

論文

日本近海のメタン湧出点における嫌氣的メタン酸化古細菌の群集組成*

荻原成騎**

(2010年8月30日受付, 2010年11月9日受理)

Abstract

Anaerobic oxidation of methane (AOM) in the marine environment is mediated by three phylogenically distinct clusters of Archaea called ANME-1, 2 and 3 (Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea: ANME). ANME-1 and ANME-2 can be distinguished with biomarker composition. Environmental regulation leading to the dominance of ANME-1 or ANME-2 is not clear.

In this study the author investigated the lipid biomarker composition of ANME at the selected seep sites with high methane flux to find the clues to potential niche occupation by the different type of ANME groups. Samples were collected from (1) Umitaka spur off Joetsu, (2) Ryuyo canyon off Tokai, (3) Kumanonada mud volcano, (4) Sagami bay off Hatsushima and (5) Kuroshima knoll. ANME-1 markers were detected in the samples from (1), (2) and (3). On the other hand, ANME-2 markers were detected in the samples from (4) and (5).

This study will be useful in identifying the environmental factors controlling the ANME community.

1. 緒言

有機物は地層中において分解されてメタンを生産する。海底から数100mより浅い地層中では微生物による分解によって生成される(微生物分解起源メタン), 地下深部の高温環境では非生物的に熱分解によって生成される(熱分解起源メタン)。このように海底下で生成されたメタンは, 微生物による嫌氣的メタン酸化反応(Anaerobic oxidation of methane: AOM)によって, その大半が堆積物中で消費される(Iversen and Jorgensen, 1985)。嫌氣的メタン酸化古細菌(Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea: ANME)は, AOMを担う主要な微生物と考えられており, 現在の所, ANME-1, 2, 3の3つの系統群が知られている。

ここで, メタン湧出が生じている嫌氣的堆積

物中におけるAOMは, 硫酸還元細菌(Sulfate Reducing Bacteria: SRB)による硫酸還元とANMEによるメタン酸化の組み合わせによって行われている(Ritger et al., 1987; Paull et al., 1992; von Rad et al., 1996)。ANMEとSRBが行うネットの反応は, 以下のように表すことができる。



一般にメタン酸化を行うメタン酸化細菌は好氣的にメタンを酸化するグラム陰性菌の一群であるが, メタン湧出水域に生息する化学合成生物群集における一次生産者としての好氣的メタン酸化菌は発見されていない。

顕微鏡観察に基づく研究から, ANME-2はSRBと密接に関係していることが知られている(Orphan et al., 2002)。ANME-2とSRBの集合体に

*Composition of anaerobic methane oxidizing archaea (ANME) at the methane seep site around Japan

**東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻, 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学理学部1号館 Shigenori Ogiwara: Department of Earth and Planetary Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033
e-mail: ogi@eps.s.u-tokyo.ac.jp Tel: 03-5841-4524; Fax: 03-5841-4555

において、ANME-2は中心部に位置し、これをSRBが取り囲んでいる。このような両者の物理的関係は、SRBとANME-2の共生関係の証拠となっている。これに対して、ANME-1は、しばしば単独の集合で観察される(Orphan et al., 2002)。メタン酸化効率率はANME-1に比べANME-2が著しく高い(Nauhaus et al., 2002, 2005)。

遺伝子情報およびバイオマーカー分析によって、メタン湧出域における表層堆積物中のANMEの解析が行われた。たとえば、バミューダ沖 Lost City 熱水フィールド (Atlantis Massif の頂上) における低温地域においてANME-1が検出された(Brazelton et al., 2006)。オレゴン沖 Hydrate Ridge からはANME-1とANME-2の両者が検出され、表層ではANME-2が優勢であった(Knittel et al., 2005)。黒海の深海泥火山からはANME-1が検出された(Michaelis et al., 2002)。

これまでにANMEの単離培養例がないため、ANMEに好適な地球化学的環境は明らかにされていない。また、ANME-1とANME-2の群集の差が何に起因するのか明確ではない。地質試料の場合は、現世試料で行われている遺伝子解析を行うことができない。そこで、地質試料においても用いることのできるバイオマーカーによるANME-1とANME-2、さらにANME-3の識別が重要となる。

本研究では日本近海のメタン湧出が観察される深海底において、バクテリアマットに被覆される堆積物を用いて、ANMEを特徴付ける炭化水素とエーテル型脂質の炭化水素鎖を分析することによって、メタン湧出海域におけるANMEの活動の支配要因を推定する研究の基礎的データの解析と比較を行った。

