

成層圏における微生物捕獲実験

大野宗祐、石橋高、三宅範宗、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、山岸明彦、仁田原翔太(東薬大)、瀬川高広、近藤伸二(極地研)、山田和彦、野中聡、河口優子(JAXA)、高橋裕介、原田大樹(北大)、石川裕子(日本全薬工業)、所源亮(アリジエン製薬)、山内一也(東大)

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を行い、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った。その結果、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が2株得られた(Yang et al. 2008b, 2009b, 2010)。以上のように、中層大気、特に成層圏において微生物が存在していることがわかってきた。

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、前述の山岸グループの実験例などでは採取した微生物をまず培養するという分析手順を採用していたため、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、蛍光顕微鏡による観察、シングルセル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27年度は、先行研究で用いられたフィルター

式よりも採取効率の高いインパクト式の微生物採取装置を新たに試作し、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。また、蛍光顕微鏡、シングルセル DNA 分析、培養の 3 種類の分析手法を確立する。

平成 28 年度は、平成 27 年度に行った実証試験の結果を踏まえ、制作したインパクト式高感度試料採取装置を用い微生物を採取・分析する。平成 28 年度の実験では、1) 成層圏浮遊微生物の物理状態(単独か凝集体か塵に付着か)の観察、2) 難培養性の成層圏浮遊微生物の同定と遺伝子配列の解読、3) 成層圏微生物の寿命制約、4) 成層圏浮遊微生物の高度分布観測、の 4 つの成果を上げることを目標とする。中層大気中の微生物の形態と高度分布を実際に観測することで、先行研究では全く手つかずであった微生物の対流圏から中層大気への輸送メカニズムや中層大気中での滞留時間と寿命に関する制約を与えたい。

3. 観測の具体的な方法

インパクト型高効率試料採取装置は、密閉用ゲートバルブと中空の I 字管、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。インパクト型微粒子採取法は、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。インパクト式を採用することにより、既存のフィルター型採取装置の 24 時間分を落下距離わずか 1km で採取できる(大きさ 10cm 角)。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、γ線滅菌が可能で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。バルブ制御は自動で行い、タイミングはあらかじめ地上で設定し動作させる。試料採取板と I 字管はアルミを

用い、風洞実験の結果を受けて形状の最適化を行って製作する。

4. 微生物採取装置に関する準備状況

4-1 採取装置の概念

本気球実験では、気球で成層圏まで上昇した後、気球からゴンドラを切り離し、パラシュードで落下する最中に、成層圏中に浮遊する微生物を採取することを目指す。落下中に採取することにより、気球から落下してくる微生物(地上で気球に付着したもの)によるコンタミネーションを防ぐことができると考えられる。

採取装置は、地上での微粒子採取に用いられているインパクト式採取装置をベースとして、現在開発を行っている。地上でのインパクト式採取装置は、大気をポンプで能動的に吸引し、粒子をインパクションプレートに衝突させて採取する。一方、我々は装置の降下により大気を受動的に装置内に取り込み、微生物をインパクションプレート上に採取する。気球実験用のインパクト式採取装置の概念図を図 1 に示す。円筒状の筒の内部にノズルとインパクションプレートを設置する。装置下部から取り込まれた大気はインパクションプレートを避けるように流れるが、含まれる微粒子はインパクションプレートに衝突し付着する。インパクションプレートには、粒子が付着しやすいように粘着性のある塗布剤を塗布する。細胞を持つ微生物の大きさは約 1 μm よりも大きいことが知られており、本気球実験ではサイズ 1 μm 以上の微生物の採取を目指す。捕獲することが出来る粒子の下限サイズはストークス数により決まる。

採取機構部の入口と出口にはゲートバルブが設置されており、指定したタイミングにより開閉を行い、目的とする高度での採取を行う。

この採取方法は、あくまでも地上に於ける能動的吸引による微粒子採取方法を参考としているため、成層圏中における受動的取り込みにより微生物の採取ができるのかどうか、確認する必要がある。さらに、効率良く微生物を採取するためには、装置の最適化が必要である。そこで、風洞実験と流体計算によるそれら

の確認作業を実施している。

4-2 風洞実験

まず、微生物を効率良く採集するためには、装置内部に大気が効率良く通り抜けることが必要条件となる。そこで、筒にノズルやインパクションプレートを取り付けた模型を用いて風洞実験を行い、装置内の大気の流れを調べた。

実験は、宇宙航空研究開発機構の惑星環境風洞で行った。大気の流れを知るために、装置の出入り口やノズルのスロート部の静圧を測定した。ノズルのスロート部の直径や、インパクションプレートの直径、ノズルとインパクションプレートの距離、流れに対する装置の角度、流速、風洞内の圧力などを変えながら測定を行った。

4-3 流体計算

風洞実験で測定できるのは離散的箇所での静圧のみであるため、装置内の流れを知るために、流体計算を行い、風洞実験結果との比較を行った。まず、ノズルのみ、ついでインパクションプレートありの場合の計算を行った。得られた結果(各圧力測定点の圧力)は、風洞実験の結果と良く一致した。流体計算では風洞実験における流れ場を良く再現していると言える。計算結果を見ると、今回調べた範囲においては、ノズルのスロート部断面積が流れのボトルネックとなっており、インパクションプレートの面積はあまり影響がないことがわかった。また、流れに対する迎角があっても装置内の流量は低下しない(むしろやや増加する)という意外な結果も得られた。実際の気球実験において採集装置が落下する際には、パラシュートを頂点とする円錐振り子運動になり、装置は落下方向に対して角度を持つ。したがって、今回の結果は、そのような条件に於ける微生物採集に対してポジティブなものである。

