

研究課題：糞 DNA を活用したユニバーサルな個体識別技術の開発

申請者：藤井太一（助教）

所属：中部大学 応用生物学部

1. 研究目的

野生生物の個体数把握は、近年の環境変動に伴う各種動物への影響度合いや、人間活動による直接的影響を把握するために重要な要素の一つであるが、個体数を把握することは非常に困難である。体の模様などから個体識別が可能であれば直接カウントして、個体数を確認・推定可能であるが、多くの動物では見た目からの個体識別は基本的には不可能である。このような背景より、糞 DNA を活用して個体識別を行い、個体数を推定する研究も実施されているが、対象種毎に固有の遺伝子マーカの探索が必要であり、ユニバーサル性に欠けるため、研究が進んでいない希少種の場合には迅速な分析は困難である。そこで、ユニバーサルなゲノム SNPs 取得技術である mig-seq を活用した糞からの個体識別技術を実施した。分析対象種は申請者が別途研究で調査対象としているヒメネズミを用いた。

2. 本分析の想定される課題

この分析の大きな課題は糞中の多種多様な生物由来の SNPs まで検知される点である。本課題採択後、実際に糞から直接 DNA を分析して mig-seq 分析を実施し、検出された DNA 配列全てを対象に claident (Toju et al. 2018) を用いて相同性検索を実施した。その結果、ホスト由来の配列が少なく、バクテリアや採餌物と思われる植物が多く検出された。想定していることではあるが、この夾雑物由来の配列を除去し、ホストの DNA をどれだけ抽出できるかが重要な課題である。

3. 方法

糞からの夾雑物を除去するため、percoll による分画を実施した。percoll は密度勾配を利用した遠心分離によって細胞の重さで分画することが可能である。本研究では 80%、40%、30%、20% の percoll を準備し、15ml 遠沈管にゆっくりと重層した。その後、上部に糞を DNA フリーの超純水で希釈した溶液を重層し、スイングローター遠心機でアクセル、ブレーキを最低に設定した後、30分遠心した。その後、80-40%の間の層 (A 層)、40-30%の間の層 (B 層)、30-20%の間の層 (C 層) として抽出し (図 1)、各層内容物より DNA を抽出した。

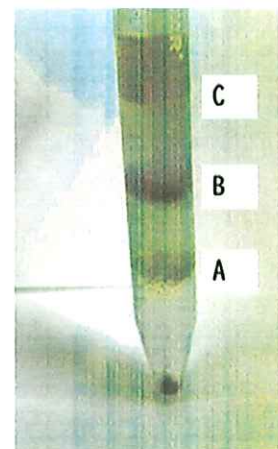


図 1

ここで、細胞の分画を確認するため、各層の一部を顕微鏡で観察した結果、A層には採餌物断片と思われる思い物質、B層には細胞断片と思われる物質、C層には糞粒子？と思われる同定困難な細かい粒子が確認された。しかし、顕微鏡観察の結果、percollによる分画は有効だが、除去しきれていない物質の混入が確認された。そこで、Chiou and Bergey (2018)の方法を参考に微生物由来のDNAをさらに除外するため、NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kitを用いて微生物由来と推定されるメチル化構造を持たないDNAを除去した。この作業により核ゲノム由来のDNAを濃縮可能である。本研究ではpercollで分画後のA,B,C層由来のDNA溶液と、それをNEBNext Microbiome DNA Enrichment Kitで精製したDNA溶液を準備し、mig-seq分析を実施した。さらに宿主由来の配列かそれ以外かを判定するため、ヒメネズミの毛からもDNAを抽出し、これもmig-seq分析を行った。そして得られた生配列を一般的なmig-seqのプロトコールに従って分析した。

