

宇宙空間における細胞性粘菌の分化 (SPORE)

代表研究者： 大西武雄*¹

共同研究者： 岡市協生*²、松本英樹*³

*1 奈良県立医科大学、*2 長崎大学 医学部、*3 福井医科大学

Two strains of the slime mold *Dictyostelium discoideum*, a wild-type strain (NC4) and a radiation-sensitive mutant (γ s13), were used to investigate the effects of cosmic radiation and/or microgravity through the whole life span on cell morphology and cell differentiation. Dry spores of NC4 and γ s13 were placed in a slime mold cell culture kit with *Escherichia coli* cells. On the seventh day after launch, the growth condition of the amoebae that developed from the spores was checked and feeding was not detected. Therefore I investigated the growth condition of one control kit in the Biorack at KSC, and no growth of amoeba from the spores was evident. Since I could not complete the experiment, the experiment was terminated and the kit moved to a refrigerator. After this, I changed the purpose of the experiment to measure the effects of cosmic radiation on germination, cell growth and mutation frequency of the spores. All the spores of space sample and the controls of NC4 germinated, and the amoebae grew after the treatment. In γ s13, only the spores in one of the control samples germinated. We could not detect germination of spores in the space sample even after the germination treatment. There was no difference in the growth rate of amoebae between the space and control NC4 samples. The shapes of fruiting bodies formed by the amoebae were examined using spores sent into space or left on Earth as controls. There was no difference in abnormality of fruiting bodies between the space and the control NC4 samples. In addition, there was no difference between the mutation rate for the space sample and that of the control in NC4. From these results, it is suggested that cosmic environment may induce the depression of germination in γ s13 spores, but not in NC4 spores. In NC4, however, the cosmic environment is no effect on germination, cell growth, morphology and mutation frequency as compared as the ground control.

実験の目的、意義

宇宙空間での生命活動が現実化しつつある現在、宇宙空間で地上と同じような生命活動が営めるかどうかは、重要な問題である。例えば、受精から胎児の発生や成長の過程で、1個の受精卵から全身を構成するそれぞれの細胞への分化に、宇宙空間の微小重力や宇宙放射線が影響をもたらすのであろうか。この問題に対する基礎研究として、細胞性粘菌を用いてIML-2での実験を行った。

実験の方法と試料

細胞性粘菌

細胞性粘菌は動物にも植物にも分類されている下等有核生物である。増殖時は大腸菌を

餌とし、光合成を行わず、アメーバの状態であり、あたかも動物のようである。しかし、餌を食べ尽くすと、それらアメーバは集合することにより、単細胞から多細胞の時代へと変身し、いくつものステージを経て最後には子実体となる。子実体の先には孢子嚢があり、その中に孢子が詰まっている。このように次の世代へは孢子で子孫を残すのはあたかも植物そのものである。したがって単細胞と多細胞また動物と植物といった進化から見ても極めて特徴のある生物であるといえる。しかもその染色体は4本であり、 n の核相で生活できるので、さらにDNA損傷を修復できない放射線感受性株も樹立されており、放射線生物学の面からも極めて興味の大い生物でもある。今回用いた細胞性粘菌は放射線感受性株(γ s13)とその野生株(NC4)の2種である。 γ s13のアメーバは、野生株NC4のアメーバに比べると、放射線に約100倍も感受性である。この孢子と乾燥した大腸菌をスペースシャトルで宇宙に持っていき、宇宙空間でリン酸バッファーを加えることにより孢子を発芽させ、増殖と分化のようすを観察する。

宇宙実験装置

実験装置は非常にコンパクトなものに、また、リン酸バッファーを加える操作もできるだけ搭乗員の作業時間の少ないものにした。図1は粘菌培養容器である。Aは上から見た図で、Bは横から見た図である。またCはリン酸バッファー液用注射筒である。まず、丸く切ったフィルター(a)をセットする。このフィルターに大腸菌が乾燥状態で付いている。上下に二箇所ある長方形の(b)部分にNC4と γ s13の孢子を染み込ませたパッドをセットする。プラスチックの枠(c)で上から押さえて、蓋をしてビスで留める。(d)部分には注射針が取り付けられていて、リン酸バッファー液用注射筒に突き刺してリン酸バッファーを注入する。(e)部分は注入時の空気抜き用の穴である。

