

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21646

研究課題名(和文) 貝殻のミューゼオミクス：博物館の収蔵標本を活かすための実験的研究

研究課題名(英文) Shell museomics: Experimental study to utilize museum collections

研究代表者

佐々木 猛智 (Sasaki, Takenori)

東京大学・総合研究博物館・准教授

研究者番号：70313195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、博物館に収蔵されている貝殻標本からDNAを抽出することにより、古典的な博物館標本の新しい活用法を検討することである。貝類は種多様性・形態学的多様性が高く、しばしば収集の対象とされるため、各地の博物館に大量の標本が収蔵されている。それらを分子系統解析に用いることを想定して様々な分類群で実験を行った。本研究の結果から言えることは、どのような種でも貝殻からDNA抽出をすることは可能であるが、抽出効率手法によって異なる。目的とする種以外の種のDNAが増幅されることもあり、データの信頼性について検証作業が必要である。DNAが貝殻中になぜ保存され得るかという点は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA用のサンプルの保存には冷凍が理想的であるが、大量の標本を非常に長期に亘って博物館で冷凍収蔵することは現実的ではない。もし乾燥標本もDNA研究に使用することができれば、幅広い分野で博物館標本を活用できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate methods to utilize museum specimens by extracting DNA from shells in museum collections. Due to their high species and morphological diversity, shells are often the subject of collections, and a vast number of specimens are stored in museums in various regions. We conducted experiments in a variety of taxa with the intention of using them for molecular phylogenetic analysis. The results of this study indicate that DNA can be extracted from shells of any species, but the extraction efficiency depends on the method. The question of why DNA can be preserved in shells is a topic for the future.

研究分野：貝類学、博物館学

キーワード：博物館 貝殻 DNA

1. 研究開始当初の背景

本研究「ミュージオミクス：博物館の古い収蔵標本を活かすための実験的研究」の目的は、博物館の収蔵標本を DNA 解析に活用し、博物館における標本のより良い保存法あるいは利用法の検討に役立てることである。「ミュージオミクス museomics」は 2010 年代に入って提唱された新しい概念である（論文としては 2013 年が最初: Guschanski et al., 2013）。「オミクス」とは生体中に存在する分子全体を網羅的に研究する学問を差し、ゲノム全体を研究する場合はゲノミクス、タンパク質全体を対象とする場合はプロテオミクスのように使用する。従って、ミュージオミクスとは博物館の標本から抽出可能な DNA やその他の生体分子全体を対象とする研究を意味する。日本の博物館では、膨大な数の自然史標本が蓄積されており、特に貝類では大量の乾燥貝殻標本が存在しているが、それらから DNA 情報を抽出し活用する研究は限定的である。そこで、実際に博物館の収蔵標本から DNA の塩基配列データを取得する実験を行い、博物館標本を用いた研究技術を向上させることを目指した。

2. 研究の目的

分子生物学的な情報を得るためには、動物体組織を用いることが一般的である。一方で、近年貝殻から DNA 情報を抽出する試みがいくつかなされているが、研究例が限定的であるため、どのような条件で処理を行えばよいか、必ずしも明らかではない。そこで、本研究では、博物館に収蔵する貝殻試料から DNA を抽出し、解析するための方法を模索し、分類学、系統学に活用することを試みる。

3. 研究の方法

本研究の研究材料には博物館に収蔵されている液浸標本(99%エタノール)、乾燥貝殻標本、および、新規にフィールドで採集した生体標本を用いた。

貝殻から抽出した DNA 情報が適正なものであるか評価するため、参照用の配列データを動物体から取得し比較した。一部の種は次世代シーケンサを用いてミトコンドリアゲノム配列を決定した。

貝殻 DNA の抽出方法の評価には、ハンマーで破碎した貝殻を用いた。漂白溶液処理の有無、キレート剤 EDTA による脱灰の有無、タンパク質分解酵素 (Proteinase K) 処理の有無の 8 通りの組み合わせで評価を行った。さらに、Phenol/Chloroform 法と Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit を用いた抽出の 2 種類の DNA 抽出法を行った。

貝殻から抽出した DNA はミトコンドリアのチトクローム c 酸化酵素 I (COI) 遺伝子と 12S-rRNA (12S) 遺伝子を対象に、ユニバーサルプライマーと、より特異的なプライマーを用いて増幅し、PCR 産物をサンガーシーケンスで解読した。動物体から取得した塩基配列と比較し、さらに NCBI の BLASTn 検索により、配列データの同定の妥当性を確認した。

4. 研究成果

(1) DNA の保存条件の検討 (西本・他, 2020)

