

生物教育実験のための市販キノコ・ダイレクト PCR 法¹

A Direct PCR Method from Commercially Available Mushrooms for Experimental Teaching

青木駿介 摂南大学理工学部 生命科学科
(現 丸本酒造株式会社)

西矢芳昭² 摂南大学理工学部 生命科学科

AOKI, Shunsuke Department of Life Science, Setsunan University

NISHIYA, Yoshiaki Department of Life Science, Setsunan University

Abstract

A direct polymerase chain reaction (PCR) method from fruitbody tissues of commercially available mushrooms was developed for experimental teaching. This method was combined with easy sampling of a mushroom and using KOD FX Neo as DNA polymerase. From four mushroom species, Enokitake (*Flammulina velutipes*), Bunashimeji (*Hypsizygos marmoreus*), Maitake (*Grifola frondosa*), and Mushroom (*Agaricus bisporus*), the ribosomal DNA fragments amplified by the direct PCR could be detected at the expected size by agarose gel electrophoresis. Especially, Maitake was most suitable as a teaching material for simple manipulation. The amplified DNAs were verified by sequencing, and were identified by database search. High school students learn by this teaching method which deepens their understanding of PCR techniques, microorganisms, and bioinformatics.

キーワード: ダイレクト PCR, キノコ, 生物教育, 教材, 高校

Keywords : direct PCR, mushroom, biological education, teaching material, high school

1. はじめに

生物が持つ DNA の特定の遺伝子のみを増幅する PCR 法 (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応法) は、バイオテクノロジーの基本技術であり、すでに医療や食品分析、犯罪捜査などの分野で世界的に広く活用されている⁽¹⁾。大学や公的機関、企業などの研究部門では PCR 法がごく普通に行われ、企業の分析部門や品質管理部門などでも利用されている⁽²⁾。応用を踏まえた手技としての PCR 法の理解は、大学生はもちろんのこと高校生でも十分に役立つと思われる。

高校生物の教科書には、PCR 法の原理および具体的な実験方法が詳細に記載されている。例え

¹ 【原稿受付】 2016 年 7 月 20 日、【掲載決定】 2016 年 9 月 27 日

² 【主著者連絡先】 西矢 芳昭 摂南大学、教授 e-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町 17-8、摂南大学理工学部 生命科学科

ば、第一学習社の「高等学校生物」には、元となる DNA、人工的に合成したプライマー、好熱菌から単離された DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ）、4 種類のヌクレオチドなどを加えた混合液を温度サイクルにかけることで、理論的には 20 サイクルで 100 万倍を超える増幅が見られると記載されている。しかしながら、PCR 法の応用を理解するための簡便な実験教材が乏しい。まず、元となる DNA を得るために生物サンプルの粉碎や DNA 抽出などが必要で、手間と時間がかかる。さらに全実験時間も長くなり、大きな初期投資が必要なことなど教育実験法としての課題が多い。

一方、PCR 法の応用として、元となる DNA を使わず生物そのものを用いる、いわゆるダイレクト PCR 法も普及している。ダイレクト PCR では元となる DNA を得るための処理が不要なため、遺伝子増幅実験が極めて簡便になる（図 1）。ダイレクト PCR 法に供するサンプルとしては、遺伝子組換え大腸菌をはじめとする遺伝子組換え微生物や病原性微生物などが主に使われている⁽³⁾。これらのサンプルは、温度サイクルの最初で細胞が壊れ DNA が漏出するため、元となる DNA は不要である。細菌や菌類などの微生物は発酵や腐敗などヒトとの関わりが深く、教育対象としては極めて重要である。しかし、個体が小さく取り扱いの専門性が高いため、高校生物の教材にはほとんど使われていない。われわれは、PCR 法の応用を理解するための簡便な教育実験として、入手しやすい微生物をサンプルとしたダイレクト PCR 法が適していると考えた。

キノコは真核生物の菌類に属し、その構造はカビと同じく菌糸から成っており、分類上カビや酵母と区別されない。キノコは目に見える微生物で身近に存在すると共に、食材なので入手しやすく種類も豊富なため、実験教材として選択した。ただし、これまでキノコのダイレクト PCR 法は報告されておらず、キノコの強固な細胞壁を壊し内部の DNA を放出させるためには何らかの前処理が必要と考えられていた^(4,5)。われわれは、キノコからのサンプル取得や適切な PCR 用試薬の選定、および PCR 条件検討などを行い、市販のキノコを対象とした教育実験用ダイレクト PCR 法を設定した。そして、微生物を理解するためのキノコの観察と PCR による遺伝子増幅および検出からなる教育実験フローを作成したので、報告する。

