

クマムシの遺伝子解析の条件

～クマムシの乾燥耐性メカニズムの解明に向けて～

学校法人星美学園静岡サレジオ高等学校

1 年 桐生有花

1 動機・目的

安全な水を気軽に得られない生活をする人は、世界だけでなく国内にも存在する。これを解決するために自分にできることを考え、中学生の頃に生活排水処理用の循環型ろ過装置を試作した。そのろ過能力向上のために、下水処理場でも用いられている活性汚泥中の微小生物を利用したいと考えた。しかし、ろ過装置が一時的に乾燥する状況も想定され、乾燥耐性を備えていない微小生物が死滅してしまう可能性が考えられた。この課題を解決するために、このような微小生物に乾燥耐性を獲得させることはできないかと考えた。耐性を持たない活性汚泥中の微小生物の一つであるゲスイクマムシ (*Isohypsibius myrops*) が属するクマムシ門のうち、コケなどの乾燥が起こり得る環境に棲む種は、その乾燥耐性の強さで知られることから、クマムシの乾燥耐性メカニズムの解明が、乾燥耐性発現技術の実現につながると考え、これを目指して研究している。

研究では、食餌と乾燥耐性の関連性に特に着目している。昨年度行なった実験では、強い乾燥耐性をもつモデル生物のヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) の食餌として提案されている生クロレラ V12 (クロレラ工業株式会社) をゲスイクマムシに投与し、その結果、乾燥環境下での活動継続時間の延長に成功した。しかしその遺伝子解析実験を試みたものの結果が得られず、作用や関連成分について明らかにできなかった。

そこで本研究では、PCR 法によってクマムシの遺伝子を増幅させるためのサンプルの条件と PCR 条件を明らかにすることを目的とした遺伝子解析実験を行なった。遺伝子増幅のための適切な条件を得ることで実験が容易になり、今後、食餌が遺伝子に及ぼす影響や、乾燥耐性強化に関連する成分の特定につながると考えている。自分自身の研究に限らず、クマムシの研究の普及と発展の促進にもつながると期待している。

2 方法

ゲスイクマムシとヨコヅナクマムシを飼育し、個体群のうち、個体数が一定以上 ($n \geq 400$) 集まったものの遺伝子を PCR 法と電気泳動法により解析し、適切な条件を調べた。

(1) 飼育

すべての個体群を、20℃に設定したインキュベーター内で飼育した。

ヨコヅナクマムシは 1.5%寒天培地 (STAR Agar L-grade 01) 上、ゲスイクマムシは培地なしのシャーレで飼育した。クマムシはシャーレよりも寒天培地が歩きやすいと言われているが(*[1])、ゲスイクマムシが棲む活性汚泥では水が攪拌されるため、生息環境に近づけるために培地を用意しなかった。

各種、生クロレラ V12 給餌群と無添加クロレラ給餌群に分けて飼育し、個体数の増減を比較した。前者には 100 倍希釈した生クロレラ V12 (クロレラ工業株式会社)、後者には八重山クロレラプレミアムパウダー (八重山殖産株式会社) 2.0g に対して超純水 100mL を加えて攪拌した混合液の、粒が小さい上澄みを食餌として与えた。増減の比較は、増減率を算出して行なった。これは、「その日の個体数」から「飼育開始時の個体数」を減じて、その差をさらに「飼育開始時の個体数」で割った値を百分率にして算出した。

(2) PCR 及び電気泳動実験

飼育開始日から約1ヶ月後、一定数以上の個体 ($n \geq 400$) を集めることができた、ヨコヅナクマムシとゲスイクマムシの生クロレラ V12 給餌群、活性汚泥中のゲスイクマムシの3個体群を遺伝子解析した。以前、同様の個体群で遺伝子解析を行なった際はバンドが現れなかったため、その原因を探す予備実験から始めた。電気泳動後の染色の様子を確認するため、DNA マーカーのみを電気泳動し、以前用いた ViewBlue® Stain で染色した。結果、マーカーが確認できず(図1)、染色ができていなかったことが原因であったと考えられる。本来は図2のようにマーカーが確認できる。このため今回の実験では、別の染色試薬を用いた。



図2. 昨年度用いた試薬で染色したマーカー

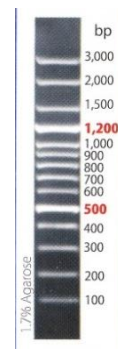


図3. 本来見られるDNAマーカー (KE-2410の説明書より抜粋)

