

コケ類胞子と茎葉体の真空および窒素置換に対する耐性実験

三枝誠行¹, 進藤明彦¹, 小野文久², 松島康², 西村直樹³, 西平直美¹, 鈴木忠⁴, 山下雅道⁵ (1: 岡山大・院・自然科学 (生物系), 2: 岡山大・院・自然科学 (物理系), 3: 岡山理科大学・院・総合情報研究科, 4: 慶應大・医・生物, 5: Jaxa)

Resistibility of moss spores and leaves against vacuum and nitrogen-exchange condition

M. Saigusa¹, A. Shindo¹, F. Ono², Y. Matsushima², N. Nishimura³, A. Suzuki⁴, M. Yamashita⁵, [1 and 2: Faculty of Science, Okayama Univ (1: Biology, 2: Physics), 3: Okayama Rika University, 4: Keio University, 5: JAXA]

Abstract: We have investigated to know the limit where the life on the earth can be resistant against various kinds of the extreme environmental factor in the space. Spores and leaves of a moss may be extremely resistant against them, so we have chosen three kinds of moss, and investigated the effect of three kinds of extreme environmental factors: vacuum (1×10^{-3} Pa), nitrogen-exchanged air (1 Pa), and ultrahigh pressure (7.5 GPa). Ratio of budding in the spores and leaves exposed to vacuum for 2 months was not different from that of the control groups not exposed to vacuum. Budding of the group exposed to nitrogen-exchanged air for 1 month did not show any difference from that of control groups. Furthermore, 20% of spores were resistant against ultrahigh pressure exposed for 1 week. These results indicate that spores and leaves of the moss have much stronger resistivity against extreme environmental factors than the 'tun' of *Milnesium tardigradum* we have studied up to now. Spores and leaves of the moss may be a very good material for the resistivity of the life on earth against extreme environmental conditions in space.

Key words: spore and leaves, moss, vacuum, nitrogen-exchanged air, ultrahigh pressure, resistivity

コケ類は、地球上のさまざまな極限環境に生息しており、胞子や茎葉体は極度の乾燥条件に耐性があることが知られている。コケ類が宇宙環境にどの程度耐えられるかを明らかにすることは、宇宙空間における生物体の移動の可能性を考えることができるばかりでなく、将来人類が宇宙環境で生存するための基礎的データや、中等教育における宇宙生物学実験のすぐれた材料を提供するものとして注目されている。

地球型生命の極限環境耐性の限界とそのメカニズムを知るために、私たちは今までオニクマムシ (*Milnesium tardigradum*) の「樽」を実験に使ってきた。クマムシ類の樽は、今まで行われた実験の結果では、 -273°C から上は $+151^{\circ}\text{C}$ まで、圧力は真空から7.5GPaまで、X線やγ線に対しては5700グレイまで耐性があることが報告されている。しかし、クマムシは、極限環境には一時的には耐性を示すものの、長期間にわたる耐性は獲得していない可能性が高く、宇宙空間における各種の極限環境条件への耐性を研究するための生物としては、適していないことがわかってきた。

一方、クマムシが生息している多くのコケ類は、胞子体や茎葉体を含め、クマムシよりも遥かに強力な極限環境耐性があることが期待された。

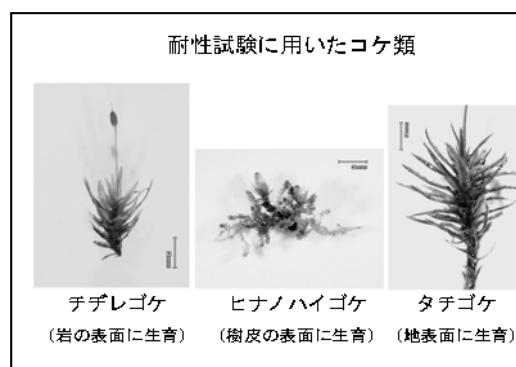


Figure 1. Materials used for the present experiments.

私たちの身の回りには多くの種類のコケ類が生活している。石や岩の表面に生活している種類 (チヂレゴケ) や樹皮の表面で生活している種類 (ヒナノハイゴケ), および地表の土の上で見られる種類 (タチゴケ) を選び、(Fig. 1), 真空条件, 窒素置換した空気, お

よび 7.5GPa の高圧条件に置き、胞子の発芽率や茎葉体の生存率を比較した。

材料と方法

1. 胞子の発芽率と茎葉体の生存率

極限環境耐性の実験には、胞子の発芽率や茎葉体の生存率を正確に求めることが必要である。コケ類の胞子は培地に蒔いた後、徐々に体積が増加する (Fig. 2)。4 日目あたりから発芽が始まる。Fig. 3 に示されているように、発芽する割合は急激に増加し、7 日以降に最大になる。発芽した胞子の数は、胞子が単独で蒔かれた場合には容易であるが、複数になると、8 日目や 9 日目になると、判別がしにくくなった。そのため、発芽胞子は、培地に蒔いてから 7 日後にカウントした (Figures 3 and 4)。

