

堆積物脂肪酸によるメタン湧水帯微生物相の解析

高杉 秀美*1 長沼 毅*1,2 藤倉 克則*3 山本 智子*4
服部 陸男*5 山本 啓之*6 岩井 雅夫*7 小川勇二郎*8

プレート境界の沈み込み帯及びその関連域（南海トラフ、相模湾初島沖、遠洲灘金洲ノ瀬）において、メタン湧水に伴う生物群集地点及び近隣の非生物群集地点で堆積物を採取し、堆積物脂肪酸の量と組成を比較検討した。堆積物脂肪酸組成にもとづくクラスター分析を行った結果、生物群集地点と非生物群集地点は明らかに異なる群（クラスター）に分けられた。これは、ある地点におけるメタン湧水の有無を知るのに、生物群集の観察とともに、堆積物脂肪酸の分析も有効であることを示す。また、一部の非生物群集地点は、生物群集地点と同じクラスターに分類された。これは、メタン湧水がまだ「若く」、生物群集が十分に発達していない場合でも、堆積物脂肪酸分析により肉眼の観察では知ることができないメタン湧水依存型の海底微生物相の存在を推定できるということを示唆している。

キーワード：メタン湧水帯、南海トラフ、金洲ノ瀬、堆積物脂肪酸、微生物相

Analysis of Methane-Seep Microbial Communities Based on Sediment Fatty Acid Analysis

Hidemi TAKASUGI*9 Takeshi NAGANUMA*9,10 Katsunori FUJIKURA*11
Tomoko YAMAMOTO*12 Mutsuo HATTORI*13 Hiroyuki YAMAMOTO*14
Masao IWAI*15 Yujiro OGAWA*16

Sediment samples were collected from subduction-related areas (Nankai Trough and Sagami Trough and Kanasu-no-se Bank, Enshu-nada). Sediments were collected at the points where biological communities (as a methane-seepage indicator) were observed and the points with no

*1 広島大学生物生産学部

*2 海洋科学技術センター深海研究部

*3 海洋科学技術センター深海研究部（現 海洋科学技術センター海洋生態・環境研究部）

*4 海洋科学技術センター深海研究部（現 鹿児島大学水産学部）

*5 海洋科学技術センター海底下深部構造フロンティア

*6 聖マリアンナ医科大学微生物学科

*7 高知大学理学部地質学科

*8 筑波大学地球科学系

*9 Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University

*10 Deep Sea Research Department, Japan Marine Science and Technology Center (JAMSTEC)

*11 Deep Sea Research Department, JAMSTEC (present: Marine Ecosystem Research Department, JAMSTEC)

*12 Deep Sea Research Department, JAMSTEC (present: Faculty of Fisheries Science, Kagoshima University)

*13 Oceanic Crust Dynamics Research Frontier, JAMSTEC

*14 Department of Microbiology, St. Marianna University, School of Medicine

*15 Department of Geology, Faculty of Science, Kochi University

*16 Institute of Geoscience, University of Tsukuba

visible colonies. Phospholipid fatty acids were extracted from the sediments, and the abundance and composition of the fatty acids were compared among the sediments, with special reference to the occurrence of biological communities, i.e. the occurrence of methane seepage. Cluster analysis of the fatty acid compositions showed that the sediments from biological communities were closely associated with each other, while the non-colony sediments formed a distinct group. This suggests that the sediment fatty acids, which reflect sediment microflora, is a potential bio-indicator of methane seepage. Two non-colony sediment samples were placed in the cluster of colonized sediments. This implies that the fatty acid analysis may serve as the precursor bio-indicator preceding to biological colonization.

Keywords : Methane seep, Nankai Trough, Kanasu-no-se Bank, Sediment fatty acids, Microflora

1. はじめに

プレート境界である沈み込み帯では海洋底が変形作用を受け、場所によっては圧縮される。圧縮された堆積物からはメタンを含んだ間隙水が絞り出され、海底から湧出することもある。これをメタン湧水(methane seepage)といい、メタン湧水帯の海底にはしばしばシロウリガイやハオリムシなどからなる生物群集あるいは微生物マットが形成されている。これらの生物群集の形成と維持は、湧水に含まれるメタンを直接利用するメタン栄養(methanotrophy)、あるいは、海水由来の硫酸をメタンで還元して生じた硫化水素を利用するイオウ栄養(thiotrophy)という栄養戦略にもとづいている。逆に言うと、これらの生物群集の存在により、その場所にメタン湧水のあることが視覚化されるのである。

ある場所がメタン湧水帯だとしても、生物群集や微生物マットがなければ、そこにメタン湧水があるとは認識されにくい。熱水噴出孔では熱水の「ゆらぎ」が肉眼で観察できるが、メタン湧水については肉眼での確認はとても難しいか稀である。このため、生物群集や微生物マットが発達する前の「若い」メタン湧水帯を発見するために、迅速・鋭敏、データの相互比較が可能、そしてデータベース化の可能な方法の開発が望まれている。これに対し、既に堆積物脂肪酸の分析がきわめて有効であると報告されている。例えば、北部奥尻海嶺の開口割れ目域には小生物群集と局所的な微生物マットしか観察されていないが、ここの堆積物脂肪酸組成は既知のメタン湧水帯(初島沖)との類似度が高く、他の地質学的知見と合わせて、ここに若いメタン湧水帯の存在することが示唆された(長沼ほか, 1997)。

堆積物脂肪酸のほとんどは微生物、特に細菌(バクテリア)由来である。脂肪酸には多数の種類があり、その組み合わせ(組成)は微生物種ごと、あるいは、微生物

群集ごとに特徴的である。また脂肪酸分析は比較的迅速かつ簡単に行なえるので、微生物群集の量(バイオマス)と質(種組成=微生物相)を概観的に把握する際に有効である(Rajendran *et al.*, 1994)。特に、リン脂質脂肪酸は生細胞に特有に存在するので、生きた微生物の良好指標となる(ラジェンドラン・芳之内, 1997)。このように、堆積物脂肪酸の量と質(組成)は、堆積物中の微生物の量と種組成(微生物相)を反映する。堆積物脂肪酸組成が似ていれば、その堆積物中の微生物相も似ており、その微生物相を支える環境条件(メタン湧水の有無など)も似ていると考えられる。当然、海底直上水や堆積物間隙水のデータ(メタン濃度など)との相互補完も必要であるが、堆積物脂肪酸分析には1)採水に比べて採泥の方が行われやすい、2)メタン濃度は短期的データであるのに対し堆積物脂肪酸は中～長期にわたる環境変動を反映したデータである、というメリットもある。このため、筆者らのグループは主に堆積物脂肪酸組成を指標として、メタン湧水帯の有無と堆積物微生物相の相関を調べてきた。

