

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04261

研究課題名(和文)機能特異分子で描く新しいメタン生成観

研究課題名(英文)A new view of methanogenesis with a function-specific biomarker

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究では、海洋堆積物表層から基盤岩までのメタン菌の分布を明らかにし、その分布を支配する環境要因を明らかにすること、補酵素F430の未知機能解明と未知メタン菌の結びつきを証明すること、を目的として研究を行った。
成果としては、下北半島沖の堆積物下2.5kmまでの補酵素F430の分布と非生物的な分解速度を明らかにし、海底下のメタン菌の分布を初めて定量的に明らかにするとともに、遺伝子による推測よりもメタン菌バイオマスが1-2桁多いことを示し、未知メタン菌の存在可能性を示した。また補酵素F430の未知機能について明らかにし、メタン菌の進化についての新しい知見についても創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は「メタン菌はどこに、どれくらいいるのか」という長年の学術的問いに対し、初めて定量的にメタン菌の分布を明らかにした。また、そこから未知メタン菌の存在の可能性について示した。
補酵素F430の未知機能について明らかにし、触媒としての可能性と、未知機能を持ったメタン菌の探索に資する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this research were 1) to clarify the distribution of methanogens from the surface of marine sediments to basement rocks and to identify environmental factors controlling their distribution, and 2) to prove the link between the unknown function of coenzyme F430 and the unknown methanogens.

The distribution and kinetics of non-biological degradation of coenzyme F430 up to 2.5 km below the sediment off the Shimokita Peninsula were clarified, and the distribution of methanogens in the deep marine sediment was quantitatively clarified for the first time. The methanogenic biomass was 1-2 orders of magnitude higher than estimation based on genome analysis, indicating the possible presence of unknown methanogens. We also clarified the unknown function of coenzyme F430, and generated new insights into the evolution of methanogens.

研究分野：有機地球化学

キーワード：メタン菌 補酵素F430 メチルコエンザイムM還元酵素 海底堆積物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタン (CH_4) は二酸化炭素 (CO_2) の 20 倍以上の温室効果ガスであると同時に、メタンハイドレートや、天然ガスの主成分でもある。つまり、メタンは地球温暖化やエネルギー資源に直結する物質であり、メタンの循環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課題である。地球上で最も大きなメタンの濃集場は海洋であり、その中でも最大のメタン生成・消費場は堆積物中である。堆積物深部では、海洋表層の光合成を起源とする有機物の分解によりメタンが生成され、 10^{13} トンものメタンがメタンハイドレートとして蓄積している。

このメタンの生成にはメタン生成アーキア (メタン菌) 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、メタン菌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。一方、地球生命科学分野においては「生命の存在限界およびそれを支配する環境要因」を明らかにすることが大きな科学目標になっている。熱力学的視点では、メタン生成は堆積物中での主要な代謝経路となること、メタン菌が低温から超高温 (数 -122) 下で増殖可能であることを考慮すると、メタン菌のバイオマスや活性分布を定量的に明らかにすることは、「生命全体の存在限界」を議論する上で必要不可欠な課題である。

しかし、堆積物深部においては、バイオマスと活性低い、直接的な観測、観察といった手法が利用不可能、未知メタン菌にも対応可能な定量的検出ツールがない、という問題から、堆積物下数 m~数千 m において「どこに、どれくらいメタン菌が存在するのか」という極めて基本的な問題について定量的な議論が全く進んでこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、海洋堆積物表層から基盤岩までのメタン菌の分布を明らかにし、その分布を支配する環境要因を明らかにすること、補酵素 F430 の未知機能解明と未知メタン菌の結びつきを証明すること、である。また、それにより「どこに、どれくらいメタン菌が存在するのか?」という長年明らかにできなかった学問的問いに解を出すものである。