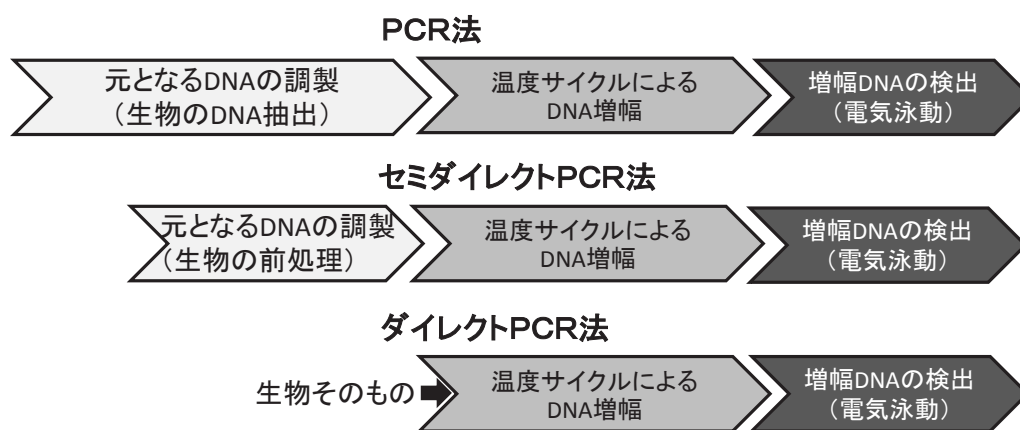


図1 各種 PCR 法の比較

2. 実験材料および方法

各種キノコはスーパーにて購入した。市販キノコの観察には、位相差顕微鏡（ニコン，東京）およびスマートフォン顕微鏡⁽⁶⁾（テラベース，岡崎）を用いた。培養は、YM 寒天培地にて行った。ダイレクト PCR に供するキノコ小片はイエローチップで採取し、シリンジにて PCR 用混合液をあ

らかじめ分注しておいたチューブに添加した。混合液内に全てのキノコ小片が入っていることを確認し、サーマルサイクラーにチューブをセットして温度サイクルによる PCR 反応を実施した。

PCR 実験の DNA ポリメラーゼは、常用される Taq polymerase (ホットスタート用, New England Biolabs, USA) および KOD FX Neo⁽⁷⁾ (東洋紡, 大阪) を使用した。その他の試薬は、ナカライテスク (京都) および八洲薬品 (大阪) より購入した。PCR 用混合液は各メーカーのプロトコールに従い作成し、チューブあたり 10~50 μ L 分注した。対象とする遺伝子増幅領域は、菌類の種の同定に用いられるリボソーム RNA 遺伝子上の D1/D2 領域約 0.6kbp の DNA (図 2) を選定し、対応する合成プライマーは NL-1 と NL-4 (それぞれの DNA 配列は以下の通り) を使用した。

NL-1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3'

NL-4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

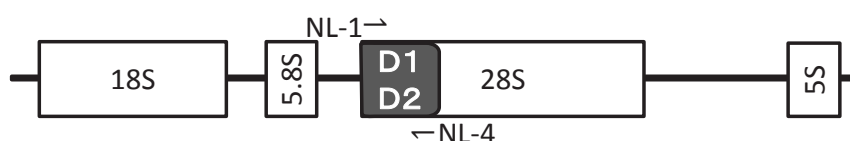


図 2 キノコのリボソーム RNA 遺伝子と増幅領域

温度サイクルは、サーマルサイクラー (タカラバイオ, 草津) を使用して、各 DNA ポリメラーゼの標準プロトコールに基づく条件 (図 3) で行った。

PCR 反応終了後、増幅 DNA の検出はアガロースゲル電気泳動にて行い、DNA 検出色素はセーフティダイ (ナチュラルイムニティ, 東京) を使用した。さらに、増幅 DNA は NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用いて精製し、シーケンシングにより塩基配列を確認した。

[Taq polymerase]

