

遺伝の指導に関する実践的研究

筑波大学附属駒場中・高等学校

貝 沼 喜 兵

遺伝の指導に関する実践的研究

貝 沼 喜 兵

I はじめに

現代の生命科学の進歩は実にめざましいものがある。遺伝子工学によるインシュリン、成長ホルモン、インターフェロンの製造、クローニング、細胞融合による新しい種の育成、試験管ベビーなどがその典型例であろう。これらに対する倫理的批判は別として、生命科学の進歩はまさに驚異的である。

これらの成果の大半は、1953年、Watson と Crick による、「DNA の二重らせん構造と複製のしくみ」の提唱を契機にしている。そしてわずか30年たらずで遺伝子工学の実用化に到達したのである。

このような生命科学の飛躍的な発展は当然ながら理科 I の生物分野、および選択生物の指導内容にも反映されている。特に後者の「遺伝子と形質発現」の単元が最もそれと関連性が高い。

この単元の指導のポイントは、図1の基本命題（セントラルドグマ）である。これは、また、20世紀後半の生物学の得た生命の本質的な法則を示すものである。

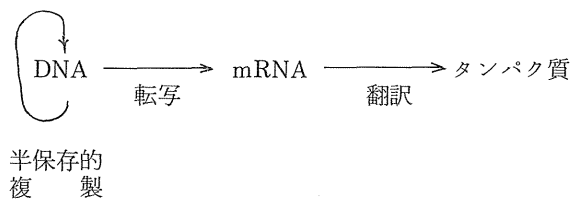


図1 基本命題（セントラルドグマ）

そこで、この単元を指導する上での、教師の課題は何であろうか。筆者は、それを、可能なかぎり工夫して実験を導入し、生徒に命題の本質をわかりやすく指導することであると考える。ところがこの単元での高校レベルにおける実験での実践例が極めて乏しく、大半の学校では講義だけで終わっているようだ。したがって、この重要な法則も教師にとっては指導しにくいし、生徒にとっては極めて難解なものになっているのが現状であろう。この障害を除去するには、なんと少しでも適切な実験を工夫し、生徒の興味と理解の促進をはかる必要がある。

このような観点から筆者は、ファージ r II 変異株の交配実験で遺伝子地図の作成を頂点とする一連の実験系を生徒に指導する過程で、上述の基本命題をどのように理解させようとしたかを本

論で実践的に明らかにしたい。また、遺伝子地図作成を目標としたフェージ実験では、基本的命題にふさわしい遺伝子概念の確立が、どのような実験を背景に提起されてきたのかを実証的に指導しようとした経過も本論で明らかにするつもりである。

II 指導計画

基本命題の実証的指導には、DNA を取り扱う基本的な実験と、それを支える微生物遺伝学の実験をすることが必要となる。いきなり生徒にフェージの組みかえ実験にとりくませても、生徒は混乱するだけで適切な効果をあげることはできない。基本的な実験を積み上げ、最後にフェージの組みかえ実験にもっていくのがよい。筆者は次の計画で指導をすすめている。

選択の「生物II」で、筆者は実験をA、Bの2項目に分けている。()は指導時間である。

A 形質転換を中心とする実験

1. 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の遺伝形質を調べる実験 (3時間)。

(1) 実験のねらい

微生物の遺伝形質の特徴を知り、微生物の取り扱いの基本を習得させる。

(2) 実験の概要

B. subtilis W₂₃ (wild) と Y_{S11} (mutant) を用い、選択培地で、栄養要求性突然変異株の遺伝形質を、どのように区別するかを実験で指導する。wild は最小培地 (M) にコロニーを形成できるが、mutant は、M にアデニン、ロイシン、アルギニンを加えないと生育できない。

すなわち、W₂₃^{ade⁺, leu⁺, arg⁺}, Y_{S11}^{ade⁻, leu⁻, arg⁻} である。実験は次の Table 1 を作成させることにある。

この実験では、また、菌の定量方法についても指導する。

Table. 1 *B. subtilis* の遺伝形質

	M	Ade ⁻	Leu ⁻	Arg ⁻	A ₁₁	Cells/ml
W ₂₃	101	122	89	57	121	1.0×10 ⁹
Y _{S11}	0	0	0	0	47	4.7×10 ⁸

2. 形質転換 (6時間)

(1) 実験のねらい

DNA が遺伝子の本体であることを実証させ、同時に DNA の化学的特性

について理解を深めさせる。この実験は次の3種の実験から構成されている。

(2) 実験の構成

① W₂₃ 生菌から DNA の抽出 (2時間)

