Res. Org. Geochem. **31**, 1−14 (2015) 〔2013 年度田口賞受賞〕

総説

堆積物中のアーキア膜脂質同位体分析のメタン生成場への応用 *

金子 雅紀 **

（2015 年 6 月 8 日受付，2015 年 7 月 15 日受理）

Abstract

A significant contribution of Methanogenic archaea (methanogens) on methanogenesis in marine subsurface sediments has been suggested on the basis of isotopic compositions of methane from sediments and gas hydrate water lattice. However, habitats and activities of methanogens are still unknown. Lipid biomarkers and their isotope analyses can be useful tools to study distribution of methanogens in marine sediment because their unique metabolism is reflected in carbon isotope compositions of their membrane lipids. The techniques to detect methanogens and their membrane lipid analysis are more recently developed and are applied to gas hydrate bearing marine sediments, and a new approach of function specific compound analysis is suggested.

1. はじめに

1990 年代からの約 20 年間の研究により，海底下における生物圏の広がりが理解されつつある。おおまかな傾向で見れば，海底下 1 m には実に 10^{10} 細胞もの原核生物が存在し，堆積物の深度とともにその細胞数は減少していく（Parkes et al., 1994）。炭素量に換算すればそれらのバイオマスは 56−303 Pg となり，見積もりによっては，陸上のバイオマス（560 Pg）に匹敵する（Lipp et al., 2008; Parkes et al., 1994; Whitman et al., 1998）。原核生物の膜脂質バイオマーカーの分布からは，海底下 1 m 以深ではバクテリアよりもアーキアが卓越する「アーキアワールド」であることが示唆されている。しかしながら，海底下に生息するものの多くは未培養であり，これらの原核生物が堆積物中でどのように振る舞っているのかその「機能」に関する知見は乏しい。

海底下の原核生物の中でもメタン生成アーキアを研究する意義は大きい。第一に，初期生命やその発生環境を考える上で極めて重要な研究対象である。メタン生成アーキアは二酸化炭素と水素あるいは酢酸，ギ酸，メチル化合物など単純な化合物を基質として用いる始原的な代謝様式を持つ微生物であり，生命の起源に近い生物である（Thauer, 1998; Woese, 1987）。つまり，どのようなメタン生成アーキアがどのような環境を好むのかを明らかにすることは，初期生命の発生環境を考える上で重要な制限要素を与える。第二に，メタン生成アーキアの活動の解明は地球表層の炭素循環の理解に重要である。地球表層で合成された有機物の大部分は好気的分解によって消費されるが，ごく一部は分解を免れ堆積物中に埋没する。酸素のない堆積物中では原核生物による発酵分解により，上で述べた単純な化合物へと分解され，メタン生成の基質となる（Thauer et al., 2008）。つまり，メタン生成は堆積有機物の運命を決める生物的有機物分解過程の最終段階であり，メタン生成を定量的に理解することは炭素循環の理解に不可欠である。第三に，海底下のメタン生成プロセスを定量的に

*Isotopic compositions of archaeal membrane lipids in methanogenic sediments

**国立研究開発法人産業技術総合研究所，地質調査情報センター，〒 305-8567 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 7
Masanori Kaneko: Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), AIST Tsukuba central 7 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8567 Japan
e-mail: m-kaneko@aist.go.jp

解明することは，エネルギー資源の形成プロセスや気候変動を理解する上で不可欠である。これらの問題は，我々人間社会にとって重要な影響を与える可能性がある。例えば，堆積物中で生成されるメタンはエネルギー資源になる可能性がある。メタンハイドレートは永久凍土中や海洋プレートが大陸プレートに沈み込む際に形成される付加堆積物中に特異的に存在する。地球全体の総量は数千兆 m^3 と見積もられており（Milkov, 2004; Milkov and Sassen, 2002），これは現在の主要エネルギー資源である石油，石炭，天然ガスの確認埋蔵量（エネルギー白書，2014）とエネルギー量で比較すると 8-30 倍大きい。日本近海の南海トラフ，下北半島沖，能登半島沖などにもメタンハイドレートは存在し，現在の推定埋蔵量は約 12 兆 m^3 で，日本の年間天然ガス使用量のおよそ 120 年分に相当する。このメタンハイドレートを構成しているメタンの生成にはメタン生成アーキアが大きく関与しており，その成因を理解するためにはメタン生成アーキアの分布と活動を解明する必要がある。一方で，メタンは温室効果ガスでもある。メタンは二酸化炭素と比べて 20 倍以上も温室効果が高いガスである。そのため，気候変動への影響が懸念されており，過去に暁新世－始新世温暖化極大事件（Paleocene－Eocene thermal maximum, PETM, 55 Ma）などの地球温暖化イベントに関与した可能性が指摘されている（Dickens et al., 1995; Zachos et al., 2005）。

メタン生成アーキアの活動は嫌気的な堆積物中における主要な代謝プロセスであるとされている。実際に，海底下には高濃度なメタンが存在し，その同位体組成やガス成分の組成がメタン生成アーキア由来であること示している（Milkov, 2005; Pohlman et al., 2009）。また，電子受容体や，糖などの高エネルギー物質が深部では乏しいため，最終的には二酸化炭素還元型のメタン生成がより重要になると考えられている。ところが，海底下のメタン生成アーキアの分布や活性について定量的な議論はおろか，検出さえほとんど出来ていないのが現状である。近年の知見からは，堆積物中の有機炭素量と原核生物のバイオマス量が相関すること，膜脂質の同位体比が有機炭素の同位体組成と近いことから，従属栄養細菌が主要な成分で，メタン生成アーキアのような独立栄養細菌の割合は小さいか（0.1％程度）技術的に検出できていない可能性があると指摘されている（Biddle et al., 2006; Fry et al., 2008; Valentine, 2011）。

2. 海底下メタン生成

メタン生成アーキアによるメタン生成反応には二酸化炭素還元型（水素資化性），酢酸発酵型，メチル基栄養型の 3 経路が知られている。一般に，海底下では二酸化炭素還元型のメタン生成が主要なメタン生成経路であることが，メタン及び溶存二酸化炭素の同位体組成から考えられているが，局所的にはそれ以外の経路が起こっている可能性も示唆されている（Heuer et al., 2009; Pohlman et al., 2009; Whiticar, 1999）。一般的な海洋堆積物のように熱源が近くに存在しない環境ではメタン生成に必要な水素は堆積有機物の発酵分解に依存する（Conrad, 1999）。そのため，代謝的には独立栄養生物であるが，メタン生成アーキアの存在度が従属栄養細菌よりも小さくなることは矛盾しない。

