

センチュウの嗅覚と聴覚に基づく走性と寿命の評価実験

－ プロポリスに対するセンチュウの走性－



実施担当者 東北学院中学校・高等学校
教諭 小島 紀幸

左の写真は、科学部部員のひとりが、供試動物であるセンチュウの飼育用の培地を、クリーンベンチ内で作成している様子です。

これまでの研究の成果について、下記の通り、報告いたします。

1 はじめに

センチュウ (*Caenorhabditis elegans*) は、動物の発生研究ならびに遺伝子研究のモデル生物であるだけでなく、特に老化研究において寿命関連遺伝子が同定されるなど、世界的に注目されている動物です。本研究は、センチュウの優れた嗅覚と聴覚に着目し、生物由来の天然物質の主に匂いと音の周波数に対する主に走性の評価試験を実施することにしました。実験に取り組んだのは、この研究に興味関心を抱いている科学部の生徒約6名が中心です。センチュウの飼育方法の学習から寿命延伸効果が期待できる天然物質の探索に至るまで、十分な先行研究の調査と検討のもと、主体的に研究活動に取り組んできました。これから、一年間にわたる活動の成果をここに記します。

2 実験方法

2-1 センチュウ (*Caenorhabditis elegans*) とは

線形動物門に属し、多くが雌雄同体で自家受精をします。実験材料として優れた特徴をもつことからモデル生物として広く利用されています。全ゲノム配列がすでに決定しており、19000個の遺伝子が存在すると推測されています。世界的に発生学や神経学に関する多くの知見が得られているほか、寿命実験や行動実験、学習実験などが広く実施され、遺伝子レベルでの研究成果が多く得られている動物です。

2-2 研究試料の検討

今年度当初は、これまでのセンチュウの行動実験に関する先行研究について調査し、研究試料に関する議論を重ねてきました。最終的に、生徒たちとともに絞り込んだ物質がプロポリスです。

プロポリスとは、ミツバチがユーカリやマツ、ポプラなどの樹木から採取した樹液と自身の唾液とを混ぜ合わせ、巣箱のすき間や内部の壁に塗り付けた樹脂様物質であり、さまざまな実験から、抗菌作用や抗ウイルス作用、抗炎症作用等が注目されて物質です。

2-3 実験準備

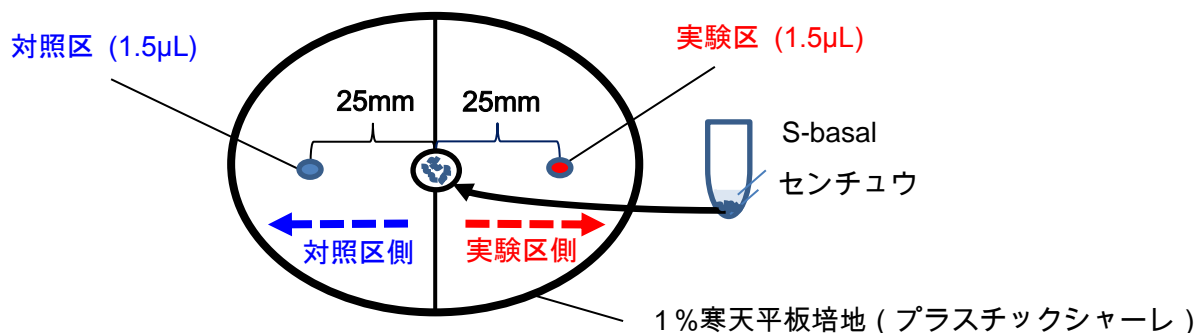
センチュウ (*Caenorhabditis elegans*) の飼育法について、まずは岩手大学工学部若林研究室にて、在籍されている博士研究員のシラパコング ピヤマースさんからご教示いただく機会をもちました。ピヤマースさんには、事前にセンチュウの飼育に関するさまざまな文献を取り寄せていただき、それらの内容について説明を受けた後、具体的な培地の作成法やセンチュウの飼育法、センチュウの幼虫ならびに成虫の判断方法など、実体顕微鏡による観察を通して、実際に体験する機会をもちました。



2-4 走性実験方法

- ①大腸菌を塗布したNGM培地（右図）でセンチュウ（系統：N2）を飼育し、飼育開始後4日目に増殖した成虫を行動解析に使用しました。
- ②培地中のセンチュウは、バッファー（S-basal）にて1.5ml用エッペンチューブにすべて回収しました。その後、軽く遠心機でスピンドウンさせた後、S-basalで3回洗浄したものを実験に使用しました。
- ③1%寒天平板培地（直径90mmプラスチックシャーレ）を作成し、下図のように、シャーレ裏面に油性ペンで中央にラインを引き、試料を滴下するスポットを中央から25mm離れた場所に決定します。さらに、シャーレ中央に直径10mmの円を描き、センチュウをのせるスポットとします。
- ④両スポットにまず、センチュウの動きを止める作用のある1Mのアジ化ナトリウムを1.5 μ L滴下し、15分間放置して培地に浸透したことを確認した後、下図のように、対照区には溶媒のみを、実験区には溶媒に一定濃度で希釈した試料（プロポリス）を同量滴下し、中央のスポットにはセンチュウを置き、1時間後の行動を解析しました。なお、センチュウを含んだバッファーはできるだけろ紙で拭き取り、センチュウが動けるようにしました。
- ⑤走性指数を算出し、プロポリスの濃度ごとの行動解析を実施しました。なお、センチュウスポット上の動かないあるいは動けない個体は全調査個体数からは除き、明らかに移動した個体を調査個体数としました。

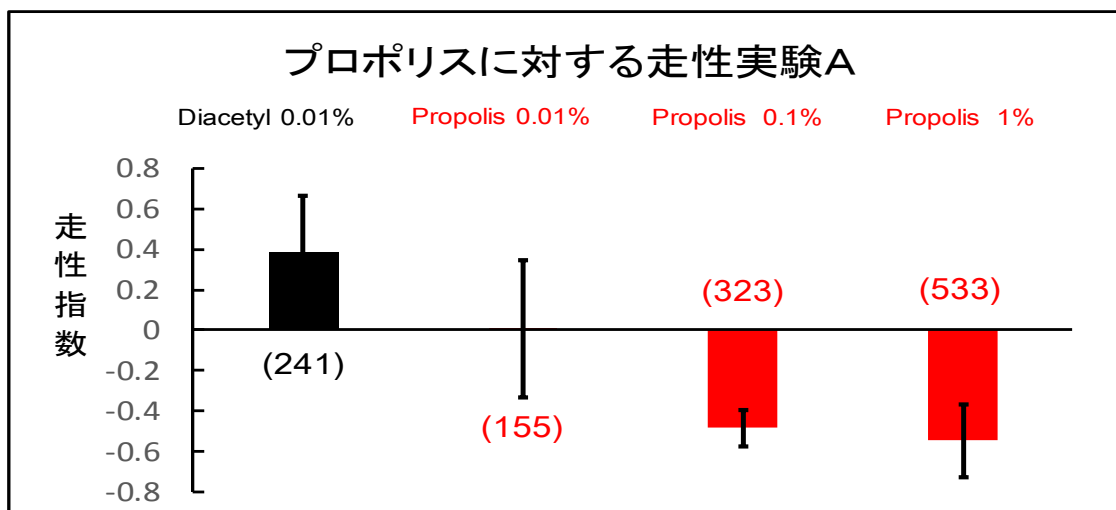
$$\text{走性指数} = (\text{実験区側に集まった個体数} - \text{対照区側に集まった個体数}) / \text{全調査個体数}$$



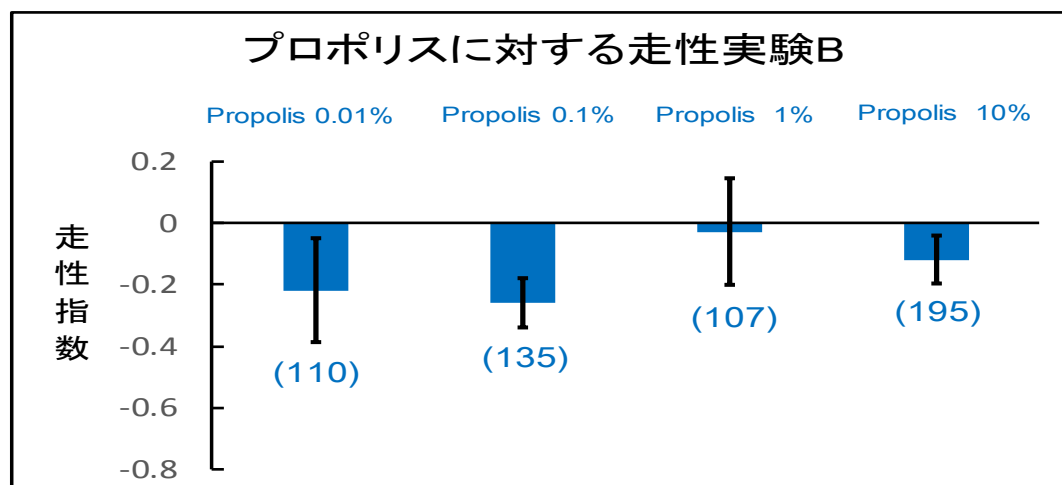
3. 実験結果

プロポリスに含まれる成分には、脂溶性あるいは水溶性成分が含まれるため、エタノール抽出と熱水抽出を行い、それぞれに溶解した成分について段階希釈し、走性試験を実施しました。結果は次の通りです。

3-1 プロポリスのエタノール抽出物（プロポリス走性実験A）と熱水抽出物（プロポリス走性実験B）に対するセンチウの走性実験結果



3-2 プロポリスの熱水抽出物に対する走性実験結果



※各プロポリス抽出物を 10%から段階希釈し実験区としました。図中のカッコ内の数値は調査した個体数を、走性指数は4~8回の実験の平均±標準誤差を示しています。

3-1の実験において、まず、ジアセチルを用いて実験を進めたのは、センチウがジアセチルに対して、正の走性を示すことがすでに証明されているからです。我々のプロポリスを用いた走性実験の方法に、まずは問題がないかどうか、ジアセチルを用いて再現性を確認することができました。次に、同様の方法にて、プロポリスのエタノール抽出物に対する走性実験を実施したところ、高濃度では負の走性を示す結果が得られたことから、濃度が高いほどセンチウの忌避効果が高まることを確認することができました。

一方、熱水抽出物を用いた3-2の実験では、全体的に負の走性を示す個体が多いものの、実験ごとのばらつきも大きく、エタノール抽出物ほどはっきりした忌避効果は確認できませんでした。

4. 考察

センチュウに対するプロポリスの投与実験は、過去に寿命への影響を調査する目的で行われており、プロポリスを与えられた個体では寿命延長が認められるという知見が得られています。しかしながら、殺菌効果があることも知られているプロポリスに対し、細菌を捕食するセンチュウが、どのような行動を示すのかはいまだに研究されておりません。プロポリスはミツバチがつくる天然物質であり、実験に用いたプロポリスはブラジル原産品ですが、幸いなことに成分分析がなされているため、今後の研究により、忌避効果を示す物質を特定することは可能になると考えております。なお、プロポリスを使った寿命研究では、その成分の中に、PAK1 (セリン/スレオニンプロテインキナーゼの p21 活性化プロテインキナーゼ (PAK) ファミリの一つ) を阻害する作用があり、寿命延伸効果につながっているという報告もあります。また、プロポリスには多くのフラボノイド化合物が含まれており、それらがもつ抗酸化作用が寿命延伸につながっているという報告もあります。これまでの走性実験結果に基づくならば、プロポリス成分の中でも、比較的含有量の多い脂溶性物質に対して忌避作用がもっている可能性が高いと考えます。したがって、今後は比較的含有量の多い脂溶性成分に焦点を絞り、まずは忌避作用をもつ成分を特定していきたいと考えております。

5. まとめ

5-1 連携機関先での研究報告の様子 (平成30年9月)

連携機関先とは計3回の打ち合わせの機会をもっていただき、その都度、右図のように、研修室での生徒発表の機会を設定してもらいました。

当日は、研究所の所長をはじめとする専門の先生方、研究員からのアドバイスを多くいただき、今後の研究の課題点や進展を目指す上でのご指導ご鞭撻をいただくことができました。



5-2 宮城県生徒理科研究発表会でのポスター発表の様子

右図は、平成30年11月7日に開催された高校生のポスター発表の様子です。

質疑応答もふくめて7分程度の発表時間でしたが、これまでの研究成果を集約し、科学部長を中心に、研究発表をしてくれました。

これまでの研究成果を評価していただき、生物部門で最優秀賞を受賞することができました。頂戴したアドバイスをもとに、今後さらに研究を発展させていきたいと思っております。



6. 謝辞

これまでの研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団科学教育振興助成のもと、実施することによって成果を得ることができました。ご支援を賜りました貴財団の軽部征夫理事長をはじめとする関係の皆様へ心から感謝申し上げます。

7. 参考文献

三谷昌平編. 線虫ラボマニュアル シュプリングー・フェアラー東京. 2003;1-224.

Porta-de-la-Riva et al. Basic Caenorhabditis elegans methods: Synchronization and observation J. Visualized experiments. 2012, 64: 1-9.

松浦哲也 線虫の化学感覚と行動. 比較生理生化学 2006, 23(1):1-19.