

〈はじめに〉

みなさんはイカが光ることを知っていますか？市販の生のスルメイカを人工海水に漬けて数日放置すると、このように **【スライド変える】**

イカが光り始めます。これは、イカの体表に生息している発光細菌が増殖したからです。スルメイカに付着しているこの青白く光る発光細菌は **【スライド変える】** *V.fischeri* と言います。

また、発光細菌は、**【スライド変える】**

この図のようにルシフェリン・ルシフェラーゼ反応と呼ばれる酸化反応によって発光しています。この反応によってできる、オキシルシフェリンという物質が放出するエネルギーが光として認識されているのです。私たちはこの光る細菌に興味をもち、昨年度のプレ課題研究でも、発光細菌を扱いました。

〈昨年の実験〉

【スライド変える】

昨年度、私たちは、プレ課題研究でこのような実験を行いました。イカの体表から採取した発光細菌を、アジ、ササミ、イカの煮汁の中で培養し、どの煮汁の中で増殖するかを調べました。その結果、発光細菌はイカとアジに含まれて、ササミに含まれない物質を栄養にしているということがわかりました。そして、その物質は、イカの色素胞の主成分である、エリスリトールという物質である可能性が高いという結論を出しました。

〈目的〉

【スライド変える】

(間あける)私たちの、今年度の実験では、ビブリオフィシェリが、スルメイカの体表に生息することによって、どのような利益を得ているのかを調べるのを目的としました。ビブリオフィシェリがイカの体表に生息することで得られる利益として、

- ・イカの体表の粘膜は、ビブリオフィシェリにとって定着しやすい
 - ・「イカの」生息環境の、温度などの環境条件が、ビブリオフィシェリに適したものである
 - ・イカの体表に、ビブリオフィシェリの好む栄養分が含まれている
- などが考えられます。

今回は、その中の、**【スライド変える】**

イカの体表の栄養分に注目して調べることにしました。

〈仮説〉

【スライド変える】

私たちは、ビブリオフィシェリが、昨年度の実験からエリスリトールを求めてイカの体表に生息しているという仮説を立てました。エリスリトールは、糖アルコールの一種であり、糖アルコールには、微生物の餌になりにくいという特徴があります。エリスリトールが含まれるイカの体表は、ビブリオフィシェリだけが利用できる栄養分が存在する場所であると考えたのです。

〈実験概要〉

【スライド変える】

そこで私たちは、液体培地に様々な栄養分を入れて、その中で *V.fischeri* を培養し、どの培地の中で一番増殖したかをみることができれば *V.fischeri* が好む栄養分がわかるだろうと考えました。私たちの仮説が正しければ、エリスリトールが入っている培地の分裂速度が大きくなるはずなので、このようなグラフが、結果として出ると考えられます。また、糖アルコールは熱に強いので、煮汁にも、エリスリトールは含まれていると考え、煮汁の入った培地も、(グラフ指しながら)これと同じようなグラフになると予想しました。

〈各種栄養分〉

【スライド変える】

培地に加える栄養分としては、この5つを選びました。

まず、スルメイカの煮汁を煮詰めて粉末にしたもの。昨年の実験からエリスリトール、それと似た化学構造を持っている、キシリトール、グリセロール。そして、主に軟体動物に含まれており、スルメイカの皮にも豊富に含まれる 2-アミノエチルホスホン酸という物質です。スルメイカにはエリスリトールが 0100g に 0.3g 含まれています。よって、実験ではわかりやすい数字として 1L に 5g の濃度でエリスリトールを液体培地に加えしました。他の栄養分についても同様です。私たちは、これら5つの物質を使って、このような実験を行いました。

〈実験方法〉

【スライド変える】

まず、培養チューブに *V.fischeri* の入った液体培地を入れ、それぞれの培地に先ほど述べた栄養分を加えます。*V.fischeri* は1ヶ月間10回ほど継代培養をして単離したものを実験に使用しました。

【スライド変える】

それらを1日振盪培養したものの濁度を、分光光度計で1時間ごとに測定します。これを6時間行います。また、測定開始時と6時間後、23時間後にはそれぞれの液体培地を寒天培地にまいておきます。この寒天培地にできたコロニーの数をあとで数えて、液体培地中の菌体数を求めます。

これらの操作により、時間ごとの菌体数の変化のグラフを作成しました。

〈実験結果〉

【スライド変える】

実験の結果、このグラフが得られました。

【スライド変える】

経過時間と菌体数のグラフはこうなりました。

【スライド変える】

さらに、これは菌体数を測定するために用いた寒天培地の写真です。これを暗室で見ると、

【スライド変える】

このようにこの二つの培地がよく光っているのがわかります。

〈考察〉

【スライド変える】

分光光度計のグラフを見ると、分光光度計で測定した値でマイナスになっている部分があります。しかし基準にした培地はバクテリアを入れていないので、バクテリアが入っている培地のほうが基準より濁度が低いということは考えにくいです。さらに、このように濁度が下がっている部分も見られます。これらの理由から、分光光度計で測定したデータは **【スライド変える】**

