

バイオの世紀への入門 ～ショウジョウバエは面白い～

2001年11月3日, 4日

Drosophila Genetic Resource Center
Kyoto Institute of Technology

京都工芸繊維大学 ショウジョウバエ遺伝資源センター 山本研究室

子どもゆめ基金（独立行政法人 国立オリンピック記念青少年総合センター）助成活動

後援：京都府教育委員会・京都市教育委員会

“科学者の世界がどんなものか知りたいなら、
かれらのいうことを聞くのではなく、かれらの
していることをごらんください。”

—— アルベルト・アインシュタイン

タイムテーブル

1日目							
13:00	体験実習の説明と導入						
13:30							
	<table border="1"> <tr> <td>野外採集と 観察</td> <td>突然変異の 観察</td> <td>DNAの抽出と 遺伝子の増幅</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;"> </td> </tr> </table>	野外採集と 観察	突然変異の 観察	DNAの抽出と 遺伝子の増幅			
野外採集と 観察	突然変異の 観察	DNAの抽出と 遺伝子の増幅					
13:30	トラップの設置						
14:00	ショウジョウバエ遺伝資源センターの見学						
15:00		実体顕微鏡 による観察					
16:30							
2日目							
10:00	トラップの回収と 観察・分類						
11:30		DNAの抽出と PCR					
12:45	昼休み						
13:45	観察・分類						
15:00		電気泳動					
16:00		結果の解説					
16:15	まとめ						
16:30							

注意事項

実験を安全に行うために、次のことを守ってください。

- 実験室には、危険な薬品や道具が保管してあります。使わない薬品や道具にはさわらないでください。
- 電気泳動は、100V の電圧で行ないますので、泳動槽の中に指や鉛筆などをけっして入れないでください。また、ゲルには危険な薬品が含まれていますので、取り扱いはスタッフにお任せください。
- 実体顕微鏡やサーマルサイクラーなどは大変高価な機械です。スタッフの指導のもと、取り扱いには十分気を付けてください。
- 実験室内は飲食禁止です。お弁当は、1階の食堂とロビー、2階の演習室で食べてください。ジュースの自動販売機は門を出てすぐにあります。道路を渡るときは自動車に十分気をつけて下さい。行き方はスタッフまでお尋ねください。
- (大人の参加者で喫煙される方) 喫煙は、1階ロビーまたは建物の外でお願いします。

実験は失敗してもやり直しが出来ますが、事故が起こってしまうと取り返しのつかないことになりかねません。ご協力をお願いします。

その他、わからないことがございましたら、気軽にスタッフにお尋ねください。

目次

Section1 ショウジョウバエとは？	1
Section2 ショウジョウバエと遺伝学	3
Section3 ショウジョウバエの野外採集と観察	5
Section4 突然変異の観察	9
Section5 ショウジョウバエの DNA の抽出と遺伝子の増幅	11
5.1 PCR 法	16
5.2 電気泳動法	17
Section6 もっといろいろ知りたいときには	19
6.1 ショウジョウバエに関する本	19
6.2 インターネット Web サイト	20

