

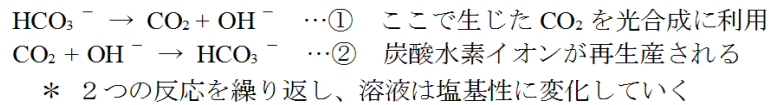
## 18. 水中光合成生物の炭酸水素イオン利用

静岡県立静岡中央高等学校定時制課程自然科学部

3年 山下 瞭、 2年 松下大輔、 2年 池谷朋佳、 2年 山田 桐

### 1 研究の目的

オオカナダモなど一部の水草は、溶存二酸化炭素不足の環境下では、炭酸水素イオンをその光合成の二酸化炭素源として利用し、周囲の水質を塩基性に変える。この反応式は以下の通りである。



これまで、高校生による先行研究により、①この機能は、沈水性の水草に限られ、②シアノバクテリアもこの機能を持つ、の2点が明らかにされ、「シアノバクテリアにその機能の起源がある」との仮説が提唱されている。私たちは、この仮説の証明には単細胞の緑藻類が鍵を握ると考え、「単細胞の緑藻類に炭酸水素イオン利用の機能があることを確かめる」を主たる目的として研究に取り組んだ。当初の目的は達成され、先行研究を裏付ける結果が得られたが、実験方法の改善の必要性を感じ、以後は「少ない試料で短時間に結果を得る方法の開発」を目的として研究に取り組んだ。

### 2 コケ類および単細胞緑藻類における確認実験

#### (1) コケ類における確認実験

##### ア 自生していた二種のコケ類

静岡市葵区の十二双川源流部に、二種のコケ類が自生していた。ジャゴケはクチクラ層が発達するゼニゴケ植物に属し、石垣の水位より高い位置にへばりついている。一方のクロカワゴケはマゴケ植物に属し、川底に水草のように生えている。ふと見ると学校で培養している南米産のウィローモスにそっくりであった。



図1 十二双川に自生するコケ類

コケ類での実験方法は以下の通りである。

- ① 試料をよく洗い、茶色い部分を取り除き、70%エタノールを吹きつけ滅菌する。
- ② 2本のフラスコに以下の2液をつくる。
  - (a) 弱塩基性のミネラルウォーター 100mL + BTB 溶液 2.5mL = 青色
  - (b) 脱イオン水 100mL + BTB 溶液 2.5mL = 黄緑色
- ③ 2つの溶液にポンベから  $\text{CO}_2$  を吹きかけ、BTB 溶液を黄色くする。
- ④ 2本のねじ栓付き試験管に試料を入れ、各 BTB 溶液で浸して密封し、光を当て (20W 蛍光灯×2 本)、デジタルカメラでインターバル撮影を行う。(1 時間毎)

\* 脱イオン水は中性だが、BTB 溶液は空気中の二酸化炭素を取り込み、黄色～黄緑色に変色し、溶解度が大きい低温ほど黄色が強くなる。

##### イ クロカワゴケの実験結果

実験の結果、各 BTB 溶液は2日後にはどちらも青色に変色し、炭酸水素イオンを利用することが



図2 クロカワゴケによるBTBの変色(明条件)

確認された。その後、変色した試験管を暗条件においた結果、2日後にはBTB溶液の色が黄色に戻った。明条件、暗条件とも、変色時間はかなり長く、陰生植物的な性質を示した。

#### ウ ジャゴケの実験結果

ジャゴケは水中では呼吸すらできない可能性を考え、実験方法②の2液を用いて暗条件でも同時に実験を行った。明条件では約2日後に、ミネラルウォーターのBTB溶液が水色に変色し、脱イオン水のBTB溶液はほんの少し緑色に変色した。暗条件では、どちらのBTB溶液とも2日後には黄緑色に変色した。これらのことから、ジャゴケは炭酸水素イオンを利用する機能を持たないこと、水に浸された状態でも呼吸はできることが確かめられた。

### (2) 単細胞緑藻類における確認実験

#### ア 実験に用いた緑藻類と実験方法

培養していた緑藻類のクラミドモナスで実験することにし、液体肥料を培養瓶に加えたところ、あっという間に他の緑藻類が増殖した。クラミドモナスは正の光走性を示し上部に集まるため、これをピペットで取り出すことを繰り返し、沈殿型緑藻類と分離した。そして、大量に増殖した沈殿型緑藻類も、せっかくなので実験に使用した。

