Biotechnology Explorer™

実習用テキスト

Secrets of the RainForest

カタログ番号
166-0006JEDU

www.bio-rad.com

Biotechnology Explorer プログラム

過去数十年にわたる技術の進歩により、バイオテクノロジーと呼ばれる科学の新しい領域が誕生し、生物学および生命科学の研究に変革が起きました。生命の基本的な構造単位である DNA の分離、分析をはじめ有用な実験手法が多く開発され、生体内で起こる反応過程を調べたり、ヒトの疾患状態および治療法において、すでに多数の進展がみられています。そのため、教育の場でも学生にこうした概念を教えることが次第に重要になってきています。来るべき数十年のあいだには、家庭医の通常の診察に一連の DNA 診断検査が含まれるようになったり、DNA フィンガープリント法が個人識別の最終的な方法となり、これらの原理を理解することが衛生学や栄養学の学習と同様に重要なこととなるかもしれません。

高校、短大、専門学校あるいは大学初年度レベルの学生をはじめ、多くの皆さんに、この新しい技術にふれていただくため、バイオ・ラッド社は、学生が実験を行ない、基本的な DNA を使用した実験を直接経験していただくための教科書と実験器材を含んだ学校教材キットを開発しました。この Biotechnology Explorer は、経験の有無を問わず、教室で教える科学と実際の科学のギャップを埋めようとしている先生方が、第一に選ぶプログラムとなりました。

この Biotechnology Explorer は非常にユニークで極めて革新的なものです。実験室での体験は学生の皆様の想像力をかきたてるでしょうし、彼らの生活、あるいは個人や社会の意思決定のあり方に次第に影響力を持つようになってきている、バイオテクノロジーの背後にある科学の認識と理解を深める事にもなるでしょう。

バイオテクノロジー教育の問題解決にクラゲが役立つ？

バイオテクノロジーや分子生物学を学ぶ人達が最初に感じることの一つは、なにがどんなプロセスを経て起こっているのかが目に見えないことです。このキットは、生物発光するクラゲの遺伝子とそれから作られる GFP(Green Fluorescent Protein)を用いることにより、その問題を解決しました。GFP は紫外線光を当てると、鮮やかな緑色の光を発するタンパク質です。この GFP の遺伝子は、元々は発光クラゲから分離されました。分離されたワイルドタイプのクラゲ遺伝子はアメリカ・カリフォルニアの Maxgen Inc.というバイオテクノロジー会社によって、GFP がより強い光を発するように改良されました。バイオ・ラッドでは、この改良された GFP 遺伝子を pGLO プラスミドに組み込み、教育用キットとして利用できるようにしました。

このキットではこの pGLO システムを用いて遺伝子工学の概念や基本的操作を学び、大腸菌の形質転換および、組換え蛍光タンパク質の産生と精製を行ないます。学生は、遺伝子導入、遺伝子調節、遺伝子発現および、タンパク質の精製過程の結果を、その経過に従って直接観察することができます。バイオ・ラッドの GFP を利用したカリキュラムはとてもユニークで、理科の先生方に非常に驚かれ、また興味を持って頂いています。

Secrets of the Rainforest ー 熱帯雨林の秘密

このキットは 50 分授業が 10 回分のバイオテクノロジー教育カリキュラムとなっており、学生はアンデス山中の熱帯雨林での冒険から開始して、新薬を開発しているバイオテクノロジー企業へと舞台を移し、最終的に米国食品医薬品局へと到達します。

この冒険は、ティシャーという女性が珍しい植物を求めて熱帯雨林を探索している最中に、原住民の少年から、胃癌を治癒させる力を有する不思議な緑の葉を持つ年老いた呪医の話を聞くところから始まります。少年はティシャーにこの葉が数枚入ったビンをくれ、ティシャーはこれを、ヒトの疾患を治療するための新しい医薬品を開発している架空のバイオテクノロジー企業、バイオテックス社に持ち帰ります。

バイオテックス社でティシャーは、この不思議な葉が紫外線光のもとで明るい緑の光を発することに気づきます。バイオテックス社では別の研究員が、この緑色蛍光物質がタンパク質であり、治療の力を秘めていることを突き止めます。今回のカリキュラムの最初の週では、学生はバイオテックス社の研究員となり、この葉からこのタンパク質を産生する DNA を取り出して、大腸菌に導入する方法について学びます。

学生は、GFP のクローン化遺伝子を含むバクテリアから GFP を精製することになります。この遺伝子は、胃癌を治癒する力を持ち緑色蛍光を発する不思議な葉に由来するものとされています。

Lesson 7〜10 で学生は、この医療用タンパク質を胃癌の治療薬として市場に出すための現実社会でのプロセスをシミュレートします。学生は、支援団体、今回のバイオテクノロジー企業、および米国食品医薬品局（FDA）のニーズおよび見解を検討することになります。学生は、現実世界での特定のシナリオに沿って、問題解決のために可能な戦略を立てることになります。この部分では、実際のバイオテクノロジー分野での行動が模倣されます。

今回のキットから得るものを最大限にするためには、学生が、遺伝子とは何かということを知っており、遺伝子とタンパク質との関係を理解しておく必要があります。このキットでは、クローニングが成功するはずなので、学生がクローニングの詳細を理解する必要はありません。

本キットは、教育実験手引書に代わって、現実社会での統合的な調査研究を行なわせるものです。回答または結果に焦点をあてるのではなく、慎重な観察とデータの解析によりどのようにして結果が得られそれが裏付けられたのかに焦点があてられています。バイオ・ラッドではこれからもカリキュラムや製品の改良を勧めていきます。皆様のお声はその意味でも大変重要です。ぜひご意見をお聞かせください。

！注意！

なお、このキットでは組換え体の大腸菌を利用して実験を行います。よって、文部科学省「組換え DNA 実験指針」の教育目的組換え DNA 実験の項に従って実験を行う必要があります。

目　次

教員用テキスト

教員用テキスト 2
キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧 1
＜キット内容物チェック(√)リスト＞ 1
Secrets of the Rainforest－授業のシナリオ 3
授業前の準備 5
授業前の準備 6
＜時間割例＞ 6
＜前準備の概要＞ 6
＜実験台チェック(√)リスト＞ 7
＜実験前準備＞ 9
キットを使用するにあたってのポイント 14
クイックガイド 20
学生・生徒用テキスト 25
Lesson 1　緑色蛍光を発する不思議な葉 26
◆質問 27
Lesson 2　クローニング 28
◆実験手順 29
◆質問 30
Lesson 3　スクリーニング 31
◆実験手順 32
◆質問 34
Lesson 4　精製段階 1－大腸菌の集菌 35
◆実験手順 36
◆質問 38
Lesson 5　精製段階 2－大腸菌の溶菌 39
◆実験手順 40
◆質問 42
Lesson 6　精製段階 3－タンパク質のクロマトグラフィー 43
◆実験手順 44
◆質問 46
Lesson 7　検定およびプラセボ 48
Lesson 8　市場販売－支援団体および見解 50
Lesson 9　市場販売－倫理的および経済的考察 51
◆質問　市場販売－倫理的および経済的考察 53

Lesson 10　生徒による発表 54
◆質問 56
◆学生による発表の基準 57
付録 A　用語集 58
付録 B　基本的概念 60
付録 C　安全性、無菌的操作および廃棄物処理 61
付録 D　胃癌に関する情報 62
付録 E　支援団体およびその見解 63
付録 F　教員用回答テキスト 64
付録 G　発現調節、1 遺伝子＝1 タンパク質 70
付録 H　教育目的遺伝子組換え実験実施の時の注意事項について 72

教員用テキスト

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧 1
＜キット内容物チェックリスト＞ 1
Secrets of the Rainforest－授業のシナリオ 3
授業前の準備 5
授業前の準備 6
＜時間割例＞ 6
＜前準備の概要＞ 6
＜実験台チェックリスト＞ 7
＜実験前準備＞ 9
キットを使用するにあたってのポイント 14
クイックガイド 20

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧

＜キット内容物チェック（√）リスト＞

このキットの構成物と、キット以外に必要になる試薬・器具等の一覧表です。1 キット＝4 人×8 班分の実験に必要な数になっています。準備の時の確認リストとしてお使いください。

キット内容物	数量／キット	(√)
・キット 1　Lesson 2 および 3－クローニングおよびスクリーニング		
大腸菌ライブラリー凍結乾燥品	1 バイアル	❑
LB 寒天培地プレート用タブレット	5 錠	❑
プラスチックプレート－60mm、滅菌済み	20 枚	❑
植付け用ループ－10 本入りパック	1 袋	❑
ピペット－滅菌済み、個別包装	10 本	❑
・キット 2　Lesson 4、5 および 6－精製		
アンピシリン－凍結乾燥品	1 バイアル	❑
アラビノース－凍結乾燥品	1 バイアル	❑
LB 培地用タブレット（50ml 用）	1 錠	❑
植付け用ループ－10 本入りパック	2 袋	❑
ピペット－滅菌済み、個別包装	40 本	❑
マイクロチューブ－2.0ml、透明	30 個	❑
培養用チューブ－15ml、滅菌済み（25 本パック）	1 袋	❑
採取用チューブ－5ml、ポリスチレン製	25 本	❑
TE 緩衝液（10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0；滅菌済み）	1 ボトル	❑
リゾチーム－凍結乾燥品	1 ボトル	❑
結合用緩衝液（4M $(NH_4)_2SO_4$）TE/pH 8.0	1 ボトル	❑
平衡化緩衝液（2M $(NH_4)_2SO_4$）TE/pH 8.0	1 ボトル	❑
洗浄用緩衝液（1.3M $(NH_4)_2SO_4$）TE/pH 8.0	1 ボトル	❑
HIC クロマトグラフィーカラム	8 本	❑
カラム末端キャップ	1 袋	❑

本キットに含まれていない付属品	数量／クラス	(√)
電子レンジ	1	❑
オートクレーブ	1	❑
温度調整可能なウォーターバス(1～6 L)	1	❑
クラッシュアイスとボックス	1～8	❑
1L 用フラスコ	1	❑
250 ml 用フラスコ	1	❑
100 ml および 250 ml のメスシリンダー	1	❑
蒸留水(ピペット洗浄用＋培地用)	～4.5L	❑
温度計	1	❑
遠心分離機	1	❑
ピペット洗浄用の水の入ったビーカー	1	❑
使用済みピペットやループを入れるための容器	4～8	❑
長波長 UV ランプ	1～8	❑
ゴーグルまたはシールド	1～8	❑
タイマー	1～8	❑
ハサミ	8 本	❑
カラーマーカー	8 セット	❑
インキュベーター(培養用)	1	❑
70%エタノール	適量	❑
ガスバーナー	8 つ	❑
実験用白衣	人数分	❑
Jellyfish フォームフロート(166-0479、8 枚)マイクロチューブ浮遊用	8	❑

Secrets of the Rainforest－授業のシナリオ

◆Lesson 1　緑色の蛍光を発する不思議な葉

ティシャーは、アンデス山中の熱帯雨林を探索している最中に緑色の薬用植物の葉を入手し、癌の治療薬について研究しているバイオテクノロジー企業であるバイオテックス社に持ち帰りました。バイオテックス社の社員は、この葉に緑色蛍光タンパク質が含まれていることを突き止め、この葉から得られた DNA を大腸菌に導入します。

◆Lesson 2 および 3　不思議な葉からの遺伝子のクローニング

この薬用植物の葉から採取した遺伝子を無作為に切断してプラスミドベクターとつなぎ合わせ、このプラスミドベクターを大腸菌内に入れます。長波長紫外線光の下では GFP 遺伝子を取り入れた大腸菌のみが明るい緑色の蛍光を発します。Lesson 2 および 3 では、学生はこれらの大腸菌を他の大腸菌から見つけ出して、分離しなければなりません。この GFP 遺伝子を有する大腸菌を見つけ出すために、学生はまず、大腸菌の栄養物を含む寒天培地プレート上に、大腸菌ライブラリを塗抹しなければなりません。寒天培地プレート上で大腸菌を分離して個々の菌体が同一細胞の集塊（コロニー）を形成できるようにしたこの手法を、クローニングと呼びます。次ページの図を参照してください。

◆Lesson 4、5 および 6　緑色蛍光タンパク質の精製

バイオテックス社の技術者は、他の大腸菌タンパク質から GFP を分離しなければなりません。この段階では、学生は大腸菌細胞を培養し、簡単な手法を用いて大腸菌抽出物を調製、これをクロマトグラフィーカラムに流して混在する大腸菌タンパク質から GFP を分離することになります。精製 GFP タンパク質が得られ、これについて、胃癌治療能の検討を行なうことができるようになります。

◆Lesson 7　検定およびプラセボ

精製したタンパク質をヒトで検定する前に、学生はまず、ラットまたはマウスの胃癌で検討を行なわなければなりません。このタンパク質が実際に作用するかどうかを決定するために、学生は対照薬またはプラセボの利用法について学ぶことになります。米国食品医薬品局（FDA）では、バイオテックス社の実験を検討し、このタンパク質が安全で、望ましくない副作用を生ずることなく胃癌を実際に治癒するか否かを決定することになります。

◆Lesson 8 および 9　倫理的および経済的考察

この項では、学生はタンパク質をどのようにして市販製品にするかについての方法を学びます。学生はシナリオから、FDA、社会的通念、患者支援団体、およびバイオテックス社の社員という、4 つの主要な見解を知ることになります。学生が今回の新しいタンパク質を市場に出そうとする場合には、この授業の中で提示されている実社会での問題を解決しなければなりません。

◆Lesson 10　学生による発表

この最後の授業では、学生は Lesson 1 から 9 で学んだ知識を利用して、Lesson 10 に提示された問題のうちの一つについて、その解決法を示すことになります。

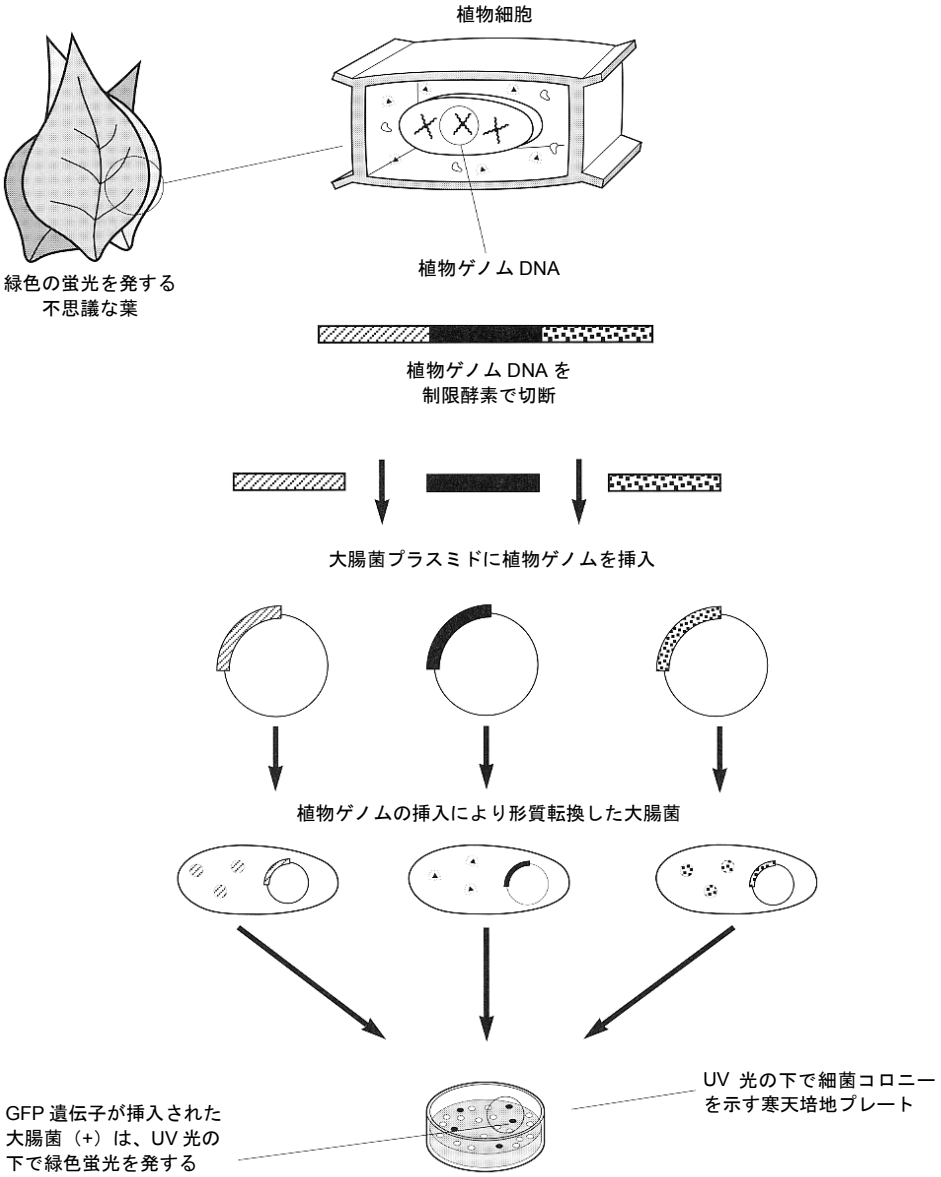
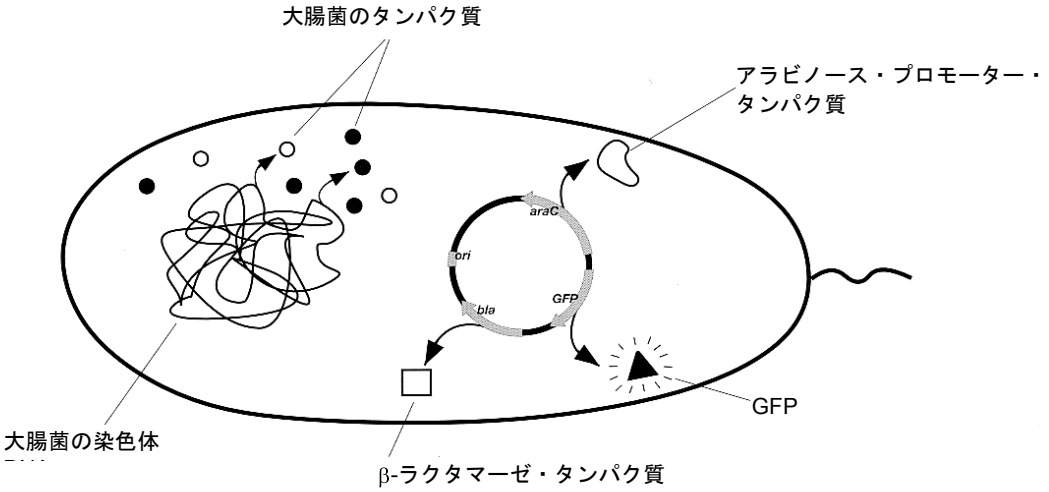


図. 薬用植物からの遺伝子クローニング



大腸菌に新しい遺伝子を挿入するために使われる、遺伝子工学的に作られたプラスミド

「*GFP*」	GFP 遺伝子	▲
「*bla*」	β-ラクタマーゼの暗号を持つ遺伝子。β-ラクタマーゼは大腸菌を抗生物質（アンピシリン）に対して耐性にするタンパク質。	□
「*araC*」	アラビノース C の暗号を持つ遺伝子。アラビノース C は GFP の発現を調整するタンパク質。	

授業前の準備

＜時間割例＞

このキットは、下記の例のように 5 回の学生実習を含む 10 回の授業で行えるように組まれています。また、実験を含む授業は、連続した 50 分の授業の中で行なうようデザインされています。他の講義やディスカッションの部分に関しては、先生方の都合や生徒や学生のレベル等に合わせてカリキュラムを組んでください。

