

乾燥ウミホタルの*cox1*と18S rDNAのPCR

高橋天地*, 安川洋生**

(令和3年2月1日受理)

TAKAHASHI Tenchi, YASUKAWA Hiro

PCR Amplification of *cox1* and 18S rDNA Genes in Dried Sea Firefly

1. はじめに

1. 研究の背景

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。この発光はルシフェリンとルシフェラーゼの酵素反応によるもので、乾燥ウミホタルは生物発光や酵素活性の教材として利用されている。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。昨今では新型コロナウイルスの蔓延に伴い、PCRが一般の人々の興味関心の的ともなっている。

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。また、「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は高校においてぜひ実施したい実験の一つである。

2. 先行研究

PCRの成否はDNAの濃度、純度、損傷の程度、等に大きく影響される。生命科学系の研究室であれば、生物試料から高純度で十分な濃度のDNAを調製してPCRに供することも可能であるが、高校では試薬や設備の都合によりそれができず、DNAの粗抽出液を調製してPCRに用いることが前提となるであろう。筆者らはこれまでの経験から、KOD DNAポリメラーゼを用いれば不純物の含まれるDNA溶液であっても良好な結果が得られるのではないかと考えた。

また、乾燥ウミホタルは必ずしも理想的に保存されているとは限らず、DNAが損傷している可能性が高い。そこでPCRの標的を、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(*cox1*)と、核DNAにコードされる18S rDNAとした。様々な生物種においてこれらの遺伝子はいずれも多コピーであり、理想的な保存状態ではない試料からもPCRが可能である例が数多く報告されている。ウミホタルにおいても*cox1*と18S rDNAは多コピーであることが想定され、乾燥試料からのPCRは不可能ではないと思われた。

筆者らは乾燥ウミホタルを出発材料としてDNA粗抽出液を調製し、KOD DNAポリメラーゼを用いてPCRを行ったところ、*cox1*については500bpから1551bpのDNA断片を、18S rDNAにつ

*岩手大学教育学部, **岩手大学教授

いては500bpから1906bpのDNA断片を増幅可能であることを示すことができた(高橋 他, 2020). なお, *coxI*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.

3. 本研究の目的

筆者らは先行研究により乾燥ウミホタルを出発材料としたPCRが可能であることを示し, その段階での研究目的を果たすことができた. しかし, 用いた酵素がKOD DNAポリメラーゼであり, 汎用のTaq DNAポリメラーゼより高価である点が, 高校での実施にあたって検討の余地があると思われる.

そこで筆者らは, Taq DNAポリメラーゼを用いて乾燥ウミホタルを出発材料としたPCRが可能かどうかを検討した. なお, Taq DNAポリメラーゼは汎用の酵素であり複数の試薬メーカーから販売されているが(酵素単品としても酵素キットとしても), 各メーカーの酵素の比較を本研究の目的とはしない. また, KOD DNAポリメラーゼとの比較も本研究の目的とはしない.

2. 方法

1. DNAの調製

市販の乾燥ウミホタルのうち小型の1個体を1.5mLチューブに入れペッスルで入念に破碎した. ここから簡易DNA抽出キットversion 2 (Kaneka)を用いてDNA粗抽出液を調製し, 滅菌水で10倍に希釈してPCRに供した.

2. 増幅反応

PCR酵素は2社(A社, B社)のTaq DNAポリメラーゼを用い, 反応液の組成はそれぞれのメーカーのプロトコルに準じた. A社の酵素の場合は, 反応液量を20 μ Lとし, 希釈したDNA粗抽出液を1 μ L, フォワードプライマーとリバースプライマー(各10 μ M)を1.5 μ Lずつ加えた. B社の酵素の場合は, 反応液量を25 μ Lとし, 希釈したDNA粗抽出液を1 μ L, フォワードプライマーとリバースプライマー(各10 μ M)を1.5 μ Lずつ加えた. プライマーは表1に示す. cxF1(フォワードプ

ライマー)とcxR1(リバースプライマー)を用いて *coxI*の一部(500bp)を増幅した. また, 18F1(フォワードプライマー)と18R1(リバースプライマー)を用いて18S rDNAの一部(500bp)を増幅した.

表1. 使用したプライマー

名称	塩基配列 (5'-)
cxF1	atgtcaactcaattaatgcgatg
cxR1	aggaaattaatagctccagctaagg
18F1	tacctggttgatcctgccagtag
18R1	ttatTTTTcgtcactacctccccgt

反応サイクルの条件はそれぞれのメーカーのプロトコルに準じた. すなわちA社の酵素を用いた場合は, 1サイクルの反応を「94°C \times 15秒 \rightarrow 55°C \times 15秒 \rightarrow 72°C \times 40秒」としてこれを30回繰り返した. B社の酵素を用いた場合は, 1サイクルの反応を「94°C \times 5秒 \rightarrow 55°C \times 1秒 \rightarrow 68°C \times 4秒」としてこれを30回繰り返した.