博物館において液浸標本を研究に利用することを想定して、固定方法および固定期間が生化学的組成に与える影響を評価した。

材料にアサリの動物体を用い、それらを加熱処理の有無、90% エタノールの有無、保存温度 4 °C および -20 °C の組み合わせで処理した。保存期間は 0-100 日とし、一定期間ごとに DNA、タンパク質採取量を調査した。

DNA 採取量は、すべての保存条件において 30 日経過すると DNA の加水分解によると考えられる急激な減少が見られた。それ以上の保存期間については保存条件によって脱水による単位質量あたりの DNA 採取量の増加や腐敗による DNA 採取量の減少は見られたが、本研究の結果からは、保存期間が 90 日まではエタノール中に試料を保存することで保存温度の影響を受けづらく、また -20 °C で保存することで温度以外の保存条件の影響を受けづらいことがわかった。

タンパク質採取量は、80 日までは保存温度やその他の保存条件によって腐敗や変性などの原因は異なるものの、緩やかに減少した。しかし、それ以上の保存期間では、保存温度やその他の条件に関係なく安定して得られる可能性がある。また、タンパク質採取量には加熱の有無は影響しなかった。

本研究の結果からは、試料の保存は -20 °C でエタノール中に保存することにより DNA やタンパク質を安定して得られると考えられる。しかし、これらの結果は 100 日間と短期間影響の結果であるため、博物館での長期的収蔵条件下とは異なる可能性がある。

冷凍庫自体が故障する可能性があることに加え、日本では台風や地震による停電のリスクがあり、標本を長期冷凍で収蔵することは危険である。大量の博物館標本を -20 °C で保存することは多くの博物館で現実的ではないため、必要な場合に特別なサンプルのみ冷凍保存を検討する価値がある。

(2) 博物館収蔵標本および新規採集標本の動物体を用いた DNA 塩基配列の決定

① DNA バーコーディング：貝殻 DNA との比較するための参照配列を得ることを目的として、和歌山県産の貝類の標本の動物体から COI 遺伝子の塩基配列を取得し報告した (Setiamarga et al., 2019)。

② ミトコンドリアゲノム配列の決定：ミトコンドリアゲノムの全長配列を 2 種決定し、報告した (腹足綱マツバガイ *Cellana nigrolineata*: Nakashima et al., 2021; 頭足綱アオイガイ *Argonauta argo*: Hirota et al., 2021)

③ カサガイ類のアオガイ属 *Nipponacmea* 9 種の 4 遺伝子 (COI, Cytb, 12S, 16S) の塩基配列データを用いて分子系統解析を行い、その結果を形態形質と比較し、種分類に問題がないことを確認した (Teruya et al., 2022)。

④ 頭足綱オウムガイの貝殻基質タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、タンパク質のドメイン構造について報告した (Setiamarga et al., 2021)

これらの研究に用いた証拠標本は東京大学総合研究博物館に登録されている。

(3) 貝殻からの DNA 抽出実験：マツバガイ、イソヒナ、バイ等の腹足類を用いて、貝殻から DNA (ミトコンドリア DNA の COI, 12S) を抽出する実験を行った。

① 貝殻 DNA 抽出を、漂白剤による有機物除去の有無、EDTA による酸処理の有無 (予備実験の結果から貝殻の溶解には塩酸よりも EDTA の方が適していることが明らかとなったため、本実験では全て EDTA を用いた)、プロテアーゼ K 処理の有無の組み合わせにより実験し、取得された塩基配列データを比較した。

結果は、(i) 漂白処理無で抽出キットを用いる手法が塩基配列解読の成功率が最も高いが、解読された塩基配列に別種のもが含まれていた。(ii) DNA 抽出は、CTAB-フェノールクロロホルム法より抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit) を用いた方が結果が良好であった。(iii) 成功率は用いるプライマーによっても影響を受けていた。ユニバーサルプライマーを用いると付着生物、貝殻中の穿孔生物等のコンタミネーションが増えやすい。

② コンタミネーション：サンプルによっては別種の DNA 配列が得られたものがあつたが、これは貝殻表面の付着生物や穿孔生物等が由来の DNA 配列である可能性が考えられる。従って、付着生物由来のコンタミネーションを防ぐためには最外層を確実に取り除くか、最外層以外の殻層を用いる方が確実性は高い。あるいは、最外層を用いる場合には漂白処理を行うなどの条件検討が必要であると考えられる。

殻内には穿孔性生物 (多毛類、藻類、海綿等) が微小な孔を開けていることも多い。穿孔痕には様々な生物由来物質が入り込んでいると予想されるが、それらは貝殻の最外層のみだけでなく中層の一部にも存在する可能性がある。