② DNA 塩酸加水分解物のペーパークロマトグラフィーによる塩基の定量分析で、A : T = G : C (C + T : G + A) = 1 : 1 であることを明らかにし、二重らせん構造の基本を理解させる (2時間)。

③ Y_{S11} を前処理し、DNA を取り込める状態にし、W₂₃ DNA を処理し、対象実験で転換菌を検出する。この実験結果は Table 2 に示した。DNA が遺伝子の本体であることを実証する

実験としては、この実験が最も簡明である（2時間）。

B フェージに関する実験

1. フェージの遺伝形質と増殖法（3時間）

(1) 実験のねらい

T_4 フェージ r^+ (wild) と $r II$ (mutant) を用いて遺伝形質を区別する方法を理解させる。バクテリアのコロニーに対するフェージのプラーグの共通点と相違点について理解させ、同時に増殖法についても学ばせる。

(2) 実験方法の概要と結果

① 遺伝的特徴と定量法

r^+ と $r II$ の原液を与え、これを生徒に希釈させ、指示菌と共に λ 培地で一晚培養する。その結果を Table 3 ~ 4, ならびに photo 1 に示した。

Table. 3 $T_4 r II$ の遺伝形質

指示菌 フェージ	K12(λ)	BS
$T_4 r^+$	小型プラーグ	小型プラーグ
$r II$	プラーグ形成せず	r型プラーグ

Table. 2 形質転換菌の検出

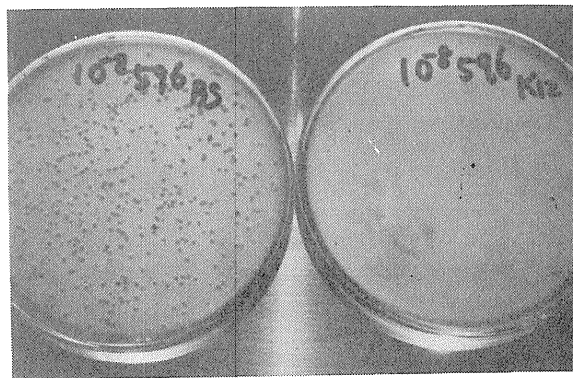
	10^{-1}		10^{-2}		備 考
I	3296	2808	448	638	CPY _{S11} + W23DNA
II	0	0	/		CPY _{S11} + DNase W23DNA
III	0	0			W23DNA only
IV	0	0	/		CPY _{S11} only

Ade⁻ の選択培地

IIは、DNA加水分解酵素で処理した
W23DNAを加えたもの

Table. 4 フェージの定量

フェージ	指示菌				フェージ/ml
	K12(λ)		BS		
$T_4 r^+$	46	39	35	43	4.1×10^{11}
$T_4 r II$	0	0	29	31	3.1×10^{11}



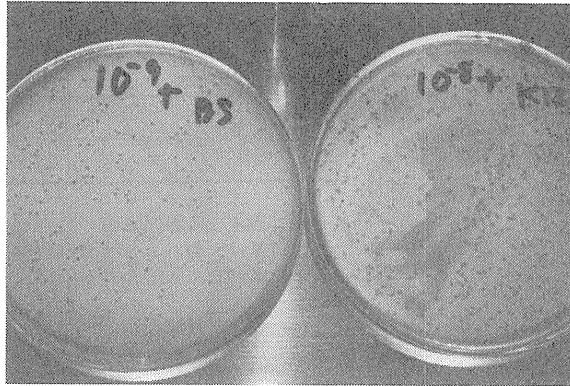


Photo 1 ファージの遺伝形質
 (ただし 596 は r II, + とは r⁺ のこと)

