

乾燥ウミホタルを出発材料とした PCR

PCR amplification of the *Vargula hilgendorffii* genes in crude extracts prepared from dried samples○高橋天地*¹, 佐々木知美*¹, 菅井響*¹, 安川洋生*¹Tenchi TAKAHASHI*¹, Tomomi SASAKI*¹, Hibiki SUGAI*¹, Hiro YASUKAWA*¹*¹ 岩手大学教育学部*¹ Faculty of Education, Iwate University

【要約】市販の乾燥ウミホタルを破砕して DNA 粗抽出液を調製し, PCR により DNA の特定の領域を増幅する実験を検討した. 増幅する対象をミトコンドリア DNA にコードされるシトクローム C オキシダーゼサブユニット 1 の遺伝子として, そこから 500bp, 1000bp, 及び 1551bp を増幅する反応を行ったところ, いずれにおいても明瞭な単一の PCR 産物がみとめられ良好な結果を得た. また, 増幅する対象を核 DNA の 18S rDNA として, そこから 500bp, 1000bp, 及び 1906bp を増幅する反応を行ったところ, これについても良好な結果を得た.

【キーワード】ウミホタル, 18S rDNA, *coxI*, PCR

I. 緒言

ウミホタル (*Vargula hilgendorffii*) は海洋性の小型節足動物の一種であり, 刺激により青く発光する. 発光はルシフェラーゼ (酵素) とルシフェリン (基質) の酵素反応による.

ウミホタルの乾燥試料は生物発光や酵素活性の教材として利用されている. 市販の乾燥ウミホタルをすりつぶし, そこに水を加えると鮮やかな青色光が観察される. これまで多くの学校でこのような観察が行われてきたであろうが, 乾燥ウミホタルの他の用途についてはおそらくほとんど検討されることはなかった. そこで筆者らは学校における乾燥ウミホタルの別の用途として, これを出発材料とした PCR が可能かを検討した. PCR は DNA の特定の領域を迅速に増幅する技術であり, 今日では, 基礎研究, 応用研究, 臨床, 犯罪捜査等の様々な分野で広く利用されている. そのため PCR は, 生命科学分野の研究者や技術者を志す生徒にはぜひ経験させたい実験の一つである.

また, PCR は反応原理が明快で理解しやすく, 作業手順も簡単であることから, 高校の発展的

授業の一部としても取り入れやすい. 更に「高等学校学習指導要領 (平成 30 年告示) 解説」においては「遺伝子を扱う技術については(中略) PCR 法を用いた DNA 解析などについての資料を示し, その原理と有用性を理解させることなどが考えられる。」と記されている. これらのことから, PCR は高校の生物担当教員を目指す生徒にもぜひ経験させたい実験の一つである.

本稿では PCR の標的を, ミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされるシトクローム C オキシダーゼサブユニット 1 の遺伝子 (*coxI*) と, 核 DNA にコードされる 18S rDNA とした. これらはいずれもコピー数が多いため PCR の成功率が高いと予想される.

ミトコンドリアは多くの真核生物が有する細胞内器官であり, その内部に数コピーの mtDNA が存在する. mtDNA は環状で, そのサイズは生物種により異なる. 例えばモデル生物として研究によく用いられる出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では 78917bp であり (GenBank NC_027264.1), ヒトでは 16569bp である (GenBank NC_012920.1). ウミホタルの mtDNA

は 15923bp で、2 種の rRNA と 22 種の tRNA、13 種のタンパク質をコードすることが知られている (Ogoh & Ohmiya, 2004; GenBank NC_005306.1). なお、ミトコンドリアが核とは別に独自の環状 DNA を有するのは、ミトコンドリアがかつて細菌であった証拠の一つとされている。

細胞あたりの mtDNA のコピー数も生物種により異なり、出芽酵母では 50~100 コピーとされている。ヒトの場合は組織によっても異なるが、細胞あたりの mtDNA は数百~数千コピーとされる。ウミホタルについては知見がない。

真核生物の 18S rRNA は、5.8S RNA, 25S rRNA, 5S rRNA と共にリボソームの構成要素であり、タンパク質合成に関わる極めて重要な分子である。生物が生存する上でタンパク質合成は恒常的に必須であり、そのために常に多量の rRNA を細胞内に準備しておかなければならない。これを保障するために生物は多コピーの rDNA を有していると考えられている。上記 4 種の rRNA をコードする塩基配列は核 DNA 上に近接して配置しており、それを 1 ユニットとして 100 コピー以上が直列して繰り返している (出芽酵母においては約 150 コピー、ヒトにおいては約 400 コピー)。ウミホタルに関しては、18S rDNA の塩基配列は部分的に解読されゲノムデータベースに登録されている (GenBank AB076654.1) が、その周辺領域の情報やコピー数については報告がない。

