

メタン冷湧水における嫌氣的メタン酸化に特徴的な 脂質バイオマーカーについて

大庭雅寛*

(2010年6月16日受付, 2010年9月21日受理)

Lipid biomarkers for the anaerobic oxidation of methane in methane-cold seep sediments

Masahiro OBA*

* Institute of Geology and Paleontology, Tohoku University,
Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

Methane is one of the most important components in the global carbon cycle. High amounts of methane are constantly produced in marine subsurface sediments and temporarily stored in sediments of the continental margins as free gas, dissolved or frozen as methane hydrate. Despite extensive production in marine sediments, most of the upward moving methane never reaches the overlying water column because the majority of it is consumed before reaching the seafloor through the anaerobic oxidation of methane (AOM), conjointly conducted by consortia of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria. Cold seeps, occurring widely along active and passive continental margins, are characterized by the expulsion of complex fluid mixtures from deep sedimentary horizons to the seafloor. The key biogeochemical process at cold seeps, especially methane-cold seeps, is the AOM. Organic geochemical methods have been contributing extensively to the studies of the compositions of microorganism and diagnostic of these activities in methane-cold seeps.

The lipid constituents in sediments and carbonates of methane-cold seeps are characterized by the occurrence of certain strongly ^{13}C -depleted isoprenoid and non-isoprenoid ether lipids and irregular isoprenoid hydrocarbons. The distributions of these lipids depend on the different methane-oxidizing archaeal and sulfate-reducing bacterial populations in sediments. The separation of polar and neutral ether lipids by Oba's method (Oba *et al.*, 2006) makes it possible to estimate the living and fossil (i.e. dead) biomass contributions in sediments. The lipid biomarkers having characteristics of AOM can also be detected from sediments and carbonates deposited at ancient methane-cold seeps. It is expected that many of the findings revealed by organic geochemical studies of cold seeps and AOM will be applied to clarification of the ancient events of massive dissociation of oceanic methane hydrate.

Key words: anaerobic oxidation of methane, cold seeps, lipid biomarkers, methane-oxidizing archaea, sulfate-reducing bacteria, polar and neutral ether lipids

1. はじめに

地球の炭素循環を考える上で、メタンは最も重要な炭素化合物の1つである。嫌氣的な海洋底堆積物は、そのメタンの主要な生産の場であり、かつ巨大なり

* 東北大学大学院理学研究科
〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3

ザーバーでもある。特に近年、次世代のエネルギー資源として注目されているメタンハイドレートは、その膨大な炭素のリザーバーであり、その炭素量はこの地球上に約10,000 Gt以上存在すると考えられている(Kvenvolden, 1988, 2002)。これは炭素量比較で大気中の二酸化炭素量の約20倍、海洋に溶存する炭酸の約1/4の量に相当する。さらにメタンは温室効果ガスとして知られ、赤外線を吸収し熱に変換する効率は、二酸化炭素の20倍にもなる。ゆえに、メタンハイドレートの大規模な分解によって大量のメタンが大気に放出された場合、極端な地球温暖化を促進させる可能性がある。したがって、メタンの動態は、地球の表層環境の変動や、生物とその生態系に大きな影響を与えるものと考えられ、地球変動解析の観点からも注目されている。

海洋底堆積物中では恒常的に大量のメタンが生産されていると考えられているが、大気中に散逸する量は少量であり、約90%は海洋底の表層において、微生物により嫌氣的に酸化されていると考えられている(Barnes and Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976)。最も顕著な嫌氣的メタン酸化(Anaerobic oxidation of methane)が起きているのが、海洋沿海部に沿って存在するメタンハイドレート賦存域でよく見られるメタン冷湧水帯である。この十数年間、世界中の海洋底からメタン冷湧水地帯が発見され、生物圏における炭素循環の重要な一部分を占めていることがわかってきた。またメタン冷湧水地帯からは、特異的な化学合成生物群が発見され、光合成に必要な光の届かない海洋底において豊かな生物活動を支えていることが知られており、その実態解明は地球の生物進化を考える上でも重要な知見をもたらす可能性がある。

このメタン冷湧水の実態解明のため、その分布や形成因に関する地質学的研究やメタンに依存した特異的な生態系の生物学的研究とともに、地球化学、特に有機地球化学的研究がメタン冷湧水における微生物活動実態の解明のために多くなされており、これまで様々な知見をもたらしている。後述するように、嫌氣的なメタン酸化は異なる種類の微生物の共生によって行われている。共生系を維持したままでの人工培養や、個々の微生物の活動実態を明らかにするために必要な単離培養が難しいことから、微生物学的研究はまだその緒についたばかりである。一方、有機地球化学的研究は、このメタン冷湧水域の微生物相解析や環境変化の解明に関して早くから成果を挙げている。微生物学

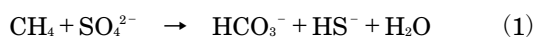
的研究や分子生物学的分析の実行が不可能である、過去の嫌氣的メタン酸化やメタン冷湧水の研究に関しては、有機地球化学的研究が微生物活動の履歴について唯一言及できる研究手法であると考えられ、今後さらにその重要性が増すものと考えられる。

そこで本総説では、嫌氣的メタン酸化を行っている微生物群集に特徴的な脂質化合物(バイオマーカー: 地質学的試料中に含まれる有機分子のうち、生物起源であることを明瞭に示している炭素骨格を有するもの)を紹介する。またエーテル脂質についてはその存在形態を区別して分析することで、現在生息し活動中の古細菌由来とすでに死んでしまった古細菌由来に脂質成分を分離することができる手法を紹介する。この手法を用いた分析例として、南海トラフメタン冷湧水地帯の表層堆積物における嫌氣的メタン酸化の研究例を示す。さらに過去に嫌氣的メタン酸化が発生していた堆積物中に存在する脂質バイオマーカーについて紹介し、これらの脂質バイオマーカーの保存性・安定性について言及する。最後にこれらを用いた古環境変動の解明における今後の展望などについて言及する。

2. メタン冷湧水と嫌氣的メタン酸化

1984年に有人潜水調査艇アルヴィン号は北アメリカ・オレゴン沖カスカディア大陸縁水深2,036 mの海底において、熱水由来の化学合成生物群集に類似した生物群集を伴いながらも、熱水と全く性質の異なる冷湧水を発見した(Kulm *et al.*, 1986)。この冷湧水中には高濃度のメタンが含まれており、生物群集の体組織や海底に沈積した炭酸塩鉱物の安定炭素同位体比が低かったことから、これらの生物群集がメタンをエネルギー源および炭素源としており、炭酸塩鉱物はメタンの酸化により生成した炭酸イオンと海水中のアルカリ土類金属イオンが反応してできたものであることが判明した。この発見以降、世界中の海洋においてメタン冷湧水は発見され、収束的プレート境界にあたる大陸縁辺部に特に多く分布することがわかってきた。

この8年前、Barnes and Goldberg (1976)は、沿岸の堆積物中の硫酸イオン濃度が0になった深度より深くなるにつれてメタン濃度が急激に増加する傾向を見つけ、嫌氣的メタン酸化という現象を発見した。これは堆積物中に含まれるメタンを電子受容体とし、一方海水中に含まれる硫酸イオンを電子供与体として(1)式で総合的に表される化学反応によるものと考えられた。



