

高等学校生物における形質転換実験用プラスミドの開発

Development of the Plasmid for Transformation Experiments in High School Biology

笠原 恵*
KASAHARA Megumi

高等学校での組換え DNA 実験が可能になって 18 年が経とうとしている。その間に 2 度の学習指導要領の改訂が行われ、遺伝子発現やバイオテクノロジーの内容が充実してきている。新学習指導要領では、観察・実験などを通して理解させることが重要になっており、探究活動の充実も示唆されている。しかし、教育現場ではまだまだ組換え DNA 実験が普及しているとは言い難い。

そこで、本研究では新学習指導要領に対応した遺伝子発現の実験や探究活動に使用できる大腸菌の形質転換用プラスミドを開発した。大腸菌と同じ原核生物であり大腸菌と同様のプロモーターを持つネズミチフス菌由来の酸性ホスファターゼ遺伝子 (*phoN*) と真核生物であるオワンクラゲ由来の GFP 遺伝子 (大腸菌のラクトースオペロンのプロモーターを持つ) の 2 つの遺伝子を持つプラスミドを作製した。高等学校の設備や予算などの現状に合わせて選択培地を選ぶことができる他、このプラスミドと大腸菌株の組み合わせで探究活動も可能であると考えられる。今後、このプラスミドが高等学校の教育現場で普及することを期待したい。

キーワード：形質転換、プラスミド、大腸菌、酸性ホスファターゼ遺伝子 (*phoN*)、GFP 遺伝子

Key words : transformation, plasmid, *Escherichia coli*, acid phosphatase gene (*phoN*), GFP gene

1 はじめに

高等学校における組換え DNA 実験は、2002 (平成 14) 年 1 月告示、3 月施行の「組換え DNA 実験指針」の中に教育目的組換え DNA 実験の項目が付け加えられ初めて可能になった。その後、2003 (平成 15) 年 6 月に「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」が公布、2004 (平成 16) 年 2 月に施行され、高等学校での組換え DNA 実験は、現在に至ってもその法律のもとで実施されている。

現行の学習指導要領 (文部科学省 2009) では、第 2 章、第 5 節 理科、第 7 生物、2 内容 (1) ウ (イ) 遺伝子の発現調節、3 内容の取り扱いにおいて、転写レベルでの遺伝子発現の調節を扱うこととされている。新学習指導要領 (文部科学省 2019) においてもほぼ同様の扱いになっているが、観察・実験などを通して理解させること、また観察、実験などの技術を身に付けさせることになっており、組換え DNA 実験が現在より一層取り組まれる内容になると考えられる。

現在使用されている各教科書では、表 1 のような実験が記載されている。扱う遺伝子としては、大腸菌 (原核生物) 由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) やオワンクラゲ (真核生物) 由来の GFP 遺伝子がある。そして遺伝子発現の検出系としては、青色発色あるいは緑色蛍光発光が主である。5 社の教科書の内 3 社の教科書

では、大腸菌にプラスミド DNA を導入させる形質転換実験を行うことにより、目的遺伝子の発現を検出している。また 1 社の教科書では、プラスミド DNA が既に導入された大腸菌 (形質転換済みの大腸菌) を選択培地で観察させることにより遺伝子発現を観察させている。この 4 社については、組換え大腸菌を使用することになるため、組換え DNA 実験として法のもとで実験が行われる必要がある。残りの 1 社の教科書は、大腸菌がゲノム上に本来持っている遺伝子の発現調節を選択培地で観察させているため、組換え DNA 実験ではなく、通常の教室でも実施可能な実験となっている。

高等学校の現状として、SSH (スーパーサイエンスハイスクール) 指定校以外の高校では、形質転換実験にかかる実験準備の煩雑さや設備・費用の問題等により実施しているところは少ない (data not shown)。GFP の発光を検出するためには UV 照射装置 (トランスイルミネーター) が必要である。また、青色発色を検出するためには、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) や IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) などの試薬も必要である。高等学校の現状に合わせて、どのような遺伝子を使用するか考える必要があるが、外来遺伝子の導入の検出と遺伝子発現の調節を一度に考えさせることは難しい面もあると思われる。

