

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

2023 年 6 月 2 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 理学研究科

職 名 特定研究員

氏 名 杉田 典正

助 成 の 種 類	令和4年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	鳥類標本の非破壊的DNA抽出法の開発と日本産鳥類を網羅した生物多様性解析への応用			
上記以外で助成金を 充 当 した 研 究 内 容	関連する古い鳥類標本DNAを用いた集団遺伝学的生物多様性解析への応用			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 国立科学博物館・研究主幹・西海功、山階鳥類研究所・研究員・山崎剛史			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	471,040	
		旅費	280,810	
人件費(謝金)		36,400		
その他	221,750			
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 23年度の科研費の採択をえられなかったため、独自研究を進めることができず困っていたが、京都大学教育研究振興財団の助成金により、独自研究を進めることができよかったです。科研費の採択発表時期が以前より早くなったので、より早く助成金も募集時期を始められると良いと思います。			

国内の博物館は、約150年前から自然史標本の収集と保管を続けてきた。標本は古くから分類学や形態学等に活用され多くの研究成果を与えてきた。一方、標本DNAの遺伝解析はDNAの断片化と化学的劣化の問題があり従来のサンガー法シーケンスでは効率が悪く限定的な情報による研究成果が多かった。近年、次世代シーケンサーによる解析技術の発展により、古いDNAでも比較的容易に多くのDNA配列を得られるようになった。

しかしながら、古い貴重な標本を遺伝子解析等の研究へ利用するとき、大きな壁があった。従来の標本のDNA抽出法は、標本組織を一部切り取り標本を不可逆的に破壊してしまう。この問題は、標本を利用したい研究者と標本を保管管理する博物館の担当者との間で軋轢を生じさせていた。したがって、標本の非破壊DNA抽出法の開発が進められてきた。これまでに昆虫類と植物の乾燥標本からの非破壊DNA抽出法が開発された。

従来の鳥類標本のDNA抽出は、脚指裏のフットパッドと呼ばれる皮膚組織と内部の筋肉や腱を切り取る方法が用いられてきた。この方法は、標本を不可逆的に破壊するため、研究者側と標本管理者側との意見の相違があり標本の利用性は低かった。そこで、本研究は、鳥類標本の非破壊的DNA抽出法の開発に取り組んだ。本研究は、鳥類標本の利用可能性を高めることで、標本の研究への活用を促進させる。標本の価値を高める効果も期待できる。

方法

大型鳥類のキジの標本を用いて非破壊DNA抽出法の開発を試みた。国立科学博物館所蔵の標本3点（NSMT-A10827, 12580, 2020-65）。採集年はそれぞれ1928、1931、2020年であり、古い標本でも本手法が利用可能か検証した。

キジ標本の腹側の皮膚にDNA抽出緩衝液（Tris-HCl [pH8.0]とEDTA[pH8.0]から成る緩衝剤にタンパク質変性と分解作用のある尿素、SSD、プロテイナーゼKを含んだ水溶液）約30 μ lを置いて、30分間静置した。規定の時間経過後、緩衝液を回収し、微量DNA用カラム式DNA抽出キットを用いてDNAを精製した。得られたDNAは、FFPE repair kitでウラシル化等の変異を修復した。微量DNA用の次世代シーケンサーライブラリー作成キットを用いて、ライブラリーを作成した。他のサンプルのライブラリーを混合し濃度調整後、外部の業者にHiSeq Xによるシーケンシングを委託した。

結果研究成果

標本3点の内、2標本で非破壊的に抽出したDNAからミトコンドリアDNA全配列約16,700bpを復元することができた。採集年1931年の標本（12580）は、約300万リードが得られ、このうち2,936リードからmtDNAの断片から復元された。採集年2020年（2020-65）は、約2000万リードが得られ、3,393リードから復元された。どちらもカバレッジが高く信頼性のあった。

今後の見通し

本研究は極めて容易な方法で、鳥類標本の非破壊的DNA抽出が可能であり、得られた標本DNAからミトコンドリアDNAのほぼ全領域を復元できることを示すことができた。約100年前の標本からも非破壊的な実験操作でミトコンドリアDNAのほぼ全領域を復元できたことは、博物館標本の研究への活用の促進という点で画期的な成果である。本研究は、研究者が遺伝解析を行うとき、標本由来のDNAが必要になった場合、博物館の標本管理担当者からの使用許可を容易にさせる。今後、本研究を論文として国際学術誌において出版し、分子実験室に常備される通常の試薬のみで標本から非破壊的にDNA抽出可能なことを広報する。また、本手法を用いた鳥類標本のケーススタディを進め、本研究の活用を進める。