HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	昆虫群集組成解析への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法適用の試み
Author(s)	胡, 耀光; 戸田, 正憲
Relation	生物進化研究のモデル生物群としてのショウジョウバエ. 北海道大学低温科学研究所編
Citation	低温科学, 69, 135-143
Issue Date	2011-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/45197
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS69_015.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 69 （2011） 135-143

昆虫群集組成解析への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法適用の試み

胡　　耀光[1)]，戸田　正憲[1),2)]

2010 年 10 月 19 日受付，2011 年 1 月 4 日受理

微生物生態学で，環境中のメタゲノムから直接バクテリア群集を調べるために使われている変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法を，近年その必要性が強く認識され，いろいろな取り組みが行われている生物多様性観測において，大量のサンプルを処理（種同定）しなければならないことが多い昆虫群集に適用できるかどうか，ショウジョウバエ類を材料としてテストした．その結果，PCR 増幅段階でのバイアスが避けられず，PCR-DGGE 法は，限られた条件のもとでの適用（例えば，構成種が既知のある範囲に限られた群集の種組成の解析・比較など）は可能ではあるものの，網羅的な生物多様性観測のための新しい手法としては問題があることがわかった．

A test for applying the method of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to analysis of insect community composition

Yao-guang Hu[1], Masanori J. Toda[1,2]

Applicability of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), which has been used to analyze microbial communities based on metagenomes in environments, to insect communities, as a useful technology for non-experts to easily identify component species in a large amount of samples to be obtained in various projects of biodiversity inventory and monitoring, was examined using some drosophilid species as test materials. As a result, it has been revealed that there are some problems in the process of PCR amplification for applying the PCR-DGGE method to the comprehensive observation of biodiversity, although it can be used under limited situations or conditions.

1．はじめに

近年，地球環境の変動と生物種の大量絶滅が進行する中で，生物多様性のインヴェントリーとモニタリングの必要性が強く認識され，いろいろな取り組みが行われている．例えば，国際的な生物多様性観測のネットワークとして，GEO BON: GEO Biodiversity Observation Network (http://www.earthobservations.org/geobon.shtml) があり，それを支える地域・国内ネットワークとしての AP-BON: Asia-Pacific Biodiversity Observation Network (http://sites.google.com/site/asiapacificbon/) や J-BON: Japanese Biodiversity Observation Network (http://www.j-bon.org/first_workshop/jbonws) が動き出そうとしている．

これらの生物多様性観測において，最も重要でありながら困難な問題は，種レベルの情報を如何に効率よく蓄積するかにある．生物学（生物多様性）の世紀と言われる 21 世紀のスタートを記念して設定された国際生物多様性観測年（IBOY: International Biodiversity Observation Year）に行われた，西太平洋・アジア地域生物多様性一斉観測（DIWPA-IBOY，2001～2003 年）では，観測手法を標準化して（Nakashizuka and Stork, 2002; http://diwpa.ecology.kyoto-u.ac.jp/diwpa_iboy/iboy_manuals.html）比較可能なデータを蓄積することを目指した．森林生態系の無脊椎動物の多様性観測には，東シベリアからタスマニアに至るほぼ地球を縦断するトランセクトに沿って，26 の観測サイトが設置され，標準化された方法でサンプリングを行った（戸田，2002）．しかしながら，得られた貴重かつ膨大なサンプルは，多くのサイトで，高次分類群（多くは目）レベルでソートされたにとどまり，所期の目的である種レベル

1）北海道大学低温科学研究所
2）北海道大学総合博物館
[1] Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan
[2] Hokkaido University Museum, Hokkaido University, Sapporo, Japan

の比較可能なデータを蓄積することが達成されたとは言い難い．

最大の障壁は，膨大なサンプルの種レベルの同定作業である．生物（昆虫）相の解明が進んでいない熱帯域に関しては，分類学的研究の進展を待つしかないが，相当程度にわかっている温帯域といえども，サンプルの量が膨大になると，種レベルの同定はそう簡単ではない．例えば，DIWPA-IBOY のコアーサイトの一つである北海道大学苫小牧研究林で，ライトトラップで採集された全（126）サンプルには，鱗翅目昆虫が 892 種，51,742 個体，鞘翅目が 355 種，11,633 個体含まれていた（Hirao et al., 2006）．これらのサンプルは，観測チームに加わっていたそれぞれの目の分類の専門家が，多大な労力と時間をかけて同定してくれたのであるが，一般に，このような作業を専門の分類学者に依頼することは困難である．この難問を解決するためには，複数の種を含んだ大量のサンプルを，迅速かつ簡便に，専門の分類学的知識に頼らないで処理するための新たな手法の開発および導入が不可欠である．

そのための手法の一つとして，形質データベースに基づいてコンピュータ上に構築される（多くの画像情報，あるいは他のデータベースへのリンクを同定の支援ツールとして活用できる），多重入力（あるいは会話）型検索システムがある：Lucid (http://www.lucidcentral.com/), DELTA: DEscription Language for TAxonomy (http://delta-intkey.com/), BioCIS: Biological Classification and Identification System (Toda et al., 2004; 戸田，2007; http://biokey.museum.hokudai.ac.jp/Classification/index.jsp)．これは，従来の二分岐検索表と異なり，検索プロセスの自由度を提供するユーザーフレンドリーな検索ツールである．また，以下に紹介する手法と異なり，ユーザーが同定作業を繰り返すことにより，生物群（種）の特徴を自然に理解し，同定者の能力開発ツールともなり得る利点を備えている．

