

1. はじめに

海藻は、主に海や汽水域に生息し視認可能な多細胞性の藻類を指し、アオサ藻類(クンショウモ等の緑藻綱と区別するため緑藻類という表現は避けた)、紅藻類、褐藻類に分けられる。日本沿岸では多種多様な種が生息しており、食用利用も盛んに行われているため日本人には馴染み深い生物だろう。

兵庫県淡路市岩屋に位置する田の代海岸では 2014 年に造成された人工磯場で様々な種類の海藻が観察される。私は昨年 9 月から今年 1 月にかけて、田の代海岸にて海藻を採集し得られた DNA サンプルを用いて葉緑体ゲノム 16S rRNA 遺伝子(rDNA)の配列を比較し分子系統樹を作成する実験を行った。なおこの実験の実施において、神戸大学内海域環境教育研究センターの T.H.助教授に多大なるご協力を頂いた。また実験の大半は、田の代海岸に臨む神戸大学内海域環境教育研究センター・マリンサイトの設備をお借りして行った。

2. 実験プロトコル

(1) 海藻や外群のシアノバクテリア類を採集する。

田の代海岸の人工磯場で自生していた個体と漂着していた個体を採集した。またアオサは兵庫県洲本市由良で採取されたものを、外群に用いたシアノバクテリア類のイシクラゲは学校の近くの緑地(住吉川東緑地)で採取されたものを用いた。

(2) 得られた標本から植物 DNA 精製キットを用いて DNA サンプルを抽出する。

乾燥サンプルまたは生のサンプルを破碎し細胞を溶解、不要なタンパク質や多糖類を除去しスピンカラムを用いてトータル DNA(サンプルに含まれる全ゲノム DNA)を回収する。

(3) PCR 法によって葉緑体ゲノム 16S rDNA 領域を増幅させる。

対象とする種には海藻のみならず外群として原核生物のシアノバクテリア類も含まれ、広い範囲の分類群をカバーしている。そのため葉緑体ゲノム上の、進化速度が遅く、多くの分類群で保存された領域を含む 16S rDNA 領域を用いることにした。この領域は葉緑体リボソーム小サブユニットを構成する ribosomal RNA である 16S rRNA をコードしている。それらの領域に対して 1st PCR, 2nd PCR と 2 回の PCR を行い目的の領域を確実に増幅させた。各 PCR の設定および使用したプライマーは後

述する。

(4) 電気泳動を行い増幅を確認する。

(5) 外部のサービスに委託してシーケンスデータを得る。

DNA シーケンス解析によって、増幅した DNA サンプルの波形データおよび塩基配列データを得る。

(6) 塩基配列データを編集しマルチプルアライメントを行う。

波形データをもとに塩基配列データの信憑性を評価する。最終的に得られた様々な種の配列同士を比較し相同性の高い領域を揃える。

(7) アライメントした配列データをもとに最尤法系統樹を構成する。

ソフトを用いて最尤法による分子系統樹を作成する。最尤法は、様々な考えられうる系統樹のパターン(樹形)ごとに、手元のアライメントデータが実現する確率を計算し、その確率が最も高い樹形を採用する。例えば、ある箱の中にいくつかの赤玉と白玉が合計 10 個入っており、1 個ずつ計 3 個の玉を箱から取り出すと、順に赤、白、白の玉であったとする。そして、このデータについて次の二つのモデルを立てる:箱の中には赤玉と白玉が 5 個ずつ入っていたとするモデル A、赤玉が 3 個で白玉が 7 個入っていたとするモデル B。モデル A の場合、3 個玉を取り出し順に赤白白となる確率は $\frac{5}{10} \times \frac{5}{9} \times \frac{4}{8} = \frac{5}{36}$ であり約 14% であるのに対し、モデル B の場合、その確率は $\frac{3}{10} \times \frac{7}{9} \times \frac{6}{8} = \frac{7}{40}$ であり約 18% である。この場合はモデル B の方がよりもっともらしい、すなわち尤度が高いといえる。

3. 採集した種

採集された種の種名、分類(綱、目)および採集日、採集地を Table 1 に示す。アナアオサの配列データは T.H.先生から提供されたものだが、採集日はお聞きできなかった。

