

J. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric., 61 (2), 76-83 (2016)
東京農大農学集報, 61 (2), 76-83 (2016)

植物色素アントシアニンのヒドロキシラジカル消去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***・佐藤純一****・村上敏文*****・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、植物色素が光合成のみならず酸素毒性から細胞や種を守る抗酸化物質としても働いてきたことを、進化的側面から植物色素の存在意義について再考察させるための実験開発と教材開発を行った。

実験開発では、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ラジカルによる DNA 分解が、植物色素であるアントシアニンにより防ぐことができることを可視化するための最適実験条件を明らかにした。また、高校生を対象とした授業実践から、本実験教材を用いた授業の教育効果を検証し、高等学校生物への発展的導入について考察を行った。

授業実践の事前・事後アンケートの比較の結果、本教材のアントシアニンによる抗酸化能を可視化した実験により、植物色素の抗酸化能について理解しやすい教材であることが明らかとなった。また、授業解説と実験を行うことで、植物色素の抗酸化能が、紫外線や光合成から生じる活性酸素の毒性に対する防御機構として、植物の細胞機能の維持に重要な働きをしていることを、進化的側面から理解させることのできる効果的な教材であることも明らかとなった。

よって本研究は、光合成以外の働きとして重要な植物色素の抗酸化能に着目した新たな実験としてだけでなく、光合成とバイオテクノロジーで学ぶ知識と実験技術を融合したバイオテクノロジーの発展的教材として、生徒に生命進化の観点から植物色素を多面的に理解させるための探究活動として、高校生物への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、植物色素、バイオテクノロジー、進化

1. はじめに

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 イ 代謝 (イ) 光合成において扱われる光合成は、光エネルギーが化学エネルギーに変換される過程を理解させることがねらいとしている。光合成の中心である葉緑体は、クロロフィルやカロテノイドなどの色素を有している。光合成色素であるクロロフィルやカロテノイドは有機溶媒に溶けやすい構造をもった色素であり、それら色素の吸収波長やクロマトグラフィーによる分離実験が高校生物の教科書に記載されている²⁻⁵⁾。教科書に記載されている分離したクロロフィル a, クロロフィル b, カロテノイドの吸収曲線や作用曲線により、これら光合成色素としての役割について、主としてクロロフィル a が反応中心として機能し、カロテノイドは吸収した光エネルギーをクロロ

フィルに伝達することが教科書に記載されている。また、数研出版ではカロテノイドの光捕集以外の機能について、参考として以下のような内容を取り扱っている。カロテノイドの一種でありニンジンなどに多く含まれることで有名なβ-カロテンが以前は光を集める補助色素として考えられていたが、現在は光阻害から葉緑体を守る働きをしていると考えられている。また、カロテノイドの一種であるキサントフィルは、過剰なエネルギーを熱エネルギーに変換する役割をしている⁵⁾。

さらに、植物には光合成色素のほかに、フラボノイドに分類される色素があり、基本的にコケ植物からシダ植物、種子植物など植物界に広く分布し、植物の根、茎、葉、花、種子などほとんどすべての器官に存在している。生物はフラボノイドのような紫外線吸収物質を蓄積することにより、太陽の紫外線による DNA 損傷から身を守ってきたと

* 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

**** 株式会社リガク

***** 農研機構東北農業研究センター

***** 東京農業大学バイオサイエンス学科

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

考えられている。一部のコケ植物から高等陸上植物において、フラボノイドの合成が可能になったものと考えられており⁶⁾、植物が陸上に進出した歴史とフラボノイドの合成経路の獲得の歴史が非常によく一致している⁷⁾。また、フラボノイドは紫外線を引き金に合成されることや、230~320 nm の紫外域を強く吸収することから、紫外線防御効果としての役割が示唆されていた^{8,9)}。フラボノイドは表皮の液胞に多く含まれ、種子や芯にも多いことから、フラボノイドの蓄積は紫外線防御として子孫存続に働いてきたと考えられる⁷⁾。

花卉などに含まれるこれら色素による様々な色は昆虫をはじめとする動物を惹き付け、受粉など有性生殖に関わる重要な役割を担っている。また、ブドウ、リンゴ、イチゴやブルーベリーなどの果実やナス、シソ、マメ種子に含まれる赤から紫色の色素として、様々なアントシアニン類が知られている。アントシアニンはフラボノイドの一種であり、種子や果実にはアントシアニン以外のフラボノイドも有し、それらも紫外線防御活性を有している。

