

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

荻原 成 騎* 石 崎 理* 松 本 良*

Organic Geochemical Analysis of Push Core Sediment Samples Collected from NT-06-19 (Umitaka Spur and Joetsu Knoll off Naoetsu)

Shigenori OGIHARA*, Osamu ISHIZAKI* and Ryo MATSUMOTO*

Abstract

The Umitaka spur and the Joetsu knoll in the eastern margin of the Japan Sea off Naoetsu are characterized by a high methane flux accompanied by the formation of methane hydrates. Several sediment cores were obtained from this region during the “Natsushima” NT-06-19 cruise. Various geochemistry analyses were carried out on these samples. ANME-1 and ANME-2 groups of archaea were distinguished by biomarkers. ANME-1 was found from the sediment sample covered by a bacterial mat with the maximum concentration of dissolved methane in pore water. The samples in which ANME was detected are characterized by a remarkably high sulphur content.

Key words : Anaerobic oxidation of methane, Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea, biomarker, methane seep, Umitaka spur, Joetsu knoll

キーワード : 嫌気的メタン酸化, 嫌気的メタン酸化古細菌, バイオマーカー, メタン湧出, 海鷹海脚, 上越海丘

I. はじめに

海底下で生成されるメタンは、微生物による嫌気的メタン酸化反応 (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)。嫌気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、ANME-1, 2, 3 の 3 つの系統群が知られている。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 (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生物である。ANME は、還元的な堆積物中において、他の嫌気性菌の発酵生産物、すなわち二酸化炭素、水素、蟻酸、および酢酸をメタンに変換しているメタン生成菌のグループに属する。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。

ここで、メタン湧出が生じている嫌気的堆積物

* 東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻

* Department of Earth and Planetary Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo

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)。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關係も、SRB と ANME-2 の共生關係の証拠となっている。ここで ANME-2 が行うメタン酸化は、メタン生成とは逆の反応であり、“reverse reaction” または “back reaction” と呼ばれる。

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)。また、メタン酸化効率は ANME-1 に比べ ANME-2 が著しく高い (Nauhaus *et al.*, 2002, 2004)。

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 の解析が行われてきた。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)。これに対して、我が国の沿海では竜洋海底谷から ANME-1 マーカーが記載された (荻原・芦, 2004)。

本研究では、間隙水中の溶存メタン量と炭素同位体組成、堆積物中の有機炭素量と全硫黄量、AOM を行っている微生物を特徴づけるバイオマーカーの組み合わせ、さらに個別炭素同位体組成を分析することによって、それぞれの関係を明らかにし、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。

II. 試料

日本海直江津沖海鷹海脚および上越海丘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を行った。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 (push core) 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。研究に用いた試料は、第 598 潜航 (海鷹海脚中部) PC1, 2, 4 ~ 8, 第 600 潜航 (海鷹海脚北部) PC1 ~ 4, 第 601 潜航 (上越海丘中央部) PC1, 2, 4 ~ 6 の合計 16 の表層堆積物柱状コア試料である。海鷹海脚および上越海においての海底から噴出するガスバブルは、第 598 潜航 PC2 および第 601 潜航 PC6 採取点において 2004 年の本海域における調査開始以来、はじめて視認された。また、第 600 潜航 PC3 は、海底がバクテリアマットに被覆された地点の試料である。試料採取地点の水温は 0.2 ~ 0.3℃であった。図 1 に各試料の採取位置と潜水艇からの観察事項を示す。

III. 分析手法

1) 間隙水中のメタン

30 ml バイアルに堆積物サンプル 3.0 ml を入れ、塩化水銀で殺菌後、ミリ Q 水を充填する。窒素ガスを用いてヘッドスペース 3.0 ml 作成し、20 分間振とうする。ヘッドスペースから 0.1 ~ 1.0 ml ガスタイトシリンジでガスを取り出し、ガスクロマトグラフ (GC) およびガスクロマトグラフ燃焼質量分析計 (GC/C/MS) で分析を行った。用いた GC は島津製作所社製 GC-14B であり、これを用いて分離したメタンを Thermo Finnigan 社製 Combustion device を用いて酸化し、ThermoFinnigan 社製 Delta-plus にて質量分析を行った。