2. バイオマーカーを用いたANMEの識別

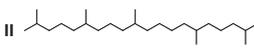
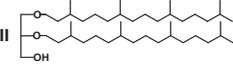
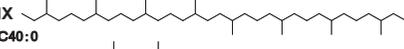
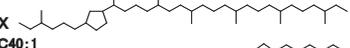
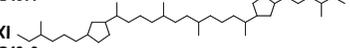
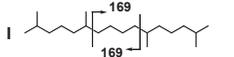
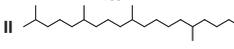
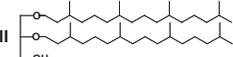
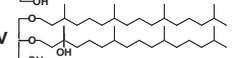
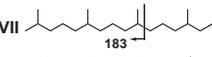
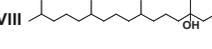
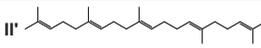
AOMを担う主要な微生物であるANMEは無孢子性の偏性嫌気性の古細菌(アーキア、始原菌)である。古細菌とは原核構造は持つが、リボゾーム小サブユニットRNAの相同性により、真核生物ともバクテリア(真正細菌)とも区別される一群の原核生物である。近年、GDGT(グリセロール ジアルキル グリセロール テトラエーテル)

の分解生成物であるビフィタンは古細菌のバイオマーカーとしての重要性が指摘されており、これらを用いた古細菌の対比が行われた(De Rosa et al., 1986)。Koga et al. (1998)は、嫌氣的メタン酸化古細菌(ANME)における定性的脂質組成、すなわち、コア脂質、単糖、ホスホジエステル結合性の極性基が化学分類学的指標になりうることを指摘した。ここでKoga et al. (1998)は、ビフィタンなどのエーテル結合型炭化水素をコア脂質分析の補助として用いた。コア脂質の部品分析(エーテル結合型炭化水素分析)は、コア脂質の全体構造についての情報は無くなるが、化学構造情報が得られる。

その後、還元環境でメタン酸化を行っている古細菌の大部分は、16S rDNA解析に基づいた分類によって、ANME-1とANME-2に分類された(たとえばMills et al., 2003)。Blumenberg et al. (2004)は、ANME-1とANME-2がそれぞれ卓越する海洋堆積物の有機地球化学分析を行ない、遺伝子情報を基にして分類されたANMEは、バイオマーカーを用いて分類した。Table 1にそれぞれを特徴付けるバイオマーカーを示した。炭化水素画分においては、ANME-1はペンタメチルイコサン(PMI;II)のみが検出されるのに対して、ANME-2はクロセタン(I)がPMI(II)の等量から数倍の量比で検出され、どちらも不飽和を伴う。グリセロールジエーテルにおいては、ANME-1はアーケオール(III)と*sn*-2-ヒドロキシアーケオール(IV)の組み合わせで特徴付けられ、ANME-2からはアーケオールのみが検出される。エーテル結合型炭化水素においては、ANME-1からはフィタン(VII)およびヒドロキシフィタン(VIII)が検出され、ANME-2は数種のC₄₀ビフィタン(IX, X, XI)によって特徴付けられる。このような性質を利用して、ANME-1とANME-2の識別が可能である。これに対してANME-3は、研究例が少ない。Niemann et al. (2006)は、PMI₄および5不飽和量が高い場合は、ANME-3をANME-2から区別できるとした。これがバイオマーカーを用いたANME-3認定の数少ない研究例であるが、Blumenberg et al. (2005)では、黒海のANME-1群集から飽和に比べて高い濃度のPMI₄および5不飽和を報告しており、PMIの不飽和度はANME-3

Table 1. Biomarkers for identification of ANME community.

ANME-1およびANME-2, 3の認定に有効なバイオマーカー (Blumenberg et al., 2004)

	Hydrocarbon	Glycerol diethers	Ether-bond cleaved lipids
ANME-1 marker	II 	III 	IX  C40:0 X  C40:1 XI  C40:2
ANME-2 marker	I  II 	III  IV 	VII  VIII 
ANME-3 marker (ANME-2からの鑑別)	II' 	4および5不飽和 >> 2,3不飽和	

の存在ではなく、初期続成作用の度合いを示している可能性もある (Niemann et al., 2008)。

3. 分析方法

凍結乾燥した試料は、瑪瑙乳鉢にて粉末化した。粉末試料 2g を 50 ml テフロン製遠沈管に測り取り、40 ml のジクロロメタン：メタノール (93:7) を加えた。これを超音波洗浄機中にて 60 分抽出し、遠心分離を行った。抽出溶媒はナスフラスコに移した。抽出操作は、3 回繰り返した。ナスフラスコに集めた抽出溶媒は、ロータリーエバポレーターおよび窒素ガス気流下にて濃縮した。得られたビチューメンは、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、脂肪族炭化水素画分 (N-1)、多環芳香族炭化水素画分 (N-2)、極性画分に分離した。カラムにはパスツールピペットを用い、また 3 wt% H₂O に調整したメルク社製シリカゲル (grade 10180, 70-230 mesh) を用いた。N-1 画分はヘキサン 4 ml、N-2 画分はヘキサン：ジクロロメタン (2:1) 4 ml、極性画分はジクロロメタン：メタノール (1:1) 7 ml を用いて分離した。この分離条件において、PMI の飽和から 2 不飽和までは N-1 画分に、4 から 5 不飽和は N-2 画分へ分けられる。3 不飽和 PMI は N-1/N-2 境界に湧出するため、溶媒量の微調整によって N-1 または N-2 に分離した。すなわち、1, 2 不飽和 PMI が相対的に多い場合には、N-1 画分のヘキサン量を 5 ml とし 3

