特集 —— 生命科学における高圧力研究の異分野融合 ——

超高圧力下生命探索と生物の常識を超えた
高圧力耐性Search for Lives under Very High Pressure and Extraordinary Strong Pressure-Tolerance
of Animals and Plants

小野 文久

Fumihisa ONO

We applied a cubic anvil press which was originally developed for physical and geophysical research to a biological study of search for lives under very high pressure of several GPa order or more. All the animals and plants which have been tested, tardigrades at cryptobiotic state, eggs of plankton, spores of mosses and seeds of same plants, were found alive after exposure to the hydrostatic pressure of 7.5 GPa for at least 1 h. It is un-understandable that actually living creatures can withstand such a very high pressure.

[*high pressure tolerance of plants and animals, tardigrades, Artemia, Ptychomitrium, Venturiella, Triforium lepens L*]

1. はじめに

高圧力の下での生物の研究は、0.3 GPa あたりから始まるタンパク質の「高圧変性」を基礎とする研究が主として行われ、いわゆる「高圧殺菌」の技術は食品の保存などの分野に広く応用されるようになってきた。高圧力下における動物細胞、脂質、澱粉、細菌などの基礎的な研究においては日本がその先端部分を担っている[1,2]。さらに、潜水艇「しんかい」や「かいこう」を利用した深海生物の探索も、日本が主導的な役割をはたしており 6,000 m の深海においても新種のプランクトンなどが次々と発見されてきた。深海アナゴの細胞は 0.14 GPa の高圧力下で 20 分間生存可能であることが示された[3]。

一方、数 GPa 以上の超高圧力領域における生物の研究はこれまでにほとんど行われていなかった。超高圧力下の磁性や超電導の研究をしていた筆者は、たまたま訪ねてきた生物学を専門とする友人に、「この小さいテフロンカプセルの中に入る動物はい

ないか？」と聞いてみたところ、クマムシなら数 10 匹入るとのことであった。当然つぶれて死んでしまうであろうと考えたが、ために「樽」とよばれる乾燥休眠状態のクマムシ 20 匹をテフロンカプセルに入れ、7.5 GPa の超高圧力を 20 分加えてみた。その後、圧力を常圧に戻してからクマムシを水に浸したところ、約 1 時間後にはそれらのほとんどが生きていて動き出したのである[4]。これが我々の研究の発端である。

数 GPa という超高圧力領域で乾燥休眠状態のクマムシがその生命を維持できるという実験結果は、それより一桁低い圧力領域における高圧殺菌の技術と基本的に相矛盾しているようである。しかし、高圧殺菌関係の研究はバクテリアなどの活動状態を主として対象としているので、細胞内代謝や呼吸といった要素が加わっている。我々は「生命そのものがどれほどの超高圧力に耐えられるか」という問題に注目し、クマムシ以外の他の乾燥休眠状態をとる動植物、アルテミア（動物プランクトン）の乾燥卵、チデレゴケやヒナノハイゴケなどのコケ類の胞子、

クローバーの種子，ドライイーストなどに研究対象を拡大してきた。

2. 生きている生物の加圧

我々が用いた超高圧力発生装置はキュービックアンビルプレスと呼ばれ，先端の一边が 4 mm の超硬合金(WC)製アンビル 6 個を上下，前後，左右に配置し，これを 250 トンプレスで上下方向から駆動するタイプである。水平に置く 4 個のアンビルはそれぞれの背面に 45°のテーパーが付けてあり，上下からプレスすることにより，中心に置いたパイロフィライト製の一边 6 mm の立方体(キュービックスセル)を均等に 6 方から圧縮することができる。このキュービックスセルの中心に外径 2 mm，高さ 3.0 mm の円筒形テフロンカプセルを埋め込む。テフロンカプセルの内径は 1.6 mm，内側高さは 1.8 mm である。この中に生物試料を入れ，液体の圧力媒体(フロリナート FC-77 または FC-72; Sumitomo 3M)で満たす。このフロリナートは生物に直接害を及ぼすことが無いので[5]，この研究の目的に適している。一方，圧力媒体として純水や水を含む媒質を使うことは，純水が常温・1 GPa で氷 VI 相に相転移する影響が懸念されるので本研究には適さない。

