

ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子の 第5～第6エキソンの解析

藤原 歩¹、安川 洋生² (¹岩手大学技術部、²岩手大学教育学部)

FUJIWARA Ayumi, YASUKAWA Hiro :

Sequence analysis of the region from exon 5 to exon 6 of *Vargula hilgendorffii* luciferase gene

It has been reported that sea firefly *Vargula hilgendorffii* encodes at least two copies of the luciferase gene, each consisting of 13 exons. PCR amplification and agarose gel electrophoresis of the region from exon 5 to exon 6 of the gene revealed four DNA fragments, suggesting that *V. hilgendorffii* has two additional copies. To determine nucleotide sequences of these fragments, the fragments in the agarose gel were individually poked with the tip of a toothpick, immersed in the PCR reaction solution, and amplified again with the same primer set, and subjected to direct sequencing. The results showed that the fragments contained sequences homologous to exon 5 and exon 6 of the luciferase gene, indicating that *V. hilgendorffii* has at least four copies of this region. The PCR-based sequencing method used in this study is extremely simple compared to the standard method involving genetic recombination experiments, and is applicable to experiential learning for high school students.

1. 緒言

(1) 本研究の背景

PCR法は、極微量のDNA試料から標的とする領域を迅速に増幅する技術であり、今日の生命科学系の多くの分野で活用されている。高等学校学習指導要領(平成30年告示)解説には、「遺伝子を扱う技術について、その原理と有用性を理解すること。」「制限酵素、ベクター及び遺伝子の増幅技術に触れること。また、それらが実際にどのように用いられているかについても触れること。」「遺伝子を扱う技術については、例えば、制限酵素やベクターを用いた遺伝子組換え技術による医薬品の製造や、増幅技術である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。」などの記載があり、高校生にPCR法について理解させることが求められている。

筆者が技術支援に訪れている研究室では、高校生にPCR法を体験する機会を提供するために、高額な実験試薬や機器を用いることなく簡単な方法で市販の乾燥ウミホタルからDNAを調製し、これを用いてPCR法を体験できるプロトコルの検討を行ってきた。また、その検討結果に基づいて岩手県内の高校生を対象としたPCR体験学習を実施してきた。2022年度に実施した体験学習では、のべ14名の高校生が参加し、乾燥ウミホタルからDNA粗抽出液を調製してCOI遺伝子の

5'末端の500bpをPCR増幅した¹⁾。また、2023年度に実施した体験学習では、計14名の高校生が参加し、乾燥ウミホタルからDNA粗抽出液を調製してルシフェラーゼ遺伝子の第6エキソン(167bp)を増幅した²⁾。

ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子については、cDNAの塩基配列は解読されていたが、核DNAにコードされる塩基配列が不明であったため、PCRプライマーが設計できず体験学習を実施することができなかった。しかし近年になって同遺伝子の全長が解明されたため³⁾、公開された情報に基づいて数通りのPCRプライマーを設計してPCR増幅プロトコルを検討し、2023年度にPCR体験学習を実施することができた。なお、公開された情報によると、ウミホタルは当該遺伝子を少なくとも2コピー有しており(λ34、及びλ61)、いずれもエキソンの数は13個で、コピー間で対応するエキソンの塩基数(51b~186b)は同じであるが、いくつかの塩基置換がみとめられる。また、コピー間で対応するイントロンの塩基数が異なっており、そのため遺伝子の全長が異なる。

(2) 本研究の目的

既報²⁾でも言及したように、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子の第6エキソンをPCR増幅する体験学習を開催するにあたっては、事前にPCR増幅する領域として同遺伝子の他の領域も検討した。その過程で筆者

らは、愛知県碧南市で採集されたウミホタルの DNA 粗抽出液と、第 5 エキソンの 5' 末端側にアニールするプライマー (vlex5F)、及び第 6 エキソンの 3' 末端側にアニールするプライマー (vlex6R) を用いた PCR にて、4 本の PCR 産物を認めた (図 1; 1 個体のウミホタルを用いて得られた結果)。

