

環境試料からの DNA 抽出の難しさ

(一財)九州環境管理協会環境部環境技術課 大井 和之

要 旨

環境調査では調査対象とする生物が様々であるため、DNA 分析にも環境試料特有の取り扱いの難しさが存在する。中でも DNA 抽出は、試料の種類や状態によって抽出効率が大きく低下することがあり、最適な抽出方法を選択するのは容易ではない。標本や糞だけでなく、動物プランクトンや植物プランクトン、大型海藻など幅広い対象の DNA 分析を実施する中で、試料に応じて酸化分解の防止、夾雑物の除去、試料の効率的な溶解等の抽出方法の改良を行って、DNA 抽出後の PCR 分析の成功率を高めてきた。

1. はじめに

環境調査において生物の DNA 分析の利用が増加している。遺伝子の本体であるデオキシリボ核酸 (DNA) は比較的安定な物質で、動植物の生体や標本だけでなく、糞や毛、種子や根などの断片からも取りだすことができる。野生生物の DNA 分析についての教科書や参考書も多数出版されていて (例えば 1), 2)), どんな対象であっても DNA 分析を行って、観察だけでは得られないような情報を得ることができるように思える。しかし、野生生物の DNA 分析には、標準手法では必ずしもうまくいかないという環境試料特有の難しさがある。

環境調査で用いるような野生生物の DNA 分析の流れを図 1 に示す。DNA 分析はサンプルを採取・保存し DNA 抽出処理を行って DNA 溶液を作成するまでの前処理段階と、適切なプライマーを用いた PCR 反応によって対象を増幅し、目的に合わせた分析方法で対象 DNA の特徴 (塩基配列、遺伝子型等) を記録する分析段階、さらに既存文献やデータベースと照合して系統解析や集団遺伝学的解析を行う解析段階に分けることができる。

DNA はデオキシリボースという五炭糖にプリン塩基 (アデニン(A), グアニン(G)) またはピリミジン塩基 (シトシン(C), チミン(T)) とリン酸が結合したデオキシヌクレオチドのポリマーである。この塩基の並び順 (配列) が遺伝情報を記録していて、例えばヒトゲノム全体の

DNA の大きさは約 30 億塩基対 (bp) にもなる。ゲノム全体は分析するには膨大すぎるため、解析対象とする一部分だけを増幅する PCR (polymerase chain reaction) という方法が広く用いられている。PCR 反応生成物 (PCR 産物) の分析方法にはいろいろなバリエーションがあり、それに応じて解析方法も異なるが、分析対象となる DNA 溶液ができてしまえば、分析操作自体はマニュアル通りでさほど問題は無い。なお、PCR については、分析の目的や対象に応じて、用いるプライマーを替える必要があり、前号の「環境管理」において PCR のプライマー設計について報告した³⁾。

一方、前処理段階では、サンプルの種類や状態によって採取・保存と DNA 抽出の方法に様々なバリエーションがあり、抽出方法が DNA 溶液の品質を大きく左右する。DNA 抽出は、細胞を破碎して細胞膜を構成する脂質やタンパク質、多糖類等を除去して、DNA の水溶液を得る操作である。飼育・栽培されている生物と異なり、野生生物や環境試料では、文献通りの DNA 抽出方法をとっても、濃度が薄かったりあとの反応を阻害する物質 (夾雑物) が残ったりして、うまくいかない場合もある。環境試料の DNA 分析の依頼に対応するためには、様々な試料から DNA 抽出できる技術を磨いておく必要がある。本報告では、標準的な方法では DNA 抽出がうまくいかなかった 3 つの場合について、不調の要因を絞り込み、それに合わせた対策を講じて解決した例を示す。

