

カタユウレイボヤのペプチドホルモンの同定

松岡 未樹, 岸間 菜々美, 清瀬 茜

指導教員 村上 敦彦

雲雀丘学園高等学校 科学部

【目的】 原索動物の一種であるカタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* は、発生生物学で用いられるモデル生物で、発生の分子メカニズムを解読するために 2002 年にはゲノムが解読されている。しかし、内分泌系についてはまだまだ不明な点も多い。

今回はカタユウレイボヤから抽出されたペプチドを既知のペプチドホルモンと照合し、活性を測定することで、同定をおこなう。

【方法】

- 1 カタユウレイボヤからペプチドを抽出、精製する。
質量分析からアミノ酸配列を決定し、既知のペプチドホルモンと照合する。
- 2 特定されたペプチドホルモンの遺伝子を PCR で増幅し、サブクローニングする。
得られた産物をシーケンス解析し、ホヤのゲノムデータベースと照合する。
- 3 受容体遺伝子を GFP 発現プラスミドに挿入して HEK293MSR 細胞に導入する。
ホルモン活性を受容体が放出する Ca^{2+} 濃度の測定によって確認する。

【結果】

- 1 神経節から抽出された 2 種類のペプチドの 1 つは、tachykinin homolog であった。
また、もう 1 つのペプチドのアミノ酸配列は脊索動物では未知のものであった。
- 2 神経節から得られるペプチドホルモンの 1 つである cionin のシーケンス解析をおこなったところ、消化管ホルモンである gastrin や cholecystokinin と類似点が多く見られた。
また、ゲノムデータベースに登録されている配列とは完全に一致しなかった。
- 3 GnRH 受容体 1, GnRH 受容体 4, cionin 受容体 1 の遺伝子をそれぞれ GFP 発現プラスミドに HEK293MSR 細胞に導入した。導入したことは、蛍光顕微鏡で確認することができた。
次に受容体を導入した細胞に生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンである tGnRH-6 を加え、放出される Ca^{2+} を FLEX ステーションで測定したところ、GnRH 受容体 1 を導入した細胞でのみ活性が測定された。

【考察】

- 1 未知のペプチドの得られたアミノ酸配列の前に細胞外放出シグナル配列が見られたことから、ホヤ固有のペプチドホルモンである可能性がある。
- 2 得られたサンプルとデータベースの塩基配列の違いは個体差ではなく、生息地域によって遺伝子に差異があると推定される。調べたところ、カタユウレイボヤには 2 グループいることが知られており、データベースに記載されている試料はデンマークで採取された個体であった。
- 3 tGnRH-6 の受容体は GnRH 受容体 1 であると予想された。
また、tGnRH-6 の濃度を変化させて活性を測定したところ、シグモイド曲線を描くことから、tGnRH-6 と GnRH 受容体 1 の相関が高いことを示している。

高校生ポスター発表

E2

へたすきの原因探索から御所柿復活へ切り込もう！

○東晴菜¹，朝田拓海¹，美濃静香¹，森川晋平¹，森中拓海¹，笠原高貴¹，
中川光成¹，橋本色¹，大西莉穂¹，武内菜穂子²

¹奈良県立青翔高等学校，²奈良県立青翔高等学校教諭

【目的】御所柿は本校がある奈良県御所市原産のカキで、甘柿の起源であるといわれている¹。この柿は室町時代に突然変異により出現し、織田信長が食したとされる献立表にも記述が残っている²。また、正岡子規の有名な俳句「柿食えば鐘が鳴るなり法隆寺」の句で詠われている柿も御所柿であるなど¹、歴史的に見ても非常に興味深いカキである。他の甘柿にはない多くの特徴があり、上品な甘さと滑らかで粘質な舌触りをもっている。しかし、近年市場に出回ることは少ないため、御所柿に関する研究はほとんど行われていない。そこで、御所柿の様々な特徴を解明し、多くの人に知ってもらいたい！との思いから、SEISHO GOSHO-KAKI プロジェクトを立ち上げ、科学的にアプローチを行ってきた。3年間にわたり、細胞の大きさの違いや糖度、水分含量、細胞間接着成分、糖組成について解析を行い、他の柿には見られない御所柿独特な特徴が何に起因するのかを明らかにしてきた。

御所柿が市場に出回らない原因は、御所柿は完熟すると黒く損傷する「先割れ」や、へたの部分に隙間ができる「へたすき」が生じやすく、実が小さく青いうちに落下する「生理落下」が多く出たりする特徴にも起因する。このマイナスの特徴を改善することができれば御所柿復活への道も開けるのではないかと考えた。そこで、本年度は、御所柿に生じる「先割れ」や「へたすき」を科学的に解明し、将来的には改善することを目的として研究を行った。