また、以前の実験では各個体群を100匹ずつ分注したが、DNAを十分に抽出できていなかった可能性もあるため、各個体群を100匹ずつ分注したものと300~400匹ずつ分注したものを用意してDNAを抽出し、PCRを行なった。

キットを用いて得たDNAを、サーマルサイクラーによりPCR法で増幅させた。DNAの濃度が高い場合、増幅されない可能性が想定されたため、各サンプルにおいてDNA抽出液の原液と、純水で10倍希釈したDNA抽出液の両方を用意した。PCRのサイクルは、以下の通りである。サイクル前の熱変性を98℃で2分行なった後、熱変性:98℃で10秒、アニーリング:55℃で30秒、伸長反応:72℃で30秒のサイクルを35回繰り返し、最終伸長反応を72℃で3分行なった。またこれは、以前の遺伝解析実験よりもアニーリング温度を5℃下げ、サイクル数を5増やした設定である。PCR反応液は、DNA抽出液1μL、各プライマー1μL、純水7μL、PCR試薬10μLを調製した。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

- ・フォワード: 5'-TCTCAGTACTTGCTTTAACAAGGC-3'、
- ・リバーズ: 5'-GATCCTTCCGCAGGTTACAC-3'

これは、真クマムシ綱(*)と異クマムシ綱を判別できる設計である*[4]。得られたPCR産物を電気泳動し、バンドを調べた。電気泳動は、100Vの電圧で約20分行なった。

*真クマムシ綱；

クマムシ門は、真クマムシ綱、異クマムシ綱、その中間の形質をもつと言われる中クマムシ綱の3つに分類できる。異クマムシ綱の起源が古く、そこから真クマムシ綱が出現したとされている。なお実験に用いたプライマーでは、真クマムシ綱の場合バンドが確認できるが、異クマムシ綱の場合はバンドが現れない。

3 結果

生クロレラ V12 給餌群は両種とも腸が緑色になったことから、クロレラを食べたことが確認できた(図3, 4)。無添加クロレラ給餌群でも緑色になっていたが、鮮明ではなかった。



図3. 生クロレラ V12 給餌群のゲスイクマムシ (左) とヨコヅナクマムシ (右)

