慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	発光バクテリアを用いた実習プログラムの開発
Sub Title	Preliminary study of luminescent bacterium for developing new curriculum
Author	池田, 威秀(Ikeda, Takehide) 秋山, 豊子(Akiyama, Toyoko)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2012
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of the natural science). No.52 (2012. 9) ,p.79- 88
JaLC DOI	
Abstract	微生物の存在を体感できる実習プログラムとして, イカ体表より採取培養した発光バクテリアを用いた実習の実施可能性について検討した。採取したバクテリアの発光および持続時間について簡単な実験を行った結果, バクテリアの発光は肉眼でも充分に認識可能であり, 条件によっては数日間光り続けることが明らかになった。観察において照明灯の電力を使用しない本プログラムは, 節電時の実習としても応用可能である。
Notes	研究ノート
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20120930-0079

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hiyoshi Review of Natural Science
Keio University No. 52, 79-88（2012）

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**

Preliminary Study of Luminescent Bacterium for Developing New Curriculum

Takehide Ikeda and Toyoko Akiyama

要約

微生物の存在を体感できる実習プログラムとして，イカ体表より採取培養した発光バクテリアを用いた実習の実施可能性について検討した。採取したバクテリアの発光および持続時間について簡単な実験を行った結果，バクテリアの発光は肉眼でも充分に認識可能であり，条件によっては数日間光り続けることが明らかになった。観察において照明灯の電力を使用しない本プログラムは，節電時の実習としても応用可能である。

目的

我々の周囲には多くの微生物が存在しているものの，実際に目に見えないためその存在を実感することは困難である。そこで，身近な材料であるスルメイカから培養した発光バクテリアを用いることによって，視覚的にその存在を実感するとともに，生物発光および微生物についての理解を深める実習プログラム実施の可否を検討した。

なお，本プログラムは震災等における節電時の実習として，出来る限り電力を消費しないことも目標とした。

* 東京工業大学生命理工学研究科（〒152-8551　東京都目黒区大岡山2-12-1 W3-43）：Fac. Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 W3-43 Ookayama, Meguro-ku, 152-8551, Japan
** 慶應義塾大学生物学教室（〒223-8521　神奈川県横浜市港北区日吉4-1-1）：Dept. of Biology, Keio University, 4-1-1 Hiyoshi, kohoku-ku, 223-8521, Japan [Received Apr. 24, 2012]

1．発光バクテリアとその特徴

1－1.　発光バクテリア

発光バクテリアは地表から深海まで広く分布しているが，現在確認されている４属19種のうち，３属16種は海洋性であり，沿岸から外洋の海水や海底泥，海産動物の体表や腸管，特定の魚類，イカ類の共生発光器官内などから分離される[1)]。バクテリアの発光はルシフェリン - ルシフェラーゼ反応であり[2)]，中でも Vibrio および Photobacterium 属の発光種に関しては研究が進んでいる。発光バクテリア由来ルシフェラーゼの極大発光波長は495nm（青緑色）であるが，極大発光波長が475nm（青色）のものや，535nm（黄色）のバクテリアが存在することも知られている[1)]。

これらの生物発光の適応的な意味については未知な部分が多いが，他生物の器官内に共生する種も多く，宿主の生活に役立っている可能性も高い。発光生物の約80% は海中に住んでおり，身を隠す場所がない外洋で自らが進む方向を照らし出したり，食べ物や交配相手を探したり，捕食者を追い払ったりするのに光を利用していると考えられている[3)]。

身近なところではイカの体表面にも発光バクテリアが生息しており，これは刺身用のスルメイカ *Todarodes pacificus* を用いることで比較的容易に採取する事が可能である。本プログラムでは，このスルメイカ体表の発光バクテリアを採取，培養して使用した。

1－2.　スルメイカ体表からの発光バクテリア採取

スーパーにて購入後，内蔵を除去した新鮮なスルメイカ胴部を３%NaCl 水溶液に浸し，17℃に設定したインキュベーター内に１～２日置いた後，暗室にて体表に青い光を確認した（図１）。発光バクテリアの生育においては17℃程度が最適であり，温度設定によっては他のバクテリアが優先するため発光が見られないこともある，との事である[4)]。

