

付録3

下限数量以下の非密封³²Pと³⁵Sを用いた 遺伝子発現機構の検証実験 (サイエンスパートナーシッププログラム等における C 高等学校の実施例)

[解説]

●バクテリオファージの遺伝物質の同定

DNA は分子内にリンを含みますがイオウを含まず、タンパク質はイオウは含みますがリンを含まないことから、ハーシーとチェイス(1952)はバクテリオファージのDNAを放射性の³²Pで標識し、タンパク質を放射性の³⁵Sで標識して大腸菌に感染させ、どちらの元素が大腸菌中に入っていくかを調べました。この実験を高校生を対象として実施できます。この実験は典型的なトレーサー実験として非常に教育効果の高い実験です。

- 1) 事前に指導者が³²Pや³⁵Sを加えた合成培地で大腸菌を培養し、バクテリオファージを加えて溶菌させることで、標識バクテリオファージを得ておきます。
- 2) 生徒実験では、まずそれらのバクテリオファージを大腸菌に感染させた後、ブレンダーやボルテックスなどで激しく攪拌してバクテリオファージを大腸菌からひきはがします。
- 3) 攪拌後に遠心分離を行って上清(バクテリオファージ)と沈殿(大腸菌)に分離してそれらの放射能を測定します。

●セントラルドグマの検証実験

遺伝情報はDNAからRNAに写し取られ、RNAの情報をもとにタンパク質が合成されます。この過程を放射性同位元素を使ってトレースする実験です。

1) 転写 (DNA → RNA)

鋳型となるDNA(GFP遺伝子にプロモーターを連結したもの)とRNAポリメラーゼ、³²P標識ATP、NTP混合液(非標識ATP、TTP、CTP、GTP)を混合して、15分後にゲル浸透クロマトグラフィー スピнкаラムを用いて、高分子量の画分(RNA)の放射能を測定します。その際、反応液にRNAポリメラーゼを添加しなかったもの(対象)と、RNAポリメラーゼとRNA分解酵素を加えたものも作製し、高分子物質がRNAであることを確認します。

2) 翻訳 (RNA → タンパク質)

転写実験で合成したGFPの伝令RNA(³²P-ATPは用いない)を、破碎した大腸菌液(無細胞翻訳系)に加え、³⁵S-メチオニン、³⁵S-システインを含むアミノ酸混合液を加えて15分間翻訳を行います。その後、ゲル浸透クロマトグラフィー スピнкаラムを用いて、高分子量の画分(タンパク質)の放射能を測定します。得られたタンパク質をSDS-電気泳動で展開後、ろ紙に貼付けて乾燥し、イメージングプレートでオートラジオグラフィーを行なって、放射性タンパク質の分子量を求めて、遺伝子として使用したGFPが翻訳されているかを調べます。

また、一晩継続して翻訳反応を行った試験管に紫色の光を当てると GFP の緑色の蛍光が観察できます。

●DNA の塩基組成の規則性（シャルガフの法則）を調べよう

DNA の構造がまだ解明されていなかった時代に、シャルガフがさまざまな生物から DNA を抽出して、その塩基の割合を調べた結果、どんな生物の DNA でも アデニン(A)とチミン(T)の量がほぼ等しく、グアニン(G)とシトシン(C)の量がほぼ等しいということと、(A+T)と(G+C)の割合は、生物種によって異なるという経験則を見出しました。この経験則は後にワトソン・クリックによる DNA の構造決定の参考になったと言われていました。

シャルガフは DNA を酸で分解して塩基の組成を直接調べましたが、ここではこの法則を PCR 法を使って検証します。DNA は dATP、dTTP、dCTP、dGTP を基質として合成されますが、それぞれの放射性ヌクレオシド三リン酸を取り込ませ、DNA に G と C がほぼ同量ずつ取り込まれ、G と A は生物種によって異なることを調べます。その際、鋳型となる DNA として、原核生物由来の GC 含量の多い DNA と、植物の葉緑体由来の AT 含量の多い DNA を用い、生物材料の違いが放射能の違いとして反映されるかどうかを調べます。

[実験の実際]

ここでは、上記「DNA の塩基組成の規則性（シャルガフの法則）を調べよう」を例に取り、実際の高等学校における実施例を紹介します。実施をされる先生方が放射線管理についてそれほど詳しくない場合は、前述のようにお近くの理系大学や科学館などへ協力を依頼してください。

