

撃退できないネンジュモを探る

静岡県立掛川東高等学校

サイエンス部 2年 赤堀百音 谷川正都 1年 赤堀景哉 犬塚竜斗 渡辺ヒトミ 進士美海 榛葉維衣

1 動機

掛川東高校では、校内の弓道場芝生に生息するネンジュモを撃退できないか依頼を受け、4年間研究してきた。しかし、その撃退の難しさから、ネンジュモの悪条件に対する耐性の高さに注目するようになった。調べていく中で、サイエンス部で育てているネンジュモと同じ HK-01 が、ISS 国際宇宙ステーションによる1年間の宇宙暴露実験に耐え、蘇生しているという論文を 生命工学会誌 から見つけることができた。この耐性には、「乾燥」と「遮光」の条件が必要なことに、我々は注目した。宇宙での実験と異なり、野生株のネンジュモは、乾燥などの悪条件を生き抜いた後、雨などで湿潤化して「乾燥」の耐性が解除され、「太陽光」で光合成を行って子孫を増やすはずである。耐性が解除された後の生育条件に興味を持ち、研究を始めた。

2 論文から分かったこと「たんぽぽ計画での陸棲藍藻の宇宙環境耐性実験」

たんぽぽ計画とは、「生物が宇宙で移動する可能性」を調べる計画である。宇宙での移動が可能な生物のひとつとして様々な悪条件に耐えられるネンジュモが選ばれている。この論文からわかったことは以下の3つである。

- (1) *Nostoc sp.*(HK-01 株)は乾燥状態において 100℃、10 時間の乾熱、 10^{-5} Pa の真空、重粒子線、ガンマ線、UVC(254nm)、VUV(172nm)、-80~80℃の温度変化のサイクルに曝した後も休眠細胞から蘇生することが先に確認されていた。
- (2) 乾燥状態では宇宙曝露後も生存率は低下しないが、わずかな湿潤で代謝が再開して生存率が低下した。
- (3) 1年間、乾燥、遮光して宇宙曝露した *Nostoc sp.*(HK-01 株)の休眠細胞が、蘇生したことが、酵素活性から示された。

3 ネンジュモ「イシクラゲ」について、これまで確認したこと

ネンジュモとは原核生物のシアノバクテリアの一種である。大きなヘテロシストで窒素固定を行うことで有名である。単細胞生物であり、光にあてて光合成を行うと分裂する。分裂後に離れることなく繋がったままであることを確認している。そのため、念珠に似た形態を持つ(資料1)。ネンジュモのうち「イシクラゲ」は陸上に生育し、弱塩基性の土壌を好む。多糖類を自ら分泌することで乾燥耐性を持つ。乾燥時は乾燥わかめのような状態だが、雨が降ると多糖類が水を含み寒天状になる。(資料2) 多糖類中には微生物が生育している。

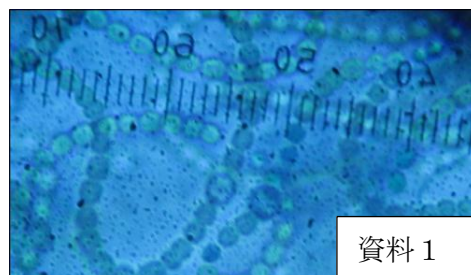
サイエンス部では、昨年度までに次のことを確認している。

2016 年・・・0.05mol/L 以上の酢酸で枯れる

2017 年・・・酸で呼吸量が減少する

2018 年・・・自ら塩基性環境を作る

2020 年の予備実験では、湿潤時にみられる微生物の中に、光合成を行う藻類はほとんどみつからなかった。湿潤状態にすると、3 日程度で、微生物が増殖し、ネンジュモが腐敗することを確認している。



資料 1



野生株ネンジュモ

資料 2

4 本年度の研究

野生株のネンジュモは、湿潤で耐性が解除された後、どのような条件下で生きているのかを、以下の2つに注目して研究した。

(1) 湿潤後の光合成活性の変化

乾燥下の耐性が湿潤で解除された後、どれくらいの時間で、光合成活性を取り戻すか。

(2) 光条件による不活性率調査

遮光せずに、異なる光条件の下で休眠状態(乾燥)が解除された(湿潤)場合、どのような光条件下で、野生株は生きているのか。

5 仮説

(1) 仮説1 「乾燥」では代謝はほとんど見られず、「湿潤」後の早い時間に代謝が再開される。

(2) 仮説2 ネンジュモが蘇生できなくなる原因は UV(紫外線)であると考えられるため、「乾燥」「湿潤」両方とも、UVによって不活性化する。

6 材料・薬品等

<材料>

- ・ネンジュモ野生株 *Nostoc Commune Vearch*

細胞の周りの多糖類中に微生物が生育する。掛川東高校正門石垣上の同じ場所から採取することで、ネンジュモがなるべく均一になるようにした。今回の実験では、細胞数を同じにするために、新鮮な野生株を洗浄した後、野生株をバットに薄く延ばして乾燥させ、5×5 mmの正方形(資料3)と、幅1mmの短冊状(資料4)に切って実験に使用した。これによって、細胞に当たる光が均等になり、顕微鏡観察も容易になった。

