

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 30 日現在

機関番号：14601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350250

研究課題名(和文)カイコを用いた生命理解の教材化

研究課題名(英文)The development of teaching materials for understanding of life by Silkworm

研究代表者

森本 弘一(morimoto, koichi)

奈良教育大学・教育学部・教授

研究者番号：70243350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高校で実施できる実験として「カイコ幼虫の消化液に含まれるアミラーゼとプロテアーゼ活性の半定量的簡易検出法」を開発し、続けて、「手動ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によるカイコの雌雄判別」を開発した。いずれも高校生を対象として検証授業を行った。その結果、高校生がカイコ幼虫の消化液の半定量的簡易検出をできることが検証された。さらに、手動PCRによるカイコの雌雄判別も実行できた。高校生は、この実験を通して、PCRの理解を深めることができた。

研究成果の概要(英文)：We developed "Semi-quantitative assay of amylase and protease activities using agar plates with enzyme substrates." Moreover we developed "Sex determination of the silkworm by manual polymerase chain reaction." In order to verify the effectiveness of them, we taught the high school students. As a results, the high school students could get a good results. They could understand the meaning of the procedure and discuss the results well. It is considered that they could understand the semi-quantitative assay of amylase and protease activities in digestion juice of the silkworm and PCR deeply through these experiments. As our developed experiments will be done in the high school laboratory, they will be contributed the high school biology education.

研究分野：理科教育

キーワード：カイコ 教材 生命理解

1. 研究開始当初の背景

本研究で使用するカイコは、本邦での養蚕業の進展と共に古くから研究されており、多くの研究蓄積がある。その一例として、世界的なカイコ遺伝資源の収集・保存が九州大学でなされており、必要に応じて分子レベルの種々の遺伝資源が利用できる。また、人工飼料でのカイコ飼育法が確立されており、実用・商業規模に達している。特別な施設や器具を必要とすることもなく、約1カ月と短いライフサイクルのため、学校現場でも、容易に周年飼育でき、個体レベルで研究することが可能である。

しかし、これまでカイコ繭の色素決定に関わる抑制遺伝子と行動に関わる性フェロモンについては、高校生物教科書に記述があるものの、個別事象として取り扱われているに過ぎなかった。

カイコを教材とした著書はあるが、20年ほど前のものであり、近年の生物学の発展に関連した教材開発が求められているところである。特に遺伝子組み換えの材料として、現在脚光を浴びているカイコであり、話題が豊富である。この現状に適した教材開発を行うことは、有意義である。

2. 研究の目的

本研究課題では、カイコを単一材料として、生命活動の全体像を連続的に把握することを可能とする、学校現場で採用できる教材開発を目的とする。現在の生物教育の主流は、多様な生命活動を単元・項目別にカテゴリー化して理解させる手法を取っている。しかし、この教授手法では、各項目別に種々異なった生物材料を用いてそれぞれの生物事象を提示するため、個別事象の理解度は進むが、単元や項目間の関連性・展開性の理解が希薄になっている。そこで本研究では、カイコを中核材料とすることによって、(1)分子レベルでの遺伝情報の発現、(2)個体レベルでの生命の連続性(発生、生殖、遺伝)、(3)集団レベルでの個体群生態について、生命現象の単元的・項目別理解ではなく、より統合的・連続的な理解に導く教材開発を目指す。

3. 研究の方法

教材開発1:分子レベルからのアプローチ

消化液 -amylase, protease の簡易検出法の開発

半定量的に酵素活性が検出でき、最適pH、活性阻害剤との反応性などの酵素化学的特性が測定できるアッセイ法を開発する。

カイコ組織からのDNA抽出と同定法の開発

これまで中高校において昆虫組織からDNAを抽出する方法は明示されていない。新たに学校現場で対応できる手法を開発する。また、DNAの同定には、酢酸カーミンやジフェニルアミン法が報告されているが、未だ満足すべき同定法がない。特異的にDNA

