

## LAMP法による性別判定の教材化

### Development of a teaching material for sexual decision by using LAMP method

伊左治錦司\*・松本省吾\*\*

Kinji ISAJI\* and Shogo MATSUMOTO\*\*

#### 要 旨

口腔粘膜細胞から抽出したDNAから、等温増幅法であるLAMP法を用いて、短時間かつ簡易な方法で性別の判定を行うことができた。また、この実験に口腔粘膜細胞から簡易的な方法でDNAを注する実験を併せて授業実践を行ったが、生徒の反応もよく、高等学校の実験室で一斉授業としてDNA解析実験を行う可能性を示すことができた。

キーワード：LAMP法、性別判定、SRY遺伝子、高校生物教材、DNA鑑定、遺伝子診断、DNA

#### I. はじめに

遺伝子を解析する技術の中でも比較的長い歴史があり様々な分野で応用されているのがDNA鑑定である。親子鑑定や兄弟鑑定を始めとしたDNA鑑定は、法律上の問題解決に役立ったり犯罪捜査や考古学の分野などでもその威力を発揮している。この分野に生徒は強い興味関心を示すが、PCR (polymerase chain reaction) 法に代表される遺伝子解析実験を高等学校で授業の実験として扱うことは時間だけでなく器材や費用の面などから難しい。

一方、高等学校の生物では、すべての細胞に生命の設計図であるDNAが含まれており、どんな細胞でもそのDNAは共通であることを学ぶ。そしてそれ故に植物細胞には分化の全能性を示し植物組織培養という技術が成り立つこと、また動物のクローン作成についても近年は高等動物（ほ乳類）でも可能になってきたこと等を紹介する。植物組織培養や動物のクローンなどにも生徒は高い興味関心を示し、格好の教材となるのだが、いざ実験となると、クローン動物はもとより組織培養なども手間と時間がかかりすぎて、授業に組み込んだ実験としては扱いにくい。

以上のような理由から、授業の一環として短時間に簡便な操作でできるようなDNAを扱う実験の開発が待たれているところであるが、本研究では新しい遺伝子増幅法であるLAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法<sup>1)</sup>を用いた遺伝子検出の教材化の可能性を検討することとした。LAMP法は栄研化学株式会社が開発した全く新しい遺伝子増幅法であり、増幅反応が等温条件下で進むこと、および増幅産物が極端に多くその検出がピロリン酸マグネシウムによる白濁の視認によって行うことができる<sup>2)</sup>という特徴を持ち、従来の遺伝子増幅法であるPCR法では必要になる高価なサーマルサイクラーや電気泳動装置を必要としない。この特徴をうまく生かせば、高等学校の実験室で行える実験を開発できると思われる。

「DNA鑑定の基礎」と題して開発する今回の実験では、DNA鑑定の最も基礎となる性別判定を行うこととした。具体的には、LAMP法によりSRY (sex-determining region Y) 遺伝子とGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子の2つを増幅することによりヒトの性別判

\* 岐阜大学大学院教育学研究科（東濃高校教諭）Graduate School Pedagogy Graduate Course

\*\*岐阜大学教育学部 Department of Biology

定を行う。SRY遺伝子はY染色体上（Yp11.3）にある精巣を作る遺伝子で、この遺伝子の機能により男性性器が作られて男性になる。異常があれば性染色体は男性型（XY）であるのに女性の体となる。したがってSRY遺伝子の有無は表現型として現れた性徴を規定するものであって、性染色体のタイプを規定するものではないので、性染色体異常を検出してしまうというようなことは起こらない（教育の場で染色体異常が診断されたら問題である）。GAPDH遺伝子は第12番染色体（12p13）に位置し、糖代謝のエネルギー生産過程に関与する脱水素酵素を作る代表的なハウスキーピング遺伝子（どこの細胞でも必ず働いている遺伝子）であり、これを本実験の内部コントロールとして用いる（男女とも必ず増幅が見られるので、もし増幅されないのであれば、実験操作や試薬などにミスがあったとことになる）。すなわち、試料を2つの遺伝子それぞれを特異的に増幅する反応液に加え、両方とも増幅すれば男性、GAPDH遺伝子のみ増幅すれば女性、と判定される。

本実験で用いる性別判定の基準はたった1つの遺伝子の有無によるもので極めて単純であり、実験操作も器具の扱いを除いて大変簡便である。遺伝子の増幅の結果もあらかじめ予想でき、かつ「白濁」で観察することになるので、決してインパクトの強い実験とはいえない。したがって、実験の進め方によっては非常に退屈な実験になってしまうことも考えられるので、実験の位置づけや教材として使うプリント類や実験自体の進め方についても十分な検討を行った。

## II. LAMP法を用いた性別判定実験の検討

### 1. 材料と方法

#### （1）DNAの抽出

DNAは以下の①～③に示す3つの方法で口腔粘膜細胞より抽出した。

##### ①研究室レベルの純度で抽出＜DNA試料①＞

ニッポンジーンのDNA抽出キット「ISOHAIR」を用いて抽出した。<sup>3)</sup>

##### ②簡易抽出その1＜DNA試料②＞

メニコン社のコンタクトレンズ洗浄剤を用いた方法<sup>4)</sup>で抽出した。

##### ③簡易抽出その2＜DNA試料③＞

綿棒で取り取った口腔粘膜細胞を滅菌蒸留水に懸濁し、95℃で10分間加熱したものの上澄み液をDNA溶液とした。

#### （2）LAMP反応

##### ①プライマーの設計

まず図1および図2に示すように、SRY遺伝子（Genbank L10102）とGAPDH遺伝子（Genbank J04038）の塩基配列の一部に、6つの領域（F1, F2, F3, B1, B2, B3）を設定し、この6つの領域を認識する4種類のLAMPプライマー（FIP, BIP, F3, B3）を作成した。さらに、LAMP反応の速度を高めるLoopプライマー（反応時間を2分の1～3分の1に短縮することができる）を作成するために2つの領域（Loop F, Loop B）を設定し、それぞれを認識するLoop FプライマーおよびLoop Bプライマーを作成した。なお、上記の各領域の設定に当たっては、インターネットに公開されているLAMP法プライマー作成ソフト（Primer explorer Ver.3<sup>5)</sup>）を用いた。プライマーの精製度については、OPC（Oligonucleotide purification cartridge column:簡易カラム）精製グレードとした。

