

<第 27 回山崎賞>

7 いろいろな光合成生物の光合成と呼吸

1. 研究の目的

私たち生物部研究班では、ミドリムシやミドリゾウリムシなどの微生物を培養している。そこで、BTB 溶液を用いて、いろいろな微生物の光合成速度と呼吸速度の関係、つまり見かけの光合成速度の正負を調べることを主たる目的として研究を行った。

実験に用いた生物は、①ミドリムシ [09 年、10 年]、②ミドリゾウリムシ [09 年、10 年]、③ホワイト（共生藻のいないミドリゾウリムシ） [09 年]、④イシクラゲ [09 年、10 年]、⑤微細な緑藻類 [09 年、10 年]、⑥ワカメとコンブ [10 年]、⑦オオカナダモ [09 年、10 年]（比較のため使用）の 8 種である。

2. BTB に関する予備実験

光合成の指示薬として用いた BTB について、オオカナダモを用いた予備実験の結果、明条件で青変しただけでなく、栓をしないと暗条件でもやがて青変した。実験には BTB で緑色を示す市販のミネラルウォーター（以後 MW と記述）を使用した。BTB-MW 溶液が気体酸素により青変することになるので、これを確認した。

その結果、オオカナダモの明条件で青変した試験管の pH は 8.9 とかなり強いアルカリ性を示した（図 1）。また、気体酸素を BTB-MW 溶液に通したところ溶液は完全に青変し、pH は 7.7 と弱アルカリ性を示した。従って、二酸化炭素量の変化だけでなく、酸素量の変化も BTB 溶液の色で判断できることになった。しかし、これがどのような化学反応によるものかは不明である。

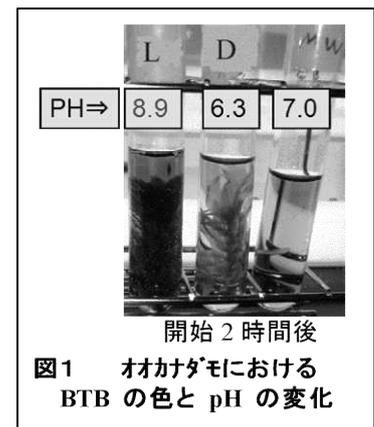


図1 オオカナダモにおける BTB の色と pH の変化

3. 見かけの光合成速度の観察

(1) 実験方法

見かけの光合成速度の観察は、以下の手順で行った。

<緑藻類以外>

試料を 2 本の試験管にわけ、BTB を入れ緑色にした後息を吹き込み、シリコン栓で密封して試験管を振り黄色に変化させる。1 本はアルミ箔で覆い暗条件、1 本はそのままの状態です。明条件とし、蛍光灯で照射する。色の変化を観察し、変化が終了したら、明条件と暗条件を入れ替える。

*微生物の場合は、培養液を手動遠心機やナイロンメッシュ（径 15 μ m）を用いて濃縮、洗浄し、中性に近づけた溶液を MW で約 10ml に希釈して使用した。

<微細な緑藻類>

キムワイプでろ過した培養液を手動遠心機で遠心し、上澄み液 10ml を 2 本の試験管に等分し、明条件と暗条件とする。残りの液を卓上遠心機で 1 分間遠心し（10,000 回転/分）沈殿物を回収する操作を 2 回繰り返す。回収した沈殿物を、MW に懸濁して 2 本の試験管に等分し、

明条件と暗条件とする。以降は他の生物と同様である。

* 緑藻類については、昨年は暗条件ではっきりした結果が得られなかった。その原因は緑藻類が手動遠心機で沈殿せず、上澄み液を使用したためと考えられた。そこで、卓上遠心分離機を用いて上澄み液を濃縮して実験を行った。

