

微生物起源メタンハイドレート分布域における 微生物メタン生成活動

吉岡 秀佳*・坂田 将*

(2010年8月10日受付, 2010年11月9日受理)

Microbial methane production activity around the biogenic methane hydrate-bearing regions

Hideyoshi YOSHIOKA* and Susumu SAKATA*

* Institute for Geo-Resources and Environment,
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8567, Japan

Methane forming methane hydrates along continental margins is produced mostly by microbial methanogenesis. Results of gas compounds and stable carbon and hydrogen isotopic studies indicate that methane in these hydrates was produced by methanogens through carbonate reduction pathway. However, the geochemical interpretation is not supported by microbiological studies.

From late 1980's, researches of ODP and IODP revealed that subsurface biosphere is widespread under deep marine sediments and the microbes are still active in the subsurface region. Studies of marine sediments in the Blake Ridge and the Cascadia Margin showed that numbers of subsurface microbes and their activities in the sediments were closely related with the distribution of methane hydrates in each region.

Three regions are proposed as main methanogenesis location around the methane hydrate-bearing regions: (1) near surface sediments below the sulfate-methane interface (SMI), (2) sediments within the hydrate-bearing region and just below the BSR, and (3) deep region far below the BSR. So far, it is not obvious how methane provided from each region contributed to the formation of methane hydrate. Multidisciplinary studies are necessary to estimate contribution of methane provided from each region.

Key words: methane hydrate, microbe, methanogen

1. 微生物起源のメタンハイドレート

メタンハイドレート (MH) は、水分子からなる籠構造の中にゲスト分子としてメタンが入った包接水和物であり、低温高圧条件で安定な固体物質である。その存在は、19世紀後半から化学の世界で知られていたが、20世紀半ばから、天然ガス資源として注目され、

現在まで世界各地に分布していることが分かってきた。主な分布域は、極域に近い凍土や大陸縁辺域の大陸棚近辺であり (例えば, Kvenvolden, 1993), 後者の場合, 地震波を用いた物理探査によって, 海底地下数百 m の深度に海底擬似反射面 Bottom Stimulating Reflector (BSR) と呼ばれる反射面が発見されることによって MH の分布が推定された。MH の多くのものは, 微生物起源のメタン, つまり, 微生物の活動によって生成されたメタンを含んでいると解釈されている (Kvenvolden, 1995; Milkov, 2005)。その根拠

* 産業技術総合研究所地圏資源環境研究部門
〒305-8567 茨城県つくば市東1-1-1 中央第7

として、(1)ガスの炭化水素成分の99%以上がメタンであることと、(2)メタンの炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$) が -60% より低いことが挙げられている (Bernard *et al.*, 1976)。つまり地球化学的な研究によって微生物起源と解釈されている (Fig. 1)。微生物学では、古細菌に分類されているメタン生成菌のみが H_2/CO_2 や、蟻酸、酢酸、メタノール、メチルアミン、硫化ジメチル等を基質としてメタンを生成することが知られており (Zinder, 1993)、自然環境では、塩沼のような特殊な環境を除き (Oremland *et al.*, 1982)、二酸化炭素を還元してメタンを作る経路 (CO_2 還元経路、式(1)) と酢酸を分解してメタンをつくる経路 (酢酸分解経路、式(2)) が主なメタン生成経路であると考えられている (Oremland, 1988)。

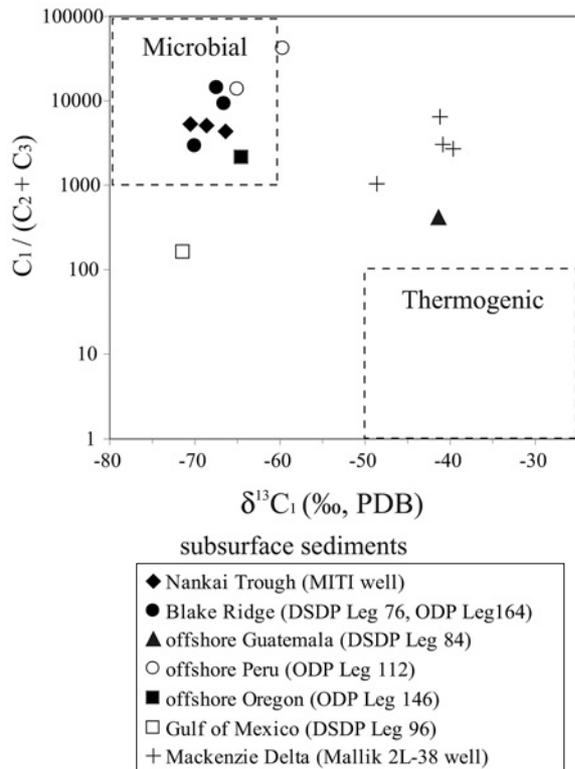
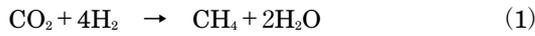


Fig. 1 Hydrocarbon ratio of $\text{C}_1/(\text{C}_2 + \text{C}_3)$ versus carbon isotope compositions in natural gas hydrates recovered from marine subsurface sediments. Data from Waseda and Uchida (1998) and Uchida *et al.* (1999).

一方、地球化学研究では、1970年代から環境中のメタンの安定炭素同位体比と水素同位体比が、天然ガス田や海洋環境、湖沼等の淡水環境のような集積している環境毎に異なった値を持つことが知られるようになった (中井ほか, 1974; Schoell, 1980; Whiticar *et al.*, 1986)。また、海洋堆積物中で硫酸イオンが枯渇した深度では、主に CO_2 還元経路によるメタン生成が活発であり (Crill and Marten, 1986; Kuivila *et al.*, 1990)、硫酸イオンのほとんど無い淡水環境では、酢酸分解経路によるメタン生成が起こる (Phelps and Zeikus, 1984; Kuivila *et al.*, 1989) ことから、Whiticar *et al.* (1986) は、メタンの安定同位体比の値は、微生物によるメタン生成経路の違いを反映していると解釈した。それ以後、地球化学の分野では、Whiticar *et al.* (1986) の示した区分に従って、メタンの安定炭素同位体比や水素同位体比を用いて生成経路を解釈するようになった (例えば、Burke *et al.*, 1988; Hornibrook *et al.*, 1997)。この区分に従って、南海トラフや北大西洋のブレークリッジ等の多くのMHのメタンは、 CO_2 還元経路によるメタン生成活動によって作られたと解釈されている (早稲田・内田, 1998; Milkov, 2005, Fig. 2)。一方で、安定同位体比

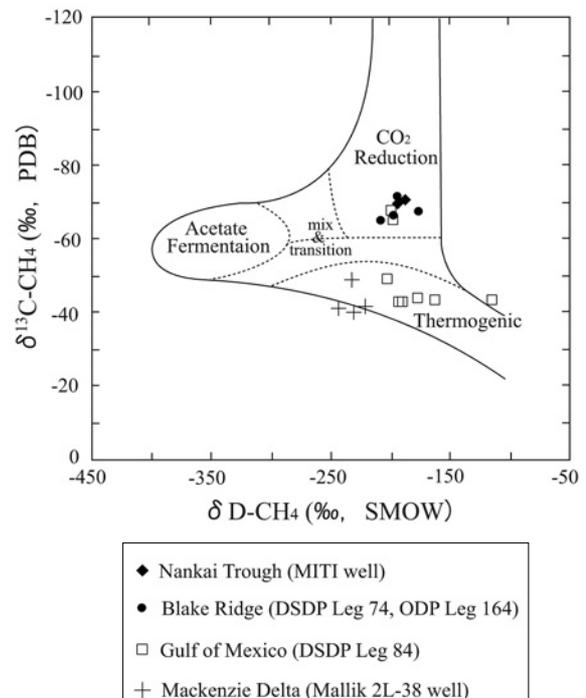


Fig. 2 δD vs. $\delta^{13}\text{C}$ values of CH_4 in natural gas hydrates. Data from Waseda and Uchida (1998) and Uchida *et al.* (1999).

