

報告書

インターネットおよび DNA チップを活用した 高校生へのゲノム教育への実践

沖嶋 直子

〈目次〉

1. 本企画のねらい
2. 方法
3. 結果と考察

1. 本企画のねらい

ヒトゲノム配列が Human Genome Project(HGP)および Celera Genomics によって完全解読・公開¹⁾されて約6年が経過した。ヒトゲノム情報が完全解読されたことにより、遺伝子型をあらかじめ検査しておいた上で薬剤の種類や量の調整を行うオーダーメイド医療の進展²⁾や、DNA配列のちょっとした個人差である遺伝子多型の解析が生活習慣病や肥満に関連していると予想される遺伝子の発見に寄与する³⁾⁴⁾など、ヒトゲノム情報は疾患の発見や治療、健康の維持増進に寄与している。このような背景からマスコミにも取り上げられるなど、一般人にもゲノムという言葉が定着しつつある。

しかしながら、科学技術分野の他の用語と同じく生命科学とはまったく関連のない事象にも「〇〇のゲノム」といった表現を使っているケースも散見されるなど⁵⁾、この言葉そのものの本当の意味や意義を一般人が本当に理解しているかは疑問である。今回、ヒトゲノムについて一般人にも広く正しく知ってもらうことを目的に、長野県下の高校生と保護者・引率の理科教員を対象とした実験教室を企画・開催したので報告する。

2. 方法

① 対象者と募集方法

対象は長野県下の高校生および引率の保護者および高校教員とした。実験を実際に行うのは生徒のみとし、講師1名および助手1名で安全に実験が行えるよう、定員を少人数に絞り10名と設定した。募集に関しては、松本市および周辺の高등학교の生物・化学担当教員宛に告知チラシと応募用紙を郵送すると同時に本学ホームページにも掲載し、オープンキャンパスや健康栄養学科の他教員の開催する実験教室の参加者にもチラシを配布し募集を行った。チラシの郵送を受け、中信地区の県立高校より教員1名、生徒4名、オープンキャンパス参加者より健康栄養学科3年次編入学予定者1名の計6名が参加した。

② 実験教室の企画と実施

本教室はDNAチップを用いた実験と講義、コンピューター実習による1日のコースを設定した。その日程を図1に示す。

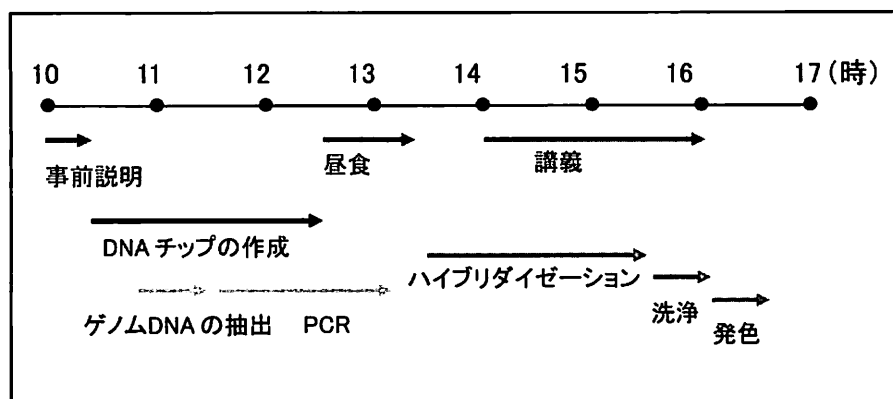


図1 実施日当日の日程

1) DNAチップによる遺伝子多型検出

DNAチップによる遺伝子多型検出は、ハイブリ先生（DNAチップ研究所、Cat.No. H0002）を使用した。この検出キットは高校生のバイオテクノロジー分野の理解増進への活用が既に報告されていること⁶⁾より、当該活動にも十分活用できると判断した。検出原理および

