

ウツボカズラが持つ消化液の カビに対する効果

研究者 高橋咲紀 戸谷田泰生 福島未悠 吉浦瑞希
指導教諭 古川知世

要旨

ウツボカズラは病気に強いと言われている。植物に発生する病気はカビによるものが多いため、私たちは、ウツボカズラの消化液は、カビに対してより強い効果を持つのではないかと考え、研究を行った。

ウツボカズラの消化液は弱酸性であり、消化酵素と常在菌を含み、未開封の捕虫袋は無菌であることが知られているが、実際にそれらを確認した研究はなかった。そこで、まずは消化液のpHの測定、開封前の消化液と開封後の消化液を培養し常在菌の有無を確認したところ、確かに消化液は弱酸性であり、未開封の液は無菌であった。

この結果をもとに消化液の成分、消化酵素、そして常在菌のそれぞれのカビに対する効果を調べようと考えたが、消化液の成分を取り出したり、消化酵素のみを取り除いたりする方法は無かった。そこで、消化酵素と常在菌に着目して、無菌消化液(消化酵素のみ：消化液④)、開封後消化液(消化酵素＋常在菌：消化液⑤)、そして消化液⑤にオートクレーブをかけて消化酵素と常在菌のはたらきを無くした消化液(両方無し：消化液③)のカビへの効果を比較することにした。

その結果、抗カビ効果は消化液③よりも消化液④の方が高く、最も抗カビ効果が高いのは消化液⑤であることが分かった。さらに、ウツボカズラの消化液が持つ抗カビ効果は、複数のカビに対して発揮されることも分かった。

このことから、ウツボカズラの消化液は抗カビ効果を有し、消化液そのものだけでも抗カビ効果をもつが、消化液がもつ消化酵素によって消化液の抗カビ効果が上がり、さらにそこに常在菌が加わることでより抗カビ効果が高まると結論付ける。

本研究ではウツボカズラが病気に強い理由が消化液であると結論づけることはできなかったが、本研究によって、ウツボカズラの消化液が抗カビ効果をもつことは示すことができたと考える。

1 はじめに

1-1 研究動機

私たちは研究内容を決定するにあたり、他の植物にない特徴を持った植物を扱い、研究を行いたいと考えた。そこで、食虫という習性を持つ「ウツボカズラ」という食虫植物に関する実験を実施することにした。

ウツボカズラについて先行研究を調べる中で、ウツボカズラは病気に強いという報告があり[1][2][3][4]、私たちは興味を持った。また、植物に発生する病気の要因はカビによるものが約8割を占めているといわれているため[5]、ウツボカズラが他の植物よりも病気に強い理由は、ウツボカズラの消化液に抗カビ効果にあるのではないかと仮定し、実験を行うことにした。

1-2 ウツボカズラ(ネペンテス)について

ウツボカズラ(学名：Nepenthes)は、常緑性の蔓植物で食虫植物の代表的な一種である。熱帯アジア、マダガスカル、セーシェル諸島、ソロモン諸島、ニューカレドニア、オーストラリア北部に約90種が自生している[6]。ウツボカズラは葉緑体を有しているため光合成が可能だが、捕虫袋という虫を消化するための器官も有している。ウツボカズラの捕虫袋は、最初は蔓の先の膨らみとして生じる。膨らみは徐々に成長して大きくなり、それにつれて基部で曲がることで、捕虫袋の口を上に向け、袋の形になる。この時点では袋の口に蓋が密着して閉じているが、蔓内の消化液を分泌する管を通して透明な消化液が徐々に分泌され、袋の底から3割程まで溜まる。蓋が開くと昆虫を誘引し、捕虫袋に落ちた昆虫が逃げ出そうとしても内側の壁に足を滑らせ、さらに消化液を含む内側の液体にも少しとろみがあるため、昆虫はなす術もなく消化されて消化液を分泌した管を通して吸収される[7]。

1-3 ウツボカズラに関する先行研究

ウツボカズラは消化液を通して外部から栄養を取り込むことができ、また、病気に強いといわれている[1][2][3][4][7]。しかし、それを証明する論文は見つからなかった。この消化液は虫を消化するための酵素を含んでおり、弱酸性である[7][8]。捕虫袋の蓋が開くまでは消化液は無菌状態であるといわれているが[4]、それを前提とした先行研究は存在するものの、実際に無菌状態で

あることを証明した先行研究は無かった。

蓋が開いた初期の消化液は、自身が分泌する酵素によって虫を分解しているが、後期の消化液は雨の侵入などによって消化液が薄まり、消化液そのものの消化能力は衰退する。その代わりに、雨や空気を通して捕虫袋内に侵入した好酸性のバクテリアが消化液内で繁殖し、これらのバクテリアが虫の分解を助けることが知られている[9]。このように、動物や植物の体内や体表に存在する細菌で、他の病原菌から宿主を守るはたらきや、環境の変化に対する影響を和らげるはたらきがあると考えられている細菌は常在菌と呼ばれている。ウツボカズラが持つ消化液は、原核生物に対する抗菌効果があることが分かっている[10]。この抗菌効果というのは、ウツボカズラの消化液中のバクテリアが他の細菌の繁殖を抑制していることによると考えられるため、以降、ウツボカズラの消化液内で繁殖するバクテリアを常在菌と呼ぶことにする。

ウツボカズラの消化液には、植物が持つキチン分解酵素(キチナーゼ)が含まれていることも分かっており、この酵素がカビの細胞壁の主成分であるキチンを直接分解すると考えられている[9][11][12]。これにより、ウツボカズラの消化液はカビの繁殖を抑制していると考えられるが、ウツボカズラの消化液によって実際にカビの繁殖が抑えられていることを示した研究は無い。

