

# 市販の乾燥ウミホタルの *COII* 遺伝子の塩基のバリエーション Nucleotide variation in the *COII* gene of commercially dried sea fireflies

○紺野ひな<sup>\*1</sup>, 岡田菜月<sup>\*2</sup>, 福士祥代<sup>\*2</sup>, 藤原歩<sup>\*2</sup>, 平安名盛達<sup>\*1</sup>, 安川洋生<sup>\*1</sup>

Hina KONNO<sup>\*1</sup>, Natsuki OKADA<sup>\*2</sup>, Sachiyo FUKUSHI<sup>\*2</sup>, Ayumi FUJIWARA<sup>\*2</sup>, Moritatsu HENNA<sup>\*1</sup>,  
Hiro YASUKAWA<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 岩手大学教育学部, <sup>\*2</sup> 岩手大学技術部

<sup>\*1</sup>Faculty of Education, Iwate University, <sup>\*2</sup>Division of Technical Support, Iwate University

【要約】教育学部の実験科目において、市販の乾燥ウミホタルを出発材料として DNA 粗抽出液を調製し、ミトコンドリア DNA にコードされる遺伝子の PCR 実験を指導した。受講生が増幅した遺伝子のうち *COII* 遺伝子について結果を確認したところ、乾燥ウミホタルには部分的に塩基の異なる個体が混在していることが推測された。そこで、あらためて 16 個体の乾燥ウミホタルについて DNA 粗抽出液を調製し、*COII* 遺伝子の全長 (702bp) を PCR 増幅してシーケンシングし塩基配列を比較した。その結果、塩基配列が完全に一致したのは 5 個体であり、他の 11 個体についてはどの個体も 1 ヶ所以上の塩基置換がみとめられた (計 18 ヶ所)。その内の 2 ヶ所についてはアミノ酸の変化を伴う置換であった。乾燥ウミホタルは PCR 法や遺伝子の突然変異について学ぶ教材として有用かもしれない。

【キーワード】ウミホタル, ミトコンドリア, *COII*

## I. はじめに

PCR 法とは DNA の特定の領域を迅速に増幅する技術であり、基礎研究から応用研究に至る様々な分野で広く利用されている。高等学校の教科書にも記述されており、生徒には正しく理解させておきたい重要な技術の一つである。

これまで筆者らは本学部生を対象に市販の乾燥ウミホタルを出発材料として、DNA 粗抽出液の調製や試薬類の調製等を含む PCR 法の実習を実施してきた (永井 & 安川, 2022)。また、その実習内容の一部を岩手県立高等学校の生徒を対象に体験実習として行った (投稿準備中)。これらは PCR 法の確かな理解のためにたいへんに有効であったと考える。その際の増幅の対象はミトコンドリア DNA にコードされる遺伝子とした。本生物のミトコンドリア DNA については既に全塩基配列が決定されており (Ogoh & Ohmiya, 2004)、国際的なゲノムデータベースに登録され公開されている (GenBank NC\_005306) ため誰でも検索できる。

2021 年度に岩手大学教育学部生を対象として実施した実習で、数名の受講生が *COII* 遺伝子 (電子伝達系に関与するシトクロム c オキシダーゼサブユニット 2 の遺伝子) の一部領域を PCR 法で増幅した。増幅した DNA 断片の塩基配列を解析したところ、市販の乾燥ウミホタルには *COII* 遺伝子に違いのある個体が混在していることが推測された。

ミトコンドリア DNA は核 DNA に比べて変異しやすいことが多くの研究から分かっている。例えば、ヒトと 4 種の類人猿の DNA を比較解析した結果から、ミトコンドリア DNA では核 DNA の 5~10 倍の速さで変異が起きていると報告されている (Brown *et al.*, 1982)。また、ヒト培養細胞を用いた解析から、ミトコンドリア DNA の変異率は核 DNA の変異率の数百倍も高いとの報告もある (Khrapko *et al.*, 1997)。また、ヒトの大腸幹細胞の DNA の解析から、加齢に伴う自然変異蓄積率はミトコンドリア DNA では核 DNA の約 100 倍であると報告されている (Taylor *et al.*, 2003)。こ

のように解析対象や解析手法により算出される数値に違いはあるが、ミトコンドリア DNA が核 DNA に比べて変異しやすいことは多くの研究者の間で見解が一致している。

一方、ミトコンドリア DNA には生命活動に極めて重要なタンパク質や RNA がコードされており、それらに起きる変異は生存に関わる可能性がある。そのため、ミトコンドリア DNA に変異が生じやすいとしても、そのような重要な領域には変異は無い、有ってもミトコンドリアが機能する上で影響の無い、あるいは影響の小さい種類の変異であると思われる。

遺伝情報の変異とその影響に関しては高等学校の生物で学ぶ内容であり、ウミホタルのミトコンドリア遺伝子の比較解析は高校生の学習に有用であると思われる。そこで、筆者らは複数個の乾燥ウミホタルについて *COII* 遺伝子の全長を解読し、塩基にどのような違いがあるかを調査した。本稿ではその結果を報告する。

