

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22684030

研究課題名（和文）

海底下を支配する性状未知アーキアの特異的代謝の解明とその生物地球化学的意義

研究課題名（英文）

Deep-sea benthic archaea: unseen major prokaryote and their biogeochemical process

研究代表者

高野 淑識（TAKANO Yoshinori）

独立行政法人 海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物圏領域 主任研究員

研究者番号：80399815

研究成果の概要（和文）：

本研究は、海底下を支配する2大生物界の原核生物（表層を支配するバクテリア、深層を支配するアーキア）の代謝を解明し、特に優勢な性状未知アーキアが持つ新しい生物地球化学プロセスを明らかにした。海底下の原核生物を構成する「バイオマーカーの一次生成 → 初期続成 → 再利用」という一連のプロセスを分子レベルで追跡し、未知の生理・代謝機構の証拠を捉えることができた。特に、深海底に生息しているアーキアが、わずかなエネルギー源を有効に活用するために発達させたと考えられる新しい代謝経路の発見(Takano et al., Nature Geoscience, 3, 858-861)は、継続して調査研究していく方針である。

研究成果の概要（英文）：

The research objective of this project was to investigate the deep-sea benthic archaea, sub-seafloor unseen major prokaryote, and their biogeochemical process by a novel stable isotope technology from insight of metabolomics and lipidomics. Since most benthic archaea are viable but non-culturable microbes and difficult to study in the laboratory, we conducted in situ ^{13}C -tracer experiments 0-405 days at Sagami Bay, Western Pacific. We found that the ^{13}C was peculiarly enriched into the 2,3-sn-glycerol backbone of archaeal membranes, while the isoprenoid chain remained unlabelled. 16S rRNA and quantitative PCR (qPCR) analysis indicated a community shift in the composition of the community and its abundance. We suggest that benthic archaea build their membranes by recycling relic lipids via salvage pathway to minimize the energy expenditure for de novo synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	12,900,000	3,870,000	16,770,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	19,700,000	5,910,000	2,5610,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：Deep Biosphere、生物圏地球化学、分子レベル同位体、生物地球化学循環

1. 研究開始当初の背景

地球全体の70%を占める海洋は、水中およ

び海底下に地球生命を育む場を提供し、グローバルな物質循環の「駆動の場・貯留の場」

となっている。その海底下には、原核生物からなる地下生物圏が広がっていることが近年の研究で明らかになっている。果たして海底下の微生物は、「生きているのか、死んでいるのか。」という問いは、ガスハイドレートの成因や難培養性微生物の特徴とともに常にクローズアップされてきた地下生物圏の大きな課題である。その直接的な解決を目指して、代表者らは、 ^{13}C -安定同位体トレーサーを用いて(cf. Nomaki et al., 2006)、海底下を優勢的に支配するアーキアを主に対象として、海底での現場培養実験を行なった(図1)。仮に微生物の代謝があれば、 ^{13}C -安定同位体トレーサーが微生物に取り込まれ、その同位体比を観察すれば、生死識別が可能になる。さらに、分子内の同位体比から脂質合成経路の代謝強度を定量的に評価できる。これらの研究背景が契機となり、研究の着想に至った。

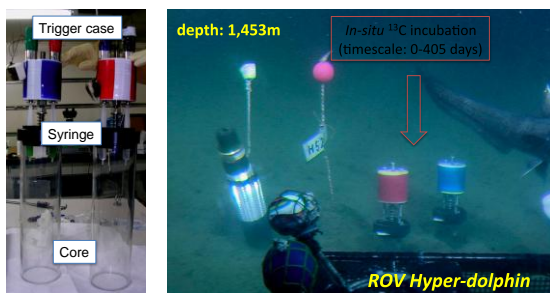


図1 海底での ^{13}C -現場培養実験の様子

2. 研究の目的

本研究の目的の1つは、実際の海底および掘削孔内での現場実験・現場検証を行い、海底下や地殻内に棲息する原核生物の特異的代謝機構を網羅的に解明することである。微生物によるバイオマーカーのリサイクル過程が、3つの生物界(真核生物、バクテリア、アーキア)に共通する現象であるかどうか、特殊な室内培養実験と併せて検証した。