3. 研究の方法

(1) 室戸沖高熱流量地質体におけるメタン菌の分布とそれを支配する環境要因の解明

室戸沖にて IODP 第 370 次航海で科学掘削が行われた地点 (SiteC0023) は地熱勾配が高く、本航海で掘削に成功した基盤岩の温度は 130 以上となり、生命の増殖限界温度 (122) を超える。本航海では「生命の生息可能領域と限界を規定する環境要因を解明する」ことが科学目標として掲げられており、国際連携のもと、生命活動を規定しうる地質構造、栄養塩濃度、有機物熟成、微生物解析などの各種パラメーターが創出される。また、過去の隣接地点での掘削調査の結果、微生物的メタン生成が起こっていることが示唆されている。本研究では堆積物表層から基盤岩までの補酵素 F430 の深度分布を明らかにし、メタン生成バイオマスが増大する領域とメタン生成の限界領域における物理・化学パラメーター等を比較することで、そのメタン生成を支配する環境要因を解明する。

(2) 補酵素 F430 のアルキル基還元触媒としての未知機能解明

メタン菌の大量培養により、mg スケールの F430 を精製する。F430 を還元剤にて活性化し、触媒として作用できる基質の多様性 (アルキル鎖の長さ、結合種、3 次元構造) とその限界 (立体障害、溶解度、結合エネルギー等) を明らかにする。具体的には、生体内で基質となっている $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ の他、チオメチル化合物、ハロゲン化メタン、メトキシ化合物を基質に用いたメタン化実験を行う。また、それぞれのメチル基を各種アルキル基に置換した化合物を基質に用いて炭化水素化を行う。生じた炭化水素は GC および GC-MS を用いて同定・定量を行う。

(3) 補酵素 F430 の未知機能を起点とした未知メタン菌の発見

通常のメタゲノム解析により環境中のメタン菌存在の有無および多様性を調査する場合、「紛う事なきメタン菌」を検出するために既存のメタン菌ゲノム情報からメタン生成代謝に関わる幾重ものフィルターをかける。本研究では、環境試料だけでなく、世界中のビッグデータを活用し、メタン生成代謝にもっとも重要な補酵素 F430 生合成に関するゲノム情報を中心とした最低限のアノテーションを用いることで、これまで検出されなかった未知メタン菌を探索し、補酵素 F430 のホストとなる MCR 様タンパク質の 3 次元構造を復元する。その中から、補酵素 F430 の未知機能を発揮しうるホストタンパク質と未知メタン菌の有無および多様性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 室戸沖高熱流量地質体におけるメタン菌の分布とそれを支配する環境要因の解明

IODP にて採取された室戸沖の掘削堆積物コアを用いて、海底下 1200m までの補酵素 F430 の

分布を明らかにした。その結果、室戸沖の掘削地点 (Site0023) における補酵素 F430 の存在量は、極めて少ないことが分かった。これはメタン菌バイオマスが極めて少ないことを意味する。研究航海の共同研究者らが行った、遺伝子解析や培養実験でもバイオマスが少ないこと、メタン菌の増殖が見られないことが分かっており本研究結果と調和的である。一方、下北半島沖の堆積物を用いて、以下の様な研究を行った。メチルコエンザイム M 還元酵素 (MCR) の補欠基であるコエンザイム F430 は、メタン代謝における重要な化合物である。我々は、メタン生成の機能特異的バイオマーカーとして、硫酸還元帯以下で採取した海底堆積物に補酵素 F430 を適用し、メタン生成菌の分布と活性を調査した。また、本研究で用いた掘削堆積物の原位置条件をカバーする様々な温度 (4, 15, 34, 60) と pH (5, 7, 9) 条件において、細胞死後の分解過程の第一段階である補酵素 F430 のエピ化の速度論を明らかにした。分解実験の結果、エピ化の速度論は熱力学的法則によく従うことがわかり、補酵素 F430 の半減期は原位置温度の上昇に伴い 304 日から 11 時間へと減少していることがわかった。このことは、堆積物から検出された F430 が生きたメタン菌に由来するものであることを示している。補酵素 F430 の分析および分解実験から、下北半島の海底堆積物から検出された F430 の原型 (ネイティブ) は生きたメタン菌の細胞に由来し、細胞内での分解から保護されているが、細胞死後すぐに消失することが分かった。原位置での F430 濃度と培養可能なメタン菌の F430 含有量から算出したメタン菌のバイオマスは、堆積深度 2.5km まで 2 桁減少し、海底下約 70m で最大値を示したが、全原核細胞量に占めるメタン菌の割合は深度とともに増加し、従来の予想より 1~2 桁高くなった。この結果は、従来の手法では検出できなかったメタン菌の存在を示すものである。この成果は JACS Au 誌より発表をした。

