

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20952

研究課題名(和文) 元素特異的ナノスケールCTで迫る微生物と生息空間 ナノ空間地球微生物学の幕開け

研究課題名(英文) 3D visualization of microbes and surrounding environment by nano-xCT

研究代表者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(高知コア研究所)・主任研究員

研究者番号：30421845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物とそれを取り巻く微小空間、つまり「微生物の家」はどれくらい大きいのか？どのような物質で囲まれているのか？全地球バイオマスの数～10%程度を占め、生態が謎に包まれる海底下微生物を観察対象とし、地層環境中での微生物存在様態を明らかにすることを目的としてCTによる可視化を目指した。微生物に重元素を付加した染色や空隙を可視化するイオン液体の活用などを通じて、微生物レベルの空間分解能でCT観察を実現した。さらに元素特異的にコントラストが変化するCT観察も実施し、微生物様の粒子を環境試料で可視化することにも成功し、選択的可視化への課題も発見することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「環境と相互作用しながら生きる微生物とその周辺環境の三次元可視化・観察」これが本研究での挑戦であり、その意義である。海底下に限らず、微生物が生育する環境では微生物自身が行う代謝反応により様々な化学グラジエントが形成され、その結果として物理的な生息環境の改変も起こる。このような海底下の持続的物質動態を本質的に理解する上で、主体となる生命活動とその周辺環境を観察することこそが必要なアプローチである。これまで二次元的な観察またはその連続によって可視化されてきた微生物と生息空間を3次的に解析するために必須の研究であると自負している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the subseafloor sedimentary biosphere through the approach aimed to visualize microbes and their surrounding environment in a 3D manner by using an X-ray CT scanning approach. The chemical addition of heavy elements to microbial cells and impregnating ionic liquids enabled the microbe-scale visualization of natural marine sediment samples. Also, we further tried element-specific contrast enhancements and identified issues for future.

研究分野：地球微生物学

キーワード：海底下生命圏 生存空間 CT

1. 研究開始当初の背景

深い海の底のさらに下、泥や岩石で形成される海底地層には地球最大級の生命圏が広がっている。これまで海底地下2.5 kmまでの海底地層内から生命が発見されている[1]。1 cm³あたり10³-10⁹細胞の微生物細胞が存在し、海底下全体では地球生命炭素量の数~10%ものバイオマスに達すると推算されている[1,2,3]。この膨大な海底下生命は人間が直接目にするのでできない地層環境で何をしているのか？代謝産物としてメタンハイドレートのようなエネルギー資源を生成するなど、地球規模での物質循環においてその役割が重要視されている[4]が、極限環境へのアクセスの難しさなどから依然として「地球最後の秘境」といわれる謎に包まれた生命圏であり続けている。

その一因として、地層環境が持つ複雑な物理構造と、多数の有機・無機粒子で構成される試料を解析する難しさがある。これまで、陸上地下圏を含め、非生物粒子が大部分を占める地下圏微生物の分布を詳細に可視化した例は、研究代表者の知る限り皆無である。近年になり、海底下微生物生命の生存状態や断片的な物質代謝が明らかとなり、生態解明の糸口が見えてきた。しかし、微生物細胞の微視的かつ立体的な分布に関する根本的な問いに答えられる科学的知見は得られていない。微生物の“家”とも言える生息空間はどのように空間的に配置し、それが微生物の代謝、物質移動をどのように促進または制約するのか？これらの疑問はすべて現在も未解決のままである。換言すれば、海底下地層環境中で微生物によって進行する物質循環プロセスの空間的因子に関する理解が欠けた状態にあるとも言え、新しいアプローチをもって解決すべき問題となっていた。

[1] Inagaki, Morono et al. Science (2015) [2] Parkes et al. Hydrogeol J (2000)8:11-28. [3] Kallmeyer et al. (2012)109:16213-6. [4] D'Hondt et al. Science (2004) 306:2216-21.

