

研究 成 果 報 告 書

(ふりがな) つるたに たもつ

氏 名 鶴 谷 保

現 職 (所属名、職名等) 山口県立宇部高等学校 教諭

卒業又は修了年月、専修又は専攻コース名

教科・領域教育専攻・自然系コース(理科) 平成19年3月修了

研究のテーマ 遺伝子を身近に感じる実験教材の開発

～理科を学ぶ最後の機会となる高校生へ向けての取り組み～

平成24年度から数学と理科で先行実施される高等学校の新学習指導要領では、高校生物の学習内容が大幅に見直され、急速に進歩する生命科学の研究成果を多く取り入れ、生物の共通性と多様性を中心に学ぶことになる。中でも遺伝子の働きは多くの高校生が履修する「生物基礎」と、選択教科としての「生物」の両方で取り上げられ、これまでに以上に重視される。この分野での実験としては体細胞分裂、減数分裂、だ液腺染色体の観察、遺伝子組換え、PCR法による遺伝子解析実験などが取り上げられているが、これらの実験の中で特にPCRは高校現場で実施されることが少ない。これは実験計画を立てる段階で、どの遺伝子を対象として選ぶか、器具・試薬が高価であり、何から揃えるかなど高校教員の経験不足もあって、この点で立ち往生することが多いからと考えられる。また、実験時間が長い、高校生を相手にどう倫理・安全上の問題点をクリアするかなどの問題点もある。それゆえ、大学や研究施設等でイベント的に行われることはあっても、高校の通常の授業の一環として実施されることは少ない。そこで、以下のような教材(詳細は資料1～4)を開発し、高校現場でのPCRによる遺伝子解析実験の普及に努めたいと考えている。

ヒトの口腔上皮細胞をFTAカードに固定した後、DNAを抽出し、ミトコンドリアDNAのND2遺伝子をPCR法によって増幅した。制限酵素Alu IによってDNAの特定の塩基配列のみを切断し、RFLP(制限酵素切断断片長多型)分析する。この実験の実施によって高校生に次のような教育的効果が得られる。①遺伝子解析技術への理解が深まる: DNA抽出やPCR法、電気泳動、制限酵素処理などの技術や、解析された塩基配列・アミノ酸配列がインターネット上に登録されており、それらの情報をもとに医療や犯罪捜査など現代社会で起こる様々な問題の解決がなされていることがわかる。②科学的探究心が育成できる: 電気泳動法やRFLP分析では人間の目で見えないものを可視化する工夫が行われている。これらの方法の巧妙さを知り、目に見えない物を想像することで科学的探究心が養われる。③セントラルドグマについて理解できる: たった1個の塩基が置換することでタンパク質を構成するアミノ酸配列が変化することや、遺伝子型の違いが外見上の違いに結びつくとは限らないことがわかり、遺伝子型と表現型の関係についても理解できる。④自らの遺伝子型を調べることで、学習への動機付けができると同時に遺伝子型の個人情報としての扱いについて学ぶこともできる。⑤調査対象として問題のない遺伝子である: ND2遺伝子には日本人集団内に2つのタイプ(多型)が見られ、それはたった一つの塩基の置換に由来するSNP(一塩基多型)であること、病気とは関係ない遺伝子と考えられていることなどから、高校生を対象とした実験に適していると思われる。

この実験を授業で実施した際の生徒の感想も、遺伝子への興味・関心が高まったなど、好意的なものが多かった。多くの生徒にとっては、高校生物が遺伝子について系統立てて学ぶ最後の機会になると思われる。将来、企業や行政などで幅広い職種で活躍する生徒たちが、この実験を通して科学・技術について理解し、正しい認識を持つきっかけとなることが期待される。

実験 ヒトの遺伝子型を調べてみよう

[目的]

生物の形質決定に関わる遺伝子は、同種の生物であっても、個体毎に共通な部分と異なる部分とがあることが知られている。犯罪捜査での犯人捜しや親子関係を調べる際に行われる DNA 鑑定は、遺伝子のそのような性質を利用して、個人を特定するものである。今回は、ヒトの口腔上皮細胞から DNA を取り出し、PCR 法によってミトコンドリア DNA の ND2 (NADH 脱水素酵素サブユニット 2) 遺伝子を増幅し、制限酵素 Alu I による処理を行って、ヒトの遺伝子型について調べてみよう。

[仮説] 遺伝子には人により共通な部分と異なる部分とがある。

[準備]

材 料：ヒトの口腔上皮細胞

薬 品：ND2 プライマー (前・後)、DNA ポリメラーゼ (DNA 合成酵素)、緩衝液、
dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP を含むもの)、制限酵素 Alu I など

器 具：綿棒、FTA カード、PCR チューブ、サーマルサイクラー、電気泳動装置など

[方法]

1. DNA 採取・調整

- (1) 綿棒でほおの内側にある口腔上皮細胞を採取する。
- (2) 細胞を採取した綿棒を FTA カードに押しつけて細胞を付着させ、乾燥させる。
- (3) FTA カードを 1mm 四方に切り抜き、PCR チューブへ入れる。
- (4) 切り抜いたカードを FTA 精製試薬と TE バッファーで洗浄した後、乾燥させる。

2. PCR による ND2 遺伝子の増幅

- (1) PCR チューブに 1 サンプルあたり蒸留水 18.875 μ l、ND2 のプライマー 1 μ l (前 0.5 μ l、後 0.5 μ l)、酵素液 5.125 μ l (DNA ポリメラーゼ 0.125 μ l、緩衝液 2.5 μ l、dNTP 2.5 μ l) を入れ、静かにピペッティングする。
- (2) PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で PCR をおこなわせる。

	9 4 °C	2 分	熱変性	
32 サイクル 繰り返す	[9 4 °C	3 0 秒	熱変性
		5 3 °C	3 0 秒	アニーリング
		7 2 °C	1 分	エクステンション
		7 2 °C	5 分	エクステンション

3. 制限酵素処理による ND2 遺伝子の遺伝子型調査

- (1) 遺伝子の増幅が確認できた PCR 産物を制限酵素 Alu I で 3 7 °C、3 0 分間処理する。
- (2) 酵素処理した PCR 産物を電気泳動し、遺伝子型を調べる。

[結果]

電気泳動結果を以下の図に示し、遺伝子型別の人数を記入しなさい。

マーカー	制限酵素 未処理	5178C 型 () 人	5178A 型 () 人
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

泳動
方向
↓

[考察]

1. PCR では三段階の温度(94℃、53℃、72℃)の下で反応させるが、それはなぜか。
2. 電気泳動によって遺伝子型がわかるのはなぜか。
3. ミトコンドリア DNA の ND2 遺伝子は、どのようにして子孫に遺伝するか。
4. 5178C 型と 5178A 型の塩基配列の違いによっておこる変化は何か。
5. 仮説は検証されたか。