これを一歩進めると，コンピュータ自動検索同定システムとなる．基本設計は，画像などの情報を取り込む感覚部分，取り込んだ情報を前処理する部分，形質を抽出する部分，抽出した形質によって分類する部分，分類結果を出力する部分から構成される．まさに，人間の分類作業を模したコンピュータロボットである．その中心である，形質抽出，分類過程には，ニューラルネットワークモデルが使われる．このロボットの優れている点として，感覚部分に人間にはないセンサー（例えば，コウモリのエコーロケーションに使われる高周波音声をキャッチするためのセンサー）を使うことができること，疲れないこと・飽きないこと・慣れないこと（人間の場合，これがミスにつながる），同定結果の信頼度を出力できることなどが挙げられる．既にいくつかのシステムが開発され，限られた範囲ではあるが，人間（分類学者以外）以上の成功率を挙げている（MacLeod, 2007）．

最後は，DNA 塩基配列情報の利用である．これにより，分類の専門知識を持たない研究者でも，塩基配列データベースを用いることで比較的容易に種の同定を行うことが可能となってきている．地球上の全生物種を DNA 分子マーカーによって識別しようという国際的プロジェクト〝The Barcode of Life″（Ratnasingham and Hebert, 2007; http://www.barcodinglife.com/views/login.php）が発足しており，動物についてはミトコンドリア *COI* 遺伝子の部分配列（648 塩基対）が標準マーカーに指定され，鱗翅目，魚類，鳥類などについてデータの蓄積が始まっている．しかし，1 個体ずつ DNA を抽出し，標的遺伝子マーカーを増幅し，その塩基配列を決定するのであれば，手間は通常の同定作業の比ではない．多くの種を含んだ大量のサンプルを処理するためには，もっと簡便な方法が求められる．そのような方法は，主に微生物生態学分野において発展してきた．環境中から得られる細菌のメタゲノム DNA から，細菌の種同定に使われる標準遺伝子（*16S rRNA* 遺伝子）を PCR 増幅しさまざまな解析に用いることで，同定が困難な細菌の群集組成や多様性解析が可能になってきた．一般に，環境中における微生物群集の多様性は非常に大きいことが知られている．そのため，その膨大な遺伝子情報を単純化するための方法として，変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis）法のような手法が開発されてきた（Muyzer et al., 1993）．DGGE 法は，DNA 変性剤濃度勾配ゲルを用いて電気泳動を行うことにより，同じ長さの 2 本鎖 DNA 断片であっても塩基配列の違いによって異なる位置にバンドを分離することを可能とする手法である．このように，DGGE 法は比較的迅速かつ簡便な方法であり，個々の分類群をバンドとして可視化できるため群集構造の比較を容易に行うことができる（石井ほか，2000）．

本研究では，PCR-DGGE 法が昆虫に対しても応用できるかどうかを，DNA 情報の蓄積の多いショウジョウバエ類をモデル生物群として評価した．マーカー遺伝子としては，将来網羅的な塩基配列情報の蓄積が期待される BOLD (Barcode of Life Data Systems) の標準配列である *COI* 遺伝子を用いた．この手法の適用に成功すれば，多くの種を含んだ大量のサンプルを，1 個体ずつ種同定をする大変な作業の必要がなくなり，一連の手法を習得した技術者がサンプルから種レベルのデータを短時間に得ることができるようになるものと期待される．

2．材料と方法

2.1　研究材料

本研究では，ショウジョウバエ亜科 Drosophilinae の

表1：実験に用いたショウジョウバエ種

No.*	Genus	Subgenus	Species group	Species subgroup	Species
1	*Scaptodrosophila*		*coracina*		*coracina*
2	*Chymomyza*		*procnemis*		*procnemis*
3	*Drosophila*	*Drosophila*	*virilis*		*virilis*
4	*Drosophila*	*Drosophila*	*immigrans*	*immigrans*	*immigrans*
5	*Drosophila*	*Drosophila*	*funebris*		*funebris*
6	*Drosophila*	*Drosophila*	*repleta*	*hydei*	*hydei*
7	*Drosophila*	*Sophophora*	*melanogaster*	*melanogaster*	*yakuba*
8	*Drosophila*	*Sophophora*	*melanogaster*	*melanogaster*	*simulans*
9	*Drosophila*	*Sophophora*	*melanogaster*	*melanogaster*	*melanogaster*
10	*Lordiphosa*		*miki*		*stackelbergi*

*図3，4の泳動レーン番号に対応．

主な系統群を代表し，さまざまに類縁の程度が異なる10種を試験材料として選んだ（表1）．それらは，最も重要なモデル生物である *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830（キイロショウジョウバエ）とその近縁種である *Drosophila simulans* Sturtevant, 1919 および *Drosophila yakuba* Burla, 1954，比較的祖先的な *Scaptodrosophila* Duda（マメショウジョウバエ属）と *Chymomyza* Czerny（ハシリショウジョウバエ属），また，より派生的な subgenus *Drosophila* Fallén（ショウジョウバエ亜属）のいくつかの系統群などを含んでいる．

