「高校新教科 理数」の学び方［第2回］

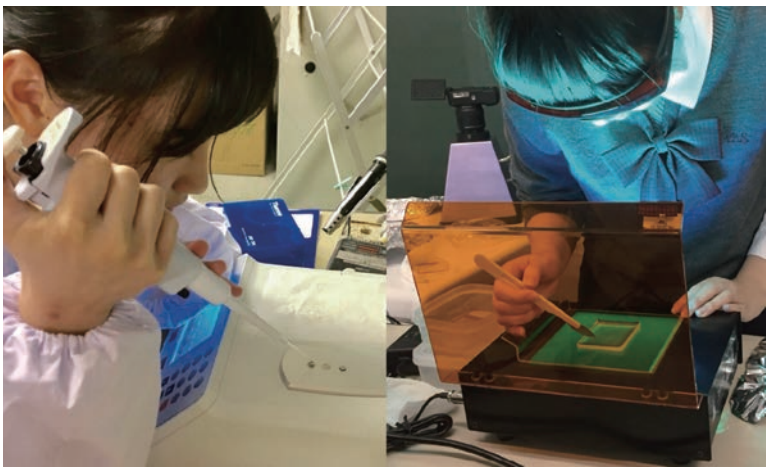
理数探究と生物遺伝実験
――高校におけるRT-PCR法を用いた分子生物学実験

田中 福人 *Fukuto Tanaka*
ノートルダム清心学園 清心女子高等学校 教諭

(1) 生物を扱った「探究」における遺伝子実験例

近年の高等学校の学習指導要領「生物基礎」および「生物」においては，さまざまな単元において遺伝子およびタンパク質の機能に関する記載が増えており，これらの理解がなければ各単元を深く理解することは困難である。しかし，遺伝子を直接見ることは困難であり，生徒にとって理解しがたい内容であることは間違いない。そこで，遺伝子について体験的に理解するために，さまざまな教材開発および教案作成がなされているが，特に，「DNAの抽出」「制限酵素処理および電気泳動法」「PCR法および電気泳動法」等はその代表例といえる。「DNAの抽出」は最も容易な実験であり，簡易的なものであれば中学校でおこなう場合もある。「制限酵素処理および電気泳動法」の実験については，プラスミド溶液と制限酵素溶液を混合して反応させた後，電気泳動でのバンド出現パターンを比較するといった実験例が知られている。「PCR法および電気泳動法」については，たとえばコメの品種判別を目的とした実験キットが㈱タカラバイオから市販されており，予算および設備に余裕があれば実施することも可能である。ただし，これらの実験例は，想定される実験結果が明白であり，探究を目的とするというより，学習内容や実験原理の深い理解や，実験器具の扱い方の習得を目的として実施されるケースが多い。

2022年度（令和4年度）より高校で実施される新学習指導要領では，共通教科「理数」が新設される。2018年（平成30年）7月に公表された高等学校学習指導要領解説理数編によれば，探究内容の一例として，“DNAによる品種判定に関する探究：イネの各品種からDNAを抽出し，それを用いてイネの品種判別を行う”という記載が見られ，前述のような実験キットを用いるケースも想定されている。また，文部科学省指定スーパーサイエンスハイスクール（以下SSHと称す）等



生徒課題研究における遺伝子解析の様子

では，既に探究活動および課題研究が実施されており，遺伝子を扱った前述以外の実験例も見られる。そこで，毎年おこなわれるSSH生徒研究発表会における，遺伝子を扱った課題研究内容を2018年～2021年度（平成30年～令和3年度）にわたり調査した（**表1**）。

表1より，種の判別や系統解析を目的としてDNAの分析が高校現場では良くおこなわれていることがわかる。共通する実験フローとしては，生体サンプルからのDNA抽出→PCRによる目的の遺伝子領域の増幅→電気泳動もしくはシークエンスによる分析，というものである。DNAは安定した物質であることや，さまざまなプロトコルが開発されていることが，多くの高校で研究例が見られる理由であろう。ただし，これらの実験にはサーマルサイクラーや遠心分離機，核酸濃度測定用の吸光光度計といった実験機器や，DNA抽出のための試薬，プライマーといった消耗品の類も必要である。

