

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：27101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18808

研究課題名(和文)生命エネルギー獲得の未解決反応から探る太古代のメタン・鉄循環

研究課題名(英文) Novelty of microbial energy gain and ancient biogeochemical cycles of methane and iron.

研究代表者

柳川 勝紀 (Yanagawa, Katsunori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：50599678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：嫌氣的メタン酸化は海水環境での重要なメタンシンクとして研究が進められてきた。本研究では淡水環境での嫌氣的メタン酸化による物質循環の解明を目的として、生物地球化学的研究を進めた。間隙水中の硝酸塩や硫酸塩は極めて微量であるが、メタンと鉄は高濃度で含まれている湧水域近傍の湖沼堆積物を研究対象とした。標的反応を担う微生物の多い堆積物深度数cmでは、嫌氣的メタン酸化活性も顕著であった。本研究により、水酸化鉄の供給が顕著な表層堆積物では、嫌氣的メタン酸化アーキアによる鉄依存的なメタンサイクルが活発であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌氣的環境下で発生したメタンの多くは微生物の働きによって大気に放出されることなく分解される。この反応は特に海洋環境でのメタン放出を抑制する生物学的機構として重要であるが、淡水環境においても同様のプロセスがあることが近年分り始めている。この反応が卓越することが期待される自然環境として溶存鉄とメタンが豊富な湧水堆積物に着目したところ、水酸化鉄の供給が盛んな堆積物表層においてこの反応を担う微生物のシグナルが顕著に検出された。本研究は、鉄の酸化・還元に関与した形でメタン循環も活発に進行することを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：Methane is an important greenhouse gas on Earth. Anaerobic oxidation of methane (AOM) in freshwater setting is mediated by archaeal methanotrophs called with AAA group. In this study, we focused on AOM coupled to iron (hydr)oxides reduction (Fe-AOM) and explored iron-rich freshwater pond to understand methane fluctuations associated with the physical and chemical condition. At the study site, high concentration of dissolved ferrous iron leads to ferrihydrite precipitation. Methane was increased with depth while nitrate and sulfate were below the detection limit throughout the sediment column. Radiotracer-based experiments showed potential rates of Fe-AOM. Functional and 16S rRNA gene analyses showed that the highest numbers of AAA population were present at surface sediment. These results suggest that iron-dependent methane oxidation by AAA group is enhanced due to abundant supply of iron oxide from the freshwater surface sediments.

研究分野：地球微生物学

キーワード：メタン 酸化鉄 嫌氣的メタン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嫌氣的メタン酸化は、海水環境のみならず淡水環境でも重要なメタンシンクであり、嫌気環境中で発生したメタンの大気への放出を抑制する機構として考えられている。海水環境では嫌氣的メタン酸化を担う嫌氣的メタン酸化アーキアである ANME-1~3 のサブグループと共生する硫酸還元菌について多くの報告があり、分布、ゲノム、形態、代謝、反応、共生機構などの研究が盛んに展開されてきた。一方、淡水環境では ANME も検出されているが、AAA (AOM-associated archaea) というアーキアの寄与が大きいと考えられている。海水環境での嫌氣的メタン酸化では電子受容体として硫酸塩が利用されるが、淡水環境では、硝酸塩、硫酸塩、鉄(III)、マンガン(IV)といった多様な電子受容体が候補になると考えられている。しかし、その多くが集積培養系からの考察に基づくものであり、自然環境中で実際に寄与する電子受容体の役割や嫌氣的メタン酸化を担う系統群に関する知見は少ない。淡水での嫌氣的メタン酸化を行うアーキアの生物学的解明やその物質循環への寄与に関する理解が進めば、全球的なメタンサイクルの統合的理解が進む。さらに淡水での嫌氣的メタン酸化の中で、三価の鉄を電子受容体とした反応は、初期生命が誕生した時点からシアノバクテリアによって酸素が大量にもたらされた 25 億年前までメタン循環を考える上で重要と考えられていることから、この反応に影響を与える因子の解明は地球史の理解に通ずるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メタンの嫌気分解の中で近年注目されている「酸化鉄依存的メタン酸化」の反応機構と、その反応を担う生命の実態解明にある。研究対象となる化学反応は、メタンと酸化鉄がそれぞれ電子供与体、受容体として利用されるものであり、 $\text{CH}_4 + 8 \text{Fe}(\text{OH})_3 + 15 \text{H}^+ \rightarrow \text{HCO}_3^- + 8 \text{Fe}^{2+} + 21 \text{H}_2\text{O}$ で表される反応である。この反応は太古代におけるメタンの挙動を理解する上で重要な反応として位置づけられている。しかしながら、反応に関与する微生物、特に嫌氣的メタン酸化アーキアの系統とその反応機構の詳細については解明されていない。本研究では、地球化学的手法を駆使し、鉄依存的メタン酸化が卓越する自然環境での微生物学的同定から実施する。メタンの濃度や同位体といった地球化学的情報は、ガスの起源や生物学的関与を探る上で極めて重要な指標である。また熱力学計算も実施し、この反応が進行することが望ましい環境の選定を行う。そして、候補地の生息微生物を対象に生命地球科学的解析を実施することで、この反応に関連する微生物の分布、群集構造、機能の特定を図る。それらの研究を通して、淡水性堆積環境におけるメタンの生成と分解に至る一連の微生物活動の流れを整理し、鉄依存的メタン酸化という未知のメタンシンクの長期スケールでの役割についての理解を目指して研究を実施した。

