

指導資料

鹿児島県総合教育センター

平成31年4月発行

理科 第321号

対象
校種

高等学校 特別支援学校

大腸菌を使った遺伝子組換え実験の実施へ向けて —発光タンパク質 GFP 遺伝子の導入実験を通して—

高等学校生物の教科用図書（以下「教科書」という。）には、バイオテクノロジーの学習内容と合わせて、遺伝子組換え実験例が示されているが、多くの課題があるため、教師が実験実施へ踏み出せない状況もある。ここでは、実験導入の流れや簡易器具による代用例を示すとともに、実験を単なる確認実験にしないための指導の工夫例についても紹介する。

1 はじめに

しもむらおきむ
下村脩（2008年ノーベル化学賞を受賞）は、昭和37年（1962年）にオワンクラゲというクラゲから GFP（緑色蛍光タンパク質）を初めて単離することに成功し、紫外線を当てると明るい緑色に輝くことを発見した。GFPは特別な酵素なしに蛍光を発し、ほかのタンパク質につなげても蛍光を発することができる。そのため、細胞に遺伝子を導入することにより、GFPを光る目印として利用することが可能となり、今日では生きた細胞におけるタンパク質の位置や挙動を観察するための蛍光標識として、広く応用されている。



写真1 オワンクラゲ（出典：文部科学省ホームページ（<http://www.mext.go.jp/>））

「高等学校学習指導要領（平成30年3月告示）解説 理科編 理数編」（以下「解説」という。）には、「遺伝情報の発生について、観察、実験などを通して探究し、遺伝子発現の調節の特徴を見いだして表現すること。」と示され、高等学校生物の数社の教科書では、GFP遺伝子の導入実験も掲載されている。遺伝子組換え実験を実施することは、その原理と有用性の理解に有効であると考えられる。

また、解説の内容の取扱いに当たっての配慮事項には、「遺伝子組換え実験や動物を用いた実験を行う際には、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（いわゆるカルタヘナ法）（以下「カルタヘナ法」という。）や動物の愛護及び管理に関する法律（いわゆる動物愛護管理法）など、関連法令に従い適切に行う必要がある。」と示されており、高等学校における遺伝子組換え実験においても教師はカルタヘナ法など、関連法令に従う必要がある。

遺伝子組換え実験には、多くの準備が必要である。本稿では、実験導入の流れを明確にし、学校で常備されていない器機や器具に関しては代用による方法を示すので参考にしてほしい。

2 GFP 遺伝子の^{大腸菌への導入実験について}

ここでは、バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社の pGLOバクテリア遺伝子組換えキットを用いた実験で紹介する。

