

令和元年5月28日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05330

研究課題名(和文)最先端X線顕微鏡を駆使した微生物による海洋地殻の酸化風化機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of biogenic basalt alteration by synchrotron-based X-ray microscopy

研究代表者

光延 聖 (Mitsunobu, Satoshi)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70537951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：海洋地殻(玄武岩)に多く含まれる還元体鉄(2価鉄)の酸化反応は、海底下微生物圏を支えるエネルギー獲得反応の一つであり、また海洋地殻の風化作用全体を促進する反応である。水溶解性がきわめて低い海洋地殻から2価鉄を効率よく利用するため、微生物は多様な戦略を有すると推測されるがこれまで詳細な機構は未解明な点が多い。本研究では、未風化の海洋地殻試料をもちいた現場培養アプローチに基づき、微生物による海洋地殻の風化作用およびエネルギー獲得反応機構を調べた。その結果、放射光源X線分光法を用いて、回収試料を分析した結果、微生物によって海洋地殻中の鉄酸化反応および風化作用が促進されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上述の通り、海洋地殻である玄武岩の酸化風化は海洋のCO<sub>2</sub>固定を促進するため、地球規模の炭素循環を考える上でも重要な反応である。本研究では、ナノスケールの空間分解能を有する先端的X線顕微鏡を利用して、鉱物-微生物細胞界面における鉄、酸素、炭素の元素分布さらには化学種分析をおこない、海底下微生物が玄武岩風化を促進させる分子レベルでの証拠を得た。これらの知見は、地球規模の炭素循環に果たす海底下微生物の影響を再考するきわめて重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The weathering of oceanic basalt has a significant impact on Earth's climate on a geological timescale by providing a sink for atmospheric CO<sub>2</sub> through carbonization of oceanic basalts. The fresh basalt rock contains abundant Fe and its major species is Fe(II). Recent previous studies have reported that oceanic microorganisms would play a significant role to the oxidation of Fe(II) in the basalt. In this study, we investigated the mechanisms of the biogenic Fe(II) oxidation in basalt weathering by synchrotron X-ray spectroscopic techniques. We applied the techniques into the basalt samples prepared by in situ incubation of fresh basalt at deep seafloor in Izu-Ogasawara bonin. Our analysis of the sample clearly showed that microbial Fe(II) oxidation is more rapid reaction than abiotic Fe(II) oxidation and that the biotic Fe(II) oxidation promotes the whole basalt weathering. These findings would be an important knowledge to understand mechanism of biogenic weathering of oceanic crust.

研究分野：地球化学

キーワード：海洋地殻 生物的風化 XAFS 鉄酸化反応 バクテリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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(バクテリア、アーキア)が生息することがわかってきた。とくに、地球表面積の70%を占める海洋底下の岩石圏に巨大な海底微生物圏が広がっていることが報告され(Mason et al., *ISME J*, 2012 など)、地球生命科学にパラダイムシフトが起きている。海底微生物圏を支えるエネルギー獲得反応の1つに、海洋地殻(玄武岩)に多く含まれる還元体鉄(2価鉄)の酸化反応がある(Edwards et al., *Trends Microbiol.*, 2005)。主に珪酸塩鉱物から構成される玄武岩は水溶解性が低く、生物利用性も低いため、微生物は玄武岩中の2価鉄を効率よく利用するための多様な戦略を有すると推測されている。他方、玄武岩の酸化風化は、炭酸塩鉱物の沈殿を伴い海洋のCO<sub>2</sub>固定を促進するため、全球的な炭素循環を考える上でも重要な反応である。しかし、微生物による玄武岩鉄酸化の反応機構、反応速度には不明な点が多い。

不明な点が多い理由として、まず分析上の問題3点が挙げられる。

- (1) 地球上の微生物の99%以上は難培養性で、海洋性鉄酸化微生物も殆ど単離されていない。
  - (2) 玄武岩の風化は、主に微小領域である微生物-鉱物付着面で起きており、直接分析が困難。
  - (3) 金属元素(鉄)と有機物が絡んだ代謝反応であり、どちらも同時分析できる手法がない。
- こうした背景から、研究代表者は最先端分析法である放射光源X線顕微鏡「マイクロX線吸収微細構造法(μXAFS法)」を使い、高空間分解で元素化学種(価数、結合状態)を調べる手法を確立し、微生物-金属-鉱物(岩石)反応に関する先進的分析法を確立してきた(Mitsunobu et al., *Environ. Sci. Technol.*, 2012; *Chem. Lett.*, 2015)。

