

緑色蛍光タンパク質の精製を題材とした教育プログラム

玉 腰 雅 忠

はじめに

生命科学のキーワードは遺伝子と言ってよい。1953年にDNAの二重らせんモデルが提案されて遺伝因子の実体が明らかになって以来、この学問分野は急速に発展してきた。遺伝子工学という技術を介してそれ以前には不可能だった解析を可能とし、生物現象のより深い理解や思いもよらない発見が日々報告されている。そしてこれらの成果は深く社会に浸透しつつある。本学と関連が深い医療・薬学分野では遺伝子治療が広く行われているし、再生医療にも遺伝子導入は必須である。食品においては遺伝子組換えという言葉が広く普及している。光る熱帯魚はゼブラフィッシュに珊瑚の蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えペットとしてビジネスの世界で成功した。不可能という言葉の代名詞であった青いバラはパンジーの遺伝子を組み込んで作られ、高級花として販売されている。DNA鑑定は裁判の行方を決定づけるほど信頼を得ており、司法において個人の特定に必須の技術となった。アメリカでは個人のゲノム配列を1000ドルで解析することが数年以内に実現しそうである。体質や個性が遺伝子レベルで理解されるようになれば、将来は就職や結婚、保険分野への影響も考えられる。こういった状況を考えると、生命科学部で学ぶ学生に限らず、生命科学という学問を広く正しく広めることが極めて重要であることがわかる。そのための方策は始まったばかりだが、総合的な学問であることを考えれば、ある程度の知識を持った高校段階からの教育が有効であろう。

本稿では緑色蛍光タンパク質（GFP）とその遺伝子を用いた実験実習を紹介する。これは2010年12月18日と19日に東京薬科大学 生命科学部で行われた神奈川県立横須賀高等学校のサイエンス・パートナーシップ・プロジェクト（SPP）の実習として行われた内容である。参加人数は一年生12人、二年生3人の合計15人である。なお、この実習は2009年5月16日に行われた高校教員対象の「生命科学への誘い」を基にして新たに実験内容を加えて作成したものである。

実験実習の内容

実習書を末尾に掲載した。2日間にわたる実習で、以下の3つの実験から成り立つ。

- ① GFPを発現させるためのプラスミドベクターによる大腸菌の形質転換
- ② 大腸菌からのGFPの精製
- ③ SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製度の解析

なお、SPPではこの実験実習に加えて3つの研究室を訪問し、最先端の研究の様子を各研究室の教員が説明した。さらに生命科学部の共同機器室を見学した。今回は共焦点顕微鏡、電子顕微鏡、およびDNAシーケンサーを前に説明した。生物は好きだが物理や化学は好きでないからという理由で生命科学を志す学生が一部に見られるが、高度な機器類の開発には物理や化学の素養が必要であることや、コンピュータの知識も必須であることを強調した。

* 生命科学部 分子生命科学科 細胞機能学研究室

各実験の意図と実習中に行った説明

実習書には大学学部生のための実習書と同等レベルの用語を用い、あえて省略したり易しい言葉に置き換えるということとはしなかった。難しい数学や物理法則を説明するわけではないので、意欲的な高校生なら理解はそれほど難しくないと考えたからだ。そのかわり実習の前や待ち時間には丁寧な解説を行った。実習書の下線部は、詳しい説明または実演をした部分である。

① 大腸菌の形質転換

実験に用いる大腸菌は病原性を持たないことをまず説明した。また遺伝子組換えを施した大腸菌は実験室からは持ち出せず、滅菌してから廃棄することを説明した。遺伝子組換えの実験実習は生命倫理を考える上でも有用である。科学者自らが遺伝子組換え実験の規制を制定したアシロマ会議を話題にした。

形質転換実験に用いた大腸菌は BL21 (DE3) 株だが、その名を知る高校生はいない。O157 という名称に対応することを説明すると理解できたようである。

遺伝子工学の中で最も重要な概念は、遺伝子のクローニングである。2 日目に観察される大腸菌のコロニーを観察しながら、それらが「クローン」であることを説明した。また「大腸菌の形質を転換する」ことの意味を説明し、抗生物質を含んだ寒天上ではベクターを取り込んだ大腸菌だけが生育する仕組みを説明した。その際、薬剤耐性菌の出現が問題になっていることにも触れた。DNA を切断する制限酵素、DNA 同士を連結するリガーゼ、そして大腸菌の形質転換法の開発が遺伝子工学の発展に貢献したことも付け加えた。

