

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05332

研究課題名(和文) 光合成とメタン生成のリンケージ：機能特異分子補酵素F430分析という新手法の展開

研究課題名(英文) Linkages between photosynthesis and methanogenesis: application of function specific compound analysis of coenzyme F430

研究代表者

金子 雅紀 (Kaneko, Masanori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：80633239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では申請者が開発したメタン生成補酵素F430の高感度分析法を環境中のメタン生成菌および嫌氣的メタン酸化菌の分布やメタン生成・消費ポテンシャルを推定するためのバイオマーカーツールとして応用するため、バイオマーカー分子としての確立および、海底堆積物、バクテリアマット、表層海水等の環境試料への応用を行った。それにより、世界で初めてメタン生成補酵素F430の海洋堆積物中の分布、環境中の嫌氣的メタン酸化アーキア由来補酵素F430の炭素同位体組成、海水柱における補酵素F430の分布と海洋メタンパラドックスへの寄与など、世界中の誰一人として見たことのない新たな知見を創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究において確立し、その有効性を実証した補酵素F430というバイオマーカーツールは、直接観測が不可能な地下深部のメタン生成および酸化プロセスの分布とポテンシャルを定量できる現在唯一の手法であり、それによりエネルギー資源や、地球温暖化ガスであるメタンの成因解明が飛躍的に高まると期待できる。また、地下深部における生命圏の広がりに関する調査・研究において今後も重要なツールとして応用されると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In previous study, we have developed the high sensitive analysis of methanogenic coenzyme F430. In this study, we further developed methanogenic coenzyme F430 as a biomarker tool to understand distributions of methanogens and anaerobic methane oxidizing archaea and their metabolic potentials, and applied it into marine sediments, bacterial mats, and water columns. All our produced data including coenzyme F430 distribution in deep marine sediments and sea water columns and carbon isotopic compositions of F430 from uncultivable anaerobic methane oxidizing archaea provided new insights of deep biosphere and their nature. Our results received internationally high evaluations.

研究分野：有機地球化学

キーワード：メタン生成アーキア 補酵素F430 嫌氣的メタン酸化アーキア 海洋メタンパラドックス メタン動態 安定同位体比

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタンは地球温暖化やエネルギー資源に直結するため、その動態を定量的に明らかにすることは、人類社会の持続的発展に極めて重要な問題である。大局的に見れば、海洋環境のメタンの動態は光合成-海洋メタンパラドックス間の「短距離リンケージ」と光合成-暗黒生態系間の「長距離リンケージ」およびその間の「嫌氣的メタン酸化」により構成される。

このメタン生成と酸化にはメタン生成アーキア(メタン菌)と嫌氣的メタン酸化アーキア(メタン酸化菌)が大きく関与している。つまり、海洋環境におけるメタン循環を解明するには、これらの微生物の分布や活性を定量的に明らかにすることが肝要である。しかし、特に堆積物深部においては、1) 低いバイオマスと活性、2) 直接的な観測、観察といった手法が利用不可能、3) 現場活性を反映するプロキシ(代理指標)がない、という問題から、どこに、どれくらいこれらの微生物が存在するのかについて定量的な議論が全く進んでいない。

この問題を解決するために、研究代表者はメタン生成および酸化の鍵となる補酵素 F430 の超高感度分析法の開発と原位置のメタン菌・メタン酸化菌の分布と活性のバイオマーカー分子としての応用を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が開発した補酵素 F430 分析法を環境試料に広く応用するために、F430 をバイオマーカーツールとして確立させること、また、それを海洋表層水や海洋堆積物試料に応用し、補酵素 F430 の水平・垂直分布および同位体組成を定量的に明らかにすることにより、メタン菌およびメタン酸化菌の分布や活性について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 補酵素 F430 の分解実験を様々な温度、pH 条件で行い、その速度論を定量的に明らかにする。またその実験結果から、天然環境の任意の温度における補酵素 F430 の無機的分解速度を見積もる手法を開発する。

(2) 補酵素 F430 分析法を海底掘削堆積物に応用し、海底下の F430 とメタン菌の分布を明らかにする。堆積物は CK06-06 航海および国際深海科学掘削計画の第 337 次航海において下北半島沖で採取された掘削試料を用いる。

