

発光バクテリアの好む栄養源とは

田口 心 帯屋 直希 神田 実穂 高木 真実 藤田 知之 森 遥香
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

普段私たちが食べているスルメイカ (*Todarodes pacificus*) は、暗所では光って見える。これは体表に青白く光る発光バクテリア (*Vibrio fischeri* 以下 *V.fischeri*) が生息しているからである。私たちは、*V.fischeri* が、スルメイカに生息することでどのような利益を得ているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。そこで、*V.fischeri* はスルメイカの体表に含まれる栄養分を求めて生息していると仮定し、その栄養分やそれに類似した栄養分などを培地に加えて培養することで、*V.fischeri* の分裂速度がどのように変わるのかを調べた。その結果、*V.fischeri* の分裂速度を速める物質の特定には至らなかったが、発光を強める可能性のある物質が浮かび上がった。

1 はじめに

1.1. 研究の動機と目的

私たちは環境問題に興味を持ち調べていたところ、発光バクテリアの存在を知った。培養液中に重金属イオンなどを入れると発光バクテリアの発光が弱まることを応用し、環境汚染の度合いを測定できないか研究されている。発光バクテリアは海洋中に多く存在しており、現在確認されている4族19種のうち3族16種が海洋性であり、沿岸から外洋の海水や海底泥、海洋動物の体表や腸管、特定の魚類、イカ類の強制発光器官内から分離される。特に、身近な生物ではスルメイカの体表に *V.fischeri* が多く生息していることが知られている。しかし、光る理由やどのような共生関係を結んでいるかなど明らかになっていないことは多い。そこで私たちは、*V.fischeri* は、スルメイカに生息することでどのような利益がもたらされるのかを疑問に思い、それを栄養分の視点から解明しようと試みた。

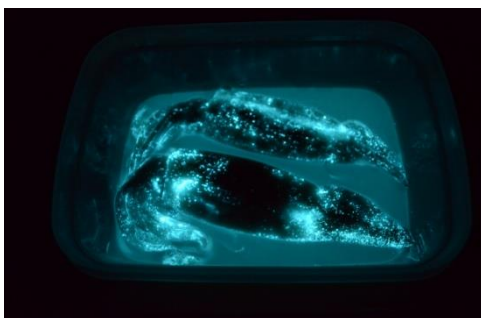


図1 暗室で観察したスルメイカ
(露光 30 秒)

1.2. 発光バクテリアの発光の仕組み

発光バクテリアは、密度がある一定まで大きくなるとバクテリアが分泌する物質の濃度が全体として増え、バクテリアがその物質を感知し発光する。そ

の密度はまだ明らかになっておらず、私たちは当初それを計測しようと試みたが、適切な実験系を組むことができなかったため断念した。

発光バクテリアの発光はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応 (L-L 反応) によっておこる生物発光である。これはルシフェリンという基質とルシフェラーゼという酵素が使われている。まず、ルシフェリンがルシフェラーゼとマグネシウムにより ATP と結合し、ルシフェラーゼによって酸素と結合する。その後 AMP、二酸化炭素を放出することでオキシルシフェリンとなる。オキシルシフェリンは不安定な物質であるのでエネルギーを放出するのだが、この放出するエネルギーが光として認識されるのである。

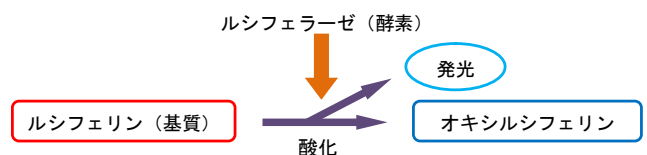


図2 発光の仕組み

2 本実験の概要

イカの体表に含まれる栄養分やそれに類似した栄養分を液体培地に入れることで、*V.fischeri* の分裂速度がどう変わるかを調べた。

それぞれの液体培地の吸光度 (ABS) 濁度を 1 時間ごとに測定するとともに、初めと終わりに液体培地を寒天培地にまき、できたコロニーの数を数えることによって菌体数を調べることで増殖速度を調べた。