Section 1

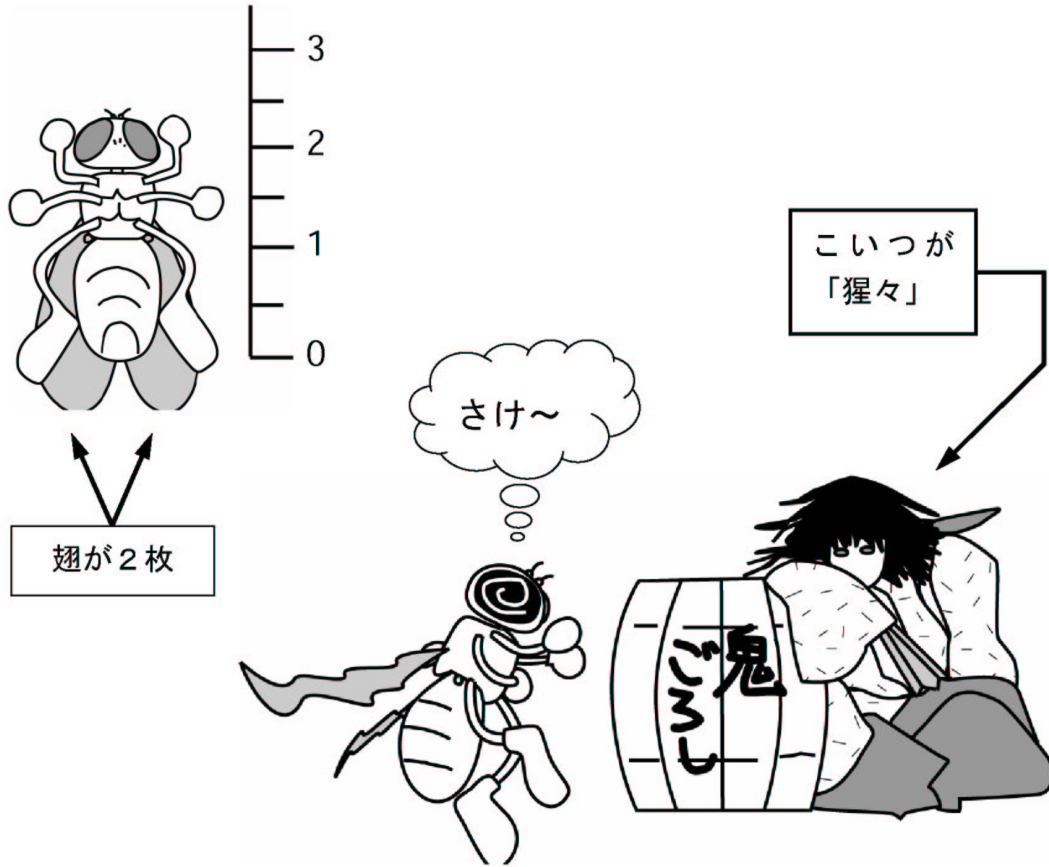
ショウジョウバエとは？

ハエ、カ、アブの仲間（双翅目：そうしもく）で、体長2~4 mmの小さな昆虫である。ショウジョウバエ科には全世界で3000以上の種が知られており、日本ではそのうちの200種以上が記録されています。野外では、果物や樹液、キノコなどにつく酵母を主なえさとしている。醜臭が好きなので、新鮮な果実よりは、むしろ、熟しすぎた果実や落果など、アルコールを含むものによく集まります。複眼が赤いのが特徴です。生物学の研究に主に使われているのは、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) で、寒地や乾燥地を除くほぼ全世界に生息し、日本全国で採集できます。



図 1.1: キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)

酒を呑み赤い顔をして舞う、能（日本の古典芸能）の「猩々（しょうじょう）」にちなみ、ショウジョウバエと名付けられました。学名の *Drosophila*（ドロソフィラ）の語源は、「露（dros）を好む（philia）」。



Section2

ショウジョウバエと遺伝学

1910年にアメリカのモーガンがキイロショウジョウバエの眼色が白い突然変異を発見し、ショウジョウバエの遺伝学研究の歴史は始まりました。最近のゲノム研究の進展にともない、その研究材料としての重要性はさらに高まると考えられています。

ノーベル賞でたどるショウジョウバエ研究の歴史 (医学・生理学賞)		
T. H. モーガン	1933年	染色体説
H. J. マラー	1946年	X線による人工突然変異の誘発
E. B. ルイス C. ニュースライン - フォルハルト E. F. ヴィーシャウス	1995年	初期発生を支配する遺伝子の解明

ショウジョウバエは、理学・医学・薬学・農学など生命科学研究の分野において、生物機能を解明する上で不可欠な研究用モデル生物として、その

重要性が認められています。それを示す一例として、1995年には、ショウジョウバエの初期発生を制御する遺伝子群を発見した貢献により、E. B. ルイス、C. ニュースライン－フォルハルト、E. F. ヴィーシャウスにノーベル医学・生理学賞が贈られています。