また、飼育時の個体数の増減率の比較は図 4 に示した。

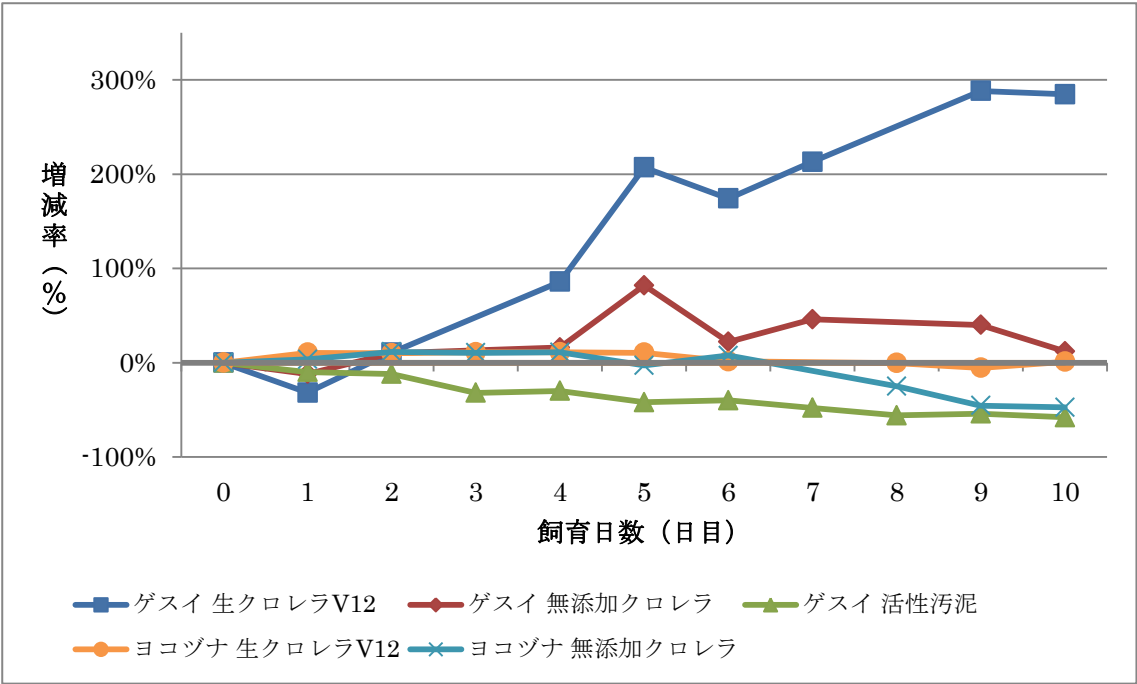


図 5. 各個体群の飼育による個体数の増減率の比較
※凡例の「ゲスイ」はゲスイクマムシ、「ヨコヅナ」はヨコヅナクマムシを示す。

ゲスイクマムシについて、活性汚泥中の個体群は期間を通して減少傾向にあり、また無添加クロレラ給餌群は一時増加したものの再び減少した。両方とも、10 日目の個体数は飼育開始日とあまり変わらなかった。一方生クロレラ V12 給餌群は、10 日間で 3 倍近く増加した。ヨコヅナクマムシは、どちらの個体群でも個体数があまり変化せず、無添加クロレラ給餌群の場合、期間の最後に減少傾向が見られた。両種の生クロレラ給餌群を比較すると、ゲスイクマムシの個体数の増加が著しいものであることがわかる。

(2)PCR 実験

PCR 産物を電気泳動した結果、図 6 のようにバンドが確認できた。マーカ―は 100bp DNA ladder である。得た PCR 産物の一覧を表 1 にまとめた。

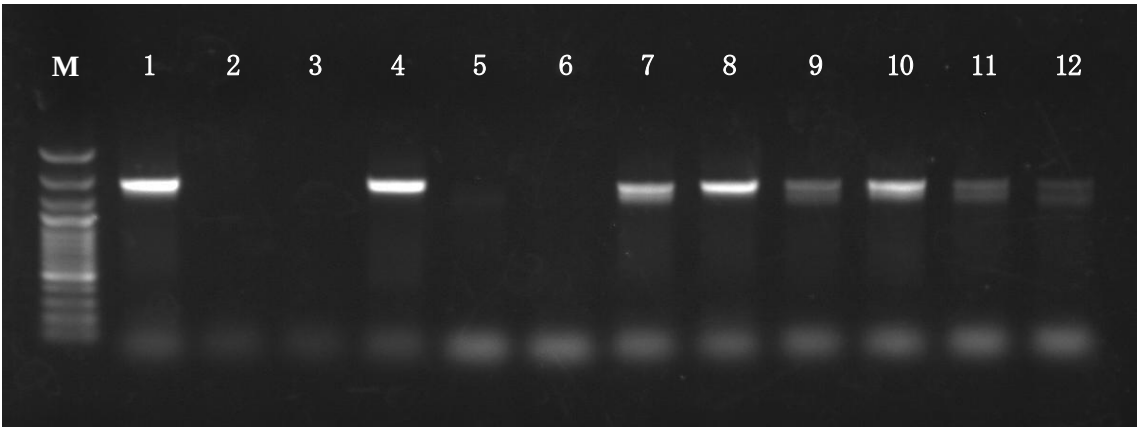


図 6. PCR 産物の電気泳動の結果 (表 1 参照)

表 2. PCR 産物の一覧

	クマムシの種	食餌	分注した個体数 (匹)	DNA 抽出液の濃度 (%)
1	ゲスイ	活性汚泥	100	100
2	ゲスイ	生クロレラ V12	100	100
3	ヨコヅナ	生クロレラ V12	100	100
4	ヨコヅナ	生クロレラ V12	400	100
5	ゲスイ	生クロレラ V12	400	100
6	ゲスイ	活性汚泥	300	100
7	ゲスイ	活性汚泥	100	10
8	ゲスイ	生クロレラ V12	100	10
9	ヨコヅナ	生クロレラ V12	100	10
10	ヨコヅナ	生クロレラ V12	400	10
11	ゲスイ	生クロレラ V12	400	10
12	ゲスイ	活性汚泥	300	10

確認できた DNA のサイズは約 2000bp と ≥ 100 bp、一部のサンプルでは約 1800bp の位置にもバンドが見られた。

得られた結果を、種、食餌、個体数、DNA 抽出液の濃度の 4 つの条件それぞれに着目してバンドの濃さを比較し、分析した (以下、図 8、表 2 参照)。

種に着目すると、他の条件が等しい組み合わせは、2-3, 5-4, 8-9, 11-10 (それぞれ「ゲスイクマムシ - ヨコヅナクマムシ」の順) の 4 つである。2-3 では両種ともバンドが見られず、8-9 ではゲスイクマムシ、5-4, 11-10 ではヨコヅナクマムシのほうが濃く現れた。