次いで，目視できた発光点を白金耳にて海産バクテリア用培地プレート（Marine Broth 2216, Difco, USA）に接種し，数代にわたり植え継ぐことで純化を図った。

1－3.　プレート培地におけるバクテリア培養

純化したと思われる菌体をプレート培地（Marine Broth 2216，３%-agar）に塗布し，インキュベーター内で17℃にて培養した。数回の試行の結果，培地上のコロニーが翌日には青く発光し始め，少なくとも数日間は発光を続けることが明らかとなった。なお，発光のピーク時には明所でも肉眼で確認できる程明るかった（図２）。発光の中心波長を測定するため，分光器（USB-2000, Ocean Optics, USA）にてプレート上の直径約１mm の範囲を測定した。バクテリアコロニーの発光スペクトルを（図３）に示す。発光のピークは495-500nm であったが，475nm 付近にも発光の肩が見られた。475nm の発光波長をもつ発光バクテリアとしては *Photobacterium phosphoreum*，および *P. leiognathi* が知られており[1)]，複数の発光バクテリ

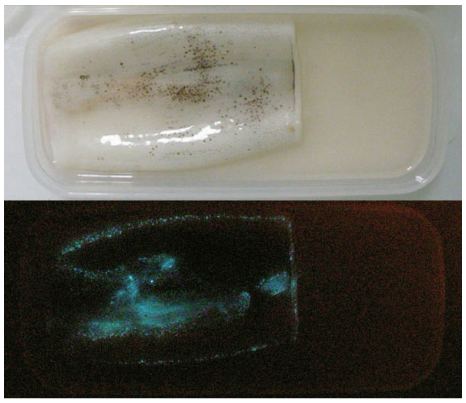

図１：約48時間経過後のスルメイカ；明所（上）および，暗室内（下）

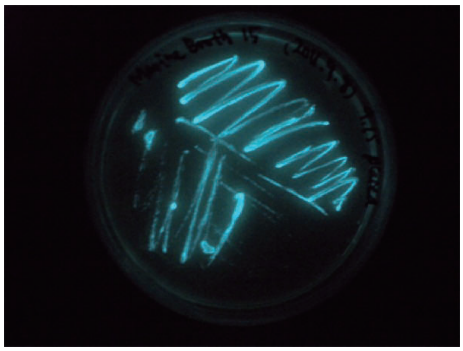

図２：プレート上での発光の様子

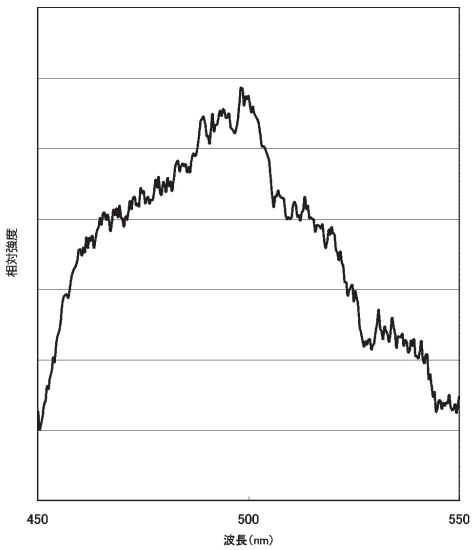

図３：プレート培地におけるバクテリア発光スペクトル

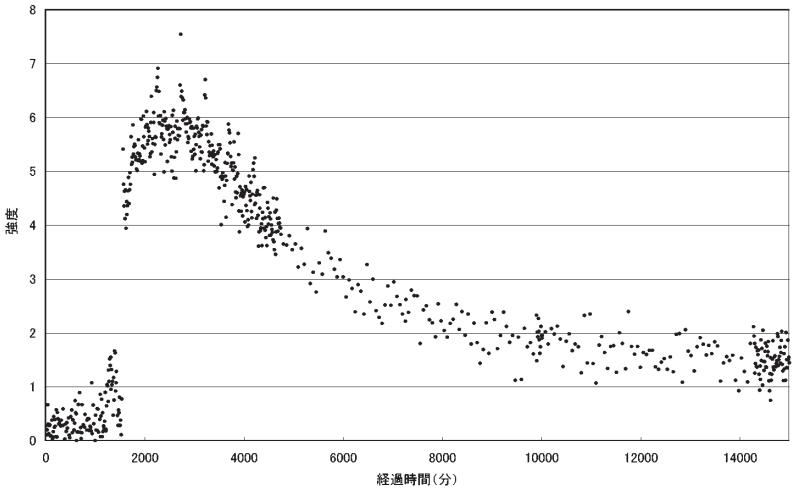

図４：プレート培地における経過時間と発光強度（500nm）

アが混在していた可能性もある。

次いで，発光の経時変化と継続時間の測定を行った。分光器（USB-2000, Ocean Optics, USA）を用いて，17℃のインキュベーター内でコロニーの発光強度を植え継ぎ時より10分毎に記録した。上記同様，測定したのはプレート上のごく狭い範囲（径約１mm の円上）における変化である。