

## 成層圏における微生物生態調査

大野宗祐、石橋高、三宅範宗、小林正規、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、山岸明彦、仁田原翔太、河口優子(東葉大)、瀬川高広、近藤伸二(極地研)、山田和彦、野中聡(JAXA)、石川裕子(日本全薬工業)、所源亮、山内一也(アリジェン製薬)

### 1. 研究の背景

1936年から1976年にかけて、大気球あるいはロケットを用いたサンプリングが行われ、そこから菌の単離が行われた。こうした、初期の研究から11-12 kmの高度において $0.14 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 、10-30 kmにおいて $0.8-0.4 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ (CFUは菌数の意味・実体積)の菌の存在が報告されている。単離された菌の種類としては *Bacillus* sp.、*Micrococcus*、*Alternaria*、*Micobacterium* などが報告されている (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を行い、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った。その結果、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が2株得られた (Yang et al. 2008b, 2009b, 2010)。

以上のように、中層大気、特に成層圏において微生物が存在していることがわかってきた。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、前述の山岸グループの実験例などでは採取した微生物をまず培養するという分析手順を採用していたため、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

そこで本研究では、中層大気中の微生物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、蛍光顕微鏡による観察、シングルセル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26年度は、先行研究で用いられたフィルター式よりも採取効率の高いインパクト式の微生物採取装置を新たに試作し、落下時に試料採取の実証試験を行う。また、蛍光顕微鏡、シングルセルDNA分析、培養の3種類の分析手法を確立する。

平成27年度は、平成26年度に行った実証試験の結果を踏まえ、制作したインパクト式高感度試料採取装置を用い微生物を採取・分析する。平成27年度の実験では、1)成層圏浮遊微生物の物理状態(単独か凝集体か塵に付着か)の観察、2)難培養性の成層圏浮遊微生物の同定と全遺伝子配列の解読、3)成層圏微生物の寿命推定、4)成層圏浮遊微生物の高度分布観測、の4つの成果を上げることを目標とする。中層大気中の微生物の形態と高度分布を実際に観測することで、

先行研究では全く手つかずであった微生物の対流圏から中層大気への輸送メカニズムや中層大気中での滞留時間と寿命に関する制約を与えたい。

### 3. 観測の具体的な方法

インパクト型高効率試料採集装置は、密閉用ゲートバルブと中空のI字管、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。インパクト型微粒子採取法は、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。インパクト式を採用することにより、既存のフィルター型採集装置の24時間分を落下距離わずか1kmで採取できる(大きさ10cm角)。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、 $\gamma$ 線滅菌が可能で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。バルブ制御は自動で行い、タイミングはあらかじめ地上で設定し動作させる。試料採取板とI字管はアルミを用い、風洞実験の結果を受けて形状の最適化を行って製作する。

### 4. インパクト式微生物採集装置に関する準備状況

インパクト式の微生物採取装置は現在詳細設計を行っている。インパクト型高効率試料採集装置は、中空のI字管とその両端に取り付けた密閉用バルブ、内部に取り付けた試料採取板からなる。I字管・バルブ・試料採取板の一組で約20kg程度の重量であり、5組から10組程度を並列にゴンドラに搭載する予定である。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浮遊微生物を試料採取板に衝突させ、捕獲する。成層圏で気球が落下している途中でバルブを開けて試料を採取し、対流圏に突入する前に再びバルブを密閉し、回収する。

唯一の上空で動作をさせる部品である密閉用バルブは、 $\gamma$ 線滅菌が可能で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。バルブ制御は自動で行い、タイミングはあらかじめ地上で設定し動作させる。先行研究で用いられたフィルター式微生物採集装置と同じフジテクノロジー社製の製

品を用いるため、成層圏の環境に対する耐性や着水時の衝撃に帯する耐性などに関しては実証済みであり、問題は無い。今年度中にゲートバルブを購入し、衝撃試験や低温低圧環境での動作試験・密閉試験を行う。

