

「形質転換」の公開授業について

貝 沼 喜 兵

「形質転換」の公開授業について

貝 沼 喜 兵

1. はじめに

1973年2学期の10月に、筆者は、「形質転換」実験授業を4回にわたり公開した。

今回の公開授業は、筆者の希望ではなく、日本生物教育学会の事務局の企画によって実施したものであった。

1974年から開始される生物Ⅱの指導に関連し筆者の分子遺伝学の実験授業が他の学校の参考になり、かつ、参観された先生方と指導に関して座談会を開き、その討論の内容を「生物教育」（日本生物教育学会誌）に掲載したいからということだった。

分子遺伝学の実験指導について、筆者は44年より実践研究として発表してきた。しかし、今まで、筆者の学校以外ではまだ実験指導を実施しているところはみられないようだ。その原因の一つに、授業で、これらの実験がどのように展開され、どのような成果と問題があるのか不明であることもあげられるのではないかと考えた。

そこで筆者は、次の表1のようなスケジュールで公開授業を計画した。

公開したクラスは4クラスのうち、土曜日の3～4時限に授業のある2年1組を選んだ。理由は、放課後、座談会を開くのに都合がよいからであった。他の3クラスについては、公開したクラスと同一の指導を実施した。（筆者の学校は一学年4クラス制である）。

そこで、今回の公開授業のねらいと成果などの概要についてまとめた。

表1 公開授業のスケジュール

| 月／日 | テ ー マ と そ の 内 容 |
|-------|---|
| 10／6 | 微生物の遺伝形質とその特徴 |
| 10／13 | 形質転換 (1)W23生菌からDNA抽出。 (2)ペーカロによるDNAの塩基分析 |
| 10／20 | 形質転換 (1)YS11に、W23DNAを加えて保温、 (2)転換菌を選択培地で検出。 |
| 10／27 | 形質転換まとめの発表学習 |

2. 実験の構成

(1) 形質転換を選んだ理由

分子遺伝学を生徒に指導する場合は、次の観点を考慮する必要がある。

- ① 古典遺伝学との関連性（発展の歴史的過程）を理解できる。
- ② 分子遺伝学の基本概念を理解し、基礎技術の習得ができる。
- ③ 実験内容が長期継続観察・実験にふさわしいものであること。
- ④ 高校生に理解でき、かつ興味を喚起できるもの。

上記の観点から「形質転換」が高校段階の実験テーマ（内容）として最もふさわしいものの一つであると考えている。その理由を具体的に検討してみると次の通りである。

分子遺伝学の成立と発展の直接の契機は1953年、Watson & Crick の「二重らせんモデルと複製のモデル」の提唱であろう。このモデルが刺激となり、これを実証する実験が多数の学者によって実施された。その結果、モデルの正しさが証明されたばかりでなく、更に発展し、次の図に示された分子遺伝学の中心的課題がほぼ明らかにされたという歴史的事実があった。

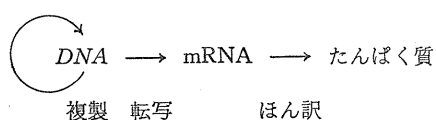


図1 分子遺伝学の中心課題

ところで、1953年の Watson & Crick の「モデル」提唱を直接支えていた研究成果は何だろうか。それは次の4研究になるのではないだろうか。

- ① Griffith から Avery らにいたる形質転換の研究。
- ② Wilkins & Franklin らによる DNA の X線回折の研究。
- ③ Chargaff による DNA の塩基分析の研究とそれによるテトラヌクレオチド説の打破。
- ④ Pauling によるたんぱく質 α のらせん構造の解明。

このように分析すると、Watson & Crick の「モデル」を支えた研究成果の中の一つになっていた。形質転換は一連の実験の中でDNA抽出が必要である。そのDNAを用い、加水分解物のペーパークロマトグラフィーによる塩基分析を加えれば、Chargaff のテトラヌクレオチド説の打破と二重らせん構造の基礎となった、塩基対の水素結合に関する指導も可能となる。すなわち分子遺伝学の成立の直接の契機となった歴史的な研究に関連した4つの実験のうち2つの研究に関連した実験指導が可能である。また、実験指導に先だってこのような歴史的事実を明らかにすることは、生徒の学習に対する意欲をかきたてるのに十分効果があると考えている。

