

## 補酵素 F430 を経由するメタン生成とメタン酸化の 2 核種炭素同位体フィンガープリント法の展開：地球深部での炭素循環

高野 淑識\*<sup>1</sup>  
Takano Yoshinori

浦井 暖史\*<sup>1</sup>  
Urai Atsushi

金子 雅紀\*<sup>1,2</sup>  
Kaneko Masanori

大河内直彦\*<sup>1</sup>  
Ohkouchi Naohiko

### 1. はじめに ～「アーキア」と「カーボン」の指紋追跡

カール・ウーズの提唱に始まる第 3 の生物界「アーキア (Archaea)」(和称：古細菌) の発見は、20 世紀の科学界を代表する出来事と言われている<sup>1, 2)</sup>。約 40 年以上にわたり、先駆者たちによって、アーキアの生化学、生理学、そして多様な生態学的特徴が明らかにされてきた<sup>3)</sup>。アーキアの多様性は、当初の 2 つの門 (クレンアーキオータ門, ユーリアーキオータ門) から、今や約 30 の門 (phyla) に拡大し、その数 (species) は 2 万種を超える。アーキアは、進化系統的にも多様な微生物群であることが認識され、地球上のほぼすべての環境に存在し、バクテリア (真正細菌) やユーカリア (真核生物) と共存している<sup>4, 5)</sup>。アーキアは、培養された種類も少なく、その知見はまさに日進月歩の様相である<sup>6, 7)</sup>。本稿では、酸素の無い世界で汎世界的にアーキアが駆動する炭素循環のうち、最も代表的なメタン生成とメタン酸化<sup>8, 9)</sup> に注目する。補酵素 F430 を経由する炭素の動態及びプロセス固有の情報を解読するために、安定炭素 (SI: Stable Isotopes) と放射性炭素 (RI: Radio Isotopes) からなる多次元同位体フィンガープリント法の展開について紹介する。

### 2. アーキアによるメタン生成～メタンを終点にする有機反応

メタン生成アーキアは、陸地と海洋を含む全球的なメタン生成に大きく貢献している<sup>9)</sup>。アーキアに

よるメタン生成は、補酵素 F430 (以下、F430: 図 1) が介在する重要な反応ステップになる<sup>10)</sup>。環境中あるいは試料中に含まれる F430 の濃度を正確に評価することにより、メタン生成のポテンシャルを数値化することができる<sup>11-14)</sup>。F430 は、物理化学要因による失活や生化学的なエイジングに伴い、異性化 (エピマー化) が起きる。近年、海底下深部試料及び室内モデル実験に基づいて、異性化のメカニズムと反応速度論の詳細が、数式化されている<sup>14)</sup>。

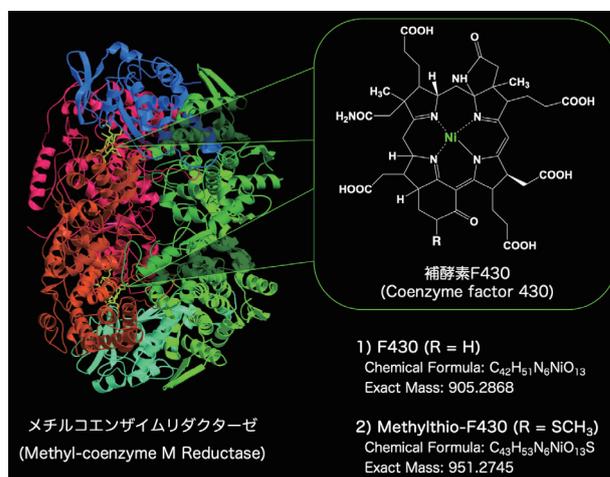


図 1 アーキアによる微生物学的メタン生成反応の活性中心 (2つのホストスペース) を有するメチルコエンザイムリダクターゼ (メチル補酵素 M 還元酵素, MCR: Methyl-coenzyme M reductase)

立体構造及び微生物学的メタン生成の最終酵素である補酵素 F430 (Coenzyme Factor 430) とメタン酸化反応を触媒する補酵素メチルチオ-F430 の化学構造と組成式を示す。MCR は、原典 (10, 27) を一部引用。エピマー化に関する反応速度論 (F430, 13-epi-F430, 12,13-diepi-F430) は、文献 (14) を参照

