

過酸化水素から発生するヒドロキシル ラジカルの活性を可視化した理科実験 教材開発とその教育効果

武田晃治[†]・和田 薫^{**}・砺波雄介^{***}・岡本真実子^{****}・佐藤純一^{*****}・新村洋一^{*****}

(平成 28 年 2 月 18 日受付/平成 28 年 6 月 10 日受理)

要約：本研究は、酵素の単元で学習した過酸化水素分解反応に関わる酵素の存在意義について、進化的側面からその重要性について再考察させることを目的とした。そして、本研究教材をバイオテクノロジーの探究活動として位置づけ、酵素とバイオテクノロジーの単元で学習する知識と実験技術を融合した発展的教材として、過酸化水素と 2 価鉄から生じる最も酸化力の高いヒドロキシルラジカルの DNA に対する酸化力の強さを可視化するための最適実験条件を電気泳動法により明らかにした。また、中学・高校生を対象とした教育実践から、本教材の教育効果の検証および高等学校生物への発展的導入について考察を行った。

教育実践の事前・事後アンケートの比較の結果、本教材は、酸素を利用する生物にとって過酸化水素の無毒な水への分解反応が、いかに生物学的に重要な反応であるかを生徒に気付かせることに有効であることが明らかとなった。そして、過酸化水素分解反応が、エネルギー生産に酸素を利用する生物が進化の過程で獲得した過酸化水素の毒性に対する防御機構として重要な反応であることを、進化的側面と結び付けて理解させる効果的な教材であることが明らかとなった。よって、高等学校生物への発展的教材として、今後の導入が期待された。

キーワード：理科実験教材、活性酸素、過酸化水素、酵素、バイオテクノロジー

1. はじめに

教科書に示されている実験の多くは、学習内容に関係した生命現象の一面のみを強調して計画されているが、多面的に生命現象を理解することが必要である。その一つの方法として、生命現象の理解に進化的視点を取り入れていくことが望まれる。高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の(5)生物の進化と系統 ア(ア)生命の起源と生物の変遷において、生命の誕生とその後の生物進化を環境条件の変化と関連付けて扱うことが記載されている。原始地球では、シアノバクテリアによる酸素発生が、地球の大気組成を大きく変貌させ、生物進化に大きな影響を与えた。地球上の歴史で酸素の出現と酸素を利用した呼吸によるエネルギー産生システムの獲得は革新的なものであった。原始の生命にとって酸素は“猛毒”として作用し、酸素のない条件下で生きていた多くの生物は大絶滅したと考えられている。この酸素が、呼吸をする現在の生物においても過酸化水素などに形を変えた活性酸素となり、“毒”として作

用していることは、意外と認識されていない。酸素を呼吸や代謝などでエネルギー産生に利用するためには、その過程で酸素から生じる活性酸素〔(一重項酸素($^1\text{O}_2$), スーパーオキシドアニオン($\cdot\text{O}_2^-$), 過酸化水素(H_2O_2), ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)]に対する毒性から身を守らねばならない。中でも、過酸化水素と 2 価鉄(Fe^{2+})とのフェントン反応($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$)から生じるヒドロキシルラジカルは、最も細胞毒性が高いと考えられており、その発生源となる過酸化水素の分解は非常に重要である。そのため、高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の「生物基礎」や「生物」で扱われる生命現象を支えるタンパク質の働きについて、多くの教科書に掲載されているカタラーゼによる過酸化水素分解反応の獲得は、生命進化に大きな影響を与えた事象である。しかしながら、教科書には過酸化水素分解反応と進化的視点を絡めた記載がない。過酸化水素分解反応の生物学的重要性についてより深い理解を生徒に得させるために、シアノバクテリアによる酸素発生により、①生物が酸素に適応しながら酸素をエ

* 東京農業大学教職課程

** 八王子市立由井中学校

*** 浜松市立神久呂中学校

**** 内野株式会社

***** 株式会社リガク

***** 東京農業大学バイオサイエンス学科

[†] Corresponding author (E-mail: k2takeda@nodai.ac.jp)

エネルギー産生システムに利用してきた進化の視点、②酸素から生じる過酸化水素の分解反応の獲得が生物進化に大きな影響を与えた重要性についての解説、③過酸化水素の生体毒性を理解するための教材化が必要であると考えた。

そこで、DNA、酵素、呼吸、バイオテクノロジーで学習した知識と実験技術を融合した「過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルの生体成分に対する毒性」を視覚的に見せ、エネルギー生産に酸素を利用する生物が進化的に獲得した過酸化水素分解反応の生物学的重要性について学習することのできる発展的教材の開発を行うこととした。

従来の実験及び教材については、進化の過程で様々な生物に保存されている DNA に関する学校現場での実験として、中学校 3 年生の教科書²⁻⁶⁾において、ブロッコリーやバナナの実からの抽出実験や抽出された DNA 写真が記載されている。また、東京書籍、啓林館、実教出版の生物基礎には、ブロッコリーやヒトからの DNA 抽出⁷⁻⁹⁾が掲載されている。馬場らにより DNA 抽出実験の再検討がなされ、中学校で簡便法による DNA 抽出実験を限られた授業時間内 (50 分) で実施するには、ブロッコリーが適しているとの報告や実験により得られた沈殿物が DNA であることを確認するためのジフェニルアミン法を再提案している¹⁰⁾。ジフェニルアミン法は森屋らにより高校でも使用可能であるとすでに報告されている¹¹⁾。このように、遺伝子の本体が DNA であることを学習するための DNA 抽出を扱った実験が、多くの教科書、教材研究報告、実験書に掲載されている。

高等学校で生物を履修する生徒は、高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の(1)生命現象と物質 ウ(ウ)バイオテクノロジーにおいて、遺伝子を扱った技術についてその原理と有用性について学習している。「生物」の教科書においては、遺伝子を扱った技術の中で、ある特定の DNA 配列を切断する制限酵素、バクテリオファージ、電気泳動法について学習しており、啓林館や第一学習社の生物の教科書^{12,13)}に DNA の切断と電気泳動に関する実験として掲載され、インターネット上でも様々な制限酵素を用いた実験の教育実践例¹⁴⁾が紹介されている。バイオテクノロジーの単元で学ぶ DNA の切断と電気泳動による実験は、制限酵素によるある特定の配列に作用させた全塩基配列既知の DNA 切断のため、出てくるバンドの位置も予測でき、遺伝子を扱った実験技術の原理について学習することを目的としている。

