

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02935

研究課題名(和文) 集水域における炭素-窒素-リンの共役循環が湖のメタン動態に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Stoichiometric-coupled dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus influences aerobic methane production in lake ecosystems

研究代表者

岩田 智也 (IWATA, Tomoya)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：50362075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：湖の好気環境に出現するメタン極大の生成プロセスとパターンを明らかにすることを目的に研究を実施した。その結果、溶存有機態炭素が多い湖ほど水中の窒素濃度が低下し、それによって小型のシアノバクテリア(Synechococcus)が優占すること、さらにSynechococcusはホスホン酸代謝により好氣的にメタンを生成することも明らかとなった。湖の炭素と窒素のバランスが生物地球化学的なカスケード応答によって浮遊性微生物の群集構造を変化させ、亜表層の好気環境に出現するメタン極大の発達に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、温度上昇によって湖水の成層構造が変化したり、集水域の人為攪乱が増大すれば、生元素の量的バランスの変化を介して湖からの温室効果ガス放出量にまで影響が及ぶ可能性があると考えられる。とくに、流域からの有機物負荷や温度上昇による成層構造の強化により湖の表層環境において窒素やリンが枯渇すると、ピコシアノバクテリアが優占することでメタンの生成量が増加する可能性があるだろう。湖は主要なメタンの自然放出源の一つであることから、温室効果ガスの動態や気候変動の機構解明の観点からも、本研究で明らかにした湖のメタン生成プロセスは学術的・社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study surveyed nine Japanese deep freshwater lakes to show the pattern and mechanisms of aerobic CH₄ production and subsurface methane maximum (SMM) formation. The results showed that the availability of organic carbon controls N accumulation in lake waters thereby influences the CH₄ production process. The microbial community analyses revealed that the distribution of picocyanobacteria (i.e., Synechococcus) was closely related to the vertical distribution of dissolved CH₄ and SMM formation. Moreover, a cross-lake comparison showed that lakes with a more abundant Synechococcus population exhibited a greater development of the SMM, suggesting that these microorganisms are the most likely cause of methane production. We conclude that the stoichiometric balance between DOC and DIN might cause the cascading responses of biogeochemical processes, from N depletion to picocyanobacterial domination, and subsequently influence SMM formation in lake ecosystems.

研究分野：水域生態学

キーワード：好氣的メタン生成 ホスホン酸 C-Pリアーゼ 元素バランス 温室効果ガス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタンは、長寿命の温室効果ガスがもつ放射強制力の約 18% を占める強力な温室効果ガスである。湖はメタンの主要な自然放出源であり、湖面からのグローバル放出量 (8~48 TgCH₄/年) は海洋全体からのフラックスを凌ぐと言われている。湖の溶存メタンは、嫌気的な湖底堆積物中でメタン菌が生成していると考えられてきた。しかし、貧~中栄養湖の多くでは、リン酸が欠乏する夏期に亜表層の好気環境にメタン極大が出現する。とくに窒素過剰・リン酸欠乏の湖で、巨大なメタン極大が出現することが我々の研究で明らかとなってきた。また、亜表層メタン極大 (SMM) の発達は浮遊性微生物 (シアノバクテリアなど) の季節消長と密接に連動している。さらに、リン酸欠乏の湖水に有機態リン化合物 (メチルホスホン酸: MPn) を添加すると C-P 結合開裂酵素 (C-P リアーゼ) が駆動し、好氣的にメタンが生成することも明らかとなった。リン酸欠乏湖沼では微生物が MPn を代謝し分解産物としてメタンが生成するのである。この発見はハワイ沖で観測された現象によく一致しており、陸水学のパラダイムを覆す新たな温室効果ガス生成メカニズムである。

