

植物ホルモンを介した環境応答を
分子生物学的手法に基づいた実験により理解する
教材開発と授業実践

2017

兵庫教育大学大学院
連合学校教育学研究科
園山 博

《目次》

序 章	1
1 章 ・ ・ ヒマワリ矮性品種を用いた茎の伸長に対するジベレリンの効果を理解するための教材開発と授業実践	
I はじめに	5
II 生徒実験開発のための諸実験	8
III 授業実践	14
IV 授業実践の評価	19
V おわりに	26
2 章 ・ ・ 黄化芽生えの徒長とジベレリンの関係から植物の環境応答を学ぶ実験教材の開発と授業実践	
I はじめに	27
II 生徒実験開発のための諸実験	30
III 授業実践とその評価	38
IV おわりに	45
3 章 ・ ・ PCRにおけるプライマーの働きの理解を目的とした授業案と授業実践	
I はじめに	46
II PCR実験の概要	51
III 生徒実験開発のための諸実験	54
IV 実践授業とその評価	59
V おわりに	66

4 章	植物の環境応答を遺伝子発現と関連づけるためダイレクト RT-PCR 法を用いた実験教材の開発と授業実践	
I	はじめに	68
II	生徒実験開発のための諸実験	69
III	ホウレンソウ黄化芽生えの光照射による徒長抑制と <i>SoGA3ox</i> 発現量の変化	72
IV	環境変化がもたらす遺伝子発現の変化を検証する授業計画	80
V	授業実践と学習効果の評価	84
VI	まとめ	92
終 章		95
引用文献		102
謝 辞		106
資 料	1-1 ワークシート「ジベレリンの働きと節間の伸長」	107
	2-1 ワークシート「芽生えの伸長と植物ホルモン」	111
	3-1 ワークシート「PCR法によるDNAの特定領域が 増幅される仕組み」	114
	4-1 ワークシート「Direct RT-PCR法による遺伝子発現を確かめる 暗所の芽生えはどのようにして茎を伸ばしているのか？」	120

序 章

高等学校の現行学習指導要領解説理科編（文部科学省 2009b）には、「生物」の内容の（3）生物の環境応答 イ 植物の環境応答の項に対して、「植物が植物ホルモンや光受容体の働きで環境変化に反応する仕組みを理解させることがねらいである。」と解説されている。一方、前学習指導要領解説理科編（文部省 1999b）には、「生物Ⅰ」の内容の（2）環境と生物の反応 イ 環境と植物の反応で、「植物の生活が外部の環境条件に影響を受けていることや、植物に見られる反応と調節の仕組みを環境と関連させて理解させる。」と述べられている。今回の改訂では単元名が「環境応答」と変更されるとともに、内容の取扱いが「環境と関連させて理解させる」から「環境変化に反応する仕組みを理解させる」と変更され、環境による植物の形態的变化や生理的变化を学ぶ単元であることが強く打ち出されている。

植物ホルモンが高等植物の形態形成、生育過程での生理変化や環境応答を調整していることは過去多くの研究から明らかである（今関 1998）。山路ら（2006）が大学生1・2年次生を対象として実施した調査によれば、生物ⅠA、生物ⅠBおよび生物Ⅱの教科書に掲載されている34の生物実験中、植物ホルモンに関する実験の実施率は25位であり、よく実施されているとは言いがたい実験項目に挙げられている。また、畑中（1993）の小学校教諭養成課程2年次生を対象とした調査報告によると、石原・山上（1983）の分類に基づいた34の生物実験中、植物ホルモンに関する実験は実施率が最も低く2%であった。このように、植物ホルモンを取り扱った実験はほとんど行われていない。

高等学校の学習指導要領解説理科編（文部科学省 2009b）では、「生物」の5つの目標を解説している。すなわち、（1）生物や生物現象に対する探究心、（2）目的意識を持った観察・実験、（3）生物学的に探究する能力と態度、（4）基本的な概念や原理・法則の理解、（5）科学的な自然観の育成。環境への応答を学ぶ中で植物ホルモンを扱い、「生物」の目標の（1）から（4）を達成し、生物の生活に広汎に現れる分子的な仕組み、すなわち、（5）に当たる「科学的な自然観」に裏打ちされた現代的な生物観を育成する教材を構築しようと考えた。

環境の変化や差異が植物の形態変化を引き起こすまでには、多くの日数を要するので、授業の時間や時間割に合わせて植物の変化を検証することができる教材が求められている。環境に反応して植物が変化する様子を知るには、継続した観察が必要であ

る。実験の進め方を工夫して限られた時間の中で、植物を継続的かつ、目的意識のある観察を行なえば、「生物や生物現象に対する探究心」を育てたり、「生物学的に探究する能力や態度」を身につけたりすることにつながるであろう。

環境に応答した形態の変化などその作用を観察することはできるが、植物ホルモンの存在は植物を観察しても知ることができない。しかし、植物ホルモンの存在とその作用に関する仮説を検証する適切な実験を行なえば、植物ホルモンの存在を確信することができる。このように目的意識を持った観察・実験を通じた学習には、教科書で学ぶ生物現象の基本的な概念や原理・法則の理解が必須である。この知識理解を活用することで、仮説（課題）を検証することができる。つまり、観察や実験などを通して仮説を検証することは、生物や生物現象に関する基本的な概念や原理・法則が世界の至る所で成り立つことを理解することにつながる。

セントラルドグマは、生物学を発展させた基本的な概念の一つである。DNAが持つ遺伝情報がmRNAを経てタンパク質へ受け渡され遺伝子が発現することの理解には、生物学の「基本的な概念や原理・法則の理解」に基づく「科学的な自然観を育成」が内包されている。しかし、このことを探究的に学ぶためには、分子生物学的分野の実験技術の習得とそのしくみの理解が不可欠となる。いわゆるバイオテクノロジーは、これからの時代に不可欠な科学リテラシーであるとともに、現行学習指導要領（文部科学省 2009a）における「生物」の大きな変更点でもある。

先に述べたように、植物ホルモンを取り扱った実験はほとんど行われていない。しかし、片山ら(1982)は、植物ホルモンの作用を肉眼で確認でき、定量的に把握できる教材として、異なる濃度の GA_3 を投与したイネ苗の第二葉鞘の長さを測定し、ジベレリンの作用と徒長について生徒の理解を深める実験を開発した。著者らはこの教材を用いて、生徒たちに GA_3 が第二葉鞘の伸長を促進させることや GA_3 の作用が矮性種と普通種とでは異なることとその原因を考えさせる授業を行い報告している。また、マカラスムギの分割種子が、吸水した時に胚があれば胚乳のデンプンが分解され、胚が無くても GA を投与すれば胚乳のデンプンが分解される実験では、明瞭な結果がなかなか得られない。明瞭な結果を得るために、泉・山口(2012)は、3つに切断した種子の両端を「胚あり」と「胚なし」として用いることを提案している。これらの教材は、外から投与した植物ホルモンが植物体や組織に直接的に引き起こした現象を観察する実験であり、環境の変化が引き起こす植物ホルモンの現象として扱うことはでき

ない。

本研究では、4つの教材を開発し4つの実践を行った。開発した教材の効果、すなわち、著者の意図とした効果がそれぞれの教材を使用した実践で得られたのか、あるいは、教材が生徒の理解を向上させたのかを、何らかの客観的根拠をもって評価したいと考えた。

生物の目標に倣って書けば、本研究で開発した教材は、いずれも、(1)生物や生物現象の理解と、生物学的に探究する能力や態度の開発、(2)生物や生物現象に関する基本的な概念や原理・法則の深く、系統的な理解、(3)セントラルドグマを基礎に「科学的な自然観、とりわけ生物観の育成」、(4)分子生物学的分野の実験の技術習得とそのしくみの理解、を目指した。したがって、この観点から教材を評価できるように工夫した。

(1)については、教材を用いた実践授業を行い、積極的に行っているか観察するとともにアンケートを用いて生徒たちの関心度を評価した。(2)(3)については、教材を通して理解してほしい内容を問う選択肢問題による調査を行い、統計的な検定を行った。(4)については、作業上の課題を設定し、その課題の成否で評価した。また実験のしくみの理解については、(2)(3)と同様に選択肢問題等を用いて評価した。各評価問題は個々の生徒の到達度を主観的に評価するのではなく、教材と授業を客観的に評価することに留意して作成し、アンケートには自由記述として行うことにした。

前述のように、環境変化に応じた植物の形態変化や生理変化を植物ホルモンが介在する現象として扱う実験は、教科書にも取り上げられておらず、新しい教材の開発や提案もほとんど行われていないので、この単元では、生物の学習目標である「生物学的に探究する能力や態度を身に付けさせる」ことが難しい状況である。そこで本研究では、植物の環境応答により消長する内生植物ホルモンとその作用による植物の形態変化を、高校生が正しく理解するため、まず、1章では、ヒマワリの矮性品種を用いて、ジベレリンの伸長促進作用と品種による草丈の違いを学ぶ実験教材の開発とその実践について述べる。この実験教材の実践を通して、生徒たちは形態の違いを遺伝子の違いと捉えるようになるとともに、ジベレリンの作用の特徴を理解するようになった。2章では、暗所の芽生えが徒長する理由をジベレリンの作用と合わせて考える実験教材の開発とその実践について述べる。この実験教材の実践を通して、明暗の環境に応じで内生ジベレリン量が増加していることに気づき、ジベレリン量の測定を行い

たいと考える者もいた。ジベレリン量を測定することは、高等学校では不可能に近いが、遺伝子発現を検証することは可能だと考えて、分子生物学的な手法を導入することを試みた。3章では、分子生物学的な手法の理解と基本技術習得に向けて教材の開発とその実践授業について述べた。この実践を通して、生徒たちはマイクロピペットの扱いを習得し、分子生物学実験に多用されるPCRにおけるプライマーの働きを理解するようになった。4章では、ジベレリン合成系の主たる酵素であるGA3oxidaseの遺伝子発現の消長をダイレクトRT-PCRで調べる教材の開発とその実践について述べる。この実践を通して、生徒たちは環境に応答した遺伝子発現と植物ホルモンを介した形態の変化を関連づけて理解するようになった。

1章 ヒマワリ矮性品種を用いた茎の伸長に対するジベレリンの効果を理解するための教材開発と授業実践

I はじめに

現行の高等学校学習指導要領解説理科編（文部科学省 2009b）では、植物の環境応答の単元の内容の取扱いに「植物ホルモンと光受容体を扱うこと」と明示している。一方、旧高等学校学習指導要領解説理科編（文部省 1999b）の内容の取扱いでは「植物の発芽、成長、花芽形成等と環境との関連について探究の過程を重視して扱うこと」と記載しており、植物ホルモンという文言は見当たらない。現行では、より明確に植物ホルモンの学習を行なうことが示された。また、現行学習指導要領に基づく各教科書（浅島ら, 2013; 本川ら, 2013; 嶋田ら, 2013; 吉里ら, 2013; 庄野ら, 2014）には、旧課程の教科書（石原ら, 2009; 石川ら, 2008; 川嶋ら, 2011; 本川ら, 2006; 田中ら, 2009）で扱われたオーキシン、ジベレリン（以下GAと示す）、アブシシン酸、サイトカイニン、エチレンの5つの植物ホルモンに加え、ジャスモン酸やブラシノステロイドも扱われる内容へと変更された（表1-1）。しかし、探究活動は、旧課程から現課程に変わってもオーキシンの作用を扱うものが多く、新しい内容の実験は見られない（表1-2）。

近年、植物ホルモンの作用と信号伝達などの多くの事象が、変異体を利用し解明されている。例えば、根の異常な重力屈性を示すシロイヌナズナの変異体 *aux1* を用いたオーキシン輸送体タンパク質の発見（Marchant ら 2002）や、シロイヌナズナの GA に対する不感受性の変異体 *gai* を用いた GA の信号伝達経路の解明（Peng ら 1997）がある。

実験植物の変異体は、研究機関で系統の維持管理が行われており、高等学校では、入手や利用が困難である。しかし、園芸植物には、矮性変異体が有用な品種として販売されている場合がある。GA が関わる矮性形質の要因には、GA 生合成系の変異や GA に対する不感受性の変異を挙げることができる（山根 1991）。生合成系の変異ならば、GA を投与すれば矮性形質が改善され、茎の伸長が確認できる。

大手種苗会社のホームページ（例えば、サカタのタネ (<http://www.sakataseed.co.jp/>)）で調べると、スイートピー、コスモス、ヒマワリなどの矮性品種を見つけることができる。スイートピーやコスモスは、茎が細く、節間長を繰り返し測定する際に折ってしまう心配があるが、ヒマワリは幼苗でも茎が十分に太く、繰り返しの測定

表 1-1 現旧学習指導要領に基づく各教科書に記載のある植物ホルモン

	Aux	GA	CK	ABA	Eth	BS	JA
第一学習社	現	○	○	○	○	○	○
	旧	○	○	○	○		
実教出版	現	○	○	○	○	○	
	旧	○	○	○	○		
啓林館	現	○	○	○	○	○	○
	旧	○	○	○	○		
数研出版	現	○	○	○	○		
	旧	○	○	○	○		
東京書籍	現	○	○	○	○	○	○
	旧	○	○	○	○		

Aux: オーキシシン, GA: ジベレリン, CK: サイトカイニン, ABA: アブシシン酸,
Eth: エチレン, BS: ブラシノステロイド, JA: ジャスモン酸

表 1-2 現旧学習指導要領に基づく各教科書で扱う探究活動の植物ホルモン関連実験

テーマ	活動内容	植物ホルモ ン	第一学 習社	実教 出版	啓林 館	数研 出版	東京 書籍
屈光性	子葉鞘の先端から 5mm おきに印をつけ、暗室中で一方から光を当てたときの変化を測定する。	(Aux)		○			
オーキシンの働き	子葉鞘を 1cm に切り、濃度の異なるオーキシンに浸し、その後の長さを調べる	Aux				◎	
オーキシンによる屈曲	マカラスムギの子葉鞘に濃度の異なるオーキシンにつけその後の屈曲する角度を測定する。	Aux		○			
ジベレリンによる植物の成長調節	エンドウにジベレリンやわい化剤を与え茎の伸長を調べる内容	GA			◎		
光と植物ホルモンが発芽に及ぼす影響	レタス種子を用いて、暗箱下、蛍光灯其々でジベレリン、アブシシン酸を添加することによる発芽率の違いを測定する。	GA, ABA		●			
エチレンが植物に与える影響	成熟した果実とともに未熟な果実や樹木の枝を入れ、果実の色の変化や落葉を調べる。(成熟果実からの Eth を予想)	(Eth)	○				●
	密封容器にアズキの芽生えにとリンゴを置き胚軸の伸長が阻害されることを調べる。(成熟果実からの Eth を予想)	(Eth)					●

旧課程の教科書に掲載されているものは●，旧課程，現課程ともに掲載されている実験は◎，現課程のみに掲載されているものは○で示した。

が可能であると期待される。種子袋の記載には、ヒマワリの高性品種「かがやき」は草丈が約 160cm もあるが、矮性品種「小夏」の草丈は 25~30cm と低い。また、ヒマワリは花壇にもよく植えられている身近な植物でもあり、生徒たちの興味を引き付けるものと期待される。

現行の高等学校「生物」の教科書 5 社中 3 社には、GA の説明と合わせ黒田栄一氏が発見者であることが記載されている（表 1-3）。日本人研究者が発見したことや種なしブドウの生産に利用される等の話題があり、GA は生徒に興味を持たせる話題の多い植物ホルモンである。

エンドウを材料に GA とわい化剤を用いて草丈の伸長を測定する実験が啓林館の教科書に掲載されている（表 1-2）。投与の成否など外的要因に草丈が左右されるわい化剤を用いた実験よりも、矮性品種を用いた方が材料の準備が簡便である。遺伝的な矮性では、草丈が安定して低い苗を多量に用意でき、生徒実験に適していると考えられる。また、矮性品種は農業上の有用品種であり、いわゆる緑の革命の主役となったメキシコ系短稈コムギ品種群やイネの高収量品種 IR8 などは代表的な矮性品種である（山根 1991）ため、矮性品種は、学習内容と実社会での利用を関連付ける好材料である。さらに、品種の違いから、遺伝子の違いへと発展的に扱うことも期待できる。ent-カウレン酸酸化酵素遺伝子の欠損による矮性ヒマワリ品種も知られている（Fambrini ら 2011）。

そこで、本研究では、ヒマワリの高性品種と矮性品種の GA および GA 合成阻害剤に対する反応特性を調べ、通常の設定で実施可能な植物ホルモン（GA）の作用を実験的に調べる教材開発を試みた。また、この教材を用いた実践授業の前後に評価問題を生徒に課し、実践の効果を調査した。

II 生徒実験開発のための諸実験

1 材料の準備と節間の測定

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) は、ホームセンターなどで販売されているサカタのタネ（横浜市）の矮性品種「小夏」と高性品種「かがやき」を用いた（これらの品種を選択した特段の理由はない）。直径 7.5 cm のポリエチレン製育苗ポットに培養土（タキイ種苗）を入れ、その中央に深さ 2 cm 程度の穴をあけ、種子を 1 粒ずつ播種した。十分に吸水させた育苗ポットを蛍光灯で照度約 5000 lux, 明暗周期 14:10 に

表 1-3 各教科書におけるジベレリンの学習項目

	第一学習社	実教出版	啓林館	数研出版	東京書籍
矮性 ¹⁾			△		
抽苔 ²⁾			○	○	
セルロース ³⁾	○	○	○		○
馬鹿苗病		○		○	○
研究者		○		○	○
発芽	○	○	○	○	○
種なしブドウ	○	○	○		○

¹⁾矮性という言葉を用いてないが、啓林館では、メンデルが取り上げたエンドウが草丈の「低い」形質と紹介している。²⁾抽苔は、ジベレリンにより、ロゼットから茎が伸長することの説明の有無である。³⁾セルロースは、細胞壁のセルロース繊維の配向とジベレリンの作用を扱っているかである。それ以外の項目は、それぞれについての紹介とジベレリンの関係の説明の有無を示した。

設定した温度 25 ± 1 °C の恒温装置（日本医化器械製作所 LH-100-RD）内に置いた。3-4 日経過すると芽生えが生じ、子葉が展開した。

0.17 g の GA_3 （和光純薬）を約 0.5 mL の 1 M の NaOH に溶かし、イオン交換水を加え 500 mL に希釈し 1.0×10^{-3} M の溶液とした後、1.0 M の HCl で pH を 7.0 に調整した。さらに 10 倍に希釈して 1.0×10^{-4} M として使用した。GA 合成阻害剤としてウニコナゾール P ($C_{15}H_{18}ClN_3O$) を 0.025% 含むスミセブン P 液剤（住友化学）をイオン交換水で 10 倍に希釈して使用した。ウニコナゾールは、GA 合成系の初期段階である ent-カウレン酸の合成に際し C19 位の酸化的脱メチル化を阻害する（Katagi ら 1987）。各薬剤はポンプ式スプレー（大創産業）に入れ、茎頂部分に向けて 3 回噴霧して約 0.4 mL を投与した。

1 つの試料を繰り返し測定するために、傷つけないように、培土表面から子葉の付け根まで（胚軸長）と葉柄の茎への付け根の部分を開始点として、一つ上位の葉の付け根まで（節間長）を測定した（図 1-1）。この胚軸長と各節間長との総和を草丈とした。

2 矮性、高性ヒマワリの成長と GA の作用

矮性品種も高性品種も播種後 3 日で発芽し、子葉を展開した。高性品種は子葉展開後も胚軸の伸長が続くが、矮性品種では胚軸はさほど伸びずに本葉を作り、各節間は、その後もほとんど伸長することがなかった。播種後 5 日目（発芽後 2 日目）では、矮性品種の草丈は高性品種の約 30%、播種後 12 日目には、約 20% しかなかった（図 1-2）。

播種後 5 日目に、子葉が展開した矮性品種の芽生えに GA を投与した後、草丈を繰り返し測定した。投与 2 日目から草丈に明瞭な差が生じた。GA を投与した芽生えの草丈は、6 日目には対照の 2 倍以上の長さになった（図 1-2）。t 検定の結果、GA 投与株の草丈の平均値は対照に比べ有意に大きかった ($p < 0.05$)。

播種後 5 日目以降の草丈の値を用いて回帰直線を求めると無処理の高性品種の傾きは 8.0 mm/日となり、GA 投与の矮性品種の傾きは 7.6 mm/日とほぼ同じ値となった（図 1-2）。つまり、矮性品種は GA の極端な不足状態にあり、投与した GA は高性品種の成長と同レベルに回復するだけの十分な量であったと考えられる。

部位別の伸長を調べたところ、胚軸の伸長には大きな差は見られず、処理後 6 日目の平均の胚軸長には有意な差はなかった ($p > 0.05$)（図 1-3A）。対照の第 1 節間は 4

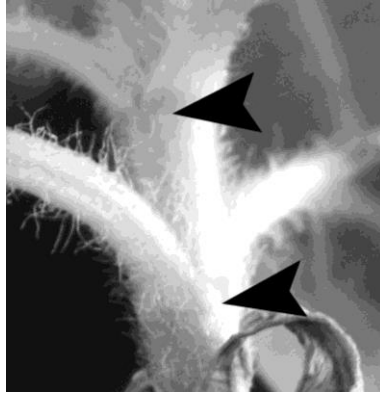


図 1-1 節間の測定部位

節間は葉の基部を始点（矢頭下）として、ひとつ上位にある葉の基部（矢頭上）までの長さとした。この部分に物差しをあて長さを測定した。

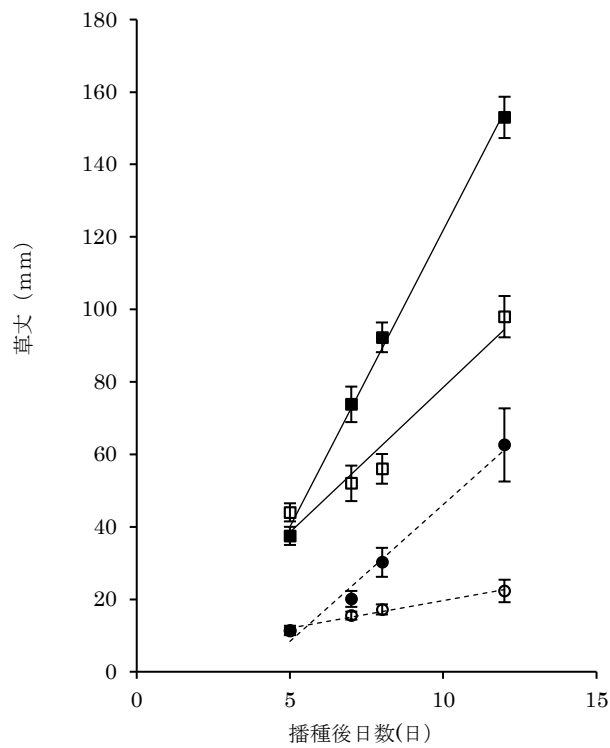


図 1-2 ヒマワリ芽生えの草丈の変化

播種後 5 日目からの各品種の草丈の推移の平均値をプロットし、回帰直線を求めた。高性品種の対照区 (□) は傾き 8.0, $r^2=0.95$, GA 投与区 (■) は傾き 16, $r^2=0.99$, 一方、矮性品種の対照区 (○) は傾き 1.5, $r^2=0.98$, GA 投与区 (●) は傾き 7.6, $r^2=0.98$ となった。傾きは mm/日を, r^2 は決定係数を, バーは SE を示す。

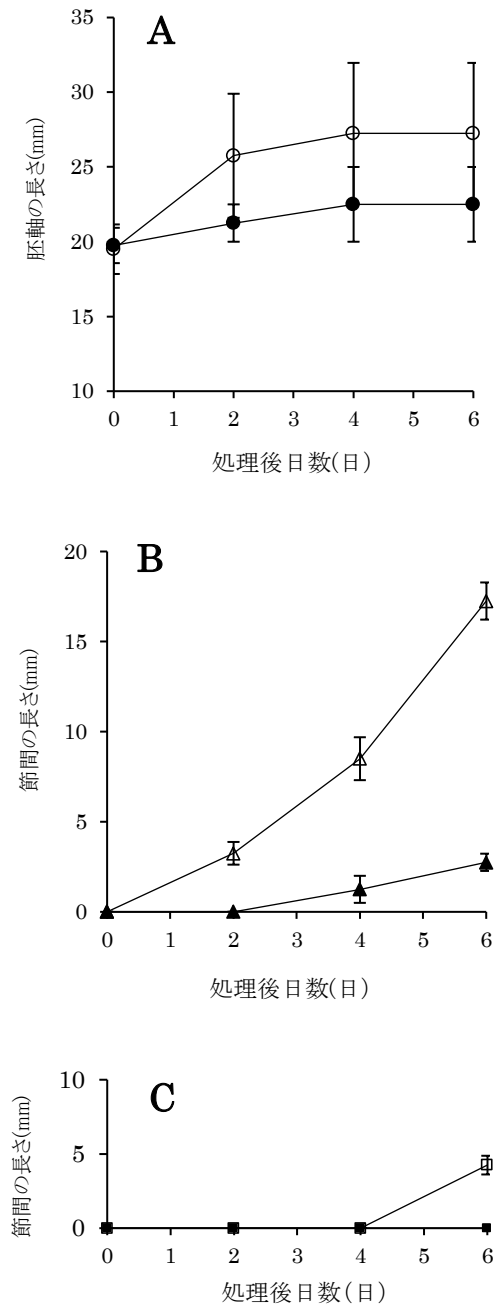


図 1-3 播種後 5 日目の矮性ヒマワリの芽生えに GA₃ を投与した後の節間長の変化

播種後 5 日目の矮性ヒマワリの芽生えに $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ の GA₃ を投与した後の胚軸 (A), 第 1 節間 (B), 第 2 節間 (C) の長さの変化を表した。白抜きマークは GA₃ 投与した時の変化を, 黒塗りマークは対照を, バーは SE を示している。

日目以降は、ほとんど伸長せず、GA 投与区の第 1 節間は実験期間中伸長し続け、6 日目には投与区の第 1 節間は対照の約 6 倍となった (図 1-3B)。第 2 節間は、GA 投与後 6 日目に伸長を始めたが、対照の節間はまだ伸長していなかった (図 1-3C)。

播種後 10 日目の矮性品種の芽生えへの GA の投与は、播種後 5 日目での投与と全く異なり、第 1 節間は全く伸長せずに (図 1-4A)、第 2 節間と第 3 節間が、それぞれ、投与の翌日に、あるいは、投与 3 日目に伸長を開始した。さらに、投与 8 日目には、投与した植物の第 2 節間は対照の約 3 倍 (図 1-4B)、第 3 節間では約 5 倍に伸長した (図 1-4C)。つまり、GA を播種 5 日目の矮性品種の芽生えに投与すると、第 1 節間の伸長が顕著であり、一方、播種後 10 日目に投与すると、第 2 節間やそれに続く第 3 節間の伸長が著しかった。GA は、伸長した節間をさらに伸長させるのではなく、これから伸長する節間の伸長に作用し、より伸長させていると考えられる。さらに、各節間は伸長とともに GA 感受性を失い、投与された外生 GA に反応しなくなったと考えられる。

矮性品種「小夏」に GA を投与すると感受性を持つ節間が伸長して草丈が伸びた。従って、この矮性品種は、GA に対して常時不感受でなく、GA 不足による矮性であることが示唆される。一方、草丈の高い高性品種は常時 GA を生産しているため節間の伸長が大きいと考えられる。このことを確かめるために、播種後 5 日経過し子葉を展開した高性品種「かがやき」の芽生えに GA 合成阻害剤を投与すると、第 1 節間の伸長は、10 日目で対照の約 35%、17 日目では対照の約 25%に著しく抑制された。しかし、GA 合成阻害剤投与後 10 日目に GA を投与すると、胚軸の伸長促進は見られないが (図 1-5A)、第 1 節間では伸長が再開し、GA 投与 7 日目で、対照の約 85%に回復し、GA 投与をしなかった節間の約 4 倍の長さに伸長した (図 1-5B)。第 2 節間ではさらに伸長し、GA 投与 7 日目で、対照の 4 倍以上の長さとなった (図 1-5C)。つまり、「かがやき」は内生 GA を常時生成し、感受性がある時期に節間が伸長する成長を示すと考えられる。

Ⅲ 授業実践

1 生徒実験の方法

実施適期は、ヒマワリを野外栽培するなら、5-7月であり、人工気象器があれば通年の実施が可能である。材料として、高性品種と矮性品種のポット苗を各班に 2 株ず

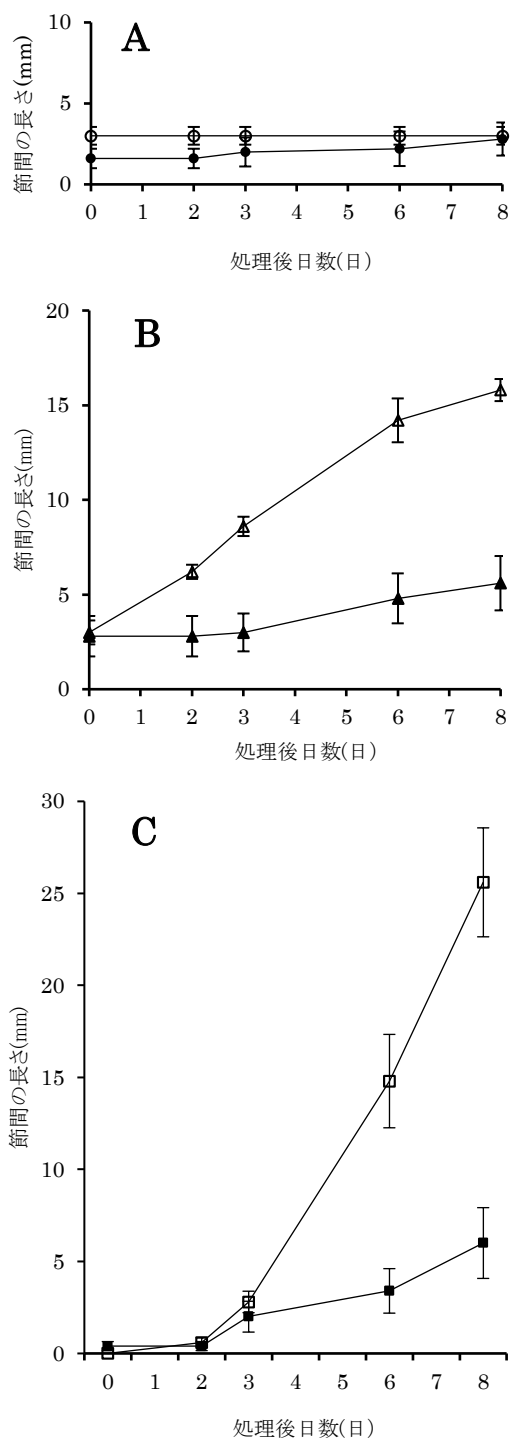


図 1-4 播種後 10 日目の矮性ヒマワリの芽生えに GA₃ を投与した後の節間長の変化

播種後 10 日目の矮性ヒマワリの芽生えに $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ の GA₃ を投与した後の第 1 節間 (A), 第 2 節間 (B), 第 3 節間 (C) の変化を表した. 白抜きマークは GA₃ 投与時変化, 黒塗りマークは対照を示す. バーは SE を示している.