不飽和 PMI を N-1 に分離した。同様に 4, 5 不飽和 PMI が多い場合には、N-1 画分のヘキサン量を 3.5 ml とし 3 不飽和 PMI を N-2 画分へ分離した。

本研究では、エーテル結合型炭化水素について、以下の操作によって分析を行った。極性画分を窒素ガス気流下にて濃縮し、1 ml の 55% HI と共にアンプル管に封入した。これを 110°C で 20 時間還流し、エーテル結合を切断し炭化水素鎖をヨウ化アルキルとした。試料はヘキサン洗浄済み蒸留水 20 ml を入れた 50 ml ナシ型フラスコに移し、ヘキサン：エーテル (9:1) でヨウ化アルキルを 3 回抽出した。抽出した試料は窒素ガス気流下にて濃縮し、20 mg の LiAlH₄ と無水テトラヒドロフラン、一滴のクロロホルムを加え、70°C で 2 時間還元させヨウ化アルキルを炭化水素とした。試料はヘキサン洗浄済み蒸留水 20 ml を入れた 50 ml ナシ型フラスコに移し、ヘキサン：エーテル (9:1) で炭化水素を 3 回抽出した。

GC/MS 測定には ThermoQuest 社製 Voyager を使用した。試料はオンカラム注入法、使用カラムは HP-5 ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm) であった。GC 昇温条件は 40°C で 1 分保持し、4°C/分で 300°C まで昇温した後、30 分保持した。質量分析計は全イオンスキャンモード (*m/z* 50-580)、イオン化電圧は 70 eV に設定した。

各化合物の個別炭素同位体組成は、ヒューレットパッカード社製 6980GC を用いて分離した化合物を ThermoFinnigan 社製 Combustion device にて

酸化し、ThermoFinnigan 社製 Delta-plus にて質量分析を行った。

なお、クロセタンとフィタンは同じ C_{20} イソプレノイド炭化水素であるため、ガスクロマトグラム分析において湧出時間がほぼ等しく、ガスクロマトグラム分析では識別が難しい。そこで、ガスクロマトグラム質量計が用いられる。ガスクロマトグラフ質量分析において、クロセタンは“tail-to-tail 結合”を含むため m/z 169 が卓越するのに対して、フィタンは m/z 183 で特徴付けられる。すなわち、 m/z 169 と 183 の量比を用いて、二つの化合物を区別できる。

4. 試料

本研究に用いた試料の採取地点と水深を Fig.1 に示す。各試料は、ピストンコアの最上部もしくは潜水艇による堆積物柱状コア (push core) を用いた。各地点における産状の詳細を以下に示す。

4.1. 直江津沖海鷹海脚

日本海直江津沖海鷹海脚 (地点 1) のメタン湧出海域で実施された“なつしま”NT-06-19 航海において、ハイパードルフィンを用いた潜航調査が行われた。本調査潜航では深海底におけるガス放出の観察、堆積物柱状コア試料の採取およびニスキン採水器による海水の採取を行った。本研究に用いた試料は、第 600 潜航 PC3 であり、海鷹海脚北部の水深 912 m の海底がバクテリアマットに被覆された地点から採取した約 16cm の柱状堆積物試料である。試料採取地点の水温は、0.2 ~ 0.3℃であった。

4.2. 東海沖竜洋海底谷

竜洋海底谷 (地点 2) は、後背地をもたない放棄された海底谷であり、その方向は北西から南東 ~ 南西 ~ 北西方向とほぼ直角に折れ曲がる断層規制の海底谷と解釈されている (岩淵ほか, 1991)。潜航地点の海底谷の中央部は泥で完全に覆われ平坦であるが、西側斜面に近い谷底ではシロウリガイコロニーやバクテリアによる変色域が斜面と平行に分布する。本研究で用いた試料は、“しんかい 2K” 第 821 潜航によって、深度 1093 m の変色

域にて採取した 16cm の堆積物柱状コア試料である。船上観察によると、この試料は砂交じりの泥で、強い硫化水素臭が認められた。この試料の間隙水の分析によると、メタン濃度の増加に伴って炭素同位体組成が軽くなる傾向が認められた (Tsunogai et al., 1999)。

4.3. 熊野灘泥火山

研究に用いた試料は、(旧)石油公団が実施している「大深海における石油資源などの探査技術など基礎調査」において、平成 14 年度第三次航海前半において熊野灘泥火山 (地点 3)、水深 1930 m において行ったピストンコアリングによって採取した 850 cm の堆積物試料の最表層 (23 cm) である。堆積物の岩質はシルト質泥で、タービダイトの挟在は認められなかった。テフラ解析から堆積速度が周囲と比較して著しく遅く、半遠洋性泥の堆積速度が遅いことが示された。

4.4. 相模湾初島沖

研究に用いた試料は、相模湾初島沖 (地点 4) 水深 1165 m のメタン湧出海域において 2003 年に採取されたピストンコア KY03-11-PC18 (約 100 cm) の最表層 (10cm) である。岩質は、シルトからシルト