適切ではないと考えました。よって、菌体数の変化のグラフを使って考察をすることにしました。

【スライド変える】

菌体数の変化のグラフを見ると、スルメイカの煮汁が入った液体培地ではビブリオフィシェリがとてもよく増えていることがわかります。従って、スルメイカには *V.fischeri* の分裂速度を速める物質が多く含まれていることがわかります。また、エリスリトール、キシリトール、グリセロールを加えた培地は、何も加えていない液体培地での増殖速度との差が **【スライド変える】**

このようにあまりないので、糖アルコールが *V.fischeri* の分裂速度を速める栄養分である可能性は低いと考えられます。

そして、2-アミノエチルホスホン酸も、エリスリトールなどと同様に液体培地のみでの結果とあまり差がなかったため、*V.fischeri* の分裂速度には関わっていないと考えられます。

【スライド変える】

しかし、この寒天培地の写真を見てみましょう。このように、2-アミノエチルホスホン酸入りの培地をまいた寒天培地は、煮汁以外の培地と菌体数に大きな差が無いのにもかかわらず、よく光っていることがわかります。

【スライド変える】

ここで、発光バクテリアが光るまでの仕組みである、クオラムセンシングについて説明したいと思います。クオラムセンシングとは何か、知っているでしょうか。クオラムセンシングとは、簡単にいうと、菌体密度に応じて発光に関わる遺伝子を発現するためのスイッチのオンオフを切り替える機構です。発光バクテリアは常にシグナル物質を分泌しています。発光バクテリアの数が増えると、シグナル物質を分泌するバクテリアの数が増加します。つまり、培地

中でシグナル物質の密度が高くなります。発光細菌はこの増えたシグナル物質を細胞表面にある受容体で受け取り、それがトリガーとなって発光に関わる遺伝子の転写、発現を開始します。受容体で受け取る時はランダムであるので、シグナル物質の密度が高いほど遺伝子の発現がしやすいということになります。

今、この話をしたのは、2-アミノエチルホスホン酸はクオラムセンシングの機構に関わっているのではないかと考えたからです。

【スライド変える】

寒天培地は全て同じ Marine Broth 2216 を使っており、液体培地から寒天培地にまいた後の条件に変わりはないはず。違うところは、寒天培地にまく前。したがって、2-アミノエチルホスホン酸は振盪培養している液体培地中の細菌の遺伝子の発現のスイッチをオンにしているのではないかと私たちは考えました。

〈結論〉

【スライド変える】

私たちの実験の結論として仮説で挙げられていたエリスリトールは、何も栄養分を加えていない液体培地での結果と差が小さかったため、V.fischeri の栄養分となっていないということがわかりました。

しかし、煮汁が入っている液体培地は、何も入っていない液体培地に比べ差が大きかったため、スルメイカに含まれるエリスリトール以外の物質が V.fischeri の分裂速度を速めることがわかりました。

また、2-アミノエチルホスホン酸は、分裂速度の促進に関わってはいませんが、クオラムセンシングに関わって発光を強める効果がある可能性があるということがわかりました。

〈今後の展望〉

【スライド変える】

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です。さらに菌体数を数えるだけでなく、照度計や蛍光分光光度計等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にも挑戦してみたいと思っています。そして、これらの研究成果が発光細菌を環境指標とする研究につながっていけばいいなと思います。

ご清聴ありがとうございました。

	イカ		アジ		ささみ	
濃度(%)	20	80	20	80	20	80
透過率(%)	91.2	68.55	93.7	86.95	88.6	88.75

※Marine Broth 2216 成分

ペプトン 酵母エキス 塩化鉄 塩化ナトリウム 塩化マグネシウム 硫化マグネシウム 塩化カルシウム 塩化カリウム 炭酸ナトリウム 臭化カリウム 塩化ストロンチウム

ホウ酸 ケイ酸ナトリウム フッ化ナトリウム 硝酸アンモニウム リン酸二ナトリウム

質問対策

*菌体数の変化のグラフは点3つしかとってないのにいいのか

→今回は正確な菌体数を求めることが目的ではなく、増え方の違いを見たかったので、おおまかな菌体数の変化と、菌体の最終的な数がわかればいいので、このグラフで考察しました。

*バクテリアが分裂してからスイッチオンの状態は続くのか

*2-アミノエチルホスホン酸はクオラムセンシングの機構のどこにはたっていると考えるか