Lesson 1	導入。講義および考察。
Lesson 2（実験）	寒天培地プレートへの大腸菌ライブラリの塗抹
Lesson 3（実験）	大腸菌ライブラリのスクリーニングおよび選択したクローンの液体培地での増殖（振盪器が利用できない場合には 2 日を要することがあります。）
Lesson 4（実験）	遠心分離による大腸菌の集菌
Lesson 5（実験）	溶菌（大腸菌のこじ開け）によるタンパク質の放出
Lesson 6（実験）	タンパク質用クロマトグラフィーを用いての GFP の精製
Lesson 7	検定。蛍光タンパク質とプラセボの試験結果の比較。
Lesson 8	問題。見解を識別し、経済的な考察を検討。
Lesson 9	選択したシナリオについて、教室内で発表する準備。
Lesson 10	教室内での学生の問題解決法発表。

＜前準備の概要＞

この項では、教員用の部分について、前準備のスケジュール例を概説します。詳細な前準備テキストは、9 ページから掲載します。

前準備の行動	時　期	必要な時間
本キットについてのマニュアルを読む	ただちに	1 時間
寒天培地プレートを調製し、作製する（20 枚）	Lesson 2 の 2～5 日前	1 時間
液体培地を調製する	Lesson 2 の 2～5 日前	15 分
大腸菌ライブラリを溶解する	Lesson 2 の当日	5 分
実験台の準備	各々の Lesson　日	5 分／日

＜実験台チェック(√)リスト＞

◆学生用実験台

各々の実験を開始する前にそれぞれの学生用実験台に準備しておかなければならない材料および器具を以下に示します。本キット内には、4 人×8 班分の実験に十分な量が含まれています。

◆教員用(共通)実験台

各々の実験中、すべての学生グループが利用することのできる共通場所に準備しておかなければならない材料、器具および装置のリストについても、以下に示します。共通の試薬や機器を学生が利用するようにするか、または、先生が試薬や装置等を分配するかどうかについては、その都度調整をしてください。

Lesson 2

・学生用実験台	数量
植付け用ループ滅菌済み	1
調製済み寒天培地プレート培地	2
油性ペン	1
・教員用実験台	
溶解済みバクテリアライブラリ	1
37℃インキュベーター	1

Lesson 3

・学生用実験台	
コロニーの生えたバクテリア培地	2
植付け用ループ	2
培養用チューブ	2
油性ペン	1
試験管立て	1
・教員用実験台	
振盪培養器または回転台	1
長波長 UV ランプ及びゴーグル	1～8

Lesson 4

学生用実験台	数量
・マイクロチューブ	1
ピペット	1
マイクロチューブ立て	1
マーカー	1
ピペット洗浄用の水の入った	1
ビーカー	
・教員用実験台	
TE 緩衝液	1
リゾチーム(溶解済み)	1
遠心分離機	1
長波長 UV ランプ及びゴーグル	1～8

Lesson 5

・学生用実験台	数量
マイクロチューブ	1
ピペット	1
マイクロチューブ立て	1
マーカー	1
ピペット洗浄用の水の入った	1
ビーカー	
HIC クロマトグラフィーカラム	1
カラム末端キャップ	1
・教員用実験台	
結合用緩衝液	1
平衡化緩衝液	1
遠心分離機	1
長波長 UV ランプ及びゴーグル	1～8

Lesson 6

・学生用実験台	
採取用チューブ	
ピペット	3
マイクロチューブ立て	1
ピペット洗浄用の水の入った	1
ビーカー	1
HIC クロマトグラフィーカラム	1
カラム末端キャップ	1
・教員用実験台	
洗浄用緩衝液	1
平衡化緩衝液	1
TE 緩衝液	1
長波長 UV ランプ及びゴーグル	1～8

Lesson 7、8、9 および 10

・学生用実験台

コンピュータおよびインターネット

アクセス環境

＜実験前準備＞

この項では、Lesson 2 から 6 のために先生が前もって行なっておくべき準備について記述します。

Lesson 2 前準備

目 的　・寒天培地プレートの準備

・液体培地の準備

・大腸菌ライブラリの溶解

・学生用および教員用実験台の準備

必要な時間　およそ 1 時間 15 分

注意：以下の材料を準備する際には、無菌的操作が必要になります。（付録 C を参照のこと）

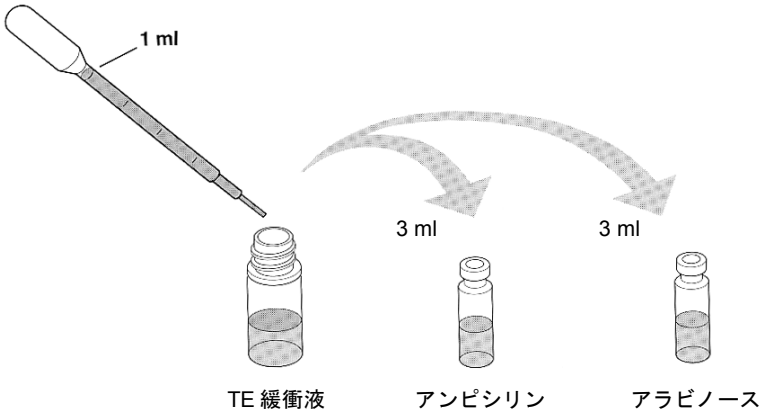
Lesson 2 を開始するためには、学生は各々の実験台に 2 枚の寒天培地プレートを必要とし、大腸菌ライブラリは溶解しておく必要があります。

1. アンピシリンおよびアラビノース溶液の調製

アンピシリンとアラビノースは、小さなボトルに乾燥させた状態でキットに含まれています。溶解後、両方を、まだ液体の寒天培地プレート（プレートに流し込む前）および液体培地に加えます。アンピシリンは、環境中から混入する可能性のあるバクテリアの増殖を抑制する抗生物質です。アラビノースは糖の一種で、クローン化した菌体での GFP の過剰発現を促進します。アンピシリンとアラビノースの機能については、付録 A および B を参照してください。

滅菌済みピペットを用いて、アンピシリンを入れたボトルに 3ml の TE 緩衝液を直接加えます。別の滅菌済みピペットを用いて 3ml の TE 緩衝液を加えて、アラビノースを溶解します。溶解を促進するために、ボトルを混和し、穏やかに撹拌します。

注意：アンピシリンとアラビノースは、寒天培地プレートを調製する当日に溶解してください。アラビノースが完全に溶解するには 10 分必要です。

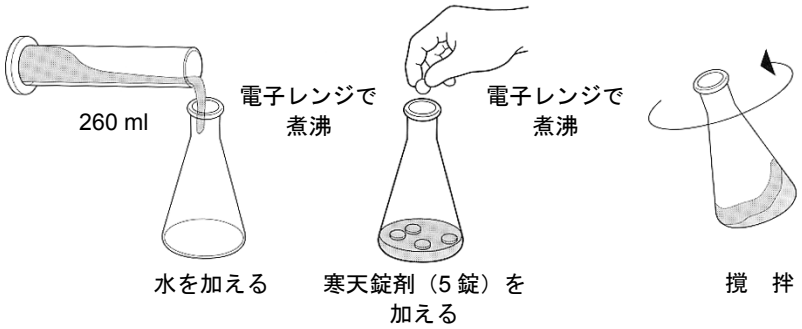


2. LB 寒天培地の調製

注意：寒天培地プレートは、Lesson 2 の開始の少なくとも 2 日前に調製してください。

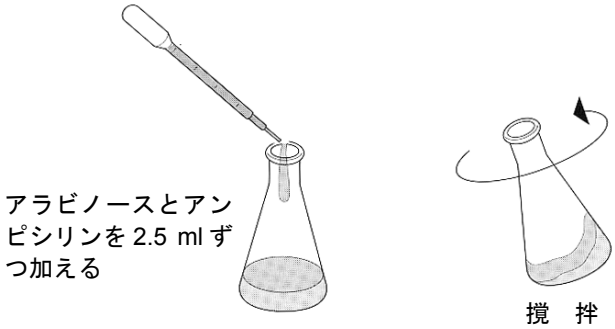
蓋をしたプレートを放置しておくと週末の間に適度に乾燥するため、この作業は金曜日に行なうと都合がよいでしょう。室温で 2 日間放置すると寒天が十分に固まり、大腸菌ライブラリが得やすくなります。実験よりも 2 日以上前に調製したプレートは、使用時まで冷蔵庫内で保存します。

A.　寒天の調製では、まず、1L の三角フラスコに 260 ml の蒸留水を加えて、電子レンジ内で沸騰するまで加熱します。この時、突沸しないように注意しながら、溶液中に泡が出てきたところで加熱を止めます。5 錠の LB 寒天タブレットをフラスコに入れ、熱水の中に 20 分間浸します。これにより、溶解が早まり、寒天粒子の凝集が避けられます。フラスコをゆっくりと、軽く揺らしたら、再び電子レンジで、突沸しないように注意しながら加熱します。溶液中に泡が出てきたところで加熱を止め、一度電子レンジから取り出してフラスコを揺らして寒天粉末を溶解します。数回揺らしても粉末が残っているようであれば、再度電子レンジで加熱し、完全に粉末が溶解するまで繰り返します。（フラスコが熱くなりますので、耐熱手袋を着用して行って下さい）。



B.　プレートに流し込む前に、アンピシリンおよびアラビノースを液状寒天培地に加えます。寒天粉末が完全に溶けたら、溶液が均一になるように（ムラがあると溶液中によどみが見えます）フラスコを揺らし混ぜ、手で持てるまで冷ます。アンピシリン、アラビノースは 50℃以上になると分解されてしまいますので、それ以下に下がっていることを確認してください。液状寒天培地が冷めたら、新しい滅菌済みピペットを用いて、調製しておいた 2.5ml のアンピシリン溶液をフラスコ内の寒天に加えます。新しいピペットを用いて、2.5ml のアラビノース溶液を、手で触れるぐらいまで冷却した液状寒天培地に加えます。撹拌して混和します。寒天は 27℃で固化するため、アンピシリンとアラビノースを加えた後は、最初から終わりまで一気に、20 枚のプレートに寒天を注ぎ入れます。

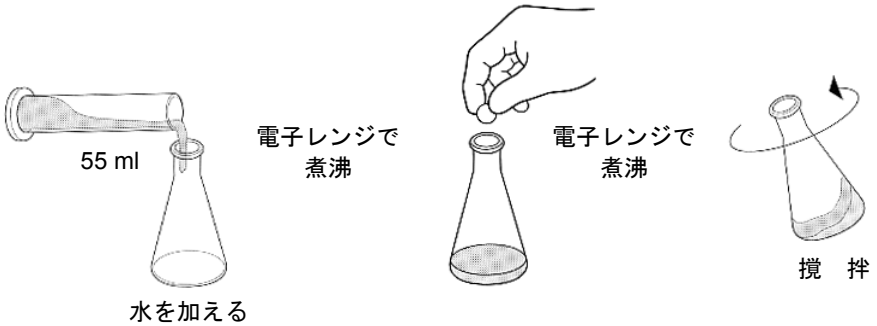
次のステップで、残った 0.5ml のアンピシリンとアラビノースを用いて、液体培地を調製します。



3. LB 液体培地の調製

注意：培地を調製する際には、無菌的操作にて行なってください。液体培地は Lesson 3 で使用しますが、寒天培地プレートと同日に調製すると都合がよいため、この項をここに掲載します。手順は寒天培地プレートの調製手順に似ており、並行して行うことができます。

Lesson 3 では、各々の学生用実験台に、2ml の液体培地を入れた培養用チューブが 2 本必要になります。これらは、大腸菌の培養に使用します。液体培地を調製するためには、55ml の蒸留水を 250ml の三角フラスコに入れ、電子レンジで煮沸するまで加熱します。ついで、LB タブレット 1 錠をフラスコに加えます。タブレットを熱水に数分間浸します。これにより、溶解が容易となります。再度フラスコを電子レンジで加熱して煮沸させます。タブレットが溶解するまで、加熱と撹拌を数回繰り返しますが、撹拌の前にフラスコを少し冷却して、熱した培地が突沸して手にかからないように注意します。

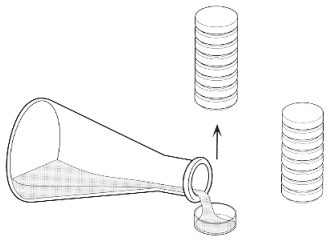


タブレットが完全に溶解したら、50℃以下になるまで、LB 培地を放置して冷却させます。培地を冷却している間に、上述のステップ 1 で調製したアンピシリンとアラビノースを用意します。培地が冷却したら、残りの 0.5ml のアンピシリンとアラビノースをフラスコに移します。

新しいピペットを用いて、2ml の液体培地を 16 本の培養用チューブに分注します。（このステップは、滅菌済みピペットで 1ml ずつを 2 回移しいれることにより行なうことも可能です。）培養用チューブは使用日当日まで冷蔵庫内で貯蔵します。9 本の予備の培養用チューブが添付されています。この予備の試験管にも培地を入れ、Lesson 3 で予備の培地として使用しても差し支えありません。

4. 寒天培地プレートの調製

空のプレート(蓋をしたもの)を 4～8 枚ずつ、積み重ねます。一番下のプレートから順に、一方の手で蓋を持ち上げて(その上のプレートと共に)脇によけ、もう一方の手で寒天を注ぎ込みます。プレートが寒天で 1/3 ほど(＜12ml)満たされたら蓋を戻し、その上の段で同様の作業を行ないます。この方法で 20 枚のプレートに寒天を注ぎ込みます。ご自分のやり方でプレートの寒天を注ぎ込むのでも構いません。寒天は、15～20 分で固化するはずです。



注意:プレートに寒天を注ぎ込んだ後は、寒天が固化するまで動かさないようにしてください。

5. 寒天培地プレートの保存

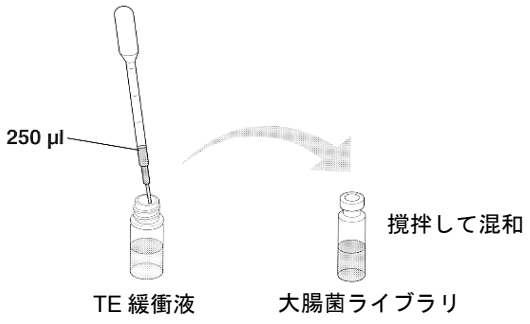
寒天培地プレートは室温で 2 日間固化させた後、積み重ねて(20 枚まで)プラスチック製のフィルムで覆います。ついで、積み重ねたものを逆さまにして、フィルムをテープで閉じます。

6. 大腸菌ライブラリの溶解

注意: ①Lesson 2 の当日に溶解してください。

②この大腸菌は組換え体を含んでいるため、以後の実験は組換え DNA 実験にあたります。
詳細については付録 H をご参考下さい。

大腸菌ライブラリは凍結乾燥させた状態でキットに含まれていますので、Lesson 2 の当日に溶解してください。外部から汚染されている可能性があるため、大腸菌ライブラリの溶解はLesson 2の当日に行なうようにしてください。新しい滅菌済みピペットを用いて、250μl の TE 緩衝液を大腸菌ライブラリのボトルに加えます。穏やかに撹拌して懸濁してください。溶液中では大腸菌は沈殿しやすいですので、学生グループがプレートに大腸菌を塗抹する際には、その前に、ボトルを十分に混和してください。



Lesson 3 前準備

目　的　・実験台の準備

・回転台、振盪培養器またはインキュベーターの準備

必要な時間　10 分

Lesson 3 では、各々の学生用実験台には、上述のステップ 3 で調製した液体培地をそれぞれ 2ml ずつ入れた 15ml 用培養用チューブが 2 本ずつ必要となります。

Lesson 4 前準備

目　的　・実験台の準備

・リゾチームの溶解

必要な時間　10 分

Lesson 4 の当日に、新しいピペットを用いて、1ml の TE 緩衝液により、凍結乾燥させたリゾチームを溶解します。穏やかに混和して、懸濁させます。リゾチームのボトルは使用時まで、氷槽上または冷蔵庫内で保管します。

Lesson 5 前準備

目　的　・実験台の準備（必要な準備はこれだけ）

必要な時間　10 分

Lesson 6 前準備

目　的　・実験台の準備（必要な準備はこれだけ）

必要な時間　10 分

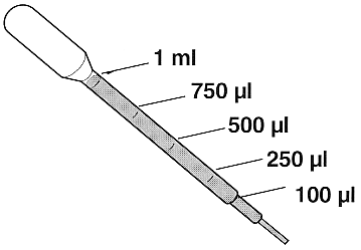
キットを使用するにあたってのポイント

この項では、技術的に困難な実験手順、実験全般の結果および実験の理解にきわめて重要な実験手順のステップについて記述します。先生は、これらのポイントを学生に十分説明し、可能であれば生徒たちが実験を行う前に、実際の操作を見せてあげてください。

学生・生徒用テキストには、すべての実験手順および Lesson 2～6 で利用されている技術についての詳細な記述と図が掲載されています。実験で利用される実験プロトコールの特定の手順についての質問には、学生・生徒用テキストを参照してください。

＜ピペットの利用法＞

実験開始前に、学生にはピペットの標線について確認しておいてください。Lesson 4～6 では、250μl と 1ml をよくは量り取ることが多いので、その量を量り取る練習をしておくと良いでしょう。



＜大腸菌の取り扱い＞

このキットで使用する K-12:HB101 という種類の大腸菌は、世間を騒がせている大腸菌 O-157:H7 のような病原性は持ちません。 もちろん、遺伝子組換え実験を行った後の大腸菌も同様です。

この大腸菌は組換え DNA 実験（形質転換実験）には非常に適した生物であり、バイオテクノロジーを用いた研究では頻繁に利用されています。その理由は、単細胞生物で、20 分毎に増殖し、さらにこの種類の大腸菌は人間に対して毒性はなく、研究室外の環境では生育できないからです。このことは生徒達に充分理解させておいてください。

しかし、安全性の有無に関らず、遺伝子組換え実験を行う場合は遺伝子組換え生物等使用のための法律や関係規則、省令等に従う必要があります。（付録 H）また、地域によっては、その特別に法令等を設けている自治体もありますので、確認をお願いします。

実験を行う実験室は P1 レベルの実験室でなくてはいけません。（付録 H） 実験台の表面は実験終了後、または菌体を含む溶液がこぼれたら素早く拭き取り、必ず 70％エタノール水溶液を拭きかけて、ペーパータオル等で拭いてください。また、菌を含むものは液体や固体に関わらず、廃棄する前にオートクレーブをかけてください。また、組換え DNA を導入された生物を含むサンプルを扱った後、実験室を出る前には必ず手を洗ってください。全ての操作はエアロゾルを最小にするために慎重に行ってください。このキットでは使用しませんが、ガラスピペットを使用する際には、口で吸うのではなく、自動吸引をお使いください。実験室での飲食、喫煙や化粧直し等は厳禁です。

また、実験後、作成した組換え大腸菌を保管する場合はそのプレート等にはもちろん、保管する冷蔵庫等にも組換え体保管中の表記をしてください。誰が見てもそこに「組換え大腸菌があるので取扱に注意が必要であること」が分かるように明記する事が重要です。

法律等に関する詳細は文部科学省ホームページをご参照ください。
（http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/index.htm）

＜洗浄方法と廃棄方法について＞

使用した植付け用ループやピペット等の、実験中にバクテリアが混じった溶液や触れた器具は使用後に必ず、全て回収し、オートクレーブ処理をし、その後廃棄してください。オートクレーブがどうしてもない場合は、圧力鍋（120℃以上で加熱できるもの）でも代用することは可能です。

一度殺菌したプレートは二重に袋に入れて、通常のゴミとして捨てても大丈夫ですが、廃棄物処理方法は自治体によっても違うことがあります。廃棄物処理業者（特にバイオハザードの廃棄物の取り扱い経験のあるような）に確認してみるのも良いかもしれません。

