

フード ケミカル

月刊

食品のおいしさと安心を科学する技術情報誌
A Technical Journal on Food Chemistry & Chemicals.

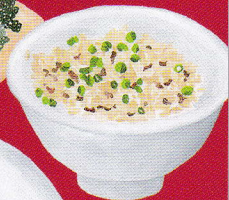
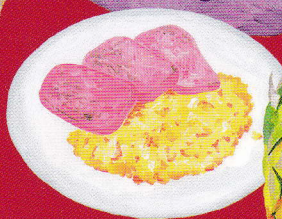
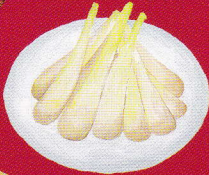
2018

12

404

特集1 フルーツの力

特集2 注目の地域ブランド—沖縄編—



PICK UP!

編集部イチ押し

イングレディオン・ジャパン (株)

「ノベロース™ 8490」

世界の食品・原材料・添加物トピックス④0

抗菌剤耐性と闘う

最新技術情報

マイクロカプセル化GdLのベーキングパウダーへの応用



栞勝 Masaru Hashi

東京家政大学附属女子高等学校 教諭

はし・まさる

- 略歴 北海道大学理学部生物科学科卒業。北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻修了(2004年)。協和発酵工業株式会社等を経て、現職。
- 専門分野 生物学教育、微生物学教育
- 著書 高等学校生物用の問題集の執筆あり

1. はじめに

現在の高等学校や大学で学ぶ生物学の内容は、日々進化する研究内容が取り入れられ、一昔前のものとは様変わりしている。なかでも分子生物学の発展はめざましく、生物の教科書に大幅に内容が加わっている。ただ単に、新たにわかってきたものや新たな技術を次から次に教えていくことがよいのか、疑問に感じることがある。そこで筆者は、生命に対してどう向き合い、生命から何を学ぶのが高校(大学)の教育としてふさわしいのかを考えつつ、教材の研究を行っている。ここでは、分子生物学の基本中の基本である大腸菌の形質転換を抗生物質を用いずに行えるよう改良したので紹介する。なお、この学習は衛生学、微生物学の基礎となり、将来食品に関わる人に特に重要な分野である。

2. 高等学校における抗生物質の扱い

生徒がみつめてきた新聞記事に抗菌薬(抗生物質)について書かれているものがあつた。抗菌薬の乱用は、かえって耐性菌の出現を増加させる。しかし、ウイルスが原因の風邪には抗菌薬が効かないにもかかわらず、一般人の3人に1人は、それを処方するのを良い医師と思うというような内容である。

そもそも、一般の人は、大腸菌などの細菌を実験で扱ったり、抗生物質を用いた実験をすることがまずない。あいまいなイメージで細菌も抗生物質も捉えてしまうのは当然であ

る。そのようななか、現在の分子生物学の台頭で、高等学校の生物でも大腸菌や抗生物質を扱う実験をする学校が増えつつある。幸いにも、このような実験を高等学校でできた生徒は、細菌や抗生物質に対する理解も進むであろう。もちろん大学などでより深く学べる人もいるだろうが、抗生物質が関わらない分野に進む人がたくさんいることを考えると、高等学校の生物で実験を行う意義がわかっているかと思う。したがって、高等学校でも抗生物質を使用した実験をどんどん行えばよいという考えもあるが、むやみやたらに抗生物質を使用することも避けたい。抗生物質なしで行うことができる実験系を開発することは、それはそれで意義のあることと考える。

3. 現行の実験方法

高等学校や大学の生物学実験でよく行われる形質転換実験の概要を表1の現法1と現法2にまとめた。そのなかでも特に多くの教科書に登場するのは現法2で、大腸菌JM109株に、プラスミドpUC19(アンピシリン耐性、β-ガラクトシダーゼ補完)を入れることにより形質転換させ、形質転換した大腸菌だけがアンピシリン入りLB培地にて生育し、そこにX-galとIPTGが添加されている場合は、X-galを分解して青くなるというものである。ちなみに、X-galは「β-ガラクトシダーゼによって分解されると青色に発色する物質」、IPTGは「ラクトースオペロンで調節される遺伝子の発現を誘導する物質」である。

表 1 現法と新法の比較

| | 現法1 | 現法2 | 新法 |
|------|--|--|--|
| 宿主 | 大腸菌 (HB101株) ラクトースを分解できる | 大腸菌 (JM109株) ラクトースの分解ができない | 大腸菌 (JM109株) ラクトースの分解ができない |
| ベクター | pGLO アンピシリン耐性遺伝子あり GFP遺伝子あり GFPの調節遺伝子あり | pUC19 アンピシリン耐性遺伝子あり β -ガラクトシダーゼ遺伝子あり | pUC19 アンピシリン耐性遺伝子あり β -ガラクトシダーゼ遺伝子あり |
| 形質転換 | ヒートショック | ヒートショック | ヒートショック |
| 回復培地 | LB培地またはSOC培地 | LB培地またはSOC培地 | LB培地またはSOC培地 |
| 液体培地 | | | 改良M9培地 |
| 寒天培地 | LB | LB | 新法1 (抗生物質なし) |
| | LB/アンピシリン | LB/アンピシリン | LB/X-gal |
| | LB/アンピシリン/アラビノース | LB/アンピシリン/X-gal /IPTG | またはLB/X-gal /IPTG |
| | | | 新法2 (X-galなし, IPTGなし) |
| 時間 | 形質転換から寒天培地に塗布するまで2時間程度 | 形質転換から寒天培地に塗布するまで2時間程度 | 形質転換から液体培地まで1時間で行うことも可能 |
| | ※ただし, 時間は, クラスの人数, 事前準備等による。 | | 液体培地から寒天培地に塗布まで1時間で行うことが可能 |

