

文部科学省 大学等開放推進事業

高大連携特別授業：
ショウジョウバエの
遺伝子DNAの観察

2004年11月28日(日)

京都工芸繊維大学
ショウジョウバエ遺伝資源センター

“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

10:00	特別授業の説明と導入		
10:15	アルコール耐性試験 の開始		
11:15	DNA と遺伝子に関する講義		
11:45	昼休み・集合写真撮影		
12:45		DNA の抽出・遺伝 子増幅の開始	
13:20			ショウジョウバエの 野外採集と種の分類
13:40			ショウジョウバエの 突然変異の観察
14:00		電気泳動開始	
14:20	アルコール耐性試験 の結果		
15:00		電気泳動像の観察・ 撮影	
15:20		DNA 塩基配列決定 デモンストレーショ ン実験	
16:00	まとめ		

注意事項

実験を安全に行うために、次のことをお守りください。

実験室には、薬品や道具が保管してあります。危険なものもありますので、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決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、取り扱いに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南門を出てすぐにあります。行き方はスタッフまでお尋ねください。北門を出た向い側の自動販売機は、交通量の多い道路を渡り危険ですので、ご利用はご遠慮下さい。

(大人のオブザーバー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せんが、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。

特別授業について

大学レベルの遺伝学の実験・実習です。ショウジョウバエのアルコール脱水素酵素 (Adh) の突然変異を使って、アルコール耐性を調査する実験 (表現型を調べる) と Adh 遺伝子の違いを DNA レベルで調査する実験 (遺伝子型を調べる) を行います。実験結果を比べて、表現型と遺伝子型との関連について学びます。

本特別授業は、文部科学省の地域振興施策「大学等開放推進事業 大学 Jr. サイエンス事業」として行います。地域の小、中学校、高等学校等の教育機関との連携し (本特別授業では、京都工芸繊維大学が京都教育大学附属高等学校と連携して実施)、子どもたちに科学技術等に関する体験活動の機会を提供します。なお、本事業は文部科学省から放送大学に委託されており、京都工芸繊維大学は放送大学と委託契約し、事業を行います。

目次

第1章	ショウジョウバエとは？	1
第2章	ショウジョウバエと遺伝学	3
2.1	遺伝すること	4
2.2	遺伝子が発現すると	6
2.3	ショウジョウバエを飼育する	8
第3章	アルコールを代謝する	9
第4章	アルコール耐性実験	11
4.1	材料	11
4.2	方法	12
4.3	結果	13
第5章	DNAの抽出と増幅	15
5.1	DNAの抽出と増幅の手順	16
5.2	PCR反応液の準備	18
5.3	PCR法	21
5.4	電気泳動法	22
第6章	DNAの構造と塩基配列	23
6.1	DNAの塩基配列の決定法	24
第7章	突然変異体の観察	27
7.1	ショウジョウバエの観察	28
第8章	野外採集と観察	31
8.1	バナナトラップ法による採集	31
8.2	スリーピング法による採集	31

8.3	採集したショウジョウバエの観察	33
第9章	もっといろいろ知りたいときには	35
9.1	ショウジョウバエに関する本	35
9.2	メンデルの遺伝の法則の原本	35
9.3	インターネット Web サイト	36

第 1 章

ショウジョウバエとは？

ハエ、カ、アブの仲間（そうしもく双翅目）で、体長 2~4 mm の小さな昆虫です。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ます。はっこう醗酵臭が好きなので、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。

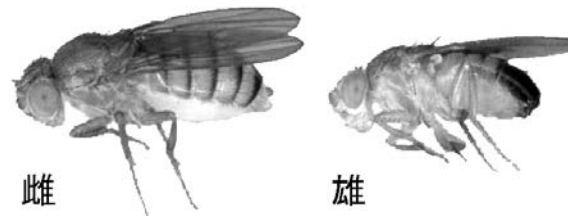
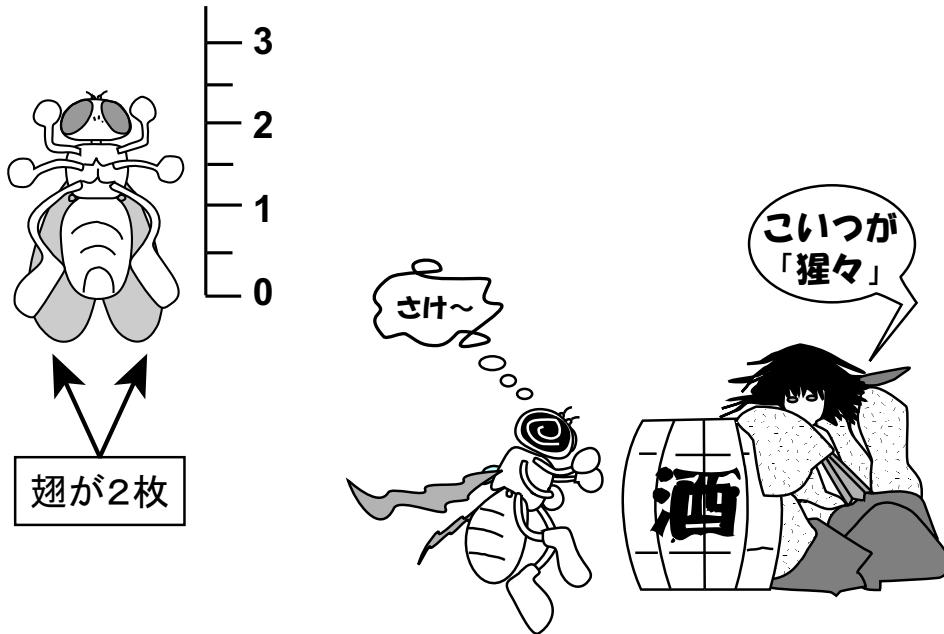


図 1.1: キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)

酒を呑み赤い顔をして舞う、能^{*1}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。能の猩々は真っ赤な髪、赤い面、赤い装束で登場します。学名の *Drosophila* (ドロソフィラ) の語源は、「露 (dros) を好む (philia)」。



*1 日本の古典芸能

第2章

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もない、その研究材料としての重要性はさらに高まっています。