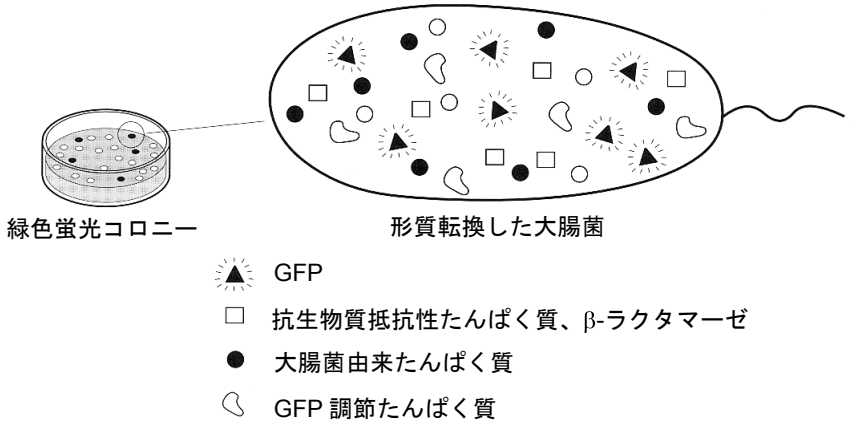
＜UV ランプ＞

紫外線は目や皮膚にダメージを与えます。長波長 UV は短波長 UV 光よりも与えるダメージは小さくなります。このキットでおすすめしているバイオ・ラッド製の UV ランプは長波長 UV です。また、一般的なブラックライトでも使用可能です。

UV 照射する時は、シールドを用いるかゴーグルの着用をおすすめします。

Lesson 2 単一コロニー発生のための寒天培地プレートへの塗抹

大腸菌ライブラリを塗抹する目的は、濃縮大腸菌懸濁液から、寒天培地プレート上で単一コロニーを生じさせるためです。学生・生徒用テキストにはこの手順について詳細に記述されています。学生には、溶解した大腸菌ライブラリに植付け用ループを差し込んだ後にループに余分な液体が認められてはならないこと、および、少量の大腸菌懸濁液で十分であることを強調しておいて下さい。適切な条件下では、一つの細胞が 24 時間で、遺伝的に同一な数百万もの細胞（コロニー）に増殖します。一つのバクテリアコロニーには 100 万個以上の菌体が存在している可能性があります。



キット内には予備のプレートが 4 枚入っています。これらのプレートは、線を描くような塗抹の実演に使用しても構いませんし、自分たちのプレートで単一コロニーがうまく得られなかった学生グループのための予備のプレートとして使用しても構いません。

Lesson 3 コロニーの分離と液体培地での増殖

この項では、学生は寒天培地プレートから白色コロニー1 つと緑色コロニー1 つを選び、別の液体培地でこれを培養させます。液体培地への移植では、分離した単独コロニー（寒天培地プレート上で他のコロニーから分かれているもの）を選択することがきわめて重要です。大腸菌コロニーは単独の大腸菌細胞から生じています。

コロニーからの採取では、無菌的に行うことが大切です。何かのミスにより学生グループが緑色培養物を得られなかったときのために、緑色コロニーを接種した予備の培養用チューブを用意しておくとよいでしょう。

寒天培地プレートで培養した緑色コロニーの大腸菌は、GFP に対する遺伝子を含むプラスミドにより遺伝的に形質転換を受けています。学生が選択して培養させることになる大腸菌は、この大腸菌です。このプラスミドには、GFP 遺伝子の他に、抗生物質のアンピシリンに対する抵抗性を大腸菌に与える遺伝子が含まれています。最後に、このプラスミドには、GFP の産生を制御する（スイッチを入れたり切ったりする）タンパク質に対する遺伝子が含まれています。

（遺伝子調節の詳細については、付録 B を参照してください。）

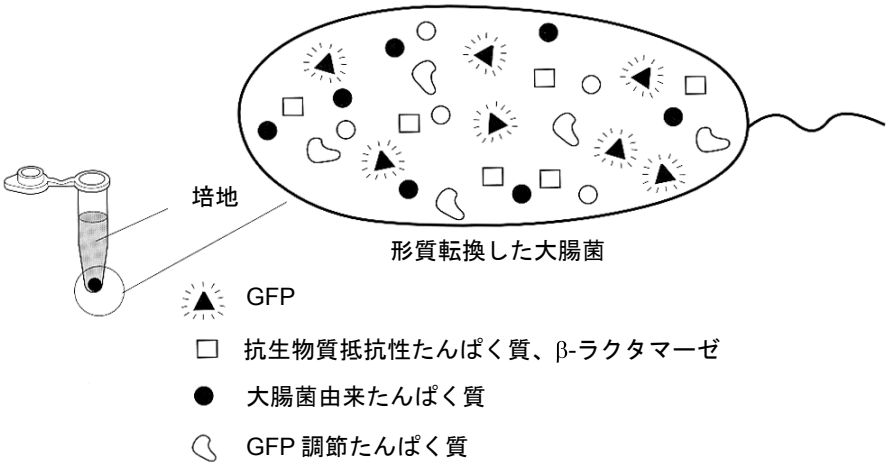
＜液体培地での一晩培養＞

タンパク質の適切な折りたたみと蛍光発光のためには、GFP 遺伝子は 32℃（またはそれ以下）の温度での培養を必要とします。32℃のインキュベーターが入手できない場合には、大腸菌を室温で振盪培養することも可能ですが、この場合には、長時間の培養を必要とします。このステップでは、液体培地で十分な増殖が得られ、振盪を行なわなくとも、32℃で一晩培養するだけでタンパク質が産生されることがわかっています。しかし、液体培地を激しく浸透すると個々の菌体に十分な酸素が供給され、増殖が速くなります。培養後、(+)の液体培地は UV 光を照射すると明るい緑色の蛍光を発するはずです。

Lesson 4 液体倍地中の大腸菌の濃縮

遠心分離とは、高速回転を利用して、質量により粒子を分離する際に利用される方法です（洗濯機の脱水のときに、衣類が洗濯機の壁面に張りつく現象に似ています）。今回の実験では、遠心分離により、試験管の底部には大腸菌の沈殿が生じ、沈殿の上部には上澄み液が生じます。

学生は、使い捨てピペットを用いて、培養用チューブから 2ml を慎重にマイクロチューブに移します。その後、高速回転（遠心）させて大腸菌の集塊をマイクロチューブの底部に落とし、上澄み液を流し出します。学生が遠心分離機のバランスの取り方および適切な操作法を知っているかどうかを確認してください。大腸菌内にある GFP が発現しているため、この段階で、沈殿は UV 光の下で明るい緑色蛍光を発します（下図を参照してください）。



Lesson 5 タンパク質のクロマトグラフィーのための大腸菌溶解産物の調製

＜大腸菌沈殿物の懸濁＞

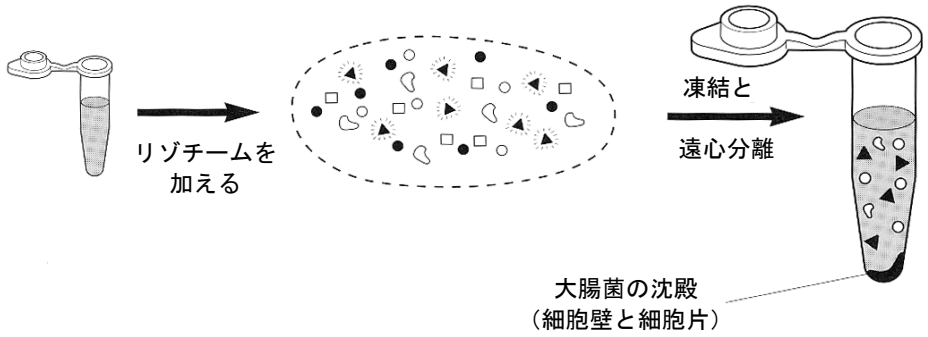
プロトコールのこの段階では、前回の実験で濃縮されたすべての大腸菌の沈殿物を TE 緩衝液に再懸濁する必要があります。学生は、大腸菌の沈殿物に 250μl の TE 緩衝液を加え、ついで、250μl をピペットで急速かつ慎重に吸い上げたり吐き出させたりすることにより、大腸菌沈殿物を懸濁しなければなりません。（ボルテックスミキサーが利用できる場合には、穏やかな振盪撹拌によって懸濁させることもできます。）チューブ内の液体を肉眼的に観察します。大きな塊が認められた場合には、ピペットによる操作を継続し、大腸菌を十分に懸濁させます。

＜リゾチーム＞

リゾチームは、バクテリア細胞壁を破壊（溶解）する機能を有した酵素です。今回の実験で行なう凍結融解手順により、細胞壁および内部の膜が完全に破壊して（溶菌）、GFP を含む可溶性内容物が放出されます。

＜バクテリア細胞片の遠心分離＞

この最後の遠心分離では、大きな大腸菌細胞片を、GFP などの小さなタンパク質から分離します。細胞片はマイクロチューブの底部で沈殿を生じ、タンパク質は上澄み液に残ります（下図参照）。上澄み液には GFP が含まれているため、UV 光の下で明るい緑色の蛍光を発します。ついで学生は、きれいな 1ml のピペットを用いて、沈殿から上澄み液を慎重に取り出し、ラベルをつけた新しい 2.0ml のマイクロチューブに移すことになります。この時、沈殿物を吸い取らないように注意します。



Lesson 6 タンパク質のクロマトグラフィー

クロマトグラフィーは、複雑な混合物からタンパク質を分離するための強力な手法です。大腸菌には数千種類もの大腸菌タンパク質が含まれており、ここから GFP を分離しなければなりません。

＜疎水的相互作用クロマトグラフィー（HIC）＞

Lesson 6 では、上澄み液中の可溶性GFPを疎水的相互作用クロマトグラフィー（HIC）を用いて精製します。GFPの表面はきわめて疎水性（水を嫌う性質）です。塩類溶液中では、タンパク質のこれらの部分は、他の疎水性表面と強く結合する傾向があります。GFP を含むタンパク質混合液を、疎水性ビーズを充填したカラムに流し込みます。ビーズが塩類溶液中にある場合には、GFP のような疎水性タンパク質はカラム内を通過しながら、ビーズと結合し、その他のタンパク質は流れ落ちます。塩類を取り除くと、GFP タンパク質の形状が変化し、疎水性表面がそれまでほど表に現われなくなります。その結果、GFP はビーズと結合しなくなり、カラムの底部から流出します。この方法で、GFP を他の大腸菌タンパク質と分離することが可能です。

・緩衝液…HIC 手順では 4 種類の異なる緩衝液を使用します。

・平衡化緩衝液…塩類緩衝液（2.0M $(NH_4)_2SO_4$）で、GFP の結合に利用するクロマトグラフィーカラムの平衡化または前調製に使用します。

・結合用緩衝液…等容量の高塩濃度結合用緩衝液（4.0M $(NH_4)_2SO_4$）をバクテリア溶解産物に加え、最終的に、GFP を含有するバクテリア溶解産物の塩濃度を平衡化したカラムと同一（2.0M $(NH_4)_2SO_4$）になるようにします。

・洗浄用緩衝液…中等度の塩濃度の緩衝液（1.3M $(NH_4)_2SO_4$）を用いて、弱く結合しているタンパク質をカラムから洗い流します。疎水性の高いタンパク質（GFP など）はカラムに結合したまま残ります。洗浄用緩衝液をカラムに流しいれると、GFP の輪がカラムベッドの上表面に浸透し始めるはずです。

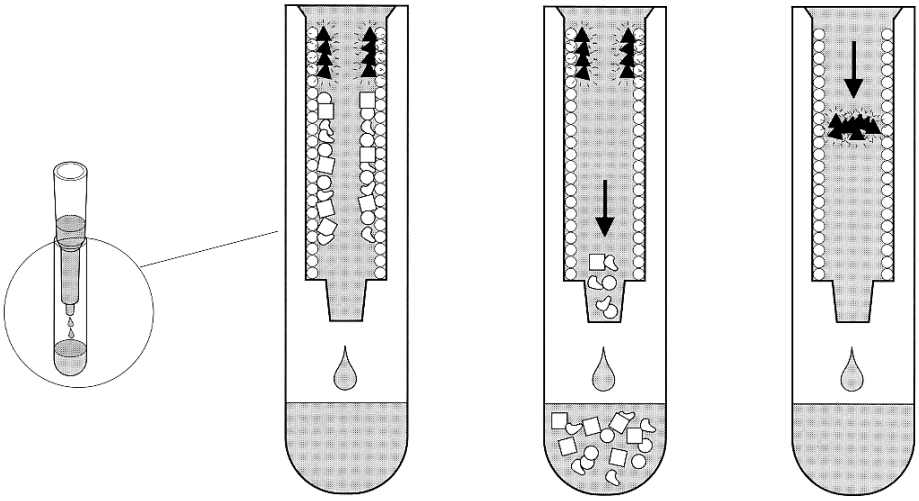
・溶出用緩衝液…低塩濃度緩衝液（TE 溶液；10mM Tris/EDTA）を用いて、カラムから GFP を洗い流します。上述のようにして、0.75ml の TE 緩衝液をカラムに流し込みます。GFP がカラムの中を通過し、これは、緑色の蛍光の輪として観察されます（UV 光下で）。クロマトグラフィーが成功すれば、採取用チューブの 3 が明るい緑色の蛍光を発します。すべての GFP が完全に溶出されなかった場合には、さらに 250μl の TE 緩衝液を加えても差し支えありません。

・緩衝液の貯蔵…採取用チューブとその内容物は、すべてにしっかりと蓋をすれば、冷蔵庫内で 1～2 週間貯蔵することができます。

＜クロマトグラフィーのための重要なヒント＞

1. カラムを採取用チューブにセットします。採取用チューブにカラムを固く押し込むと、空気が閉じ込められて、試料が流れてゆかなくなりますので、カラムはコレクションチューブの上に軽く置く程度にセッティングすると良いでしょう。

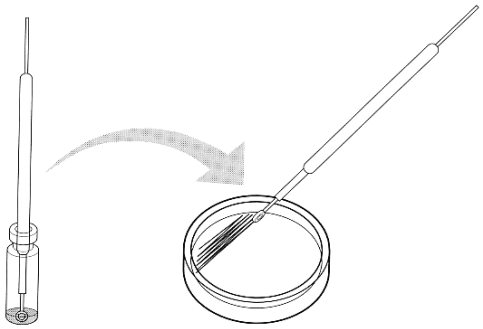
2. カラムはゆっくりと流れ落ちるようにデザインされています。クロマトグラフィーの全手順には 20～30 分かかります。カラムの移動はカラムベッドの乱れの大きな原因となるため、採取用チューブの交換時に必要なとき以外は、カラムを動かさないようにすることが大切です。



クイックガイド

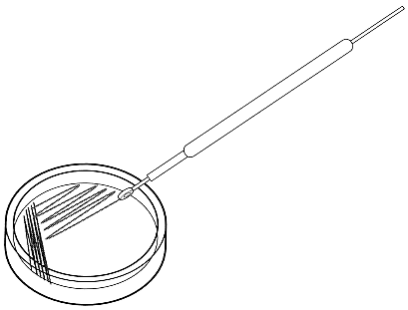
Lesson 2 クローニング

1. 滅菌済みの植付け用ループを溶解した大腸菌ライブラリに挿入します。ループを取り出し、右図のように、単独コロニーとなるように、線を描くようにして塗抹します。

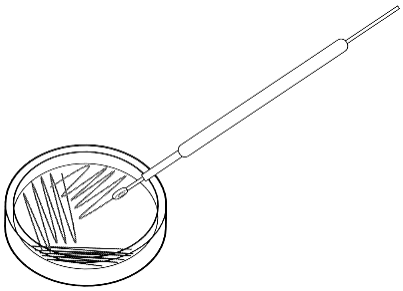


2. 塗布は 4 回に分けて続けて行ないます。最初の塗布ではごく一部に広げます。図のように、小さな範囲で 12 回ほど、ループを左右に動かします。

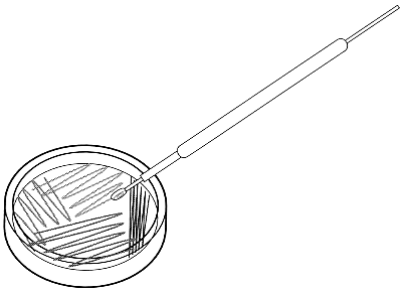
3. その後の何回かの塗布で、プレートのできる限り広い面積に広げることになります。プレートを約 45 度回転させ（これにより、操作がしやすくなります）、2 回目の塗布を開始します。ループは前に描いた線上に約 2 回接触させた後、図のように、合計約 10 回左右に動かします。



4. プレートを回転させ、塗布手順を繰り返します。



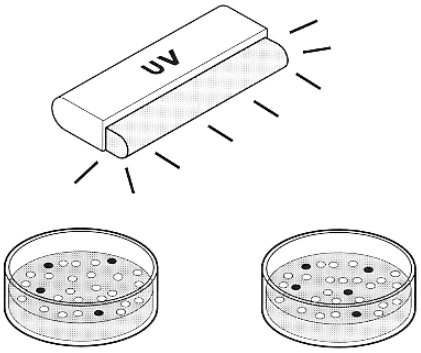
5. 最後にもう一度プレートを回転させて、最後の塗布を行ないます。2 枚目の LB／アンピシリン／アラビノースプレートでも、同じ植付け用ループを用いて、1～5 の手順を繰り返します。



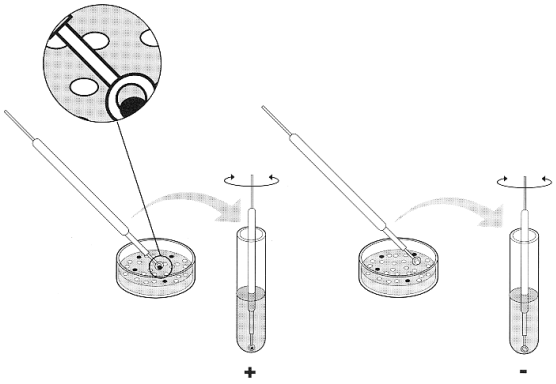
6. プレートを 37℃のインキュベーター中で一晩培養します。インキュベーター内ではプレートを上下逆さまに置いてください。

Lesson 3 スクリーニングおよび液体培地での培養

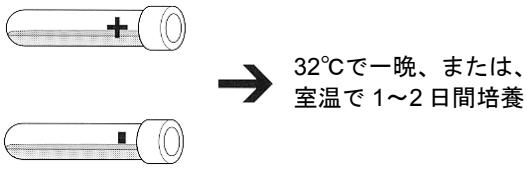
1. プレートをインキュベーターから取り出し、UV 光を用いて観察します。プレート上で他のコロニーと接触していない緑色コロニーを見つけます。独立した緑色コロニーには、プレートの底面に丸で囲んで印をつけます。さらに、プレート上で他のコロニーと接触してない白色コロニーにも同様にアンダーラインを引きます。



2. 液体培地のはいった培養用チューブを 2 本用意します。一方には「＋」、もう一方には「－」と表示をつけます。滅菌済みループを丸で囲んだ緑色コロニーに軽く接触させ、「＋」の試験管の中に入れます。新しい滅菌済みループを用いて、アンダーラインをつけた白色コロニーで同様の手順を繰り返し、「－」の試験管の中に入れます（単独のコロニーのみから採取することが大切です）。親指と人差し指でループを回転させながら、コロニーを十分に拡散させます。



