

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21839

研究課題名(和文) 地下生物圏探索のための岩石中への流体と微生物の隔離と流体個別採取に関する研究

研究課題名(英文) Individual fluid sampling and isolation of bacteria in fluid inclusion

研究代表者

土屋 範芳 (Tsuchiya, Noriyoshi)

東北大学・環境科学研究科・教授

研究者番号：40207410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：石英中に豚アルブミン溶液を封入し、人工的に流体包有物を合成する実験に成功し、さらにこの流体包有物に対してラマンスペクトル計測を実施し、C-H結合に由来するスペクトルを得ることができた。この結果を基に、天然の黒鉱鉱床(秋田県 相内鉱山産)の黒鉱試料中の流体包有物に対して、ラマンスペクトル計測を試み、豚アルブミンと同様なC-H結合に由来するスペクトルを得ることができて、黒鉱鉱石中には有機物が含まれていることがわかった。微生物である確証は得られていないが、この方法を展開することにより、海洋噴気堆積性鉱床に関わる微生物の存在や、地下生物圏の探索に応用できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地圏環境にはまだ未発見の生物が隠されており、それらは岩石・鉱石中の流体包有物中に隔離されていると推定される。この生物痕を調査するために、流体包有物を個別にラマン計測する方法を考案し、海底噴気堆積性黒鉱中の流体包有物に有機物が含まれることをはじめと認められた。まだ生物であるかどうかの確証は得られていないが、この方法を展開することにより未知の生物の探索につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in synthesizing fluid inclusions artificially by encapsulating albumin solution in quartz, and then conducted Raman spectroscopy of these fluid inclusions to obtain spectra derived from C-H bonds. Based on these results, we attempted Raman spectroscopy of fluid inclusions in black ore samples from a natural black ore deposit (Ainai Mine, Akita Prefecture), and obtained spectra derived from C-H bonds similar to those of albumin, indicating that the black ore contains organic matter. Although we have not yet obtained proof of the presence of microorganisms, we believe that this method can be applied to the search for the presence of microorganisms associated with marine hydrothermal sedimentary deposits (VMS: Volcano hosted Massive Sulfides) and the underground biosphere.

研究分野：地圏環境科学

キーワード：地下生物圏 流体包有物 海底噴気堆積性鉱床 微生物隔離 ラマン分光計測

## 1. 研究開始当初の背景

地下生物圏には、多様な生態系環境が存在していると推定されているが、地下生物圏の解析手法は未だ充分には開拓されていない。

岩石中には流体が含まれており(流体包有物)、この中の微生物の生態情報を解析できれば、地下生物圏探索は大きく前進する。本研究は、岩石内に微生物含有人工流体包有物を合成し、その流体包有物の特徴情報や位置情報を失うことなく流体を個別に採取し、地下生物圏の微生物ゲノム解析技術の端緒を切り開く。

## 2. 研究の目的

本研究は、岩石内に微生物含有人工流体包有物を合成し、その流体包有物の個別流体を採取して、保存し、流体包有物中に含まれている流体中の微生物のシングルセルゲノム解析技術、ラマン分光による DNA 構造解析が可能かについて検討を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 人工流体包有物合成実験：流体包有物には鉱物生成時に形成された初生流体包有物、

その後の流体を取り込んだ二次流体包有物に大別される。この2つの異なる流体包有物は顕微鏡下では容易に識別が可能であるので、非破壊検査できれば、異なる地質時代の地下生物圏情報をおのおの独立に取り出すことができる。したがって、A 微生物を入れた初生流体包有物を合成し、その後、B 微生物を入れた二次流体包有物を合成して、それらが互いに汚染せずに隔離され、独立にゲノム解析できれば、各地質環境での生物圏情報を取得することが可能となるであろう。対象鉱物は石英とする。石英の種結晶および好熱微生物を含むシリカ飽和溶液をオートクレーブ内に封入し、長期間加熱し、微生物含有初生流体包有物鉱物と二次包有物を、ひとつの石英結晶内にそれぞれ独立に合成する。

(2) 個別流体採取：流体包有物に含まれている流体を個別に取り出すことができれば、初

生流体包有物は、その鉱物が生成したときの地下生物圏情報が、また二次流体包有物は、その後の地下生物圏情報を獲得することができる。このためには、流体包有物の性状を確認しながら個別に流体を採取する必要がある。レーザーラマン分光装置により個別の流体の情報を獲得したあと、レーザーアブレーション法を用いて、流体を外界に導いて保存溶液を含むサンプルに保存する。この試料に対してシングルセルゲノム解析を行う。

