

Eleocharis vivipara からの効率的 RNA 抽出法の検討

原田 大士朗¹, 泉井 桂^{1,2}, 秋田 求¹

要旨

Eleocharis vivipara は、湿地に生息するカヤツリグサ科の植物であり、湿地の水位が低下し植物体が気中に露出する乾季には陸生型、雨季には水中に没して水生型とよばれる形態をとる。この変化は同一個体上で生じ、陸生型の稈の維管束鞘細胞は C4 型植物に特徴的な Kranz 構造をとるのに対し、水生型の稈では維管束鞘細胞は著しく小型となり、C3 型植物の特徴を示す。酵素活性等も、陸生型は C4 型の、水生型は C3 型の特徴を示ことが知られている。このことから、*E. vivipara* における C3 型-C4 型光合成の相互転換の分子機構を明らかにすることで、C3 型植物を C4 型化するために必要な遺伝子群を明らかにできると期待される。

一方、これまで *E. vivipara* から高品質な RNA を抽出する方法は知られていない。実際に、グアニジン法などでは、十分に品質の高い RNA を効率よく得ることは困難であった。この RNA 抽出の困難さは *E. vivipara* の多糖類含量の高さに起因していると予想された。検討の結果、多糖類含量の高い植物に適したキットである RIZO RNA すいすい P と Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit という 2 つのキットを組み合わせるにより、*E. vivipara* から高純度の RNA を抽出できた。

キーワード: *Eleocharis vivipara*、リグニン、RNA、抽出法

1. 緒言

陸上植物種の 9 割以上は C3 型光合成をおこなう C3 型植物であるが、これに対し、C4 型光合成をおこなう C4 型植物種は陸上植物全体の約 3% でありながら、バイオマス生産量は陸上植物全体の約 25% を占めると考えられている⁽¹⁾。C4 型植物の炭酸同化能は C3 型植物より個葉レベルで 1.5~2 倍、栽培面積あたりの生産性も 2~3 倍で、水の利用効率も高い⁽²⁾。これは C4 型植物が二酸化炭素 (CO₂) を捕集・濃縮し、カルビン回路に CO₂ を供給する C3 型植物にはない代謝経路をもつことと、C4 型特異的組織を構成する 2 種類の細胞 (葉肉細胞と維管束鞘細胞) が、役割を分担することに基づいている。

C3 型植物に、これまでに同定された C4 型光合成関連酵素の遺伝子を単独または複数組み合わせることで、C4 型光合成代謝経路を獲得させ、作物の収量を増加させる試みが世界各国でなされてきたが、未だ顕著な成果は得られていない⁽³⁾。C4 型光合成の成立に必須である遺伝子群の全容は解明されておらず、C4 型植物の光合成細胞の分化を誘導する遺伝子も不明である。

そこで、C3 型植物を C4 化するためには C4 型光合成の成立に必要な全遺伝子群を解明し、細胞の機能分化にかかわる遺伝子を含む遺伝子群を C3 型植物に導入する必要があるのではないかと考えられている。C4 型光合成の成立に必要な遺伝子群には、維管束鞘細胞の形成に関係する広範な遺伝子が含まれていると

原稿受付 2012 年 6 月 15 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究費 (10-I-3) No.10-I-3, の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

考えられている⁽⁴⁾。そこで我々はカヤツリグサ科の *Eleocharis vivipara* に着目した。*E. vivipara* は、陸上では C4 型光合成、水中では C3 型光合成を行う。この切り替えは同一個体で起こり、陸上と水中の生育環境の変化に依存している。このように本植物は生化学的特徴だけでなく構造的特徴まで変化する極めて興味深い植物である⁽⁵⁾。そこで、我々は陸生型 (C4 型光合成) と水生型 (C3 型光合成) で発現している遺伝子群を比較することで、C4 型光合成の成立にはどのような遺伝子が発現している必要があるのかを解明することが可能になると考えた。しかし、本植物において遺伝子解析に必須となる核酸やタンパク質の抽出は比較的困難であった。たとえば、我々のグループでは、C4 型光合成において重要な酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) をこの植物から常法により抽出することは困難であり、スキムミルクや PVP の共存が必須であることを報告した⁽⁶⁾。また、この植物に対し未だ効率的な RNA の抽出法は報告されていない。本研究では植物から高品質な全 RNA を効率良く低コストで抽出する方法について検討した。

2. 材料と方法

2-1 *E. vivipara* の栽培

E. vivipara は、農業生物資源研究所の上野修氏 (現・九州大学農学研究院) より、陸生状態のもの (図 1) を供与していただいた。植物は通常のガラス温室 (冬期は 16°C 以上)、自然光下で維持した。また、同温室に透明アクリル水槽 (60cm×30cm×36cm) を設置し、24 時間流水下で水生型を栽培維持した。試料を無菌培養する際は、陸生型 *E. vivipara* の、成長点を含む先端約 2cm を切り取り、70% エタノールに数秒間くぐらせた後、1.0% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて滅菌処理したのち、B5 培地 (3% スクロース、1% 寒天を含む) を 10 ml 入れた試験管 (径 2.3 cm) に植え、25°C、連続明条件下で培養した。水生型の無菌培養植物は陸生型の無菌培養植物を上記の固形培地上で 10 日間培養したのち、滅菌水を 30 ml 加えて、約 1 ヶ月間 25°C、連続明条件下で培養したものを使用した。