そこで、本研究では、大腸菌と同じ原核生物であり大腸菌と同様のプロモーターを持つネズミチフス菌の

*兵庫教育大学大学院教育実践高度化専攻理数系教科マネジメントコース 教授

令和2年4月24日受理

表 1 各教科書に記載されている形質転換実験について

東京書籍		実教出版		第一学習社	
単元	啓林館	東京書籍	実教出版	第一学習社	第一学習社
章	遺伝現象と物質	バイオテクノロジー	遺伝情報の発現	遺伝子の発現調節	遺伝子の発現調節
項目	実験 探究活動	バイオテクノロジーの発展と課題	バイオテクノロジー	真核生物の発現調節	原核生物における遺伝子の発現調節
タイトル	実験 探究活動	探究	探究活動	観察&実験	実験
	遺伝子の発現調節	パン酵母を利用した組換えDNA実験	遺伝子組換え実験 発光タンパク質GFPの遺伝子の大腸菌への導入	遺伝子発現の誘導の観察	ラクトースオペロンにおける遺伝子の発現調節
頁 (頁数)	p.94 - p.95 (2)	p.128 - p.129 (2)	p.132 - p.135 (4)	p.130 (1)	p.131 (1)
菌株	大腸菌 JM109株	大腸菌 (菌株未記載)	酵母, 変異体酵母 (UR43欠失)	大腸菌 (菌株未記載)	大腸菌 HB 101株
プラスミド	pUC19 (β -ガラクトシダーゼ遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子が組み込まれているもの)	GFPの遺伝子をもつプラスミド(プラスミド名未記載)	ウラシル合成酵素の遺伝子とアミラーゼ遺伝子をもつプラスミド(プラスミド名未記載)	pGLO (GFP遺伝子, <i>bla</i> 遺伝子, <i>araC</i> 遺伝子をもつプラスミド)	
選択培地	寒天培地(組成未記載), Amp, X-gal・IPTG	LB寒天培地, Amp, Ara	YPD培地, 最少培地(ウラシル欠損培地), デンプン培地	LB寒天培地, Amp, Ara	LB寒天培地, X-gal・IPTG
確認方法	青色発色	UV照射で緑色蛍光	コロニーの有無, アミラーゼ活性 (ヨウ素デンプン反応)	UV照射で緑色蛍光	青色発色

酸性ホスファターゼ遺伝子 (*phoN*) と真核生物であるオワンクラゲ由来の GFP 遺伝子 (大腸菌のラクトースオペロンのプロモーターを持つ) の2つの遺伝子を持つプラスミドを作製した。*phoN* 遺伝子は二成分制御系の *phoP-phoQ* 遺伝子により調節されており, 培地中のリン酸濃度の低下を感知すると発現誘導が起こる。*phoN* 遺伝子は大腸菌のゲノム上にはないが, 制御遺伝子の *phoP-phoQ* 遺伝子は存在している (Kasahara 1991)。そのため, *phoN* 遺伝子が大腸菌に導入した場合, *phoN* の発現が見られる。大腸菌はアルカリホスファターゼ遺伝子 (*phoA*) を持つが, この遺伝子は, 二成分制御系の *phoB-phoR* 遺伝子により強力に調節されており, リン酸欠乏培地でのみ発現が誘導されるため, 通常の大腸菌の栄養培地では発現が抑えられている (牧野 1989)。これらのホスファターゼは, リン酸モノエステル結合を切る酵素であるため, 培地中に基質である X-P (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-phosphate) があると X と P の間の結合が切れて, X の部分が酸化され青色に発色する。また, GFP 遺伝子は, ノーベル賞受賞者の下山博士が発見した遺伝子で, その遺伝子が発現すると UV 照射により緑色発光が観察できる。本報では, この pGFP-*phoN* プラスミドの作製方法について記載するとともに, このプラスミドを使って形質転換実験を行なった場合に, どのような結果がもたらされるか, どのような実験系が考えられるかについて考察した。