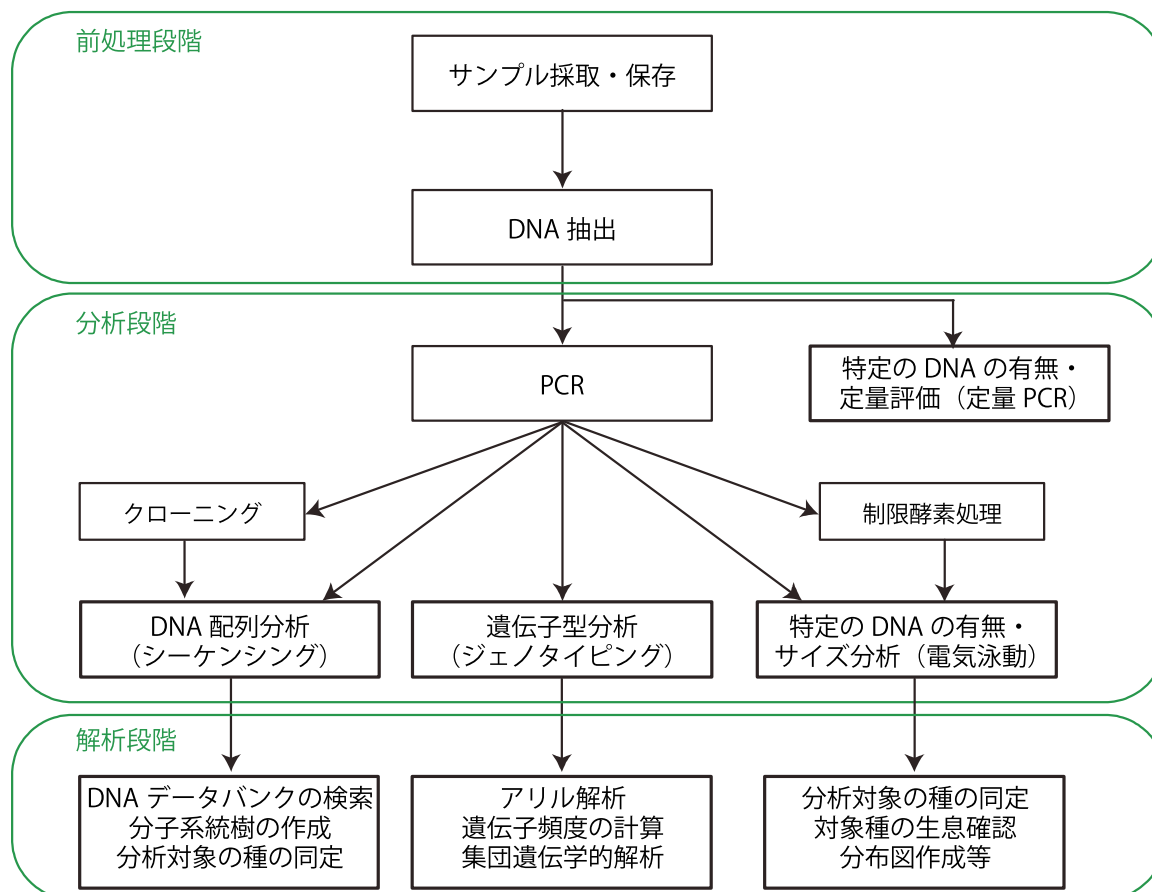


図1 DNA 分析の流れ

2. DNA 抽出の原理

動物の場合は、肉片などの試料を、SDS などの界面活性剤と 55°C 付近で活性が高いタンパク質分解酵素を含む溶解液に加えて 50~60°C に加熱処理することで、細胞膜などの膜に包まれタンパク質と絡み合っている DNA を水溶液として溶かしだすことができる。溶解液は、フェノールなどの有機溶媒で夾雑物を除去して、水層に溶けている DNA をエタノール沈殿で分離・精製する。

細胞の中には、酸化や加水分解反応を促進し DNA を分解する働きを持つ酵素も含まれている。DNA 抽出では、細胞を壊して水に DNA を溶かし出して分離精製するまでに、いかに DNA が分解しないようにするかが重要である。溶解液には pH 緩衝剤やナトリウム塩とともに、酵素の活性に重要な 2 価の金属イオンを除去するキレート剤 (EDTA) が含まれていて、DNA 分解酵素の反応を抑制している。

また、人体に有害な有機溶媒を使わずに、エタノール存在下で DNA を吸着するシリカカラムフィルターを用い、容易に DNA を抽出できるキット⁴⁾が市販されていて、広く使われている。

