

PCR法，電気泳動法を用いた トウモロコシの遺伝の規則性の探究

—バイオテクノロジーの単元の教材開発—

奈良 尚久

高等学校の生物の教科書の内容も大きく変わり，急速に進歩する生命科学の研究成果が多く取り入れられている。バイオテクノロジーの単元では，PCR法や電気泳動法など分子生物学的手法が記載されているが，内容に対応した観察・実験及び探究活動が充実していない状況である。そこで，本研究では，トウモロコシを用いて，遺伝の規則性とゲノムの塩基配列の関係について，PCR法と電気泳動法を用いて確認できる教材の開発し，高等学校等で実践したので紹介する。

[キーワード] PCR 電気泳動 DNA SSR プライマー トウモロコシ

はじめに

学習指導要領の改訂に伴い，高等学校の生物の教科書の内容も大きく変わり，急速に進歩する生命科学の研究成果が多く取り入れられ，内容の充実が図られている^{*1)}。特に，バイオテクノロジーの単元では，PCR法^{*2)}や電気泳動法など分子生物学的手法が記載されているが，試薬や機器が高額であること，プライマーの設計の難しさなどから，内容に対応した観察・実験及び探究活動が充実していない状況である^{*3)}。また，遺伝の単元において，親と子で遺伝の規則性をゲノムの塩基配列で確認する実験や探究活動がないことから，分子生物学と遺伝の概念を包括的に理解させ，十分な探究をさせるには不十分な状況である。そこで，本研究では，北海道の代表的な作物であるトウモロコシを用いて，遺伝の規則性とゲノムの塩基配列の関係について，PCR法と電気泳動法を用いて確認できる教材の開発を行い，教材を通して興味・関心を高めるとともに，基本的な概念をより深くかつ包括的に理解させ，科学的な思考力，判断力及び表現力を育成させる教育プログラムを開発することを目的とする。

1 PCR法とは

PCR (Polymerase chain reaction)は分子生物学の研究のみならず，医療や犯罪捜査，畜産や農作物の品種改良など社会の中でも幅広い分野に応用されている。目的の塩基配列を選

び出し，高温条件下で失活しないDNAポリメラーゼと，起点となるプライマーを用い，3段階に温度を変えながら反応させる。95℃でDNAが変性して1本鎖になり，55～65℃でプライマーが相補的に結合し，72℃で複製反応が起こる。これが1サイクルにあたり，DNAが2倍に増幅される。このサイクルを22回行うと計算上は100万倍にまで増幅される(図1)。

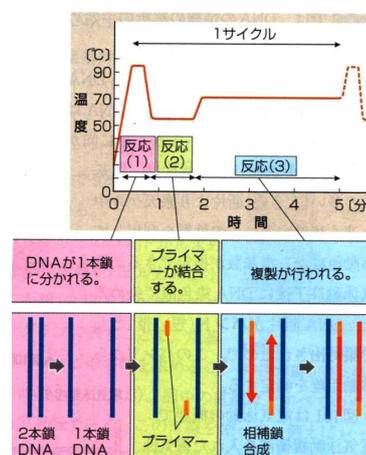


図1 PCRの原理^{*4)}

2 プライマーの設計

本研究では，DNA レベルでの農作物の品種判別等で用いられているSSR^{*5)} (マイクロサテライト: Simple Sequence Repeats)を挟むようにプライマーをセットした。SSRとは，生物のゲノムDNA中の主に遺伝子をコードされていない非コード領域において見

られる数塩基の単純反復配列(繰り返し配列)のことであり,染色体上に広く分布している。SSRは,自然淘汰されることがなく,過去に起きた突然変異がよく保存されていることから,個体間でSSRの長さに差が見られる。さらに,目的の遺伝子とSSRの染色体上の位置が近い,つまり,連鎖しているSSRを見つけることで,SSRを目的の遺伝子の目印にすることで,品種判別やヒトでは犯人や親子鑑定に用いられる。また,ホモとヘテロのSSRを電気泳動で調べたときに,バンドの位置が異なる共優性マーカーであることが多く,親子判別といった多型を調べることができ,かつ短い塩基配列で調べることができる(図2)。本研究では,SSRの特性に着目し,遺伝の規則性とSSRの塩基配列の長さの関係を調べるために,プライマーの選定や,PCR法,電気泳動法を用いて行った。

