

## アフリカツメガエル胚を用いた発生学に対する興味 喚起を目的とした教材の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 静岡大学学術院教育学領域 公開日: 2019-12-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 雪田, 聡, 江口, 優大, 大澤, 哲 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.14945/00026981">https://doi.org/10.14945/00026981</a>

## アフリカツメガエル胚を用いた発生学に対する興味喚起を目的とした 教材の開発

Development of teaching materials for raising interest in developmental biology using *Xenopus* embryos.

雪田 聡<sup>1</sup>, 江口優大<sup>1</sup>, 大澤哲<sup>2</sup>

Akira Yukita, Yudai Eguchi and Satoshi Osawa

（令和元年 12 月 2 日受理）

### 1. 背景

児童生徒の理科嫌いや理科離れが進んでいると言われて久しい。複数の国内外の調査結果を見ると、特に中等教育においてその傾向は強くなる。例えば、高校 3 年生を対象にして 2004 年に行われた調査によれば、高等学校の理科 4 科目（物理、化学、生物、地学）の勉強が好きだと答える学生の割合は平均で 37～38%にとどまる<sup>1)</sup>。高等学校理科の中でも生物分野における動物の発生の小单元では、アフリカツメガエルなどの両生類がモデル生物として発生過程が取り上げられており、特に初期発生を詳しく学習する。初期発生は細胞の運動や性質の変化が複雑であり、また時間・空間的な理解が必要であることから、内容が複雑でわかりにくく苦手意識を持つ生徒が多いのではないかと考えられる。しかし、発生学は生命の誕生を学ぶことができる非常に魅力的な学問であり、我々ヒトも一つの受精卵から卵割を重ね無数の細胞に分裂し、形態を形成していく。またライフイベントの中で、自身の子どもの誕生という場面では生命の発生は切っても切り離せない事象である。このように生命の発生は我々に密接に関係している現象である。

高等学校学習指導要領解説理科編には、生物分野の目標として「生物や生物現象に対する関心や探求心を高める」、「生物のつくりと働き of 精妙さや生命は生命からしか生み出されないことなどを、科学的な知識に基づいて理解させ、生命を尊重する態度の育成を図る。」という目標が掲げられている<sup>2)</sup>。そこで我々は発生という生物現象に興味を持つことにより生物および生命を科学的に深く考え、それを尊重する態度の育成を目指すことを本研究の目標とし、動物の発生の中でも初期発生過程における形態形成に対して興味を引き付ける教材を開発したいと考えた。開発においては、①身近で手に入りやすく馴染みのある生物を用いること、②発生過程で保たれている絶妙なバランスが崩れると形態形成が大きく変化することを明確に伝えられるものであること、③一般的な高等学校でも揃えやすい機材や試薬のみで実行できること、の 3 点を重視した。

①について、本研究ではアフリカツメガエルを用いることとした。アフリカツメガエルは発

<sup>1</sup> 理科教育系列

<sup>2</sup> 兵庫県立兵庫高等学校

生学研究のモデル動物として世界で最も用いられている生物の一つであり、前述の通り一部の教科書では脊椎動物の初期発生の様子を説明するためにアフリカツメガエルを用いている<sup>3)</sup>。また、国内で安定的かつ比較的安価に入手可能であり飼育も容易である。さらに最大の利点として発生過程に対する膨大な知見の蓄積が挙げられる。試薬の添加など様々な実験発生学的な操作が発生過程に影響を及ぼし、形態を大きく変化させる事例はその分子機構の解明も含めて多数報告されている。本研究ではそのうちの2つに着目した。1つめは塩化リチウム処理による背側化の誘導現象についてである。アフリカツメガエルの卵の植物極側には母性因子である Dishevelled や XWnt-11 mRNA が局在しており、背腹軸の決定因子と考えられている<sup>4,5)</sup>。この XWnt-11 を含むいくつかの Wnt タンパク質は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路と呼ばれるシグナル経路を活性化することが知られている。このシグナル伝達経路において  $\beta$ -catenin は転写調節因子として作用し、背側構造を形成するために必要な遺伝子の転写を活性化する。一方で、腹側領域においてはプロテインキナーゼの GSK3 $\beta$  によって  $\beta$ -catenin はリン酸化され、プロテアソーム分解される<sup>6)</sup>。アフリカツメガエル胚を塩化リチウムで処理すると、塩化リチウムは背腹軸決定に重要な  $\beta$ -catenin の分解を促進する GSK3 $\beta$  の活性を阻害するため、胚全体の腹側構造と後方構造が消失し、胚全体が背側化する<sup>7,8)</sup>。胚全体が背側化による形態異常は一目見て分かるほどに明確で観察者に大きなインパクトを与える(図 1A)。すなわちこの実験系は上述した本研究が目指す教材の条件の②を満たすといえる。さらに、塩化リチウムは 25 g で 2000 円程度と試薬としては比較的安価であり、これを受精卵に添加するのみで背側化が誘導できるという点で条件③も満たす。その一方で、飼育条件等が異なる高等学校で同様の実験を行っても、論文に記載された塩化リチウム処理条件下で同様の結果を得られるかを検討する必要があると考えられた。