抗生物質の添加量を計算させた。簡単な比例計算だが、卒業研究を始める時でも計算できる学生は多くない。

② GFP の精製

予めヒスチジンタグを付加するための配列を持った GFP 遺伝子を用いた。それを T7 プロモーターにより大腸菌内で大量発現させ、菌体を破碎後、ニッケルカラムによるアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製した。アフィニティー精製については詳しく説明した。この手法は現在のタンパク質化学研究では定番の精製方法である。T7 RNA ポリメラーゼの発現系や誘導物質による発現誘導を理解することは難しいので、それらは説明しなかったが、受講生の持つ知識によっては可能かもしれない。

大腸菌の細胞破碎は市販の溶解液を用いた。この試薬の成分は公表されていないが、主成分は一般的な界面活性剤と思われる。脂質膜が洗剤によって溶ける仕組みも説明した。

③ 電気泳動

タンパク質が一様に負に帯電していること、サンプルバッファーにはグリセリンが入れているのでサンプルが分散せずにウェル内に収まること、電極付近では電気分解が起きていること、分子ふるい効果により分子量の違いによって分離されること、タンパク質に特異的に結合する色素を用いて染色されることなどを説明した。

本実験での精製では、ニッケルに親和性を持つと考えられる大腸菌由来のタンパク質が混在する。そこで、GFP とは異なる可溶性タンパク質遺伝子を連結したベクターを作製し、それを保持する大腸菌からもタンパク質を精製した。したがって、これらの泳動パターンの違いから GFP がどのバンドなのかを推定することができる。実習では時間がなかったので考えさせる間もなく解説したが、時間があれば GFP のバンドを推定させることをしてもよいだろう。

学生からの反応

実習中は操作に関する質問は勿論だが、原理に関する質問も多く受けた。高校側で予め GFP に関する下調べをさせ、レポートにまとめさせたとのことで、GFP 自体の説明はほとんどしなかったが、発色団形成の仕組みやアミノ酸置換により蛍光波長が変化する理由など、答えに窮する高度な質問もあった。実習後のアンケートでは、高校で扱えない器具類に触れたことがよかった、楽しかったという感想が大半を占めた。高校教員対象の「生命科学への誘い」でも同様に高い評価を得た。

実習内容の応用

高校教員対象の「生命科学への誘い」では1日の日程だったため、タンパク質の精製実験のみを行った。SPP では2日間の日程だったので、大腸菌へのベクターの導入実験と精製タンパク質の電気泳動を加えた。さらに時間があれば、PCR法を用いた遺伝子増幅、吸光度計を用いたDNAやタンパク質の濃度測定なども加えられるかもしれない。3日から4日のスケジュールなら、DNAの切断と連結、プラスミドDNAの調製といった操作も加えられる。コンピュータを用いたタンパク質の立体構造表示は難しい内容かもしれないが、インターネット接続ができれば家庭でもできるので、オプションとして考えてもいいかもしれない。

おわりに

遺伝子やタンパク質といった名称は知っていても、それらを日常生活において分子としてイメージすることはほとんどない。しかし実験をすればある程度それが可能となる。GFPは日本人が発見してノーベル賞受賞に至ったこと、および蛍光の美しさが感動を呼ぶなどの理由で知識欲をかきたて、生命科学の基本を学ぶのに非常に適している。実験自体もそれほど難しいものではなく、また比較的安価にできる。設備が必ずしも十分ではない高校の理科教育でも十分実施可能な実験である。事実、高校教員対象「生命科学への誘い」の終了後、何人かの先生から実験の準備をするための問い合わせがあったので、実際に成果を上げているものと思われる。

今回の実習では、大腸菌や精製したタンパク質が光る様子を見る場面が最も強い印象を与えることは予想通りだった。しかし引率された飯田教諭、金子教諭によれば、意外にも寒天プレートに大腸菌をひろげるといった単純な操作もかなり好評だったそうである。日常では寒天を目にすることはあっても、その上にバクテリアをひろげることはなく、また目に見えなかったバクテリアが翌日には見えるようになるという体験も新鮮なようだ。今後の企画に役立てたい。