図 1 温室栽培中の *E. vivipara* (陸生型)

2-2 チオグリコール酸比色法によるリグニン量の比較

温室で栽培した陸生型と水生型の植物と、無菌培養した陸生型と水生型の植物、そして通常の水田で栽培されたイネのヒコバエを 10 月下旬にハサミで切り取り、それぞれ 100 mg づつ液体窒素で凍結後、frequency 20、2 分間 (10 秒ごとに液体窒素で冷却) の条件でミキサーミル MM301 (Rosch) により凍結破碎した。凍結粉碎した試料に約 10 倍容のメタノールを加え、60°C で 1 時間インキュベートした。18000×g、20 分、25°C で遠心し、上清を廃棄後、風乾した。沈殿に凍結粉碎した試料の 10 倍容の 2M HCl を加えてよく混和した。HCl の 0.1 倍容のチオグリコール酸を加え、100°C で 4 時間インキュベートした。18000×g、5 分、25°C で遠心し上清の色を確認した。次に 2 M NaOH を HCl と等容加え 37°C で 18 時間インキュベートした。18000×g、15 分、25°C で遠心し上清をリグニン抽出液とし、A₂₃₀ における吸光度を Gene Quant 1300 (GE healthcare) を用いて測定した⁽⁷⁾。

2-3 RNAの抽出用試料の調製

温室で栽培した試料をハサミで切り取り、液体窒素で直ちに凍結後、frequency 20、2分間(10秒ごとに液体窒素で冷却)の条件でミキサーミル MM301 (Retsch)により凍結破碎した。使用する金属、ガラス製の器具は全て 185℃、10時間以上乾熱滅菌するか、DEPC 処理後、120℃、20分間オートクレーブ処理した。

2-3-1 グアニジンチオシアネート法による抽出⁽⁸⁾

Denaturing solution として以下の組成の溶液を用いた。4 M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム(pH 7.0)、0.5 % (w/v) sodium N-lauryl sarcosine。使用直前にこれに 100 mM となるように 2-メルカプトエタノールを加えた。凍結粉碎した試料に約 10 倍容の 65℃に加温しておいた Denaturing solution を加えてただちにボルテックスミキサーを用いて混和した。Denaturing solution の 0.1 倍容の 2 M 酢酸ナトリウム溶液を加えた。Denaturing solution と等容の酸性フェノールを加えて転倒混和した。Denaturing solution の 0.2 倍容の CIA(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加えて転倒混和後、氷上で 20 分間静置した。18000×g、20 分、4℃で遠心し、水層を新しい遠沈管へ移した。Denaturing solution と等容の CIA を加えて転倒混和後、氷上で 20 分間静置した。18000×g、20 分、4℃で遠心し、水層を新しい遠沈管へ移した。水層と等容のイソプロパノールを加え混和後、-20℃で 30 分静置した。18000×g、15 分、4℃で遠心し上清を除いた。沈殿を最初に用いた量の 0.05 倍容の Denaturing solution に懸濁後、回収した。等容のイソプロパノールを加え混和後、-20℃で 30 分静置した。18000×g、15 分、4℃で遠心し上清を除いた。回収した沈殿を 75 %エタノールで洗浄後、風乾したのち DEPC 処理水に懸濁した。Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 (Nano Drop Technologies)を用いて吸光度を測定後-80℃で保存した。

2-3-2 グアニジン塩酸塩による抽出⁽⁸⁾

グアニジンチオシアネートが多糖類と凝固を起こし RNA 抽出が不可能になることを避けるため、2-3-1 で用いた Denaturing solution のグアニジンチオシアネートの代わりに 4 M グアニジン塩酸塩を用いて作成した。その他の操作は 2-3-1 に準じた。

2-3-3 簡易版 SDS/フェノール法による抽出⁽⁸⁾

SDS 抽出液として以下の組成の溶液を用いた。100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0)、100 mM 塩化リチウム、1.0 % (w/v) sodium lauryl sulfate。それぞれ試料の約 5 倍容の SDS 抽出液と酸性フェノールを混和し 80℃に保温した。凍結粉碎した試料に加えてただちにボルテックスミキサーを用いて混和した。SDS/フェノール溶液の 0.5 倍容の CIA を加えて混和した。18000×g、15 分、4℃で遠心後、水層を回収した。水層と等量の 4 M 塩化リチウム溶液を加えよく混和し-20℃で一晩静置した。18000×g、15 分、4℃で遠心し上清を除いた。回収した沈殿を適量の DEPC 処理水で溶解後、イソプロパノール沈殿を行った。回収した沈殿を 75 %エタノールで洗浄後、風乾し DEPC 処理水に懸濁した。Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80℃で保存した。

