

教育用キットを用いた組換え DNA 実験 (講義と実習)

大藤道衛 (東京テクニカルカレッジ・バイオ科)

1. はじめに

「組換え DNA 実験を含む授業」は、単に実験操作を行うことが目的ではない。生徒は、実験を通じて物に触れ、セントラルドグマ (DNA > RNA > タンパク質 > 形質) と遺伝子発現調節の仕組みという生物学的に重要な概念を学ぶことができる。また組換え DNA 実験の原理、組換え実験を行う際の組換え DNA 実験の規則 (安全を保つきまり) や廃棄物の処理、更には、生物系実験結果の評価方法を学ぶこともできる。この授業を受けた生徒は、組換え DNA 実験を体験し生命科学の面白さに興味を知るキッカケや更に勉強する動機付けになろう。

本研修では、アメリカ合衆国の高校で広く使われている市販教材”Biotechnology Explorer”を用いた実験を行い、授業方法について考察する。”Biotechnology Explorer”には、実習用試薬、器具ばかりでなく 50 分単位で授業ができるように教員用テキスト・生徒用テキスト・確認テストなど授業実施に必要な教材が全て含まれている。

このキットでは、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) が持つ緑色蛍光タンパク質である Green Fluorescent Protein (GFP) の遺伝子を大腸菌へ導入し大腸菌を形質転換することにより光る大腸菌を作製する系を使用している。具体的には GFP の遺伝子を大腸菌プラスミドのプロモーター下流に組み込んだ組換えプラスミド DNA (pGLO) を大腸菌 K12 (HB101 株) に導入し形質転換する。形質転換した大腸菌内で、GFP 遺伝子を発現させ、GFP タンパク質を作らせる。この大腸菌に紫外線を当てると蛍光を発する。プロモーターはアラビノースオペロンのプロモーター配列を用いているため培地にアラビノースを添加するか否かで遺伝子発現調節を行うこともできる。

このキットは、実験に必要な試薬・器具・テキストが含まれ良くできたものであるが、実際に授業を組む際に教員は、キットをそのまま使用するのではなく、生徒に何を教えたいかの目的を明確にし、自分が行う授業の流れの中で組換え DNA 実験を有効に取り入れることが大切であろう。

2. 実施予定

8月8日(木)13:30-16:30

講義:

DNA の構造と組換え DNA 実験

実験を含む教育の主眼

実験原理と操作・廃棄物処理

Biotechnology Explorer キットテキスト使用方法

実習:

培地調製と無菌操作

大腸菌への GFP 遺伝子の導入と形質転換

8月9日(金)9:30-12:30

演習と講義: 形質転換結果の観察と実験データのまとめ考察

実習:

実験廃棄物の処理方法

本研修での講義・実習は、本テキストならびに Biotechnology Explorer キットの説明書を使用する。

3. Biotechnology Explorer テキストを用いた実習授業の流れ

ページ数は、キットに含まれるテキストのページを示している。

(50分 x4コマ)

3-1. 形質転換授業準備(約3時間)

①講義内容の準備

形質転換と遺伝子組換え:p. 1-2

遺伝子組換えについて:p. 28-31

付録(用語解説等):p. 47-59

②実習の準備 p. 3-15

使用器具の準備:p. 3-9

寒天プレートの準備:p. 11-13

スタータープレートの準備・試薬調製:p. 13-15

試薬分注:p. 15

使用した器具・試薬の殺菌廃棄方法を確認すること:p. 5

③実習講義内容の準備

使用器具・試薬・用語説明:p. 3-5

実験操作説明:p. 16-20(先生用)、p. 34-39(生徒用)

実験結果解説説明:p. 20-28(先生用)、p. 28-46(生徒用)

3-2. 遺伝子組換えについての講義と実習・演習(50分 x4コマ)

各コマにおける実施内容の要点を示す。

1コマ目(Lesson 1):遺伝子組換えについて(講義) p. 28-31

下記の5項目を盛り込み講義します。

- ① 組換え DNA 実験と原理(宿主・ベクター)
- ② 組換え DNA 実験の規則(実験室・滅菌方法)
- ③ 実験の結果評価方法
- ④ 遺伝子発現とセントラルドグマ(DNA>RNA>タンパク質>形質)
- ⑤ 発現調節の仕組み(プロモーター:種固有)

2コマ目(Lesson 2):遺伝子導入実験(実習) p. 32-38

実際に形質転換を行います。

3コマ目(Lesson 3):データの収集と分析(演習) p. 39-42

蛍光の観察とコロニーの有無を定性的に確認し、発現調節の仕組みを考えます。

4コマ目(Lesson 4):考察(演習) p. 43-46

形質転換効率を測定し、他のクラスメートの結果と比較して定量的に評価します。

注:上記における「講義」・「実習」・「演習」の定義

講義:先生からの一方通行が中心の授業

実習:先生の指示により生徒が手を動かし実際に実験してみる授業

演習:先生と生徒がディスカッションし双方向性のある授業

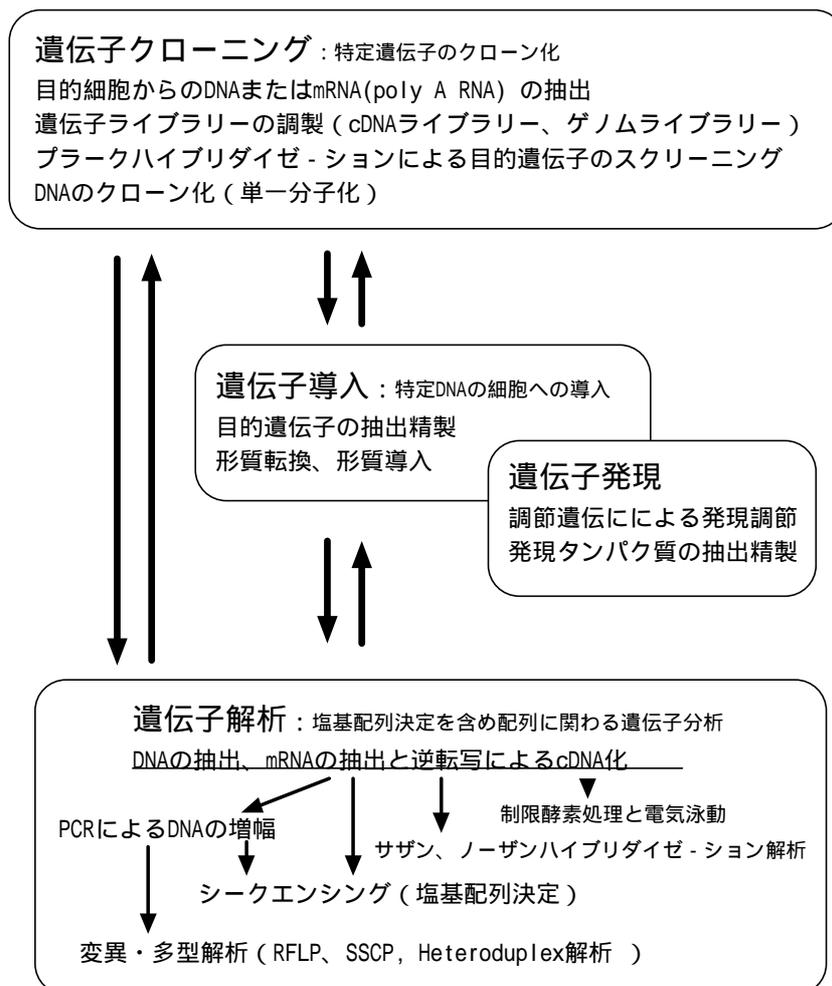
Biotechnology Explorer:米国 Bio-Rad Laboratories 社が開発販売している遺伝子教育用教材 (<http://explorer.bio-rad.com>)

4. 実験の背景と予備知識

4-1. 遺伝子工学と実習の位置付け

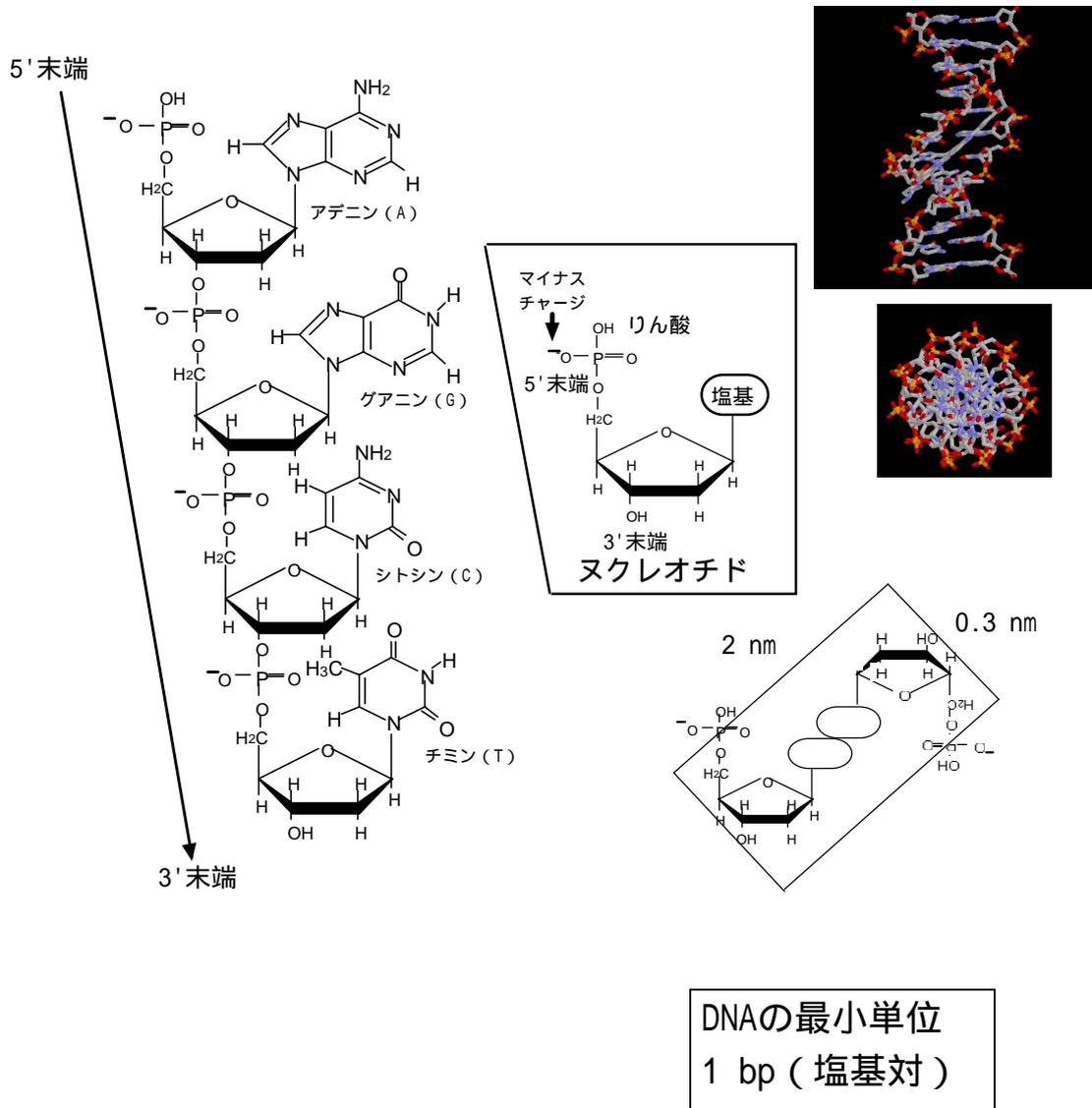
遺伝子工学実験には、特定の遺伝子クローンを得る遺伝子クローニング、得られたクローン化遺伝子を他の細胞に入れる遺伝子導入、更に遺伝子の多型、変異、塩基配列を決める遺伝子解析がある。これらの実験のうち、いわゆる組換え DNA 実験と呼ばれるものは、遺伝子クローニングならびに遺伝子導入実験である。