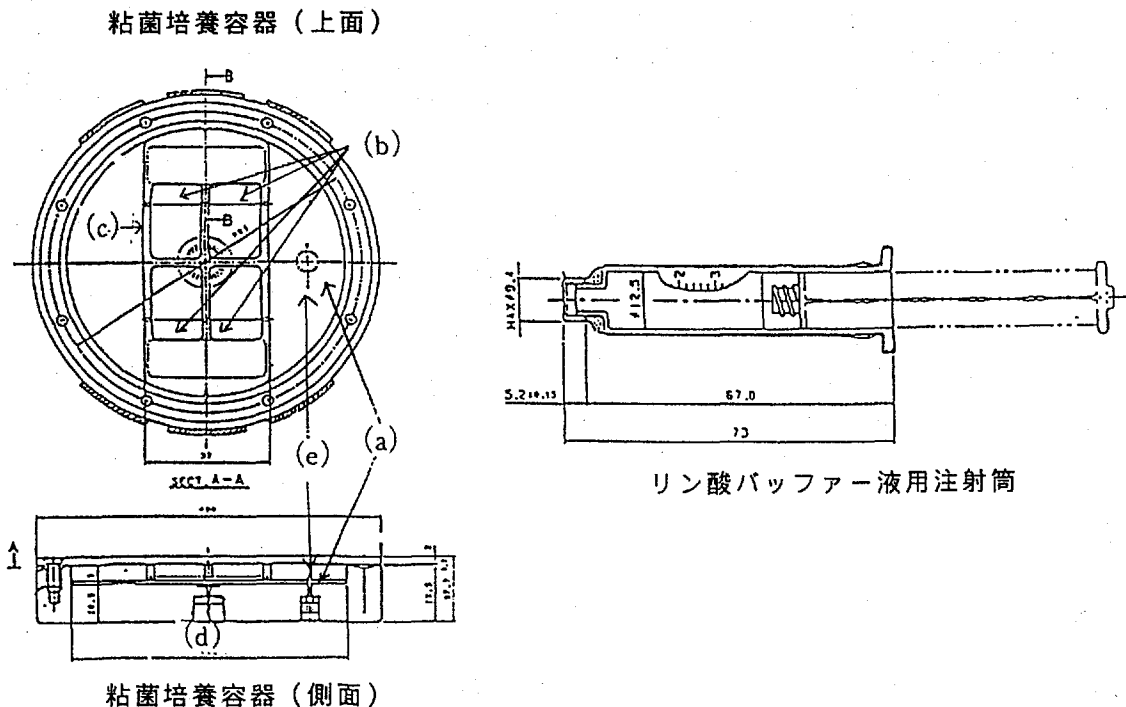


図1 細胞培養キット(細胞性粘菌培養用)

日本における予備実験

粘菌培養容器で最も効率良く実験できる系の確立。

- 1) リン酸バッファー液の液量
培養容器が曇らないための最小のリン酸バッファー液の液量は、2.5 mlであった。
- 2) 大腸菌の濃度
胞子が発芽して出てくるアメーバが一週間以内で、大腸菌を広い領域まで食べ、最大の子実体を作るのは、大腸菌が 5×10^{10} の濃度のときであった。
- 3) 胞子の保存温度
胞子は、31 °Cで36時間まで保存しても正常に発芽した。

ハンガーLにおける予備実験(1994年4月25日から5月13日まで)

日本から空輸した細胞性粘菌の胞子と大腸菌を用いて実験を行った。

実験

- 1) 細胞性粘菌の胞子と大腸菌はコンタミもなく生きた状態で輸送されていた。
- 2) 野生株(NC4)と放射線感受性株(γ s13)の紫外線に対する生存率曲線をかいて株のチェックを行い、それぞれが正しい株であることを確認した。
- 3) それぞれの株で子実体を形成させ、正常な子実体を形成し、胞子ができることを確認した。しかし、室温が高いために(25 °C以上になる)子実体の形成はあまり良くはなかった。また、紫外線を照射したときに γ s13 で高率にダブルフルーツの奇形子実体が形成されることを確認した。(100 J/m²の紫外線で半数以上がダブルフルーツになった。)これも、室温が高いために成功率が低かった。(初めの1回はうまくいったが、後の2回は成功しなかった。)
- 4) ハンガーLで作った胞子と大腸菌を粘菌培養容器にセットし実験を行ったが、日本での予備実験のようによく成育せず、日本での半分以下(NC4で3 mm、 γ s13で6 mm)で子実体もNC4は多数見られたものの、 γ s13では3個という結果であった。