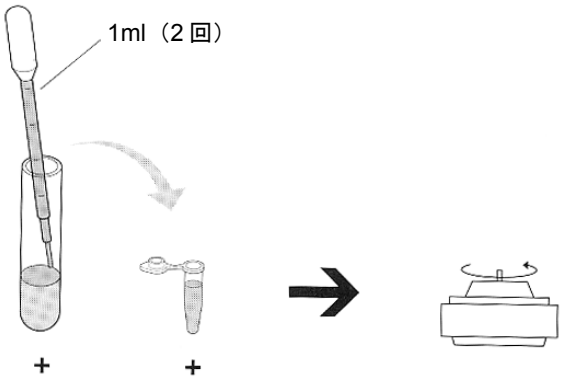
3. 試験管を振盪培養器に入れるか、または、振盪回転台の上に置き、32℃で一晩、または、室温で 1～2 日間培養します。振盪器が利用できない場合には、試験管を激しく浸透してから、インキュベーターの中に横にして置き、1～2 日間培養します。



Lesson 4 精製段階

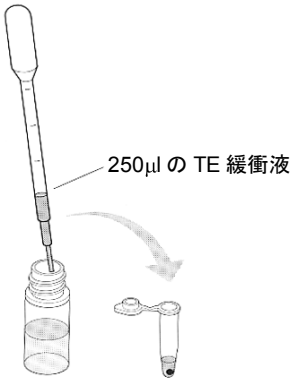
集菌

1. 1 本のマイクロチューブに「＋」と表示し、氏名と実験日す。振盪器から液体培地を取り出し、UV 光を使って観察して、2 本の試験管の色の相違を記録します。新しいピペットを用いて、「＋」の液体培地から「＋」のマイクロチューブに 2ml を移します。遠心分離機を用いて、マイクロチューブを最高速度で 5 分間遠心分離します。この段階で使用したピペットは、ビーカーに入れた水で洗浄し、今回の実験の以下のステップで繰り返し利用することができます。

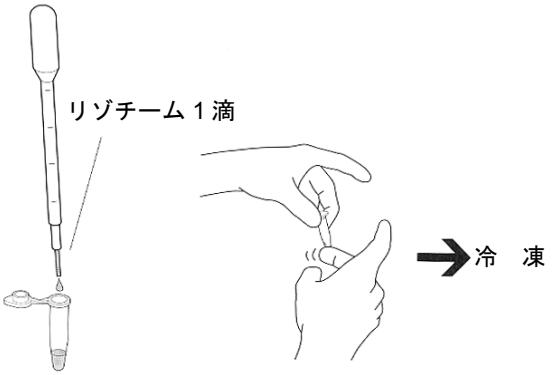


2. 上澄み液を捨て、UV 光の下で沈殿を観察します。

3. 洗浄したピペットを用いて、チューブの中に 250μl の TE 緩衝液を加えます。内容物をピペットで数回、急速に吸い上げたり吐き出させたりすることにより、沈殿物を十分に再懸濁させます。



4. 洗浄したピペットを用いて、再懸濁した大腸菌沈殿物にリゾチームを 1 滴加え、大腸菌細胞壁の酵素的分解を行ないます。内容物は、チューブを指で叩いて穏やかに混和させます。UV 光の下で観察を行なってください。

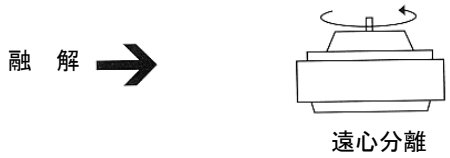


5. 次回の実験時までマイクロチューブを冷凍庫内で保管します。凍結・融解により、大腸菌が完全に破壊します。

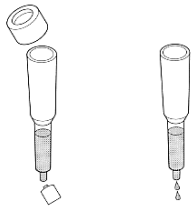
Lesson 5 精製段階

溶 菌

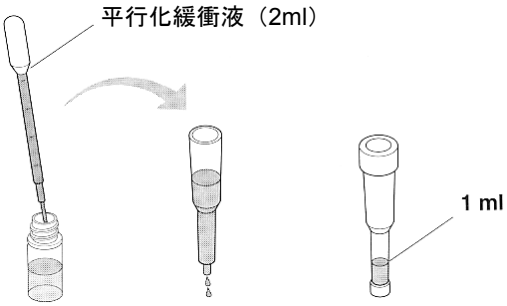
1. 冷凍庫からマイクロチューブを取り出し、手で暖めて融解させます。チューブを遠心分離機に入れ、最高速度で 10 分間遠心分離して、不溶性の大腸菌の細胞片を沈殿させます。



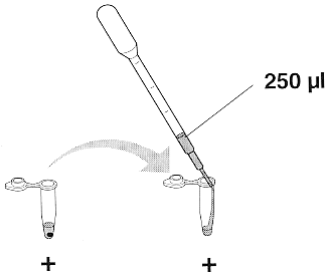
2. チューブの遠心分離中に、クロマトグラフィーカラムを用意します。あらかじめ充填された HIC カラムの上部キャップと末端のつまみを取り外します。緩衝液がすべて流れ落ちるまでカラムを放置します（約 3～5 分）。



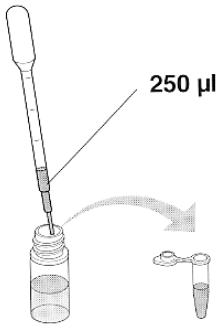
3. カラムの上部に 2ml の平行化緩衝液を加えて、カラムの調製を行ないます。これは、洗浄したピペットを用いて、1ml の緩衝液を 2 回加えることにより行ないます。カラムの 1ml の印の部分まで、緩衝液を排出させます。上部および底部にキャップをして、次回の実験時までカラムを室温で保管します。



4. 10 分間の遠心分離後、ただちに遠心分離機からチューブを取り出します。UV 光を用いてチューブを観察します。新しいピペットを用いて、「＋」のチューブの上澄み液 250μl を、「＋」の表示をつけた新しいマイクロチューブに移します。この段階でも、ピペットを十分に洗浄して、この実験期間の残りの操作で繰り返し使うことができます。



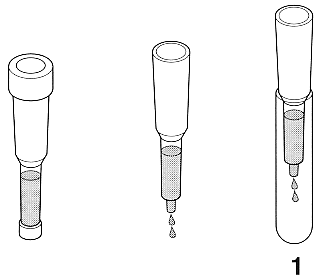
5. 十分に洗浄したピペットを用いて、250μl の結合用緩衝液を「＋」の上澄み液に移します。チューブは、次回の実験時まで冷蔵庫内で保管します。



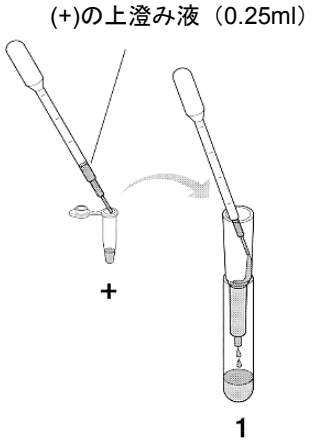
Lesson 6 精製段階

タンパク質のクロマトグラフィー

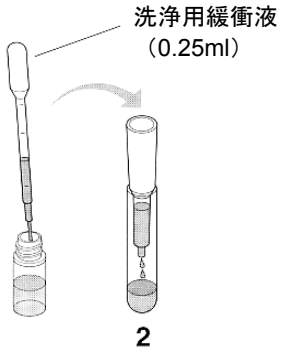
1. 3 本の採取用チューブに 1～3 の番号を付け、試験管立てに立てます。カラムの上部および底部のキャップを取り外し、カラムを採取用チューブ 1 に立てます。HIC カラムのベッド上端表面に最後の緩衝液が到達したら、以下のステップに進みます。



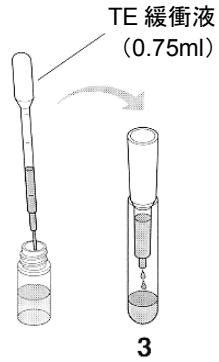
2. 新しいピペットを用いて、カラム上端に「＋」の 250μl の上澄み液を穏やかに流し入れます。ピペットの先端を、カラム基質上端表面の真上のカラム壁面につけ、上澄み液がカラム壁に沿って流れ落ちるようにします。UV 光を用いてカラムを観察し、観察結果を記録してください。滴下が終了したら、カラムを試験管 2 に移します。



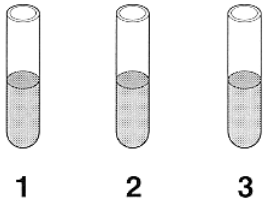
3. 洗浄したピペットを用いて、250μl の洗浄用緩衝液を加え、全量をカラムに流しいれます。UV 光を用いてカラムを観察し、観察結果を記録してください。カラムからの滴下が終了したら、カラムを試験管 3 に移します。



4. 洗浄したピペットを用いて、750μl の TE 緩衝液（溶出用）を加え、全量をカラムに流しいれます。UV 光を用いてカラムを観察し、観察結果を記録してください。



5. 3 本の採取用チューブを比較し、試験管間の色の違いを記録します。パラフィルム®またはサランラップ®で試験管の口を覆い、次回の実験時まで冷蔵庫内で保管します。



Secrets of the Rainforest

学生・生徒用テキスト

Lesson 1　緑色蛍光を発する不思議な葉 26
◆質問 27
Lesson 2　クローニング 28
◆実験手順 29
◆質問 30
Lesson 3　スクリーニング 31
◆実験手順 32
◆質問 34
Lesson 4　精製段階 1－大腸菌の集菌 35
◆実験手順 36
◆質問 38
Lesson 5　精製段階 2－大腸菌の溶菌 39
◆実験手順 40
◆質問 42
Lesson 6　精製段階 3－タンパク質のクロマトグラフィー 43
◆実験手順 44
◆質問 46
Lesson 7　検定およびプラセボ 48
Lesson 8　市場販売－支援団体および見解 50
Lesson 9　市場販売－倫理的および経済的考察 51
◆質問　市場販売－倫理的および経済的考察 53
Lesson 10　生徒による発表 54
◆質問 56
◆学生による発表の基準 57

Lesson 1　緑色蛍光を発する不思議な葉

ティシャーは、珍しい植物を求めてアンデス山中の熱帯雨林を探索している最中に、ラモンという名の少年に会い、不思議な緑の葉を持つ、年老いた呪医の話を聞きました。ラモンの話では、彼の姉は胃の痛みを訴えて町の医師の診察を受け、疼痛性で通常は死に至る病、胃癌であるとの診断を受けたということでした。ラモンの家族には町の医師に治療してもらえるほどのお金がなかったので、呪医の診察を受けたところ、呪医はラモンの姉の腕に小さな切り傷をつけ、そこに不思議な葉を貼り付けました。

数ヵ月後にラモンの姉が町の医師の診察を受けたところ、癌が治癒していると言われました。ラモンがお礼を言うために呪医を訪ねると、彼は息も絶え絶えな状態で、まもなく年亡くなってしまいました。そして、ラモンの手元には「不思議な葉」が、秘密と共に残されました。

ラモンはティシャーに数枚の不思議な葉の入ったビンをくれました。ティシャーはヒトの疾患を治療するための新薬を開発しているバイオテクノロジー企業であり、また自分の勤務先でもある、バイオテックス社に持ち帰りました。

バイオテックス社でティシャーは、この不思議な葉が紫外線光のもとで明るい緑の光を発することに気づきました。バイオテックス社では別の研究員が、この葉の中にある緑色発光性の物質がタンパク質であり、これが特別な作用を生じていることを突き止めました。このタンパク質についてさらに研究するために、この葉から DNA が取り出され、大腸菌細胞内に導入されました。これらの大腸菌のうちの一部は、この特殊な緑色タンパク質のための遺伝子を持っています。

バイオテックス社は医学の治療薬の開発に社運を賭けています。開発には長期間を必要とし、約 10 年におよぶ開発費用は 1 億ドルを上回る経費のかかるものですが、疾患の治療とそれによってもたらされる恩恵は、潜在的に優れたものです。現在のところ、バイオテックス社には、今後数年間、ティシャーや他の従業員に支払うための資金が銀行にありますが、バイオテックス社では、会社がさらに生き延びるための新製品を早急に必要としています。さらにティシャーは、ラモンから絶望的な手紙を受け取っています。ラモンは、自身にも繰り返し再発する胃の痛みが胃癌であるとの診断を受けたとのことでした。

◆質問

あなたはバイオテックス社に雇われており、ティシャーを助けて、現在ではこの緑色蛍光タンパク質の遺伝子を持つ大腸菌を識別し、胃癌の治療薬としての検討を進めるために、大腸菌からこのタンパク質を抽出する必要がりあります。さらに今後は、癌治療薬を市場に出すために複数の問題に遭遇する可能性があり、こうした障害を克服するための方法を見つけ出さなければなりません。

1. ティシャーとは何者ですか、また、彼女はなぜ、アンデス山中にいたのですか。

2. ティシャーとバイオテックス社が解決しなければならない問題点を二つ挙げてください。

3. 不思議な葉に由来する遺伝子を大腸菌細胞に導入した理由はなんでしょうか。

4. バイオテックス社の技術者が特殊な癌治療タンパク質を大腸菌細胞内に入れることに成功したかどうかを決定するために役立つ糸口として、どのようなものがありますか。

Lesson 2　クローニング

われわれの身体には、異なる役割を持つ非常に多くの種類のタンパク質が含まれています。タンパク質は、各々のタンパク質を作り出すための情報を含む DNA 領域である遺伝子にコードされています。ヒトの細胞には 80,000～100,000 種もの遺伝子が含まれています。

バイオテックス社の科学者は、不思議な葉の中に癌治療タンパク質の遺伝子があることを見つけ出しています。科学者たちは、ラモンからもらった葉の遺伝子を無作為に切断し、すべての遺伝子を大腸菌細胞内に導入しました（大腸菌ライブラリの作成）。この中のごく一部の大腸菌は癌治療タンパク質に対する遺伝子を持っているはずです。これらの大腸菌を他の大腸菌から見つけ出して、分離する必要があります。

まず、この大腸菌ライブラリを、特別に調製した、栄養分を含む寒天培地プレートに薄く広げて培養する必要があります。1～2 日のうちに、プレートには個々の大腸菌コロニーが認められるようになります。プレート上で大腸菌を分離して個々の菌体が同一細胞の集塊（コロニー）を形成できるようにしたこの手法を、クローニングと呼びます。一つのコロニーではすべての大腸菌が遺伝的に同一であるため、これらをクローンと呼びます。

以下に概説した手順にしたがって、大腸菌ライブラリの塗抹を行なってみましょう。

＜実験台チェック（√）リスト＞

学生用実験台	数　量	（√）
植付け用ループ（滅菌済み）	1	❑
寒天培地プレート（滅菌済み）	2	❑
油性ペン	1	❑

教員用実験台		
大腸菌ライブラリ凍結乾燥品	1	❑
37℃インキュベーター	1	❑

◆実験手順

1. 寒天培地のプレートを裏返します。油性ペンを用いて、2 枚の寒天培地プレートに氏名および実験日を記入してください。

2. 大腸菌ライブラリを用いて 2 枚のプレートに塗抹を行ない、Lesson 2 を開始します。線を描くようにして塗抹する目的は、濃縮大腸菌懸濁液から単一コロニーを生じさせるためです。大腸菌懸濁液は少量で十分です。適切な条件下では、一つの細胞が 24 時間で、遺伝的に同一な数百万もの細胞に増殖します。

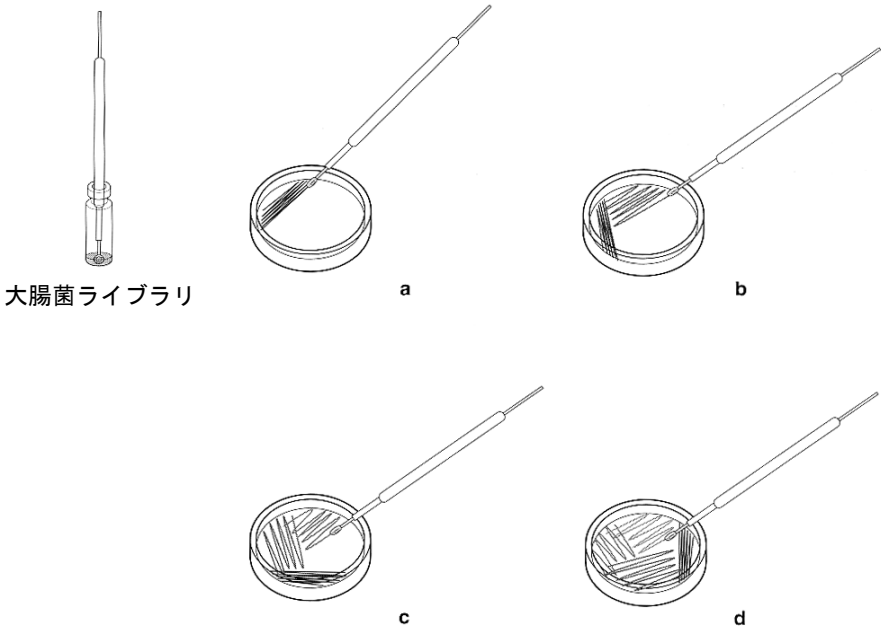
a. 滅菌済みの植付け用ループを、ボトル内に差し込みます。ループを取り出し、下図のように、単独コロニーとなるように、線を描くようにして塗抹します。塗布は、1 枚のプレートの 1/4 ずつ、4 回に分けて続けて行ないます。最初の塗布ではごく一部に大腸菌を広げます。図のように、小さな範囲で 12 回ほど、ループを左右に動かします。

b. その後の何回かの塗布で、プレートのできる限り広い面積に大腸菌を広げることになります。プレートを約 45 度回転させ（これにより、塗布の操作がしやすくなります）、2 回目の塗布を開始します。ループは前に描いた線上に約 2 回接触させた後、図のように、合計約 10 回左右に動かします。

c. プレートを回転させ、塗布手順を繰り返します。

d. 最後にもう一度プレートを回転させて、最後の塗布を行ないます。もう 1 枚のプレートにも、a～c の手順を繰り返します。どちらのプレートにも、植付け用ループは同じものを使用するようにしてください。プレートは 1 枚ごとに作業が終わり次第、蓋をして、汚染されないようにします。

e. プレートを裏返して、37℃のインキュベーター中で一晩培養します。24～36 時間以内に使用し、使用前には冷蔵庫に入れないようにしてください。



◆質問

1. タンパク質について

a. タンパク質とは何ですか。

b. 体内にあるタンパク質の例を 3 つあげてください。

c. 遺伝子とタンパク質との関係を説明してください。

2. 自分の言葉で、クローニングを定義し、記述してください。

3. 大腸菌ライブラリ内の大腸菌細胞は、シングルコロニーの大腸菌細胞とはどのように異なっているのかを記述してください。

4. 大腸菌細胞からどのようにして癌治療タンパク質を分離できるかを記述してください。

Lesson 3　スクリーニング

大腸菌コロニーは、紫外線（UV）灯の下で容易に観察することができます。ティシャーは、UV 光の下でラモンからもらった葉に特別な何かがあることに気づいたということを思い出してください。

二つの大腸菌コロニーを選択します。一つは、緑色蛍光タンパク質に対する遺伝子を含むコロニー（緑色）で、もう一方はこれを含まないコロニー（白色）です。これら二つのタイプのコロニーを培養用チューブに移し、一晩、培養します。

＜実験台チェック（√）リスト＞

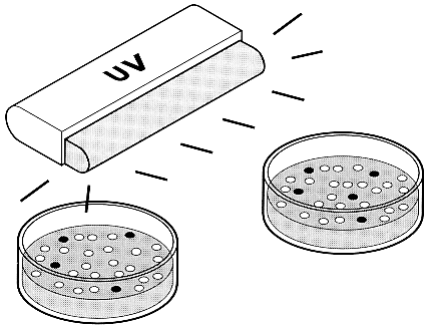
学生用実験台	数　量	(√)
塗抹済みバクテリア培地プレート	2	❑
植付け用ループ	2	❑
培養用チューブ－2ml の液体培地を入れたもの	2	❑
油性ペン	1	❑
試験管立て	1	❑

