小型密封容器(クールミル)を用いたイネ細胞の効率的破碎法

小泉一倫¹⁾・今村智弘¹⁾・高野裕二²⁾・松江登久²⁾・島田浩章^{*1)}

(¹⁾ 東京理科大学基礎工学部生物工学科, 千葉県野田市, 〒278-8510, ²⁾ (有) トッケン, 千葉県柏市, 〒277-0882)

Simple procedure for disruption of rice tissues sealed in a small deep-frozen cell

Kazuyoshi Koizumi¹⁾, Tomohiro Imamura¹⁾, Yuji Takano²⁾, Toshihisa Matsue²⁾, Hiroaki Shimada¹⁾

(¹⁾ *Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, Noda 278-8510, Japan*, ²⁾ *Tokken Inc., Kashiwa 277-0882, Japan*)

キーワード：植物組織破碎，自動クールミル，SKミル，多検体処理

1. はじめに

植物細胞から DNA, RNA あるいはタンパク質を効率よく単離・精製するためには十分に組織を破碎する必要があるが、イネ等のシリカ化合物が多く含まれる植物の組織は、ホモジナイザーのような単純な器具では細胞壁の破碎が困難である。これまでに報告されている植物組織破碎法は、それぞれの植物体固有の性質によりさまざまな工夫がなされている。これらの組織破碎法の中で、液体窒素中に植物組織を投入して超低温条件で破碎する方法は、広範囲の植物組織に適用可能であり、精製途上での不純物の混入や RNase やプロテアーゼなどによる分解を防ぐことができるため、非常に優れた方法として広く利用されている(渡辺・杉浦 1989)。しかしながら、液体窒素中での細胞組織破碎法は、超低温に冷却した乳鉢と乳棒を用いた手作業に頼るため、操作中の事故の危険性が大きく、また多検体の破碎操作を行なうことが困難であるなどの問題点を抱えている。

動物の骨組織や酵母細胞を効率的に破碎する方法としてこれまでに密閉容器を用いたセルミル法が開発されている(松江 1999)。この方法では、破碎したい細胞組織をステンレス塊(クラッシャー)と一緒に密閉容器に封入し、これを手動で激しく振とうすることによって植物組織が磨砕され、それによって細胞は粉碎される。しかしながら、この方法では、室温で操作を行なうため、細胞内に含まれる DNase や RNase などの夾雑物の影響は避けられない。また、この方法をそのままイネ組織の破碎に準用した場合、植物組織に含まれる様々な繊維状物質やシリカ化合物による強固な細胞構造のために、十分

な破碎効果が得られない。

そこで、破碎した植物組織から純度の高い DNA, RNA あるいはタンパク質を得るために、これらの分解が少ない液体窒素条件の超低温での細胞破碎を可能にする器具の開発とこれを用いた新規な細胞破碎法の確立を試みた。ここでは、超低温条件下での植物細胞破碎を可能にしたクールミルの開発について報告する。

2. 大容量の細胞破碎を目的とした自動クールミル装置

2.1 自動クールミル装置

液体窒素冷却下で、安全かつ効率的にイネ緑葉組織を破碎するための装置の開発と破碎条件の検討を行なった。

従来の代表的な方法は、液体窒素で冷却しながらイネの組織を乳鉢と乳棒を用いて破碎するものである(渡辺・杉浦 1989)。そこで、この方法の自動化を試みた。まず、乳鉢、乳棒を用いる従来法の機械操作化を検討した。しかし、操作中の液体窒素飛散の危険性を完全に排除することは困難であると考えられた。また、液体窒素低温条件下で安定的に運転することができる自動乳鉢の作製は技術的に困難であった。そのため、自動乳鉢による破碎操作の自動化はできなかった。

次に、動物の骨組織等の破碎に用いられる密閉容器を改良し、植物組織破碎用に適用することを検討した。また機械操作による容器の振とうの連続化および自動化を試みた。まず、植物細胞を破碎するための容器として、内径 30 mm 高さ 50 mm の円筒形のステンレス容器とこれに適合する直径 30 mm 高さ 30 mm の円筒形のステンレス塊のクラッシャー(中子)を作製した。液体窒素冷却による急激な温度変化と超低温での破碎操作に耐えるように、円筒容器には 2 mm 厚のステンレス鋼を使用した。容器には、ねじ込み式の蓋をセットし、サンプルとクラッシャーを投入後、外ネジを締めつけて蓋を固定した(図 1A)。さらに容器全体を、アタッチメントを介してレシプロ式の振とう器(トッケン・TK-SR3)にセットした(図

