

特集「火星圏のサイエンス」

火星生命探査のための生命探査顕微鏡の開発

吉村 義隆¹, 山岸 明彦², 佐藤 毅彦³, 宮川 厚夫², 今井 栄一⁴,
佐々木 聰⁵, 小林 憲正⁶, 癸生川 陽子⁶, 藪田 ひかる⁷, 長沼 毅⁷,
三田 肇⁸, 藤田 和央³, 臼井 寛裕^{3,9}

2018年6月29日受領, 査読を経て2018年8月2日受理.

(要旨) 近年の探査によって, 火星表面から有機物や微生物のエネルギー源などが見つかり, 火星に現在も微生物が存在する可能性が考えられるようになってきた. 我々は, 火星の微生物細胞を検出するための, 生命探査顕微鏡(LDM: Life Detection Microscope)の開発を行っている. LDMは, 蛍光色素で試料を染色し, 非生物起源を含む有機物, 膜構造や触媒活性をもつ有機物(微生物細胞)の他, レゴリスやダストなどの鉱物を, 1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の分解能で映像化する. 現在, 実験室レベルでの試験機のための設計と製作を進めており, 本稿ではLDMの開発状況を報告する.

1. はじめに

現在の火星表面は, 乾燥した低温環境であるが, これまでの研究から, 数十億年前の火星は, 1) 表面に大量の水(海洋/湖沼)が存在したこと[1], 2) 一定の期間, 温暖湿潤な気候が存在したこと[2], 3) 大気を保護する強力な磁場が存在していたこと[3], などが明らかになり, 生命の誕生に適した環境であったと考えられるようになってきた. 2011年に打ち上げられたマーズ・サイエンス・ラボラトリー(MSL)計画のキュリオシティローバーによっても, 生命に必須な元素(炭素, 水素, 酸素, リンなど)や, 微生物のエネルギー源となる, 様々な酸化還元状態の鉄や硫黄の化合物[4], チオフェン類や芳香族などの有機化合物が見つかっており[5], 数十億年前の火星表面には生命が存在できる環境があったと考えられている.

現在の火星は, 当時の環境とは大きく異なるが, 地

球の生命は, 環境の変化に伴って進化し, 地球上の隅々まで生息場所を広げてきた. 火星の生命もまた, 一端誕生したならば, 環境変化に適応し, 現在も生き残っている可能性がある. 可能性の高い場所の一つとして考えられているのは地下である. 地下(表面下2~20 km)は温度と圧力が上昇するため, 液体の水が安定して存在している可能性がある[6]. また, 火星大気からはメタンが発見されており, 季節変動が見られることから, クラスレート(メタン分子が水分子に囲まれた包接水和物)のような状態で地下にメタンが存在する可能性が示唆されている[7]. メタンは, 地球上ではその多くが生物由来(メタン生成菌と呼ばれる微生物が生成したもの)と言われている物質である. 火星では, 地下でのフィッシャー・トロプシュ反応や, 隕石などに由来する有機物の熱や紫外線による分解など, 非生物学的メタン生成の可能性も考えられており[8]. その起源は不明であるが, 地下にはメタン生成菌のような微生物が存在している可能性がある[9].

一見過酷な環境に見える表面もまた, 微生物が生息できる可能性がある. 近年, 地球上の極限環境に存在する微生物の知見が多く得られてきており, -20°C でも代謝できる微生物[10], 火星と同程度の気圧(7 hPa)でも増殖する微生物[11], 火星表面の放射線量(76 mGy yr⁻¹[12])に十分耐えられる微生物[13]など, 生物

1. 玉川大学
2. 東京薬科大学
3. 宇宙航空研究開発機構
4. 長岡技術科学大学
5. 東京工科大学
6. 横浜国立大学
7. 広島大学
8. 福岡工業大学
9. 東京工業大学
ystk@agr.tamagawa.ac.jp

の生存限界は非常に広いことが分かってきた。火星環境では、表面に降り注ぐ紫外線が最も生物に与える影響が大きいが、紫外線は数cm程度のレゴリスで十分に遮蔽されるので、表面から数cm下であれば生存可能である[14]。微生物のエネルギー源となる、還元物質(Fe^{2+} , S^0 , S^{-1} , CH_4 など)も見つかっており[15]。液体の水については、地下水が継続的に湧出していることを示唆する峡谷や、リカリング・スロープ・リニア(RSL: Recurring Slope Lineae)と呼ばれる、水が流れた跡のように見える筋状の表面構造が見つかっており[16]。気温が上昇する春から夏に現れ、秋から冬に消滅することを周期的に繰り返している。RSLは、液体の水[17]、砂などの粒子[18]などの可能性が考えられているが、塩濃度が高ければ、凝固点が下がり、火星の低温環境でも水は液体状態を保つことが出来るので、好塩菌のような高塩濃度環境に適応した微生物が存在しているかもしれない。

