

専門職大学における PCR 実験実習の開発
—1 枚の葉から 3 時間で明らかにする柑橘類の農業形質—

太田智、丹羽康夫

(静岡県立農林環境専門職大学 生産環境経営学部)

Development of PCR Experimental Practice at Professional University

- Agricultural traits of a citrus plant observed in 3 hours in a single leaf -

OHTA Satoshi, NIWA Yasuo

(Faculty of Agricultural Production and Management)

<要約>

新型コロナウイルスと共に PCR という言葉は広く一般にも知られるようになった。PCR 法は 1980 年代に開発され、高等学校の生物でも履修するようになったが、授業時間数と設備の問題でその体験的な学習履修率は極めて低い。その一方で、PCR 法はその有用性から農林業分野も含め、生命科学の幅広い分野でなくてはならない重要な基礎技術となっている。専門職大学において基礎実験に充てられる授業時間数が限られる中、学習効果を高めるために、解析対象とゲノム DNA 抽出法を検討することで、学生一人が 1 試料を担当し、解析結果が育種形質に結びつけられる PCR 実験実習を開発した。

<キーワード>

PCR, 学生実習, アガロースゲル電気泳動, マイクロピペット, カンキツ胚数性

I. はじめに

PCR とは、Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応) の頭文字からなり、微量な DNA を複製し増幅させる反応である。その有用性により、現代においては生命科学に関わる非常に多種多様な分野でなくてはならない技術として活用されている。新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、SARS-CoV-2 ウイルスによって引き起こされる感染症で、感染の有無の判定にも PCR 法が使用されたことにより、今や広く一般の人々の間にも認識されるにいたった。高等学校において生物学を履修してきた学生は、PCR について座学により学んできているが、本学 1 年生を対象に実施しているアンケート結果から、実際に PCR 実験を高校で体験した学生は毎年概ね 1 割程度である。高等学校において、実験・観察といった体験的な学習の履修率が極めて低い点は、高等学校学習指導要領の解

説内でも指摘されており (文部科学省、2019)、そのような状況を踏まえての大学生への遺伝子教育の有効性が西本ら (2021) により示されている。PCR 反応には 3 点での温度制御を精度よく繰り返す機能を備えた、サーマルサイクラーが必要ではあるが、高等学校で準備するのが予算面で容易でない点も、高等学校で PCR 実験が困難である大きな一因になっている。例えば、大井ら (2019) は、サーマルサイクラーの代わりに保温性スプージャーを用いる簡易的な PCR 実験法の開発を報告している。歴史的には、サーマルサイクラーが開発される以前には、3 台の恒温槽を並べての PCR が行われていた。3 台の恒温槽を人の手で移動させる方法は非常に煩雑ではあるが、PCR 法の原理を理解する上ではとても優れた方法であるため、丹羽は静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科での学生実習として、サーマルサイクラーとの比較実験を

組み入れていた。1985年にPCR法の原理が(Saikiら、1985)、さらに1988年にはDNA増幅用の酵素として好熱性細菌の*Thermus aquaticus*から耐熱性DNAポリメラーゼであるTaq DNAポリメラーゼを用いた方法が開発された(Saikiら、1988)。30年以上も前に開発され、その後広い分野で利用されてきたとはいえ、普段目にする機会が少ない基礎研究分野での利用が主で、2019年以降に起きた新型コロナウイルスのパンデミックによる影響の大きさと、その感染判定に用いられたPCR法との関連性の強さから、本学の1年生の中にも、PCR法とは新型コロナウイルス感染の有無を確認するために開発された方法だと回答する学生がいる。農業分野においても、薬剤耐性菌、薬剤抵抗性害虫の検出、水稲品種の特定など、あるいは、豚熱や高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断、さらには、新品種の開発など特に研究レベルでは欠かすことのできない一般的な実験手法として利用されている。その一方で、PCR法は微量の多くの試薬を混合後、増幅反応により高感度に検出する方法であるがゆえに、その過程のどこかで問題が生ずると、増幅されない、あるいは増幅されるべきものでないものが増幅されてしまうという、新型コロナウイルス感染検査でもしばしば問題となる、偽陰性、偽陽性を引き起こしうる。このようなPCR法が抱える問題点も、実際にPCR法を体験することにより理解が深まることが期待される。