1B)．これにより円筒容器に最大振幅約 10 cm の連続的な上下振動を与えることとした．これを自動クールミル装置と名付けた．

2.2 ゲノム DNA の調製

温室で栽培したイネ緑葉，1.85 g をハサミを用いて細かく切り刻み，上記のステンレス容器に投入した．容器に緑葉と一緒にクラッシャーを入れ，蓋を締めて密封した．次に容器全体を液体窒素に沈めて約 5 分間静置し，容器全体を液体窒素温度まで冷却した．冷却後，容器を取り出し，レシプロ振とう器に装着し，最大振動数 (250 rpm) で 10 分間強く振とうした．振とう後，容器の上下を転倒して振とう器に装着し直し，再び 10 分間振とうした．合計 20 分間の振とう後，容器を振とう器より取り外し，蓋を開けて破碎された緑葉サンプルを取り出した．この実験操作後も，容器は低温が維持されていた．破碎された緑葉サンプルは微細粉末として回収された．回収したサンプルをビーカーに移し，室温まで温度が上がるのを待って次の操作を行なった．一方，対照実験として，1.04 g のイネ緑葉を細かく切り刻み，十分に冷却した乳鉢と乳棒を用いて，液体窒素存在下で 20 ～ 30 分間かけて手操作により完全にすりつぶした．

以上の 2 つの破碎処理法で得られた緑葉破碎物から，CTAB 法 (Ausubel *et al.* 1987) によりゲノム DNA の調製を行なった．その結果，緑葉 1 g あたりのゲノム DNA の収量はそれぞれ 1.65 mg (自動クールミルによる操作) および 1.04 mg (手操作) であった．図 2A に示すようにど

ちらも純度の高い DNA が得られた．これらの結果から，手操作によって得られた破碎物を用いて調製したゲノム DNA と，自動クールミル装置を用いて破碎した緑葉破碎物を用いて調製したゲノム DNA との間で，収量や品質に顕著な差異は認められなかった．また，これらのゲノム DNA をそれぞれ制限酵素で切断した場合，ともにスミアな泳動パターンを示した (データ示さず)．以上の結果から，自動クールミル装置を用いた植物細胞破碎法は，ゲノム DNA の抽出に供するサンプル調製法として有効であることが明らかとなった．

2.3 RNA の調製

ゲノム DNA 調製の場合と同様の方法で調製したイネ緑葉破碎物を用いて，RNA 抽出キット (ナカライテスク，セパゾール RNA I super) を用いた緑葉の全 RNA の調製を試みた．抽出法はキットに記載されている方法に従った．その結果，1.0 g の緑葉を自動クールミル装置で調製した破碎物，手作業で調製した破碎物それぞれを RNA 調製のための出発物質とした場合，それぞれ 302 μ g, 366 μ g の RNA が得られた．ともに高品質な RNA が得られ，これらの間には収量，品質に差異は認められなかった (図 2B)．

2.4 タンパク質の調製

自動クールミル装置で調製した緑葉破碎物，手作業で調製した緑葉破碎物それぞれを 2 ml 容量のサンプリングチューブに入れ，これに 600 μ l の抽出バッファー (10%

図 1. 自動クールミル装置. A: クールミルの構造図. 収納凹部にクラッシャーが格納される. フタは雄ネジと雌ネジにより固定される. B: 自動クールミル装置の外観. 冷却したクールミルを振とう台にセットし，上下振とうを加えることにより，内部のクラッシャーが上下し，サンプルを破碎する．

図2. 自動クールミル装置による抽出. A: ゲノム DNA の抽出結果. それぞれ 0.5 μ g のゲノム DNA を用いた 1% アガロースゲル電気泳動結果を示す. B: 全 RNA の抽出結果. それぞれ 20 μ g の全 RNA を用いた電気泳動結果を示す. 電気泳動には 3% のホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルを用いた. C: 緑葉のタンパク質粗抽出物を用いた 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す. タンパク質の染色は Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた. 図中, M, 1, 2 はそれぞれサイズマーカー, クールミルを用いて調製したサンプル, 乳鉢と乳棒を用いた手操作によって調製したサンプルであることを示す.