年 月 日	年 組 番 氏名
-------	----------

実験解説

[事前準備]

- ★事前に溶液を調製 ※詳細は参考文献 1 を参照
- ストックしておく溶液 0.5M EDTA (pH8.0)、1M Tris-HCl (pH8.0)
- TE {0.5M EDTA (pH8.0) と 1M Tris-HCl (pH8.0) を用いる} を調製し、ストックする。
- 10 × TAE {0.5M EDTA (pH8.0)、1M Tris-HCl (pH8.0)、氷酢酸、蒸留水を用いる} または 50 × TAE を調製し、ストックする。
- 希釈した 1 × TAE は、アガロースゲル作成や電気泳動などに使用する。

[方法]

1. FTA カードを使用した口腔上皮細胞からの DNA 抽出

(1) 口腔上皮細胞の採取・FTA カードへの固定

綿棒を使って口内から細胞を採取した後、FTA カードに固定し、乾燥させる。

(2) DNA サンプルの準備

FTA カードを 1mm 四方の大きさに切り抜き、予めサンプル番号を記入した PCR チューブに入れる。FTA 精製試薬 200 μ l で 3 回、次に TE バッファー (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0) 200 μ l で 2 回洗浄し、自然乾燥または 60℃、30 分以内で乾燥させる。

※乾燥させたサンプルは冷暗所で 1 週間程度使用可能だが、なるべく早く使用する。

FTA カードの使用によって DNA 抽出の過程を簡略化し、時間を短縮することができる。

2. PCR の準備 (25 μ l / PCR チューブの場合)

(1) PCR チューブに以下の物を (ア) から順に加え、よく混合する

(ア) 精製水 18.875 μ l

(イ) プライマープレミックス液 1 μ l

事前に別のチューブで、プライマープレミックス液を作っておく。

プライマープレミックス液：サンプル 1 個あたり、前後のプライマーがそれぞれ 0.5 μ l ずつになるように混合したもの (液は不足しないように 1 割増しに作る)。

(ウ) 酵素液 5.125 μ l

事前に別のチューブで酵素液を作っておく。

酵素液：サンプル 1 個あたり 10 × PCR バッファー 2.5 μ l, dNTP 2.5 μ l, Taq 0.125 μ l ずつになるように混合したもの (Taq ポリメラーゼは最後に入れる。液は不足しないように 1 割増しになるように作る)。

※酵素は製品によって使用条件が異なることがあるので、詳細は使用説明書に従う。

(2) PCR チューブに流動パラフィン 1 滴を加えて、軽く遠心機にかける。

壁面についた液を落とすため。

PCR を成功させるためには

凍結保存試薬は解凍後、容器内で試薬濃度が不均一になっているので、事前によく混合して使用する。また、PCR チューブに入れた試薬もよく混ぜなければ十分に反応進行し

ない。いずれにしても PCR は小さなチューブの中でうまく化学反応を進めなければならないので、その際に正しい濃度の薬品が、十分に混合していなければならない。

3. PCR

サーマルサイクラーにセットして PCR をおこなわせる。PCR 条件はサンプルの種類や対象領域によって異なる。ND2 遺伝子では、以下の条件で PCR をおこなわせる。

	94℃	2分	熱変性
32 サイクル 繰り返す	94℃	30秒	熱変性(2本鎖DNAを1本鎖にする)
	53℃	30秒	アニーリング(プライマーとDNAが結合)
	72℃	1分	エクステンション(DNAの伸長反応)
	72℃	5分	エクステンション

4. 電気泳動での DNA 増幅チェック

(1) ゲルの作製

事前に電気泳動用アガロースを 0.5g を三角フラスコに入れ、1 × TAE50ml を加え、電子レンジで3回程、吹きこぼれないように沸騰させ、1%アガロースゲル溶液をつくる。50～60℃になったら、10mg/l のエチジウムブロマイド 2.25 μl を加え攪拌し、ゲル作成容器に流し込み、30～40分以上放置し、ゲルを作る。

(2) 電気泳動

泳動槽にゲルをセットし、1 × TAE をゲルが浸る程度に入れる。新たなチューブに 0.25%BPB1 μl を入れ、サンプル 5 μl を入れてピペッティング。最初のゲルの穴に λ DNA Hind III (マーカー) を 5 μl 入れ、次の穴から BPB 着色サンプルを入れる。100V で 30分、50V で 60分泳動後、ゲルをラップを敷いたバットに移し、紫外線を当ててDNAが増えているか確認する。

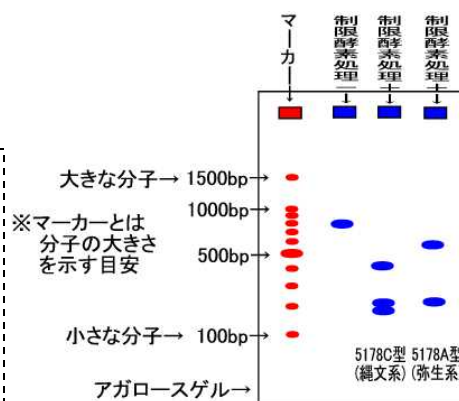
5. 制限酵素処理による ND2 遺伝子の遺伝子型の判定

4でDNAが増幅できていることが確認できたら、新しい PCR チューブに PCR 産物 5 μl、制限酵素 Alu I と緩衝液の混合液 5 μl を加え、ピペッティングし、軽く遠心する。PCR チューブを 37℃、30分間、制限酵素処理する。処理したサンプルを 100V、30分程度電気泳動し、遺伝子型を調べる。

[結果]

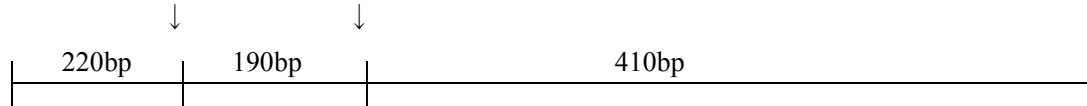
ミトコンドリア DNA の NADH 脱水素酵素のサブユニット 2 遺伝子 (ND2) を調べた結果

参考：2011年 萩高校生徒・教職員 22名および宇部高校生徒 121名を調べた結果
 ヒトのミトコンドリア DNA の 16,569塩基対のうち、5,178番目の塩基がシトシン(C)の人(5178C型) 86人、アデニン(A)の人(5178A型) 57人であった。

