

原著論文

中学校・高等学校での酵母を使った 理科実験プロトコールの検討

竹内知子・手呂内伸之
大妻女子大学短期大学部家政科

A Consideration on Methods for a Scientific Experiment in Junior High Schools and High Schools

Tomoko Takeuchi and Nobuyuki Terouchi

Key Words: 理科実験, 酵母, 培養, 中学校, 高等学校

要旨

中学校・高等学校の理科では、観察・実験の結果を考察し表現するなどの学習活動が重視されている¹⁾。本研究では、中学校・高等学校の教科書の内容に添い、酵母の培養と観察を行なうプロトコールを作成した。実験方法は、著者の研究室で行なっている方法²⁾をベースとし、なるべく簡便に実験を行なえるよう、使用する器具や実験方法について工夫した。

はじめに

中学校理科の教科書第2分野の単元「生物と細胞」「生物の成長と殖え方」、高等学校生物基礎の教科書の単元「生物と遺伝子」に関連する実験として、酵母を用いた簡単な培養実験のプロトコールの作成を試みた。また、本実験では直接にはテーマとして取り扱わないが、高等学校生物の教科書では、アルコール発酵を行なう生物として酵母が登場する他、バイオテクノロジーに利用される生物として酵母を載せている教科書³⁾もある。したがって、高等学校生物への導入として本実験を行ない、酵母を実際に扱っておくこともよい。

酵母の純粋培養には、無菌操作が必要となる。無菌操作は、クリーンベンチ内での作業が理想的であるが、生徒全員にクリーンベンチを使用させるための台数を確保するのは困難である。そこで、本プロトコールでは、ガスバーナーの上昇気流の下で作業することで、無菌操作を簡便に行なうこととした。

顕微鏡を用いて酵母を観察する方法は、中学校理科の教科書にでてくる微小生物の観察法と関連する。

材料

1) 器具

オートクレーブ
恒温振とう培養機*¹
光学顕微鏡
ガスバーナー
氷箱および氷
キムワイプ
プレート (滅菌済み)
巴斯ツールピペット (滅菌済み) (図 1A)
アルミホイル (図 1B)
100 ml 三角フラスコ (図 1C)
つまようじ (滅菌済み) (図 1D)
70% エタノール (図 1E)
50 ml コニカルチューブ (滅菌済み)*² (図 1F)
1.5 ml チューブ (滅菌済み) (図 1G)
血球計算盤 (図 1H)

2) 酵母株

Saccharomyces cerevisiae NBRC No. 10217

独立行政法人製品評価技術基盤機構の NITE Biological Resource Center (NBRC) に分譲を依頼して上記株を購入した。NBRC のプロトコールに従い、ガラスアンプル内の乾燥標品を復元した。ただし、復水液および復元培地は簡易なものに変更し、復水

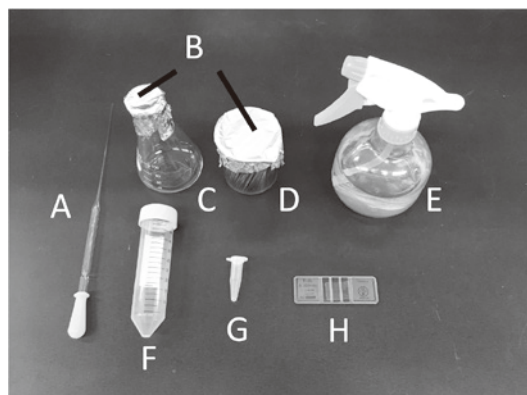


図 1 実験に使った器具の一部

実験器具として図の A～H (本文を参照) 等を用いた。

液は YPD 液体培地、復元培地は YPD 寒天培地を用いた。

3) 培地

- ・ YPD 液体培地
- 2% Glucose
- 2% Polypeptone
- 1% Yeast extract

上記試薬を各濃度になるように蒸留水に溶かし、オートクレーブにより滅菌した。

- ・ YPD 寒天培地

YPD 液体培地の試薬を蒸留水に溶かした後、寒天粉末を最終濃度が 2% になるように加え、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、ガスバーナーの下で滅菌済みのプレートに注ぎ、しばらく室温に置いて固まらせた。

実験例および結果

[1] 実験方法

雑菌の混入を防ぎ、酵母を純粋培養するために、操作はすべて、可能な限り無風状態で行なった。また、適宜、実験台や手を 70% エタノールで消毒しながら行なった。ただし、70% エタノールをガスバーナーに近づけないように注意した。

1 日目：前培養

1) 滅菌した 50 ml コニカルチューブに、滅菌したパスツールピペットを使って、ガスバーナーの下で約 3 ml の YPD 液体培地を入れた。

2) ガスバーナーの下で、滅菌済みのつまようじを使って YPD 寒天培地から酵母株を少量掻き取り、

チューブ内の YPD 液体培地に懸濁し、26℃*3 で一晚培養した (前培養)。培養には恒温振とう培養機を用いたが、恒温振とう培養機がない場合は、振とう機能のない恒温機でも代用できる。

3) 100 ml 三角フラスコに YPD 液体培地 20 ml 分の試薬を入れ、蒸留水で溶かし、オートクレーブで滅菌した。

2 日目：本培養および観察

1) 一晚培養した培養液 (前培養液) を、よく懸濁した。滅菌したパスツールピペットを用いて、ガスバーナーの下で、前培養液を 1 滴、三角フラスコ内の YPD 液体培地に加えた。