操作ステップについて図 2 に示す。

1. プローブのプラスチック基盤への固層化と洗浄
ハイブリ先生付属のプラスチック基板に、スポット液として添付されているプローブを滴下し、80°Cの恒温機に入れ1時間以上乾燥させることにより、プローブのガラス基板（チップ）への固層化を行った。1時間経過後、基板を1x ブロッキング液（ハイブリ先生添付）の入ったタッパーへ移し、5分間静置した。その後沸騰水の入ったビーカーへ移し2分間静置し、さらに室温の超純水へ移して2分間浸すことで急冷した。その後取り出し、OA 用エアダスターにて水分を飛ばし、チップ表面の水分を除いた。

2. DNA の抽出
プローブの基盤への固層化を行っている間に、常法にて頬の内側の細胞からゲノム DNA の抽出を行った。綿棒で頬の内側を擦過し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）をあらかじめ添加しておいた1.5ml チューブ内で洗い流すことにより細胞懸濁液を作製した。にごりが出て頬の細胞が採取できたことを確認し、微量遠心分離器にて12000rpm、1分間遠心分離をし、上清である PBS と沈殿物である頬の内側の細胞とに分離した。上清をマイクロピペットにて取り除き、滅菌蒸留水を30 μL 添加し、タッピングにて再懸濁させた。ここへ Insta Gene Matrix（バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)、Cat.No. 732-6030）を200 μL 添加し、56°Cの恒温槽にて15分静置後タッピングにて内容物を混合し、100°Cの恒温槽にて8分間静置した。タッピングで内容物を混合した後12000rpm、1分間遠心分離を行い、沈殿物を吸わないよう注意しながら、ゲノム DNA が含まれている上清10 μL を新たな1.5ml チューブに移した。

3. ALDH2 遺伝子の増幅およびビオチンラベル

2の項目で採取したゲノム DNA を鋳型にし、ALDH2遺伝子を PCR 法にて増幅・ビオチン化した。DNA 溶液を10 μL 加えた1.5ml チューブへ滅菌水を12 μL、ALDH2 Primer mix（ハイブリ先生添付試薬）を3 μL、2×PCR Solution（Premix Taq®（Ex Taq™ Version）タカラバイオ(株) Cat.No. RR003A）を25 μL 加えた。よく混合した後、8連 Optical tube（Applied Biosystems、Cat.No. 4316567）にそれぞれ移し、Optical caps（Applied Biosystems、Cat.No. 4322032）にて8連チューブのキャップを閉じた。これをサーマルサイクラー（Applied Biosystems 2720）にセットし、94°C・5分の熱変性後、94°C・20秒～64°C・30秒～72°C・30秒の温度変化サイクルを35サイクル行い、35サイクル目終了後、72°C・5分の伸長反応および4°Cに保持のステップで PCR 反応を行った。

4. ハイブリダイゼーション～洗浄

1.5ml チューブにハイブリ液（ハイブリ先生添付試薬）40 μL、3のステップを行った PCR 液40 μL、ポジティブコントロール液1 μL 加え、キャップをして95°C・3分間の熱変性を行った後、クラッシュアイス上に2分間静置して急冷した。1のステップで作製した DNA チップにハイブリカバー（ハイブリ先生添付）をかぶせ、マイクロピペットにて急冷したハイブリダイゼーション溶液をチップとカバーの隙間から注入し、湿らせたキムワイプを入れたタッパーへ入れてふたをし、37°Cの恒温機に入れ2時間のハイブリダイゼーション反応を