メタン生成アーキアが海底下で活動可能な深度の上限は，硫酸塩濃度によって支配される。これは硫酸還元菌とメタン生成アーキアの水素の競合により説明できる。つまり，メタン生成アーキアは硫酸塩が消費され，硫酸還元菌が不活発になった後に活発化する。また，現在報告されている微生物の最高増殖温度はメタン生成アーキア *Methanopyrus kandleri* strain 116 の 122℃である（Takai et al., 2008）。平均的な地熱勾配が 30℃/km であることを考えると，メタン生成アーキアが存在可能な深度の下限は海底下 4 km 程度になる。温度が高くなるにつれて必要になる細胞修復のためのエネルギーコストを考えても，メタン生成アーキアが活動可能な範囲は硫酸還元が終了する海底下およそ 10 m から数千 m のどこかということになる。ただし，硫酸還元菌と基質で競合しないメチル基栄養型メタン生成アーキアは硫酸還元領域でも活動しうる。

それでは，この制限範囲の中のどのようなところにメタン生成アーキアは存在するのだろうか？一般に硫酸還元領域の直下でメタン生成の活性が上がることが観察から明らかにされている（Parkes et

al., 2007)。これは，利用可能な有機物が比較的多く，微生物群集全体の活動が活発であることによる。しかしながら，微生物起源のメタンはその下部にも存在し（Borowski W.S., 2004; Milkov, 2005; Pohlman et al., 2009），主なメタン生成場はさらに深部にあると考えられる。一方で，堆積物中の有機物濃度が著しく高い層準や，海水による栄養塩の流入などがあれば，局所的にメタン生成が活発になる場合がある。例えば，スリナム・パラマリボ沖のデメララライズ（Demerara Rise）では，堆積物深度 150～700 m に存在する白亜紀の黒色頁岩層で活発なメタン生成が起こっている（Erbacher et al., 2004）。また，ペルー縁辺域（Peru margin）では，堆積物下 38 m までに硫酸が消費されるが，90 m からまた硫酸塩濃度が上昇し始める。メタン生成は硫酸濃度が低いこの 38～90 m の間で活発に起こっている（Parkes et al., 2005）。しかしながら，このような特殊な例を除き，硫酸還元領域以深のメタン生成アーキアの分布およびそれを支配する環境要因は未だ不明である。

3. メタン生成（菌）の検出

環境中のメタン生成アーキアを研究する手段としては単離・培養，^{14}C トレーサー法，16S rRNA，機能遺伝子の解析，膜脂質分析などが知られている。

培養や ^{14}C トレーサー法によってメタン生成アーキアの増殖や活性が検出されることは現場環境において「死んでいない細胞が存在する」ことを意味する。また，これらの手法を用いることにより，増殖した細胞の生育環境や代謝様式などを推定できる。ところが，海洋堆積物中からメタン生成アーキアの単離・培養に成功した例は数例しかない（Imachi et al., 2011; Kendall and Boone, 2006; von Klein et al., 2002; Mikucki et al., 2003）。最近では，ポリプロピレンスポンジ（微生物の生息場）に低濃度の基質を連続的に流す連続フロー型の培養装置が開発され，これまで培養が困難であった海底下の微生物の培養を可能にする手段として期待されている（Imachi et al., 2011）。

一方，^{14}C トレーサー法では，与える炭素基質を同位体標識し，生じたメタンを分析することにより，メタン生成経路ごとの活性を測定する。これまでにペルー沖，日本海，カスカディア縁辺域（Cascadia margin），ブレーク海嶺（Blake Ridge），赤道太平洋の掘削堆積物コアでの ^{14}C トレーサー法を用いた活性測定が報告されており，二酸化炭素還元型のメタン生成では 0.005～3.69 nmol d^{-1} cm^{-3}，酢酸発酵型メタン生成では 0.00001～1240 nmol d^{-1} cm^{-3} の範囲にある（Fry et al., 2008; Parkes et al., 2005; Parkes et al., 2000; Yoshioka et al., 2010）。しかし，深海底の堆積層深部と実験室内での培養では大きな環境の違いがあり，現場の環境を完全に再現できないため，いずれの方法も現場の活性や代謝様式を定量的に議論することは難しい。

培養に依らない微生物学的手法として，16S rRNA や機能遺伝子（*mcrA*）の解析によるメタン生成アーキアの検出法がある。これらの手法では，堆積物中から抽出した遺伝子を，ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）によって増幅し，解析する。特に後者の *mcr*A 遺伝子分析ではメタン生成反応の鍵酵素であるメチルコエンザイム M レダクターゼ（MCR）の一部をコードする遺伝子をターゲットにしており，メタン生成アーキアおよび嫌気的メタン酸化アーキア（ANME）を検出するのに利用される。しかし，これまでにメタン生成アーキアの遺伝子が海底堆積物下から検出された例は希である（Fry et al., 2008; Valentine, 2011）。これは，実際にメタン生成アーキアの相対的な存在度が小さいという可能性もあるが，PCR に用いるプライマーが培養可能なメタン生成アーキアの遺伝子をベースに設計されており，未知のメタン生成アーキアを捉え切れていないなどの人為的なバイアスの可能性も指摘されている。

有機地球化学の分野では海底下の微生物を調査するツールとして膜脂質バイオマーカーを用いている。これは上記の手法と異なり，現場環境中の天然存在度を定量出来る点で優れている。原核生物の細胞膜は基本的に脂質二重膜によって構成されているが，その構造には多様性があり，特にバクテリアとアーキアでは大きく異なる。また特定の原核生物に特徴的な膜脂質構造も報告されており，メタン生成アーキアの場合，hydroxyarchaeol（ジエーテル脂質）がその代表である（Fig. 1）。その他のメタン生成アーキアの膜脂質の主要な成分

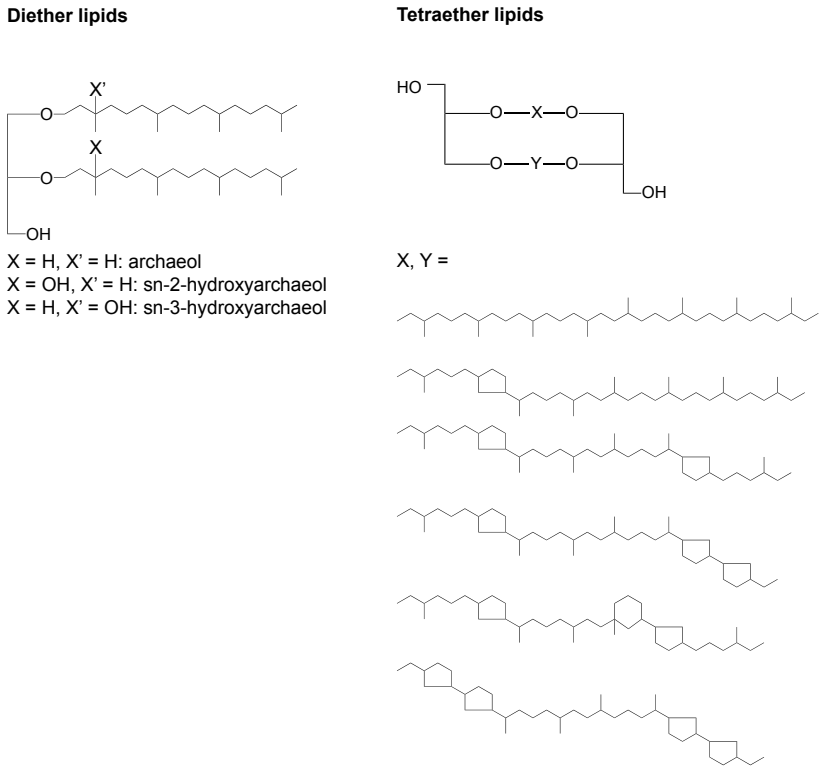

Fig. 1. Structures of archaeal diether and tetraether lipids.