- ・ネンジュモ無菌株 *Nostoc sp.* (HK-01株)

三重大学から分けていただき、サイエンス部で無菌の継代培養したものを使用。HK-01株には微生物がないため、野生株との比較のために用いた。



<使用機器>

- ・熱伝導度付きガスクロマトグラフ(資料5)
：静岡理科大学からお借りし、酸素量定量に使用した。
- ・顕微鏡 ・蛍光灯 ・UV灯(249nm)

<使用器具>

- ・気体用スクリーバイアル(資料6)
：8mLの気体を密封し、光合成による酸素量変化を測定する。蓋には密封状態のままシリンジの針を刺すことのできるシリコンが使われている。
- ・気体用マイクロシリンジ
：ガスクロへの気体注入 および、光合成の材料としてCO₂を注入するために使用
- ・二酸化炭素ガスボンベ

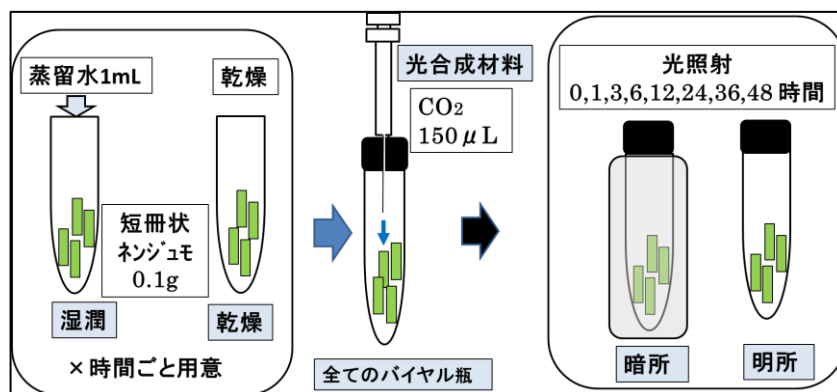


7 <調査1> 湿潤後の光合成活性の変化

乾燥による休眠が湿潤で解除された後、どれくらいの時間で、光合成活性を取り戻すかを、密封したバイアル瓶の中の酸素量で測定した。酸素量の測定には、静岡理科大学の熱伝導度付きガスクロマトグラフをお借りした。

(1) 方法

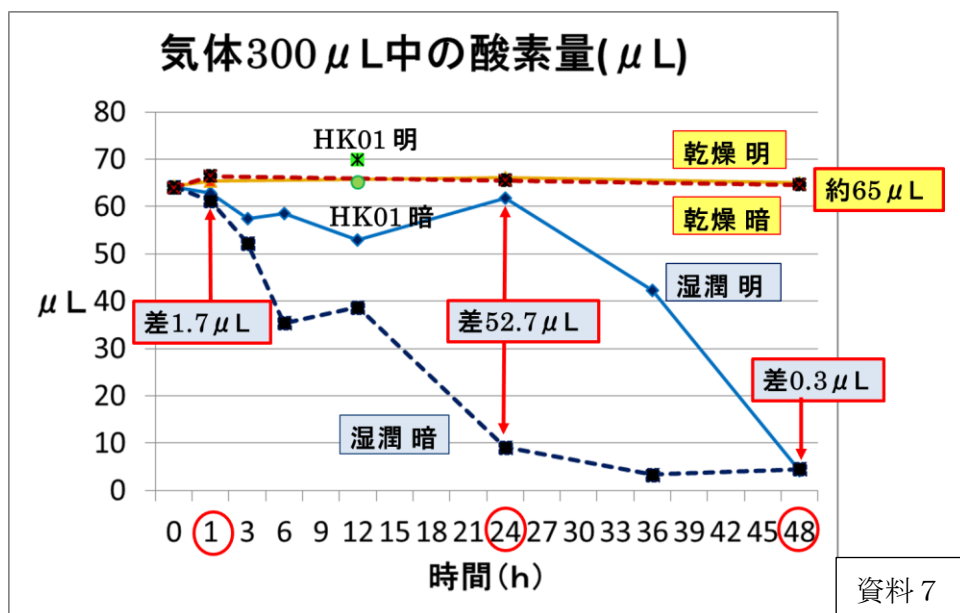
- ① 乾燥した短冊状の野生株ネンジュモを、0.1 g ずつバイアル瓶に密封する。
- ② 湿潤バイアルには 1mL の蒸留水を入れ、「湿潤」と「乾燥」とする。
- ③ 全てに、光合成の材料として 150 μ L の二酸化炭素をシリンジで注入する。