以上のように、現在でも火星には微生物が存在している可能性があるが、1970年代に行われたバイキング計画による生命探査では生命は見つからなかった。バイキング着陸機は、表面土を使って光合成反応や呼吸活性など、代謝活動を検出する3つの生命探査実験を行った。これらのうち、LR(Label Release)実験と呼ばれる、表土試料に ^{14}C で標識した有機物(栄養液)を加えた実験では、大量の放射性炭素の放出が検出され、添加した有機物を代謝する生物が存在する可能性も考えられたが、熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法で、火星由来と思われる有機物が検出されなかったことから、生命の存在に否定的な結論が出された[19]。しかしその後、バイキング実験結果の再検討がなされ、質量分析装置の感度が低く、アタカマ砂漠など地球上の微生物密度が低い環境でも生命を検出できないなどの問題点が指摘されている[20]。また、実験で添加した有機物を火星の微生物が利用できるかどうか不明である。近年、NASA(アメリカ航空宇宙局)やESA(欧州宇宙機関)は、有機物分析装置の開発を進め、2020年打ち上げ予定のMars 2020計画では紫外線蛍光とラマン分光法を組み合わせた装置(SHERLOC: Scanning habitable environments with Raman & luminescence for organics & chemicals) [21]、ExoMars 2020では、ラマン分光装置(RLS: Raman Laser Spectrometer) [22]や、ガスクロマトグラフィ

ー質量分析とレーザー脱離質量分析(laser desorption mass spectrometry)を組み合わせた装置(MOMA: Mars Organic Molecule Analyzer)を搭載する計画である[23]。Mars 2020計画ではさらに、土を容器に入れて火星上に保存し、将来のミッションで地球に持ち帰ることも検討している。これに対して我々は、現在も火星に生命が生きている可能性に着目し、微生物細胞を検出する、蛍光顕微鏡を使った生命探査を提案した[14]。探査装置を生命探査顕微鏡(LDM: Life Detection Microscope)と名付け、JAXA(宇宙航空研究開発機構)のワーキンググループで開発を続けている[24]。本論文では、LDMの開発状況を報告する。

2. LDMの原理

LDMは、蛍光顕微鏡を基本原理として、有機物、特に微生物を検出できる装置である。蛍光顕微鏡は、微生物学、生化学、医学など、生物学の幅広い分野で用いられている機器であり、蛍光色素で染色した試料に励起光を照射し、色素から発する蛍光を検出する。様々な生体成分を検出する蛍光色素が市販されているが、我々は、以下の特徴を持った色素が生命探査に適していると考えている。(1)非生物起源を含む有機化合物を検出する。(2)膜に囲まれた有機化合物を検出する。(3)触媒反応を検出する。地球の生命は有機化合物で構成されている。特にアミノ酸は隕石にも含まれるほど宇宙には普遍的に存在するので、アミノ酸が重合したタンパク質様の有機物は火星の生命も利用している可能性が高い。(1)の有機物検出にはSYPRO Redという蛍光色素を用いる(図1(a)左)。この色素は、生物起源のタンパク質の他、前生物的過程で生産されることが考えられるプロテノイド(アミノ酸熱重合物)、隕石などに含まれる多環芳香族炭化水素(PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon)などの非生物起源有機物も検出する(図1(b))。また、地球の生命は全て、膜に囲まれた細胞構造を基本として、外界と内部を隔て選択的に物質交換を行っている。このような膜構造は地球のみならずあらゆる生命の基本構造と考えられる。そこで、(2)では膜透過性の異なる2種類の蛍光色素を用いて膜構造を検出する。用いる蛍光色素はSYTO24とPropidium iodide(PI)の混合色素である(図1(a)中央)。細胞膜構造が保たれている細胞(生細