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. ウィッシュハウス	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. ウィッシュハウス^{*1}にノーベル医学・生理学賞が贈られています。

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、2001年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

^{*1} ドイツ語読みの「ヴィーシャウス」と紹介されていることもあります。ですが、本人は「ウィッシュハウス」と言っていたと大学院時代の同級生（日本人）はおっしゃっています。

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。

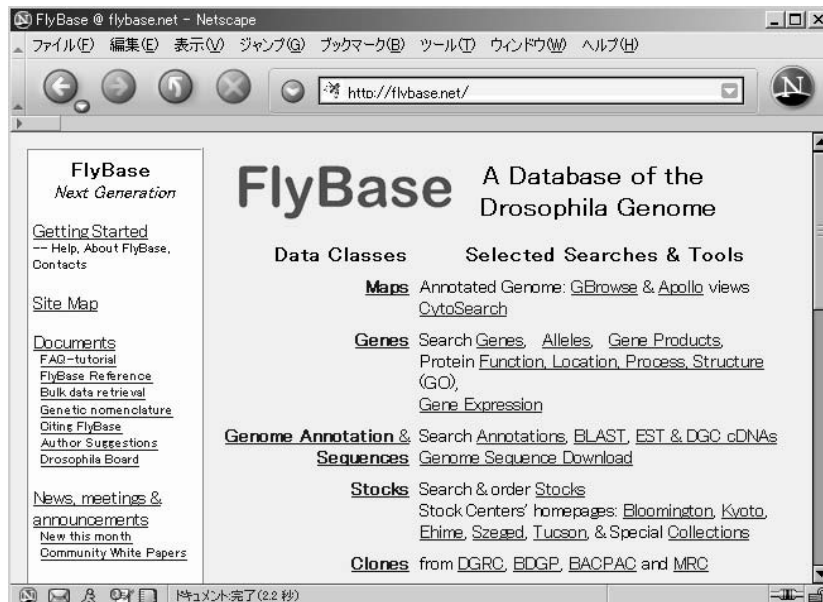


図 2.1: ショウジョウバエデータベース FlyBase

興味のある人は、<http://flybase.net/> 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。

また、ショウジョウバエ遺伝資源センターのホームページ (<http://www.DGRC.kit.ac.jp>) から、日本ショウジョウバエデータベース (Japan Drosophila Database: JDD) にアクセスしてみてください。様々な突然変異の写真とその説明があります。FlyBase へのリンクもあり、最新情報も得られます。こちらは日本語です。

2.1 遺伝すること

生物の性質 (表現型) は、遺伝と環境によって決まります。親から子、子から孫へと伝えられるものが「遺伝子」です。両親から 1 セットずつ遺伝子をもらい、子供は 2 セットで 1 組の遺伝子を持っています。両親からもらった遺伝子が、かたちをつくる設計図のように働くことから、生命の青写真と言われることもあります。一卵性双生児がそっくりなのも、ふたりとも同じ遺伝子のセットを持っているからです。

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。その分子構造 (二重らせん) は、1953 年にワトソンとクリックにより明らかにさ

れました。遺伝子の情報が正確に複製され、親から子へと遺伝子が伝えられること、遺伝子がタンパク質の設計図になっていることとが、二重らせん構造の解明により、分子のレベルで理解できるようになりました。

子供は、両親のどちらにも似ていて、両親の特徴が混ざっているように感じるかもしれませんが、しかし、遺伝子に注目すると、「混ざる」というのはちょっと不適切です。子供は、両親からもらった遺伝子をどちらも持っていて、遺伝子そのものが混ざったり、消えてしまったわけではありません。親は、自分の持っている1組の遺伝子のうち、どちらか一方の対立遺伝子*²を次の世代（自分の子供）に渡します。

生物が卵から発生して、成長し、大人になる間に、体を作る細胞は増え、様々な特徴を持つようになります。全ての細胞には同じ遺伝子のセットがありますが、細胞によって、ある遺伝子は働いたり、また、別な遺伝子は働かなかったりして、個々の細胞の個性ができてきます。

*² 対立遺伝子：同じ遺伝子であっても、「個性」が違うものが多く知られています。遺伝子と個々の遺伝子の「個性」（対立遺伝子）とは別々に考えないと混乱してしまいます。なお、英語では、遺伝子は gene、対立遺伝子は allele という別な単語です。

グレゴール・ヨハン・メンデル

グレゴール・ヨハン・メンデル (Gregor Johan Mendel) は、1822年7月22日、ブルノ（現在はチェコ共和国）の近くの小さな村で生まれた。村の学校に入ったところから神童ぶりが先生方の目にとまったという。1843年にブルノの修道院に入った。1851年から1853年にかけて、ウィーン大学に留学し、物理学を学んだ（指導教授はC. ドップラー教授：ドップラー効果に名を残している）。1854年から1868年までブルノの州立専門学校で代用教員も務めていた。

1856年から1862年にかけて、メンデルは修道院の庭にエンドウを植え、交雑の実験を行った。1865年2月8日と3月8日の2回にわたり、研究結果を口頭発表し、その発表内容が論文「雑種植物の研究」として1865年のブルノ自然科学会誌に掲載された。

1868年に修道院長になってからは、多忙で研究をする暇もなかったようである。1884年1月6日に慢性の腎臓炎のため亡くなった。（ここまでは、「メンデル 雑種植物の研究」岩槻・須原訳 1999 の解説によった）

1865年にメンデルの「雑種植物の研究」によって明らかにされた遺伝の基本的な法則は、ほとんど注目されず、無視されてしまっていた。1900年にド・フリース、コレンス、チェルマクの3人がそれぞれ独立にメンデルの実験結果を検証し、「再発見」したとされる。

2.2 遺伝子が発現すると

遺伝子を持っているだけでは何もおこりません。生き物は卵から成長し、子孫を増やしていきますが、体を作る基礎となるのはタンパク質です。タンパク質は体の構造となる働きをするものや酵素として働くものがあります。一般に、それぞれのタンパク質はある特定の遺伝子によって決められています（「コードされる」といいます）。つまり、ひとつの遺伝子は設計図のように働き、1種類のタンパク質を作るという「仕事」をしています*3。