ウツボカズラの消化液のpHに関して、蓋が開く前は約4.6ほどで弱酸性であり、蓋が開いた後、約5.5に増加し、中性に近い弱酸性を示すことが知られている[13]。

2 予備実験1

2-1 実験目的

ウツボカズラの消化液は、捕虫袋の蓋が開くまでは無菌状態であると言われているが、実際に無菌状態であることを証明した先行研究は無い。そこで私たちは、消化液の細菌の有無を調べることにした。

2-2 培地および消化液、実験道具について

予備実験及び本実験においては、共通の培地および消化液を用いた。

2-2-1 培養に用いた培地について

予備実験及び本実験において細菌やカビの培養は、寒天にじゃがいもの煮汁を混ぜて作るポテト培地を用いた[14]。ポテト培地の作成には、材

料として、ジャガイモ、砂糖、寒天(粉末)を用いた。器具として、包丁、まな板、皮むき器、500mL ビーカー2つ、ガスバーナー、三脚、金網、薬さじ、薬包紙、電子天秤、ガーゼ、ラップ、電子レンジ、直径約4 cm のプラスチックシャーレを用いた。以上の材料及び器具は、実験過程で十分に加熱を行うため、殺菌はせずに用いた。

培地の作成方法は以下のとおりである。

まず、皮をむいたジャガイモを約5 mm の厚さの短冊切りにし、5 倍量の水道水で約 30 分間煮沸した。煮汁をガーゼで 500mL ビーカーに漉し、熱い煮汁に、煮汁の2 %分の砂糖を加えてよくかき混ぜて溶かした。砂糖入りの熱い煮汁に、砂糖を入れる前の煮汁の2 %分の寒天を加えてよくかき混ぜて寒天をだいたい溶かした。

この状態では寒天が溶けきっていないため、殺菌も兼ねて、電子レンジで十分に加熱した。電子レンジでの加熱時には、煮汁入りの 500mL ビーカーにラップをかけた状態で重さを量り、10g の水道水を加え、10g の水分の重さが減るまで、電子レンジをかけてかき混ぜることを繰り返し、寒天を完全に溶かした。この溶液を、クリーンベンチ内で、寒天が固まる前に直径約4 cm のプラスチックシャーレに深さ3 分の2 程流し入れ、固めた。なお、プラスチックシャーレは十分に UV を照射し、殺菌をした状態のものを用いた。

2-2-2 消化液について

培養する消化液は、蓋が開いていない状態の捕虫袋の蓋を、クリーンベンチ内で開けて細菌等が液に入らないようにしながら取り出した消化液(以降消化液④)、蓋が開いた捕虫袋から取り出した常在菌及び酵素を含む消化液(消化液⑤)、消化液⑤に対してオートクレーブ(内部を飽和蒸気によって高温高压にすることで滅菌を行う機器。本実験では、この機器の使用によって消化液内の消化酵素と常在菌のはたらきを失わせたと考える)をかけて酵素及び常在菌のはたらきを除いた消化液(消化液⑥)を用意して用いた。

2-2-3 実験道具について

消化液の培養および消化液の採取は、2-2-1 で示したポテト培地、200 μ L マイクロピペット、1000 μ L マイクロピペット、200 μ L チップ、1000 μ L チップ、綿棒、油性マジックを用いた。なお、ポテト培地、チップそして綿棒はオートクレーブにて、ピペットおよびマジックは UV 照射にて殺菌を行った。

2-3 実験方法

2-3-1 消化液内の菌の有無の確認

最初に、2-2-3 に示した材料および道具・器具を用意した。実験は以下の手順で行った。

- (i) 消化液④、⑤、⑥を撒くポテト培地と、ネガティブコントロールのポテト培地を用意し、油性マジックで①、②…と番号を記した。
- (ii) 蓋が開いていないウツボカズラの捕虫袋をクリーンベンチ内に入れて蓋を開き、消化液④をマイクロピペットを用いてマイクロチューブに採取した。
- (iii) 蓋が空いているウツボカズラから消化液⑤をマイクロピペットを用いマイクロチューブに採取した。
- (iv) 消化液⑤に対してオートクレーブをかけ、酵素と常在菌のはたらきを除いた消化液⑥を用意した。
- (vi) (i) で用意したポテト培地に消化液④、⑤、⑥を撒いた(以降、培養前の準備済みポテト培地をプレートと呼ぶ)。
- (vii) 上記の消化液④、⑤、⑥とネガティブコントロールのプレートを、本実験と同じ環境のインキュベータ内で3 日間培養し、朝(8:30)昼(12:10)夕方(16:30)にプレートの様子を観察した。

2-3-2 消化液の pH の確認

2-2-2 の方法で、異なる日に採取した消化液を、それぞれ消化液④は3 日分、消化液⑤は3 日分、消化液⑥は量に限りがあったため2 日分用意した。オートクレーブによる消化液の pH の変化がないかを調べるために、pH 試験紙を用いて消化液の pH を調べ、比較した。pH 試験紙は結果の2 cm 程に切り、30 μ L の消化液を試験紙に付けた。

2-4 結果

2-4-1 消化液内の菌の有無

消化液⑥のプレートには細菌が生えていることが確認できた(写真にはうまく写らなかったため、結果写真は割愛)。消化液④、⑤とネガティブコントロールのプレートには何も生えていなかった。