Biotechnology Explorer では、オワンクラゲが持つ蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を大腸菌へ導入し大腸菌を形質転換する。この大腸菌内で GFP を発現させ光る大腸菌を作製する。この授業では、組換え実験の原理、遺伝子組換え実験の規則、実験の結果評価のやり方、遺伝子発現とセントラルドグマ、発現調節の仕組みを学ぶことができる。



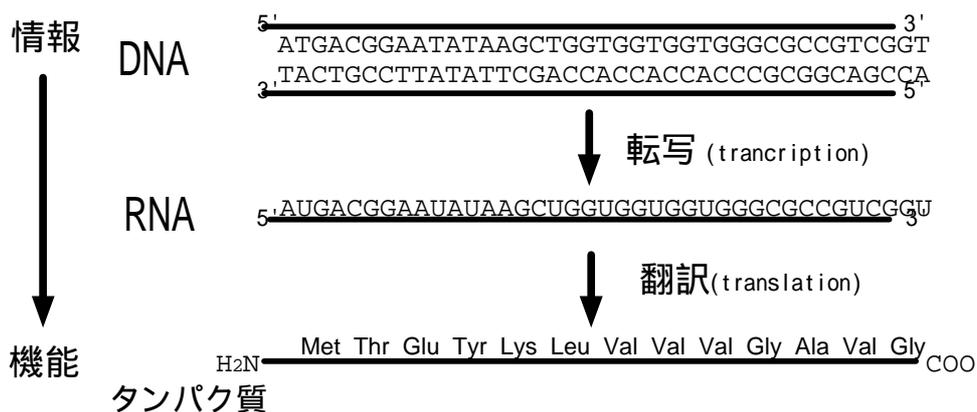
4-2. DNA とは

DNA は、デオキシリボースという糖に 4 種類の有機塩基並びにりん酸が結合したヌクレオチドがりん酸エステル結合した高分子である。この 4 種類の塩基の配列が遺伝情報をになっている。分子構造は繰り返し構造(下図)であり、解析しやすい。重らせんを形成に当たっては、GとC(水素結合 3つ)、AとT(水素結合 2つ)が、対となって結合する。 GC の含量は DNA の安定化に寄与している。また、りん酸のマイナスチャージは電気泳動で解析する場合に有効に作用する。



4-3. セントラルドグマとコドン表

DNA から RNA に転写され、更にタンパク質に翻訳される。この流れはレトロウイルスを除く生物に共通である。遺伝情報は、この流れに沿って機能をもつタンパク質へと翻訳されていく。



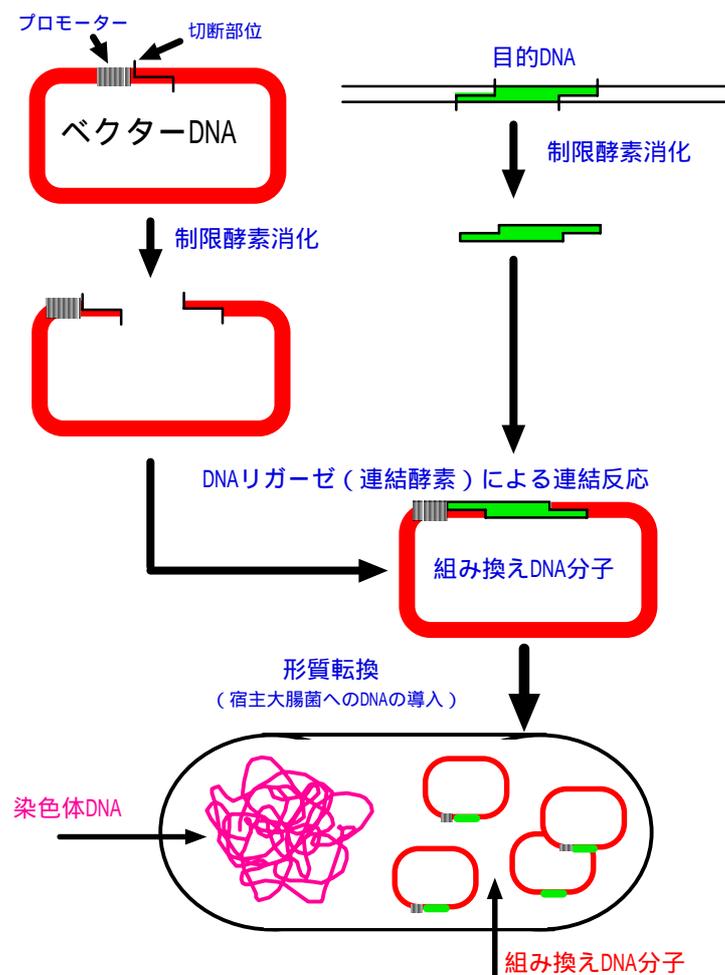
コドン表

DNA の塩基配列(A, G, C, T)は3塩基を1単位(コドン)としてアミノ酸に翻訳される。コドン表は、この暗号解読表である。(コドン表では、RNAのAGCUで表わしてある。)このコドン表は、基本的に全ての生物に対し共通である。

第一塩基	第二塩基				第三塩基
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	-	-	A
	Leu	Ser	-	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

4-4. 組換え DNA 実験

ゲノムまたは cDNA ライブラリー、PCR 産物などから目的 DNA を制限酵素にて切り出す。一方プラスミドなどのベクターDNA も同じ制限酵素で切断した後、目的 DNA とベクター DNA を連結酵素(DNA リガーゼ)にて連結する。この分子を組換え DNA 分子という。この組換え DNA 分子を宿主細胞(下図では大腸菌)に導入することで、組換え DNA をもつ細胞ができる。ベクターのプロモーター領域の下流にコドンに合わせて目的遺伝子を組み込んだ場合、遺伝情報に従い組換えタンパク質が宿主細胞のタンパク質合成系を用いて合成される。種を超えて組換え実験ができる前提は、全ての生物において遺伝子は4種類の塩基を持つDNAで構成されており、塩基配列とアミノ酸の種類の関係(コドン表)も生物種を超えて共通であることによる。

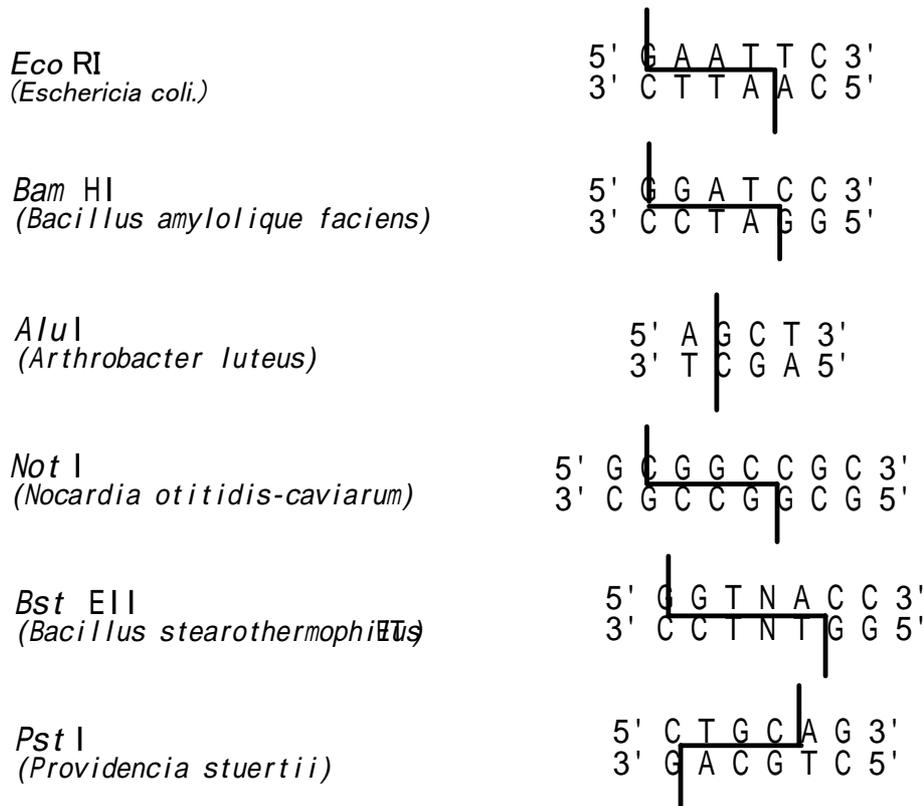


4-5. 制限酵素と連結酵素

制限酵素

DNA を切断する酵素 (DNA 分解酵素 : DNase) には、DNA 鎖の途中を切断するエンドヌクレアーゼ (endonuclease) と DNA 鎖の末端から切断するエキソヌクレアーゼ (exonuclease) がある。エンドヌクレアーゼのうち、特定の塩基配列を認識し、この部位を特異的に切断する酵素を制限酵素 (restriction endonuclease) という。制限酵素は、現在までに 100 種類以上が精製され市販されている。

制限酵素には、4 塩基認識、6 塩基認識、8 塩基認識など色々な種類がある。何れも

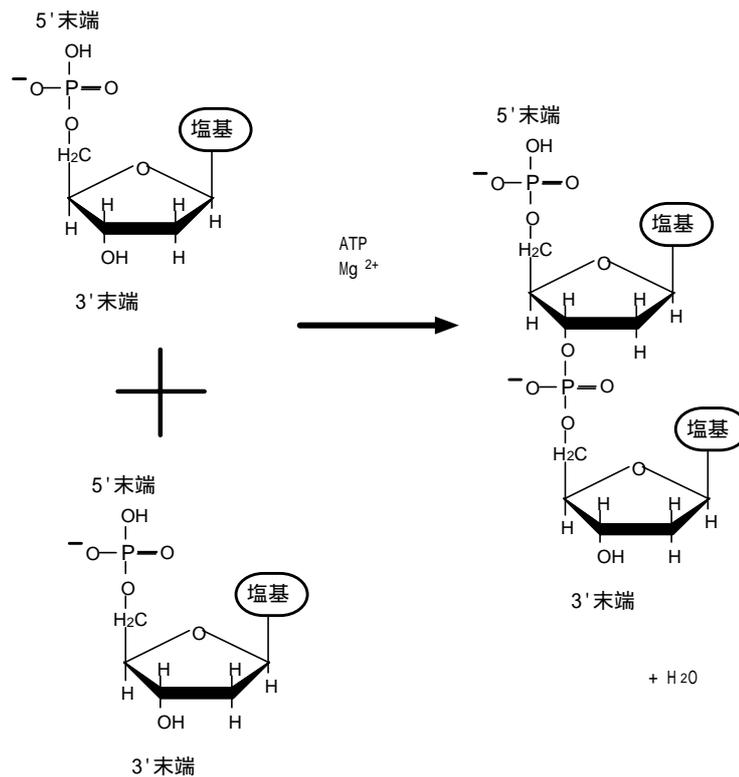
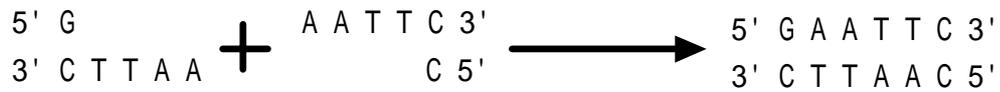


