

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K04482

研究課題名(和文) 倍数体作成と植物ホルモン処理による体細胞分裂観察実験の改良

研究課題名(英文) Improvement of the observation of mitosis at school by the introduction of polyploids and plant hormone processing

研究代表者

佐野 史 (Sano, Fumi)

群馬大学・教育学部・教授

研究者番号：30313018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞分裂の観察実験の改良を目的として、倍数体を作成して大きな分裂細胞を持つ試料の調整を試みた。高等学校における実践では顕著な効果は得られなかったが、単元を通じて倍数体について触れることが単元内容の理解につながるという副次的な効果が得られた。また、組織化学的解析によって分裂領域の範囲を特定し、その長さの根を用いることの効果を示し、植物ホルモン処理によって分裂領域が広がる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体細胞分裂の観察実験は、中高の全ての教科書に手順が載っている基本的な実験であるが、成功率が低く、単元の理解につながらない場合が多い。本研究で特定した、分裂細胞の発見に適切な試料の大きさの知見を活用すれば、多くの生徒に生命の連続性を実感させることが可能になる。また、倍数体の導入そのものの効果は不明瞭であったが、倍数体の学習自体がDNA量の概念の理解を深めるといった副次的成果も意義の一つであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To improve the observation method of mitosis at school, preparation of the materials with large mitotic cells by making polyploid plants was attempted. Although outstanding effect was not obtained with those materials in the practice at high school, as a subsidiary effect, students could understand the contents of the unit by learning about polyploidy itself. Besides, by histochemical analysis, the length between the root tip and the boundary of the meristematic and elongation zones in the root was measured. Then the effects of using the roots with such length at the observation was shown. It was also implied that the meristematic zone could be expanded by phytohormone treatment.

研究分野：植物細胞学

キーワード：体細胞分裂観察実験 倍数体 植物ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体細胞分裂の観察は、生命の連続性を実感させる教材として、中学校で行われる必須の実験の一つであり、高等学校でも実験が行われることが多い。この実験の基本的な方法は、根端分裂組織など分裂細胞を多く含む組織を化学固定し、組織を塩酸で解離したのち酢酸オルセインなどで染色することにより、細胞核および染色体を顕微鏡下で観察するというものであり、うまくいけば細胞周期間期や分裂中のさまざまな時期にある細胞を観察することができる。しかし、生徒が自分で作成したプレパラートでは分裂像を見つけることは難しく、教員が準備しておいたプレパラートを用いたり、初めから演示実験として行うなどの手段がとられることが多い。このような状況を打破するために使いやすい材料の検討や実験手順の改良などが多数報告されているが、研究開始当初においても生物分野でやりにくい実験を尋ねるとこの実験を真っ先に挙げる中学校教員が多い状況が続いていた。そのため、本研究室でもかねてよりこの実験の改良を試み、実験器具の改良や、細胞周期の同調を取り入れることによって分裂細胞の割合を増加させた試料の調整法などを提案してきたが、目覚ましい効果を上げることはできておらず、新機軸の改良法を模索していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで試みられていなかった方法により、体細胞分裂の観察実験の改良法を確立することである。生徒が分裂中の細胞を観察しづらい理由はいくつか考えられるが、その中から二つの課題に対して二つのアプローチで解決を図ることとした。一つ目は、分裂中の細胞が小さいために見つけづらいという課題に対して、倍数体植物を作成することによって観察しやすい大きな分裂細胞を得るアプローチであり、もう一つは分裂している細胞が存在する領域が狭いため生徒がその領域までたどりつけないという課題に対して、分裂細胞が存在する領域を広げるアプローチである。

3. 研究の方法

本研究では、倍数体作成による細胞が大きな植物の作成と分裂細胞が存在する領域を広げる方法の確立を試みた。

倍数体作成による細胞が大きな植物の作成は、以下の方法により行った。まず、教材用植物であるファストプランツの茎頂を紡錘体の形成を阻害するコルヒチンを含む寒天で処理し、倍数体植物が得られる処理方法を確定した。倍数性の確認は得られた個体の葉の細胞を用いてフローサイトメトリーによって行った。得られた倍数体から自家受粉によって種子を採取し、その種子から発根した根について、顕微鏡で得られた細胞画像を Image J で測定して分裂細胞の大きさを確認した。また、体細胞分裂の観察実験でよく用いられるネギやニンニクなどについて、発根した根を直接コルヒチンで処理することより倍数性の高まった細胞を得ることを試みた。