本校では，遺伝子の発現量解析にも着手している。主な実験フローは，生体サンプルからのRNA抽出→逆転写によるcDNA作製→PCR→電気泳動による分析，である。DNAより不安定で壊れやすいRNAを扱う関係上，実験項目が増えることに加え，実験の難易度も上がる。実験ミスの誘発を避けるため，実験プロトコルシートの作製と順守，実験ノートへの結果の記載の徹底，実験中の私語の制限などを特に意識して指導している。

表1　SSH生徒研究発表会で発表された遺伝子を扱う実験の例

年度	学校	主な内容
平成30年度（2018年度）	京都府立桂高等学校	キヌア品種のDNA鑑定
	北海道旭川西高等学校	アズマヒキガエルのミトコンドリアDNAの分析
令和元年度（2019年度）	兵庫県立尼崎小田高等学校	トゲワレカラのリボソームDNAの分析
	ノートルダム清心学園清心女子高等学校	酵母のリボソームDNAの分析
令和2年度（2020年度）	鹿児島県立国分高等学校	リュウキュウアブラゼミのミトコンドリアDNAの分析
	和歌山県立向陽高等学校	ブドウハゼのDNA分析
	ノートルダム清心学園清心女子高等学校	イネのアクアポリン遺伝子の発現量解析
令和3年度（2021年度）	兵庫県立三田祥雲館高等学校	プラナリアのリボソームDNAの分析

(2) 本校での実践の具体例

本校では文部科学省からSSHに指定されたことにより，2006年度（平成18年度）入学生から高校2年生において課題研究（2単位）を履修できるようにしている。その中で実施してきた，遺伝子を扱った研究例を一部紹介する。

• 植物の吸水量が高まる原因について遺伝子の発現量解析から考察する

植物にとって，根からの吸水は生育上とても重要な出来事であるが，一般的には，水やりは朝方おこなう方が良いとされている。その理由として，たとえば夏場や冬場の高温や低温の水に対して根が枯れてしまうことが知られている。このように水やりの最適な時間については気温が大きく影響していると考えられているが，温度条件を一定にした時も，同様のことがいえるのか，植物本来の持つ吸水能力という視点で見た時，植物が最も吸水できる時間帯，つまり最適な水やり時間帯はいつなのだろうかと興味を持ち，研究を始めることにした。

まず，イネ（*Oryza sativa*）を対象とし，インキュベーター内で温度一定・明暗条件下で吸水量を調査したところ，吸水量は常に一定ではなく，夜間はあまり吸水せず，明け方から日中にかけて吸水量が高まることを確認した（**図1**）。また，同条件で蒸散量に関係する，気孔の開閉運動について調べたところ，明期開始直後から気孔が開き，蒸散量が高まっていることが予想された（**図2**）。これらの結果をもとに吸水量の日周変動について生徒とディスカッションをおこなったところ，日中の