Pre-denature	95°C	30 sec	} 30 cycles
Denature	95°C	15 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	68°C	30 sec	
Final extension	68°C	5 min	

[KOD FX Neo]

Pre-denature	94°C	2 min	} 30 cycles
Denature	98°C	10 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	68°C	30 or 60 sec	

図 3 各 DNA ポリメラーゼを使用した PCR 条件

3. 結果および考察

3-1 キノコ・ダイレクト PCR 法の開発

市販キノコのダイレクト PCR 法を設定するにあたり、主に 2 つの課題が想定された。1 つは、温度サイクル最初の Pre-denature にて硬質なキノコ細胞が壊れ DNA が漏出せねばならない。先行文献では、キノコの PCR は少なくともセミダイレクト PCR (元となる DNA を得るためにサンプルに前処理を施す, 図 1 参照) でないと難しいとの報告であった⁽⁴⁾。もう 1 つは、キノコ細胞成分

や付着物質などによる PCR 反応阻害である。反応阻害を考慮して、通常のダイレクト PCR では目に見えるほどのサンプルは使わない。しかし、教育実験法としては目視できるサンプルの添加が望ましい。

具体的なダイレクト PCR 実験の手順を検討し、ハンドリングと汎用性の点で以下の操作を採用した。まず、イエローチップをキノコに突き刺すことでチップ先端に目視できる程度(およそ 0.05 mm³) のキノコ小片を詰めた。次に、チューブに分注した PCR 用混合液内へシリンジを使ってキノコ小片を添加し、PCR 反応を実施した (図 4)。