3 仮説

発光バクテリアはイカ以外の魚類にも存在することから、イカに生息するのは物理的な条件ではなく栄養条件が大きく関係していると考えた。

イカの色素胞の主な色素成分はエリスリトールである。そしてエリスリトールは糖アルコールの一種で、一般に糖アルコールは細菌の栄養分になりにくい。それにもかかわらず、イカの色素胞には発光バクテリアが多くいることが分かっている。このことから、*V.fischeri* にとってスルメイカの体表は栄養分を独占できる場所であるため *V.fischeri* はスルメイカの体表に生息するのではないかと予想された。

4. 実験条件の設定

- ・実験に使用する発光バクテリアの採取には、スルメイカに存在する発光バクテリアを用いた。
- ・バクテリアの培養は海水中の温度を参考に 8°C に設定したインキュベーターMIR-153(三洋電機株式会社)内で行った。
- ・液体培地は振盪培養機ラボシェイカーBC-730(株式会社バイオクラフト)で76.5回/分に設定して振盪培養した。
- ・寒天培地に発光しているコロニーが観察されたあと、菌の死滅を遅らせるため冷蔵庫(7°C)に移し、保存した。
- ・発光バクテリアは1か月間に10回程度寒天培地で植え継ぎをして単離したものを液体培地に移し、それをさらに希釈したものを使用した。

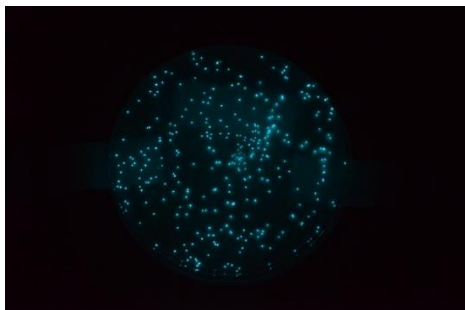


図2 寒天培地で単離した *V.fischeri*(露光 25 秒)

- ・培地を扱う操作においては、全てクリーンベンチ内で行った。
- ・培地は海水中の栄養分を主な成分とする Marine Broth2216(Difco Laboratories)を 37.4g/L 使用した。寒天培地には Agar(シグマ アルドリッチ)を 15g/L 使用した。
- ・液体培地に対し操作を行った前後には、それを毎秒 2000 回転の vortexer(heathrow scientific のボルテックス)に 5 秒かけた。
- ・分光光度計 UVmini1240(島津製作所)で測定する際には人工海水レッドシーソルト(株式会社エムエムシー企画)でそれぞれ 5 倍に希釈した。
- ・バクテリアの培養の開始時刻を 0 時として測定を

行った。

- ・液体培地に加える栄養源としては以下の 5 つを選んだ。
 - ① スルメイカの煮汁の粉末
→煮汁を煮詰めて粉末状にしたもの
 - ② エリスリトール【C4H10O4】(大東物産株式会社)
→スルメイカの体表の色素胞の主成分
 - ③ キシリトール【C5H12O5】(東京化成工業株式会社)
→エリスリトールに化学構造が似ている糖アルコール
 - ④ グリセロール【C3H8O3】(米山薬品工業株式会社)
→エリスリトールに化学構造が似ているアルコール
 - ⑤ 2-アミノエチルホスホン酸【NH₂C₂H₄PO₃H₂】(和光純薬工業株式会社)
→イカの皮に多く含まれており、多くのバクテリアが分解することができる栄養分であると知られていることから、*V.fischeri* にも同様の機構があるのではないかと予想
また新たに栄養分を加えない、液体培地のみのものも 6 つめの培地として準備した。

5. 実験方法

- (1) 測定 1 日前に、6 本の培養チューブに滅菌済みの液体培地を 10ml ずつ入れ、図 3 のように各種栄養分を 0.05g ずつ加える。各種栄養分は 4 の①～⑤で示した通りである。
- (2) (1)に、培養された発光バクテリアの入った液体培地を 0.1ml ずつ加え、振盪培養機の上で培養する。

