

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420884

研究課題名(和文) 高圧培養による深海底由来メタン菌が生成するメタンの同位体組成の再評価

研究課題名(英文) Evaluation of high hydrostatic pressure on the isotopic composition of methane generated by methanogen isolated from deep-sea sediment

研究代表者

田角 栄二 (TASUMI, Eiji)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・技術副主任

研究者番号：50553228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：メタンの炭素・水素同位体比は深海環境でのメタン生成起源を推定するための指標として利用されてきたが、高圧条件下で生育するメタン生成菌が生成するメタンの同位体比に関する知見は極めて少ない。本研究では、南海トラフの深海底表層堆積物より分離したメタン生成菌(Methanosarcina sp. NT-MS1株)を用いて、大気圧および深海の圧力条件下でメタノールを基質に培養した際の細胞増殖速度、メタン生成活性、および生成メタンの炭素および水素同位体比を測定し、圧力が深海底堆積物由来のメタン生成菌の増殖能およびメタン生成活性だけでなく、生成するメタンの炭素・水素同位体比にも影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Carbon and hydrogen isotopic ratio of methane has been used as one of the most effective indicators for estimating the origin of methane existing in the deep-sea environment. Although microbial methane production has been evaluated as an important source origin, little is known about the isotopic compositions of methane actually generated by methanogenic microbes under high hydrostatic pressure conditions.

We investigated the effects of hydrostatic pressures on growth rate, methanogenesis activity, and isotopic fractionation of methane by using a methylotrophic methanogenic archaea, Methanosarcina sp. NT-MS1, isolated from a deep-sea surface sediment collected from Nankai Trough.

In this study, we demonstrated that hydrostatic pressure affects not only growth rate and methanogenesis activity of methanogen but also carbon and hydrogen isotopic fractionation of methane generated.

研究分野：微生物学

キーワード：高圧培養 メタン 炭素同位体比 水素同位体比

1. 研究開始当初の背景

(1) 深海底に天然ガスあるいはハイドレートとして存在するメタンは未来のエネルギー資源として考えられており、その生成起源やメカニズムを理解することは、深海エネルギーの資源評価や探索および地球環境の炭素循環を解明する上で極めて重要である。

(2) メタンの炭素および水素同位体比は、メタンの発生成源を理解する上で重要な指標である。特に炭素同位体比は多くの研究で用いられ、 $^{12}\text{CH}_4$  の割合が多い“同位体的に軽いメタン”は微生物起源、 $^{13}\text{CH}_4$  の割合が多い“同位体的に重いメタン”は有機物熱分解/マグマ起源という解釈がなされてきた。しかしながら、近年、超好熱性メタン生成菌により“重いメタン”が、Fischer-Tropsch 型の物理化学反応により“軽いメタン”が生成することが報告され、本指標の再評価が求められている。

(3) 一方、メタンの水素同位体分別に関しては、実際にメタン生成菌を用いた培養実験により網羅的に研究された例は少なく、まして深海底由来のメタン生成菌が高圧条件下で生成するメタンの水素同位体分別に関する知見は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、深海底堆積物由来のメタン生成菌を供試し、現場環境を再現した高圧培養において生成される微生物由来メタンの炭素同位体および水素同位体比のデータから、従来の同位体組成によるメタン起源および生成メカニズムの推定法を再評価する。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

申請者が水深 2,500 m の南海トラフ深海底表層堆積物から 3 年におよぶ長期バッチ培養により分離した *Methanosarcina* sp. NT-MS1 株 (以下、NT-MS1 株) のメタン生成菌 (至適生育温度や基質利用性などの基礎的な生理学性質は把握済み) を一連の実験に供試した。

(2) 培養および分析方法

連携研究者の高井により考案された高圧培養装置 (図 1) を使用して、供試メタン生成菌の分離環境水圧 (水深 2,500 m = 約 25 MPa) を基準に様々な圧力条件下で培養を行った。培養温度は 37°C、メタン生成基質には、メタノール (50 mM) を使用した。培養液中のメタン生成菌数および溶存メタン濃度および炭素・水素同位体比は、以下に示す方法で経時的に測定した

メタン生成菌細胞数

核酸染色剤 (DAPI) で染色した細胞を顕微鏡下でカウントした。

溶存メタン濃度

水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC-4000, GL-Science) により測定した。