さて、炭素循環の起点になる二酸化炭素の化学式は、CO<sub>2</sub>であるから、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>という安定 (SI) 及び放射性炭素同位体 (RI) が存在する。同様に、メタンは、CH<sub>4</sub>であるから、<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>、<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>、<sup>14</sup>CH<sub>4</sub>が存在する。したがって、<sup>12</sup>C-<sup>13</sup>C の1次元の関係性に加え、<sup>12</sup>C-<sup>14</sup>C の2次元目を合わせた2核種炭素の規格化が可能になる。

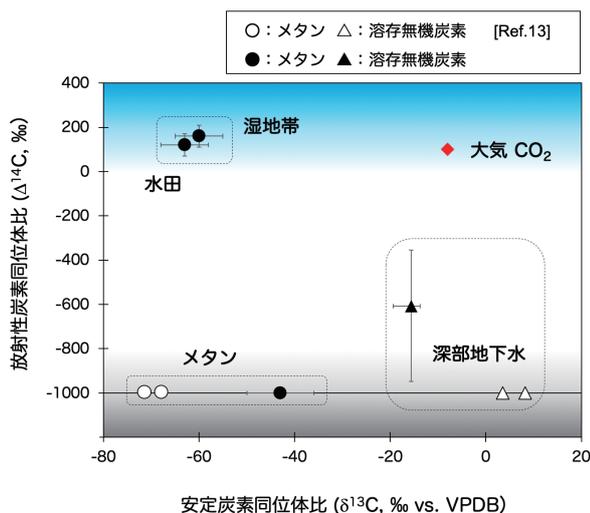
ここで、千分偏差のデルタ表記 (‰) を用いて、

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{sample}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000 \quad [1]$$

$$\Delta^{14}\text{C} (\text{‰}) = (\text{e}^{-\lambda t} - 1) \times 1000, \lambda = 1/8267, t = \text{yr BP} \quad [2]$$

を定義する (yr BP は、1950年を起点とした年数)<sup>13)</sup>。

代表例として、房総半島地下深部の帯水層から採取したメタン<sup>13)</sup> について、安定炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) と放射性炭素同位体比 ( $\Delta^{14}\text{C}$ , ‰) の2次元プロットを **図2** に示す。微生物起源を示す  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  のプロファイルと共に、大気由来の炭素では無い、放射性炭素同位体が見えてきている ( $\Delta^{14}\text{C}_{\text{CH}_4}$ )。この高精度な2次元プロット情報、メタン生成アーキアに特有な補酵素 F430 の分子情報、16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子による系統解析の情報の3点を同時に照合<sup>13)</sup> すると、地下深部では現在進行形でメタン生成が起きているこ



**図2** 房総半島の深部帯水層から採取されたメタン及び無機態炭素の安定炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) と放射性炭素同位体比 ( $\Delta^{14}\text{C}$ ) の2次元プロット

$\Delta^{14}\text{C}$  の最小値は、-1,000‰である。原典<sup>13)</sup> に基づいて作成。●と▲は、既報データ<sup>13)</sup> のコンパイルとして示した

と、そして、地表の大気や天水由来の炭素供給がほぼ無い、独立した地下生命圏を形成していることが明らかになった。補酵素 F430 のエピマー化がほとんど起きておらず、補酵素の高い活性が示された点も興味深い。メタン分子レベルの評価には、前処理や精製法の最適化<sup>15)</sup>、微量モードでの加速器質量分析法<sup>16)</sup> との相乗的なアプローチが重要になる。

### 3. アーキアによるメタン酸化 ～メタンを起点にする有機反応

地下深部等で生成したメタンは、一部は、ガスの安定領域に留まり、一部は、やがて水圏や大気圏に拡散する<sup>9)</sup>。ところが、なぜか大気中へのメタン放出量は、その収支と釣り合っていないことが、科学者らにとって長年の謎であった。1970年代後半、メタンが大気中に拡散する前に、海底下のどこかで、その大部分が消費・分解されているからではないか、と報告された<sup>17)</sup>。メタンが、硫酸等の酸化剤と生化学的に反応すると、消費・分解が進むという訳である。その酸化還元反応を化学式で表すと、



ウーズの提唱(アーキアによるメタン生成を含む)と W. リーバーの提唱(アーキアによるメタン酸化を含む:ただし、当時はアーキアの正体がよく見えず、現象記載に留まった)のタイミングが、1970年代後半のほぼ同時期であることが、興味深い。その後、2000年代に嫌氣的メタン酸化アーキア (ANME: ANaerobic MEthanotroph archaea) と呼ばれる無酸素下でしか棲息できない始原的なアーキアの役割が、少しずつ可視化されてきた。硝酸も酸化剤の1つであるから、近年、嫌気下での以下の酸化還元反応も議論されている。