(2) 実験結果

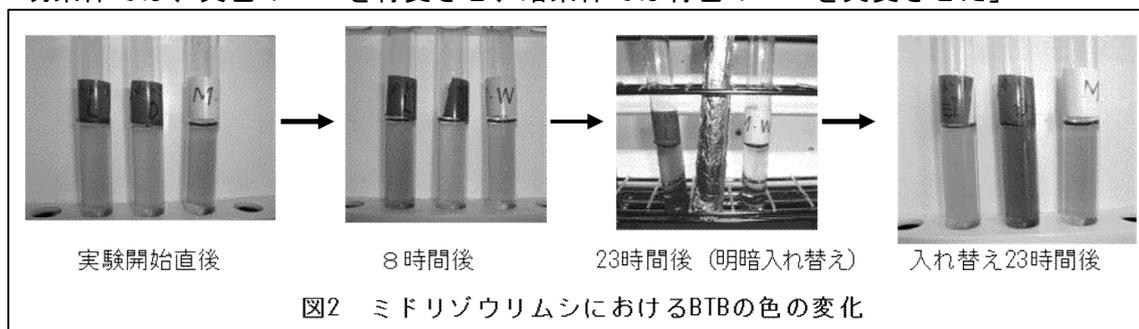
①ミドリムシ

「明条件では黄色の BTB を青変させ、暗条件では青色の BTB を黄変させた」

二次共生により生じた独立栄養生物であり、鞭毛により活発に動き回る。呼吸速度が大きいことも考えられたが、きわめて明瞭な結果が得られた。

②ミドリゾウリムシ

「明条件では、黄色の BTB を青変させ、暗条件では青色の BTB を黄変させた」



ゾウリムシの細胞内にクロレラ的一种が共生しており、捕食による独立栄養生活もする。繊毛による移動速度もかなり速いが、ミドリムシ同様、きわめて明瞭な結果が得られた。

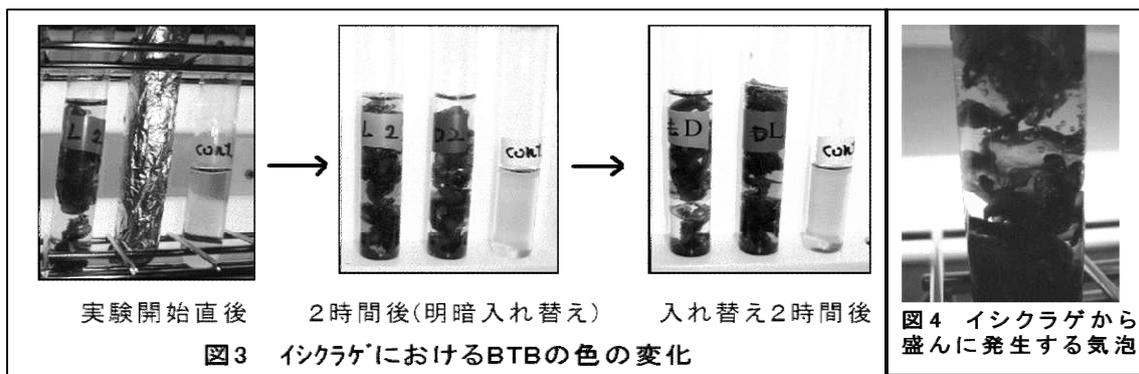
③ホワイト

「明・暗条件にかかわらず、黄色の BTB をわずかに緑変させた」

光合成をしないので、黄色のままではあるはずである。シリコン栓が緩く空気中の酸素の影響を受けた可能性がある。

④イシクラゲ

「明条件では、黄色の BTB を青変させ、暗条件では、青色の BTB を黄変させた」



色の変化は他の生物よりかなり速く進んだ(図 3)。また、明条件でさかんに気泡が発生する

様子が観察された(図 4)。なお、暗条件におけるこの結果は、ミトコンドリアを持たないイシクラゲも、好気呼吸により二酸化炭素を排出することを示している。

⑤微細な緑藻類

「明条件では、黄色の BTB を青変させ、暗条件では、青色の BTB を黄変させた」

上澄み液の暗条件では青色からの変化は、あまり見られなかった。しかし、遠心した濃縮液では、暗条件においても、青色の BTB 溶液が黄緑色に変化した。

このような結果が得られた理由は、個体数の影響であると考えられる。光合成植物の場合、呼吸による二酸化炭素排出量よりも、光飽和における酸素排出量の方が数倍大きい(図 6)。このため、個体数が少ない上澄み液を用いた場合は、明条件では半日程度で BTB 溶液が青変するが、暗条件では呼吸速度が非常にゆっくりで変色しなかったのであろう。きわめて小さい緑藻類でも、集団としてみれば見かけの光合成速度が正であることが確認された意義は大きい。

