

酸性温泉中の単細胞藻イデユコゴメのコロニー形成に伴うシリカの生体鉱物化作用

Biomineralization of silica associated with colonization of an unicellular alga, *Cyanidium caldarium*, in an acidic hot spring

Abstract

朝田隆二* 田崎和江**

Ryuji Asada* and Kazue Tazaki**

1999年11月15日受付.

2000年4月13日受理.

* 金沢大学大学院自然科学研究科
 Graduate School of Natural Science and
 Technology, Kanazawa University, Kakuma,
 Kanazawa 920-1192, Japan

** 金沢大学理学部地球学科
 Department of Earth Sciences, Faculty of
 Science, Kanazawa University, Kakuma,
 Kanazawa 920-1192, Japan

Biomineralization processes of silica associated with colonization of unicellular red alga, *Cyanidium caldarium* in green biomats were examined in this study. The green biomats occur in Higashi Hot Spring at the Satsuma-Iwo Jima Island in Kagoshima Prefecture, Japan. The biomats consist mainly of *C. caldarium* cells under acidic condition (<pH 2). The colonies of *C. caldarium* cells gradually change into angular shape with concentration of silica, and simultaneously organic matter is leached out together with P and S. The XRD and electron diffraction pattern indicated that the concentrated silica transformed from amorphous silica into cristobalite. When the colony developed, the inside part decolorized and became transparent due to loss of chlorophyll. Natural cultivation examination of *C. caldarium* indicates that the development of the colony depend on solution pH, nutrients, silica-concentration, growth rate of the cells, and eco-system with bacterial condition, and play an important role in silica-biomineralization.

Key words : acidic hot spring, *Cyanidium caldarium*, colonization, silica, biomineralization, biomats

はじめに

地球上に最初に現れた生命体を探求するために、先カンブリア紀のチャート中に保存されている珪化した微生物についての多くの研究が行われてきた (Barghoorn and Tyler, 1965; Schopf and Packer, 1987; Walsh, 1992; Schopf, 1993). 例えば, Schopf (1993) は最も古い化石の一つとして、西オーストラリア北西部の始生代前期の褶曲した玄武岩の層状チャート中の糸状微生物について研究し、少なくとも 3465 Ma より古い時代に、酸素を生産する光合成無機栄養生物がすでに生息していたと報告している。また, Barghoorn and Tyler (1965) は先カンブリア紀のチャートを形態学的に研究し、その当時からすでに生物の多様性があったことを示唆した。さらに、バクテリアの光合成は酸素を出さないため、先カンブリア紀における藻類のストロマライトは、大気の進化に重要な意味を含んでいると、Walter et al. (1972) は報告している。しかし、地球初期における生命体を化石から理解することには限界があり、古い化石ほど保存の状態が悪くて、それらを微生物と判断したり、あるいは、分類したりすることは難しい。また、微生物自体も地球初期の頃は、その形態が球菌や桿菌のように単純であり、それらが化石として残っていたとしても、物理的・化学的に形成されたものと区別することが困難であることが多い。例えば、先カンブ

リア紀のチャート中にみられる石英の球状微粒子が、全く無機的なプロセスで説明できることを、Oehler (1976a) は報告した。そのため、実験によって微生物の珪化のプロセスを明らかにする研究も行われている (Oehler and Schopf, 1971; Oehler, 1976 b; Francis et al., 1978). 微生物が珪化していくプロセスを調べるために、大西洋東南部の深海底の微生物を含む表層の堆積物を用いて、大気圧と深海底の圧力下で Westall et al. (1995) は培養実験を行い、珪化した第三紀の堆積物と比較することによって、微生物の生存中に珪化が起こることを報告した。しかし、微生物の死後に珪化が起こる場合と、微生物が生きている間に起こる場合とについては、組織の観察だけではそれらの差異が認められない場合が多い。なお、生物活動によって鉱物が生成するとき、その現象は生体鉱物化作用と呼ばれている。生体鉱物化作用はケイ藻や放散虫の殻のような生物制御起因によるもの、および、生物活動によって誘発されてできるものにと、大きく2分されてきた (Lowenstam, 1981; Mann, 1983). しかし、それらのうち、生物誘発による結晶は、無機的に生成された鉱物とは形態や構造においてあまり相異がないとされてきたが、前者によるものと考えられる結晶でも、その形態や結晶化の程度に生物が大きく関与しているという報告が出てきた (田代・田崎, 1999; 安多ほか, 2000).

一方、先カンブリア紀の微生物のうち温泉のような熱水環

Table 1. Physical and chemical characteristics of hot spring water and sea water.

Location	Sample	pH	Eh (mV)	EC (mS/cm)	DO (mg/l)	WT (°C)	Si (ppm)	Al (ppm)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Fe (ppm)	Mg (ppm)
Higashi Hot Spring	Water source	1.7	496	12	2.4	52.7	74	360	600	100	128	140	n.d.
	Bath	1.7	503	12	7.1	44.4							
Ohura seashore	Sea water	8.2	150	49	7.8	29.9	4	0.2	11000	359	211	2	1140

Eh: electrode potential vs. standard hydrogen electrode
EC: electric conductivity
DO: dissolved oxygen

WT: water temperature
n.d.: not determined

境下で珪化を受けたものもいたと考えられているため、初期生命体の探求において天然のバイオマツト中におけるシリカの生体鉱物化作用の研究も行われている（例えば、Ferris et al., 1986；赤井ほか, 1995；Schultze-Lam et al., 1995；Konhauser and Ferris, 1996；田崎ほか, 1997；Renaut et al., 1998；Tazaki et al., 1998；Asada and Tazaki, 1999）。一種あるいは多種類の微生物で構成されるバイオマツトは、pH・温度・栄養の供給・流速・水深などのさまざまな要因に依存して、生体鉱物化作用の結果として、層状構造を作る。バイオマツトを実験的に生成させて、その分布や形成過程も調べられている（例えば、Wolfaardt et al., 1994；Møller et al., 1998；Sternberg et al., 1999）。しかし、これらは炭酸塩鉱物やFe-Mn 鉱物に関する例がほとんどであり、微生物によるケイ酸の実験的な生体鉱物化作用の研究はほとんど行われていない。

そこで、ほとんどが単細胞紅藻類イデユコゴメ (*Cyanidium caldarium*) のみで構成されている鹿児島県薩摩硫黄島の東温泉にみられる緑色バイオマツトに注目して、そこで形成されるシリカ鉱物の生成過程と生態系について知るために、観察および自然培養実験を行った。その結果、イデユコゴメのコロニー形成とシリカ鉱物の形成およびその結晶化は相互関係があることが明らかになった。なお、このイデユコゴメは好酸性・好熱性であり、世界中の酸性泉で一般にみられる紅藻類である（例えば、Hirose, 1950；Fukuda, 1958；Doemel and Brock, 1971）。この東温泉はpH 1.7の強酸性の特殊環境のため、緑色バイオマツトはイデユコゴメによって独占されており、シリカ鉱物の形成と微生物の関係は単純化して考えることができる。

実験方法

1. 試料

本研究に用いた試料は鹿児島県薩摩硫黄島で採取した。硫黄島は東西5.5 km・南北4 kmであり、鬼界カルデラの北西端に位置しており、約3,000年前の完新世に形成された後カルデラ火山の稲村岳・硫黄岳の2火山およびカルデラ壁とそれらの間の低地とからなる（小野ほか, 1982）。この西部には溶岩（輝石流紋岩）と火山性碎屑物（流紋岩の石質角礫）からなる硫黄岳、南部には稲村岳スコリア丘（玄武岩質スコリ

ア状火山岩塊）と南溶岩（輝石かんらん石玄武岩）・東溶岩（輝石かんらん石玄武岩）・磯崎溶岩（かんらん石輝石安山岩）からなる稲村岳火山がある（小野ほか, 1982）。

硫黄島を取り囲む海岸には、多彩なバイオマツトが形成されている。稲村岳火山と稲村岳スコリア丘の南東裾野の海岸にある赤湯温泉には、鉄とマンガンの濃集の相異による縞状の赤褐色バイオマツトがある。また、長浜港付近には海中から鉄・炭酸イオンを多く含む温泉が湧出して、鉄質の沈殿物の生成による褐色バイオマツトがみられる（田崎ほか, 1997；Shikaura et al., 1999；Tazaki, 1999）。