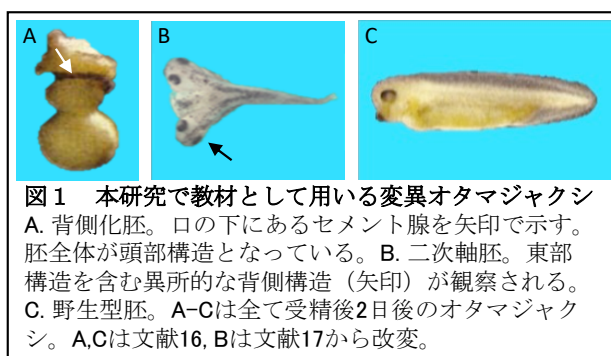


図1 本研究で教材として用いる変異オタマジャクシ  
A. 背側化胚。口の下にあるセメント腺を矢印で示す。胚全体が頭部構造となっている。B. 二次軸胚。東部構造を含む異所的な背側構造(矢印)が観察される。C. 野生型胚。A-Cは全て受精後2日後のオタマジャクシ。A,Cは文献16, Bは文献17から改変。

二つ目は遠心処理による二次軸胚の誘導である。二次軸とは、将来の背側領域に形成されるのとは別に異所的な背側構造が形成された胚で、シュペーマンのオーガナイザー移植によって形成されることが高等学校生物の教科書でも紹介される有名な現象である<sup>9)</sup>(図 1B)。教科書でも目にするこの現象は1個体に頭部が二つあるという形状で先の背側化胚に劣らないインパクトを与え、上述の②を満たす。しかし、シュペーマンらが行ったような胚手術には熟練した技術が必要であり高等学校で行うのは難しい。そこで遠心処理により二次軸誘導に成功したという知見に着目した。受精直後のツメガエル卵を特定の角度でゼラチンに包埋し、600 毎分回転の強さで4分間遠心処理することで二次軸胚が誘導される<sup>10)</sup>。精子進入後の表層回転によって背側決定因子の移動が起こり、因子が移動した場所が背側となるため、表層回転後すぐに一定の速さで動植物極軸に90°になるように遠心力をかけると、背側決定因子の局在異常が起こり、本来背側決定因子が存在しない領域にも局在するようになる。その結果、将来腹側となる予定であった領域が背側構造を形成し、頭部を二つ有する胚が形成される。この手法はシュペーマンオーガナイザー移植よりは簡便ではあるが、遠心処理をする際の角度が非常に重要で胚をゼラチンに包埋する必要がある、遠心分離機を用いる必要もある。そのため条件③を満たす

には、さらに簡便な方法の開発が必要であると考えられた。

本研究では、まず、生物学の単元のうち発生がどの程度好きまたは得意と感じられているかを調査して発生学の興味喚起の必要性を確認するため、高等学校で生物学を選択している学生を対象に行ったアンケート調査の結果を示す。続いて、発生に対する興味喚起を目的とした教材として(1)塩化リチウム添加による背側化誘導現象を利用した教材開発に向けた条件検討、(2)教材化を目的とした簡便な遠心処理による二次軸誘導実験、(3)振とう処理が初期発生過程における形態形成に与える影響、の3つの研究結果について述べる。

## 2. 方法

### 2.1. 高校生物に関するアンケート調査

静岡県の私立高校二校と兵庫県の公立高校一校に依頼し、理系生物を履修した高校三年生を対象にしたアンケート調査を行った。アンケートは生物の教科書の単元を、「細胞と分子、代謝、遺伝情報の発現、有性生殖、動植物の発生、動物の反応と行動、植物の環境応答、個体群と生物群集、生態系、生物の進化とその仕組み、生物の系統」の11項目に分け、好き/得意な単元と嫌い苦手な単元をそれぞれ一位から三位まで選択した後、好きあるいは得意な理由について、「ア. 簡単であるから、イ. 覚えるものが少ないから、ウ. 身近なものだと感じることができるから、エ. その分野に関して興味があるから、オ. その他」から選択し、嫌いあるいは苦手な理由について、「カ. 複雑であるから、キ. 覚えるものが多いから、ク. 身近なものだと感じることができないから、ケ. その分野に関して興味がないから、コ. その他」から選択する形式で行った。

### 2.2. アフリカツメガエルの取り扱い

アフリカツメガエルの飼養方法および本研究で行ったすべての実験は静岡大学動物実験委員会にて審査を受けて承認され、本学の定める指針に従って実施した。

### 2.3. 人工授精

実験に用いたアフリカツメガエルの未受精卵は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(持田製薬株式会社)を皮下に600単位注射し、22-23℃に保った水槽で飼育したメスのカエルから得た。精子はオスのアフリカツメガエルから摘出した精巣を細かく切り刻み、1×スタインバーグ氏溶液(58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.83 mM MgSO<sub>4</sub>, 3.0 mM HEPES, pH 7.4)に懸濁して用いた。3% L-システイン水溶液(pH 7.8)により受精卵のゼリー層を溶解させた後、汲み置き水で培養した。

### 2.4. 塩化リチウム処理

汲み置き水に塩化リチウム(Wako)を、1.2, 12, 60, 120, 240, 480 mM となるように調整した。1.2, 12, 60, 120 mM では15または30分間、120, 240, 480 mM では30, 60, 120分間処理して実体顕微鏡によりツメガエル胚を観察した。背側化の強度はDorso-anterior Index (DAI)スコア<sup>1)</sup>を用いて評価した(図2)。

### 2.5. 遠心処理

受精後 24 分に受精卵の動物極を上を保ちながら、飼育水は入れずに 50 ml チューブの側面に沿うように置き、毎分 600 回転で 4 分間遠心処理した。遠心処理後は通常の重力下で飼育を行い、受精後 60 分で脱ゼリーを行った。