2.2 PCRプライマーの設計

ショウジョウバエ科の *COI* 遺伝子に特異的なPCR増幅を行うために使用するプライマーを設計した．COI-a（フォワードプライマー：5'-ATCGCCTAAACTTCAGCCAC-3'）は，*COI* 遺伝子に隣接し，保存性の高い *tRNA (Tyr)* 遺伝子領域の塩基配列に基づいて作成した．COI-b（リバースプライマー：5'-GGATAAAGGTGGATAiACiGTTCA-3'）は，DGGE法を適用できるDNA断片の限界長（約500塩基対）を考慮して，試験種10種を含むショウジョウバエ科34種の *COI* 遺伝子の塩基配列を比較して，COI-aから354塩基離れたところに，*D. melanogaster* の配列を基準として作成した（表2）．*COI* 遺伝子のこの領域には変異サイトが多く含まれており，すべての種に共通する塩基配列のプライマーを設計することはできなかったので，特に3'端側のミスマッチを最小限にするために，ユニバーサルヌクレオチドであるイノシン(i)を2ヵ所に挿入した．また，DGGE法を適用するためのPCR増幅では，バンドの分離能を向上させるために，COI-aの5'末端にGCクランプ（5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'）を付加した．

2.3 実験1

実験の流れを図1に示す．

2.3.1 ゲノムDNAの抽出と鋳型DNAの調整

ゲノムDNAの抽出は，小林・舘（2009）に記載されている方法を用いて行った．

DNA抽出は，二通りの組み合わせのサンプルから行い，それぞれ後述の解析に用いた．一つは，各種の供試成虫1個体から別々にゲノムDNAを抽出し，それぞれ

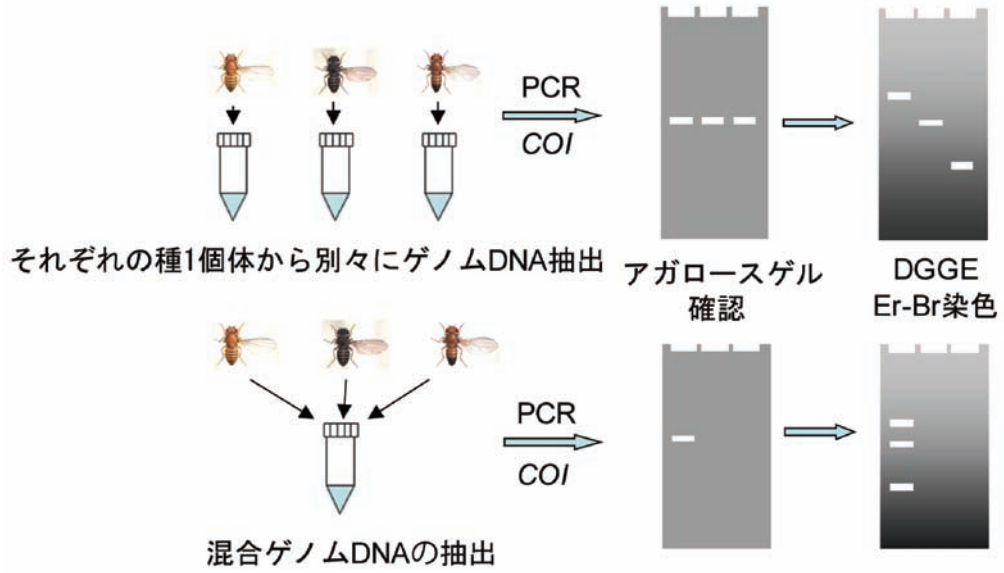

図1：実験1の流れ．

表 2：*COI* 遺伝子断片を PCR 増幅するために設計したリバースプライマー（COI-b）の塩基配列とショウジョウバエ科 34 種の塩基配列の適合性

Primer (COI-b)	5'-	G	G	A	T	A	A	A	G	G	T	G	G	A	T	A	i	A	C	i	G	T	T	C	A	-3'
D. melanogaster*		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	**A**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	
D. simulans		**A**	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	
D. yakuba		**A**	•	•	•	•	•	•	•	•	**A**	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	
D. pseudoobscura		T	•	•	•	•	G	T	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. bifasciata		T	•	•	•	•	G	C	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. willistoni		T	•	•	•	•	•	G	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. paulistorum		T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. nebulosa		T	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. saltans		A	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. emerginata		•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
L. collinella		A	•	•	•	•	•	G	•	•	C	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
L. stackelbergi		**T**	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**G**	•	•	•	•	•	
L. clarofinis		A	•	•	•	•	G	G	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	G	•	•	•	•	•	
L. magnipectinata		A	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	G	•	•	A	•	•	G	•	•	•	•	•	
D. virilis		**T**	•	•	•	•	•	**T**	•	•	**A**	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**T**	•	•	•	•	•	
D. robusta		T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
D. sordidula		C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
D. repleta		T	•	•	C	•	G	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
D. hydei		**T**	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	
D. annulipes		T	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
D. immigrans		**T**	•	•	•	•	•	•	•	•	**A**	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**T**	•	•	•	•	•	
D. funebris		•	•	•	•	•	•	**T**	•	•	**A**	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	
D. maculinotata		A	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	G	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
D. palustris		A	•	•	•	•	•	C	•	•	G	•	•	G	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
D. guttifera		T	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
M. poecilogastra		A	•	•	•	•	G	T	•	•	G	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
H. macromaculata		A	•	•	•	•	•	T	•	•	G	•	•	G	•	•	C	•	•	G	•	•	•	•	•	
H. alboralis		A	•	•	•	•	•	C	•	•	A	•	•	G	•	•	A	•	•	T	•	•	•	•	•	
H. quadrivittata		A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
Di. tenuicauda		•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	G	•	•	T	•	•	T	•	•	•	•	•	
Di. pseudotenuicauda		A	•	•	•	•	A	•	•	•	G	•	•	G	•	•	T	•	•	T	•	•	•	•	•	
Di. acutissima		T	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•	•	
C. procnemis		**T**	•	•	•	•	**G**	**T**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	**A**	•	•	**A**	•	•	•	•	•	
S. coracina		**T**	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	**G**	•	•	**A**	•	•	**T**	•	•	•	•	•	

