

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 4 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012（2011.9.～2012.9 中断）

課題番号：22710035

研究課題名（和文）陸域における微生物による嫌氣的メタン酸化プロセスの解明

研究課題名（英文）Anaerobic oxidation of methane in terrestrial subsurface environments

研究代表者

竹内 美緒（TAKEUCHI MIO）

独立行政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：20357403

研究成果の概要（和文）：関東平野の沖積層を対象に、嫌氣的メタン酸化に関わる地球化学的／微生物学的解析を実施した結果、陸域地下圏において嫌氣的メタン酸化が行われていることを初めて発見した。また、それを担う微生物は海底で嫌氣的メタン酸化を行っている古細菌（ANME）に近縁だが、系統的にやや異なることが明らかになり、おそらく淡水環境に適応したサブグループとして ANME-1a-FW を提案した。本研究により陸域地下圏の炭素循環経路に微生物による嫌氣的メタン酸化が初めて加わる事になった。

研究成果の概要（英文）：Holocene sediments in the subsurface of the Kanto Plain in Japan were collected for biogeochemical and molecular analysis. The potential activity of the anaerobic oxidation of methane (AOM) was detected in sediment slurry incubation experiments with a $^{13}\text{CH}_4$ tracer. Higher AOM activity was observed in low-salinity treatment compared with high-salinity condition (20‰), which supports the adaptation of microbes involved in AOM in freshwater habitats. The 16S rRNA sequence analysis clearly revealed the presence of a distinct subgroup of ANME-1, designated ANME-1a-FW.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	101,220	30,366	131,586
24 年度	1,598,780	479,634	2,078,414
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：メタン、嫌氣的メタン酸化、微生物、古細菌、地下圏

1. 研究開始当初の背景

メタンは二酸化炭素に次ぐ地球温暖化ガスであるため、地球におけるメタンサイクルの解明は重要な課題である。微生物はメタンサイクルに大きく関与しており、メタン生成、消費ともに行っている。メタン消費活動としては古くから好気環境でのメタン酸化が知られていたが、2000年に嫌氣的環境でメタン

酸化を行う古細菌（ANME）が発見された後、嫌氣的メタン酸化は主に海底堆積物で調べられてきた。海底堆積物では深部で生成されるメタンの7-8割を嫌氣的メタン酸化活動が消費していると考えられている。一方で陸域地下圏での知見は全くなく、陸域地下圏における微生物による嫌氣的メタン酸化のメタンサイクルへの重要性は明らかではなかつ

た。

2. 研究の目的

陸域地下圏における微生物による嫌氣的メタン酸化の実態を明らかにするとともにそれを担う微生物を特定する。

3. 研究の方法

関東平野の沖積層を対象とし、掘削試料を用いた解析を実施する。嫌氣的メタン酸化速度の測定は安定同位体でラベルしたメタンを用い、溶存無機炭素の同位体比の変化をGC-IRMSでモニターする。潜在活性が確認できた場合には、現場活性による定量評価を試みる。微生物の特定は、DNAやRNAを抽出し、16S rRNA遺伝子、メタン酸化に関与していると考えられる *mcrA* 遺伝子の解析により実施する。また、海底における嫌氣的メタン酸化はANMEと硫酸還元菌が共役して行っていると考えられていることから、硫酸還元に関わる酵素である *dsrA* 遺伝子も解析対象とする。

4. 研究成果

関東平野の沖積粘土層試料を新たに掘削により採取した(図1)。



図1 関東平野の沖積粘土層

これを用いてまずは化学分析を実施した。間隙水中の塩濃度は $< 1.1 \text{ mM}$ であり、堆積物は海成ではあるものの、海水はほぼ天水に置き換わっていると考えられた。メタン濃度を分析した結果、沖積粘土層中央部をピークとし、上部また下部に減少していくプロファイルがみられ、嫌氣的メタン酸化活動が示唆された(図2)。

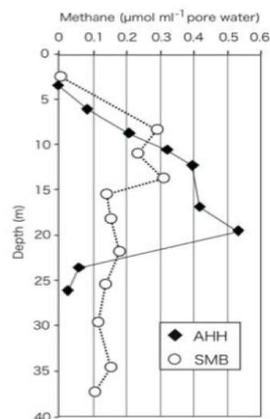


図2 沖積層におけるメタン濃度鉛直分布

安定同位体を用いて嫌氣的メタン酸化潜在活性を測定したところ、溶存無機炭素の同位体比に有意な変化がみられ、嫌氣的メタン酸化が行われていることが明らかになった。また、海底に生息している嫌氣的メタン酸化古細菌(ANME)は、高塩濃度環境で活性が高いことが知られているが、沖積層試料では、高塩濃度環境よりも低塩濃度環境で高い活性が見られ(図3)、海底のANMEとは異なり淡水環境に適応した微生物が嫌氣的メタン酸化を担っていることが示唆された。

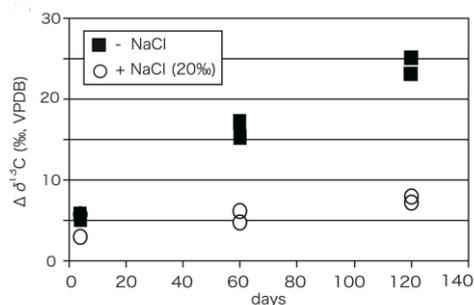


図3 高塩濃度環境(20% NaCl)、低塩濃度環境下における嫌氣的メタン酸化活性

沖積層試料から抽出したRNAを用いて現場でアクティブな微生物を16S rRNA遺伝子を対象に解析した結果、海底に生息しているANME-1と近縁ではあるが、異なるクラスターを形成するサブグループの存在が示された(図4)。*mcrA* 遺伝子についても解析した結果、従来知られていた海底のANMEのものとは異なるクラスターに属するものが得られたことから、これらは淡水環境独自に進化してきたサブグループ(ANME-1a-FW)に由来す