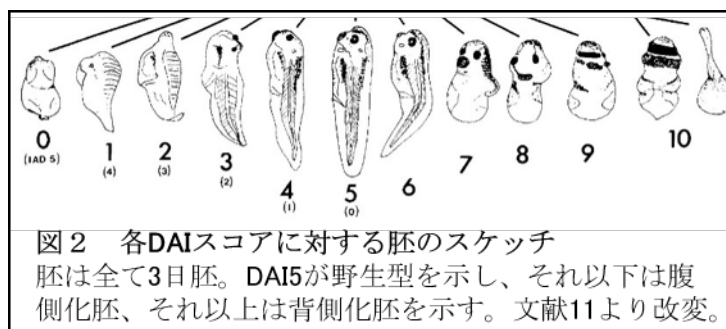


図2 各DAIスコアに対する胚のスケッチ

胚は全て3日胚。DAI5が野生型を示し、それ以下は腹側化胚、それ以上は背側化胚を示す。文献11より改変。

## 2.6. 振とう処理

受精後約 1 時間で脱ゼリーを行い、脱ゼリー後の胚を 6 cm シャーレまたは 96 穴プレートに胚を入れ、卵割開始後すぐに波動式振とう機(アズワン)を用いて振とう処理を行った。飼育は室温または 16 °C に保たれたインキュベーター内で行った。振とうは継続して行い、受精後 24 時間と 48 時間で胚の発生段階を観察した。

## 3. 結果

### 3.1 高校生物に関するアンケート調査

高校生が発生の学対してどのような印象を持っているか、静岡県の私立高校二校 (A 校、B 校) と兵庫県の公立高校一校 (C 校) でアンケート調査を行った。発生学が好きまたは得意と答えた高校生の割合の順位は A 高等学校では 11 項目中 8 位、B 高等学校では 11 項目中 9 位、C 高等学校では 11 項目中 7 位であり、3 校の割合を合計した場合は 9 位であった。一方、発生学が嫌いまたは苦手と答えた高校生の割合の順位は A 高等学校では 11 項目中 4 位、B 高等学校では 11 項目中 7 位、C 高等学校では 11 項目中 2 位、合計すると 4 位であった(表 1)。好き/得意、嫌い/苦手と回答した理由についても調査し、発生学を好きあるいは得意である理由について 3 校で合計 48 票の回答があり、最も多く選ばれたのが「その分野に関して興味があるから」であり、23 票 (47.9%) を集めた。一方、発生学が嫌いあるいは苦手である理由については 3 校で合計 85 の回答が得られ、「複雑であるから」(36 票、42.4%) が 40%以上を占め最多であった。以上のことから、発生の学対は苦手意識を持っている高校生が多く、その理由は単元の内容または発生過程そのものが複雑であるからであり、好きになるためには発生学に興味を持てることが重要であると結論付けた。

### 3.2 塩化リチウム処理

#### 3.2.1 処理する時期

高効率で背側化できる処理濃度、処理時間、処理時期を検討するために、まずは処理時期を検討した。処理濃度は 120 mM、処理時間は 30 分で統一し、処理時期を 2、4、8、16、32 細胞期、初期胞胚期の条件に分け検討した。その結果、32 細胞期で背側化した胚が全体の約 50% であり、最も多く観察された(図 3 A)。そのためこれ以降の処理濃度と処理時間の検討では、処理時期を 32 細胞期で行うこととした。

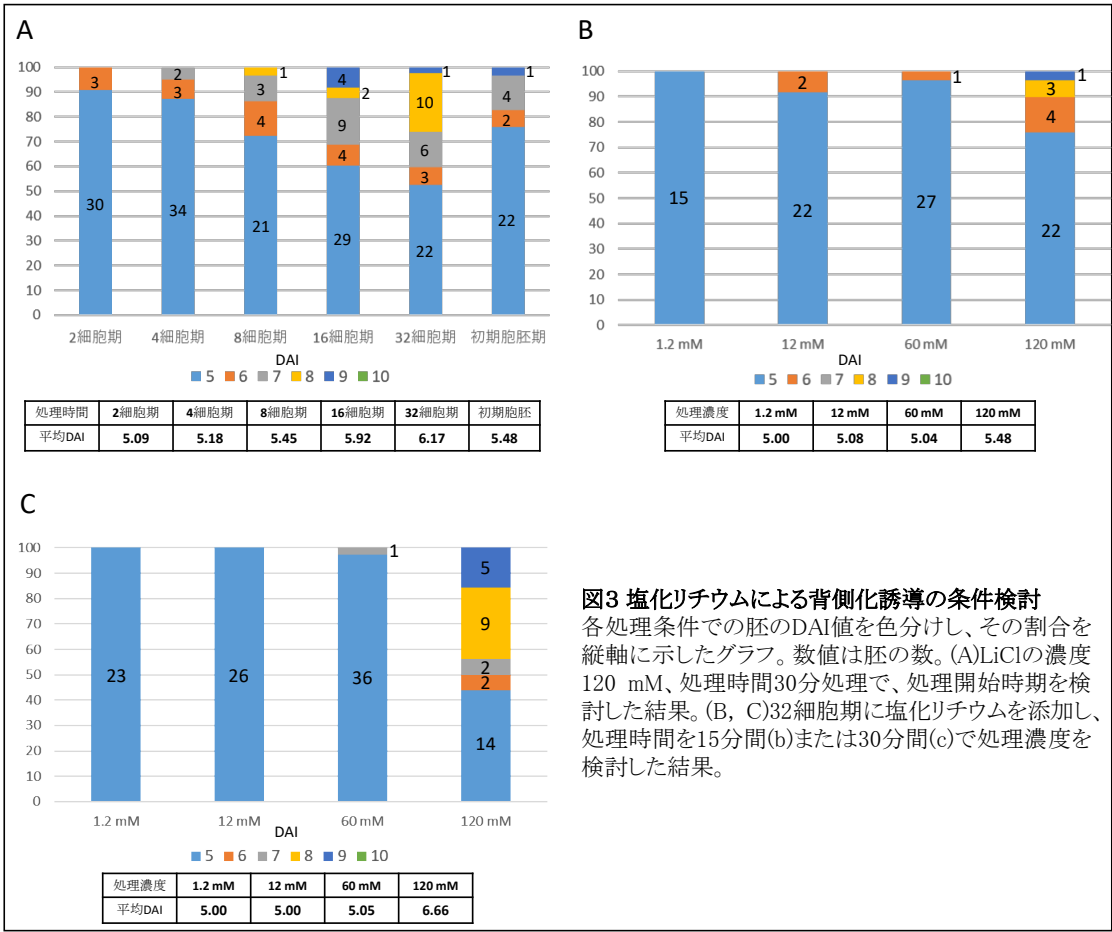
#### 3.2.2 120 mM よりも低い濃度では十分に背側化を誘導できない