その後、この反応は微生物群集によっておこなわれていることが指摘され、さらに嫌氣的メタン酸化古細菌 (Anaerobic methanotrophic Euryarchaeota; 以下 ANME) と硫酸還元菌との共生によって行われていることが判明した (Hinrichs *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001)。現在では、ANME には3つのグループ (ANME-1, ANME-2, ANME-3) があることがわかっている。ANME-2 と ANME-3 には共生パートナーとしてそれぞれ特有の硫酸還元菌が存在する (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001; Niemann *et al.*, 2006; Lösekann *et al.*, 2007) が、一方 ANME-1 には共生パートナーとしての硫酸還元菌は確認されておらず、単独で生育している可能性も示唆されている (Orphan *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2005)。これらの ANME がどういった微生物なのかは、これらの分離培養がほとんどなされていないことからよくわかっておらず、また海洋・堆積物中における棲み分けやその分布についても不明なことが多い (これまで判明している、ANME を含むメタン冷湧水域における微生物の生態系やその代謝活動に関しては、宮崎 (2009) に詳しくまとめられている)。しかし地球化学的研究により、多くのメタン冷湧水域において、これらの微生物による嫌氣的メタン酸化が普遍的に存在していることが明らかになり、加えてメタン冷湧水域が世界中の大陸縁辺部海洋から次々に見出されるに及んで、嫌氣的メタン酸化が生物圏における炭素循環の重要な一部を担っていることが明らかになった。これを明らかにしたのが、ANME によって生合成された脂質化合物をターゲットとした有機地球化学分析である。

3. メタン冷湧水に特徴的な脂質バイオマーカー

メタン冷湧水域の表層堆積物の有機地球化学的研究は過去10年間にさかんに行われてきた。これまで有機地球化学的研究対象となってきたメタン冷湧水域として、メキシコ湾 (Sassen *et al.*, 1999) やアメリカ太平洋沿岸域の Hydrate Ridge (Elvert *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000) や Eel River Basin (Hinrichs *et al.*, 1999, 2000; Orphan *et al.*, 2001)、地中海の泥火山 (Pancost *et al.*, 2000, 2001)、黒海 (Michaelis *et al.*, 2002; Blumenberg *et al.*, 2004)、南海トラフ

(Oba *et al.*, 2006) などがある。これらの結果を総括すると、メタン冷湧水域で見いだされる主要な脂質バイオマーカーは、エーテル脂質、イソプレノイド式炭化水素、脂肪酸に大別できる。そして、嫌氣的メタン酸化を行っている ANME や硫酸還元菌由来のそれらの安定炭素同位体比は、冷湧水中のメタンの安定炭素同位体比が一般的に $-40 \sim -70\%$ とかなり低く、さらにその軽いメタンの炭素を取り込む際に同位体分別を伴うことから猛烈に軽い値を持っており、 -100% より軽い値をもつことが多い。以下に個々の脂質バイオマーカーのうち、ANME 由来であるイソプレノイド式エーテル脂質とイソプレノイド式炭化水素について詳述する。

3.1 イソプレノイド式エーテル脂質

エーテル脂質は、メタン冷湧水堆積物から見出される主要な脂質バイオマーカーである。一般的に、バクテリアや真核生物の膜脂質は、glycerol に2つの脂肪酸が glycerol の *sn*-1位と *sn*-2位にエステル結合したエステル脂質から構成されている (Fig. 1)。glycerol の *sn*-3位にはリン酸や糖などの極性基が結合して極性頭部をなしている。一方、古細菌の膜脂質はエステル脂質を含んでおらず、かわりにエーテル脂質から成り立っている (Fig. 1)。その特徴を列挙すると、1) glycerol とアルキル鎖がエーテル結合している、2) アルキル鎖はイソプレノイド式炭化水素である、3) *sn*-2位と *sn*-3位にアルキル鎖が結合しており、*sn*-1位にリン酸や糖が結合している、である (Koga *et al.*, 1998a, b)。特に2) と3) の特徴は古細菌由来のエーテル脂質に限定される。一部のバクテリアからは、エーテル脂質が膜脂質の成分として見つかったものがある (Langworthy *et al.*, 1983; Huber *et al.*, 1992, 1996) が、それらのアルキル鎖は非イソプレノイド式炭化水素であり、さらにそれらが *sn*-1位と *sn*-2位に結合しているという特徴を持っている (Fig. 1)。古細菌由来のエーテル脂質の生合成経路や、種々の古細菌それぞれのエーテル脂質組成の特徴については、産業医科大学名誉教授の古賀洋介博士の種々の論文 (例えば、総説論文として、Koga and Morii, 2005, 2006など) に詳しく述べられている。

archaeol は最も単純かつ主要な古細菌由来のエーテル脂質である (Fig. 2)。glycerol に2つのフィタニル基がエーテル結合している。地質試料からの検出例としては、中新世の岩塩などから検出された例 (Teixidor *et al.*, 1993) を皮切りに、無酸素環境にあ

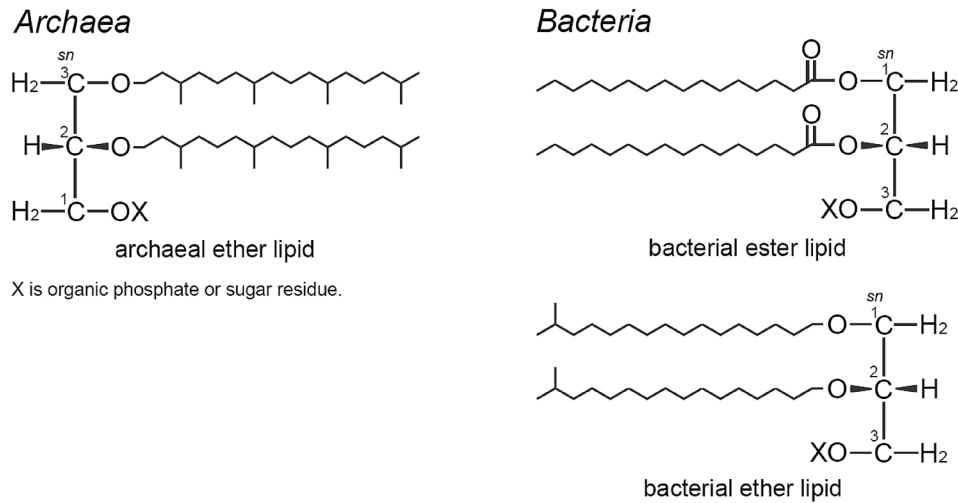


Fig. 1 Characteristics of archaeal ether lipids. Archaeal ether lipids are characterized by (i) *sn*-G-1-Polar head group backbone, (ii) ether bonds, (iii) isoprenoid hydrocarbon chains.