一連のPCR実験は、試料よりPCR増幅のための鋳型DNAの抽出、PCR反应用の試薬の調整、サーマルサイクラーによるPCR反応、アガロース等を用いたゲル電気泳動による増幅DNAの検出、得られた結果に基づくその解釈および考察に分けられる。コメを試料としたPCRによる品種識別実験は、普段自身が食べているお米を試料として扱うことができ、身近な例として非常に有用であり、これまでに実験キットなども開発、販売もされていて、その検討もなされている(吉川ら、2015)。丹羽は静岡県立大学において担当していた学生実習で実施していた。PCRに使用するコメゲノムの抽出は、エタノールによる沈殿処理等の操作がある。PCRの増幅を効率よく行うためには、反応を阻害する夾雑物を極力減らすことが重要であり、ゲノムDNA調整過程でのエタノールによるDNA沈殿は非常に有効な手段である。一方で、エタノールを

用いたDNA沈殿では、低温での遠心分離操作が必要となり、遠心分離のための時間及び、学生全員分の試料を一斉に遠心分離できないため、90分の講義時間内で終わらせることが困難となる。丹羽はPCR実験の学習効果を高める目的で、PCR反応の前に、ゲノムDNA抽出操作後の試料の状態を確認させるための電気泳動aを実施していた(図1A)。

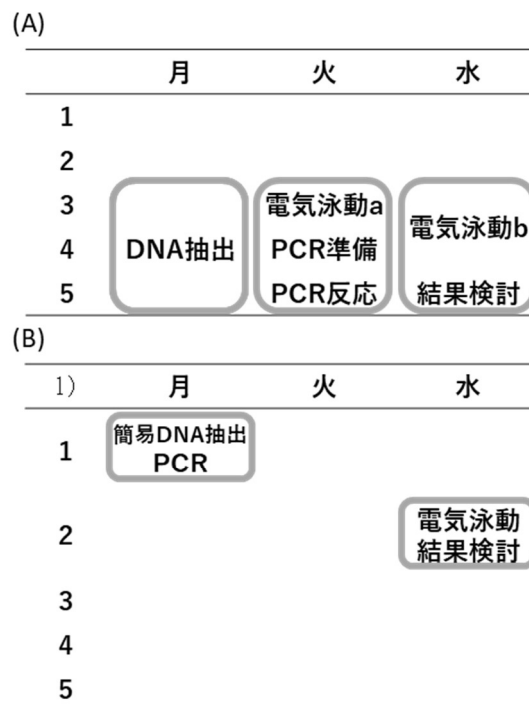


図1 一般的なPCR法によるコメ品種識別実験に必要な授業時間数(A)と今回確立したカンキツ胚数性識別実に必要な授業時間数(B)
1) いずれも1回の授業時間は90分

さらに、コメの品種識別には、1試料について複数のPCR反応を組み合わせることが必要であり、学生が1試料を担当した場合、図1Aに示すように3回分の授業時間を3日連続して実習時間として計画するのが理想である。一方本学では、指定されたカリキュラムの中で、実験室での実習に用いることができる時間が少なく、基礎科学実験の時間を十分に確保することは困難である。加えて、エタノール沈殿で得られたゲノムDNAは、沈殿回収時のエタノール除去や、70%エタノールによる洗浄操作時に試料を失うリスクが小さくない。解析対象試料からエタノールを用いたDNA沈殿操作なくゲノムDNAを抽出できれば、以上のリスクを回避できるばかりでなく、操作時間の大幅な短縮が可

表1 試料の違いによる学生実験での適正比較

	コメ品種識別	キノコダイレクト法	カンキツ胚数性識別
ゲノムDNA調整時間	×	○	○
電気泳動に要する時間	×	○	○
結果の信頼性	△	△	○
表現型との関係	○	×	○
試薬の汎用性	○	△	△