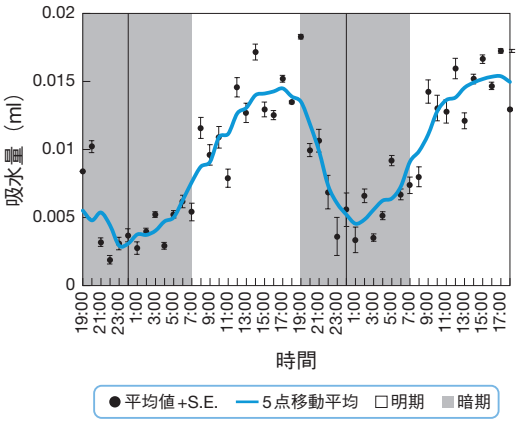


図1 イネの吸水量の日周変動

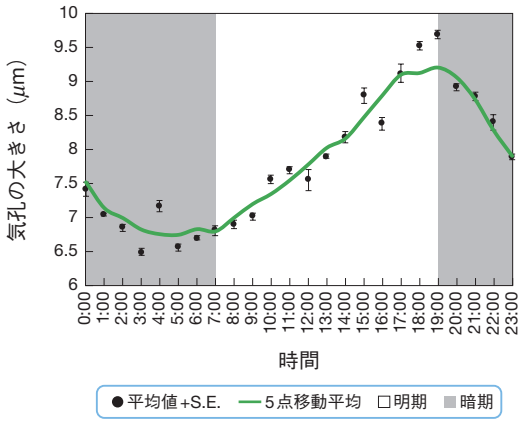


図2 気孔の開閉の日周変動

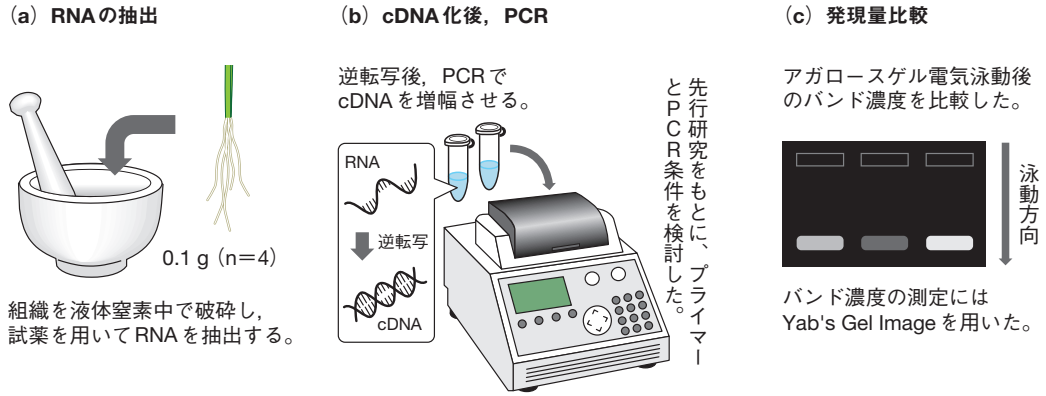


図3 RT-PCR法の流れ（半定量PCR）

吸水量の増加には蒸散量の増加が関係しているが，吸水量の増加は明期開始前（明け方）から始まっており，それは蒸散だけでは説明できないという意見が出た。

そこで，明け方に吸水量が増加する原因の一つとして，根のアクアポリン遺伝子の発現量の違いが影響しているのではないかと仮説を立てた。イネのアクアポリン遺伝子については先行研究により複数種類が同定されていたため[1]，遺伝子データベースからこれらの塩基配列等の情報を取得した。その後，仮説の検証のため，温度一定，明暗12：12の周期で生育させたイネの根を2時間ごとにサンプリングし，RT-PCR法によりアクアポリン遺伝子の発現量解析をおこなった。実験の流れを**図3**に示す。

得られた実験結果が**図4**である。各時間から抽出したRNAを逆転写し，PCR後におこなった電気泳動結果および，その電気泳動のバンド濃度を解析ソフトで数値化して作製したグラフである。

この結果より，アクアポリン遺伝子の転写量は明期開始前後に高まっていることが確認できた。アクアポリン遺伝子が発現し，根の細胞においてアクアポリンが増えれば，根の吸水性は上がると考えられる。このデータを加えて再度生徒とディ

スカッションをおこなったところ，日中は気孔が開き，蒸散量が増えることで吸水量が高まるが，夜明け前にアクアポリン遺伝子の発現量が高まることで，明期開始前の段階から吸水量が増加し始めると考察した。このように，アクアポリンの発現が吸水量の日周変動を生み出す要因の一つである可能性を示すことができた。しかし，現データではmRNA量で考察をしている段階であるので，翻訳後のアクアポリン量そのものを測定する必要があるという意見もあり，現在は同条件でタンパク質を抽出した後，ウエスタンブロッティングによる解析に向けて実験条件等を検討している。

