

40 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、異種細胞間で細胞融合を試みた。色素の異なる細胞間での融合は光学顕微鏡で容易に観察でき、雑種細胞が作成された経緯を知ることができた。また、シロイヌナズナの無菌株から、ホルモン添加培地におけるカルスの誘導と器官の再分化を無菌培養により成功させ、いったん分化した細胞にも全遺伝子が失われずに残っており、ホルモンによりこれらの遺伝子が発現することを目の当たりにすることができた。

(2) 研究開発の経緯

ア 準備・打ち合わせ

(ア) 平成16年9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の内諾をいただく。

(イ) 平成16年12月、松林助教授に4時間の授業展開例を提示し、教示をいただく。

(ウ) 平成17年3月、松林助教授に代表生徒4名の指導協力の内諾を得る。計画を一部変更する。

(エ) 5月、名古屋大学にて代表生徒5名(希望者が募集人員を上回ったため、5名に変更)が松林助教授の指導のもと、特別研究当日に使用するイロイヌナズナ無菌株を作成(播種)する。



融合した二種の細胞

イ 実験は、2・3組が6月9日、16日、7月8日、および8月4日で、4・5組が6月8日、6月17日、7月6日および8月1日の各日程で実施した。

ウ 各実験後、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 通常の植物細胞とプロトプラストを比較観察する。

イ 異種の細胞間で行われる細胞融合を観察し、バイオテクノロジーが発展した経緯を知る。

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 器官分化に植物ホルモンがどのように関わっているか考えさせる。

オ 観察、実験やレポート作成を通して、真理の追究に向け主体的に探究する態度を身につけさせる。

(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(2・3組31名、4・5組31名)

イ 実施日程

(ア) 第1回目 「プロトプラスト作成と細胞融合」

6月8日(4・5組) 9日(2・3組)

(イ) 第2回目 「組織培養1～カルスの誘導」

6月16日(2・3組) 17日(4・5組)

(ウ) 第3回目 「組織培養2～カルスから組織への再分化」

7月6日(4・5組) 8日(2・3組)

(エ) 第4回目 「組織培養3～まとめ」

8月1日(4・5組) 4日(2・3組)

ウ 実施内容

(ア) 第1回目 「プロトプラスト作成と細胞融合」

ニンジンの根と赤タマネギの色素を含む表皮を切り刻み、酵素液(ペクチナーゼ、セルラーゼを含む)を作用させ、一晚静置したものをプロトプラスト懸濁液とする。これをろ過したろ液を1分間遠心分離し(1,000rpm)、沈殿した液を顕微鏡で観察し、プロトプラストが得られたか確認した。ニンジンと赤タマネギのプロトプラストをスケッチし、比較観察した。また、作成した両者のプロトプラストを混合し、ポリエチレングリコールを作用させ、細胞が融合する過程を観察した。

(イ) 第2回目 「組織培養1～カルスの誘導」

シロイヌナズナ無菌株から茎を無菌的に切り出し、脱分化用培地、基本培地（ホルモンなし）にのせ、人工気象器内（22℃、連続光下）で約3週間培養した。また、シロイヌナズナの葉・根・茎を肉眼・光学顕微鏡で観察し、スケッチした。



シロイヌナズナのカルス

(ウ) 第3回目 「組織培養2～カルスから組織への再分化」

脱分化したカルスを茎再分化用培地、根再分化用培地および基本培地（ホルモンなし）に移し、人工気象器内（22℃、連続光下）で約4週間培養した。また、カルスを実体顕微鏡で観察・スケッチし、脱分化した（葉緑体をもたない）ことを確認した。

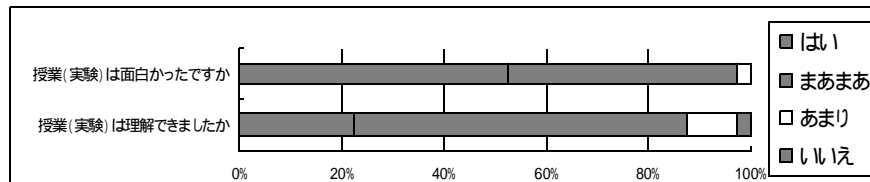
(エ) 第4回目 「組織培養3～まとめ」

再分化した組織を培地組成の違いと関連づけて比較・観察した。また、スケッチをした。さらに、4回の実験のまとめとして、特別研究4「バイオテクノロジーの基礎」からわかったこと・理解できたことをまとめさせた。