付記

筆者の所属する細胞機能学研究室では、生命科学ゼミナールの学生(1年生)を対象として夏休み中にGFPの精製実験を行っている。生命科学部の1年生の実習が後期から始まることも一因と思われるが、多くの学生が入学当初抱いていた生命科学に対する熱い思いを失いがちである。生命科学部ではその対策を議論しているが、本実習はその解決策の一つになるかもしれない。またいわゆる Early exposure のためのプログラムとしても適していると考えられる。なお、ゼミナールの学生を相手にする場合、実験は大学院生からなるティーチングアシスタントが主体となって指導し、教員は実験にほとんど関与しない。そのときの実習書は大学院生が作成し、実習中も高校を卒業したばかりの学生を相手に非常に丁寧な指導をする。本稿にある実習書の一部は大学院生による実習書を参考にした部分もある。本実験は大学院生の指導力向上にも一役買っていることを付け加えておく。

【実験の概要】

1日目

(1) 大腸菌の形質転換

(大腸菌で変異型 GFP を発現させるためのベクターを大腸菌に導入する。)

2日目

(2) 大腸菌から GFP を精製する。

(アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製する)

(3) 電気泳動してタンパク質を染色し、精製度を調べる。

【実験操作】

1日目

(1) GFP 発現プラスミドベクターの大腸菌への導入

(1-1) 寒天培地プレートの作製 (2人一組で)

- ① 500mL の三角フラスコに精製水 100mL、LB broth を 2.5 g、寒天 1.5 g を入れて軽く混ぜる。
- ② 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌する。
- ③ 滅菌終了後、手で触れるくらいまで溶液の温度が下がるのを待つ。
- ④ アンピシリン溶液を終濃度が 100μg/mL となるようにピペットマンで加え、シャーレに流し入れる。パーナーの近くでしばらく乾燥させる。

(計算問題：アンピシリンのストック溶液は 50mg/mL である。100mL の培地にどれだけ加えればよいか？

1 g = 10³ mg = 10⁶ μg = 10⁹ ng = 10¹² pg = 10¹⁵ fg)

(1-2) 大腸菌の形質転換

- ① (以下の実験のうち、42℃のヒートショックまではすべて氷上で操作すること。) 大腸菌 BL21 (DE3) の コンピテントセル (competent cell) 40μL にプラスミド溶液 1μL を加えて穏やかに混合する。
- ② そのまま 30 分間氷上におく。
- ③ 42℃で 90 秒保温し、すぐ氷上に戻して 2 分間待つ。
- ④ SOC 培地を 360μL 加えて 37℃で 1 時間培養する。
- ⑤ 培養液 100μL を コンラージ棒を用いてアンピシリン含有 LB プレートにひろげる。
- ⑥ プレートを裏返しにして 37℃で一晩保温する。

2日目

(2) GFP の精製

(2-1) 大腸菌の集菌および洗浄

- ① 大腸菌一晩培養液を遠心チューブに入れる。
- ② 12000rpm で 1 分間遠心する。
- ③ 上清を デカンテーションにより取り除き、所定のチューブに捨てる。
- ④ そのままもう一度 12000rpm で 1 分間遠心後、ピペットマンにより完全に上清を除く。

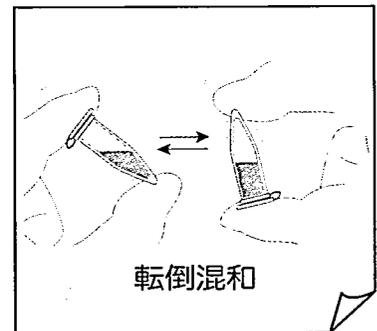
- ⑤ 菌体洗浄用緩衝液を 150 μ L 加えてボルテックスミキサーにより懸濁する。
- ⑥ 12000rpm で 1 分間遠心後、ピペットマンにより完全に緩衝液を取り除く。

