

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：80101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K13248

研究課題名（和文）DNA半減期の解明 生物標本の保存環境と分析可能性について

研究課題名（英文）The half-life and analyzability of DNA in museum specimens

研究代表者

表 溪太（Omote, Keita）

北海道博物館・研究部・学芸主査

研究者番号：70761659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,400,000円

研究成果の概要（和文）：博物館等の標本に含まれるDNAの分析可能性と保存環境について明らかにするために、試料を様々な条件下に長時間おいて、残存DNAのモニタリングを行った。その結果、DNA半減期は保存環境と断片サイズに依存すること、また、経過時間の早い段階では見かけ上の半減期が非常に短くなることを確認した。この現象は試料中でDNA損傷速度の異なる部位が混在することが要因であった。先行研究ではDNA半減期が一定だという前提で解析を行っており、誤差が大きくなる可能性がある。さらに、古い剥製標本を用いることでより長期的な半減期についても解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、DNA分析が古い標本でも可能になったことで、博物館等の標本が様々な分野で利用されるようになっていく。しかし、DNAは時間の経過とともに分解していくため、分析成功率は徐々に低下していく。どのような条件下でDNAの分解がどの程度の早さで進むのかについては、ほとんど定量的な研究が行われていなかった。本研究の成果に基づいて、標本の年代や保存環境等から残存DNAの状態を推定することで、より効率的・確実な分析が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：For clarifying analyzability of DNA in old museum specimens under various conditions, I studied temporal change in quantity and fragment size of DNA. The DNA half-life depends on storage environment and fragment size, and that the apparent half-life is very short at early stage. This phenomenon is caused by the mixing of sites with different rates of DNA damage in the sample. Previous studies have been analyzed on the assumption that the DNA half-life is constant, and the error may be large. In addition, I analyzed longer term DNA fragmentation in old specimens.

研究分野：生物学

キーワード：博物館標本 古代DNA 資料保存

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA 分析の技術の進歩にともない、生物標本に新たな価値が見いだされるようになってきている。従来は生体サンプルが必要であった分析が、長期間保存されていた標本から得られる微量のサンプルからでも可能になったことにより、形態学的な研究利用に限られていた標本が様々な分野で利用されるようになった。

DNA 分子は比較的安定とされてはいるが、時間の経過とともに着実に分解が進行する。DNA の分解には紫外線・酵素・水分・温度等の条件が関わっており、その残存量は保存環境や経過時間に大きく左右される。しかしながら、どのような条件下で DNA がどれだけの早さで分解するのかについては、ほとんど定量的な研究が行われていなかった。

そのため、標本を用いて分析を行う研究者は、その標本にどれだけの DNA が残存しているのか分からない状況で、その都度手探りの実験を強いられる。もし、標本の年代・状態・保存環境等から DNA の残存量を推算することができれば、より効率的・確実に分析を進めることが可能になる。

2. 研究の目的

博物館等に保管されている生物標本を用いた DNA 分析のために、DNA の残存量および断片サイズを概算する手法を開発する。そのために、経過時間・温湿度・光環境等の条件に応じた DNA の半減期の解明を目的とした。

DNA 分析では最低限の量の DNA が残存していることに加えて、DNA 断片のサイズが問題になる。PCR による DNA 増幅では断片サイズが小さくなるほど増幅が難しく、断片サイズに適合したプライマーが必要になる。次世代シーケンサーを用いればある程度断片化した DNA も解読が可能ではあるが、いずれの方法でも断片サイズが 50bp 未満になると分析が困難になる。現状ではそれぞれの標本に対して手探りで実験を進めなくてはならないが、特に貴重な古い標本では DNA 分解が進んでいることに加え、使用できる試料の量がごく限られている場合が多く、効率的なサンプルの利用が求められる。

3. 研究の方法

本研究では、比較的件数が多く他分野への応用も見込まれる乾燥標本を対象とし、特に条件をそろえた実験が容易なニワトリの羽軸を試料として用いた。

(1) 温湿度・光環境等の効果の検証

DNA の分解に各要因がどの程度関わるのかを明らかにするために、新鮮な試料を用いて対照実験を行った。温度(常温・低温・高温)、湿度(多湿・乾燥)、光環境(暗所・光照射・紫外線照射)等、対照条件下にサンプルをおき、数週間から数ヶ月毎に DNA の残存量および断片サイズを確認した。そして、実験開始時の DNA 量を基準とした経時的な DNA の減少率のデータから、各条件下での DNA 分解の早さを算出した。

