

令和元年6月18日現在

機関番号：27101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05335

研究課題名(和文) ガスハイドレート鉱床形成過程における生物地球化学的続成作用の解明

研究課題名(英文) Effect of biogeochemical diagenesis on gas hydrate deposit development

研究代表者

柳川 勝紀 (Yanagawa, Katsunori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：50599678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：深海底に分布するガスハイドレートが微生物によって受ける続成作用を、生物地球化学の観点から解析した。堆積物中のメタンは、系統的に多様な嫌氣的メタン酸化アーキアの一類によって分解を受けていた。嫌氣的メタン酸化アーキアは堆積物中で棲み分けをしており、それは物理化学環境に依存的であった。また、堆積物のみならず、堆積物中に埋没する炭酸塩ノジュール内にも微生物が生息し、メタンを酸化していることが示唆された。さらに、ガスハイドレート胚胎堆積物中ではメタノールの異化的分解とメタノールの生産が活発であることも高感度微生物活性測定法から示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガスハイドレートは、深海底に広く分布し、次世代エネルギー資源として期待される。一方で、その海底資源の起源を知る上での手がかりとなる炭化水素は微生物活動によるメタンの消費や付加を受けることが本研究から明らかとなった。ガスハイドレート鉱床成因への微生物の寄与と資源ポテンシャルに与える影響を考慮する際、深海堆積環境における様々な生物地球化学的続成作用における素過程に着目する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Methane in sedimentary environment is anaerobically oxidized by archaeal methanotrophs, which shows niche segregation depending on physical and chemical condition. As well as deep-sea sediments, calcium carbonate nodule harbors abundant microbes including anaerobic methanotrophic archaea, and contributes significant methane consumption in gas-hydrate bearing sediment. Furthermore, we quantified biological flux and lifetime of methanol in anoxic marine sediments. Our results suggest that microbial reactions play an important role in the sources and sinks of methanol in seafloor sediments. Overall, this study suggests that marine gas hydrate deposit is affected by biogeochemical diagenesis in the subsurface biosphere.

研究分野：地球微生物学

キーワード：ガスハイドレート メタン 嫌氣的メタン酸化 炭酸塩ノジュール 海底下生命圏

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

深海底に広く分布する次世代エネルギー資源として期待されるガスハイドレート(通称メタンハイドレート)は、地下深部で生成された炭化水素のうちの一部が堆積物中を上方に移動し、海底面まで到達したものである。ガスハイドレート産出海域では、浅層で得られる炭化水素を手がかりに、深部に存在するであろう供給源の推定が行われる。しかし、海底深部の炭化水素がどのようなプロセスで生成され、どういった経緯、過程を経て海底面付近まで到達してきたのか、全容解明には遠い。一方、これまでの海底下生命圏を対象とした研究で、生息微生物がメタン、エタン、プロパン、ブタンといった炭化水素の生産と消費に積極的に関わっているということが示唆され始めてきた。炭化水素が堆積物中を上方移動してくる中で受ける、こうした様々な続成作用についての理解が進めば、ガスハイドレート鉱床成因における微生物の寄与と資源ポテンシャルに与える影響についての統合的理解が進むものと期待される。

### 2. 研究の目的

ガスハイドレート産出域において、メタンの濃度やその炭素・水素同位体比といった地球化学的情報は、ガスの起源を探る上で極めて重要な指標となっている。海洋堆積物中ではメタンが好氣的メタン酸化菌や嫌氣的メタン酸化アーキアなどの特定の微生物によって分解されることから、その素過程における生物地球化学的調査も重要である。先行研究において、ガスハイドレートの胚胎する海洋堆積環境では、微生物の生息する堆積物間隙中の物理化学因子によって、微生物の群集組成が大きく変化することが報告された。このことは、メタンの分解や付加、エタン、プロパンといった低分子炭化水素の挙動にも影響し、ひいてはガスハイドレートの続成にも関与することが期待される。また、メタンの分解反応で生じた二酸化炭素は炭酸塩鉱物となり海底に沈殿するが、形成した炭酸塩鉱物内部にも微生物が居残り、現場の炭素循環に関与することが近年指摘されている。そこで本研究では、微生物数の多く、微生物活性も高いと期待される表層海底堆積物や炭酸塩ノジュールを対象に、堆積物の表層から深部における生息環境の変化とそれに対応する微生物の分布と棲み分けの解明を試みた。特に、ガスハイドレート胚胎域の堆積物を用いて、メタンの分解を担う微生物を対象に、遺伝学的、生理学的、生態学的特徴の解明を目指した。また、それらの研究と並行して、嫌氣的堆積物中でのメタン循環を解明できるような高感度微生物活性測定法も開発し、特に低濃度メタン環境での堆積物中での炭素循環の解明に取りかかった。それらの研究を通して、海底堆積物や炭酸塩といった表層堆積環境における、浅部堆積物や炭酸塩ノジュール中におけるメタン生成と分解に至る一連の微生物活動の流れを整理し、メタンハイドレート鉱床の生物地球化学的続成過程とメタンソースとシンクの役割についての素過程解明を目指して研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### サンプリング