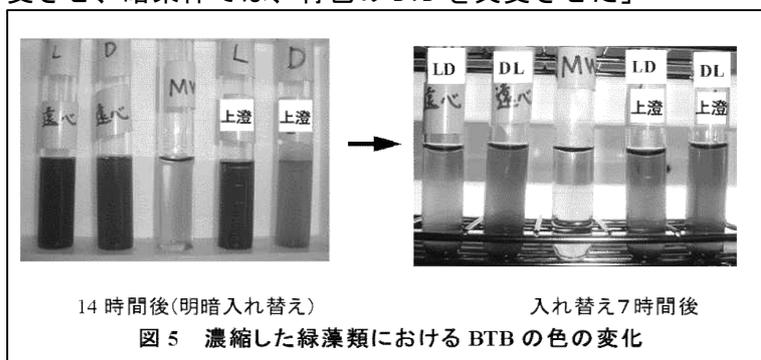


図 5 濃縮した緑藻類における BTB の色の变化

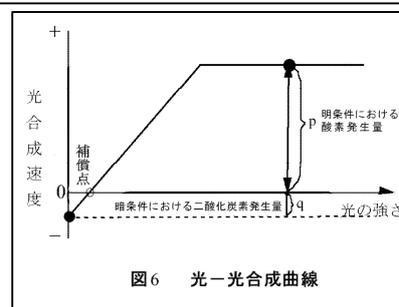


図 6 光-光合成曲線

⑥ワカメとコンブ

「明暗いずれの場合も、BTB の色の变化は全く見られなかった」

海藻であるので MW と 3.5%食塩水の 2 種の溶液を用いて実験した。しかし、コンブ、ワカメとも BTB 溶液の色の变化は全く起きず、光合成、呼吸のいずれも確認できなかった。光合成はできなくても、生きた細胞である限り呼吸はしているはずである。そこで、多量の試料をマヨネーズの空容器に入れて暗条件に一晩おき、中の気体を石灰水中に通した。その結果はやはり、ワカメ、コンブのいずれも石灰水の白濁は起こらなかった。その原因については、「生」と表示されているが、一度お湯で処理しているらしいことがわかった。すでに死細胞である可能性が高いと考えられる。

4. イシクラゲの好気呼吸を確かめる実験

ミトコンドリアを持たないイシクラゲが、好気呼吸により二酸化炭素を排出するという結果に強い疑問を持ち、これを確かめる実験を行った。

(1) 二酸化炭素の排出の確認

- (a) 透明な 2 本のポリ容器にイシクラゲを入れ、明条件と暗条件とし、丸 1 日照射した後、中の気体を緑色の BTB 溶液に通した。その結果、明条件のものは青色に、暗条件のものは黄色に変化した。
- (b) ペットボトルにイシクラゲを大量に入れ、丸 1 日暗条件に置いた後、内部の気体を石灰水に通した。その結果、石灰水は白濁した。



図 7 イシクラゲによる石灰水の白濁

(2) ヨードホルム反応

二酸化炭素を排出する呼吸として、好気呼吸の他にアルコール発酵が知られている。そこで、ヨードホルム反応によりアルコール発生の有無を確かめた。比較の実験として、アルコール発酵をすることがわかっている酵母菌を用いた。6本の試験管を用意し、① 10%グルコース溶液 10ml+酵母菌 1.0 mg、② MW10ml+酵母菌 1.0 mg、③ ④ 10%グルコース溶液 10ml+イシクラゲの明暗条件、⑤ ⑥MW10ml+イシクラゲの明暗条件、とした。人工気象器(25℃、約 12,000 Lux)で丸1日光照射した後、キムワイプでろ過してヨードホルム反応を行った。

その結果、①の酵母菌+グルコースの試験管のみ、特有のヨードホルム臭がした。よって、イシクラゲはアルコール発酵をしていないといえる。



図8 ヨードホルム反応の様子

この2つの結果から、イシクラゲは光合成だけでなく、好気呼吸も行っていると考えられる。文献によると、イシクラゲを含むシアノバクテリアは好気呼吸も行い、好気呼吸と光合成の電子伝達系の一部を共有している。好気呼吸の起源について、今までは光合成が先で好気呼吸が後から生じたと考えられてきた。しかし、今回得られた結果から、好気呼吸が先で、光合成が後から生じたという考えも成り立つことになり、とても興味深い問題である。

5. イシクラゲをバラバラの細胞にする実験

イシクラゲをバラバラの細胞にして、他の単細胞生物と同じ条件にしたいと考えた。昨年は、乾燥させてすりつぶす方法と、湿った状態でジューサーで粉砕する方法を試みたが、いずれもうまくいかなかった。今年は、培養していたイシクラゲからはがれた細胞糸を集めて光合成速度を調べた。

これまでと同様の方法で、BTB 溶液の色の变化を観察したが、期待に反し光合成活性はかなり低下した(人工気象器使用 25℃、約 12,000 Lux)。細胞数が量的に少なすぎたものと推測される。

なお同じ方法で、葉緑体の光合成指示薬である DCIP を加え、色の变化を観察した。イシクラゲの細胞は葉緑体そのものであり、明条件で DCIP を脱色することが期待された。だが、明暗条件どちらも明瞭な変化が見られなかった。この理由も、やはり細胞数が少ないためと推測される。

