

葉緑体核様体の観察とその教材化の検討

泉 好弘*・伊藤みづき*・野尻 直朗*・三次 徳二*

【要 旨】 近年の生命科学の研究成果には、生物学に対して関心を高めるような素材も多く含まれており、それらを教材化することによって高校生の生物学に関する興味を高めることができるのではないかと考えられる。今回我々は、「生物の分類と進化」の単元で簡単に紹介されている「共生説」に関連して、葉緑体核様体の教材化とその観察を含んだ共生説の高等学校理科における指導法の検討を行い、ライムギ及びホウライシダを実験材料に用いた「大学で行う発展的な学習」の実施案を作成した。

【キーワード】 共生説 葉緑体核様体 教材化

I はじめに

近年の生命科学，特に生物の進化に関連する分野では，非常に興味深い研究が数多く行われているが，これらの多くは学習指導要領から逸脱するため，小学校から高等学校までの教育においては紹介されていない。しかしながら，これらの研究の中には，生物学に対する関心を高めるような素材も多く含まれており，一律に学校現場から除外する必要も無いと考えられる。

このような中で，平成 15 年に学習指導要領の一部が改正され，子どもの実態や指導の場面に応じて，習熟度別や補充・発展など，個に応じた指導が柔軟かつ多様に導入できるようになってきた。さらに，文部科学省の「科学技術・理科大好きプラン」などに見られるように，高等学校と大学の連携の一環として，生徒や教師が大学に出向き，実験・観察の個別指導を受けるといった取り組みも見られるようになった。そのような状況もあり，生命科学の先端的な研究を高等学校において取り入れていく試みが，各地で行われ始めている。

生物の進化については，高等学校の理科の理科総合 B と生物 II の科目を中心に扱われている。特に初期の単純な構造の細胞（原核細胞）から，核や葉緑体，ミトコンドリアなどを持つ複雑な細胞（真核細胞）への進化については，生物 II の教科書において，Margulis (1970) の共生説をもとにしたモデルが簡単に紹介されている。葉緑体やミトコンドリアは細胞内の構造物（細胞内小器官）であるが，それぞれ独自の DNA を持っていることなどから，このような説が考えられている。葉緑体中の DNA（核様体）が観察できれば，共生説について実感を伴って深く理解することができると考えられる。葉緑体 DNA の観察実習を高等学校で行うことは，観察機器の問題からほとんどの場合不可能であるが，大学に高校生を招いて実習を行うことによ

平成 18 年 5 月 31 日受理

*いづみ・よしひろ，いとう・みづき，のじり・なおあき，みつぎ・とくじ

大分大学教育福祉科学部

り機器の問題は解決される。今回我々は、葉緑体核様体の教材化とその観察を含んだ共生説の高等学校理科における指導法の検討を行ったので報告する。

Ⅱ 葉緑体核様体の教材化

1 共生説成立の過程

葉緑体やミトコンドリアが分裂して増殖するという報告や、現在の共生説と同様の仮説は1900年前後から報告されていたが、確固たる証拠に欠けていた。以後、そのような状態が続いていたが、1950年代の後半から1960年代にかけて、電子顕微鏡による観察や生化学的手法により、葉緑体やミトコンドリアが独自のDNAを持ち (Ris and Plaut 1962, Nass and Nass 1962, Schuster 1965), 分裂することによって増殖すること (Manton 1959, Luck 1963) が証明された。その後、Margulis (1970) は葉緑体、ミトコンドリア及び鞭毛は、元はそれぞれ別個の生物だったという共生説を発表した。これは、それ以前に明らかになっていた葉緑体やミトコンドリアのDNAの発見に影響を受けている。このうち、鞭毛に関しては否定的な考えが現在では主流となっているものの、葉緑体やミトコンドリアが別個の生物であったことに関しては、ほぼ定説となっている。近年では、共生の過程についても研究が進んでおり、千原 (1999) によれば、葉緑体の起源は藍藻類であると考えられており、藍藻類を取り込んだ真核生物が灰色藻類、紅藻類及び緑藻類に進化し、緑藻類の一部が陸上植物に進化したと考えられている (一次共生, 図1)。さらに、これらの真核藻類を取り込んで葉緑体にしたと考えられる藻類もいくつか発見されており、クリプト藻類や褐藻類は紅藻類を、クロララクニオン藻類やミドリムシ類は緑藻類を取り込んだと考えられている (二次共生, 図2)。

