

「遺 伝 学 習 に お け る 分 子 遺 伝 学
の 指 導 に 関 す る 実 践 的 研 究」

貝 沼 喜 兵
重 松 檉 三

〔Ⅰ〕 はじめに

微生物遺伝学を基盤に発展した分子遺伝学は、1953年、Watson-Crick の二重ラセンモデルならびに複製のモデルの提唱をきっかけに飛躍的に発展した。

その成果は、レッシング (DNA-二重ラセンの秘密、みすず書店) によれば、次のように評価されている。「DNA はその化学的単位のさまざまな配列のうちに、地球上の生きている細胞や生物の繁殖や生長を支配する遺伝情報をもっていることを示しました。遺伝情報は、生命の主要構造と調節機構を形づくるたくさんのたんぱく質の成分と形を規定することによって生長を支配しています。」DNA は、現在では、多細胞生物における細胞の分化、神経原における、学習や記憶の関連についても研究され、生体を構成する高分子の機能が実に合理的にその構造と関連していることを明らかにした。

生物学にとって実に革命的なこの成果を可能にした、生命の研究に対する考え方ならびに研究方法は何んであったのだろうか。それは従来の研究方法とどんな点において区別されるのだろうか。

従来の生物学の研究方法は、レッシングを引用するならば「……外部から生命を研究することどまり、その内部機能を外にあらわれる多くの現象から言及するにかぎられ……したがって基本原理がなく個々の現象の羅列が多かった。」これに対して、分子遺伝学は、生命を構成する高分子、例えば、DNA, RNA およびたんぱく質などを直接取り出し、化学者が、ピルビン酸や NAD などの小さな分子を取り扱うのと同じような確かな手法で、その構造から機能、すなわち遺伝情報を解析しようとした。すなわち、分子遺伝学、広くは生物物理学の確立があげられよう。

生物学に研究方法上で革命的变化をさせたのは物理学の影響を受けた生物学者ならびに生物学に興味をもった物理学者が大きな役割を果たしているといわれている。

例えば、二重ラセンモデル確立に貢献した Crick, トリップレットコードの Gamov, シストロンの概念を確立した Benzer などの著名な学者はいずれも物理学専攻であった。これらの研究者達は、生体を構成する高分子を物理化学的に解析し、その構造からこれらのもつ遺伝情報を定量的に取り扱う方法を確立した。

研究方法における革新性と成果の素晴らしさは、当然高校の生物の学習内容をも序々に変化させつつある。現時点においては、分子遺伝学の指導の是非を論じている段階ではなく、どのようなテーマについて、どんな方法で指導するかについて研究する段階であろう。

そこで、分子遺伝学の指導においては、その成果を単なる知識として解説するだけでなく、前述のような立場で研究方法の変革、すなわち、分子遺伝学とは何かを明らかにする必要がある。それには、実験を通して実証的に指導するのが最も効果的である。

そこで、筆者は、トランスフォーメーションの実験を高校の遺伝学習に導入し、上記の目的を達成しようとした。理由は、DNA が遺伝子の本体であることを実証し、Watson-Crick の二重ラセンの提唱にも一役果した歴史的な実験であることと、ならびに、現在でもこの実験は、DNA の生物活性を直接測定する唯一の方法であるからである。

トランスフォーメーションを用いて、生物学の研究に革命的成果をもたらした研究方法とその成果の指導を同時に行なえんと考えた。

この報告は、筆者が担当する高校2年生全員を対象にして、1969年6月―7月にかけて指導した実践である。なお、1969年夏、日本生物教育会仙台大会において一部を報告していることを付記する。

〔Ⅱ〕 実践研究の計画と目標

遺伝学習をどう指導するか。その中で、分子遺伝学の指導はどのように伝置づけられるか。特に分子遺伝学の実験を通して実証的に指導するには、どのような実験をどう指導するか、その際の指導理念は何か、などを明らかにするのが実践研究のねらいである。

1. 実践研究の目標

この実践研究の目的は次の3点である。

- (1) 遺伝学の発展を歴史的に取扱うことを通して科学がどのように発展するかを理解させることが可能かどうか。
- (2) DNA が遺伝子の本体であることを分子遺伝学の立場で実証的に指導するにはどんな実験をどのように指導したらよいか。
- (3) 遺伝情報の発現については、どのようなテーマをどう指導したらよいか。

(1)―(3)の中で、特に今回は(2)に重点を置いて、分子遺伝学の確立の中心課題であった「DNA が遺伝子の本体であることを実証的に指導するにはどうしたらよいか」という課題に対して、トランスフォーマーシヨンの実験を実施することで解決しようとした。この実験をどのような考え方で指導したか。実際の指導はどうであったか。その中でどのような成果と問題点があったかを明らかにしたい。

2. 遺伝学習の指導目標ならびに計画

遺伝学習の指導目標とその計画を次のようにたてた。

(1) 指導目標科

① 科学的思考力

- I 遺伝学の発展を歴史的に体系づけることにより、遺伝学を発展させた契機と原動力ならびに科学の発展における研究方法の変革とその成果について考察させる。
- II DNA が遺伝子の本体であることを実証する生徒実験を通して科学の研究の基本を知り、かつDNAの働きをその構造と関連づけて考察させる。

② 実験技術

- I バクテリアの取り扱いができる。
- II トランスフォーマーシヨンの実験ができる。

③ 知識・理解

- I Mendel の法則を中心として生物の遺伝現象を知る。
- II 染色体に遺伝子が座を占めている根拠と染色体地図作成の方法を知る。
- III Beadle と Tatum のアカパンカビによる one gene-one enzyme 説ならびに Lederberg と Tatum の大腸菌の接合の発見は、分子遺伝学の基盤となったことを理解する。
- IV Watson-Crick の DNA の二重らせん構造ならびに複製のモデルの提唱は分子遺伝学を飛躍させる契機になったことを知る。
- V DNA がどのようにしてたんぱく質を合成するかについて理解する。

(2) 指導計画

- | | | |
|---------------------------------|------|-------------|
| ① 遺伝学の歴史 | 2 時間 | スライド利用 |
| ② Mendel の法則 | 2 時間 | プリント・スライド利用 |
| ③ 染色体地図 | 2 時間 | だ腺染色体の観察 |
| ④ バクテリアの遺伝形質と選択培地ならびにバクテリアの有性生殖 | 2 時間 | 実験 O・H・P 利用 |

⑤ トランスフォーメーションの実験 10時間 (試験休中)

⑥ 分子遺伝学 4時間 スライド、O・H・P

3. 指導対象生徒

付属の高等学校2年生全員(168名)を実験対象にする。なお男子校であるので女子生徒はいない。

生徒の理科の指導は次のようになっている。

1年生 生物(2単位) 化学(4単位)

2年生 生物(2単位) 物理(3単位)

3年生 物理(2単位) 地学(2単位)

生徒の能力、特に理解力は著しく高い。知能検査の結果は2/3は優以上で、残りの1/3が上の中一上の段階である。

4. 実践研究の計画(方針と経過)

実践研究の中心課題は分子遺伝学を実験を通して実証的に指導すること、その中で生徒に科学の方法を学ばせることにある。はじめからトランスフォーメーションを明確に意識していたわけではなかったが、東京大学農学部農芸化学科今堀和友教授の研究室で研究を続ける中で、トランスフォーメーションがいろいろな面で高校の分子遺伝学指導の実験テーマとして適切であるという結論に達した。そこで、(1)―(4)の段階に実践研究を行なう方針で準備を進めた。

(1) 実験技術の習得とその簡便化

トランスフォーメーションの実験技術は、東京大学応用微生物研究所の斎藤日向先生から直接指導して頂いた。筆者の考えを聞かれた先生は賛意と懇切なご指導をして下さった。なお、この実験に使用した *Bacillus subtilis*; W 23; YS 11 は斎藤先生から分譲されたものである。

大学の研究室で行なわれている方法は、高価な機械器具を用いているのでそれをそのまま高校に導入することは不可能である。そこでこれを設備や予算の少ない高校に導入を前提にして簡便化のための研究をはじめた。ここでの主目的は、高価な設備を用いなくてもよい方法、高価な輸入薬品を国産のものに置きかえることが可能かどうかについてであった。なお、生徒実験を考慮して実験方法の改良も行なった。

これ等の実験は1968年8月―1969年1月にかけて行ない、その成果は雑誌「遺伝」裳華房(1969年2月―3月)に発表した。

(2) 生物部の活動

生徒実験の段階では、各学級に1―2名、実際のリーダーがいた方が、実験を円滑に進行させる上にも、生徒の討論を科学的に行なわせる上にも役立ち、重要な役割を果たせることができる。更に、生徒実験の段階では、生物部員は、実験の準備、生徒の助言者として極めて重要な役割を果たす。このような各種の目的と、部員の中にトランスフォーメーションを部活動のテーマにすることの要求が強かったので、この実験を1968年9月から開始し、11月の文化祭にはその成果として大腸菌の接合とトランスフォーメーションの実験の結果などを発表した。一応の実験技術を習得した部員は、部活動の一環として、生徒実験を対象とする簡便化などの基礎的研究を行なって成果を上げた。このようにして、本実践研究では、実験の準備、生徒への助言、実験指導の補助などで大きな役割を果たしたことを特筆しておきたい。

(3) 第1回実践研究

筆者の1人重松樫三は、担当する学級の中の1学級に対してトランスフォーメーションの実験を中心とする実践研究を実施して成果を上げた。

この中で、43名という生徒集団に対して微生物実験は、クラブなどの小人数の場合と非常に

違った困難点があることを明らかにした。その最も大きな点は、雑菌の混入であった。ついで、生徒は、個々の実験の意図を十分理解しないで、教師のいうまま機械的に操作するという点があった。その他、技術的に細かい点の改善について非常に示唆に富む実践研究であった。

雑菌の混入を防ぐ改良法として軟寒天重層法を用い、雑菌の混入の機会を少なく不馴れた生徒実験に効果的な方法であることを示した。

生徒の実験に対する受動的な、主体性のない態度に対しては、あらかじめ、トランスフォーメーションの実験の意義を考察させ、W 23 (Wild), Ys 11 (mutant) を用いて、生徒自身新しい実験に取り組むのだという気概をもたせるように指導した。その他、この段階の研究で、一切を生徒に行なわせる必要はなく、生徒に前後の関連性を十分つける指導を行なえば、時間が相当短縮できる見通しも得られた。なおこの成果は、本校の研究紀要に発表の予定である。

(4) 第2回実践研究

実践研究の計画ならびに指導目標に明かなように、この実践研究には次のねらいがあった。

- ① 遺伝学の発達が歴史的に把握され、分子遺伝学もその中で位置づけられていること。
 - ② 実際に対して、主体的に取り組み、実験を通して、科学の方法が把握されるように指導すること。
 - ③ バクテリアの遺伝形質の区別ができ、トランスフォーメーションは、大腸菌の接合と同じように一種の有性生殖と理解されること。
 - ④ 学年全体を対象とする実験の場合にどんな指導上の問題があるか。
- 上記の①—④の課題を解決するために次のように計画をたてて準備した。

① 遺伝学の歴史について。

スライドを用いて、Mendel 遺伝学から分子遺伝学まで、遺伝学という科学が大きく飛躍した転換点に重点を置いて指導した。

② 実際に対して主体的に取り組む。

実際に先だって、次にかかげるレポートを提出させ、トランスフォーメーションに対する理解と、*Bacillus subtilis* を用いてのトランスフォーメーションのオリジナルな実験計画を立てさせ、実験に対する主体的取り組みを期待した。(付録資料1)