3. 研究の方法

試料採取

標的反応が卓越する理想的な研究調査地を決定するために、堆積物試料を複数箇所から採取した。メタンと酸化鉄が共生し、かつ酸素、硝酸塩、硫酸塩が乏しい環境であることが標的反応の進行する上で好ましいことを考慮して、この条件に合致する複数の候補地において、研究試料を取得した。深度方向のプロファイルが分かるよう、取得した堆積物コア試料は数 cm ごとの複数深度でサブサンプリングを実施し、その後の解析のために適宜保管をした。

研究調査地の絞り込み

酸素、硫酸塩、硝酸塩、マンガン、鉄といった電子受容体候補となる化学物質の濃度を測定した。また、メタンは ^{13}C に乏しい炭素同位体組成を示すため、溶存無機炭素の炭素同位体比を測定することで、メタンの酸化の痕跡を探った。取得試料の間隙水、溶存ガス、鉍物の化学分析、ギブス自由エネルギー計算による熱力学的予測をおこない、候補地の絞り込みを実施した。

微生物数の定量

堆積物中の全微生物数は、直接計数法を採用することで、堆積物 1cm^3 あたりの微生物細胞数を求めた。また、試料から原核生物 DNA を抽出し、特異的プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を対象としたリアルタイム定量 PCR 解析も実施した。嫌氣的メタン酸化反応の鍵酵素遺伝子である *mcrA* についても同様の解析を実施し、標的微生物の存在量と環境条件との呼応関係について探った。

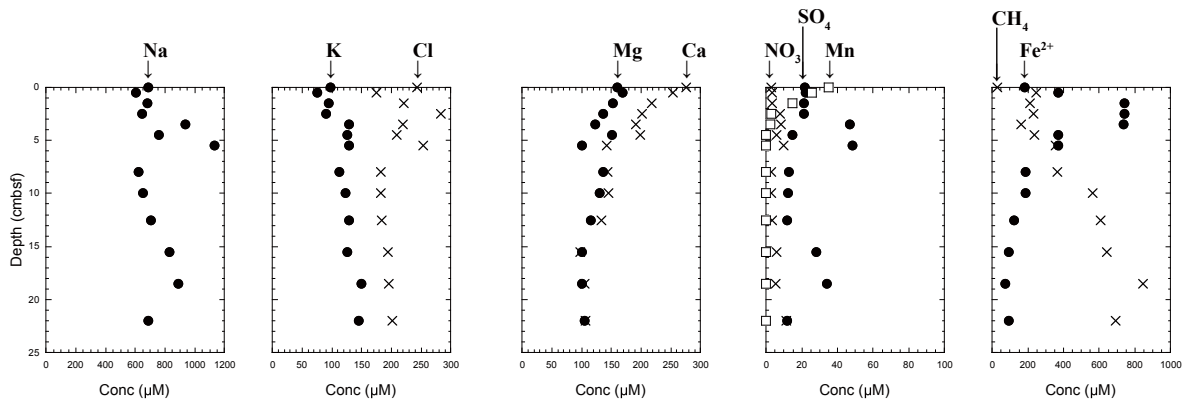


図 1. 間隙水化学分析

微生物群集構造解析

生息する微生物の群集組成を決定するために、各深度における原核生物由来 16S rRNA 遺伝子を抽出し、次世代シーケンスによるアンプリコン解析を実施した。そして、メタン生成アーキア、嫌氣的メタン酸化アーキア、鉄還元菌、鉄酸化菌などのメタンと鉄の循環に関与する微生物系統群の分布を調査した。

