

高校・生物科における
遺伝学習の現代化について

共同研究 重 松 檉 三
" 貝 沼 喜 兵

研究の必要性と要旨

高校の生物学習の現代化という表現で種々の主張が述べられてきた。生命現象を本質的にとらえさせるため生徒の科学的な思考能力を促進することは、当然、すべての主張でとりあげられている。

筆者等は、遺伝の学習についての現代化をテーマに研究を進めてみた。特に遺伝現象に関する学習はそれ自体が体系をもった生物学習であるといっても過言ではないであろうという考え方をしているが、それについては、別の機会にのべることとし、範囲をしばって今回は、遺伝子の化学的本質としてのDNAの指導について述べてみたいと思う。

一般に現場では、BSCSの刺激をうけて日本的なものとして消化すべく努力を重ねているようであるが、種々困難な問題もあって進展してないと思う。筆者等は、最初単なる説明の域を出ないような取り扱いをしていたが文献も時代と共に多くなり、自作のスライドを用意して科学的な取り扱いをするにおよんだ。また、16mmの映画を活用したり、若手研究者に質問をする機会をつくるなどしてみた。筆者等自体、実験を通しての実証的な理解ができてない段階であったからだと反省をしている。

教師自体、解決への意欲を燃やしていたのであるが、筆者の一人、貝沼は、昭和43年2月東京大学の今堀先生の御理解を得て御指導をしていただくことができるようになった。

その陰の力として東大教養学部の学生指導をなさっておられるキリスト者としての御友人西村秀夫先生の紹介をいただいたのであった。

従来、キイロシヨウジウバエを飼育して遺伝の実験材料とし、生徒実験を通して遺伝現象の考察をさせるべく指導してきたが、段階的なものとして重要な意味をもっている。

しかし、遺伝子の取扱いについては、メンデルイズムの段階の理解では、生徒自体納得性がとばしいのは勿論、BSCSのブルーブックに示されている内容の程度の探究的取扱いをしたとしてもそれが実験を通して考究されなければ、その価値は、きわめて不十分といわねばならない。スライド・16mm映画・分子模型・暗号の組み合わせ等のモデル化による取扱いもそれなりの価値を持ち、指導の段階の中に是非取り入れなければならないと思うが、どうしてもDNAそのものを取扱う実験が展開されなければ、探究心の旺盛な生徒にとって感得しえないところである。勿論、問題点として残し、大学教育の場で展開、解決されるという見解もあろうが、もしも、DNAそのものを探究の科学内容として取扱う実験が高校生に可能であれば、探究の科学としてその内容を取り入れ、一般化されていかななくてはならないと考える。

筆者等は、学問的な段階のものを高校教育の学習にどのように消化して取り入れるか。

創意工夫によって高校生としての知識や能力で可能であろうという実験内容、方法およびその実験が生物の指導目標を達成する上での役割(価値)を考慮してみた。

不十分な点が多いが、DNAに関する実験上の創意工夫をふくむ遺伝学習全体におよぶ指導計画を単なるプランに終らせることなく、指導実践をすることによって指導内容の適切さや生徒の学習活動の状態、今後の問題点の発見に役立つであろうと考えている。

本年度は、高校2年の4学級の指導をしたのであるが、1組に対し枯草菌を教材としたDNAの抽出・分離(精製)・形質転換(transformation)を内容とした生徒実験、2組には、DNAの抽出・分離(精製)とペーパークロマト法による塩基の検出を演示実験、3組と4組とは、キイロシヨウジウバエを用いたメンデルイズムの検証的な生徒実験をする。それで何れの学級に対しても古典遺伝学から分子遺伝学へと科学的な取扱いをし、自作スライドや遺伝DNAなる16mm映画の観察などを活用して遺伝現象に対する探究の過程を考察させ、基本的な知識として認識の結果を指導し、知識理解を深めるべく配慮した。

以上のような指導実践によって遺伝学習の現代化に関する考察をしてみたのである。

学習の内容や形態の学級間差違を比較検討することを次回にゆずって、今回の発表は、特に2年1組に対して指導した分子遺伝学の教材化がどんな問題点を持っているか、また、どのような学習結果となったか、指導実践を通しての考察に重点をおいて報告することにした。

A. 研究の目標

1. 分子遺伝学の教材化にあたって生徒実験の適用範囲を指導実践によって検討する。
2. 分子遺伝学の学習内容に対する生徒の理解はどのようなものか指導実践によって検討する。

B. 研究の方法

1. 研究対象生徒と各学級に対する指導方法の区分

高校2年生4学級・1学級42名男子のみ；本校では高校1年で生物2単位を化学4単位と平行して履習している。

2年1組を教育実験学級とし、指導実践をしたが今回は、研究目標に示した範囲の報告をすることとする。

生物学習の経過、特に遺伝に関する学習経過（指導計画）については、別の機会に報告することとする。

他の3つの学級は比較学級とした。

ア. 教育実験学級に対する学習経過

グループ別に学習活動をし、次に示す生徒実験ⅠとⅡのように指導する。

- イ. 比較学級 2組・3組・4組の3学級とし、

2組はDNAの抽出と精製、DNAの加水分解による塩基のペーパークロマトグラフィーによる検出（Rf値の測定）については教師の演示実験、形質転換の実験は、当学級内の生物部員で部活動で実施した研究の発表という形で演示、培地に発育したコロニーの観察をさせた。

3組と4組とは、キイロシヨウジョウバエの遺伝実験をグループ毎に実施し、科学的な取扱いをし、別紙のような資料（全員に配布）を参考にした分子遺伝学については、自作のスライドや16mmの映画を使用して理解の助けとした。

2. 2年1組の指導計画案

指導目標

1. 枯草菌を材料にして遺伝子が形質を表現するしくみについて考究する。
2. 生命と分子（今堀和友著）のテキストを7人1グループ（学級で6グループA～F）の各グループで協力して学習し、分子遺伝学に対する基本的な知識を得、理解を深める。
3. 古典遺伝学（メンデルイズム）との関連を科学的に把握し、科学の進歩にみられる科学者の創造性を追求してみる。

指導対象

男子生徒 43名；7人～8人のグループをつくる。＜グループは、生徒に自由に編成させたが、リーダーを6名立候補させ、リーダー別に各自希望で班わけをさせるとよかったと思う。＞

学級としては協調性のある集団であり、普段の場合、注意力のすぐれている集団で受講態度は静しゅくで意欲的なよい学級である。知能検査の結果は、 $\frac{8}{10}$ 以上が優以上で残り $\frac{2}{10}$ が上の中～上の段階となっている。

生物学習に対する興味のきわめてうすい生徒も少数いるがグループのリーダー格の生徒を中

心に意欲（考究しようとする）が非常に大きかった。

指導経過の概要

指 導 内 容	学習活動についての特記事項	日 時	配当時間	
1. 遺伝における形質と遺伝子と遺伝因子との関係についての概念	メンデルの発表論文の内容についてグループで話しあう。 「遺伝学のあゆみ」参照	43年11月18日 " 21日	2	2
2. 遺伝物質としてのDNA a. 遺伝予説 b. 遺伝物質の所在 c. 染色体とDNA・DNAの構造 d. DNAによるトランスフォーメーション	別紙資料（BSCSの日本版参照＜ブルーバジョン＞）と自作スライドを見て話しあう	43年11月25日 " 28日 43年12月2日 " 5日	4	4
3. 遺伝子の作用 a. DNAの複製 b. DNA・RNAと酵素 c. 酵素と形質 d. 遺伝子のはたらく時期	自作スライドと16mmの映画の観察 別紙実験ⅠとⅡについて実験（生徒実験）の手引 ＜レポートを提出＞	43年12月5日 43年12月16日 " 17日 44年1月25日 " 27日	1 5 8 5 1	1 19
4. 遺伝物質の伝達 a. 遺伝子と染色体 b. 減数分裂と分離 c. 優性と劣性 d. 独立遺伝と連鎖 e. 性と遺伝、遺伝子の組換え f. 遺伝子のくみかえ g. 遺伝子形と形質の時間的ずれ h. 染色体地図 i. 細胞質内の遺伝物質	資料として「遺伝学の歩み」32P～51P科学史的なものを理解するため、メンデル発表時代の生物学的背景とその後の細胞学の進歩などについて話しあう	44年1月13日 " 16日 " 20日 " 23日	4	4
5. 集団と変異 a. 血液形の遺伝 b. 集団と遺伝子 c. 個体変異と突然変異	統計処理の結果について討論する。	44年1月30日 " 2月3日 " 2月6日	3	3

