

## 外来種ブルーギルの起源を考える教材の開発

佐々木秀明 山端卓祐 岩田恵理

### 1. はじめに

生物多様性とは、地球上に生息するすべての生物の変異性を示すものであり、種内の多様性、種間の多様性、および生態系の多様性を含むものと定義されている（宮崎と田上，2014）。生物の中には当然ではあるが人間も含まれ、様々な生物が生きる豊かな自然の保護は我々にとって重要な課題であり、教育現場において取り扱う重要な課題でもある。しかしながら、生物多様性は地球温暖化、自然破壊を伴った開発や環境汚染などが原因で失われつつあるのが現状である。生物多様性の消失には様々な要因があるが、そのような中でも生物学的視点で見ると、外来種の問題も大きな位置を占める（関口，2017）。

外来種とは、本来その地域に存在しなかったが、人間活動の結果、意図的あるいは非意図的に導入された種、亜種、あるいはそれ以下の分類群を指す。日本では、導入年代がはっきりしている明治時代以降に導入されたと推定されるものを外来種と位置づけている。この内、導入もしくは拡散が本来ある生物多様性を脅かすものを侵略的外来種という（日本生態学会編，2002）。

侵略的外来種の一つとしてブルーギル (*Lepomis macrochirus*) が知られている。1960年に日本に食糧増産を目的に移入された北米原産の淡水魚であり、日本各地で急速に分布を拡げている（Kawamura et al., 2006）。アメリカ合衆国アイオワ州グッテンベルグの一地点で採取された15匹が水産庁淡水区水産研究所で繁殖され、その後、全国に広がった（読売新聞，2009）。1960年の導入以後、新たに海外からのブルーギルの導入は知られていない。2005年には特定外来生物法により特定外来生物に指定され、駆除の対象となっている。

日本に広く分布するブルーギルはアメリカ合衆国から導入された15匹が起源であり、種内における多様性は低い（Kawamura et al., 2006）。遺伝的に似通った、わずかな個体数の導入が現在の生態系を脅かす問題を起こしていることは脅威であり、教育上、重要な問題を指摘しうるものである。外来種による在来生態系への影響は、現在、学校教育現場においても取り上げるべき重要な問題となってきた（土井と林，2015）。

本研究では、外来種の起源と分布の拡大を考えるための教材開発を試みた。まず、現行の学習指導要領に基づく中学校の理科および高等学校の生物の教科書を対象に、外来種に関する掲載状況を調査した。また、外来種の記載に際し、ブルーギルを例示しているかも確認した。次に、日本に生

息するブルーギルの rRNA 遺伝子領域の遺伝子解析を通して、起源について考えるきっかけに成りうるかを確認した。

## 2. 方法

### 2-1. 教科書調査

現行の学習指導要領に基づく中学校の「理科」の教科書（全5社）において外来種が扱われているか、掲載されている場合、ブルーギルが外来種として記載されているかを調査した。同様に、高等学校の「生物」および「生物基礎」の教科書（全5社）においても外来種の記載に関して調査した。

### 2-2. ブルーギルの釣獲

2005年～2006年にかけて、福島県いわき市、北塩原村および茨城県土浦市の湖沼・河川においてブルーギルの釣獲を行った。釣獲した雌の個体から DNA 抽出のためにブルーギル体表の細胞が付着したウロコを採取した。ウロコは採取後、 $-25^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 2-3. DNA 抽出と rRNA 遺伝子領域の塩基配列決定