加圧実験は，アンビルの破損がほとんど無く何回も安定して発生できる常用最高圧力を 7.5 GPa と設定し，この圧力で実験を行った。常圧から最高圧力までの加圧，減圧速度は共に 0.3 GPa min^{-1} とした。圧力は自動コントロールされ，7.5 GPa の圧力を無人で長時間保持することができる。実験では 7.5 GPa の圧力を 20 分～144 時間の間で一定に保持した。生物試料とテフロンカプセルの概略を Fig. 1 に示す。

実験では種々の動物や植物について，超高圧力を一定時間加えた後，常圧に戻し，テフロンカプセルから取り出し，水や海水に浸けたり，種蒔し，孵化・発芽・培養してから直接，あるいは光学顕微鏡下で観察した。

3. 実験結果

3.1 オニクマムシ(*Milnesium tardigradum*)

クマムシ(water bear と呼ばれる)は地球上に広く生息する体長約 0.6 mm の小動物で，コケ類に付着して生息している。水分があると活動するが，

Fig. 1. (Color online) A schematic illustration of the sample preparation into the Teflon capsule.

干上がると「樽」とよばれる乾燥休眠状態になる。この状態のクマムシは高温，低温，高圧力，高放射線などの極限的な厳しい環境に強い動物として知られている。

オニクマムシについては，超高圧力印加後，純水に浸してから活動状態に戻る過程を観察し，さらに引き続き飼育観察した。その結果，7.5 GPa の超高圧力を 3 時間印加した 20 匹はすべて生存していて，圧力を印加していないクマムシ(コントロール)と変わらず元気に動き回っていた[4]。これらは体のどの部分にも損傷は全く無いように見えた。さらにその後の継続飼育でも，個体数はゆるやかに減少し，31 日後に 0 匹となった。この状況はコントロールと比べてあまり変わらないようであった。しかし，超高圧力を 6 時間印加したクマムシは 20 匹すべて生存していたが，それらの動きは鈍く，動き回れるほどではなかった。これらは 6 日後にすべて死滅した。超高圧力を 12 時間印加したクマムシは 20 匹中 5 匹のみ生存していた。Fig. 2 にこれら生還したクマムシの中の 1 匹を示した。しかしそれらは足をわずかに動かすだけで，2 日後には 2 匹だけとなった。その後これらは 1 週間生存した。超高圧力を 24 時間印加したクマムシには生存するものはいなかった。

Fig. 2. (Color online) One of the five tardigrades which were alive and moving after exposure to 7.5 GPa for 12 h [4].

このようにオニクマムシは 7.5 GPa の超高圧力下で 12 時間以上耐えることができ、非常に強力な圧力耐性を持つことがわかった。

3.2 アルテミア (*Artemia salina*)

アルテミア (brain shrimp, sea monkey と呼ばれる) はプランクトンの一種で内陸部の塩湖に生息していて、海水より塩分濃度が濃い場合でも生息できる。卵は乾燥卵の状態でも長期間生き続けることができ、やはり極限的に厳しい環境に強いとされている。

アルテミアについてはその乾燥卵に 7.5 GPa の超高圧力を印加後、海水に浸けて孵化させた。その結果、超高圧力を 42 時間印加した卵でも孵化率 (生存率) は約 90% に達し、コントロールとあまり変わらない高い値を示すことがわかった [5,6]。しかし、超高圧力を 72 時間印加した場合は孵化率がわずか 3% となり、この圧力維持時間がほぼ生存の限界であると考えられる。Fig. 3 に 7.5 GPa の超高圧力を 48 時間印加後、常圧に戻し海水に浸けてから 24 時間後のアルテミアの様子を示した。孵化して動き回っているもの (左下)、ちょうど孵化したもの (中央) や孵化を始めたもの (中央やや右)、まだ孵化を始めているもの (右他) がすべてみられる。

3.3 チヂレゴケ (*Ptychomitrium*)

チヂレゴケは国内でよく見かけられるコケで、大きな石の上などに生えている。乾燥すると葉が縮れ

Fig. 3. (Color online) *Artemia* larvae, nauplii, hatched from the eggs exposed to 7.5 GPa for 48 h. This photo was taken, 24 h after soaked in sea water. In this photo, two nauplii are seen, one of which (left hand side) is moving around and the other (center) is just hatched [6,7].