ただし、12月16日、17日、1月25日の特別時間が18時間（期末テスト後の家庭研修期間を利用）割当てられた時間配当は15時間となる。合計33時間でこの中、実験の失敗をやりなおしたため5時間のロスがあった。実験が成功していると28時間となる。

実験Ⅰ DNAの抽出と精製

実験Ⅱ 形質転換

2年1組A班 三森（班長）・多島・早瀬・久光・福山

初めに

我々は、高一の三学期に、DNA及びDNAと遺伝との関連について、概説的に学んだ。それに引き続いて、今回は、そういった知識の根拠となっている一つの実験（*Bacillus subtilis* の transformation）を行なってみた。また、予備実験としてDNAの抽出と精製の実験を行なった。この実験によって遺伝をより深く

考えていこうというわけである。元来、「生物」(自然科学一般についても言える)は、単に動植物の名を覚えたり、～の法則を丸暗記したりするだけのものではないはずである。その根底には、常に、物事を論理的、実証的、客観的にとらえていこうとする態度——科学的思考態度がなければならない。その意味でも、こういった実験のもつ意義は大きいと思う。また、いわゆる分子生物学は、高校生物にはとりいれられていないが、こういった試みはぜひ、続けていってほしいと思う。科学は常に進歩している。そしてその進歩のいないとなるのは結局、我々なのであるから。

実験Ⅰ DNAの抽出と精製(12月16日)

1. 実験の目的

- (1) 「実験Ⅱ形質転換」に使用するためのDNAを抽出・精製する。
- (2) 抽出・精製の方法と手順を知り、器具操作の技能を習得する。
- (3) 抽出・精製の各段階での処理の意味について理解する。
- (4) グループ活動によって、共同研究の態度を養う。
- (5) 高校生物学に新しい分子生物学を取り入れるための予備実験。

2. 実験の原理

培養→集菌→溶菌→DNA抽出→DNA精製

- (1) 材料生物には、枯草菌を使用し、それを培養して集菌する。集菌には菌の増殖の対数末期のものを使い、なるべく低温で遠心分離する。集めた菌は20倍量の saline-EDTA で洗う。
- (2) 溶菌には、SLS法、リゾチームによる処理などの方法がある。
- (3) DNAは菌体中で核蛋白質として溶けにくい形で存在しているので、菌体を潰してから、SLS、クロロホルムフェノールなどによる蛋白質の変性作用や、高濃度塩溶液による核酸と蛋白質の解離作用によってDNAを溶かし出す。
- (4) 最後に沈殿・酵素処理により精製する。

3. 材料・器具・薬品

(1) 材料

Bacillus Subtilis (枯草菌) のうちで、栄養摂取に関する正常形として wild 23 を使用する。

(2) 器具

スターラー、試験管、三角フラスコ(2ℓ) ガラス棒オートクレープチューブ(50mℓ) 共栓つき試験管上皿天びん、コマゴメピペット(1mℓ)、コルベン、透析チューブ、遠心分離器、恒温器

(3) 薬品

培地(L-broth)

saline-EDTA……0.15M-NaCl+0.1M-EDTA pH8. EDTAの存在や pH8 で DNase の作用を防ぐ。

リゾチーム……SLSで溶菌せぬものに使う、リゾチーム処理後SLSを使う。

25% SLS……溶菌、酵素作用阻止、蛋白質変性などの働きをする。

過塩素酸ソーダ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)……核酸と蛋白質の解離が目的

クロロホルムイソアミルアルコール(CHCl_3 isoamyl alcohol)……除蛋白用、イソアミルアルコールは消泡、変性蛋白層の分離を助ける。

エタノール(cold $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)……95%以上、核酸沈殿用

SSC……希10%、濃10倍

6N 特級 HCl

4. 方法

(1) 斜面培地に原菌としてW23を接種し、37°Cで約12時間培養し、冷凍保存する。

(2) 前培養

L-broth に(1)で培養してある菌を白金耳（実は白金でなく、ニクロム製）でとり接種する。約12時間振とう培養をする。スターラーを用いて37°Cの恒温器に入れておく。

L-broth の組成

poly peptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
NaOH (2 N)	3 mℓ
yeast-extract	5.0 g
glucose	1.0 g

（総重量1000mℓに対する）

（注）PH7.2に保っておく（NaOH・HClで調節）

(3) 本培養

L-broth を入れた2ℓの三角フラスコに、前培養したものを、約25mℓ位ずつ注入接種する。スターラーでかきまわしながら、37°Cで12時間培養する。

(4) 集菌

本培養の終了した液を50mℓ tube に分注し、10000回転10分（0°C〜5°C）常法で0.5〜0.6gの集菌となる

(5) 8mℓの saline EDTA をチューブに注入して、懸濁液とする。

(6) 溶菌

(5)の懸濁液を共栓つき試験管へ移入する。さらに、10mgのリゾチームを混入し、37°Cで30分〜60分溶菌する。

(7) 完全溶菌

さらに、1mℓの25% SLS を注入し、60°Cのウォーターバスで10分保温し、完全溶菌する。

(8) さらに過塩素酸ソーダ約1.2gを注入し溶かしこむ。

(9) さらにクロロホルムイソアミルアルコール10mℓを注入し、10分間軽くふる。

(10) 遠心分離

(9)の液をチューブに移し、10000回転10分遠心後、チューブの上清液を1mℓのコマゴメピペットで何mℓあるか測定しながら50mℓ コルベンに移す。

(11) 冷却したエタノール（核酸液の2倍量）を静かに注入する。

(12) 硝子棒を用いて、DNAのまきとりをする。上下層が混濁しないように回転させていると硝子棒の先の部分に白い糸状のものが固形物として付着してくる＝粗DNA

(13) まきとったDNAの部分の口の壁面におしつけエタノールをできるだけ絞りとり、0.1 SSC 6mℓの注入してある共栓付試験管に棒のDNAを浸せきして、膨潤させる。

備考

14日、午後4時30分開始

$\left(\begin{array}{c} 50m\ell \\ \downarrow \\ \text{本培養} \quad 3\ell\text{分} \end{array} \right)$

15日午後4時30分開始

(1), (2), (3)共にオートクレーブで、常法にしたがって滅菌してある培地を使用する。

以下16日

3 : 08 ~ 3 : 57
黄白色の液
↓
黄白色の粘性のある液
↓
いっそう粘性を増した

4 : 29 ~ 4 : 39
(約20mℓ)

4 : 53 ~ 5 : 04
→上清液は6mℓ

→エタノール12mℓ

- (14) さらに10SSC 0.6mlを注入し、完全にとかす。
- (15) さらにクロロホルムイソアミルアルコールを7ml追加注入し、10分間軽くふる。
- (16) 10mlチューブを用いて、10000回転10分
- (17) 上清液をコマゴメピペットで小型コルベンへ移し、冷エタノールを静かに流入し、硝子棒でまきとる。
- (18) 0.1 SSC 5mlに膨潤、ついで10SSC 0.5mlで完全に溶かす。
- (19) 透折
透折チューブにつめて12時間透折する。