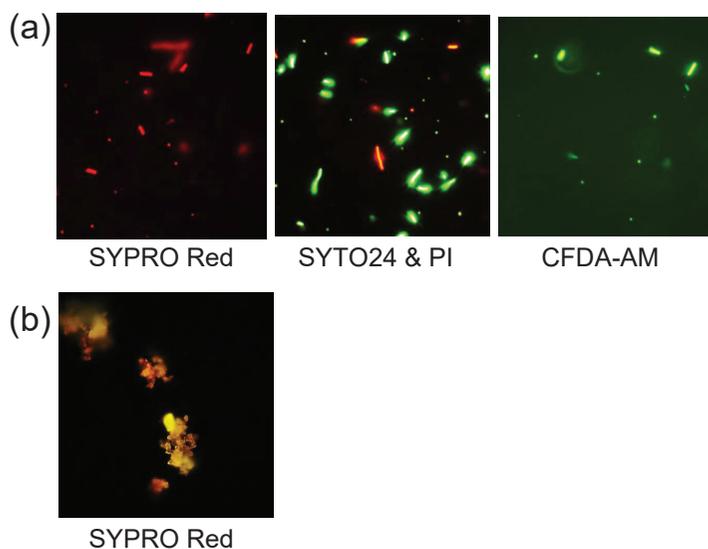


図1：蛍光色素で染色された、(a) *Escherichia coli* およびDNAが欠損したミニセル、(b) PAHの蛍光画像。使用した蛍光色素はSYPRO Red, SYTO24とPIの混合液, CFDA-AMである。(a)で点状に見られる小さな細胞がミニセルであり、DNAがない細胞でも検出可能である。

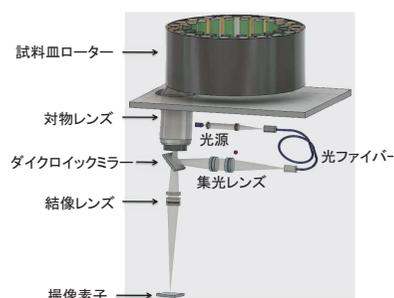


図2：LDMの概念図。試料皿ローターには20個の試料室と染色液タンクが並んでおり、20個の試料を異なる蛍光色素で染色できる。概寸160 W×120 L×240 H (mm)、目標6 kg、電力消費約30 Wである。文献[24] (© 2018 by the Japan Society for Aeronautical and Space Sciences and ISTS) より改変。

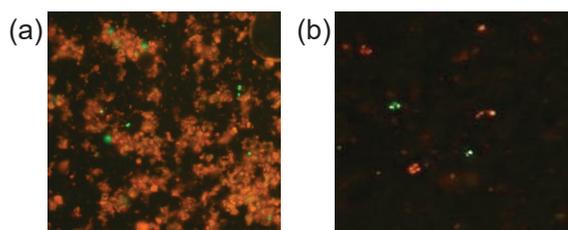


図3：粘土鉱物(モンモリロナイト)に *Deinococcus radiodurans* の生菌および死菌を添加して、SYTO24とPIの混合色素で染色した蛍光画像。(a) SYTO24による緑色蛍光(生菌)は観察されるが、粘土鉱物にPIが吸着し死菌と鉱物を識別することができない。(b) 黒色インクを添加することで鉱物由来の蛍光が吸収され、微生物の蛍光が観察可能になる。

胞)では、親水性のPIは細胞膜を透過できないが、疎水性が高いSYTO24は細胞膜を透過し、核酸などの有機化合物を染色する。そのためSYTO24の緑色蛍光が観察される。細胞膜が壊れている死細胞では、PIが細胞内に入り、SYTO24と共に核酸が染色されるが、SYTO24の緑色蛍光をPIが吸収するため、PIによる赤色蛍光が観察される。これにより膜構造をもつ細胞を検出できる。(3)の色素は、生命の代謝を支える酵素による触媒反応を検出する。全ての地球の生物は、

生命活動を維持するために酵素によって触媒される、多くの化学反応を行っている。最も一般的な酵素であるエステラーゼによる触媒反応を検出する蛍光色素CFDA-AMを用いる(図1(a)右)。CFDA-AM自体は無蛍光だが、細胞内でエステラーゼによって加水分解されると緑色の蛍光を発する。これらの色素は、一般的な微生物細胞の他、ミニセルと呼ばれるDNAを持たない直径1 μm 以下の微小な細胞[19]も染色可能である。また、蛍光色素を含む染色液には、火星の低温低圧環境で用いるために、67%グリセロール溶液として使用する。これにより、 -30°C $\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、火星大気圧(7 hPa)で、染色と撮像に必要な時間中、液体状態を保つことができる。また、過塩素酸や放射線、温度耐性も十分な色素溶液を開発している。

