走査型X線分析顕微鏡でみるバイオマツト

高野雅夫*・川上紳一**・岡庭輝幸*・植崎由紀子**・熊澤峰夫*

Microbial Mats Investigated with the Scanning X-ray Analytical Microscope

Masao TAKANO*, Shin-ichi KAWAKAMI**, Teruyuki OKANIWA*,
Yukiko NARAZAKI** and Mineo KUMAZAWA*

Abstract: Understanding the coevolution of life and the earth's environments is one of the important subjects of the Decoding the Earth Evolution Program, a grant-in-aid scientific research for the priority areas, Ministry of Education, Japan. A large amount of stromatolites and banded iron formations has been collected for this purpose. Although many of them have been regarded as remnants of microbial mats, quite few direct evidence for microbial communities, their biogeochemical roles, or ecological settings has been preserved. Here we argue that recent microbial mats and stromatolitic structures observed in many active hot springs may provide important clues for modeling stromatolite formation processes as well as Precambrian biosphere. We present some results of chemical mapping of microbial mat sampled from hot springs in central Japan. The scanning X-ray analytical microscope we introduced here provides new and important information on the morphological and chemical structures of microbial mats.

1. はじめに

われわれは1995年度から文部省重点領域研究「全地球史解読」をスタートさせ、40億年にわたる地球の歴史を解明する研究を開始した。このプログラムの特徴は、世界中から系統的かつ大規模に岩石試料を採取して、さまざまな分野から総合的に研究することにある。特に遠洋深海堆積物起源の堆積岩類については、完全連続サンプリングと称して、露頭の続く限り連続的に試料を採取する方法を採用している。そうすることによって現在の海底堆積物のボーリングコア試料に相当する地球環境の変動記録を、38億年前までさかのぼって得ることが可能になる。すなわち、ODPの研究スタイルを先カンブリア時代の地球にも適用しようとするものである。

このプログラムの中でわれわれは、地球環境の進化において生物活動とその進化の果たす役割を重視する必要性を痛感し、「生命と地球の共進化」というコンセプトのもとに新しい研究の方向を模索してきた^{1), 2)}。その中で温泉バイオマツトの存在とその重要性を認識し、生命科学と地球科学の新しい境界領域における研究を開始し

た。小論ではこの研究の意義と課題を議論したのち、バイオマツト記載の主力装置と考えている走査型X線分析顕微鏡によるバイオマツトの観察例を紹介する。

2. 温泉バイオマツト研究の意義と課題

全地球史解読でこれまでに確保した試料の中には、27億年前のストロマトライト(Fortescue Group, Western Australia)や19億年前のストロマトライト(Pethei Group, Great Slave Supergroup, NWT, Canada)がある。ストロマトライトは乱れた縞をもち炭酸塩鉱物を主成分とする堆積物をさし、その多くはシアノバクテリアを主体とするバクテリアのマツト(バイオマツト)が化石化したものであると考えられている。ストロマトライトは地球環境の変動史や生物進化の研究に重要な手掛かりを与えている。大気中の酸素が形成されたのは酸素発生型光合成をするシアノバクテリアが生まれて大繁殖したためであり、ストロマトライトが存在することはその活動の記録を示すものと考えられているからである。浅海域で形成されたと考えられる大規模なストロマトライトは27億年前から出現した³⁾。このようなストロマトライトは、特におよそ25億年前から6億年前までの原生代には浅海環境において普遍的に見られる。また、27億年前ごろから19億年前ごろにかけて大規模な縞状鉄鉱床が形成されており、シアノバクテリアの光合成によって発生した酸素が海水中に解けこんでいた鉄イオンと結びついて化学的に沈殿したものであると考えられている⁴⁾。

1996年10月22日受付, 1996年12月24日受理

* 名古屋大学理学部地球惑星科学教室

Department of Earth and Planetary Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, 464-01, Japan.

** 岐阜大学教育学部

School of Education, Gifu University, Yanai-1-1, Gifu, 501-11, Japan.