種名	分類	採集日	採集地
イシクラゲ	シアノバクテリア,ネンジュモ目	2019.10.21	東灘
アナアオサ	アオサ藻,アオサ目	---	由良
ウスバアオノリ	アオサ藻,アオサ目	2020.1.11	田の代
スジアオノリ	アオサ藻,アオサ目	2020.1.11	田の代
ヒメアオノリ	アオサ藻,アオサ目	2020.1.11	田の代
ヒビミドロ	アオサ藻,ヒビミドロ目	2020.1.11	田の代
イバラノリ	紅藻,スギノリ目	2020.1.11	田の代
オオバツノマタ	紅藻,スギノリ目	2019.9.15	田の代

オキツノリ	紅藻,スギノリ目	2020.1.11	田の代
フクロフノリ	紅藻,スギノリ目	2020.1.11	田の代
ツノムカデ	紅藻,スギノリ(イソノハナ)目	2019.9.15	田の代
ヒラムカデ	紅藻,スギノリ(イソノハナ)目	2019.9.15	田の代
ウスバノリ	紅藻,イギス目	2020.1.11	田の代
キブライトグサ	紅藻,イギス目	2020.1.11	田の代
ウシケノリ	紅藻,ウシケノリ目	2020.1.11	田の代
スサビノリ	紅藻,ウシケノリ目	2020.1.11	田の代
ピリヒバ	紅藻,サンゴモ目	2020.1.11	田の代
マクサ	紅藻,テングサ目	2019.9.15	田の代
フシツナギ	紅藻,マサゴシバリ目	2020.1.11	田の代
ユカリ	紅藻,ユカリ目	2020.1.11	田の代
ヒジキ	褐藻,ヒバマタ目	2019.9.15	田の代
ヨレモクモドキ	褐藻,ヒバマタ目	2020.1.11	田の代
フクロノリ	褐藻,カヤモノリ目	2020.1.11	田の代
ホソカヤモ	褐藻,カヤモノリ目	2020.1.11	田の代
カジメ	褐藻,コンブ目	2019.9.15	田の代
ワカメ	褐藻,コンブ目	2020.1.11	田の代

Table 1: 採集された種

4. PCR 法

(1) 手法について

PCR 法は DNA 上の特定の領域を短時間で指数関数的に複製(増幅)させる手法である。この手法は昨今の国際社会を混乱させている新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の感染を判定する検査にも利用されている。この場合 PCR 検査は特異度(非感染者に対して陰性と判定する確率)は非常に高いが、感度(感染者に対して陽性と判定する確率)は低いとされている。

PCR 法は特定の DNA 領域を、2 倍に増幅させるサイクルを数十回繰り返して数百万~数十億倍に増幅させる。反応液に増幅させる DNA や多量のプライマーや dNTP、DNA ポリメラーゼ(後述)等を加えてサーマルサイクラーと呼ばれる機械を用いて温度を変化させることによってサイクルを繰り返す。PCR サイクルを Fig. 1 に示す。(a)は 2 本鎖 DNA の一部領域を示しており、Fig. 1 はその領域を増幅させる PCR サイクルを表している。DNA は合成する際の伸長方向が決まっており(5'→3')、図では黒色の矢印で表されている。温度を 94~98°C に上昇させると塩基間(A-T,G-C)の水素結合が解離し(b)のように 1 本鎖 DNA となる。温度を 50~65°C に下降させると、DNA は再び水素結合を形成し 2 本鎖に戻ろうとする。しかし、約 20 塩基対ほどの短い 1 本鎖 DNA であるプライマーが多量に反応液中に存在するため、プライマーが DNA 上の領域に結合する(アニール)反応が優先的に起こる。(c)では灰色の矢印でプライマーが示されている。DNA 上にプライマーが結合し温度を 68~72°C まで上昇させると、DNA ポリメラーゼ(合成酵素)の活性が上がり、(d)のよ

