

生物基礎における観察実験の再検討Ⅱ -イシクラゲの細胞化学的な観察-

○矢守 健太郎^A, 渡邊 重義^B

YAMORI Kentarou^A, WATANABE Shigeyoshi^B

熊本大学大学院教育学研究科^A, 熊本大学教育学部^B

【キーワード】生物基礎, 原核生物, イシクラゲ, 細胞の観察, 教材化

1. はじめに

生物基礎は教科全体を通して, 生物の共通性と多様性の視点を重要視している。共通性に関しては, 第1章で「細胞」, 第2章では共通分子である「DNA」について学習する。多様性に関しては, 第1章で細胞の種類や器官の多様性, 第2章ではDNAに関連した細胞の形や働きが多様性について学習する。矢守・渡邊(2014)は, 生物基礎の教科書を調べて共通する5種類の観察・実験を抽出した。その中で最初に登場するのが原核生物と真核生物の観察である。

原核生物の観察材料には納豆菌や乳酸菌がよく使用される。しかし, これらの細菌類は体長が $1\mu\text{m}$ 程度と小さいので, 真核細胞の構造と比較して共通性や多様性を認識することは難しい。そこで, 教科書で原核生物の観察材料として提示されていたシアノバクテリアのイシクラゲ(*Nostoc commune*)を用いて観察方法の再検討を行い, 実験材料としての有用性を検証した。また, イシクラゲを用いることで, 生物教育において他の学習内容と関連付けて学習する可能性を調査した。

2. イシクラゲの生態

(1) 生息場所

熊本大学(熊本市中央区黒髪)周辺でイシクラゲの生息場所を調べたところ, 大学内のグラウンド(図1A), 周辺の路上(図1B), 裏山の山道で採集を行うことができた。イシクラゲは一般的に開けた空き地や草がまばらに生えている場所で見られると言われているが, 生息場所を特定するのは難しい。図1Aは, トラック内で人による踏みつけが少なく, 直射日光は当たるが,

草丈が低い植物により日光が少し遮られるような場所である。図1Bではコンクリートの塀に沿って舗装された道路の上にイシクラゲがみられた。そこは, 塀の北側で日陰になる場所であった。そして, 図1Aのグラウンドでは1年を通してイシクラゲを採集することが可能であった。



図1 イシクラゲの採集場所(熊本市黒髪)
A: 熊本大学内のグラウンド
B: 舗装された道路

図1Aのグラウンドにおける, 晴れた日と雨の日のイシクラゲの様子を図2に示す。晴れた日が続くと, 乾燥して海苔のような外観となる(図2A)。雨が降った後は, 吸水して膨らみ, クラゲのような外観となる(図2B)。体色は黒色～緑色であった。



図2 野外のイシクラゲ
A: 乾燥状態 B: 膨潤状態

(2) 保存方法

採集したイシクラゲは, 水道水で洗浄を行い, よく乾燥させて, 蓋付きのビンに保管した。観察するときは, イオン交換水等に5分程度浸すと膨潤状態に戻る。さらに数日間イシクラゲを

水に浸した状態にしておくと寒天状の物質が分解され、その一部はゲル状となることが知られている。

3. 細胞の観察

(1) 目的

生物基礎の教科書には、イシクラゲを柄付き針等でほぐし、押しつぶして、光学顕微鏡で観察する方法が記載されている。しかし、この方法ではイシクラゲの細胞が分泌する寒天状の物質が障害となり、細胞の連なり(糸状体)を観察しにくい。そこで、水に数日間浸して寒天状の物質の一部が水で分解されたイシクラゲを用いて観察方法の検討を行った。

また、生息場所によってイシクラゲの形態に差異が生じるのかを確かめるために、土壌に生息していたものとコンクリートに生息していたものを材料として比較した。

(2) 方法

【切片の作成】

- ①乾燥状態のイシクラゲをイオン交換水に5分程度浸した。
- ②5分後に1×1cm程度のイシクラゲをスライドガラスにのせた。
- ③ピンセットでイシクラゲを固定してフェザークミソリを用いて切片を作成した。なお、切片作成に用いたカミソリは、2枚の刃の間に位置をずらしてもう1枚のカミソリを挟み、カミソリの厚さ分の切片ができるように工夫した。

