

# ホスファターゼ活性測定による海底熱水系地下生物圏の探査

## Search for Subsurface Biosphere of Submarine Hydrothermal Systems by Using Phosphatase Activities

# 伊藤 有希[1]; 師井 茂倫[2]; 枝澤 野衣[3]; 小林 憲正[3]; 高野 淑識[4]; 丸茂 克美[5]; 浦辺 徹郎[6]  
# Yuki Ito[1]; Arimichi Moroi[2]; Yae Edazawa[3]; Kensei Kobayashi[3]; Yoshinori Takano[4]; Katsumi Marumo[5]; Tetsuro Urabe[6]

[1] 横浜国大・院工・機能発現工学; [2] 横国大・工・物質工; [3] 横浜国大院工; [4] 産総研地質; [5] 産総研・地調; [6] 東大理系大学院 地球惑星科学

[1] Dept of Chem and bio, Yokohama Univ; [2] Fac. Eng., Yokohama Natl. Univ.; [3] Dept. Chem. Biotech., Yokohama Natl. Univ.; [4] AIST Central 7, MRE; [5] AIST, GSJ; [6] Earth and Planetary Science, Univ. of Tokyo,

<http://www.bsk.ynu.ac.jp/~kobayashi-lab/index.html>

【緒言】生命は高温高压などの過酷な環境にも適応し、これまで生存しえないと考えられていたような高層大気、温泉、地下深部などからも微生物の生存が報告されている。深海底の熱水噴出孔は、生命の誕生した場所とも考えられており、その地下を掘削し始源的微生物を探しだそうとする「アーキアンパーク計画」により岩石圏・生物圏の相互作用が調査されている。従来、微生物検出は培養法などによって行われてきた。しかし培養条件のわからない未知生命の検出法はまだ確立されてはいない。ホスファターゼはリン酸エステルを加水分解する酵素であり、地球生物にとって不可欠である。またホスファターゼは一般に環境中での安定性が高く、海水・陸水・土壌中などで存在する事が知られている。そこで本研究では南部マリアナ海底熱水系で採取したコア試料およびチムニー試料中のホスファターゼ活性を測定することにより、海底熱水系という極限環境での微生物活動の検出を試みた。

【実験】 < 試料 > : アーキアンパーク計画の一環として、伊豆小笠原水曜海山と南部マリアナ海底熱水系で採取したコア試料およびチムニー試料を用いた。

< 吸光光度法によるホスファターゼ活性の測定 > : 粉碎したコア試料・チムニー試料に基質溶液 (0.5 mM p-ニトロフェニルリン酸の修飾ユニバーサル緩衝液 (MUB) 溶液) を加え、酵素による加水分解生成物として得られる p-ニトロフェノールの単位時間当たりの生成量を吸光光度法 (波長 410 nm) で定量し、酵素活性値を求めた。活性値に及ぼす反応温度の影響についても調べた。また、鉱物由来のバックグラウンド値の検討も行った。

< 蛍光光度法によるホスファターゼ活性の測定 > : より高感度な活性測定のため、4-メチルウンベリフェニルリン酸のトリス塩酸緩衝液を基質とした活性測定 (生成物: 4-メチルウンベリフェロンを蛍光光度法により定量) を試みた。

< 岩石試料からの酵素の抽出 > : 試験管にそれぞれのサンプルを 0.1g ずつ入れ、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) または MUB 緩衝液 (pH 8.0) を加え、室温にて 180 r.p.m. で 2 時間攪拌した。その後親水性 PTFE メンブレンフィルター (孔径 0.2  $\mu$ m) で濾過し、抽出サンプルとした。抽出試料はゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量推定を行った。分子量スタンダードには蛋白質スタンダードを用いた。

【結果】吸光光度法による測定により、水曜海山では熱水系地下深部各所に生物由来と考えられる酵素活性が認められたのに対し、マリアナ背弧拡大軸の熱水深部では、沈殿物を含む表層部にのみ鉱物由来バックグラウンド値 (過酸化水素で有機物を分解したモンモリロナイトの有する活性) 以上の活性が見られた。これは、水曜海山では、地下に熱水の流路があり、熱水により運ばれてきた物質に依存した地下生物圏が存在するのに対し、マリアナでは、岩盤の透水性が低く、生物圏を維持する物質の供給が少ないためと解釈できる。

一方、南部マリアナ海底熱水系のチムニー試料では外側部位において他の部位よりも大きいホスファターゼ活性が検出されたのに対し、熱水にさらされた内側の試料では、ほとんど活性が認められなかった。ゲル濾過クロマトグラフィーで外側部位から抽出された酵素活性種の分子量を測定したところ、30000~6000 であり、活性がタンパク質などの高分子有機物に由来することが強く示唆された。これらの分子量は既知のホスファターゼの分子量よりも小さいが、その原因は不明である。チムニー中の有機物、微生物および酵素活性の分布の解析から、チムニーの生成機構に関する重要な情報が得られることが期待される。

本結果と他の研究者らによる微生物・有機物解析結果とはよい相関を示しており、ホスファターゼ活性が微生物活動の指標として利用可能であることが強く示唆された。

しかし、より生物活動の低い試料の測定や、試料中ホスファターゼのキャラクタリゼーションのためには、活性測定法の高感度化及び試料の濃縮法の検討が必要である。