DNA 抽出は、Dneasy Tissue Kit (Qiagen) を用いた。ウロコを直接抽出液に浸す方法で、キットのプロトコールに従って抽出を行った。rRNA 遺伝子領域の PCR 増幅は GeneAmp PCR System 9700 (ABI) を使い、 $0.16\ \mu\text{L}$  Ex Taq ポリメラーゼ (Takara)、 $3.0\ \mu\text{L}$   $10\times$  Ex Taq 緩衝液 (Takara)、 $3.0\ \mu\text{L}$  dNTP 混合液 (Takara)、 $0.21\ \mu\text{L}$  12SA - L1067プライマー溶液（塩基配列：AAACTGGGATTAGATACCCGACTAT）(Martin et al. 1992)、 $0.21\ \mu\text{L}$  16SA - H2492プライマー溶液（塩基配列：ATGTTTTTGTATAAACAGGCG）(Martin et al. 1992)、 $1.0\ \mu\text{L}$  DNA 溶液、 $22.42\ \mu\text{L}$  蒸留水を含む  $30\ \mu\text{L}$  反応混合液の下、( $94^{\circ}\text{C} / 5\text{分}$ )  $\rightarrow$  ( $94^{\circ}\text{C} / 30\text{秒} \rightarrow 54^{\circ}\text{C} / 30\text{秒} \rightarrow 72^{\circ}\text{C} / 1\text{分}$ )  $\times 35$  サイクル  $\rightarrow 72^{\circ}\text{C} / 7\text{分}$  の反応サイクルで行った。PCR 増幅産物は、 $0.5\ \mu\text{g/mL}$  エチジウムブロマイドを含むアガロース TAE ゲルによる電気泳動によって確認を行った。

得られた PCR 増幅産物は、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、キットのプロトコールに従ってクローニングを行った。PCR 増幅産物が挿入されたプラスミド DNA を細胞内に含む大腸菌は栄養培地 (Dry Yeast Extract D-3 5g/L, Polypepton 10g/L, NaCl 2g/L, Agar 20g/L, pH7.0) で振盪培養後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA は、DNA オートシーケンサー ABI PRISM 3100 (ABI) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、国立遺伝学研究所・DDBJ の BLAST 検索 (Altschul et al. 1997) による既存の塩基配列との同源性検索を行った。

## 2-4. RFLP 法

rRNA 遺伝子領域の共通性・多様性を視覚化するため、RFLP 法（制限酵素断片長多型法）を行った。PCR 増幅産物を制限酵素 *Hind* III および *Sac* I で処理し、生じた DNA 断片を 0.5  $\mu$  g/mL エチジウムブロマイドを含むアガロース TAE ゲルで電気泳動を行った。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 教科書分析

中学校の「理科」の教科書を調査した結果、中学校3年時に学ぶ「理科3」の教科書に外来種に関する内容が記載されており、調査した5社全ての「理科3」に記載が確認できた。外来種に関する記載は、全ての教科書において自然と人間との関わりを扱う領域に記載されていた。また、ブルーギルを外来種の例として取り上げていたのは2社であった（表1）。

高等学校の教科書においては、外来種については、調査した全ての「生物学」および「生物基礎」の教科書に記載されていた。外来種に関する記載は、全ての教科書において生態系を扱う領域に記載されていた。また、ブルーギルを外来種の例として取り上げていたのは「生物」で2社、「生物基礎」で3社であった（表2）。

調査の結果、中学校3年時使用の全ての「理科」の教科書および高等学校使用のすべての「生物」および「生物基礎」において外来種（教科書によっては外来生物）の記載があった。この結果から、外来種を学ぶ教材の開発は重要と言える。また、ブルーギルを外来種の典型例として記載する教科書も複数あったことから、教材の対象としてブルーギルを使用することは妥当であると言える。

### 3-2. rRNA 遺伝子領域の解析

ブルーギル DNA から得られた PCR 増幅産物の塩基配列を決定した結果、プライマー部分を除いて1496塩基対の配列が得られた。BLAST 検索による既存の塩基配列との相同性検索を行った結果、ブルーギル・ミトコンドリア DNA（アクセスナンバー：JN389795）にある rRNA 遺伝子領域と100%一致し、rRNA 遺伝子領域であることが確認できた。得られた rRNA 遺伝子領域には、12S rRNA 遺伝子領域の一部（505塩基対）、tRNA Val 遺伝子領域（70塩基対）、16S rRNA 遺伝子領域の一部（921塩基対）が含まれていた（図1）。

福島県いわき市、北塩原村および茨城県土浦市の湖沼・河川由来のブルーギルの塩基配列を比較した結果、解析した全ての個体で rRNA 遺伝子領域の塩基配列は完全に一致した（図1）。この結果から、日本国内に生息するブルーギルの多様性度は非常に低いことがわかる。日本に生息するブルーギルの起源が、アメリカ合衆国アイオワ州グッテンベルグの一地点で採取された15匹に由来し、そもそも多様性度が低いことを反映した結果と言える。

塩基配列の一致からブルーギルの多様性の度合いを学ぶことも可能ではあるが、より視覚的に学習者に訴える為に、アガロースゲル上で観察できる RFLP を行った。得られた rRNA 遺伝子領域