嫌氣的メタン酸化活性

AOM の進行を直接的に証明するために、放射性同位体標識トレーサーを用いた超高感度活性測定法を実施した。この方法では、 ^{14}C -メタンを放射性同位体ラベルトレーサーとして添加し、一週間のインキュベーション後、トレーサーの分解産物である ^{14}C 標識された二酸化炭素をガスクロマトグラフで分離し、高感度放射能検出器で定量的に評価した。

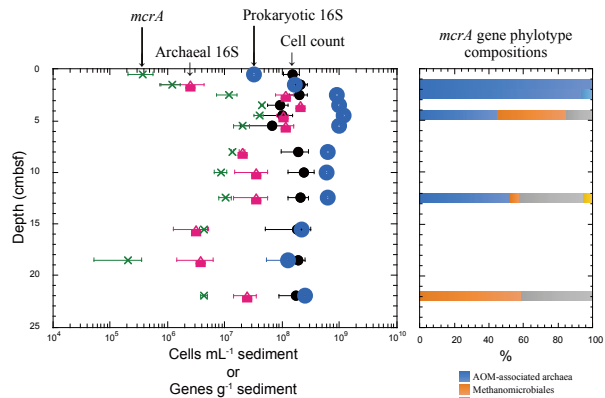


図 2. 微生物計数と定量 PCR

4. 研究成果

酸化鉄を利用したメタン酸化をおこなう微生物反応、すなわち嫌氣的メタン酸化反応と鉄還元反応の共役反応が期待される研究調査地の絞り込みをおこなったところ、取得した複数の試料のうち、広島県に存在する湧水は特徴的な物理化学的条件を形成していた。この環境では還元的地下水に含まれる高濃度の二価鉄が供給されており、採取した堆積物の最表層では溶存していた二価鉄が酸化され、水酸化鉄の絨毯様構造が形成されており、その水酸化鉄は堆積物深部にまで分布していた。

また、深部堆積物の嫌気環境では微生物起源と推定されるメタンも高濃度で存在していた。

そして、本研究で検証を目指すメタン酸化-鉄還元反応が熱力学的に好ましい環境、すなわち水酸化鉄とメタンの共存する領域は数十 cm に渡って広がっていた。さらに、溶存酸素、硝酸塩、硫酸塩はほとんど検出されなかった(図 1)。すなわち、深部堆積物から供給されるメタンを分解するためには、水酸化鉄に頼らざるを得ない環境であり、本研究に最適な試料であった。メタ