Fig. 4. (Color online) *Ptychomitrium* spores exposed to 7.5 GPa for 144 h, seeded on an agar and cultivated for 3 weeks. It is seen that protonemata are not frizzled [8].

Fig. 5. (Color online) *Ptychomitrium*, control (not exposed to high pressure) [8].

るのでその名が付いている。1つの孢子囊の中には非常に多数の孢子が入っていて、孢子の直径は約20 μm である。コケ類孢子は乾燥などの極限耐性を持つので、超高圧力耐性を調べるのに適していると考えた。

採集した孢子囊を2~3個テフロンカプセルに入れ、7.5 GPaの超高圧力を長時間加えた後、孢子を取り出し寒天培地に蒔いて、その後の生育を調べた。その結果、超高圧力を48時間印加した孢子の発芽率は86.8%，72時間印加した孢子は49.8%，さらに144時間加圧した孢子の発芽率は30~38%となった[8]。Fig. 4にチヂレゴケ孢子に7.5 GPaの超高圧力を144時間加えた後、培地に蒔いてから3週間後の様子を示した。この写真の部分ではかなりの数の孢子が発芽し、まっすぐに伸びた原糸体が多数みられる。Fig. 5に比較のためコントロール（非加圧）の状態を示す。このように通常ではチヂレゴケの名の通り原糸体も縮れている。このことから超高圧力を長時間印加することにより原糸体が縮れる機能を失ったと考えられる。

3.4 ヒナノハイゴケ(*Venturiella*)

ヒナノハイゴケも国内でよく見かけられるコケで、大きめの木に這い登るように生息している。孢子の大きさもチヂレゴケと同じ程度である。ヒナノハイゴケの孢子についてもチヂレゴケの場合と同様に超高圧力印加実験を行った。その結果、7.5 GPaの圧力を48時間印加した孢子は発芽率86.8%，72時間印加した孢子は69~79%，144時間印加した孢子は4%となった[9]。

コケ類孢子の7.5 GPaにおける生命維持時間としての超高圧力耐性はクマムシと比べて1桁以上、アルテミアの乾燥卵と比べて2倍となり、非常に強力な圧力耐性を持つことが示された。

3.5 ホワイトクローバー(*Trifolium lepens* L.)

ホワイトクローバーはシロツメグサとも呼ばれ、国内でいたるところでみられる雑草である。その種子は直径約1 mmであり、我々の使用するテフロンカプセルに2~3個入れることができる。植物の種子は通常約8%の水分を含むので、数GPaの超高圧力を加えれば、静水圧力であったとしてもこの水分が凝固し、種子の細胞組織を破壊すると考えていた。

超高圧力を加えたクローバーの種子を、最初は培

地の上に蒔いてその生育状態を調べた。7.5 GPaの超高圧力を30分および1時間印加した種子は蒔後それぞれ3および4日後から根が出てきた[10]。超高圧力を24時間印加した種子の1個から蒔後2週間で3 mmの根が出てきた。しかしこの根はそれ以上生育することなく、やがて死滅した。

つぎに、葉の生育を調べるためにこれらを種蒔土を入れたプランターに植え替えたところ、すべて枯れてしまった。したがって、その後は根の発芽観察をあきらめ、加圧した種子を直接プランターに蒔いた。7.5 GPaの超高圧力を2時間以上印加した種子は葉が発芽することなく、消滅してしまった。超高圧力を30分印加した種子はコントロールとほぼ同様に生育し、8か月後に開花するまでになった。

超高圧力を1時間印加した種子は子葉から本葉まで出てきたが、超高圧力30分印加種子と比べて生育が遅く、1年目は小さいままであった。しかし、クローバーは多年草なので、2年目からは30分印加のクローバーと同じように生育し開花した[11]。Fig. 6に7.5 GPaの超高圧力を1時間加えた種子の蒔種から2年6か月後に開花した花の様子を示した。水分を8%程度含んでいるはずのホワイトクローバーの種子が7.5 GPaの超高圧力に少なくとも1時間以上耐えられることは非常に驚くべきことである。

植物の種子に関しては、冬野菜の代表であるブロッコリー、コマツナやミズナなど、クローバーよりサイズが大きい種子について、5.5 GPaの超高圧力を15分加えた研究がある[12]。これらの種子もほ

Fig. 6. (Color online) Flowers came out from the seed of white clover which was exposed to 7.5 GPa for 1 h. The photo was taken 2.5 years after seeded [10,11].