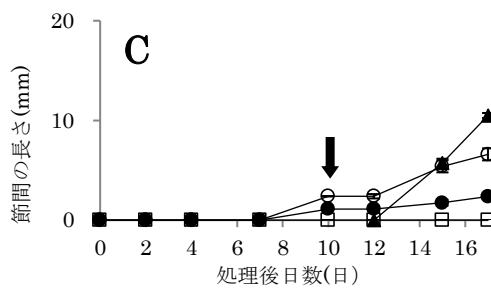
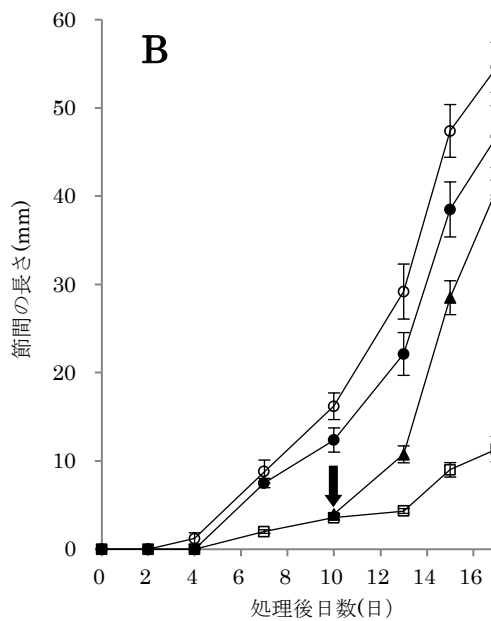
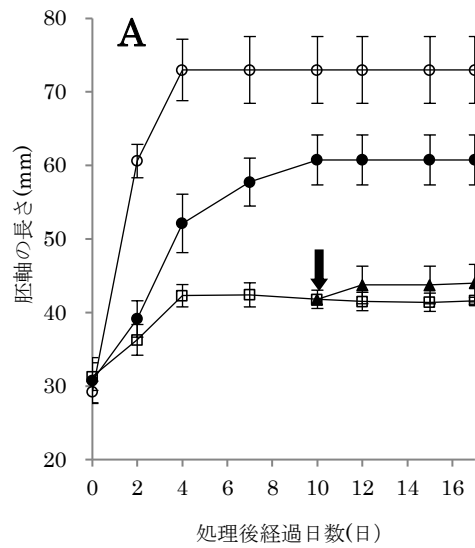


図 1-5 GA₃やGA合成阻害剤投与後の高性ヒマワリの節間伸長

播種後5日後の高性ヒマワリに、ジベレリン(GA₃)やGA合成阻害剤を投与(0日)後、胚軸(A)・第1節間(B)・第2節間(C)の伸長を測定した。GA合成阻害剤処理後10日目に $1.0 \times 10^{-4}M$ のGA₃を投与した(矢印)。GA投与区(○)、GA合成阻害剤投与(□)、阻害剤投与後のGA投与(▲)、●は無処理(対照)、バーはSEを示す。

つ用意し、50分の授業を1週間の間隔で2回行なう計画を立案した。

1回目の授業では、各苗の節間長の測定と、品種ごとにGA投与区を設定するように指示する。投与区には、生徒たちが芽生えの茎頂部にポンプ式スプレーを用いて、 1.0×10^{-4} MのGAを約0.4 mL噴霧する。残りには投与せず対照とする。処理後、これらの苗を日当たりのよい窓際（もしくは、25°Cに設定した人工気象器内）に置くように指示する。これらの作業に当たり生徒たちに与えるべき注意点は、茎を粗暴に扱い折らないこと、物差しを直接茎に当て長さを測定すること、そして、茎頂部分にGA溶液が確実にかかるようにスプレーで噴霧することである。さらに、土の表面が乾けば水やりすること、そして、1週間各節間の伸長を毎日測定することを指示する。

各品種のヒマワリを「ミニヒマワリの小夏」と「普通のヒマワリのかがやき」と呼び分けたが、観察により違いに気付くことを期待して、その詳細は説明しなかった。

1週間後の2回目の授業では、教師はワークシート（資料1-1）を用いた結果のまとめを指導した。ワークシートは4つの実験区の結果を記入するグラフ用紙と各実験区を比較して伸長の違いを記入する欄を設けてあり、まとめとして、「GAはどのような働きがあると分かりましたか」と「ミニヒマワリと通常のヒマワリは何が違うため形態の変化に差があると考えられますか」という問いを設け、自由記述で回答を求めた。このワークシートに各班の測定結果を記入させ、班で意見を出し合いながら各項目に答えるよう指示した。

2 生徒実験の結果と考察

以上の計画に沿って、平成27年6月9(火)からの1週間、京都府立Y高等学校にて、3年の生物選択クラス21名（男子12名 女子9名）を対象に授業実践を行った（図1-6）。このクラスでは東京書籍の教科書を使用し「環境と植物の応答」の学習を終えていたので、植物ホルモンの名称やその働きは既習事項である。この単元のまとめとして実験を実施した。1回目の授業での作業において、植物の栽培実験が小学校以来の取り組みの生徒もいて、生徒の会話や苗の取扱いから興味を持って行なっていると感じられた。測定時刻は特に指定しなかったが、班により昼休みであったり、放課後であったり時間は異なるがそれぞれ役割を決め定時に測定した。芽生えの先端の未伸長部分の扱いは特に説明をしなかったので、生徒たちも未伸長部分は無視した。2回目の授業において、最終回の測定を行なった後、班ごとに1週間分のデータをグ

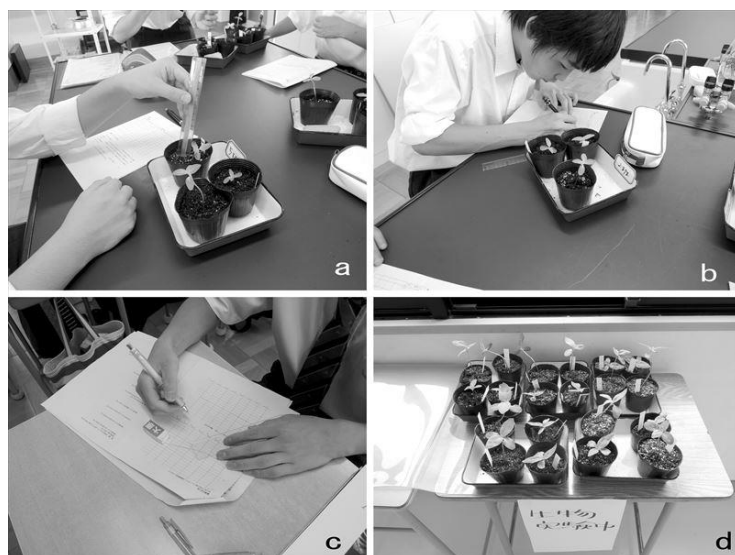


図 1-6 生徒実験の様子

実践授業における生徒の活動。各条件のヒマワリ苗の胚軸の長さを測定(a)及び記録を取っている(b)様子。全ての測定が終われば記録用紙に測定結果をグラフ化する(c)。ヒマワリは南側の日の当たる窓側に置き、水やり班内で順に行なった(d)。

ラフ化した。各班の値は大きく異なることはなく、全班の値を平均して求めたグラフにおいても標準誤差は小さかった（図 1-7）。考察中に机間巡視をすると、GA 投与の有無の比較は容易に行えていたが、品種の違いと GA の関連を考えるのには苦勞している様子が見られた。班内で相談することと品種の形態的な違いと GA の働きが何であったかを思い出し、GA が働けば形態の特徴にどう関わるかを考えるようにアドバイスすると、生徒たちは、互いの意見を出しながら考えをまとめられるようになった。アンケートの「実験の作業はわかりやすかったですか。」や「実験の内容はわかりやすかったですか。」、「GA の働きを理解できましたか」の各問いに対し、「とてもそう思う」、「そう思う」を合わせると約 100%となった（表 1-4）ので、生徒たちは、納得のできる学習を行なったと自己評価したとみられる。一方、全ての矮性形質は GA 量不足によるものではないので、生徒が誤認識しないように補足説明をする必要がある。

IV 実践授業の評価

1 評価の調査方法

本教材を用いた授業の効果を客観的に評価するため、5つの選択肢から1つもしくは複数の正しい説明文を選ぶ評価問題を事前と事後の2回実施し、回答の変動を調べた（表 1-5）。事前は授業に入る直前に、事後は実験結果の解説後に行なった。アンケートは持ち帰らせ、翌日に回収した。

2 評価問題及びアンケート結果と考察

設問 1 は、学習事項である GA の作用が定着しているかを測ることを目的とした問いである。対象のクラスは、この内容が既習事項であるため、知識が定着していれば、(a)を容易に選択できる。この設問に対する生徒の答えは、事前・事後とも全員が(a)を選択しており、実験の実施による影響は見られないが、基礎的な知識が定着している学習集団であったと考えられた。

設問 2 は、注意深く観察したかを問う設問である。実験では GA を 1 回しか投与していないため、作業を行なえば、容易に (d) を選択できる。実験後の正答に有意差が生じたため（表 1-5）、実験の効果があると言える。一方、変化が生じたる時期は、(a) と (b) と分かれた結果となり、実験後の正答に有意差は生じなかった（表 1-5）。矮性品種に GA を投与すると対照より草丈が、2 日目には平均約 12 mm 長く伸長し、

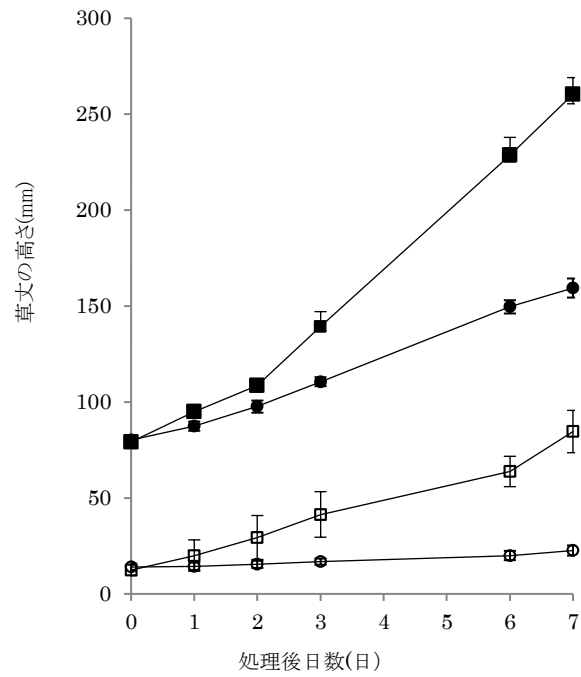


図 1-7 生徒実験の結果

胚軸と各節間の長さの合計を草丈として表した。値は、クラスの全測定値の平均値である。●高性品種 (無処理), ■高性品種 (GA 投与), ○矮性品種 (無処理), □矮性品種 (GA 投与), バーは SE を示す。

表 1-4 授業に対するアンケート結果

設問内容	とても そう思う	そう思う	そう思わない	全く そう思わない
実験の作業はわかりやすかったですか。	52	48	0	0
実験の内容はわかりやすかったですか。	48	48	0	5
ジベレリンの働きは理解できましたか。	48	48	5	0
品種の違いは何によるものか理解できましたか。	10	52	33	5
植物の成長の仕組みに興味を持ちましたか。	38	57	0	5
実験を行うことで、理解は深まりましたか。	48	48	0	5

各設問について 4 件法で調査した結果を%で示している。

表 1-5 授業に対する評価問題とその回答率 (%) の変化及び McNemar 検定の結果

	事前	事後	X ² 値	p 値	備考
(1) ジベレリンによっておこる茎の変化は次のうちどれか 1 つ選びなさい。					
(a) 茎の伸長を促進する。	100	100	0	1	n. s.
(b) 茎の伸長を抑制する。	0	0			
(c) 茎の太さを太くする。	0	0			
(d) 茎の太さを細くする。	0	0			
(e) ジベレリンによって起こる変化が分からない。	0	0			
(2) ジベレリンによる茎に生じる変化について正しい記述を全て選びなさい。					
(a) ジベレリンを与えると 1~2 日で変化する。	52	67	3	0.083	n. s.
(b) ジベレリンを与えると 4~5 日で変化する。	10	24			
(c) 変化し続けるにはジベレリンを与え続けなくてはならない。	19	5			
(d) ジベレリンを 1 度与えるとその効果はしばらく続く。	62	86	5	0.025	※
(e) ジベレリンが茎に対して、いつどのようにして働くかは、分からない。	24	5			
(3) ヒマワリの品種の差とジベレリンの関係について正しいものを全て選びなさい。					
(a) 通常品種はジベレリンの合成能力が高いので、背が高くなる。	62	86	5	0.025	※
(b) 通常品種はジベレリンの合成能力が低いので、背が高くなる。	14	5			
(c) 矮性品種はジベレリンの合成能力が高いので、背が低くなる。	14	10			
(d) 矮性品種はジベレリンの合成能力が低いので、背が低くなる。	57	86	5	0.025	※
(e) ヒマワリの品種の差とジベレリンの関係について、分からない。	14	0			
(4) 植物ホルモンの働き方について正しく述べているものを 1 つ選びなさい。					
(a) 植物ホルモンは、植物自身が作るものしか効果が無い。	0	0			
(b) 植物ホルモンは、植物の体内で働くので、植物の体に塗ったりかけたりしても効果が無い。	10	0			
(c) 植物ホルモンは、植物の種類に関係なく効果を示す。	24	29	0.33	0.56	n. s.
(d) 植物ホルモンは、特定に器官に対して特定の効果のみを生じる。	57	71			
(e) 植物ホルモンの働き方について正しく述べられている文を判断できない。	5	0			
(5) 植物ホルモンの効果について正しく述べているものを全て選びなさい。					
(a) サイトカイニンによって、落葉を促進する。	10	14			
(b) オーキシンは、頂芽優勢を引き起こす原因となっている。	71	62	0.67	0.4	n. s.
(c) エチレンによって、発芽が促進される。	19	14			
(d) アブシシン酸によって、気孔が開く。	5	24			
(e) ジベレリンによって種なしブドウが生産される。	76	95	4	0.046	※

事前、事後は、生徒の選択した回答率 (%) を示し、事後における正答者数の変化について McNemar 検定を行ない、X² 値および p 値を求めた。備考欄の※は 5% での有意差を示し、n. s. は有意差を示さないことを表す。

3日目では平均約 25 mm 長い結果が得られた。2日目からの草丈の違に気づくと考えたが、より大きな差がつく (b) を選択した生徒の割合も増えた。測定結果をよく吟味することなく回答を選んだ生徒が一部にいたことは、測定結果をグラフ化する作業段階で、違いが生じる日数に着眼する指導の必要性が示唆されたと考えられる。

設問 3 は、実験結果より導き出される事実を問う設問である。生徒が実験を通して正しく GA の効果を理解し、GA が茎の伸長を促進すると理解できれば、容易に (a) と (d) を回答できる。(a) (d) いずれも実験後の正答に有意差が生じたことから (表 1-5)、実験を通して、品種間の形質の差が生じた理由を考えることができたと考えられる。

設問 4 は、実験操作の意味が理解できているかを問う設問である。事後での正答者の変動に有意差は認められなかった (表 1-5)、誤答である (d) を正答と選ぶ者が増加する結果となった。生徒たちは、実験結果より GA が節間の伸長を促進する効果をもたらしたと読み取ったと考えられる。しかし、GA の作用は、発芽の促進や子房の肥大にも関わると既習事項にあるため、茎に特定するのではなく、種子や子房にも働きかけると考えて (d) を選択しないと想定していた。(d) を選択する生徒が増加したことは、実験結果に強く囚われた生徒が多くいたことの現れであると考えられる。一方、(c) を誤りとする理由は無い。GA 溶液はヒマワリの草丈を伸長させることを実験で学んだが、ブドウの果実を肥大させることも既に学んでいたため (c) を選択すると考えていた。評価問題の文言にも工夫が必要だったと考えられる。

設問 5 は、実験で扱った内容ではなく、通常の授業で扱う一般的な植物ホルモンの働きを問う設問である。この設問で正答を選択する割合が上昇すれば、本実験やレポート作成を通して、植物ホルモンの働きを振り返ることや思い出したことが現れたと考えられる。(b) のオーキシンに関することと (e) の GA に関することが正答であるが、事後での正答者の変動は、(b) について有意差は認められなかったが、(e) について有意差が認められた (表 1-5)。GA は本実験で扱った植物ホルモンであるので関心を持ち、既習事項を思い起こせたが、それ以外の植物ホルモンまで興味が深まらなかったと考えられる。

また、考察に関する問題として「ミニひまわりと通常のヒマワリでは何が違うために形態的な変化に差があると考えられますか。」という設問 (自由記述) に対して、「植物自身が生産する GA の量が違うからだと思う」といった GA の量の違いに着目した回答が全体の約 80% であった (図 1-8)。本教材を用いて、「GA は草丈を大きくする」

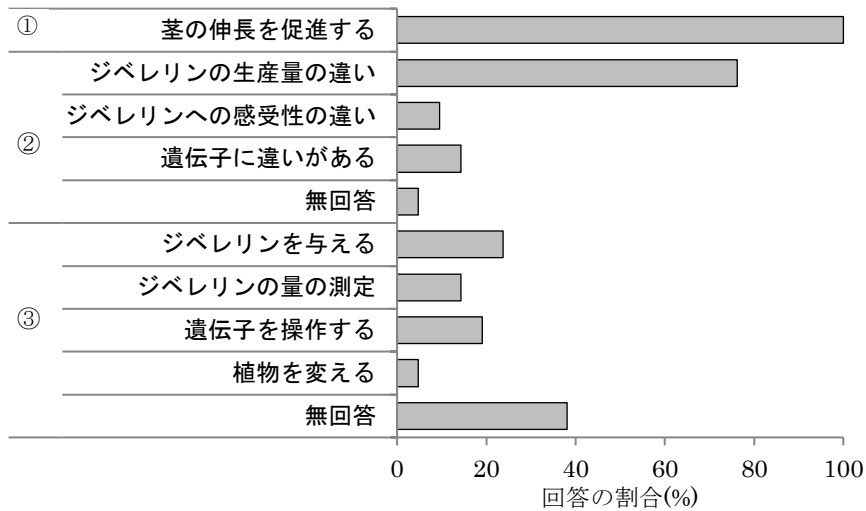


図 1-8 設問（自由回答）に対する回答の割合

①「ジベレリンはどのような働きがあると分かりましたか。」②「ミニヒマワリと通常のヒマワリは何が違うために形態の変化に差があると考えられますか。」③「②で考えたことを証明するためにほかにどんな実験をすれば良いと考えられますか。」のそれぞれの問いに対する回答（自由記述）の割合。①に対しては全員が茎の伸長に関係すると答えた。②に対しては、ジベレリンの生産量に着目した回答が多かったが、感受性に関する回答もあった。③では遺伝子に着目した意見も見られた。回答者の総数は 21 名であった。

という仮説を肯定する結果を得た(図1-7)。ここから、生徒たちの多くは、「植物は自らGAを作り背を高くしている。」や「少ししか作れないと背が低くなる」という仮説に至ったと考えられる。本実験ではこれらの仮説の立証をしていないが、生徒たちに考察問題で答えた内容を確認する実験を質問すると、GAを与える場所や量を変えるなどのGA投与実験やGA量の測定実験を行うなどのGAに関わる実験を想定した生徒が多く見られた(図1-8)。このような意見は、今回行なった生徒実験で得た植物の草丈に関してGAが主要な働きを担っているという認識を持ったことを示している。GA量の測定は、高等学校では難しいが、GA合成阻害剤の投与実験(図1-5)は、生徒実験として行なうことが可能である。今後は、このような実験を組み立て、生徒たちの考えを立証させることも含む教材に発展させたい。一方、考察問題の回答の中には、GA量の違いに言及しているものだけでなく、GAの感受性に差があるという考えを述べた生徒もいた。矮性品種にGAを投与することで伸長が回復し(図1-2)、GA合成阻害剤を投与すると節間の伸長は抑えられるが、GAを投与すると再び伸長が促進されるため(図1-5)、本研究で使った品種の矮性形質はGAの感受性に由来するものではない。内生GA量の違いが草丈の違いの原因であると予想される。生徒実験として行っていないGA合成阻害剤投与実験を参考資料として提示していれば、生徒の考察の助けとなったと考えられる。事前に品種間の遺伝子の差異について指導者が言及しなかったにもかかわらず、80%の生徒が品種間でGAの生産量に違いがあることを指摘した(図1-8)。品種間の形質の差を遺伝子の差異ととらえた生徒は20%未満に止まったが、GAの生産量や遺伝子の違いを調べるために遺伝子操作を提案する意見は、無回答が多かった設問にも関わらず、20%に達した。この実践を通して、バイオテクノロジーの単元での学習内容を活用した生徒がいたと考えられる。

実験後の感想の欄には、「GAが成長を促進するのは勉強したので知っていましたが、どのくらい成長するのは知りませんでした。最初は促進するといってもおまけ程度だと思っていましたが、今回の実験で結構することがわかりました。」や「花壇の土と混ぜる肥料にたくさんの栄養が詰まっていて、花はそれを吸収して大きくなると考えていましたが、今回の実験で植物が成長するのに必要なのは肥料だけじゃないということがわかりました。」など実験を通して理解できるようになったことも多く述べていた。以上のように、本教材を利用することでGAの作用をはっきりと理解できるようになったことは、評価問題の正答率の変化からもうかがえ、また、植物の成長に関し感覚的

に理解していた事柄を，植物ホルモンの作用という観点で改めて理解するのに役立ったと言える。

V おわりに

矮性品種と高性品種のヒマワリの茎の伸長に対する GA の効果を調べる教材を開発し，実践授業を行なった。1週間程度の短い期間の観察で，GA が茎の伸長を促進させることを確かめることができた。植物の栽培が小学生以来だと楽しそうに話しながら作業をしたり，日々大きく成長するヒマワリの姿に愛着を持って観察したりする姿が印象的であった。この実験のような体験こそが知識の定着には不可欠な要素であると感じた。単純な長さの測定という活動であるが，GA の投与時期を変えることや GA 合成阻害剤と合わせて使用するなど様々な工夫も考えられる。また，遺伝子との関連を気付きは一部の生徒だったので，気付かせる工夫も今後の課題である。

2章 黄化芽生えの徒長とジベレリンの関係から植物の環境応答を学ぶ実験教材の開発と実践授業

I はじめに

高等学校「生物」の各教科書（浅島ら, 2013; 本川ら, 2013; 嶋田ら, 2013; 吉里ら, 2013; 庄野ら, 2014）の「植物と環境応答」で扱われる内容は、数研出版「生物」に「低温や傷害ストレス」についての記載がない以外は大きな差が見られない。例えば、オーキシンによる茎の屈曲や節間の伸長の実験は、5社中3社の教科書で掲載されている。一方、東京書籍の春化を扱った実験や第一学習社の果実の追熟に伴うエチレン放出とエチレンによる落葉の誘導を同時に調べる実験は、他社の教科書には記載されていない（表2-1）。多くの教科書に共通に記載されている実験は、植物ホルモン自体の直接的な作用や効果を扱うものであり、環境要因による形態形成や生理現象と植物ホルモンの作用を関連して扱うものはレタスの光発芽やムギなどの子葉鞘が示す光屈性、そして春化による花芽形成が挙げられているだけである。

環境に応答して働く植物ホルモンを扱った実験は、必要な機器の準備ができなかったり、時間的な制約を解決できなかつたりするため、実施されることが少ないと考えられる。レタス種子が光に応答して発芽する現象（実教出版）は短期間で結果が出るが、レタスの品種の選定を誤ったり種子を適切に保管しなかつたりすると結果を得られない。一方、ダイコンの芽生えが低温を経験して花芽を形成する現象（東京書籍）は、低温処理に1カ月、その後の栽培に1カ月の計2カ月もの時間を要する。マカラスムギの芽生えが光に向かって屈曲する現象（実教出版）を調べる実験では、成長の揃った芽生えを用意し、完全な暗所で芽生えに当たる光が必ず一方向のみから照射されるように工夫する必要がある（高桑 2004）。この実験は赤色の安全光下で行なうこともできるが、高等学校でこのような実験環境を整えることは難しい。特別な施設や設備を必要とせず、比較的短期間で結果が得られる生徒実験が求められている。環境変化の前後における植物の形態や状態を比較することにより、容易に環境の変化と植物の変化の間に関連を見出すと期待される。特に、明暗の環境は、暗箱を準備すれば容易に作り出すことができる。

暗所の芽生えには、フックの形成、胚軸の徒長、子葉の黄化が見られ、光が当たると脱黄化、すなわち子葉の緑化と展開、および胚軸の伸長の抑制が起きる。暗所で発

表 2-1 各社教科書「植物と環境応答」分野で取り上げられている主な現象と実験例

現象	環境要因	植物ホルモン	反応の速さ	タイプ	教科書				
					第一学 習社	実教 出版	啓林館	数研 出版	東京書籍
発芽	光	GA・ABA	遅	2	○	◎●	○	○	○
屈性	光・重力	Aux	速	1	○	◎●	◎	◎	○
伸長	-	Aux	速	1	○	◎	◎	◎	○
	光	GA	遅	2	○	◎	◎	○	○
花芽形成	日長	花成ホルモン	遅	2	○	○	○	○	●
気孔の開閉	乾燥	CK・ABA	速	1	○	○	○	○	○
ストレス	低温・傷害	ジャスモン酸	速	2	○	○	○	-	○
果実の追熟	-	エチレン	遅	2	◎	○	○	○	○
落葉	低温・乾燥	Aux・エチレン	遅	2	◎	○	○	○	○

Aux はオーキシシン，GA はジベレリン，CK はサイトカイニン，ABA はアブシシン酸を表す。○は教科書に記載があることを示し，その中で◎は植物ホルモンについての実験を示しているもので，●は環境要因についての実験を示しているものである。表中の項目や関係する植物ホルモンは教科書の記載に従い，反応の速さについては，一般的な条件で数時間以内に観察できるものを「速」，数日経過しなくては観察できないものを「遅」とした。タイプは，遺伝子の発現を伴わないものを「1」，発現を伴うものを「2」とした。環境要因の「-」は，特定の環境要因が関係しないことを示す。

芽したエンドウに光照射をすると、その4時間以内に内生GA量が約80%低下する (Ali-Atiら 1999)。また、O'Neillら(2000)は、光による胚軸の伸長抑制は、GAへの反応性の低下とともに、*PsGA3oxidase1*の発現量の抑制と、*PsGA2oxidase2*の発現量の増加による内生GA量の低下が起きていることを示した。*PsGA3oxidase1*はGA₂₀から活性のあるGA₁に変換する酵素(PsGA3oxidase)を、*PsGA2oxidase2*は活性のあるGA₁から活性のないGA₈に変換する酵素(PsGA2oxidase)をコードしている。さらに、Symons・Reid(2003)は、黄化芽生えに光を照射すると、IAA(インドール3酢酸)やブラシノステロイドの含量は低下せず、GA含量が低下することを報告している。また、黄化芽生えの脱黄化にはフィトクロムAとクリプトクロムの両方が光受容体として関わることが知られている(Fooら 2006)。黄化芽生えの徒長に関して、GAが関わっていることが解明されているので、GA生合成阻害剤を用いて胚軸の伸長を抑制させ、光を感受した時のように成長させれば、GAの作用により環境(明るさ)に応答した形態の変化が生じたことが確かめられ、環境に応答したGAの作用による形態形成を学ぶ教材を作成することが期待できる。

入手が簡単で、作期を選ばない作物を材料として検討した。マメ科の作物の種子は一般的に大きく、芽生えも大きいため多数の芽生えを用意するには広い栽培場所が必要となりむずかしい。またイネ科の穀物は新たに作られた節間が葉鞘に包まれ見づらいため実験材料には不向きである。ナス科は、種子も芽生えも小さく扱いにくい。アブラナ科は種子の大きさも適当で扱いやすいが、無胚乳種子であるため子葉が大きくなるので密に植えることができず栽培場所を広く取らなくてはならない。ホウレンソウ(*Spinacia oleracea* L.)は、子葉が細長いので密生にしても、個々の成長が損なわれることが少なく、またGAの合成経路が解明され(Metzger・Zeevaart 1980)、その中心的な酵素をコードしている遺伝子の塩基配列も既知である(Wuら 1996)なので、分子生物学的教材開発も期待できる材料である。しかし、ホウレンソウの種子の外側には硬い果皮があり吸水を不揃いにするとともに、この果皮に含まれているシュウ酸のために発芽率が低く、また発芽時期が揃わない(牧野・宮本 1954)。しかし、果皮を取り除いた種子を利用すれば、発芽率が向上(留森ら 1997)し、成長の揃った芽生えを多数得ることができる。果皮を取り除いた種子はネーキッド種子として市販されており、インターネットの通販サイトからも購入可能である。

これらの知見をもとに、暗所と明所で発芽させたホウレンソウの胚軸長の測定を通

して、光による GA 量の調節による環境応答を学ぶ教材を開発し、実践を行った。本報告では、教材の開発の基礎となった実験結果と、開発した教材を用いた実践の結果について報告する。

II 生徒実験開発のための諸実験

1 明所・暗所での栽培

2枚重ねのペーパータオルを敷いたペトリ皿に約 8.5 mL の水を注ぎ、ホウレンソウのネーキッド種子(図 2-1)(オーライ, タキイ種苗:京都)を播き, 温度 25 ± 0.2 °C の恒温器(日立アプライアンス CRB-14)内で一晩吸水させた。翌日, 直径 9.7 cm 高さ 5.5 cm の透明円筒容器に乾量 30 g のバーミキュライトを詰め, 80 mL の水を吸収させ, そこに発根した種子 20 粒を均等に播いた。その上に, 乾量 10 g のバーミキュライトを被せ, 容器付属のふたをした。この容器を, 照度約 5,000 lux, 明暗周期 14:10, 温度 25 ± 1 °C の人工気象器(日本医化器械製作所 LH-100-RD)内に置いた。遮光して栽培するときには, 容器をダンボール箱(17.2×17.2×11.6 cm)に納め, 25 ± 0.2 °C の恒温器内に置いた。実験温度 25 °C はホウレンソウの発芽最適温度から比べると高温であるが, 果皮の除去により高温での発芽不良は著しく改善する(Suganuma・Ohno 1984)。本研究の材料は果皮を取り除いたネーキッド種子であるので問題なく実験を行なえた。測定時には, 使用するもののみ箱ごと取り出し, 他のもものに光が当たることを避けた。胚軸の長さ(図 2-2)は物差しを用いて測定した。

暗所に置いたホウレンソウの芽生えは, フックを形成して, 子葉は黄色で閉じていた。暗所の胚軸は他の植物と同様, 明所に置いたものに比べ著しく伸長した。恒温器内に静置 4 日以降, 明所では胚軸の伸長は全く停止したが, 暗所の芽生えの胚軸は伸長を続け 10 日目には明所のものに比べ約 6 倍の長さになった(図 2-3)。

2 ホウレンソウの芽生えの伸長と GA 合成阻害剤の影響

0.1×10^{-6} M, 0.2×10^{-6} M, 0.3×10^{-6} M のウニコナゾール($C_{15}H_{18}ClN_3O$)溶液を含ませたバーミキュライトに II-1 に示した方法にしたがって発根種子を播き, 栽培した。この溶液は調製の利便性のためにウニコナゾールを 0.025% 含むスミセブン P 液剤(住友化学, 東京都)を 1000 倍, 600 倍, 300 倍に希釈して用いた。

明所あるいは暗所に置き, 4 日後に胚軸の長さを測定した。ウニコナゾールを含むバ

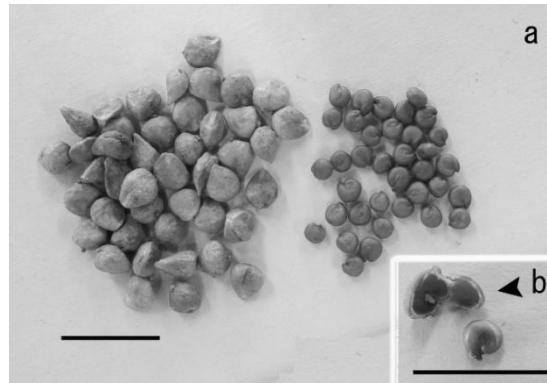


図2-1 ホウレンソウの種子

ホウレンソウ（オーライ）の種子（a左）とネーキッド種子(a右). ホウレンソウのいわゆる種子は硬い果皮 (b矢印)に包まれている果実である. この内部に種子が1個ある (b下). 果皮を取り除きむき出しの種子にしたものが, ネーキッド種子として市販されているものである. バーは1cm.