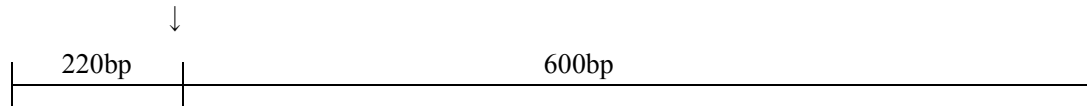


この実験で増幅した部分はND 2 遺伝子全体ではなく、以下の資料 3 に示す 4771 ~ 5585 番目の 815 塩基である。この中に制限酵素 Alu I 切断部位 (↓) が 2 カ所あるか、1 カ所あるかによって遺伝子型を判定する。

5178C 型 : Alu I 切断部位 2 ヶ所。



5178A 型 : Alu I 切断部位 1 ヶ所。



この遺伝子型は、制限酵素処理によって長さの違う切断片が現れる多型なので、制限酵素断片長多型 {RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)} という。この実験では PCR 法で増幅した DNA を制限酵素 Alu I で切断し、その断片の長さを調べて遺伝子多型を検出している。5178C 型の人 は母方の先祖が縄文人系、5178A 型の人 は先祖が弥生人系であり、5178C 型よりも長寿の傾向があるという研究結果もある。

[考察]

1. PCR では三段階の温度 (94 °C、53 °C、72 °C) の下で反応させるが、それはなぜか。

94 °C で二本鎖構造の DNA を熱変性により一本鎖にする。53 °C でアニーリングによりプライマーを結合させる。72 °C は Taq ポリメラーゼの最適温度であり、プライマーの部分から新たな DNA 鎖の伸長反応がおこる。

2. 電気泳動によって遺伝子型がわかるのはなぜか。

PCR によって遺伝子の同一部位を同長に増幅した DNA を、特定の塩基配列部位を切断する制限酵素により処理することで、制限酵素切断部位の塩基に違いがある場合には、切断される断片数及び断片長に変化が生じる。そのため、電気泳動は DNA 分子を大きさによって分けることができるので、遺伝子型を識別することができる。

3. ミトコンドリア DNA の ND2 遺伝子は、どのようにして子孫に遺伝するか。

母のものだけが子孫に伝わる (母系遺伝)。

※注意点 : 自分の遺伝子型がわかると、母親や兄弟の遺伝子も推定できることから、個人情報としての遺伝情報の管理についても考えてみることも必要である。

4. 5178C 型と 5178A 型の塩基配列の違いによっておこる変化は何か。

ND 2 を構成するアミノ酸の 1 つが変化する。

5. 仮説は検証されたか。

ミトコンドリア DNA の塩基 4990 ~ 4993 番目の Alu 配列 (agct) は、制限酵素 Alu I によって全員切断され、220bp の DNA 断片が形成された。よって、この部分の塩基配列

は全員共通であることがわかる。一方、5176～5179番目のAlu配列は、制限酵素Alu Iによって切断される5178C型と、切断されない5178A型が見られた。両者は5178C型が410bpと190bpの2本、5178A型が600bp 1本のDNA断片を形成することから識別することができる。よって、この部分では遺伝子の多型が見られ、全員の遺伝子が同じでないことがわかる。

以上のことから、「遺伝子には人によって共通な部分と異なる部分とがある。」という仮説は検証された考えられる。

[生徒の感想より]

資料3の生徒の感想より、本教材の開発・実施によって、理科を学ぶ最後の機会となる高校生はもとより、これからへ大学に入って遺伝子について学ぶ生徒も、遺伝子を身近に感じ、興味・関心を高めることができたと考えられる。

[おわりに]

本研究を進めるにあたり、宇部高等学校や前任校である萩高等学校の教職員の方々、生徒の皆さんに多大なるご協力をいただきました。また、ND2遺伝子のPCRについては、東邦大学理学部生物分子科学科 佐藤浩之先生の2008年度 文科省理数系教員指導力向上研修採択企画「高校でできるPCR～ヒトミトコンドリアDNAの手動PCRとRFLPによる多型分析～」テキストを参考にさせていただき、PCRの実験方法や報告書の作成などには上越教育大学大学院学校教育研究科の五百川裕先生にご指導いただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

[参考文献など]

1. 溶液の作り方等実験の基礎的な知識については
中山広樹・西方敬人. 1995年. 細胞工学 別冊 目で見える実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド①分子生物学実験の基礎. 秀潤社.
2. 塚谷裕一・池田博. 2005年. FTAカードを用いたフィールドでの植物DNA採集法. 分類 **5** : p127-135.
3. 笹川由紀・佐々義子・大藤道衛・小野道之. 2009年. 教育目的ヒトゲノム・遺伝子解析実験の普及と実験指針についての検討. 生物教育 **49**(23) : p90-107.
4. FTAカードについてはワットマン社ホームページ
<http://www.gelifesciences.co.jp/whatman/catalog/pdf/FTACatalogue.pdf>

[実験で使用した機器・薬品など]

1. 実験全体で必要となる薬品・器具など

- ・ EDTA
- ・ 塩酸
- ・ 水酸化ナトリウム
- ・ Tris(トリスヒド^ロキシメチルアミノメタン)
- ・ キムワイプ
- ・ オートクレーブ(大きめの圧力鍋でもよい)
- ・ 冷蔵庫・冷凍庫
- ・ マイクロチューブ(1.5ml または 0.6ml)
- ・ マイクロピペット(1000,200,20 μ l の使用頻度が高い)
- ・ 氷酢酸
- ・ イオン交換水
- ・ 氷
- ・ pH メーター
- ・ アルミ箔
- ・ ねじロビン(250ml,500ml)
- ・ マイクロピペットチップ
- ・ チューブ立て(ないときは発泡スチロール等で代用)

2. PCR で必要となる薬品・器具など

- ・ PCR キット(Taq ポリメラーゼ[®]、dNTP、10 × PCR バッファーなど)
- ・ DNA マーカー
- ・ 試験管ミキサー(ない場合は手でタッピング)
- ・ 遠心機(色々な用途がある。ある程度の回転数があるものがよい)
- ・ かき氷器(試薬を溶かすときの氷水を作る際に使用)
- ・ ND2 のプライマー(資料 3 のプライマー配列を参考に注文)
- ・ PCR チューブ
- ・ FTA キット(FTA カード[®]、精製試薬など)
- ・ 流動パラフィン
- ・ サーマルサイクラー

3. PCR 後の電気泳動・制限酵素処理で必要となる薬品・器具など

- ・ BPB(ブ^ロモフェノールブルー)
- ・ 電気泳動用アガロース
- ・ 軍手
- ・ 紫外線防護メガネ
- ・ 電子レンジ
- ・ エチジウムブロマイド(溶液タイプ[®] 0.625mg/mL が便利)
- ・ トランスイルミネーター(ハンディ^ー UV ランプ[®]でも可能)
- ・ 制限酵素 Alu I
- ・ 暗室
- ・ 電気泳動装置
- ・ デジタルカメラ
- ・ ラップフィルム