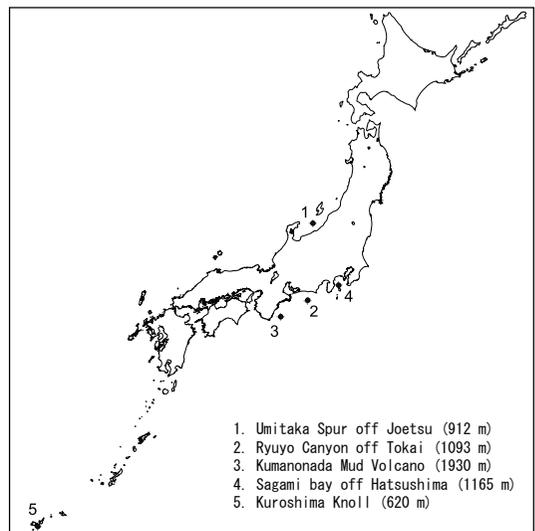


Fig. 1. The location map showing the sampling point and the depth of water. 1. Umitaka spur off Joetsu, 2. Ryuyo canyon off Tokai, 3. Kumanonada mud volcano, 4. Sagami bay off Hatsushima, 5. Kuroshima knoll.

質砂であり、シロウリガイの死殻を多量に含む。分析にはシロウリガイ殻を除いた堆積物を用いた。

4.5. 黒島海丘

黒島海丘(地点5)は、沖縄県石垣島の南方約25kmに位置する。頂部の水深は約620mであり、冷湧水に伴う化学合成生物群集や炭酸塩岩類が分布している。現在も活動的なメタン噴出が観察され、大規模なシンカイゼバリガイ類コロニーが観察される。本研究で用いた試料は、“しんかい2K”第1363潜航にて、黒島海丘頂部のシロウリガイコロニーの脇に分布する白～青色のバクテリアマットで被覆される堆積物である。採泥筒を差込み約25cmの堆積物柱状コア試料を採取した。

5. 分析結果と考察

各試料のバイオマーカー分析の結果を以下に示す。ANMEの識別に有効な炭化水素画分とエーテル結合型炭化水素のGC/MS分析結果(トータルイオンクロマトグラム;TIC)を示した。なお、全ての試料について、バイオマーカー分析を前提とした採取方法が行われておらず、採取に用いた機器、容器に特有の汚染が見られた。

5.1. 直江津沖海鷹海脚

海鷹海脚のメタン湧出点より採取した試料の分析結果をFig.2に示した。多量の3不飽和PMI(不飽和の位置が異なる2種類)で特徴付けられ、これに2不飽和PMI, 2不飽和C₂₃アルケンと陸源高等植物を起源とするC₂₇, C₂₉, C₃₁直鎖アルカンを伴う。クロセタンおよび飽和PMIは検出されなかった。炭素数の少ない直鎖アルカンは相対的に少量であり、このスケールのクロマトグラムに現れない。矢印で示した容器起源の汚染化合物(2,2-ジメチルアルカン)についても、バイオマーカー量が多い場合には、ほとんど問題にならない。個別炭素同位体組成は、湧出時間が早い順に、C_{23:2}-91.0‰, 2不飽和PMI-114‰, 3不飽和(前)PMI-114‰, 3不飽和(後)PMI-116‰であった。なお、湧出しているメタン(分析試料の間隙水中のメタン)の炭素同位体組成は-71.9‰であった。エーテル結合型炭化水素からは、4種のピフィタ

ンが検出された。ピフィタン(IX)が卓越し、ピフィタン(X, XI, XII)は相対的に少量である。ここで、17βH, 21βH-C₃₁ホパンと17βH, 21βH-C₃₃ホパンが僅かに検出された。

この結果、海鷹海脚のメタン湧出点から採取された試料は、クロセタンの欠如と不飽和PMI, ピフィタン(IX, X, XI)で特徴付けられ、活動しているメタン酸化古細菌はANME-I群集と認定される。C_{23:2}アルケンについて、*n*-C₂₃およびその不飽和は起源不明であるが、AOMにおいて頻繁に検出される*n*-アルカンであることが報告されている(Thiel et al., 2001)。本研究では、炭素同位体組成が-91.0‰と非常に軽い値を持つことからAOMへの関与を示唆しており、今後の研究によって有効な指標となる可能性がある。ここで、溶存メタンとANME脂質の炭素同位体組成の差は約43‰であった。

海鷹海脚における分析結果の詳細は、荻原ら(2009)に報告されている。

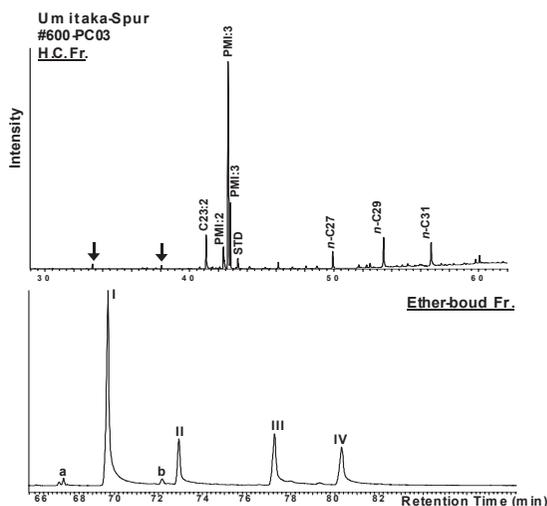


Fig. 2. Total ion chromatogram (TIC) of hydrocarbon fraction (upper) and ether-bound cleaved fraction (lower) from surface sediment covered by bacteria mat at the methane seep site of Umitaka spur off Joetsu. IX, X, XI and XII are biphytane with 0, 1, 2 and 3 cyclopentane ring (s), respectively. a and b indicating 17βH, 21βH-hopane which carbon number is 31 and 33. Arrows indicating the contaminated compound 2,2-dimethylalkanes.

