

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871219

研究課題名(和文)堆積学・地質学的制約から探る海底地下環境における微生物の生息条件

研究課題名(英文)Sedimentological and geological constraints on the habitability of microbes in subseafloor environment

研究代表者

浦本 豪一郎(Uramoto, Go-Ichiro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：70612901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物電子顕微鏡分野で常用される溶媒置換・樹脂包埋処理を海底堆積物試料の処理に導入し、水分を含む海底堆積物試料を物理的に乾燥させることなく樹脂固定する技術を確立した。これによって堆積物の三次元構造の攪乱を抑え、電子顕微鏡や高解像度X線CTで微細構造を観察し、画像解析によって地層の物理特性などを調べる技術を確立した。さらに、軽元素から構成され、従来は電子顕微鏡などで観察できなかった地層試料中の微生物細胞または類似構造を有する固体状有機物などに重金属を付加する電子染色処理を施し、軽元素から成る物質も同時に観察することが可能となり、こうした粒子の地層内での配置様式を調べる手法的基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：This study established a modified resin-embedding method of marine sediments for high-resolution observation of sediment microstructure. The microfocus X-ray computed tomography (micro-XCT) and scanning electron microscopy (SEM) results showed significant microstructural disturbances were not observed in the samples prepared using the new resin-embedding method, and the microstructural arrangement of the sediment were clearly visible. In addition, the porosity visible from SEM images was similar to that measured using the moisture and density method, providing additional evidence that the microstructures were well preserved. The resin-embedding method allowed observation of the limited contact of the fine particles in clayey sediments and the presence of organic materials in environmental sediments. This method is suitable for the detailed observation and characterization of fine-grained marine sediment microstructure.

研究分野：堆積学

キーワード：海底堆積物 海底下微生物 微細構造

### 1. 研究開始当初の背景

世界各地の海洋底科学掘削により、海底堆積物 1 cm<sup>3</sup> あたり 10<sup>3</sup> 細胞を超える微生物が存在し、全地球バイオマス炭素の約 10% を構成する地球最大の微生物生命圏の存在が明らかになってきた。こうした海底下微生物は、堆積物中の鉱物粒子や有機物と相互作用しながら生命活動を育む。その結果、海底下エネルギー資源の生成・分解を含む、物質の移動・集積過程の一翼を担うことが知られる。海底堆積物内の地下生命活動を詳しく理解することは、現在に限らない、海底下での持続的な物質動態の理解に必須の知見をもたらすことが期待される。

しかしながら、海底下微生物の堆積物内での存在様式や、周辺環境と相互作用の実体を示す直接的なデータは未だに得られていなかった。海底下微生物は、堆積物を緩衝液で懸濁し、フィルターにトラップして顕微鏡観察される。近年では、こうした手法を利用し、1 細胞レベルでの炭素源・窒素源を特定、基質取り込み活性を検出し、海底下微生物が生きて存在することが報告されている。また、遺伝子解析と有機・無機化学物質濃度から、海底下で起こる微生物反応が推測されてきた。しかし、生命活動を維持する上で、最重要要件の一つである生息空間、すなわち堆積物の孔隙内における微生物分布は、未圧縮で孔隙に富む海底表層堆積物 (数 cm) 内の原核生物の観察例のみで、孔隙分布がより限定される地下深部での観察例はない。他方、地質学分野で、走査電子顕微鏡画像による海底地下深部堆積物の粒子配列の観察例があるが、試料調製・観察条件の不適合で、堆積物内部の微生物は確認されていない。この場合、試料の間隙水をアルコール置換後、凍結乾燥し、試料の断面を観察するが、乾燥・割断処理に伴う柔らかい微生物の細胞構造の崩壊は免れない。また、微生物の主要構成元素 (炭素、酸素、水素など) の原子番号は、堆積物粒子の主要構成元素 (珪素、カルシウムなど) より小さく、電子線が透過しやすい。堆積物の観察条件では単に微生物が観えない可能性もある。

微生物分布のみならず、堆積物内部のサブミクロンスケール観察は、堆積物の微細構造解析や物性の把握など、異分野で必要とされるアプローチである。堆積物内部で最も柔らかい微生物と堆積物微細構造を同時に観察する技術を確立することは、現状の観察技術の隘路を打開し、海底地下深部での生命の実体、微生物・堆積物の相互作用を分野横断的に理解する足がかりとなることが期待される。