一方、縞状鉄鉱床の形成にもバクテリアが積極的に関与した可能性や、シアノバクテリアの出現以前に嫌気性の環境で鉄を酸化することでエネルギーを獲得していたバクテリアの存在も示唆されている。19億年前に形成された大規模な縞状鉄鉱床であるGunflint Iron Formationにはバクテリア様の微化石が多数含まれており、鉄バクテリアのバイオマットであった可能性もある⁵⁾。

このように、原生代はストロマトライトを作ったバクテリアが主人公であった時代と言ってもよく、その活動が地球表層環境における物質循環、大気・海洋の組成、気候変動などをコントロールしていたと考えられる。そこでわれわれは、これらのストロマトライトからそれらが形成された当時のバクテリア活動の実態や、それがグローバルな物質循環に果たす役割、縞状構造に記録された環境変動のリズムやイベントを解明したいと考えている。

しかしながら、現在残されているのはバイオマトの主に無機成分だけであり、バクテリア自身の痕跡については、微化石はほとんど残っておらず、有機物も相当に変質したものになってしまっている。無機成分も結成過程によってさまざまな変化を被り、鉱物の種類、組成、組織も変化している。そこで、先カンブリア時代のストロマトライトを解釈し理解するためには、現在生きている多様なバイオマットやストロマトライトの形成過程をよく観察し、それらをモデル化して frame of reference を持つことがどうしても必要である。

現在形成されつつあるバイオマットは、家庭の台所の排水口をはじめとしてさまざまなところで形成されている。これらの中でわれわれは、温泉におけるバイオマットを原始地球の生態系モデルとなりうるものとして注目している。温泉のバイオマットに関する研究としては、特に米国のイエローストーン国立公園などで数多くの研究があるが、我が国では次のようなものがある。Mita et al.(1994)⁶⁾は北海道湯の滝温泉噴出口付近にマンガン酸化バクテリアがマンガン鉱物の鉱床を作っているマットを報告した。赤井ほか(1995)⁷⁾は日本の温泉のいくつかにストロマトライト様の岩石が生成していることを報告した。田崎ほか(1996)⁸⁾はバクテリアがその形成に深く関わっていることを示唆した。また牧(1996)⁹⁾は温泉噴出口によく見られる硫黄芝が硫黄細菌を一次生産者とするバクテリアの共生系であることを明らかにし、山本啓之ほか(1996, 私信)はこの細菌が 16S-rRNA 分子系統樹の中で *Thermotoga* や *Aquifex* に近い原始的なものであることを示している。

硫黄芝は1897年に三好学によって最初に記載された硫黄酸化細菌のマットであり、その名前は温泉流水中でゆ

らゆらとゆれている姿が硫黄でできた芝生のように見えることに由来している。硫黄芝を構成する硫黄酸化細菌は大型鎌型細菌であること⁹⁾、16S-rRNAの分子系統でみると他の硫黄酸化細菌に比べ系統が古いことから、従来報告されていない新しいタイプの硫黄酸化細菌であると考えられている。加藤・清水(1996)¹⁰⁾や牧(1996)⁹⁾は、硫黄芝を原始共生系モデルの一例として、生物進化、地球進化における硫黄芝のもつ意味の重要性を示唆している。

日本列島には多数の温泉があり、多様なバイオマットが分布していると考えられる。それらの中で地球史研究に重要なフィールドを見つけ、重点的に調査を行うことが賢明である。そこで、まずどこにどのようなバイオマットが分布しているかを調べカタログを作成することを提案した。予備的な調査を進める中で、シアノバクテリアと *Chloroflexaceae* が共生するバイオマット、硫黄芝を構成するバイオマットに焦点を絞ることにした。

これまでにわれわれが調査した温泉の中で、岐阜県平湯温泉、福地温泉、長野県湯田温泉、中の湯でも温泉噴出口にはごく普通にシアノバクテリアを主体とするバイオマットや硫黄細菌のバイオマット(硫黄芝)が形成されている。その中にはストロマトライト様の岩石を伴うものもある。

これらの温泉バイオマットは、以下の点で先カンブリア時代のストロマトライトの形成モデルとしてふさわしいと考えられる。

1) バクテリアの生態系であること。温泉噴出口は50℃から90℃程度の高温のため、好熱性細菌などの耐熱性のあるバクテリアしか生息できない。このことがより高等な真核生物に捕食されることなくバクテリアのみでマットを作ることができる理由である。また温泉水はほとんど有機物を含まないため独立栄養細菌を一次生産者とする共生系を構成することがある。これはバクテリアのみで閉じた生態系を形成していることを意味し、主要な生物としてはバクテリアしかいなかった先カンブリア時代の地球のモデルとしてはふさわしい。

2) 岩石(ストロマトライト)をつくりつつある。温泉噴出口は温泉水の急激な温度低下、pHや酸化還元電位の変化によって溶存成分が結晶化する場である。この結晶化作用にはバクテリアが直接・間接に関わっていると考えられる。その結果として形成されている岩石には炭酸塩鉱物を主成分とし縞状構造を持つなど、先カンブリア時代のストロマトライトと類似した特徴を示すものがある。このようにバイオマットがどのような固体成分を形成し、それがどのように変化して岩石として残るのかという過程を追跡できる点で好都合である。

