

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25610166

研究課題名(和文)機能性分子F430を用いた堆積物深部メタン生成ポテンシャルの精密定量

研究課題名(英文)Quantification of methanogenic potential with coenzyme F430 analysis

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・地圏資源環境研究部門・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究期間において、種々の環境試料から高回収率で精密に補酵素F430を定量するための、前処理および分析法を開発し、従来法に対しておよそ10万倍の高感度定量分析法を確立した。これにより0.1フェムトモルでの定量検出が可能になり、最も検出が困難な海洋堆積物をはじめ、微生物マット、水田土壌、地下水などからの補酵素F430の検出を実現した。また、科学掘削史上最も深い海底下2000 mの石炭層において補酵素F430の検出に成功し、活きたメタン生成アーキアの存在を示した結果がサイエンス誌に掲載された。

当該研究機関の研究成果は計4報の査読付論文と11件の学会発表により公表し、国内外で高い評価を得た。

研究成果の概要(英文)：During the research period, analytical method was developed to quantify coenzyme F430 from various environmental samples. The sensitivity of the developed method is 100000 times higher than the conventional method, which can quantify coenzyme F430 at 0.1 femto mol. The method made it possible to quantify coenzyme F430 from marine sediments, microbial mats, paddy soils, groundwater etc. Coenzyme F430 was detected coalbeds located at 2000 m below seafloor offshore Shimokita Peninsula (world record of deep biosphere), suggested presence of active methanogens. This study was published from Science.

The scientific results was published from totally 4 peer reviewed scientific journals and presented at 11 conferences and received high international evaluation.

研究分野：有機地球化学

キーワード：補酵素F430 機能特異分子分析 メタン生成 嫌気的メタン酸化 液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析

### 1. 研究開始当初の背景

海洋堆積物中には多種多様な代謝経路をもつ原核生物が存在し、それらの活動は地球の物質循環を駆動しているだけでなく、気候変動の原因になり、一方では人間社会に有用な物質を生み出している。その代表的な生物がメタン生成アーキアであり、それが生み出すメタンは地球温暖化の原因や将来のエネルギー資源として期待されるメタンハイドレートの起源物質となる。そのため、海洋堆積物中のメタン生成アーキアの分布と活動を定量的に解明するための研究が、統合国際深海掘削計画 (IODP) をはじめとする国内外の様々なプロジェクトで行われている。従来の研究手法には、膜脂質の定量分析や分子生物学的手法、同位体ラベルによる活性試験があるが、指標性、実験操作によるバイアス、海底堆積物中での保存性などの問題から現場でのメタン生成アーキアのバイオマスや活性を定量的に理解するには限界があった。特に、研究代表者が関わってきた有機地球化学分野では、膜脂質の極微量 (ナノモル) での定量分析を用いて堆積物の解析を行ってきた。しかし、膜脂質にはメタン生成アーキアのみを反映し、かつメタン生成アーキア全体を反映するような高い指標性がなく、結果として定量的な議論が不可能であった。

申請者は、メタン生成反応に関わる機能性分子をバイオマーカーとして用いれば、メタン生成アーキアのみでの分布と活動の全体像を定量的に解明できるという結論に至り、補酵素 F430 に注目した。F430 はメタン生成反応の最も重要な最終段階を触媒する補酵素で、全てのメタン生成アーキアが保有し、かつ他の生物が保有しないため、極めて指標性が高い。そのため、F430 の堆積物中での分布を定量的に調べれば、メタン生成アーキアの分布と活動を定量的に解明できるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでオーダーレベルでしか議論ができなかった海洋堆積物深部でのメタン生成アーキアのバイオマスや活動を定量的に評価するツールを開発・実用化する事である。本研究では、これまで応用された事のない機能性分子 F430 の堆積物中における濃度を精密に分析する手法を開発し、メタンアーキアの分布や活動度を定量的に明らかにする。

これにより、海洋中のメタン生成ポテンシャルが定量的に議論できるようになり、地下生物圏、メタンハイドレートの形成過程、地球の炭素循環や気候変動における研究に新しい展開が期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) 固相抽出カラムや高速液体クロマトグラフを用いて、堆積物、土壌、生体試料、水試料など、様々な環境試料中から補酵素

F430 を高い回収率で抽出、精製する手法を開発する。

(2) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) や NMR を用いて、定量分析法開発に不可欠な補酵素 F430 の標品を培養菌体より作成する。