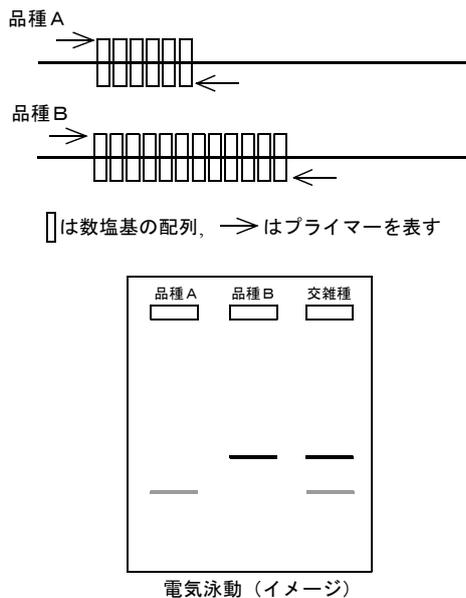


図2 SSRのイメージ

また, MaizeGDB^{※6)}(Maize Genetic and Genomics Database)という,トウモロコシのゲノム情報や,遺伝資源,形質情報など,膨大な情報を内包しているデータベース(図3)があり,プライマー情報を用いて設計したプライマーを用いた。

Highlighted Sequence: (Primer regions in red; Amplicon region in yellow)

```
>gi|4432583|gb|G44748.1|G44748 umc1076 CA library Zea mays STS genomic. sequence
tagged site
CAAGCACTATGCATATATGAAAAATACCAA TGGAAATACAAATGAAAGATGATAGATAGTAAGCAAAATTAATAATTG
GTATTACACTAAGTTCTCAAGTTTGTGTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
CACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
AATTAAGTTCCAGACACACAGAGTTTATAAGATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AATTTTAAAGTGCCTTGGAAATGAAATTTAGTCTCNAAGATTCCAAATTATAGAACATTCTCCOCCAAAATTTGTGCAACACG
ACATAATATCTTGGAAATGAAATTTAGTCTCNAAGATTCCAAATTATAGAACATTCTCCOCCAAAATTTGTGCAACACG
ATGAATACTGTTTAAAGAACTT
```

図3 MaizeGDBに記載されているプライマー情報(濃い部分プライマーの結合部位を示している)

3 実験方法

(1) 実験試料

試料として,トウモロコシを用いた。トウモロコシは,トウモロコシは個体内雌雄異花で,自殖でも他殖でも受精することから,遺伝研究のモデル植物として今日まで様々な研究が行われている。さらに,北海道の多くの地域で生食用,飼料用として栽培されており,身近な植物でもあることから,生物の授業教材として適している。今回用いたのは,独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センターから飼料用トウモロコシ自殖系統Ho112とHo100の葉のサンプル及びF₁品種(きよら)の種子を供与していただき,F₂については,F₁の種子を当センター圃場にまいて自家受精させて得た。

(2) 実験器具

トウモロコシの葉,マイクロピペット(1000 μL, 200 μL, 20 μL, 2 μL),サンプリングチューブ(2.0mL, 0.2mL),プライマー(フォワード,リバース),PCR用8連チューブ,サーマルサイクラー,DNA抽出試薬,遠心分離機,ウォーターバス,温度計,DNAポリメラーゼ,MgCl₂,dNTP,10×Reaction Buffer,油性マーカーペン,Tris-HCl,EDTA,オートクレーブ水,アガロース,Tris,EDTA・2Na,ブロモフェノールブルー,ホウ酸,グリセロール,DNA染色液,マグネチックスターラー,デジタルカメラ,暗箱,青色LEDイルミネーター

(3) 実験方法

A DNAの抽出とPCR用サンプルの調製

① トウモロコシの葉(親,F₁)0.5gそれぞれ計り,サンプリングチューブに入れ,先を火で軽くあぶってつぶしたチップを用いて葉をつぶす。

- ② マイクロピペットを用いてDNA抽出試薬を1 mL入れ、95°Cに設定したウォーターバスに5分間入れる。
- ③ 2分間静置した後、遠心分離機（10,000G）を5分間行い、固体成分と液体成分に分離する。
- ④ 新しいサンプリングチューブを用意し、マイクロピペットで方法③の液体成分のみを移す。
- ⑤ 新しいサンプリングチューブを用意し、マイクロピペットを用いて方法④の上澄を20 μ Lとる。さらに、Tris-EDTAバッファー（表1）を780 μ L入れて40倍に希釈し、軽く攪拌する。
- ⑥ 方法⑤の溶液を遠心分離機（図4）にかけた後、マイクロピペットを用いてPCR用の8連チューブ（図5）にそれぞれ4 μ Lずつ入れる

表1 Tris-EDTAバッファー

試薬	添加量
1mmol Tris-HCl	5mL
0.5mmol EDTA (pH=8.0)	1mL

精製水で500mLにメスアップする。



図4 遠心分離機



図5 PCR用8連チューブ

- ⑦ マイクロピペットを用いてDNA合成酵素を含んだマスターミックスを50

倍量（表2）をつくり、方法⑥の8連チューブに6 μ Lずつ入れる。

表2 マスターミックス（50倍量）

試薬	添加量
DNAポリメラーゼ	2.5 μ L
50mmol MgCl ₂	40 μ L
10mmol dNTP	10 μ L
10×Reaction Buffer	50 μ L

