

吸収スペクトルでの透明化ダンゴムシの検証

静岡市立高等学校

2年 佐藤なつみ 小杉采葉 齋藤穂佳 土谷晴乃

1 動機

私たちは生物に関係する研究をしたいと考えていた。そこで、静岡県の生徒理科研究論文集の中から「ミミズの組織透明化」を見つけ、「透明化」という言葉に興味を持ち、私たちも土壌生物であるダンゴムシの透明化について研究することにした。透明化後のダンゴムシの吸収スペクトルを分光光度計で測定することで透明になっているのか科学的に検証することにした。

2 組織透明化(CUBIC 液)について

理化学研究所が発表している論文によると、CUBIC とは Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis の略である。和訳では脳透明化と全脳イメージングのための化合物の混合溶液とコンピュータを用いた画像解析だ。これはサンプルを試薬に浸すだけでサンプルを透明化させることのできる方法である。また、複数のサンプルを同等の条件で透明化することが可能である。医療現場で応用されている。

3 透明化試薬(CUBIC 液)の組成

私たちは以下の材料と分量で CUBIC 液を調製した。

ア尿素 25wt%

イ N,N,N',N' -テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン 25wt%

ウ トリトン X-100 15wt%

エ 水 35wt%

4 分光光度計について

分光光度計は光を利用した分析装置である。分光光度計を用いることで、溶液試料における定量分析や光の波長ごとの吸光度をプロットした吸収スペクトルの取得が可能である。また、固体試料においては、透過スペクトルや反射スペクトルを測定することができる。

私たちが使用したのは島津製作所の UV-2600 である。UV-2600 のオプションで積分球を追加すると近赤外領域まで測定が可能になる。まず白色光が分光器によって単色光に変わる。この単色光がサンプルに当たり、吸収されなかった透過光は受光器へいく。その後、吸光度のグラフが出来上がる。