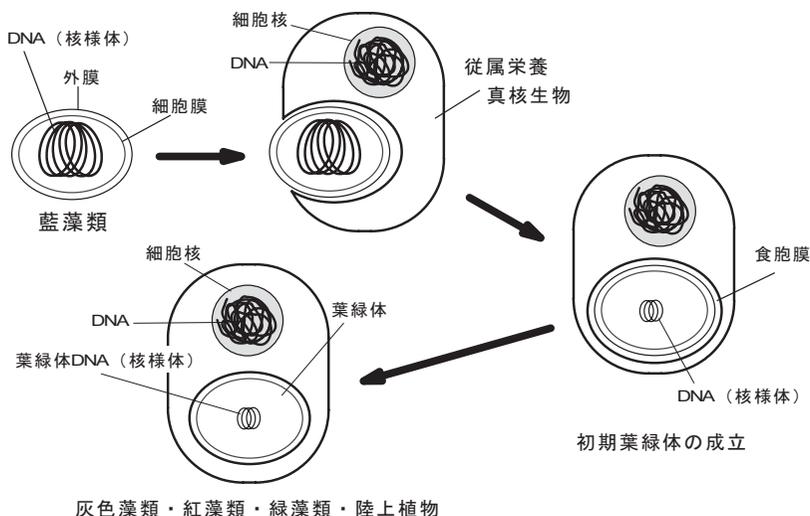


図1 一次共生による葉緑体の成立過程 (仮説)

千原 (1999) より一部改変して引用。

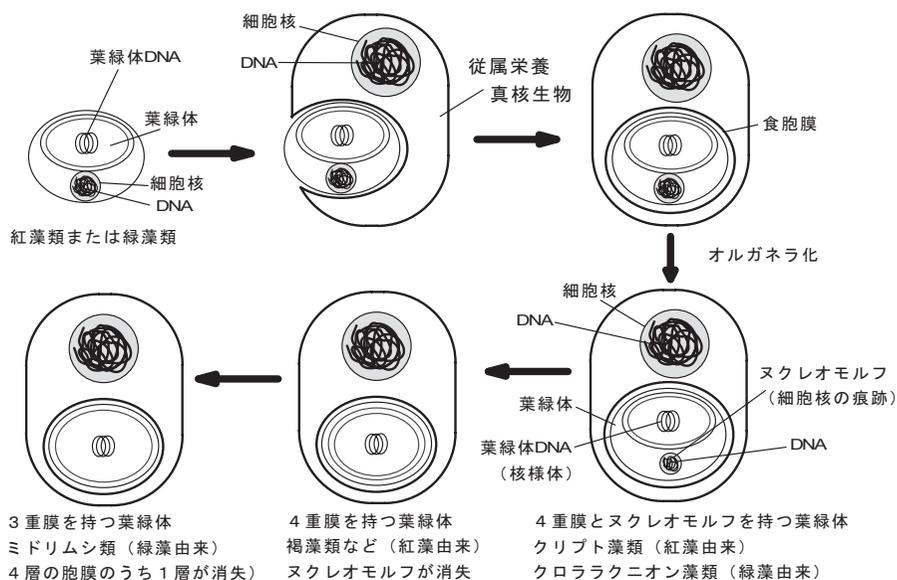


図2 二次共生による葉緑体の成立過程 (仮説)

千原 (1999) より一部改変して引用。矢印は3重の膜を持つ葉緑体が成立する過程を示しており、褐藻類からミドリムシ類が生じたわけではない。

2 教材化の視点

葉緑体やミトコンドリアの DNA 量は極微量であるため、通常の染色法では観察できなかったが、1980 年前後に蛍光顕微鏡を用いた DAPI 染色法が開発されて、現在では比較的容易に観察できるようになっている。すでに述べたが、葉緑体 DNA の観察実習を高等学校で行うことは、観察機器の問題からほとんどの場合不可能である。しかし、近年の高等学校と大学の連携の取り組みに見られるように、大学に高校生を招いて実習を行うことにより機器の問題は解決される。葉緑体 DNA の観察実習は生物の進化の領域における貴重な実物教材であり、それに合わせて葉緑体の起源に関する解説を行うことによって、共生説や生物の進化についてより深く理解できるとともに、生物学に関する興味を高めることができるのではないかと考えられる。そのため我々は、葉緑体 DNA の観察実習を、高等学校理科の理科総合 B の「生命と地球の移り変わり」や生物 II の「生物の分類と進化」の単元と関連した発展的な教材とすることを目標にした。