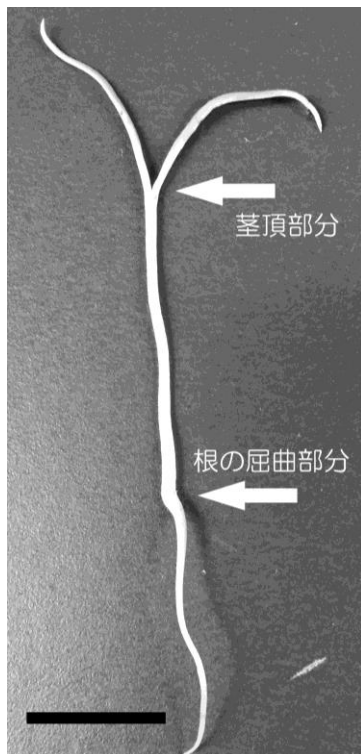


図2-2 芽生えの測定部分

パーミキュライトから胚軸を切らないように取り出し、丁寧に根を露出さ、根元の屈曲部分を下端として、子葉の付け根を上端としてその間を胚軸とし、その長さを物差しで測定した。バーは5mmを表す。

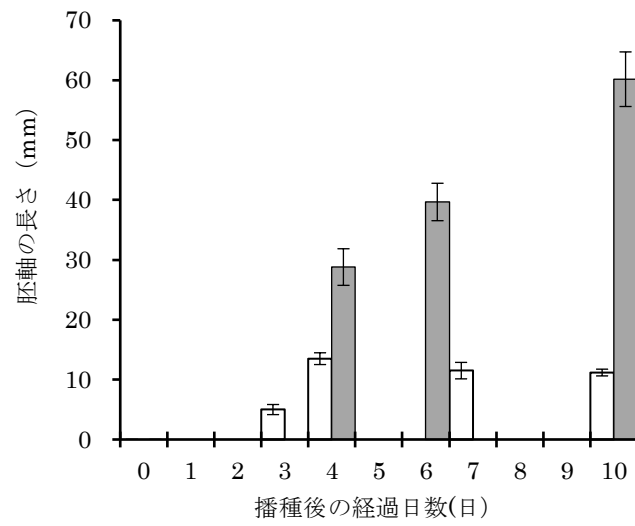


図2-3 ホウレンソウの芽生えの光による伸長の抑制

明所（白色）では、播種後4日以降の胚軸の長さに変化は見られなかった。一方、暗所（灰色）では日々伸長し、実験10日目では、明所の6倍程の長さに成長した。縦線は標準誤差を示す。

一ミキュライトで育てた芽生えの胚軸の長さは、暗所に置いたにもかかわらず、4日目には約60%に抑制されていた(図2-4)。ウニコナゾールの濃度が高くなるにしたがい抑制は強くなり、胚軸の長さは、 0.1×10^{-6} Mウニコナゾール溶液では、対照の約85%、 0.2×10^{-6} Mの場合では約70%、 0.3×10^{-6} Mの場合では約60%に抑制された(図2-5)。つまり、胚軸長はウニコナゾールの濃度に反比例した(図2-5)。しかし、明所の芽生えはこれ以上に抑制されて、胚軸長は約50%であった(図2-5)。

また、ウニコナゾールを含むバーミキュライトに発根種子を植え、暗所に置いた。2日後、伸長した芽生えに 1.0×10^{-4} M GA₃溶液を約0.4 mL噴霧し、3日後に胚軸の長さを測定した。ウニコナゾールを含むバーミキュライトで栽培すると、胚軸の長さは対照の約40%の長さしかなかったが、GA投与区では対照の約73%の長さとなり、GA未投与区より1.8倍長くなった(図2-6)。

GA₃溶液の濃度は、0.05%のGA₃溶液(約 1.4×10^{-3} M相当)でハウレンソウが抽苔した(Zeevaart 1971)こととダイズの節間伸長を促進するのに0.1 ppm~100 ppmのGA₃溶液が効果的である(梅崎ら 1991)ことを考慮し、GA₃溶液は 1.0×10^{-4} Mの濃度で用いた。

暗所のハウレンソウの芽生えに投与したウニコナゾールは胚軸の伸長を抑制した。ウニコナゾールは、GA合成系の出発物質ent-カウレン酸の合成に際しC19位の酸化的脱メチル化を阻害する(Katagiら 1987)。ウニコナゾール投与によるent-カウレン酸含量の低下がGA含量の低下をもたらし、胚軸の伸長を抑制する。さらに、ウニコナゾールによって胚軸の伸長が阻害された芽生えにGA₃を投与すると胚軸は再び伸長し、回復が見られた(図2-6)。このことから、暗所での芽生えの徒長はGAによるものであることが示唆された。

3 授業計画

上述のように、発芽したハウレンソウの芽生えは、暗所(地中)では胚軸を伸長し続け、光を受容すると(地上)胚軸の伸長は抑制され、子葉は緑化し展開する。暗所で胚軸を伸長させる主要な植物ホルモンはGAであることが知られている(例えば、Ali-Atiら 1999)。暗所では芽生えの胚軸は伸長し続けたが、明所では胚軸の伸長は停止した(図2-3)。暗所は土中の状況に対応し、芽生えは徒長する。明所は光が当たる地上の状況に対応する。生徒たちは暗所では胚軸を伸長させる物質の存在を予想

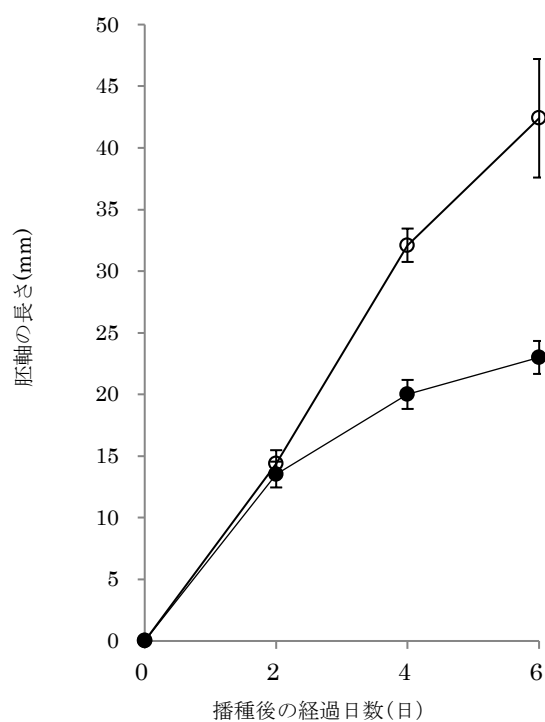


図2-4 GA合成阻害剤による伸長の抑制

バーミキュライトに 0.3×10^{-6} Mウニコナゾールを含浸させた場合 (●) は、対照 (○) に比べて、4日目には胚軸の伸長を顕著に抑制した。25°C暗所で栽培した。縦線は標準誤差を表す。

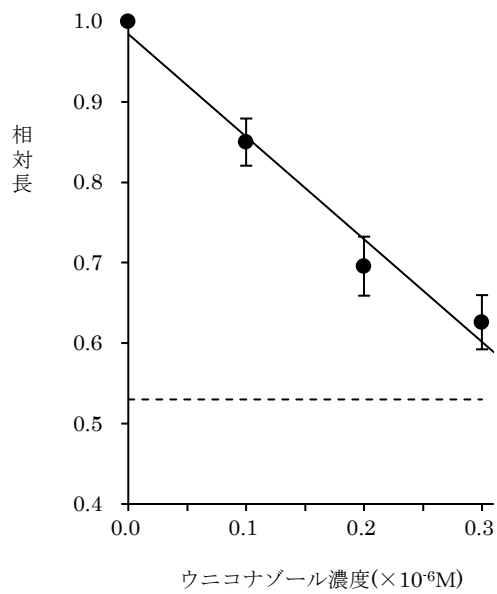


図2-5 ウニコナゾールを含むパーミキュライトに置いてからの4日目のホウレンソウ芽生えの相対長

ウニコナゾール 0Mの時の胚軸の長さに対する各濃度のウニコナゾール処理をした胚軸の長さの割合を示した。ウニコナゾール濃度が高くなるにつれて胚軸の伸長は抑制された。破線は明所の相対長を表し、測定値の縦棒は標準誤差を示す。

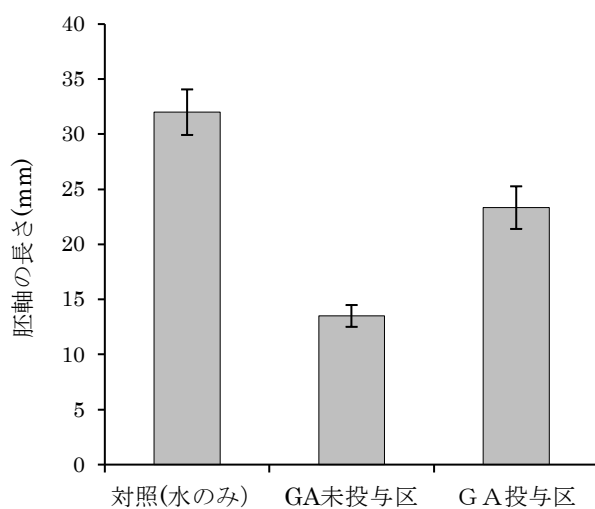


図2-6 GA合成阻害剤による伸長抑制とGA₃による伸長の回復

0.3×10⁻⁶Mのウニコナゾールを含ませたバーミキュライトに発根した種子を植え、暗所にて4日間育てた。半数の芽生えに1.0×10⁻⁴MのGA₃を芽生え全体に噴霧した。さらに3日間栽培した後、胚軸の長さを測定した。対照区とGA未投与区間、対照区とGA投与区間、GA未投与とGA投与区間でそれぞれt検定を行なったところ、各平均値の間には5%水準で有意差が認められた。縦線は標準誤差を表す。

することができると考えられる。さらに、GA 合成阻害剤を投与すると暗所での徒長が抑制されることを生徒たちが観察することで、「暗所の芽生えが徒長するには GA が存在するからであり、光を感知した芽生えで GA がなくなるので胚軸が止るのだ」という考えを導けるだろうと考えた。

乾燥した種子を GA 合成阻害剤の溶液に直接浸すと、予備調査の結果で、発芽が完全に抑制されたので、実験の前日に種子をペーパータオル上で水に浸漬し発根させる必要がある。授業時間の配当は、3 時間（1 時間ずつ別日に実施）とし、1 時間目に、教師が発根種子と GA 合成阻害剤溶液を用意し、生徒は栽培の準備をする。すなわち、容器に入れたパーミキュライトに水または GA 合成阻害剤溶液を含ませた後、発根種子を播く作業を行う。各容器を明所と暗所に置き栽培する。1 時間目の授業日から 4～5 日間隔を空けて 2 時間目の活動を行なう。教師は物差しを準備し、生徒は、芽生えの胚軸長を測定する。3 時間目には、普通教室で、生徒が班毎に分かれて実験結果のまとめを行なう（表 2-2）。実験では、明所にて水で栽培したものと GA 合成阻害剤を与えて栽培したもの、暗所にて水で栽培したものと GA 合成阻害剤で栽培したものの 4 つの実験区の結果が得られるので、生徒たちはこれらを比較する。

Ⅲ 授業実践とその評価

1 授業展開

平成 26 年 6 月 12 日（水）から京都府立 Y 高等学校普通科 3 年生（男子 8 名 女子 32 名計 40 名）を対象にして、授業を実施した（図 2-7）。授業は、Ⅱ-3 「授業計画」での計画に基づき 3 日間で各日 1 時間ずつの計 3 時間で展開した（表 2-2）。生徒は第一学習社の教科書を使用し、実験前に植物の環境応答の単元を学習したので、光受容体であるフィトクロムやクリプトクロムの存在や GA の働きは既習事項であった。光形態形成については、レタス種子の発芽は学習したが、今回の実験で行なう脱黄化に伴う胚軸の伸長の抑制と光の関係は学習していなかった。

(1) 生徒実験の方法

実験は、4 人 1 組の 10 班構成で行なった。生徒は、班毎に用意した 4 個の各透明容器(8.0 cm×10.0 cm×7.5 cm)にパーミキュライトを 10 g ずつ入れ、水または GA 合成阻害剤(ウニコナゾール濃度 0.2×10^{-6} M)を 50 mL 含ませたのち、発根種子を

表 2-2 実践授業の指導計画

準備		実験の前日にペトリ皿にペーパータオルを敷き、十分な水を与え、播種する。（一晚置き、発根させる）	
	学習活動（生徒の活動）	指導上の留意点	
1 時 間 目	導入	実験の目的を知る。 事前アンケートに答える。	実験全体の流れと本時の活動の概略を説明する。 自分の考えでアンケートに答えさせる。
	展開	水または GA 合成阻害剤を含ませた培土を準備する。 発根した種子の選別および播種する。	各容器に実験区を明記し、区別させる。 同じ程度発根した種子のみ使用するよう注意する。
	まとめ	実験区ごとの仕分けと後片付けをする。	各実験試料を、各条件の恒温器内に配置する。
2 時 間 目	導入	本時の活動内容を知る。 恒温器より、実験試料を取り出す。	各条件の試料を取り間違えないように、一つの実験区ごとに扱うように指示する。
	展開	各実験区の芽生えの長さを測定する。 各実験区ごとの値をまとめ、平均値を求める	芽生えを根ごと取るように注意する。 測定は mm 単位で行なう。
	まとめ	レポートへの各値の記入と後片付けをする。	各班で計測した胚軸の長さを提出させる。 用土や容器を指定の場所に返却させる。
3 時 間 目	導入	本時の活動内容を知る。 班毎の値をまとめたクラスの結果を知る。	前回までの活動を振り返る。 各実験区の値を比較して違いに気付かせる。
	展開	各班毎の値をグラフ化するとともにクラス全体の結果と比較する。 各実験区での結果の違いを考察する。	値が違う原因を植物ホルモンの働きから考えさせる。 班員と相談しながら進めさせる。
	まとめ	実験の感想を書く。 事後アンケートに答える。	実験を通して知ったことを踏まえてアンケートを答えさ、全体の感想を書かせる。

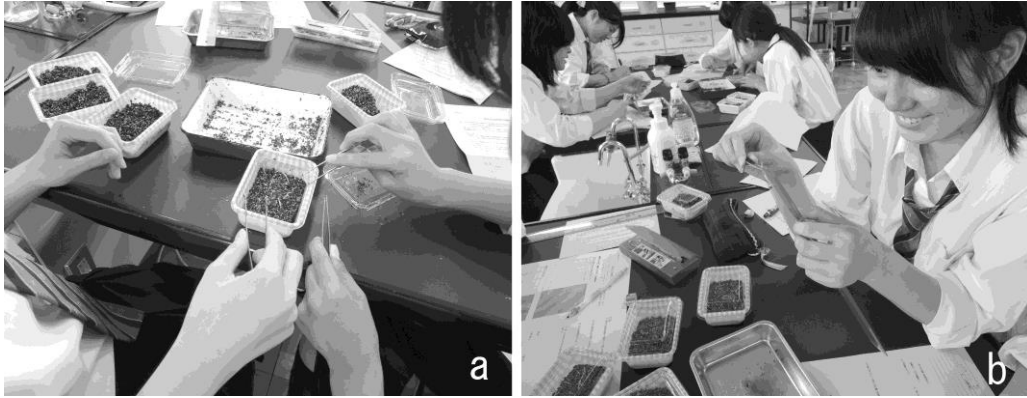


図2-7 生徒実験の様子

実践授業における生徒の活動. 各条件の芽生えを取り出している(a). 取り出した芽生えの胚軸長を測定している(b)様子.

ピンセットで丁寧に扱いバーミキュライトの上に 10 粒播き、5 g のバーミキュライトで覆った。容器の側面に実験条件を記入させ、暗条件のものは遮光したダンボール箱に容器を入れ、明条件はそのまま 25 °C の人工気象器内で栽培した。5 日後に 2 回目の授業を行なった。生徒は、芽生えをバーミキュライトから取り出し、各班は各実験区当たり平均 7.5 ± 0.78 個体の芽生えの胚軸長を測定した。測定結果はワークシート（資料 2-1）に記入した。胚軸の長さを一つずつ測定する作業時間は 15 分から 20 分程度を要するものであったが、生徒は班毎に協力しながら作業した。3 回目の授業では、教師が班毎の結果をクラスでまとめたもの（図 2-8）を準備して生徒に配布した。この結果が生じた理由を班毎で検討し、レポートとして提出させた。

(2) 生徒実験の結果と考察

生徒実験の結果は、ハウレンソウの芽生えの胚軸長は明所では 16.1 ± 2.0 mm であったが、暗所では約 1.5 倍の 25.5 ± 1.9 mm に伸長していた。一方、暗所で GA 合成阻害剤を投与した暗処理区では、胚軸の長さが暗対照の約 0.6 倍の 15.5 ± 1.3 mm に抑制された（図 2-8）。これは、教材開発に当たり行なった実験結果（図 2-6）と同じ傾向の結果であった。

「芽生えがちぎれてしまった」や「根についている土を取るのが難しかった」など測定時の作業に困難を感じた生徒もいた。胚軸の長さは 1 cm ~ 3 cm 程度あり、十分に大きく、手で扱うことができる。しかし、根がしっかりと張り、引き抜く際の抵抗が大きいため、不用意に引き抜くと胚軸の途中で切れる場合がある。そこで、手で胚軸をつかみ引き抜かず、ピンセットで周りのバーミキュライトを掘り起こし根元を持ってバーミキュライトごとゆっくり取ることを注意した。胚軸の根元側が切れてしまうこともあったが、各班 1 実験区 10 粒の種子を用意して実験を行ない、各実験区当たり約 7.5 個体と十分な数を測定することができた。生徒たちは、前述のようにフィトクロムやクリプトクロムといった光受容体や GA による茎の伸長促進などの作用は既習事項であり、クリプトクロムが光による茎の伸長を抑制する際に働く青色光の光受容体であることが、教科書（第一学習社）に記載されているので、このことと関連させられると考えたが、「いろいろな条件で実験し、それがどのように違うのか考えること」や「光が当たるときと当たらない時でどのようなしくみになっているのか考えるのが難しかった」など 3 時間目の結果のまとめを難しく感じる生徒が見られた。実

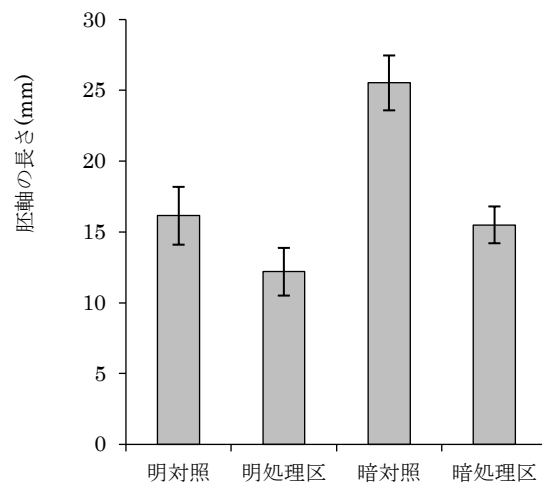


図2-8 生徒実験の結果

ウニコナゾール $0.3 \times 10^{-6} \text{M}$ または水を含んだパーミキュライトに発根した種子を 25°C の恒温器内の明所あるいは暗所にて5日間栽培した。種子の約75%が芽生えた。以下の各2実験区での値をt検定で有意差を調べた。明所の2実験区間で胚軸長の平均値に有意差は無かった ($p > 0.05$)。また、明対照と暗処理区の間にも有意差は無かった ($p > 0.05$)。しかし、暗条件の2実験区間では有意差が認められた ($p < 0.05$)。各条件で生育した個体の胚軸の長さの平均値を示し、縦線は標準誤差を表す。

験区を比較して、実験結果を解釈することに困難を感じていた。明所における伸長抑制と、暗所の伸長促進の現象面に気付いても、このことと GA の作用との関連に気付けない生徒が各班に 1 名ずつは見られた。しかし、これらの生徒たちも、教科書やノートを参照し、班員との話し合いで理解を進めている様子が机間巡視で観察された。

2 実践授業の評価

(1) 評価の調査方法

本教材を通して、光の環境変化に応じて生じる胚軸の長短は、内生 GA 量の差が引き起こしたことを生徒が正しく理解できたかどうかを確かめるために、事前・事後に評価問題と事後にアンケートによる調査を行なった（表 2-3）。4 つまたは 5 つの選択肢から正しい答えを 1 つ選ぶ評価問題 3 問と自由記述のアンケートを行なった。

(2) 評価問題およびアンケート結果と考察

評価問題の設問 1 は、植物が環境の違いに応答していることを理解しているかを問う設問である。事前の回答では、「発芽したての芽生えは光があるとすくすくのびる」という答が最も多く 56.8% であった。光合成の活動と関連させて、植物はいつでも明るければよく成長すると考えているようであった。実験を通して、暗所では徒長することを学んだので、事後では 9 割近い生徒が「発芽したての芽生えは暗がりですくすく伸びる。」を選択した（表 2-3）。

設問 2 は、GA の効果を問う設問である。GA が「茎の伸長を促進する」は既習項目なので、事前の結果で①の選択が圧倒的に多くなると予想したが、実際には 50% 程度であった。授業での「GA は茎の伸長を促進する」という説明だけでは、知識の定着が低いことが示された。実験では、単に GA を投与して胚軸の伸長の増加を調べるのではなく、GA 合成阻害剤を投与して、内生の GA 量を抑制することで胚軸の伸長も抑制されることを調べた。実験後、胚軸の伸長と GA の関係を正しく答えた生徒の割合が 80% に上昇したこと（表 2-3）から、生徒たちは GA が茎の伸長に効果がある物質であるということをよく理解することができたと判断できる。

設問 3 は、生徒が環境応答による形態変化と GA の量の差を関連付けて考えたかを問う設問である。事前の調査では、①（38%）と⑤（35%）が上位の回答であった。①は、設問 1 と同様に明所ならば芽生えが伸びると考えて、環境に応答した植物の形態

表 2-3 実験の事前事後での生徒の考え方の変化

	設問内容	事前の 選択(%)	事後の 選択(%)
設問 1	芽生えの伸長を述べた文で正しいものを選びなさい。		
	① 発芽したての芽生えは光があるとすくすく伸びる	57	3
	② 発芽したての芽生えは暗がりですくすく伸びる	11	88
	③ 発芽したての芽生えは明るさに関係なく、一定の大きさになるまで伸びる。	27	8
	④ ①～③のどれが正しいか判断できない	5	3
設問 2	芽生えの伸長とジベレリンとの関係で正しく述べられている文を選びなさい。		
	① ジベレリンがあると芽生えの伸長は良い	51	80
	② ジベレリンがないと芽生えの伸長は良い	16	5
	③ 芽生えの伸長はジベレリンの有無に関係がない	24	10
	④ ①～③のどれが正しいか判断できない	8	5
設問 3	芽生えの生育条件とジベレリンの関連を正しく述べている文を選びなさい。		
	① 明るいときジベレリンがたくさん作られて芽生えの伸長がよい。	38	10
	② 明るいときジベレリンがたくさん作られて芽生えの伸長が悪い。	3	3
	③ 暗いときジベレリンがたくさん作られて芽生えの伸長がよい。	11	80
	④ 暗いときジベレリンがたくさん作られて芽生えの伸長が悪い。	14	0
	⑤ ①～④のどれが正しいか判断できない	35	8

各設問の選択率の総計は四捨五入のため 100 とはならない。各設問の正答は、設問 1 は②、設問 2 は①、設問 3 は③である。

を考慮してないことが分かる。また、⑤は「判断できない」ということなので、既習事項だけでは、生徒は環境応答を考える材料を持っていない状況だと考えられる。本実験を経験することで正答である③の選択は事前の 11%から 80%と大きく上昇した(表 2-3)。単に芽生えは、暗条件で徒長するだけでなく、内生 GA と関連して考えられるようになった結果であると言える。明暗の異なる環境で生育した芽生えの形態と GA 合成阻害剤の投与実験の結果とその考察から、生徒たちは光条件の変化とそれを感知して植物が伸長の度合いを変えていることを、正しく考えられるようになったと言える。

実験後の生徒が理解した内容を答えた自由記述には、「今回の実験をして、芽生えの頃は、土から早く出ないと陽に当たれないので伸長が早いということは納得できるし、とても賢いなと思いました。」や「実験する前は、暗条件よりも明条件の方が伸びると思ったけど、実際、実験結果を見て暗条件の方が長いことに驚きました。」など芽生えが環境に応答して伸長している様子を 57%の生徒が挙げた。実験前には、芽生えも光合成を行なうので明るい方が伸長すると考えていたこと生徒が、植物の環境応答に関心を持ち、明所と暗所の芽生えの伸長の違いが、植物ホルモンである GA によって引き起こされたと考えられるようになったと言える。

V おわりに

生徒実験の結果(図 2-8)では、明所栽培にて GA 合成阻害剤投与した明処理区と明対照との間で、芽生えの伸長に有意な差はなかった。この点に注目した生徒はいなかった。暗所で GA を合成して徒長する芽生えには、GA 合成阻害剤の影響が顕著に現れたが、明所で徒長しない芽生えは、GA 合成能は低く、GA 合成阻害剤の影響がほとんど見られなかったと考えられる。今後この点を考察できるワークシートを作成して、明暗それぞれにおける GA の合成の変化から、光条件の変化によって生じる芽生えの環境応答をより詳しく学習する教材へと発展が期待できる。

授業実践を行なったクラスは、いわゆる文系クラスであり、理科に対して強い関心を持っている生徒は少ない。このようなクラスにおいても、本教材を用いた実験を行なったことで、約 8 割の生徒が興味を持ち、また全ての設問において正答率が 80%以上に向上したので、多くの学校で本実験教材が生徒の興味を引き、内容理解が向上する有効な実験教材となると期待できる。

3章 PCRにおけるプライマーの働きの理解を目的とした授業案とその実践

I はじめに

生物の学習内容の「現代化」を目指し、高等学校学習指導要（文部科学省 2009a）には、新しい内容が多く組み込まれた。松浦（2010）は、最近 20~30 年の進展で明らかになった生物学の基礎的・基本的な事項が、現学習指導要で重視されたと指摘している。また、田代（2010）も、生命科学の急速な進展への対応を考慮することが生物領域全般の改訂の特徴であると述べている。進展した領域とは、主に分子生物学の見識であることは論を待たないだろう。

分子生物学の技術と応用は高等学校「生物」では、バイオテクノロジーの単元にまとめられている。高等学校学習指導要領解説理科編（文部科学省 2009b）では、バイオテクノロジーについて、「遺伝子を扱った技術について、その原理と有用性を理解させること」とある。内容の取扱いとして、「制限酵素やベクター及び遺伝子の増幅技術にも触れること。」とあり、「生物」の各教科書（浅島ら, 2013; 本川ら, 2013; 嶋田ら, 2013; 庄野ら, 2014; 吉里ら, 2013）には、(1)ベクターを用いた遺伝子組換え、(2)PCRによるDNAの増幅、(3)制限酵素に加えて、(4)DNAの電気泳動などが記述されている。遺伝子組換え実験は5社中4社が掲載している一方、PCRを行う実験は5社中2社の教科書のみが掲載している（表3-1）。

一般的な解説書でのPCRの説明は、「遺伝子の単離、構造解析、発現解析など様々な操作を行なうことができる分子生物学研究の基盤をなす技術であり、多方面に応用されている重要な技術である」（青柳 2009）と述べられている。PCRなどのバイオテクノロジーについては、「バイオテクノロジーに関わる知識は、読み書きそろばんのように市民の日常生活をより豊かにするために資するものである」（佐々 2004）と述べられているように、現代社会でのリテラシーとして身につける必要があると言える。

高等学校「生物」の教科書は、5社全てで1ないし2ページを割いてPCRを説明している。いずれも、異なる温度でDNAの解離、プライマーとのアニール、DNA鎖の伸長の3つの反応が起こり、これを順に繰り返してDNAを増幅することを説明している。一方、増幅されるDNAの表現には、各教科書によって違いが見られる。数研出版(p.132)は「同じDNAを多量に複製」、実教出版(p.95)と啓林館(p.113)は、「特

表3-1 高等学校「生物」の教科書で取り上げている分子生物学に関する事項及びその実験

遺伝子組み換えや電気泳動に関する実験は、多くの教科書で記載されている。電気泳動は制限酵素の実験にも用いられるので、多くの教科書で紹介されている。教科書に記載がある (○), 実験の項目で取り上げられている (◎)

	遺伝子組換え	制限酵素	PCR	電気泳動	シーケンス	DNA鑑定	DNAマイクロアレイ	GFP
第一学習社	○	◎	◎	◎	○	○		
実教出版	◎	◎	○	◎		○	○	○
啓林館	◎	◎	○	◎	○			
数研出版	◎	○	◎	◎	○		○	○
東京書籍	◎	○	○	○	○			○

定の DNA 領域を（多量に）増幅」，第一学習社(p. 137)は「目的の塩基配列を選び出し，その配列を持つ DNA を増幅，東京書籍(p. 123)は「プライマーには含まれた領域の DNA は大量に増幅」と表現している．このような表現の違いは，PCR におけるプライマーの説明の違いにつながる．

全ての教科書でプライマーは，DNA に相補的に結合する短い DNA であることと，DNA 鎖の伸長の起点となることが指摘されている（表 3-2）．また，いずれの教科書でも，鋳型 DNA もプライマーも棒状に図示されている．鋳型 DNA へのプライマーの結合は，長短 2 つの棒が並べて描かれているだけであり，鋳型 DNA に結合するプライマーの向きや DNA の伸長方向についての詳細は示されていない．また，第一学習社以外の 4 社の教科書の図では，2 つのプライマーが同じ色の棒で示されていて，同じものであるように読み取れる．第一学習社の図では，2 つのプライマーが異なる色の棒で示されているが，なぜ異なる色で示しているのか，何が違うため色を分けているかの説明がない．5 社共通して図からは，DNA とプライマーとの結合の相補性も読み取れない．すなわち，プライマーが鋳型 DNA のその領域になぜ結合するのかを考える材料が示されていない．また，東京書籍や啓林館の教科書では DNA の向きを示す 3' 端や 5' 端を全く表記していない．数研出版や実教出版の教科書では，鋳型 DNA にも 3' 端や 5' 端を表記している．第一学習社の教科書だけが，鋳型 DNA もプライマーにも 3' 端や 5' 端を表記している（図 3-1）．つまり，教科書では，鋳型 DNA の二本鎖の違いや，プライマーが 2 種類存在し，それぞれが塩基配列の異なるものであることについての説明がないなど各社の説明や紹介は余りにも簡略化し過ぎたものであると言えるだろう．

長大な鋳型 DNA の特定領域を増幅するには，センス鎖とアンチセンス鎖の特定の部分に特異的に結合するプライマーが必要となり，通常このプライマーは塩基配列が異なる．PCR について解説した一般書には，「2 つのプライマーは鋳型 DNA の増幅したい領域を挟んで 3' 端が内側に向くように設計しなくてはならない．」（青柳 2009）と説明してある．しかし，前述のように教科書の説明では，塩基配列の異なるプライマーが 2 種類存在することが説明されていないので，生徒たちは，プライマーによって特定領域が増幅される現象を理解できない．つまり，プライマーによって特定領域が増幅される現象を理解するために，プライマーが鋳型 DNA の決まった領域にその向きで相補的に結合することと，DNA の伸長方向が分かるように DNA に 3' 端や 5' 端

表3-2 高等学校「生物」の各教科書で取り上げているPCRに関する事項

	教科書での記載		教科書での内容			
	PCRの説明	プライマーの説明	反応温度	相補性	結合の向き	伸長方向
第一学習社	1983年、マリスはDNAを人工的に短時間で多量にふやす方法を着想した。DNAポリメラーゼを利用したこの方法をPCR法と呼ばれる。	<ul style="list-style-type: none"> 鋳型の塩基配列に相補的な配列を持つ短いヌクレオチド鎖 目的とする部分の2本のヌクレオチド鎖の3'端に結合するように人工的に合成したDNA 	○△	○	○△	△
実教出版	試験管内で酵素反応により特定のDNA領域を増幅させる方法	<ul style="list-style-type: none"> 複製したい領域の末端と相補的な塩基配列をもつ 	●▲	●	-	-
啓林館	試験管内で特定のDNA領域を多量に増幅する方法	<ul style="list-style-type: none"> プライマーは化学的に合成でき、増幅したいDNA領域の両端に相補的に配列することで、特定の領域のみを増幅することができる。 	○△	○	-	-
数研出版	わずかなDNAをもとに、おなじDNAを多量に複製する方法	<ul style="list-style-type: none"> 3'末端に、その部分と相補的な短いDNAが結合する。 プライマーは、新生鎖が伸長を開始する起点 	○△	○	-	-
東京書籍	プライマーを加え、高温で加熱しても変性しにくいDNAポリメラーゼにより複製を起こさせる	<ul style="list-style-type: none"> 鋳型の一端と相補的な塩基配列をもつ短いDNA断片。 DNAの複製の起点 	○△	○	-	-

反応温度:3ステップの異なる温度で起こる反応を1サイクルとして反応が進むことの記載の有無. 相補性:プライマーが鋳型DNAに結合するときの塩基の相補性の記載の有無. 結合の向き:プライマーが鋳型DNAに結合する向きの記載の有無. 伸長方向:DNA鎖の伸長が5'端から3'端に向かって起こることの記載の有無. 教科書の本文に記載がある(○), 参考の欄等本文とは別に記載がある(●), 本文の図中に記載がある(△), 参考等の図中に記載がある(▲).

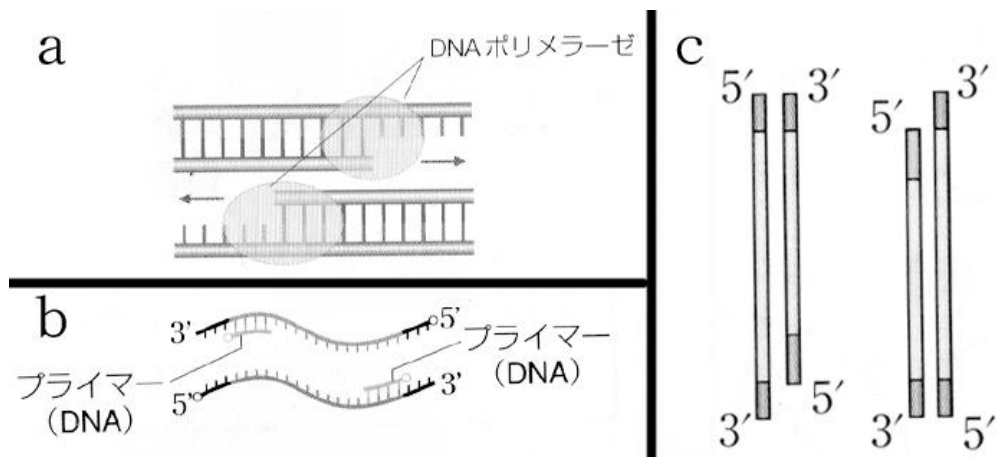


図3-1 「生物」の教科書におけるPCRでのDNA増幅の図の違い

a; 東京書籍の教科書の図, 鋳型DNAは, センス鎖, アンチセンス鎖の区別は無く, 同等の棒2本で示している. 鋳型DNAとプライマーともに分子の向きは示されていない. 啓林館の図も同様. b; 数研出版の教科書の図. 鋳型DNAは, センス鎖, アンチセンス鎖を色の違う棒で示している. 鋳型DNAは, 分子の方向が示されている. 実教出版の教科書も同様の図. c; 第一学習社の教科書の図. 鋳型DNAは, 分子の方向示した2本の棒で, センス鎖とアンチセンス鎖を示し, プライマーは, 異なる色でフォワードプライマーとリバースプライマーを区別し, プライマーを含めた断片の分子の向きを示している.

