

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25610164

研究課題名(和文) シングルセル化学種分析法を駆使した海底下生命圏研究の新展開

研究課題名(英文) Study on deep biosphere ecosystem in oceanic crust by "single-cell" chemical speciation

研究代表者

光延 聖 (Mitsunobu, Satoshi)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：70537951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海底下微生物は活性が著しく低いことなどから、その解析が地球上で最も困難な生態系と言われており、基礎的な代謝反応ですら未解明である。この現状を打開するために、本研究では、2つの最先端分析法(走査型透過X線顕微鏡と蛍光in situハイブリダイゼーション法)を組み合わせることで、海底下微生物の分析に特化したシングルセル(1細胞)レベルでの金属化学種分析法を確立した。

研究成果の概要(英文)：It is much difficult to investigate a deep biosphere microbial ecosystem in oceanic crust due to their low activities and difficulty in the analysis. Hence, there is little finding even on general microbial metabolic process of the deep biosphere. In this study, we have developed a new method to analyze chemical species of metals and organic materials at single-cell level by coupling two advanced techniques, scanning transmission X-ray microscopy and fluorescence in situ hybridization.

研究分野：生物地球化学

キーワード：シングルセル スペシエーション 微生物 金属

1. 研究開始当初の背景

最近の研究によって、これまで生物活動が存在しないと考えられていた地下や海底下に、多種多様な微生物が生息していることが明らかとなってきた (Mason et al., 2010 など)。とくに、地球表面積の 70% を占める海洋底下の岩石圏に広大な「地下生命圏」が広がっている可能性が指摘され、地球生命科学に大きなパラダイムシフトが起こりつつある。岩石圏の生態系における一次生産者は、無機物質を使った化学合成独立栄養微生物であると推測されている (Edwards et al., 2005 など)。これらの微生物群がエネルギー獲得に用いる化学反応の 1 つに、海洋地殻の含有鉱物であるパイライト等に含まれる鉄や硫黄の酸化反応が予想されている。しかし、鉄酸化反応を含む地下微生物による鉱物のような固体基質を利用した代謝プロセスには未解明な点が多い。

未解明な点が多い理由は、以下の 3 点に集約される。

- (a) 地球上の微生物の 99% 以上は難培養性で、分離培養法だけでは微生物代謝を調べられない。
- (b) 岩石試料は不均質な混合物であり、ミクロスケールで無機物質の存在量は変化する。
- (c) 海底下微生物の活性は陸上微生物と比べて著しく低く、細胞検出自体がきわめて難しい。

これらを考慮すると、海底下岩石圏生態系の解明には、培養に依存せず、高い空間分解能で、微生物細胞 1 細胞の検出を可能とする新規観察法の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

我々はこれまで、放射光源顕微 X 線分析法であるマイクロ XAFS 法を使って、高い空間分解能で金属の化学種を調べる手法を確立し、先進的な研究を進めてきた (Mitsunobu et al., 2010a, 2010b, 2012, *Environ. Sci. Technol.* 等)。XAFS 法は、X 線吸収分光法の 1 種であり、試料の相を問わず含有する元素の化学種 (価数や配位環境) を直接的に決定できる先端手法である。

これらを踏まえ、本研究課題ではより高い

空間分解能を有する顕微 X 線分析法と細胞可視化技術を組み合わせた新たな微生物観察法を開発することを目的とした。

具体的には、高空間分解能化が期待できる放射光源顕微分光 (マイクロ XAFS 法や走査型透過 X 線顕微鏡) および遺伝子選択的な細胞可視化技術である蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) を組み合わせ、これまで難しかったシングルセル (1 細胞) レベルでの元素化学種分析法の確立を試みた。

また、本研究で開発する新規手法は、cultivation-independent (培養に依存しない) の 2 つの手法を組み合わせるため、99% 以上が培養困難と言われる環境微生物を直接分析により代謝プロセスまで調べられる可能性を有する。世界的に見ても類似の方法論は存在せず、高いオリジナリティを有する手法が開発できる。

3. 研究の方法

本課題は、以下の 3 つのサブテーマに分けて実施した。

(1) ナノスケールでの元素化学種決定法の開発

対象とする微生物 (バクテリア、アーキア) 細胞のサイズは 1-5 μm であるため、少なくともサブミクロン、可能であればナノスケールで化学種を調べられる手法を確立することが不可欠となる。本課題では、日本の大型放射光施設である高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー (KEK-PF) や分子科学研究所極紫外光研究施設 (UVSOR) の研究員の方々と共同で X 線ビームの微細化や検出系の高感度化を進め、現状より 1-2 桁高い世界最高レベルの超高空間分解能 (50 nm 程度) での XAFS 分析を試みた。