教材化にあたっては、材料の手に入りやすさ、目的となるものの観察のしやすさ (特に分裂の過程の観察しやすさ) を考慮している。まず我々は、葉緑体の DNA を観察するための予備的な検討を 8 種の植物を用いて行った。このうち、ライムギ、ホウライシダ及びミヤベツノゴケの 3 種以外については、いずれも表 1 に示す理由で除外した。そのため今回の報告では、比較的良好的な結果が得られたライムギ、ホウライシダ及びミヤベツノゴケの 3 種について述べる。

表 1 予備実験の結果

	植物種名 (和名)	予備実験の結果 ⁴⁾
一般的な植物 ¹⁾	イネ ²⁾ コムギ ²⁾ トウモロコシ マカラスムギ ライムギ	プロトプラストが極少量しか得られなかった。 プロトプラストが極少量しか得られなかった。 発芽率が低く、生長が遅かった。 発芽率が低く、生長が遅かった。 良好な結果が得られた。
分裂途中の葉緑体が観察しやすい植物	ホウライシダ タチクラマゴケ ミヤベツノゴケ ³⁾	良好な結果が得られた。 DAPI 染色の結果が悪かった。 良好な結果が得られた。

¹⁾ 被子植物であれば何でもよいが、室内で育てた植物の方がプロトプラストを単離しやすいため、種子が入手しやすいものが適している。そのため、実験材料としては野菜類や穀類が適しているが、今回は、種子発芽やその後の成長が早いものが多いイネ科植物を用いた。

²⁾ 種苗店では入手できないため、入手性に問題がある。

³⁾ 実験に使用できる期間が限定される。

⁴⁾ 今回の実験結果であり、結果が良くなかったものでも、今後の改良により、使用可能となる可能性がある。

Ⅲ 葉緑体核様体の観察

1 実験材料の調整

ライムギの種子(雪印種苗)は、種苗店にて購入した。種子を 1/10 の濃度の MS 液体培地 (Murashige and Skoog 1962) に浸したフロリアライト(日清紡)に撒き、25°C、連続光下で 10 日間培養した。伸長した葉を 2% セルラーゼ“オノヅカ”RS (ヤクルト) 及び 0.3% ペクトリアーゼ Y-23 (キッコーマン) を含む酵素液に浸し、10 分間脱気した後、35°C で約 4 時間処理した。その後、77µm のナイロンメッシュを通してプロトプラストを単離し、NS 緩衝液 (Kuroiwa et al. 1981) に溶かした 2% グルタルアルデヒド溶液で 1 時間以上固定した。

ホウライシダの胞子は、大分大学内で採集した。胞子を 1% 寒天を含む Knop 培地 (Knop 1865) 上に撒き、ライムギと同様の条件で 30 日間培養した。生長した前葉体をライムギの場合と同じ条件で固定した。固定した前葉体を前述の酵素液で約 2 時間処理して大部分の細胞壁を除去した後、再固定した。

ミヤベツノゴケの配偶体及び胞子体は、大分大学内で採集し、NS 緩衝液に溶かした 4% パラホルムアルデヒド溶液で 1 時間以上固定した。

2 葉緑体核様体の観察

材料を 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) で約 10 分間染色し、NS 緩衝液で洗浄して、プレパラートを作成した。観察には、落射蛍光ユニットを装備したオリンパ

ス AX-70 顕微鏡を用いた。

ライムギの種子は培養開始後 1 または 2 日で発芽し、培養 10 日後には、葉が 15 cm 程度に伸長した (図 3A)。伸長した葉を酵素で処理すると細胞壁のない細胞 (プロトプラスト) が単離された (図 3B)。プロトプラストを DAPI 染色し、通常光源の透過光下 (以下、透過光下と略す) で観察すると、無色の細胞核と緑色の葉緑体が観察された (図 3C)。これに紫外線を照射し、通常光源の透過光を消した状態 (以下、紫外光下と略す) で観察すると、細胞核全体に非常に強い白色の蛍光が観察された (図 3D)。さらに、葉緑体の内部にも DAPI の蛍光が観察された (図 3D)。葉緑体における DAPI の蛍光は、約 10 個の白色の小粒として観察された (図 3F)。