##### ②LAMP反応

3種類の方法で抽出された試料（DNA試料①～③、男女については既知のものを用意）それぞれに

ついて、DNA試料2 $\mu$ lおよび蛍光目視検出試薬（栄研化学）1 $\mu$ lを含む反応液（Tris-HCl pH8.8 20mM, KCl 10mM, MgSO<sub>4</sub> 8mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10mM, Tween20 0.2%, Betaine 1.6M, dNTPs mixture 1.25mM each, *Bst* DNA polymerase 8unit, F3プライマーおよびB3プライマー 5pmoles, FIPプライマーおよびBIPプライマー 40pmoles, Loop FプライマーおよびLoop Bプライマー 20pmolesを含む）25 $\mu$ lを、反応温度は63 $^{\circ}$ C, 反応時間は20分, 30分, 45分の3条件下でインキュベートした後, 反応停止（酵素失活）の為に80 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートした。なお, インキュベートにはPERKIN ELME R社のサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 2400を用いた。また, Loopプライマー（Loop FプライマーおよびLoop Bプライマー, 反応時間を短縮するのに役立つ）については加えないものについてもLAMP反応を行った。

### (3) 増幅産物の確認

#### ①電気泳動による確認

増幅産物3 $\mu$ lをBPB 2 $\mu$ lと混合し, 3%アガロースゲルにより100V, 約30分電気泳動を行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し, トランスイルミネーター下で観察した。

#### ②白濁による確認

LAMP反応後の反応液の白濁の度合いをコントロールと比較した。

#### ③蛍光目視検出試薬による確認

LAMP反応後の反応液を反応チューブごとトランスイルミネーター下またはハンディタイプの長波長紫外線ランプ（Bio-Rad社）で紫外線を照射して観察した。

## 2. 結果

### (1) ISOHAIRを用いて抽出したDNAによるSRY遺伝子およびGAPDH遺伝子の増幅テスト

図3はSRY遺伝子増幅用プライマーセットによるLAMP反応後の反応液を電気泳動したものである。試料が男性のDNAである場合, 反応液にLoopプライマーを加えなかったものについては, 45分インキュベートしたものだけ増幅反応（LAMP法では様々なサイズのDNAが生じるので, 電気泳動像は特有のラダーパターンを示している）が見られ, Loopプライマーを加えたものは20分, 30分, 45分

```

2281 tgtgtgtctcg cgcacagaww cgcawwaww cctagagaa tcccagaatg cgaawcicaw
                                     F3
2341 awatwccaa cawctggwa tacawtwa awatwcttac tgaagcgaa awatwccat
                                     F2                               Loop F
2401 tttccagga cawcagaaa ttacawcca tawcawaa awatwcccg awtataaet
                                     F1                               B1
2461 atgawctcg awwawggcg aagatgctgc awwawattg awgtttgctt cccgawctc
                                     Loop B                               B2
2521 cawctcgggt awctgcagc gaagtgaac tggacaacag gttgtacagg gatgactga
                                     B3
FIP 5'「F1c」「F2」3' gctcctggaagaatggccatt-ctcagagatcagcaagcagc(42mer)
BIP 5'「B1」「B2c」3' acaggccatgcacagagagaaa-tgcaattcttcggcagca(40mer)
F3 5'「F3」3' aggcgcaagatggctcta(18mer)
B3 5'「B3c」3' agagtaccgaagcgggatc(19mer)
Loop F 5'「Loop F」3' agtaagcattttccactggtatcc(24mer)
Loop B 5'「Loop B」3' attataagtatcgacctcg tcggaa(25mer)
    
```

図1 SRY遺伝子塩基配列とLAMPプライマーセット

```

4201 tgcawaccac awctcawctc at-awctcaw cawawawaw tgtggatggc cctcawaw
                                     F3                               F2
4261 awatwawaw awatwawaw awatwawaw awatwawaw awatwawaw awatwawaw
                                     Loop F                               F1                               B1
4321 awawawctgt ggawawaw atcawctgaw tawawggaa gawawawaw awawawaw
                                     Loop B                               B2
4381 gtgtccccc tcgcaawctg awawawaw awctgacctg cawctagaa awawctgcca
                                     B3
FIP 5'「F1c」「F2」3' gatgttctggagaggccgc-cactgcccawcagaagc(38mer)
BIP 5'「B1」「B2c」3' cctctactggcctgccaag-gaaggccatgccagtgag(38mer)
F3 5'「F3」3' cagaccacagtcawtgc(18mer)
B3 5'「B3c」3' ggtcawcawctgawctg(18mer)
Loop F 5'「Loop Fc」3' awcawcawcawctgcttccc(19mer)
Loop B 5'「Loop B」3' gcaawgtcawctgawctg(23mer)
    
```

図2 GAPDH遺伝子塩基配列とLAMPプライマーセット

のすべてで増幅反応が見られた。女性のDNAを試料とした場合は、どの条件でも増幅は全く見られなかった。

図4はSRY遺伝子の増幅の有無を白濁の度合いで見たもの、図5は蛍光目視検出試薬を加えトランスイルミネータ下で観察したものである。白濁、蛍光ともに、増幅の見られたチューブでは目視で確認することができた。ただし、蛍光目視検出試薬での検出に関しては、プライマーを希釈した溶液および試料DNAを希釈した溶液が若干のEDTAを含むので、増幅の見られなかった反応チューブでもわずかに蛍光が観察された。

