

遺伝子増幅技術を用いた分子生物学実験

——文系学生を対象とした授業への導入——

佐藤由紀子[†]・長谷純崇[†]・萱嶋泰成[†]・村部直之[†]・澤田佳一郎[§]

Introduction of a new molecular biology class using DNA amplification technique
for students of non-biology majors

Yukiko SATO, Sumitaka HASE, Yasunari KAYASHIMA, Naoyuki MURABE and
Kaichiro SAWADA

慶應義塾大学では文学部，経済学部，法学部，商学部のいわゆる文系学部の学生を対象に，実験を重視した生物学教育を行っている。この授業では，生命現象に対する学生の興味を喚起し，理解を深めることを目的に，講義に加え実験を隔週で実施している。これまで，生態学，形態学，生理学，生化学など，生物学の様々な分野に対応する実験プログラムが実施されてきたが，分子生物学の実験は行われていなかった。

分子生物学は，生命現象を分子レベル（DNAレベル）で解き明かす事を目的とした学問であり，近年めざましい発展を示し，政治，経済，社会に大きな影響を与えている。分子生物学の発展は，遺伝病の回避や食糧難解決の糸口になるなど，現代社会に生きる私たちの生活に大きな恩恵をもたらすことが期待される。一方で，遺伝情報が生み出す新しい差別，遺伝子組み換え作物の氾濫による生態系の崩壊などが危惧され始めている。文系学生においても，卒業後に社会に出て，法律関係，マスコミや商品取引などの職種に就いたとき，また，病気時の薬や治療法の選択，日常生活における食材の選択など様々な局面で，分子生物学の基本的な知識やそれに関する論理的な思考法を求められる機会が生じると予測される。

そこで，生物学教室では，平成16年度慶應義塾大学（日吉）予算管理部門内調整費事業「学生実習のための新しいプログラム開発」の中で，「遺伝子増幅技術を用いた分子生物学実習のたちあげ」をテーマに分子生物学実験プログラムの開発を行った。このプログラムは，ヒトの

[†] 慶應義塾大学日吉生物学教室（〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1）：Dept. of Biol., Keio Univ., 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, 223-8521, Japan.

[§] 慶應義塾大学教養教育センター（〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1）

Keio Research Center for the Liberal Arts, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, 223-8521, Japan.

[Received May 10, 2005]

第16番染色体のPV92座位のDNA配列に個人差があること、すなわち、*Alu*と呼ばれる短い反復配列が挿入されている場合とされていない場合があることに着目し、各学生におけるこの領域のDNAの*Alu*の挿入を調べるという内容である。分子生物学における中核といえる二つの技術、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法 (DNA増幅) とアガロースゲル電気泳動法 (DNAサイズ測定) を利用したDNA検査法を学習できる (PCR法、電気泳動法についての詳細は、資料p. 1, 2を参照されたい)。

私たちは、このプログラムを実際の授業に導入するに当たり、1クラス約60名の学生が高確率でデータを取得できることを目標に予測される問題点を検討して、新たにマニュアルを作成した。実習後、クラス全員の成功率を調査し、学生の感想とアンケートを解析することで今後の対応を考えた。更に、より多くの学生がデータ取得に成功するための条件を検討した。

I. プログラム内容

各自の口腔粘膜細胞を採取し、250 μ lのキレックス液 (10% Chelex-100, 50mM Tris HCl (pH 11)) に顕濁, 10分煮沸する。氷冷後, 50 μ lの1M Tris-HClと, 300 μ lの滅菌水を混合し, 遠心する (3500回転, 5分)。2 μ lの上清をDNAテンプレートとし, これを23 μ lのPCR反応液 (2.5 μ l 10X rTaq buffer, 2.5 μ l 2mM dNTPs, 5 μ l 0.3125 μ M PV 92 primer mix (PV-92for: 5'-GGATCTCAGGGTGGGTGGCAATGCT-3'; PV-92rev: 5'-GAAAGGCAAGCTACCAGAAGCCCAA-3'), 2.5 μ l 25mM MgCl₂, 0.2 μ l rTaqポリメラーゼ (TOYOBO), dH₂O 10.3 μ l) に混合する。サーマルサイクラー (MyCycler™ thermal cycle, BIO-RAD) にセットし, 94°C 5分を1サイクル, 94°C 30秒と72°C 2分を35サイクル, 72°C 5分を1サイクルの反応条件でPCR反応を行う。PCR反応産物に, 3 μ lのローディングバッファーを加え, 電気泳動槽 (mupid-I, mupid) にセットした1.2%のアガロースゲルのレーンに10 μ l入れる。ゲルの左端のレーンには, 3 μ lのサイズマーカーを入れ, 100Vで電気泳動する。30分後, エチジウムブロマイド液でゲルを30分染色し, ゲル撮影装置 (FAS-III, TOYOBO) にセットして, 写真撮影を行う。

II. 準備

PCR法や電気泳動法は、理工学部専門実習でも行われる先端技術であり、文系学生にとって、非常に難易度が高いと予測される。そこで、「学生が混乱しやすい点の予測と対応」、「難解な内容をできるだけ平易に」、「学生の興味とやる気を喚起」の3点に特に注意を払って数ヶ月かけて準備を進めた。まず、本プログラムは、正規の2コマ分の授業時間である180分では実験を完遂できないため、授業時間2回分を使って行うこととした。そして、1回目の授業 (PCR法) を休んだ学生は、スタッフが準備したPCR反応産物を2回目の授業で使用するものとした。学生が最も頻繁に使用する器具であるマイクロピペッターは、ほとんどの学生が初めて使用する上に、P20, P200, P1000の三種類を使い分ける必要がある。このため、使用に際する混乱