これらアントシアニン類は太陽光からくる紫外線からの毒性を防ぐ役割をしており、果実に含まれる種子を守る働きをしている。フラボノイド自体は水に溶けにくい、糖などと結合して存在することで水に溶けやすい性質を持っている。最近、これら食用植物に含まれる色素が、ヒトの体内に取り込まれることで紫外線防御に加えて酸化ストレス防御活性(抗酸化能)を示し、健康維持に有効なため、医薬・科学雑誌、メディア、専門家に着目されている。

このように植物色素の役割は光合成以外にも、強光などの害から葉緑体や核を守るための安全装置(防御系)としても機能していることが知られている。また、植物は動物とは異なり光合成でエネルギー源を生産する過程で酸素を発生するため、強光のような外的環境によるストレスを受けると、生体内が過還元状態になりやすく、生体成分に害を及ぼす活性酸素を生じやすくなる。そこで植物は、生じた活性酸素から身を守るための酸素適応機構として、進化の過程で植物色素の抗酸化能を利用した防御系を獲得することで、自らの身を守りながら生命活動を営んでいる。また、動物は植物からそれら植物色素を摂取することで、植物色素の抗酸化能を生命活動に利用していると考えられる。

植物から抽出した色素を用いた実験として生物分野では、クロマトグラフィーによる脂溶性の光合成色素の分離実験が知られている。その方法として、ペーパークロマトグラフィーによる分離¹⁰⁻¹²⁾や薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離¹³⁻¹⁶⁾が知られており、TLCを用いた教材研究^{10,13-15,17-19)}や教育現場での活用^{20,21)}が報告されている。光合成色素の分離実験を導入した授業展開として、藻類から陸上植物への進化の過程を地球環境の変遷と関連づけて理解させる内容が報告されている^{10,16)}。これら教材は真核生物のみを用いていたため、蛙はその改良として、原核生物である藍藻類を加え、コケ植物を植物の進化上最初の陸上植物とし、藍藻類・紅藻類・褐藻類・緑藻類・コケ植物・被子植物を用いて、植物間での光合成色素の共通性

や多様性から植物の系統と進化を考察させる教育実践を報告している²²⁾。

一方、主に化学分野の教材として、花卉などから抽出できる水溶性の植物色素の特性を利用し、アントシアニン系色素の pH による色の変化に着目した教材^{23,24)}や身の回りの植物を素材とした酸・アルカリ指示薬の作成とその利用²⁵⁾、トルコキキョウから抽出した酸・アルカリ指示薬を用いた授業実践²⁶⁾などが報告されている。また、植物色素とは少し異なるが、花の染色用色素(ファンタジー、パレス化学)を使い、簡単な装置で根を染め分け、隣り合う植物の根の関係を調べる研究にも利用可能と思われる²⁷⁾。

上述したように、光合成色素の生物間の共通性や多様性に着目した進化の観点からみた教材研究や植物色素の特性を利用した教材研究は知られているが、光合成による酸素発生と植物の酸素に対する適応機構という進化の観点から植物色素の存在意義について考察させる授業として、植物色素の抗酸化能に着目した教材研究やその教育実践報告は見当たらない。

抗酸化に関する専門的な研究としては様々あるが、天然カロテノイドの多様性とその役割について²⁸⁾や、過酸化水素の光分解や過酸化水素と2価鉄(Fe^{2+})との反応から生じるヒドロキシルラジカルに対するアントシアニン類やVerbascoside(カフェ酸配糖体の一種)による抗酸化実験として、DNA開裂の抑制効果を観察した実験^{29,30)}やアントシアニンの電子スピン共鳴法(ESR法)によるラジカル消去に関する研究³¹⁾などが報告されている。

呼吸や光合成といった生命現象は、光合成生物による酸素発生とそれを利用する生物の酸素適応機構について進化の観点から考えることで、生命進化とエネルギー代謝の大きなつながりをもたせた授業展開が可能となる。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。そこで本研究では、植物が進化の過程で環境条件の変化にどのように適応してきたのかについて、植物色素の光合成以外の機能である抗酸化能に着目し、我々の生活に身近な食用植物に含まれる水溶性のアントシアニン色素を用いて、学校現場で実施可能な教材開発を行うこととした。抗酸化能の測定法については、武田らの開発した2価鉄(Fe^{2+})と過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルによるDNA分解実験の最適条件の実験系³²⁾を活用し、アントシアニンによるDNA分解防御の最適濃度の検討を行った。そして、本実験の位置づけを光合成とバイオテクノロジー技術を習得した後の探究活動として、進化の観点から植物色素の存在意義を振り返り、光合成以外の植物色素の抗酸化能について学習することのできる授業計画を検討した。

本授業を通して、①植物の多様な色素の存在が、太陽光エネルギーを化学エネルギーに変換し有機物を合成するだけでなく、自らの身を守るためにも働いていることについて理解することで、より多面的な植物色素の役割について理解させる。②植物が酸素適応機構として進化の過程で植