認識配列は回文構造 (palindorome) を持っている。命名は、その酵素が存在する微生物の名前に由来している。属名と種名の最初の 2 文字のイタリック体で示し、1 種類の菌で 2 種類以上の制限酵素が存在するときは、ローマ数字を付け区別する。

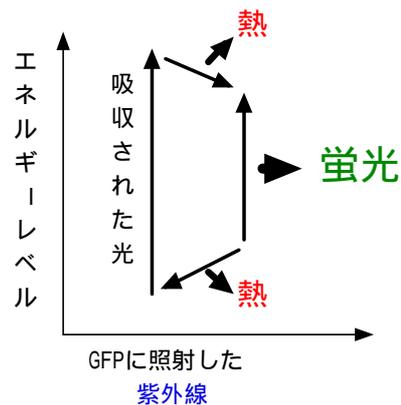
また切り口は、5'または 3'側に突出している付着末端 (cohesive end) や平滑に切断される平滑末端 (blant end) がある。

連結酵素

2本の異なるDNA鎖の3'-OHと5'-りん酸基を、ホスホジエステル結合で連結させる、いわば糊の役割をする酵素をDNAリガーゼ (DNA ligase: 連結酵素)という。よく用いられるDNAリガーゼには、大腸菌DNAリガーゼ、T4DNAリガーゼがある。前者は、付着末端同志の連結に適し、後者は平滑末端同志の連結もできる。これらの酵素も各メーカーから市販されている。



4-6. Green Fluorescent Protein (GFP) とは

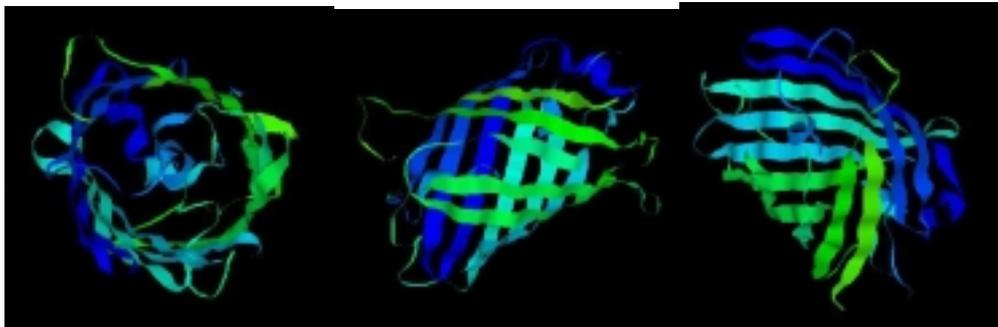


GFP は発光オワンクラゲ *Aequorea victoria* に含まれる緑色蛍光タンパク質である。オワンクラゲにはフォトサイト と呼ばれる発光組織があり、この組織中にイクオリンと GFP の 2 つの発光分子が結合して存在している。外部から刺激を受けた場合、イクオリンにカルシウムが結合し、エネルギーが生産される。そのエネルギーが GFP に受け渡されて緑色の蛍光を発する。一方、単離された GFP にエネルギーの高い紫外線を照射した場合でも GFP は、蛍光を発する。

GFP は、27kDa(分子量:27000)の籠状のタンパク質で分子内部に発色団をもっている。このため紫外線を当てると照射された光のエネルギーの一部を蛍光として放出し GFP タンパク質自身が蛍光を発する。蛍光は、始めに照射した光よりもエネルギーの低い光(長波長)となる。

注: $E=Nhc/\lambda$:エネルギーは光の波長に反比例する。つまり紫外線のような波長の短い(青色系の)光のエネルギーは高く、赤外線のような波長の長い(赤色系の)光のエネルギーは低い。

E:エネルギー、 λ :波長(nm)、N:アボガドロ数(6.02x10²³)、h:プランク定数(1.58x10⁻³⁷ kcal/mol)、c:光速(3x10⁸ m/s)



GFP の分子構造

4-7. プラスミド pGLO の構造

プラスミド pGLO は、オワンクラゲ由来の GFP 遺伝子の他に GFP 遺伝子を発現させるため、アラビノースオペロンのプロモータ(PBAD)配列および発現調節に関わるタンパク質(Ara C)の遺伝子 *Ara C*、さらに抗生物質アンピシリンを分解する酵素(β ラクタマー (Bla)をもつ 537bp)の遺伝子組換えプラスミドである。このプラスミドが導入された大腸菌は、アンピシリンを含む培地に植えることにより選択的に生育させることができる。

注:

プロモータとは、RNA ポリメラー

であるが結合する配列のこと

β ラクタマー lactamase、Beta lactamase(β)は、アンピシリナー ampicillinase)ということもある。

ぜ(

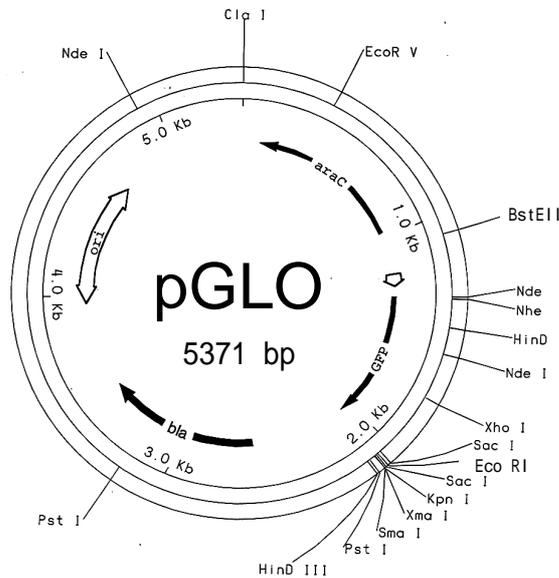
β ラクタマー (Bla)をアンピシリンの阻害遺伝子ということもある。

oriとは、複製開始点である。

プラスミド pGLO の全塩基配列は、参考資料参照

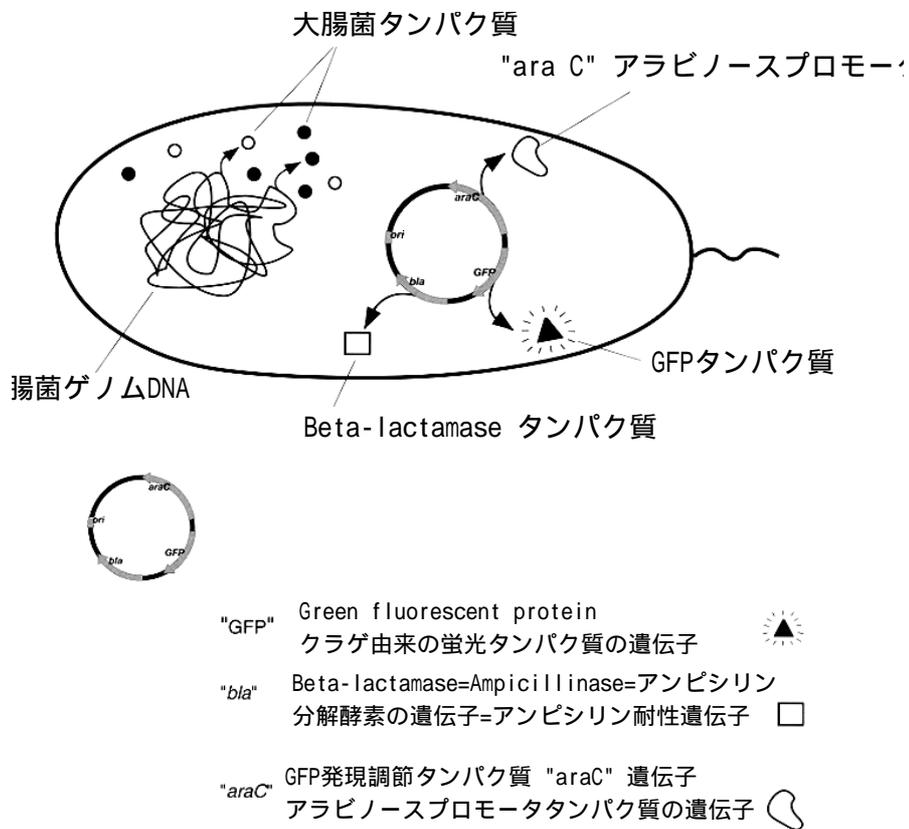
なお、遺伝子を英文字で現す場合、斜体字で表示する。

GFP: GFP タンパク質 *GFP*: GFP 遺伝子



4-8. pGLO プラスミド導入大腸菌におけるタンパク質の発現

GFP 遺伝子を含むプラスミド pGLO を大腸菌に導入し形質転換 (Transformation)した場合、GFP ばかりでなく Beta-lactamase やアラビノースプロモータ結合タンパク質も発現される。形質転換した大腸菌では、Beta-lactamase が発現されるためにアンピシリンを含む培地でも生育できる。また、GFP の発現は、培地にアラビノースが存在するか否かによって調節される。アラビノースが存在しない場合は、GFP 遺伝子が菌体内に存在するにも関わらず、発現はしない。言い換えれば、情報があるにもかかわらず、機能はしないということである。

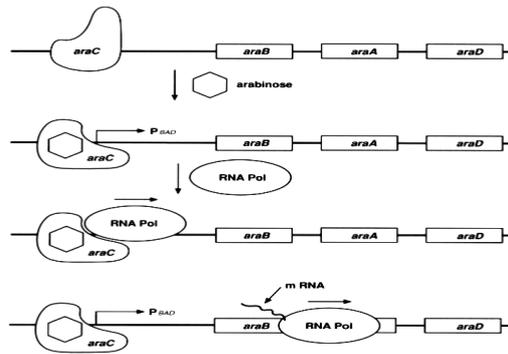


4-9. アラビノースオペロンと遺伝子発現調節

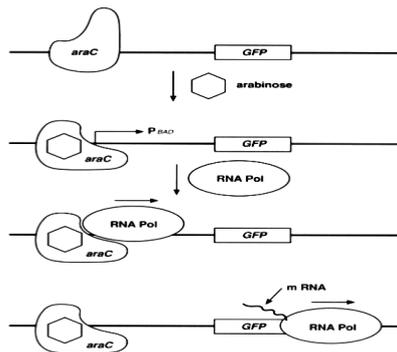
アラビノース分解酵素遺伝子を含むアラビノースオペロンには、分解酵素の遺伝子である *araB*, *araA*, *araD* およびプロモータ配列である PBAD が存在する。発現調節は、タンパク質 AraC で行われている。培地にアラビノースが存在しないとき、AraC は PBAD の付近に結合している。しかしアラビノース存在下で、AraC の立体構造が変化することにより PBAD が露出し、PBAD に RNA ポリメラーゼが結合することで構造遺伝子が発現する。このように AraC タンパク質は、*araB*, *araA*, *araD* という構造遺伝子の発現調節を行っている。

一方プラスミド pGLO では、*araB*, *araA*, *araD* の代わりに、オワンクラゲの GFP 遺伝子が組み込まれている。そこで GFP の発現は、AraC タンパク質により調節されている。培地にアラビノースを加えるか否かにより GFP の発現調節を行うことができる。