図1 マイクロピペッター。

本実験では、マイクロピペッターの種類毎に色を変えたものを準備した。紫色 (P20), オレンジ色 (P200), 青色 (P1000)。

への対応策として、種類毎に色が異なる物を準備し (図1), 目盛りの合わせ方や溶液の出し入れなど使用方法の練習時間を設けることにした。学生には技術的に難しいと予測される動作, 例えば, PCR反応液のDNAテンプレート以外の試薬 (酵素やヌクレオチドなど) の混合, PCR反応をおこなう機器であるサーマルサイクラーのセッティング, 電気泳動に使用するゲルの作製などはスタッフが行うこととした。続いて, また, 学生に配布するマニュアルを作成するために, 数名のスタッフと学生アルバイトによる予備実験を行い, 間違えやすい操作, 難しいと予測される操作を細かく検討した。そして検討結果をもとに, 注意事項や詳しい操作方を説明文に盛りこませたマニュアルを完成させた (資料p.1~P.7)。このとき, 操作が視覚的にわかりやすくなるよう, 各工程を番号化し, 図を充実させた。実験時の講義では, 本実験内容に直接関わるPCR法や電気泳動法の原理だけでなく, 分子生物学の利用例や問題, 文系学生が学習する必要性についても説明することとした。

Ⅲ. 学生実験の実際

実験は, 2004年10月6-9日 (第1回) と20-22日 (第2回) に, 1日2クラスずつ, 計6クラス (計352人) で実施した。第1回目の授業では, 80分の講義時間を設け, 分子生物学と社会の関係の例, 実験の目的, PCR法の原理, 実験操作を説明した。続いて, マイクロピペッターの練習を約30分行い, 資料p.4の「DNA抽出」の操作に入った。ほとんどの学生は, 班員同士で操作内容を確認しあいながら確実に作業を進めていた。途中, スタッフの一人がPCR反応液を作成するために実習室を離れる必要があったが, 学生に大きな混乱はみられなかった。しかしながら, 各クラス1-2名程度, 各操作内容の理解が足りないケースが見受けられた。例えば, 1) の操作では, キレックス液の入った容器を振らないまま使用する, ふたを開けたまま振るといったケース, 8) の操作で, マイクロピペッターの目盛りの設定の方法理解が足りず破損につながったケースが散見された。資料p.5の「PCR反応」の操作もほとんどの学生

表1 PV92座位のDNA増幅に成功した学生の割合

クラス	A	B	C	D	E	F	合計
受講者 (人)	62	54	54	51	39	47	307
成功者 (人)	32	33	34	29	23	33	184
成功率 (%)	51.61	61.11	62.96	56.86	58.97	70.21	59.93

において混乱無く進められた。ただし、一部の学生において、DNAテンプレートとPCR反応液を間違える、ストックのPCR反応液を使用後机に放置する、ストックのPCR反応液に直接DNAテンプレートを入れるなどのミスがあった。しかし、若干の混乱はあったものの最終的には、所要時間内に全員が全ての操作をやり遂げることができた。第2回目の授業では、1回目の授業の復習、文系学生の進路と分子生物学との関わりの例、アガロースゲル電気泳動法の原理、実験内容の説明を60分行った。続いて、サンプルを返却し、資料p.6の「アガロースゲル電気泳動法」の操作に入った。ウェルのサイズの小ささに緊張する学生が多かったが、特に問題はみられず、全ての学生が授業時間内に操作を終了させることが出来た。第1回、第2回の実験ともに出席した学生は総勢307名であり、約60%の学生がPV92座位のDNAの増幅を成功させ、*Alu*配列の有無を確認できた(表1)。

IV. 学生レポートの解析

A. 感想

本実験に対する学生の受け止め方を調べるために、実験レポートに記載された学生の感想を分類、集計した(図2)。大多数(82%)の学生が、「(分子生物学を)身近に感じるようになった」、「楽しかった」、「なかなか出来ない経験ができて嬉しい」、「内容が興味深い、有意義であった」など、ポジティブな反応を示した。このような好意的な受け止め方が多かったことの背景には、学生が、生物学の講義やマスメディアによる報道を通じて遺伝子治療やDNA検査法に関する話題に身近に触れていて、分子生物学の技術を学ぶことに対して心理的な抵抗が少なく、強い関心を持っていることがあると考えられる。また、意外と簡単な操作で自分でもDNAの解析をする事ができたこと、珍しい器具や試薬が使用できたことなどが、楽しさと親近感につながったと推測される。本実験を経験したことにより、分子生物学や生物学全般のより深い知識を得る事に対する動機付けや、通常の講義における理解がより深められていくといった効果が期待できる。14%の学生はネガティブな反応を示したが、DNAが増幅されず*Alu*の有無を確認することができなかったためにつらかりして否定的な見方をする学生が多くを占めていたことから、増幅を成功できる学生の割合を上げることが求められる。Vで述べるが、私たちは幾つかの実験を行い、学生がミスを起こしやすい箇所を特定した。

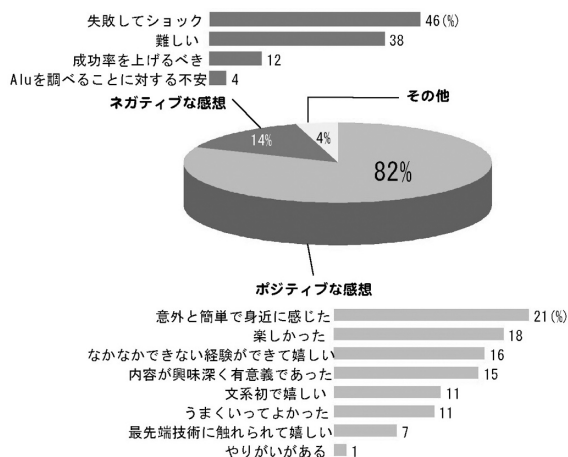


図2 実験に関する学生の感想

B. アンケート

分子生物学と社会の関係に対する学生の理解を調査するため、「分子生物学およびその周辺技術と、社会および個人の生活との関係について考えたこと」についてアンケート調査を行った（自由回答）。表2は回答の一部である。これらの結果から、多くの学生が、犯罪捜査や親子鑑定などの社会における様々な応用を評価すると同時に、遺伝情報の流出、遺伝情報による差別や犯罪といった問題に対して危機感を感じていることが分かる。特に情報流出に対する危機感が強いことに関しては、顧客データ流出など個人情報流出に関する問題が頻繁に生じている昨今の社会状況が反映されていると考えられる。また、本実験を通じて、道具さえ有れば自分たちでも特定のDNA配列を増やして解析することが可能であることを実感したことも大きいと推測される。こういった社会への影響に関する問題に対しては、「情報が流出しない仕組み」「情報を安易に利用しないための倫理教育や法整備の徹底」といった法レベルの対策に加え、「文系だが、今後急速に進歩していく遺伝子について知っておくことは有益だと思う。あいまいな知識が一番危険である」（整理番号8）といった回答にあるような、個人レベルでの対応の重要性を感じていた。今後は、分子生物学の利用例や問題点、対応策などを考察する機会を増やしていくことが必要であると考え。実習と実習の間の2週間を利用して書籍、インターネットサイトなどの関連資料を調べる、グループディスカッションやプレゼンテーションの様に学生が発信する時間を設けるなど、様々な対応を考えていきたい。