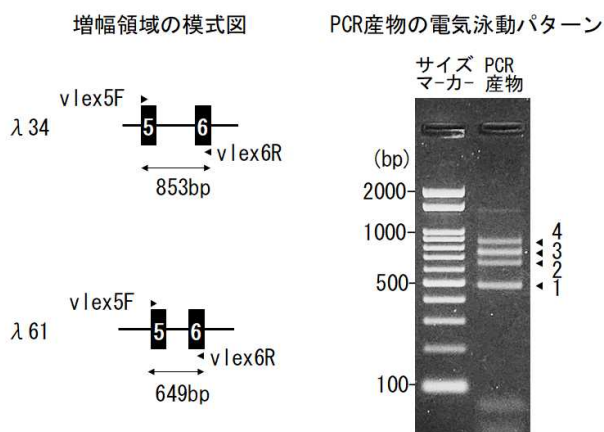


図 1. 第 5 エキソン～第 6 エキシソンの PCR 増幅

この結果は、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子には λ 34 と λ 61 の他に未記載のコピーが存在する可能性を示唆している。これを明らかにするために、筆者らはあらかじめウミホタルから DNA を抽出して PCR し、PCR 産物の塩基配列を解析することにした。なお、鎖長から PCR 産物 2 は λ 61 に由来する DNA 断片、PCR 産物 4 は λ 34 に由来する断片と思われたが、この点も塩基配列を解析し確認することとした。

PCR 産物の塩基配列を解析する場合は、PCR 産物をアガロースゲルから回収してクローニングするのが定法である (P1 レベルの遺伝子組換え実験を含む) が、結果を得るには手技に習熟した者でも数日を要する。筆者らは、より簡単に迅速に結果を得るために、また将来的には高校生の体験学習に適用することを想定して、4 本の PCR 産物を 1 本ずつ再度 PCR してダイレクトシーケンシングする方法を検討した。

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、2017 年 9 月 28 日に採集したウミホタル (井上博士がウミホタルルシフェラーゼ遺伝子の解明に使用した試料の残り) を用いた。ウミホタルをホモジナイザーペッスルで破碎し、100 μ L 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。

(2) 1st 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 μ M とした。

vlex5F: 5'-gaacctggtaaatgtgctggctcgagga

vlex6R: 5'-gctgtgtctggagcaattctcacagatctt

反応溶液は、KOD One PCR Master Mix-Blue (東洋紡株式会社) を 20 μ L, vlex5F を 1 μ L, vlex6R を 1 μ L, 10 倍に希釈した DNA 粗抽出液を 1 μ L, 純水を 17 μ L 混合して調製した (計 40 μ L)。連鎖反応は「98°C × 10 秒 → 65°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

PCR 後の反応液の 10% 量 (4 μ L) を 2% アガロースゲルにロードして泳動した。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。

(4) 2nd PCR の条件

反応溶液は、KOD One PCR Master Mix-Blue を 20 μ L, Vhcox5F を 1 μ L, Vhcox6R を 1 μ L, 純水を 18 μ L とした (計 40 μ L)。1st PCR の産物をアガロースゲル電気泳動で展開し、検出された PCR 産物を爪楊枝で突き、その爪楊枝を反応溶液に浸して DNA を添加した。連鎖反応は「98°C × 10 秒 → 65°C × 5 秒 → 68°C × 5 秒」を 40 サイクルとした。

(5) PCR 産物の解析法

2nd PCR 後の反応液の 10% 量 (4 μ L) を電気泳動して増幅産物を確認し、電気泳動に供さなかった 36 μ L を精製し二分して、一方を Vhcox5F にて、他方を Vhcox6R にて、それぞれダイレクトシーケンシングした (アゼンタ株式会社)。

3. 結果

1st PCR で増幅した PCR 産物 1~4 を個々に 2nd PCR に供して増幅した。その産物を電気泳動したところ、PCR 産物 1~4 がそれぞれメインバンドとして検出さ

れた (data not shown)。複数のエキストラバンドが見られたが、それらの量はメインバンドの量に比べて少ないためシーケンシングに及ぼす影響は少ないであろうと判断した。