2つ目は、特に海底堆積物を支配する、性状未知アーキアの新しい代謝経路マップの構築と生元素循環のモデル化である。代謝経路マップの構築には、 ^{13}C -NMRや ^{15}N -NMRの特異部位同位体比解析法(アイソトポマー法)を新たに検討した。海底現場培養実験では、 ^{13}C -基質を用いたトレーサー実験の他、嫌氣的アンモニア酸化アーキアの活性を調べるために、 $^{15}\text{NH}_3$ を加えた培養実験を行った。この達成により、「バイオマーカーの一

次生成、初期続成、再利用」という分子レベルでみた一連の生物地球化学サイクルの解読を試みた。

3. 研究の方法

本研究を効率的に遂行するためのポイントは、次の3点である。(1)分析方法の確立、(2)海底および掘削孔内での現場実験・現場検証、(3)代謝経路マップの構築と生元素循環のモデル化、である。(1)について代表者は、 ^{13}C -安定同位体トレーサーを用いたアーキアおよびバクテリアの生きている指標とされる Intact Polar Lipids (IPLs) およびその分子レベル安定同位体比、分子内安定同位体比の分析技術を構築してきた。(2)について、深海底での現場培養実験には、航海計画(研究支援母船、有人あるいは無人潜水艇)が審査通過した。(3)本提案では、アイソトポマー法を新しく開発導入し、初年度から本格的な海底フィールド調査、実践研究を行った。

4. 研究成果

深海底に生息しているアーキアが、わずかなエネルギー源を有効に活用するために発達させたと考えられる新しい代謝経路を発見した(Takano et al., Nature Geoscience, 3, 858-861)。深海底のアーキアはエネルギーの低い深海底において、周囲の環境に含まれる有機物をリサイクル(=再利用)する究極のエコ戦略によって、エネルギーをセーブしながら暮らしているという微生物生態学的な特徴を明らかにした。

「アーキア」と呼ばれる原核生物は、海洋や海底堆積物中におけるその分布や量が、従来考えられていたよりも大きいことが最近になって明らかになり、様々な分野から注目を浴びている。しかし、海洋性のアーキアは、培養が難しく、海水や海底堆積物中でどのような活動を行っているのか、またどれくらいの活性をもっているのか(どれくらいの速度で代謝しているのか)といった基本的な性状でさえも不明な点が多かった。そこで、世界で初めて海底の現場(最大405日)でアーキアを培養する新たな実験手法を応用し、精密なバイオマーカー解析により、アーキア由来膜脂質の分子内同位体比を評価した。また、アーキア(ユーリアーキオータ門、クレニアークオータ門)の群集構造は、16S rRNA および定量PCRで解析した。本研究によって、

従来の手法は、アーキアの活動度を過小評価しており、これまで推定されてきた活動度よりもかなり大きなアーキアの活動度が示唆される。つまり、アーキアが海底における物質循環に従来の考えられていたよりも大きな役割を果たしているとは推定される（日本学術振興会ニューズレターにおいて、研究成果トピックスに掲載）。

海底下の炭素循環の主役である原核生物の微生物生態に着目し、まず、海洋環境の光合成系と海底下の原核生物のエネルギー的なリンケージを証明するために、¹³C-海底現場培養法と¹³C-室内培養法による発展研究を進めた。一連のイソプレノイド合成系の化合物の新しい分子リサイクル過程の予察的実験に取り組んだ。

次に、メタンハイドレート形成の主役であるメタン生成アーキアが、メタン生成するために必要な補酵素ファクター430 (F430)の分析方法の精度向上を行った。この分析法のアドバンテージは、メタン生成の一次情報としての補酵素分子レベルの多次元同位体比解析が可能になることである。この開発により、海底下でのメタン生成プロセスの「場」を評価することができるようになった。メタン生成の補酵素ファクター430に関する一連の分析方法（抽出、分離、精製、飛行時間型質量分析計）を「ちきゅう」で採取された下北沖海底堆積物試料へ応用し、メタン生成の「場」の一次証拠を得た。ドイツ・マックスプランク研究所（マールブルグ）との共同研究の一環として、本分析法の確度検証を行った。そのF430濃度の定量結果に基づいて、海底下100m以深のメタン生成菌の密度を推定したところ、全原核生物のうち最大で約10%が、メタン生成菌であることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[学術誌・雑誌論文] (計 25 件)