なお、ウミホタルのミトコンドリア遺伝子の名称については論文やデータベースで複数の表記が混在するが、本稿では Ogoh & Ohmiya の原著論文の本文に記載されている遺伝子名に倣って記すこととする。

## II. 材料と方法

### 1. DNA 粗抽出液の調製

ウミホタルの発光実験セット（株式会社ナリカ）の乾燥ウミホタルを 1 個体ずつ 1.5mL チューブに入れ、ホモジナイザーペッスルで破碎し、DNA 抽出キット version 2（株式会社カネカ）を用い、メーカーのマニュアルに従って DNA 粗抽出液を調製し PCR に供した。

### 2. PCR の反応条件

プライマーはゲノムデータベースに登録されている情報に基づいて次の通りとした (5'-).

Vhcox2F: ctaatattgaatgaagtcattcaactcctc

Vhcox2R: ggaggcaataaagacaataaccttag

酵素試薬キットは KOD One PCR Master Mix Blue（東洋紡株式会社）を用い、反応液組成およ

び反応条件はメーカーのマニュアルに準じた。

## III. 結果と考察

16 個体の乾燥ウミホタルの *COII* 遺伝子の全長 (702bp) を含む 861bp を増幅し、Vhcox2F を用いてシーケンシングした。その結果、塩基配列が完全に一致したのは 5 個体であり、他の 11 個体については 1 個体あたり 1 ヶ所以上の塩基置換がみとめられた (計 18 ヶ所)。それらの塩基を含むコドンを図 1 に示す。図中の sf1~sf16 は解析した 16 個体の乾燥ウミホタルを示し、数字 (39~693) は置換がみられた塩基の位置 (開始コドン ATG の A を 1 とする) を示す。置換していた塩基を赤字で示す。

18 ヶ所の置換のうち 16 ヶ所がトランジション (transition ; A ⇌ G のようなプリン塩基同士の置換および C ⇌ T のようなピリミジン塩基同士の置換) であり、2 ヶ所がトランスバージョン (transversion ; プリン塩基 ⇌ ピリミジン塩基) であった。一般にトランジションはトランスバージョンより起こりやすいとされており、本調査の結果もこれまでの知見に合致するものである。

図 1 に示したコドンがコードするアミノ酸を図 2 に示す。図中の数字 (13~231) は翻訳された際のアミノ酸の番号を示す。なお、図に示した部位を含め、全長の翻訳は無脊椎動物のミトコンドリアのコドン表に従った。

18 ヶ所の塩基置換のうち 16 ヶ所は翻訳されるアミノ酸に変化はなかったが、2 ヶ所 (146 番目の塩基置換と 216 番目の塩基置換) はアミノ酸の変化を伴っていた。これにより 49 番目のコドンが多くのウミホタルでは CGT でアルギニン (Arg) をコードしていたところ、ウミホタル sf2 では CAT でありヒスチジン (図中の赤字で示す His) をコードしていた。また、72 番目のコドンが多くのウミホタルでは ATA でメチオニン (Met) をコードしていたところ、ウミホタル sf14, sf15, sf16 では ATC でイソロイシン (図中の赤字で示す Ile) をコードしていた。

これらのアミノ酸の違いがシトクロム c オキシ

ダーゼサブユニット 2 の機能にどのような影響を及ぼすのかは分からない。しかしながら、この変異を有するウミホタルが自然界で生存していたことは事実であるから、本生物のシトクロム c オキ

シダーゼサブユニット 2 の機能を低下させるような影響は非常に小さかったか、あるいはほとんど無かったと思われる。

	39	93	102	146	150	181	216	217	241	285	336	351	429	609	669	681	690	693
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
sf1	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf2	GGT	ATC	ATC	CAT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAG	GAA	TGG
sf3	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf4	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf5	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf6	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf7	GGT	ATC	ATT	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	CTA	GTG	ATT	AAC	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf8	GGC	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf9	GGT	ATC	ATC	CGT	TAT	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf10	GGT	ATT	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf11	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATC	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf12	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGG	GGG	CAT	GAA	GAA	TGG
sf13	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	TTA	ATA	TTA	TTA	GTG	ATT	AAT	CGT	GGG	CAT	GAA	GAG	TGG
sf14	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	CTA	ATC	CTA	TTA	GTA	ATT	AAT	CGT	GGA	CAC	GAA	GAG	TGG
sf15	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	CTA	ATC	CTA	TTA	GTA	ATT	AAT	CGT	GGA	CAC	GAA	GAG	TGA
sf16	GGT	ATC	ATC	CGT	TAC	CTA	ATC	CTA	TTA	GTA	ATT	AAT	CGT	GGA	CAC	GAA	GAA	TGG