## 4. 研究成果

2020 年度は、コロナ禍により、当初予定どおりの研究は行えなかったが、2021 年度になって、海底噴気堆積鉱床を形成するブラックスモーカーのモデルとして、秋田県黒鉱鉱床区でのチムニー跡から試料を採取し、微生物探索のための試料作りを行った。

海底噴気堆積性鉱床は、海底下での熱水の噴出により硫化物が沈殿して形成される鉱床であり、黄鉄鉱の形成温度は明確には求められないが、周囲の海水の急激な冷却の結果



図1 北鹿 相内鉱山跡

と推定され、おそらく 200-100°Cでの低温析出ではないかと推定される。このことから、この気泡および黄鉄鉱の周辺部には、海洋底での特殊環境で生育していた細菌が付着していることが期待される。

秋田県 北鹿（小坂町から大館市にかけての盆地地方）に分布する黒鉄鉱床（相内鉄山：図1）から試料を採取した。黒鉄鉱試料から、薄片を作成し（図2）、流体包有物を観察して（図3）、その流体包有物に対してラマン散乱を測定した。薄片作成時には試料接着のためなどに樹脂を用いるが、これをエタノールで、十分に洗浄除去した。十分に洗浄されているかを、流体包有物のないところで（図4の赤丸印）、測定し、 $1100\text{cm}^{-1}$  に C-P 結合に起因するスペクトルを観察したが、これは含まれている炭酸起源のものとされ C-H 結合に関係するスペクトルは観察できなかった。