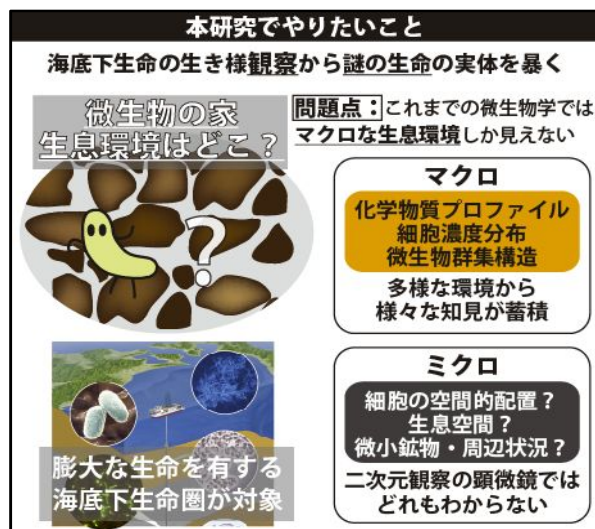


図1:本研究の目的

2. 研究の目的

環境中に存在する微生物はどんな生息空間に暮らしているのだろうか？光学・電子顕微鏡や分子生物学が飛躍的に進歩し、微生物群集の生態が次々と明らかにされている。しかし、微生物が実際に活動する「微生物の家」とも言える生息空間を攪乱なく可視化した例はほぼ皆無である。これを立体的かつサブミクロンスケールで実現し、極限環境における生命存続戦略や地球規模の元素循環に果たす微生物生命の役割へと繋がる知見を得ることが本研究の目的である。全地球バイオマスの数~10%程度を占め、その生態が謎に包まれる海底下微生物を対象とし、超高空間分解能 X 線 CT(コンピュータ断層撮影、X 線 μCT)で微生物、及び空隙を選択的に可視化することを試みた。

3. 研究の方法

三次元的な試料中に存在する空隙について情報を得るためには、例えば試料を樹脂で包埋したものをマイクロームなどで平面切断した表面、または試料を連続的に薄くスライスして作成した薄片などの(電子)顕微鏡による観察結果から三次元構造を可視化するような試みが行われている。また、X 線 CT を利用した三次元可視化においては、試料を構成する物質の X 線吸収係数の違いにより空隙と物質部分を見分けることが行われ、三次元構造中で X 線吸収係数の低い部分が空隙部分として検出されていた。しかし、炭素や窒素、酸素、水素などの軽元素から成る有機物は空隙に存在する水と同様に X 線吸収率が低い。そのため、X 線吸収係数が高い鉱物などを含む地層試料などの場合には、空隙と有機物を見分けられるほどコントラストが得られることが困難となる。共に X 線吸収率が低い水と有機物を見分け、水や流体が浸透可能な空隙を可視化することが課題となっていた。そこで、本研究ではコントラストを改善するために微生物細胞へ重元素を付加する手法、空隙にイオン液体を浸透させることで空隙の X 線吸収係数を変化させる方法、X 線吸収分光的なコントラスト増強を行うこと、この三点について検討を行った。

4. 研究成果

<オスミウム付加による微生物細胞コントラストの増強>

微生物を含む生体試料を可視化するにあたって重元素を付加する処理は電子顕微鏡用観察試料の作成でよく行われる。この中で、酢酸ウランやリンタンゲステン酸を用いて行うネガティブ染色では、微細な観察対象の周辺部に重金属を残留させ、微細構造のコントラストを増加させて観察する。これに対して、オスミウムは細胞の生体分子に直接結合し、細胞自体に重金属を付加

する。このオスミウム染色法であれば細胞自体のコントラストが増強されると考えた。

また、X 分光学的な側面も活用した CT 測定を試みた。物質に入射する X 線エネルギーを徐々に上げると、X 線の吸収強度が急峻に変化する現象が起こる。これは入射 X 線のエネルギーが内核電子の結合エネルギーと同等になった時に起こる吸収端と呼ばれ、元素ごとに異なる。この吸収端前後の X 線エネルギーで CT 撮影を行えば、特定元素のみ吸収計数が変化し、元素特異的に可視化が出来る。本研究ではこれを微生物、孔隙の選択的可視化の手段として用いた。

