

■原 著■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 腊葉標本 DNA の MIG-seq 法による利用可能性・解析手法の検討

岩崎貴也<sup>1,2,8</sup> 小玉あすか<sup>2</sup> 松尾 歩<sup>3</sup> 陶山佳久<sup>3</sup>  
大西 亘<sup>4</sup> 尾関雅章<sup>5</sup> 中濱直之<sup>6</sup> 山本 薫<sup>7</sup>

### Examination of Possibilities and Methods for MIG-seq Analysis Using Plant Herbarium Specimen-Derived DNA

Takaya Iwasaki<sup>1,2,8</sup>, Asuka Kodama<sup>2</sup>, Ayumi Matsuo<sup>3</sup>, Yoshihisa Suyama<sup>3</sup>,  
Wataru Ohnishi<sup>4</sup>, Masaaki Ozeki<sup>5</sup>, Naoyuki Nakahama<sup>6</sup>  
and Kaoru Yamamoto<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Kawatabi Field Science Center, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Osaki City, Miyagi 989-6711, Japan

<sup>4</sup> Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Odawara City, Kanagawa 250-0031, Japan

<sup>5</sup> Nagano Nature Conservation Research Institute, Nagano City, Nagano 381-0075, Japan

<sup>6</sup> Institute of Natural and Environmental Sciences, University of Hyogo, Sanda City, Hyogo 669-1546, Japan

<sup>7</sup> Yokosuka City Museum, Yokosuka City, Kanagawa 238-0016, Japan

<sup>8</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: iwasaki-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Herbarium specimens hold their DNA information at the time of collection from fields. This DNA information provides us with the opportunity to directly compare the past and present. However, it is difficult to analyze specimen DNA in the usual way because the DNA has been fragmented due to the effects of ultraviolet light and chemical fumigation. Therefore, in this study, we examined possibilities and methods of MIG-seq analysis using specimens of six plant species. As the results, several thousand or more loci were sequenced on average in all species, indicating that MIG-seq analysis is also useful for plant specimen-derived DNA. The number of loci and number of sequence reads obtained by the next-generation sequencer were significantly positively correlated, and the number of loci continues to increase without convergence even if the number of reads exceeds 300,000. Although the number of loci after correction of the number of reads decreased in old specimen samples of three species, a relatively large number of loci could be obtained in many samples in the case of specimens prepared around 1980. Also a sufficient number of loci were also sequenced in some samples of older specimens. Therefore, as long as the specimen condition is good, MIG-seq analysis should be useful even for a fairly old sample. Moreover, when the sequence data from multiple independent library constructions were integrated, the number of loci continued to rise even when the number of reads exceeded about 800,000. In conclusion, the most effective way to perform MIG-seq analysis for plant specimen-derived DNA would be to carry out multiple independent library preparations and obtain as many reads as possible.

**Keywords:** Plant herbarium specimen, DNA, MIG-seq, next generation sequencer, stacks

## 序論

植物研究者が野外の植物を調べる際には、プロアマを問わず、腊（さく）葉標本（＝押し葉標本）を作成し、博物館や大学の標本庫に収蔵して保存することが一般的である。腊葉標本は、植物分類学的研究の基礎になるだけでなく、地域の植物相研究や保全を行う上でも重要な情報源となる<sup>1)</sup>。特に数十年前などの過去に作製された標本は、生きていた時の植物の形態や分布といった情報はもちろんとして、当時のDNA情報をもタイムカプセルとしてその中に保存している可能性があり、過去と現在の遺伝的情報比較を可能とする貴重な材料でもある。このような過去の博物館標本を活用した研究分野は、近年、博物館 (Museum) + オミクス (Omics) の造語であるミュゼオミクス (Museomics) として注目されるようになってきている<sup>2)</sup>。トキ<sup>3)</sup> やコヒョウモンモドキ<sup>4)</sup> など、これまでは動物標本を用いた研究例の方が多かったが、植物でも標本DNAを解析することで、実は絶滅種が移入種であったことを明らかにした例などがある<sup>5)</sup>。

標本のDNAを解析する際に立ちはだかる最大の問題は、DNA分子の断片化である。多くの場合、腊葉標本のDNAは、標本作成時の熱乾燥や、保存時の紫外線や薬品燻蒸の影響などによって、断片化が進んでいる<sup>6)</sup>。これは古い標本ほど顕著であり、腊葉標本の場合、骨由来DNAの分解速度の約6倍である  $1.66 \times 10^{-4}$  nucleotide per year という速度で断片化が進むと推定されている<sup>7)</sup>。断片化が進んだDNAでは数百bp程度の領域のPCR増幅さえ困難になることが多く、このような場合、通常のサンガー法によるDNA塩基配列解読をするためには、短い領域を増幅するプライマーを設計し直すなどの工夫が必要となる<sup>8,9)</sup>。短い断片の塩基配列を大量に解読できる次世代シーケンサーを活用し、断片化した標本DNAのゲノム全体を解析するという試みもされているが<sup>9)</sup>、これには多額の解析費用が必要であり、様々な非モデル生物の多サンプルで行うのは難しい。また、特定の制限酵素部位に挟まれた領域だけを選択的に解析するRAD-seq法<sup>10)</sup>では、断片化・劣化が進んだDNAで制限酵素反応がうまくいかず、結果が安定しないことがあった。

