

海底堆積物の微細構造と微生物細胞の観察

Observation of Microstructure and Microbial Cells in Marine Sediments

浦本豪一郎^a, 諸野 祐樹^{a, b}, 植松 勝之^c, 稲垣 史生^{a, b}
Go-Ichiro Uramoto, Yuki Morono, Katsuyuki Uematsu and Fumio Inagaki

^a海洋研究開発機構高知コア研究所

^b海洋研究開発機構海底資源研究開発センター

^cマリンワークジャパン

要旨 広大な海洋, その下に広がる暗黒の深海底のさらに下の海底下地層環境には, 地球最大級の微生物生命圏が存在することが分かってきた. 海底に降り積もる泥や岩石を主体とした地層, 人間の生息域から離れた「極限環境」である海底下環境の実態に迫るには, 構成マトリクスである地層を含めた詳細な微細構造観察が必要不可欠となる. しかし, 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, 柔らかい地層の微細構造観察は不可能な状態にあった. また, 海底下微生物生命は, 大量に存在する地層マトリクスを構成する非生物粒子に阻まれて, その観察は容易ではなかった. これらの点を解決するべく, 筆者らは海底下から採取した試料の微細構造, およびその中に存在する微生物を観察する技術の開発を進めてきた. 本講座では環境試料へのアプリケーションとして筆者らの取り組みを紹介し, 未解決の課題, および将来への展望について議論したい.

キーワード: 海底堆積物, 微細構造, 微生物

1. はじめに

海底に積もる泥は「堆積物」と呼ばれている. 海底には, マリンスノーと呼ばれるプランクトンの死骸や陸から風で運ばれてきた塵, または火山活動によって放出された砕屑物などが積もっていく, すなわち堆積する. これが海底下に形成される地層の正体である. 基本的には地上に形成される地層と同様の形成メカニズムを取るが, 海底の場合, 常に水の中にあり, かつ大規模な地殻変動などが起こらない場所が多いため, 地層構造が比較的良好に保存されているのが特徴である. 20世紀後半から行われている世界各地の海洋底科学掘削の進展により, この海底下堆積物によって構成される地層環境に地球最大規模の微生物生命圏が存在することが分かってきた. 現在までに海底から約2.5 km までの地層には膨大な数の微生物が確認され (図1)^{1,2)}, 海底下全体の微生物数の見積もりでは全地球バイオマス炭素の1-10%が海底下環境に存在すると考えられている^{2,3)}. こうした微生物は, 構成マトリクスである地層中で様々な代謝活動を行っていることが知られており⁴⁾, 石油や天然ガスなどの海底地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ている⁵⁾. これら海底地下に潜む微生物生命活動の理解は, 海底下で起こる地球規模の物質動態の解明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環境は, 微生物生命研究にとって非常

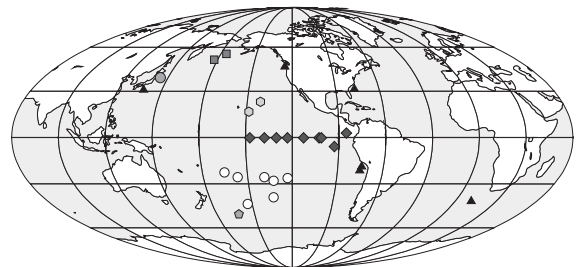
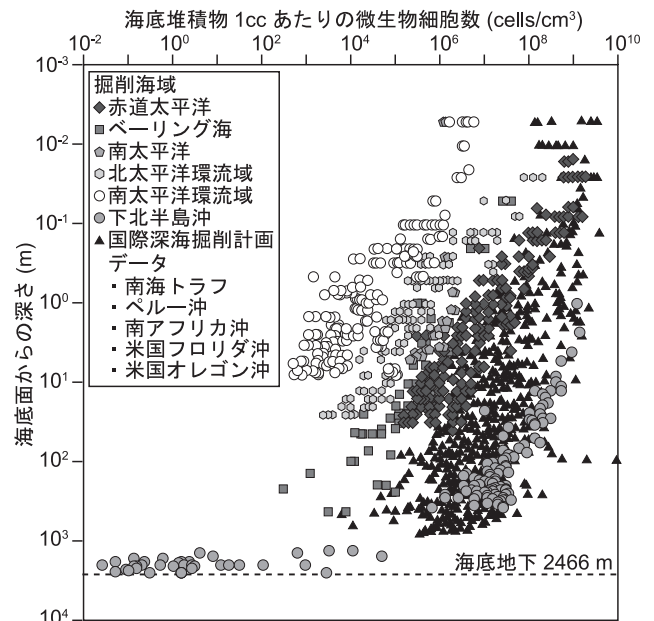