本研究では代表的な沈み込み帯及びその関連域(南海トラフ、相模湾初島沖、遠州灘金洲ノ瀬)で採取された堆積物について脂肪酸分析を行い、それらの堆積物試料間の近縁度を解析する。これにより、生物群集が発達する以前のメタン湧水帯の存在の推定を試みる。またメタン湧水の指標となる脂肪酸(バイオマーカー脂肪酸)を検討し、これから推定される微生物相と海底環境の相関を考察する。

2. 材料と方法

2.1 堆積物試料の採取

海底堆積物試料は「かいこう」及び「ドルフィン3K」により、柱状採泥器(push corer)、スコップ(scoop)。

エクマンバー型採泥器 (Ekman-Burge grabber; 8 × 8 × 14 cm) を用いて採取された (表1)。柱状採泥器で採取された試料 (約 10 cm 長) は上下に二分割し、上層 (U; Upper, 0-5 cm below sea floor [cmbsf]) 及び下層 (L; Lower, 5-10 cmbsf) に分けた。ただし、南海トラフの非生物群集地点から採取した試料 N-1a (約 12 cm 長) 及び微生物マット内外から採取した N-2-In 及び N-2-Out 試料 (約 8 cm 長) は上下分割せずに用いた。エクマンバー型採泥器で採取した試料 (N-3b シリーズの 5.10, 10.15, 15.19) は上下に三分割した (0-5, 5-10, 10-14 cm)。ただし、これは既にスコップで採取した (約 5 cm ほど挟まれた) 場所で再採取したものであり、堆積物表面からの深さは各々 5 cm プラスされるので 5-10, 10-15, 15-19 cmbsf 試料となる。

(1) 南海トラフ

南海トラフは、海溝型巨大地震を引き起こすプレート境界 (沈み込み帯) であり、1944 年東南海地震、1946 年南海地震など M8 規模の地震震源となった場所である。また、そこには、プレート沈み込みに伴うメタン湧出のあることも報告されている (Gamo *et al.*, 1992)。この南海トラフ境界最前線断層付近の堆積物を、1997 年 8

月 14 日から 8 月 25 日にかけて行われた「かいこう」第 42, 43, 44, 45 潜航において採取した (図 1; 川村ほか, 1998)。第 42 潜航の試料 (N-1a, N-1b) は天竜海底谷出口左岸付近で採取された。ここでは生物群集は視認されなかった。第 43 潜航の試料は天竜海底谷出口左岸付近の陸側斜面で採取された。ここには微生物マットのみが観察され、微生物マットの中 (N-2-In) とそこから 1 m ほど離れた場所 (N-2-Out) から試料を採取した。第 45 潜航では東部南海トラフ変形前線近くのベンチ段差を上った地点で試料を採取した。ここには、シロウリガイを中心とした生物群集 (シロウリガイコロニー) が発達しており、そのコロニー内の堆積物試料を採取した (小川・平野, 1997)。

(2) 相模湾初島南東沖

初島沖冷湧水湧出域は相模トラフプレート境界に沿ったメタン湧水域であり、世界的にも大規模なシロウリガイ群集地として知られている。1923 年の関東大震災の震源域にも近い。このため初島沖海底には 1993 年から長期ステーションが設置され、以来、海底流や水温、地震活動、海底観察などが続けられている (門馬ほか, 1994)。1995 年 4 月 18 日に行われた「ドルフィン 3K」第 211 潜

表 1 採取された堆積物試料とそのリン脂質脂肪酸含量
Table 1 Description of sediment samples and their phospholipid fatty acid contents

Sample	Dive	Date (MM/DD/YY)	Location	Water depth (m)	Sampler	Depth (cmbsf*)	No. of PLFA** forms	Total PLFA (μg g ⁻¹) ³	Note
N-1a	10K-42	08/20/97	33-36.015° N 137-32.385° E	3848	Push corer	0-12	9	0.53	No biological communities observed
N-1b-U	10K-42	08/20/97	33-36.015° N 137-32.385° E	3848	Push corer	0-5	6	0.69	No biological communities observed
N-1b-L	10K-42	08/20/97	33-36.015° N 137-32.385° E	3848	Push corer	5-10	3	0.12	No biological communities observed
N-2-In	10K-43	08/21/97	33-36.301° N 137-32.341° E	3768	Push corer	0-8	8	1.47	Inside of Microbial mat
N-2-Out	10K-43	08/21/97	33-36.316° N 137-32.293° E	3765	Push corer	0-8	13	2.27	1 m from microbial mat
N-3a-U	10K-45	08/23/97	33-38.810° N 137-54.540° E	3761	Push corer	0-5	5	0.47	1 m from <i>Calypotegena</i> colony
N-3a-L	10K-45	08/23/97	33-38.810° N 137-54.540° E	3761	Push corer	5-10	6	0.58	1 m from <i>Calypotegena</i> colony
N-3a-S	10K-45	08/23/97	33-38.810° N 137-54.540° E	3761	Scoop	0-	24	3.74	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
N-3b-0.5	10K-45	08/23/97	33-38.817° N 137-54.535° E	3761	Push corer	0-5	14	3.35	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
N-3b-5.10	10K-45	08/23/97	33-38.817° N 137-54.535° E	3761	Ekman-Burge grabber	5-10	19	2.29	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
N-3b-10.15	10K-45	08/23/97	33-38.817° N 137-54.535° E	3761	Ekman-Burge grabber	10-15	13	0.99	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
N-3b-15.19	10K-45	08/23/97	33-38.817° N 137-54.535° E	3761	Ekman-Burge grabber	15-19	23	2.78	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
N-3b-S	10K-45	08/23/97	33-38.817° N 137-54.535° E	3761	Scoop	0-	17	1.98	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
HC	3K-221	06/02/95	35-05.681° N 139-20.703° E	1167	Push corer	0-5	24	8.37	Inside of <i>Calypotegena</i> colony
P0-U	3K-222	06/03/95	34-59.989° N 139-13.685° E	1169	Push corer	0-5	11	1.56	0 m from a porcine head
P0-L	3K-222	06/03/95	34-59.989° N 139-13.685° E	1169	Push corer	5-10	9	0.42	0 m from a porcine head
P1-U	3K-222	06/03/95	34-59.989° N 139-13.684° E	1169	Push corer	0-5	18	5.49	1 m from a porcine head
P1-L	3K-222	06/03/95	34-59.989° N 139-13.684° E	1169	Push corer	5-10	9	0.96	1 m from a porcine head
N-KS	3K-300	09/03/96	34-17.247° N 138-15.049° E	321	Scoop	0-	2	0.98	No biological communities observed