と結合する蛍光試薬による可視化法を検討する。また、抽出したDNAから4塩基を分離・同定する方法を検討する。

遺伝子発現から酵素合成にまでの過程について資料構築

-amylase, protease 酵素遺伝子の塩基配列、その配列から推定されるアミノ酸配列および活性中心のアミノ酸が決定されている。これら情報とコドン表から、DNA mRNA 酵素合成 消化管への分泌について、実際のデータを用いて検証できる資料を構築し授業に供する。

教材開発2:個体レベルからのアプローチ(生命の連続性の理解度を高めるために)

生殖器官の形態と機能

雄蛾、雌蛾を解剖し、内部生殖器官の特徴を基に、他の脊椎動物との類似性を教材化する。また、貯精嚢を採取し、精子の形態・運動性を観察し、教材化の可能性を探る。

手動PCR法による雌雄の判別

カイコの性決定に関わる染色体構成はWZでZZである。最近の研究から、W染色体特異的な遺伝子配列が見出された。この配列からデザインされたプライマーセットを用いてPCR反応をすると、W染色体上の特異配列のみが増幅され、雌を判別できる。本課題では、雌雄判別できる手動PCR法を開発する。異なる温度条件を水槽系で行い、学校現場でも容易に実施できるような温度管理条件を見出す。手動PCR法は遺伝子増幅の原理を知る上でも有効である。

メンデル遺伝の検証

カイコには、斑紋がある品種(形蚕)と斑紋が無い品種(姫蚕)がある。斑紋は優性形質でメンデル遺伝する。交配からF1世代の育成・分離比の検定に到る手順を簡便化して、メンデル遺伝の検証教材にする。

教材開発3:集団レベルからのアプローチ(個体群の理解度を高めるために)

飼育密度による相変異、成長パターン、摂食行動パターンの変動を検討する。

4. 研究成果

教材開発1(分子レベルからのアプローチ):

カイコ消化液に存在するアミラーゼとプロテアーゼ活性を半定量的に検出できる方法を開発した。基質(可溶性デンプンまたはカゼイン)を含む1%寒天ゲルプレートを作成し、粗酵素液(20 μL)を吸収した濾紙円盤(6 mm)をゲル上に置いて酵素反応をさせ、可視的に活性を検出した。消化液アミラーゼやプロテアーゼのみならず、微生物、発芽種子、胃腸薬、ヒト唾液に含まれるアミラーゼ、微生物、衣料用洗剤、パイナップル・キウイフルーツ果肉、キノコに含まれるプロテアーゼも検出でき、教育現場で容易に実施できる半定量的酵素検出法を確立した(図1、2、3)。

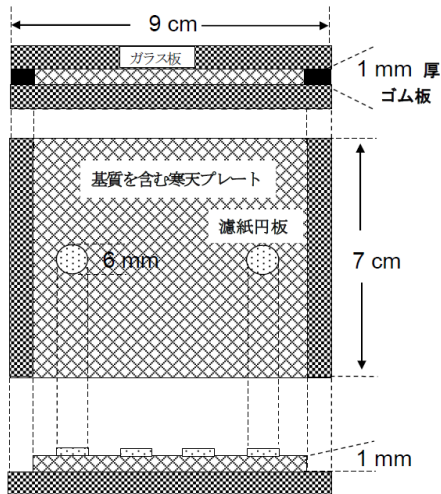


図1 酵素活性の検出に用いた寒天プレート
の作製図

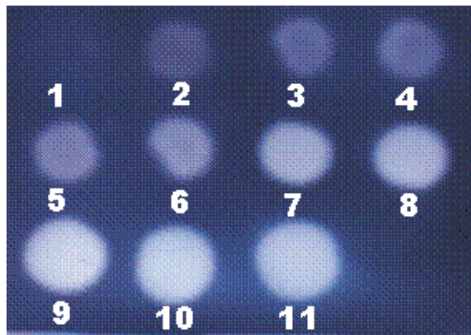


図2 デンプンを含む寒天プレートでのア
ミラーゼの半定量的活性測定。使用酵素：
Aspergillus oryzae 由来の 2700 U/mL
-amylase. 酵素反応温度：A~C, 30。酵素
反応時間：40 分間 希釈倍率：1 蒸留水； 2，
x 1500 (3.6×10^{-2} U)； 3， x 1000 ($5.4 \times$
 10^{-2} U)； 4， x 750 (7.2×10^{-2} U)； 5， x
500 (0.11 U)； 6， x 300 (0.18 U)； 7， x 100
(0.54 U)； 8， x 50 (1.1 U)； 9， x 20 (2.7
U)； 10， x 10 (5.4 U)； 11， x 5 (10.8 U)。