2) 培養液の入った三角フラスコを 26℃*3 で振とう培養した (本培養)。恒温振とう培養機がない場合は、恒温機を用い、ときどき振りまぜるとよい。

3) 2 時間おきに、ガスバーナーの下でパスツールピペットを用いてサンプルを数滴ずつ回収し、滅菌した 1.5 ml チューブに入れた。サンプルの入った 1.5 ml チューブは、すぐに氷上に置き、酵母の増殖を止めた。

4) 氷上の 1.5 ml チューブから、パスツールピ

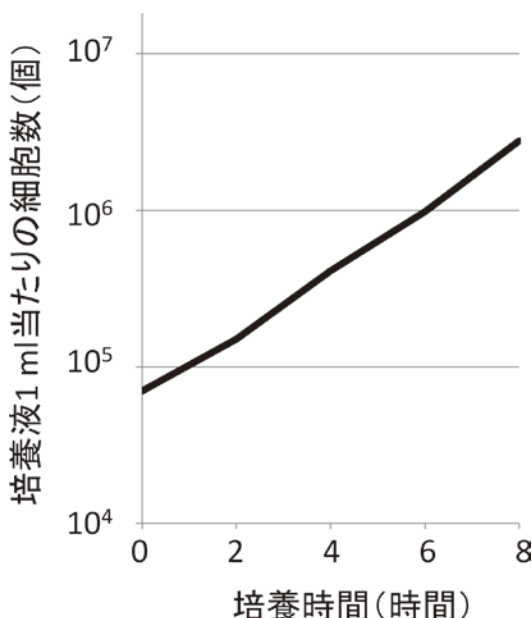


図 2 酵母の増殖

酵母を一晚培養した前培養液 1 滴を、新しい 20 ml の YPD 培地に加えた時間を 0 時間とした。26℃ で培養しながら 2 時間おきにサンプリングして、培養液中の細胞濃度を計数した。

ペットを用いて、サンプルを一滴、血球計算盤にのせた。カバーガラスをかぶせ、接着面に虹色が観察できるまで、カバーガラスを血球計算盤にしっかり接着させた。光学顕微鏡（接眼レンズ10倍、対物レンズ40倍）を用いて、血球計算盤上のマス内の細胞数を数えた*4。血球計算盤の仕様に従って、培養液1ml当たりの細胞数を計算した。

5) 培養後0時間～8時間の細胞濃度の変化を、片対数グラフにまとめた（図2）。

6) 血球計算盤以外の、生菌を含む培養液や器具は、オートクレーブで滅菌してから片付けた。血球計算盤は70%エタノールで洗って片付けた。

[2] 結果

グラフで示された通り、酵母がほぼ対数的に増殖することがわかった（図2）。

実験のアレンジと生徒への課題

ここで示した実験例については、いろいろなアレンジが可能である。注釈にも示したが、培養温度や一部の実験器具は、別のものに変えてもよい。各学校の設備に合わせて、実験計画を立てて欲しい。この実験例では、標準培地であるYPD液体培地での細胞増殖を調べた。標準培地を使うだけでなく、各自が興味のある試薬をYPD液体培地に混ぜて同様に実験し、細胞増殖の早さの違いを検討することも可能である。例として、YPD液体培地で一晚培養した前培養液を、0.5 M NaCl入りのYPD液体培地に加えて本培養を行なうと、細胞増殖が著しく阻害される様子を観察することができる（未発表データ）。また、いくつかの異なる培養温度で培養し、各温度での細胞増殖の早さを比較することも可能である。実験時間に制約がある場合は、前もって氷上で経時的にサンプルを保存しておき、生徒などにまとめて観察させる方法も考えられる。

なお、実験後の課題として、酵母の細胞分裂にかかる時間を、グラフから求めさせることなどが、考えられる。

まとめ

本研究では、中学校・高等学校で実際に微生物を扱えるプロトコルを作成した。この実験では、細胞増殖の様子を具体的な数値で表現することができる。また、対数増殖期の細胞を顕微鏡で経時的に観察することにより、細胞分裂によって細胞数が増えていく様子を実感できる。この実験を行なうことで、生徒たちは生物への興味を深められるのではないだろうか。

[注釈]

*1 振とう機能のない恒温機でも代用できる。

*2 滅菌済みの試験管でも代用できる。

*3 培養温度は26℃以外で設定してもよい。通常は24～30℃の範囲での培養を推奨するが、それ以外の温度での培養実験を計画してみてもよい。実験の目的によっては、室温で培養を行なってもよい。

*4 酵母細胞は、連なって増殖しているものが多かったが、連なりの中に含まれる細胞を1つ1つ計数した。また、数え終わった細胞は70%エタノールで洗い流し、血球計算盤をキムワイプで拭いてよく乾かしてから、次のサンプルを順に観察していった。

参考文献

- 1) 伊藤英樹、江崎士郎、江田稔、小川義和、小椋郁夫、加藤裕之、熊野善介、小森栄治、榊原博子、清水誠、高島勇二、富山雅之、中道貞子、中村日出夫、波田野彰、松本誠、宮内卓也、室伏きみ子、三宅征夫、小倉康、五島政一、高橋道和、牛尾則文、神山弘、坂下裕一、清原洋一、笹尾幸夫、田代直幸「中学校学習指導要領解説理科編」平成20年7月 文部科学省 p6
- 2) Fred Sherman, Getting Started with Yeast in Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology vol. 194 (1990) p 3-21
- 3) 浅島誠、市石博、伊藤元己、可知直毅、上村慎治、久力誠、小林設郎、小林秀明、小林裕光、西駕秀俊、新免輝男、杉山宗隆、長山隆男、新田光昭、長谷川真理子、広瀬敬子、深川治、藤原晴彦、宮下直、山本高之「生物」平成26年2月 東京書籍 p 134-137