

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24620009

研究課題名(和文)宇宙環境における光合成機構の解析

研究課題名(英文)Determination of photosynthesis in space

研究代表者

大森 正之(Ohmori, Masayuki)

中央大学・理工学部・その他

研究者番号：80013580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙環境下での光合成活性の測定を目指して、宇宙実験用にJAXAにより開発された全自動型微細藻培養装置を用い、藍藻スビルリナ(*Arthrospira platensis*)を実験材料として地上での準備研究を行った。スビルリナは6日間の培養により、クロロフィル量では約9倍、タンパク質量にして約9倍に増加した。光合成活性は、酸素の発生量および $H_2^{18}O$ から発生した酸素の同位体比の変化、また ^{13}C の取り込み量により測定した。その結果、光合成活性が高い精度で測定できることが実証された。宇宙利用を想定したナノバブル水は、ハンドミキサーで作成できた。ナノバブル水は藍藻*Anabaena*の増殖を促進した。

研究成果の概要(英文)：A ground level experiment was performed for space experiment. A cyanobacterium, *Arthrospira platensis*, was cultivated for 6 days in a device manufactured by JAXA. The amount of chlorophyll increased 9 folds, and protein increased 9 folds. It is concluded that the cell growth can be determined using this equipment. Photosynthetic activity was determined by measuring oxygen production and carbon assimilation. Stable isotopes of ^{18}O and ^{13}C was used. It has been shown that growth and photosynthetic activity of the cyanobacterium can be precisely determined using this device. It seems necessary to use stable isotope in order to get reliable data. Nanobubble water could be produced using a hand mixer by vigorous swirling. It was found that the growth of a cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC7120, was enhanced when grown in a culture medium using air-nanobubble water.

研究分野：植物生理学

キーワード：宇宙実験 光合成 藍藻 ナノバブル

1. 研究開始当初の背景

(1) 光合成は水と二酸化炭素から光のエネルギーを用いて、酸素と炭水化物を作る反応であり、植物の光合成は地球上の生命活動を支えている。人類が長期にわたって宇宙に滞在しようとする時、光合成の利用は欠かせない。宇宙の微小重力空間で光合成反応が地上とまったく同じように行われるか否かについての研究はこれまで行われておらず、従って知見の蓄積もない。申請者は日本 インド 2 か国の協力により行われる「微小重力環境下におけるシアノバクテリアの光合成能と増殖に関する研究」の準備作業を開始している。

(2) 水は、光合成は言うまでもなく生命にとって最も大事な物質であり、無重力状態では、水の玉として浮遊することは良く知られている。水の中に極微細気泡（ナノバブル）を発生させた場合、その微細な泡がどのように挙動し、また、生物がどのような影響を受けるかは全く未知の問題である。申請者は直径が 100nm 以下のナノバブルの作成に成功し、地上で、ナノバブル水の生物への影響について研究を開始している。

2. 研究の目的

(1) 現在、月滞在計画や火星基地建設計画が立案され、その準備が開始されている。火星に往復するためには宇宙飛行士は一年以上宇宙船に滞在せねばならず、その中で光合成生物を培養あるいは栽培することは宇宙飛行士の健康な心身を維持するために、必要なこととなる。また、光合成生物は二酸化炭素や無機窒素を吸収して有機物を作り、同時に酸素を発生する能力を持つため、食糧供給のみならず宇宙船内の空気環境の浄化の上でも大事な役割を持つ。しかしながら、宇宙の微小重力環境下で光合成の基本的な生化学反応が、地上と全く同じように進むか否かについてはこれまで全くと言って良いほど知見がない。

そこで、我々は Indian- Japan Space Corroboration Experiment として人工衛星を地球周回軌道に打ち上げ、その中でシアノバクテリアを培養し、光合成活性を測定する計画を立案した。最初に、地上において予備実験を行い、宇宙環境下での光合成の初期反応の実態を正確に把握し、宇宙における植物栽培の基盤となる知見を得ることを目的とする。そのために、宇宙環境下で藍藻（シアノバクテリア）を用いた全自動光合成活性測定装置の実用試験を行う。

(2) ナノバブルとは直径が 1 μm に満たない極微細気泡（Gas Nanoparticle: GNP）を意味する。直径が数 μm 以上の気泡を含むマイクロバブル水は、既に水処理など様々な分野で利用されている。最近ナノバブル水の応用が医療や食品加工、農業、水産業のバイオ関連産業において注目されている。本研究では、複雑な装置によらない簡易で効率的なナノバブル水の作成方法を確立し、ナノバブル水の物理化学的な性質の一端を明らかにする。また、シアノバクテリアの増殖におよぼす影響および光合成能力の増進の可能性を評価するとともに、植物の成長におよぼす作用についても検討し、ナノバブル水の宇宙での利用の可能性を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料には、我々がすでに全ゲノムシーケンスの決定に成功した、シアノバクテリア *Spirulina (Arthrospira) platensis* NIES-39 を用いた（図 1）。このシアノバクテリアは古くから食料としてアフリカや中米で用いられており、強いアルカリ性でも生育できることや塩耐性があることなどから、培養中に他のバクテリアの混入を受けにくい利点がある。