として，archaeaol（ジエーテル脂質），cardoarchaeol（テトラエーテル脂質）があるが，これは一般的にアーキアに共通な膜脂質である。また，膜脂質の炭素安定同位体比は起源生物の炭素源や，代謝経路などの生物生理を反映するため，さらに詳細な起源を推定するのに有効である。

4. メタン生成菌膜脂質の同位体的特徴

二酸化炭素還元によるメタン生成の場合，7段階の酵素反応を経てメタンが生成される（Fig. 2）。各段階における同位体分別は明らかにされていないが，基質に対し最大で80‰の同位体分別が起こる（Londry et al., 2008; Whiticar et al., 1986）。メタン生成反応の途中段階では，methyl-tetrahydrosarcinapterin（CH_3-H_4STP, Fig. 2）が生成され，この化合物を分岐点としてそのメチル基はアセチルCoAとなり，膜脂質を含む生合成経路へと進む。基質に対する膜脂質合成時の同位体分別は最大で47‰であることが培養実験で明らかにされている（Londry et al., 2008）。この同位体分別の大きさは水素濃度に依存して30‰程度の幅を持つ。その原因は，CO_2をH_2で還元する時の自由エネルギーが酵素の反応の可逆性に影響するためと考えられており，低水素濃度では酵素反応に可逆性が生じ，結果として最大の同位体分別が起こる。熱源が近くに存在しない海底堆積物中では主な水素の供給源は有機物の発酵分解であり，一般的にその濃度は低いと考えられる（Conrad, 1999）。つまり，海底堆積物中のメタン生成アーキア由来の膜脂質の炭素同位体比は最大に近い同位体分別を示すはずである。

5. カスカディア縁辺域ガスハイドレート腑存域への応用

カスカディア縁辺域（Cascadia Margin）はカナダ・バンクーバ島沖からアメリカ・オレゴン州沖に位置し，ファンデフカプレートが45 mm/yの速度で北アメリカプレートに沈み込むことによって新第三紀から第四紀の堆積物により付加帯が形成

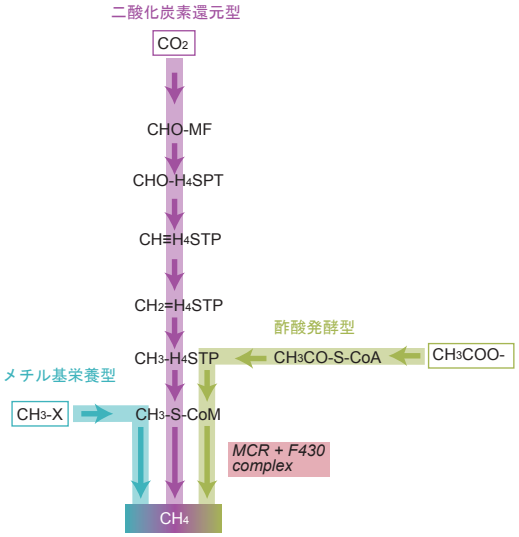

Fig. 2. Methanogenic pathways (modified after Thauer, 1998). CHO–MF, formyl–methanofuran; CHO–H_4SPT, formyl–tetrahydrosarcinapterin; CH≡H_4STP, methenyl–tetrahydrosarcinapterin; CH_2=H_4STP, methylene–tetrahydrosarcinapterin; CH_3–H_4STP, methyl–tetrahydrosarcinapterin; CH_3–S–CoM, methyl–coenzyme M; MCR, methyl-coenzyme M reductase.

されている（Akiba et al., 2009）。この付加堆積物中ではガスハイドレートが存在することが，現在の統合国際深海掘削計画（Integrated Ocean Drilling Program, IODP）の前身である The Ocean Drilling Program（ODP）の第 146 次航海および 204 次航海における掘削調査で示唆されていた。2005 年には第 311 次航海により，付加帯を横断するトランセクトライン上で 4 地点，メタンが冷たい流体とともに海底から湧き出る cold vent で 1 地点の掘削が行われた（Figure 3, Riedel et al., 2006）。このうち U1329 サイトを除く全ての地点からメタンハイドレートの存在が確認され，特に cold vent である U1328 では表層 40 m に渡ってガスハイドレートの濃集が確認された。メタンおよび溶存二酸化炭素の同位体分析の結果，すべての地点におけるメタンは微生物起源のうち二酸化炭素還元型のメタン生成に由来するものであることが示唆されている（Pohlman et al., 2009）。また，U1327 および U1329 サイトにおいて，メタン生成アーキアの機能遺伝子 *mcr*A および ^{14}C トレーサー法による二酸化炭素還元型のメタン生成が検出されている（Yoshioka et al., 2010）。いずれのデータもメタン生成アーキアの存在をしている。

U1327 および U1328 サイトはともに陸と変形フロントを結んだ付加帯の中間地点に存在するが，ガスハイドレートの存在形態や，流体の移動において大きな差異がある。特に，U1328 サイトでは地震波の伝搬が遅い部分が垂直に伸びており，流体およびガスの移流に導管のような役割を果たし，表層型メタンハイドレート形成に関与していると考えられている（Riedel et al., 2006）。堆積物中有機物の濃度はどちらも平均 0.6 wt％ほどで，陸源有機物の影響も見られる（Kaneko et al., 2010）。

この 2 つの地点においてアーキアの膜脂質の膜脂質と同位体組成を調べた。どちらの地点も archaeol や hydroxyarchaeol などのジエーテル型脂質は検出限界以下，あるいは極めて微量であったのに対し，テトラエーテル脂質（Fig. 1）が多く検出された。このテトラエーテル脂質を抽出し，化学分解によって取り出したアルキル鎖（ビフィタン）の分布と炭素同位体組成を調べたところ，Fig. 4 のような深度プロファイルとなった（Kaneko et al., 2013）。どちらの地点でも深部で膜脂質の量が増えているが，U1328 の深度 130～230 m でその傾向が顕著に見られる。炭素同位体組成をみると，どちらの地点でも BP-1 を除くビフィタンの δ^{13}C 値は約 –20‰ で一定しており，総有機炭素（TOC）の同位体組成（–26～–22‰）と近いことから，従属栄養アーキア由来であると考えられる。特に BP［3］は 6 員環を 1 つ含む構造であることから，タウムアーキオータに属するアーキア由来の膜脂質の寄与が大きいと考えられる（Biddle et al., 2006）。ところが，BP-1 の δ^{13}C 値は 100 m 以深の膜脂質量が多い層準で –48‰まで低くなっている。現場の CO_2 の δ^{13}C 値が約 0‰であるため，両者の差は低水素濃度で培養したメタン生成アーキアによる膜脂質合成時の同位体分別の大きさ（47‰）と一致する。つまり，この δ^{13}C 値の低い BP［1］の起源生物としてメタン生成アーキアが考えられる。間隙水中のアンモニアやリン酸などの栄養塩分布などを考慮すると次のようなシナリオが成り立つ。

