

次世代 DNA 解析を用いた種多様性評価を正確にする 塩基配列コピー数平準化法の開発

愛媛大学大学院 学生会員 ○福田航平 大阪府立大学 非会員 加藤幹男
愛媛大学大学院 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

河川生態系評価において、種多様性（種数）は中心的な指標となっている。近年、DNA 塩基配列に基づく種多様性評価が注目されている。なぜなら、形態が崩れて目視による分類が困難な生物群を分類できるからである。また、従来法の形態分類と比べると、人為的な誤同定も減り、作業時間や人件費を抑えることができる。つまり、塩基配列情報を用いることで正確に速く安価に種多様性が評価できる。

従来のサンガー法では、1 回の反応で 1 個体の配列情報しか読み取れないため、多くのサンプルを解析するには時間がかかっていた。一方、次世代 DNA シーケンシングを用いると、1 度の解析で複数個体の塩基情報を解読するアンプリコン解析が可能となる。

アンプリコン解析は、速く、大量のサンプルの解析ができる長所があるが、解析の正確性に問題点がある。生物群集サンプルを次世代 DNA シーケンシングに適用することで、その群集内の稀少種が欠落し¹⁾、正確な種多様性（種数）の評価ができない可能性がある。この問題点の解決方法として DNA ハプロタイプのコピー数平準化が考えられる（図 1）。

平準化にはポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる。ゲルの中で 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の移動速度が異なるので、異なるバンドとして検出される。DNA を熱変性すると 2 本鎖 DNA が 1 本鎖 DNA に変化する。その後、徐冷すると互いに相補的配列を有する 1 本鎖 DNA が再会合し、2 本鎖 DNA を形成する。互いに相補的な DNA 鎖の割合が大きいほど再会合速度は高まるため²⁾、溶液中に多く存在する塩基配列ほど 2 本鎖構造を多く形成する。この状態で氷水を用いて急冷することで残っている 1 本鎖 DNA は、分子内に相補的領域があると高次構造を形成するので再会合反応が止まる。よって 2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA に分かれることが予想される。DNA サンプルを熱変性し、急冷する時の降温速度条件を変えると再会合後の 2 本鎖と 1 本鎖の割合が変化することが期待される。

しかし、再会合した 2 本鎖 DNA 中のヘテロ接合体、つまり互いに完全に相補的ではない配列同士の結合が増加すると、熱変性処理の平準化効果が弱まることが予想される（図 2）。ヘテロ接合体は再会合温度や再会合させる時間によって形成される割合が異なることが予測される。そのため再会合