植物の場合は、細胞壁がありセルロースなどの多糖類が多く存在するため、動物と同じ方法では DNA がほとんど溶け出してこない。また、切ったリンゴがすぐに褐変するように、細胞が壊れて出た液には酸化分解を促進する酵素が含まれている。このため、最初に物理的に細胞を破壊した後に、還元剤 2-メルカプトエタノールの存在下で分解を抑えながら、界面活性剤 (CTAB 等) の作用によりタンパク質と脂質や多糖類等を吸着して、有機溶媒 (クロロホルム・塩化ベンジル等) と水の界面に集めることで除去し、水層に溶けている DNA を分離する方法が標準となっている。

3. DNA 抽出の難しさに対処法

3.1 DNA の分解防止 (動物プランクトン)

動物の DNA 抽出では、DNA の分解防止として溶解液にキレート剤の EDTA は入れるものの、酸化防止剤までは使わないのが一般的である。しかし、爪や羽毛など古い細胞が含まれる硬い組織では、還元剤ジチオスレイトール(DTT)を溶解液に加える方法が考案されている⁵⁾。

動物プランクトンの DNA 試料は、海水をプランクトンネットで曳いて濃縮したサンプルを2倍量の95%エタノールで固定している。この塩分濃度の高い海水に約65%のエタノールを含む状態は、保存液として良好とはいえず、DNA の分解が徐々に進んでいくと考えられる。また、藻類が生産する多糖類等の高分子物質が含まれていて、DNA 抽出時に夾雑物として混入しやすい。そこで、DNA の分解を防止するために、爪や羽毛などからの DNA 抽出方法⁵⁾を参考にして、細胞を溶解する際に還元剤を添加する工夫を行った。具体的には、試料を界面活性剤とタンパク質分解酵素を含む溶解液に入れて 56℃ で2~3 時間処理して細胞を溶解するステップで、溶解液に最終濃度 10mM のジチオスレイトール(DTT)を添加し、DTT を添加した場合と添加していない場合で、得られた DNA 溶液の吸光スペクトルを比較した (図2)。

DNA (核酸) 溶液の紫外線領域の吸光スペクトルは、230nm に極小になり 260nm に極大のピークがあらわれる。タンパク質やフェノール類は 230nm を吸収し、タンパク

質は 280nm も吸収することから、260nm の吸光度と 230nm や 280nm の吸光度との比が DNA 溶液の純度の指標になる。OD₂₆₀/OD₂₈₀ と OD₂₆₀/OD₂₃₀ のいずれも 2 程度がきれいな DNA 溶液の指標とされている。

例示した動物プランクトン試料では、DTT 不使用時には、260nm の DNA の吸光極大よりも大きな 270nm の吸光ピークがみられるが、この物質が何かは不明である。DTT を添加して溶解した場合は、この 270nm のピークは消え、全体に吸光度は小さく (濃度が薄く) なっているが、260nm にピークがあり DNA 溶液が得られていることがわかる。

また、水生生物のホルマリン固定標本も、DNA の加水分解が進むため DNA 抽出は難しいとされているが、固定液を 50%エタノール (エタノール:蒸留水=1:1) → 70%エタノール→100%エタノールに置換してホルマリンを除去した後に、DTT を使って分解を抑えて DNA 抽出することで PCR によって対象遺伝子が増幅できる場合がある。

3.2 収率が低い場合 (植物)

植物用の DNA 抽出キットであるニッポンジーン社の ISOPLANT II[®]では、室温で細かく切断した試料を使って DNA 抽出することが可能とされている。植物は標準的には、液体窒素を用いて凍結し、乳鉢で細かな粉末状になるまで粉砕したものから DNA を抽出する (図3)。ただし、凍結した試料が再融解すると分解酵素の働きで収率