物色素を防御機能（抗酸化）として活用することが、細胞機能や遺伝の維持をとおして生命現象をより深く理解させるための授業に導入できる教材を開発した。

そして、本研究で開発した実験教材の教育効果を確かめるため、最適実験条件を活用した実験を導入した授業実践を、高校生を対象にして講義と実験を行い、事前と事後のアンケート調査から進化的側面からみた植物色素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。また、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の考察を行った。

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

本研究は、植物色素アントシアニンの抗酸化能を DNA 電気泳動法により可視化できる実験教材の開発を目的とした。また、本実験を光合成とバイオテクノロジーの単元後の探究活動として位置づけ、植物色素の抗酸化能の進化における重要性からその存在意義を考察し、光合成以外の機能である植物色素の抗酸化について学習する発展教材として高等学校生物への導入を目指した。

本実験教材開発では、武田らの実験条件³²⁾を参考にし、カタラーゼの代わりに植物色素アントシアニンを用いた。

両者ともフェントン反応 ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) を防止するが、カタラーゼは反応因子である H_2O_2 を分解し、アントシアニンは反応因子の Fe^{2+} もしくは生成物の $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシルラジカル) を捕捉することで DNA 分解を防止する。

生徒実験では、アントシアニンの有無において、アントシアニンによるフェントン反応による DNA 分解の抑制を可視化した実験教材を用いて授業を行った。

(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), 6 mM EDTA (pH8.0) (Wako:特級), DNA (ϕX174) (TaKaRa), 3 mM 塩化鉄 (II)・四水和物 (Wako:特級), 6.5 mM 過酸化水素 (0.33%) (Wako:特級), 1.9% アントシアニン溶液 (Red cabbage jiffy juice: Universe of Science), ミドリグリーン Direct (日本ジェネティクス), 50 x TAE (2M Tris-acetate, 50 mM 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 1.5 ml) (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) を用いた。

b) 試薬調製

3 mM 塩化鉄 (II) (Fe^{2+}), 6 mM EDTA 溶液, 6.5 mM (0.33%) 過酸化水素, 0.8% アガロースゲルの調製の詳細は武田らの論文³²⁾を参考に行った。

9.1% アントシアニンの調製は、Red cabbage jiffy juice 1 g を電子天秤で測り、超純水 10 ml 加え溶解したものをアントシアニン溶液とした。そこから 207 μl を 793 μl の水に加え計 1 ml とした (終濃度 1.9%)。アントシアニンは安定な物質ではないことから、生徒の実験の進度に合わせ、使用する直前に調製を行い、分配した。

c) 反応溶液の調製

反応溶液 (計 20 μl) は、超純水, EDTA, アントシアニン (\pm), DNA (ϕX174) 0.1 μg (原液 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を 10 倍希釈), Fe^{2+} , 過酸化水素の順に各溶液を加え、添加ごとに遠心分離を行いながら、各溶液を混ぜ合わせ、すべての溶液を混ぜ合わせた後、手で握り 5 分間保温した。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

武田らの開発した実験方法³²⁾を参考に、アントシアニン存在下・非存在下において、DNA のみ, DNA と過酸化水素, DNA と Fe^{2+} , DNA と過酸化水素と Fe^{2+} の 4 つの条件下で反応させた DNA 溶液をアガロースゲル電気泳動法により分離し、LED 照射により DNA バンドを検出した。

3. 結果および考察

(1) ヒドロキシルラジカルによる DNA 分解の防御に働くアントシアニン最適濃度の検討

学校では pH の指示薬として用いられているアントシアニンが、近年、植物色素の抗酸化物質として様々な食用植物に含まれることから注目を浴びている。そこで、前報で報告³²⁾した DNA 分解における最適条件 (Fe^{2+} 0.6 mM, 過酸化水素 1.3 mM) に対し、アントシアニン濃度を変化させた 3 つの条件 (条件 I : 0.095%, 条件 II : 0.14% 条件 III : 0.19%) において、どの条件が DNA の分解防御に適しているかの検討を行った。実験条件それぞれのコントロールとして、DNA (ϕX174) 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。DNA バンドの解釈については、武田らの論文³²⁾を参考に判断した。

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) とほぼ同様のバンドが観察された。電気泳動による DNA のバンドからは過酸化水素の影響をほとんど受けていないことが図 1 から推察された。

Fe^{2+} のみ存在下 (レーン③, ⑦, ⑪) では、コントロールよりも少し上の位置 (C: 直線状) にバンドが観察され、アントシアニン濃度が高くなるにつれて、D (切断状) の位置のバンドが薄くなった。これは、アントシアニンが Fe^{2+} とキレート錯体を形成してフェントン反応を阻害したか、

