

明神海丘チムニーとそこに棲息する生物群の含有元素

二重作 豊*¹ 小塚 芳道*¹ 上野 正樹*¹ 半田 素子*¹
 赤木 巧*² 端川 勉*² 植松 勝之*³ 藤原 義弘*⁴
 土田 真二*⁴ 堀井 善弘*⁵ 山口 寿之*⁶ 飯笹 幸吉*⁷

深海熱水噴出孔周辺に棲息する無脊椎動物・微生物の、エネルギー源と超微細形態の関係をj知るために、チムニー細片と生物の超微細形態上に現れる高密度顆粒を、電子線プローブ X 線分光法で元素分析を、電子分光結像法で元素分布を観察した。この結果、糸状菌の菌体内と莢膜・フジツボのクチクラ上皮細胞・エラゴカイの鰓呼吸上皮細胞・ユノハナガニの体液中等に、マグネシウム(Mg)・アルミニウム(Al)・シリコン(Si)・ヒ素(As)・硫黄(S)・カルシウム(Ca)・チタン(Ti)・鉄(Fe)・ニッケル(Ni)・コバルト(Co)・銅(Cu)・亜鉛(Zn)・オスミウム(Os)・セレン(Se)等の元素が、直径10nmの砂粒状から、直径200nmの有芯顆粒状まで、球形では在るが様々な形態の顆粒に含まれて存在した。有芯小胞の殻にはZnのみが、芯にはCo等が各々含まれていた。

一方、チムニー細片からは、Mg・Al・Si・S・Ca・Fe・Cu・Zn・As・ストロンチウム(Sr)・イットリウム(Y)・ジルコニウム(Zr)・バリウム(Ba)・バナジウム(V)が検出された。生物がAl・Si・As・Ca・Fe・Cuを大量に蓄積し、且つNiやCo等のミネラルを選択的に蓄積し、Sr・Y・Zr・Ba・Vは取り込まない事が判明した。糸状菌が化学合成による一次産生を行っている事は周知であるが、高度に進化した二枚貝(Solemya)でも、浮遊生物の補食以外に、硫黄や硫化水素から化学エネルギーを得る事が知られている。熱水噴出孔附近に棲息するこれらの生物が、細胞内に鉱物顆粒を貯え、必要に応じてこれらを利用している可能性が示唆された。

キーワード：深海生物，電子顕微鏡，元素分布，明神海丘，熱水噴出孔

Mineral distribution in both chimney and organisms living in a deep sea on hydrothermal vents at Myojin Knoll Caldera

Yutaka FUTAESAKU*⁸ Yoshimitsu KOZUKA*⁸ Masaki UENO*⁸
 Motoko HANDA*⁸ Takumi AKAGI*⁹ Tutomu HASHIKAWA*⁹
 Katsuyuki UEMATU*¹⁰ Yoshihiro FUJIWARA*¹¹ Shinji TSUCHIDA*¹¹
 Yoshihiro HORII*¹² Toshiyuki YAMAGUCHI*¹³ Kokichi IIZASA*¹⁴

-
- *1 北里大学 医療衛生学部
 - *2 理化学研究所 脳科学総合研究センター
 - *3 マリンワークジャパン
 - *4 海洋科学技術センター 海洋生態・環境研究部
 - *5 東京都水産試験所 八丈分場
 - *6 千葉大学 海洋バイオシステム研究センター
 - *7 工業技術院地質調査所 海洋地質部海洋鉱物資源課
 - *8 School of Allied Health Sciences, Kitasato University
 - *9 Brain Science Institute, The Institute of Physical and Chemical Research (Riken)
 - *10 Marine Work Japan Co.
 - *11 Marine Ecosystems Research Department, Japan Marine Science and Technology Center
 - *12 Hachijo Branch, Tokyo Metropolitan Fisheries Experiment Station
 - *13 Marine Biosystems Research Center
 - *14 Geological Survey of Japan

To investigate the correlation between energy sources and ultrastructures of both microorganisms and invertebrates living around hydrothermal vents in a deep sea, electron dense granules in cells and tiny pieces of chimney were observed by an electron microscope and the distribution of their elements was analyzed by electron probe X-ray microanalysis and electron spectroscopic imaging.

Elements in organisms such as magnesium (Mg), aluminum (Al), silicon (Si), arsenic (As), sulfur (S), calcium (Ca), titan (Ti), iron (Fe), nickel (Ni), cobalt (Co), copper (Cu), zinc (Zn), osmium (Os) and selenium (Se) were analyzed in the electron dense granules which size ranged between 10 nm and 200 nm and spherical shapes were varied between sand-shaped precipitates and cored vesicles. These granules were found in cytoplasm and surface coat of gliding threaded bacteria, epithelial cells of *Neoverruca* sp., cytoplasm of respiratory cells in gills of *Polychaeta* and blood plasma of a Bythograthid Crab. Outer shell of the cored vesicles in *Polychaeta* contained exclusively Zn, while the core contained S, Co, and As. Chimney contained minerals such as Mg, Al, Si, S, Ca, Fe, Cu, Zn, As, strontium (Sr), yttrium (Y), zirconium (Zr), barium (Ba), and vanadium (V). Organisms accumulated a lot of Al, Si, As, Ca, Fe, Cu, and Zn and selectively additional minerals such as Ni and Co which were not found in the component of chimney, while Sr, Y, Zr, Ba and V were not found in organisms.

It is well known that the threaded bacterium is a primary producer of organic compounds by chemosynthesis. The clam, *Solemya* which performs highly evolution, can produce an energy from reduced sulfur and hydrogen sulfide additionally with digestion of gliding organisms. Therefore these organisms living around hydrothermal vents may have potential to utilize a chemosynthesis and store the mineral deposits in their bodies.

Key words : deep sea organisms, electron microscope, elemental mapping, Myojin Knoll Caldera, hydrothermal vents

1. はじめに

深海熱水噴出孔の近傍では、化学合成を行う事ができるメタン菌や硫黄酸化菌、糸状菌の棲息が知られている。これらモネラ界の生物は、単にゴカイの棲管やフジツボの縁脚に付着する消極的共生に止まらず、ハオリムシやシンカイヒバリガイの細胞内に入り込む積極的共生も有名である。さらに*Solemya*など高度に進化した二枚貝が、有機物や浮遊生物の補食を行う一方で、硫化水素や還元硫黄を酸化して、化学エネルギーを利用できる事も、報告されている。

深海では、数十～数百気圧の圧力で、300°Cを越えても蒸気にならない熱水が、硫化鉄等の鉱物を溶解して熱水噴出孔から吹き出し、周囲の4°Cの海水に冷やされて硫化鉄を析出させる。このような環境に棲息する生物には、しばしば電子密度が高い顆粒を細胞内に持っている事が観察され得る。

今回は、明神海丘の熱水噴出口近傍に棲息する生物が、その体内に蓄積している沈澱物の素性を調べ、チムニーを構成する細片の元素組成と比較する事により、これらの生物が化学エネルギーを利用できるかどうかを推測する。

2. 材料・方法

2.1 試料採集

「しんかい2000」第1112潜航(1999年6月29日、観察者：山口寿之)、第1113潜航(1999年7月1日、堀井善弘)、第1114潜航(1999年7月2日、二重作豊)、第1115潜航(1999年7月3日、土田真二)、第1116潜航(1999年7月4日、藤原義弘)、第1117潜航(1999年7月6日、飯笹幸

吉)により、明神海丘南東部カルデラ壁下部(32°06.1'N, 139°51.9'N～32°06.3'N, 139°52.2'N)潜航調査で、水深1200m～1300mにて、バイオマット(Biological mat)・フジツボ(*Neoverruca* sp.)・エラゴカイ(*Polychaeta*)・ユノハナガニ(*Bythograthid Crab*)を採取した。この内、第1114潜航で採集したエラゴカイ12個体は、深海その場固定装置で化学固定を施しながら、母船「なつしま」に引き上げた。残りの深海生物については、母船に引き上げた後、電子顕微鏡用の固定処理を施した。

2.2 電子顕微鏡観察用試料処理

2.2.1 深海その場固定

2K#1114で採集したチムニー上のバイオマット及びエラゴカイは、「深海その場固定装置」に格納し、固定液を混合した。固定液は、最終濃度が各々2%になるようglutaraldehydeとparaformaldehydeを深海水に希釈した。水深1298mで10分間固定した後、そのまま水面まで1時間をかけて浮上し、その後合計固定時間が3時間になるように、追加固定をした。組織片は、母船「なつしま」に引き上げた後、組織片の大きさが1mm³以下になるように細切した。固定後の試料は、深海水をろ過してNaN₃を0.005%加えた液に保存した。