ホウライシダの胞子は、培養開始後 5~7 日で発芽し、培養 30 日後には、両翼の幅約 1 mm の前葉体となった (図 4A)。前葉体を DAPI 染色し、紫外光下で観察すると、ライムギの場合と同様に、細胞核全体に非常に強い蛍光が観察された (図 4C)。葉緑体の内部には 2~5 個の白色に光る小粒が観察された (図 4C)。ホウライシダの葉緑体は、多くの場合、卵形であったが、中央部でくびれた葉緑体もいくつか観察された (図 4D 及び E)。これらの葉緑体は分裂

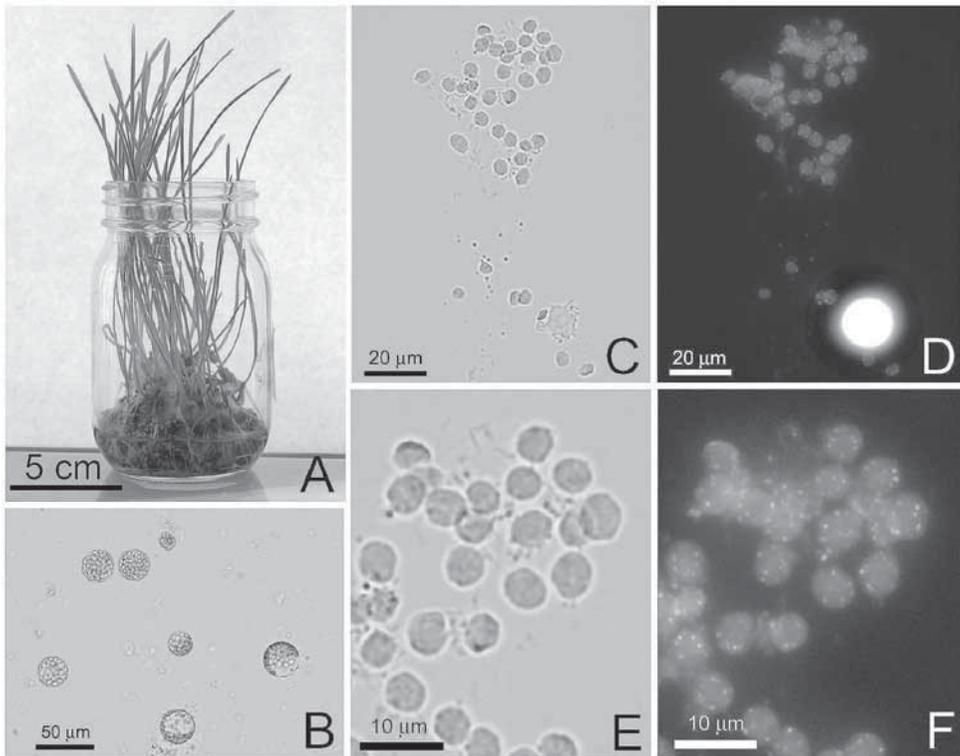


図 3 ライムギの植物体 (A)、プロトプラスト (B) 及び葉緑体 (C - F) の写真

C と E は透過光下で、D と F は紫外光下で観察した像で、C と D 及び E と F それぞれ同一の視野で観察したものである。ライムギの葉緑体では、10 個前後の葉緑体核様体が観察された (F)。

途中の状態にあると考えられる。

図 5 はミヤベツノゴケの植物体と配偶体細胞の写真で、配偶体の細胞内には葉緑体が 1 個のみ観察された。ツノゴケ類の細胞には、多くの場合、葉緑体が 1 個のみ存在することが知られており、古くから葉緑体分裂の研究に用いられてきた。DAPI で染色された孢子体の分裂組織の細胞から遊離した細胞核と葉緑体を紫外光下で観察すると、細胞核と葉緑体内部に白色の蛍光が観察された (図 6)。分裂組織の細胞では、小型で球形に近い葉緑体 (図 6A)、中央部でわずかにくびれた葉緑体 (図 6B)、中央部で大きくくびれた葉緑体 (図 6C) 及び 2 個の小型の葉緑体と 1 個の細胞核がペアになっているもの (図 6D) が観察された。これらは葉緑体の分裂段階を示していると考えられ、それぞれ、細胞分裂直後の状態、葉緑体分裂の初期の状態、葉緑体分裂の後期の状態及び葉緑体分裂が終了した状態だと考えられる。このように、ミヤベツノゴケでは、様々な分裂段階の葉緑体が観察された。