とんどすべて発芽し、このような超高圧力に十分に耐えられることが示された。

3.6 イースト (*budding yeast, Saccharomyces cerevisiae*)

イースト菌の超高圧力耐性を調べる目的でドライイースト顆粒を数個、圧力媒体フロリナートと共にテフロンカプセルに挿入した。これに 7.5 GPa の超高圧力を 2–12 時間印加した後、PDA (potato dextrose agar) 培地で 2–3 日培養した。

その結果、超高圧力を 6 時間加えたドライイーストからは Fig. 7 に示すようにイースト菌が見られた。さらにアルコール発酵能力を調べたところ、コントロールとほとんど同じように発酵することがわかった[13]。しかし、超高圧力を 12 時間加えたものからはイースト菌は見られず、死滅したと考えられる。このように、イーストもその乾燥休眠状態においては強い超高圧耐性を示し、7.5 GPa の圧力に 6 時間以上耐えられることがわかった。

3.7 藍藻 (*blue-green alga, Microcystis flos-aquae*)

藍藻はシアノバクテリアとよばれる細菌の一種で、単細胞であるがそれらが集まり、群体を形成する。1 つの細胞は直径 2–3 μm のほぼ球形であり、数千個あるいはそれ以上が集まりコロニーを作る。藍藻も極限環境耐性が強いと考えられる。

我々はヒナノハイゴケの胞子嚢を超高圧力で加圧した時、一緒に付着していた藍藻 (*Microcystis* 属) を同時に加圧していた。この藍藻に 20 GPa の超高

圧力を 30 分間加えた後、ヒナノハイゴケと一緒に寒天培地で培養した。

この寒天培地上にコントロールと比べて遅れて現れてきた直径 20 μm ほどの藍藻のコロニーを見つけ、その後の生育状態を観察した。

Fig. 8 に 20 GPa の超高圧力を 30 分間加え、寒天培地上で約 8 か月培養した藍藻 (*Microcystis flos-aquae*) の細胞を示した。超高圧力を印加した藍藻のコロニーはコントロールに比べて 1 か半月ほど遅れて培地上に出現したが、その後の増殖はコントロールとほとんど同様であった。このように藍藻はこれまでに我々が調べてきた生物の中で最も超高圧力耐性が強いことがわかった[14]。

これまでに我々が調べた動物、植物、菌などについて 7.5 GPa の超高圧力下における生命持続時間を Fig. 9 にまとめて示した。この図よりホワイトクローバー[9]やシロイヌナズナ[15]の種子 (~1 h)、クマムシ[4]の樽 (~10 h)、コケ類[7,8]胞子 (~100 h) の順にほぼ一桁ずつ 7.5 GPa の超高圧力に耐えられる時間が増大していることがわかる。さらに高い圧力、20 GPa の下では、サイズが小さい藍藻は生存できるが[14]、クマムシやアルテミアなどは生存できないこともわかった[16]。

4. 考察

我々がこれまでに調べてきた生物の高圧力耐性を地球の深さ (内部) の圧力に対応させて Fig. 10 にまとめた。乾燥休眠状態のクマムシ、アルテミアの

Fig. 7. (Color online) Cells of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* incubated on a potato dextrose agar after exposed to 7.5 GPa for 6 h [13].

Fig. 8. (Color online) Membranes of blue-green algae *Microcystis flos-aquae* exposed to 20 GPa for 30 min, and cultivated on an agar for about 8 months [14].

Fig. 9. (Color online) Survival limit of exposed time at 7.5 GPa for white clover [10], Shepherd's purse [15], budding yeast [13], tardigrades [4], *Artemia* [6,7], *Venturiella* [9] and *Ptychomitrium* [8] investigated to date.