*1. ROV *Kaiko*; *2. ROV *Dolphin 3K*; *3. cm below sea floor; *4. phospholipid fatty acids; *5. μg PLFA per g dry sediment

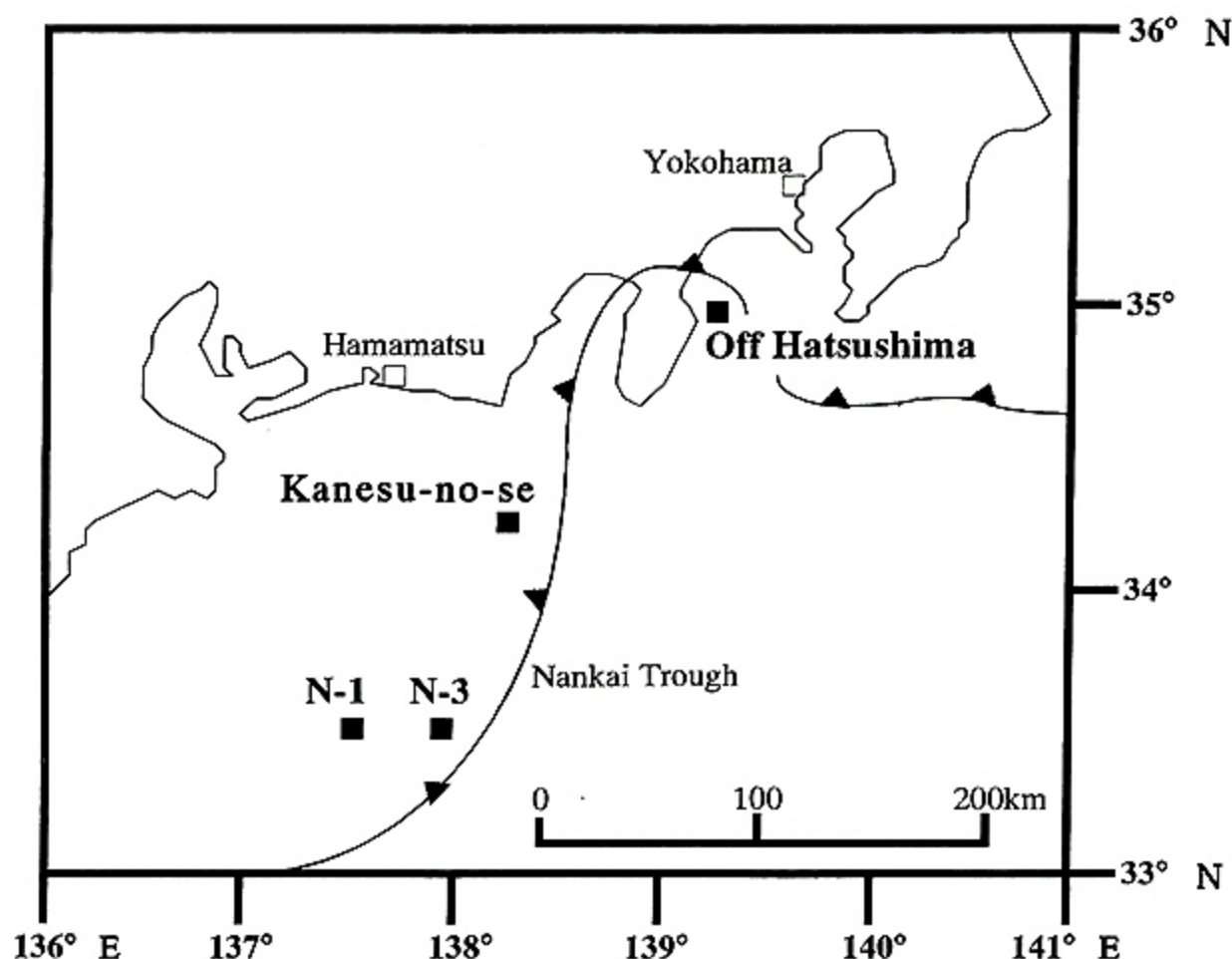


図1 堆積物試料の採取地点
Fig. 1 Sites of sediment sample collection

航、相模トラフプレート境界最前線の逆断層である。(小川ほか, 1997) 初島沖冷水湧出域でシロウリガイコロニーの近くの海底に実験的に豚頭を設置した(長沼ほか, 1997)。同年6月2日に行われた「ドルフィン3K」第221潜航でそのシロウリガイコロニー内からHC 試料が柱状採泥器により採取された。その翌日の6月3日「ドルフィン3K」第222潜航において豚頭の直近及び豚頭から1 m離れた地点の堆積物が柱状採泥された(P.O., P.1.; 長沼ほか, 1997)。得られた堆積物は上層(U; 0-5 cmbsf)と下層(L; 5-10 cmbsf)を試料とした。海底設置後46日の豚頭にはシロウリガイが誘引されていた。サンプリング時には群がっていたシロウリガイの多くは死んでいるように見えた(長沼ほか, 1997)。

(3) 南海トラフ付加体上部(遠洲灘金洲ノ瀬)

金洲ノ瀬は東部南海トラフ付加体上部に位置し、北東方向以外は急斜面で特に西側の斜面が大きく、頂部水深

50mの海丘である。嶺の中心部周辺は炭酸塩岩が露出しており、化学合成生物群集が観察された(橋本ほか, 1995)。また金洲ノ瀬の西南西側の水深1,000-1,200 m付近においても、メタン湧水現象とそれに伴うメタン湧水帯生物群集が報告されている(太田ほか, 1995)。1996年9月3日「ドルフィン3K」第300潜航において金洲ノ瀬の頂部から南西に突き出した小さな嶺上(水深321 m)の比較的平坦な地点で、生物群集が観察されない海底表面からスコップで堆積物試料採取を行った(N-KS)。

2.2 堆積物のリン脂肪酸の分析

採取した堆積物は潜水船揚収後直ちに船上にて分取し、-80℃で保存した。冷凍状態のまま研究室に持ち帰り、凍結乾燥した。凍結乾燥した堆積物に、リン酸緩衝液(K_2HPO_4 8.7g l⁻¹) / クロロホルム / メタノール混液(2:3:6 v:v:v)を加えて脂質を抽出する。このとき、乾燥堆積物1 gに対してリン酸緩衝液1 mlの比率で混液

