

(原稿作成例)

ページ設定：文字数 42 字、行数 38 文字、
余白上下 30mm、左 30mm、右 25mm。MS 明朝。
執筆にあたっては、下記枠内の指示に従ってください。スーパーファ
イン用紙 (A4 判) に印刷し、電子媒体と併せて提出してください。

蚕への各種ストレスの供与と産生される絹糸の品質に関する研究

河原 壽治・衣笠三郎

タイトル：14 ポイ
ント Bold、著者
名：12 ポイント、
所属：10 ポイント

1. 2. ... のタイトルは 12 ポイント、Bold

当財団理事、評議員であっても所属、住所は記載する

1. 研究背景と目的

本文は、10.5 ポイント

これまでの広食性カイコ (*Bombyx mori*) の摂食行動・植物選択行動に関する研究から、多種多様な人工飼料の開発が可能となり、農学面だけでなく、養蚕経済学的にきわめて重要な成果が得られている。その中で、~~クワ葉中の炭酸カルシウムは~~ ~~摂食促進因子であることが確認されている~~ [1]。クワ葉文献は、番号で示し、2 件の場合も、一葉に蓄積されるが、特にクワは他の植物と異なり、括して[]で括る。クワ葉に蓄積される炭酸カルシウムに着目したとき、春と秋では蓄積量が異なる。炭酸カルシウムに対して摂食行動を示すカイコにとっても、もし、他の動物と同様であれば炭酸カルシウムの多い秋の葉は春に比べてストレスとなる。その不完全な延伸が起こると、フィブロインは silk1 結晶[3,4]を生成するのではないかと考えられる[5]。

1
行
空
け、
次
項
に
進
む

2. 材料および方法 (or 調査方法)

2.1 DNA の抽出

11 ポイント、Bold

人工飼料で育成したカイコ (*Bombyx mori* 交雑種 ‘錦秋’ X ‘鐘和’) の 5 齢幼虫から、左右の絹糸腺を摘出した後、後部糸腺 (約 0.3 g/頭) のみを選択的に採取した。後部糸腺組織を 0.8% NaCl を含む 0.01M クエン酸ナトリウム溶液 (SSC) で磨砕し、遠心分離により沈殿画分を得た。その画分を SSC で洗浄した後、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液中で攪拌することにより蛋白質を可溶化した。この DNA 溶液を適宜希釈した後、分光光度計で波長 200~300nm 範囲の吸光度を測定した。260nm の吸光度 1.0 が 50 μ g/mL として DNA 濃度を算出した。

2.2 PCR の条件

PCR の反応液の組成 (40 μ L) は、鋳型 DNA 5 μ L, プライマー (Forward と Reverse を含む) 5 μ L, Quick Taq HS DyeMix™ (TOYOBO) 20 μ L, 滅菌 蒸留水 10 μ L であった。Quick Taq HS DyeMix には、Tag DNA ポリメラーゼ、dNTP、電気泳動用色素、反応緩衝液が入っており、2 倍濃縮のプレミックス液である。PCR 条件は、特に断りのない限り、次の通りである：反応① 94°C (30 秒間) → 反応② 60°C (30 秒間) → 反応③ 70°C (1 分間) の 30 回繰り返し。反応は、反応液 40 μ L を入れた 200 μ L 容チューブをフロートトラックに装着して、反応①では 30 秒間、反応②では 30 秒間、反応③では 1 分間、それぞれの水槽に順次浮かべて行なった。

2.3 アガロース電気泳動と染色

2%アガロースゲルのウェルに PCR 増幅産物 (20 μ L) を注入し、100 V で 30~40 分間電気泳動した。なお、標準 DNA サイズマーカーとして、50 bp DNA Ladder Marker を用いた。電気泳動後、ゲルを 100 倍希釈の Fast Blast™ DNA 染色液 (Bio-Rad) に浸し、緩やかに振盪しながら数分間染色した。その後、水道水で脱染色した。

3. 研究成果 (or 調査結果)

3.1 抽出した DNA の純度と収量

磨砕した後部糸腺組織からの DNA 抽出は簡単であり、SDS で可溶化した蛋白質を高塩濃度条件下で凝固・沈殿化する操作のみである。DNA の紫外吸収スペクトルを測定した結果、 $A_{260}/A_{280}=2.0$ 、 $A_{260}/A_{230}=1.7$ であり、夾雑タンパク質が少なく極めて純度が高く、その DNA 収量は 300~400 μ g/頭であった。この DNA 標品を適宜希釈して、鋳型 DNA 溶液を調製した。

図、表の番号
は Bold

3.2 サーマルサイクラー機器による PCR 条件の検討

1) 反応の繰り返し回数と鋳型 DNA 濃度

鋳型 DNA 濃度を増加させても、雌特異的 W マーカーの DNA バンド (W-Yukemuri-S) が検出できなかった (図 1)。25 回繰り返しでは、鋳型 DNA 量を 2.5 ng/ μ L にした場合、

