

In situ imaging of living cells on surface of Mars:

Current status of development of LDM

(Life Detection Microscope)

(火星表面での生命探査：LDM 生命探査顕微鏡開発の現状報告)

Akihiko Yamagishi^{1*}, Atsuo Miyakawa¹, Takehiko Satoh², Keigo Enya²,
Yoshitaka Yoshimura³, Hajime Honda⁴, Eiichi Imai⁴, Satoshi Sasaki⁵,
Genya Ishigami⁶, Hirohide Demura⁷

¹Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Japan; ²JAXA, Japan; ³Tamagawa University,
Japan; ⁴Nagaoka Institute of Technology, Japan; ⁵Tokyo University of Technology, Japan;
⁶Keio University, Japan; ⁷Aizu University, Japan

ABSTRACT

Past trial of direct detection of life on Mars by 1970's Viking mission reported a negative conclusion, whereas numbers of circumstances provided by recent Mars exploration missions in the last decade indicate that there are good reasons to perform another life detection program. Here we propose Life Detection Microscope that has much higher sensitivity than the instrument onboard Viking. Indeed Life Detection Microscope (LDM) that we propose here could detect less than 10^{**4} cells in 1 gram clay. Our life-detecting instrument has the sensitivity that is three orders of magnitude higher than the one onboard Viking that issued the negative conclusion. LDM is capable of identifying what we think to be the most fundamental features that a cell should possess to constitute life. Our Investigation Goals are: 1: High-resolution characterization of regolith and dust particles. 2: Search for any type of organic compounds in Mars surface samples. The compounds include cells, other biological materials, and abiotic polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). 3: Identify cell-like structure in which organic compounds are enveloped by membrane, which

may represent Martian life.

Among the planets and giant satellites in our solar system, the characteristics of Mars are most similar to those of Earth. This suggests that the life similar to terrestrial life may arise and survive on Mars.

Here we propose a new life detection project, to search for living microbes by fluorescence microscopy [1]. We propose to search for “cells” from a depth of about 5 - 10 cm below the surface, which is feasible with current technology. Microscopic observation has the potential to detect single “cells”. The subsequent analysis of amino acids will provide the information needed to define the origin of the “cell” in the following mission.

Physical and chemical limits for terrestrial life have been major foci in astrobiology [2], and are summarized in ref. [1]. Combining the environmental factors, anywhere in the Martian environment where we can find the three components, water molecules, reducing compounds and oxidative compounds could be an environment where life can be sustained for long periods of time, if other factors such as temperature, pressure, UV and other radiations permit. We will report the current status of the development of the Life Detection Microscope.

References

[1] Yamagishi, A, *et al.* (2010) *Biol. Scie. Space*, **24**, 67-82. [2] Marion, G.M. *et al.* (2003) *Astrobiol.* **3**, 785-811.

1.1. 科学的意義・価値

- 太陽系外惑星候補が3000個以上見つかった
- 恒星の2割が地球型惑星を持つ
- 第二の地球が見つかった
- 太陽系外生命探査が具体的な課題となりつつある。
- 系外惑星からサンプルを持ち帰ることはできない。
- 太陽系内での生命探査が必要
- 見つかった場合には、地球に持ち帰り、詳しく解析する事から、「地球生物学」が「一般生物学」となる。

1.2. 科学目的 背景

- 1) 火星に生命が誕生していたかも知れない(40億年前)
 - A. 火星表層にはかつて大量の水が存在
 - B. 温暖湿潤な気候がある程度長期間保たれていた
 - C. 強い磁場を保持していた
 - D. 当時の地球と極めて似ていた
- 2) 現在も微生物生存可能環境が保たれている
 - A. 液体の水が流れた後と推定される場所が複数
 - B. メタン(可能性)や酸化鉄、還元型硫黄(H_2S)などが存在
 - C. 数cm表面下であれば生命は十分生存可能
- 3) Vikingの結果の見直し
 - A. 1g土壤中に 10^7 個の細胞が検出できる程度
 - B. 地球上微生物密度の低い地域(1g土壤中に 10^4 個細胞)

1.2. 科学目的 背景

1) 火星に生命が誕生していたかも知れない(40億年前)

- 火星表層にはかつて大量の水が存在
- 温暖湿潤な気候がある程度長期間保たれていた
- 強い磁場を保持していた
- 当時の地球と極めて似ていた

40億年前の火星には海があった



40億年前の火星

火星には氷が見つまっている
左の氷の固まりが数日後にはなくなった。

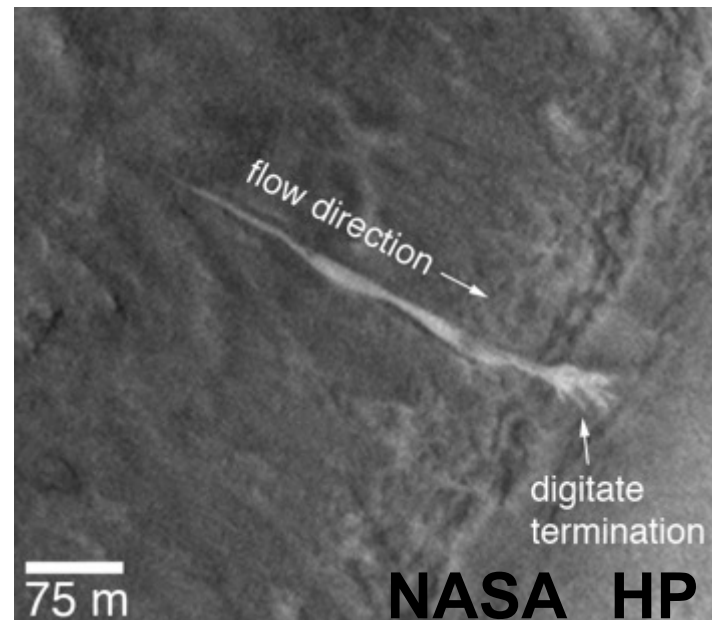
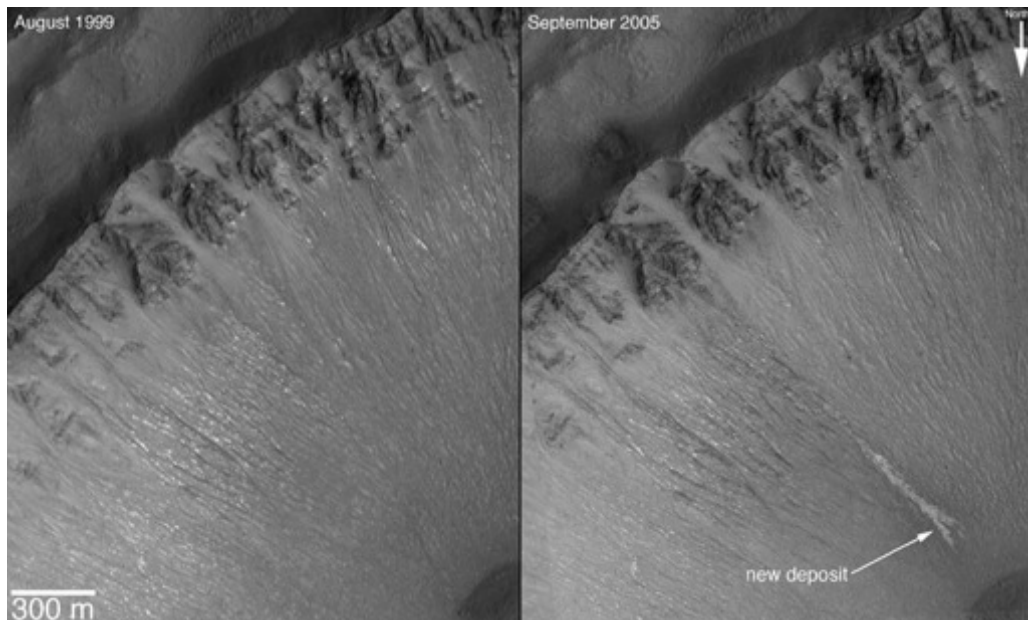