問題点

- 1) 室温が25 °C前後で、クリーンベンチ内は室温より2 °C程高く、時には28 °Cにも達し、22 ~ 23 °Cに最適温度を持つ細胞性粘菌には高温過ぎた。この為、クリーンベンチ内での作業により細胞性粘菌が死滅していたようである。特に、子実体を作るための操作は、非常に困難であった。
- 2) 細胞性粘菌を培養するインキュベーターの精度が悪く、10分程の間に上下1 °C程変

動を繰り返していた。この為、培養シャーレの蓋が曇り、胞子作製等に支障をきたした。

対策

- 1) 室温が高い点に関しては、操作を水中で行った。また、本番では低温室にグローブボックスを置いて、その中で操作ができるように手配した。
- 2) インキュベーターについても、本番ではより精度の高いものを使用できるよう手配した。

飛行実験の結果

サンプルの準備(1994年6月14日からシャトルの打上げまで)

1) 大腸菌サンプルの作製

大腸菌サンプルの作製は、小型の液体振盪培養器で行った。この培養器は、一度に1リッターの培養しかできず、また、あまり強く振盪すると培養器内の液が飛沫となって培養容器にかかるため低い振盪数(250 rpm)でしか振盪できなかった。この為、本番用の大腸菌は、日本から輸送したものを使用することにした。

2) 胞子サンプルの作製

使用した細胞性粘菌は、前回のハンガーLでの予備実験で使った NC4 と γ s13、今回新たに日本から輸送してきた NC4 と γ s13 である。

細胞性粘菌をエバラのインキュベーターで培養した。アメーバの増殖速度は NC4 と γ s13 共に十分速いものであった(2倍になるのに NC4 で約4時間、 γ s13 で約6時間)。

紫外線による生存曲線を調べたところ、NC4 では正常な生存曲線が得られたが、 γ s13 では室温が高い為か、紫外線を照射したものからは生き残ったアメーバが得られなかった。室温で 28 °C、インキュベーター内では 30 °C を越す場合もあった。実際の操作中には細胞性粘菌は 35 °C を越える温度にさらされることになると思われる。

そこで、35 °C での温度感受性を調べた。 γ s13 のアメーバでは5分間の 35 °C 処理ですでに7割以下になり15分間処理では半数以下になっていた。NC4 のアメーバでは10分間の処理までは耐えるがそれ以上の熱処理により失活してゆく。一方、胞子では NC4 と γ s13 共に、25分間の熱処理に耐えた。子実体は、低温室に入れたグローブボックス中でアメーバをフィルターに広げ、その後 22 °C のインキュベーターに移し、2日間培養して作製した。アメーバに紫外線を照射して、奇形の子実体ができるかどうかを調べたところ、今回日本から輸送してきた γ s13 の奇形子実体の形成率が低かったが、他の株では期待通りの奇形形成率が得られた。

子実体から胞子を回収した。胞子を 4 °C で保存して何日間胞子の活性が持続できるかを調べた。胞子をリン酸バッファーに懸濁して N プレートに大腸菌と共に広げて発芽率を調べたところ、 γ s13 では、3日目にすでに 10^{-4} 以下になっていた。NC4 では1週間の間高い発芽率を示した。胞子をリン酸バッファーに懸濁して大腸菌と共にそのまま 22 °C で振盪培養した場合は、 γ s13 では5日間 4 °C で保存していたのものからはアメーバが生えてきたが、それ以上保存したものからはアメーバが出現しなかった。一方、NC4 では、9日間 4 °C で保存してあったものでもアメーバが生えてきた。

NC4の胞子は実験に使用できることが分かったので、今回日本より輸送してきた株より得た胞子サンプルをターンオーバーの当日に作製し使用することにした。

一方、ハンガーLで作った γ s13の胞子の4°Cでの保存がきかないため、日本から別に輸送した胞子を用いて宇宙実験を行うことにした。この γ s13は、日本で紫外線による生存率と奇形子実体の形成率を調べ、確かに γ s13であることを確認してあった。