LDMの大きな特徴は、高感度(10^4 cells/g)と高空間分解能(1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$)である。この感度は、バイキング着陸機で用いられた熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析装置よりも2桁高く、地球の陸上環境で最も微生物密度の低い場所でも検出できるように設定した。仮に細胞が検出されなかった場合でも、火星は、地球

で最も過酷な場所よりも低い微生物密度であることが判明し、火星の微生物密度の上限を設定することができる。これは、将来の有人探査で、ヒトと火星生命が接触するリスクを評価する際の重要な情報になる。また、1細胞中には大腸菌で約0.3 ngの有機物が含まれており、これが有機物の検出限界と言える。

1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の分解能は、地球の原核生物のサイズをもとに設定した。火星生命がどのようなものかは不明であるが、生命が誕生してからおよそ20億年間は単細胞の原核生物だけの世界であった。火星では、海および大気が最初の10億年ほどで多くが失われたことを考えると、現在の火星生物は、原核生物の段階であると推定できる。地球の原核生物は、細胞内器官(核ミトコンドリア等)や細胞内運搬装置を持たず、細胞内での物質移動は拡散のみに依存するため、細胞直径が1 μm より大きくなることはまずなく、ほぼ全ての原核生物(球菌あるいは桿菌)の直径は1 μm 以下である。また、蛍光顕微鏡はピクセル面積に反比例して検出感度が悪くなるので、仮に10 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ だと、1 μm の物質に対しては、検出感度は1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の100分の1になる。ExoMars 2020計画のSHERLOCやExoMars 2020計画のRLSでも有機物の映像化を行うが、解像度は7~30 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ で、蛍光法よりも感度が低いラマン分光法による検出のため、微生物細胞(1 μm)の検出は期待できない。

3. LDM装置の概要

図2はLDMの概念図である。装置上部の円筒形は、試料を受け取る試料皿を回転するローターである。ローターには20個の試料皿があり、それぞれの試料皿の隣には色素液タンクが並んでいる。ローターのロボットアームで採取された土は試料皿に入り、色素液タンクから染色液が試料皿に流れ込んで染色する。試料皿の下部は石英窓になっており、対物レンズで試料を下から観察する。光源には青色レーザーダイオード(LD)を使用し、LDからの励起光を、ダイクロイックミラー(DM)と対物レンズを通して試料皿下部に入射する。生じた蛍光は、対物レンズ、DM、結像レンズを通り、撮像素子に結像させ撮像する。ローターを動かしながら約1 mm^3 の試料体積を走査し、静止画像を200枚撮影する。10⁴ cells/gの密度で微生物が存在

していれば、1 mm^3 の体積内に数~10細胞程度検出される。各画像中の焦点が合った粒子を抽出し1枚の画像に統合したのち地球に送信する。また、LDとは別に、白色LED照明を搭載しており、蛍光画像だけでなく、明視野画像も得ることもできる。これは、レゴリスやダストなどの鉱物粒子の形状を高解像度に観察するとき特に有効である。現在の仕様は、概寸160 W × 120 L × 240 H(mm)、目標6 kg、電力消費約30 W、動作温度-30~30 °C、保存温度-40~70 °Cである。MSL計画などで使われている質量分析装置は小型軽量化が難しいのに対し、LDMは軽量化できるのが利点である。解析試料数を減らせば、大幅に小型の装置も可能であり、将来の様々な火星探査計画に合わせて仕様を変更することができる。

4. 今後の課題

土壌などの環境試料を蛍光顕微鏡で観察する場合、鉱物への色素の吸着や、鉱物の自家蛍光によって擬陽性シグナルとなる可能性がある。例えばモンモリロナイトのような粘土鉱物はPIを吸着し、図3(a)のように微生物と鉱物の蛍光が区別することができない。この問題に対しては、黒色インクを添加し、鉱物からの蛍光を消光し、微生物の蛍光を検出することが可能であることが分かっている(図3(b))、また、鉱物の自家蛍光と細胞の蛍光との識別は、退色速度や蛍光スペクトルの違いを利用する予定である。鉱物の自家蛍光は励起光を照射してもほとんど退色しないのに対し、色素由来の蛍光は徐々に退色する。撮像後、一定時間励起光を照射し続けた後にもう一度撮像し、蛍光強度が減少している粒子が色素由来の蛍光と判定できる。また、鉱物の蛍光は、ピーク波長や半値幅が蛍光色素と異なるのでスペクトルを比較することで識別可能である。これらの方法を用いて、擬陽性として検出される粒子数を最小限に抑える。さらに、最初に分析するサンプルは、表面土の試料を用いる。表面土は強い紫外線にさらされているため、火星由来の微生物は存在しないはずであるが、機器などに付着して地球から持ち込まれた微生物や、鉱物由来の蛍光(擬陽性)が検出される可能性がある。これをリファレンスとして、ノイズレベルを設定する。試料中で検出された細胞の数が統計的に有意である場合、試料は火星由来の細胞を

