

高等学校生物におけるマイクロスケール実験の実践

－酵素反応への適用－

Practical Lessons on Microscale Experiments in High School Biology Class

－ Application for Enzymatic Reactions －

大西 伸弥^{a)}, 中川 徹夫^{b)}
OHNISHI Shinya^{a)}, NAKAGAWA Tetsuo^{b)}

a) 兵庫県立御影高等学校, 教諭

Hyogo Prefectural Mikage High School

s-ohnishi@hyogo-c.ed.jp

b) 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科, 教授

Department of Biosphere Sciences, School of Human Sciences, Kobe College

nakagawa@mail.kobe-c.ac.jp

キーワード: マイクロスケール実験, 生物実験, 酵素, 授業実践

Key words: microscale experiment, biology experiment, enzyme, practical lesson

1 はじめに

マイクロスケール実験には, 試薬の節約や廃液削減など多くの利点があり, 教育効果も高いといわれている¹⁾。高等学校理科においては, 化学分野を中心にマイクロスケール実験の教材開発や授業実践がなされ, その報告もされている¹⁾²⁾。一方, 生物分野においても実験で多くの試薬を使用することから, マイクロスケール実験に関する教材開発は有用である。しかしながら, これに関する報告は僅少である。現行の高等学校生物の教科書の中には, マイクロプレートを用いた実験を紹介しているものもある³⁾。しかし, 試験管で酵素反応させたのち, 色の比較をマイクロプレート上で行うという内容であり³⁾, 化学分野のマイクロプレートそのものを試験管の代用とする, 通常 of マイクロスケール実験とは大きく異なる。

本研究では, 高等学校生物で扱う酵素反応に注目して, マイクロスケール実験の有効性について検討した。今回は, 椎葉ら⁴⁾や宮田ら⁵⁾の先行研究を参考にして, 著者の一人である大西の勤務校の実態に合わせて実験方法などを改良し, 授業実践を実施した。その結果, マイクロスケール実験の有用性が認められたので, 報告する。

2 授業実践と方法

2-1 授業実践の日時と内容

授業実践は2019年10月上旬～11月中旬，兵庫県立H農業高等学校3年生の生物選択者17名を対象に行った。授業は1回が2時間連続（50分×2コマ）で，実験は3回実施した。1回目は「アミラーゼの活性測定」，2回目は「アミラーゼの活性比較」，3回目は「プロテアーゼの性質」という内容である。安全性の確保から，いずれも保護眼鏡を着用した。

2-2 器具と試薬

本授業実践で用いた器具と試薬は，以下のとおりである。

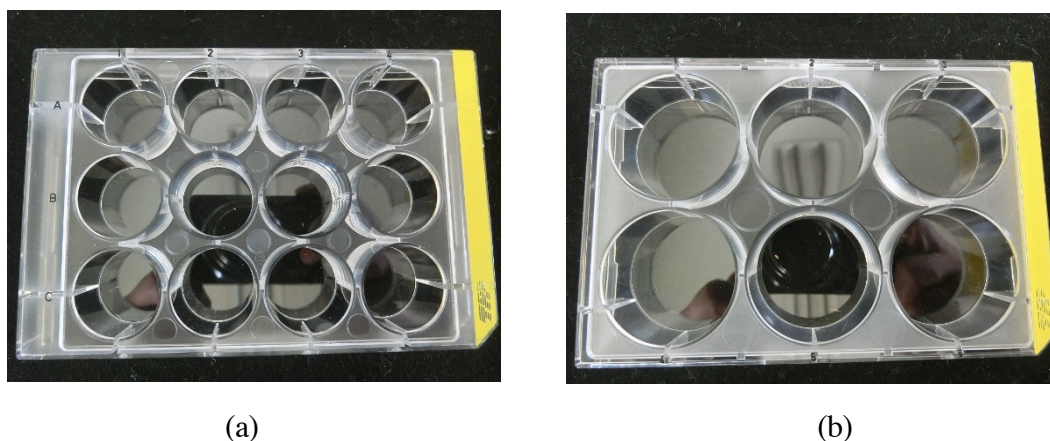
器具：6および12穴マイクロプレート，スポイト（1 mL），つまようじ，乳鉢，乳棒，ガーゼ，パスツールピペット，駒込ピペット，ビーカー，ガスバーナー

