

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681003

研究課題名(和文)湖表水層に出現するメタン極大層の形成パターンと好氣的生成機構の解明

研究課題名(英文) Aerobic methane production in oxygenated water column of lake ecosystems

研究代表者

岩田 智也 (IWATA, Tomoya)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：50362075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,600,000円、(間接経費) 2,280,000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機構を明らかにするため、野外調査と室内実験を行った。野外調査の結果、多くの湖で好気環境にメタン極大が出現し、とくに深くて貧栄養な湖でメタン極大が形成されやすいことを明らかにした。また、無機リンの枯渇に伴うシアノバクテリアの有機リン代謝が、その形成に関与していると考えられた。そこで培養実験を実施したところ、C-Pリアーゼによるメチルホスホン酸分解がメタン生成の原因であると判明した。さらにCARD-FISHにより、シアノバクテリアであるSynechococcusが、無機リンが枯渇した状況でMPn代謝を駆動させ好氣的にメタンを生成していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We conducted the field and laboratory studies to identify the aerobic methane production pathways in lake ecosystems. The field studies revealed that dissolved CH₄ concentrations often exhibit a subsurface maximum during the stratified period in many lakes. In particular, large, oligotrophic lakes tended to form large CH₄ maximum. Moreover, seasonal occurrence of the CH₄ maximum was closely related to the abundance of planktonic microbes (Synechococcus), suggesting CH₄ production by microbes even in the presence of O₂. Furthermore, the microcosm experiments showed the aerobic CH₄ production when methylphosphonic acid (MPn) was added to the P-deficient lake water, suggesting the expression of a carbon-phosphorus lyase for P utilization and producing CH₄ from MPn. The present study revealed the causal relationships between aerobic microorganisms, their phosphonate metabolism, and CH₄ production, which clarify the novel methane production pathway observed in many oligotrophic lakes.

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：メタン極大 好氣的メタン生成 有機リン代謝 メチルホスホン酸 シアノバクテリア Synechococcus

1. 研究開始当初の背景

メタンは強力な温室効果ガスであり、湖沼や湿原などの陸水域が主な自然発生源である。なかでも湖沼から大気へのメタン放出量は、全球規模のメタン収支に大きく影響しており、湖内におけるメタン生成プロセスが地球表層の温度環境に大きく関わっていると考えられている。

従来、湖沼から放出されるメタンは湖底の嫌気環境で生成したものと考えられてきた。しかし、湖沼表水層において溶存メタンの極大層が出現することが、いくつかの湖で確認されている。このことは、湖の好気環境においても未知のメタン生成機構が存在している可能性を示唆している。しかし、好氣的メタン生成の機構とそれに関与する微生物は未だ明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 様々な湖沼で調査を行い、好気環境におけるメタン極大の有無とメタン極大の形成に影響を及ぼす環境要因を明らかにすることを目的とする。さらに、(2) 制限栄養元素、代謝および基質が好氣的メタン生成に及ぼす影響をバッチ培養により明らかにするとともに、浮遊性細菌群集の鉛直分布を CARD-FISH 法により定量化して溶存メタン濃度の季節変化との対応関係を評価する。以上のアプローチにより、湖における好氣的メタン生成に関わる微生物と代謝プロセスを特定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メタン極大の形成パターンの解明

野外調査は 2011 年 7 月から 10 月にかけて、山梨県、長野県および神奈川県計 14 湖沼で行った。各湖沼では、湖心において鉛直方向に物理環境の計測と採水を行った。溶存メタン濃度はヘッドスペース法により測定し、溶存態無機窒素(DIN)、溶存態無機リン(SRP)

および溶存態有機リン(DOP)濃度は比色法により測定した。また、植物プランクトンの現存量としてクロロフィル a(Chl. a)濃度を蛍光法により定量化し、ピコシアノバクテリアの細胞密度は蛍光顕微鏡下で計数した。また、動物プランクトンの現存量も推定した。以上の結果をもとに、各湖沼の溶存メタンおよび環境変量の鉛直分布を定量化した。