3. 電気泳動

反応後の試料を1.5%のアガロースゲルにアプライし, 100V(定電圧)にて電気泳動した. 緩衝液はTAE(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)を用いた. PCR産物の検出には蛍光試薬であるミドリグリーン Xtra (FastGene)を用い, 青色LED(470 nm)にて観察した.

4. シーケンシング

PCR産物であるDNA断片を精製し塩基配列を確認した. *coxI*から増幅した500bpのDNA断片についてはcxF1をシーケンシングプライマーとして用いた. 18S rDNAから増幅した500bpのDNA断片については18F1をシーケンシングプライマーとして用いた. いずれも片鎖のみをワンパスで確認した.

3. 結果と考察

1. PCRの結果

*coxI*については, cxF1とcxR1を用いて500bpの領域を増幅する反応を行った. 18S rDNAについては, 18F1と18R1を用いて500bpの領域を増幅す

る反応を行った。いずれも2社のTaq DNAポリメラーゼを用いた。結果を図1に示す。図1AはA社の酵素による結果、図1BはB社の酵素による結果である。レーンMにはサイズマーカーを、レーン1にはcxF1とcxR1を用いて増幅したPCR産物を、レーン2には18F1と18R1を用いたPCR産物をアプライした。矢印はPCR産物を示す。いずれの反応においてもPCR産物が明瞭にみとめられた。なお、DNA粗抽出液の100倍希釈液を用いた場合でも明瞭なPCR産物がみとめられた (data not shown)。

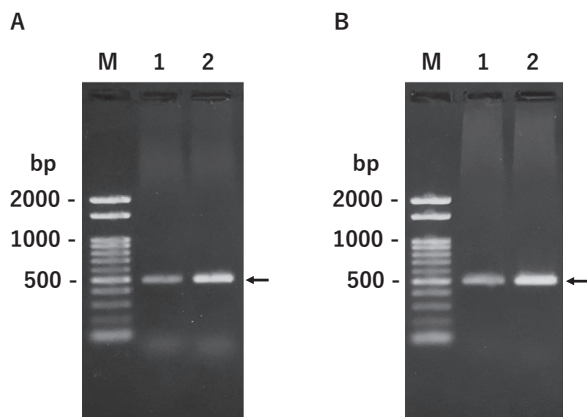


図1. PCRの結果

これらのPCR産物を精製してシーケンシングした結果、*cox1*、または18S rDNAに由来するDNA断片であることが確認できた (data not shown)。これらの結果より、乾燥ウミホタルを出発材料としてDNA粗抽出液を調製し、ここから*cox1*と18S rDNAをPCR増幅することは、Taq DNAポリメラーゼを用いても可能であることが分かった。

2. 展望

乾燥ウミホタルを出発材料としたPCRを高校で実施する際も、Taq DNAポリメラーゼを用いて良好な結果を得られると思われる。Taq DNAポリメラーゼは開発から長い期間を経て様々な製品が開発されており、予算や実施規模等の実情に合わせて選択し購入することができる。酵素を単品で購入することもできるが、ready to useのキットの方が操作が簡単であり高校生には扱いやすいと思われる。

PCRが開発された後、世界中の研究者・技術者

により新たなPCR酵素の探索・開発がされ、同時に反応系のブラッシュアップ等が行われた。その結果、更に増幅効率が高く、更に正確性が高く、多少の不純物があっても阻害されずに増幅できるようになった。また、標的がDNAではなくRNAであっても、逆転写酵素によりRNAからDNAを合成し、これを鋳型としてPCRするRT-PCRも早い段階で開発された。RT-PCRは遺伝子の転写レベルの解析や、RNAウイルスの検出に極めて重要な技術である。2020年にパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスを検出するためのPCR検査にもこの技術が用いられている。このような反応系の進化により、PCRの有用性はますます高まった。

反応系だけではなく検出系も進化し、標的DNAの半定量が可能なりアルタイムPCR (リファレンスがあれば絶対定量も可能) や、絶対定量が可能なデジタルPCRが開発され研究現場に投入された。高校ではPCRについて教科書の記載内容を説明した上で、進化し続ける科学技術に言及しながら授業を展開すると、生徒たちの興味関心を引き出すことができるであろう。

参考文献等

- 高橋天地, 佐々木知美, 菅井響, 安川洋生 (2020) 乾燥ウミホタルを出発材料としたPCR, 日本科学教育学会研究会研究報告, 35(2), pp43-46.
ウミホタルのミトコンドリアDNAの塩基配列情報: GenBank NC_005306.1.
ウミホタルの18S rDNAの塩基配列情報: GenBank AB076654.1.