

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

平成 28 年 6 月 10 日	
所属部局・職	野生動物研究センター・修士課程学生
氏名	野本 繭子

1. 派遣国・場所 (〇〇国、〇〇地域)
京都府 京都市
2. 研究課題名 (〇〇の調査、および〇〇での実験)
ゲノム科学実習 (ゲノム実習)
3. 派遣期間 (本邦出発から帰国まで)
平成 28 年 5 月 30 日 ~ 平成 28 年 6 月 3 日 (5 日間)
4. 主な受入機関及び受入研究者 (〇〇大学〇〇研究所、〇〇博士/〇〇動物園、キュレーター、〇〇氏)
京都大学野生動物研究センター
5. 所期の目的の遂行状況及び成果 (研究内容、調査等実施の状況とその成果：長さ自由)
写真 (必ず 1 枚以上挿入すること。広報資料のため公開可のもの) の説明は、個々の写真の直下に入れること。 別途、英語の報告書を作成すること。これは簡約版で短くてけっこうです。
本実習は、フィールド科学実習 (屋久島実習) に続いて行われ、私は引き続きシカ班に参加した。シカ班の目的は、糞サンプルから抽出された DNA の分析手法を理解することである。糞サンプルは、非侵襲的に採取できるサンプルであり、直接観察が困難な動物種や、絶滅危惧により捕獲が禁止されている動物種などの調査を行う上で非常に有用である。内容としては(1)性判別と(2)シーケンシングによるミトコンドリアハプロタイプの特定制という 2 つの実験を行った。
日程は以下のものであった。 5 月 30 日：DNA 抽出、PCR 増幅 5 月 31 日：PCR 増幅(2 回目)
(1)性判別 5 月 31 日：アガロースゲル電気泳動 6 月 1 日：アガロースゲル電気泳動(2 回目)
(2)シーケンシングによるミトコンドリアハプロタイプの特定制 6 月 1 日：DNA 精製、シーケンス反応、シーケンサーによる検出 6 月 2 日：DNA 精製、シーケンス反応、シーケンサーによる検出(ともに 2 回目) 6 月 3 日：シーケンシング分析
糞サンプルには対象個体の DNA だけでなく、餌としている生物種や腸内に生息する細菌、ウイルス、寄生種などの DNA も含まれるため、対象個体の DNA のみを抽出する必要がある。その後、PCR によって特定の領域のみを増幅する。以下でそれぞれの実験の手法について簡単に述べる。
(1)性判別 性判別では、性染色体上に存在し X 染色体と Y 染色体で分子量が異なるアメロゲニン遺伝子を増幅した。DNA は負に帯電しているため、アガロースゲルを用いて電気泳動をすると正極側に引き寄せられる。分子量が大きいほど網目状のゲル内を移動するスピードが遅いため、分子量の違いで DNA を分離することができる。X 染色体を 2 本持つメスでは、219bp の位置にバンドが見られるが、X 染色体と Y 染色体を 1 本ずつ持つオスでは、219bp に加えて 165bp の位置にもバンドが現れる。
(2)シーケンシングによるミトコンドリアハプロタイプの特定制 シーケンシングでは、ミトコンドリア DNA のコントロール領域 (D-loop) を増幅し、DNA 配列を特定した。ミトコンドリア DNA は母親由来であるため、変異の違いによって血縁関係を調べることができる。屋久島では、ハプロタイプ 1 と 2 というふたつの型の存在が知られている。本実習では、4 種のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP) に加えて、蛍光標識された 4 種類のジデオキシヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) を加えて合成を行うジデオキシ法を用いた。結果の分析には MEGA5 というソフトウェアを用いた。

