



長野県屋代高等学校 小林 孝次*

目 的

近年の生命工学技術は発展目覚しく、私たちの生活と直接的な接点を持つようになりはじめた。しかしながら、現在の一般生活では、遺伝子そのものであるDNAを目の当たりにする機会はほとんど無く、また、中学校や高校の生物授業でも遺伝子やDNAについて学習する機会はわずかである。

この作品では、高校生が簡易的な実験を通し、「遺伝子の役割」「DNAからタンパク質ができるまでの仕組み」などを体験的に学習することを目的とした。

概 要

実践した方法は、3ステップで構成されている。初めに生体組織からDNAを抽出し、「物質としてのDNA」を確認する。次のステップでは、市販キットを用いて大腸菌に他生物由来の遺伝子を導入し、大腸菌の性質（形質）を変える実験を行い、「生命の設計図・DNA」の意味を体験的に学ぶ。最後に、形質の変わった大腸菌（形質転換体）が生産した酵素を用いて酵素実験を行い、「セントラルドグマの仕組み」や「酵素の性質」について学ぶ。実験の概要は次の通りである。

I. DNA抽出実験

ニワトリ肝臓組織からDNAを抽出し、DNA染色液で検出した物質がDNAであることを確かめる。

II. 大腸菌形質転換実験

市販されている大腸菌形質転換実験キットを用いて、大腸菌にホタル発光酵素遺伝子を導入し、大腸菌をホタルのように光らせる。

III. 形質転換大腸菌が生産した酵素による酵素実験

実験IIで作成した形質転換大腸菌にホタル発光酵素を生産させ、その酵素を使い、加熱やpH変化に伴う酵素の失活などの酵素実験を行う。

教材・教具の製作方法

実験IIで用いる大腸菌形質転換実験キットは、東洋ビーネット社のDr.ジーン4（現在はDr.ジーン4 Ver.2）を用いた。この製品はケニス株式会社で取り扱っており、代理店から購入が可能である。

実験II・IIIでは、大腸菌培養のため20～37℃に調整可能なインキュベーターが必要である。また、菌体回収を遠心分離で行うため、2,000～5,000rpmで遠心可能な遠心分離機が必要となる。

実験II・IIIは遺伝子組換え生物を扱うため、文部科学省の遺伝子実験指針に従い実験を行う。

学習指導方法

I. 簡易抽出法によるDNAの抽出と確認

生体組織からのDNA抽出は、次のように簡略化した方法で行った。

1. 凍結試料（ニワトリ肝臓を1cm角に切断）50gにつき、台所用中性洗剤を少量加えた溶液200mlを加え、約1分間ミキサーで破碎する。
2. 破碎溶液10mlに同量の12.5%食塩水を加え、ゆっくりと混ぜる（粘りが出てくるのでゆっくり混ぜる。激しく混ぜるとDNAが壊れる）。
3. 2の溶液（約20ml）を電子レンジで約5～10分間加熱する（赤みが消え、全体が白く変色するまで十分に加熱する）。
4. 加熱後、溶液が温かいうちにろ過を行い、ろ液2～5mlをスクリーン管に集める。
5. よく冷やしたエタノールをろ液に加える（エタノール濃度が70%以上になるようにする）。
6. スクリーン管を転倒させ、溶液を混ぜるとDNAが析出する。

この方法は短時間（20～30分ほど）で行える。また、電子レンジ加熱により、タンパク質の熱変性も時間をかけず行えるため、DNA分解酵素の活性化を容易に押さえることができ、以前に紹介されている方法よりも実験成功率は高い。

* こばやし こうじ 長野県屋代高等学校 教諭 〒387-8501 長野県千曲市屋代1000

☎(026) 272-0069 E-mail rgntj015@ybb.ne.jp



写真1 組織から抽出したDNA

抽出したDNAは、メチルグリーン・ピロニン染色液（文献4参照）で確認を行った。染色の手順は、まず抽出したDNAをろ紙に取り、十分に乾燥させることでDNAを水に溶け難くする。次に染色液を滴下し、約1分後、水道水で水洗いを行い、ろ紙上のDNAを観察する。DNAはメチルグリーンにより青く染色され、ろ紙はピロニンで染まるため、コントラストが鮮やかで、染色されたDNAの観察は容易である（写真2）。

