

成層圏微生物採取実験 Biopause:2016 年度実験報告と今後の展望

大野宗祐、石橋高、三宅範宗、奥平修、山田学、小林正規、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、河口優子、山岸明彦(東葉大)、山田和彦、野中聡(JAXA)、瀬川高弘(山梨大)、高橋裕介、原田大樹(北大)、石川裕子(リンカーン大)、所源亮(ISPA)、山内一也(東大)、梯友哉、福家英之、吉田哲也(JAXA)

1. 研究の背景

古くは1936年から、大気球あるいはロケットを用いた成層圏での微生物サンプリングが行われ、成層圏にも生命が存在しているということが報告されている(総説 Yang et al. 2009a)。本実験の共同研究者である東京薬科大学山岸のグループでも、平成16年、17年に大気球を用いた微生物採集実験で成層圏での微生物の採集に成功した(Yang et al. 2008a)。また、1999年から2000年にかけて数回にわたり、航空機を用いた成層圏、対流圏での大気中塵埃の採取とrRNA 遺伝子の解析および紫外線耐性の解析を行い、これまで知られている最も紫外線耐性の菌 *Deinococcus radiodurans* よりもさらに高い耐性を示す菌を2株得た(Yang et al. 2008b, 2009b, 2010)。以上のように、中層大気、特に成層圏に微生物が存在していることがわかってきている。中層大気は地球生物圏の上端にあたり、明確な境界面の有無やそれを決定するメカニズム、さらには地球生物圏が宇宙に向かって閉じているのか開いているのかを理解する上で重要な鍵となる。

ところがここで問題となるのが、どのような状態で微生物が成層圏に存在しているかがよくわかっていないことである。成層圏で採取された微生物は紫外線等の耐性が高いとはいえ、一個体が単独で浮遊している場合には短時間で死滅してしまうはずである。そのため、微生物の生存の観点からは、成層圏の微生物は数個体以上が凝集体として集まっている、もしくは数ミクロン以上のサイズの岩石の塵の内部に付着している等、紫外線から何らかの形で遮蔽されているはずである。しかし、微生物の凝集体でも岩石の塵でも大きさが数ミクロン以上の粒子は、ストークス沈降を考えると終端速度が大きいため成層圏にとどまることが出来るのは短時間に限られてしまう。数ミクロン以上の粒子が中層大気中にとどまるためには、微生物を上空へ持ち上げる何らかのメカニズムが働く必要があるが、これは未だ確認されていない。この矛盾を解き、生物の地球からの流出/地球への流入のフラックスに制約を加えるためには、中層大気中の微生物の形態・サイズ分布と高度分布を測定し、難培養性微生物を含めた動態を理解する必要がある。

ところが、多くの先行研究では、採取した微生物をまず培養するという分析手順が採用されている。そのため、採取された微生物の状態を観察することが困難であった。培養法では、一個体が単独で浮遊しているのか凝集体でも塵に付着しているのかの区別は難しい。また、難培養性微生物や死んだ微生物も検出できない。一方高度分布に関しても、これまでに報告されている中層大気中の微生物の高度分布は、ロケット、気球、飛行機実験などの異なる手法、異なる場所、異なる時期に得られたデータをコンパイルしたものである。同じ手法で系統的に同じ場所における異なる高度の微生物分布を調べた例は存在しない。そのため、それぞれの手法のバイアスや誤差、水平方向の数密度の違い、季節変動などの影響を受けてしまい、鉛直方向の輸送メカニズムや中層大気での滞留時間等を定量的に評価することが出来ない。

2. 本研究の目的

そこで本研究では、中層大気中の微生物の形態と高度分布を観測することを目的とし、大気球を用いた中層大気中の微生物採集実験を行うこととする。また、採取した試料を、蛍光顕微鏡/SEMによる観察、直接DNA分析、培養の3種類の方法で多角的に分析し、成層圏中の浮遊微生物の種類と物理状態を調査する。平成28年度に行った第1回実験では、開発中のインパクター式の微生物採取装置を用いたパラシュートによる降下時に試料採取の実証試験を行うとともに、蛍光顕微鏡とSEM観察の分析手法を確立することができた。また、成層圏の難培養性微生物数密度に関する世界初の観測結果を得た。

それを踏まえ、第2回の気球実験となる平成29年度の実験では、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形

状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第1回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の4点を目標とする。

上記実験目標4項目が達成されれば、生物圏界面 biopause の決定の為に最も重要な成層圏微生物の高度分布情報を得ることができる。また、成層圏微生物の先行研究との比較を行うため必要な培養法との定量的な比較が可能となる。単独でも重要な成果であるが、プロジェクト目的達成の為に不可欠なステップとなる。