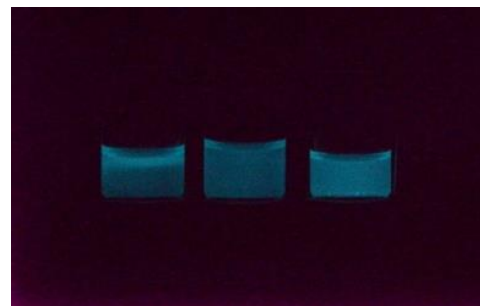


図3 光っている液体培地(露光 15 分)

- (3) (1)(2)の 24 時間後、それぞれの培養チューブから 1ml、人工海水を 4ml 取ってセルに入れ、分光光度計で吸光度(ABS)と透過率を測定する。この操作を 1 時間ごとに、計 7 回行う。また、測定開

始から 23 時間後にも同様の操作を 1 回行う。

- (4) (3)と同時に、それぞれの培養チューブから 10 μ l とったものを 100 万倍、1000 万倍に希釈して 200 μ l ずつ寒天培地にまき、スプレッダーで広げる。この操作は測定開始時、測定開始から 6 時間後、23 時間後の計 3 回行う。ただし、測定開始から 6 時間後と 23 時間後にこの操作を行う際には、培養チューブからとったものを 1000 万倍、1 億倍に希釈してまく。
- (5) (4)の寒天培地にコロニーができたならその数を数え、まいた時刻に液体培地中に存在した菌体数を計算により求める。
- (6) (3)と(5)のデータをもとに、時間の経過と菌体数の変化の関係をグラフ化する。

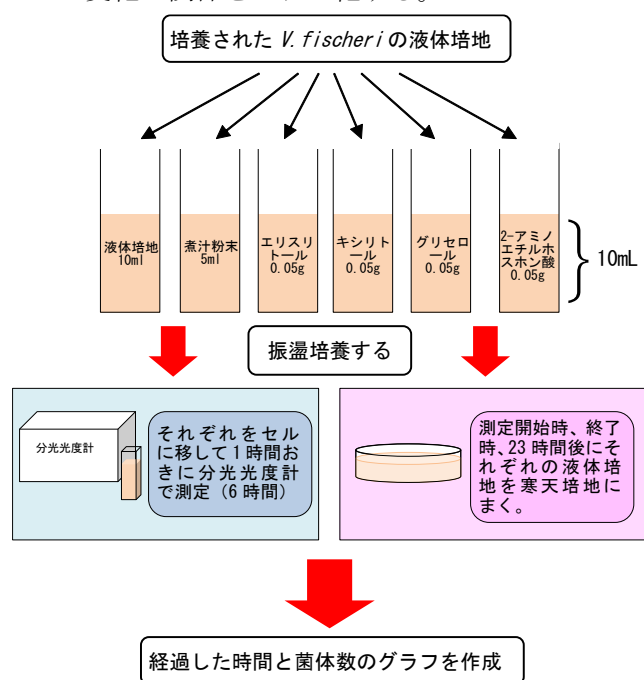
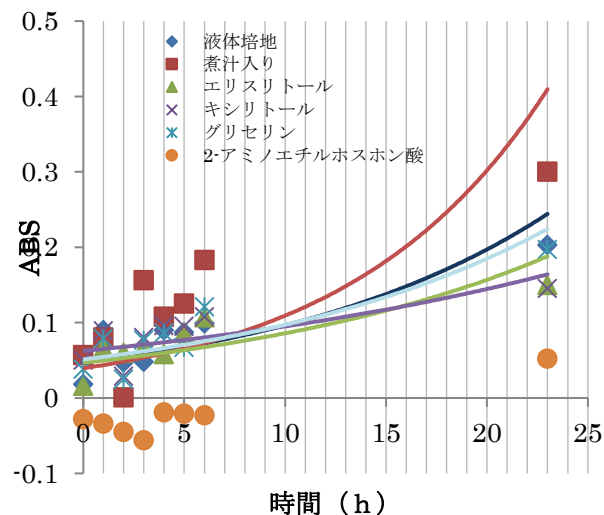