る湿地堆積物中や様々な海洋堆積物，そしてメタン冷湧水堆積物から検出の報告がなされてきた。archaeol は古細菌全般に見られるエーテル脂質であり，したがってメタン古細菌以外の好熱古細菌や高度好塩古細菌などにも含まれている (Koga *et al.*, 1998a, b)。したがって，archaeol の存在量だけでメタン古細菌のバイオマスの評価をすることはできない。ただし，メタン冷湧水堆積物から検出される archaeol の安定炭素同位体比を測ってみると，非常に軽いことが多い。これは archaeol の炭素源が冷湧水に含まれるメタンであることを示唆するものであり，したがって，そのような特徴を持つ archaeol は ANME 由来であると考えることができる。なお，全ての ANME が archaeol の起源と成りうることが判明している (Blumenberg *et al.*, 2004)。

hydroxyarchaeol は，archaeol と同じ炭素骨格を有するが，いずれかのフィタニル側鎖の3位の炭素に水酸基が結合したものである (Fig. 2)。sn-2位のフィタニル基に水酸基が結合したものを sn-2-hydroxyarchaeol，sn-3位に結合したものを sn-3-hydroxyarchaeol と呼ぶ。この化合物は，*Methanococcales* 目や *Methanosarcinales* 目のメタン生成古細菌の主要な膜脂質成分であることが知られている (Sprott *et al.*, 1990)。他にも，*Methanosphaera* 属 (Koga *et al.*, 1998a, b) や *Methanobrevibacter smithii* (Sprott *et al.*, 1999) などのメタン生成古細菌から検出された報告があり，メタン生成古細菌以外

としては，高度好塩古細菌の *Natronobacterium* から検出された例もある (Upasani *et al.*, 1994)。また，極微量ではあるが好熱古細菌の一種から hydroxyarchaeol が検出された例もある (Sprott *et al.*, 1997)。もし塩分の高い蒸発岩や熱水噴出孔などの沈殿物から hydroxyarchaeol が検出される場合は，それぞれ高度好塩古細菌や好熱古細菌由来と考えられ，メタン古細菌由来ではない可能性がある。しかし，そのような極限環境は比較的少なく，一般的な海洋堆積物やメタン冷湧水堆積物から見出される hydroxyarchaeol は，そのほとんどがメタン古細菌もしくは ANME 由来と考えることができる。

地質試料からの hydroxyarchaeol の検出例としては，Eel river (Hinrichs *et al.*, 1999) や Santa Barbara (Hinrichs *et al.*, 2000) のメタンハイドレート層の上の堆積物やメタン冷湧水堆積物で最初に報告され，その後様々なメタン冷湧水堆積物からの検出例が続いた。archaeol 同様に，メタン冷湧水堆積物中の hydroxyarchaeol の安定炭素同位体比も猛烈に軽いことがほとんどであり，それらが ANME 由来であることを示唆している。Blumenberg ら (2004) は，黒海のメタン冷湧水地帯に分布するバイオマットの有機地球化学及び微生物学的分析を行い，主に ANME-2 から成るバイオマットに，archaeol と同等かそれ以上の濃度の sn-2-hydroxyarchaeol が含まれていることを明らかにした。ANME-2 はメタン生成古細菌である *Methanosarcinales* 目に属しており，これは sn-

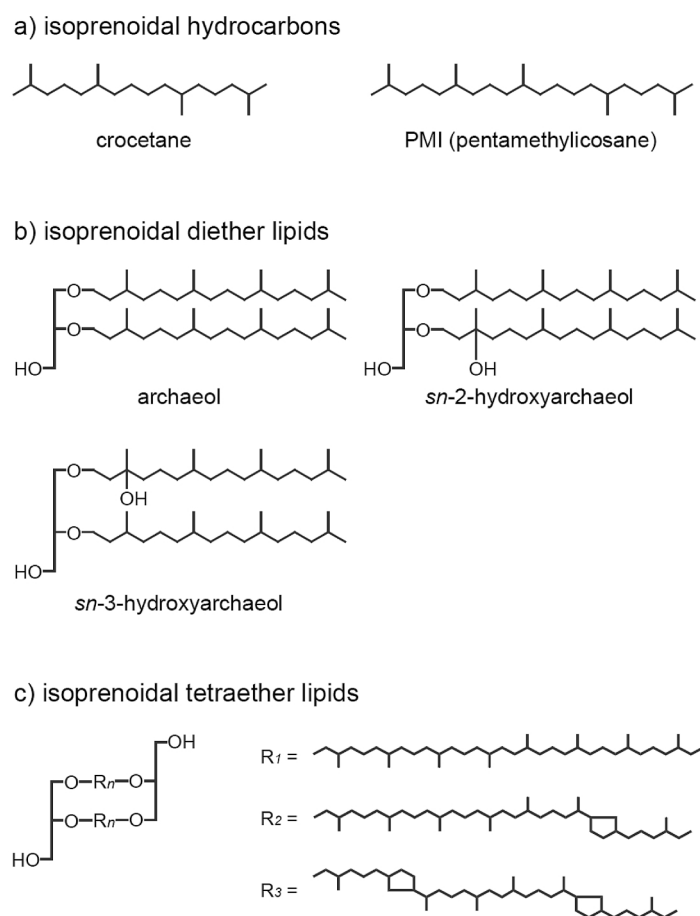


Fig. 2 Chemical structures of ANME's biomarkers which are discussed in the text.

2-hydroxyarchaeol が *Methanosarcinales* 目に特徴的な脂質成分であることと矛盾しない。一方、メタン冷湧水域においては一般的に *sn*-2-hydroxyarchaeol より *sn*-3-hydroxyarchaeol の存在量が少ないことが多い。Oba *et al.* (2006) は、南海トラフのメタン冷湧水堆積物から両方の hydroxyarchaeol を検出しており、最も存在量の多い深度におけるそれらの安定炭素同位体比がいずれも -100‰ を下回る軽い値を持っていることを明らかにした。したがって *sn*-3-hydroxyarchaeol も ANME 由来であることは間違いないであろう。*sn*-3-hydroxyarchaeol を生合成する古細菌としては、*Methanococcus voltae* (Sprott *et al.*, 1993) や *Methanlobus bombayensis* (Pancost *et al.*, 2001) などのメタン生成古細菌が知られている。また、両方の hydroxyarchaeol を生合成するものとして *Methanosaeta concilii* (Ferrante *et al.*, 1988) が知られている。以上の事から、メタン冷湧水

から見出される *sn*-3-hydroxyarchaeol は、ANME-2 以外の既存の ANME かまだ知られていない ANME に由来する可能性があると考えられる。

テトラエーテル脂質は、古細菌全般によって生合成される脂質である (Fig. 2)。2つの glycerol の間に2本のビフィタニル鎖がエーテル結合しているが、そのビフィタニル鎖中に五員環や六員環を伴うことがある。

テトラエーテル脂質は分子量が大きく、また極性が高いため、誘導体化を行っても十分に沸点を下げることはできない。そのため、分析時に気化させる必要のある GC および GC/MS を用いた分析はできない。そこで、これまでの多くのメタン冷湧水域の有機地球化学的研究では、テトラエーテル脂質の4つのエーテル結合をヨウ化水素で切断し、次に、生じたヨウ化ビフィタンを水素化リチウムアルミニウムで還元してビフィタン (Fig. 2) を得て、GC/MS あるいは GC/C/

IRMS を用いた定性分析及び安定炭素同位体比分析を行っている。メタン冷湧水堆積物試料からのピフィタン類の検出例は多くあるもののジエーテル脂質に比べれば少ない。ANME-1を主に含むバイオマツトからは、Fig. 2に示した3種のピフィタンが検出されているのに対し、ANME-2から成るバイオマツトからは全く検出されなかったとの報告例もある (Blumenberg *et al.*, 2004)。Oba *et al.* (2006) の分析では、ピフィタン類は全ての深度で検出されるものの、その安定炭素同位体比は、五員環を全く含まないピフィタン (Fig. 2の R_1) が $-51 \sim -53\%$ 、五員環を1つ含むピフィタン R_2 が $-71 \sim -81\%$ 、ピフィタン R_3 が $-36 \sim -43\%$ であり、ジエーテル脂質 ($-110 \sim -121\%$) に比べれば重い値を持っていることが判明した。これは、これらピフィタン類の一部がメタン以外のより重い炭素源から作りだされているということであり、すなわちこれらの一部がANME以外の古細菌に由来することを示しているのではないかと考えられた。このことは、メタン冷湧水域に嫌氣的メタン酸化とは無関係の古細菌が生息していることを示唆するものであり、メタン冷湧水における微生物活動の多様性を示しているかもしれない。