昨年、2000年には、キイロショウジョウバエの全ゲノム塩基配列が決められ、公開されました。また、今年（2001年）の2月にはヒトの遺伝子の全塩基配列のかなりの部分（ドラフトシーケンス）が決められ、公開されました。ショウジョウバエとヒトを比べると、遺伝子のレベルではかなりよく似ていることがはっきりしました。遺伝学の研究はゲノムの時代を迎え、新しい展開が始まっています。

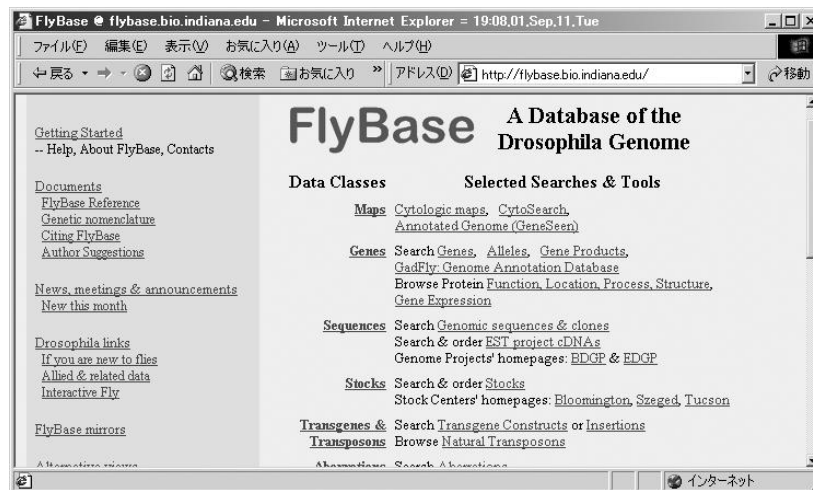


図 2.1: ショウジョウバエデータベース FlyBase

興味のある人は、<http://shigen.lab.nig.ac.jp:7081/> にアクセスしてみてください。FlyBase というショウジョウバエの遺伝学の世界最大のデータベースです（図 2.1）。最新の遺伝学の情報を誰でも利用できます。ただし、英語です。

Section3

ショウジョウバエの野外採集 と観察

バナナトラップ法でショウジョウバエを採集します。ショウジョウバエの多くは、このバナナトラップによく集まります。ショウジョウバエを効率よく採集できるので、野外採集で最も多く使われる方法です。欠点は、キノコに集まるショウジョウバエのように、食物が限定しているものが採れないことです。

1 日目：ショウジョウバエ用のトラップの設置

トラップを農場内のいろいろなところに設置します。林の中の暗いところ、明るく開けたところ、建物から近いかどうか、川から近いかどうか、環境条件が違ふところでは採れるショウジョウバエの種類に違いがあるでしょうか。トラップはひとつの班でひとつずつ設置します。各班でトラップを仕掛けるところをいろいろ考えてください。



図 3.1: バナナトラップ

トラップには、えさ（バナナにドライイースト（パン酵母）を振りかけたもの）を入れ、木の枝などに釣り下げます（図 3.1）。地上から 1m 以上の高さにして下さい。あまり低いところに設置すると、ほかの動物にいたずらされるかもしれません。

2 日目：ショウジョウバエの採集と観察

前日に設置したトラップからショウジョウバエを採集します。トラップにポリエチレンの袋をかぶせ、缶をたたいてショウジョウバエを袋の中に追い込みます。集まったショウジョウバエを逃がさないよう注意して、採集しましょう。

ショウジョウバエは小さいので、そのままではよく観察できません。実験室に持ち帰り、実体顕微鏡（図 3.2）を使って観察しましょう。実体顕微鏡は対象物の左右がそのまま、立体的に観察できる、虫眼鏡の親分みたいな装置です。ズームが付いているので、いろいろな大きさに拡大して観察できます。