能である。しかしながら、ゲノムDNAの簡易抽出では、PCRを阻害する夾雑物の持ち込みも多く、解析可能な増幅産物を得ることが難しい。青木と西矢(2016)により開発された市販キノコを用いたダイレクトPCR法は、図1Bに示す2回の授業時間内で実施可能である点が非常に魅力的ではあるが、使用できる耐熱性DNA合成酵素が限定される点に加えて、増幅領域がリボソームRNA遺伝子であるため、増幅反応自体は容易であるが、単に目的領域の増幅の有無を確認するのみとなってしまう、その解析結果から、試料の違いによる表現型の違いと結びつけることができない。さらに、新型コロナウイルス感染の確認の際にも問題となっているが、電気泳動による解析で増幅シグナルが確認できない場合には、偽陰性の可能性が排除できず、得られた結果の信頼性にも影響を与える。偽陰性の問題は、コメの品種識別法でも問題となる(表1)。

PCR法について、座学による原理の理解のみにとどまらず、グループとしてではなく、各自が実際に実験操作を、分子生物学の15回の講義(90分/回)の中の2回分を使って一通り体験すること、しかも農林環境専門職大学として取り扱うべき、

すなわちPCRにより得られた結果を利用して、農業形質として意味のある、あるいは用いた植物体の表現型を予測するところまでを学べる実習となるようデザインすることを目指した。そのために、PCR反応の鋳型となる試料からのゲノムDNAの抽出方法に加えて、解析対象として扱うべき試料について、開学初年度である2020年の夏季の開講に間に合うよう検討した。その後2年にわたり改良を加え、2022年夏季に開講した3度目のPCR実験後にアンケート調査を実施した。

II. 材料と方法

1. 扱うべき試料の検討

静岡県の特産品でもあるカンキツ類は、育種の際にその胚数性が重要となる。カンキツ類の中には、単胚性以外に多胚性の品種も数多く含まれているが、新たな品種を生み出す際には、単胚性品種を母方にするのが重要である。カンキツ類品種の胚数性は、農研機構のShimadaら(2018)により開発された、カンキツ成葉を用いた胚数性識別法を用いれば、1試料あたり1回のPCRにより解析可能である。さらに、A遺伝子に由来する約700bp

表2 PCR実験実習に使用したカンキツ品種と遺伝子型および胚数性

品種名	学名	遺伝子型 ^z	胚数性
キシウミカン	<i>C. kinokuni hort. ex Tanaka</i>	AA	単胚
じゃばら	<i>Citrus sp. 'Jabara'</i>	AA	単胚
晩白柚	<i>C. grandis Osbeck 'Banpeiyu'</i>	AA	単胚
ぶちまる	<i>Fortunella sp. 'Puchimaru'</i>	AA	単胚
太田ポンカン	<i>C. reticulata Blanco 'Ohta'</i>	AB	多胚
不知火	<i>Citrus sp. 'Shiranui'</i>	AB	多胚
せとか	<i>Citrus sp. 'Setoka'</i>	AB	多胚
はるか	<i>Citrus sp. 'Haruka'</i>	AB	多胚
はるみ	<i>Citrus sp. 'Harumi'</i>	AB	多胚
レモネード	<i>Citrus sp. 'Lemonade'</i>	AB	多胚