アラビノースオペロン



GFPタンパク質の発現



4-10. プロモータ配列と遺伝子発現

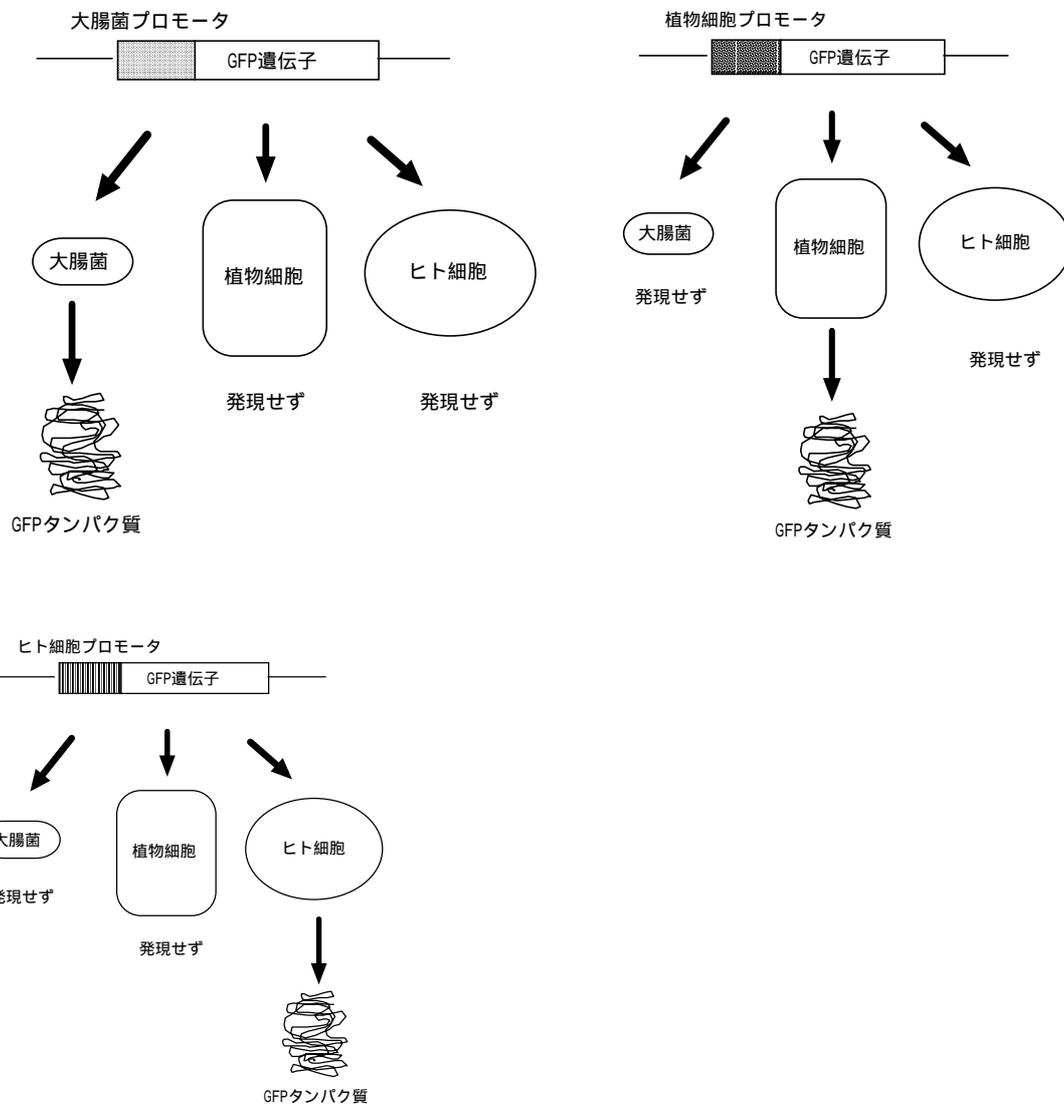
生物種によりプロモータ配列や調節遺伝子は異なる。実験では、大腸菌のプロモータ配列 PBAD を含むプラスミドベクター

GFP 遺伝子を組み込んだしかし、

このプラスミドを植物細胞やヒト細胞に導入して培地にアラビノースを加えても GFP は発現しない。これは、生物種ごとに RNA ポリメラー

も異なりプロモータ配列

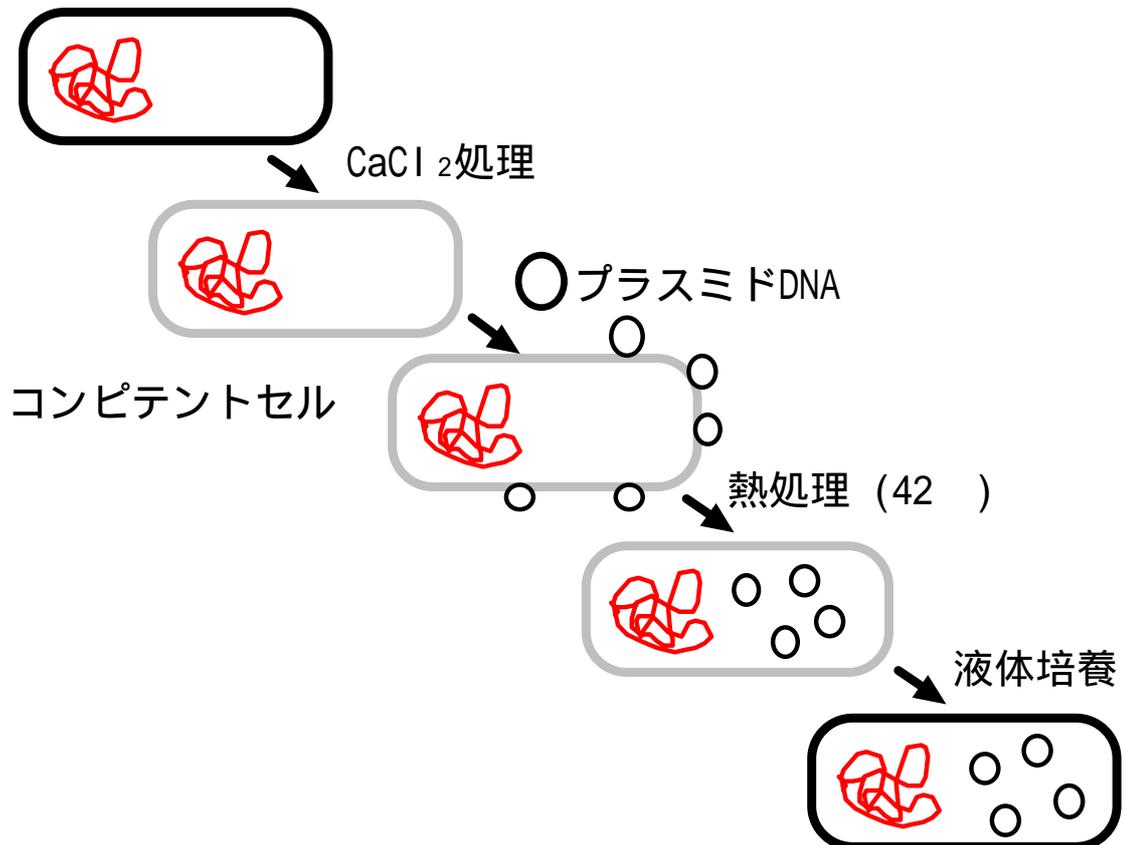
めである。下図において、大腸菌プロモータ配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、大腸菌のみで発現している。一方、植物細胞プロモータ配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、植物細胞のみで発現する。ヒト細胞でも同様である。



4-11. 大腸菌への遺伝子導入

大腸菌は細胞膜および細胞壁をもち、通常、プラスミドのような大きな分子は内部に取り込めない。大腸菌を 50 mM の CaCl_2 処理することによりプラスミドを取り込めるコンピテント細胞 (competent cell) を調製することができる。更に Ca^{2+} イオンにより DNA のマイナス電荷が中和されると同時にマイナス電荷をもつ細胞表面からの反発が除かれプラスミド大腸菌表面に吸着した後に効率良く大腸菌の中に取り込まれる。実験に際しては、 42°C での熱処理を短時間おこなうことで膜の流動性が変わり導入効率をあげることができる。実験で用いる形質転換用緩衝液が、50 mM CaCl_2 を含む溶液である。

コンピテントセルを用いた化学的遺伝子導入法



4-12. 教育目的組換え DNA 実験に際しての注意点

教育目的組換え DNA 実験を行う大前提は、実験申請手続きが済んでいることである。手続きを確認した後、実際の実験に際しては、実験系、実験者、実験室環境を守るために幾つかの注意が必要である。

- ① 実験中は、ドアを閉めて閉鎖系にする。
- ② 実験前および実験後には、必ず手を洗う。
- ③ 実験台は、70%エタノール溶液を噴霧し殺菌してから使用する。
- ④ 実験に使用する水は、蒸留水、イオン交換水もしくはこれらよりも高純度な水を用いる。
- ⑤ 使用する器具、試薬は、予め全て滅菌する⁽¹⁾。
- ⑥ プラスミド DNA を扱う場合は、会話しないなどの注意を払い唾液からの DNase の混入を避ける⁽²⁾。
- ⑦ 使用した菌、プレート、器具、試薬は、全てオートクレーブ滅菌⁽¹⁾もしくはそれに準じた方法にて滅菌し、廃棄⁽³⁾する。
- ⑧ 紫外線を使用する際には、ゴーグルもしくはフェイスシールドを使用して目を保護する。

(1) 滅菌

キットを用いる場合、キット中の器具、試薬は予め滅菌してある。しかし、ピペットやチューブなどをキット以外に購入し使用する場合は必ず滅菌してから用いる。この滅菌は、菌のコンタミを防ぐばかりでなく混入した DNase を失活させる目的がある。また、実験後にも同様に滅菌する。滅菌方法には以下の方法があるが、主に用いる方法は、オートクレーブ滅菌である。

○高圧蒸気滅菌;オートクレーブ滅菌(121 °C、15-20 分)

実験前では、タンパク質成分など熱に弱い物質を含まない溶液の滅菌に用いる。また、ポリプロピレン製のチューブ、チップ、更にはマイクロピペットを滅菌する時にも用いる。チューブ・チップなどの場合、オートクレーブ滅菌後 60°C程度で乾燥させてから使用する。実験後には、使用したチューブ、ピペット、プレート、菌を含む培地など全て滅菌する。(ポリスチレンやポリエチレンの器具は、熱に弱いのでオートクレーブでは、滅菌できない。

オートクレーブが設置されていない施設では、圧力釜などで代用することも可能である。

○乾熱滅菌(160 °C、1-2 時間)

乾熱滅菌器を用い、主にガラス器具の滅菌に用いる。

○火炎滅菌

火で直接あぶる。白金耳の滅菌など植菌の際に用いる。

○ろ過滅菌

0.22 μ のニトロセルロースフィルターなどで溶液をろ過する。オートクレーブにかけられない血清タンパク質や抗生物質を含む溶液の滅菌(除菌)に用いる。

○ガス滅菌

エチレンオキサイドガスで置換し滅菌する。熱に弱いプラスチックプレート(ポリスチレンやポリエチレン製)の滅菌に用いる。通常の使い捨てプラスチック製品すは、すでにガス滅菌してある場合がある。

オートクレーブ滅菌の際の注意:タンパク質や抗生物質などの熱に弱い成分を含む溶液を滅菌する場合、抗生物質などは溶液をオートクレーブした後に添加する。

(2) DNA 分解酵素

DNA は安定な物質であるが、 Mg^{2+} イオン依存性の DNA 分解酵素(DNase)により簡単に分解されてしまう。DNA 分解酵素は、細胞内ばかりでなく唾液・血液・その他の体液中にも存在し、実験中に実験者から混入する場合がある。これを防ぐためには、実験系にキレート剤である EDTA を添加し、実験中会話をしないようにする。