(3) 蛍光化試薬による化学修飾および蛍光検出器による分析や質量分析計を用いた分析法を開発することにより、現行の吸光検出器を用いた分析法の 1000 倍程度の高感度定量分析法を開発する。

(4) 開発した定量分析法を環境試料に応用することにより、補酵素 F430 の分布を明らかにする。最終的には海洋堆積物のような低濃度試料からの定量検出を目指し、メタン生成場におけるメタン生成アーキアのバイオマスやメタン生成ポテンシャル評価方法を確立する。

### 4. 研究成果

#### (1) 補酵素 F430 の抽出・精製法の開発

氷浴上での低温・酸性下での超音波抽出、低温条件下でのイオン交換および逆相クロマトグラフィーによる濃縮・精製、メチルエステル化による安定化と低極性下により、作業中の分解を極限まで抑えながら、95%以上の収率で菌体試料から補酵素 F430 を回収する手法を開発した。

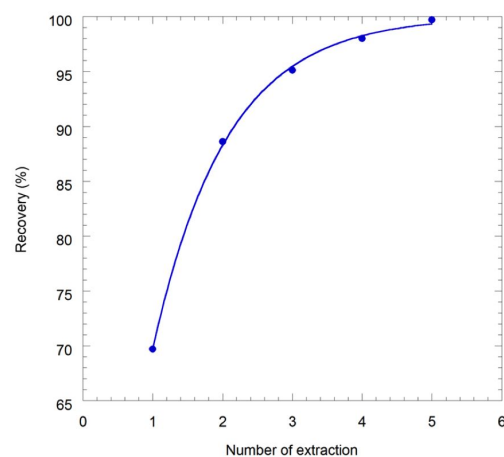


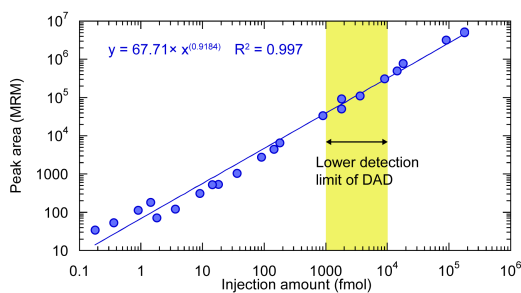
図 1. 超音波による抽出回数と補酵素 F430 の回収率。3 回以上の抽出で回収率 95%以上となる。

#### (2) 補酵素 F430 標品の作成

補酵素 F430 をメチルエステル誘導体化することで安定化し、HPLC での単離中の分解を抑えながら精製することを可能にした。単離した補酵素 F430 溶液を元素分析や NMR を用いて、純度の評価をした結果、極めて純度の高い標準溶液を作成することに成功し、世界で唯一無二の補酵素 F430 標品を作成することを実現した。

### (3) 高感度定量分析法の確立

HPLC による補酵素 F430 の分離時、移動相に不揮発性の塩をイオンペア剤として用いることで、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) での分析を可能にした。LC-MS/MS での分析法開発により、従来の吸光検出器を用いた分析法に対し 10 万倍の高感度定量分析法を確立し、サブフェムトモル ( $10^{-16}$  モル) での補酵素 F430 の定量分析を可能にした。当初の計画では 1000 倍程度の高感度化を目指していたが、予想を上回る高感度化となった。これは、補酵素 F430 のイオン化効率が高いことに起因する。現在の感度ではメタン生成アーキア約 1000 細胞ほどでの検出が可能である。今後は HPLC 部の配管および分離カラムの径を細小化する事で、1 細胞レベルでの超高感度分析を目指す。



また、感度は LC-MSMS よりも劣るが、

### 図 2. 補酵素 F430 の LC-MS/MS による分析感度

LC-ICPMS (誘導結合プラズマ質量分析計) による補酵素 F430 の検出にも成功した。環境試料への応用にはさらなる高感度化が必要であるが、実現されれば補酵素 F430 亜種の探査や分解物の特定により、新たな指標性の発見や古メタン生成環境復元と温暖化との関連など重要度の高い研究への派生が可能になる。

### (4) 環境試料への応用

高感度定量分析法を、水田土壌、微生物マット、海洋堆積物、地下水に応用した結果、様々な環境試料で補酵素 F430 を定量検出する事に成功した。特にこれまで不可能であった海洋堆積物においても補酵素 F430 を検出するという当初の研究目的を達成することが出来た。