II 材料と方法

A 材料

2種類のプラスミド, pUC19 および pGFP_{uv} を購入し (Clontech TAKARA), そのプラスミドを大腸菌へ導入後, それらの大腸菌を増殖させ, そこからプラスミド DNA を精製し実験に使用した。また, ネズミチフス菌の酸性ホスファターゼ遺伝子を持つプラスミド *phoN* (笠原ら 2007) も同様に増やし使用した。大腸菌株は JM109 (TOYOBO), CSH26 (Miller 1992) を使用した。これらの概要を表 2 に示す。

B 方法

(1) pGFP-*phoN* プラスミドの作製方法

表2 本研究で使用した大腸菌株およびプラスミド

大腸菌株・プラスミド	遺伝子型・特性
大腸菌株	
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), <i>e14⁻</i> (<i>mcrA⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) / F' [<i>traD36</i> , <i>proAB⁺</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15]
CSH26	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ (<i>pro-lac</i>), <i>met</i> , <i>thi</i>
プラスミド	
pUC19	プラスミドベクター, アンピシリン耐性 (Amp ^r)
phoN	酸性ホスファターゼ遺伝子を持つプラスミド, Amp ^r
pGFPuv	GFPバリエントベクター, Amp ^r
pGFP-phoN	pGFP _{uv} の3' MCSに酸性ホスファターゼ遺伝子を持つプラスミド, Amp ^r