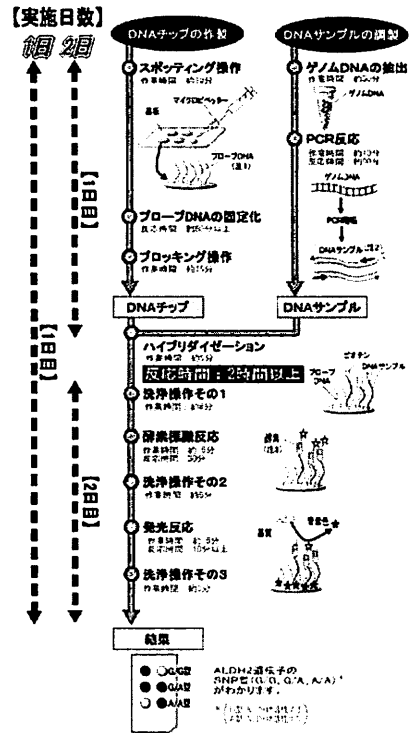


図2 ハイブリ先生の原理および実験ステップ

行った。

2時間後、ハイブリカバーをはずしたチップを37°Cに保温した1x洗浄液①（ハイブリ先生添付試薬）の入ったタッパーに5分間浸し、軽く揺すって洗浄し、続いて1x洗浄液②（ハイブリ先生添付試薬）の入ったタッパーに移して軽く揺すり30秒間すすぎを行った。その後取り出し、OA用エアダスターにてチップ表面の水分を除いた。

5. ストレプトアビジン-APによる反応

1.5ml チューブに2x溶解液（ハイブリ先生添付試薬）500 μ L、滅菌水490 μ L、Streptavidin, AP Conjugate（フナコシ(株), Cat.No.）を10 μ L加え、よく混合した（酵素液）。4のステップの終了したDNAチップを実験台に置き、新たなハイブリカバー（ハイブリ先生添付）を静かにかぶせ、マイクロピペットを用いて希釈した酵素液をハイブリカバーとチップの隙間へ70 μ L注入した。このチップを湿らせたキムワイブを入れたタッパーへ入れてふたをし、30°Cの恒温機に入れ30分間反応させた。反応時間終了後、ハイブリカバーをはずしたチップを37°Cに保温した1x洗浄液①（ハイブリ先生添付試薬）の入ったタッパーに5分間浸し、軽く揺すって洗浄し、続いて1x洗浄液②（ハイブリ先生添付試薬）の入ったタッパーに移して軽く揺すり30秒間すすぎを行った。その後取り出し、OA用エアダスターにてチップ表面の水分を除いた。

6. BCIP/NBTによる発色反応

DNAチップを実験台に置き、70 μ LのBCIP/NBT（フナコシ(株), Cat.No. 50-81-18）をチップ表面に添加し静かにハイブリカバーを乗せた。これを湿らせたキムワイブを入れたタッパーへ入れてふたをし、30°Cの恒温機に20分間入れ発色させた。通常プロトコールでは反応時間は10分間だが、10分後に色調を見たところ発色が弱かったため、さらに10分間加温した。その後チップは1x洗浄液②の入ったタッパーへ移し30秒間軽く揺すって洗浄し、OA用エアダスターにて水分を飛ばし、チップ表面の水分を除き、結果を観察した。

2) 講義およびインターネットを利用したヒトゲノム情報へのアクセス

2時間のハイブリダイゼーションの間にヒトゲノム計画の歴史に関する簡単な講義をパワーポイントと補助教材（プリント）を用いて30分程度行った。その後ノート型パソコンを1人1台ずつ配布し、講義担当者の指示に沿ってNational Center of Biotechnology Informationのホームページ（アドレス <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）からReference Sequence Project（アドレス <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>）へアクセスをし、当日実験を行ったALDH2遺伝子の検索を行わせた。このサイトは全て英語であるため、当日配布したパワーポイントおよび補助教材（プリント）にて操作方法および各ページにどのような内容が記載されているかを補った。当日使用した教材を補足資料として文末に示す。