図 4 実験手順

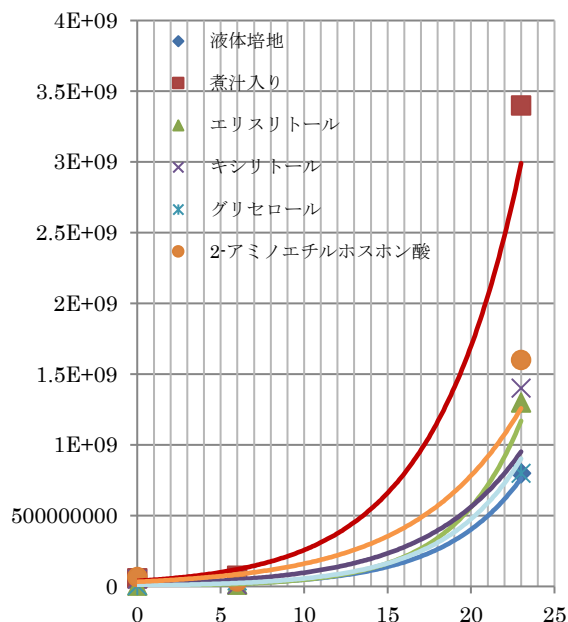
6. 結果



グラフ1 吸光度 (ABS) の変化のグラフ

表 1 200 μ lあたりの菌体数の変化 [100万個]

時刻	液体培地	煮汁入り	エリスリトール	キシリトール	グリセロール	2-アミノエチルホスホン酸
0	6.47	56	5.54	50	4.71	65
6	17	74	12	11	38	34
23	800	3400	1300	1400	800	1600



グラフ2 菌体数の変化

- ・実験方法(4)でまいた寒天培地を3日後に暗室で観察したところ、煮汁を加えたものと2-アミノエチルホスホン酸を加えた培地のコロニーが際立ってよく光っていた (図6)。

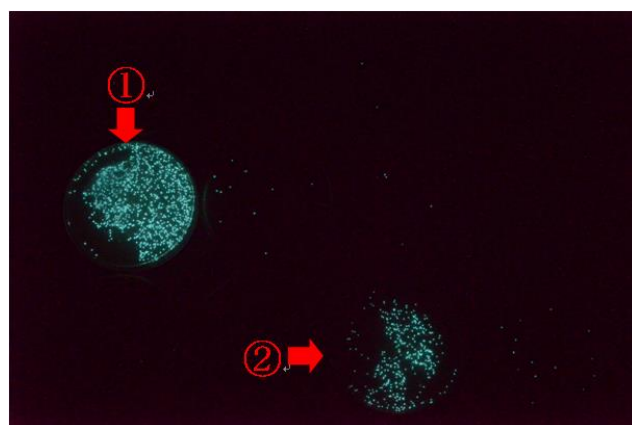


図6 暗室で観察した寒天培地の様子 (露光15分)