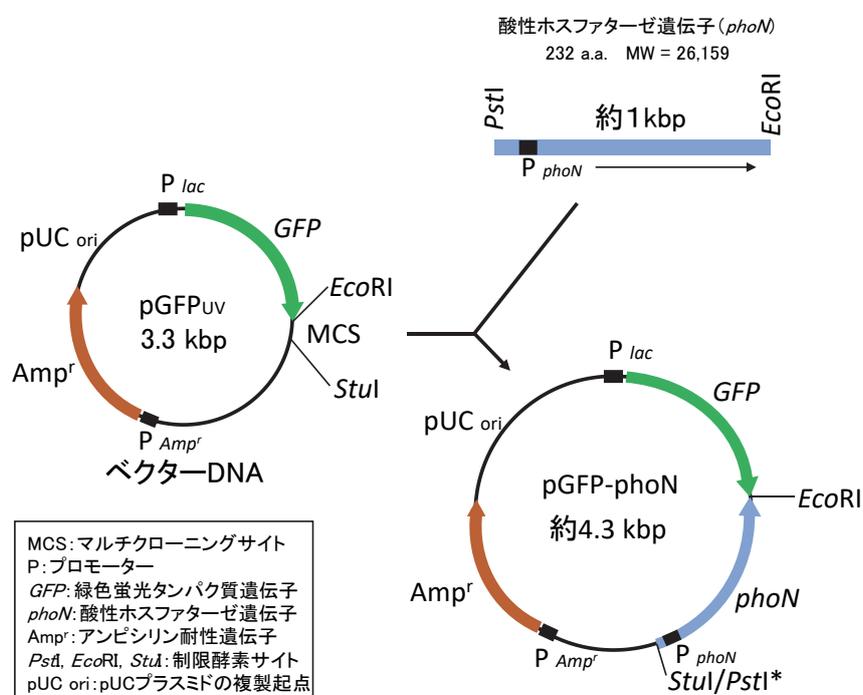


図1 プラスミド pGFP - phoN の作製方法の概略

酸性ホスファターゼ遺伝子を持つプラスミド *phoN* を制限酵素 *PstI* で切断し、その末端を平滑末端になるように DNA Blunting kit (TAKARA) を用いて処理をした。その後、制限酵素 *EcoRI* で切断し、プロモーターを含む酸性ホスファターゼ遺伝子領域の約 1 kbp の DNA 断片を精製した。次に GFP 遺伝子を持つプラスミド pGFPuv を制限酵素 *EcoRI* と *StuI* で切断し、そこへ前述の約 1 kbp の DNA 断片を Ligation high (TOYOBO) を使い結合させた。GFP 遺伝子と *phoN* 遺伝子を逆向きに挿入したのは、それぞれの遺伝子のプロモーターからのリードスルーを防ぐためである。その後、大腸菌 JM109 株へ導入し、PhoN⁺ GFP⁺ のコロニーを選択し、その大腸菌

を多量に増殖させ、そこからプラスミドを NucleoBond Xtra Midi (TAKARA) を用いて精製し、以下の形質転換実験に使用した。pGFP - phoN プラスミドの作製方法の概略を図1に示す。

(2) 形質転換実験

大腸菌の形質転換は、Green and Sambrook (2012) の方法に従った。使用したプラスミドは全てアンピシリン耐性遺伝子 (Amp^r) を持つため、培地には最終濃度が 100 μ g/mL になるようにアンピシリンナトリウム水溶液を加えた。また、酸性ホスファターゼ (PhoN) の選択培地には、最終濃度が 40 μ g/mL になるように X-P を加えた。この培地では、PhoN を作る大腸菌のコロ

ニーは青色を呈する。一方、GFP は真核生物の遺伝子であるため、大腸菌で発現させるためには大腸菌のプロモーターが必要である。そのため GFP 遺伝子のプロモーターには大腸菌ラクトースオペロンのプロモーター領域（オペレーターを含む）が使用されている。GFP 遺伝子の発現には、ラクトースオペロンのリプレッサーである LacI をラクトースもしくはアロラクトースの誘導体である IPTG でオペレーターから外す必要がある。そのため、GFP 遺伝子の発現誘導の培地には、最終濃度が 100 μ M になるように IPTG を加えた。GFP 遺伝子の発現には、トランスイルミネーター上に大腸菌のコロニーが生えた寒天培地を置き、その下から UV を照射し、緑色蛍光を発することで確認した。pGFP プラスミドは pUC19 プラスミド由来であり、pGFP のコントロールとして pUC19 を使用した。pUC19 は、 β -D-ガラクトシダーゼ（LacZ）の α フラグメントを持つ。大腸菌 JM109 株は、ラクトースオペロンを欠失しているが、F 因子上に LacZ の ω フラグメントを持つ（*lacZ* Δ M15）。 α フラグメントと ω フラグメントが共存すると複合体を形成し LacZ の活性を示す（ α 相補性）。LacZ の選択培地には、最終濃度が 40 μ g/mL になるように X-gal を加えた。形質転換後の大腸菌は T 寒天培地（トリプトン 10g, NaCl 5g / 1L H₂O, 寒天 15g）に広げ、37°C で一晚生育させた。一般的な大腸菌の培地は LB 培地（トリプトン 10g, 酵母エキス 5g, NaCl 5g / 1L H₂O, pH 7.2, 寒天 15g）であるが、酵母エキスが入っているため培地の色が T 培地より濃くなる。発色や発光の確認にはより薄い色の T 培地が適していると考えたため、本実験では T 培地を使用した。

III 大腸菌形質転換実験の結果

2 種類の大腸菌株と 3 種類のプラスミド（表 2, 図 2）を使用した形質転換実験の結果を表 3 に示す。また、以下に示す実験結果の代表的な大腸菌コロニーの発色および緑色発光の様子を図 3 に示す。