教員用実験台		
振盪培養器またはインキュベーター	1	❑
UV 灯	1 台以上	❑

◆実験手順

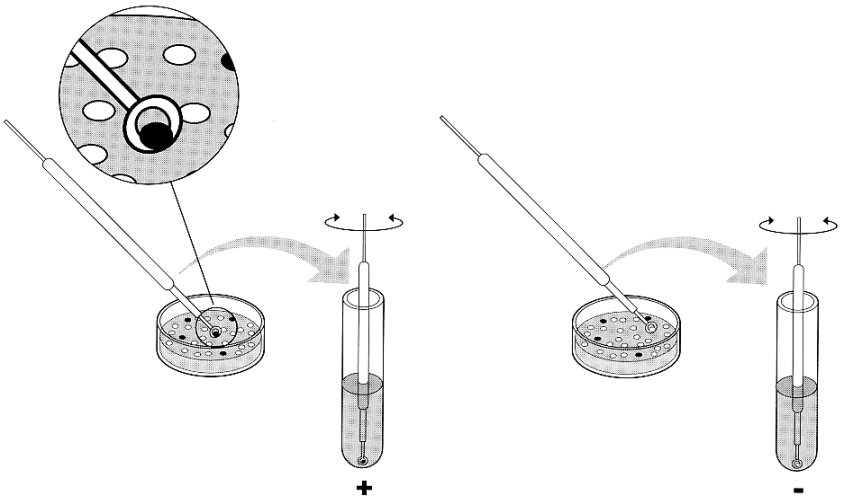
1. プレートをインキュベーターから取り出して観察します。最初は、通常の室内灯を利用し、ついで、実験室の暗室内で UV 光を用いてください。観察結果を記録します。

皮膚または眼球の損傷を避けるために、UV 光には当らないようにしてください。UV 灯を直接見てはいけません。可能な場合には、保護眼鏡をつけてください。

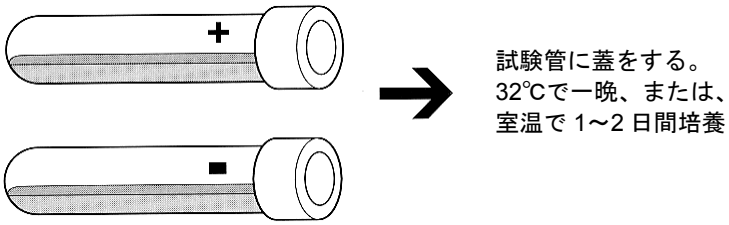


2. プレート上で他のコロニーと接触していない緑色コロニーをいくつか見つけます。プレートを裏返して、これらの緑色コロニーを丸で囲みマークします。もう一方のプレートでは、他のコロニーと接触してない白色コロニーをいくつか見つけ、丸で囲みマークします。

3. 2ml の液体培地の入った 15ml 用培養用チューブを 2 本入手し、一方には「＋」、もう一方には「－」と表示をつけます。滅菌済みループの先端を丸で囲んだ緑色コロニーの一つに軽く接触させ、寒天をえぐり取らないようにしながら、菌体をすくい上げます。ループを「＋」の試験管に浸し、親指と人差し指でループを回転させながら、コロニーを十分に拡散させます。新しい滅菌済みループを用いて白色コロニーで同様の手順を繰り返し、「－」の試験管の中に浸します。単独のコロニーのみから採取することが大切です。



4. 試験管に蓋をし、振盪培養器またはインキュベーターにセットします。試験管は、32℃で 24 時間、または、室温で最高 2 日間培養します。振盪器が利用できない場合には、試験管をインキュベーターの中に横にして置きます。振盪器は利用できるがインキュベーターが利用できない場合には、試験管をテープで回転台にとめ、32℃で 24 時間または室温で最高 48 時間、振盪します。



培養条件	必要日数
32℃－振盪	1 日
32℃－振盪せず	1～2 日間
室温－振盪	1～2 日間
室温－振盪せず	望ましくない

＊ 定期的に手で振盪し、インキュベーター内では横にしておく。

◆質問

1. 大腸菌コロニーとは何ですか。

2. 寒天培地プレートから緑色コロニーと白色コロニーを一つずつ選択したのはなぜですか。これによって、何が証明されますか。

3. クローニング実験では以下の装置はどのような目的で使用しますか。

a. 紫外線（UV）灯

b. インキュベーター

c. 振盪培養器

4. クローン化した大腸菌を液体培地に入れて培養させることと、癌の治療薬として蛍光タンパク質を検討するという最終的な目的との間にどのような関係があるのかを説明してください。

Lesson 4　精製段階 1－大腸菌の集菌

これまでの段階で、2 種類の大腸菌コロニーを元に培養した大腸菌が得られています。一方には、緑色蛍光タンパク質（GFP）を産生するための遺伝子が含まれており、もう一方には含まれていません。今回の実験では、大腸菌細胞から GFP を抽出します。まず、これらの大腸菌を大量に採集する必要があります。

大量の菌体を濃縮するために便利な方法として、液体培地の入った試験管を遠心分離機に入れ、遠心分離するという方法があります。培養した大腸菌を遠心分離した場合、菌体は、液体部分（上澄み液）と試験管底部（沈殿物）のどちらに集まると予想されるでしょうか。

＜実験台チェック（√）リスト＞

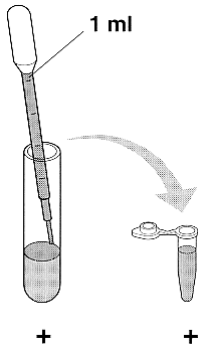
学生用実験台	数　量	(√)
マイクロチューブ	1	❑
ピペット	1	❑
マイクロチューブ立て	1	❑
マーカー	1	❑
ピペット洗浄用の水の入ったビーカー	1	❑

教員用実験台		
TE 緩衝液	1 ボトル	❑
リゾチーム（溶解済み）	1 ボトル	❑
遠心分離機	1	❑
長波長 UV ランプ	1～8	❑

◆実験手順

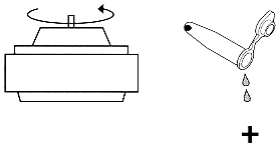
1. マーカーを用いて、新しいマイクロチューブ 1 本に氏名と実験日を記入します。

2. 振盪器またはインキュベーターから 2 本の液体培地を取り出し、通常の室内灯、ついで UV 光で観察します。観察した色の違いを記録してください。きれいなピペットを用いて、(+)の液体培地の全内容物を、2ml のマイクロチューブに移し、(+)と表示してキャップをします。この段階で、(−)の培養物を取り除き、廃棄します。



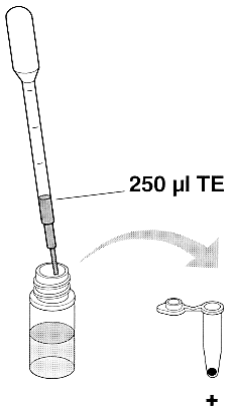
3. 遠心分離機を用いて、(+)のマイクロチューブを最高速度で 5 分間回転させます。遠心分離機 内ではチューブのバランスに注意してください。チューブのバランスのとり方がわからない場合には、遠心分離を行なわずに、先生の指示を受けてください。

4. 液体培地は遠心分離後、チューブの蓋を開け、沈殿の上にある上澄み液をゆっくりと流し出します。上澄み液を捨てると、チューブの中には大きな塊が残っているはずです。



5. UV 光の下で沈殿を観察し、観察結果を記録してください。

6. 新しいピペットを用いて、各々のチューブの中に 250μl の TE 緩衝液を加えます。ピペットを用いて内容物を数回、急速に吸い上げたり吐き出させたりすることにより、沈殿物を十分に再懸濁させます。



7. 洗浄したピペットを用いて、再懸濁した沈殿物にリゾチームを 1 滴加えます。チューブにキャップをし、チューブを指で叩いて内容物を混和させます。リゾチームによる細胞壁の分解が始まります。UV 光の下で観察を行なってください。次回の実験時までマイクロチューブを冷凍庫内で保管します。凍結・融解することにより、大腸菌が破裂し、完全に破壊します。

◆質問

1. 胃癌治癒力を持つ可能性のある特殊な植物タンパク質を産生する遺伝子を増やすために、大腸菌を利用しました。Lesson 4 で使用した以下の装置・試薬はどのような目的で使用しましたか。

a. 遠心分離機

b. リゾチーム

c. 冷凍庫

2. 今回のタンパク質精製手順では、なぜ上澄み液を捨てたのですか。

3. 「－」のチューブから白色の液体を捨て、緑色の液体をとっておいたのはなぜですか。

4. 細胞を凍結すると菌体の外膜が破壊する理由を説明できますか。未開封のソフトドリンクのビンを冷凍庫に入れるとどうなるでしょうか。

5. 大腸菌を破壊または溶解する目的は何ですか。

Lesson 5　精製段階 2－大腸菌の溶菌

胃癌研究のニュースが公表されました。ここ 1 ヶ月の間、胃癌患者やその家族から、GFP について詳細が知りたいとの問い合わせが来ています。

一方、バイオテックス社の研究者は、他の大腸菌由来タンパク質から、クロマトグラフィーにより GFP を分離する手法を開発しています。クロマトグラフィーは、混合物からタンパク質を分離するための強力な手法です。大腸菌には数千種類もの大腸菌タンパク質が含まれており、ここから GFP だけを分離しなければなりません。

GFPの表面はきわめて疎水性（水を嫌う性質）です。塩類溶液中では、タンパク質のこれらの部分は、他の疎水性表面と強く結合する傾向があります。GFP を含むタンパク質混合液を、疎水性ビーズを充填したカラムに流し込みます。ビーズが塩類溶液中にある場合には、GFP のような疎水性タンパク質はカラム内を通過しながらビーズと結合し、その他のタンパク質は流れ落ちます。塩類を取り除くと、GFP タンパク質の形状が変化し、疎水性表面がそれまでほど表に現われなくなります。その結果、GFP はビーズと結合しなくなり、カラムの底部から流出します。この方法で、GFP を他の大腸菌タンパク質と分離することが可能です。

＜実験台チェック（√）リスト＞

学生用実験台品目	数　量	(√)
マイクロチューブ	1	❑
ピペット	1	❑
マイクロチューブ立て	1	❑
マーカー	1	❑
ピペット洗浄用の水の入ったビーカー	1	❑
HIC クロマトグラフィーカラム	1	❑
カラム末端キャップ	1	❑
廃液用ビーカーまたは試験管	1	❑

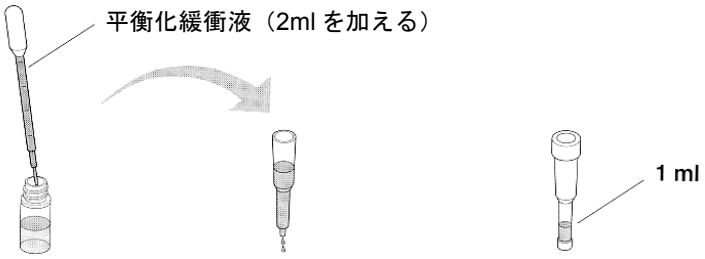
教員用実験台品目		
結合用緩衝液	1 ボトル	❑
平衡化緩衝液	1 ボトル	❑
遠心分離機	1	❑
長波長 UV ランプ	1～8	❑

◆実験手順

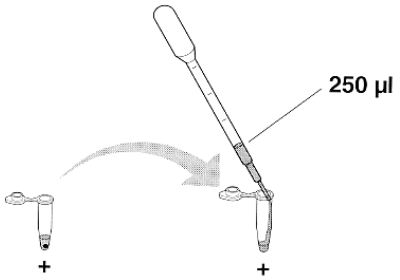
1. 冷凍庫からマイクロチューブを取り出し、手で暖めて融解させます。チューブを遠心分離機に入れ、最高速度で 10 分間遠心分離して、不溶性の大腸菌細胞片を沈殿させます。新しいマイクロチューブにはグループの名称の頭文字を記入しておいてください。

2. 遠心分離を待つ間に、クロマトグラフィーカラムを用意します。クロマトグラフィーを行なう前に、カラムを数回激しく上下に振って、ビーズを再懸濁させておきます。ついで、最後に、体温計を振るときのようにカラムを 1 回振り、ビーズを底部に集めます。カラムを机の上に軽く叩きつけても、ビーズがカラム底部に集まります。クロマトグラフィーカラムの上部キャップと末端のつまみを取り外します。緩衝液がすべて流れ落ちるまでカラムを放置します（これには約 3～5 分かかります）。

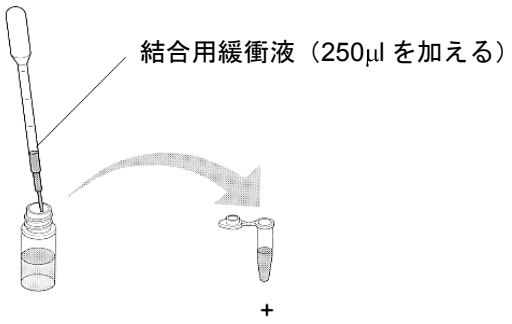
3. 十分に洗浄したピペットを用いて、一度に 1ml ずつ、2ml の平行化緩衝液をカラムの上部に加えて、カラムの調製を行ないます。白色のカラムベッドの上端の真上にある 1ml の印の部分まで、カラムから緩衝液を排出させます。カラムの上部および底部にキャップをして、次回の実験時までカラムを室温で保管します。



4. 10 分間の遠心分離後、ただちに遠心分離機からチューブを取り出します。UV 光を用いてチューブを観察します。チューブの底部に上部にある液体を上澄み液と呼びます。沈殿と上澄み液の色を記録してください。新しいピペットを用いて、250μl の上澄み液を新しいマイクロチューブに移します。この段階でも、ピペットを十分に洗浄して、この実験期間の残りの操作で繰り返し使うことができます。



5. 十分に洗浄したピペットを用いて、上澄み液の入ったマイクロチューブに 250μl の結合用緩衝液を移します。チューブは、次回の実験時まで冷蔵庫内で保管します。



◆質問

1. UV ランプを当てた時、(a)沈殿は何色でしたか。(b)上澄み液は何色でしたか。(c)なぜそのようになると考えているのかを説明してください。

2. 今回のタンパク質精製手順で沈殿を捨てたのはなぜですか。

3. タンパク質クロマトグラフィーについて簡単に説明し、今回の実験の目的を述べてください。

Lesson 6　精製段階 3－タンパク質のクロマトグラフィー

今回の GFP 精製の最終段階では、調製した大腸菌溶解物を疎水的相互作用クロマトグラフィー（HIC）カラムに流します。HIC カラムには小さな疎水性のビーズが入っています。GFP はこのビーズに結合しますが、他のタンパク質はそのまま通過してゆくはずです。その後、塩類を取り除くと、GFP がビーズと結合しなくなり、カラムの底部から流れ落ちます。

クロマトグラフィーを行なうために、以下の 4 種類の溶液を使用することになります。

・平衡化緩衝液－塩濃度の高い溶液（2M $(NH_4)_2SO_4$）

・結合用緩衝液－塩濃度のきわめて高い溶液（4M $(NH_4)_2SO_4$）

・洗浄用緩衝液－塩濃度が中程度の溶液（1.3M $(NH_4)_2SO_4$）

・TE（溶出用）緩衝液－塩濃度がきわめて低い溶液（10mM Tris／EDTA）

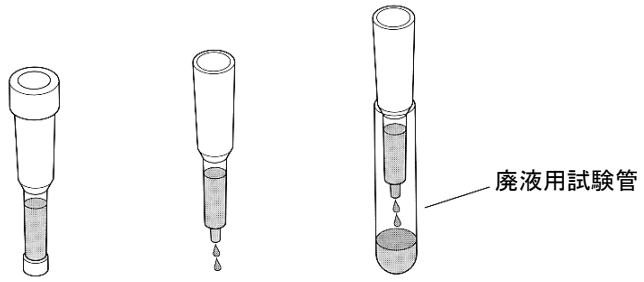
＜実験台チェック（√）リスト＞

学生用実験台	数　量	(√)
採取用チューブ	3	❑
ピペット	1	❑
マイクロチューブ立て	1	❑
マーカー	1	❑
ピペット洗浄用の水の入ったビーカー	1	❑
HIC クロマトグラフィーカラム	1	❑
カラム末端キャップ	1	❑
廃液を採集するためのビーカーまたは試験管	1	❑

教員用実験台		
洗浄用緩衝液	1 ボトル	❑
平衡化緩衝液	1 ボトル	❑
TE 緩衝液	1 ボトル	❑
長波長 UV ランプ	1～8	❑

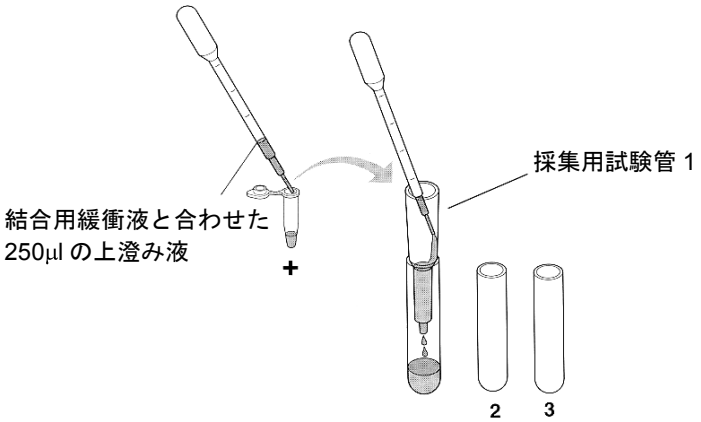
◆実験手順

1. 3 本の採取用チューブを入手し、1～3 の番号を付けます。試験管を試験管立てに立てます。カラムの上部および底部のキャップを取り外し、液体を廃液用試験管に完全に流し落とします（予備の試験管が利用できます）。HIC カラムベッドの上端表面に最後の緩衝液が到達したら、カラムを穏やかに採取用チューブ 1 に移動させます。カラムに通した緩衝液が流れなくなるので、採取用チューブにはカラムを固く押し込まないようにしてください。

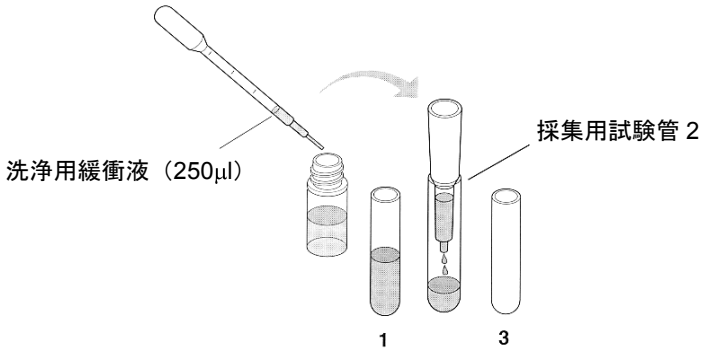


2. 以下のステップでどのようなことが起きるかを予測して、50 ページのデータ表に実際の観察結果と共に記入してください。

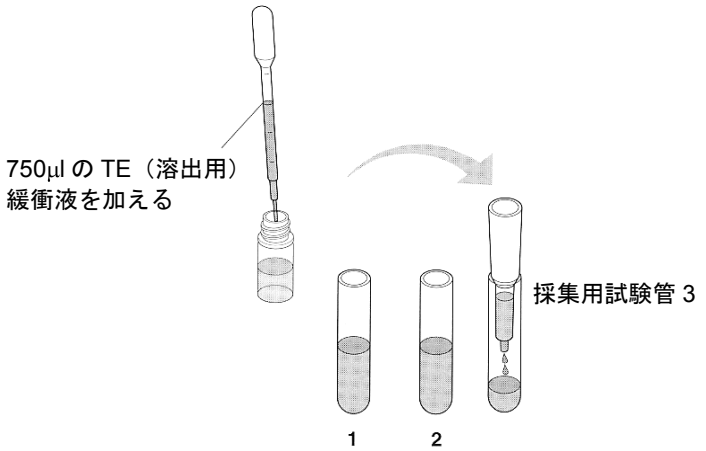
3. 新しいピペットを用い、ピペットの先端をカラム壁面につけ、上澄み液がカラム壁に沿って流れ落ちるようにして、カラム上端に 250 μl の上澄み液を慎重に流しいれます。ます。UV 光を用いてカラムを観察し、観察結果をデータ表に記録してください。上澄み液の全容量を試験管 1 に流しいれます。