もしくは発生したヒドロキシルラジカルが、アントシアニンに結合しているヒドロキシル基の水素を引き抜くことで反応し、DNA分解を防いだためと推察された。最近、ナスの主要なアントシアニン(ナスニン)を用いた実験では、ナスニンによる鉄イオンへのキレート作用によりフェントン反応によるヒドロキシルラジカルの発生を防いでいることが明らかとされている³¹⁾。実験に用いたDNAの購入時期や保存状態により、B(開環状)の位置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、前報で報告したDNAの完全消失とは異なり、レーン③, ⑦, ⑪と同様にアントシアニンの濃度が高くなるにつれて、A(閉環状)もしくはC(直線状構造)の位置のDNAバンドがはっきりと検出された。すなわち、本実験において、アントシアニン濃度が高くなるにつれ、ヒドロキシルラジカルの発生を抑制していることが観察された。その理由としては、 Fe^{2+} のみ存在下と同様の防御機構が推察された。実験に用いたDNAの購入時期や保存状態により、B(開環状)の位置にバンドが現れる場合もあった(データ未掲載)。

本実験により、ACQUAVIVAら²⁹⁾のDNA開裂抑制実験と同様に、抗酸化物質として知られているアントシアニンの抗酸化効果を今回のDNA分解実験から確認することができた(図1)。本実験条件においてDNAの切断を防ぐには、アントシアニン濃度を0.19%で用いることが最適条件であると判断し、本条件を用いた実験を授業実践へ導入することとした。

(2) 生徒実験用アントシアニン非存在下・存在下でのDNA分解実験

図1において観察された最適条件下(Fe^{2+} 0.6mM, 過酸化水素 1.3mM, アントシアニン 0.19%)でのアントシアニン非存在下および存在下において、DNA分解実験を行い、同一ゲルにて電気泳動を行った(図2)。本来の実験条件としては、図1で行っているように4つの条件が考えられるが、授業実践で生徒が行う際の実験条件は、アントシアニン存在下においてDNAのみ、DNAに過酸化水素と Fe^{2+} を加えたものの2つの条件で行い、対象実験としてアントシアニン非存在下も同時に行う方が抗酸化能を観察するうえで理解しやすいと考えた。そのため、図2に示した実験条件は、DNA分解における最適条件(Fe^{2+} 0.6mM, 過酸化水素 1.3mM)で、アントシアニン存在下・非存在下の両方を行い、それぞれDNAのみ(①, ③), DNAに過酸化水素と Fe^{2+} を加えたもの(②, ④)の2つの条件で行うこととした。

図2に観察された現象は、武田らの報告と同様に³²⁾、レーン①の条件に対し、レーン②条件では Fe^{2+} と過酸化水素により生じたヒドロキシルラジカルによりDNA分解(断片化)が起こることが観察された。一方、レーン④においては、レーン①に見られたDNA分解が、図1同様にアントシアニンの抗酸化能によりレーン③より少し上の直線状(C)の位置にはっきりと観察された。このことから、ヒ

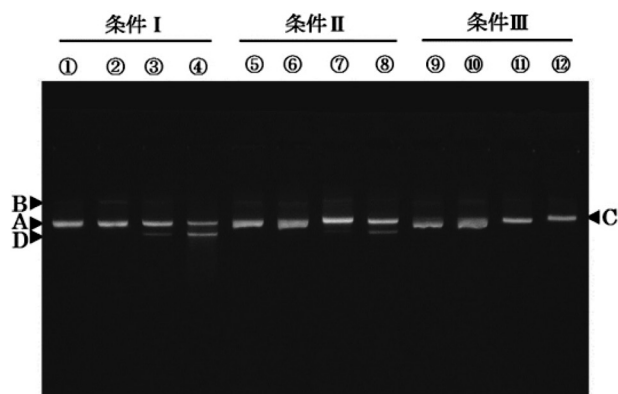


図1 アントシアニンの最適濃度の条件検討
 Fe^{2+} 0.6mM, 過酸化水素 1.3mMの実験条件に対し、アントシアニン濃度を変化させた3つの条件(条件Ⅰ:0.095%, 条件Ⅱ:0.14%, 条件Ⅲ:0.19%)で実験を行った。それぞれのコントロールとして、DNA(ϕ X174)サンプルのみをレーン①, ⑤, ⑨, DNAに過酸化水素のみ添加したものをレーン②, ⑥, ⑩, DNAに Fe^{2+} のみ添加したものをレーン③, ⑦, ⑪, DNAに過酸化水素と Fe^{2+} 両方添加したものをレーン④, ⑧, ⑫とした。A:閉環状, B:開環状, C:直線状, D:切断状。

