

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18658

研究課題名（和文）FIB加工薄膜における微生物その場検出法の開発

研究課題名（英文）Development of in-situ detection method for microorganisms in FIB-processed thin foils

研究代表者

白石 史人（Shiraishi, Fumito）

広島大学・先進理工系科学研究科（理）・准教授

研究者番号：30626908

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）：マンガンや炭酸塩などの鉱物に含まれる微生物の分類群を、集束イオンビーム（FIB）加工薄膜中において、走査型透過X線顕微鏡を用いて同定することを目的として研究を行った。様々な蛍光物質で標識されたDNAプローブの検出可能性を探索した結果、検討を行った中ではCy3チラミドで標識されたものが最も適していることが明らかとなった。この手法を、マンガン団塊中に生息する微生物を模した試料に適用したところ、微生物が特異的に検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、鉱物中に存在している微生物様構造が微生物であるかどうか、そしてそれらがどのような分類群の微生物であるかを、集束イオンビーム加工薄膜中において高解像度に判断する手法の可能性が提示された。この手法を確立し、マンガン団塊などの金属資源や、微生物性炭酸塩岩による石油貯留岩などに適用することで、資源等の形成に微生物がどのように関与しているのか、理解が進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted a study to identify microbial taxa contained in minerals such as manganese and carbonate using a scanning transmission X-ray microscope in focused ion beam (FIB) processed thin foils. As a result of exploring the detectability of DNA probes labeled with various fluorescent substances, it became clear that the one labeled with Cy3-tyramide was the most suitable among those investigated. When this method was applied to a sample simulating microorganisms living in manganese nodules, microorganisms were specifically detected.

研究分野：地球微生物学

キーワード：集束イオンビーム加工 微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

集束イオンビーム (FIB) 加工は、狙った位置からピンポイントで透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察用の薄膜試料を作成できるため、地球惑星科学では特に鉱物学分野で広く用いられている。微生物-鉱物相互作用に関しても、FIB 加工薄膜を用いた研究によって理解が深まりつつある。しかしながら、FIB 加工薄膜において鉱物が TEM などによって正確に同定されるのに対し、微生物の存在は形態的特徴や有機物分布から判断されているために、確証が得られないことが多い。また仮に微生物であるとの確証が得られたとしても、天然環境中には鉱物と無関係の微生物も大量に存在しているため、微生物と鉱物が近接しているだけでは相互作用の証拠とはならない。

2. 研究の目的

そこで本研究は、微生物-鉱物相互作用を理解するため、FIB 加工薄膜中において 1) 微生物の存在とその分類群 (代謝の種類など)、そして 2) 微生物周辺鉱物の特徴 (微生物代謝の痕跡など) を明らかにすることを可能にする新手法の開発を目指す。この手法をマンガン団塊などの金属資源や、微生物性炭酸塩岩による石油貯留岩類似物などに適用することができれば、資源等の形成に微生物がどのように関与しているのか、理解が進むと期待される。

3. 研究の方法

「微生物のような構造」の中に核酸が存在していれば、微生物である可能性が高い。微生物の核酸を検出する手法の一つに SYBR Green I 染色がある。また、核酸の中でもリボソーム RNA (rRNA) が大量に存在していれば、その微生物が活動していた証となる。rRNA を検出する手法の一つに、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法がある。これは標的微生物の rRNA に対して相補的な塩基配列を持つ蛍光標識 DNA プロブを結合させることで、標的微生物を蛍光顕微鏡によって検出する手法である。本研究では、鉱物と微生物が混在する試料に対して SYBR Green I 染色または FISH 法を適用し、その FIB 加工薄膜を TEM および透過型走査 X 線顕微鏡 (STXM) を用いて観察・分析することで、微生物の存在とその分類群、そして微生物周辺に特異的な鉱物学的・化学的特徴を明らかにすることのできる手法の開発を目指す。

4. 研究成果

まず初めに、SYBR Green I による微生物の検出に取り組んだ。マンガン団塊を模擬するために、人工的に合成したマンガン酸化物 ($\delta\text{-MnO}_2$) と、SYBR Green I で核酸染色した大腸菌を混合し、樹脂に包埋した。この試料から FIB 加工薄膜を作成し、TEM および STXM で観察・分析を行った。C 吸収スペクトルでは、大腸菌が存在する部分で細胞由来のピークがわずかに検出された一方で、SYBR Green I 由来のスペクトルは検出困難であった (図 1)。また、共存する $\delta\text{-MnO}_2$ の Mn 吸収スペクトルは本来の Mn(IV)ではなく、Mn(II)を示しており、FIB 加工や STXM の X 線によるビームダメージの可能性が疑われた。