1 下限数量以下の RI の入手

この実験では、³²P で標識されたヌクレオシド三リン酸(dATP, dGTP, dCTP)を DNA 合成の基質として使用します。

- 1) まず管理職の先生へ相談し、「下限数量以下 RI 管理責任者」を選びます。この管理責任者はどなたでも結構ですが、今後この方が中心となって RI の購入や廃棄などの管理を行う事になりますので、実際の実験を担当する理科の先生が望ましいと思われます。
- 2) 日本アイソトープ協会では取り扱っている RI を購入する際は、「下限数量以下の非密封 RI 使用事業所登録依頼・同意書」を交します。
- 3) 発注する RI が下限数量以下であることを管理責任者が確認し、「下限数量以下 RI 注文書」を用いて FAX で注文します。この実験では [α -³²P]dATP, [α -³²P]dGTP, [α -³²P]dCTP をそれぞれ 30 kBq ずつ購入しました (dTTP は入手できなかった)。³²P の下限数量は 100 kBq なので、3 種類のヌクレオシド三リン酸を購入しても合計で 90 kBq であり、下限数量以下となっています。この実験で購入した RI は ARC 社のもので、カタログ番号は以下のとおりです

ARP0118A Deoxyadenosine 5'-triphosphate, tetra (triethylammonium) salt, [α - ^{32}P]

ARP0120A Deoxycytidine 5'-triphosphate, disodium salt, [α - ^{32}P]

ARP0140A Deoxyguanosine 5'-triphosphate [α - ^{32}P] (tetra-triethylammonium salt)

4) RIを受領したら、発注品したものが正しく納品されたかを確認し、受入れの帳簿に記載します。帳簿の様式は自由ですが、受入者の氏名、日付、数量、保管場所などを記載します（帳簿の例が上に掲載されています）。保管場所は理科準備室のキャビネットや冷蔵庫とし、みだりに生徒などが触れないような場所にします（規則はありませんが、施錠できるものが推薦されます）。受入の記録は使用を終了してから5年間保存します。

2 実験の準備

- 1) 下限数量以下とは言え、実験では放射線を放出する物質を取扱うため、実験に参加する生徒およびその保護者には、事前に文書による十分な安全性の説明を行います。
- 2) 使用場所を「生物室」や「化学室」などと決め、それ以外の場所では使用しないようにします。使用場所では飲食など、体内にRIを摂取するおそれのある行為はさせないようにします。
- 3) 実験机にポリエチレンろ紙を貼付けておくと、万一RIが飛散しても対処が容易です。
- 4) 生徒に対しては、放射線の性質や人体への影響、取扱い上の注意点などについて説明しておきます。
- 5) 可能であれば、事前にRIを使用せずに全く同じ手順で実験の練習をしておくと、RI使用実験時の手順や注意点を確認することができ、RI使用実験当日の安全性が向上します（コールドランの実施）。
- 6) 鋳型DNAや精製キットの準備、PCR用試薬の調製など、遺漏の無いように準備をします。特に今回の実験では、PCRに用いる非放射性dNTPの最適濃度（放射性dNTPとの比）を予備実験によって調べておくことが重要です。

3 実験の実施

この実験は、通常授業の2時間分を使って実施しました。生徒を5～6人ずつ6班に分け、各々の机に大学生のティーチングアシスタントを1名ずつ配置して実施しました。

- 1) 再度、実験手順を生徒に説明して良く理解させます。
- 2) 実験にあたり、生徒には白衣、手袋、ゴーグル、マスクなどの保護具を着用させます。
- 3) RIは「下限数量以下RI管理責任者」の許可を得た後、保管場所から持ち出します。

[DNA の各ヌクレオチドの放射標識]

放射標識された dGTP、dCTP、dATP の 3 種類のヌクレオシド三リン酸が鋳型 DNA の種類 (AT を多く含む DNA および GC を多く含む DNA) によって、どのくらいの割合で合成 DNA に取込まれるかを測定します。

今回は 6 班に分かれて実験を行い、各班ごとに以下のように 1 種類の DNA について 2 種類の放射標識ヌクレオシド三リン酸を取込ませます。

1 班 AT rich DNA で C と G の量を比較	4 班 GC rich DNA で C と G の量を比較
2 班 AT rich DNA で A と C の量を比較	5 班 GC rich DNA で A と C の量を比較
3 班 AT rich DNA で A と G の量を比較	6 班 GC rich DNA で A と G の量を比較