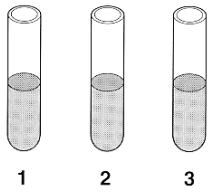
4. カラムを試験管 2 に移動させます。洗浄したピペットを用い、上述の流し込み手順と同様の手順により、250μl の洗浄用緩衝液を加え、全量をカラムに流しいれます。待っている間に、この緩衝液を用いた場合の結果を予測してください。UV 光を用いてカラムを観察し、結果を 50 ページに書き込みます。



5. カラムを試験管 3 に移動させます。洗浄したピペットを用いて、750 μl の TE 緩衝液（溶出用緩衝液）を加え、全量をカラムに流しいれます。ここでも予測を行なった後に、UV 光を用いてカラムを観察し、結果を 50 ページに書き込みます。



6. UV 光を用いてすべての採取用チューブを観察し、試験管間の色の違いを記録します。パラフィルムまたはサランラップで試験管の口を覆い、次回の実験時まで冷蔵庫内で保管します。



◆質問

1. サンプルに何が生じたか、次の緩衝液をいつ HIC カラムに加えるかについての予測してください。また実際の試料の観察結果を記入してください。

採取用チューブの番号	予 測	UV 光の下での観察 （カラムおよび採取用チューブ）
試験管 1 結合用緩衝液中での試料		
試験管 2 洗浄用緩衝液中での試料		
試験管 3 溶出用緩衝液中での試料		

2. 上述のデータを用い、各々の緩衝液について予測が観察結果とどの程度適合していたかを比較してください。

a. 結合用緩衝液

b. 洗浄用緩衝液

c. 溶出用緩衝液

3. 結果に基づいて、これらの緩衝液の役割または機能を説明してください。ヒント：緩衝液の名称はその機能とどのように関連しているでしょうか。

a. 平衡化緩衝液―

b. 結合用緩衝液―

c. 洗浄用緩衝液―

d. TE（溶出用）緩衝液―

4.　塩濃度が最も高い緩衝液ともっとも低い緩衝液はどれですか。どうしてそうなるのですか。

5.　クローン化した大腸菌細胞からのGFPの分離および精製に成功しましたか。回答を裏付ける根拠を述べてください。

Lesson 7　検定およびプラセボ

精製したタンパク質は、ヒトで検討する前に、まず、胃癌になったラットまたはマウスで検査する必要があります。これらの動物が治癒したかどうか、さらに、治癒した場合には、治癒のためにどの程度の量を投与するかを決定しなければなりません。さらに、このタンパク質によって生じ得る副作用または問題を見つけ出す必要があります。

今回のタンパク質が実際に作用するかどうかを決定するためには、対照薬、すなわちプラセボを使用しなければなりません。プラセボには、例えば水のように、実際にはその病気の治療薬にはならないような不活性な物質を利用することができます。米国食品医薬品局（FDA）では、バイオテックス社の実験を検討し、このタンパク質が安全であり、望ましくない副作用を生ずることなく胃癌を実際に治癒するか否かを決定することになります。さらに FDA からは、ヒトでの試験を行なう前に、2 種類の動物種ですべての薬物を検討するよう、要求されます。これらの FDA の規定に従わない場合には治療薬として認められず、販売ができません。そうなると、ラモンやその他の胃癌患者を助けることもできなくなりますし、それまでの研究に費やされた数百万ドルを無駄にしてしまいます。

バイオテックス社のある技術者が、胃癌のラットに精製したタンパク質の 1、2 または 3 滴を注射しました。この技術者は、別の動物群に対して、プラセボについても同様に試験し、一定期間後に、動物の体内にまだ残っている胃癌の数を数えました。以下の表に示したこの試験の観察結果を検討し、質問 1～3 に答えてください。

検討した試料	投与滴数	認められた腫瘍数
緑色タンパク質	1	11
緑色タンパク質	2	7
緑色タンパク質	3	1
プラセボ	1	14
プラセボ	2	17
プラセボ	3	13

1.　上述の結果に基づいた場合、この緑色タンパク質は胃癌を制御すると思われますか。

2.　サルやヒトなどの大きな動物で試験を行なう場合には、どの程度の量のタンパク質が望ましいと思われますか。

3.　今回の試験のことを聞きつけて、動物実験反対運動グループの活動家がバイオテックス社に陳情に訪れ、また、同社には、動物実験に代わる方法を見つけるようにとのファックスや手紙が届けられています。一部の活動家は動物を人道的に取り扱うことの必要性を強く感じており、こうした人々は今後、バイオテックス社の製品をボイコットする恐れがあります。悪評がたてば投資家が援助をしなくなり、今後の研究が脅かされる可能性があります。動物実験反対運動グループの活動家であるマチューが今、ティシャーの事務所に来ています。あなたがティシャーだとすると、マチューの懸念を解消し、この危機的状況を回避するために、どんなことを話したり、行ったりしますか？

Lesson 8　市場販売－支援団体および見解

以下の団体を考慮し緑色タンパク質を市場に出そうとする努力に対してこれらの団体の意見がどのように影響を及ぼすかを考察してください。

＜第Ⅰ段階　役割の識別＞

以下の各々の団体について、これらの団体の目標と、これらの団体が今回の癌治療タンパク質の研究にどのような反応を示すかについて述べてください。これらの団体はどのようなもので、何をしようとしているのですか。自分の言葉で説明してください。調査が必要な場合には、インターネットや図書館を利用してみるのも良いでしょう。

A．FDA（米国食品医薬品局）

B．ラモンおよびその他の胃癌患者

C．マチューおよびその他の動物実験反対運動グループの活動家

D．ティシャーおよびその他のバイオテックス社の従業員

Lesson 9　市場販売－倫理的および経済的考察

現在、バイオテックス社には 50 名の従業員がおり、銀行には 4000 万ドルあります。今回のタンパク質はまだ FDA から要求されている試験をすべて完了していないため、市場に出すことができず、そのため、収益は得られていません。最初の 2 年間の試験で 1600 万ドルを使用しました。以下の表を検討して、今回の癌治療タンパク質を市場に出す場合に、バイオテックス社が利用者にどの程度の支払いを負わせる必要があるかを決定してください。

[バイオテックス社の推定支出額：1 年目から 6 年目]

年	従業員数	推定支出額（100 万ドル）	試験および商品化のための行動
1	50	8	げっ歯類でのプラセボを利用した試験
2	50	8	サルでのプラセボを利用した試験
3	70	11	FDA に動物実験結果を提出し、ヒトでの試験を開始：第 I フェーズ臨床試験－健常人での副作用の識別
4	85	13	ヒトでの試験：第 II フェーズ臨床試験－タンパク質が作用する場合の最適用量の決定、および、実際の癌患者で副作用が忍容性であるかどうかの検討 上記の試験が成功した場合には、投資家がさらに 7000 万ドルをバイオテックス社に投資すると予想される
5	100	45	ヒトでの試験：第 III フェーズ臨床試験－多数の胃癌患者を対象とした試験、これに成功した場合には、製品認可申請書（PLA）が FDA に送られる
6	100	18	FDA から承認は受けられたか。承認が受けられた場合には、バイオテックス社はこのタンパク質の製造および市場販売のためにさらに年間 1800 万ドルを費やすことになる

この薬物の製造のために、バイオテックス社は 400 ドル（1 回の治療あたり）の費用（製造経費、コスト）がかかります。この治療薬の販売価格によって、どの程度の数の人々がこの治療を受けられるかが決まります。FDA の承認後、市場は以下のようになると思われます：

治療する癌のタイプ	治療を受けられる患者の数	治療あたりの経費
胃　癌	10,000	2,000 ドル
（1 回の治療あたり 1000 ドルを上回るとメディケア*の対象にならない）	30,000	1,000 ドル
	60,000	600 ドル
肺　癌	6,000	2,000 ドル
（現在、競合療法に対して 500 ドルが支払われているため、メディケアでは、1 回の治療あたりの経費が 500 ドル以下の場合には対象になると思われる）	15,000	1,000 ドル
	300,000	500 ドル

*メディケア；老人医療保険

◆質問　市場販売－倫理的および経済的考察

バイオテックス社の財政状況および現在の市場状況を考慮して、以下の質問 1～3 に答えてください。

1. メディケアからの経済的支援が多くなるのは、肺癌と胃癌のどちらのタイプの癌ですか。

2. バイオテックス社が大きな利益を得られるのは、肺癌と胃癌のどちらのタイプの癌ですか。

3. バイオテックス社が今回のタンパク質を癌に対する治療薬として市場販売するとした場合、肺癌に対する治療薬と胃癌に対する治療薬の販売価格はどのいくらに設定すればよいでしょうか。両者は同一の価格となりますか、異なる価格となりますか。また、その理由も説明してください。

Lesson 10　生徒による発表

新しい薬物を市場に出す場合に遭遇すると思われる現実社会での問題をここに提示します。グループ内で一つの問題を選び、以下の 4 つの団体の見解を考慮して、調和のとれた解決法を調査し、導き出してください。

A.　FDA

B.　患者支援団体ーラモンおよびその他の癌患者、米国癌学会

C.　米国内の社会的良識団体ーシエラクラブ（米国環境保護団体）、動物実験反対運動グループ、懸念を表明する科学者による国家財源擁護団体、など

D.　バイオテックス社従業員

問題 1

2 年目の前臨床試験の段階で、マチューや動物実験反対運動グループの活動家が、試験にサルを利用することに懸念を表明し始めています。バイオテックス社では、FDA に必要条項を撤回するよう求めましたが、FDA からは拒絶され（FDA は、なぜ拒絶したのでしょうか）、すべての手順が泥沼に陥っています。バイオテックス社は、この難局を打開して開発を再開させようと躍起になっている癌患者グループを含む 4 つの団体が参加するグループミーティングを招集しています。この問題を解決し、今回のタンパク質をできる限り速やかに市場に出すための道を考え出してください。

問題 2

ヒトでの第 II 相臨床試験の最中に、複数の医師が患者にプラセボ療法を行なうことを拒んでいます。これらの医師は、今回の緑色タンパク質が癌を治癒できると考えており、この場合、なぜ患者の半数にプラセボを投与してみすみす死に至らせなければならないのでしょうか。バイオテックス社が FDA から今回の治療薬の市場販売許可を得るために、これらの医師を論破して今回のタンパク質を適切に利用させるための方法を検討してください。

問題 3

6 年目が半分終わっています。第 III 相臨床試験の結果は良好で、ティシャーとラモンは FDA の承認を待ち望んでいます。しかし、FDA は公開討議を招集し、そこにマチューやその他の動物実験反対運動グループのメンバーを招集しています。今回の試験で集められた情報では生殖能に対するこの薬物の長期副作用の問題が取り扱われておらず、FDA では、こうした問題の可能性があるのではないかと懸念しています。ただしそのためには、サルを用いてさらに試験を行なうことになります。この新しい問題を取り扱うための妥協策を提案し、この薬用タンパク質を速やかに市場に出すようにしてください。

問題 4

7 年目に、バイオテックス社では今回の胃癌に対する治療薬の販売を開始します。Lesson 7 に提示した財政的データを用いて、価格戦略を立ててください。収益が年間経費の 1800 万ドルを下回ると、従業員を解雇するか、または、ビジネスから撤退しなければならなくなります。従業員を解雇したり、製品の製造・販売をする能力を失ったりすることなく、バイオテックス社を競争力のある財政的に安定した状態に維持するための方法を提案してください。

問題 5

バイオテックス社で行なわれた 8 年目の新しい試験で、今回の緑色タンパク質が肺癌も治療したと想定してください。この治療法に対してメディケアが病院に償還をするようになれば、この製品の市場は巨大なものとなります。ただしこ

の場合には、患者の負担金を 500 ドル（以下）としなければ、メディケアからの支払いは行なわれません。すでに胃癌患者に対しては、同一の薬物に対してもっと多くの支払いを求めています。胃癌患者を維持しながら、メディケアからの経済的援助の恩恵を受けるようにするためには、どのようにすればよいでしょうか。

問題 6

9 年目に、ある患者がマサチューセッツの無名の科学者から、今回のものと同じ癌治療タンパク質を受け取っています。この科学者は、ティシャーが宿命的なアンデスの旅に出る前に、独自にこのタンパク質についての研究を行なっていたと思われます。現在、この科学者はバイオテックス社に支払いを求める法的権利を有しており、2000 万ドルを要求しています。ビジネスから撤退しないようにするために、この科学者に何を申し出ることができるでしょうか。

問題 7

バイオテックス社では今回の癌治療タンパク質の製造に 400 ドルをかけていますが、ラモンの村の住人やその他のアンデスの患者は、この治療タンパク質の利用に対して 40ドル以上を支払うことができないことを思い出してください。(a) 今回の製品が元々はこれらの国で見つけられたことを考慮して、こうした患者を助けるために費用を負担することができますか、また、できる場合には、どのようにして負担しますか。(b) こうした村々に対して、製造費用を下回る価格で製品を提供することを決定したとします。6 ヵ月後に、ロサンゼルスの闇市場で、今回の薬物が低価格で販売されていることが発覚しました。その間、ラモンの村では多くの人々が胃癌に罹っていると思われ、これらすべての人々を助ける義務が生じています。このとき、あなたはどうしますか。

問題 8

今回の緑色タンパク質は、皮膚斑点症という稀な皮膚疾患の予防または抑制にも有効なのではないかと思われます。全世界で約 250～300 名の患者がこの疾患に罹患しています。この緑色タンパク質が皮膚斑点症も治療でき、それによって、この疾患に罹った不幸な人々が隣人から身を隠す必要がなくなるとした場合、バイオテックス社はどのような決定をすべきでしょうか。バイオテックス社がこれについての試験を行なうとすると、FDA の試験必要条項すべてに従わなければならず、この緑色タンパク質でこの疾患を安全に治療できる場合にはさらに 1200 万ドルを費やすことになります。答えた内容について説明してください。

◆質問

発表についての概要を示す際には、8 つの問題のうちの一つを分析し、それによって生ずる論点または問題点を記述してください。ついで、生じ得る疑問と回答を 2 種類、考慮してください。各々の場合について、質問を行なっている人物の見解を識別してください。

A. FDA

B. ラモンなどの患者

C. マチューやその他の動物実験反対運動グループの活動家

D. バイオテックス社

問 題	あなたの回答
論点は何ですか。	
質問 1 (見解は I、II、III または IV のいずれのものですか)	生じ得る回答
質問 2 (見解は I、II、III または IV のいずれのものですか)	生じ得る回答

◆学生による発表の基準

グループメンバー _____

_____

_____

_____

問題_____配点シート

項　目	最高点	あなたの得点
シナリオについての要約記述	8	
以下のグループの見解		
＊FDA	8	
＊ 患者支援団体	8	
＊ 社会的良識団体（シエラクラブ、動物実験反対運動グループ、懸念を表明する科学者による国家財源擁護団体のうちのどれですか）	8	
＊ バイオテックス社従業員	8	
解決法および根拠	30	
図表	10	
＊ 各々の見解の表示		
＊ 解決法および根拠		
＊ その他_____		
口頭発表	20	
総合点	100	

付録 A 用語集

寒天培地	バクテリアの生育をサポートする固形物質。炭水化物やアミノ酸、ヌクレオチド、塩、ビタミンを含みます。
アラビノース	バクテリアが通常食物として利用する炭水化物、糖の一つ。
大腸菌ライブラリ	ある生物種から挿入した DNA を運ぶ、組換え型プラスミドベクターで形質転換した大腸菌のコレクション。今回の場合は、DNA は不思議な緑の葉を持つ植物に由来していました。
バクテリア溶解物	溶解した大腸菌の内部から放出された物質。タンパク質、核酸、および細胞質を構成するその他全ての物質を含みます。
バイオテクノロジー	生存している生物に対して、生物が実際に行っている分子レベルでの生命活動を利用して有益な物質を産出できるように、主に遺伝子レベルでの操作を施すこと。
クロマトグラフィー	固形マトリックス入りのカラムに混合液を通すことにより、タンパク質その他の混合液を分離する過程。マトリックスの性質を調節すると、ある種の分子をその他の分子から選択的に分離することができます。分子の性質には疎水性、分子の大きさ、および電荷などがあります。
クローニング	ある一つの細胞を培養することにより多数に増やした時、それらの細胞はすべて、同じ遺伝子を持つことになります。この増やされた多数の細胞をクローンといいます。そして、クローン細胞を作り出す過程をクローニング、といいます。特異的な DNA 配列または遺伝子のコピーは、導入された細胞（宿主）の細胞分裂により作られます。
コロニー	寒天培地上で生育した、同じ遺伝子を持つ細胞の凝集塊。一つのコロニーにあるすべての細胞は同じ遺伝子を持つので、クローンと呼ばれます。
遠心分離	混合物を高速で回転させて重い粒子と軽い粒子を分離すること。この場合、遠心分離によりチューブ底部に「沈殿」ができ、沈殿の上には液体「上清」が残ります。
培　地	液体や寒天の LB 培地のような、液体や固体の培地は、バクテリアの生育に必要な栄養源である炭水化物、アミノ酸、ヌクレオチド、塩、ビタミン等を含む酵母の抽出物や肉をタンパク質分解酵素で処理したものから作られています。寒天（アガロース）はご存知の通り、海草から抽出されたもので、加熱すると溶解し、冷却すると固形化する性質を持ち、バクテリアを培養する際には良く使われています。
米国食品医薬品局（FDA）	新しい食品または薬物が実際に製造業者の主張どおりに働くかどうかを検討することによって利用者を保護する、政府の機関。
遺伝子工学	生物の遺伝子 DNA に、他からの遺伝子を組み込んだり、そこから切り出したりという操作を行うこと。
緑色蛍光タンパク質	Green Fluorescent Protein（GFP）は生物蛍光を発するオワンクラゲ、*Aequrea victoria* から単離されたタンパク質です。*GFP* 遺伝子は最近になってクローン化されました。特徴的な構造ゆえに、紫外線を照射するとそのエネルギーを吸収し、吸収されたエネルギーは緑色のきれいな光となって放出されます。
リゾチーム	大腸菌細胞壁を溶解、あるいは破壊して開くために必要な酵素。自然界では、この酵素はヒト涙中に存在し、大腸菌感染から眼を防御する殺菌剤として働きます。リゾチームという名前は、この酵素の大腸菌を溶解（lyse）する能力からつけられました。

沈　殿	遠心分離すると、大腸菌、あるいは溶解した大腸菌の細胞膜およびその他の不溶物等比較的重い粒子が、マイクロチューブ底部に塊となって観察されます。
プラスミド	環状の DNA で、自己複製ができます。抗生物質耐性タンパク質や GFP のようなクローン化された他の生物の遺伝子を組み込むことがでます。
pGLO	アラビノース制御の下で、GFP 遺伝子を含有するプラスミド。さらに、抗生物質に対する抵抗性のための遺伝子をも含んでいます。
スクリーニング	大腸菌ライブラリから希望の大腸菌を識別するための手順。
無菌的手技	慎重な手技を行なうことによって、実験中に外部からのバクテリア汚染の可能性を最小限にすること。付録 C を参考にしてください。
塗　抹	バクテリアを分離するために、先端にバクテリアをつけた植付け用ループを寒天培地プレートの上で動かす方法。
上澄み液	遠心分離で生ずる沈殿よりも軽い、バクテリア成分を含む液体。
ベクター	独立して複製する DNA 分子（すなわちプラスミド）で、その中に外来の DNA フラグメントを挿入して増殖させることができます。