堆積物深度 130～230 m の範囲において，タウムアーキオータなど従属栄養アーキアが堆積物中の有機物を発酵分解し，その産物として間隙水中に

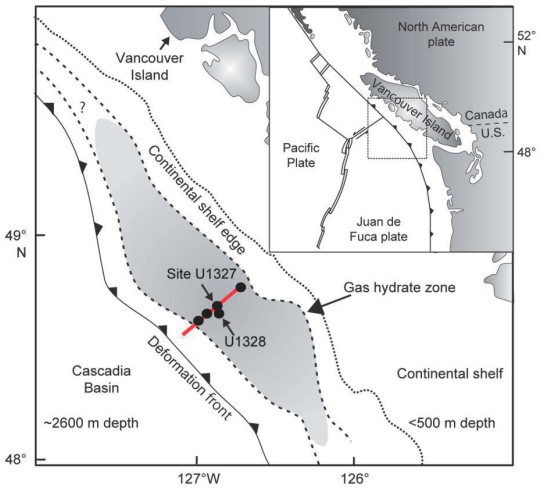

Fig. 3. Map of the region offshore of Vancouver Island (Canada) where Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Expedition 311 was conducted (modified after Pohlman et al. (2009b) and Riedel et al. (2006)). Sites drilled during the IODP Expedition included four sites in a transect perpendicular to the continental margin and the Bullseye cold seep (Site U1328).

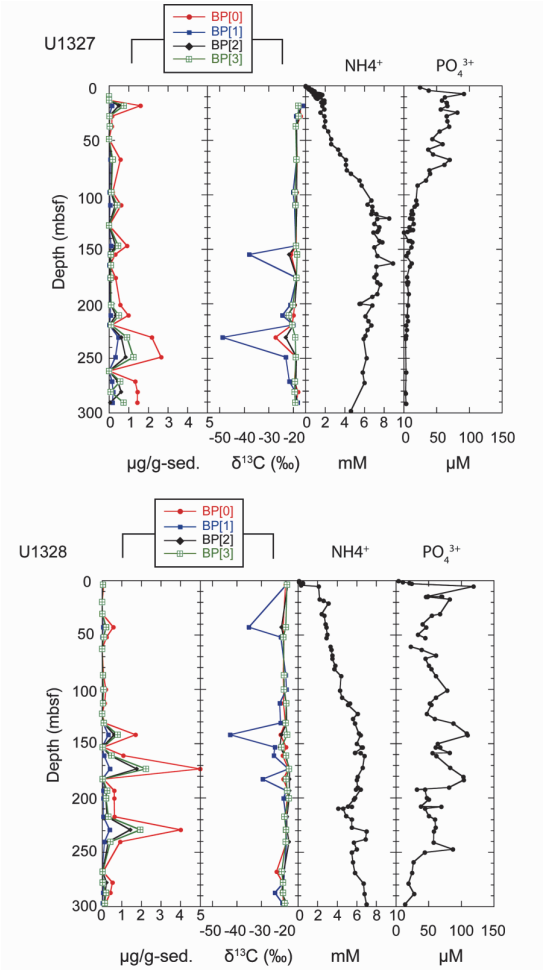

Fig. 4. Depth profiles of concentrations and δ^{13}C values of BPs (Kaneko et al., 2013), and concentrations of inorganic components (ammonium and phosphate) obtained during IODP Expedition 311 (Riedel et al., 2006) at U1327 and U1328 sites.

CO_2 や水素が生成されると同時にリン酸やアンモニアを放出する。メタン生成アーキアはそれらのメタン生成基質や栄養塩を用いてメタン生成を行う。U1328 では深部からのガスや流体の供給により表層型メタンハイドレートが形成されているのに対し，隣接する U1327 では堆積物深部の砂層を充填するように形成されている。このような堆積物構造の違いが膜脂質や栄養塩の分布の違いに関係しているかもしれない。

ところが，BP-1 の起源に関しては別の解釈も可能である。例えば，BP [1] はタウムアーキオータや嫌気的メタン酸化アーキア（ANME）等も保有する（Hoefs et al., 1997; DeLong et al., 1998, Blumemberg et al., 2004）。δ^{13}C 値が –20‰程度の BP-1 はおそらく従属栄養性のタウムアーキオータ由来であろう。もし堆積物表層の嫌気的メタン酸化領域で嫌気的メタン酸化アーキア（Anaerobic methane oxidizing archaea, ANME）により生合成された同位体的に軽い BP [1]（δ^{13}C < –100‰）が「化石分子」として存在していれば，両者の混合率によって –40‰程度の BP-1 は説明できることになる。つまり，本研究で検出された同位体的に軽い BP-1 がメタン生成アーキア由来であると言う上述の解釈は「説明可能な」1 つの可能性でしかない。

6. アーキア膜脂質の水素同位体比分析法

このように炭素同位体のみからでは堆積物中の膜脂質の起源生物を正確に推定することが困難である。同位体分析による膜脂質の起源生物推定の分解能を上げる手段として，水素同位体分析を加えた 2 次元同位体解析法があり，バクテリアや真核生物のエステル脂質に用いられている。膜脂質の水素同位体組成は代謝や生合成時の水素源や環境

中の H_2O の同位体組成を反映するため（Naraoka et al., 2010; Zhang et al., 2009），起源生物推定にさらなる洞察を与えるはずである。ところが，アーキア膜脂質の水素同位体比分析法は，技術的な問題からこれまで測定することができなかった。アーキアの膜脂質の同位体比をガスクロマトグラフ／同位体比質量分析計（GC/IRMS）で分析するためには，上述のようにエーテル脂質の化学分解により，構造中のビフィタンを取り出し，分析する必要がある。従来の方法では，ヨウ化水素酸（HI）によりエーテル結合を切断し，生じたヨウ化ビフィタンを $LiAlH_4$ により GC で分析可能なビフィタンに還元していた。この操作で起こる反応には炭素原子は関与しないため，炭素同位体分析に用いられてきた（Kohnen et al., 1992; Pancost and Sinninge Damsté, 2003; Schouten et al., 1998）。しかし，水素同位体分析においては，ヨウ化ビフィタンの還元により $LiAlH_4$ 由来の 2H を補正することができないため分析が不可能であった。