### 2. 研究の目的

そこで本研究は、海底堆積物の孔隙内に存在し、堆積物と相互作用するとされる海底下微生物の生存実態を *in situ ex situ* で観察し、海底下での微生物の存在が堆積物のどのような特徴によって規定されているか、その境界条件を解明することを究極な目的として研究を行った。そのためのアプローチとして、様々な堆積環境、海底表層～地下深部から掘

削された天然堆積物試料と既知の微生物と堆積物を混合した標準試料を用いて、生物学的な電顕試料調製法での処理によって、微生物の産状や存在環境の実体を直接観察する。更に、既往の生物学・地球化学データと共に個別・統合的に解析し、様々な海底地下環境における微生物の生息条件を堆積学・地質学的な側面から明らかにする。

### 3. 研究の方法

まず、既知の微生物と堆積物を混合した標準試料を使用した実験的なアプローチにより、研究目的の達成に必須となる試料処理手法、走査電子顕微鏡や X 線 CT の操作と画像解析手法など、一連の要素技術を確立した。試料処理では、以下の生物学的な電子顕微鏡試料調製法を適用し、地質試料の処理における適切な試料処理条件の探索・手法的基礎を築くことを試みた。

(1) 化学固定法: ブロック状に切り分けてアガロースに包埋した堆積物試料をパラホルムアルデヒド溶液とグルタルアルデヒド溶液に浸漬する。アルデヒド基が堆積物中の微生物や類似構造を有する固体状有機物のタンパク質に結合・架橋構造を形成し、物理的強度を与える処理を実施した。これによって、硬い鉱物粒子が配置する堆積物試料内部に存在する柔らかい有機質の構造であっても、物理的に構造を攪乱することなく観察できるようになった。(2) 電子染色法: 四酸化オスmium水溶液とチオカルボヒドライド水溶液に、交互にブロック試料を浸漬する。オスmiumが不飽和脂肪酸と結合する効果に加えて、チオカルボヒドライドが媒介することでオスmium同士を結合させる。オスmiumは重金属なので、走査電子顕微鏡では反射電子の発生効率を高め、X 線 CT では X 線透過率が低く、観察画像内でオスmiumの存在領域にコントラストをつけることができ、重金属をいわば“トレーサー”として、微生物観察に利用した。(3) 樹脂包埋法、及び研磨・マイクローム切削法: 試料を乾燥させずに溶媒置換、段階的に樹脂を試料内部へ浸透させた後、樹脂を重合させた。樹脂固定試料は研磨ないしマイクロームで削り出し、平滑な試料断面を露出させた。試料観察では、走査電子顕微鏡—エネルギー分散形 X 線分析装置と高精細 X 線 CT を利用し、2 次元・3 次元での海底堆積物の微細構造と微生物細胞の観察を試みた。エネルギー分散形 X 線分析装置の分析では研磨ないしマイクローム切削断面の観察で、微生物と堆積物粒子の分布・相互接続様式を詳細観察した。本研究では切削された平滑な試料断面の観察で、高精度の分析が可能となったので、堆積物粒子、微生物だけでなく、その構成元素もターゲットとし、微生物細胞近傍の元素分布をマッピングした。一方、X 線 CT では樹脂包埋したブロック試料を撮影し、取得画像を処理して 3 次元像を構築する。X 線 CT では、物質の密度と X 線吸収係数に基づく CT 値を反映した輝度の画像が得られる。そこで、画像の輝度情報をヒストグラム化し、画像処理によって堆積物粒子、微生物細胞など

構成物質ごとの3次元分布の把握を試みた。さらに、重金属(オスmium)付加した微生物細胞の配置を特異的に可視化するため、オスmiumのX線吸収率が大きく変化するX線のエネルギー(X線吸収端)前後のエネルギーレベルで試料を測定した。測定データを画像演算することで、付加した重金属を特異的に可視化するための測定条件、画像演算の解析条件を検討した。