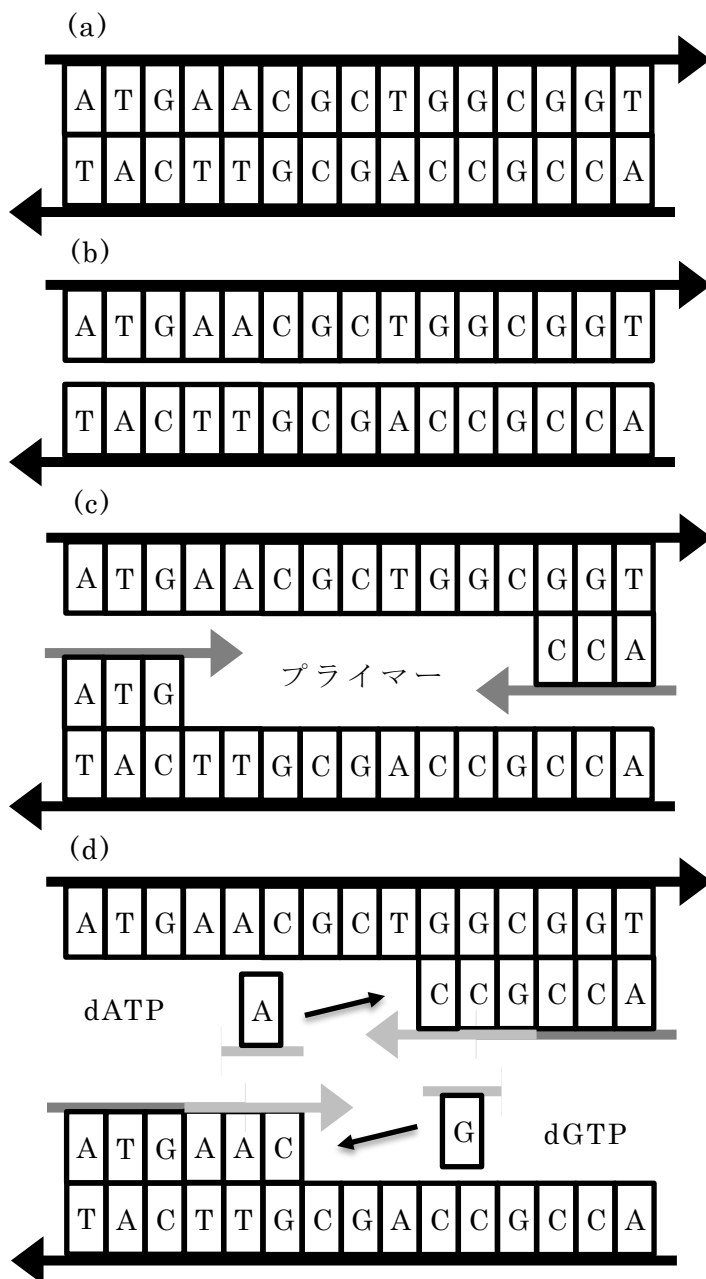


Fig. 1: PCR サイクル

うに DNA が再び水素結合を形成し 2 本鎖に戻ろうとする。しかし、約 20 塩基対ほどの短い 1 本鎖 DNA であるプライマーが多量に反応液中に存在するため、プライマーが DNA 上の領域に結合する(アニール)反応が優先的に起こる。(c)では灰色の矢印でプライマーが示されている。DNA 上にプライマーが結合し温度を 68~72°C まで上昇させると、DNA ポリメラーゼ(合成酵素)の活性が上がり、(d)のよ

うに結合したプライマーを起点として DNA 鎖が複製される。dNTP は DNA 合成に必要な材料であり、dATP,dTTP,dGTP,dCTP の混合物である ((d)では薄灰色で示されている)。プライマーは増幅させたい DNA 上の領域を挟むように設計する。これらのように、反応液の温度条件を刻々と変化させて、解離→アニーリング→合成のサイクルを繰り返すことでプライマーに挟まれた領域は 1 サイクル毎に 2 倍に増幅されていき、n 回のサイクルで理論上 2^n 倍に増幅されることになる。

(2) 本実験におけるプライマー・PCR 設定

① プライマー

1st PCR には P1,P2 を、2nd PCR には P1,P4 を、シーケンスには P3 を用いた。

16S-P1: AGAGTTTGATYCTGGCTCAG

16S-P2: CTACCTTGTTACGACTTCAC

16S-P3: AWACTTAACGCGTTAGCTAC

16S-P4: TTCTTCGCGTTGCATCGAAT

② ランニングプログラム

94°C 2m

(98°C 10s, 50°C 30s, 68°C 30s)*10cycles

Touchdown(-0.5°C/cycle)

(98°C 10s, 46°C 30s, 68°C 30s)*24cycles

72°C 10m

③ 反応液組成

各 PCR における反応液の組成を Table 2 に示す。

1st PCR	1 反応分 (μ l)	2nd PCR	1 反応分 (μ l)
滅菌水	1.23	滅菌水	1.47
反応バッファー(2x)	2.5	反応バッファー(2x)	3
dNTPmix(各 2mM)	1	dNTPmix(各 2mM)	1.2
16S-P1(10 μ M)	0.1	16S-P1(10 μ M)	0.12
16S-P2(10 μ M)	0.1	16S-P4(10 μ M)	0.12
KOD FX(1U/ μ l)	0.08	KOD FX(1U/ μ l)	0.09
合計	5	合計	6
DNA サンプル	0.5	DNA サンプル	0.5