表2 アンケートの答え (一部)

整理番号	意見
1	DNAを分析することにより、医学の面などでは種々の利益が生まれるかもしれない。しかし、社会的な面から見ると、不利益とまでいえなくとも、良くないことが起こってしまうのではないかと思う。それは、DNAの違いによる差別である。例えば、選りすぐれた子供が欲しいと考えたとき、遺伝子による伴侶選びを行ってしまう可能性、遺伝子の技術を利用したドーピングの行われる可能性である。人種差別や宗教差別のように、あるDNAの配列が違うかどうかと言う理由で迫害されてしまうことが起こってしまうかもしれない。
2	思ったよりも簡単に遺伝子の情報を知ることが出来ることを身をもって体験し、法整備などの必要性を感じた。今後理系のヒトが様々な発明をすると思うが、その発明をよりよく活用するために努力できればよいと思った。
8	文系だが、今後急速に進歩していく遺伝子について知っておくことは有益だと思う。あいまいな知識が一番危険である。
9	これからの社会において、遺伝子の重要性が感じられる。今まで科学的に分析できない問題なども、遺伝子の解明によって様々な多くの分野で飛躍的に発展することが出来るようになったと思う。その例としてDNA鑑定による犯罪捜査や遺伝子組み替えなどが挙げられる。これからは、こういった遺伝子鑑定が人間にとって害にならぬように方向性を与えていくことが求められると思う。
10	プライバシーに関わる問題でもあり、遺伝子を調べることの必要性などを考えていく必要があると思った。
11	データが漏れた場合、生活するに当たり、様々な問題が発生する。例えば保険加入など。DNAを知ることには、プラスの面とマイナスの面があると考えた。
12	DNA検査により、様々な遺伝的疾患が発見され、早期治療が可能になると言うメリットがある。一方、個人情報を扱う上で大きな注意を要すると考えた。
13	個人情報が漏れてしまうなどの不安がつきまとう。それらが起きないように注意するべきであると思う。
15	特定の遺伝子やそれが原因となる遺伝病の研究を効率的に行うことが可能になり、その病気の克服にもつながっていくと予想される。しかし、研究が進みすぎれば、出生前診断による中絶の増加なども予想される。このような場合、法律が画期的研究の足かせとならぬよう法体系を整えて行かねばならないと思う。私は、法学部の学生であるので、そういった事態になるよう常に自覚を持って勉学に励みたい。
16	医療の現場などでこの技術が生かされていることはすばらしいと思う。
21	人のプライバシーに関わる物だと思う。個人情報と言うことを深く受け止め、慎重に扱っていく必要がある。
22	身元判定などにDNA情報を使うことが出来るのは非常にすばらしい。しかし、悪用されてクローンをつくられたり、個人のプライバシーに関わることを利用されたら困る。正しい倫理観をもつことが必要だ
26	思ったよりも簡単に出来たので、倫理的な問題を考えながら有効に使う必要性を感じた。
27	特定の遺伝性疾患などの有無を調べることが出来る。診断結果などの情報をいかにコントロールして、遺伝情報が筒抜けにならないようにしていくことは重要な課題である。
28	身元不明者、身元確認や容疑者の逮捕に役立つだろう。しかし、遺伝情報、個人情報が流出して悪用されることをさげなければならぬ。
29	身元確認、犯人逮捕に役立つが、個人情報の流出し悪用される危険性がある。便利がある反面、危険でもあるこの方法をうまく利用してもらいたい。
30	この実験はとても意義のある物だと思いました。なぜなら、DNAの性質を利用した技術は現代社会の様々な分野で利用されているからである(例:病気の診断、最近やウィルスの検出、混入された遺伝子組み替え作物の検出、農作物の新種作成、犯罪捜査、親子鑑定など)。DNAは私たちの私生活に深く関わっていて、DNAの性質やそれに関わる技術について学ぶのはとても大切なことだと思います。
33	この分野は、遺伝子治療など医学分野に対して大きな期待をされていると思うが、その一方で、人間の尊厳に関わる危険な実験に使用されてしまう可能性も併せ持っている。よく、神の領域に踏み込むなどの表現が使われるが、それほど重大な問題を持った技術であることは確かだ。人間の生活にとって最前の方向にこの先進技術が使われていけばすばらしいと思う。
34	犯罪者の逮捕や特定に利用されるのは動かぬ証拠として良いと思うが、個人の教えたくない情報までも分かってしまうとしたら、それは度が過ぎていると思う。DNAを通じて、本人でさえ知りたくない情報を他人が知ってしまうことは間違っていると考えている。
36	親子鑑定や事件解決の手がかりになるなど、無くては成らない存在となっておりと同時に、遺伝子はその人自身のプライバシーの固まりであり、DNAの情報を悪用されてしまうことも起きかねない。利点と同時に生じる欠点を考慮する必要性を忘れては行けない。
43	文系、理系という線引きをせず、技術に対する正しい理解を身につけると共にそれが持つメリットデメリットについても議論の必要があるだろう。
46	DNAの解析によって先天的な病気や寿命までも分かるため、医療の現場で役立つと考える。ただ、潜在的な病気などの情報は、悪用されプライバシーの侵害につながる危険が高いと感じる。そして、このように専門性の高い技術に関しては、私たちのような文系の人には分からない部分が多いため、一部の分かる人だけに乱用されないようにしなくてはならないと感じた。
47	私たちは文系の人間であり、このような技術があること自体知らなくて当然である。自分の知らないところで自分の遺伝子を見られていてもこのようなことが出来ると言うこと自体知らない人が大半なら、悪用するのも簡単なのではないだろうか。技術の発展は、人間や環境をより良くしていく面と共に利用の仕方によっては、特定の人に不利益を与えたり人権を侵害することになるという面を必ず持ちあわせていると思った。

表2 アンケートの答え (一部) (つづき)