[実験に要する時間]

8サンプルを処理したときの目安

- ① 1時間：FTA カードを使用しての口腔上皮細胞の採集・乾燥
※採集したサンプルは1年以上保存可能
- ② 1時間：FTA カードの切り抜き・洗浄・乾燥（DNAの採集・精製・抽出）
※洗浄したカードは冷暗所で1週間使用可能であるが、なるべく早く使用する
- ③ 1時間：PCRチューブへ酵素などを入れる（PCRの準備）
- ④ 3時間：PCR
※PCR後、PCR産物を冷蔵庫で保管すれば1週間後でも使用可能
- ⑤ 1時間：電気泳動によるDNAの増幅チェック
- ⑥ 1時間：制限酵素処理
※制限酵素処理後、冷蔵庫で保管すれば1週間後でも使用可能
- ⑦ 1時間：電気泳動による遺伝子型の判定

※注意：授業の都合でやむえず実験を分割して行う場合は①、②、④、⑥で実験を中断することも可能。しかし、本来は①以外では中断しない方がよいので、予備実験時に良く確認する。

[実験後の生徒の感想]

対象生徒：宇部高校普通科3年文系生物選択者・3年理系生物選択者、理数科3年

- ・遺伝子についてもっと知りたいと思うようになった。
- ・大学でさらに研究してみたいと思った。
- ・大学でしかできないと思ったことが体験できて良かった。
- ・他の遺伝子を調べてみたいと思った。
- ・調べる遺伝子によって、結果に違いがでるのかを知りたい。
- ・実験を行い、PCR法への理解を深めることができた。
- ・難しい遺伝子の話を身近に感じる事ができた。
- ・紫外線をあてるとDNAがオレンジ色に光って見えて驚いた。
- ・普段見ることのできない遺伝子を見ることができ、興味深かった。
- ・科学技術の進歩を感じた。
- ・口の中のわずかな細胞だけで遺伝子型がわかるのがすごいと思った。
- ・遺伝情報は個人情報なので注意して扱わなければならないことがわかった。
- ・DNAが1人1人違うのがわかった。
- ・安易に結果のみを鵜呑みにしてはいけないと思った。
- ・遺伝子の違いによって外見に影響がないので安心した。
- ・母親からミトコンドリアを受け継いできた歴史を感じた。
- ・遺伝子で自分のルーツを知ることができ、先祖とのつながりを感じることができた。

[インターネット上のゲノム情報]

1. ND 2 遺伝子付近の塩基配列

ND 2 遺伝子 4470 番目～ 5513 番目は太字で示してある。

4441 aaaatggttg ttataccctt cccgtactaa **ttaatccctt ggccaaccc gtcactact**
4501 ctaccatctt tgcaggcaca ctcactacag cgctaagctc gcactgattt tttacctgag
4561 taggcctaga aataaacatg ctagctttta ttccagttct aaccaaaaa ataacctc
4621 gttccacaga agctgccatc aagtatttcc tcacgcaagc aaccgcatcc ataatcctc
4681 taatagctat cctcttcaac aatatactct cggacaatg aaccataacc aatactacca
4741 atcaatactc atcattaata atcataatgg ctatagcaat aaaactagga atagcccct

前プライマー (5'-ctatagcaataaaaactaggaatagcccc-3') →

4801 ttcacttctg agtcccagag gttaccaag gcaccctctt gacatccggt ctgcttctc
4861 tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcatatacca aatctctccc tactaaacg
4921 taagccttct cctcactctc tcaatcttat ccatcatagc aggcagttga ggtggattaa
4981 accaaaccca gctacgcaa atcttagcat actcctcaat taccacata ggatgaataa

制限酵素 Alu I で切断される部位

5041 tagcagttct accgtacaac cctaacataa ccattcttaa tttactatt tatattatcc
5101 taactactac cgcattccta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat
5161 ctgcacctg aaacaagcta acatgactaa cacccttaat tccatccacc ctctctccc

制限酵素 Alu I 切断部位：5178 番目 C は切断、5178 番目 A は切断できない

5221 taggaggcct gccccgcta accggctttt tgcccaaatg ggccattatc gaagaattca
5281 caaaaaaaa tagcctcatc atcccacca tcatagccac catcaccctc cttaacctct
5341 acttctacct agcctaate tactccacct caatcacact actcccata tctaacaacg
5401 taaaaataaa atgacagttt gaacatacaa aaccacccc actcctccc acactcatcg
5461 cccttaccac gctactccta cctatctccc cttttatact aataatctta tagaaattta

5521 ggttaaatac agaccaagag ccttcaaacg cctcagtaag ttgcaatact taatttctgt

←後プライマー (5'-ctgttacagaaattaagtattgcaacttac-3')

5581 aacagctaag gactgcaaaa ccccactctg catcaactga acgcaaatca gccactttaa

2. ND2(5178C 型)のアミノ酸配列

1 MNPLAQPIY STIFAGTLIT ALSSHWFFTW VGLEMNMLAF IPVLTCKMNP RSTEEAIKYF
61 LTQATASMIL LMAILFNNML SGQWTMTNTT NQYSSLMIMM AMAMKLGMAP FHFVWPEVTQ
121 GTPLTSGLLL LTWQKLAPIS IMYQISPSLN VLLLLLSIL SIMAGSWGGL NQTQLRKILA
181 YSSITHMGWM MAVLPYNPNM TILNLTIIYII LTTAFLLLNSNSSTTTLLL SRTWNK L TWL
241 TPLIPSTLLS LGGLPPLTGF LPKWAHIEEF TKNNSLIPT IMATITLLNL YFYLRLIYST
301 SITLLPMSNN VKMKWQFEHT KPTPLLPTLI ALTLLLLPIS PFMLMIL

5178A 型では下線部の 237 番目のアミノ酸がロイシン (L)ではなく、メチオニン (M)に変わる(ミトコンドリアのcodonは核DNAのものとは異なる)。

この変異のように1塩基のみが変異した遺伝子多型をSNP(スニップ)という。

上記の塩基・アミノ酸配列は <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/af382012.1> より引用

ヒトの遺伝子型を調べよう

～ミトコンドリアDNAのND2遺伝子の多型について～

実験の目的

遺伝子は生物の形質を決めるものであるが、同種の生物であっても必ずしも全て同じ遺伝子をもっているわけではない。同種の生物中に見られる遺伝子の違い(多型)を調べてみよう。

