

# ラン藻の宇宙環境耐性実験のための実験系の検討

°五十嵐裕一\*, 富田一横谷 香織\*\*, 本橋恭兵, 佐藤誠吾 (筑波大学), 新井真由美 (日本科学未来館), 馬場啓一 (京都大学), 大森正之 (中央大学), 橋本博文, 山下雅道 (JAXA)

## Several tolerance tests in a cyanobacterium, *Nostoc* sp., for the space environmental experiment

Yuichi Igarashi, Kaori Tomita-Yokotani, Kyohei Motohashi, Seigo Sato, (University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572 Japan), Mayumi Arai (National museum of emerging science and innovation, Koutou-ku, Tokyo 135-0064 Japan), Kei'ichi Baba (Kyoto University, Uji, Kyoto, 611-0011 Japan), Masayuki Ohmori (Chuo University, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551), Hirofumi Hashimoto, Masamichi Yamashita (JAXA/ISAS, Sagami-hara, Kanagawa 229-8510 Japan.)

\*[s0710653@u.tsukuba.ac.jp](mailto:s0710653@u.tsukuba.ac.jp) \*\*[kaboka@sakura.cc.tsukuba.ac.jp](mailto:kaboka@sakura.cc.tsukuba.ac.jp)

### Abstract

We have been investigating the temperature tolerance in *Nostoc* sp. HK-01, exposed high and low temperature for several hours and weeks. All the cyanobacterial cells was able to live under the environment, 80°C, 100°C in un hour and -80°C and 80°C in 45 minutes during one week and three weeks in room temperature 25°C. The surface of the dray lump was observed under a Scanning Electron Microscope (SEM). After the exposed cells, they are difficult to live under the environment, 100°C in 2, 3 hours. Further detail protective functions in *Nostoc* sp. are under study.

Keywords; cyanobacteria, space environment, temperature tolerance

### 1. はじめに

地球上の生物の宇宙環境耐性の詳細な検証は、生物の起源に関連する情報から対象生物の個々の耐性機能の解明に至るまで、数多くの新規結果の取得や考察に発展できる可能性を含む。特に、過去の地球環境の物質循環に多大な影響を及ぼしたと考えられる光合成を行う微生物のラン藻の出現は、地球の大気酸化に大きく役立った。陸生ラン藻の*Nostoc* sp. は、これまでに、Araiらによる、火星環境でラン藻の生育を行うことを想定した研究の中で、高い真空耐性を示すことが証明されている。将来、ラン藻を乾燥状態で真空中を運搬することも可能であると考えられる。

宇宙船内においても、宇宙空間への生物の運搬の過程には、有人区域以外は、過酷な温度条件が曝露される可能性が考えられるが、生物の構築された構造への影響の詳細な検証はまだされていない。無人域で宇宙空間へ運ばれる場合、軌道上で高温と低温に複数回曝露されることなどは容易に考えられることから、これら

の環境を想定した乾燥ラン藻の構造上の変化について、形態的観察と曝露後の蘇生を指標として調べた。また、温度曝露直後に乾燥ラン藻の生死の割合とラン藻1細胞あたりのダメージの割合を知りたいが、乾燥ラン藻は加水直後には藻塊を形成するための最適な方法を確認できていない。そのため、曝露直後に生死の割合を調べられる適切な方法の検討も合わせて行った。

### 2. 材料および方法

生物材料:

陸棲ラン藻*Nostoc commune* HK-01(*Nostoc* sp. HK-01)を材料として用いた。

#### 1) 温度曝露後の形態的観察と蘇生検定

温度曝露:

少量の乾燥ラン藻を小チューブに分配し、100°Cのオーブン内に1時間、2時間、3時間静置した。一方、-80°Cを45分と続けて80°C45分の環境を、1サイクルと3サイクル与えた。この時、酸化によるサンプルの変化の可

能性を考慮し、小チューブ内を窒素ガスで置換したサンプルも用意し、同様に熱を与えた。また真空状態でラン藻をアルミシートに包み、熱伝導により熱を与えたサンプルも用意した。真空条件では熱サイクルを1サイクル、3回サイクル与えたサンプルと熱サイクルを連続で1週間、3週間与えたサンプルを用意した。得られた各乾燥ラン藻サンプルは、加水後蘇生観察を行った。