1.2. 科学目的 背景

2) 現在も微生物生存可能環境が保たれている

A. 液体の水が流れた後と推定される場所が複数

火星表面の流体？の痕跡



Miyamoto, H., et al., 2004, J. Geophys. Res. Planets 109(E6).

Miyamoto, H., et al., 2004, Geophys. Res. Lett. 31(13).

Malin, M. C. et al., 2006, Science 314, 1573.

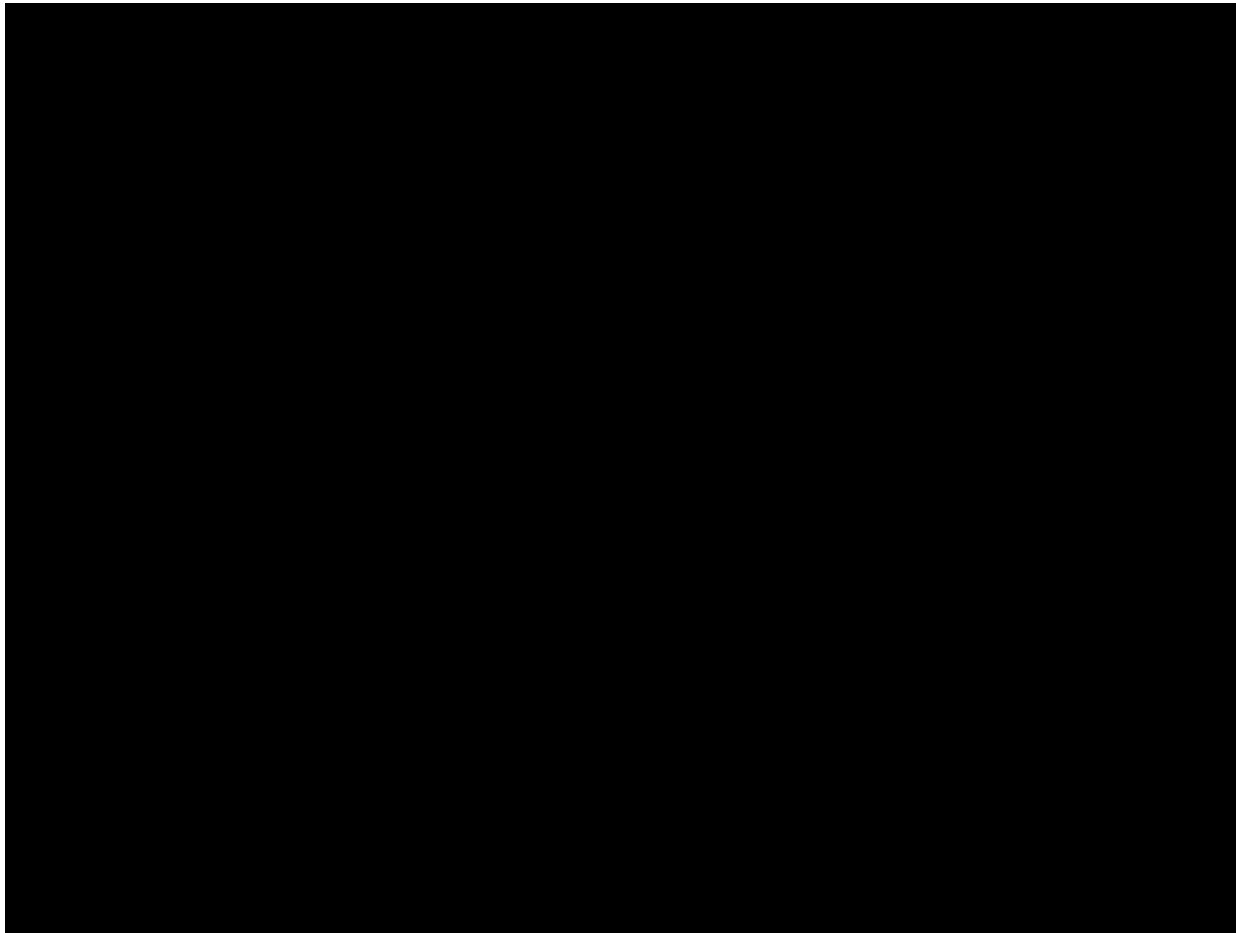
McEwen, A. S., et al., 2011, Science 333, 740.

1.2. 科学目的 背景

2) 現在も微生物生存可能環境が保たれている

A. 液体の水が流れた後と推定される場所が複数

毎年春夏に水の流れ出す場所



NASA

1.2. 科学目的 背景

- 2) 現在も微生物生存可能環境が保たれている
B. メタン(可能性)や酸化鉄、還元型硫黄(H_2S)などが存在

メタンガスの発見(Mumma et al. 2009)

MSLは未検出

ESA ExoMars 2018 Trace Gas Orbiterで観測予定

1. サイエンススコープ 1.2 科学目的・背景

火星の探査車は火星土壌を分析して、水、酸素、二酸化炭素、二酸化硫黄、硫化水素、を見つけた：最後の二つは餌になる。塩化メタンがでることを見つけた：有機物がある。

NASA火星探査車
MSL: Curiosityの結果

Ming, D. W. et al
Science 343 (2014)

1. サイエンススコープ

1.2. 科学目的 背景

2) 現在も微生物生存可能環境が保たれている

C. 数cm表面下であれば生命は十分生存可能

重力	地球の38%	○
温度	-50°C (-140~+20°C)	○
大気圧	0.0075気圧 不明(生存は大丈夫)	○
大気組成	CO ₂ 95%、N ₂ 2.7%、O ₂ 0.13%	○
ガンマ線	150mGy/年	○
紫外線	結構強い ~ 20 W m ⁻² → 地下に潜れば○	