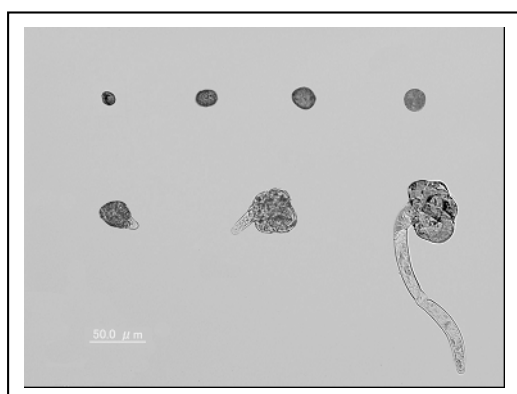


Figure 2. Budding of the spores incubated on the medium

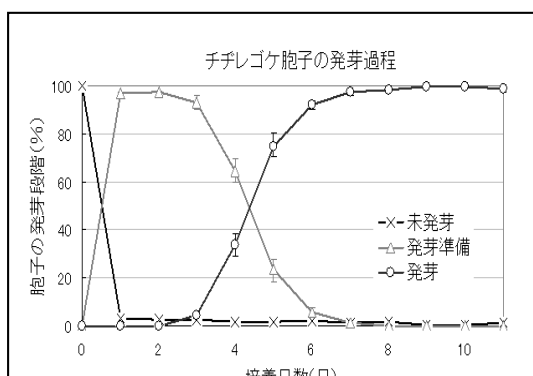


Figure 3. Ratio (%) of budding in the spores incubated in the medium.

2. 真空実験

コケ類胞子のうから採取された胞子、ならびに茎葉体葉は、油回転ポンプと油拡散ポン

プにより真空吸引を行った後、空気の窒素置換を行い、もう一度真空吸引を行ってから石英管に封入した。真空吸引は 1×10^{-3} パスカ (1 億分の 1 気圧) であった。サンプルを

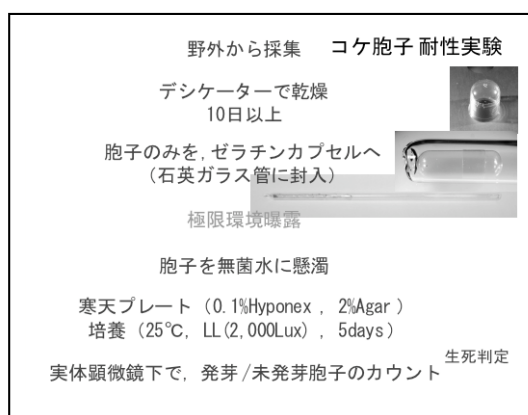


Figure 4. Method for incubation of spores.

封入した石英管は全暗条件 (25°C) に置き、必要なときに石英管を割り、中のサンプルを取り出して培地に移し、発芽率をカウントするとともに、茎葉体に関しては生死の判定を行った (Figure 5)。

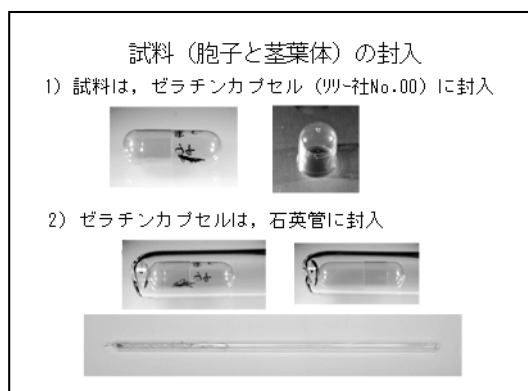


Figure 5. Embedding of the samples into the glass tube after vacuum (1×10^{-3} Pa).