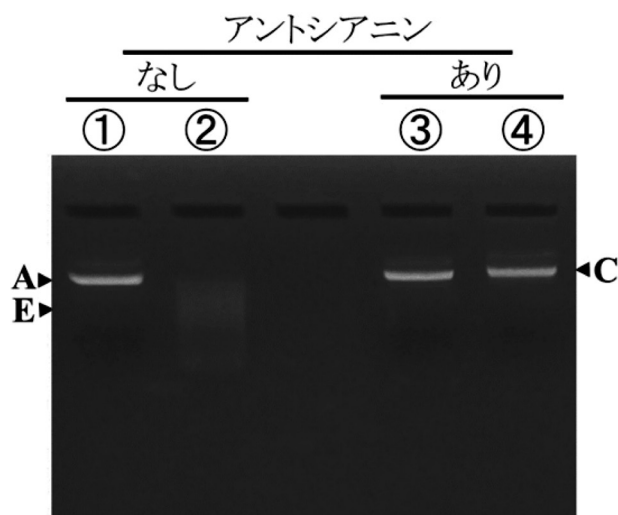


図2 生徒実験用電気泳動写真
 Fe^{2+} 0.6mM, 過酸化水素 1.3mM, アントシアニン 0.19%の実験条件に対し、アントシアニン非存在下, 存在下における実験を同一ゲル上で行った。それぞれのコントロールとして、DNA(ϕ X174)サンプルのみをレーン①, ③, DNAに過酸化水素と Fe^{2+} 両方添加したものをレーン②, ④とした。A:閉環状, C:直線状, E:断片状。

ドロキシルラジカルによるDNA防御は完全ではないが、アントシアニンによる抗酸化能を十分実感することができた。本実験により、アントシアニンの抗酸化能について、アントシアニン存在下, 非存在下の条件を同時に行うことで、結果を同一の視野で同時に観察でき、一目で理解させることができると考えられる。

4. 授業実践

(1) 授業対象者および授業方法

東京農業大学教職課程アカデミア理科実験教室に参加した東京農業大学第一高等学校の生徒を対象に、植物色素の課題研究授業として授業実践を行い、事前・事後アンケートから授業実践における本講義内容の理解度や実験教材としての教育効果の検証を行った。実験を行う前に、光合成により生じる酸素が生物の進化に大きな影響を与え、光合成の代謝の過程で生じる活性酸素の発生メカニズムや植物色素の光合成や抗酸化機能について概説した後、実験手順や諸注意を行い、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)によるDNA分解の防御に働くと考えられる植物色素アントシアニン存在下で、DNA構造がどのように変化し、電気泳動によりそれぞれのDNA構造がどの位置³²⁾にでるのかについてイメージを持たせて実験を行った。実験後のまとめとして、アントシアニンの抗酸化能についての実験結果について解説を行い、事後アン

ケートによる本講義の理解度調査を行った。

(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

アンケートは高校生(高1:9名, 高2:1名)10名を対象に授業実践を行った。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、光合成や植物色素に関する知識や理解度を問う事前アンケートを行い、光合成や植物色素に関する知識、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)。

(3) 結果と考察

1) 光合成及び葉緑素に関する基本的知識

事前アンケートより、光合成と葉緑体については、全生徒が知っており、光合成の働きを調べる実験も全生徒が経験していた。基本的な知識や実験については、中学校段階

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=10)		Yes (人)	No (人)
	1	光合成という言葉を知っていますか。	10	0
2	光合成の働きを知っていますか。	10	0	
3	光合成の働きを調べる実験をしたことがありますか。	10	0	
4	葉緑体を知っていますか。	10	0	
5	葉緑体を観察したことはありますか。	9	1	
6	葉緑体にクロロフィルがあることを知っていますか。	10	0	
7	光合成におけるクロロフィルの役割を知っていますか。	3	7	
8	クロロフィル以外の植物色素を知っていますか。	3	7	
9	植物色素の実験・観察をしたことがありますか。	6	4	
10	光合成が生命進化にどのような影響を与えたか知っていますか。	3	7	
11	植物色素の光合成以外の働きを知っていますか。	0	10	
12	植物色素が生命進化にどのような役目をしてきたか知っていますか。	0	10	