ウミホタルに関しては mtDNA のコピー数も rDNA のコピー数も明らかにされていないが、他生物の知見からいずれも多コピーであることが予想され、*cox1* と 18S rDNA を標的とした PCR は決して困難ではないと思われる。

II. 材料と方法

1. DNA の調製

市販の乾燥ウミホタルから、簡易 DNA 抽出キット version2 (カネカ) を用いて次のように DNA 粗抽出液を調製した。小型の乾燥ウミホタル 1 個体を 1.5mL チューブに入れペッスルで入念に

破碎し、キットの試薬 A を 100 μ L 添加して混合し加熱 (98°C にて 8 分) した後、室温に戻してからキットの試薬 B を 14 μ L 添加し混合した。

2. PCR

PCR には KOD One PCR Master Mix-Blue (TOYOBO) を用いた。反応系を 25 μ L とし、DNA 粗抽出液の希釈液 (滅菌水を用いて $10^2 \sim 10^3$ 倍に希釈) を 1 μ L、酵素溶液を 12.5 μ L、プライマー (各 10 μ M) を 0.75 μ L ずつ加えた。使用したプライマーは表 1 の通りとした。増幅反応は「98°C \times 10 秒 \rightarrow 55°C \times 5 秒 \rightarrow 68°C \times 5 秒」を 1 サイクルとしてこれを 40 サイクル行った。

表 1. 使用したプライマーの塩基配列と PCR 産物の鎖長

Target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>cox1</i>	cxF1: atgtcaactcaattaatgcatg cxR1: aggaaattaatagctccagctaagg	500
	cxF1: atgtcaactcaattaatgcatg cxR2: agttagcaccagacagggttc	1000
	cxF1: atgtcaactcaattaatgcatg cxR3: ttattgtcatggtgaagggatttctg	1551
18S rDNA	18F1: tacctggttgatcctgccagtag 18R1: ttattttctgctactacctccccctg	500
	18F1: tacctggttgatcctgccagtag 18R2: tacattcttggaatgcgttcg	1000
	18F1: tacctggttgatcctgccagtag 18R3: tgatccttccgcaggttcacc	1906

3. 電気泳動

反応後の試料の 10 μ L を 1.5% のアガロースゲルにアプライし、100V (CV) にて電気泳動した。泳動バッファーは TAE buffer を用いた。PCR 産物の検出には蛍光試薬 Midori Green Xtra (FastGene) を用いた。

III. 結果

1. *cox1* の PCR

ウミホタルの *cox1* (1551bp) について、明らかにされている塩基配列に基づいて 1 種類のフォワードプライマー (cxF1) と 3 種類のリバースプライマー (cxR1, cxR2, cxR3) を合成し、

それらを組み合わせて 500bp, 1000bp, 及び 1551bp を増幅する反応を行った。

結果を図 1 に示す。レーン M にはサイズマーカーを、レーン 1, 2, 3 には DNA 原液の 10^2 倍希釈液を PCR に供し増幅した産物をアプライした。レーン 1 は cxF1 と cxR1 による PCR 産物、レーン 2 は cxF1 と cxR2 による PCR 産物、レーン 3 は cxF1 と cxR3 による PCR 産物であり、いずれも明瞭に検出された。なお、図には示さないが、DNA 原液の 10^3 倍希釈液を PCR に供した場合も良好な結果が得られた。

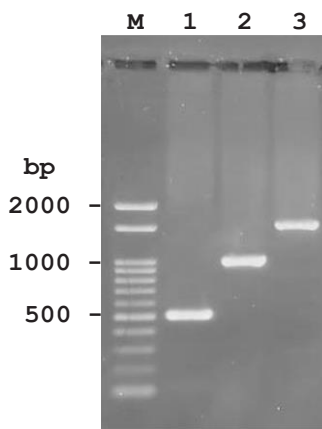


図 1. *cox1* を標的とした PCR の結果。

2. 18S rDNA の PCR

ゲノムデータベースに登録されている塩基配列 (1906bp) に基づいて 1 種類のフォワードプライマー (18F1) と 3 種類のリバースプライマー (18R1, 18R2, 18R3) を合成し、それらを組み合わせて 500bp, 1000bp, 及び 1906bp を増幅する反応を行った。

結果を図 2 に示す。レーン M にはサイズマーカーを、レーン 1, 2, 3 には DNA 原液の 10^2 倍希釈液を PCR に供し増幅した産物をアプライした。レーン 1 は 18F1 と 18R1 による PCR 産物、レーン 2 は 18F1 と 18R2 による PCR 産物、レーン 3 は 18F1 と 18R3 による PCR 産物であり、いずれも明瞭に検出された。なお、図には示さないが、DNA 原液の 10^3 倍希釈液でも良好な結果が得られた。