5.2. 東海沖竜洋海底谷

竜洋海底谷より採取した試料の分析結果を Fig.3 に示した。他の試料と異なり、この試料の炭化水素画分には ANME の活動を示唆するクロセタンおよび飽和 PMI は検出されなかった。これに対して N-2 画分から、3～5 不飽和 PMI が検出された。そのため、この試料については、炭化水素化画分を示さずに多環芳香族画分を示した。相対的に 3 不飽和はわずかで 4 および 5 不飽和量が多い。この分析条件では、4 不飽和は STD (C₂₄D₅₀) の直前に、5 不飽和は直後に湧出する。4 不飽和、5 不飽和、スクワレンについて、個別炭素同位体組成は、それぞれ、-114‰、-109‰ および -41.6‰ であった。この画分から、多環芳香族ではペリレンが検出された。飽和 PMI およびクロセタンが全く検出されない試料から、多量の PMI₃～5 不飽和が検出された研究は報告が少ない。クロセタンが存在した場合には、このような PMI₃～5 不

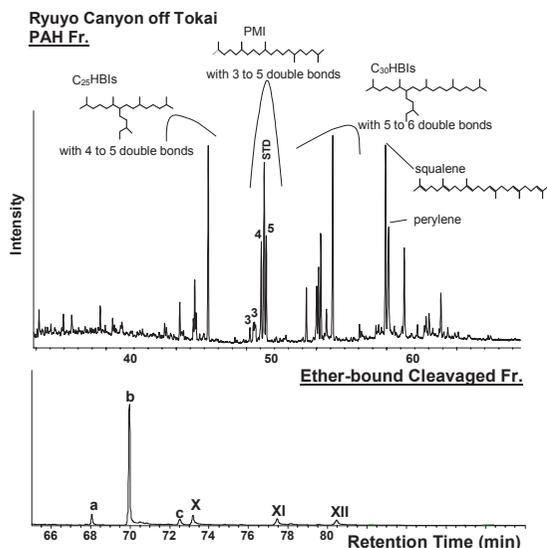


Fig. 3. Total ion chromatogram (TIC) of hydrocarbon fraction (upper) and ether-bound cleaved fraction (lower) from surface sediment covered by bacteria mat at the methane seep site in Ryuyo canyon off Tokai. Arabic number (upper chromatogram) indication the number of double bonds in pentamethylcosene (PMI). IX, X, XI and XII are bipentane with 0, 1, 2 and 3 cyclopentane ring(s), respectively. a, b and c indicating 17βH, 21βH-hopane which carbon number is 31, 32 and 33.

飽和は、ANME-3 の指標となるが (Niemann et al. 2006), 本試料の分析結果と比較して組み合わせが異なる。Niemann et al. (2008) の報告のように、多量の PMI₃～5 不飽和の存在は、初期続成作用の程度を示している可能性は十分考えられる。

エーテル結合型炭化水素からは、4 種類のピフィタン (IX, X, XI 及び XII) が認められた。ここで、ピフィタン (IX) の直前に 17βH, 21βH-C₃₂ ホパンが湧出している。このようにエーテル結合型画分は、4 種類のピフィタンと 17βH, 21βH-C₃₂ ホパンで特徴付けられる。なお、ピフィタン (X) の個別炭素同位体組成は -85.0‰ であった。

不飽和 PMI は認められるがクロセタンを欠き、3 種のピフィタン (IX, X および XI) は、ANME-1 の特徴である。東海沖竜洋海底谷のバクテリアマットは、ANME-1 群集である。

ここで、不飽和 C₂₅HBI および C₃₀HBI は、ポリエチレン容器起源の代表的汚染化合物である。汚染なのか天然化合物であるかの区別には、使用した容器起源の汚染確認は必須である。天然で記載された不飽和 C₂₅HBI および C₃₀HBI は、全てポリエチレン容器から検出される。構造から天然と汚染化合物の区別を行なうことはできない。なお、汚染化合物はポリエチレン容器の原料に依存し、容器の銘柄 (型番) には依存しない。すなわち、同じ種類の容器でもロットが異なると含まれる汚染化合物も異なる。過去にテストしたのと同じ容器でも汚染化合物は異なることがあるので、ブランクテストは必須である。本試料に用いた容器のブランクテストから、不飽和 C₂₅HBI および C₃₀HBI が検出された。