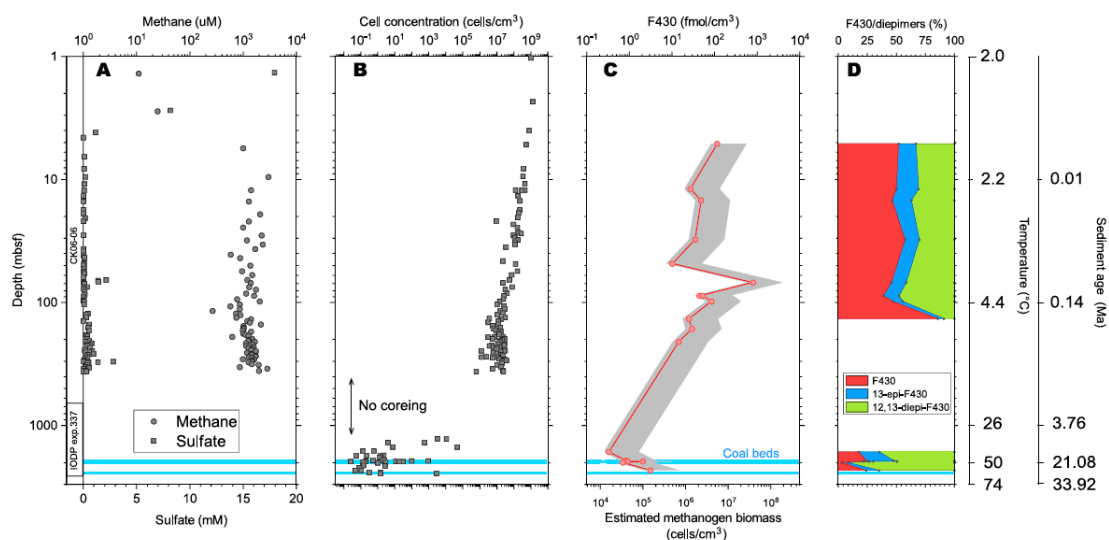


図 1. 補酵素 F430 の濃度およびエピマーの相対的存在量と他の生物地球化学データとの比較。メタンと硫酸の濃度 (A) と原核生物の細胞数 (B)。F430 の濃度とメタン生成物質の推定バイオマス。灰色の影は、培養可能なメタン生成菌の細胞内の F430 の含有量が最大と最小の場合のバイオマスの可能な範囲である。ネイティブ F430 とそのエピマーの相対的な存在量 (D)。水色の棒は石炭層を示す。

(2) 補酵素 F430 のアルキル基還元触媒としての未知機能解明

メタン菌の大量培養により精製した補酵素 F430 を用い、還元剤および電気化学的手法を用いて活性化を行い、様々な炭素基質と反応させた。その結果、生体内基質である $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ だけでなく、ジメチルスルフィド、ヨウ化メタン、メトキシ安息香酸からメタン及びエチレンが生成した。また、 $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ の代わりに、炭素数 $\text{C}_2\text{-C}_4$ のアルキル S-CoM を基質として用いた結果、アルキル鎖の炭素長に対応するアルカン、アルケンガスが生じた。この結果は、補酵素 F430 が $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ だけでなく、多様なチオアルキル化合物、ハロゲン化アルキル化合物、アルコキシ化合物と反応できる未知機能を持つことを示唆する。堆積物中の微生物のメタン菌を含め未培養のものが多く、それらの性状の多くは謎に包まれている。性状未知なメタン菌の中には補酵素 F430 の未知機能を実際に利用しているアルキル代謝菌が存在している可能性がある。この成果は現在特許出願中である。

