

# 高校生対象の SPP 実験テーマと題材の選択と検討

豊橋技術科学大学 研究協力課 総合技術支援チーム

坂井悦子

sakai@ens.tut.ac.jp

## 1. はじめに

国立大学法人豊橋技術科学大学は、愛知県東部に位置する工学部の単科大学である。愛知県東三河地域において生命科学関連学科を持つ唯一の大学であることから、例年、生命科学分野のサイエンス・パートナーシップ・プロジェクト（SPP）実施の連携機関としての協力要請が、地域の高校からなされている。

演者は、今年度に愛知県立豊丘高等学校 2 年生を対象に実施した、DNA の抽出や精製の実験実習の計画・実施に携わった。本講演では、テーマの設定、実習内容の検討を進める上での苦労や工夫した点、独創的に行えたと思われる点について報告する。

## 2. 協力依頼を受けてから実施まで

高等学校「生物基礎」学習指導要領では、生物と遺伝子についての学習内容の範囲は、「観察、実験などを通じて探求し、細胞の働き及び DNA の構造と機能の概要を理解させ、生物についての共通性と多様性の視点を身に付けさせる。」と書かれている。

DNA、遺伝子、タンパク質といった生物基礎の教科書に登場することばの正しい理解を促し、さらに興味を喚起するために、DNA の抽出、PCR（Polymerase Chain Reaction）、電気泳動といった遺伝子工学技術の原理や基本的な操作を、実際に体験して学習できるよう、演者らは、これまでも地域の高校からの協力要請を受けて高校生向け生命科学分野の SPP を実施してきた。昨年度以前では、平成 21 年度に、生徒各自の口腔（ほお内側）粘膜細胞から抽出した DNA を使ったヒトゲノム遺伝子解析実験、平成 24 年度に、DNA 断片の結合（ライゲーション）反応及び大腸菌の形質転換実験を、いずれも愛知県立成章高等学校の生徒を対象に行ってきた。

今年度は、理系クラス生物選択コースの 2 年生 33 名対象の 2 日間の SPP 実験の実施について、愛知県立豊丘高等学校から協力要請があった。担当の高校教諭側からは、豊橋市を含む愛知県東部は、野菜類の畑作農業がさかんな地域であるため、その野菜類を使って、植物の細胞や遺伝子についての知識を深める実験実習を行いたいという要望があった。そこで、DNA を抽出する実験の材料は、野菜を中心とすることにした。

平成 25 年 3 月に SPP 採択決定の連絡を受け、その後、高校教諭との実施日程や内容の詳細に関する打ち合わせや具体的な実験内容の検討、予備実験の実施、ティーチングアシスタント（TA）への指示、配付及び説明のための資料の作成、下表に示すような実施日（8 月 26、27 日）当日のスケジュール調整、学内見学施設への受け入れ依頼等の準備を進めた。

第1日目(8月26日)		第2日目(8月27日)	
9:00~9:10	到着	9:00~9:20	到着~休憩
9:10~9:20	休憩	9:20~9:30	実験室へ移動 着席
9:20~9:30	実験室へ移動 着席	9:30~9:50	本日の実験の説明
9:30~9:40	ガイダンス、あいさつ 講師、TAの紹介	9:50~10:20	PCR
9:40~10:00	2日間の実験内容の説明	10:20~10:30	休憩
10:00~11:30	植物と動物のDNA抽出(簡易抽出法)	10:30~11:10	学内施設見学(1ヶ所目)
11:30~12:30	昼休み	11:10~11:50	学内施設見学(2ヶ所目)
12:30~13:00	午後の実験の説明	11:50~12:50	昼休み
13:00~16:00	植物とコウボ菌のDNAの抽出	12:50~13:50	電気泳動の説明と実験
(途中)	休憩	13:50~15:50	実験のまとめとグループ討論(適宜休憩)
(時間があれば)	翌日の実験の説明	15:50~16:00	閉会あいさつ

### 3. テーマ及び実験内容の検討と実施

DNA の抽出実験で特に目に見える収量を得るために用いる材料は、細胞が小さく入手が容易なものが適しており、実験例としてブロッコリーの花蕾（からい 緑色の濃い部分）、バナナ、タマネギの鱗茎（りんけい 通常、食する部分）、魚類の白子、トリのレバーなどがよく使われている。今回は、植物材料としてブロッコリーとタマネギ、動物材料としてサケの白子、入手が容易で安全な微生物としてコウボ菌を材料とした。このうち、ブロッコリーとタマネギは生徒に持参してもらった。