2.2.2 母船上固定

2K#1112, #1113, #1115～#1117で採集したバイオマット・フジツボ・エラゴカイ・ユノハナガニは、母船「なつしま」に引き上げた後、組織片の大きさが1mm³以下になるように細切し、固定液に3時間浸漬固定した。固定液は、ろ過深海水に、最終濃度が各々2%になるようglut-

araldehydeとparaformaldehydeを混合した。固定後の試料は、深海水をろ過して NaN_3 を0.005%加えた液に保存した。

2.2.3 試料の後処理

全ての深海固定試料は、相模原の北里大学医療衛生学部の研究室に持ち帰り、その後引き続き後処理を行った。

2.2.3.1 電子顕微鏡用一般処理

アルデヒド固定処理試料は、ろ過深海水で洗浄後、ろ過深海水に1%に希釈した四酸化オスミウムで1.5時間追加固定し、エタノールで脱水しepoxy樹脂又はspurr樹脂に包埋した。加熱重合後、包埋試料は、LKB-Novaにダイヤモンドナイフで50nm厚に超薄切り、2%酢酸ウラニル水溶液で15分間、佐藤の鉛で3分間電子染色を施し、真空蒸着機で約10nmのカーボンを加熱蒸着した。

2.2.3.2 光学顕微鏡用処理

アルデヒド固定処理試料は、ろ過深海水で洗浄後、エタノールで脱水し、LR-White樹脂に包埋した。冷蔵庫内で重合後、包埋試料は、JB-4にダイヤモンドヒストナイフで0.3mmに準薄切り、スライドガラスに添付し、0.1% toluidine blue染色液で染色した。

2.2.3.3 元素分布観察用処理

アルデヒド固定処理試料は、ろ過深海水で洗浄後、エタノールで脱水し、LR-White樹脂に包埋した。冷蔵庫内で重合後、包埋試料は、LKB-Novaにダイヤモンドナイフで50nm厚に超薄切り、膜張りカーボングリッド(電子線プローブX線分光法用)又は、600メッシュの銅グリッド(電子分光結像法用)に添付した。

2.2.4 鉱物の試料処理

チムニー細片は、実体顕微鏡下で形状と色調を観察し、異なるもの9片を作為的に選び、大塚製薬の注射用蒸留水で3回洗浄した。細片は、導電性を高める為に活性炭を混ぜ込んだ両面テープで、アルミニウム製ボートに接着した。この鉱物試料は、60℃に加熱し、ターボモレキュラーポンプで 10^{-4} Pa以下の真空(真空デバイス製)にして、1時間の真空加熱乾燥をした。カーボンテープ上に電子ビームを照射して、アルミニウムや銅が検出されない事を確認した。

2.3 観察・元素分布分析

エポキシ樹脂包埋切片は、JEOL2000EXを用い、加速電圧200kV、試料照射電流1pA/mm²で観察した。画像は、Fuji FGフィルムに記録し、Nikon Film Scanner LS-4500 A Fで2000dpi/16bitにデジタル化し、Adobe Photoshop v5.0とAldus Persuasion v3.0で画像処理し、Fujix Pictography 3000で印画処理した。

カーボングリッド積載試料は、電子線プローブX線分光法(JEOL2000EX / Traicor-Northan TN-5500)により元素分析した。加速電圧40kV、試料照射電流1pA/mm²、試料傾斜角：生物試料=30°；鉱物試料=40°、X線検出機：水平取り出し口20mm、ベリリウム窓：7μm厚 / 開口20mm、計数時間：100～500秒、DT：10～20%で計測した。

LR-White樹脂包埋切片は、電子分光結像法(LEO-912)により、含有元素の分布を観察した。加速電圧120kV、電子線照射角0.35mrad、電子エネルギーシフト：0～410eV、電子エネルギー窓巾：2～15eVで観察した。画像記録は、CCDカメラ及びFuji Imaging Plateを用いた。正味の元素分布像を得る為の画像演算は、吸収端から後方へ20 eV巾で元素を含む像を撮影し、前方へも20 eV巾で元素を含まない像を2視野連続して撮影し、合計3視野の画像から、正味の元素分布像を得る(3窓法)。これらの画像縁算は、AnalySIS及び、Fuji L-Processの画像ソフトを用いた。

3. 結 果

ユノハナガニの鰓、イトエラゴカイ、フジツボの触手、フジツボに付着していた微生物等に見出された高密度顆粒を分析した。直径0.1～0.2μmの顆粒は、多くの生物種に観られた。ゴカイの鰓細胞に見られた顆粒は、電子密度の高い殻と、多少電子線を透過させる芯の構造を示した。電子線プローブX線分光法(XMA)では、硫黄の他に、ヒ素、銅、ニッケルが高濃度に検出された(図4)。特に金属元素は、顆粒毎に様々な分布を示した。XMAの特徴は、同一地点に含有される全ての元素を、同時に検出することができる。電子分光結像法(ESI)では、更にコバルトが検出された事に止まらず、有芯顆粒の殻と芯では、亜鉛とCoが層状に別々に存在した(図10)。ESIは、観察視野に存在する同一元素の分布像を得る特徴を持つ。ユノハナガニの血液中には、10nm程度の砂状沈澱物がみられた。主な成分は、硫黄/銅/鉄であった。ここでも、金属イオンの混在は観られないので、おそらく単一の結晶であろう。生物の外周にも、微細な砂状沈澱物が普遍的に観られた(図2)。現在の処、硫黄の単体は未だ検出していない。

3.1 糸状菌(Beggiatoaceae, thiothrix, 他, 図1, 2)

無核の細胞が糸状に連なり、その直径は1～10μmで時に100μm以上のものも観察され、細胞一個の高さは3～20μmもあり、真核細胞と比較しても決してひけを取らない(図1, 2)。菌体の周囲には、厚いコートで覆われるものや裸のもの等一様ではない。細胞接着部位の細胞膜には、植物細胞に見られるPlasmodesmata様の構造があり、細胞間の連絡を示唆している。細胞膜内にはribosome様顆粒と、DNA様線維が観られ、多数の小形小胞(0.5μm前後)と小数の大形小胞(1μm以下)が散在する。電子密度の高い沈澱物様顆粒は、30nm～60nmの大きさで、細胞内

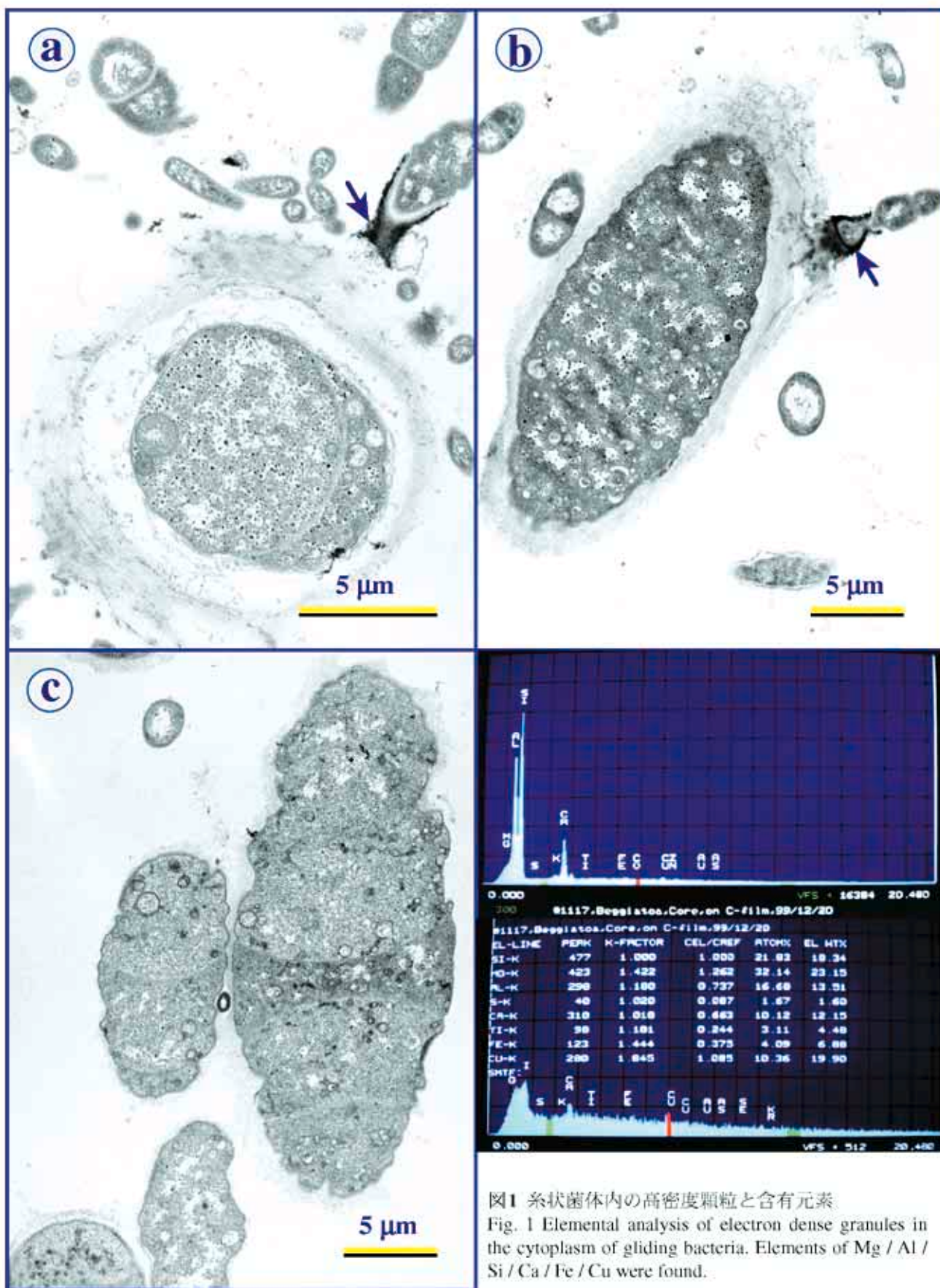


図1 糸状菌体内の高密度顆粒と含有元素
Fig. 1 Elemental analysis of electron dense granules in the cytoplasm of gliding bacteria. Elements of Mg / Al / Si / Ca / Fe / Cu were found.