3. 実験原理と授業の構成

形質転換実験は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いる。実験原理は、図2の通りである。ここでは、菌の遺伝形質をどのように区別し、mutant から wild への形質転換をした菌を検出し、

確認するかという問題がある。さらに, mutant の菌が, 外来性の DNA を取り込む状態にし, この菌に DNA を処理するという問題がある。いわゆる「cp」といって細菌が DNA を取り込む生理的状态にすることである。

「形質転換」実験の原理は, *B. subtilis* の wild である W 23 (最小培地に生育できる) から

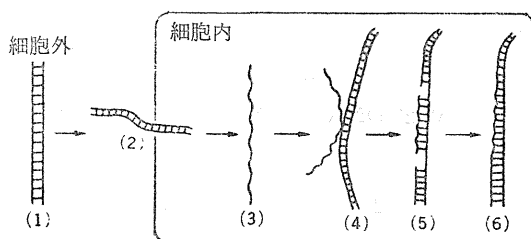


図2 形質転換におけるDNAの行動

(1)~(6)は細胞内外でのDNAの状態を表わす

- (1) 高分子二重らせんDNA
- (2) 細胞表面の吸着および吸収の過程
- (3) 単鎖化されたDNA
- (4) 細胞染色体との接合状態(シナプス)
- (5) 単鎖組み込みの中間段階
- (6) 染色体に組み込まれた状態

吉川寛(1968)「トランスフォーメーションについて」
タンパク質・核酸・酵素 Vol. 11 No. 13 p. 3 (共立出版)

DNA を抽出し, mutant である YS 11 (ade^- , leu^- , arg^- : 最小培地にアデニン, ロイシン, アルギニンを加えないと生育できない) を cp にし, これに W 23 DNA を加え, 転換菌を選択培地で検出する実験である。YS 11 が本来生育できない選択培地に生育できるように遺伝形質を転換したのは, W 23 DNA を取り込んだためであるとする実験である。

この実験を系統的に展開するには, 次のような順序で生徒に学習させる。

(1) *B. subtilis* W 23 (wild) と YS 11 (mutant) の遺伝形質

一例として表2のような選択培地を調整させ, これに W 23 と YS 11 を適当な濃度でぬりつけ, コロニーを生じさせる。細菌の遺伝形質は栄養要求性突然変異(他に糖の利用性, 抗性物質抵抗性, ファージ抵抗性などもあるが)できわめて容易に区別でき, またコロニーを測定することから正確に定量できることを観察を通して理解させる。これに関連して微生物遺伝学の歴史も指導できる。

表2 *B. subtilis* の遺伝形質

| B.sud | M* | Ade ⁻ | Leu ⁻ | Arg ⁻ | All | 菌数/ml |
|-------|-----|------------------|------------------|------------------|-----|-------------------|
| W23 | 101 | 122 | 89 | 57 | 121 | 1.0×10^9 |
| YS11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 47 | 4.7×10^8 |

* Mとは minimum medium すなわち, 最小培地のことである。

Ade⁻ とはM+ロイシン+アルギニンで, アデニンのはいらない培地の意味である。

(2) W 23 の培養と DNA の抽出

常法によって W 23 の大量培養と集菌で, 生徒実験用の生菌を得る。この生菌を用いて, 実験

で生徒に形質転換用の DNA を抽出させる。

(3) DNA の加水分解とペーパークロマトグラフィー

精製した DNA を乾燥し、これに 6 N 塩酸で加水分解し、水解物をイソプロパノール塩酸系溶媒で展開する。ペーパークロマトグラムを暗室中でマナスライトで検出し、 R_f 値などから塩基構成を定性確認する。この実験ではアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルの標品をスポットし、分解物と同時に展開すると確認が楽である。