(2) 長期保存された標本を用いた DNA 半減期の推定

博物館等に長期間(数年~100年程度)保管されている剥製や骨格等の乾燥標本から各部位のサンプルを採取した。標本から DNA を抽出し、DNA 量および増幅可能な DNA 断片サイズの測定を行う。DNA 増幅は、細胞あたりの DNA 量が比較的多いミトコンドリア DNA を対象に行い、コンタミネーションでないことを確認するためにシーケンスを解読した。

得られた DNA の残存量・断片サイズと標本の作製年代等の情報から、DNA 半減期を推定した。

4. 研究成果

(1) 見かけ上の半減期の変化について

一般的に DNA が一定の半減期をもつと仮定して、時間 : t における DNA の残存量 : $f(t)$ は、DNA の塩基対あたりの損傷率: λ 、対象の DNA 断片の長さ: L を用いて次のように表される。

$$f(t) = f(0) e^{-\lambda L t} \quad (1)$$

しかしながら、羽毛を用いた予備実験で、経過時間と DNA 残存量の関係を分析したところ、半減期の推定値が時間とともに変化するという結果になった。特に経過時間の早い段階では、見かけ上の半減期が非常に短い値を示した。これを説明する仮説として、羽毛の表面と内側などサンプルのぐくわずかな部位の違いによって光や空気への曝露の程度に差があるなど、DNA 損傷率の異なる部位が混在することが原因でないかと予想した。これをごく単純化し、 $f(t)$ が損傷率の異なる 2 つの部位からなると見なすと、以下のように表せる。

$$f(t) = f_1(t) + f_2(t) = f_1(0) e^{-\lambda_1 L t} + f_2(0) e^{-\lambda_2 L t} \quad (\lambda_1 > \lambda_2) \quad (2)$$