そこで筆者らは，ヨウ化ビフィタンの還元法として PtO_2/H_2 法を用いた水素同位体比分析法を確立した（Kaneko et al., 2011）。この手法では，白金触媒上における水素ガスとの接触還元によりヨウ化ビフィタンを還元する。還元の際に付加する水素原子の同位体比は同位体既知の標品（例えば，Iodeoctadecane, $C_{18}H_{17}I$）を用いて，標品（$C_{18}H_{37}I$）－水素化物（$C_{18}H_{38}$），水素ガス－水素化物（$C_{18}H_{38}$）間の二方面から補正することができる。また，PtO_2/H_2 法を用いたテトラエーテル脂質からのビフィタンの回収率は 96％以上であり，これは従来の $LiAlH_4$ を用いた手法の 2 倍以上高く（Lengger et al., 2014b），また実験操作もより簡便である。

好熱性アーキアである *Sulfolobus* の純粋培養菌体を上記の手法を用いて分析した結果，0 から 4 つのシクロペンタンをもつビフィタン（BP-0 から BP-4）が検出された。これらのビフィタンの δD 値はビフィタン中の環数が増加するとともに，上昇する傾向があり，BP-0 と BP-4 では約 50‰の差を示した（Fig. 5）。テトラエーテル脂質の生合成経路には未だ不明な部分が多い。特に，ジエーテル脂質の C_{20} 鎖が重合して C_{40} 鎖になる際に，不飽和態の DGGGP が飽和化された状態（archaeol）で起こるのか，環状構造ができるタイミングと機構などについては不明であった（Eguchi et al., 2003; Koga and Morii, 2007）。近年，Villanueva et al.（2014）では，脂質合成に関与するタンパク質のアミノ酸配列の解析から，C_{20} 鎖ができる過程で既に環状構造ができていること，数種の C_{20} イソプレノイド鎖の重合反応によって，0～4 つの環状構造を持つ C_{40} イソプレノイド鎖が合成され，グリセロール基の結合とアルキル差の飽和化が起こるという新しい生合成系を提案している（Fig. 6）。環状構造ができた後にイソプレノイド鎖の飽和化が起こるということは，必要な水素原子の数がビフィタン中の環数の増加とともに減少することを意味する。この水素付加反応には同位体効果が存在するはずであり，これが BP-0 から BP-4 の間の約 50‰の差を生み出していると考えられる。このように，同じ起源生物であっても生合成時の同位体分別により膜脂質の水素同位体組成は幅を持っているということが示唆された。今後は代謝様式の違いがこれら膜脂質の同位体比にどのように反映されるのかを明らかにする事により，膜脂質の炭素・水素同位体比の 2 次元解析により，より詳細に起源生物が推定可能になると期待される。

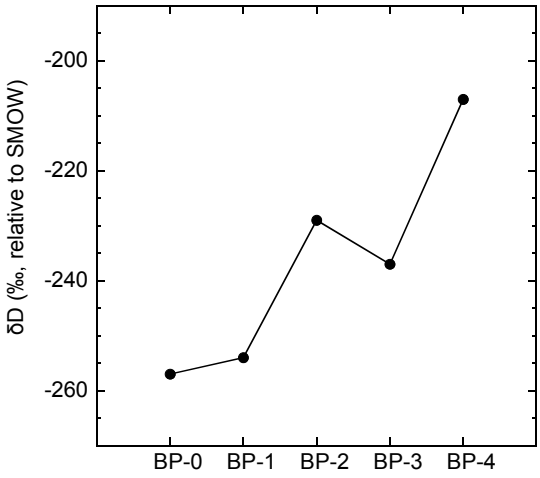

Fig. 5. Distribution of hydrogen isotopic composition of BPs from a *Sulfolobus* culture.

7. 機能特異分子でみる新しい挑戦

膜脂質バイオマーカーという研究ツールはポテ

ンシャルの高いツールであり，環境中の微生物バイオマスを定量的に理解し，またその構造の多様性によって起源生物を特定できる可能性がある。ただし，海洋堆積層深部のような複雑系では，保存性，リサイクリング，現場活性の有無など不確定要素が多くなるため，議論が困難な場合がある（Lengger et al., 2014a; Lipp et al., 2009; Schouten et al., 2010; Takano et al., 2010; White et al., 1979）。特にメタン生成アーキアの場合，海底堆積物中からの培養に成功した例は2, 3例しか無く，その多様性や，バイオマスに関してはほとんど分かっていない。つまり，海底下メタン生成アーキアが実際にどのような膜脂質を持っているのか，不明である。

私たちが地球化学的に知りたいのはメタン生成という「機能」がいかに駆動し，地球表層の物質循環に寄与しているかということである。この「機能」を駆動しているのは，酵素・補酵素群である。Fig. 2 に示すように，二酸化炭素還元型のメタン生成は 7 段階の酵素反応からなり，その他に酢酸発酵型や，メチル基栄養型のメタン生成が存在する。これらの反応段階にはメタン生成に特異な酵素・補酵素が多く関与するが，唯一すべてのメタン生成経路に共通するのがメチルコエンザイム M レダクターゼ（MCR）・補酵素 F430 の複合体である（Fig. 2, Thauer, 1998）。これはメタン生成経路の最終段階であるメチルコエンザイム M をメタン