2-4-2 消化液の pH

消化液④は pH 6 弱、消化液⑤及び⑥は pH 6 強程度であった(図1)。

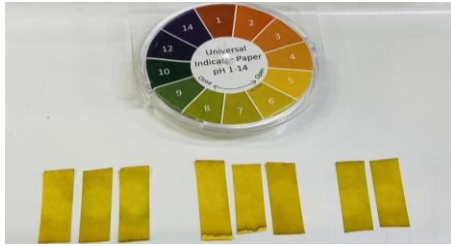


図1 消化液の pH

消化液の pH を pH 試験紙で確認したところ、どの消化液も pH は約 6 であった。図の左 3 本は消化液④、真ん中 3 本は消化液⑤、右 2 本は消化液③。

2-5 考察

2-5-1 消化液内の菌について

消化液⑤のプレートには細菌が確認されたが、消化液④のプレートでは確認されなかった。このことから、蓋の空いていない捕虫袋の消化液は無菌であると考えられる。また、消化液⑤のプレートで確認された細菌は、蓋が開いたことで消化液内で培養された細菌である常在菌だと考えられる。

2-5-2 消化液の pH について

pH 試験紙で確認された消化液の pH は、消化液④でも pH 6 弱であり、先行研究で報告されている pH よりも中性寄りであった。オートクレーブをかけて殺菌を行うその性質上消化液③は事前に採取したものであり、また、常在菌を繁殖させる必要がある消化液⑤もその性質上捕虫袋の蓋が開いてからある程度の日数が経っているため、pH が変わってしまう可能性はある。しかし、消化液④に関して、右端の試験紙は、直前に捕虫袋の蓋を開けて採取した消化液の試験紙の結果であり、残りの 2 つの試験紙はそれぞれ左から 2 か月前、1 か月前に同様の方法で採取した消化液の結果である。このことから、採取後保存していたことによる pH の変化はほぼないと考えられる。よって、先行研究よりも pH が高いことについて、以下の 2 つの可能性が考えられる。

1 つ目は、消化液の pH は種によって異なる可能性である。本実験において使用したウツボカズラは「ウツボカズラ」であることしかわからず、どの種であるかなどの詳細は不明である。さらに、ウツボカズラにはたくさんの種があり、先行文献に示された pH も各種における消化液の pH を確認したものではない。よって、本実験で使用したウツボカズラは、より中性に近い弱酸性の消化液を分泌する種である可能性がある。

2 つ目に、生育環境による pH の変化が考えられる。本実験では水道水を用いており、直射日光

を避けるために遮光率 75% のサンシェードを張り付けた窓の前の室内で午前中光合成ができる状態で置き、午後は日陰に移すという日課で生育していた。雨による消化液の希釈防止に室内生育としたが、自然環境とは異なるため、何らかの影響があってもおかしくはない。

いずれにしても、本研究で使用したウツボカズラの消化液は pH 6 の弱酸性である。

3 予備実験 2

3-1 実験目的

ウツボカズラは、消化液に含まれる酵素であるキチナーゼの効果によって消化液に抗カビ効果があると考えられるが、それを確認した先行研究はない。そこで、本研究では消化液のカビへの効果を研究することにした。しかし、カビを安定的に培養する方法が分からなかったため、まずは本実験で使用するカビの採取と、ポテト培地でカビを培養可能かどうか調べることにした。

3-2 実験に用いる材料

カビの採取には、2-2-3 で用意した滅菌綿棒を用い、培養には 2-2-1 で作成したポテト培地を使用した。

3-3 実験方法

湿度が高く、埃などの汚れがあると考えられる校内 4 箇所(生物室のエアコンのダストボックス、2 階女子トイレの手洗い場、渡り廊下の手すりの溝、雨樋)からカビらしきものを綿棒で採取し、作成したポテト培地の全面に撒布した。カビの繁殖に適している温度である 27 度に設定し [15]、湿度を 90% 前後に保つために水を入れたガラスシャーレと共に生物教室のインキュベーター内に入れ、数日間培養した(図 2)。



図2 培養中のインキュベーター内の様子

温度を 27℃ に設定し、水を入れたプレートをカビとともにインキュベーター内に入れ、湿度を約 90% に保った。

3-4 結果

ポテト培地にカビらしきものが生えているのが確認できた。(図3)

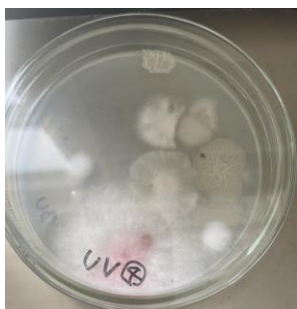


図3 ポテト培地でカビを培養させた様子

白いカビと赤い色素を持つカビと思われるものが生えた。

3-5 考察

カビかどうかを正確に判別する方法が見つからなかったため、カビであるかの確証は得られなかった。しかし、菌糸と思われるものが生えていること、カビの培養に適している培地・環境で生えたことから、私たちは、培養によって得られたものはカビであると判断した。今後の実験では、観察がしやすい赤い色素を持つカビをポテト培地に撒布して実験を行うこととする。

4 実験1

4-1 研究目的

先行研究よりウツボカズラの消化液には細菌に対する抗菌効果があるとわかっていた[10]。しかし、1-3で述べたようにキチン分解酵素を含むウツボカズラの消化液は、カビの細胞壁の主成分であるキチンを直接分解すると考えられているが、実際にカビを抑制できるという研究は見られなかった。そこで私たちは、ウツボカズラの消化液の抗カビ効果の有無を調べることにした。