そこで本研究では、近年に開発され、普及が進んでいるMIG-seq法<sup>11)</sup>による解析に着目した。この手法では、単純な塩基配列が複数回繰り返されたSSR (simple sequence repeats) 領域の配列をプライマーとして最初にPCRを行う。これによって、ゲノム中に多数存在するSSR配列に挟まれたISSR (inter-simple sequence repeats) 領域を増幅し、次

世代シーケンサーによって配列を決定する。DNAの断片化や劣化の影響を比較的受けにくいPCRを最初に行うため、最初に制限酵素処理が必要なRAD-seq法よりも安定した結果が得られることが期待できる。実際に、30年前に作製されたアザミ属植物の腊葉標本でも、状態さえよければ、MIG-seq解析に用いることが可能であることが報告されている<sup>1)</sup>。ただし、アザミ属植物以外での腊葉標本への適用例はまだほとんどなく、MIG-seq法が腊葉標本のDNAに対してどれくらい有効なのかはまだ分かっていないことも多い。本研究では、6種の植物の腊葉標本を用い、どんな植物種の腊葉標本でも同じ様に解析可能なのか、どれくらい前に作製された標本まで解析が可能なのか、効率良く解析を行うためにはどのような工夫が有効かなどを明らかにすることを目的として、研究を行った。

## 材料と方法

### 腊葉標本からの葉片採取とDNA抽出

対象として、被子植物からブナ *Fagus crenata* Blume (ブナ科)、ヨツバヒヨドリ *Eupatorium glehnii* F.Schmidt ex Trautv. (キク科)、マツムシソウ *Scabiosa japonica* Miq. (マツムシソウ科)、ゼンテイカ *Hemerocallis dumortieri* C.Morren var. *esculenta* (Koidz.) Kitam. ex M.Matsuoka et M.Hotta (ユリ科)、シダ植物からヒカゲノカズラ *Lycopodium clavatum* L. (ヒカゲノカズラ科)、マツバラン *Psilotum nudum* (L.) P.Beauv. (マツバラン科) の合計6種を選んだ。それぞれの種について、神奈川県立生命の星・地球博物館 (標本室コードはKPM)、長野県環境保全研究所 (NAC)、横須賀市自然・人文博物館 (YCM) に収蔵されている腊葉標本合計198点から、それぞれ5mm × 5mm程度の葉片を採取した。内訳としては、ブナ標本67点 (KPM収蔵、1962-2016年作製)、ヨツバヒヨドリ標本10点 (NAC収蔵、1981-2010年作製)、マツムシソウ標本6点 (NAC収蔵、1978-2010年作製)、ゼンテイカ標本6点 (NAC収蔵、1981-2009年作製)、ヒカゲノカズラ標本43点 (KPM収蔵、1949-2015年作製)、マツバラン標本66点 (そのうち、KPM収蔵36点、1958-2017年作製。YCM収蔵30点、1951-2017年作製) である (表1)。

採取した葉片はステンレスビーズを用いて破碎し、Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega) を用いて、規定のプロトコルに従い、ゲノムDNAを抽出した。マツバランについては、抽出後のDNAを分注後、DNAが受けた損傷を修復できるとされるNEBNext FFPE DNA Repair Mix (NEB) によ

表 1. 本研究で使用了腊葉標本のリスト

## ブナ

KPM-NA0026816, KPM-NA0026818, KPM-NA0027786, KPM-NA0027787, KPM-NA0027789, KPM-NA0061922, KPM-NA0106146, KPM-NA0107783, KPM-NA0112972, KPM-NA0114551, KPM-NA0115413, KPM-NA0131361, KPM-NA0152656, KPM-NA0154294, KPM-NA0158722, KPM-NA0166125, KPM-NA0180700, KPM-NA0184345, KPM-NA0184346, KPM-NA0202858, KPM-NA0206990, KPM-NA0207172, KPM-NA0213578, KPM-NA0280238, KPM-NA0282452, KPM-NA0287791, KPM-NA0288518, KPM-NA0289692, KPM-NA0289752, KPM-NA0296271, KPM-NA0296787, KPM-NA0297322, KPM-NA0297388, KPM-NA0298518, KPM-NA1032358, KPM-NA1032359, KPM-NA1032360, KPM-NA1032361, KPM-NA1032362, KPM-NA1032363, KPM-NA1032364, KPM-NA1032365, KPM-NA1032366, KPM-NA1032367, KPM-NA1032368, KPM-NA1032369, KPM-NA1032370, KPM-NA1032371, KPM-NA1032372, KPM-NA1032373, KPM-NA1032374, KPM-NA1032375, KPM-NA1032376, KPM-NA1032377, KPM-NA1032378, KPM-NA1032379, KPM-NA1032380, KPM-NA1032381, KPM-NA1032382, KPM-NA1032383, KPM-NA1032384, KPM-NA1032385, KPM-NA1032386, KPM-NA1100214, KPM-NA1103157, KPM-NA1105852, KPM-NA1108494