【糸状体の観察】

- ①イオン交換水に数日間浸して分解が生じたイシクラゲを少量スライドガラスにのせた。
- ②ピンセットの先でイシクラゲをタッピングして十分に潰した。
- ③カバーガラスをかけ、上から押しつぶして観察した。

(3) 結果および考察

土壌の上に生息していたイシクラゲ(図3A)は厚い部分が約0.5mmで、糸状体が多く見られた。表面付近で糸状体の密度が高く、中心部で

はまばらであった。一方、コンクリートに生息していたイシクラゲ(図3B)は厚さが約150 μm であり糸状体が多くなかった。土壌で採集を行ったイシクラゲの方が糸状体を観察する材料として適している。

図3Cは教科書の記載方法で観察した結果である。糸状体が重なり、細胞の構造を明確に観察することが難しかった。押しつぶしたときに、寒天状の物質の外にはみ出した糸状体(図3D)は、切れて短くなっていた。分解が生じたイシクラゲを観察材料として使用すると、図3Eのように試料が薄く広がり糸状体の観察がより明瞭となった。また、寒天状の物質から出てきた糸状体は図3Dと比べると、より長く連なった状態であった。(図3F)これらの結果よりイシクラゲの細胞の構造を観察する場合はイオン交換水に数日浸して分解が生じた材料の方が適している。

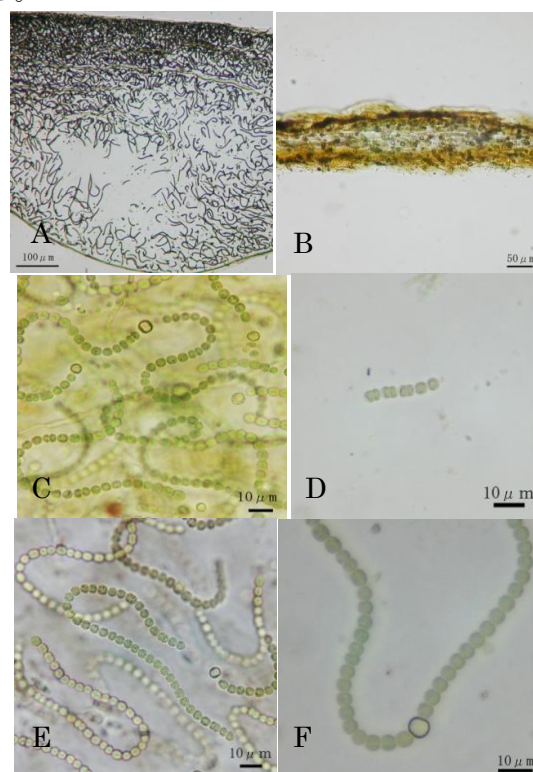


図3 イシクラゲの観察

A:土壌に生息するイシクラゲ B:コンクリートに生息するイシクラゲ C:寒天状物質に包まれた糸状体 D:寒天状物質からはみ出した糸状体 E:寒天状物質が分解された状態の糸状体 F:寒天状物質が分解されてきた長い糸状体

4. 染色した細胞の観察

(1) 目的

原核生物と真核生物を比較して、生物の共通性と多様性を学習するためには、真核生物と原核生物の細胞の構造の違いを明瞭に観察できることが重要である。そこで、本研究では原核生物のイシクラゲの染色を行い、細胞化学的な特徴を調べた。染色液には細菌等の確認に用いられるメチレンブルーと酢酸ゲンチアナバイオレット、核染色に用いられる酢酸ダーリアと酢酸オルセイン、そして特異的に DNA を染色するフクシン亜硫酸水(フォイルゲン染色)の5種類を用いた。

