

2014 年度宇宙微生物学研究会ワーキンググループ活動報告

那須 正夫 (大阪大), 大森 正之 (中央大), 石岡 憲昭 (JAXA), 一條 知昭 (大阪大),
 内井 喜美子 (大阪大谷大), 江崎 孝行 (岐阜大), 大石 浩隆 (志田病院), 太田 寛行 (茨城大),
 加藤 憲二 (静岡大), 喜多 正和 (京都府立医科大), 嶋津 徹 (JAXA), 白川 正輝 (JAXA),
 杉田 隆 (明治薬科大), 谷 佳津治 (大阪大谷大), 谷垣 文章 (JAXA), 馬場 貴志 (鳥取大),
 東端 晃 (JAXA), 堀 克敏 (名古屋大), 榎村 浩一 (帝京大), 三木 猛生 (JAXA),
 森崎 久雄 (立命館大), 山口 進康 (大阪大), 山崎 丘 (帝京大/JAXA)

Annual Report of Working Group "Microbiology in Space" FY2014

Masao Nasu, Masayuki Ohmori, Noriaki Ishioka, Tomoaki Ichijo, Kimiko Uchii, Takayuki Ezaki,
 Hirotaka Ohishi, Hiroyuki Ohta, Kenji Kato, Masakazu Kita, Toru Shimazu, Masaki Shirakawa,
 Takashi Sugita, Katsuji Tani, Fumiaki Tanigaki, Takashi Baba, Akira Higashibata, Katsutoshi Hori,
 Koichi Makimura, Takeo Miki, Hisao Morisaki, Nobuyasu Yamaguchi, Takashi Yamazaki*

*Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

E-Mail: nasu@phs.osaka-u.ac.jp

Abstract: Roadmaps of each space agency (JAXA, NASA, and ESA) emphasize the importance of microbial monitoring and utilization of useful microorganisms in space habitation environment. The objective of the Working Group "Microbiology in Space" is to promote microbiological researches to protect astronauts from all problems caused by microorganisms in space habitats, as well as researches on beneficial microbes to support long-duration space habitation. This year, we continued researches on new techniques for comprehensive analysis of microbial community structures in space habitats and also on biofilm formation and gene transfer under microgravity.

Key words; International Space Station, Microbial monitoring, Biofilm, Gene transfer

1. はじめに

ヒトの宇宙滞在は現実のものとなり、我々の活動範囲は宇宙空間にまで広がりがつつある。この宇宙閉鎖環境においても、地上と同様、ヒトは微生物の影響を受けながら生活している。宇宙閉鎖環境は微小重力や宇宙線の曝露に加え、現状では生態系を構成する生物がヒトと微生物に限られる、地上とは全く異なる環境である。このような宇宙閉鎖環境に存在する微生物は、ヒトのみではなく、機器に対してもリスクとなっており、宇宙ステーション・ミールではコミュニケーション・ケーブルに真菌が発生し、トラブルの原因となったことが報告されている。したがって、有人宇宙探査の実現のためには、宇宙飛行士が船内および閉鎖施設内で安全に滞在するための微生物学的な知的基盤が必要となる。そこで、当ワーキンググループでは、宇宙ステーションや宇宙船内において微生物モニタリングを適確に行うための研究、また微小重力が微生物に与える影響についての研究を進めている。

これまでに、国際宇宙ステーション日本実験棟「き

ぼう」において、機器の表面、ハンドレール、空調機器の送風部や吸気部などを対象として、細菌および真菌のモニタリングを継続して実施している(研究課題名: Microbe)。2009年以降、4回のサンプリングにより、「きぼう」内における細菌や真菌の現存量を測定するとともに群集構造解析を行い、現時点では「きぼう」が微生物学的に適切に管理されていること、一部の箇所では微生物の集積が見られること、「きぼう」内に存在する微生物の多くはヒトの常在微生物であり、宇宙飛行士から移行したと考えられることなどを報告してきた^{1,2)}。

