

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687004

研究課題名(和文) 海底下未知微生物は1億年生きるのか? NanoSIMSで探る海底下の生存戦略

研究課題名(英文) Ecophysiological analysis on subseafloor microorganisms by using NanoSIMS

研究代表者

諸野 祐樹 (Morono, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理

研究者番号：30421845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NanoSIMS(Nano-scale Secondary Ion Mass Spectroscopy)による元素同位体分析を応用し、地球最大級の生命圏といわれる海底下地層中に存在する未知微生物が、「生きているのか?」「機能・役割は?」「活性は?」という問いに答えることを目標とした。海底下試料に存在する微生物を分析するための様々な技術開発により、 ^{13}C や ^{15}N などの安定同位体基質を「エサ」として与え、取り込んだ微生物を高い精度で分析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We employed NanoSIMS(Nano-scale Secondary Ion Mass Spectroscopy) for studying eco-physiology of microorganism in subseafloor biosphere, which is largest microbial biosphere on the Earth. Through developments of techniques to detect, separate, and purify microbial cells from the matrix of subseafloor samples (e.g. sediment grains), we successfully detected substrate incorporation activity of subseafloor microbes.

研究分野：地球微生物学

キーワード：海底下生命圏 NanoSIMS 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

20世紀後半から行われた国際海洋掘削、微生物細胞の直接計数によって、世界各地の海洋底(深度1.6kmまで)には1cm³あたり10⁵細胞を超える微生物が存在することが明らかになってきている^{1,2}。ここから推算された海底下全体のバイオマス総数は3.5×10³⁰で、全地球バイオマス炭素の10%を構成する別世界が地球内部に広がっている可能性が示されており³、全地球規模での元素循環や海底下資源の生成、分解など、環境、エネルギーを含む諸分野から注目を集めている。一方で、リボソームRNA遺伝子配列による分子系統学的解析によると、海底下には現在の技術では分離・培養に至っていない多くの未知系統微生物群が優占種として存在することが明らかとなっている⁴。

しかし、実際個々の微生物について「どんな微生物種が」、「どれくらいの割合で活性をもって生きて」いるのかについては、分子系統学的解析や極性脂質などの解析では直接的なデータが得られない。培養による単離が困難である以上、有機物・硫酸・メタン・鉄・マンガンなどの化学組成の鉛直プロファイルと群集構造を突き合わせて推測するしか手立てがなく、地球最大の生命圏とも言われる海底下で起こっている元素循環は微生物反応をブラックボックスとして長く議論されてきた。つまり、彼らがどんな基質を代謝、生命活動を維持しているのかについて追及するのは従来の手法ではほぼ不可能であり、新しいアプローチを必要とする状況にあった。

2. 研究の目的

このような閉塞的状況の一つの打開策として、我々は超高空間分解能二次イオン質量分析計(NanoSIMS、図1)による1細胞レベルでの炭素源、窒素源の特定と生物活性の測定を通じ、未知の海底下環境に棲息する微生物生命活動を明らかにすることを目的とした。



図1: 超高空間分解能二次イオン質量分析計(NanoSIMS)

NanoSIMSは、非常に細く絞った一次イオンビームによって微小領域を分析することを目的としてデザインされた走査型二次イオン質量分析計である。NanoSIMSにおける