【方法】**実験①** へたの前身であるがくの形態について御所柿と富有柿、上西早生柿、禅寺丸柿、西村早生柿、富有柿を比較した。液体絆創膏を利用したレプリカ観察を行い、がくの外側と内側の表皮細胞の大きさや形態、気孔の様子について、富有柿との観察比較を行った。**実験②** がく直下の果実の形態について御所柿と富有柿、藤原御所柿を比較した。さらに、がく周囲の果実の表皮切片を作製し、大きさや形態の比較を行った。

【結果】**実験①** 御所柿にのみがくが外側にきつくカールする特徴が見られた。しかし、がくの中央、端、表、裏の表皮細胞では、細胞の面積に顕著な差は見られなかった。**実験②** 御所柿と富有柿では、成熟果実の表皮細胞は部位によって大きさが異なった。特に、御所柿はへた直下の部分、富有柿は側面の部分が最も細胞が小さかった。

【考察】将来へたになるがくの形態に顕著な違いを見出した。農家の方も知らず、御所柿のがく形態に関する報告は検索されなかったため、自分達で原因を調べることにした。富有柿と比較して細胞数や細胞の大きさに顕著な違いは確認されなかったことから、御所柿特有の「きついカール」ががくの表裏の表皮細胞面積の差により生じるわけではないことが示唆された。また、果実の形態と「先割れ」や「へたすき」の関係を調べるために行った果実表皮細胞の大きさや形態観察の結果より、御所柿では特にへた直下の細胞が小さいことが確認された。カキでは、6月下旬以降の果実成長は果肉柔細胞の肥大と表皮細胞の分裂による³。御所柿ではへた付近での表皮細胞分裂の制御に異常が生じ、必要以上の分裂が表皮面積の拡大につながり、しわの原因になっている可能性が考えられた。

- 【文献】
1. 「うぐいす」復刻版（公開ごせまち講座）
 2. 小辰家文書（公開ごせまち講座）
 3. 中村三夫ら，1994，樹生産新技術カキの生理生態と栽培新技術，誠文堂新光社

高校生ポスター発表

E3

高校でもタンパク質以外の不凍物質が抽出できた！

○平重輝¹，藤木大悟¹，伊藤黎弥¹，当广怜央¹，名倉正騎¹，
西島拓海¹，吉岡友裕¹，生田依子²

¹奈良県立青翔高等学校3年生，²奈良県立青翔高等学校教諭

【目的】エノキタケからキシロマンナンというタンパク質ではない不凍物質が抽出できることが知られている(河原秀久 2014)。しかし、河原らの方法では大学の特殊な設備を用いなければ抽出することはできない。我々は以前からタンパク質以外の不凍物質に関心があり、高校の設備でも抽出できる方法の開発を目的とした。

【方法】

- ① 生のエノキタケに同量の水を加えてミキサーで粉碎し、一方は 10℃、他方は 100℃で 6 時間加熱した。その後、2%および 20%水酸化カリウム 100℃で 2.5 時間さらに加熱した。塩酸を用いて中和した。(ここまでは河原らの方法と同じである。)
- ② 透析チューブに方法①の液をいれ、蒸留水を入れたビーカーにひたし、透析をした。透析後、-20℃の冷凍庫で蒸留水と共に冷凍した。方法②は河原らの方法より、フリーズドライ、エタノール沈殿の除去、およびイオン交換カラムクロマトグラフィーの行程を減らした。
- ③ 得られた液を-20℃の冷凍庫にいれ、凍結するか確認した。
- ④ 得られた液と蒸留水に豚肉 32 g を浸し、凍結、解凍しドリップ量を比較した。
- ⑤ 得られた液と蒸留水に卵液を加え、プリンを作り、凍結させた。その後、解凍しプリンの状態を比較した。

【結果】図 1 より、冷凍庫で凍結させた場合、エノキタケ抽出液は凍結しなかった。また、図 2 より、解凍後、蒸留水のプリンは全重量の 28%、エノキタケ抽出液のプリンは全重量の 22%の水が出た。豚肉を蒸留水に浸した場合、ドリップは 1.4 g、エノキタケ抽出液の場合 0.9 g であった。