1. Takano, Y., Kaneko, M., Kahnt, J., Imachi, H., Shima, S. and Ohkouchi, N. (2013) Detection of coenzyme F430 in deep-sea sediments: A key molecule for biological methanogenesis. *Organic Geochemistry*, in press. [査読有り]
2. Kaneko, M., Naraoka, H., Takano, Y. and Ohkouchi, N. (2013) Distribution and isotopic signatures of archaeal lipid biomarkers associated with gas hydrate occurrences on the northern Cascadia Margin. *Chemical Geology*, in press. [査読有り]
3. Ohkouchi, N. and Takano, Y. (2013) Organic nitrogen: sources, fates, and chemistry. *Treatise on Geochemistry*, 10: Organic Geochemistry (Edited by Birrer, B., Falkowski, P., Freeman, K.), Elsevier, in press. [査読有り]
4. Takano, Y., Tyler, J.J., Kojima, H., Yokoyama, Y., Tanabe, Y., Sato, T., Ogawa, O.N., Ohkouchi, N. and Fukui, M. (2012) Holocene lake development and glacial-isostatic uplift at Lake Skallen and Lake Oyako, Lutzow-Holm Bay, East Antarctica: based on biogeochemical facies and molecular signatures. *Applied Geochemistry*, 27, 2546-2559. doi: 10.1016/j.apgeochem.2012.08.009. [査読有り]
5. Bassez, M.-P., Takano, Y., and Kobayashi, K. (2012) Prebiotic organic microstructures. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42, 307-316. DOI 10.1007/s11084-012-9290-5. [査読有り]
6. 高野 淑識, 力石 嘉人, 大河内 直彦 (2012) 分子内同位体比で観る海底下のアーキアの生態: エーテル脂質分子内のサルベージ経路と新生経路を例にして. *地球化学 (Geochemistry)*, 46, 113-128. [査読有り]
7. Kurihara, H., Yabuta, H., Kaneko, T., Obayashi, Y., Takano, Y., and Kobayashi, K. (2012) Formation of organic aggregates by heating products of simulated primitive Earth atmosphere experiments. *Chemistry Letters*, 41, 441-443. doi:10.1246/cl.2012.441. [査読有り]
8. Kurihara, H., Takano, Y., Kaneko, T., Obayashi,