2-3-4 SDS/フェノール法による抽出⁽⁸⁾

2 M 塩化リチウム洗浄溶液として以下の組成の溶液を用いた。50 mM EDTA (pH 8.0)、2 M LiCl。それぞれ試料の約 5 倍容の SDS 抽出液と酸性フェノールを混和し 80℃に加温しておいた。凍結粉碎した試料に加えてただちにボルテックスミキサーを用いて混和した。SDS/フェノール溶液の 0.5 倍容の CIA を加えて、ボルテックスミキサーを用いて混和した。18000×g、15 分、4℃で遠心後、水層を回収した。水層と等

容の PCI (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、よく混和し 18000×g、15 分、4°C で遠心後、水層を回収した。水層の 0.25 倍容の 10 M 塩化リチウム溶液を加えよく混和し-20°C で一晩静置した。18000×g、30 分、4°C で遠心し上清を除いた。沈殿に 2 M 塩化リチウム溶液を最初に用いた SDS/フェノールの 0.5 倍容加え、18000×g、15 分、4°C で遠心し上清を除いた。再び沈殿に 2 M 塩化リチウム洗浄溶液を最初に用いた SDS/フェノールの 0.5 倍容加え、18000×g、15 分、4°C で遠心し上清を除いた。回収した沈殿を適容の TE buffer で溶解し、TE buffer と等容の PCI を加えて 18000×g、10 分、4°C で遠心し水層を回収した。水層と等容の CIA を加えて混和後 18000×g、10 分、4°C で遠心し水層を回収し、イソプロパノール沈殿を行った。沈殿を 75 %エタノールで洗浄後、風乾し DEPC 処理水に懸濁した。Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°C で保存した。

2-3-5 CTAB 法による抽出⁽⁸⁾

CTAB ex solution として以下の組成の溶液を用いた。100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、25 mM EDTA (pH 8.0)、2 M NaCl、2.0 % (w/v) 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)、0.1 % (w/v) spermidine。SSTE 溶液として以下の組成の溶液を用いた。10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)、1 M NaCl、0.5 % (w/v) sodium lauryl sulfate。凍結粉碎した試料に約 10 倍容の 65°C に加温しておいた CTAB ex solution を加えてただちにボルテックスミキサーを用いて混和した。65°C で 30 分インキュベートした。18000×g、15 分、室温で遠心し上清を回収した。CTAB ex solution と等容の酸性フェノールと 0.4 倍容の CIA を加えボルテックスミキサーを用いてよく混和した。室温で 10 分間静置後、18000×g、15 分、室温で遠心し水層を回収した。水層と等容の CIA を加え、よく混和し 18000×g、15 分、室温で遠心後、水層を回収した。水層の 0.25 倍容の 10 M 塩化リチウム溶液を加えよく混和し-20°C で一晩静置した。18000×g、30 分、4°C で遠心し上清を除いた。沈殿を 5 ml の SSTE buffer に溶解し等容の PCI を加え、18000×g、15 分、室温で遠心し水層を回収した。水層と等容の CIA を加え 18000×g、15 分、室温で遠心し水層を回収した。水層の 0.25 倍容の 10 M 塩化リチウム溶液を加えよく混和し-20°C で 6 時間静置した。18000×g、30 分、4°C で遠心し上清を除いた。沈殿を適容の TE buffer で溶解し、TE buffer と等容の PCI を加えて 18000×g、10 分、4°C で遠心し水層を回収した。水層と等容の CIA を加えて混和後 18000×g、10 分、4°C で遠心し水層を回収し、イソプロパノール沈殿を行った。沈殿を 75 %エタノールで洗浄後、風乾し DEPC 処理水に懸濁した。Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°C で保存した。

2-3-6 QIAGEN RNeasy Maxi Kit (QIAGEN) を用いた抽出

凍結粉碎した試料を 1 g 用い、キットのプロトコルに従って抽出を行った。得られた RNA 抽出液は Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°C で保存した。

2-3-7 TaKaRa RNAiso (TaKaRa) を用いた抽出

凍結粉碎した試料 1 g に 60°C に保温しておいた RNAiso 液 3 ml を加えて、ボルテックスミキサーを用いてよく混和し、室温で 5 分静置した。18000×g、10 分、4°C で遠心し、上清を新しいチューブに回収した。クロロホルムを 1200 μ l 加えてよく混和し、室温で 5 分静置した。18000×g、10 分、4°C で遠心し、水層を新しいチューブに回収した。再びクロロホルムを 1200 μ l 加えてよく混和し、室温で 5 分静置した。18000×g、10 分、4°C で遠心し、水層を新しいチューブに回収した。TaKaRa High Salt Solution for Precipitation 液を 750 μ l、イソプロパノールを 750 μ l 加えてよく混和し、-20°C で 10 分静置した。18000×g、10 分、4°C で遠心し、上清を完全に除いた。75 %エタノールで洗浄後、適量の DEPC 処理水に溶解した。イソプロパノール沈殿を行い、再び 75 %エタノールで洗浄後、風乾させ適量の DEPC 処理水に懸濁した。Nano Drop[®]

Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°Cで保存した。

2-3-8 Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit(Agilent)を用いた抽出

凍結粉碎した試料 100 mg に Extraction solution を 1 ml と β -メルカプトエタノールを 10 μ l 加えた。ボルテックスミキサーを用いてよく混和し、16000 \times g、5分、室温で遠心し、上清を回収した。回収した上清を最大 600 μ l キット付属の Prefiltration カラムに加え、16000 \times g、3分、室温で遠心し、ろ液を回収した。同じカラムに残りの上清を加え、同条件で遠心し、ろ液を回収した。回収したろ液に等容のイソプロパノールを加え混和後、室温で 5 分静置した。最大 500 μ l の混液をキット付属の Mini Isolation カラムに加え 16000 \times g、30 秒、室温で遠心し、ろ液を捨てた。同じカラムに残りの混液を加え同条件で遠心し、ろ液を捨てた。キット付属の Wash solution を 500 μ l カラムに加え、16000 \times g、30 秒、室温で遠心し、ろ液を捨てた。再び Wash solution を 500 μ l カラムに加え、16000 \times g、2分、室温で遠心し、ろ液を捨てた。カラムにキット付属の Nuclease Free Water を 30 μ l 加え、室温で 1分静置した後、16000 \times g、1分、室温で遠心した。これを数回繰り返して、回収したろ液を RNA 抽出液とした。Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°Cで保存した。

2-3-9 RIZO RNA すいすいS、すいすいP、すいすいR(RIZO)を用いた抽出

凍結粉碎した試料を 1 g 用い、キットのプロトコルに従って抽出を行った。得られた RNA 抽出液は Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°Cで保存した。

2-3-10 RIZO RNA すいすいPと QIAGEN RNeasy Maxi Kit を用いた抽出

凍結粉碎した試料を 1 g 用い、RIZO RNA すいすいPのプロトコルに従って抽出を行った。得られた RNA のペレットを DEPC 処理水 1 ml に溶解した。これを、QIAGEN RNeasy Maxi Kit のプロトコルに従って精製した。得られた RNA 抽出液は Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°Cで保存した。

2-3-11 RIZO RNA すいすいPと Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用いた抽出

凍結粉碎した試料を 1 g 用い、RIZO RNA すいすいPのプロトコルに従って抽出を行った。得られた RNA のペレットを DEPC 処理水 1 ml に溶解した。これを Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用い 2-3-8 と同様に精製した。得られた RNA 抽出液は Nano Drop[®] Spectrophotometer ND-1000 を用いて吸光度を測定後-80°Cで保存した。

2-4 RNA の電気泳動

FlashGel[™] System (TaKaRa) を用い、FlashGel[™] RNA Cassettes (TaKaRa) に試料をレーンあたり RNA として 100 ng となるように用いプロトコルにしたがって変性及び非変性条件で 275 V、約 5 分間電気泳動した。

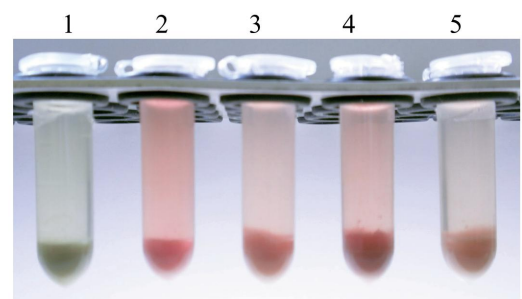


図 2 チオグリコール酸比色法によるリグニン含量の相対的比較結果

1: イネ、2: 陸生型 *E. vivipara* (温室栽培)、3: 水生型 *E. vivipara* (温室栽培)、4: 陸生型 *E. vivipara* (試験管培養)、5: 陸生型 *E. vivipara* (試験管培養)

3. 結果

3-1 チオグリコール酸比色法によるリグニンの確認

無色のチオグリコール酸とリグニンは酸性条件下で加熱することで赤色のチオグリコール酸リグニンとなる⁽⁷⁾。イネと比べて *E. vivipara* では育成条件の違いに関わらず、濃い赤色の上清が確認された。特に陸生型の材料で発色は強くなっていた。それぞれの試料の A_{230} における吸光度を表 1 に示す。イネと比べて *E. vivipara* の吸光度は約 2.6 倍～約 3.5 倍と高くなっていた。

表 1. チオグリコール酸比色法による各植物抽出液の吸光度

	イネ	陸生型 <i>E. v</i> (温室栽培)	水生型 <i>E. v</i> (温室栽培)	陸生型 <i>E. v</i> (試験管培養)	水生型 <i>E. v</i> (試験管培養)
吸光度(A_{230})	1.82	6.28	5.02	5.87	4.81