採取効率に関してもインパクト式の微粒子採取装置に問題はない。地上での大気中浮遊微生物の捕集に一般的に用いられており、微生物サイズでも捕集効率は非常に高い(例えば柴田科学製、空中浮遊菌サンプラーMBS-1000D型、直径0.8 $\mu$ mの微粒子の捕集効率99%以上)。インパクト式の微粒子採取では、大気の密度が小さく対象微粒子のサイズが大きいほど捕集効率は高くなるため、成層圏で微生物もしくはその凝集体などを捕集することに問題はない。気球による成層圏エアロゾルの捕集実験の先行研究でも、実際にインパクト式の微粒子採取装置で成層圏エアロゾルを捕集し成功している(Okada et al., 1997)。また、捕集効率も求められており、成層圏で微生物以上のサイズであれば捕集効率はほぼ100%である(Okada et al., 1997)。

インパクト板表面には粘着性のある塗布剤を塗ることにより、採取と分析の効率と信頼性を向上させることが可能となる。塗布剤は比較的低温でも粘性を保ち生物分析を妨げない物質として、グリセロールと水の混合物もしくはtweenを候補として検討中である。

試料採取板とI字管はアルミを用い、風洞実験の結果を受けて形状の最適化を行って製作する。風洞実験はJAXA相模原キャンパスの惑星環境風洞を用い今年度中に行う。図1に風洞実験用モデルの概略図を示す。フライトモデルとほぼ同じスケールの中空管中にノズルとインパクト板を取り付け、惑星環境風道内に設置し大気の流れ方を調べる。特に性能に大きな影響を与えるノズル部開口径とノズル⇄インパクト板間距離をパラメータとして変化させて、最も流量が大きく、かつ浮遊粒子のインパクト板への衝突効率が高い条件を決定する。

## 5. 採取試料の分析方法(各手法の準備状況と昨年行った蛍光顕微鏡分析予備実験の結果)

### 5-1 蛍光顕微鏡

環境微生物解析の先行研究(土壌、水)から、培養可能な微生物の100倍から1000倍の微生物が環境中に存在すると言われている。以前のJAXA大気球を用いた微生物採取実験では採取した全ての試料について培養を試みたが、今回は蛍光色素で染色し、採取された微生物

物の数と形態を蛍光顕微鏡で観察する。また、生きている細胞のみならず死んだ細胞も違う色で染色することが出来る蛍光色素(Live-Dead)を用い、培養法では検出できない死んだ細胞の数も観測することが出来る。生きている細胞と死んだ細胞の数の高度分布を観測することが出来れば、成層圏浮遊微生物の寿命や動態について非常に重要な情報となる。

気球で採取された試料の蛍光顕微鏡での観察に関して予備実験を行った。予備実験の目的は、1) 浮遊微生物・塵試料の数、サイズ、状態(凝集体など)についての蛍光顕微鏡を用いた分析手法の確立、2) 確立した手法と以前の気球実験で山岸グループで行った培養法との微生物検出感度の比較、の2項目である。

予備実験では市販の地上用のダイアフラムポンプを用い、直径 25mm のフィルターを通し地上の大気を 180 リットル吸引し、その中に含まれている浮遊微生物と塵を漉しとった。フィルターはポリカーボネートとセルロースの二種類を用い、それぞれ試料採取を行った。漉し取ったフィルターは 4 個に切り分け、一部は蛍光色素 SYBR Green I で染色後蛍光顕微鏡で観察した。また、一部はフィルターごと寒天培地上に置いて培養し、1 週間後の株数をカウントした。

1) の蛍光顕微鏡を用いた分析手法の確立については、単独で浮遊している微生物、複数で凝集体を形成している微生物、浮遊している岩石の塵、の3種類それぞれの観察に成功した。用いた蛍光色素 SYBR Green I では、蛍光顕微鏡に NIBA フィルターセット(励起フィルタ 470nm-490nm、観測波長帯 510-550nm)を使用し、DNA があれば蛍光を発する。今回、単独で浮遊していた微生物の撮像に成功した(図2)。また、撮像された形態から凝集体か否かの判別も可能である。今回の予備実験で採取できた凝集体の画像を図3に示す。2 個の微生物が付着している様子が観察できる。一方、蛍光は岩石からも発光される(図4a)ため注意が必要である。ただし、岩石の蛍光の場合には NIBA 以外の蛍光顕微鏡フィルターセット(例えば WIG、WU)でも発生する蛍光が観測される(図4b、4c)のに対し、微生物の DNA では NIBA フィルターセットを使用した場合のみ蛍光を観測することが出来るため、複数のフィルターで観察する事により区別できる。また、蛍光の強さや形態も微生物と塵で違うため区別できる。今回の予備実験で撮像したものでは無いが、岩石の塵が多く存在する中に微生物が混在している場合でも蛍光顕微鏡観察により検出できる(図5)。