- ④ アルミ箔で被ったものを「暗所」とし、「暗所」と「明所」のバイアルを時間ごとに用意し、0～48 時間蛍光灯にあてた。
- ⑤ ガスクロマトグラフに 50、100 μ L の純酸素を注入して、検量線を作成した。その検量線の 50 μ L 強のあたりが最も酸素量を正確に測ることができる。50 μ L の O₂ は、約 250 μ L の空気に含まれる。そのことから、測定する空気の体積を 250 μ L よりやや多い 300 μ L と決定した。
- ⑥ 300 μ L の気体をシリンジで取り出してガスクロマトグラフに注入する。
- ⑦ 酸素量を測定し、明所と暗所で比較する。

(2) 結果

資料 7 のグラフは、バイアル瓶の気体 300 μ L 中の酸素量を示している。「乾燥」ネンジュモは、明所と暗所すべて、常に約 65 μ L の酸素が含まれており、変化しなかった。「湿潤」ネンジュモの明暗の酸素量の差は、1 時間後 1.7 μ L、24 時間後には最大の 52.7 μ L になった。しかし、48 時間後にはほとんど差が見られなくなった。比較として、微生物のいない HK-01 株に 12 時間光を照射した場合、明暗の差は 4.8 μ L となることを確認した。HK-01 株の明暗の差よりも、野生株の差が多い。



(3) 考察

同量のネンジュモの明所と暗所の酸素量の差分が、光合成量と我々は判断した。「乾燥」時、明暗共に酸素量の差がなかったのは、呼吸も光合成も行わない休眠状態であり、クマムシなどのクリプトビオシスに近い状態であったと考えられる。「湿潤」時の酸素量の減少は、ネンジュモの多糖類の中の微生物の呼吸もプラスされる。一方、微生物には藻類が確認できないため、「明所」の酸素量の増加はほとんどネンジュモによるものと考えている。野外で生息する野生株は、雨で「湿潤」状態になると、1 時間以内に代謝を開始することが推測できる。その後、24 時間にわたって光合

成などの代謝を行い、栄養合成を行うことができると判断した。これらから、『乾燥』では代謝はほとんど見られず、『湿潤』後の早い時間に代謝が再開される」という仮説は証明されたことになる。一方、24時間以上の「湿潤」では光合成量が減少する。予備実験から、「湿潤」ネンジュモは3日で、微生物が大量発生して腐敗することを確認している。つまり野生株は、雨が降っても24時間程度で再び乾燥する場所があれば、ネンジュモは活発に光合成を行い増殖すると推測することができる。

8 <調査2> 光条件による不活性化率調査

「湿潤」により「乾燥」耐性が解除された場合、どのような光条件下で、野生株は活性を失うのか。

(1) 方法

① 5×5mm 正方形の乾燥ネンジュモを3枚ずつ、シャーレに入れる。

② 1mL の蒸留水に 10 分間つけたものを「湿潤」とした。

③ シャーレのふたを外して1時間光にあてる。光条件は、UV294nm、

蛍光灯、太陽光、暗所である。ただし太陽光照射は、野外で、乾燥ネンジュモが風で飛ばされるのを防ぐために、乾燥・湿潤両方のシャーレにラップをかけた。ラップは UV を 90%以上透過することは静岡県立大学の食品栄養環境科学研究所の HP で確認した。

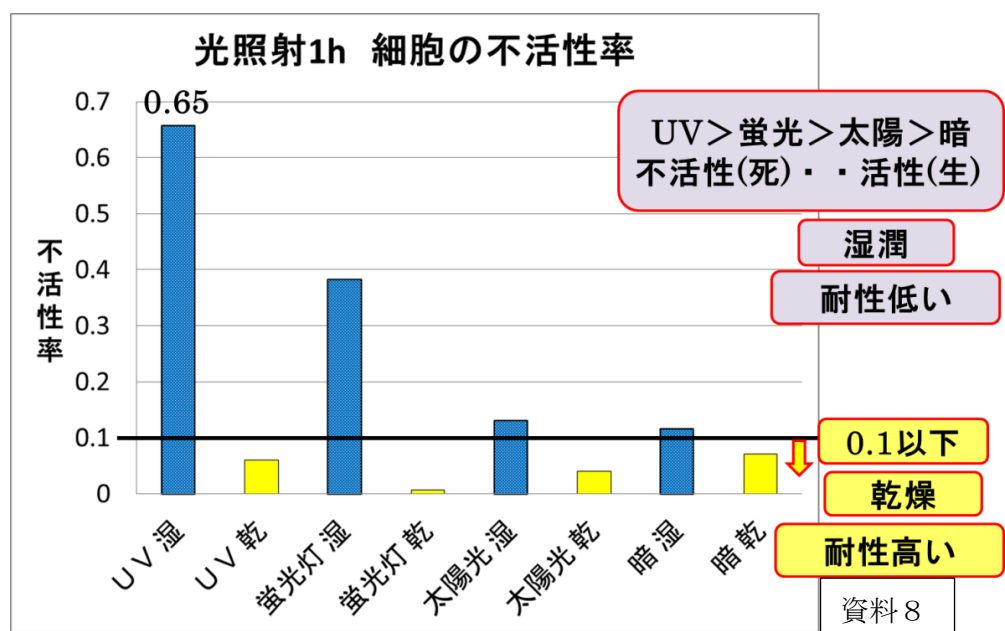
④ 光照射後、プレパラート上でメチレンブルーを滴下し、不活性ネンジュモ数をカウントした。この実験を 3 回繰り返して、平均した。

