深海環境プログラムと 深海微生物実験システム

Deep-sea Environment Exploration Program and
Deep-sea Microorganisms Collecting - Cultivating System

大月 利 許 正憲

Toshi Otsuki and Masanori Kyo

JAMSTEC, in order to effectively promote research and development of the deep-sea environments, inaugurated a new "Deep-sea Environment Exploration Program (DEEP)" in October 1990. The new program, launched following the completion of a world-class submersible, the "SHINKAI 6500" and its support vessel "YOKOSUKA" (4500 tons), and based on JAMSTEC's past deep-sea research experience, reflects our growing interest in studying the deep-sea more analytically, one step forward from the "descriptive"-type research that we have traditionally been engaged in.

The DEEP will enlist the services of the researchers on contract with JAMSTEC and organize them into respective study groups to pursue basic and pioneer-type research.

In order to support research activities of the DEEP, JAMSTEC has been engaged in developing the "Deep-sea Microorganisms Collecting - Cultivating System (DMCCS)" as a four-year plan starting 1990. Under the system, specimens will be collected and kept in the same environmental conditions (pressure and temperature) in which they naturally grow. Then they will be diluted, isolated and cultured in facilities built on the ground and kept in an environment equivalent to deep-sea. The DMCCS consists of four subsystems: the sediment sampler, dilution device, isolation device, and culture vessel.

1. はじめに

海洋の面積は3億6千万km²で地球表面積の約71%を占める。また、世界で一番深いところはマリアナ海溝の10,924mの地点、海の平均の深さは3,795mといわれている。海洋の大部分は、深海といえる。

高圧で冷暗な深海底にも生物が生存していることがわかったのは、つい最近のことで、生物学の常識からいえば、太陽光が届かず、食物連鎖の基礎となる緑色植物が生存できない深海環境では、生物は生きていけるはずがないと思われていた。しかし、1970年代後半に深海底の特殊な環境である大洋底拡大軸の熱水噴出孔の付近などに多様な生物が高密度で生存していることが発見された。これらの発見は、今まで未知の世界であった深海環境の実態を解明する研究に結びつくものとして、特に注目されている。

深海環境には、深海の物質循環や地殻構造といった物理・化学的な環境のみならず、生物学的な環境も含まれるが、さらに、それらの間の相互作用や深海域と

浅海域との間の相互作用なども境界領域の問題として重要な研究対象になる。

深海環境の研究開発を進めるためには、潜水調査船によって直接、深海底にアプローチし、深海のいろいろな試料を採集する必要がある。海洋科学技術センターは「しんかい2000」を用い、これまで様々な深海調査を進めてきた。平成3年度からは新たに完成した「しんかい6500」によって世界の海の98%という広い範囲を調査対象とすることができるようになった。

高圧・低温等の深海の特殊な環境下に生息している深海微生物や深海生物、さらに、それらの織りなす深海の生態系の形態や機能の解明等が、当面の研究開発の対象となる。センターでは、深海域を対象とする研究開発を強力に推進するため、平成2年10月、新たに「深海環境プログラム」を設置した。これは、世界有数の潜水調査船「しんかい6500」⁽¹⁾とその支援母船「よこすか」(4,500トン)の完成を機に、これまでの深海調査・観測の実績を踏まえ、深海における諸現象の観察を中心とする研究から、さらに一歩踏み込んだ解析を行

うための研究組織である。「深海環境プログラム」では、センターとの契約に基づく研究者を結集して、研究領域毎に研究グループを編成し、先導的・基礎的研究を推進する。また、この「深海環境プログラム」における研究活動を支えるための研究支援組織として、「深海環境プログラム推進課」を設置している。

2. 深海環境プログラムにおける研究の推進

「深海環境プログラム」では、当面、深海の生物学的な環境を対象とする先導的・基礎的な研究を長期計画のもとに推進するが、その第一弾として、深海の微生物の研究を取り上げた。このプロジェクトは、深海の微生物、特にブラックスモーカーと呼ばれる300℃を超える熱水が噴出している深海域や、0℃程度の冷水が湧出している深海底などのきわめて特殊な環境に分布している微生物に着目し、それらの基本的な特性、耐圧のメカニズム、特異的な遺伝子やタンパク質の性質などを明らかにすることを目指している。深海環境プログラムにおける研究活動を支援するために設置した深海環境プログラム推進課では、研究者の受け入れ、フォーラムの開催といった研究推進事務のほかに、深海微生物実験システムの開発・運用及び深海微生物の管理・提供という2つの研究支援事業を進めている。Fig. 1に深海環境研究開発の推進体制を示す。