含むと見なすことができる。

擬陽性以外の課題として、低温低圧環境下での染色液添加機構、試料量の対応範囲の確認、試料皿の蓋開閉機構などを検討しており、実験室レベルでの試験機(ブレッドボードモデル(BBM))の製造を目指して開発を行っている。

5. まとめ

近年の探査によって、火星に現在も生きている微生物が存在する可能性が考えられるようになってきた。生命探査装置として提案したLDMは、顕微鏡を使って有機物やレゴリスやダスト粒子を1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の分解能で映像化する装置である。有機物は、試料を蛍光色素で染色したのち、青色レーザーダイオードを照射して発する蛍光を検出する。SYPRO Redは、微生物の他、PAHなどの非生物起源有機物を検出し、SYTO24とPIの混合色素によって膜構造を持つ微生物を、CFDA-AMによって触媒活性を有する微生物を検出する。これらの微生物は生きている細胞と見なすことができる。レゴリスやダスト粒子は白色LEDを使った明視野照明で映像化する。微生物の検出感度は、 10^4 cells/gであり、地球上で最も微生物密度の低い土でも検出可能である。日本では、火星の衛星フォボスとダイモスの観測とサンプル採取を行う、火星衛星探査計画(MMX: Martian Moons eXploration)が進められており、火星本体への着陸計画は検討段階であるが、軽量かつ生命の形態を映像化できるLDMは、火星だけでなく、エンケラドスや金星など、他の天体での生命探査にも有効であると考え、今後行われるであろう、国内外での生命探査計画に搭載することを目指して開発を進めている。

謝辞

LDMの開発は、JAXAの生命探査ワーキンググループで、平成29年度および平成30年度宇宙理学委員会戦略的基礎開発予算、平成30年度自然科学研究機構アストロバイオロジーセンタープロジェクト(課題番号: AB301019)の助成を受けて行っている。

参考文献

- [1] Carr, M. H. and Head, J. W., 2003, *J. Geophys. Res. Planets* 108.
- [2] Pollack, J. B. et al., 1987, *Icarus* 71, 203.
- [3] Acuna, M. et al., 1999, *Science* 284, 790.
- [4] Grotzinger, J. P. et al., 2014, *Science* 343, 1242777.
- [5] Eigenbrode, J. L. et al., 2018, *Science* 360, 1096.
- [6] Oze, C. and Sharma, M., 2005, *Geophys. Res. Lett.* 32, L10203.
- [7] Webster, C. R. et al., 2018, *Science* 360, 1093.
- [8] Oehler, D. Z. and Etiope, G., 2017, *Astrobiology* 17, 1233.
- [9] Atreya, S. K. et al., 2007, *Planet. Space Sci.* 55, 358.
- [10] Rivkina, E. et al., 2000, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3230.
- [11] Nicholson, W. L. et al., 2013, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 666.
- [12] Hassler, D. M. et al., 2013, *Science* 343, 1244797.
- [13] Cox, M. M. and Battista, J. R., 2005, *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 882.
- [14] Yamagishi, A. et al., 2010, *Biol. Sci. Space* 24, 67.
- [15] Cockell, C. S., 2014, *Astrobiology* 14, 182.
- [16] McEwen, A. S. et al., 2014, *Nat. Geosci.* 7, 53.
- [17] Ojha, L. et al., 2015, *Nat. Geosci.* 8, 829.
- [18] Dundas, C. M. et al., 2017, *Nat. Geosci.* 10, 903.
- [19] Klein, H. P., 1977, *J. Geophys. Res.* 82, 4677.
- [20] Navarro-Gonzalez, R. et al., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16089.
- [21] Beegle, L. et al., 2015, *IEEE Aerospace Conference*, 1.
- [22] Edwards, H. G. et al., 2013, *Astrobiology* 13, 543.
- [23] Vago, J. L. et al., 2017, *Astrobiology* 17, 471.
- [24] Yamagishi, A. et al., 2018, *Trans. JSASS, Aerospace Technology Japan* 16, 299.