

# 生物教育における分子生物学実習の活用 -高校生物教員を対象とした遺伝子実験講習を通じて-

田中 正人<sup>1</sup>、浅野 謙一<sup>1</sup>

## 1.はじめに

近年の生命科学分野における飛躍的な発展に伴って、高校の生物の内容は激変している。2012年より始まった新課程の生物の教科書では、従来、生命科学あるいは医療系の大学でのみ取り上げられていた専門的な内容が多く盛り込まれており、その中には、最新の研究成果に基づいた知見も含まれている。例えば、近年の進歩が目覚ましい免疫学の分野では、自然免疫から獲得免疫への抗原情報の橋渡しとして、樹状細胞による抗原の捕捉とT細胞への抗原提示について、詳細な記載がなされている。また、バイオテクノロジーの項では、プラスミドを用いたcDNAのクローニング、PCR、DNAの塩基配列の決定法といった、遺伝子解析に必要な基本技術の解説にとどまらず、遺伝子改変動物の作製やゲノムの網羅的解析法等の、研究の現場でリアルタイムに用いられている最新の分子生物学的な手法にも触れている。これら最新技術の紹介は、もともと生物学に興味のある高校生の知的好奇心や学修意欲を、大いに刺激する効果がある一方で、その理解には膨大な学修時間を要することから、高校生の理科離れを加速する可能性も懸念される。また、生物教員にとっても、自身の学生時代に学修経験のない最新の知見を常に習得し、正しい理解に基づいて学生に教授するためには、不断の努力が必要である。

このような最新の生物学の知見を学習者が習得するためには、実習の活用が有効であると考えられる。特に分子生物学分野におけるDNA関連の実験は、研究の現場で繁用されている複数の手法を取り入れた実験計画の立案が比較的容易であり、また、得られた結果を論理的に考察しやすいことから、高校生でも十分に組み入れる。本学の教職課程履修者は、生物学分野における高度な実習を多数行っており、現在の高校教科書で取り上げられている程度の実験を企画し実行することは、十分可能であると考えられる。一方で、実際に高校でこのような実験を行う場合、機器や予算面の制約により、実施が困難な場合もあると考えられ、教員には、実情に合わせた企画の立案が要求される。

本学では、定期的に、高校教員を対象とした生物実験講習を開講している。本稿では、この講習を通じて得られた高校における分子生物学分野の実習の実現性と問題点について考察し、教職課程における理科教授法指導の一助としたい。

## 2. 高校生物教員を対象とした遺伝子実験講習の概要

平成28年8月21日に、「生命科学への誘い - GFP実験：様々な色に光るたんぱく質を取り出してみよう！」と題して、高校生物教員を対象とした実験講習会を開催した。この講習は、教員免許更新講習を兼ねて行われた。参加者は、高等学校教師・講師（理科）15名であった。

### 2-1.背景と目的

生命科学の諸分野において、タンパク分子やその発現細胞の可視化法は、広く用いられている技術であ

<sup>1</sup> 東京薬科大学生命科学部 免疫制御学研究室

る。この可視化に利用される分子の一つが、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein:GFP）である。下村 脩博士 はオワンクラゲから GFP を単離し、世界で初めて蛍光物質の正体を明らかにした。その後マーティン・チャルフィー 博士は遺伝子工学的手法を駆使し、生きている生物に GFP を強制的に発現させて、その利用価値を示した。さらにロジャー・チェン博士 は GFP を改変して、様々な色の蛍光タンパク質を開発し、より高度な応用の途を拓いた。2008 年にこれら、緑色蛍光タンパク質の発見とその応用に貢献した 3 名の博士に、ノーベル化学賞が授与されている。

GFP は蛍光を発するタンパク質であることから、他の蛍光物質と比べて、生物学研究への応用性が高い。すなわち、GFP の cDNA を適切なプロモーター制御のもとに細胞に導入することにより、容易に目的の細胞を蛍光ラベルすることができる。また、目的の分子とのキメラタンパクの cDNA を作製して細胞に導入することで、分子の細胞内での局在や挙動を解析することも可能である。さらに、他の生物が持つ蛍光タンパクやその遺伝子の改変等により得られた、スペクトルの異なる複数の蛍光タンパク質も利用可能であることから、異なる細胞や分子の相互作用の解析にも威力を発揮している。

本講習では、GFP とその誘導体の精製の実習を行う。この実習を通じて、分子生物学の基本的な操作を確認するとともに、中学生・高校生にとって魅力ある理科実験を企画、実行するためのストラテジーや指導法をともに考えていく。

到達目標は、蛍光タンパクの精製原理の理解と、それを基にした指導法の考察とした。

## 2-2. 実習内容

大腸菌は染色体 DNA とは別にプラスミドと呼ばれる環状の DNA を持つことができる。プラスミドは染色体とは独立に複製され大腸菌内で維持される。このプラスミドの性質を利用して、目的の遺伝子をプラスミドに組み込み、大腸菌にトランスフォーメーションすると、目的のタンパク質を大腸菌で大量に生産することが可能になる。本実習では、種々の蛍光タンパク質発現プラスミドを導入した大腸菌を用い、タンパク質の精製操作を体験する。精製した蛍光タンパク質に紫外線を照射して発色させ、遺伝子発現を目視で確認する。