培養は、JAXA が作製した宇宙実験用完全自動培養装置を用いて行った。全装置の大きさは D-20cm、W-20cm、H-10cm であり、アルミニウムをくり抜いた箱に納められた。*Spirulina* 細胞は実験室内で定常状態の濃度になるまで培養した後、3,000 rpm で遠心して集めた。その後、*Spirulina* 細胞を 5atom% H_2^{18}O 、4atom% $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を含む培地に $\text{OD}_{720}=0.2$ の濃度で懸濁し、10mL ずつを 6 個の透明テドラーバッグに分注した。6 個のバッグはそれぞれ LED パネルの間に設置され、 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の照度で照明された。照明開始後 72h、73h、144h、145h 経過した時点で、自動的に 10mL ずつのメタノールをそれぞれのバッグにポンプ挿入して、反応を停止した。ただし、バッグの一つは反応を停止せずに、細胞の増殖の測定に使用した。

藍藻 *Nostoc commune* は和名ではイシクラゲとよばれている（図 2）。陸棲であるため乾燥や低温に強く、窒素固定能を持つため窒素肥料の供給も必要ない。地球上での砂漠緑化における利用が考えられており、火星での土壌の創生には最適と思われる。実験では、乾燥させた *Nostoc commune* に重量の 50 倍量の 50mM TES-KOH Buffer を加えて 1 日放置した後、ガラスバイアルまたはプラスチックバッグに入れ気相を N_2 に置換した。バイアルでは内圧

が 150kPa、プラスチックバッグでは内圧が 101kPa になるようにし、光合成の基質として CO₂ を 100 ~ 500 μ L 加えた。細胞を一定時間白色光または波長 660nm の LED 光を用いて照射し、GC/MS によって明暗における CO₂ 量の増減と O₂ 量の増減を測定した。

(2) GNP の作成には、ブラウン社のハンドミキサー (マルチクイック MR400Plus) を使い、Milliq 超純水、あるいはそれにエタノールを加えたものを、氷冷しつつ攪拌した。GNP の直接観察にはオリンパス社の全反射顕微鏡 IX71-TIR を用いた。粒子径、体積比、ゼータポテンシャルの測定には Malvern/Sysmex 社の Zetasizer Nano 微粒子測定装置を用いた。

GNP の藍藻の増殖におよぼす影響の評価においては、材料として *Anabaena* sp. PCC7120 を用いた。培養はモノ管を用い 25、24 時間光照射 (20 ~ 50 μ mol) の条件下で計 5 日間行った。光合成活性、呼吸活性の測定には、酸素電極を用いた。

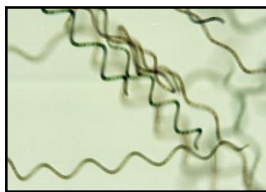


図 1 *Arthrospira platensis*

図 2 *Nostoc commune*
(採取した凝集体)

4. 研究成果

(1) *Spirulina* 細胞は、6 日間の培養により、OD に関しては約 5 倍、クロロフィル量にして約 9 倍 (10.4 μg Chl a ml⁻¹) に増加した。照度は 30 μmol m⁻²sec⁻¹ とやや弱めであったが、細胞は本実験条件下で十分に増殖することが確かめられた。酸素ガスの発生量は 6 日間で約 0.3mmol であったが、定量的なサンプリングが難しく、値は大きくばらついた。しかしながら、³²O₂, ³⁴O₂ の測定結果から、酸素ガスは時間とともに直線的に増加していることが高い精度で確認された。すなわち H₂¹⁸O を利用することの意義が認められた。炭素の固定については、(株)昭光通商に測定を依頼した。6 日間における炭素の固定量は酸素ガスの測定におけるのと同様に、サンプリングの難しさから、大きくばらついたが、細胞中の ¹³C は高い精度で直線的な増加が確認され、やはり同位体の利用が有効であることが明らかとなった。これらの結果から、人工衛星を用いた宇宙空間での光合成活性の測定は可能であることが実証された。