乾燥卵、ホワイトクローバーの種子、ドライイーストなどが少なくとも1時間以上耐えられる圧力、7.5 GPaは地球の深さ180 kmに相当し、上部マントルの中ほどである。さらに藍藻が30分以上耐えられる圧力、20 GPaは深さ550 kmに相当し、下部マントルの直上の圧力である[17]。

このような実験結果は乾燥休眠状態の小生物が大きな堆積岩のような隕石の中に閉じ込められたまま宇宙空間を生きたまま飛行できる可能性を示唆するであろう[18]。しかし、ごくわずかでも酸素を必要とする場合は、飛行年月が限られる。

さらに動物・植物の差はあまり見られないが、サイズが小さい生物ほど超高圧力耐性が強いという傾向が明確である。このことから超高圧力下で生物が死にいたる主な原因として生命維持に必要な酸素の欠乏と、圧力の不均一性が考えられる。必要酸素量が原因であれば超高圧力下で耐えられる時間に関係し、小さい生物ほど長時間耐えられる。また、圧力勾配 (x -方向とする) が原因であれば超高圧力耐性 T は、第1近似で、

$$T = B(dp/dx)^{-1} l^{-1} \quad (1)$$

と表され、サイズ l の逆数に比例する[19]。ここで B は定数である。したがって小さい生物ほど圧力耐性が強いことが説明される。

その他の高圧力耐性に関係する要因として、生物体内、細胞内の水分量や細胞の種類があげられる。残留水分は超高圧力下で凍結するので細胞を破壊すると考えられる。しかし、通常、植物の種子は8%

Fig. 10. (Color online) Tolerance to static high pressure for living samples investigated so far to date, listed along the corresponding depth from the surface of the earth.

程度の水分を内部に持っていて、それが外部に逃げないように種皮でおおわれているにもかかわらず、ホワイトクローバーの種子が7.5 GPaの超高圧力に1時間以上耐えられることが示された。このことから水分の寄与は大きくはないと考えられる。細胞の種類に関しては、細胞分裂に寄与する細胞や生殖細胞は通常細胞と比べて放射線などに弱いので、圧力耐性も弱いと考えられる。実際に、ホワイトクローバーの根の生育状態は7.5 GPaの圧力を30分加えた場合と1時間加えた場合とでは大きく異なり、1時間加圧の場合はあまり伸長しない。したがって細胞分裂に寄与する細胞は超高圧力耐性が弱いと言える。しかし、ホワイトクローバーの場合は多年草であり、次年度からは超高圧力を30分加えた場合と同様によく生育した。超高圧力印加による細胞損傷は次年度には修復されたと考えられる。

5. おわりに

我々がこれまでの研究で対象としたすべての生物が7.5 GPaの超高圧力に少なくとも1時間以上耐えられるということは、これらの生物の体を構成している細胞や酵素、タンパク質、DNAなどすべてが可逆的に圧縮されていることを示唆するであろう。しかし、そうであればタンパク質の不可逆的な高圧変性がこれより1桁低い圧力で観察されていることが理解できない。

さらに圧力パラメーターだけでいうと7.5 GPaは、炭素(グラファイト)からダイヤモンドが工業

的に多量に合成される圧力 5.5 GPa[20]より高い圧力である。このような超高压力の下ではタンパク質分子を構成する原子も強く圧縮され、固体とほぼ同様な状況にあると考えられる。我々は超高压力の下でのコケ類胞子やタンパク質の体積収縮を 7.5 GPa の下で 50%, 20 GPa の下で 60% と評価した [14,19,21]。生物の体を構成する分子やその中の原子がこのような固く押し詰められている場合には、生物の細胞に必要な酸素を各所に運ぶことが容易でないことは明らかであろう。

このように生物は我々の常識を超えた非常に強力な圧力耐性を持っていることがわかった。

謝 辞

本論で紹介した研究内容は以下の方々との共同研究を基礎とするものであり、ご協力いただきましたこれらの皆様方に深く謝意を表します。三枝 誠行 博士（元岡山大学理学部生物学科）、西平 直美 講師（岡山一宮高校）、ナウラン・サイニ教授（ローマ大学 “La Sapienza” 物理学科）、山下 雅道 教授（JAXA）、森 義久 教授、財部 健一 教授、波田 善夫 教授（岡山理科大学）、山崎 大輔 准教授、伊藤 英司 名誉教授（岡山大学惑星物質研究所）、魚住 太郎 氏はじめ元岡山大学・理学部・三枝研究室および極限物質研究室の方々。