を用いた解釈は地球化学研究に基づいており、微生物学的な研究による裏づけや検証は十分でない。例えば、実際、メタン生成菌を含んだ水田土壌やメタン生成菌を用いた培養実験では、メタンの水素同位体比の結果が地球化学の解釈と調和的でない同位体分別を示すことから (Sugimoto and Wada, 1995; Balabane *et al.*, 1987; Yoshioka *et al.*, 2008), メタンの水素同位体比は、水素分圧 (Burke, 1993) や成長段階 (Valentine *et al.*, 2004), 水の同位体比 (Waldron *et al.*, 1999), メタン生成菌の種類 (Yoshioka *et al.*, 2008) に依存している可能性が指摘されているので解釈においては注意を要する。本稿では、微生物起源のメタンからなる MH のうち、大陸縁域の微生物起源の MH について、メタン生成菌を主とする地下微生物に関連する研究の経緯と、MH の分布とメタン生成活動の関係について取り組んだ研究を解説する。

2. 海底地下環境における微生物分布・活動

大陸縁域の MH 分布域のように、1 km 以上の水深で堆積物表層から数百 m 程度の深さに微生物起源のメタンが溜まっていることから、地下環境に生息する微生物が関与していることは明らかだが、地下微生物の研究が進展したのは、ここ20年あまりのことである。それ以前にも、地下環境に微生物が存在することが報告されてきたが、研究手法やデータが不十分であったり、表層環境の微生物からの汚染の可能性があったりして信憑性は必ずしも高くなかった。そのような状況を変えたのが、国際的な海洋掘削計画である Ocean Drilling Project (ODP), あるいはその後継である Integrated Ocean Drilling Project (IODP) において推進された地下微生物研究である。ODP や IODP は、堆積学、地球物理学、地球化学、古生物学等の手法を用いて、地球環境や地球の歴史を総合的に研究する国際プロジェクトである。1986年にペルー沖で行われた ODP Leg 112を皮切りに地下微生物の研究を目的の一つとする掘削調査が次々と行われ、微生物学的手法も取り入れられて、地下微生物の研究が大きく進展した。ODP や IODP においては、海底下の堆積物をできるだけ乱さず地下の状態を保ったまま採取することが、堆積学、地球化学、古生物学等の研究のために共通の課題であったために優れた掘削技術が開発されたことや、グラスビーズやパーフルオロカーボントレーサー (PFT) を用いた掘削泥水の汚染

評価法が開発されたことなどが (Smith *et al.*, 2000), 地下微生物研究の進んだ理由として挙げられる。また、ODP や IODP の特徴として1つの掘削調査に対して多分野の研究者が研究を行うことから、微生物学的なデータのみならず、堆積学や地球化学等の研究が同じ掘削場所や堆積物コアに対して多面的・総合的に行われたことが、信頼性の高い地下微生物研究を確立する基礎となり、地下微生物の生息環境を推察する重要な手がかりになった。

海洋堆積物から得られる直接的な微生物データとしては、微生物の数、活性、DNA や RNA 等の遺伝子情報、脂質成分等があげられる。また、培養実験によって微生物を単離することも直接的な証拠となる。Parkes *et al.* (1994) は、ペルー沖や日本海等の堆積物において、海底表層から深度500 m の範囲に堆積物1 cm³当たり10⁶から10⁹個の微生物が分布していることを明らかにし、海洋の堆積物中に微生物が生息する領域が広がっていることを示し注目を浴びた (Fig. 3)。その後、ODP で行われたほかの海域 (MH が分布するカスカディアやブレークリッジも含む) の調査結果をまとめて、いずれの地域も同程度の菌数密度で微生物が広く地下に分布していることを明らかにした (レビューとして、Parkes *et al.*, 2000)。Whitman *et al.* (1998) は、地下微生物全体のバイオマスは、表層の微生物全体のバイオマスより大きいと見積り、地下微生物の重要性やインパクトが広く認識されるようになった。Parkes らは、硫酸還元活性や、CO₂還元によるメタン生成活性、酢酸分解によるメタン生成活性、メタン酸化活性の評価を行い、各地域での違いを見出している (Parkes *et al.*, 2000; Wellsbury *et al.*, 2002)。その他のメタン生成菌に関するものをあげると、まず、培養による微生物の単離に関しては、これまで2例しか報告がない。Mikucki *et al.* (2003) は、南海トラフの MH の分布域における深度447 m の堆積物から、*Methanoculleus submarines* sp. Nov の単離に成功している。Kendall *et al.* (2006) は、Mikucki *et al.* と同一の堆積物から、CO₂還元によりメタン生成を行う2種類の新規メタン生成菌 (Nankai-2, Nankai-3) を単離している。培養によらない遺伝子解析の研究では、リボゾーム RNA (Marchesi *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 2006) や、メタン生成菌の機能遺伝子である *mcrA* の報告例 (Biddle *et al.*, 1999; Yoshioka *et al.*, 2010) がある。メタン生成菌の単離の報告例が少ないのは、環境中の

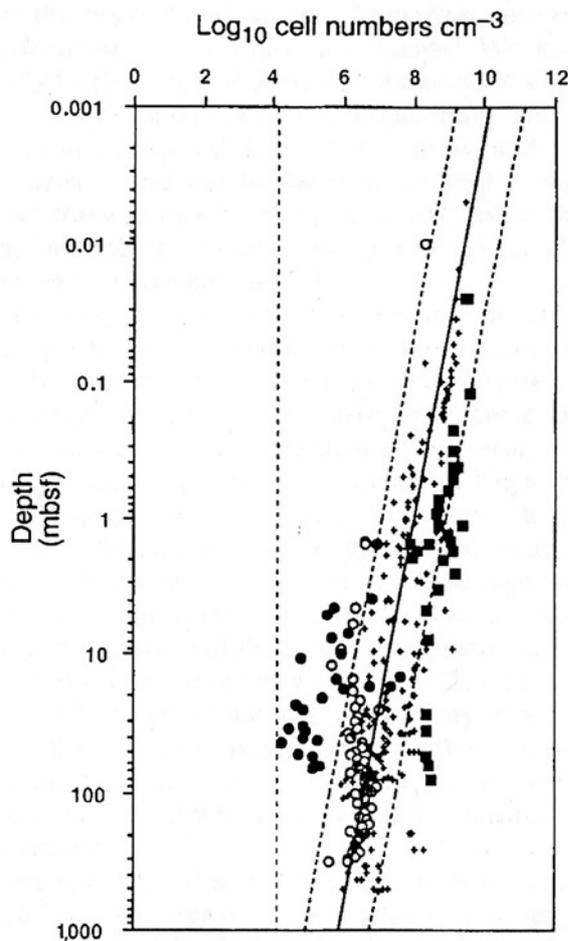


Fig. 3 Depth distribution of subsurface bacterial populations. Bacterial numbers are shown on a logarithmic scale. (Parkes *et al.*, 1994)

メタン生成菌に関して、人工的に簡便に培養できる条件が今なお不明であるという技術的な問題が理由として考えられる。DNA や RNA の報告例が多くないことも、抽出過程での分解や、堆積物中に含まれる物質による阻害作用などの技術的な問題が理由として考えられる。脂質成分については、intact polar lipids (IPLs) が微生物のバイオマーカーとして利用されるが (例えば, Reed *et al.*, 2002; Lipp *et al.*, 2008), 堆積物中の IPLs が、その場で“生きている”微生物の証拠であるのか、あるいは、化石成分、つまり、“死んでしまった”微生物の残骸なのか議論があり、解釈に際しては注意を要する (Schouten *et al.*, 2010)。

次の2節では、微生物起源のメタンを含む MH の分布域で、MH の分布とメタン生成活性または、メタン生成菌の分布との関係を明らかにした2つの研究 (場

所は、ブレークリッジとカスカディア縁辺域) について解説する。

3. ブレークリッジの MH 分布域における微生物分布・活性の評価

ブレークリッジは、大西洋の北米大陸縁辺部に位置し、アメリカ・ノースカロライナ州の沖合約400 km の大陸棚の深海平坦面から突き出た高さ約1.5 km の高まりである (Fig. 4)。同地域には、物理探査によって BSR が見付き (Markl *et al.*, 1970), 1970年に行われた深海掘削計画 Deep Sea Drilling Program (DSDP) Leg 11における物理探査によって、MH の安定領域の下部境界と関連していると解釈された (Ewing and Hollister, 1972)。また、Leg 11では、南東方向の端にあるブレークアウターリッジで初めて掘削調査が行われ、BSR 付近からガスに富んだ堆積物が見付き、MH の存在が示唆された (Ewing and Hollister, 1972)。さらに、1980年の DSDP Leg 76によるブレークリッジ側方の掘削調査によって初めて MH を胚胎する堆積物が採取された (Kvenvolden and Barnard, 1983)。ガス分析により、同地域の堆積物や MH 中のメタンは微生物起源であり、メタンおよび二酸化炭素の炭素同位体比の差より CO₂還元経路でメタンが生成されたと考えられた (Brooks *et al.*, 1983; Galimov and Kvenvolden, 1983)。1995年に行われた ODP Leg 164では、当時の最新技術を駆使して当該地の MH を研究する目的で掘削調査が行われた。10 km 間隔で3箇並ぶ位置において700~750 mbsf の深度まで掘削調査が行われ、そのうち2箇所 (サイト995と997) は、明瞭な BSR が見つかっている場所であり、もう1つ (サイト994) は、BSR が無い場所が選ばれた。船上でのコア堆積物の観察や間隙水中の塩素濃度分析、物理探査の結果、BSR が無かったサイト994も含めて3箇所すべてのサンプルからメタンハイドレートが発見され、ノジュール状 (塊状) または、ペイン状 (割れ目を埋める形) で堆積物に含まれており、堆積物の空隙体積のおよそ1~2% を占めていた。200~450 mbsf (BSR の深度) の範囲では、14%まで占める箇所があった (Paull and Matsumoto, 2000)。

ODP Leg 164では、同地域で初めて、MH を含む堆積物を対象とした微生物研究が行われた (Wellsbury *et al.*, 1997, 2000)。表層近くの堆積物中には、堆積物1 cm³あたり10⁸から10⁹個の菌数の微生物が含ま