一方、タンパク質が酵素として働くなどして生命現象を支えていることについて、高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の「生物基礎」(1)生物と遺伝子 ア 生物の特徴 (イ)細胞とエネルギーや (1)生物と遺伝子 イ 遺伝子とその働き (ウ)遺伝情報とタンパク質の合成で取り扱われている。また、高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の「生物」(1)生命現象と物質 ア 細胞と分子 (イ)生命現象とタンパク質における生命現象を支えるタンパク質の働きについて、高等学校「生物」の教科書における酵素の働きや特徴を調べる実験として、肝臓片に含まれるカタラーゼによる過酸化水素分解実験が掲載されている^{12,15,16)}。

しかし、基質となる過酸化水素がどのように生成し、過酸化水素の分解が生物の酸素適応のために進化の過程で獲得した重要な反応であることについて明記されていないことから、生徒は過酸化水素分解酵素の性質や特異性のみを学び、その存在意義を理解することは難しいと推察された。

過酸化水素を用いた実験として化学分野では、中学校 1 年で行う過酸化水素と二酸化マンガンとの反応による酸素発生⁶⁾、様々な酸素発生法の実験¹⁷⁻²⁰⁾、過酸化水素分解反応における触媒に関する実験²¹⁾、反応速度に関する実験法^{22,23)}などが知られている。生物分野においては、酵素の特徴を理解するための高校生物の教科書に掲載されているカタラーゼによる過酸化水素分解実験^{12,15,16)}の他、シャボン玉液のバブルを用いた酵素実験²⁴⁾などが知られている。上述した実験教材は、酸素発生に着目した教材であり、本研究テーマである生物学的になぜ過酸化水素分解反応が必要なのかに着目した教材研究の実践報告は見当たらない。

そこで本研究では、DNA および過酸化水素と 2 価鉄から生じるヒドロキシルラジカルとの反応から、電気泳動法により DNA バンドの消失を観察することで、過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルの生体毒性を知り、過酸化水素分解反応の生物学的重要性に気づくことのできる発展的教材の開発を行った。また、本研究で開発した実験教材の教育効果を確認するため、過酸化水素と 2 価鉄から生じるヒドロキシルラジカルによる DNA 分解反応の最適条件を用いて、中高校生を対象に講義と実験を行い、事前と事後のアンケート調査から過酸化水素の生成過程や進化的に獲得した過酸化水素分解反応の存在意義についての理解度や教育効果についての検証を行った。そして、教育効果の検証から、高等学校「生物」への発展教材としての導入の可能性について考察を行った。

2. 実験教材開発のための趣旨・実験方法・実験条件の検討および工夫

(1) 教材開発の趣旨

従来、電気泳動法による DNA バンドの解析から生命現象やその反応の意義を問う教材研究はなされてこなかった。そこで本研究は、電気泳動法を利用して、過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルとの反応物としてバクテリオファージ DNA (ϕ X174) を用い、高等学校で実施可能な教材作成を目指した。

バイオテクノロジーの単元で学ぶ DNA の切断と電気泳動による実験は、制限酵素によるある特定の配列に作用させた全塩基配列既知の DNA 切断のため、出てくるバンドの位置も予測でき、遺伝子を扱った技術の原理について学習することを目的としている。一方、ヒドロキシルラジカルは、反応性が非常に高く DNA の特定配列に関係なく無作為に反応し、DNA の塩基にヒドロキシル基の付加や水素の引き抜きにより、塩基対が壊れて切断が起こるため、制限酵素による切断反応の原理とは全く異なる。

ヒドロキシルラジカルの生体成分に対する研究は、過酸化水素と 2 価鉄との反応により生じるヒドロキシルラジカルとの反応物として、生体高分子である DNA との反応²⁵⁻²⁸⁾

や納豆のネバネバ成分として知られるポリ- γ -グルタミン酸との解重合反応²⁹⁾の報告がある。

本実験系は、アルゴンガスで嫌気置換した溶液を用いた TAKEDA らや SATO らのヒドロキシルラジカルによる DNA 分解の実験条件^{27,28)}の改良を行い、学校での実施を考慮し、溶液の嫌気処理を行わずに、好気条件で DNA 分解が観察できるような 2 価鉄と過酸化水素濃度の濃度比の最適条件の検討から、実験教材としての最適化を行った。

さらに、生徒実験では、最適条件下における反応系にカタラーゼを加えることで、フェントン反応の要因である過酸化水素を分解し、DNA 分解を抑制することができることを可視化した実験にすることで、過酸化水素の存在意義に気付かせる教材作成を目指した。

(2) 実験材料、試薬調製および DNA バンドの検出法

a) 実験材料

実験には、超純水 (Millipore), 6mM EDTA (pH8.0) (Wako: 特級), DNA (ϕ X174) (TaKaRa), 3mM 塩化鉄 (II)・四水和物 (Wako: 特級), 108mM 過酸化水素 (0.33%) (Wako: 特級), ウシ肝臓由来カタラーゼ (Wako: 生化学用), ミドリグリーン Direct (日本ジェネティクス), 50 x TAE (2M Tris-acetate, 50mM EDTA) (ニッポンジーン), アガロース (ニッポンジーン: 遺伝子工学用), エッペンドルフ型チューブ (容量 1.5ml) (GBO), 黄色チップ (QSP), NEXTY-20 マイクロピペット (WATSON), Force MiniTM SBC-140 ミニ遠心機 (ビーエム機器), DNA 電気泳動槽 (Wako), LED トランスイルミネーターゲルみえーる (Wako), リアルタイムバンドみえーる (Wako), デジタルカメラ (ペンタックス WG-II) を用いた。

b) 試薬調製

3mM 塩化鉄 (II) (Fe^{2+}) の調製は、塩化鉄 (II)・四水和物 1.00g を電子天秤で測り、超純水 10ml に溶解して 500mM の溶液を作成し、そこから 6 μ l を 994 μ l の水に加え計 1,000 μ l とした。塩化鉄 (II) は、水に溶解後、時間が経つと水酸化鉄として沈殿しやすいので、あらかじめ塩化鉄 (II) を量りとおき、生徒が実験中、2 価鉄を使用する前に水に溶解してすぐに配布できるように希釈用の水や分注用のエッペンドルフ型チューブ (容量 1.5ml) をあらかじめ準備した。