(1) キットの購入

キットは、日本にあるバイオ・ラッドラボ

ラトリーズ株式会社が販売しているが、代理店を通じて購入するとよい。

(2) 実験導入の手順及び注意点

教育目的遺伝子組換え実験の流れを図1に示す。

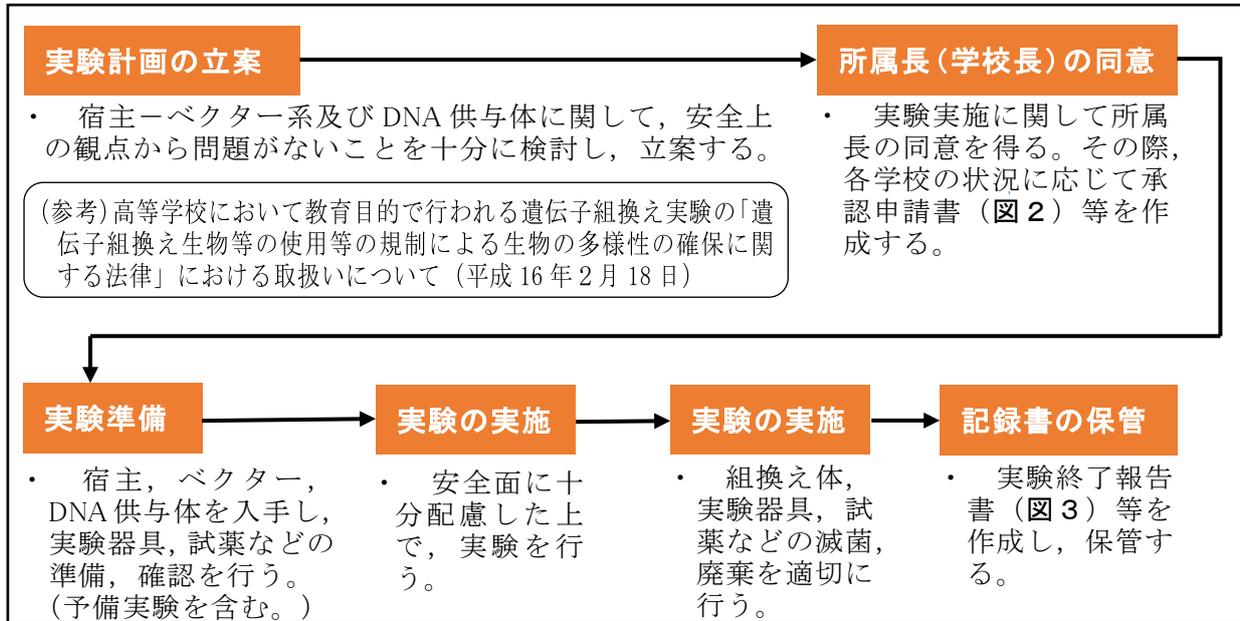


図1 教育目的遺伝子組換え実験の流れ

第 号				
教育目的組換えDNA実験計画承認申請書 (記入例)				
平成 ○ 年 ○ 月 ○ 日				
学校長殿				
実験指導責任者氏名 ○○○○ 印				
このたび下記のとおり教育目的組換えDNA実験を行いたいのので、ご承認願います。なお実験指導責任者は筑波大学主催による「平成30年度教員のための遺伝子組換え実験教育研修会」において所定の課程を修了しており、また下記の実験は、「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」に従い、安全性の確保に十分配慮して実施いたします。				
授業科目名	「生物」			
実験課題名	大腸菌の形質転換			
実験内容	オワンクラゲのGFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子を大腸菌に導入し、形質転換を行う。			
実験方法	宿主	ベクター	DNA供与体	封じ込めレベル
	大腸菌 (HB101株)	pGLO (pBR322由来)	オワンクラゲ (<i>Aequorea victoria</i>)	P1
組換え体の廃棄方法	オートクレーブ(高圧蒸気滅菌器)による滅菌			
使用教室	生物実験室			
実験実施期間	平成○年○月○日 ~ ○月○日			
実験生徒名	生物選択者 ○名 (詳細は別紙名簿参照)			
添付書類	生徒名簿、実験マニュアル、BIO-RAD社形質転換キットカタログの写し			
上記の願い出について承認する。				
平成 年 月 日 高等学校校長 ○○○○ 印				

図2 教育目的組換えDNA実験計画承認申請書(記入例)

教育目的組換えDNA実験終了報告書 (記入例)				
平成 ○ 年 ○ 月 ○ 日				
学校長殿				
実験指導責任者 ○○○○ 印				
このたび、過日承認を受けた教育目的組換えDNA実験(申請書第○○号による)を終了しましたので下記の通り報告いたします				
授業科目名	「生物」			
実験課題名	大腸菌の形質転換			
形質転換実施日	平成 年 月 日			
実験内容	オワンクラゲのGFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子を大腸菌に導入し、形質転換を行う。			
実験方法	宿主	ベクター	DNA供与体	封じ込めレベル
	大腸菌 (HB101株)	pGLO (pBR322由来)	オワンクラゲ (<i>Aequorea victoria</i>)	P1
使用教室	生物実験室			
実験実施期間	平成○年○月○日 ~ ○月○日			
実験生徒名	生物選択者 ○名 (詳細は別紙名簿参照)			
組換え体の数量	寒天プレート○枚で培養			
組換え体の廃棄日時	平成 年 月 日			
組換え体の廃棄方法	オートクレーブ(高圧蒸気滅菌器)による滅菌後、(平成○年○月○日 ○○(株)引取)			
その他	安全管理のための自己点検表、実験生徒名簿			

図3 教育目的組換えDNA実験終了報告書(記入例)

申請書・報告書は、東京農工大学遺伝子実験施設 Web サイト(ホーム>公開講座>学校教員のための遺伝子組換え実験教育研修会>H30年度テキスト)から書式のダウンロードができる。

(3) 概要

GFP 遺伝子をもつ pGLO (図 4) を大腸菌に導入し、この大腸菌がアラビノース存在下で GFP を合成することで「光る大腸菌」となる (図 5)。図 5 の実験からバイオテクノロジーにおける遺伝子組換えの仕組みを理解する。