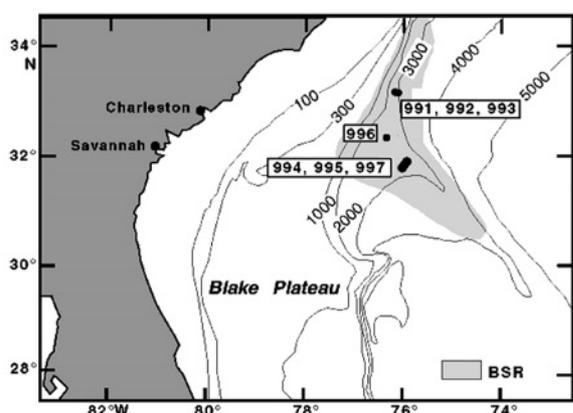


Fig. 4 Map showing location of ODP Leg 164 Sites with respect to the regional BSR. (Paull and Matsumoto, 2000)

れ、他の海洋堆積物と同じく深度が増加すると共に徐々に減少する傾向があった。細胞の増殖度の指標となるチミジン取り込み量も同様な傾向が見られた。MHの分布域の下部境界、つまりBSR直下で、菌数や分裂細胞数が増加する傾向が見られた。彼らは、微生物活性を評価しており、表層堆積物(20~30 mbsf)では、硫酸還元速度が大きい、間隙水中の硫酸イオン濃度の減少と共に減少し、替わってメタン酸化やメタン生成活性が大きくなるが、100 mbsf以深では、すべての活性が低くなる。しかし、BSR深度の450 mbsf付近で、メタン生成(CO₂還元経路と酢酸分解経路の両方とも)やメタン酸化、硫酸還元、酢酸酸化活性が相対的に高くなる(1.5から15倍)傾向を見つけ、さらに、酢酸濃度が、メタンハイドレートの下部境界から増加し、BSR(450 mbsf)を超えて691 mbsfで15 mMまで増大していることを発見した(Fig. 5; Wellsbury *et al.*, 1997)。彼らは、BSR以深の微生物活動が活発化している領域を biogeochemical zone と称して、BSRより深いところにあるフリーガスが作用していると考えた。同地域のMH分布域近くにおける微生物の遺伝子解析や培養実験の報告例はない。

ブレークリッジのMH分布域では、地球化学研究においても微生物活動を評価する研究が行われている。Galimov and Kvenvolden (1983)は、DSDP Leg 76の掘削調査でブレークリッジから採取された堆積物に含まれるメタンと二酸化炭素の炭素同位体比を測定し、両者が60~70%の間隔(同位体分別)を保ちながら、深くなるに従って(400 mbsfまで)重い値

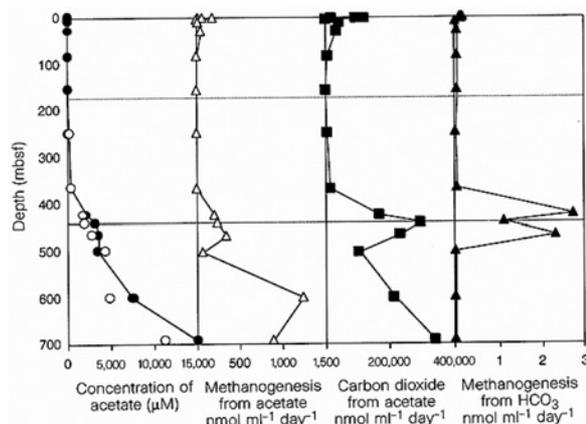


Fig. 5 Depth profiles of pore-water acetate concentrations and rates of bacterial activity in sediments from Blake Ridge, ODP Leg 164, Site 995. (Wellsbury *et al.*, 1997)

に漸移していく傾向を発見した。この鉛直分布は、堆積物が表層から埋没する過程において、物質の出入りがない閉鎖系になっていると考え、(1)の反応でメタンが生成した場合に、レーリー蒸留モデルから計算されるメタンと残留二酸化炭素の同位体比の関係(Claypool and Kaplan, 1974)と調和的であったため、Galimov and Kvenvolden (1983)はCO₂還元がメタンの主要な生成経路であると解釈した。メタンと二酸化炭素の炭素同位体比をそれぞれ、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ と表すと、同位体分別は以下のように近似できる

$$\begin{aligned} \varepsilon_c &= (\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}) / (1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} \cdot 10^{-3}) \\ &\approx \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} \end{aligned} \quad (3)$$

海洋堆積物の場合、 ε_c はおよそ65から75である(Whiticar, 1999)。その後、ODP Leg 164では、ブレークリッジにおいてBSR(450 mbsf)よりも深い深度(700 mbsf)まで掘削され、Leg 76よりも深部の傾向が分かった。その結果、メタンと二酸化炭素の炭素同位体比の差は、表層から120から150 mbsf付近まで約72%で一定であったが、それより深くなると二酸化炭素の炭素同位体比が低い値に変化してきて700 mbsfでは、差は45%まで縮まる傾向が報告された(Fig. 6)、閉鎖系におけるCO₂還元経路によるメタン生成を想定したレーリー蒸留モデルでは説明できず、より深い場所からのガスの移動が示唆された(Paull *et al.*, 2000)。

4. カスカディア縁辺域のMHにおける微生物の分布と活性の評価

カスカディア縁辺域は、北太平洋のバンクバー島沖合でファンデフッカプレートが北米プレートに収束している場所であり、ファンデフッカプレートの沈み込みに伴って付加体構造を形成している (Fig. 7)。付加体地域の海底下には明確なBSRが報告され (Field and Kvenvolden, 1985)、また、掘削コアからMHが検出されたことから (Brooks *et al.*, 1991)、プレート境界域にMHが広く分布していると考えられた。カスカディア縁辺域に広がるMHについて最初の総合的な研究は、ODP Leg 146によって行われた。掘削調査場所は、バンクバー島沖合 (Site 888, 889, 890) とオレゴン沖 (Site 891, 892) であり、ガス組成と炭素同位体比の値から、両地域には微生物起源のメタンと熱分解起源のガスが分布していると解釈された。断層沿いに検出されたメタンは、熱分解起源のものが多かった。一方で、MHを形成しているメタンは、微生物起源であった (Whiticar *et al.*, 1995)。2005年に行われたIODP航海311では、バンクバー島沖合で、ファンデフッカプレートが北米プレートに沈み込む方向に沿って4箇所において掘削調査が行われ、MHの分布と形成を解明する目的で総合的な研究が行われた (Fig. 7)。LWDや間隙水中の塩素濃度、船上での堆積物コアの観察により、もっとも東側 (大陸に近い) のU1329以外で、MHが分布していることが判明し、タービダイト中の砂層に伴うものが多かった (Riedel *et al.*, 2006)。もっとも東側の掘削場所では、物理探査でかすかにBSRは検出されるもののMHが存在するという証拠は得られなかった。

カスカディア縁辺のMHが分布する地域での最初の微生物研究は、ODP Leg 146で行われた。Cragg *et al.* (1996) は、MHが分布するSite 889/890において全菌数を計測し、表層付近で堆積物1 cm³中に10⁸個オーダーの微生物が分布するが、表層から深さが増すにしたがって減少し、深度217 mbsfで10⁶個のオーダーまで減少した。そして、MHの分布域でわずかに全菌数が増加する傾向を見出している。彼らは、硫酸還元やCO₂還元によるメタン生成、メタン酸化活性を測定し、MHの分布域で活性が高くなっていると報告している。同サイトで採取された試料に関して、Marchesi *et al.* (2001) は、MH分布深度を含む4つの深度の試料からメタン生成菌由来の遺伝子16S

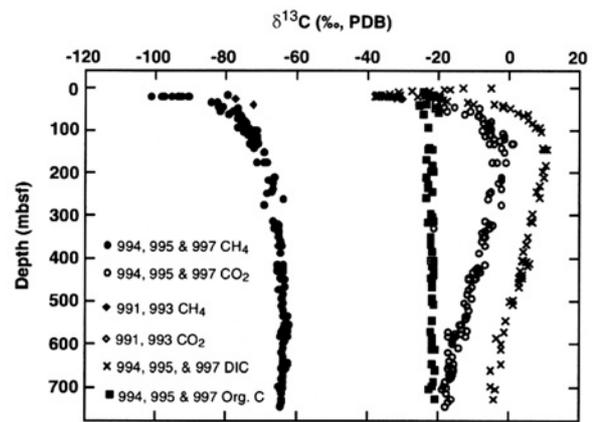


Fig. 6 Profiles of carbon isotopic values of methane and carbon dioxide in the free gases, dissolved inorganic carbon (DIC), and bulk sedimentary organic carbon for ODP Leg 164 Sites vs. sub-bottom depth. (Paull *et al.*, 2000)