本研究で用いた試料は、硫黄岳南東麓海岸の「東温泉」で形成されている緑色バイオマツトである（Fig. 1A；1B）。東温泉付近では、硫黄岳の温泉変質した火山角礫岩が東溶岩を覆い、その上位には東温泉背後の厚い溶岩があり、また、沖積層および扇状地堆積物が露出している（小野ほか, 1982）。東温泉の温泉水はやや珪化変質作用を受けた角礫岩から湧出しており、泉質は酸性明バン・緑バン泉であって浴用に利用されている。1958年から1972年にかけての泉温は45～60°Cで、pH約2であった（鎌田, 1964；鎌田ほか, 1974；地質調査所, 1976）。1999年6月の調査では、温泉水湧出口の水温は52.7°Cであり、pH 1.7・酸化還元電位 (Eh) 496 mV・電気伝導度 (EC) 12 mS/cm・溶存酸素 (DO) 2.4 mg/lであった。また、浴槽の水温は44.4°Cであり、pH 1.7・酸化還元電位 (Eh) 503 mV・電気伝導度 (EC) 12 mS/cm・溶存酸素 (DO) 7.1 mg/lであり、湧出口よりも浴槽の方が明らかに溶存酸素が高くなっている（Table 1）。

湧出口付近から浴槽にかけては緑色バイオマツトが広く分布している。また、その付近には黄色バイオマツトも認められ、桿菌の細胞壁にジャロサイトの濃集、および緑色バイオマツト中には球状微生物のコロニーの存在が報告されている（田崎ほか, 1997；Tazaki et al., 1998）。本研究では、この緑色バイオマツトに焦点を当てたものであり、現地における1999年6月の水質測定後に、火山角礫岩・扇状地堆積物に付着した緑色バイオマツトおよび温泉水を同時に採取した。そして、バイオマツトを温泉水中に浸した状態で持ち帰って研究試料とした。さらに、後述の自然培養実験のために、東温泉のpH調整用として、硫黄島西部の大浦海岸付近の海水も採取した。

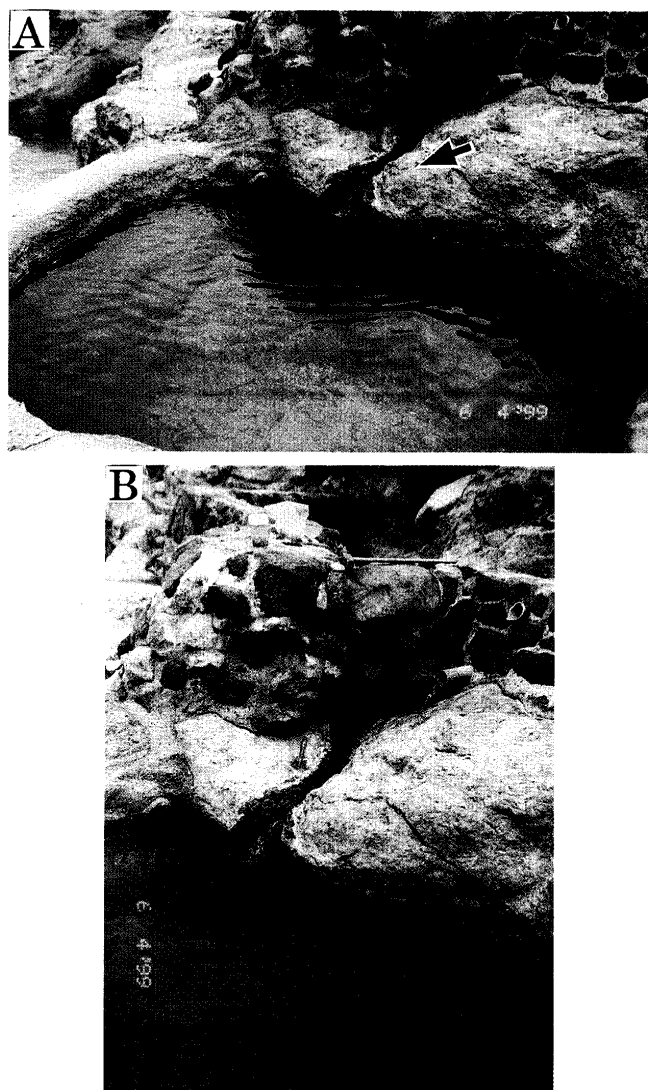


Fig. 1. Field view of green biomats at Higashi Hot Spring, Satsuma-Iwo Jima Island, Japan (A). Close-up photograph of a part indicated by an arrow in Fig. 1 A (B).

2. 分析方法

1999年6月の調査の際に、東温泉の水質は現地において、pH・酸化還元電位 Eh (mV)・電気伝導度 EC (mS/cm)・溶存酸素 DO (mg/l)・水温 WT (°C) を測定した。また、この温泉水と大浦海岸の海水の溶存イオンを調べるために、ICP質量分析 (Inductively coupled plasma mass spectrometry : ICP-MS) (Hewlett Packard, 4500 series) を行った。そして、濃度決定には多元素標準溶液 (1・10・100 μg/m³) (Spex, XSTC-1・-8・-11) を用いて、外部校正法を採用した。

湿潤状態の緑色バイオマット試料の表面を、微分干渉および落射蛍光顕微鏡 (Nikon-NTF2A および EFD3) で観察を行い、また、DAPI (4,6-diamido-2-phenylindole) で染色し、紫外線照射によって DNA やクロロフィルの有無を確認した。また、その一部は室温乾燥後に、粉末にしてガラス板に塗布し、X線粉末回折装置 (XRD : Rigaku-RINT1200) (CuKα線, 加速電圧 40 kV, 電流 30 mA) を用いて鉱物組成

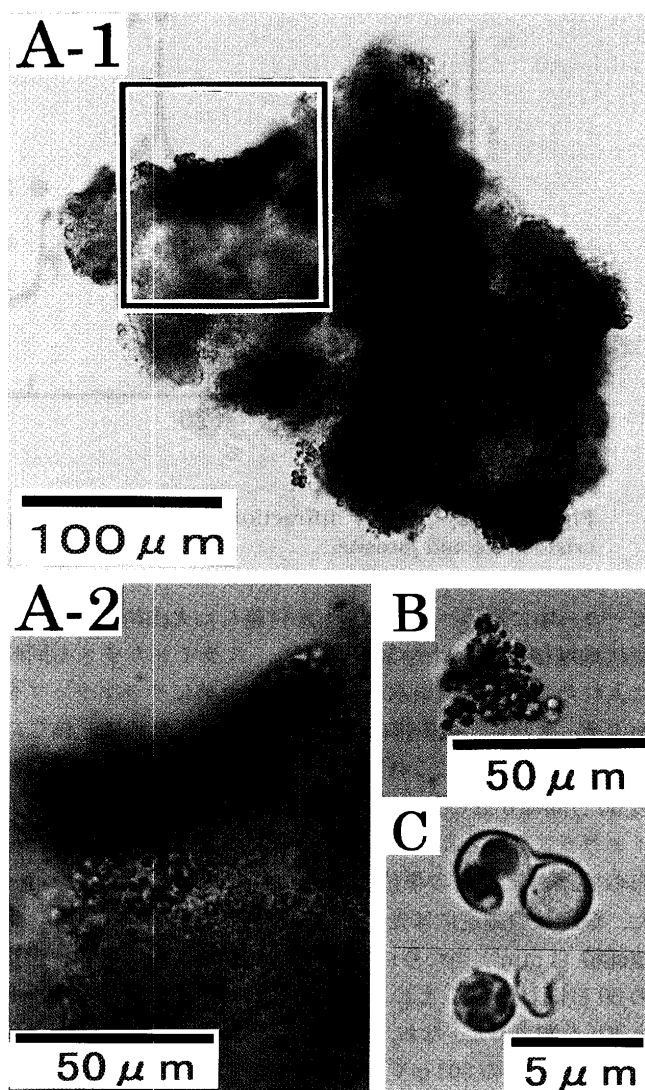


Fig. 2. Optical micrograph of colony of *Cyanidium caldarium* in green biomats (A-1). Close-up photograph of an enclosure in Fig. 2A-1 showing silica crust covering the cells (A-2). Some colonies formed angular shape (B). The cells have silica crust and chlorophyll (C).