50	犯罪捜査や父親を特定することが出来ると思う。DNAは人によって異なるので、それを利用した検索が出来ると思う。しかし、個人情報も多いので、扱う際は配慮しないとプライバシーの問題に発展すると思う。
52	最近では犯罪が多くなっているからこういった実験で犯人を割り出せるのはとても良いことだと思う。病気の早期治療が出来るだろう。ただ、DNAが悪いことに利用されることを思うと怖いかもしれない。
58	このような実験の積み重ねによって、社会の進歩は維持されて射るんだと思います。有効な薬の開発などのオーダーメイド医療、クローン人間、再生医療など、全ての根本はこのような遺伝子(ヒトゲノム)解析から始まっているのではないのでしょうか。その一方で、このような技術の知識はまだまだ社会に浸透していないように思います。文系学部の友達などの発言を聞いてみると理系の研究・実験に対する誤解の多さを実感します。そのような誤解を払拭して、文系。理系の両方が対外に理解。協力するよりよい社会をつくっていききたいです。
60	良いことに役立てていくのは頼りになるし嘘が無く分かるのですばらしいと思いますが、体の一部から自分のことが分かってしまうのは悪用されることを考えるととても怖いです。
74	他人の癌発生率の高さや血縁関係の詳細を調べることが比較的簡単に出来ると言うことを示しているわけです。そう考えるとこれは結構怖いこと何じゃないかと思いました。
75	いつ自分のDNAが取られているか分からない状況は正直怖いと思う。簡単にDNAが分かるのは便利だけれど、それがいつどの様な目的で使われるかが分からないし、どうすれば守れるかも分からない。役に立つことが多いのは分かる。このような技術を持つ人は、慎重に扱って欲しい。
76	少しの細胞から人の情報が分かるということは自分の情報が誰に知られるかも分からなく不安である
77	技術が発展して民間の手でもDNAを利用して個人情報を取り出せるようになってしまったらと考えると、犯罪解決の糸口が増えると同時に新たな利用用途が増加しそうで怖い。
78	犯罪捜査などにも利用されてとても役に立つ物とは思いますが、DNAの解析によって何でも分かってしまうのは強行きもします。DNAの解析によって発ガンの可能性が分かるなど、DNAで知らなくても良いようなことが分かるには抵抗を感じます。
81	犯罪捜査や親子鑑定などが出来るというのは非常に有効な手だと思う。科学の進歩はすごい。しかし、自分のDNAがこんなにも簡単に取り出せて増やしたり、鑑定できるということは、自分のプライベートな情報を誰かに知られる可能性も高くなる。少し怖い気もする。
82	重要な個人の情報が他人によって簡単に知られてしまうのではないかと不安にも思いました。
83	非常に有益な技術ではあるが、同時に人間のモラルが試されるような技術だと感じる。道徳を持って社会に約たてていって欲しい。
84	犯罪捜査や医療に遺伝子技術は必要だと思いますが、調べたり手を加えたりする遺伝子の部位は、安全性・プライバシーを考慮して、慎重に検討して欲しいと思いました。
85	病気の診断、細菌やウィルスの検出、犯罪捜査など多様な方面に活用されているが、自分が想像していたよりも遙かに簡単な方法だったのでもとても驚いた。遺伝子がこんなに簡単に分かってしまうことに抵抗を感じる。
87	DNAについて分かって来るに連れ、犯人を特定したり事件では役立つ面が多くなっている。だが、分かりすぎて、プライバシーを侵害するようになる日が来るのが怖い。保険に入らなかったり、差別の面も同時に強化しなければならぬと覆う。
91	犯罪者を特定できたりするのはとてもすごいと思うけど、その人を特定する最低限の情報だけ得られるようにしたり、警察や病院で厳重に保管したりする必要があると思う。プライバシーに関わることや妊婦の場合、傷害を持った赤ちゃんが産まれることが他人に知られてしまったり、知りたくないのに分かってしまうのは良くないことだと思う。
93	犯罪捜査の過程で用いられることにより、事件解決の迅速化に役立ったり、親子関係の確定をより正確に行うことが出来るようになったり、また完成した遺伝子組み替え食品の遺伝子型を特定し、人体への安全性を考えることにも役立つ。一方人体に対してこの技術を用いることは、プライバシーの問題とも関わる重要な側面を持つが、実社会に対してこの技術は非常に遊離に働くと思われる。
94	犯罪における犯人の特定はすごく簡単になるし、医療にもいろいろな形で応用できるはずだ。でもそれは最も基本となる個人情報の流出でもあり、きちんと管理しないと逆に遺伝し犯罪なんて物が多くなるかもと危機感を覚えた。
95	遺伝子情報に対する法的整備をしっかりとしない内に研究などの方が先行してしまうのは危険なことであると思う。一部の人だけがそれに関わるのではなくと、もっと一般民衆に知識を広げるべきであり、また私たちも認識すべきだ。
97	犯罪の操作などで有効活用できると思われるが、安易に使用することは個人情報の流出などプライバシーの問題を発生する可能性を有するので、その取り扱いには十分注意しなければならないと考えられる。
98	自分がどの様な病気にかかりやすいかがわかることや、産まれてくる子供にもそれが分かってしまうため子供を産まなくなるといった倫理的な物に関わってくる。情報が病院から外部に漏れる危険性も考えられる。
99	技術を利用することは人の生活を豊かに出来ると思うが、こういった遺伝子暗号が解明されるのが人々にとってどの様な意味を持つのかということを実際に考えなければ行けない時期が来ていると思う。
100	犯罪者のDNA特定などにどんどん使ってもらいたい。ただし遺伝子は個人の大切な情報であることも同時に認識しなければならない。良い研究だからといって個人情報を侵害して良いわけではない。そういった既成も必要になるだろう。倫理的な問題のため、人それぞれ意見は違いますが、まずは個人情報のしっかりした保護、それからこの遺伝子研究とその技術をフル活用できればいいと思う。
101	犯罪捜査にも活用され、優れた技術です。しかし、もっと広く利用されるようになったら、個人情報、プライバシーの問題につながってくると思います。そしてそれはまた、差別問題にも発展するでしょう。例えば保険加入問題のような。すばらしい技術だけに影響力を持ちます。慎重に扱われるべきだと思います。