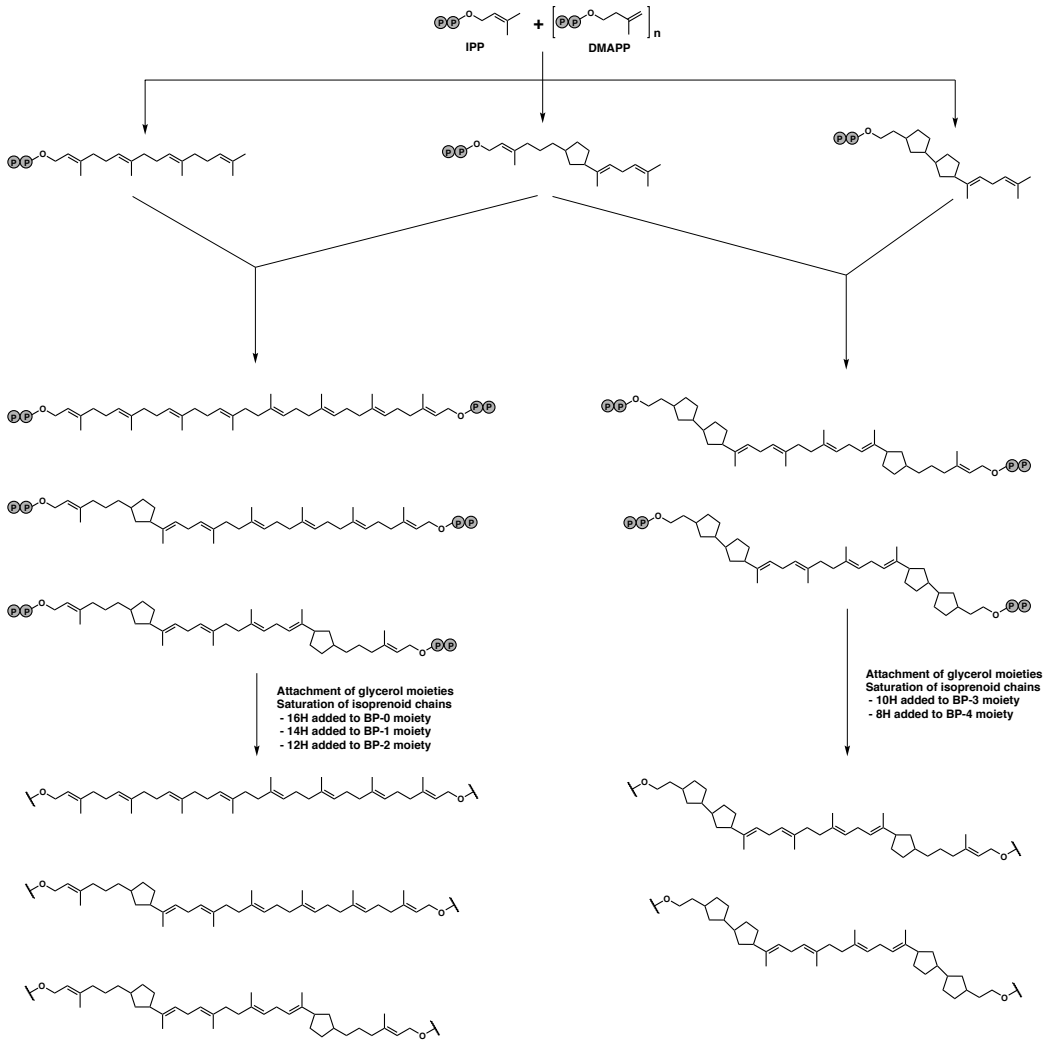

Fig. 6. Biosynthetic pathways archaeal tetraether lipids proposed by Villanueva et al. (2014).

に還元し，エネルギーを生み出す重要なステップを触媒する（Ellefson et al., 1982; Hartzell and Wolfe, 1986; Pfaltz et al., 1985）。F430 は MCR の反応サイトとして存在し，中心金属にニッケルを含むテトラピロール化合物である（Fig. 7）。つまり，全ての微生物起源メタンは補酵素 F430 によって作られているといえる。

また，海洋堆積物表層で起こっている嫌気的メタン酸化を行う嫌気的メタン酸化アーキア（ANME）はメタン生成アーキアとほぼ同じ酵素・補酵素群を用いてメタン生成の逆反応によりメタンを酸化する。ANME の単離培養は現在不可能であるが，ANME が存在する黒海の微生物マットや，堆積物中から ANME 由来と考えられる F430 やその亜種が報告されている（Krüger et al., 2003; Mayr et al., 2008; Shima et al., 2012）。つまり，F430 はメタン生成アーキアおよび ANME のバイオマーカーとして応用できる可能性がある。

このようなメタン生成反応の最終段階（あるいは嫌気的メタン酸化反応の第 1 段階）に着目したメタン生成アーキアの検出法として機能遺伝子（mcrA）の解析があるが，堆積物中の補酵素 F430 の分布を定量できれば，より直接的な手法となるはずである。

F430 は不安定な化合物であり，環境中に残らないとされている（Thauer and Bonacker, 1994）。MCR から遊離した F430 はエピマー化や脱水素反応によりクロマトグラフィックに分離可能な「分解物」に変化する（Diekert et al., 1981; Pfaltz et al., 1985）。この分解速度は速く，例えばエピマー化は 100℃では 2 時間，常温でも日スケールの速度で進行する。海底下での分解速度を今後見積もる必要があるが，上記のような分解過程に生分解作用も加わることを考えれば，地質年代を通して F430 は本来の構造のままでは堆積物中に残らないと考えられる。つまり，F430 を分析することによって，現世のメタン生成アーキアおよび ANME の分布や活動を解明することが出来る可能性がある（Kaneko et al., 2014; Takano et al., 2013）。

堆積物試料中の F430 の定量分析には，前処理時の分解や検出感度などの問題がある。特に，海底堆積物下におけるメタン生成アーキアのバイオマスや活性は極めて低いことが考えられるため，高感度な分析手法が必要である。Kaneko et al.（2014）では，低温度による抽出や，誘導体化による安定化，高速液体クロマトグラフ／トリプル四重極質量分析計による超高感度な分析法により定量分析法を確立した。本分析法では，0.1 フェムトモルでの F430 の定量分析が可能であり，従来法と比べると約 10 万倍高感度である。これにより 1000 細胞ほどのメタン生成アーキアでの検出が可能になった。

F430 分析を環境試料に応用すれば，メタン生成アーキアの水平分布や鉛直分布を明らかにする事

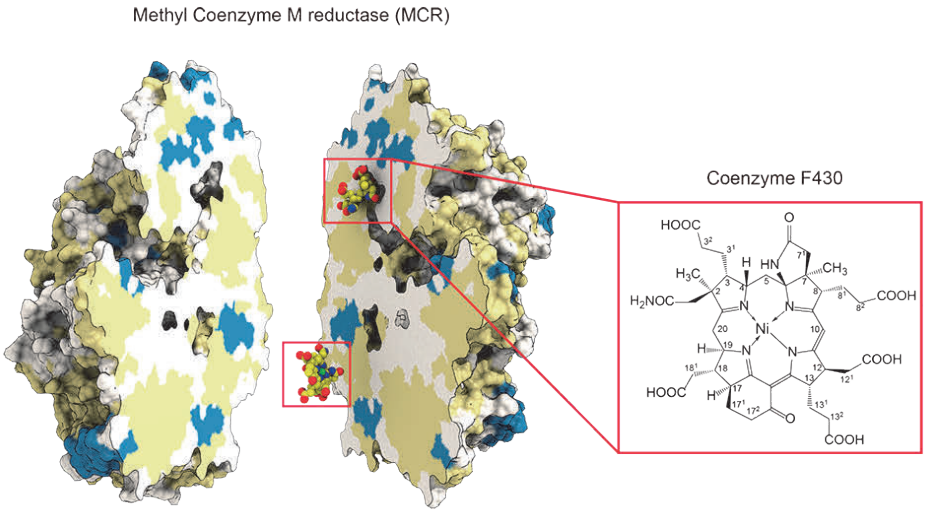

Fig. 7. A structure of coenzyme F430 in methyl-coenzyme M reductase.