各 3 連以上の測定による平均値を示す。 *E. v*: *E. vivipara*

3-2 *E. vivipara* からの RNA 抽出法の検討

本研究では、グアニジンチオシアネート(GT) 法、グアニジン塩酸塩(GC) 法、SDS/フェノール(SP) 法、簡易版 SDS/フェノール(SSP) 法、CTAB (CTAB) 法、QIAGEN RNeasy Maxi Kit を用いた RNA 抽出(Qmaxi) 法、TaKaRa RNAiso を用いた RNA 抽出(Riso) 法、Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用いた RNA 抽出(Amini) 法、RIZO RNA すいすい S (RS)、すいすい P (RP)、すいすい R (RR) を用いた RNA 抽出法、RIZO RNA すいすい P と QIAGEN RNeasy Maxi Kit を併用した RNA 抽出(RP+Qmaxi) 法、RIZO RNA すいすい P と Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を併用した RNA 抽出(RP+Amini) 法を比較した。各抽出法により得られた抽出物のスペクトルデータを図 3 に示す。また、表 1 に各抽出液の品質と RNA の生重量当たりの回収量を示す。また、表 3 に対照としてイネのヒコバエから GT 法、GC 法、SP 法、CTAB 法、Q-maxi 法、A-mini 法で抽出した RNA の品質と回収率を示す。

核酸は A_{260} に吸収極大を持ち、核酸抽出液中にリグニンや多糖類が多く混入していた場合は A_{230} での吸光度が高くなり、タンパク質などが多く混入していた場合は A_{280} での吸光度が高くなるとされている⁽⁹⁾。 A_{260}/A_{230} と A_{260}/A_{280} がともに 1.8 以上のとき、良好な核酸抽出液であるとされており⁽¹⁰⁾本報もこれに従った。

使用したキットのうち RS はデンプンの多い植物に、RP は多糖類の多い植物に、RR は粘性物質の多い植物に適しているとされている。試料生重量当たりに換算して、最も回収量が多かったのは RP 法であったが、品質は低かった。一方 CTAB 法では最も品質の高い RNA が得られたと考えられたが回収量は少なかった。RP を用いて調製した RNA 溶液は A_{230} の値が大きいものの、 A_{260} の値が他の抽出法と比べて大きい値を示したので、これに他の精製キットを併用する方法を試みた。結果、CTAB 法と、Amini を単独か RP と組み合わせて用いる方法によって純度の高い RNA 溶液を調製することができた。それ以外の方法によって得られる試料は A_{260}/A_{230} の値が 1.8 未満であり、多糖類が多く混入していると考えられた。CTAB 法は抽出までに約 30 時間を要するうえ、材料の生重量 1 g 当りの RNA 抽出量は Amini を単独か RP と組み合わせて用いる方法と比べても低かった。Amini を単独で用いた場合はカラム 1 本あたりの抽出量が少なかった。これに対して、イネのヒコバエからは、いずれの方法でも、 A_{260}/A_{230} と A_{260}/A_{280} がともに 1.8 以上の RNA が抽出でき、RNA 回収量も *E. vivipara* と比べて多くなった。