参考文献

- [1] K. Akasaka, H. Matsuki, eds.: *High Pressure Bioscience*, Subcellular Biochemistry, **72** (Springer, 2015).
- [2] K. Nomura, T. Fujisawa, H. Iwahashi, eds.: *High Pressure Bioscience and Biotechnology* (Sankeisha, 2015) (in Japanese).
- [3] S. Koyama: J. Jpn. Soc. Extermophiles, **9**, 106 (2010).
- [4] F. Ono, M. Saigusa, T. Uozumi, Y. Matsushima, H. Ikeda, N.L. Saini, M. Yamashita: J. Phys. Chem. Sol., **69**, 2297 (2008).
- [5] K. Seki, M. Toyoshima: Nature, **395**, 853 (1998).
- [6] F. Ono, K. Minami, M. Saigusa, Y. Matsushima, Y. Mori, K. Takarabe, N.L. Saini, M. Yamashita: J. Phys. Chem. Solids, **71**, 1127 (2010).
- [7] K. Minami, F. Ono, Y. Mori, K. Takarabe, M. Saigusa, Y. Matsushima, N.L. Saini, M. Yamashita: J. Phys. Conf. Series, **215**, 12164 (2010).
- [8] N. Nishihira, A. Shindou, M. Saigusa, F. Ono, Y. Matsushima, Y. Mori, K. Takarabe, N.L. Saini, M. Yamashita: J. Phys. Chem. Solids, **71**, 1123 (2010).
- [9] F. Ono, Y. Mori, K. Takarabe, N. Nishihira, A. Shindo, M. Saigusa, Y. Matsushima, N.L. Saini, M. Yamashita: J. Phys. Conf. Series, **215**, 12165 (2010).
- [10] N. Nishihira, T. Iwasaki, R. Shinpou, A. Hara, F. Ono, Y. Hada, Y. Mori, K. Takarabe, M. Saigusa, Y. Matsushima, N.L. Saini, M. Yamashita: J. Appl. Phys., **111**, 112619 (2012).
- [11] F. Ono, Y. Mori, M. Sougawa, K. Takarabe, Y. Hada, N. Nishihira, H. Motose, M. Saigusa, Y. Matsushima, D. Yamazaki, E. Ito, N.L. Saini: J. Phys. Conf. Series, **377**, 12053 (2012).
- [12] Y. Mori, S. Yokota, F. Ono: J. Phys. Conf. Ser., **377**, 12055 (2012).
- [13] M. Shibata, M. Torigoe, Y. Matsumoto, M. Yamamoto, N. Takizawa, Y. Hada, Y. Mori, K. Takarabe, F. Ono: J. Phys. Conf. Series, **500**, 102004 (2014).
- [14] F. Ono, N. Nishihira, Y. Hada, Y. Mori, K. Takarabe, M. Saigusa, Y. Matsushima, D. Yamazaki, E. Ito: J. Phys. Chem. Solids, **84**, 57 (2015).
- [15] S. Tanaka, H. Motose, F. Ono, M. Yamashita, M. Saigusa: Space Utiliz. Res., **27**, 171 (2011) (in Japanese).
- [16] R. Hazael, F. Meersman, F. Ono, P.F. McMillan: Life, **6**, 34 (2016).
- [17] F.D. Stacy, ed.: *Physics of the Earth* (Brookfield Press, 1992).
- [18] F. Ono, Y. Mori, K. Takarabe, A. Fujii, M. Saigusa, Y. Matsushima, D. Yamazaki, E. Ito, S. Galas, N.L. Saini: Cogent Physics, **3**, 1167575 (2016).
- [19] F. Ono: in *High Pressure Bioscience*, eds. K. Akasaka, H. Matsuki (Springer, 2015), Chap. 22, pp. 443–466.
- [20] F.P. Bundy, H.T. Hall, H.M. Strong, R.H. Wentorf: Nature, **176**, 51 (1955).
- [21] F. Ono, N. Nishihira, M. Sougawa, Y. Hada, Y. Mori, K. Takarabe, M. Saigusa, Y. Matsushima, D. Yamazaki, E. Ito, N.L. Saini: High Pressure Res., **33**, 362 (2013).

[2016 年 11 月 7 日受付, 2017 年 1 月 6 日受理]

© 2017 日本高圧力学会