

分子化石による過去の湧水活動の復元 —更新統小柴層と大船層の例—

坪井美里*・中村栄子**・間嶋隆一**・北里 洋***・菅 寿美***・力石嘉人***・加藤和浩****・
 和田秀樹****・大河内直彦***・佐藤蓉子*・浜名徳明*

*横浜国立大学環境情報学府・**横浜国立大学教育人間科学部・***海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域・****静岡大学理学部地球科学科

Reconstruction of ancient cold-seep activities based on biomarkers –A case study of Lower Pleistocene Ofuna and Koshiba Formation, central Japan–

Misato Tsuboi*, Eiko Nakamura**, Ryuichi Majima**, Hiroshi Kitazato***, Hisami Suga***,
 Yoshito Chikaraishi****, Kazuhiro Kato***, Hideki Wada****, Naohiko Ohkouchi**, Yoko Sato*
 and Noriaki Hamana*

*Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, Yokohama 240-8501 (corresponding author: majima@ynu.ac.jp); **Department of Human and Educational Sciences, Yokohama National University, Yokohama 240-8501, *** Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, Yokosuka 237-0061, ****Department of Geosciences, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529

Abstract. We analyzed lipid biomarkers related to AOM (anaerobic oxidation of methane) that happened in the early Pleistocene (1.7–1.4 Ma) cold-seep site, northern part of Miura Peninsula, Pacific side of central Japan. Nineteen samples are obtained from a bedding-normal, 107 m-long core consisting of the Koshiba (sandy mudstone and muddy sandstone, above 23 m in core depth) and the Ofuna (mudstone, below 23 m) Formations. In this core, both the chemoautotrophic bivalves (*Lucinoma*, *Conchocolea*, *Archarax*) and ^{13}C -depleted authigenic carbonates (aragonite, MG-calcite, dolomite) occur abundantly. Four important results of this study are summarized as follows .

- 1) Both archaeal and sulfate reducing bacterial (SRB) biomarkers are recovered in all samples and their ether linkages are well preserved even in 1.7–1.4 Ma sediments.
- 2) High activities of AOM are inferred in 7.1–7.6 m and 14.6 m in core depths where both archaeal and SRB-biomarkers are distinctly concentrated and greatly depleted in ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$ less than -100‰ vs. PDB). Those activities happened probably when marine bottoms were in 6.5–7 m and 13–13.5 m, respectively, where chemoautotrophic bivalves occur abundantly.
- 3) Two samples obtained from the same horizon 14.6 m show an apparent difference in biomarker compositions. This difference may be attributed to a different micro habitats for microbes.
- 4) The occurrences of biomarkers derived from planktonic archaea are inferred from their $\delta^{13}\text{C}$ values and relative abundance of 4 kinds of biphytanes. Planktonic archaeal biomarkers are probably recovered from all samples and their concentration rates may be useful as an index of sedimentation rate.

Key words: biomarker, cold seep, Pleistocene, AOM (Anaerobic Oxidation of Methane), archaea, sulfate reducing bacteria, central Japan

はじめに

プレート収束域の海底には、湧水現象がしばしばみられる。こうした場所では、湧水中に溶存しているメタンや硫化水素を一次エネルギーとする化学合成細菌が著しく多量に生息し (Sibuet and Olu, 1998; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001a など), これらの化学合成細菌と共生するシロウリガイ類やハオリムシ類などの特徴的な従属栄養生物からなる化学合成群集と呼ばれる生態系が成立する (Paull *et al.*, 1984; Kulm *et al.*, 1986; 太田ほ

か, 1987)。湧水に依存する日本近海の化学合成群集は、初島沖 (Okutani and Egawa, 1985; 太田ほか, 1987) で初めて発見されて以来、駿河湾 (Okutani *et al.*, 1993)、南海トラフ、日本海溝 (Ohta and Laubier, 1987) など多くの場所で確認され (Kojima, 2002)、地質時代の群集も日本列島から多数報告されている (Majima *et al.*, 2005)。

地質時代の化学合成群集の認定には、1) 化学合成細菌と共生すると推定される大型無脊椎動物化石の高密度での自生的産出、2) 著しく低い炭素安定同位体比をもつ自生炭酸塩コンクリーションの存在、そして3) 著し

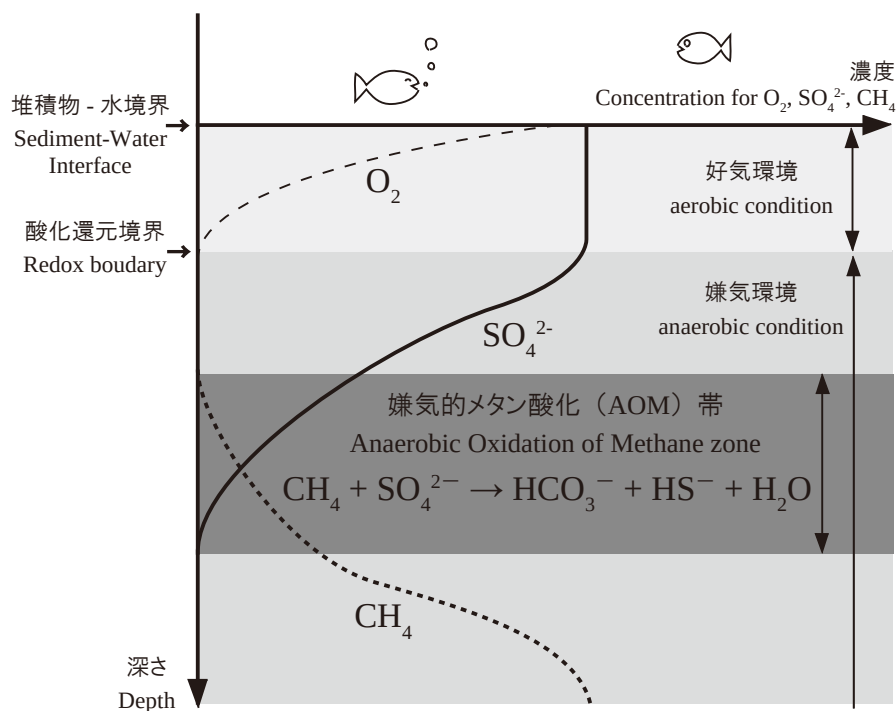


図1. 嫌氣的メタン酸化帯の概念図.

Fig. 1. Schematic diagram of anaerobic oxidation of methane zone.

く低い炭素安定同位体比をもつ古細菌バイオマーカーの存在などが必要である。神奈川県横浜市栄区にある「瀬上市民の森」にはツキガイ類、ハナシガイ類、キヌタレガイ類などの大型二枚貝化石密集層が下部更新統小柴層の陸棚堆積相（水深100～200 m：館・間嶋，1998）を示す露頭から密集して産出する（間嶋ほか，1996；館・間嶋，1998；Kitazaki and Majima, 2003；Majima *et al.*, 2005）。間嶋ほか（1996）と館・間嶋（1998）は，これらの二枚貝は，その現生種が化学合成細菌と共生すること，自生状態で著しく密集し，狭い範囲にレンズ状に産出すること，共産する自生炭酸塩の炭素安定同位対比が ^{13}C に著しく枯渇した値を示すことを明らかにし，この化石群集がメタン湧水に依存した化学合成群集であると結論した。また，Kitazaki and Majima (2003) は，この地域で採取された4本のボーリングコア中の化学合成二枚貝化石と自生炭酸塩の地表面下での分布を明らかにし，メタン湧水が強弱を繰り返しながら，狭い範囲に断続的に起こっていたと推定した。一方，荻原（2005a）は化学合成群集を産出する「瀬上市民の森」の露頭から得た堆積物を分析し，古細菌に由来するバイオマーカーを多数検出した。

本研究は，「瀬上市民の森」の化学合成群集の露頭周辺に新たに掘削した107 mのボーリングコア（コアE）から，層序的に連続した試料中のバイオマーカーを分析することにより，過去の海底湧水場に特徴的な微生物相の垂直分布の復元を行うことを目的とする。なお，本研究

で解析したコアEの岩相，自生炭酸塩，および産出する貝化石の記載は別の論文で詳細に行う予定である。

嫌氣的メタン酸化帯を特徴付けるバイオマーカー

海底下における嫌気環境下では，生物学的あるいは無生物的にメタンが生成する。前者は古細菌に分類されるメタン生成菌（古賀・亀倉，1998）などによる二酸化炭素還元と酢酸発酵に，後者は有機物の熱分解によっている。生成されたメタンは間隙水に溶存または気体として拡散したり，断層などの堆積物中の弱線を通る流体とともに移流し，海底面方向へ移動していく。メタンが硫酸イオンと共存する深度では，以下の式で表される嫌氣的メタン酸化（Anaerobic Oxidation of Methane；AOM）が起きる（例えば，Boetius *et al.*, 2001 など）。



この反応が起こっている深度を嫌氣的メタン酸化帯（AOM帯）と呼ぶ（図1）。以下，嫌氣的メタン酸化はAOMと略して表記する。

AOMは，古細菌である嫌氣的メタン酸化菌（ANAerobic MEthanotrophs；以下ANME）と真生細菌である硫酸還元菌の2種類の微生物によって「触媒」される二つの反応の和である。これらの微生物はコンソーシアムを形成することが知られている（Boetius *et al.*, 2000）。Hinrichs

et al. (1999) は、カリフォルニア沖の冷湧水堆積物の 16S rRNA 系統解析の結果、メタン生成菌である Methanosarcinales 目に近縁の ANME-1 と、Methanosarcinales 目に属する ANME-2 の二つの ANME グループを見出した。それまで AOM は、メタン生成菌がメタンの多い環境下でメタン生成と逆の代謝を行うことで起きていると考えられていた。しかし、この報告により AOM を行う微生物は、メタン生成菌とは別のグループであることが明らかにされた。その後の研究によって、ANME-1 と ANME-2 はその系統的な隔たりだけではなく、硫酸還元菌と形成するコンソーシアムの形状や、生息環境にも差があることが分ってきた (Orphan *et al.*, 2002; Blumenberg *et al.*, 2004; Elvert *et al.*, 2005)。例えば、ANME-1 は、ANME-2 よりも低いメタン濃度環境で、また広い温度範囲で生息できると推定されている (Blumenberg *et al.*, 2004; Elvert *et al.*, 2005)。また、ANME-1 は ANME-2 よりも堆積物深部に生息することが分かっており、ANME-1 の方がより嫌気的な環境に生息していると考えられている (Knittel *et al.*, 2005)。

AOM は、海底下から地球表層環境へもたらされるメタンの約 90 % を消費していると推定され (森井・古賀, 1998)、二酸化炭素に比較して短期的には約 60 倍、長期的には約 20 倍の温室効果 (Kennett *et al.*, 2003) を持つ大気中のメタン濃度を抑制する重要な反応であることが知られている (Reeburgh *et al.*, 1993)。AOM の結果、炭酸水素イオン (HCO_3^-) が生成されるため間隙水中のアルカリ度が上昇し、炭酸塩が沈殿する。この炭酸塩を構成する炭素は、その大部分がメタン由来であるため、メタンに特徴的な ^{13}C に乏しい炭素安定同位体比、すなわち δ 値の低い炭素安定同位体比を示す。