(4) YS 11 を cp にし、これに W 23 DNA を加えて保温する。処理菌を選択培地にぬりつけ、40時間培養後、転換菌数を測定する。

これら(1)~(4)の各実験は、いずれも 2~4 時間単位の授業で実施するのに適した程度のものである。実験のまえに 1~2 時間の講義を行ない、実験のねらい、方法・原理、結果の予測とデータの処理などについて指導しておく必要がある。実験のあとは、結果の分析、検討、そこから原理や法則性を導びくためのまとめの学習を 1~2 時間とるとよい。

今回の公開授業では、時間の制約から、(2)と(3)をまとめて 2 時間で指導した。また原則として、実験の前に講義の時間を 1~2 時間ほしかったが、これを省略し、実験の前に必要に応じて 30~40 分の説明ですませた。

実験の方法その他についての詳細についてはすでに発表してきたので省略した。

4. 指導方法の概要

実験は、各クラスに 6~7 人の実験班を 6 ケ班、名簿の順に編成させ、すべての実験は、これを単位として実施させた。なお、各班に諸連絡、実験、討議のリーダーとして班長を 1 名選ばせた。

授業での実験は、あらかじめ配布した資料を教材として、実験のねらい、原理・方法を説明した。ついで、実験器具、薬品などを配布し、実験を開始させた。

実験操作で重要なもの、あるいは複雑であるとか、「コツ」が必要なときは、操作を一時中断させ、生徒を一ヶ所に集め筆者がデモンストレーションをした。その後、各班に分かれて継続させた。実験操作の遅れている班には筆者が手伝うこともあった。

実験結果は、特に最後の転換菌の測定は、40時間後測定するのであるが、これは放課後行なわせた。結果の観察と測定と終わったあと、寒天を落し、シャーレを洗って乾燥するまで各班の分担とした。

それぞれの実験のたびにレポートの作成を義務づけた。実験とその結果の分析などの討議は班長を中心に班単位にやらせたが、レポート作成は個人単位であった。

レポートの形式は、目的・方法・結果とその分析のほか、特に筆者は、実験に関連した考察課題を出した。その課題は、特殊な本を調べないとわからないようなものではなく、筆者が印刷して配布した資料を読み、授業内容を理解し、実験方法等を検討すればよいものであった。形質転

換の(3)~(4)に関連して生徒に課した考察課題を参考に次の①~⑦に示した。この考察課題は、実験の原理・方法および結果の分析などの総合的理解を促進するのに重要である。

- ① 「cp」とは菌がどのような状態のときか。
- ② 形質転換実験を用いて DNA の取り込み速度を測定する実験を計画せよ。
- ③ YS 11 (ade. - leu. - arg. -) が Ade. - (最小培地+ロイシン+アルギニン) にコロニーを生じた。この菌の遺伝形質はどう変わったのか。それはまたどうすれば確認できるか。
- ④ この実験で YS 11 が ade. +, leu. +, arg. + になる確率はどうか。各班のデータを用いて算出せよ。
- ⑤ YS 11 を ade. +, leu. +, arg. + にするにはどうしたらよいか。
- ⑥ この実験で I ~ IV の各実験区を設けた根拠は何か。
- ⑦ この実験で「DNA が遺伝子の本体である」と結論できるか。否定、あるいは肯定する場合のいずれでもその根拠を明確に示せ。

発表学習の方法は、班単位に順に結果とその考察を発表させた。特に、失敗した班は、その原因の分析について厳密性を要求した。ついで、筆者の考察課題を同様に班単位に発表させた。課題によっては、班によって全く反対の見解が述べられる場合があった。その場合は、問題点を明らかにし、各班に討議をさせ、再発表するという方法で内容を深めさせた。

最後に、筆者がまとめをし、次の実験へと発展させる方法で発表学習を進めた。

5. 実験結果の概要

今回の公開授業での実験・観察は前述した通りであった。

(1) 微生物の遺伝形質とその特徴。

この実験は、筆者が準備したプレートを各班に観察させ、コロニーやプラークを測定させ、bacteria と bacteriophage の遺伝形質を理解させるためのものであった。