東海沖竜洋海底谷における分析結果の詳細は、荻原・芦 (2004) に報告されている。

5.3. 熊野灘泥火山

熊野灘泥火山より採取した試料の分析結果を Fig.4 に示した。プリスタンとフィタンが卓越し、Pr/Ph 比は 2.5 であった。高等植物起源の奇数炭素優位性を持つ *n*-C₂₇, *n*-C₂₉, *n*-C₃₁ アルカン、奇数炭素優位性が乏しい *n*-C₂₁, *n*-C₂₃, *n*-C₂₅ アルカン、および奇数優位性を持たない炭素数の少ない (C₂₀ 以下) *n*-アルカンが検出された。iso-C₁₅ アルカンが同炭素数のアルカンに比べて多量に検出さ

れた。ステランが検出されたので m/z 217 で確認を行った。ステランは C_{29} が C_{27} および C_{28} に比べてやや多い。海底における泥火山とは、地下の堆積物が泥ダイアピルとして海底に噴出したものである。分析した試料は表層堆積物ではなく、地下からもたらされたものであり、続成作用を被っている。

ANME に関係する化合物は PMI がわずかに検出されただけで、クロセタンは多量のフィタンの存在によって確認できなかった。

エーテル結合型画分では、4種のビフィタン (IX, X, XI, XII) が検出された。ビフィタン (XI) がビフィタン (X と XII) に比べて多量であることが特徴的である。

熊野灘泥火山の表層堆積物は、クロセタンの有無は明らかでないが、PMI とビフィタン (IX, X, XI) の存在から ANME-1 である可能性が高い。

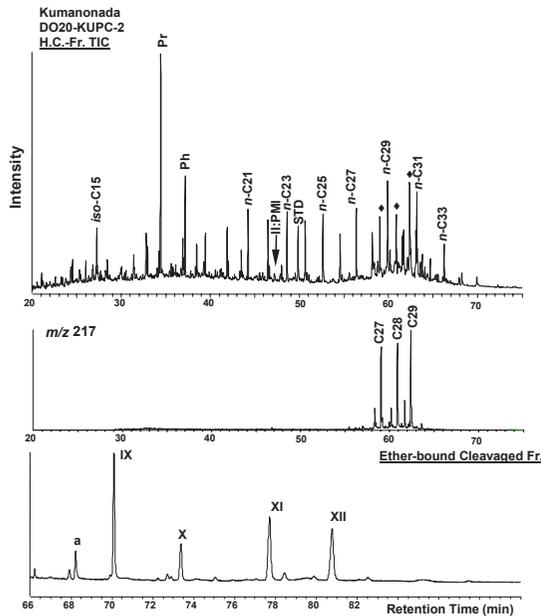


Fig. 4. Total ion chromatogram (TIC) of hydrocarbon fraction (upper) and ether-bound cleaved fraction (lower) and partial in chromatogram (middle, m/z 217) from surface sediment of Kumanonada mud volcano. Arrow indicating pentamethylcosane (PMI) and \blacklozenge showing steranes. IX, X, XI and XII are biphytane with 0, 1, 2 and 3 cyclopentane ring(s), respectively. a is indicating $17\beta H, 21\beta H-C_{31}$ hopane.

熊野灘泥火山における分析結果の詳細は、Ogihara et al. (2007) に報告されている。

5.4. 相模湾初島沖

相模湾メタン湧出海域より採取した試料の分析結果を Fig.5 に示した。炭化水素画分は、多量のクロセタンと相対的に少量の PMI およびその 1 不飽和が検出された。さらに、このクロマトグラムは陸源の $n-C_{27}$, $n-C_{29}$, $n-C_{31}$ およびコレステレン、ジブロプテンで特徴付けられる。個別炭素同位体は、クロセタンが -102‰ 、飽和 PMI が -88.9‰ であった。エーテル結合型画分については、ビフィタンはわずかで $17\beta H, 21\beta H-C_{32}$ ホパンが卓越する。図中には示していないが、多量のフィタンとその 1 不飽和フィテンが検出された。

相模湾のシロウリガイ死貝を含む堆積物は、多量のクロセタンと飽和および 1 不飽和 PMI の検出、エーテル結合型炭化水素におけるビフィタンの欠如およびフィテンの検出から、ANME-2 群集と認定される。

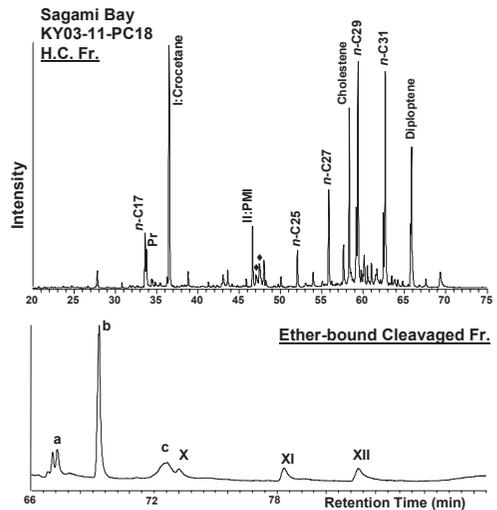


Fig. 5. Total ion chromatogram (TIC) of hydrocarbon fraction (upper) and ether-bound cleaved fraction (lower) from surface sediment at Sagami bay off Hatsushima. \blacklozenge indicating PMI with 1 double bonds. X, XI and XII are biphytane with 1, 2 and 3 cyclopentane rings, respectively. a, b and c indicating $17\beta H, 21\beta H$ -hopane which carbon number is 31, 32 and 33.

