

オニクマムシ (*Milnesium tardigradum*) の超高压耐性

三枝誠行¹、魚住太郎¹、小野文久²、松島康²、鈴木忠³、長沼毅⁴、橋本博文⁵、山下雅道⁶
 (1: 岡山大・院・自然科学 (生物)、2: 岡山大・院・自然科学 (物理)、3: 慶應大・医・生物、5: 広島大・院・生物圏科学、5: 筑波大学・院・システム情報工学、6: Jaxa)

Resistibility of *Milnesium tardigradum* against the ultrahigh pressure in criptobiotic condition

M. Saigusa¹, T. Uozumi¹, F. Ono², Y. Matsushima², A. Suzuki³, T. Naganuma⁴, H. Hashimoto⁵, M. Yamashita⁶ [Faculty of Science, Okayama University (1: Biology, 2: Physics), 3: Keio University, 4: Hiroshima University, 5: University of Tsukuba, 6: JAXA]

Abstract: Criptobiosis is a feature of *Milnesium tardigradum* (Phylum Tardigrata). When this animal is exposed to environmental conditions that are not good for their activity, they are transferred to a special shape called 'tun'. We have investigated the resistibility of the tun against super high pressure. Twenty specimens of *M. tardigradum* were transferred to tun in dry conditions, and were kept in desiccator for a week. Tuns were placed in 7.5 GPa for 20 min, 3hrs, 6hrs, 12hrs, and 24hrs, respectively. While almost of tuns exposed up to 6 hrs recovered, but all of the no specimens exposed for 24 hrs did recover. Twenty-five percent of the specimens exposed to 12 hrs were alive, but no specimens couldn't walk and died within a week. We supposed that resistibility of *M. tardigradum* should be further enhanced if their tun is formed in complete vacuum and low temperature.

オニクマムシ (緩歩動物門) は、道端のコケの中に普通に見られる体長 600-700 ミクロンの小型動物である。系統学的には、節足動物や有爪 (ゆうそう) 動物門と比較的近縁のようであるが、起源はよくわかっていない。

オニクマムシ (*Milnesium tardigradum*) を含めて、陸上のクマムシ類は、乾燥状態に置かれると、体内の水分が抜け、「樽」に移行する。クマムシ類の樽は、極端に厳しい環境にも耐えられることが知られ、今まで行われた実験の結果では、マイナス 273 度から上はプラス 151 度まで、圧力は真空から 1.2GPa 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。その他、エーテルや無水アルコールに対する耐性も持つ。

このように陸生のクマムシの樽は、極限的環境に耐性能力を持つことが知られているが、さらに強力な極限環境にも耐えられるのか。あるいは、今まで報告されている例は多くの中のごく一部の個体で得られたもので、実際には極限環境では生存率は極めて低いのではないかと、という疑問には答えられなかった。

この疑問に答えるためには、クマムシの樽が、見かけは同一の状態でも、条件によっては耐性の程度がかなり異なるかどうかを明らかにする必要があるだろう。

私たちは、オニクマムシの樽に強力な極限環境耐性を発現させるための環境条件を明らかにするために、7.5GPa の高压下にどれだけ長く置いても蘇生する能力が失われないかを調べた。

今までアルテミアの卵や線虫を用いて、極限環境耐性が発現するためには、トレハロースの合成必須であるとされてきた。これらの生物は、乾眠 (クリプトビオシス) に入るには、かなり長い時間を必要とする。一方、オニクマムシは 1~2 分もすれば少なくとも見かけ上は、乾眠状態に移行し、樽を水にひたすと 5 分~10 分ほどで肢を動かし始め、30 分もすれば正常な歩行が可能になる (Fig. 1)。

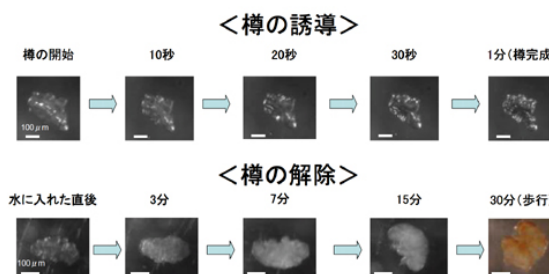


Figure 1. *M. tardigradum*: induction of tun, and release from tun.