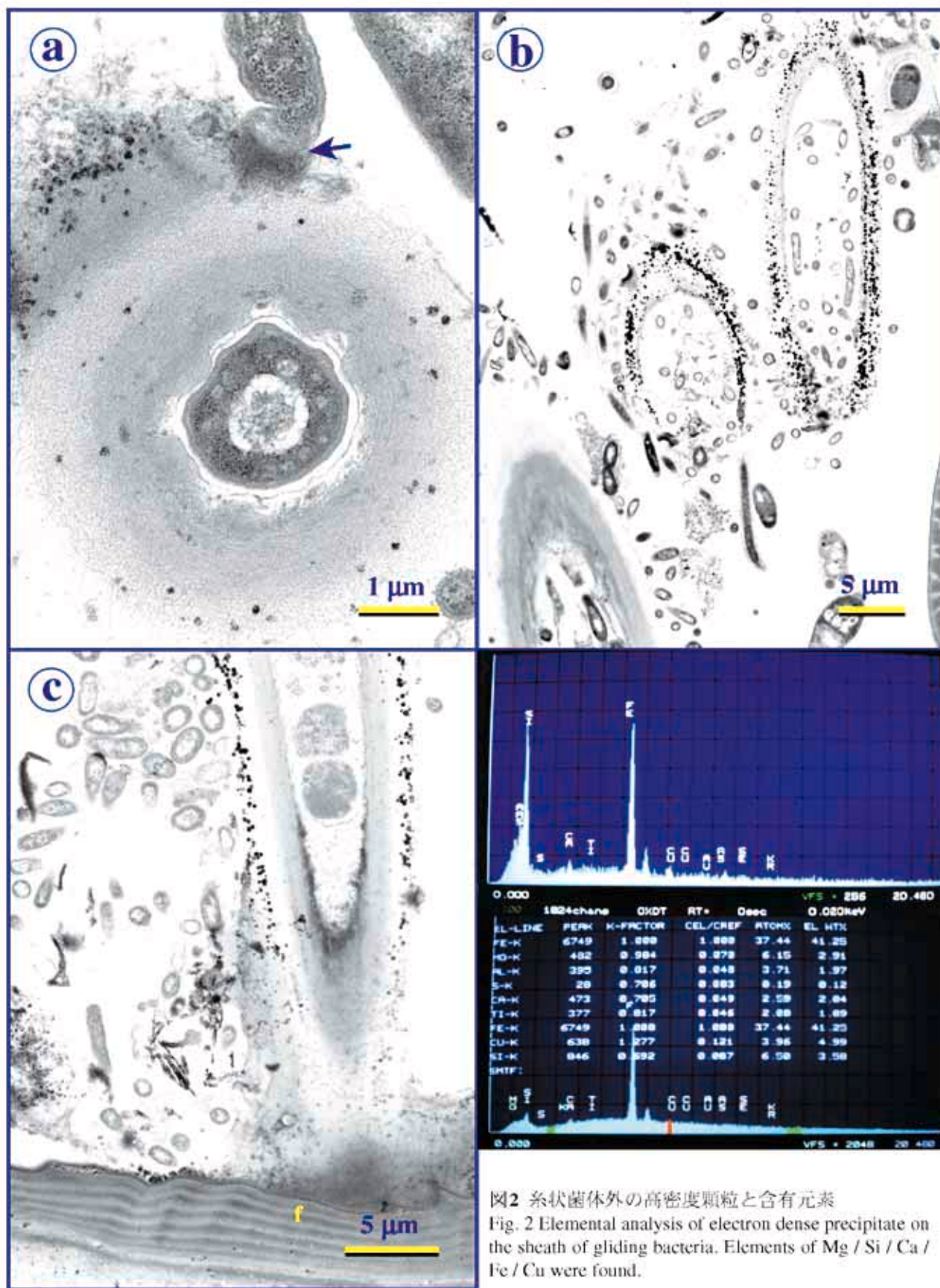


図2 糸状菌体外の高密度顆粒と含有元素

Fig. 2 Elemental analysis of electron dense precipitate on the sheath of gliding bacteria. Elements of Mg / Si / Ca / Fe / Cu were found.

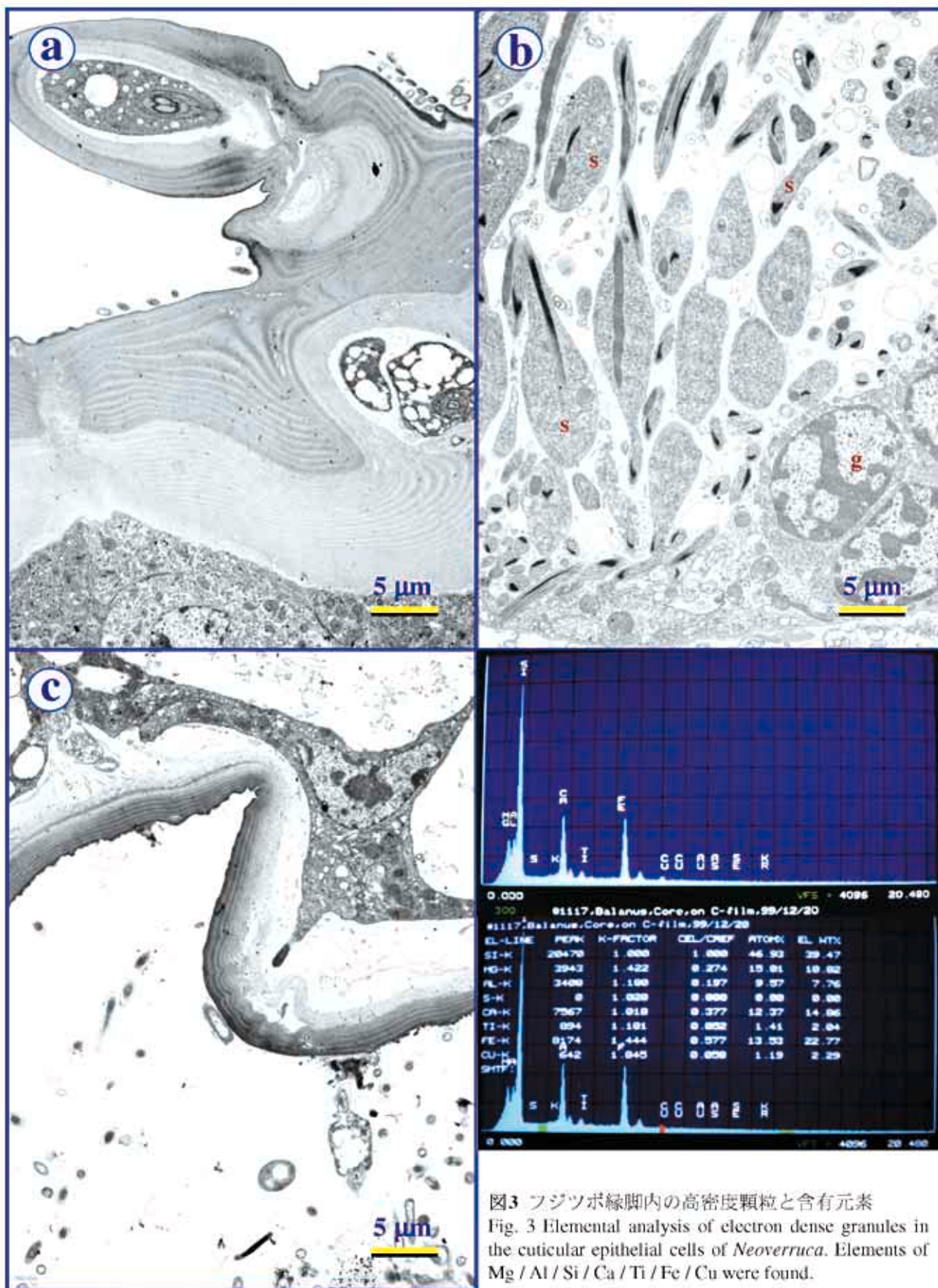


図3 フジツボ縁脚内の高密度顆粒と含有元素
Fig. 3 Elemental analysis of electron dense granules in the cuticular epithelial cells of *Neoverruca*. Elements of Mg / Al / Si / Ca / Ti / Fe / Cu were found.