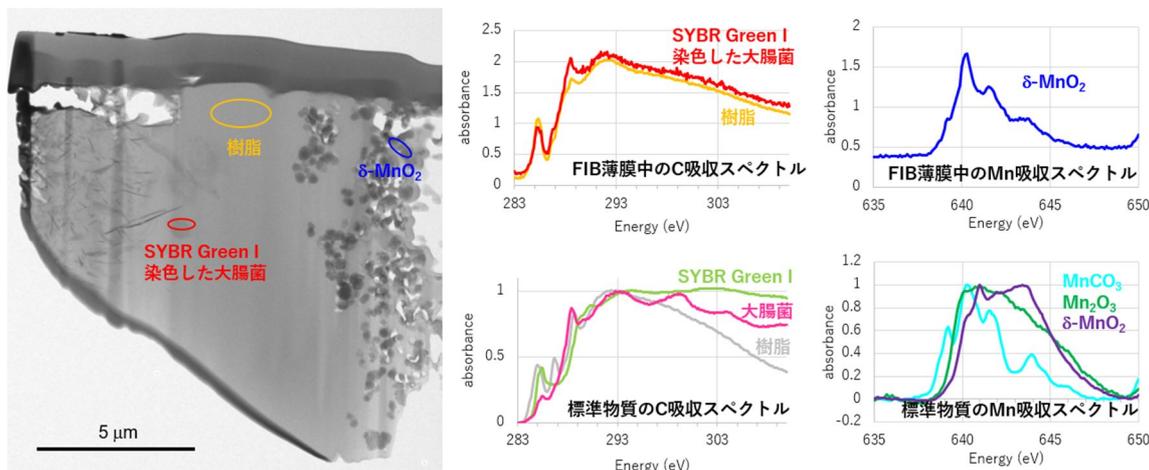


図 1 .(左) $\delta\text{-MnO}_2$ と、SYBR Green I で核酸染色した大腸菌を樹脂包埋し、その FIB 加工薄膜を TEM で観察した像。(右) 試料の各部位から抽出した X 線吸収スペクトル、および標準物質の X 線吸収スペクトル。

そこで $\delta\text{-MnO}_2$ と SYBR Green I 染色した大腸菌の混合物を、FIB 加工せずに直接炭素支持膜付き銅グリッド上に載せ、STXM 分析を行った。その結果、 $\delta\text{-MnO}_2$ の Mn 吸収スペクトルは多くが本来の Mn(IV)を示した (図 2)。この結果は FIB 加工の際、ガリウムイオンビームのダメージによって Mn(IV)が Mn(II)に還元されうことを示している。しかしながら、銅グリッド上においても一部の $\delta\text{-MnO}_2$ は Mn(III)に類似したスペクトルを示し、これは共存する有機物と