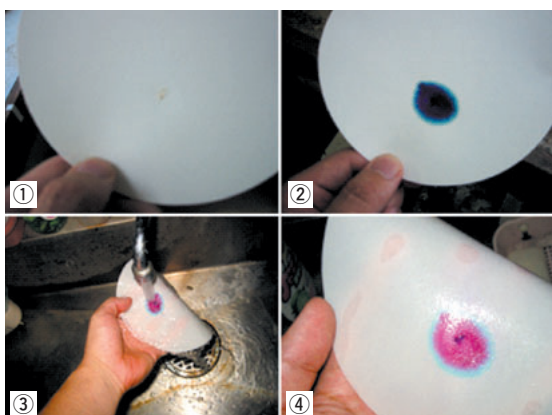


写真2 メチルグリーン・ピロニン染色液によるDNAの染色

Ⅱ. ホタル発光酵素遺伝子の導入による大腸菌形質転換実験

大腸菌形質転換実験は、大腸菌に本来持ち得ない他生物の遺伝子を人為的に導入し、新しい形質を持たせるといふ実験で、最も簡単な生命工学技術の1つである。高校でこの実験を行う場合、市販の実験キットを用いるのが便利である。今回は大腸菌へホタル発光酵素（ルシフェラーゼ）の遺伝子を導入し、大腸菌をホタルのように発光させる形質転換実験を行うため「Dr.ジーン4」キットを使用した。市販キットでは、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を導入し、大腸菌を蛍光発光させる実験キットが最も多く利用されている。しかし、今回は以下の5つの理由から、GFPのキットを用いなかった。

1. クラゲは生徒には馴染みが薄く、また、クラゲの発光現象を生徒が知らない。
2. 生徒はホタルの発光は見たことがある。
3. GFPは蛍光タンパク質であり、しかも、特殊なタンパク質であるため、その後の学習に発展性が乏しい。
4. ホタル発光反応は酵素反応であるため、酵素についての発展学習が可能である。
5. ホタル発光反応はATPを必須とする反応系として、生物の教科書で紹介されている。

形質転換実験は、キットのマニュアル通りに行った。実験時間は遺伝子導入実験に40分、大腸菌培養に約1.5日を要した。培養後、プレート上にコロニーが発現し、ここへ付属の基質（ルシフェリン）溶液を滴下すると発光が確認できた。この発光は約1分間見られた。大腸菌の培養条件にもよるが、最も強い発光が生じた場合、直径約2mmのコロニーで生じた発光は、暗室下で1～2m離れた場所からでも確認できた。

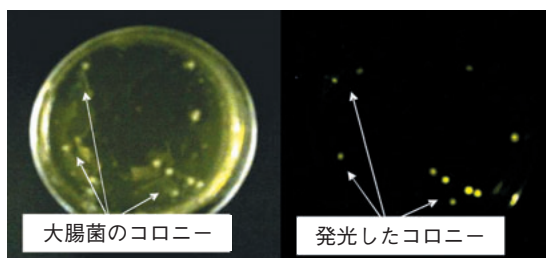


写真3 形質転換した大腸菌の様子(右の写真は発光の様子)

Ⅲ. 形質転換大腸菌が生産した酵素を使った酵素実験

実験Ⅱで形質転換した大腸菌では、菌体内にホタル発光酵素が生産される。この大腸菌をLB液体培地で37℃12時間、その後、24℃24時間振とう培養し、溶液を3,000rpmで遠心分離後、回収した菌体の懸濁液に発光基質溶液を加えると、発光反応が確認できた。

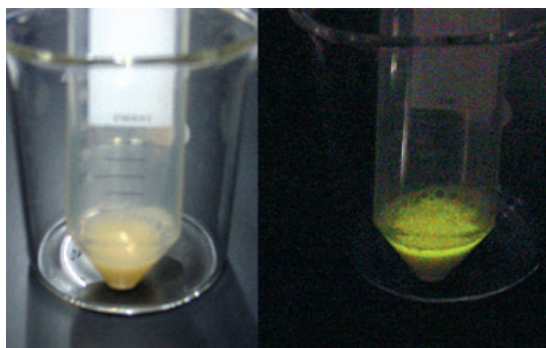


写真4 液体培養した大腸菌(右の写真は発光している様子)