2.1 深海微生物の概要

深海微生物を特徴づける生理特性は、低温性(好冷性)と耐圧性・好圧性であろう。海水の温度は、深度が増すにつれて低下し、深海では数℃以下にまで低下する。したがって、深海微生物は低温適応の機能をもっていると期待される。オレゴン州立大学のリチャード・モリタらは、好冷微生物が深海環境に分布していると報告している。好冷微生物とは、一般に、15℃以下で最

大増殖を示し、0℃以下でも増殖できるものとされている。

また、圧力についていえば、深海微生物は、加圧時の増殖の程度により、耐圧微生物、好圧微生物、及び絶対好圧微生物にグループ分けされている。耐圧微生物とは、加圧時の増殖が、大気圧下での増殖より劣るような微生物をさす。一方、好圧微生物とは、加圧時に最大増殖を示すものをさすが、最適な圧力は、微生物の種類や生息深度によって異なる。さらに、ある圧力以上で増殖し、それ以下の圧力では増殖できないか、死滅する微生物を絶対好圧微生物とよぶ。絶対好圧微生物の存在は、かつて疑問視されたが、1981年に初めてマリアナ海溝から絶対好圧微生物の分離に成功したとの報告がなされた。

深海微生物では、好冷性と好圧性とが複合していると考えられる。

高圧、低温(場所によっては高温)、暗黒といった深海底では、多様な生物が高密度で生息し、特殊な生態系を形成しているところが存在する。熱水噴出域や冷水湧出域である。地表や海表面付近の生態系では、光合成による太陽エネルギーの固定が行われているが、太陽光の届かない深海底での生態系では、海底から噴出する熱水、あるいは湧出する冷水中の硫化水素やメタンなどから化学合成によってエネルギーと有機物質を獲得する特殊な微生物が基礎生産者となっている。深海生態系の構成員である大型生物の中には、そのような微生物と共生関係をもつものもある。

深海熱水噴出域は、高温・高圧というきわめて特殊な環境であり、その環境に適応した特異な微生物が発見されている。東太平洋海膨にはEPR(East Pacific Rise) 21° N と呼ばれる熱水噴出域があり、かつて、このブラックスモーカーの熱水から250℃でも増殖できる好熱性微生物を発見したという報告もあった。現在までに知られている最も増殖温度の高い微生物は、ピ

Fig.1 SET-UP FOR THE PROMOTION OF DEEP-SEA ENVIRONMENT RESEARCH AND DEVELOPMENT

ロディクティウム(Pyrodictium)で、105℃で最もよく生育し、110℃でさえも生育可能であるといわれる。

2.2 深海微生物研究の研究計画

センターでは、深海微生物の研究を実施するため、平成2年10月、「深海環境プログラム」の中に、掘越弘毅博士(東京工業大学教授、理化学研究所主任研究員)をリーダーとする「深海微生物研究グループ」を編成した。この研究グループでは、熱水噴出域や冷水湧出域に生息している深海微生物の培養法の確立、深海微生物の形態学的、生理・生化学的及び分子生物学的な特性の解明等を目指し、8年計画(全体は、2期15年計画)のもと、次の3項目に応じた3研究チーム体制で研究を推進することとしている。なお、Fig. 2に研究チームの構成を示す。

(1) 深海微生物の培養と形態の研究

深海から採集した微生物の培養条件を検討し、大量培養の方法を確立する。また、深海微生物の細胞膜、細胞内小器官等の形態学的特徴を解析し、一般の微生物や他の特殊環境微生物と比較解析する。

(2) 深海微生物の代謝と生理の研究

深海微生物は、その分布している場所の圧力、温度、

塩分等の環境要因に適応し、特異的な膜機能、代謝機能等を備えていると考えられる。このような深海微生物の代謝及び生理特性を他の微生物と比較解析するとともに、環境要因が深海微生物の代謝・生理機能に及ぼす影響を検討する。