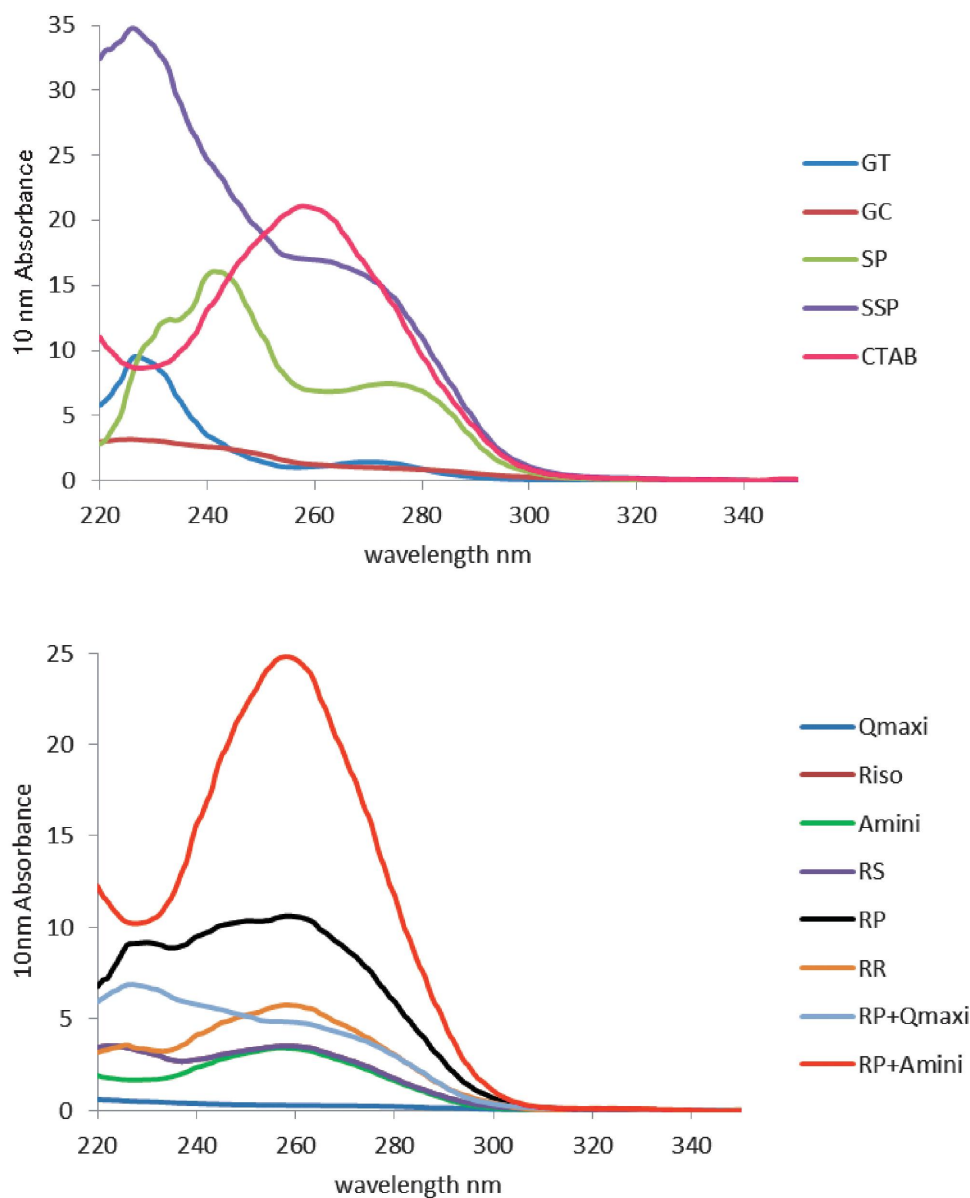


図3 各抽出法による *E. vivipara* の RNA 抽出液の吸収スペクトル

各種キットを利用しない方法 (A) とキットを使用する方法 (B) を示す。縦軸は 10 nm 光路長における吸光度、横軸は光波長を示す。

GT : グアニジンチオシアネート法、GC : グアニジン塩酸塩法、SP : SDS/フェノール法、SSP : 簡易版 SDS/フェノール法、CTAB : CTAB 法、Qmaxi : QIAGEN RNeasy Maxi Kit を用いた RNA 抽出法、Riso : TaKaRa RNAiso を用いた RNA 抽出法、Amini : Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用いた RNA 抽出法、RS:RIZO RNA すいすい S、RP : すいすい P、RR : すいすい R を用いた RNA 抽出法、RP+RIZO RNA すいすい P と QIAGEN RNeasy Maxi Kit を併用した RNA 抽出法、RIZO RNA すいすい P と Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を併用した RNA 抽出法

表 2. 各種抽出法による *E. vivipara* RNA 抽出液の品質と RNA 回収量

抽出方法	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	濃度 (ng/ μ l)	抽出液量 (μ l)	RNA 回収量 (μ g/g)
GT	0.16	1.30	79.4	300	23.8
GC	0.41	1.43	49.5	300	14.9
SP	0.51	1.56	672	300	202
SSP	0.62	1.00	276	300	82.8
CTAB	2.39	2.19	640	200	128
Qmaxi	0.58	1.34	11.1	1000	11.2
Riso	1.11	2.00	140	300	42.0
Amini	1.97	2.09	152	180	274
RS	1.71	1.87	229	300	68.8
RP	1.06	1.79	1.19×10^3	300	357
RR	1.15	1.78	424	300	127
RP+Qmaxi	0.71	1.60	192	300	57.6
RP+A mini	2.39	2.10	987	300	296

GT: グアニジンチオシアネート法、GC: グアニジン塩酸塩法、SP: SDS/フェノール法、SSP: 簡易版 SDS/フェノール法、CTAB: CTAB 法、Qmaxi: QIAGEN RNeasy Maxi Kit を用いた RNA 抽出法、Riso: TaKaRa RNAiso を用いた RNA 抽出法、Amini: Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用いた RNA 抽出法、RS: RIZO RNA すいすい S、RP: すいすい P、RR: すいすい R を用いた RNA 抽出法、RP+RIZO RNA すいすい P と QIAGEN RNeasy Maxi Kit を併用した RNA 抽出法、RIZO RNA すいすい P と Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を併用した RNA 抽出法