ができるかもしれない。構造が近い化合物であるクロロフィルにおいては，衛星を用いた地球表層の分布から，光合成生物の分布や光合成量を見積もるのに利用されている。これらの原理を応用すれば，F430 量からメタン生成アーキアのバイオマスや活性を見積もることも可能になるだろう。また，メタン生成アーキアの分布が定量的に理解できると，重要な層準に狙いを定めて，化学分析や微生物解析を用いて重点的な解析を効率良く行うことが可能になる。メタン生成アーキアの多様性や，分布・活性をコントロールしている環境要因を一般化出来れば，地球上のメタン生成アーキアの物質循環や地下生命圏への寄与に関する理解が大きく進むと期待できる。

8. おわりに

近年の微生物学分野の技術進歩により，地下生命圏の理解は日進月歩で進んでいる。しかしながら，一説には私たちが培養可能な微生物は1%にも満たず，99%以上は性状が全く未知である。メタン生成アーキアは微生物群集を構成する 1 成分に過ぎないが，物質循環や気候変動，生命の起源を考える上で極めて重要な微生物である。また，エネルギー資源であるメタンを生み出すため，排水処理によるバイオガス生成など，産業への利用も進められている。メタン生成アーキアは，その重要性から長く研究がされてきた。Volta による「燃える気体」としてメタンが発見された 1776 年から数えれば，140 年近くの歴史がある。メタン生成アーキアは有機物があり還元的な環境であれば，どこにでも存在しうる。しかしながら，その定量的な分布や活性については基本的な問題にも関わらず未だに不明である。特に，海底下のような複雑系では利用可能な研究手法が限られるため，メタン生成アーキアのシグナルを検出することも困難である。

本稿の最後に取り上げた補酵素 F430 をメタン生成アーキアの新しいバイオマーカーとして利用する手法は，メタン生成という「機能」を定量的に捉えるのに有効なはずである。また，このような微生物に特有な代謝反応を直接駆動する化合物を定量分析するという考えは（「機能特異分子分析」と呼ぶことにする），その他の微生物研究にも応用可能である。補酵素 F430 分析をメタン生成アーキアの分布や活性の指標として用いるためには，培養実験や堆積物中での保存性など，まだ多くの検証すべき課題が残されているが，有機地球化学分野においても新規性の高いアプローチ法になるはずである。

謝　辞

この度は田口賞という実績のある賞を頂き光栄に思うとともに，本稿を執筆する機会を与えて頂き感謝いたします。本賞受賞という栄誉に預かれたのも，これまでご指導くださいました先生方やご協力して頂いた先輩や後輩方のおかげだと感謝しております。特に学部生時代から博士課程修了までご指導くださった奈良岡浩先生（九州大学）には研究に必要な多くの知識や技術，研究の楽しさを教えて頂きました。また，奈良岡研究室の先輩である大場康弘博士（北海道大学）にも多くのアドバイスを頂きました。前所属先である海洋研究開発機構の大河内直彦博士，力石嘉人博士，高野淑識博士には日頃より多くのサポートを頂いております。この場を借りて感謝申し上げます。まだ何も為し得ていませんが，今後も研究に精進し，有機地球化学の発展に少しでも貢献していきたいと思います。

引用文献

Akiba F., Inoue Y., Saito-Kato M. and Pohlman J. (2009) Data Report: Diatom and Foraminferal Assemblages in Pleistocene Turbidite Sediments from the Cascadia Margin (IODP Expedition 311) Northeast Pacific. In: Riedel M., Collett T.S., Malone M.J. and the Expedition 311 Scientists (Eds.), Proc. IODP, 311. doi:10.2204/iodp.proc.311.211.2009.

Biddle J.F., Lipp J.S., Lever M.A., Lloyd K.G., Sørensen K.B., Anderson R., Fredricks H.F., Elvert M., Kelly T.J., Schrag D.P., Sogin M.L., Brenchley J.E., Teske A., House H.C. and Hinrichs K.-U. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA **103**, 3846-3851.

Blumenberg M., Seifert R., Reitner J., Pape T. and Michaelis W. (2004) Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic mehtanotrophic consortia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11111-11116.

Borowski W.S. (2004) A review of methane and gas hydrates in the dynamic, stratified system of the Blake Ridge region, offshore southeastern North America. *Chem. Geol.* **205**, 311-346.

Conrad R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**, 193-202.

DeLong E.F., King L.L., Massana R., Citton H., Murray A., Schleper C. and Wakeham S.G. (1998) Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1133-1138.

Dickens G.R., O'Neil J.R., Rea D.K. and Owen R.M. (1995) Dissociation of oceanic methane hydrate as a cause of the carbon-isotope excursion at the end of the Paleocene. *Paleoceanography* **10**, 965-971.

Diekert G., Konheiser U., Piechulla K. and Thauer R.K. (1981) Nickel requirement and factor F_{430} content of methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **148**, 459-464.

Eguchi T., Nishimura Y. and Kakinuma K. (2003) Importance of the isopropylidene terminal of geranylgeranyl group for the formation of tetraether lipid in methanogenic archaea. *Tetrahedron Lett.* **44**, 3275-3279.

Ellefson W.L., Whitman W.B. and Wolfe R.S. (1982) Nickel-containing factor F_{430}: chromophore of the methylreductase of *Methanobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3707-3710.

Erbacher J., Mosher D.C., Malone M.J., et al. (2004) Proc. ODP, Init. Repts., 207: College Station, TX (Ocean Drilling Program). doi:10.2973/odp.proc.ir.207.2004

Fry J.C., Parkes R.J., Cragg B.A., Weightman A.J. and Webster G. (2008) Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**, 181-196.

Hartzell P.L. and Wolfe R.S. (1986) Requirement of the nickel tetrapyrrole F_{430} for *in vitro* methanogenesis: Reconstitution of methylreductase component C from its dissociated subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6726-6730.

Heuer V.B., Pohlman J.W., Torres M.E., Elvert M. and Hinrichs K.-U. (2009) The stable carbon isotope biogeochemistry of acetate and other dissolved carbon species in deep subseafloor sediments at the northern Cascadia Margin. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 3323-3336.

Hoefs M.J.L., Schouten S., de Leeuw J.W., King L.L., Wakeham S.G. and Sinninghe Damsté J.S. (1997) Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3090-3095.

Imachi H., Aoi K., Tasumi E., Saito Y., Yamanaka Y., Saito Y., Yamaguchi T., Tomaru H., Takeuchi R., Morono Y., Inagaki F. and Takai K. (2011) Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *ISME J.* **5**, 1913-1925.

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. *Chem. Geol.* **343**, 76-84.

Kaneko M., Shingai H., Pohlman J.W. and Naraoka H. (2010) Chemical and isotopic signature of bulk organic matter and hydrocarbon biomarkers within mid-slope accretionary sediments of the northern Cascadia margin gas hydrate system. *Mar. Geol.* **275**, 166-177.

Kaneko M., Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Asakawa S., Watanabe T., Shima S., Krüger 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. *Anal. Chem.* **86**, 3633-3638.

Kendall M.M. and Boone D.R. (2006) Cultivation of methanogens from shallow marine sediments at Hydrate Ridge, Oregon. *Archaea* **2**, 31-38.

Koga Y. and Morii H. (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 97-120.

Kohnen M.E.L., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., de Leeuw J.W., Merritt D.A. and Hayes J.M. (1992) Recognition of paleobiochemicals by a combined molecular sulfur and isotope geochemical approach. *Science* **256**, 358-362.

Krüger M., Meyerdierks A., Glöckner F.O., Amann R., Widdel F., Kube M., Reinhardt R., Kahnt J., Böcher R. Thauer R.K. and Shima S. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**, 878-881.