これらの成果を受けて、今後、より詳細にISS環境における微生物の動態を解析するためには、これまでの微生物の属種に関する情報に加えて、微生物の活性、機能、さらに遺伝子発現に関する情報を得ることが重要となる。そこで本年度は1) 微生物群集構造の網羅的解析に関する研究、2) 微小重力下におけるバイオフィーム形成に関する研究、3) 宇宙飛行士や船内の微生物の迅速・簡便な検出に関する研究を進めた。さらに、これまでの地上実験およ

び宇宙実験の成果をふまえて、JAXA 飛行体利用実験への申請を行った。

2. 微生物群集構造の網羅的解析に関する研究

Microbe-II の細菌群集構造解析においては、試料から全細菌の DNA を抽出した後、PCR により rDNA 上の可変領域の配列を増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動により増幅産物を分離後、電気泳動ゲルから各バンドを切り出し、シーケンス解析を行う方法を用いた。本方法の利点としては、細菌群集構造における優占種を把握できることが挙げられるが、電気泳動の解像度の限界により存在比の少ない細菌の検出ができず、細菌群集構造の詳細な解析が困難であった。

そこで、次世代シーケンサーを利用した pyrosequencing により細菌群集構造を解析し、従来法で得られた結果と比較した。各試料について平均 5,500 reads の配列を解析した結果、従来法と同様に、「きぼう」内からブドウ球菌や腸内細菌科などヒトの皮膚や腸内に常在する細菌が多く検出された。一方、pyrosequencing では、ヒトには常在せず水環境などに生息する細菌も検出でき、細菌群集構造のより詳細な解析が可能であった。したがって、今後の「きぼう」の細菌モニタリングにおいては、ハイスループット・シーケンシングを行うことに決定した。

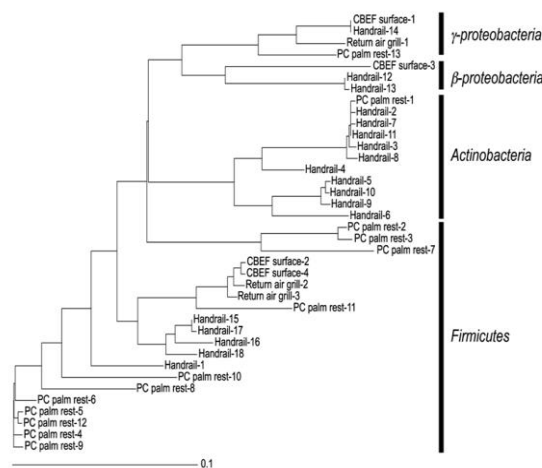


Fig. 1. Bacterial community structure in ISS-kibo determined based on bacterial 16S rRNA gene sequences.

3. 微小重力下におけるバイオフィーム形成に関する研究

バイオフィームは微生物の集合体であり、病原性や抗生物質耐性遺伝子の伝播による耐性菌の拡大など、有人宇宙活動においてリスクとなる可能性が考

えられる。また、微生物はバイオフィーム内で単独では見られない機能を発現することがあり、宇宙閉鎖環境における有用微生物の利用にあたっては、バイオフィームを十分に考慮する必要がある。

そこで、バイオフィームにおける微生物の機能を明らかにするために、高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol5 WT 株を用いて研究を行った。本菌は疎水性基材（プラスチック類）から親水性基材（ガラス、金属）まで幅広い基材に対する高い付着能を保持しており、その付着能は菌体表面の繊維タンパク質 *AtaA* が担っていることを明らかにしている³⁾。

本菌の野生株および *AtaA* 遺伝子を欠損させた変異株を用いて研究を行った結果、野生株の凝集塊のみが反重力面に対して高付着性を示した。一方、凝集塊でない状態の野生株および *AtaA* 遺伝子欠損株では、付着が見られなかった。したがって、凝集による表面積の拡大が反重力面への高付着に関与したと考えられた。今後、研究を続けることにより、微小重力下におけるバイオフィームの特徴を明らかにできるものと考えられる。