付録 B　基本的概念

細胞とは、独立して増殖することのできる、生物の最小単位です。天然に生息している場所から細胞を集めて、実験用容器の中で増殖させることができます。これを培養といいますが、細胞培養には、適切な栄養分と環境が必要です。増殖させた後、培地内の細胞を採取して研究に使用することができます。

＜クローニングおよび塗抹＞

一つの細胞から増殖させることによって細胞集塊を調製する場合には、集塊内のすべての細胞が遺伝的に同一になります。こうした集塊を作り出す手順を、クローニングと呼びます。寒天上での塗抹の目的は、各々一つの細胞から生ずる、単一コロニーを生じさせることです。そうすれば、これらの細胞の性質を検討することができます。たとえば、*GFP* 遺伝子を含む細胞は、培地にアラビノースが存在する場合にはこれらの細胞内部で *GFP* 遺伝子から GFP タンパク質が作り出されるため、UV 光の下で明るい緑色を発します。

＜DNA および遺伝子＞

DNA とは、細胞の中にある長いひも状の化合物です。DNA の働きは、情報を運ぶことです。細胞が分割するとき、細胞はその DNA のコピーを、娘細胞にわたします。

DNA はファイルキャビネットのようなものです。DNA の中の情報は、遺伝子と呼ばれるファイルに分割されています。ほとんどの遺伝子は、タンパク質を作るための情報を含んでいます。ヒトの体内には 80,000～100,000 種類のタンパク質があり、それぞれ、異なる遺伝子にコードされています。クラゲの *A.victoria* の中では、*GFP* 遺伝子が GFP タンパク質を組み立てるための情報を運んでいます。GFP の遺伝子が特定の場所（バクテリア細胞内など）に移動すると、GFP タンパク質をその場所で組み立てることが可能になります。

＜アラビノースはどのようにして遺伝子を制御するのでしょうか？＞

遺伝子は、異なる環境に適応するように、慎重に調節されています。たとえば、バクテリアは、糖類であるアラビノースを炭素源として利用することができます。アラビノースを消化するために必要なバクテリア酵素は、アラビノースが存在する場合にしか作られません。言い換えれば、アラビノースはこれらの消化酵素に対する遺伝子のスイッチを入れるのです。アラビノースが利用されている場合には、これらの遺伝子のスイッチは切られます。

このキットで使用する pGLO プラスミドは、これらの制御因子を *GFP* 遺伝子と組み合わせるように組換えされています。そのため、アラビノースの存在下では、GFP タンパク質が産生されるのです。細胞内で GFP タンパク質が蓄積すると、明るい緑色の蛍光が発します。アラビノースがない場合には、*GFP* 遺伝子は遮断されます。GFP タンパク質が産生されないと、大腸菌コロニーは白色となり、蛍光は発しません。

＜プラスミドおよび形質転換＞

プラスミドとは、一部のバクテリア細胞内に認められる小さな環状 DNA です。プラスミドは独自で複製することができ、そのため、これらの細胞内でいつまでも生き残ることができます。プラスミド DNA は、その大きさが小さいため、バクテリア細胞から容易に抽出して精製することができます。プラスミド DNA は、遺伝子導入と呼ばれる手法により、バクテリア細胞内に再導入することが可能です。一部のプラスミドには、抗生物質耐性遺伝子が含まれています。こうしたプラスミドが遺伝子導入によりバクテリア細胞に導入されると、このプラスミドを受け取ったバクテリアは抗生物質に対して生き残る能力を獲得し（これを形質転換といいます）、バクテリアの選別が容易になります。

＜DNA は、切断したりつなぎ合わせたりすることが可能です＞

研究者は、酵素を用いて DNA を切断し、つなぎ合わせます。一般的に利用されている手法の一つに、ある特定の DNA 源からの DNA すべてを無作為に切断し、これらの断片を、その後大腸菌細胞内に戻すことのできるプラスミド内に一度につなぎ合わせるという方法があります。各々の大腸菌は異なる断片を受け取ることになります。それぞれの場合に、プラスミドは外来の DNA 断片を細胞内で永遠に自己複製します。こうした大腸菌の集まりを、大腸菌ライブラリと呼びます。元の DNA 源が「不思議な緑の葉」であれば、この葉に由来するすべての遺伝子が、この大腸菌ライブラリのどこかで見つけ出されることになります。

付録 C　安全性、無菌的操作および廃棄物処理

＜無菌操作＞

実験中、バクテリアのコンタミネーションは指先や実験台の上など、至るところで起こりますので、そういった表面にバクテリアを含む溶液等が直接触れることを避けることが重要です。実験の前には、70％エタノールで実験台を拭いておくこと良いでしょう。必ず、それが乾いてから実験を開始します。

生徒達が植付け用ループ、ピペッター、寒天培地を使用している時には、充分に生徒達の操作に気を配り、特に各実験台を巡回し、指導するようにしてください。ピペットの先、寒天培地の表面は実験台に直に触れるように置かないよう指導してください。何らかのコンタミもなく、実験がうまく進んでいれば、生徒達は無菌操作を習得しています。それはまた、実験する私達の衛生と安全につながるのです。

大腸菌を扱う際には、ガスバーナーの火の近くで行うと良いでしょう。バーナーの炎により上昇気流が起こり、ガスバーナーの下は無菌状態に近くなります。ガスバーナーを使う際には、やけどに充分気をつけ、また近くに実験台を拭いた 70％エタノール等がないことを確認しておきましょう。

＜大腸菌を使った実験＞

このキットで使用する K-12:HB101 という種類の大腸菌は、世間を騒がせている大腸菌 O-157:H7 のような病原性は持ちません。 もちろん、遺伝子組換え実験を行った後の大腸菌も同様です。しかし、取り扱いには標準的な微生物学的手技の利用が必要となります。こうした手技にはこれから述べるようなものが含まれますが、これらに限定されるわけではありません。

実験台の表面は実験終了後、または菌体を含む溶液がこぼれたら素早く拭き取り、必ず 70％エタノール水溶液を拭きかけて、ペーパータオル等で拭いてください。また、菌を含むものは液体や固体に関わらず、廃棄する前にオートクレーブをかけてください。また、組換え DNA を導入された生物を含むサンプルを扱った後、実験室を出る前には必ず手を洗いましょう。全ての操作はエアロゾルを最小にするために慎重に行ってください。このキットでは使用しませんが、ガラスピペットを使用する際には、口で吸うのではなく、自動吸引をお使いください。実験室での飲食、喫煙や化粧直し等は厳禁です。

＜実験の実施にあたって－組換え DNA 実験指針＞

大腸菌 K-12 を扱うには、文部科学省「組換え DNA 実験指針」に従う必要があります。また、このキットに含まれる宿主－ベクター系及び供与体 DNA は、指針に記載のある、教育目的組換え DNA 実験に用いることができるものです。

また、地域によっては、その特別に法令等を設けている自治体もありますので、確認をお願いします。

付録 D　胃癌に関する情報

・疫学およびリスクファクター

米国では毎年、胃癌が約 25,000 症例認められています。胃癌は、男性では女性の 2 倍であり、黒人では白人の 2 倍です。発生頻度が最も高い年齢層は 50～59 歳です。米国では発生頻度は大きく低下していますが、全世界では依然として胃癌が主な癌となっています。

原因として、主に食物との関連が疑われています。硝酸ナトリウムや亜硝酸ナトリウム（多くのホットドッグや加工肉に使用されている保存料）は胃袋に入ると分泌される胃酸によって、強力な発癌性物質であるニトロソアミンに変化します。ビタミン C は、ニトロソアミンの化学的反応に対して防御作用があると思われます。

社会経済学的な状況の悪化、喫煙および飲酒は、リスクの増大と相関しています。胃癌は胃潰瘍と誤診されることがあります。

・予防および早期発見

癌のリスクを低減させる食事は、禁煙および飲酒の節制と共に、胃癌に対する最も明確な予防措置です。

・症状および診断

症状は曖昧であり、通常は胃のあたりのわずかな不快感や体重減少から始まります。後期症状には、体重減少の加速、食事開始直後の満腹感、吐き気、血便、貧血、触診による組織塊および腹部の膨脹があります。治療後 4～6 週間たっても胃潰瘍が改善しない場合には、癌である可能性があります。

・治療法および予後

胃癌は治療が困難です。症例の半数では、外科医が腹部を切開した場合に癌が広がっていて除去を試みることが困難となっています。外科手術では、胃の一部または全部が摘出されます。包括 5 年生存率は約 10%にすぎません。

参考文献

Understanding Cancer, 3rd ED., 1989, Pages 176-177, ISBN 0-915950-86-3.

付録Ｅ　支援団体およびその見解

見　解	組　織	これらの組織はどのようなもので、何をしようとしているのか
I	FDA 米国食品医薬品局	製品の安全性を評価し、その製品が実際に製造業者の主張どおりに働くかどうかを検討する責任を有する、政府の機関。製造業者の主張はすべて、動物実験およびヒトでの試験により確認されていなければならない。
II	ラモンおよびその他の胃癌患者	経費や動物実験などの問題を生ずることなく、救済されることを願う、癌患者およびその家族。
III	マチューおよびその他の動物実験反対運動グループの活動家	動物の権利保護団体の活動家は、マウスやサルなどのすべての生き物を、残酷な処置から保護したいとしている。一部の活動家は、動物実験は不要であると考えている。
IV	ティシャーおよびその他のバイオテックス社の従業員	バイオテクノロジー企業の従業員は、患者を疾患や死から守るために、治療薬を発見してそれを市場で販売したいと考えており、同時に、企業の利益を守りたいと思っている。

付録 F　教員用回答テキスト

Lesson 1

1. ティシャーとは何者ですか、また、彼女はなぜ、アンデス山中にいたのですか。

ティシャーは生物学者で、珍しい植物を求めてアンデス山中の熱帯雨林を探索していました。

2. ティシャーとバイオテックス社が解決しなければならない問題点を二つ挙げてください。

まず、緑色タンパク質の遺伝子をもつ大腸菌を培養させてそれを単離する方法を決定する必要があります。さらに、どのようにして大量の大腸菌を増殖させ、培養物から緑色タンパク質を精製するか、方法を見つけ出さなければなりません。

3. 不思議な葉に由来する遺伝子を大腸菌細胞に挿入した理由はなんでしょうか。

大腸菌は、植物の遺伝子を細胞内に獲得し、増殖させることのできる宿主として機能しています。今回の研究者たちは、特に、GFP の遺伝子を増殖させることに興味を持っていました。

4. バイオテックス社の技術者が特殊な癌治療タンパク質を大腸菌細胞内に入れることに成功したかどうかを決定するために役立つ糸口として、どのようなものがありますか。

クローニングが成功していれば、大腸菌は、不思議な葉と同じように明るい蛍光を発するはずです。

Lesson 2

1. タンパク質

a. タンパク質とは何ですか。

アミノ酸の鎖からなる、微小分子です。

b. 体内にあるタンパク質の例を 3 つあげてください。

抗体、消化酵素、毛髪タンパク質、ホルモンおよびヘモグロビンなどはいずれも、タンパク質の例です。

c. 遺伝子とタンパク質との関係を説明してください。

遺伝子は、タンパク質のアミノ酸組成を決定する遺伝的コードを含んでいます。体内のすべての細胞に、各々のタンパク質のための独自の遺伝子が存在します。

2. 自分の言葉で、クローニングを定義し、記述してください。

細胞または組織の複製および増殖。

3. 大腸菌ライブラリ内の大腸菌細胞は、シングルコロニーの大腸菌細胞とはどのように異なっているのかを記述してください。

大腸菌ライブラリには、多様な遺伝子の混合物を含む、種々のタイプの大腸菌混合物が含まれています。大腸菌の

シングルコロニーは、単一の遺伝子のみを含む個々のクローンから生じています。

4. 大腸菌細胞からどのようにして癌治療タンパク質を分離できるかを記述してください。

大腸菌の緑色蛍光コロニーを単離すれば、液体培地の中で大量の大腸菌を増殖させることができます。液体培地中の大腸菌は、遠心分離により濃縮することが可能です。大腸菌細胞を溶解して癌治療タンパク質を放出させた後は、この癌治療タンパク質に対して親和性を持つクロマトグラフィーカラムを通じることにより、このタンパク質を分離することができます。

Lesson 3

1. 大腸菌コロニーとは何ですか。

大腸菌コロニーとは、クローンと呼ばれる単独の細胞から生じた大腸菌細胞の大きなグループまたは集塊のことです。

2. 寒天培地プレートから緑色コロニーと白色コロニーを一つずつ選択したのはなぜですか。これによって、何が証明されますか。

緑色コロニーは、大量の緑色癌治療タンパク質を増殖または産生させるために選択されました。白色コロニーは、緑色癌治療タンパク質を含んだり産生したりするのが緑色コロニーのみであることを示すための「ネガティブコントロール（陰性対照）」として選択されました。

3. クローニング実験では以下の装置はどのように役立ちますか。

a. 紫外線（UV）灯 －*UV 灯にあてると、GFP は蛍光を発し、目に見えるようになります。*

b. *インキュベーター－インキュベーターは、大腸菌が増殖できるようにするための暖かい温度を維持するためのものです。*

c. 振盪培養器－*振盪培養器により、暖かい温度と、大腸菌培地に酸素を加えるための空気が供給されます。酸素量が増加すると、大腸菌の増殖速度が速まります。*

4. クローン化した大腸菌を液体培地に入れて培養させることと、癌の治療薬として蛍光タンパク質を検討するという最終的な目的との間にどのような関係があるのかを説明してください。

GFP を含むクローン化した大腸菌細胞は、精製に利用することができるような大量の GFP を産生させるために、まず、大腸菌細胞自体を大量に増殖させなければなりません。大量の GFP 含有大腸菌が入手できるようになれば、大腸菌細胞を濃縮し、GFP を放出させて、濃縮した沈殿から GFP を精製できるようになります。

Lesson 4

1. 胃癌治癒力を持つ可能性のある特殊な植物タンパク質を産生する遺伝子を増やすために、バクテリアを利用しました。Lesson 4 で使用した以下の装置・材料の機能について述べてください。

a. 遠心分離機－*大腸菌を沈殿させ、液体培地から大腸菌を分離するための機能。*

b. リゾチーム－*大腸菌細胞壁を酵素的に分解する機能を持ちます。大腸菌細胞壁が弱くなれば、凍結によって大腸菌は破壊します。*

c. 冷凍庫－*細胞質を膨脹させて弱くなった大腸菌細胞壁を完璧に破壊するために、大腸菌を凍結する機能。*

2. 今回のタンパク質精製手順では、なぜ上澄み液を捨てたのですか。

上澄み液に含まれているのは液体培地であり、希望の GFP は含まれていないため。

3. 「－」のチューブから白色の液体を捨て、緑色の液体をとっておいたのはなぜですか。

大腸菌の白色培養物には GFP は含まれておらず、その後の精製段階では不要になるから。

4. 細胞を凍結すると菌体の外膜が破壊する理由を説明できますか。未開封のソフトドリンクのビンを冷凍庫に入れるとどうなるでしょうか。

大腸菌細胞を凍結すると、細胞質の容量が膨脹します。この膨脹により、弱くなった大腸菌細胞壁に圧力が加わり、この圧力によって大腸菌細胞壁が破壊されます。

5. 大腸菌を破壊または溶解する目的は何ですか。

GFP を放出させ、その後、カラムクロマトグラフィーを用いて GFP を精製できるようにするために、大腸菌を破壊する必要があるのです。

Lesson 5

1. (a)今回の実験では、沈殿は何色でしたか。(b)上澄み液は何色でしたか。(c)なぜそのようになると考えているのかを説明してください。

(a) 沈殿は、白っぽい緑色をしているはずです。

(b) 上澄み液は明るい緑色の蛍光を発するはずです。

(c)上澄み液の緑色蛍光は、緑色タンパク質が大腸菌から放出され、上澄み液に残っていることを意味します。大腸菌沈殿が薄い色をしているのは、溶菌によって大腸菌から GFP が放出されたことを示唆しています。

2. 今回のタンパク質精製手順で沈殿を捨てたのはなぜですか。

沈殿には、細胞壁、細胞膜、染色体 DNA などの、不要な大腸菌細胞片が含まれています。沈殿に含まれている GFP はごく少量であり、廃棄しても差し支えありません。

3. タンパク質クロマトグラフィーについて簡単に説明し、今回の実験の目的を述べてください。

タンパク質クロマトグラフィーは、他の分子からタンパク質を分離または精製するために利用することのできる手法です。今回の実験では、GFP が疎水性であるため、GFP を精製するためには疎水的相互作用クロマトグラフィーを使用しました。

Lesson 6

1. サンプルに何が生じたか、いつ次の緩衝液を HIC カラムに加えるかについての予測および試料の観察結果を記入してください。

採取用チューブの番号	予 測	UV 光の下での観察（カラムおよび採取用チューブ）
試験管 1 結合用緩衝液中での試料	*GFP はカラムに結合しているはずです。*	*GFP は、カラムの上部にバンドとして存在しています。*
試験管 2 洗浄用緩衝液中での試料	*GFP はカラムに結合しているはずです。*	*GFP は、カラムの上部に幅の広いバンドとして存在しています。*
試験管 3 溶出用緩衝液中での試料	*GFP はカラムから溶出するはずです。*	*GFP は環状になってカラムの中を下に移動し、試験管 3 に溶出されます。*

2. 上述のデータを用い、各々の緩衝液について予測が観察結果とどの程度適合していたかを比較してください。

a. 結合用緩衝液－*GFP はクロマトグラフィーカラムの上部に結合しています。*

b. 洗浄用緩衝液－*GFP はカラムの上部に存在しています。*

c. 溶出用緩衝液－*GFP はカラムから溶出しています。*

3. 結果に基づいて、これらの緩衝液の役割または機能を説明してください。ヒント：緩衝液の名称はその機能とどのように関連しているでしょうか。

a. 平衡化緩衝液－*この緩衝液では、GFP を流しいれるためのカラムを調製します。平衡化緩衝液はカラムの塩濃度を上昇させ、大腸菌 GFP 溶解産物に適した状態にします。*

b. 結合用緩衝液－*この緩衝液は、GFP の塩濃度を上昇させて、GFP の構造を変化させ、疎水性の部分が表に出てくるようにします。*

c. 洗浄用緩衝液－*洗浄用緩衝液は、疎水性の低い、混在するタンパク質をカラムから洗い流すために使用します。*

d. TE（溶出用）緩衝液－*この緩衝液は、GFP をカラムから除去するために使用します。*

4. 塩濃度が最も高い緩衝液ともっとも低い緩衝液はどれですか。どうしてそうなるのですか。

結合用緩衝液>>平衡化緩衝液>>洗浄用緩衝液>>溶出用緩衝液。

結合用緩衝液は、GFP 溶解産物の塩濃度を上昇させる必要があるために、最も高い塩濃度となっています。このタンパク質の疎水性の部分は、塩濃度の高い緩衝液の中で表に出てきます。TE 溶出用緩衝液は、GFP をカラムから溶

出させるために、最も低い塩濃度となっています。このタンパク質の疎水性の部分は、塩濃度の低い緩衝液の中では再び中に向いて、親水性の部分が表に出てきます。

5. クローン化した大腸菌細胞からの GFP の分離および精製に成功しましたか。回答を裏付ける証拠を述べてください。

試験管 3 が緑色蛍光を発していれば、学生は GFP の精製に成功しています。試験管 3 に GFP が認められない場合には、カラムに間違った緩衝液を流し込んだために溶出していない可能性を調べてください。または、学生が明るい緑色の培養物で実験を開始していない場合には、試験管 3 がきわめて明るい色になることはありません。

