

高校生の PCR 体験実習に向けた ウミホタルの *COII* 遺伝子の解析

藤原 歩¹、安川洋生² (岩手大学 理工学系技術部¹、教育学部²)

FUJIWARA Ayumi, YASUKAWA Hiro :

Analysis of *Vargula hilgendorffii* *COII* gene for hands-on PCR training for high school students

We amplified and analyzed the nucleotide sequence of the gene for the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (*COII* gene; 702 bp) of sea firefly *Vargula hilgendorffii* collected at Hekinan City, Aichi Prefecture. The results obtained from 15 specimens showed that the sequences of the gene in eight specimens were completely identical, while those in seven had base substitutions. The results also showed that the base substitutions were found in 10 sites in the gene, two of which changed codons resulting in amino acid substitutions. *Vargula hilgendorffii* would be useful material for learning about PCR amplification, mutation and genetic variation.

1. はじめに

1. 背景

遺伝子の変異について、岩手大学教育学部の学生を対象に無記名のアンケート調査をしたところ (2023 年 10 月 6 日実施。回答者は、2 年生 49 名と 4 年生 1 名の計 50 名)、ほとんどの学生が変異によって生物の形状や機能になんらかの変化が起きる旨の回答をしており、生存する上で影響が無い変異や、影響の極めて小さい変異については考慮していないようであった。また、17 名 (34%) は奇形や病気を連想する趣旨の回答をしており、遺伝子の変異は生物に有害であると考えているようであった。

生物の遺伝情報の変異とその影響は、高等学校の生物で学ぶ内容であり、教科書にはタンパク質コード領域における塩基の欠失や挿入の影響について図と共に詳細に記述されている。また、一塩基の置換に起因する鎌状赤血球貧血症についても図と共に詳細に記述されている。それらが高校生に、変異は生物に有害であるとの印象を与えるのかもしれない。

遺伝情報の変異はタンパク質コード領域にだけ起こるのではなく、それ以外の領域 (イントロンを含む非コード領域) にも起きる。高等学校の教科書ではその点についての説明は少ないようであるが、タンパク質の翻訳に関する解説との関連からそのようにしているものと思われる。また、非コード領域に変異が起きても生体に重大な影響を与えることが少ないと考えられ、解説に多くのスペースを割く必要性は低いとの判断が

あるのかもしれない。本稿も、以降はタンパク質コード領域の変異について扱うこととする。

タンパク質コード領域に起こり得る変異のうち塩基の欠失や挿入は、フレームシフトの原因となり、翻訳されたタンパク質が本来の機能の一部または全部を失う可能性が高い。このような変異は生物に重大な影響を及ぼし、致死的である場合や、個体が正常に成長しない場合があると思われる。

一方、塩基置換は、生物に重大な影響を及ぼし得る非同義置換 (塩基の変化に伴いタンパク質のアミノ酸配列が変化してしまうタイプの置換) と、重大な影響を及ぼさない同義置換 (タンパク質のアミノ酸配列が変化しないタイプの置換) に分けて説明される。

非同義置換では、タンパク質の機能が大きく変化 (機能の喪失、低下、亢進等) して生体に極めて深刻な影響を及ぼすことも考えられるが、タンパク質の機能があまり変化せず生体に及ぼす影響がほとんど無い (有っても限定的) ことも考えられる。

同義置換では、翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列に変化がないため、その生物のコドン使用頻度による影響が無視できるほど小さいなら、生体に及ぼす影響はほとんど無いと考えられる。

このように、変異により塩基配列が変化しても、必ずしも生物に重大な影響を及ぼすとは限らず、塩基の同義置換はそのような変異としてよく検出される。

2. 教材としてのウミホタル

岩手大学教育学部生物学研究室 (以下、本研究室)

にて市販の乾燥ウミホタルの *COI* 遺伝子や *COII* 遺伝子を PCR 増幅しシーケンシングしたところ、個体間で複数の塩基置換がみとめられた(紺野 他, 2022; 新國&安川, 2023)。これらの多くは同義置換であったが、希に翻訳結果の変化を伴う例もみとめられた。塩基配列に個体差が見られたが、解析に用いたウミホタルは自然環境中に生息していた個体であり、それらのミトコンドリア DNA にみられる違いは生存に影響が無いか、あるいは影響が極めて小さいと思われる。自然環境の生物から致死性の変異が検出されることは考えられないし、生存に極めて不利な変異が検出されることもほとんど無いであろう。一方、生存に影響が無い変異や、影響が極めて小さい変異は自然環境の生物から検出可能であり、ウミホタルはそのような変異が決して稀ではないことを知る試料になると思われる。