(3) 深海微生物の遺伝子・タンパク質の研究

深海微生物の機能を詳細に明確にするため、代謝酵素やその遺伝子を解析する。まず、深海微生物の遺伝子ライブラリーを作製、ついで遺伝子の単離とその構造及び発現調節機構を解析し、遺伝子の発現産物(タンパク質)を同定する。さらに、深海微生物の宿主・ベクター系の開発を行う。

3. 深海微生物実験システム⁽³⁾

深海微生物の研究を行うには、いくつかの方法が考えられるが、深海微生物を、その生息する現場環境を保持した状態で培養・分析等を行うことは当然考慮されるべきである。なぜなら、環境の変化により、ある種の微生物は死滅したり、活性が落ちるのではないかと疑いがもたれるからである。

Fig. 2 ORGANIZATION OF DEEP-SEA MICROORGANISMS RESEARCH GROUP
CONSISTING OF THREE RESEARCH TEAMS

では、深海環境を保持した状態で微生物を研究するにはどうしたらよいであろうか。大別すると次の2つの手法が考えられる。

①研究者自身が実験機器を持って深海へ行き、深海の現場において、微生物の培養・分析等を行う。

②深海より、現場環境を保持したまま試料を持ち帰り、陸上の施設で深海環境を再現して微生物の培養・分析等を行う。

①は微生物の生息環境を全く変えることなく、研究できるという利点があるが、全ての研究者が頻繁に深海へ行くことは不可能であり、また、小型の潜水船に十分な実験機器を搭載することはできない。さらに、限られた潜航時間内では満足のいく研究はできないであろう。

①の実際例としては、米国ウッズホール海洋研究所

Fig.3 Flow of DMCCS.

が有人潜水調査船Alvinを用いて行った現場培養法があげられる。これは潜水船によって、試料を採集後、そのまま試料を海底上に放置して培養を続け、次の潜航の機会に回収し、分析を行うものであった⁽²⁾。現場培養法は、当時、画期的であるといわれたが、採集と回収時の2回のみしか計測できず、培養期間中の代謝活性を経時的に計測することによって得られるもっとも重要な代謝速度を知ることができなかった。

これに対して、②のごとく深海環境を保持したまま、試料を陸上へ持ち帰り、培養・分析を行えるのであれば、研究者は実験室の十分な設備を利用して微生物研

Photo 1 DMCCS.

究に取り組んでいられるのである。

ただし、従来の実験設備では、深海環境に対して十分な配慮がなされていないので、特殊な実験設備を開発する必要がある。

このようなニーズから、センターでは平成2年度より4カ年で「深海微生物実験システム」を開発することとした。

この「深海微生物実験システム」は採泥器、希釈装置、分離装置及び培養槽の4つのサブシステムから構成されている。

本システムの基本的なオペレーションフローをFig. 3に、完成予想図をPhoto 1にそれぞれ示す。潜水調査船に搭載された採泥器で深海底から泥を採集し、採集現場の圧力と温度を保持した状態で船上に回収する。採泥器を陸上の希釈装置に接続し、泥試料中の微生物を単離するために、試料を滅菌海水で希釈する。次に希釈された試料を分離装置内の36本のセルに分配し、任意の培地で培養する。ここで各セルについて微生物の増殖の有無を確認し、微生物が単離されたかどうかを判定する。すなわち、増殖が確認されたセルの中から、最も希釈度の高いセルを選ぶことにより、確率的に微生物の単離を行うことができる。単離を確認した試料は培養槽に移送され、大量に培養される。

各サブシステムの圧力・温度条件をTable 1に示す。

Table 1からわかるように、上述のすべての工程を通じて、圧力は一貫して深海状態を保持することができる。

しかし、温度については、採泥器と希釈装置は0～10℃、分離装置と培養槽は0～300℃と異っている。この理由は以下のとおりである。まず、通常の深海底でサンプリングする場合、深海の水温は数℃であるので、10℃までの温度範囲は十分といえる。次に300℃の熱水鉱床でサンプリングする場合を考えると、確かに試料自体は高温な状態であるが、周囲は無限ともいえる低温の海水で覆われているので、サンプリングした瞬間に試料は急激に冷却される。この温度差約300℃の急速冷却は、100℃付近の中間温度で試料を保温するよりも、むしろ好熱性細菌の生存率を高めることが知られてお

Table 1 Conditions of pressure and temperature.

サブシステム	圧力		温度	
	範囲	精度	範囲	精度
採泥器	0～680 kgf/cm ²	±2 kgf/cm ² (0～200 kgf/cm ²)	0～10℃	+2℃以下 (水中) ±2℃ (船上)
希釈装置				±1℃
分離装置			0～300℃	±1℃ (0～150℃)
培養槽				±1℃ (150～300℃)

り、試料を低温状態で保存することは有効である。なお、分離装置と培養槽では熱水噴出域の環境を模擬して微生物の培養が行えるように最高300℃という温度が設定されている。

以下に各サブシステムの詳細を述べる。

3.1 採泥器

採泥器はFig. 4・(1)に示すとおり、保温材で覆われた外部容器と保圧容器から構成されている。さらに、保圧容器は、試料を保圧保管する保圧部、圧力変動を補正するアキュムレータ及び泥試料を一定量のみ残存させる計量部から構成されている。

潜水船の潜航前に母船上で行う準備として、保圧容器を外部容器に収納し、外部容器内に海水を充填する。外部容器を閉じた状態で、全体を121℃、2atmに加熱・加圧し、外部容器内を滅菌する。滅菌後、外部容器外面を保温材で覆い、全体を潜水船のパイロドラックに取り付ける。

外部容器の蓋は、堅く閉じているので、潜水船が目的の海底に到着する間に、周囲海水に含まれる微生物で汚染される心配はない。

海底到着後、外部容器の蓋を開ける。次に、潜水船の手となるマニピュレータでスコップを操作して、海底の泥を採集し、計量部に入れる (Fig. 4・(2))。この際に、ホッパーには余分な泥が残るが、この余分な泥

Fig. 4 Sediment sampler.

はホッパーを回転させることによりすり落し、一定量(5ml)のみを計量部に残す。最後にピストンを移動させることにより、泥試料を保圧部に移送し、外部容器の蓋を閉じて、採集作業は完了する(FIG.4・(3))。

船上に回収された採泥器は保圧部のみが切り離され、高圧ポンプに接続されるとともに、低温庫に保管され、帰港までの間、厳密に圧力と温度が保持される。

さて、陸上もしくは船上では、上述の通り、圧力、温度を制御するために高圧ポンプや恒温庫等を用いることができるが、このような大型の機器を深海へ持ち込むことは難しい。そこで、深海で有効な保圧、保温方法を検討しなければならない^{(4)・(5)}。

特に、生物は一般的に温度変化には弱く⁽⁶⁾、保温には十分留意しなければならない。温度を保持する最も単純な方法は、熱伝導率の小さい保温材で外面を覆い、内外の熱の流入出を防止することである。陸上ではガラスウール(熱伝導率約0.027kcal/mh℃)等、非常に簡単な構造で優れた保温材が多く存在するが、そのほとんどは、海中に持ち込んだ瞬間に空隙部に水が侵入し、まったく保温の役目を果たさなくなる。このように、深海で使用可能な保温材といふとなかなか良いものがないが、実際に深海で使用されている保温材としては、直径数10~100 μ m程度の中空ガラス球(ガラスマイクロバルーン)をエポキシ樹脂で固めたシンタクチックフォームがあげられる。シンタクチックフォームは、元来深海用の浮力材として用いられているもので、比重は0.54、圧壊強度は1200kgf/cm²以上の実績値がある。これが保温材として用いられるのは、内部にガラスマイクロバルーンによる気相を含むため、樹脂材より熱伝導率が小さくなるからであるが、実際には約0.1kcal/mh℃程度と、それほど画期的なものとはいえない。そこで、より精密に温度を保持するために、積極的に温度を制御する方法を検討しなければならない。特に、深海から回収する場合には、冷却が重要になり、硝酸アンモニウムが水と混合する際に生じる冷却反応や、P-N型半導体に通電した際に生じる冷却効果(ペルチエ効果)を応用した保温方法等が検討されている⁽⁷⁾。