また、国際統合深海掘削計画 (IODP) により調査された下北沖海底下 2000m の石炭層において、補酵素 F430 の検出に成功し、科学掘削史上最も深い海底堆積物中で活きた微生物 (メタン生成アーキア) のシグナルを検出する事に成功した。本研究は Science 誌に掲載された。

### (5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトおよび将来の展望

本研究で対象としている補酵素 F430 のよ

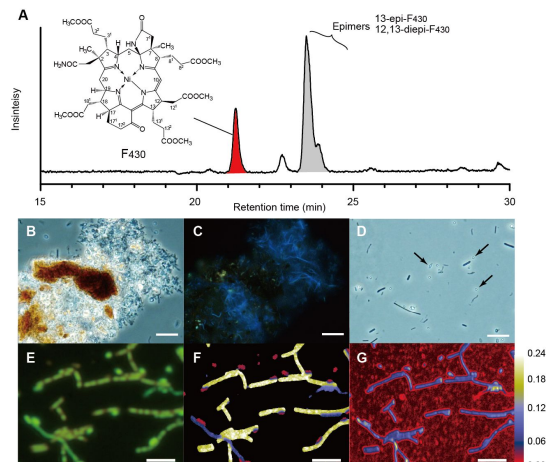


図 3. 下北半島沖海底下 2000 m の石炭層から検出した補酵素 F430 (Inagaki et al., 2015, Science, 「5. 主な研究論文等」参照)

うな機能特異分子を分析し、環境中の特定の代謝を正確に定量検出するアプローチは有機地球化学や微生物学的に全く新しい試みである。特に本研究で扱うメタン生成アーキアは物質循環、生命の起源、エネルギー資源、地球温暖化などの重要な研究課題に直結するため、光合成生物に匹敵するほど極めて重要度の高い微生物である。このメタン菌を本研究のように高感度に定量的に検出する手法は存在しないため、国内外の評価も極めて高い。例えば、抽出・精製から環境試料への応用までをまとめた補酵素 F430 の高感度定量分析法に関する研究論文は化学分析において国際的に最も権威のある Analytical Chemistry 誌に掲載され、査読段階でレビューからは上位 5% に入る重要な研究であるとの評価を受けた。国内誌 Researches in Organic Geochemistry 誌では掲載号の中で最も質の高い論文であることから、掲載号の表紙デザインとなった。また、極めて厳選された内容だけが口頭発表に選出される国際有機地球化学会 (IMOG) では、2015 年に開催された学会においてプレナリーセッションに選出され、2016 年度に開催される Japan Geoscience Union Meeting 2016 の国際セッションでは招待講演の依頼を受けた。

今後は緻密な培養実験と現場観測の両軸から補酵素 F430 濃度を用いて現場のメタン生成ポテンシャルやバイオマス分布を見積もるための研究を行うことで、本研究で行った「分析手法の確立」から「研究手法への確立」を目指す。

また、補酵素 F430 を皮切りに、機能特異分子分析というアプローチ法や金属錯体有機物の有機地球化学的応用へ展開していきたい。

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4件)

Kaneko, M., Takano, Y., Ogawa, N.O., Sato, Y., Yoshida, Y., Ohkouchi, N. (2015) Estimation of methanogenesis by quantification of coenzyme F430 in marine sediments. *Geochemical Journal*, in press. 査読有  
Doi:10.2343/geochemj.2.0410

Inagaki, F., Hinrichs, K.-U., Kubo, Y., Bowles, M.W., Heuer, V.B., Hong, W.-L., Hoshino, T., Ijiri, A., Imachi, H., Ito, M., Kaneko, M., Lever, M.A., Lin, Y.-S., Methé, B.A., Morita, S., Morono, Y., Tanikawa, W., Bihan, B., Bowden, S.A., Elvert, M., Glombitza, C., Gross, D., Harrington, G.J., Hori, T., Li, K., Limmer, D., Liu, C.-H., Murayama, M., Ohkouchi, N., Ono, S., Park, Y.-S., Phillips, S.C., Prieto-Mollar, X., Purkey, M., Riedinger, N., Sanada, Y., Sauvage, J., Snyder, G., Susilawati, R., Takano, Y., Tasumi, E., Terada, T., Tomaru, H., Trembath-Reichert, E., Wang, D.T. and Yamada, Y. (2015) Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science*, 349, 420-424. 査読有  
DOI: 10.1126/science.aaa6882