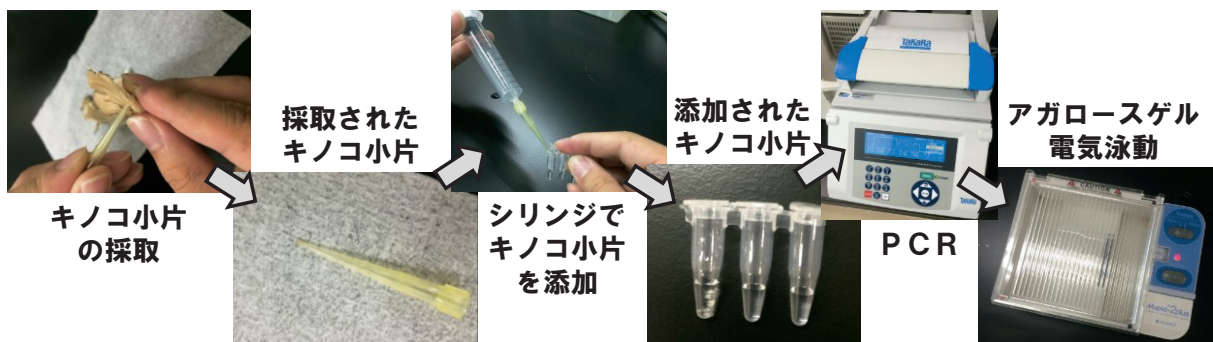


図 4 ダイレクト PCR 実験の手順

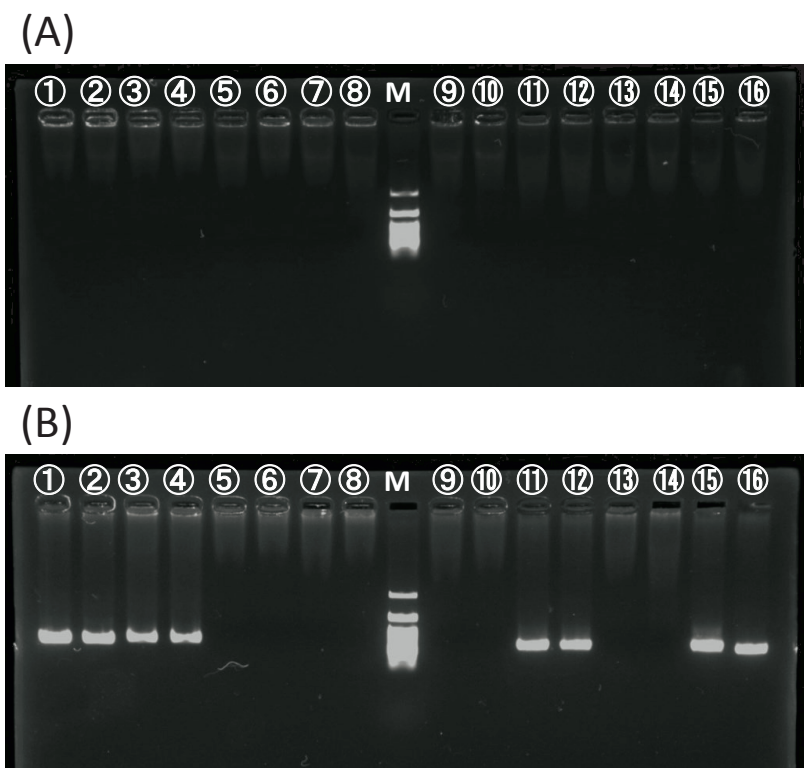


図 5 ダイレクト PCR の電気泳動結果 (A) Taq polymerase, (B) KOD FX Neo ①② : エノキタケ, ③④ : ブナシメジ, ⑤⑥ : シイタケ, ⑦⑧ : エリンギ, ⑨⑩ : ナメコ, ⑪⑫ : マイタケ, ⑬⑭ : ヒラタケ, ⑮⑯ : マッシュルーム, M : 分子量マーカー (100bp ラダー)

PCRの応用分野において常用される Taq polymerase を用いた場合、いずれの市販キノコを用いてもダイレクト PCR は成功しなかった (図 5)。一方、基礎研究用途で使用される KOD FX Neo を用いた場合では、設定した操作にて 8 種の市販キノコ中 4 種 (エノキタケ、ブナシメジ、マイタケ、マッシュルーム) においてダイレクト PCR が成功し (図 5)、その結果を 100%再現することが確認できた。特に、キノコ小片を採取する際の容易さ (キノコの柔らかさ) からマイタケが教材としてもっとも優秀で、次いでエノキタケが優れていた。

以上より、キノコのダイレクト PCR 法には KOD FX Neo の使用が適しており、PCR 反応阻害が見られず、Extension 時間 30~60 秒で増幅に差異はなかった。一方、Taq polymerase はダイレクト PCR には不向きだったが、通常の PCR であれば D1/D2 領域を増幅できることが確認されている。おそらく、市販キノコに由来する PCR 反応阻害物質の影響と思われる。温度サイクルに要する時間は、Taq polymerase、KOD FX Neo 共に約 1.3 時間だった。KOD FX Neo での実験時間短縮のためサイクル数を 30 から 25 に減らしたところ、再現性に課題が生じた (図 6)。原因として、Pre-denature で壊れる細胞はごく一部のため、25 サイクルでは電気泳動で DNA を確認できる最小限の増幅と予想される。また、コスト削減のため PCR 用混合液の少液量化も検討した。結果として、30 μ L までなら液量を減らすことが可能であった (図 7)。

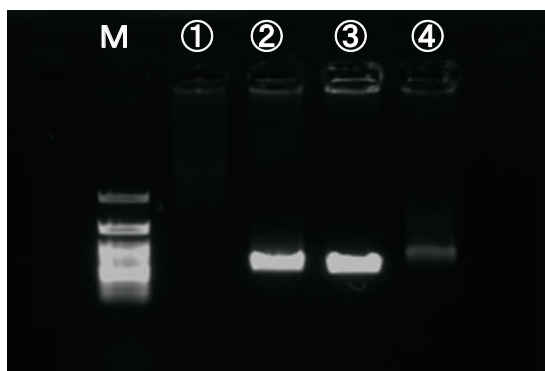


図 6 KOD FX Neo を使用したダイレクト PCR の時間短縮効果 (サイクル数 25) ①②:マイタケ, ③④:エノキタケ, M: 分子量マーカー (100bp ラダー)