3. 結果と考察

実験終了後アンケートを実施した。その結果を表1に示す。また、当日の写真を図3に示す。



図3 当日の実験、講義、実習風景。
実験は生理学実験室、講義・コンピューター実習は演習室にて行った。

表1 実施担当者が行った事後アンケート結果

	よく参加している	参加したことがある	今回が初めて		
設問1 実験教室への参加	①参加したことはありますか	2	2		
	②(差し支えない範囲で)どのような活動でしたか	参加したことがある:S大学公開講座、地域の高校科学部研究発表交流会(2名とも)			
設問2 ヒトゲノムという言葉について	①ヒトゲノムという言葉を知っていましたか	知っていた	知らなかった		
	②言葉だけでなく、内容について知っていましたか	知っていた	知らなかった		
	③今回の実験教室でヒトゲノムについて理解できましたか	よく理解できた	理解できた	とららでもないがあまり理解できなかった	
設問3 実験について	①実験は好きですか	好き	普通	嫌い	
	②好き・普通・嫌いな理由	普通: 班の人がやってくれるので任せてしまうから。 好き: 新しく覚えたことが目の前で見られるから。 好き: 反応を見るのが楽しい。 好き: どんな反応が出るのか楽しみだから。今回はとても時間がかかったけれど、実験過程の中でいろいろな物質を混ぜたりして楽しくできた。			
	③今回の実験は簡単でしたか	簡単だった	普通	難しかった	
	④その理由	難しかった: テップを(キムワイプで)ふいてしまったから(講師の指示不足) 難しかった: テップ同士がくっついてしまった(タッパーで洗浄操作をしたため。無理やりはがしたためか、シグナルが出なかった)液量が多くなってしまいました(PCRにかける段階で試薬の入れ間違えがどこかであったようだ。これも講師の指示不足が原因と思われる) 難しかった: 物質名(試薬の名前のことと思われる)が不明だった。(操作を簡単にするために、キット化されているため、試薬名でなく、スポッティング液、などと呼んでいるためだと思われる。)			
設問4 今後の実験教室についての希望	①今後どの分野の実験教室を希望しますか	生物	化学	物理	地学
	②具体的な内容があれば記載してください。	解剖(ねずみ、ラット、鳥) GCMSを使用した実験(合間にラポターを行ったときに機器の説明を行ったため) 遺伝子組み換え植物(ラポターで紹介したリアルタイムPCRを用いた組み換え植物の検出について説明したため)			

①参加者の素養について

今回参加した高校生は、中堅校からの参加でしかも全員科学系の部活動部員であった。したがってそれらのバイアスがかかっていることは否めないが、アンケートの結果から以下の素養があることが判明した。

1. このような活動に参加する機会がある

これは設問1 ①参加経験に関する問いの回答が、2名はある、2名はないであったことから推測される。ない、と答えた生徒は1年生だったため、まだ本格的に部活動を行っていなかった可能性がある。

2. 生命科学をはじめとした自然科学に興味がある

これは設問2 ①②より読み取れた。もちろん自然科学系の部活動を行っていることから、普通の生徒よりも興味があって当然である。アンケートの自由記入欄からは実験が好き、反応を見るのが楽しいというコメントもあり、科学に関する興味、好奇心を持っていることがアンケート結果から読み取れた。

3. 難しいことでも最初から拒否をせず、楽しめる

これは設問2 ③④および本活動の助成を受けた、科学技術振興財団から指定されたアンケート設問(「今日の感想をお答えください。')とても楽しかった~全然楽しくなかった、の5段階評価)から推測された。この設問に対し、4名全員の生徒が「とても楽しかった」と解答していた。それに対し著者が独自に設定した「難しかったですか。」においては「難しかった」の回答が4名中3名で、これらの回答結果から「難しいことでも最初から拒否するのではなく、やってみると難しくても楽しかった。」と感じていたことが読み取れた。

②ヒトゲノムの理解について

アンケート結果から、本実験教室を実施する前には、参加した生徒の4名中3名は「ヒトゲノム」について言葉も知らない状態であった(アンケート設問2 ①)。これはヒトゲノム計画が終了し、新聞やTVといったマスコミに話題になった頃、彼らは小学校高学年~中学生だったことから、あまりニュースに触れていなかったことが考えられる。しかしながら、1日の講義および実験実習を通してその片鱗ではあるが理解することが可能であることが明らかとなった。