<メチレンブルー染色法> 0.05%メチレンブルーを滴下すると、不活性細胞はメチレンブルーに染色されて青色になる。一方、活性のある細胞はメチレンブルーを還元させて無色になる。

<不活性化率> 400 倍の顕微鏡下で、約 $50\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ($500\mu\text{m}^2$) の区画を 5 か所ランダムに選ぶ。各区画の全細胞数 a の中の、不活性細胞数 b をカウントして合計し、 $b \div a =$ 不活性化率として数値化した。

(2) 結果

資料 8 のグラフの不活性化率が低いと、生きた細胞が多いことを表している。「乾燥」ネンジュモは全ての光条件で不活性化率が 0.1 以下である。生きた細胞が多いことから、耐性が高いと考えられる。「湿潤」ネンジュモは UV で不活性化率が約 0.65 と高く、いずれの光でも「乾燥」ネンジュモより高い不活性化率を示した。不活性化率の高さは UV が一番高く、次いで蛍光灯、太陽光、暗所となった。



(3) 考察

どの光条件でも「湿潤」で不活性率が高く、光の耐性を失うことがわかる。仮説の「『乾燥』『湿潤』両方とも、UVによって不活性化する。」に対し、1時間程度では、「乾燥」ネンジュモはUVの影響を受けなかった。ネンジュモが蘇生できなくなる原因はUVであると考えられるが、仮説とは異なり、UVの含まれる太陽光の不活性率が高くなかったのは、ラップの影響と、自然の太陽光には条件の変動があるためだと考えている。すべての光条件でラップをかけて追実験を行ったが、ラップによる温度上昇、光の波長によるラップの透過率の違いが計測できないなど、様々な要因が加算されて、正確なデータが得られなかった。今後、方法を模索したい。

9 まとめ

- (1) 「乾燥」は全48時間明暗共に酸素量に変化が見られず、クリプトビオシスと同じように代謝がほぼ行われないと推測できる。
- (2) 酸素量による明暗差を光合成量と判断した。「湿潤」1時間以内に光合成開始。24時間で光合成量最大。その後は低下して48時間で光合成なしとなる。本校の野生株は、24時間程度で再び乾燥する場所で、活発に増殖すると推測できる。
- (3) 光照射「湿潤」状態では不活性率がUV、蛍光灯、太陽光、暗所の順に高かった。

10 今後の課題

- (1) 「湿潤」後の、時間経過における分裂速度の変化を、タイムラプスで計測する。
- (2) 「湿潤」後の24時間以降の酸素量の低下が、微生物の代謝の増加であることを確認する。
- (3) 光の波長によるラップの透過率の計測方法を探る。
- (4) 酸・アルカリ、高温・低温など、自然界に存在する様々な悪条件下での「湿潤」での耐性を分析する。

11 参考文献

- ・たんぽぽ計画での陸棲藍藻の宇宙環境耐性実験 木村 俊太 (生命工学会誌)
- ・アルカリ性メチレンブルー染色法による酵母活性の測定 佐見 学
The Alkaline Methylene Blue Staining Method for Yeast Activity Determination
- ・国立環境研究所 微生物系統保存施設 HP 微生物株取扱いについて(初心者用)
- ・Isolation and Characterization of a Drought-Tolerant Cyanobacterium, *Nostoc sp.* HK-01
- ・静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究院 光環境生命科学研究室
https://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~photobio/hikari_ultraviolet.html

12 謝辞

静岡理工科大学 理工学部物質生命学科 齋藤明広教授

ガスクロマトグラフの操作方法をご教授いただき、借用させていただきました。

三重大大学 生物資源学部生物資源研究学科 加藤浩教授

HK-01株を分けていただきました。培養方法のご教授の他多くのアドバイスをいただきました。ご協力いただき、本当にありがとうございました。