GAPDH遺伝子の増幅については、男性および女性のDNAのどちらを用いても30分で増幅を白濁の目視、電気泳動、蛍光目視検出試薬による蛍光のすべてで確認することができた。

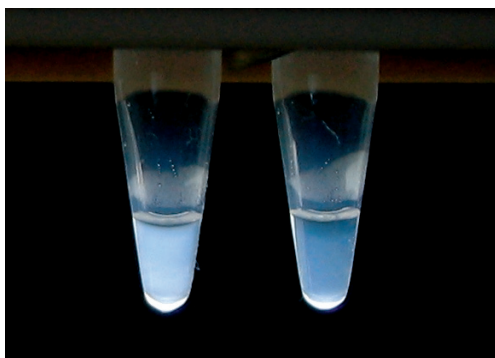


図4 SRY遺伝子の白濁による検出。左は試料DNAが男性の場合、右は女性の場合。蛍光目視検出試薬は加えていない。

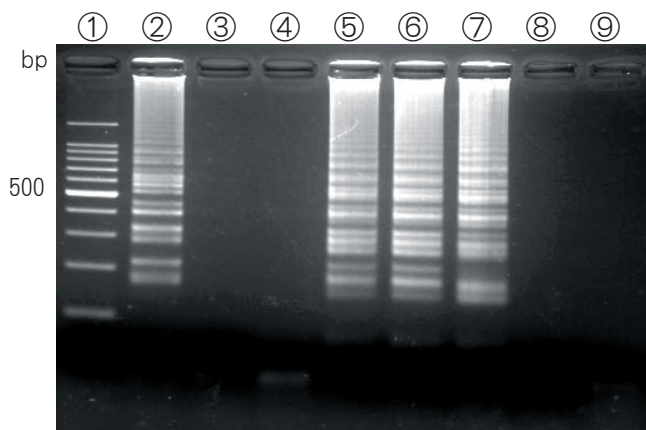


図3 SRY遺伝子の検出。①はサイズマーカー、②～⑦は男性DNAが試料で②③④はループプライマー無し（②は45分、③は30分、④は20分）、⑤⑥⑦はループプライマー有り（⑤は45分、⑥は30分、⑦は20分）。⑧および⑨は女性のDNA試料で⑧はループプライマーなし、⑨はループプライマー有りでどちらも反応時間は45分間。

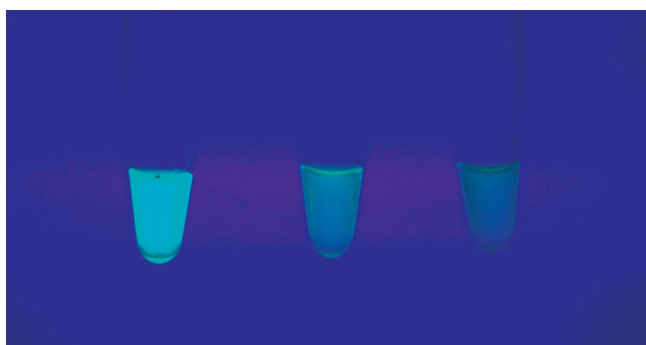


図5 SRY遺伝子の蛍光目視検出試薬による検出。左は試料DNAが男性、中央は女性、右はネガティブコントロール（DNAを加えていない）の場合。

なお、蛍光の観察においては、トランスイルミネータ、ハンディータイプの紫外線ランプのどちらを用いても明確に確認することができた。また、紫外線を照射しなくても、蛍光灯下において反応液の変色（薄いオレンジ色→薄い黄緑色）が観察され増幅の有無を判定できることが分かった。

## (2) DNA抽出法の違いによる影響

簡易抽出その1および簡易抽出その2で得られた男性のDNA試料を用いて、SRY遺伝子およびGAPDH遺伝子の増幅を試みたところ、ISOHAIRで抽出されたDNAを試料とした場合と同じ条件で増幅が確認された。

## 3. 考察

SRY遺伝子をLAMP法により63°C45分のインキュベートで増幅、検出することができた。さらに

ループプライマーを加えることによって、20分でも検出できることが分かった。白濁による検出、蛍光による検出のどちらについても男女で明瞭な差が見られたので、性別判定に十分用いることができる。GAPDH遺伝子の増幅も再現性が非常に高く、内部コントロールとして用いることができた。

また、水で懸濁した口腔粘膜細胞を加熱するだけで得られた不純物が多く量もわずかであると考えられるDNA試料でも、LAMP法による増幅の試料となりうることが確認された。

以上を考慮し、LAMP反応に20分（ループプライマーも用いる）、抽出操作に20分をみておけば、50分の授業時間内に終わらせる実験系とすることも可能であると考えられた。

### Ⅲ. 授業実践

#### 1. 教材化における留意点

本実験を高等学校の生物の授業で行うに当たって、次にあげる3つに留意して教材（実験プリント類、資料など）の作成にあたった。

（1）生物のどの分野に位置づけるか。

今回の実践では、生物Ⅱの遺伝子分野の総まとめの実験としてDNAの複製、遺伝情報の発現などを一通り学んだ後で行った。冒頭でも述べたように、本実験はマイクロピペットやマイクロチューブなど普段はなじみの薄い器具を使うことを除けば、基本的には「混ぜて暖めるだけ」であり、退屈極まりない実験となる可能性がある。したがって、単に結果を見るだけの実験ではなく、過程を重視する実験とするために、増幅する遺伝子（それ自体の説明や塩基配列等の情報の入手法など）についての詳しい説明も行うこととした。