を示す必要がある。現状の学習では、プライマーによる DNA の増幅領域に関する問（例えば、図 3-2）に対し、正しく考えることが出来ず正答率は高くないと考えられる。

そこで、鋳型 DNA にプライマーが相補的に結合することと、DNA のヌクレオチド鎖の向きや DNA ポリメラーゼによる伸長方向を明確に示した図（図 3-3）を含むワークシート（資料 3-1）を作成した。ワークシートの図では、2 種類のプライマー DNA が鋳型 DNA の特定の領域に結合する理由や、そこを起点として DNA 断片が増幅される理由を生徒たちが理解できると考えた。

ワークシートを用いた学習と、プライマーの有無によって PCR 産物ができるか否かを検証する実験とからなる PCR 法でのプライマーの働きを学ぶ授業を計画した。さらに、この計画に基づいた授業実践で、実験原理の正しい理解と実験結果の正確な予想の達成を測る評価問題を作成し、事前・事後に評価とアンケート調査を行ない、実践の成果を検証した。

ハウレンソウは 1 年を通して購入が可能であり、抽出した DNA は精製することなく PCR の鋳型となる。ハウレンソウのジベレリン (GA) 合成に関わる酵素の 1 つ GA20oxidase の遺伝子 (*SoGA20ox*:SOU33330) の cDNA 塩基配列 (Wu ら 1996) を Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) に入力しプライマーを設計した。プライマーの塩基長を 20 塩基対 (bp)、T_m 値を 57°C に設定し、増幅領域が約 200bp になるプライマーを探し、フォワードプライマーとして、5' agctctcaggaaacaaggtg 3' , リバースプライマーとして、5' cagtccccattaagttggag 3' を選択した。両プライマーは Oligo@SIGMA-PCR (シグマアルドリッチジャパン) から入手した。

II PCR 実験の概要

1 方法

ハウレンソウの葉を約 0.1 g, 約 5 mm 角に切り 1.5 mL のマイクロチューブ入れ, ISOPLANT (ニッポンジーン) を使用して DNA を抽出した。抽出した DNA は 100 μL の TE (10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA pH 8.0) に溶かし DNA 抽出液とした。

DNA 抽出液 0.5 μL, DNA ポリメラーゼ (KOD FX Neo, 東洋紡) 0.2 μL, PCR 緩衝液 5.0 μL, 2.0 mM dNTPs 2.0 μL, 滅菌蒸留水 (滅菌水) 1.3 μL を入れた PCR チューブを 4 本用意した。1 本にはフォワードプライマーとリバースプライマーを 0.5 μL

問6 下線部クについて。いま、図1のような塩基配列をもつDNA断片を試験管内で複製し増幅させたい。加えるべき短い1本鎖DNAの組合せとして最も適当なものを、下の①～⑨のうちから一つ選べ。 12

5'-ATGCCTGAGCACAGCAATCAGCGATGTCAGCCCCGCTTTAG-3'

図 1

- ① 5'-CTTTAG-3' と 5'-ATGCCT-3'
- ② 5'-CTTTAG-3' と 5'-TACGGA-3'
- ③ 5'-CTTTAG-3' と 5'-GAAATC-3'
- ④ 5'-CTAAAG-3' と 5'-ATGCCT-3'
- ⑤ 5'-CTAAAG-3' と 5'-TACGGA-3'
- ⑥ 5'-CTAAAG-3' と 5'-GAAATC-3'
- ⑦ 5'-GATTTC-3' と 5'-ATGCCT-3'
- ⑧ 5'-GATTTC-3' と 5'-TACGGA-3'
- ⑨ 5'-GATTTC-3' と 5'-GAAATC-3'

図3-2 プライマーによるDNAの増幅領域に関する問題

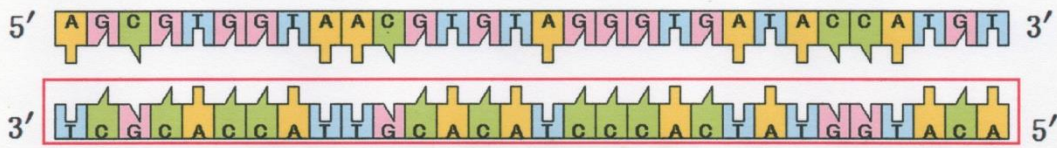
正答は④だが、教科書の学習ではプライマーが鋳型DNAのどの場所に、どの向きで結合するかの詳細が説明されていないので、生徒らは答えを出すのが非常に難しい。問題は2015大学入試センター駿台実践問題集生物（第4回）駿台文庫株式会社より

課題1 プライマーの結合を学ぼう！！

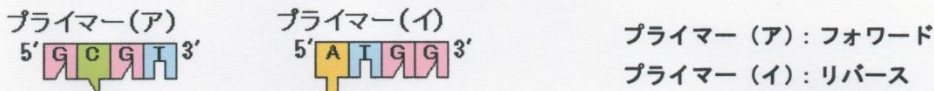
DNAの塩基配列は5' → 3' 方向に表記される。ある遺伝子の塩基配列の一部が図に示す。



このDNAには本来相補鎖があるので、実際は図の赤枠の対を形成している。

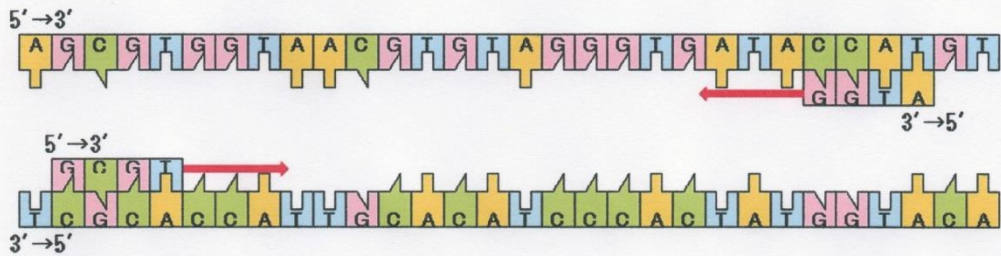
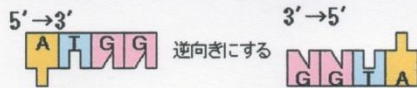


このDNAを図のプライマーを用いて増幅してみる。



プライマーの配列も5' → 3' 方向に書かれている。このプライマーがDNAのどこに対応するかは向きを合わせる必要がある。フォワード側(プライマー(ア))は、そのまま5' → 3' 方向に伸長する向きなので、相補鎖側の3' → 5' 方向に書かれている側の鎖に結合する。一方、リバース側は、はじめに表記してある側(5' → 3')に結合するので、プライマーの配列は表記とは逆向きになる。つまり、配列は5' → 3' 方向に書かれているので、逆向きの3' ← 5' にして結合場所を考えなくてはならないということである。

プライマー(イ)



つまり、DNAの配列とプライマーの配列から見るプライマーの結合場所は図のようになる。

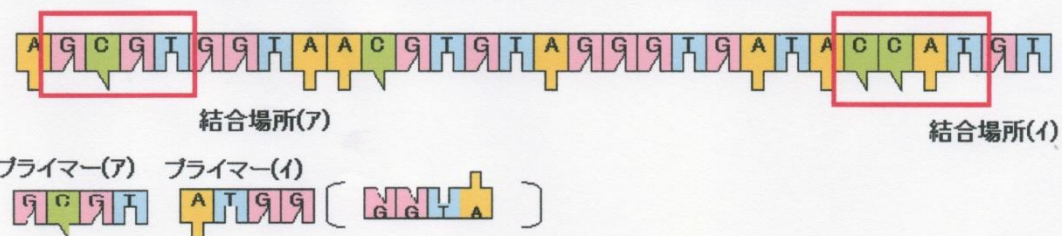


図3-3 ワークシートのプライマーが鋳型DNAと結合する様子を示した図

プライマーが鋳型DNAのどの領域に、どの向きで結合し、新生鎖がどの方向に伸長するかを正確に示した図である。生徒たちは、この図を使用してプライマーの働き方を学ぶ。

ずつ入れ、別の2本にはそれぞれ片側のプライマーと滅菌水 0.5 μL ずつ、残りの1本には滅菌水を 1.0 μL を加えた。これの PCR 混合液をサーマルサイクラー（ジーンアトラス 322 ASTEC）に設置して、98 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、68 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒のサイクルを 30 回行い、反応終了後そのまま 4 $^{\circ}\text{C}$ で保管した

PCR 産物 10 μL に、ミドリグリーン Direct（日本ジェネティックス）1.0 μL を良く混合し、1.5 %アガロースゲルに空けた窪みに、混合液 10 μL を入れ、100 V の電圧で 20 分間程度電気泳動を行なった。ミドリグリーン Direct はゲル染色や試料と混合して用いることができる。ゲルを染色すると、洗浄してもバックグラウンドに蛍光が残留するので、明瞭なバンドの像を得にくい。一方、試料に染色剤を混合した場合、ゲルが染色されることなく明瞭なバンド像が得られる。また、電気泳動後にゲルを染色する方法に比べて、染色と洗浄を省略できるので実験時間を短縮できることは教材に組み入れる上で利点である。

2 結果と考察

フォワード、リバースの両プライマーを加えた PCR 産物の電気泳動像には、ただ1本のバンドを確認することができた（図 3-4）。泳動距離からこの DNA 断片の大きさは約 170 bp と推定された。塩基配列から予想される増幅断片の長さ 168 bp と良い一致を示すので、今回用いたプライマーが、*SoGA20ox* の標的部分を増幅（図 3-5）したと考えられる。それ以外のレーンでは、電気泳動像にバンドを検出できなかった。プライマーが無いと DNA は増幅できず、フォワードあるいはリバースのプライマー一方だけでは、鋳型 DNA の片側の鎖をサイクル数倍しか増幅できないので、バンドが確認できる程に DNA を増幅することができないことが示された。

III 生徒実験開発のための諸実験

第一学習社の教科書「生物」には PCR によるイネの品種判別が紹介されている。また、山内 (2013) は遺伝子組換えによって作られた青いバラや青いカーネーションの、組み込まれた遺伝子を PCR によって検出する教材を報告している。山内は、大学生を対象に 90 分授業を 4 コマ（6 時間）使用した実践を行い、高等学校で行う場合 50 分の授業時間に対応させることが課題と述べている。これほどの時間がかかる PCR 法の実験を、一般の高等学校の通常授業で行うことは難しい。そこで、本研究では一般の

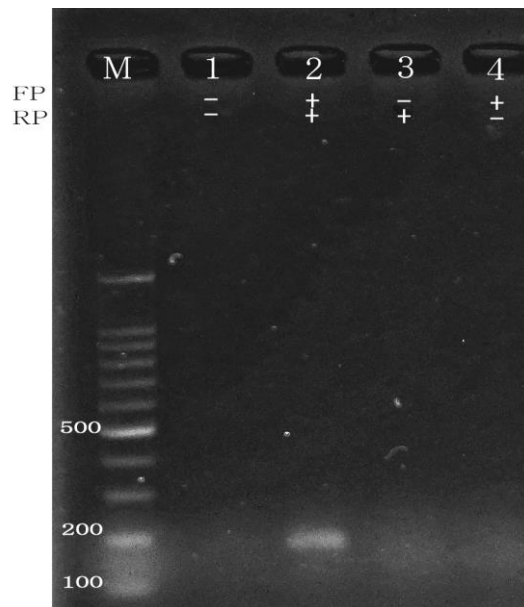


図3-4 *SoGA20ox* 検出用プライマーを用いた PCR の電気泳動像

レーン1から4は、順にプライマーなし、フォワードプライマー(FR)・リバースプライマー(RP)の両方あり、フォワードプライマーのみ、リバースプライマーのみの各条件で行なった PCR 産物を電気泳動した。

```

1 acctccattt tctaacaaa gtagottaa ttggcttcaa accaacaaaa aatgatgcaa
61 ccacttotta ccattccacc accacttcca acaacctcat tgtttgatac atcatttctt
121 aaacatgaag ataacatacc aagccaattt atatggccag atgatgaaaa accatgctog
181 gaaacgctc cagagctcga ggtacctccc attgatctag gggggttcct ctcaggagac
241 ccagttgcag tgtcaaaggc aactacactt gccaatgaag catgcaagtg gcatgggttc
301 ttcttgattg tcaacctga tatctatttc gagctcttag ttaaagctca tgaagctatg
361 gattactttt ttatgcagcc gttttccaa aaacaaaag ctctcaggaa acaaggatgat
421 cattgtggct atgctagtag ctttcttga agatttgcca caaaacttcc ttggaagag
481 actctttcct ttcgatatta tgatgatgat gatgataagt cctcaaaaat ggtacaaaac
541 tacatctcca acttaatggg gactgacttt caagaatttg ggagggtgta ccaagaatat
601 tgtaaggcta tgagcaagtt gtccttggc atcatggagc ttttgggaat gacocntagga
661 gttggaagaa actatttcag ggaatttttc aaagggatg actcaataat cagactaac
721 tactacccgc cttgcaaaa accogaatta actcttggga oggggcctca ctgtgatcc
781 acgtcgtga cgattcttca tcaagatcat gttgttgcc ttgaagtctt cgtcgaccaa
841 aaatgtact ccatccgtcc caaccagaaa gcatttctog tcaacattgg agataccttc
901 atggctttgt caaatgggaa atacaagagt tgcttgaca gggcagtggt gaatagcaaa
961 actcctagaa aatcagtggc tttctttctg tgtccaaggg gaaacaaagt gattcgtcca
1021 ccaattgagt tagggcatcc aagggtatac coggatttta catggccgct tcttttgag
1081 ttacacaga aacattatag ggccgacaca aaaactctag attcttttac aaagtggctt
1141 caaaagagat caactgaaga cgagcgagta aagtaaaacc atgcaacagc aacagcaaca
1201 gcaacagcaa cagcagcacg caaaggacat acatgtaaaa acatgatgca ctcgttatag
1261 aaaagcattg tactccgtat atgaattgaa gagacaaaag ggtccaatt gaagttagct
1321 aaaggatcga tctgattaaa ttacaactga agcaccgctg ttgg

```

図3-5 *SoGA20ox* の塩基配列とプライマーの結合部位

398 からの 20 塩基と 546 からの 20 塩基の部分 (□) は、プライマーが結合する領域である。GA20oxidase となる部分は▼52 から▽1176 の領域である。

高校でも実施しやすいように、1 授業時間（50 分）を区切りとした 2 回の活動に分けて実施するように工夫した。すなわち、授業と授業の間の時間に、DNA 断片を増幅させることで、実質の実験時間を省略した。温度変化を 30 サイクル行なった後、4℃に保持することで、2 時間目の授業に試料をすぐに利用することができる。

PCR 実験の工程を（1）試料と試薬を PCR チューブに分注し、サーマルサイクラーに装着後 PCR 法を開始するまでの工程、（2）PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、泳動像の観察を行いまとめるまでの 2 工程に分けた。各工程は 50 分の授業時間で行った。アガロースゲル電気泳動で近接するバンドを分離するには、30 分程度の泳動時間が必要である。しかし、本実践では、単一の DNA 断片の有無を判別するようにプライマーを設計したので、泳動時間を短縮することができた。そこで、余裕のできた時間を使って、ゲルの窪みに試料を入れる練習に十分な時間を費やすように計画した。

授業の始めに、本実験の目的が、「PCR の原理を理解し、プライマーの働きによって特定の DNA 領域が増幅される仕組みを理解する。」であることと、2 日間にわたる実験であり、ワークシートで学習内容を整理しながら実験を進めることを告げた。1 日目にはマイクロピペット操作の練習を行なった（表 3-3）後、PCR 試薬の分注を行い、サーマルサイクラーにチューブを装着して温度サイクルをスタートさせること、2 日目には、増幅される DNA 断片の大きさを使用するプライマーにより理論的に予想することと、実際の PCR 産物を電気泳動で分離し、増幅された DNA 断片の長さ予想した DNA 断片の長さを比較する（表 3-3）という授業の概略を説明した。

1 日目には、正確な操作が必要なマイクロピペットの練習を行なった。すなわち、マイクロピペットを用いて、1.0 μL の水を測り取り、パラフィルム上に吐き出す練習を行ないながら、1.0 μL の水滴の大きさを確認させた。この際、パラフィルム上に吐き出した水を再び吸い取らないために、水を押し出したらプッシュロッドを押したまま、チップの先端を水滴から離し、その後プッシュロッドを戻すことを生徒たちに注意した。練習後、生徒たちは、必要な試薬をマイクロピペットで PCR チューブに分注した。

試薬の入った PCR チューブをサーマルサイクラーに装着し装置を起動したら、ワークシートの図（図 3-3）を用いて、プライマーが鋳型 DNA のどの鎖のどの部分に、どの向きで結合するかを生徒たちに説明した。ここまでを 1 日目の活動とした。

2 日目の始めに、多数の窪みのあるゲルに模擬試料を入れる練習を行った。練習後、

表3-3 授業展開

2回に分けることでサーマルサイクラーでのPCR反応を待たず、2回目の授業でPCR産物を用いて実験を行なうことができる。ワークシートを1回目の授業の始めに生徒に配布し、実験はこれに沿って行なった。

	説明事項	生徒の作業・活動	学習内容
1 時間 目	<ul style="list-style-type: none"> 実験全体の流れと本時作業の注意 		
	<ul style="list-style-type: none"> マイクロピペットの操作方法 試薬調製の説明 プライマーの働き 次回の指示 	<ul style="list-style-type: none"> マイクロピペット操作の練習 PCR試薬の調製 サーマルサイクラーにチューブ装着 課題1の学習 	<ul style="list-style-type: none"> マイクロピペットの操作方法 PCR法に必要な試薬 サーマルサイクラーについて プライマーの結合の理解
2 時間 目	<ul style="list-style-type: none"> 本時作業の注意 		
	<ul style="list-style-type: none"> ゲルの窪みに液を入れる方法 電気泳動の方法 増幅したDNA断片の大きさ予想 バンドの位置と大きさの関係 	<ul style="list-style-type: none"> ゲルの窪みに液を流す練習 ゲルにPCR産物を流す。 課題2を行なう 増幅したDNA断片の大きさの確認と写真撮影 予想と結果を比較 	<ul style="list-style-type: none"> 電気泳動によるDNA断片の分離の理解 予想と実際の結果から、プライマーにより、DNAの特定領域が増幅されることを確認
	<ul style="list-style-type: none"> レポートの指示 	<ul style="list-style-type: none"> 結果をレポートにまとめ、活動の感想を記述する。 	

生徒たちは、PCR産物にミドリグリーン Direct を混合した試料を実験用のゲルの窪みに入れ、電気泳動を行った。泳動時間中に、1日目の学習内容を活用して、実験に用いたプライマーの塩基配列と *SoGA20ox* の塩基配列からどの領域が増幅され、どれくらいの大きさのDNA断片が生じるかを考えさせた(図3-6)。そして、電気泳動が終了した後、泳動像から増幅断片長を求め、予想と比較させた。実験のまとめとして、今回の実験を通して分かったことと感想をレポートにまとめさせた。

IV 授業実践とその評価

平成28年10月25日(火)から京都府立Y高等学校普通科3年生物選択講座(男子14名 女子6名計20名)を対象に、授業実践を行なった(図3-7)。「遺伝子の働き」の単元は東京書籍の「生物」を用いて学習済みである。この講座の生徒のほぼ全員が大学入試に向けて「生物」を履修している。Ⅲで述べた授業展開(表3-3)に基づき2日間で各日1時間ずつの計2時間の授業を行なった。

マイクロピペットの練習では、生徒たちは扱う量が少量であるので、はじめは戸惑っていたが、数回操作を繰り返していく中で、要領をつかんでいった。この練習の後、PCRのために各溶液を量りPCRチューブに移した。PCRチューブ4本に、それぞれ異なる容量の溶液を分注するが、いずれも総量が10 μL となるので、軽く遠沈すれば、容量が同じであることを目視で確かめることができるが、5班中1班において、1本だけ容量が明らかに多かったが、それ以外は量的には問題が無いように見えた。入れる溶液の確認不足で同じ溶液を複数回入れ容量が増したようであった。この班のものも含めてサーマルサイクラーに装着し、30サイクルのPCRを行なった。

翌日はPCR反応液を電気泳動にかけた。まず、生徒たちにアガロースゲルの窪みに試料を入れる作業を行なっている動画を視聴させ、この作業の要領と注意点を伝えた。はじめチップの先が震えて目標が定まらず練習用のゲルの窪みに試料を入れる作業に苦戦していたので、空いている手の人差し指でチップの少し上を支えると安定すると示唆を与えた。3回程度練習を行うと、生徒たちは窪みに静かに試料を入れることができるようになった。PCR産物に染色とローディングバッファーを兼ねたミドリグリーンDirectを加えた後、溶液を新しいアガロースゲルの窪みに流し込み、約20分間電気泳動を行なった。20分の待ち時間を用いて、各レーンに生じるバンドの有無と位置を考えさせた。生じるDNA断片の長さは、前回の授業での解説に基づいて班内で検討

下の塩基配列はホウレンソウのジベレリン 20oxidase 遺伝子の塩基配列である。活性のあるジベレリンを合成するための基質であるジベレリン 20 を合成する酵素をコードしている遺伝子である。今回、プライマー1（フォワード）、プライマー2（リバーズ）を用いてこの遺伝子の一部を増幅するのだが、このプライマーで増幅される遺伝子の領域を答えなさい。下図の遺伝子の塩基配列にマーカーペンでプライマー1（フォワード）とプライマー2（リバーズ）の結合場所を記し、その間の塩基配列を数えなさい（プライマーの配列も含む）。

Primer1（フォワード）： agctctcaggaacaaggtg

Primer2（リバーズ）： cagtccccattaagtggag

『ホウレンソウのジベレリン 20oxidase 遺伝子の塩基配列』

```

1  acctccattt  tctaacaaa  gctagcttaa  ttggcttcaa  accaacaaaa  aatgatgcaa
61  ccaacttotta  ccattccacc  accacttcca  acaacctcat  tgtttgatac  atcatttctt
121  aaacatgaag  ataacatacc  aagccaatth  atatggccag  atgatgaaaa  accatgctcg
181  gaaacgcctc  cagagctcga  ggtacctccc  attgatctag  gggggttcct  ctcaggagac
241  ccagttgcag  tgtcaaaggc  aactacactt  gccaatgaag  catgcaagtg  gcatgggttc
301  ttcttgattg  tcaacctatg  tatctatttc  gagctcttag  ttaaagctca  tgaagctatg
361  gattactttt  ttagtcagcc  gttttcccaa  aaacaaaaag  ctctcaggaa  acaaggtgat
421  cattgtggct  atgctagtag  ctttcttggg  agatttgcca  caaaacttcc  ttggaaagag
481  actcttttct  ttcgatatta  tgatgatgat  gatgataagt  cctcaaaaat  ggtacaaaac
541  tacatctoca  acttaatggg  gactgacttt  caagaatttg  ggagggtgta  ccaagaatat
601  tgtaaggcta  tgagcaagtt  gtcccttggg  atcatggagc  ttttgggaat  gagcctagga
661  gttggaagaa  actatttcag  ggaatttttc  aaagggaaatg  actcaataat  cagactaaac
721  tactaccgcg  cttgccaaaa  acccgaatta  actcttggga  cggggcctca  ctgtgatccc
781  acgtcgctga  cgattcttca  tcaagatcat  gttggtggcc  ttgaagtctt  cgtcgaccaa
841  aaatgggtact  ccatccgtcc  caaccagaaa  gcatttgtcg  tcaacattgg  agataccttc
901  atggctttgt  caaatgggaa  atacaagagt  tgcttgacac  gggcagtggg  gaatagcaaa
961  actcctagaa  aatcagtggc  tttctttctg  tgtccaaggg  gaaacaaagt  gattcgtcca
1021  ccaattgagt  tagggcatcc  aagggtatac  ccggatttta  catggccgct  tcttttggag
1081  tttacacaga  aacattatag  ggccgacaca  aaaactctag  attcttttac  aaagtggctt
1141  caaaagagat  caactgaaga  cgagcgagta  aagtaaaacc  atgcaacagc  aacagcaaca
1201  gcaacagcaa  cagcagcacg  caaaggacat  acatgtaaaa  acatgatgca  ctcgttatag
1261  aaaagcattg  tactccgtat  atgaattgaa  gagacaaaag  ggtgccaatt  gaagttagct
1321  aaaggatcga  tctgattaaa  ttacaactga  agcaccgctg  ttgg

```

増幅される DNA 断片は

その大きさは

bp(塩基対)である。

図3-6 ワークシートの実験での増幅される DNA 断片の大きさを予想する問題

プライマーの働きを学習した後に、実験で増幅させている DNA 断片の大きさを予想する問題を班毎で行なった。班員と相談しながら、プライマーの働きを確認して、全ての班において正答を導いた。



図3-7 生徒実験の様子

実践授業における生徒の活動。マイクロピペットを用いて、パラフィルム上に液を吐き出す練習をしている(a)。吐き出した液滴、大きさが揃っている(b)。アガロースゲルの窪みに液を流す練習(c)。マイクロチューブに試薬を入れている様子(d)。実験中の様子、4人班で協力して行なった(e)。プライマーによって増幅される領域を特定する課題に取り組んでいる様子(f)。

し、全員が168bpのDNA断片が生じると予想した。

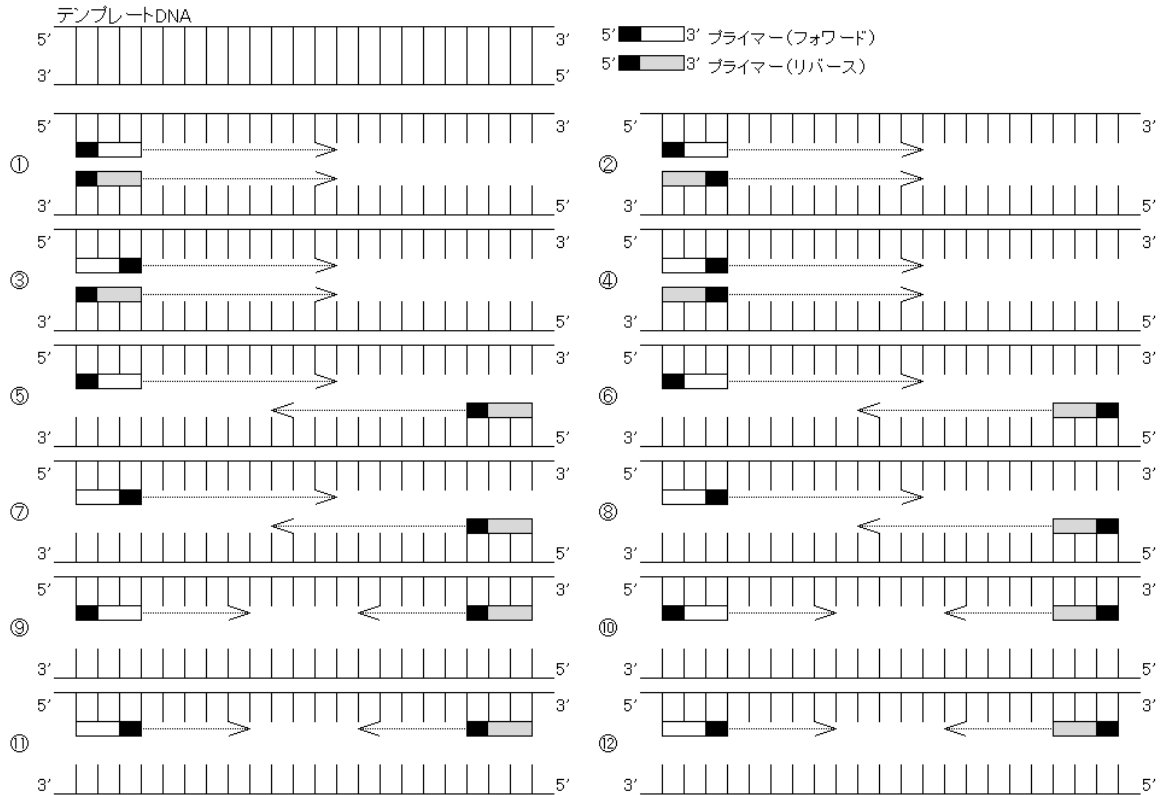
電気泳動後、バンドを観察すると、5班中2班では明瞭なバンドを観察できたが、残りの班ではバンドを検出できなかった。PCRチューブに反応液を作成する際に、溶液を正確に量り取れなかったと想像された。それぞれのプライマーを0.5 μL ずつ量り取らせたが、1.0 μL 量り取る計画にすれば、より多くの班で良好な結果を得られたと考えられる。最後にPCRによる増幅結果を共有し、授業を終了した。

特定領域のDNA断片が増幅されるPCRのしくみを正しく理解したか否かを確認するために、事前と事後に評価問題（図3-8）とアンケートによる調査を行なった。評価問題は2問あり、第1問はPCRにおけるプライマーの働きを正しく示している図を12の選択肢から選ぶ形式、第2問は塩基配列とプライマーの塩基配列から、DNAの増幅断片の大きさを回答する問いである。アンケートは、自由記述で行なった。

第1問は、フォワードプライマーとリバースプライマーが鋳型DNAの解離により生じた各一本鎖DNAへの結合する位置と結合する向き、および新しく合成されるDNA鎖の伸長方向を問うものである。選択肢の図①～④は、プライマーが増幅領域の両端でないことから、⑨～⑫は、2つのプライマーが同じDNA鎖に結合していることから、明らかに誤りだと気が付く図である。事前の調査では、1人（5%）だけが、①～④のうち③を選び、⑨～⑫を選んだ者はいなかった（図3-9）。つまり、鋳型DNAの解離により生じた2本の一本鎖DNA鎖それぞれにプライマーが結合し、そこを起点としたDNA断片を合成することを、ほぼ全員の生徒が理解していると考えられる。しかし、プライマーの結合する向きを意識することなく、5'端から3'端方向に記載されているままの向きで結合している⑦を正答と選んだ生徒が多く、65%もいた（図3-9）。このことは、2つの事項の理解が十分でないことによると考えられる。1つ目は、DNAの相補鎖は、互いに逆向きになって対合しているということである。このことは、5社全ての教科書で、「生物」の「DNAの分子構造」の単元にて述べられており、生徒たちも学習済みの内容である。しかし、多くの生徒が一本鎖DNAに対して、5'端から3'端方向に示されているプライマーが同じ向きで結合することが誤りであると気付いていなかった。2つ目は、伸長方向についてである。DNAは、DNAポリメラーゼが、DNAの3'端に新しいヌクレオチドを付加し伸長させる。プライマーが結合した時、伸長を示す矢印が5'端から3'端方向に向くはずである。しかし、生徒たちはそうになっていない誤りに気付いていない。教科書での鋳型DNAの増幅領域を示す図に、

確認テスト 事前 ・ 事後

第1問 PCR法により、DNAを増幅している様子を正しく表している図は①~⑥のうちどれか、1つ選べ。ただし、矢印はDNAが伸長する方向を示している。



第2問 ある遺伝子の塩基配列を調べたら以下のような配列であることが分かった。フォワード側のプライマー1 (TTCGG) とリバース側のプライマー2 (AGGTC) を用いてPCRを行なうと、下記のDNAの一部を増幅させることができると考えた。この時、増幅されるDNA断片の大きさは何塩基対となると考えられるか。ただし、DNA断片の大きさは、プライマーの長さも含めること。

DNAの塩基配列

ATTTCGGATGGATACGATGGATCCTCCTGATGATTGACCTCCATAAA

増幅されるDNA断片の大きさ

※分からなければ、×と記入すること

図3-8 評価問題

第1問は、フォワードプライマーとリバースプライマーが、鋳型DNAの各1本鎖にどの向きで結合し、新生鎖が方向に伸長するかを正しく理解しているかを問う問である。第2問は、指定した2つのプライマーを用いたPCRの結果、遺伝子として示した塩基配列における増幅領域の大きさを答える問である。

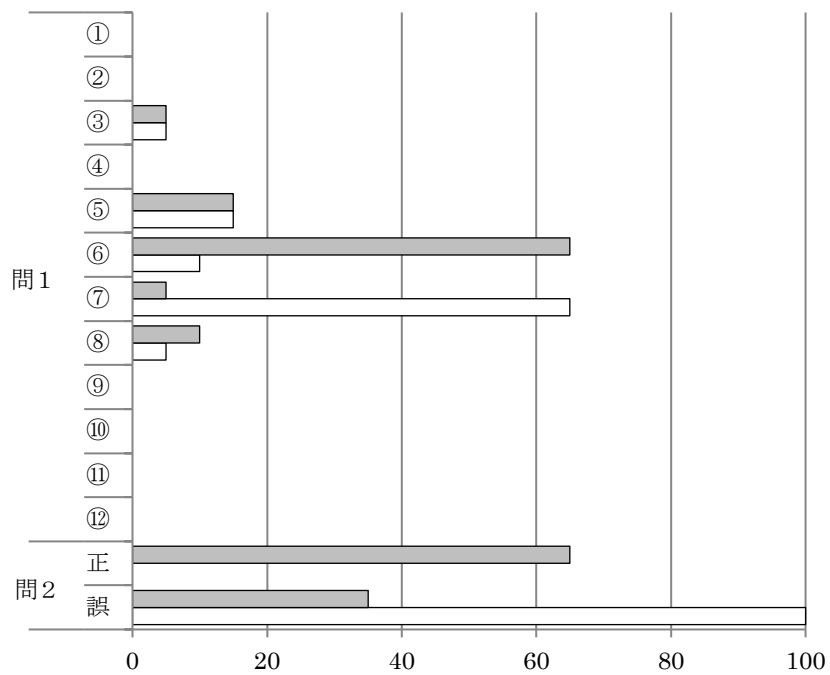


図3-9 評価問題の事前・事後での回答の変化

灰色：事前での生徒の選択した回答率（%）、白：事後での生徒の選択した回答率を示した。事前の正誤の数に対する事後での正答者数の変化についての McNemar 検定による p 値は、第1問の⑥では、 p 値=0.002 であり、第2問では p 値=0.00003 であった。

プライマーの向きや、DNA の方向が示されていないことが、誤った理解の原因一つになっていると考える。

倉林と武村 (2014) は、大学 1 年生を対象に DNA 複製の正しいモデル図を選択させる質問用紙を用いて DNA の伸長方向の理解を調査したところ、正しく理解している学生は約 40%に留まり、伸長方向に決まりがないと認識している学生は約 28%、答えられなかった学生は 14%であったと報告した。伸長方向に決まりがないと認識した原因の一つは、DNA の合成方向である「5'端→3'端」を学習しないことであると報告では分析し、教科書によっては誤解を生むような図が掲載されていることによると指摘している。著者らは誤解を生む図の特徴について述べていないが、DNA の向きや伸長方向を示さない簡便な図では、誤って理解した生徒を生む要因となりかねず、PCR の学習においても、増幅される領域を正しく理解することができなくなる原因となると考えられる。

一方、事後の調査では、正答を選択した者は 10%から 65%と大きく増加した。実験の前に不正解であった生徒のうち実験後に正解へ変化した生徒の数の増加は McNemar 検定によって、有意な増加であることが示された ($p=0.002$)。生徒たちは、教科書を使用して、DNA の構造、複製や PCR について既に学習していたが、評価問題の第 1 問に対して適切に答えた生徒は少なかった。ワークシートを利用した PCR の学習を通して、相補性に基づいて結合する 2 つの一本鎖 DNA の向きや DNA ポリメラーゼによる相補鎖の伸長の方向に決まりのあることをもとにプライマーの働きを理解したため、事後の評価問題では正答を選択することができるようになった者が有意に増加したと考えられる。

第 2 問は、第 1 問で検証した理解を実際に当てはめて、DNA の塩基配列から増幅される断片の大きさを求めるものである。事前の調査では、生徒たちは、第 1 問の正答率が低かったのでプライマーの結合箇所を判断することができず、正答した生徒はいなかった。ワークシートでの増幅される DNA 断片の大きさを予想する問題(図 3-6)は、5 班中 5 班全てで正しくできていた。班内で相談しながら、プライマーの結合場所と増幅される領域を判断できるようになった結果、学習を終えた後では、各プライマーが鋳型 DNA のセンス鎖、アンチセンス鎖のそれぞれの特定の領域に、正しい向きで結合することを理解するようになり、65%の生徒が生じる断片の大きさを正しく答えることができた。McNemar 検定により、事後で正答した者は、事前に比べ有意に増

加したことが示された ($p= 0.0003$) .

