

# 研究成果報告書（第28回学術研究助成）

2021年 12月 22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 兵庫県立大学自然・環境科学研究所  
職 名 講師

氏 名 中濱 直之

## 1. 研究課題

遺伝情報を長期保存できる植物乾燥標本作製手法の開発

## 2. 共同研究者

門田満隆（理化学研究所） 遺伝解析の分担

工樂樹洋（国立遺伝学研究所・理化学研究所） 遺伝解析の分担

## 3. 研究報告

### I. 研究の目的

生物標本は作製や保管の過程で紫外線、湿気、微生物などによりDNAが劣化の一途をたどる。DNAが劣化した標本サンプルの遺伝解析は新鮮なサンプルと比較して困難となるため、これまで標本からの遺伝解析には技術的に難しく、また多額の解析費用がかかるのが現状であった。標本中のDNAの質を長期的に維持することができればより安価かつ容易に遺伝解析が可能となり、生物標本に遺伝資源としての価値が確立される。すでに昆虫標本におけるDNAの長期保存手法は申請者らによって確立されているものの、他の分類群においては未着手だった。

そこで本研究では、植物標本中のDNAを長期的に保存できる手法の開発を目的とした。DNAの断片化には特に湿気や微生物等による分解が大きな影響をもたらすことが先行研究で示されている。そのため、本研究では湿気や微生物を防ぐために乾燥した葉を真空パックで封入すればDNAの長期保存が可能となると仮説を立てた。また葉の真空パックであれば、押し葉標本の台紙に張り付けることができるために標本と一緒にDNAサンプル保管することができる。このように、真空パックによる封入はメリットが大きいと期待される。そのため、真空パックによる封入によるDNA保持効果、さらに標本作製手法によるDNA断片化への影響を検証し、それらの結果をもとに植物標本中のDNAを長期的に保存できる手法を検討した。

### II. 研究の方法

アレチヌスビトハギの葉を採集し、2つの実験を実施した。

#### ①標本作製条件におけるDNA断片化の違い

以下の6実験区の条件で10標本ずつ作製した。

0. 採集後すぐに-30℃で冷凍保存
1. 新聞紙に1週間挟んで脱水。新聞紙は毎日入れ替えた。
2. 70℃で3日間熱乾燥して脱水。
3. シリカゲルで3日間急速乾燥して脱水。
4. 99.5%エタノールに浸して2日間脱水。
5. 99%プロピレングリコールに浸して2日間脱水。

上記の条件で5mm×5mmの葉組織を切り取り、標本作製条件によるDNA断片化の違いを比較した。

## ②標本保管条件によるDNA断片化の違い

実験①のうち実験区1~5について、下記の通り常温保存と真空パックに封入した保存の2通りをそれぞれの実験区で作成した。

1-1. 新聞紙に1週間挟んで脱水。新聞紙は毎日入れ替えた。  
その後押し葉乾燥標本として常温で保管。

1-2. 新聞紙に1週間挟んで脱水。新聞紙は毎日入れ替えた。  
その後真空パックに封入して常温で保管。

2-1. 70℃で3日間熱乾燥して脱水。その後押し葉乾燥標本として常温で保管。

2-2. 70℃で3日間熱乾燥して脱水。その後真空パックに封入して常温で保管。

3-1. シリカゲルで3日間急速乾燥して脱水。その後押し葉乾燥標本として常温で保管。

3-2. シリカゲルで3日間急速乾燥して脱水。その後真空パックに封入して常温で保管。

4-1. 99.5%エタノールに浸して2日間脱水。その後押し葉乾燥標本として常温で保管。

4-2. 99.5%エタノールに浸して2日間脱水。その後真空パックに封入して常温で保管。

5-1. 99%プロピレングリコールに浸して2日間脱水。その後押し葉乾燥標本として常温で保管。

5-2. 99%プロピレングリコールに浸して2日間脱水。その後真空パックに封入して常温で保管。

上記の条件で1年間保管して5mm×5mmの葉組織を切り取り、標本作製及び保管によるDNA断片化の違いを比較した。

標本作製後及び1年間経過した各実験区の標本からランダムに6サンプルを選び、CTAB法によりDNA抽出を行った。なお、抽出したDNAについてはAgilent 4200 TapeStationを用いて300-60000bpのDNA断片長を計測した。

DNA断片の評価については、DNAの短断片(300-3000bp)と全体(300-60000bp)のDNA濃度を測定し、全体のDNA濃度のうち短断片(300-3000bp)のDNA濃度が占める割合を算出した。標本作製時については各実験区1~5で多重比較検定を実施することで結果を比較した。また各実験区の真空パックと乾燥標本での保管の結果についてはT検定により結果を比較した。