glycerol-100 mM MES (2-morpholinoethanesulfonic acid)-1 mM EDTA (ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid), pH. 7.0) を加えて激しく混合後, 遠心分離し, その上清をタンパク質粗抽出液とした. この粗抽出液を 10% SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により分析し, 両者の泳動パターンを比較した. その結果, それぞれの緑葉破碎物から得られた粗抽出液に含まれるタンパク質の泳動パターンに差は認められなかった (図 2C). 収量にも顕著な差異は認められなかった. これらのことから, 自動クールミルを用いて破碎する方法は, 従来の乳鉢・乳棒を用いる方法と遜色ない結果が得られることが明らかになった.

3. 多検体の微量サンプルを処理するための小型クールミル細胞破碎装置

小スケールで多検体のサンプル調製のため, クールミルの小型化を試みた. 効率的に多数のサンプルを処理するために, 2 ml 容量のプラスチック製のサンプリグチューブを用いるシステムを検討した. 簡易抽出を可能にするため, 2 ml サンプリグチューブの形状に合わせたステンレス製のクラッシャーを作製した.

破碎材料として, ハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した組換え体イネおよび非組換え体イネを用いて実験を行なった. 約 50 mg の緑葉を切り刻んでサンプリグチューブに投入し, クラッシャーを入れ, 蓋をした. これを図 3A に示す形状の 3 本のチューブが装着可能なチューブホルダーに装着して固定した. 次に, このチューブホルダーを液体窒素中に沈め, 液体窒素温度まで冷却した. その後, チューブホルダーを取り出して図 3B に示

すアクリル容器 (アウターケース) にセットし, 手動で約 5 分間振とうした.

振とう後もチューブホルダーは十分に冷却状態が保持されていた. 振とうの結果, チューブの中のイネ緑葉は完全に破碎されており, 微細粉末となっていた. そこで前項と同様に, この操作で得られたイネ緑葉破碎物を用いて, ゲノム DNA の抽出を試みた. 対照実験として, 約 50 mg のイネ緑葉を細かく切り刻み, 十分に冷却した乳鉢と乳棒を用いて, 液体窒素存在下で手操作により完全にすりつぶした.

この小型クールミル (SK ミルと命名した) を用いて破碎した植物組織を用いた場合には, 振とう時間および振とうの強さにより, 破碎の度合いにばらつきが生じたが, 5 分間の振とうによりほぼ完全に破碎された. 一方, 少量の試料を手操作で破碎した場合には, 乳鉢から植物組織破碎物を回収する際に試料の損失が発生した. しかし, SK ミルによる方法と手操作による方法との間で最終的な収量には顕著な差異は認められなかった. 得られた DNA を用いてハイグロマイシン耐性遺伝子 (Roberts *et al.* 2000) を検出するための PCR を行なった結果, 目的の遺伝子に対応するバンドが確認された (図 4A). この結果から, 得られたゲノム DNA は, サザン分析や PCR に用いることが可能であることが明らかとなった.

非組換え体イネの未熟種子および完熟種子 (それぞれ 2 粒) を用いてタンパク質粗抽出液の調製を試みた. それぞれより穎を取り除き, SK ミルを用いて破碎し, 得られた破碎物からタンパク質粗抽出液の調製を行なった. 得られたタンパク質粗抽出液を用いた SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動では, 主要なタンパク質に対応する明確なバンドパターンが認められた (図 4B). また, こ

図3. SKミルの構造(A)と外観(B). サンプルは2 ml サンプルチューブにクラッシャーとともに投入し、チューブホルダーにセットする。これをチューブ押えを用いて固定し、液体窒素で冷却する。アクリルケースに収納し上下に振とうさせて、サンプルをクラッシャーにより破碎する。