を加える。抽出した脂質はケイ酸カラムクロマトグラフィーで中性脂質、糖脂質、リン脂質（生細胞の指標）に分け、それぞれクロロホルム、アセトン、メタノールに溶出して分画する。メタノールで溶出したリン脂質はさらにメチルエステル化し（White *et al.*, 1979）、薄層クロマトグラフィーで精製する。（Rajendran *et al.*, 1992）。この脂肪酸メチルエステルの含量と組成をガスクロマトグラフ装置（Shimadzu GC-17A）とガスクロマトグラフ質量分析装置（GC/MS；Hewlett Packard HP 6890 Series GC system；ポリシリコンカラム [5% ジフェニル，95% ジメチル]，カラム長 25 m，カラム内径 0.25 mm）で分析した。

得られた脂肪酸メチルエステル組成から脂肪酸組成を読みとり、脂肪酸を定量した。この脂肪酸組成比に基づいて堆積物試料間の類似度（近縁度）をクラスター解析した。解析結果はユークリッド距離を用いてデンドログラムで図示した（Sasser, 1990）。デンドログラムでは、類似度の高いものほどユークリッド距離が短く、脂肪酸組成に基づく堆積物試料間の関係の近縁が直感的に把握できる。

3. 結果

3.1 堆積物リン脂質脂肪酸の種類

ひとつの堆積物試料に含まれる脂肪酸の種類数は、少ない試料で2種類（N-KS）多い試料で24種類（HC，N-3a-S）であった。脂肪酸の種類数の多い堆積物は、脂肪酸含量も比較的高かった。相模湾初島沖シロウリガイコロニー内の堆積物（HC）では24種類と脂肪酸種類数が最も豊富であり、脂肪酸含量は約 $8.37 \mu\text{g/g}$ と最高値を示した。分析した全ての堆積物試料について、脂肪酸含量と脂肪酸種数の間に累乗関係（ $Y = aX^b$ ）を想定して相関関係を調べたところ、きわめて有意な相関関係が認められた（図2； $r = 0.868$ ， $n = 19$ ）。

3.2 デンドログラム

各堆積物試料の脂肪酸組成比に基づいてその関係をデンドログラムで表した（図3）脂肪酸組成比が類似する試料はデンドログラム上で互いに近接して配置される。堆積物間の類似度はクラスター解析で計算される“ユークリッド距離”で表される。微生物の細胞脂肪酸については一般に、ユークリッド距離が25，10，6以下の場合、それらの微生物はそれぞれ属，種，亜種以下のレベルで類似すると考えられる（Sasser, 1990）が、堆積物脂肪酸の場合、微生物相同上の類似度とユークリッド距離

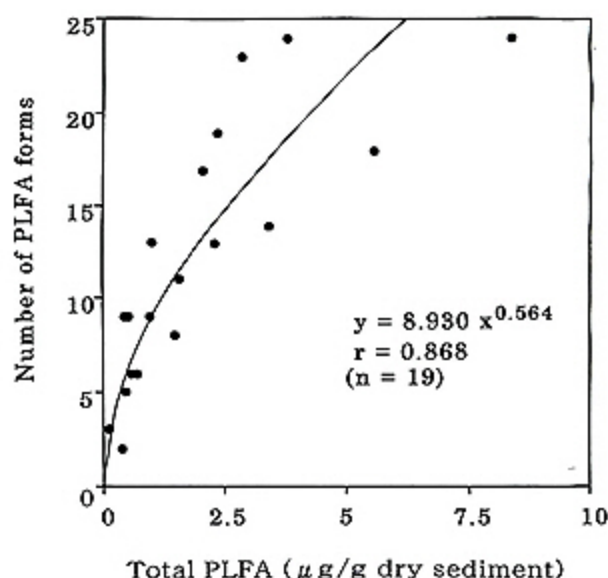


図2 堆積物中のリン脂質脂肪酸含量と脂肪酸種数の関係
Fig. 2 Correlation between contents and numbers of phospholipid fatty acids (PLFA) extracted from sediment samples.

の直接対応についてはまだ研究がなされていない。

図3から、生物群集が肉眼で確認できなかった堆積物試料（N-1b-L，N-KS）と確認できた堆積物試料とは、脂肪酸組成比が大きく異なっていることが分かる（ユークリッド距離57）。その他の試料を含むクラスター1はユークリッド距離が29以内であった。

クラスター2はシロウリガイコロニー内、豚頭から1mの上層試料を含んでいた。また、クラスター2に含まれる同じ地点のシロウリガイコロニー内試料であるN-3b-0.5，N-3b-5.10はデンドログラム上で遠くに配置された。

クラスター3ではバクテリアマット内試料、シロウリガイコロニーから1mほど離れた地点、豚頭直近、豚頭から1m離れた地点など、いわゆる一般の海底堆積物とは異なる微生物相の存在が期待される試料が主に含まれていた。また、生物群集が肉眼で確認できなかった試料（N-1b-U，N-1a）もクラスター3に含まれていた。

3.3 堆積物脂肪酸組成

堆積物に含まれる脂肪酸の組成を表2に示す。表の試料名は上段からデンドログラム（図3）のならびと対応させてある。全般的に16：0（炭素数16，二重結合数0），16：1 ω 7C（炭素数16，二重結合数1，二重結合位置が ω 位炭素から7-8番目の炭素原子間，二重結合はシス cis 型）の脂肪酸が多かった。脂肪酸種数が少ない堆積物中（N-1b-L，N-KS）では、他の堆積物試料に比べて特に

