

成層圏における微生物生態調査

大野宗祐、石橋高、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(東薬大)、石川裕子(日本バイオリジカルズ)、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(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 radiodurance* 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ので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、これは未だ観測的に確認されていない。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と高度分布を測定し、その動態を理解する

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。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したい。平成25年度大気球共同利用には、成層圏にいる微生物を既存の大気球用フィルター式採取装置で採取し、その形態を蛍光顕微鏡により観察することを目的として申請した。また、フィルター式よりも採取効率の高いインパクター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。平成25年度に行った実証試験の結果を踏まえ、平成26年度は制作したインパクター式高感度試料採取装置を用い、微生物分布の高度分布を求める。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

フィルター式微生物採集装置は、数年前に山岸グループの実験用に制作されたものをほぼそのまま用いる。真空ポンプと流路、微生物を濾過するフィルターと流路を制御す

るゲートバルブで構成されている。真空ポンプの入り切り、およびバルブ開閉は地上からの信号で制御する。放球後、設定した高度でポンプを起動、上空大気を吸引する。バルブを開いて吸引大気をフィルターでろ過することによって微生物を採集する。フィルターを無菌的に取り外し、蛍光顕微鏡で観察する。蛍光顕微鏡による観察では採取できた微生物の検出効率が以前採用されていた培養法と比較して 10 倍程度向上するので、上空での飛行時間が 3 時間程度でも十分な数の微生物を採取できる。採集装置の概要は宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAXA RR-05-012 (2006 年3月)参照。ただしフィルターだけは、以前使っていたセルローズフィルターではなく、表面のざらつきが無く蛍光顕微鏡の観察に適したポリカーボネイトフィルターを用いる。蛍光顕微鏡による解析法と培養法との比較については、5 節で詳述する。

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。

4. 微生物採集装置に関する準備状況

フィルター式微生物採集装置および取扱い方法に関しては実績がある。平成 16 年度フィルター式微生物採集装置を製作し、17 年度に大気球を用いた大気中の微生物採集実験を行った。20km の高度で合計約 10m^{-3} の大気のろ過をおこなった。装置の回収を行い、フィルターホルダーを本体から取り外して、東京薬科大山岸研究室まで搬送した。フィルターを無菌的に取り出し、培地上で 30°C で保温して菌の培養を行った。20km 高度からの紫外線耐性菌の採集を実現した。その結果 4 株の微生物採集と培養に成功した (Yang et al. 2008a)。装置の詳細は宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAXA RR-05-012 (2006 年3月)参照。

一方、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。平成 25 年度の実証試験では、既存のフィルター式微生物採集装置に鉛直方向に一本通気管を付け

加えてインパクト式微粒子採取の実証試験を行う予定である。新たに設けた鉛直管の途中にインパクト板を設置し、上下をゲートバルブで密閉可能な状態にしておく。成層圏で気球が落下している途中でバルブを開けて鉛直通気管中を通り抜ける大気に含まれる試料を採取し、対流圏に突入する前に再びバルブを密閉し、フィルター式微生物採集装置と一緒に回収する。唯一の上空で動作をさせる部品であるゲートバルブは、既存のフィルター式微生物採集装置で使用しているゲートバルブと同型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、地上からの信号を用いた制御などに関して実証済みであり、問題は無い。

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。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の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)。

5. 分析方法: 蛍光顕微鏡による観察

本節では蛍光色素を用いた蛍光顕微鏡による微生物の観察・解析について、予備実験の結果など準備状況を詳述する。

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、今回はフィルターごと蛍光色素で染色し、採取された微生物の数と形態を蛍光顕微鏡で観察する。試料採取の手法は実証されており確立されているが、気球で採取された試料の蛍光顕微鏡での観察に関しては新規要素であるので、予備実験を行った。

予備実験の目的は、1) フィルターに採取した浮遊微生物・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、3) 気球での試料採取と蛍光顕微鏡によ

る観察に適した試料採取用フィルターの選定、の3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、フィルター上に単独で付着した微生物の撮像に成功した(図 1)。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 2 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 3a)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 3b、3c)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 4)。

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桁程度の感度の向上が期待できる。先行研究では上空での試料採取に 24 時間程度が必要であったが、蛍光顕微鏡での観察に切り替えることによって 2~3 時間の試料採取でも十分な数の微生物