＊　＊　＊

以上，本校で過去におこなった，遺伝子を扱った生徒課題研究例を紹介させていただいた。実際の研究の中では，根のサンプルからRNAがうまく取れなかったり，PCRで遺伝子の増幅が見られなかったり，電気泳動でバンドがスメア上になったりと，うまくいかないことも多かった。そのような度々起こる失敗に対しては，たとえば実験手順にしっかりと向き合わせるなど，どこに課題があるのかを見つけるように指導し，適切な実験手法を確立するように指導した。そのようにして課題を一つひとつクリアさせることが，生徒の課題解決能力を向上させることにつながると考えている。遺伝子を扱った探究活動は容易ではないが，今後も時間と費用に余裕があるならば，是非生徒に挑戦させたいと考えている。

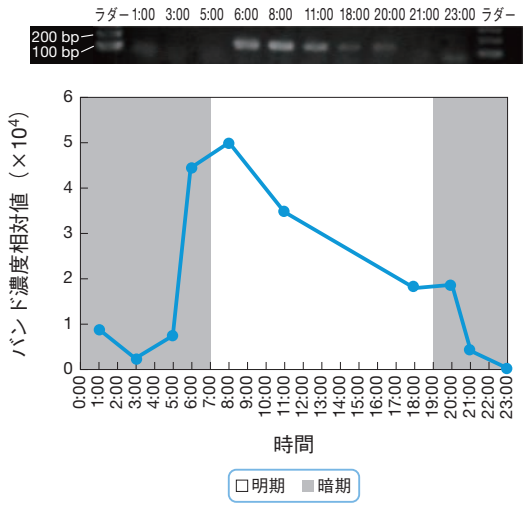


図4　**イネのアクアポリン遺伝子（*OsPIP2;1*）の発現量の日周変動**

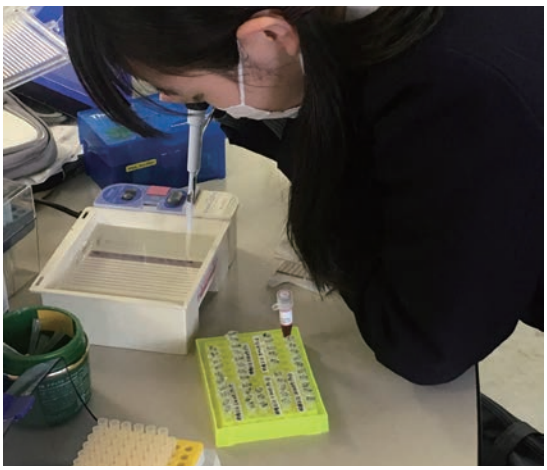


図5　**電気泳動の実験の様子**

［文 献］

1) Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M. & Maeshima, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1568–1577 (2005).

2) 前田彩花，石原亜侑美．アクアポリン発現リズムと気孔開閉リズムに基づく植物の水吸収効率の日周変動．令和2年度SSH生徒研究発表会 2020年8月.

田中 福人 *Fukuto Tanaka*

ノートルダム清心学園 清心女子高等学校 教諭

2001年，岡山大学理学部生物学科入学。2005年，岡山大学大学院教育学研究科（修士課程）入学。2007年，ノートルダム清心学園 清心中学校清心女子高等学校勤務。2017年，岡山大学大学院自然科学研究科（博士課程）社会人入学。専門分野は，時間生物学，植物生理学。第46回東レ理科教育賞（東レ科学振興会）理科教育賞（2014年），第4回リカジョ育成賞（公益財団法人 日産財団）準グランプリ（2021年）を受賞。アクアポリン遺伝子から探るデンジソウの水上葉形成メカニズム（公益財団法人 下中記念財団 2017年報 2017年10月に論文掲載）。