図1 海底堆積物1 ccに含まれる微生物細胞数ならびに試料の掘削海域^{1,2)}

^a〒783-8502 高知県南国市物部乙200
2016年4月15日受付, 2016年7月1日受理

に困難なターゲットであった。微生物の生存空間である堆積物の孔隙は、地層中の鉱物粒子や有機物粒子が三次元的に織りなす微細構造の隙間であり、微生物の生命が存続するために必要な生息空間を提供する。しかし、その観察技術が未確立であり、岩石など硬い試料については様々な方法論が存在したが、柔らかい地層の微細構造を攪乱なく観察する技術は存在していなかった。一方、海底下微生物生命（細胞）自体を研究対象とする場合においては、試料の99.9%以上の体積を占める地層マトリクス構成粒子（無機、有機粒子）がその解析を阻み、単なる観察ですら容易ではなかった。これらの点を解決すべく、筆者らは海底下から採取した試料の微細構造を観察する技術⁶⁾、およびその中に存在する微生物を分離する技術⁷⁾の開発を進めてきた。本講座では環境試料へのアプリケーションとして筆者らの取り組みを紹介し、未解決の課題、および将来への展望について議論したい。

2. 海底下地層試料の微細構造観察

これまでの研究では、地質学分野において地層試料中の鉱物粒子の配置を観察することを目的とした走査電子顕微鏡（SEM）観察の例があった⁸⁾。この場合、1辺の長さ約2 cmの立方体状に採取した試料の間隙水をn-ブチルアルコールに置換後、凍結乾燥し、割断することによって露出した試料の表面を観察する。しかし、乾燥に至る溶媒置換プロセス、サイズの大きい試料の凍結処理ないし割断処理に伴い、柔らかく水分に富んだ堆積物の構造は崩壊を免れない^{6,9)}。また、微生物の主要構成元素（炭素、酸素、水素など）は、鉱物粒子の主要構成元素（珪素、カルシウムなど）より軽元素のため、電子線が透過しやすく、堆積物の観察条件では微生物が観察できない問題もあった。

一方、柔らかい地層の孔隙内における原位置での微生物配置を観察した研究は、未圧縮で孔隙に富む海底面近傍の堆積物（海底面から数 cm）を樹脂によって固定化し、核酸染色を行って原核生物を光学顕微鏡で観察した事例があった¹⁰⁾。これにヒントを得て、筆者らは、生物電子顕微鏡分野において常用されている樹脂包埋法を海底下地層試料の処理に適用し、微細構造の攪乱を抑えた試料調製法による試料観察を試みた（図2）。樹脂包埋処理そのものは、従来の地質学分野でも存在したが、最初に岩石試料の乾燥を行うため、柔らかく水分に富む地層試料処理には不相当である。生物細胞の構造を攪乱なく観察することを目的とした溶媒置換-樹脂包埋法を用いることで、水分を含んだ海底下地層試料の三次元構造を攪乱することなく樹脂包埋を行うこと、また、マイクロームを用いて平滑表面を得ることで、凍結乾燥-割断によって生じるアーティファクトを排除することも同時に可能となった。また、さらに酢酸ウラニルを用いた電子染色も同時に行ったことで、地層試料中の微生物細胞または類似構造を有する有機物の存在も可視化することが可能となる。

このような手法で、大陸沿岸から外洋域の多様な海底地下環境から掘削採取された試料^{11,12)}を処理した。比較のために従来法のアルコール置換・凍結乾燥観察処理も実施し、マイクロフォーカス X 線 CT と SEM の二次電子像を併用した観察で試料処理結果を比較した。マイクロフォーカス X 線 CT では、サブミリメートルスケールの観察で、処理前の生試料と各電頭試料調製手法での処理結果を比較した。SEM では二次電子像を観察し、各試料調製手法の詳細な微細構造の観察結果を比較した（図2）。