## ヨツバヒヨドリ

NAC-126381, NAC-143933, NAC-144206, NAC-144305, NAC-145516, NAC-146035, NAC-155039, NAC-167198, NAC-167435, NAC-167439

## マツムシソウ

NAC-97293, NAC-97294, NAC-144680, NAC-159205, NAC-167028, NAC-167477

## ゼンテイカ

NAC-144761, NAC-144762, NAC-157762, NAC-158082, NAC-167450, NAC-167451

## ヒカゲノカズラ

KPM-NA0005073, KPM-NA0029558, KPM-NA0075482, KPM-NA0075483, KPM-NA0075484, KPM-NA0075485, KPM-NA0075486, KPM-NA0075487, KPM-NA0075488, KPM-NA0101554, KPM-NA0103258, KPM-NA0106207, KPM-NA0106582, KPM-NA0108236, KPM-NA0109334, KPM-NA0111443, KPM-NA0117483, KPM-NA0119118, KPM-NA0119694, KPM-NA0125017, KPM-NA0126750, KPM-NA0127262, KPM-NA0134692, KPM-NA0154865, KPM-NA0154872, KPM-NA0158533, KPM-NA0175866, KPM-NA0280502, KPM-NA0292885, KPM-NA1050003, KPM-NA1050004, KPM-NA1050005, KPM-NA1050006, KPM-NA1050007, KPM-NA1100277, KPM-NA1100531, KPM-NA1101279, KPM-NA1102599, KPM-NA1102784-1, KPM-NA1102784-2, KPM-NA1102784-3, KPM-NA1103018, KPM-NA1107929

## マツバラ

KPM-NA0005666 (2), KPM-NA0005667, KPM-NA0005668, KPM-NA0119422, KPM-NA0124184 (3), KPM-NA0131941, KPM-NA0132388 (4), KPM-NA0132389, KPM-NA0133611 (2), KPM-NA0137727, KPM-NA0143539, KPM-NA0143545, KPM-NA0148330 (3), KPM-NA0168792 (2), KPM-NA0176451 (2), KPM-NA0184210, KPM-NA0283355 (2), KPM-NA0285369, KPM-NA0294659, KPM-NA0297301 (3), KPM-NA0301811, KPM-NA1103376, YCM-V-554, YCM-V-2356 (2), YCM-V-2955 (4), YCM-V-2958, YCM-V-2959 (3), YCM-V-19469 (4), YCM-V-19470, YCM-V-19471, YCM-V-19472, YCM-V-32674, YCM-V-34659, YCM-V-44368, YCM-V-44664, YCM-V-44727, YCM-V-62883, YCM-V-63206, YCM-V-66750 (2), YCM-V-67582 (2), YCM-V-68506

標本番号末尾の括弧内数字は同じ標本台紙上から採取したサンプルの点数を示す。

る修復処理 (DNA 8  $\mu$ l に、NEBNext FFPE DNA Repair Mix 0.3  $\mu$ l と NEB FFPE DNA Repair Buffer 0.9  $\mu$ l を加え、20° C で 20 分インキュベート) を行った。処理後の DNA の精製は行わず、未処理の DNA とは別にして、そのままその後の実験に用いた。

## MIG-seq 解析

各サンプルから抽出した DNA を用い、Suyama and Matsuki<sup>11)</sup> の方法に従って、MIG-seq 解析のためのライブラリを作成した。最初の 1st PCR の条件は Suyama and Matsuki<sup>11)</sup> のものと基本的に同じだが、アニーリング温度は 38° C に、サイクル数は 30 に変

更した。ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンテイカのサンプルについては、独立した 1st PCR を 3 回行い、それぞれを混ぜずにそのまま 2nd PCR 以降の操作を行った。1st PCR 後には、Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Life Sciences) を用いて、PCR 産物の濃度の標準化と短い断片の除去を行った。2nd PCR 以降の操作は、Suyama and Matsuki<sup>11)</sup> と同じ方法で行った。作製したライブラリは、MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle) (illumina) を用い、MiSeq (illumina) の 80bp Paired-end のラン合計 2 回で塩基配列データを得た。

## データ解析

得られた配列データについてまず、Suyama and Matsuki<sup>11)</sup>の方法に従ってフィルタリング処理を行った。最初に FASTX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) を用いてデータのクオリティでフィルタリングを行った (パラメータは Phred quality score 33, q=30, p=40)。更に、TagDust<sup>12)</sup> を用い、FDR 0.01 の基準で、アダプター配列が含まれる配列を除去した。

フィルタリング後の配列データは種ごとに整理し、Stacks v. 1.48<sup>13)</sup> の ustacks の機能を用い、同一遺伝子座と思われる配列をまとめた (パラメータはデフォルト条件である m=3, M=2, N=4)。このまとめた配列数は MIG-seq 解析で得ることのできた遺伝子座数に相当し、各サンプルでどの程度のゲノムワイドな ISSR 領域を増幅・塩基配列決定することができたかの指標となる。