Lengger S.K., Hopmans E.C., Sinninghe Damsté J.S. and Schouten S. (2014a) Fossilization and degradation of archaeal intact polar tetraether lipids in deeply buried marine sediments (Peru Margin). *Geobiology* **12**, 212-220.

Lengger S.K., Lipsewers Y.A., de Haas H., Sinninghe Damsté J.S. and Schouten S. (2014b) Lack of ^{13}C label incorporation suggests low turnover rates of thaumarchaeal intact polar tetraether lipids in sediments from the Iceland shelf. *Biogeosciences* **11**, 201-216.

Lipp J.S., Liu X.L. and Hinrichs K.-U. (2009) Structural diversity and fate of intact polar lipids in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, A771-A771.

Lipp J.S., Morono Y., Inagaki F. and Hinrichs K.-U. (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* **454**, 991-994.

Londry K.L., Dawson K.G., Grover H.D., Summons R.E. and Bradley A.S. (2008) Stable carbon isotope fractionation between substrates and products of Methanosarcina barkeri. *Org. Geochem.* **39**, 608-621.

Mayr S., Latkoczy C., Krüger M., Günther D., Shima S., Thauer R.K., Widdel F. and Jaun B. (2008) Structure of an F430 variant from archaea associated with anaerobic oxidation of methane. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10758-10767.

Mikucki J.A., Liu Y., Delwiche M., Colwell F.S., Boone D.R. (2003) Isolation of a methanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates, and description of *Methanoculleus submarinus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3311-3316.

Milkov A.V. (2005) Molecular and stable isotope compositions of natural gas hydrates. *Org. Geochem.* **36**, 681-702.

Milkov A.V. (2004) Global estimates of hydrate-bound gas in marine sediments: how much is really out there? Earth-Sci. Rev. 66, 183-197..

Milkov A.V. and Sassen R. (2002) Economic geology of offshore gas hydrate accumulations and province. *Mar. Pet. Geol.* **19**, 1-11.

Naraoka H., Uehara T., Hanada S. and Kakegawa T. (2010) δ^{13}C-δD distribution of lipid biomarkers in a bacterial mat from a hot spring in Miyagi Prefecture, NE Japan. *Org. Geochem.* **41**, 398-403.

Pancost R.D. and Sinninghe Damsté J.S. (2003) Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings. *Chem. Geol.* **195**, 29-58.

Parkes R.J., Webster G., Cragg B.A., Weightman A.J., Newberry C.J., Ferdelman T.G., Kallmeyer J., Jørgensen B.B., Aiello I.W. and Fry J.C. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature* **436**, 390-394.

Parkes R.J., Cragg B.A. and Wellsbury P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hyd. J.* **8**, 11-28.

Parkes R.J., Cragg B.A., Bale S.J., Getliff J.M., Goodman K., Rochelle P.A., Fry J.C., Weightman A.J. and Harvey S.M. (1994) Deep bacterial biosphere in Pacific ocean sediments. *Nature* **371**, 410-413.

Parkes R.J., Wellsbury P., Mather I.D., Cobb S.J., Cragg B.A., Hornibrook E.R.C. and Horsfield B. (2007) Temperature activation of organic matter and minerals during burial has the potential to sustain the deep biosphere over geological timescales. *Org. Geochem.* **38**, 845-852.

Pfaltz A., Livingston D.A., Jaun B., Diekert G., Thauer R.K. and Eschenmoser A. (1985) Factor F430 from methanogenic bacteria: on the nature of the isolation artifacts of F430, a contribution to the chemistry of F430 and the conformational stereochemistry of the ligand periphery of hydroporphinoid nickel(II) complexes. *Helv. Chim. Acta* **68**, 1338-1358.

Pohlman J.W., Kaneko M., Heuer V.B., Coffin R.B. and Whiticar M. (2009) Methane sources and production in the northern Cascadia margin gas hydrate system. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **287**, 504-512.

Riedel M., Collett T.S., Malone M.J. and the Expedition 311 Scientiststs (2006) Proc. IODP, V. 311 Expedition Reports, Cascadia Margin Gas Hydrate. *Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc., for the Integrated Ocean Drilling Program*.

Schouten S., Middelburg J.J., Hopmans E.C. and Sinninghe Damsté J.S. (2010) Fossilization and degradation of intact polar lipids in deep subsurface sediments: A theoretical approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* **74**, 3806-3814.

Schouten S., Hoefs M,J.L., Koopmans M.P., Bosch H.-J. and Sinninghe Damsté J.S. (1998) Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Org. Geochem*. **29**, 1305-1319.

Shima S., Krueger M., Weinert T., Demmer U., Kahnt J., Thauer R.K. and Ermler U. (2012) Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **481**, 98-101.

Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T. and Horikoshi K. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH_4 production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **105**, 10949-10954.

Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Nomaki H., Morono Y., Inagaki F., Kitazato H., Hinrichs K.-U. and Ohkouchi N. (2010) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geoscience* **3**, 858-861.

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. *Org. Geochem.* **58**, 137-140.

Thauer R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology-Sgm* **144**, 2377-2406.

Thauer R.K. and Bonacker L.G. (1994) Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoid involved in methanogenesis. In the Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigment, pp. 210-227. Chadwick D.J. and Ackrill K (eds.) Ciba Foundation Symposium 180. Chichester, Wiley.

Thauer R.K., Kaster A.-K., Seedorf H., Buckel W. and Hedderich R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 579-591.

Valentine D.L. (2011) Emerging topics in marine methane biogeochemistry. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **3**, 147-171.

von Klein D., Arab H., Völker H. and Thomm M. (2002) *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles* **6**, 103-110.

Villanueva L., Sinninghe Damsté, J.S. and Schouten S. (2014) A re-evaluation of the archaeal membrane lipid biosynthetic pathway. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 438-448.

White D.C., Davis W.M., Nickels J.S., King J.D. and Bobbie R.J. (1979) Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**, 51-62.

Whiticar M.J. (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.* **161**, 291-314.

Whiticar M.J., Faber E. and Schoell M. (1986) Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO_2 reduction *vs*. acetate fermentation—Isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 693-708.

Whitman W.B., Coleman D.C. and Wiebe W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6578-6583.

Woese C.R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**, 221-271.

Yoshioka H., Maruyama A., Nakamura T., Higashi Y., Fuse H., Sakata S. and Bartlett D.H. (2010) Activities and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments

from the Cascadia Margin. *Geobiology* **8**, 223-233.

Zachos J.C., Röhl U., Schellenberg S.A., Sluijs A., Hodell D.A., Kelly D.C., Thomas E., Nicolo M., Raffi I., Lourens L.J., McCarren H. and Kroon D. (2005) Rapid acidification of the ocean during the Paleocene-Eocene thermal maximum. *Science* **308**, 1611-1615.

Zhang X., Gillespie A.L. and Sessions A.L. (2009) Large D/H variations in bacterial lipids reflect central metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12580-12586.

経済産業省（2014）“第 2 部 エネルギー動向”．エネルギー白書 2014，平成 25 年度エネルギーに関する年次報告．p. 139-223. http://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2014pdf/