

高校生向けの生物学実習の実践（“生命科学への誘い”より）

中野春男¹，時下進一²

要旨

中高校生の理科離れ対策や理科教育啓蒙のため、本学においても生物学、物理学、化学の各分野から毎年1つのテーマを選んで高校生向けの科学実習を行っている。

本稿では2016年度7月に行った生物学実習の内容の紹介と実験器具・方法を簡潔にまとめた。さらに受講した高校生に対する内容の理解度向上のための工夫や安全性の工夫についても記載した。受講した高校生に行ったアンケート結果により、このような科学実習が「生物」への学習意欲を高める効果があると評価できた。

1. はじめに

1-1 背景

近年、中高校生の理科離れや大学理系学部への進学率が経済状況により大きく変動することがよく耳にされる。実際にOECDの「生徒の学習到達度調査」においても「科学への興味・関心がある」や「科学に楽しさを感じている」学生の割合が国際平均よりも著しく低い結果（国際平均57%に対して45%）となっている。また、「理科を学ぶことが将来役に立つ」と考えている学生の割合も国際平均よりも大幅に減少している⁽¹⁾。多くの理系学部では、この流れに対して小中高校生を対象により理科に興味を持ってもらえるよう出張授業や科学実験を開催している。

DNAは遺伝情報を伝達する物質として、高校理科の初年度から生物基礎で学んでいる。生物基礎の教科書では、身の回りにある材料からDNAを取り出して観察する目的で、すりつぶしたブロッコリーの花芽に塩化ナトリウム溶液とエタノールを加えてDNAを抽出する（DNAのエタノール沈殿）実験が紹介されている⁽²⁾。また、発展的な生物の教科書ではより進んだ内容で、バイオテクノロジーに関する記載があり、遺伝子の運び手としてプラスミドDNAについて学ぶ。実験としても蛍光緑色タンパク質遺伝子を持つプラスミドDNAの大腸菌への導入実験が紹介されている⁽³⁾。しかしながら、DNAの持つ化学的な構造と遺伝情報について深く理解するには、より発展的な内容の実験実習が求められるところである。本論は、本学部が昨年夏に実施した高校生向けの実験実習“生命科学への誘い、微生物からプラスミドDNAを取り出してみよう”のテキストを再構成したものである。大腸菌の性質を変化させ有るプラスミドDNAの精製や、DNAを構成するリン酸基の負電荷を利用したアガロースゲル電気泳動による分離実験を通じてDNAに対する化学的・物理化学的な理解を深める。そして実験の難易度と実験による生命科学への興味がどう変わったかを調べるためのアンケートを行い、今後の高校生向けの生物学実習へのフィードバックとすることとした。

² 東京薬科大学生命科学部 応用微生物学研究室

¹ 東京薬科大学生命科学部 環境応用動物学研究室

1-2.実験内容

本実習では大腸菌からプラスミドを精製し、アガロースゲル電気泳動で分離後、UV イルミネーターで DNA を観察する。このプラスミドは環状の染色体以外の DNA で、複製するための複製開始点や複製に必要なタンパク質の遺伝子を有し、染色体とは独立に自立的に増える。多いものでは大腸菌 1 細胞当たり 200 個ほど存在している。そのため、現在では遺伝子操作により様々な遺伝子を組込むことで生命科学の研究になくてはならないものになっている。このプラスミドに様々な遺伝子を挿入することで、大腸菌に色々な機能を持たせることができる。今回、精製するプラスミド pZsGreen (クローンテック社 図 1) には β ラクタマーゼという酵素の遺伝子 (Amp^r) が存在する。 β ラクタマーゼはアンピシリンという抗生物質を分解する酵素である。この酵素を作ることができる大腸菌はアンピシリンという抗生物質に耐性を示すようになる。この他に、pZsGreen プラスミドにはマメスナギンチャクという生物由来の緑色蛍光タンパク質の遺伝子 ZsGreen が組み込まれている。この緑色蛍光タンパク質を作ることのできる大腸菌は青色光の照射により蛍光を発する(図 2)。

実験で用いる大腸菌には染色体 DNA とプラスミドが存在するが、実験ではプラスミドだけを精製する。大腸菌の細胞を溶解した後、染色体 DNA とプラスミドを分けて、プラスミドをカラム(核酸を吸着する)に通して吸着させ、洗浄してから溶出して精製する。その後、アガロースゲル電気泳動による プラスミドの分離を行う。従来のエチジウムブロマイド試薬より安全性の高いミドリグリーン Direct 試薬を DNA に結合させることで、紫外線の照射により蛍光を発する。これによりプラスミドが検出可能となる。