4. 結果

4-1. 微生物由来 DNA の除去確認

PercollとNEBNext Microbiome DNA Enrichment Kitによる効果を検証するため精製前のDNA溶液、精製後のDNA溶液についてChiou and Bergey (2018)の方法を参考にqPCRを活用して微生物由来のDNA濃度を測定した。この時、primerにはバクテリアをユニバーサルに増幅させるものを利用した。その結果、バクテリア由来のDNAを4-16倍程度除去していることを明らかにした。なお、宿主であるヒメネズミ由来のDNA配列を測定するための固有のprimerが存在しておらず、Chiou and Bergey(2018)で哺乳類ユニバーサルと紹介されていたprimerではヒメネズミのゲノム増幅が確認されなかった。そのため、対象種DNAの濃度については分析できなかった。

4-2. Novaseq X plus による塩基配列決定

イルミナ社のNovaseq X plusにて塩基配列解読を実施した(外注:日本ジェネティクス Novaseq X Plus レーンシーケンス)。得られた配列についてfastpを用いてmig-seq primerおよび低品質配列などの配列を除去し、vsaerchで配列長を均一化した。その後、stacksにてSNPsを取得した。本研究ではmig-seq分析用primerにてPCR断片増幅後、NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (takara)を用いて300-800bpを回収した。これは外注先のクオリティーチェック(QC)でも確認済みである。しかし、fastpによるfastqデータ分析の結果、ポリGやポリAが全リードの約6~7割を占めており、何かしらの問題が生じている可能性が示唆された。この原因の詳細は不明であるが、Novaseq X plusのような2色法による塩基配列決定方法の場合、いくつかの原因によって解析が検出する蛍光シグナルが検知されなくなると上記の問題が生じることがイルミナ社より発表されている。本分析では業者によるQC結果では短い断片の混入は無

いはずなので、その他の何かしらの問題が発生したものと示唆される。ポリ G やポリ A などの配列を除去してもある程度のリード数（約 10 万～100 万リード）を得られていたため、fastp のオプションコマンドにてこれら配列を除去し解析を続行した。

4-3. Mig-seq 分析

最終的に毛 DNA, 糞 DNA, percoll による分画および NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit の精製, 全ての結果が揃った個体番号 AG31 由来の結果を分析した。その結果, 糞から直接 DNA を抽出したサンプル, percoll による分画したサンプル, NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit の精製ともに, ヒメネズミ毛由来の遺伝子座と一致せず, それぞれの手法毎に固有の配列情報が検出されていた。そこで, 複数のサンプルに共有して検出し, かつ各サンプル総リードに対して 0.001%以上のリードアバUNDANCEを持つ配列を抽出し, claident を用いて相同性検索を実施した。その結果, 糞由来の DNA はどの処理由来からも多量の細菌の検出が見られた。ただし, 精製工程を経たサンプルは細菌の数が減少している傾向が見られた。特に 40-30%の間の層 (B 層) の活用が有効だと示唆された。しかし, 本研究では糞から個体識別が出来るまでの精度には至らなかった。

5. 結論

本研究より, 糞から直接 mig-seq 分析を行うと糞中の多量の微生物由来配列が検出するため, これらを除去する工程の必要性が示された。本研究では percoll および NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit による精製による効果を検証した。その結果, 一定の効果をj得ることが可能であった。本研究では改良 mig-seq 手法と同様に PCR アニール温度を下げて分析を進めた。その結果, 細菌類の配列に primer がアニールした結果, ノイズ配列が増加している可能性が考えられる。そこで, 原著の mig-seq 同様にアニール温度をより高く設定するなどの処理を今後検証する予定である。また, PCR 断片サイズについては, 磁気ビーズによるサイズセレクションではなく, ブルーピッペンや電気泳動ゲル切り出しなどを活用してより厳密な手順で分析する予定である。

[引用]

Toju, Hirokazu, Akifumi S. Tanabe, and H. S. Ishii. "Ericaceous plant-fungus network in a harsh alpine-subalpine environment." *Molecular Ecology* 25.13 (2016): 3242-3257.

Chiou, Kenneth L., and Christina M. Bergey. "Methylation-based enrichment facilitates low-cost, noninvasive genomic scale sequencing of populations from feces." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1975.