

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25287149

研究課題名(和文) 太陽定数の海底下へのインパクト：光合成と海底下のアーキアワールドのリンケージ証明

研究課題名(英文) Impact of the Solar constant to deep-sea microbial community

研究代表者

高野 淑識 (TAKANO, Yoshinori)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・主任研究員

研究者番号：80399815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：有機分子レベル分析法の最適化として、安定同位体トレーサーを用いたアーキアおよびバクテリア由来の分子レベル同位体比、分子内同位体比の分析技術確立に加え、クロロフィル-aなどの色素化合物、新奇の極性脂質の質量分析・同位体質量分析法の最適化を行った。メタン生成アーキアが、メタン生成するために必要な補酵素ファクター430の分析法開発を連携研究者と共同で行った。代謝経路の酵素反応を検証するために、Enzyme Commissionの記載と実際に観察された分子レベル解析の結果を相補的に評価することを目的に、有機化学的な解析に加えて、次世代シーケンサーを用いた代謝マップの構築を進めた。

研究成果の概要(英文)：We conducted the method development using liquid chromatography and gas chromatography/ combustion/ isotope ratio mass spectrometry, occasionally coupled as LC x GC/C/IRMS to determine key molecules and their carbon/nitrogen isotopic compositions (e.g., lipids, amino acids, chlorophyll and other molecules). After the confirmation of high recovery during chromatographic separation without isotopic fractionation, we validated the accuracy and precision of the nitrogen isotopic composition of amino acids. To trace the metabolic pathways together with Enzyme Commission code, we customized the analytical scheme of the molecular sequencer including DNA and RNA pre-treatments.

研究分野：質量分析化学、有機地球化学、地球生命科学

キーワード：有機分子レベル解析・分子内レベル解析 海底下の地下生命圏 性状未知アーキアの生理生態 ピルビン酸ファミリーアミノ酸族 液体クロマトグラフィー/質量分析法 ガスクロマトグラフィー/質量分析法 ガスクロマトグラフィー/同位体質量分析法

1. 研究開始当初の背景

地球全体の70%を占める海洋は、有光層および海底下に地球生命を育む場を提供し、グローバルな物質循環の「駆動の場・貯留の場」となっている。近年、その海底下には、アーキア(世界平均割合87%: Lipp et al., 2008)およびバクテリア(同平均13%)からなるDeep Biosphere(地下生物圏)が広がっていることが急速に明らかになっている。

本研究の目的は、地球の炭素循環の中心を担う、光合成ワールドと海底下のアーキアワールドのエネルギー的リンケージ仮説の検証である。研究の到達点は、地球への一次エネルギーである太陽光が駆動する光合成系と海底下を優勢に支配する原核生物であるアーキア(古細菌)とのエネルギー的な因果関係を分子レベルで追跡し、分子に内在するエネルギーフローを明らかにすることである。本研究の遂行により、これまで切り離されて議論されてきた光合成系の一次規定因子である「太陽定数」が、暗黒の海底下を支配する「アーキアワールド」へ与えるインパクトを全球炭素循環の視点で包括的に評価できるようになる。

2. 研究の目的

本研究目的の正当性を示すためには、地球炭素循環を駆動する中心的な有機化合物は何か?そして、地球で最も多いタンパク質、色素、脂質は何か?という定義が必要である。まず、世界で最も多いタンパク質は、光合成(炭素固定)に必須であるRubisco(酵素)である。その光合成に必要な光アンテナ分子は、主要色素成分であるクロロフィル-aであり、地球上で最も多い色素である($< 12.5 \text{ Tg Chl C yr}^{-1}$)。したがって、海底への炭素供給源は、元をたどれば、海洋有光層の光合成(シアノバクテリア、藻類等)による基礎生産である。このような背景を受けて、光合成ワールドと海底下のアーキアワールドのエネルギー的リンケージ仮説の着想に至った。そこで、我々が開発した海底現場培養実験法を用いて、温度、圧力、栄養塩などの物理・化学条件そして難培養性アーキアの代謝・生理学的条件を忠実に再現し、実験的な証明を行うのが本研究の主目的である。