自由記述の感想では、「マイクロピペットでゲルの窪みに入れる時、どうしても手が震えてしまうので入れるのが大変でした。」や「マイクロピペットで上手く溶液を出すことができず何度も練習しました。」など器具の扱いに関することを半数以上の65%の生徒が述べていた。初めて使うマイクロピペットの扱いが難しいと感じた生徒が多くいた。バンドの確認ができなかった班の生徒からは、液量を正確に量り取れなかったため結果が出なかったのではないかという意見があり、生徒たちは器具の扱いに不慣れなことが原因だと考えていた。マイクロピペットの扱いに慣れさせることが実験の成否に関わる重要項目であった。従って、マイクロピペットの扱いの練習に時間を割いたことは、生徒たちの作業を円滑に進める上で必要不可欠であったと考えられる。一方、「PCR については、しばらく勉強していなかったもので、今回の実験で復習できた。」や「プライマーの結合など難しかったので、もう一度復習しないとイケなかった。」などこの実験を通して、生徒たちは知識の整理や定着を行ない、復習したいなど学習意欲が高められたことが示された。さらに、「研究員になった気分の実験ができた。」や「自分が進みたい学部でやるような実験で良い経験となった。」とこの実験の経験を活かしていきたいという意見も見られた。そして、「プライマーが2種類ないと増幅できないことが分かった。」や「プライマーを入れる時ミスをしたから、結果が良くなかったのかもしれない。」とプライマーに関することを約60%の生徒が言及した。

DNA の構造や構造に依存した複製のしくみとともに、DNA 分子に向きがあることを学習していても、PCR を学習する場面にこれらの知識を活かして、プライマーが鋳型 DNA のどの領域を増幅させるかを判断できない生徒が多いことが分かった。本実践でのワークシートは、DNA 鎖の方向を確認しながら、プライマーと鋳型 DNA の結合や DNA の伸長を学び、実験を通して増幅領域の予想とその確認を行なえるので、プライマーの働きが理解でき、DNA の相補鎖の向きや DNA 合成の伸長方向を改めて学習することができた。評価問題の回答も授業の経験により、正答者が有意に増加したことを示す結果となったので、本教材は PCR におけるプライマーの役割を十分に理解できる教材である。

V おわりに

学習指導要領の改訂で分子生物学的な内容を多く学ぶようになったが、分子生物学

分野の実験は、多くの高価な試薬や特殊な器具と時間を要し、授業時間内で行なえる活動は限られている。しかし、本教材では、実験内容を単純化し短時間に行なうことで、PCRにおけるプライマーの働きを理解させることのでき、また、分子生物学的実験のための基本的な技能の習得もさせることができる授業を展開することができた。身につけたマイクロピペットの操作などは、遺伝子組換えなどの他の分子生物学的実験を行う時やさまざまな生物現象のしくみを理解するために分子生物学的手法を用いる時にも活かされる技術であり、本教材で行なう基本技術の習得は意義のあるものであると言える。生徒たちの分子生物学的な実験への興味関心は高いので、本実験のように授業時間内でできる授業例が今後多く出てくることを期待する。

4章 植物の環境応答を遺伝子発現と関連づけるためダイレクト RT-PCR 法を用いた実験教材の開発と授業実践

I はじめに

植物は、環境の状況を検知し、状況に応じた形態や生理状態となる。高等学校理科「生物」では、この内容を「植物の環境応答」の単元で学習する（文部科学省 2009a）。「生物」の教科書（浅島ら 2013, 本川ら 2013, 嶋田ら 2013, 吉里ら 2013, 庄野ら 2014）では、外部から植物ホルモン等を与えることで形態や生理状態が変化することを確かめる実験は紹介されているが、植物ホルモンの消長を測ることによって植物の環境応答に植物ホルモンが介在していることを扱う実験は見られない。

高等学校学習指導要領解説理科編（文部科学省 2009b）には、「遺伝情報の発現」の単元で、「遺伝子の発現が調節されていること及びその仕組みの概要を理解すること」、「遺伝子の発現が調節されることによって、細胞の分化が起こることについても取り上げることが考えられる」と述べられている。一方、「植物の環境応答」の単元では、「植物が植物ホルモンや光受容体の働きで環境変化に反応する仕組みを理解させることがねらいである」と述べるにとどまり、遺伝子の発現が調節されていることへの言及はない。しかし、啓林館「生物」は、レタスの光発芽の説明に、赤色光を吸収して生じた P_{fr} 型のフィトクロムが、GA 合成酵素の遺伝子の発現を誘導すると記述している。「遺伝情報の発現」の単元で遺伝子発現のしくみと細胞の分化に関する内容を学習するが、生物学習の様々な場面で遺伝子の発現を扱うことは、生物の普遍的なしくみの理解に有益であると考えられる。

2章において、黄化芽生えの徒長を、GA 合成阻害剤の投与が抑制する現象を観察させ、GA 合成阻害剤による内生 GA の低下が徒長抑制をもたらしたことに気づき、環境に応答した形態の調節が植物ホルモンである GA を介して行なわれたことを学ぶ教材について述べた。この教材で学習した生徒たちは、暗所での徒長を内生 GA の有無と関連づけて考えられるようになったため、GA 含量を測定することができれば、暗所での徒長と GA との関連をより明瞭に考えることができるようになる考えた。

しかし、一般的な高等学校の理科室の設備では植物体内の微量な植物ホルモン量を測定できない。「生物基礎」の「遺伝情報タンパク質の合成」の単元で、「DNA の情報に基づいてタンパク質が合成されることを理解すること。」とされ、「生物」の「遺

伝子の発現調節」の単元では、同様の事項をさらに発展的に学習しているので、生徒たちは植物ホルモンの合成酵素の遺伝子発現を調べ、植物ホルモンの生成を予想することは可能である。つまり、合成酵素（タンパク質）の有無を、その遺伝子の mRNA の消長で捉えることができる。植物ホルモンの合成に関わる遺伝子の発現を調べ、mRNA の多少を測り遺伝子発現を知ることで、同時に、環境により遺伝子の発現量が増加することを介して植物の成長が変化することを学ぶことができると考えられる。

遺伝子発現は、mRNA を検出するノーザンブロット（例えば、仙波 2003）か、あるいは遺伝子産物である酵素（タンパク質）を検出するウェスタンブロット法（例えば、小林 2003）で検証するのが通例である。いずれの方法も特有の資材と熟練の技術が必要とする。また、リアルタイム PCR をノーザンブロットの代わりに使うことは可能だが、一般的な高等学校の設備で行う方法ではない。しかし、mRNA の半定量的な測定法である RT-PCR（例えば、鈴木ら 2005, Suzuki et al. 2004, 実験指導書では例えば、青柳 2013, 三橋 2010）ならば高等学校の設備で実施可能と考えられる。

RT-PCR は組織破砕物から抽出した mRNA に逆転写酵素を働かせて、単鎖 DNA を得ることから始まる。次に、この単鎖 DNA に特異的なプライマーを使った PCR を行い、増幅した DNA 量を比較・測定することで mRNA を半定量的に検出する。この方法は、mRNA の抽出と遺伝子の増幅という 2 つの操作から成る。特に mRNA の抽出では、RNase による分解や mRNA の自壊を阻止するために液体窒素での抽出や超低温槽内での保存が推奨されている（赤坂・嶋田 1992）。いずれも高等学校では容易に準備できるものではなく、何らかの工夫が必要となる。そこで本実験では、mRNA の抽出は行わず、組織破砕物に直接逆転写酵素を用いるダイレクト RT-PCR を用いることを試みた。この方法ならば、高等学校の理科室の設備でも実施が可能である。

本研究では、ダイレクト RT-PCR 法を用いて高等学校の理科室で遺伝子の発現を検証する生徒実験を開発し、環境応答による形態変化と遺伝子発現との関連を効果的に学習するための授業実践の計画を立案した。また、学習内容の定着を測るため、実践の前後で生徒に評価問題を課し、実践の効果を調査した。

II 生徒実験開発のための諸実験

1 材料とその栽培方法

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) の GA3-酸化酵素 (GA3oxidase : GA20 から活性

のある GA₁ を生成する酵素) の遺伝子 (以下, *SoGA3ox*: AF506280) の cDNA の塩基配列はすでに報告されている (Lee・Zeevaart 2002). そして, ホウレンソウの小さな芽生えを多数用意することは容易であることは 2 章にて示した. 直径 9.7 cm 高さ 5.5 cm の透明円筒容器に乾量 30 g のパーミキュライトを詰め, 80 mL の水を吸収させた上に均一に種子 (オーライ, タキイ種苗: 京都) 20 粒を播き, 乾量 10 g のパーミキュライトをさらに被せ, 容器付属のふたをした. この容器を, 照度約 5,000lux, 明暗周期 14:10, 温度 25±1°C の人工気象器 (日本医化器械製作所 LH-100-RD) 内に置いた. 遮光して栽培するときには, 容器をダンボール箱 (17.2×17.2×11.6cm) に納めた後, 恒温器内に置き, 栽培 7 日目の芽生えを用いた.

RT-PCR 法を行うために, 内部標準用として, 構成的に発現している β チューブリン遺伝子 (*SoTub*, : EF407952) と *SoGA3ox* を検出するための 2 種類のプライマーセットを用意した. PCR プライマー設計ツールである Primer3 を用いて, プライマーダイマーを形成しない長さ 20bp 程度で, いずれも同程度の T_m 値になるようなプライマーを設計した. *SoGA3ox* および *SoTub* を検出するプライマーセットの候補からゲノム DNA を増幅できるかを確認, 単一のバンドを検出するプライマーセットを選出した. *SoGA3ox* の検出には, フォワードプライマー 5' acaatgccatctaggccatctc 3' とリバースプライマー 5' ctcgggttatcaattgaacacg 3' を, *SoTub* 検出には, フォワードプライマー 5' gaactctgatcttcgcaagc 3' とリバースプライマー 5' gcacacatcatgttcttggga 3' を設計した. *SoGA3ox* のプライマーセットは, 転写開始部分を含む領域 143bp を増幅する. また, *SoTub* のプライマーセットは, 転写開始部より 42 番目から 209 番目の領域 168bp を増幅する.

2 全 RNA の抽出と cDNA 作成

液体窒素を満した乳鉢の中でホウレンソウ芽生えの芽や子葉を含む胚軸上部を破砕し, その約 1 g を 15 mL の遠心管に取った. そこに, 50 °C に温めた RNA 抽出用試薬 ISOGEN 10 mL (ニッポンジーン) を加え 30 秒間攪拌した. 50 °C の湯に 10 分間浸けたのち, 室温に 5 分間置いた. そして, プロトコルに従い, クロロホルムを 2.0 mL 加え攪拌し, 2 分間室温で置いた後, 4 °C, 10×10³ G で 15 分間遠心し, 水相を別の遠心管に集めた. 水相と等量のイソプロパノールを加え, 室温で 5 分間置いた後, 4 °C, 12 ×10³ G で 10 分間遠心し, 水相を捨て, 沈殿物を取った. 沈殿物を 70% エタ

ノール 1.0 mL に懸濁した後、再び 4°C $7.5 \times 10^3 \text{ G}$ で 5 分間遠心し、水相を捨て沈殿物を風乾した。これを 300 μL の RNase フリー水（タカラバイオ）に溶かし、溶液 10 μL に対して、DNase 液（タカラバイオ）を 1.0 μL 加え、 37°C で 10 分反応させ、残留する DNA を除去した。この溶液を RNA 抽出液として用いた。必要に応じて -80°C の冷凍庫に保管した。RNA の抽出には合計 80 分程度、その後の DNase 処理に 15 分程度の時間を要した。RNA 抽出液に逆転写反応キット（PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ））を用いて cDNA を作成した。キットを使用した cDNA の作成には 30 分程度を要した。

3 組織から直接 cDNA を作成

ホウレンソウ芽生えの芽や子葉を含む胚軸上部を液体窒素で満たした乳鉢の中で破碎し、この破砕片 0.1 g と RNase フリー水 200 μL を 1.5 mL マイクロチューブに取り良く攪拌した。また、生徒実験では液体窒素の代わりに瞬間冷却スプレー（協和インターナショナル）を用いて凍結した後、破碎した。瞬間冷却スプレーは可燃性ガスを含むので、火気の有無と換気に注意をはらって使用する必要がある。攪拌した液には全 RNA を抽出する方法と同様に DNase 処理を行なった。抽出液を得るまでに 30 分程度要した。反応後、前述の逆転写反応キットを用いて cDNA を作成した。

4 PCR

cDNA 溶液 0.5 μL に、*SoGA3ox* あるいは、*SoTub* のフォワードプライマー（10 μM ）とリバースプライマー（10 μM ）を各 0.5 μL ずつ加え、DNA ポリメラーゼ（KOD FX Neo, 東洋紡）0.2 μL 、PCR buffer 5.0 μL 、dNTPs 2.0 μL そして H_2O を 1.3 μL 加え終量 10 μL とした。これをサーマルサイクラーで、始めに 98°C で 10 秒、続いて 58°C で 30 秒、さらに 68°C で 30 秒を 1 サイクルとして、30 サイクル反応させた。PCR 産物は 4°C で保存した。

5 電気泳動

PCR 産物と DNA マーカー（100bp DNA Ladder, タカラバイオ）各 10 μL に対しミドリグリーン Direct（日本ジェネティクス株式会社）を 1.0 μL 加え混合した試料 10 μL を、2% アガロースゲル（アガロース ME, ナカライテスク）を使い 100 V で 25 分

間泳動した。泳動後、ゲルを UV トランスイルミネーター (UV 波長 302 nm) (フナコシ) 上に置き、バンドを観察するとともに撮影した。

6 電気泳動像の計測

電気泳動で確認できたバンドの強度を画像解析ソフト ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて解析した。各バンドの中心部について、同面積となるように測定領域を設定し、ImageJ の使い方・基礎編 (http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Lab_Manuals/entori/2017/6/26_ImageJ_files/20170513_ImageJの使い方.pdf)に従って、平均輝度を計測した (図 4-1)。SoTub のバンドの平均輝度を基準 (1.0) とした SoGA3ox のバンドの平均輝度を求め、遺伝子発現の程度を表す指標とした。

III ホウレンソウ黄化芽生えの光照射による徒長抑制と SoGA3ox 発現量の変化

ホウレンソウの葉から ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて抽出したゲノム DNA と SoGA3ox 検出用プライマーセットおよび SoTub 検出用のプライマーセットを個別に用いて PCR を行った。電気泳動像では、各プライマーセットを用いた PCR 産物に 1 本のバンドを確認することができた (図 4-2)。マーカー DNA の移動距離から推定した SoGA3ox と SoTub の断片の塩基数は、それぞれ約 150bp と約 170bp となり、cDNA の塩基配列から予想される 142bp と 168bp と非常に近かった。したがって、今回用いたプライマーセットは、ホウレンソウの SoGA3ox と SoTub の塩基配列の特定部分を増幅することができるプライマーであると考えられる。

組織より抽出した全 RNA に逆転写酵素を作用させて合成した cDNA と、破碎組織に直接逆転写酵素を作用させて合成した cDNA の吸光度は、それぞれ 260nm にピークを持ち、A260/A280 比はともに約 1.8 であった。いずれの方法でも来雑物の少ない DNA 溶液が得られた。

明所で生育した芽生えは播種後 7 日目から 10 日目では胚軸の伸長は見られない。一方、暗条件で生育した芽生えはこの間でも胚軸は伸長していた (図 2-3) ことから、明所では、播種後 7 日目より前には内生 GA 量の低下があると考えられた。そこで、播種後 4 日、5 日、7 日のホウレンソウの芽生えの胚軸から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により SoGA3ox の発現を調べた。4 日と 5 日の芽生えでは、SoGA3ox の発現が見ら

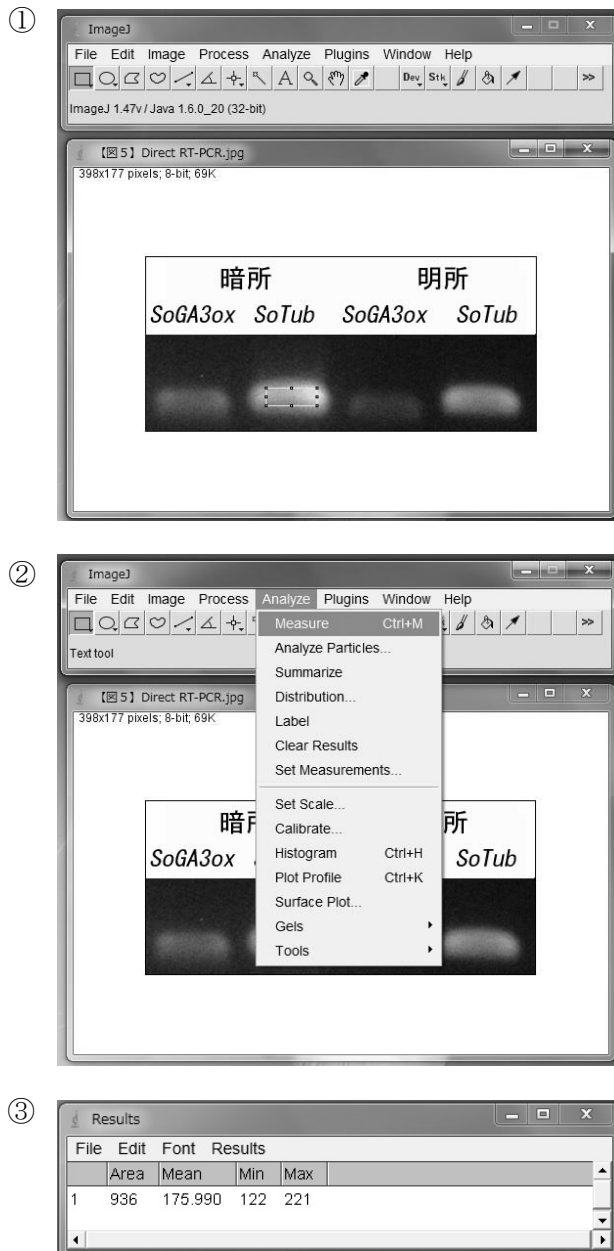


図 4-1 ImageJ を用いた平均輝度の測定方法

- ①: Files から open を選ぶと、画像のあるフォルダが開かれる。測定する画像ファイルをクリックして選ぶ。選んだ画像は別ウインドウに表示される。画像中のバンドの中央部にカーソルを移動させ、ドラッグして測定領域を指定する。測定領域の大きさは枠にカーソルを持ってくることで変更できる。
- ②: Analyze から Measure を選択すると③のウインドウが開く。
- ③: Area (測定範囲), Mean (測定領域の平均輝度), Min (測定領域の最低輝度), Max (測定領域の最高輝度) の値が表示される。測定時は Area の値を同じにして、各 Mean を測定値として用いた。

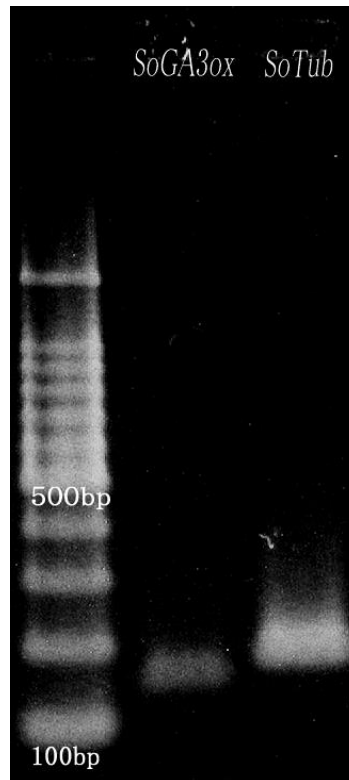


図4-2 *SoGA3ox* および *SoTub* 用プライマーによる PCR 産物の電気泳動像

ゲノム DNA を対象に PCR を行った。 *SoGA3ox* 用プライマーでは約 150bp, *SoTub* 用プライマーでは約 170bp の単一の増幅バンドが観察された。

れたが、7日の芽生えでは発現が検出されなくなった(図4-3)。一方、*SoTub* はどの試料でも同程度の発現が検出された。バーミキュライトで覆土された種子の発芽時に、GA生合成に関わる遺伝子の発現量が増加し、胚軸などの促進を促しているように見える。しかし、覆土上に子葉を展開する頃には遺伝子発現量は大きく減じ、胚軸の伸長も停止した。一方、暗所の芽生えでは播種後7日以降も徒長し続け(図2-3)、徒長を支えるように暗所の7日目の芽生えでは*SoGA3ox*の発現が見られた(図4-4)。*SoGA3ox*のバンドは、図4-2と同様に200bp付近に単一のバンドとして現れた。*SoTub*のバンドの平均輝度を基準とした*SoGA3ox*のバンドの平均輝度を求めると、暗所の芽生えの*SoGA3ox*のバンドの平均輝度は0.65となり、明所の約2.5倍も明るく、明所では*SoGA3ox*の発現が暗所に比べかなり低くなっていることが示唆された。つまり、暗所に置かれ徒長が続いている間、*SoGA3ox*の発現は低下しないと考えられる。エンドウの黄化芽生えに光照射を行なうと*GA3ox*の発現量が低下することが報告されている(Ati-Aliら1999)。そこで、播種後5日目の黄化芽生えに6時間白色光を照射したものと、暗所に置いたままのもので*SoGA3ox*の発現を調べた(図4-5)。*SoGA3ox*のバンドの平均輝度を*SoTub*のバンドの平均輝度を基準として求めると、暗所でのバンドは0.44で、明所では0.31であった。明所に移された結果、*SoGA3ox*の発現が明らかに低下した。つまり、*SoGA3ox*が発現している5日目に芽生えを光が当たる環境に置くと、*SoGA3ox*の発現が減少した。芽生えは光環境の変化に応答し、暗所での芽生えの徒長を支えていたGAの生合成を止めた。明所に移して十分な時間を経過した芽生え、あるいは簡便に、明所で発芽した芽生えの*SoGA3ox*の発現を、暗所で徒長した芽生えの*SoGA3ox*の発現と比較すれば、芽生え(植物)は環境に応答して遺伝子発現を変化させることを学ぶことが出来る。すなわち、この実験を使って、環境の変化が植物の形態変化をもたらすことを遺伝子の発現を通して学習する授業を計画することが出来る。

しかし、一般的な高等学校では、mRNAを安定的に取り扱う設備がないため、mRNAの抽出を行わないダイレクトRT-PCRを検討した。播種後7日目の芽生えの*SoGA3ox*の発現量をダイレクトRT-PCRで測定すると、*SoGA3ox*の発現量が暗所の芽生えに比べ、明所の芽生えでは少ないことがバンドの観察から読み取れた(図4-6)。バンドの明るさの差が少なかったため、ImagJを用いて上述のように*SoGA3ox*の平均輝度を求めたところ、暗所のバンドは0.54、明所は0.41となっており、観察結果を支持す

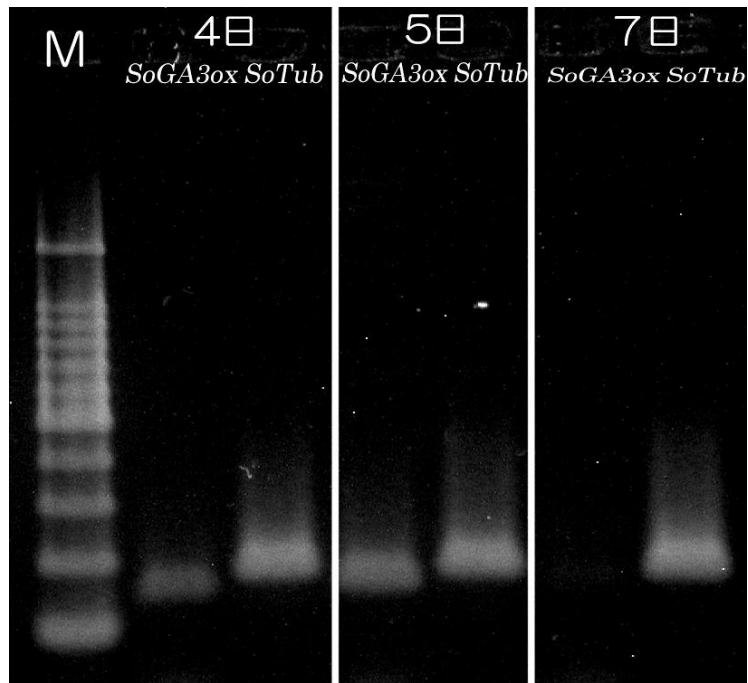


図4-3 播種後の *SoGA3ox* の発現量の変化
SoGA3ox の発現は播種後4日目、5日目では検出されるが、7日目に検出されなくなった。同時に胚軸の伸長は停止した。

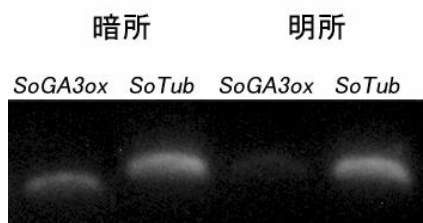


図 4-4 明所暗所における *SoGA3ox* の発現の比較

播種後 7 日間明所あるいは、暗所で栽培した芽生えから全 RNA を抽出して、RT-PCR を行なった。暗所の芽生えは、*SoGA3ox* の発現が確認できるが明所の芽生えでは発現が見られなかった。

光照射なし 光照射あり
SoGA3ox SoTub SoGA3ox SoTub

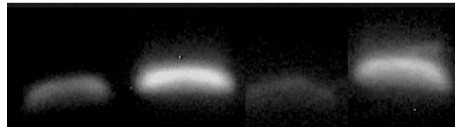


図4-5 光照射は黄化芽生えの *SoGA3ox* の発現を抑制する

暗所で生育させた播種後 5 日目に、白色光を 6 時間照射した芽生え（光照射あり）と照射しなかった芽生え（光照射なし）の *SoGA3ox* の発現を比較した。

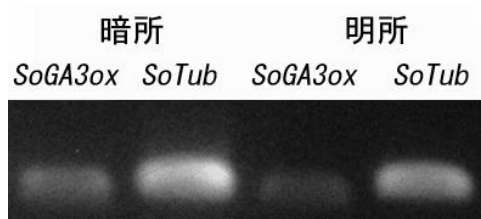


図4-6 ダイレクト RT-PCR による *SoGA3ox* の発現量の検出

ダイレクト RT-PCR の結果でも、通常の RT-PCR と同様に明所の芽生えに比べ暗所では *SoGA3ox* の強い発現が観察された。

る値となった。

ダイレクト RT-PCR 用いても通常の RT-PCR と同等の結果が得られ、RNA を抽出する作業時間を節約でき、RNA の保管装置や RNase フリー水の準備なども不要となる。高等学校の実践では、最適な方法がダイレクト RT-PCR だと判断される。

IV 環境変化がもたらす遺伝子発現の変化を検証する授業計画

分子生物学的な手法を用いた実験は、技術的な理解に終始し、生きもののしくみあるいは生命現象の分子レベルのしくみの理解が蔑ろにされる場合がある。そこで授業を次の①～⑤で構成し、しくみの理解の徹底を計った。①植物の生理現象の復習、②RNA からの逆転写反応の理解と cDNA の合成、③PCR による *SoGA3ox* と *SoTub* 領域の増幅、④電気泳動による PCR 産物の検出、⑤遺伝子発現と生理現象の関連の考察である。②～④の項目は分子生物学的手法による作業が主であり、①と⑤は理解を深める学習活動である。

①は、本授業の背景を理解するために重要な項目である。芽生えが光に応答して胚軸の伸長を停止したのは、内生GA量の減少により生じることを理解しなければ、胚軸伸長と遺伝子発現を関連づけることができない。2章にて、暗所で徒長する芽生えにGA合成阻害剤を投与すると、徒長は明所の芽生えと同程度まで抑制される実験による実践を報告した。この実験結果をまとめたワークシート(図4-7)を用いて、明暗各所で生育した芽生えの胚軸の長さの違いを生じるしくみをめぐって班ごとやクラス内での意見交換を10分程度行なった。この活動を通して、生徒たちと土中(暗所)から地上(明所)に出る芽生えの環境応答におけるGAの役割を理解した。これを踏まえて、これから実施する実験はGA合成酵素遺伝子のmRNAの消長を調べることにより、植物が環境に応答してGA合成酵素の遺伝子発現が変化したことを知る実験であることをワークシートに示した図(図4-8)を用いて説明した。

