

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24653282

研究課題名(和文)植物を例として生物多様性・進化をDNAレベルで実感できる理科教育プログラムの開発

研究課題名(英文)Development of a science-educational program for experience of biological diversity and evolution at the DNA level using plant species

研究代表者

朝倉 史明 (Asakura, Nobuaki)

神奈川大学・工学部・准教授

研究者番号：80301589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：世界的に生物多様性の重要性が強く認識されるようになった生物多様性は、生態系の多様性、種の多様性、遺伝的多様性という3つのレベルで捉えることが出来る。遺伝的多様性の根底にはDNAレベルでの多様性があるが、一般にはまだ身近なものではない。高校生や生物学を専攻しない大学生などを対象にDNAレベルでの生物多様性の理解を促すような教材が必要であると考え、DNAレベルでの多様性を植物において体感できるような理科教育プログラムの開発を行った。台所にある野菜や果物といった身近な植物を用い、PCRによる増幅DNA断片長の多型(多様性)を検出するために、本実験プログラムを「キッチンPCR」と呼ぶこととした。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive understanding of biodiversity is considered important when considering global environmental conservation. However, genetic diversity is less well known. We developed a simple practical program called 'Kitchen PCR' to communicate the concept of genetic diversity at the DNA level. Kitchen PCR essentially consists of three steps: Crude DNA extracts were prepared by homogenizing the plant materials in a Tris buffer, and the psbA-trnH intergenic region of the plastid genome was amplified by PCR. The amplified DNA fragments were fractionated by agarose gel electrophoresis and visualized by staining with ethidium bromide or Fast Blast DNA stain. Huge diversity the amplified DNA fragment lengths were clearly observed in the experimental plants. Kitchen PCR provides a simple method for demonstrating the concepts of genetic diversity at the DNA level and for introducing students to molecular biological techniques.

研究分野：植物遺伝学、植物育種学、生物教育学

キーワード：生物多様性 植物 DNA ポリメラーゼ連鎖反応法 制限酵素切断断片長分析

1. 研究開始当初の背景

1992年にリオ・デ・ジャネイロにおいて環境と開発に関する国際連合会議が国際連合の主催で開催された。これは一般に地球サミットとよばれる、環境と開発をテーマとする国際会議である。その成果の一つに生物多様性条約の採択が挙げられるが、世界的に生物多様性の重要性が強く認識されるようになった。生物多様性は、生態系の多様性、種の多様性、遺伝的多様性という3つのレベルで捉えることができる。遺伝的多様性の根底にはDNAレベルでの多様性があるが、一般にはまだ身近なものではない。21世紀に入り生物多様性の重要性はさらに増していき、DNAレベルでの生物多様性の理解を促すような実験プログラムが必要であった。

同じく21世紀に入り、個人の体質や疾病発症の可能性などを遺伝子レベルで診断する技術が身近になってきた。遺伝子を診断する技術はいかなるものか、この理解は今後いっそう増してくると考えられる。このような状況もふまえて、分子生物学の基礎となる技術(DNA分析技術)の理解を促すために、初めて実験を実施する人にとっても取り組みやすい簡便な実験プログラムの開発が急務であった。尚、各家庭の台所に普段あるような食材を実験材料に用いることから、本実験プログラムをキッチンPCRと呼ぶこととした。

2. 研究の目的

上記の研究開始当初の背景のもと、高校生や生物学を専攻しない大学生などを対象にDNAレベルでの生物多様性の理解を促すような教材が必要であると考え、2012年度より、植物を例として生物多様性・進化をDNAレベルで実感できる理科教育プログラムの開発というテーマのもとに簡便な実験プログラムの開発研究に着手した。この実験プログラムは、同時に、遺伝子診断に用いられるDNA分析技術の基礎の理解にもつながるものになるよう意識し、研究を遂行した。

3. 研究の方法

以下に、個別の研究方法を列記する。

(1) どのような植物を材料に用いることができるか調査した。できる限り身近な植物を材料とし、親しみやすい実験プログラムになるように配慮した。具体的には、各家庭の台所にあるような食材を用いることが可能か調査した。さらに、身近な観賞用の植物も材料となり得るか調査した。

(2) どのようにDNAを細胞から抽出するか調べた。できうる限り簡便にDNA抽出を行えないか検討した。具体的には、Trisバッファー中ですりつぶした粗抽出物でも分析に使用できるかを調査した。

(3) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によりDNAの増幅を行うことが前提であるが、どのようなDNA領域が分析しやすく、本研

究目的に合致し、多様性を検出しやすいかを検討した。具体的には、限定的なDNA領域を分析して種の同定を行うこと(DNAバーコーディングと呼ばれる)に用いられる核、ミトコンドリア、色素体ゲノムの計4つの領域を調べた。