Table 2: マスターミックス

5. 実験の最終データ

得られた系統樹を Fig. 2 に示す。ユカリのみはシーケンス解析の結果、波形が読まれなかった。また、他種と大きく異なる配列を示したヒビミドロを除いた系統樹を Fig. 3 に示す。系統樹の分岐点にはブートストラップ値(1000回)を記している。そして一部の種の PCR 産物電気泳動結果を Fig. 4 に示す。系統樹の枝の長さは座位当たりの置換数を示す(スケールバーを参照)。



Fig. 2: 海藻の 16S rDNA 分子系統樹, ユカリを除く 25 種から構成される。また、C(青色)はシアノバクテリア類、U(緑色)はアオサ藻類、R(赤色)は紅藻類、P(茶色)は褐藻類であることを示す。

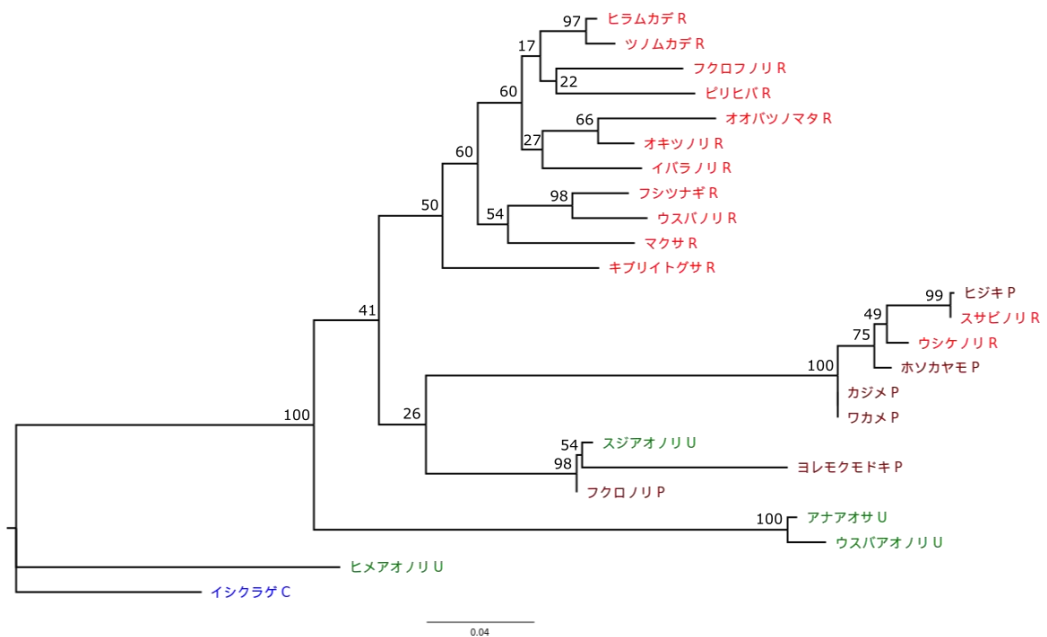


Fig. 3: ヒビミドロを除外した海藻の 16S rDNA 分子系統樹, ユカリとヒビミドロを除く 24 種から構成される。また、C(青色)はシアノバクテリア類、U(緑色)はアオサ藻類、R(赤色)は紅藻類、P(茶色)は褐藻類であることを示す。



Fig. 4: 電気泳動結果, 中央のマーカを除いて左から 1 スサビノリ, 2ヒメアオノリ, 3ウシケノリ, 4ウスバアオノリ, 5スジアオノリ, 6フクロノリ, 7ユカリ, 8ヨレモクモドキ, 9ツノムカデ, 10ヒラムカデ, 11オキツノリ, 12フクロフノリ, 13ウスバノリ, 14ヒビミドロ, 15キブリティグサ, 16ワカメ, 17イバラノリ, 18ホソカヤモ, 19フシツナギ, 20ピリヒバ