V. DNA増幅に成功する学生を増やすための試み

本実験において、より多くの学生がPV92座位のDNA増幅を成功させられる様にするため、増幅に到らなかった学生がどの実験操作を誤ったのか、幾つかの実験を行い調査した(図3, 図4)。その結果、PCR反応液とDNAテンプレート混合に失敗している可能性が強いことが示唆された。そこで、この手順(資料p.5, 1) -3))を改善し、別のクラスで実験を実施したところ、DNA増幅に成功する学生の割合が約6割から約8割と飛躍的に増加した(図5)。

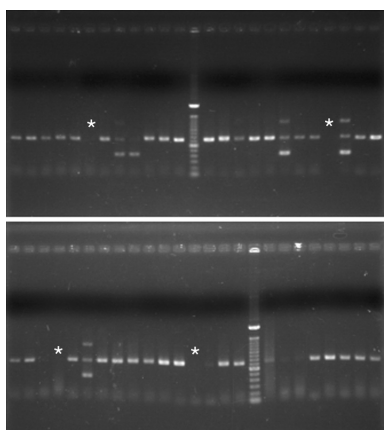


図3 テンプレート作製に失敗している可能性の検討

学生実験において、PCRによる増幅がみられなかった学生96人のDNAサンプルテンプレートについて、本人の許可を得た上で、スタッフがPCRを行った。図は、泳動結果の一部である。4サンプルはDNAの増幅が見られない(*)が、全体の95.8%である92サンプルにおいて Alu 配列の増幅が見られたことから、失敗した学生の多くはテンプレートは作製できていることがわかる。

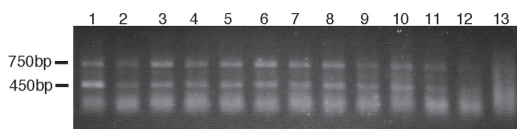


図4 PCR反応液が失活した可能性の検討

チューブを長時間握っていたなど、温度によってPCR反応液中に含まれるDNAポリメラーゼが失活してしまった可能性を検討するために、PCR反応液にテンプレートDNAを入れたもの(レーン2, 4, 6, 8, 10, 12)と入れないもの(レーン3, 5, 7, 9, 11, 13)を、0℃(レーン1-5)、20℃(レーン6-9)、37℃(レーン10-13)で、0分(1)、30分(レーン2, 3, 6, 7, 10, 11)、60分(レーン4, 5, 8, 9, 12, 13)インキュベートし、PCR反応を行った。インキュベート時にテンプレートDNAを入れなかったサンプルについては、反応直前に添加した。0℃、20℃においてはいずれの条件においても正常な増幅が確認されている(レーン1-9)。37℃に1時間放置すると適切な増幅産物が得られにくい傾向にある(レーン12, 13)。特にテンプレートを入れない状態でインキュベートすると、非特異的な増幅産物が多く検出される。しかし、30分の場合は正常な増幅を示す(レーン10, 11)。従って、30分以内であれば学生がチューブを握っていたとしてもDNAポリメラーゼは失活しないと考えられる。

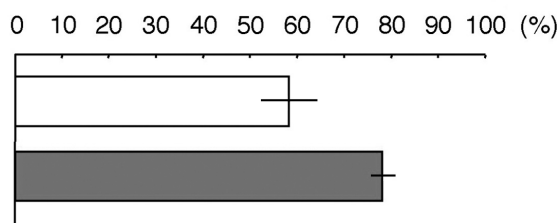


図5 DNAテンプレートと反応液の混合方法の変更に伴うPV92座位のDNA増幅に成功した学生数の増加。

従来の方法では、先に23 μ lのPCR反応液をチューブに入れ、後からDNAテンプレート2 μ lを加えさせていた。この場合、2 μ lは非常に微量である事に加えてどちらの液も無色透明であるため、確実に加えられたかを学生が確認することは困難である。そこで、先にテンプレートを空のチューブに入れることで2 μ lが確実に入ったことを確認させ、その上で、PCR反応液を混合してPCR反応を行うように手順を変更し、3クラス総勢146名の学生に、改編した方法で実験を行わせた。グラフは、従来の方法で行った場合（6クラス平均、□）と混合方法を改編した場合（3クラス平均、■）におけるDNA増幅に成功した学生の割合である。混合方法を変えた結果、増幅を成功するに到った学生の割合は、6割弱から8割に増加する。

VI. まとめ

本実験において、実験を行った学生の約6割が、実験後のプロトコル改善によって8割の学生が増幅を成功させることができた（図5）。このことは、本プログラムが文系学生でも十分対応できる分子生物学実験のプログラムであることを示している。レポートの感想もおおむね好意的であり、学生が意欲を持って取り組んだことがうかがえる。実験を通して分子生物学を身近に感じるようになった学生が多く、分子生物学の講義の導入としても非常に有用なプログラムであると考えられる。今後は、分子生物学の社会における影響に関して考察する機械を増やしていきたい。

VII. 謝辞

本実験は、根岸寿美子先生、長谷川由利子先生、福澤利彦先生の生物学の授業時間に行いました。中島陽子先生、金子洋之先生には、本実習プログラムの先行授業を見学させていただきました。有岡幸子さんには技術的な支援をしていただきました。また、生物学教室の皆様には、様々な助言を頂きました。この場を借りて深謝いたします。本実験報告で使用したプログラムは、平成16年度慶應義塾大学部門内調整費を用いて開発されたものです。

顕微鏡番号

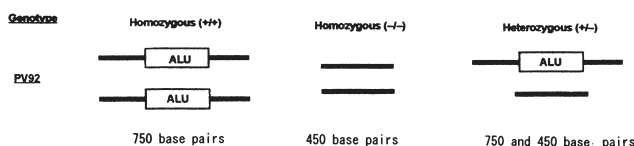
名前

自分の遺伝子を見てみよう ～DNA 学～ (2 回連続実習)

病気の診断、細菌やウィルスの検出、混入された遺伝子組み換え作物の検出や農産物の品種確定、犯罪捜査、親子鑑定など、DNA の性質を利用した様々な技術が社会のいろいろな分野で利用されています。DNA は非常に長い分子なので、「PCR 法」という技術によって目的の配列のみを増やして様々な目的に使用します。この実習では、1 回目に各自の、Alu と呼ばれる DNA の配列を、「PCR 法」によって増やし（増幅し）、2 回目に増やした配列を「アガロースゲル電気泳動法」で確認します。実習を通して、PCR の原理、および電気泳動法の原理を理解し、実社会での応用の可能性を考えてみましょう。

