

東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修： （生物・生命コース）の報告

著者	木野 瑞萌, 阿部 紗織, 山本 千尋
雑誌名	技術報告
巻	22
ページ	49-54
発行年	2017-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00010251

東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修

(生物・生命コース) の報告

○木野瑞萌・阿部沙織・山本千尋

技術部 教育研究支援部門

1. はじめに

今回私は、8/8~8/10に開催された東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修（生物・生命コース）に参加した。合同研修の目的は、東海・北陸地区の国立大学法人等の技術職員に対し、その職務遂行に必要な基本的、一般的知識及び専門的知識、技術等を修得させ、技術職員としての資質の向上を図るとともに職員相互の交流に寄与する事を目的としていた。

1日目はオリエンテーションと全体講義、2日目は6コース中からそれぞれが1コースを選んで、そのテーマでの実習を行い、3日目は実習結果の発表と薬学部附属薬用植物園の見学を行った。選択したコースは、静岡大学からは阿部技術職員がCコースの「唾液中からの人ペルペスウイルスの検出」、山本技術職員がBコースの「透過電子顕微鏡による微粒子試料の観察」、木野技術職員はDコースの「遺伝子改変マウスのジェノタイピング」となった。この3つのコースを中心に発表する。

2. Bコースの研修（透過電子顕微鏡による微粒子試料の観察）

透過電子顕微鏡による微粒子試料の観察だが、透過型電子顕微鏡はネガティブ染色法でウイルスや生体高分子の形態観察を行う方法がある。ネガティブ染色とは、支持膜の上に載せたウイルス等の観察対象を、重金属塩類で染色する方法だ。重金属塩類は電子を散乱させるが、ウイルス等の粒子は電子が透過するため、負のコントラストを得ることで観察できるようになる。

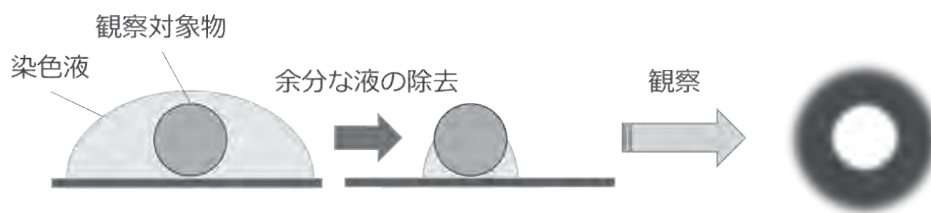


図1 ネガティブ染色の仕組み

この実習では、牛乳のガセインミセルをネガティブ染色して観察することで、一連の操作を習得することが目的となる。牛乳の前処理として乳脂肪分の取り除きと希釈を行い、リンタングステン染色液、酢酸ウラン染色液を調整したあと、支持膜を試料溶液に接触させることで試料をのせる。余分な溶液を吸い取らせ、染色液を乗せる。この後これも余分なものは吸い取らせ、乾燥後観察を行った。結果は、ネガティブ染色によってガセインミセルの周りが黒くなり、観察できるようになっていた。

また、酢酸ウラン染色の画像と比較すると、酢酸ウラン染色の方が、ガセインミセルは黒く見えたことから、リンタングステン染色より酢酸ウラン染色の方が染色されやすいことがわかった。

さらに、牛乳の処理で取り除いていた乳脂肪分も染色し、観察した。これにより、乳脂肪分はガセインミセルより100倍程度大きく、また平べったい形をしていることも観察できた。