6. 実験結果・考察

Fig. 2 よりヒビミドロが、ウシケノリ目でない紅藻の最新の共通祖先とその子孫からなる単系統群に含まれていることが分かる。さらに、ヒビミドロの枝は他に比べて圧倒的に長く、読まれた配列が他種と大きく異なっていたことが分かる。Fig. 4 の電気泳動結果のヒビミドロのレーン(右から 7 番目)を見ると、他種よりも長い領域が増幅されていることが示唆されているため、ヒビミドロが正しく他種と比較されているかは不明である。ヒビミドロのレーンの右隣に見られるキブライトグサのレーンではうっすらとではあるが同様に長めの領域が増幅されているように見えるが、コンタミネーションが発生している可能性もある。系統樹中でヒビミドロは、他のアオサ藻類よりもキブライトグサと比較的近縁な系統関係にある。

Fig. 2 ではヒビミドロ以外の種の系統関係が確認しにくいので Fig. 3 を見ると、ウシケノリ目の紅藻は褐藻と近縁であるというデータが得られているが、その他の紅藻は単系統群をなしてまとまっている。ヒジキとスサビノリの分岐点のブートストラップ値は 99 と非常に高い。系統樹上方の紅藻の単系統群内ではスギノリ目の種は比較的まとまっている。また、アオサ藻のスジアオノリはヨレモクモドキやフクロノリと近縁であるという結果が出ている。

しかし、一般にはブートストラップ値が 95 以上でないとその系統関係は有意とみなされない為、この場合系統樹上の多くの系統関係は有効でない可能性が高い。ブートストラップ法ではサンプルの配列データをもとに疑似的な配列データを大量に生成し、それらのデータから同様に系統樹を再構築する。得られた大量の系統樹のうち、ある単系統群が形成されている確率をその単系統群の系統関係の信頼度とする。

7. 謝辞・おわりに

冒頭でも述べたように、本実験は T.H.先生の多大なるご協力のもと成り立っており、実験の相談から設備のご用意まで大変お世話になった。昨年の 9 月にメールをお送りしてから、今年の 1 月にマリンサイトの設備を使用し実験の指南をしてくださるまで長きにわたり実験の遂行に協力していただいたお陰で、部に十分な設備が揃っていない状態から無事に実験を完了するまでに至ることができた。採集した海藻を同定してくださったり、独自に設計されたプライマーを提供していただいたり、また具体的に実験手法やソフトの利用方法について教えてくださったりと様々な面で先生にはお世話になったため、この場を借りて感謝させてい

ただきたいと思う。

また、S.H.先輩と K.M.先輩には、田の代海岸での海藻採集やマリンサイトでの実験にご協力いただいた。私だけでは力不足であるため、T.H.先生とともに経験のある先輩方にもご協力いただいたことで、実験の効率化に努めることができた。貴重なお時間を割いてまで、実験に同行してくださったことを感謝したい。

そして、大学とのやりとりを円滑に進めてくださり、金銭面の問題にも対応してくださった生物研究部顧問にも感謝させていただきたい。初めは、顧問にご相談する前に T.H.先生とのやりとりを進めておりご迷惑をおかけしたが、生徒のみでは実験計画を進めることはできなかったため大変お世話になった。そして、わざわざ休日に先生の運転で我々を淡路島まで連れて行ってくださったことも感謝したい。

予想とは異なる系統樹が得られたが私は本実験を行ったことで、海藻に関する知識を得たり、実際に PCR 法を体験したり、配列データから系統樹を構築したりと自身のスキル向上につながる経験をすることができた。PCR 反応液の調合を誤ったり、慣れない実験に慌てたりと人に迷惑をかけてしまったことは反省したい。この実験で得た教訓を次に活かしていきたいと思う。

8. 使用したキット・試薬・サービス・ソフト

- ・ QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit

<https://www.qiagen.com/jp/shop/pcr/dneasy-plant-mini-kit/>

- ・ 東洋紡 KOD FX

http://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=164

- ・ 株式会社ファスマック DNA シーケンス解析

http://fasmac.co.jp/gene_loupe

- ・ 4Peaks

<https://nucleobytes.com/4peaks/index.html>

- ・ MEGA X

<https://www.megasoftware.net/>

9. 参考文献

- ・ Neil A.Campbell ら著,池内昌彦ら監訳,「キャンベル生物学」,丸善出版,2018 年発行

- ・ 神谷充伸監修,「ネイチャーウォッチングガイドブック 海藻」,誠文堂新光社,2012 年発行

- ・ 藤田敏彦著,「新・生命科学シリーズ 動物の系統分類と進化」,裳華

房,2016年発行

・「PCR実験の手引き」,タカラバイオ,2020年3月31日閲覧

http://www.takara-bio.co.jp/kensa/pdfs/book_1.pdf

他