

多糖類を豊富に含む植物病原菌からの DNA・RNA 抽出



玉川大学 農学部 生産農学科
植物病理学分野
BaCaDM プロジェクト代表
渡辺 京子 先生

植物病理学分野では、病害診断や防除技術の開発を含むあらゆる解析において、核酸の品質が研究の成否を大きく左右します。特に、次世代シーケンスや全ゲノム解析では、高精度な DNA の取得が不可欠です。

私たちは、SATREPS BaCaDM プロジェクトとして、フィリピンとの国際共同研究を通じ、バナナおよびカカオの難防除病害に対する管理技術の開発に取り組んでいます。対象とするのは、バナナの萎凋病・葉枯病、カカオの果実腐敗病や VSD 病など、有効な防除法が確立されていない病害です。

研究の過程で、現地で報告されていた病害の一部が誤同定であることや、分類学的整理を要する病原菌群の存在が明らかになりました。そのため、次世代シーケンス解析や全ゲノム情報に基づく病原菌特異的遺伝子の探索を行い、病原菌を正確に識別するための PCR および qPCR 用プライマーの設計を進めています。これらの分子診断技術の確立には、高品質で再現性の高い DNA の取得が前提となります。当研究室では、Maxwell® による DNA 抽出を導入することで、安定したゲノム解析と診断技術の開発を支えています。

本研究を通じて、バナナおよびカカオの病害対策に貢献し、食料生産の安定化という世界的課題に取り組んでいます。

／ そんなところに困ってました ／

植物の病害診断のためには、病原菌の分類に基づいた同定が必要になります。それは、病原体の形態のみだけでなく、複数の遺伝子情報から分子系統解析を行います。各遺伝子の増幅には、ユニバーサルプライマーを用いるのが一般的であり、増幅不良や非特異的増幅が頻発していました。そのため、全ゲノムデータを用いた新たな PCR プライマーの設計が必要でしたが、従来の核酸抽出法では、多糖類を多く含む細胞壁が硬いため、次世代シーケンス解析に適した品質の核酸抽出物を得ることが困難でした。

／ このように解決できました ／

高品質な DNA 取得による分子系統解析の効率向上

Maxwell® と独自のラボプロトコールにより、ゲノム DNA の抽出が困難だった病原菌から、高品質のゲノム DNA が容易に得ることが可能になり、全ゲノムデータを基に PCR プライマーを設計できるようになりました。結果取得までの近道となるだけでなく、コスト削減につながる場合があります。

CYLH3F / CYLH3R (Crous et al. 2004) Co_H3F / Co_H3R(設計)

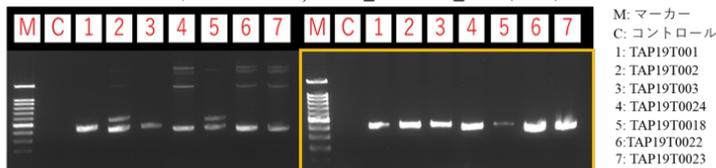


図 1. 炭疽病菌の HIS 3 の PCR の結果。左：既報のプライマー。右：当研究室で開発したプライマー (Co_H3F/Co_H3R)。既報のプライマーに比べ、非特異が減少し、増幅効率が改善された。

多糖類を多く含む病原体から高品質な DNA を精製するコツ

1. 菌体の回収には、0.2%YG 液体培地で培養後にコーヒーフィルターを使用してろ過し、滅菌水で洗浄し風乾させる。その後、コーヒーフィルターより剥がし、40～100 mg の菌体を液体窒素で凍結し破碎する。乾燥させすぎず前に回収するのがコツ。
2. CTAB バッファーを加えても液状にならないサンプル（疫病菌）も、そのまま進める。また、CTAB バッファーを入れてボルテックスを行うとサンプルが粘性を増す株がある（一例として、*Nigrospora*）が、プロトコール通り 65℃ で保温する。ただし、ときどきボルテックスを行う。遠心後は、上澄みをできるだけ回収し、Maxwell® のカートリッジに加える。これまでの結果、最少の回収量は 100 μl 程度であり、得られた DNA で NGS 解析に成功している。
3. サンプルが多いと、溶解液の粘性が高くなり、Maxwell® の磁性体ビーズの凝集による収量低下を引き起こす場合がある。このため、DNA も RNA も抽出量が少なかったときは、粘性を低減するためにサンプル量を減らす。

