



北海道月形高等学校 稲毛 哲彦*

目的

近年の分子生物学の発展にはめざましいものがあり、高等学校の「生物」においては常に最新的话题を提供していかなければならない。そのためにはまず分子生物学の基本となる技術をきちんと教える必要があるが、遺伝子組換え実験は機材・設備の問題で実際に高校の現場で実施することはなかなか困難である。高額な器具が完備されていても、マイクロチューブのなかで何が起きているのかをきちんと整理して考えさせるためには視覚的なモデル教材が必要である。そこで遺伝子組換え技術の一連の操作を極めて廉価な材料を用いて、視覚的に理解させることを目的とした。

概要

シアノバクテリアの遺伝子破壊による機能解析法を土台に、一連の操作のすべてを紐、色テープ、はさみ、透明テープで擬似体験させ、視覚的に理解させる。使用する制限酵素の検索やPCR用のプライマー設計はゲノムデータベースを利用する。遺伝子組換え技術の応用として、iPS細胞の製法や遺伝子組換え食品に対する正しい理解を中心に、今後の地球の未来を真剣に考えさせる課題発見・課題探求・課題解決型の教育プログラムになっている。

教材・教具の製作方法

I. 必要な材料

- ・紐
 - (白色、50 cm) × 2
 - (白色、30 cm) × 2
 - (緑色、30 cm) × 2
 - (緑色、20 cm) × 2
 - (橙色、20 cm) × 2
 - (紫色、30 cm) × 2
- ・ビニールテープ (透明、赤、青、黄、灰)
- ・はさみ × 3
- ・画用紙 (緑色、赤色、青色)

II. 製作方法

1. プラスミド

50 cmの白色紐を2本束ね、端を透明テープでつなぎ、円形にする。制限酵素認識配列 KpnI (GGTACC)、SacI (GAGCTC) を色テープで示す。(A → 赤、T → 青、G → 黄、C → 灰)

2. PCR産物

30 cmの緑色紐を2本束ね、片方に KpnI 認識配列、もう片方に SacI 認識配列を色テープで示す。

3. 抗生物質耐性遺伝子を含むプラスミド

30 cmの白色紐を2本束ねたものと20 cmの橙色紐を2本束ねたもの(抗生物質耐性遺伝子)を透明テープでつなぎ、円形にする。橙色紐の両端に NcoI 認識配列 (CCATGG) を色テープで示す。

4. シアノバクテリアのゲノム

30 cmの紫色紐を2本束ねたものと20 cmの緑色紐を2本束ねたものを透明テープでつなぎ、円形にする。緑色紐は slr 1747 遺伝子とし、全体でゲノムとする。



写真1 教材の作製

学習指導方法

I. 目標提示

「遺伝子組換えを擬似的に体験することで、その一連の操作や応用を理解し、さらに遺伝子組換え食品における食の安全と地球の未来について考える」

* いなげ てつひこ 北海道月形高等学校 教諭 〒061-0518 北海道樺戸郡月形町1056

☎ (0126)53-2046 E-mail snowbell@mbf.nifty.com

II. 遺伝子組換え技術の疑似体験

1. 破壊する遺伝子の選択

シアノバクテリアのゲノムサイト (cyanobase) を利用して、破壊する遺伝子を決定させる。

ここでは *Synechocystis* sp. PCC 6803 の slr 1747 遺伝子を破壊するという仮定のもとで話を進める。

2. 制限酵素の選択

使用するプラスミドベクター (pBS など) のマルチクローニングサイトを認識する制限酵素を検索させる。その中で、目的の遺伝子 (今回は slr 1747) を認識しない制限酵素を選択する。

slr 1747 の全塩基配列を制限酵素認識部位検索サイト (webcutter) にペーストし analyze することで、KpnI と SacI が最適であることがわかる。

3. プライマー設計

slr 1747 の全塩基配列を表示させ、その前後の配列からプライマーの塩基配列を考えさせる (実際は Tm 値、GC 含量、足場などを考慮しなければならないが、この実習では省略)。Left (Forward) primer は最初の 20 塩基、Right (Reverse) primer は最後の 20 塩基を後ろから (3' 側から) 相補的に読ませる。実際の現場ではプライマー設計ソフトを利用し、それを元に外注することを説明する。プライマー設計ソフト (primer 3 Plus) を体験させるために、slr 1747 遺伝子の塩基配列 (前後 200 塩基を含めて) を FASTA FILE にする。