(2-2) 大腸菌の破碎

- ① 細胞溶解液 200 μ L を加えてボルテックスミキサーにより攪拌し、細胞を完全に破碎する。
- ② 15000rpm で 20 分間遠心する。
- ③ 上清を別の遠心チューブに移す。
- ④ 20 μ L を別のチューブにとっておく (ゲル精製前サンプル)。

(2-3) Ni ビーズへの GFP の結合と洗浄

- ① 十分に懸濁した Ni-NTA: 50 μ L を (2-2) ②の上清に加え、10 分間穏やかに転倒混和する。
- ② 3000rpm、1 分間遠心し、上清を別のチューブに除く。タンパク質洗浄用緩衝液 200 μ L を加えて穏やかに懸濁する。3000rpm、1 分間遠心し、その上清を別のチューブにとっておく。この洗浄操作を合計 3 回行う。
- ③ 溶出用緩衝液 200 μ L を加えて穏やかに混和する。3000rpm、1 分間遠心し、その上清を別のチューブに移してヒスタグ GFP を回収する (ゲル精製後サンプル)。



緩衝液の組成

- A) 菌体洗浄用緩衝液
20 mM NaPi (pH 7.8)-1 mM EDTA
- B) 細胞溶解液
BugBuster[®] Protein Extraction Reagent [Novagen] Cat No. 70584-3
- C) 洗浄用緩衝液
20 mM NaPi (pH 7.8)-0.5 M NaCl
- D) 溶出用緩衝液
20 mM NaPi (pH 7.8)-0.5 M NaCl, 0.2 M Imidazole

(3) 電気泳動による精製度の観察

(3-1) サンプルの調製

- ① 新しいチューブを 2 本準備し、2x サンプルバッファー (注 a) を 10 μ L ずつ入れる。
- ② それらのチューブにゲル精製前サンプル、およびゲル精製後サンプルをそれぞれ 10 μ L ずつ入れる。
- ③ 分子量マーカーと②で作製したチューブ 2 本、合計 3 本のチューブを 100 $^{\circ}$ C で 5 分加熱する。

(3-2) 電気泳動と染色・脱色

- ① 分子量マーカー (XL-ladder, Low) を 5 μ L、2 つのサンプルを 10 μ L ずつゲルのウェルに入れる。(左端のレーンをあける)
- ② 200 V の一定電圧で色素がゲルの下端近くに移動するまで泳動する (約 1 時間)。
- ③ ゲルをガラス板からはがし、タッパに入れた (注 b) 固定液中で 20 分間振とうする。
- ④ 固定液を所定の容器に捨て、染色液 (注 c) 50 mL を入れて 30 分間振とうする。
- ⑤ 染色液を所定の容器に捨て、精製水を適量入れてゲル表面の色素を洗い落とす。その水を捨てて、精製水によ

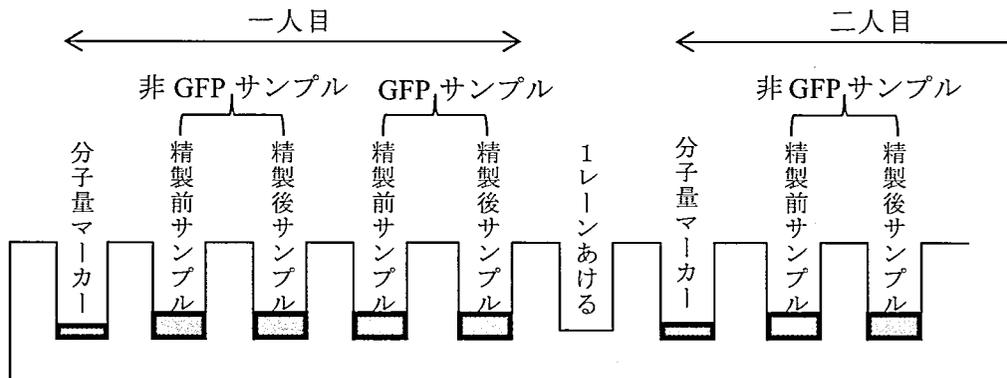
る洗い落としをさらに数回繰り返す。

(注 a) 2 x サンプルバッファー：

グリセロール 10 g, 1 M Tris-HCl (pH 6.8) -0.8 % SDS 3.125 mL, 2-メルカプトエタノール 2.5 mL, SDS 1.5 g, BPB (プロモフェノールブルー) 5 mg を精製水 25 mL に溶解する。