結果を図４に示す。縦軸は波長500nm における相対強度，横軸は時間（分）を示している。コロニーの発光は接種からおよそ2000-3000分後において極大となり，その後徐々に弱くなるものの，測定した10日間は発光を続けていた。また，少なくとも7000分後あたりまでは，暗室内であれば肉眼でも確認できる程度の発光がみられた。

1－4.　液体培地による培養

培地の種類によって発光の強度や持続時間が異なるのかを確認するため，プレートで用いたものと同様の液体培地（Marine Broth 2216, Difco）を使用して経時変化を測定した。設定温度は同じく17℃とした。フラスコ内の液体培地約70ml 中に菌体コロニーを白金耳にて接種した時点から，10分毎に発光スペクトルを計測した。なお，培地はマグネティックスターラーにて約100rpm で撹拌を行った（図５）。

結果，３回の試行中２回において発光が確認できた。発光しなかったものは培地の色が他と明らかに異なっており，コンタミネーションが生じたものと思われる。

発光時のスペクトルを図６に示す。プレート培地での結果（図３）と同様，500nm 付近にピークを持つ青緑の光である事が確かめられた。475nm 付近にやはり発光の肩がみられ，複数種のバクテリアの存在が示唆された。

次いで，発光強度の経時変化を図７に示す。２回の試行において，その推移には顕著な差があった。一方では500分で発光のピークを迎えた後，約1000分後に急激に発光が衰えたのに対

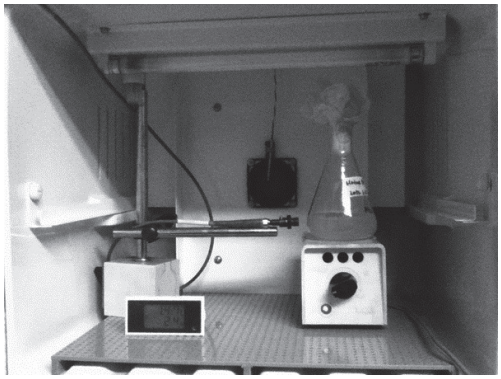

図５：液体培地での培養

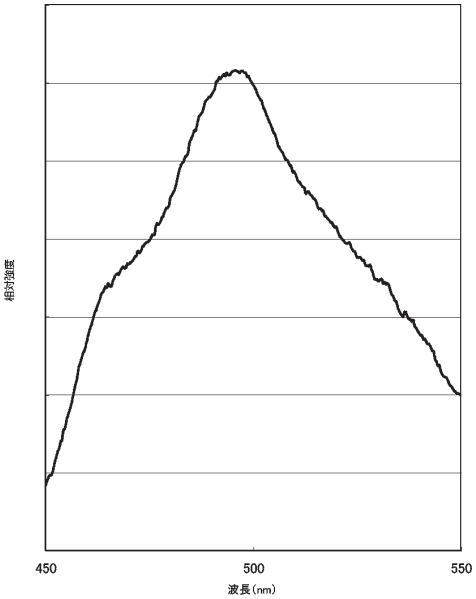

図６：液体培地におけるバクテリア発光スペクトル

し，もう一方のサンプルは遅れて発光を始めた後，明確なピーク無しに2500分あたりまで微弱な発光を繰り返していた。この違いの理由として，最初の菌体濃度の違いならびに実験中の地震等の影響によるスターラー停止が挙げられる。バクテリアが発光を開始するには Quorum-Sensing 機構*が大きく関与しており，菌体密度が閾値に達した時点で発光に関与する遺伝子

