

ヨーロッパモノアラガイの教材化

金澤 昭良

高等学校生物 の「生殖と発生」の単位における，モノアラガイの教材化を検討した。ここでは，この貝の簡単な飼育方法や発生過程の観察，脳と神経節の切片を使った実験を紹介する。

[キーワード] モノアラガイ 発生 割球 卵割 幼生 高等学校

はじめに

ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) は，欧米でよく知られている淡水産の貝である。今回，高等学校生物 の「生殖と発生」及び「遺伝」の単位，生物 の「遺伝情報とその発現」の単位におけるこの貝の教材化を試みた。

ここでは，この貝の簡単な飼育方法や発生過程の観察，脳標本と脳切片の作成・観察，学習・記憶に係わるmRNA発現の観察について紹介する。

1 準備・材料

ヨーロッパモノアラガイ，水槽，エアポンプ，濾過装置，解剖ばさみ，メス，ピンセット，双眼実体顕微鏡，柄付き針，パラフィン，ミクロトーム，アゾカルミン，アニリン青，リボプローブ，ジゴキシゲニン，クリオスタット（凍結切片作製装置），緩衝液（40mM NaCl，4.1mM CaCl₂，1.7mM KCl，1.5mM MgCl₂），4%パラホルムアルデヒド，抗DIG抗体

2 実験・観察方法

(1) モノアラガイの飼育

横60cm×高さ45cm×奥行き30cmの水槽にくみ置き水を入れ，エアポンプと濾過装置を取り付け作動させる。また，オオカナダモ等の水草を多めに入れる。

エサは，レタスを一日おきに大葉三枚程度与えるだけで良い。

水の交換は特に必要ない。一定の水量を保つため，減った量のくみ置き水を随時入れる。

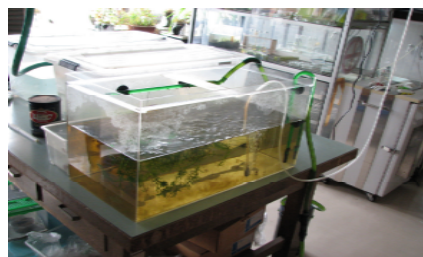


図1 飼育水槽外観

必要に応じて，殻のカルシウム源として，カキ殻をネットにいれて，水槽に沈めておいても良い。



図2 ヨーロッパモノアラガイ

(2) 発生過程の観察

産卵された直後から3週間，毎日下記～の方法で異なる発生ステージの胚を観察する。

ろ紙上に卵塊を取り出し，受精卵や胚の周りの寒天状の物質をピンセットを用いて取り除く。

スライドガラスに受精卵や胚を載せ，実体顕微鏡下でピンセットを用いて卵殻を取り除く。

胚を壊さないために，ホールスライドガラスに胚と純水を入れ，カバーガラスをかけて光学顕微鏡で観察する。

(3) モノアラガイの脳標本の作成・観察

モノアラガイを貝殻からピンセットを用いて取り出す。

メスで頭部皮膚に切れ目を入れ，解剖バサミで2 cm程度切る。

頭部を切り開き，ピンセットで脳を取り出す。

取り出した脳を双眼実体顕微鏡で観察する。

(4) 脳切片の作成・観察

2で取り出した脳を2.4%パラホルムアルデヒドで固定する。

パラフィンで包埋する。

包埋片をミクロトームにかけ，厚さ5ミクロン(μm)の切片を作る。

アザン染色(アゾカルミンとアニリン青の二重染色)を行う。

染色した切片を封入し，光学顕微鏡で観察する。

(5) 学習・記憶に係わるmRNA発現の観察

緩衝液に，転写因子CCAAT/enhancer binding protein(略称C/EBP)をつくるmRNAにハイブリダイズ(相補的に結合)するリボプローブと，発色させるためのジゴキシゲニン(DIG)を入れ，リボプローブとDIGを結合させる。この液を緩衝液Aとする。