5 : 41 ~ 5 : 51

6 : 38 ~ 6 : 48

7 : 35 透折開始

5. 結果

少量のDNAがとれた。

6. 考察

- (1) 全体的にみた成功率……70%程度
- (2) DNAが少量しかとれなかったがなぜか。
- ・溶菌時間が少し短かった(49分)
 - ・実験操作の不正確
ピペット……指の操作が不慣れなため、測定が不正確であった。
遠心分離の際、3層がはっきりと分かれず、だいたいの見当でやった。
DNAのまきとり……少々乱暴にかきまわしすぎた、以上があげられるが、やはり初めての実験であったために実験操作が不正確であったことが主な原因であると思う。
- (3) 実験の目的は達成できたか。(生徒の自己評価)
- ・目的(1)に対して
一応DNAはとれたからほぼ達成できた。
 - ・目的(2)に対して
班長の一人舞台ということがないように、班員全員が協力し、操作を試み、ほぼ達成できた。
 - ・目的(3)に対して
ほとんど達成できなかった。我々の実験態度はコピーに書いてある通りに、あるいは、先生や、生物部の人のやる通りにやるだけであった。つまり自分達が今何をやっているのか、何のためにやっているのかが少しもわからなかった、わかろうとする意欲もわからなかった。
※しかし、1月にはいって2度目の実験をやるところになると、班員もだいたい実験内容を理解するようになった。
 - ・目的(4)に対して
達成できたとは言えない(実験操作の意味がわかっていないのだからあたりまえ)
 - ・目的(5)に対して
この実験の問題点は、内容が高度であること、特別の設備が必要であること、まる2日の時間が必要であること、以上の3点であると感じた。

実験Ⅱ 形質転換(12月17日, 1月18日)

1. 研究の目的

DNAの生物における働きを調べ、その重要性を認識する。

2. 原理

『ある生物の突然変異種に正常種のDNAを加えてみる。その結果、突然変異種のもつ性質にどんな変

化があるかを調べる』

〔我々の場合〕

枯草菌の mutant YS11 (突然変異種) には、アデニン・アルギニン・ロイシンの3種のアミノ酸を外部から取らなければならないという欠陥がある。これに正常型の wild 23 の DNA を接種して、この欠陥にどのような変化が起こるかを見る。

(コロニー測定法による)

なお、我々A班では、比較のために、YS11 only を培地で生育させてみる実験もする。

3. 実験器具と薬品

〔器具〕・ピペット ・三角フラスコ ・白蠟 ・L字管 ・上皿てんびん ・ガスバーナー ・シャーレ ・ガラス棒 ・試験管 ・綿 ・アルミはく

〔薬品〕・グルコース ・ $MgSO_4$ ・KOH ・ KH_2PO_4 ・ $(NH_4)_2SO_4$ ・ $Na_3citrate$ ・L-tryptophane ・Caseine hydrolysate ・Nitaminefree ・L-arginine ・adenine ・Leucine ・Methionine ・ K_2HPO_4 ・agar ・エタノール

4. 実験の方法と手順

(I) 前培養

原菌の YS11 を新しい培地へ接種して、 $37^{\circ}C$ で12時間ほど培養する。

培地 { 1 回目……Tryptose blood agar base Difco 製
2 回目……液体培地…L-broth

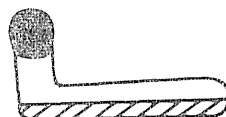
(II) CI Media に培養する

1. CI Media 5mℓ

50% glucose 50入 (0.05mℓ)

5% $MgSO_4$ 20入 (0.02mℓ)

この培養液をL字管に
注入し、その後オート
クレープする。



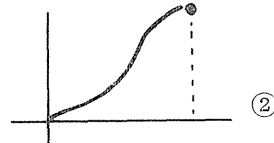
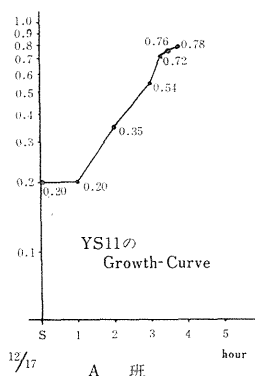
ロ. 前培養してある菌を {第1回目—白金耳で
第2回目—ピペットで0.2mℓ} とり、L字管の培養液に接種し、4.5~5.0
時間振とう培養する。

(第1回目 9:00~12:45)
(第2回目 9:40~13:40)

<C I Media>の組成

KOH	4.52 g	KH_2PO_4	22.92 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g	$Na_3 citrate$	1 g
L-tryptophane	50m g	Caseine hydrolysate	200m g
Vitaminefree		L-arginine	200m g
adenine	10m g	L-leucine	30m g
Methionine	50m g	glucose	5.0 g
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g

ハ. 対数グラフを用いて1時間単位
で濁度計を用いて、Growth
Curveを記録していき、②のよ
うになったところで培養を中止
する。(log-phase)



①

(Ⅲ) 集菌する

tube に L 字管から $10m\ell$ とり、これを Tominaga No. 13 rotar で 10000rpm で 10 分間遠心分離する。

(第 1 回目 1:05~1:15p.m.)
(第 2 回目 1:56~2:06p.m.)



上清液は捨てる。

(Ⅵ) C II Media に移す

イ. C II Salts $10m\ell$
50% glucose $0.1m\ell$
5% MgSO₄ $0.2m\ell$ } L 字管に調合する。

ロ. 3~5mℓ を集菌 tube に移注して、ミキサーでよくまぜて懸濁液にする。

ハ. これをもとの L 字管へかえし、1.5 時間、37°C の振とう恒温水そうで培養する。

(第 1 回目 1:20~2:50p.m.)
(第 2 回目 2:30~4:00p.m.)

<C II Salts>の組成

C I medium に次のものを加える

L-tryptophane	5m g (結局 55m g)	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g (0.5 g)
Caseine hydrolysate	100m g (300m g)		
Arginine	50m g (250m g)		
adenine	5m g (15m g)		

(Ⅴ) 培地 (plate) をつくる。

組 成；

K ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Na ₃ Citrate 2H ₂ O	0.5 g
glucose	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
Agar	1.5% (10 g)
蒸 留 水	1000mℓ

(参考)

この 5 種類の無機塩と glucose と蒸留水のみでつくった培地が最小培地 (minimal medium) である

arginine
Leucine
adenine

作り方； 1 班当たり

- ① シャーレ (24 組—2 回目は 30 組) をブリキ箱に入れて乾熱殺菌する。
- ② 各のシャーレに 0.1mℓ ずつ 2 種類のアミノ酸を入れ Ade-(Leucine と arginine のみ入れる) = 8 組、Leu = 8 組 Arg = 8 組とする。但し All には 3 種類入れる。(6 組)
- ③ 2ℓ フラスコに Agar 10 g と蒸留水 1000mℓ を加え、よく混ぜてからオートクレーブする。
- ④ 残りの無機塩と glucose は溶液状にして、25M (MgSO₄ · 7H₂O を除いた全ての無機塩を合

む, 28ml) 50%glucose (7ml), $MgSO_4$ 液 (2.8ml) を順次加える。

⑤ ④が終わったら, 直ちにシャーレに分注する。その際, 表面にアワができないように, パーナーで焼くのもよい。また, アミノ酸とよく混ぜるようにする。

⑥ 終わったら, 恒温器中で, 表面をかわかす。

シャーレにははいつているアミノ酸の種類と, 接種する菌の名前及び物質名と, 班名をマジックであらかじめかいておく。

(IV) DAN処理

〔第1回目〕

① 原液DAN (1000r/ml) 0.3ml+SSC2.7ml で 100r/ml の DNA 3ml を作る。

② これを2本の試験管に 1.5ml ずつ分ける。

(1本は normal DNA に, 他の1本は heat DNA に使う)

③ heat DNA を作る。

DNAを100°Cで15分間熱する……ウオーターバス

④ 15分間熱したら, それを氷水に入れる。

同時に90分の培養を終えたC IIより2本のL字管に2ml ずつ入れておく。

(残りのC II液は氷水に入れておく<YS11onlyに使う>)

⑤ C IIの2本のうち, 1本には normal DNA を, 他の1本には充分に冷えた heat DNA を0.1ml ずつ入れる。この2本を90分間振とう培養する。

(3:20~4:50p.m. (第1回目)
4:20~5:50p.m. (第2回目))

⑥ 5で培養した2本のL字管から液を, 各0.1ml ずつ取り, 0.9ml の minimal medium にそれぞれ加える。これを<YS11+DNA(10^{-1})>(6組)<YS+heat DNA>(6組)として plate に接種する。