も調べた。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM ; JEOL-JSM-5200LV) を用いて、その微細な形態を観察し、SEMの付属装置のエネルギー分散型 X線分析装置 (EDX ; Philips PV 9800) を用いて元素分析も行った。試料はカーボンテープを貼った真鍮の試料台に固定し、炭素蒸着を行って、加速電圧 15 kV の条件で観察した。

3. 自然培養実験

緑色バイオマットの形成過程、主にイデユコゴメのコロニー形成について SEM 観察結果から推察されるような変化がみとめられるかどうかを調べるため、自然培養実験を約 70 日間行った。また、pH を変化させることによるコロニー形成に対する影響や水質変化を検討した。2つのビーカーを用意して、1つのビーカー中には東温泉水を 100 ml、他のビーカー中には東温泉水と海水の混合 (約 1 : 10 の割合) により、pH を 2.7 に調整した培養液を 100 ml 入れ、これら両方の

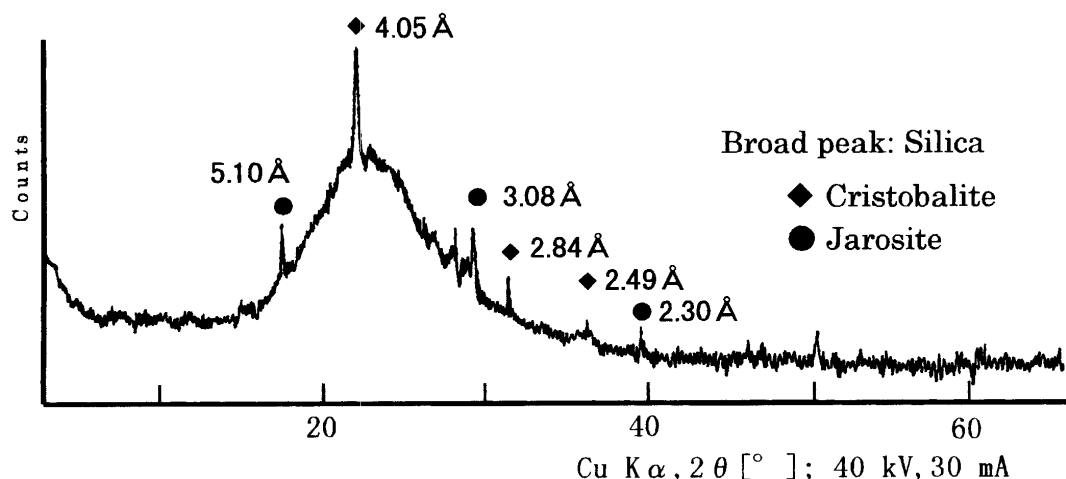


Fig. 3. X-ray powder diffraction pattern of green biomats including *Cyanidium caldarium* shows the presence of cristobalite and jarosite.

ビーカー中に緑色バイオマットが付着した火山角礫岩および扇状地堆積物の合計約 50 g を入れ、スライドガラスも同時に入れた。また、温泉水の蒸発を防ぐためにサランラップをかぶせ、さらに、微生物の増殖を促進させるために、45°C に設定した恒温槽中にこれらのビーカーを設置した。実験開始後 30 日間は 3 日ごとに、残りの 40 日間は 10 日ごとに、スライドガラスを取りだして、その表面に付着している細胞の分布の観察およびその単位面積あたりの細胞数の測定を行った。細胞数の測定には光学顕微鏡写真から細胞数を数え、単位面積 (1 mm²) 当たりに換算した。また、水質変化は、当初の 30 日間は 2 日ごとに、残りの 40 日間は 10 日ごとに pH と Eh を測定した。なお、測定開始時には、温泉水の Eh は現地での測定時の 503 mV と比較して、620 mV に上昇していた。

結 果

1. 緑色バイオマットおよび水質

東温泉の緑色バイオマットは Fig. 1 A に示すように、湧出口と浴槽全体に分布している。特に、湧出口では、緑色バイオマットの厚さが約 2 mm に達する (Fig. 1 B)。なお、付着している火山角礫岩・溶岩・沖積層および扇状地堆積物などの種類によっては、その厚さが 0.5~1.5 mm とさまざまである。

東温泉源泉および大浦海岸の海水の水質測定結果と ICP-MS 分析結果を Table 1 に示す。前者の pH は 1.7 と強酸性を示し、Eh は 496 mV で、EC は 12 mS/cm を示す。DO は湧出口浴槽の 7.1 mg/l と比較すると、2.4 mg/l と低い値を示した。また、浴槽の 44.4°C に対して、水温は 52.7°C を示した。大浦海岸の海水の諸性質については、pH は 8.2、Eh は 150 mV、EC は 49 mS/cm のそれぞれの値を示し、水温は 29.9°C であった。ICP-MS 分析結果から、東温泉の源泉には Si は 74 ppm 含まれ、これを大浦海岸の海水の 4 ppm と比較すると、約 20 倍の Si が含まれている。また、温泉水には Al と Fe が多く含まれ、一方、海水には Na・K・Mg・Ca が多く含まれることが特徴である。

2. 光学顕微鏡観察

東温泉の湿潤状態の緑色バイオマットを光学顕微鏡を用いて観察した結果を Fig. 2 に示す。直径約 3 μm の球状の微生物がコロニーを形成しており、大きいコロニーの内部のある部分には透明から薄い茶色になっている。これは細胞が死滅し、クロロフィルを失っているためと考えられる (Fig. 2 A-1, 2)。これらのコロニーの外形はしばしば角張り、Fig. 2 A-1 の右上や Fig. 2 B に見られるような形態を示す。コロニーを形成している微生物は透明な殻を持ち (Fig. 2 A-2, 2 C)、DAPI で染色して、紫外線下で観察すると、その DNA の存在を示す青色蛍光を発する。また、クロロフィルの存在を示す自己蛍光も認められた。これらのことから、Hirose (1950)、Fukuda (1958) および Doemel and Brock (1971) が報告しているように、微生物と同様の好酸性・好熱性の単細胞紅藻類イデユコゴメ (*Cyanidium caldarium*) と同定される。なお、この緑色バイオマットはイデユコゴメで独占されており、ごくまれにケイ藻やバクテリアなどの他の微生物が観察される。

3. X線粉末回折

東温泉の緑色バイオマットは、低結晶物質の存在を示すブロードピークが顕著であり、これは後述するエネルギー分散分析結果も考慮すると低結晶質のシリカと考えられる。また、クリストバライト (4.05 Å・2.84 Å・2.49 Å)、および、ジャロサイト {KFe₃(SO₄)₂·(OH)₆} (5.10 Å・3.08 Å・2.30 Å) のピークも認められる (Fig. 3)。

なお、2 か月後の自然培養実験におけるイデユコゴメのコロニーの TEM による観察の結果によれば、電子線回折では非晶質のパターンを示した。このことはイデユコゴメの細胞壁の周囲に初期に生成する物質は非晶質シリカと考えられる。

4. 走査型電子顕微鏡観察およびエネルギー分散分析

緑色バイオマットの微細形態および元素組成を調べるために、SEM による観察および EDX 分析を行った (Fig. 4)。緑色バイオマットは Fig. 4 A に示すように、大部分がイデユコゴメによって構成され、全体が硫黄 (以下 S) を主とする膜