最小50nmの一次イオンビーム径は、通常のSIMSでは対応できない数百nmのサイズである海底下微生物の解析に十分適用可能であり、ナノスケールでの元素同位体組成測定を行うことが出来る。栄養源として与える基質を構成する元素を安定同位体である¹³Cや¹⁵Nで置換し、一定期間の培養(この場合、分離を目指す培養ではない為、細胞が増殖する必要は必ずしも無い)を行った後に分析を行えば、基質を代謝する微生物を同位体組成の異常として細胞単位で検出することが出来る。また、NanoSIMSによる高精度な同位体比測定を用いれば、海底下に多数存在している「培養困難な」微生物でも、ごく少量の¹³C、¹⁵N基質(微生物の炭素含量を50fg[10⁻¹⁵g]とするとその0.1%分、50ag[10⁻¹⁸g])を取り込みさえすればNanoSIMSによって検出可能な差(この場合は+100%)が生じ、たとえ増殖速度の極めて遅い微生物であっても基質の取り込みを定量的に捉えることができる。これに加え、近年開発が進んでいる微生物種の判別ツールについてもアップグレードを施した上で利用する。微生物の活性と共に種類を判別することが出来るFISHのプロープにハロゲン原子を付加することにより、NanoSIMSによる元素組成分析で微生物の種類も同時に判別できる手法が発表されている⁵⁻⁷。残念ながら海底下ではハロゲン類元素が多く存在していてこれらを用いることが出来ない為、金ナノ粒子をFISHプロープに付加して利用するアップグレードを施して上記の分析に適用する。この解析によって、微生物細胞の種類とその代謝活性、すなわち、「どの微生物が」、「どの物質を消費、生成して」いるのかという問いに答えを与え、これまでのバルク分析では手に入らなかった情報にアクセスできるようになり、海底下生命圏のさらなる理解を深めることが期待される。

3. 研究の方法

本研究においてはまず、研究対象とする海底下試料として、開始前に取得済みであった試料の他、統合国際掘削計画および国際深海掘削計画による掘削航海に乗船研究者として参画することで新たな試料を獲得した。

フローサイトメーター、セルソーターレーザーマイクロダイセクション、蛍光顕微鏡システム、及びNanoSIMSについては海洋研究開発機構高知コア研究所に設置されている設備を利用した。

また、試料の確保と並行し、目的を実現する為に必要な要素技術の確立を実際の試料も用いながら遂行した。海底下試料中に存在する微生物分析において、堆積物試料に含まれる泥の粒子など非生物粒子を如何に排除しながら分析を実施するのが分析の成否を左右する。その為、蛍光顕微鏡で観察した視野に紫外線レーザーで印を付けてNanoSIMS分析視野を事前に特定することを

含む、装置分析以外の試料準備について必要な様々な改善、技術の標準化や、金ナノコロイドを結合した FISH プローブの導入などの海底下微生物の解析に適合した技術の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) 海底下試料の獲得

海底下堆積物試料として、本研究を開始する時点において南太平洋中央部に広がる南太平洋還流域から統合国際掘削計画第 329 次航海によって採取した試料の培養を実施していた。これに加え、平成 24 年 7 月～9 月に渡って統合国際海洋掘削計画(IODP)第 337 次航海に乗船研究者として参画し、科学掘削としては世界最深部となる海底下 2460m からの試料を含む複数の試料を取得した。これらについて、9 つの異なる深度から得られた試料に ^{13}C や ^{15}N を含む安定同位体基質を添加し、約 900 本のバイアルで培養を開始した。2 か月の培養の後に経時サンプルの第一段目を終了した。試料取得後に実施した細胞数カウントから、極めて少数の細胞しか存在せず、活性が低いことが予想されたため、第二段目の培養は最終的に 1 年半の間実施したうえで培養を終了した。