参考文献

- 1) Nature Collections Human Genome, Supplement to Nature Publishing Group
(1 June 2006)
- 2) A.Iida et.al., Cancer Sci., 97,16-24,'05
- 3) A.Loktionov, Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifunctional chronic diseases. J. Nutr. Biochem., 14, 426-51,(2003)
- 4) M.Kussmann, et.al., OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. J.Biotechnol., 124,758-87 (2006)
- 5) 芦田嘉之著 やさしいバイオテクノロジー (ソフトバンククリエイティブ、2007)
- 6) M. Oto, M. Ono and H. Kamada.: Gene literacy education in Japan. ~Fostering public understanding through practice of hands-on laboratory activities in high school. Plant Biotechnol., 23, 339-346 (2006)

謝辞

この活動は独立行政法人科学技術振興機構の平成20年度地域科学技術理解増進活動推進事業地域活動支援により実施した。

実施日当日助手としてお手伝いいただいた羽石歩美助手に深謝する。

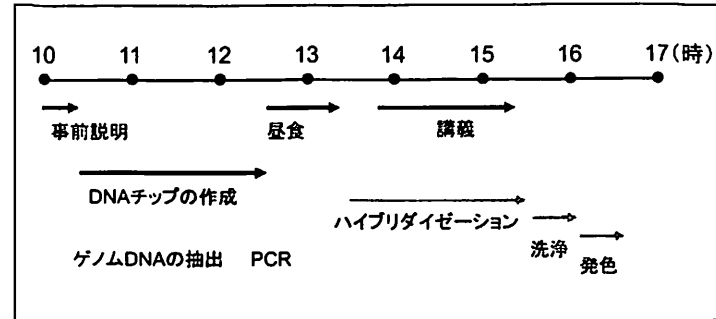
科学実験教室

ヒトの設計図、ヒトゲノムについて知ろう！

1. 遺伝子検査をしてみよう。

ハイブリ先生（DNAチップ研究所）を使用して、遺伝子検査をしてみましょう。

1日の予定表



- ①DNAチップの作成 遺伝子検査に使う、DNAチップを自分で作ります。遺伝子検査を行いたい配列の周辺と結合する物質（プローブ）をガラス板表面に結合させます。
- ②ゲノムDNAの抽出 ほおの内側の組織を綿棒でこすり取り、それを使用してゲノムDNAを抽出（細胞の中から欲しい物質を取り出すこと）します。
- ③PCR 抽出したゲノムDNAの検査したい部分を増幅して、それにビオチンという物質を結合させる操作です。
- ④ハイブリダイゼーション PCRを行ったDNAをチップに乗せて、チップ上のプローブと結合させます。
- ⑤洗淨～発色 余分なDNAを洗い流し、結合したDNAを発色させて検出を行います。

具体的な操作方法はハイブリ先生のマニュアル（別紙）を見ながら行います。

平成20年11月24日 松本大学人間健康学部健康栄養学科

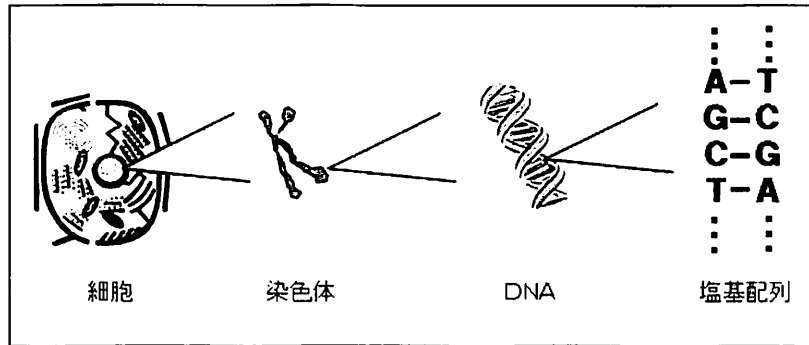
専任講師 沖嶋 直子

助手 羽石 歩美

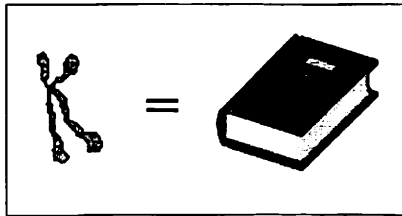
2. ヒトゲノムについて知ろう!