^z A: ca. 700bp、B: ca. 1000bp

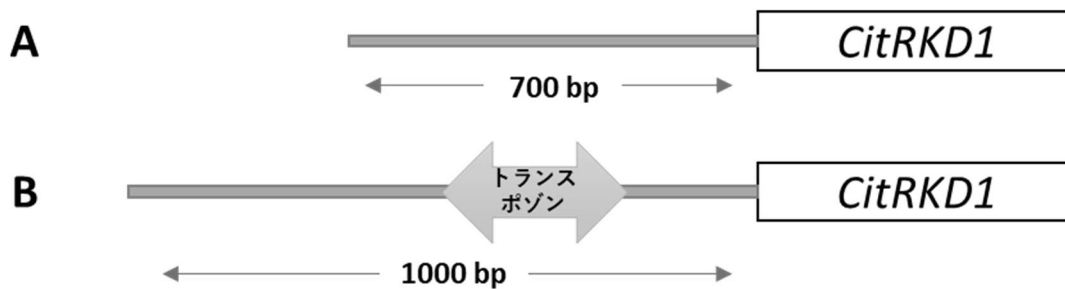


図2 カンキツ胚数性の違いと関連するDNA構造の模式図

の DNA 断片の増幅シグナルをコントロールとすることにより偽陰性の可能性が排除できる点からも、結果の信頼性が高く、本学学生実験の候補としてふさわしいと結論付けた (表 1)。そこで、植物材料として、表 2 に示すカンキツ 10 品種を用いた。2020 年度に実施した条件検討時には実験当日、学生実験用には実習初日の 10 日から 7 日前に、本学圃場にて成葉を採取した。葉は、なるべく病虫害がなく綺麗なものを当年枝から採取した。採取後、それぞれの品種名を書いた透明なビニール袋に入れ、保存が必要な場合には 4°C の冷蔵庫にて静置した。なお、学生の主体性確保を鑑み、単胚性の品種と多胚性の品種を複数ずつ選定したが、単胚性の品種が相対的に少ないことから多胚性の品種が多くなった。

2. PCR および電気泳動

DNA マーカーは、単胚性と多胚性を識別することのできるマーカー (Shimada ら、2018) を用いた。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの塩基配列は、論文に掲載の通りそれぞれ 5'-TCTCTGGTTCATTGAGAATCC-3' および 5'-CTGAGCACCAGGCAACAACACTAC-3' である。なお、このマーカーを用いると単胚性品種では約 700bp の配列のホモ型 (AA) となり、多胚性品種では約 700bp の配列と、トランスポゾンの挿入による約 1000bp の配列のヘテロ型 (AB) となる (図 2)。

DNA 抽出および PCR 反応液の組成は、木本植物サンプル調整法 (Ohta ら、2013) のうち Non-direct PCR 法に従った。ろ紙の上にカンキツ成葉を置き、滅菌した爪楊枝で 30 回突き (図 3)、その後、TE0.2 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.2 mM EDTA) 20 マイクロリットルに、突いた爪楊枝で底を突くよ

うに 5 秒間混ぜ、薄っすら着色したことを確認した。75°C で 10 分間処理し、鋳型 DNA 試料とした。ただし、木本植物サンプル調整法開発後の改良により、TE 0.2 液中には 0.01% のトリトン X-100 を追加する条件について、学生実験に先立って実施した条件検討時において、期待する増幅が確認できたことから、学生実験においても同様とした。また、プライマー開発の論文 (Shimada ら、2018) および図 4 に示した BIOTAQ HS と Takara Ex Taq 比較実験の結果に従い、学生実験時の DNA 合成酵素は、Ampdirect に添付の BIOTAQ HS から Takara Ex Taq (タカラバイオ株式会社) に変更した。なお、木本植物サンプル調整法においては、Direct PCR 法も開発しているが、学生に DNA 抽出という工程が存在することを理解させるため、あえて Non-direct PCR 法を採用することにした。PCR 反応条件は (Shimada ら、2018) に従った。ただし、簡易抽出した DNA 試料を用いるため、サイクル数を 40 回



図3 爪楊枝によるカンキツ成葉からの DNA 採取の様子

とした。すなわち、94°Cで10分の後、(94°C/20秒、56°C/30秒、72°C/60秒)で40サイクル、最後に72°Cで7分間反応させたのち、4°Cにて保存した。サーマルサイクラーは、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice もしくは Applied Biosystems™ ProFlex™ PCR システムを用いた。