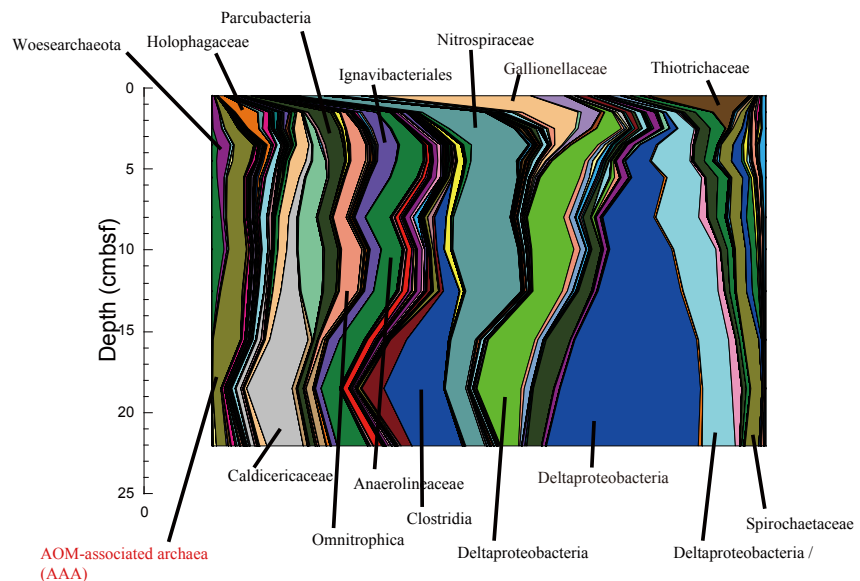


図 3. 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析

ン酸化一鉄還元反応の進行を裏付ける状況証拠として、表層で沈殿した水酸化鉄の一部は、堆積物中において続成作用を受け、深部では菱鉄鉱に変化していた。この菱鉄鉱は微生物による鉄還元反応により生じた二価鉄とメタン酸化反応で生じた二酸化炭素から生成・沈殿した可能性が想定される。

蛍光顕微鏡下で微生物計数を実施したところ、分子生態学的解析に十分な微生物バイオマスが存在することが確認された(図2)。特に、堆積物表層で微生物数が極大値を示しており、水酸化鉄が活発に生成されている深度と一致していた。しかしながら、堆積物全深度において、嫌氣的メタン酸化アーキアに特有の微生物凝集体は観察されなかった。次に、試料から原核生物由来DNAを抽出し、分子生態学的解析を実施した。リボソームを構成する16S rRNA遺伝子を対象としたリアルタイム定量PCRの結果では、アーキア由来遺伝子数は原核生物由来遺伝子の15%相当になることが判明した。さらに、次世代シーケンサーを用いた16S rRNA遺伝子アンプリコン解析で、微生物群集組成を詳細に分析した。その結果、嫌氣的メタン酸化能を有することが期待される *Methanoperedens nitroreducens* に近縁なアーキアが全群集の10%ほど存在し、堆積物深部にまで分布していることが明らかとなった(図3)。

さらに、嫌氣的メタン酸化反応の鍵酵素遺伝子 *mcrA* に特異的プライマーを用いたPCRを行い、分子系統も調べた。その結果、堆積物表層では *M. nitroreducens* に相同性の高い配列が検出され、深部では *Methanosaricanales* などのメタン生成アーキア由来の遺伝子も検出された(図2)。さらに、リアルタイム定量PCR法で定量的な分布を調べたところ、堆積物表層3-4cmで *Methanoperedens* 様遺伝子が極大を示すことが明らかとなった。16S rRNA遺伝子アンプリコン解析でも同じ深度で *Methanoperedens* に近縁な系統が検出されていることも整合的であった。また、AOM活性実験でもこの深度で明瞭な活性として $0.9 \text{ pmol/cm}^3/\text{day}$ もの反応が示された(図4)。*Methanoperedens nitroreducens* は硝酸依存的メタン酸化をすることがこれまでに報告されているが、本調査地では硝酸塩、硫酸塩は低い濃度でしか検出されていない。大量に存在しているのは水酸化鉄のみであることから、それらは鉄(III)を利用したメタン酸化を行っているかと推測される。

以上の結果から、以下のプロセスが進行することが考察された(図5)。(1) 表層では還元的な地下水より供給された二価鉄が鉄酸化細菌による酸化を受け、水酸化鉄の絨毯様構造を形成する。(2) 深層ではメタン生成アーキアがメタンを供給する。(3) 水酸化鉄とメタンが共存する環境、特に新鮮な水酸化鉄がもたらされる深度3-4cmにおいて、嫌氣的メタン酸化とそれに依存的な鉄(III)の還元が進行する。以上、メタンと鉄を媒介とした微生物駆動物質循環が進行していることが本研究により提示された。なお、表層で沈殿した水酸化鉄の一部は、堆積物中での続成作用を受け、深部の嫌氣的環境では菱鉄鉱に変化していた。これは鉄依存的メタン酸化反応で供給された二価鉄と二酸化炭素から沈殿したものかもしれない。菱鉄鉱は現在のような酸化的大気のもとではゲーサイトに容易に酸化されるものであるが、太古代には広く分布していたと考えられている。さらに、菱鉄鉱は光化学的反応を介して水素を発生させていた可能性も至適されていることも興味深い。以上、本研究では湖沼堆積物における鉄依存的メタン酸化反応を評価し、これまで見逃されていた微生物生態、系統、物質代謝についての総合的な理解を深めることができた。特に、太古代からのメタン、鉄、さらに間接的には水素の物質循環の観点からも興味深い対象であることを認識できた点は大きな科学的成果であったと考えている。