試薬：5%水酸化ナトリウム溶液（w/v），5%塩酸（v/v），蒸留水，ヨウ素液（イソジン20倍希釈（v/v）溶液），0.05%デンプン溶液（w/v），10%ゼラチン水溶液（w/v），5%寒天水溶液（w/v）

2-3 方法

アミラーゼに関する実験（「アミラーゼの活性測定」および「アミラーゼの活性比較」）は宮田ら³⁾の論文を「プロテアーゼの性質」は椎葉ら⁴⁾の論文を参考にした。いずれも，1人1枚のマイクロプレート（図1）を使用させた。

試薬は1 mLのスポイト（0.5 mLの目盛付き）を用いて各ウェルに加えさせた。また，実験中は誤操作を回避するために，大型モニターにマイクロプレート模式図（図2～4）を表示し，パワーポイントのアニメーション機能を利用して，加える試薬を順番に表示しながら，各ウェルに試薬を加えさせた。



(a)

(b)

図1 授業実践で使用したマイクロプレート

(a) 12穴 (b) 6穴 大きさはいずれも8.5×12.8×2 (cm)

2-3-1 アミラーゼの活性測定

授業の冒頭でマイクロスケール実験について説明し，アミラーゼについてプリントを用いて復習させた。また，生徒には事前に試薬調製に必要な計算をさせた。この時点で計算方法に誤りのある生徒については，ただしく計算できるように指導した。そして，生徒にはその結果に基づいて試薬を調製させた。

続いて，実験指導を実施した。アミラーゼを含む酵素液は各自のだ液を使用した。加熱酵素液は，だ液を 100℃で 10 分間煮沸したものを使用した。12 穴マイクロプレートに，だ液（酵素液），加熱酵素液，5 %水酸化ナトリウム溶液，5 %塩酸，蒸留水を図2のとおり 0.5 mL ずつ加えた。また C1 ウェルには蒸留水を 1 mL 加えた。そして，軽くプレートを揺すって混和した。0.05 %デンプン水溶液を各ウェルに 1 mL 加え，pH 試験紙を用いて各ウェルの pH を測定させた。5 分静置した後，ヨウ素液（イソジン 20 倍希釈溶液）をパスツールピペットで 2，3 滴（C1 に加えた量と同じ量）各ウェルに加え，軽くプレートを揺すって混和した後，プリントに色の変化を記入させた。

実験後，周囲の生徒と色の変化を比較させ，なぜそのような色の変化が起こったかについてディスカッションさせた。

	1	2	3	4
A	酵素液 蒸留水	酵素液 水酸化 ナトリウム	酵素液 塩酸	加熱酵素液 蒸留水
B				
C	蒸留水			

図2 各ウェル内の溶液の種類（「アミラーゼの活性測定」の場合）

2-3-2 アミラーゼの活性比較

この実験では，どの試料（ダイコン・ニンジン・キュウリ・サツマイモ）に含まれるアミラーゼ活性が高いと思うか，まず結果の予想をさせた。次に試料の調製をさせた。15 g の試料を乳鉢ですりつぶし，30 mL の蒸留水を加え，ガーゼでろ過したものを酵素液とした。そして，12 穴マイクロプレートに各酵素液を図3のとおり 0.5 mL ずつ加えた。この実験では再現性を重視したため，A 列と B 列へ同じ試料を加えさせた。また，C1 セルにはだ液を 0.5 mL 加えた。各ウェルに蒸留水を 1 mL ずつ加え，軽くプレートを揺すって混和した。各ウェルに 0.05 %デンプン溶液を 1 mL 加え，軽くプレートを揺すって混和した後，15 分間静置した。最後にヨウ素液をパスツールピペットで 2，3 滴（C2 に加えた量と同じ量）加えて色の変化を観察し，プリントに色の変化を記入させた。