(2) 解析対象試料準備に際しての技術開発

NanoSIMS による試料分析では、固定倍率の CCD カメラによってのみ分析位置の探索を行う。CCD カメラでは、試料表面の凹凸を基本とした反射光による濃淡しか見分けることが出来ないため、微生物が試料上に存在しても、堆積物中に存在する非生物微粒子と見分けることが不可能である。一般的には微生物を検出するためには SYBR Green I などの核酸染色試薬によって細胞を染色し、蛍光観察することによって微生物の局在を特異的に解析するが、NanoSIMS における超高真空分析チャンバーの中ではこの観察を行うことが出来ない。そこで、事前に蛍光顕微鏡で観察した視野に紫外線レーザーで印を付けて NanoSIMS 分析視野を事前に特定することを実施したが、特に微生物数の少ない試料について分析を行うと、事前に特定した分析位置に細胞が 1 つしか存在しないなど、分析の効率上の問題が顕在化した。そこで、密度勾配を利用して海底下試料中から効率的に細胞を濃縮する手法の開発、および濃縮試料から微生物細胞のみを選択的にソーティングする手法をそれぞれ開発した。これにより、例えば試料中に少数の細胞しか存在しなかったとしても数百マイクロメートルの極小領域に多数の細胞を集めることが可能となり(図 2)、分析の効率が劇的に向上した。さらに、紫外レーザーで試料上にマイクロレベルのマーキングを施すことにも工夫を施し、これまで試料位置の特定に要していた時間を数時間から 10 分以内に削減することに成功した。

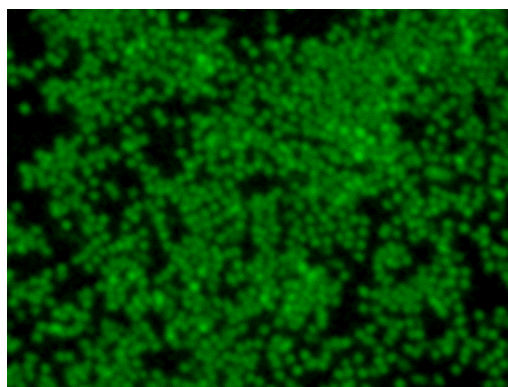


図 2 : 南太平洋還流域海底下試料(安定同位体基質による培養後)からソーティングによって選択的に分取した微生物細胞

さらに、微生物の種類に関する情報も同時に得られるよう、既存の手法をアップグレードすることにも挑戦した。微生物の体内に存在する 16S rRNA に対し、その配列情報を元に特異的に対合するように合成した核酸塩基配列をプローブとして染色操作を行う Fluorescence In situ Hybridization(FISH)は、細胞ごとに活性の指標である RNA の存在と微生物の種類を判別することのできるツールとして広く用いられている。しかし、前述にもある通り、NanoSIMS の分析チャンパー内で蛍光シグナルを観察することは不可能である。近年では NanoSIMS における FISH シグナルの取得を念頭に、用いる核酸プローブにハロゲン原子を付加することにより、NanoSIMS による元素組成分析で微生物の種類も同時に判別できる手法が発表されている(1, 3, 6)が、海底下堆積物中にはハロゲン元素が多く含まれることが分かっており、これらの方法を用いることが出来ない。そこで、金ナノ粒子を FISH プローブに付加して利用する Gold-ISH 法を考案した。プローブには、手法の有効性を確認するため、従来通りの蛍光分子を結合し、それに加えて NanoGold と呼ばれる直径 1.4 nm の金ナノ粒子を化学結合によって付加した。このプローブを用いて FISH による染色を実施したところ、蛍光シグナルによって事前に確認した標準微生物試料において、NanoSIMS によって金原子の局在が確認され、また、模擬環境試料として用いた嫌気糖蜜処理汚泥試料においては、 ^{13}C 酪酸を取り込んだ硫酸塩還元菌を特異的に検出することに成功した(図 3)。さらに、本方法を海底下微生物など、活性の著しく低い微生物に適用するために、オートメタログラフイーを利用したシグナルの増幅を試みた。その結果、プローブで染色された細胞(すなわち細胞内に金ナノ粒子が存在する細胞)においては、十分なシグナル増強が短時間で得られ、手法の有効性を示すことが出来た。