天然試料は、国際深海科学掘削計画(IODP)の研究航海(IODP第353次航海)への参加も含めて、国内外の研究航海で取得した試料や、取得済みの様々な堆積環境、海底表層~地下超深部から掘削された天然の海底堆積物試料(青森県下北半島沖、新潟県上越沖、ニュージーランド南島東方沖カンタベリー海盆、南太平洋環流域、インド東縁など)を確保し、本研究に利用した。様々な試料の解析を通して、天然での堆積環境の違いによる微生物活動の差異などを、様々な観察技術を駆使して可視化した。観察結果を、既往の生物学・地球化学的なデータと共に集約し、様々な海底地下環境における微生物の生存様式を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)排出量削減技術の中で、地層中にCO<sub>2</sub>を回収・貯留する技術は、排出CO<sub>2</sub>の約20%を削減できる有効な方法として注目され、技術開発が進み、実際に地層環境への回収・貯留実験が進められている。しかしながら、海底地下の地層環境へCO<sub>2</sub>注入に伴う微生物活動とそれに伴う地層の微細構造への影響を、地下深部環境の温度・圧力条件で実験的に検証した例はなく、理解は十分に進んでいない。本研究は、地下深部環境を再現する実験系となる高温・高圧培養リアクターで、海底下から採取した古第三紀層の石炭と砂岩で構成される夾炭層に高温・高圧環境でCO<sub>2</sub>を圧入し、地層試料の物理特性や鉱物組成の変化、それに伴った地層試料中の微生物活動への影響を検証した。実験では、まずCO<sub>2</sub>を混合した間隙流体の圧入前後でのCO<sub>2</sub>濃度を測定したところ、圧入後の試料ではCO<sub>2</sub>濃度が減少しており、鉱物として固定された、ないし微生物による物質変換が生じたことが示唆された。そこで、鉱物組成をX線回折装置で調べたところ、CO<sub>2</sub>圧入前後で主要な鉱物組成の変化は見られなかったが、走査電子顕微鏡によって鉱物の局所構造を観察したところ、圧入後の試料に微細な炭酸塩鉱物が認められ、CO<sub>2</sub>が炭酸塩鉱物として地層中にトラップされたことを示す結果を得た。加えて、微生物活動との関係では、ホモ型酢酸生成菌の活性化が確認され、培地として注入した間隙流体における酢酸濃度の上昇が認められた。微生物活動によって、CO<sub>2</sub>を還元して酢酸に変換反応が生じることが示された。こうした微生物による物質変換反応から示唆されたのは、貯留CO<sub>2</sub>を地層中の微生物活動を利用してメタンガスのような還元化合物に変換し、資源として回

収する可能性である。この場合、CO<sub>2</sub>の圧入だけでなく、電子供与体として水素ガスを供給する実験系を構築する必要がある。実験系を改善することにより、CO<sub>2</sub>を資源として利用可能なCO<sub>2</sub>貯留システムを構築できると期待される。

(2) 地層試料の微細構造解析技術は硬い岩石を対象としたものが多く、水分を含み、柔らかい海底堆積物の微細構造観察は不可能だったが、本研究は、生物電子顕微鏡分野で常用される樹脂包埋法を海底堆積物試料の処理に導入することで、新しい地層試料処理技術の構築を試みた。新手法の要点は、水分を含む生物細胞の微細構造を攪乱なく観察することを目的とした溶媒置換-樹脂包埋処理で、試料を物理的に乾燥させることなく樹脂固定できることにある。これによって、水分を含む海底堆積物試料であっても三次元構造の攪乱を抑えて樹脂包埋し、電子顕微鏡や高解像度X線CTで微細構造を観察することが可能になった。樹脂包埋法による試料処理結果と、従来の地層試料処理で利用されてきたアルコール置換・凍結乾燥法と比較したところ、従来法ではクラックなどの試料処理に伴う構造攪乱が観察されたのに対して、樹脂包埋試料では個別の粒子レベルで亀裂が生じるなどの攪乱が認められたが、試料処理前後の物性を比較すると大きな差異がなく試料処理による微細構造攪乱を大幅に抑制することができた(図1)。

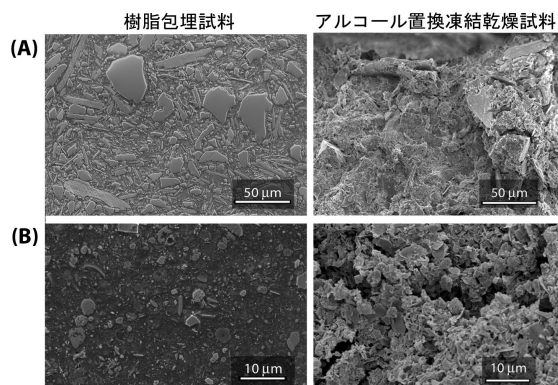


図1 試料調製法ごと(本研究で確立した樹脂包埋処理ならびに従来法のアルコール置換・凍結乾燥処理)の海底堆積物試料の走査電子顕微鏡二次電子像の比較。(A)ニュージーランド沖大陸棚堆積物。(B)南太平洋環流域の遠洋性粘土。