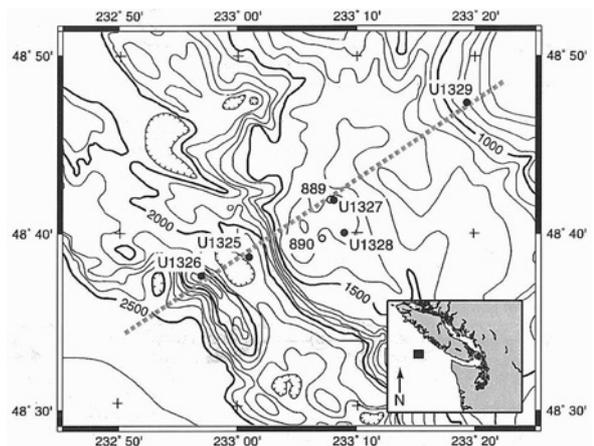


Fig. 7 Map showing location of ODP Sites 889 and 890 and IODP Expedition 311 sites. (Malinverno *et al.*, 2008)

rRNAを検出し、*Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*の系統の遺伝子配列のDNAを報告している。Cragg *et al.* (1996) と Marchesi *et al.* (2001) は、同じサイトから試料を採取しているが、残念ながら両者の結果は比較できるものではなく、メタン生成菌の分布と全菌数および活性の関係は、明らかでなかった。2005年に行われたIODP航海311において、カスカディア縁辺域のMHについて再び総合的な調査が行われた。Yoshioka *et al.* (2010) は、メタン生成菌が特徴的に持つ機能遺伝子 *mcrA* に注目し、それらのPCR増幅率の強さによってメタン生成菌の量を推

定し、また、同じ箇所の堆積物試料を用いてメタン生成活性とメタン酸化活性を測定した (Fig. 8)。その結果、MH の分布している U1327 のサイトでは、MH

の分布深度内でメタン生成菌が多く、かつ CO₂還元経路のメタン生成活性が相対的に高かった。酢酸分解経路のメタン生成活性も検出されたものの、CO₂還元

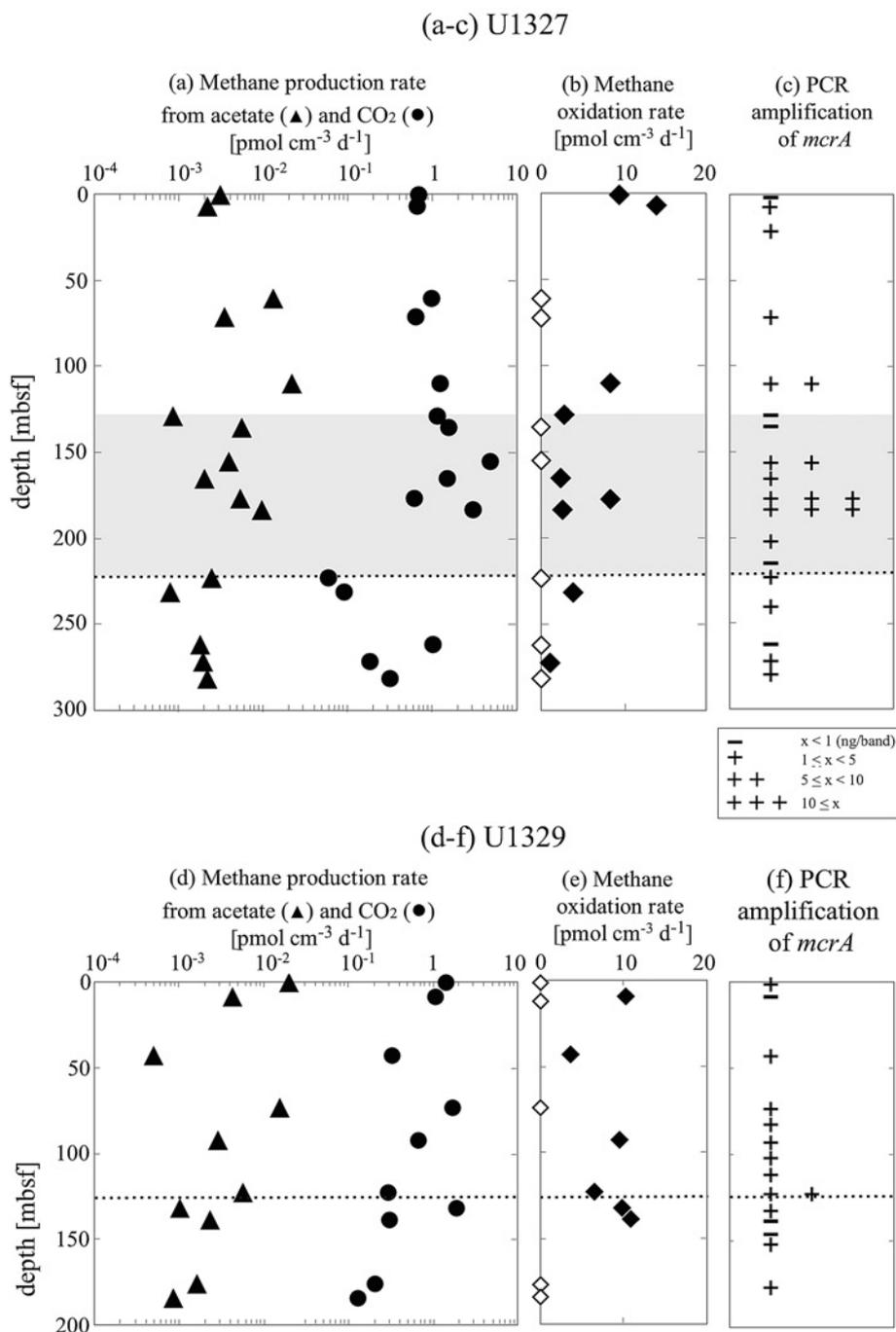


Fig. 8 Depth profiles of rates of methane production and oxidation and PCR amplification results for *mcrA* in sediments from Cascadia Margin, IODP Expedition 311. Modified from Yoshioka *et al.* (2010)

経路に比べて1桁から2桁低かった。また、機能遺伝子 *mcrA* の塩基配列を解読したところ *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* の系統のものが検出され、Marchesi *et al.* (2001) の結果と調和的であり、深度によってメタン生成菌の系統が異なることはなく、むしろ、表層近くと深度200 mbsf 付近であまり変わらない結果であった。さらに、興味深いことに、嫌氣的メタン酸化古細菌 Anaerobic methanotrophic archaea (ANME) のタイプ1と2の遺伝子も見つかった。ANME は、海洋表層の硫酸イオンが減少しメタン濃度が増加する化学成分の境界においてよく見つかると近年注目されている (例えば、Boetus *et al.*, 2000; Michaelis *et al.*, 2002; Knitttle *et al.*, 2003)。ANME は、硫酸イオンのような電子受容体に電子を渡してメタンを酸化するが、メタン生成菌と同じ機能遺伝子 *mcrA* を持っており、メタン生成菌とは離れた系統に位置する (Hallam *et al.*, 2003)。Yoshioka *et al.* (2010) は、MH の分布域で ANME のタイプ1と2が存在すること、堆積物にメタン酸化活性があることからその場で嫌氣的メタン酸化活動が起こっている可能性を示した。これまで海洋の表層堆積物中 (およそ数10 m 以内の深度) で嫌氣的メタン酸化 (AMO) が起こっていることは良く知られていたが、海底下深度100 m から200 m ぐらいの深度でも AMO が行っている可能性を、遺伝子と活性の2つの証拠で示したことは重要である。深部におけるメタン酸化反応は、MH の形成や分解プロセスに関与していると考えられる。また、電子受容体については、間隙水中に残っている硫酸イオンが考えられるが (Yoshioka *et al.*, 2010)、近年、硝酸や亜硝酸 (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Ettwig *et al.*, 2008) や鉄やマンガン (Beal *et al.*, 2009) も ANME の電子受容体として利用されることが報告されているので、MH の分布する深度の堆積物中では、表層堆積物とは異なる反応の組み合わせで AMO が起こっている可能性がある。さらに最近、ANME が関与しない AMO が発見されたことから (Ettwig *et al.*, 2010)、MH 分布域においてそのような反応が起こっている可能性もある。

一方で、MH の見つからなかった大陸側のサイト U1329において、BSR の深度126 mbsf 付近でメタン菌の遺伝子が MH の分布域と同じぐらい検出され、CO₂還元経路がメインのメタン生成活性が検出された (Fig. 8)。つまり、U1327と U1329の両サイトにおける微生物的な特徴の違いは見つからなかった。それ

にもかかわらず、一方には MH はなく、もう一方には MH が分布していることから、MH の分布は微生物の特徴以外の要因が関係していると考えられる。その1つとして、堆積層の違いが考えられる (Yoshioka *et al.*, 2010)。MH のある地域は、主に堆積層はタービダイトで構成され、砂層に伴って MH が検出されることが多かった。U1329では、タービダイトはなく、主に海洋性と非海洋性の珪藻で構成されている (Akiba *et al.*, 2009)。粒形の大きい砂層が堆積層の中に空間を作り出し MH の貯留層となることから (川崎ほか, 2009)、貯留層としてのタービダイトの有無が MH の分布の有無の違いをもたらしたと考えられる。