5.5. 黒島海丘

黒島海丘より採取した試料の分析結果を Fig.6 に示した。炭化水素画分は、ジプロプテンとプリスタンで特徴付けられる。*n*-アルカンは、高炭素数領域で奇数優位性が著しく、低炭素数領域では奇数優位性が弱い。少量の PMI が検出されたのに対して、クロセタンは検出されなかった。ここで、フィタンと認定したピークのマスペクトルは 169<183 であった。エーテル結合型画分では、極少量のピフィタン 3 種 (X, XI, XII) が認められたが、ピフィタン (IX) は 17βH, 21βH-C₃₂ ホパンと重なり、トータルイオンクロマトグラムからは認められなかった。図中には示していないが、エーテル結合型画分からフィタンが検出され、その個別炭素同位体組成は -90.4‰ であった。

このように黒島海丘よりの試料は、“ANME 量が少ないこと”を少量の PMI 量が示唆している。クロイセタンは確認できなかったが、エーテル結合型画分におけるピフィタンの欠如と軽い炭素同位体組成を持つフィタンの検出は ANME-2 の活動を示している。なお、バクテリアマットを特徴

付けるのはジプロプテンである。残念ながら試料が少量であること、濃度が薄いことから炭素同位体組成についての値を得ることが出来なかった。

黒島海丘における分析結果の詳細は、荻原ら (2003) に報告されている。

6. まとめ

日本近海のメタン湧出海域 5 地点における海底表層試料のバイオマーカー分析によって活動する ANME 群衆を特定し、Table 2 に示した。直江津沖海鷹海脚、東海沖竜洋海底谷、熊野灘泥火山においては、ANME-1 の活動が認定された。これに対して、ANME-2 群衆の活動は、相模湾初島沖試料と、おそらく黒島海丘よりの試料から認定された。本研究で認定した ANME 群衆は ANME-1 が 3 地点、ANME-2 が 2 地点である。これまでの研究によって、活動を支配していると考えられている要因は、温度、pH (Nauhaus et al., 2002)、メタンフラックス、硫酸イオン濃度、酸素濃度 (Knittel et al., 2005)、深度 (Nauhaus et al., 2002) および圧力などである。現状では、5 地点の環境を直接比較することは難しい。

ここで、群衆組成の支配要因は単純ではなく、いくつかの要因が複雑に作用していることが考えられる。たとえば、メタンフラックスについて、直江津沖海鷹海脚では、これまでの研究で ANME-1 が相対的にメタンフラックスの高い地点に生息し、ANME-2 がメタンフラックスの低い地点から検出された (荻原ら, 2009)。これに対して、黒海における研究では、逆に ANME-2 がメタン分圧の高い環境から検出された (Pape et al., 2005)。今後、ANME の棲み分けを支配する環境要因が明らかにされれば、この情報は、地球科化学的に重要な情報をもたらすこととなる。

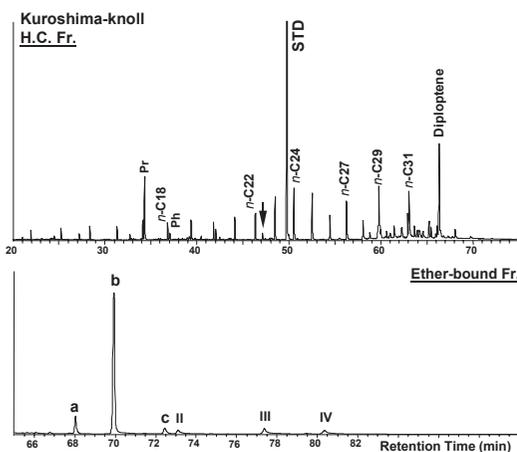


Figure 6 S.Ogihara

Fig. 6. Total ion chromatogram (TIC) of hydrocarbon fraction (upper) and ether-bound cleaved fraction (lower) from surface sediment covered by bacteria mat at the methane seep site of Kuroshima Knoll. Arrow (upper chromatogram) indicates pentamethylicosane (PMI). X, XI and XII are biphytane with 1, 2 and 3 cyclopentane ring (s), respectively. a, b and c indicate 17βH, 21βH-hopane which carbon number is 31, 32 and 33.

Table 2. Result of identifications of ANME community from five methane seeping sites around Japan.