実際に、オスミウムで染色した大腸菌、および嫌気グラニュール汚泥のグラニュールを CT 測定した結果を図 2 に示す。測定は Spring-8 の BL20XU または BL47XU ビームラインで行った。元素ごとに吸収端のエネルギーは異なるが、今回の測定ではオスミウムの 2p_{3/2} 軌道に対応する L3-edge 吸収端 (10.870 keV) の上下で測定を行った。また、柔らかいままの試料を測定することが出来ないため、試料をそれぞれエポキシ樹脂に包埋し、整形したものを測定試料として使用した。標準試料で吸収端上下でのコントラスト強化が起こるエネルギーについてキャリブレーションを行った後、実試料で測定を行ったところ、吸収端より下のエネルギーでの測定 (図 2A) では大腸菌細胞が樹脂と区別がつかず、樹脂の塊のようにしか見えてなかったところ、吸収端より上のエネルギーでの測定 (図 2B) では大腸菌細胞が存在しているところが明るくコントラストがついた断面像が得られた (CT 像で明るく見えるのはその場所の X 線吸収係数が増加していることを意味する)。グラニュールでの測定ではよりはっきりとオスミウムによるコントラスト増強を確認することが出来た (図 2C, D)。

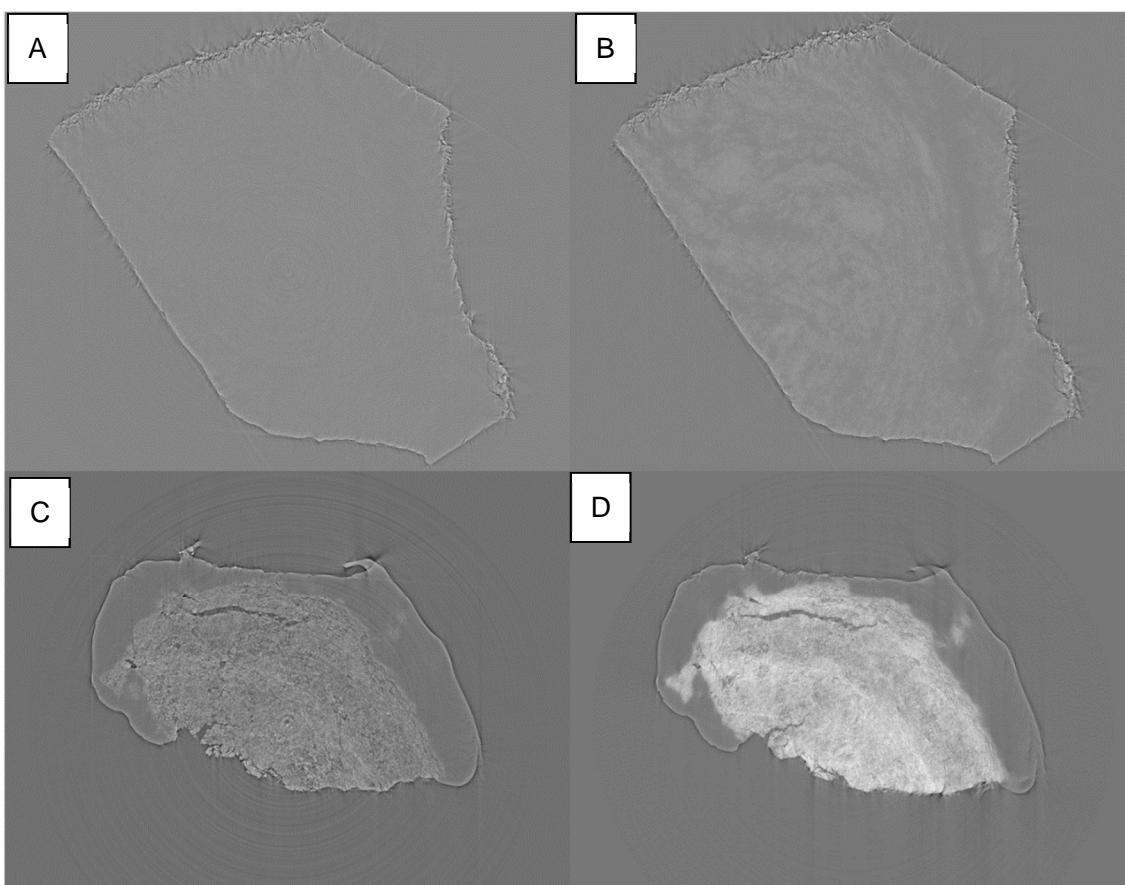


図 2：オスミウム染色した試料の CT 断面像の一例。A, B: 大腸菌、C, D: グラニュール汚泥。A, C はオスミウム吸収端より下のエネルギー (10.845 keV)、B, D はオスミウム吸収端より上のエネルギー (10.875 keV) での CT 測定結果。ピクセルサイズは 0.5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$