IODP 航海311では、地球化学研究においても微生物活動を評価する研究が行われた。Pohlman *et al.* (2009) は、4箇所のサイトにおいて表層堆積物から200 mbsf (U1329) あるいは300 mbsf (U1329以外の3サイト) までのメタンの炭素同位体比を測定した (Fig. 9)。その結果、最も西側 (大陸から最も離れており、変形フロントに近い) のサイト U1326で最小値-82.2%を示し、もっとも東側の U1329では、-39.5%を示し、Fig. 1で示した区分では、微生物起源の範囲をはみ出しており、U1329では、熱分解起源のメタンがあるようにみえた (Fig. 3 in Pohlman *et al.*, 2009)。Fig. 2のように、メタンの水素同位体比をパラメータに取っても同様であった (Fig. 4 in Pohlman *et al.*, 2009)。しかし、彼らは、それらの結果をもって熱分解起源のメタンの寄与があるとは解釈せず、メタンと共存する二酸化炭素の炭素同位体比を測定することによって、メタンの炭素同位体比との差が、一定 (63.8%) であることから、メタンの起源は全て微生物起源であり、CO₂還元経路で生成されたと解釈した。各サイトで、メタンと二酸化炭素の炭素同位体比は深くなるに従って大きい値に遷移し、その遷移する大きさは東側 (大陸に近い) ほど大きくなることを明らかにした (Fig. 9)。これらの結果は、堆積物表層から掘削深度までの間で主に CO₂還元経路を主としたメタン生成活動が起こっていることを示しており、その間において微生物活動で生成されたメタンが MH の形成に寄与していることを示唆している。MH の無かった U1329においてもメタンと二酸化炭素の炭素同位体比は、CO₂還元による同位体分別を示していて、ほかのサイトと同じようなメタン生成活動があることを示した。Pohlman *et al.* (2009) は、メ

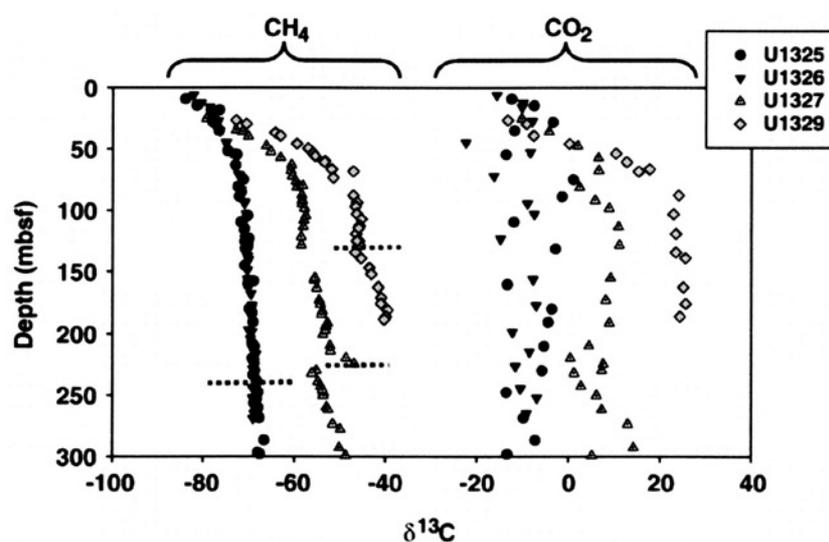


Fig. 9 Depth profiles of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ from the IODP Expedition 311 transect. The dashed lines intersecting the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ profiles represent the depths of the bottom simulating reflector (BSR). (Pohlman *et al.*, 2009)

タンの炭素同位体比が大陸に近くなるに従って大きい値に遷移する傾向は、堆積有機物の続成作用の違いにより生じたと考えた。つまり、大陸により近い U1329 では、堆積速度がより遅いために堆積有機物が埋没過程でより分解され、メタン生成に利用される有機物が少なくなった結果、二酸化炭素の同位体比の値が深度に従ってより重くなったと考えた。Torres and Kastner (2009) は、溶存無機炭素の炭素同位体比が深さと共に大きい値に変化して一定の値になることに注目し、堆積物中のメタン生成活動によって同位体比が重くなると解釈した。4サイトの中では、同位体比の値は沈み込み帯の変形フロントからの距離に比例し、最も離れた（大陸にもっとも近い）U1329が大きい値を示した。つまり一番活発なメタン生成活性があったことになる。Heuer *et al.* (2009) は、酢酸、DOC、DIC、メタンの炭素同位体比を測定することによって、U1329の深度毎に、有機物分解による酢酸生成、二酸化炭素からの酢酸生成、酢酸分解経路によるメタン生成が起こっていると推察した。

5. MH 分布域におけるメタン生成活動領域

Wellsbury *et al.* (1997) や Yoshioka *et al.* (2010) は、MH の分布と微生物によるメタン生成活動が関連していることを示したが、これらの結果は、Claypool and Kaplan (1974) によって推定されたメ

タン生成の深度プロファイルと異なるものである。MH が形成される地下環境において（ただし、Claypool and Kaplan (1974) が考えたモデルは、MH と関係なく一般的な海洋堆積物環境を想定している）、微生物によるメタン生成の活動領域については、次の3つの考え方がある。(a)浅い堆積物（正確には、SMIの直下、硫酸イオン濃度が著しく低くなる、数mから数十mの深度）に主なメタン生成活動があり、深度が増すに従い指数関数的にメタン生成活性が減少する、(b)MHの分布域やBSRの直下近くでメタン生成が起こる、(c)BSRよりずっと深い場所においてメタン生成が起こる。Wellsbury *et al.* (1997) や Yoshioka *et al.* (2010) は、(b)に分類される説を支持するデータだが、多くの地球化学研究者は(a)を支持している（例えば、Galimov and Kvenvolden, 1983; Claypool *et al.*, 2006）。

(a)の説については、前述のように、Claypool and Kaplan (1974) が最初の提唱者であり、それ以後、Whiticar (1999) は、堆積物の埋没過程において‘閉鎖系’が成り立つという仮定に基づき、浅部堆積物において二酸化炭素の還元反応によってメタンが生成され、それより深い場所ではメタンは生成されないと解釈している。

しかし、この解釈では、二酸化炭素の還元反応（式(1)参照）に必要な水素の由来が明確にされていな

い。通常、水素は堆積有機物の微生物分解プロセスで生成されるが、その過程で二酸化炭素も同時に生成するため（次式参照），



閉鎖系という前提に矛盾が生じる。言い換えれば、閉鎖系では水素の供給がなく、二酸化炭素の還元反応が進まないと考えられる。また、一方で、この‘閉鎖系’という仮定がなくなると、同位体比による解釈は全く違ってくる可能性があることにも注意したい。堆積有機物の分解（式(4)）と CO_2 還元経路のメタン生成（式(1)）とあわせると以下のような式になる。



つまり、有機物が分解し、二酸化炭酸とメタンが生じる。実際の堆積有機物は多種類の有機分子の混合体であり、その分解で生じる二酸化炭素とメタンの比率も多様である。そこで、堆積有機物の分解によりメタンが生じる割合を f とすると、炭素の同位体比に関して、次のマスバランスの式が書ける。

$$f \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} + (1-f) \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = \delta^{13}\text{C}_{\text{OM}} \quad (6)$$

ここで、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{OM}}$ は、堆積有機物の炭素同位体比を表す。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ と $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ の関係に式(3)の関係があったら、式(6)は、次のように書ける

$$\begin{aligned} \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} &= \delta^{13}\text{C}_{\text{OM}} - (1-f) \cdot \varepsilon_c \\ \text{又は、} \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} &= \delta^{13}\text{C}_{\text{OM}} + f \cdot \varepsilon_c \end{aligned} \quad (7)$$

つまり、メタン生成の割合 f が大きくなると、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ も $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ も重くなることを意味する。これは、単純化した計算の1例だが、‘閉鎖系’という条件がなくなると二酸化炭酸の生成とメタン生成がバランスしてしまうので、浅部でのみメタン生成が起こり、深いところではメタン生成が起こっていないという結論は得られなくなってしまうことに留意したい。Pohlman *et al.* (2009) は、カスカディア縁辺域において、他の地域と同様に、メタンと二酸化炭酸の炭素同位体比が一定の差（61~66%）を保って、深度が増すに従って重い値に漸移していく傾向を見つけているが、この結果をもって浅部でメタン生成が起こっていると結論せず、堆積物中は、‘開放系’であると考え、堆積速度の違いが堆積有機物の質を変え、*in situ* のメタン生成にも影響していると考えて、MHの安定領域、つまり BSR より上部において *in situ* のメタン生成が