(2) 方法

- ①水に数日間浸したイシクラゲを準備した。
- ②少量のイシクラゲをスライドガラスにのせた。
- ③ピンセットでよく潰した。
- ④染色液を1滴加えて15分染色を行った。
- ⑤カバーガラスをかけ、余分な染色液をろ紙で吸収して観察を行った。

※. フクシン亜硫酸水のみ、材料を60℃の1N塩酸に5分、フクシン亜硫酸水に60分、イオン交換水に3時間浸した後、観察した。

(3) 結果及び考察

染色結果を図4に示す。その結果は次の4種類に分類することができた。a: 細胞全体が染色された。b: 細胞全体が染色され、特に細胞の中心部が濃く染色された。c: 細胞内の1,2箇所が点状に濃く染まった。d: 細胞内の複数箇所が濃く染色された。

aについてはすべての染色液で観察することができた。図4では、メチレンブルー(A)と酢酸ゲンチアナバイオレット(C)の例を示している。aの染色結果は、真核生物において細胞の核が濃く染色されるのとは異なり、細胞全体が染色されているため、原核生物と真核生物の核に関する違いを認識できる。

bについてもすべての染色液で観察することができた。図4では酢酸ゲンチアナバイオレ

ト(D)とフクシン亜硫酸水(G)が該当する。シアノバクテリアの中心部は中央体と呼ばれ、その部分には核様体が存在する。核様体は核膜で覆われていないが、DNAやタンパク質を含んでいる。そこで、酢酸オルセインのような塩基性色素で中心部が周りより濃く染色されたと考えられる。bの染色結果は、真核生物の核が濃く染色された様子に似ているため、生徒は原核生物に核があると誤って認識してしまうかもしれない。

cについてはメチレンブルー以外の染色液で観察することができた。図4では酢酸オルセイン(F)とフクシン亜硫酸水(H)が該当する。cの染色結果より、メチレンブルーで確認できずに他の染色液、特にフクシン亜硫酸水で確認されたことから、イシクラゲの細胞が分裂を行う際にDNAの凝集が生じ、その部分が濃く染色されたのではないかと考えられる。

最後にdはメチレンブルー、酢酸ダーリア、フクシン亜硫酸水で観察することができた。図4ではメチレンブルー(B)と酢酸ダーリア(E)が該当する。dの染色結果では、cの結果と異なり細胞の周縁部に染色される点が複数個確認できた。染色されている点の大きさは、cと比べると小さかった。シアノバクテリアの細胞の構造を考えると、シアノフィシンという同化産物が染色されていると考えられるが、DNAを染色するフクシン亜硫酸水でも反応が生じているので、染色されている物質については、さらに検証する必要がある。シアノバクテリアの細胞には染色結果に影響する物質として、シアノフィシン、カルボキシソーム、ポリリン酸体等が含まれている。

