

9 2 生物分野 「遺伝子工学の基礎」

(1) 研究開発の概要

植物細胞のプロトプラストを作成し、異なる細胞間での細胞融合を試みる。色素の有無によって区別できる細胞の融合は、光学顕微鏡でも容易に観察でき雑種細胞が作成される経緯を知ることができる。シロイヌナズナの無菌株を切り出し、ホルモン添加培地でのカルスの誘導と器官の再分化を試みる。カルスの再分化によって、分化した細胞の全能性を確認するとともに、無菌培養処理も体験する。

(2) 研究開発の経緯

ア 準備・打ち合わせ

昨年同様の、本校のカリキュラムに即した生徒実習手順で行う。

ただし本年度は、シロイヌナズナの無菌播種に失敗したので、松林先生の指導のもと、本校の無菌装置を使用して、改めて無菌播種を試みた。



無菌播種（名古屋大学）

(ア) 平成19年4月、名古屋大学大学院生命農学研究科松林嘉克助教授に特別研究協力について指導を受ける。

(イ) 平成19年6月2日、松林助教授に、代表生徒4名に対する実技指導を受ける。

イ プロトプラスト作成と細胞融合の生徒実習を、7月10日（3組）、7月11日（1・2組）に実施し、カルス誘導を9月13日に、その結果観察を10月19日に実施した。

ウ 各実験について、レポート作成を指示した。

また、参加生徒全員に本事業についてのアンケートを実施した。

エ レポートを提出させ、実施目的が達成できたかを調べた。

(3) 仮説（ねらい、目標）

ア 通常細胞の原形質分離時の形態とプロトプラストの形態を比較観察する。

イ 赤タマネギのプロトプラストを使用して細胞融合を観察する。

ウ カルス作成・組織の再分化を通して、植物細胞が全能性をもつことを確認する。

エ レポート作成を通して、主体的に探究する態度を身につける。

(4) 研究の方法および内容

ア 対象生徒 3年生理系生物選択者（1・2組25名、3組18名）

イ 実施日程

(ア) 「プロトプラスト作成と細胞融合」 7月10（3組）、11日（1・2組）

(イ) 「カルスの誘導」 9月13日（1・2・3組）

結果確認 10月19日（1・2・3組）

ウ 実施内容

(ア) 「プロトプラスト作成と細胞融合」

前処理：ニンジンの根と赤タマネギの色素を含む表皮を採取し、酵素液中で一晩静置する。

タマネギ表皮を、マンニトール液につけ、湿室で一晩静置する。

本実習： 試料液をろ過したろ液を遠心分離し、沈殿（プロトプラスト）を顕微鏡観察する。



プロトプラスト観察実習



カルス細胞

ニンジンと赤タマネギのプロトプラストのスケッチ後、両者を混合して、ポリエチレングリコールを添加し、細胞が融合する過程を観察する。

マンニトール液中で原形質分離した表皮細胞と、プロトプラストを比較観察する。

(1) 「カルスの誘導」

シロイヌナズナ無菌株から茎等を取採し、無菌培地（22、連続光下）で約3週間培養する。

結果観察

脱分化してできたカルス細胞を観察し、レポートを作成する。

(5) 検証（成果と反省）

ア 結果の分析

(7) 「プロトプラストと細胞融合」の授業（実験）について

昨年同様、生徒は実習に強い関心・興味をもち、積極的に取り組んだ。

身近な植物細胞を材料とし、異なる色の2種類の細胞が、顕微鏡下で実際に融合することが観察できた。また「原形質分離」との比較から、細胞壁が存在しないことや、細胞が融合できる理由を納得でき、関心がもてたものと思われる。