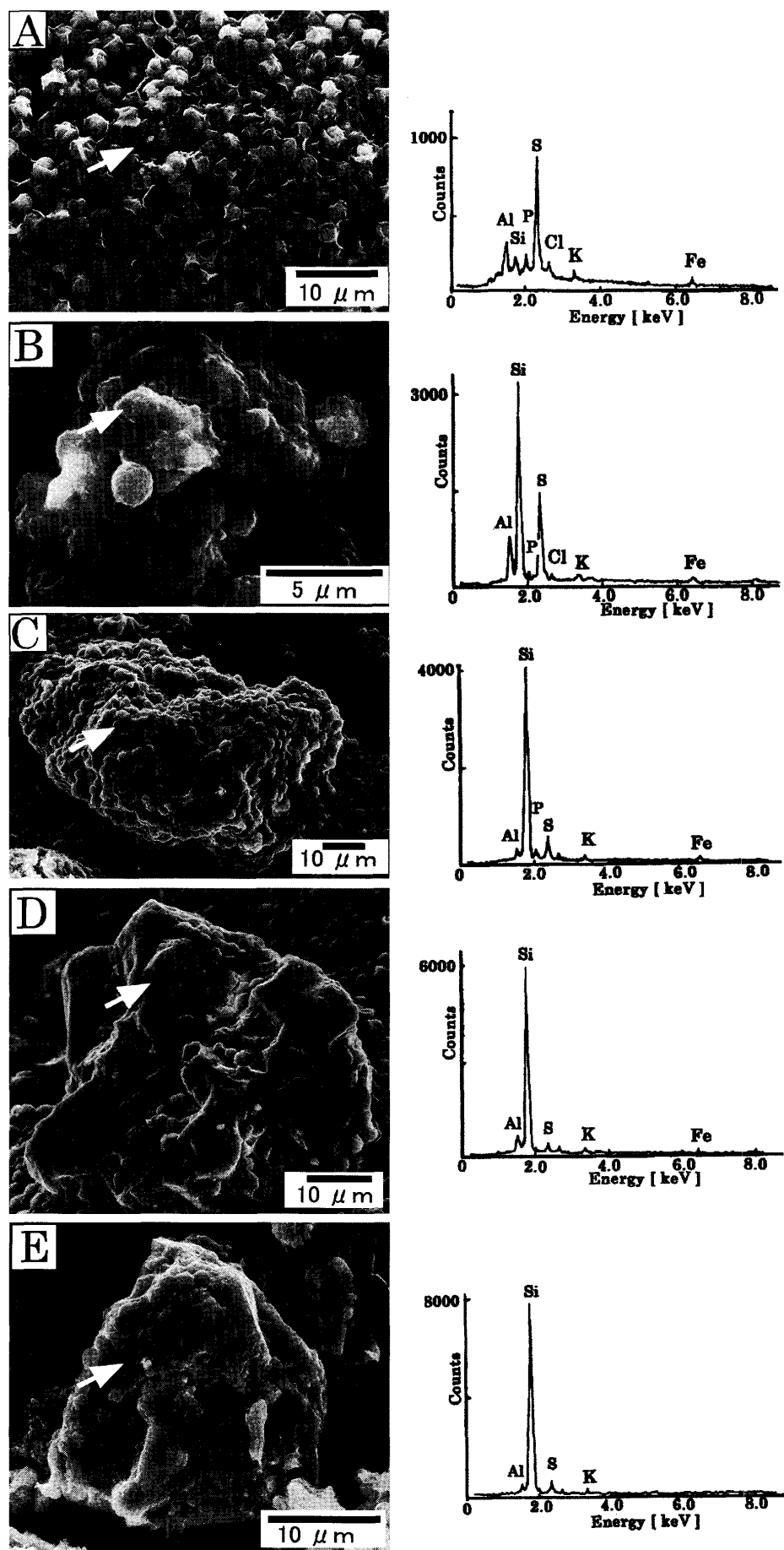


Fig. 4. SEM micrographs and EDX spectra showing the biomineralization processes of *Cyanidium caldarium* from amorphous stages (A ~ C) to crystallized stages (D and E). At the amorphous stages, the colony mainly contains sulfur, whereas the crystallized angular colony is composed of almost only Si. Arrows indicate analytical points for EDX. Note that Si counts are increased due to biomineralization processes.

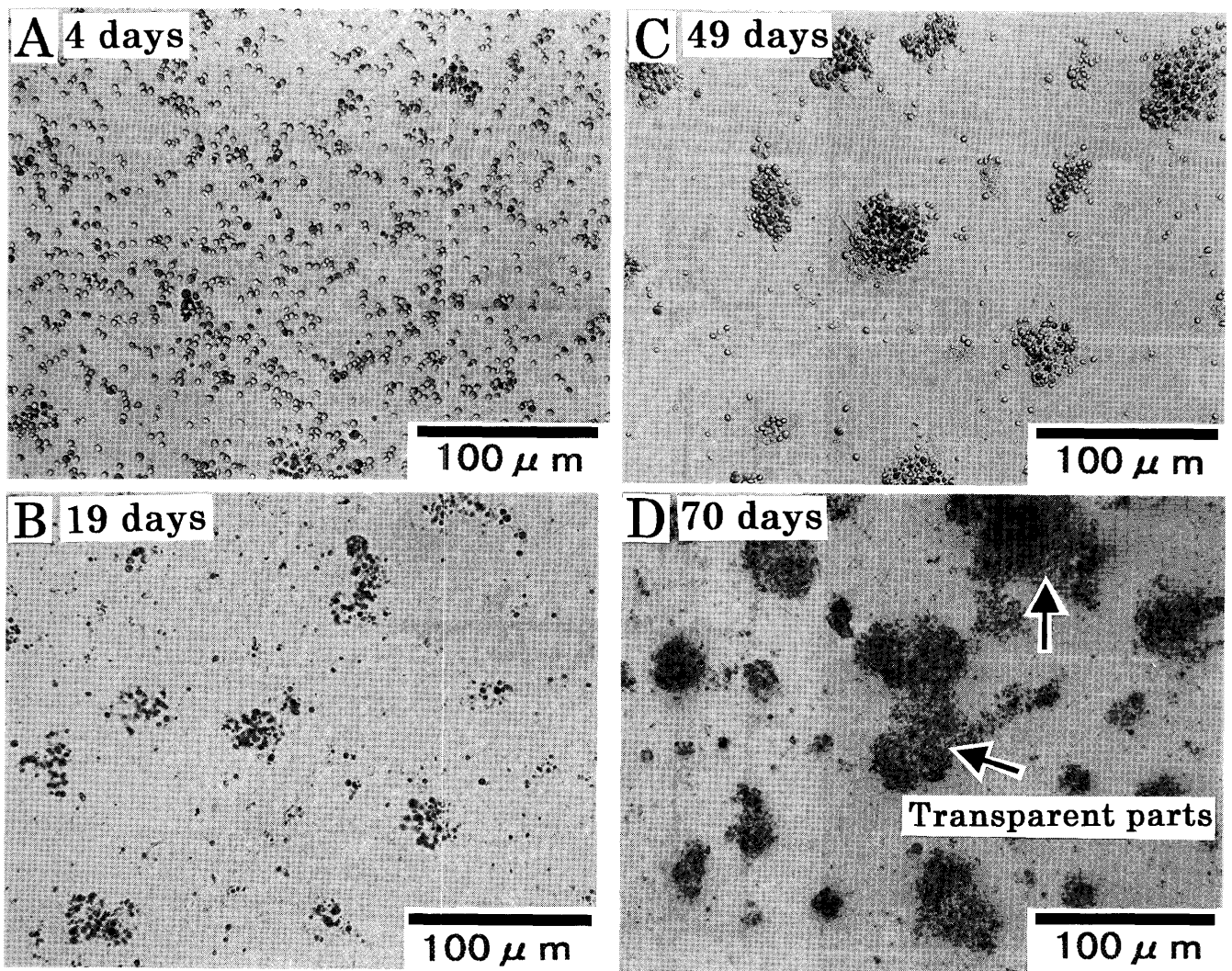


Fig. 5. Optical micrographs of *Cyanidium caldarium* cells cultivated in hot spring water (pH 1.7). The cells occurred after 4 days aging (A). The colonies were formed about $30\mu\text{m}$ in wide after 19 days aging (B), and synchronously developed about $40\mu\text{m}$ in wide after 49 days aging (C). Finally, the colony became more than $80\mu\text{m}$ in wide after 70 days aging, and the inside parts of colony decolorized, and became transparent (arrows) (D).

状物質に被われている (Fig. 4A, 矢印)。また、イデユコゴメはコロニーの形成で、体積を増して形状が盛り上がった部分が所々に認められる。その大きさは $5\sim 200\mu\text{m}$ とさまざまである。コロニーの形成と発達過程は Fig. 4B~E に示すような順序で、平面的から立体的な形態に変化したと考えられる。Fig. 4B にはイデユコゴメの形態がコロニー中に明瞭に残っており、Fig. 4C のコロニーにもイデユコゴメの形態が全体的に残っている。また、Fig. 4D のコロニーは他より立体的になり、外形も角張って、結晶化の進行過程であることが示唆され、イデユコゴメの形態が残存している部分は Fig. 4C に比べるとあまりみられない。Fig. 4E のコロニーにおいては Fig. 4D 以上に結晶化が進み、角張った部分および平らな面が多く観察され、イデユコゴメの形態を残している部分はほとんど認められない。結晶化の進行についてはそれぞれの粒子について XRD をとるとよいが、その分離が困難であった。

これらの形態変化に伴い、化学組成も以下に説明するように変化する。膜状物質に含まれたイデユコゴメには多量の S

が存在し、少量の Al・Si・P・Cl・K・Fe の存在を示すピークも認められる。また、有機物の存在を示す高いバックグラウンドが特徴である (Fig. 4A, 矢印)。Fig. 4B から 4E では、Si のカウント数の上昇から示されるように、有機物の存在も少なくなり、より Si に富むようになる。Fig. 4B では Fig. 4A と同様に、S・Al・Si・P・Cl・K・Fe のピークが認められるが、これらの中でも特に Si の量が増加する (Fig. 4B, 矢印)。また、Fig. 4C においては、さらに Si の増加と S・Al・P・K・Fe の減少が認められる (Fig. 4C, 矢印)。Fig. 4D および 4E においては P が消失し、バックグラウンドも低くなる。最後の Fig. 4E の段階になると P のみならず、Fe のピークも認められなくなり、Si のみがさらに増加する (Fig. 4E, 矢印)。

5. 自然培養実験

温泉水の pH 1.7 と混合水の pH 2.7 の条件において、約 70 日間の自然培養実験の結果を Fig. 5-8 に示す。東温泉水のみで培養したサンプル (pH 1.7) は、4~14 日目まではコロニー形成はみられず、Fig. 5A に示すように、スライドガラス面