④で取っておいたC II液も同様にして10倍に希釈して, <YS11 only>(6組)として接種する。

⑦ ⑥で作った<YS11+DNA(10^{-1})>から0.1ml をとって, それを10倍に希釈し<YS11+DNA(10^{-2})>(6組)として接種する。

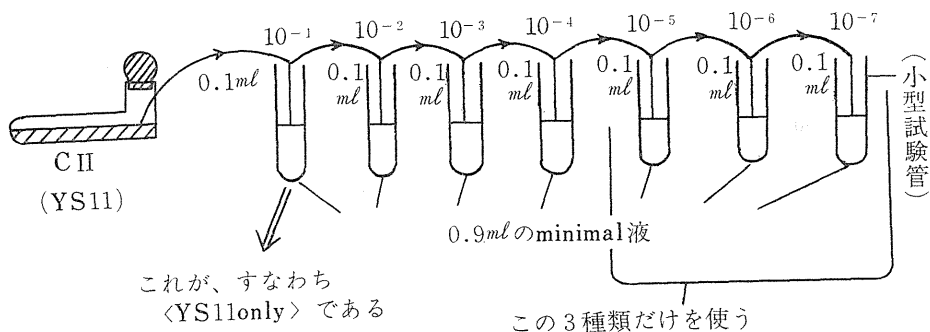
〔第2回目〕

○前回の<YS11+heat DNA>を行わずに, その代わり<DNA only>を調べてみる。

<YS11+DNA>の原液に用いた normal DNA の残りから0.1ml を取り, 10倍に希釈して<DNA only>(6組)として接種する。

○転換率を調べるために All の測定を行なう。(6組)

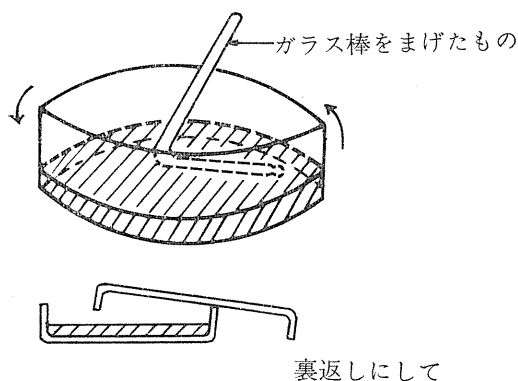
All; (培地——3種類のアミノ酸を含む)
接種——C II液を希釈して用いる)



○他は第1回目と同じである。

(VII) 接種 (ぬりつけ)

plate の Agar が完全に固まり、表面も乾いたら、それぞれの希釈した液を 0.1ml ずつ接種して、
下図のようにして、まんべんなくぬりつける。(1)



※棒はエタノールにひたし、いったん燃やして、滅菌し、菌のないプレート上で充分冷やしてから、ぬりつけをする。シャーレは回転させながら、ぬりつける。

ぬりつけが終わったら、下図のようにして、恒温器(37°C)の中で、表面を乾かす。(2) (30分程度)

乾ききったら、フタをとり恒温器(37°C)の中に裏返しにして重ねて入れておく。(2 昼液)

(1) コロニーが 1 カ所に、密集して生じないように、接種液を一樣に plate 全体に広げるのである。

(2) 裏返しにして、培養・観察するので、表面が乾

いていないと正確な値が得られない。

(補足)

実験操作上の注意

- ・無菌的に行なう。(雑菌の混入——contamination に十分に注意する)
- ① 実験器具(ピペット、L 字管、シャーレ等)はあらかじめブリキ箱に入れて、乾熱殺菌をしており、使用する際も、バーナー等でいったん焼いてから用いる。
- ② 液を他の容器に移すときなど、初めと終わりに容器の口、綿セン等をバーナーで焼いて、滅菌する。
- ③ ピペットの先を、にぎったり、他の物にふれさせたりしない。
- ④ 窓は閉めきり、動き回らないようにし、また不必要な話もしないようにする。
- ・実験は、綿密に行なう。
特にピペットによって、薬品を加えるときなどは十分に注意する。
- ☆ これらは、実験 I についても同様である。

5. 結 果

〔第 1 回目〕測定日 12月19日 午前12時

	plate	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³	備 考
I	Ade—	群生*	群生*	2	0		<YS11+DNA>
	Len—	0	0	0	1		
	Arg—	0	1	0	0		
II	Ade—	0	0				<YS11 only>
	Len—	0	0				
	Arg—	0	0				
III	Ade—	3	1				<YS11+ heat DNA>
	Len—	0	0				
	Arg—	0	0				

* 群生 —— 菌が密生したため、詳しく数えられなかったもの

〔第2回目〕 1月20日 午前10時

	plate	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³	備 考
I	Ade—	218	200	0	0		<YS11 + DNA>
	Len—	67*	0	0	0		
	Arg—	46*	36*	0	0		
II	Ade—	0	0				<YS11 only>
	Len—	0	0				
	Arg—	0	0				
III	Ade—	0	0				<DNA only>
	Len—	0	0				
	Arg—	0	0				

* <YS11+DNA(10⁻¹)> の Ade— を除いた3つの場合は、コロニーが非常に小さく、ルーベによって count したもの

《参 考》 生物部の結果

	plate	10 ⁻¹		10 ⁻²		備 考
I	Ade—	4000,	4000,	540,	738,	YS11+DNA —glu 不変
	Len—	2000,	2000,	267,	300,	
	Arg—	2000,	2000,	420,	477,	
II	Ade—	140,	108,			YS11+heat DNA
	Len—	53,	48,			
	Arg—	38,	29,			
III	Ade—	0,	0,			{YS11 only {DNA only
	Len—	0,	0,			
	Arg—	0,	0,			
IV	Ade—	870,	1140,	165,	187,	YS11+DNA —glu 変

生菌調査 (All の測定)

〔第2回目〕 1月20日 午前10時測定

	10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		備 考
All	0	0	0	0	0	0	<YS11 only>

《参 考》 生物部調査

	10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		
All	475,	492	49,	48	3,	3	

6. 考 察

(1) 全体的にみた成功率……60%

○分子生物学への入門的なものとして、この実験をとらえると、曲がりなりにも実験を行ない、不完全ながらも結果を出し得た（特に第2回目）ということは一応の成功とみてよいのではなかろうか。また、操作技能にもある程度習熟したといえよう（ピペットの使い方 etc.）

(2) 結果に対する考察

（ここでは、生物部の調査結果を一つのモデルケースとみて、それとの比較によって、考えてみた）

① 第1回目——I——10⁻¹ の Ade— が“群生”になってしまったがなぜか。

・ぬりつけが十分でなかった。

つまり、カゼ等で休む者が続出して、2人でぬりつけをしなければならなかった事情もあって、一通りのばしただけで終わりにしてしまった。

ぬりつけは、何度もくり返して、行なう必要あり。

- ② 第2回目——I——(10^{-1} , 10^{-2}) IIIや第2回目——I—— 10^{-2} , Allなどで、コロニーが出るべきなのに、0か、またはほとんど出なかった。なぜか。

- ぬりつけの時、いったん燃やしたガラス棒を十分冷やさずに用いたため、菌を殺してしまった。
- ぬりつけの時、エタノールが燃えつきずにガラス棒に残っていたため、その殺菌作用で菌が死滅した。

(前の2つの意見を支持するものとしてE・F班の結果がある、E・F班ではガラス棒を使わないぬりつけ法を用いたところ、かなり生物部の結果に近いものが出ている)

- 使用したDNAの量が少なかった(特に第一回目)

この他にも他の不慣れによる、実験操作上のミスなども、原因としてあげられると思うが、我班では主に「ぬりつけの時の不手際」が問題とされた。

- ③ 第2回目——I—— 10^{-1} において、一応、コロニーは出ているが、その数はかなり少ない($1/20 \sim 1/40$)のは、なぜか。

- ②とも関連して、ぬりつけの時の不手際によって、大部分の菌を殺してしまい、一部だけが残っていた。

- DNAの量が少なかった。

- ④ 第2回目——I—— 10^{-1} において他の5つのプレートには一応コロニーが出ているのに、Leu—の1個だけが0になっている。実験操作、ぬりつけ方はほぼ同じであったはず。これだけの差異が生じたのは、なぜか。

- ぬりつけのガラス棒は毎回ごとに、消毒したわけであるが、その時の冷却時間の長短などといったごくわずかな違いが積み重なって、これだけの差異になったのではなからうか。(?)