③ 取り扱う菌に対する理解とバクテリアが遺伝学の研究材料として用いられる根拠に対する理解の促進。

B. subtilis (W 23 YS 11) *Eschericia coli* (HfrC, AB 1450) を材料として選択培地上に生育したコロニーを観察させて、遺伝形質の区別を把握させ、その上でバクテリアなどの有性生殖、トランスフォーメーション・トランスダクションなどについてその実験の原理と意義について指導した。

④ トランスフォーメーションの実験

担当する学級の生徒全部にトランスフォーメーションの実験を実施するように計画した。その時の生徒への連絡に用いたプリントを付録資料に示した。

〔Ⅲ〕 指導の方法とその結果

遺伝学習指導全体の中で、「遺伝学の歴史的把握」と「DNA の遺伝情報の発現」の指導内容は省略し、バクテリアを用いての分子遺伝学の実証的指導に焦点を絞って指導の方法と結果について述べる。

今回の実験は次の通りであった。

1. バクテリアの遺伝形質と選択培地

2. *B. subtilis* を用いてのトランスフォーメーションの実験

(1) *B. subtilis* W 23 (wild) から DNA の抽出ならびに構成塩基の検出。

(2) YS 11 (mutant) に W 23 DNA を処理し、選択培地で転換菌を得る。

これらの実験について、(A) 指導の方法、(B) 指導準備、(C) 生徒の活動とその結果、に分けて報告する。

1. バクテリアの遺伝形質と選択培地

トランスフォーメーションの実験に先だって、この実験を行なう目的は実験で取り扱う菌の遺伝形質を明確にしておくこと。バクテリアが遺伝学の研究材料として非常に優れた特徴をもっていること、ならびにトランスフォーメーションは、大腸菌の接合、ファージによるトランスダクションと同様に一種の有性生殖であることを理解すること、かつ、バクテリアの取り扱いになれることなどであった。

(A) 指導の方法

この実験は、生徒に培地の調整、菌のぬりつけなどを行なわせたのではなく、あらかじめ準備し、コロニーの生じたプレートを観察させ、結果を班で討論させる方法をとった。

① 指導時間 2時間

② 生徒の組織：1学級42名、7人1班、6班編成

③ 指導の実態

指導とその経過は次の通りであった。

I 導入 遺伝学は、同種間の形質の異なる個体同志で雑種をつくる研究からはじめられた。現在、分子遺伝学を築いた主役は、バクテリアならびにファージである。これらの顕微鏡でなければ見分けることのできない生物の遺伝形質は一体どのようにして区別するのが。また、これらは一体有性生殖をさせることが可能なかどうかを明らかにするのがこの時間のねらいである。

II 展開

ア 生徒に1枚のプリントと各種のプレートと試薬を配布する。

イ オーバーヘッドプロジェクター (O・H・P) で、このプレートはどのような調整にしたかを説明する。

ウ 生徒にプレートのコロニーを観察させた結果をプリントに記入させ、「結果の考察」をさせる。(付録資料3)

エ 生徒に班で1通の報告書(結果ならびに考察を記入したもの)を提出させた。

オ バクテリアの遺伝形質に対する概念が現在のように発展してきた過程を明らかにする。O・H・P利用。

カ バクテリアの遺伝形質の区別、糖の発酵性、必須代謝物合成能力、抗菌性物質に対する抵抗性、ファージなどに対する抵抗性など多様であることの説明。(実験との関連性)

キ バクテリアの突然変異性、バクテリアは、 $A^+ \rightarrow A^-$ などの自然の生ずる突然変異は 10^{-6} — 10^{-7} である。これらは、選択培地によって選択可能で、ここにバクテリアが遺伝研究材料として優れた特徴の一つがあることの説明。(O・H・P利用)

ク バクテリアの有性生殖 Lederberg と Tatum の実験を中心に、大腸菌の接合、トランスダクション、枯草菌のトランスフォーメーションなどについて説明。(O・H・P利用)

III 整理と評価

(B) 指導の準備

上記(A)の実験観察の指導に当って準備するものは下の通りである。

① プレート (各班計16枚, 1学級総計96枚, 破損を見込み1枚づつ余分に調整。)

② プリント (付録資料3)

③ O・H・Pの原稿作成

以下①の概要について述べる。

① プレーートの準備

プレート調整の具体的な実験方法については、貝沼¹⁾の方法によったので細部については省略する。

B. subtilis W 23, YS 11 の Ade^- , Leu^- , Arg^- , All^- の各プレートは、1学級の観察ごとに作りかえるのでは、シャーレの個数の整備ならびに培地の準備に大変であるし、その必要性もない。5°Cの冷蔵庫に貯蔵しておけば夏でも3—5日間は貯蔵可能である。冬期は、室内に放置しておいても暖房のない部屋なら3—5日は生徒の観察に使用できる。

ただし、プリントのNPP (パラニトロフェニールホスフィート) をしみこませたロ紙をコロニーに押しつける方法は、もし、コロニーが、アルカリ性ホスファターゼを合成しておれば黄変するので、その都度新しく培地を作って培養する。この培地の調整法は、Garen と Levinthal²⁾によった。色の変化があざやかに出るので著しく生徒の興味を喚起した。

(C) 生徒の活動とその結果

プレートに生じたコロニーを実際に肉眼で観察するのははじめての生徒が多かった。生徒の中にはハンカチを喰わえて恐る恐るのぞきこむものもいる。そこで、大腸菌も枯草菌も、全く無害なバクテリアであることを説明してやると彼らの不安は解消された。

各種のプレートに生じたり、生じなかったりするコロニーの観察を通して、生徒はバクテリアの遺伝形質は、選択培地で区別できることを容易に理解した。また、アルカリ性ホスファターゼの形成の有無は、NPP をしみこませたロ紙をコロニーに密着させることで黄変するしないで数秒の内に判定できるのでバクテリアの遺伝形質の純粋性とその変化の早さに驚いた。この観察は、後半の分子遺伝学の指導のフィードバック阻害、すなわちたんぱく質合成の調節機構の指導の重要な実験事実になる。

E. coli の Hfr C (♂) AB 1450 (♀) はバクテリアの有性生殖、すなわち接合に用いる菌であるが、Hfr C がストレプトマイシンの培地に生じたコロニーも貴重な観察テーマであった。生徒は、これが、自然に生じた突然変異と仲々気づかなかった。大半は雑菌の混入ということで片づけていた。

この観察の結果は生徒の提出したプリント報告書の一部を参考にかかげておく。(付録資料4)

2. *B. subtilis* を用いてのトランスフォーメーションの実験

この実験を行なうねらいは、実験に主体的に参加することを通して科学の方法を体得することにある。すなわち、課題を明確にし、解決のための仮説をたてる。仮説を実証するための実験を行なう。結果に基づいて仮説を再検討し、次の仮説を立てる。生徒に少しでもこの科学における探究の方法を経験させる。それを通して、DNA が遺伝子の本体であることを実証するにある。なお、DNA の抽出確認、構成塩基の検出など、今後の分子遺伝学指導の重要な実験内容となる。

これらの目的を達成するために、実験の前に生徒にレポートの提出を求めた。従来の実験班は7名1班であったが、レポート作成の時だけは、3—4名 (すなわち1班を3人と4人) に分けて作成させた。評価基準は下の基準によった。すなわち実験計画にいろいろな検討を加えている

か否かを判断の基準にした。最もすぐれたレポート（100点に評価）、出来の悪いレポート（65点に評価）を付録資料5に示した。この時の全体のレポートは48通でその時の評価の観点は次の通りであった。なお、次のプリントは生徒に評価して渡したものである。

Report の評価について

次の観点から report を評価した。

1. Avery らの実験について

- (1) 実験を正確に理解しているか。
- (2) 実験のもつ意味をどう評価しているか。

2. Transformation について

- (1) Original な実験計画を立てているか。
- (2) 計画が科学的に検討されているか。
- (3) 各種の問題に疑問を出し、それについて積極的な討論をしているか。

評 価

組 班 班員

なお、report は発表用の資料にするために当分教官が保管する。

評 価

100点	1通
95%	3%
90%	2%
85%	2%
80%	20%
75%	9%
70%	10%
65%	2%

(B) 指導の準備

生徒実験に当たってどのような準備が必要かについては、①—⑤に分けて述べる。

① W23 から DNA の抽出

I W23 生菌の準備、各班 0.3g の生菌を用いるので、実験の前に 1 学級 1.8g をスターラー方式で増殖させ、遠心法によって集菌し、冷蔵庫に貯蔵しておいたものを使用した。

II 試薬、saline EDTA, 25% SLS, ○リゾチーム、過塩素酸ソーダ、○クロロホルム、イソアミルアルコール、○エタノール、SSC（透析用）、○1/10 SSC、○10 SSC、○透析チューブ

なお、○印をつけたのは、各班に容器に入れたり、薬包紙に包むなどしてあらかじめ配布したもの。他は、教卓に常置し、必要な時だけ生徒にとりこにさせた。なお試薬は実験に先だって調整しておいた。

トランスフォーメーションの実験は非常に時間がかかり、かつ、断続実験なので正規の授業の中に導入するには、工夫が必要である。今回は、試験休みを利用して行なった。体育クラブの合宿のために参加できない生徒が各クラス 2—3 人あった。

(1) 実験の期日と時間（資料 2 参照）

(2) 生徒の組織（7 人 1 班 1 学級 6 班 男子のみ）

(3) 実験の概要

次の①—⑤小実験に分かれている。

- ① W 23 wild から DNA を抽出する。
- ② YS 11 (mutant) を cp. (competent, バクテリアが外来性の DNA を取り込める状態) にする。
- ③ cp. になった YS 11 に W 23 DNA を与えて処理する。
- ④ Ade⁻, Leu⁻, Arg⁻, All などの選択培地を調整し、転換菌を選択する。
- ⑤ ①に関連し、抽出した DNA の加水分解とペーパークロマトによる構成塩基の検出を行なう。

これらの実験のうち、②は、教師が準備し、⑤の実験は、教師のデモ実験にし、生徒は暗室の中で塩基の観察調査を行なった。

前後3日間にわたる実験の配分は下のものであった。

第1日：W 23 生菌より DNA の抽出・DNA の加水分解とペーパークロマトの展開。

第2日：cp. YS 11 に第1日目に抽出した W 23 の DNA を処理し、選択培地を調整し、これにぬりつける。ペーパークロマトグラムより塩基の検出。

第3日：転換菌の検出と結果についての討論。実験のあとかたづけ。

(A) 指導の方法

第1日から第3日の実験まで含めて、指導の方法は共通していた。

実験開始に先立って、トランスホメーションの概要について説明し、ついでその日の実験の経過をO・H・Pとプリントを併用して説明を行なう。

あらかじめ、当番生徒によって配布しておいた材料器具などで実験を行なうが、新しい実験のたびごとに指示し、あるいは必要に応じて、生物部の生徒の演示をも併用した。

実験の都度、ポイントについては生徒に考察を行なわせ、その日の最後に提出させた。実験の方法については生徒にプリントにして配付した。(付録資料6<E×p, No, 1—No, 4>)

Ⅲ ガラス器具 100 ml 三角フラスコ 1 個、駒込ピペット (2 ml—3 ml) 3 本、10 ml メスピペット 1 本、1 ml メスピペット、1 本、ガラス棒 2 本、500 ml ビーカー 1 個、温度計 1 本、遠心分離用遠沈管 50 ml 容 1 本。