(2) メタン極大の形成メカニズムの解明

2012 年と 2013 年には、湖内における好氣的メタン生成のメカニズムを明らかにするために、山梨県西湖の湖水を用いて実験を行った。2012 年には好氣的メタン極大が出現した水深 6 m から湖水を採取し、メタン生成過程を明らかにするための室内培養実験を行った。また、CARD-FISH では、7 月に西湖の 11 水深から採水した湖水試料に 5 つのプロープ(EUB338, ARC915, MG3, CYA361, Mg84+Mg705)をハイブリダイズさせ、浮遊性細菌群集の分布を定量化した。

2013 年には、2012 年の結果をもとに西湖にて 3 月～12 月に湖内の 4 地点において定期的に採水を行い、湖内における溶存メタン濃度の鉛直・水平分布とその季節変化を調査した。また、好氣的メタン極大が出現した 7 月には水深 7.5 m から湖水を採取し、メタン生成過程を明らかにするための室内培養実験を行った。実験 1 では DIN および DIP が好氣的メタン生成に及ぼす影響を、実験 2 では各種阻害剤(BES, DFM, 遮光)がメタン生成速度に及ぼす影響、実験 3 では有機リン化合物であるメチルホスホン酸(MPn)がメタン生成速度に及ぼす影響を評価した。各実験とも 4-5 日間のバッチ培養を行い、処理区間でメタン生成速度を比較することで、制限栄養元素濃度や微生物代謝およびホスホン酸の有無が好氣的メタン生成に及ぼす影響を評価した。また、CARD-FISH では、3 月、5 月、7 月および 10 月に採水した湖水試料に 4 つの

プローブ (EUB338 , CYA361 , Mg84+Mg705 , 405_Syn) をハイブリダイズさせ、浮遊性細菌群集の分布を定量化した。

4. 研究成果

(1) メタン極大の形成パターン

調査を行った 14 湖沼中 10 湖沼で、水柱の好気環境に明瞭なメタン極大が確認された。このメタン極大層の濃度は、大気平衡時の飽和溶存メタン濃度 (2.0-3.8nM) を遥かに上回っており、現場におけるメタン生成により形成されている可能性が考えられた。また、メタン極大は溶存酸素 (DO) や Chl. *a* 濃度が高い水温躍層付近に多く形成されていた。このことは、光合成活性の活発な水深でメタンが好氣的に生成している可能性を示唆していた。

メタン極大の有無に影響を及ぼす環境要因をロジスティック回帰分析で評価したところ、面積が広く水深が深い湖沼で、好気環境にメタン極大が出現する傾向が認められた。また、透明度が高く、リン濃度が低い湖沼でもメタン極大が形成されやすい傾向にあった。このことは、湖沼の栄養状態が好気環境におけるメタン生成に関与していることを示唆している。とくに、湖底からの栄養塩回帰が少ない深い湖ほどメタン極大が形成されやすく、反対に富栄養化しやすい浅い湖沼では出現しにくいと考えられた。

さらに、湖沼中のメタン極大層の環境変量を詳細に解析したところ、メタン極大は水深 10m 付近の亜表層に多く出現し、そこでは DO 濃度が高く SRP 濃度が低い傾向がみられた。また、ピコシアノバクテリアの細胞密度も高かった。このパターンは、2008 年に発見された外洋表層における好氣的メタン生成機構によく合致している (Karl et al. 2008)。すなわち、光合成活性の上昇に伴い無機態リンが枯渇すると、微生物は代替として有機態リンを代謝し、分解産物としてメタンが生成

する。この有機リン代謝を担う酵素は、淡水性のピコシアノバクテリア (*Synechococcus* spp. など) も有している。光合成活性の高い湖沼の水温躍層付近においても同様のリン代謝が駆動し、好気環境におけるメタン極大の形成に寄与しているものと考えられた。