B	事後アンケート (N=10)		Yes (人)	No (人)
	13	授業より、植物色素にどのような種類があるか理解できましたか。	10	0
14	授業より、光合成の役割や生命進化に与えた影響についてより理解できましたか。	10	0	
15	授業より、光合成の過程で活性酸素(過酸化水素水など)が細胞の中で生じる仕組みを理解できましたか。	9	1	
16	授業より、植物色素の防御機能としての働きを理解できましたか。	10	0	
17	授業より、植物色素の光合成以外の防御機能が生命進化にとっても必要な理由が理解できましたか。	10	0	
18	全体として授業の説明は分かりやすかったですか。	9	1	
19	実験手順の説明は分かりやすかったですか。	9	1	
20	実験手順の理解は簡単でしたか。	10	0	
21	実験でマイクロピペット等の操作は簡単でしたか。	10	0	
22	実験でゲルへのサンプルの打ち込みは簡単でしたか。	5	5	
23	全体としてこの実験の操作は簡単でしたか。	7	3	
24	実験を通して、植物色素の抗酸化能についてより理解が深まりましたか。	10	0	
25	実験を通して、植物色素が植物の生命進化に、光合成だけでなく、防御系としても必要なことについてさらに理解が深まりましたか。	10	0	

で教えられている。クロロフィルに関しては、高校1年生の段階で扱われるため、ほぼ全員の生徒が、葉緑体にクロロフィルがあることを知っていた。一方で、一般に知名度のあるクロロフィルであるが、その役割への理解を含めてクロロフィル以外の様々な色素への知識は少なかった（それぞれ30%（3人））。

2) 植物色素を用いた実験の経験

植物色素を用いた実験をしたことのある生徒は60%（6人）であったことから、実験経験をしっかりと記憶しているわけではないことが推察された。

3) 実験操作に関する課題

武田らの開発した過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルによるDNA分解を可視化した実験³²⁾と手法が重なるため、特に前実験³²⁾で生徒が課題として挙げていた「ゲルウェルへのサンプルの添加」及び「全体としての実験操作のしやすさ」をよりスムーズに習得できるように次のような工夫をした。

ゲルウェルへのサンプルの添加をスムーズにするためには、マイクロピペット操作が重要である。そこでマイクロピペットの使い方を説明し、溶液の取り方を教えた後、取った溶液をパラフィルムに出す練習や取った液量を目で確認させ、実験に用いるエッペンドルフ型チューブへの溶液の移し方などを丁寧に指導した。また、ゲルウェルへのサンプルの添加の仕方については、添加の仕方を絵にして説明することやチップの先をどの程度ウェルに入れるのかを生徒の目の前で手本を見せることにより、生徒は具体的なイメージを持って取り組んだ。

事後アンケートの結果を比べると、「ゲルへのサンプルの打ち込み」は33%³²⁾から50%（5人）へと、わずかではあるが、操作のしやすさ感が向上していた。本実験の評価「全体としてこの実験の操作は簡単でしたか」については、50%³²⁾から70%（7人）になり、高校生が基本的にできる実験になったと考えている。

4) 生命現象への知識・理解及び本実験の効果

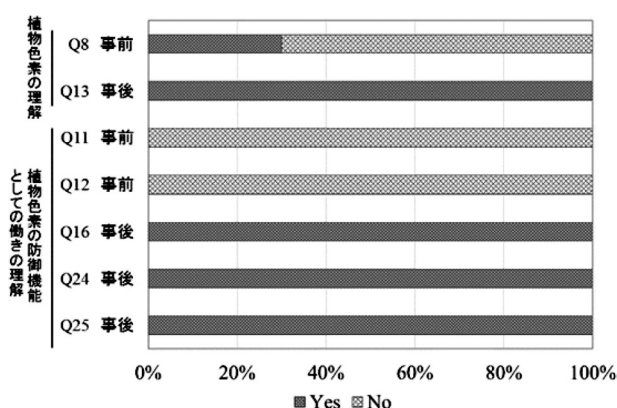
本授業前の段階では、生物に植物色素がなぜ必要か、また、植物色素が生命進化にどんな影響を与えたかの知識や理解は、皆無であった（事前アンケート）。このことから、授業や実験の経験はあるが、その意義や理解については授業でふれられていないことが推察された。

事後アンケートの結果から、授業により、光合成の過程で生じる過酸化水素の分解が生命にとって必要な理由や植物色素の重要性をほとんどの生徒が理解できた。

特に、過酸化水素が植物の葉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、光合成を行う過程で生じることを、図を用いながら丁寧に説明したことで、生徒が理解を深めたことが確認された。また、生命における光合成により生じる植物色素の存在意義や植物色素が生命進化に与えた影響については、授業を通じて、ほぼ全生徒の理解が深まった。

さらに、実験により全員の生徒が確実に植物色素の抗酸化能や植物色素の生命進化に与えた影響を理解することができた。特に、本実験の目的である「植物色素（アントシ

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



ニン)の抗酸化能」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、全生徒が実験により視覚的に確認することで、理解を大いに助けたと考えられる。