表 3. 各抽出法によるイネ RNA 抽出液の品質と RNA 回収量

抽出方法	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	濃度 (ng/ μ l)	抽出液量 (μ l)	RNA 回収量 (μ g/g)
GT	2.34	2.04	1.63×10^3	300	489
GC	2.25	1.98	1.49×10^3	300	448
SP	2.33	2.02	1.39×10^3	300	417
CTAB	2.29	1.98	2.17×10^3	200	435
Qmaxi	2.42	2.1	580	1000	580
A mini	2.39	2.1	172	300	516

GT: グアニジンチオシアネート法、GC: グアニジン塩酸塩法、SP: SDS/フェノール法、CTAB: CTAB 法、Qmaxi: QIAGEN RNeasy Maxi Kit を用いた RNA 抽出法、Amini: Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用いた RNA 抽出法

3-4 抽出した RNA の電気泳動による品質検査

吸光度測定の結果、純度が高いと予想され、かつ、生重量 1g 当たりの抽出量の多かった Amini 法と RP+Amini 法を用いて抽出した RNA を電気泳動した (図 4)。約 3 kb に 28S、約 1.5 kb に 18S の rRNA のバンドが確認された。このことから、各 RNA サンプルには分解や断片化は見られないと判断した。

4. 考察

C3 型、C4 型光合成切り換えの分子機構を解析するためには、高純度の RNA を十分量入手することが必要不可欠である。例えば、市販されている cDNA 構築キット (TaKaRa cDNA Library Construction Kit など) を使用する場合、mRNA が最低でも 5 μ g 必要であり、これには 500 μ g 以上の高純度な total RNA が必要である。しかし、これまで *E. vivipara* からの効率的な RNA 抽出法は知られていなかった。実際に、一般的に用いられる GT 法や SP 法では RNA を効率よく抽出する事が出来なかった。

リグニンは複雑な芳香族化合物の重合体で植物の二次細胞壁に特徴的な成分である。植物の器官に堅さを与え、細胞壁を疎水性にし、二次壁の構造や細胞壁の物理的な機能を生み出している。しかし、核酸やタンパクを抽出するさい、網目状に広がったリグニン分子によって、核酸やタンパクが絡み取られ抽出効率が低下すると報告がされている⁽⁹⁾。本研究において、チオグリコール酸に対する反応から *E. vivipara* にはイネと比べて多くのリグニンが含まれていると予想された。

また、GT 法、GC 法、SP 法、Qmaxi 法はどれも *E. vivipara* からの RNA 抽出には適さなかったのに対し、イネからは同法により A_{260}/A_{230} と A_{260}/A_{280} がともに 1.8 以上の高品質な RNA を抽出することができた。さらに、これらの方法による *E. vivipara* 抽出液では A_{230} の吸光度が高かった。これらのことから、*E. vivipara* では、リグニンや多糖類などが抽出時に大量に混入し、RNA の抽出効率を低下させているのではないかと考えられた。

2010 年に永松ら⁽⁵⁾によって *E. vivipara* から PEPC を抽出する方法が検討された。この際、*E. vivipara* の PEPC は通常の抽出方法では抽出できず、抽出時にスキムミルクや PVP を共存させることが必須であった。*E. vivipara* は、リグニンなどが豊富に含まれているため、抽出中にそれらに PEPC などのタンパク質が吸着されると考えられた。同様の問題は核酸抽出の際にも見られるはずであり、従って、*E. vivipara* から核酸やタンパク質を抽出するためには、大量に混入してくるポリフェノール類や多糖類への対策が必要と考えられる。実際、グアニジンチオシアネートを用いる方法では十分な量、品質の RNA を得ることができなかった。これはグアニジンチオシアネートが多糖類と結合してしまうためであり⁽⁹⁾、上記の考察と一致する。また、CTAB 法は、ポリフェノール類を多く含む植物から効率的に核酸を抽出できるとされており⁽⁸⁾、本研究でも CTAB 法で得た *E. vivipara* RNA 抽出液は良好なスペクトルを示した。抽出に 30 時間近くかかり、生重量 1g 当りの RNA 回収効率も低かったが、本法はスケールアップが容易であり、コストも低いいため、改良を試みる価値はあるかも知れない。Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を用いた場合、RNA

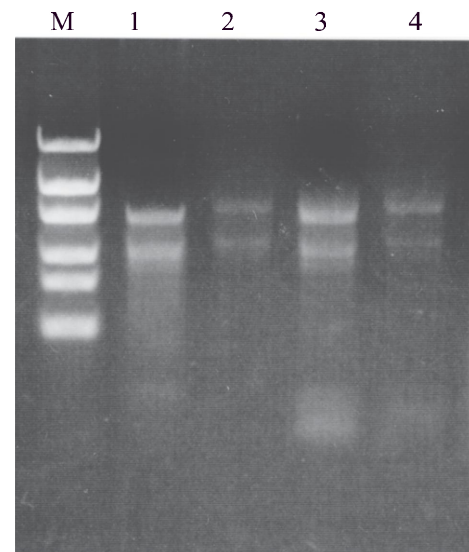


図 4 各抽出法による *E. vivipara* の RNA 抽出液の電気泳動結果

M : FlashGel RNA Marker, (9.0 kb 5.0 kb, 3.0 kb, 1.5 kb, 1.0 kb, 0.5 kb), 1 : Agilent mini kit (変性条件)、2 : Agilent mini kit (非変性条件)、3 : すいすい P と Agilent mini kit (変性条件)、4 : すいすい P と Agilent mini kit (非変性条件)