Dでモノアラガイから取り出した脳を4%パラホルムアルデヒドで固定する。

固定片をクリオスタットにかけ，20 μm の厚さの「凍結切片」を作製する。

切片を界面活性剤に20分間入れる。

切片にリボプローブの入った緩衝液Aを滴下し，組織中のmRNAとハイブリダイズさせる。

アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体を用いてDIGを染色し，光学顕微鏡で観察する。

3 結果と考察

(1) モノアラガイの飼育

通年でモノアラガイの飼育が可能になった。

(2) 発生過程の観察

水槽の壁面に生み付けられた卵塊は，粘液に包まれていた(図3)。2細胞期の胚には極体が(図4)，4細胞期の胚には同じ大きさの割球が4個観察できた(図5)。

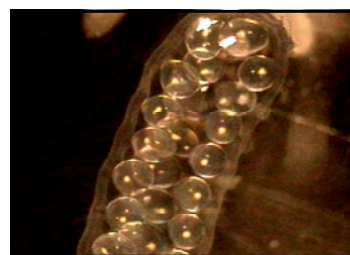


図3 卵塊

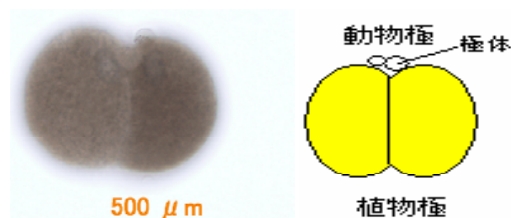


図4 2細胞期

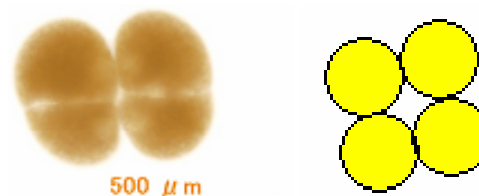


図5 4細胞期

また，4細胞期の胚を観察していると，第三卵割により大小2種類の割球が4個ずつ生じ(図6)，さらに，小割球が大割球に対して右へねじれるように移動して8細胞期の胚になる様子が観察できた(図7)。引き続き，大割球だけが卵割し，12細胞期になる様子も観察できた。

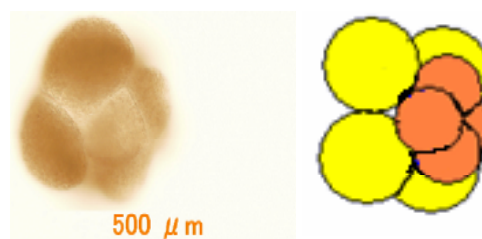


図6 8細胞期

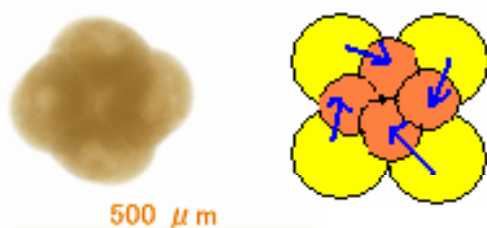


図7 8細胞期

モノアラガイの発生では，第一卵割と第二卵割は経割，第三卵割は緯割であることや，8細胞期は，動物極側に4個の小割球，植物極側に4個の大割球が生じることがわかっている。

受精卵から稚貝までの発生にかかる所要時間は2～3週間である。卵割速度はゆるやかなため，全ての発生過程を短時間で観察することは難しい。しかし，産卵した時期の異なる卵塊を準備し，胚を観察すると様々な発生過程を観察できることや，卵殻が透明なため発生の過程が観察しやすいことなどから，初期発生の教材としての可能性が考えられる。この後，16細胞期，桑実胚，胞胚，原腸胚，さらには幼生，稚貝まで観察することができた（図8～11）。

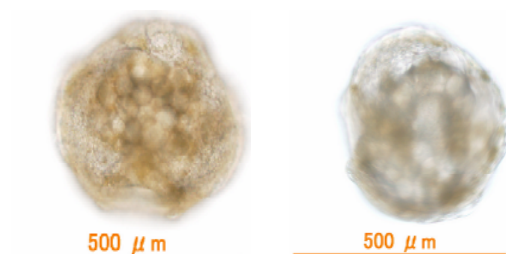


図8 胞胚期

図9 原腸胚期

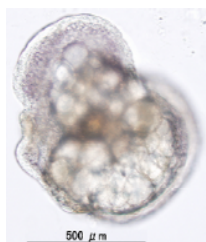


図10 トコアラ幼生期

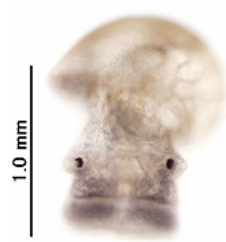


図11 ヲリコナ幼生期

(3) モノアラガイの脳標本の作成・観察

モノアラガイの脳には，膨らんだ神経節が多

数見られた（図12，13）。



図12 双眼実体顕微鏡で観察した脳

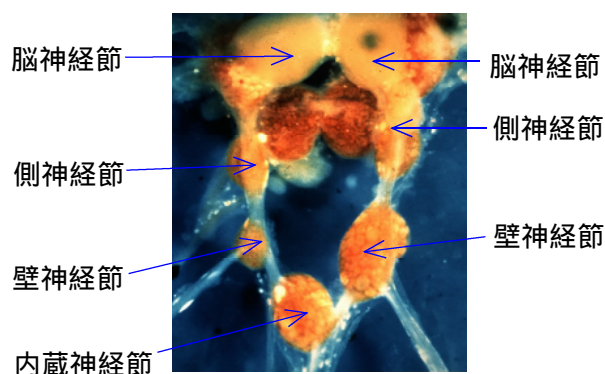


図13 背中側から見た神経節

(4) 脳切片の作成・観察

アザン染色により，モノアラガイの脳切片の染色質は赤色に，細胞質は青色に染色された。モノアラガイの神経節内ニューロンは，脊椎動物の脳同様，外側に細胞体が局在していた（図14）。