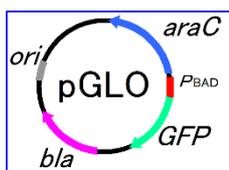


図 4 pGLO プラスミド (指導資料理科第 243 号より)

当センターでは、指導資料理科第 243 号(平成 16 年 5 月)「大腸菌の遺伝子組換え実験」で同様の実験に関する内容の指導資料を発行しているため、実験内容の詳細については省略する。本稿と併せて活用していただきたい。

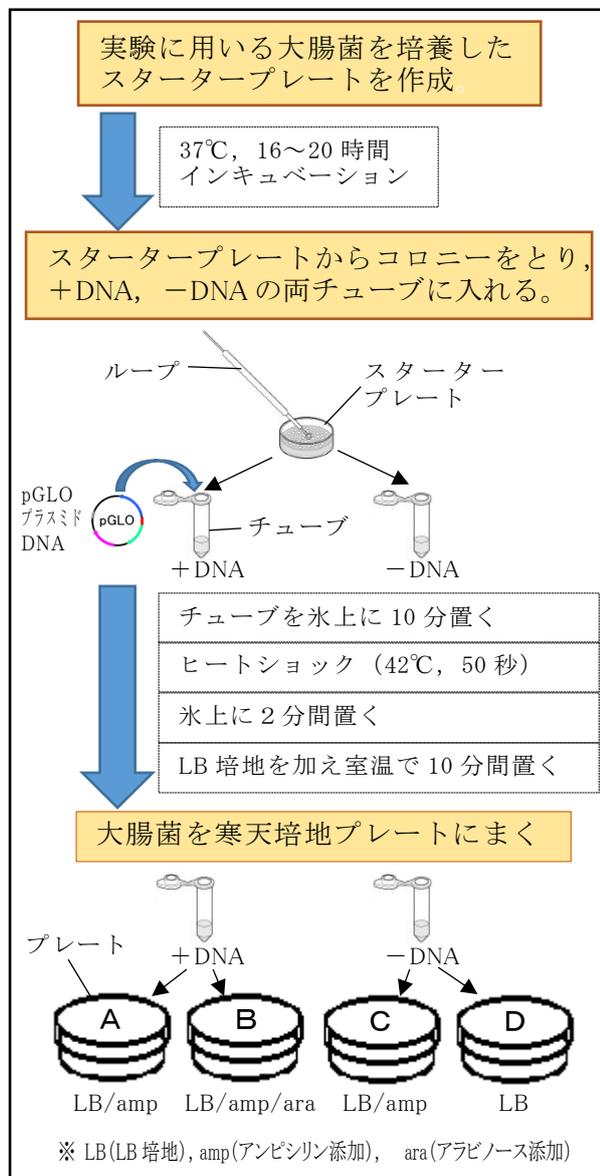


図 5 実験の概要(実習用テキスト(Kit1 pGLO バクテリア遺伝子組換えキット) p19 の図を一部使用)

(4) 用語の整理

表のとおり、用語を整理する。

表

bla	アンピシリンに対する耐性を細胞に与えるタンパク質
araC	GFP 遺伝子の調節遺伝子
amp	アンピシリン (抗生物質)
pGLO	GFP 遺伝子, bla 遺伝子, araC 遺伝子を含むプラスミド
LB 培地	大腸菌などの細菌培養用培地

(5) 実験準備と簡易器具による代用例

実験準備として、物理的封じ込めの P1 レベル実験室は図 6 に、拡散防止措置の内容については P1 チェックリストを最後に示す。

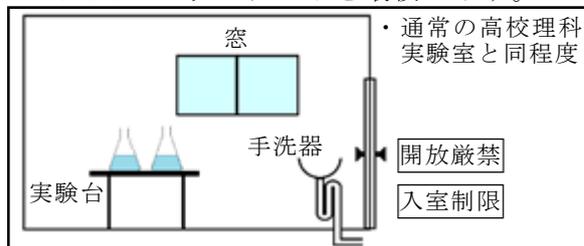


図 6 物理的封じ込め P1 レベルの概略図

また、代用例については、以下に示す。

○ インキュベーター (恒温器)

37℃での大腸菌の培養に使用。

室温で可 室温で長時間培養 (24~48 時間)。室温に応じた時間の確認が必要。

○ オートクレーブ (高圧蒸気滅菌器)