なお、メタンを酸化するプロセスとして、AOM 以外にも好氣的メタン酸化があるが、関与する微生物は真正細菌である (古賀・亀倉, 1998)。

ANME が合成する膜脂質

ANME は、古細菌に属し (Woese and Fox, 1977)、古細菌にはメタン生成菌、好熱菌、好塩菌など、特殊な生物地球化学プロセスを触媒するものが多く含まれている (古賀・亀倉, 1998)。

古細菌の細胞膜脂質の構造は、真正細菌や真核生物の細胞膜脂質と以下の 3 点において異なる (Langworthy *et al.*, 1982, 1985; DeRosa *et al.*, 1988, 1991; Woese *et al.*, 1990; Koga *et al.*, 1998)。1) グリセロール (図 2 の a) と炭化水素鎖の結合はエーテル結合 (図 2 の b) であり、真正細菌や真核生物で一般的であるエステル結合は存在しない。2) 炭化水素鎖はイソプレノイド炭化水素 (図 2 の g-n) である。3) 炭化水素鎖はグリセロールの *sn*-2, *sn*-3 位に結合する (図 2 の a: 西原・古賀, 1998)。個々の特徴にはいくつかの例外が見出されているものの、こ

れら三つの特徴を全て持つジエーテル脂質 (図 2 の a-d) は、現時点で古細菌以外からは見出されていない。また、一部の古細菌はジエーテル脂質が二分子向き合って結合したテトラエーテル脂質 (図 2 の e, f) を合成する。これらのテトラエーテル脂質も古細菌だけに見られる脂質である (Koga *et al.*, 1993)。古細菌が合成するジエーテル脂質とテトラエーテル脂質の多くは、微生物の死後、堆積物中で続成作用により分解されて、イソプレノイド炭化水素 (図 2 の g-n) として存在していると考えられる。

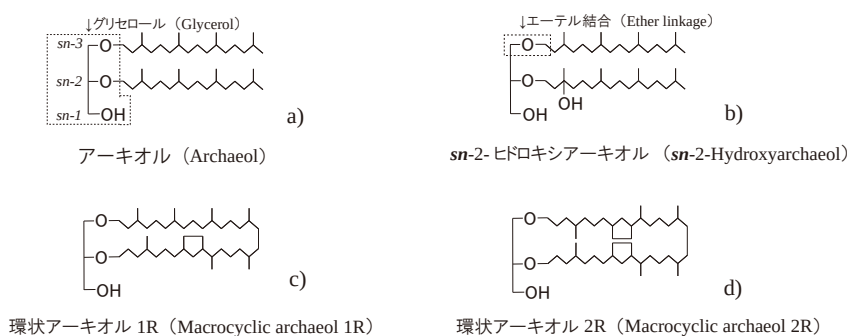
メタン生成菌によって生成されたメタンの炭素安定同位体比は、生物学的な同位体分別により非常に低い値 ($-110 \sim -40 \text{ ‰}$) を示す (Schoell, 1988)。ANME はメタン由来の炭素を生合成に用いることから、その細胞膜脂質は炭素安定同位体比によって他の古細菌由来の膜脂質と区別することが可能である。

ANME-1 は *sn*-2-ヒドロキシアークイオール (図 2 の b) よりもアークイオール (図 2 の a) を、ANME-2 はアークイオールより *sn*-2-ヒドロキシアークイオールを多く合成し (Blumenberg *et al.*, 2004)、クロセタン (図 2 の g) は ANME-2 だけが合成する (Niemann and Elvert, 2008) など合成する脂質が両者で異なる (Niemann and Elvert, 2008)。また、テトラエーテル脂質は ANME-1 と一部の ANME-2 が合成するが、基本的には ANME-1 の指標とされている (Niemann and Elvert, 2008)。

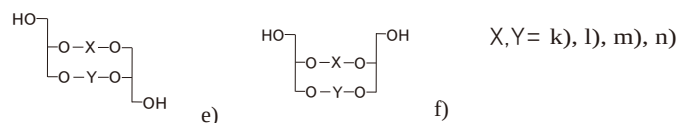
硫酸還元菌が合成する膜脂質

ジエーテル脂質やテトラエーテル脂質は、古細菌に特有のバイオマーカーとしてこれまで広く利用されてきた。しかし最近になり、一部の原始的な真正細菌もエーテル結合を持つ脂質を合成することが報告されている (Langworthy *et al.*, 1983; Sturt *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 1992, 1996; Sinninghe Damsté *et al.*, 2005)。真正細菌が合成するジエーテル脂質は非イソプレノイド型ジエーテル脂質 (以下 DAGE: Non-isoprenoidal DiAlkyl Glycerol diEther) と呼ばれ、直鎖の炭素鎖がグリセロールの *sn*-1, *sn*-2 位にエーテル結合しているという特徴を持つ (図 2 の o-s)。DAGE は多くの現世冷湧水環境から古細菌のバイオマーカーと共に見つかった (Sinninghe Damsté *et al.*, 2000; Jahnke *et al.*, 2001)。DAGE は、その炭素安定同位体比が非常に低いことからメタン由来の炭素を用いて合成されたと考えられている。しかし DAGE は ANME のバイオマーカーより炭素安定同位体比が $10 \sim 40 \text{ ‰}$ ほど高い値をとる場合がある (Pancost *et al.*, 2001a) こと、炭化水素鎖がイソプレノイド型ではないこと、古細菌のエーテル脂質とは異なった特徴を持つことなどから、ANME とは異なった生物が合成したと考えないと説明がつかない。ANME を除くと、AOM 帯でメタン由来の炭素を用いて生合成すると考えられるのは、ANME とコン

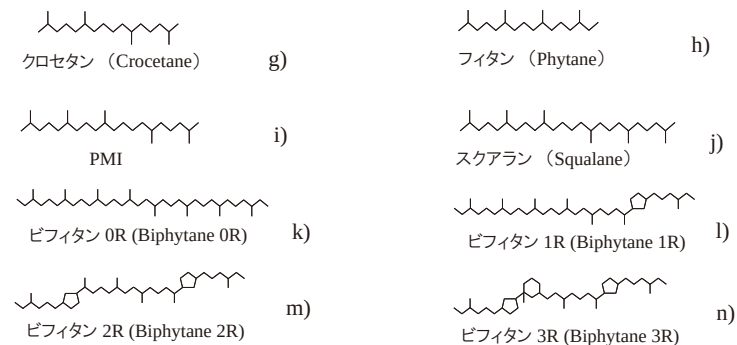
●イソプレノイド型ジエーテル脂質 (Isoprenoidal dialkyl glycerol diether)



●テトラエーテル脂質 (Glycerol dialkyl glycerol tetraether)



●イソプレノイド炭化水素 (Isoprenoidal hydrocarbon)



●非イソプレノイド型ジエーテル脂質 (Non-isoprenoidal dialkyl glycerol diether: DAGE)

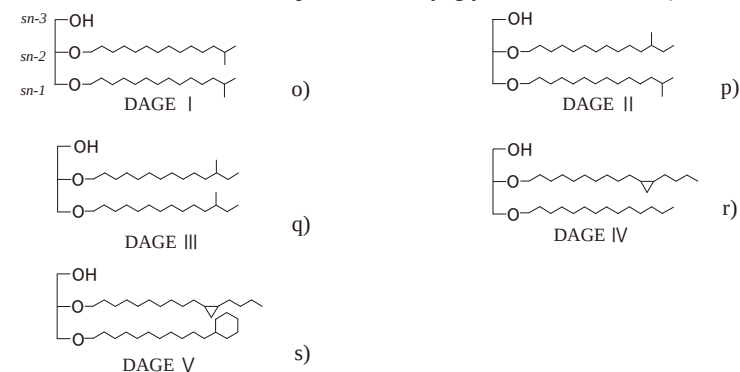


図2. 古細菌および硫酸還元菌由来の脂質.

Fig. 2. Lipid biomarkers of archaea and sulfate reducing bacteria.

ソーシアムを形成する硫酸還元菌だけである。ANMEとコンソーシアムを形成する硫酸還元菌は、蛍光標識をした微生物の顕微鏡観察によって *Desulfosarcina/Desulfococcus* グループであることが分かっている (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001b)。これらのことから DAGE は、AOM に関わる硫酸還元菌である *Desulfosarcina/Desulfococcus* グループ由来の脂質だと推定されている (例えば, Hinrichs

et al., 2000; Pancost *et al.*, 2001a)。しかし、DAGE が培養実験で見出されたのは好熱菌だけであり (Blumenberg *et al.*, 2004)、硫酸還元菌 *Desulfosarcina/Desulfococcus* グループからは今のところ見出されていない (Boetius *et al.*, 2001)。以上の問題はあが、DAGE は *Desulfosarcina/Desulfococcus* グループ由来の脂質という推定に基づいて以下の議論を進める。

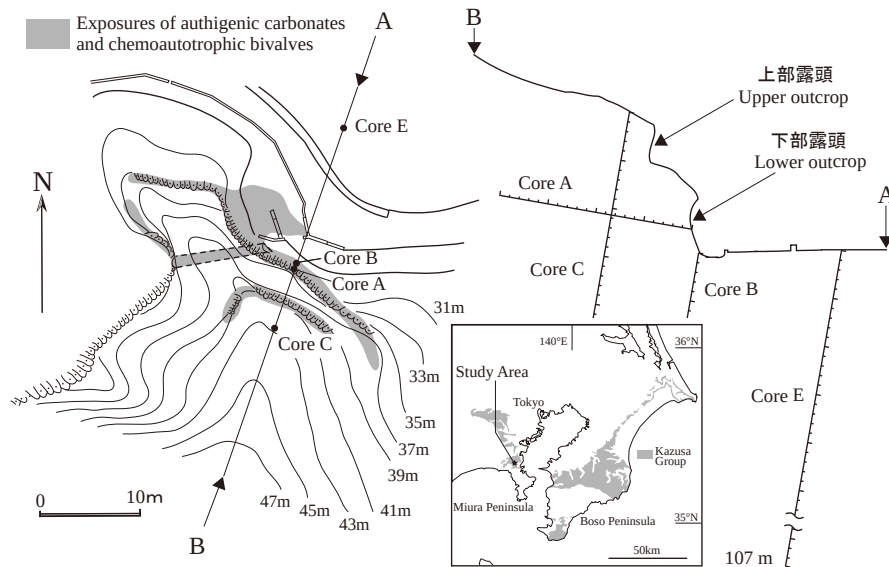


図3.「瀬上市民の森」(横浜市)に露出する化学合成化石群集産出地の地形図と断面図(コアA, B, CについてはKitazaki and Majima, 2003を参照)。

Fig. 3. Topographic map and section of lower Pleistocene cold seep site at "Segami Citizen Forests", Yokohama City. See Kitazaki and Majima (2003) for cores A, B and C.