＊ Quorum-Sensing 機構

微生物がシグナル物質を介して 周囲の菌体密度をモニタリングし，菌体密度が閾値に達した所で様々な遺伝子の発現を活性化させる機構。発光微生物においては，培地内の菌体密度が閾値を超えた時点で発光反応に関与する酵素ルシフェラーゼの誘導を起こし，発光を開始することが知られている[1)]。

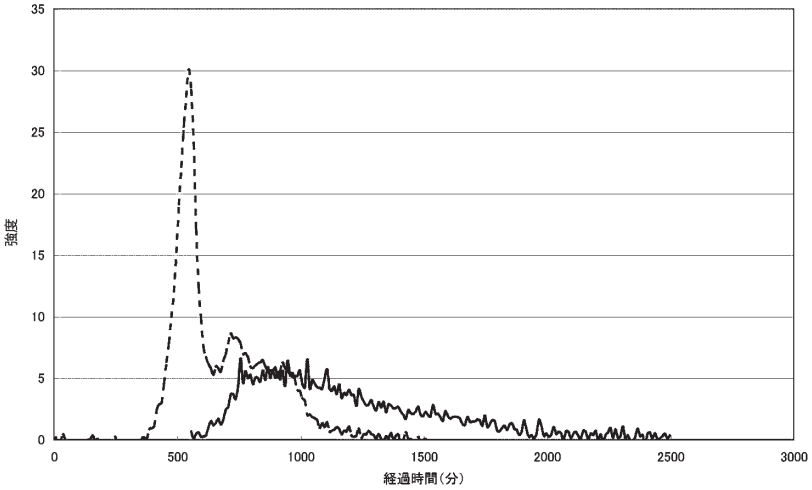

図７：液体培地における経過時間と発光強度（500nm）；２回の測定をそれぞれ実線と破線で示す

群の活性化が生じる[1)]。従って，発光までの時間は実験開始時の菌体数に大きく関係する。今回の予備実験において開始時の菌体数のコントロールは行っておらず，発光開始のずれはそのまま初期菌体数の差を表していると考えられる。なお，報告されている発光微生物のDoubling-time は約50分である[1)]。

ピークの無いサンプルにおいては，実験中にスターラーの停止を確認している（500分および3000分付近）。500分の時点で再度撹拌を開始したものの，すぐに停止した可能性がある。発光強度の上下へのぶれが大きい事からも，撹拌が停止したため栄養および酸素の供給が局所的となり，フラスコ内での発光が不均一になっていた事が推測される。フラスコの一部では培養に理想的な状況ではなかったために栄養分の消費が抑えられ，結果として微弱ながら長時間の発光が見られた可能性が高い。

なお，分光器での測定条件はほぼ同じであるため，図４および図７における縦軸の値はそのまま明るさの違いを表している。撹拌がうまくいっている場合，ごく短時間ではあるものの，寒天培地の約５倍の強い発光が測定された。

1－5.　まとめ；培地の違いと発光について

以上のようにプレート培地，液体培地共に発光バクテリアの培養は可能であり，目視でも鮮やかな発光を観察する事ができた。発光までの時間と継続時間は培地によりそれぞれ異なっていた。プレート培地は発光ピークまでに時間がかかる（2000min～）ものの，弱い発光が長く続く（10日以上）のに対し，液体培地は発光ピークまでは早く（500min～1000min）明るいものの，発光継続時間は短い（＜2000min）。ただし初期菌体数や培地量，撹拌のペースにより，液体培地の数字はある程度コントロールできる可能性がある。