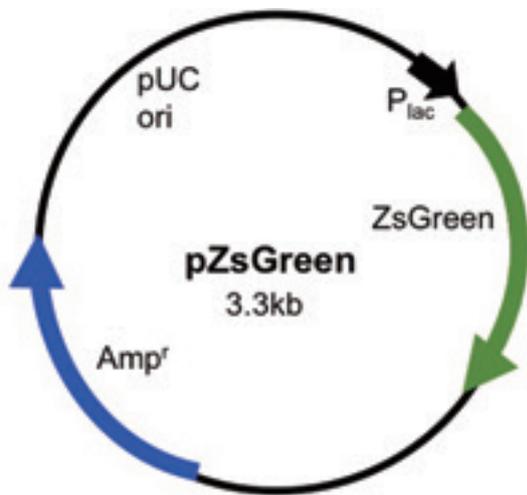


図 1 pZsGreen プラスミド (クローンテック社)

図 2 ZsGreen 緑色蛍光タンパク質を発現した大腸菌

2. 実験方法

2-1. 大腸菌の形質転換と培養

実習に先だって pZsGreen プラスミドを導入し形質転換した大腸菌を培養する。具体的には、1.5 mL の遠心チューブ内で大腸菌コンピテントセル溶液 (DH-5 α 株) 50 μ L に 20 ng の pZsGreen プラスミドを混合し氷上にて 15 分間静置する。遠心チューブを 42°C、1 分間インキュベートし、すぐに氷上に戻すヒートショック操作を行った後、SOC 培地 250 μ L を加えて 37°C、1 時間インキュベートする。この大腸菌液 50 μ L を 0.4 mM IPTG、50 μ g/mL アンピシリンを含む LB アガロース培地プレートに塗布し 37°C、1 晩 (約 18 時間) インキュベートする。翌日、培地プレートにコロニーが出現していることを確認する。また、IPTG 誘導によって ZsGreen 緑色蛍光タンパク質が発現していることを UV イルミネーターで観察する。大腸菌コロニーを拾い、蓋付きガラス試験管内アンピシリンを含む LB 液体培地 3 mL に入れて、震盪培養器にて 37°C、150 rpm にて 1 晩 (約 18 時間) インキュベートする。翌日、菌液の一部 500 μ L を蓋付きガラス三角フラスコ内にアンピシリンを含む LB 液体培地 100 mL に入れて、震盪培養器にて 37°C、150 rpm にて 1 晩 (約 18 時間) インキュベートする。大腸菌液を 1.5 mL ずつ遠心チューブに分注し、13000 rpm で 2 分間遠心する。培地上清を完全に除いて菌体の沈殿した遠心チューブを実習当日まで -20°C にて保存する。

2-2. プラスミドの精製

準備するもの

(実習生 1 名に各 1 本、1 個、1 組) 大腸菌の入った遠心チューブ、市販の FastGene プラスミド ミニキット (日本ジェネティクス株式会社) に含まれる細胞懸濁用バッファー (mP1)、細胞溶解液 (mP2)、中和バッファー (mP3)、洗浄バッファー (mP5)、溶出バッファー (mP6) をそれぞれ必要量分注した 1.5 mL の遠心チューブ、スピナーカートリッジ、2 mL の洗浄チューブ、1.5 mL のプラスミド回収用チューブ、マイクロピペッター (P-20, P-200, P-1000)、遠心チューブ立て、チップ (イエロー: P-20, P-200 用、ブルー: P-1000 用)、チップの廃棄容器 (実習生 4 名に各 1 台) 微量遠心チューブ用の卓上高速遠心機、ボルテックス

- 1) 菌体の懸濁: マイクロピペッター (P-1000) を使って 200 μ L の細胞懸濁用バッファー (mP1) を沈殿させた菌体に加え、均一になるまでボルテックスを使用して懸濁させる。
- 2) 細胞の溶解: マイクロピペッター (P-1000) を使って 200 μ L の細胞溶解液 (mP2) を加える。蓋をしたチューブを 5 回上下反転させて緩やかに混ぜる。ボルテックスは使用しない。室温で 5 分間おく。
- 3) 中和: マイクロピペッター (P-1000) を使って 300 μ L の中和バッファー (mP3) を加えずすぐに 5 回上下反転させて緩やかに混ぜる。ボルテックスは使用しない。13000 rpm で混合液を 5 分間遠心する。
- 4) カートリッジへのサンプルの添加: スピナーカートリッジを 2 mL の洗浄チューブに挿入する。3) のステップでできた遠心上清をカートリッジに移す。13000 rpm で混合液を 1 分間遠