6mM EDTA 溶液の調製は、500mM EDTA 溶液 12 μ l を 988 μ l の水に加え計 1ml とした。108mM (0.33%) 過酸化水素の調製は、エッペンドルフ型チューブ (容量 1.5ml) に超純水 989 μ l と過酸化水素の原液 (30%) 11 μ l を加え、よく攪拌した。そこから 60 μ l を 940 μ l の水に加え計 1,000 μ l とした (終濃度 6.5mM)。生徒実験用のカタラーゼ溶液の調製は、カタラーゼ 1mg を 1ml の超純水に溶解した (13,000 U/mg)。

0.8% アガロースゲルの調製は、アガロース 0.8g に対し、100ml の 1 x TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) を加え、突沸に注意しながら電子レンジ加熱して溶解させた。溶解後よく攪拌した液体を、ゲル作成トレイに流し込み、サンプルコウムを刺して固めた。

c) 反応溶液の調製

反応溶液 (計 20 μ l) は、超純水, EDTA, DNA (ϕ X174) 0.1 μ g (原液 0.5 μ g/ μ l を 10 倍希釈), 過酸化水素, (カタラーゼ: 生徒実験), Fe^{2+} の順に加え、添加ごとにスピンドウンを行いながら、各溶液を混ぜ合わせた。すべてを加えた後、5 分間、手で握り保温した。EDTA は、鉄の沈殿防止のために鉄の濃度に対して 2 倍の濃度を加え、さらに過酸化水素も同様に鉄濃度に対し約 2 倍の割合で加えて実験を行った。なお、本実験系を行う際は、過酸化水素の取り扱いと同様に、ヒドロキシルラジカルを発生する溶液が直接手につくことを防ぐために手袋を着用した。

d) DNA 電気泳動および DNA バンドの検出

DNA (ϕ X174) サンプルのみ, DNA に過酸化水素のみを加えたもの, DNA に Fe^{2+} のみを加えたもの, DNA に過酸化水素と Fe^{2+} の両方を加えたそれぞれの反応溶液を各レーンに打ち込み、アガロースゲル電気泳動法により分離した。リン酸基を持つ DNA はマイナスの電荷を帯びているため、電流を流すことによりプラスの方向に移動する。寒天ゲルの網目状の中に DNA が通ると、DNA の構造の違いにより移動度が変化する。DNA はヒドロキシルラジカルと反応することで、段階的に DNA が切断される (閉環状 (A) \rightarrow 開環状 (B) \rightarrow 直線状 (C) \rightarrow 切断状 (D) \rightarrow 断片状 (E))。その結果、DNA のバンドの位置から DNA の構造がどのように変化したかが推定できる (図 1)。

1 x TAE で作成した 0.8% アガロースゲルを、1 x TAE の入った電気泳動槽にセットした。反応溶液 (20 μ l) に 1 μ l のミドリグリーン Direct を添加し、混ぜ合わせた後、スピンドウンを行い、19 μ l のサンプルをアガロースゲルのウェルに添加した後、100V で 30 分間電気泳動を行った。

DNA (ϕ X174) サンプルのみ, DNA に過酸化水素のみを加えたもの, DNA に Fe^{2+} のみを加えたもの, DNA に過酸化水素と Fe^{2+} の両方を加えた 4 つのそれぞれの反応溶液の各 DNA バンドの検出は、泳動後のゲルを LED トランスイルミネーターゲルみえーる (Wako) にのせ、暗条件で LED による照射を行い、DNA バンドの確認、写

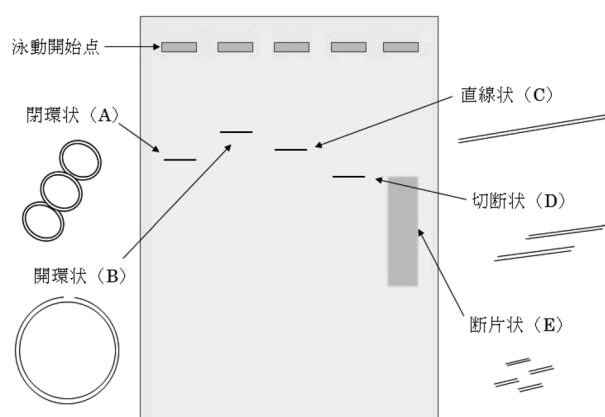


図 1 DNA 電気泳動イメージ図

DNA とヒドロキシルラジカルによる反応産物の構造と DNA バンドの位置のイメージ図。閉環状 (A), 開環状 (B), 直線状 (C), 切断状 (D), 断片状 (E)。

真撮影を行った。生徒実験においては4つの条件として、①DNA (ϕ X174) サンプルのみ (対象実験)、②DNA に過酸化水素のみを加えたもの、③DNA に過酸化水素と Fe^{2+} の両方を加えたもの、④DNA に過酸化水素と Fe^{2+} の両方を加えた条件で、最後に Fe^{2+} を加える前にあらかじめカタラーゼを加えておいたものとした。それぞれの反応溶液の各 DNA バンドの検出は、泳動槽の蓋の代わりに、リアルタイムバンドみえーる (Wako) を載せ、スイッチを入れて LED 照射することで継続的にバンドの確認を行い、スマートフォンに付属されるカメラで撮影を行った。

(3) 2価鉄と過酸化水素を用いた DNA 分解実験の最適化条件と生徒用実験条件の検討

a) 方法

ヒドロキシルラジカルは、2価鉄 (Fe^{2+}) と過酸化水素との反応により生じるため、それら最適濃度の検討を Fe^{2+} と過酸化水素濃度を変化させた3つの条件 (条件 I : Fe^{2+} 0.3mM, 過酸化水素 0.65mM, 条件 II : Fe^{2+} 0.6 mM, 過酸化水素 1.3mM, 条件 III : Fe^{2+} 0.9mM, 過酸化水素 1.9mM) で行った。実験条件それぞれのコントロールとして、DNA (ϕ X174) サンプルのみをレーン①、⑤、⑨とした。レーン②、⑥、⑩は、それぞれ DNA に過酸化水素のみを加えた。レーン③、⑦、⑪は、それぞれ DNA に Fe^{2+} のみを加えた。レーン④、⑧、⑫は、それぞれ DNA に過酸化水素と Fe^{2+} の両方を加えた (図2)。