図2 黒鉄鉱試料の薄片（脆いため作成は難しい）

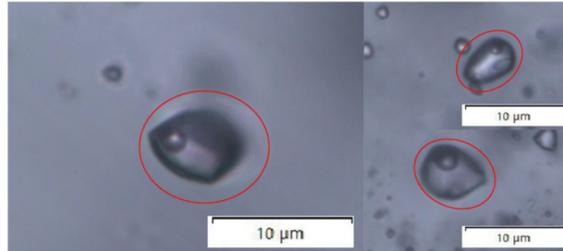


図3 黒鉄鉱試料中の流体包有物

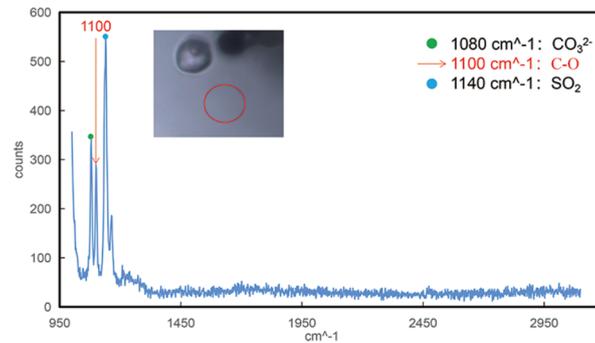


図4 バックグラウンドのラマンスペクトル

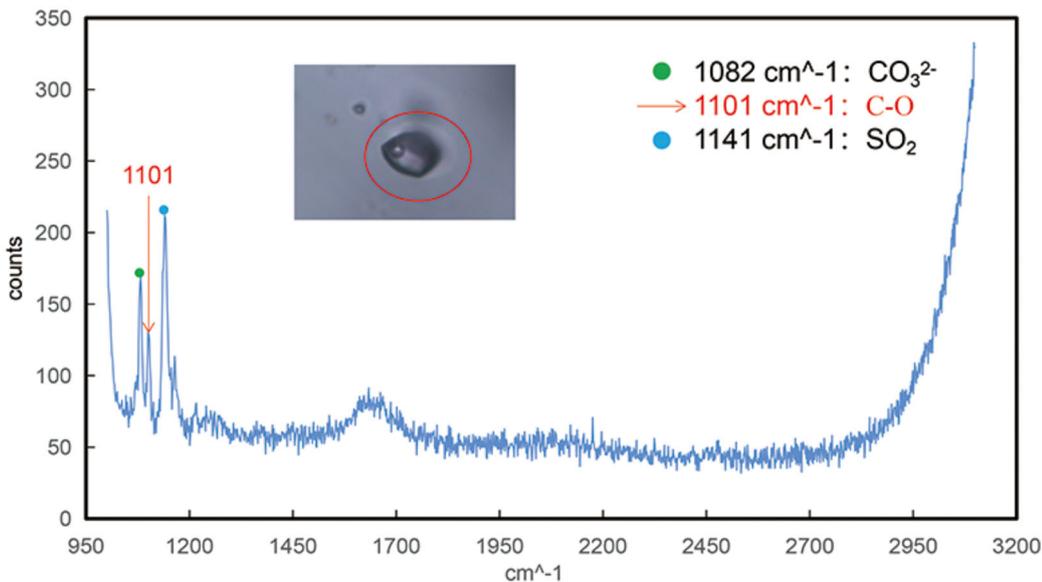


図5 黒鉄鉱試料中の流体包有物のラマンスペクトル

次に、流体包有物に対してラマン分光測定を行った。この結果、 $1100\text{cm}^{-1}$  付近に図5と同様に C-O 振動のスペクトルが観察され（図6）、また  $2900\text{cm}^{-1}$  以上から O-H の水の振動スペクトルが大き

く観察されることがわかった。さらに  $2800-3100\text{cm}^{-1}$  を拡大してみると、 $2878, 2916$  および  $2938\text{cm}^{-1}$  に省ピークが観察され、それぞれ、C-H 結合に起因するスペクトルであることがわかった。これらのことから、黒鉱内の流体包有物内には、何らかの C-H 結合を持つ物質が含まれていると考えることができる。

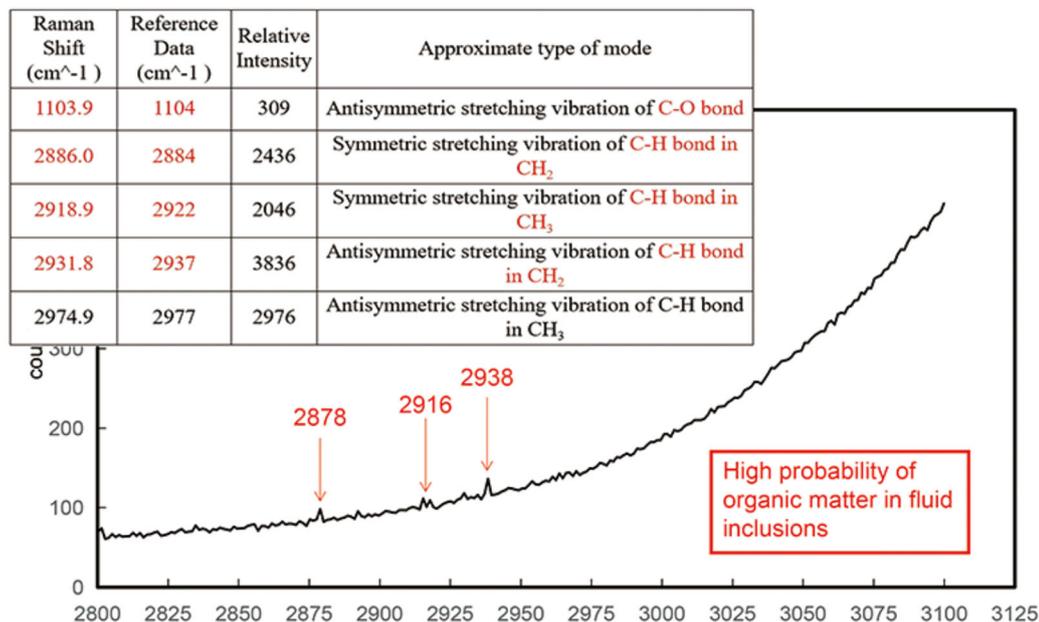


図7 ラマンスpekトルの詳細図 (C-H 結合に起因するスペクトルが観察される)

※ 人工流体包有物の作製

石英をいったん  $400^\circ\text{C}$  まで加熱して、急冷することにより石英試料中にき裂を発生させることができる (図8)。このき裂を発生させた石英試料と水、 $250\text{mg/mL}$  豚アルブミン溶液および石英粉末試料をステンレス製のマイクロオートクレーブに封入し (充填率 95%)、 $125^\circ\text{C}$  で、4日間および8日間加熱した (図9)。

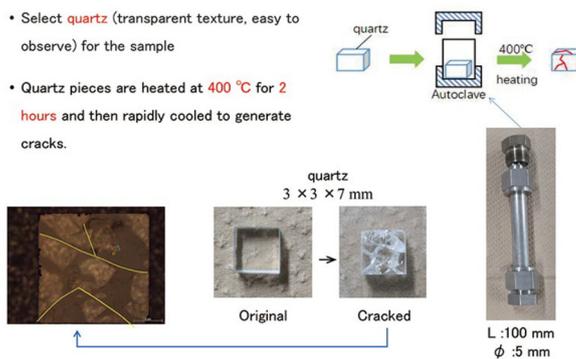


図8 石英に熱衝撃クラックを作製

その後、マイクロオートクレーブより試料をとりだして、薄片を作成し光学顕微鏡で観察した結果、8日間の試料には  $3.2-5.5\mu\text{m}$  の流体包有物を確認することができた (図10)。