Lesson 7

1. 上述の結果に基づいた場合、この緑色タンパク質は胃癌を制御すると思われますか。

はい。GFP 投与量が増加するにつれて、腫瘍の数が減少しています。さらに、プラセボでは腫瘍の数には影響はなく、このことからも、胃癌に対する GFP の作用が裏付けられます。

2. サルやヒトなどの大きな動物で試験を行なう場合には、どの程度の量のタンパク質が望ましいと思われますか。

量は、動物の体重によって左右されると思われます。ラットの平均体重が 0.25kg で、ヒトの平均体重が 72kg だとすると、直線的な用量関係が存在すれば、ヒトを治療するために必要な滴数は約 288 滴になると思われます。しかし、このことを確認するためには、用量確認試験が必要と思われます。

3. 今回の試験のことを聞きつけて、動物実験反対運動グループの活動家がバイオテックス社に陳情に訪れ、また、同社には、動物実験に代わる方法を見つけるようにとのファックスや手紙が届けられています。一部の活動家は動物を人道的に取り扱うことの必要性を強く感じており、こうした人々は今後、バイオテックス社の製品をボイコットする恐れがあります。悪評がたてば投資家が援助をしなくなり、今後の研究が脅かされる可能性があります。動物実験反対運動グループの活動家であるマチューが今、ティシャーの事務所に来ています。あなたがティシャーだとすると、マチューの懸念を解消し、この危機的状況を回避するために、どんなことを話したり、行なったりしますか。

マチューには、ヒトの胃癌の治療薬として GFP を開発するためには、動物実験が非常に重要なのだ、まず動物で試さなければ、ヒトに投与する際の用量を知ることは難しいのだと説明することができます。さらに、薬物の効果を検定するために、培養細胞系などの、動物を用いない試験方法を検討する予定であると示唆することもできます。

Lesson 8

A. FDA（米国食品医薬品局）

FDA からは、ヒトを対象とした市販薬として認可する前に、動物およびヒトの双方で GFP の試験を行なうことが要求されます。

B．ラモンおよびその他の胃癌患者

これらの人々は、胃癌に対する効果的な治癒薬または治療薬を求めています。

C．マチューおよびその他の動物実験反対運動グループの活動家

これらの人々は、動物の権利を守ることを求めており、動物実験を避けるよう求めています。

D．ティシャーおよびその他のバイオテックス社の従業員

これらの人々が、自分たちの GFP を精製して効果のあるものにし、FDA から市販のための認可を受けたいと思っていることは明らかです。胃癌に対する効果的な治療薬としての GFP の利用は、これらの人々の研究努力に報いるものとなるでしょう。

Lesson 9

1．メディケアからの経済的支援が多くなるのは、肺癌と胃癌のどちらのタイプの癌ですか。

メディケアからは、肺癌に対して、1 億 5000 万ドル（300,000 症例×500 ドル＝1 億 5000 万ドル）という、最も大きな支援が得られると思われます。

2．バイオテックス社が大きな利益を得られるのは、肺癌と胃癌のどちらのタイプの癌ですか。

胃癌では、薬物の製造経費と治療費用との差が 200 ドルになるため（肺癌の場合には 100 ドル）、胃癌治療の場合の方が、利益が大きくなると思われます。

3．バイオテックス社が今回のタンパク質を癌に対する治療薬として市場販売するとした場合、肺癌に対する治療薬と胃癌に対する治療薬の販売価格はどのいくらに設定すればよいでしょうか。両者は同一の価格となりますか、異なる価格となりますか。また、その理由も説明してください。

議論の余地のある質問です。倫理的には、同一価格で販売すべきであると考えると思われますが、バイオテックス社は企業として生き残るために利益を上げる必要がありますので、利益を上げるために、企業の生き残りのためには胃癌の費用のほうを高くするべきだと論じることも可能です。

Lesson 10

問　題

ここでは提示する問題に対して生徒たちが導き出す、さまざまな回答や解決法を期待しましょう。

付録 G　発現調節、1 遺伝子＝1 タンパク質

私達の体は、たくさんの異なった役割を持つ、何千ものタンパク質から成り立っています。消化酵素も、その一つですし、私達の体中に走っているホルモン信号や病気から守ってくれる抗体もタンパク質です。その、タンパク質を作るもとになる情報は、DNA が持っています。タンパク質を作り出す暗号を含む DNA 部分は遺伝子と呼ばれ、人間にはおよそ 3 万の遺伝子が存在します。それぞれ 1 つの遺伝子は、1 つのタンパク質をコードしています。たとえば、消化酵素をコードする遺伝子は消化酵素だけをコードし、抗体や目の色素をコードする遺伝子とは異なるのです。

私達生物は、私達の遺伝子が発現するのを自身で調節することで、進化や細胞特異性、環境適応など、さまざまな理由から、細胞中で機能するタンパク質の量や種類を調節します。遺伝子発現調節は、状況変化への適応だけでなく、不必要なタンパク質が過剰生産されるのを防ぎます。食物の運搬と消化に関与する遺伝子も、発現調節されている遺伝子の良い例の一つです。例えば、糖であるアラビノースはバクテリアにとってエネルギー源と炭素源の両方に使われます。バクテリアは食物としてアラビノースを消化するために、3 種類の酵素（タンパク質）を作り出します。これらの消化酵素をコードする遺伝子は、アラビノースがないと発現されませんが、アラビノースが存在すると発現されます。これはどういうことでしょうか？

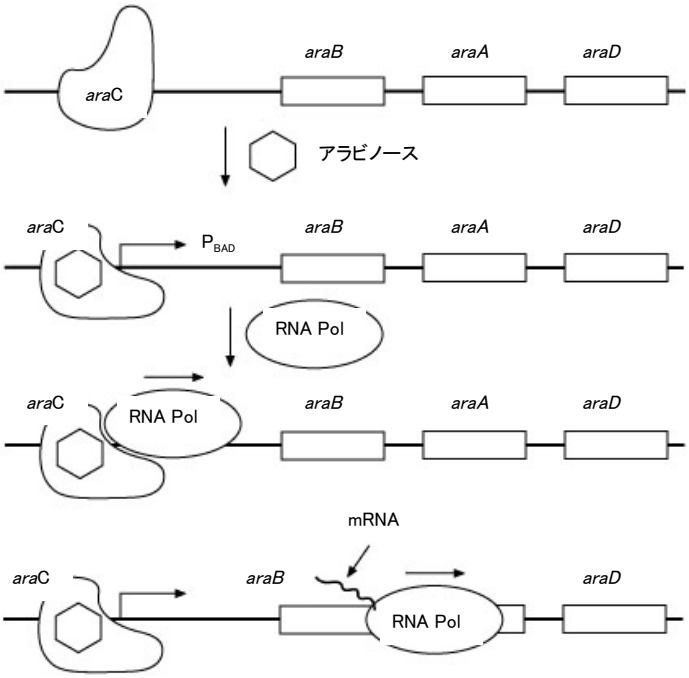
タンパク質の発現調節は DNA から RNA が転写されるときに起こることもあります。この調節はプロモーターと呼ばれる、テンプレートである DNA 上にあり、RNA ポリメラ―ゼが結合し RNA への転写が始まる、という非常に特異的な位置で行われます。バクテリアでは、関係のある遺伝子はある場所に集中して存在し、一つのプロモーターで転写調節されています。この遺伝子の集団（＝クラスター）はオペロンと呼ばれ、1 つのプロモーターで転写調節されています。

アラビノースを分解する酵素を始めとした、3 つの消化酵素は *ara*B、*ara*A、*ara*D の 3 つの遺伝子によってコードされています。これらの遺伝子はクラスターを形成しており、アラビノースオペロンとして知られています。これら 3 つのタンパク質は P_{BAD} という 1 つのプロモーターによって RNA への転写が開始されます。3 つの遺伝子の転写はプロモーター、オペロンを含む DNA テンプレート、RNA ポリメラ―ゼ、*ara*C という DNA 結合タンパク質が必要になります。*ara*C は RNA ポリメラ―ゼが結合するアラビノースオペロンの始まる DNA 配列部分に結合します。アラビノースが存在すると、バクテリアはアラビノースを細胞内に取り込みます。取り込まれたアラビノースは DNA に結合している *ara*C と作用します。RNA ポリメラ―ゼが DNA に結合することを手助けできるように、アラビノースとの作用によって *ara*C は形を変え、3 つの遺伝子の転写が始まるのです。3 つの酵素が作られると、その酵素が機能してアラビノースが消化され、なくなっていきます。アラビノースがない時には、*araC* はその形を変えることがないので、転写は行われなくなります。

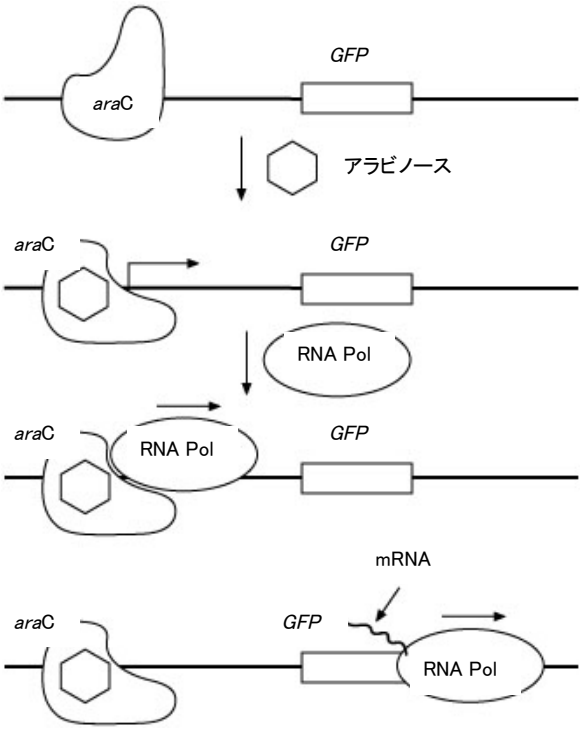
pGLO プラスミドの DNA には、アラビノースオペロンの一部分が組み込まれています。プロモーター P_{BAD} と *ara*C 遺伝子が存在しています。しかし、アラビノース消化酵素をコードする *ara*B、*ara*A、*ara*D は含まれて折らす、変わりに GFP をコードする遺伝子が 1 つ、組み込まれています。このことによって、アラビノース存在下では *ara*C が RNA ポリメラ―ゼの結合を促し、GFP が作り出されるのです。細胞が緑色に光るのは GFP が細胞内でたくさん作り出されるからなのです。アラビノースがない場合は、RNA ポリメラ―ゼが DNA に結合する手助けをしないため、GFP 遺伝子は転写されません。GFP タンパク質が作り出されないときは、細胞はもともとの細胞の状態、光らない、白いコロニーになるのです。

このことは、DNA＞RNA＞タンパク質＞性質・特徴という、生物を理解する上で、大変重要な 1 つのしくみ（セントラルドグマ）の格好の例なのです。

アラビノース オペロン



GFP タンパク質の発現



付録Ｈ　教育目的遺伝子組換え実験実施の時の注意事項について

2004 年 2 月 19 日から施行された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下「法」と略）及びその関係規則や省令では遺伝子組換え実験だけでなく、遺伝子組換え生物の取り扱い全般に関して取り決めがされています。安全性が高い教育目的遺伝子組換え実験でも研究開発と同様、これに沿って実験を行う必要があります。

また、これまでの「組換え DNA 実験指針」（以下「指針」と略）は上記法施行と同時に廃止になります。教育目的実験に関しては大きく変わる部分はないと思われますが、多少の変更点もありますのでご注意ください。

教育目的遺伝子組換え実験を（特に中学校・高等学校で）実施する際の注意事項を、関係すると思われる条文とともに記します。

なお、関係法律等の詳細については文部科学省ホームページをご参照ください。
（http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/index.htm）

・実験の指導について

研究開発等の場合での実験を含む遺伝子組換え生物等の取扱いに関する体制や記録保管については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 3 条の規定に基づく基本的事項」（以下「基本的事項」と略）に記述があります。教育目的実験でもできるだけこれに沿った形で実施することが望ましいと考えられます。

実験の指導者は遺伝子組換え実験の経験があることが望ましく、また適切に拡散防止措置を執りながら実験従事者を指導することが重要です。また、法令等には教育目的実験における安全委員会等設置に必要性については記述されていませんが、これまで同様、所属長あるいは実験室が設置されている機関の長の同意を得ることが望まれます。

また、今までのように実験実施に関する記録（実験日時、場所、実験系、実験後の廃棄に関する事項、参加者名簿等）は残しておくことも必要です。

＜基本的事項より抜粋＞

第二　遺伝子組換え生物等の使用等をする者がその行為を適正に行うために配慮しなければならない基本的な事項

1　他法令の遵守に関する事項

遺伝子組換え生物等の使用等を行う者は、法の規定によるほか、人の健康の保護を図ることを目的とした法令等予定される使用等に関連する他法令を遵守すること。

2　遺伝子組換え生物等の取扱いに係る体制の整備に関する事項

第一種使用規程（第一種使用等の場所を限定する等生物多様性影響を防止するために第一種使用等の方法を限定する場合に限る。4において同じ。）の承認を受けようとする者又は第二種使用等をしようとする者は、遺伝子組換え生物等の使用等をする事業所等において生物多様性への影響を防止するための措置を適切に行うことができるよう、遺伝子組換え生物等の特性及び使用等の態様に応じ、遺伝子組換え生物等の安全な取扱いについて検討する委員会等を設置し、第一種使用規程の承認若しくは拡散防止措置の確認を受けるに当たり又は第二種使用等を行うに当たり、あらかじめ遺伝子組換え生物等の安全な取扱いについての検討を行うとともに、遺伝子組換え生物等の取扱いについて経験を有する者の配置、遺伝子組換え生物等の取扱いに関する教育訓練、事故時における連絡体制の整備を行うよう努めること。

3　情報の提供に関する事項

譲渡者等は、譲受者等に対し、主務省令で定められる情報を提供する際、遺伝子組換え生物等の性状等に応じて、譲受者等が当該

遺伝子組換え生物等を適切に取り扱うために提供することが望ましいと判断される情報を有する場合には、当該情報についても提供するよう努めること。

4　記録の保管に関する事項

第一種使用規程の承認取得者及び第二種使用等をする者は、使用等の態様、2の委員会等における検討結果、譲渡等に際して提供した又は提供を受けた情報等を記録し、保管するよう努めること。

・実験系について

指針には別表7に教育目的組換えDNA実験に使用できる宿主ーベクター系及び供与体DNAがリストアップされていました。法律化に伴いこれらの記述はなくなりましたが、本キットで使用している宿主ーベクター系及び供与体DNA はこれらに該当している、非常に安全性の高いものとして選ばれたものですので、今後も教育目的実験にご使用いただくことができます。

・実験室について

法律では、教育目的遺伝子組換え実験は実験室内で行なわれる「第二種使用」にあたります。第二種使用についてはいくつか別途省令等が定められていますが、その中でもこのキットを使用した実験系等を行なう教育目的実験は「研究開発等に関る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」に規定されているP1レベルの拡散防止措置（これまでの指針では物理的封じ込め）を執る必要があります。

＜第二種省令より抜粋＞

（遺伝子組換え実験に係る拡散防止措置の区分及び内容）

第4条　遺伝子組換え実験（別表第1に掲げるものを除く。次条において同じ）に係る拡散防止措置の区分及び内容は、次の各号に掲げる遺伝子組換え実験の種類に応じ、それぞれ当該各号に定めるとおりとする。

1　微生物使用実験別表第2の左欄に掲げる拡散防止措置の区分について、それぞれ同表の右欄に掲げる拡散防止措置の内容

別表第2（第4条第1号関係）

拡散防止措置の区分	拡散防止措置の内容
一　P1レベル	イ　施設等について、実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。 ロ　遺伝子組換え実験の実施に当たり、次に掲げる事項を遵守すること。 (1)　遺伝子組換え生物等を含む廃棄物（廃液を含む。以下同じ。）については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 (2)　遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再使用（あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。以下「廃棄等」という。）の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 (3)　実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 (4)　実験室の扉については、閉じておくこと（実験室に出入りするときを除く。）。 (5)　実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等必要な措置を講ずること。 (6)　すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。 (7)　実験室以外の場所で遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときその他の実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等が漏出その他拡散しない構造の容器に入れること。

	(8) 遺伝子組換え生物等を取り扱う者に当該遺伝子組換え生物等が付着し、又は感染することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等必要な措置を講ずること。 (9) 実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。

・組換え体の保管及び運搬について

組換え体を保管・運搬する場合にはしっかりと密閉し、それが組換え体であることを容器や外箱に明記する必要があります。

例えば実験で作成した組換え大腸菌をオートクレーブ処理するまでの間保管する時、それらを箱等の中にまとめて冷蔵庫で保管するとします。この場合、大腸菌を培養したプレートやチューブへの表記はもちろん、箱の外側や冷蔵庫の外側にも“組換え大腸菌保管中　取り扱い注意”等の張り紙をしてください。

＜第二種省令より抜粋＞

（保管に当たって執るべき拡散防止措置）

第 6 条　研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち、保管（遺伝子組換え実験又は細胞融合実験の過程において行われる保管を除く）に当たって執るべき拡散防止措置は、次に定めるとおりとする。（施行規則第 16 条第 1 号、第 2 号及び第 4 号に掲げる場合並びに虚偽の情報の提供を受けていたために、第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を執らないで第二種使用等をする場合を除く。）

1　遺伝子組換え生物等が漏出、逃亡その他拡散しない構造の容器に入れ、かつ、当該容器の見やすい箇所に、遺伝子組換え生物等である旨を表示すること。

2　前号の遺伝子組換え生物等を入れた容器は、所定の場所に保管するものとし、保管場所が冷蔵庫その他の保管のための設備である場合には、当該設備の見やすい箇所に、遺伝子組換え生物等を保管している旨を表示すること。

（運搬に当たって執るべき拡散防止措置）

第 7 条　研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち、運搬（遺伝子組換え実験又は細胞融合実験の過程において行われる運搬を除く）に当たって執るべき拡散防止措置は、次に定めるとおりとする。（施行規則第 16 条第 1 号、第 2 号及び第 4 号に掲げる場合並びに虚偽の情報の提供を受けていたために、第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を執らないで第二種使用等をする場合を除く。）

1　遺伝子組換え生物等が漏出、逃亡その他拡散しない構造の容器に入れること。

2　当該遺伝子組換え生物等の遺伝子組換え実験又は細胞融合実験に当たって執るべき拡散防止措置が、P1レベル、P2レベル、LSCレベル、PS1レベル、P1Aレベル、P2Aレベル、特定飼育区画、P1Pレベル、P2Pレベル及び特定網室以外のものである場合にあっては、前号に規定する措置に加え、前号に規定する容器を、通常の運搬において事故等により当該容器が破損したとしても当該容器内の遺伝子組換え生物等が漏出、逃亡その他拡散しない構造の容器に入れること。

3　最も外側の容器（容器を包装する場合にあっては、当該包装）の見やすい箇所に、取扱いに注意を要する旨を表示すること。

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

本社　〒116-0014　東京都品川区東品川 2-2-24

Tel : 03-6361-7000　Fax : 03-5463-8480

大阪　〒532-0025　大阪市淀川区新北野 1-14-11

Tel : 06-6308-6568　Fax : 06-6308-3064

福岡　〒812-0013　福岡市博多区博多駅東 2-5-28

Tel : 092-475-4856　Fax : 092-475-4858

製品の学術的なお問い合わせ

修理・メンテナンスに関するお問い合わせは

Tel : 03-6404-0331　Fax : 03-6404-0334

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com

http://explorer.bio-rad.co.jp

M4124 1303E