Ⅳ 器具 37°C, 60°C の温湯準備のためのもの、鉄製三脚、アスベスト付金網、試験管たて。

Ⅴ 共通器具 遠心分離器 1 台、冷蔵庫、スターラー、大型三角フラスコ。

② YS 11 を CP にする。

YS 11 のスラントから、100 ml の L-broth に接種し、一晚培養し (15時間)、15 ml C I medium の入った 100 ml の三角フラスコに 0.3 ml 接種し、4 時間、恒温器 (37°C) の中でスターラーで培養したものを、30 ml の C II medium に移す。これで 1.5 時間培養した。

1 学級当り CP YS 11 30 ml があればこの時は十分であった。

準備するもの

Ⅰ YS 11 スラント、滅菌した L-broth, C I medium, C II medium。

Ⅱ 器具 オートクレーブ、遠心分離機、スターラー、恒温器、乾熱殺菌器。

Ⅲ ガラス器具 100 ml 三角フラスコ、3 本、滅菌メスピペット 10 ml 5 本、1 ml 3 本、0.2 ml 4 本。

③ CP YS 11 に DNA を処理する。

CP になった YS 11 を滅菌した綿栓つき試験管に 1 ml ずつ分注し、透析の終わった DNA を加えて 60 分処理するのである。

この場合、透析の終わった DNA にはかなりの雑菌が入っているので、クロロホルムを懸濁させることが必要である。

I 滅菌した綿栓つき試験管 3 本、滅菌した小試験管 2 本、滅菌駒込ピペット 1 本、滅菌メスピペット 10ml, 0.2ml, 各 1 本。

II DNA の熱変性用 100°C の沸とう水の準備、水冷用の水。

III クロロホルム

④ 選択培地の調整とぬりつけ

各班、Ade⁻, Leu⁻, Arg⁻, 各 10 枚、All 6 枚のプレート进行调整する。

I ガラス器具 シャーレ 36 枚、ピペット、いずれも滅菌済みのもの 10ml 3 本、1 ml 8 本、0.2ml 5 本、小試験管 10 本。

II 試薬・培地 アデニン、ロイシン、アルギニンの各溶液 5 ml 程、最小培地 (36 枚に足りよう 1 l の三角フラスコに入れて滅菌して渡す)、ぬりつけ用の軟寒天液 (200ml の三角フラスコに 100ml ほど入れ 45°C にして用いる)、菌液を希釈する minimal (200ml の三角に 100ml ほど入れて渡す)。

III 器具 鉄製三脚、アスベスト付金網・ビーカー (45°C の温湯をつくって軟寒天を凝固しないように保つ)、試験管たて、マジック、輪ゴム、アルミホイル、温度計。

IV 共通用具 オートクレーブ、恒温器、乾熱殺菌器、冷蔵庫など。

なお、ここで大量に必要な、最小培地、アデニンなどの有機物、軟寒天、菌を希釈する minimal (最小培地からブドウ糖と寒天を除いた) などは、一括滅菌し、滅菌しておいた三角フラスコに分注して配布するとよい。最小培地は、1 l の三角フラスコに 700ml 必要なので、それぞれ滅菌する。性能のよいオートクレーブがないと、この実験は出来にくい。

⑤ DNA の加水分解と構成塩基の検出

乾燥した粉末状の DNA をガラス封管中で塩酸加水分解し、これをロ紙に吸着させ、純粋な塩基と対応させて、イソプロパノール塩酸の溶媒で展開するのである。

ペーパークロマトグラムの検出は、乾燥したロ紙に暗室の中でマナスライトを照射して、塩基の所在を鉛筆で印をつけ検出した。

I ガラス封管 ガラス毛细管、クロマト用展開シリンダー。

II 6N 塩酸、イソプロパノール、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウルシルル。

III クロマト用ロ紙、マナスライト、ヤスリ。

(C) 生徒の活動と結果

生徒の実験活動は大体順調に行なわれ、大きなミスはなかった。

実験に先立って、O・H・P で概要の説明があり、ついで、実験指針用のプリントをみながら実験を進行させ、重要な実験は、生物部の生徒あるいは教師の演示が終ってから行なったので、大きなミスは生じなかった。

実験の中で、生徒を感激あるいは興奮させたのは、DNA のガラス棒での巻き取りと DNA を処理した CP YS11 を選択培地にぬりつける時と、最後の転換菌の測定の時であった。

実験の結果について概要をのべる。

DNA の抽出、構成塩基の検出、CP YS11 に DNA の処理、菌のぬりつけなど生徒側に実験のミスはなかった。ところが、最終的に転換菌の検出において、前半の 2 学級は大半が転換菌がみられず失敗、後半の 2 学級は完全に成功であった。この原因は、最小培地調整の際のなんらかの必要成分の不足であるらしい。

次に 14 項目の課題について生徒に考えさせた結果をまとめてみると次の通りであった。この

目的は漠然と教師にいわれた通り機械的に実験をするのでなく、個々の操作の意味を考え、主体的に実験に参加させようとするににあった。

(1) 溶菌すると粘性がどう変化するか。その理由は何か。

① 時間がたつと共に粘性が増してくる。

菌の中に含まれていた Protein が、菌の膜が破られることによって出てきたのだ。

② 細胞内の高分子が外へでたから粘性が増加した。

③ 粘性がでてくる。理由は、細胞壁が破壊されて粘性をもった細胞内物質がとけでてくるからである。

などの解答が多かった。

④ 粘性がつよくなる。DNA がでてきたから。

抽出の目的である DNA との関連性を指摘しているものは割合に少ない。

(2) 2-(3)において、60°C 以上に温度を上げない理由は何か。

① DNA の変性する温度に達してしまわないように、しかも Protein がじゅうぶんに変性するように。

② 高温では DNA が破壊されるから。

③ DNA の二重ラセンがはずれるから。

実験の際に、DNA の活性の低下をしないように、各班抽出した DNA を用いてトランスフォーメーションを行なう。注意深く抽出しないと活性が低下することの注意は徹底していた。

(3) 冷エタノール沈澱で crude DNA はガラス棒で巻きとれる。この理由は DNA がゲル状でかつゼンイ状のものとなってあらわれたから。

(4) 最後の透析する理由は何か。

DNA の存在する液中の不純物（低分子の）を取り除くためである。

(DNA は半透膜を通らない)

(5) Rf 値の算出

	移動距離		Rf 値
	塩基	crude DNA	
guanine	4 cm	4 cm	0.22
adenine	6.4	6	0.33
cytosine	8.5	8.2	0.46
uracil	12.1	11.6	0.65
thymine	15	15	0.83

(6) 封管中で hydrolysis する理由は何か。

加水分解するのは、構成成分にわけけるため (DNA がバラバラにわかれる)、封管中でやるのは、空気があると加水分解がうまく行なわれないから。

封管中で行なうのは酸の蒸発を防いで、酸化を防ぐという正答が割合に少なかった。

(7) 展開に先立って溶媒蒸気に飽和させる理由は。

① 条件を一定にするため (開始時と終了時の)

② 展開中に溶媒が蒸発してしまい展開ができなくなる。

この考察は生徒にとって非常に困難であつたらしい。図書館で参考書を調べ、条件を一定にした場合、Rf 値で物質の同定をするための基本条件ということを生徒に討論の過程でださせるのは無理な注文か。不明とした班もあった。

(8) crude DNA 中に Uracil が検出されるが、こたは何故か。DNA 中には Uracil はない筈だが。

crude DNA だから、まだ純粋でなく RNA が含まれているため。

ここでは、どの班も正しい結論を出していた。

(9) DNA 中の A, T, G, C の構成比を調べるにはどちらがよいのか。

① ペーパークロマトグラフィーによって定量する。

(斑点から適当な溶媒で抽出して吸光光度などで(簡単な方法)面積で比べる。)

② 切りとって酸でとかし、沈澱などで定量する。

③ 定量分析をする。マナスライトをあて紫外線の吸光量を測定する。

④ ペーパークロマトグラフィーを定量的に行ない、ロ紙を切りとってそれをとかし、その紫外線の吸収量を調べる。

定量的に測定しようという努力のあとがわかるが、定量分析の方法について知識と経験のない生徒ではこの程度でも仕方があるまい。

(10) DNA が遺伝情報を荷うためには、4種の base が20種の a, a を code するためには、A, T, G, C がどのような組み合わせになることが必要かを考えよ。

① 2つの組み合わせ 16通り

3 ♪ 64 ♪

4 ♪ 256 ♪

ゆえに、3つの組み合わせが1つの a, a, を決定する。

② 4種のものを組み合わせて20以上になるようにする。

4種のものから1つずつ取り出すと 4通り

♪ 2つずつ ♪ 16 ♪

♪ 3つずつ ♪ 64 ♪

♪ 4つずつ ♪ 256 ♪

③ 4種のうち3個があれば code できるゆえに64の組合せが可能である。

生徒は筆者の紹介した Watson 著、「遺伝子の分子生物学」を読んでいるものが30%近くもいるので、この程度の知識はもっている。

(11) transformation の experiment で、I—IVの実験区(資料6(p. 46)参照)を設けた理由は何か。

① IIを設けた理由は、DNA が熱によってこわれる(少なくとも transformation)はできなくなる)事を示した。

III 突然変異がおこったりした時に判別できる(数の多さから)。

IV DNA だけでは生育できない。もしくは W 23 が混入していないか。

対照実験があって始めて transformation が確認される。

② I, IIIにより W 23 DNA を入れたことによって形質転換を証明し、しかもIVで DNA だけではだめであり、また、IIによって DNA が正常でない(熱変性)にも役に立たないことを見るため。

③ IIでは熱変性による失活を実験する。III, IVで、Ys11, DNA が単独ではコロニーをつくらないが、Iで混合してコロニーをつくることによって DNA が遺伝形質を支配する本体であることを証明する。

どの班も、比較実験区を設けてデータを解析する意味を理解している。

(12) CP (competent) とは菌がどのような状態にある時か。

① 普通の状態では DNA をうけつけないが、CP は DNA をうけつけやすくなった状態。

② 菌の結婚適令期 (DNA を取りこめる様な状態になる)。対数増殖が終った時。

③ DNA をとりこむことが可能な時期で、表層構造変化や生理条件の推移がみられる。

CP. という菌の生理的な変化について、理解している。中には、専門書を読んでいるものもある。

(13) 熱変性すると DNA はその構造はどうなるか。

① 転換率が極めて低くなったことから、DNA の遺伝形質をになう能力が失われたことは明らかである。熱を加えることにより、水素結合がきれ、さらに鎖が分解して暗号を伝える能力を失ったと考えられる。

② 活性は著しく減少するが、わずかに残る。1 本鎖構造に変わる。水素結合が切れる。

③ バラバラにこわれる (水素結合がはずれる)。

熱変性すると水素結合が切れて 1 本鎖になるという知識は、本からのもの。

(14) この実験において、DNA が *bacteria* の遺伝形質を支配する遺伝子の本体であると結論できるか。

① まず、結論から言うと、この実験が成功した場合、これだけではつまり、DNA により形質転換現象が起きるということだけでは、DNA が *bacteria* の遺伝形質を支配する遺伝子の本体であるとは言えないと思う。なぜならば、DNA はそれ自身が直接遺伝形質を荷うのではなく、その作用、働きを媒介する助けとなる働きをしているのかもしれないからである。この実験ではこの点がはっきりしないのではないだろうか。したがって、DNA が *bacteria* の遺伝形質を支配する遺伝子の本体であることが証明されたのは、その他もろもろの (このことは前のレポートに書いた)、Griffith から Avery……などの人々によってだと思う。(研究の総合的結論だと思うの意)

② この実験だけでは DNA が *gene* の本体であるとは結論できないと思う。なぜなら DNA をふくむものが遺伝情報をもっていることはわかるが、それが DNA 以外のものである可能性がある。DNA が完全にとりだせなくては、はっきりしない。