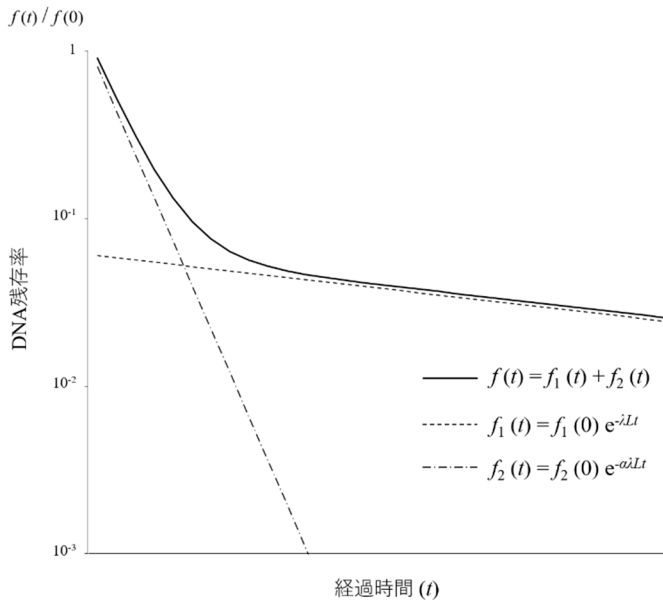


図1 DNA半減期の見かけ上の変化に関するモデル

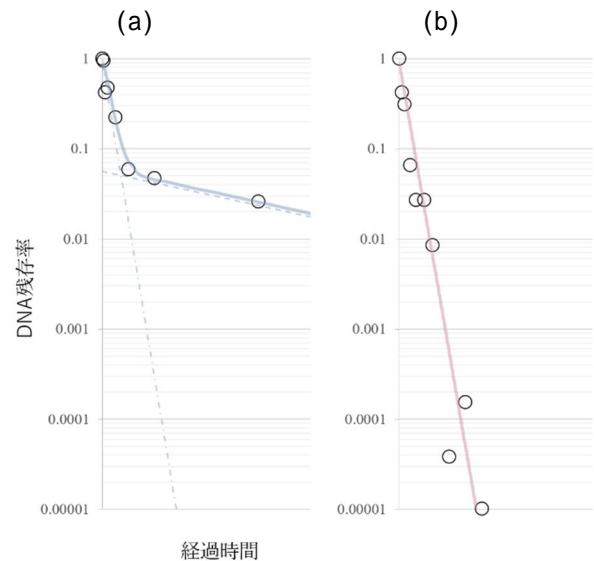


図2 対照実験での実測値 (L: 251 bp)
(a) 未処理試料、(b) 溶解済試料

実際に対照実験を行ったところ、未処理の試料を紫外線に曝露した場合には DNA の残存率の変化が式 () に適合するのに対し、溶解してマイクロレベルで均一化した試料を紫外線に曝露した場合は、理論値に近い一定した半減期をもつことを確認できた(図2)。式 () において、時間 t が十分大きければ、損傷率がより大きな $f_2(t)$ は $f_1(t)$ に対して極めて小さくなり、 $f(t) \approx f_1(t)$ と近似できるようになると予測される(図1)。しかし、生物標本等を用いた分析では、この半減期の見かけ上の変化が DNA の残存量を概算する上で無視できないレベルである可能性が高い。先行研究では、DNA 半減期が式 () に従って一定であることを前提とした解析が行われており、半減期の変化に着目した解析は、本研究に独自である。

(2) 長期保存された標本における分析可能性について

研究期間における実験に加えて、博物館に 50~100 年程度保管されてきた剥製標本を用いて経過時間と PCR 増幅が可能な DNA 断片の最大サイズを測定した(図3)。その結果、標本中の DNA は初期に急激に断片化が進み、その後は緩やかに分解していくことが明らかになった。100 年以上が経過した剥製標本では、ほとんどの場合で PCR 増幅が可能な DNA 断片サイズは 100 bp 以下となっていた。DNA 半減期は断片サイズや保存環境に依存するが、一例として、剥製標本の羽毛では、250 bp 程度の断片サイズでは、数年の半減期をもつと算出された。

博物館には利用されることなく収蔵されている標本が多数あるが、こうした資料は適切に管理しなければ時間とともに遺伝学的な情報を失っていく。本研究の成果によって、標本の年代や保存環境等から残存 DNA の状態を推定することで、分析手法の選択の目安になるなど、より効率的・確実な分析が可能になると期待される。そこで、標本等の活用を促すとともに、DNA の保存に最適な条件を公開、普及することで、様々な分野で利用される可能性をもつ標本の価値の維持に努めていきたい。

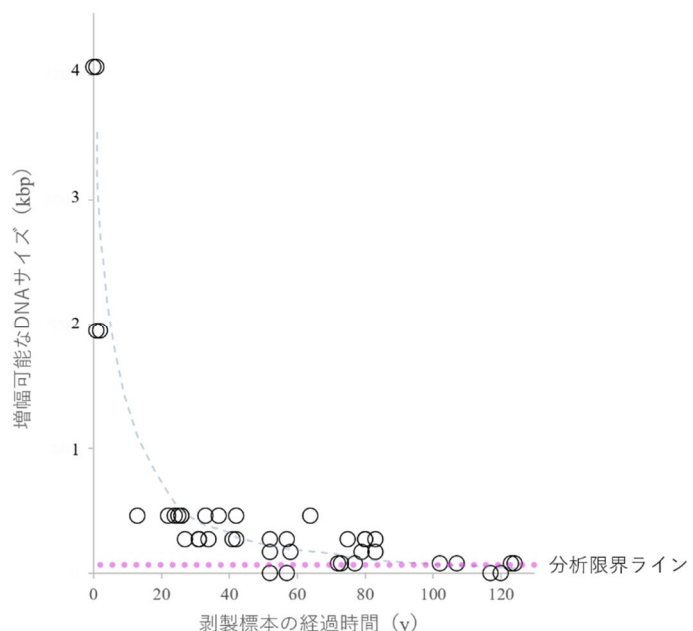


図3 剥製標本の経過時間と PCR 増幅に成功した DNA 断片の最大値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 表溪太
2. 発表標題 鳥類の剥製標本を用いた保全遺伝学的研究
3. 学会等名 種生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 表溪太
2. 発表標題 鳥類剥製標本におけるDNA半減期について
3. 学会等名 日本鳥学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 種生物学会編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文一総合出版	5. 総ページ数 230
3. 書名 博物館標本の生態学 過去・現在・未来をつなぐ（予定）	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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