3. 研究の方法

(1) 中央代謝の実験的記載のために、アミノ酸の代謝プロセスの追跡検証を進めた。同化・異化過程を精度良く追跡・評価するために、トレーサーとして用いる化合物に部位特異的な ^{13}C -, D -, ^{15}N -ラベルを行い、分子トレーサーの生体内拡散経路を辿った。アーキアおよびバクテリアの生きている指標とされる極性脂質(IPLs)およびその分子レベル同

位体比、分子内同位体比の分析技術確立に加え、クロロフィル-aなどの色素化合物、新奇の極性脂質を新たに湿式手法で応用して、質量分析・同位体質量分析法の最適化を行った。

(2) 代謝経路の酵素反応を検証するために、Enzyme Commission code (EC)の記載と実際に観察された分子レベル解析の結果を相補的に評価した。DNAおよびRNA抽出・精製・シーケンス解析に関わる技術員1名を雇用し、有機化学的な解析に加えて、次世代シーケンサーを用いた代謝マップの構築を進めた。また、天然存在比のアミノ酸炭素・窒素同位体比測定の実験を併せて進め、成果の一部をInternational Journal of Mass Spectrometry誌(2015年2月にPublication Award_IJMS2015受賞)および国際有機地球化学会議の基調講演で発表した。

4. 研究の結果

(1) 代謝経路マップと生合成経路のモデル化として、アーキアのアミノ酸合成経路のうち、ピルビン酸ファミリーアミノ酸族である分岐鎖アミノ酸(特にバリン、ロイシン、イソロイシン)について、代謝経路の解析を行った。正確な抽出、分離、精製を行うために様々なイオンペア剤の導入を最適化し、イオンペアクロマトグラフィー/電子スプレーイオン化質量分析法(Underivatized chemical formula: HPLC/ESI-MS)およびコロナCAD検出法(HPLC/CAD)を開発した。分岐鎖アミノ酸の安定同位体比の系統的な解析を行い、アミノ酸合成経路とイソプレノイド鎖前駆体(プレカーサー)の分子的リンケージの解明に向けて研究を進めた。関連内容として、次の招待講演を行った【高野 淑識(招待講演): 海底下メタンの行方と地球生命科学(2015年日本地球惑星科学連合大会、千葉・幕張、2015年5月)】。

(2) 海底下生命圏とアミノ酸分子の研究調査の基礎過程として、重要な有機分子のマススペクトルデータを示しておくことは、将来に有益であるため、ピバロイル/イソブチルエステル誘導体化法(GC/MS)(Derivatized chemical formula)マススペクトルデータ集をまとめたこの誘導体化法は、(1)誘導体基にケイ素やフッ素を含まないことから、分離ラインや検出器へのダメージが少ない、(2)誘導体化体アミノ酸が比較的安定である、(3)D-, L-光学異性アミノ酸の分離が可能、という特徴がある。ゆえに、ガスクロマトグラフィー/同位体質量分析法による分子レベル(Compound-specific)もしくは、光学異性体分子レベル(Enantiomer-specific)の安定窒素同位体比分析においても有用な誘導体化法であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

(1) Naeher, S., Suga, H., Ogawa, N.O., **Takano, Y.**, Schubert, C.J., Grice, K. and Ohkouchi, N. (2016) Distributions and compound-specific isotopic signatures of sedimentary chlorins reflect the composition of photoautotrophic communities and their carbon and nitrogen sources in Swiss lakes and the Black Sea. *Chemical Geology*, 443, 198-209.

doi:10.1016/j.chemgeo.2016.04.029.

【査読有り】

(2) Rudd, R.C., Tyler, J.J., Tibby, J., Yokoyama, Y., Tavernier, I., Verleyen, E., Fukui, M. and **Takano, Y.** (2016) A diatom inferred record of lake variability during the last 900 years in Lutzow-Holm Bay, East Antarctica. *Journal of Quaternary Science*, 31, 114-125.

doi:10.1002/jqs.2845

【査読有り】

(3) Kaneko, M., **Takano, Y.**, Ogawa, N.O., Sato, Y., Yoshida, N. and Ohkouchi, N. (2016) Estimation of methanogenesis by quantification of coenzyme F430 in marine sediments. *Geochemical Journal*, 50, 453-460.

doi:10.2343/geochemj.2.0410.