3.2 イソプレノイド式炭化水素

2,6,10,15,19-pentamethylcosane (PMI) は、メタン生成古細菌、例えば *Methanosarcina barkeri* (Holzer *et al.*, 1979; Risatti *et al.*, 1984) や ANME (Blumenberg *et al.*, 2004) が有するイソプレノイド式炭化水素である (Fig. 2)。嫌氣的メタン酸化が起きていた地質試料では、後述するシリカゲルクロマトグラフィーの画分の中の脂肪族炭化水素画分中に顕著に検出される (e.g., Boetius *et al.*, 2000; Elvert *et al.*, 2000; Hinrichs *et al.*, 2000; Pancost *et al.*, 2000)。また二重結合を1~5つ含む不飽和化合物も同時に検出されることが多い。この化合物は、その構造的特徴、つまりイソプレンの結合様式が不規則であることから、不規則性イソプレノイドに区分される。“head-to-tail” 結合である規則性イソプレノイドに属する構造異性体である2,6,10,14,18-pentamethylcosaneとGCにおける溶出時間がとても近接しており、その同定には注意する必要がある (Greenwood and Summons, 2003)。ANME-1とANME-2はともにPMIを含むが、ANME-2では飽和PMIはほとんど含まれずほとんどが不飽和PMIsとして存在し、一方ANME-1では飽和PMIも不飽和PMIsと同じくらい

含まれているとの報告がある (Blumenberg *et al.*, 2004)。

crocetane は最もANMEに特有なイソプレノイドであると一般的に受け止められている。メタン冷湧水以外の試料からは、メタン生成古細菌のひとつ、人糞や動物糞から単離された *Methanospaera stadtmanae* からしか検出されていない (Jones and Holzer, 1991)。これも不規則性イソプレノイドに属する。ANME-2を主とするバイオマツト中にはcrocetaneとその不飽和化合物である crocetene の両方が含まれていることが報告されているが、ANME-1を主とするバイオマツトには検出限界量の crocetane が含まれるか、全く両方とも含まれていない結果が報告されている (Blumenberg *et al.*, 2004)。GC分析では、crocetaneは規則性イソプレノイドである phytane と溶出時間がほとんど同じであり、定量や特に同位体分析では分離して分析することは難しい (Greenwood and Summons, 2003)。

4. 生きた古細菌とかつて生きていた古細菌の脂質バイオマーカーの分離

海洋堆積物の有機地球化学的手法を用いた分析、すなわち、そこに含まれる脂質バイオマーカーの同定、あるいは組成比や化合物ごとの安定炭素同位体比の分析により、生息する微生物の種類やそれらの活動実態に関する有益な情報が得られる。さらに、これら脂質バイオマーカーの定量を行い、例えば柱状堆積物中の濃度の深度分布を調べることで、それらバイオマーカーを作る微生物の経時的なバイオマス変動を明らかにすることができる。しかし、これまでの脂質バイオマーカーによる研究では、サンプリング時に生きていた微生物由来の脂質と、死んだ微生物の分解産物として残存している脂質を区別することなく同定し、定量を行ってきた。したがって、例えばメタン冷湧水域の海底表層堆積物を用いた研究でも、これらを区別することなく分析した場合、海底堆積物中に現在生息しているANMEや硫酸還元菌由来のものに、海洋表層や海水中にかつて生息していた微生物由来のものを足し合わせて見てしまっている恐れがある。海底面下の堆積物における微生物の活動実態の解明は、例えば微生物起源メタンハイドレートのメタン生産場の解明にかかわるなど、大変注目し値する研究であり、その場に今現在生息している微生物由来の脂質といわば化石となった脂質とを区別することは大変重要なことであ

る。

そこで、脂質化合物の生体内における存在状態と死後の存在状態を分けて分析する手法の開発が必要となった。生きた細菌の細胞膜の主成分はリン脂質である。細菌の死後、リン脂質は酵素による加水分解により、比較的速やかにリン脂質からリン酸基が離脱し、ジグリセリドが生成する (Fig. 3)。この加水分解は細菌の死後数分から数時間以内に発生すると考えられている (White *et al.*, 1979)。したがって、試料中の全リン脂質態脂肪酸 (PLFA) の量を調べることで現在生息中の全細菌の定量的な評価が、ジグリセリド態の脂肪酸 (DGFA) の量を調べることで、すでに死んでいた細菌の定量評価がそれぞれ可能になると考えられる。この手法は実際に、南海トラフのメタンハイドレート賦存堆積層における生きた細菌量の見積りに応用されている (Reed *et al.*, 2002)。

細菌同様、生きた古細菌の膜脂質のほとんどは、リン脂質態や糖脂質態であることが知られている。古細菌が死んだあと、それらがどのように分解されるかについては、未だ詳細がわかっていないが、細菌のリン脂質同様、極性頭部が酵素によって速やかに加水分解されている可能性もある。そこで、リン脂質態や糖脂質態のエーテル脂質の解析は、試料中に生息中の古細菌の種類やバイオマスの評価ができるものと期待された。Oba *et al.* (2006) は、培養したメタン菌を用いて、極性脂質態と中性脂質態のエーテル脂質をシリカ

ゲルクロマトグラフィーにより区別する手法を明らかにした。その手法を簡単に説明すると、凍結乾燥後、粉末化した堆積物試料を酸性 Bligh and Dyer 法で堆積物中の有機物を超音波抽出し、その抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、展開溶媒の極性を徐々に上げながら F1 から F10 までの画分に分ける (Fig. 4, Table 1)。F1 画分には、PMIs や crocetane などの脂肪族炭化水素が含まれている。F4~F7 画分には中性脂質態エーテル脂質が、F8~F10 には極性脂質態エーテル脂質が分画される。さらに個々の画分を見ていくと、F4 画分には中性脂質態の archaeol が分画される。またバクテリア由来の非イソプレノイド式ジエーテル脂質群もこの画分に分画され、有益な情報をもたらすことがある。F5 画分にはまれに少量の hydroxyarchaeol が検出されることがあるが、これはシリカゲルクロマトグラフィーのシリカゲルの分量が少し足りなかったり、展開溶媒の量が若干多かったりする場合に起きるようである。つまり、おそらく F6 画分に落ちるべきものが混ざってしまうのだろう。F6 と F7 画分には、中性脂質態の hydroxyarchaeol とテトラエーテル脂質群が分画される。hydroxyarchaeol については、GC 分析において先に溶出するものが *sn*-2-hydroxyarchaeol で、後のものが *sn*-3-hydroxyarchaeol である。テトラエーテル脂質は誘導体処理を行っても GC では分析できないので、同定したい場合にはこの画分を LC/MS で分析