試料と分析法

地質概要と試料

研究対象地域の「瀬上市民の森」には、下部更新世の前弧海盆堆積物である上総層群大船層(主に泥岩層)と、それを整合に覆う小柴層(主に砂質泥岩層、泥質砂岩層、砂岩層)が走向N57°E-89°W、傾斜8°-23°Nで露出する。化学合成化石群集が露頭で確認された小柴層下部の古水深は100~200m、ボーリング調査で化学合成化石群集の存在が確認された大船層上部の古水深は200~300mと推定されている(館・間嶋, 1998)。

化学合成化石群集を産出する露頭は上部露頭と下部露頭に分かれ(図3)、上部露頭は高さ3m、幅6m、下部露頭は高さ4.5m、幅9mからなり、レンズ状に密集した貝化石と自生炭酸塩が産出する(館・間嶋, 1998)。露頭から得たボーリングコア(図3のコアA~C)は、化学合成二枚貝化石密集部と顕著に発達した自生炭酸塩を共産する層が、コア中に複数回繰り返すことを示し、この事実から湧水活動は長期にわたって消長を繰り返していたと推定される(Kitazaki and Majima, 2003)。

本研究には、下部露頭から北北東に14m離れた場所から層理面に垂直に107m掘削されたコアEの試料を用いた(図3, 4)。コアEは、湧水中心部(図3の上部露頭、下部露頭、およびコアB, Cを含んだ部分)で確認された活発な湧水活動を示唆する貝化石密集部と化石群集産出露頭周辺で追跡される凝灰岩鍵層(SKT-1~SKT-20: Kitazaki and Majima, 2003)との層位関係を調べることを目的とし、湧水の縁辺部と推定された場所で新たに掘

削された試料である。岩相観察の結果、貝化石密集部と凝灰岩鍵層(図4のSKT-1, 2, 7, 11)の両方をコアEの試料中に確認することができた。コアEの堆積物は上総層群大船層(コア深度23m以深)と小柴層(深度23m以浅)で構成され(図4)、藤岡ほか(2003)による露頭調査で決定されたナノ化石基準面とコア中の凝灰岩鍵層との対比から、約175~160万年前の地層であると推定される。図4には、コアEの40m以浅だけを示した。40m以深のコアは大船層の泥岩ないし砂質泥岩からなり、コア深度105m付近に藤岡ほか(2003)のSg3凝灰岩層が確認できた。

化学合成群集を構成する大型二枚貝化石は、化学合成細菌と共生するツキガイ類、ハナシガイ類、キヌタレガイ類からなり、コア中の産出数は深度50cmごとに、合併、合併か離弁か不明、離弁(2殻で一つと数えた)、破片に分けて数を数えた(図4)。貝化石は深度6.5~13.5m層準で多産し、特に6.5~7m層準に大きなピークが認められた(図4)。深度13~13.5mの貝化石は完全に溶解し、殻の一部が自生炭酸塩(dolomite)によって置き換えられたり、失われた殻の空洞が周囲の堆積物によって押し潰されたりしていた。その結果、ある程度外形が識別できた大型の合併二枚貝の存在は確認できたものの、離弁や破片からなる貝化石の存在は確認が困難であった。したがって、この層準の貝化石の個数は、もっと多かった可能性がある。自生炭酸塩は深度1~15mで断続的に分布し、貝化石を伴う層準と、伴わない層準があった(図4)。以下で議論するように、本研究では、AOMに関わる古細菌バイオマーカーの顕著な濃集はコア深度6.5~

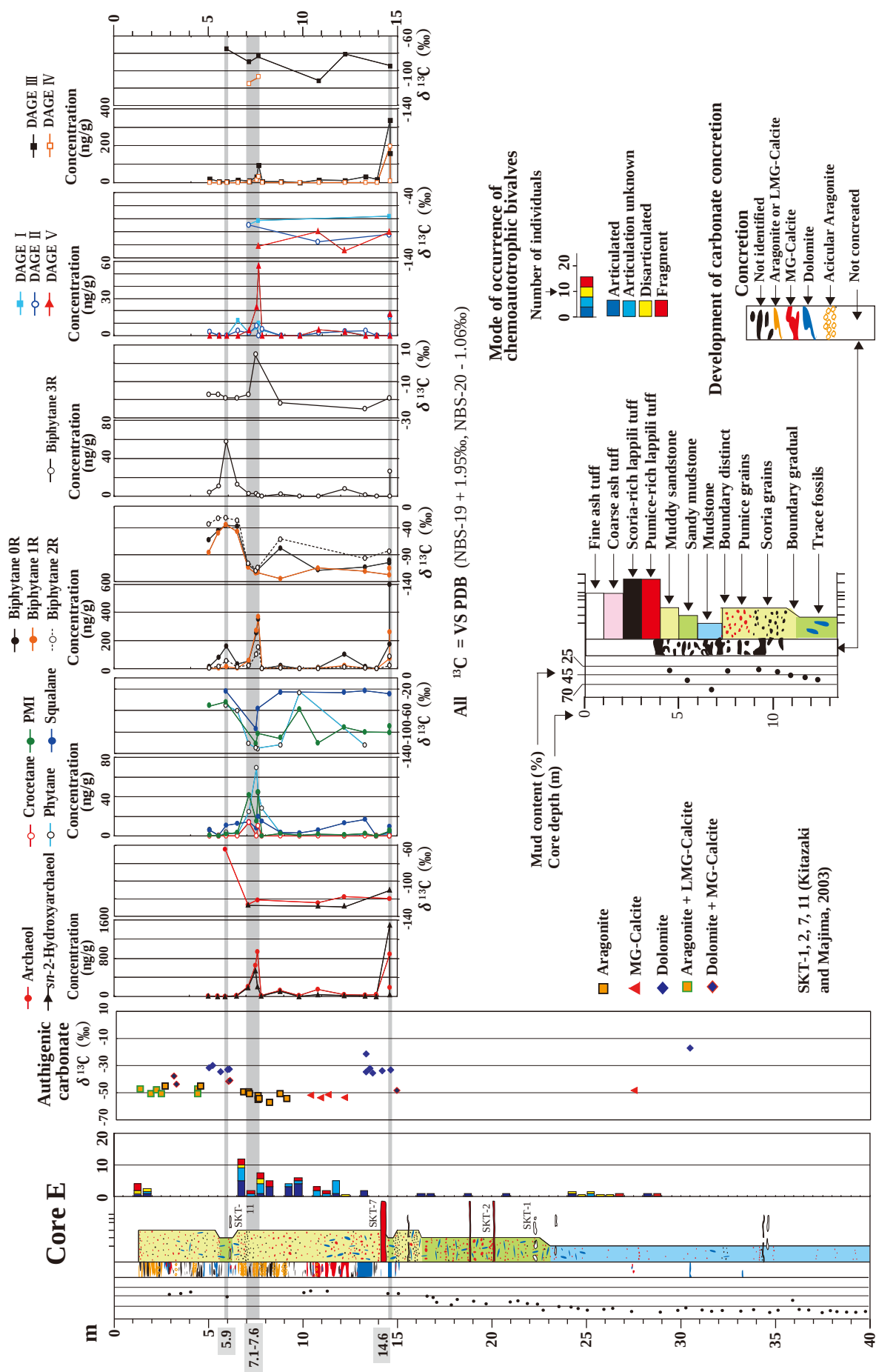


図4. コアEの岩相, および化学合成二枚貝, 自生炭酸塩 (鉱物組成と炭素安定同位体比), 古細菌と硫酸還元菌 (脂質濃度と炭素安定同位体比) の分布.

Fig. 4. Along with core E, lithology and distributions of chemoautotrophic bivalves, authigenic carbonates (mineral compositions and their $\delta^{13}\text{C}$), and lipid biomarkers (concentrations and their $\delta^{13}\text{C}$) of archaea and sulfate reducing bacteria.

表 1. コア E 各試料のバイオマーカー濃度とその炭素安定同位体比.
Table 1. Concentration and carbon stable isotope ratio of biomarkers in each sample of core E.

Depth m	Develop- ment of authigenic carbonate concretion	Archaeol		sn-2- Hydroxyarchaeol		Macrocylic archaeol 1R		Macrocylic archaeol 2R		Crocetane		Phytane		PMI		Squalane	
		Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰
5	little	12.7		6.6		n.d.		n.d.		n.d.		6.2		6.2		6.0	
5.5	little	5.7		4.5		n.d.		n.d.		n.d.		0.2		0.2		0.1	
5.9	little	2.9	-64	2.2		n.d.		n.d.		n.d.		1.1		1.1		3.5	
6.5	moderate	20.6		14.0		n.d.		n.d.		n.d.		0.3		0.3		12.7	
7.1	moderate	206.6	-127	185.0	-127	n.d.		n.d.		13.5		n.d.		n.d.		14.4	
7.5	moderate	647.3		544.3		n.d.		n.d.		n.d.		69.5		12.2		7.5	
7.6	weak	936.8	-122	210.7		n.d.		n.d.		10.0		43.9		16.8		20	
7.8	moderate	22.5		8.5		n.d.		n.d.		n.d.		28.3		n.d.		15	
8.8	weak	130.9		104.1		n.d.		n.d.		n.d.		2.7		2.2		2.4	
9.8	weak	16.5		1.6		n.d.		n.d.		n.d.		0.4		tr		1.4	
10.8	weak	149.6	-125	35.5	-128	n.d.		n.d.		n.d.		0.4		1.5		2.1	
12.2	weak	43.1	-118	22.9	-128	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		0.9		13.0	
13.3	well	29.2		10.6		n.d.		n.d.		n.d.		1.7		1.7		9.0	
13.9	well	38.2		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
14.6①	massive	886.1		1488.2		n.d.		n.d.		n.d.		1.9		n.d.		3.7	
14.6②	massive	185.9	-120	42.9	-110	83.0	-124	31.9	-134	n.d.		n.d.		6.1		9.8	
60.2	weak	1.5		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		0.2		18.1	
61.3	little	41.2		5.2		n.d.		n.d.		n.d.		3.1		1.0		23.6	
62.5	weak	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		0.6		1.3	
78.8	little	22.7		3.6		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		9.1	

Depth m	Develop- ment of authigenic carbonate concretion	Biphytane OR		Biphytane 1R		Biphytane 2R		Biphytane 3R		DAGE I		DAGE II		DAGE III		DAGE IV		DAGE V	
		Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Concen- tration ng/g	$\delta^{13}\text{C}$ ‰
5	little	13.5	-63	2.0	-86	3.9	-33	4.0	-17	3.1		2.9		19.2		n.d.		n.d.	
5.5	little	80.1	-45	5.3	-50	13.8	-23	10.5	-17	tr		tr		7.3		n.d.		n.d.	
5.9	little	159.5	-35	14.1	-34	54.4	-22	57.3	-19	n.d.		n.d.		5.5		n.d.		n.d.	
6.5	moderate	33.1	-37	2.8	-47	11.3	-26	12.2	-19	12.4		4.1		15.8		n.d.		n.d.	
7.1	moderate	54.9	-110	56.5	-114	22.2	-107	2.8	-17	2.4		2.0		9.2		2.2		4.4	
7.5	moderate	254.0	-120	271.1	-124	101.6	-120	2.8	5	6.5		7.8		33.6		13.9		23.2	
7.6	weak	351.7	-119	367.2	-123	152.7	-115	0.8		10.2		n.d.		95.5		33.4		56.3	
7.8	moderate	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		4.3		5.4		4.5		n.d.		n.d.	
8.8	weak	23.0	-78	7.2	-135	4.7	-62	2.3	-22	tr		tr		6.4		n.d.		n.d.	
9.8	weak	1.5		tr		tr		tr		tr		tr		tr		n.d.		n.d.	
10.8	well	7.0	-118	2.3	-116	0.9		tr		2.3		2.2		14.8		n.d.		4.9	
12.2	weak	99.8		20.5		11.7		7.8		3.3		3.3		13.1		n.d.		3.2	
13.3	well	15.2	-114	3.2	-121	2.2	-97	1.2	-25	n.d.		3.8		33.3		n.d.		n.d.	
13.9	well	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		16.5		n.d.		n.d.	
14.6①	massive	172.8	-106	71.2	-128	19.9		n.d.		n.d.		15.7		337.0		196.6		n.d.	
14.6②	massive	596.6	-101	260.1	-116	85.3	-84	26.4	-19	13.8		15.7		157.5		9.0		17.7	
60.2	weak	219.5		56.8		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		1.1		n.d.		n.d.	
61.3	little	26.2	-63	4.5	-87	7.7	-35	6.6	-22	12.6		6.8		18.7		n.d.		n.d.	
62.5	weak	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
78.8	little	298.3		40.9		67.8		57.8		12.2		13.1		15.2		n.d.		n.d.	