3) 身近に観察できる．このようなバイオマットやストロマトライトが形成されつつあるのは、深海底の熱水噴出口や西オーストラリア・ハメルンブルのような高塩分濃度の浅海域がある．しかしながら、日本列島のいたる所に自噴する温泉に、このようなバイオマットがあることは、研究を進める上で大きな地の利となり、徹底した詳細な研究を行うことができる．

このような温泉バイオマット形成過程の解明を進める上では、以下のような課題についての研究を組み合わせた総合的な研究が必要となる．1) バクテリアの微生物生態学的・生化学的研究．特に代謝とそれにかかわる酵素の特徴を明らかにすること．酵素に利用されている特徴的な金属イオンがあれば、バイオマットはそれを濃集している可能性があり、岩石になった時にその情報が残りやすい．2) バクテリアの共生関係とバイオマトの構造形成．3) バクテリアによって合成され、岩石中に取り込まれて保存される有機分子の種類と特徴．4) 鉱物形成のメカニズム．特にバイオミネラリゼーション．5) 縞状構造形成のメカニズム．特に気象、気候の変動や温泉水の温度、組成の変動などの環境変動との関係．

われわれは微生物生態学の専門家と協力してこのような研究をすすめてやろうとしている．このためには、まずバイオマットを記載する手法を確立する必要がある．そこでバイオマットを観察するさまざまな測定機器を導入・開発しつつある．走査型X線分析顕微鏡はその主力装置として導入して研究を開始したところである．研究はスタートしたばかりであり、ここで結論的なものを披露することはできないものの、走査型X線分析顕微鏡によるバイオマトの観察例を紹介し、その特徴と今後の展望を述べる．

3. 走査型X線分析顕微鏡の原理と特徴

Fig. 1 に走査型X線分析顕微鏡の原理を示す11)．X線発生管で発生した一次X線は、回転放物面の内壁をもつガ

ラスチューブであるX-ray Guide Tube (XGT)で細く絞られ、試料に照射される．試料から発生する蛍光X線を半導体検出器で検出し、そのエネルギーを測定する．試料表面を面的に走査することによって蛍光X線強度の2次元画像を得る．XGTが開発されたことによって強度の強いX線ビームを発生させることができ、比較的コンパクトな装置で元素マッピングが可能になった．X線発生管は空冷式Rhターゲット、出力50 kV×1 mAのもの、X-ray Guide Tubeはビーム径100μmと10μmの2本を装備している．X線検出器には高純度Si検出器を用い、測定系は同時に31元素の元素マッピングを行う能力をもつ．さらに透過X線を検出する固体シンチレーション検出器も装備して、透過X線像も同時に測定できる．空間分解能は1画素あたり10μmから0.8 mmで、画像サイズは最少2.56 mm×2.56 mmから最大200 mm×400 mmのものまで測定できる．したがって人間の肉眼から光学顕微鏡でみる程度の空間スケールにおける元素分布を観察するのに適している．

この装置の最大の特徴は試料が空气中に置かれることである．このことによってさまざまな形態・大きさの試料が測定可能となった．その反面、空気層によるX線の吸収およびX線励起・検出系を真空中に保つための窓材によるX線吸収のため、アルミニウムまでの軽元素についての感度がきわめて悪い．

この装置はバイオマット試料の観察にきわめて適している．1) 試料は空气中に置かれるため、ほとんど生のバイオマット試料でもそのまま測定できる．これは試料を真空容器に入れなければならない電子顕微鏡には真似のできないすぐれた特徴である．2) バイオマットにおける金属イオンの濃集や鉱物の存在を画像として計測できる．従来の蛍光X線分析装置では形の情報が捨てられてしまうので、形態が重要なファクターであるバイオマトの計測には不適切である．3) 先カンブリア時代のストロマトライトもまったく同じ手法で計測でき、両者の比較が容易になる．

4. 温泉バイオマトの測定結果

岐阜県平湯温泉および長野県湯田温泉を調査して、温泉噴出口付近のバイオマットを採取した．

Fig. 2Aは平湯温泉バスターミナルの温泉噴出口を示す．側壁の泥の部分の採取した(試料名 HIRAYU-A)．この泥は、水分を含んだままアセトンと樹脂の混合物に浸し、真空容器中で減圧してアセトンと水分を蒸発させる作業をくり返して、水分と樹脂を置換して固めた．これを堆積方向に垂直な断面で切断して蛍光X線スキャナで元素分布を計測した．Fig. 2Bは平湯温泉平湯神社内の泉源タンク

Fig. 1 The constitution of the Scanning X-ray analytical microscope (XGT-2000V, Horiba Ltd.).