シーケンシングの結果として出力された波形データはいずれも十分に明瞭で信頼できると判断した。得ら

れた塩基配列を解析した結果、PCR 産物 1~4 のいずれにおいても第 5 エキソンと相同性の高い塩基配列 (図 2) と、第 6 エキソンと相同性の高い塩基配列が認められた (図 3)。これらの図では PCR 産物におけるプライマー部位を除いて整理させた。塩基の違いが見られる部位に*を付した。

```

λ 34      GAACCTGGTAAATATGTGCTGGCTCGAGGAACCAAGGGTGGCGACTGGTCTGTAACCCTCACCATGGAGAATCTAGATGGACAGAAGGGA
λ 61      GAACCTGGTAAATATGTGCTGGCTCGAGGAACCAAGGGTGGCGATTGGTCTGTAACCCTCACCATGGAGAATCTAGATGGACAGAAGGGA
PCR産物1  ACCAAGGGAGGCGACTGGTCTGTAACCCTCACCATGGAAAATCTAGATGGACAGAAGGGA
PCR産物2  ACCAAGGGTGGCGACTGGTCTGTAACCCTCACCATGGAGAATCTAGATGGACAGAAGGGA
PCR産物3  ACCAAGGGTGGCGATTGGTCTGTAACCCTCACCATGGAGAATCTAGATGGACAGAAGGGA
PCR産物4  ACCAAGGGTGGTACTGGTCTGTAACCCTCACCATGGAGAATCTAGATGGACAGAAGGGA
          * * *                               *

λ 34      GCAGTACTGACTAAGACAACACTGGAGGTAGCAGGAGACGTAATAGACATTACTCAAGCTACTGCAGATCCTATCACA
λ 61      GCTGTACTGACTAAGACAACACTGGAGGTTGCAGGAGACGTAATAGACATCACTCAAGCTACTGCAGATCCTATCACA
PCR産物1  GCTGTACTGACTAAGACAACACTGGAGGTTGCAGGAGACGTAATAGACATTACTCAAGCTACTGCAGATCCTATCACA
PCR産物2  GCTGTACTGACTAAGACAACACTGGAGGTTGCAGGAGACGTAATAGACATCACTCAAGCTACTGCAGATCCTATCACA
PCR産物3  GCTGTGCTGACTAAGACAACACTGGAGGTTGCAGGAGACGTAATAGACATTACTCAAGCTACTGCAGATCCTATCACA
PCR産物4  GCTGTGCTGACTAAGACAACACTGGAGGTTGCAGGAGACGTAATAGACATTACTCAAGCTACTGCAGACCTATCACA
          * *                               * * *

```

図2. 第5エキソンの塩基配列の比較

```

λ 34      GTTAACGGAGGAGCTGACCCAGTTATCGCTAACCCGTTACAATTGGTGAGGTGACCATTGCTGTTGTGAAATACCCGGCTTCAATATT
λ 61      GTTAACGGAGGAGCTGACCCAGTTATCGCTAACCCATTACAATCGGTGAGGTGACCATTGCTGTTGTTGAAATACCCGGTTTCAATATC
PCR産物1  GTTAACGGAGGAGCTGACCCAGTTATCGCTAACCCGTTACAATTGGTGAGGTGACCATTGCTGTTGTTGAAATACCCGGCTTCAATATC
PCR産物2  GTTAACGGAGGAGCTGACCCAGTTATCGCTAACCCATTACAATCGGTGAGGTGACCATTGCTGTTGTTGAAATACCCGGTTTCAATATC
PCR産物3  GTTAACGGAGGAGCTGACCCAGTTATCGCTAACCCGTTACAATTGGTGAGGTGACCATTGCTGTTGTTGAAATACCCGGCTTCAATATC
PCR産物4  GTTAATGGAGGAGCTGACCCAATTGTCGCTAACCCGTTACAATTGGTGAGGTGACCATTGCTGTTGTTGAAATACCCAGGGTTCAATATC
          * * * * * * * * * * * * * * * *

λ 34      ACAGTCATCGAATTCTTTAACTAATCGTGATTGATATTCTGGGAGGAAGATCTGTGAGAATTGCTCCAGACACAGC
λ 61      ACTGTCATCGAATTCTTCAAAGTATCGTGATTGATATTCTGGGAGGAAGATCTGTGAGAATTGCTCCAGACACAGC
PCR産物1  ACTGTCATCGAATTCTTTAACTGATCGTGATTGATATTCTGGGAGG
PCR産物2  ACTGTCATCGAATTCTTCAAAGTATCGTGATTGATATTCTGGGAGG
PCR産物3  ACAGTCATCGAATTCTTTAACTGATCGTGATTGATATTCTGGGAGG
PCR産物4  ACTGTCATCGAATTCTTTAACTGATCGTGATTGATATTCTGGGAGG
          * * *