#### 3-1 DNA の簡易抽出実験

第1日目の午前中は、まず、スタッフの紹介、実験における注意事項や緊急時の避難経路等を説明した後、「DNA の簡易抽出実験」を行った。研究室において日頃扱う DNA 量（mg 以下）の実験をいきなり始めるのは難しいと思われたので、ここでは、おろし金や乳鉢で数 g〜数十 g の材料をすりつぶして大量の DNA を抽出する実験を行うことにした。タマネギを大量にすりつぶすと、眼が痛くなって実験の進行に支障があるため、この実験での材料は、ブロッコリーの花蕾とサケ白子を使った。破碎したブロッコリー花蕾 10 g に 10% 食塩水 40 ml と 10% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液 10 ml 加え、10 分程度放置してからろ過し、ろ液に倍量の冷エタノールを静かに加えると二層となったエタノールとろ液の接触面から DNA が析出するのが確認できた。サケ白子はタンパク質含有量が多いため、加熱とタンパク質分解酵素（プロテイナーゼ K）を加える操作を追加した。ろ過をなぜ行うのか、途中で加えた試薬（食塩水、エタノール、SDS）は、どのような性質を持ち、どういった働きをするのか、といったひとつひとつの手順を確認しながら実験を進めていった。析出した白いひも状の物質が DNA であることは、酢酸カーミン溶液及び食紅の溶液を滴下して染色することで確認した。

#### 3-2 マイクロスケール DNA 抽出実験

第1日目午後は、少し実験に慣れてきたと思われるので、DNA 抽出キット、マイクロチューブ、マイクロピペット、卓上遠心分離装置など、生命科学分野研究室で用いられている器材を使った DNA の抽出実験を行った。ここでの材料は、タマネギとコウボ菌を使い、DNA の抽出実験は、植物 DNA 抽出キット「ISOPLANT II」（株式会社日本ジーン）を用い、そのプロトコルに従って行った。

#### 3-3 DNA の増幅とその確認

タマネギの鱗茎は無色透明〜白色であるが、これは未分化細胞にある「原色素体」が、細胞が各器官に分化したときに、葉や茎では葉緑体などの「色素体」になるのに対し、鱗茎では「白色体」になり、葉緑体がないあるいはわずかしかな存在しないからである。植物の細胞では、遺伝情報をつかさどる DNA は、核の中だけでなくミトコンドリアや葉緑体にも存在しているが、「白色体」となっても葉緑体の DNA は失われたわけではない。そこで、このことを確認する実験を高校生向けに設計できないかを検討した。

核の中にある DNA（ゲノム DNA）は、塩基の重複や欠失が複雑で、生物の種間のみならず個体間においても塩基配列が保存されている部位が少ない。一方、ミトコンドリアや葉緑体の DNA は、核の DNA に比べると生物種を超えて保存性が高い塩基配列部位の存在が見受けられるため、生物の分類、進化の度合いといった系統解析に有効な DNA の領域に関する研究が多くなされてきている。中でも、葉緑体 DNA にある遺伝子 *rbcL*、*matK* の領域は、植物の生物種を特定する計画（陸生植物の DNA バーコーディング）での「標準的バーコード領域」として、多くの植物種で塩基配列が解析されている。（文献 1）

*rbcL* は、植物の光合成で二酸化炭素をカルビン回路に取り込む最初のステップで働く酵素、リブローズ 1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（RubisCO）を構成する 2 種類のサブユニットのうちの一つ（大サブユニット）の遺伝子で、すべての緑色植物で通常 1 コピーだけ存在している。さらに、植物種が異なっても遺伝子領域の長さはあまり変わらないこと、植物種が異なっても保存性の高い DNA 配列が多いこと、比較した配列が PCR で DNA を増幅する際に 500~600 塩基対程度の長さの断片が得られるようなちょうどよい位置でプライマーを設計できること、進化速度は遅いが同属の近縁種間での変異があること（文献 2）などから、比較的近縁の種間から大系統群間までの幅広いレベルでの系統解析に適用されている。一方、*matK* の塩基配列は、葉緑体 DNA 上の *trnK*（リジン転移 RNA）遺伝子を成熟化させる酵素をコードする領域である。*rbcL* よりも進化速度が 2~3 倍速いため、*matK* の塩基配列