① ヒト PV92 座位 Alu 配列って、なに？

ヒトのゲノム中には、Alu 配列と呼ばれる約 300 塩基対の短い反復配列が 50 万～100 万コピー、散在しています。Alu 配列はおよそ 6500 万年前からゲノムのあちこちへ自分のコピーを挿入することで、その数を増やしてきました。それらの中で、比較的最近（100 万年以内）に Alu 配列の挿入が起こった部位のひとつが、第 16 番染色体の PV92 と呼ばれる座位です。この座位への Alu 配列挿入には個人差があり、両方の染色体に Alu 配列を持っている人（+/+）、片方の染色体にだけ持っている人（+/-）、全く持っていない人（-/-）の 3 パターンに分けられます。この座位の Alu 配列保持率はヒト集団により異なるので、これを利用して、現代人の起源やヒト集団間の遠近関係を推測することができます。なお、PV92 位には Alu 配列の有無以外の遺伝的な情報を得ることはできません。従って、個人のプライバシーに関わる部分は軽微です。



② PCR 法とは？

PCR (Polymerase Chain Reaction、ポリメラーゼ連鎖反応) は、DNA の長い鎖の中の、どこでも必要な部分だけを試験管の中で増やすことのできる分子生物学の技術で、1983 年に開発されました。非常に少量のサンプルから、迅速かつ特異的に任意の DNA 断片を増幅できる PCR 法は、革新的な技術として、生命科学研究に長足の進歩をもたらしました。この功績により、開発者のキャリー・マリスは、1993 年にノーベル賞を受賞しています。

③ アガロースゲル電気泳動法とは？

PCR 反応液のままでは反応の結果を解析することができないので、アガロースゲル電気泳動という方法で、PCR により増幅された DNA 断片を分離して、眼に見えるようにします。アガロースは寒天（アガー）を精製したものです。お湯で溶かしてから室温に冷やすことでゼリー状のゲルを作成します。DNA はリン酸基を持つので、溶液中ではマイナスの電荷を持っています。このため、DNA をアガロースゲルに作った穴に入れて電圧をかけると、DNA 分子はアガロースの中を、+ 極の方へ移動します。ゲルは、網目構造を持っており、DNA は電圧によって移動する際に、この網目構造の中をくぐり抜けていかなければなりません。この時、短い DNA は網目をくぐりやすいので速く移動し、長い DNA は網目にかかりやすいので遅く移動します。この結果、DNA の大きさによって移動の度合い（移動度）に差が出ます。同じ大きさを持つ DNA は同じ移動度を持つため、PCR 反応で大量に増幅された同じ大きさの DNA 断片は、ゲルの同じところにバンド状に集中します。この DNA のバンドを染色して観察します。

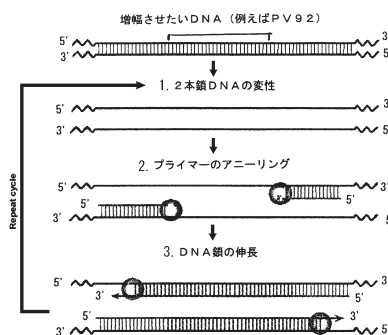
PCR 法の原理

PCR 法では耐熱性の DNA ポリメラーゼ (DNA 合成酵素) を用いた酵素反応を繰り返すことにより DNA の増幅を行います。反応には、耐熱菌の DNA ポリメラーゼの他に、DNA 鎖の材料となる 4 種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、塩化マグネシウム、増幅したい DNA (標的 DNA) を含む少量のテンプレート DNA (鋳型 DNA)、および標的 DNA の両端からの DNA 合成開始のための 2 種類のオリゴヌクレオチド (プライマー DNA) が必要です。

1. **2 本鎖 DNA の変性**: 増幅したい部分を含む 2 本鎖 DNA (テンプレート DNA) を 94℃ 程度に熱して、2 つの 1 本鎖 DNA に分離 (変性) します。

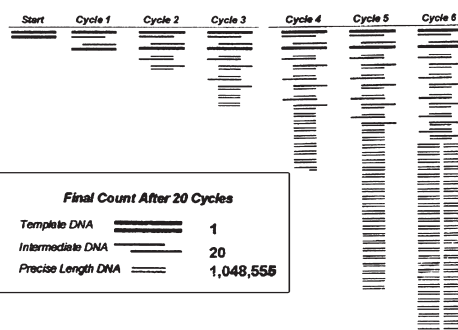
2. **プライマーのアニーリング**: 変性したテンプレート DNA を 55℃~68℃ 程度に冷却して、2 種類の短い 1 本鎖のオリゴヌクレオチド (プライマー DNA) を、増幅したい部を挟むように、テンプレート DNA 上の相補的配列に特異的に結合 (アニーリング) させます。

3. **DNA 鎖の伸長**: 耐熱菌由来の DNA ポリメラーゼを作用させ、72℃ で活性を上げてやると、プライマー部分より後方 (3' 側) へ向けてテンプレート DNA の相補鎖が伸長し、2 本鎖 DNA ができます。



三段階の温度を順に変化させることにより、「変性」→「アニーリング」→「伸長」のサイクルを繰り返します。各サイクルで新たに合成された DNA が次のサイクルではテンプレートとなってさらに DNA が合成されるので、2 つのプライマーで挟まれた DNA 領域のコピーが、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍・・・と、幾何級数的に増えていきます。

理論的には、たった 1 本の 2 本鎖 DNA から、30 サイクルの反応で、2 の 30 乗 (10 億本以上) 増幅させることが可能です。反応温度の変化は、サーマルサイクラーという専用の機械で行います。



実習では PV92 (16 番染色体の中の特定部位) のうち、Alu 配列の挿入部位をはさむ両サイドの塩基配列を持つプライマーを使用します。Alu 配列を除いた両プライマー間の距離は約 450bp (base pairs; 塩基対)、Alu 配列は約 300bp なので、もし、Alu 配列の挿入があれば両プライマー間の距離は約 750bp となります。