（2）DNA増幅の技術的な解説にどこまで踏み込むか。

本実験では日本で開発された新しい遺伝子増幅法であるLAMP法を用いているが、LAMP法のDNA増幅の仕組みは極めて複雑である。特に65℃付近でDNAの2本鎖が動的平衡状態にあることや増幅の基点となるダンベル様構造のDNAを作らせるためのプライマーの設計などは、高校生には難解であると考えられる。したがって、LAMP法におけるDNA増幅の仕組みについては、開発した栄研化学のWEBページ<sup>6)</sup>にあるアニメーションを参考する程度にとどめ、深入りしないこととした。一方、LAMP法の特徴である「等温増幅」、「特異性の高さ」、「増幅産物の多さ」、「検出の簡易さ」については、教科書でも取り上げられることが多くなってきたPCR法と比較することとした。

（3）実験装置、手順を如何に簡略化するか。

PCR法などと比較するとLAMP法は実験操作が極めて単純であり、もともと特別な器具は必要としないが、高校の授業実験として多人数で一斉に行える実験とするために、以下のような工夫をしてみた。

- ・恒温器はアルミブロックなどの固槽のものがあれば便利で使いやすく火傷なども防げるが、やや高価でありこの実験のためだけにそろえるのは少々ためられる。したがって、今回は一般的なウォーターバスを用いることとした。なお、0.2mlマイクロチューブは5mm程度の厚さの発泡スチロール板に穴を開け、そこに差し込んでウォーターバスに浮かべた。

- ・DNA増幅後の試料は観察後、直ちに廃棄する（DNAは究極の個人情報であることを生徒には説明する）こととしたので、反応停止の操作（80℃2分のインキュベート）は省略した。

- 本来なら反応試薬の意味を理解させ入れる順番なども考えさせたいところであるが、時間的な問題に加え、マイクロピペットの扱いに習熟していない生徒の操作は実験の失敗の原因になりかねないので、試薬はあらかじめ混合（→LAMP法反応液と呼ぶこととした）しておいた。
- 高価なマイクロピペットを生徒の人数分用意するのは難しいので、固定容量の簡易マイクロピペット（Bio-Rad社製）3種類（5  $\mu$ l, 20  $\mu$ lおよび50  $\mu$ l）を用いた。

## 2. 実験プリント

実験は2時間連続（100分授業）で計画できたので、まず1時間目に口腔粘膜細胞から簡易法でDNAを抽出し可視化して観察した後、沈殿乾燥させ10mM Tris Bufferに溶解しDNA溶液を作ることとし、2時間目にLAMP反応を行った。

資料1は、以上の実験プロトコルを実験プリントとしてまとめたものである。このプリントに沿って実験を進めた。

資料2は性別判定の方法およびLAMP法について解説した補足プリントである。この補足プリントは、LAMP反応時の待ち時間（およそ30分）に配布し、説明を行った。

### 資料1 実験プリント

**実験 DNA鑑定的基础**

## 口腔粘膜細胞DNAによる性別判定

**目的**  
自分自身のDNAを抽出・観察し、最新の技術を用いて特定の遺伝子を増幅・検出する。

**準備**  
マイクロチューブ（1.5ml, 0.2ml）、マイクロピペット（50, 20, 5  $\mu$  l）、綿棒、DNA抽出液、99%エチルアルコール、NaCl飽和水溶液、観察用チューブ、氷水、油性ペン、10mM Tris 緩衝液、LAMP 反応液、恒温槽、ハンディ UV ランプ 他

**方法1 (DNA抽出)**

1. 1mlの DNA 抽出液（※1）の入った透明な1.5ml マイクロチューブを1つ取り、油性ペンで自分の名前を記入する。
2. 口腔上皮細胞を採取する。まず綿棒の片側を用いて、右頬の内側および頬と歯茎の間を念入りに 30秒以上こする。
3. 頬の細胞のついた綿棒を、DNA 抽出液の入ったマイクロチューブに入れ、回転させるようにして攪拌し、細胞がバッファー中に溶解されるようにする。綿棒の先端部分をマイクロチューブの口の部分に回転させてこすりつける。よびにして吸収した DNA 抽出液を絞り、できるだけたくさん細胞が入るようにするとともに抽出液が減らないようにする。（右図）
4. 綿棒のもう一方を使って、今度は左側の頬の細胞を採取し、3と同様にマイクロチューブ内に入れる。
5. マイクロチューブのキャップを閉め、穏やかに5回転倒混和させる。
6. マイクロチューブを37℃で15分以上インキュベートする。
7. 駒込ピペットを用いて、NaCl 飽和水溶液を2滴加え、キャップを閉め、穏やかに5回転倒混和させる。
8. 観察用チューブに自分の名前を記入し、マイクロチューブの内容物を観察用チューブに移す。
9. 駒込ピペットを、冷やしたアルコールで満たし、45°に傾けた観察用チューブに、非常に穏やかに加える（※2）。（2層になる、右図）
10. 観察用チューブをまっすぐに立て、そのまま5分間放置しておく（析出したDNAを観察する）。
11. 5分後に観察用チューブの口をパラフィルム片で覆い、チューブを非常にゆっくりと6回転倒させて、析出し始めた DNA が凝集しやすくなるようにする。
12. ディスポーザブルピペットを用いて、750  $\mu$  l ~ 1ml のアルコールとともに、析出した DNA を、別の1.5ml マイクロチューブに移し、遠心分離し上澄みを除く。
13. 沈殿を少し乾燥させ、10mM Tris 緩衝液（※3）を加えて溶かす。




※1・・・DNA を抽出するための溶液、リン脂質を主成分とする細胞膜や核膜などを破壊するための界面活性剤（SDS:ドデシル硫酸ナトリウム）タンパク質変性作用もある）、およびDNAに結合しているタンパク質（ヒストン）を分解するためのタンパク質分解酵素（ロンタグレンズ用タンパク質除去剤で代用）を含んでいる。