観察の結果、アルコール置換・凍結乾燥試料にはマイクロフォーカス X 線 CT 断面、SEM 二次電子像ともにクラック

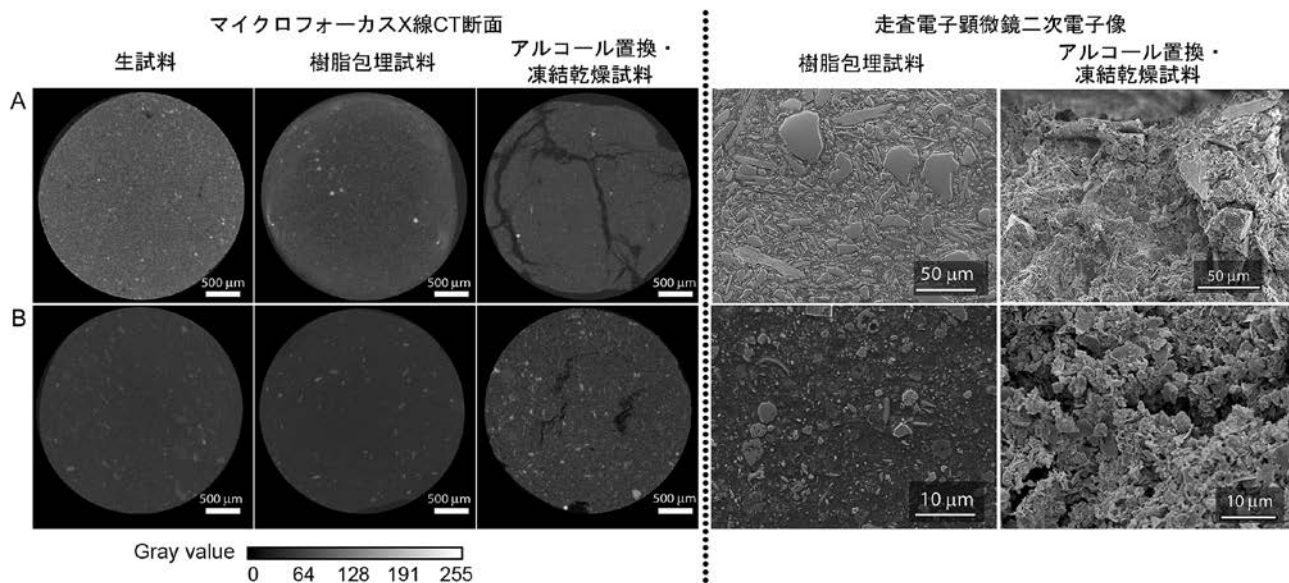
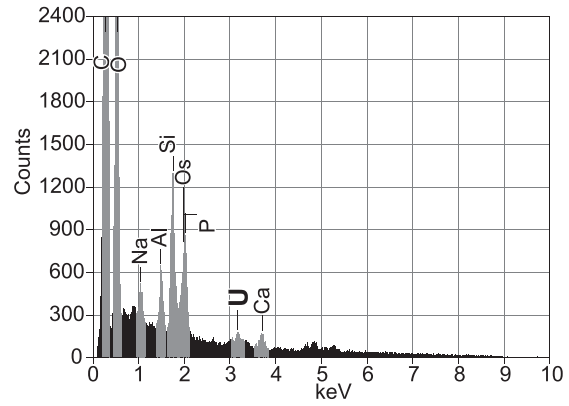
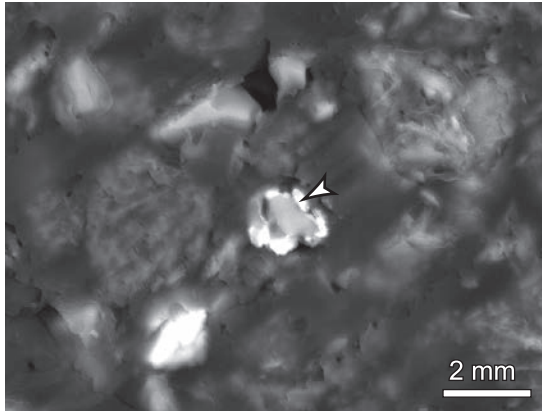