まず各種について、得られた塩基配列のリード数と最終的に検出できた遺伝子座数との間に相関があるかどうかをピアソンの積率相関係数を用いて調べた。次に、リード数の多寡の影響を緩和するために 10 万リード当たりの数に標準化した遺伝子座数と、標本作製年の間の相関関係を調べた。マツバランについては、FFPE Repair 処理を行った DNA と未処理の DNA それぞれで得られた遺伝子座数を比較し、標本由来 DNA における FFPE Repair 処理の効果を調べた。その際には、対応のある t 検定によって、有意な遺伝子座数の増加があるかを調べた。最後に、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ニッコウキスゲについては同じ DNA に対して 1st PCR 以降の実験を独立に行った 3 回分のデータをまとめた際に、マツバランについては FFPE Repair 未処理と処理済み DNA それぞれのデータをまとめて解析した際に、遺伝子座数がどう変わるかを調べた。その際、総リード数と遺伝子座数の相関関係をピアソンの積率相関係数を用いて調べた。統計処理や作図については、全て R v. 3.2.5<sup>14)</sup> を用い、有意水準は 5% とした。

## 結果

### リード数と遺伝子座数の関係

198 点の腊葉標本から抽出した DNA を元に、重複も含めて合計 308 サンプルの MIG-seq 解析用ライブラリを作成し、MiSeq で塩基配列を決定した。フィルタリングの結果、2 ラン分の合計で 49,110,296 リード、約 3.9 Gbp のデータを得ることができた。1 サンプル当たりの平均は、159,449 リードであった。

各標本につき 1 サンプル分のデータを取り出して ustacks 解析を行った結果、ブナでは 187 ~ 8,834 (平

均 2,334)、ヨツバヒヨドリでは 4,291 ~ 11,686 (平均 9,255)、マツムシソウでは 5,943 ~ 70,724 (平均 8,607)、ゼンテイカでは 6,252 ~ 14,726 (平均 10,755)、ヒカゲノカズラでは 550 ~ 14,401 (平均 2,394)、マツバランでは 443 ~ 13,703 (平均 4,398) の遺伝子座が得られた。サンプル数の少ないゼンテイカを除いた他 5 種では、リード数と遺伝子座数の間に有意な正の相関が検出された (全て  $p < 0.01$ ) (図 1)。相関係数  $r$  は、ブナで 0.950、ヨツバヒヨドリで 0.872、マツムシソウで 0.973、ヒカゲノカズラで 0.973、マツバランで 0.962 であった。どの種でも、本研究で得られたリード数の範囲では、遺伝子座数が収束するような様子はみられず、単調増加していた。

### 標本作製年と遺伝子座数の関係

各標本につき 1 サンプル分のデータを取り出し、標本作製年と、10 万リード当たりの値に補正した遺伝子座数との関係を調べた結果、ブナ、ヒカゲノカズラ、マツバランの 3 種でのみ、有意な正の相関が検出された (全て  $p < 0.001$ ) (図 2)。相関係数  $r$  は、ブナで 0.518、ヒカゲノカズラで 0.645、マツバランで 0.806 であった。一方、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンテイカでは 1980 年前後に作製された標本由来の DNA でも、2010 年前後に作製された標本由来の DNA とほぼ同程度の遺伝子座数が得られており、標本作製年の効果は顕著にはみられなかった。ブナやヒカゲノカズラでも、1980 年頃に作製された標本であれば、一部で近年に作製された標本とそれほど変わらない数の遺伝子座数が得られた。マツバランの場合は 1980 年前後の標本がほとんど無かったために影響が推定しづらいが、より古い 1960 年頃の標本で、10 万リード当たり数千レベルの遺伝子座数が得られたサンプルも複数みられた。

### FFPE Repair 処理の効果

66 点のマツバラン標本から抽出した DNA について、FFPE Repair 未処理の DNA と処理済み DNA を使って実験を行った結果を比較した。リード数では、未処理が平均 118,306、処理済みが平均 144,988 であり、対応のある t 検定でも有意な差が検出された ( $p < 0.001$ )。しかし、遺伝子座数では、未処理が平均 4,398、処理済みが平均 4,541 であり、わずかに増加はしたものの、有意な差はみられなかった。また、各サンプルについて未処理と処理済み DNA で得られた遺伝子座数の差分を調べた結果、一部のサンプルでは遺伝子座数が大きく増加しているものの、逆に減少したサンプルもあり、一貫した傾向はみられなかつ