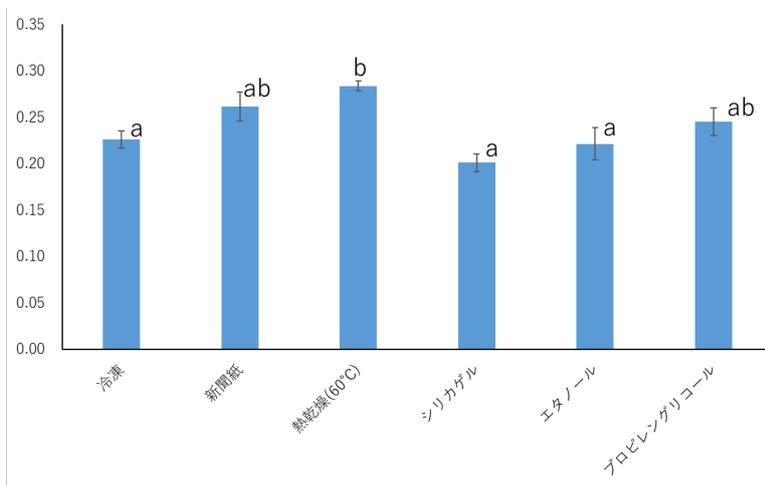
## III. 研究結果

### ① 標本作製条件におけるDNA断片化の違い (図1)

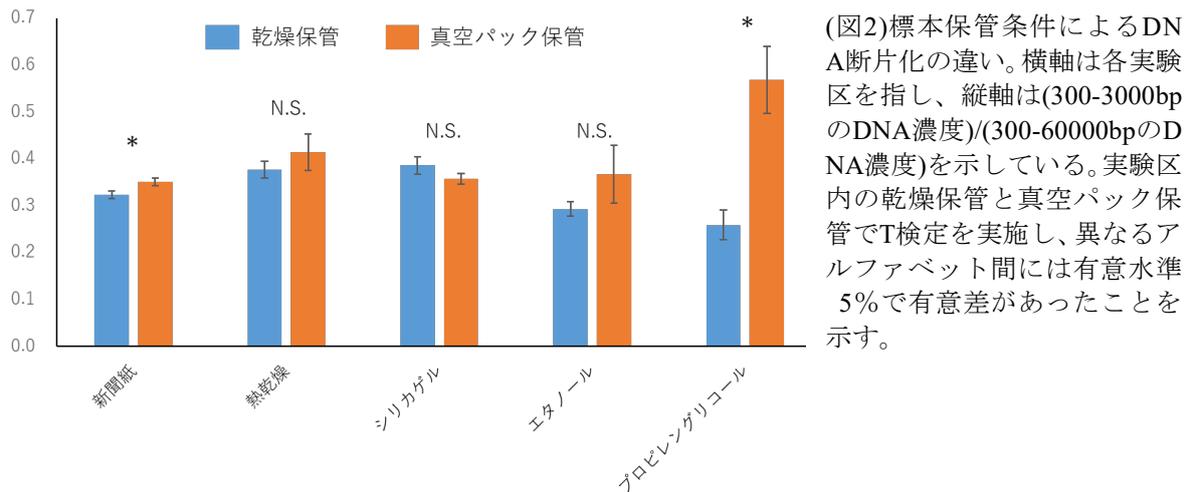
標本作製時の結果においては、実験区0の冷凍保存、実験区3のシリカゲルによる乾燥、実験区4のエタノールによる脱水でDNAの断片化が抑制されていた。一方で、実験区2の70℃での熱乾燥ではDNAはより断片化が進行していた。

### ② 標本保管条件によるDNA断片化の違い (図2)

1年後経過した場合、各実験区において真空パックによるDNA断片化の抑制効果は見られなかった。むしろ、実験区1の新聞紙による脱水、実験区5のプロピレングリコールによる脱水では真空パックで保管した場合でよりDNAの断片化が進んでいた。またいずれの実験区においても10000bpを超える長いDNA断片が多く観察された。



(図1) 標本作製時における、DNA断片化の違い。横軸は各実験区を指し、縦軸は(300-3000 bpのDNA濃度)/(300-60000bpのDNA濃度)を示している。核実験区間でTukeyの多重比較検定を実施し、異なるアルファベット間には有意水準 5%で有意差があったことを示す。



(図2)標本保管条件によるDNA断片化の違い。横軸は各実験区を指し、縦軸は(300-3000bpのDNA濃度)/(300-60000bpのDNA濃度)を示している。実験区内の乾燥保管と真空パック保管でT検定を実施し、異なるアルファベット間には有意水準5%で有意差があったことを示す。

#### IV. 考察

##### ①標本作製条件におけるDNA断片化の違い

植物のDNAサンプルの保管については一般的にシリカゲルによる急速脱水乾燥が推奨されており、本研究についてもそれらを支持する結果が得られた。また、熱による乾燥ではDNAの断片化が進行することも先行研究で知られている。本研究では70℃の熱乾燥によってDNAの断片化が進行しており、これも先行研究を支持する結果となった。ただし意外なことに、エタノールによる脱水もDNA断片化が抑制された。基本的に動物ではエタノールやプロピレングリコールによるDNAサンプル保管が一般的である一方、植物ではエタノール脱水時にDNAがタンパク質を介して細胞壁と結びつくために、エタノール保存は推奨されていない。本研究ではCTAB法によるDNA抽出時に少量のプロテナーゼK (タンパク質分解酵素) を添加した。そのため、効率的にDNAを抽出できたのかもしれない。

##### ②標本保管条件によるDNA断片化の違い

本研究を取り組み際の動機として、真空パックによる水分や酸素からの忌避が、DNA断片を抑制する効果を期待していた。しかし実験結果としては真空パックによるDNA断片の保存効果が認められず、実験区によっては真空パックがDNA断片化を促進する効果が見られた。真空パックによるDNA断片化の促進効果は不明であるものの、真空パックで封入された葉組織中のわずかな水分がDNAを分解した可能性が考えられる。

一連の2つの検証から、標本作製時には高温での熱乾燥を避けるとよりDNA断片化が抑制されること、また真空パックによる保存はDNAの保存に適していないことが示された。

#### V. 成果発表

なし

#### VI. 今後の課題

標本作製後1年間ではそもそも植物乾燥標本のDNAの劣化がそこまで深刻ではなく、10000bp以上のDNA断片が多く見られた。標本作製してからさらに数年が経過することにより植物乾燥標本中のDNAの断片化が進行すると考えられる。そのため解析に供試した標本を今後も保存し、3年や10年が経過した後に同様に解析をすることで、より顕著な差が生じると期待できる。また本研究では真空パックに葉組織を封入したのみであるが、真空パックに乾燥剤を同封することで、真空パック中の水分を完全除去した場合の結果についても検討する必要がある。