ゲスイクマムシの食餌に着目すると他の条件が等しい組み合わせは、2-1, 5-6, 8-7, 11-12 (「生クロレラ V12 - 活性汚泥」の順) の 4 つである。バンドは、2-1 では活性汚泥中の個体群のほうが濃いが、他 3 つの組み合わせでは生クロレラ V12 給餌群のほうが濃く現れた。

個体数に着目すると他の条件が等しい組み合わせは、1-6, 2-5, 3-4, 7-12, 8-11, 9-10 (「100 匹 - 300~400 匹」の順) の 6 つである。個体数の多いほうがバンドが濃く現れたのは 2-5, 3-4, 9-10 の 3 つであり、他は個体数が多いもののバンドが薄く現れた。

DNA 抽出液の濃度が 100% の 1~6 と 10% の 7~12 を比較すると、すべての個体群のバンドが確認できたのは 10% の場合であった。しかし、両方において検出された 1 と 4 は、100% の場合にバンドがより強く現れた。なお、バンドがまったく現れなかった、もしくは現れたが非常に薄かった、2, 3, 5, 6 の 4 つのサンプルすべてに共通する点は、DNA 抽出液の濃度が 100% であったことだ。

4 考察

(1) 飼育

ゲスイクマムシの生クロレラ V12 給餌群では、著しくかつ安定した増加が見られた。また、個体数を数えた 10 日間以降約 1 ヶ月観察していても、幼体や卵は多く、うまく繁殖していた。ヨコヅナクマムシは、どちらの個体群でもあまり増減が見られなかったが、生クロレラ V12 給餌群は飼育開始日から 2~3 週間にかけて著しく増加し、食餌の効果が見られた。飼育系が確立しているヨコヅナクマムシと比較しても、生クロレラ V12 の投与によるゲスイクマムシの増加は同等もしくはそれ以上に著しく、持続的な飼育が可能であることがわかった。一方無添加クロレラ給餌群は繁殖せず、遺伝子解析実験を行なうことができなかった。生クロレラ V12 の影響を正しく評価するためにはこの個体群が必要となるため、今後は食餌をホモジナイズするなど、飼育や実験の方法を再検討する必要がある。

(2)PCR 実験

今回の実験では、以前よりもサイクル数を増やし、アニーリング温度を下げることで DNA がより増幅されやすい設定にした。結果、バンドが確認できたことから DNA が増幅したことがわかり、今回の PCR 条件は適切であったことがわかった。クマムシの遺伝子解析に際して適切な PCR 条件は、以下の通りであると結論を得た。

- ・サイクル前の熱変性:98℃で2分
- ・熱変性:98℃で10秒、アニーリング:55℃で30秒、伸長反応:72℃で30秒 ×35
- ・最終伸長反応:72℃で3分

DNA サンプルの条件の比較から、個体数は、今回の実験での範囲内であれば DNA 増幅への影響はあまりないと考えられる。すなわち、 $400 \geq n \geq 100$ が適切である。DNA 抽出液の濃度は解析結果に大きく影響することがわかった。DNA 原液の場合、バンドが現れないサンプルがあったため濃度が高すぎたと考えられ、10 倍希釈した場合はすべてのサンプルにバンドが現れた。このことから、DNA 抽出液を希釈した上で PCR 反応液を調整する必要があることがわかった。

また解析の結果から、サンプルの条件以外についても考察した。種に着目すると、両種のクマムシのバンドが現れたことから、どちらも真クマムシ綱に属することが確認できた。また、乾燥耐性を持たないゲスイクマムシのバンドが比較的薄く現れた。クマムシの起源は水中であり、生息環境の陸上への変遷に伴い必要となった乾燥耐性を発達させたと考えられていることから (*[5][6][7])、実験結果はこれを肯定する可能性もあると考えている。

さらに、ゲスイクマムシの食餌に着目すると、生クロレラ V12 給餌群のバンドが活性汚泥中の個体群よりも比較的濃かった。このことから、生クロレラ V12 が遺伝子に影響を及ぼしたことが示されたと考えている。種に着目した比較も踏まえると、食餌の影響を受けたゲスイクマムシの系統がヨコヅナクマムシにより近づいた可能性が想定されることから、特に種内の系統に関わる遺伝子領域に影響すると思った。

昨年度の研究結果である、生クロレラ V12 の投与による乾燥環境下での活動継続時間の延長と、今回の結果から、食餌が遺伝子に影響を及ぼし、それが乾燥耐性獲得につながった可能性が肯定された。ここから、食餌の投与によりクマムシの系統が種内で変化し、その変化が乾燥耐性獲得につながるという新たな可能性を予想している。