さらに、湖水に窒素を添加するとメタン生成が加速する興味深い現象も観測された。野外でも NO₃ 濃度の高い水深でしばしばメタン極大が発達する。過剰な窒素が微生物を強いリン飢餓状態へと誘導し、ホスホン酸代謝 (= 好氣的メタン生成) を加速させるのだろう (窒素誘導仮説)。あるいはホスホン酸代謝が酵素律速下 (C-P リアーゼが不足) にあり、窒素添加によるタンパク質合成の促進でメタン生成活性が上昇した可能性もある (酵素制限仮説)。このことは、湖の N/P バランスの変化が大気へのメタン放出に影響することを示唆している。たとえば、リン酸欠乏湖沼への過剰な窒素流入 (農地からの N 流出、森林の窒素飽和など) は微生物による有機態リンの代謝とメタン生成を連鎖的に促進すると考えられる。さらに、集水域の有機態炭素の動態も深く関与するだろう。一般に、土壌や湿地が発達した集水域では河川の DOC 濃度が高く、DOC を基質とする異化的硝酸還元 (脱窒) によって NO₃ が流域から除去される傾向にある。一方、DOC 濃度の低い流域では脱窒反応が有機態炭素で律速されるため、過剰な NO₃ が除去されずに湖へと輸送される。しかし、このような集水域の炭素-窒素-リン循環の共役 (カップリング) が湖のメタン生成にどう影響しているかは明らかにはされていない。

海洋ではシアノバクテリア (*Trichodesmium*) や従属栄養細菌 (*Pelagibacterales*) が、C-P リアーゼ遺伝子 (*phn*) によりアルキルホスホン酸からメタンを生成することが報告されている。一方、湖を対象に我々が実施してきた研究では、メタン極大の発達とともに浮遊性のシアノバクテリア (*Synechococcus*) や従属栄養細菌 (*Limnohabitans*) が特異的に増加することが明らかとなった。しかし、どの微生物が現場で実際にメタンを生成しているのか未だ明らかではない。また、集水域の違いによる CNP ストイキオメトリーの変化が湖水の *phn* 遺伝子の発現やメタン生成微生物の分布に及ぼす影響についても不明である。さらに、好氣的メタン生成の基質であるホスホン酸については湖での研究例は皆無であり、メタン動態の理解に不可欠な湖水中の起源や動態については何もわかっていない。しかし、分担者の予備実験により浮遊性微生物自身が水柱でホスホン酸化合物を生合成している可能性が浮かび上がってきた。ポリリン酸と同様に、微生物は P 欠乏下でリンをホスホン酸として細胞内に蓄積し、機会的に C-P 結合を開裂しながらリン酸を獲得する日和見成長戦略をとっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、集水域の炭素-窒素-リンの共役循環が湖の好氣的メタン生成に及ぼす影響を明らかにする。とくに、集水域の CNP バランスの変化が 1) 好氣的メタン極大の形成、2) 湖水中

のホスホン酸の挙動および3)ホスホン酸代謝を担う浮遊性細菌と C-P 結合開裂酵素 (*phn*) 遺伝子の発現状況に及ぼす影響を定量化する。さらに、4)P 飢餓状態における微生物細胞内のホスホン酸生成過程と5)メタン生成カイネティクスを明らかにし、集水域のマルチ元素 (CNP) 動態が大気へのメタン放出に及ぼす影響を予測する。

3. 研究の方法

2016~2017年にかけて北海道、東北および中部日本の9つの大型湖沼(中栄養、貧栄養または超貧栄養湖)を対象に夏の成層期に野外調査を実施した。各湖では最深部付近で物理環境を測定し、さらにDO、EC、pH、溶存CH₄、DOC、クロロフィルaおよび栄養塩と金属濃度の鉛直プロファイルを計測した(各湖10深度)。また、浮遊性微生物の細胞密度計数用試料の採集を行うとともに、微生物群集の栄養飢餓状態の強さを定量評価するための培養実験を行った。微生物群集構造は、表水層(水深0m)、水温躍層(水深7-15m)および深水層(水深26-60m)から採取した湖水試料を対象に分析した。真核藻類の細胞密度は生物顕微鏡下で計数した。また、微生物群集については、16S rRNA 遺伝子を対象に次世代シーケンスによるアンプリコン解析により実施した。メタン生成に関わると考えられる微生物の水中における分布については、10深度から採取した試料に対してCARD-FISH法を用い蛍光顕微鏡下で計数を行なって評価した。また、河川からのメタンの流入の影響を評価する目的で、湖の主要な支流で採水と流量の計測を行い、試料の理化学分析を実施した。C-P 結合開裂酵素(*phn*)遺伝子の発現状況については、2016年に西湖(山梨県)から採取した湖水の培養試料からmRNA抽出・精製にも成功し、RNAシーケンスによる発現解析を実施した。

