

指導資料

理科 第243号

高等学校，盲・聾・養護学校対象

平成16年5月発行

鹿児島県総合教育センター

大腸菌の遺伝子組換え実験

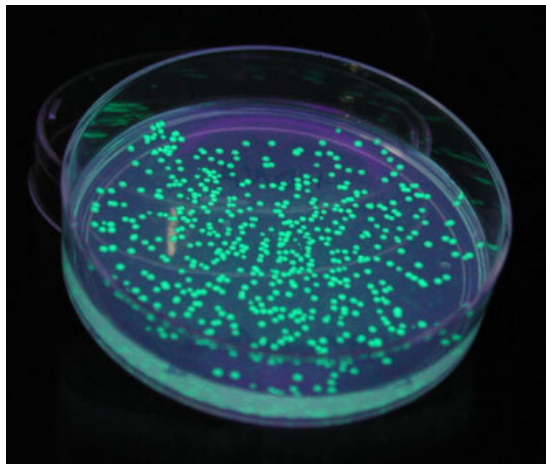


写真1 発光する大腸菌

大腸菌のコロニーにブラックライトの紫外線を照射すると，大腸菌が発光し，緑色の蛍光色が浮かび上がる。その幻想的な光景に，誰もが感嘆の声を上げる瞬間である。

もちろん，これは普通の大腸菌ではない。遺伝子組換え技術によって，発光生物であるオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質（GFP，Green Fluorescent Protein）の遺伝子を導入してできた大腸菌である。

この実験では，導入した遺伝子が発現したことを肉眼で容易に確認でき，遺伝子組換え技術や遺伝子発現調節の仕組みについて，体験的に理解を深めることができる。最近では高等学校などでの実施例も増えつつある実験だが，実施経験のある学校は限られている。

そこで，本稿ではこの実験の内容を紹介す

るとともに，実施上の留意点や指導の在り方などについて述べる。

また，遺伝子組換え実験を行うに当たっては，関連の法律や遺伝子組換えに関する最近の動きなどについて事前に知っておく必要がある。これらについては，巻末の参考資料を参照していただきたい。

1 遺伝子組換え実験の内容

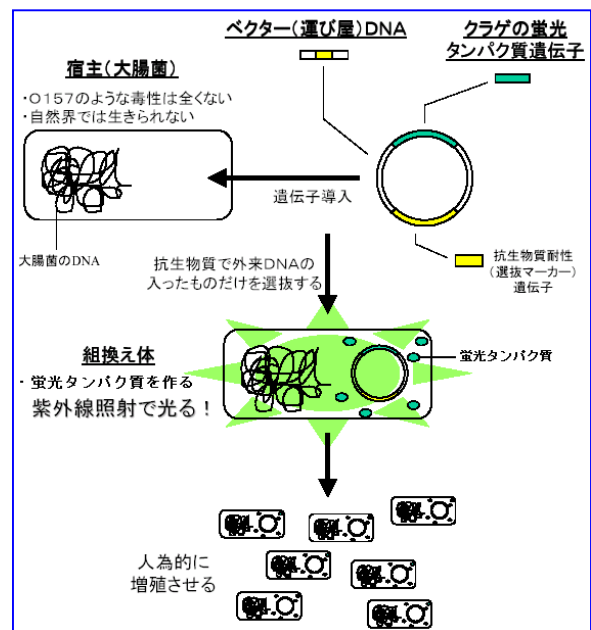


図1 遺伝子組換え実験の概要

文部科学省通知（13文科振1152号）を基に作成
実験内容の概略は，図1のとおりである。

組換え DNA を取り入れたプラスミドをベクターとして用い，大腸菌に導入して，形質転換を起こさせる内容となっている。

大腸菌の遺伝子組換えの実験材料は、数社から販売されている。今回は Bio-Rad 社のキットを使用し、表 1 や図 2 に示した宿主やベクターを用いた。

表 1 使用した宿主やベクター、及び供与 DNA

宿主	大腸菌 K12 株 (HB101)
ベクター-DNA	pGLO プラスミド
タンパク質をコードする遺伝子	<i>GFP</i>
抗生物質の耐性をコードする遺伝子	<i>bla</i> (ampicillin 耐性)

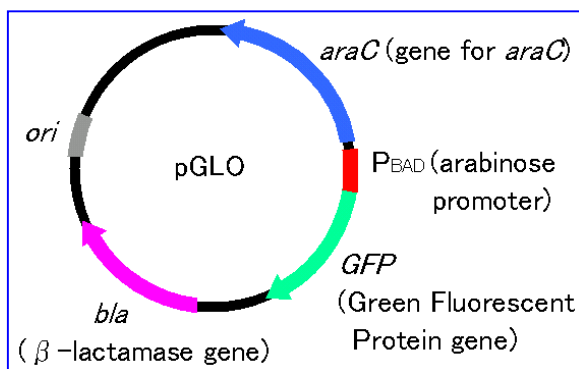


図 2 pGLO プラスミド

実験に使用する薬品や器具は、ほとんどがキットに含まれている。キットのほかに必要な器具としては、ガスバーナー、オートクレーブ、インキュベーター、ウォーターバス、長波長紫外線ランプ（ブラックライトでも可）などがある。