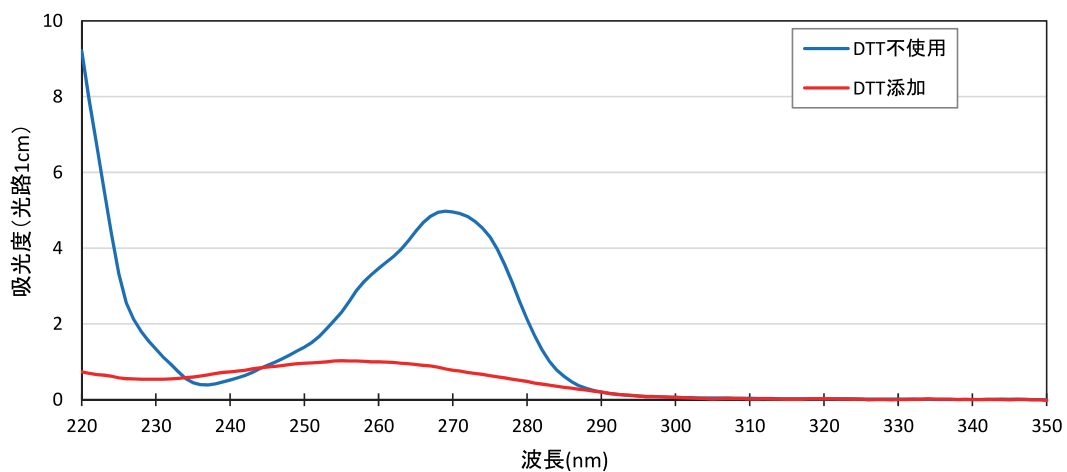


図2 動物プランクトンから抽出した DNA 溶液の紫外線吸光スペクトル (赤: DTT 添加, 青: DTT 不使用)



図3 液体窒素による凍結粉碎

が低下するため、必ず凍結したまま溶解液に入れる。実際に、同じ植物の葉を液体窒素で凍結粉碎した場合と Wash Buffer 中で、ハサミで細かく切断した場合の DNA の抽出効率と純度を、DNA 溶液の分光光度計の測定結果で比較した(図4)。

図に示した試料では、凍結粉碎したほうが得られる DNA 溶液の濃度が 10 倍も高く、ポリフェノールなどの夾雑物も少ないことがわかる。ただし、この材料でははさみで切断しただけの試料から得た DNA 溶液でも、葉緑体 DNA 遺伝子の PCR は正常に増幅できているので、DNA 分析の目的と液体窒素を準備する手間やコストも考慮して抽出方法を選択すればよい。

このほか、DNA の収率が悪い場合に、試料の保存や回収方法の工夫で収率が改善する場合もある。植物プランクトンの DNA 分析を行う際に、浮遊性の藍藻が遠心操

作で分離できなかったことがあった。この時は、試料(湖水)に 2 倍量のエタノールを添加してから遠心操作をすることで、全ての藍藻をチューブの底に集めて回収することができた。

3. 3 夾雑物の除去(海藻)

陸上植物だけでなく海藻でも ISOPLANT II による DNA 抽出が可能である。乾物の昆布(日高昆布, 羅臼昆布, 利尻昆布等)の原材料となるコンブの種類を確認するため DNA 抽出を行った際は、エタノール沈殿時に DNA とともにどうしても多糖類が残ってしまい、DNA 溶液が粘性の高い液になって PCR 増幅も出来なかった。

また、陸上植物でも多糖類やポリフェノールを DNA 溶液から除去することが難しく、せっかく DNA 溶液を得ても粘性が強くて PCR で対象遺伝子が増幅されないような場合がある。ポリフェノールなどの夾雑物が多い試料については、ポリビニルピロリドン(PVPP)などを使って夾雑物を除去する方法も提案されている。

しかし、より簡単に、DNA を吸着するカラムを使って夾雑物を取り除くことが可能な場合がある。コンブの乾物から DNA 抽出する際に障害となったアルギン酸等の多糖類は、ゲノム DNA 精製用カラム(タカラバイオ社の NucleoSpin gDNA Clean-up キット⁷⁾)を用いて再精製することで除去でき、対象遺伝子の PCR 反応が可能となった(図5)。