Fig. 2 The photographs of microbial mats studied in this study. A: The Hirayu hot springs at the Hirayu Onsen bus terminal, Gifu Prefecture. The white circle shows the site where sample HIRAYU-A were collected. The vertical scale of the photograph is about 50cm. B: The hot spring of Hirayu Onsen at Hirayu Zinzya shrine. The white circle shows the sampling point of HIRAYU-B. The vertical scale of the photograph is about 80cm. C: Iou-shiba (sulfur-turf) of Yumata Onsen, Nagano Prefecture. The vertical scale of the photograph is about 40cm.

Fig. 3 XRF images of Ca, Fe, Sr and Mn. Sample is HIRAYU-A. The gray scales show the counts of fluorescence X-ray within one pixel for 10.8 hours operation. The scale bar is 10 mm.

側壁を示す。ここには緑色の部分と茶色の部分があり、緑色の部分は主にシアノバクテリアからなるマツである。その下には固結した白い結晶の層がタンク壁面にこびりついて成長している。固結部分を採取し、断面を走査型X線分析顕微鏡で計測した(HIRAYU-B)。

湯俣温泉では高さ数mの墳湯丘から温泉が噴出している。温泉は水流となって川に流れ込む。この水流の中に硫黄芝がゆらゆらと流れにゆれており(Fig. 2 C)、源泉か

ら遠ざかるにつれて黒-灰色-黄色-白色へと色の変化が認められる。ここでは特徴的な色を示す三種類の試料を採集し(黄色から白色: YUMATA-Y, 灰色: YUMATA-G, 黒色: YUMATA-B), それらをアルミニウム板の上に分散し、乾燥させて走査型X線分析顕微鏡で計測した。

走査型X線分析顕微鏡によるHIRAYU-A試料の測定結果をFig. 3に示す。ビーム径 100 μ mで10.8時間かけて測定した。主成分はカルシウムおよび鉄である。両者は相補

Fig. 4 XRF images of Ca, Fe, S and Sr. Sample is HIRAYU-B. The gray scales show the counts of fluorescence X-ray within one pixel for 10.8 hours operation. The scale bar is 10 mm.

Fig. 5 XRF images of S, Fe, Ca and K. Three samples of YUMATA-Y, YUMATA-G and YUMATA-B are shown together. The gray scales show the counts of fluorescence X-ray within one pixel for 10.8 hours operation. The scale bar is 50 mm.

的な縞状構造をしているのがよく分かる。カルシウムは球状の粒子として見えており、calcite 集合体が球状に成長しつつあるものと考えられる。微量成分としてストロンチウムとマンガンが観測された。ストロンチウムはカルシウムが多い層に特徴的に分布する。マンガンはごく一部、カルシウムにともなって存在する。

HIRAYU-B 試料の測定結果を Fig. 4に示す。主成分のカルシウム、鉄に加えて硫黄およびストロンチウムが観

測された。層の下位には硫黄に富む層があり上位に向かって鉄の濃集が進んでいる。カルシウムと鉄がきれいな縞状構造を作っており、何らかの堆積環境のリズムを表現している。これは規模は小さいもののストロマトライトと呼んでもよい試料である。ストロンチウムは全体にあるわけではなく層に沿ってごく一部にのみ存在する。ストロンチウムの濃集は突発的な温泉水の水質変化のようなイベントを記録している可能性がある。このような

リズムやイベントの実態とその原因を明らかにするには、バイオマトの成長過程を観測し温泉周辺の環境変化を計測して、そこに記録されている化学的、鉱物学的変化との対応関係を調べる必要がある。

Fig. 5は湯俣温泉の硫黄芝の測定結果である。黄色～白色のYUMATA-Yには硫黄しか観測されない。無機成分はほとんど単体硫黄であると考えられる。鉄は灰色のYUMATA-G、黒色のYMUMATA-Bで観測され、色が濃くなるほど鉄分に富むことが分かる。YUMATA-Gは鉄に加えてマンガン、カルシウムを含む。YUMATA-Bでは鉄、カルシウムに加えてカリウムが観測された。硫黄はほとんど観測されない。ここでは粘土鉱物が主要な無機成分であると思われる。このように「硫黄芝」と言っても硫黄をほとんど含まないものがあることが明らかになった。色の異なる硫黄芝は水温が違う場所に生育しており、温度やpH、溶存酸素濃度などのパラメータの違いによって、生成される無機成分が異なることが推測される。湯俣温泉の水質や生態に関する詳細な調査は今後の課題である。