生徒用実験は、図2の条件II (0.6mM Fe^{2+} と 1.3mM 過酸化水素) で行った。本来の実験条件としては図2に示した DNA に Fe^{2+} のみを加えたものも行うべきであるが、DNA のみ (レーン①)、DNA と過酸化水素のみ (レーン②)、DNA と過酸化水素と Fe^{2+} (レーン③)、レーン③の条件で Fe^{2+} を加える前にあらかじめカタラーゼを加えて

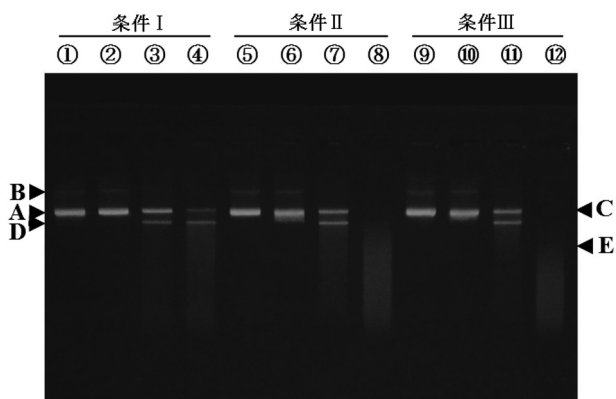


図2 鉄と過酸化水素の最適濃度の条件検討
2価鉄 (Fe^{2+}) と過酸化水素濃度を変化させた3つの条件 (条件 I : Fe^{2+} 0.3mM, 過酸化水素 0.65mM, 条件 II : Fe^{2+} 0.6 mM, 過酸化水素 1.3mM, 条件 III : Fe^{2+} 0.9mM, 過酸化水素 1.9mM) で実験を行った。それぞれのコントロールとして、DNA (ϕ X174) サンプルのみを①、⑤、⑨、DNA に過酸化水素のみ添加したものを②、⑥、⑩、DNA に Fe^{2+} のみ添加したものを③、⑦、⑪、DNA に過酸化水素と Fe^{2+} 両方添加したものを④、⑧、⑫とした。A : 閉環状, B : 開環状, C : 直線状, D : 切断状, E : 断片状。

おいたもの (レーン④) に絞って実験を行うことで、過酸化水素とヒドロキシルラジカルの DNA に対する反応性の違いやカタラーゼによる過酸化水素分解反応の重要性について理解しやすくなると考え、4つの条件とした (図3)。

b) 結果と考察

過酸化水素のみ存在下 (レーン②、⑥、⑩) では、コントロール (レーン①、⑤、⑨) のバンドの位置 (A) とほぼ同様であったことから、電気泳動による DNA のバンドからは過酸化水素による影響を受けていないことが図2から推察された。

Fe^{2+} のみ存在下 (レーン③、⑦、⑪) では、コントロールに比べ、 Fe^{2+} 濃度が高くなるにつれ、バンドが若干薄くなっていくことが観察された。金松ら (2014) の研究²⁹⁾ により、 Fe^{2+} のみでタンパク質を分解する本実験と似たような現象が報告されている。このことから、 Fe^{2+} が溶液中の酸素と反応し ($2[\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}] + 2\text{O}_2 \rightarrow 2[\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}] + 2\text{O}_2^-$)、生じたスーパーオキシド (O_2^-) から過酸化水素が生成し ($\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ or $2[\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}] + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2[\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}] + \text{H}_2\text{O}_2$)、その過酸化水素と2価鉄が反応することで生じたヒドロキシルラジカル ($\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-EDTA} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) が DNA と反応したため直線状 (C) や切断状 (D) を示す位置にバンドが観察されたように DNA が部分的に切断されたと推察された (図2)。実験に用いた DNA の購入時期や保存状態により、開環状の位置 (B) にバンドが現れる場合もあった (データ未掲載)。

過酸化水素と Fe^{2+} 存在下 (レーン④、⑧、⑫) では、鉄と過酸化水素の濃度が高くなるにつれ、DNA のバンドが

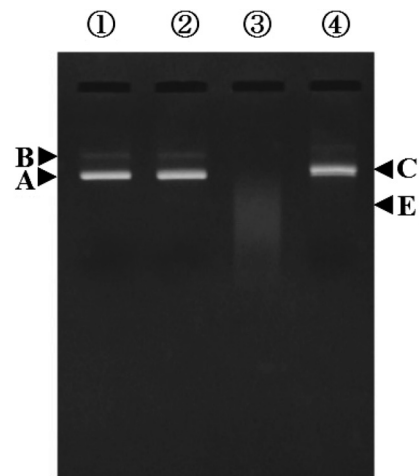


図3 生徒実験用電気泳動写真

最適条件として、0.6mM Fe^{2+} と 1.3mM 過酸化水素で実験を行った。コントロールとして DNA (ϕ X174) のみをレーン①、DNA に過酸化水素のみ添加したものをレーン②、DNA に過酸化水素と Fe^{2+} 両方添加したものをレーン③、レーン③と同条件で Fe^{2+} を加える前にあらかじめカタラーゼを加えておいたものをレーン④とした。ミドリグリーンダイレクトを 2 μ l 加え、それぞれの反応溶液を 20 μ l アプラインして 15 分間電気泳動を行い、スマートフォンに付属したカメラで撮影した。A : 閉環状, B : 開環状, C : 直線状, E : 断片状。

消失し、低分子化された DNA が断片状 (E) となりスミア状に観察された。これは、フェントン反応により生じたヒドロキシルラジカルが、DNA と反応することで分子量の小さな DNA に分解されてしまったためと考えられた。写真の感度を上げることで、スミアバンドを明瞭に撮影することができるが、肉眼ではスミアバンドはうっすらと観察され、コントロールの位置 (A) でのバンドはほとんど確認できなかった。

