

# 研究成果報告書（第26回学術研究助成）

2019年 4月11日

公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団

理事長 野村茂樹 殿

所属機関名 国立科学博物館植物研究部

職 名 短時間非常勤研究員

氏 名 杉田典正

## 1. 研究課題

植物標本からの非破壊的DNA抽出法の開発

## 2. 共同研究者

遊川知久 国立科学博物館植物研究部多様性解析・保全研究グループ, グループ長

## 3. 研究報告

### I. 研究の目的

現代の博物館は、バウチャー標本に加えて遺伝情報も同時に収集する。博物館標本は、その遺伝情報が生物多様性の研究や保全に広く活用されている。しかし、植物の一般的なDNA抽出法は、植物体の一部を粉砕する手順を含む。これまでの方法では、DNA抽出による植物体の部分欠損により標本の価値が大きく損なわれる問題があった。特に葉の数が少ない小型植物では、欠損する面積の割合が大きい。本研究の目的は、植物標本から非破壊的にDNA抽出する方法を開発することである。先行研究で、乾燥昆虫標本からプロテイナーゼKとドデシル硫酸ナトリウムを含む緩衝液を用いた非破壊的DNA抽出法が開発されている。本研究では、昆虫標本の非破壊DNA抽出法を応用し、PCR可能なDNAを植物標本の破壊なしに抽出できるかどうか検証する。ここで非破壊とは、植物標本を破いたり欠損させたりしないこととする。

### II. 研究の方法

検証には、ヤクシマヒメアリドオシランなど14種の小型植物の押し葉標本を使用した。植物は、2017年と2018年に茨城県に位置する国立科学博物館筑波実験植物園で栽培または培養されている植物を用いた。標本は、50℃で一晩加熱する方法で製作された。植物のDNAバーコーディング用プライマー (*matK*及び*rbcL*遺伝子の一部領域) を用いて、抽出DNAのPCR増幅とDNA配列の読み取りを実行した。はじめに緩衝液を標本の葉上に30分間乗せる方法を試した(実験1)。次に実験1の手法が適さない植物に対し、標本の損傷を最低限にとどめる代替方法を検討した。標本の一部を切り取り上記の緩衝溶液に20℃で30分間浸けた後、再乾燥させて押し葉標本に復元し、標本台紙に戻した(実験2)。

### III. 研究結果

実験1では*matK*で80%と*rbcL*で53.8%の標本からターゲットのDNA配列を得た。すべての標本で葉の損傷は無かったものの一部の種で葉の変色を伴った。実験2では*matK*で80%と*rbcL*で92.8%の標本からターゲットのDNA配列が得られた。実験1と実験2を組み合わせると*matK*で80%と*rbcL*で92.8%の植物標本からDNA配列の解読に成功した。通常のDNA抽出キットではPCR可能なDNA溶液を得られない一部の植物でもDNA配列

の解読に成功した。

#### IV. 考察

本研究で植物標本から非破壊的にDNA抽出する方法を実現した。本研究で提案されたDNA抽出法は、植物標本の形態情報を保持したままDNA分析を可能にすることで博物館標本の利用促進に貢献する。また、分子実験室に短時間・低コストのDNA抽出法としても利用が期待される。

当初、標本片を切り取ってDNA抽出緩衝液で煮出し、標本片を押し葉標本に戻す方法で実験をおこなう予定であった。この方法では標本の一部を切断するため非破壊的とはみなせなかった。試行錯誤の結果、より非破壊的なDNA抽出法を開発することができた。

#### V. 成果発表

学会発表：杉田ら、「植物標本からの非破壊DNA抽出：生態学研究への博物館標本の利用促進」第66回日本生態学会. I03-08. 神戸国際会議場.

論文：Sugita et al. (in revision) Non-destructive DNA extraction from herbarium specimens: a method particularly suitable for small plants. Journal of Plant Research.

#### VI. 今後の課題

本研究で提案した非破壊DNA抽出法の有効性を確認するために、多くの植物で本方法を適用し汎用性を検討する必要があるだろう。また、博物館に所蔵される貴重な古い標本からDNA抽出する際に、本方法が有効か検討する必要がある。標本の作製方法の違い（例えば化学薬品、乾燥時間・温度）によって本方法が使用可能か検討する必要があるだろう。