②～④での作業内容は、実験の流れ(図4-9)を用いて生徒たちに示す。②は、実験の流れの[実験2]に相当する。転写されたRNAが細胞中に存在するが、RNAは分解され易いので、安定なDNAに急いで変換する必要があることを生徒たちに理解させる。DNAは全てRNAからの逆転写によって生じたものでなくてはならないので、逆転写反応前にDNaseで細胞中に存在しているDNAを分解しておくことも生徒たちに理解させる。③は、図中の[実験3]に相当する。GA合成酵素の遺伝子 *SoGA3ox* とともに構造遺伝子 *SoTub* の発現量を標準にすることで、

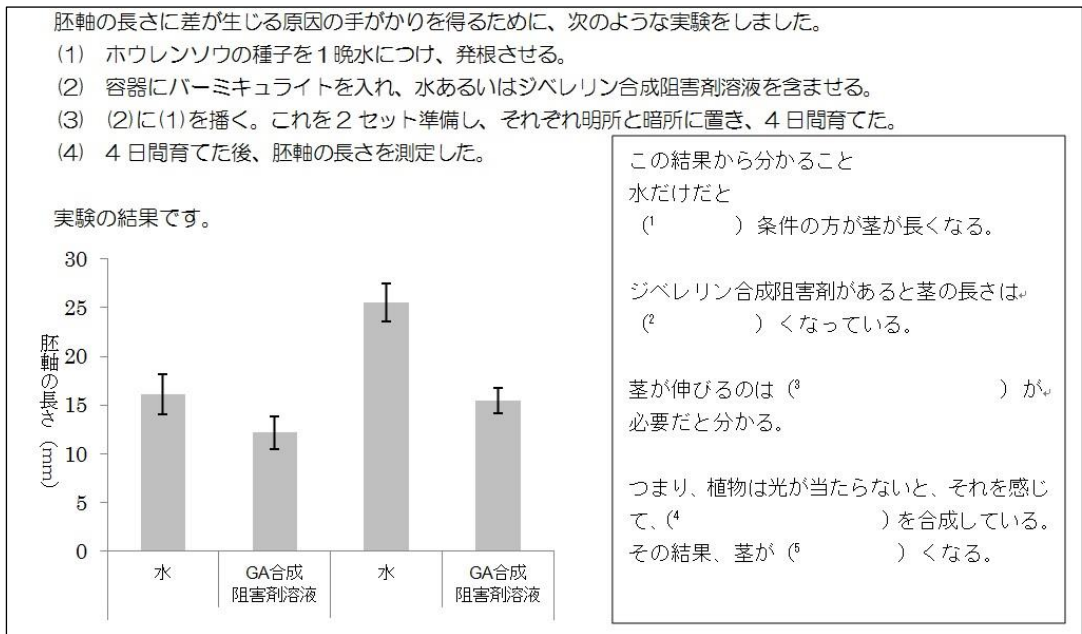


図4-7 ワークシートに示した「GA 合成阻害剤投与の有無と光条件の異なる環境で生育させた芽生えの胚軸伸長を確かめた実験について示した図」

明所と暗所にて、GA 合成阻害剤を投与したものとそうでないものを生育させ、その胚軸の伸長の違いから、光に対して胚軸伸長にどのような違いがあるか、また GA の有無はどう関わっているかを生徒たちに考えさせるために、ワークシートに示した図である。この図を使用して、生徒たちは、芽生えの光に対する環境応答を理解した。

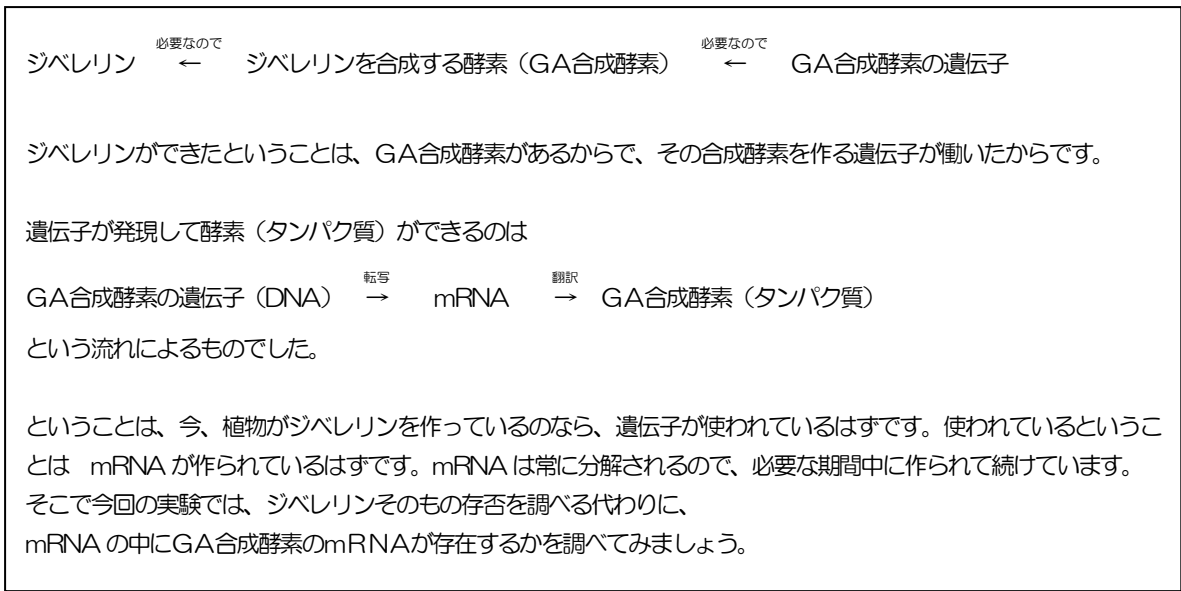


図4-8 ワークシートに示した「mRNAの存在を確認することは、GAの存在を確かめること」であるとする思考過程を示した図

GAの有無を確かめるためことは、GAの合成過程から考えて、その最初に遺伝子の発現が起る事を生徒たちに気づかせるために、ワークシートに示した図である。この図を使用して、生徒たちに遺伝子発現を確認する実験を行うことと植物体内にGAがあることとの関連を理解させる。

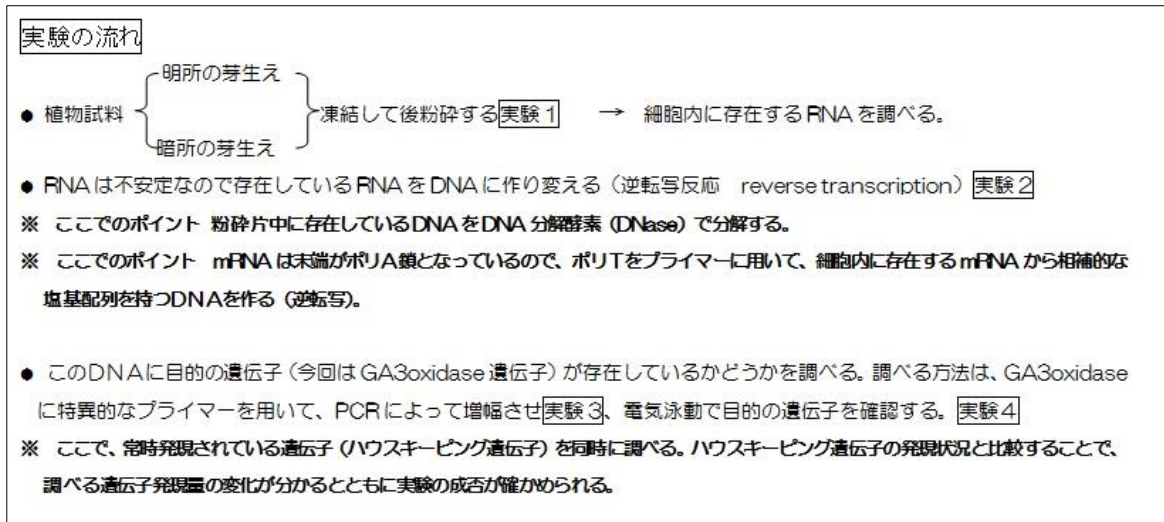


図4-9 ワークシートに示した実験の流れ

3日間で行う計3時間の授業で行なう4つの実験の順番と、それぞれの実験における生徒らに理解させたい実験のポイントを示している。全体の授業のはじめに、この図を使用して、生徒たちに全実験の概要を理解させる。

*SoGA3ox*の発現量の変化を明確にする考え方を生徒たちに理解させる。④は、図中の「実験4」に相当し、PCR産物を電気泳動によって分離、検出する実験である。負に帯電しているDNAは、+極側に移動することを生徒たちに理解させる。

⑤は、生徒が①で学習した内容と、④で得られた結果を関連付けさせる活動である。実験結果を整理するために、穴埋め問題によるまとめ(図4-10)を用意した。穴埋め問題は、上段から、下段へと段階を経て考えていくように構成した。まず、「実験4」の電気泳動像を観察すると、芽生えが生育した場所の明暗に関わらず *SoTub*の発現量は大きくバンドは濃い。一方、*SoGA3ox*のバンドは明所で淡く発現量が減少していることが読み取れる。画像をImagJで処理する方法だと数値化でき比較も容易だが、時間を要する欠点もある。数値を比較することが目的ではなく、定性的に違いを確認することが目的であるので、生徒実験ではImagJによる解析は行なっていない。しかし、前述のように明所での発現量が減少していると分かるので、①で学習した内容と関連づけることができる。最後に、この結果を一般化し、環境応答による植物の形態変化のしくみをまとめる。

授業のまとめに、生徒たちは、この問題(図4-10)を班員と相談しながら行なう。その他分かったり気付いたりしたことは、レポートに記述して提出するように指示した。

全工程を通常の授業時内で①～⑤を実施するために、1回50分間の授業3回で行なう計画を立てた(表4-1)。1回目は、①を10分程度行ない、②を30分程度で行なう。逆転写酵素を使用することは、実験の流れ(図4-9)で示し、生徒たちに読ませながら、教師の説明を通して、生徒たちに理解させる。2回目の授業は③を35分で行なう。実験では *SoGA3ox*と *SoTub* の一部分をプライマーによって増幅させていことを生徒たちに理解させて行なう。3回目の授業では、④⑤を行なう。④は作業に10分間要し、泳動には約20分を要する。泳動が完了するまでは待ち時間となる。この待ち時間の中に、生徒たちに泳動像の読み取り方を説明しておけば、泳動終了後直ぐに、穴埋め問題(図4-10)の解答を班員と相談しながら完成させることができ、⑤を約10分の活動時間で完了させることができる。

V 授業実践と学習効果の評価

平成27年1月20日より京都府立Y高等学校普通科3年生(男子5名 女子10名 計15名)を対象に、「生物」の授業で実施した(図4-11)。授業は、IVでの計画に基づき3日間で各日1時間ずつの計3時間で展開した(表4-1)。生徒は第一学習社の

実験の結果から分かること

- ◇ 泳動像のバンドを比較すると(1)の芽生えでは、(2)遺伝子のバンドが見つかる。
- ◇ チューブリンの遺伝子は、明所、暗所の芽生えで同じようなバンドが見えているので、遺伝子の発現は明所・暗所の植物において通常に行なわ(3)と考えられる。
- ◇ ハウスキーピング遺伝子が通常に発現している状態で、(1)の芽生えで、(2)遺伝子のバンドが強く現れたということは、(1)の芽生えで、より多くの(2)遺伝子が発現していたことを示している。
- ◇ したがって、(1)の芽生えは、(2)遺伝子を多く発現しているので、その体にたくさん(4)を持っていると考えられる。(1)の芽生えの茎が(5)いのは、この(4)の影響であると考えられる。
- ◇ 生き物は、環境に応じて必要な(6)を発現させ、これによって必要な(7)を生産している。植物の場合は、この(7)が植物ホルモンの場合、その影響で形態が変化する。

図4-10 ワークシートに示した実験結果のまとめ

実験結果と得られる電気泳動像から、順を追って考えていく道順を示している。生徒たちは、班活動として空所補充問題を解くことで、電気泳動像から考えられる遺伝子発現と暗所での芽生えの徒長とを関連づけて、環境の変化からの遺伝子発現変化と植物ホルモンの生成、これによる形態変化が起こることを学ぶ。問題の解答例：1. 暗所 2. GA3oxidase 3. れている 4. ジベレリン 5. 高い 6. 遺伝子 7. 物質

表4-1 授業計画

		作業・活動	学習内容
1時間目	3分	実験目的と全体（3時間）の流れの説明	
	10分	材料の説明	光環境の違いにおける胚軸伸長とGAの関係を学ぶ①
	5分		明所、暗所の芽生えを凍結破碎し、チューブに入れる。 破碎液をDNase処理。②
	20分	逆転写反応のプロセスを説明	チューブを37°Cで10分、75°Cで10分処理する。②
	10分		チューブに逆転写反応に必要な試薬を入れ、提出②
	2分	次回の指示・後かたづけ	チューブはサーマルサイクラーに入れる。②
2時間目	3分	前回の復習	作成したcDNAを受け取る
	35分	PCRの説明と遺伝子の検出方法	<i>SoGA3ox</i> と <i>SoTub</i> 用プライマーを用いたPCRの試薬を調整する。③
	9分	芽生えの伸長を引き起こすジベレリンとその合成酵素遺伝子の発現との関連を考えさせる	実験結果を予想する。
	3分	次回の指示・後かたづけ	
3時間目	5分	前回の復習 増幅したDNAを確認	
	10分	電気泳動を行なうための手順を説明	電気泳動のためゲルに試料をアプライする。
	25分	電気泳動および結果の確認方法を説明	泳動を開始する。④
	10分	泳動像の写真撮影。 確認後の後かたづけ	紫外線を当て、泳動像を観察する。 検出したバンドから、遺伝子発現の変化と胚軸伸長の環境による調整とを関連付ける。⑤

反応の待ち時間を省くため、3回の行程に分け各回1時間の内容とした。

①～⑤は、本文中に示した学習及び作業の分類

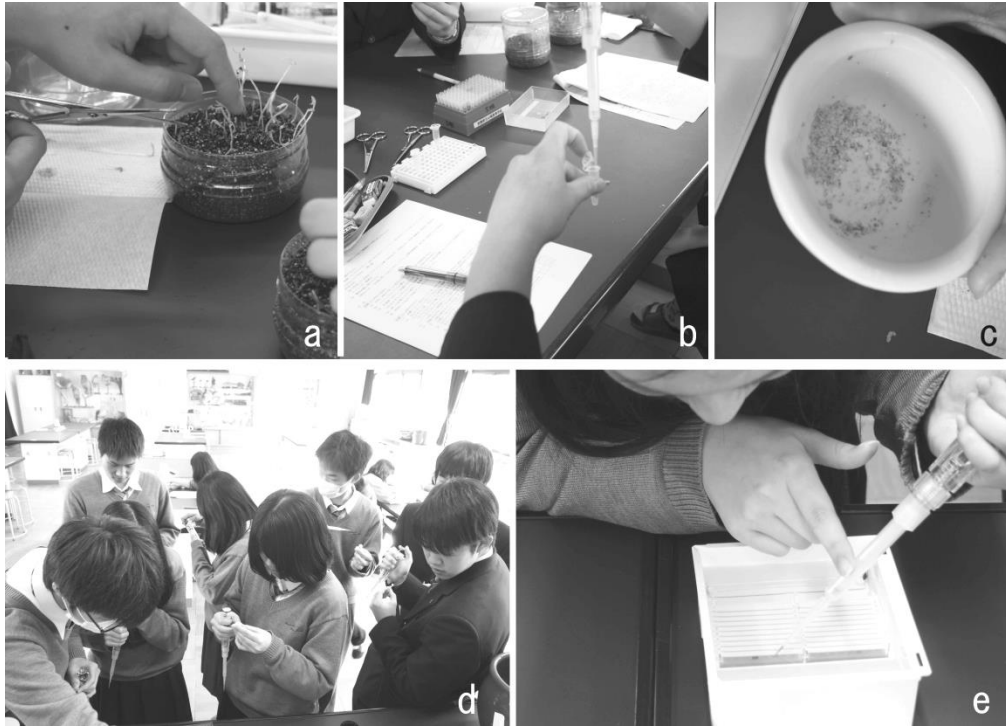


図4-11 生徒実験の様子

実践授業における生徒の活動。材料の芽生えを切り取っている(a)。逆転写反応のためマイクロチューブに試薬を入れている(b)。逆転写反応のため芽生えを粉碎している(c)。PCR のためにマイクロチューブに試薬を入れている(d)。電気泳動のためアガロースゲルの窪みにPCR 産物を入れている(e)。

「生物」教科書を使用し、遺伝子発現や植物の環境応答の単元の学習は終えていた。

ワークシート（図4-7）にて、芽生えの形態とGAとの関連及び光によるGA合成の調節について学習した後、試料の破碎を行なった。破碎での芽生えの凍結には、液体窒素を用いれば容易に凍結できるが、液体窒素を取り扱う機器が十分になかったため、ビニール袋に入れた芽生えの子葉と胚軸に冷却スプレーを噴霧し、凍結させた。冷気の噴出の勢いで、芽生えが飛びまわり、一様に冷却できず手間取ったので、ドライアイスの使用など凍結方法には検討の余地がある。しかし、生徒たちは手際よく凍結し芽生えを破碎した。

生徒たちはマイクロピペットの操作を経験していたため、第1日目の逆転写酵素によるcDNAの作成と、第2日のPCR及び第3日の電気泳動に係る一連の作業を円滑に進めた。一方、生徒たちの実験による結果では、期待通りのバンドを検出することができた班が4班中2班であった。著者らが行なった3回の同じ実験では、3回とも図4-6で示したような結果を得ることができたが、生徒たちが実験を実施するうえで、実施方法をさらに簡便にする必要があったと感じた。

津嘉山ら(2015)は、本実践で実施したRT-PCRに比べ簡素なPCR実験を高大連携講座として大学で実施した際に、高校生の技術不足を補うため3～4人の班に1人のメンターを配置して手技の直接的な指導を行ったことを踏まえて、実験の円滑な進行と成功には技術的なサポートが不可欠であったと結論づけていた。本実践の対象生徒は、マイクロピペットの操作の扱いは理解していたが、マイクロピペットを用いた作業が難しいと感じていた者も少なからずいた。本実践の方法では、試薬を少量量り取る作業が多数あったため、試薬をあらかじめ混合（例えば、フォワードとリバースのプライマー溶液など）して、量り取る量を多くするとともに、手順を少なくすることによって、量り取る量や種類の間違いを少なくするなどの工夫が必要であった。

一方、すべての班の結果を共有して考察を行なったので、本教材を通して、環境変化に応じて遺伝子発現が変化することと、遺伝子発現の変化がGAの生合成の変化を介して形態変化を引き起こすことを生徒が理解したかを確かめるために、事前と事後に評価問題を行ない（表4-2）、事後にアンケートを記入させた。

問①は、各細胞内にある遺伝子についての問いである。細胞は異なる形態や生理作用を持つように分化するが、細胞ごとに異なる遺伝子を持つものではなく、異なる遺伝子が発現したからであることを認識できているかを問うた。正答の「遺伝子の種類

表 4-2 評価問題

設問	回答(選択肢)
① 同一個体の体細胞の核内にある遺伝子に関して、正しい内容の文を1つ選びなさい。	(a) 遺伝子の種類は、どの細胞でも同じであり、その細胞に必要な遺伝子のみが発現している。 (b) 遺伝子の種類は、どの細胞でも同じであり、その細胞はこれら全ての遺伝子が発現している。 (c) 遺伝子の種類は、始めはどの細胞も同じであるが、分裂により変化し、その時ある遺伝子が発現する。 (d) 遺伝子の種類は、細胞によって異なり、それぞれの細胞にある遺伝子が順番に発現している。 (e) 遺伝子の種類は、細胞によって異なり、それぞれの細胞が必要な順番で遺伝子が発現している。
② 遺伝子発現を調べる実験(a)～(d)のうち正しいと思えるものと、その理由として適切なものを(ア)～(オ)から選びなさい。	(a) どの遺伝子が発現しているかを調べるには、細胞にある染色体を観察すればよい。 (b) どの遺伝子が発現しているかを調べるには、細胞にあるタンパク質の種類を調べればよい。 (c) どの遺伝子が発現しているかを調べるには、細胞にあるDNAの種類を調べればよい。 (d) どの遺伝子が発現しているかを調べるには、細胞にあるRNAの種類を調べればよい。 【理由】 (ア) いつどんな細胞を観察しても、染色体ははっきり観察でき、発現している部分はバフとなるから。 (イ) 染色体を高倍率の顕微鏡で観察すると、遺伝子の分子構造が確認できるから。 (ウ) タンパク質は、遺伝子の発現によって作られるものであるから。 (エ) 発現しているタンパク質は、特別な試薬で調べることができるから。 (オ) RNAは、遺伝子の発現によって作られるものであるから。 (カ) 発現しているRNAは、特別な試薬で調べられるから。 (キ) DNAは、遺伝子の発現によって作られるものであるから。 (ク) 発現しているDNAは特別な試薬で調べられるから。
③ 「暗所で育った芽生えは、明所で育つたものより伸びている。」という現象の説明として正しい文を1つ選びなさい。	(a) 植物は、環境の変化を受容し、植物ホルモンの合成に関わる遺伝子発現を調節した。その結果、植物ホルモン量が増加し、形態が変化した。 (b) 植物は、環境の変化を受容し、遺伝子の塩基配列を調節して、植物ホルモンの合成遺伝子を作る。その結果、植物ホルモン量が増加し、形態が変化した。 (c) 環境の変化により、植物が持っている植物ホルモンの割合が増加する。その結果で形態が変化した。 (d) 環境の変化により、植物ホルモンの分布に変化が起こった。その結果、分布の違いによる作用で植物の形態が変化した。

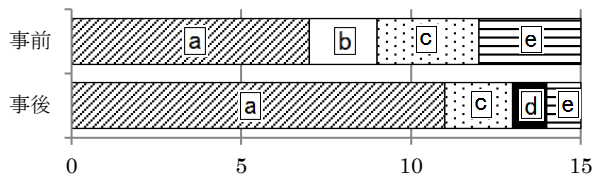
評価問題は、1回目の授業において内容の説明前(事前)と最終の授業を終えた後(事後)の2回行なった。

①の正答は(a)、②の正答は(d)-(イ)、③の正答は(a)である。

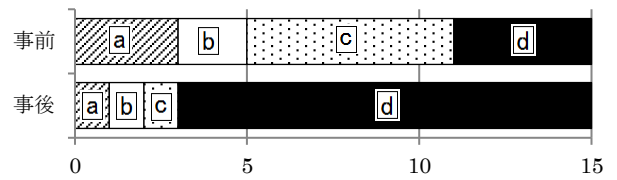
は、どの細胞でも同じであり、その細胞に必要な遺伝子のみが発現している。」を選択した数は、事前調査でも一番多く7名（約44%）であったが、半数以上は誤った文を選択していた（図4-12①）。本実験で遺伝子発現を調べた後では、正答を選択した割合は、11名（68%）と上昇した。正答を選択した人数の変化を McNemar 検定すると、事後で正答を選択した者は事前に比べ有意に多くなっていることが示された（ $p=0.05$ ）。生徒が使用している第一学習社「生物」の教科書には、「細胞が分化するのは、調節遺伝子の働きによって関連する複数の遺伝子の発現が調節されるためである。」と記載してあり、問の内容は既習事項であった。しかし、この内容の理解が定着しておらず、事前の調査結果のように半数以上が誤答を選択した。しかし、本実験を行なったことで、遺伝子の発現についての復習が行なえ、細胞の違いを遺伝子の違いと捉えるのではなく、遺伝子の発現の違いであることを認識させることができたと考えられる。

問②は、遺伝子発現に関する問いである。遺伝子が発現すると DNA の遺伝子情報が mRNA に転写され、次いで翻訳されタンパク質となる。つまり、それまでに存在していない RNA やタンパク質が出現したり、逆に存在していた RNA やタンパク質が消失したりするのは、遺伝子の発現が調節された結果であると考えられる。生徒たちは、事前では「DNA を調べれば発現が分かる」が一番多く選択した（6名（40%）、図4-12②a）。一方、「RNA を調べる」を選択した者は4名（27%）であった。遺伝子発現は既習事項であるが、知識の定着が低かった。事後では、「RNA を調べる」を選択した者は12名（80%）に上昇し、McNemar 検定すると有意に変化したと示された（ $p=0.005$ ）。また、RNA を選んだ12名のうち11名が、その理由を、「RNA は、遺伝子の発現によって作られるものであるから」を選択した（図4-12②b）ため、内容を理解した回答であるとうかがえる。

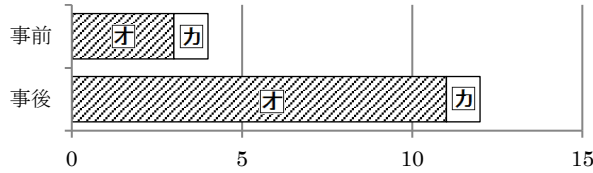
問③は、実験材料である芽生えが徒長した理由を問うものである。徒長の原因が GA によることは、実験の導入時に説明してある。しかし、この GA がどのように生産されるかなどは、実験の結果と形態を関連付けて理解しなくては正しい答えを導けない。事前では、正答の（a）を選んだ者が一番多く6名（40%）であったが、2番目に多かった（d）を選んだものが4名（27%）おり、さほど差のない結果である（図4-12③）。（d）は植物ホルモンの分布の変化を光によるオーキシンの再分布による光屈性と連想して答えたようである。しかし、事後の調査では14名（93%）の者が正答（a）を



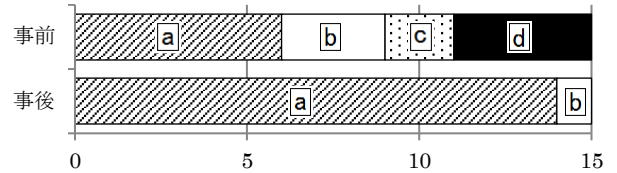
4-12① 各細胞内の遺伝子についての問い (表4-12-①) に対する回答の変化



4-12②a 遺伝子発現に関する問い (表4-12-②) に対する回答の変化



4-12②b 評価問題②で正答 d を選んだ者の選択理由の変化



4-12③ 芽生えが徒長した理由についての問い (表4-12-③) に対する回答の変化

図4-12 事前事後での生徒の回答の変化.

グラフの横軸は、その回答を選択した生徒の人数である (N=15). McNemar 検定を行ない事前テストでの正答数と誤答数に対し、事後テストでの正答数と誤答数を比較し、正答数の変化として p 値を求めた. 評価問題①で a を選択した数の p 値は 0.05, 評価問題②で d を選択した数とその理由に才を選択した数、および、評価問題③で a (正答) を選択した数の p 値は 0.005 であった.

選び、有意に変化したことが示された (McNemar 検定, $p=0.005$) .

授業後のアンケートでは、約 90%の生徒が興味を持って取り組み、約 60%の生徒が作業は難しくなかったと感じていた。内容に関しては約 60%の生徒が難しいと感じていたが、逆転写や遺伝子発現に関しては 80%以上の生徒が理解できたと感じていた (図 4-13) . これからも分子生物学実験を行いたいかには、約 60%の生徒が肯定的に回答した (図 4-13) . 実施時期が 3 年生の学年末だったことから、自分の進路との関わりで興味を示せなかった生徒もいた。一方、特に大学で分子生物学方面に進学したいと考えている生徒たちは、今回の実験の経験を今後に生かしたいと考え、感想に「高校でこのような遺伝子を扱う実験ができて、大学での勉強のための良い経験ができた」や「遺伝子発現を調べることができて、大学でも様々な遺伝子を調べてみたい」さらに「このような遺伝子実験の技術が、医療など私たちの生活の中で活かされていると思うと、それを忘れずに大学で頑張りたい。」と述べていた。自らの今後の活躍を想像し感想を述べたものも多かった。この教材が高校生にとって大学での専門的な学習を想像させる内容だったことも、このような感想を述べさせた要因の一つだと考えられる。

本実践では、通常の授業時間内に収めることを目的に、1 時間ずつ 3 日間に分けた計 3 時間の活動で構成した。この構成通りの計画で、授業を進めることができた。各評価問題の正答数の有意な増加から、授業の目標「環境応答による形態変化と遺伝子発現との関連を効果的に学習し、その内容を理解すること」が達成されと考えられる。

VI まとめ

暗所で生育した芽生えは、フックの形成、胚軸の徒長、子葉の黄化が見られ、光が当たることで脱黄化と胚軸の伸長抑制が起きる。Ati-Ali ら (1999) は、暗所で発芽したエンドウに光照射をすると、4 時間以内に内生 GA 量が約 80%低下すると報告している。また、O' Neill ら (2000) は、光による胚軸の伸長抑制は、 GA_1 への反応性の低下とともに、*PsGA3oxidase1* の発現量の抑制と、*PsGA2oxidase2* の発現量の増加による内生 GA 量の低下を介して起きていることを示した。*PsGA3oxidase1* は GA_{20} から活性のある GA_1 に変換する酵素 (*PsGA3oxidase*) を、*PsGA2oxidase2* は活性のある GA_1 から活性のない GA_8 に変換する酵素 (*PsGA2oxidase*) をコードしている。さらに、Symons・Reid (2003) は、黄化芽生えに光を照射しても、IAA(インドール-3-酢酸)

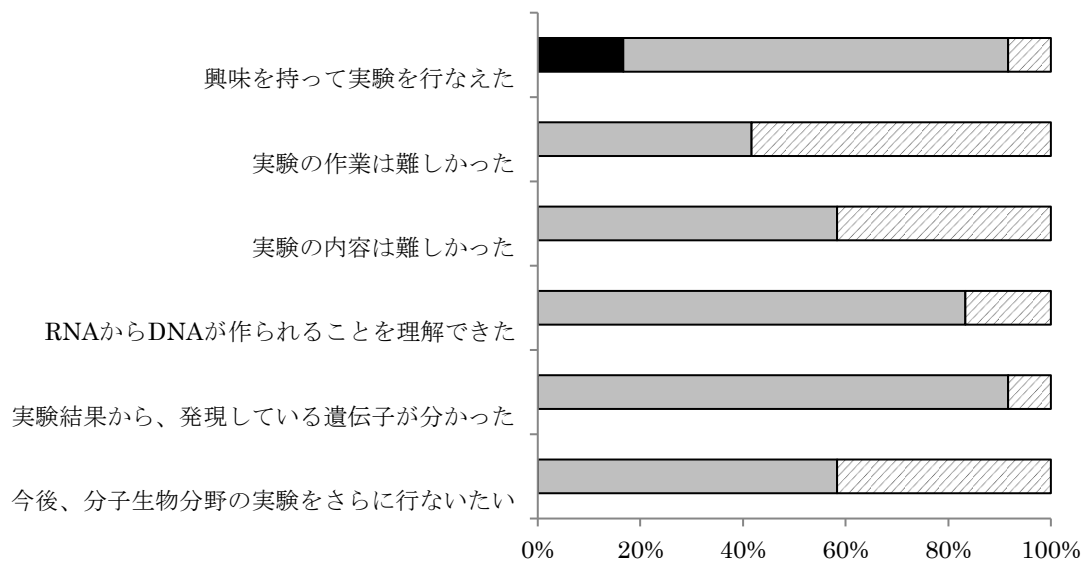


図 4-13 授業アンケートの結果

回答は、良く当てはまる（黒色）、当てはまる（灰色）、当てはまらない（斜線）、全く当てはまらない（白色）からの選択とした。（N=15）

やブラシノステロイドの含量は短時間には低下しなかったが、GA₁ 含量は急速に低下すると報告している。(芽生えに当たった) 光が遺伝子発現の変化を引き起こし、活性型 GA の生成活性が低下し分解活性(不活性化)が昂進する。すなわち、GA の生成と分解に関与する遺伝子の発現の変化が胚軸の伸長を停止させると考えることができる。

このような、植物形態に関与する植物ホルモンの有無を遺伝子の発現で確かめることが、本実験での目的であった。生徒たちは、導入時に例示された黄化芽生えの徒長と GA との関連を示す実験結果を通して、暗所での芽生えは内生 GA 量を増加させ、徒長するが、明所では内生 GA 量が低下し、徒長が抑制されることを理解した。さらに、本実践授業で行なわれた実験を通して、環境に応答して必要な遺伝子の発現が行なわれていることを確かめた。そして、この2点を統合し、環境に応答した遺伝子発現により合成された植物ホルモンの作用により形態変化が生じたことを理解した。