5. 生物基礎・生物の教材としてのイシクラゲ

生物基礎と生物の教科書において、イシクラゲ及びシアノバクテリアという用語が記載されている学習内容を抽出した。抽出してまとめたものを図5に示す。

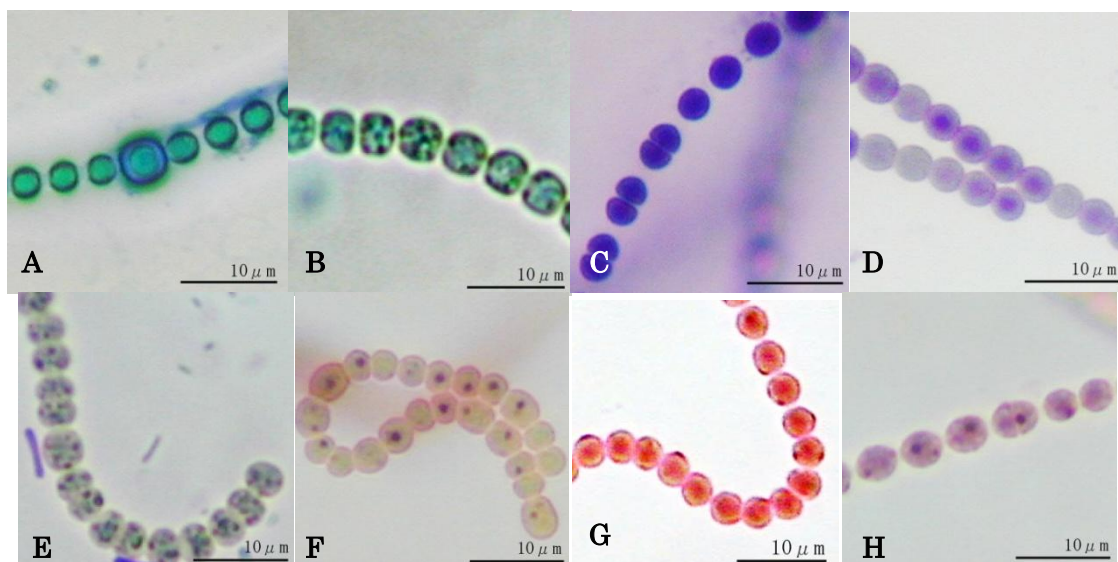


図4 イシクラゲの染色結果

A, B: メチレンブルー染色. C, D: 酢酸ゲンチアナ violet 染色. E: 酢酸ダーリア染色. F: 酢酸オルセイン染色.

G, H: フォイルゲン染色. 染色結果は次のように分類できた. a. 細胞全体が染色された (A, C). b. 細胞の中央部が濃く染色された (D, G).

c. 細胞内の 1, 2 箇所が点状に濃く染まった (F, H). d. 細胞内の複数箇所が濃く染色された (B, E).

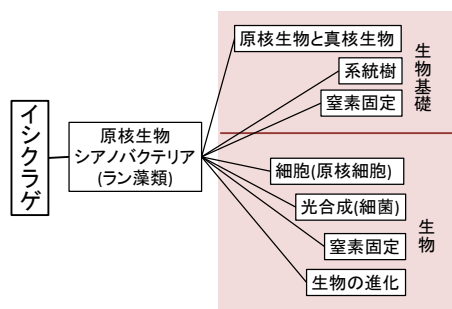


図5 生物基礎・生物におけるイシクラゲの学習関連図

生物基礎では、原核生物と真核生物の比較以外に、系統樹や窒素固定の学習内容でシアノバクテリアという用語が登場する。また生物基礎と同様に生物では、細胞(原核生物)と窒素固定でシアノバクテリアが扱われ、さらに光合成細菌や生物の進化の分野でも扱われている。

生物基礎において、原核生物と真核生物の観察材料としてイシクラゲを使用すると、図5に示した内容を学習するときに、イシクラゲを鍵にして内容を関連付けられるであろう。

図5に示す内容以外でもイシクラゲは活用できる。例えば、細胞分化の学習で、イシクラゲを観察すると、寒天状の物質を分泌する栄養細胞と、窒素固定を行う異型細胞などを確認できるため、細胞分化が生じることを学習できる。

6. おわりに

本研究で使用した染色液を用いてイシクラゲを観察すると、細胞全体が染色されるので、核が濃く染まる真核生物との違いを確認できる。また、メチレンブルーで染色したときには、細胞の周縁部に複数個の点が染色される場合があり、真核生物の細胞とは異なる構造を観察することができる。しかし、中心部が濃く染色されたり、1, 2 箇所が点状に濃く染色される場合は真核生物の核と類似しているため、学習者がイシクラゲを真核生物と誤解する危険性がある。

また、イシクラゲは生物基礎および生物の学習内容を関連付ける教材生物として活用できる。

参考文献

- ・矢守健太郎・渡邊重義(2014)日本科学教育学会研究報告 Vol. 29 No. 1. pp. 1-6 「生物基礎における観察実験の再検討-原核生物の観察材料としてのイシクラゲ-