

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25701004

研究課題名(和文)あらゆる環境のメタンの起源を推定するための炭素・水素安定同位体指標確立

研究課題名(英文) To develop geochemical tracers of hydrogen and carbon isotope systematics by methanogen incubations

研究代表者

川口 慎介 (KAWAGUCCI, Shinsuke)

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・研究員

研究者番号：50553088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：地球生命(圏)の限界把握においてメタンの起源推定は有効な手段の一つであり、その指標として安定同位体比が用いられている。本研究では微生物培養実験により、安定同位体比の指標性を検証した。その結果、1)炭素同位体比は水素分圧に依存して変化する、2)水素分圧が高く増殖速度が速い場合には水素ガスの同位体比がメタンの水素同位体比に影響をおよぼす、3)増殖速度が遅い場合には水素分圧に寄らずメタンの水素同位体比はおおむね一定の値を示す、4)本培養と地質試料のメタンの水素同位体比は不一致である、ことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1. The hydrogen isotope ratio of CH₄ produced by a thermophilic methanogen, *Mt.c. okinawensis*, under high p_{H2} conditions (~105 Pa-H₂) is affected by the isotope ratio of H₂, as pointed out in a previous incubation. This pattern is named as the DH₂ effect. This effect also appears to account for the diverse hydrogen isotope fractionation between CH₄ and H₂O previously observed in H₂-enriched culture incubations.
2. The hydrogen isotope fractionation between CH₄ and H₂O in hydrogenotrophic methanogenesis under low p_{H2} conditions (<102 Pa) observed in experiments is in the range of 0.66-0.74.
3. Hydrogen isotope fractionation exhibited in laboratory incubations under low-p_{H2} conditions is consistent with that observed in "young" methane reservoirs but inconsistent with that observed in "aged" methane reservoirs.

研究分野：自然科学

キーワード：メタン 安定同位体 炭素同位体比 水素同位体比 生命の限界

1. 研究開始当初の背景

地球生命(圏)の限界を知ることは環境学および生命科学の1大テーマである。環境中のメタンの起源を推定することで、もっとも極限的な環境で生息すると考えられているメタン生成古細菌の分布・活性が間接的に把握できる。安定同位体比はメタンの起源を推定する指標として用いられている。しかしその指標性は地球表層の環境条件で確立されたものであり、極限環境における安定同位体比の特徴は詳しく調べられていなかった。

2. 研究の目的

生命圏の分布、あるいは生命の限界を知ることは環境学および生命科学の1大テーマであり、これらを規制する主要因の1つが温度である。現在知られている最高生育温度は122 °Cであり、これはメタン生成古細菌(以下メタン菌)が記録している[Takai et al. 2008 PNAS]。メタン菌は還元環境に分布し、特に高圧のため水温が100 °Cを超えうる地下深部環境では優先種である。このため、いまだ人類が確認できていない123 °C以上で生育可能な生物がいるならば、『高温・高圧の地下深部に生息するメタン菌』が最有力候補である。

地下深部におけるメタンの起源は微生物代謝が高温化学反応の2つに大別できる。つまり、123 °C以上の高温地下深部環境を調査し、その場のメタンについて『このメタンは微生物代謝生成物である』と判別できれば、我々が現在知るよりさらに高温の領域まで、生命(圏)の限界が広がっていることを指摘できる。この目的を達成するためには『メタンの起源を明確に推定できる化学指標の存在が肝要』である。

メタンの起源を推定するために広く利用されている化学指標が、炭素安定同位体比($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比)である。従来知見によれば、微生物メタンと高温化学反応メタンとは炭素同位体比によって明確に判別が可能である。しかし最近になって、地下深部環境を模した高温・高圧・高 H_2 濃度下でのメタン菌培養で、微生物メタンであっても高温化学反応起源メタンと同等の炭素同位体比を持ちうることが示された。この事実はこれまでの『炭素同位体比でメタンの起源推定が可能という指標性には、地球表層環境の物理化学条件に限るという条件が付いていた』ことを示している。つまり、極限環境(温度・圧力・ H_2 濃度など)において安定同位体比をメタンの起源推定指標として利用するには、メタンの安定同位体比の特徴と環境条件との対応を明らかにして『極限環境にも適用可能な安定同位体指標として(再)確立する』ことが急務である。

