4) J. J. Doyle and J. L. Doyle : Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15 (1990)
- (5) 「新細胞工学実験プロトコール」(1991) 東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社 p 171 - 176
- (6) 「新細胞工学実験プロトコール」(1991) 東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社 p 188 - 193
- (7) 坂井拓夫、坂本龍司：繊維機械学会誌アミラーゼとペクチナーゼ 45、p 301 - 314 (1992)

13. 研究業績

13-1. 原著論文 なし

13 - 2 . 総説など なし

13 - 3 . 国際学会発表 なし

13 - 4 . 国内学会発表 なし

13 - 5 . 新聞など なし

13 - 6 . 特許 なし

14 .

(1) Development of Automated DNA Isolation System for Plants

(2) Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.

(3) Tadaaki Mukai

(4) Koji Kitahiro, Hiroshi Yanase, Satoru Niwata, Ryohei Yamamoto (Department of Biochemistry, Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.)

Shosi Kikuchi (National Institute of Agrobiological Resources, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

Masami Watanabe (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University)

(5) 1996

(6) Abstract

The gene isolation and the analysis of gene are now general techniques for the biochemists and the molecular biologists. However the procedures to isolate the gene need intricate manipulations and much time, even if anyone can isolate the gene. Therefore, it is desired to isolate the gene by automated system. And we developed an equipment, Automated Plasmid Isolation System PI-100, and the reagents, which can be applied to the equipment. Plasmid can be isolated from bacteria by this system, and many researchers are using this system not only in Japan but also in other countries. We have also developed a system, Automated Nucleic Acid Isolation System NA-1000, to isolate animal DNAs from blood, cells and so on. The researchers can isolate RNAs by this system too.

As described above we can isolate DNAs and RNAs automatically from microorganisms and animals including human. However we do not have any system to isolate DNAs from plants. In this project, we have tried to establish new isolation system for plant DNA.

The plant tissues or cells are hard compared with animal cells. They should be crushed well before extracting DNA. This step is very difficult to be automated, since the conventional methods are not suitable to be automated, i.e., we have to develop new

method to crush the tissue for the automated system. We have thought that this should be studied in another project. Therefore, we decided to automate the process after crushing the tissue. And we used the mechanical parts of PI- 100 or NA-1000 to develop the automated plant DNA isolation system.

We improved CTAB method, that was used for the isolation of plant DNAs, and confirmed that the method was able to be automated using the mechanism composed the dispersion, shaking, centrifugation and decantation. The genomic DNA was isolated from *Oryza* sp. by this method. However the purity of DNA obtained by this method was lower than that isolated by original CTAB method. Although the protosystem of the automated plant DNA isolation was developed, it should be improved to raise the purity of DNA. In addition, it needs to be confirmed if DNAs obtained by this system can be use for PCR, hybridization and other analysis.