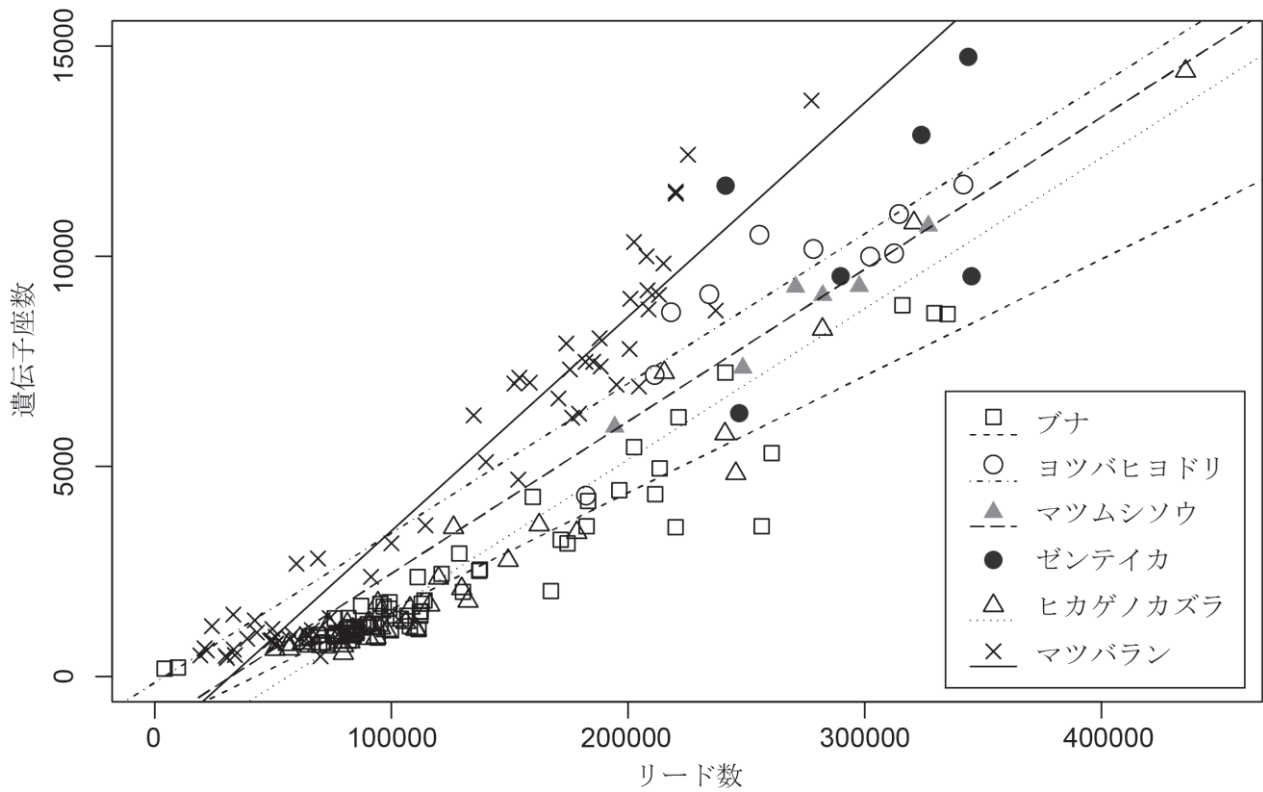


図 1. リード数と遺伝子座数の関係. 有意な相関関係がみられた 5 種のみで近似直線を示している.

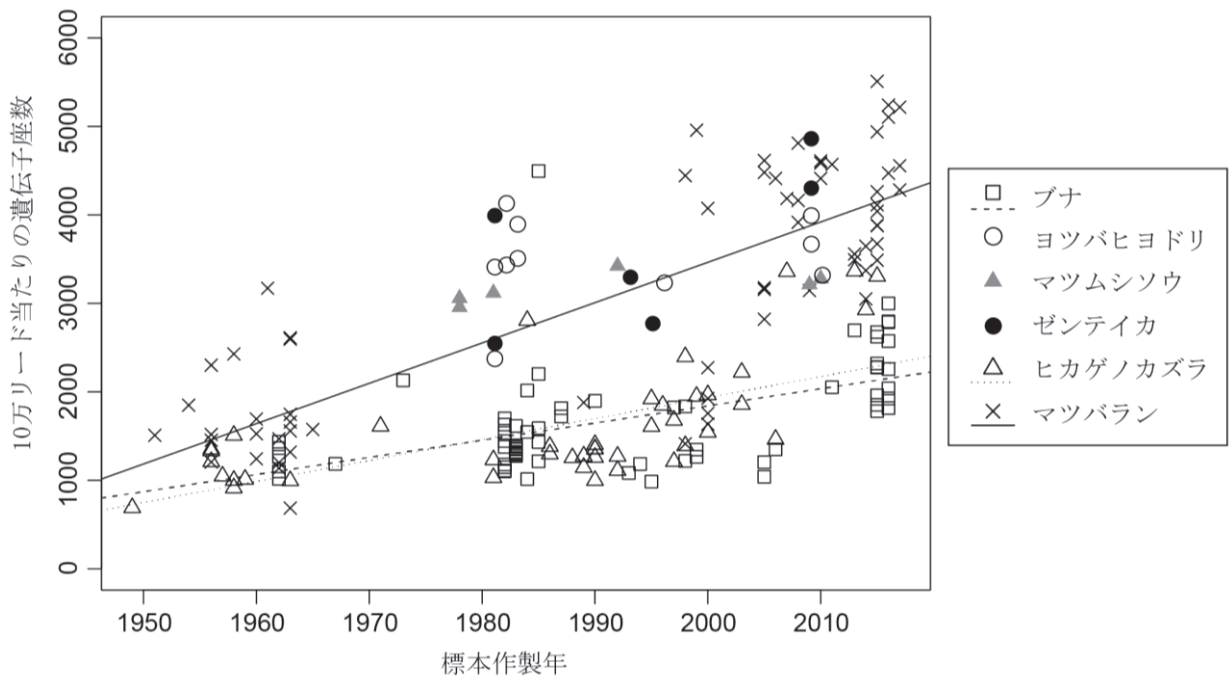


図 2. 標本作製年と 10 万リード当たり補正した遺伝子座数の関係. 有意な相関関係がみられた 3 種のみで近似直線を示している.