ると考えられた。

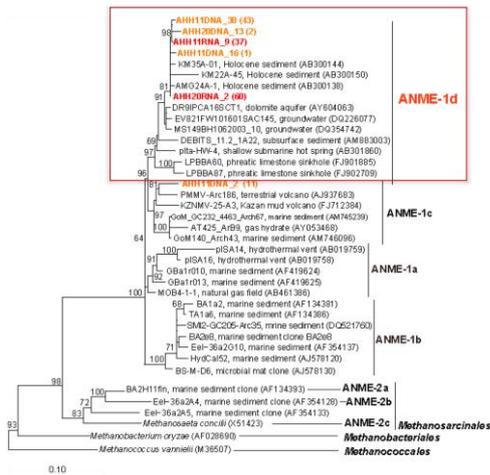


図4 16S rDNA 遺伝子解析結果 (枠内が ANME-1a-FW)

さらに、硫酸還元菌の指標として異化的硫酸還元過程の最終段階で働く亜硫酸還元酵素の α サブユニットをコードしている *dsrA* 遺伝子についても解析を行った。その結果、海底で ANME と共役していると考えられているグループ (Desulfosarcina/Desulfococcus group) は検出されなかったことから、ANME-1a-FW は海底のグループとは異なる代謝機構を持つ可能性も示唆された。また、バクテリアに対する抗生物質 (ストレプトマイシン, アンピシリン) の添加は、嫌氣的メタン酸化速度に大きく影響しなかったことから、バクテリアが関与していない可能性も示唆されている。

嫌氣的メタン酸化の潜在活性が確認されたことから、現場活性による嫌氣的メタン酸化速度の定量評価を実施した結果、沖積粘度層の 15-20 m 付近に高い活性が存在することが明らかになった。メタン生成活性も検出されたものの、メタン酸化の方が卓越していると考えられた。

本研究では、これまで陸域地下圏で全く報告されていなかった微生物による嫌氣的メタン酸化活動の存在を証明することができた。これにより、陸域地下圏における炭素循環経路に従来考えられていなかった嫌氣的メタン酸化が加わる事となった。微生物による嫌氣的メタン酸化活動は、陸域においてもメタンの大気への放出を抑制している可能性が考えられる。今後、陸域地下圏メタンサイクルにおいてどの程度の重要性を持つのかを明らかにしていく必要がある。

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 1 件)

Takeuchi, M., H. Yoshioka, Y. Seo, S. Tanabe, H. Tamaki, H. A. Takahashi, S. Igari, D. Mayumi, S. Sakara. (2011) A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan. *Environmental Microbiology*, 13: 3206-3218. (査読有り) なし

〔学会発表〕 (計 5 件)

① H. Yoshioka, M. Takeuchi, S. Tanabe, H. Takahashi, H. Tamaki, S. Sakata. Microbial activities of methanogenesis and methane oxidation in terrestrial subsurface environment of the Kanto Plain in Japan, 2012 年 12 月 7 日, Moscone Center (San Francisco, USA)

② 竹内 美緒, 吉岡 秀佳, 徐 維那, 田邊 晋, 玉木 秀幸, 鎌形 洋一, 高橋 浩, 猪狩 俊一郎, 眞弓 大介, 坂田 将, Distribution and activity of ANME-1 archaea in the terrestrial subsurfaces, 第 26 回日本微生物生態学会大会, 2010 年 11 月 25 日, 筑波大学 (茨城県)

③ Takeuchi M., Yoshioka H., Seo Y., Tanabe S., Tamaki H., Kamagata Y., Takahashi H. A., Igari S., Mayumi D., and Sakata S. Anaerobic oxidation of methane in the terrestrial subsurface environment. 13th International Symposium on Microbial Ecology. 2010 年 8 月 23 日, Washington State Convention & Trade Center (Seattle, USA)

④ 竹内 美緒, 吉岡 秀佳, 徐 維那, 田邊 晋, 玉木 秀幸, 鎌形 洋一, 高橋 浩, 猪狩 俊一郎, 眞弓 大介, 坂田 将, 陸域地下圏のメタンフラックスにおける嫌氣的メタン酸化古細菌の役割. 第 28 回日本有機地球化学シンポジウム, 2010 年 8 月 5 日, 石油資源開発株式会社, (新潟県)

⑤ 竹内 美緒, 吉岡 秀佳, 徐 維那, 田邊 晋, 玉木 秀幸, 鎌形 洋一, 高橋 浩, 猪狩 俊一郎, 眞弓 大介, 坂田 将, 陸域地下圏における微生物による嫌氣的メタン酸化の解明, 日本地球惑星科学連合大会, 2010 年 5 月 24 日, 幕張メッセ小国際会議場 (千葉県)

〔その他〕

ホームページ等

産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・地圏微生物研究グループホームページ

<http://unit.aist.go.jp/georesenv/geomicrob/research.html#md07>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 美緒 (TAKEUCHI MIO)

(独)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：20357403