

乾燥ウミホタルのミトコンドリア遺伝子の PCR 実験 PCR amplification of mitochondrial genes of dried *Vargula hilgendorffii*

○永井美帆, 安川洋生

Miho NAGAI, Hiro YASUKAWA

岩手大学教育学部

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 法によりミトコンドリア DNA の一部領域を増幅する実験実習を検討した. 受講生にはゲノムデータベースを検索して増幅する遺伝子を選定させ, プライマーを設計させ, PCR 法を深く学びつつ周辺知識も習得できるようにした. 増幅産物を電気泳動したところほとんどの受講生が良好な結果を得ることができた. 実習書を改訂しながら引き続き実施することで教育の質的向上に貢献できると考える.

【キーワード】ウミホタル, ミトコンドリア, PCR

I. 緒言

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, 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. 今日では PCR という言葉は聞かない日がないほど多くの人を使うようになり, PCR 法は正しく理解しておくべき技術である. 高等学校学習指導要領解説には「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. したがって PCR 法は高校で積極的に取り入れたい実験の一つであり, 教員を目指す学生には深く学ばせておきたい技術である.

PCR法を用いた実験実習は教員養成課程でも実施されているであろうが, 予め準備された試薬類を混合して想定通りの結果が得られるかを確認するケースが多いと思われる.

私たちは, 教員を志望する教育学部生を対象に PCR 法の確かな理解のために, ゲノムデータベースの利用, 試薬類の調製, PCR プライマーの設計, 等を含む実践的な PCR 法の実験実習を行った. その際の増幅の対象はウミホタル (*Vargula hilgendorffii*) のミトコンドリアの遺伝

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⁽¹⁾, ゲノムデータベースでも検索できる. 実験実習は具体的には次の通り実施した.

市販の乾燥ウミホタルを破砕し, 簡易 DNA 抽出キット version 2 (Kaneka) にて DNA 粗抽出液を調製し, 滅菌水で希釈して PCR に用いた. 16名の学生を4つの班に分け, ミトコンドリアにコードされる *cox1* 遺伝子の一部 (500bp) を標的とした PCR を指導した. これは次の実験実習日以降のための練習であり, あらかじめ調製したプライマー溶液を受講生に配布した. 酵素試薬には KOD One PCR Master Mix Blue (TOYOBO) を用いた. 受講生は配布された実習書に従って反応液を調製し, PCR 装置にセットして連鎖反応を開始した. 連鎖反応の間に, 受講生に電気泳動用のアガロースゲル (蛍光色素であるミドリグリーン Xtra (FastGene) を含む) の調製を指導した. 所定のサイクル数の反応が終了した後, PCR 産物の一部をアガロースゲルにアプライして電気泳動した. 電気泳動後に受講生に, 青色 LED の青色光 (470nm) をアガロースゲルに照射して PCR 産物を観察し, 各自のスマホ等で撮影するように指示した.

次の実験実習日に、各班でゲノムデータベースにアクセスし、ウミホタルのミトコンドリア DNA を検索し、増幅する対象を選定し、プライマーを設計するように指示した。その際、プライマーの設計に関する基本的な情報を提供し、PCR 産物の鎖長を 400~500bp 程度とするように指示した。指導教員がプライマーの情報を取りまとめて業者にメールで送信し合成を依頼した。数日後にプライマーは所定の濃度の水溶液として到着した。

次の実験実習日に、各班に設計したプライマー配り、実習書に従って反応液を調製するように指示した。全員の反応液を PCR 装置にセットし連鎖反応を行った後、反応液の一部をアガロースゲルにアプライして電気泳動した。電気泳動後に青色光を照射して PCR 産物を撮影するように指示した。

このように実際の研究現場に近い実践的な PCR の実験実習を行った。本稿ではその結果を報告する。なお、各班の PCR 産物は精製し PCR プライマーの一方を用いてシーケンシング（塩基配列の解読）した。日程の都合でこの工程は実験実習が終了した後に行い、受講生には後日解析結果を伝えた。