起こっていると解釈した。つまり、彼らの解釈は(b)の考え方も含んでいる。

(b)の考えは、3節と4節で解説したように微生物学の研究結果から提示されている。南海トラフには微生物起源のMHが分布し、堆積物のメタン生成活性が評価されているが（Colwell *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2002; レビューとして Colwell *et al.*, 2004）、堆積物を培養して菌を濃縮させた試料（enrichment）を用いたり、基質を添加したりして、現場の状況と異なった条件で評価しているため、どの深度の試料からも活発なメタン生成が起こり（Colwell *et al.*, 2002）、現場のメタン生成活性評価方法としては課題があると考えられる。Yoshioka *et al.* (2009) は、堆積物を崩さずそのままの状態のサブコア試料（sub-core sample）を使い、ラジオアイソトープを用いた高感度の方法で、南海トラフのMHが分布する場所における堆積物のメタン生成活性を評価した。検出されたメタン生成活性は全般的に低く、表層でほとんど活性が検出されなかったが、MH分布域あるいは、BSRより下部でメタン生成活性が検出された。この結果はブレイクリッジにおけるMH分布域の結果（Wellsbury *et al.*, 1997; 2000）と類似しており、メタンの生成場所を示すデータとしては(b)を支持している。また、唯一メタン生成菌が単離されているのは、南海トラフのMH分布域であることも（Mikucki *et al.*, 2003; Kendall *et al.*, 2006）、(b)を支持する。

(c)の考えは、様々な分野から提唱されている。例えば、地球物理の専門誌でHyndman and Davis (1992) が提唱している。彼らは、大陸縁辺域の海洋堆積中に強い反射面 BSR が検出され、それがMHの安定領域の下限境界に相当することに注目して、BSRより下部からの流体の移動によりメタンが移動してきたと考えた。大陸縁辺域のプレートの沈み込み帯では、急速な堆積物形成により十分に固結しないまま埋没し、プレートの沈み込み作用により堆積物が圧密され、鉛直上向きの流体の流れが生じ、メタンがMHの安定領域に供給されMH結晶が形成されると考えた。堆積物間隙水の地球化学研究によっても、深部からのメタン供給が提案されている。Egeberg and Barth (1998) は、ブレイクリッジの堆積物の間隙水中の臭素とヨウ素の濃度が高くなっていることから深部からの流体の供給源を提案している。Fehn *et al.* (2000) は、間隙水に含まれる ^{129}I の年代を測定し、1~2 km 下部の第三紀初めごろの有機物の続成作用が

Table 1 メタンハイドレート (MH) 分布域におけるメタン生成活動領域について3つの考え

メタン生成活動領域	長所	難点
(a) 浅部堆積物 ・表層近く SMI の直下で最大、 深くなると指数関数的に減少	・メタンと二酸化炭素の炭素 同位体比プロファイルを説 明 (但し、閉鎖系を仮定)	・微生物学的証拠に乏しい ・低温 (3~5°C)
(b) MH 分布域堆積物 ・MH の分布域あるいは BSR 直下	・メタン生成菌やその遺伝子 が見つかる ・活性は相対的に高い	・低温 (10~15°C) ・現存する MH を説明でき るのか不明
(c) 深部領域 ・BSR より数百 m~1 km 深い場所	・中温から高温 (20~40°C) ・範囲が広い	・証拠に乏しい

ブレークリッジの MH のメタンの供給源になっていると推察した。消去法で(c)の考え方を提案している研究もある。Waseda and Uchida (2004) は、(a)の考え方で堆積物中にメタンが生成されていると解釈する一方、現在 MH に含まれるメタンの起源については、南海トラフに分布する MH の堆積物孔隙中の飽和率が、MH の濃集帯では最大80%に達するにもかかわらず (Matsumoto, 2004)、現場の南海トラフの堆積有機物の濃度が平均0.5 wt%と低いために、(a)のプロセスで生成されるメタンの量は十分でなく、他の場所から上方へ微生物起源のメタンが移動してきて、砂層に濃集したと推定している。

メタン生成活動領域について、3つの考え方について、長所難点を整理した (Table 1)。(a)は、地球化学研究だけで成立していて微生物学的なデータによる裏づけが乏しい。一方で、(b)は、微生物学的研究から提唱されているが、MH 分布域近くで生成されるメタンで、現存する MH が形成できるのか量的に評価する必要がある。(c)は、BSR よりさらに数百 m や1 km 近く掘削して調査されたことがほとんど無いために証拠となるデータに乏しい。また、証拠ではなく参考事項程度だが、微生物学的視点から見ると、(a)や(b)の地下環境は、数度から十数°Cであり、微生物の生育温度として低いといえる。実験室では微生物が最適に生息するのは20から40°C ぐらいの中温程度が多い。実際、MH の分布域から単離されている *Methanoculleus submarines* sp. Nov というメタン生成菌は、試料が採取された場所の温度は12~17°C だったが、最適生育温度はほぼ30°C であった (Mikucki et al., 2003)。30°C で最適に育つ菌がなぜ

このような低温環境に居たのかという疑問は残り、可能性としてもっと深い場所の最適温度の環境で多く生息しているのではないかという見方ができる。

今後、さらに証拠を集め、地球化学、微生物学のみならず、堆積学、水理学等の多方面からの検討が必要である。

6. 数値シミュレーションによるメタン生成活動領域の推定

MH 分布域におけるメタン活動領域の推定に関して、数値シミュレーションが重要な示唆を与える。前節ではメタン生成活動領域について説明したが、それぞれの場所におけるメタン生成活動で、現在分布している MH が形成されるかどうか定量的な評価が必要である。その方法として、流体の移動やガスの生成、MH の形成を組み込んだ物理化学モデルで数値シミュレーションすることによって検証することができる。ここでは流体の移動とメタン生成反応、MH 形成反応を組み込んだ Davie and Buffett (2001, 2003) の一連の研究が、3つの活動領域を評価する上で示唆的な結果を得ているので紹介する。彼らは、ブレークリッジで行われた ODP Leg 164 のデータを参考に、鉛直方向の1次元モデルで流体の移動やメタンの生成、MH の形成を計算し、そこでの MH の分布が再現できるか検証している。まず、Davie and Buffett (2001) では、(a)に相当する浅部でのメタン生成活動によって堆積物中の塩素のプロファイルと MH の分布と飽和度が再現できることを示した。但し、その際、表層の堆積有機物 (平均1.2 wt%) の75%がメタンになることを仮定している。Davie and

Buffett (2003) では、浅部でのメタン生成ではなく、BSRより下部からのメタンフラックスを仮定しても塩素の分布とMHの分布を説明できることを示した。さらに、Davie and Buffett (2003) では、表層付近の硫酸還元領域の硫酸イオンのプロファイルから、メタン供給速度を推定し、浅部でのメタン生成活動では説明つかないとして却下し、代わりにMH安定領域の下部（ほぼMHの分布域に相当）でのメタン生成活動とBSRより深部からのメタン供給を仮定すると、硫酸還元領域の硫酸のプロファイルと全深度の塩素のプロファイルが説明できることを示した。その際、MH安定領域の下部でのメタン生成活動は全有機炭素(TOC)の25%程度がメタンに転換すればよく、浅部でのメタン生成活動で説明する場合より転換率は少なくすむ。彼らは、MH分布域でのメタン生成を考える根拠として、Wellsbury *et al.* (1997) の研究を参考しているため、2つの結論が調和的になるのはしかるべき結果ともいえるが、MHの分布と間隙水中の塩化物イオンや硫酸イオン濃度の深度プロファイルを再現できるのは、浅部でのメタン生成活動ではなく、MH分布域でのメタン生成活動と深部からのメタンを含んだ流体の移動によって形成されたと明確に結論できたことは3つの活動領域のMH形成への寄与を評価する上で重要である。

カスカディア縁辺域におけるMH形成に関しては、Malinvernoらが数値シミュレーションを試みている(Malinverno *et al.*, 2008; Malinverno, 2010)。2つの研究とも、メタン濃度のみ扱い、(a)の浅部でのメタン生成活動を組み込んだモデルを用いて計算している。Malinverno *et al.* (2008) は、当該地域でMHが大陸に近いほどMH分布が深くなる傾向が説明できることを示し、Malinverno (2010) は、砂泥互層の砂層にMHが濃集していることに注目して、泥層で生成されたメタンが拡散によって砂層に移動してMHが形成されることを示し、深部からのメタン供給、つまり(c)の考えは、MH形成に必要なものとして。ただし、これらの研究は、Davie and Buffett (2001, 2003) のように塩素や硫酸のプロファイルについては扱っていない。また、(b)の可能性は検討していない。

7. ま と め

大陸棚近くの海底下に分布するMHには、微生物起源のメタンを含むものが多く存在する。MHの発

見以来、地球化学研究によって、微生物活動によってメタンが生成され、メタン生成菌によるCO₂還元経路でメタンが生成されたと推定されていたが、必ずしも微生物学的な研究によって支持されているわけではない。

1980年代後半になって、ODPやIODPによる海洋掘削調査によって、海底下に地下微生物圏が広がっていることが明らかになり、微生物の量や活性が測られるようになった。微生物起源のメタンからなるMHの分布域において掘削調査が行われ、MHと地下微生物の関係、特にメタン生成菌との関係が明らかになってきた。