☆ 雑菌については、第2回目は3個出ただけであったが、第1回目は、雑菌とそうでないものの判別をそれほど綿密に行なわなかった(ルーペ等を用いて)ので、あるいは1~2個出ていたものの中には、かなりの雑菌が含まれていたかもしれない。

(3) 目的に対する考察

YS11は3種類のアミノ酸がなければ、生息できない菌である。従って Ade—, Leu—, Arg—のいずれでもコロニーはつぐれない。(＜YS11 only＞の実験結果より)

その YS11 に nomal DNA を加えると、本来なら生息できないはずの培地で、繁殖し、数千のコロニーをつくる。(＜YS11+DNA＞の実験結果より)

この理由としては、幾通りも考えられよう。

- ① (DNA) あるいはその希釈液中に wild 23 の菌が残っており、それが繁殖した。
- ② 希釈液 (minimal 液 etc) に、C II 液の中に必須のアミノ酸がかなり残っており、それを栄養として YS11 が繁殖した。
- ③ DNA がアミノ酸を作り出す酵素のはたらきを持っており、他のアミノ酸や他の物質から必須のアミノ酸をつくり出した。
- ④ DNA が何らかの生物活性を YS11 に与え、不適な培地でも生息できるようにさせた。

(i) DNA が YS11 の体内にとりこまれる。

(ii) DNA は YS11 の外にあって、何らかの化学反応を通じて、YS11 にはたらきかける。

このうち、①は完全に否定される(＜DNA only＞より)②も確かに、C I 液や C II 液には3種のアミノ酸がふくまれている。しかし、それはごくわずかで、コロニーを発生させるには充分でない。

(＜YS11 only＞より)

③も他のDNAに関する実験などを合わせて考えてみると成り立たない。また④の(ii)も不自然である。すなわち、DNAはYS11にとりこまれ、ある種のアミノ酸がなければ、生息できないというY

S11の形質を変えさせた訳である。(形質転換)。ところで、この形質は子孫へと伝わっていく遺伝形質である。となるとメンデル以来言われてきた、要素=遺伝子の本体がDNAではないかという一つの推測がなされると思う。

もちろん、この実験のみでは決定できないが、DNAが遺伝子の本体であることは、他の多くの実験の積み重ねによって確実な事となっている。この考えによれば、すべての生命現象を酵素に代表させて考え、酵素の働きに重要な意味をもつ、酵素の立体構造は酵素を構成するタンパク質のアミノ酸配列に支配されており、そのアミノ酸配列を決定するのがDNAというようになっている。この実験の場合も、YS11にとりこまれたDNA(全部とは限らない*)が指令を出して必須とされていたアミノ酸を合成する酵素をつくらせたと考えられる。

また逆にYS11(mutant)は、正常型の菌が紫外線の影響等で、adenine, Leucine, arginineの合成酵素に対応するDNAの部分に損傷を受け、合成酵素をつくることができなくなったものとみることができよう。

(注意)○とりこめるDNAは同種のものだけである。人間のDNAとバクテリアのDNAとはまた異質なものである。

○*とりこむDNAはwild 23のDNAの全部とは限らない。つまり切れてしまった、DNAの断片だけがとりこまれる場合もあると思われる。例えば、Ade⁻に生息しう菌は、

- adenineのみを合成できる菌
- adenineとLeucine(又はarginine)だけを合成できる菌
- adenine, Leucine, arginineを合成できる菌

<YS11+heat DNA>についていえば、DNAは熱せられると、その構造がこわれてしまって、生体活性を示さなくなる。しかし、一部はその構造が残っており、それがある程度、生体活性を示し、前のような実験値がでてくる。

(補足) 転換率 = $\frac{\text{くみかえ数}}{\text{総数}} = \frac{\text{接種した元の液 1ml 中の形質転換前の数}}{\text{接種した元の液 1ml 中の、菌の総数}}$

実際には、菌の数を数えることは不可能なので、コロニー数で代用させる。

(この値は、結局、YS11のうち、どの位の割合のものが形質転換されたかを示すものである)

生物部の実験結果より

(<YS11+DNA>の 10^{-1} のAde⁻を4000、Allの 10^{-5} を484)とすると

$$\text{転換率} = \frac{4000 \times 10 \times 10^1 (\text{cells/ml})}{484 \times 10 \times 10^5 (\text{cells/ml})} = \frac{4}{4840} = 0.000825 (0.08\%)$$

このことから、実際にDNAがとりこまれ、形質転換がなされる菌は、ごく一部であることがわかる。

逆に言って、このような実験を他の実験動物、例えばモルモット等で行なおうとすれば、表現形質を簡単に観察できないのは、もちろんのこと、その上にばく大な労力と時間を必要とする。なぜならば、転換率0.08%を得るためには、少なくとも数千の個体数を要するわけで、それは非常に困難である。

ここに、遺伝の研究に微生物が多く用いられる一つの根拠があると思われる。

〔感想・反省〕

三森：実験操作からレポート作成まで一応班員全体の協力によってできたことは嬉しい。この実験の意義等もほぼ理解できたと思う。“生物”のおもしろさの一つ見つけたような気がする。班員全体が、実験前にある程度実験について理解しておいた方がよかった。(ぶっつけ本番の感じ)

早瀬：はっきり言っておもしろくなかった。その原因は、我々の方にも、先生の方にもあったようだ。我々が実験内容をよく理解していなかったこと、そして、実験課題が先生の押しつけであったこと、である。しかし班員全体の協力という点では非常に有意義であった。

久光：実験についての説明をよく聞いていなかったの、実験そのものに興味が持てなかった。

どうせなら成功したかったが自業自得である。

先生の説明はやはり、よく聞くべきだと後悔している。

生物をやるたびに人間的に成長するようである。

多島：このような長時間のかかる実験は現在の高校のカリキュラムを見ると不可能である。しかし、科学の発展に伴い、どんどんこのような最先端たる実験は高校にも導入しなければならない。従って、今の高校3年間というものは改革されなければならない、6・3・3・4制も変革しなければ、現代についていけないし、また社会は発展しない。

福山：計画を立ててそれを実行するというおもしろさがあったが、扱う事柄（生物の実験）がおもしろくなかった。自分の嫌いな科目では、いくら「生物のおもしろさ」であっても迷惑なものである。

☆ このような新しい分野のことを高等学校の生物の必修事項とすることは、誠によいことと思われる。現代の科学の進歩は目ざましいものである。従って、当然、高校の取り扱う分野に広げなければならない。しかし、数百年前に人類が地球上に出現して以来、頭蓋骨の容量はどれほどふえたであろうか。Australopithecus 600cc, Pithecanthropus-Erectus 900cc, Sinanthropus-Pekinensis 1100cc, Homa-Neanderthelensis 1800cc, そして現代人は1400～1500ccといわれる。

この数字からもわかるように、人間の頭蓋骨の容量は数百万年経っても3倍に満たない。

また、仮に我々が2000ccあったとしても現代の科学を全てmasterしようとするのは無理ではなからうか。しかし、現在の高校の状態は必修科目が現代国語、古典、漢文、……と17科目もあるのである。これは数年前に文部省で決められたもので、現在の高校生の意見は全く反映されていない。高校は義務教育ではないのであるから、自主カリキュラムを生徒に組ませるべきである。そして、古い理論から新しいものへと移行するのは当然である。

実験レポート

2年1組E班 青木、青山、赤尾、植田、小倉、神崎、榊原、松野

1. 実験目的

- mutant の YS11 に正常な w23 の DNA を導入して TS11 が形質転換して正常型になることから遺伝子の本体がDNAであることを推察する。
- 実験の過程を通じてこの種の実験に必要な技術を養う。（たとえば、無菌処理など）
- 本や講義などで、抽象的に理解していた遺伝についての知識をDNAを取り出したりすることによって具体的に把握する。
- 生命の本体がDNAという物質にあることを理解し、これらのことについてこの後興味をもつ態度を養う。