そこで本研究では、安定同位体比をあらゆる環境条件に適用可能なメタンの起源推定指標として確立することを目的とし、メタン菌分離株の培養により微生物起源のメタン

が示す安定同位体比の特徴を把握する。高温化学反応(有機物熱分解)についての同様の研究はすでに別計画として実施しているため、本研究の対象は微生物起源のメタンに限定する。

培養では、微生物種・物理条件・化学条件を、地球上で想定される幅広い環境条件に対応させ、体系的なデータセットを得る。網羅的培養の狙いは、単に条件数を増やし、結果を強固にすることのみではない。生物代謝に伴う同位体比変動の素過程は化学反応であるから、熱力学や反応速度の法則を逸脱しないため、体系的なデータセットからその法則性を抽出することができる。この法則性と微生物の生理・生化学を照らし合わせることで、単に各条件下で生成するメタンの安定同位体比を知るのみでなく、それを引き起こす要因・原理に踏み込んだ理解を得る。これにより、いまだ分離株の存在しない高温・高圧の極限環境で微生物メタンが示すであろう安定同位体比の特徴まで予見的に把握することができる。

研究代表者はこれまで観測による研究を推進し、これまでに高温熱水、地震流体、およびその周辺生態系で採取したメタンの安定同位体分析を行ってきた。観測値の解釈のため従来知見をまとめた際に、安定同位体比は有用な指標となりうるが、特に水素安定同位体比(D/H)で知見が不足しており、指標性がいまだ限定的であることを指摘した。そこで数年前から実験研究にも着手し、熱分解実験や微生物培養実験によって、炭素・水素安定同位体比をととも指標として確立することを目指している。水素同位体指標を確立できれば、たとえ各メタン源の炭素同位体比が重複しても起源を見分けることが可能になり、より確かな起源推定が可能になる。本研究に先立ち行ったメタン菌培養では、これまで無視されてきた基質(H_2)の水素同位体比が生成物(メタン)の水素同位体比に影響を与えることを初めて見出している[Kawagucci et al., 2014]。またこれまでに微生物メタンの炭素と水素の安定同位体比を調べた研究のほとんどでは、炭素か水素のいずれかのみを対象としており、両者をととも観測しその変動要因を連動させて解釈することが出来なかったため、本研究では同一試料において炭素・水素の両同位体比を分析する。

安定同位体指標によるメタンの起源解明は、現在の地球生命(圏)の限界把握にとどまらず、太古代地質試料や火星のメタンからの生命活動検出、あるいは温室効果気体である大気中メタンの挙動解析など、環境学/地球惑星科学で幅広く期待されている。その期待感は、1980年に提案された安定同位体比の指標基準が、多くの教科書・総説に掲載され、孫引きも含め少なくとも3000件以上引用されていることに現れている。しかし先に述べたとおり、現在の教科書的知見で示している

安定同位体比の指標性は適用可能な環境が限定的であり、特に極限環境解析においては誤った理解を導いてしまう懸念がある現状は看過できない。本研究により安定同位体比をあらゆる環境で利用可能な指標として(再)確立することは、安定同位体地球化学の教科書を30余年ぶりに改訂することであり、メタンの関与する環境学/地球惑星科学に正しい航路を示す羅針盤を作成することに他ならない。

3. 研究の方法

メタン菌分離株のバッチ培養を実施し、微生物が生成するメタンの炭素・水素安定同位体比、さらにその環境条件への応答を把握する。具体的には、常温株・好熱株から計3を選定し、これまでに微生物メタンの安定同位体比の支配要因と考えられている温度・ H_2 分圧・培地同位体比(H_2O , H_2 , CO_2)の条件を変数として培養を行う。分析試料数が多数におよぶため、既存の炭素・水素安定同位体比分析手法を自動化することで効率的な研究推進を実現する。体系的データから安定同位体比と環境条件の対応を導出し、起源推定指標として確立する。