3. 観測の具体的な方法

インパクター型高効率試料採集装置は、密閉用ゲートバルブと中空の鉛直管、内部に取り付けた試料採取板からなり、バルブの動作は地上から制御する。ゴンドラをパラシュートで降下させる途中にバルブを開け、管内部を通り抜ける空気中の微生物を試料採取板に衝突させ、捕獲する。インパクター型微粒子採取法は、一般的な市販の微粒子採取装置でも採用されている等、地上では一般的な手法である。インパクター式を採用することにより、既存のフィルター型採集装置の24時間分を落下距離わずか1kmで採取できる(最狭部断面積100cm²の場合)。上空での動作がバルブ開閉のみですむ上に試料採取時のコンタミの危険性が大きく減ずるため、気球実験、特に微生物高度分布測定には非常に適している。密閉用バルブは、滅菌手順に耐え衝撃に強くコンダクタンスが大きい、フジテクノロジー社製・圧縮空気制御ゲートバルブを用いる。バルブ制御は地上からのコマンド、搭載した気圧計に基づく制御、気球切り離しからのタイマーの3通りを用い、メイン制御と冗長計で使い分ける。試料採取板と中空管はアルミを用い、風洞実験の結果を受けて形状の最適化を行い、既に製作を行った。放球前には洗剤とアルコールを用いて滅菌・洗浄を行った上でゲートバルブを密閉し、その状態のまま大樹実験場へ輸送し、気球実験に用いる。

採取・着水・回収後、試料採取装置は密閉したまま大樹実験場へ漁船で輸送する。その状態では採取装置内圧は成層圏圧力となっておりコンタミのリスクがある為、外壁を洗浄後大樹実験場内のクリーンベンチ内に持ち込み、採取装置にフィルターを通した外気を導入し内圧を外気圧に戻す。その状態で試料採取装置ごと冷蔵し、千葉工大の実験室へ輸送する。千葉工大のクリーンベンチ内で試料採取板を取り外し、一部の試料採取板は蛍光色素で染色後密閉し、千葉工大の蛍光顕微鏡を用いて観察する。SEM用の試料採取板は金蒸着し、千葉工大のSEMを用いて観察する。また、培養用の試料は試料採取板から培地に移し培養する。

4. 平成28年度大気球実験

平成28年度(6月、大樹実験場)の大気球実験に向け、実験装置一式の準備を行った。ゴンドラ、試料採取板などは千葉工業大学工作センターの協力で製作した。ゴンドラにはインパクター型試料採取装置を試料採取用とコントロール用の2セットの他、流量測定装置、制御部、バッテリー、ゲートバルブ開閉用高圧ガスタンク、JAXA大気球GのHK装置一式等を搭載した。試料採取装置の洗浄・滅菌は千葉工業大学惑星探査研究センターで行った。ゲートバルブ単独の低温・真空環境下での動作試験は別途行い、-50°Cでも作動することを確認したが、凍結の可能性を減らす為保温と温調を行うこととした。コンタミ軽減の為、試料採取部の先端はゴンドラの下部に突き出た形に設置した。そのため、放球直前まで使う為の専用支持台を別途製作し、ゴンドラの下に設置した。試料採取部の先端ノズル部への地上微生物の付着はコンタミの原因になり得るので、放球直前に取り外せる蓋を別途製作し、ノズル部に取り付けた状態で洗浄・滅菌を行った。

平成28年度実験では、大樹実験場にて最終組み立てと配線、パッキング、感度試験を行い、実験装置一式を搭載した大気球は6月8日早朝に大樹航空宇宙実験場から放球された。気球に搭載された実験装置は高度28kmまで上昇し、気球を切り離し、その後パラシュートによる降下中に試料採取を行った。試料採取部の入口・出口のゲートバルブは予定通り動作し、高度27kmから高度13kmまでの成層圏微生物試料採取に成功した。その後実験装置一式は回収船によって回収され、密閉されたまま大樹航空宇宙実験場へと輸送された。

平成28年度実験において、搭載した試料採取部は、試料採取用(S1)とコントロール用(S2)の2組であるが、回収後、S2内部への浸水を確認した。塩分計で確認したところ海水であった。S2は保温・温調を行わなかったため、上空で容器

内圧が低下し、着水後にゲートバルブリング部分から浸水したと考えられる。一方、保温・温調を行った S1 への浸水は確認されなかった為、成層圏で採取された試料は無事であった。

試料採取部は、大樹航空宇宙実験場格納庫内の専用作業スペース内部に設置されたクリーンベンチにて分解され、蛍光顕微鏡観察用試料は蛍光色素を添加した後カバーガラスを用い密閉した。また、SEM 観察用試料は、クリーンベンチ内にて表面を金蒸着し、密閉容器に保存した。試料は千葉工大惑星探査研究センターに持ち帰り、それぞれ蛍光顕微鏡と SEM を用い観察した。