を基に増幅されたDNA断片の長さを求めた。

一連の操作におけるマイクロピペットとして、ピペットマン (ギルソン社) を使用した。

3. PCR 実験に関するアンケート調査

本論文の主たる調査対象者は、2022 年度夏季に

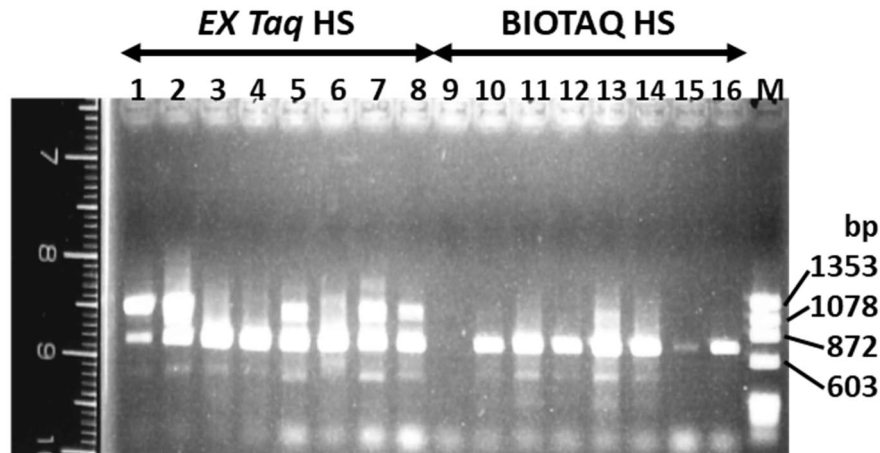


図4 アガロースゲルを用いたDNA合成酵素の違いによる増幅検討結果

DNA合成酵素はTAKARA EX Taq HS (1~8) とBIOTAQ HS (9~16)。

1,9:レモネード (AB)、2,10:はるか (AB)、3,11:ぷちまる

(AA)、4,12:晩白柚 (AA)、5,13:太田ポンカン (AB)、

6,14:キシウミカン (AA)、7,15:不知火 (AB)、8,16:せとか

(AB)、M:マーカー4、定規の目盛は1 mm

PCR産物の分離・検出には、1.2% アガロースゲル(ニッポンジーン社製アガロース S)を用いた。PCR後の試料10 μ lに2 μ lのBPB(プロモフェノールブルー)泳動色素(1 mM EDTA, 30% glycerol, 0.25% キシレンシアノール, 0.25% プロモフェノールブルー)、DNAサイズマーカーとしてマーカー4(ニッポンジーン社製 ϕ X174/HaeIII digest)を2 μ l用いた。電気泳動装置Mupid-2により電気泳動用トリス酢酸緩衝液(40 mM Tris-HCl (pH8.0)、20 mM 酢酸ナトリウム、2 mM EDTA)にて100Vで約30分間電気泳動を行った。その後、エチジウムブロマイド(500 μ g/l)液に約10分間浸して染色し、UVイルミネーターにより観察、撮影した(アトールWSE-5300プリントグラフCMOS I)。印刷した泳動写真を使用し、DNAサイズマーカーとして同時に泳動したマーカー4の移動度を測定した。得られた値を配布した片対数グラフ上にプロットし、スタンダードとして各自の試料から得られた移動度

本学にて開講した「分子生物学」を必修科目として履修した短期大学部1年生92名であるが、比較のため、必要に応じて過去2年間のアンケート結果も一部引用した。1回の授業時間は90分間で、分子生物学15回分の講義のうち、14、15回目をPCR実験と電気泳動にそれぞれあてた。授業は同一内容を3クラスに分かれて開講しているため、アンケート調査もクラス単位で15回目の実験終了後に、TeamsのFormsにて実施し、集計もクラス単位で行った。結果は、クラス単位と総計を適宜使い分けて示した。Aクラス31名は8月1日1限と3日2限、Bクラス30名は7月29日2限と8月3日1限、Cクラス31名は8月1日2限と3日4限に実験を行った。アンケートの回答数と回答率は、Aクラス26名で84%、Bクラス29名で97%、Cクラス27名で87%、合計82名から回答があり回答率は89%であった。設問は以下の6項目とし、(1)マイクロピペットの使用経験(4択)、(2)PCR実

験経験の有無、(3) 電気泳動実験経験の有無、(4) PCR 実験後の理解度 (5 段階評価)、(5) 実験をやって良かったこと (自由記述) (6) 実験をやってわからなかったこと、今後の改善点 (自由記述)。アンケートの集計と解析は Teams の Forms 機能を使用した。

カー1078 pb とほぼ同じ位置に約 1000 bp の多胚性ゲノムから由来する増幅シグナルを検出することができた。他方、Ampdirect に添付の BIOTAQ HS を用いた場合 (レーン 9~16) にはレモネードで増幅が確認できなかったことに加えて、多胚性ゲノムから由来する約 1000 bp の増幅はレーン 13 の太

表3 学生実習用カンキツ胚数性識別PCR反応液

6.9	μl	蒸留水
10	μl	2 × Ampdirect (3mM MgCl ₂ , 0.4mM dNTPs)
1	μl	10uM センスプライマー:5' -TCTCTGGTTCATTGAGAATCC-3'
1	μl	10uM アンチセンスプライマー:5' -CTGAGCACCAGGCAACAACACTAC-3'
0.1	μl	5 units/ul <i>ExTaq</i>