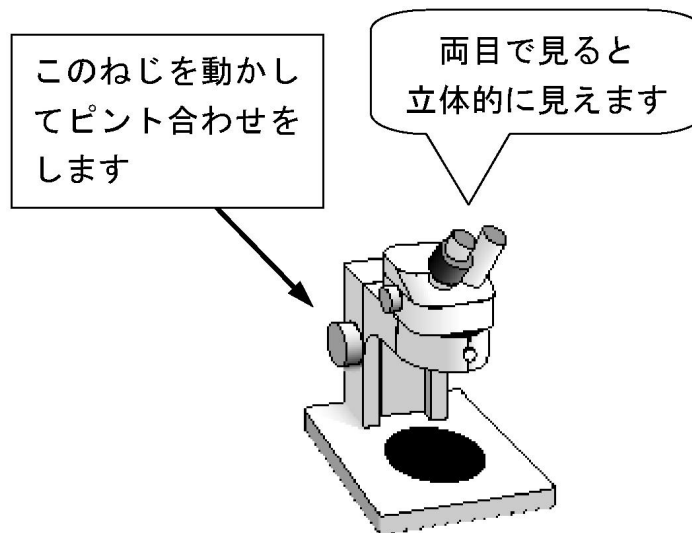


図 3.2: 実体顕微鏡

どのような種類のショウジョウバエがいるでしょうか。種の分類を試みましょう。それぞれの班でトラップを仕掛けたところが違うので、班毎に採れたショウジョウバエの種が違っている可能性があります。附属農場は京都市内の住宅地にありますので、「人家性」と呼ばれるショウジョウバエが採れると考えられます。深い森の奥に住んでいるようなショウジョウバエは残念ながら採れないでしょう。しかし、明るいか暗いか、開けているか林の中か、好みの居場所が種によって違うのが分かるかもしれません。最後に、班ごとにどんなハエが採れたか、発表してもらいましょう。

Section4

突然変異の観察

遺伝子の正常な機能が損なわれたものが突然変異です。突然変異を起こした生物（突然変異体）の性質を調べれば、その遺伝子の正常な機能が分かると考えられます。また、遺伝子が染色体のどこにあるのかを調べるためにも突然変異は大変重要です。今日は、体の形や色、翅や剛毛、触角の形の突然変異体を用意しました。

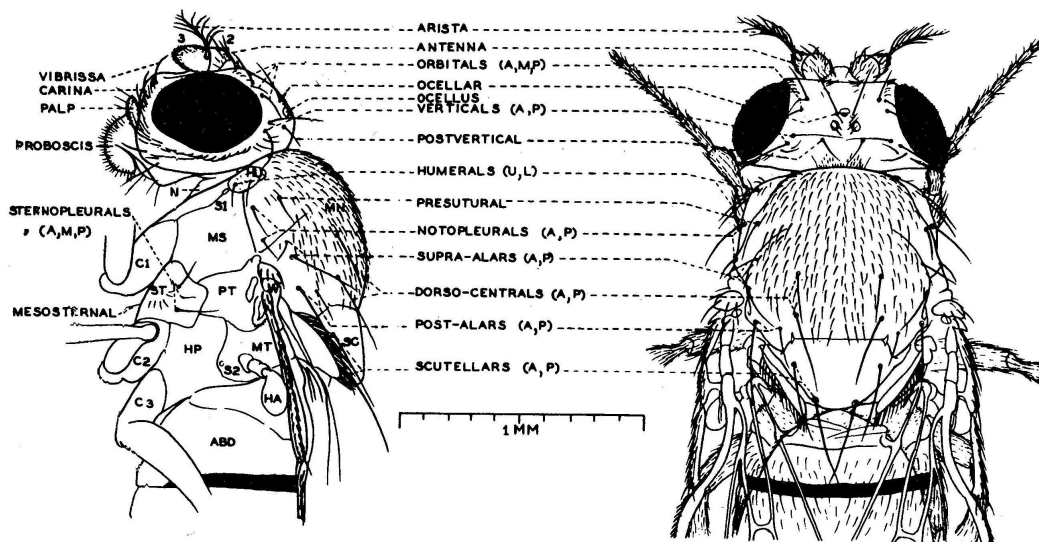


図 4.1: The Genome of *Drosophila melanogaster*. Lindsley & Zimm 1992 より

皆さんにお渡ししたショウジョウバエは、次のような突然変異を持っています。中にはふたつの突然変異を組み合わせで持っているものもあります。普通のタイプとよく見比べて、違いを見つけましょう。