② ファージの増殖法

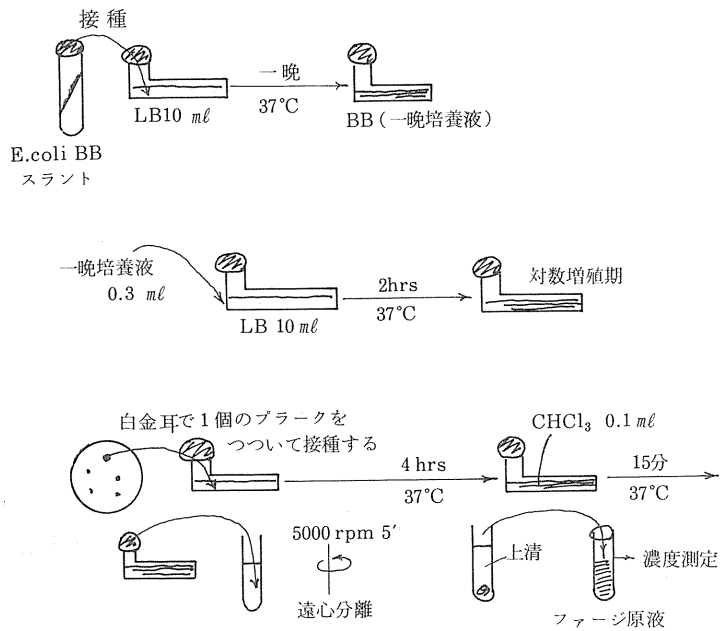


図 2 ファージ増殖法
 (* LBとは L-broth のこと)

Table 5 増殖ファージ濃度測定 (10^{-8})

指示菌 ファージ	K 12(λ)		B S		ファージ / ml
r ⁺	55	95	65	85	7.5×10^{11}
A 205	0	0	61	68	6.5×10^{11}
N 55	0	0	21	31	2.6×10^{11}
596	0	0	50	52	5.1×10^{11}
638	0	0	77	86	8.2×10^{11}

2. 一段増殖 (3時間)

(1) 実験のねらい

ファージの生活環を理解させる。

(2) 実験原理

ファージは、図3に示したとおり、大腸菌に感染すると、はじめにファージ DNA を複製する。ついでファージタンパク質を合成し、菌内に感染性の子ファージを形成する(暗黒期)。つぎにリゾチームを合成し、細胞壁を溶解し子ファージを放出する(潜伏期)。

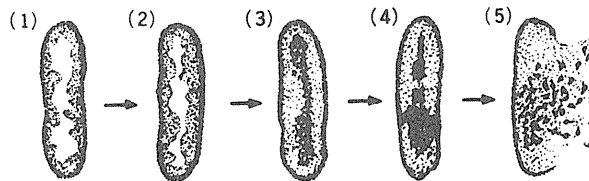


図3 T₄ファージ感染より溶菌までの形態的变化

[W. B. Wood, R. S. Edgar : Sci. Am, 1968 p. 155]

(1)ファージ吸着およびDNA放出, (2)宿主菌DNAの崩壊およびファージDNAの複製, (3)ファージ構造たんぱく質の合成, (4)ファージ粒子完成, (5)溶菌およびファージ粒子の放出

(3) 実験方法

大腸菌にファージを感染させ、一定時間ごとにサンプリングし、プラーク数を調べる(A系列)ことで潜伏期を、このA系列にクロロフォルム(CHCl₃)を加えて溶菌させ細胞中の子ファージを放出させてプラークを調べ(B系列)暗黒期を求めることができる。この実験の結果は Table 6 と図4に示した。

Table. 6 一段増殖法の結果

時間 (分)	A 系 列			B 系 列		
	希釈	プラーク数	ファージ/ml	希釈	プラーク数	ファージ/ml
0	10^{-1}	311	3.1×10^4	10^{-1}	1	1.0×10^1
7	10^{-1}	345	3.5×10^4	10^{-1}	0	0
14	10^{-1}	340	3.4×10^4	10^{-1}	21	2.1×10^1
21	10^{-1}	368	3.7×10^4	10^{-1}	134	1.3×10^2
25	10^{-1}	32	3.2×10^4	10^{-1}	185	1.9×10^2
30	10^{-1}	25	2.5×10^4	10^{-1}	63	6.3×10^1
45	10^{-1}	81	8.1×10^4	10^{-1}	137	1.4×10^2
60	10^{-1}	321	3.2×10^4	10^{-1}	548	5.4×10^2

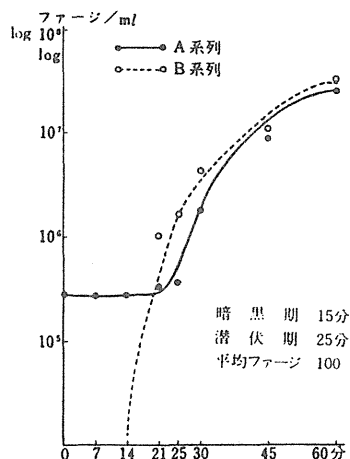


図4 一段増殖

3. 突然変異の誘起 (3時間)