メタン炭素および水素同位体比

連続フロー分析ガス精製・導入ラインを接続した同位体比質量分析計 (Mat253, Thermo Fisher Scientific) により測定した。

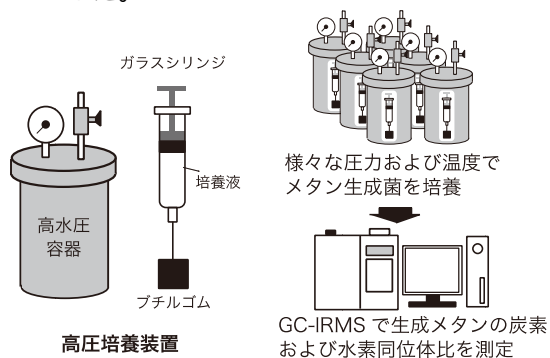


図1 高圧培養装置と実験のフロー

4. 研究成果

深海底堆積物由来メタン生成菌 NT-MS1 株の分離環境水圧 (約 25 MPa) を基準として、大気圧および高水圧 (15 および 25 MPa) 条件下で培養を行い、培養液中におけるメタン生成菌数、溶存メタン濃度およびメタン炭素・水素同位体比を、培養 0, 12, 18, 24, 30 および 36 時間後に各条件あたり 3 連で測定した。

(1) 細胞増殖速度

NT-MS1 株の大気圧、15 MPa および 25 MPa における最大比増殖速度は、0.054、0.063 および  $0.054 \text{ h}^{-1}$  であり、15 MPa において増殖速度が最も速いという結果が得られた。また、NT-MS1 株の分離環境水圧 (25 MPa) における増殖速度は、大気圧における増殖速度とほぼ同程度であり、NT-MS1 株は水深 2,500 m の圧力環境下でも生育障害を受けることなく、高い増殖能を有していることが確認された (図 2, 3)。

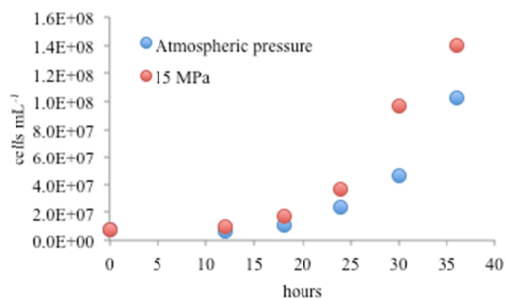


図2 大気圧および 15 MPa における細胞数の経時変化

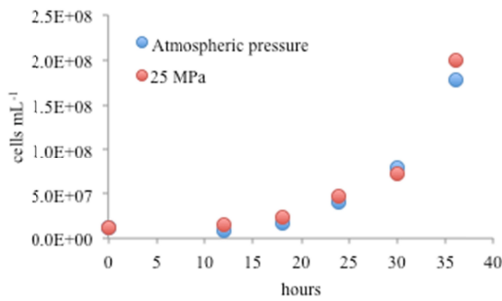


図3 大気圧および 25 MPa における細胞数の経時変化

## (2) メタン生成活性

それぞれの圧力条件における NT-MS1 株のメタン生成活性は、増殖速度と同様の傾向を示した。すなわち、15 MPa で最も活性が高く（図 4）、25 MPa においても大気圧下と同程度の活性を有しており（図 5）、NT-MS1 株は水深 2,500 m の圧力環境下でも、高いメタン生成活性を伴う増殖能を有していることが証明された。メタン生成菌の高圧培養に関する過去の研究においても、高圧条件下でメタン生成活性が高くなるという報告はあるが、これらの研究結果は水素をメタン生成基質とした培養であり、活性の上昇は高圧状態における溶存水素濃度の上昇で説明することができる。一方、本研究ではメタノールをメタン生成基質として培養しているため、15 MPa において増殖速度やメタン生成活性が増加した原因として、水素培養のような圧力変動による培養基質濃度の変化が関与したとは考えられない。したがって、圧力条件の変動によりメタン生成菌の細胞形態や生理状態に何らかの変化が生じることで、増殖やメタン生成能に変化が生じたのではないかと推察された。

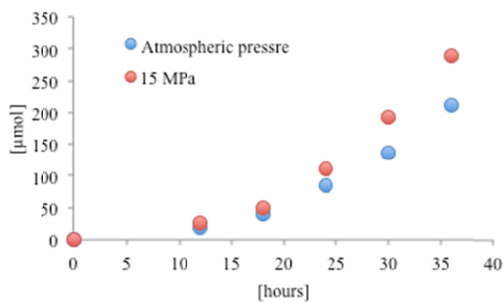


図4 大気圧および 15 MPa における溶存メタン濃度の経時変化

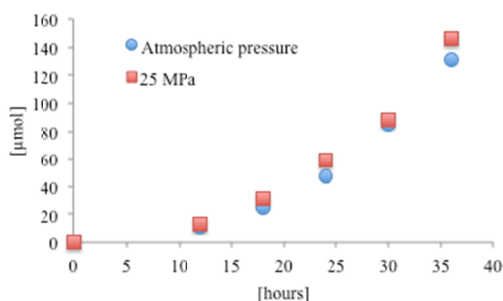


図5 大気圧および 15 MPa における溶存メタン濃度の経時変化

## (3) メタン炭素・水素同位体比

大気圧 (CTL), 15 MPa, および 25 MPa における培養で生成したメタンの炭素同位体比は、それぞれ -100 から -114‰, -79 から -110‰, および -68 から -106‰ であり、経時および圧力の増加に伴い同位体的に重くなる傾向があることが確認された（図 6）。