遺伝子発現に関する教材は、ユスリカなどの唾腺染色体にあるパフの観察などがある。また、ラクトースオペロンに関する遺伝子発現調節の実験が啓林館と数研出版「生物」の教科書に紹介されている。薄井(2014)は、この実験を簡略化して高等学校の授業時間で行える実験として報告している。この実験は、原核生物が外生の化学物質によって、関連する代謝を変化させることを学ぶ教材である。一方、本研究では、真核多細胞生物が、物理的な外的要因の変化によって発現する遺伝子を調節し、自らの成長パターンを変える現象をダイレクト RT-PCR を利用して検証する教材を開発した。この教材では、暗所で生育した芽生えは徒長するが、明所ではその徒長は抑制されるという環境の変化と徒長という可視的な個体レベルの変化を捉えている。さらに、この変化は GA という分子の作用で起こる分子レベルの変化と、この GA が遺伝子の発現により生産されるという遺伝子レベルの変化を捉えている。つまり、本研究により開発した教材は、分子生物学的手法を用いているとは言え、PCR を利用した遺伝子型を判定する実験教材(例えば、山内 2013, 伊佐治・松本 2006)のように遺伝子型の解析だけのものではなく、可視的に認識できる植物の環境応答を、ダイレクト RT-PCR 技術を援用して、暗から明への環境変化が引き起こす形態変化を、直接認識することのできない植物ホルモンに関わる遺伝子発現の変化を捉えることで、生徒が理解する希な教材である。さらに、実験内容と方法を検討し、合計3時間の実験で生徒たちに検証させる学習プログラムとして成立することを確かめた。

終 章

本研究で、4つの実験教材を開発し、4つの授業実践を行なった。植物の環境応答による形態変化を消長する内生植物ホルモンと植物ホルモン合成酵素遺伝子の発現に関連づける教材を通して、植物の生き方を理解し、「基本的な概念や原理・法則の理解」に基づく「科学的な自然観を育成」することを目指した。1章から4章までに述べたように、本教材を使用した実践授業を通して、各教材で目標とした力をつけることができたと考えられる。本教材は、今まで生物実験で取り上げることの少なかった「植物ホルモン」を学ぶというものだけでなく、分子生物学的手法を用いた遺伝子の発現を検証する内容を含んでいるので、「現代化」した高等学校「生物」の内容に合致していると主張できるだろう。

4つの各教材を単独で実施することはもちろん可能であるが、1年間の「生物」の授業において、系統的に学習することで、各教材で得た知識を次に行なう実験での考察に用いることで知識の理解から知識の活用へと発展させることができた。また、技能の習得は、次の実験を円滑に進め技術の向上につながっていった。

「生物」の標準単位数は4単位である。学校の状況に応じてこの単位数は増減するものであるが、標準単位数から算出すると年間140時間（4単位×35週）で、「生物」の学習を行う。1学期（4月から7月）に56時間（4単位×14週）、2学期（9月から12月）に56時間（4単位×14週）、3学期（1月から3月）に28時間となるのが3学期制の一般的な配当時間だと考えられる。この中で、1学期・2学期に定期試験が各2回、3学期には1回と各学期に学習のまとめを1時間ずつ配当すると、合計8時間が必要である。園山(2007)は、3学期制の高等学校での年間授業時間に対して実験やテスト等に関わる時間が占める割合を調査し、テストや学習のまとめ等には、全授業時間の約13%の時間が使われていることを報告した。今回テストや学習のまとめ等に配当した8時間は、全授業時間の約6%の時間であるので、配当可能な時間だと考える。また、啓林館の「生物」に基づいた年間指導計画（<https://www.shinko-keirin.co.jp/keirinkan/kokyoka/science/index2.html>）に計画されている実験は、36項目あり、約40時間が配当されている。これは、全授業時間の約30%の時間である。園山(2007)は、全授業時間に対する実験に配当した時間の割合は約23%と述べており、参考にした年間指導計画は、実験への時間配分が少し高い。授業内容に時間を

充てるためにも、少し実験項目を減らすことが、バランスの取れた年間指導計画になると考えた。そこで、実験の内容を考慮し14項目の実験を減らした。この14項目の実験は、本開発教材を行うことで学習内容が重複する「DNAの切断と電気泳動」、「試験管内での転写と翻訳の再現」、「ジベレリンによる植物の成長調節」、生物基礎でも行なうことのある実験である「唾液腺染色体の観察」、3学期の実施では材料の確保が困難である「トンボの数の測定」、「コオロギ相撲によるコオロギの順位の確認」、「層別刈り取り法による生産構造図の作成」、また実験の準備や実施が容易に行なえない「ニワトリの初期発生とアポトーシス」、「キイロショウジョウバエの2遺伝子雑種」などである(表5-1)。

上述のように時間配当を行ない、本研究で開発した4つの教材を年間学習指導計画に配置した(表5-2)。本稿3章で述べた「分子生物学的手法を理解する教材」を教科書の第1部第3章「遺伝子現象と物質」の終了後に配置し、2時間配当した。ここで、授業で学習したPCRや電気泳動のしくみをまとめる活動を行い、あわせてPCRにおけるプライマーの働きを詳しく学ぶことで、理解が深まると考えられる。また、早期にマイクロピペットの扱いを習得することで、後々の実験を円滑に進めることができる。次に、1学期末試験後に別の教材を配置した。年間学習計画では、1学期末は教科書の第2部第2章「動物の生殖と発生」を学習している途中である。学習事項と内容の異なる実験を行うことで、学習の流れを止めることが懸念されるが、すぐに夏季休業となり、これまでの継続性が一端途切れる時期であるので問題とはならないと考えられる。この時期の数時間単位で完結する教材は、生徒たちの集中力と意欲を持続させる有効な教材であることを著者は度々経験した。そこで、本稿1章で述べた「植物ホルモンの働きを理解する教材」を配置し、2時間配当した。「植物ホルモン」についての知識を生徒たち持っていないが、実験はヒマワリを育てるものであるため、知識の有無が実験の成否に関わることは無い。また7月中旬の時期では、教材の材料であるヒマワリの生育にも適しているため、培養器などの温度管理を必要とせず実験を実施できる。植物ホルモンの知識に欠ける生徒たちが、自ら答えを導き出す発見学習的な手法での授業展開は難しい。川上・渡邊(2010)は、抽象度が高い内容は、発見学習よりも問題意識を持たせ、核になる考え方を提示し、具体的な事象に適応させる受容学習が有効であり、この学習方法は、小学校より抽象的な学習内容の多くなる中学校の授業で使う場面が多くなると述べている。したがって、品種による

表5-1 啓林館「生物」の年間指導計画上において、実施しない実験項目

部	章	既定の計画での実験等
第1部 生命現象と物質	第1章 生命と物質	実験1-1「原形質流動の観察」 実験1-2「カタラーゼの働きと温度・pH」
	第2章 代謝	実験1-3「脱水素酵素の反応」 実験1-4「アルコール発酵」 実験1-5「緑葉色素の抽出と分離」 実験1-6「硝酸還元酵素の働き」
	第3章 遺伝現象と物質	実験1-7「核内のDNAとRNAの染色による検出」 実験1-8「遺伝子の発現調節」 実験1-9「DNAの切断と電気泳動」
	探究活動	1. 試験管内での転写と翻訳の再現
第2部 生殖と発生	第1章 有性生殖	実験2-1「減数分裂と花粉の形成」 実験2-2「キイロショウジョウバエの二遺伝子雑種」 実験2-3「だ腺染色体の観察」
	第2章 動物の生殖と発生	実験2-4「ウニの受精の観察」 実験2-5「ウニの初期発生の観察」 実験2-6「ニワトリの初期発生とアポトーシス」
	第3章 植物の生殖と発生	実験2-7「花粉の発芽と花粉管の観察」 実験2-8「芽と茎頂分裂組織の観察」
	探究活動	2. 調節卵の分割割球の発生
第3部 生物の環境応答	第1章 動物の反応と行動	実験3-1「盲斑の位置と形」 実験3-2「グリセリン筋の収縮」 実験3-3「フェロモンと昆虫の行動」
	第2章 植物の環境応答 探究活動	実験3-4「オーキシンの働き」 3. ジベレリンによる植物の成長調節

部	章	既定の計画での実験等
第4部 生物の進化と系統	第1章 生物の進化	実験4-1「コアセルバートの形成」 実験4-2「花と訪花昆虫の共進化」
	第2章 進化とその仕組み	実験4-3「胚膜の観察」 実験4-4「選択が働く場合の遺伝子頻度の変動」
	第3章 生物の系統	実験4-5「DNAの塩基配列の違いにもとづく進化の推定」 実験4-6「光合成生物の系統と光合成色素の関係」
	探究活動	4. 系統樹の作成
第5部 生態と環境	第1章 生物の生活と環境	
	第2章 個体群と生物群集	実験5-1「トンボの数の推定」 実験5-2「個体群の成長曲線-ウキクサを用いて-」 実験5-3「コオロギ相撲によるコオロギの順位の確認」 実験5-4「魚の食性調査」
	第3章 生態系	実験5-5「層別刈取法による生産構造図の作成」 実験5-6「地表性動物の種類と個体数調査」
探究活動	5. 植物の成長に対する個体群密度や環境条件の影響	

啓林館「生物」の年間指導計画で取り上げられている実験のうち、作成した「年間学習計画」において省略した実験項目を青字で示した。

表5-2 「生物」の年間指導計画と開発教材の位置づけ

部	章	節	項目	時間	実験・観察等	
第1部	第1章 生命と物質 (15)	第1節 生体物質と細胞	A生体を構成する物質/B細胞小器官/C細胞分画法/D細胞骨格/E生体膜	6	実験1-1「原形質流動の観察」	
		第2節 生命現象とタンパク質	Aタンパク質の立体構造/B酵素とタンパク質/C恒常性にかかわるタンパク質/D筋収縮とタンパク質/E物質輸送とタンパク質/F情報伝達とタンパク質/G細胞接着とタンパク質	9	実験1-2「カタラーゼの働きと温度・pH」	
	第2章 代謝 (11)	第1節 呼吸	A呼吸の仕組み/B呼吸基質と呼吸商/C発酵と解糖	5	実験1-3「脱水素酵素の反応」 実験1-4「アルコール発酵」	
		第2節 炭酸同化	A光エネルギーの化学エネルギーへの変換/B二酸化炭素の固定/C光合成の産物/D細菌の光合成と化学合成	4	実験1-5「緑葉色素の抽出と分離」	
		第3節 窒素同化	A窒素同化/B窒素固定/C脱窒	2	実験1-6「硝酸還元酵素の働き」	
	第3章 遺伝現象と物質 (11)	第1節 遺伝情報とその発現	A核酸/B DNAの複製の仕組み/C遺伝子の発現の仕組み/D遺伝子とタンパク質/E遺伝情報の変化	6	発展「セントラルドグマに合わない現象ー逆転写ー」 実験1-7「核内のDNAとRNAの染色による検出」	
		第2節 遺伝子の発現調節	A原核生物における遺伝子発現の調節/B真核生物における遺伝子発現の調節	1	発展「転写開始とヌクレオソーム構造」 発展「RNAによる遺伝子発現の調節」	
		第3節 バイオテクノロジー	A遺伝子組換え/B PCR法/C遺伝情報の解析/D遺伝子組換え作物と安全性の確保/E遺伝子診断と遺伝子治療	4		
	(37)					
	(2)	探究活動 (2)			2	開発教材「分子生物学的手法を理解するための教材」(3章)
第2部	第1章 有性生殖 (6)	第1節 減数分裂と受精	A生物の生殖法/B減数分裂/C性染色体	3	実験2-1「減数分裂と花粉の形成」	
		第2節 遺伝子と染色体	A遺伝の法則/B遺伝子の連鎖と組換え/C組換えの仕組みと組換え価/D染色体地図と遺伝子の配列/Eだ腺染色体	3	発展「遺伝子の相互作用」 発展「伴性遺伝」	
	第2章 動物の生殖と発生 (6)	第1節 動物の配偶子形成と受精	A動物の配偶子形成/B動物の受精	2	実験2-4「ウニの受精の観察」	
		第2節 初期発生の過程	A卵と卵割/Bウニの発生/Cカエルの発生/D細胞質と体の方向	4	実験2-5「ウニの初期発生の観察」	
(12)	試験及び総括 (3)			3	中間試験・期末試験各 (1) 1学期の総括 (1)	
(2)	探究活動 (2)			2	開発教材「植物ホルモンの働きを理解する教材」(1章)	
と発生	(6)	第3節 動物の細胞の分化と形態形成	A調節卵とモザイク卵/B胚の予定運命と決定/C細胞質の働き/D発生と細胞間相互作用/E形成体と誘導/Fアポトーシス/G形態形成と遺伝子	6		
	(10)	第3章 植物の生殖と発生 (4)	第1節 植物の受精	A花粉と胚嚢の形成/B重複受精	2	実験2-7「花粉の発芽と花粉管の観察」
		第2節 種子形成と胚の発生	A種子の形成/B胚の発生	1		
		第3節 植物の器官形成	A栄養器官の形成/B花器官の形成と調節遺伝子	1		
第3部	第1章 動物の反応と行動 (11)	第1節 刺激の受容	A受容器/B視覚/C聴覚	3	実験3-1「盲斑の位置と形」	
		第2節 神経	A神経細胞/B静止電位と活動電位/Cシナプスでの伝達	2		
		第3節 効果器	A筋肉/B繊毛とべん毛/Cその他の効果器	2	実験3-2「グリセリン筋の収縮」	
		第4節 神経系	A神経系の種類/Bヒトの脳と脊髄/C刺激の受容から反応まで/D反射	3		
		第5節 動物の行動	A走性/B刺激と行動/Cさまざまな行動/D学習	1		
生物の環境応答	第2章 植物の環境応答 (11)	第1節 発芽と成長の環境応答	A屈性と傾性/B屈性の仕組み/C発芽と植物ホルモン/D発芽の光応答/E屈性と成長の光応答/F植物の成長調節/G植物の運動	5		
		第2節 開花と老化の環境応答	A植物の花芽の形成/B花や果実の成長と老化/Cストレスへの応答	3		
		第3節 植物の一生と環境応答	A植物の一生と植物ホルモン/B環境の変化と植物の反応/C植物の培養と植物ホルモン	2		
	(23)	探究活動 (2)			2	開発教材「環境応答における形態変化と植物ホルモンの関連を学ぶ教材」(2章)
第4部	第1章 生物の進化 (5)	第1節 生命の起源と生命の変遷	A化学進化/B生命の誕生と進化	2	実験4-1「コアセルバートの形成」	
		第2節 生物界の変遷と地球環境の変化	A光合成生物の出現/B海中での多様化/C陸上への進出/D裸子植物と爬虫類の多様性/E被子植物と哺乳類の多様性	2		
		第3節 人類の起源と進化	A霊長類の誕生/B人類の誕生	1		
	第2章 進化とその仕組み (9)	第1節 進化の証拠	A化石が示す証拠/B形態の比較/C代謝の比較/D分子レベルの比較	4	実験4-3「胚嚢の観察」	
		第2節 生物の変異と進化	A進化学説の誕生/B進化の仕組み/C変異と種分化/D高次の進化/E現代の進化理論	5	実験4-4「選択が働く場合の遺伝子頻度の変動」	
生物の進化	第3章 生物の系統 (3)	第1節 生物の分類と系統	A人為分類と自然分類/B分類の方法/C系統推定の方法/D二界説から3ドメイン説へ	3	実験4-5「DNAの塩基配列の違いにもとづく進化の推定」	
		試験及び総括 (3)		3	中間試験・期末試験各 (1) 2学期の総括 (1)	
	(17)	探究活動 (3)			3	開発教材「環境に反応して植物ホルモンの合成に関与する遺伝子の発現が消失することを検出して、植物は環境に応じた形態に変化することを学ぶ教材」(4章)
と系統	(9)	第2節 原核生物の分類と系統		1		
		第3節 原生動物の分類と系統		2	実験4-6「光合成生物の系統と光合成色素の関係」	
		第4節 植物の分類と系統	Aコケ植物/Bシダ植物/C種子植物	1		
		第5節 菌の分類と系統		1		
		第6節 動物の分類と系統	A祖先に近い動物/B二胚葉動物/C三胚葉動物/D旧口動物/E新口動物	2		
		探究活動 (2)			2	4. 系統樹の作成
第5部	第1章 生物の生活と環境 (2)	第1節 環境要因		1		
		第2節 環境と適応		1		
	第2章 個体群と生物群集 (9)	第1節 個体群とその変動	A個体群の密度と変動/B個体群の構造と変動/C種内関係	5	実験5-2「個体群の成長曲線」 発展「個体数の変動要因を解析する方法」	
		第2節 異種個体群間の関係	A種間関係	1		
		第3節 生物群集とその構造	A生物群集/B食物連鎖/C種間競争と異種共存/D生態的地位と生態的同位種	3	実験5-4「魚の食性調査」	
第3章 生態系 (4)	第1節 生態系と物質生産	A栄養段階/B植物による物質生産/C動物の同化量・生産量/D生態ピラミッド	1			
	第2節 生態系と生物多様性	A種の多様性/B種内における遺伝的多様性/C生態系の多様性/D個体群の絶滅	3			
(17)	探究活動 (2)			2	5. 植物の成長に対する個体群密度や環境条件の影響	
(2)	試験及び総括 (2)			2	学年末試験 (1) 1年間の総括 (1)	
合計				140		

啓林館「高等学校生物」に準じた年間学習指導計画を基に、4つの開発教材を配置した。()内の数字は配当時間である。赤字で示しているのは、本研究での開発教材。青字で示しているのは、テストや学習のまとめの時間である。

ヒマワリの生育の違いと GA の投与との関係について問題意識を持たせる展開として実験を行なって、その後の授業で核になる考え方として「GA の作用」を示し、品種による生育の違いなどに当てはめるとともに、微量で植物の形態や生理に作用していくという一般的な植物ホルモンの作用について広げる展開を行なうことで、有効に活用できると考える。

2 学期では、教科書第 3 部「生物の環境応答」の単元の学習の終了時に本稿 2 章に述べた「環境応答における形態変化と植物ホルモンの関連を学ぶ教材」を配置し、3 時間配当する。ここに配置すると、単元のまとめ学習として実施でき、考察も既習事項を活用して行なえる。次に、2 学期末に本稿 4 章に述べた「環境に応答して植物ホルモンの生合成に関与する遺伝子の発現が消長することを検出して、植物は環境に応じた形態に変化することを学ぶ教材」を配置し、3 時間配当する。ここも試験と長期休業とのはざまの時期であるので、数時間のまとまりのある教材の活用が有効な時期である。2 学期前半に「環境応答における形態変化と植物ホルモンの関連を学ぶ教材」を学習しているので、環境に応じた植物の形態変化が生じる理由を植物ホルモンの観点から考えることができ、マイクロピペット等の扱いも習得できているので円滑に実験を行なえられると考えられる。

このように配置すれば、特別プログラムとして実施するのではなく、1 年間の「生物」の学習に沿って実施することができる。植物ホルモンの働きを理解し、その理解を持って環境に応答した働きがあることを学び、さらに植物ホルモンの生産が遺伝子発現によるものであることを理解したり、はじめの実験で身につけた技術を後の実験で活かすことができたりするなど、各教材間の連携が取れる配置となっているので、年間を通じた一つの課題研究を行なっていると捉えることもできる。

小学校において、植物の観察から植物の体には根・茎・葉・花があること、発芽から結実までの個体の成長、光を受けて二酸化炭素を吸収し酸素を放出することとデンプンが生じることや植物の体の中を水が通ることなどを学んでいる。また中学校において、植物組織の観察から植物細胞の特徴と系統分類の初歩を学び、光合成・呼吸・蒸散などの生理機能を学んでいる（表 5-3）。高等学校では光合成や呼吸のしくみを分子レベルで学び、伸長成長も環境要因と遺伝プログラムの相互作用のもとで起こることを遺伝子やそれと相互作用する分子（植物ホルモン）の働きによることを学ぶ。

1 章で述べたように、生徒たちは矮性ヒマワリの草丈が伸びない原因を、GA の作用

表5-3 小学校および中学校における植物に関する学習項目

	見方	学習項目	学習内容	
小学校	生命に関する自然の事物・事象を「個体～生態系レベル」において、主として多様性と共通性の視点で捉える	第3学年 身の回りの生物	<ul style="list-style-type: none"> 生物は、色、形、大きさなど、姿に違いがあること。また、周辺の環境と関わって生きていること。 植物の育ち方には一定の順序があること。また、その体は根、茎及び葉からできていること。 	
		第4学年 季節と生物	<ul style="list-style-type: none"> 植物の成長は、暖かい季節、寒い季節などによって違いがあること。 身近な動物や植物について追究する中で、既習の内容や生活経験を基に、季節ごとの動物の活動や植物の成長の変化について、根拠のある予想や仮説を発想し、表現すること。 	
		第5学年 植物の発芽・成長・結実	<ul style="list-style-type: none"> 植物は、種子の中の養分を基にして発芽すること。 植物の発芽には、水、空気及び温度が関係していること。 植物の成長には、日光や肥料などが関係していること。 花にはおしべやめしべなどがあり、花粉がめしべの先に付くとめしべのもとが実になり、実の中に種子ができること。 	
		第6学年	植物の養分と水の通り道	<ul style="list-style-type: none"> 植物の葉に日光が当たるとでんぷんができること。 根、茎及び葉には、水の通り道があり、根から吸い上げられた水は主に葉から蒸散により排出されること。
			生物と環境	<ul style="list-style-type: none"> 生物は、水及び空気を通して周囲の環境と関わって生きていること。 生物の間には、食う食われるという関係があること。
中学校	生命に関する自然の事物・事象を「細胞～個体～生態系レベル」において、主として多様性と共通性の視点で捉える	第1学年 生物の観察と分類の仕方	<ul style="list-style-type: none"> いろいろな生物の共通点と相違点に着目しながら、次のことを理解するとともに、それらの観察、実験などに関する技能を身に付けること。 身近な生物についての観察、実験などを通して、いろいろな生物の共通点や相違点を見いだすとともに、生物を分類するための観点や基準を見いだして表現すること。 	
		植物の体の共通点と相違点	身近な植物の外部形態の観察を行い、その観察記録などに基づいて、共通点や相違点があることを見いだして、植物の体の基本的なつくりを理解すること。また、その共通点や相違点に基づいて植物が分類できることを見いだして理解すること。	
		第2学年 生物と細胞	<ul style="list-style-type: none"> 生物の組織などの観察を行い、生物の体が細胞からできていること及び植物と動物の細胞のつくりの特徴を見いだして理解するとともに、観察器具の操作、観察記録の仕方などの技能を身に付けること。 	
		植物の体つくりと構造	植物の葉、茎、根のつくりについての観察を行い、それらのつくりと、光合成、呼吸、蒸散の働きに関する実験の結果とを関連付けて理解すること。	
		第3学年	生物の成長と殖え方	<ul style="list-style-type: none"> 体細胞分裂の観察を行い、その順序性を見いだして理解するとともに、細胞の分裂と生物の成長とを関連付けて理解すること。 生物の殖え方を観察し、有性生殖と無性生殖の特徴を見いだして理解するとともに、生物が殖えていくときに親の形質が子に伝わることを見いだして理解すること。
生物と環境	<ul style="list-style-type: none"> 微生物の働きを調べ、植物、動物及び微生物を栄養の面から相互に関連付けて理解するとともに、自然界では、これらの生物がつり合いを保って生活していることを見いだして理解すること。 身近な自然環境について調べ、様々な要因が自然界のつり合いに影響していることを理解するとともに、自然環境を保全することの重要性を認識すること。 			

学習項目・学習内容は小学校学習指導要領解説理科編(2017 文部科学省)および中学校学習指導要領解説理科編(2017 文部科学省)より、植物に関わるものを抜粋してまとめたものである。この内容に適応する開発教材をそれぞれの項目に配置した。

や生合成に関連させることが学習前にはできなかった。しかし、生徒たちは、GAとGA合成阻害剤を投与する実験を通して、植物の中に存在するジベレリンという「分子」を用いて考えるようになった。また、生徒たちは暗所で徒長した芽生えに光が当たると、その徒長が止るといふ植物の環境応答を2章の教材を通して理解し、「光」と「芽生えの成長」を関連させて考えるようになった。さらに、4章で述べたように、ダイレクトRT-PCRを用いた実験を通して、「光」と「芽生えの成長」を遺伝子の発現に関連づけて考えるようになった。より科学的に捉えられるようになり、本教材を用いた学習後は、芽生えが光を受容すると、GA生合成遺伝子の発現調節し、暗所にて徒長を支えていたGA量が減少することで徒長が止るといふ考えに変容した。

本教材は、一般的な高等学校で実施できるように、市販の矮性品種やネーキッド種子を用いたり、直接RNAを使わない方法で遺伝子発現を検出する方法を行ったり工夫をした。しかし、マイクロピペットや電気泳動槽などの実験機材は、全ての高等学校に整備されているものではない。片山（2012）は、学校間での設備備品の充足度に大きな隔たりがあり、高額な機器はあっても数が必要なマイクロピペットのような機器が不足していることを指摘している。一方、このような状況に対し、中央教育審議会答申（2016）では、理科の教材や教育環境の充実について、「実験器具等の整備充実、ICT環境の整備などの条件整備が求められる。」と述べられている。各学校における機器の充実が、早期に達成されることが望まれる。

4章の実践を中心に据えた本教材の実施には、機器の充足が不可欠であるが、これらの機器を用いることで遺伝子の発現を検証することができる。これによって、植物の環境に応じた形態の変化を植物ホルモンの存在から捉えるだけでなく、「セントラルドグマ」に基づいて植物ホルモンの働きを捉える事ができる。つまり、本教材は、生物学の「基本的な概念や原理・法則の理解」に基づいて「科学的な自然観を育成」する教材であると言える。

引用文献

- 青柳一彦 (2009) 試験管内の実験. 佐々木博巳(編・著)『よくわかる分子生物学・細胞生物学実験』2-45. 講談社サイエンティフィク.
- 青柳一彦 (2013) RT-PCR. 佐々木博巳(編)『目的別で選べるPCR実験プロトコール』74-87. 羊土社.
- 赤坂甲治・嶋田拓 (1992) RNAの調製. 竹内正幸・石原勝敏(編)『生物の実験』309-317. 裳華房.
- 浅島誠・他20名 (2013) 『生物』東京書籍
- Ait-Ali, T., S. Frances, J.L. Weller, J.B. Reid, R.E. Kendrick and Y. Kamiya (1999) Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3 β -hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol.* 121:783-791.
- 中央教育審議会 (2016) 「幼稚園, 小学校, 中学校, 高等学校及び特別支援学校の学習指導要領等の改善及び必要な方策等について(答申)」(中教審第197号)
- Fambrini, Marco., L. Mariotti, S. Parlanti, P. Picciarelli, M. Salvini, N. Ceccarelli, C. Pugliesi (2011) The extreme dwarf phenotype of the GA-sensitive mutant of sunflower, dwarf2, is generated by a deletion in the ent-kaurenoic acid oxidase1 (HaKAO1) gene sequence. *Plant Mol. Biol.* 75:431-450.
- Foo, E., J. Damien Platten, J.L. Weller and J.B. Reid (2006) PhyA and cry1 act redundantly to regulate gibberellin levels during de-etiolation in blue light. *Physiol. Plant.* 127:149-156.
- 畑中恒夫・内海俊策・鈴木彰 (1993) 小学校教員養成課程学生が高校までに受けた生物分野の実験・観察の内容に関する調査. 千葉大学教育学部研究紀要41(2):43-57.
- 伊佐治錦司・松本省吾 (2006) 遺伝子診断の教材化. 岐阜大学教育学部報告(自然科学) 30(21):21-33.
- 石原勝敏・山上健次郎 (1983) 図説教材生物「理科と実験」別冊 p. 3-4 共立出版
- 石原勝敏・他 14 名 (2009) 『新版生物 I』実教出版
- 石川統・他 19 名 (2008) 『生物 I』東京書籍
- 今関英雅 (1998) 植物ホルモンと細胞の形. 今関英雅・柴岡弘郎(編)『植物ホルモンと細胞の形』p. 1-5 学会出版センター.

- 泉好弘・山口一成 (2012) 「イネ科植物の発芽時におけるジベレリンの働き」に関する実験方法についての研究. 大分大学教育福祉科学部研究紀要 34(1):95-100.
- Katagi, T., N. Mikami, T. Matsuda and J. Miyamoto (1987) Structural studies of the plant growth regulator uniconazole (ES pure) and computer-aided analysis of its interaction with cytochrome P-450. *J. Pesticide Sci.* 12:627-633.
- 片山舒康・三ツ橋悦子・西村宗一郎・古谷庫造 (1982) 高校生物教育における植物ホルモンの実験開発 (I) ジベレリン・イネ苗検定方法の教材化. 東京学芸大学紀要 34:159-167.
- 片山豪 (2012) 分子生物学の教材開発. 遺伝 66(3):301-311.
- 川上昭吾・渡邊康一郎 (2010) 日本における有意味重要学習の展開. 理科教育学研究 50(3):1-14.
- 川嶋誠一郎・他 9 名 (2011) 『改訂版高等学校生物 I』数研出版
- 小林典子 (2003) ウェスタンブロット法. 仲嶋一範・北村義浩(編) 『必ず上手くいく 遺伝子導入と発現解析プロトコール』 142-155. 羊土社.
- 倉林真理緒・武村政春 (2014) 「複製」と「転写」の誤理解もしくは混同に関する考察. 生物教育 55(1):40-47.
- Lee, D.J. and J.A.D.Zeevaart (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. *Plant Physiol.* 130:2085-2094.
- 牧野岩男・宮本隆夫 (1954) ホウレンソウの種子における発芽後の成長を抑制する物質について. 育種学雑誌 4(3):158-160.
- 松浦克美 (2010) 高等学校学習指導要領改訂 2009 における, 生物領域大変更の経過の一側面. 生物教育 51(特別号):17-22.
- Marchant, R.B., I. Casimiro, J. Eklöf, P.J. Casero, M. Bennett and G. Sandberg (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 14: 589-597.
- Metzger, J.D. and J.A.D. Zeevaart (1980) Effect of photoperiod on the levels of endogenous gibberellins in spinach as measured by combined GAs chromatography-selected ion current monitoring. *Plant Physiol.* 66:844-846.

- 三橋将人 (2010) RT-PCR. 養王田正文(編)『もっと知りたい PCR 実験』69-77. 講談社.
- 本川達雄・他17名 (2013) 『生物』啓林館
- 本川達雄・他19名 (2006) 『高等学校改訂版生物 I』啓林館
- 文部省 (1999) 高等学校学習指導要領解説 理科編
- 文部科学省 (2009a) 高等学校学習指導要領
- 文部科学省 (2009b) 高等学校学習指導要領解説 理科編
- 文部科学省 (2017) 小学校学習指導要領解説理科編
- 文部科学省 (2017) 中学校学習指導要領解説理科編
- O'Neill, D.P., J.J. Ross and J.B. Reid (2000) Change in gibberellin A₁ levels and response during de-etiolation of pea seedling. *Plant Physiol.* 124:805-812.
- Peng, J, P. Carol, D.E. Richards, K.E. King, R.J. Cowling, G.P. Murphy and N.P. Harberd (1997) The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that neGAtively regulates gibberellin responses. *Genes. Dev.* 11:3194-3205.
- 佐々義子 (2004) バイオリテラシーの育成. 千葉県立現代産業科学館研究報 10:101-108.
- 仙波憲太郎 (2003) ノーザンプロット. 仲嶋一範・北村義浩(編)『必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール』156-161. 羊土社.
- 庄野邦彦・他 13 名 (2014) 『生物』実教出版
- 嶋田正和・他 21 名 (2013) 『生物』数研出版
- 園山博 (2007) 新課程における探究活動の取り組み状況. フォーラム理科教育 8:1-6.
- Suganuma, N. and Ohno, H (1984) Role of pericarp in reducing spinach (*Spinacia oleracea* L.) seed germination at supra-optimal temperatures. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 53(1):38-44.
- 鈴木健・飯嶋直人・花田薫・吉井幸子 (2005) RT-PCR 法を用いたイチゴマイルドイエローエッジアソシエートウイルスの検出と千葉県内の系統. 千葉農総研研報 4:125-133.
- Suzuki, Yuji., T. Kawazu and H. Koyama. (2004) RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of *Arabidopsis thaliana*. *BioTechniques* 37:542-544.
- Symons, G.M. and J.B. Reid (2003) Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* 216:422-431.

- 津嘉山泉・武田泰典・川上祐生・山本登志子 (2015) 高校生を対象とした分子生物学実験に関する報告- 高校生のための大学開放2015 - . 岡山県立大学保健福祉学部紀要 22(1) : 203-209
- 高桑純 (2004) Avena を用いた光屈性に関する実験の教材化. 北海道立理科教育センター研究紀要 16:51-54.
- 田中隆荘・他 22 名 (2009) 『高等学校改訂生物 I』第一学習社.
- 田代直幸 (2010) 新学習指導要領 生物領域における改訂. 生物教育 51(特別号):9-16.
- 留森寿士・池尻朗・竹内芳親 (1997) ホウレンソウ種子の発芽・出芽における無果皮処理の有効性. 生物環境調節 35(1):35-39.
- 梅崎輝尚・島野至・松本重男 (1991) ダイズの節間伸長に関する研究. 日作紀 60(1):15-19.
- 薄井芳奈 (2014) 実践報告「新開発「シート培地『サニ太くん』高校生物実験教材用」を使った大腸菌の遺伝子発現調節の実験 ～遺伝子分野でもシンプルな実習を～」. サイエンスネット 50:10-13.
- Wu, K., L. Li, D.A. Gage and J.A.D. Zeevaart (1996) Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol.* 110: 547-554.
- 山根久和 (1991) 植物ホルモンと矮性 化学と生物. 29(5):330-336.
- 山内宗治 (2013) 高等学校生物における PCR 法を利用した遺伝子判定実験を取り入れた教材開発. 広島県教育センター研究紀要 40:117-134.
- 山路裕昭・古賀雅夫・星野由雅・中西弘樹・近藤寛 (2006) 高等学校理科における観察、実験の現状について 長崎大学教育学部紀要(教科教育学) 46:77-86.
- 吉里勝利・他 16 名 (2013) 『高等学校生物』第一学習社.
- Zeevaart, J.A.D. (1971) Effects of photoperiod on growth rate and endogenous gibberellins in the long-day rosette plant spinach. *Plant Physiol.* 47:821-827.