(2) 標的微生物種の可視化技術の確立

FISH 法を用いて玄武岩中に存在する目的微生物を 1 細胞レベルで可視化する手法を確立する。活性が低い微生物を可視化するため、蛍光シグナルを増幅させる CARD-FISH 法などを検討する。

4. 研究成果

(1) ナノスケールでの元素化学種決定法の開発

顕微 X 線分光法には、様々な手法が存在するが、本手法開発に応用が期待できる手法として、マイクロ XAFS 法と走査型透過 X 線顕微鏡 (STXM) の 2 つの手法が挙げられる。これらの手法は、元素の化学状態を高空間分解能で調べることができるため、岩石試料の局所領域における金属価数や生体分子種を調べることができる。また 2 つの手法は、利用する X 線エネルギーの違いに起因して集光系が異なり、STXM の方がマイクロ XAFS 法に比べて 1~2 桁ほど高い空間分解能 (50 nm 程度) を有する。本研究で対象とするバクテリアおよびアーキアの細胞サイズは 1~5 μm であるため、STXM を利用し、シングルセルレベルでの化学種分析の確立を試みた。

本課題のスタートと時を同じくして、日本の放射光施設に 2 つの STXM ビームラインが設置され、それら装置を駆使して本研究を推進した。これまでの STXM 分析では、軟 X 線の大気による減衰を抑えるために、装置/試料チャンバー内を高真空に引き、ヘリウムでチャンバー内を置換する過程を必要とする。しかし、測定条件の検討を進める中で、この真空引きの過程で、一部の微生物細胞が破裂 (バースト) することが明らかとなったため、本過程での真空度は中程度に抑え高真空まで引かないよう留意した。これにより、微生物細胞の形態を安定的に保持し、得られる XAFS スペクトルの質も落とさない測定条件を確立した。また試料ホルダーは、同じく入射軟 X 線の吸収を抑えるために、通常 STXM 分析で使用する Cu グリッドではなく、窒化シリコン (Si_3N_4) 膜を選択した。

(2) 標的微生物種の可視化技術の確立

STXM 分析の前処理として、目的微生物の可視化条件を検討した。当初計画通り、FISH 法を適用することで、STXM 分析時の標的微生物を遺伝子選択的に選択することが可能となった。蛍光強度の増幅が見込める CARD-FISH の応用も検討したが、顕微鏡観察までの染色ステップが煩雑であり、また染色過程で金属

化学種が変化する可能性が高いことも明らかになったため、本手法開発ではあえてノーマル FISH を適用することを選択した。ノーマル FISH 時の、低い蛍光強度は蛍光像を撮影するカメラに高感度 CCD カメラを選択することで克服することにした。

(3) 確立した手法の実試料への応用

確立した手法を実試料へ応用することで、本手法の有効性を確認した。用いた試料は、伊豆小笠原弧の深海底において鉄含有固体基質による微生物現場培養を実施した試料である。使用した鉄含有基質は、海洋地殻中に存在する 2 価鉄固体である玄武岩およびパイライトを選択した。

まず、試料に含まれる微生物のうちバクテリアだけを FISH 染色により選択的に染色し、STXM 分析時の標的細胞とした。その試料に対して、走査型透過 X 線顕微鏡 (STXM) を用いて、バクテリアーパイライト付着面の炭素 (C) および鉄 (Fe) の化学状態をナノスケールで調べた。確立した測定条件で、STXM をもちいたシングルセルレベルの元素の化学種分析を問題なくおこなうことができ、本手法の有効性を確認できた。また得られた結果についても、バクテリアによる鉱物 (岩石) 溶解に関する興味深い結果であった。つまり、バクテリアによる鉱物溶解に及ぼす Bio-catalysis (生物触媒作用) を直接分析から初めて観察することができた。具体的には、海底での現場培養試料 (特に適用が進展したパイライト基質に関する成果を本報告書では主に紹介する) の STXM による炭素 1s XANES 局所分析の結果、バクテリアは鉱物付着面で酸性多糖類に富んだ細胞外有機物を産生していることが分かった。一般的に、酸性多糖類の存在下では玄武岩およびパイライトの溶解度が上昇することが知られており、微生物は鉱物溶解を促進するために、酸性多糖類を細胞外へ産生していることが推測される。また、Fe 4p NEXAFS 分析をナノスケールでおこなった結果、パイライト近傍には、ナノサイズのクラスター状水酸化鉄鉱物が点在していることが確認された。また、バクテリアーパイライト付着面では、Fe の