1) 片括弧

表 2. 大腸菌接種個体における PGRP 遺伝子の発現量変化

遺伝子発現量	有意差	プローブ数	
		3 時間後	12 時間後
増加	P < 0.01	0	0
	P < 0.05	0	1
減少	P < 0.01	0	0
	P < 0.05	0	0
変化なし	-	297	296
総数		297	297

表のタイトル (10
ポイント、Bold)
は表の上に、説明
(9ポイント)下。

大腸菌接種個体のマイクロアレイ解析により、PGRP 遺伝子の発現量変化を調べた。ツマゲロヨコバイマイクロアレイには PGRP 遺伝子のプローブが 297 種 (150 遺伝子) 搭載されており、この中で水注入個体に比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を示した。有意差検定は t 検定による。羽化 1 日齢のメス成虫に 1.5×10^5 の大腸菌 (DH5 α) を注入し、5 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して注入 3 時間後では 3 回、注入 12 時間後では 4 回の反復実験を行った。t 検定を行った (*: P < 0.05, **: p < 0.01)。

極めて薄いバンドが現れたが、明確でなかった。それに対して、30 回の繰り返し反応で試したいずれの鋳型 DNA 濃度でも明瞭な 1 本のバンドが検出された (図 3)。この増幅したバンドは、標準 DNA サイズマーカーとの比較から、300 bp と 350 bp の間に現れた。Abe ら (2005) は、この増幅バンドの塩基対 (bp) は 324 bp であること報告しており、本結果と完全に一致していた。

両端を揃える

2) 反応温度の許容範囲

手動 PCR 法では、水槽の温度を持続的に一定に維持することは困難であり、繰り返しの反応工程で温度変化が起こり、DNA 増幅に影響を与える可能性がある。各反応温度を 4℃または 5℃の幅をもたせて、PCR を行なった。反応①では 96℃、94℃、92℃で行ない、反応②では 61℃、58℃、56℃で、反応③では 73℃、70℃、68℃で実施した。

4. 今後の展望

クワ葉の厚壁異形細胞に含まれる結晶性 Ca の吸収 絹糸腺は繭の原料を合成するだけでなく、生理的役割として、過剰に摂取した Ca の選択的排泄も担っている (赤尾 1943)。つまり、絹糸腺のイオンバランスは摂食したクワ葉からのミネラルの影響を受けやすい。しかし、これ

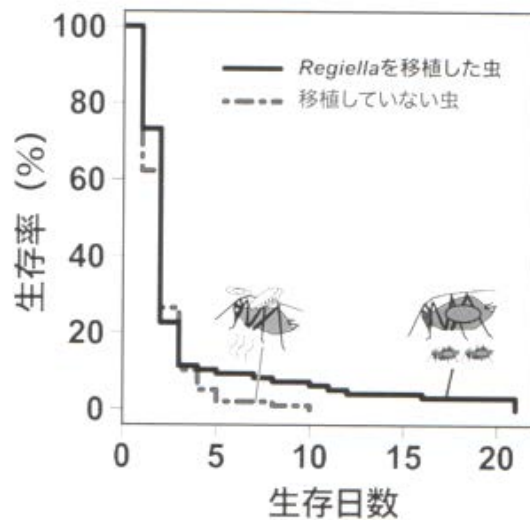


図3. ソラマメとアブラムシのシロツメクサ上での生存率の推移と *Regiella* 移植の効果

Regiella 移植虫 (実践)、移植していない虫 (破線) ともに.....シロツメクサ上での生存率が有意に増加し (一般化線形モデル、 $p < 0.05$)、移動前には成虫にさえなれなかった系統でも産仔が確認された。

図のタイトル (10 ポイント、Bold) は、図の下に。説明は続けて (9 ポイント)

をさらに強固にするため、季節だけでなく複数の異なる品種の交雑種について追試実験を行い、絹糸腺の生理機能的特徴を確認する。.....

11 ポイント、Bold
謝 辞

謝辞文章: 9 ポイント

本研究の遂行に当たり、○をご提供下さいました群馬県蚕糸技術センター・○○研 究員、無機分析にご協力下さいました○○技術研究所・○○研究員、並びに繊維構造解 析にご協力下さいました○○大学・○○○教授、○○博士研究員へ深謝致します。

5. 引用文献

引用文献は9ポイント、本文中での引用順に並べる。

[1] 赤尾 晃 (1943) 家蚕の吐糸に関する研究 IV. 絹糸腺除去蚕の生化学的態より観たる絹糸腺の生物学的意義に就いて. 蚕試報. 11(3), 295-309

[2] Asakura, T., Ashida, J., Yamane, T., Kameda, T., Nakazawa, Y., Ono, K., Komatsu, K. (2001) A repeated β -turn structure in Poly(Ala-Gly) as a model for silk I of *Bombyx mori* silk fibroin studied with twodimensional spin-diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance. *J. Mol. Biol.* 306, 291-305.

なお、参考文献、参考図書の記載は、特に重要なものがあれば記載して下さい。

学術雑誌名は、論文中、最初はフル・ネーム、2度目からは略名。最初: 蚕糸試験場報告、2度目からは蚕試報、最初: *Journal of Molecular Biology*, 2度目から *J. Mol. Biol.* と記載する