仮説

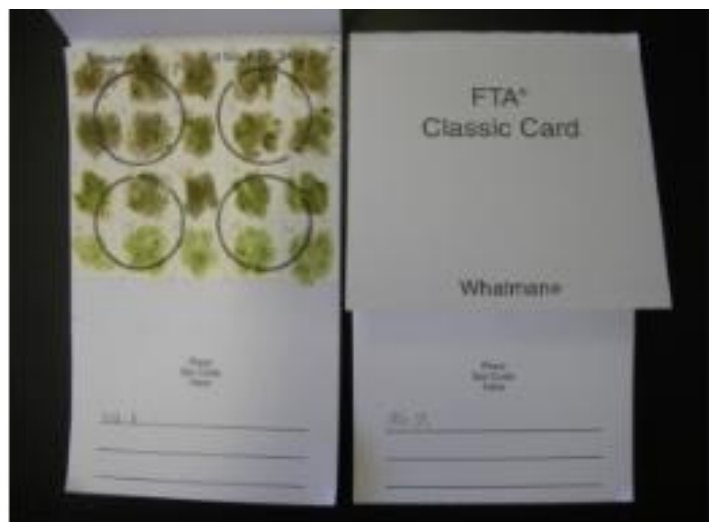
ND2遺伝子には人によって共通な部分と異なる部分とがある。

材料と方法

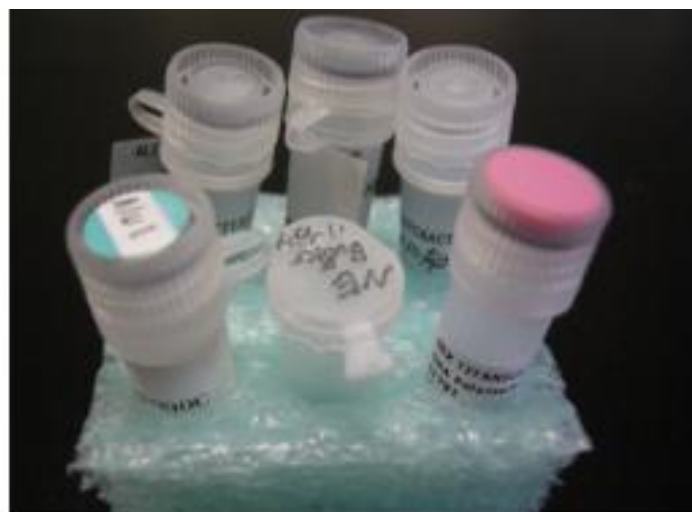
材料: ヒトの口腔上皮細胞

方法

1. FTAカードを用いてDNAを採集・抽出
2. PCR法によってDNAを増幅する
3. 制限酵素Alu I で特定の塩基配列を切断
4. 電気泳動法によって遺伝子型を調べる



FTAカード(植物サンプル)



冷凍保存している酵素など



ストックしている溶液



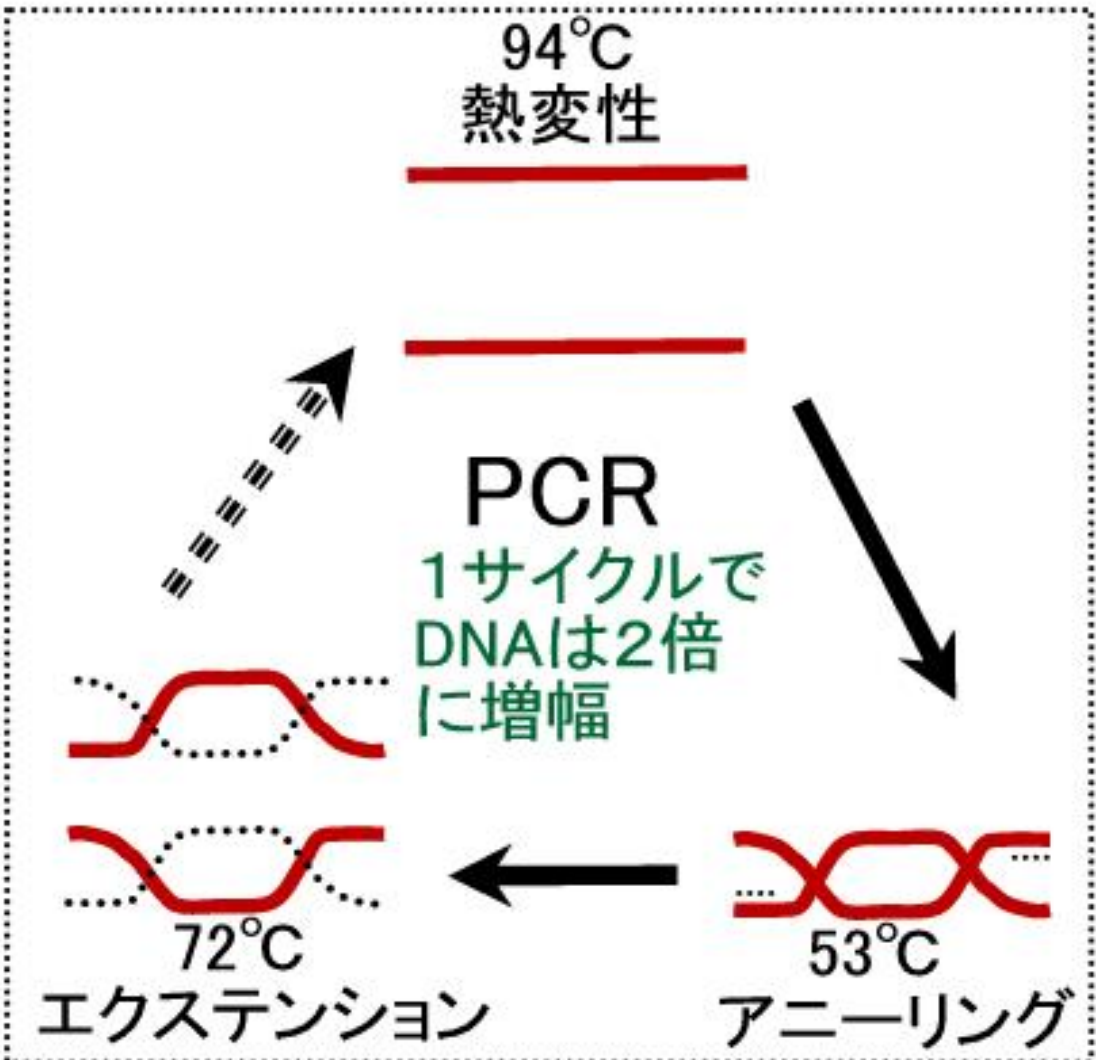
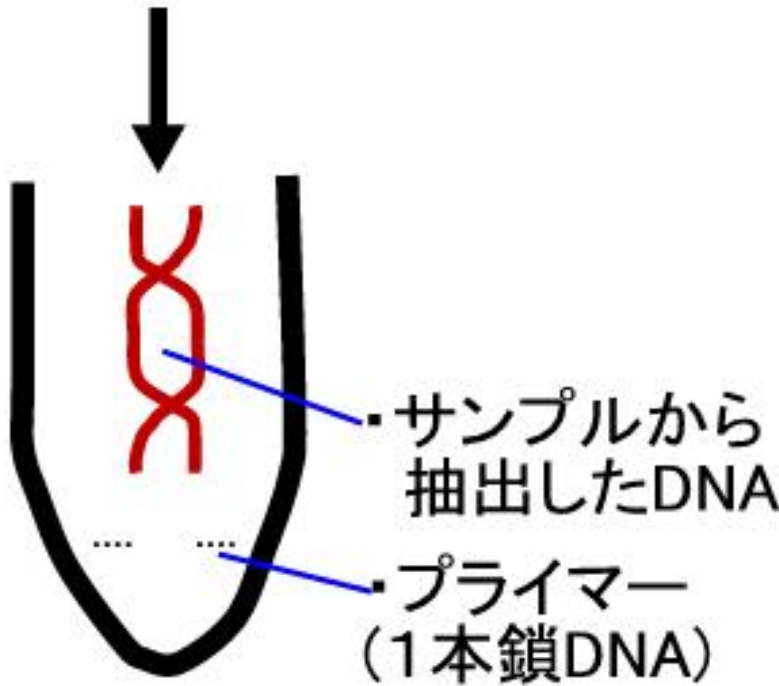
実験に使用した器具など