遺伝子の情報はDNAの塩基の並び（塩基配列）として、つまり、DNAの構造として命令*4が組み込まれています。このDNA情報はメッセンジャーRNA（mRNA）に転写

*3 タンパク質をコードしていない遺伝子もあります。また、遺伝子の中には複数の種類のタンパク質をコードしているものもあります。

*4 「遺伝暗号」という魅力的な名前が付けられています。「暗号」は英語ではコード（code）です。3つの

され、タンパク質のアミノ酸配列*⁵に翻訳されます。

細胞の中で遺伝子からタンパク質が作られる過程を簡単に見ると下のようになります。

- DNA を鋳型にして、たくさんの酵素の働きによって mRNA が作られます (転写)。ここで、DNA の情報が mRNA に写されます。RNA (リボ核酸) は DNA (デオキシリボ核酸) とよく似た構造と性質をしているので、DNA の情報がそのまま写し取られます。転写は核の中で起こります。
- mRNA が核膜の穴を通過して細胞質に移動します。
- mRNA とアミノ酸とを両方とも認識する^{トランスファーRNA} tRNA という分子の働きにより、mRNA の情報にしたがって、アミノ酸を順序よく並べていきます (翻訳)。RNA とアミノ酸は全く構造が違うので、RNA の情報と対応するアミノ酸を仲介する分子として tRNA が活躍します*⁶。翻訳は、細胞質にあるリボソームという構造で行われます。
- こうしてできたポリペプチド (アミノ酸が連なったもの) は立体的に折り畳まれ、場合によっては一部分が切り取られたり、糖鎖がくっついたりして機能的なタンパク質が完成します。こうしてできあがったタンパク質は適切な場所に運ばれていきます (または、そのままそこに留まります)。

分子遺伝学のセントラルドグマ

「DNA は自己複製する。DNA は RNA に転写される。RNA はタンパク質に翻訳される。遺伝情報はこの向きに進む。」という考え。DNA の二重らせん構造を発見したクリックによって提唱された。ある種の RNA ウィルス^αから、RNA から DNA を合成する酵素 (逆転写酵素) が発見され、転写の方向は必ずしも一方向とは言えないことがわかっている。しかし、タンパク質が作られる過程は DNA の構造から推察されたセントラルドグマ (中心教義) から逸脱するものではない、と考えられます。

^α レトロウィルス。HIV (エイズウィルス) などそう。

塩基でひとつのアミノ酸に対応します。

*⁵ タンパク質はアミノ酸がつながったもの (ポリペプチド) が複雑な形に折り畳まれてできています。

*⁶ 特定の tRNA は特定のアミノ酸と対応します。また、mRNA と性質と構造が似ているので、上手く結合できるところが別にあります。

2.3 ショウジョウバエを飼育する

遺伝ショウジョウバエの飼育はあまり難しくありません。バナナなどの果物を入れた適当な大きさのびんにショウジョウバエを入れ、綿などでふたをすれば飼育できます。ショウジョウバエを実験材料として使いはじめた20世紀のはじめの頃は、バナナをえさとして使っていたそうです。とはいえ、遺伝の実験にはバナナよりも簡単に保存できる材料が便利です。トウモロコシを材料にしたえさの作り方を下の囲みに紹介しています。

びんの大きさは、牛乳びんかそれよりも小さなものが手軽で便利です（重いと大変です）。ショウジョウバエ遺伝資源センターでは、直径25 mm、高さ90 mmのガラスびんで飼育しています。今回の実習では同じサイズのプラスチック製の使い捨てのびんを使います。なお、実際に飼育するときは、温度があまり高くないよう（28より低いほうがよい）、低くないよう（18以上がいいでしょう）に注意して下さい。また、個体の密度が高くなりすぎないように、親バエを入れる数も調整しましょう。

えさの組成

- トウモロコシの粉 70g
- 乾燥ビール酵母 40g
- ブドウ糖 100g
- 粉末寒天 7.5g
- プロピオン酸 5ml
- 10% p-ヒドロキシ安息香酸メチル^a 5ml

^a 70%エタノールに溶かしたもの)

えさの作り方

- トウモロコシの粉、乾燥ビール酵母、ブドウ糖、粉末寒天をぬるめのお湯に溶き、鍋で沸騰直前まで加熱する^a。
- 沸騰しない程度の温度で20分間ほど煮込む^b。
- 火を止め、80°Cくらいまで冷めたら、プロピオン酸とボーキニンを加える。
- 冷めて固まる前に、びんに分注する。
- 栓をする。

^a 焦げつかないように、よくかき混ぜながら加熱する。

^b 気を抜かず、よくかき混ぜる。

第3章

アルコールを代謝する

エタノール（エチルアルコール、酒精）は、お酒に含まれているアルコールだということをご存じでしょう。もちろん、お酒を飲めばエタノールは体内に取り込まれますが、食物などに少量含まれていることもありますし、代謝過程で体内に生じることもあります。生物にはこのエチルアルコールを代謝しエネルギーに変えるしくみがあります。このしくみの第一段階で働くのが、アルコール脱水素酵素（Alcohol dehydrogenase, ADH）です。ADHはエタノールの水酸基を酸化（脱水素）して、アセトアルデヒドに変えます。アセトアルデヒドは、別の酵素（ヒトではアルデヒド脱水素酵素 ALDH、ショウジョウバエではアルデヒド酸化酵素 ALDOX）の働きで酢酸になり、クエン酸回路に入ります。このようにして、エタノールは体内でエネルギーになります。