(3) 黒海の高海面に形成されているメタン酸化アーキアが優先するバクテリアマットを用いて補酵素 F430 の安定炭素同位体組成を明らかにする。それにより補酵素 F430 の安定同位体比分析により、補酵素 F430 の起源識別が可能かどうかを検討する。試料には R/V Meteor cruise M72/1 で採取されたバクテリアマット試料を用いる。

(4) 海洋表層水柱における補酵素 F430 存在の可否および分布を明らかにすることにより、海洋メタンパラドックスにおけるメタン生成菌寄与を明らかにする。試料には海洋地球研究船「みらい」により MR14-04 に北太平洋の東西測線で採取された水深 500m までの海水試料をフィルター過により捕集した粒子状有機物を用いる。

4. 研究成果

(1) 補酵素 F430 の分解実験

補酵素 F430 を嫌気環境にて pH 5, pH 7, pH 9 および 60, 34, 15, 4°C の温度にて分解実験を行った結果、補酵素 F430 のエピ化が図 1 に示すように見かけ上の一次反応で進行した。この分解曲線をもとに各 pH、温度条件における反応速度定数 (k) を算出し、反応温度との相関関係を明らかにした(図 2)。反応速度定数と反応温度の間には強い相関関係があり、pH との相関は不明瞭であるが、アルカリあるいは酸性条件でエピ化反応が促進される結果を示した。また反応速度定数と反応温度の間の回帰曲線を外挿し、海底面に相当する 2 °C での補酵素 F430 のエピ化による半減期を計算すると 304 日と推定された。

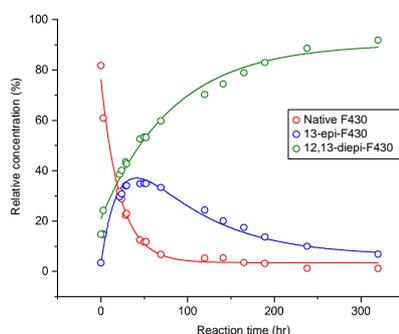


図 1. 60 °C、pH5 における補酵素 F430 の分解曲線。

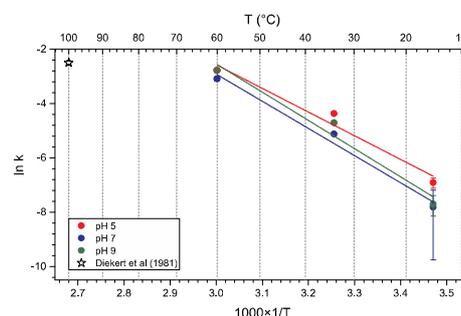


図 2. 補酵素 F430 エピ化反応のアレニウスプロット。

補酵素 F430 の分解経路において、エピ化は還元的な堆積物環境における主要な分解経路であり、エピ化による補酵素 F430 の分解速度は最も温度低い海底面で 300 日程度、堆積物深部に相当する 60 °C では 11 時間であった。これらの時間は地質年代スケールおよび原位置の微生物代謝速度からすると極めて早いことから、補酵素 F430 は環境中に残存せず、生きたメタン菌および酸化菌のバイオマーカー分子として応用可能であることを示した。

(2) 下北半島沖の補酵素 F430 の深度分布

下北半島沖 Site C9001 (=IODP Site C0020) 地点における補酵素 F430 の深度分布を明らかにした結果、堆積物コア中に 0.17-530 fmol/g の範囲で補酵素 F430 が存在しており、堆積物深度とともに濃度が減少していく傾向にあった(図 3)。また、堆積物下 70 m 付近において補酵素 F430 濃度が増大しており、メタン生成菌のバイオマスおよびメタン生成ポテンシャルが増大していることを示唆した。海底下 2000 m 以深の石炭層からも微量ではあるが補酵素 F430 が検出され、大深度および現場温度 60 °C においてもメタン生成活動が存在することを示した。本結果は化学掘削史上最深の深さにおいて、メタン生成アーキアの存在を証明し、国際的に高い評価を得た。

