

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：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560811

研究課題名（和文） 高圧培養による深海底由来メタン生成菌を使ったメタン炭素同位体比の再評価

研究課題名（英文） Re-evaluation of microbial methane stable carbon isotope fractionation under high hydrostatic pressure

研究代表者

田角 栄二（TASUMI EIJI）

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・技術研究副主任

研究者番号：50553228

研究成果の概要（和文）：

南海トラフの深海底表層堆積物を植種源とするバッチ集積培養から分離した *Methanosarcina* sp. NT-MS1 株を圧力培養した。増殖は 15 MPa で最も良好であり、分離源と同じ圧力（25 MPa）下でも、高い増殖能を有していることが確認された。生成されたメタンは、炭素同位体比（ $\Delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ ）が $-81\sim-63\text{‰}$ の「同位体的に軽い」メタンであり、NT-MS1 株は高井らにより報告された *Methanopyrus kandleri* 116 株のように「同位体的に重い」メタンを生成しなかった。

研究成果の概要（英文）：

Methanosarcina sp. NT-MS1 that had been isolated from Nankai Trough subseafloor sediment using batch-culture was cultured under high pressure conditions. Its optimum pressure for growth was 15 MPa, and it showed positive growth with methanogenesis at its habitat pressure (25 MPa). Takai et al. reported that the hyperthermophilic methanogen, *Methanopyrus kandleri* strain 116, generates “isotopically heavy” methane under high pressure conditions. But, strain NT-MS1 generated “isotopically light ($\Delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = -81\sim-63\text{‰}$)” methane at 5 to 35 MPa.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学、地球・資源システム工学

キーワード：メタン

1. 研究開始当初の背景

(1) 深海底に天然ガスあるいはハイドレートとして存在するメタンは未来のエネルギー資源として考えられており、その生成起源やメカニズムを理解することは、深海エネルギーの資源評価や探索、および地球環

境における炭素循環を解明する上で極めて重要である。現在までメタンの発生起源の特定はメタンの炭素同位体比の測定とメタンとその他のアルカン炭化水素の存在比により行われてきた。この推定法に依ると、メタンの存在比率が高く、 $^{12}\text{C}-\text{CH}_4$

の割合が多い” 同位体的に軽い” メタンは微生物起源、 $^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ の割合が多い” 同位体的に重い” メタンは地下深部における有機物熱分解あるいはマグマ起源とされている。この化学的メタン発生源の推定法は1986年に Whiticar らにより提案され、それ以降、資源探査および地球化学の分野で教科書にも記載される定説として、長らく使われてきた。

- (2) しかしながら、圧力が微生物の生産するメタンの炭素同位体比に大きな影響を与えるという極めて重要な知見が研究分担者の高井らの研究により明らかになった。具体的には、深海熱水噴出孔から分離した超好熱性メタン生成菌が高圧培養条件下において、定説に従えばマグマ起源と分類されるほど同位体的に重いメタンを生成するという発見である。この発見は従来の「同位体的に軽いメタンは微生物が作ったメタン」という定説を覆すものであり、メタンの炭素同位体比に基づいたメタンの発生源推定法の再考を迫るものである。
- (3) 深海底に生息するメタン生成菌は典型的な難培養性微生物であり、メタン生成菌研究の世界的権威であった David Boone 博士が分離した2株を除いて分離例は皆無であった。しかしながら、ごく最近になって、申請者らは南海トラフの泥火山（水深 2,500 m）や日本海溝（水深 6,000 m）の深海底表層の堆積物および下北半島東方沖で採取した深海コア堆積物（水深 1,200 m、海底下 360 m）から合計 10 種のメタン生成菌の純粋分離に成功している。

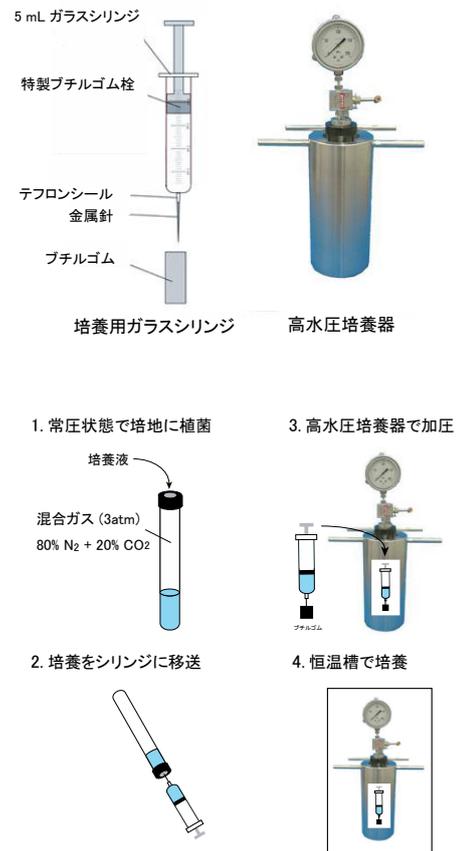
2. 研究の目的

近年、地球化学および微生物学分野において、炭素同位体比を利用したメタンの起源推定法の常識を覆す報告がなされている。そこで、本研究では深海底堆積物由来のメタン生成菌を使い、現場環境を模した圧力培養における微生物由来メタンの炭素同位体比の挙動を解析することで、従来の炭素同位体比によるメタン起源推定法を再評価する。