*太字：供試種．

を〝単一種ゲノム DNA〞とした．もう一つは，10 種の供試成虫をそれぞれ 1 個体ずつ選び，それらを混ぜたサンプルから抽出した DNA を〝混合ゲノム DNA〞とした．

また，混合ゲノム DNA は，鋳型 DNA 濃度の違いによる PCR 増幅への影響を調べるために，濃度を $2^{-1\sim8}$ 倍に希釈した試料を準備した．

2.3.2 PCR 増幅

抽出したゲノム DNA を鋳型とし，作成したプライマーセット（GC クランプ＋COI-a と COI-b）を用いて PCR 増幅を行った．PCR には TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を用い，以下の組成の反応液中で行った：10× EX Taq buffer 2ul，0.2mM dNTP 混合液 1.6ul，10pM 各プライマー 0.4ul，5U/ul EX Taq polymerase 0.2ul，滅菌蒸留水 14.9ul．PCR は，94°Cで 3 分間初期熱変性させた後，94°C30 秒・56.3°C30 秒・72°C 1 分を 30 サイクル繰り返し，最後に 72°Cで 8 分間伸長反応させた．得られた PCR 産物の一部を，1.5%アガロースゲルで電気泳動した．電気泳動後，ゲルをエチジウムブロマイドで染色し，トランスイルミネーター上で UV 照射により目的の増幅産物を確認した．

2.3.3 DGGE 解析

得られた PCR 産物について，DCode system (Bio-Rad) を用い，石井ほか（2000）に解説されている方法に従って，以下の DGGE 条件で塩基配列の違いによる分離を行った．6 %ポリアクリルアミド（アクリルアミド：ビス＝37.5：1）に，5 %～25%の濃度勾配で変性剤（100%変性剤は 7 M 尿素，40%ホルムアミドに相当）を加えたゲルを作成し，0.5×TAE 緩衝液中で，60°C，150 V 定電圧下で 5 時間，電気泳動を行った．泳動終了後，ゲルをエチジブロマイドで染色し，トランスイルミネーター上で UV 照射によってバンドを可視化し撮影を行った．

2.4 実験 2

実験の概要を図 2 に示す．

実験 1 の DGGE で明瞭に分離したバンドをゲルから

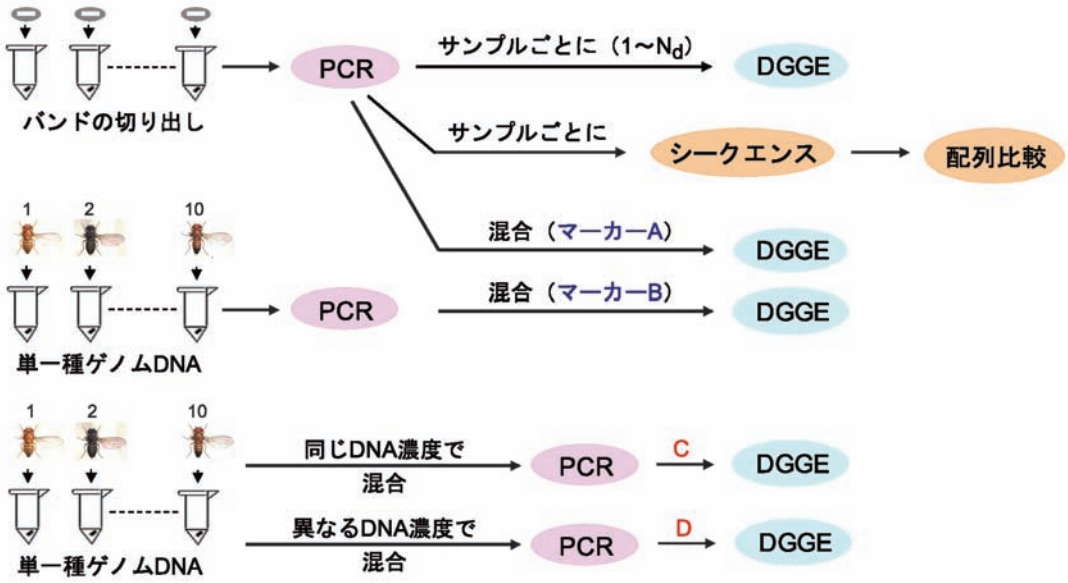

図 2：実験 2 の概要．

切り出し，それを鋳型 DNA として PCR の再増幅を行った．得られた再増幅産物の塩基配列を，それぞれ，DNA シーケンサー ABI PRISMTM 377 (Applied Biosystems) によって決定し，GenBank に登録されている，あるいは Katoh (1999) に報告されている既知の *COI* 塩基配列との相同性を比較した．