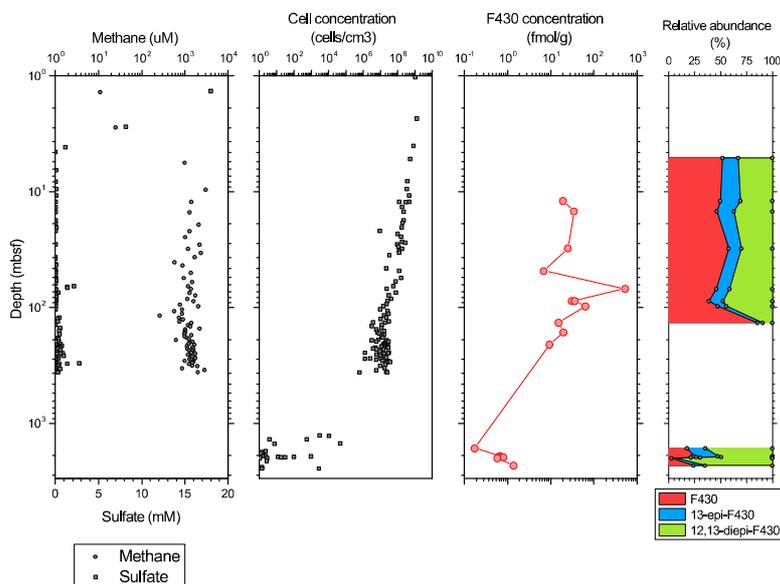


図 1. Site C9001 における各種深度分布。左からメタンおよび硫酸塩濃度、全菌数、補酵素 F430 濃度、F430 およびそのエピ化体の比率。

(3) 黒海バクテリアマット中の嫌氣的メタン酸化アーキア由来補酵素 F430 の安定炭素同位体比

通常の補酵素 F430 抽出プロトコルおよび高速液体クロマトグラフィーによる単離・精製では夾雑物を全て取り除くことができず、そのままでは補酵素 F430 の同位体比を分析することができない。そこで、前処理により得られた補酵素 F430 メチルエステル画分に対し、シリカゲルクロマトグラフィーによる夾雑物除去法を開発した。開発した精製法を黒海の未培養な嫌氣的メタン酸化アーキアが優先するバクテリアマット試料に応用し、世界に先駆けて嫌氣的メタン酸化アーキア由来の補酵素 F430 の安定炭素同位体比を明らかにした(図 4)。バクテリアマット中の ANME-1 が優先する部位の補酵素 F430 は約 -60‰ を示し、ANME-2 が優先する部位では -75‰ を示した。両者の同位体比の差はバルクおよび膜脂質のそれと調和的であり、メタン由来の炭素により補酵素 F430 が構成されていること、両アーキアの生物生理がよく反映されていることが明らかになった。また、この結果により、安定同位体分析により理論上は補酵素 F430 の起源生物の同定が可能であることを示した。