Yamagishi et al. (2010) Biological Sciences in Space 24, 67-82

1.2. 科学目的 背景

3) Vikingの結果の見直し

A. 1g土壌中に 10^7 個の細胞が検出できる程度

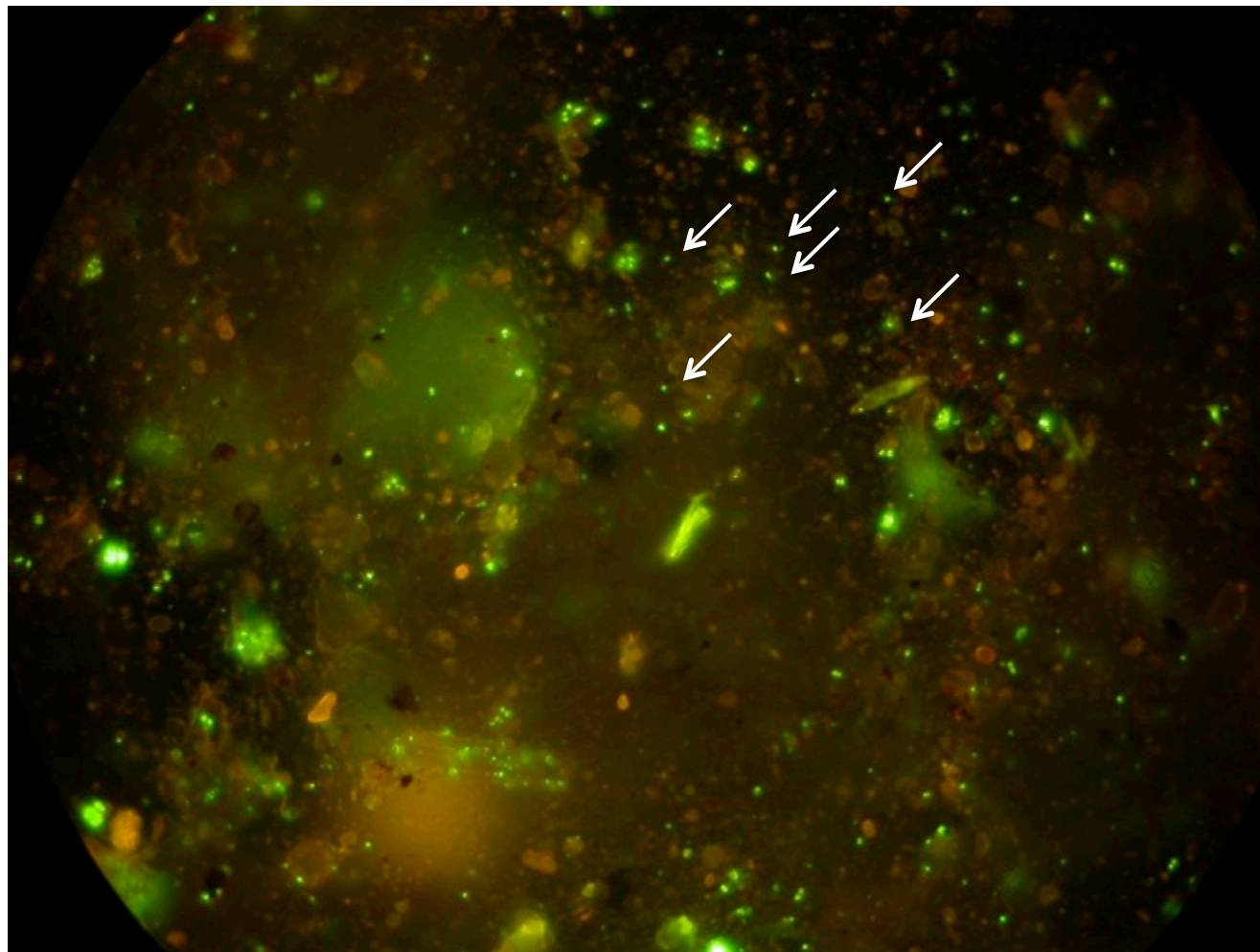
1976年バイキングの探査で
有機物は検出限界以下であった。

2000年代

バイキングの有機物の検出能力は究めて
悪いことが分かった(Glavin, D. P. et al.2001,
Earth Planet Sci. Let 185,1; Nabarro-Gonzalez,
R. et al. 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103)

3) Vikingの結果の見直し

B. 地球上微生物密度の低い地域(1g土壤中に 10^4 個細胞)



アタカマ砂漠の微生物

微生物密度
 10^4 細胞/g
SYBR Green

科学目的・背景のまとめ

2013年NASAの探査車MSL: Curiosityが
生命に必要な元素(C, H, O, N, S)発見
有機物があるかもしれないという結果を発表
還元型の物質(硫化水素、二酸化硫黄)を発見

火星の初期は地球と同じ: 生命誕生の可能性
火星表面の環境は地球生物でも生存可能
微生物の餌(硫化水素、有機物、メタン)が発見され、
あるいは存在の可能性がある。
液体の水がある
現在も微生物が生きている可能性がある

1.3. 探査原理

微生物をどう見つけるか？

1. 有機物でできている

水、初期火星環境、隕石由来有機物

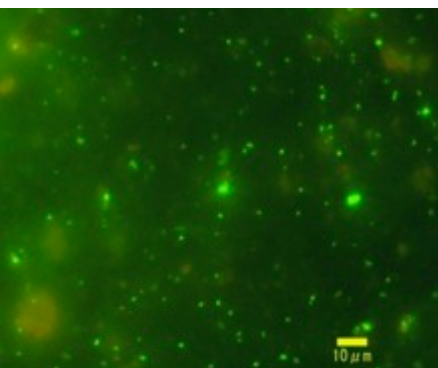
2. 膜に囲まれている

細胞膜：細胞内分子濃度を高いたもつ

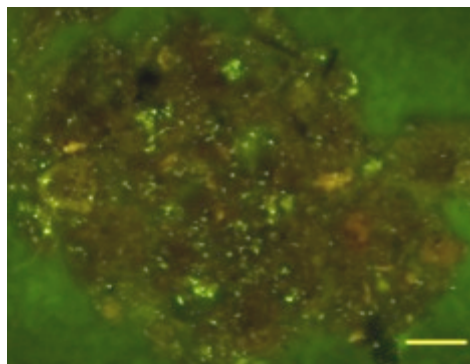


蛍光顕微鏡で検出可能な特徴

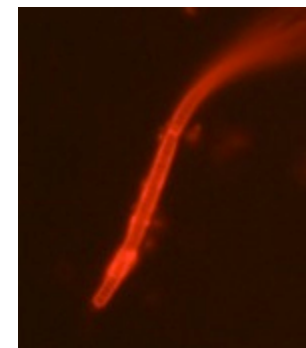
特徴	分子種	蛍光色素
遺伝情報	核酸	SYBR Green I and II, SYBR Gold, Acridine orange, DAPI, etc.
代謝	酵素反応	CFDA, CFDA-AM, SFDA, etc.
細胞膜	脂質膜	ANS, FM1-43, FM4-64, etc.
非生物的合成等	アミノ酸	Fluorescamine, etc.