(1) 大腸菌 JM109 株を使用した場合

大腸菌 JM109 株に pUC19 を導入した場合、IPTG, X-gal の選択培地で青色に発色した。これは、大腸菌株とプラスミドの間で α 相補性が起こったためである。pGFP を導入した場合、IPTG が入った培地で GFP 遺伝子の発現が見られ、UV を照射することで緑色蛍光の発光が見られた。これは、GFP 遺伝子のプロモーターにラクトースオペロンのプロモーターが使用されているためである。本研究で作製した pGFP-*phoN* を導入した場合、X-P が入った培地で *phoN* 遺伝子の発現が見られ、コロニーが青色を呈した（図 3C）。また、IPTG が入った培地で GFP 遺伝子の発現が見られ、UV を照射することで緑色蛍光の発光が見られた（図 3E）。IPTG と X-P

が入った培地では、GFP 遺伝子の発現も *phoN* 遺伝子の発現も見られ、コロニーは青色になったが、緑色蛍光は少し見にくくなった（図 3F）。

(2) 大腸菌 CSH26 株を使用した場合

大腸菌 CSH26 株は、ゲノム上のプロリンの合成遺伝子からラクトースオペロンまでが欠失した菌株であり、ラクトースリプレッサー（*lacI*）も欠失している。そのため、外来遺伝子の導入に挿入されたラクトースのプロモーターは常に働くことになる。

大腸菌 CSH26 株に pUC19 を導入した場合、IPTG 不要で、X-gal が入った選択培地で青色に発色した。pGFP を導入した場合、T 培地を除く全ての培地で GFP 遺伝子の発現が見られ、UV を照射することで緑色蛍光の発光が見られた。T 培地では、形質転換した大腸菌もしなかった大腸菌も培地上に一面に生えるため、形質転換したものだけが緑色蛍光を発した。本研究で作製した pGFP-*phoN* を導入した場合、X-P が入った培地で *phoN* 遺伝子の発現が見られ、コロニーが青色を呈した。GFP 遺伝子の発現に関しては、pGFP を導入した場合と同様の結果が得られた。

IV 考察

高等学校における大腸菌の形質転換実験は、遺伝子発現の調節の単元やバイオテクノロジーに関する単元で欠かすことのできない実験であると考えられる。新学習指導要領（文部科学省 2019）では、「観察、実験などを行い、科学的に探究する力を養う」ことが目標に挙げられており、教科書においても実験が充実したものになると考えられる。現教科書では、ほとんどの教科書で大腸菌の形質転換実験が記載されているが、大腸菌株が不明であったり、プラスミドが未記載であったりと、形質転換実験をスムーズに行うことが困難であると考えられる。また、高等学校の設備や予算の問題で、緑色蛍光の発光を見るための装置がないという場合も想定される。

一方、生徒にとって、初めから遺伝子発現の調節の実験を行い、調節遺伝子による誘導を理解をさせることは難しいのではと感じる。その前段階として、遺伝子発現の誘導なしに外来の遺伝子の導入のみで形質が変化する現象から生徒に観察させ、その後で遺伝子発現の誘導を必要とする実験を経験させた方が、遺伝子の発現誘導に関する基本的な原理の理解を深め、科学的に探究しようとする態度が培われるのではないかと考えられる。

以上のような観点から、本研究では pGFP-*phoN* プラスミドを作製した。このプラスミドは原核生物由来の *phoN* 遺伝子と真核生物由来の GFP 遺伝子の両方を持っている。そのため、*phoN* 遺伝子を大腸菌に導入するだけで、基質さえあれば何の誘導もなく形質転換を青色発