All $\delta^{13}\text{C}$ = VS PDB

*: value with ether cleavage treatment.

n.d.: not detected

tr: trace amount, (over the detection limits but below the quantification limits)

blank space: not measured.

bold face: data plotted on Fig.4.

7mとコア深度13～13.5mの貝化石が生息していた時代に起こったと推定した。これらの層準は、Kitazaki and Majima (2003) のコアBのコア深度2～3mとコアCの14～15m, およびコアBの8～9mとコアCの19～20mの層準にそれぞれ相当する。コアBとCのこれらの層準には貝化石が多産し、自生炭酸塩も顕著に発達する。

バイオマーカー解析用の試料は、貝化石と自生炭酸塩がある程度連続的に産出するコア深度5～15mで15試料、60～80mで4試料の合計19試料を採取した(表1)。なお、コア深度14.6mでは、14.55～14.65mの自生炭酸塩発達部分内の異なる2箇所から試料を採取した。これらは14.6m①、14.6m②と区別して表記する(表1)。

以下の議論でコアの深度を表記する時は「コア深度」は省略し直接mだけを記す。

分子化石(バイオマーカー)の分析法

粉末化した試料約20gをはかりとり、ジクロロメタン/メタノール(7:3, v/v)を100ml加え、15分間超音波装置を用いて試料中の有機物を溶媒に抽出した。抽出液をガラスフィルターで濾過し、ロータリーエバポレーターによって抽出物を濃縮した。その後全抽出物に0.5M KOH溶液(メタノール/水=95:5, v/v)を加えてケン化した(80℃, 2時間)。そこから*n*-ヘキサンに脂質を抽出し、これを中性画分とした。得られた中性画分は、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、ケトン・アルデヒド画分、アルコール画分、極性画分に分画した(Ohkouchi *et al.*, 2005)。アルコール画分は、*N*, *O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド溶液を加え、トリメチルシリル化した。その後、それぞれの画分に含まれる化合物の同定・定量と、化合物ごとの炭素安定同位体比測定を行った。

一方、テトラエーテル脂質由来の脂質化合物について分析を行うため、ほぼ同量の試料を別に用意した。テトラエーテル脂質は分子量が大きいため、上記の方法では分析することができない。そこでエーテル結合開裂処理を行い、テトラエーテル脂質から得られるビフィタン(図2のk-n)の定量を行った。上記の方法で得た中性画分に56wt%ヨウ化水素溶液を加え、110℃で4時間還流し、エーテル結合を開裂してヨウ化アルキルの形にした。これを*n*-ヘキサンに抽出した後、窒素雰囲気下で乾固させた。脱水済のテトラヒドロフランと水素化リチウムアルミニウムを加え、70℃で2時間還流し、ヨウ化アルキルを水素置換した。酢酸エチルを加えて水素化リチウムアルミニウムを失活させた後、脂質をジクロロメタン/*n*-ヘキサン=1:1, (v/v)に抽出した。上記と同様にシリカゲル・カラムクロマトグラフィーにより分画し、得られた炭化水素画分について化合物の同定・定量と化合物ごとの炭素安定同位体比測定を行った。開裂操作後の試料から新たに得られたビフィタン以外のイソプレノイド

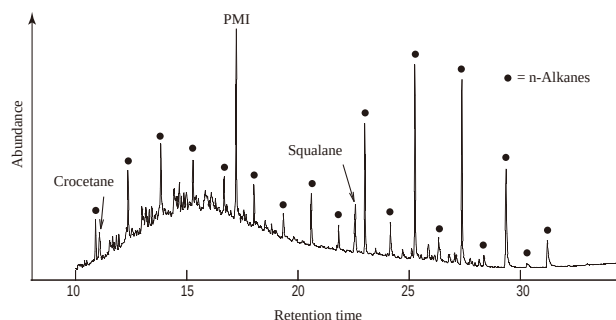


図5. コアE 7.5m試料のバイオマーカー濃度。

Fig. 5. Concentration of biomarkers in core depth 7.5 m of core E.

炭化水素も同定・定量した。

化合物の同定および定量には、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS; Agilent 6890N/Agilent 5973)を用いた。分離カラムは溶融石英キャピラリーカラム(HP-1ms, 30m × 0.25 mm i.d.; 膜厚0.25 μm; SHIMADZU)を用いた。オーブンの昇温プログラムは、40℃から120℃までは30℃ min⁻¹, 120℃から320℃までは6℃ min⁻¹, 320℃で20分間保持とした。キャリアーガスはヘリウムを用いた。電子イオン化電圧は70 eVとし、スキャン範囲は*m/z* 40～800, サイクルタイムは1秒間である。化合物の定量は、Aldrich社製のC₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₈, C₃₀のalkane標準液を用いて調製したアルカン混合標準液(ヘキサン1 μl当りそれぞれのアルカン20 ngを含む)を試料測定前に測定し、それらの化合物のクロマトグラムの積分値と、目的化合物のクロマトグラムの積分値との比から行った。GC/MSによる定量の誤差は通常10%程度である。また、GC/MSでのブランク回収実験では、測定の対象物質が検出されることはなかった。

化合物の同定は、以下に示す論文のマススペクトルのデータとの対比によって行った。フィタン(図2のh)とクロセタン(図2のg)はElvert *et al.* (2000)と荻原・芦(2003), PMI (PentaMethylIcosane; 図2のi)はElvert *et al.* (1999), ビフィタン0R(図2のk)は荻原(2004), ビフィタン1R(図2のl), ビフィタン2R(図2のm), ビフィタン3R(図2のn)はSchouten *et al.* (1998), アーキオールはTeixidor *et al.* (1993), *sn*-2-ヒドロキシアーキオールはHinrichs *et al.* (1999, 2000), 環状アーキオール1R, 環状アーキオール2RはStadnitskaia *et al.* (2003), DAGE III, DAGE IV, DAGE VはPancost *et al.* (2001a)を参考に同定した。クロマトグラムの一例として、7.5mの炭化水素画分を図5に示す。

各化合物の炭素安定同位体比の測定は、ガスクロマトグラフ/燃焼/同位体質量分析計(GC/C/IRMS; Agilent 6890N/COMBUSTION III/ThermoFinnigan DELTA plus XP)を用いて行った。分離カラムは溶融石英キャピラ

リーカラム (HP-1HT, 30 m × 0.32 mm i.d.; 膜厚 0.10 μm; Agilent) を用い、オープン昇温プログラムは GC/MS と同じ条件とした。アルコール画分の炭素同位体比測定は、無水酢酸とピリジンを用いてアセチル化をした後に行い、アセチル化反応にともなう起きる炭素同位体分別は、Chikaraishi *et al.* (2004) にしたがって補正した。測定値は PDB を標準物質とする δ 値で表し、質量分析計のリファレンスガスの PDB 校正は、NIST 標準物質 NBS-19 (δ¹³C 値 + 1.95 ‰ で補正) で行った。直鎖アルカンの繰り返し測定の誤差は、通常 0.3 ‰ 以内である。

得られたバイオマーカー濃度と、その炭素安定同位体比を表 1 に示し、図 4 に 5 m から 14.6 m の測定結果をプロットした。濃度は乾燥試料 1 g あたりのバイオマーカーの含有量で表した。開裂処理前後の二つのデータがあるクロセタン (図 2 の g), フィタン (図 2 の h), PMI (図 2 の i), スクアラン (図 2 の j) については、表 1 に両方の値を記した。図 4 の濃度には開裂処理前後の二つのデータのうち大きい値をプロットし、炭素安定同位体比は、濃度としてプロットした試料の値を使用した。図 4 で使用した値は、表 1 に太字で表記して区別した。二種類の試料 (表 1: 14.6 m ①, 14.6 m ②) のある 14.6 m については、図 4 に両方の値をプロットしてある。

本来エーテル結合開裂処理後の試料のイソプレノイド炭化水素濃度は、開裂処理前の脂質に開裂処理後の新たな脂質が加わるため、開裂処理前に比較して濃度が高くなることが期待されるが、必ずしも高くなっていない。この理由として、開裂操作が多段階の処理で行われるという分析の性質上、分析過程での試料の多少の損失は避けられず、最終的に回収できる脂質が少なくなってしまうことが原因の一つと考えられる。

自生炭酸塩の安定同位体比の測定

図 4 に自生炭酸塩の X 線粉末回折 (XRD) による同定結果と炭素安定同位体比を示す。採取した自生炭酸塩は、粉末にして静岡大学あるいは横浜国立大学の (株) リガク製 LINT2000 XRD を用いて同定し、同定した粉末の一部を炭素安定同位体比測定試料とした。δ¹³C 値は、PDB 標準に対する偏差の千分率で表示した。6.8 ~ 12.10 m の Aragonite と MG-calcite は、海洋研究開発機構の VG SIRA10 質量分析計を用い 90 °C のリン酸で反応させて測定を行った。VG SIRA10 質量分析計のリファレンスガスの PDB 校正は、NIST 標準物質 NBS-19 (δ¹³C 値 + 1.95 ‰ で補正) を、試料測定と同じ 90 °C で反応させた炭酸ガスで行った。1.33 ~ 4.50 m の Aragonite と LMG-Calcite が混合した試料は静岡大学 MAT251 質量分析計で 60 °C のリン酸で反応させて測定した。3.06 ~ 6.32 m, 13.15 ~ 14.88 m, および 30.43 m の Dolomite および Dolomite と MG-Calcite が混合した試料は静岡大学 MAT251 質量分析計で 100 °C のリン酸で反応させて測定した。MAT251 質量分析計の

リファレンスガスの PDB 校正は、NIST 標準物質 NBS-20 (δ¹³C 値 - 1.06 ‰ で補正) を、60 °C で反応させた炭酸ガスで行った。標準試料で繰り返し測定を行った δ¹³C 値の標準偏差は、どちらの装置も ± 0.05 ‰ 以内である。コア 5 m 以下で XRD により同定された Aragonite と LMG-calcite 混在部について硝酸コバルトによる染色法により鉱物を同定したところ、1 回のステージで沈殿したと考えられる針状結晶が Aragonite と LMG-calcite の両方からなることが確認された。このことから、この深度の LMG-calcite は、地表近くの風化による Aragonite の変質によって生成したと考えられる。