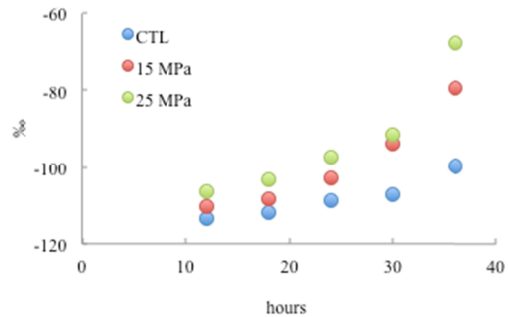


図6 生成メタンの炭素同位体比の経時変化

メタン生成活性および同位体分別効果が同程度の培養系では、一定時間後に蓄積されたメタンの炭素同位体比は理論的には等しくなる。しかしながら、メタン生成活性が同程度であった大気圧と 25 MPa における培養では、理論的には同程度の炭素同位体比のメタンが生成すると考えられるが、両者の炭素同位体比には顕著な差が見られた。

一方、大気圧 (CTL), 15 MPa, および 25 MPa における培養で生成したメタンの水素同位体比は、それぞれ -323 から -329‰, -299 から -324‰, および -309 から -312‰ であり、経時変動は見られなかったが、25 MPa で顕著に重くなっていた。

ある種の微生物では高圧条件下で培養すると、細胞組織や酵素活性などに変化が生じることが知られている。したがって、圧力条件の違いによりメタン生成菌の細胞生理状態に変化が生じ、それに伴い炭素および水素同位体分別効果に何らかの影響が生じたことが一因ではないかと推察された。

今後の研究において、高圧条件下で培養したメタン生成菌細胞の形態や生理活性と生成されるメタンの化学特性を総合的に研究することにより、深海を含めた高圧環境におけるメタン生成菌の生態が解明されることに期待したい。

## 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 2 件)

Hidetaka Nomaki, Tomohiro Mochizuki, Tomo Kitahashi, Takuro Nunoura, Kazuno Arai, Takashi Toyofuku, Gengo Tanaka, Shuichi Shigeno, Eiji Tasumi, Katsunori Fujikura, Shuichi Watanabe, Effects of mass sedimentation event

after the 2011 off the Pacific coast of Tohoku earthquake on benthic prokaryotes and meiofauna inhabiting the upper bathyal sediments, *Journal of Oceanography*, 査読有, 72, 2016, 113-128  
DOI: 10.1007/s10872-015-0293-5

Fumio Inagaki, Kai-Uwe Hinrichs 他 46名中の42番目, Exploring deep microbial life in coal-bearing sediments down to ~2.5km below the seafloor, *Science*, 査読有, 349, 2015, 420-424  
DOI: 10.1126/science.aaa6882

〔学会発表〕(計3件)

Hiroyuki Imachi, Eiji Tasumi, Akira Ijiri, Yuta Konno, Yuki Morono, Motoo Ito, Ken Takai, and Fumio Inagaki, Cultivation of methanogenic community from 2-km deep subseafloor coalbeds using a down-flow hanging sponge bioreactor, International Symposium on Microbial Ecology 15 (ISME15), 2014-Aug-25, Seoul, Korea

田角 栄二, 野牧 秀隆, 柳川 勝紀, 今野 裕多, 酒井 早苗, 平井 美穂, 首藤 彩, 藤倉 克則, 布浦 拓郎, 高井 研, 巨大地震による深海底生態系への微生物学的影響評価, プルーアース 2014, 2014年2月19日, 東京水産大学(東京都・港区)

田角 栄二, 野牧 秀隆, 柳川 勝紀, 今野 裕多, 酒井 早苗, 平井 美穂, 藤倉 克則, 布浦 拓郎, 高井 研, 巨大地震後の深海底におけるメタン生成ホットスポットの出現, 第29回日本微生物生態学会, 2013年11月23日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計1件)

Eiji Tasumi, Katsunori Yanagawa, Junichi Miyazaki, and Ken Takai, Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016, 300 (1-14)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田角 栄二 (TASUMI, Eiji)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海底生態系内生物圏研究分野・技術副主任  
研究者番号: 50553228

(2) 研究分担者

井町 寛之 (IMACH, Hiroyuki)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海底生態系内生物圏研究分野・主任研究員

研究者番号: 20361933

今野 裕多 (KONNO, Yuta)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海底生態系内生物圏研究分野・技術研究員  
研究者番号: 80631762

(3) 連携研究者

高井 研 (TAKAI, Ken)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海底生態系内生物圏研究分野・分野長  
研究者番号: 80359166