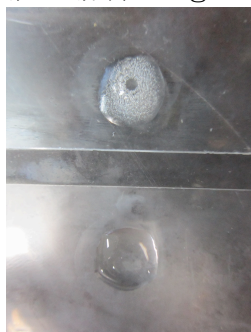


図1 上 蒸留水
下 エノキタケ抽出液

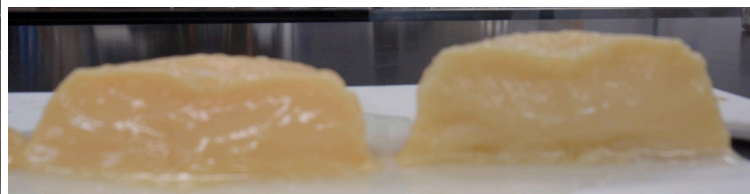


図2 左 蒸留水のプリン 右 エノキタケ抽出液のプリン

【考察】河原らの研究結果を再現でき、高温・強酸・強塩基でも、不凍効果を示したため、高校の設備でもタンパク質以外の不凍物質が抽出できたと考えられる。しかし、キシロマンナン以外の物質も混入している可能性がある。今後は精製の過程も工夫をしたい。また、現在は本校でエノキタケを栽培し、条件を変えた試料からの抽出を行っている。これが成功すれば、先行研究はないため初報告ができる予定である。

- 【文献】 1. Fhemanda, R., Smiderte, Elaine, R., Carbonero, Caroline, G., Mellinger, Gullherme L., Sasaki, philip A.J., Gorin, Marcello laccomini (2006) Phytochemistry 67, 2189-2196
2. 河原秀久. (2014) 不凍タンパク質に次ぐ新製品を開発 エノキタケ由来不凍多糖の量産化に世界で初めて成功 関西大学プレスリリース 配布試料

E4

地衣類に含まれている抗生物質の同定

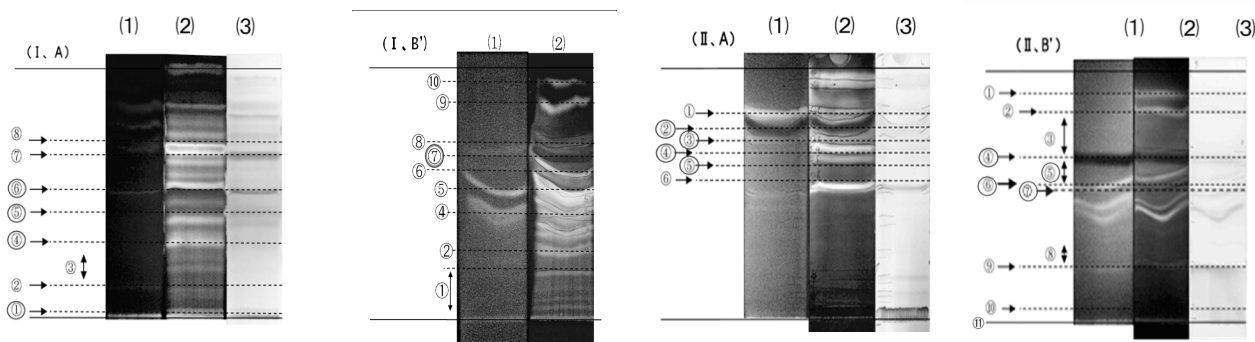
井上潮音 北田絢也 後藤啓之 新川幹人 ○畑中淳之介 藤田剛輝 ○矢野亜実

指導教員：南勉

兵庫県立神戸高等学校総合理学科

【目的】地衣類とは、藻類と菌類の共生体である。平成26年度の本校課題研究[1]により、本校周辺の地衣類の一部には抗生物質が含まれていることが確認された。今回の平成27年度の課題研究では、コフキヂリナリアとウメノキゴケという二種類の地衣類を使用し、地衣成分を分離することによって抗生物質の同定を試みた。

【方法】コフキヂリナリアとウメノキゴケをそれぞれ採取し、自然乾燥させてから摩砕する。この粉末状地衣類 10 mgにつき、抽出液(エタノール:酢酸エチル=1:1)を 1mL 加えて静置し、遠心分離することにより上澄み液を作る。この上澄み液を薄層クロマトグラフィーにかける。このとき、展開溶媒として、トルエン:ジオキサン:酢酸=180:45:5 の混合液(以下展開溶媒 A とする)、ヘキサン:メチルtertブチルエーテル:ギ酸=140:72:18 の混合液(以下展開溶媒 B' とする)を使用した。クロマトグラフィーが終了した後、254nm と 365nm の紫外線を照射したり、10%硫酸をクロマト板に噴霧し加熱したりすることにより、地衣成分が分離されていることを確認して、区域分けをした。この区域のうち、*Bacillus mycoides* に対して抗生物質を含む区域を調べた。含む区域に関しては、次にバンドごとに抗生物質の有無を調べ、抗生物質があると断定されたバンドは、Rf 値や紫外線照射時の蛍光などからバンドに含まれる抗生物質の特定を試みる。