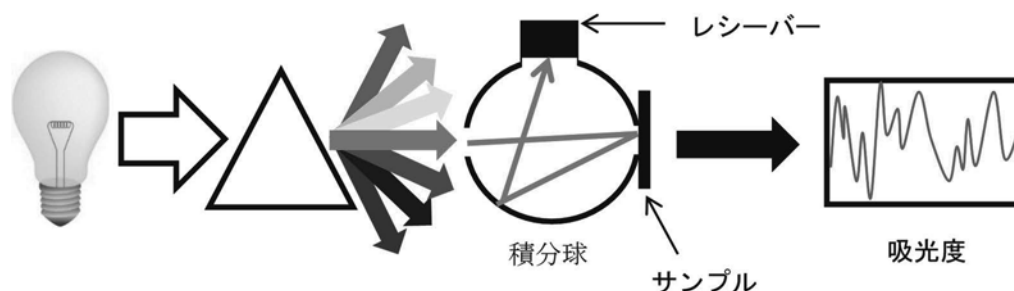


図1 積分球の仕組み

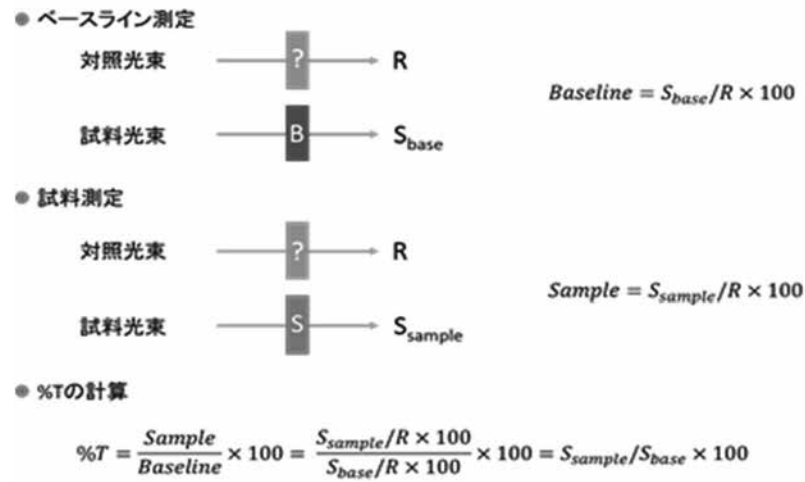


図2 吸光度の単位について

5 脱灰反応と除タンパク質・脱アセチル化反応について

(1) 脱灰反応

ア生物の硬組織からカルシウム塩の結晶が溶出する現象。あるいはそれを引き起こさせる実験上の操作。

イ実験操作において生物の硬組織からリン酸カルシウムや炭酸カルシウムといったカルシウム塩の結晶を溶出させて軟化させ、実験操作を容易にするための技法。

(2) 除タンパク質・脱アセチル化反応

ア除たんぱくの方法にはタンパク質の変性、沈殿による不溶化、物理的な除去、浸透制限カラムなどがある。

イ脱アセチル化反応は炭素を含む化合物の大部分である有機化合物からアセチル基が取り除かれる反応のこと。

ウアセチル基は、アミノ基の一種で、酢酸からヒドロキシ基(水酸基)を取り除いたものにあたる一価の官能基。

6 実験1

(1) 実験目的

透明化前後のダンゴムシの吸光度を比較する。

(2) 実験方法

ダンゴムシを採集した後、コールドスプレーで固定し、独自で調合したCUBIC液(組織透明化液)に浸して35℃の恒温器内で数日間保管して透明化をした。そして静岡大学にて積分球を取り付けた分光光度計で透明化前後のダンゴムシの吸光度を測定した。



写真1 生きたダンゴムシ

(3) 実験結果

透明化したダンゴムシは双眼実体顕微鏡で観察すると(写真2)(写真3)(写真4)のように見えた。また、透明化前後のダンゴムシの吸光度(図3)(図4)を可視光の範囲で比較すると透明化後ダンゴムシの方が全体的に吸光度の値が低かった。しかし、完全な透明ではなかった。