【査読有り】

(4) **高野 淑雄**, 力石 嘉人, 大河内 直彦 (2016) アミノ酸 (ピパロイル/ イソブチルエステル誘導体) の GC/MS による解析 [技術論文]. *Researches in Organic Geochemistry*, 32, 1-18. (in Japanese with English abstract)

【査読有り】

(5) 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., Methe, B.A., Morita, S., Morono, Y., Tanikawa, W., Bihan, M., 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. doi: 10.1126/science.aaa6882.

【査読有り】

(6) Chikaraishi, Y., Steffan, S., **Takano, Y.**, and Ohkouchi, N. (2015) Diet quality influences isotopic discrimination among amino acids in an aquatic vertebrate. *Ecology and Evolution*, 5, 2048-2059. doi: 10.1002/ece3.1491.

【査読有り】

(7) **Takano, Y.**, Kojima, H., Takeda, E., Yokoyama, Y., and Fukui, M. (2015) Biogeochemistry and limnology in Antarctic subglacial weathering: molecular evidence of the linkage between subglacial silica input and primary producers in a perennially ice-covered lake. *Progress in Earth and Planetary Science*, 2:8. doi: 10.1186/s40645-015-0036-7.

【査読有り】

(8) **Takano, Y.**, Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2015) Isolation of underivatized amino acids by ion-pair high performance liquid chromatography for precise measurement of nitrogen isotopic composition of amino acids: development of comprehensive LC x GC/C/IRMS method. *International Journal of Mass Spectrometry*, 379, 16-25. doi: 10.1016/j.ijms.2014.11.012

【査読有り】

(9) **高野 淑雄**, 力石 嘉人, 大河内 直彦 (2015) イオンペアクロマトグラフィー/電子スプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS)によるアミノ酸のマスペクトル解析 [技術論文]. *Researches in Organic Geochemistry*, 31, 33-49. (in Japanese with English abstract)

【査読有り】

(10) **高野 淑雄**, 大河内 直彦 (2015) マントルゼノリスの炭素と窒素の起源について [依頼総説]. *地学雑誌 (Journal of Geography)*, 124, 503-514. doi: 10.5026/jgeography.124.503. (in

Japanese with English abstract)

【査読有り】

(11) 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, 3633-3638. doi: 3610.1021/ac500305j.

【査読有り】

(12) Ohkouchi, N. and Takano, Y. (2014) Organic nitrogen: sources, fates, and chemistry. *Treatise on Geochemistry*, Vol. 12, 10: Organic Geochemistry (Edited by Birrer, B., Falkowski, P., Freeman, K.), Elsevier, pp. 251-289. doi: 10.1016/B978-0-08-095975-7.01015-9.

【査読有り】

(13) Schouten, S., Hopmans, E.C., Rosell-Mele, A., Pearson, A., Adam, P., Bauersachs, T., Bard, E., Bernasconi, S.M., Bianchi, T.S., Brocks, J.J., Carlson, L.T., Castaneda, I.S., Derenne, S., Selver, A.D., Dutta, K., Eglinton, T., Fosse, C., Galy, V., Grice, K., Hinrichs, K.-U., Huang, Y., Hugué, A., Hugué, C., Hurley, S., Ingalls, A., Jia, G., Keely, B., Knappy, C., Kondo, M., Krishnan, S., Lincoln, S., Lipp, J., Mangelsdorf, K., Martinez-Garcia, A., Menot, G., Mets, A., Mollenhauer, G., Ohkouchi, N., Ossebaar, J., Pagani, M., Pancost, R.D., Pearson, E.J., Peterse, F., Reichart, G.-J., Schaeffer, P., Schmitt, G., Schwark, L., Shah, S.R., Smith, R.W., Smittenberg, R.H., Summons, R.E., Takano, Y., Talbot, H.M., Taylor, K.W.R., Tarozo, R., Uchida, M., van Dongen, B.E., Van Mooy, B.A.S., Wang, J., Warren, C., Weijers, J.W.H., Werne, J.P., Woltering, M., Xie, S., Yamamoto, M., Yang, H., Zhang, C.L., Zhang, Y., Zhao, M., and Sinningh Damste, J.S. (2013) An interlaboratory study of TEX86 and BIT analysis of sediments, extracts and standard mixtures. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 14, 5263-5285. doi: 10.1002/2013GC004904.