図1. *COI* 遺伝子のバリエーション

	13	31	34	49	50	61	72	73	81	95	112	117	143	203	223	227	230	231
sf1	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf2	Gly	Ile	Ile	His	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf3	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf4	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf5	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf6	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf7	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf8	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf9	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf10	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf11	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf12	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf13	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf14	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf15	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp
sf16	Gly	Ile	Ile	Arg	Tyr	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Ile	Asn	Arg	Gly	His	Glu	Glu	Trp

図2. アミノ酸のバリエーション

#### IV. おわりに

16 個体の乾燥ウミホタルの *COII* 遺伝子を解析したところ塩基の置換が見られたが、これらがウミホタルの生存に大きな影響を与えたとは考えにくい。これは高等学校の生物を学習する上で踏まなければならない点の一つであると考え。高等学校の生物では突然変異や SNP について学習するが、教科書の記載内容は変異によって生物が大きな影響を受けるイメージが強く、生徒らは変異について誤解をする可能性がある。そのため生徒らには、塩基の損傷等は頻繁に起きているが通

常は速やかに修復されていること、元の通りに修復されず変異することもあるが頻繁には起きていないこと、変異には生存に影響が無い場合や極めて小さい場合もあること、変異が生存に有利な場合は進化につながることを理解させる必要があると考える。このような理解が及ばず誤解したまま教育学部に進学した学生に対しては、大学卒業までに正しく理解させるように指導をする必要がある。そのために、高校生に対しては教科書を補完する形で、教育学部生に対しては実験科目の一環として、市販の乾燥ウミホタルを教材とし

て活用することが有効であると考え、高校生や教育学部生を対象に PCR 実習や塩基配列の解析実習を行うことで、塩基や遺伝子というミクロの視点から種や進化というマクロな視点に至る領域について、誤解を排しながら捉えることができるようになることを考える。

また、高等学校の生物教育では遺伝子を扱う技術に接しながら、今日的な生物学の基本的な概念等を学習することが求められている。しかし、これまでは高等学校で生徒らがそれらの技術に実際に接する機会はほとんど無かった。そのような状況を改善するためにも、高校生を対象に乾燥ウミホタルを活用した PCR 法の体験実習を実施することは有益であると考え、実際に実験器具や実験装置を扱いながら学習することで、その技術の原理や有用性を単に知識として記憶するのではなく、実感を持って理解することができるであろう。

乾燥ウミホタルは生物発光の教材としてこれまで多くの教育現場で使われてきた。筆者らはこれを PCR 法の体験学習や、初歩的な遺伝子解析に活用することを考えている。それは、高校生や教育学部生にとって教科書だけでは学べないことを学習することができると共に、生物の共通性、普遍性、多様性についての科学的な視点を養うことにもつながる。乾燥ウミホタルは季節を問わずいつでも安価で購入でき、購入後は長期にわたり保存できる。筆者らは、乾燥ウミホタルを生物および生命現象の確かな理解のための教材として高等学校や教育学部で活用できるように、今後も実習実験をデザインし、実験プロトコルをブラッシュアップする予定である。

## 文献

- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. & Wilson, A. C. (1982): Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution, *J. Mol. Evol.*, 18, pp225-239.
- Khrapko, K., Coller, H. A., Andre, P. C., Li, X. C., Hanekamp, J. S. & Thilly, W. G. (1997): Mitochondrial mutational spectra in human cells

and tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, pp13798—13803.

永井美帆 & 安川洋生 (2022): 乾燥ウミホタルのミトコンドリア遺伝子の PCR 実験, *日本科学教育学会研究会研究報告*, 36, pp57-60.

Ogoh, K. & Ohmiya, Y. (2004): Complete mitochondrial DNA sequence of the sea-firefly, *Vargula hilgendorffii* (Crustacea, Ostracoda) with duplicate control regions, *Gene*, 327, pp131-139.

Taylor, R. W., Barron, M. J., Borthwick, G. M., Gospel, A., Chinnery, P. F., Samuels, D. C., Taylor, G. A., Plusa, S. M., Needham, S. J., Greaves, L. C., Kirkwood, T. B. & Turnbull, D. M. (2003): Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells, *J. Clin. Invest.*, 112, pp1351-1360.

## 付記

本稿では DNA 抽出キット version 2 と KOD One PCR Master Mix Blue を用いた結果を記載した。本学部生を対象とした実習でも以前はこれらを使用していた。しかし 2021 年度の実習からはより簡便な方法として、DNA 抽出キット version 2 を用いずに、乾燥ウミホタルを破碎し純水に懸濁して加熱することにより DNA 粗抽出液を調製する方法に切り換えた。同時に、高等学校の生物の教科書の記載内容を念頭に、KOD One PCR Master Mix Blue ではなく、PCR 用酵素として基本的な Taq DNA ポリメラーゼを含む PCR 酵素試薬に切り換えた。高校生を対象とした PCR 体験実習もそのように切り換えた方法で実施した。