心する。カラムを通り抜けた液体 (flow-through) は廃棄する。

- 5) カートリッジの洗浄: flow-through を廃棄したあと、スピンカートリッジを再度 2 mL の洗浄チューブに戻す。マイクロピペッター (P-1000) を使って洗浄バッファー (mP5) 600 μ L をスピンカートリッジに添加する。13000 rpm で洗浄チューブを1分間遠心する。flow-through は廃棄する。再度、カートリッジ内に残った洗浄バッファーを取り除くため、スピンカートリッジを挿入した洗浄チューブを13000 rpm で1分間遠心する。
- 6) プラスミド DNA 溶出: スピンカートリッジを1.5 mL のプラスミド回収用チューブに移し、マイクロピペッター (P-200) を使って溶出バッファー (mP6) 50 μ L をカートリッジの中央に添加する。室温で1分間おく。13000 rpm で2分間遠心する。この溶出バッファーで溶出した液をプラスミド溶液とする。

2-3. アガロースゲル電気泳動

準備するもの

(実習生1名に各1本、1個) ミドリグリーン Direct 泳動用色素溶液 (日本ジェネティクス株式会社)、 λ Hind III 電気泳動用 DNA サイズマーカー溶液 (5 μ L にミドリグリーン Direct を1 μ L 添加)、空の1.5 mL の遠心チューブ

(実習生2名に各1組) アガロースゲル (0.7%)、TAE (トリス-酢酸-EDTA) 電気泳動用緩衝液 (400 mL)、電気泳動槽 (ミューピット)

<アガロースゲルの作成>あらかじめ作製する。

DNA 解析用アガロース (アガロース S、ニッポンジーン) を0.35g 量りとり三角フラスコにいれ 50 ml の TAE 電気泳動用緩衝液を加えて電子レンジ (600W 約2分間) でアガロースを完全に溶かす。溶かしたアガロースを専用の容器に注ぎ込み、コームを差し込み固まらせる。

<泳動用プラスミド DNA 溶液の作成>

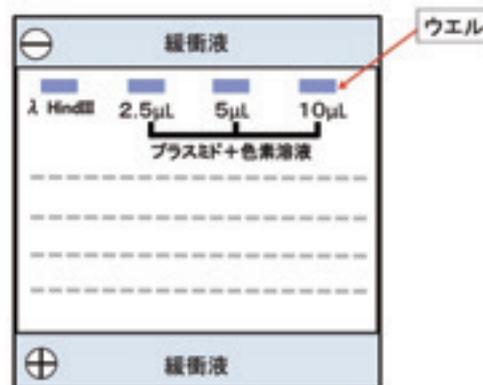
- 1) マイクロピペッター (P-20) を使ってプラスミド溶液を20 μ L とって、空の遠心チューブに入れる。
- 2) 次に20 μ L のプラスミド溶液が入った遠心チューブに、マイクロピペッター (P-20) を使って、泳動用色素溶液 (ミドリグリーン Direct) を2 μ L とって加える。これを泳動用プラスミド DNA 溶液とする。

<アガロースゲル電気泳動>

泳動には DNA のサイズを測るため、電気泳動用 DNA サイズマーカーと一緒に泳動する。今回は λ Hind III という λ フェージ DNA を制限酵素 Hind III にて断片化した DNA サイズマーカーを使用する。

- 1) マイクロピペッター (P-20) を使って、 λ Hind III を5 μ L とってアガロースゲルのウエルに入れる。失敗した場合は、入れたウエルの隣を使用する。

- 2) マイクロピペッター (P-20) を使って、泳動用プラスミド溶液を $2.5 \mu\text{L}$ とって1) の隣のウェルに入れる。
- 3) 2) と同様にして、泳動用プラスミド溶液を $5 \mu\text{L}$ とって2) の隣のウェルに入れる。
- 4) 泳動用プラスミド溶液を $10 \mu\text{L}$ とって3) の隣のウェルに入れる。
- 5) λ Hind III、泳動用プラスミド溶液 ($2.5 \mu\text{L}$ 、 $5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$) を入れ終わったら、電気泳動を開始する (右図参照)。泳動の目安は 100V 電圧で $30 \sim 45$ 分である。
- 6) 泳動終了後、UV イルミネーターでミドリグリーン Direct によって染色された DNA の蛍光を観察し、ポラロイド写真を撮影する。