(2) 藍藻 *Nostoc commune* の藻体 31.5 μg Chl をガラスバイアルに入れ、白色光 (111 μmol m⁻² s⁻¹) を照射したところ、CO₂ 濃度は 45.3nmol μg⁻¹Chl h⁻¹ で減少した。O₂ 量は 179nmol μg⁻¹Chl h⁻¹ で増加した。同様の実験を LED (660nm, 111 μmol m⁻² s⁻¹) を用いて行ったところ、CO₂ は 36.8 nmol μg⁻¹Chl h⁻¹ で減少し、O₂ は 122 nmol μg⁻¹Chl h⁻¹ で増加した。光合成活性は LED 光源でも十分に測定でき、LED は白色光電球よりも発熱量が少ないため、宇宙実験にはより適した光源であると結論した。発生した酸素の量と吸収した CO₂ の量が一致しないのは、採取した藍藻資料中に混入したバクテリアが呼吸をしているためであろうと推定した。

次に、プラスチックバッグ (6.0 x 5.0cm) に *Nostoc commune* の藻体を入れ、LED を用いて、前述したのと同様の実験を行った結果、CO₂ は経時的に減少し、O₂ は経時的に増加する傾向がみられたが、測定値にばらつきが大きく、サンプリング時における大気の混入が大きな問題となることが明らかとなった。そこで、系全体を十分に窒素ガスで置換したところ、大気の混入は大きく改善された。

このように、本地上準備実験により、宇宙空間で光合成活性を測定するための装置、および実験手法を確立することができた。また ¹⁸O および ¹³C を安定同位体トレーサーとして用いることで、より正確な測定が可能となることが確認された。

(3) GNP の作成に関しては、Milliq 超純水、1%エタノール水ともに、ハンドミキサーを 30 分攪拌させることにより、直径 100nm 以下の空気 GNP が生成した。1%エタノール水中では直径 100nm 以下の GNP が、個数としては大多数を占めた (図 3)。

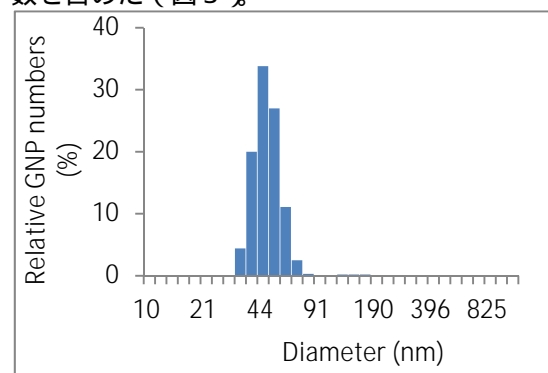


図 3 GNP のサイズ分布

MilliQ 超純水中では 100nm より大きな GNP の割合が増加した。また、攪拌時間の違いによる GNP の生成量に関しては、1%エタノール水を 5 分間攪拌したものより、30 分間攪拌したものは、約 10 倍の GNP 数が得られたため、通常 30 分攪拌して GNP を作成した。一度発生した GNP は、2 カ月にわたってほぼ一定の数を維持していることが明らかとなった。水中で 100nm オーダーの直径を持つガス粒子は、それぞれがブラウン運動をすることにより、全てが揃って一定方向に移動することはない。すなわち単純に水面に向かって上昇することではなく、いつまでも水中にとどまるものと考えられる。

GNP 水に NaCl を加えて、GNP の直径の変化を測定したところ、加えた NaCl 量が多くなるにつれて、直径が大きくなった (図 4)。同時に GNP 生成直後 -30mV 程度であったゼータポテンシャルが 0mV に近づいた。NaCl は GNP の表面電位に影響を与え、その結果 GNP の融合が起き易くなり、より大きな GNP になると推論した。

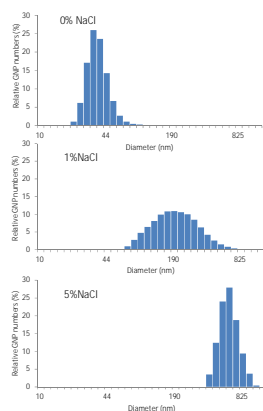


図 4 食塩の添加による GNP のサイズ変化

(4) 藍藻の呼吸と光合成におよぼすナノバブル水の影響に関しては、以下のようなことが明らかとなった。GNP 水で調整した培養液はオートクレーブ滅菌操作によっても、GNP の数が減じることはなかった。また、GNP が入っていることにより、通常の MDM 培地で増殖させた対照細胞よりも、速い増殖を示した。さらに、通常の MDM 培地で増殖させた細胞を、GNP を含む培地に懸濁して呼吸速度を測定した結果、1.3~1.6 倍ほどの促進が見られた。光合成に関しても促進が見られることがあった。

藍藻 *Anabaena* 細胞は、70mM の食塩存在下では、通常、増殖の阻害が見られるが、GNP 含有培養液中では食塩による増殖の阻害が軽減された。これらの事実から、GNP は *Anabaena* の細胞増殖、呼吸速度を促進する効果を持つと