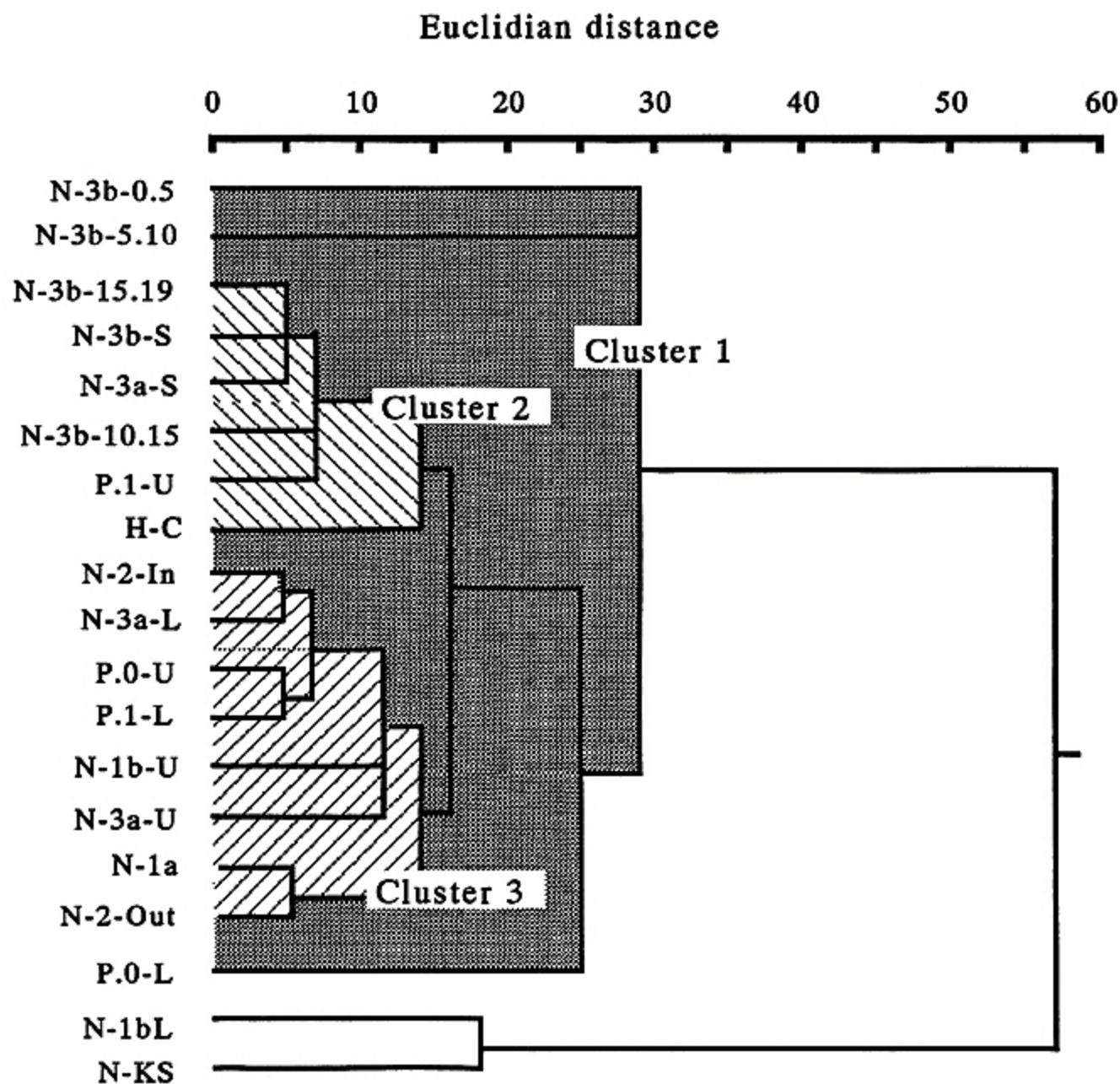


図3 堆積物から抽出したリン脂質脂肪酸の組成にもとづくデンドログラム

Fig. 3 Dendrogram based on the compositions of phospholipid fatty acids extracted from sediment samples.

14 : 0, 16 : 0 の脂肪酸が大きな割合を占めていた。特にメタン湧水も生物群集も見られない海底堆積物だと、炭素数が偶数で炭素原子間に二重結合のない飽和型の脂肪酸が組成のほとんどの割合を占める (Naganuma *et al.*, 1996)。図3のデンドログラムでクラスター2とクラスター3に含まれる堆積物試料の脂肪酸組成を比較してみると炭素数が奇数個の脂肪酸 (13 : 0, 15 : 0, 17 : 0) がクラスター3ではほとんど見られなかった。また、微生物、特に細菌 (バクテリア) では二重結合数が2以上の高度不飽和脂肪酸が少ないので、18 : 2, 18 : 3,

20 : 4 などの脂肪酸は堆積物中の小型動物や微小動物、あるいは海洋表層の微細藻類由来と考えられる。

3.4 バイオマーカー (生物指標) 脂肪酸

脂肪酸組成のうち、特定の生物や微生物に特徴的な脂肪酸、または比較的多く存在する脂肪酸が知られている。これらの脂肪酸は、バイオマーカーとして、環境試料中の微生物相の推定に用いられている (Rajendran *et al.*, 1994)。今までに報告されているバイオマーカー脂肪酸のうち、硫酸還元細菌、メタン酸化細菌、硫酸化細菌

Major PLFAs	14:0	15:0 iso	15:0 ante	15:0	16:1 ω 7c	16:1 ω 5c	other 16:1	16:0	17:1 iso	17:0 ante	17:0 cyclo	18:2 ω 6,9c	18:1	18:0	Others
N-3b-0.3	7.3	3.42	6.5	1.79	5.01	16.37	5.52	25.89	1.52	-	3.39	5.73	12.7	5.39	-
N-3b-5.10	3.01	1.79	3.71	0.81	22.81	32.41	1.8	11.63	1.25	1.44	2.01	2.17	11.59	2.49	1.11
N-3b-15.19	3.77	2.36	5.74	1.14	30.79	10.62	1.43	15.76	1.85	4.23	2.83	2.33	11.99	3.64	1.52
N-3b-S	3.29	2.21	4.8	1.03	30.93	11.12	1.52	17.12	1.61	2.47	2.66	3.27	13.8	3.54	0.64
N-3a-S	3.22	2.03	4.6	0.88	29.46	9.25	-	14.44	1.52	3.88	2.39	2.45	16.77	5.27	3.84
N-3b-10.15	4.95	2.52	6.69	-	30.85	10.9	1.84	16.59	1.58	1.13	2.37	2.7	17.88	-	-
P.1-U	4.69	2.31	4.81	1.02	29.09	6.02	2.59	19.25	1.07	1.89	1.64	1.41	17.42	2.1	4.69
HC	7.45	3.62	7.74	1.5	18.85	8.11	0.7	18.28	1.89	3.87	2.52	0.57	13.21	2.98	8.74
N-2-In	12.9	3.66	5.91	-	31.97	9.36	2.44	21.78	-	-	-	-	11.99	-	-
N-3a-L	14.15	-	6.86	-	34.15	11.37	-	20.12	-	-	-	-	13.34	-	-
P.O-U	9.29	2.32	6.09	-	29.36	8.94	3.2	21.17	-	-	-	1.58	11.66	-	3.79
P.1-L	9.8	2.99	7.4	-	29.84	6.9	2.64	25.56	-	-	-	-	10.46	-	4.41
N-1b-U	17.59	-	7.06	-	25.74	7.78	-	25.03	-	-	-	-	16.81	-	-
N-3a-U	9.71	-	-	-	35.51	11.28	-	24.74	-	-	-	-	18.76	-	-
N-1a	6.94	1.3	6.88	-	26.18	7.47	1.56	27.12	-	1.4	-	-	20.75	-	-
N-2-Out	6.72	2.56	6.27	0.85	22.49	6.5	1.63	28	1.23	1.47	-	-	19.44	2.84	-
P.O-L	12.75	2.61	8.03	-	16.14	5.59	-	28.4	-	-	-	-	6.95	-	19.51
N-1b-L	35.44	-	14.11	-	-	-	-	50.45	-	-	-	-	-	-	-
N-KS	37.23	-	-	-	-	-	-	62.77	-	-	-	-	-	-	-
Minor PLFAs	12:0 iso	12:0	13:0	14:0 iso	16:0 iso	17:0	18:3 ω 3,6,9c	20:4	20:1 ω 9t						
N-3b-5.10	-	-	0.38	-	-	-	-	0.73	-						
N-3b-15.19	-	-	0.26	0.27	0.18	0.31	-	0.5	-						
N-3b-S	-	-	0.64	-	-	-	-	-	-						
N-3a-S	-	0.13	0.67	0.65	-	0.52	0.63	0.76	0.48						
P.1-U	-	0.53	0.83	-	3.33	-	-	-	-						
HC	0.95	0.39	1.79	1.26	-	1.89	-	1.33	1.13						
P.O-U	-	0.87	-	-	2.92	-	-	-	-						
P.1-L	-	-	-	-	4.41	-	-	-	-						
P.O-L	-	2.23	-	-	12.28	-	-	-	-						