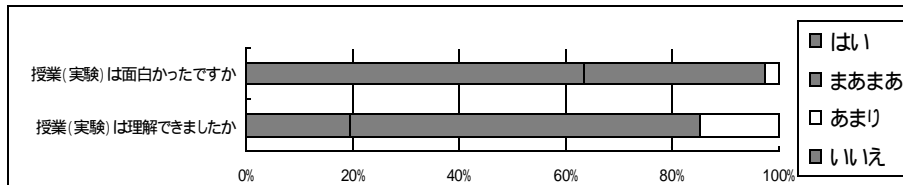
(5) 検証（成果と反省）

ア アンケート結果の集約

(ア) 「プロトプラストと細胞融合」の授業（実験）について



(イ) 「組織培養」の授業（実験）について



イ アンケートの結果の分析

(ア) 「プロトプラストと細胞融合」の授業（実験）について

- a 9割を超える生徒が、この実験に強い関心・興味をもっていたことがわかる。
- b 理解度についても8割強の生徒が理解できたと回答し、身近な植物（野菜）からプロトプラストを作成し、色の異なる2種のプロトプラストが実際に融合することを観察したことが、生徒の理解を深めたようである。

一方、「理解できなかったことは何ですか」の問いには、「なぜ細胞融合が起きるのか」、「融合した細胞の核は2つ存在することになるのか、またその細胞は自分でまた細胞壁をつくって分化していくのか」、「ニンジンと赤タマネギの異種間だとうまく融合しなかったこと（非自己だからか?）」と答えている。このことから、生徒は細胞が融合するという現象だけを捉えているのではなく、さらに自ら課題を見つけて観察できたことが窺える。



プロトプラストの作成

- c 「印象に残ったことは何ですか」の問いに、「酵素を作用させるとプロトプラストができること」、「ニンジンと赤タマネギの細胞融合を実際に見たこと」とあり、このことから生物個体の中でも起こっている生命現象やバイオテクノロジーを体験し、生命の神秘に触れることができたことが窺える。また、身近な植物（野菜）を用いたことも生徒の興味を引いたようだ。
- d 「さらに知りたいこと」については、「融合した細胞をさらに培養してみたい」、「他の植物で試しても細胞融合するのか、融合した細胞は新しい品種として生育できるのかを調べてみたい」などがあつた。

(イ) 「組織培養」の授業(実験)について

- a 9割を超える生徒が、この実験に強い興味・関心をもっていたことがわかる。
b 理解度についても8割強の生徒が理解できたと回答し、実際に無菌操作を体験し、2ヶ月という長い時間をかけてホルモン組成の異なる培地で組織を培養し、カルスや再分化した組織を時間経過に伴って観察したことが、自ら学ぶ姿勢につながったようである。また、代表生徒が材料の無菌株を準備したことで他の生徒にとっても培養が身近なものに感じられ、無菌操作も集中したものとなった。



再分化した組織の観察

一方、「理解できなかったことは何ですか」の問いには、「ホルモンを加えなかった培地の方がよく育ったこと」、「透明な毛が何かよくわからなかった」、「カビが生えるのはどうしてか」などと答えていることから、じっくり時間をかけて観察できたことがわかる。