また，PCR 再増幅産物をそれぞれ，同じ DGGE 条件で泳動し，バンド位置の再現性を確認した．同時に，それらを混合した試料(A)と実験 1 の単一種ゲノム DNA から増幅された PCR 産物を混合した試料(B)を，それぞれマーカーとして泳動した．

さらに，混合ゲノム DNA から PCR 増幅を行う際に，各種の DNA 濃度の違いによる影響を調べるために，単一種ゲノム DNA をそれぞれ等濃度になるように調整して混合した鋳型 DNA(C)と濃度を調整せずに混合した鋳型 DNA(D)から PCR 増幅を行った．また，実験 1 の結果を再確認するために，同じ鋳型混合ゲノム DNA から再度 PCR 増幅し，これらの産物をそれぞれ上記の試料とともに DGGE 分析した．

3．結果と考察

3.1　実験 1

3.1.1　単一種ゲノム DNA からの PCR-DGGE

単一種ゲノム DNA から増幅した PCR 産物の DGGE 結果を，図 3 のレーン 1 〜10 に示した．2 本のバンド（a と b）が検出されたレーン 3 の *D. virilis* を除いて，各レーンにおいて，それぞれ単一で明瞭なバンドが確認された．また，各バンドの出現位置は種ごとに異なっており，互いに区別できるように分離された．

3.1.2　混合ゲノム DNA からの PCR-DGGE

次に，10 種各 1 個体の供試虫を混合して抽出したゲノム DNA からの PCR-DGGE 結果を，図 3 のレーン N_0〜N_8 に示した．$N_{1\sim8}$ は，PCR に適切な鋳型 DNA 濃度を調べるために，抽出した混合ゲノム DNA を $2^{-1\sim8}$ に希釈して行った PCR-DGGE の結果である．いずれの濃度においても，2 本の明瞭なバンド（c と d）しか得られなかった．

3.1.3　考察

各種の単一種ゲノム DNA からの PCR-DGGE は，それぞれ異なる位置に明瞭なバンドを形成した．つまり，DGGE 法によって種を判別することが可能であると期待される．この結果については，得られた各 DGGE バンドの位置に再現性があるかどうか，そして，出現した各バンドがそれぞれ実験に供した種由来の DNA 断片であるかどうかを，確認する必要がある．

混合ゲノム DNA からの PCR-DGGE では，明瞭なバ

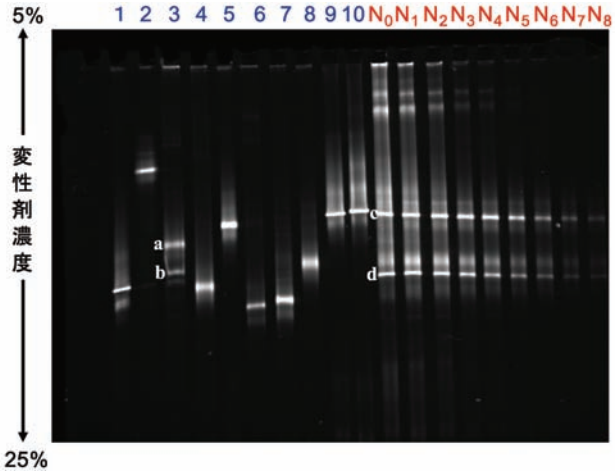

図 3：実験 1 による DGGE バンドパターン．1 〜10 は単一種ゲノム DNA からの PCR 産物（番号は，表 1 の種 No. に対応），N_0 は混合ゲノム DNA からの PCR 産物，$N_{1\sim8}$ は混合ゲノム DNA を $2^{-1\sim8}$ に希釈した鋳型 DNA からの PCR 産物．

ンドは2本しか出現しなかった．この原因としては，(1)鋳型混合ゲノムDNA中のDNA濃度の種間差と，(2)それぞれの種の*COI*配列とプライマー配列との適合度の違いによる，PCR増幅におけるバイアスが考えられる．

3.2　実験2

3.2.1　DGGEバンドの再現性と塩基配列の確認

実験1で得られたDGGEゲルから，13のバンドを切り出してPCRによる再増幅を行い，DGGEで結果の再現性を確認した．その結果，それぞれのバンド位置は前回とほぼ同じであった（図4：レーン1，2，3_a，3_b，4-10，N_c，N_d）．また，各バンドから切り出したDNAの塩基配列は，それぞれの種の*COI*遺伝子の既知の配列と非常に高い（99%以上）相同性を示した．*Drosophila virilis*で検出された2本のバンドのうち，3aは*D. virilis*の*COI*配列と100%一致していたが，3bは9カ所の塩基に違いが認められた．混合ゲノムDNAから検出されたバンドN_cは*D. melanogaster*の配列と100%，バンドN_dは*S. coracina*の配列と99%一致した．

3.2.2　DGGEマーカーの作成

図4のレーンA，Bはそれぞれ10種の単一種鋳型DNAから得られたPCR産物の混合物だが，どちらも10（11）本のバンドで構成された明瞭なマーカーにはならなかった．