③ 今回の実験により、われわれは少なくとも DNA は *B. subtilis* のアミノ酸製造についての遺伝形質を伝えるという事がわかったのである。その意味でならば、DNA は *gene* の本体である。

このように、実証できるという結論とできないというのと 2 通りで、前者が非常に多かった。

前者の根拠は、加えた DNA は不純で RNA、ならびにたんぱく質が完全に取り降かれていないことと、DNA が、どんな仕組みでたんぱく質 (酵素) を合成するかについて理解していないためである。

後者の根拠は、分子遺伝学について理解があり、相対的に DNA が、遺伝子の本体と結論できるとしているのと、単純に結論したものとの 2 通りあるようだ。

⑥ 最終的な転換菌の検出の結果を示す。前述のように 1—2 組の結果は培地調整のミスで転換菌は出なかった。

以下にかかげるものは 3—4 組の結果である。転換率は 4 組 1 班のものだけを示す。

3組の測定結果

班	1 班				2 班				3 班			
	10		10 ²		10		10 ²		10		10 ²	
I Ade ⁻	10	39	4	5	119	118	14	16	32	43	2	6
I Leu ⁻	6	0	1	0	122	135	7	20	22	36	1	6
I Arg ⁻	15	5	0	0	104	108	21	12	27	41	3	?
II Ade ⁻	3	0			0	0			3	0		
II Leu ⁻	0	0			0	0			1	0		
II Arg ⁻	0	1			0	0			0	0		
III Ade ⁻	0				0				0			
III Leu ⁻	0				0				0			
III Arg ⁻	0				0				0			
IV Ade ⁻	0				0				0	雑判 菌別 と困 の難		
IV Leu ⁻	0				0				0			
IV Arg ⁻	0				0				0			

班	4 班				5 班				6 班			
	10		10 ²		10		10 ²		10		10 ²	
I Ade ⁻	64	20	0	0	104	81	15	13	70	50	6	4
I Leu ⁻	0	0	0	0	84	79	9	6	20	10	3	3
I Arg ⁻	12	17	0	0	125	80	18	11	40	30	1	1
II Ade ⁻	0	0			0	0			0	0		
II Leu ⁻	0	0			0	0			1	1		
II Arg ⁻	0	0			2	0			2	3		
III Ade ⁻	0				1				0			
III Leu ⁻	0				0				0			
III Arg ⁻	0				0				0			
IV Ade ⁻	0				0				0			
IV Leu ⁻	0				0				0			
IV Arg ⁻	0				0				0			

班	1 班				2 班				3 班			
	10		10 ²		10		10 ²		10		10 ²	
I Ade ⁻	3400	1440	220	560	362	380	120	140	224	512	53	48
I Leu ⁻	576	170	90	80	10	21	2	0	78	85	0	19
I Arg ⁻	1012	1440	336	140	508	620	71	80	1364	492		
II Ade ⁻	3	47			0	0			0	0		
II Leu ⁻	3	3			1	2			0	2		
II Arg ⁻	0	968			4	5			0	0		
III Ade ⁻	0	失			0				0			
III Leu ⁻	0				0				0			
III Arg ⁻	0	敗			0				0			
IV Ade ⁻	720				0				0			
IV Leu ⁻	720				0				0			
IV Arg ⁻	720				0				0			

班	4 班				5 班				6 班			
	10		10 ²		10		10 ²		10		10 ²	
I Ade ⁻	472	600	132	100	720	800	458	640	350	245	24	20
I Leu ⁻	14	58	0	1	270	140	42	64	86	29	6	2
I Arg ⁻	17	30	10	2	2500	1100	220	296	96	86	16	0
II Ade ⁻	14	10			254	319			2	3		
II Leu ⁻	0	0			15	11			0	0		
II Arg ⁻	0	1			3	0			0	0		
III Ade ⁻	0				0				0			
III Leu ⁻	0				0				0			
III Arg ⁻	0				0				0			
IV Ade ⁻	0				0							
IV Leu ⁻	0				0				0			
IV Arg ⁻	0				0				0			

4組1班の転換率

$$\text{Ade}^- = \frac{220+560}{2} = 3.9 \times 10^5 \quad \frac{3.9 \times 10^5}{5.6 \times 10^8} = 7.0 \times 10^{-4}$$

$$\text{Leu}^- = \frac{90+80}{2} = 8.5 \times 10^4 \quad \frac{8.5 \times 10^4}{5.6 \times 10^8} = 15.7 \times 10^{-4}$$

$$\text{Arg}^- = \frac{336+140}{2} = 2.4 \times 10^5 \quad \frac{2.4 \times 10^5}{5.6 \times 10^8} = 0.43 \times 10^{-5}$$

$$\text{All} = (10^5) : \frac{520+600}{2} = 5.6 \times 10^8/\text{ml} \text{ (生菌総数)}$$

〔IV〕 考 察

この実践研究は3つの目的をもっていた。

- (1) 遺伝学の発展を歴史的に取り扱うことを通して、科学がどのように発展するかを理解させることが可能でないだろうか。
- (2) DNA が遺伝子の本体であることを分子遺伝学の立場で実証的に指導するには、どのような実験でどうしたらよいか。
- (3) 遺伝情報の発現については、どう指導したらよいか。

(1)の主題については、指導を重点に置いたのは次の諸点であった。① Mendel がはじめて遺伝の法則を明らかにすることができた根拠と発生当時彼の説が認められなかった理由。② 1900年3人の学者が再発見するとその説に容易に浸透した理由。③ Mendel の法則が他の生物にも適応することが出来るかどうかの研究をする中で、遺伝学の飛躍が準備されたこと。④ Beadle Tatum と Lederberg らの研究が分子遺伝学の基盤をつくったこと。遺伝学の研究材料が研究の進展につれてどう変化してきたか、また、それぞれの意味をも力説した。⑤ Watson-Crick のDNAの二重らせんモデルがどのようにして考え出されたか。また、このモデルの実証をする実験と取り組む中で分子遺伝学が飛躍的に進展したことを説明した。

これらについて、プリントを補助教材とし、スライドを併用して行なった。しかし、Mendelの法則をも含めて4時間では時間が足りず、説明が中途半端に終わった感があった。

(2) DNA が遺伝子の本体であることの実証的指導の問題

トランスフォーメーションの実験を計画した。この実験を通して主題に答えるだけでなく、この実験に主体的に取り組ませることを通して生徒に科学の発展の基盤である科学研究における「実験の方法」を経験させ、科学的思考力、を伸展させようと試みた。

特に DNA を直接取り扱って、菌の遺伝形質を転換させる、「分子遺伝学の研究方法」を生徒に体験させることも目的の1つであった。

このねらいで、生徒に実験の前に W23 と Ys11 を用いて、DNA が遺伝子の本体であることを実証する「オリジナルな実験を計画せよ」という課題でレポートさせた。これに対して、生徒はかなり熱心にレポート作成に取り組み、満足のいくレポートが多かった。この報告に収録したレポートにあるように「今回のように実験の前にレポートを提出することは非常に意味のあることだと思う。実験をやっているとき、ただ漠然と行なうことは、この方法をとればなくなるであろう。さらに、このような実験の前に仮説らしきものをたてることによって、新しい発見もされることだろう。」と書いている。これは、この実践研究の主題の主目的である。しかし、バクテリアに関する基礎知識も不十分な生徒にオリジナルな実験を計画せよというのは相当無理な点もないではなかったが、生徒の中にはかなりユニークな計画を立てていたものもあった。それら

を2-3紹介する。

- ① W23 と Ys11 を混合培養する。そうして W23→Ys11 をみる。

この場合、どんな方法でこれを確認するかが明らかでないが、非常に面白い実験の着想だ。

- ② Ys11 (mutant) (ade^- Leu^- Arg^-) から DNA を取り、W23 に加える。

W23 が mutant になるかどうか調べる。

これも、アイデアが面白いが、その方法は明らかでない。

これらの方法は、いずれも研究室で実際におこなわれている方法で、生徒の活動状況からみて、参考書から引っぱってきたものでないという意味でオリジナルなものであった。

又、生徒は、このレポート作成の過程でいろいろな点について疑問を提示し、これが実際の実験の際に興味を持続させたエネルギーになっている。

③ 取り出した DNA をどういう形で Ys11 に処理するのか。この疑問については、実験指導の段階において明らかにされたが、かなりの班がこの疑問を提唱していた。

- ④ 高分子の DNA がどうしてバクテリアの細胞壁を通して内部に入るのか。

この疑問に対しては、学問的にも解明がされつくしていないが、相当鋭い疑問である。

- ⑤ 形質転換の分子的機構はどうなっているのか。

この疑問を提出した生徒はかなり勉強をしているが、この疑問に対して現在の分子生物学は完全に解答を出していない。一部は仮説の段階である。

実験の前にレポート提出(仮説をたてさせてみたことは)は、実験に対して主体的に取り組ませる目的をかなり満たしているのではないかと考える。

また、実験の目的の1つに、「DNA が遺伝子の本体であることを実験によって実証する」があった。これに対する判断の基準は、「生徒の実験中の態度とレポートなどに表明される生徒の感想によったものである。」

実験は試験休み中に行なわれたが、合宿などで特別の理由があるもの以外は欠席者がなかった。実験中、生徒の態度はかなり熱心で、怠情・不注意などによる実験ミスはほとんどなかった。このことは、生徒の実験に対する熱意を表明している。

この実験によって生徒がどんな感想をもったかを知ることが、所期のねらいがどれだけ達成したかの判定の基準になる。もちろん、教師に提出するレポートであることは割りきして考えなければならないが、しかし、これは個人のレポートでなく班のレポートであり、7名1組の班で作成したものである。

割合に多い感想

最後に感想を一言。今まで授業や本などで、「遺伝子の本体は DNA である」と聞いてきた。しかも、それがわかったのは最近のことである。われわれにとって「遺伝子の……」というのは、テストを前にすれば、「水素と酸素を混ぜれば水になる」というのと全く同じであった。特に最近の研究は、われわれにとっては逆立ちするほど複雑だし、その結果は一本の文字の配列となって頭の中に入っていくだけであった。何事も実際に把握するためには、実験が必要である。半強制的でも、このようにして参加すればその意味は良く理解できるし、頭にも文字の配列という意味でなく、実際にバイ菌を通して憶えることができる。複雑(もっとも普通の実験に比べれば非常に単純なのであろうが)な実験であっただけに、それだけ又、楽しかった。

つぎに断片的な感想

○ 実験操作のひとつひとつが科学的に裏づけられていて、感激的であった。

○ 生物という教科では、教科書の上で「こうだ」という事実だけを教えられることが理科の中でも比較的多かったように思います。実際が容易でないのは事実ですが、今回、それらの一部

であっても、自ら確かめることができたのはすばらしいことだと思う。

- 今回の実験は、授業内容とよく結びついている点、又、現代生物学の内容を明らかにするためのすばらしい試みだと感じた。
- 実験内容が先駆的なものであるということは興奮させる。
- 専門的で高度な実験ができてよかった。

一般に、実験を通して DNA を確認できたこと、トランスフォーメーションによって遺伝子の本体であることを実証した実験を経験できたことに感激して、分子遺伝学に興味をもったと書いている。