1. 各班で PCR チューブを 2 本用意し、おのおのに調べる塩基を書きます (1 班なら C と G)。インクが消えやすいので書いた所はあまりさわらないようにして下さい。
2. 2 本の PCR チューブに AT rich 用、GC rich 用の PCR 反応液を 40 μ l 加えます。
PCR 反応液には、DNA (AT rich または GC rich)、dATP、dTTP、dCTP、dGTP、プライマー-DNA、耐熱性 DNA ポリメラーゼがあらかじめ混合されています。
3. おのおのの PCR チューブに 10 μ l の放射標識ヌクレオチド三リン酸を加え、キャップを閉めて混合します。
4. 2~3 秒ほど遠心分離して溶液を下に集めたあと、サーマルサイクラーへ入れて下さい。その際、自分の入れた場所を忘れないようにして下さい。
5. 以下の条件で PCR を行います。

熱変性	94°C	2 分	
熱変性	94°C	15 秒	┌
プライマーの結合	55°C	15 秒	└ 10 サイクル繰り返します
DNA の合成	68°C	15 秒	┌
DNA の合成	68°C	2 分	

[標識された DNA と未反応 dNTP の分離]

PCR で合成された DNA と、DNA に取込まれなかった放射標識 dNTP をカラムクロマトグラフィーで分離します。DNA の精製は、キアゲン社のキット (QIAquick PCR Purification kit) を用います。

1. PCR を行った反応液全量 (50 μ l) を注意深く PB 溶液 (250 μ l) の入ったチューブに加えて良く混合します。

2. 上で混合したサンプルを紫色のカラムに入れ、フタに班の番号と加えた放射性 dNTP の種類を書きます(1G, 2A, 3C など)。
3. 1 分間室温で遠心分離を行います。DNA はカラム樹脂に吸着し、dNTP はカラムを素通りします。
4. コレクションチューブ内のカラムを素通りした液を、チューブごとゴミ入れに捨てます。この溶液の放射能は高いと思われるので、こぼしたり飛沫を散乱させないように注意して下さい。
5. 新しいコレクションチューブにカラムを入れます。
6. 樹脂を洗浄するために、500 μ l の PE 溶液 をカラムに加え、1 分間遠心分離を行います。
7. コレクションチューブ内のカラムを素通りした液を、チューブごとゴミ入れに捨てます。この溶液の放射能も高いと思われるので、こぼしたり、飛沫を散乱させないように注意して下さい。
8. 新しいコレクションチューブにカラムを入れます。
9. カラムに何も加えずに、再度 1 分間遠心分離を行い、PE 溶液を完全に取り除きます。
10. コレクションチューブ内のカラムを素通りした液を、チューブごとゴミ入れに捨てます。
11. 新しいコレクションチューブにカラムを移します。カラムに吸着した DNA を溶出するために、50 μ l の EB 溶液をカラムに加え、2 分間室温においた後、1 分間遠心分離を行います。

[ポリエチレンろ紙へのスポットと放射能測定]

1. 遠心分離が終わったら、注意深く遠心機からカラムを取り出し、コレクションチューブを外したら、カラムは容器に捨てます。
2. スポット用のポリエチレンろ紙を用意し、マイクロピペットを用いてコレクションチューブ内の溶出液の全量をろ紙にスポットします。
3. スポットしたろ紙 (乾いてなくても良いです) にサランラップをかけ、プラスチックシンチレーション計数器を使って、放射能を計数します。その際、測定する試料以外の部分はアクリルの板で覆っておいて下さい。計数値が大きすぎて振り切れる場合は、講師を呼んで下さい。
4. 2 種類の塩基のスポットの計数値を記録します。
計数値は CPM で測定されます (1 分間に何本の放射線が検出されたか)。

各班の測定結果を黒板の表に書いて下さい。

5. 実験が終了したら、手を洗ってゴーグルをはずし、白衣、マスク、手袋を所定のゴミ袋へいれます。



下限数量以下 RI 使用実験の様子

4 保管や使用の書類への記帳

- 1) 残った未使用 RI は保管場所へ戻し、RI 管理責任者に返却した旨を報告します。
また、実験により発生した廃棄物を RI 管理責任者に引き渡し、RI 管理責任者はこれを適切に処理します。
- 2) 使用した核種・数量、廃棄した量を保管量から差し引いて保管記録の更新を行います。使用簿には、「持出年月日時間」「核種・放射能」「持出者（使用者）」「使用目的」を記録し、RI 管理責任者の確認を受けます。これらの書類は使用終了（すべてを廃棄した）後、5年間保管します。

（注）印刷物等に転載するには、転載許可が必要です。