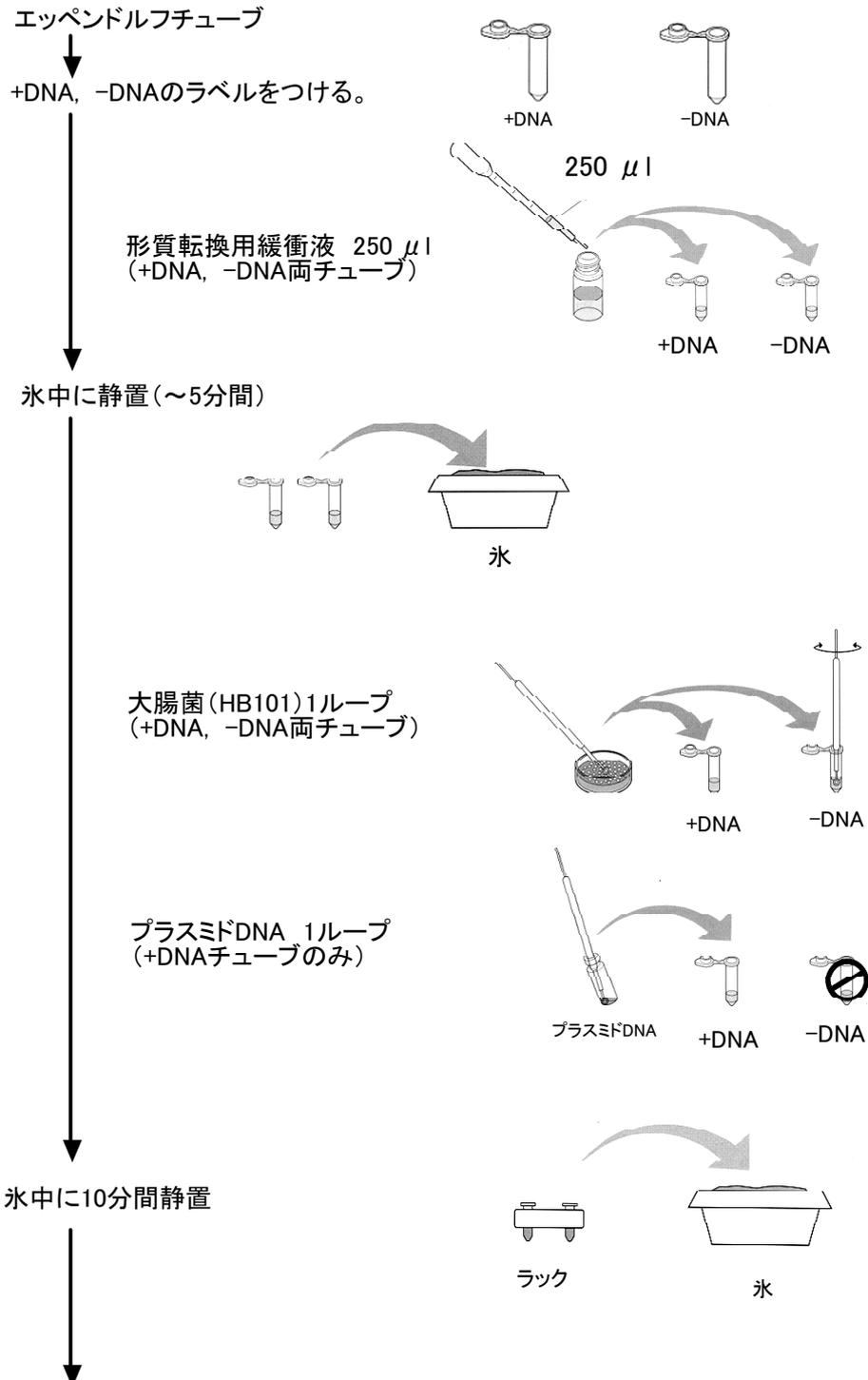
(3) 実験終了後の器具・試薬・大腸菌の処理方法

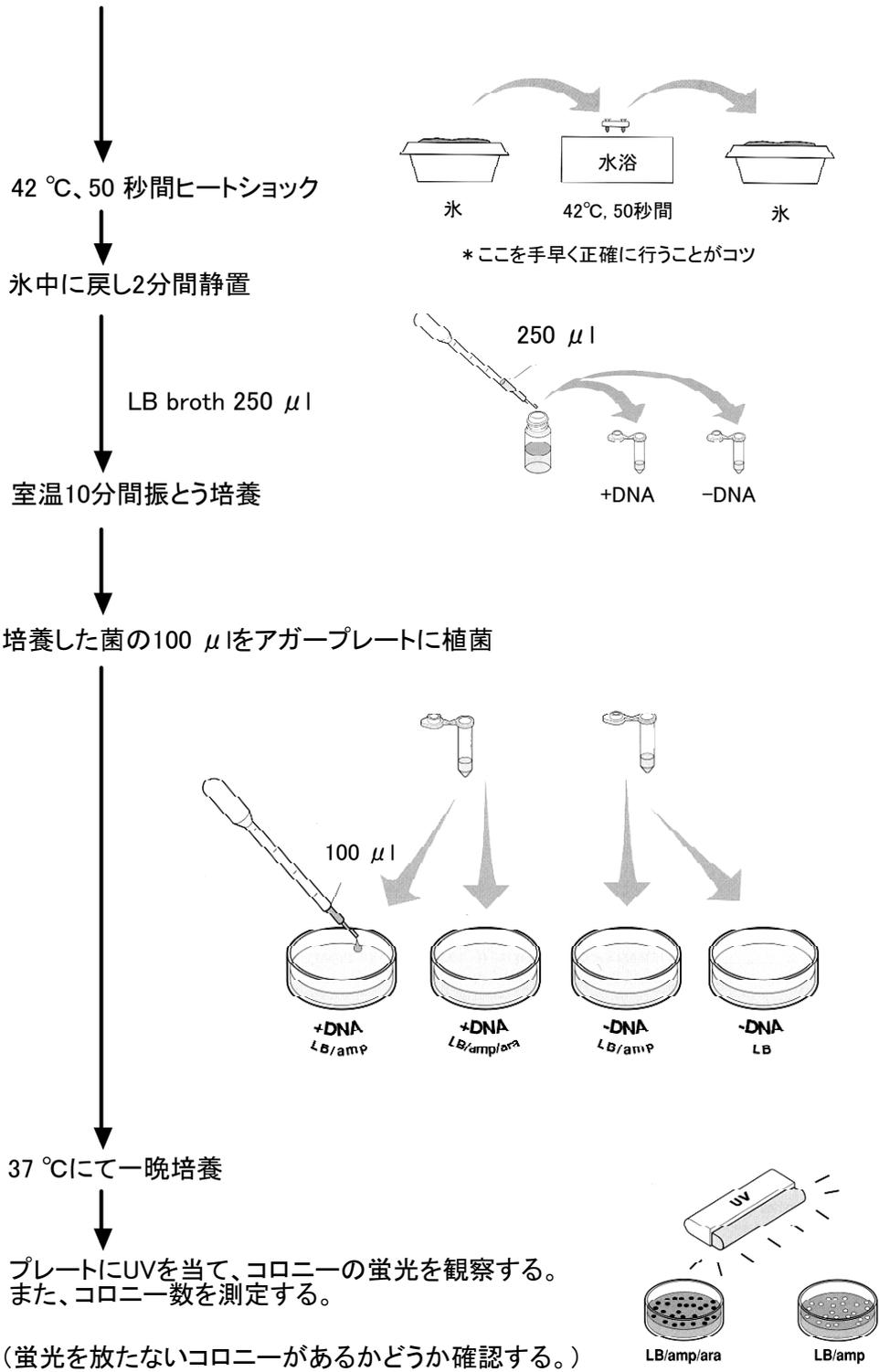
組換え実験に使用した器具／試薬／組換え大腸菌などは、全て滅菌してから廃棄する。滅菌方法は、オートクレーブ滅菌が原則である。

菌をまいたプレートは、オートクレーブ滅菌後、最終的には産業廃棄物業者に処置してもらおう。ゴミの処理方法は、各都道府県により方法が異なるため、各地区の方法に沿って行う。

実験を実施する施設で、廃棄物処理のプロトコールを事前に作製しておくとい。

5. 組換え DNA 実験(形質転換)



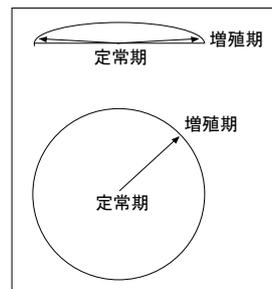
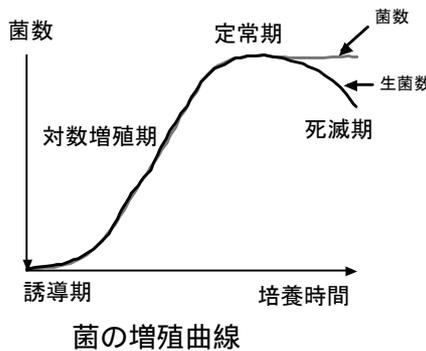


5-1. 実験のポイント

実験の各ステップでのポイントを示す。実験の各ステップでどのような反応が起こっているかも同時に示す。

① 使用する菌の増殖状態と数

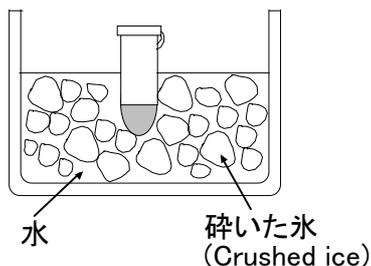
スタータープレートにおける大腸菌の増殖状態と数は、形質転換効率に影響する。実験には前日から培養した増殖中の菌を用いる。コロニーの大きいものを選び、充分量の1ループを採取する必要がある。コロニーの周縁部の菌は、増殖が盛んな状態(増殖曲線の対数増殖期)である。このため大きいコロニーを選べば増殖の盛んな菌を多く採取できる。長期間培養した菌は増殖状態が悪いため用いない方がよい。



一つのコロニーにおける菌の増殖

② 菌を形質転換緩衝液に添加した後、氷中で保温

形質転換緩衝液は、塩化カルシウム(CaCl_2)溶液であるため、懸濁した菌は不安定な状態にある。特にプラスミドを混ぜる時やヒートショックを行う際には、氷中に静置し室温に放置しないように注意する。製氷機で作製した氷を使用できない場合は、氷を木槌などで十分に破碎(crushed ice)し、更に水を加え、チューブが十分に氷に接する状況を作ることが大切である。また、いずれの場合でも、氷の表面をアルミホイルで覆い、アルミを貫いてチューブを立てると氷の温度が一定しチューブも安定する。



アルミホイルで氷を覆った場合

③ プラスミド DNA を確実に採取

プラスミド DNA を、1ループ確実に採取する。この際、ループにプラスミド DNA 溶液は“シャボン玉”のように表面張力で付着しているの自分で見て付着していることを確認してから菌に添加する。採取後に“シャボン玉”が割れてプラスミド DNA 溶液が採れない場合がある。

④ ヒートショック

ヒートショックは、氷中 > 42°C・50秒 > 氷中、と連続的に温度差をつけなければならない。この温度差により大腸菌の膜の流動性が変化しプラスミド DNA が菌の中に入り込める。42°C 処理前に室温に出してしまうと菌は弱まり、ヒートショックにもならないために形質転換の効率が低下するので注意する。

⑤ LB broth 添加後の放置

放置中に β lactamase が発現する。この放置を行わなければ、(抗生物質耐性が得られず) 抗生物質は分解できず、抗生物質存在下で生育できない。

⑥ 液の混合

バイオ系実験では、混合が重要である。この実験においても菌と DNA の混合(懸濁)を充分に行う。ただし、混合の際、室温に戻ってしまうと菌の状態が悪くなり形質転換の効率が落ちるために注意する。