材料と方法

アルテミアや線虫では乾眼前になるとトレハロースの合成が盛んになり、体内の細胞や組織がトレハロースによって保護される結果、乾燥耐性が現れることが知られているが、オニクマムシでは樽への誘導、樽からの解除が迅速に起こることから、これらの生物とは別な耐性発現機構があることが予想される。

オニクマムシの乾眠誘導に続く極限環境耐性の発現は、体内からどれほど完全に水分を抜くかということにあるように思えたので、樽を誘導してから1週間デシケータの中に置いた。

このような樽を7.5GPaの高圧にどれほどの時間おいた個体まで蘇生するかどうか、また蘇生した個体が超高压に置かれなかった個体と比べて死亡率に変化があるかを調べた。

まず超高压にかける際には、微小カプセルの形態維持のためフロリナート (C_8F_{18}) を注入する。フロリナートに24時間漬けた個体は蘇生率100%であったので、これをコントロールとして使用した。

本研究では、超高压として7.5GPaを用いているが、これはクマムシ20匹をカプセルに入れて暴露できる限界の圧力である。

実験条件	個体数	生存数	死亡数	生存率
C_8F_{18} (24 hrs)	20	20	0	100%
7.5 GPa (20 min)	20	18	2	90%
7.5 GPa (3 hrs)	20	20	0	100%
7.5 GPa (6 hrs)	20	20	0	100%
7.5 GPa (12 hrs)	20	5	15	25%
7.5 GPa (24 hrs)	20	0	20	0%

Table 1. Resistibility of *M. tardigradum* against 7.5 GPa exposed in different times.

結果

まず7.5GPaに20分間、3時間、6時間暴露された場合には、蘇生率は90~100%であった (Table 1)。20分間の超高压暴露実験では、蘇生してからの生残率の経過は、コントロールと暴露個体間で差がなかった (Fig. 2)。

しかし、3時間暴露実験では、蘇生してからの生残率に明らかに違いが見られた (Fig. 3)。

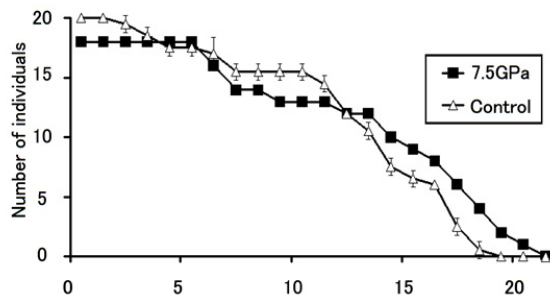


Figure 2. Survival ratio of *M. tardigradum* exposed to ultrahigh pressure for 20 min.

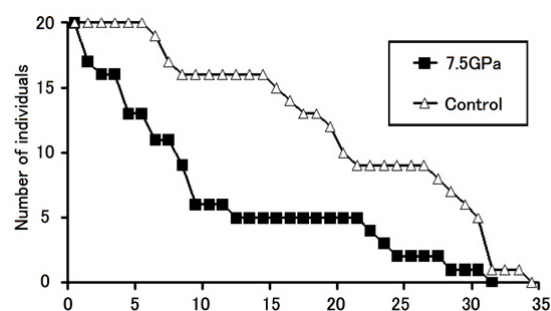


Figure 3. Survival ratio of *M. tardigradum* exposed to ultrahigh pressure for 3 hrs.

6時間暴露した実験では、すべての個体は生きていた (蘇生した) が、すべて付属肢が痙攣を起こしており、歩行は困難であった (Table 2)。また歩行が回復することはなかった。生残率もコントロール・グループに比べて明らかに違っており、コントロールでは25日間生存した個体がいたのに対し、暴露グループでは5日で全部死亡した (Fig. 4)。

12時間暴露になると生存は25%になり、痙攣を起こしながら生存した5匹も8日目にはすべて死亡した (Table 2, Fig. 5)。24時間暴露されたグループでは取り出したときにはすべて死亡していた (Table 1)。

この実験では、樽をフロリナート (C_8F_{18}) に漬けた状態で高圧に暴露する。24時間暴露される樽はその間にずっとフロリナートにひたされたままである。さらに高圧によりフロリナートが体内にしみ込んで組織や細胞に悪影響を与え、それで長時間置くと生残率が低下する可能性も考えられた (Fig. 6)。

実験条件	個体数	正常歩行	けいれん	死亡
7.5 GPa (20 min)	20	18	0	2
7.5 GPa (3 hrs)	20	20	0	0
7.5 GPa (6 hrs)	20	0	20	0
7.5 GPa (12 hrs)	20	0	5	15

Table 2. Influence of ultrahigh pressure on *M. tardigradum*.