物が捕獲できることが期待される。

最後に3)の気球での試料採取と蛍光顕微鏡による観察に適した試料採取用フィルターの選定については、先行研究で成層圏での試料採取で実績のあるセルロースのフィルターと、フィルタ表面が平らで顕微鏡観察に適したポリカーボネイトフィルターの2種類を用いて実験を行った。その結果、先行研究で用いられたセルロースのフィルターは、蛍光色素液を吸ってしまい微生物に蛍光色素液が行き渡りにくく、表面のざらつきの影響で顕微鏡観察の際ピントを合わせるのが困難であることがわかった。一方、今回新たに試したポリカーボネイトフィルターは上記2つの問題が発生せず、問題なく蛍光顕微鏡で微生物が観測できることがわかった。図1、図 2、図 3 は全てポリカーボネイトフィルターを用いた実験で撮像された画像である。よって、本研究ではポリカーボネイトフィルターを用いることを前提に、真空と低温に対する耐性の検討を今後気球実験までの期間に行う。実験を行う場合には、千葉工業大学惑星探査研究センターの火星環境模擬チャンバーを用いて試験を行う。

以上述べた通り、予備実験の目的である項目1)~3)を達成できた。気球実験の際の運用や回収試料の無菌的取り扱い等それ以外の点については以前の気球実験に準じて行うことで問題は無いので、既存のフィルター式試料採取装置を用いて気球実験を行うことは大きな障害が無いことを示すことが出来た。

参考文献

- 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)
- Yamagishi A., Yano H., Kobayashi K., Yokobori S., Tabata M., Kawai H., Yamashita M., Hashimoto H., Naraoka H. and Mita H. TANPOPO: astrobiology exposure and micrometeoroid capture experiments. *International Symposium on Space Technology and Science (ISTS) Web Paper Archives*. 2008-k-05 (2008)
- 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 aerius* 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)



図 1 ポリカーボネイトフィルター上に単独で存在する微生物の蛍光顕微鏡画像。蛍光色素は SYBR Green I、蛍光顕微鏡のフィルターは NIBA フィルターセット(励起フィルタ 470nm-490nm、観察波長帯 510-550nm)を使用。



図 2 微生物凝集体(微生物2個)の蛍光顕微鏡画像。蛍光色素は SYBR Green I、蛍光顕微鏡のフィルターは NIBA を使用。



図 3a 岩石の塵の蛍光顕微鏡画像。蛍光色素は SYBR Green I、蛍光顕微鏡のフィルターは NIBA を使用。

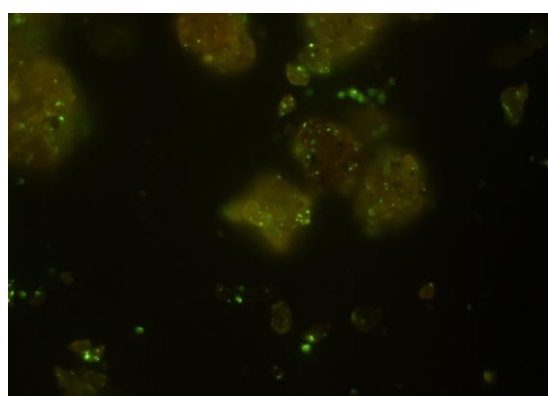


図 4 火星模擬土壌とそこに含まれる微生物の蛍光顕微鏡画像。蛍光色素は SYBR Green I、蛍光顕微鏡のフィルターは NIBA を使用。岩石の塵が多く存在する中に微生物が混在している場合でも蛍光顕微鏡観察により検出できる。(玉川大学・吉村研究室撮影)

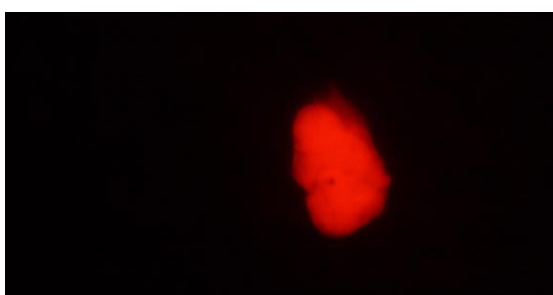


図 3b 岩石の塵の蛍光顕微鏡画像。蛍光顕微鏡のフィルターは WIG(励起フィルタ 520nm-550nm、観察波長帯 580nm-)を使用。



図 3c 岩石の塵の蛍光顕微鏡画像。蛍光顕微鏡のフィルターは WU(励起フィルタ 330nm-385nm、観察波長帯 420nm-)を使用。