2. 実験操作とそれぞれの実験操作の意味

実験 I

栄養摂取に関する正常型である w23 の DNA をとり出し精製する。

1. 斜面培地に原菌としてw23を接種し、37°Cで半日培養し、冷凍保存する。

○斜面培地……培地の広さを広くするため。

2. 前培養 L-broth の液体培地に(1)で培養して、ある菌を白金耳でとり接種する。約12時間振とう培養をする。（スターラーにより 37°C の恒温器に保存する）

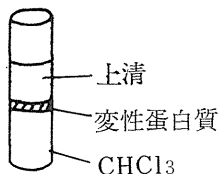
○L-broth (1ℓ中)

poly peptone 10.0g yeast-extract 5.0g NaCl 5.0g glucose 1.0g

3. 本培養

前培養したものを約25ml 位ずつ 1.5ℓ の 2本の L-broth の液体培地へ注入接種する。スターラー方法を使用し、37°C に恒温器で保つ。約12時間培養する。

4. 集菌 チューブは50mlを使用する。チューブの重さを測定しておき集菌した菌の重さを算出する。
本培養の終了した液を遠心分離器、1万回転/秒、10分間遠心する。チューブの底に菌が集菌されるから液を捨てる。
5. 8ml の saline EDTA をチューブへ注入して懸濁液とする。
○saline-EDTA, 0.15M-NaCl+0.1M-EDTA (エナレンジアミンテトラ酢酸), PH8 DNase の作用を防ぐ。
EDTA は鉄、カルシウム・マグネシウムなどと結合して水溶性のキレートを生成し、硬水の軟化剤となり、洗浄剤・安定剤の働きをする。
6. 共栓つき試験管へ移入する。そのあと10mgのリゾチームを混入して37°Cに60分前後保つ。
○リゾチーム 溶菌用
7. さらに 1ml の 25%SLS を注入し60°Cのウォーターバスで10分保温し完全溶菌する。
○SLS 25%溶液→溶菌、酵素作用阻止、蛋白質変性などの働き。
8. さらに過塩素酸ソーダ ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5M 溶液を約 1.2 g 注入し溶かしこむ。
○過塩素酸ソーダ 核酸と蛋白質の解離
9. さらにクロロホルム・イソアミルアルコール10mlを注入して軽くふる。…10分間、
○除蛋白をする。
○イソアミルアルコールは消泡、変性蛋白層の分離を助ける。
10. 遠心分離



⑨の液をチューブへ移して10分間遠心する。

上清液だけをコマゴメピペットで何 ml あるか測定しながら50mlのコルベンに移す。

11. 冷却したエタノールを核酸液の2倍量、器壁より静かに注入する。
核酸の沈殿用
12. ガラス棒でおだやかにDNAのまきとりをする。
13. 二回目の精製
ガラス棒の先になきとったDNAを口の壁面におしつけ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ をできるだけ絞りと
1/8 ssc 6ml の注入してある共栓付試験管に棒のDNAを浸せきして膨潤する。
14. さらに 10ssc を 0.6ml 注入して完全にDNAを溶かす。
15. クロロホルム・イソアミルアルコールを 7ml 追加注入し10分間軽く振る。
16. 10分間遠心する。
17. 上清液をコマゴメピペットで小型コルベンへ移し冷エタノールを静かに管壁より流入して、硝子棒でまきとる。
18. 1/8 ssc 5ml, 次に 0.5ml の 10ssc を注入して完全に DNA を溶かす。
19. 透析
透析チューブにつめて12時間透析する。

実験Ⅱ

枯草菌の wild23 からとり出した DNA を突然変異型 YS11 に加えて、形質転換を行なう。

I 前培養

原菌 YS11 を新しい培地へ接種し37°Cで12時間位培養する。

- II C I Media に培養する。 $\left\{ \begin{array}{l} 50\% \text{ glucose (0.05ml)} \\ 5\% \text{ Mg SO}_4 \text{ (0.02ml)} \end{array} \right\} 5\text{ml}$

この培養液をL字管に注入した後、殺菌しておく。

そこへ前培養してある菌を接種し、4.5～5.0時間振とう培養する。

対数グラフを用いて濁度計により濁度をグロースカーブで記録し、濁度曲線の勾配がゆるやかになったところで培養を中止する。

Ⅲ 集菌

1万回転で10分間遠心する。

Ⅳ C II media に移す。

Salts 10ml
50% glucose 0.1ml } → C I media
5% MgSO₄ 0.2ml }

これをL字管に入れる。Ⅲで集菌したチューブの上清液を捨てそこへC II media を3～5ml 移注して懸濁液とする。そしてL字管へ再びもどし、1.5時間位振とう培養する……37°C

Ⅴ DNA処理

① W23DNA 1000r/ml から 100r/ml の濃度の液を 3ml つくる

(DNA 0.3ml+SCS 2.7ml)

② heat DNA をつくる 100°C で15分間

③ 15分間の Leat を終えたらすぐにその DNA を氷水につっこむ。

一方90分の培養を終えたC IIより2本のL字管にその液を 2ml ずつ入れておく。

④ C II の2本のうち1本には onrmal の DNA をもう1本には充分に冷えた DNA をそれぞれ 0.1ml のずつ入れる。(濃度は10r/ml) この2本を振とう培養器で90分間培養する。

⑤ 培養が終わったら、プレートに植えつける。

第一回め { YS11+DNA
YS11+Lent DNA
YS11 only
DNA only }

第二回め { YS11+DNA
YS11 only
DNA only } …寒天培地に菌を植えつけその上からさらに寒天をかぶせる。

{10r/ml になった液から 0.1ml 取り ssc 0.9ml を混ぜて 1ml とする。これを 0.1ml ずつ植えつける。(濃度は 0.5r/ml) ……これを⑩で表わす。

{さらに⑩の液を 0.1ml 取り 1ml にうすめて 0.1ml ずつ接種する。(濃度は 0.05r/ml) ……⑩²で表わす。

⑥ plate を DNA 処理の前に用意しておく

{ K₂HPO₄ 7g Ager 1.5%
KH₂PO₄ 3g
(NH₄)₂ SO₄ 1g
Na₃ Citrate 2H₂O 0.5g
glucose 5g
MgSO₄ 7H₂O 0.2g }

これに3種のアミノ酸のうち2種ずつを加える。

実験結果

① 第1回め(12月末)

どのプレートからもコロニーは発見できなかった。

② 第2回め(1月)

	Plate	10		10 ²		
I	Ade—	⑩1624	⑪4400	⑫2000	⑬48	YS11+DNA
	Leu—	⑭2	⑮0	⑯13	⑰0	
	Arg—	⑱12	⑲2	⑳125	㉑564	
II	Ade—	0	0			YS11 only
	Leu—	0	0			
	Arg—	0	0			
III	Ade—	0	0			DNA only
	Leu—	0	0			
	Arg—	0	0			

<表 I>

考察

① 第一回めにコロニーの出なかったことに対する考察。

○DNA取りが充分でなかったこと。

○plateに菌をぬりつける際の不注意。

前者の方はDNAが少しであってもコロニーはある程度生ずることが予想されるので、直接の原因ではないように思われる。

後者の方はまず、塗りつける棒を焼いたあと十分に冷やさなかったこと。

それとともに、アルコールによって菌が死んでしまったこと。

○このようなことになった原因として、ガラス棒を熱いまま使ってしまうなどということは、不注意ということもあるが、その時々何をしているのかということを考えていない機械的に実験をしているからであろう。

これは反省しなければならない点であろう。

② 第二回めのコロニーの数について。

E班と同じ実験をしたF班のデータ(表Ⅱ)も引用することにする。まず表Ⅰをながめると、Leu⁻のプレートの結果が、非常におかしいこと。(F班も同じ)Arg⁻の10のプレートの数が少ないこと、Ade⁻にもその傾向がある。