粘菌培養容器のセット

スペースシャトルが打上げられる前に、細胞性粘菌の胞子(NC4と γ s13)と大腸菌を粘菌培養容器1個にセットし、リン酸バッファの入った注射筒を2本用意してNASDAに引き渡した。これらのセットはスペースシャトルに搭載され、1994年7月8日12時43分(米国東部夏時間)に打上げられた。

地上の対照実験用には、打上げ用のサンプル(A)と同時にセットした粘菌培養容器1個(B)と遅延用にセットした粘菌培養容器2個(C, D)の合計3個を用いることにした。

宇宙空間での実験

MET Day 02 / 13時45分に、宇宙空間でリン酸バッファが注入され22~23°Cで培養を始めた。地上では2時間遅れてリン酸バッファを注入しバイオラックに入れ22~23°Cで培養した。MET Day 07 / 13時38分に宇宙で観察したところ増殖がまったく行われていなかった。地上の対照実験でも増殖が認められなかった。MET Day 09に増殖と分化の様子をカムコーダで記録する予定であったが、予定を取り止め、MET Day 08 / 12時54分で冷蔵庫に移した。2時間後に、地上でもサンプルを冷蔵庫に移した。

ハンガーLでの帰還後実験(シャトルが帰還した1994年7月23日から8月4日まで)

- 1) 宇宙に上がった粘菌培養容器1個(A)と、地上で対照実験を行った粘菌培養容器3個(B, C, D)のそれぞれから、NC4と γ s13を別々に、胞子が付いているフィルター部分を切り取り、パッドと一緒に培養用のチューブに移し、リン酸バッファと大腸菌を加えて、22°Cで振盪培養した。結果は図2に示した。NC4では、宇宙に上がって帰ってきたサンプルと地上対照実験のサンプルすべてからアメーバが出現した(図2A)。一方、 γ s13では地上対照実験用サンプルの3個の内の1個(γ s13 D)からだけアメーバが出現した(図3A)。
- 2) NC4のサンプルで発芽しアメーバが出現したものでも、まだ胞子が残っていたので、発芽処理により残りの胞子からアメーバを出現させた。発芽処理は、胞子を0.4%のBrijに懸濁し、水中で5分処理した後、遠心により2回リン酸バッファで洗い、45°Cで30分間熱処理して行った。結果は図2Bおよび図3Bに示した。NC4では、宇宙に上がって帰ってきたサンプルと地上対照実験のサンプルすべてからアメーバが出現した(図2B)。一方、 γ s13では地上対照実験用サンプルの3個の内の1個(γ s13 D)からだけアメーバが出現した(図3B)。この結果は、発芽処理していない胞子からのアメーバの出現と一致する。

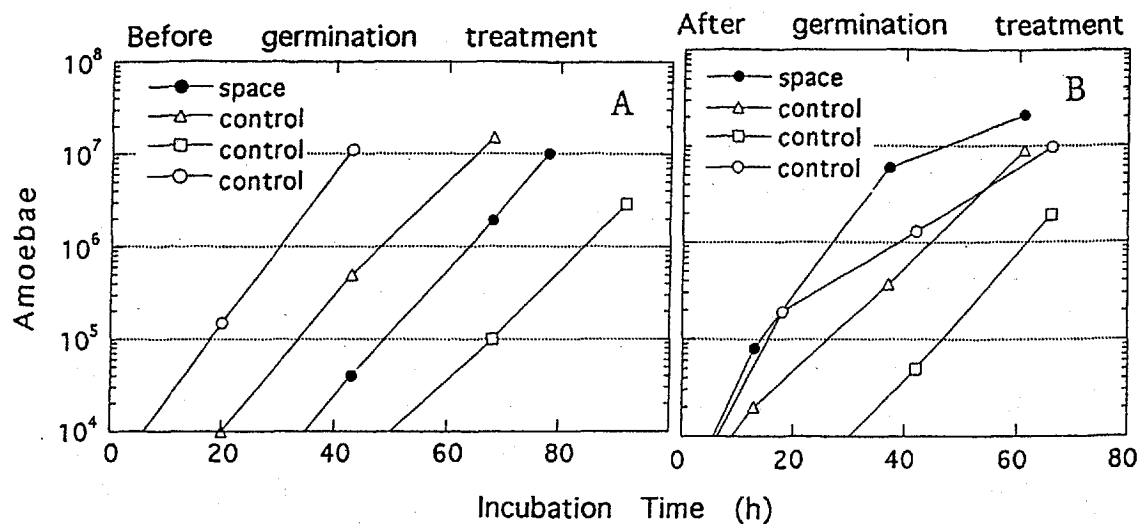


図 2 NC4 アメーバ増殖

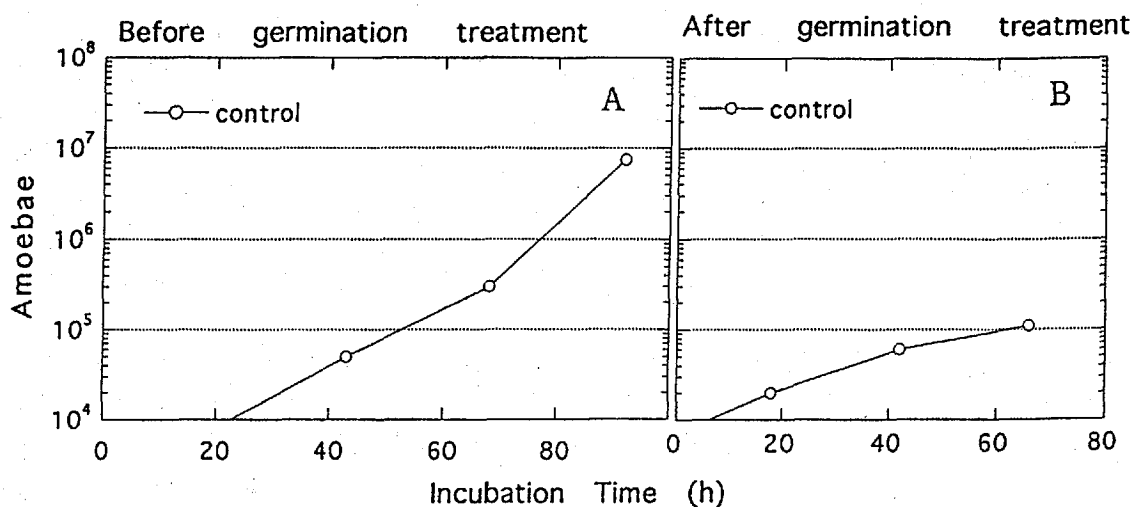


図 3 γ 13 アメーバ増殖

- 3) 出現した NC4 のアメーバの内、宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験の NC4 B, NC4 C, NC4 D を一つにまとめた NC4 GT のふたつに分けて、アメーバのままプレート培地を広げて日本へ輸送した。gamma13 D も同様にして日本へ輸送した。

解析と考察

日本での帰還後実験

1) アメーバの増殖

宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験を一つにまとめた NC4 GT、それに γ s13 D の増殖の様子を調べた(図4)。宇宙にあがったサンプルの NC4 A と、地上対照実験の NC4 GT とでは増殖速度に差はなかった。また、 γ s13 D は確かに γ s13 株で、NC4 が混入したものではなかった。

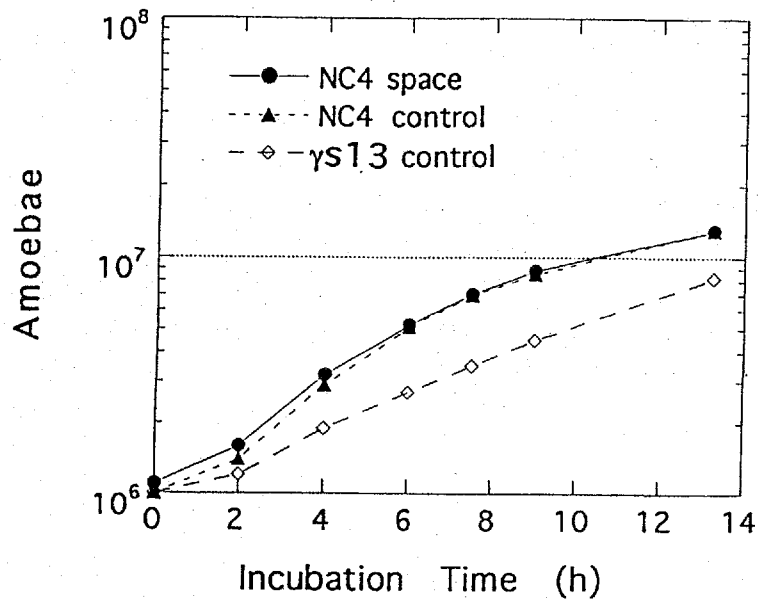


図4 アメーバ増殖速度

2) 子実体の形成

宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験を一つにまとめた NC4 GT、それに γ s13 D の子実体の形成を調べた。宇宙にあがった NC4 A に特に変異は認められず、地上対照実験の NC4 GT とのあいだに差はなかった。 γ s13 D にも特に変異は認められなかった。