※2・・・DNAは高温条件下では溶アルコールに溶けにくいという性質を利用して、DNAを精製化させ、沈殿させる。エタノール沈殿という。

※3・・・pH を一定に保つなどの働きがある。

**方法2 (性別判定: LAMP法(※4)による)・・・グループで1セット。**

1. 0.2ml マイクロチューブを2本用意し、一方に LAMP 反応液①（SRY 遺伝子検出用）20  $\mu$  l を入れ、もう一方に LAMP 反応液②（GAPDH 遺伝子検出用）20  $\mu$  l を加える（20  $\mu$  l のマイクロピペットを用いる。ピペットチップを必ず替える）。
2. それぞれのマイクロチューブに方法1で抽出した試料 DNA 溶液を5  $\mu$  l ずつ入れる（5  $\mu$  l のマイクロピペットを使用する）。
3. 直径 3mm 程度の穴の空いた発砲スチロール板にマイクロチューブをセットし、65℃に設定した恒温槽で30分間インキュベート（恒温に保つこと）する。
4. 恒温槽より取り出し、①チューブの濁り具合、②色、③ハンディ UV ランプで紫外線を当てた時の様子を観察する。

※4・・・LAMP 法: 日本で開発された新しい遺伝子増幅法。PCR 法と異なり、等温増幅が可能である。LAMP 法を用いた性別判定実験については、別紙の補足説明プリントを参照のこと。

**結果と考察**

1. 口腔粘膜細胞から抽出した DNA はどんな様子だったか。
2. LAMP 反応後の結果について以下にまとめよ。  
① 用いた試料は・・・ 男性 女性（○印を）  
② 反応後の様子は・・・  

	SRY 増幅用反応液	GAPDH 増幅用反応液
濁り(白濁)		
試薬の色		
UV 照射		
3. 感想と反省  
.....  
.....  
.....

3年 組 番・氏名 \_\_\_\_\_

資料2 補足プリント

実験 口腔粘膜細胞DNAによる性別判定 補足説明

### 特定の遺伝子の検出 ～LAMP法を用いた性別判定～

**実験の目的**  
 男と女の違いは性染色体であるX染色体とY染色体によって決められます。すなわち男性ならXY型、女性ならXX型の性染色体の組み合わせを仰っています。本実験では、口腔粘膜細胞から簡易的な方法で抽出したDNAを用いて、男性だけが持つY染色体を構成するDNAの特定の領域を増幅し検出することで男女の性別判定を行います。

**本実験で検出する遺伝子**  
 (1) SRY遺伝子  
 本実験では男性だけが持つY染色体にあるSRY (Sex determining region Y) 遺伝子が検出できるかどうかで性別判定を行います。SRY遺伝子は精巣を作る遺伝子で、この働きにより男性性器が作られ男性の体となります。SRY遺伝子の機能に異常(欠失など)があると、XY型でも女性の体となります。この場合はSRY遺伝子は検出されませんので、染色体異常を検出するようなことにはなりません。  
 (2) GAPDH遺伝子  
 実験の内部コントロール(実験操作に問題が無く確かめるための対照実験)として、代表的なハウスキーピング遺伝子であるGAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : グリセラルデヒド3リン酸脱ヒドロゲナーゼ) 遺伝子を増幅します。この遺伝子は男女ともに必ず検出されるので、もし検出されない場合は、実験操作や試薬に問題があった可能性が生じ、再実験を行なうことになります。

※実験ではそれぞれの遺伝子の塩基配列の一部を検出します。全塩基配列は下記のデータベースを参照してください。  
 SRY遺伝子… GenBank L10102      GAPDH遺伝子… Genbank J04038

**本実験で用いる新しい遺伝子増幅法・LAMP法**  
 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法は日本の栄研化学株式会社によって開発された全く新しい遺伝子増幅法です。LAMP法では、増幅を目的とする遺伝子の塩基配列(塩基数は300bp前後)に6つの領域を設定し、それらの領域を認識する4種のプライマーを設計し、増幅反応を進めるといふ遺伝子増幅法で、その特徴としては、  
 (1) 増幅には6つの領域が関与するので極めて特異性が高い。  
 (2) 反応は等温条件下(65℃付近)で進む。  
 (3) 反応終了までの時間は30分以内である。  
 (4) 反応産物が極端に多く増幅の有無をピロリン酸マグネシウムの白濁で検出できる。

などの特徴があります。従来のPCR法のように、高価なサーマルサイクラーが必要であったり、電気泳動で増幅産物を検出するなどの手間がかかるというようなことが不要となる上に、極短時間(30分程度)で検出が可能になるといふことで、高等学校の授業時間に行うことも可能になっています。反応のメカニズム自体は大変複雑ですが、今後は期待される技術です。詳しくは栄研化学のLAMP法に関するWEBページを参照してください。 <http://loopamp.eiken.co.jp/index.html>

**LAMP法反応液の組成**

試薬など	① SRY 増幅用	② GAPDH 増幅用
2.0 × Reaction Mix (※1)	12.0 μl	12.0 μl
<i>Bst</i> DNA polymerase (※2)	1.0 μl	1.0 μl
SRY 遺伝子増幅用プライマーセット	6.0 μl	—
GAPDH 遺伝子増幅用プライマーセット	—	6.0 μl
蛍光目視検出試薬	1.0 μl	1.0 μl
<b>Total</b>	<b>20.0 μl</b>	<b>20.0 μl</b>

※1… Loop-ampDNA 増幅試薬キット(栄研化学)より。緩衝液、A, T, G, C各ヌクレオチドなどを含む。  
 ※2… DNA 合成酵素(鎖置換型, PCRに用いられるものとは異なる。最適温度は60～65℃)

**プライマー(DNA複製の基点となる合成ヌクレオチド)**  
 下記の図1および図2に示す塩基配列のもの、各6本、計12本

2281 tgtgtctctg cgatcagagg cccaagatgg ctctagagaa tcccagaatg cgaactcag  
 F3

2341 agatcagcaaa gcaagctgga taccagtgga aaatgcttcc tgaagcga aaatgcaat  
 F2 Loop F