タンパクの精製には以下の方法を用いる。今回用いる蛍光タンパク質の C 末端には、遺伝子操作により 6 個のヒスチジンが付加してある。ヒスチジンはニッケルに配位結合する。そこで、ニッケルをアガロースビーズに結合させた担体で大腸菌破碎液を加えることによってヒスチジントグ蛍光タンパク質を結合させる。担体を洗浄することによって非結合タンパク質等を除去し、ヒスチジンの類似物質であるイミダゾールを加えることによってヒスチジントグ GFP を解離させ回収する。GFP とその誘導体を用いた本実習では、実験の成否がカラフルな蛍光により確認できるため、視覚的にも楽しむことができる。

## 2-3. 器具類、試薬、および実験手順

【使用した器具類】（各班 3-4 名で構成）

50 mL ディスポーザブル遠心管(大腸菌廃液入れ)

15 mL ディスポ遠心管、2 本/班

パワーマッシャー、バイオマッシャーII

1.5 ml チューブ

φ12 mm x 75 mm ガラス試験管

マイクロピペット

チップ

パラフィルム

ボルテックスミキサー

#### 【試薬】

Ni-NTA アガロース

菌体洗浄用緩衝液 (20 mM リン酸 Na-1 mM EDTA-pH 7.8)

細胞溶解液 (B-PER Reagent, Thermo Scientific 社)

洗浄用緩衝液 (20 mM リン酸 Na-0.5M NaCl-pH 7.8, 0.1% Triton x-100)

溶出用緩衝液 (20 mM リン酸 Na-0.5M NaCl-0.2M Imidazole-pH 7.8)

#### 【手順】

各種蛍光タンパクの cDNA を挿入したプラスミドを大腸菌にトランスフォームし、LB 培地で培養した。実験開始数時間前に、IPTG (イソプロピルチオガラクトシド) の添加により、蛍光タンパクの産生を誘導した。その後、以下の手順で実験を行ったが、1)と 2)は、実験開始直前に担当の TA が行った。

- 1) 蛍光タンパクを産生した大腸菌を 3,000 rpm で 10 分間遠心する。
- 2) 上清をデカンテーションにより取り除く (大腸菌廃液専用容器を用意)。試験管は逆さまのままにして、残った液をペーパータオル上で除く。
- 3) マイクロピペットを用いて菌体洗浄用緩衝液を加える。ピペッティングにより大腸菌を懸濁し、バイオマッシャーII 用のチューブへ移す。
- 4) 13,000 rpm で 1 分間遠心後、マイクロピペットを用いて上清を取り除く。
- 5) マイクロピペットを用いて細胞溶解液を加える。
- 6) パワーマッシャー (目盛り I) で大腸菌の沈澱をよく懸濁する。
- 7) 13,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を Ni-NTA アガロース入りチューブに移す。
- 8) 10 分以上、穏やかに手で混和する。この間にヒスチジンタグ GFP が Ni-NTA アガロースに結合する。
- 9) 5,000 rpm、1 分間遠心し、マイクロピペットを用いて上清を除く。
- 10) マイクロピペットを用いて、洗浄用緩衝液を加えてボルテックスミキサーで懸濁する。
- 11) 5,000 rpm、1 分間遠心し、マイクロピペットを用いて上清を除く。
- 12) マイクロピペットを用いて G 液を加えてボルテックスミキサーで懸濁する。ヒスチジンタグ GFP が Ni-NTA から外れ、溶出する。
- 13) 5,000 rpm、1 分間遠心し、上清をガラス試験管に移してヒスチジンタグ GFP を回収する。

14) ガラス試験管にパラフィルムで蓋をしたのち、紫外線照射装置を用いて蛍光を観察する。

目的の蛍光タンパクがどの分画に含まれているか確認するために、各ステップで、マイクロチューブに小型の紫外線照射装置 (UV ライト) を用いて紫外線を照射し、蛍光の所在を確認するように指示した。紫外線照射装置を使用する際には、保護メガネを装着するよう指示した。

#### 2-4. 実習の実施と考察

今回の実習には 15 名の教員の方に参加頂いたが、うち 5 名は免許更新を目的としていた。実習については、教員の他に TA も配置したことから、滞りなく実験をすすめることができた。一方で、実際に高校の実習として行う場合に、限られた人員のもとで実施できる内容であるかについては、今後、検討する必要がある。参加者からは、説明がわかりやすかった、今後の教育活動の役に立つと思う、他の教員に参加を勧めるなどの好意的な意見を頂いた。一方で、予算を考えると高校では実施が困難であり、中・高校の理科室における実験器具や比較的安価で購入可能な機器でできる実験を紹介して欲しいとの意見も寄せられた。今回用いた試薬や器具は、本学の学部実習としては、比較的安価で、特別な機器を必要としないようにデザインされており、大学と高校の実験環境に大きなギャップがあることがあらためて感じられた。最近では、同様の実験を高校でも実施できるように、必要な試料や試薬等が含まれたキットが販売されていることも話題になった。キットの使用により、高校での実習の実施が容易になるという側面はあるが、経済性に加えて、実験計画の柔軟性や発展性の面でも多くの障壁を生む可能性もあり、その導入には十分な検討が必要であろう。一案として、高校への分子生物学実験の導入を促進するためには、専門家グループが経済性、応用性、安全性等を考慮した、実験企画案を作成し、それを基に定期的に今回のような講習会を開くといった方策が必要なのではないかと考える。

#### 3. 謝辞

本実習は、本学生命科学部の 1 年次に行われる生命科学実習を基に立案されたものです。この生命科学実習の最初の立案は、本学生命科学部 細胞制御医科学研究室の田中弘文教授により行われたもので、今回の執筆に当たってもご助言を頂きました。また、本学生命科学部 免疫制御学研究室の西躰 元博士には、本実習の準備をご担当頂きました。ここに感謝の意を表します。