微生物培養の内容は、培地調整・前培養・本培養からなり、各条件下での菌数倍加時間に依存するが、1回の培養実験あたり4~14日を要する試算であった。培養条件を網羅するためには、1株あたり6~12セット、研究期間全体で計24セット程度を実施する必要があった。培養するメタン生成菌については地球表層および海底下高温環境の温度帯をカバーできる株を選定し、すでに培養に着手しており安定同位体研究で広く用いられている *Methanothermobacter thermoautotrophicus* H株(至適温度55℃)などを培養した。

本研究ではすべて H_2 と CO_2 を利用する無機独立栄養代謝によって生育するメタン菌を培養した。メタン菌の中には、 H_2 - CO_2 を利用する代謝以外に、酢酸やメタノールなど、メチル基を持つ有機物を利用できるものも存在する。しかし、高温環境では H_2 - CO_2 利用が卓越すると考えられていることに加え、(1)環境中でのこれら有機物の動態・同位体比が不明、(2)有機物内での部位別同位体比の不均一が近年判明、および(3)有機物中メチル基のみの水素同位体比を分析する手法は未確立、という現状を踏まえ、本研究では有機物利用代謝は対象としなかった。

培養 H_2 分圧は、2気圧および H_2 生成細菌との共培養系(<0.001気圧)とした。培養はバイアル瓶を用いて実施した。体積比で瓶内の1~3割を液体培地で、残りを基質となる H_2 や CO_2 を含む気体で充填した。培地同位体比(H_2O , H_2 , CO_2)は、重度な同位体ラベルによる生育障害を避けるため、ソフトラベル(天然値を表記するデルタ値で数百パーミル以内)で多段階を設定した。これらを合わせると分析する試料数は1株あたり約400試

料となった。

メタン安定同位体比分析システムの自動化に取り組んだ。安定同位体比の分析では、ガスクロマトによるメタンと他気体の分離のため、最短でも1試料あたり約20分を要する。このため現状の手動分析システムでは、日中の8時間を割いても約20試料しか分析できず、また分析の間は他の作業(たとえば培養)が出来なかった。一方、分析システムを自動化することが出来れば、24時間稼働による約60試料/日の分析ペースに加え、分析と並行して培養作業が可能になるため、効率よく研究が推進できると考えた。自動化に向けた具体的な実施は、(1)各種バルブ類の空圧動作式への置換、(2)プログラム機能付リレーによるバルブ動作圧縮空気の制御、(3)自動動作下での分析性能の確認、となる。同様の分析システム自動化については実績があり[Kawagucci et al., 2005 Analytical Chemistry]、また分析条件自体は現行の手動法ですでに固まっているため、自動化に投入する時間コストは小さく、享受できるメリットが格段に勝ると考えた。

4. 研究成果

メタン菌培養および安定同位体比分析により下記の成果をえた。

(1)高い水素分圧と低い水素分圧で実施した培養ではそれぞれ小さな炭素同位体効果と大きな炭素同位体効果が見られた。これは、メタン菌が水素酸化代謝によって生成するメタンの炭素同位体比は水素分圧に依存して変化するという従来の見解と調和的である。また定量した炭素同位体効果(メタンと二酸化炭素の間での炭素同位体分別)の程度はこれまでに同様の培養実験研究によって報告されている範囲であった。この結果から、本研究で培養したメタン菌の生育条件は従来の研究と相違ないことが示唆された。