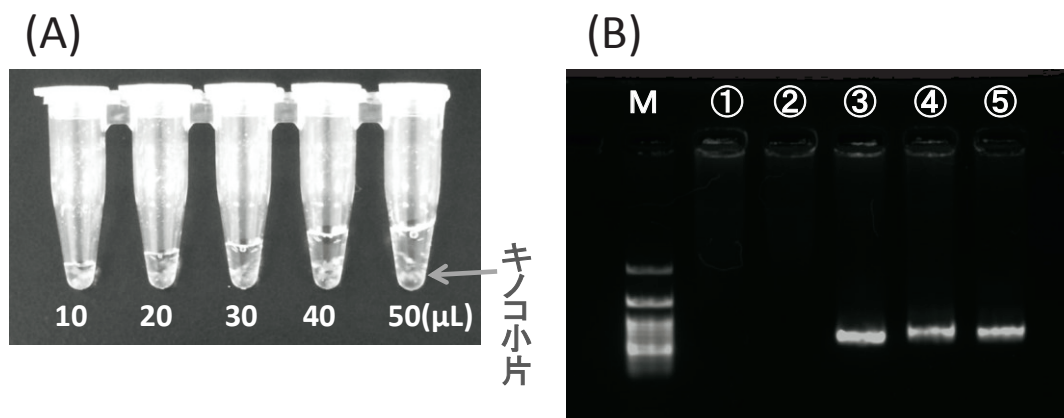


図 7 KOD FX Neo を使用したダイレクト PCR の液量減少効果 (A)PCR 前のチューブ (キノコはマイタケを使用), (B)電気泳動結果 ①②③④⑤: PCR 液量 10, 20, 30, 40, 50 μ L, M: 分子量マーカー (100bp ラダー)

3-2 PCR 増幅産物の配列確認

ダイレクト PCR にて増幅した DNA は精製し、シーケンシングにより塩基配列を決定、配列データをウェブの塩基配列データベース検索にかけることにより種を簡易同定することができた。一例として、市販マイタケを用いたダイレクト PCR の増幅産物を精製、シーケンシングを行い、データベース検索 (BLAST) したところ、*Grifola frondosa* (マイタケの学名) の 1 菌株と 99% の一致率を示した (図 8)。商業的に生産される食用キノコの多くは Basidiomycota (担子菌門) に属するが⁽⁸⁾、分類的位置付けを見るとマイタケは他のキノコと少し離れている。エノキタケ、ブナシメジ、シイタケ、エリンギ、ナメコ、ヒラタケ、マッシュルームなどは全て Agaricales (ハラタケ目) に属し、ヒラタケとエリンギは共に *Pleurotus* (ヒラタケ属) である。対してマイタケは, Polyporales (タマチョレイタケ目) に属する (図 8)。特定の遺伝子の DNA 配列に基づく進化的考察を行う上でも、マイタケは良い教材だと思われる。さらにこのような流れは、PCR を応用した病原性微生物の検査や商品植物の品種鑑定の作業などと共通しており、バイオテクノロジーの知識向上に役立つ。