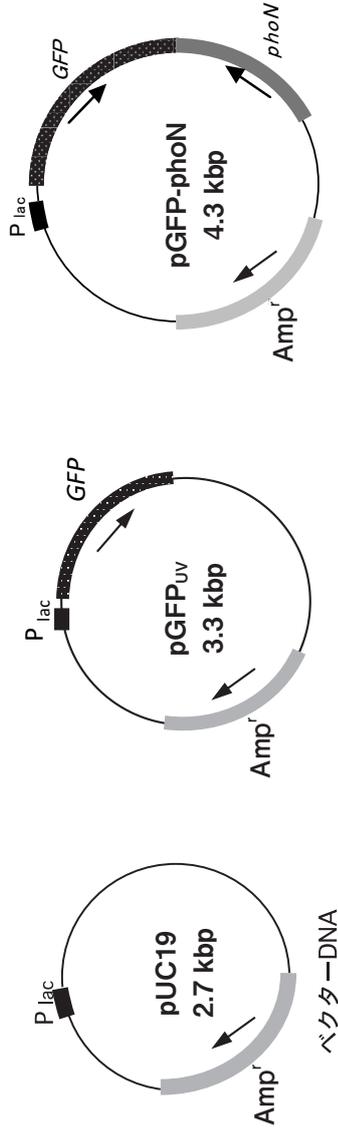


図2 大腸菌の形質転換実験に使用したプラスミド3種の構造

表3 大腸菌の形質転換結果

大腸菌株/plasmid	培地							
	T	T / Amp	T / Amp, IPTG	T / Amp, X-P	T / Amp, IPTG, X-P	T / Amp, X-gal	T / Amp, IPTG, X-gal	
JM109 / no plasmid	+++*	—	—	—	—	—	—	
JM109 / pUC19	+++	++++	+	+	+	+	+(青色)	
JM109 / pGFP	+++	+	+(緑色蛍光)	+	+(緑色蛍光)	+	+(緑色蛍光)	
JM109 / pGFP-phoN	+++	+	+(緑色蛍光)	+(青色)	+(緑色蛍光, 青色)	+	+(緑色蛍光)	
CSH26 / no plasmid	+++	—	—	—	—	—	—	
CSH26 / pUC19	+++	+	+	+	+	+(青色)	+(青色)	
CSH26 / pGFP	+++ ±** (緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	
CSH26 / pGFP-phoN	+++ ± (緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光, 青色)	+(緑色蛍光, 青色)	+(緑色蛍光)	+(緑色蛍光)	

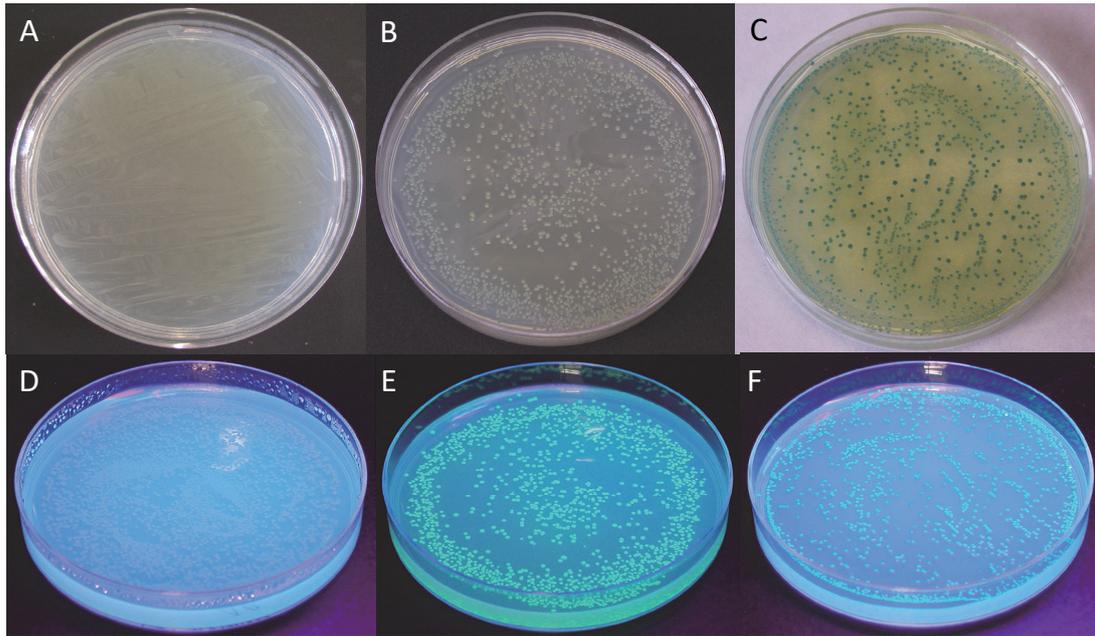
* ; 非常に多くのコロニー (プレート上でコロニーをカウントできないくらいの数) が見られる。