この流体包有物に対して、ラマン計測を行ったところ、図11,12のような結果を得た、これは、C-H 結合を示しており、豚アルブミンを含む溶液を岩石内に流体包有物として封入することができたと考えられる。

この流体包有物のラマン分光計測結

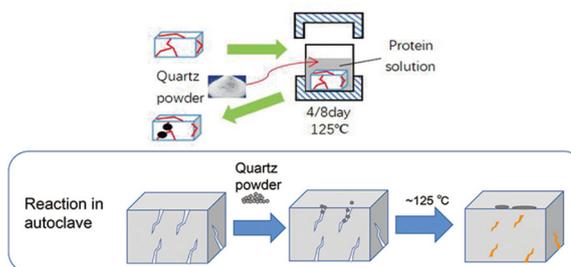


図9 人工流体包有物合成実験

果を図 11,12 に示す。  $1100\text{cm}^{-1}$

( $1094\text{cm}^{-1}$ ) に C-O の結合スペクトルが観察され、さらに図には、黒鉱の中の流体包有物と同様なスペクトルも示したが、ほぼ同様なスペクトルが計測されたことから、この方法で有機物を流体包有物として岩石中に閉じ込めることができたと考えられる。



図 10 合成した人工流体包有物

今後は、より堅固な流体包有物の合成を目指すと共に、好熱細菌を流体包有物中に封入させること、またラマン分光計測で、C-N 結合スペクトルの取得を進めていきたい。

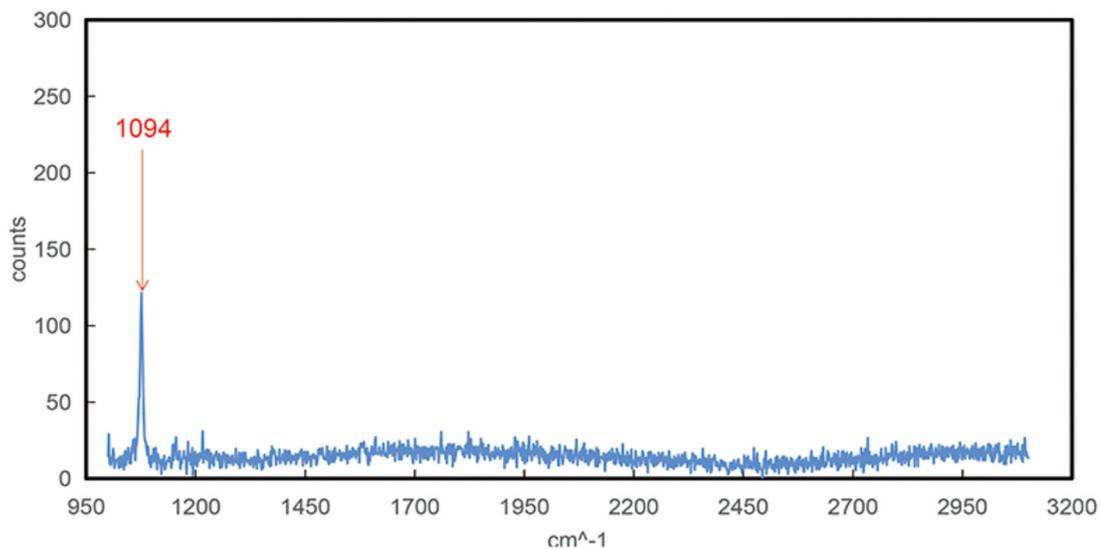


図 11 人工流体包有物のラマンスペクトル

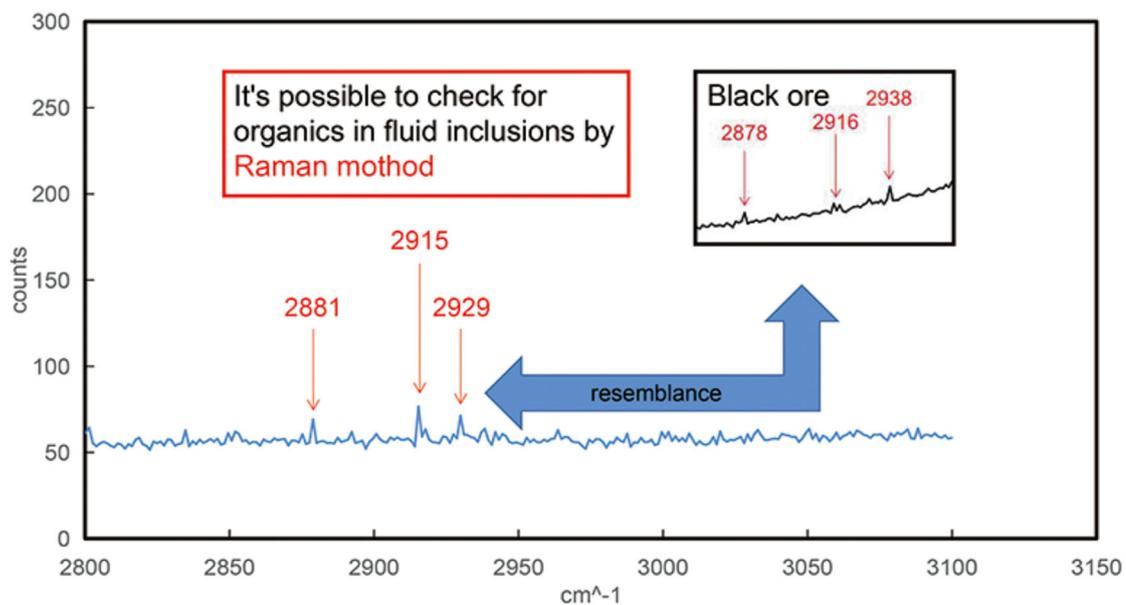


図 12 人工流体包有物のラマンスペクトルの詳細図

(黒鉱内の流体包有物のラマンスペクトルと類似のものが観察される)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryosuke Oyanagi, Atsushi Okamoto and Noriyoshi Tsuchiya	4. 巻 270
2. 論文標題 Silica controls on hydration kinetics during serpentinization of olivine: Insights from hydrothermal experiments and a reactive transport model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geochimica Cosmochimica Acta	6. 最初と最後の頁 21-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gca.2019.11.017	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 -
1. 著者名 Diana Mindaleva, Masaaki Uno, Fumiko Higashino, Takayoshi Nagaya, Atsushi Okamoto, Noriyoshi Tsuchiya	4. 巻 -
2. 論文標題 Rapid fluid infiltration and permeability enhancement during middle lower crustal fracturing: Evidence from amphibolite granulite-facies fluid rock reaction zones, Sor Rondane Mountains, East Antarctica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lithos	6. 最初と最後の頁 105521-105521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lithos.2020.105521	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 -