北大西洋のプレークリッジの掘削調査では、MHの分布域の下部領域とBSRの直下において菌数や微生物活性が高くなっていることからMHやフリーガスと微生物活動が関連していることが示された。MHの下部では、深度が増すに従って、酢酸濃度が増大していることから、地下微生物による酢酸生成、さらにメタン生成菌によるメタン生成プロセスが活発に起っていると推定された。

北太平洋のカスカディア縁辺域のMHでは、プレークリッジと同じようにMHの分布域でメタン生成活性が高い特徴が見られ、メタン生成菌の遺伝子も多いことが示された。一方で、プレートの沈み込む方向に沿って大陸側の掘削場所では、MH分布域と同じようにメタン生成菌の遺伝子やメタン生成活性が検出されたが、MHは検出されなかった。前者には、MHの貯留層となるタービダイトが含まれていたが、後者には含まれていないことより、微生物特性の違いというより堆積層の違いがMHの有無の違いをもたらしていると考えられる。

MH分布域におけるメタン生成活動領域について、浅部堆積物、MH分布域やBSR直下の堆積物、BSRより数百m~1kmの深部領域の3つの場所が考えられている。それぞれの場所から供給されたメタンがどれくらい現在分布するMHの形成に寄与しているか必ずしも明らかではない。地球化学、微生物学、水理学、数値シミュレーション等による総合的な検討が必要である。

謝 辞

本論文の一部は、日本地球化学会第56回年会(2009年9月15日)にて発表した。本総説で紹介した研究を行うにあたり、John R. Parkes氏、丸山明彦氏、鎌

形洋一氏との議論が有意義であった。2名の査読者には、本論文を読んで頂き有意義な助言を頂いた。心から感謝いたします。

参考文献

- Akiba, F., Inoue, Y., Saito-Kato, M. and Pohlman, J. (2009) Data report: Diatom and foraminiferal assemblages in Pleistocene turbidite sediments from the Cascadia margin (IODP Expedition 311), northeast Pacific. In: *Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **311** (eds., M. Riedel, T. S. Collett, M. J. Malone, and the Expedition 311 Scientists), doi: 10.2204/iodp.proc.311.211.2009.
- Balabane, M., Galimov, E., Hermann, M. and Letolle, R. (1987) Hydrogen and carbon isotope fractionation during experimental production of bacterial methane. *Organic Geochemistry*, **11**, 115–119.
- Beal, E. J., House, C. H. and Orphan, V. J. (2009) Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, **325**, 184–187.
- Bernard, B. B., Brooks, J. M. and Sackett, W. M. (1976) Natural gas seepage in the Gulf of Mexico. *Earth and Planetary Science and Letters*, **31**, 48–54.
- Biddle, K. A., Kastner, M. and Bartlett, D. H. (1999) A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microbiology Letters*, **177**, 101–108.
- Boetus, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F. and Gieseke, A. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623–626.
- Brooks, J. M., Field, M. E. and Kennicutt, M. C. (1991) Observation of gas hydrates in marine sediments, offshore northern California. *Marine Geology*, **96**, 103–109.
- Brooks, J. M., Bernard, L. A., Weisenburg, D. A., Kennicutt, M. C., II, and Kvenvolden, K. A. (1983) Molecular and isotopic compositions of hydrocarbons at Site 533, Deep Sea Drilling Project Leg 76. In: *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Projects*, **76** (eds., R. E. Sheridan, F. M. Gradstein), Washington (U.S. Govt. Printing Office), 377–389.
- Burke, R. A. Jr. (1993) Possible influence of hydrogen concentration on microbial methane stable hydrogen isotopic composition. *Chemosphere*, **26**, 55–67.
- Burke, R. A., Martens, C. S. and Sackett, W. M. (1988) Seasonal variations of D/H and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of microbial methane in surface sediments. *Nature*, **332**, 829–831.
- Claypool, G. E. and Kaplan, I. R. (1974) The origin and distribution of methane in marine sediments. In: *Natural Gases in Marine Sediments* (ed., I. R. Kaplan), New York (Plenum), 99–139.
- Claypool, G. E., Milkov, A. V., Lee, Y. -J., Torres, M. E., Borowski, W. S. and Tomaru, H. (2006) Microbial methane generation and gas transport in shallow sediments of an accretionary complex, southern Hydrate Ridge (ODP Leg 204), offshore Oregon, USA. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **204** (eds., A. M. Trehu, G. Bohrmann, M. E. Torres and F. S. Colwell), College Station, TX (Ocean Drilling Program), 1–52.
- Colwell, F. S., Matsumoto, R. and Reed, D. (2004) A review of the gas hydrates, geology, and biology of the Nankai Trough. *Chemical Geology*, **205**, 391–404.
- Colwell, F., Delwiche, M., Blackwelder, D., Cherry, R., Mikucki, J., Liu, Y., Boone, D. and Uchida, T. (2002) Evidence of broad thermal tolerance of methanogens in sediments containing gas hydrates. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Gas Hydrates*, Yokohama, Japan, 19–24.
- Cragg, B. A., Parkes, R. J., Fry, J. C., Weightman, A. J., Rochelle, P. A. and Maxwell, J. R. (1996) Bacterial populations and processes in sediments containing gas hydrates (ODP Leg 146: Cascadia Margin). *Earth and Planetary Science Letters*, **139**, 497–507.
- Crill, P. M. and Martens, C. S. (1986) Methane production from bicarbonate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **50**, 2089–2097.
- Davie, M. K. and Buffett, B. A. (2001) A numerical model for the formation of gas hydrate below the seafloor. *Journal of Geophysical Research*, B1, **106**, 497–514.
- Davie, M. K. and Buffett, B. A. (2003) Sources of methane for marine gas hydrate: inferences from a comparison of observations and numerical models. *Earth and Planetary Science Letters*, **206** (1-2), 51–63.
- Egeberg, P. K. and Barth, T. (1998) Contribution of dissolved organic species to the carbon and energy budgets of hydrate bearing deep sea sediments (Ocean Drilling Program Site 997 Blake Ridge). *Chemical Geology*, **149**, 25–35.
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., et al. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, **464**, 543–548.
- Ettwig, K. F., Shima, S., van de Pas-Schoonen, K. T., Kahnt, J., Medema, M. H., op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M. and Strous, M. (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology*, **10**(11), 3164–3173.
- Ewing, J. I. and Hollister, C. D. (1972) Regional Aspects of Deep Sea Drilling in the Western North Atlantic. In: *Initial Report of the Deep Sea Drilling Projects*. **11** (eds., C. D. Hollister, and J. I. Ewing, et al.), US Govt. Printing Office, Washington, DC, 951–973.
- Fehn, U., Snyder, G. and Egeberg, P. K. (2000) Dating of pore waters with ^{129}I : Relevance for the origin of marine gas hydrates. *Science*, **289**, 2332–2335.
- Field, M. E. and Kvenvolden, K. A. (1985) Gas hydrates on