Antarctic ice
stained by SYBR Gold



Alpine soil
stained by CFDA-AM

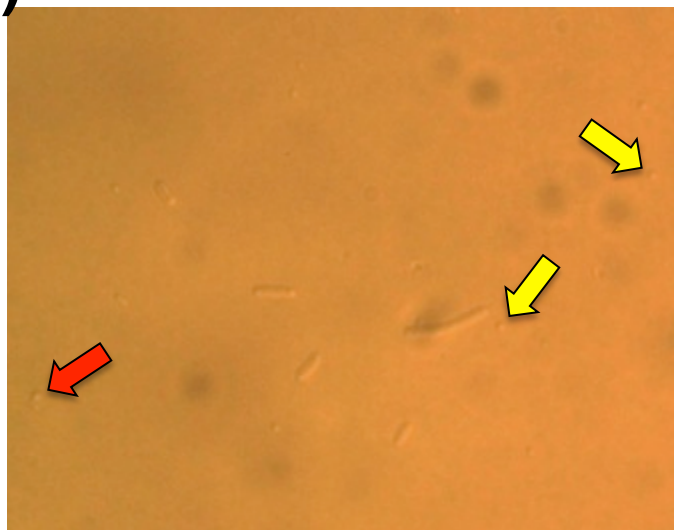


Antarctic soil stained by
FM4-64

DNAを持たない大腸菌を検出(黄色矢印)

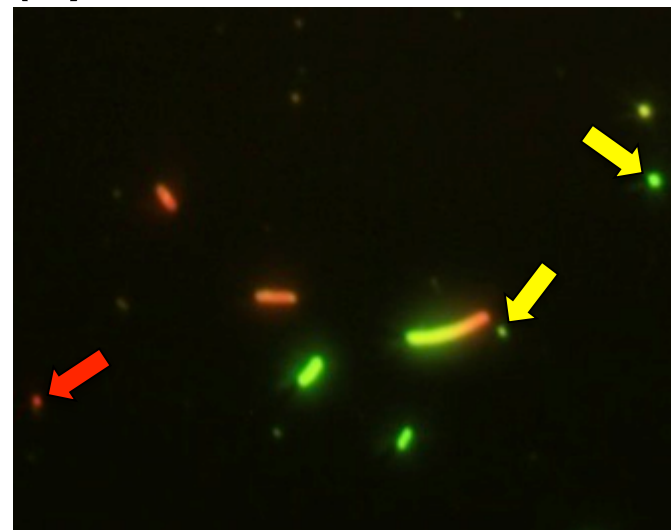
Staining of miniature *Escherichia coli* P678-54

(a)



Bright field

(b)



Fluorescent field

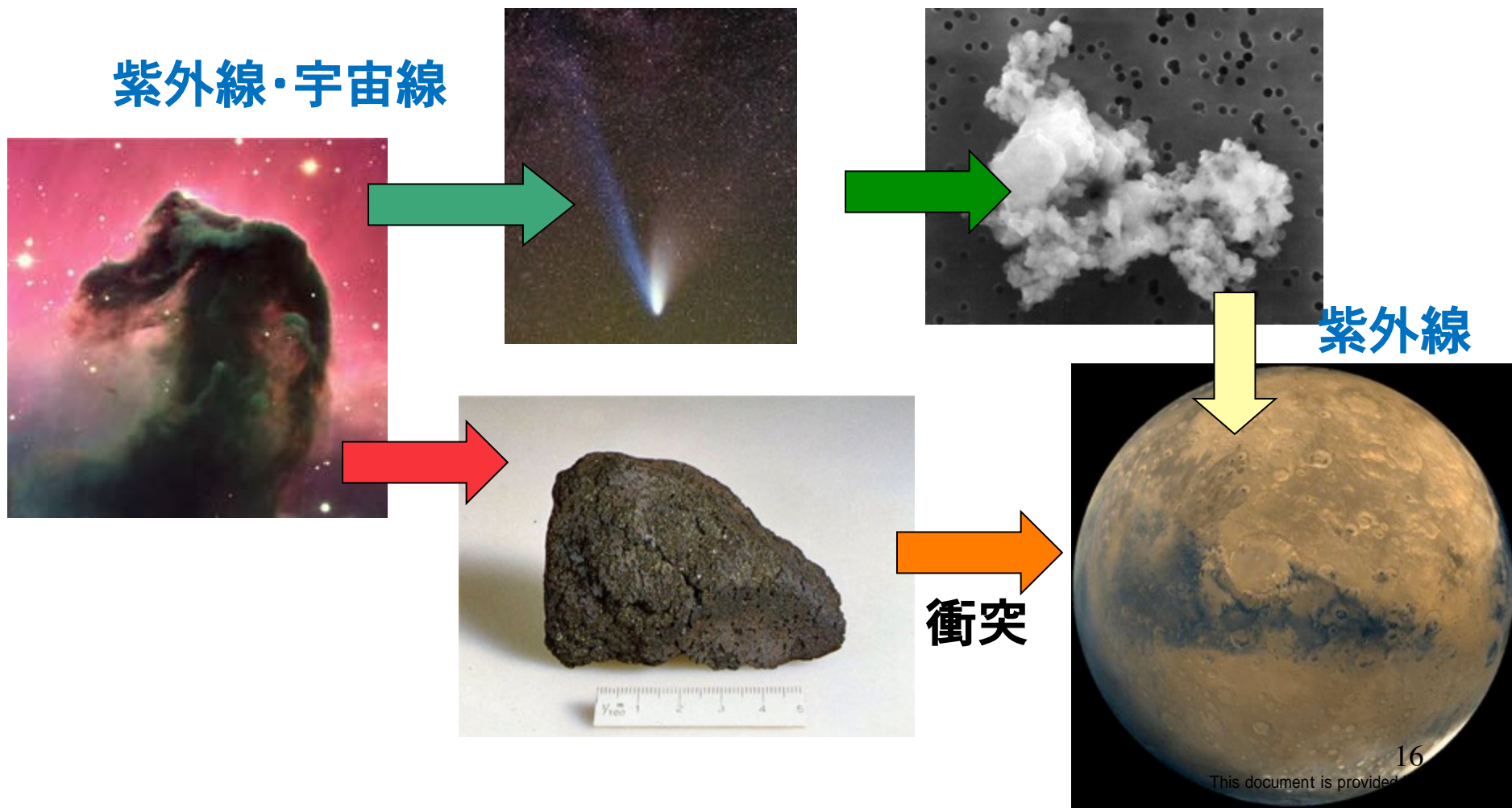
Microscopic images of P678-54. (a): bright image, (b): fluorescence image stained with LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (SYTO9 & PI)

蛍光色素で染色した、大腸菌、火星模擬土壤中、粘度中

	<i>E.coli</i>			<i>E.coli</i> without DNA			Sim.Mar.Soil	Clay	
	Live	Dead		Live	Dead		JSC MARS 1	Monmorilonite	Saponite
SYBR Green I									
SYTO9									
PI									
BacLight									
Acridine orange									
CFDA									

Possible organic compound from space.