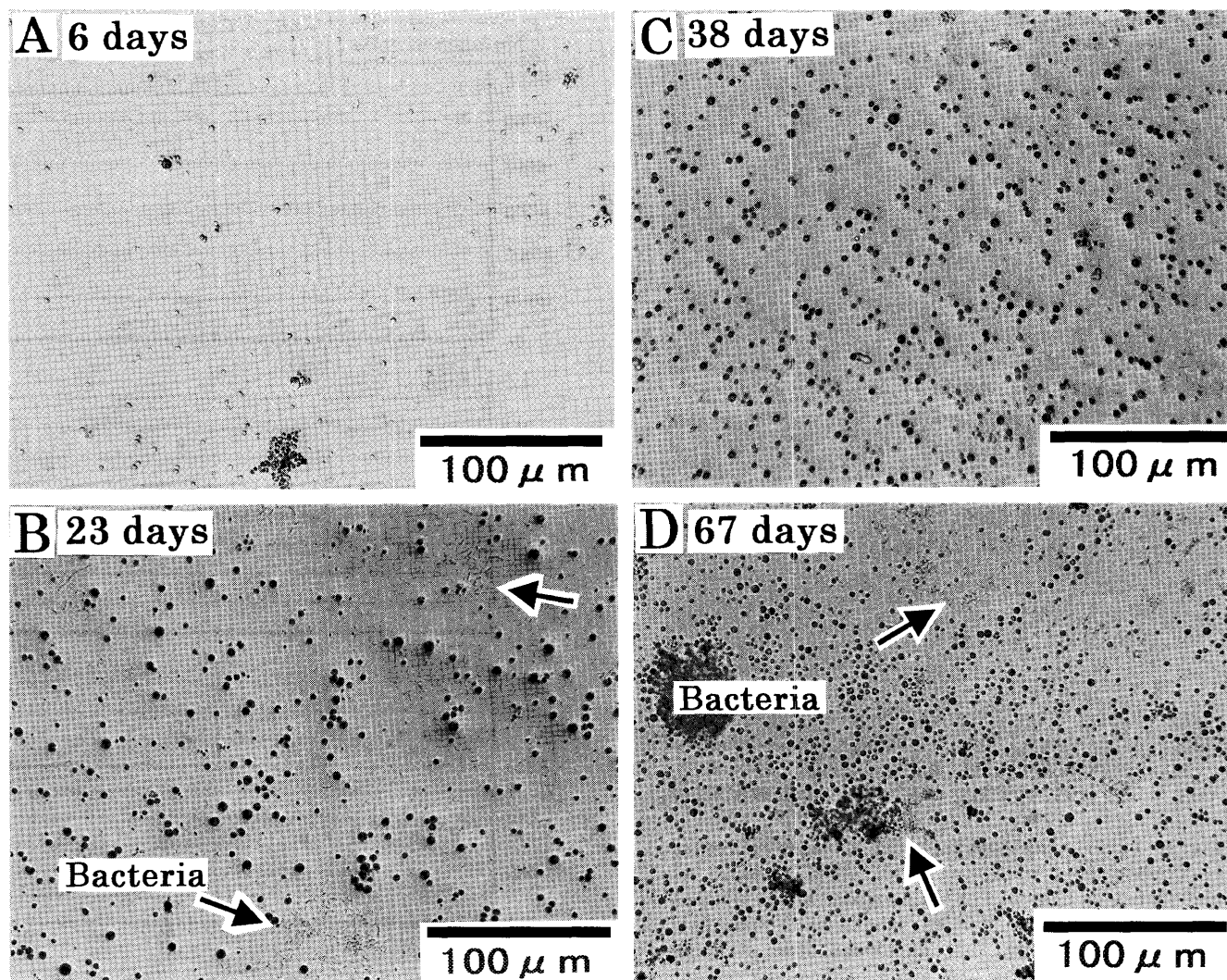


Fig. 6. Optical micrographs of *Cyanidium caldarium* cells cultivated with a mixture of hot spring water and sea water in condition of pH 2.7. The cells slightly appeared after 6 days aging (A). Number of the cells increased and bacteria (arrows) appeared after 23 days aging (B). Both number of the cells and bacterial colonies gradually increased after 67 days aging (C and D).

にイデユコゴメが均等に分布している。そして、19日目では、約 $30\mu\text{m}$ のコロニーが所々に形成される (Fig. 5 B)。49日目では、コロニーが約 $40\mu\text{m}$ になり (Fig. 5 C)、70日目では約 $80\mu\text{m}$ のコロニー同士の合体が顕著になり、部分的に緑色が退色する現象がみられた (Fig. 5 D, 矢印)。すなわち、pH 1.7の条件下では、約半月でイデユコゴメのコロニー形成が認められた。一方、大浦海岸の海水でpH 2.7に調整した培養では、当初の6日間はスライドガラス上にはほとんどイデユコゴメの付着が認められなかった (Fig. 6 A)。しかし、23日目ではイデユコゴメの個体数が増加し始め、スライドガラス上に均等に分布するようになり、イデユコゴメと共生するバクテリアの数も増えてくる (Fig. 6 B, 矢印)。そして、38日目では、イデユコゴメの数が一段と増加する (Fig. 6 C)。67日目では、イデユコゴメと共生するバクテリアの数とともに増加する (Fig. 6 D)。このように、東温泉 (pH 1.7) で培養した場合にはコロニーが形成されたが、海水で調整した場合 (pH 2.7) は2か月以上経ってもそれは形成されなかった。49日目と70日目の両者のようすを Fig. 7 に示す。pH

1.7の温泉水では、49日目ですでにイデユコゴメのコロニーが等間隔で形成している (Fig. 7 A) のに対し、pH 2.7では、まだイデユコゴメが分散しており、67日目でもコロニー形成が認められない (Fig. 7 B)。また、pH 2.7ではイデユコゴメと共生するバクテリアのコロニー (約 $50\mu\text{m}$) が形成されることが特徴である (Fig. 7 B, 矢印)。

これらの培養実験において、単位面積 (1mm^2) 当たりの細胞数の測定および水質変化の結果 (pH・Eh) を Fig. 8 に示す。東温泉の水での培養では、同調的な変化を示し、3日目ですでにイデユコゴメの数は $7,860\text{cells}/\text{mm}^2$ になり、4日目には $11,230\text{cells}/\text{mm}^2$ になるが、その後コロニー形成が観察される19日頃までは増加せず、50日目には約2倍の $28,390\text{cells}/\text{mm}^2$ になり、70日目には約5倍の $51,610\text{cells}/\text{mm}^2$ になった (Fig. 8 A)。一方、大浦海水によりpH 2.7に調整した培養では、イデユコゴメは6日目では $3,360\text{cells}/\text{mm}^2$ になり、そのあと少し減少し、23日目では再びバクテリアとともに増加し、 $4,030\text{cells}/\text{mm}^2$ になる。その後、少しずつ増加し、67日後には $12,900\text{cells}/\text{mm}^2$ になり (Fig. 8 A)、培養液のpHの

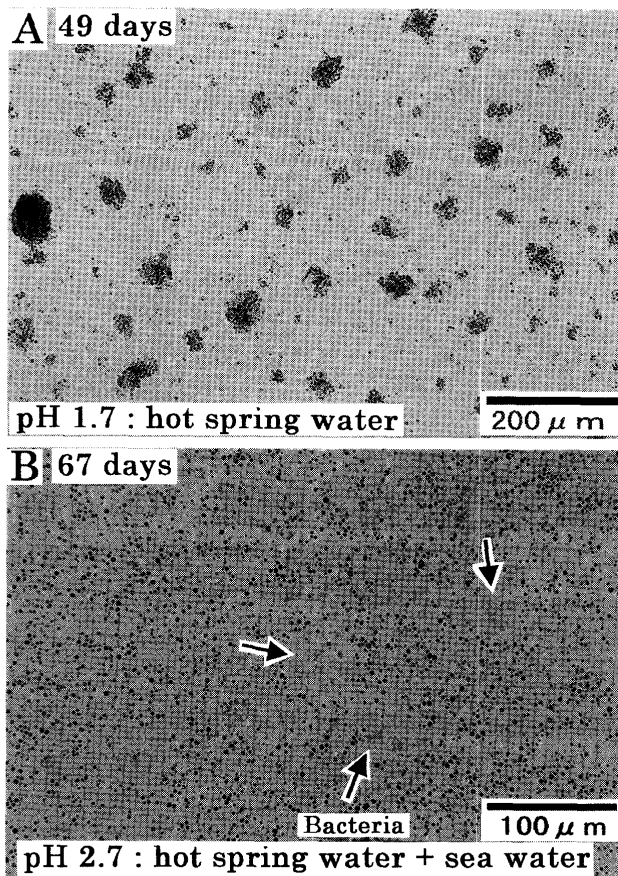


Fig. 7. Optical micrographs of *Cyanidium caldarium* cells cultivated in hot spring water (pH 1.7, 49 days) (A) and with a mixture of hot spring water and sea water (pH 2.7, 67 days) (B). A : The colonies of *C. caldarium* cells about 40 μ m in wide developed after 49 days aging. B : *C. caldarium* cells failed to form any colony even after 67 days aging, and bacterial colonies developed (arrows).