特徴	普通のタイプ (野生型)	突然変異	遺伝子の名前 (遺伝子記号)
眼の色	赤	白	<i>white (w)</i>
翅(はね)の向き	まっすぐ伸びる	上向きに曲がる	<i>Curly (Cy)</i>
翅の形	端が丸い	端が欠ける	<i>Serrate (Ser)</i>
体の色	茶	黄	<i>yellow (y)</i>
触角	羽毛状の突起がある	肢(あし)になっている	<i>Antennapedia (Antp)</i>
剛毛の形	細長い	やや太く、短い	<i>Stubble (Sb)</i>

観察した突然変異を記録しましょう。ひとつだけ、全ての特徴が普通のタイプ(野生型)のハエがいます。

特徴		例	No.1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
眼の色	<i>w</i>	○					
翅の向き	<i>Cy</i>						
翅の形	<i>Ser</i>						
体の色	<i>y</i>						
触角	<i>Antp</i>						
剛毛の形	<i>Sb</i>						

Section5

ショウジョウバエの DNA の抽出と遺伝子の増幅

遺伝子の本体はデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid: DNA) という化学物質です。今回の実験では、ショウジョウバエから DNA を抽出し、特定の遺伝子だけを PCR 法にて増幅し、観察します。

ショウジョウバエを適切な溶液の中につぶすと、DNA が溶液中に溶け出します。この時、細胞内の DNA 分解酵素が働いて DNA の自己分解がおこります。この現象を防ぐために、この溶液にはタンパク質分解酵素が加えてあります。タンパク質分解酵素によって DNA 分解酵素が壊されるので、DNA を安定して取り扱うことが可能となります。

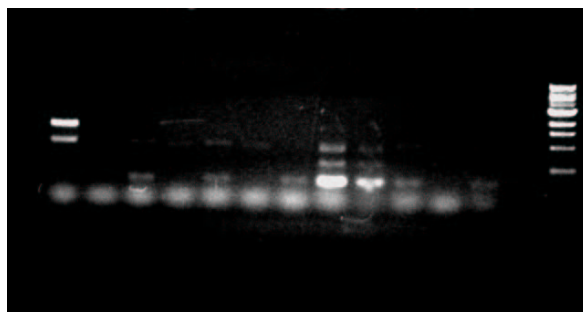


図 5.1: 電気泳動像

このように調製したショウジョウバエの DNA に「プライマー」と呼ばれる短かい一本鎖 DNA と DNA 合成酵素を加え、DNA 増幅装置（サーマルサイクラー）で、特定の遺伝子を増幅させます。この DNA の増幅方法を PCR 法といいます。今回の体験実習では、*white* と呼ばれる遺伝子、または、アルコール脱水素酵素をつくる遺伝子を増幅します。

増幅した遺伝子 DNA を電気泳動法により観察します。DNA を電気泳動すると長さによって、ゲル内を移動する速さが異なるので、同じ長さの DNA が同じ位置に集まりバンドができます（図 5.1）。この DNA に蛍光色素を結合させ、紫外線照射すると蛍光が発せられるので DNA をバンドとして観察できるのです。電気泳動のゲルの写真は一人一枚ずつお渡しできる予定です。

DNA 抽出溶液などの組成

DNA 抽出溶液

- 10 mM Tris-HCl, pH8.0,
- 1 mM EDTA
- 25 mM NaCl
- 200 $\mu\text{g/ml}$ プロテアーゼK

PCR 反応溶液

- 10 mM Tris-HCl, pH8.5,
- 50 mM KCl
- 1.5 mM MgCl_2
- 200 μM dNTPs
- 0.5 μM プライマー 1
- 0.5 μM プライマー 2
- 0.5 Unit Taq ポリメラーゼ

電気泳動用溶液

- 40 mM Tris-acetate
- 1 mM EDTA

電気泳動用アガロースゲル

- 40 mM Tris-acetate
- 1 mM EDTA
- 1.2 % アガロース
- 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 臭化エチジウム