ラボプロトコール

DNA 精製：Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (カタログ番号 AS1600)

RNA 精製：Maxwell® RSC Plant RNA Kit (カタログ番号 AS1500)

サンプル破碎 20～100 mg の回収した菌体を凍結破碎する。

DNA 抽出の前処理

プロメガのキットに含まれる CTAB Buffer を 500 μl 加えて、試料を完全に混和する。
20 μl RNase A, Solution、40 μl Proteinase K Solution を加えてボルテックスする。

RNA 抽出の前処理

Wash Buffer *1 を 1 ml を加える。さらに破碎して、2 ml チューブに入れる。
30 秒間ボルテックスする。
11,000 × g で 5 分間の遠心分離し、上清を除く。
この工程を 2 度繰り返す。自作の CTAB Buffer *2 500 μl を加えて、試料が完全に混和するまでボルテックスする。

*1 Wash Buffer: 0.1 M Tris-HCl, 0.35 M sorbitol, 10% (w/v) PEG 6000, 4% (v/v) 2-メルカプトエタノール, pH8.0 (2-メルカプトエタノールは使用直前に添加する)
*2 CTAB Buffer: プロメガより CTAB Buffer (カタログ番号 MC1411, 容量 100 ml) を調製する。この製品 1 ml あたり 40 μl 1-thioglycerol, 3% (w/v) PVP-40 を加え、よく攪拌して調製する。

65℃ で 2 時間保温する (注意: サンプルの粘性が高い場合は、ときどきボルテックスする)。
16,000 xg で 10 分間遠心する。
上清 500 μl を使用して、Maxwell® で核酸を自動精製。

結果

表 1. 異なるサンプルから得られた核酸の収量と純度

| DNA | | | |
|----------------|-----------|------------|---------|
| サンプル (属名) | サンプル量 (g) | 収量 (μg/μl) | 260/280 |
| Phytophthora | 0.2 | 681.0 | 2.00 |
| | 0.1 | 513.1 | 1.97 |
| | 0.05 | 1060.0 | 1.96 |
| Nigrospora | 0.5 | 204.5 | 1.96 |
| | 0.04 | 396.7 | 1.88 |
| Colletotrichum | 0.02 | 363.2 | 1.92 |
| | 0.1 | 1189.0 | 1.99 |
| Trichoderma | 0.05 | 506.0 | 1.89 |
| | 0.1 | 226.0 | 1.87 |
| Lasiodiopodia | 0.05 | 69.0 | 1.88 |

| RNA | | | |
|------------|-----------|------------|---------|
| サンプル (属名) | サンプル量 (g) | 収量 (μg/μl) | 260/280 |
| バナナ根 + 病原菌 | 0.1 | 100.0 | 2.02 |
| Fusarium | 0.1 | 304.5 | 2.40 |

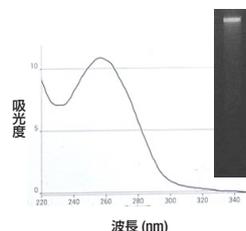


図 2. DNA の QC チェック

サンプル量は乾燥菌体の場合 0.02 g 以上あれば、その後の解析に十分量の核酸が得られました。しかし、同種内でも菌株によって多糖の量が異なるため、核酸抽出のしやすさが異なります。これまでの経験から上述のコツを見出しているため失敗はほとんどありませんが、抽出に失敗した株は粘度が高いものであり、サンプル量を減らすことで抽出ができています。