差や栄養塩の量によって細胞の数やコロニー生成に大きな変化が認められた。

自然培養実験による pH・Eh の経時変化において、東温泉水の場合は pH が 1.8-2.2 の間で推移するのに対し、大浦海水では pH 2.5-2.9 の間を推移し、大差は認められなかった (Fig. 8 B-1)。一方、Eh についても、両者ともそれぞれ 620-660 mV・540-580 mV と推移しており、大差は認められなかった (Fig. 8 B-2)。

考 察

1. イデユコゴメのコロニー形成に伴うシリカ鉱物の形態変化および結晶化過程

本研究によって、約 50 $^{\circ}$ C の強酸性温泉水に常に曝されている緑色バイオマットの表面に、低結晶質シリカやクリストバライトが生成していることが明らかになった。また、X線粉末回折・SEM 観察・エネルギー分散分析および自然培養実験の結果、イデユコゴメのコロニー形成に伴って、丸みを帯びていたコロニーは次第に角張り、それに伴って有機物および S・P・Al・Fe の元素は溶脱し、Si は非晶質シリカ、低結晶質シリカ、クリストバライトの構造へと変化していくこ

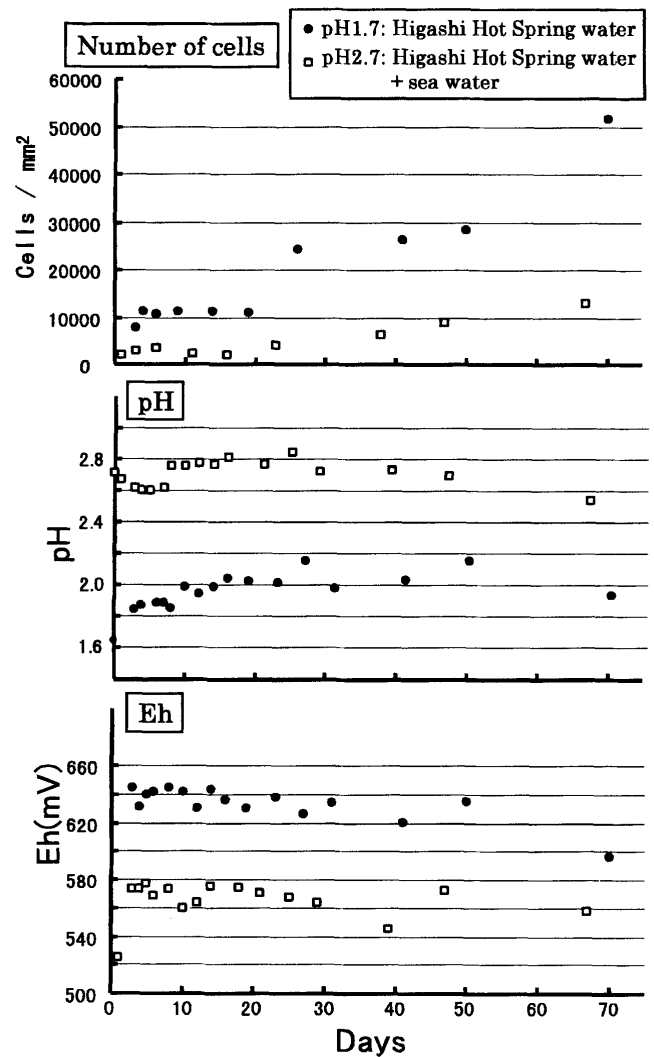


Fig. 8. Changes of the number of *Cyanidium caldarium* cells on the glass slides, pH and Eh of cultivated solutions for 70 days aging. Note that the growth rate of *C. caldarium* cells under pH 1.7 condition are faster than under pH 2.7.

とが示唆された。さらに、結晶性を増したコロニー (Fig. 4 D, E) に残存する少量の Al・S・K・Fe も、形態や構造変化に対して何らかの効果があることが示唆された。また、Ferris et al. (1988) の報告においても、バイオマット中のある種のバクテリアは、その表面に Fe を固定し、有機物の分解を遅らせて化石化しやすくする可能性がある指摘されている。

2. イデユコゴメのコロニー形成に伴うシリカの濃集

イデユコゴメによるシリカの濃集には、大きく 2 つの作用が考えられる。その一つは、細胞壁表面やバイオマット全体を被う膜状物質における生体鉱物化作用であり、もう一つは、細胞内の pH 調整機能である。イデユコゴメの細胞壁にシリカが容易に核形成および付着することは、以下の研究例からも示唆される。イデユコゴメの細胞壁には多量のタンパク質と少量の多糖類が含まれており (Bailey and Staehelin, 1968)、シリカの核形成を起こし易いサイトがあると考えられる。また、Renaut et al. (1998) の報告によれば、微生物

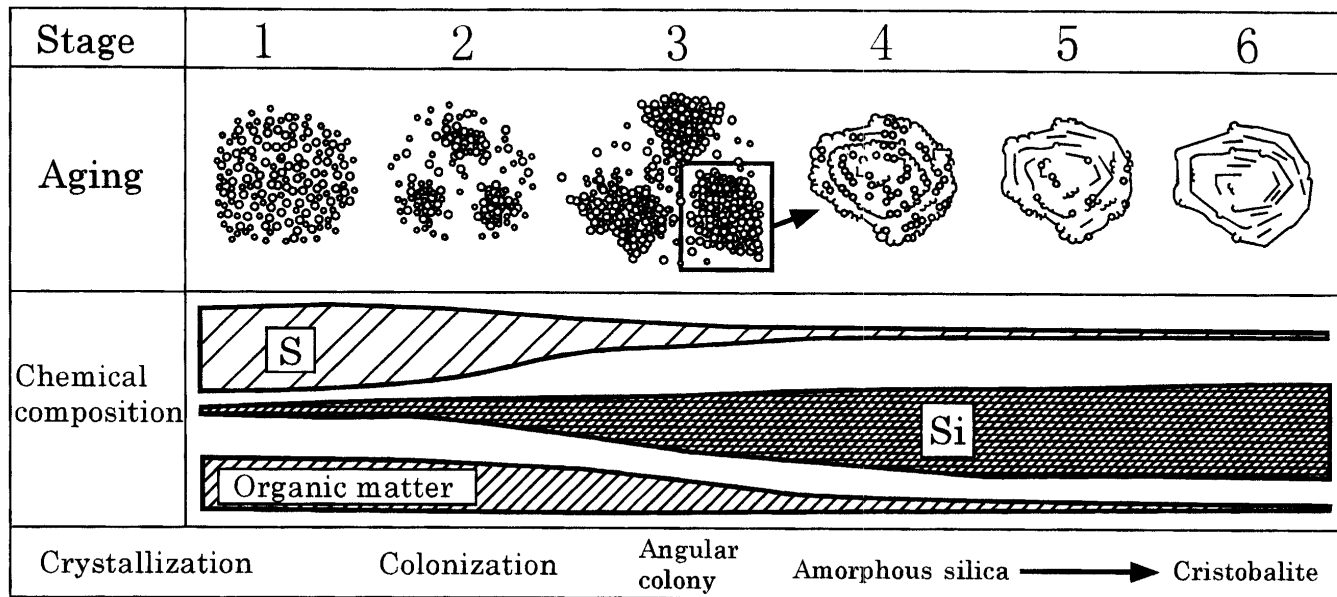


Fig. 9. A schematic diagram of biomineralization processes of silica minerals associated with colonization of *Cyanidium caldarium* cells. The morphological change of the colony depends on sulfur and silica concentrations. Crystallization of the colony changes from amorphous silica to cristobalite. Number is developing stage. S: sulfur, Si: silica minerals.