以上のことから、講義と実験を順次体験することで、植物における植物色素の必要性への理解や生命進化における植物色素の存在意義の理解が十分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楽しかったという感想以外に、以下のような感想が寄せられた—①進化からのアプローチが面白かった。②学校の授業ではやらない内容の実験だったので、初めて知ることが多くとても楽しかった。③抗酸化物質（植物色素）が生物進化にとっても、人体にとっても大切だということがわかりました。④薬剤1つ1つを何故入れるのかも教えていただけて一層理解が深まりました。⑤学校の授業でお話として聞いていたことは、実はもっと奥が深く、掘り下げれば下げるほど面白いことがわかりました。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確認できた。

以上の結果から、本研究で開発した実験や授業内容は、植物色素の抗酸化能の生物学的重要性について進化の視点から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。今回の教育効果の検証は、アカデミア理科実験教室に参加した高校生を対象に行われた。そのため、実験の参加者は理科好きの理科系志望の高校生に偏っている可能性がある。今後は、一般的な高等学校での授業実践により、本教材の更なる教育効果の検証をしていきたい。

5. おわりに

光合成色素に着目した色素の分離実験や植物色素を利用した色の変化に関する実験教材は、生物のみならず化学分野においても様々報告されてきた。しかしながら、植物色素の抗酸化能に着目して、進化の視点からその存在意義を振り返るための教育実践の報告はなかった。そこで本研究では、植物色素の抗酸化能に着目し、光合成とバイオテクノロジーの知識と実験技術を融合したバイオテクノロジーの探究活動に位置づけた発展的教材として開発を試みた。

本実験教材開発では、DNA電気泳動法を用いて、過酸化水素と2価鉄(Fe²⁺)との反応から生じるヒドロキシルラジカルによるDNA分解が、抗酸化物質として有名なアントシアニンにより防がれることを可視化するための最適実験条件の検討を行った(図1)。また本実験前の授業実践では、進化の過程で植物が植物色素を光合成のみならず、紫外線や光合成時に生じる活性酸素から身を守る抗酸化物質として、細胞機能の維持のためにも獲得し、利用してきたことを解説した。その後、本実験を行い、本授業実践の教育効果の検証を行った。事前・事後アンケートにより、授業解説とヒドロキシルラジカルによるDNA分解とアントシアニンによる防御効果を同一視野で同時に観察する(図2)ことで、アントシアニンの抗酸化能や進化的な側面からの植物色素の存在意義について、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。