PCR の条件

- 94°C 2分
- (a) 94°C 30秒
- (b) 55°C 30秒
- (c) 72°C 1分
- ★ (a)~(c) を 30 回繰り返す。
- 72°C 5分
- 4°C

DNA の抽出と増幅の手順

DNA 抽出溶液が $50\mu\text{l}$ 入ったチューブにハエを 1 匹入れる。

ハエをペッスルですりつぶす。



1.5 ml チューブをウォーターバスで 37°C 、30 分間加温する。

1.5 ml チューブをヒートブロックで 95°C 、2 分間加熱する。

DNA 溶液として保存する。



PCR 反応液が $18\mu\text{l}$ 入った 0.2 ml チューブに DNA 溶液 $2\mu\text{l}$ を加える。

サーマルサイクラーに 0.2 ml チューブをセットする。

プログラムをスタートする（1 時間半程度かかる）。

0.2 ml チューブを取り出す。



電気泳動槽にアガロースゲルと電気泳動用溶液をセットする。

DNA サイズマーカー $5\mu\text{l}$ をゲルの一番端の穴に入れる。

各自の PCR 反応液 $10\mu\text{l}$ と電気泳動用色素 $4\mu\text{l}$ を混ぜる。

そこから $5\mu\text{l}$ を採り、各自別々のゲルの穴に入れる。

電気泳動をする（ 100V 30 分間）。

紫外線照射で DNA のバンドを観察する。

電気泳動像の写真をとる。

図 5.2 を参考に。

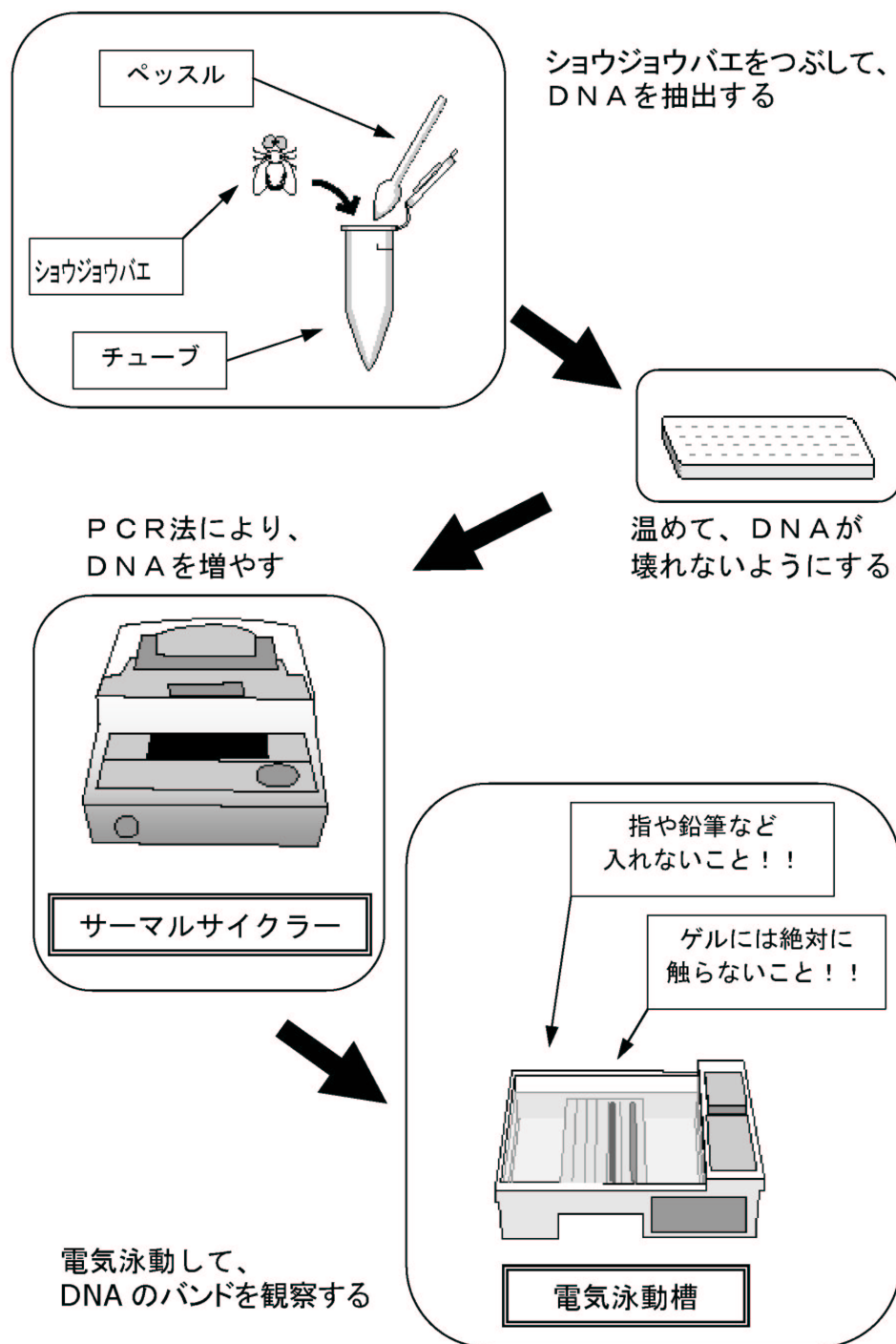


図 5.2: DNA の抽出と観察の手順

5.1 PCR 法