私たちは、ウツボカズラの消化液の構成要素として、①常在菌、②消化酵素、③左記の2つを除いた全て(液自体)の3つがあると考えた。③については、弱酸性を示す消化液に溶けている成分(物質)を示すが、水の他に具体的な成分に関する研究や記述はなく、抽出する術も無い。そこで、今回は①および②の有無に焦点をあてて調査することにした。ウツボカズラの消化液の抗カビ効果が、消化液中の内容物(常在菌や消化酵素のはたらきによるものなのか、あるいは消化液自体のはたらきによるものなのか)を調べるため、ウツボカズラから採取した消化液と、その消化液をオートクレーブにかけたものをカビを塗布したプレー

トに撒いて数日間培養し、発生するカビの量を比較する実験を行った。

4-2 実験に用いた材料

2-2-1で作成したポテト培地を8枚用意した。消化液は、蓋が開いた捕虫袋から採取した酵素及び常在菌を含む消化液⑥、オートクレーブ処理により酵素及び常在菌のはたらきがない消化液⑦を用いた。また、実験道具として、2-2-3で示したものの以外にペーパータオルを用意した。なお、ペーパータオルも十分にUV殺菌をした。またカビは、3-3で採取し培養した赤カビを用いた。

4-3 実験方法

まず、クリーンベンチ内に材料および道具を入れ、無菌の状態を保った。実験は以下の手順で行い、プレート①～⑧を準備した(表1)。

(i)用意したプレートの蓋表面およびプレート裏面に油性マーカーを用いて、①～⑧までの番号を記した。

(ii)①、③、④、⑤、⑦のプレートに、綿棒を用いて半径1cmの円状にカビを撒布した。

(iii)消化液⑥をプレート①、②に160μLずつ、消化液⑦を③に80μL、④、⑥に160μLずつ、⑤に320μLずつそれぞれ撒いた。⑦はポジティブコントロール、⑧はネガティブコントロールとして準備した。

(iv)①～⑧を、3-3同様、カビの生育に適した環境にしたインキュベーター内に入れ、培養した。培養開始日の翌日から、朝(8:30)昼(12:10)夕方(16:30)にプレートの様子を観察し、カビの繁殖が十分に確認できるまで観察を続けた。

プレート③～⑤において消化液量に幅を持たせているが、抗カビ効果が消化液に含まれる常在菌や消化酵素によるものではなく、消化液の液量(溶けている成分や弱酸性であることに由来)によるものなのかを比較して調べるために、異なる液量で同時に実験を行った。

また、③、④、⑤のプレートに撒いた消化液量を80μL、160μL、320μLに設定した理由については、直径9cmのプレートを使用した先行研究において[15]、200μLの消化液を撒いたところ、大腸菌に対して抗菌効果が確認されていた。そのため、同じく200μLと、その2分の1である100μLと2倍の量の400μLの消化液を撒こうと考えていた。しかし、その実験の結果どのプレートも抗カビ効果が確認されなかった場合、撒く液量を増やす実験が必要となる。ウツボカズラの消化液量には限りがあるため、私たちはプレートの大きさを直径約

4 cm のものに小さくし、相対的にプレートに撒く消化液の量を直径 9 cm のプレートと等しくした。これにより、今後消化液を増加して実験を行ったとしても、消費する消化液量を抑えられる。

直径 9 cm のプレートの表面積は、

$$4.5\text{cm} \times 4.5\text{cm} \times \pi = 63.617\cdots \\ \doteq 63.62\text{cm}^2$$

また、直径約 4 cm のプレートの表面積は、

$$2.0\text{cm} \times 2.0\text{cm} \times \pi = 12.566\cdots \\ \doteq 12.57\text{cm}^2$$

$$63.62\text{cm}^2 \div 12.57\text{cm}^2 = 5.061\cdots$$

$$\doteq 5.06 \text{ (倍)}$$

つまり、直径約 4 cm のプレートの表面積は、直径 9 cm のプレートの約 5 分の 1 である。よって、直径約 4 cm のプレートに撒く消化液の量は、

$$200\mu\text{L} \div 5 = 40\mu\text{L}$$

上記の計算から私たちは、40 μL を中心とした系で実験を行おうと考えた。しかし、40 μL およびその 2 分の 1 の 20 μL では直径約 4 cm のプレート全体に消化液を行き渡らせることができず、菌糸で増殖するカビに対して消化液が十分に効果を発揮できないことが考えられた。そこで、プレートに消化液を行き渡らせることができる 80 μL (40 μL の 2 倍量) を最小量とし、80 μL の 2 倍の 160 μL 、その 2 倍の 320 μL を撒いて実験を行うことにした (表 1)。

	オートクレーブなし 消化液あり	オートクレーブあり 消化液あり	消化液なし
カビあり	①	③80 μL ④160 μL ⑤320 μL	⑦
カビなし	②	⑥	⑧

表 1 実験 1 で作成したプレートの条件

プレート全体に消化液を行き渡らせるために 80 μL を最小量として消化液を撒く実験系とした。⑦はポジティブコントロール、⑧はネガティブコントロール。

4-4 結果

2 日ほど培養したのち、プレート内にカビの繁殖がはっきりと確認された。なお、カビのみの⑦のプレートではカビがきちんと増殖し、何も撒いていない⑧のプレートでは何も繁殖しなかったことから、本実験の材料および道具に問題はなかったといえる。