の配列から広く汎用される制限酵素による切断可能な配列を探索した結果、制限酵素 *Hind* III（認識配列：AAGCTT）および *Sac* I（認識配列：GAGCTC）による認識配列が確認できた。制限酵素 *Hind* III および *Sac* I で得られた rRNA 遺伝子領域を処理後、電気泳動を行ったところ、視覚的に判別可能な DNA 断片をアガロースゲル上で観察できた（図2）。福島県いわき市、北塩原村および茨城県土浦市の湖沼・河川由来のブルーギル DNA の切断パターンは一致しており、視覚的に同一性を確認できるものとなった。

### 3-3. ブルーギルの教材化を考える

わずかな個体数の導入から始まったブルーギルの日本全国への分布拡大は、現在、生態系を脅かす問題として認識される様になった。中学校及び高等学校の教科書においても外来種問題の例としてブルーギルに言及しており、広く認知された存在となっている。皮肉ではあるが、全国各地の湖沼・河川で入手が可能であるため、理科教育における材料としても適している（和田，2019）。

日本に導入されたわずかな個体数を遺伝的に似通った個体群ととらえ、今回は遺伝子配列の共通性で示すこととした。DNA を扱う実験は、教育内容や学校現場の状況を勘案すると、中学校以上での実施ということになるであろう。ただし、DNA の抽出に関する実験は、中学校（川上ら，2005）や高等学校（伊佐治と松本，2005）で実施されているが、遺伝子組換え等の高度な実験は高等学校以上での実施が中心である（笹川と小野，2008）。そのため、本実験は実験手技や機器操作の複雑さから、高等学校あるいは大学の初年次で実施することが適当と思われる。

#### 調査対象とした教科書

- 岡村定矩，藤嶋昭ほか49名，2015. 新編 新しい科学1, 284pp, 東京書籍  
岡村定矩，藤嶋昭ほか49名，2015. 新編 新しい科学2, 302pp, 東京書籍  
岡村定矩，藤嶋昭ほか49名，2015. 新編 新しい科学3, 326pp, 東京書籍  
有馬朗人ほか62名，2015. 新版 理科の世界1, 280pp, 大日本図書  
有馬朗人ほか62名，2015. 新版 理科の世界2, 304pp, 大日本図書  
有馬朗人ほか62名，2015. 新版 理科の世界3, 328pp, 大日本図書  
霜田光一，森本信也ほか29名，2015. 中学校 科学1, 302pp, 学校図書  
霜田光一，森本信也ほか29名，2015. 中学校 科学2, 312pp, 学校図書  
霜田光一，森本信也ほか29名，2015. 中学校 科学3, 322pp, 学校図書  
細矢治夫，養老孟司，丸山茂徳ほか27名，2015. 自然の探求 中学校理科1, 282pp, 教育出版  
細矢治夫，養老孟司，丸山茂徳ほか27名，2015. 自然の探求 中学校理科2, 284pp, 教育出版  
細矢治夫，養老孟司，丸山茂徳ほか27名，2015. 自然の探求 中学校理科3, 314pp, 教育出版  
塚田捷，大矢慎一，江口太郎，鈴木盛久ほか58名，2015. 未来へひろがるサイエンス1, 272pp, 啓林館  
塚田捷，大矢慎一，江口太郎，鈴木盛久ほか58名，2015. 未来へひろがるサイエンス2, 280pp, 啓林館  
塚田捷，大矢慎一，江口太郎，鈴木盛久ほか58名，2015. 未来へひろがるサイエンス3, 304pp, 啓林館  
庄野邦彦ほか11名，2016. 生物基礎 新訂版, 246pp, 実教出版  
庄野邦彦，馬場昭次ほか18名，2017. 生物 新訂版, 406pp, 実教出版  
吉里勝利ほか20名，2016. 高等学校 改訂 生物基礎, 242pp, 第一学習社  
吉里勝利ほか20名，2017. 高等学校 改訂 生物, 470pp, 第一学習社  
嶋田正和ほか14名，2016. 改訂版 生物基礎, 244pp, 数研出版  
嶋田正和ほか22名，2017. 改訂版 生物, 452pp, 数研出版