(3) 海底下微生物の NanoSIMS による活性測定

上記の技術基盤を活用して、海底下堆積物

中に存在する微生物の代謝活性を検出することを試みた。

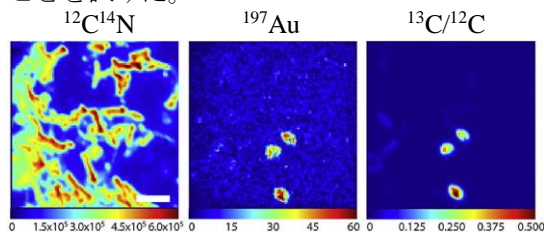


図3：嫌気糖蜜処理汚泥において実施した Gold-ISH、硫酸還元菌を特異的に検出する SRB385 プローブに金ナノ粒子を化学結合したものをを用いた

(1)で既に述べた海底下試料において、 ^{13}C 、 ^{15}N でラベルされた基質(グルコース、酢酸、アミノ酸、重炭酸、ピルビン酸、メタンなど)を添加し、数週間から1年ほど培養を行った。培養後、試料全体を化学固定(ホルムアルデヒド)した後、堆積物中の非生物粒子と微生物細胞を選別するため、前項で開発した密度による細胞と非生物粒子の分離を実施した。この操作が終わっても、細胞画分には微生物細胞以外の粒子も多く含まれていたため、セルソーターを用いた特異的高速分取を行い、南太平洋還流域から取得された超貧栄養環境試料や下北半島沖海底下 2460m 付近を含む深部環境から採取された試料など、非常に細胞の数が少ない試料においても、NanoSIMS による分析を問題なく実施できる試料を作成することが出来た。実際に分析を行ったところ、南太平洋還流試料において堆積してから数千万年以上が経過したとみられる堆積物試料の中から数の少ない微生物細胞を分取、NanoSIMS 測定用の試料を作成することが出来た。これらの試料に対し、NanoSIMS によって基質として与えた ^{13}C 、 ^{15}N の取り込みを調べたところ、南太平洋還流試料、および下北半島沖双方の試料において、微生物体内に ^{13}C 、 ^{15}N が蓄積される現象を確認することに成功し、超貧栄養環境、または大深度海底下においても微生物が生存状態を維持して存在していることを示す直接的な証拠が得られた。

(5) 今後の展望

本研究では、人間の生息環境とはかけ離れた極限環境である海底下環境に存在する微生物細胞を研究の対象とし、謎に包まれたその生態や生理活性を検出して海底下生命圏に関する理解をさらに深めることを目指した。海底下生命圏には地球全体の微生物バイオマスの数~数十%が存在している、地球最大級の生命圏であると考えられ、近年ではメタンハイドレートやレアアースなど、海底資源の生成などとの関わりについても注目されている。しかし、前述のように、海底下生命圏においては、地層を構成する非生物粒子が大量に存在し、微生物の解析を効率的に実施することが出来なかった。

本研究では上記の問題を解決し、目的を達成するために様々な技術開発を実施した。その成果として、海底下堆積物試料から効率的に微生物細胞のみを取り出す方法などを構築することに成功した。これらの手法は国際的にも高く評価され、様々な国際共同研究が進行する礎となっている。今後は、構築した手法を活用し、様々な環境における生命活動の理解へ繋げることが期待される。

参考文献

- 1 Parkes, R. J., Cragg, B. A. & Wellsbury, P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeol J* V8, 11-28 (2000).
- 2 Roussel, E. G. et al. Extending the Sub-Sea-Floor Biosphere. *Science* 320, 1046, doi:10.1126/science.1154545 (2008).
- 3 Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 6578-6583, doi:10.1073/pnas.95.12.6578 (1998).
- 4 Inagaki, F. et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2815-2820 (2006).
- 5 Li, T. et al. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ Microbiol* 10, 580-588, doi:doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01478.x (2008).
- 6 Behrens, S. et al. Linking Microbial Phylogeny to Metabolic Activity at the Single-Cell Level by Using Enhanced Element Labeling-Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl Environ Microbiol* 74, 3143-3150, doi:10.1128/aem.00191-08 (2008).
- 7 Popa, R. et al. Carbon and nitrogen fixation and metabolite exchange in and between individual cells of *Anabaena oscillarioides*. *ISME J* 1, 354-360 (2007).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Fumio Inagaki, Kai-Uwe Hinrichs, Yusuke Kubo, Marshall W. Bowles, Verena B. Heuer, Wei-Li Hong, Tatsuhiko Hoshino, Akira Ijiri, Hiroyuki Imachi, Motoo Ito, Masanori Kaneko, Mark A. Lever, Yu-Shih Lin, Barbara A. Methe, Sumito Morita, Yuki Morono, et al., Exploring deep microbial life in coal-bearing sediments down to 2.5km below the seafloor, *Science*, 2015, 349: 420-424, DOI: 10.1126/science.aaa6882, 査読有り
- ② Takuro Nunoura, Yoshihiro Takaki, Shigeru