4-4-1 消化液のオートクレーブの有無による違い

カビを塗布していない②と⑥のプレートを比較すると、オートクレーブ処理をしていない消化液を撒いた②には細菌のコロニーのようなものが生えており、オートクレーブ処理をした消化液を撒いた⑥には何も確認されなかった (図 4)。

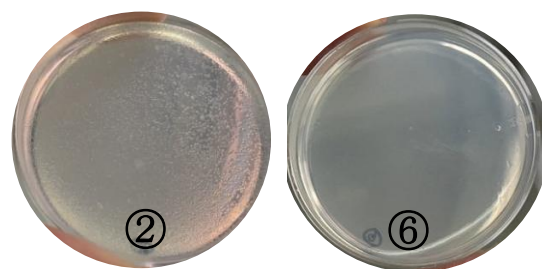


図 4 カビを塗布していないプレートにオートクレーブ処理の有無が異なる消化液を撒いて培養した様子

未オートクレーブ処理消化液を撒いた②ではコロニーのようなものが観察されたのに対して、オートクレーブ処理消化液を撒いた⑥では何も確認されなかった。

4-4-2 消化液による抗カビ効果の確認

カビを塗布したプレートではカビの繁殖が確認された。しかし、オートクレーブ処理をしていない消化液を撒いた①とオートクレーブ処理をした消化液を撒いた④を比較すると、④ではカビが広く繁殖しているのに対して、①では細菌のコロニーと思われるものによって、カビの繁殖が抑えられている様子が観察された (図 5)。

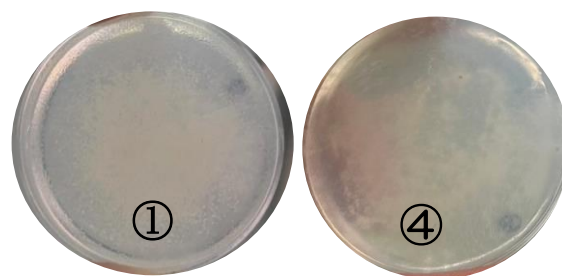


図 5 赤いカビを塗布したプレートにオートクレーブ処理の有無が異なる消化液を撒いて培養した様子

オートクレーブ処理をした消化液を撒いた④では全体的にカビの繁殖が確認されたのに対して、オートクレーブ処理をしていない消化液を撒いた①ではカビの繁殖が抑えられている様子が観察された。

4-4-3 消化液の量による違い

カビを塗布したプレートに対して撒く消化液の量を 80 μL とした③、160 μL とした④、320 μL と

した⑤のプレートを比較すると、カビの発生量の少ない順に⑤⇒④⇒③となった(図6)。



図6 カビを塗布したプレートにオートクレーブ処理をした消化液の量を変更し撒いて培養した様子

消化液の量が多い方がカビの繁殖が抑えられる様子が観察された。

4-5 考察

4-4-1 で示したように、カビを撒布していないプレートにおいて、オートクレーブ処理有りの消化液を撒いたプレートでは何も変化が見られず、オートクレーブ処理無しの消化液を撒いたプレートでは細菌のコロニーと思われるものが増殖した(図4)。このことから、2-5-1 同様、ウツボカズラの消化液中には常在菌が存在していることが確認できた。

そして4-4-2 で示したように、カビを塗布したプレートにおいて、オートクレーブ処理有りの消化液を撒いたプレートよりも、オートクレーブ処理無しの消化液を撒いたプレートの方がカビの発生量が少なかった(図5)。このことから、常在菌や消化酵素が含まれていることによって、より大きな抗カビ効果があるということが分かった。

また、4-4-3 で示したように、常在菌や消化酵素のはたらきの無い消化液のみでも液量が多いほどカビの繁殖が抑えられた。このことから、消化液そのものにもカビの繁殖を抑える効果はあると考えられる。しかし、常在菌や消化酵素のはたらきがある状態よりも、その抗カビ効果は大きく落ちることが分かった。

したがって、消化液そのものにも抗カビ効果はあるが、常在菌や消化酵素のはたらきによって、ウツボカズラの消化液の抗カビ効果が高められているといえる。

5 実験2

5-1 研究目的

実験1では、予備実験2で採取した赤いカビを用い、抗カビ効果が確認されたが、ウツボカズラの抗カビ効果がそのカビだけにある可能性も考えられる。そこで、予備実験のカビ採取場所とは異なる場所が無作為に採取して培養した実験1とは異なるカビを用いて、実験1と同様の実験を行い、他のカビでも消化液が抗カビ効果を発揮するのかを確かめるため、実験を行った。

5-2 実験に用いる材料

実験1と同様の材料や器具を用いた。但し、塗布したカビは、新たに排水溝から採取して培養したカビに変更した。採取手順については予備実験2と同様である。

5-3 実験方法

4-3 と同様の方法で実験を行った。ただし、撒いた消化液量は全て 160μL とした(表2)。

実験1と異なり、オートクレーブ処理をした消化液の液量を変えたプレートを用意しなかった理由は、今回は液自体に効果があるのかではなく、他のカビにも効果があるのかという視点を重視しており、消化液量にも限りがあったため、液量を変えたプレートを用意しなかった。

	オートクレーブなし 消化液あり	オートクレーブあり 消化液あり	消化液なし
カビあり	①	③	⑤
カビなし	②	④	⑥

表2 実験2で作成したプレートの条件

実験1とは異なるカビを用いて実験を行った。⑤はポジティブコントロール、⑥はネガティブコントロール。

5-4 結果

3日ほど培養したのち、プレート内にカビの繁殖がはっきりと確認された。なお、カビのみの⑤のプレートではカビがきちんと増殖し、何も撒いていない⑥のプレートでは何も繁殖しなかったことから、本実験の材料および道具に問題はなかったといえる。

5-4-1 消化液のオートクレーブの有無による違い

4-4-1 同様, カビを塗布していない②と④のプレートと比較すると, オートクレーブ処理をしていない消化液を撒いた②には細菌のコロニーのようなものが生えており, オートクレーブ処理をした消化液を撒いた④には何も確認されなかった(図7).