- 1) 反応液は0.2mlのPCR用チューブを用いて調製
- 2) 1試料あたりの分量を示す (実際にはグループの人数分をまとめて作成)
- 3) 反応液を混合、遠心後、各チューブに19μlずつ分注 [ピペットマンP20使用]
- 4) 最後に各自が抽出したDNA試料を1μl添加 [ピペットマンP2使用]

III. 結果および考察

1. PCR のための鋳型 DNA とするゲノム DNA の調整および DNA 合成酵素の検討

表2に示すように、エタノールを用いた DNA 沈殿により、ゲノム DNA 調整に手間がかかるコメの品種識別では試薬の汎用性が高い一方で、キノコのダイレクト PCR 法では、得られたゲノム DNA への持ち込みの夾雑物の影響により、使用できる耐熱性 DNA 合成酵素が限定される。カンキツ胚数性識別実験においても、PCR に用いる緩衝液が増幅の成否に決定的な影響を及ぼす。島津製作所が開発した PCR 用緩衝液である Ampdirect は、試料中に含まれる PCR 阻害物質の影響を抑制する働きがあり、DNA を精製することなく PCR を行うことを可能とした。Ampdirect を用いた簡易 DNA 抽出法 (Ohta ら, 2013) を基本とし、本学圃場で生育させている 10 種類のカンキツ成葉を試料とし、PCR に使用する 2 種類の DNA 合成酵素について比較検討を行った。図4に示すように、DNA 合成酵素として *ExTaq* HS を用いた場合 (レーン 1~8) には、ぶちまる、晩白柚、キシウミカン (レーン 3,4,6) では、DNA サイズマーカー (レーン M) の 872 bp と 603 bp の間の位置に単胚性ゲノムから由来する約 700 bp のシグナルのみが、それ以外のレーンではいずれも約 700 bp に加えて、サイズマ-

田ポンカンのみでの確認にとどまった。はるみとじゃばらでも同様の傾向が確認されたので、DNA 合成酵素として *Ex Taq* HS を用いることとした。以上の検討結果より、本研究で開発したカンキツ胚数性識別実験では、Ampdirect と *ExTaq* HS を組み合わせて使用する場合に限り信頼性のある結果が得られるということから、用いる試薬は限定されるという点で注意を要する。

2. 学生実験における PCR 液の調整とサーマルサイクラーによる増幅

PCR 反応液を作成する際、1 試料あたりの各試薬の分量は極めて少ないため、鋳型 DNA を除く各試薬を複数試料分まとめて作成してから分注するのが一般的である。本実習でも、個々人の技量による操作ミスを極力避ける目的もあり、鋳型 DNA 以外は各グループで人数分をまとめて調整することとした (表3)。

反応液調整過程で誤操作があれば、そのグループは全員増幅できない危惧はあるが、2年目以降はこの方法で実施した。調製の最後に、自分自身で選り出したカンキツゲノム DNA を自身で分注することにより、反応液の調整を完了させた。全員分の反応液の調整が済み次第、サーマルサイクラーによる増幅を開始した。反応開始後、二本鎖 DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリ

メラゼによる伸長反応、の3ステップ、1サイクルをそれぞれの温度と意味をイメージしながら観察させることで、実際のPCRを体感させた。

以上の改良を加える以前の初年度は、DNA増幅の成功率が70% (54/77人)であったが、改良2年目の2022年度は90% (81/90人)と高くなった。特に初年度はグループ全員が増幅シグナルを検出できなく、別のグループの結果を流用させてもらい、その後の解析を進めることとなった学生は、増幅に失敗した精神的なダメージも加わって、淡白な内容のレポートが多く見受けられたが、自分自身が選んだ試料を用いてDNA鎖長を求めた学生は、得られた実験結果に興味をもって考察に取り組むことで、内容が充実したレポートを提出する割合が増加した。

3. 学生実験におけるアガロースゲル電気泳動によるPCR増幅産物の解析

初年度は、1回目の時間内でアガロースゲルの作成も実施したが、PCR実験に集中するために、2年目以降はこちらで準備したアガロースゲルを使用することとした。サーマルサイクラーによる反応が終了し、こちらで冷蔵保存しておいたチューブを2回目の授業で各グループに配布後、BPB泳動色素を加えたのち、各自が自分の試料をアガロースゲルのウェルへと入れたのち100Vで約20分間、電気泳動を行った。核酸染色試薬であるエチジウムブロマイドで染色後、ゲル撮影装置により反応産物の検出を行った。