次に処理濃度の検討を行った。3.2.1 より 32 細胞期で塩化リチウムを添加し、処理時間を 15

好き/得意と答えた単元									
A高校			B高校			C高校			合計
順位		% 人数	順位		% 人数	順位		% 人数	順位
1	生態系	15.2 78	1	生態系	16.6 45	1	遺伝情報の発現	13.5 15	1
2	動物の反応と行動	14.2 73	2	生物の進化とその仕組み	15.9 43	2	細胞と分子	12.6 14	2
3	生物の進化とその仕組み	12.7 65	3	動物の反応と行動	12.2 33	3	動物の反応と行動	10.8 12	3
4	細胞と分子	10.9 56	4	細胞と分子	10.0 27	3	植物の環境応答	10.8 12	4
5	代謝	10.5 54	4	生物の系統	10.0 27	3	個体群と生物群集	10.8 12	5
6	遺伝情報の発現	10.1 52	6	代謝	9.6 26	3	生物の進化とその仕組み	10.8 12	6
7	生物の系統	9.0 46	7	遺伝情報の発現	7.7 21	7	有性生殖	7.2 8	7
8	動物の発生	6.6 34	8	個体群と生物群集	5.5 15	7	生態系	7.2 8	8
9	個体群と生物群集	4.3 22	9	動物の発生	5.2 14	7	動物の発生	7.2 8	9
10	有性生殖	3.3 17	10	有性生殖	3.7 10	10	代謝	4.5 5	10
11	植物の環境応答	3.1 16	11	植物の環境応答	3.7 10	10	生物の系統	4.5 5	11
合計		100 513	合計		100 271	合計		100 111	

嫌い/苦手と答えた単元									
A高校			B高校			C高校			合計
順位		% 人数	順位		% 人数	順位		% 人数	順位
1	代謝	16.0 81	1	代謝	20.7 56	1	代謝	19.6 22	1
2	遺伝情報の発現	14.8 75	2	遺伝情報の発現	16.2 44	2	動物の発生	13.4 15	2
3	有性生殖	14.6 74	2	有性生殖	16.2 44	2	有性生殖	13.4 15	3
4	動物の発生	9.9 50	4	細胞と分子	12.2 33	4	動物の発生	11.6 13	4
5	細胞と分子	9.3 47	5	個体群と生物群集	6.3 17	4	生物の系統	11.6 13	5
6	個体群と生物群集	7.5 38	5	生物の系統	6.3 17	6	植物の環境応答	10.7 12	6
7	植物の環境応答	6.5 33	7	動物の発生	5.9 16	7	動物の反応と行動	6.3 7	7
8	動物の反応と行動	5.9 30	8	植物の環境応答	5.2 14	8	細胞と分子	6.3 7	8
9	生物の系統	5.5 28	9	生態系	4.4 12	8	生態系	3.6 4	9
10	生態系	5.3 27	10	生物の進化とその仕組み	4.1 11	8	生物の進化とその仕組み	3.6 4	10
11	生物の進化とその仕組み	4.5 23	11	動物の反応と行動	2.6 7	11	個体群と生物群集	2.7 3	11
合計		100 506	合計		100 271	合計		100 112	

表 1 単元別好き/嫌いについてのアンケート結果 合計の項の値は3校の%を合算したものの。



分に統一して処理濃度を 1.2, 12, 60, 120 mM の条件に分け検討した。その結果、1.2, 12, 60 mM では背側化した胚がほとんど見られなかったが、120 mM ではそれらの条件よりも多く背側化した胚を確認した(図 3 B)。