- Shimamura, Jungo Kakuta, Hiromi Kazama, Miho Hirai, Noriaki Masui, Hitoshi Tomaru, Yuki Morono, Hiroyuki Imachi, Fumio Inagaki, Ken Takai, Variance and potential niche separation of microbial communities in subseafloor sediments off Shimokita Peninsula, Japan, *Environmental Microbiology*, 2015, Epub, DOI: 10.1111/1462-2920.13096, 査読有り
- ③ HOSHINO TATSUHIKO, Kuratomi Takashi, MORONO YUKI, Hori Tomoyuki, Oiwan Hisashi, Kiyokawa Shoichi, INAGAKI FUMIO, Ecophysiology of Zetaproteobacteria Associated with Shallow Hydrothermal Iron-Oxyhydroxide Deposits in Nagahama Bay of Satsuma Iwo-Jima, Japan, *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1554, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01554, 査読有り
- ④ 諸野 祐樹、伊藤 元雄, NanoSIMS により基質の流れを可視化する—未培養微生物のシングルセルレベルでの生理生態解析, *水環境学会誌*, 2015, 38: 375-379, 査読無し
- ⑤ Nishio, Y., Ijiri, A., Toki, T., Morono, Y., Tanimizu, M., Nagaishi, K., and Inagaki, F., Origins of lithium in submarine mud volcano fluid in the Nankai accretionary wedge, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2015, 414:144-155, DOI: 10.1016/j.epsl.2015.01.018, 査読有り
- ⑥ Morono, Y., Terada, T., Yamamoto, Y., Xiao, N., Hirose, T., Sugeno, M., Ohwada, N., Inagaki F., Intact preservation of environmental samples by freezing under an alternating magnetic field, *Environ. Microbiol. Rep.* 2015, 7:243-251, DOI: 10.1111/1758-2229.12238, 査読有り
- ⑦ D'Hondt S, Inagaki F, Zarikian CA, Abrams LJ, Dubois N, Engelhardt T, Evans, H, Ferdelman T, Gribsholt B, Harris RN, Hoppie BW, Hyun J-H, Kallmeyer J, Kim J, Lynch JE, McKinley CC, Mitsunobu S, Morono Y, et al., Presence of oxygen and aerobic communities from seafloor to basement in deep-sea sediment, 2015, 8: 299-304, DOI: 10.1038/NNGEO2387, 査読有り
- ⑧ Yanagawa, K., Morono, Y., Yoshida-Takashima, Y., Eitoku, M., Sunamura, M., Inagaki, F., Imachi, H., Takai, K., and Nunoura, T., Variability of subseafloor viral abundance at the geographically and geologically distinct continental margins., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2014, 12269: 60-68, 査読有り
