

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地上準備研究

大森正之, 諏訪裕一, 小池裕之, 勝山千恵, 高木大輔 (中央大), 鈴木石根 (筑波大), 志村遥平 (国立環境研), 鎌田源司 ((株)エイ・イー・エス), 夏井坂誠, 東端晃, 山崎丘, 石岡憲昭 (JAXA)

Photosynthesis and Growth of Cyanobacteria under Microgravity

– A preliminary study on the ground –

Masayuki Ohmori*, Yuichi Suwa, Hiroyuki Koike, Chie Katsuyama, Daisuke Takagi, Iwane Suzuki, Yohei Shimura, Motoshi Kamada, Makoto Natsuisaka, Akira Higashibata, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka *Dept.Biol.Sci./Chuo Univ., Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551
E-Mail:ohmori@bio.chuo-u.ac.jp

Abstract: Construction of a space station on the Mars is now proposed. To fly to and back from the Mars the astronauts should stay in the space ship over one year. It is necessary to grow photosynthetic organisms such as plants or microalgae in the space ship to keep their life safe and comfortable. However, the effects of micro gravity, on the fundamental photosynthetic mechanisms have not yet been determined. We are going to grow cyanobacteria and estimate their photosynthetic activity in the satellite which will be launched in the Japan-India Microbial Cultivation Experiment¹⁾. The procedure for growing cells and measuring photosynthetic activity has been determined on the ground.

Two filamentous cyanobacteria, *Spirulina (Arthrospira) platensis* NIES-39 and *Nostoc commune* were used as the materials. The *Spirulina* is edible and its full genome sequence has already been determined²⁾. Cells were cultivated in a full automatic on board culture chamber which has been developed by JAXA¹⁾. The *Spirulina* cells were grown with culture medium containing 5 atom % of H₂¹⁸O and 4 atom % of NaH¹³CO₃. The cell suspension was inoculated into a transparent plastic bag and illuminated with LED. At appropriate time periods, pure ethanol was introduced to the bags to stop the reaction and the volume of gas phase of each bag was measured and then concentrations of O₂ and CO₂ were measured by a newly developed GC/MS system³⁾. ¹⁸O-O₂ was evolved constantly under the experimental conditions. Incorporation of ¹³C –carbon into the cells was increased linearly with time and its value was well correlated to that of O₂ evolution. In another experiment, a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc commune* harvested from the field, was once dried and then wetted by a small amount of water. The cells were put in a plastic bag and then illuminated by LED (660nm) light. After appropriate time periods, O₂ and CO₂ concentration in the bag were measured using the GC/MS system. It is concluded that O₂ evolution and CO₂ fixation was precisely measured by this experimental system.

Key words; Photosynthesis in space, Cyanobacteria, Stable isotope, *Spirulina platensis*

はじめに

現在、月滞在計画や火星基地建設計画が立案され、NASA を中心に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、その中で緑豊かな光合成生物を栽培あるいは培養することは、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物理、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 Japan -India Microbial Cultivation Experiment¹⁾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。

(Fig.3) まず地上において予備実験を行った。

シアノバクテリアは地球上で 30 億年にもおよぶ歴史を持つ最古の酸素発生型光合成生物であり、地球大気に酸素をもたらした生物として知られている。その生息域は広く、南極の氷の下から火山の噴火口の中や温泉水の中、海洋から砂漠にもおよんでいる。

今回の実験には *Spirulina (Arthrospira) platensis* NIES-39 と *Nostoc commune* を実験材料に選んだ。この *Spirulina* の全ゲノムシーケンスは我々がすでに決定に成功している²⁾。 *Nostoc commune* については、小池らが千葉県南房総市で採取したものをを用いた。(Fig.1)

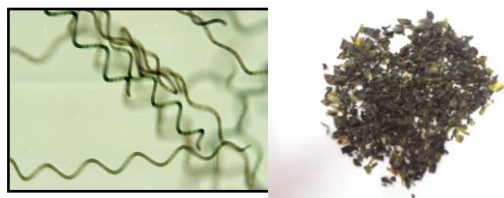


Fig. 1 *Spirulina (Arthrospira) platensis* NIES-39 (left)
Crust of *Nostoc commune* (right)

[*Spirulina platensis* を用いた実験]

1) 実験材料と方法

Spirulina platensis は螺旋状の糸状体を作るシアノバクテリアで、古くから食料としてアフリカや中米で用いられてきた。生育環境が強いアルカリ性であ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¹⁾。本装置は、光照明装置、送液装置、温度および圧力測定装置等を備え、全装置の大きさは D-20cm、W-20cm、H-10cm で、アルミニウムをくり抜いた箱に納められた。(Fig. 2)

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、5 atom% $H_2^{18}O$ 、4 atom% $NaH^{13}CO_3$ を含む培地に約 $OD_{720}=0.2$ の濃度で懸濁し、10mL ずつを 6 個の透明プラスチックバッグに分注した。6 個のバッグはそれぞれ白色 LED パネルの間に設置され、 $20\mu\text{moles m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の照度で照明された。培養温度は 28°C に保たれた。照明開始後 72h、73h、144h、145h 経過した時点で、自動的に 10mL ずつのエ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

させた。ただし、バッグの一つは反応を停止せずに、実験終了後、細胞の増殖の測定に使用した。細胞の増殖は吸光度 (OD_{720})、クロロフィル量、タンパク質量の増加より評価した。また、光合成活性については、 O_2 発生量と同位体比を諏訪らが開発した GC/MS 法により測定した³⁾。

