

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：12606

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K13245

研究課題名（和文）DNA配列解析による和紙繊維分析方法の開発-ITS領域の比較

研究課題名（英文）Development of Washi (Japanese paper) Fiber Analysis Method by DNA Sequence of ITS regions

研究代表者

田口 智子 (Taguchi, Satoko)

東京藝術大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：90755472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、和紙及びその原料植物から簡便にDNAを抽出する方法を確立し、遺伝子情報を用いた新たな和紙材料の同定方法を開発することである。DNA抽出試薬（関東化学）とPCR Master Mix（TOYOBO）を使用することにより、コウゾ、ミツマタ、ガンピの各植物及び和紙の各ゲノムを用いてInternal Transcribed Spacer(ITS)領域の塩基配列比較が可能となった。以上の結果から、ガンピ和紙の同定はITS領域のDNA配列を使用した簡便な識別方法が確立し、コウゾ及びミツマタについても、部分的な遺伝子配列から同定は可能であり、当初の研究目的はほぼ完遂できたと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

和紙が使用された文化財の保存・修復では、原料である植物の情報が必須となる。しかし、従来のC染色液や光学顕微鏡を使用した繊維分析方法では、経年劣化した資料や複数の原料からなる和紙を同定することは難しい。そのため、現行の和紙同定法は、長年の経験に裏打ちされた熟練の技術が必要となり、一部の専門家や研究機関の判断に頼らざるをえない現状がある。本研究で得られた成果を発展させ、経年劣化した文化財への適用が可能となれば、非常に簡便かつ客観的に和紙材料が特定できるため、学術的・社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a simple method for extracting DNA from washi materials and their source plants, and to develop a new method for identifying washi materials using genetic information. Using DNA extraction reagents (Kanto Chemical) and PCR Master Mix (TOYOBO), it was possible to compare the sequence of Internal Transcribed Spacer (ITS) region by the genomes of Kouzo, Mitsumata, and Gampi plants and Japanese paper. Based on these results, a simple identification method using DNA sequences of the ITS region was established for Gampi washi, and identification of Kouzo and Mitsumata was also possible based on partially identified gene sequences, suggesting that the initial research objective was almost completed.

研究分野：文化財科学

キーワード：和紙 DNA解析 ITS領域 繊維分析 文化財

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

和紙が使用された文化財は多岐にわたり、その保存・修復には原料である植物の情報が必須となる。和紙が使用された文化財の保存・修復では、原料である植物の情報が必須となる。しかし、従来の C 染色液や光学顕微鏡を使用した繊維分析方法では、経年劣化した資料や、複数の原料からなる和紙の材料を正確に同定することはかなり困難である。また現行の和紙同定法は、長年の経験に裏打ちされた熟練の技術が必要となり、専門家や研究機関の判断に頼らざるをえない現状である。そのため、和紙材料植物の同定のために DNA 解析が期待され、葉緑体ゲノムの PS-**ID** 領域の比較を行った先行研究があるが、この領域はどの植物でも非常に類似しているため、さらに有効な手段が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、和紙材料及び植物から簡便かつ高精製度な DNA を抽出する方法を確立し、各ゲノムの ITS 領域の比較により、DNA 塩基配列情報を用いた新たな和紙材料の同定方法を開発することである。

3. 研究の方法

代表的な原料としてはコウゾ、ミツマタ、ガンピに注目し、各植物及びそれらを材料とした和紙から DNA を抽出する。その際、簡便また少量で DNA が調製できる方法を模索する。各植物について、植物全般に配列が高く保存されているリボゾーマル RNA 遺伝子に挟まれた非保存領域 ITS1 及び ITS2 をデータベース検索してプライマーをデザインし、抽出された DNA を鋳型としてその領域を PCR 増幅する。そのサンプルをシーケンス解析することで、各植物に特異的な配列を BLAST データベース検索し、和紙材料の原料である植物を同定する。