【結果】

図中の番号について、(1)は365nmの紫外線を照射した際の写真、(2)は硫酸を噴霧した上で365nmの紫外線を照射した際の写真、(3)は硫酸を噴霧して蛍光灯下で撮影した写真である。また、数字のうち、丸がついているものは20mm以上の阻止円が形成されたバンドである。

【考察】コフキヂリナリアに関して、残念ながら物質の同定には至らなかったが、展開溶媒Aで分離した際、離れたバンドから20mm以上の大きな阻止円が形成された。このことから、ウメノキゴケには少なくとも二種類の抗生物質が含まれていると考えられる。

ウメノキゴケに関しては、Rf 値から 3-Dechloro-4-O-methylidiploicin、Lichexanthone、Hypophysciosporin の三種の化合物が候補に挙がった。このうち、Lichexanthone について、別の論文[2]で抗菌作用を持つことが確認されている。

【文献】 [1] 赤坂貴浩 et al. 地衣類と抗生物質についての研究、神戸高校課題研究発表会論文集 2015

[2] N.K.Honda et al. Antimycobacterial activity of lichen substances, pp328-332, Phytomedicine 17, 2010

[3] Analysis of Lichen Substances および WINTABOLITES http://nhc.asu.edu/lharbarium/lichen_info/tlc.php, 2016年3月21日最終閲覧

E5

アブラナ科植物の化学生態

3年 田部瑞貴, 中川実香, 中井星奈

指導教員: 藤原裕己

大阪府立住吉高等学校 アブラナ班

【目的】

アブラナ科植物の二次代謝産物であるイソチオシアネート (ITC) は、アブラナ科植物にとって防御物質であるという仮説を立てた。この研究の目的は、アブラナ科植物におけるイソチオシアネートの役割、アブラナ科植物とイソチオシアネートの関係性や、天敵であるモンシロチョウや、モンシロチョウに寄生するアオムシコマユバチとの関係性を明らかにすることである。

【方法】

- アブラナ科植物の天敵であるモンシロチョウの幼虫による食害を再現し、その後葉に含まれるイソチオシアネートの含量がどのように変化するかを調べる。
- シャーレの中に、イソチオシアネート含量をあらかじめ調べておいた3種類のアブラナ科植物の葉とモンシロチョウの幼虫を一緒に入れて、幼虫はどの葉を選択するのか調べる。
- 実際にアブラナ科植物の葉を食べたモンシロチョウの幼虫の体内に含まれるグルコシノレート (イソチオシアネートの前駆物質) の量を測定する。
- グルコシノレート含量の少ない人工飼料のみを食べさせたモンシロチョウの幼虫と、野生のモンシロチョウの幼虫を用いて、幼虫を寄生対象とするアオムシコマユバチが、どちらに寄生しやすいかを調べた。

【結果】

- 切り込みを入れた葉は、切り込みを入れた3日後から6日後にかけてイソチオシアネートの含量が上昇し、その後低下した。
- 一番イソチオシアネート含量が少ない耐病総太りダイコンが、モンシロチョウの幼虫に一番選択されていた。
- 幼虫が成長するにつれて、体内に含まれるグルコシノレートの濃度が上昇していた。
- グルコシノレート含量のより少ない人工飼料で育てたモンシロチョウの幼虫のほうが、野生のモンシロチョウの幼虫よりも寄生された回数が多かった。

【考察】

A, Bの結果から、アブラナ科植物は、天敵による食害に应答して、イソチオシアネート含量を上昇させ、天敵であるモンシロチョウの幼虫を忌避し、二次的被害を防いでいると考えられる。またCとDの結果から、グルコシノレートにも天敵に対する忌避効果が発揮されており、モンシロチョウの幼虫はグルコシノレートを蓄積することで、天敵から身を守ろうとしているのではないかと考えられる。

【文献】

- アゲハ人工飼料ピロトコール(J T生命誌研究館 HP)
- アオムシコマユバチの生態
(<http://www.big.ous.ac.jp/~nakamura/HTML/tagawa/study/cg.htm>)
- 江崎秀男・小野崎博通. 大根中の辛味成分の比色定量法. 栄養と食糧. 1980, 33, pp.161-167.

高校生ポスター発表

E6

ウミホテルの発光実験

○光崎玲子, 關航志, 土手元貴

指導教員: 受川達也

神戸市立六甲アイランド高等学校

発表要旨なし。会場にて示説・質疑応答いたします。