さらに、好氣的メタン生成の基質と考えられるホスホン酸の起源と分布を評価するために、湖水懸濁物のサイズ別大量捕集を行なった。まず、採取した湖水をペリスタポンプで送液し2- μ mカートリッジフィルターで懸濁物を船上にて最大200L捕集するシステムを構築した。このサンプリングシステムを各湖にも適用し、水温躍層から懸濁物の採取を実施した。懸濁物中のホスホン酸の存在は、二次元NMR(¹H-³¹P HMBC)により分析した。

浮遊性微生物によるメタン生成カイネティクスについては、2018年~2019年に西湖(山梨県)にて季節的に湖水の鉛直採取を行い、ホスホン酸添加により浮遊性微生物のC-Pリアーゼ活性を明らかにし、基質添加に対するメタン生成速度の応答を定式化した。また、得られた酵素反応曲線のパラメータから、C-Pリアーゼを介した好氣的メタン生成ポテンシャルとパラメータに影響する物理環境要因を解析した。

4. 研究成果

本研究では、まずサブテーマ1「好氣的メタン極大の形成」に取り組むために日本の9つの大型淡水湖沼で野外観測を実施し、湖水における亜表層メタン極大(SMM)の形成パターンを調査した。その結果、どの湖においても亜表層の好気環境においてSMMの形成がみられることが明らかとなった。このメタン極大の形成は大気や湖底、河川水、沿岸域からの輸送では説明することができず、湖内の生物地球化学プロセスによって生成しているものと考えられた。さらに、溶存態有機炭素(DOC)と溶存態無機窒素(DIN)および溶存メタンとの間に強い負の非線形関係が見られることが明らかとなった。このことから、有機炭素の存在量が湖沼の窒素蓄積量を制御し、それによって好気環境におけるメタン生成プロセスに影響を及ぼしているものと考えられた。以上より、サブテーマ1の主題である炭素と窒素のバランスが微生物のリン代謝を通じてメタン生成を引き起こす、生物地球化学反応のカスケードを示すことができた

(Khatun et al. 2020)

次いで、サブテーマ 2「湖水中のホスホン酸の挙動」と 4「P 飢餓状態における微生物細胞内のホスホン酸生成過程」を明らかにするために、好氣的メタン生成の基質と考えられるホスホン酸の起源と分布を評価するための研究手法の開発と分析を行った (Shinohara et al. 2018)。その結果、新たな船上ろ過システムを開発することで 200L の湖水懸濁物をサイズ別に大量捕集することに成功した。懸濁物を対象とした二次元 NMR を用いた好氣的メタン生成の基質解析では、西湖の表層水よりメタン生成基質の 1 つと考えられる 2-アミノエチルホスホン酸(2-AEP) の検出をすることができた (Shinohara et al. 2018)。同様に、洞爺湖の水温躍層からもホスホン酸が検出された。このことは、浮遊性微生物の細胞中にアルキルホスホン酸が存在することを示しており、好氣的メタン生成の潜在的基質が湖水中に存在していることを初めて明らかにすることができた (Khatun et al. 2020)。さらに、別系統の光合成微生物ではあるが、実験環境下において P 制限下で細胞内にホスホン酸を蓄積していることも NMR 解析により明らかとなり、ホスホン酸は細胞内での P 貯蔵庫としての役割を果たしているものと推察された (Khatun et al. 投稿中)。