(1) 「カルス誘導」の授業（実験）について

組織細胞の脱分化とカルスの形成に長時間必要で、生徒は関心を持続させることが難しく、「細胞分化」に対する関心は(7)より小さかった。

しかし今年も、無菌操作を経験することによって、カビの存在を改めて認識するなど、目的外ではあるが興味をもった生徒が多かった。

本年、理由は不明であるが、名古屋大学の松林先生の研究室で、代表生徒が播種した培地（30枚）では、ほとんど発芽が見られなかった。生徒全員分の無菌株を用意することができないと判明したので、改めて種子を譲渡していただき、再度播種した（8月20日）。この播種は本校生物準備室のクリンベンチによって、希望生徒3人が行った。

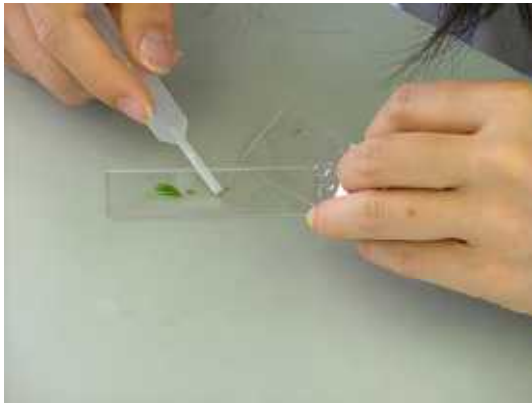
(7) 特別研究全体について

昨年度に続く本校では3度目の生徒実習であり、実習操作に対する教師の指導力も向上し、余裕をもって準備、実施することができた。

たまたま本年は、無菌播種を2度実施することになったが、そのやり直しを本校で実施することになった。その結果本校内でも実習に耐える無菌状態を1~2ヶ月保つことができることが明らかになった。

やり直しができることは、本校の日程にあわせ、一般の生徒とともに実施することが可能であり、その分生徒達にはより身近に感じることができた。

このことから、授業進度にあわせてより有意義な時期に実施できることがわかった。



カルス観察実習



原形質分離の確認

イ 研究開発実施上の問題点及び今後の研究開発の方向

(ア) 実施するにあたって

昨年度の実施した簡易滅菌装置は、本年も十分な効果を現した。

本年は、播種培地に使用した容器をガラス製に変更した。

これは、今後、無菌播種を本校で実施する場合に、繰り返し利用できるか否かを確認するためである。その結果、市販の滅菌容器よりも高価であるが、オートクレーブ（120℃ 5分）の2回滅菌で、2ヶ月近くの培養に耐える培地作成ができることがわかった。

培養期間中、1ヶ月後にカビの発生を見たものもあったが、コンタミによって廃棄しなければならない培地は、約30%であった。

種子は、次亜塩素酸ナトリウム溶液（実効5%）で滅菌したのち、滅菌水で洗浄することを、3回繰り返した。上記の廃棄した培地のほとんどは種子からのものと思われるが、この方法での廃棄率が約30%である。

やや多めに培地を準備すれば、十分な数の材料を準備できると思われる。

(イ) 大学や研究機関との連携について

本年もまた、名古屋大学の松林助教授の指導を受けることができた。毎年のことであり、本校の意図をよく理解され的確な指導を受けることができた。メールのやりとりで疑問や問題点に対して即座に指導いただけたことは、準備を進める上でも大きな効果があった。

1ヶ月以上の培養を、本校の設備で滅菌状態に保つことができるか否か、非常に心配であった。しかしまたま1回目の種子が発芽しなかったことから、生徒実習の材料が不足する事態になり、毎日のように松林先生の指導を受けながら、容器や種子の滅菌、播種を行った。その結果、不十分な滅菌で廃棄するものも多いが、実習目的を達成するには十分である準備方法を学んだ。

(ロ) 実施後のフィードバックについて

生徒のレポートから、今回の特別研究で生まれた疑問やさらなる興味を見出すことができた。今回得られた経験を自ら深化させ、発展させるような実習を、今後も授業の中で実践していきたい。

また、大学側に生徒や教員の感想をフィードバックすることで大学側と協力体制をとり、今後の対策をいろいろな側面から模索していきたい。