図2 樹脂包埋処理ならびに従来法のアルコール置換・凍結乾燥処理により試料調製された海底堆積物試料のマイクロフォーカス X 線 CT 断面画像・走査電子顕微鏡二次電子像の比較⁶⁾。(A) ニューゼaland沖大陸棚堆積物。(B) 南太平洋環流域の遠洋性粘土。

A 南太平洋環流域の遠洋性粘土



B 南太平洋の珪藻質軟泥

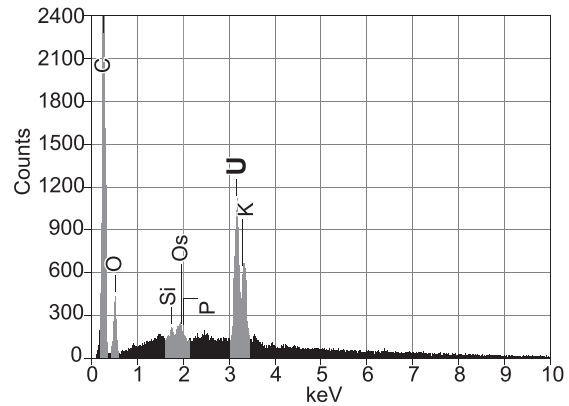
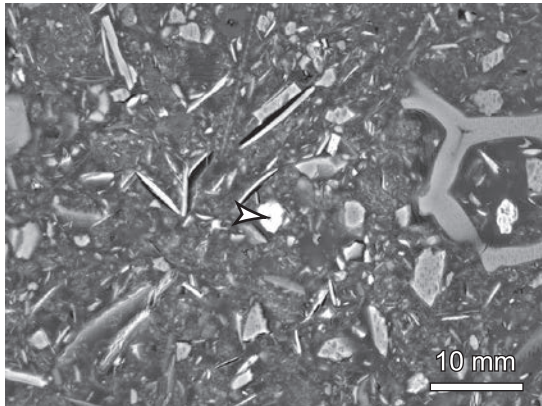


図4 海底下地層試料内部の電子染色粒子(矢印)の走査電子顕微鏡二次電子像とエネルギー分散形X線分析装置による点分析の結果⁶⁾

とから、密度の異なる重層液中で分離が可能となる。環境試料から比較的比重の小さい微生物細胞を分離する試みは以前から行われてきた^{16~18)}。これらは細胞密度の高い土壌試料などから微生物細胞を分離する試みであった。一方、Kallmeyerらは、これを細胞密度の低い海底下堆積物の細胞取得に応用し、微生物細胞を濃縮することに成功した¹⁹⁾。Kallmeyerらの方法では、比重の大きい重液層に堆積物を懸濁した試料液を重層する二層式の密度勾配を使用していた(図5)。しかし、筆者らがKallmeyerらと共同で行った回収率の検討によると、二層式の密度勾配では、堆積物試料の性質、主に試料中の粒子サイズにより回収率が異なり、場合によっては細胞の回収率が10%以下に留まることが明らかとなった。これは、比重による微生物細胞と非生物粒子の分離が試料液と重液の境界層でのみ起こるため、境界層でトラップされる微生物細胞が物理的に近距離に位置する非生物粒子と共に重液層へ沈降することが原因と考えられた。上記の問題を解決し、試料からの微生物細胞回収率を向上させるため、筆者らは多層密度勾配を利用することとした。検討に当たっては、ポリタングステン酸ナトリウムとNycodenzの二つの媒体試薬を用いて様々な比重組成を検討し、最適な組み合わせを見出すことが出来た(図6)。この比重組成では、一般的な生体細胞の

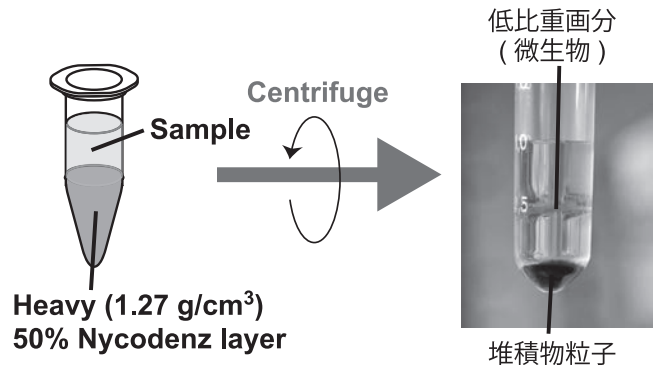


図5 Kallmeyerらが用いた二層式密度勾配遠心分離¹⁹⁾。Nycodenzと呼ばれる密度勾配媒体で作成した高比重液の上に試料懸濁液を重層し、遠心分離を行うことで、比重の小さい微生物細胞を比重境界域に濃縮する。