つぎに、批判的な意見を紹介する。全体的にみて、この実験を否定するものではない。

- 授業に取り入れるのはよいが、時期がよくなかったし、試験休みではなく正規の授業でやるべきだ。しかし、正規の授業では無理だろう。
- 授業で学んだ事と感覚的な結びつきが乏しかった。
- 実験のあいまが長くて閉口した。討論の資料、講義などがもっとあった方が充実した。
- DNA が取り出せたという確証がもてない。
- 1つ1つの薬品の働きを明確につかんでいなかったため、ただ先生のいうとおり薬品を次々に入れて、知らない間に出来ていたという感じをまぬがれ得なかった。
- 全国の高校に広めるには、まだまだ高価な機械が必要であるから改善の余地がある。
- 有意義な実験であったが、まだ事前の意義を理解する事が足らなかった。もう少し説明を加えて欲しい。印刷物はあまり量があると気をそぐので、印刷物に期待する事を避けたい。

失敗した実験はできたら再び試みてみたい。

今回の実験は、4学級全部に実施したのであるが、はじめに行なった2学級は、最小培地の調合ミスで、最後の転換実験が失敗に終わった。はじめミスに気づけなかったのであるが、いろいろ検討した結果、最小培地の構成成分の1つが欠けていたことが判った。これについて、2学級の各班は失敗の原因についてかなり慎重に考えられる可能性を上げ、検討を加えていた。その一例を紹介する。

失敗の原因はいろいろ考えられるが、改善方法はよく判らないので、この失敗の原因をなくす、つまり除くことがそのまま改善方法につながるのでここでは省き、原因と思われるものを列挙しておく。なお、ここで考えなければならないことは、われわれの班を含む一部の班でなく、前期にやった1、2組ほとんど失敗したという事実である。このことは、次のことを少なからず意味している。つまり、原因の主たるものが操作上のミスや乱暴さというものではなく、何か材料や培養基など全体に共通なものであることになる。それではどのような原因か。

① 材 料 面

- a 使った薬品に決定的ミスがあった。
- b W23 を Ys11 と間違えて使った。
- c ade., leu., arg., などの塩基、アミノ酸がおかしかった。
- d 培地・寒天が変性していた。
- e Ys11 が Cp になっていなかった。

などの細かいもの

② 技 術 面

- a DNA が全く抽出されなかった。
- b 活性 DNA を机上においたため雑菌が混入したためではないか。
- c 軽く振らなければならないところを強く振り、静かに加えるところを激しく加えた。

d DNA の変性温度を越えてしまった。70°C 以上に加熱した。

①—②について全く無視できるものを上げたが、次に少し重要なものを拾って考えてみた。まったく無視できると思われるもの

① a, b, c

② a

いくつかの班で、こんな原因によると思われるもの

② b, c, d

全体でこのような原因によるのではないかとと思われるもの

① d

全体の失敗ではないが、結果のところにあるように DNA only が最も多くコロニーを生じているが、これは雑菌によるものと思われるその理由は②—b でないかと思う。 省略

いずれにしても、機会があったらもう一度実験したいと思う。

大半の班が、具体的な例を上げて失敗の原因について討論していた。

なお、失敗の原因の追求の中に、生徒のこの実験に対する関心の度合の高さと、原因の追求に科学的な思考力の萌芽を見る。

次にこの実験に関連して、授業でバクテリアの遺伝形質と選択培地ならびにバクテリアの有性生殖についての実験観察を行なったが、この指導は、トランスフォーメーションの実験の前提として必須のものである。実験において W23 Ys11 の遺伝形質の区別はポイントである。更に分子遺伝子の指導で非常にむずかしい概念であるたんばく合成における調節機構の指導の導入実験として重要な役割を果たす。しかし、この実験においては、前述したように、教師が一切準備したプレートを観察させたのであるが、可能なかぎり生徒に準備させ、バクテリアの取り扱いについて技術的訓練を重ねて、トランスフォーメーションの実際に備えたとよいと考えられる。

次に、この実験の一般化の問題について考察したい。

この実験は、他の実験と比較してかなり長時間を要すること、実験に機材と薬品を要することおよび、生徒実験を指導するにはトランスフォーメーションについて技術を習得しておくことなどが必要になる。

時間の問題については、筆者が実施したように、夏休み、冬休み、春休みなどの休暇中を利用するのも方法の1つである。

どうしても正規の授業で実施する場合には、DNA の抽出と Cp Ys11 に DNA を処理し、これを選択培地にぬりつける方法を個別に行なうとよい。

これについて筆者は次のような実験を行なって、2時間の授業でトランスフォーメーションの最後の実験だけを生徒に経験させることが可能である。

実験における時間の短縮の可能

	実 験 区
I	CPYS 11 + DNA (90分) → ぬりつけ
II	CPYS 11 + DNA (30分) → ぬりつけ
III	CPYS 11 + DNA (60分) → ぬりつけ
IV	CPYS 11 $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C } 20\text{hrs 貯蔵}}$ DNA (90) → ぬりつま
V	CPYS 11 + DNA (90分) $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C } 20\text{hrs 貯蔵}}$ → ぬりつけ
VI	CPYS 11 only
VII	DNA only

実験における時間の可能性の結果

		10		10 ²		備 考
I	Ade ⁻	5000	4800	350	450	control
	Leu ⁻	560	1200	130	142	
	Arg ⁻	800	3000	200	160	
II	Ade ⁻	800	1500	260	220	DNA 処理時間 30 分
	Leu ⁻	460	430	64	51	
	Arg ⁻	600	800	39	46	
III	Ade ⁻	950	700	105	117	DNA 処理時間 60 分
	Leu ⁻	353	305	30	43	
	Arg ⁻	374	650	65	59	
IV	Ade ⁻	8	0	0	0	CP Ys 11 を 5°C で 20hrs 貯蔵
	Leu ⁻	13	19	0	130	
	Arg ⁻	16	4	0	0	
V	Ade ⁻	500	660	39	68	CP Ys 11 + DNA (90分) 5°C 20hrs 貯蔵
	Leu ⁻	210	260	25	21	
	Arg ⁻	1500	300	34	36	
VI	Ade ⁻	0	0			CP Ys 11 only
	Leu ⁻	0	0			
	Arg ⁻	0	0			
VII	Ade ⁻	0	0			DNA only
	Leu ⁻	0	0			
	Arg ⁻	0	0			

この実験の結果からみて、DNA 処理は、時間が足りない場合には30分でも定性的には十分差がでている。更に、この実験の欠点の1つは、C I Media に接種して CP になるまで6時間、ついで DNA 処理 1.5 時間、ぬりつけに 1 時間、計 8.5—9 時間を要する。しかし、この方法で、生徒実験に備えて CPYs 11 に DNA を処理して冷蔵しておけば、午前中の正規の授業にプレートを調整し、ぬりつけが可能である。

つぎに、実験器材と薬品などを購入するのに多額の費用を要し、一般化できないのではないかという疑問がある。

この実験は、オートクレーブ、遠心分離機、(冷凍機つきでなくてもよい。4000—5000 回転毎分)、恒温器 (37°C)、冷蔵庫、乾燥殺菌機 (乾燥にも利用できるもの) が必要である。現在の高校では、これらはかなり保有しているのではなかろうか。

つぎにガラス器具として、かなりの量のシャーレ、メスピペットが必要である。これは、はじめは生物部段階から序々に材料をそろえていったらよいのではないだろうか。

生徒実験指導技術の問題がある。これについては、各都道府県段階で、教育研究所、あるいは、教育センターなどにおいて、実験指導の講習会を開いて技術の普及に勤めるのがよいと思う。筆者の採用した段階的な発展をふまれるのがよいと考える。

指導の段階でいまだ各種の問題はあるが、分子遺伝学の指導において、筆者のとったトランスフォーメーションの指導は、生徒に興味を起させ、生徒の科学的思考力を高める上で、かなり有効であった。

〔V〕 展 望

1. DNA が遺伝子であることの実証

Hershey と Chase のファージのたんぱく質の殻の形成の情報は、DNA が保持していることの実験をスライドで説明し、同時にファージのプラークの観察を併用してファージに対する理解をも高める。

2. DNA の構造

Watson-Crick の二重らせんならびに複製のモデルの提唱が、分子遺伝学を発展させたことの理解を計る。

3. DNA の遺伝情報の発現の問題

たんぱく質合成の問題を中心に、コードの問題、たんぱく合成における調節の問題を取り扱う。ここでは、DNA の加水分解、バクテリアの遺伝形質の観察の際の NPP に対するアルカリ性ホスファターゼの問題が、重要な根拠になる。

なお、これらの指導については、スライドを用い、分子遺伝学を進歩させた実験の方法や実験を、推進する上の考え方、などに重点を置いて指導する予定である。

なお、たんぱく質合成の問題を実験的に高校に導入することは、現代段階では困難であろう。

〔VI〕 おわりに

この実践研究を遂行するにあたって、実験上の御指導と御便宜を賜った東京大学教授今堀和友先生ならびに東京大学応用微生物研究所助教授斎藤日向先生に深く感謝の意を表します。

今回の生徒実験に当り、生徒のよいリーダーとしてまた、実験の準備に協力して下さった生物部員、松浦克美君、児玉竜彦君、木暮一啓君の3君に感謝いたします。

〔VII〕 引用文献

- 1) 貝沼喜兵：遺伝（裳華房）vol. 2～3 1969
- 2) Gardn A, ard Levinthal : Biochen Biophys Acta 38 (1960) 470—483

付録資料 1 <Report 提出について>

前に連絡した通り、形質転換の実験は予定どおり実施いたしますが、実験の前に下記の項目について班（ただし、7人を3人と4人に分けて行なう。実験は7人で行なう。）で調査・討議し、report 用紙5枚にまとめ7月2日正午までに提出して下さい。

記

1. 1928年、Griffith によって発見された形質転換現象は、1944年 Avery らによって転換現象を起す本体が DNA であることが実証された。ところで Avery らは、どのような方法によって実証したのか。
2. *Bacillus subtilis* W 23 (wild), YS 11 (mutant) を用いて DNA が gene の本体であることを実証する実験を計画せよ。

ただし、W 23 は、最小培地 (minimal medium) すなわち、無機塩 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $Na_3 citrate$ (クエン酸ナトリウム) + glucose の培地に生育できる。しかるに、YS 11 は minimal medium には生育できず、これに ade. (アデニン) + leu. (ロイシン) + arg. (アルギニン) を加えないと生育できない。これは、菌の遺伝形質であり、区別のための標識遺伝子 (マーカー) ともいわれている。

上記の点を考慮して次のように書く。

B. subtilis W23

B. subtilis YS11 (ade, leu arg Ap^r ase⁻)

以上をヒントにして実験を計画せよ。

なお、実験終了後、結果をまとめ（諸君の提出した実験計画と実際の実験法との違いなどをも含めて）、再度 report を提出して貰う予定である。

なお、1. Griffith—Avery に関するものは、参考書などを参照するが、2. 実験計画については諸君の original なものを出して貰いたい。

参 考 文 献

- | | |
|---------------|-------|
| (1) 遺伝子の分子生物学 | 化学同人 |
| (2) 分子遺伝学入門 | みすず書房 |
| (3) 微生物遺伝学 | 朝倉書店 |

付録資料 2 <自宅研修期間の実験について>

微生物 (*Bacillus subtilis*) を用いて形質転換の実験を下記のように実施します。

1. 実験目的：バクテリアから DNA を抽出し、これを用いて形質転換法により DNA が遺伝現象を支配する化学的本体であることを明らかにすること。
2. 対象学年：2 年生全員、正規の授業の一環として実施する。
3. 期 日

	1 組	2 組	3 組	4 組
DNA の抽出	11日 午前	11日 午後	14日 午前	14日 午後
形 質 転 換	12日 午後	12日 午前	15日 午後	15日 午前
結 果 の 観 察	14日 午前		17日 午前	
	9.00～10.30	10.40～12.10	9.00～10.30	10.40～12.10