①そもそも、ヒトゲノムって何?

ヒトの体には約60兆個の細胞があり、その細胞の一つ一つに核があります。核の中には23対・46本の染色体があり、その染色体はDNA（デオキシリボ核酸）という糸のような成分と、その糸を糸巻きのように巻いているタンパク質で出来ています。DNAを構成する塩基にはA（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）がありますが、これがアトランダムな順番でネックレスのようにつながっています。



このATCGという4つの塩基からなる配列は、ヒトが生きていくのに必要な設計図である遺伝子を形成しています。例えて言うなら、23巻にも及ぶ巨大な百科事典のようなものです。それぞれの細胞では遺伝子配列の必要なところだけを使って、それを元にその細胞に必要なタンパク質が作られます。これは、皆さんが百科事典の必要なところを調べて、必要なところだけをコピーして使うようなものです。この百科事典全巻をまとめて「ヒトゲノム」と呼んでいます。

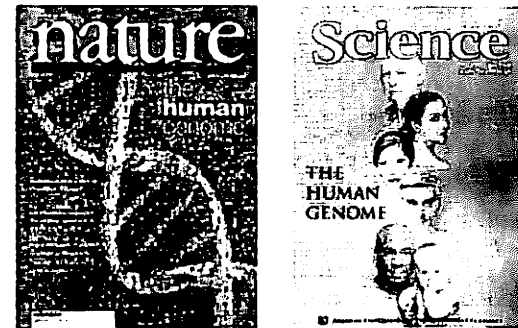


②ヒトゲノムの歴史的背景

ヒトの遺伝子配列を全て読み取り、明らかにしようとするヒトゲノム計画は、今からおよそ15年前にアメリカの公的研究機関であるNIH (National Institute of Health) からスタートしました。このプロジェクト (HGP と省略します) には、アメリカの研究者だけでなく、イギリス、日本、ドイツ、フランス、中国などの公的研究機関が分担しました。日本では東京大学医学研究所や理化学研究所が中心となって解読作業を行いました。途中、ヒトゲノムの配列を読み取り、データベース化して販売しようとする企業であるCelera Genomicsという企業も参入し、ヒトゲノムの配列解読レースがヒートアップしました。そのレースは2000年6月にHGPおよびCelera Genomics双方が同席で概要版（おおよその配列の解読）を発表することで終了しました。その後双方でさらに配列の細かな解読が進み、2003年にはヒトゲノム配列完全版が出て、配列解読作業は無事終了したのです。



ホワイトハウスで握手をして和解するCraig Venter (Celera Genomics 社長: 当時) と Francis Collins (HGP ディレクター)



科学の分野での2大学術雑誌、NatureとScience

HGPは2001年2月15日にNatureに、Celera Genomicsは同16日にScienceにヒトゲノム配列の概要版を公開しました。一時は公的研究機関対Celeraという対決の図式となっていて、Celeraは約2年前までヒトゲノム配列やそれに付随する情報を有償で公開していましたが、現在ではCeleraのヒトゲノム情報もインターネットから無料で見る事が出来るようになりました。

③ どうしたらヒトゲノムが見られるの？

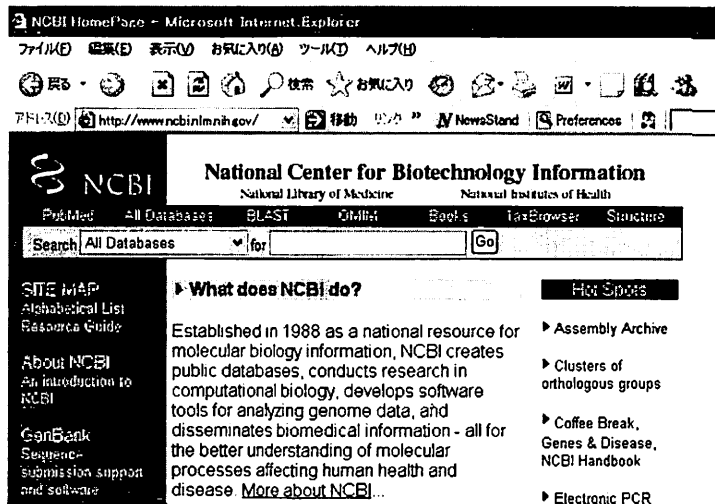
NCBI (National Center of Biotechnology Information) というアメリカの研究機関のホームページで見られます。ここには遺伝子の配列だけでなく、その遺伝子に関わるあらゆる情報（その遺伝子配列を元に作られる mRNA やタンパク質の配列など）や、さらにその遺伝子に関する研究論文を見ることが出来ます。