DAPI は DNA の AT 部位に特異的に結合し、紫外線を照射すると白色の蛍光を発することが知られている。細胞核に非常に強い DAPI の蛍光が観察されたことは、細胞核に多量の DNA が存在することを示している。さらに、葉緑体の内部にも DAPI の蛍光が観察されており、葉緑体内にも、微量ながら DNA が存在することを示している。白色に光るスポットは葉緑体核様体と呼ばれており、その領域内には数十コピーの葉緑体 DNA 存在すると考えられている。

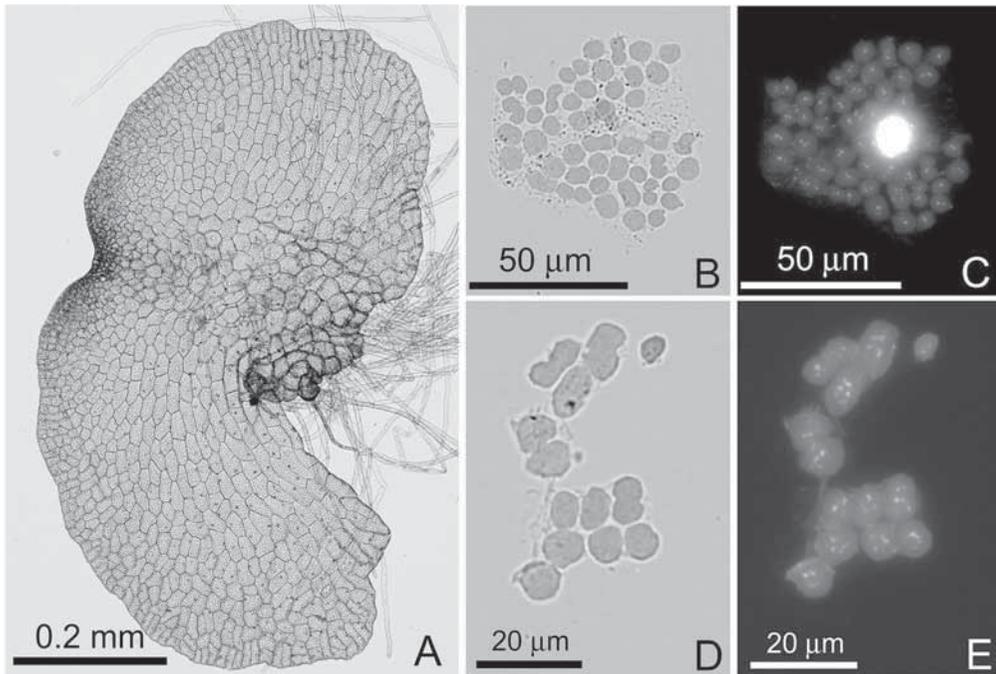


図 4 ホウライシダの前葉体 (A) 及び葉緑体 (B - E) の写真

C と E は透過光下で、D と F は紫外光下で観察した像で、C と D 及び E と F それぞれ同一の視野で観察したものである。ホウライシダの葉緑体では、5 個前後の葉緑体核様体が観察された (E)。