	PMI+Cr	PMI-Cr	Biphytane	ANME 群衆
海鷹海脚		○	○	ANME-1
竜洋海底谷		○	○	ANME-1
熊野灘泥火山		(○)	○	ANME-1
相模湾初島沖	○		×	ANME-2
黒島海丘	(○)		×	(ANME-2)

引用文献

- Blumenberg M., Seifert R., Reinter J., Pape T. and Michaelis W. (2004) Membrane liquid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of National Academy of Science*, **101**, 11111-11116.
- Blumenberg M., Seifert R., Nauhaus K., Pape T. and Michaelis W. (2005) In Vitro Study of Lipid Biosynthesis in an Anaerobically Methane-Oxidizing Microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4345-4351.
- Brazelton W.J., Schrenk M.O., Kelley D.S. and Baross J.A. (2006) Methane and Sulfur Metabolizing Microbial Communities Dominate the Lost City Hydrothermal Field Ecosystem. *Applied Environmental Microbiology*, **72**, 6257-6270.
- De Rosa M., Gambacorta A. and Gliozzi A. (1986) Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbial. Rev.* **50**, 70-80.
- Iversen N. and Jorgensen B.B. (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate methane transition in marine sediments from Kattégat and Skagerrak (Denmark). *Limnology Oceanography*, **30**, 944-955.
- 岩淵 洋, 笹原 昇, 吉岡真一, 近藤 忠, 浜本文隆 (1991) 遠州灘沖の変動地形. *地質学雑誌*, **97**, 621-631.
- Knittel K., Loekann Boetius A., Kort R. and Amann R. (2005) Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 467-479.
- Koga Y., Morii H., Akagawa-Matsushita M. and Ohga M. (1998) Correlation of polar lipid composition with 16S rRNA phylogeny in methanogens. Further analysis of lipid component parts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **62**, 230-236.
- Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel T.V., Blumenberg M., Knittel K., Gieseke A., Peterknecht K., Pape T., Boetius A., Amann R., Jorgensen B.B., Widdel F., Peckmann J., Pimenov N.V. and Gulin M.B. (2002) Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane. *Science*, **297**, 1013-1015.
- Mills H.J., Hodges C., Wilson K., MacDonald I.R. and Sobecky P.A. (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**, 39-52.
- Nauhaus K., Boetius A., Krüger M. and Widdel F. (2002) In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediments from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology*, **4**, 296-305.
- Nauhaus K., Treude T., Boetius A. and Krüger M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental Microbiology*, **7**, 98-106.
- Niemann H., Duarte Hensen J.C., Omoregie E., Magalhães V.H., Elvert M., Pinheiro L.M., Kopf A. and Boetius A. (2006) Microbial methane turnover at mud volcanoes of the Gulf of Cadiz. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**, 5336-5355.
- Niemann H. and Elvert M. (2008) Diagnostic lipid biomarker and stable carbon isotope signatures of microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane with sulphate. *Organic Geochemistry*, **39**, 1668-1677.
- 萩原成騎, 松本 良, Jenkins R, 町山栄章 (2003) 黒島海丘におけるバクテリアマットの有機地球化学的研究. *深海研究*, **22**, 107-114.
- 萩原成騎, 芦 寿一郎 (2004) 東海沖竜洋海底谷より採取されたバクテリアマットに被覆される深海堆積物の脂質組成. *深海研究*, **24**, 25-36.
- Ogihara S., Matsumoto R. and Yifeng C. (2007) An organic geochemical study of KP-2 core on the mud volcano at Nankai Trough. *Journal of Geochemical Exploration*, **95**, 81-87.
- 萩原成騎, 石崎 理, 松本 良 (2009) なつしま NT-06-19 航海 (直江津沖海鷹海脚および上越海丘) によって採取された堆積物柱状試料の有機地球化学分析. *地学雑誌*, **118**, 128-135.
- Orphan V.J., House C.H., Hinrichs K.-U., McKeegan K.D. and DeLong E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold

- seep sediments. *Proceedings of National Academy of Science*, **99**, 7663-7668.
- Pape T., Blumenberg M., Seifert R., Egorov V.N., Gulin S.B. and Michaelis W. (2005) Lipid geochemistry of methane-seep-related Black Sea carbonates. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **227**, 31-47.
- Paull C.K., Chanton J.P., Neumann A.C., Coston J.A., Martens C.S. and Showers W. (1992) Indicators of methane-derived carbonates and chemosynthetic organic carbon deposits: examples from Florida Escarpment. *Palaios*, **7**, 361-375.
- Ritger S., Carson B. and Suess E. (1987) Methane-derived authigenic carbonates formed by subduction-induced pore-water expulsion along the Oregon/Washington margin. *Geological Society America Bulletin*, **98**, 147-156.
- Thiel V., Peckman J., Richnow H.H., Luth U., Reitner J. and Michaelis W. (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonate and microbial mat. *Marine Chemistry*, **73**, 97-112.
- Tsunogai U., Yoshida N. and Gamo T. (1999) Carbon isotopic evidence of methane oxidation through sulfate reduction in sediment beneath cold seep vents on the seafloor at Nankai Trough. *Marine Geology*, **187**, 145-160.
- von Rad U., Rosch H., Berner U., Geyh M., Marchig V. and Schulz H. (1996) Authigenic carbonates derived from oxidized methane vented from Makran accretionary prism off Pakistan. *Marine Geology*, **136**, 55-77.