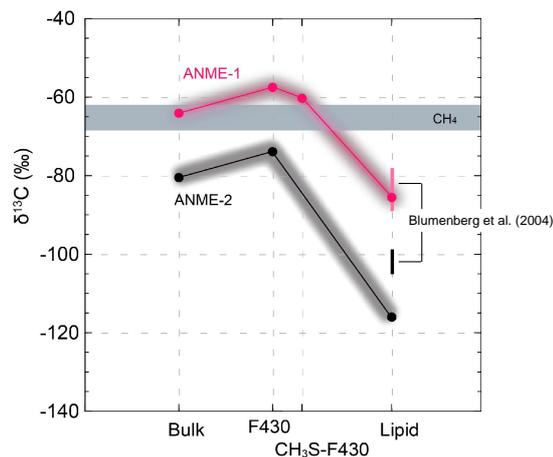


図 2. 黒海バクテリアマットおよび抽出された補酵素 F430 および膜脂質の炭素同位体組成。

(4) 北太平洋表層海水中的補酵素 F430 の分布およびメタンの起源について

北緯 47 度の北太平洋測線上にある station54 および station91 地点の水深 500 m までのメタ

ン濃度、メタン炭素同位体比、クロロフィル濃度、補酵素 F430 濃度の鉛直分布を明らかにした。メタン海洋表層の水深 100m 程度のところで最大となり、表層でメタン生成が起きていることが確認された。一方、補酵素 F430 は全ての深度から検出され、その濃度は数 fmol-90 fmol/L 程度で分布していた(図 5)。しかしながら補酵素 F430 濃度増加はメタンのそれとは対応しておらず、むしろ 100m 以深の亜表層で増加する傾向を示した。亜表層における補酵素 F430 濃度の増加はメタン濃度の減少および炭素同位体比増加と対応しており、補酵素 F430 およびその起源生物はメタン生成よりもむしろメタン酸化に寄与していることが示唆された。本結果は長年の謎である「海洋メタンパラドックス」におけるメタンの起源に重要な知見を与える。

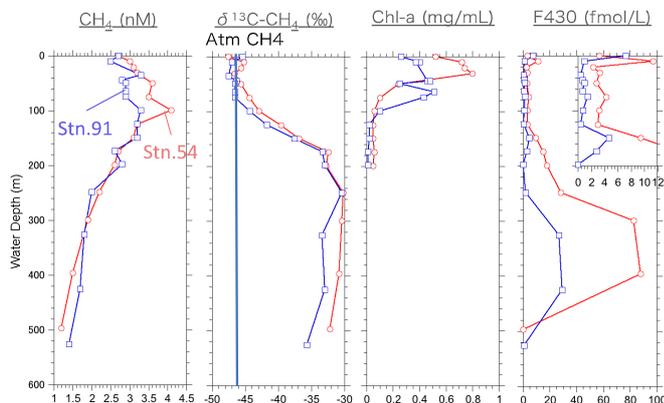


図 3. MR14-04 航海における Station 54、91 の水柱における各種化学プロファイル。左から、メタン濃度、メタンの炭素同位体比、クロロフィル-a 濃度、歩行嚙 F430 濃度。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Hamada, Y., Hirose, T., Ijiri, A., Yamada, Y., Sanada, Y., Saito, Y., Sakurai, N., Sugihara, T., Yokoyama, T., Hoshino, T., Kamiya, N., Bowden, S., Cramm, M., Henkel, S., Homola, K., Imachi, H., Kaneko, M., Lagostina, L., Manners, H., McClelland, H.-L., Metcalfe, K., Okutsu, N., Pan, D., Raudsepp, M. J., Sauvage, J., Schubotz, F., Spivack, A., Tonai, S., Treude, T., Tsang, M.-Y., Viehweger, B., Wang, D. T., Whitaker, E., Yamamoto, Y., Yang, K., Kinoshita, M., Maeda, L., Kubo, Y., Morono, Y., Inagaki, F., Heuer, V. B. (2018) In-situ mechanical weakness of subducting sediments beneath a plate boundary décollement in the Nankai Trough. *Progress in Earth and Planetary Science*, 50. 査読有
DOI:10.1186/s40645-018-0228-z

Takano, Y., Chikaraishi, Y., Imachi, Y., Miyairi, Y., Ogawa, N.O., Kaneko, M., Yokoyama, Y., Krüger, M., Ohkouchi, N. (2018) Insight into anaerobic methanotrophy from $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - amino acids and $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ANME cells in sea floor microbial ecology. *Scientific Reports*, 8. 査読有
DOI:10.1038/s41598-018-31004-5

Kaneko, M., Takano, Y., Ogawa, N.O., Sato, Y., Yoshida, Y., Ohkouchi, N. (2016) Estimation of methanogenesis by quantification of coenzyme F430 in marine sediments. *Geochemical Journal*, 50, 455-460. 査読有
Doi:10.2343/geochemj.2.0410