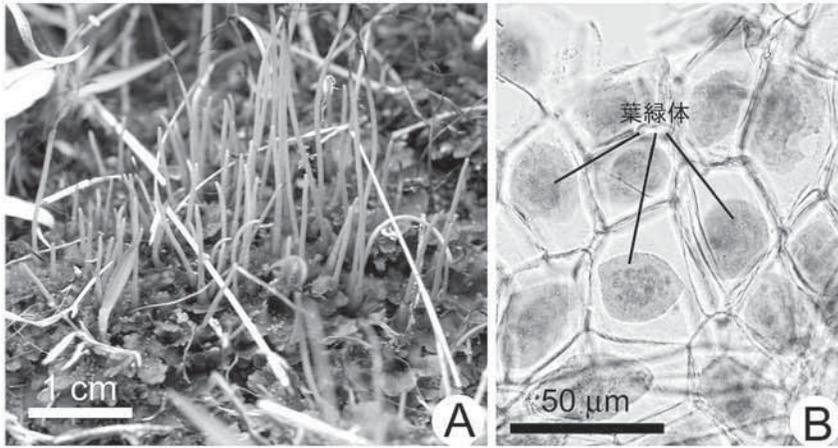


図5 ミヤベツノゴケの植物体(A)と配偶体細胞(B)の写真

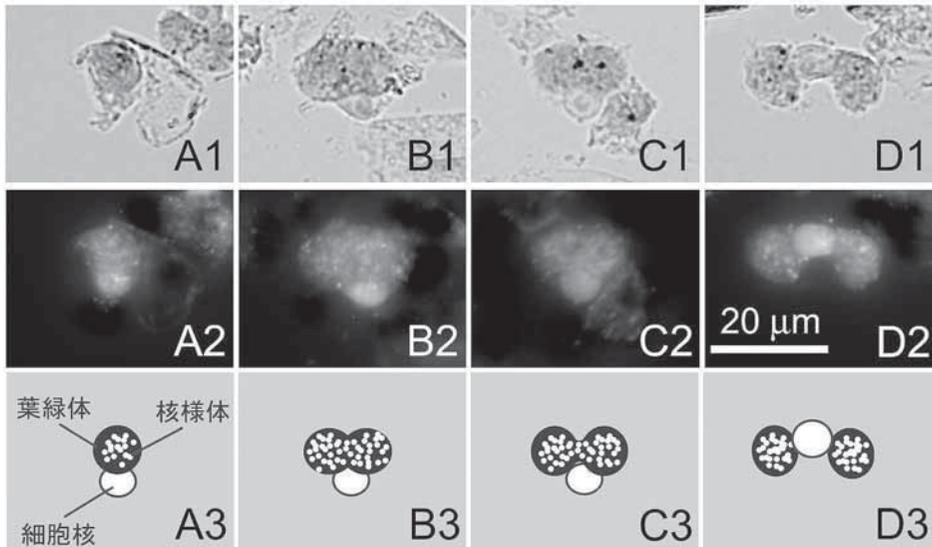


図6 ミヤベツノゴケの葉緑体分裂

A1, B1, C1 及び D1 は透過光下で, A2, B2, C2 及び D2 は紫外光下で観察した像で, A3, B3, C3 及び D3 は, それらを模式的に示したものである。A は小型で球形に近い葉緑体, B は中央部でわずかにくびれた葉緑体, C は中央部で大きくくびれた葉緑体, D は 2 個の小型の葉緑体と 1 個の細胞核がペアになっているものの写真と模式図で, 葉緑体は伸長した後, 中央部でくびれて 2 個の娘葉緑体に分裂すると考えられる。

IV 葉緑体核様体の観察を含む共生説の指導

1 観察に用いる材料

先に述べた3種では、葉緑体核様体が観察できたため、共生説の実物教材として使用可能だと考えられる。このうち、ミヤベツノゴケは葉緑体の分裂段階を観察することが可能であるため、共生説の実物教材として有効な材料だと考えられる。しかしながら、ミヤベツノゴケの胞子体が採集可能な時期は、大分市では4月下旬から5月上旬の1ヶ月程度と9月下旬から10月上旬の1ヶ月程度に限られ、固定したのも、良好な状態で観察できるのは1ヶ月程度であるため、実習に用いることができる期間が限定される。放課後や土曜日・日曜日などを利用して、大学で実習を行うのであればよいが、夏休みなどにおいては教材として適さない。そのため、今回の実施案からは除外した。一方、ホウライシダは、乾燥した状態で胞子を保存しておけば、1年を通して実習に使用することが可能である。さらに、分裂途中の葉緑体も高頻度で観察できるため、実習の材料として最も適していると考えられる。ライムギでは分裂途中の葉緑体を観察することは難しいが、一般的な植物の葉緑体にもDNAが存在することを示すため、実習の材料として加えた。

2 共生説の指導

高等学校理科の理科総合Bの「生命と地球の移り変わり」や生物Ⅱの「生物の分類と進化」の単元において共生説の概要を学んだ後、大学において葉緑体核様体の観察を行う。なお、理科総合Bにおいて実施する場合は、「生物の変遷」の学習の中で、真核生物の出現について扱った後に行う。また、生物Ⅱにおいて実施する際は、「生物の進化」の学習の中で、生命の出現や初期の生物について扱った後に行うが、DNAの基礎を学ぶ「遺伝情報とその発現」についても可能であれば先に学んでおく必要がある。