蛍光顕微鏡で観察した結果、放球前にゴンドラ側面に塗布した蛍光ビーズは全く確認されなかった。これは、ゴンドラに付着した地上微生物のコンタミがなかったことを示す。また、合計で 21 個の微生物を検出した。これは、標準大気(1 気圧 15°C)換算で 73 個/m³ の微生物数密度に相当する。この微生物数密度は、難培養性微生物を含めた成層圏微生物数密度の上限値である。なぜなら、コントロール試料が失われてしまったので平成 28 年度実験採取された試料が全て成層圏由来であると断定することは不可能であるが、コンタミの比率によらず、成層圏微生物数密度が上記の数密度を超えることはない為である。

一方、SEM観察の結果、エアロゾルをインパクター式採取装置で採取した場合に特有の「サテライト構造」を持つ微粒子を多数発見した。加速されインパクター板に衝突した柔らかい微粒子(硫酸エアロゾル等)以外はサテライト構造を持たないので、この構造は成層圏で確かに微粒子を捕集できた証拠である。現在までに採取板のごく一部しか観察できていないが、46 個のサテライト構造を持つ粒子を発見した。

また、制御部のログの解析を行った。試料採取部や制御部内等の温度履歴から、ヒーター能力と保温剤が十分であり、想定していた通りの温調が行われていたことを確認した。また、圧力計の履歴から、試料採取部の入口・出口ゲートバルブの動力用ガスタンクやガス配管に漏れが無かったことを確認した。

平成 28 年度実験の成果をまとめると、以下の 2 点である。

- 1) 培養できないものも含めた成層圏微生物数密度の上限値を世界で初めて観測することに成功。
- 2) 新規開発した降下式インパクター型試料採取装置で、成層圏微粒子の採取に成功。

一方、事前の成功基準の達成度は以下の通りである。

最低成功基準：達成

- 1) 新規開発した試料採取装置を動作させること。
 - 達成
 - ゲートバルブの開閉を確認できた。
- 2) 成層圏での浮遊微生物採取の技術的課題を明確にすること。
 - 達成
 - 動かさないコントロール用採取装置のゲートバルブも保温する必要あり。

高度成功基準：達成

- 1) 採取装置が正常に動作すること。
 - 達成
 - ゲートバルブの開閉は正常に行われた。直接手打ちコマンド、圧力自動制御の両方が正常に作動。
 - 各部温度や圧力等の測定、データ送信、ログ保存も正常に完了。
 - 採取部等のヒーター・保温材は想定通り機能し、必要な温調を行うことが出来た。
- 2) 蛍光顕微鏡もしくは SEM を用いて、成層圏の浮遊微粒子(微生物に限らない)の有無を観測すること。
 - 達成
 - SEM にて採取された成層圏エアロゾルを多数確認。

最高度成功基準：一部未達成

1) 蛍光顕微鏡で成層圏浮遊微生物を検出し、物理的特性(浮遊粒子としての形状と大きさ)を観測すること。

→ 一部未達成

実験後の試料採取板上において微生物を検出することが出来たが、コントロール試料を喪失してしまったため、今回採れたものが絶対に成層圏由来とは言い切れない。

2) SEM で確認された微粒子の元素組成を EDX で測定し、その特徴付けを行うこと。

→ ほぼ達成

ただし、硫黄は採取板のモリブデンと被るので計測できず 硫黄、水素(もともと測定できない)以外の多くの元素について定性分析を行うことができた。

6. 平成 29 年度実験の目的と準備状況

第2回の気球実験となる平成 29 年度の実験では、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第1回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の4点を目標とする。

上記実験目標4項目が達成されれば、生物圏界面 biopause の決定の為に最も重要な成層圏微生物の高度分布情報を得ることができる。また、成層圏微生物の先行研究との比較を行うため必要な培養法との定量的な比較が可能となる。単独でも重要な成果であるが、プロジェクト目的達成の為に不可欠なステップとなる。

実験装置の構成は、ゴンドラ 1 台に、試料採取部は計 6 組(本分析用 4 組、コントロール用 1 組、流量測定用 1 組。28 年度実験では計 3 組であった)、PI 制御部一式、ガスタンク 2~3 個、バッテリー、流量測定機用制御部、カメラ等を搭載する予定である。放球前までゴンドラ下側にゴンドラ支持台が付属する。個々の試料採取部は前回の平成28年度の実験とほぼ同一であるが、本分析用試料採取部の数が1組から4組に増加する。それに伴い、ゴンドラ骨組み増強、搭載バッテリー数量増、ガスタンク数量増の必要がある。そのため、全体の重量が 100kg~150kg 増加するほか、ゴンドラサイズが大きくなる。PI側の制御部の基本構造は変更しないが、4組の採取部を制御できるように改修する。また、制御部用容器も改良・軽量化を行う。

制御部容器の改修、ゲートバルブのオーバーホールを含め、外注する部分は遅くとも 1 月までに揃う予定となっている。その後、制御系・PI 側地上系の動作試験や実機を用いた分析試験まで平成 28 年度中に準備が完了するようスケジュールを組み、平成 29 年度春に大樹実験場にて大気球実験を行う前提で準備を行っている。