図3 カゼインを含む寒天プレートでのプ
ロテアーゼの半定量的活性測定。
使用酵素：*Aspergillus mellens* 由来の 170
U/mL proteinase (Type XXIII). 酵素反応
温度：A~C, 30。酵素反応時間：60 分間；
希釈倍率：1， 蒸留水； 2， x 1500 (2.3×10^{-3}
U)； 3， x 1000 (3.4×10^{-3} U)； 4， x 750

(4.5×10^{-3} U)； 5， x 500 (6.8×10^{-3} U)；
6， x 300 (1.1×10^{-2} U)； 7， x 100 (3.4
 $\times 10^{-2}$ U)； 8， x 50 (6.8×10^{-2} U)； 9， x
20 (0.17 U)； 10， x 10 (0.34 U)； 11， x 5 (0.68
U)。

本実験が、高校生で実施可能であるか検証
を行った。高校2年生5名を対象とし、講義
と実験を行った。講義では、mRNA を基にした
消化液プロテアーゼをコードする cDNA を作
成する方法を解説した。実験では、カイコ幼
虫から、電気ショックにより消化液を採取し、
pH 試験紙によりアルカリであることを確認
させた。カイコ幼虫の消化液だけでなく、キノ
コ、花、麹菌、衣料用洗剤、胃腸薬なども
用いて、調整した寒天プレートを用いて、各
サンプルの粗酵素のアミラーゼ、プロテアーゼ
活性を測定させた。その結果、生徒たちは、
良好な実験結果を得ることができ、コドン表
の読み方も理解できた。このことから、昨年
度開発した「カイコ幼虫の消化液に含まれる
アミラーゼとプロテアーゼ活性の半定量的
簡易検出法」が高校生において有効であるこ
とが検証された。

5 齢カイコ幼虫の後部絹糸線から DNA を抽
出する方法を確立した。塩濃度処理による分
画精製法であり、危険な試薬類や特別な機器
類を使用することなく、容易に抽出できるこ
とを確認した。

教材開発2 (個体レベルからのアプロ
ーチ)：カイコを周年飼育するために、全齢無
菌人工飼料育法を導入した。殺菌したスチロ
ール箱 (L,22 X W,16 X H,4 cm) に 150g 無
菌人工飼料を敷き、1 ~ 4 齢と4 齢幼虫期に
1 回餌替えをし、5 齢幼虫期には2 回餌替え
をすることにより、繭形成・蛹まで飼育す
ることが出来た。

「手動ポリメラーゼ連鎖反応法によるカイ
コの雌雄判別」を開発した。カイコの W 染色
体 () を特異的に同定できる 11 の RAPD (増幅
断片多型 DNA) マーカーの中から
W-Yukemuri-S と W-Bonsai に着目し、サー
マルサーキュラーを用いて PCR 法による増幅条
件を決定した。カイコ後部絹糸線から DNA を
分離し、鋳型とした。決定した反応条件は、
92-96 30 秒間、55-60 で 30 秒間、68-73
で 1 分間、30 サイクルである。手動 PCR は、
3 タイプの水槽 (1)ホットプレート付きスター
ラー (2)スターラーに置いた温度制御器つ
き恒温水槽 (3)温度制御器と噴流ポンプ式攪
拌機を備えた恒温水槽を用いた。これら水槽
にサンプルを順次浮かべる操作を 30 回繰り
返した。その結果、図4 に示すように、サー
マルサーキュラーと同様な結果を得ること
ができた。このことから、手動 PCR を用いて
カイコの雌雄判別ができることが明らかと
なった。

