

報 文

シカ・ミトコンドリアゲノムの多検体解析のための DNA サンプル調製法の検討*¹沖井英里香*²・白石 進*³

沖井英里香・白石 進：シカ・ミトコンドリアゲノムの多検体解析のための DNA サンプル調製法の検討 九州森林研究 68：187－189, 2015 多検体のニホンジカ・ミトコンドリアゲノムを解析するための DNA 調製法を検討した。シカの尾もしくは耳サンプルからの単離 DNA は、サンプル間で質的および量的に非常に大きな違いが認められた。ミトコンドリアゲノムの全塩基配列決定のために設計された 2 対のプライマーによる long-PCR の結果、ミトコンドリアゲノムの全領域の増幅が確認された。これを単離 DNA に適用した結果、低分子化の進んだ DNA サンプルでも増幅が可能であった。また、この PCR 産物の酵素による無作為断片化条件が決定された。

キーワード：ニホンジカ、ミトコンドリアゲノム、DNA

I. はじめに

ニホンジカ (*Cervus nippon*, 以下シカ) は我が国に広く生息している大型野生動物である。シカの生息域は拡大してきており、今後も拡大が予想されている (4)。シカの生息数の急増と生息域の拡大は地域生物相の変化をもたらし (5)、生態系へ大きな影響を与えている。また、野生鳥獣による農作物被害額は 230 億円に上り、シカによる被害は 4 割以上を占める (2)。また、森林被害面積では野生鳥獣による被害面積 (約 9 千ヘクタール) のうちシカの食害・剥皮被害が全体の 6 割を占める (3)。平成 26 年の鳥獣保護法改正により鳥獣の管理が目的に加えられ (1)、保護から管理へと大きく舵が切られた。今後は、この個体数管理に加えて、遺伝的多様性の保全の概念を加える必要があると考えられる。そのためには、シカ地域集団の遺伝的多様性の評価と、遺伝構造の解明が急務である。しかしながら、シカの遺伝学的研究は遅れているのが現状である。ニホンジカのミトコンドリアゲノムは 3 亜種 (エゾシカ, *C. n. yesoensis*; ホンシュウジカ, *C. n. centralis*; ヤクシカ, *C. n. yakushimae*) で解読されている (6) が、各亜種 1 個体のみである。種内変異、亜種内変異、集団内変異の遺伝的多様性評価や遺伝構造の解析を行うには非常に多くの個体 (多検体) を分析する必要がある。一方、次世代シーケンサーの登場により、多検体のゲノムワイドな研究が可能になった。そこで次世代シーケンサー解析に向けた多検体の DNA 調製について、(1) 多検体からの DNA 抽出、(2) ミトコンドリアゲノムの long-PCR、(3) PCR 産物の断片化条件について検討を行った。

II. 材料と方法

1. 材料

全国からの 5 亜種、8 集団、192 個体 (表-1) のシカの尻尾もしくは耳から DNA 抽出を行った。

表-1. 供試材料

集団名	場 所	亜種名	供試 個体数	供試 部位
足寄	北海道足寄町	<i>C. n. yesoensis</i>	48	尻尾
郡上	岐阜県郡上市	<i>C. n. centralis</i>	16	尻尾
四万十	高知県四万十市	<i>C. n. nippon</i>	16	耳
長崎	長崎県長崎市	<i>C. n. nippon</i>	16	耳
対馬	長崎県対馬市	<i>C. n. pulchellus</i>	16	尻尾
国東	大分県国東市	<i>C. n. nippon</i>	16	尻尾
霧島	鹿児島県霧島市	<i>C. n. nippon</i>	16	尻尾
屋久島	鹿児島県屋久島町	<i>C. n. yakushimae</i>	48	尻尾
合計			192	

2. DNA 抽出

シカサンプルは、DNA 抽出までは純粹エタノール (99.5%) に入れ、-20℃のフリーザーで冷凍保存した。尻尾もしくは耳から切り出した 5 mm 角の肉片 2 個をマルチビーズショッカー (安井器機) で粉碎 (1500rpm, 30 秒) し、SDS/Proteinase K を加え 50℃、12 時間にて溶解した後、クロロホルムで洗浄し、MagneSil (Promega) で精製した。抽出した DNA は分光光度計 (ND-100, Thermo Fisher Scientific) を用いて、核酸濃度、A 260/A 280 比と A 260/A 230 比を測定し、1.25% アガロースゲルで電気泳動した。

3. PCR によるミトコンドリアゲノムの増幅

ミトコンドリアゲノムを増幅するため、2 対のプライマーを設計した (表-2)。PCR 反応は PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA) を用いて、98℃ 10 秒、68℃ 10 分を 30 サイクル繰り返しを行った。

4. ミトコンドリアゲノムの断片化

増幅したミトコンドリアゲノムの断片化を行った。多検体の DNA の断片化には酵素が適しているため、PCR 産物の断片化は

*¹ Okii, E. and Shiraishi, S.: DNA preparation for mitochondrial genome analyses of sika deer polyspecimen.*² 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. and Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581.*³ 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581.

dsDNA Shearase Plus (ZYMO Research), NEBNext dsDNA Fragmentase (New England Biolabs) を用いた。dsDNA Shearase Plus は酵素のユニット数で断片化の程度を制御しているため、20 μ l 反応液中に、0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 U の酵素を加え、42 $^{\circ}$ C・20分間反応させ、65 $^{\circ}$ C・5分で不活性化させた。NEBNext dsDNA Fragmentase は、反応時間で生成される断片長を制御するため、37 $^{\circ}$ Cで0, 5, 10, 15, 20, 25, 30分反応させた後、0.5M EDTA (5 μ l/20 μ l 反応液) を加え、反応を止めた。

表-2. プライマー配列

プライマー名	シーケンス (5'to 3')
mwgCN_A_F	CTCACTCCCTGTACTAGCAGCCGGAATTACAATACTATTAACAGA
mwgCN_A_R	AGGTTGGTAATGACTGTTGCTCCTCAGAATGATATTTGTCTC
mwgCN_B_F	TCATTGACCTCCCCGCCCATCAAATATTTTCATCCTG
mwgCN_B_R	TGGATAATCAGAGTAGCGTCGTGGCATACCAGACA

Ⅲ. 結果と考察

抽出した核酸濃度は25.3~542.0ng/ μ l, DNA量は2.5~54.2 μ g, A260/A280比は0.62~1.88, A260/A230比は0.16~2.22であった。サンプルによって、高分子DNAが残存しているものと低分子化が進んだものがあり、質的にも大きな違いがあった(図-1)。抽出はすべて同一条件で行われたことから、このようなサンプル間で大きな量的・質的差が認められたのは、DNA単離に供試したサンプルの中に、既に劣化(断片化)が進んだものが多数あったためと考えられる。なお、抽出結果は、亜種及び部位の違いで差異は認められなかった。

Long-PCRによるミトコンドリアゲノムの増幅を行った結果、低分子化が進んだサンプルを含め、192個体すべてでPCR産物を得ることができた。5亜種を含む8集団のすべての個体で増幅されたことから、今回設計した2対のプライマーは、シカのミトコンドリアゲノムの増幅に対し普遍性が高いと考えられる。また、これらのプライマーで増幅される2領域は比較的長い(約8kbp)にも関わらず、低分子化が進んだトータルDNAを用いても増幅されたことから、かなり劣化したサンプルにおいても全ミトコンドリアゲノムの増幅の可能性は高いと思われる。

増幅されたPCR産物(ミトコンドリアゲノム)について、断片化条件を2種の酵素について検討した。dsDNA Shearase Plusは、0.1Uでは5~7kbp, 0.2Uでは3~5kbp, 0.5Uでは300~500bp, 1.0Uでは200~300bp, 2.0Uでは100~150bpの断片が主に得られた(図-3)。一方、NEBNext dsDNA Fragmentaseは、反応時間5分では7~8kbp, 10分では500bp~7kbp, 15分では500bp~5kbp, 20分では400bp~2kbp, 25分では300bp~1.5kbp, 30分では300~500bpにモードがあった(図-4)。

例えば、次世代シーケンサーとしてMiSeq (illumina) を用いる場合は、300bpのDNA断片を読めるので、Shearaseの場合は0.5U/20 μ lの条件で、Fragmentaseの場合は37 $^{\circ}$ C・30分の条件での断片化が望ましい。