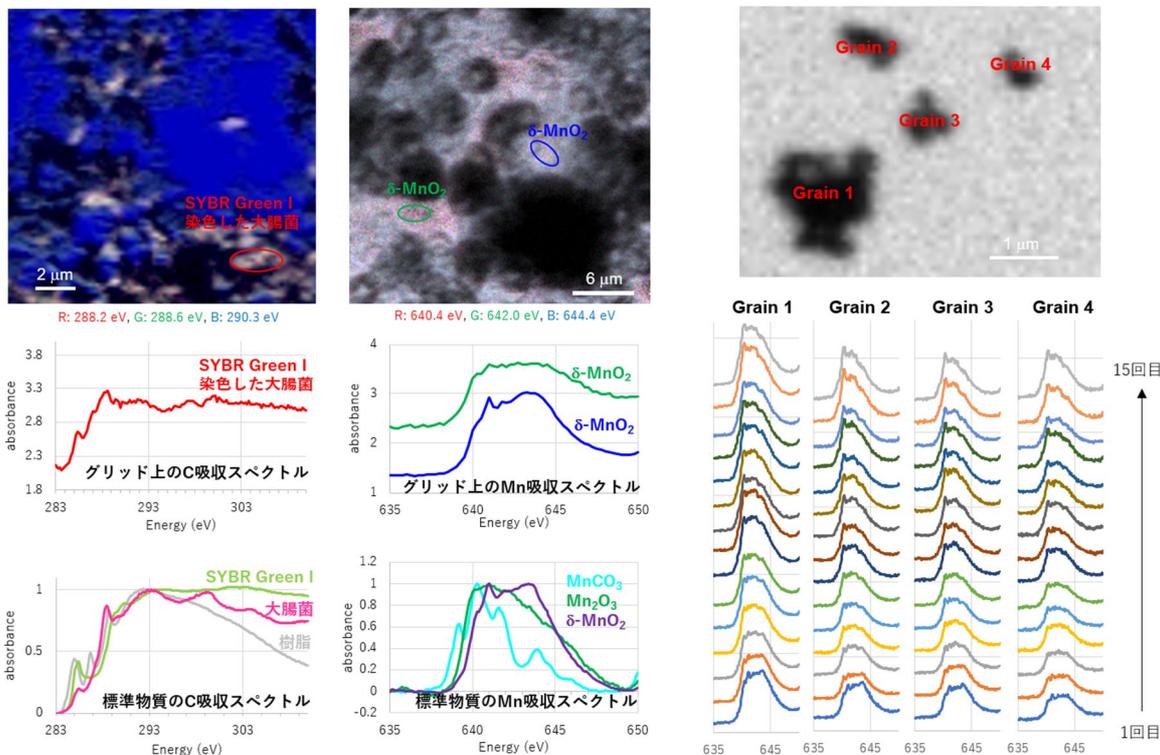


図2 . (上) $\delta\text{-MnO}_2$ と、SYBR Green I で核酸染色した大腸菌を炭素支持膜付き銅グリッド上に載せ、STXM で観察した像 . (下) 試料の各部位から抽出した X 線吸収スペクトル、および標準物質の X 線吸収スペクトル .

図3 : $\delta\text{-MnO}_2$ を STXM で 15 回スキャンした時のスペクトル変化 (0.1 eV step, 0.1 μm step, dwell 3) .

X 線によってマンガンの還元が起きていることを示すのかもしれない . 一方、SYBR Green I は前述の FIB 加工試料の場合と同様に検出困難であり、このことは SYBR Green I が STXM での検出に適していないことを示している .

念のため、STXM の X 線によるダメージの評価も行った . $\delta\text{-MnO}_2$ のみを炭素支持膜付き銅グリッドに圧着し、4 つの $\delta\text{-MnO}_2$ 粒子に対して 15 回のスキャンを繰り返したところ、全ての粒子において Mn(II) に特徴的な約 640.5 eV のピークが徐々に顕著になったが、それでもなお全体のスペクトルは Mn(IV) に類似したままであった (図3) . このことから、X 線も Mn(IV) の還元に寄与するものの、FIB 加工による還元の方が影響としては大きいことが示された . 今後マンガン酸化物の FIB 加工をする際は、ガリウムイオンビームの加速電圧を低くするなど、還元を低減するための工夫が必要であろう .

次に、FISH 法による微生物の検出に取り組んだ . まず、21 種類の物質で標識された EUB338 の FISH プロブおよび蛍光物質 (Cy3 チラミド、Cy3.5、Cy5、HRP、BIO、BIOdT、DBCOTEG、AmC12、AmC3、2OMeA、5MedC、BHQ1dT、BHQ2dT、BioON、BioTEG、PHO、AmC6、DeoxyInosine I、DeoxyInosine U、Azido、Alkyne) から C と N の吸収スペクトルを網羅的に取得し、STXM での検出に適したものを探索した . その結果、特に Cy3 チラミドの C 吸収スペクトルにおいて約 285.2 eV と約 285.8 eV に特徴的なピークが認められた (図4) . そこで、Cy3 チラミドを用いた FISH 法 (CARD-FISH 法と呼ばれる) を適用した大腸菌を $\delta\text{-MnO}_2$ と混合し、それらを炭素支持膜付き銅グリッド上に載せて STXM 分析を行った . その結果、蛍光観察で CARD-FISH 標識されて

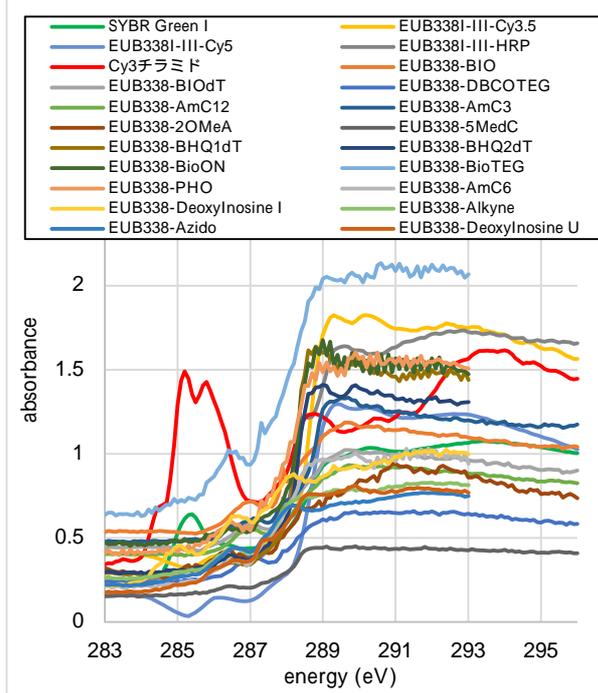


図4 . 様々な物質で標識された FISH プロブ、CARD-FISH に用いられる Cy3 チラミド、および SYBR Green I の C 吸収スペクトル .