ホタル発光反応は、酵素ルシフェラーゼの触媒作用による発光基質ルシフェリンの酸化反応である。

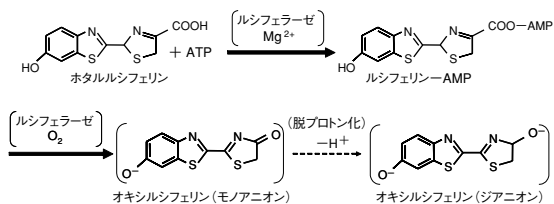


図1 ホタル発光反応
 モノアニオンからは赤色発光、
 ジアニオンからは黄緑色の発光

この酵素反応系には2つの面白い特徴がある。

1. 化学反応の進行が発光現象として確認できる。
2. 反応溶液のpH変化により発光色が変化する。

この特徴を生かし、一般的な生物授業で行うような酵素特性の確認実験（熱やpH変化による失活実験）を行うと、「目に見える酵素実験」が行える。

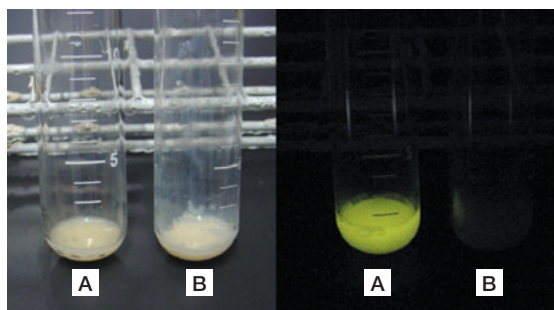


写真5 熱による失活実験の結果
 (A) 未加熱試料 (B) 加熱試料

写真5は熱による酵素の失活実験の結果である。加熱処理したBの試験管では、基質溶液を加えても発光は確認できなかった。写真6は強酸・強塩基による酵素の失活実験の結果である。この実験では強酸・強塩基を加えると酵素が失活し、発光が見られなくなった(試験管A、B)。この2つの実験は消化酵素を用いて行う酵素実験と同様の結果が得られる。更に従来の実験では、反応産物や基質の検出で間接的に酵素活性を確認しているが、この実験では活性の有無を「発光」として容易かつリアルタイムに確認できるため、酵素活性の確認が容易という利点がある。

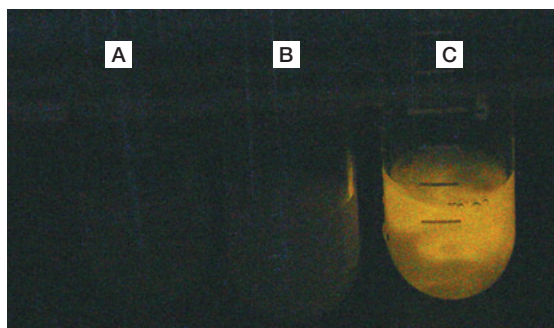


写真6 強酸・強塩基による失活実験
 (A) NaOH (B) HCl (C) 蒸留水

写真7はリン酸緩衝液で反応溶液のpHを調整し、その発光色を観察したものである。この写真では、反応溶液のpH変化に伴い発光色が変わっている様子が見られる。ホタル発光反応では、溶液のpHが酸性になるにつれ、徐々に発光色は赤色に変化していく。この現象は、pH変化に伴う酵素の立体構造変化により、異なる反応産物（酸化ルシフェリン）が生成されることに起因している。通常、ホタル発光反応はホタル体内でも、形質転換大腸菌でも黄緑色の発光しか観察されないため、『ホタルの発光は黄緑色』という固定概念がある。この実験は、その概念を打ち破ることができる点で非常に面白い。また、酵素学習としても、「酵素には最適なpH領域がある」という知識を学ぶ際、pH変化での酵素活性の有無だけではなく、『発光色も変わる』というおまけがあり、学習意欲を高めつつ、効果的に学習を行える教材として価値があると思われる。

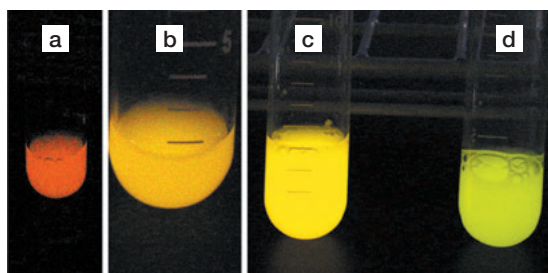


写真7 反応溶液のpH変化に伴う発光色の変化
 (加えたりん酸緩衝液のpHは以下の通り)
 (a) pH 4.0 (b) pH 5.0 (c) pH 6.0 (d) pH 8.0

実践効果

この学習活動を行う前では、DNAを実際に見たことがある生徒は少なく、また、抽出されるDNAは「二重螺旋」が見られると思った生徒も少なかった。DNA、タンパク質レベルの実験は、実際に物質を見ることが難しいため、教科書などのイメージ図などを実物として認識しているケースがある。そのため、このような簡単な方法で体験的に学習していくことが大切だと感じた。

また、形質転換実験、酵素実験については、2つの実験を続けて行うことで、生物共通の仕組み「セントラルドグマ」を効果的に学習できたと考えられる。「DNAは生命の設計図」と言われる理由を、高校生がその仕組みを交えて理解することは難しい。しかし、この活動では体験的に学習することができ、生徒の感想からも学習効果は非常に高いと感じられた。



写真8 酵素実験を行う生徒

参考文献

- 1) シリーズ．光が拓く生命科学，共立出版，第2巻，光環境と生物の進化．
- 2) シリーズ．光が拓く生命科学，共立出版，第7巻，生命科学を開く新しい光技術．
- 3) バイオサイエンス最前線，アトー株式会社，Vol.22.
- 4) 新 染色法のすべて，医歯薬出版株式会社．
- 5) 遺伝，裳華房，Vol.57，No.1（2003）．
- 6) 遺伝，裳華房，Vol.50，No.11（1996）．
- 7) 遺伝子工学実験ノート〈上〉DNA 取扱いの基本とサブクローニング，羊土社，無敵のバイオテクニカルシリーズ．
- 8) タンパク質実験ノート〈上〉抽出・分離と組換えタンパク質の発現，羊土社，無敵のバイオテクニカルシリーズ．
- 9) 生化学実験法，東京化学同人．
- 10) 生物発光と化学発光，廣川書店．