II. 各班の結果と受講生のコメント

1 班の結果

増幅する対象として *ND2* 遺伝子を選択した。その理由は「生物の呼吸やエネルギー生成に関与しているこの遺伝子についてより深く学びたいと考えた。」であった。

この遺伝子の一部 (458bp) を増幅するために次のプライマーを設計した。

5'-taacggaaccgtaattacc

5'-tgaagagtaggctaggagag

電気泳動の結果は図 1 の通りであった。M はサイズマーカーであり、1~4 はこの班の受講生の PCR 産物である（この並び順は全ての班で統一した）。3 名については明瞭な PCR 産物が観察できたが 1 名については PCR 産物が確認さ

れなかった。その 1 名については、PCR 反応液を調製する際に試薬の一部を入れ忘れた可能性が高いと思われたため、実習書を改訂することにした。改訂版では、加える試薬名の横にチェック欄を設け、学生が試薬を反応チューブに入れる度に自身でチェック (✓) を記入し、入れ忘れを防止できるようにした。

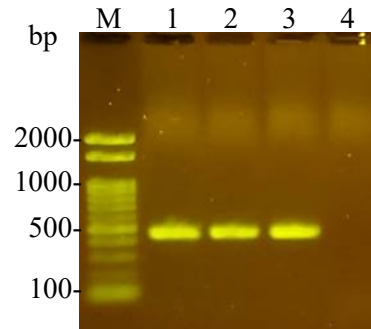


図 1. 1 班の PCR 産物の電気泳動画像。

PCR 産物の塩基配列については、サンガー法の反応原理と DNA シーケンサーの動作原理に起因する理由により PCR 産物の両末端付近は解読できなかった（全班の PCR 産物で同様であった）。解析した結果の一部を図 2 に示す。ゲノムデータベースに登録されている *ND2* の塩基配列とほぼ一致しており、想定領域が増幅されたと判断した。ただし既知の配列とは 2 塩基が異なっていた（下線で示す塩基）。

```
AAATAAACCTCCTCAGATTTATCCCCCTCCTCATAACAATCCCCC
AATCAACCGAAAGAGCCATTAATACTTTTTTATACAAGCCATTG
GCTCAATAATTATTATGTTCTAATTATAACCCCAATACTAATCT
CCTCTAACACTCTCCTCCTATGTGCCCTCGCTATTAAGTAGGAG
CAGCCCCTTTTCACCTTTGACTTCCTCATGCTATTAAGGGACAT
CCTGGCTAAACTCAGCCACCTTACTCTCTTGGCAAAAAATTGCC
CTCTTCCCTTATGACTTTCACAAAAAATCCCCCATCATACTCG
TGTTAATTACC GCCAGCGCAATCGCAGGTGCCTGAGGTGGGATCA
```

図 2. 1 班の PCR 産物の塩基配列。

2 班の結果

「ATP が合成される過程に興味を持った。」という理由から増幅する対象として *cox2* を選択した。

この遺伝子の一部 (501bp) を増幅するために次のプライマーを設計した。

5'-aatagattcccagacgcag

5'-cctcatgcgtggataacatc

電気泳動の結果は図3の通りであった。4名とも明瞭なPCR産物が観察できた。レーン2のPCR産物が歪んでいるのは、アガロースゲルを作製した時（コームを抜く際）か、サンプルをアプライした時にウェルを破損させたものと思われる。