ここでは, ①微生物 (大腸菌) の取り扱いや培養方法, 滅菌などについて, ②プラスミドが大腸菌に取り組まれること, ③プラスミドの遺伝子が大腸菌で発現すること (ヒトの遺伝子を発現させることもできる。ヒトと大腸菌のコドンが同じ), ④ラクトースオペロンの一部などを学ぶことができる。このような目的のためには, 主なものとして2つあり, 現法1では①～③が学べ, 現法2では①～④が学べる。

4. 新しい実験方法1

抗生物質の使用はしないが, 現法で記載の①～④を学べる実験系とする。まず, 宿主に関しては, 実験室レベルでよく用いられる大腸菌JM109株 (ラクトースを分解できない。本研究室では, 国立遺伝学研究所より分譲) とプラスミド (pUC19) を用意する。そして, pUC19をJM109株の大腸菌に入れる形質転換を行う。形質転換は定法に従い, LB液体培地やSOC液体培地で回復させる。ここまでは, 現法1や現法2と同様である。回復させた後, 定法ではすぐにプレートにまき, 翌

日以降にコロニーがどうなっているか確認するが, 本実験ではそれを行わない。

ここでは, その回復させたLB液体培地 (SOC液体培地) を改良M9液体培地 (グルコースをラクトースに変更し, さらにBTBを加えたもの) に入れて, 37℃で培養する。その結果, JM109 (pUC19プラスミドなし) では, ラクトースを分解できずに, BTBがそのまま青色であるが, JM109 (pUC19プラスミドあり) では, 形質転換したものは, ラクトースを分解できるので, 液が段々と黄色になっていく (大学レベルではラクトースの資化性を調べていることになる) (図1)。つまり, プレートで実験し

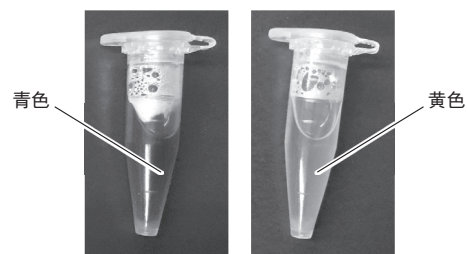

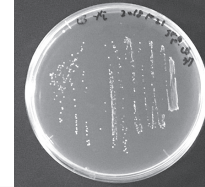

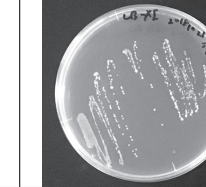


図1 液体培地による形質転換の判別
左: pUC19なし, 右: pUC19あり

2015年12月号～2018年12月号では東京家政大学教員の研究のうちから「温故知新」的な成果を紹介してきました。

表2 新法1における寒天培地での培養結果

| | A | B | C | D |
|------|---|---|---|--|
| 宿主 | 大腸菌 (JM109株) | 大腸菌 (JM109株) | 大腸菌 (JM109株) | 大腸菌 (JM109株) |
| ベクター | なし | なし | pUC19 | pUC19 |
| 寒天培地 | LB/X-gal | LB/X-gal/IPTG | LB/X-gal | LB/X-gal/IPTG |
| 結果 | 白色のコロニーが出現  | 白色のコロニーが出現  | 青色と白色のコロニーが出現  | 青色と白色のコロニーが出現  |

なくてもラクトースを分解できるようになったということがわかる。形質転換だけを教えるなら、ここまででもよい。しかし、この液をプレートにまくことで、いわゆる滅菌操作を含めた微生物学の基礎をより学べるだけでなく、形質転換や大腸菌の性質がよくわかり、教育効果がグッと上がる。そこで、寒天培地として、LB/X-galやLB/X-gal/IPTGを用意する。抗生物質のアンピシリンは入っていない。その結果、形質転換していないJM109 (pUC19なし)では、LB/X-galやLB/X-gal/IPTGで白色のコロニーが出現するだけで、青色のコロニーは出現しない(表2のA・B)。つまり、形質転換していないためX-galを分解できない。