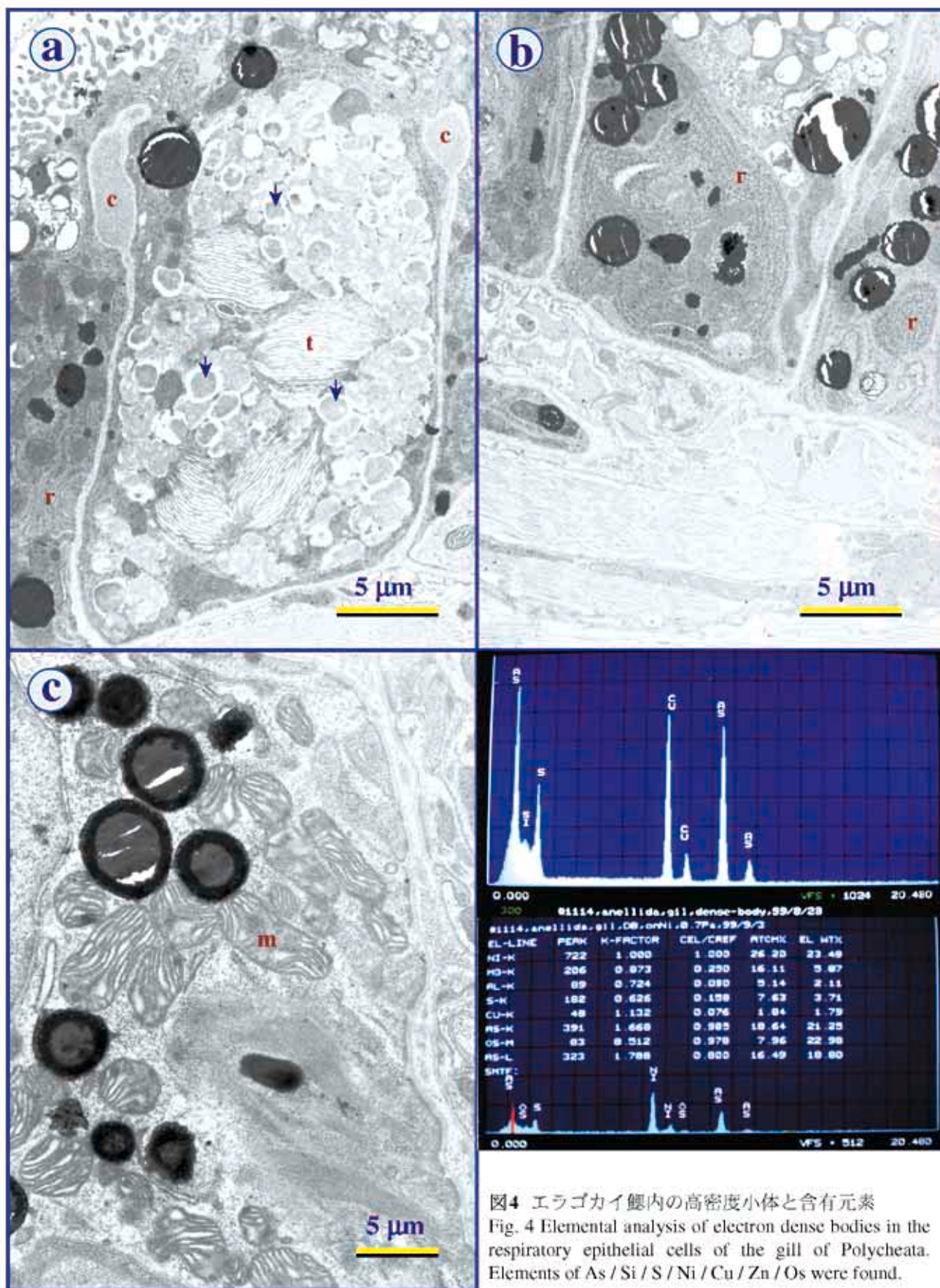


図4 エラゴカイ鰓内の高密度小体と含有元素

Fig. 4 Elemental analysis of electron dense bodies in the respiratory epithelial cells of the gill of Polychaeta. Elements of As / Si / S / Ni / Cu / Zn / Os were found.

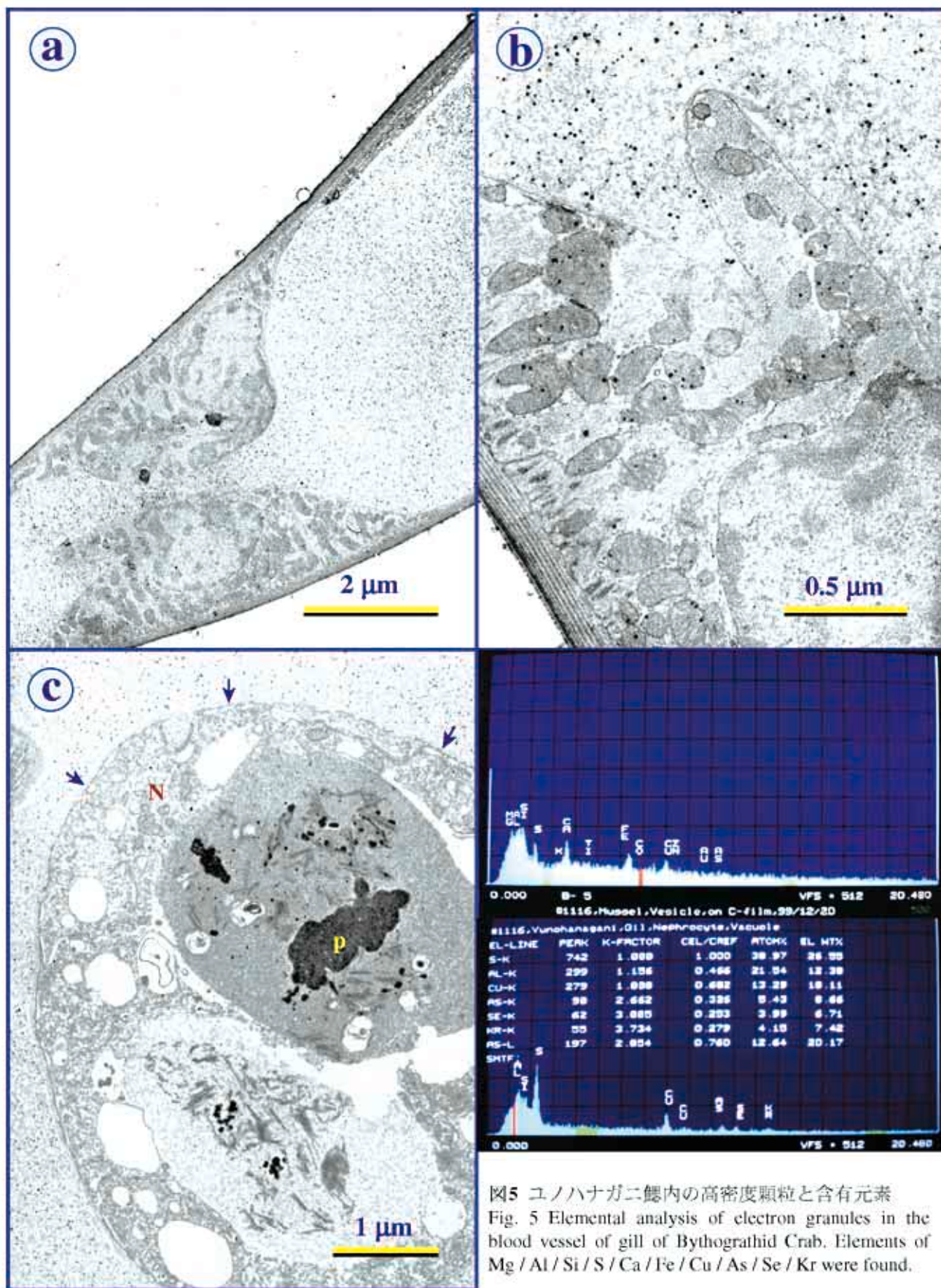


図5 ユノハナガニ鰓内の高密度顆粒と含有元素
 Fig. 5 Elemental analysis of electron granules in the blood vessel of gill of Bythograhdid Crab. Elements of Mg / Al / Si / S / Ca / Fe / Cu / As / Se / Kr were found.