た (図 3)。また、ごく小数の遺伝子座しか得られていなかった標本作製年の古いサンプル (図 3 中のサンプル番号が若いもの) については、FFPE Repair の処理の有無で遺伝子座数にほとんど差がみられなかった。

### 独立した複数回のライブラリ作成による効果

複数の独立して行った MIG-seq 解析で得られたデータをまとめてリード数を増やした結果、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンテイカ、マツバランの全ての種について、リード数の増加に伴う有意な遺伝

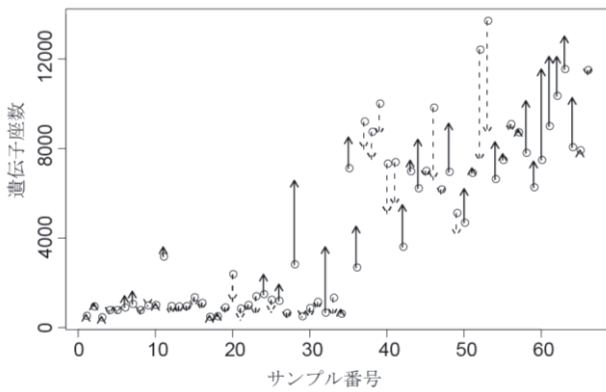


図3. マツバランにおけるFFPE Repair 処理前と後での遺伝子座数の変化. サンプル番号は左から右の順で、標本作製年が古いものから新しいものが並んでいる. FFPE Repair 処理によって遺伝子座数が増加した場合は実線の矢印で、減少した場合は破線の矢印で示している.

子座数の増加がみられた (全て  $p < 0.001$ ) (図4). 相関係数  $r$  は、ヨツバヒヨドリで 0.940、マツムシソウで 0.987、ゼンテイカで 0.789、マツバランで 0.965 であった. どの種でも、リード数の増加に伴って遺伝子座数が収束するような様子はみられず、単調増加していた. また、マツバランは1×から2×にデータを増やす際に、FFPE Repair の処理をしたDNA由来のデータを加えているが、特に相関関係から外れるような様子はみられず、リード数の増加に

伴って、遺伝子座数が単調増加した.

### 討論

#### MIG-seq 解析の汎用性

本研究で得られた結果から、MIG-seq 法による腊葉標本由来のDNAの解析は、多くの種でも広く有効であることが明らかとなった. ただし、種による違いはみられ、ヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンテイカ、マツバランの4種では、ブナとヒカゲノカズラに比べて明らかに多い遺伝子座数が得られた. この原因は不明であるが、ゲノムサイズの違いやゲノム構成の違いによってISSR領域が含まれる数が異なること、腊葉標本作製時の乾燥のし易さが種によって異なることなどが、可能性として考えられる.

#### 標本作製年の影響

本研究で得られた標本作製年と遺伝子座数の関係(図2)から、少なくとも1980年頃以降に作成された腊葉標本であれば、多くの種で十分にMIG-seq解析が可能であることが示唆された. 中でも、NACに収蔵されているヨツバヒヨドリ、マツムシソウ、ゼンテイカの腊葉標本では、標本作製年が古くとも遺伝子座数の有意な減少が検出されず、得られた遺伝子座数そのものも多かった. 標本庫で殺虫のため