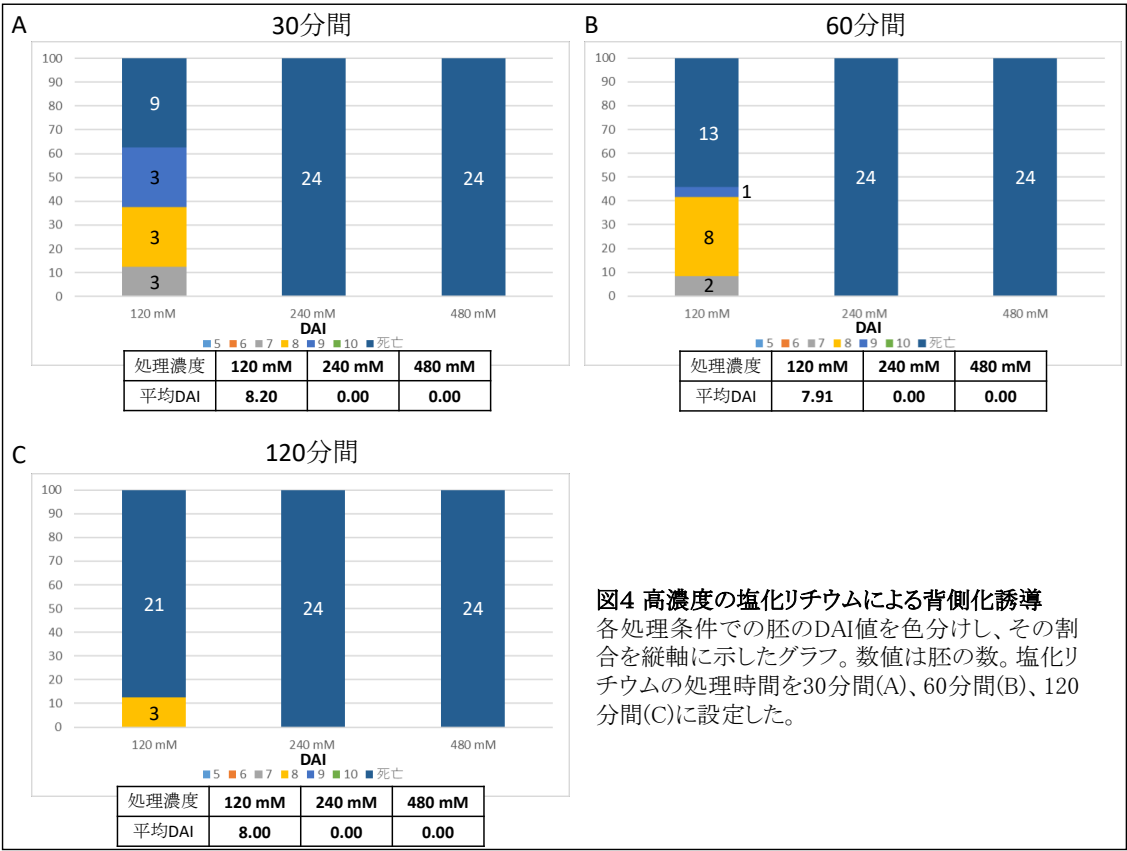
3.2.3 処理時間は 15 分よりも 30 分の方が効率よく背側化できる

処理時間を 15 分で統一した結果、120 mM 処理で最も背側化を促進したが、背側化した胚は全体の 20%程度であった。そのため、処理時間を 2 倍の 30 分に設定し、15 分処理と同様の条件で背側化を検討した。その結果、15 分処理では背側化した胚が 20%程度であったのに対し、30 分処理では 50%以上観察できた(図 3 C)。

3.2.4 120 mM よりも高い濃度での塩化リチウム処理は致死濃度である

120 mM よりも低い濃度での塩化リチウム処理では、背側化をほとんど誘導できなかった。また、15 分間の処理では 30 分間の処理に比べて、背側化を誘導できた個体は少なかったことから、濃度を 120 mM よりも高く、処理時間を 30 分よりも長くすることでより効率よく背側化できる条件を検討した。その結果、240 mM や 480 mM で処理した場合、全ての胚が死ぬことが分かった。すなわち、240 mM 以上の高濃度処理は致死量だと考えられる。120 mM 処理では 30 分、60 分、120 分のそれぞれの処理時間で背側化を誘導することができたが、30 分間の処理で死亡した個体が最も少なく、背側化した個体が最も多いという結果が得られた (図 4)。以上の結果より、塩化リチウム処理の最適条件は、32 細胞期に 30 分間、120 mM の濃度であるとし

た。



3.3 遠心処理

続いて、二次軸胚の教材化に向け遠心処理による二次軸誘導の方法<sup>10)</sup>をさらに簡便にすべく条件検討を行った。Blackらは、遠心力を胚に一定の角度でかけるため、ゼラチンに胚を包埋して角度を厳密に調整し遠心処理を行っていたが、本研究ではゼリーの除去を行っていない初期胚を50 ml チューブの壁に、胚の動物極を上になるように置き、遠心処理を行った。その結果完全な頭部構造は形成されていないものの、異所的な胴尾部構造を有する部分的な二次軸を誘導できた(図5、矢印)。



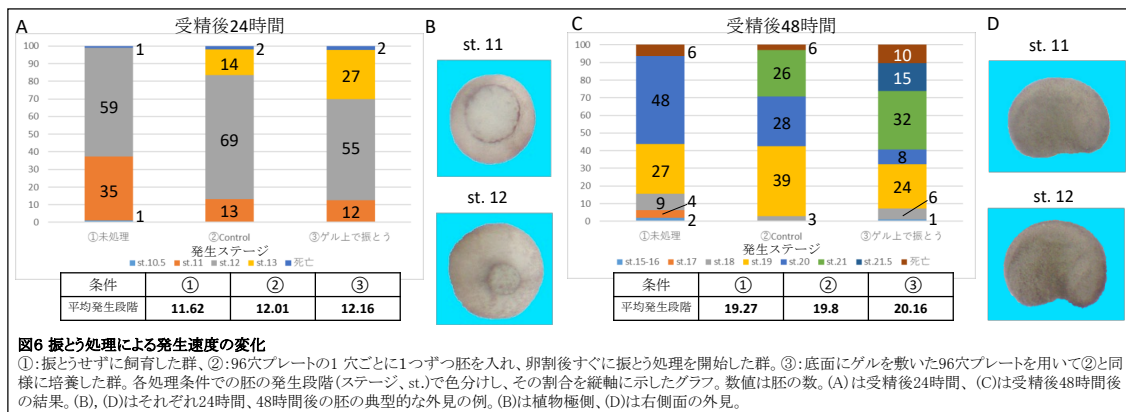
**図5 遠心処理によって形成された二次軸胚**  
矢印に示した部分が形成された二次軸である。遠心処理をする際に、ゼラチン包埋をせずに二次軸の形成に成功した。