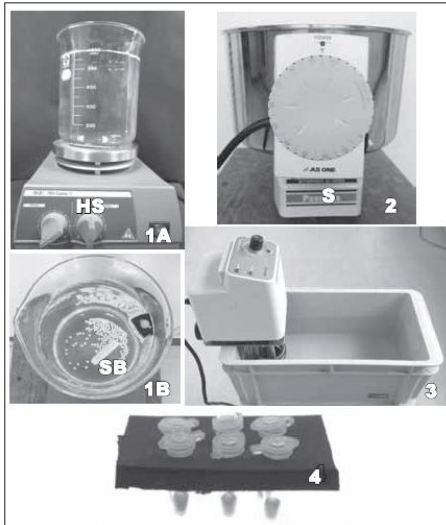


図3 手動 PCR に用いた水槽
 1 A ホットプレートスターラー 1B ビーカー 2 温度制御つきウォーターバス
 3 恒温水槽 4 フロートトラック上のマイクロチューブ

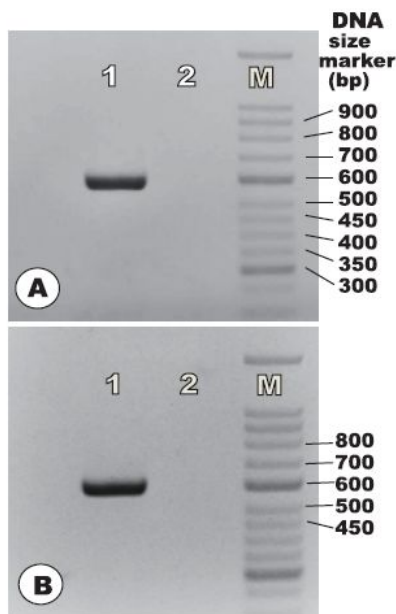


図4 手動 PCR による PCR 産物 (雌特異的マーカー: W-Bonsai) の検出 A サーマルサイクラー機器での PCR B 手動 PCR レーン1は、雌と判別された DNA 検体を鋳型にした。雌特異的マーカーである W-Bonsai のバンドが検出された。一方レーン2は、雄と判別された DNA 検体を鋳型にした。バンドは傑出されなかった。レーン M 標準 DNA サイズマーカー

この「手動ポリメラーゼ連鎖反応法によるカイコの雌雄判別」が高校生で実施可能であるか検証を行った。高校2年生5名を対象と

し、講義と実験を行った。その結果、高校生も同様な結果を得ることができ、結果の分析の様子を見ると、内容も理解できていた。

以上のことから、今回開発した手動 PCR は、高校生に PCR の原理を理解させることに有効であることが期待される。

3. 教材開発3 (集団レベルからのアプローチ): 人工飼料で发育させた均一な4齢幼虫を異なる個体密度(1区: 3頭/箱, 2区: 10頭/箱, 3区: 25頭/箱)で飼育し、5齢後期における各区の平均個体体重を比較した。その結果、1区に比べて2区と3区では有意に体重が30%程度減少していた。繭形成率は、1区と2区では100%であるのに対して、3区では56%に留まった。また、2区での平均繭重は1区よりも35%減少していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

森本弘一・尾山廣・杉村順夫「カイコ幼虫の消化液に含まれるアミラーゼとプロテアーゼを用いた新しい教材開発」生物教育、査読有り、55巻1号(2014)2-13

杉村順夫・尾山廣・森本弘一「手動ポリメラーゼ連鎖反応法によるカイコの雌雄判別」生物教育、査読有り、56巻、1号(2015)29-35

[学会発表](計2件)

森本弘一「大学生の鱗翅目昆虫の生活環に関する認識」日本生物教育学会、2014年1月12日、筑波大学 大学会館(茨城県つくば市天王台1-1-1会館)

森本弘一「酵素活性を調べる簡易な実験法の確立」日本生物教育学会、2015年1月10日 愛媛大学(松山市文京町3)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森本 弘一(MORIMOTO Koichi)

奈良教育大学・教育学部・教授

研究者番号: 70243350

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: