

# 生徒が進める課題研究における 分子生物学的・生化学的解析への取り組み



実施担当者 山梨県立韮崎高等学校  
教諭 萬木 敏樹

## 1 はじめに

本校では、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の科学教育振興助成をいただき、生物研究部の生徒が遺伝子やタンパク質等の測定及び動態解析を伴う実験研究を行った。

これらの実験支援を行うことによって、研究内容は質的に大きく向上したといえる。また、こういったレベルの高い課題研究に取り組むことで、高校生の課題解決能力は高まり、科学的・論理的思考力の育成につながったといえる。

## 2 助成対象の生徒が取り組んだ課題研究

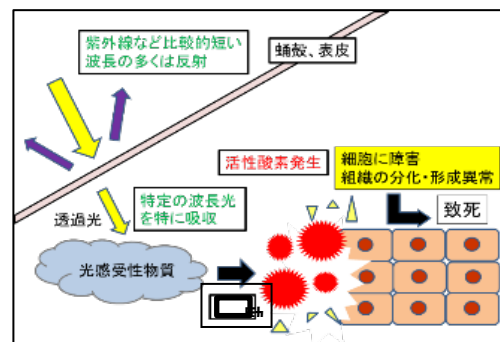
### 2-1 「青色光によるハエの死亡原因は本当に酸化ストレスなのか」

**【Abstract】** Blue light increases oxidative stress in *Drosophila Melanogaster*. As a result, apoptosis is induced in the DNA-damaged cells, and thus, resulting in the death of the insect. This is the mechanism of the insecticidal effect.

#### (1) 研究の動機

「青色LEDに殺虫効果がある」という研究成果が、東北大学の堀雅敏准教授の研究グループによって発表された(2014)。これまで紫外線などの短波長の光は昆虫に対して高い殺虫効果を示し、人体にも害があると言われていた。しかし、今回の先行研究は、可視光のような長い波長の光が生物に影響を与える可能性を示した。

私はこの現象に興味を持った。青色光が生



物にどのような影響を及ぼすのか、特に、未だ詳しくわかっていない「なぜ死亡するのか」という問題を解明したいと思い取り組んだ。死亡のメカニズムを明らかにできれば、仕組みを応用して、山梨県で生産が盛んな果物の害虫駆除に繋がると考える。

(2) 研究の目的

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて、青色光による殺虫効果の詳しいメカニズムを明らかにする。

(3) 研究の仮説

青色光による殺虫効果のメカニズムを明らかにするため、今回の研究に際して以下の仮説を設定した。

- ①ハエのもつ青色光感受性物質の1つであるクリプトクロム(Cryptochrome)、もしくはハエの視覚器に存在するロドプシン(Rhodopsin)が青色光を受容し、一連の反応のきっかけになっている。
- ②青色光を照射されたハエが酸化ストレス状態になることで、アポトーシスが誘導され、細胞の破壊が発現されることで、個体死が引き起こされる。

(4) 研究の結果 (一部)

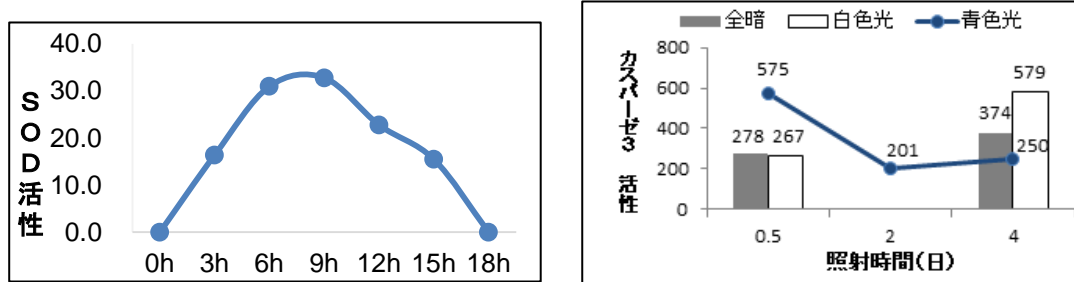


図3：カスパーゼ3活性の経時変化

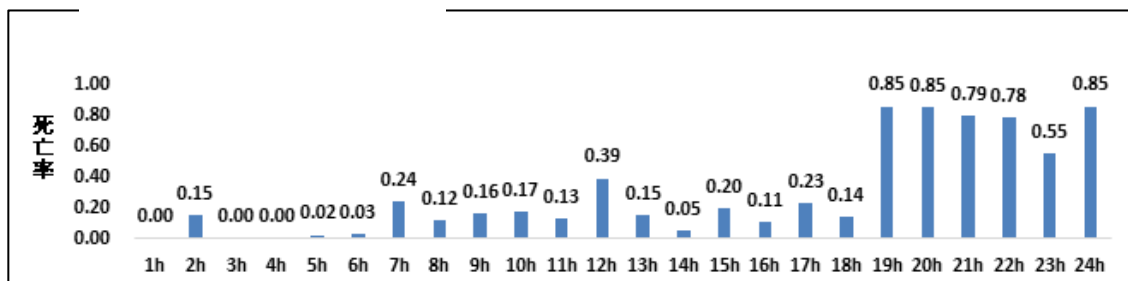


図4：青色光照射による1時間ごとの死亡率の変化

(注)研究の方法、結果の一部、結果の考察についてはスペースの関係から省略いたします。

(5) 研究の結論

- *Cry<sup>b</sup>* や *norp* が野生型とほぼ同じ死亡率を示した今回の研究結果からは、光感受性物質がクリプトクロムやRhを経由するシグナルではないと考えられる。
- 青色光照射は、3～6時間で蛹個体の酸化ストレスを上昇させる。その結果、アポトーシスによる細胞死が促進され、高い殺虫効果を示す。

(6) 今後の課題

- ①酸化ストレスによるアポトーシスは、ハエの体内の特にどのような器官の細胞に作用して個体死を引き起こすかを明らかにする。
- ②クリプトクロムやRhを経由するシグナル以外の光感受性物質の可能性を検証する。

## 2-2 「植物が酸性ホスファターゼを分泌する環境シグナルは何か」

【Abstract】 Plants need to adapt to their conditions to grow. Inorganic phosphorous is one of the necessary components for plant growth, and it is absorbed by the roots. When inorganic phosphorous in the soil decreases, LASAP2 decomposes organic phosphorus in inorganic phosphorous, so that it can be absorbed by plants. From earlier experiments, we learned that enzymes become most active when inorganic phosphorous, so that it can be absorbed by plants. We cultivated the plants using three different concentrations of phosphorous: normal organic phosphorous, 200% organic phosphorous and 20% organic phosphorous. As a result, of our experiments the same amount of enzyme was secreted proving the presence of both organic and inorganic phosphorus. We conclude that enzyme are not activated by organic phosphorous.

### (1) 研究の動機

現在、植物の三大栄養素のひとつであるリン酸の肥料の元であるリン資源の枯渇が懸念されている。世界ではリン酸のリサイクルが進められているが、肥料の需要の増加によりリン酸の取得が困難になる可能性がある。そんな中、植物はリン酸を自ら吸収できる形に分解していると知り、動けない植物がどのように環境に適応しているのか興味を持った。

### (2) 実験方法および原理

植物で一番多く酸性ホスファターゼ（以降 APase）を分泌すると言われているルピナスを用いて環境の変化や植物の成長による酵素活性の変化を調べた。p-ニトロフェノールをアルカリ水溶液で発色させ、それを吸光度で測定した。この値を酵素活性とした。APase とは植物が分泌する酵素である。植物は土壌中の無機リン酸を得て自分の栄養とする。APase は有機リン酸を分解して無機リン酸に変える酵素である。APase には 4 種類あり、今回私たちが注目したのは LASAP2 という根からの分泌型だ。

### (3) 研究の結果（一部）

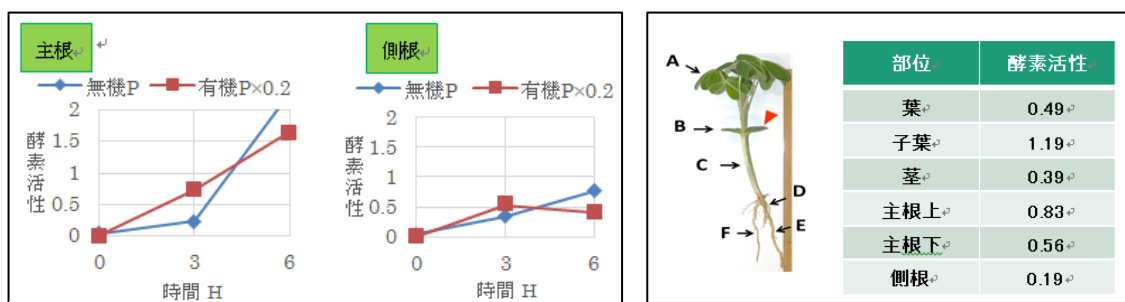


図6：ルピナスの各部の酵素活性

### (4) 研究の成果

- ・環境の無機リン酸欠乏には応答するが有機リン酸には応答を示さなかった。
- ・若齢固体の段階では、茎や葉で LASAP2 を合成し、根に師部転流・供給していると考えられる。

### (5) 今後の課題（または、ディスカッション）

- ・Lupinus albus を用いて、部位ごとおよび成長に伴う mRNA の変動を調べる。
- ・分泌されている LASAP2 を、SDS-PAGE を用いて分離し、タンパク量の違いを明らかにする。

## 2-3 「環境 DNA を用いた外来種の生息調査」

**[Abstract]** We researched to save *Lefua echigonia*. *Lefua echigonia* is an endangered species IB in Japan. It's important to find habitat that isn't known, in order to protect *Lefua echigonia*. And, it's important to find *Lefua costata* which is alien species which robs habitat of *Lefua echigonia*.

We used the survey of environmental DNA (eDNA) in order to find habitat. That is easier than the previous way of survey. Thus we used PCR method. We made primer which can be of use in PCR method and we evaluated. As a result of experiment, primer can take the survey of eDNA. And, we detected eDNA of *Lefua costata* in habitat which is Midoriko in Yamanashi.

### (1) 研究の概要

環境 DNA を利用すれば、生息調査を簡単に行える。これを地域に生息する生物の生息調査で活用できると考え、研究を行っている。今回は、ヒメドジョウとホトケドジョウの生息調査をするためにそれらに特異的なプライマーを作成した。また作成したプライマーの有効性を調べたところ、課題は残るがホトケドジョウとドジョウのユニバーサルプライマーの有効性を確認できた。

### (2) 研究の目的

環境 DNA を用いて外来種としてヒメドジョウ・絶滅が心配されている希少種としてホトケドジョウの生息調査を行うことを目的として研究を行う。ヒメドジョウが富士川水系のホトケドジョウの生息地を奪ってしまう可能性があるため、それを未然に防ぐため生息地の確定をするために生息調査研究を行う。

### (3) 考察

電気泳動の結果からポジティブコントロールとして使用した各魚の尾から蛍光が確認され、ユニバーサルプライマーもホトケドジョウ・ヒメドジョウの尾は蛍光が確認できたことから、作成した独自のプライマーは利用可能と判断した。

Table: 1 プライマーの有効性の確認結果

プライマー	A	B	C	D	E	F	G
ホトケドジョウ	○	△	△	○	△	×	×
ヒメドジョウ	△	×	×	△	○	△	×
ユニバーサル	△	○	○	○	○	×	×

A: ホトケドジョウの飼育水槽の水  
B: ヒメドジョウの飼育水槽の水  
C: ヒメドジョウと様々な魚の飼育水槽の水  
D: ホトケドジョウの尾から抽出した DNA (ポジティブコントロール)

## 3 まとめ

このたびの研究助成を受けて実施した生徒の課題研究が上記のものであるが、酵素活性の測定や PCR 法など高度な分子生物学的手法を用いて、レベルの高い研究が行えていることがわかる。生徒たちは研究対象に対して、思った通りのアプローチをすることができ、研究内容をみてもこのたびの取り組みが大きな成果を残していると評価できる。

## 謝辞

このたびの取り組みは公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の科学教育振興助成をいただき推進することができました。関係の皆様から感謝申し上げます。

## 主な参考文献

- 1) Lethal effects of short-wavelength visible light on insects. [Scientific Reports, 4, (2014)] Masatoshi HORI, Kazuki SHIBUYA, Mitsunari SATO, Yoshino SAITO
- 2) 和崎淳 (広島大学), <http://www.nougaku.jp/award/2008/wazaki.pdf>
- 3) 山梨県内におけるヒメドジョウの生息調査  
( [https://www.pref.yamanashi.jp/suisan-gjt/documents/jiho40\\_p30-33.pdf](https://www.pref.yamanashi.jp/suisan-gjt/documents/jiho40_p30-33.pdf) )