2401 tcttcagga ggcacagaaa ttacagcca tccacagaga gaattaccg aattataagt  
 F1 B1

2461 atcactctg tggaaagcg aagaactcc ccaagattg caatttctt ccgcagatc  
 Loop B B2

2521 ccctctcgt actlccgac gaagtgaac tggacaacag gttgacagg gatgactga  
 B3

FIP 5'「F1c」「F2」3' gctcttggagaatgcccatt-ctcagagatcgaacgac (42mer)  
 BIP 5'「B1」「B2c」3' acagccatgcaagagagaaa-tgcaattctggcga (40mer)  
 F3 5'「F3」3' aggcacagatgctcta (18mer)  
 B3 5'「B3c」3' agatcaccagcagggatc (19mer)  
 Loop F 5'「Loop F」3' agtaagcatttccactgtacc (24mer)  
 Loop B 5'「Loop B」3' attataagatgactcctg tggaa (25mer)

図1 SRY遺伝子塩基配列とLAMPプライマーセット

---

4201 tgcagaccac agtccatgcc atcactgcca cccagaagac tgttgatgcc ccttcggga  
 F3 F2

4261 aactgtggc tgaigccc gggactctcc agaacatgat cctgctct actgacactg  
 Loop F F1 B1

4321 ccagagctgt ggcacaggtc atccctgacc tgaacggaaa gtcacatgac atgctcttc  
 B2

4381 gtgtcccac tgcacactg tcatgtgtg acctgactgt cegtctagaa aanaactgcca  
 B3

FIP 5'「F1c」「F2」3' gatgttctggagagcgcgc-actgcccaccagaagac (38mer)  
 BIP 5'「B1」「B2c」3' cctactgctgctgccaag-gaacactgcatgag (38mer)  
 F3 5'「F3」3' cagaccacatgctcactg (18mer)  
 B3 5'「B3c」3' ggtccaccactgacactg (18mer)  
 Loop F 5'「Loop Fc」3' caccagcccaactgtccc (19mer)  
 Loop B 5'「Loop B」3' gcaaggtcactgactgta (23mer)

図2 GAPDH遺伝子塩基配列とLAMPプライマーセット

3. 学習指導案

前述のように、授業は「ヒト口腔粘膜細胞からのDNA抽出」→「性別判定」の流れで、2時間連続で行った。以下に学習指導案を示す。

学習指導案

実施：平成17年10月21日(金) 第2限, 第3限

科目	生物Ⅱ	使用教材	高等学校 生物Ⅱ (数研出版)
指導クラス	3年理系生物Ⅱ選択者39名	単元	バイオテクノロジー
単元の目標	組織培養, 細胞融合, 遺伝子組み換え, トランスジェニック動物とES細胞, DNAの塩基配列の解析とヒトゲノム計画, DNA鑑定や遺伝子診断など, 最新のバイオテクノロジーのしくみと目的について学び, それらの技術の将来における可能性について考えることができる。		
配当時間	8時間(45分授業)	本時の位置	8時間のうちの2時間目
本時の主題	ヒト口腔粘膜細胞からのDNA抽出と抽出したDNAを用いた性別判定(実験)		
本時の目標	①自分の口腔粘膜細胞から簡易的な方法でDNAを抽出・可視化しほかの動植物(ブロッコリーやニワトリレバー)は実施済み)から抽出したDNAと比較し, 量こそ少ないが同じ物質であることが直感的にわかる。 <b>【観察・実験の技能・表現】</b> ②遺伝子研究におけるDNA増幅法(PCR法やLAMP法)の基礎的な部分を理解でき, 応用法を考えることができる。 <b>【知識・理解】</b>		
事前指導	前単元までに, ブロッコリーからのDNA抽出実験は経験済みであり, 本単元においては前時にPCR法の仕組みについて基本的な事項は学習済みである。		

過程	学習項目	教師の働きかけ	学習活動	評価の観点	指導上の留意点
導入5分	・本時の目標の提示と前時の振り返り	・前時までの復習(PCR法に代表される遺伝子の検出, ブロッコリー等からのDNA抽出)に関する質問 ・本時の説明をする。	・質問に答える。	・今日の実験に対する意欲をもてたか。 <b>【関心・意欲・態度】</b>	・プレゼンテーションを利用。