- Y., and Kobayashi, K. (2012) Stability of amino acids and related compounds in simulated submarine hydrothermal systems. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 85, 624-630.
doi:10.1246/bcsj.20110349. [査読有り]
9. 大河内 直彦, 高野 淑識, 野牧 秀隆 (2012) 分子で地球を読む「エコに暮らす深海底の微生物」. 岩波「科学」, 82, 141-143. [査読なし]
10. 力石 嘉人, 高野 淑識, 小川 奈々子, 佐々木 瑤子, 土屋 正史, 大河内 直彦 (2011) アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階の解析: 陸上環境を含めた生物生態系の解明に向けて. *Researches in Organic Geochemistry*, 27, 3-11. [査読有り]
11. Nomaki, H., Ogawa, O.N., Takano, Y., Suga, H., Ohkouchi, N., Kitazato, H. (2011) Differing utilization of glucose and algal particulate organic matter by the deep-sea benthic organisms of Sagami Bay, Japan. *Marine Ecology Progress Series*, 431, 11-24.
doi:10.3354/meps09144. [査読有り]
12. Gay, A., Takano, Y., Gilhooly III, W.P., Berndt, C., Heeschen, K., Suzuki, N., Saegusa, S., Nakagawa, F., Tsunogai, U., Jiang, S.Y., and Lopez, M. (2011) Geophysical and geochemical evidence of large scale fluid flow within shallow sediments in the eastern Gulf of Mexico, offshore Louisiana. *Geofluids*. 11, 34-47.
doi:10.1111/j.1468-8123.2010.00304.x. [査読有り]
13. 高野 淑識, 野牧 秀隆, 大河内 直彦 (2011) 海底下に棲息する微生物の代謝を in-situ ¹³C-tracer 法で解明する. *Isotope News -利用技術-*. No. 684, 8-13. [査読なし]
14. Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, O.N., Nomaki, H., Morono, Y., Inagaki, F., Kitazato, H., Hinrichs, K.-U., Ohkouchi, N. (2010) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geoscience*, 3, 858-861.
DOI:10.1038/ngeo983. [査読有り]
15. 高野 淑識, 力石 嘉人, 大河内 直彦 (2010) 微量湿式分析による分子レベル同位体比の品質管理と確度向上: 特に天然存在比の正確な評価と Stable Isotope Probing (SIP) 法の応用に向けて. *Researches in Organic Geochemistry*, 26, 81-93. (in Japanese with English abstract) [査読有り]
16. Takano, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, O.N., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2317-2323.
DOI: 10.1002/rcm.4651. [査読有り]
17. 高野 淑識, 大河内 直彦 (2010) 海底下の地下生物圏: 過去と現世のリンクを担う生物地球化学プロセス. *地球化学 (Geochemistry)*, 44, 185-204. (in Japanese with English abstract) [査読有り]
18. 力石 嘉人, 小川 奈々子, 高野 淑識, 土屋 正史, 大河内 直彦 (2010) アミノ酸の窒素同位体比を用いた水棲生物の栄養段階の解析. *地球化学 (Geochemistry)*, 44, 233-241. (in Japanese with English abstract) [査読有り]
19. Takano, Y., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) Enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of D- and L-alanine: nitrogen isotopic hetero- and homogeneity by microbial process and chemical process. *Earth, Life, and Isotopes* (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba). Kyoto University Press., pp. 387-402. [査読有り]
20. Chikaraishi Y., Takano Y., Ogawa O. N., and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental

optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography /combustion /isotope ratio mass spectrometry. Earth, Life, and Isotopes (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba). Kyoto University Press., pp. 365-386. [査読有り]

21. Takano, Y., Yokoyama, Y., Tyler, J.J., Fukui, M., Sato, T., Ogawa, N.O., Suzuki, N., Kitazato, H., Ohkouchi, N. (2010) Crustal uplifting rate associated with late-Holocene glacial-isostatic rebound at Skallen and Skarvsnes, Lutzow-Holm Bay, East Antarctica: evidence of a synchrony in sedimentary and biological facies on geological setting. Biogeosciences Discuss, 7, 4341-4384.

doi:10.5194/bgd-7-4341-2010.

[査読有り]

22. Fujii, M., Takano, Y., Kojima, H., Hoshino, T., Tanaka, R., and Fukui, M. (2010) Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica. Microbial Ecology, 59, 466-475. DOI 10.1007/s00248-009-9594-9.

[査読有り]

23. Kato, S., Takano, Y., Kakegawa, T., Oba, H., Inoue, K., Kobayashi, C., Utsumi, M., Marumo, K., Kobayashi, K., Ito, Y., Ishibashi, J., and Yamagishi, A. (2010) Biogeography and biodiversity in sulfide structures of active and inactive vents at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. Applied and Environmental Microbiology, 76,2968-2979. OI:10.1128/AEM.00478-10.

[査読有り]

24. 高野 淑識, 大河内 直彦 (2010) 新しい代謝機構の発見：深海の微生物「アーキア」は膜脂質をリサイクルする。JAMSTEC News 「なつしま」, Vol. 81.