結果と考察

1. PCRでは三段階の温度(94°C、53°C、72°C)の下で反応させるが、それはなぜか。
2. 電気泳動によって遺伝子型がわかるのは、なぜか。
3. ミトコンドリアDNAのND2遺伝子は、どのようにして子孫に遺伝するか。
4. 5178C型と5178A型の塩基配列の違いによっておこる変化は何か。
5. 仮説は検証されたか。

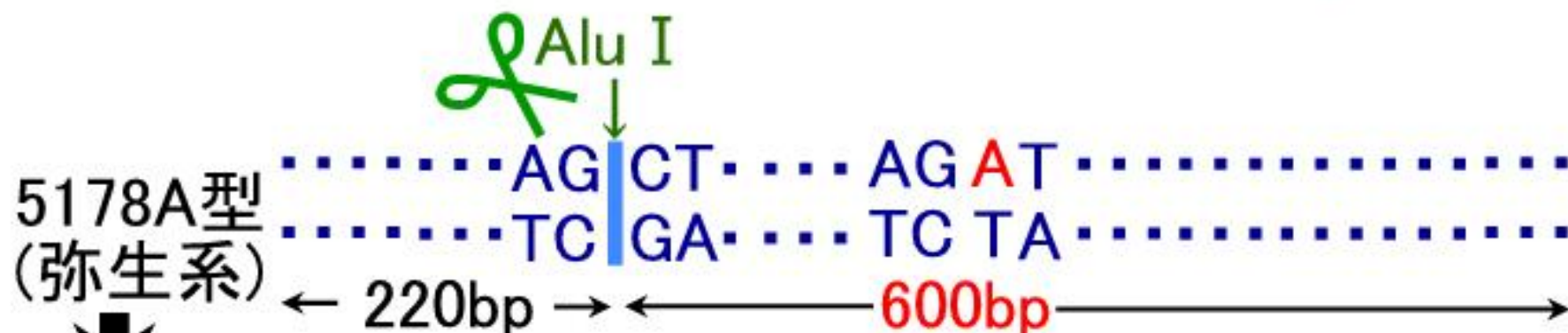
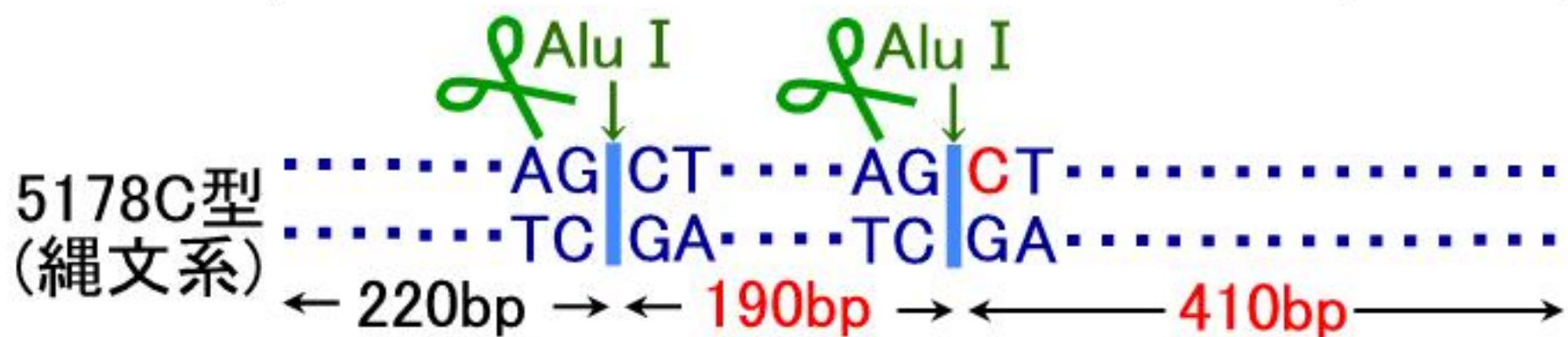
PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)

- ・酵素液
(Taqポリメラーゼ)
- ・緩衝液
- ・ヌクレオチドの材料
(dATP, dTTP, dGTP, dCTP)