- ⑧ マイクロピペットを用いて方法⑦の8連チューブに、増幅したいDNAに合うように設計したプライマー（フォワード、リバース）をそれぞれ0.5 μ Lずつ入れ、油性マジックで印をつける。

B PCRによるDNAの複製

- ① サーマルサイクラー（図6）の電源を入れて、プライマーとDNAが結合（アニーリング）する最適温度を調整したプログラムを選択し、プログラム（表3）を確認する。
- ② Aで調製した8連チューブをセットする。ふたが閉まっていることを確認し、スタートボタンを押す。
- ③ プログラムの終了後、増幅したDNAが入ったサンプリングチューブを取り出し、冷凍保存する。

表3 PCRサイクルのプログラム

温度と時間	サイクル
94°C 5分	20サイクル
94°C 15秒	
65°C 15秒 (各ステップ 毎に-0.5°C)	
72°C 30秒	
94°C 15秒	
55°C 15秒	30サイクル
72°C 30秒	



図6 サーマルサイクラー

表5 UltraPowerDNA入り0.125%BPB
グリセロール混合溶液

試薬	添加量
グリセロール	30 g
BNP (プロモフェノールブルー)	0.125 g
DNA染色液 (UltraPowerDNA)	3mL

Tris-EDTAバッファーで100mLにメスアップする。

C 電気泳動用ゲルの調製

- ① 500mLの三角フラスコを用意し、低分子解析用アガロースを9 g、5×TBE 300mL (ゲル濃度3%)を入れる。電子レンジで1分間程度加熱して攪拌した後、もう一度電子レンジで加熱し、沸騰したことを確認する。
- ② 火傷に注意して電子レンジから取り出し、60℃になるまでマグネチックスターラーを用いて攪拌する。
- ③ 方法2のアガロース溶液を電気泳動装置のゲルメーカーの目印の線まで泡が入らないようにして流し込む。
- ④ ゲルが固まったらアガロースゲルを電気泳動装置にセットし、泳動槽に0.5×TBEバッファー (表4) を500mL入れる。

- ② 泳動槽に付いているコームを抜き、泳動槽にセットしたゲルにサンプルを10μLアプライする。
- ③ 電気泳動装置 (図7) のスイッチを入れ、135Vで60分流す。



図7 電気泳動装置

表4 10×TBEバッファー

試薬	添加量
Tris	108 g
ホウ酸	55 g
EDTA・2Na	3.7 g

精製水で1Lにメスアップし、さらに20倍希釈 (0.5×TBE) して使用

- ④ 電気泳動終了後、電気泳動装置から取り外したゲルを暗箱 (図8) の中に移し、青色LED照射 (図9) してPCRで複製されたSSRをバンドで確認し、暗箱の穴に一眼レフをセットし、写真撮影を行う。

D 電気泳動前のサンプルの調製

- ① PCR終了後のサンプルに0.125%BPBグリセロール溶液とDNAの発色試薬であるUltraPowerDNAを3mLが入った混合溶液 (表5) を1.5μL入れた後、タッピングして5分間静置する。



図8 自作の暗箱



図9 青色LED照射装置

4 実験結果

北海道美深高校で行った電気泳動の結果を図10に示す。

p-ZmRR1(プライマー-696)	
フォワード	CTGCGTGTGCTATGTTAGG
リバース	GACATTGACACCTGATGTTA

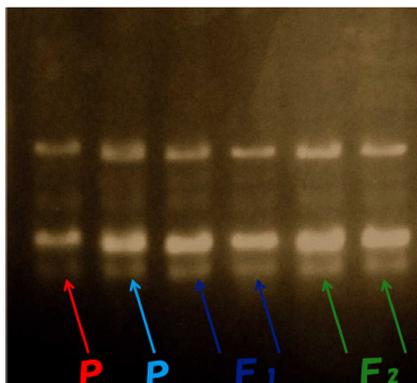


図10 電気泳動結果

真ん中の太いバンドに注目して見ると、F₁では、下側のバンドのみ見えており(今回のSSRは共優性ではなく、F₁に見えるバンドは優性のみである)、Pの左のバンドと同じ位置にあることから、Pの左のバンドはホモ、Pの右のバンドはヘテロ、F₂の左のバンドはPの右のバンドと同じ位置、F₂の右のバンドはPの左のバンドと同じ位置にあることがわかる。このように、つまり、ホモとヘテロでバンドの位置が異なり、親子判別といった多型を調べることができることを、SSRという短い塩基配列で調べることができる。