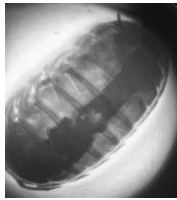


写真2



写真3



写真4

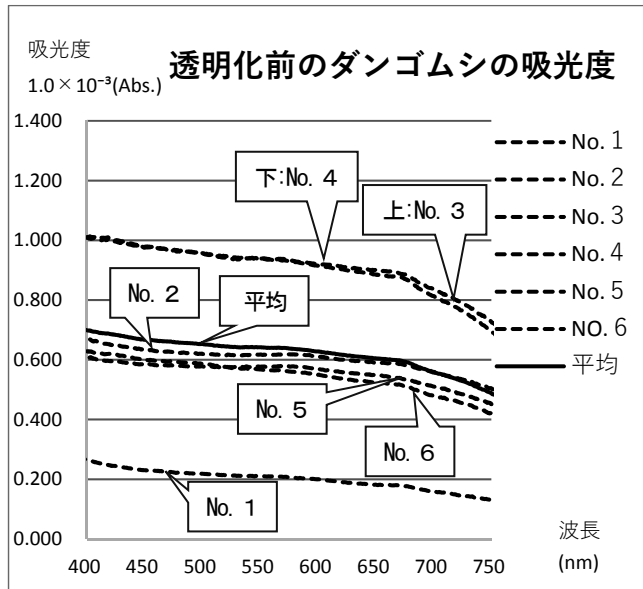


図3

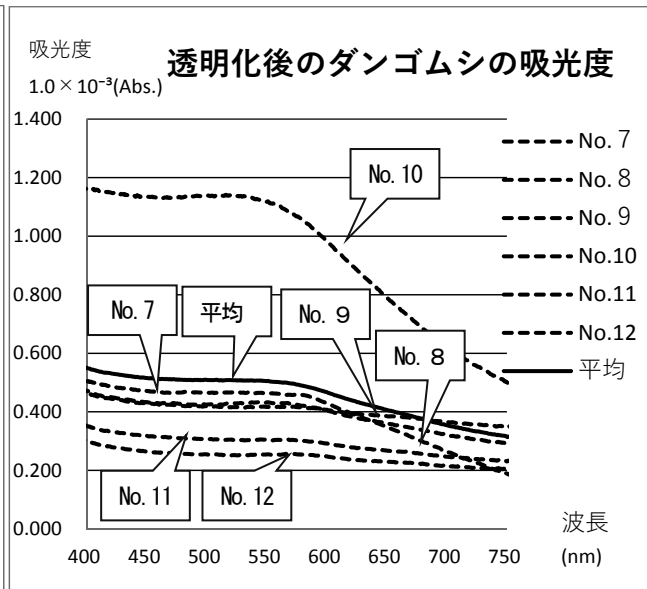


図4

(4) 考察

透明化後のダンゴムシのほうが吸光度が低い。光の三原色の範囲で平均の吸光度を棒グラフ化して比較してみた。(図5) この図からも、透明化後のダンゴムシのほうが吸光度が低いことが分かる。このことからダンゴムシはCUBIC液によって透明になったといえる。しかし完全な透明ではなかったため、塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を用いて脱灰反応でのカルシウム塩の除去、除タンパク・脱アセチル化反応でのタンパク質とアセチル基の除去を行うことで甲殻を柔らかくし、その後CUBIC液に浸せば完全な透明化が実現できるのではないかと考える。

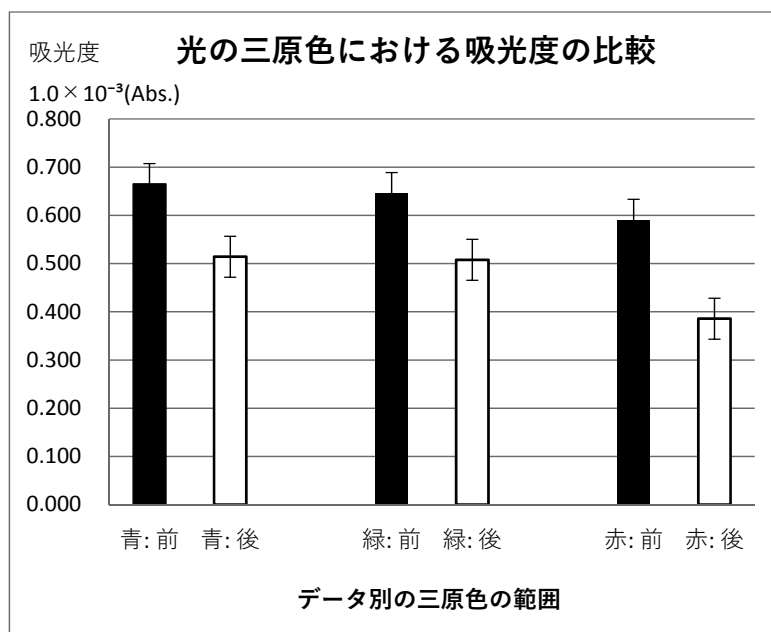


図5

7 実験2

(1) 実験目的

脱灰反応、除タンパク・脱アセチル化反応を行い、透明度を上げる。

(2) 実験方法

ダンゴムシを採集後、コールドスプレーで固定した。2mol/Lの塩酸と15mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を調合した。固定したダンゴムシを塩酸に入れ、乾熱滅菌庫(120℃)で60分脱灰反応を行った。PBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄した後に水酸化ナトリウム水溶液に入れ、乾熱滅菌庫(150℃)で120分除タンパク・脱アセチル化反応を行い、PBSで洗浄した。そしてCUBIC液に浸して35℃の恒温器内で数日保管して透明化した。これをサンプル①とする。後日吸光度を測定した。