の分解が見られない高純度な RNA を抽出できた。しかし、一度に扱えるサンプルが少量であることと、キットの性質上スケールアップが不可能であることから、RNA の大量抽出には向いていなかった。しかし、RIZO RNA すいすい P と Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を併用する事で、スケールアップが可能で RNA の分解が少ない高純度な RNA を抽出できると考えた。RIZO RNA すいすい P は SDS/フェノール法の原理を応用しているキットとされているので、SDS/フェノール法と Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit を組み合わせても高純度な RNA が抽出できるかもしれない。

これまでに、陸生型 *E.vivipara* と水生型 *E.vivipara* から RP+Amini 法で RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを構築している。この cDNA ライブラリーはサブトラクションスクリーニングを行うことが出来る品質であった(結果省略)。また、Amini 法で抽出した RNA を用い次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行っている。本研究ではイネと比べてリグニンが多く、また、多糖類が多く含まれると予想される *E. vivipara* から短時間で高品質な全 RNA を効率良く抽出する方法を明らかにした。本手法を用いることで、リグニンや多糖類を多く含むために今まで RNA の抽出が困難だった植物からも、効率良く高品質の RNA が抽出できるようになると期待される。

5. 謝辞

本研究は、近畿大学生物理工学部戦略的研究費 (10- I -3) により行われたものであり、ここに深謝いたします。また、*E. vivipara* の植物体を供与していただいた農業生物資源研究所の上野修教授 (現・九州大学農学研究院)、ライブラリ構築への利用をはじめ終始ご助言いただいた近畿大学生物理工学部生物工学科・大和勝幸准教授に深謝いたします。

6. 参考文献

- (1) Langdale, J. A., (2011) C4 cycles: past, present, and future research on C4 photosynthesis. *Plant Cell*. 23, 3879-92.
- (2) Black, C. C. Jr. (1973) Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Plant Physiol*. 24, 253-286.
- (3) Taniguchi Y., Ohkawa H., Masumoto C., Fukuda T., Tamai T., Lee K., Sudoh S., Tsuchida H., Sasaki H., Fukayama H., Miyao M. (2008) Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot*. 59, 1799-1809.
- (4) Matsuoka M., Furbank R. T., Fukayama H., Miyao M. (2001) Molecular engineering of C4 photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol*. 52, 297-314.
- (5) Ueno, O. (2001) Environmental regulation of C3 and C4 differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiol*. 127, 1524-1532.
- (6) 永松裕章、坂上綾、山崎恭央、吉村一恵、関井愛、秋田求、泉井桂、(2010) スキムミルクなどを助剤とする植物体からの酵素タンパク質の抽出法の開発、*Mem. Faculty. B. O. S. T. Kinki University No.25*, 7-16.
- (7) Bruce R., West C. (1989) Elicitation of Lignin Biosynthesis and Isoperoxidase Activity by Pectic Fragments in Suspension Cultures of Castor Bean. *West Plant Physiol*. 31, 889-897.
- (8) 島本功、佐々木卓治 (1997) 新版植物の PCR 実験プロトコール核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の解析法、第 1 版、pp.34-62、秀潤社
- (9) Alois, S., Heinrich, S., Dieter, E. (1991) Isolation of Functional RNA from Plant Tissues Rich in Phenolic Compounds. *Analytical Biochem*. 197, 91-95.
- (10) Wilfinger, W., Mackey, K., Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 22, 478-81.

英文抄録

Comparative study for the efficient RNA extraction method from *Eleocharis vivipara*Daijiro Harada¹, Katsura Izui^{1,2}, Motomu Akita¹

Eleocharis vivipara is an amphibious sedge which develops C4 traits under terrestrial conditions and C3 traits under submerged conditions. The plant seems quite useful for the screening of genes and proteins which are indispensable for C4 photosynthesis and for the elucidation of molecular mechanism for the integrated expression of C4 genes. On the other hand, the efficient method to extract high quality RNA from *E. vivipara* is not known. For this plant conventional methods such as the guanidine thiocyanate method and SDS-phenol method which are applicable to large scale preparation were not successful. Difficulty of extraction RNA was suspected to be due to high polysaccharide and lignin contents of *E. vivipara*. After many trials, an improvement of method for RNA preparation was accomplished in which RNAsuisui P by RIZO Co. (Tsukuba, Japan) was used for extraction and columns of Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent Co. Clifornia, USA) for purification.

Key words : *Eleocharis vivipara*, lignin, RNA, extraction

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama 624-0017, Japan