5 本研究の実践

(1) 教員向け研修講座での実践

本研究内容を、高校教員向け理科研修講座で

実践した。原理や方法を1つ1つ確認しながら実験を行い、PCR、電気泳動後の増幅されたDNAのバンドの位置から遺伝の規則性が確認した。さらに、本研究における考察を行い、プライマーの結合位置(図11)や、PCRでのDNAの増幅量、PとF₁のバンドの位置における親子関係などについて行った。

①プライマーの結合位置

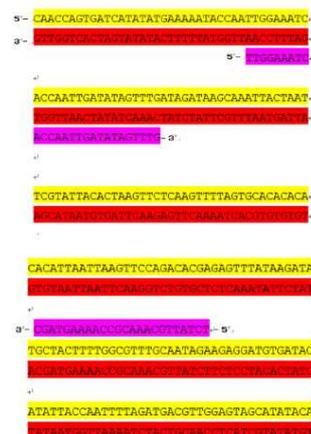


図11 プライマーの結合位置の演習プリント

実験後のアンケートから、本研究をするにあたり2つの課題を読み取ることができる。1つめは、先生方がPCRや電気泳動を生徒に指導する上での知識がやや不足していることである。研修講座では、原理や実験結果を踏まえた内容を中心に問題演習を行ったが、研修講座を通して初めて理解した先生が多いことがわかった。2つめは、先生方の所属する学校に本研究を行う実験設備がないことである。SSH校以外の学校には、サーマルサイクラーなどの本研究を行う上での実験設備がなく、実施が困難であることがわかった。このことから、本研究を行うためには、実験設備の貸し出しを行うなど、当センターがサポートできる体制づくりを整備していく必要がある。

(2) 北海道美深高等学校での実践

教員向け研修講座を受講した先生が所属する高校に当センターの実験設備を貸し出し、本研究を授業で実践した。実践したのは、美深高校の高校3年生の全員が履修する「生物」で、1

日目はトウモロコシからDNAを抽出してPCRで増幅させ、2日目は増幅したDNAを電気泳動を行い、バンドの位置から遺伝の規則性を確認した。また、電気泳動を行っているときの待ち時間には、DNAストラップを作製した。実験終了後の生徒のアンケートには、次のような記載があった。

- ・ 普段の授業ではできないDNAの実験を行うことができた。
- ・ マイクロピペットなど見たことのない実験器具や、その操作方法、専門用語がたくさんあり、貴重な体験となった。
- ・ 実験は操作が慣れてくるにつれて楽しくなっていた。実験を行うことで、DNAの複製などの理解が深まった。
- ・ 電気泳動によってバンドが移動していくように感動した。
- ・ 生物の奥深さを知ることができた。

本実験に対して肯定的な意見が多く、特に、DNAや、PCR、電気泳動についての記載が多いことから、本教材が基本的な概念をより深く理解させ、科学的に探究させる教材であることを示している。

今後は、進学希望者の多い学校で実践し、本研究に係る考察や探究活動を充実させた授業を行いたいと考えている。



図12 美深高校での授業風景（ゲルにアプライしている様子）

6 おわりに

本研究が、PCR法と電気泳動法などのバイオテクノロジーの単元における実験や探究活動、理科課題研究のテーマとして科学的に探究する能力や態度を育むことができる。

今後については、本研究では、1種類のプ

ライマーを用いてPCR、電気泳動を行い、遺伝の規則性を探究したが、今後は、2種類のプライマーを用いて、PCR、電気泳動を行い、連鎖・組替えを探究する教材を開発することや、F₁やF₂のバンドにおいて、親子判別が明確にできるような共優性のプライマーの選定も併せて行うことを考えている。さらに、当センターでの教員向け研修講座や、高校で本教材を用いた授業の実践など、教材の普及の充実を図っていきたいと考えている。

また、本研究は、当センターの研修講座と美深高校で実践したが、バイオテクノロジーに関する実験を普及させる上で、サーマルサイクラーや電気泳動装置など実験設備や、教員の実験スキルなど専門性の向上など、実験ができる環境づくりが急務であると考えている。

5 謝辞

最後に、本研究を進めるにあたり、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター黄川田智洋主任研究員、徳島文理大学香川薬学部伊藤悦朗教授に御指導いただいた。また、本研究を行うにあたり、北海道美深高等学校の八巻香織教諭には、授業実践やアンケート等のご協力をいただいた。心より感謝申し上げる。

参考文献

- 1) 中央教育審議会答申 平成20年1月
- 2) 谷口武利 PCR実験なるほどQ&A 羊土社
- 3) 片山 豪 分子生物学の教材開発 遺伝Vol.66 No.3
- 4) 本川達雄 生物 啓林館
- 5) GOLDSTEIN, David B., et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 1995, 139.1: 463-471.
- 6) SHAROPOVA, Natalya, et al. Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant molecular biology*, 2002, 48.5-6: 463-481.

(なら なおひさ 生物研究班)