結果

古細菌のバイオマーカー

分析した 19 層準すべてから古細菌のバイオマーカーが見出された (表 1, 図 4)。ジエーテル脂質が見出されることや、テトラエーテル脂質のエーテル結合を開裂するとビフィタン (図 2 の k-n) が得られることは、多くのエーテル結合が堆積物中で過去 140 万年間以上にわたって分解されずに保存されていることを示している。これらの古細菌バイオマーカーの炭素安定同位体比は、一般的な海洋における光合成生態系に属する生物の有機物が示す - 20 ‰ 前後の値から、メタンの影響を強く受けたと考えられる - 135 ‰ まで幅広く分布した。以下に、その詳細について述べる。

イソプレノイド型ジエーテル脂質

すべての古細菌が合成し、特にメタン生成菌が多く合成するアーキオール (Tornabene and Langworthy, 1979; Koga *et al.*, 1998: 図 2 の a) は、62.5 m を除く計 18 層準から見出された。特に 7.5 m, 7.6 m, 14.6 m で 500 ng/g 以上 (最大 936.8 ng/g: 7.6 m) の著しく高い濃集を示した (図 4)。アーキオールの炭素安定同位体比は、7.1 m, 7.6 m, 10.8 m, 12.2 m, 14.6 m の 4 層準で - 110 ‰ 以下の低い値を示したことから、これらの層準に存在していた古細菌のほぼすべてが ANME 由来であることを示唆している。しかし 5.9 m ではアーキオールの炭素安定同位体比は - 64 ‰ で、ANME 以外の古細菌が合成したアーキオールがかなりの量で混在している可能性がある。

sn-2-ヒドロキシアーキオール (図 2 の b) は、計 16 層準から見出された。これまでの研究によると *sn*-2-ヒドロキシアーキオールは、古細菌の中でもメタン生成菌の Methanosarcinales 目と Methanococcales 目から最もよく見出されることが知られている (Boone *et al.*, 1993; Koga *et al.*, 1998)。*sn*-2-ヒドロキシアーキオールとアーキオールの濃度は、極めて調和的に変動し、14.6 m ①を除く 16 層準でアーキオールが卓越していた。

14.6 m ②の試料だけから、アーキオールのイソプレノイ

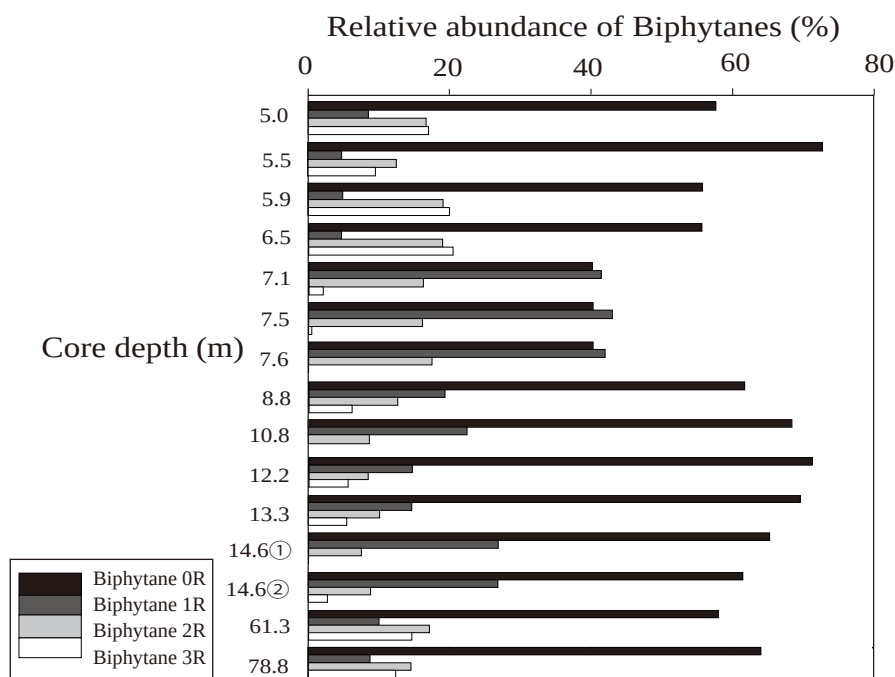


図6. コアE各試料の4種のビフィタンの相対的産出頻度。

Fig. 6. Relative abundance of 4 kinds of biphytanes for each sample of core E.

ド鎖が先端で架橋した構造をもつ2種類の環状アーキオール類、すなわち内部に一つの五員環を持つアーキオール1R (図2のc) と二つの五員環を持つ環状アーキオール2R (図2のd) が見出された (表1)。これら環状アーキオール1Rと2Rはこれまでに培養された古細菌からは見出されていないが、黒海の炭酸塩堆積物中から見出されており、それらの炭素安定同位体比は同時に見出された他の古細菌バイオマーカーと同程度に低かったことから、ANME由来の脂質であると推定されている (Stadnitskaia *et al.*, 2003)。14.6m②の環状アーキオール1Rと2Rの炭素安定同位体比は、 -124‰ と -134‰ と低い値を示した。

イソプレノイド炭化水素

PMI (図2のi) はこれまで、好熱性メタン生成菌以外に、中温性メタン生成菌である *Methanosarcina barkeri* (Holzer *et al.*, 1979; Risatti *et al.*, 1984) や海洋性メタン生成菌 *Methanobrevibacter smithii* などから見出されている (Schouten *et al.*, 1997)。さらに、メタン湧水付近の堆積物からしばしば見出され、その炭素安定同位体比も低いためにANMEもPMIを合成していると考えられてきた (Brassell *et al.*, 1981; Bian, 1994; Elvert *et al.*, 1999)。表1で示したように、PMIはコアEの17層準から見出され、その濃度は5.0~6.5mで低く、7.1~7.6mで著しく高い。一方、炭素安定同位体比は5.0~6.5mで比較的高く (-51‰ ~ -46‰)、7.1~7.6mで著しく低くなる (-128‰ ~ -103‰) (図4)。それより下位の層準では、9.8mで -58‰ の比較的高い炭素安定同位体比を示す以外、濃度

は低い炭素安定同位体比はメタンの影響を示す低い値であった。

クロセタン (図2のg) は陸性のメタン生成古細菌である *Methanosphaera* の培養株からの報告が一例あるだけであるが (荻原, 2005b), 冷湧水環境で他の古細菌バイオマーカーと共に見出されること、炭素安定同位体比が極端に低い値をもつことから、ANME由来の脂質だと推定されてきた (Elvert *et al.*, 1999; Bian *et al.*, 2001)。コアEでクロセタンは7.1m、7.6mの2層準だけから見出された (図4)。開裂操作後の試料 (表1) からクロセタンが全く検出されなかった原因として、既に述べたように開裂操作の過程で失われ、回収されなかった可能性が考えられる。

フィタン (図2のh) は、アーキオールのイソプレノイド部分に由来する他、光合成生物の持つクロロフィルの側鎖からも得られる。コアEでは、15層準からフィタンが見出された。その濃度は、他の古細菌バイオマーカーの濃度が急激に高くなる7.1~7.6mで同様に高くなり、その炭素安定同位体比は -122‰ 以下の値を示したことから、この層準で検出されたフィタンのほとんどはANMEに由来すると考えられる。5.9mと6.5mではその炭素安定同位体比は -50‰ 以下になり、メタンの影響を受けた値を示したが、5.0mでは、 -37‰ という光合成生物由来の脂質の炭素安定同位体比に近い値を示しており、そのほとんどがANME以外からもたらされたと考えられる。

スクアラン (図2のj) は、古細菌に由来する他、古細菌以外の生物によって合成されたスクアレンが、続成作

用により二重結合が還元されることによって生成する。コア E からは 18 層準で見出され、いずれも 50 ng/g 以下の含有量であった (表 1, 図 4)。7.1 m, 7.5 m, 7.6 m の 3 層準では、スクアランの炭素安定同位体比は $-94 \sim -57 \text{ ‰}$ を示した。これらの値は、光合成由来のもの (約 -20 ‰) と ANME 由来のもの (最も軽い -97 ‰ から判断して -100 ‰ 以下?) が混合し、それらの半分程度以上が ANME 由来と考えると説明が可能である。それ以外の層準のスクアランの炭素安定同位体比は、10.8 m (-64 ‰) を除いて、光合成生物由来の脂質が示す -20 ‰ に近い値 ($-36 \sim -21 \text{ ‰}$) を示したことから、そのほとんどが ANME 以外からもたらされたと考えられる。

ビフィタン (図 2 の k-n) は、テトラエーテル脂質のエーテル結合を開裂して得られ、計 16 層準から見出された。ほとんどの層準で、環構造をもたないビフィタン 0R、一つの環構造を持つビフィタン 1R、二つの環構造を持つビフィタン 2R、三つの環構造を持つビフィタン 3R の 4 種のビフィタンが見出された。その濃度はコア深度 5.9 m, 7.5 m, 7.6 m, 12.2 m, 14.6 m の 5 層準で顕著に増加した (図 4)。4 種のビフィタンの層準ごとの産出相対濃度を図 6 にまとめた。この産出相対濃度からビフィタンの組成を次の 3 つのパターンに分けることができる。すなわち、産出相対濃度が、0R が最も高く、2R, 3R がほぼ同じで 0R の約 1/4 からなり、1R が最も低くなるもの (組成 1: 5.0 m, 5.5 m, 5.9 m, 6.5 m, 61.3 m, 78.8 m の層準)、1R が最も高く、順に 0R, 2R と低くなり、3R が検出されないもの (組成 2: 7.1 m, 7.5 m, 7.6 m, 14.6 m ①の層準)、および 0R, 1R, 2R, 3R の順に低くなるもの (組成 3: 8.8 m, 10.8 m, 12.2 m, 13.3 m, 14.6 m ②の層準) である。組成 1 は、クレンアーキオータ門の浮遊性古細菌が合成するテトラエーテル脂質のビフィタン組成 (King *et al.*, 1998) に類似する。

硫酸還元菌のバイオマーカー

既に述べたように、DAGE (図 2 の o-s) は、非イソプレノイド型であるという点で古細菌に由来する脂質とは異なり、AOM に関わる硫酸還元菌由来の化合物であると推定されている (Pancost *et al.*, 2001a)。コア E では、5 種類の非イソプレノイド型ジエーテル脂質 (DAGE) が 18 層準で見出された。これらをそれぞれ DAGE I ~ DAGE V と表すこととする。DAGE III (図 2 の q) は 18 層準で見出され、特に 7.5 m, 7.6 m, 14.6 m で多く見出された。DAGE IV (図 2 の r) は 7.1 m, 7.5 m, 7.6 m, 14.6 m で見出され、DAGE V (図 2 の s) は 7.1 m, 7.5 m, 7.6 m, 10.8 m, 12.2 m, 14.6 m の 6 層準で見出された。DAGE IV と DAGE V の炭素安定同位体比は $-128 \sim -99 \text{ ‰}$ を示し、DAGE I, DAGE II, DAGE III (図 2 の o-q) の値 ($-116 \sim -75 \text{ ‰}$) よりも低く、同試料の古細菌バイオマーカーの炭素同位体比とほぼ同じ値を示した (表 1, 図

4)。以上の結果は、DAGE の炭素安定同位体比が ANME に由来するバイオマーカーよりも $10 \sim 40 \text{ ‰}$ ほど高いという従来の報告 (Pancost *et al.*, 2001a) とは異なっている。