はその表面でシリカの核形成を起こしやすく、熱水からシリカが沈殿する時には優先的な場所になる。さらに、低温において、ケイ酸を含む水溶液中に、脂肪族多価アルコールを加えるだけで、通常4配位のケイ酸イオンが安定な5配位や6配位をとる有機物の複合体が容易にできることを Kinrade et al. (1999) は報告した。また、かれらは、この容易さはシリコン複合体のような物質が微生物の物質摂取や珪質堆積物の構造変化および続成作用に重要な役割を担っているという長く続いている仮説を支持していることを示した。

本研究における SEM 観察結果では、シリカの濃集がイデユコゴメのコロニー形成が発達していない部分には認められず、コロニー形成の部分に認められた (Fig. 4 B-E)。すなわち、同一のバイオマット上においても、微生物分布の相異によってシリカの濃集の仕組みが異なることを示唆している。このことは、細胞壁によるシリカの濃集だけでは説明できないことを示している。

次に、イデユコゴメの細胞内の pH 調整機能によって、シリカが析出する可能性について考察する。P-31 の核磁気共鳴法 (^{31}P -PNR) によって、イデユコゴメの内部 pH は外部の環境が強酸性であっても、 H^+ を細胞外に出して、常に細胞内を pH 6.8-7.0 に調整していることを、Enami et al. (1986) は証明した。この機能を有しているためにイデユコゴメは天然の強酸性下でも優先的に生息できると考えられている (今中・松沢, 1991)。この代謝機能のため、イデユコゴメはコロニーを作ることによって、周囲の環境に対して pH の変動を引き起こし、ミクロンレベルでシリカの溶解度を変化させて、その結果シリカが沈積すると考えられる。この作用は次の研究によっても支持される。単純な系におけるシリカの溶解度をみても、シリカは中性付近に比べてアルカリ性 (> pH 9) や酸性領域 (pH 1~3) の方がより多く溶ける

(Alexander et al., 1954; 樽谷, 1956; Tarutani, 1989)。また、酸性付近のコロイドシリカがケイ酸イオンを生じて平衡に達する速度はアルカリ性に比べて非常に遅い (樽谷, 1956; Iler, 1979; Tarutani, 1989)。

東温泉の Si の濃度 74 ppm (Table 1) は他の酸性温泉 (樽谷, 1963; Langmuir, 1997) と比較してみると、一概に過飽和あるいは不飽和になっているかどうか判断できない。しかし、この値は不飽和であったとしても上述の議論からイデユコゴメはコロニー形成によって、シリカを細胞壁に析出させるのに十分な値であると考えられる。

3. 自然培養実験から微生物生態系への展開

3-1. コロニー内部の透明化とシリカの結晶化

イデユコゴメのコロニーの内部は、透明あるいは薄い茶色を呈す (Fig. 2 A-1, 2)。また、自然培養実験で形成されたコロニーの一部が透明になる現象もみられる (Fig. 5 D)。このような部分は何らかの理由で代謝活性が失われ、クロロフィルが溶脱したと考えられる。その理由としては、光合成のための光量・二酸化炭素の不足、あるいは、呼吸のための酸素不足・栄養不足が考えられる。また、シリカの殻が厚くなりすぎたために、イデユコゴメの細胞が分裂できなくなったなどの理由が考えられる。Heim et al. (1994) は酸素が不足している個所は、Gfp (green fluorescent protein) の形成が発達し難くて、成長活性が低くなる個所であると報告している。しかし、Sternberg et al. (1999) は Gfp の形成に必要な酸素を測定して、大気圧の 1% 以下の濃度でさえも、その形成は阻害されないと述べている。また、Gfp 生理学的探査システムで、バクテリアのコロニーの中心付近において成長不活性状態は、その原因が酸素不足や個々のコロニーの大小ではなく、バクテリアの増殖と密集のための栄養源の枯渇で

あると、彼らは報告している。これらの報告を考慮すると、イデユコゴメのコロニーの発達により、コロニー内部の不活性化を生じて、細胞が溶けることでpHが局部的に高くなり、シリカの生体鉱物化作用がより促進されたと考えられる。これはアルカリ性領域の方がシリカの結晶化の反応が速いことによって支持される (Mizutani, 1970)。

3-2. pH調整した培養でのイデユコゴメコロニーの不形成

pH 2.7に調整した自然培養実験において、イデユコゴメは2か月を経過してもコロニーを形成せずに分散していたが、そのイデユコゴメの中に、約50 μ mのバクテリアのコロニーが所々に形成された (Fig. 7B, 矢印)。また、細胞増殖速度が東温泉水 (pH 1.7) をそのまま培養液にしたものに比べて遅かった (Fig. 8)。これは、pH調整に使用した海水成分では栄養不足が起り、特にシリカの不足、他の微生物との共生によって、イデユコゴメの成長速度が遅れて、コロニーを形成しなかったためと考えられる。硫酸還元バクテリアの増殖速度は、シリカ濃度に阻害されないと Birnbaum and Wireman (1985) は報告しているが、栄養源としてのシリカの濃度が減ったことも増殖速度が遅くなった原因の一つと考えられる。

Urrutia and Beveridge (1993) は細胞を化学処理して、pH 5.5の条件下ではバクテリア細胞壁を正に荷電させれば、酸性条件下でシリカを含む粒子が集積し易いことを実験的に示している。また、増殖速度が速いグラム陰性細菌はpH 2で微生物表面がわずかに正に帯電することを Marshall (1967) は示し、増殖が遅いものは、その表面にカルボキシル基しか含んでいないのに対し、増殖が早いものはアミノ基も含んでいることを示唆した。このことをイデユコゴメにあてはめると、pH 1.7で培養したものは細胞壁にアミノ基を含み、表面電荷が正に帯電しており、それによってコロニー形成やシリカの濃集および結晶化がpH 2.7のものより促進したと考えることもできる。

4. シリカの生体鉱物化作用と生物進化

本研究によって、Fig. 9に示すように、強酸性下における緑色バイオマット中で単細胞紅藻類イデユコゴメのコロニー形成に伴うシリカ鉱物の生成過程が明らかになった。緑色バイオマット中のコロニーを形成していない個所では、Sを主成分とする膜状物質に被われている (Fig. 9-1)。ここでは、コロニー形成の開始と同時に、シリカの濃度が高くなり (Fig. 9-2)、そのコロニーが大きくなるにつれて、丸みを帯びていたコロニーは次第に角張ってくる (Fig. 9-3)。そして、コロニーが合体して密度が高くなる所ができ、それが大きくなるに従って内部に埋もれた細胞は死滅し、クロロフィルを失って透明になる (Fig. 9-4)。また、死滅した所は結晶度を増し、それに伴って有機物およびP・S・Feの元素類は溶脱し、非晶質シリカは低結晶質となる (Fig. 9-5)。その後さらに、その形態は角張り、クリストバライトの結晶構造に変化していく (Fig. 9-6)。

このような微生物のコロニー形成とシリカの生体鉱物化作用に関する知見は、珪質堆積物の構造変化および続成作用を

考える上できわめて重要であり、先カンブリア紀におけるチャート中に保存されている初期生命体の起源や進化の解明および貧酸素古環境復元にも有益と考えられる。特に、本研究結果は細胞が活着しているときに、珪化に曝されている場合とシリカの枯渇に曝されている場合に関して有益な情報を与えた。

ま と め

本研究により、鹿児島県薩摩硫黄島の酸性温泉 (東温泉) における緑色バイオマット中で、単細胞紅藻類イデユコゴメ (*Cyanidium caldarium*) のコロニー形成に伴うシリカ鉱物の生成過程が検討された。緑色バイオマット中のイデユコゴメは、pH 2以下でコロニーを形成し、その密度が高くなるにつれて内部に埋もれた細胞は死滅し、クロロフィルを失って透明になる。また、そのコロニー形成の進行に伴い、硫黄や有機物の溶脱が起り、シリカが濃集して、そのシリカは非晶質からクリストバライトへと結晶化が進む。さらに、2種類の自然培養の比較実験から、pH・栄養源・シリカ濃度・細胞増殖速度・他の微生物との共生の相違によって、イデユコゴメのコロニー形成は大きく影響を受け、シリカの生体鉱物化作用に重要な役割を果たしていると考えられる。

謝 辞

日本原子力研究所の柳瀬信之博士にはICP-MS分析でお世話になった。また、本研究を行うにあたり、田崎研究室の院生・学生の皆様に調査・実験の協力および多くの助言をいただいた。以上の方々に厚く御礼申し上げる。なお、本研究の一部には文部省科学研究費補助金 (基盤B) (代表者、田崎和江) が使用された。

文 献

- 赤井くるみ・黒川勝己・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。
- Alexander, G. B., Heston, W. M. and Iler, R. K., 1954, The solubility of amorphous silica in water. *Jour. Phys. Chem.*, **58**, 453-455.
- Asada, R. and Tazaki, K., 1999, Biomineralization of silica under strong acidic condition. *Proceeding of the International Symposium Kanazawa, —Earth-Water-Humans—*, 209-216.
- Bailey, R. W. and Staehelin, L. A., 1968, The chemical composition of isolated cell walls of *Cyanidium caldarium*. *Jour. Gen. Microbiol.*, **54**, 269-276.
- Barghoorn, E. S. and Tyler, S. A., 1965, Microorganisms from the Gunflint Chert. *Science*, **147**, 563-577.
- Birnbaum, S. J. and Wireman, J. W., 1985, Sulfate-reducing bacteria and silica solubility: a possible mechanism for evaporite diagenesis and silica precipitation in banded iron formations. *Cand. Jour. Earth Sci.*, **22**, 1904-1909.
- Doemel, W. N. and Brock, T. D., 1971, The physiological ecology of *Cyanidium caldarium*. *Jour. Gen. Microbiol.*, **67**, 17-32.
- Enami, I., Akutsu, H. and Kyogoku, Y., 1986, Intracellular pH regulation in an acido-philic unicellular alga, *Cyanidium caldarium*: ³¹P-NMR determination of intracellular pH. *Plant Cell Physiol*, **27**, 1351-1359.
- Ferris, F. G., Beveridge, T. J. and Fyfe, W. S., 1986, Ion-silica crystallite nucleation by bacteria in geothermal sediment. *Nature*, **320**, 609-611.