このインターネットサイトには、ヒト以外の生き物として、マウス、イヌなどの哺乳類、細菌などの遺伝子情報も含まれていますので、大学や大学院、各種研究機関で生命科学を研究している人は、必ず使うサイトです。

それでは、NCBI の HP にアクセスして、ヒトゲノムを見てみましょう！

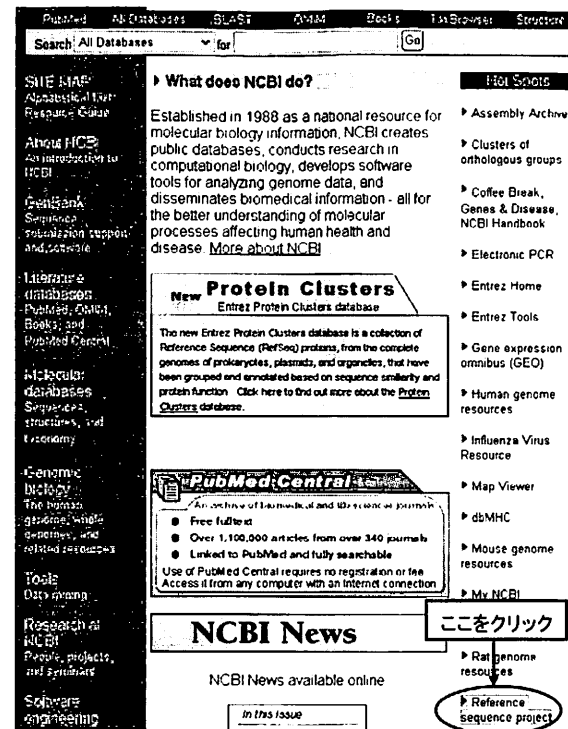
今日遺伝子検査を行っている ALDH2 遺伝子について調べる方法について実践してみます。

① http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ にアクセス

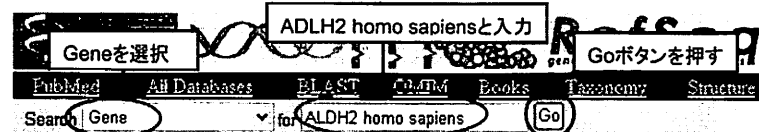


NCBI のトップページが現れます。このページから、遺伝子だけでなく様々な生物に関する情報が検索できます。

② Hot Spots の Reference sequence project をクリックする



③ RefSeq の画面が現れるので Search の後ろの選択を Gene にし、for の後の白い枠に ALDH2 Homo sapiens と入力、Go ボタンを押す



③検索結果が現れる。多くの項目が現れるが、その中からトップにあるALDH2をクリックする。

Entrez Gene

Search Gene

ALDH2をクリック

Items 7 of 7

1: **ALDH2**

Official Symbol ALDH2 and Name: aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) [*Homo sapiens*]
 Other Aliases: ALDH-E2, ALDEH, ALDM, MGC1806
 Other Designations: ALDH class 2, acetaldehyde dehydrogenase 2, liver mitochondrial ALDH, mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2
 Chromosome: 12, Location: 12q24.2
 Annotation: Chromosome 12, NC_000012.10 (110688729..110732167)
 MIM: 100650
 GeneID: 217