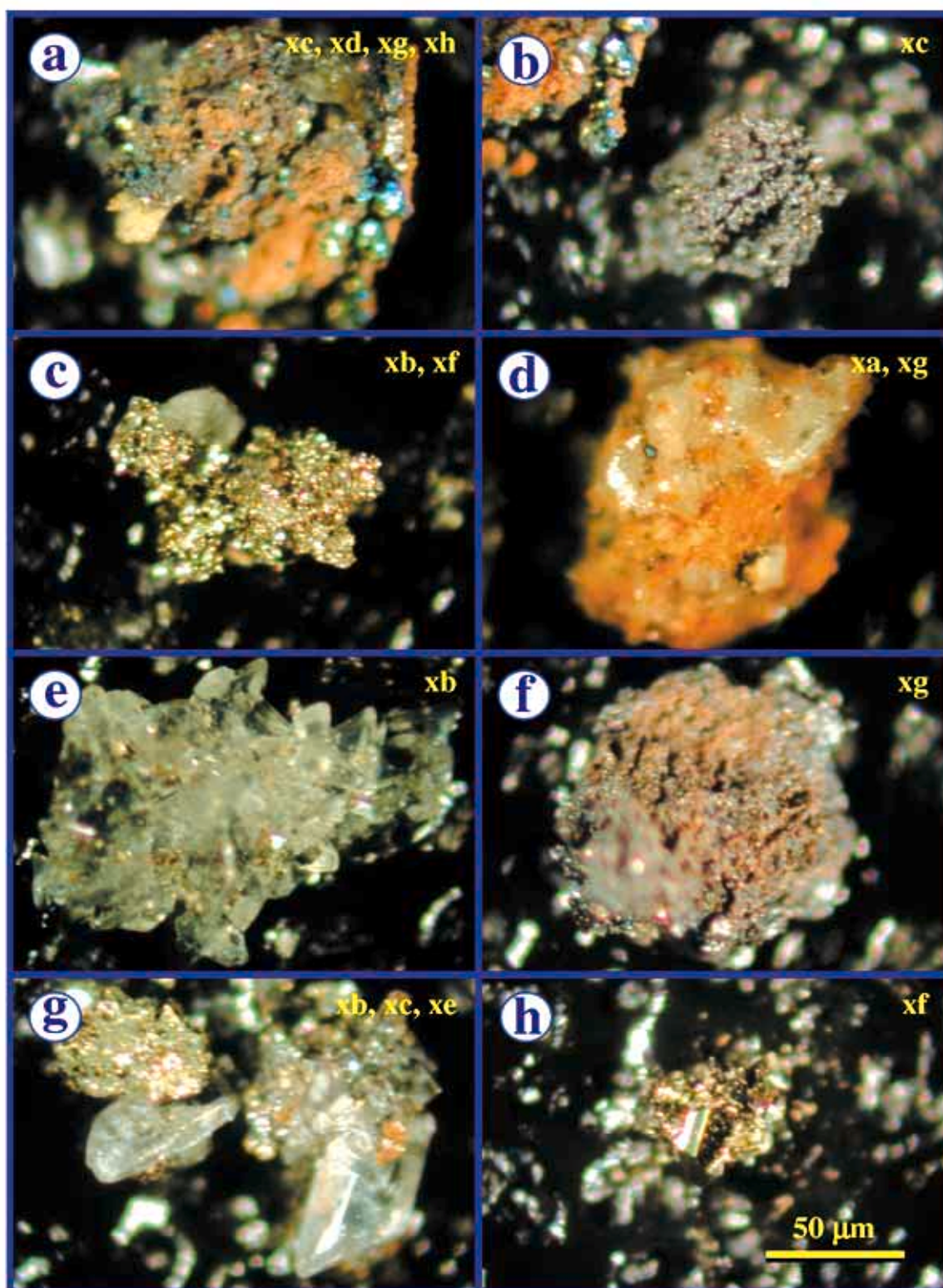


図6 明神海丘カルデラ東端のChimney由来の鉱物細片

Fig. 6 Nine tiny ores of chimney sampled from hydrothermal vents at Myojin knoll cardera. Letters followed x- on upper right corner correspond to the spectra in Figs. 7 and 8.

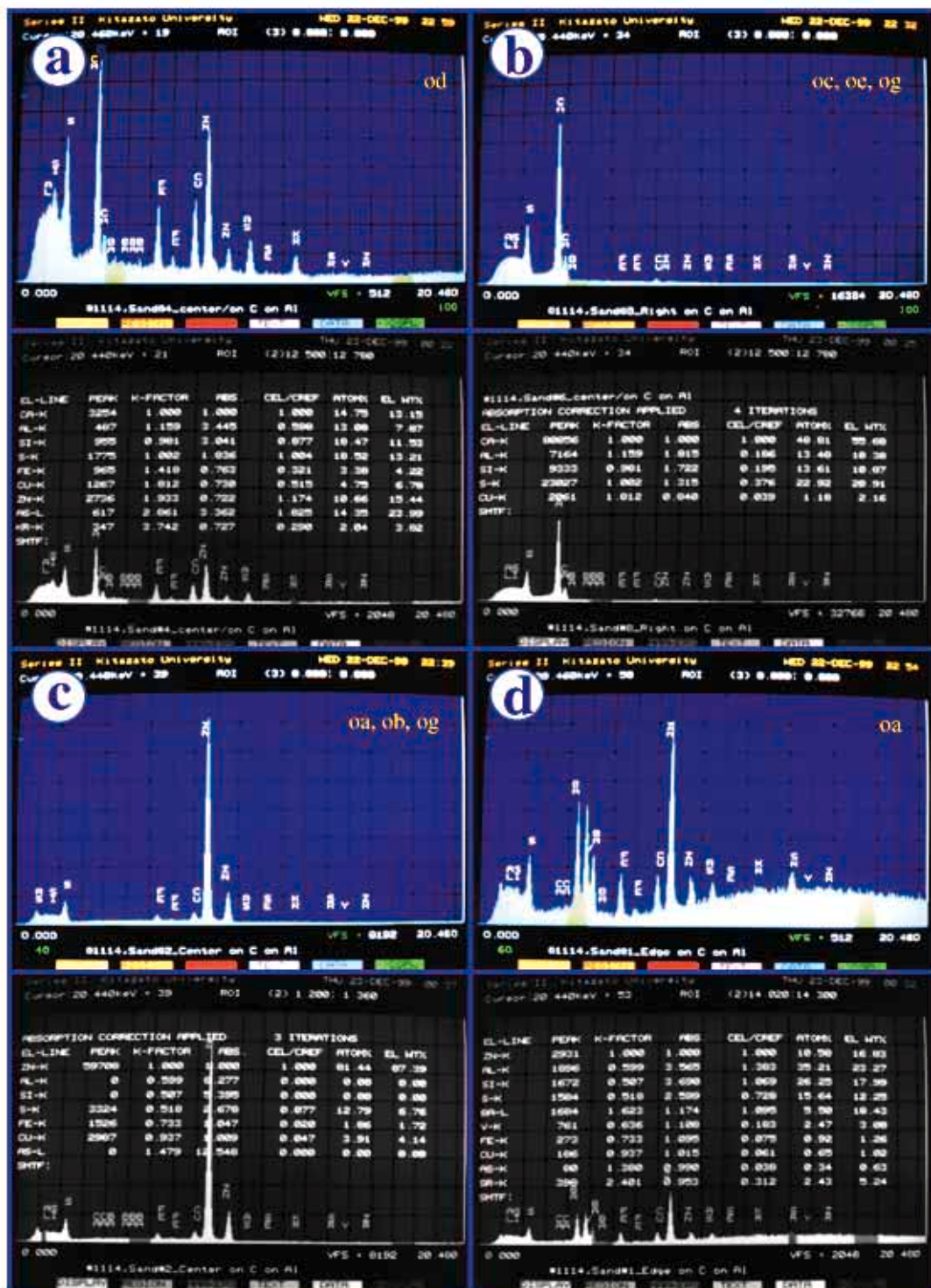


図7 電子線プローブX線分光分析による、チムニー由来の微少鉱石の含有元素①
 Fig. 7 X-ray spectra of the ores of chimney by electron probe X-ray micro-analysis. Letters followed o- on upper right corner correspond to the ores in Fig. 6.