本川達雄, 谷本英一ほか16名. 2016. 生物基礎 改訂版, 242pp, 啓林館  
 本川達雄, 谷本英一ほか16名. 2017. 生物 改訂版, 402pp, 啓林館  
 浅島誠ほか24名. 2016. 改訂 生物基礎, 265pp, 東京書籍  
 浅島誠ほか27名. 2017. 改訂 生物, 490pp, 東京書籍

## 参考文献

宮崎信之, 田上英明. 2014. 生物多様性とは. 水産工学 50: 191-197.  
 関口秀夫. 2017. 外来種と絶滅・絶滅危惧種の種数増減. タクサ 43: 30-41.  
 日本生態学会(編). 2002. 外来種ハンドブック, 390pp, 地人書館, 東京  
 読売新聞. 国内繁殖のブルーギル 起源解明. 2009年10月23日朝刊35p  
 Kawamura, K., Yonekura, R., Katana, O., Taniguchi, Y. and Saitoh, K. 2002. Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. Mol. Ecol. 15: 613-621.  
 土井徹, 林武広. 2015. 外来種の取り扱いに関する教科書分析と授業実践による児童の認識の変容—小学校における環境教育の新たな展開に向けて—. 科学教育研究 39: 212-224.  
 Martin, A. P., Humphreys, R. and Palumbi, S. R. 1992. Population genetic structure of the armorhead, *Pseudopentaceros wheeleri*, in the North Pacific Ocean: application of the polymerase chain reaction to fisheries problems. Can. J. Aquat. Sci. 49: 2386-2391.  
 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI - BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.  
 和田薫. 2019. 外来魚を用いた「体の構造」と「食物連鎖」の学習プログラムの開発と実践. 明星大学教職センター年報 2, 79-92.  
 川上昭吾, 雨森真司, 佐藤真歩. 2005. 中学校理科における DNA 抽出実験の改良. 理科教育学研究 45, 23-30.  
 伊佐治錦司, 松本省吾. 2005. 高等学校における DNA 簡易抽出実験に関する教材開発. 岐阜大学教育学部研究報告 7, 69-78.  
 笹川由紀, 小野道之. 2008. 遺伝子リテラシー教育における高等学校等での教育目的遺伝子組換え実験の普及と教材キットの有効性について. 科学教育研究 32, 6216-229.

表1 中学校教科書「理科」における外来種の記載

出版社	教科書	外来種の記載	ブルーギルの記載
大日本図書	理科の世界1	なし	-
	理科の世界2	なし	-
	理科の世界3	あり	なし
東京書籍	新しい科学1	なし	-
	新しい科学2	なし	-
	新しい科学3	あり	なし
学校図書	中学校 科学1	なし	-
	中学校 科学2	なし	-
	中学校 科学3	あり	あり
啓林館	未来へひろがるサイエンス1	なし	-
	未来へひろがるサイエンス2	なし	-
	未来へひろがるサイエンス3	あり	あり
教育出版	中学校理科1	なし	-
	中学校理科2	なし	-
	中学校理科3	あり	なし

表2 高等学校教科書「生物」および「生物基礎」における外来種の記載

出版社	教科書	外来種の記載	ブルーギルの記載
実務出版	生物	あり	あり
	生物基礎	あり	なし
第一学習社	生物	あり	なし
	生物基礎	あり	なし
数研出版	生物	あり	なし
	生物基礎	あり	あり
啓林館	生物	あり	なし
	生物基礎	あり	あり
東京書籍	生物	あり	あり
	生物基礎	あり	あり

Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	[12S rRNA — GCCTAGCCTTAAACATTGGCAACACTTTACACCTGCTGCCGCCAGGAAACTACGAGCATTAGCTTAAACCCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTAGACCCA .....
	CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACGATAACCCCGTTCAACCTCACCTTCCTTGTTTTTCCGCCTATATACCACCGTCGTCAGCTTACCCTGTGAAGG .....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	CCTTAGTAGAACAAATTTGGCACGCCGAGACGTCAGGTCGAGGTGTAGCGAATGGAAGGGGAAGAAATGGGTACATTCTTTAATAAAAAGAATACG .....
	AATGACTGACTGAAACGCTTTCCGAGGAGGATTTAGCAGTAAGCAGGAAATAGAGTGTCTGCTGAAATTTGGCCCTGAAGCGCGCACACCCGCCGT .....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	CACTCTCCCCGAGCTCACGAACCTTTAATAAAATAAAATCCGCCACTGCAAGGGGAGGCAAGTCGTAACTGGTAAGTGTACCGGAAGGTGTACTTGA .....
	..... ] [tRNA Val ——— ] [16S rRNA — AAAATCAGGGGTAGCTAAGATAGAAAAGCATCTCCCTTACACCGAGAAGTCACCCGTGCAAAATCGAGTCACCCGTGAAGCCCAACAGCTAGCCCCACACC .....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	CAAAAACAACAAACATCATTAAATACCCCCAAAACACTAACGTTTTTCAACAAACCATTTTTCCACCTAAGTATGGGCACAGAAAAGAACTACGGC .....
	GCAATAGATAAAGTACCGCAAGGGAACGCTGAAAGAGAAATGAAAGAACCCAGCAAAAGCTACAAAAGCAGAGATTTTTCTCTGACCTTTTGCATCATG .....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	ATTTAGCCAGAAATTACTCAGGCAAGGAGAACTTTAGTCTGACACCCCGAACTAAGTGAGCTACTCCAAGACAGCCTATTATTAGGCACACCCGTCTC .....
	.....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	TGTGGCAAAAGAGTGGGAAGAGCTTTGAGTAGAGGTGACAGACCTACCGAACTAAGTTATAGCTGGTTGTCTGGGAAATGGATAGGAGTTCAGCCTCTCG .....
	GATTCTTACCTCACTCTCGTCTAAACACCCAACATTGACCCGAAAGAAACCGCGAGAGTTAGCCAAGGGGGTACAGCCCTTTGAAACAAGATACAAC .....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	TTTCAGGAGGGTAAAGGTCATAATAACAAAAGTAGGATGTTCTGGTGGGCCTAAAGCAGCCATCCCTTAGAAAGCGTTAAAGCTCAGACATCACAC .....
	TAAGCTCTCTATTCTGATAATTTACCTCACCCCTTAACCTACCAGACCGCCATGCAACATGGGCGTGACTATGCTAAAATGAGTAATAAGAGAGT .....
Iwaki Kitashiobara Tsuchiura	TAAGACTCTCTCCCCGCACATCCGTAACCTCGGAACGGACTAACCCCGAACTTTAACGGACCCAAACAAAGAGGGCAATAGATGGCAGACTAAACAACTG .....
	GAAAAACATCAAGCTTTTAACCGTTAACCCACACTGGTGTGCCCTTGGGAAAGACTAAAAGAAAGAGAAGGAACTCGGCAACACATGAAGCCT .....

図1 ブルーギルのリボソーム RNA 遺伝子の部分配列

Iwaki：福島県いわき市、Kitashiobara：福島県北塩原村、Tsuchiura：茨城県土浦市で採集したブルーギルの塩基配列。  
「・」：塩基配列が一致していることを示す。

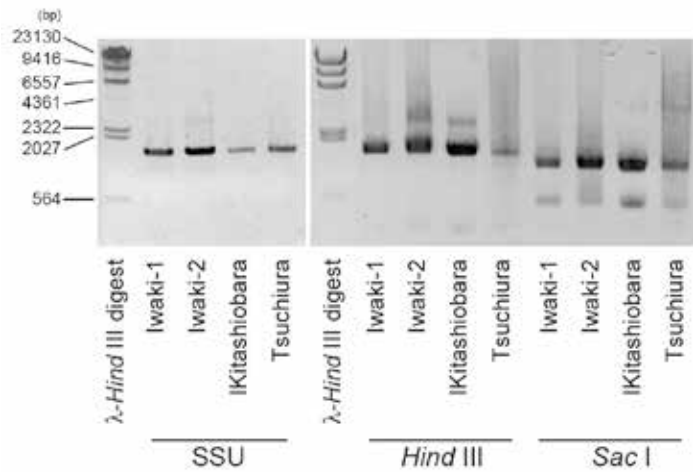


図2 RFLP 法 (制限酵素断片長多型法) によるブルーギル・リボソーム RNA 遺伝子の視覚化

λ-Hind III digest : DNA サイズマーカー。

Iwaki : 福島県いわき市、Kitashiobara : 福島県北塩原村、Tsuchiura : 茨城県土浦市で採集したブルーギル。