2: ADH1B

Official Symbol ADH1B and Name: alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide [*Homo sapiens*]
 Other Aliases: ADH2, DKFZp686C06125
 Other Designations: ADH, beta subunit, alcohol dehydrogenase 2 (class I), beta polypeptide; alcohol dehydrogenase
 Chromosome: 4, Location: 4q21-q23

④ALDH2に関する情報はこのページで見られる。

1: ALDH2 aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) [*Homo sapiens*]
 GeneID: 217 updated 06-Apr-2008

Summary

Official Symbol **ALDH2** (遺伝子の略称)

Official Full Name **aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)** (遺伝子の正式名称(フルネーム))

Primary source **HGNC:404**

See related **Ensembl:ENSG00000111275; MGC:1806; MIM:100650**

Gene type **protein coding** (タンパク質をコードしている遺伝子を示している)

RefSeq status **Reviewed**

Organism **Homo sapiens** (ヒトの遺伝子を示している)

Lineage **Eukaryota; Metazoa; Chordata; Mammalia** (この遺伝子についての説明)

Summary
 This protein belongs to the aldehyde dehydrogenase family of proteins. Aldehyde dehydrogenase is the second enzyme of the major oxidative pathway of alcohol metabolism. Two major liver isoforms of this enzyme, cytosolic and mitochondrial, can be distinguished by their electrophoretic mobilities, kinetic properties, and subcellular localizations. Most Caucasians have two major isozymes, while approximately 50% of Orientals have only the cytosolic isozyme, missing the mitochondrial isozyme. A remarkably higher frequency of acute alcohol intoxication among Orientals than among Caucasians could be related to the absence of the mitochondrial isozyme. This gene encodes a mitochondrial isoform, which has a low Km for acetaldehydes, and is localized in mitochondrial matrix.

Genomic regions, transcripts, and products

Go to reference sequence details

mRNA情報

Genomic context

chromosome: 12; Location: 12q24.2

ゲノム情報

⑤さらに See ALDH2 Map Viewer をクリックすると遺伝子の位置情報などが現れる

1: ALDH2 aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) [*Homo sapiens*]
 GeneID: 217 updated 06-Apr-2008

Summary

Official Symbol **ALDH2**

Official Full Name **aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)**

Primary source **HGNC:404**

See related **Ensembl:ENSG00000111275; MGC:1806; MIM:100650**

Gene type **protein coding**

RefSeq status **Reviewed**

Organism **Homo sapiens**

Lineage **Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Euthera; Euarchontoglires; Primates; Haplorhina; Catarrhini; Homnidae; Homo**

Also known as **ALDM; ALDH1; ALDH-E2; MGC1806**

Summary
 This protein belongs to the aldehyde dehydrogenase family of proteins. Aldehyde dehydrogenase is the second enzyme of the major oxidative pathway of alcohol metabolism. Two major liver isoforms of this enzyme, cytosolic and mitochondrial, can be distinguished by their electrophoretic mobilities, kinetic properties, and subcellular localizations. Most Caucasians have two major isozymes, while approximately 50% of Orientals have only the cytosolic isozyme, missing the mitochondrial isozyme. A remarkably higher frequency of acute alcohol intoxication among Orientals than among Caucasians could be related to the absence of the mitochondrial isozyme. This gene encodes a mitochondrial isoform, which has a low Km for acetaldehydes, and is localized in mitochondrial matrix.

Genomic regions, transcripts, and products

Go to reference sequence details

Genomic context

chromosome: 12; Location: 12q24.2

⑥詳細な位置情報が示される

ALDH2 Map Viewer

12番染色体のこのあたりを拡大した図

これがALDH2遺伝子の位置

参考文献

本プログラムは以下の書籍、文献を参考にいたしました。

ヒトゲノムを制するものは誰か クレイグ・ベンターとヒトゲノム解読競争
ケヴィン・デイヴィーズ著 中村友子訳 中村桂子監修
日本経済新聞社 (現在再版未定)

Science, Vol.291, No.5507, The Human Genome, 2001

Nature Collections, (Supplement of Nature Publishing Group), Human Genome, 2006