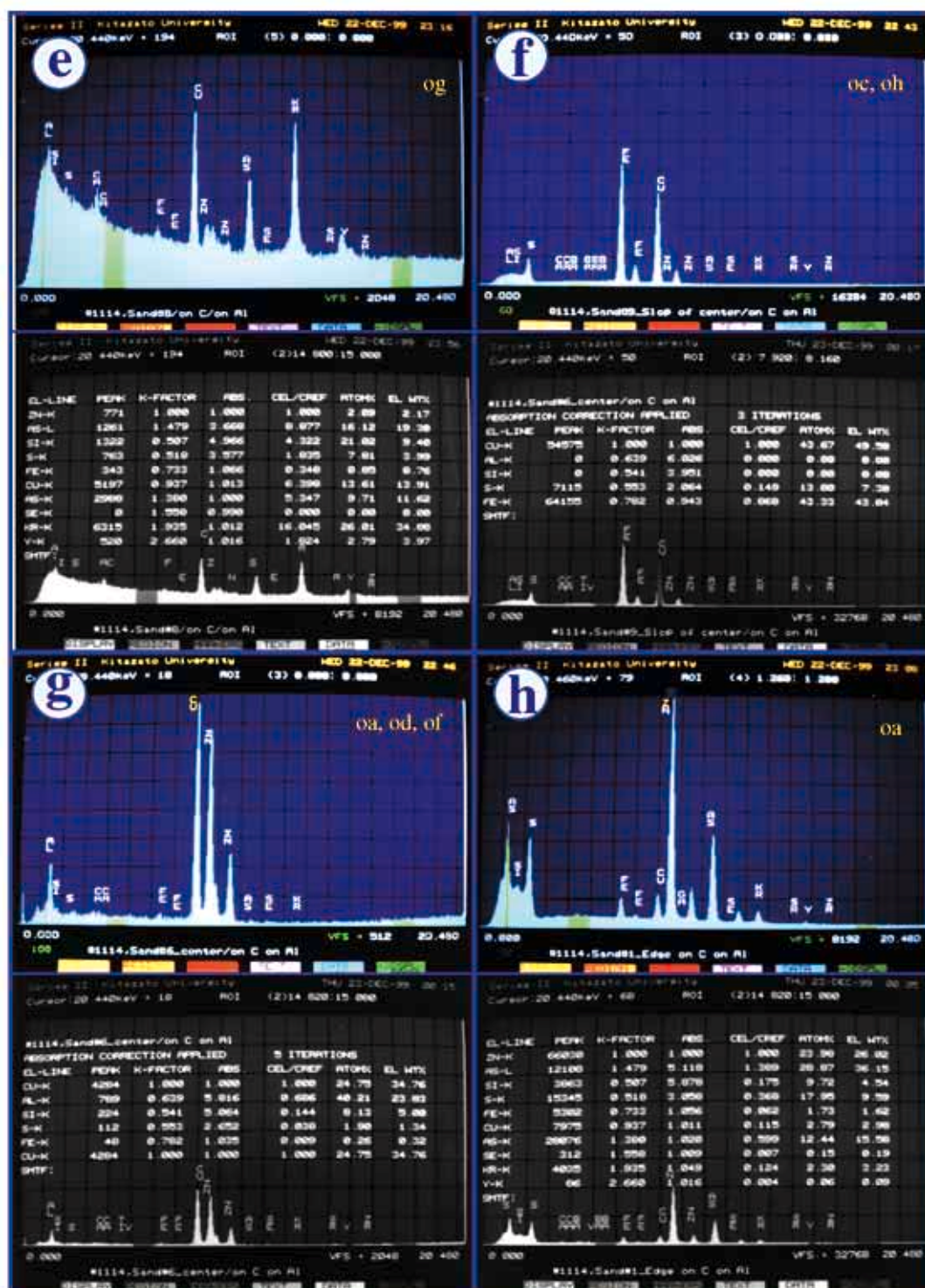


図8 電子線プローブX線分光分析による、チムニー由来の微少鉱石の含有元素 ②
Fig. 8 X-ray spectra of the ores of chimney by electron probe X-ray micro-analysis. Letters followed o- on upper right corner correspond to the ores in Fig. 6.

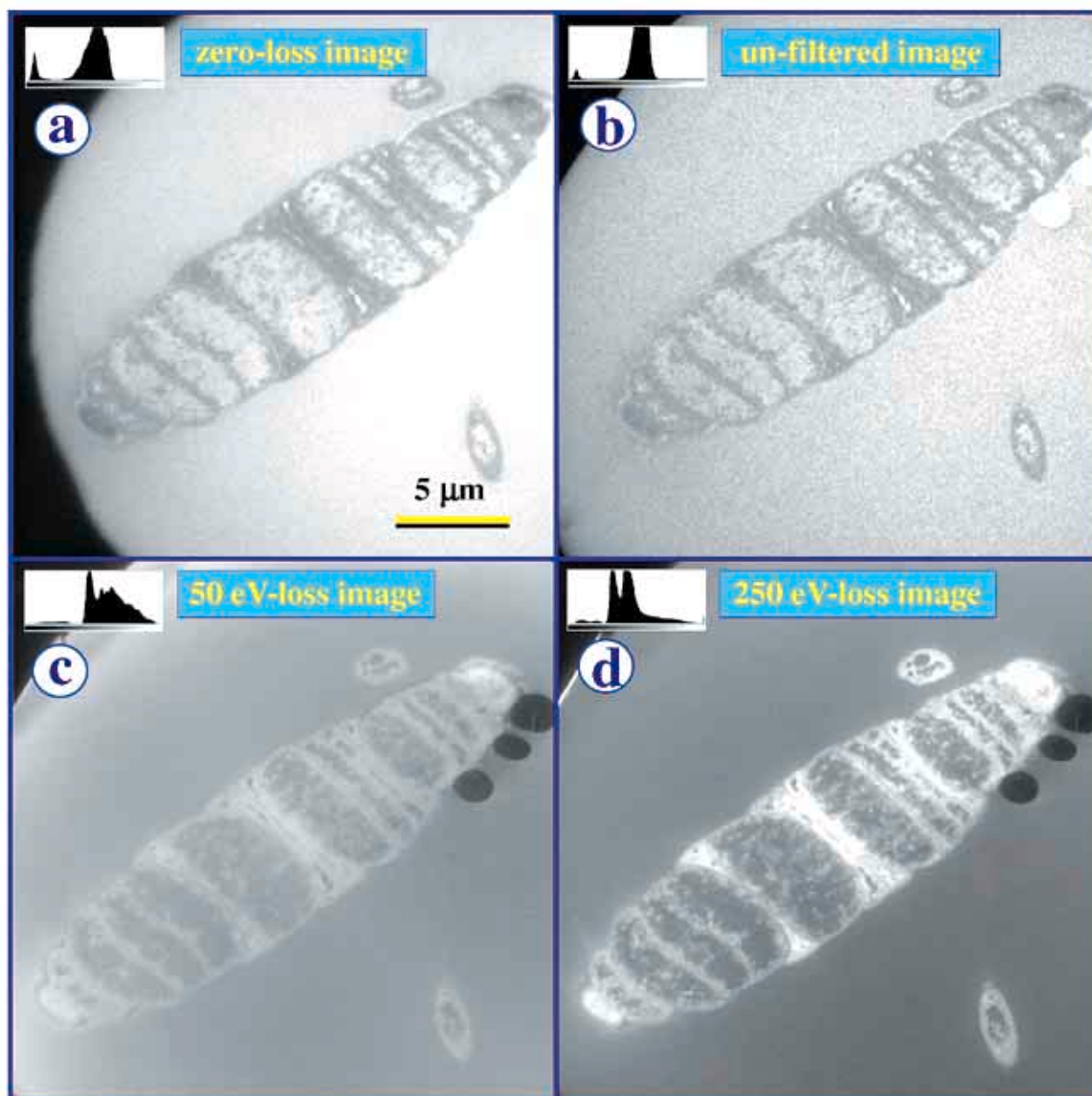


図9 アクリル系樹脂に包埋した糸状菌の電子分光結像法の像

Fig. 9 Electron spectroscopic images of gliding bacteria. A and b are the images by elastically scattered electrons with a zero-loss filter (a) and unfilter (b) respectively. C and d are the images by inelastically scattered electrons with 50 eV-loss image (c) and 250 eV-loss image (d) respectively. The inlets on upper left corner are the histograms of intensity of electron beams.

