

ダンゴムシによる透明化試薬の性質の応用

静岡市立高校

科学探究科 3年 佐藤なつみ 他2名

1 研究動機

二年次ではダンゴムシの完全透明に成功し、またダンゴムシの消化管の内容物は透明にならないということを発見したのでこの成果をもとに、私たちの最終的な目的であるダンゴムシの単位体積当たりの土壌の分解速度を予測できるのではないかと考えたからである。また、組織透明化試薬であるCUBIC液に含まれる成分が、生物組織の透明化に何らかの影響を与えているのではないかと考え、CUBIC液についてより詳しく知りたいと考えたからである。

2 仮説

単位時間当たりの消化管内の物質の量を調べることで、ダンゴムシの消化速度が予測できるのではないかと考えた。

3 目的

単位面積当たりの土壌の分解速度を予測するためにダンゴムシの消化速度を求める。

4 ダンゴムシを透明化する方法

- (1) ダンゴムシを凍結固定した。
- (2) ダンゴムシを塩酸(2mol/L)に入れ、120℃の乾熱滅菌庫で脱灰反応を行った。
- (3) 取り出したダンゴムシをリン酸緩衝生理食塩水(以下PBSと記す)で洗浄した。
- (4) ダンゴムシを水酸化ナトリウム水溶液(15mol/L)に入れ、150℃の乾熱滅菌庫で除タンパク・脱アセチル化反応を行った。
- (5) 取り出したダンゴムシをPBSで洗浄した。
- (6) 遠沈管にいれたCUBIC液に浸し、35℃の恒温器で1日程度保管した。

以下の実験では上記の手順を透明化処理と表している。水溶液での処理時間は各実験によって異なる(組織を保ったままでの完全透明に最適な時間は塩酸45分、水酸化ナトリウム水溶液90分であると2年次で結論づけた)。

5 実験1

(1) 実験目的

CUBIC液に含まれる各試薬のpHと透明化の関係を調べ、CUBIC液の性質を見つける。

(2) 実験方法

調査した日にちが異なる3種類のCUBIC液のpHをpH試験紙と2種類のpH測定器を用いて測定し、平均値を算出した。また、CUBIC液を構成する各水溶液にダンゴムシの平均体重と同じ質量の鶏のささみをつ

表1 溶液の種類

A	CUBIC液 (20 g)
B	尿素 (5 g) + 純水 (15g)
C	トリトンX-100 (3 g) + 純水 (17g)
D	エチレンジアミン (5 g) + 純水 (15g)
E	純水 (20g)

け、硬さ、透明具合を比較した。(表1)

(3) 実験結果

pH、鶏のささみの硬さ、目視による変化は以下の図のようになった。

(表2)

表2 pHと鶏のささみの状態の関係

溶液	平均pH	目視	最初と比べたときの硬さ
A	10.38	透明になった	柔らかくなった
B	8.75	わずかに透明になった	硬いまま
C	5.8	変化なし	柔らかくなった
D	11.24	少し透明になった	硬いまま
E	6.46	変化なし	硬いまま

(4) 考察

CUBIC 液が塩基性であること

から、タンパク質を分解し(生物工学基礎講座バイオよもやま話「姿をかえるタンパク質」) サンプルに染み込みやすい性質があると考ええる。

6 実験2

(1) 実験目的

ジャガイモを食紅で着色し、透明化した際に色が識別できるか、またどの色が透明化後に残りやすいかを調べた。

ア 実験方法

ジャガイモをピーラーで薄くスライスし、食紅を溶かした水でそれぞれ煮込んだ。その後オーブンで焼き、乾燥させた。これを絶食させたダンゴムシに与え、食紅の色の糞が排泄されてから透明化して体内を観察した。

イ 実験結果

すべての個体において、透明化処理をして消化管内を観察した際には色が識別できなかった(無色になっていた)。

ウ 考察

食紅の色が消化の段階で消失したのか、透明化をすることで消失したのかは不明であるが、いずれにしても食紅では内容物を標識することができなかった。そのため消化管内を標識するほかの食べ物や物質を検討する必要がある。