表2 堆積物試料から抽出されたリン脂質脂肪酸の組成 (重量%)

Table 2 Compositions of phospholipid fatty acids extracted from sediment samples (weight %)

及び ϵ -プロテオバクテリアなどのバイオマーカー脂肪酸を、メタン湧水に特徴的な脂肪酸と考えた。これらの微生物グループとそれに対応するバイオマーカー脂肪酸を表3に示す。

ϵ -プロテオバクテリアに属する細菌には微好気性のものが多く見られ、胃潰瘍の原因菌であるピロリ菌もこのグループに属する(動物の消化管内には微好気的な部分もある)。また、 ϵ -プロテオバクテリアに属する細菌は、大西洋中央海嶺やハワイ・ロイヒ海山の熱水噴出域、高温・高圧の油田環境などにも多く見られるが、これは、これらの環境に酸化/還元境界(微好気的)が広範に存在するためであろう。したがって、酸化/還元境界が広範に存在するであろうメタン湧水帯にも ϵ -プロテオバクテリアに属する細菌が多く生息すると考えられる。また、逆にこの細菌の優占性によってメタン湧水の特徴づけることができると思われる。硫酸還元細菌のバイオマーカー脂肪酸としては 15:0, 15:0 iso/ante, 16:0 iso, 17:0 iso/ante, 17:1 iso (／はandのこと, isoは ω 位炭素の隣の炭素原子に, anteはそれ以外の炭素原子に側鎖がついているもの) メタン酸化細菌は 16:1 ω 5cとし、16:1 ω 7cについては硫酸還元細菌、メタン酸化細菌、または ϵ -プロテオバクテリアと重複しておりバイオマーカー脂肪酸といえるかどうか問題ではあるが、この場合はメタン湧水の特徴づける脂肪酸

として扱うことにした。また、 ϵ -プロテオバクテリア、硫酸還元細菌のバイオマーカー脂肪酸は脂肪酸の構造が決定できなかったため扱わなかった。

各試料ごとに上記で取り上げたバイオマーカー脂肪酸(硫酸還元細菌、メタン酸化細菌、16:1 ω 7c)の組成比を図4に示す。

発達した生物群集が観察されなかった場所N-KSについてはバイオマーカー脂肪酸は全く含まれておらず、K-1b-Lでは一種類のみであった。P.O-Lでは硫酸還元細菌のN-3b-0.5, N-3b-5.10は他の試料に比べてメタン酸化細菌のバイオマーカー脂肪酸の組成比に占める割合が高かった。

4. 考 察

堆積物試料中の脂肪酸含量と脂肪酸種数の間に有意な相関関係が見られた(図2)。脂肪酸含量は生物のバイオマス、脂肪酸の種類数の増加は生物種の増加に対応していると考えられる。このことから「生物群集のバイオマスの増加はある優占種のバイオマス増加によるものよりも、生物群集内の種の多様性の増加によるものである」ということが示唆される。

堆積物試料に含まれる脂肪酸組成比から得られたデンドログラム(図3)からは、発達した生物群集が観察できた場所と観察できなかった場所とが明らかに異なるク

Fatty acid	Microorganisms	Reference*
14:0 3-OH	Some ϵ -Proteobacteria (campylobacters)	(8)
15:0	SRB (Desulfobulbus)	(11)
15:0 iso/ante	SRB (Desulfovibrio), anaerobes	(4) (9) (12)
15:1	SRB (Desulfobulbus), marine sediments	(14)
16:0 3-OH	Some ϵ -Proteobacteria (campylobacters)	(8)
16:0 iso	SRB, anaerobes, marine sediments	(1) (10)
16:1 w7	SRB, campylobacters?, anoxic sediments	(11) (12)
16:1 w5/w7/w8/w11	Type I methane-oxidizers (seep-mussel symbionts)	(7) (10)
17:0 iso/ante	SRB, anaerobes, marine sediments	(1) (2) (12)
17:1 iso/ante	SRB, marine sediments	(12) (13)
18:1 w7	SRB, anaerobes, sediments	(3) (12) (13)
18:1 w7c	type II methane-oxidizers	(10)
19:0 cyclo	Campylobacters, thiobacilli, aerobes	(1) (2) (5) (6) (9)

* (1) Baird and White 1985, (2) Baird et al. 1985, (3) Bobbie and White 1980, (4) Edlund et al. 1985, (5) Goodwin et al. 1985, (6) Goodwin et al. 1989, (7) Jahnke et al. 1995, (8) Kerger et al. 1986, (9) Mancuso et al. 1990, (10) Nichols et al. 1985, (11) Parkes and Calder 1984, (12) Parkes and Taylor 1983, (13) Taylor and Parkes 1983, (14) Taylor and Parkes 1985

表3 堆積物微生物層の指標となるバイオマーカー脂肪酸

Table 3 Biomarker fatty acids as indicators of sediment microbial populations.