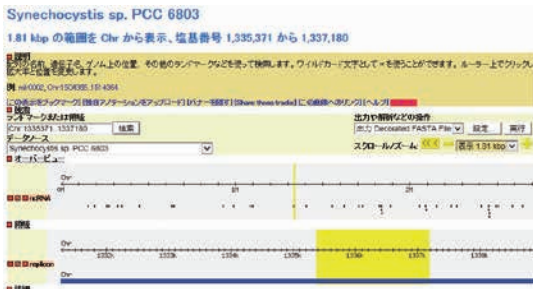


写真2 FASTA FILE で出力

そのデータを primer 3 Plus にペーストし、結果を表示させる。

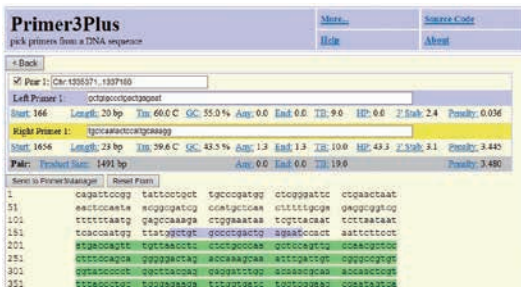


写真3 Primer 3 Plus の結果

Left primer の最初に KpnI 認識配列 (GGTACC) をつける。Right primer の最初に SacI 認識配列 (GAGCTC) をつける。

4. プラスミドベクターへのライゲーション

KpnI 役のはさみと SacI 役のはさみを用いて、プラスミドと PCR 産物を制限酵素認識部位で切断する。その切り口を合わせて、塩基が相補的になっていることを確認させ、DNA リガーゼ役の透明テープでつなぐ。

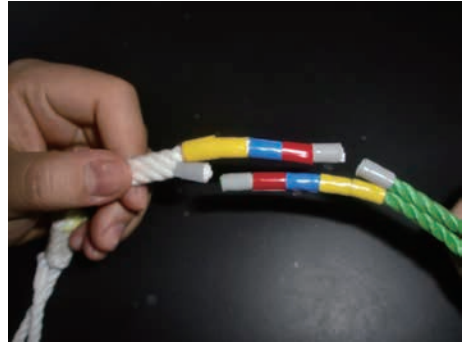


写真4 相補性の確認

5. slr 1747 遺伝子の破壊

slr 1747 遺伝子の中央付近を認識する制限酵素を探すために、webcutter による結果を参照すると、NcoI が最適であることがわかる。

プラスミドベクターに挿入された PCR 産物の中央に NcoI 認識配列を色テープで示す。NcoI 役のはさみで認識部位を切断する。



写真5 制限酵素で遺伝子を切る

6. 抗生物質 (カナマイシン) 耐性遺伝子を挿入

カナマイシン耐性遺伝子の塩基配列を webcutter で分析し、NcoI では認識されないことを確認する。カナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドの NcoI 認識部位を NcoI 役のはさみで切断する。カナマイシン耐性遺伝子を slr 1747 遺伝子の切断部位に合わせ、切り口の塩基配列が相補的になっていることを確認してから、ライゲーションする (透明テープでつなぐ)。

7. 相同組換え

破壊された slr 1747 遺伝子が挿入されたプラスミドベクターとシアノバクテリアのゲノムの間で、緑色紐の部分で相同的なので、この間で組換えが起こる。すなわち、プラスミドベクター中のカナマイシン耐性遺伝子で分断された slr 1747 遺伝子とシアノバクテリアゲノムの正常 slr 1747 遺伝子とをとりかえる。

8. 確認させること

(1) 抗生物質耐性遺伝子を使う意味

青色画用紙を通常培養液、赤色画用紙をカナマイシン入り培養液として、野生型シアノバクテリア（緑色画用紙上にシアノバクテリアのゲノムを置いたもの）と slr 1747 遺伝子破壊株（緑色画用紙上に遺伝子組換えゲノムを置いたもの）の生育可否を考えさせ、遺伝子組換え体の選抜に有効であることを理解させる。

(2) 遺伝子破壊株をつくることの意味

その遺伝子が破壊されたことによる影響からその遺伝子の機能を推測できることを理解させる。

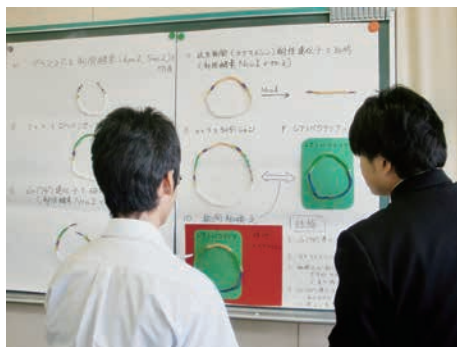


写真6 遺伝子組換え技術のしくみを議論

Ⅲ. 遺伝子組換え技術の応用

1. iPS細胞の作製法を考えさせる（ワークシート）

(1) iPS細胞をつくるためには、ES細胞の4つの遺伝子（Oct 4, Sox 2, Klf 4, c-Myc）を体細胞で発現させる必要がある。遺伝子を導入するためにはウイルスベクターを使うが、ウイルスには自己増殖能や病原性をコードする遺伝子が存在するので危険である。どうしたらよいか？