本研究では漂白処理の濃度や時間による影響は十分には検討できていない。しかし、溶液の濃度が極端に低い場合や短時間の場合には良い効果が得られなかった。漂白処理には有機物が十分に溶解する程度の濃度と時間が必要である。

③ データの信頼性：実験の結果から言えることは、貝殻から DNA 抽出をすることはどのような種でも可能である。ただし、それが正しい配列であるかを検証する必要がある。実際に、本研究の一部の実験では外来 DNA の配列が得られたことから、貝殻 DNA の研究には検証作業が必要であると考えられる。複数個体を用いて実験し結果が一致するか、あるいは繰り返し実験し同一の結果が得られるか、軟体部由来 DNA と貝殻由来 DNA でデータが一致するかなど、確認することが重要である。

特にユニバーサルプライマーを用いると様々な種の配列が増幅される可能性がある。そのため、動物体から抽出した DNA の配列と比較が重要であり、特定の種を調べる場合は種特異的なプライマーを用いる方がよい。

(4) 今後の課題

貝殻 DNA の問題点のひとつは、貝殻内のどの部分にどのような状態で DNA が存在しているか不明なことである。外套膜からはがれ落ちた細胞や外套膜からの分泌物、粘液等が殻の結晶の間にトラップされ、その中に DNA が含まれているものと予想しているが、現時点で確認はない。貝殻内に有機物が存在していることは貝殻を部分的に溶解することにより観察できるが、その有機質部分に DNA が含まれると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakashima, S., Shimizu, M., Hirota, K., Hiruta, S. F., Nakaji, N., Fujita, T., Sasaki, T. and Setiamarga, D. H. E.	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete mitochondrial genome of the Pacific limpet <i>Cellana nigrolineata</i> (Gastropoda: Patellogastropoda) determined by shotgun sequencing using the Illumina NGS platform.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 1857-1859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2021.1934579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Setiamarga, D. H. E., Hirota, K., Yoshida, M., Takeda, Y., Kito, K., Shimizu, K., Isowa, Y., Ikeo, K., Sasaki, T. and Endo, K.	4. 巻 12:1925
2. 論文標題 Hydrophilic shell matrix proteins of <i>Nautilus pompilius</i> and the identification of a core set of conchiferan domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12121925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teruya, S., Setiamarga, D. H. E., Nakano, T., and Sasaki, T.	4. 巻 1087
2. 論文標題 Molecular phylogeny of <i>Nipponacmea</i> (Patellogastropoda: Lottiidae) from Japan: Reevaluation of species taxonomy and morphological diagnosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ZooKeys	6. 最初と最後の頁 163-198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/zookeys.1087.78193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirota K, Yoshida MA, Itoh T, Toyoda A, Setiamarga DHE	4. 巻 6
2. 論文標題 The full mitochondrial genome sequence of the greater argonaut <i>Argonauta argo</i> (Cephalopoda, Argonautoidae) and its phylogenetic position in Octopodiformes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 1451-1453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2021.1911710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Setiamarga, D. H. E., Nakaji, N., Iwamoto, S., Teruya, S. & Sasaki, T.	4. 巻 17
2. 論文標題 DNA barcoding study of shelled gastropods in the intertidal rocky coasts of central Wakayama Prefecture, Japan, using two gene markers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of GEOMATE	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21660/2019.62.4521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西本真琴, 大原珠海, 山本真生, 佐々木猛智, Setiamarga DHE.	4. 巻 OES28-0045
2. 論文標題 海棲動物液浸標本の 博物館保存科学:アサリの液浸標本の生化学的組成変化を例に	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 和2年第 28 回海洋工学シンポジウム論文集	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西本真琴, 大原珠海, 山本真生, 佐々木猛智, Davin H. E. SETIAMARGA
2. 発表標題 海棲動物液浸標本の博物館保存科学:アサリの液浸標本の生化学的組成変化を例に
3. 学会等名 第28回 海洋工学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ミトコンドリア由来12S-rRNA遺伝子を用いた有殻腹足類の博物館標本のDNAバーコーディング
2. 発表標題 中島理子, 中路 渚, Do Van Tu, 佐々木猛智, Davin H. E. SETIAMARGA
3. 学会等名 第28回 海洋工学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	スティアマルガ デフィン (Setiamarga Davin) (50625259)	和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授 (54701)	
研究分担者	川島 武士 (Kawashima Takeshi) (10378531)	国立遺伝学研究所・情報研究系・助教 (63801)	
研究分担者	藤田 敏彦 (Fujita Toshihiko) (70222263)	独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・部長 (82617)	
研究分担者	西秋 良宏 (Nishiaki Yoshihiro) (70256197)	東京大学・総合研究博物館・教授 (12601)	

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
---------	---------