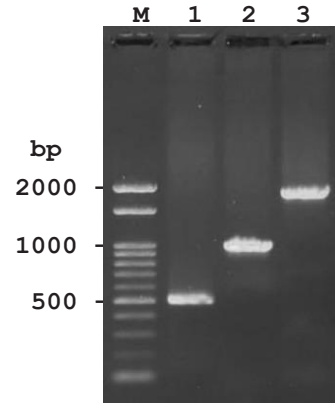


図 2. 18S rDNA を標的とした PCR の結果。

IV. 考察

上述の通り、乾燥ウミホタルを出発材料とした *cox1* の PCR と 18S rDNA の PCR は、いずれも可能であることが分かった。*cox1* と 18S rDNA は真核生物の分子系統解析に関連する研究分野では重要なツールとして利用されている。この点に言及しながら授業を展開すると、目覚ましい発展を続ける生命科学の一端に触れる機会を生徒たちに与えることができるであろう。

本稿では 1000bp を超える鎖長の PCR も行ったが、高校においては 400~500bp 程度の鎖長の PCR が適切であろう。この鎖長であれば良好な結果が得られる可能性が高く、電気泳動の結果も判定しやすい。より短い領域を増幅する PCR も可能であるが、その場合は伸長反応を 5 秒ではなく 1 秒に設定する方が良好な結果が得られるであろう。また、電気泳動には短鎖 DNA 用のアガロースゲルを用いる方が PCR 産物をシャープなバンドとして検出できる。生命科学系の研究室でよく用いられるポリアクリルアミドゲルは、ゲル化前のモノマーに神経毒性があることと、ゲルの作成に経験を有することから高校では勧められない。

V. 課題

生徒に乾燥ウミホタルの発光を観察させてからルシフェラーゼ遺伝子の PCR をすれば今日的な生命科学分野の理解が一層深まることが期待

できる。しかしこれを実現するには、下記の通り少なくとも3つの取組むべき課題がある。

①ウミホタルのルシフェラーゼに関しては cDNA の塩基配列は解明されているものの (Thompson, *et al.*, 1989; Ishida, *et al.*, 2018), 核 DNA における塩基配列は解明されていない。そのためイントロンに関する情報がなく、PCR 用の適切なプライマーが設計できない。

イントロンに関する情報を得るには、核 DNA にコードされるルシフェラーゼ遺伝子領域の全塩基配列を決定する必要がある。そのためには、ゲノム DNA ライブラリーを作成し、cDNA をプローブにハイブリダイゼーションを行い、当該領域をクローニングして塩基配列を決定するという古典的な方法か、ゲノム DNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーにより全ゲノムを解読し、その中からルシフェラーゼ遺伝子領域の塩基情報を抽出するという今日的な方法が想定される。いずれかの方法で塩基配列を明らかにした後に、適切なプライマーを設計して PCR 条件を検討することになる。

②ルシフェラーゼ遺伝子のコピー数は *cox1* や 18S rDNA に比べてはるかに少ないと思われる。そのため、電気泳動で検出できるほどには PCR 産物が増幅しないことや、非特異的な増幅により複数の PCR 産物が検出されることが想定される。このような場合、生命科学系の研究室ではタッチダウン PCR やネステッド PCR により問題を解決することが多いが、高校生を対象とした実験では基本的で標準的な操作を指導したい。そのためこの点でプロトコルの作成に時間を要すかもしれない。

③そもそも乾燥ウミホタルでは DNA が損傷しており mtDNA と rDNA 以外は PCR ができない可能性がある。生物試料の DNA が損傷していても mtDNA と rDNA はコピー数が多く PCR が可能なことがあるが、それら以外はコピー数が少なく PCR が困難な場合が少なくない。ウミホタルを採取後、直ちに -80°C で凍結すれば DNA の損傷も少なく PCR が可能かもしれないが、乾燥ウミホ

タルを用いることを前提とするならルシフェラーゼ遺伝子の PCR は非常に難しいかもしれない。

このように3つとも困難な課題であるが、教育の質的向上を図るためにはぜひ挑戦したい課題でもある。

参考文献

- Ishida, Y., *et al.* (2018): Comparison of DNA sequence encoding hydroxynitrile lyase from the invasive millipede, *chamberlinius hualienensis*, collected at Kagoshima, Shizuoka, and Hachiojima, Tokyo, *Bull. Toyama Pref. Univ.*, 28, pp35-40.
- 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.
- Thompson, E. M., *et al.* (1989): Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, pp6567-6571.

補足：出芽酵母は世界中の研究室で解析されており、様々な種類（分離株や系統保存株）がある。mtDNA の塩基配列にもバリエーションがあり、多くの解析結果が公表されている。本稿ではそれらの内、GenBank に reference genome として登録されている *S. cerevisiae* NCYC3594 の mtDNA の塩基数を記載した。本稿執筆の時点で GenBank には 32 件の *S. cerevisiae* mtDNA の塩基配列が登録されており、それらのサイズは 70523bp から 89507bp にわたる。