但し 午前、9.00—12.30

午後、1.30— 5.00

4. 評価の方法

- ① 生徒の実験過程における態度
- ② 提出される班単位 report を通しての実験に対する理解度
実験結果に対する考察の程度

付録資料 3 Bacteria の遺伝形質

1. 観察のねらい。

2. 方法 あらかじめ用意した plate に、*Bacillus subtilis* (W23 : YS11, *Eschericia coli* : Hfr C : AB 1450) を塗抹し、生じたコロニーの数を測定する。

3. 結 果

	M	Ade ⁻	Leu ⁻	Arg ⁻	ALL	NPP*	備 考
B s u b i l i s	W 23						
	YS 11						

*P. Nitrophenyl phosphate

		Str ⁺	Str ⁻	備 考
E. coli	HfrC			
	AB 1450			

4. 結果の考察

- (1) コロニー (colony) というものは菌のどのような状態になったものか。

- (2) W 23 がある plate 上に 250 個のコロニーを生じたとする。10⁴ 希釈のものを 0.1ml ずつ塗抹した場合原液の菌の濃度はどうであったか。

- (3) bacteria の遺伝形質はどのように区別することができるか。また左の結果から B. subtilis あるいは E. coli の形質はどのような性質をもっているか。(W 23, YS 11, Hfr C, AB 1450)

- (4) Hfr C は大半は [Str⁻] の plate にはコロニーを生じないが中には生じるものもある。いま 10⁸/ml の菌を 0.1 ml 塗抹したら、ある plate に 5 個のコロニー (str⁻ の plate では 10⁷ 個のコロニー) を生じた。

この現象をどのように理解したらよいか。ただしこの菌 (Hfr C) は本来 Str に感受性であり、事前に確認してあったものである。[Str]=ストレプトマイシンの略

組 班

付録資料 4 Bacteria の遺伝形質

1. 観察のねらい。

トランスフォーメーションの前段階的予備実験であり、W 23, YS11 および Hfr C, AB 1450

がどのような形質をもつかを調べる。

2. 方法。 あらかじめ用意した plate に、Bacillus subtilis (W23 : YS11) (E. Coli : Hfr C : AB 1450) を塗抹し、生じたコロニーの数を測定する。

3. 結 果

	M	Ade ⁻	Leu ⁻	Arg ⁻	All	NPP	備 考
W 23	+	+	+	+	+	黄変	
YS 11	-	-	2	-	+	無	

	str ⁺	str ⁻	備 考
Hfr C	1	20	
AB 1450	800	1000	$\frac{1}{4}\text{Count} \times 4, \frac{1}{8}\text{Count} \times 8$

4. 結果の考察

- (1) コロニー (colony) というのは菌のどのような状態になったものか。
菌の群落 (菌の増殖によりできた)

- (2) W 23 がある plate 上に 250 個のコロニーを生じたとする。10⁴ 希釈のものを 0.1 ml ずつ塗抹したものとすると、原液の菌の濃度はどうであったか。
 $250 \times 10^4 \times 10 = 25,000,000$

25,000,000個/ml

- (3) bacteria の遺伝形質はどのように区別することができるか。また左の結果から B. sub. あるいは E. coli の形質はどのような性質をもっているか。(W 23, YS 11 Hfr C AB 1450)

B. sub. W 23, M で生育可能 alkaline phosphatase を作れる。

YS 11 M に ade. leu. arg. を加えたものでないと生育できない。

E. coli Hfr C [Str⁺] の plate ではほとんど colony を生じない。

AB 1450 Str⁺ に影響されない。

- (4) Hfr C は大半は [Str⁺] の plate にはコロニーを生じないが、中には生じるものもある。いま 10⁸/ml の菌を 0.1 ml 塗抹したらある plate に 5 個のコロニー (Str⁻ の plate では 10⁷ 個のコロニー) を生じた。

この現象をどのように理解したらよいか。ただし、この菌 (Hfr C) は本来 str. に感受性であり、事前に確認してあったものである。

① 突然変異

② 抵抗性の株が一部あるのかもしれない。感受性は他の株で調べたもの。

③ ストマイの副作用により、突然変異

④ 実験ミス (雑菌混入?)

3 組 3 班

——形質転換のはなし——

discussion の記録

1. DNAが、遺伝子の本体であることについて証明

A Avery のやった遺伝子の本体が DNA であることの証明実験について調べてきたか。

B ああ。要するに、肺炎双球菌を使つての形質転換の実験だろう。肺炎双球菌には、RとSとの二種類がある。RとSというのは、お互いの形質でRは細胞の表面がroughだ。Sの方はsmoothで、Sの方が形質としては優性なわけだ。今、Sを煮殺して、そこにRを入れてやると、RはSになって生まれてくる。そこで、Sの形質をRに転換する何ものか——すなわち、遺伝子が存在するということがわかる。けれどもS煮殺してある。たんばく質は熱に弱い。だから、遺伝子はたんばく質ではない。そこで核酸だろうということになった。

A いや、形質転換する何ものかが、染色体に存在するたんばく質以外の何ものかであるというのは、グリフィースによって実験証明されたんだよ。グリフィースは、染色体を抽出してR培地に植えた。けれど、アベリーはSの純粋なDNAを抽出してRに入れて形質転換の起ることを実験して、遺伝子の本体がDNAであることをつきとめたんだ。

B だって、“生命と分子”にそう書いてあったよ。アベリーの仕事だって紹介されたんだ。——皆で、ダイヤモンド社 生命と分子 p.9~10を読む。

A このまとめ方は、ちょっと rough だよ。遺伝子の分子生物化学の p. 217 にもっと詳しく出ている。

——ここで、アベリーのやった実験は何かということが大体まとまる。

C しかし、必要十分条件からいくと、DNAは遺伝子であるということは判然と証明されたわけだが、遺伝子はDNAだけかという問題は未解決、未証明だね。貝沼先生から出された実験のプリントには、＜遺伝子の本体がDNAであることを証明せよ＞だから、DNA以外のものは遺伝子としての働きをしない、ということを証明すべきではないか。

A いやあ、ここ（遺伝子の分子生物化学 p. 217）をよく読んでみろよ。『DNA分子をこわして、DNA分子の構成素材であるヌクレオチドにする、タンパク質分子やリボ核酸（RNA）には何の作用もしない、デオキシリボヌクレアーゼによって、細胞抽出物の形質転換性が破壊されたという事実によって、この見解（アベリー報告、活性を持った遺伝的本体はDNAである）は支持された。』とあるだろう。

B なるほど、それでは、遺伝子の本体はDNAであると考えてもいいね。

C 僕は、熱変性しないたんばく質の存在の可能性を考えていたんだが。確かそんな話が“生命と分子”にのっていたように思う。

A だが待てよ。この本に書いてあるような方法じゃ、僕等には実験できないよ。僕等は段階をふまえていかなくちゃいけないから、“遺伝子の分子生物学”の Authority に頼ってデオキシリボヌクレアーゼという酵素がDNAを破壊すると書いてあったからといってそのまま使うわけにはいかないよ。

B いやいや、そんなことはないよ。純粋に抽出したDNAが形質転換をすることを確かめておいてその次に、デオキシリボヌクレアーゼが活性の状態にあるようにして、DNAに入れる。そうやってDNAが形質転換を起こさないことを調べればいい。

A だけどね、細胞の中でね、実際の細胞の中でデオキシリボヌクレアーゼがDNAを分解したその分解産物が、たとえばDNAには遺伝子の代りをする機能があったとしても、その機能を阻害しているのかも知れないじゃないか。だから、いつもDNAは形質転換を起こさな

いような実験結果が出てくるかもしれないけど、本当はどうだかわからない。

C おい、これを見ろよ。(生命と分子 p. 32)「A そうすると遺伝子の実体は DNA であるということになりますね」というのに対して「B 実はDNAだけではないのだ。菌に感染するバクテリオファージにも、人間に感染するウィルスにも、RNA を遺伝子としてもっているものが大部分ある。」だってさ。

A・B うひやっ

B とすると、貝沼先生の問題の出し方に一つの穴があったということになるね。

C うん。ところで、形質転換の実験の時に“生命と分子”に於いても“遺伝子の分子生物学”に於いても、優性形質のSに劣性形質のRを入れてるね。これを逆にしたらどうなるのかな。RのDNAをSに入れる。と、Rが出てこないかな。

B それでは、遺伝の法則に従えば勿論無理だろ。

A いや、優性、劣性はこの際、関係ないんじゃないか？

B 遺伝の時だけ関係があって、形質転換には関係ないのかい？ 同じ遺伝子の働きで。

A だけど、遺伝の法則だって、F₂には劣性形質が出てくるだろ。だからいつかは出てくるんだよ。

B・C ああ、そうだね。

2. 実験計画

A 僕の考えはこうだ。YS11はアデニンとロイシンがないと育たない。だからアデニンとロイシンのない培地で培養する。勿論育たない。そこにW23のDNAを入れてやる。W23は、アデニンとロイシンを自分で作れる。だから形質転換が起こって、やがて育ちはじめる。コロニーが見られるだろう。

C ちょっとまった。こんどの場合、煮殺と違ってたんぱく質だけ破壊されてDNAだけ残る。ということじゃないんだよ。アデニンとロイシンのない培地でYS11はDNAもろとも死ぬことも考えられる。

B そんなに早く死にっこないよ。

C だけど、それをあてにしちゃいけないんだよ。だからこうすればいいんだ。最初、アデニンとロイシンのある培地で、YS11を培養しておき、それにW23のDNAを加えてやる。次に、遠心分離かなんかでYS11をこの培地から切り離して、アデニンとロイシンのない培地で培養するんだ。とすると、形質転換が起こっていれば、当然W23の形質がYS11に転換しているからコロニーの発達が見られる筈だ。

B こういうのはどうだろう。W23を煮殺した上でYS11をそのままぶちこんで、アデニンとロイシンのない培地で培養するんだ。やっぱりW23ではたんぱく質は変性しても、DNAは変性しないから形質転換が起こってYS11はW23のアデニンとロイシンを自分で生成するという形質を受けついで、コロニーの発達が見られるだろう。

A しかし、どうも煮殺というのは独創性がないね。やっぱりC君のでいこう。

B ああ、そうしょう。

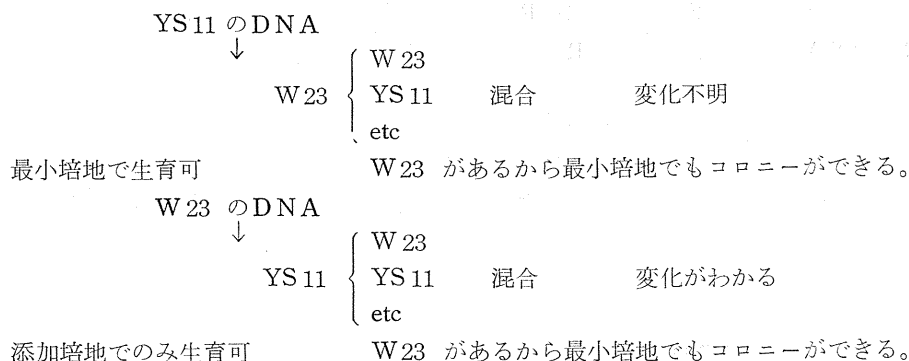
〔考え方〕

一定の仮説をすなわち“DNAが遺伝情報を持っている”をうちたてた時、その論理によるならDNAによって形質転換がおきぬはずである。それを確かめるために、上記の仮説をもとに実験を行なう。

DNAにより形質転換を起こさせるにあたり、いかなる形質の転換がわれわれに認識されやすいか？ *Bacillus subtilis* の wild と mutant とでは、必要とする培地が違う。これなら、生育