(1) 実験のねらい

r^+ から r II (mutant) を分離する実験を通して遺伝研究と突然変異株の役割の重要性を理解させ、muton について考察させる。

(2) 実験原理と方法

r^+ に酸性条件で NaNO_2 を処理すると、ファージ DNA の塩基のアミノ基 ($-\text{NH}_2$) の一部は酸化されて水酸基 ($-\text{OH}$) になる。これが、複製するとき、 $\text{AT} \rightarrow \text{GC}$, $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$ の変化をする。また、これとは別に、DNA 分子に 1 個あるいは多数のヌクレオチド対の欠落を生じ致死作用を現わす。このため、多様な変異株の生ずる中から r II を選択することができる。

NaNO_2 で処理した r^+ を BS を指示菌として培養し、 r 型のプラークを拾う。これが r II かどうかをチェックすればよい。この実験で新しい r II が得られたら、まず cis-trans 相補性 test で変異部位を同定し、ついで 3 変異株を用いた組みかえ実験で遺伝子地図を作成するオリジナルな実験も可能で、生物部の実験、あるいは生物 II、または選択生物の課題実験のテーマとして大変魅力的である。この実験の結果については省略する。

4. シストランズ相補性テスト (3時間)

(1) 実験のねらい

cistron について理解させる。

(2) 実験原理

ファージの遺伝形質として最もポピュラーな r II は、 $\text{K}_{12}(\lambda)$ を指示菌とする培地ではプレー

クを形成せず、BSの指示菌ではr型のプラークを形成する。この機構は、 $K_{12}(\lambda)$ では、増殖するのに必要な初期タンパク質を合成できないためである。このタンパク質は、四次元構造で2個のサブユニットからなり、A、Bの2領域からなる2本のポリペプチドに由来し、互いに相補性がある。この研究は、S. Benzerによるもので、その原理は図5に示したとおりである。

(3) 実験方法

実験の手順を図6に示し、結果をTable 7と photo 2に示した。

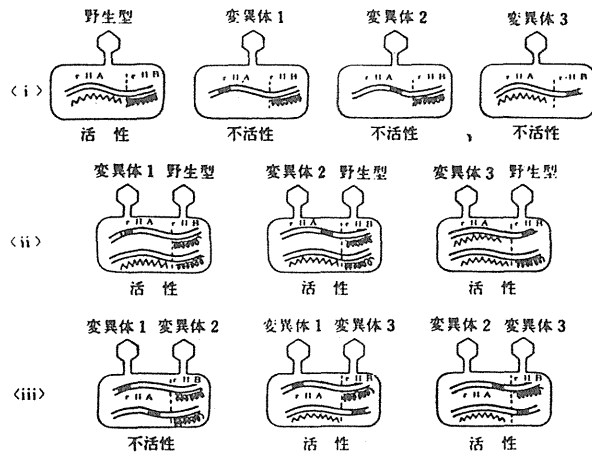


図5 大腸菌 K12株における $T_4 r_{II}$ の相補性 (S. Benzer : Scientific American, 206, 70, 1962に基づき改変)

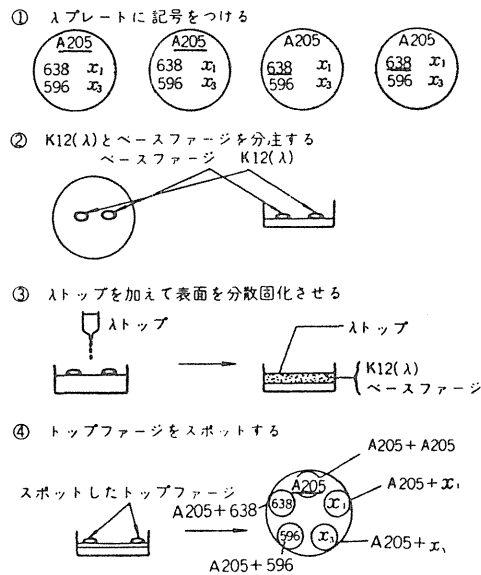


図6 シス・トランステストの実験の手順

Table 7 cis-trans 相補性テストの結果

スポット ベース	A 205	N55	596	638	判定
A 205(A)	-	-	-	+	A
N 55(A)	-	-	-	+	A
596(A)	-	-	-	+	A
638(B)	+	+	+	-	B