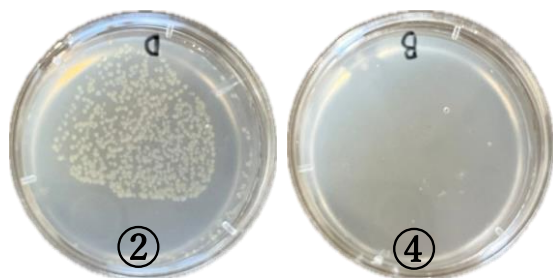


図7 カビを塗布していないプレートにオートクレーブ処理の有無が異なる消化液を撒いて培養した様子

未オートクレーブ処理の消化液を撒いた②ではコロニーが観察されたのに対して, オートクレーブ処理消化液を撒いた④では何も確認されなかった.

5-4-2 消化液による抗カビ効果の確認

4-4-2 と同様, カビを塗布したプレートではカビの繁殖が確認されたが, オートクレーブ処理をした消化液を撒いた③ではカビが広く繁殖しているのに対して, オートクレーブ処理をしていない消化液を撒いた①では細菌のコロニーと思われるものによって, カビの繁殖が抑えられている様子が観察された(図8).



図8 白いカビを塗布したプレートにオートクレーブ処理の有無が異なる消化液を撒いて培養した様子

オートクレーブ処理をした消化液を撒いた③では全体的にカビの繁殖が確認されたのに対して, 未オートクレーブ処理の消化液を撒いた①ではカビの繁殖が抑えられている様子が観察された.

5-5 考察

5-4-1 および 5-4-2 に示したように, 排水溝か

ら採取したカビでも, 実験1と同様の結果が得られた. このことから, ウツボカズラの抗カビ効果は特定のカビのみに対するものではなく, 様々なカビに効果がある可能性が高いことが確認できた.

6 実験3

6-1 研究目的

実験1では, オートクレーブの有無によって差が見られたため, 抗カビ効果は常在菌と消化酵素のはたらきによるものが大きく, 弱酸性である消化液のはたらきだけでは効果が弱いと考えられる. この結果から, 4-5 で述べたように, 消化液の抗カビ効果は消化酵素と常在菌によるところが大きいことが推測できる. さらに, ウツボカズラ以外の植物もカビの細胞壁の主成分であるキチン分解酵素を持つことから, 消化液の抗カビ効果は消化酵素よりも常在菌の方が強いのではないかと考えた.

そこで, 消化液の抗カビ効果が消化酵素のはたらきと常在菌のはたらき, どちらによる影響が大きいのか比較したいと考えた. しかし, 常在菌だけを含んでいる消化液を採取する具体的な案が思いつかなかった. そのため, 蓋が開いていない状態のウツボカズラの捕虫袋から取り出した無菌である消化液と, 蓋が開いた消化液を比較, すなわち, 常在菌を含まない消化酵素のみの消化液と消化酵素だけでなく常在菌も含む消化液を比較する実験を行うことにした.

6-2 実験に用いる材料および道具

消化液は, 2-2-2 で示した, 無菌状態かつ消化酵素を含む消化液④, 消化酵素及び常在菌を含む消化液⑤, そして比較のために消化酵素及び常在菌のはたらきが無い消化液⑥を用意した.

また, 実験の培地及び道具は, 2-2-1 および 2-2-3 で示したものをを用意した. カビは実験1で使用した赤い色素を持つカビを用意した.

6-3 実験方法

5-3 と同様の方法で行った. ただし, プレートは表3のように用意した.

	無菌状態の消化液 消化液あり	オートクレーブなし 消化液あり	オートクレーブあり 消化液あり	消化液なし
カビあり	①	③	⑤	⑦
カビなし	②	④	⑥	⑧

表3 実験3で作成したプレートの条件

常在菌の有無によって抗カビ効果に差があるのかを調べるための実験系を考えた。⑦はポジティブコントロール、⑧はネガティブコントロール。

6-4 結果

3日ほど培養したのち、プレート内にカビの繁殖が確認された。

6-4-1 消化液の蒸発跡

本実験では無菌状態つまり蓋を開けて間もない消化液を用いたプレートにおいて蒸発跡とみられる様子が観察された(図9)。

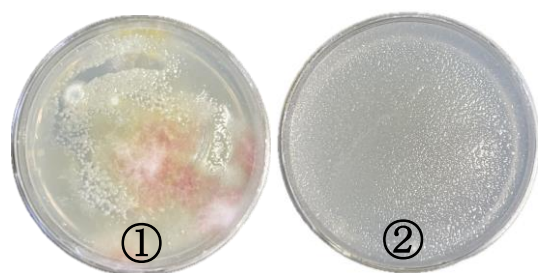


図9 消化液の蒸発跡と思われるものの様子

カビを塗布して無菌消化液を撒いたプレート①および、カビは塗布せず無菌消化液を撒いたプレート②では、消化液の蒸発跡らしき様子が観察された。

6-4-2 常在菌の有無によるカビの増殖の違い

カビを塗布したプレートにおいて、無菌消化液つまり消化酵素のみの消化液を撒いたプレート①のカビの増殖は菌糸が観察された程度であり、オートクレーブ有り、つまり消化酵素のはたらきが無い消化液を撒いたプレート⑤よりもカビの増殖が少ない様子が観察された(図10①⑤)。また、オートクレーブなし、つまり消化酵素も常在菌も働いている消化液を撒いたプレート③では菌糸が観察されなかった(図10③)。

