

次世代 DNA 解析による種多様性評価の正確性向上を目的とした DNA 型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。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る。一方、次世代 DNA シーケンサーを用いると、1 度の解析で多数個体の塩基情報を並列的に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 DNA 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。また再会合反応は 2 次反応である³⁾ため、反応時間により平準化効果が変化することが考えられる（図 2）。つまり、熱変性—再会合反応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、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA に分けることが出来る。

しかし、サンプル中の配列間で類似度が高い場合、再会合反応の際に完全相補関係ではない配列同士で結合が起こり、ヘテロ 2 重鎖が形成される。ヘテロ 2 重鎖が増加すると、熱変性処理の平準化効果が弱まることが予想される。ヘテロ 2 重鎖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。そのため再会合条件によってはヘテロ 2 重鎖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。

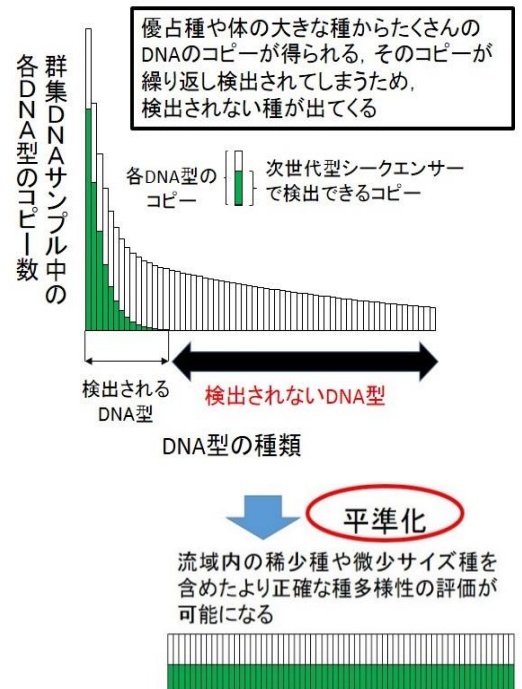


図 1 平準化の概念図

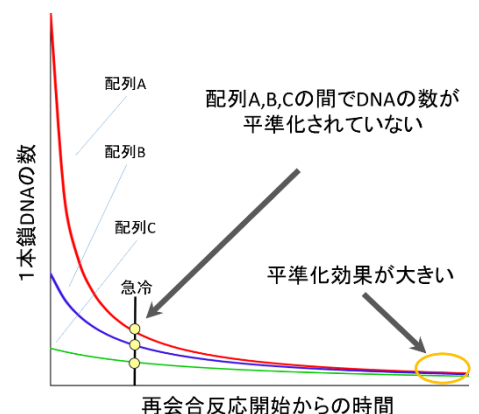


図 2 最適再会合条件の概念図

2. 方法

2.1 熱変性処理による DNA 構造の変化

DNA サンプルはミトコンドリア DNA の cytochrome oxidase subunit1 (*COI*) 領域を PCR 増幅した。水

素結合を解くために PCR 産物を 98℃で 5 分間熱した後、氷水を用いて急冷した。再会合温度は 79℃，会合時間を 5 分から 240 分まで 10 段階で変えて、1 本鎖 DNA が検出される条件を検討した。また、再会合反応は 2 次反応であるため、反応開始から時間が経過するごとに残っている 1 本鎖 DNA の数が平準化されるので 1 本鎖 DNA が検出され、且つ反応時間がもっとも長い条件を最適再会合条件とした（図 2）。

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

ゲルはゲル濃度 5%，TBE Buffer のポリアクリルアミドゲルを使用した。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 60ng に調整した。各再会合条件のサンプルをウェルに入れて、ゲルにサンプルを浸透させるために 50V，30min で電気泳動を行った後、100V，210min で再び電気泳動を行った（表 1）。レーン 1 は PCR 直後（未変性）のサンプル，レーン 2 は熱変性直後に氷水で急冷したサンプルを使用した。

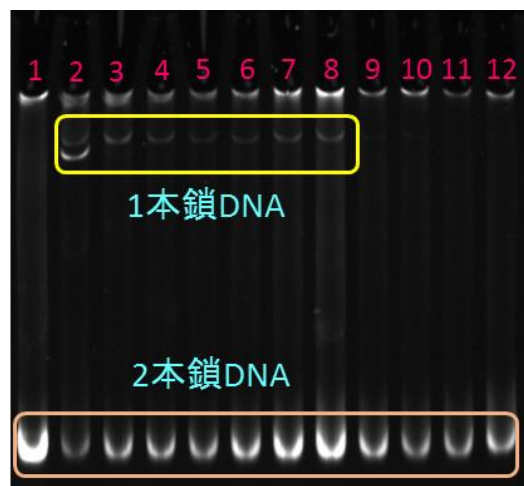


図 3 電気泳動結果

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（図 3）。また、再会合条件によって 1 本鎖が検出されるレーンと検出されないレーンに分けられた。これにより平準化にとって最適な再会合条件は、再会合温度 79℃で 90 分であると考えられる。

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。その際にヘテロ 2 重鎖が形成されにくい再会合条件の検討が必要になる。また、DNA 濃度にばらつきを与え、DNA 濃度が高い種（優先種）と濃度が低い種（稀少種）を作り出した仮想群集サンプルを用意し、そのサンプルを熱変性 - 再会合処理して次世代 DNA シーケンシングした結果（平準化）とそのままサンプルを次世代 DNA シーケンシングした結果（非平準化）を比較して平準化効果を検証する予定である。

表 1 再会合条件

レーン番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
再会合時間 (min)	—	0	5	10	30	45	60	90	120	150	180	240

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
- 3) James, G Wetmur., Norman Davidson. (1967). Kinetics of Renaturation of DNA. Journal of Molecular Biology 31 (3), pp. 349-370