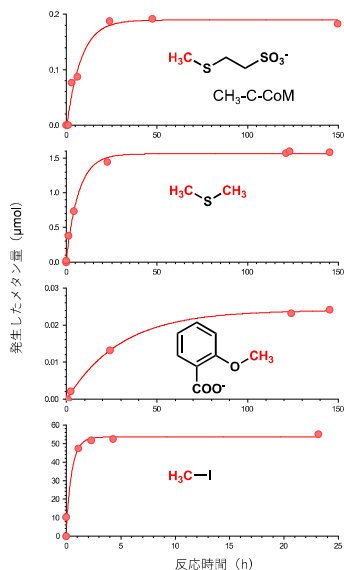


図 2. 様々なメチル化合物に対する化学的に活性化した補酵素 F430 の触媒反応結果。

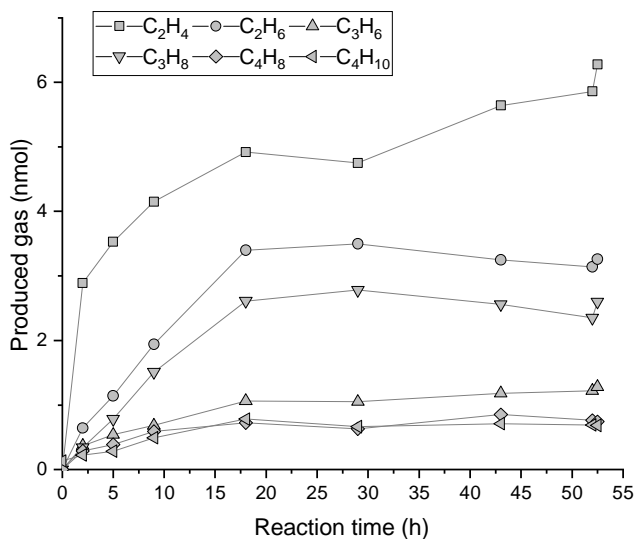


図 3. アルキル (C₂-C₄) -S-CoM を基質として、電気化学的に活性化した補酵素 F430 の触媒反応結果。

(3) 補酵素 F430 の未知機能を起点とした未知メタン菌の発見

補酵素の未知機能に直結するメタン菌として、原油成分である長鎖アルカンを直接メタンへ変換する第 5 メタン生成経路を国内の油田より発見した。詳細は現在研究中である。また、遺伝子データベースより、補酵素 F430 の生合成系にフォーカスを絞り、未知メタン菌の探索を行ったが、検出は今のところできていない、代わりに、補酵素 F430 の生合成系からメタン菌の進化に関する以下の様な新知見を得た。

メタン生成の発生時期、祖先の形態、同族代謝との関係については、それぞれ異なる説が存在する。本研究では、メタン生成の古さを示す新たな証拠となる、補酵素の生合成に関与する異化関連タンパク質の系統樹を調査した。主要な異化作用に関与するタンパク質の系統を再検討した結果、最後の古細菌共通祖先 (LACA) は、H₂-、CO₂-、メタノールを利用する汎用性の高いメタン生成を行うことができることが示唆された。メチル/アルキル-S-CoM 還元酵素ファミリーの系統解析に基づき、現在のパラダイムとは異なり、基質特異的な機能は、非特異的な祖先に遡る並行進化によって出現し、補酵素 F430 を用いた自己触媒実験から予測されるように、タンパク質を含まない反応に由来すると考えられることを提案した。LACA の後、が石炭養メタン生成を中心とした継承/損失/革新は、古代のライフスタイルの分岐と一致し、それは現存する古細菌のゲノムのに予測される生理学に明確に反映されている。このように、メタン生成は古細菌の特徴的な代謝であるばかりでなく、祖先古細菌がとった謎めいたライフスタイルと、今日著名な生理学に至る移行を解決する鍵である。この成果は、PNAS Nexus 誌より発表した。