また、圧力保持については、高圧空気を充填したアキュムレータを装備している。これは気体と液体の圧縮率の差を利用して、圧力変動を補正するものである。

3.2 希釈装置

希釈装置はFIG.5に示すとおり、希釈容器、希釈計量器、海水置換容器及び加圧容器の4つの高圧容器と、滅菌海水タンク、高圧チューブ、高圧バルブ、高圧継手など複数の高圧部品から構成されている。また、希釈装置全体は恒温室内に設置され、温度を保持してい

Fig.5 Dilution device.

る。

希釈前の準備として、系内を121℃、2atmの蒸気です十分に滅菌した後、内部に滅菌海水を充填し、深海底の現場圧力まで昇圧する。採泥器は希釈装置の入口ポートに接続され、泥試料は圧力を保持した状態で希釈容器を経由して、希釈計量器へ移送される。希釈計量器では、試料の一部を繰り返し滅菌海水と置換することにより、複数種の微生物が一種に単離できると思われる濃度まで希釈する。また、この希釈試料は、適宜、分離装置に移送される。

希釈容器と希釈計量器では、泥試料の希釈を行うので、濃度を常に均一にするために高圧下で攪拌可能なアジテータが設けられている。

また、希釈装置は、多数のバルブから構成されており、圧力を保持して希釈を行うためには、これらのバルブ開閉を複雑に行わなければならないが、プログラムブルコントローラーと遠隔操作バルブの組み合わせにより、集中監視室から単純なボタン操作のみで簡単に運転することができ

3.3 分離装置

分離装置はFIG.6に示すとおり、36本(容量はそれぞれ20ml)のパイレックスガラス製セル、加圧槽、加熱・冷却ジャケット、アジテータ、増殖モニター及び増殖モニター用旋回装置から構成されている。

加圧槽は、高張力鋼を使用し、高圧力、高温に耐える構造となっている。また、高圧、高温という特殊環境条件は、材料の腐食を促進させるものであり、腐食対策が重要になってくる。ここでは、加圧槽内に充填する加圧媒体には、脱気した純水を使用するとともに、加圧槽内面をNiメッキ処理することにより、加圧槽の母材自体が直接、水に接触しない構造としている。

加熱・冷却ジャケットは、電気ヒーターと冷媒用配管を一体化したアルミニウム鋳造品で、外面をガラスウールの断熱材で覆っている。

Fig.6 Isolation device.

また、加圧槽内には温度の均一化を図るために、高圧下で作動するアジテータが設けられている。

作業としては、系内を滅菌後、加圧槽内に純水を充填するとともに、セル内には微生物の栄養源となる培地を充填する。培地は、最大36種類の異なるものを選択することができる。

次に、系内を所定の圧力まで昇圧後、希釈装置の所定濃度の希釈試料を、圧力を保持した状態で任意のセルに移送し、培地と混合させる。さらに、増殖モニターを用いて微生物の増殖度合を計測することにより、微生物が単離されたかどうかを判断する。

一般的な微生物単離法としては、平板寒天培地を用いる方法があるが、高圧、水中、狭い空間に、このような単離法を適用するのは非常に困難である。そこで、よりシンプルなシステムにするために、本システムでは、希釈単離法を採用した。希釈単離法は、あくまでも確率に頼るもので、より確実性を増すためには、実機を用いて経験を積み重ねていく必要がある。

3.4 培養槽

培養槽の構造はFig. 7に示すとおり、分離装置によく似ているが、内部には、容量1000mlのパイレックスガラス製内槽をただひとつ装備している。

分離装置における手順と同様に、系内を蒸気滅菌後、加圧槽に純水を、内槽に培地を充填する。さらに、分離装置にて単離が確認された試料を内槽に移送し、大量培養を行う。

微生物の増殖度合は、同じく増殖モニターを用いて計測するが、レイアウト上、増殖モニターは、加圧槽外部に固定装備されている。

培養槽では、大量の培地を用いて大量培養が行うと

Fig.7 Culture vessel.