3. 窒素置換による無 (低) 酸素状態での実験
油回転ポンプと油拡散ポンプにより、サンプルを入れた石英管を真空吸引し、窒素ガス (99.5%) を充填する。さらに真空吸引し、再び窒素ガスを充填する。このような操作を 3 回繰り返す。窒素ガスを充填した後に石英管を封入した。窒素置換されたサンプルは、25°C で全暗条件に置かれ、必要なときに取り出して発芽率や茎葉体の生存率を調べた。

4. 7.5GPa の高圧耐性実験

その他、高圧耐性を調べるために、7.5GPaのもとに孢子と茎葉体を長時間置き、取り出してから孢子発芽率と茎葉体の生存率を調べた。なお、高圧にかける際には、微小カプセルの形態維持のためフロリナート (C₈F₁₈) を注入した。フロリナートに1週間漬けっ放しにしたサンプルは、発芽率・生存率ともに100%であったので、フロリナートの影響はないものと思われる。

結果

1. 真空耐性実験 (1×10⁻³Pa)

Figure 6 は、チヂレゴケ孢子をそれぞれ1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月真空状態に置いたときの発芽率を示している。コントロールは、野外から採取したコケ孢子を10日以上デシケータで乾燥させ、その後に発芽率を調べたものである。少なくとも2ヶ月間真空条件に置かれたチヂレゴケの孢子の発芽率は、95.1%から最大98.5%でコントロール実験での発芽率と比べ、全く違いは見られなかった。

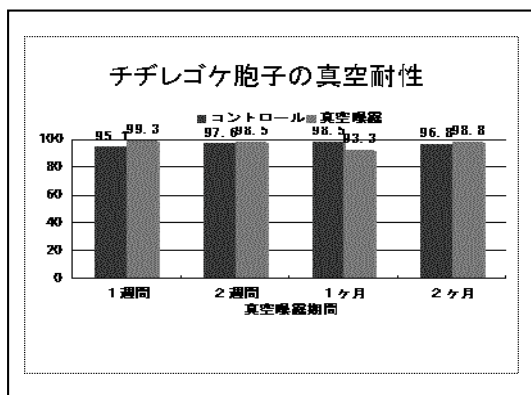


Figure 6. Budding (%) of the spores exposed to vacuum condition (1×10⁻³Pa) up to 2 months.

次にチヂレゴケ、ヒナノハイゴケ、タチゴケの孢子を野外から採取し、1×10⁻³Paの真空条件に1カ月置いてから取り出し、発芽率を調べた (Fig. 7)。その結果、チヂレゴケは98.5% (93.3%)、ヒナノハイゴケは96.4% (97.8%)を示し、コントロール実験の結果 (カッコ内) と比べて全く違いが見られなかった。一方、タチゴケは78.4%を示し、コントロール実験の95.9%と比べると、発芽率はやや低下していることがわかる。

2. 窒素置換 (1気圧) 実験

Figure 8には、チヂレゴケ孢子の窒素置換実験の結果が示されている。最長2ヶ月間無酸素条件に置かれたが、コントロール(98.2%)とほとんど変わらない発芽率(96.8%)が記録された。

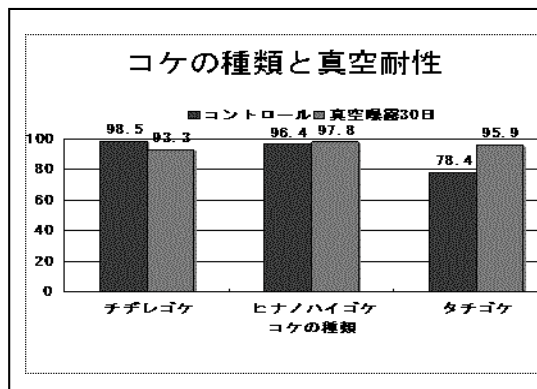


Figure 7. Ratio of budding (%) in the three species of moss spores exposed to vacuum condition for 1 month.

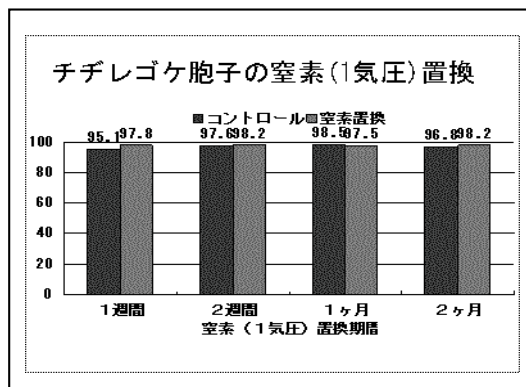
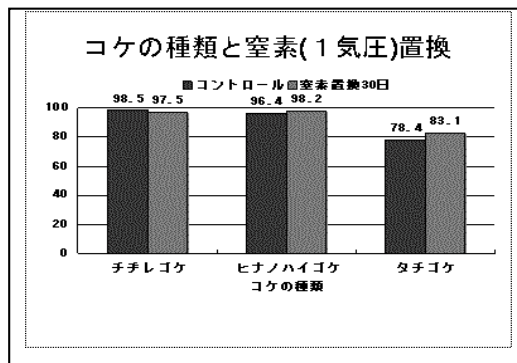


Figure 8. Ratio of budding (%) in the spores exposed to the nitrogen-exchanged air.