ただし、+は溶菌し相補あり、-は相補性なし

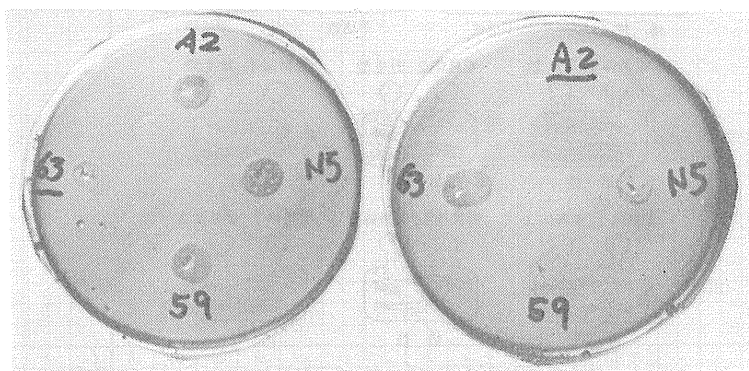


Photo 2 Cis-trans test

63, A2 はそれぞれベースフェージであることを示す

5. フェージの組みかえ実験 (5時間)

(1) 実験のねらい

r II (x_1, x_2, x_3) の 3 変異株を用い、組みかえ実験により遺伝子地図を作成させ、recon について考察させる。

(2) 実験原理

r II x_1, x_2, x_3 は、大腸菌 BB の細胞中で増殖する。その際、複製する DNA は互いに交差し組みかえ体を生ずる。そのしくみを図 7 に示した。

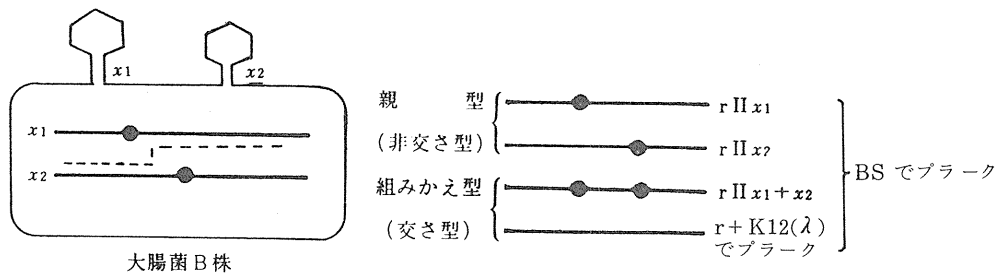


図 7 混合感染による組みかえ体の形成

このときの交さ率は、全ファージ（BSを指示菌とするプラーク数）に対する組みかえ型ファージ（ $K_{12}(\lambda)$ 上でのプラーク数の2倍）で示される。

$$\text{組みかえ率} = \frac{\text{組みかえファージ}}{\text{全ファージ}} \times 100 = \frac{K_{12}(\lambda) \text{ 上のプラーク数} \times 2}{\text{BS 上のプラーク数}} \times 100$$

x_1, x_2, x_3 を次のように組み合わせその交さ率を求めた結果、もし、 $A(3\%) + B(2\%) = C(5\%)$ になれば、遺伝子地図は、図8のようになるはずである。ただし、ファージの混合は次のとおりとする。

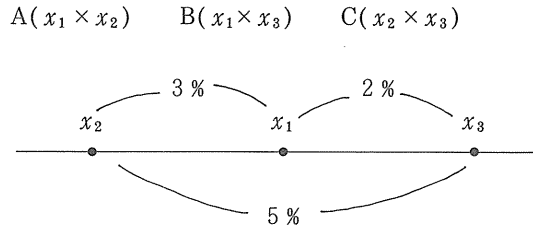
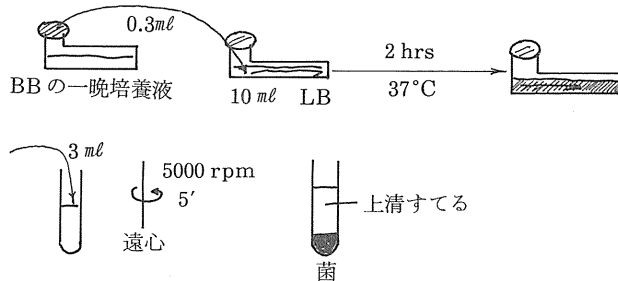


図8 遺伝子地図

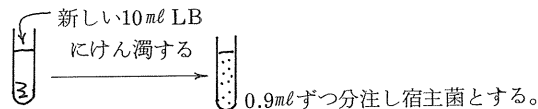
(3) 準備

① $2 \times 10^8 / \text{ml}$ の E. coli BB の調整 (図9)