4-4 制御部の開発

微生物採集機構の開発と並行して、装置の制御部の検討も行っている。本採集装置は、気球のゴンドラに搭載されて成層圏まで上昇した後、ロープカッターにより気球から切り離され、ゴンドラごと落下する最中

に、成層圏中の微生物の採集を行う。本装置の制御はシーケンス制御により行われる。制御部は気密容器に収め、大気圧の空気で密封する。また、必要に応じてヒーターによる保温を行う。ロープカッターによる切り離しの信号によりシーケンサーが作動し、以降指定したタイミングでゲートバルブの開閉を行う。ゲートバルブはエア駆動式で、電磁弁により圧縮空気を制御して開閉を行う。なお、ゲートバルブの低温・真空環境下での動作試験は実施済みであり、 -50°C でも作動することを確認した。

4-5 今後の開発予定

流体計算により風洞実験結果を良く再現できることが確認できたので、今後はさらに装置パラメータを振って、数値実験により採集装置の最適化を目指す。さらに現在、求めた流れ場に対して粒子を流し、インパクションプレート上に付着するかどうかを確認する数値シミュレーションを実施中である。流体計算と粒子計算により、ノズルのスロート部の直径、インパクションプレートの直径、ノズルとインパクションプレートの距離といったパラメータの最適化を行う。それらの結果をもとに、装置模型を作成し、再度風洞実験を行う。この風洞実験では、実際に微粒子を流す予定である。そのために、現在、風洞内で直径 $1\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを噴霧するためのスプレーシステムの導入の検討を行っている。蛍光ビーズを用いるのは、採集の可否や採集個数の確認を蛍光顕微鏡で行うためである。インパクションプレート表面には粘着性のある塗布剤を塗ることにより、採取と分析の効率と信頼性を向上させることが可能となる。塗布剤は比較的低温でも粘性を保ち生物分析を妨げない物質として、グリセロールと水の混合物もしくは tween を候補として検討中である。

現在検討中の制御部の開発も同時に進める。そして、風洞実験による微粒子採集の確認ができ次第、フライト用の微生物採集装置の作製を行う予定である。

5. 採取試料の分析方法に関する準備状況

5-1 蛍光顕微鏡

環境微生物解析の先行研究(土壌、水)から、培養可能な微生物の100倍から1000倍の微生物が環境中に存在すると言われている。以前のJAXA大気球を用いた微生物採取実験では採取した全ての試料について培養を試みたが、今回は蛍光色素で染色し、採取された微生物の数と形態を蛍光顕微鏡で観察する。また、生きていた細胞のみならず死んだ細胞も違う色で染色することが出来る蛍光色素(Live-Dead)を用い、培養法では検出できない死んだ細胞の数も観測することが出来る。生きていた細胞と死んだ細胞の数の高度分布を観測することが出来れば、成層圏浮遊微生物の寿命や動態について非常に重要な情報となる。

気球で採取された試料の蛍光顕微鏡での観察に関して予備実験を行い、単独で浮遊している微生物、複数で凝集体を形成している微生物、浮遊している岩石の塵、の3種類それぞれの観察に成功した。また、今回行う蛍光顕微鏡による観察手法では、先行研究の培養法と比べ1桁程度の感度の向上が期待できることがわかった。

5-2 非培養 DNA 分析

数密度や形状については、蛍光顕微鏡を用いることで、培養が難しいものも含めほぼ全ての微生物を検出することが可能である。ところが、蛍光顕微鏡観察のみでは、見つかった微生物がどのような種類の物であるか特定することは非常に難しい。そこで本研究では、採取した試料の中に含まれるDNAの配列を直接読み取ることにより、培養できない成層圏浮遊微生物の種類を特定し、検出された微生物の特性を推定することが可能である。

この分析はわずかな混入によっても分析の信頼性が妨げられてしまうため、国立極地研究所の氷床コア内微生物分析を行う実験施設を使用し、クリーンな環境での微量分析を行う。今後今年度中に、1)インパクト塗布剤と分析で用いる試薬との干渉についての試験、2)非培養DNA分析に適した洗浄・滅菌手順の検討・試験、3)既知の微生物試料を用いた分析手順

確立・検出感度推定の為の予備実験を行う予定である。

5-3 培養法

本研究では、蛍光顕微鏡による観察・非培養DNA分析だけでなく、培養法も併せて行う予定である。培養法は、先行研究で多く行われているため、本研究で得られた結果を先行研究と比較する際に非常に重要である。また、採取した微生物試料の環境耐性など詳細な性質を理解するためには、可能なら培養して増やした上で実験を行うことが望ましい。

培養に関しては、基本的には千葉工業大学惑星探査研究センターで行う。数年前に三陸で行った気球による微生物採取実験の際にも培養を行って成功しており、手法は確立していて技術的な問題点は非常に少ない。唯一試験が必要な点は、インパクト塗布剤と微生物事態や培養で用いる培地との干渉である。今年度中に、いくつかの塗布剤候補について、培地との干渉について試験を行う。