2) の蛍光顕微鏡法と培養法との微生物検出感度の比較は、蛍光顕微鏡で観測できた微生物の数と、同時に採取したものを培養して得られた微生物の株数の比較から求めることが出来る。今回の実験条件では、蛍光顕微鏡での観察では直径 25mm のフィルターの 1/4 の部分中に数十個程度の微生物が観測された。一方、同じものを気球実験の先行研究と同じ条件で培養した場合に形成されたコロニーの数は 4~8 株であった。つまり、今回行う蛍光顕微鏡による観察手法では、先行研究の培養法と比べ1桁程度の感度向上が期待できることがわかった。

今後今年度中に、1) 違う種類の蛍光色素の使用試験、2) インパクター塗布剤と蛍光染色との干渉についての試験、3) 蛍光顕微鏡観察に適した洗浄・滅菌手順の検討・試験を行う予定である。

## 5-2 非培養 DNA 分析

数密度や形状については、蛍光顕微鏡を用いることで、培養が難しいものも含めほぼ全ての微生物を検出することが可能である。ところが、蛍光顕微鏡観察のみでは、見つかった微生物がどのような種類の物であるか特定することは非常に難しい。そこで本研究では、採取した試料の中に含まれる DNA の配列を直接読み取ることにより、培養できない成層圏浮遊微生物の種類を特定し、検出された微生物の特性を推定することが可能である。

この分析はわずかな混入によっても分析の信頼性が妨げられてしまうため、国立極地研究所の氷床コア内微生物分析を行う実験施設を使用し、クリーンな環境での微量分析を行う。今後今年度中に、1) インパクター塗布剤と分析で用いる試薬との干渉についての試験、2) 非培養 DNA 分析に適した洗浄・滅菌手順の検討・試験、3) 既知の微生物試料を用いた分析手順確立・検出感度推定の為の予備実験を行う予定である。

## 5-3 培養法

本研究では、蛍光顕微鏡による観察・非培養 DNA 分析だけでなく、培養法も併せて行う予定である。培養法は、先行研究で多く行われているため、本研究で得られた結果を先行研究と比較する際に非常に重要である。また、採取した微生物試料の環境耐性など詳細な性質を理解するためには、可能なら培養して増やした上で実験を行うことが望ましい。

培養に関しては、基本的には千葉工業大学惑星探査研究センターで行う。数年前に三陸で行った気球による

微生物採取実験の際にも培養を行って成功しており、手法は確立していて技術的な問題点は非常に少ない。唯一試験が必要な点は、インパクト塗布剤と微生物事象や培養で用いる培地との干渉である。今年度中に、いくつかの塗布剤候補について、培地との干渉について試験を行う。