実験開始前に、実際にマイクロピペッターを使ってみましょう

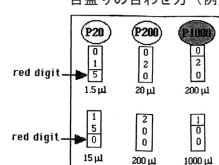
本実験に入る前に、マイクロピペッターの使い方の練習をします。1ml 以下の液体を量り採るのは、マイクロピペッターと呼ばれる特別な器具を使います。マイクロピペッターはデリケートな器具なので、無理な使い方をすると正確な計量ができません。落したり、乱暴に扱うのも控えてください。また、ピペッターの種類によって、計量できる範囲が決まっています。範囲を超えて目盛りを設定しないように注意してください。

表：ピペッターの計量できる範囲

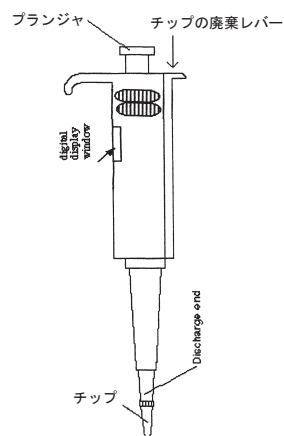
ピペッター	使用可能範囲	最小数字
P20	0.5-20.0 μ l	0.1 μ l
P200	20-200 μ l	1 μ l
P1000	200-1000 μ l	10 μ l

- 1) ビーカーに水をくみます。
- 2) 1.5ml エッペンチューブのふたを開け、チューブ立てに置きます。
- 3) マイクロピペッターは、P20、P200、P1000 の 3 種類あります。このうち、いずれか一種類を選びます。
- 4) マイクロピペッターの目盛りを以下の容量にセットします。
 P20 のマイクロピペッター・・・2 μ l
 P200 のマイクロピペッター・・・50 μ l
 P1000 のマイクロピペッター・・・250 μ l

目盛りの合わせ方 (例)



- 5) チップラックのふたをあけて、マイクロピペッターにチップを装填します。
 P20 と P200 のマイクロピペッター・・・イエローチップ
 P1000 のマイクロピペッター・・・ブルーチップ
- 6) ブランジャを 1 段目の停止位置まで押し込んでおいて、そのままチップの先端を水に入れます。
- 7) ブランジャをゆっくり戻して、水をチップの中に吸い込みます。ブランジャが戻りきっても、すぐにはチップを水から離さず、水が完全にチップの中に流れ込むのを待ちましょう。泡を入れたりしないように注意しましょう。
- 8) 2 μ l, 50 μ l, 250 μ l という容量が、それぞれ、目で見てもどれくらいの容量になるのか、お互い見せ合って確認しましょう。
- 9) 吸った水を、2) で用意した 1.5 ml エッペンチューブに移しましょう。ブランジャをゆっくり押すと、チップの先から水が排出されてきます。そのまま押していくと 1 段階目の停止位置に達しますが、さらに 2 段階目の停止位置に達するまで押し続けて、水をチップから完全に排出します。
- 10) チップの廃棄レバーを押して、チップを廃棄容器に捨てます。
- 11) 終わったら、チューブを捨てます。



★実際の実験では、試薬液を汚さないために、1 回の使用ごとに、チップを交換することが肝要です。

1回目：PCR法によるDNAの増幅

目的

- ① 自分の口内粘膜からDNAを抽出する
- ② 抽出したDNAのPV92座位を、PCR法によって増幅する。
- ③ PCR法の原理を理解する。

材料

口内粘膜細胞（持参）、キレックス溶液(pH11)、1M Tris-HCl (pH 7.5)、滅菌水、PCR反応液（DNAポリメラーゼ、デオキシリボ核酸、プライマー（2種類）、バッファー）

方法

★ アイスボックスを2人で一つ使用するためペアをつくります。実験は各自で行って下さい。

【DNAの抽出】

1) キレックス溶液の入った50mlチューブのふたをしっかりと閉め、よく攪拌してからふたを開け、P1000のマイクロピペッターで、キレックス溶液を250 μ l吸い取って、1.5ml エッペンチューブに入れる。

2) 爪楊枝の軸の部分（とがっていない方）で、頬の内側を、片方30秒ずつ両方こすり、口内粘膜細胞を採取する。

3) 2)の爪楊枝を、1)で用意した1.5ml エッペンチューブ中のキレックス溶液の中に浸して、60秒間激しくゆすぐ（こぼさないように注意！）。

4) 爪楊枝をゴミ箱に捨て、エッペンチューブのふたをして、ふたに名前を書き、留め具をつける。

5) 4)のエッペンチューブを、お湯に浮かせたフローティングフォームにはめ込んで、10分間煮沸する。

6) 煮沸が終わったら、エッペンチューブを、氷の上において十分に冷やす（約3分）。

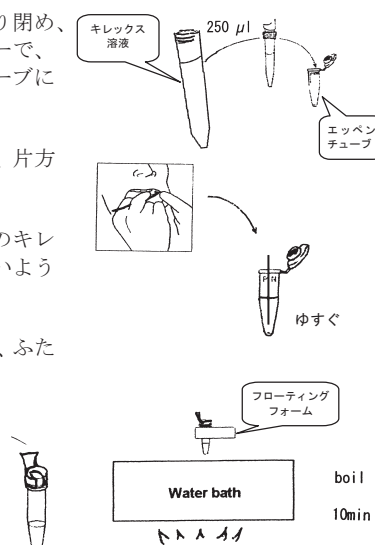
7) P200のマイクロピペッターを使って、1M Tris-HCl (pH 7.5) を50 μ l取り、6)のエッペンチューブに加える。

8) P1000のマイクロピペッターを使って、滅菌水を300 μ lとり、7)のエッペンチューブに加える。ふたをしてよく混ぜる。

9) 8)のエッペンチューブを、遠心機のガラス遠心管にセットする。エッペンチューブは、中心に対して対称になるように2本を組にしてセットする。3500回転で、5分間遠心する。

★スタッフの指示に従うこと。勝手に回さないように！

10) 遠心が終わったら、沈殿を崩さないように、静かにエッペンチューブを取り出して氷上にてる。上清にはゲノムのDNAが抽出されているはずである。（DNA抽出液）

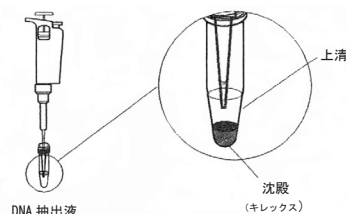


【PCR 法による DNA の増幅】

1) P200 のマイクロピペッターを用いて、PCR 用のチューブ（小さいチューブ）に、PCR 反応液を 23 μ l 入れる。

2) P20 のマイクロピペッターを用いて、DNA 抽出液（遠心の終わった 1.5ml エッペンチューブ）の上清を 2 μ l 量り採り、1)の PCR 用チューブに加える。