無菌操作

また、「カルスはどうやってできるのか」から、ホルモンと遺伝子の発現の関係を意識するような回答も得られ、本特別研究のねらいの達成に近づいた。

- c 「印象に残ったことは何ですか」の問いに、「カルスから葉や茎が生えてきたこと」、「加えるホルモンによって分化する組織が異なること」などがあり、教科書に記載されていることが具体的に脳裏に焼きつき、実感できたことがわかる。また、「カルスが硬かったこと」、「カルスを実体顕微鏡で見るときれいだったこと」など、生徒は視覚や触覚などに直接訴える実験材料に興味をもつことがわかる。さらに、「無菌操作をしたこと」、「白衣を着て、メスを使った本格的な実験だったこと」、「緊張感のある実験が楽しかった」など、普段高校の授業では行うことができないSSHならではの醍醐味を味わうことができた。一方、「ちょっとしたことですぐにカビが生えたこと」も多くの生徒の回答に見られ、高校の実験室で行う無菌操作の難しさを痛感した。
- d 「さらに知りたいこと」については、「ホルモンと遺伝子の関係はどうなっているのか」や「ホルモンは(植物の成長にとって)必要不可欠か」があり、自らの学習の指標ができた。また、「このままカルスを育てたら個体ができるのか」など、さらに長期的に培養を続けてみたいとの意見もあり、進路を選択するひとつのきっかけになることを望む。



カルス細胞

(ウ) 特別研究全体について

実験の操作そのものを改善した方がいいのでは、という意見に「ニンジンのプロトプラストがわかりにくかった」、「無菌操作の仕方を改善すべき(暑いし、カビが生えやすいので)」というものがあつた。

使用する材料の選別や無菌操作の方法については本研究を実施する以前から試行錯誤したが、植物細胞はどの種でも容易に細胞融合をするわけではなく、また無菌操作を一度も経験したことのない高校生を対象に完全に無菌状態を維持することは困難で、設備が不十分な高校で無菌培養を実施することの難しさを改めて痛感した。

また、「観察の時間をもっと長くしてほしい」という意見が多数あり、決められた時間の中でいかに観察の時間を増やすかが新たな課題となった。

さらに、「実験後に自分の推測が正しいのか示してほしい」という意見もあり、普段決まった答えを求めて学習している様子が浮き彫りになった。しかしながら、「私にとって興味深い内容だった」、「とても実りのある実験だった」という意見も多数あり、生徒が満足できる実習になった。

ウ 研究開発実施上の問題点及び今後の研究開発の方向

生徒のコメントから問題点や今後の展望が見えた。以下にそれを示す。

(ア) 実施するにあたって

4回目の教材開発になる本特別研究の特色は、大学の先生の助言を常にいただきながら、指導教員で高校生にも実施できるように実験を組み立てたことである。特に、「プロトプラストと細胞融合」の実験は手探りで、使用する材料、プロトプラスト懸濁液のごみを効率よく除く方法、プロトプラストを破裂させないような遠心分離、およびできたプロトプラストを高密度で集める方法など、研究の対象は多岐に及んだ。生徒のコメントから、ニンジンのプロトプラストは透明に近く、生徒にとっては観察しづらいことがわかった。より適した材料を見つけるべく、今後も研究していきたい。

また、「組織培養」では、松林助教授に多くのご教示をいただいた。植物の培養は、結果が出るまでに長い時間がかかるため、何度も失敗しながら、なんとかホルモンの組成を得ることができた。

なお、最も苦労したのが無菌操作で、高校の実験室でクリーンベンチをつくることの難しさを知った。上昇気流だけでは、なかなかクリーンな状態にならず、もう一步、工夫を重ねる必要がある。

反省点としては、特別研究全体を通しての授業計画では観察に主眼をおいたが、65分の授業枠にすべてをおさめることは困難で、時に生徒をせかしてしまったことが挙げられる。

今回の教材開発のために多くの時間を費やした。その甲斐あって、概ね生徒の反応は我々を満足させるものであった。この特別研究を通して、指導教員自身も理科教育について考えさせられ、自らを見つめなおし、教師の本質を振り返ることができたと実感している。

(イ) 大学や研究機関との連携について

事前準備を1年前から行い、早い段階で大学の先生の指導を仰いだことで、具体的な授業案を提示し相談することができた。また、こちらが何を目的としているのかを示して初めて具体的で的確なアドバイスにつながることを実感した。

さらに、大学の先生が代表生徒に熱心に培地や無菌株の作成のご指導をくださったことで、当生徒たちはもちろん他の生徒の積極性につながった。

(ウ) 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、発展させるような指導を授業の中でも実践していきたい。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。