実験後、周囲の生徒と色の変化を比較させ、得られた結果についてディスカッションさせた。そして、最後にアンケートを実施した。

	1	2	3	4
A	ダイコン	ニンジン	キュウリ	サツマイモ
B	ダイコン	ニンジン	キュウリ	サツマイモ
C	だ液	蒸留水		

図3 各ウェル内の溶液の種類（「アミラーゼの活性比較」の場合）

2-3-3 プロテアーゼの性質

授業の冒頭でプロテアーゼおよびゼリーと寒天の違いについて学習した。次に酵素溶液と基質溶液を調製させた。等量のキウイ、パイナップル（生）、パイナップル（缶詰）を乳鉢ですりつぶし、ガーゼでろ過したものを酵素液とした。また、加熱酵素液として、キウイ酵素液を一部取り、100°Cで10分間煮沸したものを用意した。

10%ゼラチン水溶液、5%寒天水溶液、酵素液、加熱酵素液、蒸留水を図4に示したように、2.5mLずつ、6穴マイクロプレートへ加えた。その後、冷蔵庫へ入れ、10分ごとに観察した。その際、ゼリーと寒天に市販のつまようじを刺して、その感触よりゲル状態に達したかどうかを判断した。

実験後、周囲の班と得られた結果に関してディスカッションさせた。

	1	2	3		1	2	3
A	ゼラチン 蒸留水	ゼラチン パイナップル (生)	ゼラチン パイナップル (缶詰)		ゼラチン 蒸留水	ゼラチン キウイ (生)	ゼラチン キウイ (加熱)
B	寒天 蒸留水	寒天 パイナップル (生)	寒天 パイナップル (缶詰)		寒天 蒸留水	寒天 キウイ (生)	寒天 キウイ (加熱)

(a)
(b)

図4 各ウェル内の溶液の種類（「プロテアーゼの活性測定」の場合）

(a) 試料：パイナップル（生）とパイナップル（缶詰）

(b) 試料：キウイ（生）と加熱したキウイ

2-4 アンケートの実施

実験およびディスカッション終了後に、アンケートを実施した（表 1）。「アミラーゼの活性測定」と「アミラーゼの活性比較」の実験後に1回目のアンケートを実施した。また、「プロテアーゼの性質」の実験後に2回目のアンケートを実施した。アンケートの項目は中川⁹⁾の文献を参考にした。

表1 アンケートの項目

質問項目	回答選択肢
1. これまでに（今回の講義・実習を受ける前に），マイクロスケール実験という言葉を知っていましたか。	ア．はい イ．いいえ
2. 今回のマイクロスケール実験は，どうでしたか	ア．とても楽しかった，イ．楽しかった，ウ．普通，エ．あまり楽しくなかった，オ．全く楽しくなかった
3. 今回のマイクロスケール実験の内容は，理解できましたか	ア．よく理解できた，イ．大体理解できた，ウ．半分程度理解できた，エ．あまり理解できなかった，オ．ほとんど理解できなかった
4. 今回のマイクロスケール実験の操作は，どうでしたか	ア．たいへん簡単だった，イ．簡単だった，ウ．普通，エ．やや難しかった，オ．たいへん難しかった
5. マイクロスケール実験の長所は，どこにあると思いますか	ア．実験時間の短縮，イ．試薬量の減少，ウ．廃液の減少，エ．操作が単純で簡単，オ．その他
6. 今回とは別の内容でも，機会があればマイクロスケール実験を行いたいですか	ア．是非行いたい，イ．行いたい，ウ．何ともいえない，エ．あまり行いたくない，オ．絶対に行いたくない
7. マイクロスケール実験を，高校生物の授業に取り入れることに対して，どのように思いますか	ア．是非取り入れてほしい，イ．取り入れてほしい，ウ．何ともいえない，エ．あまり取り入れてほしくない，オ．絶対に取り入れてほしくない

3 結果および考察

3-1 実験結果

3-1-1 アミラーゼの活性測定

アミラーゼの活性測定に関する生徒実験の結果を図5に示す。A1セルではヨウ素液の色調変化は認められずに茶褐色のままであったのに対して、これ以外のセルでは青紫色を呈した。生徒が行なった実験においても、同様の結果が得られた。すなわち、A1セルでは唾液中のアミラーゼによるデンプンの分解反応が円滑に進行したのに対して、A2, A3セルはアミラーゼの最適 pH ではないこと、A4セルはアミラーゼが熱変性により失活したことによって反応が進行しなかったと考えられる。