NEXAFS スペクトルの形状は、カルボキシル基などを含む酸性多糖類と鉄が錯生成していることを示唆していた。これらの結果は、微生物によって海洋地殻の酸化風化が促進されることを示唆しており、地球化学、微生物生態学の観点からも興味深い知見といえる。海底下微生物は著しく活性が低い（菌数が少ない）ことなどから、その解析が地球上で最も困難な生態系と言われている。本研究で独自開発した手法を駆使し、海洋地殻中で2価鉄をエネルギー源とする微生物の存在を直接的に示すことができれば、地球規模の炭素循環に果たす海底下微生物の役割の解明、さらに生命進化や極限環境への適応能力の解明といった地球生命科学的にきわめて重要な研究展開が期待でき、今後も様々な試料に本手法を適用しながら、研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Mitsunobu S, Zhu M, Takeichi Y, Ohigashi T, Suga H, Jinno M, Makita H, Sakata M, Ono K, Mase K, Takahashi Y, Direct Detection of Fe(II) in Extracellular Polymeric Substances (EPS) at the Mineral-Microbe Interface in Bacterial Pyrite Leaching. *Microbes and Environments*, 31, 63-69 (2016) (査読有り).
2. D'hondt S, Inagaki F, Zarikian C, Abrams L, Dubois N, Engelhardt T, Evans H, Ferdelman T, Gribsholt B, Harris R, Hoppie B, Hyun JH, Kallmeyer J, Kim J, Lynch J, McKinley C, Mitsunobu S, Morono Y, Murray R, Pockalny R, Sauvage J, Shimono T, Shiraishi F, Smith D, Spivack A, Steinsbu B, Suzuki Y, Szpak M, Toffin L, Uramoto G, Yamaguchi Y, Zhang GL, Zhang XH, Ziebis W, Presence of oxygen and aerobic communities from seafloor to basement in deep-sea sediment. *Nature Geoscience*, 8, 299-304 (2015) (査読有り).
3. Mitsunobu S, Zhu M, Takeichi Y, Ohigashi T, Suga H, Makita H, Sakata M, Ono K, Mase K, Takahashi Y, Nano-scale identification of extracellular organic substances at microbe-mineral interface by scanning transmission X-ray microscopy (STXM). *Chemistry Letters* (IF: 1.401), 44, 91-93 (2015) (査読有り).

[学会発表] (計 6 件)

1. Mitsunobu S, Zhu M, Takeichi Y, Ohigashi T, Suga H, Sakata M, Ono K, Takahashi Y: Nanoscale identification of organic substances at microbe-mineral interface in bacterial leaching of pyrite by STXM, International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements 2015, Fukuoka convention center, (Fukuoka city, Fukuoka, Japan), abstract p. 395, July 12th-15th, 2015.
2. 光延 聖: 放射光源 X 線吸収分光法による分子スケールスペシエーションを駆使した微生物-鉄-鉱物(岩石)相互作用研究. 2015 年度日本地球化学会第 61 回年会, 横浜国立大学(神奈川県横浜市), 予稿集 p. 130, 2015 年 9 月 16-18 日.
3. 光延 聖, 朱 鳴, 高橋 嘉夫; 武市 泰男; 小野 寛太: 走査型透過 X 線顕微鏡(STXM)の微生物-鉱物相互作用解明への応用. 日本地球惑星科学連合 2014 年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 予稿集 p. 375, 2014 年 4 月 28-5 月 2 日.
4. 光延 聖, 朱 鳴, 坂田 昌弘, 高橋 嘉夫; 武市 泰男; 小野 寛太: 走査型透過 X 線顕微鏡の微生物-金属-鉱物相互作用解明への応用. 2014 年度日本地球化学会第 60 回年会, 富山大学(富山県富山市), 予稿集 p. 30, 2014 年 9 月 16-18 日.

5. 光延 聖, 白石 史人: マイクロ XAFS-FISH 法による微生物-金属-鉱物相互作用の直接観察. 日本地球惑星科学連合 2013 年会, 千葉幕張メッセ (千葉県千葉市), 予稿集 p. 375, 2013 年 5 月 19-24 日.
6. Mitsunobu S, Shiraishi F: Coupled μ -XAFS-FISH technique for direct observation of the microbe-metal-mineral interaction. Florence (Italy), August 25th-30th, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光延 聖 (MITSUNOBU, Satoshi)
愛媛大学・農学部 (27 年度)・准教授
研究者番号 : 70537951

(2) 研究分担者

白石 史人 (SHIRAISHI, Fumito)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号 : 30626908