ラスターに分類された。また、肉眼で観察される生物群集内堆積物試料であっても、N-3b-0.5, N-3b-5.10はそれぞれクラスター2から離れて配置された。これら二つの試料のバイオマーカー脂肪酸の組成(図4)ではメタン酸化細菌のバイオマーカー脂肪酸の割合が高かった。メタン湧水域シロウリガイコロニー直下の堆積物の脂肪酸分析では、表層にこれほど高い割合(表2)でメタン酸化細菌バイオマーカー脂肪酸は検出されていない(長沼, 1995; 長沼ほか, 1996; 1997)。また、湧水域でのメタンの酸化、硫酸還元は堆積物表層下 20-40 cmで活発に行われていると報告されている(Masuzawa et al., 1992; 増澤, 1995)が、この高い割合のメタン酸化細菌バイオマーカー脂肪酸から、表層でもメタン酸化が活発に行われており、このメタン湧水域ではメタン湧水の流量が大きく、多量のメタンが表層まで達していると考えられる。クラスター2とクラスター3のバイオマーカー

脂肪酸を比較してみると硫酸還元菌のバイオマーカー脂肪酸は若干クラスター2の方が高い割合を示していた。これはやはり肉眼で生物が観察される場所では、それらの生物を支えるだけの硫酸還元が行われていると推測される。本研究の結果で特に注目することは、生物が肉眼で観察されなかった場所で採取した試料(N-1a, N-1b-U)がクラスター3(図3)に含まれていたことである。メタン湧水の特徴づけるバイオマーカー脂肪酸も含まれており、我々が目視できない海底下の堆積物ではメタン湧水を示唆するような「メタン湧水微生物相」が形成されていることは間違いないと思われる。これは堆積物中にシロウリガイコロニーなどの発達した生物群集を支えるだけのメタン供給量がない、例えば堆積物中で地殻変動などに伴う新たな割れ目からのメタンの供給が始まったばかり、またはメタンの供給がなくなってしまった場所かもしれない。この場所の微生物相がメタン湧水域のそ

S-reducing
 (15:0, 15:0iso/ante, 16:0iso, 17:0iso/ante, 17:1iso)

CH₄-oxidizing
 16:1ω5c

16:1ω7c

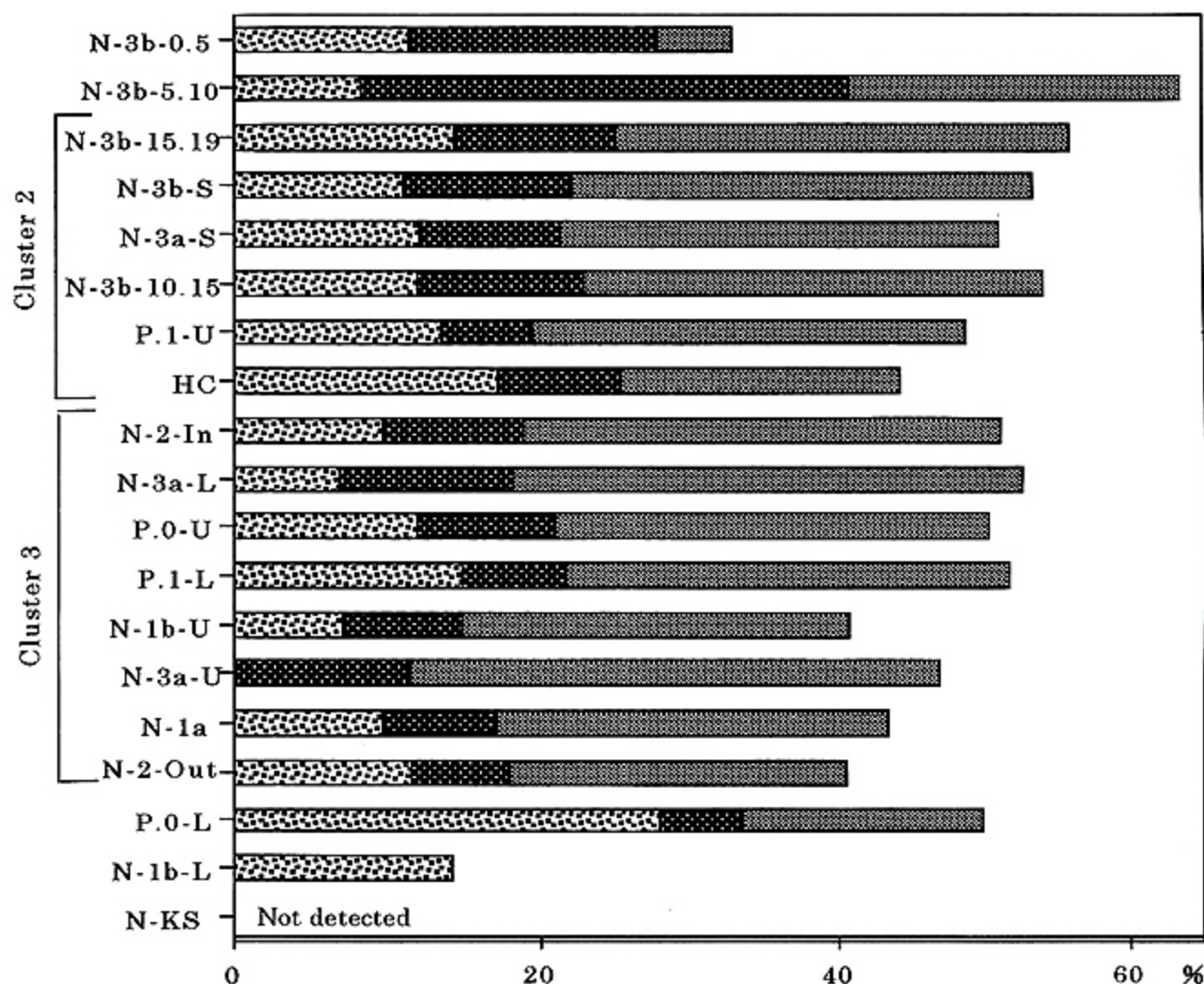


図4 堆積物から抽出した全リン脂質脂肪酸におけるバイオマーカー脂肪酸の割合 (重量%)

Fig. 4 Ratio of biomarker fatty acids to total phospholipid fatty acids (weight %)

れと類似するからといって直ちにメタン湧水の存在が示されるわけではないが、「メタン湧水微生物相」を誘発する堆積物環境が存在することは示唆される。

5. 今後の課題

今回の研究では堆積物中の脂肪酸のみの分析であった。今後の研究では他の有機分析あるいは遺伝子解析の併用により、さらに明確な堆積物試料間の類似度が得られるであろう。また、湧水・間隙水など分析による環境データと比較対照（キャリブレーション）することで、