注意：吸い取る際には、沈殿を吸い込まないように、液面の直下を吸い取ります。2 μ l は非常に少量なので、チップの先に液が入ったことを目で見て確かめること。

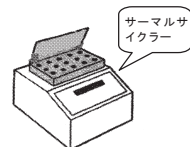


3) チップの先を 2)の PCR 用チューブに再び入れ、10 回以上すばやく回転して混ぜる。入れ終わったらチューブの側面（ふたに書いても消えてしまう）に名前を書いて、氷に差しておく。

4) 「PCR 用のチューブ」と、「DNA 抽出液の入った 1.5ml エッペンチューブ」をそれぞれサーマルサイクラーそばのチューブ立てに入れ、どの穴に入れたか記録する。自分のノートにも記録しておく。

スタッフの指示にしたがうこと。

氷に入れた状態で持ち運ぶこと。



注意：PCR 反応液を分注してから PCR 反応の開始まで 30 分以内に行わないと PCR 関連試薬は失活してしまいます。あらかじめしななければならないことをよく頭に入れ、又、ピペットの使い方にも慣れて、的確、迅速に作業を進めるようにしましょう。

5. 全員のサンプルチューブがそろったら、スタッフがサーマルサイクラーにセットし、反応を開始する。

反応はまず、94℃5 分間の前処理の後、94℃30 秒、68℃30 秒、72℃90 秒を 36 回行い、最後に、72℃5 分間の後処理の後、4℃に冷やして終わる。反応には約 2 時間かかる。

6. スタッフが、反応の終わったサンプルチューブ（PCR 反応産物）を保存用ラックに移して次回実習まで-20℃で凍結保存しておきます。次回の実習では、この PCR 反応産物を電気泳動して、DNA 断片を分離、解析します。

考察

- ① キレックスを加えた後にボイルするのはなぜか？
- ② ボイル後に 1 M Tris-HCl (pH 7.5)を加えるのはなぜか？
- ③ PCR のサイクル；94℃30 秒、68℃30 秒、72℃90 秒を 36 回行うとき、各温度ではどのようなことが起きているか？

2回目：アガロースゲル電気泳動法

目的

- ①自分の第 16 番染色体の PV92 座位に Alu 配列の挿入があるかどうかを調べる。
- ②アガロースゲル電気泳動法の原理を理解する。

材料

PCR 反応産物(前回の実習のもの)、1.2% アガロースゲル、電気泳動槽、泳動バッファー (TAE)、サイズマーカー、ローディングバッファー、染色液 (エチジウムブロマイド溶液)

方法

★班をつくります。スタッフの指示に従ってください。

1. 冷凍保存してあった自分の PCR 反応チューブを受け取り、P20 のマイクロピペッターを用いて 3 μ l のローディングバッファーをチューブに加える。チップの先端を回転させ、よく混ぜる。



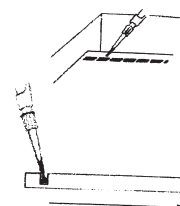
2. 泳動槽はスタッフによってすでに準備されている(班で 1 台)。泳動槽の内側の線まで泳動バッファーが入り、アガロースゲルがゲルホルダーと共に設置された状態になっているはずである。

3. P20 のマイクロピペッターを使い、まず、ゲルの一番左端のウェル (穴) にサイズマーカーを 3 μ l 入れる (1 つの泳動槽につき 1 カ所でよい)。次に、各自の PCR 反応液を 10 μ l 吸って、空のウェルに静かに入れる。どのウェルに誰のサンプルを入れたのかを記録しておく。

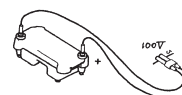
★チップの先でゲルを突き破らないよう、注意すること。

★ウェルに空気が入っているときは、ピペッターで空気を吹き出してから、サンプルを入れる。

★サンプルを入れた後で、チップの先から空気 (泡) を吹き出すと、せっかく入れたサンプルが舞い上がってしまうことがあるので十分に注意すること。

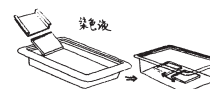


4. ふたをして、100V で通電する。色素マーカーがゲルの中を移動していくのを確認すること。泳動時間は約 30 分。



5. 通電を止め、泳動を終了する。手袋をはめ、泳動槽からゲルを取り出してスタッフの指示に従い、所定の場所に持ってくる。

6. ゲルを壊さないよう、ゲルホルダーからはずして染色液の入った容器に入れ、30 分間染色する。ゲル全体が一樣に染色液に浸るようにすること。



7. スタッフの指示に従ってゲルの写真撮影をする。結果の解析を行い、遺伝子型の判定を行う。

考察

- ① 電気泳動で DNA がマイナスからプラス方向へ移動するのはなぜか？
- ② 電圧を低くすると泳動スピードはどのようになるか？
- ③ ゲルの濃度を 1.2% のより薄くすると、DNA の泳動パターンはどのようになるか？
- ④ エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV で照射すると DNA が見えるのはなぜか？

- ⑤ 実験結果から自分は (+/+), (+/-), (-/-) のうちどれに相当するか? また、その結果から予想される親の遺伝子型を推測せよ。

【遺伝子型の判定の仕方】

サイズマーカーは 100bp (base pairs ; 塩基対)、200bp、300bp・・・と、100bp 間隔でバンドの大きさを示しています。600bp のバンドは他より濃く、見やすくなっています。PCR 産物には、しばしば予定されるもの以外のバンドが出ることがありますので、間違わないようにしてください。

- (a) 約 750bp のバンドが 1 本だけ出た場合は、遺伝子型は +/+ です。
(b) 約 450bp のバンドが 1 本だけ出た場合は、遺伝子型は -/- です。
(c) 約 750bp と約 450bp の 2 本のバンドがある場合は、遺伝子型は +/- です。このとき、一方のバンドが薄いことがありますので、見落とさないように気をつけてください。
(d) 予想されるバンドが 1 本も見られない場合は失敗です。

Results of Gel Electrophoresis