(2) 実験目的

色のついた緑黄色野菜(ホウレンソウを採用)を乾燥させてエサとして与えることで、消化物の標識を試みる。また乾燥させて腐食を防ぐ。

ア 実験方法

ホウレンソウを切りオーブンで焼いて乾燥させた。これをダンゴムシに与え、充分時間が経過してから透明化処理を行い、体内を観察した。

イ 実験結果

消化管を肉眼で見るとホウレンソウが消化されたものなのか、ほかの物質なのか正確に判断できなかった。顕微鏡を用いて観察するとわずかに緑色をしていた。

(写真1, 2)

ウ 考察

完全に色は抜けなかったが、消化されると物質に多少変化があり、それによってホウレンソウと他の内容物の色とが区別しにくくなったと考えられる。

(3) 実験目的

各緑黄色野菜の色素がCUBIC液に溶出するか、生の状態で実験を行った。

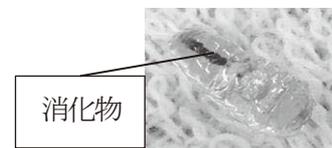


写真1

ホウレンソウを与えた個体

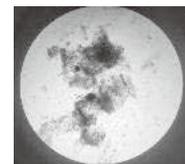


写真2

写真1の固体の消化物(双眼実体顕微鏡40倍)

ア 実験方法

- (ア) 緑黄色野菜を生のまま刻んで、さらに乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。乾燥させたホウレンソウもすりつぶした。
- (イ) それぞれを純水で洗浄し、壊れた細胞からにじみ出た色素を取り除いた。水気を取りCUBIC液の入った遠沈管に入れ、35°Cの恒温器で約1日保管した。
- (ウ) 双眼実体顕微鏡を用いて観察した。

イ 実験結果

すべての野菜において完全ではないが色が薄くなっていた。

ウ 考察

結果よりCUBIC液は野菜に含まれている色素も溶出してしまうと考えられる。よって緑黄色野菜は透明化処理をする生物に与えて消化物を標識するのに適さないといえる。

7 実験3

(1) 実験目的

腐葉土を用いた方法での空腹期間の特定を試みた。

(2) 実験方法

- ア 1.0~1.2cmのダンゴムシを43匹採集し、腐葉土内で飼育した。
- イ 4日後3匹を透明化し、消化管が満たされているか確認した。また、ダンゴムシの消化管の内容物と与えた腐葉土が同じであるかということを確認するため、腐葉土に含まれる木片をすりつぶしたものと消化管の内容物を水に溶き、光学顕微鏡で観察して比較した。
- ウ 湿らせたキムワイプのみ与えられた環境に移し、時間ごと(表3)3匹ずつ凍結固定し、塩酸5分水酸化ナトリウム水溶液5分で透明化処理を行った。

表3 固定時間

No.	固定時間 (時間後)
①	0
②	12
③	24
④	36
⑤	48
⑥	60
⑦	63
⑧	66
⑨	69
⑩	72
⑪	75
⑫	78
⑬	81
⑭	84

(3) 実験結果

図1より個体によって空腹状態が異なっていた。また、ダンゴムシの消化管内の物質と、腐葉土をそれぞれ純水に入れ顕微鏡で観察し、目視で比較した結果構造が同じことから、同様のものではないかと判断した。



(4) 考察

消化管内の内容物と腐葉土の木片は同じものであると考えたため、ダンゴムシの消化管内は腐葉土で満たされたといえる。

(1) 実験目的

個体差によるばらつきをなくすために、条件を設定して再度空腹期間の特定を試みた。

(2) 条件

- ア 採集するダンゴムシは1.2cm
- イ 腐葉土での飼育後、1匹ずつ体重を測定
- ウ 絶食期間中、排泄物をこまめに取り除く
- エ 固定する直前に1匹ずつ体重を測定
- オ 定点カメラで記録を行う
- カ 湿度と温度を記録する