また、手法開発に加え、我々は、国際海洋掘削プロジェクト(IODP Exp. 329)やJAMSTEC 公募航海(NT12-24, NT14-06等)に参加し、玄武岩中の鉄酸化を基盤とした海底微生物圏研究を精力的に進めてきた。南太平洋で掘削した玄武岩試料の分析結果から、玄武岩中の鉄酸化(風化)反応が非生物的な岩石風化では説明がつかない速度で進行していることが示された(D'Hondt and Mitsunobu et al., *Nature Geosci.*, 2015)。これらの結果は、玄武岩の酸化風化現象が、“熱水循環の低い場所”でも何らかの作用(例えば、微生物による触媒作用)によって、加速的に進行する可能性を示している。微生物による触媒作用「Bio-catalysis」が海洋地殻の酸化風化を大きく加速するというこの仮説は、他の研究者によってもなされているが、いまだ実証されていない。その理由として、掘削採取した玄武岩は、(i) 過去の風化履歴を含んでおり、現在起きている反応のみを解析できず、(ii) 経時的な情報が得られず反応機構や反応速度を詳しく調べられないといった掘削アプローチの問題点や分析の難しさが挙げられる。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえて、本研究では、経時的な観察が可能な未風化海洋地殻を用いた「深海底での現場培養実験」を実施し、微生物による玄武岩中の鉄酸化反応を解明することを目的とする。研究結果を総合し、微生物による玄武岩風化機構を明らかにすることで、掘削アプローチから得られた仮説「微生物活動は海洋地殻の酸化風化を大きく加速しうるのか？」について分子レベルの情報から検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 深海底における海洋地殻を基質とした微生物現場培養実験

JAMSTEC 所有の無人海底探査機「ハイパードルフィン」を利用して、伊豆小笠原ベヨネース海丘海底の熱水/非熱水域へ現場培養装置の設置、回収をおこなった。設置期間は約1年を予定した。この海底域には枕状玄武岩が露出しており、玄武岩の酸化風化が現在も進行しており、本研究実施に理想的なフィールドである。培養装置には、還元体鉄を含む海洋地殻試料として、粉末状(粒径50-100 μm)の玄武岩ガラス、パイライトが設置されており、また非生物的酸化(風化)を区別して考察するため、微生物透過膜(孔径50 μm)、不透過膜(孔径0.2 μm)へ各試料粉末を密包している。

#### (2) 海洋地殻の鉄酸化に寄与する微生物群集および鉄酸化(風化)機構の解明

回収した培養試料に含まれる微生物群集およびそれらの多様性解析をおこなうために、回収した各試料から抽出したDNAの16S rRNA-DNA配列解析によるバクテリア群集解析をおこなった(研究協力者と共同で実施)。また、微生物による鉄酸化機構および鉱物溶解機構を解明するために、バルク試料の放射光源X線分光分析(XAFS)、μmサイズに集光した微小X線を用いたX線顕微鏡(μXAFS法およびSTXM)を駆使することで、それぞれ試料全体の鉄化学種の同定と微生物が付着した面の鉄化学種の同定をおこなった。とくに、STXMによる分析では、微生物の細胞周辺での鉄化学種分析に加えて、微生物が産生する生体分子種の組成をナノスケールの空間分解能(約50 nm)で決定した。

### 4. 研究成果

(1) JAMSTEC 公募航海を利用して、申請時に予定していた伊豆小笠原ベヨネース海丘海底にて現場培養装置の設置と回収を無事に実施することができた。設置はNT14-06航海、回収は

KY15-07 航海にて実施した。16S rRNA 遺伝子によるクローン解析の結果において、既往研究において単離されている海洋性の鉄酸化微生物種は確認できなかった。鉄酸化微生物が有する鉄酸化に關与する遺伝子群は現在まで特定されていないため、機能遺伝子による微生物由来の鉄酸化反応の活性を調べることは難しい。本研究では微生物群集を門ごとに分類し、その増減や傾向の変化について考察を行った。その結果、熱水域培養・非熱水域培養のいずれのサイトでも 8 ヶ月・12 ヶ月培養における優先門は順に  $\alpha$ -proteobacteria、 $\gamma$ -proteobacteria、 $\delta$ -proteobacteria であり、この 3 門でおよそ 90% を占めることが示された。最も優先していた  $\alpha$ -proteobacteria は、堆積物の結果と比較すると顕著に割合が増加していた。既往研究で報告されている海洋性鉄酸化バクテリアである *Hyphomonas jannaschiana* は  $\alpha$ -proteobacteria に属しており、これらの種を含む群集が海洋地殻の鉄酸化に寄与していることが推測される。