を用いた系統解析は、*rbcL* では低い精度でしか得られない比較的近縁種間での系統解析にも有効である。

そこで、第2日目は、緑色でないタマネギ鱗茎の細胞も、緑色の細胞（ブロッコリー花蕾）と同じように植物の葉緑体 DNA 中にある *rbcL* 及び *matK* 領域を持っていることを確認する実験を、第1日目に抽出した DNA を使って行うこととした。*rbcL*、*matK* の DNA 配列の中のどの領域を増幅させるかといったプライマーは、文献3)～5)を参考に、双方のアニーリング温度に差が少なく、1台のサーマルサイクラーで同時に PCR 反応を行える領域を選んだ。1 µl の鋳型 DNA 溶液を、25 µl の 2× *Premix Taq*<sup>®</sup> (*TaKaRa EX Taq*<sup>®</sup> 1.25 U/25µl, 2× dNTPs 0.4 mM each, 2× Buffer)、*rbcL* プライマー (*rbcLaF* : 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'、*rbcLaR* : 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3') 各 1 µl (50 pmol) あるいは *matK* プライマー (*matK472F* : 5'-CCCRTYCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'、*matK1248R* : 5'-GCTRTRATAATGAGAAAGATTTCTGC-3') 各 1 µl (50 pmol)、滅菌水 22 µl に混合し、サーマルサイクラー (*TaKaRa PCR Thermal Cyclers Dice*<sup>®</sup>) にセット、94°C 5分を1サイクル、94°C 30秒、53°C 1分、72°C 1分を35サイクル、72°C 7分を1サイクルの反応条件で PCR 反応を行った(設計したプライマーの R は A or G, Y は C or T を意味する)。鋳型 DNA 以外の試薬(プライマー、酵素、緩衝液、ヌクレオチドなど)の混合、サーマルサイクラーの反応条件設定及び午後のアガロースゲル電気泳動のゲル作製、エチジウムブロマイド液を扱う作業は、高校生には難しいあるいは危険と思われる動作であるため、スタッフが行った。

PCR 反応進行中の約2時間は待ち時間となるため、この間、生徒らは、実験室を離れて、学内施設(植物工場及び次世代シーケンサー装置)の見学を行った。

午後は、各 PCR 反応産物に 10 µl のローディングバッファーを加え混合したものを試料として、電気泳動槽(株式会社アドバンス *Mupid*<sup>®</sup>2- plus など)にセットした1%のアガロースゲルのレーンに 10 µl 入れ、100 V で電気泳動した。30分経過後ゲルをエチジウムブロマイド液で染色し、ゲル撮影装置(*FAS-III TOYOBO*)にセットして、写真撮影し結果を確認した。いずれの実験グループも良好な結果が得られた。さらに各実験操作の確認や結果のまとめ、考察をグループで討論し、2日間をしめくくった。

#### 4. 苦労した点、工夫した点、独創的に行えたと思われる点

遺伝子工学実験のための学生実験室は、学部2年生が一度に行う10~15名程度分のスペース、機器しかなく、33名を一度に受け入れることは不可能であった。このため、クリーンベンチや滅菌装置が必要な、過去の SPP で実施したような遺伝子組換えや大腸菌等を扱う操作を含む実験はあきらめ、比較的広い講義室でも行える実験内容を検討した。

人数、グループ数が多く、機器の混雑や順番待ちでの時間のロスが懸念されたが、大きな混乱はなかった。ただ、電気泳動槽などを全てのグループで同じ機種のもので揃えられなかったため、機器の性能や使い勝手の違いが原因で、実験の進行に差が生じてしまった。

第1日目午前中の DNA 簡易抽出実験は、遺伝子工学技術に必要な研究設備が整っていなくても行うことが可能であるので、家庭で行ってみる場合の注意事項の説明と代替品(SDSを食器用洗剤で代用、プロテイナーゼ K をコンタクトレンズ用タンパク除去剤で代用など)の紹介も行った。

DNA 簡易抽出実験で、すりつぶした試料と DNA 溶液を分離する際のろ過は、まずガーゼで濾してから、そのろ液をろ紙で再度ろ過した。これにより、ガーゼだけでは濁っていて DNA が析出したのかどうか判別しづらかったり、ろ紙だけでは目詰まりしてなかなか溶液が得られなかったりといった問題が解決できた。

第1日目午後の DNA 抽出キットを使った操作は、マイクロピペットの扱いなど不慣れなことが多い上、手順も煩雑で、高校生には難しすぎたと思われる。DNA 簡易抽出実験でも十分 PCR を行える純度の試料を得ることができたので、今後の高校生向け DNA の抽出は、簡易抽出法を中心に検討する。

第2日目午後のグループ討論の際に、ブロッコリーとタマネギそれぞれの *rbcL*、*matK* の DNA 塩基配列データを生徒に配付し、PCR 反応のプライマー領域を探しだし、アガロースゲル電気泳動で確認された DNA 断片の長さを確認する作業を行ってもらった。