Inagaki, F., Hinrichs, K.-U., Kubo, Y., Bowles, M.W., Heuer, V.B., Hong, W.-L., Hoshino, T., Ijiri, A., Imachi, H., Ito, M., Kaneko, M., Lever, M.A., Lin, Y.-S., Methé, B.A., Morita, S., Morono, Y., Tanikawa, W., Bihan, B., Bowden, S.A., Elvert, M., Glombitza, C., Gross, D., Harrington, G.J., Hori, T., Li, K., Limmer, D., Liu, C.-H., Murayama, M., Ohkouchi, N., Ono, S., Park, Y.-S., Phillips, S.C., Prieto-Mollar, X., Purkey, M., Riedinger, N., Sanada, Y., Sauvage, J., Snyder, G., Susilawati, R., Takano, Y., Tasumi, E., Terada, T., Tomaru, H., Trembath-Reichert, E., Wang, D.T. and Yamada, Y. (2015) Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science*, 349, 420-424. 査読有
DOI: 10.1126/science.aaa6882

金子雅紀 (2015) 堆積物中のアーキア膜脂質同位体分析のメタン生成場への応用. *Researches in Organic Geochemistry*, 31, 1-14. 査読有
http://www.ogeochem.jp/pdf/ROG_BN/vol31/v31_pp1_14.pdf

[学会発表](計 9 件)

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Fumio Inagaki, Kai-Uwe Hinrichs and Naohiko Ohkouchi. Analysis of coenzyme F430 as a function-specific biomarker for estimation of methanogenesis and anaerobic methane oxidation, IMOG2015, Sep.17, 2015, Prague, Czech.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa and Naohiko Ohkouchi. Carbon

isotopic composition of coenzyme F430 from anaerobic methane oxidizing archaea, Goldschmidt2015, Aug.18, 2015, Prague, Czech.

Masanori Kaneko, Susumu Sakata. Application of coenzyme F430 analysis to environmental samples, International workshop of Organic Geochemistry, Jul. 7, 2016, Osaka, Japan.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Susumu Sakata, Naohiko Ohkouchi. Coenzyme F430: a novel biomarker for methane cycle, ASLO2017, Feb. 27, 2017, Honolulu, USA.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Naohiko Ohkouchi, Susumu Sakata. Does intact coenzyme F430 accumulate?: implication for its use as proxies for methane production and consumption, 28th International Meeting on Organic Geochemistry, Sep. 17, 2017, Florence, Italy.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Naohiko Ohkouchi. Coenzyme F430 as a biomarker for methanogenesis and anoxic methane oxidation. Japan Geoscience Union Meeting 2016, May 22, 2016, Chiba, Japan.

Konomi Suda, Gilbert Alexis, Nobuhiro Ueda, Takuya Saito, Tomohiko Sato, Yusuke Sawaki, Keita Yamada, Naohiro Yoshida, Yuichiro, Ueno, Yohei Matsui, Ryosuke Nakai, Hideyuki Tamaki, Masanori Kaneko, Hiroshi Takahashi, Noritoshi, Morikawa. Geochemical study for serpentinite-hosted hyperalkaline hot spring in Hakuba Happo, Japan, Japan Geoscience Union Meeting 2018. May 21, 2018, Chiba, Japan.

金子雅紀、高野淑識、大河内直彦トリプル四重極 LC-MS を用いた補酵素 F430 の高感度分析法, 第 64 回質量分析総合討論会、2016 年 5 月 19 日、大阪府。

金子雅紀、松井洋平、川口慎介、吉川ちさと、吉田磨、布浦拓郎、大河内直彦、北太平洋表層海水中的メタンの起源について、日本地球化学会第 65 回年会、2018 年 9 月 1 1 日、沖縄県。

〔その他〕

ホームページ等

海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野

<http://www.jamstec.go.jp/biogeochem/index.html>

産業技術総合研究所・地圏微生物研究グループ

<https://unit.aist.go.jp/georesenv/geomicrob/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：高野 淑識

ローマ字氏名：(TAKAN0, Yoshinori)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大河内 直彦

ローマ字氏名：(OHKOUCHI, Naohiko)

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：マーティン・クルーガー

ローマ字氏名：(KRÜGER, Martin)

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：井町 寛之

ローマ字氏名：(IMACHI, Hiroyuki)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：布浦 拓郎

ローマ字氏名：(NUNOURA, Takuro)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：横川 太一

ローマ字氏名：(YOKOKAWA, Taichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。