密度勾配遠心分離によく用いられる Percoll の最大比重 (1.3 g/cm^3) よりもはるかに大きな比重の重液を用いているが、これにより堆積物試料に含まれる非生物粒子の一部が浮遊するようになり、仮に微生物細胞が堆積物粒子と共に重液層に沈降してしまっても、再度低比重層にまで浮き上がってくるなどの効果により回収率が向上したものと考えている。これ

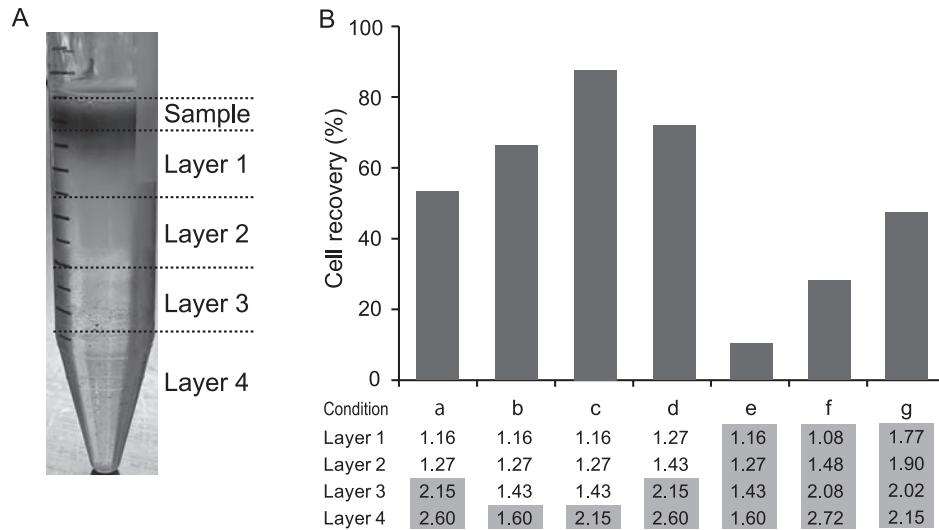


図6 多層式密度勾配による細胞分離効率の最適化⁷⁾. 多層式密度勾配 (A) と、それぞれのレイヤーにおける溶液の比重、又は異なる媒体 (グレーの影付きはポリタングステン酸ナトリウム、それ以外はNycodenz) による細胞分離効率の違い (B)