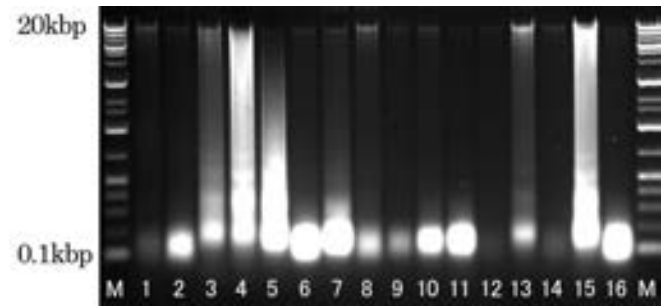


図-1. 単離 DNA の泳動像 (一部)
1~16: 供試サンプル
M: 0.1~20 kbp ladder

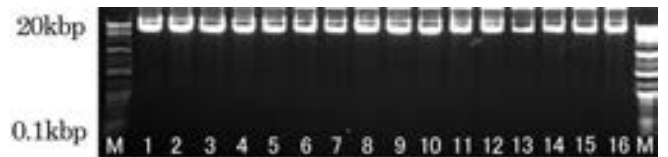


図-2. long-PCR の結果 (一部)
1~16: 供試サンプル
M: 0.1~20 kbp ladder

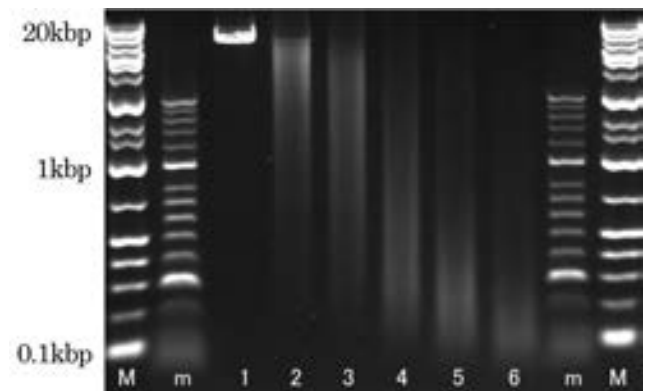


図-3. dsDNA Shearase Plus による断片化
1: PCR 産物
2~6: 断片化処理 (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 U / 20 μ l)
M: 0.1~20 kbp ladder
m: 100 bp ladder

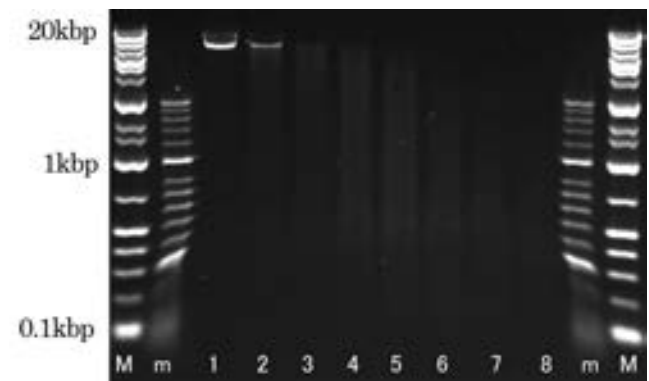


図-4. NEBNext dsDNA Fragmentase による断片化
1: PCR 産物
2~8: 断片化処理 (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 分)
M: 0.1~20 kbp ladder
m: 100 bp ladder

引用文献

- (1) 環境省 (2014) 鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律：第一章第一条.
- (2) 農林水産省 (2013) 全国の野生鳥獣の農作物被害状況について (平成 24 年度) :
http://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/h_zyokyo2/h24/.
- (3) 林野庁 (2013) 平成 24 年度森林・林業白書：109-110.
- (4) 生物多様性評価の地図化に関する検討委員会 生物多様性の地図化に関する検討調査業務報告書 (2012)：113-117.
- (5) 植生学会企画委員会 (2011) 植生情報 15：9.
- (6) Wada, K. *et al.* (2007) *Small Ruminant Res.* 69：46-54.
(2014 年 11 月 7 日受付；2014 年 12 月 26 日受理)