- ⑨ 諸野祐樹, 海底下環境における微生物生命圏とその生態, *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, 2014, 13: 4-10, 査読無し
- ⑩ Kubota, K., Morono, Y., Ito, M., Terada, T., Itezono, S., Harada, H., and Inagaki, F., Gold-ISH: A nano-size gold particle-based phylogenetic identification compatible with NanoSIMS. *Syst. Appl. Microbiol*, 2014, 37 (4), 261-266, doi:10.1016/j.syapm.2014.02.003, 査読有り
- ⑪ Morono, Y., Terada, T., Hoshino, T., and Inagaki, F., Hot-alkaline DNA extraction method for deep subseafloor archaeal communities., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, 80: 1985-1994, DOI: 10.1128/AEM.04150-13, 査読有り
- ⑫ Futagami, T., Morono, Y., Terada, T., Kaksonen, A. H., and Inagaki, F. Distribution of dehalogenation activity and characterization of organohalide-responsive genes in marine sediments of the Nankai Trough subduction zone., *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2013, 368, 20120249, DOI: 10.1098/rstb.2012.0249, 査読有り
- ⑬ 諸野祐樹, 伊藤元雄, 稲垣史生, 超高空間分解能二次イオン質量分析法による微小領域イメージングと環境微生物学—微小領域の組成イメージ分析から見えてくる環境微生物個々の代謝活性と機能, *化学と生物*, 2013, 51, 205-207, 査読無し
- ⑭ 諸野祐樹, 海底下における微生物とその代謝・活性—未知の海底下生命圏を紐解くテクニックとその応用, *日本極限環境生物学会誌*, 2013, 12, 65-70, 査読無し
- ⑮ Yuki Morono, Takeshi Terada, Jens Kallmeyer, Fumio Inagaki, An Improved Cell separation Technique for Marine Subsurface Sediments: Applications for High-throughput Analysis Using Flow Cytometry and Cell Sorting, *Nat Geosci*, 査読あり, 2013, 15 (10), 2841-2849, DOI: 10.1371/journal.pone.0046282, 査読有り
- ⑯ Tomoo Watsuji, Manabu Nishizawa, Yuki Morono, Hisako Hirayama, et al, Cell-Specific Thioautotrophic Productivity of Epsilon-Proteobacterial Epibionts Associated with *Shinkaia crosnieri*, 2012, 7, e46282, DOI:10.1371/journal.pone.0046282, 査読有り
- [学会発表] (計 32 件)
- ① D'Hondt Steven, Pockalny Robert, Spivack Arthur, INAGAKI FUMIO, Murray RICHARD, Adhikari Rishi Ram, Britta Gribsholt, Kallmeyer Jens, McKinley Claire, MORONO YUKI, Roy Hans, Justine Sauvage, Wiebke Ziebis, OXIC AND ANOXIC REGIONS OF SUBSEAFLOOR S, 2015 AGU Fall Meeting (国際学会) (招待講演), 2015/12/17, Moscone Center (San Francisco, USA)
- ② Stefan Braun, MORONO YUKI, Sten Littmann, Jorgensen Bo Barker, Lomstein