謝 辞

本研究を進めるにあたり，多くの方々にお世話になりました。ここにお礼申し上げます。研究の計画から実施に当たり，終始ご親切ご丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました兵庫教育大学大学院 渥美茂明教授には深く感謝の意を表します。また，実験室や実験器具の使用の便宜を図ってくださった兵庫教育大学大学院 吉岡秀文教授をはじめ生物教室の先生方，また，折に触れご助言を頂いた上越教育大学大学院 小林辰至教授には，心よりお礼申し上げます。さらに，渥美研究室の学生諸君には，多大な迷惑をかけたにもかかわらず，あたたかく接していただき感謝しております。

また，本研究の一部は，平成 25 年度 サイエンス・パートナーシップ・プログラム（JST 主催）「遺伝子の発現を捉える～環境変化に応じて作られる植物ホルモン～」，平成 23 年度武田財団高等学校理科助成研究「日長等の変化による抽台の誘導と植物ホルモンの関係を学ぶ教材開発」の支援により実施いたしました。感謝の意を表します。

資料 1-1 (ワークシート)

生物 実験レポート

ジベレリンの働きと節間の伸長

【目的】 植物の成長に植物ホルモンがどれほど影響を及ぼしているのかを確かめる。例として、品種の異なるヒマワリを用いて、植物ホルモンの一つであるジベレリン (GA) が茎の伸長にどの程度影響しているかを測定することで、植物ホルモンの関わり合いを考えることを目的とする。

【材料】 ヒマワリ (*Helianthus annuus*) A: 小夏 (サカタのタネ)・・・草丈が低いミニヒマワリ
B: かがやき (サカタのタネ)・・・通常の草丈になる品種

【薬品】 ジベレリン酸 (GA3) 溶液

実験 ジベレリンの働きを確かめる
方法

- (1) A と B の品種を播種して 6 日ほど育てたものを苗として準備する。
- (2) 各班に(A)、(B)各 2 本を用意する。
- (3) 現在の生育状態を確認し、葉の長さ、茎の長さ (節間) を物さしで測る。(mm の単位まで)
- (4) A・B の 1 本にはジベレリン ($1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$) をスプレーで噴霧して投与する。
- (5) 日当たりの同じ条件のところに置き、水を絶やさないようにして 1 週間成長の度合いを測定する。
- (6) 結果を表にまとめる。

結果

日	かがやき (通常品種)						小夏 (矮性品種)					
	無処理			GA投与			無処理			GA投与		
	下胚軸	第1節間	第2節間	下胚軸	第1節間	第2節間	下胚軸	第1節間	第2節間	子葉	本葉1	本葉2

考察 各項目に沿って、気がついた違いをまとめる。

- ・節間の違いを比べる
無処理の A と GA 投与の A を比べる

無処理の B と GA 投与の B を比べる

GA 投与の A と GA 投与の B を比べる

無処理の A と無処理の A を比べる

まとめ

① ジベレリンはどのような働きがあると分かりましたか。

② ミニヒマワリと通常のヒマワリは何が違うために形態の変化に差があると考えられますか。

さらに発展！！

① まとめの②で考えたことを証明するためにほかにどんな実験をすれば良いと考えられますか。

② 今後、植物の生き方（発芽・成長・開花・結実など）に関して、調べてみたいことはどんなことですか。

感想

3年 組 番氏名 _____

資料2-1 (ワークシート)

生物実験レポート

芽生えの伸長と植物ホルモン

【目的】 土に埋められた種子は、発芽後光のあたる地上にめがけてぐんぐん伸びていきます。光が当たるとそれまでの伸びを止めて、子葉は展開し緑色になります(脱黄化)。この伸びが、植物ホルモンにかかわる現象であるかどうかを調べる。

【材料】 ホウレンソウ種子(ネーキッド種子:果皮を取り除き発芽しやすくしてある種子)

【準備物】 用土(バーミュクライト)・ジベレリン合成阻害剤(スミセブンP剤)・ジベレリン溶液

【方法】

- (準備) ① 種子は25°Cの暗黒条件で一晩吸水させてある。この状況で発根したものを材料として用いる。
 ② 発根した種子を12粒C液に20分程度浸す。

- (1) 3つの容器にバーミュクライトを10g入れる。その上に準備した発根した種子および準備②の種子を12粒ずつ並べる。
 (2) (1)の上にバーミュクライトを5gかぶせる。
 (3) バーミュクライトにA液・B液を50ccを全体にまんべんなくしみ込ませる。②の種子を播いたものはA液をしみこませる。

A液	B液	C液
水	300倍希釈したGA合成阻害剤溶液	50ppmのジベレリン溶液

- (4) 2セット作成して、それぞれを明条件・暗条件に置き、4・5日後に観察して胚軸の長さを測定する。

結果 各実験区の芽生えの胚軸の長さ測定する。

	明条件			暗条件		
	水	GA合成阻害剤	GA溶液	水	GA合成阻害剤	GA溶液
各個体の値 (mm)						
平均値						

結果をグラフにまとめる

各個体の 値(mm)	60mm						
	50mm						
	40mm						
	30mm						
	20mm						
	10mm						
	0mm						
	水	GA 合成阻害剤	GA 溶液	水	GA 合成阻害剤	GA 溶液	
	明条件			暗条件			

考察

- ① 芽生えの成長は明条件・暗条件でどう違いますか。(水の時の結果を見て)

- ② GA を与えることで芽生えの成長はどうなりますか。

- ③ GA 合成阻害剤を与えることで芽生えの成長はどうなりますか。

- ④ 芽生えの伸長は光が当たるときと当たらない時でどのような仕組みに基づいて起こっていると考えられますか？

まとめ

芽生えは (¹) まで (²) している。 (²) している時は、 (³) の影響を受けていると考えられる。光は (⁴) で感知して、この情報を受けると、 (³) が作られなくなり、 (²) が止まると考えられる。

資料 3-1 (ワークシート)

PCR法によるDNAの特定領域が増幅される仕組み

目的：PCR法の原理を理解し、プライマーの働きによって特定のDNA領域が増幅される仕組みを理解する。

準備物：ハウレンソウ由来テンプレート DNA 溶液・プライマー (2 種)・PCR 緩衝液・ポリメラーゼ mix・

100bp DNA ラダー・電気泳動用ゲル (アガロース 1.5%)・泳動用緩衝液・遠心器・染色液 (ミドリ Green)・水・青色液・パラフィルム

方法：

《マイクロピペットの練習》

- (1) 各自の机の上にパラフィルムを貼り付ける。
- (2) マイクロピペットのダイヤルを $1\mu\text{L}$ に合わせて、 $1\mu\text{L}$ の水を 3 つ、パラフィルム上に置く。プッシュロッドを押して水を出し切ったら、チップの先を液滴から離し、その後プッシュロッドを戻す。

※ 取り扱う液はごく少量です。以下のことに十分気をつけること

・液を完全に吐き出すこと。 ・プッシュロッドを戻すとき、液滴を吸い戻さないこと。

- (3) ダイヤルを $0.5\mu\text{L}$ に変更し、水と青色液を 2 滴ずつパラフィルム上に置く。
(注) 1 回ごとにピペットチップを取りかえること。
- (4) ダイヤルを $1\mu\text{L}$ に変更し、パラフィルム上の水滴を 1 つ吸い取り、青色液のところへ吐き出す、二つの液を混合させて、吸い取る。(余りが出たり、足りなくなければ、正確に測れていることになる)
- (5) 残っている液滴を用いて、再び(4)を行なう。

《実験》

準備物は各班 (4 人組) ごとにある。

- ① PCR チューブにペンで班番号と 1~4 と側面と蓋に書く。(例) 1-1
- ② 各 PCR チューブに、下の表にしたがい各溶液を、マイクロピペットを用いて入れる。この際、PCR チューブの壁面に水滴を付けて液が入ったことを確認する。
- ③ ピペットチップはその都度、捨て新しいものを使用する。

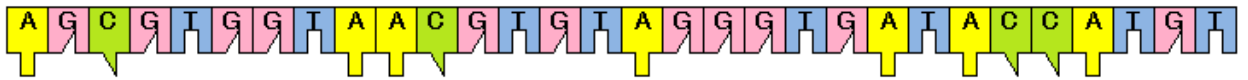
チューブ番号	1	2	3	4
テンプレート DNA 溶液	$0.5\mu\text{L}$	$0.5\mu\text{L}$	$0.5\mu\text{L}$	$0.5\mu\text{L}$
ポリメラーゼ mix*	$3.5\mu\text{L}$	$3.5\mu\text{L}$	$3.5\mu\text{L}$	$3.5\mu\text{L}$
PCR 緩衝液	$5\mu\text{L}$	$5\mu\text{L}$	$5\mu\text{L}$	$5\mu\text{L}$
プライマー (フォワード)	—	$0.5\mu\text{L}$	—	$0.5\mu\text{L}$
プライマー (リバース)	—	$0.5\mu\text{L}$	$0.5\mu\text{L}$	—
H ₂ O	$1.0\mu\text{L}$	—	$0.5\mu\text{L}$	$0.5\mu\text{L}$

ポリメラーゼ mix には DNA ポリメラーゼ $0.2\mu\text{L}$ ・dNTPs $2\mu\text{L}$ ・H₂O $1.3\mu\text{L}$ が入っている

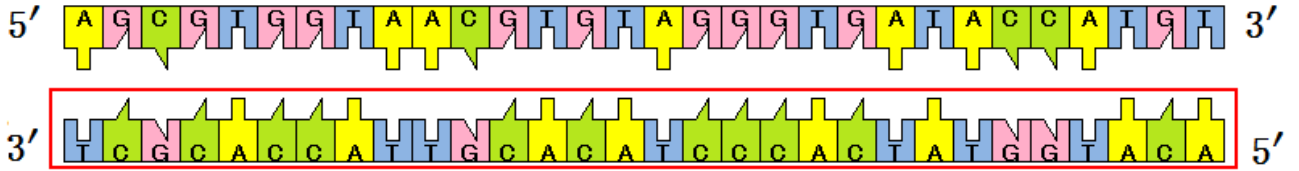
- ⑤ PCR チューブをサイマルサイクラーにセットし、以下の温度設定で DNA を増幅する。
サイマルサイクラーは次のように設定してある
 98°C 10 秒 → 61°C 30 秒 → 68°C 30 秒
以上を 30 サイクル 終了後 4°C で保管

課題1 プライマーの結合を学ぼう！！

DNAの塩基配列は5' → 3' 方向に表記される。ある遺伝子の塩基配列の一部が図に示す。



このDNAには本来相補鎖があるので、実際は図の赤枠の対を形成している。



このDNAを図のプライマーを用いて増幅してみる。

プライマー(ア)



プライマー(イ)

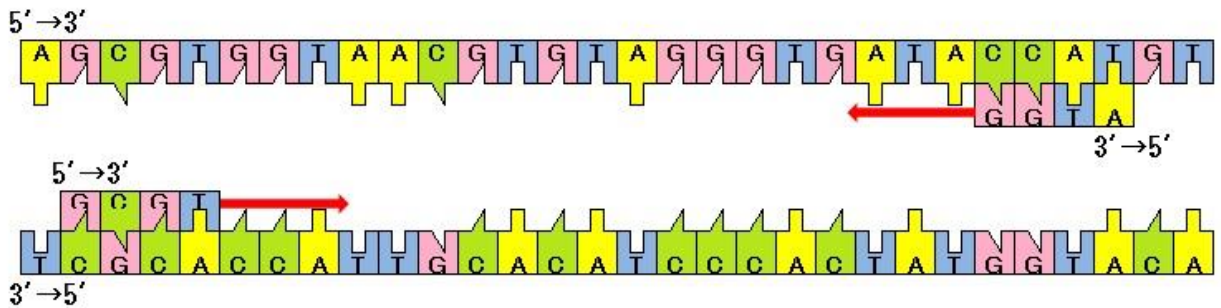
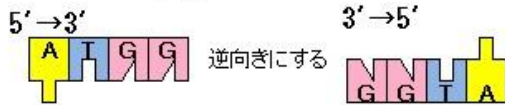


プライマー(ア) : フォワード

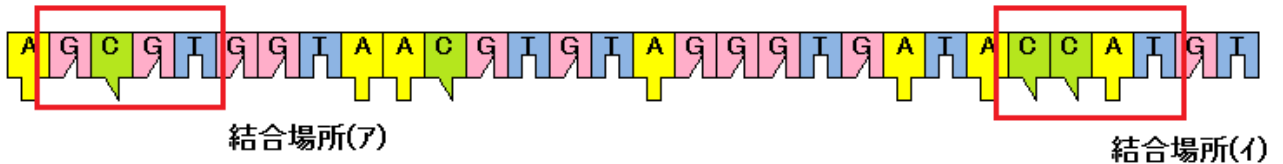
プライマー(イ) : リバース

プライマーの配列も5' → 3' 方向に書かれている。このプライマーがDNAのどこに対応するかは向きを合わせる必要がある。フォワード側(プライマー(ア))は、そのまま5' → 3' 方向に伸長する向きなので、相補鎖側の3' → 5' 方向に書かれている側の鎖に結合する。一方、リバース側は、はじめに表記してある側(5' → 3')に結合するので、プライマーの配列は表記とは逆向きになる。つまり、配列は5' → 3' 方向に書かれているので、逆向きの3' ← 5' にして結合場所を考えなくてはならないということである。

プライマー(イ)



つまり、DNAの配列とプライマーの配列から見るプライマーの結合場所は図のようになる。



プライマー(ア)



プライマー(イ)



課題 2

下の塩基配列はハウレンソウのジベレリン 20oxidase 遺伝子の塩基配列である。活性のあるジベレリンを合成するための基質であるジベレリン 20 を合成する酵素をコードしている遺伝子である。今回、プライマー1 (フォワード)、プライマー2 (リバース) を用いてこの遺伝子の一部を増幅するのだが、このプライマーで増幅される遺伝子の領域を答えなさい。下図の遺伝子の塩基配列にマーカーペンでプライマー1 (フォワード) とプライマー2 (リバース) の結合場所を記し、その間の塩基配列を数えなさい (プライマーの配列も含む)。

Primer 1 (フォワード) : agctctcaggaacaaggtg

Primer 2 (リバース) : cagtccccattaagtggag

『ハウレンソウのジベレリン 20oxidase 遺伝子の塩基配列』

```
1  acctccattt tcctaacaaa gctagcttaa ttggcttcaa accaaca meta aatgatgcaa
61 ccacttttta ccattccacc accacttcca acaacctcat tgtttgatac atcatttctt
121 aaacatgaag ataacatacc aagccaatth atatggccag atgatgaaaa accatgctcg
181 gaaacgcctc cagagctoga ggtacctccc attgatctag gggggttcct ctcaggagac
241 ccagttgcag tgtcaaaggc aactacactt gccaatgaag catgcaagtg gcatggggttc
301 ttcttgattg tcaacatga tatctatttc gagctcttag ttaaagctca tgaagctatg
361 gattactttt ttagtcagcc gttttcccaa aaacaaaaag ctctcaggaa acaaggtgat
421 cattgtggct atgctagtag ctttcttggga agatttgcca caaaacttcc ttggaaagag
481 actcttttct ttcgatatta tgatgatgat gatgataagt cctcaaaaaat ggtacaaaaac
541 tacatctcca acttaatggg gactgacttt caagaatttg ggagggtgta ccaagaatat
601 tgtaaggcta tgagcaagtt gtcccttggg atcatggagc ttttgggaat gagcctagga
661 gttggaagaa actatthcag ggaatthttc aaagggaatg actcaataat cagactaaac
721 tactaccogc cttgccaaaa acccgaatta actcttggga cggggcctca ctgtgatccc
781 acgtcgtcga cgattcttca tcaagatcat gttggtggcc ttgaagtctt cgtcgaccaa
841 aaatggtact ccatccgtcc caaccagaaa gcatttgtcg tcaacattgg agataccttc
901 atggctthtg caaatgggaa atacaagagt tgcttgcaca gggcagtggt gaatagcaaa
961 actcctagaa aatcagtggc thtctthctg tgtccaaggg gaaacaaagt gattcgtcca
1021 ccaattgagt tagggcatcc aagggtatac ccggatthta catggccgct tctthtggag
1081 thtacacaga aacattatag ggccgacaca aaaactctag attctthttac aaagtggctt
1141 caaaagagat caactgaaga cgagcgagta agtmetaacc atgcaacagc aacagcaaca
1201 gcaacagcaa cagcagcacg caaaggacat acatgmetaaa acatgatgca ctcgttatag
1261 aaaagcattg tactccgtat atgaattgaa gagacmetaag ggtgccaatt gaagttagct
1321 aaaggatcga tctgattmeta ttacaactga agcaccgctg ttgg
```

増幅される DNA 断片は

その大きさは

bp(塩基対)である。

方 法：(電気泳動編)

《くぼみに溶液を流し込む練習》

練習用ゲル(小さいシャーレに入っているくぼみのあるゲル)を用いる。

- (1) 練習用の溶液の入っているチューブ(緑色)から、マイクロピペットを用いて $7\mu\text{L}$ 吸い取る。
- (2) ゲルのくぼみにピペットチップの先端をかざす。
(注) ゲルのくぼみを決して崩さない。くぼみの奥に差し込まない。
- (3) ゆっくりとプッシュロッドを押し、吸い取った液を流し込む。
(注) ゆっくりとは、液がくぼみからあふれ出ないようなスピードでプッシュロッドを押し出すことである。
- (4) チップをくぼみからそっと出して完了である。
- (5) この作業を1人3回ずつ行う。

《実験》

- ⑥ PCRが完了したチューブにDNA染色液のミドリ Green を $1\mu\text{L}$ ずつ入れる。すべてのPCRチューブに入れ終わったら、遠心器に入れ、液を底に集める。
- ⑦ 電気泳動層内のアガロースゲルに空いているくぼみが8つ空いているのを確認する。くぼみを上に置き、左からレーン1、2、・・・8と呼ぶ。
- ⑧ 一番左端のレーンは空け、つづく4つのレーンを用いて、PCRを行なったチューブの順番通りにチューブ内の液を $7\mu\text{L}$ ずつマイクロピペットで吸い取る。この際、チューブ内で2・3度液を出し入れして、均質化したのち改めて定量吸い取るようにする。
- ⑨ $7\mu\text{L}$ 吸い取れば、くぼみにゆっくりと流し込む。この際ゲルにチップの先を差し込まないように注意する。1つのくぼみ毎に落ち着いてゆっくりと作業する。
- ⑩ 最後に、一番左端にDNAマーカーを $7\mu\text{L}$ 流し込む。
- ⑪ 泳動層の電源を入れる準備をして、合図があれば一斉にスイッチを入れる。
- ⑫ 20分間電気泳動を行う。

結果のまとめ

各自の結果の予想

実際の結果(班毎の写真を添付)

DNA マーカー	1	2	3	4
1000bp				
900bp				
800bp				
700bp				
600bp				
500bp				
400bp				
300bp				
200bp				
100bp				

考 察

1 各レーンの結果について、その理由を考えよ。

理由は、下記の文章の①か②を選び、その中の空所に適語を入れなさい。

理 由

① 反応液に（ 1 ）がないため、DNAが増幅されず、バンドが検出できなかった。

② 反応液に（ 1 ）があり、30回のサイクルを通してDNAは増幅されている。その増幅の過程は、

（ 1 ）がDNAの（ 2 ）側の鎖に結合し、（ 3 ）が働くことで新しいDNA鎖が合成された。

1回目のサイクルで1本の鋳型DNAから合成された新しい鎖は（ 4 ）本できる。2回目のサイクルでは、鋳型DNAは（ 5 ）本になっていると考えられる。したがって、n回目では、はじめの鋳型DNAの（ 6 ）倍のDNAが生じたことになるので、30回のサイクルを通してDNAは（ 7 ）倍に増幅されたと考えられた。この量はバンドを検出するのに（ 8 ）な量だったので、結果、バンドが（ 9 ）。

空所に入る語・・・1、3は反応液に含まれている物質を答えること

2は「両」あるいは「片」を答えること

4、5、6、7はそれぞれ数値を答えること

8は「十分」あるいは「不十分」を答えること

9は「検出された」あるいは「検出できなかった」を答えること

レーン	番	空所の語句				
1		1	2	3	4	5
		6	7	8	9	
2		1	2	3	4	5
		6	7	8	9	
3		1	2	3	4	5
		6	7	8	9	
4		1	2	3	4	5
		6	7	8	9	

- 2 課題2で求めた大きさのDNA断片は、PCRを通して、何回目のサイクルから生じ、30回目には、鋳型DNAが1本とした場合、何本のDNA断片が生じたと考えられるか。下記の回答欄に自由に記述して答えよ。

回答欄

回目のサイクル後に生じ、30回目では 本ある。

感想（自由記述）

資料4-1 (ワークシート)

生物実験ノート

Direct RT-PCR法による遺伝子発現を確かめる

暗所の芽生えはどのようにして茎を伸ばしているのか？

3年 9組 番氏名

目的：明所、暗所で育てた芽生えには、形態的な差が見られる。伸長の違いは、その一つである。この伸長にはジベレリンが関係していると考えられる。生育環境の違いによりジベレリン合成に差があるという仮説のもとに、ジベレリン合成遺伝子の発現の違いを調べる。

現象を捉えよう！！

明所・暗所の芽生えは、次のように育ちました。



明所では子葉は緑色で左右に開き、茎は短い

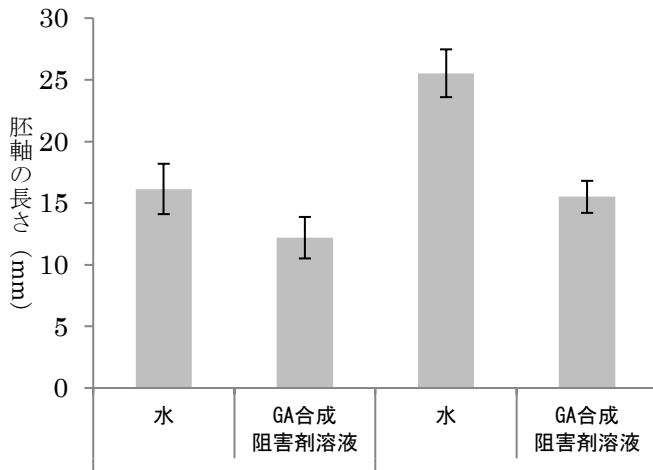


暗所では、子葉は黄色で開かず、茎は長い

胚軸の長さに差が生じる原因の手がかりを得るために、次のような実験をしました。

- (1) ホウレンソウの種子を1晩水につけ、発根させる。
- (2) 容器にバーミキュライトを入れ、水あるいはジベレリン合成阻害剤溶液を含ませる。
- (3) (2)に(1)を播く。これを2セット準備し、それぞれ明所と暗所に置き、4日間育てた。
- (4) 4日間育てた後、胚軸の長さを測定した。

実験の結果です。



この結果から分かること

水だけだと
(¹) 条件の方が茎が長くなる。

ジベレリン合成阻害剤があると茎の長さは
(²) くなっている。

茎が伸びるのは (³) が
必要だと分かる。

つまり、植物は光が当たらないと、それを感じて、(⁴) を合成している。
その結果、茎が (⁵) くなる。

では・・・

本当に植物は暗所でジベレリンを作っているのでしょうか？

植物ホルモンは植物の体の中に微量しか存在していません。そこで次の様に考えました。

ジベレリン $\xleftarrow{\text{必要なので}}$ ジベレリンを合成する酵素 (GA合成酵素) $\xleftarrow{\text{必要なので}}$ GA合成酵素の遺伝子

ジベレリンができたということは、GA合成酵素があるからで、その合成酵素を作る遺伝子が働いたからです。

遺伝子が発現して酵素 (タンパク質) ができるのは

GA合成酵素の遺伝子 (DNA) $\xrightarrow{\text{転写}}$ mRNA $\xrightarrow{\text{翻訳}}$ GA合成酵素 (タンパク質)

という流れによるものでした。

ということは、今、植物がジベレリンを作っているのなら、遺伝子が使われているはずで、使われているということは mRNA が作られているはずで、mRNA は常に分解されるので、必要な期間中に作られて続けています。

そこで今回の実験では、ジベレリンそのものを存否を調べる代わりに、mRNA の中にGA合成酵素のmRNAが存在するかを調べてみましょう。

実験全体の流れは、次の様なものです。

実験の流れ

- 植物試料 $\left\{ \begin{array}{l} \text{明所の芽生え} \\ \text{暗所の芽生え} \end{array} \right\}$ 凍結して後粉碎する **実験 1** \rightarrow 細胞内に存在する RNA を調べる。
- RNA は不安定なので存在している RNA を DNA に作り変える (逆転写反応 reverse transcription) **実験 2**
 - ※ ここでのポイント 粉碎片中に存在している DNA を DNA 分解酵素 (DNase) で分解する。
 - ※ ここでのポイント mRNA は末端がポリA鎖となっているので、ポリTをプライマーに用いて、細胞内に存在する mRNA から相補的な塩基配列を持つDNAを作る (逆転写)。
- このDNAに目的の遺伝子 (今回は GA3oxidase 遺伝子) が存在しているかどうかを調べる。調べる方法は、GA3oxidase に特異的なプライマーを用いて、PCR によって増幅させ **実験 3**、電気泳動で目的の遺伝子を確認する。**実験 4**
 - ※ ここで、常時発現されている遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) を同時に調べる。ハウスキーピング遺伝子の発現状況と比較することで、調べる遺伝子発現量の変化が分かるとともに実験の成否が確かめられる。

材 料：ホウレンソウの芽生え（明暗それぞれで播種後 7 日間生育させたもの）

準 備：

(a) RT 反応に関するもの

乳鉢・乳鉢・コールドスプレー（成分：液化石油ガス、イソペンタン）・RT 反応キット(PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA))・遠心器

(b) PCR 反応

(a)で作成した cDNA・プライマー2種 (GA3ox 用、Tubllin 用)・PCR 緩衝液・dNTPs・DNA ポリメラーゼ・滅菌水

(c) 電気泳動に関するもの

DNA ラダー (100bp 用)・1.5%アガロースゲル・泳動用緩衝液・遠心器・染色液 (シブリ Green)

方 法：

実験 1 <<試料の粉碎>>

- (1) 明所、暗所で育った芽生えを土を付けない 10 本程度切り取る。
- (2) ペーパータオルの上に置き、ペーパータオルで挟み水気を取る。
- (3) 冷凍庫で冷やした乳鉢の中に入れ、コールドスプレーを 20cm 程離れたところから 10 秒程かける。
(注)近すぎると中に入っている試料が吹き飛んでしまう。
- (4) 凍った状態になると素早く、乳棒で粉碎する。
- (5) 粉碎片 0.1g を 1.5mL チューブに入れる。

実験 2 <<逆転写反応>>

- (1) 実験 1 (5) に RNase フリー水 (RNA 分解酵素を全く含まない純水) 200 μ を加えて、よく混ぜる。
- (2) DNase を 2 μ L に対して DNase 反応緩衝液を 20 μ L 加えた混合液を (1) に加えて、37°C で 10 分間反応させた後、75°C で 10 分間置いて、酵素を失活させる。
(注:PCR 反応では少量でも DNA があると増幅されるので、この段階で DNA を取り除き、逆転写によってできた DNA だけにするためにこの作業を行ないます)
- (3) 1,000G で 5 分間遠心し、上澄み液を 6 μ L 用いる
- (4) 逆転写反応キット (PrimeScript®II 1st strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA)) を用い DNA を作る。
 - ① 上澄み液を 6 μ L に Oligo dT primer 1 μ L と dNTP mixture 3 μ L を加えよく混合して 65°C で 5 分間インキュベートしたのち氷上で急冷する。
 - ② ①のマイクロチューブに、Buffer 4 μ L, RNase Inhibiter 0.5 μ L, RTase 1 μ L, および RNase free 水 4.5 μ L を混合して、42°C で 20 分 そして 95°C で 5 分 その後、氷上で冷却をおこなう。
 - ③ 以上の反応でポリ A 鎖を持った RNA から DNA が逆転写される。

試薬	番号	容量
上澄み液		6 μ L
Oligo dT primer	5	1 μ L
dNTP mixture	4	3 μ L

→
65°C 5分
氷冷

試薬	番号	容量
以下を追加		
Buffer	2	4 μ L
RNase Inhibiter	3	0.5 μ L
RTase	1	1 μ L
RNase free 水	7	4.5 μ L

実験 p 3 ≪PCR 反応≫

- (1) 実験 2 (4)③で作成した DNA を材料とする。明条件 DNA、暗条件 DNA それぞれ準備する。
- (2) 下の表に合うように PCR チューブに入れる。

チューブ番号	1	2	3	4
明条件 DNA	0.5 μ L	0.5 μ L	—	—
暗条件 DNA	—	—	0.5 μ L	0.5 μ L
ポリメラーゼ mix [※]	3.5 μ L	3.5 μ L	3.5 μ L	3.5 μ L
PCR 緩衝液	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
GA3ox 用プライマー (フォワード)	0.5 μ L		0.5 μ L	
GA3ox 用プライマープライマー (リバース)	0.5 μ L		0.5 μ L	
Tub 用プライマー (フォワード)		0.5 μ L		0.5 μ L
Tub 用プライマープライマー (リバース)		0.5 μ L		0.5 μ L

※。ポリメラーゼ mix は、DNAポリメラーゼと dNTPs との混合溶液である。

※GA3ox 用プライマーは、ジベレリン 3 酸化酵素遺伝子を特異的に増幅する。

※Tub 用プライマーは、常時発現している細胞骨格のチューブリンの遺伝子を特異的に増幅する。

- (3) PCR チューブをサイマルサイクラーにセットする。以下のサイクルを 30 回行う。

サイマルサイクラーは以下の温度設定がしてある

98℃ 10秒 → 58℃ 30秒 → 68℃ 30秒

以上を 30 サイクル 終了後 4℃で保管

実験 4 ≪電気泳動≫

- (1) PCR の完了後、チューブに DNA 染色液であるミドリ Green を 1 μ L ずつ入れる。すべてのチューブに入れ終わったら、遠心器を用いて混合液を底に集める。
- (2) 電気泳動槽内のアガロースゲルに窪み (ウェル) が 8 つ空いているのを確認する。ウェルを上置き、左からレーン 1、2、・・・ 8 と呼ぶ。
- (3) レーン 1 は空けておく。
- (4) (1)の番号 1 のチューブの内容物を、マイクロピペットで 7 μ L はかり取る。その時数回液を吸ったり吐いたりとして繰り返した後、レーン 2 のウェルに 7 μ L 流し込む。
注：流し込む時には、ゲルにチップの先を差し込まないように注意する。
- (5) (4)の作業を、番号 4 のチューブまで、繰り返し行なう。番号 2 はレーン 3 へとレーンをひとつずつずらして入れる。
- (6) レーン 1 には、マーカー DNA 溶液を流し込む。この溶液は分子量の異なる DNA の混合物で試料中の DNA の大きさを測る目安となる。
- (6) 泳動槽の電源を入れる準備をして、合図にあわせてスイッチを入れる。
- (7) 20 分間電気泳動を行う。

実験の結果

電気泳動像の写真を貼る

実験の結果から分かること

- ◇ 泳動像のバンドを比較すると(1)の芽生えは、(2)遺伝子のバンドが見つかる。
- ◇ チュープリンの遺伝子は、明所、暗所の芽生えで同じようなバンドが見えているので、遺伝子の発現は明所・暗所の植物において通常に行なわ(3)と考えられる。
- ◇ ハウスキーピング遺伝子が通常に発現している状態で、(1)の芽生えで、(2)遺伝子のバンドが強く現れたということは、(1)の芽生えで、より多くの(2)遺伝子が発現していたことを示している。
- ◇ したがって、(1)の芽生えは、(2)遺伝子を多く発現しているので、その体にたくさんの(4)を持っていると考えられる。(1)の芽生えの茎が(5)いのは、この(4)の影響であると考えられる。
- ◇ 生き物は、環境に応じて必要な(6)を発現させ、これによって必要な(7)を生産している。植物の場合は、この(7)が植物ホルモンの場合、その影響で形態が変化する。