いることが明らかな大腸菌からは、タンパク質由来の約 288.2 eV のピークに加え、約 285.2 eV と約 288.4 eV にもピークが見られた (図 5). 約 288.4 eV のピークは大腸菌の標準スペクトルにも見られるが、約 285.2 eV のピークは Cy3 チラミド由来であると考えられる。ただし、Cy3 チラミドの標準スペクトルと比べるとピークが小さく、また約 285.8 eV のピークは認識できない。これらのことから、検討した標識物質の中では、Cy3 チラミドが STXM による検出に最も適しているが、CARD-FISH 法適用後の微生物細胞内で検出するには濃度や特異性が十分であるとは言い難い。将来的には、より特異的な物質の探索や、元素による標識を検討する必要があるだろう。

本研究ではまた、新手法の潜在的適用対象である様々なマンガン・炭酸塩試料についても、予察的検討を実施し、標識物質の微生物細胞への輸送経路が本手法の成否にとって重要であることを見出した。

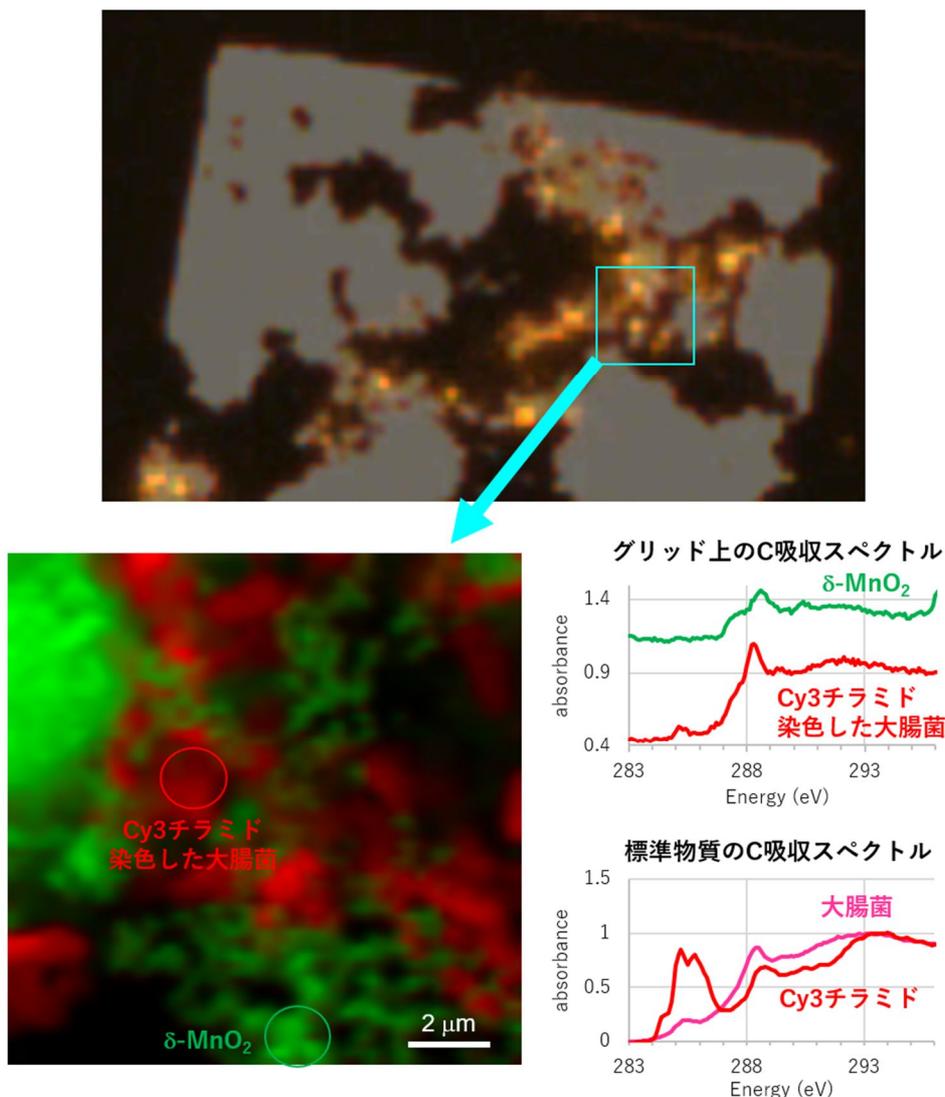


図 5 .(上) δ -MnO₂ と、Cy3 チラミドを用いた CARD-FISH 法を適用した大腸菌を炭素支持膜付き銅グリッド上に載せ、顕微鏡で蛍光・透過光観察し、重ね合わせた像。オレンジ色の明るい点が Cy3 チラミド標識された大腸菌。(左下) 青枠内から STXM でイメージスタックを取得し、2 つの代表的な C 吸収スペクトルを用いて特異値分解した像。(右下) 試料から抽出した 2 つの代表的な C 吸収スペクトル、および標準物質の C 吸収スペクトル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiraishi Fumito, Akimoto Takayuki, Tomioka Naotaka, Takahashi Yoshio, Matsumoto Ryo, Snyder Glen T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Microbial traces found in microdolomite associated with seep-related shallow gas hydrate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Earth Science	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） 10.3389/feart.2023.1188142	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 Shiraishi Fumito, Chihara Ryoji, Tanimoto Risa, Tanaka Kazuya, Takahashi Yoshio	4. 巻 31
2. 論文標題 Microbial influences on manganese deposit formation at Yunotaki Fall, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Island Arc	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） 10.1111/iar.12448	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 Shiraishi Fumito, Akimoto Takayuki, Tomioka Naotaka, Motai Satoko, Takahashi Yoshio	4. 巻 456