本実験では、3種類の寒天培地を使用する。成分は LB 培地を基本として、抗生物質アンピシリンを添加した培地と、単糖のアラビノースを更に添加した培地である。アンピシリンを使用する理由は、形質転換を生じた大腸菌だけを選択的に生育させるためである。ベクターとして導入される pGLO には、*GFP* とともに *bla* (アンピシリン耐性遺伝子) も含まれおり、*bla* からラクタマーゼ (アンピシリン分解酵素) が作られるからである。ベクター-DNA が導

入されて形質転換をした大腸菌だけが、選択的に生育できる仕組みになっている。また、ベクター-DNA + (導入) と - (導入せず) の2種類の大腸菌を用い、3種類の培地と組み合わせ、対照区を含めて合計4区の実験区を設けるのが一般的である。

実験日程と操作の概要を次に示す。

- (1) 寒天培地のプレートを作製する (3 ~ 7 日前)。

通常は指導者が行う。

- (2) スタータープレートに大腸菌をまき、培養する (1 日前)。

スタータープレートとは、実験に用いる大腸菌を培養するプレートである。

通常は指導者が行う作業だが、無菌操作の練習を兼ねて、生徒に実施させる方法も考えられる。大腸菌は、37 °C のインキュベーターで培養する。



写真 2 インキュベーターで培養する



写真 3 スタータープレート (培養 1 日後)

(3) 大腸菌に形質転換を生じさせ、寒天培地で培養する（実験開始日）。

スタープレートから大腸菌のコロニーを採り、ヒートショック法によりベクターDNAを導入する。氷温に冷却したマイクロチューブごと 42 のウォーターバスに 50 秒間湯浴し、速やかに氷温に戻す。その後、大腸菌をプレートにまいて培養する。このように、急激な温度変化によりベクターDNAを細胞内に取り込ませる方法を、ヒートショック法という。

ヒートショック後には、室温で 10 分間以上の回復時間を設ける。その理由は、この間にラクタマーゼ（アンピシリン分解酵素）を合成させて、アンピシリンを含む培地でも生育できるようにするためである。そのため、十分な回復時間をとった方が、良い結果が得られることが多いようである。



写真4 ヒートショック法でベクターを導入する



写真5 ガスバーナーの近くで無菌操作をする

(4) 実験結果の観察（実験開始日の翌日）

ベクターDNAを導入した翌日に、培養結果を判定する。可視光線下でコロニー形成の有無を調べ、次に紫外線を照射して発光の有無を調べる（写真6, 7）。

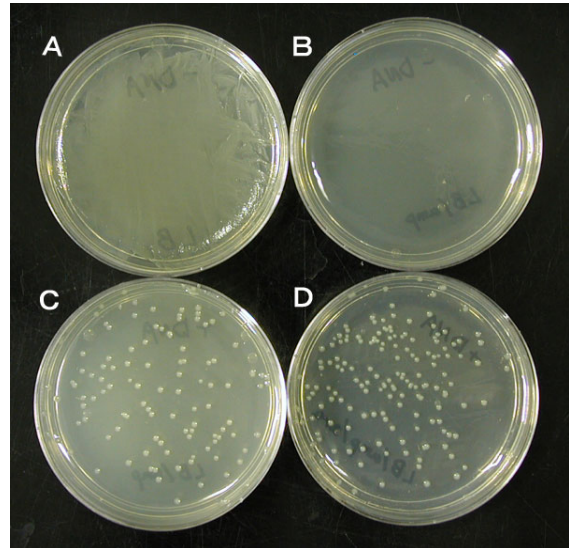


写真6 実験結果（可視光線下）

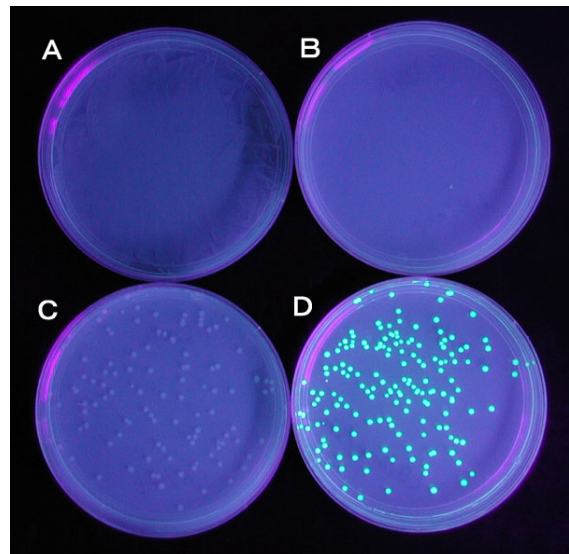


写真7 実験結果（紫外線照射下）

表2 実験結果のまとめ
プレート

	A	B	C	D
組換え DNA	-	-	+	+
培地	LB	LB/amp	LB/amp	LB/amp/ara
コロニー形成	+	-	+	+
発光	-	-	-	+

* LB(LB培地), amp(アンピシリン添加), ara(アラビノース添加)