・培地の調製

電子レンジ 500mL 三角フラスコが入らない場合、200mL 又は 300mL を使用。

・廃棄物処理 (滅菌は 121℃, 20 分が原則)

圧力鍋 滅菌後、最終的には産業廃棄物業者による処理を推奨。

○ ウォーターバス (恒温水槽)

42℃でのヒートショックに使用。

発泡スチロール 42℃温水 実験時の温度は 42℃ (±1℃)。

○ 紫外線 (UV) ランプ (長波長)

蛍光検出に使用。

ブラックライト 裸眼での直視厳禁。保護めがね (紫外線カット) を推奨。

3 「何を学ぶか」を明確にした実験の指導の工夫例

授業では、実験をすることが目的ではなく、「生徒が何を学ぶか」を明確にし、生徒の理解を促す手段として実験を位置付けることが重要である。まず、紫外線照射なしの実験結果①（写真2）と、紫外線照射ありの結果②（LB/amp/araの発光の様子のみ掲載）（写真3）を確認し、結果をまとめる（図7）。



写真2 結果①（紫外線照射なし）

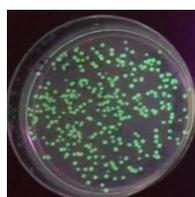


写真3 結果②（紫外線照射あり）
LB/amp/ara(Bプレート)

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

図7 結果のまとめ

問い掛けによる指導の工夫例を図8に示す。

結果の予想

コロニー形成、発光の有無を予想し、根拠とともに説明しよう。

データの収集

各プレートには、どの程度の数のコロニーが生えているか数えよう。また、形質転換効率はいくらかな。

結果の分析

形質転換した大腸菌が得られたかどうかは、どれとどれのプレートの比較で証明できますか。また、今回の実験は成功、失敗のどちらですか。それは、どのような結果から分かりますか。

図8 教師の問い掛け(例)

4 留意点

遺伝子組換え実験中には、拡散防止措置をしっかりと、実験を始める前に、図9の内容を全て満たすか確認する。

拡散防止措置の内容	
①	実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。
②	遺伝子組換え生物等を含む廃棄物（大腸菌などの菌液、廃液を含む。）についてを不活化するための措置を講ずること。（具体例：オートクレーブ装置を用いた滅菌、70%アルコールによる殺菌）
③	遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再（あっては、当該洗浄。）の前に②と同様に遺伝子組換え生物等を不活化する
④	実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。（具体例：70%
⑤	実験室の扉については閉じておくこと（実験室に入出入りするときに除く。）
⑥	実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な

図9 P1チェックリストの一部(「高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ」のリーフレットより)

実験中は、関係者以外実験室に立ち入らないよう「立入禁止」の表示をする。また、作成した遺伝子組換え生物を保管する場合には、容器や冷蔵庫など決められた場所に遺伝子組換え生物である旨の表示をする。（図10）

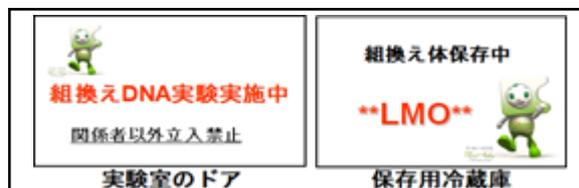


図10 表示例

遺伝子組換え実験に際しては、様々なルールがあるので十分注意する必要がある。文部科学省Webサイトには、遺伝子組換え実験に関する情報が多く掲載されているので必ず確認して実験を行ってほしい。

一引用・参考文献一

- 文部科学省Webサイト「高等学校学習指導要領解説理科編 理数編」平成30年
- 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（平成15年法律第97号）最終改正：平成29年法律第18号（平成30年3月5日施行）
- 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（平成16年2月18日15文科振第946号）
- 組換えDNA実験指針（平成14年1月31日文部科学省告示第5号）
- 高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ（リーフレット）文部科学省研究振興局ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室
- Biotechnology Explorer™ 実習用テキストKit1 pGLOバクテリア遺伝子組換えキット(166-0003JEDU)
- 文部科学省Webサイト ライフサイエンスの広場 <http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae> 平成31年1月24日アクセス
- 東京農工大学遺伝子実験施設Webサイト http://web.tuat.ac.jp/~idenshi/Japanese%20Files/Seminar_Folder/seminar.html 平成31年1月24日アクセス
(教科教育研修課 西 孝典)