3.2.3　混合ゲノムDNAからのPCR-DGGE解析

図4のレーンC，D，N_o'は，いずれも混合ゲノムDNAを鋳型としたPCR-DGGEの結果であるが，実験1と同様に，どれも10（11）本の明瞭なバンドで構成されたDGGEバンドパターンは検出されなかった．ただし，10種それぞれの単一種ゲノムDNAを等濃度になるように調整して混合したCと濃度調整をせずに混合したDを比べると，Cの方でより多くのバンドが検出されている．また，実験1のN_oと比べてN_o'の方がバンドの検出がよいように見える．

3.2.4　考察

今回の実験で設定したDGGE条件は，同じDNA分子種に対して，そのバンド位置に関して非常に高い再現性を示した．また，今回*COI*遺伝子の部分配列に対して設計したプライマーは，実験に供した10種それぞれの単一種ゲノムDNAを鋳型にすれば，充分に目的とするDNA断片を増幅できることがわかった．ただし，*D. virilis*では，標的とした*COI*断片の他に，配列が9塩基異なるパラログ断片も増幅した．

2種類のDGGEマーカー試料（AとB）を作成して泳動したが，バンドの解像度はあまりよくなかった．この点は，DGGE条件を調整することで改良できる．バンドが明瞭でなく影ができるのは，泳動時間が足りないからだと考えられる．また，一部のバンドが互いに非常に近い位置に現れる問題（例えば，レーン9と10など）は，ゲルの変性剤濃度勾配をさらに狭くすることで，バンドの分離を向上させることができるかもしれない．しかし，それは構成種の組み合わせによって異なり，今回の試験のように全構成種がわかっている場合には好適な条件を調整できるが，一般にどんな種が含まれているかわからないサンプルに適用する際には，部分的にバンドが重なる可能性があることは避け難い．

実験1，2とも，混合ゲノムDNAからのPCR-DGGEで，目的とした10種全ての明瞭なバンドを検出できなかった．その原因としては，まず，鋳型混合ゲノムDNAからPCR増幅を行う際の鋳型DNA中の

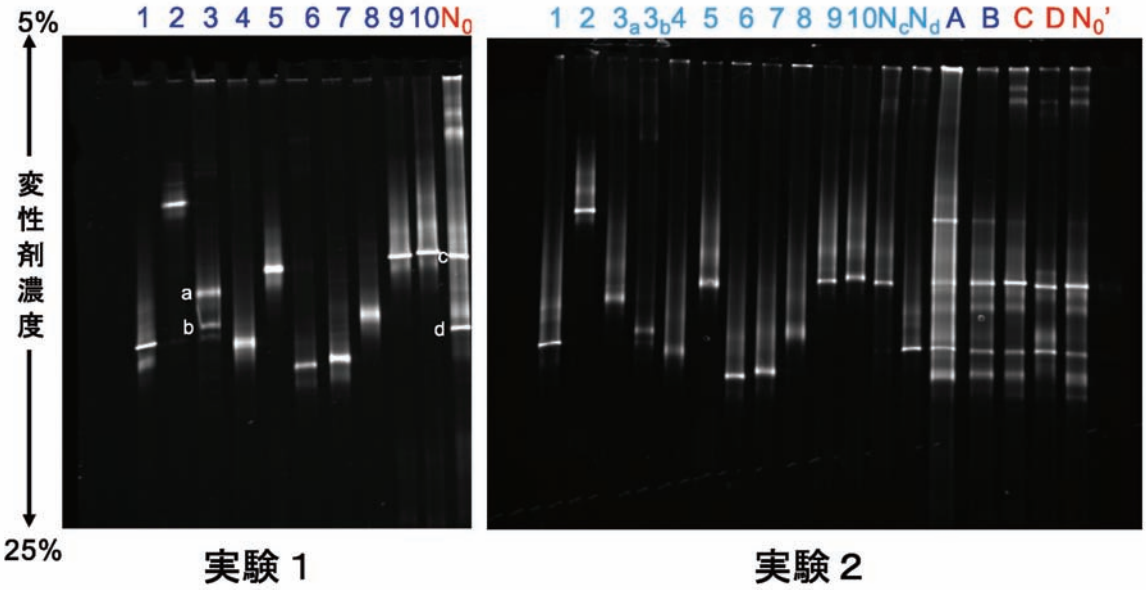

図4：実験2によるDGGEバンドパターン（実験1との比較）．1～N_dは実験1のゲルから各バンドを切り出して再増幅したPCR産物，CとDは単一種ゲノムDNAをそれぞれ等濃度になるように調整して混合した鋳型DNA(C)と濃度を調整せずに混合した鋳型DNA(D)からのPCR産物，N_0'は実験1のN_0と同じ鋳型混合ゲノムDNAから再度PCR増幅した産物，AとBはマーカーレーン（説明は本文参照）．

DNA濃度の種間差によるバイアスが考えられる．実際に，10種それぞれの単一種ゲノムDNAを濃度が均一になるように混合した鋳型DNAから増幅したPCR産物を泳動したレーンCでは，濃度が不均一な場合のレーンDよりも多くのバンドが検出できた（図4）．このことは，PCR-DGGE法を一般の生物（昆虫）群集サンプルに適用する際に重要な問題があることを意味している．つまり，種間の相対頻度に差がある（自然界の生物群集）サンプルからは，PCR-DGGE法では優占種に正のバイアスがかかった結果が得られるということになる．微生物群集でも，群集の1％以上を占める種は検出できたという報告もあるが（Muyzer et al., 1993），この解像度はいろいろな条件によって変化することがわかっている（石井ほか，2000）．