(2)水素分圧が高く、かつ、増殖速度が速い場合には、水素ガスの同位体比がメタンの水素同位体比に影響を及ぼす結果がえられた。本研究ではこの現象をあらためて「dD-H₂効果」と呼ぶこととした。この「dD-H₂効果」は、研究代表者らの研究グループによる先行研究でのみ確認されている現象であったが、本研究ではこの現象を追認できた。また従来培養実験の結果を文献調査により精査したところ、dD-H₂効果について言及がない過去の実験データについても、dD-H₂効果の影響を考慮することで、水の水素同位体比とメタンの水素同位体比の間に見られる水素同位体分別の程度を調和的に説明することができた。これらのことから、水素分圧が高く、かつ、

増殖速度が速い状況での水素資化性メタン生成代謝に由来するメタンの水素同位体比を地球化学指標として利用する場合には、従来の水の水素同位体比とメタンの水素同位体比の間の水素同位体分別のみを観測するだけではなく、同時に水素ガスの同位体比も観測すべきであることが示唆された。

- (3) dD-H₂ 効果が見られる場合と同等に水素分圧が高い条件であっても、増殖速度が遅い場合には、生成するメタンの水素同位体比はおおむね一定の値を示した。このことは、dD-H₂ 効果の発現を支配している要因が、先行研究で想定された水素分圧よりむしろ増殖速度であることを示している。一方で、増殖速度そのものとdD-H₂ 効果の程度は直接的に結びつく現象ではないため、dD-H₂ 効果を支配する生化学的背景を把握するためには、細胞内の水の置換速度、細胞内の水の水素同位体比、1細胞あたりの水素ガス消費速度、あるいは水素ガスおよび水が細胞膜を通過する速度などの微小環境条件あるいは素過程の定量的理解が不可欠であることが示唆された。また本研究で実現した高い水素分圧および速い増殖速度は、天然環境においてはきわめて稀な水準であり、水素資化性メタン生成代謝に由来するメタンの水素同位体比を一般的な環境で地球化学指標として利用する場合には、従来の研究で提案・実施されている通り、水の水素同位体比とメタンの水素同位体比の間の水素同位体分別のみを観測するだけでも、メタンの起源推定について議論が可能であることが示唆された。
- (4) 海底下堆積物内生命圏などでは極めて低い水素分圧が保たれているため、本培養実験ではメタン菌の成長限界まで水素分圧を低下させ、同条件下で起こる水素同位体効果を調べたが、地質試料の水の水素同位体比とメタンの水素同位体比の間の水素同位体分別とは一致しなかった。この現場環境で見られる水素同位体分別と実験環境における水素同位体分別との不一致については、増殖速度について現場環境に比べ実験環境の方が十分に速いことが理由であるとする議論が従来なされてきたが、本研究ではメタン菌の生育限界レベルまで水素分圧を下げており、この不一致をメタン生成代謝そのものに由来するとするのは難しいのではないかと考えた。
- (5) この現場環境と実験環境で見られる水素同位体分別（水素同位体効果）の差について、メタン生成時に起こる水

素同位体効果のみによって説明することは困難であり、むしろ環境中に一度放出されたメタンが再度メタン菌の可逆的メタン生成代謝経路に逆反応として取り込まれることによって周囲の水と水素同位体交換を起こしていることが原因であると推論した。この推論の妥当性については、メタン生成菌を十分に生育させた培地から代謝基質となる水素ガスおよび二酸化炭素をパーズした上で、水素同位体的に見分けられるメタンを封入し、一定期間毎にこのメタンの水素同位体比（と培地の水の水素同位体比）を分析することにより、検証できると考えられている。

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)

1. Okumura T., S. Kawagucci*, Y. Saito, Y. Matsui, K. Takai, and H. Imachi, Hydrogen and carbon isotope systematics in hydrogenotrophic methanogenesis under H₂-limited and -enriched conditions: Implications for the origin of methane and its isotopic diagnosis, *Progress in Earth and Planetary Science*, 3:14, DOI: 10.1186/s40645-016-0088-3, 2016. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 慎介 (KAWAGUCCI, Shinsuke)

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・研究員

研究者番号：50553088