<p>展開① 40分</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・口腔粘膜細胞からのDNA抽出(実験)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・実験プリントを配布し必要な器具等を確認するよう指示する。</li> <li>・口腔粘膜を採取しDNA抽出液に懸濁させるように指示する。</li> <li>・マイクロチューブのふたを閉め、グループ毎にチューブたてにまとめ、恒温槽に入れさせる。</li> <li>・質問「恒温槽はなぜ37℃に設定されているのか。」</li> <li>・チューブを取り出しNaCl飽和溶液を2滴加えさせる。</li> <li>・質問「何のためにNaCl飽和溶液を加えるのか。」</li> <li>・観察用チューブに移し、冷やしたエタノールを静かに加えさせる。</li> <li>以後、よく冷やしながら注意深く観察させる。</li> <li>・質問「沈殿だけをうまく集めたい。どうすればよいか。」</li> <li>・別のマイクロチューブにピペットでDNAの結晶を採取し遠心分離したあと、上澄みをのぞき緩衝液を加えさせる。</li> <li>・溶かしたDNA溶液を用いて次の時間の性別判定を行うことを説明する。試料はグループに最低1つ用意させる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・机上の器具等を確認する。</li> <li>・綿棒2本の両端を使って計4回採取し、DNA抽出液に懸濁する。</li> <li>・マイクロチューブのふたを閉め、恒温槽に入れる。</li> <li>・質問に答える。</li> <li>・チューブを取り出しNaCl飽和溶液を2滴加える。</li> <li>・質問に答える。</li> <li>・観察用チューブに移し、冷やしたエタノールを静かに加え、冷やしながら様子を観察する。</li> <li>・質問に答える。</li> <li>・別のマイクロチューブにピペットでDNAの結晶を採取し遠心分離したあと、上澄みをのぞき緩衝液を加える。</li> <li>・説明を聞く。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・実験に前向きに取り組んでいるか。【関心・意欲・態度】</li> <li>・酵素の最適温度に気づくことができるか。【知識・理解】</li> <li>・以前の実験の内容を思い起こせるか。【知識・理解】</li> <li>・白くふわふわしたDNAの結晶が観察できたか。また、ブロッコリーと比較してどう思ったか。【思考・判断】</li> <li>・遠心分離に気づくことができるか。【思考・判断】</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・実験は起立して行わせる。</li> <li>・実験はプレゼンテーションを用いて足並みをそろえる。</li> <li>・念入りに採取させる。細胞の量で実験の成功、失敗が決まることを繰り返し言う。</li> <li>・恒温槽(×2)は実験開始までに37℃と65℃に設定しておく。</li> <li>・ブロッコリーや鶏レバーでDNAを抽出する場合と同じ理由である。</li> <li>・極めてゆっくりと加えさせる。</li> <li>・緩衝液については簡潔に説明する(pHを保つことで、DNAの破壊を防ぐことなど)。</li> <li>・グループのメンバーが全員DNA抽出に失敗した場合は、次時は他のグループと合同で行わせる。</li> </ul>
10分休憩					
<p>展開② 40分</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・抽出したDNAを用いた性別判定(LAMP法による特定の遺伝子の増幅・検出)(実験)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・グループ毎に試料が用意できているか確認させる。</li> <li>・教卓周りに集め、マイクロピペットやマイクロチューブについて使い方の説明を行う。</li> <li>・LAMP反応液①および②の入ったマイクロチューブをグループ毎に渡す。</li> <li>・DNA試料をそれぞれに5μlずつ入れるように指示する。</li> <li>・教卓に用意した発泡スチロール板にセットさせる。</li> <li>・65℃に設定した恒温槽に浮かべさせる。</li> <li>・補足プリントを配布し、性別判定およびLAMP法に関する説明をする。(30分)</li> <li>・恒温槽からグループの試料を取り出し、結果を観察するように指示する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・誰の試料を用いるか確認する。</li> <li>・教卓周辺に集まり、説明を聞く。</li> <li>・反応液×2とマイクロピペットと各グループの実験台に持って行く。</li> <li>・DNA試料をそれぞれ5μlずつ加える。</li> <li>・教卓に持って行く。</li> <li>・説明を聞く。</li> <li>・結果観察をする。観察結果は実験プリントの結果と考察に書き込む。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・意欲をもって取り組めるか。【関心・意欲・態度】</li> <li>・PCR法とLAMP法の違いが理解できたか。【知識・理解】</li> <li>・実験は成功したか。失敗なら理由は何であったか。【思考・判断】</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・何人かの生徒に実際にさわらせる。</li> <li>・これ以降の実験はプレゼンテーションを用いて足並みをそろえる。</li> <li>・ピペットチップは新しいものを使う。</li> <li>・やけどに注意する。</li> <li>・LAMP法については概念的な説明にとどめる(アニメーションなどを利用する)。</li> </ul>
<p>まとめ 5分</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・LAMP法の可能性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・質問「LAMP法を用いて細胞試料から迅速に性別判定ができることはどんなことに応用できそうか。」</li> <li>・後片づけを指示。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・質問に答える。</li> <li>・後片づけをする。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・新しいアイデアが浮かぶか。【思考・判断】</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・「牛胚の性別判定キット」は実際に市販されている。</li> </ul>



## 4. 授業の様子から

以下は実験プリントにあった生徒の感想（抜粋）である。

- DNAをうまく取り出すことができなくて残念だったが、友だちのDNAを使った増幅実験では実際に紫外線を当てると緑色に光ってすごいと思った。近いうちにDNAが病院などで使われる時がくるのかなあと思った。でも、個人データだからしっかりと管理する必要があると思う。
- いろいろ手間のかかる実験だったけど、楽しくできた。私のDNAはきれいに抽出できたが、DNA増幅の結果が確認できなかったのは残念でした。
- 1.5mlのマイクロチューブは小さくて手が震えた。
- 自分で自分のDNAを取り出せたことはすごいと思った。もっと他の生物のDNAも調べてみたいと思った。

生徒の感想にもあるが、1時間目に行ったDNAの抽出実験では、DNAの採取量には個人差があって（実験技能の違いおよび口腔粘膜細胞の採取に関しては個人差が大きいこと）、エタノール沈殿法ではほとんど目視することができない生徒もいた。また、DNA増幅実験（性別判定実験）では、時間がやや足りなかったこともあり、正しい増幅が確認できたのは、1グループだけであった。

自分で抽出したDNAを目視で確認し、そのDNAを用いて性別判定を行うという流れを重視したかったので、今回のような方法をとったわけであるが、この方法で抽出したDNAでは純度も低く、夾雑物も多いため、性別判定実験では結果がはっきりしないグループもあった。教師が行った予備実験の段階では、高い再現性で性別判定が可能であったが、実験操作が未熟な生徒では、再現性に問題が残った。

図6は今回の授業の様子である。実験の内容こそ難解であったが、ほとんどの生徒が意欲的に取り組めたのは、実験器具や容器の真新しさに加え、DNAを間近に見ることができることや最新の技術の一端に触れられるということに対する期待感の表れでもあったと思っている。