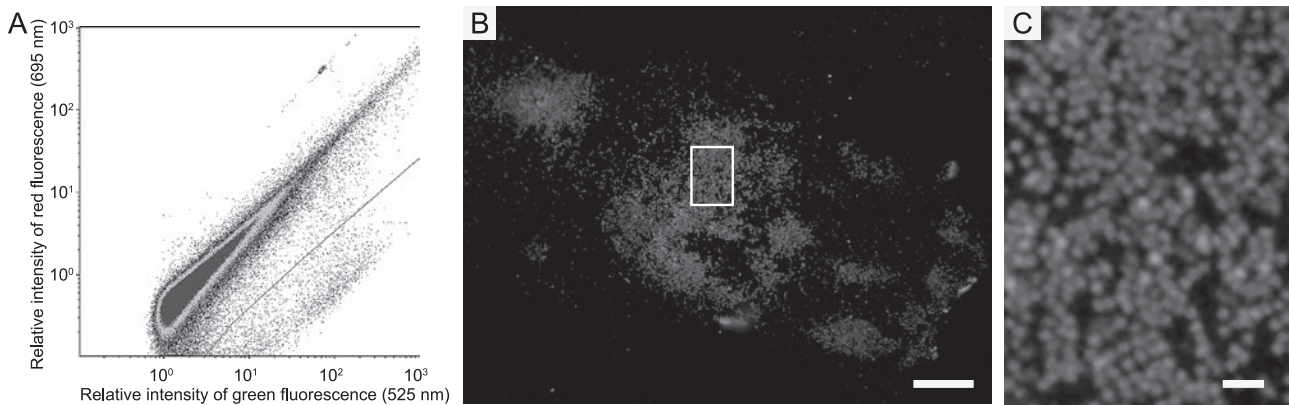


図7 フローサイトメトリーによるSYBR I染色堆積物試料の解析結果とソーティング後の細胞⁷⁾. SYBR Iによる染色を行った堆積物試料をフローサイトメトリーで分析した結果 (A), 横軸が緑色蛍光強度, 縦軸が赤色蛍光強度を示す. 右下の線で囲まれた部分が緑色蛍光を発する微生物細胞の領域. 赤い領域の多量に存在する粒子は非生物粒子. この微生物細胞をメンブレン上にソーティングしたものがB. 白四角内を拡大したものがC. 白棒はBで20 μm , Cで2 μm .

により、堆積物試料に存在する微生物細胞を、非生物粒子の割合を下げながら濃縮することが可能となった。

次に、この微生物濃縮後の懸濁液から微生物細胞のみを取り出すため、核酸染色剤を用いて染色した微生物細胞についてフローサイトメトリー／セルソーターによる細胞選択的ソーティングを試みた。核酸染色剤として知られるSYBR Green I (SYBR I) は、その高い蛍光量子収率から細胞染色剤として現在広く用いられている。しかしSYBR Iは微生物細胞だけでなく、非生物粒子にも吸着してしまうことが問題となっていた。筆者らは微生物細胞と非生物粒子の混合物をSYBR Iで染色し、顕微鏡下で青色の励起光で観察すると、非生物粒子は黄色からオレンジ色の蛍光を発し、微生物細胞は緑色の蛍光を発することを見出した²⁰⁾。フローサイトメトリーでは、細く絞った水流にレーザーを当て、そこを通過する粒子の光学特性を一つ一つ分析する。上記の色の違いは同じ青色のレーザーを用いれば、フローサイトメトリーでも識

別可能で、生物／非生物の区別を粒子ごとに行うことができる。また、各粒子について取得された光学情報に基づき、粒子を選り分けるソーティング機能を有するセルソーターを用いれば、密度勾配遠心分離後に残る非生物粒子を排除し、微生物細胞のみを選択的に取り出すことが可能となる。実際にバイオマスの低い外洋の海底堆積物²¹⁾から細胞分離後の懸濁液をフローサイトメトリーで分析したところ、図7Aのような蛍光パターンが得られ、微生物細胞のシグナルは図7Aの右下の領域に位置し、左下の領域に位置する鉱物粒子と識別された。更に、微生物細胞の蛍光が存在すると思われる領域を対象にソーティングを実施したところ、図7Bに示すように堆積物内の微生物細胞のみを選択的に取り出し、微少な領域に濃集させる基礎技術を構築することに成功した。

海底下には未だ人類によって分離・培養がなされたことのない未培養系統微生物が多く存在している²²⁾。これらの未培養系統群が海底下堆積物環境でどのような代謝活動を、どれ

くらいの速度で行っているのか、これまでは海底下試料から搾り出した間隙水の化学分析などによって作成した深度毎の溶存物質プロファイルなどにより、海底下堆積物中での物質移動フラックスやその消費などが議論されていた²³⁾が、微生物の活性を直接測定する方法は存在しなかった。海底下試料から微生物細胞を選択的に取り出すことが可能になったことで、これまでバルクで測定するしかなかった未知の海底下微生物の代謝活動を、細胞一つ一つについて測定する道が拓けた。Nanometer-scale Secondary-Ion Mass Spectrometry (NanoSIMS) による安定同位体比解析との組み合わせである²⁴⁾。NanoSIMSは同位体を観る顕微鏡ともいわれ、数十ナノメートルの空間分解能で¹³Cや¹⁵Nなどの安定同位体を含む分析対象物の原子組成を可視化することの出来る装置である。例えば未培養系統群が優占し、活性の著しく低い微生物で構成された微生物群であっても、安定同位体によって分子内の炭素、窒素を置き換えた化合物を基質とした培養を実施し細胞内に微量の基質が取り込まれば細胞ごとの生理活性を検出することが出来る²⁵⁾。しかし、この装置は生物細胞と非生物有機物粒子を見分けることは出来ない。海底下堆積物試料から微生物のみを選択的に取り出す筆者らの分離法を用いることで海底下微生物に関する超高精度分析を行うことが初めて可能となった。