## 参考文献

- 石橋高, 亀田真吾, 荒井朋子, 和田浩二, 小林正規, 並木則行, 千秋博紀, 大野宗祐, 長勇一郎, 杉田精司, 松井孝典, 月・惑星着陸探査用元素分析装置:レーザ誘起絶縁破壊分光装置 (LIBS), 日本惑星科学会誌遊星人 Vol. 21, No. 3, in press (2012).
- Masanori Kobayashi, Takashi Miyachi, Maki Hattori, Seiji Sugita, Seiji Takechi, N. Okada, "Dust detector using piezoelectric lead zirconate titanate with current-to-voltage converting amplifier for functional advancement", *Earth, Planets and Space*, accepted, (2012).
- Kobayashi, M., Ishibashi, K., Ohno, S., Kameda, S., Wada, K., Senshu, H., Arai, T., Namiki, N., Matsui, T., Cho, Y., Sugita, S., "Multi-element analysis technique for in-situ planetary exploration by laser-induced breakdown spectroscopy", 2011 2nd International Conference on Space Technology (ICST), 15-17 Sept. 2011, Conference Publication p. 1-4, (2011a).
- Kobayashi, M., Ohashi, H., Sasaki, S., Shibata, H., Iwai, T., Fujii, M., Nogami, K.-i., Kimura, H., Nakamura, M. H., Hirai, T., Srama, R., and Gruen, E., "A future observational plan of dust particles around the Moon by LDM (Lunar Dust Monitor) onboard the orbiter of the next Japanese lunar mission", *Earth, Planets and Space*, Volume 63, Issue 10, p. 1113-1117, (2011b).
- Kobayashi, Masanori, Hasebe, Nobuyuki, Hiramoto, Takuji, Miyachi, Takashi, Murasawa, Satoshi, Okada, Hiroyuki, Okudaira, Osamu, Yamashita, Naoyuki, Berezhnoy, Alexey A., Shibamura, Eido, Takashima, Takeshi, D'Uston, Claude, Narasaki, Katsuhiro, Tsurumi, Keisuke, Kaneko, Hiroshi, Nakazawa, Michio, Mori, Kunishiro, and Fujii, Masayuki, "Germanium detector with Stirling cryocooler for lunar gamma-ray spectroscopy", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, Volume 548, Issue 3, p. 401-410, (2005).
- Kobayashi, M. N., Hasebe, N., Miyachi, T., Doke, T., Kikuchi, J., Okada, H., Oka, A., Okudaira, O., Souri, H., Yamashita, N., Shibamura, E., Kashiwagi, T., Takashima, T., Narasaki, K., Tsurumi, K., Mori, K., D'Uston, C., Maurice, S., Grande, M., and Reedy, R. C., "High-purity germanium Gamma-Ray Spectrometer with stirling cycle cryocooler", *Advances in Space Research*, Volume 30, Issue 8, p. 1927-1931, (2002).
- Ohno, S.; Namiki, N.; Ishibashi, K.; Kobayashi, M.; Arai, T.; Senshu, H.; Wada, K.; Yamagishi, A.; Miyamoto, H.; Komatsu, G.; Matsui, T. Development of Mars Environment Simulation Chamber at Planetary Exploration Research Center, Chiba Institute of Technology, 41st Lunar and Planetary Science Conference, March 1-5, 2010 LPI Contribution No. 1533, p.1754 (2010)
- 大野宗祐, 火星の表層環境模擬実験装置, 地質学雑誌, 印刷中 (2012)
- K. Okada, P-M. Wu, T. Tanaka, and M. Hotta. A Light Balloon-Borne Sampler Collecting Stratospheric Aerosol Particles for Electron Microscopy. *Journal of Meteorological Society of Japan*. 75 ; 3: 753 – 760 (1997)
- Yang Y., Yokobori S., Kawaguchi J., Yamagami T., Iijima N., Izutsu H., Fuke Y., Saitoh S., Matsuzaka M., Namiki S., Ohta M., Toriumi K., Yamada I., Seo M. and Yamagishi. A. Investigation of cultivable microorganisms in the stratosphere collected by using a balloon in 2005. JAXA-RR-08-001,35-42 (2008a)
- Yang Y. Itahashi S., Yokobori S. and Yamagishi A. UV-resistant Bacteria isolated from upper troposphere and lower stratosphere. *Biol.Sci.Space* 22:18-25 (2008b)
- Yang Y, Yokobori S. and Yamagishi A. Assessing Panspermia hypothesis by microorganisms collected from the high altitude atmosphere. *Biol. Sci. Space*. 23, 151-163 (2009a)
- Yang Y., Itoh T., Yokobori S., Itahashi S., Shimada H., Satoh K., Ohba H., Narumi I. and Yamagishi A. *Deinococcus aereus* sp. nov., isolated from the high atmosphere. *Internatl. J. Sys. Evol. Bacteriol.* 59, 1862-1866 (2009b)
- Y. Yang, T. Itoh, S.-i. Yokobori, H. Shimada, S. Itahashi, K. Satoh, H. Ohba, I. Narumi and A. Yamagishi. *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* ; 60: 776 – 779 (2010)