測定したピクセルサイズが 0.5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ と、微生物を可視化するには不十分であったため、さらに空間分解能が高い CT 測定を実施した (図 3 A、ピクセルサイズ 40 nm/pixel)。その結果、大腸菌の細胞を一つ一つ可視化することに成功した。一方で、問題点も明らかとなった。空間分解能が高い CT 測定を、吸収端をまたぐ二つのエネルギーで実施すると、Z 軸方向 (測定試料の縦方向) で同じ断面の像であるはずなのに形状が異なり、重ねられない事実が判明した。実は、空間分解能が低い CT 測定でも同様の事象は起こっていたが、断面を上下どちらかに動かすなど、微調整を施すことでほとんど重ね合わせることが出来、コントラストの変化が起こっている部分を容易に特定することが出来た。しかし、空間分解能が高い場合にはそのずれが大きく、また、重ね合わせが出来ないくらい形状が異なっていた。この原因については、高エネルギーの X 線を試料に投影することによる、試料へのダメージおよびそれによる微小形状変化、またはエネルギーが変わることによる X 線用レンズ (ゾーンプレート) の収差が考えられた。

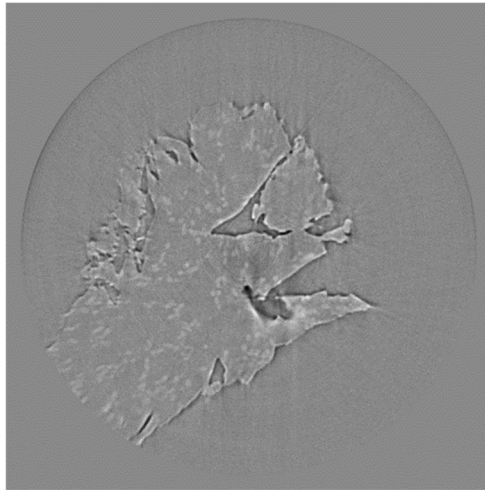


図3：大腸菌の高空間分解能 CT 断面映像の例。ピクセルサイズは約 40nm/pixel

< イオン液体による空隙コントラストの増強 >

人体の CT 検査でも使われている造影剤を用いた空隙の可視化を着想した。つまり、試料の空隙を満たしている水を造影剤と置換することで選択的可視化を実現する。X 線 μ CT は水を含む試料について高分解能で実施する場合、局所的熱発生による水の沸騰で試料が変形してしまう。これを避けるため、通常はエポキシ樹脂に試料を包埋していたが、これを蒸気圧がほぼゼロであることが知られるイオン液体に置換することを考えた。モデル試料として石英砂、中空ガラスビーズ（水が浸透しない空隙を模擬）、プラスチック片（固形有機物）を寒天で固めたものを準備し、そのまま測定を行ったもの（図 4A）、ハロゲンを含むイオン液体を試料に浸み込ませたもの（図 4B）を準備し、高知コアセンターの汎用マイクロ xCT で測定を行った。

その結果、イオン液体を使わない測定の場合は、中空ガラスビーズと石英砂は水と十分なコントラストで可視化出来ていたが、プラスチック片は予想通り水と十分なコントラストが無く、可視化することが不可能であった。これに対し、イオン液体を浸透させた試料の測定では、イオン液体を浸透させた空隙の X 線吸収係数が大きくなったため、中空ガラスビーズ、プラスチック片、石英がすべて可視化されていた。また、さらにイオン液体の濃度を高めた試料の場合は空隙の X 線吸収係数が高くなりすぎて中空ビーズとプラスチック片の見分けがつけられなくなる問題も発生した。