本研究を進めるにあたり、日本海ガスハイドレート海域と沖縄トラフの海底熱水系をモデルケースとして設定した。堆積物試料は日本海上越沖や中部沖縄トラフで既に取得、保存されているものに加え、日本海隠岐島沖のガスハイドレート胚胎堆積物試料での研究調査航海に参加して、取得した堆積物と炭酸塩ノジュールも用いた。堆積物試料は、海底面からの深度が様々なものを分析できるように、微生物の分布を知る上で適切と考えられるサブサンプリングを実施した。炭酸塩ノジュール試料については mm-cm 間隔で輪切りにした後に、特定微生物の局所的分布を調べた。

#### 微生物数の定量

堆積物中の全微生物数は、直接計数法を採用することで、堆積物 1cm<sup>3</sup>あたりの微生物細胞数を求めた。また、試料から原核生物 DNA を抽出し、特異的プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を対象としたリアルタイム定量 PCR 解析で定量的微生物群集構造を解析した。嫌氣的メタン酸化反応の鍵酵素遺伝子である *mcrA* についても同様の解析を実施した。

#### 微生物群集構造解析

複数深度ごとで抽出した原核生物由来 DNA を対象とした次世代シーケンスによるアンプリコン解析を実施し、メタン生成アーキアや嫌氣的メタン酸化アーキアなどのメタンの生成と消費に関わる微生物の分布を調査した。得られた 16S rRNA 遺伝子の配列情報をもとに嫌氣的メタン酸化アーキアを標的とするオリゴヌクレオチドプライマーもデザインし、定量リアルタイム PCR による定量評価も実施した。この方法により、微生物の分布、群集構造、機能について多角的な解析が実施できた。

#### 微生物活性評価

微弱な微生物反応を検出するために、放射性同位体標識トレーサーを用いた超高感度活性測定法を確立した。この方法は、<sup>14</sup>C 標識メタン、<sup>14</sup>C 標識重炭酸塩、<sup>14</sup>C 標識メタノールなどの放射性同位体ラベルトレーサーを添加し、一定期間の培養を行った後、トレーサーの分解産物(メタン、二酸化炭素など)をガスクロマトグラフで分離し、高感度放射能検出器で定量的に評価する方法である。この方法を用いて、ガスハイドレートの主成分であるメタンの挙動を把握すべく、