緑藻類を用いた実験方法は、以下の通りである。

- ① 2本のフラスコに脱イオン水 100mL を入れ、0.1mol/L の NaCl 1.0mL と BTB 溶液 2.5mL 加え、1本は O<sub>2</sub> を封入して緑色に、1本は CO<sub>2</sub> を吹きかけ黄色にする。
- ② キムワイプでろ過した培養液を卓上遠心機で遠心し、上の2種類の溶液を用いて濃縮洗浄を繰り返す。(1000 rpm×10分)
- ③ 得られた2種類の濃縮液をそれぞれ遠沈管に入れてシリコン栓で密封し光を当て(20W 蛍光灯×2本)、デジタルカメラでインターバル撮影を行う。(1時間毎)

#### イ 沈殿型緑藻類の実験結果

沈殿型緑藻類では、高濃度の濃縮液が得られたが、BTB溶液の色は全くわからなくなってしまった。藻類が沈殿することにより、BTB溶液の色が鮮明になることを期待した。濃縮液が大量に得られたので、暗条件での実験も同時に実施した。

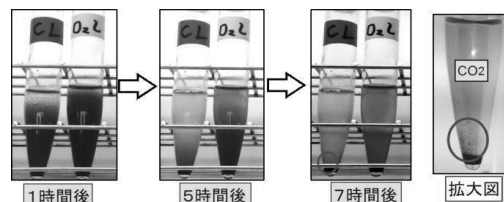


図3 沈殿型緑藻類によるBTBの変色(明条件)

明条件での実験の結果、時間の経過と共に、BTB溶液の色がわかるようになり、沈殿していく緑藻類の上部が青く変色した。この結果、沈殿型緑藻類は炭酸水素イオンを利用することが確認された。高濃度の濃縮液で実験したこともあり、変色に要した時間は、コケ類に比べてかなり速かった。

脱イオン水の種類による違いもはっきりわかり、酸素を封入した脱イオン水の方がより青く変色した。二酸化炭素を吹きかけた遠沈管では、緑藻類の沈殿が終了するとBTBの色が黄緑色に戻り、緑藻類がへばりついた付近だけ青いことが観察された。これは、沈殿した結果光合成速度が遅くなったためと考えられる。暗条件での結果は、どちらの脱イオン水 BTB 溶液も 26 時間後には黄色に変色し、呼吸のみ行っていることが確認された。

#### ウ クラミドモナスの実験結果

得られた濃縮液は遠沈管2本分だけだったため、溶液は酸素を封入した脱イオン水だけとした、濃縮洗浄中の脱イオン水 BTB 溶液は青色を示すため、これが緑色になるまで洗浄を繰り返した。明条件では、脱イオン水 BTB 溶液は、約2日後に青色に変化し、

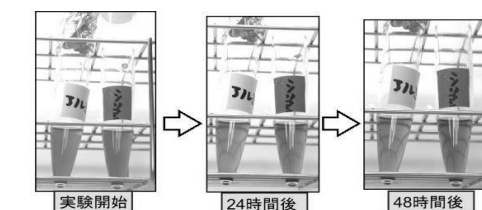


図4 クラミドモナスによるBTB溶液の変色(明条件)

炭酸水素イオンを利用することが確認された。浮遊するクラミドモナスでは沈殿型緑藻類と違い、溶液は全体的に同じ色だった。変色が完了した後、暗条件においたところ、34 時間後には BTB 溶液が黄色に戻り、呼吸のみ行ったことが確認された。

### (3) 実験結果のまとめ

以上の結果から、沈水性のクロカワゴケは炭酸水素イオン利用の機能を持つが、陸上生活に適応したジャゴケは炭酸水素イオンを利用できないこと、両種とも光合成速度も呼吸速度も遅いことがわかった。また、2 種類の単細胞緑藻類において、炭酸水素イオンを利用の機能を持つことを確認し、当初の目的は達成され、先行研究の仮説を支持する結果が得られた。

## 3 少ない試料で短時間に結果を得る方法の開発

これまでの方法では、実験に 2 日以上を要し、より多くの単細胞緑藻類で確認するには、効率が悪い。そこで、実験方法の改善に取り組むことにした。

### (1) BTB 寒天培地を用いた実験

#### ア オオカナダモの葉における実験

BTB 溶液を流し込んだ寒天培地が、藻類の光合成により変色したら、試料はごく少量で済む。手始めに、オオカナダモの葉で実験してみた。2 個のシャーレの BTB 寒天培地の上に、オオカナダモの葉を表を上にしたものと下にしたもの各 5 枚ずつ並べた。1 個のシャーレには、さらに BTB 寒天培地をかぶせて葉を覆った。

実験の結果、まず寒天培地自体が、BTB 溶液の添加によって黄色く変色し、酸性を示した。このことは、全くの想定外であり、理由は今もわかっていないが、光合成により青色に変色するはずなのでそのまま実験を行った。しかし、3 日間経過しても、BTB 寒天培地の色には何の変化も現れなかった。変色しない原因を確かめる実験はまだ行っていない。それより緑藻類での確認を優先した。