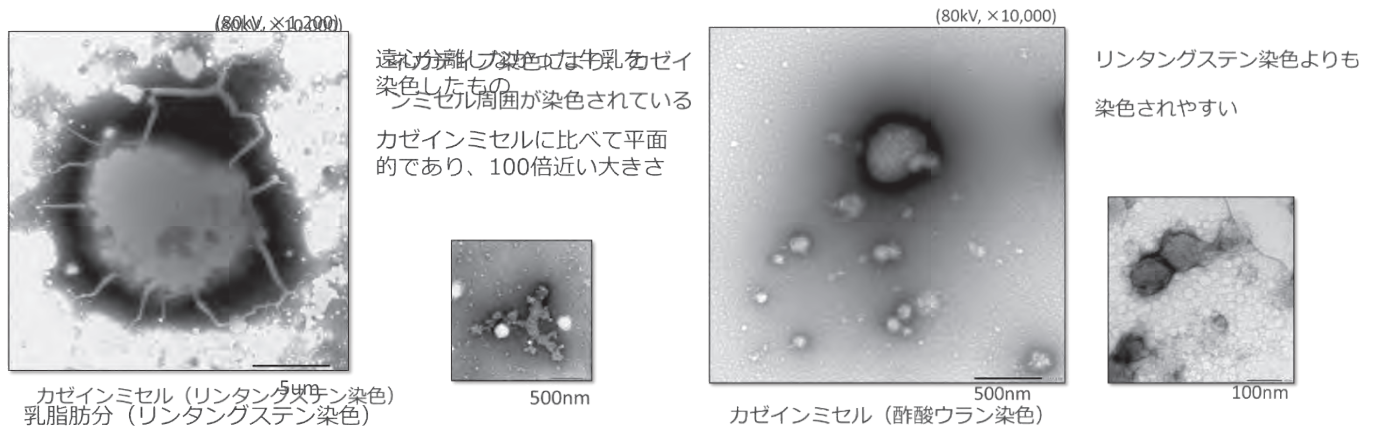


図2 染色結果

この実験は、得られる像が輪郭部分であるため、その像が目的とするものなのかそれともそれ以外のゴミなのかを判別することが難しいと感じた。また、試料の下面だけに溶液を残すのか、それとも上面にも乗せるのかや、下面の液体をどれだけ除去するのか等によって、同じ人が同じ実験を行っても得られた像が異なることもあるため、きれいな像を得るにはかなりの時間と技術を習得する必要があることも学んだ。

3. Cコース (唾液中からの人ペルペスウイルスの検出)

「唾液中からの人ペルペスウイルスの検出」は、唾液中からの人ペルペスウイルスの検出は、唾液中に含まれるウイルスをPCRによって検出する実習だった。ヘルペスウイルスは成人の70~80%が感染しており、普段は病的症状は出ないようにしている。免疫力が弱くなると分裂し症状が出るが、免疫力が戻れば粘膜や体内のウイルスは排除される。しかしウイルス自体は神経節にもいるため、免疫が働かない。そのため一度感染すると一生感染したままとなる。ウイルスは、ヒトヘルペスウイルス属のEBV、HCMV、HHV-6、HHV-7の4種類を検出することになった。唾液を採取した後、2種類の抽出方法を試した。1つ目はたんぱく質分解酵素と界面活性剤を用いてウイルスDNAを分離し、分離したDNAを、キアゲンキットを使用して精製する方法、2つ目は前処理不要のフナコシ・カネカキットを使用してウイルスを分離、分離したDNAをキアゲンのキットを使用して精製する方法だ。どちらの場合も、精製後はウイルスDNAはPCR法によって増幅し、エチジウムブロマイドを混ぜてある3%アガロースゲルで電気泳動を行った。

結果は、本来4種類のバンドが出る予定だったが、このコースを選択した4人とも0~1種類のバンドしか出なかった。泳動したゲルにはスメアが確認されているため、増幅されているDNAがあることはわかる。少ないバンドしか出なかった理由として考えられるのは、一部は抽出法2の過程でミスがあったこと、そもそもウイルスに感染していなかったこと、分離できたウイルスDNAが少なかったことや、自分のDNAが混入してしまったこと等が挙げられる。富山大学の1年生の実験結果をお借りすると、だいたい2~3種類のウイルスが検出されていた。