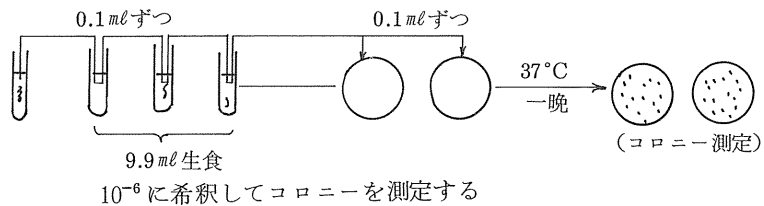
(1) 図9 $2 \times 10^8 / \text{ml}$ の BB の調整



(2) 遠心して培地の交換



(3) 菌数のチェック



② 混合ファージの調整

mutant (原液の濃度)	原液	LBに希釈 (1.0 mlずつ等量混合)
x_1 (6.5×10^{11})	0.09ml	→ 3 ml A ($x_1 \times x_2$)
x_2 (2.6×10^{11})	0.23ml	→ 3 ml B ($x_1 \times x_3$)
x_3 (5.1×10^{11})	0.12ml	→ 3 ml C ($x_2 \times x_3$)

図10 混合ファージの調整法

なお、混合する前に予定どおり $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ になっているかどうかを 10^{-7} に希釈してプラークを調べておく。

③ 培地などの準備

λ ボトム35枚, λ トップ 100 ml (三角フラスコ入り), LB 10ml 1本, LB 9.9 ml 3本, LB 9.0 ml 3本, メスピペット (10ml 3本, 1.0 ml 5本, 0.2 ml 25本), 指示菌 (K₁₂ (λ), BS), 温度計, ビーカー (500 ml) など。

(3) 実験の方法

- ① 宿主菌 A, B, C ($2 \times 10^8/\text{ml}$...0.9 ml 入り), ファージ混合液 (A, B, C), 希釈液などを 37°C 2分間保温する。
- ② 宿主菌に混合ファージを感染させ5分間保温する。
- ③ 10^{-3} に希釈して60分間培養する。
- ④ CHCl_3 を 0.1 ml ずつ加え15分間保温, 溶菌させファージを放出させる。ここまですを図11にまとめた。
- ⑤ 培養液を希釈し, プラーク数の調査の方法を図12に, 結果を Table 8~10に示した。

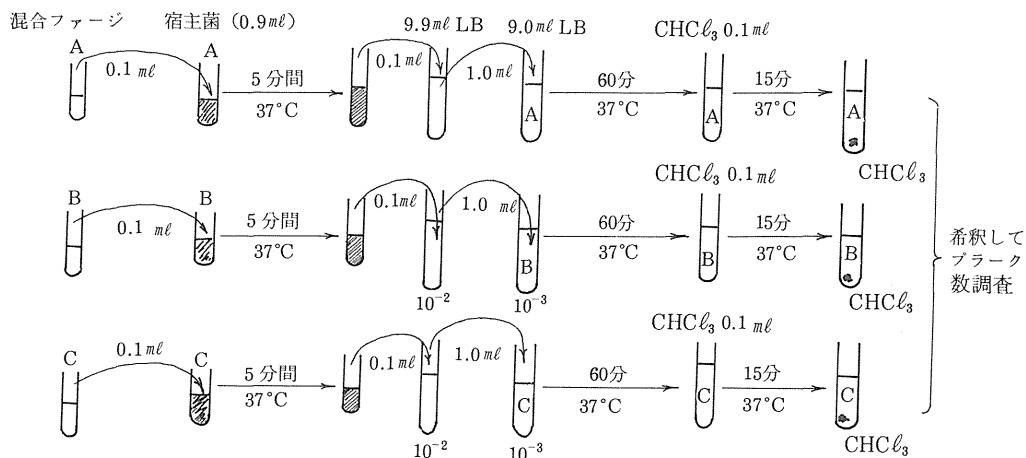


図11 宿主菌にファージを接種し増殖ファージを調べる (組みかえ実験)

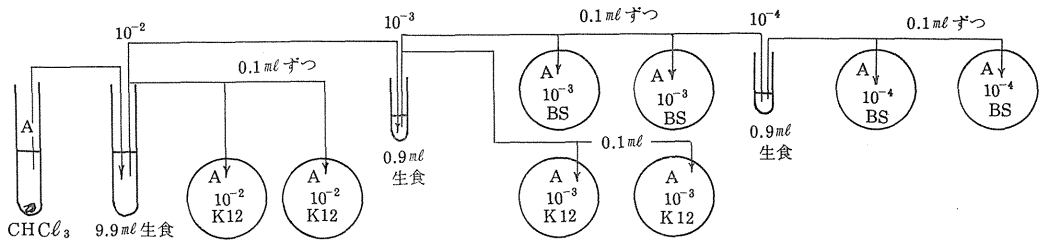
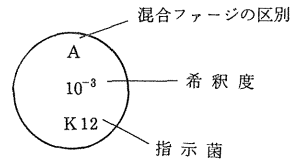