サブテーマ 3「ホスホン酸代謝を担う浮遊性細菌と C-P 結合開裂酵素 (*phn*) 遺伝子の発現状況に及ぼす影響」を定量化することを目的に行った。次世代シーケンスと CARD-FISH により湖水の浮遊微生物の群集構造と分布パターンを解析した結果、亜表層に顕著なメタン極大が出現する深い湖においては、メタン極大が発達する水温躍層付近にシアノバクテリアである *Synechococcus* が特異的に多く分布していることが明らかとなった (Khatun et al. 2020)。溶存メタンの分布パターンと *Synechococcus* の鉛直分布はほぼ一致しており、*Synechococcus* の細胞密度が高い水深で溶存メタン濃度も高い。さらに、*Synechococcus* の平均細胞密度が高い湖ほどメタン極大がよく発達することも明らかとなった。培養実験では、*Synechococcus* がホスホン酸代謝によるメタン生成能を有することが明らかとなっていることから (Khatun et al. 2019)、ピコシアノバクテリア (とくに *Synechococcus* 属) が亜表層メタン極大 (SMM) の形成に密接に関わっていることが明らかとなった。一方で、RNA シークエンスによる C-P 結合開裂酵素 (*phn*) 遺伝子の発現解析では、現在のところ、メタン生成が活発な水深で *phnJ* が発現しているとの結果は得られておらず、引き続き解析を続けて行く予定である。

サブテーマ 5「メタン生成カイネティクス」では、西湖 (山梨県) から採取した湖水へホスホン酸を添加して酵素反応曲線を定式化した。その結果、夏季に強いリン飢餓状態となるメタン極大層付近において C-P リアーゼ活性が認められた。さらに、カイネティクスの推定も試み、ごく微量ながら湖水中にホスホン酸が存在している可能性を示すことができた。また、好気環境下におけるメタン生成基質として他のメチル化合物の可能性も考えられたが、トリメチルアミンや DMSP からはメタンは発生せず、湖のメタン生成はホスホン酸分解による可能性が高いことが示された。

本課題研究により概ね予想通りの結果を得ることができ、研究当初の主要な仮説を裏付けることができた。まず、湖水中では溶存有機体炭素 (DOC) の負荷が生物地球化学的な連鎖反応を引き起こし、それによって窒素の減少とピコシアノバクテリア (*Synechococcus* など) の増加、さらに好気環境下でのメタン生成が生じていることが明らかとなった。とくに、湖水中の DOC 濃度が過剰となると従属栄養微生物の代謝が活発になることにより湖は N 欠乏環境へと陥り、細胞サイズの小さなピコシアノバクテリアが栄養塩の獲得において有利になると考えられる。そこで、もう一つの主要な制限栄養元素であるリンの獲得戦略として *Synechococcus* 属が C-P リアーゼを駆動してホスホン酸を代謝し、その副産物としてメタンが生成しているものと考え

られた。実際、NMR 解析の結果から微生物自身が細胞内でホスホン酸を生合成していること（Shinohara et al. 2019, Khatun et al. 2020）や、ホスホン酸以外の他のメチル化合物からはメタン生成反応が確認できないことから、湖水中のメタン極大は *Synechococcus* によるホスホン酸代謝が大きく関与していると考えられる。このように、湖水における有機炭素と無機窒素の化学量論比（ストイキオメトリー）が微生物群集を介して湖の好氣的メタン生成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