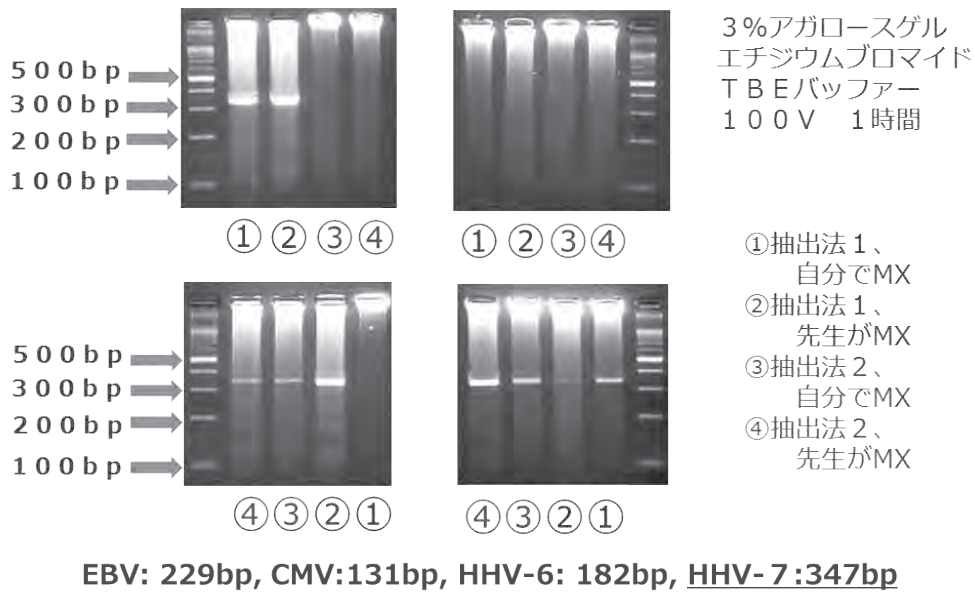


図3 増幅した遺伝子の電気泳動の結果

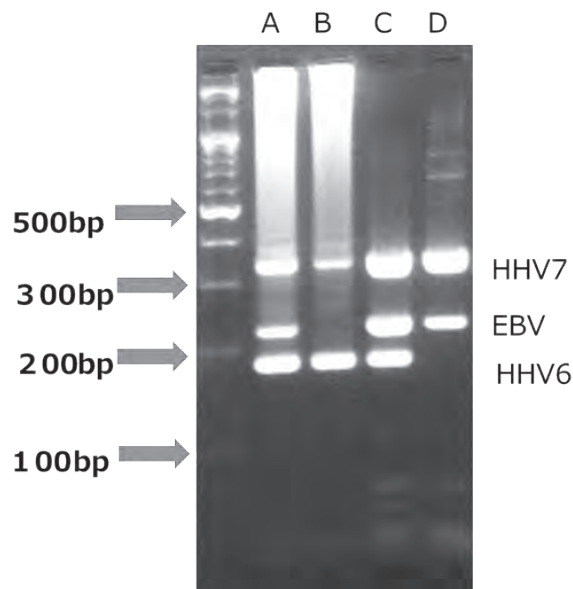


図4 富山大学1年生の結果

ヒトヘルペスウイルスは、疲労している人の方が活発になり、実験で検出できるウイルスの種類が多くなるという性質がある。そのため、このような手法は労働現場でどの程度疲れているか、というものの目安となっている。今回の実験結果でウイルスの検出数がすくなかったのは、実験者の体調も関係しているかもしれない。

4. Dコースの研修（遺伝子改変マウスのジェノタイプング）

遺伝子改変マウスのジェノタイプングは、まず実験動物がどのようなものなのかという講習を受けた。その後遺伝子改変されたマウスのDNAの抽出と電気泳動を行い、結果を待っている間マウスの灌流実験を行った。

今回の遺伝子改変マウスはコンディショナルノックアウトマウスとして、cre-loxPシステムを導入する目的で作られたマウスだ。このシステムは、ノックアウトしたい遺伝子の前後にloxP配列を導入しておき、その後に臓器特異的に発現するようにしたCre酵素を発現させることによってその遺伝子を取り除くことを目的としている。コンディショナルノックアウトマウスを作成するのはいくつか手順が必要であり、対象遺伝子をloxPで挟んだ遺伝子を作って、それをホモ接合で持つマウスと、臓器特異的にCre酵素が発現しているマウスと掛け合わせることで、特定の臓器で対象遺伝子を取り除くことができる。目的とする臓器以外ではその遺伝子は働いているため、全身でノックアウトすると致死になる遺伝子の働きも調べることができる。

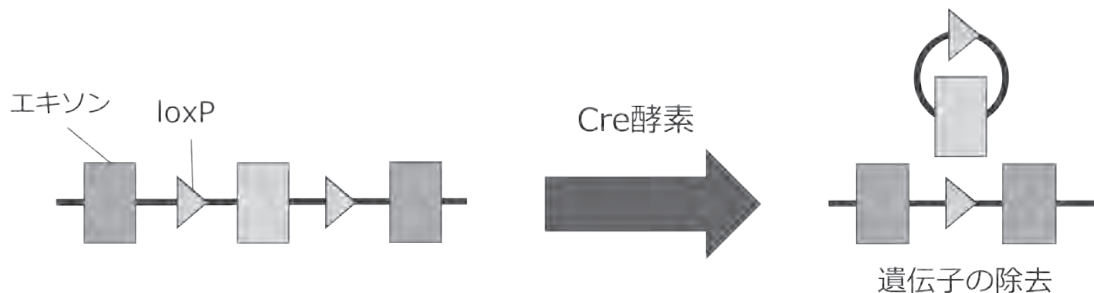


図5 Cre/loxP システム

今回はFlt-1遺伝子を標的遺伝子としたコンディショナルノックアウトマウスのPCRを行った。これはヘテロ欠損になっても病気になり、またホモ欠損になると胎児のときに死んでしまうため、コンディショナルノックアウトマウスを制作する必要がある。Flt-1ホモでCre遺伝子を持つ個体を確認するため、Cre、Flt-1に反応するプライマーを使用して、遺伝子が導入されていることを確認した。