Figure 9. Budding ratio (%) of the three



species of moss spores exposed to the nitrogen-exchanged air (1 Pa).

Figure 9は、3種類のコケ胞子を1気圧の窒素で置換した空気の中に1カ月おき、取り出してから培養したときの発芽率の違いを示している。

チヂレゴケでは、98.1%（コントロールは97.5%）、ヒナノハイゴケでは96.4%（コントロールは98.2%）と非常に高い発芽率を示した。タチゴケの発芽率はやや低く、78.4%（コントロールは83.1%）であるが、いずれもコントロールと比べ、ほとんど発芽率に違いが見られないことから、1ヶ月程度の窒素置換した空気に置かれた場合では、発芽率は全く影響を受けないことがわかる。

3. 茎葉体の生存率

真空耐性実験ならびに窒素置換実験は、胞子だけでなく、茎葉体でも行われた。Figure 10には、チヂレゴケの茎葉体をそれぞれ1ヶ月間真空と窒素置換した空気に曝露した後に取り出して蛍光顕微鏡の下で自家蛍光（細胞が生きていれば赤色に発色する）の有無を調べた結果を示している（上段は光学顕微鏡で、下段は蛍光顕微鏡で撮影した写真）。

自家蛍光の発色に関しては、Figure 10からは判別不可能であるが、明らかにどの写真も赤色蛍光を発しており、茎葉体の細胞は生存していた。また、赤色蛍光の発色はコントロールとほとんど同じ程度であり、胞子だけでなく、茎葉体細胞に関しても1ヶ月程度の曝露では影響を受けないことがわかる。

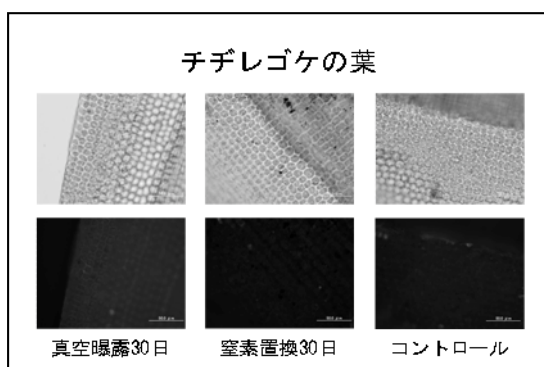


Figure 10. Leaves of a moss exposed to vacuum (left) and nitrogen-exchanged air (middle) for 1 month, respectively. Right panel indicates control experiment.

4. 高圧耐性 (7.5GPa) <予備実験結果>

チヂレゴケ胞子を2週間7.5GPaの高圧に置いてから取り出し、発芽率を調べた結果、コントロール（フロリナートに1週間つけたサンプル）が98.8%の発芽率を示したのに対し、高圧に置いたものでは発芽率は20%程度に低下していた。それでも、クマムシの樽に比べれば、コケ類胞子には遥かに強力な極限環境耐性能力が備わっていると結論できる。

議論

地球型生命の持つ極限環境耐性を明らかにするために、始めはオニクマムシ (*Milnesium tardigradum*) の「樽」を使った実験を行ったが、クマムシ類の耐性は強力ではないことが判明した。そのため、クマムシに代わる実験材料としてコケ類胞子と茎葉体 (Fig. 1) を使って、真空耐性、無（低）酸素状態、および高圧耐性の実験が行われた (Fig. 5)。

私たちの研究では、これらの極限環境への耐性の程度を判定するために、胞子の発芽率や茎葉体の生存率を定量的に求める方法を開発した (Figs. 2-4)。

これらの方法 (Fig. 2-5) を使って、3種類のコケ（チヂレゴケ、ヒナノハイゴケ、およびタチゴケ）の胞子と茎葉体のそれぞれについて、真空、窒素置換した空気、および高圧に対する耐性を調べた。その結果、真空や窒素置換した空気に2ヶ月間程度曝すぐらいでは、チヂレゴケやヒナノハイゴケの胞子の発芽率や茎葉体の生存率はコントロールと全く変わらないことがわかった。このように強力な極限環境耐性は、オニクマムシでは見られなかった。

一方、コケ類の胞子といえども、3~6年間も乾燥状態に保存されると、発芽率は10%以下に低下する。つまり、自然状態においても劣化は進行していることがわかる。ここに宇宙環境への耐性を考える前に、大きな問題が立ちだかっている。

（謝辞）本研究はJSPS二国間共同研究（日ロ共同研究）の支援を受けた。また、本研究の成果はJAXA研究班（生物衛星利用重力生物学研究グループ）の活動報告として宇宙環境利用シンポジウム（H20・1・18）で発表された。