実験後のディスカッションにおいて、生徒からは「最適 pH」、「熱変性」、「失活」というキーワードを使用してディスカッションしている様子をうかがうことができた。

	1	2	3	4
A	変化なし (薄い黄色)	青紫色	青紫色	青紫色
B				
C	青紫色			

図5 「アミラーゼの活性測定」の結果

3-1-2 アミラーゼの活性比較

アミラーゼの活性比較に関する生徒実験の結果を図6に示す。C2（蒸留水＋デンプンのみ）セルと比較するとA1・B1セル（ダイコン）は明らかに青紫色が薄くなった。また、A2・B2セル（ニンジン）、A3・B3セル（キュウリ）も多少であるが青紫色は薄かった。A3・B3セル（サツマイモ）とC1セル（だ液）では薄い黄色を呈した。著者の1人である大西が予備実験を行ったときは、A1・B1セルとA2・B2セルも薄い黄色を呈したが、生徒実験ではそうはならなかった。おそらく、試料のすりつぶしが不十分であったことが原因であると考えられる。

その原因として、生徒からは「すりつぶしが不十分」、「試料の部位によってアミラーゼ量に違いがある」などという意見が出た。また、大半の生徒はA3・B3セルは青紫色になると予想していた。しかし、予想と大きく異なる結果が出たことから、生徒たちはその原因について活発にディスカッションをしていた。これに関しても、「サツマイモはアミラーゼ活性が高い」という意見や「店で売られているものは追熟しているため、アミラーゼがよく出ている」などといった農業高校生らしい意見も出た。

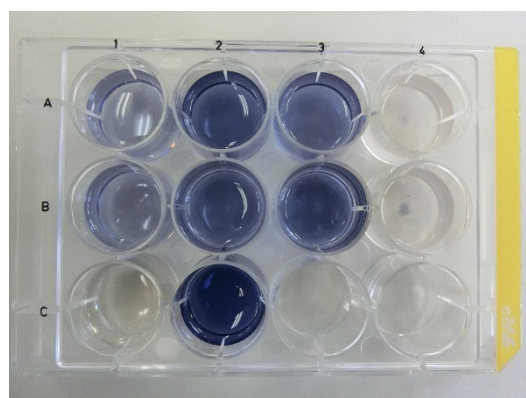


図6 「アミラーゼの活性比較」の結果

3-1-3 プロテアーゼの性質

プロテアーゼの性質に関する生徒実験の結果を図7に示す。ゼラチン・寒天の実験（図4 a および b）共にこのような結果となった。A2 セル以外は固化した。生徒は全員これと同様の結果となった。パイナップルとキウイを用いた両実験の A2 セルはそれぞれの試料由来のプロテアーゼによって、ゼラチンが分解されたと考えられる。また、プロテアーゼは基質特異性によって寒天を分解できないことから B2 セルでは寒天が固化したと考えられる。A3 セルでは酵素の熱変性によってプロテアーゼが失活したため、ゼラチンが固化したと考えられる。

実験後のディスカッションにおいて、生徒からは「基質特異性」、「熱変性」、「失活」というキーワードを使用してディスカッションしている様子をうかがうことができた。

	1	2	3
A	固化した	固化せず	固化した
B	固化した	固化した	固化した

図7 「プロテアーゼの性質」の結果

3-2 アンケート結果とディスカッションの実施

アンケート結果を表2に示す。表2で、質問項目1以外に関する数値は、2回のアンケート調査から得られた回答数の平均値を表している。また、質問項目1に関する数値は、今回の実験を行う以前に、マイクロスケールという言葉聞いた経験の有無を把握するために、1回目のアンケート結果の数値のみを示している。

表2 アンケート結果

質問項目	回答 (%)				
	ア	イ	ウ	エ	オ
1 *	0	100			
2	33.3	54.6	12.1	0	0
3	42.5	48.3	9.2	0	0
4	39.3	48.5	6.1	6.1	0
5	27.5	21.7	11.4	39.3	0
6	21.1	51.7	27.2	0	0
7	39.5	45.2	15.3	0	0