今後の研究では、乾燥耐性に関連すると考えられている LEA タンパク質や、クマムシ固有の SAHS / CAHS タンパク質 (*[8]) に関わる遺伝子領域だけでなく、種内の系統に関わる遺伝子領域にも着目しながら、食餌やその成分の遺伝子への影響を調べたい。生クロレラ V12 の特徴であるビタミン B12 が関連する可能性が高いと考えており、その可能性についても調べたい。ビタミン B12 などの物質を食餌に添加して飼育した個体群の遺伝子解析を行ない、乾燥耐性に関連する成分を特定したい。

5 結論

飼育では、生クロレラ V12 の食餌としての効果が確認できた。PCR 実験により、DNA の増幅が確かめられ、クマムシの PCR に際した適切なサイクルの条件と、DNA サンプルの希釈の必要性がわかった。条件を得たことにより、今後の研究で繰り返し行う予定の遺伝子解析実験が容易になった。

また、解析の結果は、食餌が遺伝子に影響を及ぼしたことで系統が変化し、その変化が乾燥耐性の強化につながる可能性を示唆していた。今後この点にも着目しながら研究を進めたい。特に、生クロレラ V12 の特徴であるビタミン B12 の影響を調べたいと考えている。

本研究の成果は今後、クマムシの研究の発展を促進すると期待される。また、遺伝子解析の結果が示唆する可能性は、乾燥耐性メカニズムの解明につながると期待される。耐性メカニズムの解明は、乾燥耐性発現技術の実現にも応用でき、技術を臓器や生鮮食品などの乾燥保存に利用することで、医療分野や輸送エネルギー

ギーの削減による経済発展に大きく貢献すると期待している。

6 参考文献

- *[1] 堀川大樹、荒川和晴. 「クマムシ〜極限環境を生きる究極生物」. Keio SC journal 15(1): 246-260, 2015.
https://gakkai.sfc.keio.ac.jp/journal_pdf/SFCJ15-1-14.pdf
- *[2] 国立研究開発法人 科学技術振興機構 次世代人材育成事業. 広島県立大門高等学校「クマムシ類の完全飼育をめざして〜最適飼育温度の特定〜」. (最終閲覧日: 2021/8/12)
https://www.jst.go.jp/cpse/jissen/pdf/houkoku/TK150008_matome2017_024.pdf
- *[3] Ito Makiko, Saigo Tokiko, Abe Wataru, Kubo Takeo, Kunieda Takekazu
“Establishment of an isogenic strain of the desiccation-sensitive tardigrade *Isohypsibius myrops* (Parachela, Eutardigrada) and its life history traits”
Zoological Journal of the Linnean Society, 178(4): 863-870, 2016.
<https://academic.oup.com/zoolinnea/article/178/4/863/2691468>
- *[4] Michael S Robeson II, Elizabeth K Castello, Kristen R Freeman, Jeremy Whiting, Byron Adams, Andrew P Martin, and Steve K Schmidt
“Environmental DNA sequencing primers for eutardigrades and bdelloid rotifers” BMC Ecology, 2009; 9: 25.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796995/>
- *[5] 鈴木忠「クマムシ?! 小さな怪物」, 岩波書店, 2006
- *[6] 堀川大樹「クマムシ研究日誌: 地上最強生物に恋して」, 東海大学出版部, 2015
- *[7] 堀川大樹「クマムシ博士のクマムシへんてこ最強伝説」, NATIONAL GEOGRAPHIC, 2017
- *[8] Ayami Yamaguchi, Sae Tanaka, Shiho Yamaguchi, Hirokazu Kuwahara, Chizuko Takamaru, Shinobu Imajoh-Ohmi, Daiki D. Horikawa, Atsushi Toyoda, Toshiaki Katayama, Kazuharu Arakawa, Asao Fujiyama, Takeo Kubo, and Takekazu Kunieda
“Two Novel Heat-Soluble Protein Families Abundantly Expressed in an Anhydrobiotic Tardigrade” National Library of Medicine, Epub 2012: 8: 28
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22937162/>

7 謝辞

本研究の実施にあたり、お忙しい中御指導を頂いた静岡大学の宮澤俊義様、竹内浩昭教授を始め、遺伝子解析について丁寧な助言を頂いた石原顕紀准教授、PCR 実験に際して設備を提供してくださり、御協力くださった木寄暁子准教授、並びに木寄研究室に所属する皆様に深く感謝申し上げます。また、ヨコヅナクマムシを提供してくださった東京大学の國枝武和様に感謝いたします。研究の機会を提供してくださった静岡大学 FSS 未来の科学者養成スクール関係者の皆様に、この場をお借りして心から感謝申し上げます。