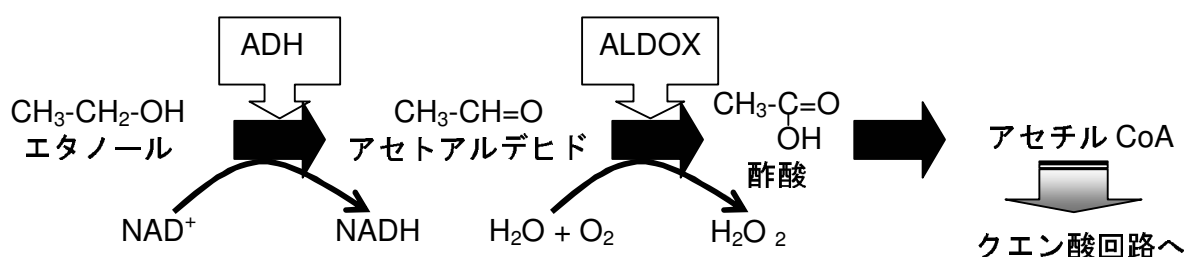


図 3.1: アルコール代謝（ショウジョウバエの場合）

一方、エタノールは、神経を麻痺させる作用や脱水作用などの毒性があり、大量の摂取は生物を死に至らしめます（いわゆる急性アルコール中毒）。こうした点から、ADHの役割にはエタノールの解毒という側面もあるといえます。

キイロショウジョウバエは、^{はっこう}醗酵した果物が好物で、野生環境では産卵や成長する場所にもなります。ところが、そういったところでは、しばしばアルコール醗酵によって高濃度のエタノールが生じることがあります。そのせいでしょうか、キイロショウジョウバエは他の昆虫などと比べても、エタノールに対してかなり高い耐性を身につけています。む

しろ、エタノール臭のするところへ好んで寄っていくほどです。しかし、ADH に変異を生じたキイロショウジョウバエは、エタノール耐性が低くなることが知られています。

今回の実験では、ADH をコードする遺伝子の型が異なる、3 系統のキイロショウジョウバエのエタノール耐性を調べるとともに（表現型を調べる）遺伝子構造が異なっている部分を PCR 法で増幅して電気泳動で比較してみます（遺伝子型を調べる）。また、その部分の塩基配列を DNA シークエンサーで解読する（塩基配列を決定する）実験のデモンストレーションをお見せします。

第4章

アルコール耐性実験

ADH の遺伝子型の異なるキイロショウジョウバエ系統 A、B、C、それぞれのエタノール耐性を調べて比較します。濃度の異なるエタノールをしみこませた紙の上でショウジョウバエを数時間飼育し、生存率を見ます。ADH はエタノールだけでなく、アルコール類一般（炭素鎖に水酸基がついたもの）の水酸基を酸化します。そこで、応用編として、アルコールの一種、ペンテノールに対する耐性も調べてみましょう。

4.1 材料

- キイロショウジョウバエ、系統 A, B, C (羽化後 4 日 ~ 5 日。一晩、絶飲食)
- 100% エタノール (エチルアルコール、 $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$)
- 1% ペンテノール (1-ペンテン-3-オール、 $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-CH=CH}_2$)
- 20% ショ糖液 (ブリリアントブルー*¹で着色)
- 蒸留水
- キムワイプ (実験室用ティッシュペーパー)
- プラスチック飼育ビン (スポンジ栓つき)
- 15 ml プラスチック試験管
- 1000 μl マイクロピペット
- スポイト
- 吸虫管、ピンセット、麻酔ビン (トリエチルアミン入り)、実体顕微鏡、割り箸

*¹ 食用色素の一種

4.2 方法

1. 下の表に従って、プラスチック試験管にエタノール、ペンテノールの希釈液(5%ショ糖を含む)を用意する。

No.	希釈液	20% ショ糖液	100% エタノール	1% ペンテノール	蒸留水
1	0% (コントロール)	2 ml	-	-	全量を 8 ml に メスアップ
2	5% エタノール	2 ml	0.4 ml	-	
3	10% エタノール	2 ml	0.8 ml	-	
4	15% エタノール	2 ml	1.2 ml	-	
5	20% エタノール	2 ml	1.6 ml	-	
6	25% エタノール	2 ml	2.0 ml	-	
7	0.05% ペンテノール	2 ml	-	0.4 ml	
8	0.10% ペンテノール	2 ml	-	0.8 ml	
9	0.15% ペンテノール	2 ml	-	1.2 ml	
10	0.20% ペンテノール	2 ml	-	1.6 ml	
11	0.25% ペンテノール	2 ml	-	2.0 ml	

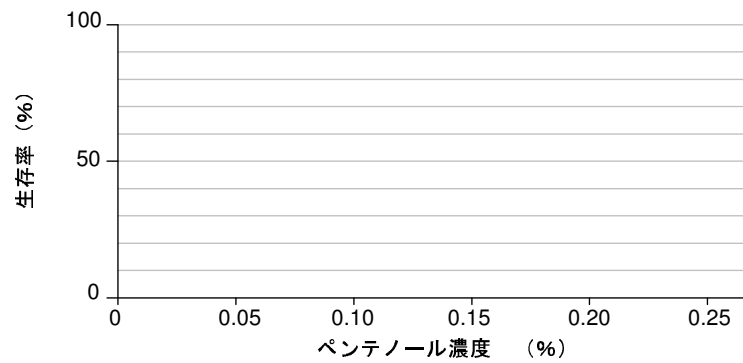
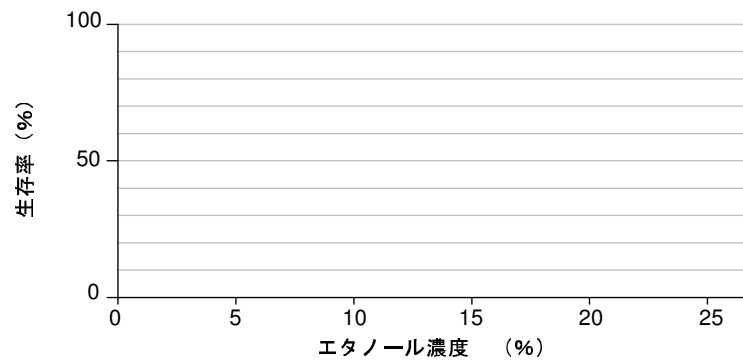
2. プラスチック飼育ビンの底にキムワイプ1枚をつめる。割り箸を使ってしっかりと押し固める。これを33本用意する。
3. 系統A, B, Cそれぞれについて、2のプラスチック飼育ビン11本に、ショウジョウバエを約30匹ずつ入れ、スポンジ栓をする。それぞれのビンに系統名と、1~11番までの番号を付ける(A-1, A-2, A-3,のように)。
4. 各系統の1番から11番の飼育ビンにそれぞれ、1番から11番までの希釈液を2mlずつ入れる。スポイトの目盛で2ml吸い、スポンジ栓の隙間からスポイトを差し込み、先端をキムワイプにつけ、静かに液を排出して吸い込ませる(注意:低い濃度から順次、高い濃度に行く場合、同じスポイトを使ってよい。エタノールとペンテノールはスポイトを変えること)。
5. 2時間から3時間、放置する。
6. それぞれの飼育ビンごとに、ハエの総数と生き残ったハエの数を数える。ハエを空の飼育ビンに移してスポンジ栓をし、スポンジ栓の隙間から、麻酔ビンの吹き出し口を差し込み、トリエチルアミン蒸気をひと吹きして、ハエが麻酔されるまで待つ(だいたい1~2分)。実体顕微鏡下で観察して、脚の痙攣けいれんや口吻こうぶんの曲げ伸ばしなど、自律的な運動がみられるものを生存と判定し、ピンセットなどで刺激を与えても全く動かないものを死亡とする。結果を表に記入する。
7. 生存率(生存数/総数)を計算する。各系統の生存率を折れ線グラフに表す。