(2) メタン極大の形成メカニズムの解明

2012 年以降に実施した野外調査の結果から、西湖では夏期において水温躍層近傍に巨大なメタン極大が出現することが明らかとなった。このメタン極大周辺ではクロロフィル *a* 濃度が高く、また溶存酸素濃度も上昇していた。また、湖底や沿岸帯、大気からメタンが供給された痕跡はなく、現場にて好気性生物によりメタンが生成しているものと考えられた。

培養実験では、栄養塩を添加した実験 1 および阻害剤を添加した実験 2 とともに、全ての処理区でメタン生成は確認されなかった。一方、ホスホン酸を添加した実験 3 では MPn の添加によりメタン濃度が大きく上昇した。この結果は、C-P リアーゼによりホスホン酸の C-P 結合が開裂しメタンが生成していることを示唆している。C-P リアーゼ遺伝子はシアノバクテリアなどの様々な微生物が有しており (Karl et al. 2008)、基質である MPn は一部の浮遊性古細菌によって合成されることも発見されている (Metcalf et al. 2012)。このことから、湖沼の好気環境に出現するメタン極大も、C-P リアーゼを有する微生物の MPn 代謝によって形成されていると考えられた。

次に浮遊性細菌群集の鉛直分布を見ると、シアノバクテリア (CYA361) や *Synechococcus* (405_Syn) の細胞密度の鉛直分布が、メタン濃度の鉛直プロファイルに一致していた。また、CYA361 と 405_Syn の季節変化はメタン濃度の季節消長によく一致しており、シアノバクテリアのなかでも C-P リアーゼを有する

Synechococcus が好氣的メタン生成に関与している可能性がきわめて高いと考えられた。

(3) 好氣的メタン生成過程とメカニズム
本研究により、多くの湖沼において好氣環境にメタン極大が出現することを明らかにした。また、その形成パターンは湖盆形状に関連した湖沼の栄養状態が関わっており、深くて貧栄養な湖ほどメタン極大層が形成されやすいことを明らかにした。好氣的メタン生成機構としては、ピコシアノバクテリアの光合成による無機態リンの枯渇とそれに伴う有機リン代謝が関与している可能性が示唆された。

なかでも、有機リン化合物の1種であるメチルホスホン酸 (MPn) の微生物による分解が、湖沼における好氣的メタン生成に関与していることが培養実験の結果から明らかとなった。海洋ではシアノバクテリアの MPn 代謝によってメタンが生成することが報告されており (Karl et al. 2008), 本研究結果においても CARD-FISH による CYA361 や 405_Syn の鉛直分布の結果がその可能性を強く支持している。湖沼においても同様に、*Synechococcus* などのシアノバクテリアが無機態リンが枯渇した貧栄養環境で MPn 代謝を駆動させることで、好氣的にメタンを生成しているものと考えられた。

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)

Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, Iwata I, Musmann M, Fukui M, Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa, Systematic and Applied Microbiology, 査読有, Vol.35, 2012, pp. 233-238,

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202012000471>

岩田 智也、積雪期における湿地からのメタン放出過程、低温科学、査読無、Vol.70、2012、pp.137-144、
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/journals/index.php?jname=173&vname=5023>

[学会発表](計 3 件)

岩田 智也、小林 あい、内藤 あずさ、小島 久弥、湖沼の好氣環境に出現するメタン極大の形成プロセス、JOGU Meeting 2014、2014年4月28日、横浜

岩田 智也、河合 巧幾、中川 裕介、湖沼の好氣環境に出現するメタン極大の形成プロセス、第78回日本陸水学会大会、2013年9月13日、大津

岩田 智也、青木 卓也、望月星斗、湖沼の好氣環境に出現するメタン極大の形成パターン、第77回日本陸水学会大会、2012年9月17日、名古屋

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.js.yamanashi.ac.jp/~iwata/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 智也 (IWATA, Tomoya)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：50362075

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし