

## 研究課題名：成層圏における微生物捕獲実験 Biopause IV

大野宗祐、石橋高、三宅範宗、奥平修、前田恵介、河口優子、山田学、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、山岸明彦(東薬大)、飯嶋一征、梯友哉、山田和彦、野中聡、福家英之、吉田哲也(JAXA)、瀬川高弘(山梨大)、高橋裕介(北大)

### 1. 研究の背景

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、特に成層圏に微生物が存在していることがわかってきている。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、もしくは数ミクロン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ミクロン以上の粒子は、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事が出来るのは短時間に限られてしまう。数ミクロン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。

## 2. 本研究の目的

そこで本研究(Biopause プロジェクト)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する。また、採取した試料を、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調査する。平成 28 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。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。平成 29 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。平成 30 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。

上記を踏まえ、本年度の実験では、平成 30 年度実験で達成を目指した科学目標の達成を再度目指した。具体的には、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との

比較、3) 第 1 回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の 4 点を目標とした。気球

本講演では、本年度の実験試料の分析結果の現状について報告する。

## 3. 観測の具体的な方法

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。

#### 4. 2016 年度大気球実験

平成 28 年度実験では、大樹実験場にて最終組み立てと配線、パッキング、感度試験を行い、実験装置一式を搭載した大気球は6月8日早朝に大樹航空宇宙実験場から放球された。気球に搭載された実験装置は高度 28km まで上昇し、気球を切り離し、その後パラシュートによる降下中に試料採取を行った。試料採取部の入口・出口のゲートバルブは予定通り動作し、高度 27km から高度 13km までの成層圏微生物試料採取に成功した。実験装置一式は回収船によって回収され、密閉されたまま大樹航空宇宙実験場へと輸送された。

平成 28 年度実験において、搭載した試料採取部は、試料採取用(S1)とコントロール用(S2)の2組であるが、回収後、S2 内部への浸水を確認した。塩分計で確認したところ海水であった。S2 は保温・温調を行わなかったため、上空で容器内圧が低下し、着水後にゲートバルブOリング部分から浸水したと考えられる。一方、保温・温調を行った S1 への浸水は確認されなかったため、成層圏で採取された試料は無事であった。

試料採取部は、大樹航空宇宙実験場格納庫内の専用作業スペース内部に設置されたクリーンベンチにて分解され、蛍光顕微鏡観察用試料は蛍光色素を添加した後カバーガラスを用い密閉した。また、SEM 観察用試料は、クリーンベンチ内にて表面を金蒸着し、密閉容器に保存した。試料は千葉工大惑星探査研究センターに持ち帰り、それぞれ蛍光顕微鏡と SEM を用い観察した。

蛍光顕微鏡で観察した結果、放球前にゴンドラ側面に塗布した蛍光ビーズは全く確認されなかった。これは、ゴンドラに付着した地上微生物のコンタミがなかったことを示す。また、合計で 21 個の微生物を検出した。これは、標準大気(1気圧 15°C)換算で  $7 \times 10^1$  個/m<sup>3</sup> の微生物数密度に相当する。この微生物数密度は、難培養性微生物を含めた成層圏微生物数密度の上限値である。なぜなら、コントロール試料が失われてし

まったので平成 28 年度実験採取された試料が全て成層圏由来であると断定することは不可能であるが、コンタミの比率によらず、成層圏微生物数密度が上記の数密度を超えることはないためである。

一方、SEM観察の結果、エアロゾルをインパクター式採取装置で採取した場合に特有の「サテライト構造」を持つ微粒子を多数発見した。加速されインパクター板に衝突した柔らかい微粒子(硫酸エアロゾル等)以外はサテライト構造を持たないので、この構造は成層圏で確かに微粒子を捕集できた証拠である。現在までに採取板のごく一部しか観察できていないが、46 個のサテライト構造を持つ粒子を発見した。

また、制御部のログの解析を行った。試料採取部や制御部内等の温度履歴から、ヒーター能力と保温剤が十分であり、想定していた通りの温調が行われていたことを確認した。また、圧力計の履歴から、試料採取部の入口・出口ゲートバルブの動力用ガスタンクやガス配管に漏れが無かったことを確認した。

平成 28 年度実験の成果をまとめると、以下の 2 点である。

- 1) 培養できないものも含めた成層圏微生物数密度の上限値を世界で初めて観測することに成功。
- 2) 新規開発した降下式インパクター型試料採取装置で、成層圏微粒子の採取・分析に成功。

#### 5. 2017 年度大気球実験

平成 28 年度の第 1 回実験の成果を踏まえ、平成 29 年度の JAXA 共同利用実験として、第 2 回の大気球実験を行った。第 2 回目の気球実験は、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第 1 回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の 4 点を目標とし、平成 29 年 6 月に JAXA 大樹航空宇宙実験場にて実施した。

第 1 回実験と同様に、実験装置は高度 28km まで上昇し、気球を切り離した後パラシュートによる降下中

に試料採取を行った。予定通り高度 27km から高度 13km までの成層圏微生物試料採取が行われたことを、実験装置に搭載した採取部モニタリングカメラにて確認した。太平洋への着水後、実験装置一式を回収船により回収し、装置外壁の海水の洗浄後、千葉工大へと輸送した。しかし、成層圏微生物試料を取り出すため、密閉されたまま輸送された試料採取部を千葉工大にて分解したところ、採取部内部へ浸水していることが判った。蛍光顕微鏡観察、SEM 観察とも第 1 回実験と同様の手法にて、千葉工大惑星探査研究センターにて行った。蛍光顕微鏡観察では微生物、SEM 観察では成層圏エアロゾルの検出を目指したが、見つけることは出来なかった。これは、浸水時に採取板に水がかかったため、付着していた微生物や成層圏エアロゾルが洗い流されてしまった為であると考えられる。

## 6. 2018 年度実験

第 2 回の気球実験となる平成 29 年度の実験は、試料採取部への浸水のため、成果を上げることが出来なかった。平成 30 年度実験では、浸水の対策を完全に行った上で、第 2 回実験の科学目標を再度目指した。低温低圧実時間試験や感度試験等の必要な試験を全て行い、採取装置、生物分析の準備、実験体制を全実験グループの中で最初に全て整え、大樹航空宇宙実験場にて気象条件等が整うまで待機したものの、平成 30 年度は大気球実験が可能な条件が整わず、実験実施は見送りとなった。

## 7. 2019 年度実験

2019 年度第 3 回目実験では、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第 1 回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の 4 点を目標として、TARF にて大気球実験を行った。

上記の実験目標 4 項目が達成されれば、生物圏界

面 biopause の決定の為に最も重要な成層圏微生物の高度分布情報を得ることができ、また、成層圏微生物の先行研究との比較を行うため必要な培養法との定量的な比較が可能となる。単独でも重要な成果であるが、プロジェクト目的達成の為に不可欠なステップとなる。

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。水中投下試験等を行ったうえで浸水対策を立て実施した為、2017 年に発生した採取部内部への浸水は全く発生せず、採取試料は無事回収され、現在千葉工大の実験室にて分析を継続中である。

## 8. 2021 年度実験の目的と準備状況

それを踏まえ、プロジェクトの第 4 回目の気球実験となる 2021 年度の実験では、確実に biopause を観測することを目指す。次回実験では、同時同地点異高度における微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測を成層圏だけでなく上部対流圏まで網羅して行う。それにより、1フライトで biopause よりも上の高度での微生物数密度と下の高度での微生物数密度を両方観測し、その時期その地点で明確に biopause の位置を観測的に決定する。また、biopause 直下の微生物の種類と物理状態を観測することで、biopause がその高度に存在する理由の理解に繋げることを目指す。