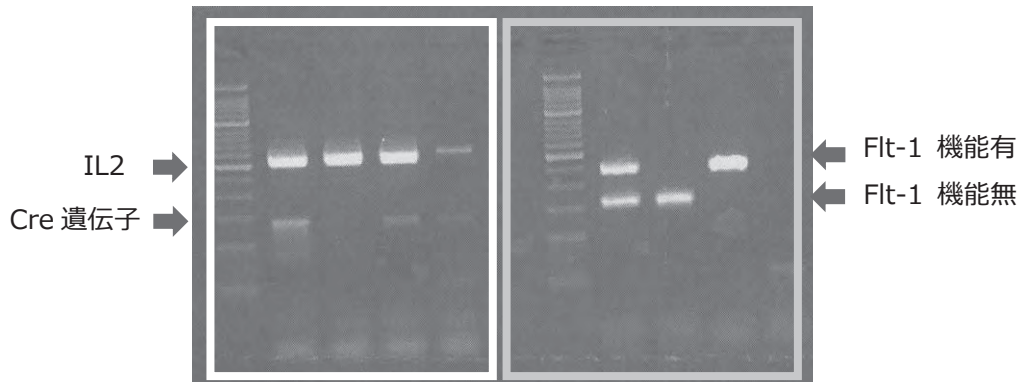


図6 遺伝子改変マウスの電気泳動結果

この実験の他に、マウスの灌流実験を行った。灌流は心臓を通して血管に固定液をいれることによって素早く固定を行う方法で、通常の固定法だと壊れてしまうような小さい、弱い組織も固定できるため、より詳細に構造を調べる方法だ。体内で起こった変化を詳しく見ることができる。実験は、マウスに麻酔を行い、麻酔がかかった段階で脚を針で刺して固定した。開腹し、全胸壁を切って上に向けて鉗子で止めて心臓を露出させた。右心室に切れ込みをいれ、すぐに左心室にも切れ込みを入れて注射針を差し込んで冷やしたPBSを流した。置換が完了すると灌流前は赤かった肝臓が白くなる。その後固定液を流し、組織全体を固定した。固定後は断頭し、頭蓋骨を除いて脳を取り出した。

今回は脳の観察を行うという想定で行わせたが、これ以外の臓器も良い状態で観察できるため、様々な変化を見ることができる。遺伝子変異によって体内にどんな変化が起きたのか、小さな変化も見つけることができる。

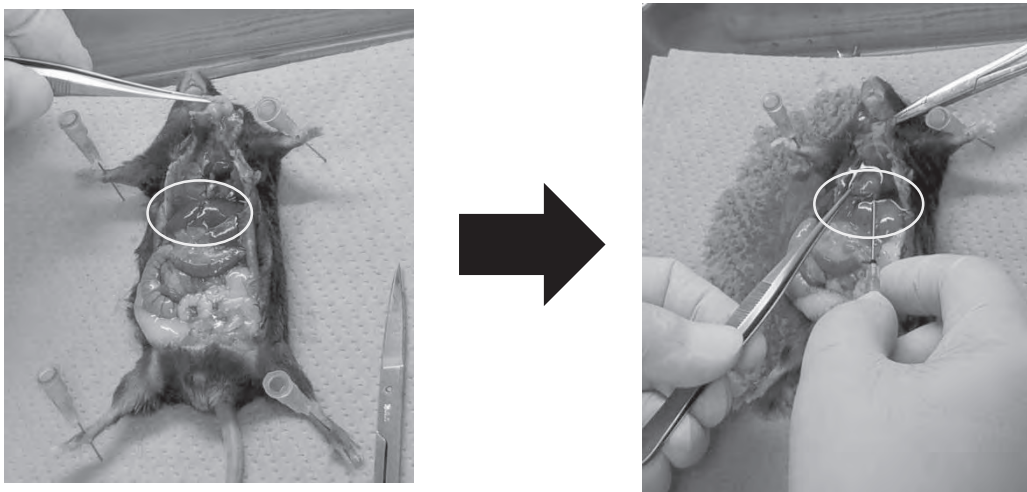


図7 マウスの灌流実験の様子

5. 謝辞

研修を計画し、準備、指導していただいた富山大学の方々に、この書面をお借りいたしまして深く感謝いたします。

6. 参考文献

[1] 痛みと沈痛の基礎知識,

<http://www.shiga-med.ac.jp/~koyama/analgesia/nr-transgenesis.html#Cre-loxP>

(最終閲覧日：2017年1月).

[2] 平林 敬浩、八木 健：Cre/lpxPシステムー脳科学辞典,

<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/Cre/loxP%E3%82%B7%E3%82%B9%E3%83%86%E3%83%A0>

(最終閲覧日：2017年1月).