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

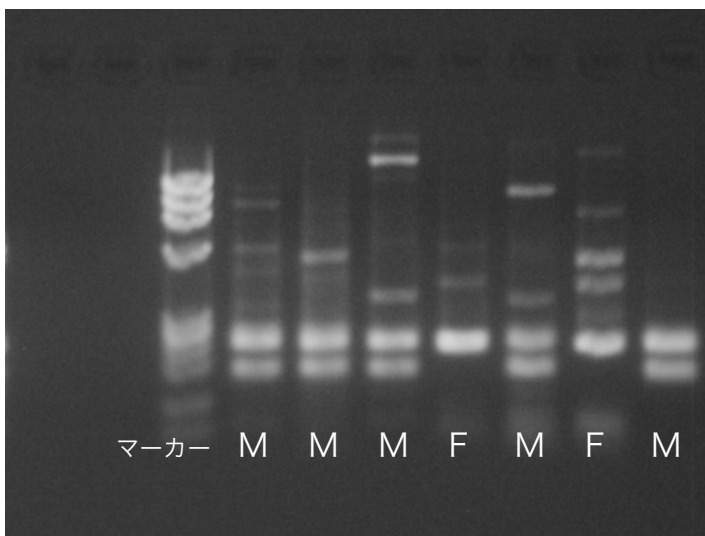
実験は緻密な作業が多く参加者の経験も様々であり、互いに教え合い分担をしながら進めていった。自分ではコンタミネーションが起こらないよう細心の注意を払っているつもりでも指摘を頂くことが多くあり、実験作法について知らないことがたくさんあった。また、どちらの実験も1回目では結果が出なかった。原因は、PCR 増幅を行う際の処理に時間がかかりすぎたことだと考えられる。素早く、正確に作業を行うことが非常に大切であるということも学んだ。4日間の実験で、マイクロピペットの扱いに幾分か慣れたように感じている。以下でそれぞれの実験の結果について大まかに述べる。

(1)性判別

観察時に性判別ができた65サンプル(オス35サンプル、メス30サンプル)のうち、3サンプルが観察時と異なる結果となった。他のメンバーや講師の方々と議論を行い、観察時に性別を見誤った、別個体の糞を採取してしまった、PCR 増幅の前にコンタミネーションが起こったといった可能性が原因としてあげられた。技術の進歩によって、目に見えないものをハイテクな機械で扱うことが増えた科学の世界で、たとえ誤った結果であっても、判定不能とならずはっきり結果として出てしまうのは少し恐ろしいと感じた。出てきた結果を鵜呑みにせず、そこから何が読み取れるのかしっかりと考えるという作業がとても重要であり、それこそが人にできて機械にできない部分であると思う。



ゲルにサンプルを注入する様子



電気泳動の結果の一部 (M:オス、F:メス)

(2)シーケンシングによるミトコンドリアハプロタイプの特定

シーケンシングにより38サンプルから塩基配列を読むことができ、共通する部分は740bpであった。この部分の比較によりハプロタイプの判定を行った結果、これまでに屋久島で見つかったハプロタイプ1と2の他に、確実なもの3つを含む5つのハプロタイプが新たに見つかった(ハプロタイプ3~7)。ハプロタイプの結果と、フィールド科学実習(屋久島実習)で収集した社会的相互交渉のデータとを照らし合わせると、メス同士の交渉が多く見られ、その多くが同じハプロタイプの個体間で行われていた。また、異なるハプロタイプの個体間での交渉が4組あり、その全てにオスが関与していた。データ数が少ないこともあり断定はできないが、この結果はとても興味深かった。フィールドワークでの成果とラボワークでの成果を合わせることで、新しい切り口で物事を捉えることができるというのが、ワイルドライフサイエンスの強みであると感じた。

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)



チューブを並べる様子



シーケンシングにかけるサンプルの準備の様子

糞の鮮度と実験の成功率の関係を調べるために集めたサンプルでは、性判別ではすべてのサンプルで正しい結果を得ることができた。一方、シーケンシングでは、糞をしてからサンプルを採取するまで日が経つほど成功率が下がり、日光にさらされた環境のほうが森の中の環境よりも成功率の低下が顕著であった。サンプルの採取条件や実験の種類によって成功率が違うことがわかり面白かった。

私はこれからの修士研究でマルミミゾウの糞分析を行おうと考えているため、今回の実習は DNA 実験と解析の基礎を学ぶとても良い機会となった。今後の予定としては PWS と CCTBio が共同主催する The 5th International Seminar on Biodiversity and Evolution にてグループでポスター発表を行い、成果を報告する予定である。



ポスター制作の様子

6. その他 (特記事項など)

本実習は PWS リーディング大学院プログラムの支援のもと行われました。実習を受け持っていただきました村山美穂先生をはじめ、ご指導とサポートをいただきました阿部秀明先生、揚妻芳美さま、佐藤悠さま、堀裕亮さま、小林宏美さま、お世話になりました参加メンバーの皆さまに深く感謝いたします。