大学における観察の実施案を表2に示すが、指導の概要は以下のような手順となる。

- 1) 前日までに材料を固定しておく。
- 2) 当日はまず最初に共生説に関する簡単な講義を行う。
- 3) 材料の染色とプレパラート作製を行い、蛍光顕微鏡で葉緑体核様体を観察する。
- 4) 最後に観察結果の解説とまとめを行う。

葉緑体核様体を観察する際には、まず最初に、細胞核にDAPIの強い蛍光が見られることを示し、白く光っている領域にDNAが存在することを理解させる必要がある。その上で、葉緑体の内部にもDAPIの蛍光が見られることを示すことによって、葉緑体内にもDNAが存在することが理解できると考えられる。

V おわりに

今回は、我々は葉緑体核様体の教材化とその観察を含んだ共生説の高等学校理科における指導法を検討した。まだ教材化の段階であり、この教材を用いた実践については行っていない。そのため、今後は高校生を対象とした「発展的な教材」として有効であるか、実践により検討していく必要がある。

現在、我々は大分舞鶴高校のスーパーサイエンスハイスクール事業（SSH）に協力し、高校生と共同で葉緑体分裂に関する課題研究を行っている。今回参加している高校生は、進化の単元をまったく履修していないが、葉緑体の成立過程に関する仮説を説明し、葉緑体核様体の写真を見せたところ、興味を示し、意欲的に実験に取り組んでいる。このように、教科書の枠にとらわれず、高校生が理解できる範囲の「面白い研究」を紹介することは、自然科学に対する興味を喚起するために有効であると考えられる。しかしながら、今回の SSH は少人数のグループに分かれて研究を行うため、限られた高校生にしか研究を紹介することができない。高校生を大学に招いて講義や実習を行うことにより、より多くの高校生に対して、自然科学に対する興味を喚起することができるのではないかと我々は考えている。

表2 「共生説に関連した大学で行う発展的な学習」の実施案

実験材料	ライムギ	ホウライシダ
事前準備 (前日まで)	①実験材料の培養 ②プロトプラストの単離 ③固定	①実験材料の培養 ②実験材料の固定 ③細胞壁の除去 ④再固定
講義	①マーグリスの共生説についての解説 ②葉緑体の起源に関する歴史と葉緑体 DNA の発見に関する研究の解説 ③一次共生による葉緑体の成立過程に関する現在の仮説についての解説 ④二次共生による葉緑体の成立過程に関する現在の仮説についての解説	
観察	①材料の染色 ②プレパラート作製 ③観察	①材料の染色 ②プレパラート作製 ③観察
講義	観察結果の解説とまとめ	

参考文献

- Knop, W. (1865) Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen. 7: 93-107.
- Kuroiwa, T., Nishibayashi, S., Kawano, S. and Suzuki, S. (1981) Visualization of DNA in various phages (T4, γ , T7, ϕ 29) by ethidium bromide epi-fluorescent microscopy. *Experientia* 37: 969-971.
- Luck, D. J. L. (1963) Formation mitochondria in *Neurospora crassa*. *J. Cell Biol.* 16: 483-499.
- Manton, J. E. M. (1959) Observation on a very small flagellata; the problem of *Chromulina pusilla* Butcher (= *Micromonas pus.*). *J. Mar. Biol.* 38: 319-405.

- Margulis, L. (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale Univ. Press, New Haven.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nass, M. M. and Nass, S. (1962) Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria. *Exp. Cell Res.* 26: 424-437.
- Ris, H. and Plaut, W. (1962) Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 13: 383-345.
- Schuster, F. L. (1965) A deoxyribose nucleic acid component in mitochondria of *Didymium nigripes*, a slime mold. *Exp. Cell Res.* 39: 329-345.
- 千原光男 (1999) 藻類の多様性と系統. 裳華房.

Observation of the Chloroplast Nucleoids, and Examination of Development of the Teaching Materials

IZUMI, Y., ITO, M., NOJIRI, N. and MITSUGI, T.

Abstract

Many interesting materials are included in recent bioscientific study. We think that it may create interest in biology for high school students to make them the teaching materials. In this study, we examined the teaching materials of the chloroplast nucleoid and guidance method of symbiosis theory including the observation of chloroplast nucleoids in high school science and made enforcement plan of "progressive learning at the university".

【Key Words】 Symbiosis theory, Chloroplast nucleoid, Development of teaching materials