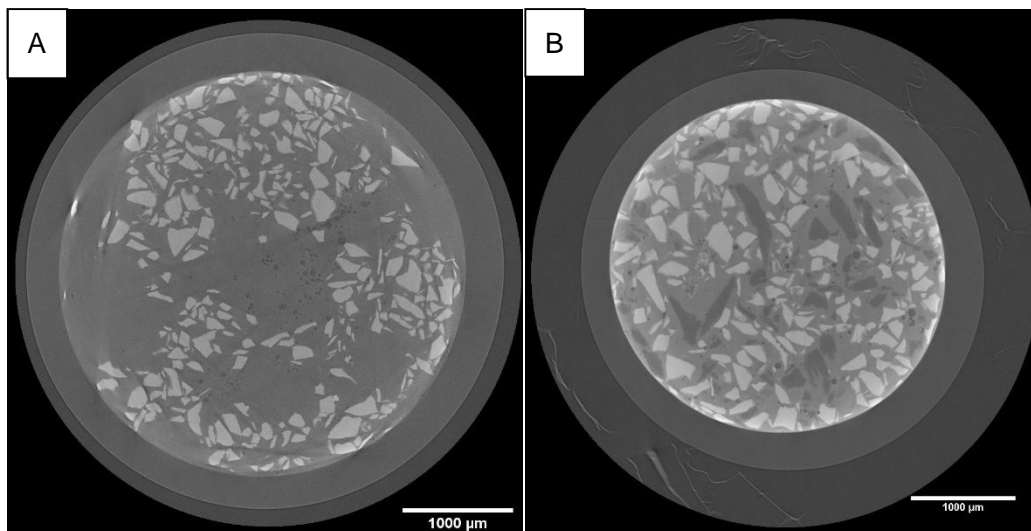


図4：モデル試料を用いたイオン液体浸透後の xCT 撮影例、寒天で固めた試料をそのまま（A）、試料中の水をイオン液体と置換して（B）測定を行った。

以上のように、微生物、空隙の双方についてこれまで不可能であったコントラストを付けた CT 測定を実施する方法を組み立て、その有効性を検証する成果を得ることが出来た。今後は実環境試料への応用を確実に実施するため、試料の成型方法など、別の問題を解決しながら環境試料の三次元可視化に取り組んでいく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mori Fumiaki, Nishimura Tomoya, Wakamatsu Taisuke, Terada Takeshi, Morono Yuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Simple In-liquid Staining of Microbial Cells for Flow Cytometry Quantification of the Microbial Population in Marine Subseafloor Sediments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME21031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morono Yuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Bringing 100 million-year-old marine microbes back to life	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 TheScienceBreaker	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25250/thescbr.brk532	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Heuer VB, Inagaki F, Morono Y, Kubo Y, Spivack AJ, Viehweger B, Treude T, Beulig F, Schubotz F, Tonai S, Bowden SA, Cramm M, Henkel S, Hirose T, Homola K, Hoshino T, Ijiri A, Imachi H, Kamiya N, Kaneko M, Lagostina L, Manners H, McClelland H-L, Metcalfe K, Okutsu N, Pan D, Raudsepp MJ, Sauvage J, Tsang M-Y, et al.	4. 巻 370
2. 論文標題 Temperature limits to deep subseafloor life in the Nankai Trough subduction zone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1230-1234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abd7934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Morono, Y., M. Ito, T. Hoshino, T. Terada, T. Hori, M. Ikehara, S. D'Hondt and F. Inagaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Aerobic microbial life persists in oxic marine sediment as old as 101.5 million years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17330-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Morono, Y., K. Kubota, D. Tsukagoshi and T. Terada	4. 巻 35
2. 論文標題 EDTA-FISH: A Simple and Effective Approach to Reduce Non-specific Adsorption of Probes in Fluorescence in situ Hybridization (FISH) for Environmental Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME20062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Morono Y, Ito M, Hoshino T, Terada T, Hori T, Ikehara M, D'Hondt S, Inagaki F.
2. 発表標題 白亜紀の超貧栄養海底下堆積物から生きて発見された生命
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諸野祐樹、久保田健吾、塚越大介、寺田武志
2. 発表標題 EDTA-FISH: 環境試料のFluorescence in situ Hybridization (FISH)において非特異的プローブ吸着を抑制する効果的かつシンプルなアプローチ
3. 学会等名 第21回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Morono Y, Ito M, Hoshino T, Terada T, Hori T, Ikehara M, D'Hondt S, Inagaki F.
2. 発表標題 Aerobic microbial life in oxic sediment of South Pacific Gyre persists up to 101.5 million years
3. 学会等名 American Geophysical Union Fall meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 諸野祐樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 くもん出版	5. 総ページ数 96
3. 書名 生物がすむ果てはどこだ？	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 試料の空隙を可視化する方法	発明者 諸野祐樹, 浦本豪一 郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-201369	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山村 雅幸 (YAMAMURA Masayuki) (00220442)	東京工業大学・情報理工学院・教授 (12608)	
研究分担者	浦本 豪一郎 (URAMOTO Go-ichiro) (70612901)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・講師 (16401)	
研究分担者	谷川 亘 (TANIKAWA Wataru) (70435840)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(高知コア研究所)・主任研究員 (82706)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------