実験結果をまとめたものが、表2である。

プレートAでは培地の表面全体に大腸菌が増殖するが、プレートBでは抗生物質アンピシリンの作用により、大腸菌は生育できない。プレートCとDではアンピシリンを含む培地でもコロニーができるが、先に述べたように、形質転換した大腸菌はアンピシリン耐性をもつからである。

プレートCの大腸菌には組換えDNAが導入されているにもかかわらず、発光が見られない。その理由を追加実験によって確かめることができる。単糖のアラビノースを一部のコロニーだけに滴下して、37℃で2～3時間培養し、紫外線を照射してコロニーの発光の有無を観察する。その結果、アラビノースを滴下した部分の大腸菌だけが、GFPを合成するようになることが分かる(写真8、プレート中央付近のコロニーが弱く発光している)。

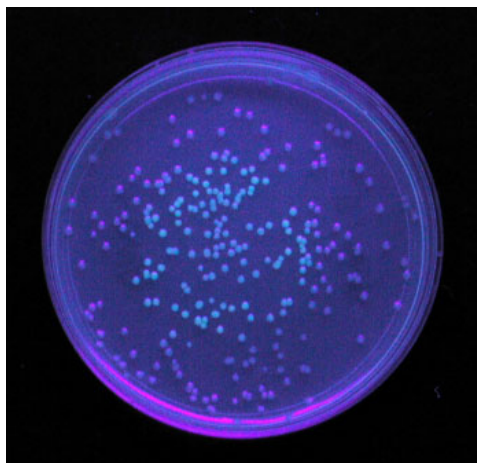


写真8 追加実験の結果(紫外線照射下)

一連の実験が終了した後にこの追加実験を行うことで、アラビノースオペロン(図3)の仕組みを確認できる。ベクターDNAでは、この構造遺伝子の部分が、GFPをコードする遺伝子に組換えられている。そのため、アラビノース存在下でプロモ-

ーターにRNAポリメラーゼが結合して、GFPの転写が開始されるのである(図4)。

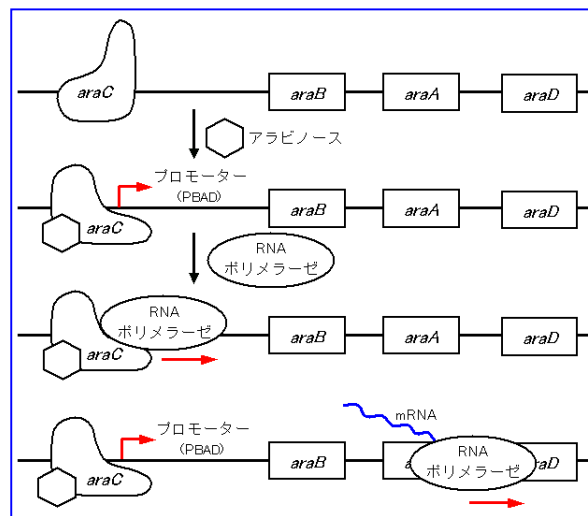


図3 アラビノースオペロン

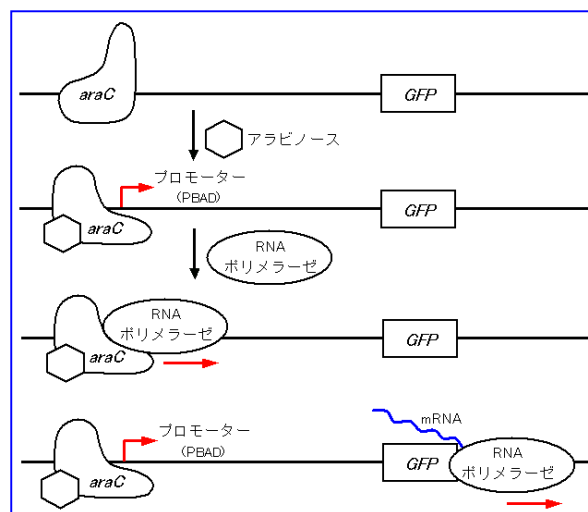


図4 GFP遺伝子の転写

2 遺伝子組換え生物等の拡散防止

今回紹介した大腸菌の遺伝子組換え実験を実施するには、法律や省令において、P1レベルの拡散防止措置を執ることが義務付けられている。P1レベルとは、通常の設定を備えた生物実験室で行うことが可能な遺伝子組換え実験のことで、具体的な拡散防止措置は下記のとおりである。