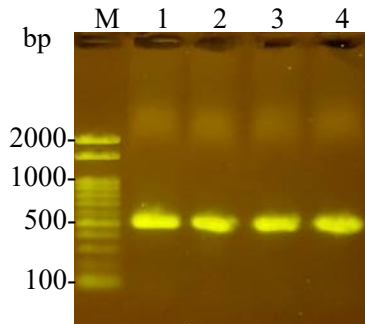


図3. 2班のPCR産物の電気泳動画像。

PCR産物のシーケンシング結果の一部を図4に示す。想定領域が増幅されていたと判断できた。ただし登録されている *cox2* 遺伝子とは1塩基が異なっていた（下線で示す塩基）。

```
TGCTATGAGATTTCATCACCCCTTATCTTCGTCTTAATCTCTACGT
AGGAACTATCATTTTTAACCACCGTTACACTAGCCGCTTCCTTCT
CGAACAACAGACATTAGAAACAATTTGAACCATTGTTCCAGTTTT
TATATTACTTTTTCTAGCCGTTCCCTCTTAAAAATCCTTTACAT
GGTTGAAGAGCTTACTTCCCCCAAGTGACTTTAAAAGCTATTGG
TCATCAGTGATATTGAACCTACGAATACTCAATTCAGACACAAA
CAATCCAGAATACTCCACCTCAACTATCAACTTTGATTACATACAT
GCTACCAGAATCTGCCCTTCTCCCCCAAGATTTTCGTAATTATGA
AGTAGACCACCGCCTCTATTGCCAGAAACACCCAATGCCGCGT
CCTGACCACTTCCAC
```

図4. 2班のPCR産物の塩基配列。

3班の結果

増幅する対象として *cox3* 遺伝子を選択した。その理由は「この遺伝子の産物は私達のエネルギー源となる ATP の合成に関与する。そのような重要な遺伝子に興味を持った。」であった。

この遺伝子の一部 (478bp) を増幅するために次のプライマーを設計した。

5'-ccatggcccttattgaccgg

5'-cagcgaatccttaccagg

電気泳動の結果は図5の通りであった。4名ともPCR産物が観察できた。1~3のPCR産物が繋がっているように見えるのは、アガロースゲルの作製時かアプライ時にウェルを破損させ、PCR産物が流れ出たものと思われる。

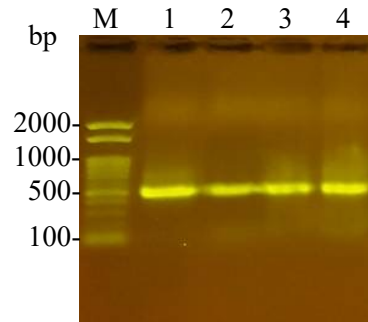


図5. 3班のPCR産物の電気泳動画像。

PCR産物のシーケンシング結果の一部を図6に示す。想定領域が増幅されていたと判断できた。ただし登録されている *cox3* 遺伝子とは1塩基が異なっていた（下線で示す塩基）。

```
TTCCACCTCAACAGCCCCCTACTATTTTTTACCAGACTTTTACTC
TTAATCGGCTGTGTCTGACGATGAGCCATTGATATTTGTGACGAA
AGTTCCTTAGGGTTTCACACTAAACCTGTCCAAAGAATCATGATT
ACCGGGTTCATTATCTTTATCCTCAGAGAAATCGCCCTGTTTGCC
TCCTCTTTTTGAGCCTTCTTTACTAGGGCACTCGTTCCTACCCCA
GAAATPGGGCTAACATGGCCCCCAAGGAATCCACATTCTTCC
CCTTCAGGCGGCCCTCTCCTAGGAACCTTATTACTCTATCTCA
GGGGCATTCTCACATGGTCCCACCACGCAATGACCACAGGACAA
```

図6. 3班のPCR産物の塩基配列。

4班の結果

増幅する対象として *ND2* 遺伝子を選択した。その理由は「ヒトの *ND2* 遺伝子の一塩基多型は生活習慣病に関連していることが示唆されており興味があった。」であった。1班と同じ遺伝子を選択したが、選択理由は二つの班でそれぞれ異なっていた。

この遺伝子の一部 (449bp) を増幅するために次のプライマーを設計した。

5'-attcagtcctgaataggcc

5'-aggtacagagtcaggctatg

電気泳動の結果は図7の通りであった。4名とも明瞭なPCR産物が観察できた。

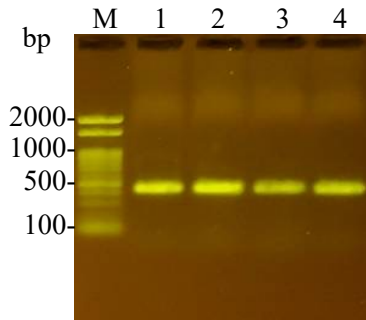


図 7. 4 班の PCR 産物の電気泳動画像.