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応：polymerase chain reaction）法は、DNA を増やす画期的な方法で、遺伝子工学に革命をもたらしました（K. B. マリス：1993 年ノーベル化学賞）。試験管の中で、DNA の特定領域をくりかえし、指数関数的に増幅させる方法です。図 5.3 に原理を模式的に示します。PCR 法により、極く微量の DNA を分析可能な量にまで増幅することができます。

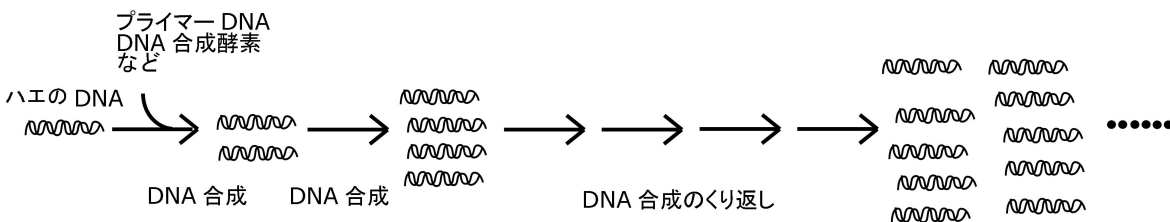


図 5.3: PCR 法

遺伝子 DNA を試験管の中に入れて、 100°C 近くに熱すると、DNA の二本鎖は離れて、一本鎖になります。DNA ポリメラーゼによって、この一本鎖の DNA が鋳型となり、新しい DNA が合成されます。この時、DNA ポリメラーゼは、合成の開始部分が二本鎖になっていなければ合成をはじめられません。そこで、鋳型になる DNA の一部と相補的な一本鎖 DNA「プライマー」が必要となります。プライマー DNA は塩基配列の情報を利用して、目的とする遺伝子 DNA の両側を挟むように設計します。一本鎖にする加熱と DNA 合成の反応を 1 回おこなうと、DNA の本数が 2 倍に増えます。この 1 回の反応（1 サイクル）に要する時間は、せいぜい 10 分間です。この DNA 合成サイクルを自動化し、温度の上昇と下降を正確にくり返し行なう機器がサーマルサイクラーです。

5.2 電気泳動法

DNA はマイナス電荷を持っているので、電界中ではプラス極に引きつけられます。電界中に適当な障害物があれば、短い DNA ほど速く移動します。この性質を利用して、長さに応じて DNA を分けることができます (図 5.4)。