結果の一部は表 2 に示した。T₄ ファージを用いたプラークの観察も行なわせたが、結果は省略した。

(2) 形質転換

① W 23 より DNA の抽出

この実験はいずれの班も抽出に成功した。白い線維状の粗 DNA をガラス棒に巻きとった時は

表 3 W23DNAの構成塩基 (Isopropanol : HCl 19 cm 展開)

| 区 分 塩 基 | W23 (cm) | Rf 値 | 塩基 (cm) (標品) | Rf 値 |
|------------|----------|-------|-----------------|-------|
| A (アデニン) | 6.5 | 0.347 | 6.7 | 0.353 |
| G (グアニン) | 4.7 | 0.247 | 4.7 | 0.147 |
| C (シトシン) | 8.5 | 0.447 | 8.5 | 0.447 |
| U (ウラシル) | 10.5 | 0.553 | 12.8 | 0.674 |
| T (テミン) | 14.6 | 0.768 | 14.9 | 0.784 |

表4 形質転換実験結果の概要(1組)(48年10月27日)

| | 班 | 1 | | ② | | 3 | | ④ | | ⑤* | | 6 | | 備 考 | | |
|------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|--|--|
| | | dil | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻¹ | | 10 ⁻² | |
| I | Ade ⁻ | 665×4 135×4 | 21 12 | 195 143 | 83 0 | 385 467 | 204 4 | 1910 2104 | 326 253 | 141 71 | 7 20 | 732 1352 | 162 72 | CPYS11 + W23DNA | | |
| | Leu ⁻ | 339 1075 | 13 54 | 764 456 | 67 20 | 130 268 | 1 5 | 370 568 | 68 98 | 161 320 | 11 6 | 632 848 | 35 6 | | | |
| | Arg ⁻ | 61 29 | 0 0 | 9 6 | 0 1 | 5 | 2 0 | 0 5 | 0 0 | 3 9 | 0 0 | 4 6 | 0 0 | | | |
| II | Ade ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | CPYS11 + DNase W23DNA | | |
| | Leu ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | | | |
| | Arg ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | | | |
| III | Ade ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | W23DNA only | | |
| | Leu ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | | | |
| | Arg ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | | | |
| IV | Ade ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | CPYS11 only | | |
| | Leu ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | | | |
| | Arg ⁻ | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | 0 0 | | | | |
| 生 菌 数 調 査 | | 10 ⁻⁵ 174 334 | 10 ⁻⁶ 28 35 | 10 ⁻⁵ 798 568 | 10 ⁻⁶ 40 49 | 10 ⁻⁵ 115 125 | 10 ⁻⁶ 3 5 | 10 ⁻⁵ 236 248 | 10 ⁻⁶ 18 17 | 10 ⁻⁵ 82 39 | 10 ⁻⁶ 5 0 | 10 ⁻⁵ 192 248 | 10 ⁻⁶ 21 1 | I を All に 10 ⁻⁵ ~ 10 ⁻⁶ dil. してぬ りつけた。 | | |
| | 転換率 | Ade ⁻ | 5.2×10 ⁻⁴ | | 3.8×10 ⁻⁵ | | 3.5×10 ⁻⁴ | | 9.2×10 ⁻⁴ | | 1.8×10 ⁻⁴ | | 4.5×10 ⁻⁴ | | * ただし、 2, 4, 5 班は再実 験の deta である。 | |
| | Len ⁻ | 2.3×10 ⁻⁴ | | 1.4×10 ⁻⁴ | | 1.7×10 ⁻⁴ | | 2×10 ⁻⁴ | | 4×10 ⁻⁴ | | 3.3×10 ⁻⁴ | | | | |
| Arg ⁻ | 1.5×10 ⁻⁵ | | 3.3×10 ⁻⁶ | | 4.2×10 ⁻⁶ | | 2.2×10 ⁻⁶ | | 1×10 ⁻⁵ | | 2.2×10 ⁻⁵ | | | | | |