4.3 結果

実験結果を記録しましょう。

No.	希釈液	系統 A			系統 B			系統 C		
		生存数	総数	生存率	生存数	総数	生存率	生存数	総数	生存率
1	0% (コントロール)									
2	5% エタノール									
3	10% エタノール									
4	15% エタノール									
5	20% エタノール									
6	25% エタノール									
7	0.05% ペンテノール									
8	0.10% ペンテノール									
9	0.15% ペンテノール									
10	0.20% ペンテノール									
11	0.25% ペンテノール									

結果をグラフにプロットしてみましょう。



系統 A : ○
 系統 B : ×
 系統 C : △

第 5 章

DNA の抽出と増幅

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、ADH 遺伝子の中で A、B、C 系統で構造の異なっている部分を PCR 法で増幅し、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。

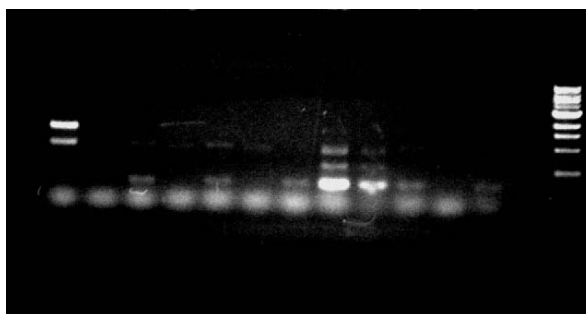


図 5.1: 電気泳動像

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。

増幅した 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。

5.1 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 チューブをヒートブロックで 56°C 、10分間加温する。
次に、 95°C 、10分間加熱する。
DNA溶液として保存する。



0.2 ml チューブにPCR反応液(作り方は次のページ)を $18\mu\text{l}$
ずつ入れる。次に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(40分程度かかる)。
 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緩衝液をセットする。
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 $20 \mu\text{l}$ に電気泳動用色素 $5 \mu\text{l}$ を加えよく混ぜる。



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撮る。

図 5.2 を参考に。

5.2 PCR 反応液の準備

下の表に従って、溶液を混ぜ、PCR 反応液を作ってください。

- DNA 溶液以外をひとつのチューブに入れます。グループごとに作ってください。
- 18 μ l ずつ取り、それぞれのチューブに小分けします。
- DNA 溶液を 2 μ l ずつ加えて下さい。

組成	ストック溶液	容量	× __本容量
1× PCR バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂)	10×	2 μ l	μ l
0.8 mM dNTP	10 mM	1.6 μ l	μ l
0.5 μ M プライマー 1	10 μ M	1 μ l	μ l
0.5 μ M プライマー 2	10 μ M	1 μ l	μ l
0.5 U Taq DNA ポリメラーゼ	5 U	0.1 μ l	μ l
純水	–	12.2 μ l	μ l
PCR 反応液の容量	–	18 μ l	μ l
DNA 溶液	–	2 μ l	–
総容量	–	20 μ l	–

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
- 20 μ g/ml RNase
- 200 μ g/ml プロテアーゼK
- 1% Triton X100

PCR の条件

- 94°C 2 分
- (a) 94°C 15 秒
(b) 60°C 30 秒
(a)~(b)を 30 回
繰り返す。
- 72°C 2 分
 - 4°C

電気泳動用緩衝液

- 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
- 4% アガロース
- 0.2 μ g/ml 臭化エチジウム