蘇生検定および構造変化：

各温度曝露した乾燥ラン藻の蘇生を調べるための染色には、Fluorescein diacetate (FDA)またはCellstain(CM)を用いた。染色剤は、ラン藻の蘇生確認用染色溶液として用いた。各温度環境曝露による構造変化は、電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

## 2) 曝露後の蘇生の割合の最適方法の検討

激しく攪拌することにより藻塊からラン藻1細胞を単離できるかを検討した。少量の乾燥ラン藻を小チューブに分配し、400 $\mu$ lの蒸留水で加水した。その後、振とう培養器を用いて、乾燥ラン藻を100rpm min<sup>-1</sup>(37 $^{\circ}$ C 30分)培養した場合と、100rpm min<sup>-1</sup>(室温 25 $^{\circ}$ C 30分)培養した場合を用意して、それぞれを15分間手で攪拌して、顕微鏡で観察を行った。

## 3. 結果および考察

1) 室温(25 $^{\circ}$ C)、80 $^{\circ}$ Cおよび100 $^{\circ}$ C1時間を乾燥ラン藻に与え、加水した後3日後に蘇生検定を行ったところ、全ての環境曝露でエステラーゼ活性を示す緑色蛍光を観察し、この環境で問題なく生存するラン藻が存在することが分かった。また、-80 $^{\circ}$ Cから80 $^{\circ}$ Cおよびその逆の80 $^{\circ}$ Cから-80 $^{\circ}$ Cを与えたラン藻を、同様に調べたが、これも生存が確認できた。そこで、100 $^{\circ}$ Cの環境を3時間まで与えて調べたところ、100 $^{\circ}$ C3時間で蘇生を示すラン藻を観察することが困難になった。窒素置換と真空条件下でも同様の結果となった。

Fig.1は、電子顕微鏡観察の結果の写真を示す。対照の乾燥ラン藻は、何らかの膜に覆われて保護されている様子が観察された。100 $^{\circ}$ C1時間までに、覆われた構造が観察されず、ネンジュモ構造がむき出しになり、3時間でラン藻の一部は、その構造自身に変化が認められた。サイクル実験を行った場合も同様に、覆われた構造の変化が認められたが、100 $^{\circ}$ C環境ほど顕著ではなかった。

この結果は、窒素置換、真空環境条件下、双方ともに室温と同様の蘇生結果を示したことから、覆っている膜構造の変化は、酸化によるものではなく、単純に熱により変化が生じた可能性が考えられる。また80 $^{\circ}$ Cではラン藻は生存しているが、100 $^{\circ}$ Cとなると生存が難しくなることから、ラン藻の生物体としての生存限界の温度が80 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ Cにある可能性がある。

真空条件下で熱サイクル1週間、3週間曝露したラン藻でも生存を確認できたが、コントロールの蘇生率を100%した時の蘇生率(培養2日目)はそれぞれ約40%

と約10%となり、蘇生率は低下した。またさらに培養を続け、5日目の状態を観察すると、サイクル1週間曝露したラン藻ではネンジュモ構造が確認され、生存ランソウが増殖したと考えられる。一方、サイクル3週間曝露したラン藻ではネンジュモ構造が確認されず、増殖が確認できなかった。これは長期の熱サイクルが、ラン藻のDNA何らかのダメージを与えて、成長を抑制したか、増殖機能を抑えた可能性などが考えられる。サイクル3週間のサンプルではネンジュモ構造が5日間の培養では確認できなかったが、サイクル3週間でもラン藻は生存していることから、今後熱サイクルに耐性を持つラン藻をスクリーニングすることができる可能性、また培養条件の検討で成長できる可能性もあると考える。今後は熱による乾燥ランソウのDNAダメージをアッセイする実験を検討中である。そのために蘇生の適切な方法を検討した。