2．実習プログラムへの導入

以上の観察結果よりイカ体表面の発光バクテリアの挙動に関しある程度の情報を得る事ができた。実際に発光バクテリアを用いた実習プログラムを行うにあたって，実現可能と思われる作業の具体例と，それぞれの問題点を検討した。

2－1.　実習における目標

バクテリアの培養を実習に組み込んだ，２日間に渡る実習プログラムを想定した。実習における達成目標として，以下のものを設定した。

①無菌操作についての理解

どのようにして目に見えない微生物の混入を防ぐかを正しく理解する

②微生物の存在の実感

培養の結果，実際に発光バクテリアが殖えたことを視覚的に捉える

③微生物のライフサイクル等の考察

具体的数値を用いた計算課題等で菌体増加のイメージを理解する

例）１つのコロニーに10^7の細胞が含まれるとする。発光バクテリアの世代時間が50分とすると，１個の細胞からコロニーが形成されるのに必要な時間（分）はどれくらいか。

発光についての考察（なぜスルメイカ表面から見つかるのか，なぜ発光するのか）等，生態に関する総合的な考察

④微生物の利用

身近な微生物利用：発酵，腐敗等における微生物の役割を理解する

バクテリアの応用：バイオアッセイ，バクテリアランプ等，日常生活への応用と問題点

2－2.　使用する培地

予備実験の結果，液体培地の発光は接種より十数時間後がピークであり，朝／夕どちらに開始しても発光は夜間～深夜早朝となる。初期菌体数等の調整により発光ピークを前後にずらせる可能性もあるが，現時点では液体培地を用いた観察は非現実的である。また，液体培地を用いる場合はコンタミネーション等の影響も大きく，再現性においてプレート培地に大きく劣ると考えられた。従って，バクテリアの塗布から発光までを扱う場合はプレート培地を用いるのが適当と判断した。

2－3.　プログラム案

２回の実習の合間にバクテリアの培養時間を組み込んで発光を観察する場合，①イカの体表からのバクテリア採取，もしくは②発光バクテリアの植え継ぎ，のどちらかを行う事が可能である。以下に具体的なプログラム案，利点および問題点を簡潔に記す。

①スルメイカと体表の発光バクテリア観察

（1日目）

1．イカの観察と解体；数人に1匹のスルメイカを用意し，観察させた後，切り身にする。

2．タッパーに食塩水とイカ切り身を入れ，暗室で観察；海水中で生活する発光バクテリアを増やすためには，どのような環境を作れば良いのか等を意識させる。暗室で観察し，光っていない事を確認する。

3．イカの内蔵，眼球等の観察，スケッチ等付随実験；培養には使用しない内蔵，眼球，触手等の観察およびスケッチ。

（2日目）

4．イカ体表面の発光バクテリアの観察；どのように光っているか，また，どの部分が明るく光ったか。

5．課題・講義；課題の考察。また，無菌操作等，実際に行わなかった作業についての講義

本プログラムにおける最大の利点は，身近な食材であるスルメイカを用いて実験を行う事で，イカ体表において発光バクテリアの存在を直接観察出来る点である。イカの生活に発光バクテリアが大きく関わっている事を理解するには適したプログラムであると考えられる。同時にスルメイカの観察も可能な事から，イカの形態，生活と絡めたバクテリア生活環の理解が可能である。反面，クリーンベンチを用いた無菌作業は解説のみに留まること，イカの観察における匂いなどの問題点もある。17℃での保存は発光バクテリアが光り出す時点までに腐敗が進行するため，実習室の換気は必須であり，使用器具の洗浄も手間がかかる可能性がある。

また，イカ体表での発光時間は比較的短く，インキュベーターに入れてから24時間から48時間後に観察できる事が必須である。このため，実習は2日間連続で行う必要がある。