生徒は非常に興奮した。

② DNA 加水分解物のペークロによる塩基の分析

結果の一部を表3に示した。これはある班のデータであるが、一部の班でシトシンの明瞭でないのがあったが、ほぼこれと同様の結果を得ていた。(Uの検出される根拠は粗DNAを用いた

ためである)。

③ cp Ys 11 に W 23 DNA を処理し、転換菌を検出する。

この実験に用いた各班の DNA は、それぞれの班が抽出したものをを用いた。結果は表 4 に示した。今年の生徒実験のデータは全般的にの転換率が低い傾向にあった。理由はいくつか考えられるが、確認していない。

このデータで、2, 4, 5 班は放課後再実験をしたが、その時のものであった。失敗の原因は雑菌の混入と、メスピペットの混用であり、いずれも不注意によって生じたものであった。

6. 参観者の概況

4 回の公開授業で参観者の数は表 5 の通りであった。

表 5 参観者の概況

| 月／日 | テ　　マ　　（内　　容） | 参観者数 |
|-------|---------------------------------|------|
| 10／6 | 微生物の遺伝形質と特徴 | 2 人 |
| 10／13 | 形質転換（(1)W23DNA の抽出、ペークロによる塩基分析） | 4 人 |
| 10／20 | 形質転換（CPYS11 に W23DNA を加え転換菌の検出） | 2 人 |
| 10／27 | 形質転換（まとめの発表学習） | 3 人 |
| 10／27 | 座談会（分子遺伝学の実験学習について） | 9 人 |

参観者数は極めて少なかった。その原因として次のことが予想された。

(1) PR の不足、2 回目までは、生物教育学会の事務局が直接電話で出席を呼びかけたという。

(2) 2 学期のこの時期は文化祭、体育祭などの行事の指導で出席できなかった。

(3) 直ちに明日の授業に役立つ内容でないこと。

次に参観者の感想を項目に分けて紹介してみる。

(1) 肯定的な感想

① この実験指導をみて高度な内容も程度を下げないで生徒に理解するよう厳しく要求することが大切だとわかった。

② 高度な実験をどのように指導するか興味あったが、何時間もかけて系統的に展開するのを見て、これなら確かに生徒にもわかると思った。

③ いろいろな試薬を用いて熱心に実験をする生徒を見て驚いた。

④ 発表学習ではむずかしい課題をよくこなしているのには驚いた。休み時間生徒と直接話しかけてみたが、興味を持ち割合によく理解しているのにまた驚いた。

⑤ 実験をしないで授業をすすめていく際、特に「二重ラセン構造」のような場合、直接生命

現象と結びつかず、これらが生徒の頭にどのようなイメージを生じさせているのか皆目見当がつかないが、形質転換では、生徒が自分達で抽出した DNA を用い、栄養要求性突然変異形質の転換現象を通して具体的な事実と結びつけて理解しているわけで興味も湧くであろう。

(2) 否定的な感想

① 特定の分野を深く学習することは他の分野を犠牲にすることになり受験に支障をきたすのではないか。

② 内容が高度で一般の生徒には理解できないのではないか。

③ 実験指導の準備や整理で、教師がオーバーワークになるのではないか。

④ 経費の面で実施できにくいのではないか。

(3) 座談会について

日本生物学会長の下泉重吉先生をまじえて 9 名の出席のもと 3 時間近く討議した。この日は学会の例会をも兼ねていた。

筆者の公開授業を中心に生物教育の在り方について活発に討議した。この座談会の様子は近く「生物教育」誌上に発表される予定であるので省略することにした。

7. おわりに

分子遺伝学の実験授業の公開については、今後も継続していく予定である。形質転換以外にフェージの組換え実験を通して、分子遺伝学における「遺伝子概念の指導」をどうするかなどは興味ある課題の一つであろう。

なお、実験に対する生徒の感想はここでは省略したが、これについては「生物教育」(Vol. 14 No. 4) にまとめてあるので参照して頂きたい。