3. 研究の方法

- (1) 分離したメタン生成菌の基礎的な生理学的特徴を把握する為に、生育可能温度、至適生育 pH、増殖速度や基質特異性 (H_2/CO_2 、酢酸、メタノール等の基質を加えてメタンを生成する基質を特定) 等を大気圧下で調べた。さらに、これらの表現型情報に加え、16S rRNA 遺伝子および *mcrA* 遺伝子 (メタン生成の鍵酵素である *methy-coenzyme M* をコードしている遺伝子) の塩基配列を決定した。

- (2) 生理学的特徴の調査結果から、最も増殖が速く、できる限りハンドリングが容易なメタン生成菌を選抜し、複数種の基質で高圧培養を行う。まずは、培養温度を供試菌株の至適温度に固定して、経時的に顕微鏡下で細胞数を測定すると同時に、生成されたメタンの濃度および炭素同位体比を Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometer (GC-RIMS) で測定する。



圧力培養器と培養方法

4. 研究成果

- (1) 初年度において、南海トラフ（水深 2,500m）および日本海溝（水深 6,000m）の深海底表層堆積物を植種源としたバッチ式集積培養法から分離した4株のメタン生成アーキア（図1）の生理学的・遺伝学的特徴を明らかにした。16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、既知の *Methanosarcina* あるいは *Methanobacterium* 属のメタン生成アーキアと 99%以上の相同性を示した（図2）。いずれの株も至適生育温度は 37°Cであったが、深海底環境と同等の 2-4°Cでもメタン生成を伴う増殖が可能であり、深海底での温度条件でもメタン生成を伴う増殖が可能であることが確認された。また、これらの菌株は、海水の半分程

度の低塩濃度で最も増殖が良好であった (表 1)。この低塩濃度でも生育できるという特徴は、南海トラフにおいて海底下深部からの塩濃度が低い湧水の存在が知られていることを考えると理に適っていると考えられた。

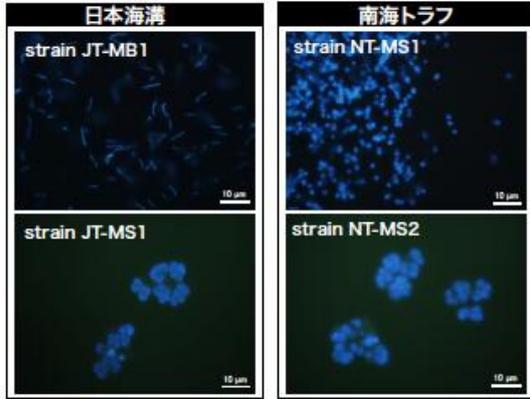


図 1 日本海溝および南海トラフから分離されたメタン生成菌

	Methanobacterium sp. strain JT-MB1	Methanosarcina sp. strain JT-MS1	Methanosarcina sp. strain NT-MS1	Methanosarcina sp. strain NT-MS2
Temp. (°C)	Optimum 37 Range 4-50	Optimum 37 Range 2-45	Optimum 37 Range 2-45	Optimum 37 Range 2-45
NaCl (g L ⁻¹)	Optimum 0 Range 0-30	Optimum 15 Range 0-60	Optimum 15 Range 0-60	Optimum 15 Range 0-60
pH	Optimum 6.0-6.5 Range 5.5-8.2	Optimum 6.0 Range 5.5-7.5	Optimum 6.0-7.5 Range 6.0-8.2	Optimum 6.0 Range 5.5-7.5
Substrate usage				
H ₂	+	+	+	+
Formate	+	+	+	+
Acetate	-	+	+	+
Methanol	-	+	+	+
Methylamine	-	+	+	+
Dimethylamine	-	+	+	+
Trimethylamine	-	+	+	+

表 1 分離株の生理学的特徴

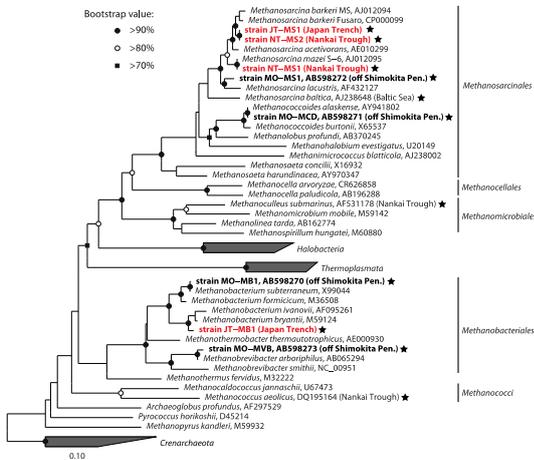


図 2 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分離株の分子系統樹

(2) 4 株の分離菌株のうち、最も増殖速度が速くハンドリングが容易であると判断された *Methanosarcina* sp. (NT-MS1 株) を、メタノールおよび水素をメタン生成基質として圧力培養した。