(4) 電気泳動後のDNA検出方法としてどのような方法が適用可能か検討した。簡便に使用できる、小さな電気泳動層であるミュールピッドを用いてアガロースゲル電気泳動をすることを前提とした。一つはエチジウムブロマイドによる最も一般的な検出方法を用いた。エチジウムブロマイドによるDNAの検出では紫外線を照射する装置が必要であることからさらに、この装置を必要としないFast Blast DNAステイン(BIO-RAD)による染色も検討した。

4. 研究成果

以下に、個別の研究成果を列記する。

(1) 植物材料

どのような植物が本実験プログラムに用いることができるか調査した。調査したのは74種類の植物であるが、そのすべてが実験使用可能であったので、ほぼすべての植物が本実験プログラムの材料として使用可能であるといえる(表1と表2)。表1の食材の場合は、主に可食部から、表2の観賞用植物の場合は、花卉からDNAを抽出した。

(2) DNA抽出方法

より簡便にDNAの抽出を行うことを第一と考え、抽出用Tris緩衝液(表3)中で磨り潰し、低速で2分間、遠心分離して得られた上清をDNA粗抽出液をキッチンPCRの鋳型DNAとした。DNAポリメラーゼとしてKOD FX Neo (TOYOBO)を用いたところ、問題なくDNA増幅を行うことができた。ただし、表2のキク科植物のうち、マーガレット、ガーベラ、マトリカリアは抽出物を4倍希釈する必要があった。

(3) PCRプロトコル

PCRの温度変化のプログラムと反応溶液組成の最適化とプライマーの選定を行った。材料とする全植物においてDNA増幅がみられるように、DNAバーコーディングという種判別手法によく用いられるプライマーセットを候補として検討した。これらのプライマーセットは核DNA中のITS領域用のもの、ミトコンドリアDNA中の*matK*領域用のもの、色素体ゲノム中の*rbcL*領域用のもの、同じく色素体ゲノム中の*psbA-trnH*領域用のものという四つのプライマーセットである。結果として*psbA-trnH*領域を増幅することによって、植物種の違いによる増幅DNA断片長の違いを明瞭に観察することができた。サーマルサイクラーの温度変化のプログラムとしては図1に示すものが良好な結果をもたらした。同様に反応溶液組成は表4のものが良好な結果をもたらした。

表1. キッチンPCRに用いた食用植物材料

真正双子葉類	
アブラナ科	ブロッコリー、キャベツ、ハクサイ、コマツナ、ダイコン
キク科	レタス、ゴボウ
セリ科	ニンジン、パセリ、セロリ、ミツバ
ナス科	ピーマン、シシトウ、トマト、ジャガイモ、ナス
マメ科	インゲンマメ、エンドウ、アルファルファ
ウリ科	ズッキーニ、セイヨウカボチャ、キュウリ、ニガウリ
ミカン科	レモン、ウンシュウミカン、ユズ、グレープフルーツ
バラ科	イチゴ、リンゴ
ヒルガオ科	サツマイモ
アカザ科	ホウレンソウ
クスノキ科	アボカド
アオイ科	オクラ、モロヘイヤ
マタタビ科	キウイフルーツ
ブドウ科	ブドウ
単子葉類	
ヒガンバナ科	タマネギ、ネギ、ニンニク、ニラ
ショウガ科	ショウガ、ミョウガ
クサスギカズラ科	アスパラガス
バショウ科	バナナ
パイナップル科	パイナップル
サトイモ科	サトイモ

表2. キッチン PCR に用いた観賞用植物

真正双子葉類	
キク科	マーガレット、ガーベラ、マトリカリア、マリーゴールド
キンポウゲ科	アネモネ、デルフィニウム、ラナンキュラス
アブラナ科	ストック
ナス科	ペチュニア
バラ科	バラ、シダレウメ、サクラ
セリ科	レースフラワー
マメ科	スイトピー
スマレ科	パンジー
ナデシコ科	カーネーション
ノウゼンハレン科	ナスタチューム
ムラサキ科	ワスレナグサ
オオバコ科	キンギョソウ
サクラソウ科	プリムラ
ゴマノハグサ科	ネメシア
クサスギカズラ科	スズラン
ツツジ科	ツツジ
イソマツ科	スターチス
単子葉類	
アヤメ科	フリージア、イキシア
ユリ科	リュウココリネ
ユリズイセン科	アリストロメリア

表3. 抽出用Tris緩衝液

100mM Tris HCl (pH9.0)
1M KCl
10mM EDTA

94°C 2分	} 30 サイクル
98°C 10秒	
62°C 30秒	
68°C 40秒	
68°C 40秒	

図1. サーマルサイクラーの温度変化プログラム

表4. PCR反応溶液組成 (1反応あたり)

成分	容量
滅菌水	11µl
2x PCR緩衝液 (KOD FX Neo用)	25µl
2mM dNTPs	10µl
25pmol/µl プライマー <i>psbA</i>	0.5µl
25pmol/µl プライマー <i>trnH</i>	0.5µl
KOD FX Neo (1.0U/µl)	1µl
DNA粗抽出液	2µl
総容量	50µl

(4) 電気泳動後の DNA 検出と生物多様性
エチジウムブロマイド染色後に紫外線照射し観察する方法は感度が高く、明瞭な増幅 DNA 断片を観察することができた(図2(a)). Fast Blast DNA ステイン染色によっても充分観察できた (図2(b)).