	10		10 ²	
Ade ⁻	3820	6565	1540	210
Leu ⁻	23	622	0	0
Arg ⁻	4088	1406	134	1608

<表Ⅱ>

さてこれらの結果に対してどのような原因が考えられるであろうか。いま便宜上<表Ⅰ>のⅠのプレートにそれぞれ①～④の番号を付ける。

ところで結果がおかしいと考えられるプレートは①②③④⑤⑥⑦⑧⑨⑩などである。この中で⑩を除いてはすべて予想されたよりも、コロニーの数が少なかったということがいえる。

ここまでくると、これらのプレートに何か菌に悪影響を与えるような要素が共通していたということが予想される。いったいどこで悪かったのだろうか。この場合も菌がちゃんと生育しているプレートがあることから、途中の過程よりもやはり塗りつけに問題があったと思われる。

私達の班では、ガラス棒で塗り付けたのではなく、菌を植え付けたあと、その上からまた寒天をかぶせたのである。

ところが途中でその寒天が足らなくなったので、もう一度寒天を用意直したのであった。

ここで2度目にかぶせた寒天がやや熱すぎて菌に悪影響を与えたのではないかということが考えられる。つまり2度目(あとから)寒天をかぶせたプレートが①②③④⑤⑥⑦⑧⑨⑩だということである。その場合、多く出すぎた⑥については菌を0.1mlよりもやや多く植え付けたのではないかということが考えられる。

ところで、ここでF班のデータ<表Ⅱ>を眺めてみると、このほうが予想された結果にE班のものよりも近いということに気がつく。

さてF班でも先ほど述べたように特にLeu⁻のプレートの結果が悪いことに気づく。この理由も上で述べたような考察で片づけようとすると少し論拠が弱いようである。

そこで別の原因を考えると、まず、植え付けた菌については、Ade⁻やArg⁻と同じなのであるから、プレートに問題があったか、その他の特殊な原因があることが考えられる。

まず、プレートについては問題があるとすれば、それは注文したアミノ酸であるが——この場合Ade⁻とArg⁻これは、AdeとArgに問題があったとすれば、他のプレートにも影響するであろうから、大きな原因と

はいえないであろう。そこで班の討論で出たのは、Leu-で菌が生育するか、つまり、Y S11が形質転換して、Leu-を作れるようになるのが、他のアミノ酸合成よりもむずかしいのではないかということである。

この観点から見ると Ade はすぐに合成できるようになるようである。しかし、この考え方は他の実験、継続実験などをしてみないとはっきりとはわからないし、考察に必要な分子遺伝学の知識も欠けているので、これ以上深入りすることをやめる。

③ 実験全体に対する考察

○まず<表 I>において、正常型の DNA を Y S11 に導入したところ菌がアミノ酸なしで生育したこと。

また Y S11 だけでは、正育しないことから、この形質転換の原因は導入した W23 の DNA にあったこと……つまり DNA が遺伝子の本体であることが容易に推測できる。

○また DNA only だけ（正常な）ではコロニーが出ないことは DNA が設計図のようなもので、それに必要な各種の道具、材料がないと考えることで納得できるであろう。

○さらに他の班の結果から Heat DNA を導入したものはコロニーが出ないことから、DNA の本体は、熱変性をするものであるということが考察できる。

実験に対する反省その他。

① 1 で最初に掲げた実験目的はどの程度達成されたか。

まず、DNA が遺伝子の本体であることを具体的に把握するということは、かなり成功したと思う。

実験技術の問題については、無菌処理など得るところは多かったが、まだまだ教えられた通りにやったという感じで、自分達のものになっていないという気がする。

② 実験が一度ならず二度までも失敗したことはそれなりに意味のあったことだと思う。

つまり私達が小学校のころからやってきた実験はほとんどのものが、成功するものばかりであったし、失敗してもその原因などはかんたんに、明らかなことが多かった。

ところが今度のように複雑な実験において、失敗すると、その原因などはそうかんたんにはわからず、ちゃんと成功するまでには何度も、実験を重ねなければならないということ。——これは科学的実験にはつきものであるが——を学んだことは大きな意味があることだと思う。

③ 実験方法についての考察。

ここではおもにプレートの作り方について述べたいと思う。

まず、それぞれのプレートで Ade-, Arg- など、どれか一つをなくしても、菌が生育することから、その欠けていたアミノ酸を合成する形質を得たということが考えられ、それがどのたんぱく質についてもいえるから全体として形質転換をしたといえるということのはわかるのだが、いろいろと疑問が起こってくるのである。

まず、同じ菌が Ade-, Arg- で生育するのだから、この菌はこの三つがすべてなくても生育しそうに思われる。

これを確かめるには、何もたんぱく質を入れてないプレートに菌を接種するかそれともなかったら、たとえば、Arg- で生育した菌を Leu- の培地に接種してみて生育するかどうかを調べてみればよいであろう。これはほんとうにやってみたい実験であった。ところで、先生は、上の後者の実験について、菌はほとんど生育しないのだと授業中にいわれた。

これはどういうことであろうか。それが正しいとすれば、Arg- の培地に接種した菌は、Arg を合成する能力しか得ていないこととなる。

この理由を考えてみると、Arg- の培地には Ade や Leu があらかじめ含まれているので、これをその上合成する必要がない。つまり、Ade や Leu があることが Ade, Leu を合成する能力を得る障害になっていると考えられるであろう。

このような考え方をするとそれでは、たとえば Arg-, Leu- と二つのアミノ酸をなくした培地では菌は生育するであろうか、という疑問が起こってくる。上の考察から Ade を合成する能力はこの培地では得られないということとなる。さて、Arg と Leu の両方を合成する能力は得られるであろうか。

これはやはり実験をしてみなくてはわからないであろう。

ところで、このような考え方には、ある反論が当然起こってくるのである。

つまり、培地の種類によってたんぱく質合成の能力が異なるとすると、たんぱく質合成の能力はY S11にW23のDNAを導入した際に得られたのではなくて、この菌がプレートに植えつけられてそこでの状況がわかってからということとなる。

そうすると、どうもDNAの働きがあいまいになってしまうのではないか。というようなものである。

しかし、ここでは問題提起にとどめておく。

④ 今日では、定性的な考察であつたので、ここで少し定量的なことを述べておこうと思う。

＜表I＞において、10で表わしたプレートにおいては、0.5r/mlの濃度の菌を0.1ml 植えつけたのであつた。したがってDNAの絶対量は0.05rである。また10²のプレートにおいては0.05r/mlの濃度の菌を0.1ml ずつ植えつけたのだから同じく絶対量としては5×10⁻³rである。

ここで何%のDNAが形質転換したかということを計算すべきなのだがrという単位がどういう意味のものなのかよくわからない。

ところでY S11の培養はC I培地において、3×10⁸ cells/ml程度で中止したのであつた。これがC II培地でそれほど変化のないものとする、まずY S11を2ml L字管にとつた段階では3×10⁸ cells/mlこれから0.1mlとつて、10倍にうすめた段階では3×10⁷ cells/mlこれを0.1ml ずつ植えつけたのが10で表わしたプレートであるからその絶対量は4×10⁶ cells、10²のプレートは3×10⁵ cells

ここでE班とF班のデータを比較して Ade⁻の10プレートのコロニーの数を約4000とすると、転換率は $\frac{4 \times 10^3}{3 \times 10^6} \doteq 1.3 \times 10^{-3}$ で約0.13%

10²のプレートでは $\frac{1 \times 10^3}{3 \times 10^5} \doteq 0.3 \times 10^{-2}$ で約0.5%

コロニーの数はあまりあてにならないので定量的な考察はこの程度にとどめておく。

(実際はもともとあつたY S11の量に対する、コロニーの数ではなくて、Y S11を完全な条件で培養して) 出た菌(生菌調査)に対する比として求める方が意味があるのかもしれない。

教育(指導実践)実験の結果

生徒の研究結果のレポートは、班別に作成された。そのすべてをここに掲載することは紙面の都合でできないが、代表的なA班とE班のを掲載することにした。

A班は、最後のプレート塗りつけを常法のように硝子曲管を熱処理しておこなつた。

接種菌を死滅させるおそれがある。

E班は、ソフトアガー法と命名し、培養寒天液を溶かした後、温度を37°Cにさげ、接種した直後に上から流入し、プレート上に寒天を拡散させることによって接種菌をプレート上に拡げて塗りつけたときと同じようにする。