(3) 実験方法

- ア 1.2cmのダンゴムシ136匹を採集して17、18匹ずつに分け、腐葉土を入れた虫かごの中で4日間飼育した。その後1匹ずつ体重を量り平均を算出した。
- ウ 湿らせたキムワイプを敷いた虫かごの中で飼育し絶食状態にした。また、排泄物の有無を

確認し、確認できた場合は取り除いた。さらに1つの虫かごを定点カメラで撮影をした。

エ 表7に示す時間ごとにダンゴムシ7匹の体重を1匹ずつ量って凍結固定し、PBSを入れた遠沈管に入れて冷蔵庫で保管した。(体の腐敗を防ぐため)

オ 塩酸30分、水酸化ナトリウム水溶液50分に設定して透明化処理を行い、表4に示す時間で固定をして顕微鏡で観察した。

表4 固定時間と経過時間

サンプルNo.	日付	固定時間	経過時間 (時間後)	サンプルNo.	日付	固定時間	経過時間 (時間後)
①	6月24日	19:30	0時間後	⑨	6月27日	13:00	65時間30分後
②	6月25日	7:20	1時間50分後	⑩		15:55	68時間25分後
③		12:45	17時間15分後	⑪	6月28日	7:30	84時間
④		16:25	20時間55分後	⑫		12:45	89時間15分後
⑤	6月26日	7:25	35時間55分後	⑬		16:15	92時間45分後
⑥		12:40	41時間15分後	⑭	6月29日	8:15	108時間45分後
⑦		15:45	44時間15分後	⑮		12:35	113時間5分後
⑧	6月27日	7:25	59時間55分後				

(4) 実験結果

まず、目視で体内の内容物が黒く残っている個体は空腹でない判断し、内容物が確認できなかった個体は空腹であると判断した。

図2より経過時間と空腹個体数の増減、体重の減少量には関係性が見られなかった。また、定点カメラでダンゴムシの様子を観察するとダンゴムシが糞を食べている様子は観察されなかった。

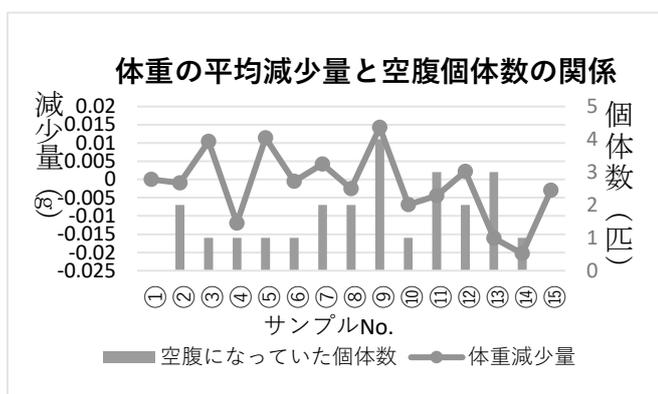


図2

(5) 考察

絶食時間の経過と体重の減少量の間に関係性が見られなかったことの原因として、絶食期間中に水分を補給して生存していたこと、個体によって空腹状態が異なり消化にかかる時間には個体差があるということが考えられる。今回の実験では原因は水分を補給していたからではないかと考えた。

9 今後の展望

- (1) ダンゴムシの空腹期間の実験で、条件をさらに詳細に設定し、より長い実験期間を設けて実験回数を重ねる。
- (2) 対象生物を絶食させることなく空腹期間の特定を図る。
- (3) 今回測定できなかったものを新たな分析機器を用いてデータを得ることで考察する。

10 謝辞

静岡大学理学部生物科学科の成川礼講師、東京大学大学院農学生物科学研究科付属の前原忠助教授に大変お世話になりました。

11 参考文献

マウスを丸ごと透明化し1細胞解像度で観察する新技術—血液色素成分を多く含む臓器なども脱色して全身を透明化—(理化学研究所)

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20141107_1

ほか13件