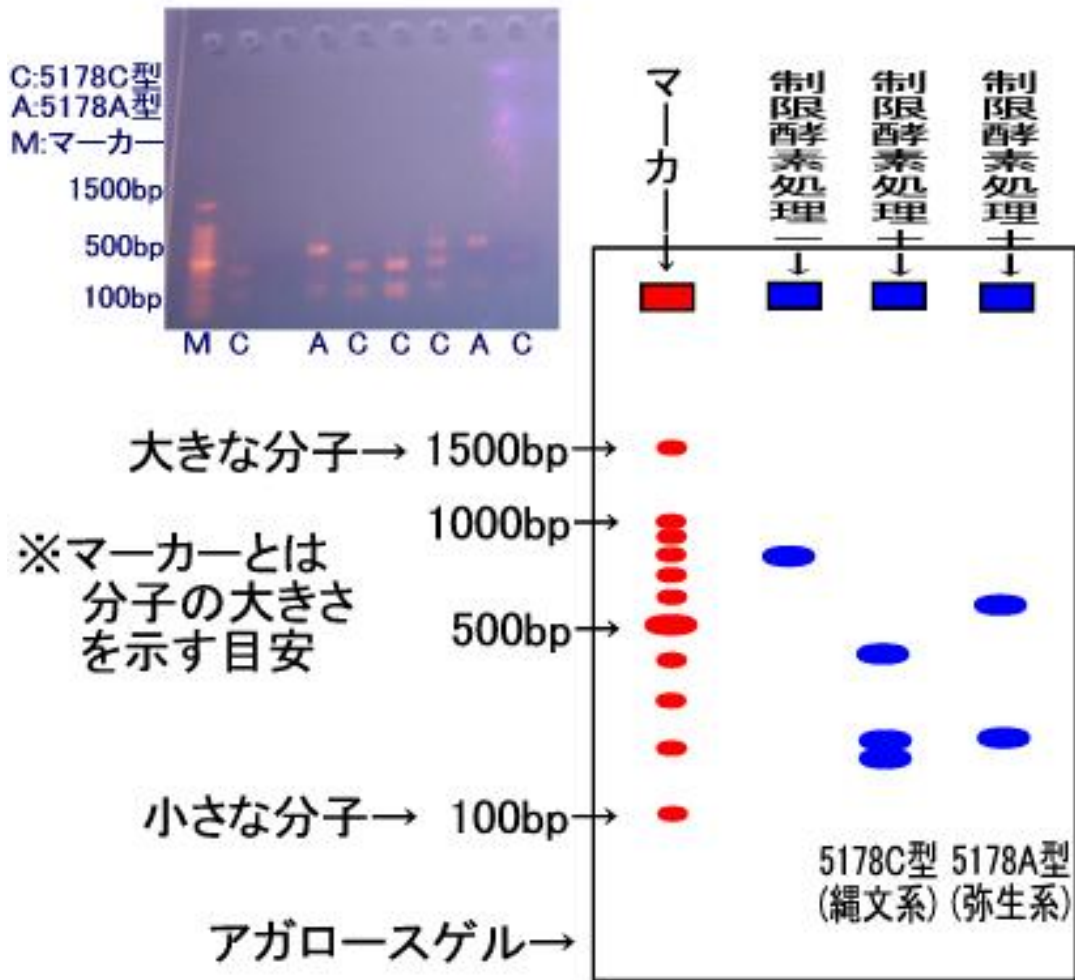
制限酵素Alu I による処理

ヒトのミトコンドリアDNA ND2遺伝子 約820bp(塩基対)