(注 b) 固定液：50 % (v/v) メタノール -20 % (v/v) 酢酸

(注 c) 染色液：Quick-CBB (和光純薬工業、コード No. 299-50101)



【ヒスチジン付加タンパク質のニッケルによる精製原理】

今回使用する GFP の C 末端には、遺伝子工学の手法を用いて 6 個のヒスチジンがタンデムに付加してある (ヒスタグ GFP)。ヒスチジンはニッケルに結合する。そこでニッケルをビーズ担体にキレートさせておき (Ni-NTA, Ni Nitrilotriacetic acid)、そのビーズ担体に大腸菌破砕液を加えることによってヒスタグ GFP を結合させる。ビーズ担体を洗浄することによって非結合タンパク質を除去し、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タグ GFP を解離させ、回収する (イミダゾールの方がヒスチジンよりも Ni に対して親和性が高いため、ヒスタグ GFP がビーズ担体からはずれる)。

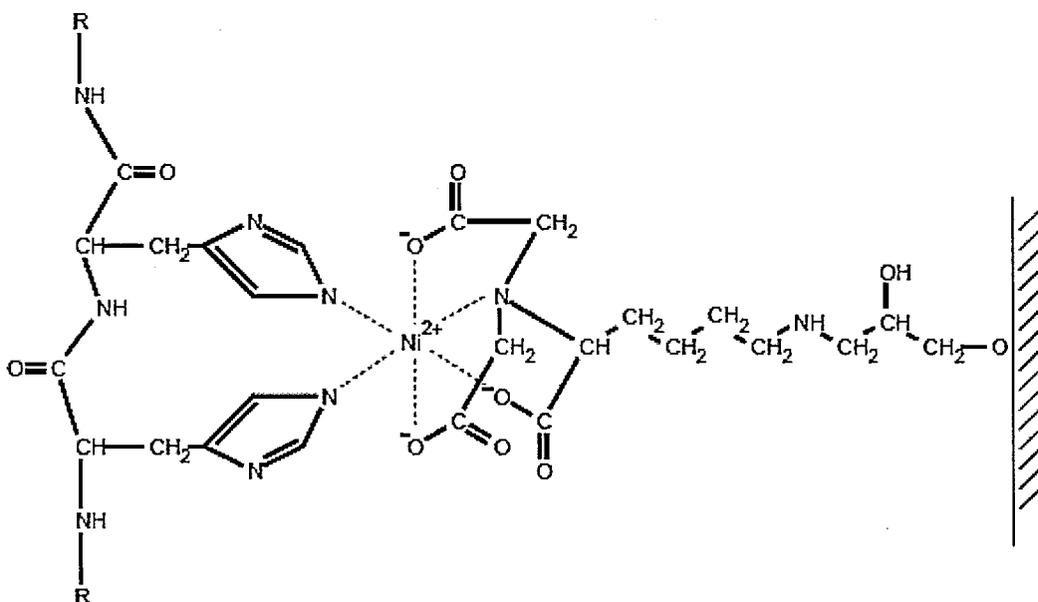


図1 ヒスチジntagと Ni-NTA との相互作用

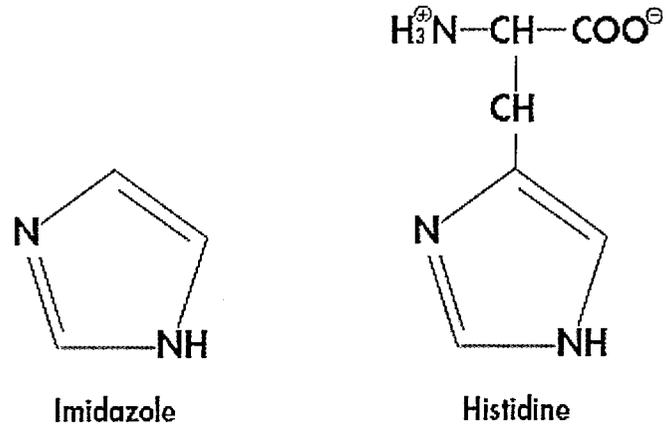


図2 イミダゾールとヒスチジンの構造