実験条件Ⅲのレーン⑩(過酸化水素と Fe^{2+} 存在下)では、DNA が他の条件に比べきれいに分解されていたが、 Fe^{2+} のみ存在下においても濃度が高くなるにつれ DNA が分解される傾向が観察された。そのため、DNA 分解反応を観察する実験条件としては、実験条件Ⅱが最適であると判断し、本条件を授業における生徒用実験とした。

生徒用実験における実験は図 2 の結果同様に、レーン①から③までは再現性のある結果が得られた (図 3)。②と③の比較により、過酸化水素よりも過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルの方が細胞毒性の強いことを明確にすることができた。レーン④は、 Fe^{2+} を加える前にカタラーゼをあらかじめ入れておくことにより、過酸化水素が分解され、レーン③のように消えるべきバンドが明瞭に観察された。このことから、生徒は、カタラーゼが過酸化水素を分解することで、ヒドロキシルラジカルの発生を防いだと考察できる。しかしながら、コントロールの位置よりも若干上にバンド (C: 直線状) が観察された。これは図 2 でも観察されたように Fe^{2+} が溶存酸素と反応することで生じたヒドロキシルラジカルが、DNA を切断したためと推察される。生徒実験用の実験条件には、DNA と Fe^{2+} との反応は入っていないため、気になる学生には図 2 で示した考察を話す程度とし、着眼すべき点として、本来 DNA バンドが消失する条件にも関わらず、カタラーゼによる過酸化水素分解反応によりヒドロキシルラジカルの発生が防がれたため、DNA バンドが消失せずに観察ができたということを認識させることが望まれる。なお、実験に用いた DNA の購入時期や保存状態により、電気泳動時間が 15 分以上になると、コントロールのバンド (B: 閉環状) より下の位置にもバンドが観察される場合もあった。閉環状の位置よりも下に観察されたことから、分解産物の混入と推察された (データ未掲載)。

(4) 本実験系の開発における工夫

本実験系の開発は、学校で行う際に用いる試薬の安全性や実施時間を考慮して行った。一般に DNA の染色には、エチジウムブロマイドがよく使用される。この試薬は検出感度が高いため、微量の DNA を検出するには適しているが、発がん性物質としても知られている。また、一般に電気泳動したゲルの染色時間が 30 分ほどかかることや、紫外線照射によりバンドを検出することから、安全性や廃液処理の面から学校での授業にエチジウムブロマイドを用いることは難しいと考えた。

そこで、染色不要の DNA 蛍光染色試薬であるミドリグリーン Direct (日本ジェネティクス) を用い、DNA を含

む反応溶液と混ぜ合わせてからすぐに電気泳動を行い、DNA の検出方法としては、ゲルに LED を照射することで、安全性と廃液面に考慮して最適実験条件の検討を行った。その結果、図 2 に示した実験は、50 分の授業内で反応から電気泳動、DNA バンドの検出までを行うことが可能となった。また、本実験条件検討での泳動時間は、30 分で行ったが、リアルタイムバンドみえー (Wako) を用いることで、10 分でもバンドの確認が可能であることを確認した。そのため授業時間内の進み具合により、泳動時間を短くすることで、授業時間内の進み具合により実験の時間配分を調整することも可能となる。また、ゲルをゲルみえー (Wako) のような LED 照射装置に移さなくても、リアルタイムバンドみえー (Wako) を用いることで、デジタルカメラやスマートフォンに付属しているカメラによる継時的な写真撮影が可能となった。

3. 授業実践

(1) 本実験系のカリキュラムの位置付けと学校での活用を考慮した授業

本実験系は、高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の「生物基礎」や「生物」の生命現象を支えるタンパク質の働きで扱われ、多くの高等学校「生物」の教科書に掲載される「カタラーゼによる過酸化水素分解反応」の重要性について進化的視点を絡めて再考察する発展的教材として開発を行った。本研究は、DNA、酵素、呼吸、バイオテクノロジーで学習した知識と実験技術を扱うため、高等学校生物のカリキュラム上、高等学校学習指導要領解説理科編理数編¹⁾の (1) 生命現象と物質 ウ (ウ) バイオテクノロジーの探究活動 (最終特別実験) が、最も効果的な位置付けであると考えられる。バイオテクノロジーの単元で学習した知識や実験技術を活用し、前章のカタラーゼの存在意義について振り返りことができ、余計なカリキュラムや授業時数変更もなく、実施が可能であると考えた。そして、実際に開発した教材の教育効果を検証するため、中高生を対象に授業実践を行った。実験を行う前の事前指導として、地球における酸素の出現と生物進化について、酸素を利用する生物がいかにして酸素や呼吸や代謝の過程で生じる活性酸素に対する毒性に適応してきたのかを進化の観点から解説した。その中でも、一般に過酸化水素分解反応の実験は、酸素発生に着目されがちであるが、反応の生物学的な意義を考えると、生じた酸素は過酸化水素の原料である酸素に戻るだけで、もう一つの生成物である無毒な水の生成こそが本反応の重要な意味を持つことを講義の中で強調した。そして、進化の視点から過酸化水素分解反応の生物学的重要性を理解させた後、過酸化水素の毒性を可視化する実験の手順や諸注意を行った。また、過酸化水素と 2 価鉄から生じる活性酸素 (ヒドロキシルラジカル) と DNA との反応から、DNA の構造がヒドロキシルラジカルによりどのように変化し、電気泳動によりそれぞれの DNA 構造がどの位置にでるのかについて (図 1) イメージを持たせてから実験を行った。本実験では、過酸化水素分解酵素としてカタラーゼを用いたが、実際に学校現場で過酸化水素

分解実験に用いることのできる試料、例えばカタラーゼを含む肝臓片や野菜などの抽出液を用いることで、事前に行った過酸化水素分解実験との結びつきを持たせることも可能になると考えられる。