```

図3. 第6エキソンの塩基配列の比較

第 5 エキソン内では塩基の違いは見られてもアミノ酸配列は同じであったが、第 6 エキソン内では PCR 産物 4 においてアミノ酸が 2 カ所 で異なっていた。λ 34, λ 61, PCR 産物 1~3 では GTTATC であるところ (コードされるアミノ酸はバリン-イソロイシン), PCR 産物 4 では ATTGTC (イソロイシン-バリン) であった (図 3, 下線部)。

λ 34 と λ 61 の第 5 イントロンの塩基数はそれぞれ 518bp, 及び 314bp と報告されている。しかし筆者らが解析した PCR 産物 1~4 の第 5 イントロンの塩基数はいずれも報告されている数とは異なり, 155bp (PCR 産

物 1), 308bp (PCR 産物 2), 412bp (PCR 産物 3), 539bp (PCR 産物 4) であった (data not shown)。なお, いずれの配列においても 5'側は GT, 3'側は AG であり, 多くのイントロンに保存されているモチーフが認められた。

4. 考察

塩基配列の解析結果から, PCR 産物 1~4 はウミホタルルシフェラーゼ遺伝子の第 5~第 6 エキソンに由来すると思われる。電気泳動の結果から, PCR 産物 2 は λ 61 に由来する DNA 断片, PCR 産物 4 は λ 34 に由

来する断片と思われたが、塩基配列は完全には一致しなかった。いずれも同じ水域で同じ日時に採集されたウミホタルが有する塩基配列であるが、個体間のバリエーションが多いのかもしれない。

PCR 産物 4 においてはコードするアミノ酸配列が異なっていた。このアミノ酸配列の違いがルシフェラーゼの生化学的特性にどのような影響を及ぼすのかは興味深い、現時点では不明である。

本稿に示す結果から、ウミホタルがルシフェラーゼ遺伝子の第 5～第 6 エキソン領域を 4 コピー有していることが分かった。しかし、ルシフェラーゼ遺伝子（全長）を 4 コピー有しているかどうかは、現時点では確定できない。それを確定するためには、本稿で見つかった領域（PCR 産物 1 と 2）をプローブとしてあらためてゲノムライブラリーをスクリーニングするか、同領域を基点に PCR、及び/または inverse PCR にて周辺領域を増幅しシーケンシングする方法が考えられる。

鎖長の異なる複数の DNA 断片が混在する試料をアガロースゲル電気泳動し、特定の断片のみを回収する作業は、遺伝子解析の分野ではよくある作業の一つである。幾つもの方法が開発されているが、いずれにおいても、回収後の DNA 試料には別の DNA 断片が混在していることが多く、その後の実験の結果に影響を及ぼすことが珍しくない。また、回収後の DNA 断片をシーケンシングするにはクローニングするのが定法であるが、手技に習熟した者でも結果を得るまでに数日を要する。それに対して本稿で示した方法では簡単かつ迅速に結果を得ることができる。筆者らは、この手法を高校生の体験学習に適用することを想定して検討を行っている。

5. 結言

ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子の第 5～第 6 エキソン領域を PCR 増幅し、得られた産物の塩基配列を解析した。その結果、ウミホタルは当該領域について既知の 2 コピーに加えさらに 2 コピーを有していることが分かった。ただし、ルシフェラーゼ遺伝子（全長）を 4 コピー有しているかどうかは、現時点では確定できない。

本稿で示した実験方法は、遺伝子組換え実験に依らずに簡単かつ迅速に結果を得ることができる。この手法を高校生の体験学習に適用することを想定し検討している。

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) 新國碧, 安川洋生 (2023) 高校生による乾燥ウミホタルの *cox1* 遺伝子の PCR 体験実習. 岩手大学教育学部附属教育実践・学校安全学研究開発センター研究紀要: 3, 185-190.
- 2) 大島康平, 岡田菜月, 小林星空, 福士祥代, 藤原歩, 星勝徳, 吉田琴美, 安川洋生 (2024) 高校生の PCR 体験実習-ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子の第 6 エキシソンの増幅. 日本科学教育学会研究会研究報告: 38(4), 33-36.
- 3) Inouye Satoshi. (2022) Multiple Cypridina luciferase genes in the genome of individual ostracods. *Vargula hilgendorffii* (*Cypridina hilgendorffii*), *Photochem. Photobiol.*, 98, 1293-1302.