してコロニーができるか否かで区別できる。すなわち、それ自身で生産できる（必要な酵素系を持っている）物質が違うのである。酵素は、たんぱく質であるからそれぞれ種類によって持っている遺伝情報が違うのである。具体的に言えば、*Bacillus subtilis* の *wild* に比べ *mutant* は、アデニン、ロイシン、アルギニンの生産に関する遺伝情報が欠けているのである。

だからこの場合、*wild* の DNA を *mutant* に加えると *mutant* が形質転換して（ごく一部）アデニンなどのない最小培地で生育する（すなわち、それまで *mutant* にはなかったアデニン等の生産の遺伝情報を *wild* から DNA によって得た）ことを確かめればよい。なぜ *mutant* の DNA を *wild* に入れないかは図示する。



YS 11 はアデニン等の酵素系をもっていない。だからその DNA を加えても意味ないようにみえるが、YS 11 の DNA はあるべき所にあるべきもの（アデニン等の遺伝情報）がないものと考えれば、それを W 23 に加えそれが分裂・交叉する時、あるべき所にあるべき物をもたない DNA ができることもありうる。

〔実験〕

- (1) Avery の方法により DNA を W 23 から抽出する。
- (2) その DNA を YS 11 に加え、そして最小培地に植えつける。
- (3) コロニーができるかどうかみる。

(2)の内、YS 11 をいつ最小培地にうつすか問題になった。すなわち、W 23 の DNA を YS 11 がとりこんで自分でアデニン等を生産できるようになるのは分裂で、交叉してからなので、だいぶ時間がかかるだろう。その間、最小培地にうえておいたら外にはアデニン等がなくて自分でも作れないという状態になる。その間に YS 11 は死なないかという疑問が出た。それに対し、分裂の時間が短いからたいしたことあるまいという見解があったが、はたして YS 11 は最小培地でどの位の時間生存するのであろうか。もし、世代の交代に間に合わないようなら、次の手段を講ずる必要がある。すなわち、YS 11 をアデニンなどのある液中に入れておき、そこに W 23 の DNA を加え、世代の交代に必要な時間が経過してから、遠心分離機で洗って最小培地にうえる。

O・T・AVERY の証明

discussion の所でもうだいたいのことはまとめてあるので、簡単に説明しよう。まず、実験に使われた菌のことを話しとかなければならない。肺炎菌は、その細胞を覆う炭水化物性莢膜の構造のちがいによって、これは遺伝的に規定されたものであるが S I・II・III・etc に分けられる。この菌を特定の条件で培養すると莢膜多糖をつくる能力を失い、その菌に病原性はなくなり、その表面はつやがなくなる。

さて、AVERY のやった仕事は次のようなものである。正常な S III 型菌から純粋に DNA を抽出し、それが存在する所で莢膜をつくらぬ菌を培養すると、そこに正常な S III 型菌が増殖す

ることが示された。しかも、この形質が第2の生物からその子孫に受け継がれることを示した。

このようにしてDNAが遺伝子の主役をになっていることが、ほぼ証明されたわけだ。

班活の記録・その他

今回は人数が少なかったせいもあって、まとまりがよかった。29日までを調査期間とし、30日の放課後にあつまって discussion をして、その後、書く所を分担してトポットをまとめた。30日の discussion は、みんなよく調査してあったため、非常に内容のある話ができた。この有意義な discussion のため、これに紙面を多くついやしてしまったので、規定の枚数をこえてしまったようだが許されたい。

今回のように、実験の前にレポートを提出することは非常に意味のあることだと思う。実験をやっているとき、ただぼくぜんと行なうことは、この方法をとれば全くないであろう。さらに、このように実験の前に仮説らしきものをたてることによって、新しい発見もみなされることだろう。

「生物 Report」 No. 2

1944年以前に、染色体によって遺伝情報が伝わるということがわかっていた。しかし、その構成成分の内、核酸よりもタンパク質の方が注目されていた。それはタンパク質の方が核酸よりも複雑でより多くの情報を伝えやすいと思われたからだ。1930年代の中頃、DNA分子が大部分のタンパク質よりも分子量が大きいことがわかった。また、精製した植物ウイルスの化学分析の結果から、すべてのウイルスは核酸を持っていると一般化できるのではないかとアメリカのスタンレーやイギリスのボードンとピリーたちがいいだし、核酸が遺伝の役割を担っているのではないかということをほのめかしていた。

1944年、アベリーとその共同研究者たちは、肺炎菌の遺伝的性質は濃厚深く調整した高分子のDNAを添加することによって変化させることが可能であるという重要な発見をした。つまり、DNAによって遺伝情報の伝達が行なわれているのではないかとということである。彼らのこの発見は核酸の詳細な化学的研究に大きな刺激を与えた。当時、ニューヨークで研究していた生化学者Chargaffがいろいろな種類の生物から取ったDNAのヌクレオチド組成を分析するのを可能にした。これにはペーパークロマトグラフィーが役立っている。1947年、彼の実験によって4種類のヌクレオチドは等量ずつ存在しないばかりか、それらの正確な比率は生物の種によってそれぞれ違うことが明らかになった。この発見は、テトラヌクレオチド仮説で考えられるよりもはるかに大きな変動がDNAの間で可能であることを意味し、すぐに1個の分子内のヌクレオチドの厳密な配列が遺伝的特異性に関係があるという可能性を開いた。

その後の研究から、4種類の塩基の相対的な割合はけっしてでたらめではないということもあきらかになった。DNA中のアデニンの量は常にチミンの量に等しく、グアニンの量はシトシンの量に等しかった。しかし、これらの事実からDNAの三次元構造に重大な注意が払われるまでにならなかった。

タンパク質の構造をX線によって調べようとする研究が行なわれている一方、小数の科学者たちによってDNAのX線による調査が進められていた。1938年に最初の実験が行なわれた。しかし高分解能の写真は、戦後になってようやくウイリキンスとフランクリンによってとられた。当時はまだ、いろいろなヌクレオチドを結んでいる化学結合の性質がはっきりと確立されていたわけではなかったが、それは1952年に有機化学者のアレキサンダー・トッドの研究室のグループによってなしとげられた。

ポーリングのいう α ヘリックスに対する関心から、1951年にはらせん形分子の回折に関するす

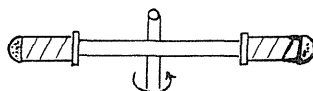
ばらしい理論が発展した。この理論のおかげで、DNAの可能な構造を試行錯誤によって調べるのが容易になった。相補的な二重らせん構造は、1953年にクリックとワトソンとによって得られた。彼らが正しい答えに到達しえたのは、大部分キングズカレッジグループのX線回折データとよく合い、しかも立体化学的に最も具合のよい構造を発見したことによる。二重らせん構造の確立はすぐに遺伝学者たちがデータを分析する方法に根本的な変革を起こし始めた。遺伝子は、もはや交配実験でしか研究できないような神秘的な存在ではなくなった。そのかわり、ただちに化学者がピルビン酸やATPなどの小さな分子と同じ手法で物質的に考えることのできる本当の意味で分子的な研究対象となった。しかし非常な興奮は単に構造が解明されたという事実だけで起きるのではなく、その構造が持っている性質にも基づいているのである。解答がわかるまでは、いつもどうせつまらないことがわかるだけで、遺伝子がどうして複製し、機能するかについては何も明らかにはならないだろうという軽い不安があった。ところが幸いなことに、その解答はきわめて刺激的であった。その構造は、互いに相補的な構造を持つ2本の糸がより合わさったようなものであったが、これは一方の糸は他方の糸が合成される際に、特異的な表面となることを示唆している。現在では正しいことがわかっているが、もし、この仮説が正しいならば、遺伝学者が長い間考え迷ってきた遺伝子の複製に関する根本的な問題が事実上解決されたことになる。

DNAの抽出法

①肺炎菌を培地でふやす

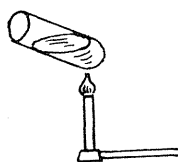


②遠心分離で菌を集める。



③菌を食塩溶液に懸濁し65℃に ←

加熱（形質転換能力破壊酵素の失活）



④菌を食塩溶液で洗い次に脂質溶液剤デオキシコール酸 ←
ナトリウムの溶液と振り、
水に可溶の細胞成分を抽出
する。



⑤菌を遠心分離により除き、
その上清に3～4倍量の
エタノールを加える。

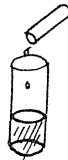


→ ⑥沈でんを集めてかわかす。デオキシコレートは上清に残っている沈でんを食塩溶液にとかし、クロロホルムと振りタンパク質を除く。

⑧ 莢膜多糖を消化する酵素を加える。再びエタノールで沈でんさせ、沈でんを食塩溶液にとかす。



⑦ クロロホルムを除き食塩溶液に再びエタノールを加えて沈でんをとり、この沈でんを食塩溶液に再びとく。

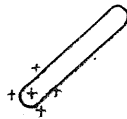


⑨ 加えて酵素をとり除くために、クロロホルムと振る。

⑩ よくかきまぜながらエタノールを滴々と加えると、ガラス棒のまわりに繊維が沈着してくる。



⑪ 繊維をガラス棒からとり除き、エタノール食塩溶液中で洗う。製品は化学的に純粋な DNA である。



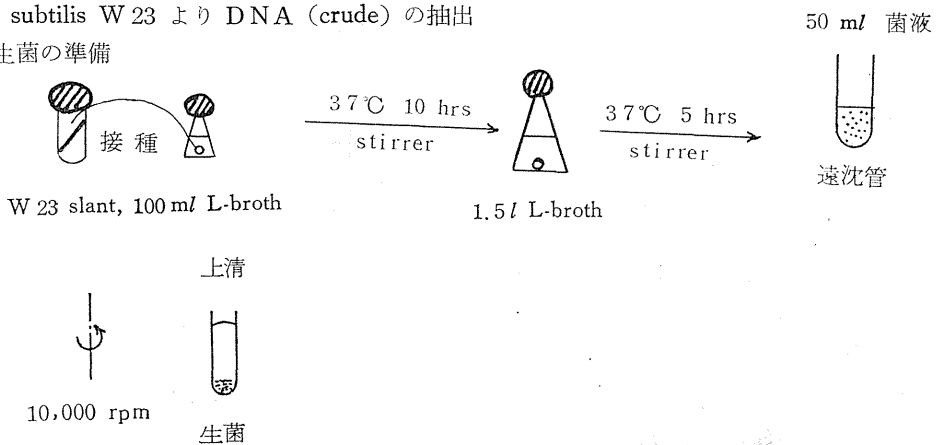
DNA を抽出し、その後、形質転換をたしかめるためにもう一つの菌（バクテリア）と混ぜ合わせていろいろ条件を変えた培地で調べる。

付録資料 6

<Exp. No. 1>

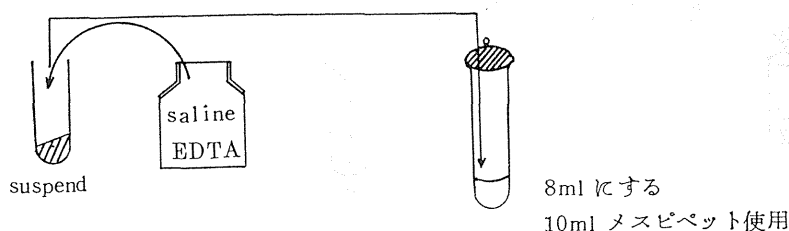
I B. subtilis W 23 より DNA (crude) の抽出

1 生菌の準備



2 溶菌と蛋白質の変性

- (1) 30 ml 容共栓つき試験管に生菌を移す。



- (2) 10 mg の lysozyme を加え, 37°C で 30 分溶菌する。
(温度は 37°C を維持し, 時々振って溶菌の度合を観察する。)

start _____ end _____

- (3) 25% SLS で溶菌をする。2 ml の SLS をピペットで加え 60°C 10 分保つ。(60°C ± 2°C を維持する。)

start _____ end _____

- (4) NaClO₄ 処理, 1.2 g を NaClO₄ 加えて軽く振って溶かす。

- (5) CHCl₃ isoamylalc. 処理約 10 ml の CHCl₃ 混液を加えて軽く振る。5'