3. 本研究の目的

販売業者によると、乾燥品のウミホタルの採集地は千葉県と兵庫県とのことである。そのためこれを用いて塩基置換が多くみとめられるとの結果を得ても、それは異なる地域で異なる時期に採集されたウミホタルを解析したためかもしれない、との疑問が残る。そこで私たちは採集地と採集日時が明確なウミホタルについて、ミトコンドリアの *COII* 遺伝子を PCR 増幅してその塩基配列を比較し、個体差が多くみられるかどうかを確認することにした。

なお、ミトコンドリア DNA については、それが変異しやすいことを、ミトコンドリア内で常に活性酸素種に曝露されていることや、ミトコンドリアの DNA 修復系が核の DNA 修復系と異なることなどと共に説明することがある。これは個体が生存している間に生体内の個々のミトコンドリア DNA に変異が生じやすいことを説明しているのであり、個体差や塩基多型とは別に考える必要がある。本稿では、ウミホタルから抽出した DNA を鋳型にしてミトコンドリア DNA の一部領域を PCR 増幅し、それをサンガー法でダイレクトシーケンシングして塩基配列を比較解析している。この手法では、個体の生存中に生じたミトコンドリア DNA の変異が検出される可能性は極めて低い。

2. 方法

1. DNA 粗抽出液の調製法

ウミホタルは、チッソ株式会社横浜研究所(当時)の井上敏博士が 2013 年から 2019 年にかけて愛知県碧南市の海岸で研究用に採集し、1.5mL チューブに 1 個

体ずつ入れて -80°C で凍結保存していたものを、本研究室が 2022 年 3 月に譲り受け保存していたものである。この内、2018 年 10 月 12 日に採集したウミホタルを使用した。ウミホタルを 1 個体ずつホモジナイザーペッスルで破碎し、1mL の純水に懸濁して加熱(95°C×10 分)し、穏やかに転倒混和して DNA 粗抽出液とした。これを 20 個体について行った。

2. PCR の条件

プライマーの塩基配列は次の通りであり、濃度はいずれも 10 μM とした。

Vhcox2F: 5'-ctaattggaatgaagtcattcaactcctc

Vhcox2R: 5'-ggaggcaataaacataagacaataccttag

KOD One PCR Master Mix-Blue(東洋紡株式会社)を 20 μL、Vhcox2F を 1 μL、Vhcox2R を 1 μL、DNA 粗抽出液を 1 μL、純水を 17 μL 混合して反応溶液(計 40 μL)を調製した。連鎖反応は「98°C×10 秒→60°C×5 秒→68°C×5 秒」を 40 サイクルとした。

3. アガロースゲル電気泳動の条件

緩衝液には TAE 緩衝液(40 mmol/l Tris-acetate、1 mmol/l EDTA)を用いた。DNA を検出するための蛍光試薬はミドリグリーン Xtra(ファストジーン株式会社)を用い、励起には青色 LED(500nm)を用いた。PCR 後の反応液の 10%量(4 μL)をアガロースゲルにロードして 100V(定電圧)で泳動し、PCR 産物の量と品質を確認した。

4. PCR 産物の解析法

電気泳動に供さなかった 36 μL を精製し、Vhcox2F にてシーケンシングした(アゼンタ株式会社)。得られた塩基配列を clustalW(塩基配列やアミノ酸配列の多重整列ツール)を用いて比較解析した。

3. 結果と考察

COII 遺伝子の PCR 増幅、及びシーケンシング結果が良好であった 15 個体について、得られた塩基配列(開始コドン ATG から終止コドン TAG までの 702bp)を比較したところ、完全に一致したのは 8 個体であり、他の個体については 1~5 ヶ所の塩基置換がみとめられた(計 10 ヶ所)。同じ地域で同じ日時に採集したウミホタルにもこのような違いがみとめられ、個体差が多いことが分かった。

置換のみとめられた塩基を含むコドンを図 1 に示す。h2~h20 はウミホタルの識別番号、塩基の上の数字(132~669)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)である。10 ヶ所の置換のう

ち 1 ヶ所 (403 番目の塩基) がトランスバージョン (transversion ; プリン塩基とピリミジン塩基の置換) であり、9 ヶ所がトランジション (transition ; プリン塩基同士の置換、ピリミジン塩基同士の置換) であった。一般に、トランスバージョンよりトランジションの方が多いとされており、今回の結果もその知見に合致するものであった。