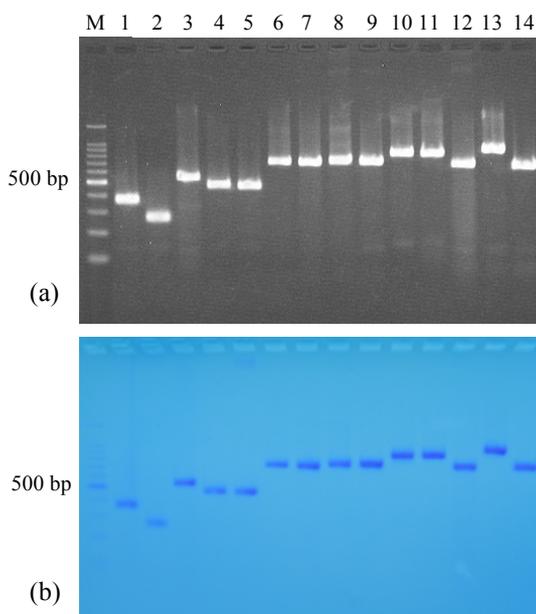


図2. 色素体 DNA 内の *psbA-trnH* 遺伝子間領域増幅 DNA 断片長の多様性.

(a) エチジウムブロマイド染色、(b) Fast Blast DNA stain 染色. レーン: M, 100-bp ladder;

1, サツマイモ; 2, ホウレンソウ; 3, アボカド; 4, ブドウ; 5, モロヘイヤ; 6, タマネギ; 7, ネギ; 8, ニンニク; 9, ニラ; 10, ショウガ; 11, ミョウガ; 12, アスパラガス; 13, バナナ; 14, パイナップル.

図2に示すように植物種の多様性を簡便なPCRによって検出することができた。当初目的とした高校生や生物学を専攻しない大学生などを対象にDNAレベルでの生物多様性の理解を促すような教材が完成した。今後は、実際の生徒さんにキッチンPCRを体験してもらい、感想をもらい微調整を加えながら、普及に努めたい。

さらに、増幅DNA断片長の多様性以外に制限酵素を用いて塩基配列レベルの多様性も簡便に検出することができた(図3)。すでにPCRを経験している生徒にはこの分析も体験してもらえる。

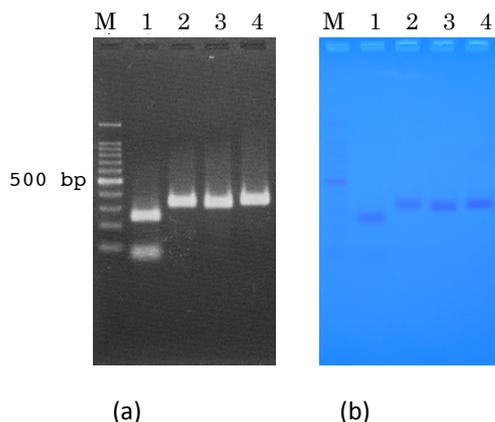


図3. セリ科植物4種の *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列の多様性。キッチンPCRの増幅産物を *Hae* III で切断した。

(a) エチジウムブロマイド染色、(b) Fast Blast DNA 染色 レーン: M, 100-bp ladder; 1, ニンジン; 2, パセリ; 3, セロリ; 4, ミツバ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] 査読あり (計1件)

Asakura N. and Kikuchi R. (2015) Kitchen PCR: an experimental program to experience plant genetic diversity. Proceeding of 25th Biennial Conference of the Asian Association of Biology Education. in press.

[学会発表] (計4件)

朝倉 史明、菊地 理絵, 「教育プログラム『キッチンPCR』の使い方について」, 日本生物教育学会第98回全国大会 第98回全国大会研究発表予稿集, p. 74 (愛媛大学, 2015年1月10日、11日)

朝倉 史明、菊地 理絵, 「教育プログラム『キッチンPCR』を通してわかること」, 日本育種学会第126回講演会 育種学研究15(別2), p. 137 (南九州大学, 2014年9月26日、27日)

朝倉 史明, 「身近な食材を用いたDNAの多様性を体感する教育プログラム『キッチンPCR』」, 日本生物教育学会第95回全国大会(つくば大会) 生物教育 Vol. 54 (3, 4),

p. 196 (筑波大学, 2014年1月11日、12日)

朝倉 史明, 「植物の遺伝的多様性をDNAレベルで体感する教育プログラム『キッチンPCR』」, 日本育種学会第124回講演会 育種学研究15(別2), p. 194 (鹿児島大学, 2013年10月12日、13日)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 史明 (ASAKURA Nobuaki)
神奈川大学・工学部・准教授
研究者番号: 80301589

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し