3) 突然変異率の測定

宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験を一つにまとめた NC4 GT、それに γ s13 D の突然変異率を調べた(表1)。突然変異率は3%のメタノールを含むN培地に 10^7 以上のアメーバと大腸菌を広げて、1週間以内に生えてきたメタノール耐性の突然変異体の数を調べるにより得た。NC4 A は 1.3×10^{-6} 、NC4 GT は 1.5×10^{-6} で宇宙に上がったサンプルと、地上対照実験のサンプルの間で特に差は認められなかった。なお、 γ s13 D の突然変異率は、 6.8×10^{-7} であった。

表 1 突然変異誘発率

Strains	Samples	Mutation rate
NC4	Control	1.5×10^{-6}
	Space	1.3×10^{-6}
ys13	Control	6.8×10^{-7}
	Space	—

4) 宇宙放射線被曝線量の測定

宇宙放射線は X 線のような低 LET(線エネルギー付与)放射線、中性子や重粒子線のような高 LET 放射線からなっている。今回の宇宙実験では放射線感受性の ys13 を搭載することによって、野生型の NC4 に比して生物影響がおりやすい場合には、宇宙環境の微小重力の影響と考えるよりも、宇宙放射線の影響と考えればよいという想定のもとにおこなった。そこで宇宙放射線を測定するために細胞性粘菌の培養キットに放射線測定用フィルムを密着させた。したがって、バイオリックおよび冷蔵庫内での総被曝線量を求めたことになる。測定は 2 枚のフィルムによって行った。それらの測定結果は吸収線量で 1.08 mGy と 1.55 mGy、線量当量で 1.38 mSv と 2.31 mSv であった。

結論

今回は、残念ながら宇宙空間での細胞性粘菌の分化を観察することはできなかったが、宇宙空間に上がった胞子から発芽したアメーバの増殖、子実体形成、突然変異率の測定を行うことができた。その結果は、野生型 NC4 については地上対照群のものと差はなかった。つまり、今回のスペースシャトルでの飛行で、細胞性粘菌に遺伝的な変異を起こしたという証拠は見られなかった。しかし放射線感受性株である ys13 については、宇宙飛行した胞子からアメーバが発芽しなかった。それは宇宙放射線あるいは微小重力それともそれらの相互作用によるかもしれないが、KSCハンガー L の地上サンプルのうち発芽しなかったものもあったので、必ずしも宇宙環境によるとは言い難い。もし、次にチャンスがあるならばもう一度同じ実験を宇宙で行い、宇宙での細胞性粘菌の分化を調べたい。

なぜ本番の実験で細胞性粘菌が増殖しなかったのか。

考えられる可能性を以下に列挙した。

- 1) 使用した培養容器が、本番が初めての使用であった為、洗浄不十分等の理由で細胞性粘菌に有毒なものを含んでいた。
- 2) ハンガー L で用いたリン酸バッファの水が細胞性粘菌に適した良い水でなかった。(ミリ Q の水を使用したか、ときどきミリ Q の調子が良くないときがあった。)

参考文献

- 1) Okaichi, K., Kajitani, N., Nakajima, K., Nozu, K. and Ohnishi, T. DNA damage and its repair in *Dictyostelium discoideum* irradiated by a health lamp light (UV-B). *Photochem. Photobiol.* **50**, 69-74 (1989).
- 2) Ohnishi, T. Possible induction of abnormal differentiation in *Dictyostelium discoideum* by cosmic radiation and low gravity. *J. Space Tech. Sci.* **4**, 29-34 (1988).
- 3) Ohnishi, T. and Deering R. A. Mechanism of strand breakage of DNA in UV-irradiated *Dictyostelium discoideum*. *Coun. Sci. Res. Integr.* **7**, 15-18 (1988).
- 4) Ohnishi, T., Hazama, M. and Nozu, K. Abnormal differentiation in *Dictyostelium discoideum* by furofuramide, mitomycin C and methylmethanesulfonate. *Jpn. J. Genet.* **62**, 265-269 (1987).
- 5) Tano, K., Ohnishi, T., Sato, S. and Nozu, K. Characteristics of DNA repair of a UV-sensitive mutant (*radC*) of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 385-389 (1985).
- 6) Ohnishi, T., Hazama, M., Okaichi, K. and Nozu, K. Formation of non-viable spore of *Dictyostelium discoideum* by UV-irradiation and caffeine. *Photochem. Photobiol.* **36**, 355-358 (1982).
- 7) Ohnishi, T., Eimoto, H. and Okaichi, K. Enhancement of ultraviolet or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sensitivity of *Dictyostelium discoideum* by 3-aminobenzamide. *Photochem. Photobiol.* **35**, 515-519 (1982).
- 8) Nozu, K., Ohnishi, T. and Okaichi, K. Pyrimidine dimer formation and germination of UV-irradiated spores of *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **35**, 587-589 (1982).
- 9) Ohnishi, T., Okaichi, K., Ohashi, Y. and Nozu, K. Effects of caffeine on DNA repair of UV-irradiated *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **33**, 79-83 (1981).
- 10) Nozu, K., Ohnishi, T. and Okaichi, K. Viability of the spores formed after UV-irradiation in *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **32**, 261-263 (1980).
- 11) Murata, Y. and Ohnishi, T. *Dictyostelium discoideum* fruiting bodies observed by scanning electron microscopy. *J. Bacteriol.* **141**, 956-958 (1980).
- 12) Ohnishi, T. and Nozu, K. Ultraviolet effects on killing, fruiting body formation and the spore of *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **29**, 615-617 (1979).

外部発表

出版物

- 1) 岡市協生, 大西武雄. 宇宙空間における細胞性粘菌の分化. *宇宙生物科学*. **8**, 4-11 (1994).
- 2) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の細胞分化の研究. *宇宙生物科学*. **4**, 16-21 (1990).
- 3) 大西武雄. 細胞性粘菌の宇宙生物学への利用 —分化異常を指標として—. *放射線生物研究*. **24**, 97-104 (1989).
- 4) Ohnishi, T. Possible induction of abnormal differentiation in *Dictyostelium discoideum* by cosmic radiation and low gravity. *J. Space Tech. Sci.* **4**, 29-34 (1988).

学会発表

- 1) 大西武雄. 宇宙空間における遺伝子の発現(細胞性粘菌及びラットの癌抑制遺伝子). 第17回宇宙ステーション利用計画ワークショップ, 東京(1995).
- 2) 大西武雄. 第2回国際微小重力実験室(IML-2)の概要 宇宙空間における細胞性粘菌の分化. 日本宇宙生物科学会第8回大会, 奈良(1994). S-4.
- 3) 岡市協生, 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の発生・分化. 京大・原子炉シンポジウム(1994).
- 4) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の分化. 宇宙基地利用シンポジウム, 京都(1994).
- 5) 大西武雄. 無重力状態での細胞性粘菌の分化. 宇宙生物学シンポジウム, 京都(1994).
- 6) 岡市協生, 大西武雄. 紫外線照射した細胞性粘菌の加重力環境での分化. 日本放射線影響学会第36回大会, 広島(1993).
- 7) 岡市協生, 井原 誠, 大西武雄. 紫外線照射した細胞性粘菌の加重力環境での分化. 日本宇宙生物科学会第7回大会, 東京(1993). 10.
- 8) 岡市協生; 森 俊雄, 大西武雄. 細胞性粘菌放射線感受性株の修復特性. 日本放射線影響学会第35回大会, 大津(1992). 2-A-11.
- 9) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の分化・増殖の研究. 第7回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1990). 224-226.
- 10) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の分化. 琵琶湖シンポジウム(1990).
- 11) 大西武雄, 岡市協生. 宇宙放射線による細胞性粘菌の分化異常. 第5回宇宙利用シンポジウム, 東京(1988).
- 12) 大西武雄. 細胞性粘菌の放射線による分化異常. 京大・原子炉シンポジウム(1985).