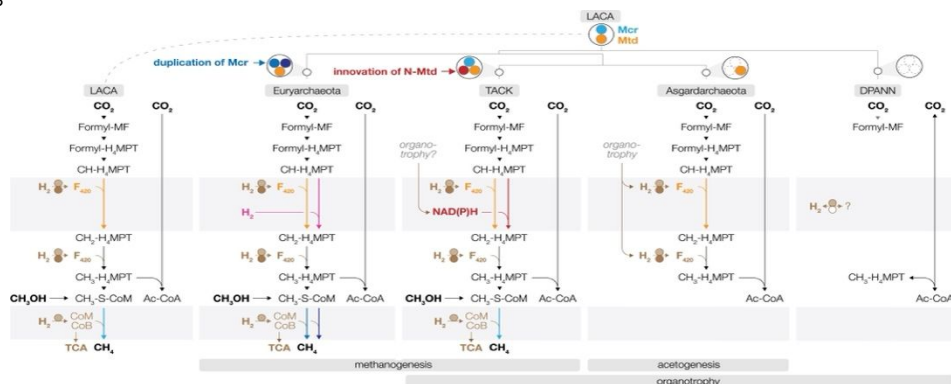


図 4. LACA における WLP とメタン生成の有無から推測される祖先の生理とライフスタイル、および各主要古細菌系統の最後の共通祖先。特定の酵素の存在は、異なる色で強調されている。水色は LACA 類似 Mcr、濃紺は Euryarchaeota の重複 Mcr、薄茶は [NiFe] hydrogenase maturation complex、濃茶は F420-H₂ reductase。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kaneko Masanori, Takano Yoshinori, Kamo Masashi, Morimoto Kazuya, Nunoura Takuro, Ohkouchi Naohiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Insights into the Methanogenic Population and Potential in Subsurface Marine Sediments Based on Coenzyme F430 as a Function-Specific Biomarker	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 1743 ~ 1751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.1c00307	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 Katayama Taiki, Yoshioka Hideyoshi, Kaneko Masanori, Amo Miki, Fujii Tetsuya, Takahashi Hiroshi A., Yoshida Satoshi, Sakata Susumu	4. 巻 16
2. 論文標題 Cultivation and biogeochemical analyses reveal insights into methanogenesis in deep subseafloor sediment at a biogenic gas hydrate site	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 1464 ~ 1472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-021-01175-7	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 Urai Atsushi, Matsushita Makoto, Park Ho-Dong, Imachi Hiroyuki, Ogawara Miyuki, Iwata Hiroki, Kaneko Masanori, Ogawa Nanako O., Ohkouchi Naohiko, Takano Yoshinori	4. 巻 8
2. 論文標題 Detection of planktonic coenzyme factor 430 in a freshwater lake: small-scale analysis for probing archaeal methanogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Progress in Earth and Planetary Science	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40645-021-00450-7	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 Suda Konomi, Ikarashi Masayuki, Tamaki Hideyuki, Tamazawa Satoshi, Sakata Susumu, Haruo Maeda, Kamagata Yoichi, Kaneko Masanori, Ujiie Tomomi, Shinotsuka Yumi, Wakayama Tatsuki, Iwama Hiroki, Osaka Noriko, Mayumi Daisuke, Yonebayashi Hideharu	4. 巻 201
2. 論文標題 Methanogenic crude oil degradation induced by an exogenous microbial community and nutrient injections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Petroleum Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 108458 ~ 108458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.petrol.2021.108458	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 -

1. 著者名 Heuer Verena B., Inagaki Fumio, Morono Yuki, Kubo Yusuke, Spivack Arthur J., Viehweger Bernhard, Treude Tina, Beulig Felix, Schubotz Florence, Tonai Satoshi, Bowden Stephen A., Cramm Margaret, Henkel Susann, Hirose Takehiro, Homola Kira, Hoshino Tatsuhiko, Ijiri Akira, Imachi Hiroyuki, Kamiya Nana, Kaneko Masanori他	4. 巻 370
2. 論文標題 Temperature limits to deep seafloor life in the Nankai Trough subduction zone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1230 ~ 1234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abd7934	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 該当する

1. 著者名 Mei Ran, Kaneko Masanori, Imachi Hiroyuki, Nobu Masaru K	4. 巻 2
2. 論文標題 The origin and evolution of methanogenesis and Archaea are intertwined	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad023	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉岡 秀佳、片山 泰樹、金子 雅紀、坂田 将
2. 発表標題 東部南海トラフ海底下堆積物における生物的メタン生成
3. 学会等名 砂層型メタンハイドレートフォーラム2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

南海トラフの深海底堆積物で生きるメタン生成微生物の特徴を解明
https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2022/pr20220202/pr20220202.html

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
研究分担者	延 優 (Nobu Masaru) (40805644)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------