配付したうちの一つ【ブロッコリー *rbcL* 塩基配列 GenBank: M88342.1】(下線部はプライマー結合領域)

aaagattcct gtgaaaaagg ttaattaaat ctattcctaa ttatgtcga gtagacctg ttgtttgtt ttattgcaag aattctaat tcatgacttg tagggaggga  
cttatgtcac cacaacaga gactaaagca agtgttgat tcaaagctgg tgtaaagag tataaattga attattatc tcctgaatat gaaaccaagg atactgatg  
cttggcagca ttccgagtaa ctctcaacc cggagtcca cctgaagaag caggggtgc gtagctgt gaacttcta ctggtacatg gacaactgtg  
tggaccgatg ggcttaccag ccttgaccgt tacaaggac gatgctacca catcgagccc gttccaggag aagaaactca atttattgcg tatgtagctt  
accattaga ccttttgaa gaagggtctg ttactaacat gttacctca attgtggta acgtattgg gttcaagcc ctggctgctc tacgtctaga ggatctgca  
atccctccg cttatactaa aactttccag ggaccacctc atggtatcca agtgaaga gataaattga acaagtatgg acgtccccta ttaggatgta ctattaaacc  
taagtgggg ttatccgca agaactatgg tagagcagtt tatgaatgc tacgtgtgg acttgattt accaaagatg atgagaatgt gaactctca cctttatgc  
gttgagaga ccgtttcta tttgtgccg aagctattta taaatcacag gctgaaacag gtgaaatcaa aggacattat tgaatgcta ctgctggatc atgcaagaa  
atgatgaaa gagctatatt tgccagagaa ttgggagttc ctatcgtat gcatgactac ttaacagggg gattcaccgc aaatactagt ttggctcatt atgcccgaga  
taatggccta cttctcaca tccaccgtgc aatgcacgct gttattgata gacagaagaa tcatggtatg cacttccgtg tactagctaa agctttacgt ctatcgggtg  
gagatcatgt tcacgggggt acagtagtag gtaacttga aggagacagg gagtcaactt tgggctttgt tgattactg cgcgatgatt atgtgaaaa  
agaccgaagt cgtggtatct ttttactca agattgggtc tcaactaccag gtgttctacc tgtgcttca ggggtattc acgtttggca tatgctgctg ttgaccgaga  
tctttggaga tgattccgta ctacaattg gtggcgaac tttagccac ccttggggaa atgcaccggg tgccgtagct aaccgagtag ctctagaagc  
atgtgtacaa gctcgtaat aggacgtga tcttcagtc gagggtaag aaattaccg tgaggcttgc aaatggagtc ctgaactagc tgctgctgtg  
gaagtatgga aggagatcac atttaactc ccaaccatcg ataattaga tggccaagac tagaaattag attagtaatt cacgtccgtt ttattagttt aattgcaatt  
aaactcgct caatctttt ttactaaaa ggattgagcc gatttatct agtgtatata ctgttttga tagatacata cttaatctag atataaaaa

## 5. おわりに

高校生対象の SPP で DNA の抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動の実験を行った。全ての実験グループで、ブロッコリー花蕾にも、タマネギ鱗茎にも、*rbcL*、*matK* 領域が存在することが確認できた。今回行った 2 日間の実験は、時間配分的にも内容的にもほぼ満足に行えたが、高校生には難しい実験操作手順もあり、より簡易でわかりやすい方法や説明など、工夫が必要な部分もあった。

今後も、人数や高校側からの要望に応じて題材や内容を検討し、生物、遺伝子、DNA に対する正しい理解を深め、生命科学分野に興味を持ってもらえるような実験を提供していきたい。

## 6. 謝辞

実験の計画を進める上でご指導頂きました菊池洋教授、ティーチングアシスタントとしてサポートしてくれた菊池・梅影研究室学生諸君及び SPP 実施校の愛知県立豊丘高等学校の先生方に深く感謝いたします。

## 7. 参考文献

- 1) COBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 12794-12797
- 2) 村上哲明 (1995) 植物分子系統学の現状と展望 - *rbcL* 遺伝子の系統解析における有効性と問題点, *種生物学研究*, 第 19 号, p1~10
- 3) Jing YU, Jian-Hua XUE, Shi-Liang ZHOU (2011) New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms, *Journal of Systematics and Evolution* 49 (3): 176-181
- 4) Sameera O. Bafeel, Ibrahim A. Arif, Mohammad A. Bakir, Haseeb A. Khan, Ahmad H. Al Farhan, Ali A. Al Homaidan, Anis Ahamed, Jacob Thomas (2011) Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants, *Plant Omics Journal* 4 (4): 195-198
- 5) Fay-Wei Li, Li-Yaung Kuo, Carl J. Rothfels, Atsushi Ebihara, Wen-Liang Chiou, Michael D. Windham, Kathleen M. Pryer (2011) *rbcL* and *matK* Earn Two Thumbs Up as the Core DNA Barcode for Ferns, *PLOS ONE* 6 (10):e26597