フロリナートの影響を調べるために、樽をフロリナートに 24 時間漬けておいたグループと乾燥状態に置いたままのグループ（コントロール）で、水に戻してから生残率を比較した (Fig. 7)。

コントロール・グループでは、最長 25 日間生きた個体があったが、フロリナートに 24 時間漬けたグループでは 17 日間ですべて死亡した。一方、生残率のパターンは 12 日まではほとんど変わらない。フロリナートの影響は全く無いとは言い切れないが、Fig. 7 から見る限りそれほど重大な影響ではないようである。

議論

オニクマムシ *Milnesium tardigradum* の超高压耐性を調べるために、生体を乾燥させて樽を作り、7.5GPa の圧にいろいろな時間暴露してから水に戻し、蘇生率とその後の生存率を高圧を加えなかったグループと比較した。

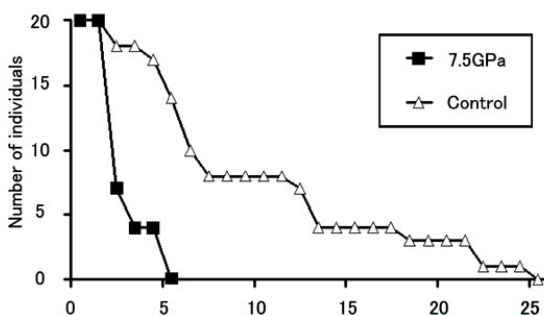


Figure 4. Survival ratio of *M. tardigradum* exposed to ultrahigh pressure for 6 hrs.

私たちの実験からは、オニクマムシの樽は 7.5GPa におかれた場合には、正常に蘇生するための限度は 3 時間ぐらいと予想される (Table 2, Fig. 3)。それ以上、6 時間あるいは 12 時間暴露すると付属肢が痙攣を起こ

し、歩行が困難になり、回復不可能になる (Table 2, Figs. 4 and 5)。しかし、7.5GPa で 3 時間という値がオニクマムシの樽の超高压耐性の限界なのかどうかという疑問が残る。

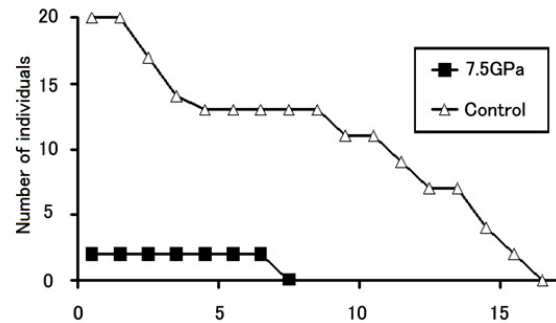


Figure 5. Survival ratio of *M. tardigradum* exposed to ultrahigh pressure for 12 hrs.

カプセル(左)とハイロファイライト(右)

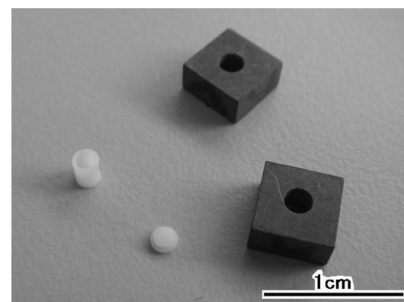


Figure 6. Chamber (left) where tuns are placed with C_8F_{18} .

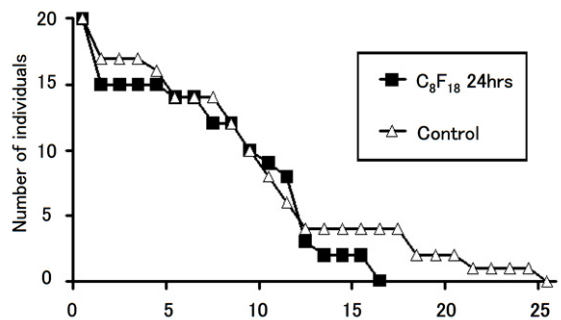


Figure 7. Survival ratio of *M. Tardigradum* soaked in C_8F_{18} for 24 hrs. Control: specimens not soaked.