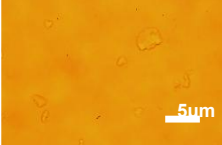
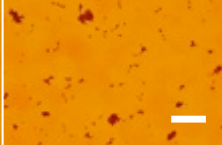
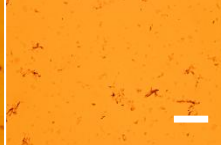
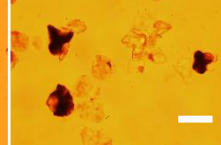
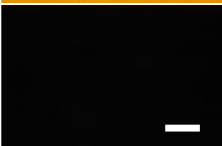

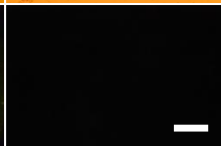
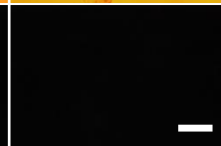
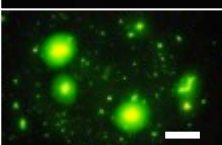
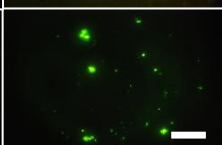
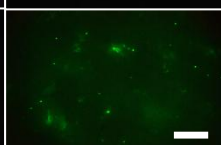
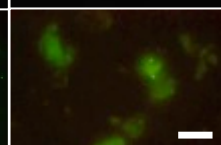
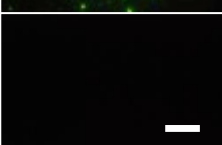
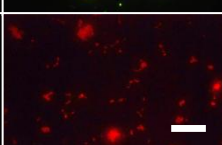
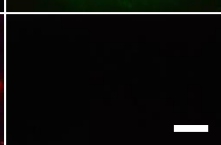
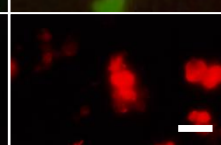

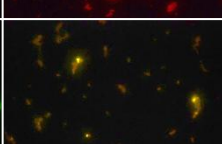
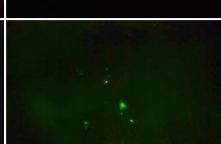
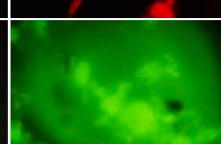
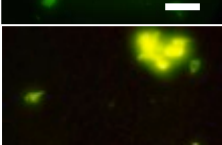
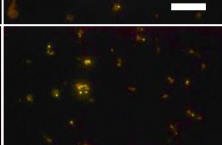

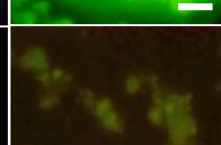
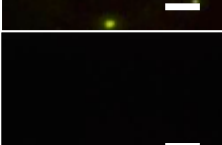
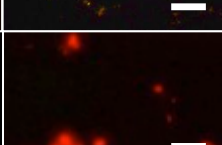

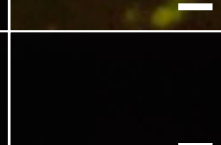
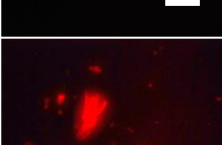
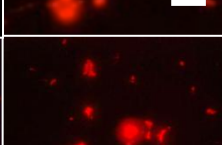
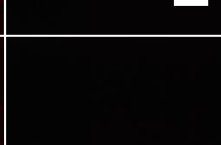
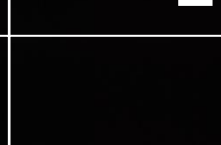
星間での有機物



1. サイエンススコープ

1.3 探査原理

蛍光色素で染色した
タンパク質の固まり
前生物的有機物
多環炭化水素
火星模擬土壌

Type	Protein	Protenoid	PAH	Sim. Mar.Soil
Samp. Pigment	BSA	Protenoid	N-(1-pyrene)	(JSC MARS-1A)
Light field				
Epifluoresc.				
SYTO9				
PI				
AO				
SYBR Green I				
LDS - 751				
SYPRO RED				

1. サイエンススコープ
1.3 探査原理



蛍光色素特性

標品	大腸菌		ミニセル		蛋白質	プロテインノイド	PAH
色素	生菌	死菌	生菌	死菌	BSA		
AO	緑	緑	緑	緑	淡赤	赤	薄緑
PI	無	赤	無		無	赤	無
SYTO 9	緑	緑	緑	緑	緑	緑	薄緑
SYBRGI	緑	緑	緑	緑	緑	無	無
LDS751	無	赤	無	赤	無	赤	無
SYPRORED	赤	赤	赤	赤	赤	赤	赤

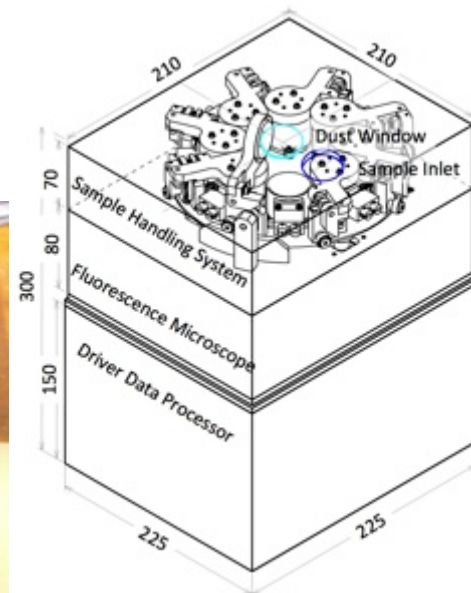
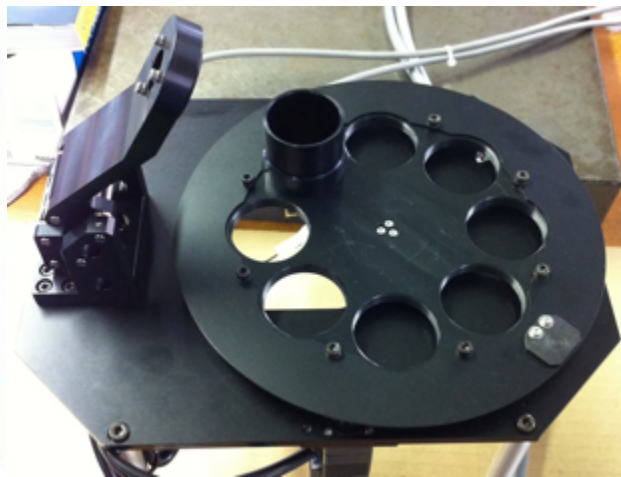
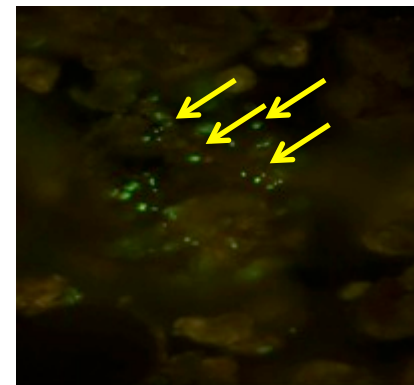
DNAをもたない細胞の**生死**を判定できる