ここで、炭素同位体的に軽い (= <sup>13</sup>C と <sup>14</sup>C に枯渇した) 微生物起源メタンが、メチルチオール F430<sup>10, 12)</sup> を経由して、嫌氣的なメタン酸化アーキアに取り込まれた後を追跡してみる。

東ヨーロッパにある黒海 (Black Sea) の深海底は、

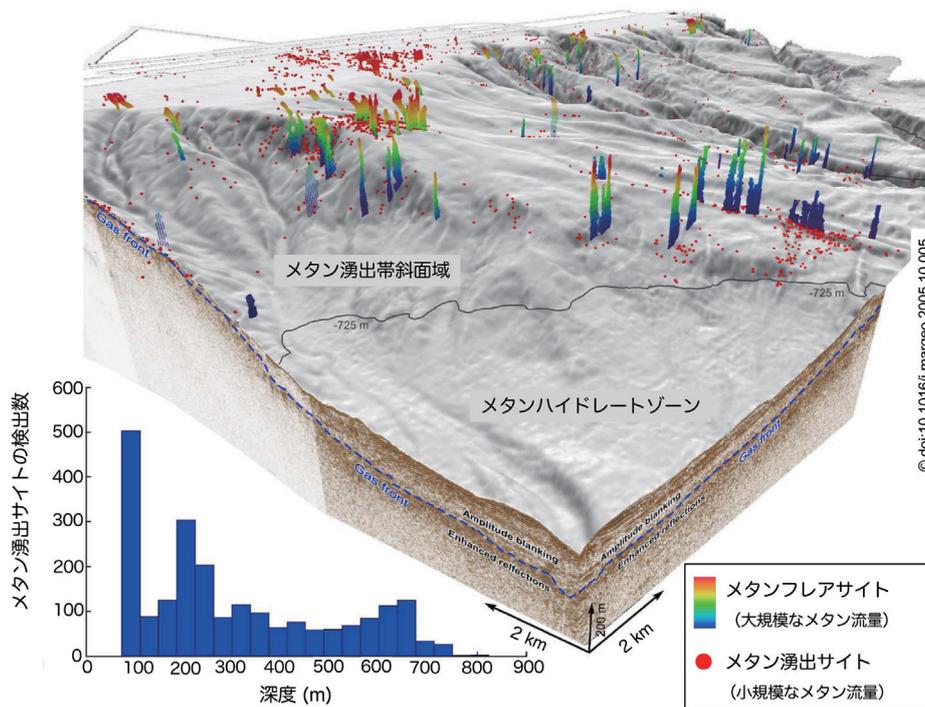


図3 黒海 (Black Sea) の深海底 (44° 46.4'N, 31° 59.5'E) に柱状に湧出するメタンフレア (=流量の大きいメタン湧水) の様子

原典 28) に基づいて作成。無酸素環境で棲息する嫌気的メタン酸化アーキア (ANME) のオアシス (=高密度なホットスポット) は、この海底下に広がるチムニーマウンド内部に存在している 18, 19, 28)。メタン酸化反応を触媒する補酵素メチルチオ-F430 の詳しい解析は、既報 12) を参照。炭酸塩チムニーからメタンを噴き上げる動画キャプチャは、文献 19) から参照できる

地球上で最もさかんに嫌気的メタン酸化が起きている場所である<sup>18, 19)</sup>。これは、黒海の深部地下圏の地質学的セッティング及び半閉鎖的な環境要因が、強く影響している。図3に示した調査地点の近傍だけで、メタン湧水サイトは、約2,700箇所を超える。室内実験系で最も難培養性のアーキアとして知られるANMEの超高密度 (~10<sup>10</sup> cell cm<sup>-3</sup>) かつ高純度 (>98%) な試料にアクセスできる唯一の場所と言っても過言ではない。