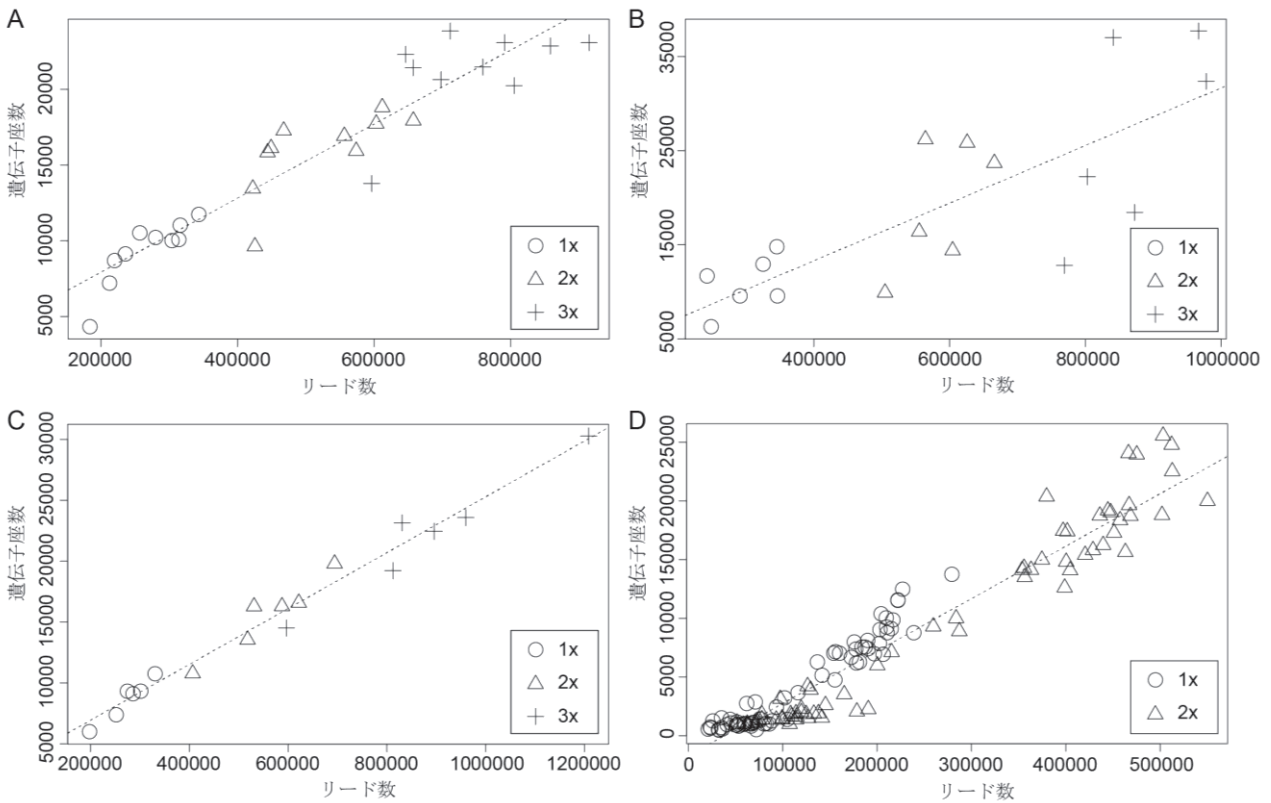


図4. 独立した複数回のライブラリ作製が遺伝子座数増加に及ぼす効果. A. ヨツバヒヨドリ, B. マツムシソウ, C. ゼンテイカ, D. マツバラン.

に行われるヨウ化メチル剤や臭化メチル・酸化エチレン混合剤などによる燻蒸は、腊葉標本の DNA を少なからず分解することが知られている<sup>6)</sup>。しかし、NAC では薬剤による燻蒸がこれまでほとんど行われておらず、それによって DNA の分解が最小限に抑えられてきた可能性がある。NAC のような、ほとんど燻蒸をしていない標本庫の腊葉標本を用いれば、かなり古い年代に作製された標本の DNA でも解析が可能になるかもしれない。本研究では、1980 年頃以前に作製された古い NAC の標本は用いていないため、薬品燻蒸をしていない標本庫でどれぐらい古い標本の DNA までが断片化されずに残っているかの限界は分からなかった。しかし、燻蒸をしている KPM や YCM の古い標本でも、1980 年前後なら一部のサンプルで十分な遺伝子座数が得られていたこと、マツバランの 1960 年頃に作製された標本でも一部では比較的多くの遺伝子座数が得られていたことなどを合わせて考えると、かなり古い年代に作製された標本でも状態さえ良ければ、十分に MIG-seq 解析に利用可能であると思われる。ただし、同じリード数当たりの遺伝子座数は多くの場合で古い標本ほど減少しており、DNA の断片化や劣化によって MIG-seq 解析用ライブラリの作製効率は落ちていると思われる。目的次第ではあるが、古い時代に作製された標本 DNA をどうしても解析に用いたい場合には、後述のリード数を増やす工夫を積極的に活用するべきであると思われる。

### 腊葉標本の DNA を用いた MIG-seq 解析において求められる工夫

種によって多少の違いはあるものの、リード数を増やすほど、得られる遺伝子座数は比例して増加した(図 1)。複数回の独立したライブラリ作製で得られたデータを統合した場合でも、リード数と遺伝子座数の相関関係は同様に維持されており(図 4)、本研究で得られたリード数の範囲を超えて、更に遺伝子座数は増えることが予想される。このことは、MIG-seq のライブラリ作製の際に増幅される ISSR 領域の数がかなり多く、数十万リードレベルではそれらの塩基配列を解読しきれないことを示唆している。独立した PCR の効果そのものについては検証できなかったが、30 サイクルと次世代シーケンサーのライブラリ作製では多めのサイクル数の PCR を行っていることも考えると、冗長性を高めるためにも複数のライブラリ作製を平行して行い、後でデータを統合する本研究の手法が有効だと思われる。

一方、FFPE Repair 処理については、遺伝子座数に対する有意な効果が検出されなかった(図 3、図

4D)。この処理によって遺伝子座数が増加しているサンプルが比較的多かったが、減少しているものも一部みられた。リード数は有意に増加していたことから一定の効果はあると思われるが、少なくとも本研究では劇的に遺伝子座数を増加させるほどの効果までは確認できなかった。昆虫標本のミトコンドリア DNA と核リボソーム DNA の塩基配列解読を行った研究では、FFPE Repair 処理によるライブラリ作製とシーケンス結果の改善が確認されており<sup>15)</sup>、サンプルの状態や解析手法によって効果が異なる可能性も考えられる。この処理の効果については更なる検証が必要であろう。