プロテインノイド、PAH等の**有機物**を検出できる。

1.3 探査原理： 蛍光顕微鏡

- 蛍光顕微鏡で微生物を検出する。
- バイキングの感度より1000倍感度が高い(10^4 個/g土壌)
- 地球と異なる微生物も検出できる。

緑に光っているのは模擬火星土壌中の細胞。



成果の波及効果

- 見つかった場合：初の地球外生命の発見
- 見つかった場合：地球以外の生物が生物学の研究対象となることにより「地球生物学」が「一般生物学」となる。
- 見つかった場合には、次の探査で、地球生物との関係（探査機からの混入、地球からの移動、火星での誕生）を区別することが可能。
（アミノ酸分析、アミノ酸DL分析、遺伝子解析）
- 最も生命がいそうな場所で見つからなかった場合：細胞存在密度上限が分かる。

ミッション目標、測定要求

ミッション目標

- 鉱物微粒子(レゴリス、ダスト)を観察する
- 有機物を検出する。
- 膜に囲まれた有機物(細胞候補)を識別する

測定要求

- 1 μ m/ピクセルの解像度を持つ
 - (ExoMars ラマン顕微鏡の10倍以上高い解像度)
- 10⁴細胞/g土壌の検出感度を持つ
(Vikingの100-1000倍高い感度)
- 有機物感度10⁻⁷～10⁻⁸ (NASA2020STD:<10⁻⁵ w/w)

他機器との比較

- Mars2020: SHERLOC
- Scanning Habitable Environments with Raman & Luminescence for Organics and Chemicals, a spectrometer that will provide fine-scale imaging and uses an ultraviolet (UV) laser to determine fine-scale mineralogy and detect organic compounds. SHERLOC will be the first UV Raman spectrometer to fly to the surface of Mars and will provide complementary measurements with other instruments in the payload. The principal investigator is Luther Beegle, JPL.

多分画像解像度1/10以下

- ExoMars mission (ESA/Roscosmos) will comprise a Raman spectrometer: 画像解像度1/10

測器機能・性能要求

土壌を入口から受け取り、自動的に染色液を添加し、z方向複数枚、X(Y)方向複数枚の撮像を行う。解像度は1 μ m/ピクセル。複数個のシャーレを持つ。画像解析して、画像を一次的に保存、地球に転送する。

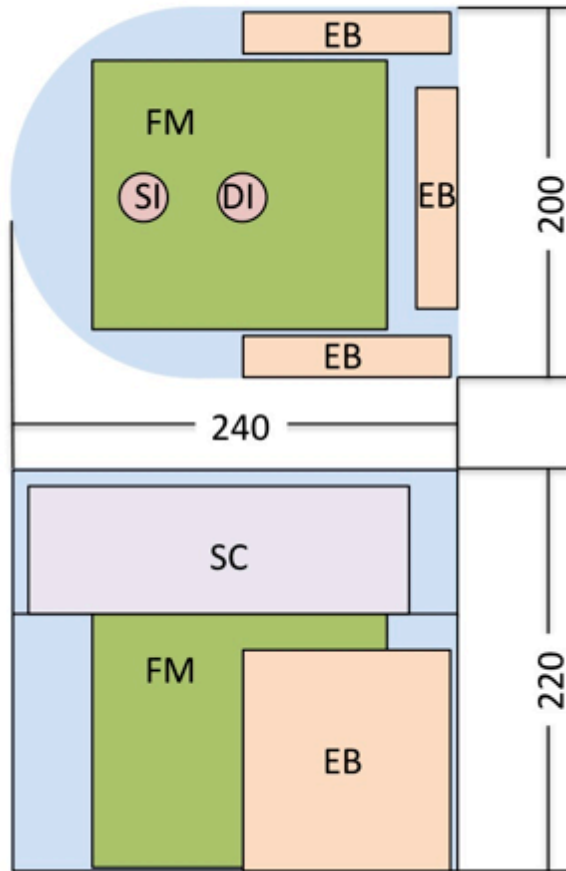
装置諸元

質量	9 kg (ローバーと兼用の画像解析、装置制御部を含む)
外形	200 x 240 x 220 (h) mm (全体の形状は変更可能)
最大電力	47 W(ローバーと兼用の画像解析、装置制御部を含む)
動作温度	-20 $^{\circ}$ C~20 $^{\circ}$ C (色素温度であり、IFでの温度要求は緩和される見込み)
保存温度	-40 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C (色素液は50 $^{\circ}$ Cで25火星日耐性)
撮像時間	200分/サンプル、運用期間中に8サンプル(シャーレ個数に規定される)
画像保存	45 MB
地球転送	200kB/サンプル

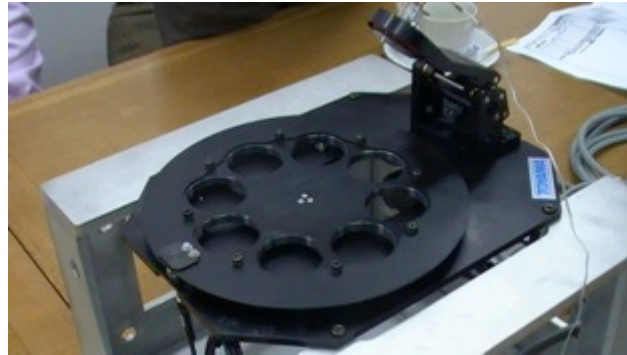
装置外觀

FM: Fluorescence
Microscope
EB: Electric circuit Board
SC: Sample Chamber
SI: Sample Inlet
DI: Dust Inlet

Top view (SC not shown) size in mm



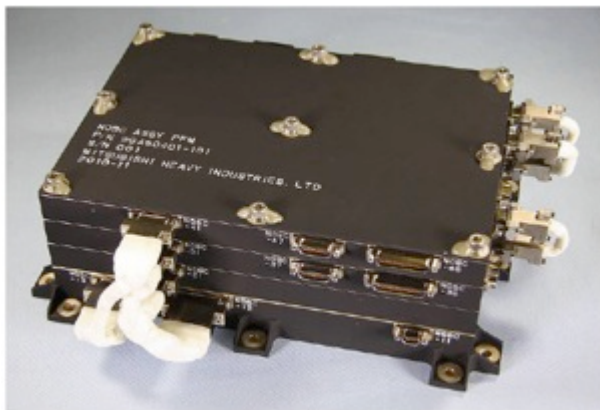
Side view



CCDは宇宙対応のCMOS 検出器であるCypress 社STAR1000 SP を採用する。

	Si CCD	STAR1000 SP
有効画素数 (実画素数)	1024 x 1024 (1040 x 1040)	1024 x 1024
画素ピッチ	17 μm	15 μm
感度特性	別図	別図
Full well	1,000,000 e ⁻	135,000 e ⁻
ADC	14 bits (IR-AE)	10 bits (on chip)
宇宙実績	あかつき、ひさき	宇宙対応部品
入手性	容易 (ISASにあり)	容易 (評価機あり)
長所	国内衛星実績	オンチップADC搭載で、 軽量化が可能
短所	担当メーカー(想定)の対 応が困難	オンチップAD深度が10 ビット(許容可能)

SDS-4のOBC構成から

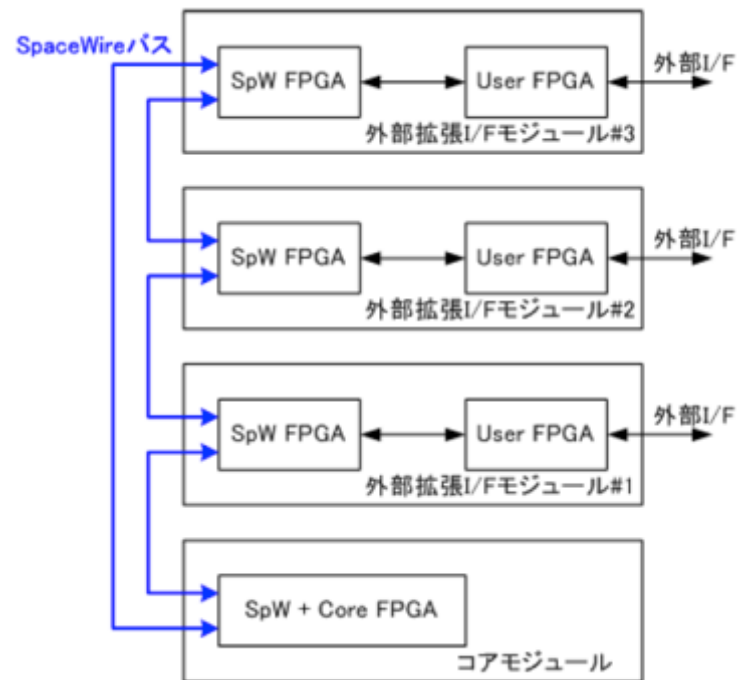


外部拡張I/Fボード(最大4枚上限)
SpWFPGA + UserFPGA

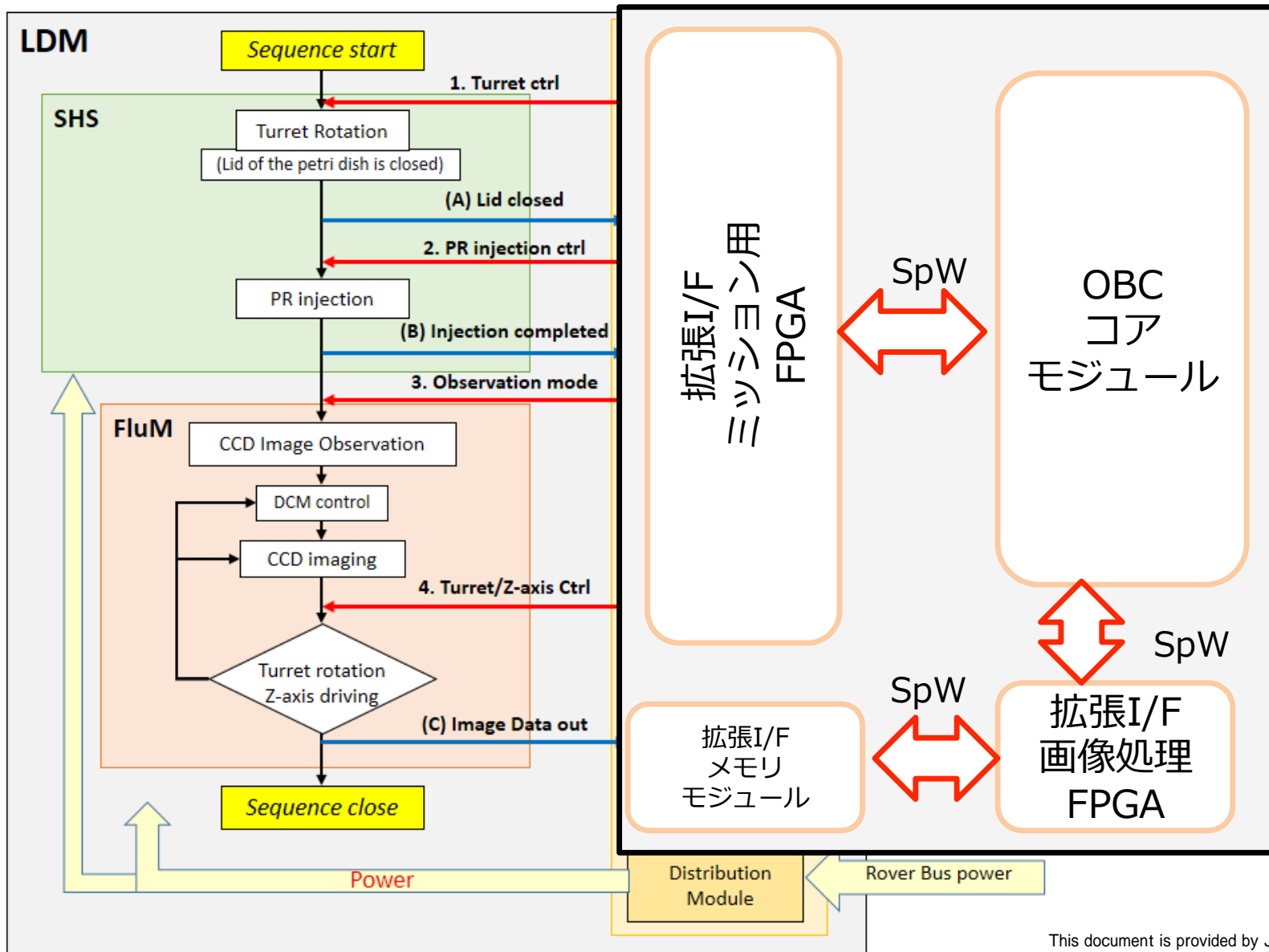
コアモジュール
SOI-SoC2 (100MPIS)

電源モジュール
安定化電源+3.3V, +5, +/-15Vを生成

- 基本方針:
 - 外部拡張I/Fモジュールを活用する。
 - ミッションは外部I/FモジュールのFPGAにより、シーケンシャルな制御(Event Driven的)にする方が良さそうだ。



LDM用のシステムブロック図

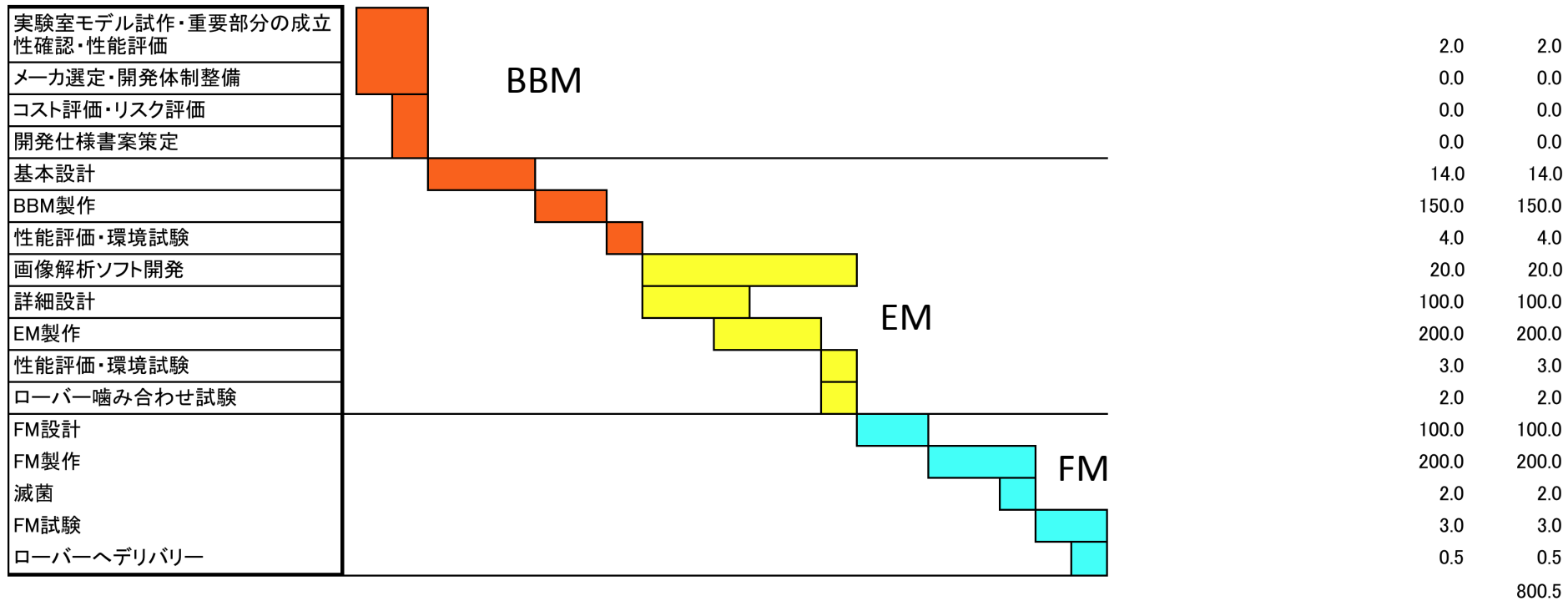
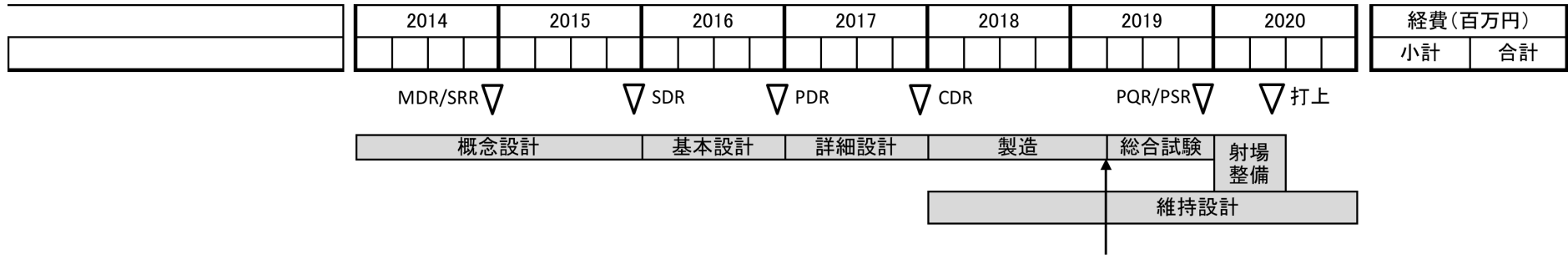


ローバOBC仕様要求一覧

- OBC: SDS-4のOBCをベースとする.

項目	要求仕様
CPU	10 0MIPS
メモリ	RAM 32MByte, FlashROM <u>2GByte</u>
通信I/F	RS422, SpW
拡張モジュール1	ミッションモジュール
拡張モジュール2	画像処理モジュール
拡張モジュール3	メモリモジュール
温度	動作温度：-10～+50℃（現状0～50℃）
電源電圧	TBD (PDMより安定バス電圧を供給か)
サイズ	TBD

スケジュール:BBM,EM,FM



計画のリスクの識別と回避方策

- 光源(LD)の温度耐性不足: -40°C のLD採用
- 色素使用温度低温限界: $-20^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 実現(火星大気圧で)
- 色素PPP: フィルターろ過
- 色素耐酸化耐性: 対処済み
- 顕微鏡駆動部振動耐性: 現状のボールネジス
テップモーター駆動をピエゾモーター駆動へ変更
- 対物レンズ温度耐性: ガラス対物レンズで -40°C
まで対応見込み
- DDP: 設計方針の明確化が緊急課題

開発体制

	統括	色素選定	顕微鏡	撮像	サンプル処理装置	画像処理
山岸明彦 (東京薬大)	○					
吉村義隆 (玉川大学)		○				
本多 元 (長岡技大)		○				
宮川厚夫 (東京薬大)			○	○		
今井栄一 (長岡技大)			○		○	
佐藤毅彦 (ISAS)			○	○	○	○
佐々木聡 (東京工科大)					○	
出村裕英 (会津大)						○
塩谷圭吾 (ISAS)			○	○	○	○
石上玄也 (慶応大)			○	○	○	

山岸明彦(東京薬科大学生命科学部)
 佐藤毅彦(ISAS/JAXA)
 宮川厚夫(東京薬科大学生命科学部)
 佐々木聡(東京工科大学応用生物学)
 今井栄一(長岡科学技術大学生物系)
 本多 元(長岡科学技術大学生物系)
 吉村義隆(玉川大学農学部)
 出村裕英(会津大学)

ISS実験PI、PPP: 微生物専門家
 あかつき
 民間顕微鏡会社開発
 工学部、PPP:微生物専門家
 ISS実験装置開発
 有機物顕微鏡実験
 微生物顕微鏡実験、PPP微生物専門家
 情報処理

サイエンス・チーム

惑星科学	佐々木晶	大阪大学
惑星科学	宮本英昭	東京大学
惑星科学	臼井寛裕	東京工業大学
微生物学	吉村義隆	玉川大学
微生物学	長沼毅	広島大学
有機物分析	三田肇	福岡工大
有機物分析	小林憲正	横浜国大
有機物分析	豊田岐聡	大阪大学

惑星検疫

惑星検疫	藤田和久	JAXA
惑星検疫	小澤宇志	JAXA

学会・コミュニティ・世界の支持

- 日本惑星科学会「月惑星探査の来る10年」
 - 「火星生命探査」「トロヤ群小惑星探査」「月面年代学探査」
- 日本地球惑星科学連合 ロードマップ2015
 - 宇宙惑星科学:太陽系探査(内惑星探査)
 - 地球生命科学:はやぶさ2, たんぽぽ計画, MELOS, JUICE, 土星衛星SR
- 国際宇宙探査ロードマップ2013年8月火星有人探査を最終目標
主な探査目的・目標:生命の探査
 - 過去または現在における生命の存在の証拠を発見する。
 - 過去または現在において太陽系天体に生命が存在できた、または存在できる可能性を探る
- 日本学術会議マスタープラン2014
宇宙探査ミッションを支える宇宙技術実証プログラム
 - H27-H35火星探査技術実証
 - H28-H36月面長期探査技術実証
 - H27-H48木星トロヤ群小惑星探査技術実証
 - H33-H55土星衛星エンセラダス探査技術実証

終わり