湖沼生態系は気候変動や人間活動に対して脆弱なシステムであると考えられている。将来予測される気候変動によって湖水の成層構造が変化したり、集水域の人為攪乱が増大すれば、生元素の量的バランスの変化を介して湖からの温室効果ガス放出量にまで影響が及ぶ可能性がある。とくに、流域からの有機物負荷や温度上昇による成層構造の強化により湖の表層環境において窒素やリンが枯渇すると、ピコシアノバクテリアが優占することでメタンの生成量が増加する可能性があると考えられる。人間活動による生物地球化学的バランスの変化が淡水生態系の好気環境におけるメタン生成プロセスに影響を及ぼす可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Khatun Santona, Iwata Tomoya, Kojima Hisaya, Fukui Manabu, Aoki Takuya, Mochizuki Seito, Naito Azusa, Kobayashi Ai, Uzawa Ryo	4. 巻 696
2. 論文標題 Aerobic methane production by planktonic microbes in lakes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 133916 ~ 133916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133916	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 Khatun Santona, Iwata Tomoya, Kojima Hisaya, Ikarashi Yoshiki, Yamanami Kana, Imazawa Daichi, Kenta Tanaka, Shinohara Ryuichiro, Saito Hiromi	4. 巻 12
2. 論文標題 Linking Stoichiometric Organic Carbon?Nitrogen Relationships to planktonic Cyanobacteria and Subsurface Methane Maximum in Deep Freshwater Lakes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 402 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/w12020402	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 Shinohara Ryuichiro, Iwata Tomoya, Ikarashi Yoshiki, Sano Tomoharu	4. 巻 25
2. 論文標題 Detection of 2-aminoethylphosphonic acid in suspended particles in an ultraoligotrophic lake: a two-dimensional nuclear magnetic resonance (2D-NMR) study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 30739 ~ 30743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s11356-018-1744-5	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13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Santona Khatun, Tomoya Iwata, Hisaya Kojima, Yoshiki Ikarashi, Kana Yamanami, Daichi Imazawa, Tanaka Kenta, Ryuichiro Shinohara, Hiromi Saito
2. 発表標題 Linking stoichiometric organic carbon-nitrogen relationships to planktonic cyanobacteria and subsurface methane maximum in deep freshwater lakes
3. 学会等名 JPGU2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Khatun Santona, Kojima Hisaya, Ikarashi Yoshiki, Yamanami Kana, Tanaka Kenta, Shinohara Ryuichiro, Iwata Tomoya
2. 発表標題 Relationships between the composition of bacterioplankton communities and subsurface methane maximum in lakes
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田智也, Khatun Santona, 小島久弥, 福井学, 寺島美亜, 高須賀太一, 田中健太, 篠原隆一郎
2. 発表標題 淡水生態系における好氣的メタン生成プロセス
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Khatun Santona, Kojima Hisaya, Iwata Tomoya, Ikarashi Yoshiki, Yamanami Kana, Tanaka Kenta, Shinohara Ryuichiro
2. 発表標題 Community structure of planktonic bacteria relating to subsurface methane maximum of aerobic lake waters
3. 学会等名 JPGU2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Khatun Santona, Hisaya Kojima, Tomoya Iwata
2. 発表標題 A novel methane production pathway in freshwater ecosystems
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2017年大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Khatun Santona, Iwata Tomoya, Kojima Hisaya
2. 発表標題 Aerobic methane production by planktonic microbes in freshwater ecosystems
3. 学会等名 第三回山岳科学学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山南果奈・岩田智也
2. 発表標題 湖の好氣的メタン極大形成に影響を及ぼす環境要因の解明
3. 学会等名 第三回山岳科学学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Khatun Santona, Iwata Tomoya, Kojima Hisaya
2. 発表標題 Aerobic methane production by planktonic microbes in freshwater ecosystems
3. 学会等名 2017年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山南果奈・岩田智也
2. 発表標題 湖の好氣的メタン極大形成に影響を及ぼす環境要因の解明
3. 学会等名 2017年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩田智也・小林あい・内藤あずさ・小島久弥
2. 発表標題 湖沼の好気環境に出現するメタン極大の形成プロセス
3. 学会等名 2017年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Santona Khatun, Hisaya Kojima, and Tomoya Iwata
2. 発表標題 A novel aerobic methane production pathway in freshwater ecosystems
3. 学会等名 日本陸水学会第81回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 KHATUN Santona・小島久弥・岩田智也
2. 発表標題 淡水生態系における新たな好氣的メタン生成経路
3. 学会等名 2016年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shinohara R., Iwata T., Ikarashi Y., Sano T., Kohzu A.
2. 発表標題 Analysis of phosphorus compounds by using 2D (1 H 31 P) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in an oligotrophic environment
3. 学会等名 ASLO 2017 Aquatic Sciences Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者ホームページ http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~tiwata/ 研究室Webページ http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~tiwata/ 研究代表者ホームページ http://www.js.yamanashi.ac.jp/~iwata/
--

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	篠原 隆一郎 (Shinohara Ryuichiro) (00610817)	国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員 (82101)	
研究分担者	小島 久弥 (Kojima Hisaya) (70400009)	北海道大学・低温科学研究所・助教 (10101)	
研究分担者	田中 健太 (Tanaka Kenta) (80512467)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	