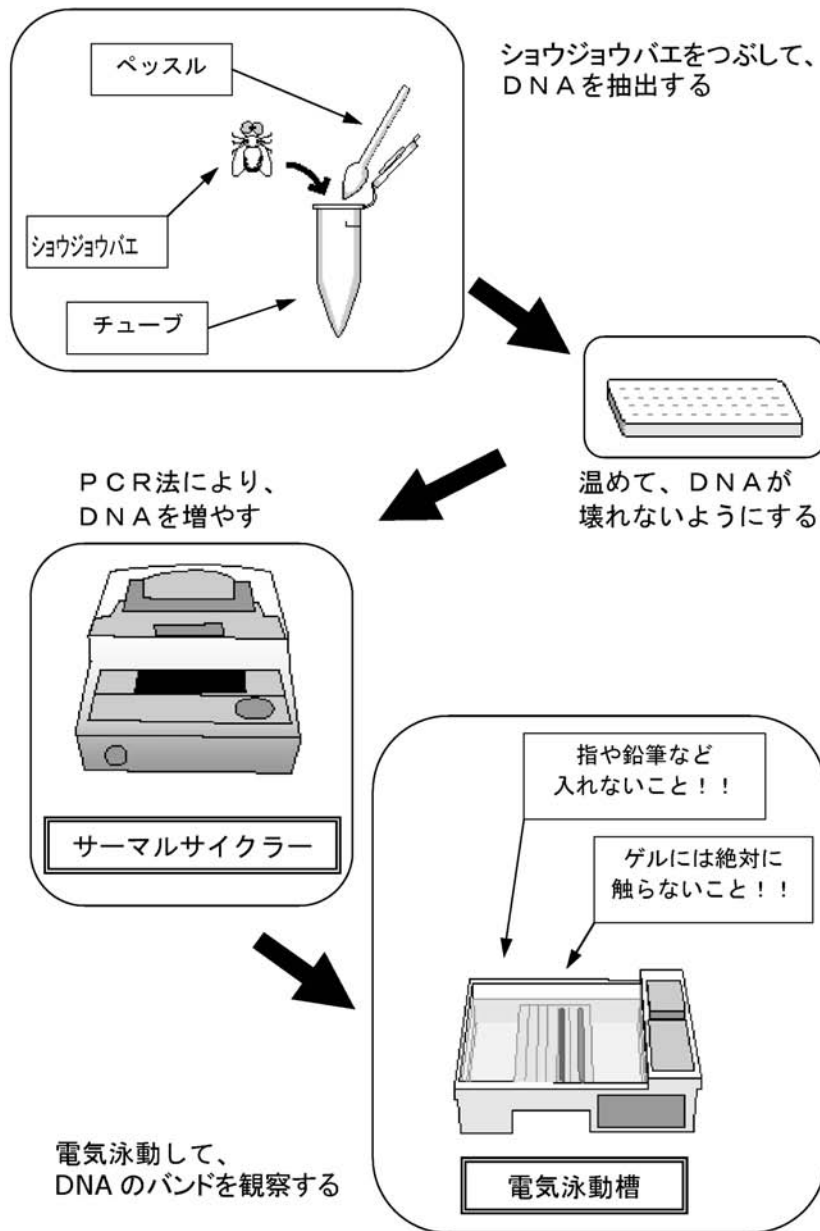


図 5.2: DNA の抽出と観察の手順

5.3 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）。微量のDNAや長くて複雑な配列のDNAから、目的の部分を、試験管の中で、指数関数的に^{*1}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、ごく微量のDNAを分析可能な量にまで増幅することができます。

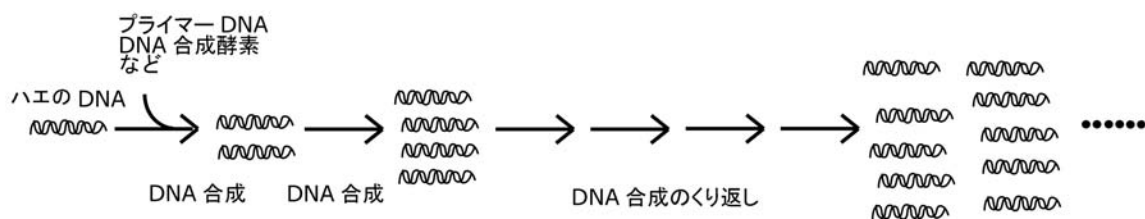


図 5.3: PCR 法

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の一部と結合する相補的な一本鎖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、増幅したいDNA配列の両側を挟むように設計し、DNA合成機で合成します^{*2}。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、ほんの数分間です。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。

*1 「ねずみ算式に」

*2 設計したプライマーを試薬会社に発注し、オーダーメイドで合成されたものを購入するのが、今は普通かもしれません。

5.4 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-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)。

第6章

DNA の構造と塩基配列

DNA (デオキシリボ核酸) は4種類の分子(塩基と言います。通常、アデニン : A、グアニン : G、チミン : T、シトシン : C のように省略されます) がリボン状に繋がった構造をしています。遺伝情報は4つの塩基がDNA上にどのように並ぶか、その順序で決定されています。ヒトもショウジョウバエも遺伝子としてDNAを用いていますが、ヒトとショウジョウバエの違いはDNA上の塩基の配列順序の違いによりもたらされます。現在、我々ヒトを含めて多くの生物の遺伝情報の解読が進められています。ヒトのゲノム(全遺伝子を含んだDNAの総体)はGATC 4つの塩基が約3,000,000,000^{30億}個並んでいます。そしてその並ぶ順序がすべて決定されています。同様に、ショウジョウバエのゲノムはヒトの17分の1、約180,000,000^{1億8000万}個の塩基から成り立っていて、やはり全塩基配列が決定されています。

遺伝子の情報は細胞から細胞へ、親から子供へ、子孫代々受け継がれていきます。では、どうしてそれが可能なのでしょうか？ その秘密は、DNAの構造に隠されています。DNAは塩基GATCが並んだりリボン状の分子でしたが、通常2本のDNA鎖が互いに絡み合っただけ構造をとっています。これをDNAの2重らせん構造といいます。そして2本のDNA鎖はお互いの塩基にたいして、ある約束を持って2重らせん構造をとります。それは互いのDNA鎖の塩基のGに対してはC、Aに対してはTという約束です。ですから、2重鎖DNAの各鎖はお互いに相補しあう塩基の並びを持つことになります。DNAが複製される時は、2本鎖DNAが1本鎖にほどけて、それぞれの1本鎖DNAを鋳型にして新しい1本鎖のDNAが合成されていきます。つまり新たに合成された2本の2本鎖DNAのそれぞれの片割れは元の古いDNA鎖に由来することになります。このようにDNA上の遺伝情報は複製をとおして変化することなく子孫代々受け継がれていきます。

本実習では、ショウジョウバエの遺伝子Adhの一部をPCR法を用いて増幅しましたが、ここではPCRにより増幅されたDNA断片の塩基配列を決定して野生型と突然変異のAdh遺伝子の比較を行ってみましょう。