2) 有機炭素量、硫黄量およびバイオマーカー分析

冷凍保存して実験室に持ち帰った試料は、凍結乾燥器を用いて乾燥した。これを乳鉢にて細粒に

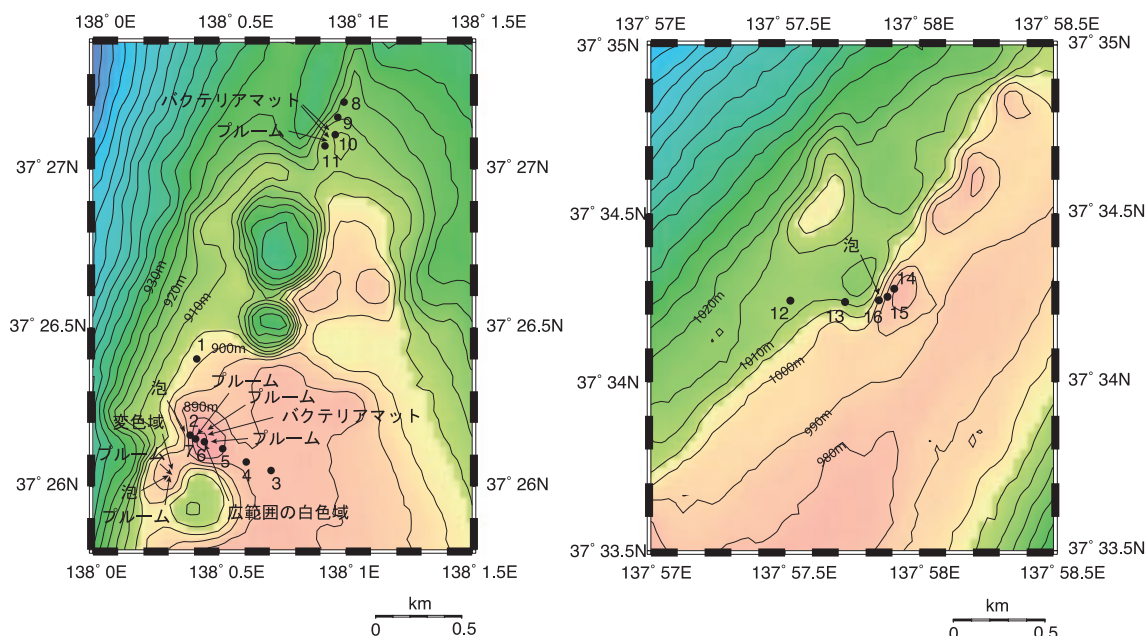


図 1 海鷹海脚（左）および上越海丘（右）における試料採取地点. 数字は表 1 中の試料番号を示す.

Fig. 1 Location map showing sampling points. Umitaka spur (left) and Joetsu knoll (right). Numbers refer to sample numbers in Table 1.

し、以下の分析に用いた。ここでマイクロ
ジュールが試料に含まれる場合には、ピンセット
を用いて取り除いた。1 M 塩酸によって脱炭酸塩
処理した粉末試料は、LECO 社製元素分析計
CNS-2000 によって、有機炭素量と硫黄量を分析
した。バイオマーカー分析は、以下の手順で行っ
た。粉末試料約 5 g を 50 ml テフロン製遠沈管に
ジクロロメタン/メタノール (93:7/v:v) 40 ml
とともに投入し、60 分間超音波抽出を行った。
抽出操作は 3 回繰り返した。抽出溶媒はロータ
リーエバポレーターによって濃縮し、シリカゲル
カラムクロマトグラフィーによって炭化水素画分
を分取した。分析に用いたガスクロマトグラフ質
量分析計 (GC/MS) は ThermoQuest 社製 Voy-
ager であり、インジェクターはオンカラム、使
用カラムは HP-5ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m,
膜厚 0.25 μ m) である。分析条件は 40℃ で 1 分
保持し、3℃ / 分で 300℃ 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 50-520), 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 Del-
ta-plus にて質量分析を行った。