金子雅紀 (2015) 堆積物中のアーキア膜脂質同位体分析のメタン生成場への応用. *Researches in Organic Geochemistry*, 31, 1-14. 査読有  
[http://www.ogeochem.jp/pdf/ROG\\_BN/vol131/v31\\_pp1\\_14.pdf](http://www.ogeochem.jp/pdf/ROG_BN/vol131/v31_pp1_14.pdf)

Kaneko, M., Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Asakawa, S., Watanabe, K., Shima, S., Krueger, M., Matsushita, M., Kimura, H., and Ohkouchi, N. (2014) Quantitative analysis of coenzyme F430 in environmental samples: a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3633-3638. 査読有  
DOI: 10.1021/ac500305j

[学会発表](計11件)

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Fumio Inagaki, Kai-Uwe Hinrichs and Naohiko Ohkouchi. Analysis of coenzyme F430 as a function-specific biomarker for estimation of methanogenesis and

anaerobic methane oxidation, IMOG2015, Sep.17,2015, Prague, Czech.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa and Naohiko Ohkouchi. Carbon isotopic composition of coenzyme F430 from anaerobic methane oxidizing archaea, *Goldschmidt2015*, Aug.18, 2015, Prague, Czech.

金子雅紀・高野淑識・小川奈々子・大河内直彦, LC-MS 分析時の夾雑物の影響 - F430 の定量・同位体分析のために -, 第32 回日本有機地球化学シンポジウム, 0-13, 2014 年 11 月 7 日, ニューウェルシティ湯河原(静岡県熱海市)

金子雅紀・高野淑識・大河内直彦・木村浩之, メタン生成補酵素 F430 の超高感度定量分析法: 環境中のメタン生成および嫌氣的メタン酸化ポテンシャルへの応用, 環境微生物系学会合同大会, P17-9, 2014 年 10 月 22 日, アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa, Martin Krüger, Naohiko Ohkouchi. Quantitative analysis of coenzyme F430 in marine sediments: function-specific compound analysis for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *ISME2014*, Aug.25, 2014, Seoul, Korea.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi, Function specific compound for methanogenesis and anaerobic methane oxidation: a new approach to quantify distribution and activities. *AOGS*, Jul.30, 2014, Sapporo, Japan.

金子雅紀・高野淑識・大河内直彦・浅川晋・渡邊健史, メタン生成補酵素 F430 を用いたメタン生成場と規模の定量. 第5 回メタンハイドレート総合シンポジウム, A-24, 2013 年 12 月 5 日, 産業技術総合研究所メタンハイドレート研究センター(東京都江東区)

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi, Quantitative analysis of Factor F430 as a methanogen biomarker. *IMOG2013*, Sep.18-19, 2013, Tenerife, Spain.

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Takeshi Watanabe, Susumu Asakawa, Seigo Shima, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi. Quantification of methanogenic potential in environmental samples. *Goldschmidt2013*, Aug.27, 2013, Florence, Italy.

金子雅紀・高野淑識・小川奈々子・大河内直彦, メタン生成場と規模を測る. 第31 回日本有機地球化学シンポジウム, 0-27, 2013 年 8 月 20, 倉敷市文芸会館(岡山県倉敷市)

金子雅紀・高野淑識・大河内直彦，海底  
下メタン生成研究の新しいアプローチ法，  
日本地球惑星科学連合 2013 年度連合大  
会，MIS24-14，2013 年 5 月 24 日，幕張  
メッセ（千葉県千葉市）

〔その他〕

ホームページ

海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野

<http://www.jamstec.go.jp/biogeochem/index.html>

産業技術総合研究所・地圏微生物研究グループ

<https://unit.aist.go.jp/georesenv/geomicrob/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 雅紀 (KANEKO, Masanori)

産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部  
門・主任研究員

研究者番号：80633239

### (2) 研究協力者

大河内 直彦 (OHKOUCHI, Naohiko)

海洋研究開発機構・生物地球化学分野・分  
野長

### (3) 研究協力者

高野 淑識 (TAKANO, Yoshinori)

海洋研究開発機構・生物地球化学分野・主  
任研究員

### (4) 研究協力者

奈良岡 浩 (NARAOKA, Hiroshi)

九州大学・理学研究院・教授

### (5) 協力研究者

嶋 誠吾 (SHIMA, Seigo)

Max Planck Institutes, Microbial  
Protein Structure, Research Group  
Leader.

### (6) 研究協力者

渡邊 健史 (WATANABE, Kenji)

名古屋大学・農学部・講師