このときの培養寒天液は、ミネラル成分と寒天とで作成されたものである。

考察的問題点

1. 実験を進めていく上での技能や方法に対する理解に関して

第1回目は、失敗の実験であつたが、むしろ、この事は大きい意味を持つことができた。生徒は1日半の長時間の実験の努力が無駄となり、予想した結果が得られなかつたのであるから失望した。しかし、すぐ、失敗の原因をグループで考え始めた。2回目の実験をするときの基礎になつたばかりでなく研究というものにきびしさを体験したからである。レポートにもあるように、実験過程での物理・化学的処理の意味がはっきりしないで機械的に操作した面があるが、説明としてはわかつたようでも体験的にわかつていないと不十分のようである。それにしても事前に問題提起の形で各班ごとに操作段階での物理・化学的処理の意義を討論させて仮説をたてそれを実証するという探究的な活動をするよう指導せねばならぬと思う。技能面では、教師のデモンストレーションと生徒の(グループ別)実験とははっきりさせて指導をすすめたが、メスピペットの操作がスムーズにいかなくつた。10ml, 5ml, 1ml, 0.2ml, 0.1ml, というように5種類のものをどうする場合に、無駄なく使えるか、正確に測定するための操作技能は、初めてでは

困難なようである。体験を通して上達するものについての基礎修練をする必要があろう。

また、DNA処理をした菌とそれに比較対照としての菌の扁平培地（シャーレーに用意したプレート）への塗りつけの場合、作ったプレートを先ず低温で表面を乾かし、接種した菌をプレート全面へ拡げる。そして更に塗布菌を低温で乾燥させてからシャーレーをさかさまにし懸てき培養し、48時間後にコロニーカウントするのであるが、以上の操作には多くの失敗をする要因がある。

先ず乾燥させるときに時間がかかりすぎることは勿論、だが、菌を接種後拡げて乾燥させるとき、乾燥器中で誤って37°C以上にして菌を殺してしまう恐れが多い。これは、乾燥器の温度調節をすれば防げるであろう。しかし、接種菌の塗布の場合、L字形の硝子曲管をアルコールにつけて燃やし、熱処理・アルコール滅菌をする操作があるがそれを雑菌におかされぬようプレートの接種菌のない部分で十分冷却させてから拡散操作に移る。この操作過程でアルコールのついたまま、あるいは燃やした後、不十分な冷やし方のまま塗布すると菌は殺され、発芽しないで、最後のところで実験全体が失敗したことになる。まさしく、第1回目は、この失敗が重なってコロニーのカウントができなかった。

その原因には、この外、抽出、精製したつもりの方のW23のDNAがとれてないか、とれたとしても能力を失っていることが予想されるので、普通、光電光度計で菌数測定をするのであるが、高価な機械故、教師の準備として菌数のわかっている、しかも形質転換能力をたしかめてあるDNAを用意しておくべきであろう。と同時に、塗布の方法を高校生の技能にあうように改良すべきことは当然である。

そこで筆者、貝沼は、ソフトアガー法と称する既述のテクニックを考案したので、第2回目は、6ヶ班中EとF班の2ヶ班に実施した。元来、好気性菌なので菌をアガーでおおうのは、よくないのであるが、教師の予備実験では、コロニーの発生数が低下するが、低下率を実験結果から算出しておけばよい。

それにプレートを乾かす必要がなく、実験を連続的にすすめて終了させることができるので、生徒の予想する結果がカウントできたのである。さて総括的にみて生徒は不安と困難を訴えているが、実験の全体にわたっては、初心者でもできる技術であることが、学習活前の状態の評価から判断できた。特に2回目は不安がなかったためか、スムーズに操作されていた。

2. 指導計画に、限られた指導配当時間、に関して

今回の実践は、実験の全過程の中で菌の前培養（プリカルチャー）や集菌（遠心分離する）段階は班長（リーダー）にポイントを演示するにとどめた。その他の実験は、生徒実験としてみた。そのため、1日半即ち、第1回目はDNAの抽出・精製に約5時間、引きつづき第2回目は午前8時30分から開始して午後5時から6時までの間を実験した。

これには、2つの見解があると思う。その1つは、生徒の科学的能力を促進するような指導としての実験を取扱う場合、年間計画の中に科学教育の大切な目標達成のための有効な実験研究として、1つでも2つでも少数にしばって選び、時間をかけて指導すべきであるという立場であろう。その場合、他教科のことも配慮して、土曜日の午後から翌日、日曜日にかけて時間をとれば十分、可能である。今回は、第2学期末の授業終了後、生徒が家庭研修として休暇状態になったときを選んだのである。生徒の中には、出席することに疑問をいだいていたものもいたが付属という実験学校に学ぶものとして認識をあらたにしたようである。

レポートを見てわかるようにごく一部の生徒を除いて感激している点は注目に値する。

教師の労働条件の問題との関係で一般化すべきであるとはいえないが、限られた時間に形式的にあてはめることでは、本当の指導はできないのではないだろうか。

その2として、考えられることは、何とかして配当時間の中で取扱う工夫をしてみることであろう。それには、実験の操作過程をビデオテープにとり、生物クラブなど自分達の身近な仲間が操作していく様子を画面を通して見る。そしてポイントになるDNAの抽出・精製の過程をデモンストレーションしてみせる。そして既に用意してあるDNAを使ってDNA処理をさせるところから生徒実験に移すと1日で実験できる。

なお、2時間の実験時間で終わらせるためには、DNA処理まではどうしても培養に時間がかかるから、そこまで、ビデオテープで映写し、実験操作はDNA処理後菌の希釈から始め、プレートをつくり、プレートに接種する過程など、最終の懸滴培養段階を生徒実験としてみるとよい。しかし、何といっても、全過程を生徒実験とするにこしたことはない。

しかし、部分的な生徒実験でも指導を関連的に（有機的取扱い）すれば、コロニーカウントをして結果の考察の効果を十分にあげることができるであろう。それには

ビデオテープを始めとする視覚教具の近代化が必要となる。

3. 今回の生徒実験に見られる科学的な思考の促進に関して

生徒の考察内容からみて可成り、その効果はあったのではないかと考えられる。仮説から実証への探究の科学は、生徒がグループ内で問題点を取りあげ、討論し、困難に立ちむかい、自分達のものとして考えてみる。ここに重要さがある。例え、まちがった判断をしたり、過分の推察をしたりすることがあっても自分達の考えを発表してみることは、大切なことである。高校生に容易にできるデーター例がどこにも見つからぬだけに、自分達で解決せざるを得ないことも手伝って、実験後の考察の意欲とその考察結果については一応、満足すべき報告内容（生徒のレポート）となった。

なお、いくつかの問題点を発見し、反省の話しあいまでしている点は大いに自発学習として認めるべきであろう。

4. 資料の与え方と共同研究に関して

実験の目的・方法（手順）などの案内のプリントは、各班別に1部宛て与えた。

グループ学習の意義を配慮して1部の資料をグループでどのように活用するかなども配慮してみたが、集会をもって交代で読みあげながら話しあいや討議をして共同して内容の理解をしていたグループもあり、共同体が形がい化し、個人の回覧順序をきめて個人的に理解し認識をしていくという方法をとったグループもあって後者の方が個人差が大きく、実験の場面では個人がバラバラで実験がスムーズに進められなかったようである。

「生命と分子」今堀和友著をグループに1冊あて、貸し与え、基本概念を総括させることを実施してみたが、その内容を把握する程度についての教師の点検や評価が今回は、不十分であったので、判明しない点が多い。

科学史的なものとして『遺伝学のあゆみ、メンデル法則100年記念出版委員会編』中の32P～51Pの内容を資料として各人にプリントして配布したが、今回の実験の位置づけをしていく上に大きい効果があったと思う。

それは、分子遺伝学がメンデルイズムの基礎のうえに積み重ねられるべきもので、その発展の実際が科学史的な考究そのものであるから。