IV. 分析結果

分析結果のまとめを表 1 に示す。ガスバブル
の湧出およびバクテリアマットが観察された地点
は特記した。有機炭素量は 1.17 ~ 2.13%, 硫黄
量は 0.13 ~ 1.42%, orgC/S 比は 0.98 ~ 11.2 で
あった。有機炭素量は最大と最小で約 2 倍, 全
硫黄量については約 11 倍の差が認められる。こ
れに対して、間隙水溶存メタン濃度は 0 ~ 1430
 μ mol/L であった。ガスバブル湧出が視認され
た地点で高濃度 (151 および 840 μ mol/L) であり,
バクテリアマットで被覆された堆積物で最大値
(1430 μ mol/L) を示した。これら以外の試料は

表 1 NT-06 試料の有機地球化学分析のまとめ.

Table 1 Summary of organic geochemical analysis of NT-06 samples.

No.	Sample Name	Depth(m)	Crocetane	PMI	org C	total S	C/S ratio	CH ₄	$\delta^{13}\text{C}$ (PMI)	$\delta^{13}\text{C}$ (CH ₄)	ANME-1	ANME-2	Core description
1	#598-PC01	904	—	—	1.47	0.13	11	0.5					Brown silt
2	#598-PC02-bubble	884	107	67	1.40	1.42	0.98	151		-41.4		○	Black silt
3	#598-PC04	894	—	—	1.60	0.17	9.2	0.99					Olive silt
4	#598-PC05	893	—	—	1.68	0.18	9.1	0.43					Olive silt
5	#598-PC06	891	—	—	1.57	0.15	11	0.62					Dark olive silt
6	#598-PC07	887	66	42	1.48	1.11	1.34	n.d.				○	Brownly black silt
7	#598-PC08	882	—	—	1.50	0.22	6.7	0.31					Brown silt
8	#600-PC01	921	—	—	1.72	0.16	11	0.69					Brown - dark olive clay
9	#600-PC02	918	109	411	1.36	1.08	1.26	1.1	-93.8			○	Dark olive -black clay
10	#600-PC03-mat	912	—	8780	1.95	1.12	1.74	1430	-114	-71.9	+		Black clay
11	#600-PC04	913	—	—	1.54	0.44	3.5	n.d.					Black clay
12	#601-PC01	1006	—	—	1.72	0.16	11	0.02					Black clay
13	#601-PC02	1003	—	—	1.79	0.16	11.2	0.8					Olive clay
14	#601-PC04	983	—	—	1.68	0.20	8.4	2.6					Brown - dark olive clay
15	#601-PC05	987	50	41	1.17	1.17	1.0	2.4				○	Dark olive - black clay
16	#601-PC06-bubble	990	73	249	2.13	0.89	2.4	840	-85.4	-61.2		○	Black clay

bubble: The point of the gas bubble arising from sea-floor observed.

mat: The point of bacterial mat observed.

Crocetane and PMI (ng/g-dry sediment), org C & total S (wt% after HCl tr.) Crocetane including phytane.

CH₄ ($\mu\text{mol/L}$), $\delta^{13}\text{C}$ (PMI) and $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄) (‰)

ANME-1; + indicate detection of ANME-1 marker

ANME-2; ○ indicate detection of ANME-2 marker

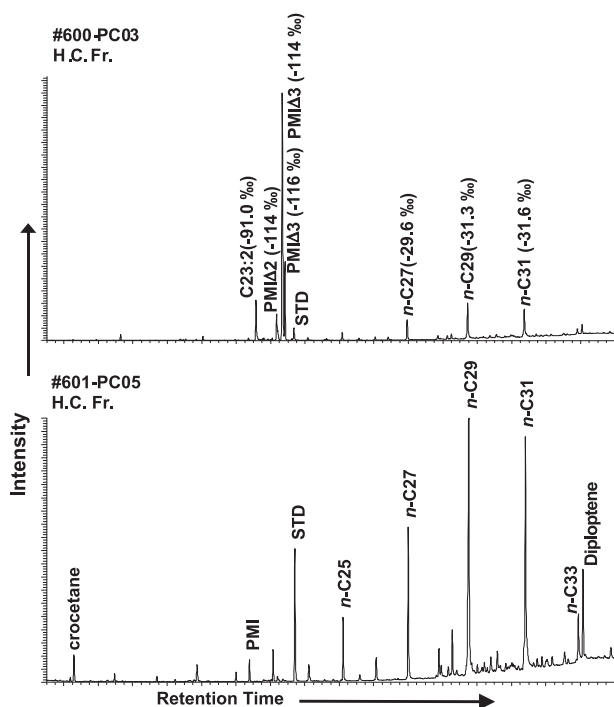


図2 #600-PC03と#601-PC05の炭化水素画分のトータルイオンクロマトグラム。

Fig. 2 Total ion chromatograms of hydrocarbon fraction isolated from #600-PC03 and #601-PC05.

0～2.6 $\mu\text{mol/L}$ であり、著しい差異が認められる。溶存メタンの炭素同位体組成は高濃度の3試料で分析に必要な濃度が得られ、分析の結果 $-71.9 \sim -41.4\text{‰}$ であった。ここでの差は約30‰である。

バイオマーカー分析の結果、16試料中5試料からクロセタン（2,6,11,15-テトラメチルヘキサデカン：I構造は付録1参照）が検出され、6試料からPMI（2,6,10,15,19-ペンタメチルイコサン：II）が定量された。クロセタンは同様にC₂₀イソプレノイド炭化水素であるフィタン（VII）と湧出時間がほぼ等しいためクロセタンの定性、定量には注意が必要である。本研究で用いたクロセタン存在の認定法は、フィタンのマススペクトルが $m/z169 < m/z183$ であるのに対し、クロセタンは $m/z169 > m/z183$ である性質を利用し、混合物ピークが $m/z169 > m/z183$ である場合にクロセタンを認定した。表1に示したクロセタン量はフィタンを含む値であり、50から109（ng/g-dry sediment）であった。これに対し

て、PMIは10試料が未検出、検出された6試料においては、41から8780（ng/g-dry sediment）と試料ごとの濃度変化が著しかった。また、PMIの個別炭素同位体組成は、高濃度の3試料について分析に必要な濃度が得られ、分析の結果 -116‰ から -85.4‰ と最小と最大で約30‰の差が認められた。

図2に第600潜航PC03と第601潜航PC05の炭化水素画分のトータルイオンクロマトグラムを示す。第600潜航PC03（図2上図）は、多量の2および3不飽和PMIで特徴づけられる。これらの個別炭素同位体組成は -116‰ から -114‰ と著しく低い値を示した。このように同一試料中の不飽和PMI異性体の炭素同位体組成差は2‰と非常に小さい。この試料からクロセタンは検出されなかった。また、 $n\text{-C}_{23:2}$ が検出され炭素同位体組成は -91.0‰ であった。 $n\text{-C}_{23}$ 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（検出例, Thiel *et al.*, 2001）。第601潜航PC05（図2

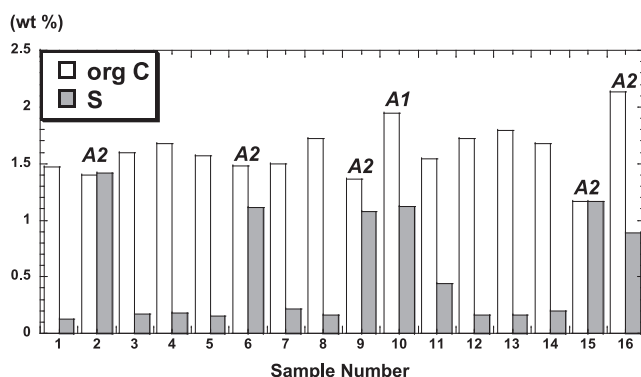


図 3 有機炭素量と硫黄量および ANME-1 (A1), ANME-2 (A2) の分布。

Fig. 3 Total organic carbon and sulphur contents and distribution of ANME-1 (A1) and ANME-2 (A2).

下図) では, n -アルカンと比較して少量の PMI とクロセタンが検出された。それぞれの不飽和は含まれない。また, この試料は PMI と比べ約 3 倍のジプロプテンを伴うことが特徴である。図 2 で示した 2 試料を含め, すべての試料から陸上高等植物起源である奇数炭素優位性を持つ n -C₂₇ ~ n -C₃₃ アルカンが検出された。 n -C₂₇ ~ n -C₃₃ アルカンは, この地域の堆積物中のバックグラウンドとして含まれていると考えられる。

V. 考 察

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することが可能である。表 1 にそれぞれを特徴づ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 PMI のみが検出されるのに対して, ANME-2 は PMI がクロセタンと等量から数倍の量比で検出され, しばしば不飽和 PMI 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づけられ, ANME-2 からはアーケオールのみが検出される。エーテル結合性脂質においては, 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) によって特徴づけられる。このような性質を利用して, ANME の分類が可能である (Blu-

menberg *et al.*, 2004)。

本研究では, 炭化水素を中心に分析を行った結果, PMI がクロセタンの等量から数倍量分布する試料について ANME-2, PMI とその不飽和が卓越しクロセタンを欠く試料について ANME-1 の生息を認定した。第 600 潜航 PC03 から ANME-1 が, 第 598 潜航 PC02, 07, 第 600 潜航 PC02, 第 601 潜航 PC05, 06 から ANME-2 を認定した。すなわち, 間隙水中の溶存メタン濃度が最大であるバクテリアマットで被覆された堆積物から ANME-1 が検出された。溶存メタン濃度が高いガスバブル湧出地点および相対的に溶存メタン濃度が低い地点からは ANME-2 が認定された。ANME-2 の棲息は, 幅広い溶存メタン濃度を持つ堆積物中から確認された。このような ANME 分布の系統的な違いは, 生息環境の差異に起因する可能性がある。ANME-2 を確認した深度は 884 ~ 990m, ANME-1 は 912 m であり, 生息深度に差はなく, 水温は 0.2 ~ 0.3℃ではほぼ一定である。pH および溶存酸素濃度の測定を行っていないため, pH および酸素への耐性についての情報は得られない。これに対して, 溶存メタン濃度の試料ごとの差は大きく, ANME-1 が検出された第 600 潜航 PC03 は突出して高い。この地域では, メタンフラックスが ANME 分布を支配している可能性が大きい。

図 3 に各試料の有機炭素量, 硫黄量と生息す

る ANME の分布を示した。ANME が検出された試料の硫黄量は高く (0.89 ~ 1.42 wt%), 検出されなかった試料の硫黄量は低い (0.13 ~ 0.44 wt%)。AOM におけるメタンを酸化する ANME と水素を受け取る硫酸還元菌が共生して行うネットの反応は以下のように示される。



ここで生産される硫化物イオン (HS^-) が間隙水中の鉄イオンと反応して硫化鉄を形成し、これによって硫黄が堆積物中に固定される。本研究では、バイオマーカーから認定した ANME が活動する地点において、高濃度の硫黄濃度が検出された。このことから、硫黄量は、現世の海洋底における AOM の簡便指標として用いることができる可能性がある。

VI. まとめ

日本海直江津沖海鰐海脚および上越海丘におけるメタン湧出海域において“なつしま” NT-06-19 航海にて採取した堆積物柱状試料について、種々の地球化学分析を行った。バイオマーカー分析によって検出された ANME-1 群集はバクテリアマットに被覆された間隙水中の溶存メタン濃度が最大の試料から検出された。これに対して ANME-2 群集は、溶存メタン濃度が高いメタン湧出視認地点、および溶存メタン濃度が相対的に低い地点から検出された。ANME が検出された試料は、著しく高い硫黄量で特徴づけられる。

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.

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 and Environmental Microbiology*, **72**, 6257-6270.

Iversen, N. and Jorgensen, B.B. (1985): Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate methane transition in marine sediments from Kattegat and

Skagerrak (Denmark). *Limnology Oceanography*, **30**, 944-955.

Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R. and Amann, R. (2005): Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 467-479.

Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, 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.

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 Kruer, M. (2004): Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: A comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental Microbiology*, **7**, 98-106.

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.

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.

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 of America Bulletin*, **98**, 147-156.

Thiel, V., Peckmann, J., Richnow, H.H., Luth, U., Reiter, J. and Michaelis, W. (2001): Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonate and microbial mat. *Marine Chemistry*, **73**, 97-112.

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.

(2008 年 11 月 20 日受付, 2009 年 2 月 5 日受理)

付録 1 本文中で用いた構造.
Appendix 1 Structures cited in the text.