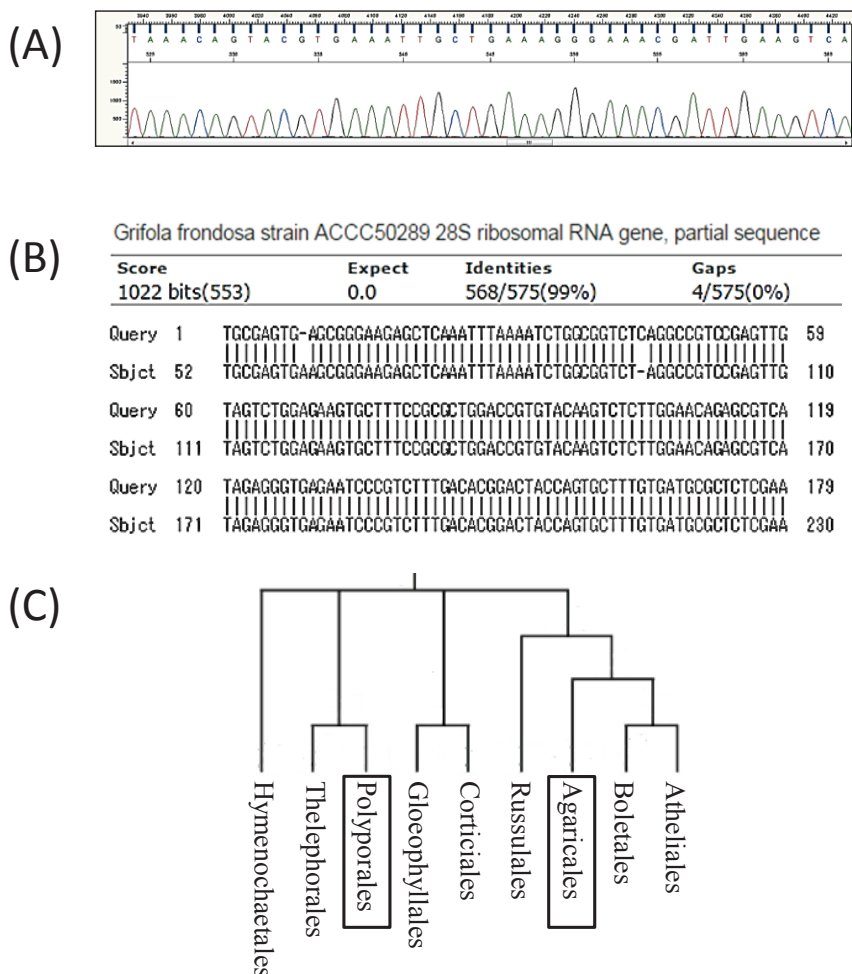


図 8 PCR 増幅産物の配列確認と簡易同定 (A)シーケンシング結果 (一部), (B)データベース検索結果 (一部), (C)市販キノコの分類的位置付け

3-3 教育実験フローの作成

以上の検討を基に、図9に示す教育実験フローおよびタイムテーブルを作成した。まずPCR法およびダイレクトPCR法について学習し、次いで市販マイタケを用いたダイレクトPCR実験を実施する。PCR反応中に、微生物に関する学習とキノコの顕微鏡観察を行う。PCR反応終了後、電気泳動により増幅DNAを検出する。泳動に約20分間を要するため、待ち時間に増幅DNAの塩基配列確認とデータベース検索、すなわちバイオインフォマティクスの概要を学習する。最後にまとめの時間を設けている。特別プログラムでなく正規の授業に収めるためには、初回をPCR反応まで、第二回を顕微鏡観察まで、そして第三回で増幅DNA検出を行うこともできる。教育実験としては、比較的余裕を持って取組めるのではないかと考えている。

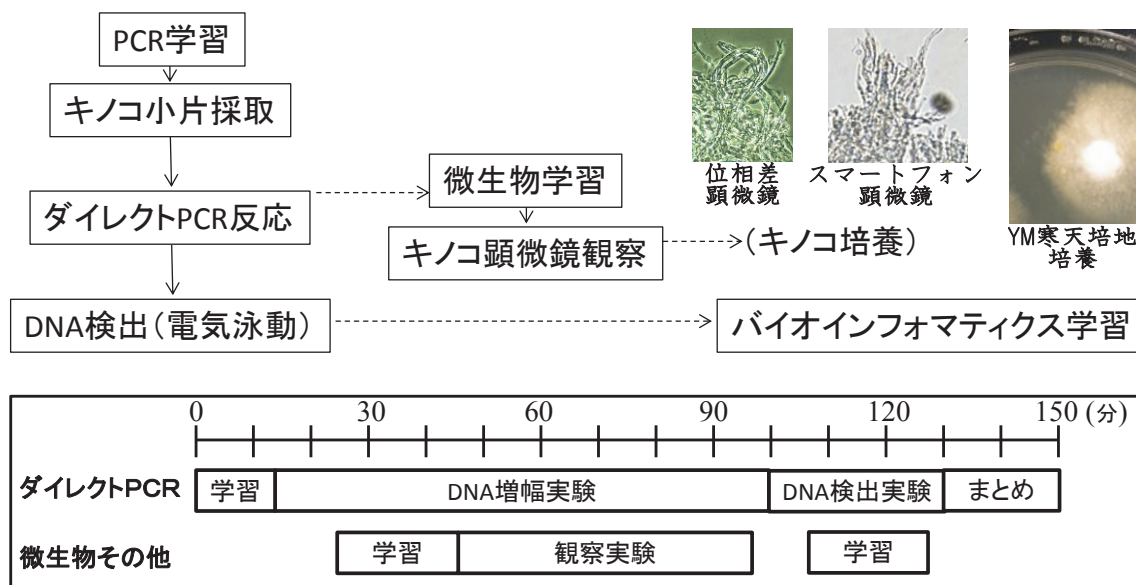


図9 教育実験フローおよびタイムテーブル

4. まとめ

DNAポリメラーゼにKOD FX Neoを使用し、実験手順の検討を行うことで、教育実験を目的としたキノコ・ダイレクトPCRが可能になった。実験の再現性およびサンプル採取の容易さなどから、マイタケが教材として適当である。本研究の教育実験を通して、PCRに関する技能や産業応用への理解の深まりが期待できる。波及効果として、微生物やバイオテクノロジーに関する理解を深めることもできる。また、本研究のキノコ・ダイレクトPCR法がさらに改良されれば、教育分野のみならず、食品研究・分析の分野でも応用可能と考えている。