実験後にまとめとなる解説を行い、事後アンケートにより理解度や興味関心に関する教育効果の検証を行った。

(2) アンケート調査からみた高校生物への導入の可能性と効果

アンケートは、中高一貫校の生物部でカタラーゼの研究

をしている中学生3名と21名の高校生(高1:9名, 高2:8名, 高3:4名)に対して実施し、回答を得た。アンケートの回答方式は、YesかNoの2択とし、授業実践で行った事前・事後アンケートの項目と結果は、それぞれ表1A, 1Bに記載した。初めに、過酸化水素分解反応に関する知識や理解度を問う事前アンケートを行い、過酸化水素、DNA、酵素やタンパク質に関する知識、実験経験、生命現象への知識・理解に関する調査を行った(表1A)。講義と実験後に事後アンケートとして、本講義を通じた授業・実験・教育効果に関する調査を行った(表1B)。

表1 授業実践で行った事前・事後アンケートの項目および回答結果

A		事前アンケート (N=24)	Yes (%)	No (%)
1		過酸化水素(オキシドール)を知っていますか。	100	0
2		過酸化水素(オキシドール)を使ったこと(実験を含めて)がありますか。	83	4
3		過酸化水素(オキシドール)の働きを知っていますか。	54	46
4		活性酸素を知っていますか。	67	33
5		活性酸素の働きを知っていますか。	17	83
6		過酸化水素(オキシドール)が活性酸素の一種だということを知っていますか。	25	75
7		酵素の性質や働きを知っていますか。	92	8
8		酵素の性質や働きを調べる実験をしたことがありますか。	71	29
9		ヘモグロビンを知っていますか。	100	0
10		ヘモグロビンが鉄とタンパク質からできていることを知っていますか。	54	46
11		体の中で様々な種類の金属が働いていることを知っていますか。	58	42
12		DNAを知っていますか。	100	0
13		DNAについて性質や役割を知っていますか。	79	21
14		DNAを観察したことがありますか。	58	42
15		DNAがどんな物質か知っていますか。	54	46
16		過酸化水素を用いたカタラーゼ(酵素)の働きを調べる実験をしたことはありますか。	71	29
17		DNAを扱った実験をしたことはありますか。	54	46
18		DNAのバンドを観察する実験をしたことはありますか。	25	75
19		生物に酵素反応がなぜ必要か、意味を考えたことがありますか。	33	67
20		酸素の出現が生命進化にどんな影響をあたえたか知っていますか。	42	58
B		事後アンケート (N=24)	Yes (%)	No (%)
21		授業より、過酸化水素がどのような物質か理解できましたか。	96	4
22		授業より、過酸化水素が細胞の中で生じる仕組みを理解できましたか。	96	4
23		授業より、過酸化水素と2価鉄(Fe ²⁺)からヒドロキシルラジカルという活性酸素が生じることを理解できましたか。	100	0
24		授業より、活性酸素(ヒドロキシルラジカル)によるDNAの断片化の仕組みを理解できましたか。	96	4
25		授業より、過酸化水素の水への分解の仕組みを理解できましたか。	100	0
26		授業より、過酸化水素の分解が生命にとって必要な理由が理解できましたか。	100	0
27		授業より、生物にとっての酸素出現時の重要性を理解できましたか。	92	8
28		全体として授業の説明は分かりやすかったですか。	100	0
29		実験手順の説明は分かりやすかったですか。	100	0
30		実験手順の理解は簡単でしたか。	96	4
31		実験でマイクロピペット等の操作は簡単でしたか。	88	12
32		実験でゲルへのサンプルの打ち込みは簡単でしたか。	33	67
33		全体としてこの実験の操作は簡単でしたか。	50	50
34		実験を通して、過酸化水素よりもヒドロキシルラジカルの方が毒性の強いことを理解できましたか。	100	0
35		実験を通して、DNAにとって、過酸化水素(活性酸素)が危険であることを理解できましたか。	100	0
36		実験を通して、酵素反応についてより理解が深まりましたか。	100	0
37		実験を通して、酸素の出現が生命進化に与えた影響についてより理解が深まりましたか。	96	4

(3) 結果と考察

a) 過酸化水素（活性酸素）に関する質問

過酸化水素分解反応実験の基質となる過酸化水素や活性酸素の知識についての質問（事前アンケート）の結果から、言葉自体の認知度は高いが、過酸化水素や活性酸素の性質や働き等に関しては深く知らないことが明らかとなった。

事後アンケートの結果から、授業により、過酸化水素や活性酸素の知識のみならず、過酸化水素の分解が生命にとって必要な理由や進化や生命活動において酵素による反応の重要性をほとんどの生徒が理解できた。

特に、過酸化水素が生体内でどのように発生するかの知識については、過酸化水素が、呼吸によりエネルギー産生を行う過程で生じることについて酸素が1電子還元されることでスーパーオキシドアニオンとなり、SOD酵素による不均化反応により生じることを、図などを用いて丁寧に説明したことで、生徒が理解を深めたことが事後アンケート（21-26）により確認された。過酸化水素の生体内での生成過程について説明する中で、過酸化水素も活性酸素の一種であり、活性酸素の中でも安定な状態で存在することを解説することで、ほぼすべての生徒に理解された。

b) 酵素に関する質問

酵素の性質や働きについては、92%の生徒が知っていたが、酵素の性質や働きを調べる実験をしたことのある生徒は71%であった。知識はあっても、確実に経験しているわけではないことが明らかとなった。ヘモグロビンについても同様な傾向がみられ、ヘモグロビンについては知っているも、ヘモグロビンが鉄とタンパク質からできていることを理解している生徒は54%であり、さらに、体の中に様々な種類の金属が働いているかについて知っている生徒は58%であった。以上のように知識の質には差が認められた。

c) DNA 及び DNA の実験に関する質問

生徒はDNAを知っているが、DNAの性質や役割について知っている生徒は79%であった。一方、DNAがどのような物質か理解している生徒は54%で、DNAを実験で扱った経験があり、DNAのバンドを観察したことがある生徒は、それぞれ54%、25%と少なかった。

本授業により、DNAの実験をよく理解でき、抵抗なく取り組めたことが、事後アンケート（28-30）により確認された。唯一、実験操作の中で難しかったのが、ゲルウェルへのサンプルの添加であった（事後アンケート32）。