[査読なし]

25. 高野 淑識, 鈴木 勝彦 (2010) 「有機物・微生物・生態系の地球化学」という視点, 地球化学(Geochemistry), 44, 99-101. (in

Japanese with English abstract)

[査読なし]

[主な学会発表] (計 10 件)

1. Yoshinori Takano: Deep-sea benthic archaea: unseen major prokaryote and biogeochemical process. 13th Japanese-American Kavli Frontiers of Science Symposium, Irvine, USA, December 1st, 2012.

2. 山口 保彦, 高野 淑識, 力石 嘉人, 菅寿美, 小川 奈々子, 横山 祐典, 大河内 直彦:海洋堆積物深部における有機物動態:アミノ酸窒素同位体組成・D/L比からの制約, 日本地球化学会, 2012年9月13日, 福岡

3. 高野 淑識, 小川 奈々子, 力石 嘉人, 野本 信也, 大河内 直彦:海洋の光合成ワールドとアーキアワールドのリンケージ仮説, 日本地球化学会, 2012年9月13日, 福岡

4. Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi: Microbial food web and energetic linkage between planktonic archaea and deep-sea benthic archaea: insight from ^{13}C -signatures in membrane lipids. ASLO Aquatic Science meeting, Ohtsu, Japan, July 8th,2012.

5. Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Nana O. Ogawa, Hidetaka Nomaki, Yuki Morono, Fumio Inagaki, Kai-Uwe Hinrichs, Nao Ohkouchi: Deep-sea benthic archaea recycle relic membrane lipids: insight from *in situ* ^{13}C -incubation experiment and its lipidomics. International Meeting on Organic Geochemistry (IMOG), Inter-laken, Swiss, September 22th, 2011

6. Yasuhiko Yamaguchi, Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Nanako Ogawa, Hiroyuki Imachi, Hisami Suga, Yusuke Yokoyama, Naohiko Ohkouchi: Nitrogen

isotopic signatures of amino acids in microbes: culture experiments and applications to marine sediments. International Meeting on Organic Geochemistry (IMOG), Inter-laken, Swiss, September 20th, 2011.

7. 高野 淑識 : 生物による有機物の「再利用プロセス」は地球化学的に何を意味するか? 地球惑星科学連合大会, 2011年5月22日, 幕張
8. 高野 淑識, 山口 保彦, 大河内 直彦 : 海底下の地下生物圏: 過去と現世のリンクを担う生物地球化学プロセス, 地球惑星科学連合大会, 2010年5月25日, 幕張
9. 高野 淑識, 力石 嘉人, 大河内 直彦 : 海洋性アーキアの膜脂質分子内炭素同位体比から読む生態学的挙動, 日本有機地球化学会, 2010年8月5日, 長岡
10. Yoshinori Takano, Yusuke Yokoyama, Jonathan J. Tyler, Manabu Fukui, Nanako O. Ogawa and Naohiko Ohkouchi: Crustal uplifting rate associated with late-Holocene glacial-isostatic rebound at Skallen and Skarvsnes, Lützow-Holm Bay, East Antarctica: evidence of a synchrony in sedimentary and biological facies on geological setting. AGU Chapman Conference on the Exploration and Study of Antarctic Subglacial Aquatic Environments (SAE), Baltimore, USA, March 15th-17th, 2010.

[図書] (計2件)

1. 日本地球化学会 (蒲生 俊敬・海老原 充) 編, 高野 淑識・分担執筆 (2013) 「地球と宇宙の化学事典」(一部の項目について執筆). 朝倉書店.
2. Kobayashi, K., Kaneko, T., Takahashi, J.-I., Takano, Y., and Yoshida, S. (2010) High molecular weight complex organics in interstellar space and their relevance to

origins of life. Astrobiology: Emergence, Search and Detection of Life (edited by V. Basiuk). American Scientific Publishers, pp. 175-186.

[その他]

[受賞]

2010年12月

地球化学研究協会「奨励賞」受賞

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/res/ress/takano/>

2011年度 日本学術振興会ニュースレターにおいて、研究成果トピックスへ掲載。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 淑識 (TAKANO Yoshinori)

独立行政法人海洋研究開発機構・

海洋・極限環境生物圏領域・

主任研究員

研究者番号: 80399815