(3) 実験結果

双眼実体顕微鏡で観察すると、(写真5)のようなダンゴムシが見れた。(図6)より吸光度は平均的にほぼ0に近い値となっている。



写真5

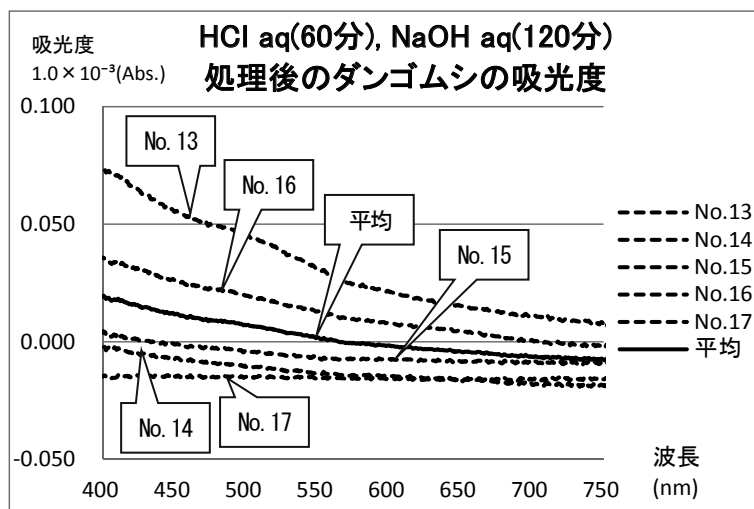


図6

(4) 考察

(図4)(図6)より塩酸で脱灰反応、水酸化ナトリウム水溶液で除タンパク・脱アセチル化反応を行ってから透明化したダンゴムシのほうがCUBIC液のみで透明化したサンプルより吸光度が低くなっている。この結果から、より透明になっていることが視覚的だけでなく、データからも分かる。しかし、塩酸と水酸化ナトリウム水溶液での反応時間が長かったためか、ダンゴムシの体が脆くなって原型を留めずに崩れてしまうサンプルもあったため、透明化に最適な反応時間の検討が必要である。

8 実験3

(1) 実験目的

ダンゴムシの透明化に適した反応時間を調べる。

(2) 実験方法

実験2と同様の手順で塩酸15分、水酸化ナトリウム水溶液30分で処理したもの(サンプル②)と、塩酸20分、水酸化ナトリウム水溶液40分で処理したもの(サンプル③)2パターンで実験を行った。それぞれ処理後CUBIC液に浸して35℃の恒温器内で数日間保管して透明化した。後日吸光度を測定した。

(3) 実験結果

塩酸15分、水酸化ナトリウム水溶液30分での処理後に透明化したダンゴムシは、(写真6)のようになった。塩酸20分、水酸化ナトリウム水溶液40分での処理後に透明化したダンゴムシは、(写