実施したPCR実験は、学生への科学的な思考法のトレーニングとしても、非常に有効であることが明らかとなった。具体例として、ゲル上でエチジウムブロマイドによる蛍光シグナルが検出できない場合、多くの学生は「DNAがなかった」という結論を導き出す。しかしながら、科学的には検出限界以下、という解釈となること。あるいは、試料中にはホモ接合体に加えて、シグナルが複数検出できるヘテロ接合体も含まれていること等があげられる。また、「このPCR実験を通して、新型コロナウイルス感染検査で偽陰性が発生する状況を理解できた」とするアンケート回答も得られた。図4にも示すように、AmpdirectとEX Taq HSを組み合わせて使用する場合において、これまで偽陽性が検出されたことはないが、学生実験という点において、偽陽

性の可能性を排除するためのコントロールについても十分に説明することが重要と考えられる。電気泳動の結果、低分子量領域に蛍光シグナルが検出されることもあった。多くの学生はその点にほとんど注意を払わなかったが、試料調整の段階でのRNAの混入や、プライマーダイマー形成の可能性について検討する価値があることを伝えている。

表4 アンケート結果

質問と回答	Aクラス	Bクラス	Cクラス	合計人数	%
(1)マイクロピペットについて					
実物を見たこともなかった	21	19	20	60	73%
見たことはあった	3	9	4	16	20%
自分で数回操作したことがあった	2	1	2	5	6%
実験等で定期的に使用していた	0	0	1	1	1%
(2)PCR実験について					
未経験	24	26	24	74	90%
経験済み	2	3	3	8	10%
(3)電気泳動について					
未経験	21	28	22	71	87%
経験済み	5	1	5	11	13%
(4)実験を体験してPCRの理解度がどの程度深まったか(数字が大きいほどより深まった)					
5	4	0	3	7	9%
4	10	14	9	33	40%
3	11	13	15	39	48%
2	0	2	0	2	2%
1	1	0	0	1	1%

4. PCR実験に関わるアンケート結果

分子生物学の講義として15回目にあたる2022年8月3日に、PCR増幅産物の電気泳動とそこで得られた結果から、PCR増幅産物のDNA鎖長を求める実験を実施した。実験終了後にFormsにて実施したアンケート調査の結果を表4に示す。マイクロピペットの使用経験に関して、回答者82名中、実物を見たことがない学生が60名、見たことはあるものの使用経験がない学生16名と合わせると、9割以上の学生がマイクロピペットを使ったことがないことが分かった。続いてPCR実験に関しては、経験者は8名で全体の1割弱であることが、また電気泳動に関しては、11名で13%に当たる学生のみが経験ありと回答した。このような状況下で実施したPCR実験について、実際に経験してPCRについての理解がどの程度深まったかを、5を最上とする5段階評価として回答してもらった。その結果、クラスによって多少のばらつきは見られたが、全体としては約半数が3と回答し、4あるいは5と回答した学生も約半数を占めていた。一方で1評価が1名、2評価が2名あった。実験を経験して良かった点についての自由記述では、「ニュースで頻繁に話題となる、新型コロナウイルスの

感染検査として用いられている PCR 法について、実際に経験できてよかった」。さらに、「高校生の時には座学でしか学ばなかったこと、あるいはよく理解せず使っていた器具について今回の実験で実際に手にすることで理解できた」という回答もあった。そのような実験実習に対してポジティブな回答は 79 名から得られた。一方で、電気泳動結果から PCR 増幅産物の DNA 鎖長の求め方が理解できなかった学生が 7 名、今回の実習の目的も含め、何をやっているのか全く理解できなかったという回答が 5 件あった。回答の中には、「その場で説明を聞いただけでは理解できなかったのも、しっかり予習をするべきだったと思う」といった、事前の準備や予習の重要性を痛感したとする記述が 5 件みられた。さらに、「班の中で理解出来ていない人がいたので、自分が説明してあげればよかったと思いました」あるいは、「PCR という言葉だけ知って中身は理解しようとはしなかったのもこれからは周りのものに興味関心、疑問を抱けるように生活したい」といった記述もみられ、予想を超える効果を実感した学生がいたことも明らかとなった。