3.4 振とう処理

背側決定因子の局在を遠心力などにより変化させると二次軸を誘導することができることから、胚を振とうすることで背側決定因子の局在を変えることができるのではないかと予想し実験を行った。処理を終えた胚は96穴プレートの1wellにつき一個体に分け、発生過程を観察し

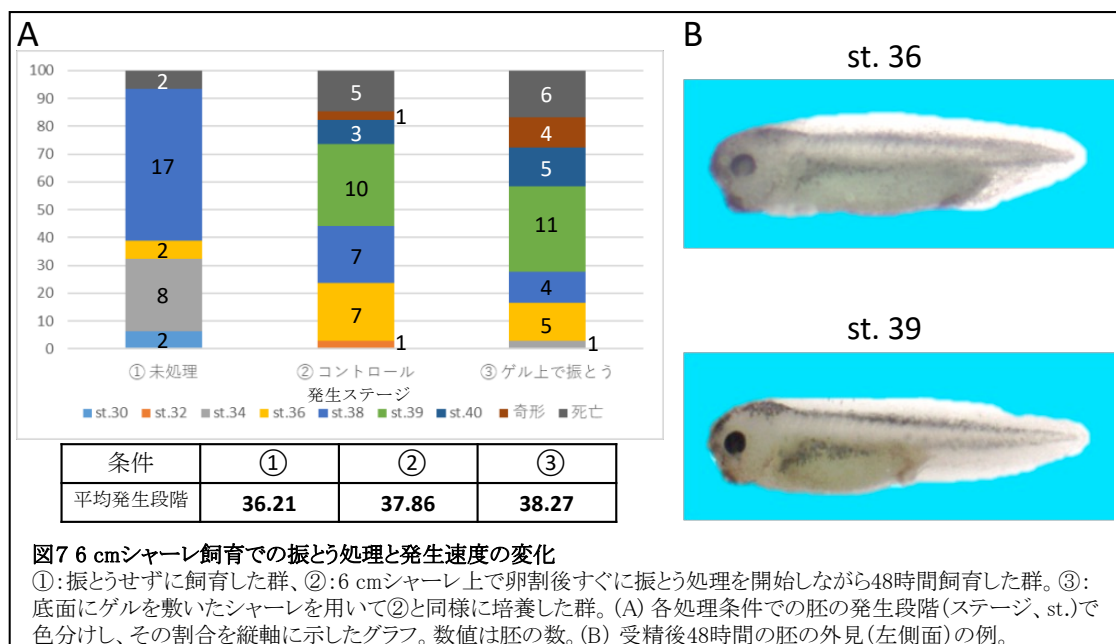


た。その結果、二次軸を誘導することはできなかったが、コントロール群と比べて発生の進行



が速くなることが観察された (図6)。我々が調査した限り、これまでに振とう処理が発生過程を速めるという報告はなく、この結果は発生学に対する興味を引き付けることができる新たな発見であると考えている。

振とう処理による発生速度の上昇をさらに大きくすることを目的として実験条件を様々に検討した。96穴プレートでの胚を培養した場合、振とうの強さを大きくしても水面の揺れが観察されず、また振とうの動きに合わせて胚が動く様子も観察されなかった。そこで胚の培養を6 cm シャーレに変更したところ、振とうに合わせて起こる水面と胚の動きが大きくなり、振とうの影響がより大きくなった。この条件で振とう培養を行った結果、受精から48時間後の観察では、コントロール群は未処理群に比べ、Nieuwkoop と Faber による発生段階表<sup>12)</sup>で比較すると平均で1.7ほど速くなっていた。アフリカツメガエルの発生は高温になると進行が早まることが知られている。6 cm シャーレに変更して振とう培養することでシャーレの底と胚の間に摩擦熱が生じ、その熱によって発生が速くなっている可能性が考えられた。そのため摩擦を減らすためにシャーレの底にアガーゲルを敷き、同様に振とう処理を行った。その結果、ゲル上で振とうした群は未処理よりも平均ステージが2ほど速くなっており、ゲルがない場合よりもむしろ



る進行が早まっていた (図7)。

#### 4. 考察

我々は高校生物における発生学の単元において、興味を引き付けることができるような教材として、塩化リチウム処理による胚の背側化と背側決定因子の局在変化による二次軸の誘導の二つの知見を用いた教材の開発を目指した。これは、発生の単元を苦手とする生徒が多い一方で、発生を好きまたは得意とする学生は身近で興味ある現象と捉えているとするアンケート調査結果からも支持されると考えられる。塩化リチウム処理による背側化誘導実験では、32 細胞期に 120 mM で 30 分間の処理が最も効率よく背側化を誘導できた。二次軸の形成については、受精後 24 分で 4 分間毎分 600 回転の遠心処理により頻度は少ないが二次軸の形成が起こることが明らかとなった。背側決定因子の局在を変化させることを目的に行った振とう処理では、二次軸の誘導はできなかったものの、振とう処理をすることで発生が速くなるという新たな知見が得られた。以下に 1) 塩化リチウム処理の条件について、2) 効率の良い二次軸誘導の方法と条件について、3) 効率の良い振とう処理の条件について考察し、最後にこれら変異型オタマジャクシの教材としての具体的な使い方について考察する。