表2の結果より，以下の事実が明確となった。マイクロスケール実験という言葉は，全員が今まで聞いたことがなかったと回答した。そして，質問項目2に関して，「とても楽しかった」「楽しかった」と回答した生徒は，約88%であった。質問項目3に関して，「よく理解できた」「大体理解できた」と回答した生徒は，約91%であった。質問項目4に関して，「たいへん簡単だった」「簡単だった」と回答した生徒は，約88%であった。これらの結果より，今回の授業実践以前に，マイクロスケール実験に関する知見を全く有していなかった生徒にとっても，簡単に操作でき，理解しやすく満足度も高い実験であるといえる。

また，質問項目6に関して，「是非行いたい」「行いたい」と回答した生徒は，約73%であった。質問項目7に関して，「是非取り入れてほしい」「取り入れてほしい」と回答した生徒は，約85%であった。これらの結果は，今回の生徒実験を通して，多くの生徒がマイクロスケール実験に高い興味・関心を示したことを示唆している。

また，アンケートの自由記述欄には，「1枚のプレート内で色を比較できるので，結果の違いが一目でわかった。」，「初めて行う実験だったので少し不安だったけど，単純で分かりやすい操作だったのでやりやすく，理解がすぐできた。」，「自分が科学者になったかのような気分で楽しかった。」などというコメントが見られ，マイクロスケール実験の有効性をうかがえるような内容が多かった。しかし，一方で細かい作業が苦手な生徒もあり，そのような生徒からは「操作が細かくて難しかった」といったコメントが寄せられた。これに関しては，今後の検討課題としたい。

実験後，周囲の生徒とディスカッションさせたとき，生徒はマイクロプレートをお互い持ち寄って話をしていた。1枚のマイクロプレート内で色の比較ができ，お互いの結果が一目でわかるため，生徒たちはスムーズにディスカッションに入れていたように思われた。そして，今回の実験の場合，後片付けが短時間で終わるということもメリットである。また，持ち運びやすいマイクロプレートを実験で使用することは，生徒どうしでディスカッションをする場合に有効なツールとなる。

近年の教育活動では言語活動が重要視されており，高等学校学習指導要領でも「言語能力を育成する中核的な教科である国語科を要として各教科等において言語活動の充実を図る」とされている⁹⁾。特に理科では，「問題を見だし観察，実験などを計画する学習活動，観察，実験などの結果を分析し解釈する学習活動，科学的な概念を使用して考えたり説明したりする学習活動などが充実するようにすること」と記述されている⁹⁾。

以上のように，本研究の結果からマイクロスケール実験が生徒の意欲や理解向上にとって有効なツールであることが明確となった。また，言語活動の充実を実現する上で重要なツールとなることも示唆された。

本研究では，これまであまり研究されてこなかった高等学校生物分野で扱われる酵素反応に注目し，マイクロスケール実験教材の改良および授業実践を行い，その有効性を確認した。今後の高等学校生物分野におけるマイクロスケール実験の研究の進展に期待したい。

本研究の一部は，JSPS 科研費 JP17K00991 の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) 中川徹夫，「2009年度神戸女学院大学で高校生を対象に実施したマイクロスケール実験の授業実践」，神戸女学院大学論集，57(1)，pp.133-145 (2010)
- 2) 中川徹夫，中澤克行，「ルシャトリエの原理に関するマイクロスケール実験—教材開発と授業実践—」，神戸女学院大学論集，63(1)，pp.105-114 (2016)
- 3) 吉里勝利ほか，高等学校改訂生物，株式会社第一学習社，pp.56-59 (2020)
- 4) 椎葉昌美，土師麻里奈，久野香月，水野暢子，中川徹夫，「マイクロスケール実験を用いたキウイに含まれるタンパク質分解酵素の教材開発」，神戸女学院大学論集，58(2)，pp.79-86 (2011)
- 5) 宮田理恵，中川徹夫，「ウェルプレートを活用した酵素反応の教材開発と授業実践」，神戸女学院大学論集，62(2)，pp.153-161 (2015)
- 6) 文部科学省，高等学校学習指導要領（平成30年告示）解説総則編，株式会社東洋館出版社，pp.121-123 (2019)