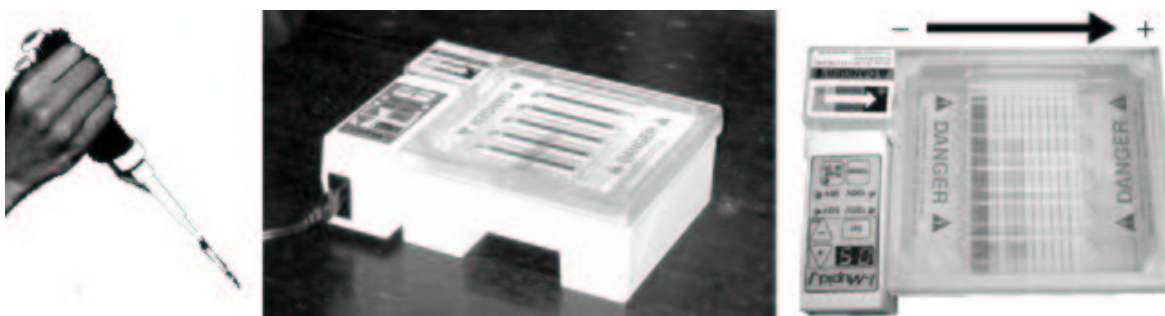


図 5.4: 左 : ピペッタン (精密ピペット)、中 : 電気泳動槽、右 : DNA は一極から+極へ移動する

アガロース (寒天の成分を精製したもの) でつくったゲルの一方の端に小さな穴を開けておき、その中に DNA の溶液を入れます。アガロースゲルを電気泳動用の緩衝液の中に入れておき、適当な電圧を加えると DNA が移動します。臭化エチジウム (DNA に結合する蛍光色素) をアガロースゲルにあらかじめ入れておくと、電気泳動中に、DNA と臭化エチジウムが結合します。泳動終了後にゲルに紫外線を当てると、DNA が存在するところから蛍光が発せられるので、これを観察します (図 5.1)。

Section6

もっといろいろ知りたいとき には

6.1 ショウジョウバエに関する本

- 遺伝学ノート：ショウジョウバエと私 森脇 大五郎 著
学会出版センター 1988年 本体価格：1,800円
ISBN: 4-7622-0540-0
- ショウジョウバエ物語 渡辺 隆夫 著
裳華房 1995年 本体価格：1,400円 ISBN: 4-7853-8618-5

6.2 インターネット Web サイト

- エルネット「オープンカレッジ」
ショウジョウバエは飛びつづけるー遺伝とゲノム研究の主役ー
講師：山本雅敏
(京都工芸繊維大学 ショウジョウバエ遺伝資源センター長)
<http://www.opencol.gr.jp/>
- 京都工芸繊維大学 ショウジョウバエ遺伝資源センター
<http://www.DGRC.kit.ac.jp/>
- 東京都立大学大学院 理学研究科 生物学教室進化遺伝学研究室・細胞
遺伝学研究室
<http://dept.biol.metro-u.ac.jp/fly/www/>
- 国立遺伝学研究所 遺伝学電子博物館
<http://www.nig.ac.jp/museum/>
- Jfly (ショウジョウバエ研究者のためのデータベース)
<http://jfly.nibb.ac.jp/index.j.html>
- FlyBase (ショウジョウバエの遺伝学の世界最大のデータベース：全
て英語)
<http://shigen.lab.nig.ac.jp:7081/> (日本のミラーサイト)
<http://flybase.bio.indiana.edu/> (マスターサイト：アメリカ)

謝辞

本体験実習は、子どもゆめ基金（独立行政法人 国立オリンピック記念青少年総合センター）の助成を受けた活動です。京都府教育委員会、および、京都市教育委員会の後援をいただきました。また、施設をお貸し下さった本学繊維学部附属農場に感謝いたします。

バイオの世紀への入門
～ ショウジョウバエは面白い～

テキスト

2001年11月3日, 4日

著者・発行者
京都工芸繊維大学
ショウジョウバエ遺伝資源センター
山本研究室
〒616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町
電話 : (075) 873-2660 (代表)
ファクス : (075) 861-0881
<http://www.DGRC.kit.ac.jp>

©Drosophila Genetic Resource Center
Kyoto Institute of Technology