ともに、圧力・温度に対するより精密な微生物の増殖特性を把握し、生理機能等の研究に役立てることができる。

また、微生物が、内槽内の栄養源を全て消費すれば、増殖が停止するか、あるいは、死滅してしまうので、ここでは実験環境圧力と温度を変えずに、培養液の一部を新たな培地と置換することにより、連続的に培養を続けられるようにしている。さらに、好気性微生物の培養を考慮して、高圧ガスの注入も可能としている。

3.5 増殖モニター

従来の微生物密度計測法としては、落射型蛍光顕微鏡を用いた直接計数法が一般的である。しかし、単離法と同様に、分離装置や培養槽の狭い空間で複雑な空間に、従来の直接計数法を適用するのは非常に困難である。

そこで、本システムでは、高圧・高温環境下で、微生物の増殖度合を計測するために、Fig. 8に示す増殖モニターを開発した。

Fig. 8に示すとおり、He-Neレーザー光源から出たレーザー光線は、ビームスプリッターで2本の光線に分割され、光ファイバー及びレンズ部を経由して、セル内部で焦点を結ぶ。

微生物は、光学的には懸濁粒子として取り扱われるので、レーザー光の入射に対して散乱現象が生じる。そして、微生物密度が増大すれば、散乱光強度も増大するので、両者の相関が把握できれば、散乱光強度を計測することにより、微生物密度を推定することができる。

微生物からの散乱光は、同じレンズ部を経由し、光ファイバーを通して、フォトセンサーで光強度が計測される。この信号をA/D変換後、コンピュータで処理し、増殖速度等を算出する。

分離装置では、円周状に並んだ36本のセルの増殖度合を計測するために、レンズ部と光ファイバーの一部

Fig.8 Growth monitor.

を耐圧チューブ内に収納し、これを加圧槽内に装備している。この耐圧チューブは、潜望鏡のように360° 回転し、その光軸が各セルに向けられる機構になっている (Fig.6参照)。耐圧チューブの端面は、光が透過できるようにサファイア耐圧窓が装着されている。

本手法の原理を確認するために、直径10 μm のラテックス粒子を用いて基礎的実験を行った結果、 10^3 個/ml 程度の濃度までは検出可能であることがわかった⁽⁸⁾。

本増殖モニターは、濁度計測法の1つであるが、このような原理を高圧、高温下に応用した例はなく、装置の小型化を含め、様々な工夫が必要である。

4. おわりに

深海環境に生息している微生物や生物の織りなす深海の生態系に着目した基礎的な研究は、その成果が社会・経済の幅広い分野に応用されるばかりでなく、海洋環境、さらには地球環境の研究開発に必要な知識と技術を提供することとなる。これは、わが国がその国際的な地位に応じ、科学技術分野で世界の指導的な役割を果たしていく上で重要な研究開発である。

センターでは、今後、深海環境プログラムが世界の深海研究に関するセンターオブエクセレンスとして機能することを期待している。このため、深海微生物の研究に引き続いて、深海生物・生態系の研究を進め、さらに将来は、深海のプレート運動等の地球物理・地球化学分野の研究にも着手する予定である。

参考文献

- (1) 許正憲：しんかい6500の開発と実海域試験、電気学会・計測研究会、IM-89-24、P1-10、1989。
- (2) H.W. Jannasch：深海の微生物、サイエンス1988・8月号、p66-78、1988。

- (3) M. Kyo：Collection, Isolation and Cultivation System for Deep-sea Microbes Study, OCEANS'91, Vol.1, p419-423、1991。
- (4) 許正憲：保圧型深海微生物採集器の開発、海洋科学技術センター試験研究報告20号、p19-30、1988。
- (5) 許正憲：深海微生物を捕らえる、JAMSTEC第2巻第1号、p15-21、1990。
- (6) 大島泰郎：極限環境微生物ハンドブック、サイエンスフォーラム(株)、p149-162、1991。
- (7) 伊藤富男：ペルチェ素子を用いた深海用冷熱器に関する実験、海洋科学技術センター試験研究報告28号、1992。
- (8) 許正憲：増殖モニターの開発 (第2報)、海洋科学技術センター試験研究報告27号、1992。