考察

メタン湧水盛衰の指標としてのバイオマーカー

既に述べたように ANME は AOM 帯にだけ生息し、AOM 反応をつかさどる微生物である。AOM は、海水に一定量含まれ、海水と一緒に堆積物表層から浸透する硫酸イオンと AOM 帯で深で生成するメタンとの等モル反応なので、堆積物の透水率が等しい場合は、メタン濃度で AOM 帯の海底面からの深度が一義的に決まる。単位体積当たりの湧水に含まれるメタンの量が同じだと仮定した場合、湧水量が増えれば AOM 帯は海底面に向かって上昇し、湧水量が減少すると深い深度へと下降するであろう (図 1)。従って、地質試料 (地層) 中の、ある層準の AOM に関わる微生物のバイオマーカー濃度の解釈には以下の要因を考慮して慎重に行う必要がある。

1. 堆積速度。

堆積速度が一定で湧水量が変化しない場合は、地層中に同濃度の ANME 由来のバイオマーカーが連続して保存されることが期待される。一方、著しく堆積速度が遅くなり、湧水量が変わらなければ、海底面下の一定の場所に ANME 由来のバイオマーカーが濃集することが起こり得るであろう。

2. 湧水量の変化。

堆積速度が一定で、その間に湧水量が一定量増大した場合、AOM 帯がメタン濃度と硫酸イオン濃度とのバランスが取れる位置まで海底面に向かって上昇し、海底面下のある場所で AOM が活発になることによって、ANME 由来のバイオマーカーを濃集させることになるであろう。湧水量の著しい増加は堆積速度とは無関係に ANME 由来のバイオマーカーを短時間に濃集させるかもしれない。メタン湧水量が減少すると、それに伴い AOM 帯はメタン濃度と硫酸イオン濃度とのバランスが取れる位置まで下降していく。このことは、地層に残されたバイオマーカーの時間的順序が、地層の層位順とは必ずしも一致しないことを意味している。この関係はメタン湧水に伴う自生炭酸塩の沈殿層準と海底面との関係にも当てはまる。AOM によって、炭酸水素イオン濃度が上昇し、自生炭酸塩が沈殿すると仮定すると、自生炭酸塩は、AOM 帯ないし、その周囲で最も沈殿しやすくなるはずである。AOM に関わる自生炭酸塩の沈殿条件は、湧水量の減少 (あるいは増加) によっては以前よりも深い深度で (あるいは浅い深度で) 成立することは十分にあり得る。過去の AOM の示標としてのバイオマーカーと自生炭酸塩が異なるのは、AOM 帯があれば ANME は必ず生息しバイオマー

カーを地層に残すが、自生炭酸塩は他の地球化学的条件が揃わないと沈殿せず、地層中に証拠を残さない点である。

3. 透水性およびその変化。

透水性の良い堆積物は海水中の硫酸イオンを海底面下に浸透させやすくし、またメタン湧水を側方に拡散させるので、透水性の悪い堆積物よりも、AOMはより深部で起こることが予想される。研究対象とした地層は、いずれも泥質堆積物（泥質砂岩と砂質泥岩）なので、透水性に大きな違いはないと判断した。また、活発なAOMに伴って沈殿する自生炭酸塩は、地層の透水性を下げる可能性があるが、この評価は困難なため本研究では考慮していない。

4. バイオマーカーの保存条件

バイオマーカーがどの程度地層中に保存されるかは未知の問題である。堆積物の違いや、自生炭酸塩に取り込まれたバイオマーカーと、そうでないバイオマーカーとの保存されやすさの違いについては、ほとんど説明されていない。表1に各試料の自生炭酸塩の発達状況を、ほとんど発達していない (little)、弱く発達している (weak)、中庸に発達している (moderate)、良く発達している (well)、塊状に発達している (massive) の5段階に分けて記載したが、自生炭酸塩の発達状況とバイオマーカー濃度との間に何らかの関係は見出せなかった。

5. 貝化石との関係。

上に議論したようにAOMに関わる微生物のバイオマーカーが生成し保存された場所と海底面とは、AOMが海底面上、あるいは海水中で起きていない限り直接関係しない。しかし、活発なAOMにより生成する高濃度の硫化水素は、化学合成細菌を共生する二枚貝の高密度での生息を可能にするので、バイオマーカー産出層準、あるいは、その直上の二枚貝産出層準が湧水時の海底面と判断することが可能である。「瀬上市民の森」の化学合成群集はツキガイ類、ハナシガイ類、キヌタレガイ類である。これらの二枚貝は海底面下に深く潜る深潜性二枚貝であることが知られているが、どんなに深く潜っても1m以上潜没することは生息に酸素が不可欠なことから考えにくい。したがって、これらの二枚貝の産出層準を湧水時のおおよその海底面の指標としても問題ないと考えられる。

以上の1から5の論点を考慮し、コアEの5mから15m層準のAOMに関わる微生物バイオマーカー濃度とその炭素安定同位体比から推定できることを以下に考察する。7.1mから7.6mと14.6mに認められる古細菌と硫酸還元菌由来と考えられる炭素安定同位体比の著しく低いバイオマーカー濃度のピークは、この場所で極めて活発なAOMが起こったとの推定を可能とする。他のバイオマーカー産出層準でもAOMは起こっていたと思われるが、そのメタン酸化量は7.1mから7.6mと14.6m層準とは比較

にならないほど小さかったと思われ、それらの活動と7.1mから7.6mと14.6mの活動との時間的前後関係は上記の理由から確定できないであろう。

7.1mから7.6mのバイオマーカーの解釈

7.1mから7.6mは、自生炭酸塩 (Aragonite) の炭素安定同位体比が最も低い (−54.5‰) 層準とほぼ一致する。自生炭酸塩の炭素安定同位体比は間隙水の溶存無機炭素の安定同位体比を反映し、それはAOM帯で最も低くなることが知られている (Claypool and Threlkeld, 1983) ことから、この層準のバイオマーカー濃集から示唆された活発なAOMは、自生炭酸塩の炭素安定同位体比の測定結果と調和的である。また、この層準の直上 (6.5～7m) には湧水時の海底面の示標となる化学合成二枚貝が最も多産する。したがって、7.1mから7.6mの高濃度なバイオマーカーをもたらしたAOMは、その直上の層準で貝化石が最も産出する6.5～7.1mの間に海底面があったときに起こったと考えるのが妥当である。

6mの層準には粒度が他の層準よりも細かい厚さ約1mの砂質泥岩層が挟在する (図4)。この砂質泥岩層が堆積したときに堆積速度が遅くなり、メタン湧水が活発ではなくても特定層準 (7.1mから7.6m) にAOMに伴う微生物バイオマーカーが濃集したという解釈も可能なように見える。6mでは浮遊性古細菌起源と考えられるビフィタン3Rの濃度が顕著に高くなっており (図4)、浮遊性古細菌の生産量が一定だと仮定すると、このビフィタン3R濃度の顕著なピークは6mの砂質泥岩層の堆積速度が上下の泥質砂岩層よりも遅くなっていないと説明がつかない。もし、堆積速度が減少すると同時に湧水量も減少し、海底面から深さ約1.5m付近でメタン濃度と硫酸イオン濃度とのバランスが成立した場合、AOMに関わる微生物バイオマーカーは、この場所に濃集していくことがあり得る。

しかし、以下の理由により、堆積速度の低下が7.1mから7.6mのバイオマーカー濃度の顕著な増加に大きく寄与したとは考えにくい。1) 6mの砂質泥岩層には貝化石の産出がなく、メタン湧水が砂質泥岩層堆積時に起こっていた証拠がない。メタン湧水が起きていない陸棚域のAOM帯の海底面からの深度は、水深400mで10m、水深20mで4m程度である (Borowski *et al.*, 1999)。コアEの砂質泥岩層と泥質砂岩層の堆積深度は100～200mと推定されている (館・間嶋, 1998)。堆積速度の低下が示唆された6mの砂質泥岩層とAOM起源のバイオマーカー濃集層準 (7.1～7.6m) は最大で2m、最小で1m程度しか離れていないにも関わらず、貝化石を全く産出しない。このことから、6mの砂質泥岩層堆積時に湧水が起こっていない、あるいは非常に弱かった場合は、7.1～7.6mよりも深い層準でAOMが起こっていたと考えられる。2) AOM起源のバイオマーカーは7.6mの狭い範囲

で非常に明瞭な濃度ピークを示す。仮に砂質泥岩層（5.5～6.5m）の堆積速度の低下が7.6mのバイオマーカー濃度ピークの原因だとすると、堆積速度の低下に合わせてAOM帯が7.6mにぴったりと留まるような湧水量の調和的変動を仮定しなければならない。こうした仮定は確率的に見ても難しいように思える。

14.6mのバイオマーカーの解釈

14.6mにもAOMに関わる微生物に由来するバイオマーカーの大きな濃度ピークが見られる。この層準の約1.5m上位（13～13.5m）からは二枚貝産出層が認められることから、これらの二枚貝の生息をもたらししたAOMがこの層準のバイオマーカーピークの原因と考えられる。13～13.5mの二枚貝は、他の層準と比較して、特に数が多いようには見えない。しかし、既に述べたように、この層準の二枚貝は、殻が完全に溶けていて、大型の合併二枚貝以外は殻の存在の確認が困難である。もし、殻が溶けていなければ、より多くの個体を確認できた可能性がある。これに加え、この層準のバイオマーカー濃集の解釈には、以下の三つの問題が指摘できる。

1. 比較的同位体比の重いdolomiteと共産する理由。

AOMに関わるバイオマーカーの濃集と同位体比の比較的重いdolomite（ -35.5% 以上）の共産は、最も難解な問題である。一つの仮説は、元々沈殿した自生炭酸塩はMG-calciteで、それがdolomite化を起こす過程で同位体比が重くなったというものである。実際、このdolomiteの下位1.4m（14.88m）にあるdolomiteとMG-calciteの混合した自生炭酸塩は -48.4% という比較的軽い同位体比を示すが、この自生炭酸塩と14.6mのdolomiteからなる自生炭酸塩の晶出時期などの関係は不明である。一方、14.6mの自生炭酸塩は、湧水とは関わりなく広域に渡って発達しているという点で極めて特異である。SKT-7凝灰岩層（図4）直下の層準には、塊状の自生炭酸塩コンクリーションが、湧水が確認されている露頭地下のコアだけでなく、湧水の証拠が認められない露頭でも、「瀬上市民の森」地域から「氷取沢市民の森」地域にかけて東方へ2.3kmも追跡することができる。この湧水とは直接関わりが無いと考えられるこれらの自生炭酸塩の沈殿が、湧水場の自生炭酸塩の同位体比を重い側にシフトさせた可能性が存在する。

2. バイオマーカー組成に大きな差異がある理由。

14.6m①は、*sn*-2-ヒドロキシアーキオール濃度が環状アーキオールを上回った唯一の層準である（図4、表1）。このような濃度比はANME-2を優占種とする堆積物中で特徴的に見出されており（Blumenberg *et al.*, 2004）、次の章で議論するように、この層準でANME-2を優占種とするコンソーシアムが存在していた可能性を示唆している。また環状アーキオール1R、2Rもこの14.6m①だけから見出された。14.6m①と②を比較したとき、極めて狭