ここで注意しておきたい点として、FFPE Repair は、DNA 分子のニックやギャップ、酸化、3' 末端ブロックなどのダメージを修復するだけでなく、シトシンの脱アミノ化(ウラシル化)についても修復が可能であることが挙げられる。FFPE Repair をしていない古 DNA では、シトシンの脱アミノ化によって変化したウラシルがアデニンと対合してしまい、PCR 増幅の際に元々はシトシンであった塩基がチミンに置換されてしまう現象が知られている<sup>16)</sup>。この脱アミノ化自体はランダムに起こるため、脱アミノ化してしまったシトシンを含む DNA 断片が PCR で偶然多く増幅されない限り、この問題は見えてこない。しかし、正確なジェノタイピングを行うためには注意すべき問題であり、この点で FFPE Repair 処理は効果が大きいと思われる。また、本研究で行っている独立した複数回のライブラリ作製は、この問題が発生する確率を下げることもできる。

以上の結果をまとめると、腊葉標本の DNA を効率良く MIG-seq を解析に用いるためには、複数の平行したライブラリ作製を行い、後でデータを統合してリード数を増やす手法が最も有効であると思われる。今回は最大 3 回分のデータ(最大で 90 万~120 万リード)をまとめて解析に用いたが、リード数の増加で遺伝子座数はまだ増加することが予想されるため、4 回あるいは 5 回以上のライブラリ作製も効果が有るだろう。特に、古い、あるいは劣化した標本の DNA はライブラリ作製効率が悪いいため、多めの重複ライブラリ作製を行ってリード数を増やすことが有効な手段の一つになると思われる。

### 謝辞

本研究は 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS201807)と科研費(18K06394)、2017 年度神奈川大学共同研究奨励助成金(課題名:丹沢山塊における大気汚染物質の沈着と環境影響)、(独)環境再生保全機構の環境研究総合推進費

(4-1605) の支援を受けて行われました。ここに深く謝意を表します。腊葉標本からの葉片採取の際には、長野県環境保全研究所の柳澤衿哉氏、神奈川大学の鮎澤勘太氏、志村映実氏にサポートをして頂きました。また、DNA 実験では、神奈川大学の泉進教授、佐藤栞氏、櫻澤健太氏にサポートをして頂きました。これらの方々にも心より感謝申し上げます。

## 文献

- 1) 黒沢高秀, 志賀隆 (2016) 植物さく葉標本室をつくらう. *分類* **16**: 17-30.
- 2) 伊藤元己 (2017) ミュゼオミクス—博物館とバイオインフォマティクスのクロスロード. *生物の科学 遺産* **71**: 438-441.
- 3) Feng S, Fang Q, Barnett R, Li C, Han S, Kuhlwillm M, Zhou L, Pan H, Deng Y, Chen G, Gamauf A, Woog F, Prys-Jones R, Marques-Bonet T, Gilbert M-T-P and Zhang G (2019) The genomic footprints of the fall and recovery of the crested ibis. *Curr. Biol.* **29**: 340-349. e347.
- 4) Nakahama N, Uchida K, Ushimaru A and Isagi Y (2018) Historical changes in grassland area determined the demography of semi-natural grassland butterflies in Japan. *Heredity* **121**: 155-168.
- 5) 兼子伸吾, 首藤光太郎, 黒沢高秀 (2013) 古い植物標本を用いた絶滅個体群の系統解析方法の開発: 磐梯朝日地域の「絶滅種」イワキアブラガヤの標本を用いた系統解析. *共生のシステム* **13**: 95-99.
- 6) 小菅桂子, 秋山弘之, 田口信洋 (2004) 生物系収蔵資料に含まれる DNA に及ぼすヨウ化メチル燻蒸剤の影響. *分類* **4**: 17-28.
- 7) Weiß C-L, Schuenemann V-J, Devos J, Shirsekar G, Reiter E, Gould B-A, Stinchcombe J-R, Krause J and Burbano H-A (2016) Temporal patterns of damage and decay kinetics of DNA retrieved from plant herbarium specimens. *R. Soc. Open Sci.* **3**: 160239.
- 8) Nakahama N and Isagi Y (2017) Availability of short microsatellite markers from butterfly museums and private specimens. *Entomol. Sci.* **20**: 3-6.
- 9) 久保田渉誠, 伊藤元己, 森長真一 (2017) 100 年前の標本を使用した全ゲノム解析—進化を直接観察する. *生物の科学 遺産*. **71**: 448-453.
- 10) Rowe H-C, Renaut S and Guggisberg A (2011) RAD in the realm of next-generation sequencing technologies. *Mol. Ecol.* **20**: 3499-3502.
- 11) Suyama Y and Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Sci. Rep.* **5**: 16963.
- 12) Lassmann T, Hayashizaki Y, and Daub C-O (2009) TagDust—a program to eliminate artifacts from next generation sequencing data. *Bioinformatics* **25**: 2839-2840.
- 13) Catchen J-M, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, and Postlethwait J-H (2011) Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3 (Bethesda)* **1**: 171-182.
- 14) R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [URL <https://www.R-project.org/>].
- 15) Sproul J-S and Maddison D-R (2017) Sequencing historical specimens: successful preparation of small specimens with low amounts of degraded DNA. *Mol. Ecol. Resour.* **17**: 1183-1201.
- 16) Brotherton P, Endicott P, Sanchez J-J, Beaumont M, Barnett R, Austin J and Cooper A (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Res.* **35**: 5717-5728.