深部海底堆積物や炭酸塩鉱物中で起こるメタン生成速度と嫌氣的メタン酸化速度の算出を実施した。

#### 4. 研究成果

ガスハイドレート胚胎堆積物の表層から深部に生息する微生物の分布と棲み分けを理解するために、次世代シーケンサーMiseqを用いて、リボソームを構成する16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコン解析を実施した。また、メタンフラックスが高いことが期待される浅海の堆積物試料でも同様の解析を実施した。間隙水中の硫酸塩が枯渇するまで深度方向に未培養性の細菌の割合が増加し、それ以降は群集構造に顕著な変化は見られなかった(図1)。AC1など一部の未培養性系統群はメタン生成ゾーンにのみ分布していた。嫌氣的メタン酸化アーキア由来の16S rRNA遺伝子は極めて少数派であったため、嫌氣的メタン酸化反応の鍵酵素遺伝子である*mcrA*を対象にphyloTYPE分析を実施した。その結果、既知系統に近縁なものは硫酸塩-メタン境界近傍で検出されたが、相同性が低いものは浅部や深部で検出された。それらのグループは、従来の嫌氣的メタン酸化反応とは異なる代謝か、反応速度論的な制約が伴う可能性が考えられたため、放射性同位体標識トレーサーを用いた超高感度活性測定をおこなったが、嫌氣的メタン酸化活性が極めて微弱であったことから、その理由を言及することはできなかった。なお、それらの系統群が富む湧水環境では、硫酸塩や硝酸塩はほとんど含まれず、溶存鉄濃度が多いという地球化学的特徴があり、その試料を用いて活性測定を実施したところ、活発な嫌氣的メタン酸化活性も検出することができた。一方、別の海域で取得したガスハイドレート胚胎堆積物では、<sup>14</sup>C-メタノールを放射性同位体ラベルトレーサーとして用いた活性測定実験で、微生物によってメタノールが異化により二酸化炭素に分解されていることが判明した(図2)。この試料では、培養試料中のメタノール濃度は有意に減少しておらず、消費と平行してメタノールの生成が行われていることも示唆された。

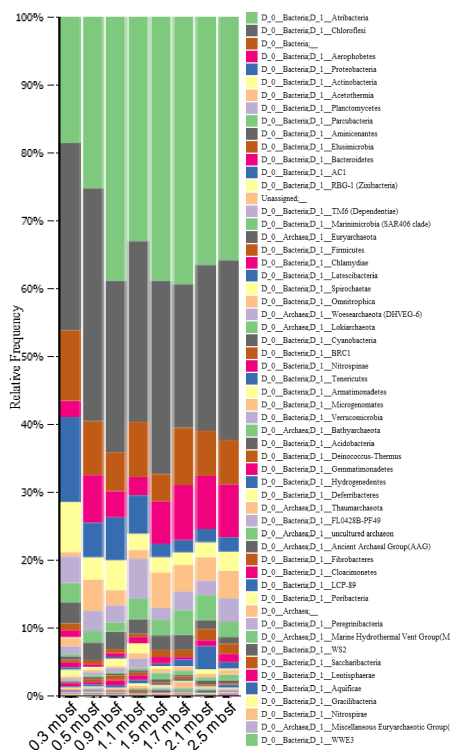


図 1.

また、隠岐諸島周辺の海底から取得された炭酸塩ノジュールを試料として、その内部に生息する微生物群集の遺伝学的、生理学的、生態学的解析も実施した。試料から作成した薄片の観察より、ミクライトから構成され、一部からは有孔虫骨格や巣穴様構造が存在することが示された。さらに、ノジュール形成後のステージで続成によりセメントされた部分も認識された。カソードルミネッセンス法では、マンガン濃度が高いと推定される組織も示された。さらに、炭素同位体比分析からは炭素の起源がメタンに由来することが示された。これらのことは、浅部環境での嫌氣的メタン酸化反応によって炭酸塩ノジュールが生成されたことを示唆していた。顕微鏡解析と分子生態学的解析により、ノジュール試料内部には近接堆積物とほぼ同等の微生物が存在するが、その組成は異なっていることが示された。また、嫌氣的メタン酸化アーキア由来の遺伝子が堆積物中だけでなく、ノジュール内部からも検出された(図3)。この傾向は、嫌氣的メタン酸化反応の鍵酵素遺伝子を対象としたリアルタイム定量PCR解析と分子系統解析でも支持された。これらの結果は、嫌氣的メタン酸化アーキアによってメタンが分解され、その一部は炭酸塩鉱物として海底面に存在することを暗示していた。海底炭酸塩鉱物というこれまでに目を向けられていなかったメタンシンクは、海底堆積物と同等の動きをする可能性が示された。特に、凝集して沈殿したノジュール構造物の内部では嫌氣的メタン酸化アーキアのニッチが存続し、断続的にメタン分解に関与していると考えられる。

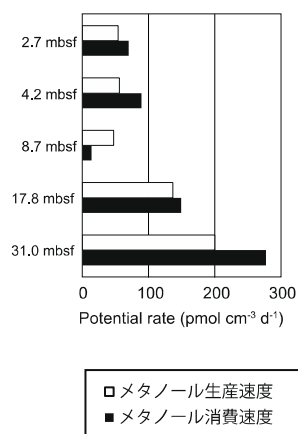


図 2.