い範囲で、異なるグループのANMEが含まれていたと解釈することが可能で、AOMに関わる微生物の異なる微環境を保存している可能性が存在する。

3. ビフィタン3Rの顕著な濃集と堆積速度の低下。

14.6m②試料のビフィタン3Rは顕著な濃集を示すが、14.6m①試料からはビフィタン3Rが全く検出されなかった（表1、図4）。浮遊性古細菌の指標であるビフィタン3Rの顕著な濃集は、この層準で堆積速度の低下が起こっていた可能性を示唆する。14.6mは上で議論した6mと同様に上下の泥質砂岩層より泥質物の多い砂質泥岩層からなる点も、堆積速度の低下を示唆している。しかし、14.6m堆積時に起こった可能性のある堆積速度の低下は、この層準のAOMに関わる微生物バイオマーカー濃集とは全く関係しないと考えられる。なぜなら、既に議論したように、14.6mのAOMは13～13.5m付近の二枚貝密集層（図4）の存在から、13～13.5m付近に海底面があったときに活発だった可能性が高い。したがって、14.6mが海底面であった時に堆積したビフィタン3Rと14.6mのAOMに関わる微生物バイオマーカーは、濃集した時代が異なるのである。両者の濃集の時代が一致する可能性は、海底面あるいは海水中でAOMが起こった場合だけである。しかし、化学合成を行う二枚貝が14mから16mにかけて全く産出しないことから、14.6mが海底面であった時に海底面で活発なAOMが起こった証拠は存在しない。また、海水中でAOMが起こったという想定は、当時の海底が広範囲に嫌気的環境になることを想定しなければならず、著しく生物擾乱をこうむった堆積物に想定することは困難である。

各層準の嫌気的メタン酸化菌組成の違い

コアEで検出された古細菌のバイオマーカー組成には、一部の例外を除いて1) *sn*-2-ヒドロキシアーキオールよりもアーキオール濃度が高い、2) クロセタンが検出されない、3) ビフィタンが多量に検出される、という特徴があった。これらは、ANMEのうちANME-1に特徴的なバイオマーカー組成であると考えられている（Niemann and Elvert, 2008）。検出された古細菌のバイオマーカーのほとんどがANMEに由来すると仮定すると、コアEには基本的にANME-2よりもANME-1が多く保存されていると推定される。しかし、7.1m、7.6mではクロセタンが見出され、14.6m①ではアーキオール濃度よりも*sn*-2-ヒドロキシアーキオール濃度が高くなっているなど、ANME-2に特徴的なバイオマーカー組成も見られる。7.1m、7.6m、14.6mはいずれもAOMに関わる微生物のバイオマーカー濃度が高くなっている層準であり、活発なAOMをもたらすような環境の変化（メタン湧水量濃度の変化など）がこの層準の微生物相に影響を与えた可能性がある。

浮遊性古細菌のバイオマーカー

浮遊性古細菌は、海水中に偏在するピコプランクトンを構成する微生物として発見された古細菌である (Furhman *et al.*, 1992). ANME がユーリアーキオータ門に分類される (Hinrichs *et al.*, 1999) のに対して、浮遊性古細菌はそのほとんどがクレンアーキオータ門に分類される (Furhman *et al.*, 1992; DeLong *et al.*, 1994). ピコプランクトン中に浮遊性古細菌の占める割合は、海洋表層では数パーセントだが、深度を増すごとに高くなり、100 m 以深では 20~30 % であると推定されている (Massana *et al.*, 1997). クレンアーキオータ門の古細菌が合成するテトラエーテル脂質は、内部に六員環を一つと五員環を二つ含むビフィタン 3R と五員環を二つ含むフィタン 2R で構成されるクレンアーキオール (Sinninghe Damsté *et al.*, 2002) が特に多いことが知られている (Hoefs *et al.*, 1997; DeLong *et al.*, 1998). 内部に三つの環構造を持つビフィタン 3R には、いくつかの構造異性体があるため、本研究では正確な同定ができなかった。しかし、表 1 と図 4 に示すように、すべての層準のビフィタン 3R は -25 ‰ より高い炭素安定同位体比を示し、メタンを利用しない浮遊性古細菌のテトラエーテル脂質に由来しているものと考えられる。ただし、7.5 m のビフィタン 3R は +5 ‰ という非常に重い同位体比を示した。この層準は著しく AOM が活発だったと推定した層準に一致するが、この異常に重い同位体比については今の所説明ができない。一方、ANME は、ビフィタン 1R を高い割合で含むテトラエーテル脂質を合成する (Pancost *et al.*, 2000b). このことは、各層準において多くのビフィタン 1R が、4 種のビフィタンのうち炭素安定同位体比が最も低いことと調和的である (図 4, 表 1).

以上のことから、ビフィタンの組成が組成 1 を示した 6 層準 (5.0 m, 5.5 m, 5.9 m, 6.5 m, 61.3 m, 78.8 m) では浮遊性古細菌由来のものが大部分を占め、組成 2 を示した 4 層準 (7.1 m, 7.5 m, 7.6 m, 14.6 m ①) では ANME 由来のものが大部分を占めていたと考えるのが合理的である。また組成 3 を示した 6 層準 (8.8 m, 10.8 m, 12.2 m, 13.3 m, 14.6 m ②) では、浮遊性古細菌起源のビフィタンと ANME 起源のビフィタンが混合していたと推定される。

海洋に生息する浮遊性古細菌の生態はいまだ不明な点が多いが、メタンを代謝に用いていないため、その生産量は海底における湧水の強弱とは直接的には関係しない。このことは AOM が活発であった 7.1~7.6 m で、ビフィタン 3R が顕著に増加することがない、すなわち湧水が活発だった時代には浮遊性古細菌由来のエーテル脂質の相対的な割合が顕著に減少していることと調和的である。8.8~14.6 m ではビフィタン 1R がビフィタン 0R の濃度を上回ることではなく、AOM が 7.1~7.6 m ほど活発ではなかった、あるいはそれを超える浮遊性古細菌の生産があっ

たとえられる。

すでに述べたように、ビフィタン 3R はそのほとんどが浮遊性古細菌由来と判断される。もし、浮遊性古細菌の生物量がコア E 堆積時のこの場所で一定であったと仮定すると、既に議論したようにビフィタン 3R 濃度は、堆積速度の指標となる。ビフィタン 3R は 5.9 m と 14.6 m の砂質泥岩層で顕著なピークを示すことから (図 4), この層準を中心に堆積速度が低下したことが考えられる。この 2 層準は、砂質泥岩層からなり、上下の泥質砂岩層よりも多くの泥質分を含み堆積速度の低下を示唆する。ビフィタン 3R 濃度の上昇から推定される堆積速度の低下は岩相と調和的であると考えられる。

まとめ

本研究で明らかになった点を以下にまとめる。

- 1) 分析した 19 層準すべてから古細菌のバイオマーカーが見出され、多くのエーテル結合が堆積物中で過去 140 万年間以上にわたって分解されずに保存されていた。
- 2) コア深度 7.1~7.6 m と 14.6 m に古細菌と硫酸還元菌起源の顕著なバイオマーカー濃集が認められ、それらの炭素安定同位体比は非常に低いことから、活発な AOM があったことが推定された。これらの AOM 活動は、化学合成二枚貝が多産する 6.5~7 m と 13~13.5 m に海底面があったときにそれぞれ起こったと推定される。
- 3) 14.6 m 層準の 2 試料は非常に異なる分析結果を示し、この解釈について微環境の異なりの可能性を指摘した。
- 4) ビフィタン組成とそれらの炭素安定同位体比から浮遊性古細菌起源のバイオマーカーが、かなりの程度混在している推定される。浮遊性古細菌は全ての層準から産出していると思われ、その集積率は堆積速度の指標として使えるかもしれない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり松本公平博士には炭素同位体比の測定に関して、柴田知則氏にはバイオマーカーの解釈について、ロバート・ジェンキンス氏には原稿の内容全般について、野崎 篤氏には「瀬上市民の森」地域の地質についてご助言をいただいた。また、査読者の一人、延原尊美氏には多くの有意義なコメントを頂いた。本研究には科学研究費補助金 (基盤研究 (A), 課題番号 1620404, 研究代表者 間嶋隆一, 浅海域の冷湧水性化学合成群集は氷河性海水準変動に同期して産出する) を使用した。上記各氏および関係各位に心から感謝いたします。