4. 研究成果

昨年度までに簡便な DNA 調製キットであるシカジーニアス(R) DNA 抽出試薬 (関東化学)を使用して植物及び和紙からゲノム抽出を試みた。本年度はさらに植物から高純度、高収量でゲノム DNA が精製できる NucleoSpin PlantII を使用して実験を行った。しかし、両方法を比較すると、前者と KOD One(R) PCR Master Mix (TOYOBO)を組み合わせた PCR 条件がエキストラバンドが少なく簡便に精製できたため、今後は基本的にこの方法を用いることとした。また、和紙、植物共に繊維を細く引き抜くことで、量的に極微量のサンプルからゲノム DNA が精製できることが判明した。

図 1 (A) にコウゾ和紙からゲノム抽出したサンプル 1 μ l または 2 μ l を鋳型として使用し、98 $^{\circ}$ C で 10 秒、60 $^{\circ}$ C で 5 秒、68 $^{\circ}$ C で 5 秒のサイクルを 40 サイクル PCR した時の電気泳動図を示す。どちらのサンプルも目的とするサイズのバンドが検出できたが、2 μ l のサンプルを使用した場合はエキストラバンドが検出されたため、今後はサンプルを 1 μ l 使用することとした。

図 1 (B) にガンピ植物から同様の実験方法で精製されたゲノム DNA を鋳型として、アニーリング温度を検討した PCR サンプルの泳動図を示す。鋳型量はすべて 1 μ l として、アニーリング温度を 60 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、56.1 $^{\circ}$ C、53.8 $^{\circ}$ C、51.9 $^{\circ}$ C 及び 50 $^{\circ}$ C に変化させて PCR を行ったところ、56.1 $^{\circ}$ C より低温でアニーリングしたサンプルからは、エキストラバンドが検出された。そのため、ガンピ植物の場合には、56 $^{\circ}$ C 以上のアニーリング条件で PCR することが望ましいと思われた。同様の方法で、ミツマタ和紙及び植物からも PCR 産物を得ることができた。

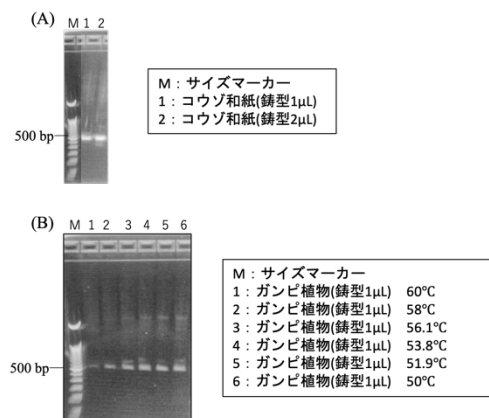


図1. (A)コウゾ和紙及び (B)ガンピ植物由来ゲノムDNAを鋳型とした PCR産物の電気泳動図。

PCR 産物を NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を使用して精製した。精製産物の濃度は各サンプルで違いがあったが、20-50 ng/ μ l 程度で約 50 μ l の精製サンプルが得られたため、シーケンス解析には十分な量を得ることができたと考えられた。

(株)ファスマックの受託サービスである Premix シーケンス解析に依頼して、各サンプルの ITS2 領域シーケンスを解読した。その中で、ガンピ植物については、これまで ITS2 領域のシーケンスについては報告がないため、近縁種の植物からプライマーをデザインして PCR 解析を行ってきた。現段階ではまだ論文として公表していないため詳細な記述は控えるが、ガンピ植物及びガンピ和紙の両方のサンプルの ITS2 領域シーケンスがほぼ解読でき、両配列は一致した。また、コウゾ及びミツマタ和紙についても、一部のシーケンスがデータベース上の配列と一致した。そのため、主要な和紙の原料であるガンピ、コウゾ及びミツマタを原料とする各和紙の ITS2 領域シーケンスによる判別は可能であることが明らかとなった。しかし、サンプルにより PCR 濃度及び精製度にばらつきがあり、今後の課題となった。

以上の結果から、ガンピ和紙の同定は ITS 領域の DNA 配列を使用した簡便な識別方法が確立したと考えられる。また、コウゾ及びミツマタについても、一部のシーケンス配列から識別同定は可能であると思われた。今後は、さらに実験の精度を向上させ、紫外線照射等により経年劣化を再現した和紙を用いて同様の実験を行った後に、文化財への適用も視野に入れ研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------