- the northern California continental margin. *Geology*, **13**, 517–520.
- Galimov, E. M. and Kvenvolden, K. A. (1983) Concentrations and carbon isotopic compositions of CH₄ and CO₂ in gas from sediments of the Blake Outer Ridge, Deep Sea Drilling Project, Leg 76. In: *Initial Report of the Deep Sea Drilling Projects*, **76** (eds., T. H. Shipley and S. Orlofsky), US Govt. Printing Office, Washington, DC (1983), 403–407.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M. and DeLong, E. F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Applied Environmental Microbiology*, **69**, 5483–5491.
- Heuer, V. B., Pohlman, J. W., Torres, M. E., Elvert, M. and Hinrichs, K. -U. (2009) The stable carbon isotope biogeochemistry of acetate and other dissolved carbon species in deep seafloor sediments at the northern Cascadia Margin. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 3323–3336.
- Hornibrook, E. R. C., Longstaffe, F. J. and Fyfe, W. S. (1997) Spatial distribution of microbial methane production pathways in temperate zone wetland soil: stable carbon and hydrogen isotope evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 745–753.
- Hyndman, R. D. and Davis, E. E. (1992) A mechanism for the formation of methane hydrate and seafloor bottom-simulating reflectors by vertical fluid expulsion. *Journal of Geophysical Research*, **97**, 7025–7041.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F. S., Nealson, K. H., Horikoshi, K., D'Hondt, S. and Jørgensen, B. B. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, **103**, 2815–2820.
- 川崎達治・Hailong, Lu・藤井哲哉・Ripmeester, J. A. (2009) 天然堆積物中でのメタンハイドレート形成における堆積物粒子径、粘土鉱物等の影響. 地学雑誌, **118(5)**, 872–882.
- Kendall, M. M., Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Stetter, K. O., Whitman, W. P. and Boone, D. R. (2006) *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 1525–1529.
- Knittle, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R. and Amann, R. (2003) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied Environmental Microbiology*, **71**, 467–479.
- Kuivila, K. M., Murray, J. W., Devol, A. H. and Novelli, P. C. (1989) Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **53**, 409–416.
- Kuivila, K. M., Murray, J. W. and Devol, A. H. (1990) Methane production in the sulfate-depleted sediments of two marine basins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **54**, 403–411.
- Kvenvolden, K. A. (1993) Gas hydrates-geological perspective and global change. *Reviews of Geophysics*, **31**, 173–187.
- Kvenvolden, K. A. (1995) A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate. *Organic Geochemistry*, **23**, 997–1008.
- Kvenvolden, K. A. and Barnard, L. A. (1983) Gas hydrates of the Blake Outer Ridge, Site 533, Deep Sea Drilling Project Leg 76. In: *Initial Report of the Deep Sea Drilling Projects*, **76** (eds., T. H. Shipley, S. Orlofsky, et al.), US Govt. Printing Office, Washington, DC, 353–365.
- Lipp, J. S., Morono, Y., Inagaki, F. and Hinrichs, K. U. (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, **454**, 991–994.
- Malinverno, A. (2010) Marine gas hydrates in thin sand layers that soak up microbial methane. *Earth and Planetary Science Letters*, **292**, 399–408.
- Malinverno, A., Kastner, M., Torres, M. E. and Wortmann, U. G. (2008) Gas hydrate occurrence from pore water chlorinity and downhole logs in a transect across the northern Cascadia margin (Integrated Ocean Drilling Program Expedition 311). *Journal of Geophysical Research*, **113(B8)**, B08103.
- Marchesi, J. R., Weightman, A. J., Cragg, B. A., Parkes, R. J. and Fry, J. C. (2001) Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, **34**, 221–228.
- Markl, R. G., Bryan, G. M. and Ewing, J. I. (1970) Structure of the Blake-Bahama Outer Ridge. *Journal of Geophysical Research*, **75**, 4539–4555.
- Matsumoto, R. (2004) Geochemical proxies and temperature regimes for the distribution of gas hydrates in Nankai Trough. In: *Proceedings of the AAPG Hedberg Conference*, Vancouver, B. C., Canada, 1–5.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V. and Blumenberg, M. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, **297**, 1013–1015.
- Mikucki, J. A., Liu, Y., Delwiche, M. E., Colwell, F. S. and Boone, D. R. (2003) Isolation of a methanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates, and description of *Methanoculleus submarinus* sp. nov. *Applied Environmental Microbiology*, **69**, 3311–3316.
- Milkov, A. V. (2005) Molecular and stable isotopic composition of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings. *Organic Geochemistry*, **36(5)**, 681–702.
- 中井信之・吉田裕・安藤直行 (1974) 石油、天然ガス鉱床の同位体地球化学. 地球化学, **8**, 87–98.
- Oremland, R. S. (1988) Biogeochemistry of methanogenic bac-

- teria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (ed., A. J. B. Zehnder), Wiley, 641–706.
- Oremland, R. S., Marsh, L. M. and Polcin, S. (1982) Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature*, **296**, 143–145.
- Paull, C. K., Lorenson, T., Borowski, W. S., Ussler, W. III, Olsen, K., Rodriguez, N. M. and Wehner, H. (2000) Isotopic composition of CH₄, CO₂ species, and sedimentary organic matter within ODP Leg 164 samples for the Blake Ridge: Gas source implications. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **164** (eds., C. K. Paull, R. Matsumoto, P. Wallace, and W. P. Dillon), 67–78.
- Paull, C. K. and Matsumoto, R. (2000) Leg 164 overview. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **164** (eds., C. K. Paull, R. Matsumoto, P. Wallace, and W. P. Dillon), 3–10.
- Parkes, R. J., Cragg, B. A., Bale, S. J., Getliff, J. M., Goodman, K., Rochell, P. A., Fry, J. C., Weightman, A. J. and Harvey, S. M. (1994) A deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, **371**, 410–413.
- Parkes, R. J., Cragg, B. A. and Wellsbury, P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in sub-seafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal*, **8**, 11–28.
- Phelps, T. J. and Zeikus, J. G. (1984) Influence of pH on terminal carbon metabolism in anoxic sediments from a mildly acidic lake. *Applied Environmental Microbiology*, **48**, 1088–1095.
- Pohlman, J. W., Kaneko, M., Heuer, V. B., Coffin, R. B. and Whiticar, M. (2009) Methane sources and production in the northern Cascadia margin gas hydrate system. *Earth and Planetary Science Letters*, **287**, 504–512.
- Raghoebarsing, A. A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J. P., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J. S., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M. and Strous, M. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, **440**, 918–921.
- 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 Environmental Microbiology*, **68**, 3759–3770.
- Riedel, M., Collett, T. S., Malone, M. J. and the Expedition 311 Scientists (2006) *Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program*, **311**. Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc., Washington DC, doi: 10.2204/iodp.proc.311.2006.
- Schoell, M. (1980) The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **44**, 649–661.
- Schouten, S., Middelburg, J. J., Hopmans, E. C. and Sinninghe Damsté, J. S. (2010) Fossilization and degradation of intact polar lipids in deep subsurface sediments: A theoretical approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **74**, 3806–3814.
- Smith, D. C., Spivack, A. J., Fisk, M. R., Haveman, S. A., Staudigel, H. and ODP Leg 185 Shipboard Scientific Party (2000) Methods for quantifying potential microbial contamination during deep ocean coring. *ODP Technical Note*, **28**. <http://www-odp.tamu.edu/publications/tnotes/tn28/index.htm>.
- Sugimoto, A. and Wada, E. (1995) Hydrogen isotopic composition of bacterial methane: CO₂/H₂ reduction and acetate fermentation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 1329–1337.
- Torres, M. E. and Kastner, M. (2009) Data report: Clues about carbon cycling in methane-bearing sediments using stable isotopes of the dissolved inorganic carbon, IODP Expedition 311. In: *Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **311** (eds., M. Riedel, T. S. Collett, M. J. Malone, and the Expedition 311 Scientists), doi: 10.2204/iodp.proc.311.206.2009
- Uchida, T., Matsumoto, R., Waseda, A., Okui, T., Yamada, K., Okada, S. and Takano, O. (1999) Summary of physico-chemical properties of natural gas hydrates and associated hydrate-bearing sediments obtained from the JAPEx/JNOC/GSC Mallik 2L-38 research well. In: *Scientific Results from JAPEx/JNOC/GSC Mallik 2L-38 Gas Hydrate Research Well, Mackenzie Delta, Northwest Territories, Canada, Geological Survey of Canada Bulletin 544* (eds., S. Dallimore, T. Uchida, and T. Collett), 205–228.
- Valentine, D. L., Chidthaisong, A., Rice, A., Reeburgh, W. S. and Tyler, S. C. (2004) Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 1571–1590.
- Waldron, S., Lansdown, J. M., Scott, E. M., Fallick, A. E. and Hall, A. J. (1999) The global influence of the hydrogen isotope composition of water on that of bacteriogenic methane from shallow freshwater environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**, 2237–2245.
- Waseda, A. and Uchida, T. (2004) The geochemical context of gas hydrate in the eastern Nankai Trough. *Resource Geology*, **54**, 69–78.
- 早稲田周・内田隆 (1998) 天然ガスハイドレートの生成・集積モデル. 地質調査所月報, **49**, 527–539.
- Wellsbury, P., Mather, I. and Parkes, R. J. (2002) Geomicrobiology of deep, low organic carbon sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**, 59–70.
- Wellsbury, P., Goodman, K., Cragg, B. A. and Parkes, R. J. (2000) The geomicrobiology of deep marine sediments from Blake Ridge containing methane hydrate (sites 994, 995, and 997). In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **164** (eds., C. K. Paull, R. Matsumoto, P. Wallace, and W. P. Dillon), 379–391.

- Wellsbury, P., Goodman, K., Barth, T., Cragg, B. A., Barnes, S. P. and Parkes, R. J. (1997) Deep marine biosphere fueled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature*, **388**, 573–576.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6578–6583.
- Whiticar, M. J. (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation. *Chemical Geology*, **161**, 291–314.
- Whiticar, M. J., Faber, E. F. and Schoell, M. (1986) Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation - Isotope evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **50**, 693–709.
- Whiticar, M. J., Hovland, M., Kastner, M. and Sample, J. C. (1995) Organic geochemistry of gases, fluids, and hydrates at the Cascadia margin. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results* (eds., Carson B. and G. Westbrook), **146**, 385–397.
- Yoshioka, H., Maruyama, A., Nakamura, T., Higashimura, Y., Fuse, H., Sakata, S. and Bartlett, D. H. (2010) Activities and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin. *Geobiology*, **8**, 223–233.
- Yoshioka, H., Sakata, S., Cragg, B. A., Parkes, R. J. and Fujii, T. (2009) Microbial methane production rates in gas hydrate-bearing sediments from the eastern Nankai Trough, off central Japan. *Geochemical Journal*, **43**, 315–321.
- Yoshioka, H., Sakata, S. and Kamagata, Y. (2008) Hydrogen isotope fractionation by *Methanothermobacter thermoautotrophicus* in coculture and pure culture conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 2687–2694.
- Zinder, S. H. (1993) Physiological ecology of methanogens. In: *Methanogenesis-Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (ed., J. G. Ferry), Chapman & Hall, 128–206.