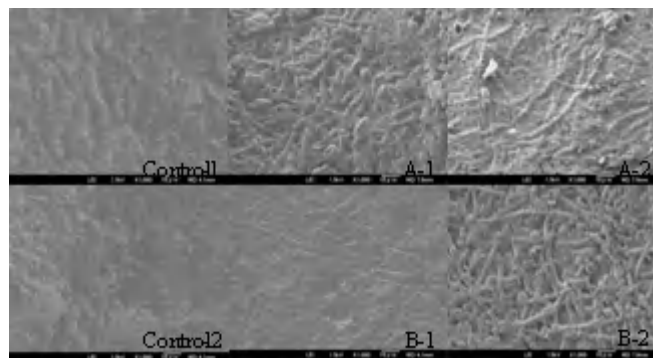


Fig.1 The surface of *Nostoc sp.* observed under a Scanning Electron Microscope (SEM). : A-1;100 $^{\circ}$ C 1hour A-2; 100 $^{\circ}$ C 2hour B-1;-80 $^{\circ}$ C and 80 $^{\circ}$ C 45minutes B-2;-80 $^{\circ}$ C and 80 $^{\circ}$ C 45minutes three times

2) 振とう培養を室温25 $^{\circ}$ Cで30分行ったラン藻は、ラン藻の塊から単離したネンジュモ構造をしたラン藻が観察された(Fig.2:B)。振とう培養を室温37 $^{\circ}$ Cで30分行ったラン藻では、ラン藻の塊から離れ、ネンジュモ構造より分離した1細胞のラン藻が観察された(Fig.2:C)。

この結果は37 $^{\circ}$ Cで乾燥ラン藻を振とう培養すると、ネンジュモ構造より離れた1細胞のラン藻の割合が増えることから、増殖のための準備が行われていると考えられる。またこの時ネンジュモ構造を分離する何らかの酵素が働いている可能性が示唆される。ラン藻塊から個別に細胞は単離することが確立できれば、これらを採集して乾燥させることで、各種曝露の細胞個数なども正確に把握できる実験系を作成することができると考えられる。

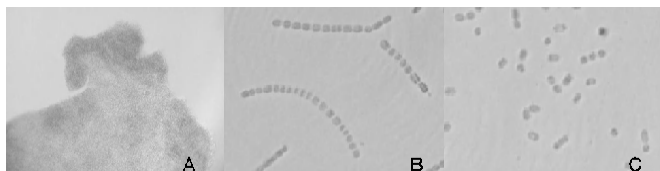


Fig.2 The picture of *Nostoc sp.* by observed in microscope :  
 A ; massive *Nostoc sp.* B ; cultured *Nostoc sp.* in 25  
 temperature during 30 minutes C ; cultured *Nostoc sp.* in 37  
 temperature during 30 minutes

乾燥ラン藻サンプルを宇宙環境に運ばれる過程で各温度条件に曝されると予測される。軌道上における低温と高温環境の変化が、乾燥ラン藻を保護していると考えられる構造を変化させ、またラン藻自体にもダメージを与える可能性を示す。しかし、長期の熱サイクルに曝露したサンプルでも生存が確認できたことは大きな結果であると考え。今後は乾燥ラン藻の保護物について、物理的・化学的全構造と機能について検討と、ラン藻のシングルセル状態での DNA ダメージの評価を検討中である。これまでに、新井や山下らの実験結果で、ラン藻が、高い真空環境耐性を持ち、更にむしろ常圧よりも酸化されるリスクのない真空環境の方が、長い保存に適していることを実験的に示していることから、今後、真空曝露との関係も詳細に検討を行う必要もあると考える。今後の研究が、生物の宇宙耐性機能に大きく貢献できる可能性があると考えられる。

#### REFERENCES

- 1)Mayumi Arai, Kaori Tomita-Yokotani, Seigo Sato, Hirofumi Hashimoto, OHMORI Masayuki , YAMASHITA Masamichi : Growth of terrestrial cyanobacterium, *Nostoc sp.* , on Martian Regolith Simulant and its vacuum tolerance, *Biological sciences in space* 22(1), 8-17, 2008
- 2)Kato Hiroshi, Shiga Yoko, Nakahira Yuka, Ohmori, Masayuki:Isolation and Characterization of a Drought-Tolerant Cyanobacterium, *Nostoc sp.* HK-01, *Microbes and environments* 18(2), 82-88, 2003
- 3)Adams,A(1985)Cryptobiosis in Chironomidae (Diptera)-two decades on. *Antenna:Bull.R.Entoml.Soc.London*,8,58-61
- 4)Arai,M.and kimura,F.(2008) An estimation of meteorological conditions in an artificial closed system on Mars, in preparation for publication