次に，それぞれの種の*COI*配列とプライマー配列との適合度の違いよるPCRバイアスが考えられる．本研究では，リバースプライマー（COI-b）を試験に供した10種に共通した配列で設計できなかった（DGGE法を適用できるDNA断片長に制限があることにより，*COI*遺伝子の種間変異の多い配列部位に設定せざるを得なかった）．プライマー（COI-b）配列の基準とした*D. melanogaster*が最も適合度が高いのは当然として，次いで，*S. coracina*，*D. simulans*，*L. stackelbergi*の適合度が高かった（2塩基違い；表2）．これらのうち，*D. melanogaster*と*S. coracina*のバンドが，実験1，2における混合ゲノムDNAからのPCR-DGGEで（$N_{o\sim8}$，N_o’，C，D），それぞれ明瞭なバンドとして検出された．この結果から，プライマー配列との適合性はPCR増幅において非常に重要な影響を及ぼすと考えられる．実際に，プライマー配列との相同性が高いものほど優先的に増幅する傾向があることは，細菌を対象としたPCR-DGGEにおいて，重要な問題の一つとして指摘されてきた（例，Ishii and Fukui, 2001）．

また，まったく同じ混合ゲノムDNAを鋳型としたにもかかわらず，実験1（N_o）と実験2（N_o’）のPCR-DGGEの結果に差が出たことは，メタゲノムを鋳型とした場合，同じ条件下のPCR増幅でも産物に差が出る可能性があることを示している．

4．まとめと今後の展望

今回の実験で，PCR-DGGE法を昆虫群集サンプルに適用する場合，PCR増幅段階でのバイアスが問題であることが明らかになった．これは，群集構成種を全て検出しようとするなら，微生物群集を含めてどんな生物群集にも付きまとう問題である．プライマーの問題は，対象とする生物群でより保存性の高いシングルコピー遺伝子の配列部位を探索すれば，ある程度は解決できるだろう．しかし，完全なユニバーサルプライマーの設計は理論上無理である．また，本研究の*D. virilis*で見られたように，パラログも増幅してしまう可能性も排除できない（メタゲノム-PCR-DGGEでは，別のバンド，〝種〟，として検出され得る）．もっと根本的な問題は，鋳型メタゲノム中でのDNA濃度の種間差によるPCRバイアスである．つまり，PCR-DGGE法では，群集（サンプル）の中の相対頻度（≒DNA濃度）組成を正確には評価できないということである．さらに，一般に種構成が未知のサンプルに対して，ゲル上でのバンドの分離能を向上させるDGGE条件を決定できない（部分的なバンドの重なりの可能性を排除できない）という問題もある．

以上の問題を考慮すると，メタゲノムに対するPCR-DGGE法の適用範囲は，ある程度限られたものにならざるを得ない．例えば，構成種が既知のある範囲に限られた群集の種組成の解析・比較，あるいは，メタゲノムの中からPCR-DGGE法で検出できる構成種のみから成る分群集を対象とした研究などである．実際に，微生物群集のPCR-DGGE法による研究は後者の例ある．一般に多くの生物群集研究は，ある方法でスクリーニングされた分群集を対象にしている（例えば，ライトトラップで採集された昆虫群集などのように）のであるから，PCR-DGGE法でスクリーニングすることに本質的な違いはないかもしれない．しかし，本研究で目指した網羅的な生物多様性観測のための新しい手法の開発という点では，適用が難しいと言わざるを得ないであろう．

しかし，DNA塩基配列情報を使った他の方法も考えられる．PCR-DGGE法は，メタゲノムから共通プライマーによって構成種のDNA断片を増幅し，それらを塩基配列の違いによって分離するという方法であるが，メタゲノムから種特異的プライマーによってDNA断片を増幅してそれぞれの種の存否を確認するという方法も考えられる．これをリアルタイムPCRと組み合わせて行えば，鋳型メタゲノム中のそれぞれの種のDNA濃度も推定でき，群集の相対頻度組成も評価できる可能性がある；DNA濃度を相対頻度（個体数かバイオマスか）に換算する検証実験が必要であるが．この方法は，既に海洋プランクトンのメタゲノムから特定の1，2種の個体群密度を推定するのに使われており（例えば，Hosoi-Tanabe and Sako, 2005；松村ほか，2008），また，群集組成解析の試みも始まっている（首都大学東京の田村浩一郎氏からの私信）．しかし，この方法もPCR増幅過程を含むので，その段階でのバイアスが考えられる．まず，方法論上，存在が予想される（プライマーが設計された）種しか検出できない．PCR-DGGE法には発見的意義（未知種のバンドも検出される）があるが，この方法にはない．未知種（パラログも）の配列がどれかのプライマーと一致すれば，それが混ざって増幅されてしまう可能性もある．鋳型メタゲノムを小分けして種特異

的プライマーによるPCRを行うので，その段階での構成種DNA濃度組成のサンプリング誤差も生ずるかもしれない（稀少種は，PCR-DGGE法と同様に，検出されない可能性がある）．結局，この方法の適用も限られたものとならざるを得ないであろう．