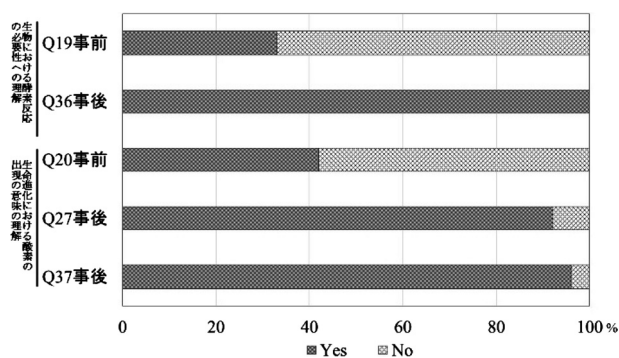
d) 過酸化水素を用いた実験に関する質問

過酸化水素を用いた実験をしたことのある生徒は83%で、加えてカタラーゼの働きを調べる実験をしたことのある生徒は71%と、比較的経験者が多かった。本実験の目的である「過酸化水素よりもヒドロキシルラジカルの方が、毒性が強いこと」と「DNAにとって過酸化水素（活性酸素）が危険であること」については、全生徒が理解できた（事後アンケート34、35）。

e) 生命現象への知識・関心及び本実験に関する質問

本授業前の段階では、生物に酵素反応がなぜ必要か、また、酸素の出現が生命進化にどんな影響を与えたかの理解

表2 事前・事後アンケートの回答結果の比較による本実験の教育的効果



や知識は、それぞれ33%と42%であった（事前アンケート19、20）。授業や実験の経験はあるが、その意義や理解については理解が深まっていないことが推察された。

講義を通じて、生命における過酸化水素分解の必要性への理解や酸素の出現が生命進化に与えた影響については、ほぼ全生徒の理解が深まった（事後アンケート26、27）。さらに、実験により全員の生徒が確実に酵素反応の意味や酸素の出現が生命進化に与えた影響を理解できた（事後アンケート36、37）。

このことから、講義と実験を順次体験することで、生物における酵素反応の必要性への理解（事前19に対し事後36）や生命進化における酸素の出現の意味の理解（事前20に対し事後27と事後37）が深まったことが明らかとなった（表2）。

本授業を受けた生徒からは次のような感想が寄せられた—①想像以上に面白かったです。今まで持っていた知識の理解が深まりました。②過酸化水素が活性酸素だというのは初めて知りました。電気泳動の実験を初めてできてよかったです。酸素や酵素について理解が深まりました。③授業ではやらないところまで詳しく実験することができてよかったです。過酸化水素の分解が生命にとって重要であることがよくわかった。④高校の授業で習ったいくつかの内容が繋がっていることが分かって面白と感じた。これらの感想から、本授業で計画した内容に対する理解が十分得られていることがわかった。

以上の結果から、本研究で開発した実験や講義内容は、過酸化水素の毒性を無毒化するための分解反応の生物学的重要性について理解を深めるのに非常に適した教材であることが明らかになった。今回は、大学で開講した特別授業に応募した高校生を対象に本教材の教育効果の検証を行ったが、今後は広く一般の高校生を対象に実施し、本教材の教育効果について更なる検証が必要と考えられる。

4. おわりに

これまで報告されている過酸化水素分解反応による酸素発生に着目した教材は、生物のみならず化学分野においても様々知られている。多くの学生は、過酸化水素分解反応から酸素が発生することを知っているが、反応の生物学的意義については、ほとんどの生徒が知らないで実験を行う

のではと考えたことが本研究のきっかけとなった。本反応の生物学的重要性については、酸素のない環境で生きてきた生物が、シアノバクテリアによる酸素発生により、酸素をエネルギー産生システムに利用しただけでなく、どのように酸素に対し適応してきたのか、進化の視点を含めた授業を計画することで、理解しやすくなるのではないかと考えた。高校生物の教科書では、酵素の働きを学習したのち、バイオテクノロジーの単元で、DNAを扱った技術について学習する。そのため、これらを履修した生徒を対象にした、酵素の単元で学習したカタラーゼによる過酸化水素分解反応の生物学的重要性について再考察するための発展的教材として、DNA電気泳動法を用いて、過酸化水素の毒性を可視化することに着目し、過酸化水素と2価鉄(Fe²⁺)との反応から生じたヒドロキシルラジカルがDNAを分解する最適実験条件の検討を行った(図2)。また、本実験系の授業実践から教育効果の検証を試みたところ、過酸化水素より生じるヒドロキシルラジカルによるDNA分解の可視化(図3)が、過酸化水素の発生機構から過酸化水素分解反応の重要性についてより深い理解を促す発展的教材として効果的であることが明らかとなった。また、本教育実践は未経験者に対しても実施可能である。実験前の講義や解説により、過酸化水素分解反応実験や電気泳動法を実際に行ったことのない生徒も、興味関心を深め、過酸化水素分解反応の生物学的重要性について容易に高い理解度が得られることが明らかとなった。

本実験系は、これまで高等学校の授業で行われてきたカタラーゼによる過酸化水素分解実験が、ヒドロキシルラジカルの発生源となる過酸化水素の無毒な水への分解として、いかに重要な反応であるかを生徒に気付かせ、カタラーゼの生命活動における重要性を生命進化の観点から理解させるのに効果的であると考えられる。