このような新手法による試料観察の結果、IODP第329次航海で取得した南太平洋環流域の遠洋性粘土を構成する微細鉱物の中にミクロスケールの球状の鉄マンガン酸化物の塊“微小マンガン粒”が大量に存在することが分かり、特徴的な微細構造を示すことが分かった。様々な環境試料を調べた結果、ミクロスケールの微細鉱物塊は、大陸沿岸から外洋域まで存在していることが分かってきた。ただし、鉄マンガン酸化物の微細鉱物は

外洋域の酸素に富んだ遠洋性粘土のみに特異的に存在することが分かった。今後、こうした微細鉍物塊の解析技術を確立し、その成因と微生物活動との因果関係や、外洋深海域における金属元素の物質循環において、微細鉍物塊が果たす役割を検討していくことを考えている。

さらに、軽元素から構成されるため、従来は電子顕微鏡などで観察できなかった地層試料中の微生物細胞または類似構造を有する固体状有機物などに対してオスミウムを付加する電子染色処理を施すことで、軽元素から成る物質も鉍物粒子などと同時に観察可能となった。こうした物質の配置様式を観察したところ、孔隙内部に存在する場合はもちろん、鉍物表面に付着するなど、特徴的な配置を示すことが分かった。さらに、大型放射光施設（SPring-8）の高精細X線μCT スキャナーを用い、細胞や有機物に付加したオスミウムのX線吸収端前後のエネルギーレベルで試料を測定した。そして、撮影したCTスキャナーの断面画像をX線吸収端前後で除算処理した結果、オスミウムの濃集域を、特異的にコントラストを高めて検出できるまでに至った。

以上の研究により、堆積物内の粒子の相互接続や孔隙分布を詳しく観察でき、堆積物内部で生じる物理・化学・微生物プロセスを分野横断的に解析する手法的基盤を確立した。その結果、外洋域で特異的に存在する微小マンガン粒を見出すなど、新たな研究の着想につながる研究成果を得られた。ただし、本研究で確立した微生物観察技術については、現状では、オスミウム付加した粒子が微生物細胞の他、固体状有機物の可能性を排除できていない。そこで、今後は核酸蛍光染色技術も併用することで、実際に、海底下で生きていた微生物細胞の配置を可視化する試料処理条件を検討する。これによって、最終的に海底地下の地層内環境で、どのように微生物が生きていたか実体を明らかにし、研究成果としてまとめる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Suto, I. and Uramoto, G-I., 2015. Data report: Diatom biostratigraphy of Hole U1371D. In D'Hondt, S., Inagaki, F., Alvarez Zarikian, C., and the Expedition 329 Scientists, *Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program 329*, Tokyo (Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc.), 査読有. doi:10.2204/iodp.proc.329.203.2015

Uramoto, G-I., Morono, Y., Uematsu, K., and Inagaki, F., 2014. An improved sample preparation method for imaging microstructures of fine-grained marine

sediment using microfocus X-ray computed tomography and scanning electron microscopy. *Limnology and Oceanography: Methods*, 12, 469–483, 査読有. doi: 10.4319/lom.2014.12.469

Ohtomo, Y., Ijiri, A., Ikegawa, Y., Tsutsumi M., Imachi, H., Uramoto, G-I., Hoshino, T., Morono, Y., Sakai, S., Saito, Y., Tanikawa, W., Hirose, T., and Inagaki, F., 2013. Biological CO<sub>2</sub> conversion to acetate in subsurface coal-sand formation using a high-pressure reactor system. *Frontiers in Microbiology*, 4, 査読有. doi:10.3389/fmicb.2013.00361.

〔学会発表〕(計4件)

浦本豪一郎・諸野祐樹・富岡尚敬・和穎朗太・上杉健太郎・竹内晃久・星野真人・鈴木芳生・光延 聖・菅 大暉・宮本千尋・高橋嘉夫・稲垣史生, 南太平洋環流域の遠洋性粘土に存在する大量の微小マンガン粒について. 地球惑星科学連合2016年合同大会, 千葉県千葉市, 2016年5月24日.

Uramoto, G-I., Morono, Y., Uematsu, K., and Inagaki, F., An improved resin-embedding method for the observations of fine-grained sediment microstructures using micro-focus X-ray CT and SEM. 19th International Sedimentological Congress, Geneva, Switzerland, August 21, 2014.

浦本豪一郎・諸野祐樹・植松勝之・稲垣史生, 海底堆積物内微小空間における微生物細胞の局在性観察: 遺伝子蛍光染色法と電子染色法の共用による新規観察手法の開発. 地球惑星科学連合2013年合同大会, 千葉県千葉市, 2013年5月20日.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦本 豪一郎 (Uramoto, GO-Ichiro)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構  
高知コア研究所・特別研究員(PD)  
研究者番号:70612901