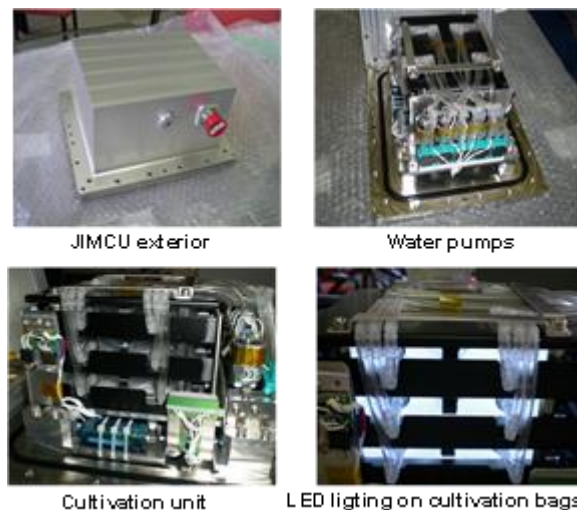


Fig. 2 Japan-India Microbial Cultivation Unit

2) 結果と考察

Spirulina platensis 細胞は、6 日間の培養により、OD に関しては約 5 倍 ($OD_{720}:1.3$)、クロロフィル量にして約 9 倍 ($10.4\mu\text{g Chla mL}^{-1}$)、タンパク質にして約 9 倍 (310mg mL^{-1}) に増加した。照度は通常の培養と比較するとやや弱めであり、培養温度も通常の培養温度より 2°C ほど低かったが、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 0.2mmol/bag であったが、プラスチックバッグからの定量的なサンプリングが難しく、測定値は大きくばらついた。しかしながら、 $^{32}O_2$ 、 $^{34}O_2$ の測定結果から、 ^{18}O を含む酸素ガスは時間とともに増加していることが高い精度で確認された。また、同位体取り込みの理論値と実測値は良く一致した。すなわち実験に $H_2^{18}O$ を利用することの意義が確認された。

炭素の固定については、SIサイエンス (株) に ^{13}C の測定を依頼した。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、バッグ全体の炭素の増加量はサンプリングの難しさから、測定値は大きくばらついたが、細胞中の ^{13}C は高い精度で直線的な増加が確認され、活性の測定には同位体の利用が必要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 *Spirulina platensis* の光合成活性の測定は可能であることが実証された。しかしながら、実験終了後、資料を日本に持ち帰る際にガスが漏れる可能性があること、定

量的なガスのサンプリングは可なり難しいこと、などの問題点を解決する必要が示唆された。

[*Nostoc commune* を用いた実験]

材料と方法

Nostoc commune は和名ではイシクラゲとよばれている。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 N₂ 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) 結果と考察

ガラスバイアルに 31.5 μ gChl の藻体を入れ、白色光 (111 μ molm⁻²s⁻¹) を照射したところ、CO₂ 濃度は 45.3nmol μ g⁻¹Chl h⁻¹ で減少した。O₂ 量は 179nmol μ g⁻¹Chl h⁻¹ で増加した。同様の実験を LED(660nm, 111 μ mol m⁻² s⁻¹)を用いて行ったところ、CO₂ は 36.8 nmol μ g⁻¹Chl h⁻¹ で減少し、O₂ は 122 nmol μ g⁻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。

プラスチックバッグ (6.0 x 5.0 x 5.0 cm) に藻体を入れ、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への混入が大きな問題となることが明らかとなった。この問題は系全体を十分に窒素ガスで置換することにより解決することが可能であると結論した。

まとめ

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。

参考文献

- 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: 158-164 (2010)
- 2) Fujisawa, T., et al.; Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira(Spirulina) platensis* NIES-39, *DNA Res.* 17: 85-103 (2010)
- 3) Isobe, K., et al.; A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites, *J. Microbiol. Methods* 84: 46-51 (2011).

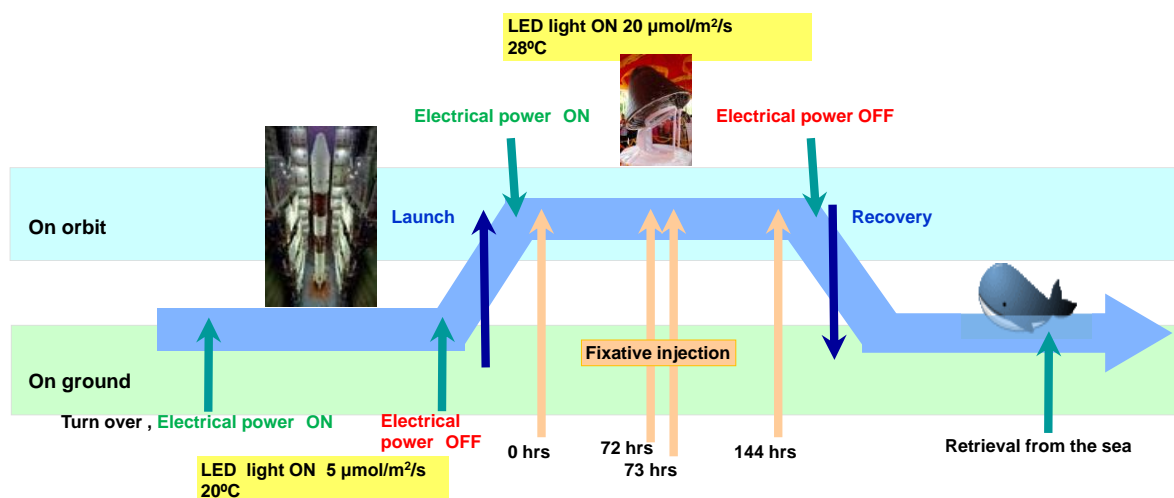


Fig.3 Japan-India Microbial Cultivation Experiment (Space Capsule Recovery Experiment II)