理想の方法は，環境（サンプル）メタゲノムを直接配列決定して，構成種のゲノムコピー数をカウントする方法であろう．それが，次世代シークエンサーを使うことによって可能になり，既に，微生物群集の解析に適用され始めている（例えば，Qin et al., 2010）．これが生物多様性観測の実用的な方法となるためには，ゲノム（少なくとも標的DNAマーカー）配列のデータベースを整備し，次世代シークエンサーによる配列解読のコストが下がる必要があるが，分子生物学技術とバイオインフォマティクスの目覚ましい発展速度を考えると，そう遠くない将来には実現できるのではなかろうか．

このようなDNA塩基配列情報を使った生物種の同定方法は，従来の同定作業と異なり，一過性のものではなく，得られた配列情報がデータベースに蓄積すればするほどにその有用性が高まる性質のものである．また，この技術を消化管内容物や寄生者群集などに適用できれば，簡単に量的食物網のデータも得られるようになるなど，さまざまな可能性を秘めており，いわば「分子群集生態学」を拓く新技術となる可能性を有している．

しかし，専門的な分類学の知識を必要としない，だれにでもできる生物種の同定技術には，その長所の裏がえしとして，作業に携わる人の同定能力・知識の向上につながらないという欠点もある．また，DNA分子情報を使う場合には，証拠標本が残らないという問題点もある（証拠標本を残しつつ，DNAを抽出する方法もあるが，本研究で想定したような生物多様性観測で得られる膨大なサンプルの処理には適さない）．形態による識別や培養などが難しい多くの種を擁する微生物群集などの場合は仕方がないとしても，昆虫のように，形態による識別が比較的容易で，標本も残すことができる生物の場合は，従来の形態形質を使った分類・同定との併用が望ましい．ましてや，未知種の問題は，まずは専門の分類学者にその解明を急いでもらわなければならない（特に，生物相の解明が遅れている熱帯域で）．そのためには，発見的な意味を持っている分子生物学的手法（PCR-DGGE法やメタゲノム配列解読など）も役立つに違いない．

謝辞

本研究を進めるにあたって，プライマーの設計に関して助言をいただいた首都大学東京理工学研究科田村浩一郎教授と元北海道大学低温科学研究所の島田公夫博士に心から感謝の意を表します．また，実験室・装置の使用を許可して下さり，技術上の指導と研究上の貴重な助言をいただいた，北海道大学低温科学研究所微生物生態学グループの福井学教授，小島久弥博士，藤井正典さんに深く感謝いたします．首都大学東京大学院理工学研究科の青塚正志教授と井出俊和さんには研究材料の一部を提供していただきました，北海道大学大学院理学研究院の加藤徹博士には研究上の相談に乗っていただき，また未発表資料の提供を受けました，ここに感謝いたします．本研究は，胡耀光が北海道大学低温科学研究所の非常勤研究員として採用されていた期間に行われたものであり，感謝いたします．

参考文献

Hirao, T., M. Murakami, H. Kogi, A. Kashizaki, Y. Hirai, S. Tanabe, N. Inari, H. Yorozuya, and M. J. Toda (2006) International Biodiversity Observation Year in Western-Pacific and Asian Region (DIWPA-IBOY): A case report on species rarity and spatio-temporal variability of species composition in Lepidoptera and Coleoptera communities from a temperate forest of northern Japan. *Ecol. Res.*, **21**, 811–818.

Hosoi-Tanabe, S., and Y. Sako (2005) Species-specific detection and quantification of toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* by real-time PCR assay. *Mar. Biotech.*, **7**, 506–514.

Ishii, K., and M. Fukui (2001) Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3753–3755.

石井浩介，中川達功，福井学（2000）微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用．*Microbes Environ.*, **15**(1), 59–73.

Katoh, T. (1999) *Molecular Phylogeny of Drosophilidae Inferred from Alcohol Dehydrogenase Gene Sequences*. Doctor thesis, Tokyo Metropolitan University.

小林憲生，舘卓司（2009）パラタクソノミスト養成講座DNA（初級）編．北海道大学総合博物館，札幌．

MacLeod, N. (ed) (2007) *Automated Taxon Identification in Systematics: Theory, Approaches and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

松村清隆，佐藤加奈，野方靖行，坂口勇（2008）DNA情報を利用した海洋生物幼生の種判定と定量的解析の試み．日本生態学会誌，**58**，113–121．

Myuzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electorphoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695–700.

Nakashizuka, T., and N. Stork (eds) (2002) *Biodiversity Research Methods, IBOY in Western Pacific and Asia*. Kyoto University Press, Kyoto, and Trans Pacific Press, Melbourne.

Ratnasingham, S., and P. D. H. Hebert (2007) BOLD: The

Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes*, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x

Qin, J., R. Li, J. Raes, et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue estimated by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**(4), 59-65.

戸田正憲（2002）IBOY（国際生物多様性観測年）. 昆虫と自然，**37**(12)，24-27.

戸田正憲（2007）6 章　みんなの分類学 ── 分類学の成果を共有・継承するために ──. シリーズ 21 世紀の動物科学 第 2 巻　動物の多様性（片倉晴雄・馬渡峻輔　編）：173-207. 培風館，東京.

Toda, M. J., K. Matsushita, and S. F. Mawatari (2004) Biological Classification and Identification System (BioCIS). In: Mawatari, S. F., and H. Okada (eds) *Neo-Science of Natural History: Integration of Geoscience and Biodiversity Studies, Proceedings of International Symposium on "Dawn of a New Natural History - Integration of Geoscience and Biodiversity Studies"*: 41-44. Sapporo, Japan,.