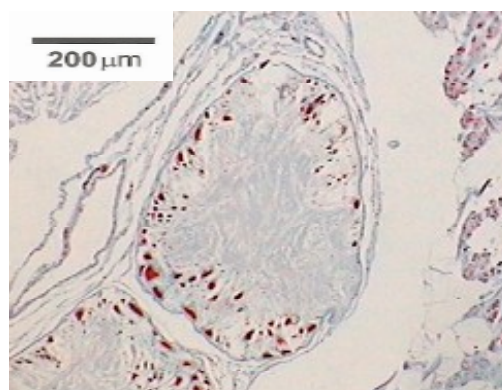


図14 アザン染色された神経節

（濃く染色されている部分は，神経節周辺部に存在している核である。周辺部に，ニューロンの細胞体が局在していることがわかる。）

(5) 学習・記憶に係わるmRNA発現の観察

図15の点線で囲んでいる部分は各ニューロンを示しており、一部が濃く染色されていた。濃く染色されたニューロンはC/EBPをつくるmRNAが発現している。

このことから、一つの神経節内を構成するニューロンのうち、一部だけがmRNAを発現していることを示している。

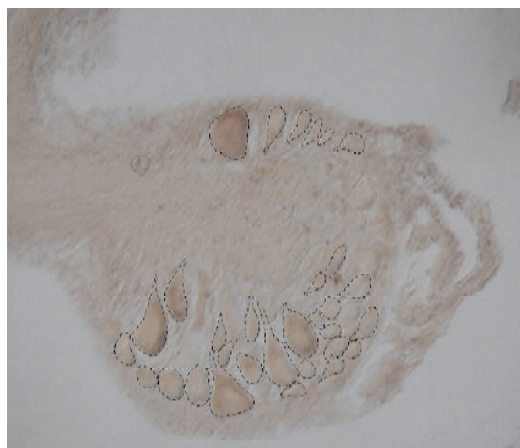


図15 神経節内C/EBP・mRNAの発現状況

染色されたmRNAを観察することにより、どの細胞でもDNAは同じものを持っているが、その遺伝子発現（すなわちmRNA）は細胞ごとに違うことを生徒に理解させることができる。モノアラガイの脳の観察は、生物の「生殖と発生」及び「遺伝」の単元、生物の「遺伝情報とその発現」の単元における発展的な教材として活用することができる。

4 当センター研修講座における導入

平成19年度当センターの理科研修講座で、モノアラガイの教材化について、指導・普及を図った。

(1) 講座種類

A 「高校発展講座」(高校教諭7人)

日時：平成19年11月1日(木)

内容：飼育方法の紹介、発生過程の観察、
脳標本の作成・観察

B 「中学校発展講座」(中学校教諭14人)

日時：平成19年10月18日(木)

内容：飼育方法の紹介、発生過程の観察

(2) 受講者アンケート(回答者数16名)

質問1 モノアラガイの発生観察は、授業で効果的に活用できる内容でしたか。

- | | |
|-----------|-------|
| a 活用できる | 62.5% |
| b 一部活用できる | 25.0% |
| c 活用しにくい | 0% |
| d わからない | 12.5% |

質問2 授業で活用できる実験項目は何。

(飼育、発生観察)

質問4 モノアラガイの飼育は簡単か。

- | | |
|--------|-------|
| a 簡単 | 81.3% |
| b 少し簡単 | 18.7% |
| c 難しい | 0% |

質問5 感想

- ・飼育に手間がかからないのは良い。
- ・胚が小さく、生徒は観察しにくいかも。
- ・飼育しやすく、年間通して胚の観察が出来る。
- ・幼生期の心臓の動きも観察させたい。
- ・脳標本の作成は生徒には難しい。

おわりに

今後は、本教材を活用した授業実践の支援やナメクジ等の他の軟体動物の教材化に取り組みたいと考えている。本研究を行うに当たり、徳島文理大学香川薬学部伊藤悦朗教授、箕田康一准教授には熱心なご指導を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、本研究は、(財)武田科学振興財団 2007年度「高等学校理科教育振興奨励」の支援を受けて実施している。

参考文献

- 1) Sadatomo, Hisayo and Ito, E(2000):Developmental study of anatomical substrate for conditioned taste aversion in *Lymnaea stagnalis*. Zool Sci 17:141-148
- 2) Hatakeyama, Dai and Ito, E(2004):Expression and distribution factor CCAAT/enhancer-binding protein in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. Cell Tissue Res 318:631-641

(かなざわ あきら 生物研究室研究員)