本研究では一貫して、メタンフラックスの強弱に対応した微生物生態系に着目したことで、ガスハイドレート胚胎域における生物地球化学的物質循環でこれまで見逃されていた部分に迫ることができた。特に、深部堆積物中の微生物によるメタン生成から浅部堆積物

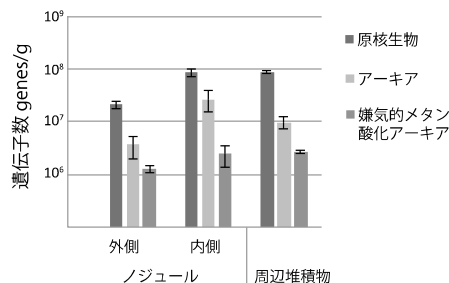


図 3.

や炭酸塩鉱物中のメタン分解に至る一連のメタンソースとシンクを評価し、メタンハイドレート鉱床の生物地球化学的続成過程について統合的な理解に迫ることができた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 7 件)

Yanagawa K, Ijiri A, Breuker A, Sakai S, Miyoshi Y, Kawagucci S, Noguchi T, Hirai M, Schippers S, Ishibashi J, Takaki Y, Sunamura M, Urabe T, Nunoura T, and Takai K. (2017). Defining boundaries for the distribution of microbial communities beneath the sediment-buried, hydrothermally active seafloor. *The ISME Journal*. 11: 529-542.

査読有

石橋純一郎, 柳川勝紀, 高井研. (2017) 熱水域掘削に基づく新しい熱水系描像と生命圏の限界: IODP 331 次航海の成果. *地質学雑誌*. 237-250. 査読有

Kano A, Miyahara R, Yanagawa K, Mori T, Owari S, Tomaru H, Kakizaki Y, Snyder G, Shimono T, Kakuwa Y, Matsumoto R. (2017). Gas hydrate estimates in muddy sediments from the oxygen isotope of water fraction. *Chemical Geology*. 470:107-115. 査読有  
Kouduka M, Tanabe A. S, Yamamoto S, Yanagawa K, Nakamura Y, Akiba F, Tomaru H, Toju H, Suzuki Y. (2017). Eukaryotic diversity in late Pleistocene marine sediments around a shallow methane hydrate deposit in the Japan Sea, *Geobiology*. 15:715-727.

査読有

Yanagawa K, Tani A, Yamamoto N, Hachikubo A, Kano A, Matsumoto R, Suzuki Y. (2016). Biogeochemical cycle of methanol in anoxic deep-sea sediments. *Microbes and Environments*. 31: 190-193. 査読有

Hachikubo A, Yanagawa K, Tomaru H, Lu H, Matsumoto R. (2015). Molecular and isotopic composition of volatiles in gas hydrates and in pore water from Joetsu Basin, eastern margin of Japan Sea. *Energies*. 8: 4647-4666. 査読有

Tasumi E, Yanagawa K, Miyazaki J, Takai K (2015) In vitro high-pressure incubation and activity measurement of deep-sea methanogenic archaea. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*, eds McGenity TJ, Timmis KN, & Nogales B (Springer), pp 1-14.

査読有

### 〔学会発表〕(計 5 件)

柳川勝紀. (2018). メタンを喰らう 暗黒地下圏微生物の生き様 . 第 7 回広島大学・海洋研究開発機構合同シンポジウム 生命地球科学の最前線

Yanagawa K. (2016). Biogeochemical cycle of methanol in anoxic deep-sea sediments of the eastern Japan Sea. 日本地球惑星科学連合 連合大会

Yanagawa K. (2016). Biogeochemical cycle of methanol in anoxic deep-sea sediments of the eastern Japan Sea. *Goldschmidt2016*.

柳川勝紀. (2016). 深海底堆積環境におけるメタノールの嫌氣的分解. 第 31 回日本微生物生態学会大会

Yanagawa K. (2016). Microbial life beneath deep-sea hydrothermal vent. *International Symposium on Plant Signaling and Behavior 2017*

### 〔図書〕(計 件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。