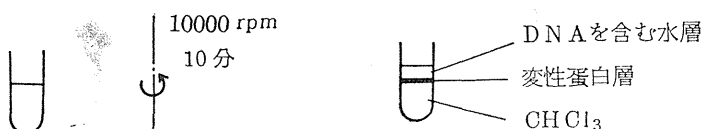
start _____ end _____

discussion

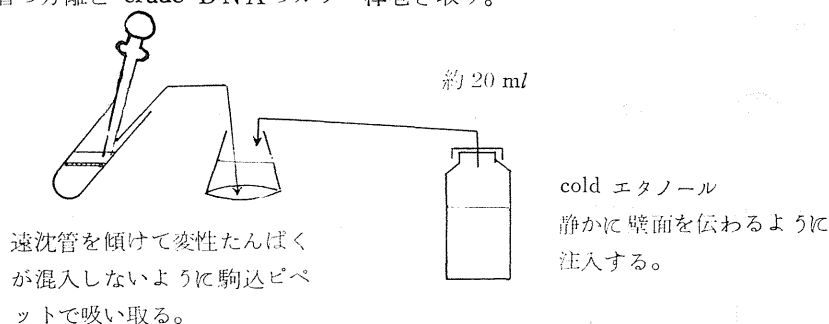
- (1) 溶菌すると粘性がどう変化するか。その理由は何か。
(2) 2—(3)において 60°C 以上に温度を上げない理由は何か。

3. DNAの抽出と精製

- (1) 遠心分離 共栓つき試験管の内容物を遠沈管に移す。遠沈管の比重を正確に!

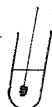


- (2) 水層の分離と crude DNA のガラス棒巻き取り。



- (3) 1/10 SSC 8 ml を試験管に取る。ガラス棒に巻き取った DNA を静かに溶かす。溶けたら 10 SSC 0.8 ml を加えて塩濃度を上げる。

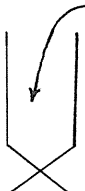
crude
DNA



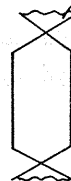
8 ml 1 / 10 ssc とけたら 0.8 ml 10 ssc

(4) 透析 (dialysis)

DNA sol



組班



dialysis

discussion

(3) cold EtOH 沈澱で crude DNA はガラス棒で巻きとれる。この理由は？

(4) 最後の透析の理由は何か？

<Exp. No. 2>

II DNAの加水分解と構成塩基の検出

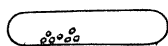
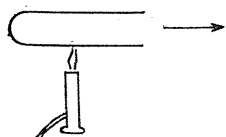
1. 乾燥 DNA の preparation

- (1) ガラス棒巻き取り
- (2) デシケーター中で乾燥する。
- (3) 秤量 1 mg drymatter

2. HCl hydrolysis

- (1) 特級 6 N HCl 0.2 ml
- (2) 1 mg DNA
- (3) ガラス封管

上記(3)の封管に(1)と(2)を入れて封管する

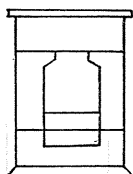


冷やす 完全に溶かす

- (2) 100°C 60 分 boil する。

3. paperchromatography

- (1) hydrolysis 後開管する capillary で R 紙に吸着させる。
(Toyofilterpaper No. 50 使用)
- (2) 展開溶媒に飽和させる。2 hrs isopropanol : 6 N HCl = 68 : 33.5 (v/v)
- (3) 展開 対照に adenine gnanine cytosine uracil thynine



を用いる。
15 hrs 展開する 20 cm
程度移動する。

- (4) 構成塩基の検出 マナスライトで検出する。

4. 結果の観察

Rf 値の算出

control		crude DNA	Rf 値
guanine	_____ cm	_____	_____ cm
adenine	_____	_____	_____
cytosine	_____	_____	_____
uracil	_____	_____	_____
thymine	_____	_____	_____

5. 結果の考察 (discussion の結果をまとめる)

(1) 封管中で hydrolysis する理由は何か。

(2) 展開に先立って溶媒蒸気に飽和させる理由は？

(3) crude DNA 中に uracil が検出されるが、これは何故か。DNA 中に uracil ははない筈だが。

(4) DNA 中の A, T, G, C の構成比を調べるにはどうしたらよいか。

(5) DNA が遺伝情報を荷うときに、4 種の base が 20 種の a, a を code するためには、A, T, G, C がどのような組み合わせになることが必要かを考えよ。

<Exp. No. 3>

II Transformation

1. 実験目的 B. subtilis W 23 から DNA を抽出し、これを Ys 11 に加え、これを Ade⁻, Leu⁻, Arg⁻ の plate で転換菌を選択する。

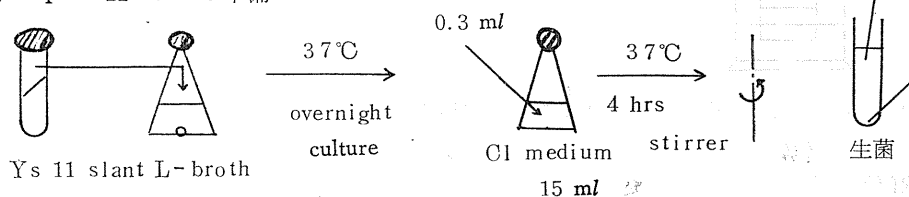
2. 実験準備

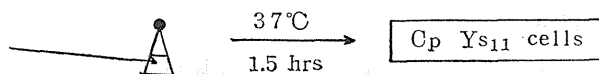
(1) W 23 DNA (2) competent Ys 11 (Cp Ys 11 cells)

(3) 選択培地 Ade⁻, Leu⁻, Arg⁻, All の各 plate

3. 実験方法

(1) Cp Ys 11 cells の準備





C II medium
30 ml

(2) DNAの処理

- ① dialytic DNA → 滅菌遠沈管
- 上澄
2/3 使用
— 0.1 ml → 1 ml (by ssc)
10 倍に希釈する

滅菌したガラス管2本に分注する (10倍に dil. したもの)

- 1 本 (アルミホイルでシール) 冷蔵
1 本 (") 熱変性 100°C 15 → 水冷する。

② 各班3本の滅菌試験管を用意する。

- I CP YS₁₁ cells + DNA 0.1 ml
- II CP YS₁₁ cells + 熱変性DNA 0.1 ml
- III CP YS₁₁ cells only
- IV DNA only
- } 37°C の incubator
に 60分 incubate
する。

(3) plate の準備

- ① 実験区を次のように設定する。

(4) plate の準備

- ① 実験区を下のように設定する。

	dil.	10	10 ²	備 考
I	plate Ade ⁻ Leu ⁻ Arg ⁻			
II	Ade ⁻ Leu ⁻ Arg ⁻			
III	Ade ⁻ Leu ⁻ Arg ⁻			
IV	Ade ⁻ Leu ⁻ Arg ⁻			

② 生菌数調査 All の plate

	10^5	10^6	10^7	cells/ml
I				

③ plate の調整法


ア plate に記号を付す

イ a. a. base などを分注する。Ade⁻ の plate には leu. + arg.

All / ade. + leu. + arg.

ウ minimal agar を約 20 ml ずつ分注 → 冷却凝固

アルミホイル

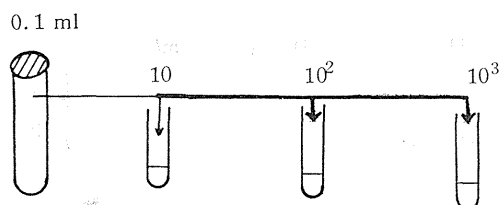


10 g	agar	} —autoclave— 冷却 (60°C)
5 g	glu	
DW	660 ml	
		+ 25 M salts 28 ml
		+ 5 % MgSO ₄ 2.8 ml

<Exp. No. 4>

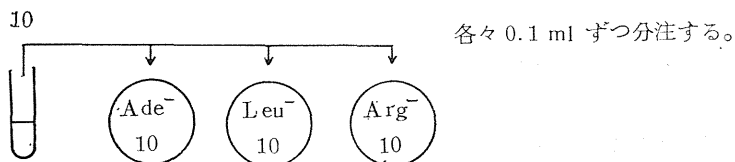
(5) 菌のぬりつけ

① 菌を dilution する。



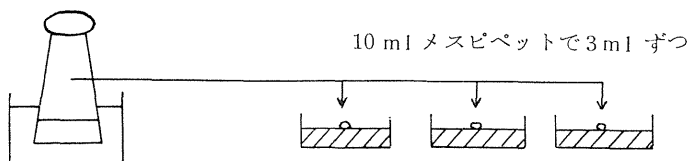
0.9 ml の minimal

② 分注する。



③ 菌液を均一に分散・固定する。

軟寒天重層式



45°C に保つ (凝固防止)

→ 放置 3 分 凝固する

ふたをする → 軽くゆり動かす

(6) 菌の培養 37°C の incubate で 40 hrs incubate する。中 1 日においてコロニーを観察・測定する。

4. 結果 Exp No. 3 の plate の欄にコロニーの数を記入せよ。

5. 考察 transformation の experiment について次の諸点を考察せよ。

(1) transformation の experiment で I ~ IV の実験区を設けた理由は何か。

(2) Cp (competent) とは菌がどのような状態にある時か？

(3) 熱変性すると DNA はその構造はどうなるのか？

(4) この exp において DNA が bacteria の遺伝形質を支配する遺伝子の本体であると結論できるか。

結果の観察

	班	1 班				2 班				3 班			
		10		10 ²		10		10 ²		10		10 ²	
I	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												
II	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												
III	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												
IV	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												

	班	4 班				5 班				6 班			
		10		10 ²		10		10 ²		10		10 ²	
I	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												
II	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												
III	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												
IV	Ade ⁻												
	Leu ⁻												
	Arg ⁻												

備考

転換率計算の参考例（生物部のデータ）

		10		10 ²		備 考
I	Ade-	4000	4000	540	730	Ys 11+DNA
	Leu-	2000	2000	267	300	
	Arg-	2000	2000	420	477	
II	Ade-	140	108			Ys 11+heat DNA
	Leu-	53	48			
	Arg-	38	29			
III	Ade-	0	0			YS 11 only
	Leu-	0	0			
	Arg-	0	0			
IV	Ade-	0	0			DNA only
	Leu-	0	0			
	Arg-	0	0			

生菌調査<YS 11 only>

	10 ⁵		10 ⁶		10 ⁷		cells/ml
all	475	492	48	49	3	3	4.8×10 ⁸

転 換 率

$$\begin{aligned} \text{Ade-} & \frac{540+738}{2} \div 6.14 \times 10^5 & \frac{6.4 \times 10^5}{4.8 \times 10^8} = 1.3 \times 10^{-3} \\ \text{Leu-} & \frac{267+300}{2} \div 2.8 \times 10^5 & \frac{2.8 \times 10^5}{4.8 \times 10^8} = 5.1 \times 10^{-4} \\ \text{Arg-} & \frac{420+477}{2} \div 4.5 \times 10^5 & \frac{4.5 \times 10^5}{4.8 \times 10^8} = 9.4 \times 10^{-4} \end{aligned}$$