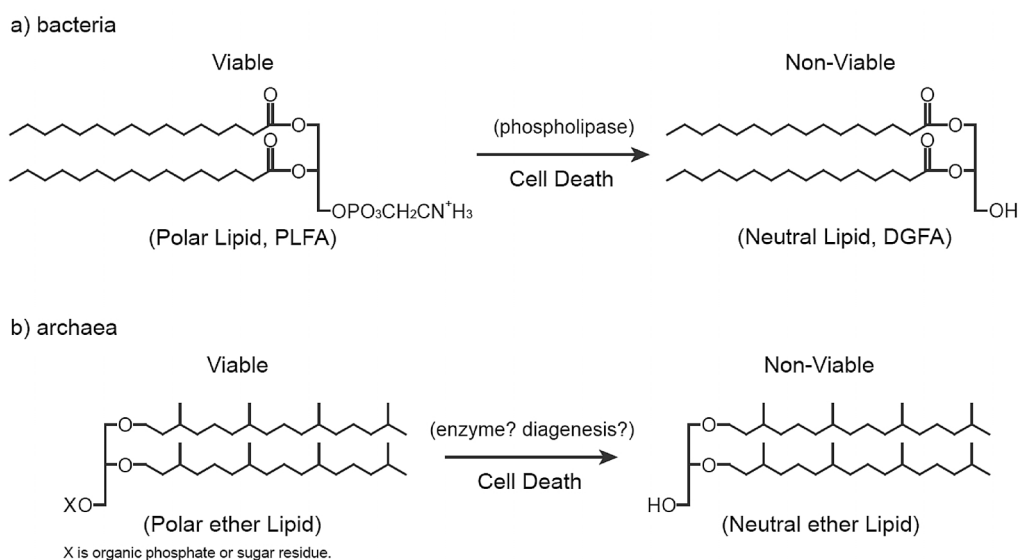


Fig. 3 Illustration showing the conversion of a phospholipid of bacteria and a polar ether lipid of archaea to a diglyceride and a neutral ether lipid as a result of cell death, respectively. PLFA, phospholipid fatty acid; DGFA, diglyceride fatty acid.

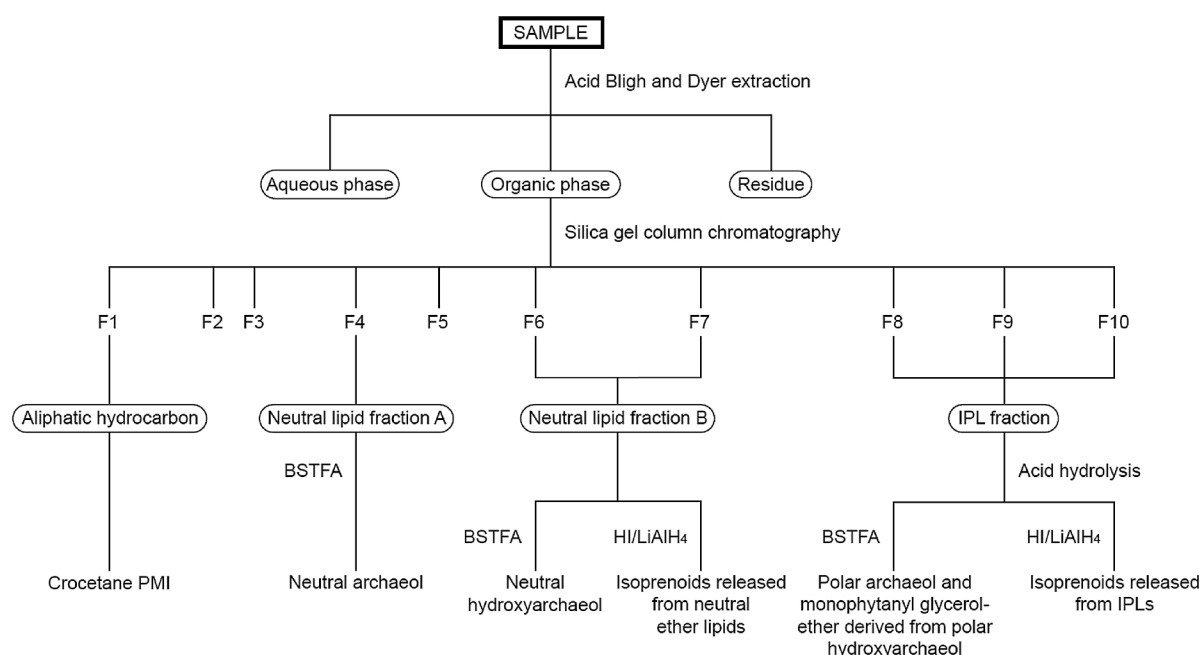


Fig. 4 Procedures for measuring aliphatic hydrocarbons, neutral and polar isoprenyl glycerol ethers in sediment samples. F1-F10 indicate fractions from total lipid extracts separated on a silica gel column. IPL, intact polar lipid; BSTFA, *N*, *O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide.

Table 1 Chromatographic separation on silica gel column (0.6 g of preactivated silica, 63-200 mesh) proposed by Oba *et al.* (2006).

Fraction	Eluent	Vol. (ml)
F1	<i>n</i> -hexane	6
F2	<i>n</i> -hexane:toluene (3:1 v/v)	3
F3	<i>n</i> -hexane:ethyl acetate (19:1 v/v)	3
F4	<i>n</i> -hexane:ethyl acetate (9:1 v/v)	3
F5	<i>n</i> -hexane:ethyl acetate (17:3 v/v)	3
F6	<i>n</i> -hexane:ethyl acetate (4:1 v/v)	3
F7	<i>n</i> -hexane:ethyl acetate (3:1 v/v)	3
F8	<i>n</i> -hexane:ethyl acetate (1:1 v/v)	3
F9	ethyl acetate	3
F10	methanol	10

するとよい。またこの画分にヨウ化水素/水素化リチウムアルミニウム処理をほどこすと、テトラエーテル脂質を構成していたピフィタン類の GC/MS, GC あるいは GC/C/IRMS による同定・定量, 安定炭素同位体比分析が可能になる。またバクテリア由来のモノアルキルエーテル脂質もこの画分に分画される。

一方極性脂質態のエーテル脂質群は, GC/MS に導入する前に, 極性頭部を加水分解で除去する必要がある, 通常これは塩酸メタノリシスで行われる。その後石油エーテルでエーテル脂質群を抽出し BSTFA を加えて TMS 化して GC/MS による定性分析をすること

になるが, hydroxyarchaeol については注意が必要である。hydroxyarchaeol 分子中の水酸基の付いたフィタニル基は酸に弱く, 塩酸メタノリシス処理によって完全に分解されてしまい, *sn*-2-hydroxyarchaeol は 1-*O*-phytanyl glycerolether に, *sn*-3-hydroxyarchaeol は 2-*O*-phytanyl glycerolether になってしまう。そのため, それらのモノアルキルエーテル脂質を同定・定量することで hydroxyarchaeol の定量を行うことが可能である。hydroxyarchaeol の glycerol 部とフィタニル基の安定炭素同位体比が同じであるのか少し異なるのか, これは生合成経路に関わる問題で, 現時点では定かでない。後述する, 南海トラフのメタン冷湧水域の表層堆積物から中性脂質として抽出された hydroxyarchaeol の安定炭素同位体比は, 同じ中性脂質態の archaeol のそれより 3% 軽い値であった (Fig. 5)。一方, 極性脂質態画分から検出された hydroxyarchaeol の酸処理分解生成物である phytanyl glycerolether の安定炭素同位体比は, 極性脂質態の archaeol のそれより 3~7% 軽い値を示した。両脂質態における 2 つのエーテル脂質の安定炭素同位体比の差が同じであったことから, phytanyl glycerolether の安定炭素同位体比は元の hydroxyarchaeol の値と同じであると考えられる。