この疑問に対して十分な答えはまだできないが、7.5GPa のもとで 3 時間という値は、限界値ではないと思われる。私たちの行った実験では樽からできるだけ水分を抜くために、

樽にしてから乾燥機に一週間置いた。それでも完全に体内から水分が抜け切っていないだろう。乾燥条件をもっと改善して、体内からさらに完全に水を抜くことができれば、さらに強力な耐性能力が発現すると予想している。

さらに、温度の影響も考えられる。この実験はかなり高温下で行われている。樽にしてから一週間デシケータに置かれたが、周囲の温度は20~30度(室温)であった。また高圧も室温でかけられた。さらに蘇生してからも25±1℃(恒温器)に置かれて死亡率を調べた。Fig. 3, Fig. 4, Fig. 7の結果を比較するとわかるように、同じ条件で調べたにもかかわらず、コントロール自体の生残率のパターンが実験ごとにより大きく違っている。これはオニクマムシの樽になる前の生理的な状態に違いがあり、それが水に戻してからの生残率の違いに結びついている可能性と同時に、樽への移行時に水分の拡散がうまく行われたかの違いが影響を及ぼしている可能性も否定できない。

オニクマムシの樽の耐性を低下させる環境要因としては、水分含有量に加えて酸素や温度が重要であると思われる。体内の水分はデシケータで一週間抜いたとしても、体内から完全に消えているかどうかわからない。また、酸素は生物の生存には必要であるが、樽になった状態ではむしろ生存には不利に働くであろう。温度も高い状態では、酸素による影響を促進する効果があると考えられる。

以上のことから、私たちはオニクマムシの樽はさらに厳密な条件設定をすることにより、7.5GPaの超高压にさらに長時間耐えられるようになるかと予想している。

<今後の実験計画>

1) 樽の極限環境耐性能力の違いが、樽に移行する過程で体内の組織や細胞の水分が抜ける程度と強い相関があるのならば、デシケータの中に樽を置く時間や日数によって、蘇生率や生残率に大きな違いが現れるだろう。例えば、デシケータに入れなかったグループと、デシケータに1日、および7日置いたグループで、それぞれ7.5GPaに3時間おき、蘇生率や生残率のパターンを調べることができる。

2) 本実験で使用したデシケータは、湿度は20%程度のものだった。これでは、デシケータの中に1週間樽を置いても体内から完全に水分を除去することは不可能である。超高压下では、ごく微量の水分でも残っていれば、細胞に大きなダメージをもたらす可能性は大きい。樽の体内からより完全に水分を除去する手段として樽を真空に置くことが考えられる。

3) クマムシの樽の蘇生率は、樽に置かれたときの温度に大きな影響を受けるかも知れない。温度が高ければ、それだけ呼吸量が増え、物質代謝が進行する。しかし、体内の水分が極端に減少している条件では、物質代謝に大きな支障が出て、その結果細胞内や組織に回復不能な障害が発生する可能性が高くなるだろう。たとえば、室温、4℃、-20℃に樽を一週間置いて、蘇生率と生残率を比較することにより、温度の影響を調べることができる。

4) 酸素の有無もまた樽の蘇生率、生残率に大きな影響があると予想される。酸素があれば、呼吸に使われCO₂と水が発生し、水が有害な作用を及ぼす可能性がある。

5) 温度サイクルへの耐性能力は?クマムシの樽宇宙に持ってゆくには、輸送途中や宇宙空間で激しい温度変化にさらされる。温度変化に耐性があるかどうかを見てみたい。

6) 樽からの回復は障害の修復、それとも障害の軽減か?樽になることで極限環境耐性が発現するのは、障害の軽減と深く関係があるように思える。他の生物でわかっている修復遺伝子を使い、樽でも発現するのか、それに続く細胞内過程の研究も可能であろう。

7) 樽は放射線耐性も知られているので、完全に水分を除去したサンプルで、放射線耐性の限界を調べることができるだろう。

(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(H19・1・17)で発表された。