10 ヶ所の塩基置換のうち 8 ヶ所は翻訳されるアミノ酸に変化はなかったが、2 ヶ所 (364 番目の塩基置換と 403 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 122 番目のコドンが多くウミホタルでは ACC でトレオニンをコードしていたところ、ウミホタル h13 では GCC でありアラニンをコードしていた。また、135 番目のコドンが多くウミホタルでは TCT でセリンをコードしていたところ、ウミホタル h2 では GCT でアラニンをコードしていた。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 II の機能にどのような影響を及ぼすのかは分からないが、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から、本生物においては機能を著しく低下させるような影響は無かったと思われる。

本研究室は昨年度、16 個体の乾燥ウミホタル (市販品) の *COII* 遺伝子を PCR 増幅してシーケンシングし解析した結果を報告した (紺野 他, 2022)。その後も引き続き乾燥ウミホタルの *COII* 遺伝子を PCR 増幅してシーケンシングし、計 27 個体について解析した。それらにみられた塩基置換は 24 ヶ所であり、今回の解析でみとめた 10 ヶ所とともにマッピングしたところ、塩基置換は *COII* 遺伝子の全体に分布しているものの均等ではないことが分かった。変異しやすい部位やにくい部位があるのか、あるいはサンプル数が少ないだ

けなのか、さらに検討を続ける予定である。

先述の通り、碧南市のウミホタル (15 個体) のうち 8 個体の *COII* 遺伝子の塩基配列が一致していた。一方、乾燥ウミホタル (27 個体) では 8 個体の *COII* 遺伝子の塩基配列が一致しており、それらは今回の 8 個体とも一致していた。また、この塩基配列は Ogoh & Ohmiya が石川県七尾市で採集し解析したウミホタルの *COII* 遺伝子の塩基配列とも一致していた (Ogoh & Ohmiya, 2004; GenBank Accession NC_005306)。遠く隔たった地域のウミホタルが同一の *COII* 遺伝子をコードしていることから、これが日本近海における現時点でのウミホタル *COII* 遺伝子の典型なのかもしれない。

4. おわりに

変異は生物の生存にほとんど影響を与えないものから致命的なものまで様々である。また、影響を与えるとしても、その程度は環境や周囲の状況により変化するというのが正しい理解であろう。これらをあらためて高校生に指摘することは必要であると思われる。この理解があつてこそ生物の進化や種の多様性を理解できる。また、ヒトゲノムの塩基配列が個人間で約 0.1% 異なることが示す意味、すなわち人の個性や多様性を理解できると思われる。

本研究室は、PCR 実験を通して高校生に生命科学分野への興味関心を深めてもらうために、実験プロトコルを検討し体験実習を行ってきた。本稿に記載した解析もその一環である。ウミホタル *COII* 遺伝子の塩基置換を解析する体験実習は、現時点ではまだ実施していないが、複数名の高校生が参加して各自が 1 個体ずつウミホタルの DNA 粗抽出液を調製し、*COII* 遺伝子を PCR 増幅し、電気泳動で PCR 産物を確認してその

	132	168	177	351	364	403	405	609	666	669
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
h2	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	GCT	GGG	GCC	CAT	
h3	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h4	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h7	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h8	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h10	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h12	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h13	ATT	CTT	CAG	AAC	GCC	TCT	GGG	GCT	CAT	
h14	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h15	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h16	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h17	ATC	CTC	CAA	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAC	
h18	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h19	ATC	CTC	CAG	AAC	ACC	TCT	GGG	GCC	CAT	
h20	ATC	CTC	CAG	AAT	ACC	TCT	GGG	GCC	CAC	

図 1. *COII* 遺伝子の塩基多型

日は帰宅し、数日後に PCR 産物のシーケンシング結果をメールで高校生に送信し塩基配列の比較解析を指導する、という行程を想定している。または、PCR 実験とは独立に、塩基配列の比較解析のみを指導することも想定している。今後も引き続き種々検討し、高校生に学びの場を提供する予定である。

謝辞

碧南市で採集したウミホタルを譲渡してくださいました井上敏博士に感謝申し上げます。

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) 紺野ひな, 岡田菜月, 福士祥代, 藤原歩, 平安名盛達, 安川洋生 (2022) 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, *日本科学教育学会研究会研究報告*, 37, pp25-28.
- 3) 新國碧 & 安川洋生 (2023) 乾燥ウミホタルの *COI* 遺伝子を対象とした高校生の PCR 体験実習, *岩手大学教育実践・学校安全学研究開発センター紀要*, 3, pp185-190.