##### 4.1 塩化リチウム処理による背側化について

本研究で適切と判断した条件は、処理する時期、1986 年の Kao らの報告<sup>7)</sup>と一致していた。すなわち、カエルの飼育条件や温度や密度などの受精卵の培養条件が多少異なっても、上記の条件が効率的に背側化を誘導することが示唆され、国内での様々な教育現場で行っても良好な結果が得られることが期待される。本研究では塩化リチウム処理を行った胚の 5 割以上は背側化できた (図3, 4)。アフリカツメガエルは一度の採卵で通常 500-2000 個の受精卵を得ることができるため、そのうち背側化胚を 5 割以上作製できればとすると、クラスまたは学年全員に十分に背側化胚を配布することができるであろう。すなわち、高等学校でも十分教材として利用できると考えられる。

##### 4.2 遠心処理による二次軸の誘導について

二次軸を形成する方法として、胚に遠心力をかけて背側決定因子の局在を変化させる方法が知られている<sup>10)</sup>。Black らは、遠心力をかける角度を固定するために胚をゼラチンに包埋して実験を行った。しかし学校現場で用いる場合はゼラチンに包埋する過程は煩雑であり容易には行えない。一方、卵を保護するゼリー層は観察の妨げとなるため、システイン溶液などで溶解させることが多い。Black らの方法も同様であり、本研究でも当初はゼリー層除去後の受精卵を用いて、遠心速度や処理時間、処理する卵の時期などを検討したが二次軸の誘導には至らなかった。そこでゼリー層を取り除かずゼラチンの代わりとした結果、二次軸の誘導に成功した。50 ml チューブの内壁に比較的安定して付着することができたためゼリー層がゼラチンと同様に遠心処理によるダメージを吸収し、致命的な影響を卵に与えることなく背側決定因子の局在を変えさせたと考えられる。ただし、高率に二次軸を誘導できる Black らとは異なり、本研究では一定の角度で胚を固定できておらず誘導率は低かった。ゼリー層の粘性が高いために操作しづらく、適切な角度で 50ml チューブに卵をゼリー層ごと付着させることが難しいことが原因として考えられる。今後、付着の方法をさらに検討することにより二次軸誘導の効率化

ができれば、教材として用いることができるようになることを期待している。

この実験には遠心分離機が必要であるが、遠心分離機が設置されている高等学校はあまり多くなく、精密な遠心分離機は高価であるため、一般的な高等学校でこの方法を用いることは困難であると考えられる。そのためレタスなどの水切りに用いるサラダスピナーなど身近な道具で遠心分離機の代替ができれば、より多くの教育現場で簡易的に二次軸誘導を行うことができるであろう。

#### 4.3 振とう処理が発生現象に与える影響について

本研究では、遠心処理以外の方法による二次軸の誘導方法を模索する中で、振とう処理が胚発生を速めることを見出した。96 穴プレートと 6 cm シャーレとで比較すると、96 穴プレートの方は振とう中に水面はほとんど動いておらず、また胚もほとんど動くことはなかった。一方で 6 cm シャーレの方は水面が大きく畝っており、胚がシャーレの底を転がるように動いていた。6 cm シャーレで振とう処理を行った時のほうが未処理群と振とう群の発生速度の差が大きくなったことから、水の動きと、シャーレ内での胚の動きの激しさが発生速度の差を大きくする要因の一つと考えられる。

なお、振とう処理により発生過程が何分くらい速くなったかを発生段階表<sup>12)</sup>を用いて換算すると、96 穴プレートの場合、受精後 24 時間の観察では、未処理胚に比べ振とう群においては 20℃で 32.4 分から 47.4 分発生がはやくなり、受精後 48 時間の観察では未処理胚に比べ振とう群は発生が 31.8 分から 58.2 分速くなった。6cm シャーレの場合、寒天なし 126 分、寒天ありの場合で 156 分発生が速くなっていることになる。

振とうによって発生速度が上昇することについては、本研究で明らかとなった新たな知見である。なぜ振とうによって発生速度が上昇するのかについての分子メカニズムについては本研究では検討していないが、発生速度が上昇する理由として、振とうによるメカニカルストレスによる細胞周期の活性化が考えられる。心臓の発生過程でもメカニカルストレスの存在が重要であるということが近年明らかとなってきた<sup>13)</sup>。心臓の初期発生に起こる心臓原基のループ形成は血管内に生じるずり応力が重要だとされており、このずり応力により心筋細胞分化に重要な因子である内皮型 NO 合成酵素やエンドセリン 1 などが増減する<sup>14)</sup>。初期発生過程においても振とう処理によって生じるメカニカルストレスなどの影響が細胞周期の進行を加速させ、発生を進行を速めた可能性が考えられる。

#### 4.4. 魅力ある教材とするために

本研究では、塩化リチウムや遠心処理、さらには振とう処理によって、背側化胚や二次軸胚の誘導、さらに発生速度の変更が可能であることを示した。最後に、これらをどのように教材として用いるか論じたい。

教材として発生単元の導入での使用を想定している。胚全体が背側、すなわち頭部と化し、腹部構造や後方構造が欠如した背側化胚や頭を二つ持つような二次軸胚は野生型とは形態が大きくなっており、大変衝撃的な形をしている。このような大きな異常が、塩化リチウムの添加や遠心力をかけること（極端に言えば、卵を振り回すこと）で生じてしまうことから、発生過程における形態形成が何と微妙なバランスの上に成り立っているのかを感じられるように指導したい。2015 年の根岩の発表では、生徒の生物多様性や共通性を理解することを目的に透明化