図12 プラーク数調査 (Aのみ, B, Cはこれと同じ)
希釈し, 1培地でプラーク数を調べる



(4) 実験結果とその分析

Table 8 プラーク数調査

	区 別	指示菌	10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		ファージ / ml
A	全 ファージ	BS			1008	1248	250	214	2.32 × 10 ⁷
	組みかえファージ	K12	601	610	52	71			6.2 × 10 ⁵
B	全 ファージ	BS			1688	676	203	250	2.3 × 10 ⁷
	組みかえファージ	K12	1108	1436	115	120			1.2 × 10 ⁶
C	全 ファージ	BS			1120	1296	262	224	2.4 × 10 ⁷
	組みかえファージ	K12	1176	1468	160	180			1.7 × 10 ⁶

Table 9 接種親ファージ

	指 示 菌			ファージ / ml	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$
	K12	B	S		
x ₁	0	72	82	7.7 × 10 ⁹	3.85 × 10 ⁵
x ₂	0	41	77	5.9 × 10 ⁹	3.0 × 10 ⁵
x ₃	0	99	124	11.2 × 10 ⁹	5.5 × 10 ⁵

Table 10 宿主菌数

	10 ⁻⁶		Cells / ml	$\frac{1}{2} \times 10^{-3}$
E. coli BB	11	16	13.5 × 10 ⁸	1.2 × 10 ⁵

データの分析

実験結果の分析で重要なのは、moiと burst size である。moi とは multiplicity of infection (多重感染) の頭文字であり、burst size とは1個の大腸菌当りの増殖フェージ数で、いずれもこの実験の根幹であり、moi は5前後、burst size は100のオーダーであればよいであろう。

① moi

$$x_1 = \frac{3.85 \times 10^5}{1.2 \times 10^5} = 3.2$$

$$x_2 = \frac{3.0 \times 10^5}{1.2 \times 10^5} = 2.5$$

$$x_3 = \frac{5.5 \times 10^5}{1.2 \times 10^5} = 4.6$$

大体 2.5 ~ 4.6 で妥当である。

② burst size

$$A = \frac{2.32 \times 10^7}{1.2 \times 10^5} = 190$$

$$B = \frac{2.3 \times 10^7}{1.2 \times 10^5} = 190$$

$$C = \frac{2.4 \times 10^7}{1.2 \times 10^5} = 200$$

これも 190 ~ 200 で適切な値である。

③ 組みかえ率

$$A = \frac{6.2 \times 10^5 \times 2}{2.32 \times 10^7} \times 100 = 5.3\%$$

$$B = \frac{1.2 \times 10^6 \times 2}{2.3 \times 10^7} \times 100 = 10.4\%$$

$$C = \frac{1.7 \times 10^6 \times 2}{2.4 \times 10^7} \times 100 = 14.2\%$$

④ 遺伝子地図

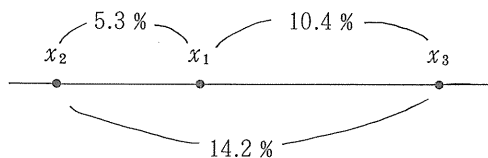


図13 遺伝子地図

$5.3 + 10.4 = 15.7$ で 14.2 より大きいですが、多交さを考慮すればまずは許容し得る範囲であろう。

(5) 生徒実験の結果

生徒実験での値はかなり多様で、交さ率は、必ずしも $A+B=C$ とはならず、 $A=B+C$ になったり、 $B=A+C$ になったりもする。しかし、生徒は実験の原理方法を十分に理解でき、recon について考察することが可能となる。また、実験を反覆すれば技術が向上し、適切な結果を出す自信がついてくる。

III 考察

筆者は本論で、図1の基本命題を実験を中心に指導する一連の指導計画とその実践例、および結果の概要を示した。筆者は、この指導をはじめてすでに13年を経過している。この実験指導を受けた卒業生が、分子遺伝学に興味をもち、微生物遺伝学、生化学、薬学あるいは医学などの大学院に在学し、あるいは研究者として第一線で活躍しているのが多数おり、また、その道を進もうとしているのもかなりいる。