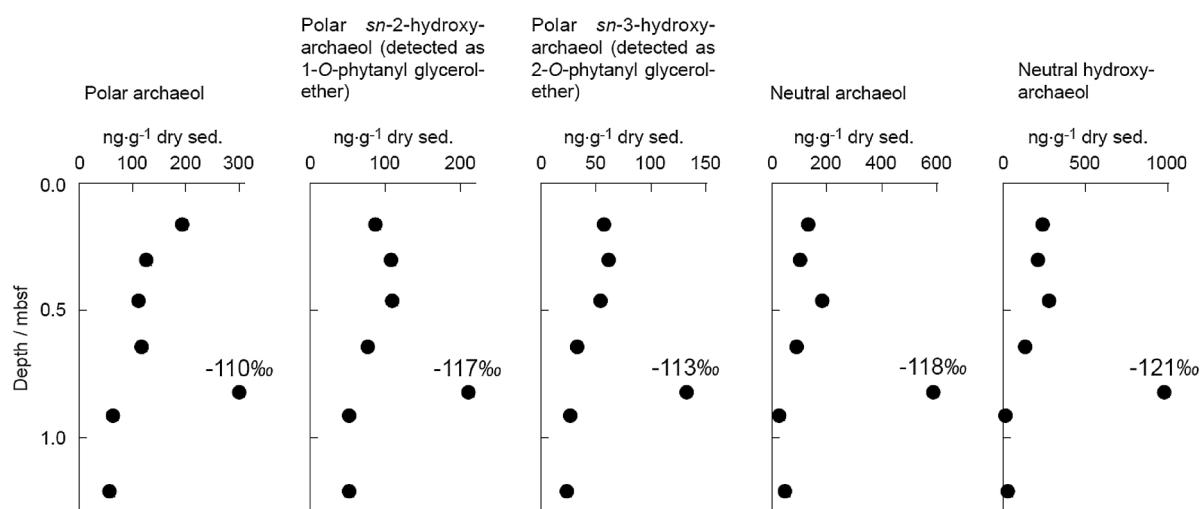


Fig. 5 Depth profiles of concentrations of diether lipids in the Nankai Trough core sediments; $\delta^{13}\text{C}$ values (vs. PDB) of ether lipids at 0.82 mbsf are also shown.

Pitcher *et al.* (2009) は, Oba *et al.* (2006) の分析手法も含め, これまで知られている古細菌由来のエーテル脂質の抽出法や分画方法について比較検討を行った。その結果, Oba *et al.* (2006) の手法は中性脂質態と極性脂質態とを完全に分離することができ, さらにはリン脂質態のエーテル脂質を抽出することができる, 唯一の手法であることが明らかとなった。さらには中性脂質態も極性脂質態もともに, 他の手法より安定して高い回収率で得ることができ, この点においても他の手法より優れていることが判明した。Pitcher *et al.* (2009) は GDGTs にのみ注目しており, GDGTs の分析に特化するため Oba *et al.* (2006) の, 10分画法を4分画法に簡略化している。しかし, archaeol や hydroxyarchaeol のジエーテル脂質と, PMIs や crocetane などの炭化水素の定量的必要性のみならず, これらバイオマーカーの分析はしばしば安定炭素同位体比分析が必要となることを考えると, Oba *et al.* (2006) の主張している, より細かい分画法で精製しておくほうが良い。

Oba *et al.* (2006) はこの手法を用いて, 静岡県御前岬沖の南海トラフ・第二天竜海丘のメタン冷湧水域の表層堆積物から, 極性脂質態および中性脂質態の各種エーテル脂質を抽出し分析を行った。その結果, 表層から130 cm の間の両態の archaeol や hydroxyarchaeol の濃度とその鉛直分布は類似しており, 特に濃度の高かった深度82 cm の堆積物試料中ではそれらの安定炭素同位体比もほとんど同じ値であることが判

明した (Fig. 5)。このことから, 第二天竜海丘の堆積物中の中性脂質態エーテル脂質は, 比較的速やかに分解されて失われている可能性が示唆されている。その一方で, この結果は極性脂質態が中性脂質態へと移行する反応速度と中性脂質態から他の構造 (例えばエーテル結合の解裂によって生じる分解生成物) に続成変化する反応速度にあまり差がないためとも考えられる。しかし両態を分けた分析は過去にこの1例だけであり, 今後より多くの分析結果や考察が必要であろう。

Oba *et al.* (2006) の分析手法は, メタン冷湧水の嫌氣的メタン酸化のみならず, メタンハイドレート賦存域におけるメタン生成古細菌の活動実態の解明や, 近年古水温指標として注目されている TEX₈₆指標の分析にも応用が可能であり, 今後さらに利用されることが期待される。

5. 過去のメタン冷湧水堆積物中の脂質バイオマーカー

メタン冷湧水域で見られるメタンの湧出と嫌氣的メタン酸化などの地球化学的現象は, 現在の海洋のみだけでなく, 過去の地球史においても起きていたことが知られている。それらの現象は, 地球環境変動の原因もしくは結果と関係があると考えられることからその重要性は大変高く, 現在多くの研究者によって研究が進められている。主に炭酸塩の安定炭素同位体比によるメタン冷湧水の地球化学的証拠は, 新生代の様々な

堆積物や炭酸塩岩から見出されている (e.g., Campbell and Bottjer, 1993; Rigby and Goedert, 1996; Peckmann *et al.*, 1999b)。さらに中生代 (Gaillard *et al.*, 1992; Campbell and Bottjer, 1993; Kelly *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2002) や、報告例は少ないものの古生代 (Peckmann *et al.*, 1999a, 2001) にまで遡って、メタン冷湧水の存在の証拠は見つかっており、地球史においては普遍的に存在していたことが判明している。

過去、例えば第三紀以前のメタン冷湧水における微生物活動を調べる際、遺伝子などは原型をとどめていないどころか、その痕跡ですら探し出すことは困難であるため、それらを対象とする分子生物学的な研究はほとんど成果を望めない。一方で、有機地球化学的証拠は見つかる可能性が十分あり、当時生息していた微生物の種類やその活動実態について有益な情報をもたらすことが可能であると考えられる。しかし前章で示したような、脂質バイオマーカーが堆積物や堆積岩中でそのままの分子構造を保持していることはまれであり、それらが続成作用を受けてどのように変化するかを調べておく必要がある。

これまで、新生代のメタン冷湧水の堆積物から、古くは南フランス Beauvoisin で産出するジュラ紀オックスフォード期の炭酸塩 (Peckmann *et al.*, 1999b) まで、有機地球化学的研究が行われている。それらから ANME や硫酸還元菌由来の脂質バイオマーカーの続成変化生成物が検出されており、Peckmann and Thiel (2004) によってそれらの続成変化に対する対応性がまとめられている。この論文において示された表に、Oba *et al.* (2006) のデータを加えて整理したものを Table 2 に示す。これを見ると、crocetane や PMI などの脂肪族炭化水素は現在から中生代の炭酸塩岩から一様に検出されており、その分子構造の続成変化に対する耐久性が大変高いことがわかる。さらに脂肪族炭化水素はその分析の簡便性から、最も優先的に分析対象になるものであり、したがって、過去のメタン冷湧水研究における最も重要なバイオマーカーの一種となる。さらにカンブリア紀の堆積物から crocetane らしきピークが検出されていること (Greenwood and Summons, 2003) から、さらに古い時代のメタン冷湧水から検出される可能性は充分あり得ると考えられる。

Table 2 Occurrence and isotopic compositions of methane-related biomarkers from fossil seeps and recent reference samples.