4. まとめ

本稿では地球最大規模の微生物バイオマスを有する海底下生命圏とその生命の実体を探るべく、筆者らが取り組んでいる技術開発の一端を紹介した。海底下生命圏はその膨大なバイオマスとは裏腹に、圧力、温度など様々な環境因子が陸上のそれと大きく異なる極限的な環境にある。また、微生物の存続を支える栄養供給や呼吸を行うための酸化的物質が極めて限られた環境でもある。このような環境に生息、存続している微生物はどのような生態を有し、その生息環境とどのような相互作用を行っているのか、海底下に眠る資源物質の生成などとも関連して注目を集めているが、依然として未解明な部分が多い。その理由の一端は適切な研究アプローチが整備されているとは言えない状況にあると筆者らは考え、技術開発を推進してきた。海底下生命圏の主役は微生物生命であるため、顕微鏡など、微小な領域を可視化することの出来るアプローチが重要であることは自明である。他方、それぞれの微小環境が海底下生命圏全体としてどのように相互作用、

影響し現在を形作っているのか、小さいものを見るだけでなく、その集合体としてのマクロな現象にも着目することが、今後海底下地層環境における生命圏の拡がり、生命の存続限界を見極めていくうえで重要なことであると考えられる。

謝 辞

本稿で紹介した研究を進めるにあたり、JAMSTECの伊藤元雄博士、マリンワークジャパンの寺田武志氏に、ご指導、ご協力を頂いた。

文 献

- 1) Inagaki, F. *et al.*: *Science*, **349**, 420–424 (2015)
- 2) Kallmeyer, J. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **109**, 16213–16216 (2012)
- 3) Whitman, W.B. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **95**, 6578–6583 (1998)
- 4) D'Hondt *et al.*: *Science*, **306**, 2216–2221 (2004)
- 5) Imachi, H. *et al.*: *ISME J.*, **5**, 1913–1925 (2011)
- 6) Uramoto, G.-I. *et al.*: *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **12**, 469–483 (2014)
- 7) Morono, Y. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **15**, 2841–2849 (2013)
- 8) Kawamura, K. and Ogawa, Y.: *Mar. Geol.*, **207**, 131–144 (2004)
- 9) Pike, J. and Kemp, A.E.S.: in Kemp, A.E.S. (Ed.), *Palaeoclimatology and palaeoceanography from laminated sediments. Geol. Soc. Spec. Publ.*, 37–48 (1996)
- 10) Bernhard, J.M. *et al.*: *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 813–828 (2013)
- 11) Fulthorpe, C.S. *et al.*: *Proc. IODP* 317, Integrated Ocean Drilling Program Management International Inc., Tokyo, doi:10.2204/iodp.proc.317.2011. (2011)
- 12) D'Hondt, S. *et al.*: *Proc. IODP* 329, Integrated Ocean Drilling Program Management International Inc., Tokyo, doi:10.2204/iodp.proc.329.2011. (2011)
- 13) Bennett, R.H. *et al.*: *NOAA, Professional Paper*, **9**, 1–86 (1977)
- 14) Weibel, E.R. and Paumgartner, D.: *J. Cell. Biol.*, **77**, 584–597 (1978)
- 15) Peth, S. *et al.*: *Soil Biol. Biochem.*, **78**, 189–194 (2014)
- 16) Katayama, A. *et al.*: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **44**, 245–252 (1998)
- 17) Prieme, A., *et al.*: *FEMS Microbiol.*, **21**, 59–68 (1996)
- 18) Lindahl, V.: *J. Microbiol. Meth.*, **25**, 279–286 (1996)
- 19) Kallmeyer, J. *et al.*: *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **6**, 236–245 (2008)
- 20) Morono, Y. *et al.*: *ISME J.*, **3**, 503–511 (2009)
- 21) D'Hondt, S. *et al.*: *Nature Geosci.*, **8**, 299–304 (2015)
- 22) Inagaki, F. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 2815–2820 (2006)
- 23) Jorgensen, B.B. and Boetius, A.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 770–781 (2007)
- 24) 諸野祐樹, 他: *化学と生物*, **51**, 205–207 (2013)
- 25) Morono, Y. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**, 18295–18300 (2011)