カビを塗布しなかったプレートにおいては、無菌消化液を撒いたプレート②およびオートクレーブをかけた消化液を撒いた、つまり常在菌が死滅した消化液を撒いたプレート⑥では、カビや細

菌の繁殖は観察されなかった(図10②⑥)。常在菌が生きている消化液を撒いたプレート④では、常在菌の繁殖が観察された(図10④)。なお、ポジティブコントロールである⑦とネガティブコントロールである⑧のプレートに問題はなかった(図10⑦⑧)。

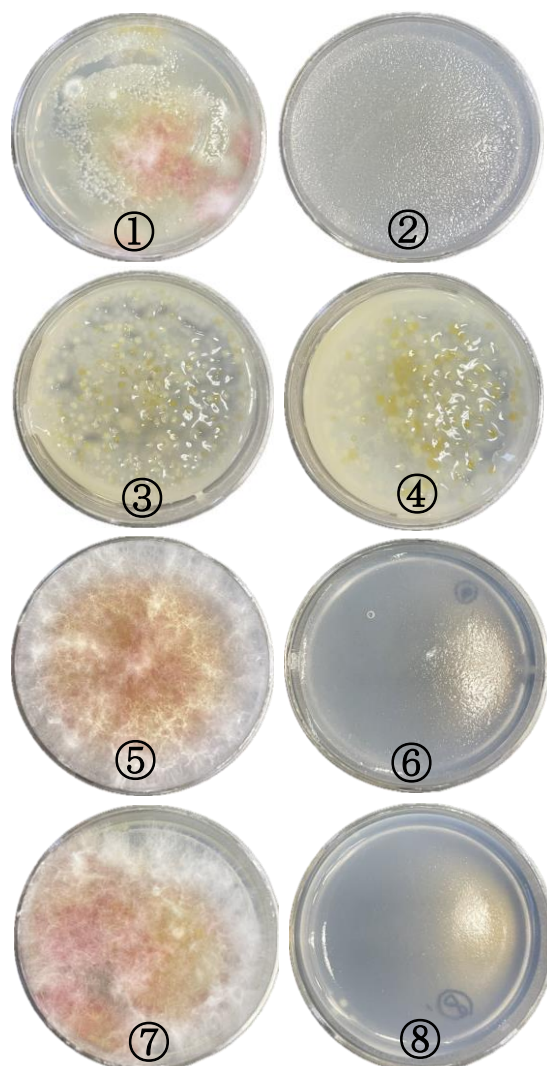


図10 実験3における培養の様子

カビの増殖は、消化液③>消化液①>消化液⑤の順に減少する様子が観察された。①③⑤はカビを塗布したプレート、②④⑥はカビを塗布していないプレートであり、①②は無菌消化液(消化液a)、③④はオートクレーブ無し(消化液b)、⑤⑥はオートクレーブあり(消化液c)をそれぞれ撒いたプレートの培養の様子を示している。⑦はポジティブコントロール、⑧ネガティブコントロール。

6-5 考察

6-5-1 消化液の蒸発跡について

無菌消化液を撒いたプレートで、消化液の蒸発

跡のようなものが観察された(図 10①②). 無菌消化液は, 捕虫袋の蓋が開いている状態で採取しなければいけない性質上, 実際に蓋が開くよりも早く採取することになる. ウツボカズラの消化液は捕虫袋の蓋が開くと, 時間とともに薄まっていくことが知られているが[13], これは雨などが侵入することによるものである. 消化液の濃度を調べる方法が無いため確認はできないが, ウツボカズラの消化液は, 昆虫などの消化に適した状態となるために, 捕虫袋の蓋が開くまでの間でも濃度が薄まっていく可能性が考えられる. 例えば, 捕虫袋への分泌初期は高濃度で徐々に薄めていって安定させる, 他にも, 最終的な濃度よりも高めの濃度で分泌し, ある程度たまったら最終的に薄める, などが考えられる. 一定時間ごとに消化液を採取し, その濃度を計測することが可能であれば, 調べることで新たな発見があるかもしれない.

理由は確定できないが, 他の結果では見られなかった蒸発後が見られたことから, 他の消化液と比べ濃度が高いと考えられる.

6-5-2 常在菌の有無によるカビの増殖の違いについて

6-4-2 で示したように, カビを塗布したプレートにおいて, 無菌状態つまり消化酵素のみの消化液を撒いたプレート(図 10①)とオートクレーブによって消化酵素と常在菌のはたらきを無くしたプレート(図 10⑤)を比較すると, 消化酵素がある方がカビの増殖を抑えられていることが分かる. このことから, ウツボカズラの消化液に含まれる消化酵素は, 抗カビ効果をもつことが分かる. これは 1-3 にあるように, ウツボカズラが持つキチン分解酵素(キチナーゼ)により, カビの細胞壁の主成分であるキチンが直接分解されることによる効果であると考えられる[9][11][12]. さらに, 無菌状態つまり消化酵素のみの消化液を撒いたプレート(図 10①)よりも, 消化酵素と常在菌を含む消化液を撒いたプレート(図 10③)の方がカビの増殖を抑制していることから, ウツボカズラは, 常在菌によってより高い抗カビ効果を得ていると考えられる.