3. 実習の実際と考察

当日 (平成28年7月31日) の実習は、午前 (10:00~12:00) と午後 (14:00~16:00) の2回行われ、それぞれ36名、26名の計62名の高校生が参加した (内訳は高1:18名、高2:17名、高3:28名)。実習における安全確保のため、高校生には使い捨て可能な簡易白衣と保護めがねを着用させた。また、実習指導補助 (TA) として研究室に所属する大学院生と学部4年生を高校生4名につき1名配置した。最初、スライドにより DNA やプラスミドの基礎知識や実習の作業手順を説明した後、高校での普段の実験実習では取り扱うことがないマイクロピペッターの使い方を高校生に学んでもらった。その後 TA の指導のもと、高校生各自が実習テキストの手順に従って、大腸菌からのプラスミド DNA の精製、アガロース電気泳動による DNA の分離、UV イルミネーターを用いたプラスミド DNA の蛍光観察を行った。DNA の化学的性質からプラスミド DNA が陰極から陽極へ移動することを観察した。今回の実習では環型のプラスミド DNA をアガロース電気泳動しているため、その環型プラスミドが取る形態により、アガロースゲル内での移動度が異なる。その結果、開いた環型プラスミドと、スーパーコイルと呼ばれる閉じた環型プラスミドに対応した2種類の DNA バンドが観察される (図: 実習結果例を参照)。高校生には輪ゴムを配布し、それを環型プラスミドに見立てて説明したところ良く理解できた様子であった。従来の実習ではアガロース電気泳動によって分離した DNA をエチジウムブロマイド溶液にて染色、UV イルミネーターで観察するが、エチジウムブロマイドは発がん性のある有害化学物質であり、その作業には極めて注意を要する。そこで今回は、より安全性の高い DNA 蛍光染色試薬ミドリグリーン Direct を使用し、従来のエチジウムブロマイドと同様の実験結果が得られた。また、電気泳動の際に泳動色素として DNA サンプルに直接混ぜて使用し、泳動後にゲルをそのまま UV イルミネーターで観察できる簡便さから、実習時間を短縮することが可能となった。この点は、高校で DNA の電気泳動実験を行う上で参考になるものと考えられる。また、蛍光線色色素の代わりにクリスタルバイオレット等の通常の色素を用いた実験も可能と考えられる。

実習後、参加した高校生に記入してもらったアンケートでは、実習の難易度について1) 簡単すぎた：0名、2) ちょうどよかった：50名、3) 難しかった：9名となっており、参加した高校生の学年を問わず適切なレベルの実習内容であったことが伺える。また、実習の楽しさや実習を通じた「生命科学」に対する興味や理解についての設問には、参加した高校生の8割強が実習は楽しく、生命科学に対する興味や理解が増したと答えていることから、本実習により高校生の「生物」への学習意欲を高める効果があると評価できた。

今後は、実習説明の際にクリッカー等を使用することにより実習を受ける高校生にも簡単な設問を行うことで参加型の実習説明が可能になると考えられる。高校の教科書で紹介されている実験を少し発展させた実習を組み立てる工夫も必要ではないだろうか。また、実習指導した大学院生の意見等を取り入れて、今後の実習にフィードバックすることができれば、大学院生の指導力向上や社会貢献への参加意欲の向上等も見込める。

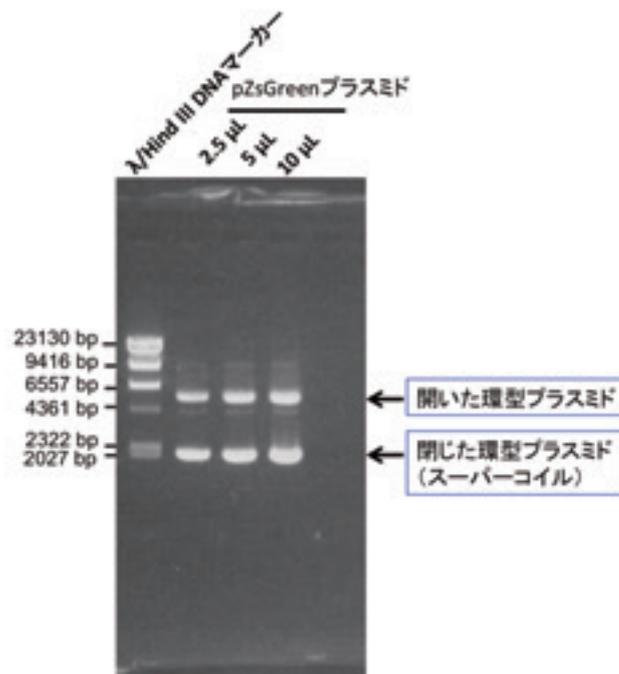


図 実習結果例

参考資料

- (1) 国立教育政策研究所「OECD 生徒の学習到達度調査 ～PISA2009 年調査分析資料集～」
- (2) 高等学校理科用教科書「生物基礎」東京書籍
- (3) 高等学校理科用教科書「生物」東京書籍