結論した。また、食塩の *Anabaena* 細胞への増殖阻害は GNP が食塩と何らかの反応をすることにより、引き起こされる可能性があるかと推論した。高等植物に対する GNP 水の生理作用については、カイワレ大根種子の発根、胚軸の伸長におよぼす GNP の影響について検討した。その結果、GNP は根の伸長促進および胚軸の伸長促進をする可能性があることが示された。

<引用文献>

- 1 夏井坂誠, 他; インドとの国際協力, 日本マイクログラビティ応用学会誌, 27 巻, 2010, 158-164
- 2 Fujisawa, T., et al., Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39, DNA Res. Vol.17, 2010, 85-103
- 3 Isobe, K., et al., A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites, J. Microbiol. Methods, Vol.84, 2011, 46-51
- 4 Takahashi, M., Zeta potential of microbubbles in aqueous solutions: electrical properties of the gas water interface., J. Phys. Chem. B., Vol.109, 2005, 21858 -21864

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- 1 Ohmori, M., Haruta, K., Kamimura, S., Koike, H., Uchida, T., Takeyama, H. A simple method for nanobubble generation and stability of the bubbles. J. Environ. Biotech., 査読あり, 15 巻, 2015, 41-44.
- 2 大森正之, ナノバブルの簡易生成法とその性質, JATAFF ジャーナル, 査読無し, 4 巻, 2016, 34-38

[学会発表] (計8件)

- 1 Masayuki Ohmori, cAMP signal cascade in cyanobacteria, International conference on "Physiology and Biotechnology of Microalgae" Devoted to the 80 Anniversary of Victor E. Semenenk, October 18, 2012, Moscow, Russia

2 得平茂樹、大森正之、窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 における炭素・窒素代謝制御、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日～18 日、京都産業大学（京都府、京都市）

3 得平茂樹、木村聡、大森正之、糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 における塩ストレス応答の制御機構、第 7 回日本ゲノム微生物学会年会 2013 年 3 月 8 日～3 月 10 日（長浜バイオ大学、滋賀県、長浜市）

4 Masayuki Ohmori, Yuichi Suwa, Chie Katsuyama, Yohei Shimura, Motoshi Kamada, Akira Higashibata, Makoto Natsuisaka, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka Microalgal photosynthesis research in space, The 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology Oct. 31～ Nov. 02, 2013, Jhongli, Taiwan

5 Determination of cyanobacterial photosynthesis in space, Masayuki Ohmori, Yuichi Suwa, Chie Katsuyama, Daisuke Takagi, Yohei Shimura, Motoshi Kamada, Akira Higashibata, Makoto Natsuisaka, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka 15th International Symposium on Microbial Ecology, Aug. 24～29, 2014, Seoul, South Korea

6 大森正之、ナノバブルの簡易生成法とその性質の検討、環境微生物系学会合同大会 2014 年 10 月 21～24 日、「アクトシティ浜松（静岡県、浜松市）」

7 Koichi Yoshina, Hiroyuki Koike, Shinji Kamimura, Masayuki Ohmori, Effect of nanobubbles on growth and respiration of cyanobacteria, 7th Japan-Taiwan-Korea Symposium on Microbial Ecology, Oct. 17～20, 2015, Ibaraki, Tsuchiura

8 大森正之、閉鎖生態系における藍藻の利用 日本地球惑星科学連合大会、2016 年 5 月 22 日～26 日、「幕張メッセ（千葉県、千葉市）」

[図書]（計 3 件）

1 大森正之 他（8 名）東京化学同人、生物学入門 第 2 版（石川 統、大森正之、

嶋田正和 編）2013、50 - 77、ISBN: 978 - 4 - 8079 - 0812 - 7

2 大森正之 他（1 名）、シーエムシー出版、微細藻類によるエネルギー生産と事業展望（監修 竹山春子）「藍藻（シアノバクテリア）のゲノム解析と生理機能」、2012、10～16、ISBN:978-4-7813-0657-5

3 Ohmori, M. and Ehira, S., John Wiley & Sons, Ltd., Cyanobacteria: An economic perspective (Edited by Sharma, Naveen, K., Rai, Ashwani, K., and Stal, Lucas, J.), Chapter 7: Spirulina an example of cyanobacteria as nutraceuticals., 2014, 103-118, ISBN: 978-1-119-94127-9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森正之（OHMORI, Masayuki）
中央大学・理工学部・共同研究員
研究者番号： 80013580

(2) 連携研究者

石岡憲昭（ISHIOKA, Noriaki）
（独）宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所・教授
研究者番号： 70184471

東端 晃（HIGASHIBATA, Akira）
（独）宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所・開発員
研究者番号： 30360720