引用文献

- Bian, L. Q., 1994. Isotopic biogeochemistry of individual compounds in a modern coastal marine sediment (Kattegat, Denmark and Sweden). Thesis, Indiana University.
- Bian, L. Q., Hinrichs, K.-U., Xie, T. M., Brassell, S. C., Iversen, H., Fossing, H., Jørgensen, B. B. and Hayes, J. M., 2001. Algal and archaeal polyisoprenoids in a recent marine sediment: molecular isotopic evidence for anaerobic oxidation of methane. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, **2**, 1023.
- Blumenberg, M., Seifert, R., Reitner, J., Pape, T. and Michaelis, W., 2004. Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 1111–1116.
- Boetius, A., Ferdemann, T. and Lochte, K., 2001. Bacterial activity in sediments of the deep Arabian Sea in relation to vertical flux. *Deep Sea Research II*, **47**, 2835–2875.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Witte, U. and Pfannkuche, O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623–626.
- Boone, D. R., Whitman, W. B. and Rouviere, P., 1993. Microbiology : diversity and taxonomy of methanogens. In Ferry, J. G., ed., *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry, and Genetics*, 35–80. Chapman and Hall, New York.
- Borowski, W. S., Paull, C. K. and Ussler, W. III, 1999. Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: sensitivity to underlying methane and gas hydrate. *Marine Geology*, **159**, 131–154.
- Brassell, S. C., Wardroper, A. M. K., Thomson, I. D., Maxwell, J. R. and Eglinton, G., 1981. Specific acyclic isoprenoids as biological markers of methanogenic bacteria in marine sediments. *Nature*, **290**, 693–696.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H. and Poulson, S. R., 2004. Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry*, **65**, 1369–1381.
- Claypool, G. F. and Threlkeld, C. N., 1983. Anoxic diagenesis and methane generation in sediments of the Blake Outer Ridge, Deep Sea Drilling Project Site 533, Leg 76. *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project*, **76**, 391–402.
- DeLong, E. F., King, L. L., Massana, R., Cittone, H., Murray, A., Schleper, C. and Wakeham, S. G., 1998. Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic Crenarchaeotes. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1133–1138.
- DeLong, E. F., Wu, K. Y., Prezelin, B. B. and Jovine, R. V. M., 1994. Archaea in Antarctic marine environments. *Nature*, **371**, 695–697.
- De Rosa, M. and Gambacorta, A., 1988. The lipids of archaeobacteria. *Progress in Lipid Research*, **27**, 153–175.
- De Rosa, M., Trincone, A., Nicolaus, B. and Gambacorta, A., 1991. Archaeobacteria: lipids, membrane structure, and adaptation to environmental stresses. In diPrisco, G., ed., *Life Under Extreme Conditions*, 61–87. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Elvert, M., Hopmans, E. C., Trude, T., Boetius, A. and Suess, E., 2005. Spatial variations of methanotrophic consortia at cold methane seeps : implications from a high-resolution molecular and isotopic approach. *Geology*, **3**, 195–209.
- Elvert, M., Suess, E., Greinert, J. and Whiticar, M. J., 2000. Archaea mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediments at cold seeps of the eastern Aleutian subduction zone. *Organic Geochemistry*, **31**, 1175–1187.
- Elvert, M., Suess, E. and Whiticar, M. J., 1999. Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C20 and C25 irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften*, **86**, 295–300.
- Fuhrman, J. A., McCallum, K. and Davis, A. A., 1992. Novel marine archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, **356**, 148–149.
- 藤岡導明・亀尾浩司・小竹信宏, 2003. テフラ鍵層に基づく横浜地域の大船層・小柴層と房総半島の黄和田層との対比. 地質学雑誌, **109**, 166–178.
- Hinrichs, K.-U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. and DeLong, E. F., 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, **398**, 802–805.
- Hinrichs, K.-U., Summons, R. E., Orphan, V. J., Sylva, S. P. and Hayes, J. M., 2000. Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Organic Geochemistry*, **31**, 1985–1701.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3090–3095.
- Holzer, Z., Ilan, D. and Levy, D., 1979. A note on the effects of monensin on the performance and on rumen metabolites of intact male cattle. *Animal Production*, **28**, 135–137.
- Huber, R., Rossmagel, P., Woese, C. R., Rachel, R., Langworthy, T. A. and Stetter, K. O., 1996. Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov. sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**, 40–49.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H. and Stetter, K.O., 1992. *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 340–351.
- Jahnke, L. L., Eder, W., Huber, R., Hope, J. M., Hinrichs, K.-U., Hays, J. M., Des Marais, D. J., Cady, S. L. and Summons, R. E., 2001. Signature lipids and stable carbon isotope analyses of Octopus Spring hyperthermophilic communities compared with those of aquificales representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 5179–5189.
- Kennett, J. P., Cannariato, K. G., Hendy, I. L. and Bhel, R. J., 2003. *Methane Hydrates in Quaternary Climate Change: The Clathrate Gun Hypothesis*. 216p., American Geophysical Union, Washington D. C.
- King, L. L., Pease, T. K. and Wakeham, S. G., 1998. Archaea in Black Sea water column particulate matter and sediments—evidence from ether lipid derivatives. *Organic Geochemistry*, **28**, 677–688.
- King, L. L., Pease, T. K. and Wakeham, S. G., 1998. Archaea in Black Sea water column particulate matter and sediments—evidence from ether lipid derivatives. *Organic Geochemistry*, **28**, 677–688.
- Kitazaki, T. and Majima, R., 2003. A Slope to outer-shelf cold-seep assemblage in the Plio-Pleistocene Kazusa Group, Pacific side of central Japan. *Paleontology Research*, **7**, 279–296.
- 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.
- 古賀洋介・亀倉正博, 1998. 古細菌研究の歴史. 古賀洋介・亀倉正博, 古細菌の生物学, 1–15. 東京大学出版会.
- 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.
- Koga, Y., Nishihara, M., Morii, H. and Akagawa-matsushita, M., 1993. Ether lipid of methanogenetic Bacteria: Structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiological Reviews*, **57**, 164–182.
- Kojima, S., 2002. Deep-sea chemoautosynthesis-based communities in the northwestern Pacific. *Journal of Oceanographic Society of Japan*, **58**, 343–363.
- Kulm, L. D., Suess, E., Moore, J. C., Carson, B., Lewis, B. T., Ritger,

- S. D., Kadko, D. C., Thornburg, T. M., Embley, R. W., Rugb, W. D., Massoth, G. J., Langseth, M. G., Cochrane, R. and Scamman, R. L., 1986. Oregon subduction zone: venting, fauna, and carbonates. *Science*, **231**, 561–566.
- Langworthy, T. A., 1985. Lipids of archaebacteria. In Woese, C. R. and Wolfe, R. S., eds., *The Bacteria*, Vol. VIII, 459–497. Academic Press, New York.
- Langworthy, T. A., Hölzer, G., Zeikus, J. G. and Tornabene, T. G., 1983. Iso- and anteiso-branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*. *Systematic and Applied Microbiology*, **4**, 1–17.
- Langworthy, T. A., Tornabene, T. G. and Holzer, G., 1982. Lipids of archaebacteria. In Zentralblatt fuer Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. 1, Originale C3, 228–244.
- Majima, R., Nobuhara, T. and Kitazaki, T., 2005. Review of fossil chemosynthetic assemblages in Japan. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **227**, 86–123.
- 間嶋隆一・館由紀子・柴崎琢自, 1996. 横浜市の上総層群から発見された現地性化学合成貝化石群集. 化石, (61), 7–54.
- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. and DeLong E. F., 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 50–56.
- 森井宏幸・古賀洋介, 1998. メタン生成古細菌. 古賀洋介・亀倉正博, 古細菌の生物学, 40–60. 東京大学出版会.
- Niemann, H. and Elvert, M., 2008. Diagnostic lipid biomarker and stable carbon isotope signature of microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane with sulphate. *Organic Geochemistry*, **39**, 167–177.
- 西原正昭・古賀洋介, 1998. 古細菌の細胞表層. 古賀洋介・亀倉正博, 古細菌の生物学, 258–282. 東京大学出版会.
- 荻原成騎, 2004. 冷湧水炭酸塩岩中の嫌気的メタン酸化を示すバイオマーカー. 地球化学, **38**, 45–55.
- 荻原成騎, 2005a. 化学合成群集を伴う下部更新統小柴層中の冷湧水性炭酸塩岩の有機地球化学的特徴. 地球化学, **39**, 17–25.
- 荻原成騎, 2005b. 冷湧水炭酸塩岩形成場における化学合成群集の進化. 化石, (78), 40–46.
- 荻原成騎・芦寿一郎, 2003. 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. *JAMSTEC Deep Sea Research*, (24), 25–35.
- Ohkouchi, N., Xu, L., Reddy, C. M., Montluçon, D. and Eglinton, T. I., 2005. Radiocarbon dating of alkenones from marine sediments: I. Isolation protocol. *Radiocarbon*, **47**, 401–412.
- Ohta, S. and Laubier, L., 1987. Deep biological communities in the subduction zone of Japan from bottom photographs taken during “Nautil” dives in the Kaiko Project. *Earth and Planetary Science Letters*, **83**, 329–342.
- Okutani, T. and Egawa, K., 1985. The first underwater observation on living habit and thanatocoenoses of *Calyptogena soyoe* in bathyal depth of Sagami Bay. *Venus (Journal of Malacological Society of Japan)*, **44**, 285–289.
- Okutani, T., Fujiwara, K. and Hashimoto, J., 1993. Another new species of *Calyptogena* (Bivalvia: Vesicomidae) from Bathyal Depth in Suruga Bay, Japan. *Venus (Journal of Malacological Society of Japan)*, **52**, 121–126.
- Orphan, V. J., Hinrichs, K.-U., Ussler III, W., Paull, C. K., Taylor, L. T., Sylva, S. P., Hayes, J. M. and De Long, E. F., 2001a. Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing Bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1922–1934.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K. D. and DeLong, E. F., 2001b. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, **293**, 484–487.
- 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 the National Academy of Sciences*, **99**, 7663–7668.
- 太田 秀・酒井 均・平 朝彦・大和田紘一・石井輝秋・前田昌調・藤岡換太郎・才野敏郎・木暮一啓・蒲生俊敏・白山義久・古田俊夫・石塚明男・遠藤圭子・角 隆幸・堀田 宏・橋本 惇・半田暢彦・増澤敏行・堀越増興, 1987. 相模湾初島沖における「シロウリガイ群集」総合調査報告(1). *JAMSTEC Deep Sea Research* (3), 51–60.
- Pancost, R. D., Bouloubassi, I., Aloisi, G., Sinninghe Damsté, J. S. and the MEDINAUT Shipboard Scientific Party, 2001a. Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry*, **32**, 695–707.
- Pancost, R. D., Sinninghe Damsté, J. S., de Lint, S., van der Maarel, M. J. E. C., Gottschal, J. C. and The Medinaut Shipboard Scientific Party, 2000b. Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1126–1132.
- Paull, C. K., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R. P., Neumann, C., Corso, W. P., Golubic, S., Hook, J. E., Sikes, E. and Curraj, J., 1984. Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science*, **226**, 965–967.
- Reeburgh, W. S., Whalen, S. C. and Alperin, M. J., 1993. The role of methylophony in the global methane budget. In Murrell, J. C. and Kelly, D. P., eds., *Microbial Growth on C-1 Compounds*, 1–14. Intercept, Andover, UK.
- Risatti, J. B., Rowland, S. J., Yon, D. A. and Maxwell, J. R., 1984. Stereochemical studies of acyclic isoprenoids—XII. Lipids of methanogenic bacteria and possible contributions to sediments. *Organic Geochemistry*, **6**, 93–104.
- Schoell, M., 1988. Multiple origins of methane in the Earth. *Chemical Geology*, **71**, 265.
- Schouten, S., Hoefs, M. J. L., Koopmans, M. P., Bosch, H. and Sinninghe Damsté, J. S., 1998. Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Organic Geochemistry*, **29**, 1305–1319.
- Schouten, S., Van Der Maarel, M. J. E. C., Huber, R. and Sinninghe Damsté, J. S., 1997. 2,6,10,15,19-Pentamethylcosenes in *Methanobolus bombayensis*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Organic Geochemistry*, **26**, 409–414.
- Sibuet, M. and Olu, K., 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Research II*, **45**, 517–567.
- Sinninghe Damsté, J. S., Hopmans, E. C., Pancost, R. D., Schouten, S. and Geenevasen, J. A. J., 2000. Newly discovered non-isoprenoid glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in sediments. *Chemical Communications*, **2000**, 1683–1684.
- Sinninghe Damsté, J. S., Rijpstra, W. I. C., Geenevasen, J. A. J., Strous, M. and Jetten, S. M., 2005. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox). *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, **272**, 4270–4283.
- Sinninghe Damsté, J. S., Schouten, S., Hopmans, E. C., van Duin, A. C. T. and Geenevasen, J. A. J., 2002. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *Journal of Lipid Research*, **43**, 1641–1651.
- Stadnitskaia, A., Baas, M., Ivanov, M. K., Van Weering, T. C. E. and Sinninghe Damsté, J. S., 2003. Novel archaeal macrocyclic diether core membrane lipids in a methane-derived carbonate crust from a mud volcano in the Sorokin Trough, NE Black Sea. *Archaea*, **1**, 165–173.
- Sturt, H. F., Summons, R. E., Smith, K. J., Elvert, M. and Hinrichs,

- K.-U., 2004. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by ESI-HPLC-MSn – new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 617–628.
- 舘 由紀子・間嶋隆一, 1998. 外側陸棚相の冷湧水性化学合成化石群集—下部更新統上総層群小柴層の例—. *地質学雑誌*, **104**, 24–41.
- Teixidor, P., Grimalt, J. O., Pueyo, J. J. and Rodriguez-Valera, F., 1993. Isopranylglycerol diethers in non-alkaline evaporitic environments. *Geochimica Cosmochimica Acta*, **57**, 4479–4489.
- Tornabene, T. G. and Langworthy, T. A., 1979. Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science*, **203**, 51–53.
- Woese, C. R. and Fox, G. E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, 5088–5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L., 1990. Towards a system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**, 4576–4579.

