

研究課題名：成層圏における微生物捕獲実験 Biopause V

大野宗祐、奥平修、三宅範宗、石橋高、前田恵介、河口優子、山田学(千葉工大惑星探査研)、山岸明彦(東薬大)、山谷昌大、飯嶋一征、野中聡、福家英之(JAXA)、瀬川高弘(山梨大)、高橋裕介(北大)、加藤健一(ステラ精密)

地球生命圏の上端(我々は biopause と名付けている)は、地球生命圏が宇宙に向けて開いているのか閉じているのかを理解する鍵である。しかし、この biopause がどこにあり、どのように決まっているのか、よく分かっていない。biopause について理解することは、生命が天体間を移動しうるかどうかというパンスペルミア仮説を検証するために必須であり、宇宙における生命の普遍性や分布を理解するための重要な手がかりとなる。

地球大気の下層である対流圏(高度約 10km 以下)は鉛直方向によくかき混ぜられており、対流圏内には生物が普遍的に存在することが知られている。一方、すぐその上の成層圏(高度約 10km～50km)は、低温低圧な上に非常に乾燥しており紫外線も強い、という生命の生存には非常に厳しい環境であることが知られている。そのため、まずは成層圏生物圏の全体像を理解する事が、Biopause を理解する為に必要であると考えられる。

成層圏生物の観測例は、数多く存在している。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、特に成層圏で微生物が存在していることが報告されている。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 μm 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 μm 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 μm 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。

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し、これまで大気球実験を実施してきた。採取した試料は、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把握することを目指している。

2016 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(Ohno et al., 2018)。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。

2017 年度には、高度分布観測と多角分析を目指し第 2 回実験を実施したが、採取部内部への浸水のため成層圏試料の分析を行うことができなかった。2018 年度にも共同利用大気球実験として採用され、浸水対策を施した上で第 3 回目実験の準備を万端整え大樹航空宇宙実験場にて待機したが、高層気象条件等の理由で実験期間終了までの間に放球機会が無かった。

2019 年度には、異なる高度での微生物採取と多角分析を目標とした第 3 回目の実験を行った。上空で採取装置は必要な動作を行い、装置の回収、その後の試料初期処理も問題なく実施された。染色法並びに培養法分析の結果、難培養性微生物を含めた成層圏由来の微生物は一切検出されなかった。また、本実験の準備・分析時のコンタミネーションも検出限界未満であった。一方で、SEM 観察の結果、多数の成層圏由来の微粒子を発見することができ、採取装置としては問題なく動作したことが確認された。このことから、2019 年度実験当日の北海道上空において、本実験で採取を行った成層圏下部の高度域では微生物の存在量は非常に小さく、本実験の検出限界未満であったことが示された。また、搭載した流量計は正常に動作し、採取装置が動作している高度・期間での流量計測に成功した(Miyake et al., 2020)。しかし、第 4 回目の気球実験となる 2021 年度の実験では、採取装置内部への海水の浸水により、試料を回収することが出来なかった。

プロジェクトの第 5 回目の気球実験となる 2024 年度の実験では、新型の降下式インパクター型サンプラーの成層圏での動作試験と着水時の浸水試験を行うことを目標とする。本研究(Biopause プロジェクト)では、過去数年間にわたり共同利用実験として大気球の飛行機会を得て、成層圏微生物採取実験を行ってきた。しかしながら、未だ生物圏界面(biopause)の観測的決定には至ってい

ない。その大きな原因の一つは、採取装置内への着水時の海水の浸水であった。これまで使用していた採取装置では、成層圏で装置を密閉してそのまま着水するため、採取部内がほぼ 1 気圧の負圧状態となり、それが海水の浸水を誘発しやすい要因となっていた。

それを踏まえ、2024 年度の実験では、フィルターを用いて採取部内外の圧力差を小さく保ったまま着水する新型採取装置の試験を行いたい。今回は採取部 1 組のみを搭載するが、フルスペックの成層圏微生物採取実験を行う場合と同様に成層圏で開閉動作を行ったうえで着水し、その後回収して浸水が起こらないことを確認したい。今回実験で新型採取部の成層圏での動作と着水時の耐浸水性を確認した上で、来年度以降に 1 フライトを使ったフルスペックの成層圏微生物採取実験に臨むことが可能となる。本プロジェクトの実験成立性における最大のネックであった採取部内への浸水問題を完全に解決し、将来的なフルスペックの成層圏微生物採取実験と生物圏界面 biopause の観測的決定へ繋げたい。

2024 年度実験では、ピギーバック実験を想定し、0.5m 立方程度の大きさのゴンドラ(アルミフレーム等で製作予定)に、成層圏微生物採取装置用のボールバルブ部、バルブ駆動用モーター、制御用エレキ部、バッテリー、センサー類(外気圧計、回転センサー等)、カメラ等を搭載する予定である。

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。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。その後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。

降下式インパクター型試料採取装置の原理実証については、これまで数回の大気球実験で既に完了している。また、地上微生物の混入を起こさない蛍光顕微鏡、SEM を用いた分析の手法は

確立されており、実験の実施へ向けて支障はない。さらに、ソフトウェアの動作試験、大気球の通信装置を介した噛み合わせ試験、低温低圧での実時間試験、感度試験は過去の大気球実験において繰り返し行っており、来年度実験へ向けて大きな問題はない。実際のフライトも既に4回行っており、フライト中のテレメトリの即時的な解釈とコマンド送信、JAXA 大気球 G との協力体制も、十分な実地的ノウハウを得ることができている。

ただし本申請では、降下式インパクター型試料採取装置のバルブ部分を完全に新規に設計・開発し、その試験を行うことを主眼としている。バルブ部分については、単独での密閉試験、洗浄試験、模擬滅菌試験、低温試験を実施し、問題がないことを確認している。また、試作したエレキ部（非フライト品）も含め、JAXA 大気球 G 所有の大型低温低圧槽にて実時間の低温低圧試験を行い、問題がないことを確認した。さらに、バルブ内部が負圧にならないための二段式フィルター（生物コンタミ防止フィルターと海水侵入防止フィルター）についても低温経験後の浸水試験を実施し、実験実施へ向け問題がないことを確認できた。

現在残っている主な事前作業は、1)バルブ駆動用モーターの模擬感度試験、2)ゴンドラ部の設計と製作、3)JAXA 大気球側とのインターフェース周辺の設計と製作、4)バッテリーの選定と周囲の回路の設計と製作、5)試料採取版の洗浄滅菌と組付け、である。バッテリーは 2021 年度実験でも実績のある充電可能なバッテリーの使用を予定している。低温・衝撃に関してはスペック上問題がなく低圧下での使用に関しても事前試験を行い問題がないことを確認した。さらに、ゴンドラ骨組みはほぼ同構造ながら再度新規に製作する予定である。2024 年度の大気球実験へ向け十分に余裕を持ったスケジュールで準備を進めている。