真7)のようになった。またダンゴムシの原型が崩れることもなかった。

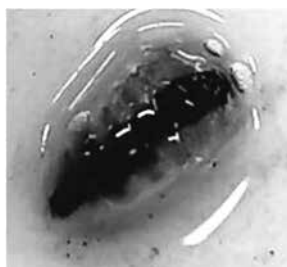


写真6

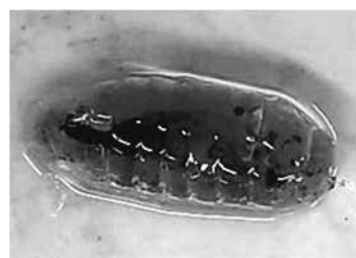


写真7

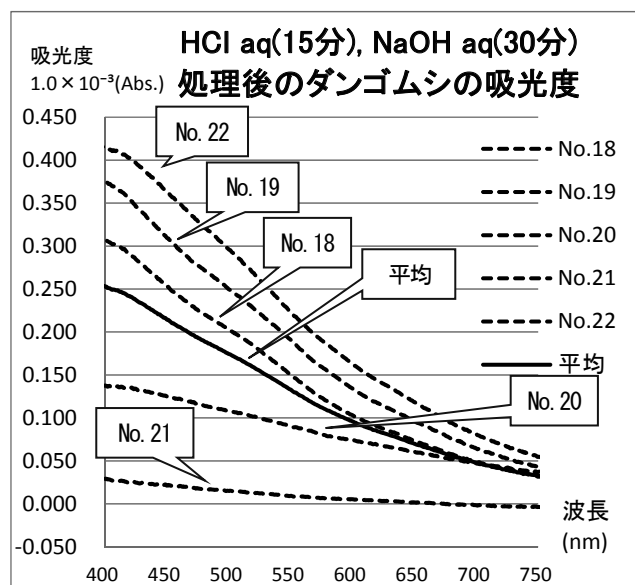


図7

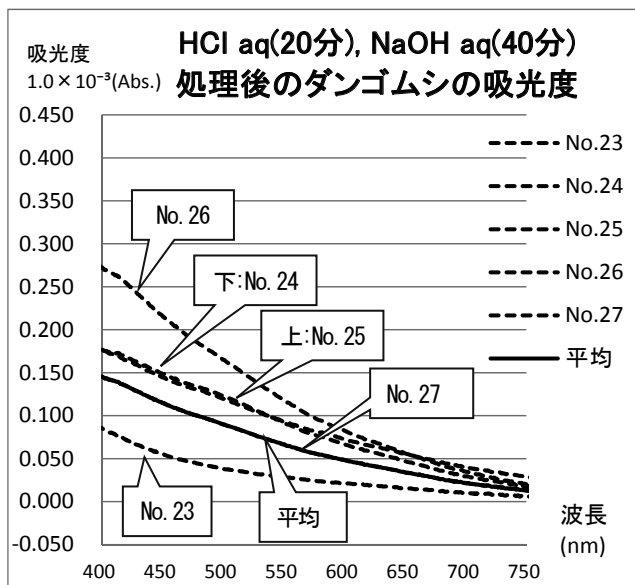


図8

(4) 考察

(図9)よりCUBIC液のみで透明化したものと比較すると、吸光度が低いため透明度が上がっている。このことからダンゴムシの原型を保ちつつCUBIC液のみで透明化したときよりも透明度を上げることができたといえる。しかしサンプル①と比べると吸光度が高いため透明度が落ちたことがわかる。また反応時間が長い方が透明度が上がっていることがわかる。今回の実験では実験2も含めて反応時間を3パターンしかやっていないのでまだダンゴムシの原型を保ちつつ透明度を上げることができる反応時間があるのではないかと考える。したがって、まだダンゴムシの透明化に最適な反応時間の検討が必要である。

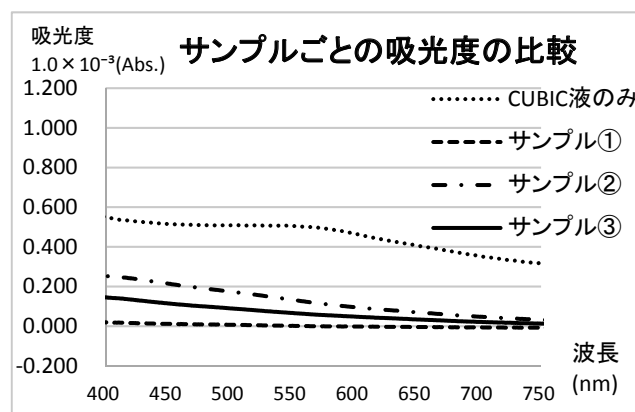


図9

9 参考文献

- ・Advanced CUBIC protocols for whole-body clearing and imaging(PubMed)
- ・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)
- ・甲殻類の処理方法(財団法人北海道地域開発研究所)

他 22 件