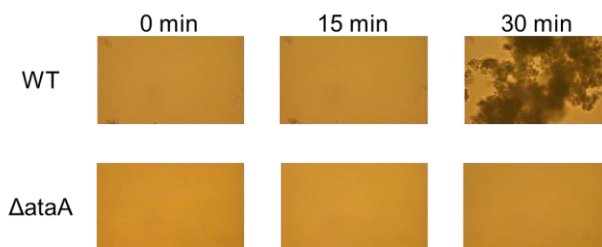


Fig. 2. Adhesion of biofilm of *Acinetobacter* sp. Tol5 WT on target surface against gravity.

4. 宇宙飛行士や船内の微生物の迅速・簡便な検出に関する研究

遺伝子を指標として微生物を検出するために、一般的に PCR 法などの遺伝子増幅法が用いられている。国内で開発された遺伝子増幅法である LAMP 法は、等温で遺伝子を増幅できることから、検出までの工程を 1 ステップで行うことができ、反応装置や検出装置の小型化が可能である。また、増幅効率が高いことから、標的とする DNA を 15 分～1 時間で 10^9 倍以上に増幅することができる。そこで、宇宙飛行士や船内環境の常在微生物の簡便な検出法として、LAMP 法に着目した。現在、LAMP 法においてはレジオネラなどの病原細菌やインフルエンザウイルスなどの病原ウイルスを検出するためのプライマーが設計されているが、真菌を網羅的に検出できるプライマーはなかった。そこで、真菌の 28S rDNA の配列を対象として、真菌のユニバーサル・プライマーを設計した。本プライマーを用いて、代表的な真菌に対する増幅精度を確認

したところ、対象とした全ての真菌の遺伝子を増幅でき、幅広い真菌種を検出できることがわかった。

5. JAXA 飛翔体利用実験：準備研究への応募

これまでの地上実験および宇宙実験の成果をふまえて、JAXA 飛翔体利用実験への申請を行った。本研究の目的は、「ISS の Microbial World を理解する」ことにある。すなわち、「きぼう」(JEM) 環境における微生物生態系を空間的・時間的に解析し、長期間の運用に伴う、その変遷を明らかにすることを目的とする。そのために、1) JEM 環境における微生物の「種と機能」の空間分布を、遺伝子情報を指標とする網羅解析により明らかにするとともに、2) JEM 環境の微生物生態系の時間的変化を明らかにし、宇宙居住環境の維持に必須となる微生物学的基盤データを獲得する。特に、細胞活性、バイオフィーム形成や薬剤耐性に関連する機能遺伝子の動態と発現についても先端的方法により解析し、JEM における微生物生態系の全体像を解明する。

本研究は、今後の長期有人宇宙活動において微生物学的な安全性を確保するために必須のデータを提供し、宇宙居住の実現に貢献するものである。また、関係各国の研究者との密な連携のなかで、イニシアチブをとって新しい先端科学研究分野「宇宙環境微生物学」を切り拓くことができるものと考えている。

参考文献

- 1) T. Ichijo, H. Hieda, R. Ishihara, N. Yamaguchi, M. Nasu.; Bacterial Monitoring with Adhesive Sheet in the International Space Station-“Kibo”, the Japanese Experiment Module., *Microbes and Environments*, 28(2): 264-268 (2013).
- 2) K. Satoh, Y. Nishiyama, T. Yamazaki, T. Sugita, Y. Tsukii, K. Takatori, Y. Benno, K. Makimura.; Microbe-I: fungal biota analyses of the Japanese experimental module KIBO of the International Space Station before launch and after being in orbit for about 460 days., *Microbiology and Immunology*, 55(12): 823-829 (2011).
- 3) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori; AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from *Acinetobacter* sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces., *PLOS ONE*, 7: e48830 (2012).