#### イ 沈殿型緑藻類における実験

試料の濃縮・洗浄の方法は、前回とほぼ同様であり、最終的に濃縮液 1.5mL を得た。これを原液とし、脱イオン水による 3 倍希釈液、9 倍希釈液を用意した。また、培地には実験器具を利用して、いくつかのサイズの穴を 5 カ所に開けた。そのうち 3 カ所の穴には緑藻類を流し込んだ後、別の寒天片で蓋をした。空気中の二酸化炭素を吸収しづらくなり、炭酸水素イオン利用に切り換えやすいと考えた。

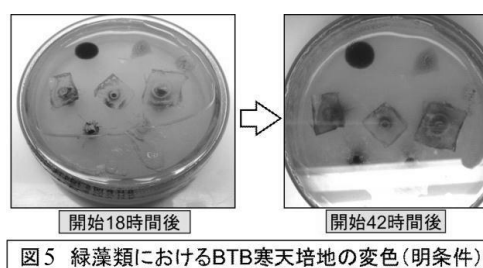


図5 緑藻類におけるBTB寒天培地の変色(明条件)

実験開始 2 日目になり、各ポイントは青色に変色した。蓋として乗せた寒天片の変色が、特にわかりやすかった。遠沈管より遙かに少ない体積で変色を確認することができたが、変色にはやはり 2 日を要し、時間の短縮にはつながらなかった。12 月という寒い時期に室温で実施したことが影響したと考えられる。変色したシャーレを暗条件に置いたところ、2 日後には青い色が消えていた。

まだ実際には試していないが、今回の実験から、BTB 寒天培地法を考案した。寒天培地に体積 50 $\mu$ L 程度の溶液が入る浅い窪みをつくり、2 倍程度に希釈した濃縮液を注入した後、寒天片で蓋をする方法だ。

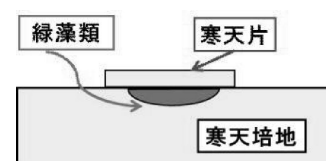


図6 BTB寒天培地法の考案

変色時間については、温度を適切に管理できれば、もっと短縮できることが期待される。ただし、実験結果の正確な解釈のためには、やはり寒天培地が BTB でなぜ黄色を示すのかを解明する必要がある。

#### 4 マイクロチューブを用いた実験

##### (1) マイクロチューブの使用、及びミドリムシについて

緑藻類の培養液を濃縮する課程で、透明なマイクロチューブ内の BTB 溶液の色がはっきりと確認できたことがヒントとなり、マイクロチューブを用いた実験を行った。実験に使える緑藻類はつきてしまっていたので、静岡県総合教育センターよりわけて頂いたミドリムシを使用した。

ミドリムシは緑藻類と二次共生をして独立栄養生活者となったユーグレナ植物であり、単細胞緑藻類とは全く異なるグループである。このため、これまで通りの遠沈管を用いた実験と並行して行い、変色の様子を比較することにした。

##### (2) 実験方法と結果

実験方法は、クラミドモナスとほぼ同様であるので詳細は省略するが、遠心時間は1分とし、二酸化炭素の吹きかけは洗浄終了後に行うよう手順を変更した。約 100mL の培養液から約 5.4mL の濃縮液が得られ、これに脱イオン水 BTB 溶液

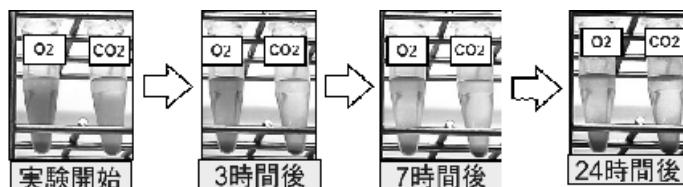


図7 ミドリムシによるBTBの変色(明条件)

を加え濃度を調整し、遠沈管とマイクロチューブに分注した。この実験では、酸素を封入した脱イオン水 BTB 溶液の色が最初から青色を示していたことに気づかず、そのまま実験を開始してしまった。その後は、酸素を封入した BTB 溶液は青色から緑色に、二酸化炭素を吹きかけた BTB 溶液は緑色から黄色に変色し、光合成を行った形跡は確認されなかった。開始 3 時間後には、浮遊しているはずのミドリムシが管の底に大量に沈殿していた。これは、濃縮に電動遠心分離機を使用したため、細胞にダメージを与えたものと考えられる。しばらくしたら復活して泳ぎ回るかもしれないと考え、沈殿したらまた攪拌するという操作を繰り返しながら観察を続けたが、特に変化は見られなかった。そこで、2本の各試料を顕微鏡で観察し、ミドリムシの状態を確認した。その結果、二酸化炭素を吹きかけた方は、細胞が壊れかかってまさに枯れた状態であった。酸素を封入した方は、特有の「もじずり運動」や移動をしており、少なくともこの時点では、生きていたことが確認された。このことから、二酸化炭素を吹きかけた方は、呼吸ができずに死んでしまい、酸素を封入した方は、遠心によるダメージで泳げなかったのだと推測される。