- Ferris, F.G., Fyfe, W.S. and Beveridge, T.J., 1988, Metallic ion binding by *Bacillus subtilis*: Implications for the fossilization of microorganisms. *Geology*, **16**, 149-152.
- Francis, S., Margulis, L. and Barghoorn, E.S., 1978, On the experimental silicification of microorganisms, II. On the time of appearance of eukaryotic organisms in the fossil record. *Precamb. Res.*, **6**, 65-100.
- Fukuda, I., 1958, Physiological studies on a thermophilic blue green alga, *Cyanidium caldarium* Geitler. *Bot. Mag.*, **71**, 79-86.
- Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y., 1994, Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12501-12504.
- Hirose, H., 1950, Studies on a thermal alga, *Cyanidium caldarium*. *Bot. Mag.*, **63**, 107-111.
- Iler, R.K., 1979, *The chemistry of silica*. J. Wiley, New York, 866 p.
- 今中忠行・松沢 洋, 1991, 極限環境微生物ハンドブック. 監修 大島泰郎, サイエンスフォーラム, 東京, 467 p.
- 鎌田政明, 1964, 鹿児島県硫黄島の火山と地熱. 地熱, no. 3, 1-23 p.
- 鎌田政明・坂本隼雄・大西富雄, 1974, 硫黄島火山(鹿児島県)の地球化学的研究(1), 東温泉の泉温, 湧出量, 化学組成およびその変化. 温泉工学誌, **9**, 117-124.
- Kinrade, S.D., Del Nin, J.W., Schach, A.S., Sloan, T.A., Willson, K.L. and Knight, C.T.G., 1999, Stable five- and six-coordinated silicate anions in aqueous solution. *Science*, **285**, 1542-1545.
- Konhauser, K.O. and Ferris, F.G., 1996, Diversity of iron and silica precipitation by microbial mats in hydrothermal waters, Iceland: Implications for Precambrian iron formations. *Geology*, **24**, 323-326.
- Langmuir, D., 1997, Silica in natural waters. In Langmuir, D., ed. *Aqueous environmental geochemistry*, New Jersey, 245-248.
- Lowenstam, H.A., 1981, Minerals forms formed by organisms. *Science*, **211**, 1126-1131.
- Mann, S., 1983, Mineralization in biological systems. *Structure and Bonding*, **54**, 125-174.
- Marshall, K.C., 1967, Electrophoretic properties of fast- and slow-growing species of *Rhizobium*. *Aust. J. Biol. Sci.*, **20**, 429-438.
- Mizutani, S., 1970, Silica minerals in the early stage of diagenesis. *Sedimentology*, **15**, 419-436.
- Møller, S., Sternberg, C., Anderson, J.B., Christensen, B.B. and Molin, S., 1998, In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 721-732.
- Oehler, J.H., 1976 a, Hydrothermal crystallization of silica gel. *Bull. Geol. Soc. Amer.*, **87**, 1143-1152.
- Oehler, J.H., 1976 b, Experimental studies in Precambrian paleontology: structural and chemical changes in blue-green algae during simulated fossilization in synthetic chert. *Bull. Geol. Soc. Amer.*, **68**, 117-129.
- Oehler, J.H. and Schopf, J.W., 1971, Artificial microfossils: experimental studies of permineralization of blue-green algae in silica. *Science*, **174**, 1229-1231.
- 小野晃司・曾屋龍典・細野武男, 1982, 薩摩硫黄島地域の地質. 地域地質研究報告(5万分の1地質図幅), 地質調査所, 80 p.
- Renaut, R.W., Jones, B. and Tiercelin, J.J., 1998, Rapid in situ silicification of microbes at Loburu hot springs, Lake Bogoria, Kenya Rift Valley. *Sedimentology*, **45**, 1083-1103.
- Schopf, J.W. and Packer, B.M., 1987, Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science*, **237**, 70-73.
- Schopf, J.W., 1993, Microfossils of the Early Archean Apex Chert: new evidence for the antiquity of life. *Science*, **260**, 640-646.
- Schultze-Lam, S., Ferris, F.G., Konhauser, K.O. and Wiese, R.G., 1995, In situ silicification of an Icelandic hot spring microbial mat: implications for microfossil formation. *Canad. Jour. Earth Sci.*, **32**, 2021-2026.
- Shikaura, H., Tawara, K. and Tazaki, K., 1999, Microbes living in hot springs at the beach of Satsuma-Iwo Jima Island, southern Kyusyu, Japan. Proceeding of the International Symposium Kanazawa, —Earth-Water-Humans—, 209-216.
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen T., Nielsen, A.T., Andersen, J.B., Givskov, M. and Molin, S., 1999, Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4108-4117.
- 樽谷俊和, 1956, 水中におけるケイ酸に関する研究(第2報)ケイ酸コロイドの生成と平衡値について. 日本化学誌, **77**, 1721-1727.
- 樽谷俊和, 1963, 日本の鉱泉のケイ酸含有量について. 温泉科学, **14**, 93-99.
- Tarutani, T., 1989, Polymerization of silica acid; A review. *Anal. Sci.*, **5**, 245-252.
- Tazaki, K., 1999, Microorganisms design the Earth history. Proceeding of the International Symposium Kanazawa, —Earth-Water-Humans—, 187-196.
- Tazaki, K., Aoki, A., Asada, R., Kishigami, Y., Matsumoto, K., Ohno, M., Sakurayama, K., Shikaura, H., Tawara, K., Ueshima, M., Watanabe, H. and Yamamura, T., 1998, A new world in the science of biomineralization. —Environmental biomineralization in microbial mats in Japan—. Ed. Tazaki K., *Sci. Rep. Kanazawa Univ.*, 65 p.
- 田崎和江・松本和也・赤井純治・青木 歩・朝田隆二・加藤裕将・大野源広・四ヶ浦弘・俵 健二・上島雅人・渡辺弘明・山本啓之, 1997, バイオマット—身近な微生物がつくる生体鉱物—. 編集 田崎和江, 金沢大学, 91 p.
- 田代陽子・田崎和江, 1999, 水酸化鉄を主成分とするバイオマットの初期形成について. 地球科学, **53**, 29-37.
- 地質調査所, 1976, 全国地熱基礎調査報告書. no. 30, 南西諸島, 90 p.
- Urrutia, M.M. and Beveridge, T.J., 1993, Mechanism of silicate binding to the bacterial cell wall in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **175**, 1936-1945.
- Walter, M.R., Bauld, J. and Brock, T.D., 1972, Siliceous algal and bacterial stromatolites in hot spring and geyser effluents of Yellowstone National Park. *Science*, **178**, 402-405.
- Walsh, M., 1992, Microfossils and possible microfossils from the Early Archean Onverwacht Group, Barberton Mountain Land, South Africa. *Precamb. Res.*, **54**, 271-293.
- Westall, F., Boni, L. and Guerzoni, E., 1995, The experimental silicification of microorganisms. *Palaeontology*, **38**, 495-528.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D., Caldwell, S.J. and Caldwell, D.E., 1994, Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 434-446.
- 安多 剛・加藤裕将・田崎和江, 2000, 微生物にコントロールされる方解石の結晶成長. 地質雑, **106**, 548-559.

(要 旨)

朝田隆二・田崎和江, 2000, 酸性温泉中の単細胞藻イデユコゴメのコロニー形成に伴うシリカの生体鉱物化作用. 地質雑, 106, 597-608. (Asada, R. and Tazaki, K., 2000, Biomineralization of silica associated with colonization of an unicellular alga, *Cyanidium caldarium*, in an acidic hot spring. *Jour. Geol. Soc. Japan*, 106, 597-608.)

本研究により, 鹿児島県薩摩硫黄島の酸性温泉(東温泉)における緑色バイオマット中で, 単細胞紅藻類イデユコゴメ (*Cyanidium caldarium*) のコロニー形成に伴うシリカ鉱物の生成過程が検討された. 緑色バイオマット中のイデユコゴメは, pH 2 以下でコロニー形成を行い, その密度が高くなるにつれて内部に埋もれた細胞は死滅し, クロロフィルを失って透明になる. また, そのコロニー形成の進行に伴い, 硫黄や有機物の溶脱が起こり, シリカが濃集されて, そのシリカは非晶質からクリストバライトへと結晶化が進む. さらに, 2種類の自然培養の比較実験から, pH・栄養源・シリカ濃度・細胞増殖速度・他の微生物との共生の相違によって, イデユコゴメのコロニー形成は大きく影響を受け, シリカの生体鉱物化作用に重要な役割を果たしていると考えられる.