今後の課題は、実験のコストダウンと実験時間のさらなる短縮である。なかでも高価なサーマルサイクラーの使用はネックだが、教育実験において温度サイクルを手動で行うマニュアルPCRが既に報告されている⁽⁹⁾。また、100円ショップ品等からの安価な自作電気泳動装置も報告されている^(10,11)。さらに、昨今のバイオハッカー時代の到来で、すでにサーマルサイクラーなど実験装置も極めて安価なものが販売されている。遺伝子操作に関する実験が自宅のキッチンにて安価に行える環境となれば、実験コストの問題は時間が解決してくれるだろう。

なお本研究内容の大筋は、2016年1月の日本生物教育学会第100回大会にて発表した⁽¹²⁾。本学

会には高校教員が多く参加しており、われわれの研究に対し、他のモデル生物への水平展開の可能性や実験コストに関するアドバイスなどさまざまな意見を頂いた。この場を借りて深謝したい。今後は教員の皆様の御意見を取入れ、あるいは摂南大学生命科学科出身の理科教員の力も借りて、さらなる教育効果の向上を図りたい。

参考文献

- (1) 杵渕隆, 「ポリメラーゼ連鎖反応法による DNA の増幅」, ぶんせき, 336 (2002), pp. 684-688.
- (2) 林清, 「PCR (ポリメラーゼ連鎖反応, Polymerase Chain Reaction)」, 日本食品科学工学会誌, 44 (1997), pp. 834-835.
- (3) Tsuchizaki, N., Ishikawa, J., and Hotta, K., “Colony PCR for rapid detection of antibiotic resistance genes in MRSA and enterococci”, *Japanese Journal of Antibiotics*, 53 (2000), pp. 422-429.
- (4) 日高史典, 李燕, 霜村典宏, 前田和彦, 永瀬光俊, 会見忠則, 「きのこのセミダイレクト PCR 法の開発」, 日本きのこ学会誌, 18 (2010), pp. 13-16.
- (5) Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Gafur, A., Ohta, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H., Ota, Y., and Tanaka, C., “Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR”, *Mycoscience*, 53 (2012), pp. 396-401.
- (6) 西野秀昭, 坂倉真衣, 伊藤明夫, 「水の中の小さな生き物観察にスマホ顕微鏡を活用することの可能性—親子を対象としたサイエンスカフェでの実践からの考察—」, 福岡教育大学紀要, 65 (2016), pp. 1-8.
- (7) Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., and Tamura, T., “Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products.”, *Foodborne Pathogens and Disease*, 13 (2016), pp. 156-162.
- (8) Porter, T. M., Skillman, J. E., and Moncalvo, J-M., “Fruiting body and soil rDNA sampling detects complementary assemblage of Agaricomycotina (Basidiomycota, Fungi) in a hemlock-dominated forest plot in southern Ontario.”, *Molecular Ecology*, 17 (2008), pp. 3037–3050.
- (9) 杉村順夫, 尾山廣, 森本弘, 「手動ポリメラーゼ連鎖反応法によるカイコの雌雄判別」, 生物教育, 56 (2015), pp. 29-35.
- (10) 倉林正, 武村政春, 「安くて簡単な電気泳動装置の開発による低コスト電気泳動実験の実現」, 日本生物教育学会第 100 回全国大会研究発表予稿集, (2016), p. 86.
- (11) Betsch, D. F., and Berard, J., “An inexpensive agarose gel electrophoresis system”, *Biochemical Education*, 27 (1999), pp. 48-50.
- (12) 青木駿介, 西矢芳昭, 「簡便で教育効果の高い遺伝子増幅実験の模索：キノコ・ダイレクト PCR 法の開発」, 日本生物教育学会第 100 回全国大会研究発表予稿集, (2016), p. 110.