に限無く分散している(図1)。電子線プローブ X 線分光分析法では、Mg・Al・Si・Caが検出された。

糸状菌は、一端をチムニーや他の生物の体に付着させ、自由端を泳がせて生活している。図2-bは、フジツボの縁脚(f)に付着している写真で、付着部位の細胞コートは非常に厚く作られている。この部位を輪切りにする(図2-a)と、中心の細胞よりもコートの方が厚い位である。そのコートに更に別の糸状菌が付着している(↓、図1-a, b, 2-a)。外周には糸状菌以外に、硫黄酸化細菌と思

われる多数のバクテリアが散在する。このコートの外壁には、多数の電子高密度の沈澱物が付着する。その主成分は鉄とSiで、他にMg・Ca・銅等が検出された。

3.2 フジツボ(*Neoverruca* sp., 図3)

フジツボの縁脚は、内外二層の5~10μmの厚いクチクラの鎧を着て、クチクラ上皮細胞がその内壁を覆う。縁脚はgliding bacteriaにとって格好の付着場所である。縁脚は常に動かされ、新鮮な熱水に浴することができ、また

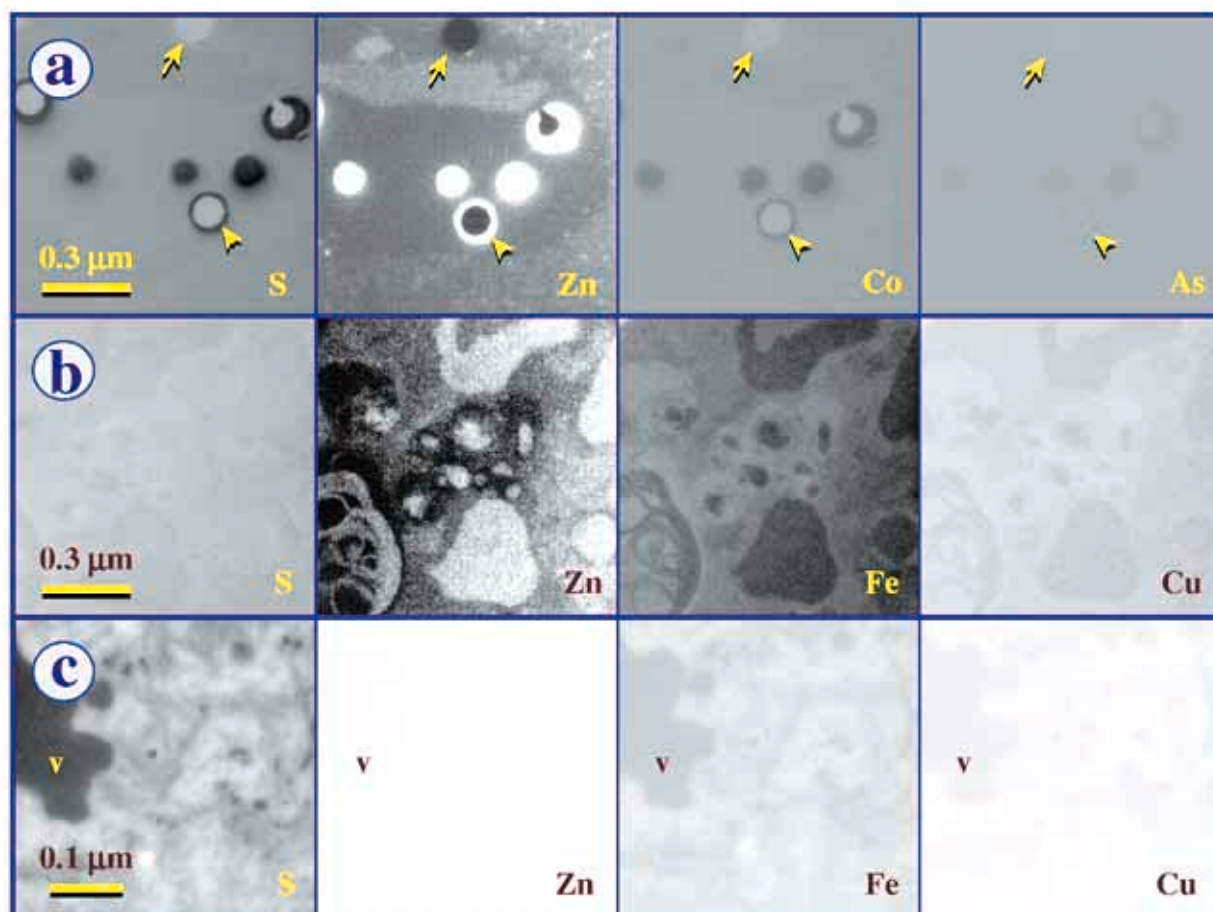


図10 電子分光結像法による正味の元素分布像 a シンカイエラゴカイの鰓上皮細胞内の有芯顆粒、b シンカイユノハナガニのnephrocyteのphagosome、c シンカイユノハナガニの鰓上皮細胞。
Fig. 10 Net elemental mappings of deep-sea organisms obtained by electron spectroscopic imaging. a Cored vesicles in the respiratory epithelial cell of Polychaeta. b Phagosomes in the nephrocyte of Bythograithid Crab. c The respiratory epithelial cell of Bythograithid Crab. Note; An outer shell of a vesicle (a) pointed by arrow-head contains exclusively Zn, while the core contains S, Co, and As.

危険が迫った時には、硬い殻の内に閉じ込めて保護して貰える訳である。図 3-b は交尾針の断面と思われる、周囲に精祖細胞塊(g)が、中心部に精子細胞から精子への成熟途上と思われる像(s)が多数観察される。電子高密度顆粒は、クチクラ上皮細胞の細胞質に多数観察された。成分は、Si・Ca・鉄が主で、Mg・Ti・銅等が少量検出された。

3.3 シンカイエラゴカイ (Annelida, Polychaeta, Terbellida, Alvinillidae, 図 4)

頭部の鰓幹に付着する突起の中心に筋線維を囲んだ鰓動脈が走り、そこから円板状の細胞間隙とループ上の毛細血管(c)が取り巻き、前後二本の鰓静脈へ、血液は循環する。鰓上皮細胞は、この円盤の間に位置し、高さは20~30μmに達する大形細胞である。核・mitochondria (m)・粗面小胞体(r)以外に、直径2~6μmのチラコイド(t, 図 4-a)が認められるが、光の届かない深海底での機

能は判らない。或いは化学合成の電子伝達系に関与しているかもしれない。その近傍には分泌顆粒様顆粒(↓)が多数在り、憶測を許して頂ければ、クチクラ層又は棲管の素材を含む可能性もある。特徴的な構造は、直径2~5μmの有芯顆粒である。外郭は特に電子密度が高く、中心の中等度電子密度の部分、薄切時にひびが入り易く、可なり硬く脆いと思われる。この構造もこのゴカイに特有であった。含有元素は、ヒ素と銅又はニッケルが非常に高く、温血動物に於けるferritin (As, Fe)を想起させる。貴金属のOsが認められるが、固定に四酸化オスミウムは用いていないので、やはり蓄積物と看做される。

3.4 シンカイユノハナガニ (Bythograithid Crab, 図 5)

この鰓は、所謂ポテトチップを並べた様な形状で、厚さ0.1~0.2μmの薄いクチクラ層と上皮細胞の直下は、血管腔(図 5-a)である。血液中には血球は観られず、蛋白密度の高い血漿中に、直径が5~10nmの大量の微粒子を含

む。含有元素は、S・Ca・Fe・Cuであった。鰓上皮細胞は、クチクラ層に対して深くはないが基底陥入を持つ(図5-b)。この細胞のmitochondriaには、形状が血中微粒子と同様なdense bodiesが大量に含まれていた。血液の流れを塞ぐ様にして血管中にnephrocyte(n)が存在する。この細胞も血管腔に面して基底層を持ち、その基底層に対して温血動物腎臓のpodocyteのfoot process様の突起(↓)を出している。このnephrocyteには、直径3~5 μ mのphagosome様構造が在り、中に電子密度が中等度の針状結晶と、高電子密度のジャガ芋状構造(p)が観られた。しかし、この構造物からは、電子線プローブX線分光分析法では、有為な量の元素を検出する事は無かった。

3.5 鉱物細片(9 pieces of chimney, 図 6, 7, 8)

深海底の熱水噴出口に成長するchimneyは、300℃の熱水に溶解した鉱物が、4℃の周囲海水に冷却されて過飽和状態と成り、通常はブラックスモーカーとして吐き出されているが、一部はchimneyとなって堆積して行く。故にchimneyは硬いが非常に脆く、採取後に一部が砂状に崩れる。この中から、形状と色の異なるものを作為的に選出し(図6)、元素分析を行った(図7, 8)。図7-aのスペクトルは、図6-dの鉱石を分析した結果である。赤い砂岩状に見え、かなり多種の鉱物の集合体と思われる。特記すべきは、krypton k-lineが検出されたことで、他の元素のL-lineである可能性は殆ど無い。kryptonは不活性ガスなので、鉱物に閉じ込められていると思われる。図7-bのスペクトルは、図6-g右側鉱石の透明な結晶部分を分析した結果である。石英の様に見えるが、Siを含まない。これと同様のスペクトルは、図6-c,e及びgの左側の結晶部分からも得られた。図7-cのスペクトルは、図6-bの鉱石を分析した結果である。硫黄の含有量が少ないが閃亜鉛鉱であろう。これと同様のスペクトルは、図6-a及びg右側上部でも観察された。図7-dのスペクトルは、図6-aの鉱石を分析した結果である。この鉱石からは、18%のbariumと3%のvanadiumが検出された。V L-line 1は、Ba L-line 2と重なるが、Ba L-line 2/line 1比が上がり、energyが高域へ変移するので、分離が可能である。図8-eのスペクトルは、図6-g右側鉱石右側赤色部分を分析した結果である。この鉱石からは、34%ものKr K-lineが検出された。またyttrium K-lineも4%検出された。図8-fのスペクトルは、図6-hの鉱石中央結晶部分を分析した結果である。鉄と銅の元素量は等しい硫化物である。混合物かどうかは、元素分布像などの解析が必要である。同様のスペクトルは、図6-cからも得られた。図8-gのスペクトルは、図6-fの鉱石を分析した結果である。元素量で見ると、Alが40%と非常に高い含有量を示している。同様のスペクトルは、図6-a及びdからも得られた。図8-hのスペクトルは、図6-aの鉱石左上部分を分析した結果である。主なピークの元素組成から類推すると、ヒ化硫化亜鉛という化合物が想定できる。