5. マイクロピペットを用いた基本操作について

前項で示したように、これまでにマイクロピペットを実際に操作した経験者は 1 割未満であった。マイクロピペットは、マイクロリットル単位の液体を再現性良く操作可能であるが、そのために残った液を出し切るための第 2 ストップという特殊な構造や、チップの着脱といった操作があるため、初見の学生が操作に慣れるまでには予想外に時間がかかることが分かった。そこで、2 年目からは 2 回の実験の前に、マイクロピペットによる操作の予習として、分子生物学の 13 回目の講義時間内にマイクロピペットの原理と操作上の注意点を説明したうえで、動画によるイメージトレーニングを導入した。その結果、前年と比較して非常にスムーズにマイクロピペットの操作に慣れることができた。アンケート回答の中には、「動画ではわからなかった点も、実際に操作することで理解できた」とする記述もあり、実際に体で触れることの重要性も再認識した。

IV. まとめ

本学園場で栽培されている 10 種類のカンキツ成

葉を実験材料として、PCR によりそのゲノム構造の違いを検出することでカンキツ胚数性を識別する学生実験をデザインした。これにより、15 回の講義の中の 2 回分を充てることで、学生一人が 1 試料を担当し、解析結果が育種形質に結びつけられる PCR 実験実習を確立できた。3 年間にわたる検討により、さらにスムーズに学習効果を高めるためには、実習前にマイクロピペットの操作方法の予習が非常に有効であることが明らかとなった。本学に入学してくる学生は、高校時における履修課程や履修科目が非常に多様であることから、生物学、とりわけ分子生物学に関する知識や経験が大きく異なっている。そのため、PCR 実験操作に加え、実験後のレポートの書き方について、よりきめ細かなサポートが重要であると考えられる。世の中で広く認知され、農林業分野でも実際に利用されている PCR 実験を、自分が選んだ試料について経験できたことについて、履修者へのアンケート調査結果から、実際に体験することで初めて気づく、あるいは理解できることがあるということ、期待通りの結果が得られた時に達成感が得られること、予想外の結果が得られた時こそその対処が重要であること、などが学生に伝わっていることが確認できた。さらに、予習や準備の大切さ、友達を思いやる心、物事の本質を見極めようとする心構えの大切さにまで及んだ回答に、実験実習の重要性とそれを担う責任を感じた。

謝辞

PCR 実験に際し、学生への指導にご協力いただいた本学の平岡裕一郎先生、貞弘恵先生に感謝いたします。

引用および参考文献

青木駿介, 西矢芳昭, 2016. 生物教育実験のための市販キノコ・ダイレクト PCR 法, 摂南大学融合科学研究所論文集, 2 巻, 1 号, 10–17
文部科学省, 2019. 高等学校学習指導要領 (平成 30 年 3 月告示) 解説 理科編 理数編 実教出版
西本浩章, 木野光莉, 藤原夕菜, 山口鉄生, 2021. 大学生における遺伝子教育の効果, 科学教育研究, 45 巻, 1 号, 49-56
大井真菜, 水口智人, 夏厩悠斗, 小川唯菜, 三宅崇, 2019. 高等学校生物における安価かつ簡易的な

PCR 実験法の開発、生物教育、61 巻、1 号、23-29
S. Ohta, K. Yano, Y. Kurita, M. Kita, T. Shimizu, H. Nesumi. 2013. A Sample Preparation Method for Direct and Non-direct PCR in Woody Plants, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 14-21
R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350–1354.
R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. 1988,

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487–491.

T. Shimada, T. Endo, H. Fujii, M. Nakano, A. Sugiyama, G. Daido, S. Ohta, T. Yoshioka, M. Omura. 2018. MITE insertion-dependent expression of CitRKD1 with a RWP-RK domain regulates somatic embryogenesis in citrus nucellar tissues. *BMC Plant Biology* 18(1): 166.

吉川ひとみ, 板宮裕実, 杉田律子、2015. 市販キットによるコメの品種識別、*分析化学*、64 巻、9 号、661–667