標本を授業中に生徒に作成させる授業実践を行っている。この授業を通して生徒は動物の体のつくりに対する理解と興味関心を高めることができたとしている<sup>15)</sup>。本研究によって開発した形態異常を誘導する教材においても、自分たちで誘導した背側化胚や二次軸胚を観察させることで、生徒に「奇妙な形だなあ」「なんでこんな形になるのだろう」「ちょっと気持ち悪いな」など何かしらの感情を抱かせながら、形態形成の謎に目を向けさせ、発生現象に対する興味・関心を高めるきっかけとしたい。まずは複雑な生命現象を解説するのではなく、発生の魅力と不思議さ、場合によってはグロテスクさも含めて感じてもらうことで、「発生学は複雑で面白くない」という印象から「発生学はすごく不思議で身近なものだから、複雑だけど勉強したい」という意識に変えることを目的としている。これらの胚を学校の実験室で、自分で実際に誘導することで、これらの胚に対する疑問や興味が深化する機会となることを期待している。

さらに、振とう処理を行うことで背側化胚や二次軸胚のような衝撃的な胚は形成されないが、目で見えてわかる程度の発生速度の差が表れることについても、生命現象の不思議さを感じてもらえるのではないかと考えられる。なぜかはまだ解明されていないが、揺らすだけで発生は早く進む。このことに興味をもってくれれば、桑実胚、胞胚、原腸胚と進行していく発生過程をただ暗記するだけでなく、その背景に力学的な影響をはじめとして細胞同士の様々な相互作用があることも実感できるのではないかと。

このような正常発生への介入はまた、学習指導要領にも記載されている科学的な探究活動にも使用できると考えられる。背景にも述べた通り、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路において、 $\beta$ -catenin は遺伝子調節タンパク質として作用して背側決定効果を発揮し、塩化リチウムは $\beta$ -catenin の活性を阻害する GSK3 $\beta$  を阻害することで背側化を引き起こす。そのため塩化リチウムは $\beta$ -catenin を活性化しているといえる。塩化リチウムは $\beta$ -catenin を活性化するという事実だけを与えて、胚に塩化リチウムを処理すると形態はどのようなになるのか、資料集を見ながら考察させて実際の実験を行わせる、ということも探究活動として考えられる。

発生の単元が複雑で好きではないという印象を与えてしまうのは、複雑な発生過程を普段見慣れない両生類を用いて理解させようとするのが原因の1つであるかもしれない。実際に両生類の正常発生を観察させることと並行して、本研究で示した異常胚を誘導することは、人間でも起こりうる奇形の紹介などとも併せて、発生過程を身近で興味深いものと感じてもらうための効果的な方法であると考えている。さらに本研究では、振とう処理が発生の進行を速めるという実験発生学的に新たな知見も見出した。複雑な仕組みで進んでいく発生過程において、簡単な介入でその後の形態形成に影響を与えることはこれからも発見されていくであろう。倫理的な配慮は当然必要であるが、本研究のように胚を様々な条件下においてその影響を検討するといった簡単な実験発生学を行う機会を設けることも、発生過程、ひいては生命そのものに興味を持つために効果的な方法であると考えられる。

## 5. 謝辞

研究に対して有益な意見を下さった岩本莉奈さん(静岡大学創造科学技術大学院)、前田久留実さん(静岡大学大学院教育学研究科)、アンケートにご協力いただいた3校の教員および生徒の皆様に深く感謝を申し上げます。

## 参考文献

1. 長沼 祥太郎 理科離れの動向に関する一考察 科学教育研究 Vol. 39 No. 2 (2015) p. 114-123
2. 文部科学省, 学習指導要領解説理科編 2018
3. 改訂版 生物 数研出版 2014
4. Miller JR, Rowning BA, Larabell CA, Yang-Snyder JA, Bates RL, Moon RT. *Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation.* J Cell Biol. 146 (1999) 427-437.
5. Tao Q, Yokota C, Puck H, Kofron M, Birsoy B, Yan D, Asashima M, Wylie CC, Lin X, Heasman J, *Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos.* Cell. 120 (2005) 857-871.
6. Sokol S, *Wnt signaling and dorso-ventral axis specification in vertebrates.* Current Opinion in Genetics & Development 9 (1999) 405-410
7. Kao K, Masui Y, Elinson R. *Lithium-induced respecification of pattern in Xenopus laevis.* Nature 322 (1986) 371-372
8. Klein PS, Melton DA. *A molecular mechanism for the effect of lithium on development.* Proc Natl Acad Sci U S A. 93 (1996) 8455-9.
9. Robertis EM and Kuroda H. *Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos.* Annu Rev Cell Dev Biol. 20 (2004) 285-308.
10. Black S, Gerhart J. *High-Frequency Twinning of Xenopus laevis Embryos from Eggs Centrifuged before First Cleavage.* Dev. Biol. 116 (1986) 228-240
11. Kao K, Elinson R, *The entire mesodermal mantle behaves as Spemann' organizer in dorsoanterior enhanced Xenopus laevis embryos.* Dev. Bio. 127 (1988) 64-77
12. Nieuwkoop and Faber *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin).* Garland Publishing Inc, New York (1994) ISBN 0-8153-1896-0.
13. 八木宏樹, 赤澤宏. メカニカルストレス応答, 心臓 47 (2015) 1372-1378
14. Blanca W, Groenendijk P, Adriana C, Gittenberger G, Robert P. *Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular*

*system of chicken embryos*. Dev. Dyn. 230 (2004) 57-68

15. 根岩直希, 高等学校における魚類の骨格標本の作製の授業実践とその教育効果の検討, 日本理科教育学会全国大会要項 65 (2015) 548

16. Sanjuan I, Brivanlou A. *Early posterior/ventral fate specification in the vertebrate embryo*. Dev. Biol. 237 (2001) 1-17

17. Ishibashi H, Matsumura N, Hanafusa H, Matsumoto K, Robertis E, Kuroda H. *Expression of siamois and twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in Xenopus laevis embryos*. Mech. Dev. 125 (2008) 58-66