5-2. 実験結果のまとめ

Biotechnology Explorer キットのテキストでは、実験授業を50分ずつに分けて各々目標を設定し、授業後に確認試験を行う形式である(キットテキスト3ページ参照)。本研修では、Lesson 3、4の一部についてテキストに従い実施してみる(Explorer キットのテキスト:22-28ページ、40-46ページ)。

まとめのポイント

① 情報と機能、セントラルドグマ

GFP 遺伝子(情報)を含むプラスミド DNA は、紫外線を照射しても蛍光を発しない(Explorer キットのテキスト17ページ)が、アラビノース添加培地のコロニーは紫外線で蛍光を発する。DNA は情報であり「蛍光を発する」という機能を持たないが、大腸菌に導入し GFP タンパク質を発現させると GFP タンパク質が蛍光を発する。

②発現調節

プラスミド DNA を導入した大腸菌は、アラビノースを含む培地中で培養すると、アラビノースが araC タンパク質と結合することで araC タンパク質の構造変化が起こりプロモータ配列 PBAD が露出する。このため GFP が発現する(本テキスト13ページ参照)。ここでアラビノースは発現スイッチの ON/OFF の役割を担っている。また、GFP 遺伝子(情報)が大腸菌内に存在しても発現しなければ、蛍光を発するという機能は起こらない。この際プロモータ配列が大腸菌のものであることが前提となる(本テキスト14ページ)。

③対照実験の置き方

抗生物質(アンピシリン)の効果、アラビノースによるタンパク質発現スイッチの ON/OFF、そもそも実験系が成立しているか否か(菌が入っているかどうか、実験の再現性はどうかなど)などは、どのプレート同志を比較したらよいか確認する。

④実験の再現性と形質転換効率

実験者全員のコロニー数のデータを比較し、形質転換効率の実験者間再現性を調べ、バラツキの原因を考察する。

注:

形質転換効率について

ライブラリーから特定 DNA 断片をクローニングする際には、少量のプラスミド DNA ライブラリーから、より多くのコロニーを作らせてスクリーニングする必要がある。通常、菌(宿主)とベクター(プラスミド)との組み合わせやコンピテント細胞による形質転換効率を評価し効率の高い系を用いて実験する。この評価は実験に用いたプラスミド DNA 量と形成されたコロニー数から計算し、プラスミド DNA1 μ g 当たりで形成されるコロニー数として比較することで行う。

本実験の場合、同じ実験条件で充分量のプラスミド DNA を用いて行っているため、実験者間の形質転換効率は、形成されたコロニーの数をみて比較できる。

⑥ 菌の増殖

形質転換後、翌朝すぐに観察する。更に昼食時、研修終了時に観察しコロニーの大きさや蛍光の具合を観察する。菌の増殖に従いコロニーは大きくなり蛍光強度も強くなるはずである。

6. どのような授業をおこなうか

教育用キットを授業に取り入れる場合、まず授業で何を教えたいかを明確にし、実行できるシラバスやコマシラバスを作製し授業計画する必要がある。同じキットであっても使い方しだいで様々な目的に使用できる。下記にいくつかの事例を示す。指導者は、授業の目的に沿った指導計画が必要であろう。

① 分子生物学の基本であるセントラルドグマを学ぶ

DNA は、情報であり mRNA を通じ、機能をもったタンパク質が作られる。(このキットの場合は、GFP が産生され蛍光を発する。) これを体験的に学ぶ。

<実験中の指導ポイント>

○プラスミド DNA に UV を当て、DNA は情報であり、蛍光を発する機能はもたないことを確かめる。

○アラビノースマイナスのプレートの大腸菌にも GFP 遺伝子は、導入されている。アラビノースを加えなければ、GFP は作られないことを確かめる。

○アラビノースを加える遺伝子発現調節により、初めて GFP タンパク質が作られて蛍光を発するという機能が生まれることを体験する。

アラビノースを加えていない培地で培養し、後からアラビノース溶液をコロニーに降りかける実験を行うことで、発現調節が更に明確になる。また、大腸菌から GFP を粗抽出し、熱処理で蛍光が消失する実験を行うと GFP がタンパク質であることが解る。

○更に発展させて、ゲノムは、情報であり細胞で一意的に決まるが、各細胞での発現状態を反映したトランスクリプトームさらにはプロテオームは発現調節によりきまる話題にも迫る。

② 実験を体験し生命科学への興味を促し、更に学ぶための動機付けとする。

<実験中の指導ポイント>

○キットに含まれている簡単な試薬で細胞内へ遺伝子を導入し形質転換が自分の手で行えることを体験する。

○たとえ簡単な実験であっても、組換え体を取り扱うことを意識できるように安全な廃棄物の処理も体験する。

○細胞内への遺伝子の導入は、組換え植物の作成や遺伝子治療など多くの応用技術がある。新聞や啓蒙書に記載されている身近な内容を含め、この体験実験の先にある講義を含めて実施する。

③ 組換え DNA 実験の基本技術を学ぶ

<実験中の指導ポイント>

○試薬の滅菌を行い、パスツールピペットの代わりにマイクロピペットを用いるなど、この教育用キットの試薬や器具は用いるものの実施方法は、研究レベルの組換え DNA に即して行う。

○滅菌・廃棄物処理含め自分で準備し、実験し、廃棄するところまで実施する。

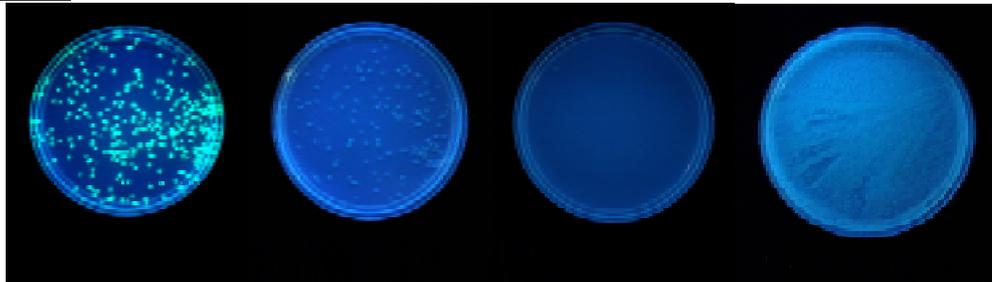
○マイクロピペット検定など実験操作自体の評価も含めて実施する。

○コントロール実験の設定など、実験系を組む場合の基本も盛り込む。

実際の授業では、上記①、②、③の要素、更には指導者がオリジナルで考えた要素を付け加えて実験授業を組み立てることになると思われる。

7. 実験結果例

形質転換



+DNA +DNA -DNA -DNA
LB/amp/ara LB/amp LB/amp LB

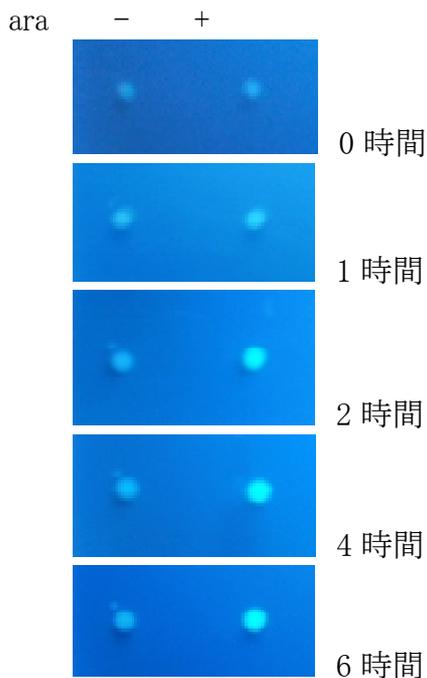
amp:ampicilline ara:arabinose DNA:plasmid

E. coli:大腸菌 K12 株 HB101

LB:LB 培地

アラビノースによる GFP 発現誘導

+DNA, LB/amp の系で培養した形質転換大腸菌のコロニーの内、孤立して隣接しているコロニーを選び、一方にアラビノース溶液をパスツールピペットで1滴垂らし、他のコロニーをコントロールとして、時間による蛍光強度を観察する。



8. 参考図書

8 1 . 実験に役立つ本

緒方宣邦／野島博著 「遺伝子工学キーワードブック」

絵や図をふんだんに取り込んであり、遺伝子工学やゲノム科学を勉強するには便利な辞書 羊土社 2000 ISBN4-89706-637-9

安藤昭一編著 「図解 微生物実験マニュアル」

バクテリア、カビ、酵母などの微生物に関する基礎的内容から、無菌操作や培養方法など微生物取り扱いの基本が実験操作の豊富な写真を用いて判りやすく解説。

技報堂出版 1993 ISBN4-7655-0223-6

大藤道衛著 「バイオ実験超基本 Q&A」

なぜ白衣は着るの？ DNA を扱う基本は何？データベースは実験でどのように使うの？遺伝子実験に必要な知識は何？バイオ支援企業ってどんな会社？など実験初心者に必要な超基本を Q&A 形式で解説 羊土社 2001 ISBN4-89706-659-X

Sambrook and Russell : “Molecular cloning A laboratory manual” 3rd ed.

この本の第 1 版 (Maniatis et al) は、遺伝子工学実験の原点であった。遺伝子工学実験プロトコールのバイブルとして、1980 年代初頭多くの遺伝子工学研究者が活用。第 3 版も試薬の調製方法から、ベクターの構造などあらゆる実験プロトコールが含まれている。更に、マイクロアレイや GFP テクノロジーについても触れている。

Cold Spring Harbor Laboratory press 2001 ISBN0-87969-577-3

URL: <http://www.MolecularCloning.com>

8-2. 米国高等学校生物学教科書

Leonard W. H. and Penick J. E.: “Biology A community context”

South-Western Educational Publishing Cincinnati, OH 1998 ISBN 0-538-65208

Greenberg J ed “BSCS Biology A molecular approach” 8th edition Everyday Learning Corporation Chicago, IL 2001 ISBN 0-538-69039-9

Campbell N. A. :”Biology” 4th edition The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park CA 1996 ISBN 0-8053-1957-3

Laboratory Manual “Biology: The Dynamic of Life” The McGraw-Hill company
ISBN 0-02-828251-5

8-3. 関連 URL

NCBI GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>



Cn3D <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>



RasMol <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>



Biotechnology Explorer <http://explorer.bio-rad.com>



9. 参考資料

9-1.ゲノム／遺伝子／DNA

○ゲノムとは、その生物の遺伝情報の1セットのことである。すなわち「その生物の設計図」である。生殖細胞(Haploid)では1セットの、体細胞(Diploid)では、2セットのゲノムがある。ゲノムの物質としての実体はDNAであり、情報を刻んでいる文字は、DNAの4種類の塩基、すなわちアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の配列である。ヒトの場合ゲノムは常染色体22対、性染色体1対の合わせて23対の染色体上にある。ヒトのゲノム1セットは、30億塩基対である。長さは約1メートルである。すなわちヒトの体細胞では、父親由来のゲノム1セットと母親由来のゲノム1セット、合計2セットの60億塩基対からなっている。ゲノムには、遺伝子ばかりでなく遺伝子以外のまだ機能が明らかになっていない配列も含まれる。すなわちゲノム=遺伝子ではない。なお、ゲノムという用語の由来は、gene+chromosome=genomeである。

実験においてゲノムDNA(genomic DNA)は、ヒトでいえば、体細胞から抽出したDNAのこと。また、大腸菌ではから取り出した染色体DNAである。これに対して実際に発現したすなわちmRNAとなったDNA配列は、mRNAから逆転写したcDNAとして得られる。