(2) 回収した玄武岩試料について、バルク XAFS による含有鉄化学種の分析をおこなった。微生物透過膜の玄武岩試料は、微生物不透過膜の試料と比べて、粒子表面 (< 50 nm) で Fe(III) 割合が 20% 程度増加しており、微生物によって玄武岩表面の鉄酸化反応が促進していることが示された。STXM を用いた微生物 - 玄武岩境界面の局所 XAFS 分析の結果、境界面の炭素 XAFS スペクトルには酸性多糖類の強いピークが観察された。このピークは微生物付着面以外では観察されず、微生物が鉱物付着面で酸性多糖類を産生していることを示している。同一領域における鉄の XAFS 分析から、微生物 - 玄武岩付着面では、近傍の鉱物表面に比べて有意に Fe(III) 割合が高く、かつ Fe(III) は有機錯体として存在していることがわかった。したがって、玄武岩に付着した微生物は、金属錯生成能をもつ酸性多糖を細胞外へ産生することで、玄武岩の溶解度を上げ、効率よく玄武岩に含まれる 2 価鉄を溶解・酸化する機構を有していると考えられる。

(3) 玄武岩試料と同様に、現場培養実験をおこなったパイライト粉末試料についてバルク XAFS 分析をおこなった。その結果、微生物透過膜のパイライト試料は、微生物不透過膜の試料と比べて、粒子表面で Fe(III) 割合が 40% 程度増加しており、玄武岩試料と同様に微生物活動によってパイライト粒子表面の鉄酸化反応が促進していることが端的に示された。パイライト粒子に観察された変質物に含まれる鉱物同定をおこなった結果、主要な変質鉱物として水酸化 Fe(III) 鉱物の 1 種であるシュベルトマナイト ( $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$ ) が観察された。シュベルトマナイトが安定に存在できる pH は pH 4 ~ 6 の範囲に限られるため、パイライト表面は周辺海水 (pH 8 付近) に比べて特異的に低 pH 環境であることが考えられる。pH が低い環境では無機的な Fe(II) 酸化速度が急激に低下することが報告されている。バクテリア等の微生物による Fe(II) 酸化速度は pH に依存して大きく変化しないため、パイライト表面は微生物による酸化が優勢しやすい環境であることが示唆された。この知見は、海洋地殻の酸化風化に微生物活動が大きく影響することを示しており、微生物透過膜のバルク XAFS で観察された Fe(III) の特異的増加の要因の 1 つと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Uramoto GI, Morono Y, Tomioka N, Wakaki S, Nakada R, Wagai R, Uesugi K, Takeuchi A, Hoshino M, Suzuki Y, Shiraiishi F, Mitsunobu S, Suga H, Takeichi Y, Takahashi Y, Inagaki F, Significant contribution of subseafloor microparticles to the global manganese budget. *Nature communications* (査読有), 10, 400, 2019.

Mitsunobu S, Suzuki Y, Watanabe K, Yang K, Kim JW,  $\mu$ XAFS and TEM studies of Fe(III) oxides precipitated on submarine basaltic glass from South Pacific Gyre. *Chemical Geology* (査読有), 501, 51-57, 2018.

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 & Environments* (査読有), 31, 63-69, 2016.

Makita H, Kikuchi S, Mitsunobu S, Takaki Y, Yamanaka T, Toki T, Noguchi T, Nakamura K, Abe M, Hirai M, Yamamoto M, Uematsu K, Miyazaki J, Nunoura T, Takahashi Y, Takai K, Comparative analysis of microbial communities in iron-dominated flocculent mats in deep-sea hydrothermal environments. *Applied & Environmental Microbiology* (査読有), 82, 5741-5755, 2016.

〔学会発表〕(計 4 件)

STXM を用いた微生物 - 金属 - 鉱物相互作用の解明, 光延 聖, 2016 年度フォトンファクトリー (PF) 研究会, KEK-PF (つくば市), 2017 年 1 月 (招待講演)

放射光源 X 線顕微鏡をもちいた環境中の微生物 - 元素 - 鉱物相互作用の直接観察, 光延 聖, 2017 年度日本バイオイメーシング学会, 東京薬科大学 (八王子市), 2017 年 9 月 (招待講演)

深海底での微生物現場培養実験から紐解く鉄を基盤とした海底下微生物圏 - 放射光源 X 線分析法を駆使した微生物による地殻内エネルギー獲得戦略の解明 -, 大橋 優莉, 光延 聖, 坂田 昌弘, 鈴木 優美, 牧田 寛子, 野崎 達生, 川口 慎介 2016 年度日本微生物生態学会年会, 横須賀市文化会館 (横須賀市), 2016 年 10 月

深海熱水活動域での酸化鉄被膜形成に関わる微生物, 牧田 寛子, 田中 英美子, 菊池 早希子, 光延 聖, 鈴木 優美, 関野 優也, 大橋 優莉, 高井 研 2016 年度日本微生物生態学会年会, 横須賀市文化会館 (横須賀市), 2016 年 10 月

〔図書〕

該当無し

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

該当無し

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

組織内に研究分担者を持たない

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 牧田 寛子

ローマ字氏名 : Makita Hiroko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。