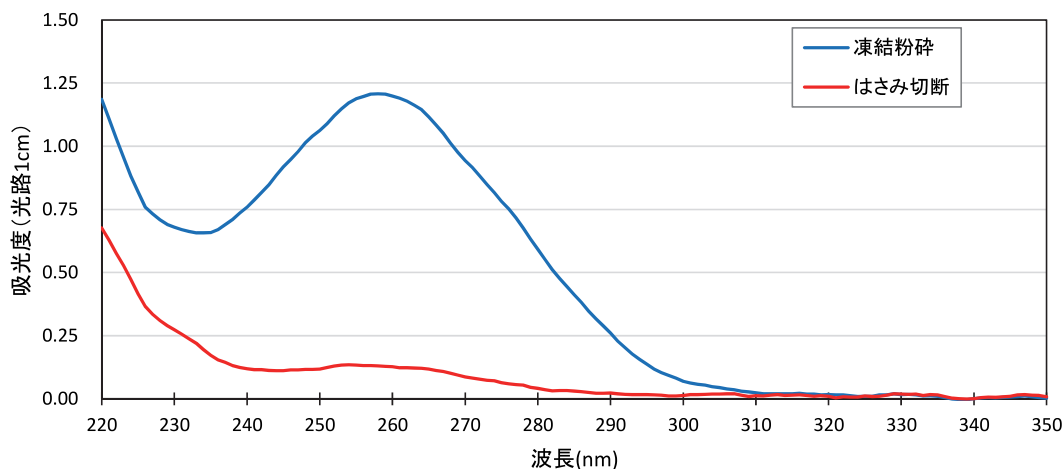


図4 植物の葉から抽出した DNA 溶液の紫外線吸収スペクトル (青:液体窒素による凍結粉碎処理, 赤:室温でのはさみによる試料切断のみ)

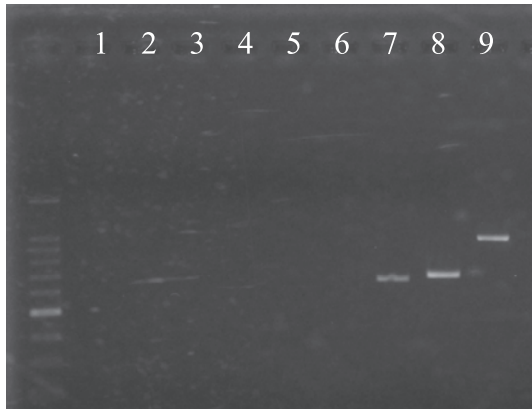


図5 コンブ DNA の PCR 産物の電気泳動像
1～6：通常の DNA 抽出で PCR 増幅なし
7～9：Nucleospin 処理追加で PCR 増幅あり

4. おわりに

DNA の抽出法は生物の種類や形状によって様々であるが、大きく分けると動物用、植物用、微生物用の教科書的な方法があり、そこから発展して溶液やカラムをセットにした各種のキットが市販されている。DNA 分析を行うユーザーとしては、市販のキットを利用して DNA 抽出を行うのが確実な第一選択である。しかし、分析対象に対して適切なキットを選択したり、キットの標準プロトコルを改変して DNA 溶液の品質を向上するための工夫を行ったりするためには、単にキットのマニュアル通りの操作ができるだけでなく、DNA 抽出の原理を理解する必要がある。

DNA 抽出のプロトコルが標準化され、自動化もされている実験生物や医療などの分野と異なり、環境調査への DNA 分析の活用を進めるためには、どんな試料でも確実に分析対象の PCR が可能な DNA 溶液を作成できる応用力が求められる。特に、川や海の水、動物の糞、植物の根といった「汚い」試料は DNA の分解が進んでいたり夾雑物が多く含まれていたりして、DNA 抽出に工夫が必要となる場合が多い。このような試料では、サンプリング時や試料の保存に際しての工夫で DNA の収量が改善する場合もあるので、今後も、DNA 抽出方法だけでなく、試料の保存方法も含めていろいろな方法を試し、環境試料の DNA 分析を環境調査に活用していきたい。

参考文献および URL

- 1) 東樹宏和 (2016) 「DNA 情報で生態系を読み解く」生態学フィールド調査法シリーズ 5 共立出版.
- 2) 井鷲裕司・陶山佳久 (2013) 「生態学者が書いた DNA の本」文一総合出版.
- 3) 大井和之「環境 DNA 分析におけるプライマー設計」環境管理 44：60-66.
- 4) QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit
<https://www.qiagen.com/jp/shop/sample-technologies/dna-preparation/dneasy-blood-and-tissue-kit/#>
- 5) User-developed protocol
<https://www.qiagen.com/jp/resources/resourcedetail?id=5a065dc-e287-4a61-b917-9792e25ab42f&lang=en>
- 6) ニッポンジーン ISOPLANT II
<http://nippongene.com/siyaku/product/extraction/isoplant2/isoplant2.html>
- 7) タカラバイオ NucleoSpin gDNA Clean-up kit
http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100006930