6.1 DNAの塩基配列の決定法

いくつかの方法が開発されていますが、現在、一般的に用いられているダイデオキシ法について簡単に説明します。

1. 塩基配列を知りたい DNA 断片を用意します。今回は PCR 法を用いて増幅した Adh 遺伝子を用います。できるだけ純粋な DNA を用意する必要がありますので、PCR 反応後アガロース電気泳動を行い、目的の DNA を含んだ領域のゲルを切り出して、そこから DNA を抽出します。ちなみに一回に解読できる DNA の長さは 500 塩基程です。
2. 1 で得られた DNA と、20 塩基程度の DNA 断片 (プライマー) を混ぜます。用いるプライマーの塩基配列は 1 で得られた DNA の一部と完全に相補するものを用います。さらにこの中に、DNA の素材になる 4 種類の塩基に対応する分子、 $dGTP$ 、 $dATP$ 、 $dTTP$ 、 $dCTP$ (合わせて $dNTP$ といいます) を入れておきます。さらに DNA を合成する酵素 (DNA 合成酵素) を加えて、新たに DNA を合成してやります。DNA 合成酵素は 1 の DNA にプライマーが貼付いた場所からプライマーの片端に 4 つの塩基 G A T C を取り込んでプライマー DNA を伸長していきます。このとき新たに作られる DNA は 1 の DNA を鋳型にして作られる相補的なものとなります。この反応は我々の細胞内で DNA が複製されるメカニズムと同じもので、これをチューブの中で行わせるのです。
3. 2 の反応では 1 の DNA が複製されるだけですが、実際には反応液の中に微量の $ddGTP$ 、 $ddATP$ 、 $ddTTP$ 、 $ddCTP$ (合わせて $ddNTP$ といいます) という物質も混ぜておきます。これら $ddNTP$ は構造的に $dNTP$ とほとんど同じなので対応する $dNTP$ と同様に DNA 合成酵素によって、ある確率で*¹ DNA に取り込まれます。大部分の合成中の DNA 鎖は $ddNTP$ が取り込まれないので、そのまま伸長していきますが、ある DNA 鎖にいったん $ddNTP$ が取り込まれるとその DNA 鎖の反応は停止してしまい、それ以上伸長できなくなってしまいます。この $ddNTP$ には蛍光色素を付けておき ($ddGTP$ は黄、 $ddATP$ は緑、 $ddTTP$ は赤、 $ddCTP$ は青) 後にどの $ddNTP$ を取り込んだ DNA かが区別できるようにしておきます。
4. 3 の反応産物をゲル電気泳動にかけます。ここから後の操作は全て機械が自動で行ってくれます。具体的には、細いガラス管 (キャピラリーといいます) の中にゲルを詰めてその中を 3 で得られた DNA を泳動します。皆さんがやった電気泳動と

*¹ 偶然に。たくさんある DNA 分子に対する反応なので、たくさんの偶然が積み重なり、一定のデータが生まれてきます。

原理は同じで、短いDNAほど早くゲルの中を移動できるために、DNAの長さによって分画することが出来ます。ただし、分解能が非常に高いため1塩基長さの違ったDNAも正確に分離できます。キャピラリーの一方の端からDNAを流しはじめて、もう一方の端から流れてきたDNAをその色素により検出します。最初にプライマーの長さのDNAが、次にそれに1塩基の長くなったDNAが、次に2塩基長く伸びたもの、次が3塩基というふうに順次長いDNAが流れでてきます。それぞれの長さのDNAは末端でddNTPを取り込んだためそこで伸長が止まってしまったものです。同じ所で伸長が止まったDNAは全て止まったところの塩基が何であるかによって、黄(G)か、緑(A)か、赤(T)か、青(C)かどれかに別れます。短いものから順次1塩基ずつ長くなったものの塩基が何色かを並べていくと、それが元の知りたいDNAの塩基配列の相補的な配列となるわけです。

ダイデオキシ法によるDNAの塩基配列の決定

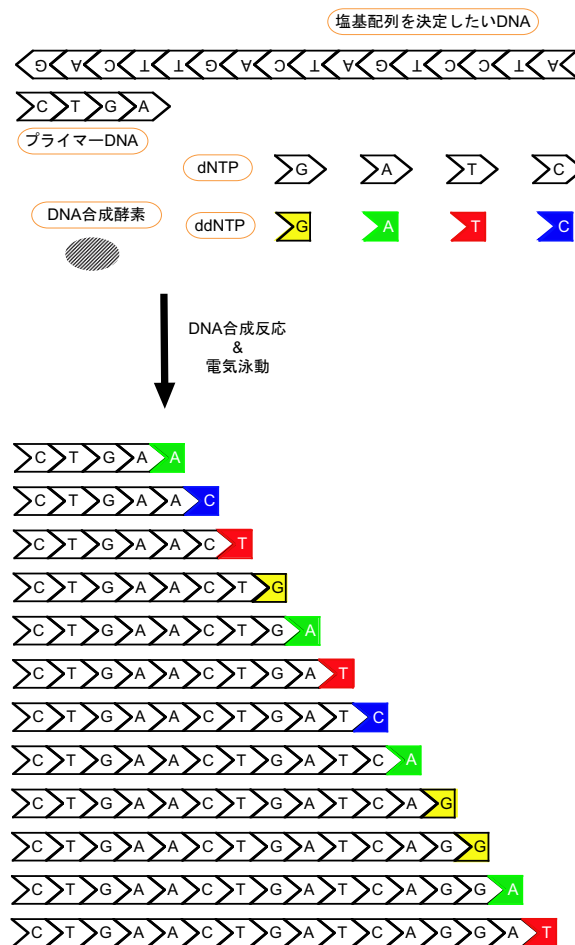


図 6.1: ダイデオキシ法

第7章

突然変異体の観察

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、体の色、眼の形や色、翅や剛毛の形の突然変異体を用意しました。