そのANME-1及びANME-2試料を解析し、16S rRNA遺伝子による系統解析の裏付けと共に、安定炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{ANME}}$ ) と放射性炭素同位体比 ( $\Delta^{14}\text{C}_{\text{ANME}}$ ) の2次元プロットを図4に示した<sup>19)</sup>。ANMEは、大気中の炭素源 (二酸化炭素) に依存する光合成系とは完全に独立して、海底下のメタンに依存した独自の生態系であった。更に、図5に示すように、アミノ酸分子レベルで安定炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{ANME}}$ ) を見てみると、メチレン基の炭素鎖 (-<sup>12</sup>CH<sub>2</sub>-) の伸長に伴い、アミノ酸分子内 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{Amino acids}}$ ) では、更に<sup>12</sup>C-炭素が濃集しながら、

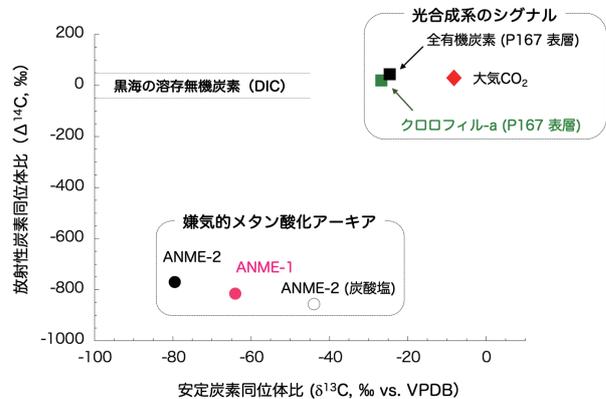


図4 黒海の嫌気的メタン酸化アーキアと光合成系のシグナルによる安定炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{ANME}}$ ) と放射性炭素同位体比 ( $\Delta^{14}\text{C}_{\text{ANME}}$ ) の2次元プロット

ANMEは、光合成系 (近似地点の海底表層における全有機炭素量と最も代表的な光合成色素クロロフィル-aで規格化:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Chlorophyll-a}}$  及び  $\Delta^{14}\text{C}_{\text{Chlorophyll-a}}$  で規格) と独立しており、海底下のメタンに依存する独自の生態系であることを明示した<sup>19)</sup>。光合成系のシグナルとして、既報 29) をコンパイルしてある

ANMEの細胞組織を構成していくことが分かった。この顕著な安定炭素同位体比の傾向は、地球上で最も「軽い」炭素のダイナミックレンジの領域にプロットされる (図6)。

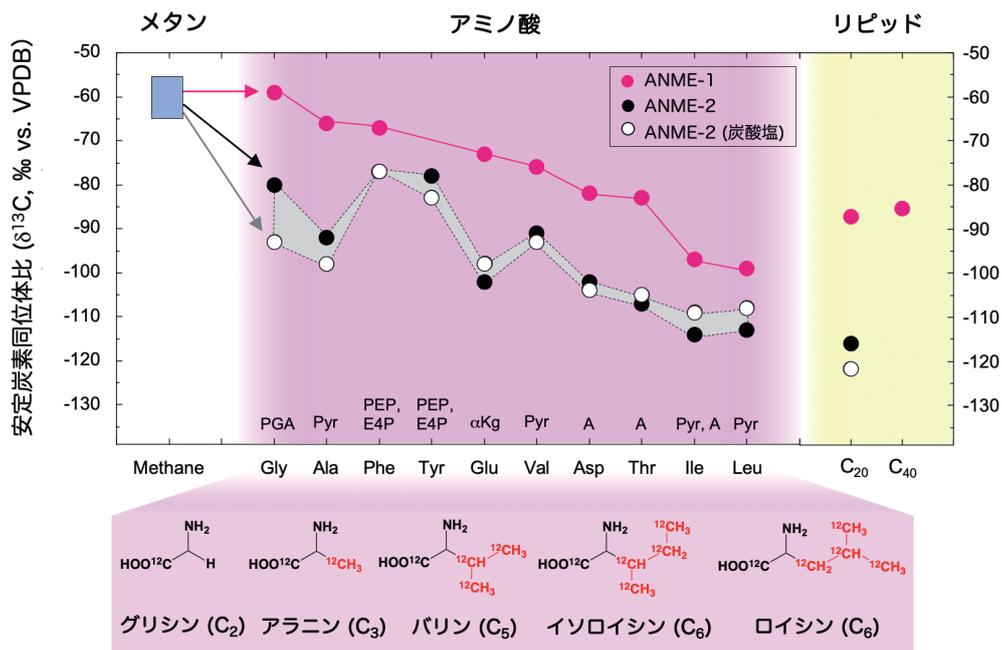


図5 黒海メタン及び嫌氣的メタン酸化アーキア (ANME-1, ANME-2) によって代謝されたアミノ酸及び脂質の炭素同位体比のプロファイル<sup>19)</sup>

アミノ酸の略記, Gly: グリシン, Ala: アラニン, Phe: フェニルアラニン, Tyr: チロシン, Glu: グルタミン酸, Val: バリン, Asp: アスパラギン酸, Thr: トレオニン, Ile: イソロイシン, Leu: ロイシン, 脂質分子の略記, Ph./Cr.: フィタン/クロセタン, BP: ビフィタン。アミノ酸の生合成経路の略記, A: アスパラギン酸ファミリー,  $\alpha$ Kg:  $\alpha$ -ケトグルタル酸ファミリー, PEP+E4P: ホスホエノールピルビン酸ファミリー, PGA: 3-ホスホグリセリン酸ファミリー, Pyr: ピルビン酸ファミリーの主要経路から構成。ANME-1は、シングルリンキングであるが、ANME-2は、硫酸還元菌とコンソーシアを作っていることに留意。ANMEの分子系統樹<sup>19)</sup>と網羅的なゲノム解析<sup>30)</sup>を参照

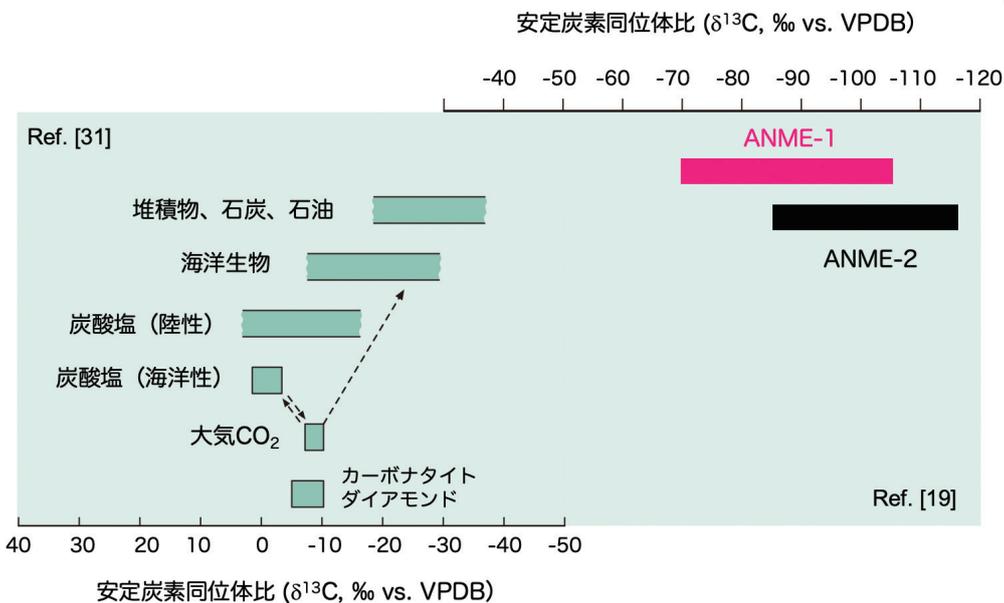


図6 地球物質に含まれる代表的な炭素源及び安定炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) のダイナミックレンジ

ANME-1, ANME-2 試料から見出されたアミノ酸分子レベル ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{Amino acid}}$ ) 及び脂質分子レベル ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{lipid}}$ ) の安定炭素同位体比の比較<sup>19, 31)</sup>

## 4. 展望 ~多次元同位体フィンガープリント法の深化

本稿では、安定及び放射性炭素からなる2核種炭素で解読する多次元同位体フィンガープリント法を用いて、地球深部や海底下での炭素循環に関与するメタン動態を追跡した研究例を解説した。近年、地球表層でのメタン研究でも新しい知見の現象理解<sup>20-22)</sup>が進んでいる。総じて、「何かが分かると、新たに未知の領域が見える」現場である。起源やプロセスの真正性(authenticity)を確証する意味で、元素及び分子情報を相乗的に深化できる多次元同位体フィンガープリント法は、これからも威力を発揮するだろう。