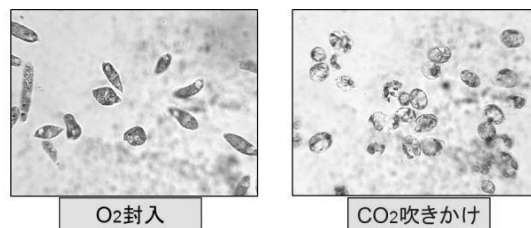


図8 実験終了後のミドリムシの顕微鏡写真(150倍)

##### (3) 実験結果の考察

ミドリムシは本来炭酸水素イオンを利用する機能を持つが、今回は遠心分離器により細胞がダメージを受けたため、はっきり確認できなかった可能性を否定することはできない。また、二次共生により生じたミドリムシについては、実験結果の解釈が難しく、興味深い研究対象ではあるが、今回の目的にはあまり適していなかったといえる。

この実験の大きな目的は、透明なマイクロチューブで BTB 溶液の変色が確認できるかであった。これについては、変色の様子が十分に確認でき、有効な方法であることがわかった。

## 5 研究結果のまとめ

まず、コケ類や単細胞の緑藻類について、炭酸水素イオン利用の機能の有無について確認する実験を行った。その結果、コケ類では沈水性のクロカワゴケにおいてのみ、この機能を持つことが確認された。単細胞の緑藻類では、沈殿型緑藻類、クラミドモナスのいずれもこの機能を持つことが確認された。これらの結果は、この機能の起源はシアノバクテリアにあるのではないかと、この先行研究の仮説を支持するものである。特に、単細胞の緑藻類でこの機能を確認したのは、高校生ではおそらく初めてのことであり、その意義は非常に大きいといえる。

実験方法の改善については、マイクロチューブを利用しても、BTB の変色は十分に観察できることを確認した。また、試料がごく少量ですむ BTB 寒天培地での実験方法を考案した。

## 6 今後の課題

今後の課題は、単細胞緑藻類での実績を増やし、炭酸水素イオン利用の機能の起源がシアノバクテリアにあるという仮説を証明することと、そのために新たな効率的手法を確立することである。

寒天培地については、理由が不明な現象が残ったままであり、現状では、マイクロチューブを利用して確認実験を行い、確認できた緑藻類の種を増やしていくことが先決だろうと判断している。

水草は、緑藻類が陸上に進出した後、再び水中生活にもどった植物であるが、すべての水草が炭酸水素イオンを利用するわけではない。私たちは、単細胞の緑藻類のほとんどは炭酸水素イオンを利用することができると考えている。もしその機能を失った種が見つければ、どのような植物がこの機能を復活させなかったのかの手がかりになるのではないだろうか。

また、研究の途中で気がついたのであるが、水に対する二酸化炭素の溶解度は非常に大きく、水 1.0L 中に 10℃では 73mL である。それに対して、空気 1.0L 中に含まれる体積はおよそ 0.40mL とごく少量である。つまり、二酸化炭素の増加が問題になっている現在、緑藻類の光合成は地球温暖化の防止に少なからず役立っていることになる。将来私たちの研究が、緑藻類の光合成量を増加させ、地球上の二酸化炭素量を減少させることにつながってほしいと願っている。

## 7 謝辞

本研究を進めるにあたり、以下の方々に大変お世話になった。（敬称略）ここに深く感謝し、お礼申し上げる次第である。

国立遺伝学研究所教授	宮城島進也
静岡県立静岡中央高等学校教諭	富田泰徳

## 8 参考文献及

- ① 静岡農業高等学校生物部. 水草の炭酸水素イオン利用の起源を探る, 2013
- ② 田中法生. 水草を科学する, ベレ出版, 2012
- ③ アクアライフ編集部編. 水草レイアウト制作ノート, エムビージェー, 2012
- ④ 数研出版編集部, フォトサイエンス化学図録, 数研出版株式会社, 2014
- ⑤ チャート式シリーズ 中1理科 数研出版, 2013.
- ⑥ 最新理科便覧静岡県版 浜島書店, 2013