ファストプランツの倍数体については、高等学校において体細胞分裂の観察実験での実践を行い、分裂細胞の発見までの時間や質問紙調査により、導入の効果を調べた。

根における分裂領域と伸長領域の境界は、植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンのバランスによって決まっていることがわかってきている。しかし、その前提として無処理の根における境界の位置を示す資料が出回っていなかった。そこで、無処理のネギやニンニクの根のパラフィン切片を作成し、組織化学的に根端からの分裂領域の位置を特定した。このデータを基盤として、オーキシンで処理することによって分裂領域の拡大を試みた。

4. 研究成果

倍数体作成による細胞が大きな植物の作成

ファストプランツについては、0.5%コルヒチンを含む寒天で播種後 7 日程度の植物の茎頂を 48 時間処理したところ、腋芽が成長を続けたため、二酸化炭素暴露によって自家不和合成を打破して自家受粉することで種子を得た。得られた種子由来の植物体では葉や花、花粉などの大きさや形が 2 倍体とは若干異なっており、葉を材料としたフローサイトメトリーによってこの植物が四倍体であることがわかった。自家受粉によって得られた子孫の根で分裂細胞の大きさを調べたところ、二倍体植物に比べて面積にして 2.5 倍程度の大きな細胞が観察された(図 1)。

そこで、この材料を用いて高等学校における授業実践を行った。6 クラス 241 名の 1 年生を 4 グループに分け、ネギ、ニンニク、二倍体ファストプランツ、四倍体ファストプランツの根を渡し、酢酸オルセインで染色して観察を行わせた。分裂細胞

を見つけれられた生徒の割合はニンニクで最も多く、次いでネギ、二倍体ファストプランツ、四倍体ファストプランツの順であった。また、プレパラートをステージに置いてから分裂細胞を発見するまでの時間は、大差はなかったが、ニンニク、四倍体ファストプランツ、ネギ、二倍体ファ

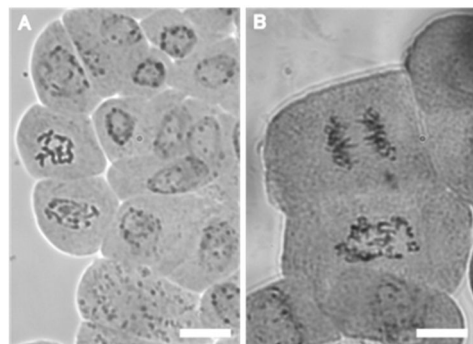


図 1 四倍体ファストプランツ (右) の大きな分裂細胞。左は二倍体のファストプランツの分裂細胞。

ストプランツの順であった。分裂期が観察しやすかった材料を訊いた質問紙調査においても、ファストプランツよりもネギ、ニンニクの方を選んだ生徒が多かった。原因として、ファストプランツの細胞核が比較的染まりづらく、教科書に掲載された染色像とイメージが異なったことが考えられる。(文献1)

このように、倍数体の導入の効果は残念ながら期待通りではなかったが、四倍体植物を導入するに当たって単元を通じて四倍体の内容を取り入れたところ、副次的な効果として、細胞周期の進行に伴う核内 DNA 量の変化に対する理解が高まることが示唆された。

また、ネギやニンニクを材料として倍数体を得ることを試みた結果、播種もしくは水栽培開始後3日目の根を0.1%コルヒチンで24時間処理することにより、一部の分裂細胞で染色体数が増えていることは確認できた。しかし、生徒の人数分の材料を再現性よく得る方法の確立には至らなかった。