図4. SKミルを用いた抽出。A: SKミルによって破碎されたイネ緑葉サンプルのPCRの結果。ハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した形質転換体および非形質転換体よりSKミルを用いてゲノムDNAを抽出し、ハイグロマイシン耐性遺伝子に対応するプライマー(5'-CGGGTAAATACGTGCGCCGATGGT-3'と5'-TGCTGGGGCGTCGGTTTCCACTAT-3')(Roberts *et al.* 2000)を用いてPCRを行なった。増幅断片は1%アガロースゲル電気泳動により分析した。図中、Mはサイズマーカーを、1は非組換え体イネ由来のDNA、2,3はともに組換え体イネ由来のDNAであることを示す。B: 未熟種子のタンパク質粗抽出物を用いた10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す。タンパク質の染色はCoomassie Brilliant Blue R-250を用いた。図中、M, 1, 2はそれぞれサイズマーカー、SKミルを用いて調製したサンプル、手操作によって調製したサンプルであることを示す。図の左側の2つのサンプルは完熟種子より、右側の2つのサンプルは未熟種子より調製した。C: Bのサンプルに対するウエスタン分析の結果を示す。一次抗体はイネ・ショ糖合成酵素に対する抗ウサギ抗血清を用いた。図中、1, 2はそれぞれSKミルを用いて調製したサンプル、乳鉢と乳棒を用いた手操作によって調製したサンプルであることを示す。

のタンパク質粗抽出液を用いてショ糖合成酵素に対する抗体 (Asano *et al.* 2002) によるウエスタン分析を行なったところ、目的とするタンパク質に対応するバンドが確認された (図 4C)。これらの結果から、SK ミルによる組織破碎は、従来の方法と遜色ない結果が得られることが明らかになった。この方法は、多検体を同時に処理することが可能であるため、組換え体植物などの遺伝子検定や特定のタンパク質産生を簡便に検出するために有効である。

4. おわりに

DNA, RNA およびタンパク質を調製するためのイネ細胞破碎法の効率化を目的として、自動クールミル装置を開発した。その結果、自動クールミル装置を用いる方法は、効率的に純度の高いサンプル調製が可能であることが明らかとなった。この方法は、従来の液体窒素存在下で乳鉢、乳棒を用いて破碎する方法に置き換えることが可能であると考えられる。今回作製した自動クールミル装置は、同時に 6 サンプルの処理が可能なものであるが、装置の改良により、さらに多検体の同時処理も可能となると考えられる。

一方、多検体の少量サンプルを処理するために、小型のクールミルである SK ミルを開発した。SK ミルを用いた方法では液体窒素冷却により冷却した 50 mg 程度の少量の緑葉サンプル、1 粒の未熟種子あるいは完熟種子の破碎が可能であり、この破碎サンプルから、純度の高いゲノム DNA, RNA およびタンパク質を調製することが可能であった。

これらの装置を用いる方法では、ともに液体窒素で冷却した密封容器を使用することから、試料の飛散やコン

タミネーションの危険性が回避される。また操作中の液体窒素による事故に対する安全性も確保されることが考えられる。破碎された植物組織からゲノム DNA 等を抽出する工程は、すでに自動化が可能な抽出キット類が開発されて市販されているため、これらと組み合わせることによって、植物組織からのゲノム DNA 等の抽出操作全体を自動化することが可能となったものと考えられる。このことから、これらの器具を用いる方法は、イネ組織の破碎法として効果的であることが明らかとなった。

謝 辞

本研究の一部は日本学術振興会による科学研究費補助金 (No.12556003) の助成により進められた。

引用文献

- Asano, T., N. Kunieda, Y. Omura, H. Ibe, T. Kawasaki, M. Takano, M. Sato, H. Furuhashi, T. Mujin, F. Takaiwa, C. Wu, Y. Tada, T. Satozawa, M. Sakamoto and H. Shimada, H. (2002) *Plant Cell* 14: 619–628.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (eds.) *Current protocols in Molecular Biology*, (1987), section 2.3.
- 松江登久 (1999) 公開特許公報, 特開平 11-148890.
- Roberts, C., S. Rajagopal, L. M. Smith, T. A. Nguyen, W. Yang, S. Nugrohu, K. S. Ravi, K. Vijayachandra, R. L. Harcourt, L. Dransfield, N. Desamero, I. Slamet, P. Hadjukiewicz, Z. Svab, P. Maliga, J. E. Mayer, P. K. Keese, A. Kilian, and R. A. Jefferson (2000) DDBJ accession no. AF234297.
- 渡辺格 (監修)・杉浦昌弘 (編集) (1989) “植物バイオテクノロジー実験マニュアル. クローニングとシーケンス”, 農村文化社, 東京. 252–264.