【査読有り】

(14) Watanabe, T., Kojima, H., Takano, Y., and Fukui, M. (2013) Diversity of sulfur-cycle prokaryotes in freshwater lake sediments investigated using aprA as functional marker gene. *Systematics and Applied Microbiology*, 36, 436-443. doi: 10.1016/j.syapm.2013.04.009.

【査読有り】

(15) Kaneko, M., Naraoka, H., Takano, Y., and Ohkouchi, N. (2013) Distribution and isotopic signatures of archaeal lipid biomarkers associated with gas hydrate occurrences on the northern Cascadia Margin. *Chemical Geology*, 343, 76-84. doi: 10.1016/j.chemgeo.2013.02.003.

【査読有り】

(16) Takano, Y., Kaneko, M., Kahnt, J., Imachi, H., Shima, S. and Ohkouchi, N. (2013) Detection of coenzyme F430 in deep-sea sediments: A key molecule for biological methanogenesis. *Organic Geochemistry*, 58, 137-140. doi: 10.1016/j.orggeochem.2013.01.012.

【査読有り】

(17) Taniuchi, T., Takano, Y., and Kobayashi, K. (2013) Amino acid precursors from a simulated lower atmosphere of Titan: Experiments of cosmic ray energy source with ¹³C- and ¹⁸O-stable isotope probing mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 29, 777-785. doi: 10.2116/analsci.29.777.

【査読有り】

〔学会発表〕(計 15 件)

主な国際学会発表リストを示す。

(1) N. Ohkouchi, Y. Yamaguchi, Y. Chikaraishi, Y. Takano, N. O. Ogawa, H. Suga, Y. Yokoyama: How do microbes mediate the nitrogen cycle in the marine seafloor? Evidence from nitrogen isotopic compositions of amino acids and chlorophyll. International Meeting on Organic Geochemistry (IMOG), Prague, Czech, 13-September, 2015.

(2) Y. Chikaraishi, Y. Takano, N. Ohkouchi: Heterotrophic Uptake of Soil Amino Acids by C4 Plants: Unusual Stable Isotopic Compositions of

C4 Plant Lipids May Be Derived from Amino Acid Uptake. International Meeting on Organic Geochemistry (IMOG), Prague, Czech, 13-September, 2015.

(3) M. Kaneko, Y. Takano, F. Inagaki, K.-U. Hinrichs, N. Ohkouchi: Analysis of coenzyme F430 as a function-specific biomarker for estimation of methanogenesis and anaerobic methane oxidation. International Meeting on Organic Geochemistry (IMOG), Prague, Czech, 13-September, 2015.

(4) Kaneko, M., Takano, Y., Ogawa, O.N., and Ohkouchi, N. Carbon isotopic composition of Coenzyme F430 from anaerobic methane oxidizing archaea. Goldschmidt 2015, Prague, Czech, 17-August-2015.

(5) Ken Sawada, Mayumi Takeda, Yoshinori Takano: Possible Climatic Signal Recorded by Alkenone Distributions in Sediments from Freshwater and Saline Lakes on the Skarvsnes and Skallen Areas, Antarctica. AGU Fall meeting 2014, San Francisco, USA. 15-December-2014.

(6) Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Hiroyuki Imachi, Masanori Kaneko, Nanako O. Ogawa, Martin Krueger, Naohiko Ohkouchi. Elucidation of ¹³C-depleted amino acids in archaeal methanotrophy by ANME 1 and ANME 2 groups. ISME-International Society for Microbial Ecology 2014., Seoul, Korea, August-27-2014.

(7) 高野 淑識, 力石 嘉人, 大河内 直彦: 「軽い」アミノ酸と地球化学の接点, 地球惑星科学連合大会, 2014年5月2日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.

他、国内学会での発表 8 件

〔その他〕

海洋研究開発機構 個人ホームページ：
<http://www.jamstec.go.jp/res/ress/takano/>

海洋研究開発機構

生物地球化学研究分野ホームページ：
<http://www.jamstec.go.jp/biogeochem/>

〔受賞〕

Inter. J. Mass Spectrometry 誌 (Elsevier)
Publication Award 2015 受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 淑識 (TAKANO, Yoshinori)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・
生物地球化学研究分野・主任研究員
研究者番号：80399815

(2) 連携研究者

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