炭素同位体分別が伴う個々の反応経路の追跡に加え、含窒素分子レベル( $\delta^{15}\text{N}$ )の動態も報告されており<sup>23-26)</sup>、必要に応じて、2核種炭素に $\delta^{15}\text{N}$ を加えた3次元プロファイルが可能となる。誌面の都合上、すべてを列挙できなかったが、先駆者たちの礎<sup>23, 26)</sup>があって現在の最先端がある。これら一連の技術開発の要素は、異分野横断の波及にとどまらず、社会への知識・技術還元にも貢献すると期待される。

本稿は、海洋研究開発機構 生物地球化学センター(BGC)、ドイツ連邦地質調査所、マックスプランク研究所・マールブルグ、住友重機械工業(株)、関東天然瓦斯開発(株)、信州大学理学部、名古屋大学農学部、静岡大学理学部、北海道大学低温科学研究所、東京大学大気海洋研究所との共同研究の成果の一部をまとめた。各機関及び共同研究者一同に謝意を表す。

本研究の一部は、科研費(20H02019, 21J00787)によって行われた。

### 参考文献

- 1) Woese, C.R. and Fox, G.E., *PNAS*, **74**, 5088-5090(1977)
- 2) Tahon, G., *et al.*, *Annual Review of Microbiology*, **75**, doi: 10.1146/annurev-micro-040921-050212 (2021)
- 3) 古賀 洋介・亀倉 正博(編集), 『古細菌の生物学』, 東京大学出版会(1998); 石野 良純(編集), 『アーキア: 第3の不思議な生物』, 蛋白質 核酸 酵素(2009)
- 4) Offre, P., *et al.*, *Annual Review of Microbiology*, **67**, 437-457(2013)
- 5) Baker, B.J., *et al.*, *Nature Microbiology*, **5**, 887-900(2020)
- 6) Imachi, H., *et al.*, *Nature*, **577**, 519-525(2020)
- 7) Lewis, W.H., *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 225-240(2020)
- 8) Thauer, R.K., *Annual Review of Microbiology*, **69**, 1-30(2015)
- 9) Thauer, R.K., *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 579-591(2008)
- 10) Thauer, R.K., *Biochemistry*, **58**, 5198-5220(2019)
- 11) Takano, Y., *et al.*, *Organic Geochemistry*, **58**, 137-140(2013)
- 12) Kaneko, M., *et al.*, *Analytical Chemistry*, **86**, 3633-3638(2014)
- 13) Urai, A., *et al.*, *ACS Earth and Space Chemistry*, **5**, 1-11(2021)
- 14) Kaneko, M., *et al.*, *JACS Au*, in press(2021)
- 15) Kawagucci, S., *et al.*, *Geochemical Journal*, **54**, 129-138(2020)
- 16) Yokoyama, Y., *et al.*, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **455**, 311-316(2019)
- 17) Reeburgh, W.S., and Heggie, D.T., *Limnology and Oceanography*, **22**, 1-9(1977)
- 18) Knittel, K., and Boetius, A., *Annual Review of Microbiology*, **63**, 311-334(2009)
- 19) Takano, Y., *et al.*, *Scientific Reports*, **8**, 14070(2018)
- 20) Yip, D.Z., *et al.*, *New Phytologist*, **222**, 115-121(2019)
- 21) Bižić, M., *et al.*, *Science Advances*, **6**, eaax5343(2020)
- 22) Urai, A., *et al.*, *Progress in Earth and Planetary Sciences*, in press(2021)
- 23) Hayes, J.M., *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **43**, 225-277(2001)
- 24) Chikaraishi, Y., *et al.*, *Treatise on Geochemistry*, **12**, 95-123(2014)
- 25) Takizawa, Y., *et al.*, *Progress in Earth and Planetary Science*, **7**, Article number: 50(2020)
- 26) 和田 英太郎, 地球化学, **47**: 129-138(2013); Ohkouchi, N., *et al.*, *Progress in Earth and Planetary Science*, **2**, Article number: 1(2015)
- 27) Ermler, U., *et al.*, *Science*, **278**, 1457-1462(1997)
- 28) Naudts, L., *et al.*, *Marine Geology*, **227**, 177-199(2006)
- 29) Kusch, S., *et al.*, *Biogeosciences*, **7**, 4105-4118(2010)
- 30) Meyerdierks, A., *et al.*, *Environmental Microbiology*, **12**, 422-439(2010)
- 31) Hoefs, J., *Stable Isotope Geochemistry*, Springer(2018)

(\*<sup>1</sup>(国研)海洋研究開発機構, \*<sup>2</sup>(国研)産業技術総合研究所)