このように走査型X線分析顕微鏡による温泉バイオマトの観察によって、元素の種類と組み合わせ、縞状構造のような分布の特徴がよく分かる。すなわち、バイオマトの無機成分を見る手段としては、きわめてすぐれた能力をもっている。従来の生態学的手法によるバイオマトの研究では、バイオマトの層構造に付随する構成バクテリア種の変化、透過光のスペクトル変化、pH、酸素や硫化水素濃度の変化が計測されている。これにさらに有機分析や炭素や硫黄同位体比などの地球化学的分析を組み合わせれば、バイオマトの記載法としてはほぼ完全なものができあがるだろう。

4. おわりに

走査型X線分析顕微鏡によるバイオマトの観察法についてはいくつかの開発要素が残っている。今回の測定では空間分解能は100 μm であった。一方バクテリアのサイズは μm のオーダーであり、これにできるだけ近づけて、個々のバクテリア細胞が見えるような計測を行いたい。また試料もできるだけ生の状態で測定できるよう工夫したい。これには測定にかかる時間(10時間程度)の間に乾燥しないようにすること、ステージ移動の際に試料が動かないようにする工夫が必要である。また、元素の分布だけでなく、鉱物の種類を測定するような手法がぜひとも必要である。われわれは走査型X線分析顕微鏡を發展させて、同時にX線回折像も計測するようなXRF/XDFスキャナを開発したいと考えている。

このように記載法を確立するための研究と同時に、温

泉バイオマト形成過程を追跡観察する研究をスタートさせたい。特に環境パラメータ(温泉水の温度、pH、溶存酸素量、酸化還元電位、溶存イオン濃度など)をその場で連続測定を行い、バイオマトの成長過程を追跡することが必要であろう。このことによってバクテリアの活性をコントロールする要因を明らかにし、バイオマト成長のリズムとイベントのメカニズムを明らかにすることができると期待される。バイオマトカタログの作成を進める中で、こうした研究に最も適したフィールドを絞りこんでいく方針である。

謝辞：吉岡秀佳、堀 哲氏には議論、測定の上でお世話になった。加藤憲二、牧陽之助、清水 晃、山本啓之、樋口澄男の諸氏は温泉バイオマト研究の共同研究者であり、試料採取、測定においてお世話になった。(株)堀場製作所の細川好則氏をはじめとする理化学開発部の皆さんには装置の開発についてお世話になった。記して感謝の意を表したい。この研究は文部省重点領域研究「全地球史解読」および文部省特定研究経費「X線分析顕微鏡による地球・惑星科学の新展開」によってサポートされている。

文 献

- 1) 川上紳一・熊沢峰夫(1995)：生命と地球の共進化—全地球史解読。月刊地球, 17, 433-440.
- 2) 川上紳一・高野雅夫・熊沢峰夫(1996)：生命がつくる地球—全地球史解読。月刊地球, 18, 3-8.
- 3) Schopf, W.(1983)：Earth's earliest biosphere. Princeton Univ. Press, 543p.
- 4) Cloud, P. (1973)：Paleoecological significance of the banded iron formation. Econ. Geol., 68, 1135-1143.
- 5) Cloud, P. (1965)：Significance of the Gunflint (Precambrian) microflora. Science, 148, 27-35.
- 6) Mita, N., Maruyama, A., Usui, A., Higashihara, T. and Hariya, Y. (1994)：A growing deposit of hydrous manganese oxide produced by microbial mediation at a hot spring, Japan. Geochem. J., 28, 71-80.
- 7) 赤井くるみ・黒川勝巳・赤井純治(1995)：温泉中で生成しているストロマトライト—鬼首温泉と赤倉温泉の例—。地球科学, 49, 292-297.
- 8) 田崎和江・山村 健・長井広恭・小岩崎浩一(1996)：バクテリアがつくりだす縞模様。月刊地球, 18, 9-17.
- 9) 牧陽之助(1996)：硫黄酸化細菌被膜(硫黄芝)と地球史。月刊地球, 18, 41-45.
- 10) 加藤憲二・清水 晃(1996)：原始共生系—微生物生態学の新展開。月刊地球, 18, 31-35.
- 11) Nakazawa, H., Kanazawa, Y., Nozaki, H., Hosokawa, Y., Wakiyama, Y. and Komatani, S. (1990)：X-ray guide tube, a potential tool for a scanning x-ray analytical microscope. In: X-ray Microscopy in Biology and Medicine, (K. Shinohara et al., ed.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 81-86.