本実験系は、これまで高等学校の授業では実施されてこなかった植物色素の抗酸化能に着目した新たな実験としてだけでなく、植物色素の生命活動における光合成以外の重要な抗酸化としての機能を、生命進化の観点から植物色素を多面的に理解させるバイオテクノロジーの発展的教材として適した教材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) 本川達雄・谷本英一ほか16名(2013) 生物, 啓林館, pp.68.
- 3) 浅島 誠ほか20名(2014) 生物, 東京書籍, pp.60-61.
- 4) 吉里勝利ほか16名(2014) 「生物」, 第一学習社, pp.78-79.
- 5) 嶋田正和ほか21名(2014) 生物, 数研出版, p.77, 80.
- 6) BJÖRN, L.O., WIDELL, S., WANG, T. 2002. Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Adv. Space Res.* **30** : 1557-1562.
- 7) 高橋昭久・大西武雄・武田幸作(2013) 紫外線吸収物質の蓄積による紫外線防御機構. 植物色素フラボノイド. 文一総合出版, 東京, pp.473-474.
- 8) SHIBATA, K (1915) Untersuchungen über das Vorkommen und die physiologische Bedeutung der Flavonderivate in den Pflanzen. *Bot. Mag. Tokyo* **29** : 118-132.
- 9) CALDWELL, M.M., ROBBERECHT, R., FLINT, S.D. (1983) Internal Filters : prospects for UV-accumulation in higher plants. *Phys. Plant.* **58** : 445-450.
- 10) 高桑 純(2001) 光合成色素の分析により植物の多様性と進化を考えさせる教材の開発. 生物教育 **42** (2) : 65-73.
- 11) 藤浦 剛・藤島弘純(1979) ペーパークロマトグラフィを用いた緑葉の色素分離に関する教材開発的再検討. 生物教育 **20** (3) : 1-8.
- 12) VALADON, L.R.G. and BENDALL, D. (1988) Textbooks can be misleading : an A-level exercise. The separation of chlorophyll pigments by paper chromatography. *School Science Review* **69** : 512-514.
- 13) 寺田卓二(1986a) TLCプラスチックシートを用いた光合成色素の分離. 生物教育 **26** (2) : 289-292.
- 14) 寺田卓二(1986b) TLCプラスチックシートを用いた光合成色素の分離. 全国理科教育センター研究協議会(編). 『身近な自然を生かした生物教材の研究』 pp.186-187. 東洋館出版.
- 15) 御園生拓・横浜康継(1986) 海藻の光合成色素. 遺伝 **40** (3) : 11-16.
- 16) 片山舒康・平田 徹・倉島 彰・太齋彰浩・横浜康継(1994) 藻類の光合成色素の簡単な定性分析法. 藻類 **42** : 71-77.
- 17) 町田敏也(1994) 光合成色素の分離. 遺伝 **48** (5) : 56-60.
- 18) 畦 浩二(1999) コケ植物の教材化. 遺伝 **53** (8) : 52-57.
- 19) 加賀友子(1998) シリカゲルを利用した同化色素分離実験のいろいろ. 遺伝別冊 (10) : 113-116.
- 20) 鳩貝太郎(1997) 海藻の光合成色素. 理科の教育 **46** (4) : 34-35.
- 21) 片山舒康(2001) 光合成色素の抽出と分離実験. 理科の教育 **50** (4) : 42-43.
- 22) 畦 浩二(2003) 光合成色素の定性分析から植物進化を考察する実践的研究. 生物教育 **44** (1) 10-18.
- 23) 本川達雄・谷本英一ほか16名(2013) 生物基礎, 啓林館, pp.53-54.
- 24) 橘 淳治(2009) 植物色素の教材化—pHの違いによるアントシアニン系色素の色の変化を見る—. 大阪と科学教育 **23** : 55-57.
- 25) 池田佳太郎・安藤秀俊(2007) 中学校選択理科における教材研究—酸・アルカリ・中和反応を例として—. 科教研報 **22** (1) : 121-124.
- 26) 木村 功・神崎夏子(2014) 花の色の科学—花の色素の指示薬としての可能性を探る—. 神奈川大学心理・教育研究論集 **36** : 57-62.
- 27) MURAKAMI, T., SHIMANO, S., KANEDA, S., NAKAJIMA, M., URASHIMA, Y. and MIYOSHI, N. (2006) Multicolor staining of root systems in pot culture. *Soil Science & Plant Nutrition* **52**, 618-622.
- 28) 眞岡孝至(2015) 天然カロテノイドの多様性とその役割. 食品・食品添加物研究誌 **220** (2) : 118-124.
- 29) ACQUAVIVA, R., RUSSO, A., GALVANO, F., GALVANO, G., BARCELLONA, M.L., Li VOLTI, G. and VANELLA, A. (2003) Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol Toxicol* **19** (4) : 243-252.
- 30) ZHAO, C., DODIN, G., YUAN, C., JIA, Z. and FAN, B.T. (2005) "In vitro" protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochimica et Biophysica Acta* **1723** : 114-123.
- 31) 五十嵐喜治(2014) アントシアニンとラジカル消去. *Functional Food* **8** (2) : 80-86.
- 32) 武田晃治, 和田 薫, 砺波雄介, 岡本真実子, 佐藤純一, 新村洋一(2016) 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. 農学集報 **61** (2) : 67-75.

The Development of an Experiment as a Science Teaching Material Visualizing Hydroxyl Radicals-scavenging Activity of Anthocyanins in Plant Pigments and its Educational Effect

By

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

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

Summary : This study aims to reorient a foundation of the existing teaching material and experiment in school education toward putting more focus on the evolutionarily preserved implication that plant pigments function not only as photosynthesis but also as anti-oxidant to protect living cells and plant seeds from oxidative toxicity. A developed experiment was designed for high school students to visualize the anti-oxidant potential of anthocyanin preventing DNA decomposition from hydroxyl radicals (ROS) derived from hydrogen peroxide and ferrous iron through electrophoresis as showing the indicative optimum condition. In addition, to the educational practice conducted for 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.

It is also indicative that the posteriori survey revealed that students clearly understand the anti-oxidant ability of plant pigments, and it is effective for students to associate the biological importance of plant pigments in the course of evolution by teaching this function as anti-oxidant material of plant pigments for species preservation against ROS toxicity resulting from ultraviolet rays and photosynthesis. The study suggests that hands on experimental teaching material elicits students' multifaceted understanding of plant pigments and the evolutionary implication, in high school education. Furthermore, the study material could be utilized as an exploratory activity to fulfill the requirement of biotechnology class, which is supported by techniques of scientific experiment and knowledge taught through unit learning of photosynthesis and biotechnology. 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), Plant pigments, Biotechnology, Evolution

* Teacher Education course in Tokyo University of Agriculture

** Yui junior high school, Hachioji city

*** Kakuro junior high school, Hamamatsu city

**** Rigaku Corporation

***** Tohoku Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization

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

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