○遺伝子とは、DNAのうちタンパク質の情報をもっている配列である。一昔前に”1遺伝子1酵素”、”1遺伝子1ペプチド”という考え方があったが、基本的には一つの遺伝子は、一つのタンパク質の情報をもっている。しかし現在では、一つの遺伝子が複数のタンパク質の情報を持っていることもあると分かった。これはAlternative splicingにより一つの遺伝子の情報から複数のタンパク質ができることもあるためである。また、高等生物ではPost translational modification(翻訳後修飾)により多くのタンパク質が作られる。ヒトの場合、DNAには、タンパク質の構成成分であるアミノ酸配列の情報を持っているエクソン(exon)とその間を繋ぐイントロン(intron)という配列からなっている。遺伝子は、mRNAを介してあるタンパク質を作る(発現させる)ために必要な情報、すなわちプロモータ、エクソン、イントロン含めた配列である。ただし大腸菌のような原核細胞では、イントロンはない。ヒトの場合、30億塩基対のうちアミノ酸の情報をもっている配列は、2%程度といわれている。国際ゲノムプロジェクトにより、次々に各染色体の配列が決められ遺伝子も同定された。2000年6月26日には、ドラフトシーケンスは完成したとの発表がなされたことも記憶にあたらしい。1999年に発表された慶應義塾大学清水信義のグループの22番染色体(全体の約1%)の結果では、545個の遺伝子(1)が、また2000年に発表された理化学研究所ゲノム科学総合研究センターの榎佳之・

服部正平のグループの21番染色体(22番よりもやや大きい)が全体の約1%の結果では、225個の遺伝子が発見されている(2)。2001年2月の“Nature”には、ヒトの遺伝子数は当初の予想していた10万個よりもかなり少なく3万個程度と云われている(3)。

ODNAとは、核酸の一種で有機塩基、糖でできたヌクレオシド(nucleoside)が、リン酸を介してリン酸エステル結合した二重らせん構造の高分子ヌクレオチド(nucleoside)で遺伝情報を有機塩基であるアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の配列として持っている。DNAは、リン酸基があるため中性付近でマイナス電荷をもつ似た構造の繰り返し配列であるため、ゲル電気泳動で分析が可能となる。また、AとT、GとCの塩基同士は水素結合で特異的に結びついており熱や変性剤により変性し、変性剤を除くと再生する。更にG-Cでは、3本の水素結合が、A-Tでは、2本の水素結合をもつため塩基配列により結合の強さが違う。この性質を利用してPCRによる特定DNA配列の増幅やハイブリダイゼーションによる特異的な配列検出が可能となった。

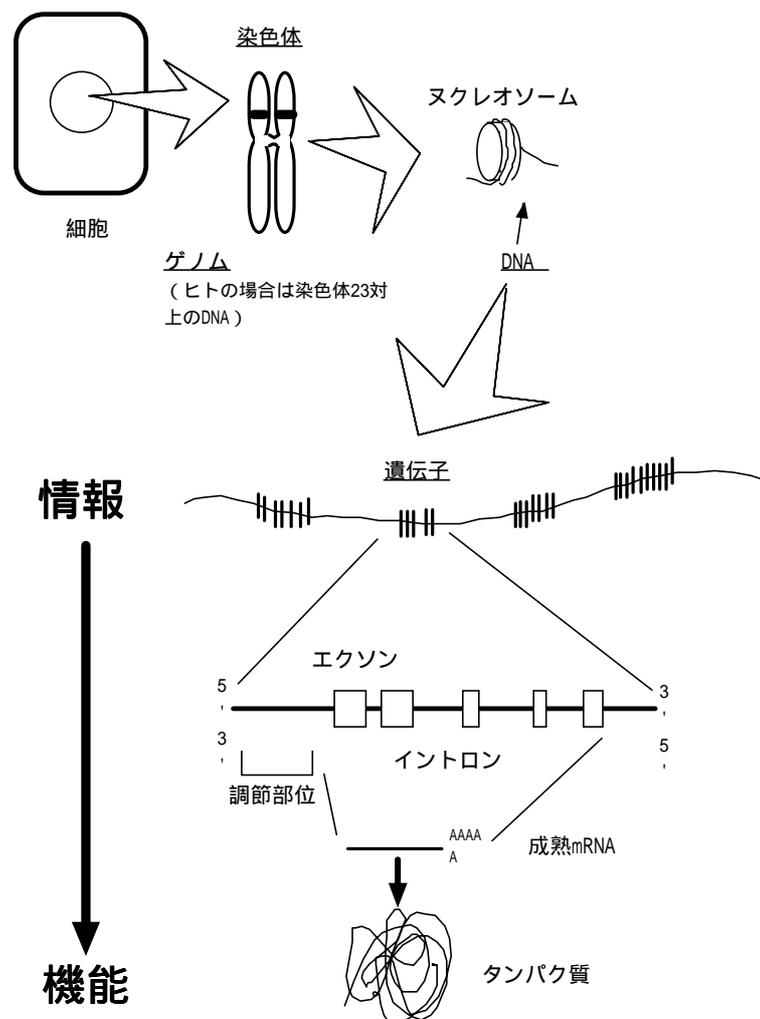
(1) Dunham, I. et al.: “The DNA sequence of human chromosome 22”: Nature, 402: 489-495, 1999

(2) HattorM. et al.: “The DNA sequence of human chromosome 21”: Nature, 403: 311-319, 2000

(3) International Human Genome Sequencing Consortium: “Initial sequencing and analysis of the human genome”: Nature, 409: 860-921, 2001

○遺伝子と発現

ヒトを含む高等生物では相同染色体がある。また遺伝子は、イントロンにより分断されたエクソンとして存在し、原核細胞である大腸菌とは、異なる構造を呈している(下図)。しかしどの生物においても遺伝子は、プロモータを含む調節配列で発現調節され、遺伝情報は機能をもつタンパク質と移行する。このプロモータの配列や調節配列は、生物固有の配列であるために、大腸菌で発現させた遺伝子を他の生物で発現させるためには、異なる調節配列を用いなければならない。

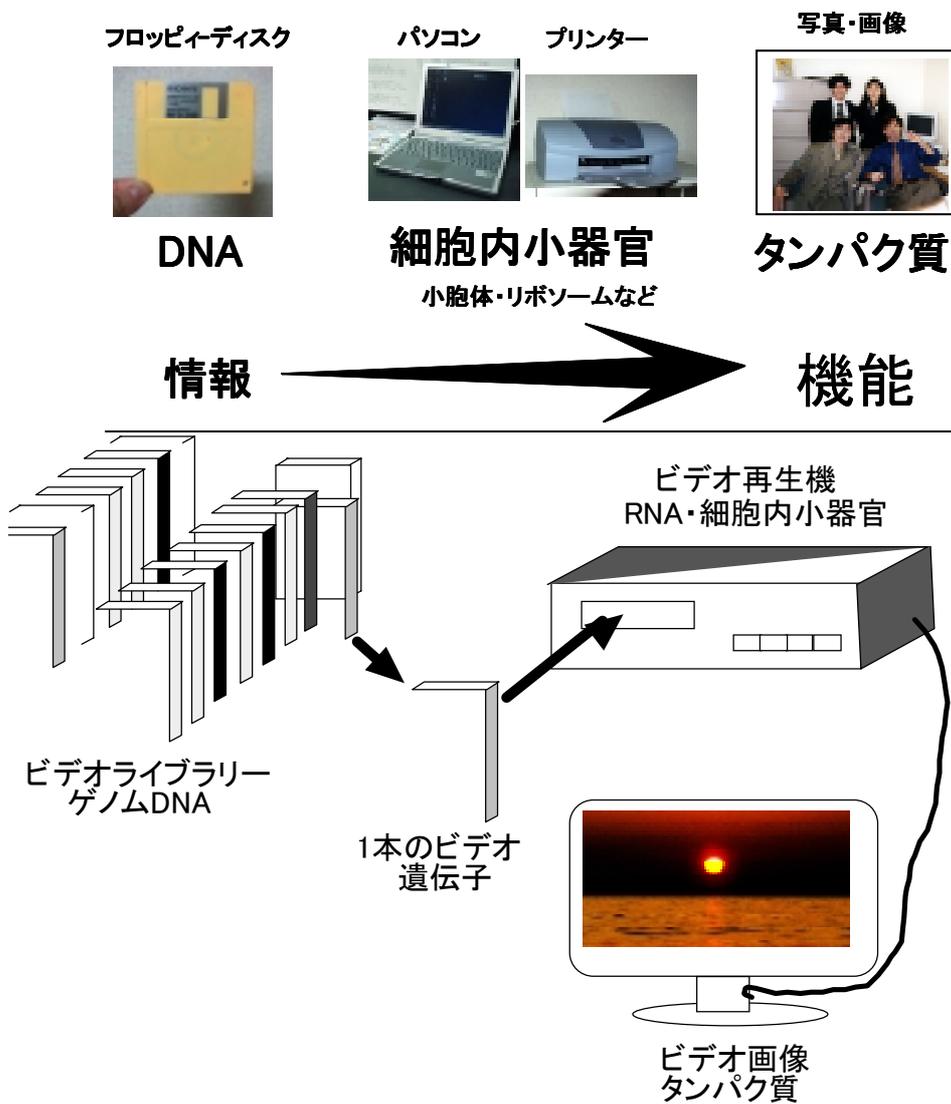


遺伝子とタンパク質の関係のたとえ話

DNA は、情報でありその中に遺伝子が含まれている。遺伝子が発現すると機能をもつタンパク質ができる。タンパク質同志の相互作用で生命現象が成り立ってくる。

下図のように、フロッピーディスクのデジタル情報(下記の例では写真情報)がパソコンやプリンターで実体である写真になることや、多くのビデオテープ(ゲノム DNA:情報)の中から特定のビデオテープ(遺伝子)を選び再生して映像という機能を発揮させる様子と似ている。

情報から機能へ =DNAからタンパク質へ



9-2.組換え体の封じこめについて

遺伝子組換え体は、自然界に存在しないものである。このため組換えDNA実験を行う場合、その宿主—ベクターのレベルに応じ異なる区域で実験する必要がある(物理的封じ込め)。また、宿主自体も特定の培養条件でなければ生育できないよう外界と区別されている(生物学的封じ込め)。

○ 物理的封じこめ(Physical containment)

物理的封じこめには、P1-4 のレベルがある。(P は、Physical の頭文字)組換え体の実験室外に漏出するのを防ぐための実験施設レベルである。

各レベルの概略を下記に記します。実験指針では、具体的なウイルスや細菌を取り扱う際の危険度、安全性等をふまえ、どの材料を使用する場合にはどの封じ込めレベルの施設で行えば良いかの基準が定められている。管轄省庁の組換え DNA 実験指針に詳細が記されている。

<P1 レベル>

オートクレーブ等の滅菌装置が設置された通常の微生物実験室で、実験中は窓や扉が閉められる区域。

教育目的組換え DNA 実験は P1 レベルの施設であれば問題なく実施できる。

<P2 レベル>

P1 レベルの条件に加え、安全キャビネットが設置、稼動できる区域。実験中は、“P2 レベル実験中”の表示を入りに掲げる必要がある。

<P3 レベル>

P2 レベルの条件に加え、実験室内を陰圧(空気が出入口から室内の方向に流れる状態)となる区域で、専用の無塵衣に着替えるための前室(他の区域と隔離できるように、前後の扉は同時に開かない構造であること)とエアシャワーなどが備えられている。また、実験区域の床や天井は容易に洗浄できるようになっている必要がある。

<P4 レベル>

P3 レベルの条件に加え、クラス III 安全キャビネット(クローブボックス)を使用する。実験室専用の給排気装置が備えられ、シャワー室も備えられている。

普通の研究所では、P2 か P3 レベルまでの施設を保有しており、P4 は日本国内に限られた施設だけです。

○生物学的封じ込め (Biological containmant)

特定の培養条件でなければ生育できない生物もしくは、組換え体が、万一実験室外に洩れでたとしても死滅してしまうような宿主、ベクターを用い、組換え体の拡散を防ぐ事。B1、2がある。(Bは、Biological containmantの頭文字)大腸菌 K12 株とプラスミドの組み合わせは、B1である。

教育目的組換え DNA 実験では、B1 レベルの系を用いる。

9-3. 組換え DNA 実験管理規則と安全委員会

研究目的で組換え DNA 実験を行う研究所などの施設では、管轄省庁の指針に基づいた組換え DNA 実験管理規則を作製し、安全委員会を設置して初めて実験ができる。

安全委員会は、組換え DNA 研究者、他の分野の研究者、人文社会研究者、医学研究者、医師などで事業所ごとに構成される。

しかし、PCR 実験や制限酵素処理と電気泳動、シーケンシングなど組換えを伴わない遺伝子実験は、この規則には関わらず実験ができる。

教育目的組換え DNA 実験では、文部科学省の組換え DNA 実験指針の教育目的組換え DNA 実験指針に従って実施することにより安全委員会の設置は必要ない。

9-4. プラスミド pGLO の全塩基配列と遺伝子のタンパク質配列

GenBank data より

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>

1: U62637 Cloning vector PubMed, Protein, Related Sequences, Taxonomy
pBAD-GFPuv,
complete sequence

LOCUS CVU62637 5371 bp DNA SYN 14-AUG-1996

DEFINITION Cloning vector pBAD-GFPuv, complete sequence.