** ; 白いコロニーが多数ある中に、緑色蛍光を発するコロニーが見られる。

*** ; コロニーは見られない。

**** ; *のコロニーの数に比べて少ないコロニーが見られる。

() ; コロニーの発色・発光の様子を示す。他は白いコロニーが見られる。



A～Cは、コロニーの発色（白または青）の結果を示し、D～Fは、UV照射によるコロニーの緑色発光結果を示す。
 A; JM109 / pGFP - phoN (T), B; JM109 / pGFP - phoN (T / Amp), C; JM109 / pGFP - phoN (T / Amp, X-P)
 D; JM109 / pGFP - phoN (T / Amp), E; JM109 / pGFP - phoN (T / Amp, IPTG),
 F; pGFP - phoN (T / Amp, IPTG, X-P)

図3 大腸菌の形質転換結果

色により観察することができる。また、遺伝子発現の誘導実験を行うのであれば、GFP 遺伝子の発現を IPTG で誘導し、緑色蛍光の発光で確かめることができる。1つのプラスミドで両方の遺伝子発現を観察することができる。さらに、大腸菌株を変えることで、IPTG の誘導なしに GFP 遺伝子の発現を観察させることも可能である。プラスミドの種類と大腸菌株を組み合わせることで、探究活動も可能になる。高等学校の設備や予算の状況によって選択培地を変えることで、様々な実験系が考えられる。以上のように pGFP-phoN プラスミドは、今後の高等学校での形質転換実験に有用であると思われる。今後、このプラスミドが高等学校の教育現場で普及することを期待したい。

追記

本研究で作製した pGFP-phoN プラスミドは、高等学校の形質転換実験に必要であれば分譲致します。その際は、著者までご連絡下さい。

V 引用文献

1. 浅島誠ほか 27名 (2018) 改訂 生物. 東京書籍. 平成 29 年検定.
2. Green, M. R., and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
3. Kasahara, M., Nakata, A., and Shinagawa, H. 1991.

Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* phoN gene which encodes nonspecific acid phosphatase. J. Bacteriol. Vol.173, pp.6760-6765.

4. 笠原恵, 西山侑希, 小河基子, 吉岡秀文, 渥美茂明. 2007. 教育目的組換え DNA 実験に関する教材開発研究. 兵庫教育大学教科教育学会紀要. 第 20 号, pp.1-8.
5. 牧野耕三. 大腸菌リン酸レギュロンのシグナルトランスダクション. 1989. 生物物理. Vol.29, No.5, pp.7-12.
6. Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
7. 文部科学省 (2009) 高等学校学習指導要領 (平成 21 年 3 月告示). 東山書房.
8. 文部科学省 (2019) 高等学校学習指導要領 (平成 30 年 3 月告示). 東山書房.
9. 本川達雄ほか 17 名 (2017) 生物 改訂版. 啓林館. 平成 29 年検定.
10. 嶋田正和ほか 22 名 (2018) 改訂版 生物. 数研出版. 平成 29 年検定.
11. 庄野邦彦ほか 19 名 (2018) 新訂版 生物. 実教出版. 平成 29 年検定.
12. 吉里勝利ほか 20 名 (2018) 改訂 生物. 第一学習社. 平成 29 年検定.