参考資料 (授業で用いたプリント)

今回授業で扱った3種類の酵素反応のうちの代表例として、「アミラーゼの活性測定」の生徒実験プリントを以下に記す。

生物実験プリント

令和 年 月 日

アミラーゼの活性測定

目的: 酵素の性質に対する理解を深める。

準備物: 0.05%デンプン溶液, 5%水酸化ナトリウム水溶液, 5%塩酸, pH 試験紙, ヨウ素液 (イソジン 20 倍希釈液), 12 ハマルチップレート, 1mL スポイト, バスツールピペット, ストロー, 駒込ビベット

[0] 予備知識

A. マイクロスケール実験

実験規模について, 試薬などを大量に使用し, 工業的な規模で行う実験のことを (①) 実験という。試薬などを少量使用し, 実験室規模で小規模に行う実験のことを (②) 実験という。これらに対して, 必要最小限の試薬を使用し, 超小規模に行う実験のことを (③) 実験という。③の実験のメリットとして, 使用する試薬などが極少量で済むことがあげられる。また, 廃液が少なくなり, 環境に配慮できる。ただし, 専門的な器具がない高校などで実施する場合は (④) 的な実験がメインとなる。 (⑤) 的な実験は少し難しい。

B. アミラーゼについて

アミラーゼは人体では主に (⑥) に含まれている消化酵素である。アミラーゼの (⑦) はデンプン (アミロース) であり, これを (⑧) に分解する。酵素の主成分は (⑨) である。このため, 最適温度や最適 pH があり, この範囲を外れると活性が低下する。ちなみにアミラーゼの最適温度は約 (⑩) °C で最適 pH は約 (⑪) である。酵素がその働きを失うことを (⑫) という。アミラーゼを多く含む植物は (⑬) や (⑭), (⑮) である。

[1] 方法

A. 試薬の調整

a. 0.05%デンプン溶液の調整

1. デンプン (①) g を計り, 少量のお湯に溶かす。
2. メスシリンダーに移して (②) mL にメスアップする。

1

b. 5%水酸化ナトリウム水溶液の調整

1. 水酸化ナトリウム (③) g を計り, 少量の水に溶かす。
2. メスシリンダーに移して (④) mL にメスアップする。

c. 5%塩酸の調整

1. 塩酸 (⑤) mL を駒込ビベットで計る。
2. メスシリンダーに入れ, (⑥) mL にメスアップする。

d. ヨウ素液の調整

1. イソジン (⑦) mL を駒込ビベットで計る。
2. メスシリンダーに入れ, (⑧) mL にメスアップする。

B. 実験手順

1. ストローを使用し, C4 セルに唾液を入れる。(これを酵素液とする)
2. A1~3セルに酵素液 0.5mL を入れる。
* スポイトのメモリをよく見る。泡が混入しないよう注意すること。
3. A4セルに加熱酵素液 0.5mL を入れる * 前のテーブルに用意してある
4. A2セルに水酸化ナトリウム水溶液 0.5mL, A3セルに塩酸 0.5mL, A1と4セルに蒸留水 0.5mL を加える。
5. C1セルに 1mL 蒸留水を加える。
6. A1~4とC1セルにデンプン溶液を 1mL 加えて軽く振盪し, 5分間静置する。
7. C1セルにヨウ素液をバスツールピペットで2滴加える。
(色が変化しない場合はヨウ素液を追加する。ただし, 何滴入れたか覚えておくこと)
8. 7で加えた量と同じヨウ素液を各セルに加える。

	1	2	3	4
A	蒸留水 0.5mL	酵素液 水酸化ナトリウム 0.5mL	酵素液 塩酸 0.5mL	加熱酵素液 0.5mL
B				
C	蒸留水			塩酸

2

[2] 結果 (部位の名称とスケッチ)

	1	2	3	4
A				
B				
C				

[3] 考察

[4] 感想

3年	組	番	氏名
----	---	---	----

3