ACCESSION U62637

VERSION U62637.1 GI:1490531

KEYWORDS .

SOURCE Cloning vector pBAD-GFPuv.

ORGANISM Cloning vector pBAD-GFPuv
artificial sequence; vectors.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5371)

AUTHORS Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.

TITLE Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA
shuffling

JOURNAL Nat. Biotechnol. 14 (3), 315-319 (1996)

MEDLINE 98294348

REFERENCE 2 (bases 1 to 5371)

AUTHORS Cramer, A. and Kitts, P.A.

TITLE pBAD-GFPuv complete sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 5371)

AUTHORS Kitts, P.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-1996) CLONTECH Laboratories, Inc., 1020 East
Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..5371

/organism="Cloning vector pBAD-GFPuv"

/db_xref="taxon:50707"
 gene complement(96..974)
 /gene="araC"
 CDS complement(96..974)
 /gene="araC"
 /note="PID: g455167"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="araC protein"
 /protein_id="AAC53662.1"
 /db_xref="GI:1490532"
 /translation="MAEAQNDPLLPGYSFNAHLVAGLTPIEANGYLDFFDI DRPLGMKG
 YILNLTIRQQGVVKNQGREFVCRPGDILLFPPGEIHHYGRHPEAREWYHQWVYFRPRA
 YWHEWLNWPSIFANTGFFRPDEAHQPHFSDLFGQIINAGQGEGRYSELLAINLLEQLL
 LRRMEAINESLHPPMDNRVREACQYISDHLADSNFDIASVAQHVCLSPSRSLSHLFRQQ
 LGISVLSWREDQRI SQA KLLLSTTRMPIATVGRNVGFDDQLYFSRVFKKCTGASPSEF
 RAGCEEKVNDVAVKLS"
 gene 1342..2061
 /gene="gfpuv"
 CDS 1342..2061
 /gene="gfpuv"
 /note="GFPuv is the GFP variant called 'cycle 3'; Allele:
 AC2; green fluorescent protein variant"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="GFPuv"
 /protein_id="AAC53663.1"
 /db_xref="GI:1490533"
 /translation="MASKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
 LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFK
 DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI ELKGI DFKEDGNI LGHKLEYNYNSHNVIYITADKQKN
 GIKANFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH
 MVLLEFVTAAGITHGMDELYK"
 gene 2636..3496

```

CDS          /gene="bla"
            2636..3496
            /gene="bla"
            /function="confers resistance to ampicillin"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="beta-lactamase"
            /protein_id="AAC53664.1"
            /db_xref="GI:1490534"
            /translation="MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGY
            IELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVE
            YSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAFLHNMGDHVTRL
            DRWEPELNEAIPNDRDRTMPAAMATTLRKLITGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPL
            LRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIIVVIYTTGSQATMDERNRQIA
            EIGASLIKHW"

```

BASE COUNT 1369 a 1368 c 1300 g 1334 t

ORIGIN

```

   1 atcgatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcagggg tcttgcaaac cctatgctac
  61 tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcggt accaattatg acaacttgac ggctacatca
121 ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggg gcatttttta
181 aataccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata
241 ggcatccggg tggtgctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctcgcgccag
301 cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag
361 caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccaggtg atcgctgatg
421 tactgacaag cctcgcttac ccgattatcc atcggtggat ggagcgactc gttaatcgct
481 tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc
541 cttcccctt gcccgcgctt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggctggtgc
601 gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgatttg gcaaatttg acggccagtt aagccattca
661 tgccagtagg cgcgcgagc aaagtaaacc cactggtgat accattcgcg agcctccgga
721 tgaccaccgt agtgatgaat ctctctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa
781 acaaattctc gtccctgatt tttcaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata

```

841 taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccggtt ggcctcaatc
901 ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt
961 tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaccaa ttgtccatat
1021 tgcacagac attgccgtca ctgctctttt tactggctct tctcgtaac caaacggta
1081 accccgctta ttaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgct
1141 aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttga cggcgtcaca
1201 ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta
1261 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagaataa tttgtttaa
1321 cttaagaag gagatataca tatggctagc aaaggagaag aacttttcac tggagtgtc
1381 ccaattcttg ttgaattaga tggatgatt aatgggcaca aattttctgt cagtggagag
1441 ggtgaagggtg atgctacata cggaaagctt acccttaaat ttatttgac tactgaaaa
1501 ctacctgttc catggccaac actgtcact actttctctt atggtgttca atgcttttcc
1561 cgttatccgg atcatatgaa acggcatgac ttttcaaga gtgcatgcc cgaaggttat
1621 gtacaggaaac gactatatac tttcaagat gacgggaact acaagacgag tgctgaagtc
1681 aagtttgaag gtgataacct tgftaatcgt atcgagttaa aaggattga tttaaagaa
1741 gatgaaaca ttctcggaca caaactcgag tacaactata actcacaca tgtatacatc
1801 acggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gctaacttca aaattcgcca caacattgaa
1861 gatggatccg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggccct
1921 gtcttttac cagacaacca ttacctgtcg acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac
1981 gaaaagcgtg accacatggt ccttcttgag ttgttaactg ctgctgggat tacacatggc
2041 atggatgagc tctacaaata atgaattcga gctcgttacc cggggatcct ctagagtcca
2101 cctgcaggca tgcaagcttg gctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca
2161 gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc
2221 ggtggtcca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaac cgccgtagcg ccgatggtag
2281 tgtgggtcc cccatgagag agtagggaac tgccaggcat caaataaac gaaaggctca
2341 gtgcaaagac tggcccttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag
2401 gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcaagcaa cggcccggag ggtggcggc
2461 aggacgcccg ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg
2521 cctttttgag tttctacaaa ctctttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc
2581 gctcatgaga caataacct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag
2641 tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttggc gcattttgcc ttctgtttt
2701 tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcaccagt
2761 gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga
2821 acgttttcca atgatgagca cttttaagat tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt

2881 tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga
2941 gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag
3001 tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta ctctgacaa cgatcggagg
3061 accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg
3121 ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc
3181 agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccc
3241 gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagtgca ggaccacttc tgcgctcggc
3301 ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg
3361 tatcattgca gactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac
3421 ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact
3481 gattaagcat tgtaactgt cagaccaagt ttactcatat aactttaga ttgatttacg
3541 cgccctgtag cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta
3601 cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctgccacgt
3661 tcgccggctt tccccgtaa gctctaatac gggggctccc tttagggttc cgatttagtg
3721 ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggcat
3781 cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac
3841 tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggg ctattctttt gattataag
3901 ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaaca aaattaacg
3961 cgaatttta caaatatta acgtttaca tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt
4021 gataatctca tgacaaaaat ccctaacgt gagtttctgt tccactgagc gtcagacccc
4081 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg
4141 caaacaaaa aaccaccgct accagcgtg gtttgttgc cggatcaaga gctaccaact
4201 ctttttccga agtgaactgg cttcagcaga gcgagatac caaatactgt ccttctagtg
4261 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgctctg
4321 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac
4381 tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca
4441 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga
4501 gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggaag cggcagggtc
4561 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggatct ttagtctc
4621 gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc aggggggagg
4681 agcctatgga aaaacgccag caaccgggc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct
4741 tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc
4801 tttgagtgag ctgataccgc tcgccgagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc
4861 gaggaagcgg aagagcgct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgt cggattttca

4921 caccgatat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat
4981 aactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacaccg ccaacaccg
5041 ctgacgcgcc ctgacgggt tgtctgtcc cggcatccgc ttacagaca gctgtgaccg
5101 tctccgggag ctgcatgtgt cagaggttt caccgtatc accgaaacgc gcgaggcagc
5161 aaggagatgg cgccaacag tccccggcc acggggcctg ccaccaacc cacgccgaaa
5221 caagcgctca tgagcccgaa gtggcgagcc cgatcttccc catcggatgat gtcggcgata
5281 taggcgccag caaccgacc tgtggcgccg gtgatgccg ccacgatgcg tccggcgtag
5341 aggatctaata tctcatgttt gacagcttat c

9-5. 米国における遺伝子教育の歴史

○米国におけるバイオ産業と遺伝子工学の歴史

1970-1980 年代前半

遺伝子工学技術が確立し、産業への利用開始 バイオ産業への遺伝子工学技術導入

1980 年代後半

医薬品分野での生物製剤製造、DNA 鑑定、遺伝子診断、遺伝子治療、遺伝子組換え植物等への応用開始

1990 年代

遺伝子工学技術はバイオ産業の「産業革命?・基盤技術」となりゲノムプロジェクト・オーダーメイド医療、組換え食品等に広く利用されるようになった。

○米国高校における遺伝子教育の歴史

1980 年ごろ

学校で習う生物学に比べ実社会でのバイオテクノロジー技術の進歩の差が顕著になった。

このため「大学に進学する人、バイオ産業界に入る人、一般社会となる人」全ての人に対する一般教養としてのバイオテクノロジー教育／遺伝子教育の必要性が高校教員、大学教員、産業人から議論が沸いてきた。

ギャップを埋めるため、新カリキュラムの必要性が、高校教員の中から草の根的に発生した。米国では、従来より高校教員が大学で研修を受ける土壌ならびに大学と企業の産学協同の関係もあった。

1985 年ごろ

大学研究者と高校教員による共同カリキュラムの創造が始まった。

Stanford Univ.などの大学での高校教員の遺伝子教育トレーニング (AP teachers workshop) が開始され教員と地域企業との交流 (産学共同の機運) が始まった。

1980 年代後半

カリキュラム開発に対する国の助成

1990 年

初のバイオテクノロジー教科書“DNA-SCIENCE”が発売された。

1995 年

遺伝子教育が NATIONAL BIOLOGY SYLLABUS (指導要領) に掲載

Biotechnology Explorer 開発・販売

Bio-Rad Laboratories – Stanford University 共同開発

参考 URL:

カリフォルニア高校教員コンソーシアム

<http://www.babec.org/default.htm>