電気泳動によって遺伝子型を判定

電気泳動による ND2遺伝子の多型検出

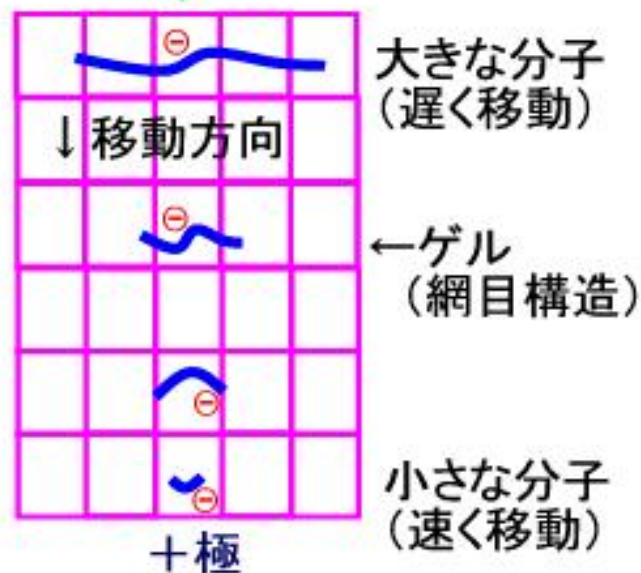


電気泳動のしくみ

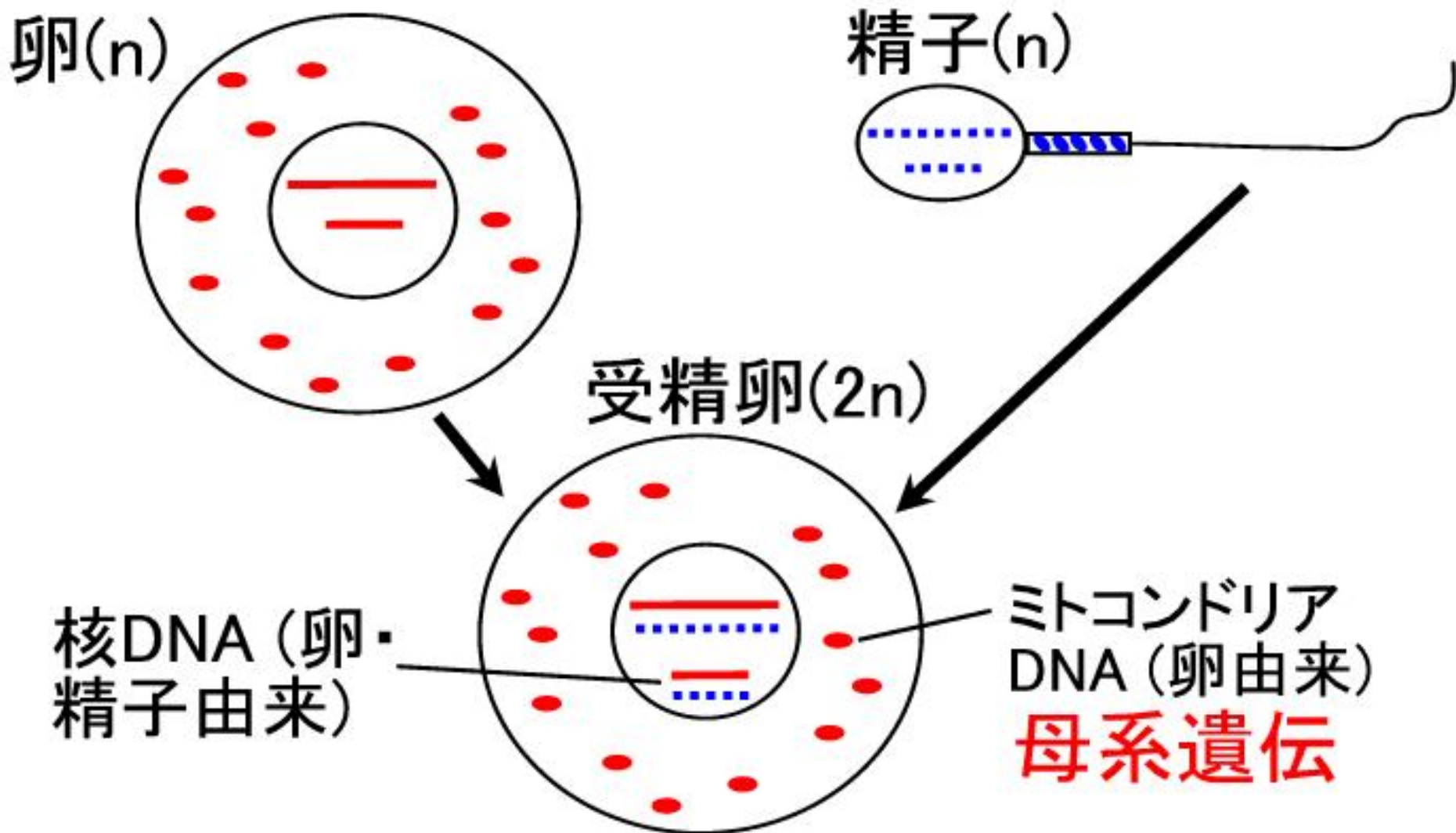
サンプルのDNA分子



電気泳動



子孫へのDNAの伝わりかた



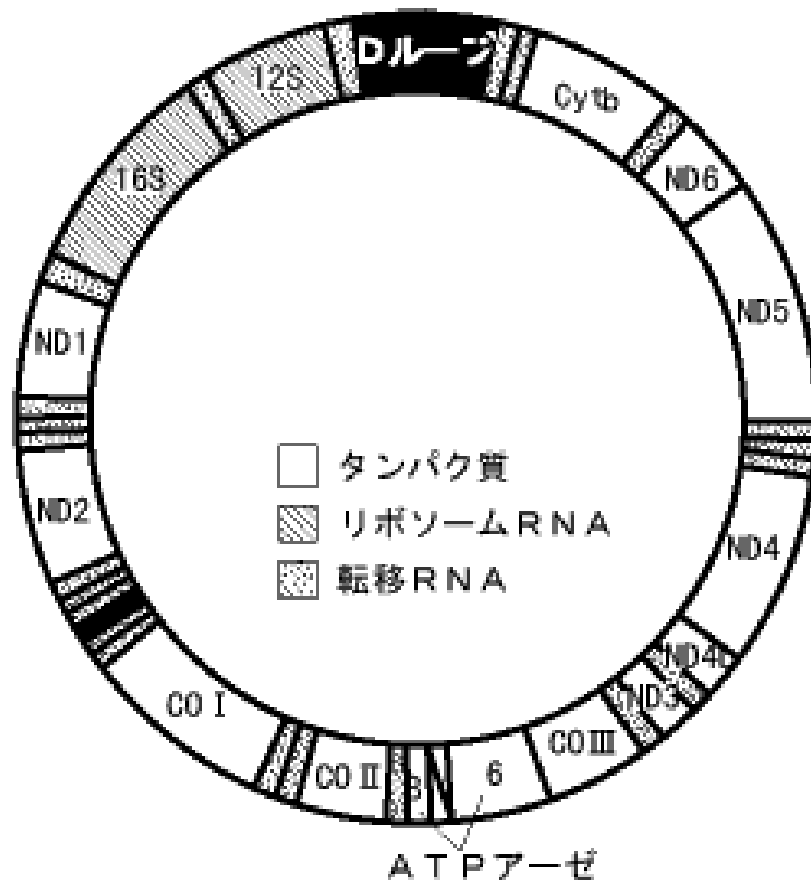


図1 ミトコンドリアDNAの遺伝子の配置。13種類のタンパク質を指定する遺伝子(白抜きで示した領域。ND1~ND6、Cyt b、CO I ~ III、ATPアーゼ6、8)、2種類のリボソームRNAを指定する遺伝子(斜線で示した領域。12S、16rRNA)、22種類の転移RNAを指定する遺伝子(点々で示した領域)がある。グレーで示した領域が、何の遺伝子も指定しないDループ領域である。

ND2遺伝子の多型とは

1塩基の置換によって起こるSNP(一塩基多型)の1つ

ミトコンドリアDNA
16,569塩基のうち

5,178番目
の塩基

DNA

...AAGCTAACA...

転写

mRNA

...UUCGAUUGU...

翻訳

237番目
のアミノ酸

ポリペプチド
(タンパク質)

...Lys Leu Thr...

リシン ロイシン トレオニン
NADH脱水素酵素
サブユニット2

5178C型(縄文系)

5,178番目
の塩基

...AAGATAACA...

転写

...UUCUAUUGU...

翻訳

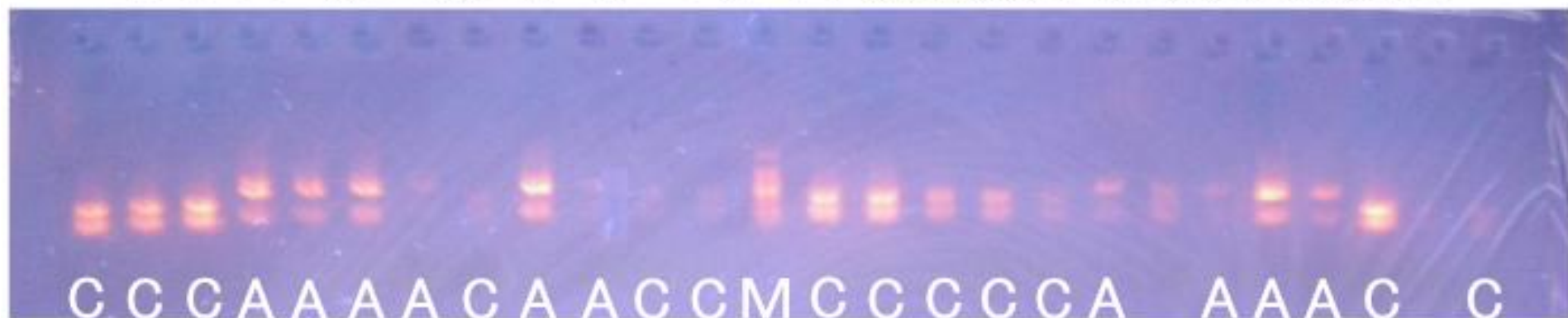
237番目
のアミノ酸

...Lys Met Thr...

リシン メチオニン トレオニン
NADH脱水素酵素
サブユニット2

5178A型(弥生系)

ND2遺伝子の電気泳動結果



C:5178番目の塩基がC(シトシン)

M:マーカ-

Alu I 切断箇所2箇所

A:5178番目の塩基がA(アデニン)

Alu I 切断箇所1箇所



「ND2遺伝子には人によって共通な部分と異なる部分とがある」という仮説は検証された。