1. 著者名 Geri Agroli, Atsushi Okamoto, Masaaki Uno, Noriyoshi Tsuchiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Transport and Evolution of Supercritical Fluids During the Formation of the Erdenet Cu Mo Deposit, Mongolia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geosciences	6. 最初と最後の頁 201-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/geosciences10050201	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 -
1. 著者名 Takahiro Watanabe, Noriyoshi Tsuchiya, Shin-ichi Yamasaki, Yuki Sawai, Norihiro Hosoda, Fumiko W. Nara, Toshio Nakamura, Takeshi Komai	4. 巻 118
2. 論文標題 A geochemical approach for identifying marine incursions: Implications for tsunami geology on the Pacific coast of northeast Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Geochemistry	6. 最初と最後の頁 104644-104644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.apgeochem.2020.104644	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 -

1. 著者名 Kazuki Yoshida, Atsushi Okamoto, Hiroyuki Shimizu, Ryosuke Oyanagi, Noriyoshi Tsuchiya, and Oman Drilling Project Phase Science Party	4. 巻 -
2. 論文標題 Fluid Infiltration Through Oceanic Lower Crust in Response to Reaction Induced Fracturing: Insights From Serpentinized Troctolite and Numerical Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Geophysical Research	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) 10.1029/2020JB020268	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 土屋範芳
2. 発表標題 流体のFlashingと岩石破壊
3. 学会等名 日本鉱物科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chen Xiaotian, Wang Jiajie, 平野伸夫, 土屋範芳
2. 発表標題 ラマンスペクトルによる熱水鉱物中流体包有物の 生体物質の検出
3. 学会等名 Japan Geophysical Union 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	平野 伸夫  (Hirano Nobuo)  (80344688)	東北大学・環境科学研究科・助教    (11301)	

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
---------	---------