- (1) 遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化する。

- (2) 遺伝子組換え生物等が付着した器具等は、廃棄又は再使用する前に、遺伝子組換え生物等を不活化する。
- (3) 実験台については、実験を行った日の実験終了後、及び遺伝子組換え生物が付着したときは、直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化する。
- (4) 実験室の扉は閉じておく（実験室に入りするときを除く）。
- (5) 昆虫等の侵入を防ぐため、実験室の窓は閉じておく。
- (6) すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限に止める。
- (7) 滅菌処理をするときなど、実験室から遺伝子組換え生物等を持ち出すときに、遺伝子組換え生物等が漏出しない構造の容器に入れる。
- (8) 遺伝子組換え生物等の付着又は感染を防止するため、実験後は手洗いをする。
- (9) 実験内容を知らない者が、実験室に立ち入らないようにする。

(1)と(2)の方法としては、オートクレーブによる加圧滅菌（121℃，20 分間）をすればよいが、圧力鍋でも代用できる。(3)については、70%エタノールでふき取ればよい。(8)については、70%エタノールを霧吹きで手に噴霧して使用すると、便利である。

従来の「組換え DNA 実験指針（平成 14 年 3 月 1 日改訂。平成 16 年 2 月 18 日限りで廃止）」の実施要項に定められていた「実験室内での飲食、喫煙又は食品の保存はしない」、「口を使うピペット操作は行わない」、「実験室は整理し、清潔を保つ」などの内容は、法律や省令においては

特に定められていない。しかし、人体への安全性の確保という観点からも、このような指導は引き続き行うべきであろう。

3 指導の在り方

実験内容から考えて、基本的には、「生物」の科目において DNA に関する学習をした生徒が対象となるであろう。一斉授業のほかに、希望する生徒に対して課題研究として取り組ませるなど、実施形態等を工夫することも考えられる。

他の実験の場合と異なり、実験内容や操作手順などのほかに、安全のための指導や無菌操作などについても、実験前にしっかりと理解をさせておく必要がある。そのためには、1～2 時間程度をかけて事前指導を行わなければならない。ベクター DNA の導入から GFP の発現までには、少なくとも 2 時間の授業が必要であるので、合計 3～4 時間を充てることになる。このように多くの時間を費やすことになるので、指導者は綿密な指導計画の下、効果的に実施できるように、工夫する必要がある。また、実験後には、問題演習やレポート作成などの事後指導を行うことも有意義である。

現在、遺伝子組換え技術は多方面に利用されており、ヒトインスリンが大量生産されて糖尿病の治療に使用されたり、病害虫に耐性をもつ農作物が作られたりしている。さらには、重い遺伝子疾患における遺伝子治療の研究も進められている。反面、遺伝子組換えによる農作物や食品に対し、多くの人々が不安感をもったり、生態系への悪影響や遺伝子汚染などについて、懸念した

りしていることも事実である。最近では、遺伝子組換え技術を利用して作られた「光るメダカ」がペットとして販売され、話題になったことも記憶に新しい。

遺伝子組換え技術は、ますます身近なものになってきているが、以上のような実態等を踏まえ、生命倫理の観点からもとらえさせることが大切である。また、遺伝子組換え実験を行う際、法律に定められた様々な拡散防止措置を執らなければならない理由を、生徒にも十分に理解させた上で、実験に臨むようにしたい。

遺伝子組換え技術に限らず、科学技術は現実の社会と深いかわりをもっている。授業においても、科学技術と実社会を関連付けて指導することによって、生徒は科学技術をより一層身近なものに感じるようになるであろう。また、生徒自身の手によって、先端技術であるバイオテクノロジーの実験を行うことで、科学技術への興味や関心が更に高められることが期待される。

【参考資料】

『組換え DNA 実験指針』平成 14 年 1 月 31 日付け文部科学省告示第 5 号

『「組換え DNA 実験指針」における教育的組換え DNA 実験の新設について（通知）』平成 14 年 3 月 28 日付け、13 文科振 1152 号

『遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律』

『研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第

二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令』平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号

『遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第三条の規定に基づく基本的事項』平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省告示第 1 号

『研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の規定に基づき認定宿主ベクター系等を定める件』平成 16 年文部科学省告示第 7 号

『高等学校等において教育目的で行われる遺伝子組換え実験の「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」における取扱いについて（通知）』平成 16 年 2 月 18 日付け、15 文科振第 946 号

（教科教育研修課）