それに対してJM109 (pUC19あり)では、LB/X-galやLB/X-gal/IPTGで青色と白色のコロニーが出現する(表2のC・D)。つまり、形質転換しているものはβ-ガラクトシダーゼをつくれるためX-galを分解し青色のコロニーになり、形質転換していないものは白色のコロニーになっている。ここで注目したいのは、この青色と白色が混在することである。なぜ白色のコロニーが出現するのか?これを考えるのが高校生にとって大切な探求活動となる。ここで、大腸菌にプラスミドpUC19を近づけても、形質転換するのは一部であることを学ぶ良い教材となる。

より詳しく説明すると、回復培地の状態では形質転換したものと形質転換していないものが混在しているが、形質転換していないものが圧倒的に多い。そのため、そのままLB/X-galやLB/X-gal/IPTGにまいてもほぼ白色になってしまう。よって、回復培地から大腸菌を改良M9培地に入れることで、形質転換した大腸菌を大幅に増やしてから、LB/X-galやLB/X-gal/IPTGにまいている。

学習効果を整理すると、①微生物(大腸菌)の取り扱いや培養方法、滅菌などについて→現法と同じ効果、②プラスミドが大腸菌に取り込まれること→表2のC・Dの結果から、現法と同等以上の効果があるといえる、③プラスミドの遺伝子が大腸菌で発現すること→現法と同じ効果、④ラクトースオペロンの一部などを学ぶことができる→図1と表2より、液体培地、寒天培地と両方で学べ、現法よりも効果があるといえる。さらに新しく、⑤として最少培地や資化性を学ぶこともできる。よって、抗生物質なしにも関わらずすべてにおいて同等以上の教育効果がある。また、「耐性菌を増やさないために高等学校の実験も抗生物質を極力使わないようにしよう」などの話をすることも可能となる。

定法の形質転換はやりようにもよるが、普通のクラスの授業で2時間ほどかかる。しかし高

この「温故知新」の連載は今回で終了となります。
長い間ご愛読下さりありがとうございました。

校によっては、2時間続きの時間割をお願いしても実現されないことがある。今回開発した実験系は、形質転換で1時間、プレートにまくことを1時間とあえて分けることができるように開発した。このことで多くの学校で実施が可能となる。また、現法2と組み合わせてアレンジして行うこともできる。回復培地までは一緒に行い、回復培地の一部を新法で、一部を現法2と同じ寒天培地にまく(現法2は教員の演示実験などでもよい)、そのことで抗生物質があるとうなるかを示すのも、またよいであろう。

5. 新しい実験方法2

新法1で話が完結しているのであるが、最後に、新法1から派生した別の実験系を紹介する。それは、X-galやIPTGは形質転換に本当に必要か?ということである。

改良M9培地までは新法1と同様に行い、最後の寒天培地でLB(アンピシリンなし)、LB(アンピシリンあり)を用意し、ここにまく。その結果、JM109(pUC19なし)では、LB(アンピシリンなし)で白色のコロニーが多数出現するが、LB(アンピシリンあり)ではコロニーが出現しない(表3のA・B)。それに対して、JM109(pUC19あり)はLB(アンピシリンなし)で白色のコロニーが多数出現し、LB(アンピシリンあり)でも白色のコロニーがいくつか出現する(表3のC・D)。

つまり形質転換してないJM109は抗生物質であるアンピシリンにより、増殖することができない。しかし、アンピシリン耐性の遺伝子をもつプラスミドをとりこんだJM109は

アンピシリンがあっても増殖することができるようになっている。よって、形質転換したかどうかを、コロニーが出現するかどうかで見分けることができる。ラクトースを分解できるかどうかは上述の改良M9培地でわかっているため、X-galやIPTGを使うことなく形質転換した大腸菌をセレクションできる。

まず、この実験系ではX-galとIPTGを購入しなくてよい。これは、研究費が少ない高校にとっては非常に大きいメリットになる。また、X-galとIPTGは、高校生が構造を踏まえて短時間で理解するには難しい物質である。つまり、高いお金をかけた物質を用いてより理解しにくい実験系を組み立てていることにならないだろうか?定法に従えば、何も考えなくても手を動かせば結果が出るが、それが教育としてふさわしいのか一考することも時には大事ではないかと筆者は考えている。

6. おわりに

一昔前まで大学で行っていたことがどんどん高等学校の教科書に入ってきているが、大学と同じように行う環境は整っていない(時間割、機械・器具・試薬の不足など)し、高校生と大学生では各教科で積み上げてきた土台に差がある。したがって、どのようにしたら高等学校で実験でき、高校生でもわかるのか、生徒に何を伝えたいのか、ということを意識しながら教材を開発していく必要がある。そのようななかで、抗生物質を使用しない実験系やX-galやIPTGを使わない実験系は、現場でできる実験の一つとなった。

表3 新法2における寒天培地での培養結果

| | A | B | C | D |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 宿主 | 大腸菌(JM109株) | 大腸菌(JM109株) | 大腸菌(JM109株) | 大腸菌(JM109株) |
| ベクター | なし | なし | pUC19 | pUC19 |
| 寒天培地 | LB | LB/Amp | LB | LB/Amp |
| 結果 | 白色のコロニーが出現 | コロニーは出現しない | 白色のコロニーが出現 | 白色のコロニーが出現 |