Location	Sample	Age	Crocetane	PMI	Hydroxyarchaeol	Archaeol	Phytanic acid	Phytol
Nankai Trough ¹⁾	Sediment	Recent	++ -112‰	++ -118‰	++ -121‰	++ -118‰	—	—
NW Black Sea Ukrainian shelf ²⁾	Microbial mats	Recent	+ -95‰	+ -96‰	+ -90‰	++ -88‰	tr	—
NW Black Sea Ukrainian shelf ^{3) 4)}	Seep carbonate	Recent	++ -107‰	+ -101‰	++	++ -112‰	+	+
Marmorito, N-Italy ⁵⁾	Tubeworm limestone	Miocene	++ -116‰	++ -112‰	—	++ -108‰	++	++ -109‰
Lincoln Creek Fm., WA, USA ^{3) 6)}	Seep carbonates	Oligocene	++ -110‰	++ -120‰	—	+	+	++
Whiskey Creek, WA, USA ⁷⁾	Seep carbonate	Eocene	tr	++	—	—	+	n.a.
Beauvoisin, S-France ⁸⁾	Seep carbonates	Jurassic Oxfordian	—	++ -76‰	—	—	tr	n.a.

Symbols, ++, +, tr, —, n.a. indicate major, minor, trace amounts, not detected, and not analyzed.

- 1) Oba *et al.* (2006)
- 2) Michaelis *et al.* (2002)
- 3) Thiel *et al.* (2001a)
- 4) Thiel *et al.* (2001b)
- 5) Peckmann and Thiel (2004)
- 6) Peckmann *et al.* (2002)
- 7) Goedert *et al.* (2003)
- 8) Peckmann *et al.* (1999b)

古細菌や細菌由来のエーテル脂質は、エーテル結合の低い反応性から、エステル脂質よりは続成変化に耐久性があるように考えられるものの、やはり脂肪族炭化水素に比べれば、続成変化しやすい。Table 2で示されているように、archaeol や hydroxyarchaeol などのジエーテル脂質は、中生代の炭酸岩からは検出されていない。hydroxyarchaeol にいたっては、現世堆積物やバイオマットからしか検出されておらず、これは水酸基の結合したフィタニル基が分解しやすいためであると考えられる。しかし、メタン冷湧水とは関係のない、白亜紀アルビアン期に発生した海洋無酸素事変（OAE）時に堆積した黒色頁岩からテトラエーテル脂質が検出された例（Kuypers *et al.*, 2002）もあり、中生代のメタン冷湧水堆積物や炭酸塩岩から archaeol やテトラエーテル脂質などが検出される可能性は充分あると考えられる。

もしすでにエーテル脂質が保存されていないほど続成作用を受けていたとしても、その続成変化生成物から、古細菌や細菌の評価ができる可能性がある。これまでの過去のメタン冷湧水の有機地球化学分析では、archaeol や非イソプレノイド式エーテル脂質が残っていない時代より古い堆積物から、若い時代からは検出されないコア部のカルボン酸態やアルコール態の脂質バイオマーカーが検出されており、その安定炭素同位体比分析を併せることで、当時の嫌氣的メタン酸化の評価が可能であることを示している（Table 2）。またさらに続成変化を受けてできる phytane などからも、安定炭素同位体比分析は必須ではあるが、情報を得ることができると考えられる。

6. おわりに—今後の応用・発展性について

これまで述べてきた嫌氣的メタン酸化に関する有機地球化学的研究およびその手法は、メタン冷湧水域における嫌氣的メタン酸化の実態解明だけでなく、様々な研究領域に応用されうるため、さらに発展し、新たな知見を得る手がかりになると期待される。

4章で述べたような生きた古細菌由来の極性脂質態エーテル脂質の分析は、メタンハイドレート賦存域におけるメタン生成古細菌や ANME などのバイオマス評価や、その活動実態の解明に応用できるものと考えられ、ペルー沖の海底下堆積物中における報告例などがすでに存在する（Biddle *et al.*, 2006）。

メタンハイドレートの大規模な分解事変における嫌氣的メタン酸化の有機地球化学的証拠は、地球の環境

変動と生物の関わりについて大きな知見を与えるかもしれない、大変興味深い研究である。

過去6億年間の顕世代において、生物の大量絶滅が幾度となく発生したことが判明している。また絶滅事変は時として、新たな生物群の発生・拡大の契機ともなっており、地球の歴史における生物進化にとって重要である。近年そのいくつかの生物大量絶滅事変の発生した層準において、安定炭素同位体比が短期的に数‰ほどネガティブシフトしている現象が多く確認されており、これを軽い安定炭素同位体比を持つメタンハイドレートの大量分解の痕跡であるとする説がある（例として、約5,500年前の暁新世／始新世境界の極端温暖化事変, Dickens *et al.*, 1995）。安定炭素同位体比のネガティブシフトは極端な地球温暖化に関与していると考えられることが多い。メタンハイドレートの大量分解が地球温暖化の原因なのか、逆に地球温暖化の結果としてメタンハイドレートが大量分解したのかといった疑問や、メタンハイドレートの大量分解はどこで発生したのか、さらにはメタンハイドレートの大量分解が環境や生物に与えた影響など、多くの疑問や謎はほとんど未解明である。大変興味をそそる課題であり、この解明に本総説で紹介したような有機地球化学的研究手法が大いに貢献できるのでないかと期待されている。

謝 辞

山内敬明准教授（九州大学）と匿名査読者には丁寧な査読をして頂き、建設的な御指摘と御意見を頂いた。高野淑識博士（海洋研究開発機構）には本総説の執筆の機会を与えて頂いた。以上の方々に記して感謝の意を表する。

文 献

- Barnes, R. O. and Goldberg, E. D. (1976) Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology*, **4**, 297–300.
- Biddle, J. F., Lipp, J. S., Lever, M. A., Lloyd, K. G., Sørensen, K. B., Anderson, R., Fredricks, H. F., Elvert, M., Kelly, T. J., Schrag, D. P., Sogin, M. L., Brenchley, J. E., Teske, A., House, C. H. and Hinrichs, K. -U. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 3846–3851.
- 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 USA*, **97**, 14421–14426.

- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B. B., Witte, U. and Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623–626.
- Campbell, K. A. and Bottjer, D. J. (1993) Fossil cold seeps. *National Geographic Research and Exploration*, **9**, 326–343.
- Campbell, K. A., Farmer, J. D. and Des Marais, D. (2002) Ancient hydrocarbon seeps from the Mesozoic convergent margin of California: carbonate geochemistry, fluids and paleoenvironments. *Geofluids*, **2**, 63–94.
- Dickens, G. R., O'Neil, J. R., Rea, D. K. and Owen, R. M. (1995) Dissociation of oceanic methane hydrate as a cause of the carbon isotope excursion at the end of the Paleocene. *Paleoceanography*, **10**, 965–971.
- 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.
- 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.
- Ferrante, G., Ekiel, I., Patel, G. B. and Sprott, G. D. (1988) A novel core lipid isolated from the acetoclastic methanogen, *Methanothrix concilii* GP 6. *Biochimica et Biophysica Acta*, **963**, 173–182.
- Gaillard, C., Rio, M., Rolin, Y. and Roux, M. (1992) Fossil chemosynthetic communities related to vents or seeps in sedimentary basins: the pseudobioherms of southeastern France compared to other world examples. *Palaios*, **7**, 451–465.
- Goedert, J. L., Thiel, V., Schmale, O., Rau, W. W., Michaelis, W. and Peckmann, J. (2003) The Late Eocene 'Whiskey Creek' methane-seep deposit (western Washington State): Part I. Geology, palaeontology and molecular geobiology. *Facies*, **48**, 223–240.
- Greenwood, P. F. and Summons, R. E. (2003) GC-MS detection and significance of crocetane and pentamethylcosane in sediments and crude oils. *Organic Geochemistry*, **34**, 1211–1222.
- 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**, 1685–1701.
- Holzer, G., Oró, J. and Tornabene, T. G. (1979) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of neutral lipids from methanogenic and thermoacidophilic bacteria. *Journal of Chromatography*, **186**, 795–809.
- 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.
- Huber, R., Rossnagel, 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.
- Jones, W. J. and Holzer, G. U. (1991) The polar and neutral lipid composition of *Methanosphaera stadtmanae*. *Systematic and Applied Microbiology*, **14**, 130–134.
- Kelly, S. R. A., Ditchfield, P. W., Doubleday, P. A. and Marshall, J. D. (1995) An Upper Jurassic methane-seep limestone from the fossil Bluff Group forearc basin of Alexander Island, Antarctica. *Journal of Sedimentary Research*, **A65**, 274–282.
- 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.
- Koga, Y., Morii, H., Akagawa-Matsushita, M. and Ohga, M. (1998a) 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., Kyuragi, T., Nishihara, K. and Sone, N. (1998b) Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent. *Journal of Molecular Evolution*, **46**, 54–63.
- Koga, Y. and Morii, H. (2005) Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **69**, 2019–2034.
- Koga, Y. and Morii, H. (2006) Special methods for the analysis of ether lipid structure and metabolism in archaea. *Analytical Biochemistry*, **348**, 1–14.
- 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., Rugh, W. D., Massoth, G. J., Langseth, M. G., Cochrane, G. R. and Scamman, R. L. (1986) Oregon subduction zone: venting, fauna, and carbonates. *Science*, **231**, 561–566.
- Kuypers, M. M. M., Blokker, P., Hopmans, E. C., Kinkel, H., Pancost, R. D., Schouten, S. and Sinninghe Damsté, J. S. (2002) Archaeal remains dominate marine organic matter from the early Albian oceanic anoxic event 1b. *Paleogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **185**, 211–