謝辞: 本論文を作成するにあたり、英文校正や貴重なご助言をいただいた佐々木誠一氏に深く感謝いたします。アカデミア理科実験教室の周知にご協力いただいた東京農業大学第一高等学校教諭の鈴木裕子氏と武中豊氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) 文部科学省(2009) 高等学校学習指導要領解説 理科編, 大日本図書, pp.75-76, 84-86, 92.
- 2) 塚田 捷・山極 隆・森 一夫・大矢禎一ほか57名(2012) 未来へひろがるサイエンス3 啓林館, p.20.
- 3) 細矢治夫・養老孟司・下野 洋・福岡敏行ほか25名(2012) 自然の探究 中学校理科3, 教育出版, p.131.
- 4) 有馬朗人ほか57名(2012) 理科の世界3年, 大日本図書, p.102.
- 5) 霜田光一ほか25名(2012) 中学校科学3, 学校図書, p.146.
- 6) 岡村定矩・藤嶋 昭ほか48名(2012) 新しい科学1年, 東京書籍, pp.82, 87-88.
- 7) 浅島 誠ほか20名(2014) 生物基礎, 東京書籍, p.45.
- 8) 本川達雄・谷本英一ほか16名(2013) 生物基礎, 啓林館, pp.63-64.
- 9) 馬場照次ほか9名(2012) 高校生物基礎, 実教出版, p.42.
- 10) 馬場典子・片山隆志・香西 武・米澤義彦(2013) 中学校理科第2分野におけるDNA抽出実験の再検討. 生物教育, 5(4): 168-175.
- 11) 森屋 一・斎藤隆政・山川 宏・鈴木恵子・輿座功子(1998) 植物体からのDNA抽出—入手しやすい野菜を使って—, 遺伝別冊, 10: 147-150.
- 12) 本川達雄・谷本英一ほか16名(2013) 生物, 啓林館, pp.29, 110, 116-117.
- 13) 吉里勝利ほか16名(2014) 「生物」, 第一学習社, pp.140-141.
- 14) 群馬県高崎高等学校, DNAの断片化とゲル電気泳動, <http://www.takasaki-hs.gsn.ed.jp/ssh/sentan/report/h21report-sentan-15.pdf> (最終アクセス2016年2月11日)
- 15) 浅島 誠ほか20名(2014) 生物, 東京書籍, pp.35-36, 44-48.
- 16) 嶋田正和ほか21名(2014) 生物, 数研出版, p.25.
- 17) 盛口 襄(1996) 酸素の新製法, 左巻健男(編)『たのしくわかる化学実験事典』, 東京書籍, p.85.
- 18) 武田一美(2003) いろいろな気体を作ろう. 東京理科大学サイエンス夢工房(編)『楽しむ化学実験』, 朝倉書店, pp.23-24.
- 19) 西田哲也(2010) 過酸化水素の性質と酸素の発生実験. 化学と教育, 58(2): 84-85.
- 20) 山口晃弘(2011) 酸素の実験. 山口晃弘(編)『イラストでわかるおもしろい化学の世界 2 調べる実験』, 東洋館出版社, pp.75-78.
- 21) 宮田光男・留目祐光(1986) 人の揮で相撲をとる—過酸化水素の分解—. 化学教育, 34(5): 412-413.
- 22) 山本勝博(1991) 種々の触媒を用いた過酸化水素の分解速度曲線. 化学と教育, 39: 228.
- 23) 紺野 昇・利安義雄(1994) 過酸化水素の分解反応速度のパソコンを利用した測定. 化学と教育, 42(6): 436-437.
- 24) 山川 隆(1996) 高校生物バブルを用いた酵素実験の工夫. 平成7年度(第27回) 東レ理科教育 奨励作, pp.54-56.
- 25) LLOYD, R. D., PHILIPS, H. D. and CARMICHAEL, L. P. (1997) Generation of Putative Intrastrand Cross-Links and Strand Breaks in DNA by Transition Metal Ion-Mediated Oxygen Radical Attack. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 393-400.
- 26) LLOYD, R. D., CARMICHAEL, L. P. and PHILIPS, H. D. (1998) Comparison of the Formation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and Single- and Double-Strand Breaks in DNA Mediated by Fenton Reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 420-427.
- 27) TAKEDA, K., IZUKA, M., WATANABE, T., NAKAGAWA, J., KAWASAKI, S. and NIMURA, Y. (2007) *Synechocystis* DrgA protein functioning as nitroreductase and ferric reductase is capable of catalyzing Fenton reaction. *FEBS J.* 274: 1318-1327.
- 28) SATO, J., TAKEDA, K., NISHIYAMA, R., WATANABE, T., ABO, M., YOSHIMURA, E., NAKAGAWA, J., ABE, A., KAWASAKI, S. and NIMURA, Y. (2011) *Synechocystis* ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase driving the Fenton reaction is capable of functioning as ferric reductase in the absence or presence of free flavin. *Biometals.* 24: 311-321.
- 29) 金松澄雄・小西章尋(2014) Fe²⁺によるポリ-γ-グルタミン酸の解重合機構. 南九州大学研報, 44A: 51-60.

The Development of an Experiment as a Science Teaching Material Visualizing Hydroxyl Radicals Activity Derived from Hydrogen Peroxide and its Educational Effect

By

Kouji TAKEDA*[†], Kaoru WADA**, Yusuke TONAMI***, Mamiko OKAMOTO****,
Junichi SATO***** and Youichi NIIMURA*****

(Received February 18, 2016/Accepted June 10, 2016)

Summary : This study aims to reorient a foundation of the existing teaching material toward putting greater focus on the importance of the evolutionarily preserved implication of the meaningfulness of the reaction to hydrogen peroxide decomposition. The study material is placed as an exploratory activity of biotechnology and considered as a developmental learning tool backed up by techniques of experiment and knowledge taught through unit learning of enzyme and biology.

An experiment was designed to discover an optimum condition by electrophoresis that visualizes the DNA decomposition from hydroxyl radicals (reactive oxygen species) derived from hydrogen peroxide and ferrous iron. In addition to the educational practice conducted for junior high and high school students, the study considered the validation of educational effectiveness of the teaching material together with a view to ushering in a developmental approach to high school biology class.

As the result of the pre- and post-survey, the teaching material was found to be an effective means for students to associate the biological importance with reaction to hydrogen peroxide decomposition and put an emphasis on the significance of the reaction that is an important discovery of mankind to learn the course of evolution as an organism acquires its defense mechanism against the toxicity of hydrogen peroxide while using oxygen as a source of energy. Thus, the experimental teaching material is encouraged to be introduced to high school biology class as part of progressive educational material.

Key words : Science experimental teaching material, Reactive oxygen species (ROS), Hydrogen peroxide, Enzyme, Biotechnology

* Teacher Education course in Tokyo University of Agriculture

** Yui junior high school, Hachioji city

*** Kakuro junior high school, Hamamatsu city

**** Uchino Co., Ltd.

***** Rigaku Corporation

***** Department of Bioscience, Faculty of Applied Bio-Science

[†] Corresponding author (E-mail : k2takeda@nodai.ac.jp)