生徒の解答例

危険な遺伝子を制限酵素でとりのぞき、目的の遺伝子をDNAリガーゼでつなぐ。

(2) 遺伝子導入によってがん化が起こる可能性がある。なぜか？

生徒の解答例

外来遺伝子が挿入されれば、挿入部位の遺伝子が破壊され機能なくなる可能性がある。機能なくなる遺伝子が抑制遺伝子の場合、他の遺伝子発現の活性化につながるから。

(3) 遺伝子導入によるがん化を回避するためには？

生徒の解答例

ウイルスベクターではなく、プラスミドベクターを使い、染色体外で発現させればよい。

2. 遺伝子組換え食品の正しい理解

実生活につながるものとして遺伝子組換え食品をとりあげる。厚生労働省発行の「遺伝子組換え食品の安全性について」「遺伝子組換え食品Q&A」を読ませる。この資料に記載されている遺伝子組換え技術や抗生物質耐性遺伝子に対して、今回の実習により理解しやすくなっているかを確認させ、学校で学んだ知識を実生活で活用できることを実感してもらう。さらに班活動として、食の安全性と地球の未来について議論させる。まとめたことを班の代表者に発表してもらい、お互いの意見からさらに深く理解させ学び合う（言語活動）。

Ⅳ. まとめと自己評価

およそ1ヶ月の実習をふりかえり感想を書かせる。また、実習開始時に定めた目標を達成できたかどうかを自己評価させる。

実践効果

実習前後の分子生物学的知識や興味・関心における意識調査

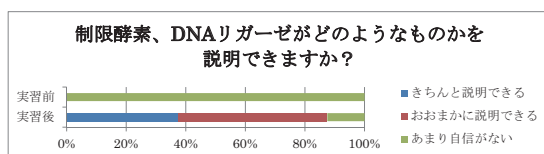


図1 用語の理解度

遺伝子組換え実験に必須となる制限酵素やDNAリガーゼの役割に関して、自分の言葉で説明できるかどうかを実習前後でアンケート調査した結果、あまり自信がなかった生徒達の80%以上が説明できる力を身につけた。

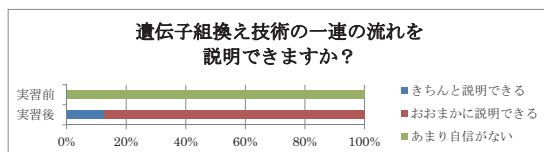


図2 全操作の理解度と説明力

今回の遺伝子破壊による機能解析法の操作手順に関して、理解した上できちんと説明できるかどうかアンケート調査した結果、実習後には100%の生徒が説明できるようになった。

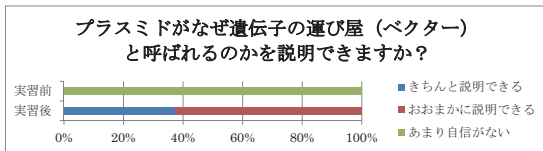


図3 プラスミドの理解度と説明力

プラスミドの役割に関して、理解した上できちんと説明できるかどうかアンケート調査した結果、実習後には100%の生徒が説明できるようになった。

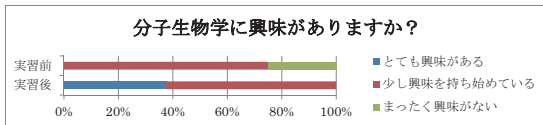


図4 分子生物学に対する関心度

遺伝子などを取り扱う分子生物学に対する興味・関心の度合いをアンケート調査した結果、実習後に著しく高まることが確認された。

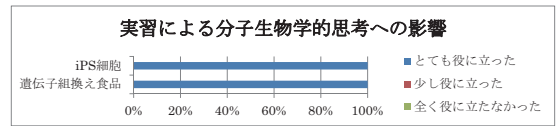


図5 実習の貢献度

遺伝子組換え実験の応用としてとりあげたiPS細胞作製法と遺伝子組換え食品について考えるときに、今回の実習が役に立ったかどうかをアンケート調査した結果、全生徒がとても役に立ったと回答した。

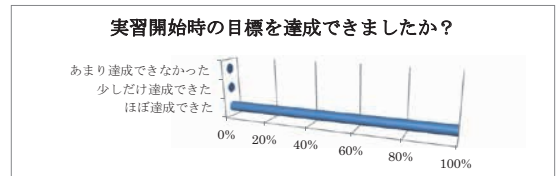


図6 目標達成度

実習開始時に設定した目標に関して、実習の最後に自己評価させた結果、全生徒がほぼ達成できたと回答した。