3.6 糸状菌の電子分光結像法の像(図 9)

糸状菌をアクリル系樹脂に包埋し、超薄切した後無染色で、電子分光結像法により弾性散乱コントラスト像(図9-a, b)と、非弾性散乱コントラストの像(図9-c, d)を得た。電子顕微鏡用試料の包埋剤には、通常エポキシ樹脂を選択する。支持膜を使わなくても電子線照射に対して十分な強度を有するからである。しかし鉛とウラニルによる電子染色を施さないと、十分な弾性散乱コントラストを得る事ができない。アクリル系樹脂は密度が低く、支持膜無しには電子顕微鏡観察に耐えられないが、図9-bのように通常の電子顕微鏡でも、無染色で十分なコントラストを得る事ができる。図9-aはエネルギーフィルタによって、非弾性散乱電子を除去した為に、背景雑音が低減された高画質の像を得る事ができる。図9-cはplasmon-loss領域の非弾性散乱電子を用いて結像した像で、反転すれば恐らく図9-bよりも高画質である。図9-dはコントラストチューニング像と云って、250 eVのエネルギーを損失した非弾性散乱電子線で結像した像である。この像は主に隣と硫黄原子のK-lineが寄与していて、炭素の吸収端(302 V)の手前なので、最も高いコントラストが得られる。左上挿入は結像に寄与している電子線のヒストグラムである。非弾性散乱電子像とは一種の暗視野像で、菌体右端の孔のコントラストが、弾性散乱像と非弾性散乱像で逆転している事からも確認できる。

3.7 電子分光結像法による正味の元素分布像(図10)

シンカイエラゴカイの鰓上皮細胞内の有芯小胞は、その殻と芯で構成元素が異なっていた(図10-a)。矢尻で示される顆粒は、殻にのみ亜鉛を含み、芯には硫黄とCo及び少量のヒ素を含む。中央水平に3個並ぶ芯の無い小胞は、Znのみを含むが、或いは殻を割らずに切片内に残している可能性もある。上方の矢印の小胞は逆に殻を被らず、矢尻の小胞の芯と同様の元素組成S, Coを含む。亜鉛の殻は、硫化鉄などの金属粒子を包む事により、金属中毒を中和しているのかもしれない。亜鉛はさらに細胞質内を砂状又は雲状に分布している(図10-b, Zn)。

シンカイユノハナガニの腎様細胞の貪食小胞(図10-b)では、亜鉛が鉄・銅・硫黄の分布域と逆転している。金属中毒や補酵素の働きで、亜鉛が特異な存在である事と関係が在るのかも知れない。シンカイユノハナガニの鰓呼吸上皮細胞(図10-b)では、硫黄以外の元素分布は極微量であるらしい。細胞内の腔胞(v)が対照となり、硫黄・鉄・銅の存在が確認できる。ここには亜鉛は全く存在しない。

4. 考 察

水深500mを越える深海に於いては、光合成による炭酸同化は期待できない。しかし、海底活火山の周囲に見られる熱水噴出孔からは、300℃の高熱水に溶解した硫化水素や炭酸塩、豊富な還元金属などの供給が有り、効率は悪いが化学合成による硫黄細菌やメタン菌、糸状菌の存

在が可能である。中でもbeggiatoaceae科のthiothrix種は、菌体の一端をチムニー壁やそこに棲息するゴカイの棲管の表面、フジツボの縁脚、ユノハナカニ/コシオリエビ/ヒチヨウシンカイヒバリガイ等の体表に付着させ、他端を浮遊させながら化学合成を行っているので、採取し易い特徴を持つ。

この糸状菌は、太さ2~200 μ m、高さ2~20 μ mの円筒又は円板状で、多数の細胞が重層して糸状体を形成しているが、細胞核を持たないので、cyanobacteriaと同様にモネラ界に属する。これらの特徴から、Beggiatoaは地球誕生間も無い頃、太陽光は厚い雲に閉ざされ、光が届かない水中で、火山活動の熱と、熱水に溶かされた還元型無機物を利用した地球最初の生命体から進化した最も古い生物形態を保持している様に思える。多細胞であるから菌界に最も近いが、核を持たない。単細胞のものは、核を持てばCaryoblasteaに最も近いだろう。発見される可能性は可なり低いかも知れない。小型化すればバクテリアに近付くが、遺伝子から見るとかなり遠縁らしい。

他方、ゴカイやヒバリガイなど高度に進化した生物群は、一度は海岸で進化を遂げた後、深海の熱水噴出孔へ降りて来て、その環境に適応し、且つモネラ界の生物と共生関係を築いたものと思われる。二枚貝のSolemyaは、浮遊生物の補食以外に、硫黄や硫化水素から化学エネルギーを得ることができる多栄養型である。今回発見された多くの高密度顆粒は、チムニーを構成する多種の元素分布と比較すると、比較的小数の元素から構成されていた。更に、ニッケルやコバルトの様に、チムニーからは検出されなかった元素を含む点で、生物が熱水から直接摂取して濃縮した可能性も考えられる。単に受動的に侵入してくる不要物質を貯蔵したとは見なしえない。むしろ積極的に化学エネルギー源として、硫化金属を備蓄している可能性が高いが、今後の検討が待たれるところである。

今回の調査研究で、電子線プローブX線分光分析法が、サブミクロンの定量元素分析に大変有効であった。電子分光結像法は、分布元素の相対的差違の識別には極めて有用な手段である事が証明された。さらにribosomes中の燐原子の含有量と比較する事によって、定量解析も可能である。

謝 辞

本研究の実施に際しては、「しんかい2000」の依田指令/Pilot光藤数也/Co-Pilot千田要介ほか運行チーム、及び「なつしま」斎藤船長/長谷甲板長ほか乗組員の方々には、大変お世話になった。以上の方々に深く感謝する。

引用文献

- 1) Futaesaku Y., K. Tone, S. Okuda, T. Hashikawa, T. Akagi, T. Hanada, K. Yase, and K. Sekiya (1998): Biological Meaning of Electron Spectroscopic Imaging (ESI) and Application for Net Carbon Mapping, Recent Development of Electron Microscopy 1998, Ed., H. Hashimoto and F. H. Li, Nakanishi Press, p.105-110.
- 2) Futaesaku Y., M. Yano, M. Ueno, M. Ono, Y. Kozuka, A. Yaguchi, R. Satoh, Y. Suzuki, T. Takagi, N. Nagai, K. Yase, and K. Sekiya (1998): Principles of Electron Spectroscopic Imaging (ESI) in Hard Tissue Biology, J. Hard Tissue Biology, 7(1), 1-10, (Review Article).
- 3) Futaesaku Y., M. Yano, M. Ono, Y. Kozuka, K. Sekiya, K. Adachi, A. Yaguchi, N. Yamahira, and K. Yase (1998): Non Carbon Supporting films for Electron Spectroscopic Imaging (ESI) - Application for Biological Specimens and Ultracryosections -. Proc. 14th Intl. Cong. Electr. Microsc. 1, 699-700.
- 4) Futaesaku Y. (1997): Principle of Electron Spectroscopic Imaging (ESI) for Biological Applications, Proc. Asian Sci. Sem. New Direction in TEM and Nano-Characterization of Materials, Res. Lab. High Volt. EM Kyushu Univ., Kyushu Univ. Press, 199-208.
- 5) Yamaguchi T. (1987): Changes in the Barnacle fauna since the Miocene and the infraspecific structure of *Tetraclita* in Japan (Cirripedia; Balanomorpha). Bull. Mar. Sci., 41, 337-350.
- 6) 小塚芳道, 二重作豊 (1998): 海産腔腸動物の固定法と超微形態. (技術情報) 電子顕微鏡 33(2), 125-128.
- 7) 八瀬清志, 堀内伸, 山本和弘, 花田剛, 矢口晶, 二重作豊, 山田俊男, 山平尚広 (1996) エネルギーフィルタ電顕による定量解析の試み - 金属コロイド, タンパク分子の炭素の解析 - 電子顕微鏡 31(2/3), 94-101.
- 8) 二重作豊 (1995) 電子分光顕微鏡(ESI)による生物試料の観察. 電子顕微鏡 30(2), 121-128.

(原稿受理: 2000年1月26日)