堆積物脂肪酸の分析という比較的迅速・簡便な方法の長所・短所がより明確になるであろう。

謝 辞

本調査研究を可能に下さった「かいこう」操縦班、「ドルフィン3K」操縦班、「かいいい」クルー、「なつしま」クルーの皆様、乗船研究者各位、「ドルフィン3K」潜航調査資料・試料使用を快諾して下さい下さった方々に深く感謝します。また、脂肪酸分析で御指導いただいた国税庁醸造研究所の岩下和裕先生にも深く感謝いたします。

参考文献

- Baird, B. H. and D. C. White (1985) : Biomass and community structure of the abyssal microbiota determined from the ester-linked phospholipids recovered from Venezuela Basin and Puerto Rico Trench sediments. *Mar. Geol.*, **68**, 217-231.
- Baird, B. H., D. E. Nivens, J. H. Parker and D. C. White (1985) : The biomass, community structure, and spatial distribution of the sedimentary microbiota from a high-energy area of the deep sea. *Deep-Sea Res.*, **32**, 1089-1099.
- Bobbie, R. J. and D. C. White (1980) : Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 1212-1222.
- Edlund, A., P. D. Nichols, R. Roffey and D. C. White (1985) : Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species. *J. Lipid Res.*, **26**, 982-988.
- Goodwin, C. S., R. K. McCulloch, J. A. Armstrong and S. H. Wee (1985) : Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter phyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.*, **19**, 257-267.
- Gamo, T., H. Sakai, J. Ishibashi, K. Shitashima and J. Boulegue (1992) : Methane, ethane and total inorganic carbon in fluid samples taken during the 1989 Kaiko-Nankai project. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **109**, 383-390.
- Goodwin, C. S., W. McConnell, R. K. McCulloch, C. McCullough, R. Hill, M. A. Bronsdon and G. Kasper (1989) : Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other *Campylobacter*s. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 938-943.
- 橋本 惇・藤倉克則・藤原義弘・谷島恵美・太田 秀・小島茂明・葉 信明 (1995) : 遠洲灘金洲ノ瀬におけるオオツキガイモドキとハオリムシ類を共優先種とする冷水湧出帯生物群集の観察. JAMSTEC 深海研究, **11**, 211-217.
- Jahnke, L. L., R. E. Summons, L. M. Dowling and H. D. Zahiralis (1995) : Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills : chemical and isotopic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 576-582.
- 川村喜一郎・小川勇二郎・藤倉克則・服部睦男・町山栄章・山本智子・岩井雅夫・広野哲朗 (1998) : 「かいこう」がみた天竜海底谷出口付近の南海付加体最前縁部の地形および地質構造. JAMSTEC 深海研究, **14**, (本誌印刷ページ) .
- Kerger, B. D., P. D. Nichols, C. P. Antworth, W. Sand, E. Bock, J. C. Cox, T. A. Langworthy and D. C. White (1986) : Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacillus* spp.: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **38**, 67-77.
- Mancuso, C. A., P. D. Franzmann, H. R. Burton and P. D. Nichols (1990) : Microbial community structure and biomass estimates of a methanogenic Antarctic lake ecosystem as determined by phospholipid analyses. *Microbiol. Ecol.*, **19**, 73-95.
- 増澤敏行 (1995) : 深海「冷水湧」生態系・相模湾初島沖深海シロウリガイ群集. 月刊海洋, 号外8, 180-187
- Masuzawa, T., N. Handa, H. Kitagawa and M. Kusakabe (1992) : Sulfate reduction using methane in sediments beneath a bathyal "cold seep" giant clam community off Hatsushima Island, Sagami Bay, Japan. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **110**, 39-50.
- 門馬大和・溝澤巨彦・海宝由佳・堀田 宏 (1994) : 相模湾初島沖「深海底総合観測ステーション」の設置と長期観測. JAMSTEC 深海研究, **10**, 363-371.
- 長沼 毅 (1995) : 後志海山の堆積物脂肪酸—冷水湧出域との比較. JAMSTEC 深海研究, **11**, 403-410.
- 長沼 毅・藤倉克則・仲 二郎・加藤幸弘・竹内 章 (1996) : 北部奥尻海嶺の海溝割れ目域における堆積物脂肪酸—メタン湧水域および海底火山火口域との比較. JAMSTEC 深海研究, **12**, 83-94.
- 長沼 毅・服部睦男・秋元和實・門馬大和・橋本惇 (1997) : 海底での有機分解による冷水型微生物相の形成—海底比較実験タフノミー (CETUS) へのアプローチ. JAMSTEC 深海研究, **13**, 697-709.
- Naganuma, T., H. Wada and K. Fujioka (1996) : Biological community and sediment fatty acids associated with the deep-sea whale skeleton at the Torishima Seamount. *J. Oceanogr.*, **52**, 1-15.
- Nichols, P. D., G. A. Smith, C. P. Antworth, R. S. Hanson and D. C. White (1985) : Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signature for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 327-335.

- 小川勇二郎・平野 聡 (1997) : 沈み込み境界におけるシロウリガイ類コロニーの定向配列とテクトニクスとの関係—日本海溝, 南海トラフ, 相模湾における例. 第14回しんかいシンポジウム予稿集, 61-62.
- 太田 秀・小島茂明・葉 信明・橋本 惇 (1995) : 遠洲灘の漸深海帯に化学合成生態系を求めて—「しんかい2000」第771潜航報告・JAMSTEC 深海研究, 11, 219-225.
- Parkes, R. J. and A. G. Calder (1985) : The cellular fatty acids of three strains of *Desulfobulbus*, a propionate-utilising sulphate-reducing bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31, 361-363.
- Parkes, R. J. and J. Taylor (1983) : The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 16, 173-189.
- N. ラジェンドラン・芳之内一美 (1997) : 指標性脂質バイオマーカーによる海底堆積物における微生物群集の解析. 月刊海洋, 29, 738-744.
- Rajendran, N., O. Matsuda, N. Imamura, and Y. Urushigawa (1992) : Variation in microbial biomass and community structure in sediments of eutrophic bays determined by phospholipid ester-linked fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 562-571.
- Rajendran, N., O. Matsuda, Y. Urushigawa and U. Shimadu (1994) : Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka Bay, Japan, by phospholipid fatty acid analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 248-257.
- Sasser, M. (1990) : "Tracking" a strain using the microbial identification system. MIDI Technical Note (MIDI, Newark, Delaware), 102, 1-4.
- Taylor, J. and R. J. Parkes (1983) : The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3303-3309.
- Taylor, J. and R. J. Parkes (1985) : Identifying different populations of sulphate-reducing bacteria within marine sediment systems, using fatty acid biomarkers. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 631-642.
- White, D. C., W. M. Davis, J. S. Nickels, J. D. King, and R. J. Bobbie (1979) : Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 40, 51-62.

(原稿受理: 1998年7月10日)