- Bente Aa. Size and Carbon Content of Sub-seafloor Microbial Cells, 2015 AGU Fall Meeting (国際学会), 2015/12/17, Moscone Center (San Francisco, USA)
- ③ Braun Stefan, MORONO YUKI, Kevin Becker, Hinrichs Kai-Uwe, Jorgensen Bo Barker, Lomstein Bente Aa., Analysis of biomolecules of sub-seafloor microbial cells separated from the sediment matrix, 3rd International Workshop on Microbial Life under Extreme Energy Limitation (国際学会), 2015/09/22, (Aarhus, Denmark)
- ④ MORONO YUKI, Technical developments to explore sedimentary biosphere: current status, limitation, and future Perspectives, CDEBI Sediment Workshop (招待講演), 2015/06/25, University of Southern California (Los Angeles, USA)
- ⑤ 諸野 祐樹, 寺田 武志, 山本 裕二, 肖 楠, 廣瀬 丈洋, 菅野 正也, 大和田 哲男, 稲垣 史生, 掘削コア試料の高品質、長期間保管を可能とする磁場振動型凍結とその評価, 日本地球惑星科学連合 2015 年大会, 2015/05/26, 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- ⑥ MORONO YUKI, Terada Takeshi, ITO MOTOO, INAGAKI FUMIO, Probing metabolic activity of aerobic microbial cells in ultraoligotrophic sediments of the South Pacific Gyre, Deep Carbon Observatory International Science Meeting (招待講演) (国際学会), 2015/05/08, (Lisbon, Portugal)
- ⑦ Morono, Y., Terada, T., Ito, M., and Inagaki, F., Probing Metabolic Activity of Deep Subseafloor Life with NanoSIMS, AGU Fall Meeting 2014 (招待講演), 2014/12/15, Moscone center, (San Francisco, USA)
- ⑧ 諸野祐樹, 海底下で太古の生命を探せー最先端技術で迫る海底下深部生命とその姿, 高知大学自主セミナー (招待講演), 2014/11/05, 高知大学 (高知県南国市)
- ⑨ Morono, Y., Terada, T., Ito, M., Hoshino, T., and Inagaki, F., Development of Analytical Technologies for Low-Biomass Microbial Communities in the Subseafloor Sedimentary Biosphere, Ninth International Symposium on Subsurface Microbiology, 2014/10/06, Pacific Grove (California, USA)
- ⑩ Morono Y., Intact preservation of environmental samples by freezing under an alternating magnetic field, Fourth C-DEBI Annual Meeting (招待講演), 2014/10/03, Marina, (California, USA)
- ⑪ 諸野祐樹, 超高空間分解能質量分析計 (NanoSIMS) によるサブミクロンレベルでの安定同位体追跡, 第 32 回「重窒素圃場利用研究会」討論会 (招待講演), 2014/09/08, 東京農工大学 (東京都府中市)
- ⑫ Morono, Y., Ito, M., Terada, T., and Inagaki, F., Metabolic activity of subseafloor microbes in the South Pacific Gyre, ISME 15, 2014/08/25, (Seoul, Korea)
- ⑬ 諸野祐樹, 海底下に広がる生命圏, 統合国際深海掘削計画 10 年の成果一般公開シンポジウム、深海を掘る (招待講演), 2014/04/06, 国立科学博物館 (東京都台東区)
- ⑭ 諸野祐樹, 伊藤元雄, 寺田武志, 稲垣史生, NanoSIMS による環境微生物の基質同化活性測定—海底下生命圏を例として—, 9 回日本微生物生態学会年会シンポジウム (招待講演), 2013/11/23, 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
- ⑮ 諸野祐樹, 海底下環境における微生物生命圏とその生態に関する研究, 日本極限環境生物学会、奨励賞受賞講演, 2013/10/27, 明治大学 (神奈川県川崎市)
- ⑯ 諸野祐樹, 生命の生息限界、代謝速度の限界を探る—海底下における微生物とその活性—, 日本極限環境生物学会 第 14 回シンポジウム (招待講演), 2013/06/15, 東洋大学 (東京都文京区)
- ⑰ 諸野祐樹, 伊藤元雄, 寺田武志, 稲垣史生, NanoSIMS およびセルソーティングによる南太平洋環流域堆積物試料中の微生物代謝活性解析, 日本地球惑星科学連合 2013 年大会 2013/05/30, 幕張メッセ (千葉県千葉市)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Morono, Y., Kallmeyer, J., Earth and Life Processes Discovered from Subseafloor Environments: A Decade of Science Achieved by the Integrated Ocean Drilling Program (IODP), 2014, Pages 804, pp. 65-83, Elsevier
- ② Morono, Y., Ito, M., and Inagaki, F., Chapter 5: Detecting slow metabolism in the subseafloor: analysis of single cells using NanoSIMS. In Kallmeyer, J. (ed.), "Life in Extreme Environments: Microbial Life in the Deep Biosphere", De Gruyter, 2014, 326 pages, pp. 101-120

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸野 祐樹 (Morono, Yuki)
 国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理
 研究者番号: 30421845