メタノール培養における増殖は、15 MPa で最も良好であった (最大比増殖速度 $\mu_{max} = 0.069 \text{ h}^{-1}$)。また、分離源と同じ 25 MPa 下における増殖も大気圧下と同程度であり ($\mu_{max} = 0.036 \text{ h}^{-1}$)、NT-MS1 株は水深

2,500m の水圧下でも、高い増殖能を有していることが確認された (図 3)。

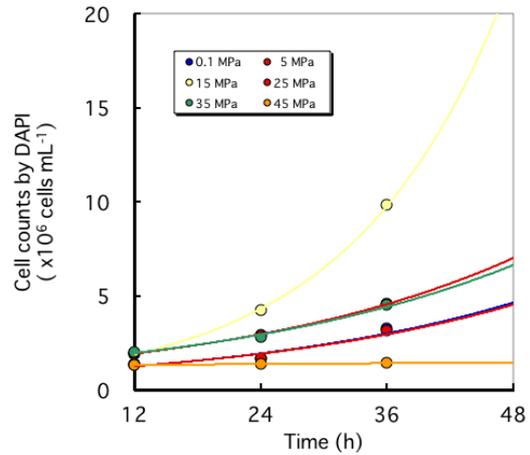


図 3 メタノールを基質とした圧力培養における増殖曲線

水素培養における増殖もメタノール培養と同様に、15 MPa で最も良好であった。生成したメタンの炭素同位体比 ($\Delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$) は -81~-63‰ であり、高井らにより報告された超好熱性メタン生成菌 (*Methanopyrus kandkeri* strain 116) のように「同位体的に重い」メタンを生成しなかった。しかしながら、高圧下ほど $\Delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ の低い「同位体的に軽い」メタンを生成する傾向にあり、5 MPa と 25 MPa では -10‰ 程度の差が見られた (図 4)。

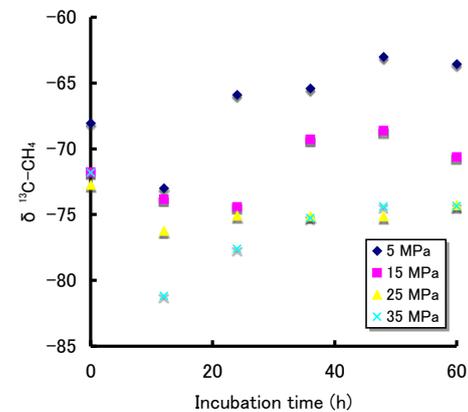


図 4 水素を基質とした圧力培養における $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$

深海底堆積物由来のメタン生成アーキアを世界で初めて圧力培養した本研究において、供試菌株である *Methanosarcina* sp. NT-MS1 株は、15 MPa (=水深 1,500m 相当) が最も生育に適しており、生息環境の圧力により $\Delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ 値の異なるメタンを生成することが明らかとなった。

深海底由来メタン生成アーキアの生成するメタンの同位体解析に関しては、まだ緒に就いたばかりである。今後、例えば水素

同位体比なども含めた総合的な同位体解析を行うことにより、メタンの生成起源推定法を詳細に再評価することが可能になるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 井町寛之、稲垣史生、2012、深海底環境からのメタン生成菌の効率的な培養技術、月刊ファインケミカル 2012年11月号、シーエムシー出版、査読無
- ② Imachi H, Aoi K, Tasumi E, Saito Y, Yamanaka Y, Saito Y, Yamaguchi T, Tomaru H, Takeuchi R, Morono Y, Inagaki F and Takai K, 2011, Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous flow bioreactor. ISME J., 5, 1913-1925. 査読有
DOI:10.1038/isme.2011.64

[学会発表] (計2件)

- ① 田角栄二、布浦拓郎、川口慎介、今野祐太、藤倉克則、古島靖夫、渡部裕美、宮本教生、辻健、新井和乃、野口拓郎、長谷川和範、土岐知弘、野牧秀隆、谷川亘、笠谷貴史、砂村倫成、高井研、東北地方太平洋沖地震後に観察された深海底堆積物中メタンの多様性が示すものとは、第28回日本微生物生態学会、2012年9月19日、豊橋技術科学大学
- ② 田角栄二、吉田奈央子、片山新太、江原真之、井町寛之、高井研、深海底堆積物から分離したメタン生成アーキアの菌学的特徴とその圧力応答、第26回日本微生物生態学会、2010年11月24日、筑波大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田角 栄二 (TASUMI EIJI)
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・
技術研究副主任
研究者番号：50553228

(2) 研究分担者

井町 寛之 (IMACHI HIROYUKI)
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：20361933

高井 研 (TAKAI KEN)
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・
プログラムディレクター
研究者番号：80359166

川口 慎介 (KAWAGUCHI SHINSUKE)
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・研究員
研究者番号：50553088