②発光バクテリアの植え継ぎと観察

（1日目）

1．講義；無菌操作の解説，注意点等。

2．無菌操作；プレートへの発光バクテリア塗布。

（2日目）

3．プレート上コロニーの観察；どのように発光しているか。

4．課題・講義；課題の考察。スルメイカからの採取等，実際に行わなかった作業についての講義。

本プログラムでは，無菌操作に重点をおいた実習となる。プレート培地での培養はイカ体表での培養と異なり，匂いは殆ど無い。また，発光が数日間継続するため，場合によっては翌週の実習で発光を確かめる事も可能である。ただし，明るい発光を見るためには，操作の翌日もしくは翌々日に観察を行う必要がある。問題点としては，既に培養済みの株を使用するため，

イカとの関連性を実感しにくい事，クリーンベンチで作業できる人数が限られており，待ち時間が長くなる可能性が高い等が挙げられる。全体として実習としての内容が希薄となる可能性がある。

③折衷案

①案および②案の問題点をなるべく排除し，かつ関連実験も取り込んで充実化を図った。

（1日目）

1．スルメイカ体表の発光バクテリアの観察；あらかじめ用意したスルメイカを用いて，体表における発光を観察する。

2．無菌操作：無菌操作の解説と実践。バクテリアのプレートへの塗布。

3．LB培地への雑菌の導入；クリーンベンチ待ち時間中に同時進行で行う。各自が調べたいもの（指，髪の毛，空気中）等をLB培地に導入する。

（2日目）

4．プレートの観察，スケッチ；発光バクテリアプレート，LB培地の観察とスケッチ。

5．課題・講義；課題の考察と簡単な講義。

本プログラムでは，スタッフがスルメイカをあらかじめ用意する事で，イカ体表での発光を観察させつつ，無菌操作も実践する事が可能である。待ち時間にLB培地への雑菌導入を行う事で，身の回りの微生物も実際に観察することができる。問題点としては，スルメイカやプレートの準備においてスタッフの負担が増えることが挙げられる。LB培地での作業では，例えば冷蔵庫と室温，のように温度による増殖の違いを観察することも可能であろう。

2日目のオプションとして他の生物発光実験と組み合わせる事で，広く生物発光一般について理解を深める事もできる。具体的には，

・ウミホタル乾燥標本を用いたルシフェラーゼ失活実験

・ホタライト（キッコーマンバイオケミファ）による発光実験

等が挙げられる。

2−4.　節電におけるメリット

本プログラムにおいては，節電という点でも他の実習と比較してメリットがあると言える。実習および準備において電気を使用するプロセスとしては，クリーンベンチの使用，滅菌作業，インキュベーターの使用が主である。発光バクテリアを用いる事で，実習における照明は最低限で済む。観察は目視およびスケッチであり，特殊な機器は使用しない。クリーンベンチに関しては使用が絶対条件であるため，操作をなるべく手短に終わらせる等の対策が必要である。事前の滅菌処理等，電気を使う作業は，電力消費の少ない夜間に集中して行う事で電力の逼迫を軽減する事ができる。また，インキュベーターの使用に関しては，実施時期を考慮する（平均室温がなるべく17℃に近い時期）事で電力消費を軽減できるものと考えている。

3．総括

身の回りの微生物を視覚的に実感するという点において，単離や培養が容易である発光バクテリアは非常に有望な材料である。発光の状態には差があるものの，比較的長期間にわたって発光が肉眼でも観察できるプレート培地による培養は，液体培地よりも実習への導入が容易だと思われる。さらなる追加実験が必要であるが，温度条件等で発光のコントロールが可能であれば，非常に明るい発光を学生に見せる事も可能であろう。また，照明や特殊な機器を使用しないという点で，節電時の実習としても多くのメリットがあるだろう。

4．謝辞

実験を行うにあたり，東京工科大学応用生物学部　佐々木聰教授に貴重なアドバイスおよび発光バクテリアの培養株を頂いた。この場を借りて厚く御礼を申し上げる。

参考文献

1）佐藤雄一（2010）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，学位論文，東京農工大学大学院。
2）Strehler B. L. & Cormier, M. J., (1954) Kinetic aspects of the bacterial luciferin-luciferase reaction in vitro. *Arch Biochem* 53, 138–56.
3）Widder E. A., (2010) Bioluminescence in the Ocean: Origins of Biological, Chemical, and Ecological Diversity, *Science*, 328, 704–708.
4）佐々木聰，私信。