2. 論文標題 Formation processes of paper-thin raft and coated bubble: Calcium carbonate deposition at gas-water interface	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sedimentary Geology	6. 最初と最後の頁 106514 ~ 106514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sedgeo.2023.106514	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12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石史人, 秋元貴幸, 富岡尚敬, 高橋嘉夫, 松本良, Snyder Glen
2. 発表標題 ガスハイドレートに伴って産出するマイクロドロマイトの特徴
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木佑二郎, 藤田和彦, 白石史人
2. 発表標題 沖縄県久米島の礫性微生物皮殻に見られるスフェルライトの起源
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石史人, 秋元貴幸, 富岡尚敬, 轟聡子, 高橋嘉夫
2. 発表標題 水面および気泡を覆う炭酸カルシウム沈殿物の形成過程
3. 学会等名 日本地質学会第129年学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木佑二郎, 藤田和彦, 白石史人
2. 発表標題 沖縄県久米島の礫性微生物皮殻に見られるスフェルライトの起源
3. 学会等名 日本地質学会第129年学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石史人
2. 発表標題 微生物による鉱物形成過程から読み解く地球史・生命史
3. 学会等名 日本地球化学会第69回年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石史人, 秋元貴幸, 富岡尚敬, 轟聡子, 高橋嘉夫
2. 発表標題 大分県長湯温泉に見られる炭酸塩スフェルライトの成因
3. 学会等名 日本地質学会西日本支部第172回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木佑二郎, 藤田和彦, 白石史人
2. 発表標題 沖縄県久米島の礫性微生物皮殻中に見られるスフェルライトの起源
3. 学会等名 日本地質学会西日本支部第172回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木佑二郎, 藤田和彦, 白石史人
2. 発表標題 沖縄県久米島の礫性微生物皮殻中に見られるスフェルライトの起源
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白石史人, 秋元貴幸, 富岡尚敬, 轟聡子, 高橋嘉夫
2. 発表標題 水面および気泡を覆う炭酸カルシウム沈殿物の形成過程
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木佑二郎, 藤田和彦, 富岡尚敬, 高橋嘉夫, 白石史人
2. 発表標題 沖縄県久米島の礫性微生物皮殻に見られるスフェルライトの起源
3. 学会等名 日本地質学会第130年学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白石史人, 秋元貴幸, 富岡尚敬, 轟聡子, 高橋嘉夫
2. 発表標題 ペーパーシラフトとコーティッドバブルの形成過程: 気液界面におけるCaCO ₃ 沈殿
3. 学会等名 日本地質学会第130年学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木佑二郎, 藤田和彦, 富岡尚敬, 高橋嘉夫, 白石史人
2. 発表標題 微細構造観察に基づく炭酸塩スフェルライトの起源推定
3. 学会等名 日本地質学会西日本支部第174回例会
4. 発表年 2024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	富岡 尚敬 (Tomioka Naotaka) (30335418)	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
---------	---------