分裂細胞が存在する領域を広げる方法の確立

体細胞分裂観察実験において生徒が分裂細胞を見つけにくい原因の一つとして、分裂領域だけでなく、伸長領域まで含む試料を観察してしまい、結果として分裂を終えた細胞が大部分を占めるプレパラートを作成してしまうことが考えられる。そこで、まず根の分裂領域が根端からどの程度の長さまでなのかを確認するため、体細胞分裂の観察実験によく用いられる材料であるネギ、ニンニク、タマネギを材料として、播種もしくは水耕栽培開始後3日目の根をパラフィン包埋して縦断切片を作り、分裂領域と伸長領域の境界を組織化学的に調べた。個々の細胞の長さが著しく変わるポイントを両領域の移行領域としたところ、いずれの根においても根端から約1mmの位置が移行領域であることがわかった(図2)。この実験の試料として、中学校の教科書の多くでは根端から3~5mm、高等学校の教科書では2~3mmを使用する手順が示されているが、これらの長い試料は分裂領域だけでなく伸長領域にかかっているため、分裂が終わった細胞が多く含まれていると考えられた。

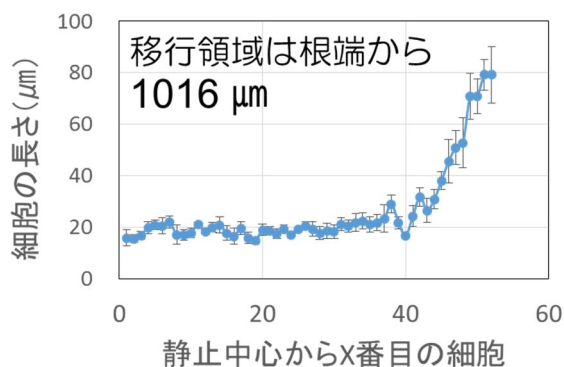


図2 ニンニクの鱗茎由来の根に置ける移行領域の位置

そこで中学校において根端1mmまでの試料を用いることを強調して実践を行ったところ、4クラス131名の3年生のうち約77%の生徒が分裂中の細胞を観察できたと自己申告した。また、生徒の作成したプレパラートのうち約73%は、観察に慣れた人間であれば顕微鏡のステージに置いてから10秒以内に分裂細胞を見つけられるレベルの出来であった。これらの結果から、従来の方法では長すぎる根を用いていた可能性が示唆された。しかし、この実験の目的として、単に分裂細胞を観察することに加えて根の組織の分化も観察させることを設定する場合には、根端から1mm以上離れた部分まで使う方がよいかもしれない。

次に、根の分裂領域と伸長領域の境界は植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンのバランスによって制御されるという知見があったため、オーキシンを与えて分裂領域を広げる方法の確立を試みた。 $10^{-10}M$ 程度のインドール酢酸にニンニクの鱗茎由来の根を浸して8時間処理したのち、無処理のものと同様にパラフィン切片によって分裂領域と伸長領域の移行領域の位置を調べたところ、根端からおよそ2mmまで分裂領域が広がったことが確認された。しかし、再現性に問題が残ってしまい、この処理によって分裂細胞がまばらになったのかなどの検討が不十分な状態にとどまっていること、また一度に多数の試料を得る方法を確立できていないことから、授業実践によって効果を検証するためには更なる検討が必要である。

(引用文献) 乗原睦樹・佐野(熊谷)史(2018)四倍体ファストプランツの作出と高等学校の体細胞分裂観察実験における活用の試み、群馬大学教育学部紀要自然科学編、第66巻、41-47

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 来原 睦樹、佐野（熊谷）史	4. 巻 66
2. 論文標題 四倍体ファストプランツの作出と高等学校の体細胞分裂観察実験における活用の試み	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 群馬大学教育学部紀要 自然科学編	6. 最初と最後の頁 41-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野（熊谷）史
2. 発表標題 体細胞分裂観察実験で試料の根の長さを限定することの効果について
3. 学会等名 日本生物教育学会第103回全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 来原 睦樹、佐野（熊谷）史
2. 発表標題 四倍体ファストプランツの作出と高等学校生物基礎においてDNA「量」の理解を深める題材としての検討
3. 学会等名 日本生物教育学会第102回全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮永慎一郎、佐野（熊谷）史
2. 発表標題 植物ホルモン処理による体細胞分裂領域の拡大
3. 学会等名 日本生物教育学会第101回全国大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗原睦樹、佐野（熊谷）史
2. 発表標題 四倍体ファストプランツの作出と教材化の検討
3. 学会等名 日本生物教育学会第100回全国大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮永慎一朗、佐野（熊谷）史
2. 発表標題 組織学的解析に基づく体細胞分裂の実験の再検討
3. 学会等名 日本生物教育学会第100回全国大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----