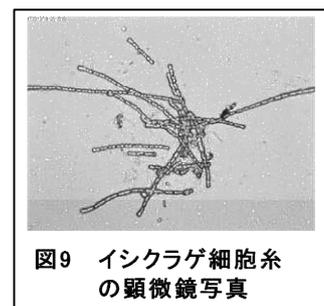


図9 イシクラゲ細胞糸の顕微鏡写真

6. インジゴカルミンを用いた実験

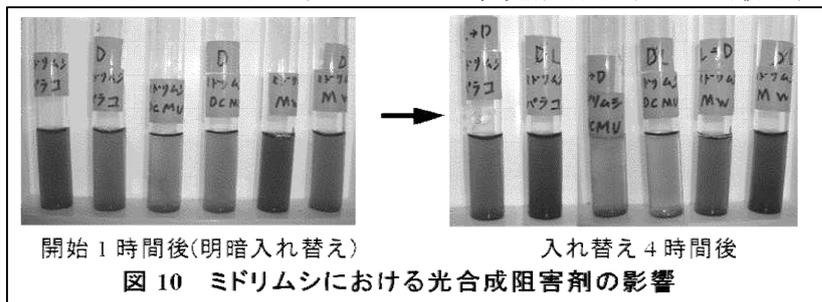
通常、BTB は酸素の発生を確かめる指示薬としては使用しない。そこで、オオカナダモとイシクラゲを用いて、酸素発生指示薬であるインジゴカルミンの色の变化を確かめた。BTB で実験を行ったときと同様の方法で、いろいろな濃度を試したが、光合成による色の变化は全く見られなかった。また、光照射により青色が脱色されることも観察された。インジゴカルミンは、適切な濃度や使用方法がよくわからず、私たちの実験に関する限り指示薬として適していない。

7. 光合成阻害剤の影響を確かめる実験

これまでの手法で、パラコートや DCMU といった光合成阻害剤が、どのような影響を与えるか調べた。オオカナダモを用いて適切な濃度を確かめてから、イシクラゲ、ミドリムシ、ミドリゾウリムシによる実験を行った。6本の試験管を用意し、①② 1 μl/ml のパラコートを加えた明暗条件、③ ④ 1 μl/ml の DCMU を加えた明暗条件、⑤⑥対照区の明暗条件とした。ミドリゾウリムシについて

は、濃縮液がわずかししか得られずパラコートのみ実施した。いずれの場合も BTB は緑色から開始した（人工気象器使用 25℃、約 12,000 Lux）。

その結果、光合成阻害剤を加えたイシクラゲとミドリゾウリムシでは、光照射を始めた当初を除き、明条件でも青変せず、光合成に対する阻害作用が確認された。ところが、ミドリムシでは DCMU による阻害作用は確認されたが、パラコートの阻害作用を全くうけず、明条件において対照区と同じ速さで青変した。



8. 研究のまとめ

BTB 溶液の色の変化を利用し、光合成をするいろいろな微生物の見かけの光合成速度を調べたところ、以下の結果が得られた。

(1) ミドリムシ、ミドリゾウリムシ、緑藻類、イシクラゲについて、次のことが確認された。

「明条件では黄色の BTB 溶液が青色に変化し、暗条件では青色の BTB 溶液が黄色に変化する」
オオカナダモも含め、実験に用いた光合成生物は、光が十分に当たっていれば、光合成速度が呼吸速度を上まわり、見かけの光合成速度は正であるといえる。

(2) 原核生物のイシクラゲについて、次のことが確認された。

「イシクラゲは暗条件で二酸化炭素を排出しているが、アルコールは生成しない」
この結果から、イシクラゲは、好気呼吸により二酸化炭素を排出するといえる。

(3) ワカメ・コンブで光合成速度を調べたが、光合成も呼吸も確認できなかった。

(4) ミドリムシ、ミドリゾウリムシ、イシクラゲについて、光合成阻害剤のパラコート、DCMU の影響を調べたところ、ミドリムシにはパラコートが効きにくいことがわかった。

(5) イシクラゲを細胞のみにする適切な方法は見つかっていない。

(6) BTB-MW 溶液は空気中の酸素と反応して青変する。このため、二酸化炭素だけでなく、酸素発生の指示薬にもなり、私たちの実験に適している。逆に、インジゴカルミンは濃度の調節等が難しく、私たちの実験には適さない。

9. 今後の課題

研究を継続するにあたり、今後の課題は以下の通りである。

- (1) 光合成速度と温度や照度との関係を調べる。
- (2) 見かけの光合成速度の正負だけでなく、BTB 溶液の変色に要する時間を調べる。
- (3) パラコート、DCMU などの、光合成阻害剤の影響をさらに調べる。
- (4) イシクラゲの細胞（糸）を大量に得て、光合成速度の測定等の実験を行う。
- (5) 本当の生ワカメを用いて、気体の発生の有無を調べる。

10. 参考文献

1. 井上勲. 藻類 30 億年の自然史, 東海大学出版会, 2006.
2. 黒岩常祥. ミトコンドリアはどこからきたか, 日本放送出版協会, 2000.
3. 岩本伸一他. 実験観察 生物図説, 秀文堂, 2003.
4. チャート式シリーズ 中1理科 数研出版, 2002.