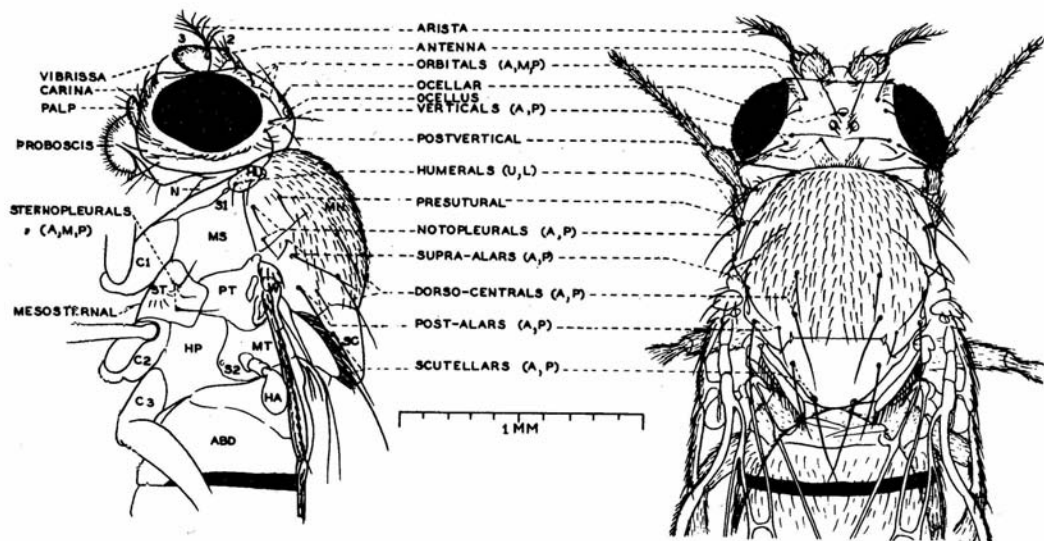


図 7.1: C. B. Bridges 原図 (Drosophila Information Service, No.3, 1935 より)

7.1 ショウジョウバエの観察

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。実体顕微鏡(図7.2)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。

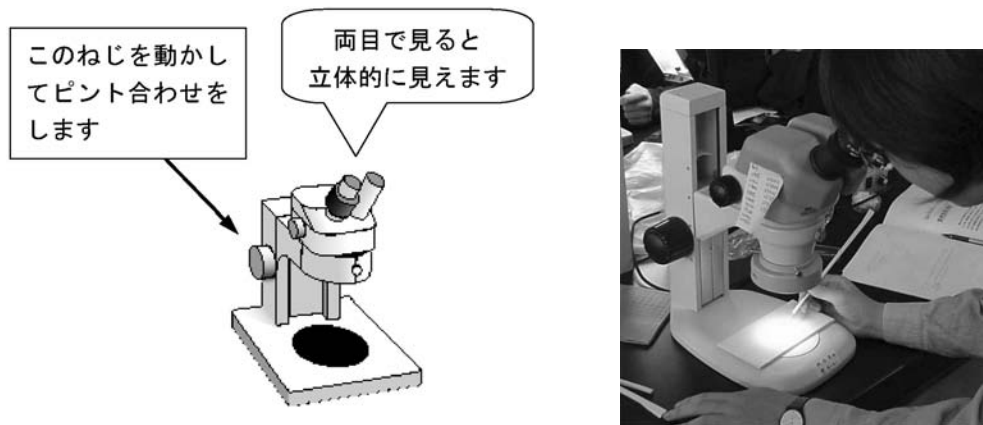


図 7.2: 双眼実体顕微鏡

ショウジョウバエを麻酔して眠らせ、白い紙^{*1}の上に乗せます(図7.3)。針先の丸い柄付針を使って、よく観察して下さい。

麻酔のかけ方

空のびんにハエを移し、トリエチルアミン
($(C_2H_5)_3N$) の蒸気を吹き込みます。

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。

観察した突然変異体の表現型を記録しましょう。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。

^{*1} 白色や水色などの薄い色のタイルでもよい。下敷きなどのプラスチックの板は静電気を持つので扱いにくい。

第 8 章

野外採集と観察

バナナトラップ法とスィーピング法（^{ほちゅうもう}捕虫網法）の 2 つの方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種類多くは、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。スィーピング法では、草の根元や木の肌にいるショウジョウバエを採集します。バナナトラップ法とは違う種類のショウジョウバエが採れます。

8.1 バナナトラップ法による採集

トラップをフィールドセンター内のいろいろなところに設置しておきました。トラップには、えさ（バナナにドライイースト^{*1}を振りかけたもの）を入れ、木の枝などに吊り下げます（図 8.1）。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ないので、地上から 1m 以上の高さにして吊るします。

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静かにかぶせ、トラップ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。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、環境条件が違う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。

8.2 スィーピング法による採集

暑い夏の昼間には、ショウジョウバエは、涼しい草の根元にひそんでいるようです。足で草の根元をガサガサとして、ショウジョウバエを飛び立たせるようにして、すかさず草

*1 パン酵母



図 8.1: バナナトラップ

むらの草をこするよう^{ほちゅうもう}にして捕虫網を振ります。網に入ったショウジョウバエは吸虫管で吸い出し、びんの中に入れます(図 8.2)。



図 8.2: スイーピング

第9章

もっといろいろ知りたいときには

9.1 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

9.2 メンデルの遺伝の法則の原本

- メンデル 雑种植物の研究 岩槻邦男・須原準平 訳
岩波文庫 1999年 本体価格：400円 ISBN: 4-00-339321-X
- MendelWeb
<http://www.netSPACE.org/MendelWeb/>
「雑种植物の研究」のウェブページ版。ドイツ語 (Versuche über Pflanzen-Hybriden) とその英訳 (Experiments in Plant Hybridization) がある。関連サイトへのリンクあり。

9.3 インターネット Web サイト

- 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/livingthing/syojyobae/index-fiy.html>
- Jfly(ショウジョウバエ研究者のためのデータベース)
<http://jfly.iam.u-tokyo.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.net/>(マスターサイト : アメリカ)

謝辞

本特別授業は文部科学省 大学等開放推進事業の助成を受けた活動です。

高大連携の事業として、京都教育大学附属高等学校にご協力いただきました。関係の諸先生方には大変お世話になりました。感謝いたします。

施設をお貸し下さった京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センターに感謝いたします。

高大連携特別授業：
ショウジョウバエの
遺伝子 DNA の観察

テキスト

2004 年 11 月 28 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
〒616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町 1
電話：(075) 873-2660 (代表)
ファクス：(075) 861-0881
<http://www.DGRC.kit.ac.jp/>

©M.-I. Yamamoto, Y. H. Inoue,
H. Matsubayashi, N. Juni & M. Tomaru

Illustration ©H. Sato, K. Nakatani & S. Toyohira