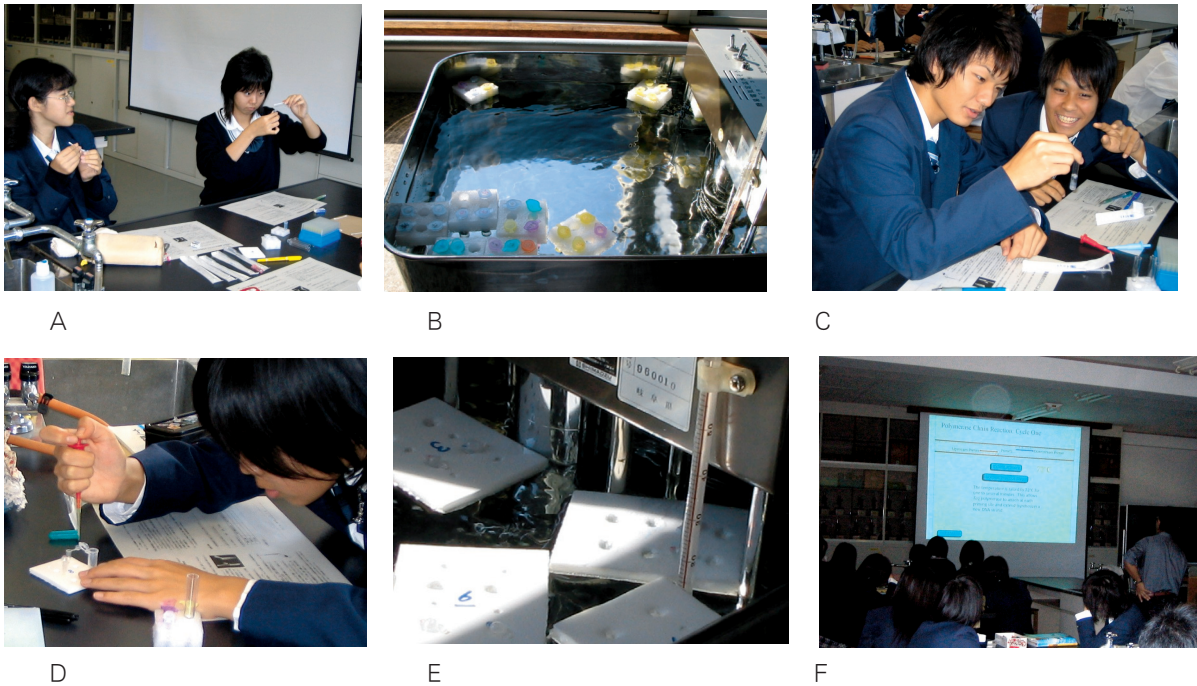


図6 授業の様子

- A：口腔上皮をDNA抽出液に懸濁　　B：DNA抽出液に懸濁した口腔上皮をインキュベート(37℃)  
 C：エタノール沈殿　　D：簡易マイクロピペット使用中　　E：LAMP反応インキュベート中  
 F：LAMP法インキュベートのための待ち時間を用いて行ったPCR法の復習

#### IV. まとめ

今回の研究と実践によって、高等学校の授業実験として遺伝子解析実験を行うという当初の目標は達成することができた。検出する遺伝子を男性に特異的なものとし、性別判定実験としたことによって、原理は高校生にも理解しやすいものになったと考えている。教師の側から見ると、LAMP法については、試薬の準備などに非常に手間がかかるので今すぐに取り入れるのは難しい面もあるが、将来的には、さらに簡易な方法でDNAを扱うこともできるようになるのではと期待している。

一方、生徒は自分自身の口腔粘膜細胞からDNAを取り出すことに対し非常に強い興味関心を示し、実験に積極的に取り組んだが、LAMP法による性別判定については、結果が明瞭に出なかったグループが多かったこともあり、もう一つ突っ込んだ考察（応用法など）がほとんどできなかったのが残念であった。またLAMP法自体の操作は、実際のDNA解析研究で用いられる様々な手法と比較すると極めて簡易ではあるのだが、高校生にとっては原理などやや難解な印象が強かったようである。今後は実験の結果がよりクリアに出るような工夫をすることが必要となる。

さて、今回は「DNA鑑定の基礎」として性別判定実験を行ったが、実際の社会ではDNA指紋を用いたDNA鑑定が最も一般的に行われており、生徒も強い興味を持っている。DNA指紋、すなわちSSR解析やPCR-RFLP法を駆使したDNA鑑定では、LAMP法で単一の遺伝子を検出するのは比較にならないほど多くのことを学べる。さすがにこれらの実験を高等学校の実験室で授業実験として行うことは難しいが、近年増えてきている高校と大学の連携として、大学の施設を借りて行うことはできる。まず、高校で遺伝子解析の基礎に触れ、次のステップとして、大学で深めるというような高大連携の実践がますます必要になっていると考えている。

#### V. 謝辞

授業実践に際してご協力いただきました、岐阜県立東濃高等学校の先生方および生徒諸君に深く感謝いたします。

#### VI. 参考文献・資料

- 1) Notomi, T., Okayama H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T., (2000) : Loop-mediated isothermal amplification of DNA *Nucleic Acid Research*, 2000., 28, e63
- 2) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T., (2001) : Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity delivered from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289,150
- 3) 伊左治錦司, 松本省吾 : 「遺伝子診断の教材化～ALDH2 (アルデヒド脱水素酵素2) 遺伝子におけるSNP (一塩基多型) タイピング～」岐阜大学教育学部研究報告 (自然科学) 第30巻 (2006) 21-33
- 4) 伊左治錦司, 松本省吾 : 「高等学校におけるDNA簡易抽出実験に関する教材開発」岐阜大学教育学部研究報告 (教育実践研究) 第7巻 (2005) 69-78
- 5) LAMP法プライマー設計支援ソフトウェア「Primer Explorer」 : <http://primerexplorer.jp/>
- 5) 栄研化学株式会社Webページ「Eiken GENOME SITE」 : <http://loopamp.eiken.co.jp/>