基本命題の理解については、何よりも形質転換の実験が基本となる。DNAが遺伝子の本体であることを、枯草菌の栄養要求性変異株を用いて実証する実験がポイントになる。DNAのX線回折像と塩基分析のデータの考察をしながら二重らせん構造のモデルが提唱されてきたのである。

また、DNAを構成する塩基は4種、タンパク質を構成するアミノ酸は20種である。このことの理論的考察からトリプレットコードンが提起され、それが実験的に証明されてきたことの指導が、次のポイントになる。

(1) ファージ実験の検討

一連のファージ実験の指導のポイントは何か。それは次のようなことではなからうか。

- ① 分子遺伝学の研究材料としてのファージのすぐれた特徴を知り、基本命題の理解を促進させることができる。それはファージの遺伝形質、増殖のしくみ、各種実験の原理と方法を学ぶことで達成される。
- ② 実験の指導者は実験を計画し、それに基づいて生徒に実験をすすめさせ、データを得る。それを分析させ、一定の法則性を導びき出す活動を通じて生徒に科学する喜びを体験させることができるであろう。
- ③ 分子遺伝学の遺伝子概念の理解

その本質的理解の段階である ciston, muton, recon などに修正されていく根拠を生徒に実験を通して指導することができる。

科学の発展が実験により修正され、それに関連した新しい分野を切り開いていく過程を生き生きと指導できるところにある。

古典遺伝学の遺伝子概念は、J. G. Mendel によって提起され、T. H. Morgan らによって発展させられた。この時代は、遺伝子の化学的実体は不明であったが、Morgan らは、遺伝子を形質発現の、突然変異の、組みかえの単位とし、それ以上分割できない究極の単位と定義した。

1950年代、遺伝子の本体は DNA で、二重ラセン構造し、半保存的複製をし、タンパク質合成を通じて形質発現をコントロールすることが解明された。この時代に、S. Benzer は T₄ ファージ r II を用いて実験的に cistron, muton, recon の概念を提起し、基本命題にふさわしい遺伝子概念を提起した。実験指導のポイントは、この遺伝子概念を Benzer の用いた実験を通して指導し、生徒に Benzer と同じような興奮を体験させるところにある。

(2) ファージ実験の問題点

① 実験技術の習得

まずはじめに教師自身が、ファージ実験の基本技術を一体どのようにして習得できるかという問題である。日常的に多忙な教師にそのような時間的余裕があるだろうかという問題でもある。

このことは、夏休みなどを利用し県単位、あるいは地区単位に実験講習会を開き普及をはかる方法で解決できないだろうか。

② 実験設備

この実験をすすめるために必要な設備と機器は、オートクレーブ、乾熱滅菌器、恒温器、遠心分離器、冷蔵庫などである。これらの設備は高校理科教室での現段階では大した障害にはならないであろう。

③ 実験材料

- ファージと大腸菌など、大学理学部生物物理あるいは生化学教室ではどこでも保存しているであろう。
- メスピペットとシャーシ、生徒実験の段階では相当量必要だが、指導する教師自身の技術の向上にあわせて少しずつそろえていくとよいであろう。

④ 指導時間

筆者は、この実験指導に、2学期の後半から3学期いっぱいかけている。時間がかかりすぎ、他の單元とのつり合いが問題だという批判もあろう。しかし、幅広くやるよりも、教師が最も得意とする分野で生徒に生命科学の基本をみっちり指導する方が生徒の興味と理解を促進する面でより効果的であるという考えもある。

IV 参考文献

- 1) 植竹久雄他編(1967)：微生物遺伝学：朝倉書店
- 2) 富沢純一(1970)：バクテリオファージの実験：岩波書店
- 3) G. S. ステント 三宅端訳：バクテリオファージ：岩波書店
- 4) 梨本裕子：内田久雄(1966)：ファージ実験法1～7：蛋白質・核酸・酵素：共立出版：Vol.11No.1～7
- 5) Benzer(1968)：The Molecular Basis of Life Sci.：Amer. Freeman
- 6) 貝沼喜兵(1971)：ファージを用いた分子遺伝学の実験(1)～(4)：遺伝 Vol.25 No.7～10：裳華房
- 7) 貝沼喜兵・石川秀樹：遺伝子概念の歴史的発展の実証的指導：日生教第37回広島大会発表
- 8) 貝沼喜兵：ファージを用いた遺伝の実験(第3報)：日生教第37回広島大会発表