PCR産物をシーケンシングした結果の一部を図 8 に示す. 想定領域が増幅されていたと判断できた. ただし既知の塩基配列とは 2 塩基が異なっていた (下線で示す塩基).

```
ATCCCCCAATCAACCGAAAGAGCCATTAATACTTTTTTATACA
AGCCATTGGCTCAATAATTATATGTTTCCTAATTATAACCCCAAT
ACTAATCTCCTCTAACACTCTCCTCTATGTGCCCTCGCTATTAA
ACTAGGAGCAGCCCTTTTCACTTTTGACTTCCTCATGCTATTAA
AGGGACATCTGGCTAAACTCAGCCACCTTACTCTCTTGGCAAAA
AATTGCCCTCTTTCCCTTATGACTTTTCAAAAAACTCCCCCAT
CATACTCGTGTTAATTACCGCCAGCGCAATCGCAGGTGCCTGAGG
TGGGATCAACGAACTCGGAATTAAACCTCTCCTAGCCTACTCTTC
```

図 8. 4 班の PCR 産物の塩基配列.

受講生のコメント

実験実習後に受講生のコメント (無記名) を回収した. 次のようなコメントがあり, 受講生の興味関心が深まったようであった.

「今回の実習を通して PCR についていろいろな側面から学ぶことができた. 新型コロナウイルスの PCR 検査とは違う部分もあると思うので調べて理解を深めたいと思った.」「高校の授業で習ったときは, あまり理解できないままでしたが, 今回の実習を通して特にプライマーの設計を行ったことで理解することができました. 今回得たものはまだまだ初歩だと思いますしもっと知識をつけたいです.」「医療現場で行われている PCR について私たちが行ったものとどう違うのか知りたい.」

Ⅲ. 考察

このように, 市販の乾燥ウミホタルを出発材

料にして教育学部生を対象に実践的な PCR の指導を行ったところ概ね良好な結果を得た. 教育の質的向上を図るために実習書を改訂しながら引き続き実施する予定である.

上述の通り PCR 産物には既知の塩基配列とは異なる塩基が確認された. 練習として増幅した *cox1* 遺伝子の一部にも既知の塩基配列とは複数の違いが確認された. これらは塩基の多型かもしれないが, 他の可能性も含めて検討が必要である.

ところで, 乾燥ウミホタルはルシフェラーゼとルシフェリンによる発光実験によく使用される. 学生にこの発光を観察させてからルシフェラーゼ遺伝子の PCR をすれば今日の生命科学分野の理解が一層深まることが期待できる. これまではルシフェラーゼ遺伝子が未解明でプライマーが設計できず PCR ができなかったが, 本稿投稿の前年に解明され⁽²⁾, PCR が実験室レベルでは可能となった. 今後, 乾燥ウミホタルを出発材料として実験実習を行うための課題や PCR 条件を検討する予定である.

附記: 本稿は日本理科教育学会第 60 回東北支部大会において発表した内容⁽³⁾を発展させたものである.

参考文献

- (1) 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.
- (2) Inoue, S. (2021): Multiple *Cypridina* luciferase genes in the genome of individual ostracods, *Vargula hilgendorffii* (*Cypridina hilgendorffii*), *Photochem. Photobiol.*, DOI: 10.1111/php.13479.
- (3) 永井美帆 & 安川洋生 (2021): 市販の乾燥ウミホタルのミトコンドリア遺伝子の PCR 実験, *日本理科教育学会第 60 回東北支部大会論文集*, p35.