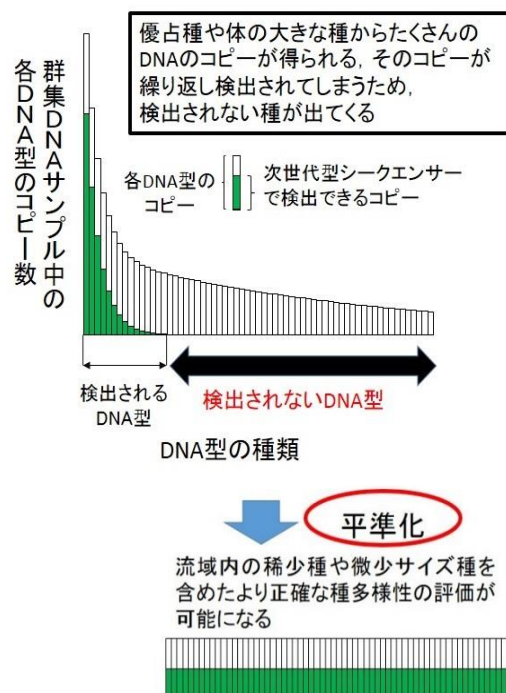


図 1 平準化の概念図

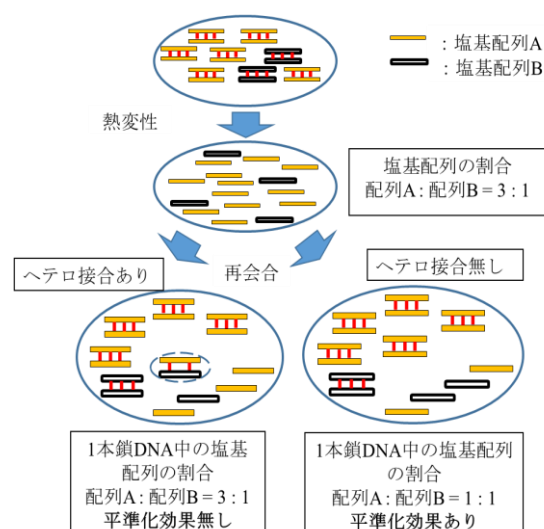


図 2 ヘテロ接合問題の概要図

条件によってはヘテロ接合体の割合を減らすことが期待される。

以上より、本研究では次世代 DNA シーケンシングによる正確・迅速・安価な群集アンプリコンの種多様性評価を可能にする DNA 型コピー数平準化法を開発することを目的とする。

2. 方法

2.1 熱変性処理による DNA 構造の変化

DNA サンプルはエグリトビケラ科の一種(*Asynarchus mutatus*) の 1 個体から抽出したものを使用し、ミトコンドリア DNA の cytochrome oxidase subunit1 (*CO1*) 領域を PCR 増幅した。水素結合を解くために PCR 産物を 100℃で 2 分間熱した後、氷水を用いて PCR 産物を急冷した。また再会合温度と再会合時間を変えて、最も平準化された条件を検討した。平準化の基準として、2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA の比を比較した。本研究では 1 本鎖 DNA の比が最も低くなる条件を最適再会合条件とした(図 3)。

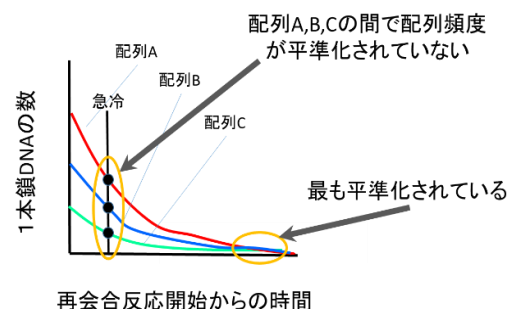


図 3 最適再会合条件の概念図

2.2 ポリアクリルアミドゲル電気泳動による 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の分画

ゲルはリアルゲルプレートミニゲルサイズ (ゲル濃度 5% BIO CRAFT) を使用した。ゲルを泳動槽にセットした後、6×Loading Buffer (タカラバイオ) とサンプルを混合して DNA 量を 13ng に調整した。サイズマーカーは DynaMarker DNA Low D(BioDynamics Laboratory Inc.)を用い、Loading Buffer 7μl とサイズマーカー1μl を混合した。混合サンプルをウェルに 2μl 入れて、ゲルにサンプルを浸透させるために 30V, 30min で電気泳動を行った後、100V, 270min で再び電気泳動を行った。

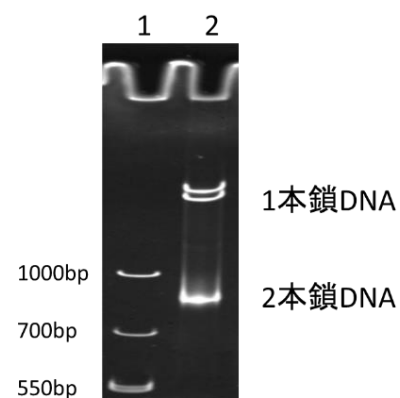


図 4 ポリアクリルアミドゲル電気泳動結果

3. 結果および考察

熱変性後、急冷したサンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動した結果、2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA のバンドがそれぞれ検出できた。この結果より熱変性処理とポリアクリルアミドゲル電気泳動を組み合わせることで、PCR 産物を 1 本鎖構造と 2 本鎖構造に分画できることがわかった。

4. おわりに

分画実験に使用した DNA は 1 個体から抽出した DNA を使用したので、今後は複数種の DNA が混合している群集サンプルを用いて分画を再現する。その後、最も平準化される熱変性処理条件を検索する。また、この方法で得られたアンプリコンサンプルを実際に次世代 DNA シーケンシングして平準化効果を検証する予定である。

参考文献

- 1) Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. PLoS ONE, 6(4)
- 2) Li, Y., White, J., Stokes, D., Sayler, G., Sepaniak, M. (2001). Capillary electrophoresis as a method to study DNA reassociation. Biotechnology Progress, 17(2) : 348-354