- ①スルメイカの煮汁が入った液体培地をまいた寒天培地
- ②2-アミノエチルホスホン酸が入った液体培地をまいた寒天培地

7. 考察

- ・グラフ1より本実験で分光光度計により得られたデータは、2-アミノエチルホスホン酸を加えたABSが負の値である他、時間が経過しているにもかかわらずABSの値が減少する部分があるなど、実際には起こり得ない値をとっている。これは分光光度計の精度の低さによる誤差であると考えられる。したがってこの透過率とABSの結果は適切なデータであるとは言えないので使用せず、表1とグラフ3の菌体数の測定結果を参照して以下の考察をした。
- ・グラフ2より、エリスリトール、キシリトール、グリセロールを培地に加えたときのバクテリアの分裂速度と、何も加えていない培地での分裂速度とで大きな違いは見られないため、発光バクテリアが糖アルコールを栄養分としている可能性は低い。
- ・グラフ2より、煮汁を培地に加えると発光バクテリアの分裂速度が大きいことから、イカの体表には発光バクテリアの分裂速度を速める効果のある物質が豊富に含まれている。
- ・表1とグラフ2より、2-アミノエチルホスホン酸は煮汁ほど発光バクテリアの増殖を速める効果はない。
- ・図6より、2-アミノエチルホスホン酸を加えた培地のコロニーは、煮汁を加えた培地のコロニーと同程度にほかの培地よりも明るく光っている。ここで、L-L反応は酸化反応であるため、バクテリアの入った液体培地を振ることで酸素に触れさせると、すぐによく光ることが知られている。一方で、2-アミノエチルホスホン酸を液体培地に入れてもすぐに光らなかった。よって2-アミノエチルホスホン酸はL-L反応の促進には関わっていないと考えられる。したがって、2-アミノエチルホスホン酸は、エリスリトール、キシリトール、グリセロールには含まれていないNとPを含んでいるため、発光に関わる遺伝子の転写を促進するなど発光を強める働きを持つ可能性がある。

8. 結論

- ・*V.fischeri* はエリスリトールを栄養分としていない。
- ・スルメイカの皮に含まれるエリスリトール以外の物質が*V.fischeri*を増殖させている。
- ・2-アミノエチルホスホン酸は*V.fischeri*の分裂速度を速める効果はないが、*V.fischeri*の発光を強

める物質である。

9. 今後の展望

今後は、短い時間でより多くの実験を行えるよう実験手順を簡略化し、より多くのデータを取って誤差を減らしていきたい。また今回は、濁度を菌体数の指標をしようとしたが、分光光度計の精度が低く、濁度と菌体数の正確な関係を求めることができなかった。そのため、今後は測定ごとに液体培地を寒天培地にまき、できたコロニーの数を数えてより正確な菌体数を測定したい。また、照度計や分光光度計などを用いて、光の強さと菌体数との関係を示す検量線を書くことも試みたい。

10. 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始丁寧な御指導してくださった繁戸克彦先生に深く感謝いたします。また、的確なご助言をいただきました東京工科大学応用生物学部の佐々木聡教授、神戸大学大学院理学研究科の樋口里樹様、樋口真之輔様に厚く御礼申し上げます。

【参考文献・参考URL】

- [1]金沢大学「イカの皮に存在する整理活性物質及び色素」鈴木, 信雄; 矢澤, 一良; 渡部, 和郎; 繁森, 英幸; 山田, 昭浩; 畠, 伸彦; 田中, 雅子; 前, 成美; 矢野, 純博; 稲葉, 信策; 中間, 俊彦; 笹山, 雄一 2010/03/23
- [2] 慶応義塾大学日吉紀要刊行委員会「発光バクテリアを用いた実習プログラムの開発」池田, 威秀; 秋山, 豊子 2012
- [3] 公益財団法人 21 あおもり産業総合支援センター「青い森の機能性食品素材ハンドブック」p. 34-35 青い森の食材研究会監修 2012/2/20
- [4] 数研出版「フォトサイエンス 生物図録」p. 39
- [5] 東京農工大学「発光バクテリアにおける発光特性の解析ならびに発光変調を引き起こす蛍光タンパク質LumPの構造生物学的解析」佐藤, 雄一
- [6] 日本農芸化学誌「哺乳動物におけるシリアチン(2-アミノエチルホスホン酸)の代謝機構に関する研究」玉利正人
- [7] 日本農芸化学誌「羊の糞よりシリアチン分解菌の分離およびその性質」玉利正人, 堀口雅昭, 神立誠
- [8] 岡山県立倉敷天城高等学校「発光バクテリアの発光制御」Shunsuke Onoo, Shunta Kitahama, Madoka Haga, Takafumi Seita