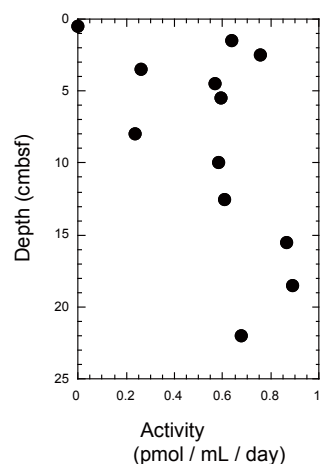


図 4. 嫌氣的メタン酸化活性

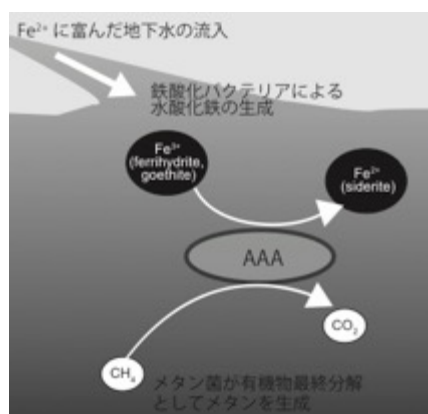


図 5. 間隙水化学分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ino Kohei, HERNSDORF Alex W, Konno Uta, Kouduka Mariko, Yanagawa Katsunori, Kato Shingo, Sunamura Michinari, Hirota Akinari, Togo Yoko S, Ito Kazumasa, Fukuda Akari, Iwatsuki Teruki, Mizuno Takashi, Komatsu Daisuke D, Tsunogai Urumu, Ishimura Toyoho, Amano Yuki, Thomas Brian C, Banfield Jillian F, Suzuki Yohey	4. 巻 12
2. 論文標題 Ecological and genomic profiling of anaerobic methane-oxidizing archaea in a deep granitic environment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 31～47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ismej.2017.140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kano Akihiro, Miyahara Reina, Yanagawa Katsunori, Mori Taiki, Owari Satoko, Tomaru Hitoshi, Kakizaki Yoshihiro, Snyder Glen, Shimono Takaya, Kakuwa Yoshihiro, Matsumoto Ryo	4. 巻 470
2. 論文標題 Gas hydrate estimates in muddy sediments from the oxygen isotope of water fraction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Geology	6. 最初と最後の頁 107～115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemgeo.2017.08.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yanagawa Katsunori, Shiraishi Fumito, Tanigawa Yusuke, Maeda Toshinari, Mustapha Nurul Asyifah, Owari Satoko, Tomaru Hitoshi, Matsumoto Ryo, Kano Akihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Endolithic Microbial Habitats Hosted in Carbonate Nodules Currently Forming within Sediment at a High Methane Flux Site in the Sea of Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geosciences	6. 最初と最後の頁 463～463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/geosciences9110463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sun Meng, Liu Bing, Yanagawa Katsunori, Ha Nguyen Thi, Goel Rajeev, Terashima Mitsuharu, Yasui Hidenari	4. 巻 179
2. 論文標題 Effects of low pH conditions on decay of methanogenic biomass	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 115883～115883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.watres.2020.115883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakai Sanae, Takaki Yoshihiro, Miyazaki Masayuki, Ogawara Miyuki, Yanagawa Katsunori, Miyazaki Junichi, Takai Ken	4. 巻 69
2. 論文標題 Methanofervidicoccus abyssi gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from a hydrothermal vent chimney in the Mid-Cayman Spreading Center, the Caribbean Sea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柳川勝紀
2. 発表標題 メタンを喰らう 暗黒地下圏微生物の生き様
3. 学会等名 第7回広島大学・海洋研究開発機構合同シンポジウム 生命地球科学の最前線 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳川 勝紀, 菊池 早希子, 白石 史人, 狩野 彰宏
2. 発表標題 鉄に富む淡水堆積物中での嫌氣的メタン酸化
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanagawa, K., Kikuchi, S., Shiraishi, F., & Kano, A.
2. 発表標題 Iron-Mediated Anaerobic Oxidation of Methane in Freshwater Ferruginous Sediments.
3. 学会等名 AGU Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----