7 結論

実験 1 と実験 2 において複数のカビに対して抗カビ効果を示したことから, ウツボカズラの消化液は, 特定のカビだけではなく, 様々なカビに対して抗カビ効果があると結論付ける. この抗カビ効果は, 実験 1 および実験 3 より, 消化液そのものの成分によるところもあるが, 大きくは消化

液が持つ消化酵素と常在菌によるものであると考える.

消化液による抗カビ効果は植物がもつキチナーゼのはたらきによると考えられる[9][11][12]. これによりカビの細胞壁の主成分であるキチンを分解し, 抗カビ効果を発揮していると考えられる.

また, 抗カビ効果は常在菌のはたらきによるところが特に大きく, これにより, 捕虫袋の蓋が開いたのち, 雨などによって消化液が薄まっても, 消化液が抗カビ効果を発揮することができるため, ウツボカズラにとって, 常在菌と共生することは生き残るうえで重要なことであると考えられる.

以上のことから私たちは, 本研究で用いたウツボカズラは, 捕虫袋の蓋が開く前後においては消化酵素が主にカビの増殖を防ぎ, 捕虫袋の蓋が開いて時間が経つと共生した常在菌が主にカビの増殖を防いでいる, つまり, ウツボカズラは抗カビ効果を常に大きい状態で発揮していると, 結論付ける.

8 まとめ

本研究によって, これまで明確に示されてこなかったウツボカズラの消化液が無菌であることや, 消化液に含まれる消化酵素にも抗カビ効果があること, そして, 消化液の抗カビ効果は, 消化液そのものだけでなく, 消化酵素および常在菌のはたらきによってより強いものとなることが示された. ウツボカズラが病気に強い理由が消化液であると結論づけることはできなかったが, ウツボカズラが消化液ごと消化した昆虫を取り込むことを考えると, ウツボカズラにとって害となるものを体内に取り込まないようにするという点では, ウツボカズラが病気になる可能性を減らす一端を消化液が担っているといえるだろう.

また, 本研究によって, ウツボカズラがもつキチナーゼの抗カビ効果が示された. 消化液を有するウツボカズラは自身の体の中だけでなく消化液にもキチナーゼを持つため, 他の植物よりもキチナーゼの量が多いと考えられる. このことから, 植物が用いているキチナーゼの研究にウツボカズラを使用することで, より安全性の高いキチナーゼを容易に入手できるようになる可能性がある.

病原性のカビに対しての農作物における微生物防除に消化液を用いたり, 血清中のキチンオリゴ糖検出・患部の細胞壁キチン検出に消化液を用いたりすることで真菌症の早期診断などに繋がる可能性があるため[9], この研究が植物の病気の研究や消化液が持つ抗カビ効果の実用化に

向けた技術革新に繋がることを期待する。

9 謝辞

今回の研究を進めるにあたってご指導, ご協力頂いた, コメリハード&グリーン箕輪店, そして, 本研究に携わってくださった方々にこの場を借りて心よりお礼申し上げます。また, 本実験にもっとも協力してくれたウツボカズラにも感謝し, 今後も大切に育てていこうと思います。

10 参考文献

[1] 【食虫植物】 【ウツボカズラ (ネペンテス) の育て方】 生態は? 栽培や水やりの方法についてもご紹介!

<https://www.hyponex.co.jp/plantia/plantia-11135/>

[2] ウツボカズラの育て方のポイントまとめ! 害虫や病気対策, 花言葉は?

<https://www.olive-hitomawashi.com/lifestyle/2020/06/post-971.html>

[3] ウツボカズラの育て方 植え付けや植え替えの時期は? 増やし方は?

<https://greensnap.jp/category1/flower/botany/105/growth>

[4] ウツボカズラ Nepenthes

<https://academic-accelerator.com/encyclopedia/jp/nepenthes>

[5] 野菜はなぜ病気になるのか?

https://agri.mynavi.jp/2021_09_24_170425/

[6] みんなの趣味の園芸

https://www.shuminoengei.jp/m-pc/a-page_p_detail/target_plant_code-586

[7] ウツボカズラの栄養獲得機能

https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagaku-toseibutsu1962/41/2/41_2_102/_pdf

[8] キチナーゼの性質からみた食虫植物の消化機構: ウツボカズラの消化酵素の役割を考える

https://katosei.jsbba.or.jp/view_html.php?id=358

[9] 高抗カビ活性酵素の実用化に向けた技術開発

https://shingi.jst.go.jp/pdf/2021/2021_miniminihon_011.pdf

[10] ウツボカズラの消化液の抗菌作用

<https://cms.miyazaki-c.ed.jp > filedownload>

[11] 食虫植物の有機化合物代謝機構の解析とその応用

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-09876032/>

[12] 食虫植物進化の過程を探る

<https://www.waseda.jp/top/news/71400>

[13] Nepenthes rajah における消化液の pH 特性 倉田薫子・矢ヶ部重隆

<http://home.f00.itscom.net/kuralab/07kiyou.pdf>

[14] 育てたくなるカビ

https://muroran-it.repo.nii.ac.jp/?action=repository_action_common_download&item_id=8646&item_no=1&tribute_id=24&file_no=2

[15] カビの繁殖は 27℃ がより多く繁殖する

https://lion-corp.s3.amazonaws.com/uploads/tmg_block_page_image/file/4885/20170901.pdf