- 234.
- Kvenvolden, K. A. (1988) Methane hydrate-a major reservoir of carbon in the shallow geosphere. *Chemical Geology*, **71**, 41–51.
- Kvenvolden, K. A. (2002) Methane hydrate in the global organic carbon cycle. *Terra Nova*, **14**, 302–306.
- Langworthy, T. A., Holzer, 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.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A. and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 3348–3362.
- 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.
- 宮崎淳一 (2009) 泥火山を含む冷湧水帯における微生物の生態系およびその代謝活動. 地学雑誌, **118**, 564–577.
- Niemann, H., Lösekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., Amann, R., Sauter, E. J., Schlüter, M., Klages, M., Foucher, J. P. and Boetius, A. (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*, **443**, 854–858.
- Oba, M., Sakata, S. and Tsunogai, U. (2006) Polar and neutral isopranyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry*, **37**, 1643–1654.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D. and DeLong, E. F. (2001) 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. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 7663–7668.
- Pancost, R. D., Sinninghe Damsté, J. S., de Lint, S., van der Maarel, M. J. E. C. and Gottschal, J. C. (2000) 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.
- Pancost, R. D., Hopmans, E. C., Sinninghe Damsté, J. S. and the medinaut Shipboard Scientific Party (2001) Archaeal lipids in Mediterranean Cold Seeps: molecular proxies for anaerobic methane oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 1611–1627.
- Peckmann, J., Walliser, O. H., Riegel, W. and Reitner, J. (1999a) Signatures of hydrocarbon venting in a Middle Devonian carbonate mound (Hollard Mound) at the Hamar Leghdad (AntiAtlas Morocco). *Facies*, **40**, 281–296.
- Peckmann, J., Thiel, V., Michaelis, W., Clari, P., Gaillard, C., Martire, L. and Reiner, J. (1999b) Cold seep deposits of Beauvoisin (Oxfordian; southeastern France) and Marmorito (Miocene; northern Italy): microbially induced authigenic carbonates. *International Journal of Earth Sciences*, **88**, 60–75.
- Peckmann, J., Gischler, E., Oschmann, W. and Reitner, J. (2001) An Early Carboniferous seep community and hydrocarbon-derived carbonates from the Harz Mountains, Germany. *Geology*, **29**, 271–274.
- Peckmann, J., Goedert, J. L., Thiel, V., Michaelis, W. and Reitner, J. (2002) A comprehensive approach to the study of methane-seep deposits from the Lincoln Creek Formation, western Washington State USA. *Sedimentology*, **49**, 855–873.
- Peckmann, J. and Thiel, V. (2004) Carbon cycling at ancient methane-seeps. *Chemical Geology*, **205**, 443–467.
- Pitcher, A., Hopmans, E. C., Schouten, S. and Sinninghe Damsté, J. S. (2009) Separation of core and intact polar archaeal tetraether lipids using silica column: Insights into living and fossil biomass contributions. *Organic Geochemistry*, **40**, 12–19.
- Reeburgh, W. S. (1976) Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth and Planetary Science Letters*, **28**, 337–344.
- Reed, D. W., Fujita, Y., Delwiche, M. E., Blackwelder, D. B., Sheridan, P. P., Uchida, T. and Colwell, F. S. (2002) Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a Forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3759–3770.
- Rigby, J. K. and Goedert, J. L. (1996) Fossil sponges from a localized cold-seep limestone in Oligocene rocks of the Olympic Peninsula, Washington. *Journal of Paleontology*, **70**, 900–908.
- 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.
- Sassen, R., Joye, S., Sweet, S. T., Defreitas, D. A., Milkov, A. V. and MacDonald, I. R. (1999) Thermogenic gas hydrates and hydrocarbon gases in complex chemosynthetic communities. Gulf of Mexico continental slope. *Organic Geochemistry*, **30**, 485–497.
- Sprott, G. D., Ekiel, I. and Dicaire, C. (1990) Novel, acid-labile, hydroxydiether lipid cores in methanogenic bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 735–740.
- Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Choquet, C. G., Patel, G. B. and Ekiel, I. (1993) Hydroxydiether lipid structures in *Methanosarcina* spp. and *Methanococcus voltae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 912–914.
- Sprott, G. D., Agnew, B. J. and Patel, G. B. (1997) Structural

- features of ether lipids in the archaeobacterial thermophiles *Pyrococcus furiosus*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanothermobacter fervidus*, and *Sulfolobus acidocaldarius*. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 467–476.
- Sprott, G. D., Brisson, J. -R., Dicaire, C. J., Pelletier, A. K., Deschatelets, L., Krishnan, L. and Patel, G. B. (1999) A structural comparison of the total polar lipids from the human archaea *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospira stadtmanae* and its relevance to the adjuvant activities of their liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1440**, 275–288.
- Teixidor, P., Grimalt, J. O., Pueyo, J. J. and Rodriguez-Valera, F. (1993) Isopranyl glycerol diethers in non-alkaline evaporitic environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **57**, 4479–4489.
- Thiel, V., Peckmann, J., Richnow, H. -H., Luth, U., Reitner, J. and Michaelis, W. (2001a) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Marine Chemistry*, **73**, 97–112.
- Thiel, V., Peckmann, J., Schmale, O., Reitner, J. and Michaelis, W. (2001b) A new straight-chain hydrocarbon biomarker associated with anaerobic methane cycling. *Organic Geochemistry*, **32**, 1019–1023.
- Upasani, V. N., Desai, S. G., Moldoveanu, N. and Kates, M. (1994) Lipids of extremely halophilic archaeobacteria from saline environments in India: A novel glycolipid in *Natronobacterium* strains. *Microbiology*, **140**, 1959–1966.
- White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D. and Bobbie, R. J. (1979) Determination of the sedimentary microbial biomass by extratable lipid phosphate. *Oecologia*, **40**, 51–62.