

分子内同位体比で観る海底下のアーキアの生態： エーテル脂質分子内のサルベージ経路と 新生経路を例にして

高野 淑 識*・力 石 嘉 人*・大河内 直 彦*,**,**

1. アーキアの広汎性

真核生物、真正細菌に次いで、第3の生物界であるアーキア（古細菌; Woese and Fox, 1977）は、海洋や陸上を問わず、広汎的に棲息する原核生物である。近年、これまで認知されてきたアーキアの2大門（Phylum）レベルであるユーリアーキオータ門およびクレンアーキオータ門の他、さらに新しい分類群のタウムアーキオータ門、コルアーキオータ門、ナノアーキオータ門の多様性が見えてきた（*e.g.*, Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Elkins *et al.*, 2008; Albers and Meyer, 2011）。分類学上、新しい門が出現するインパクトは、真核生物でいう節足動物門（甲殻類）や脊索動物門（脊椎動物）の分類群に相当する全く異なるアーキア群が存在することに匹敵する。130年に渡るアーキア研究の歴史は、Cavicchioli (2011) に詳しくまとめられている。

アーキアは、海洋環境の有光層およびそれ以深の水柱だけでなく、海底下にも広く分布していることが認識されるようになった（*e.g.*, DeLong, 1992; DeLong *et al.*, 1994, 1998; Hinrichs *et al.*, 1999; Schouten *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001; Karner *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 2006; Biddle *et al.*, 2006; Lipp *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2008）。生理活性を有するアーキア

の最深部記録は、ニューファンドランド沖の海底下1626 mである（Roussel *et al.*, 2008）。海底下のアーキアの大部分は難培養性であるが（Teske and Sorensen, 2008）、近年開発された新しい連続フロー培養法では海底下100 m以深に棲息するメタン生成菌の単離・培養に成功している（Imachi *et al.*, 2011; cf. Morono *et al.*, 2011）。また、嫌氣的メタン酸化アーキア群集の中では、窒素固定が行われていること（Dekas *et al.*, 2009）、そのメタン酸化アーキアは、メタン生成の逆反応から炭素源を同時に得ていること（Hallam *et al.*, 2004; Scheller *et al.*, 2010）、メタン酸化反応場の酵素特定（Shima *et al.*, 2012）等の発見が相次いでいる。

地球生物の最高成育温度の上限はここ10年余りで113°C, 121°C, 122°Cと記録が更新されており、いずれも好熱性アーキアである（Stetter, 1996; Blochl *et al.*, 1997; Kashef and Lovely, 2003; Takai *et al.*, 2008）。一方、成育下限温度の近傍（0°C～）には、好冷性アーキア（Nichols *et al.*, 2004; Cavicchioli, 2006）が存在することも分かっている。これらの概説だけでも学術研究としてのアーキアのマーケット規模のポテンシャルを理解して頂けるだろう。

海洋環境および海底下のアーキアに関する知見は、総説等（Hinrichs and Boetius, 2002; Edward *et al.*, 2005; Valentine, 2007; Jorgensen and Boetius, 2007; DeLong, 2007; Fry *et al.*, 2008; Engelen *et al.*, 2008; Takai and Nakamura, 2011; Valentine, 2011; 高野・大河内, 2010）を参照して頂き、ここではアーキア由来のバイオマーカーの分子同位体比および分子内同位体比の分析法および応用研究を例示し、そこから見えてきたアーキアの生態と関連する最新の知見を解説する。

* 独立行政法人海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物圏領域
〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15
** 東京工業大学大学院総合理工学研究科
〒226-8502 神奈川県横浜市緑区長津田4259
*** 東京大学大学院理学系研究科
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
(2012年3月23日受付, 2012年4月28日受理)

2. 分子で観るアーキアの特徴と地球生命科学への導入

アーキアの特徴の一つは、特有のエーテル脂質の存在である。その構造は、イソプレノイド鎖と2,3-*sn*-グリセロールの立体配座を有するエーテル結合性のコア脂質にいくつかの極性頭部を有する（古賀・亀倉, 1998）。Fig. 1にアーキアの極性脂質の一例として、*Thermoplasma acidophilum* 由来の phosphoglycolipid-GDGTs の化学構造と海洋堆積物から広く検出される糖鎖の極性頭部を示す。イソプレノイド鎖は、炭素数5のイソペン基本ユニットの伸長反応により、最大炭素数40の一本鎖アルキル基を形成する。その両サイドには、化学的に分解されにくいエーテル結合を介在して、2,3-*sn*-グリセロールがイソプレノイドを結合している。一分子内にエーテル結合を2つ有するジエーテル型、4つ有するテトラエーテル型が主なエーテル脂質である。ごく最近、イソプレノイドおよびシクロペンタン環を有する長鎖のジエーテル脂質が海洋堆積物から広く検出されている（Liu *et al.*, 2012; Knappy and Keely, 2012）（詳細は後述）。

一部のアーキアには、イソプレノイド鎖ではなく直鎖の炭化水素鎖を有するものが報告されている（Nishihara *et al.*, 2000）。また、陸上に棲息する一部のバクテリア（真正細菌）には、エーテル脂質を持つものが報告されている。これは、イソプレノイド鎖の代わりに直鎖あるいは分岐の炭化水素鎖2本を1,2-*sn*-グリセロールが結合する立体配座であり（Weijers *et al.*, 2006）、アーキア型の2,3-*sn*-グリセロールとは異なる。この1,2-*sn*-型と2,3-*sn*-型のグリセロールの立体異性が、原核生物のドメインであるアーキア界とバクテリア界を分ける基準の一つになっている。その立体異性の分岐は、分子進化学的にも大きな意義を持つと考えられている（*e.g.*, Koga *et al.*, 1998; Koga, 2011; Shimada and Yamagishi, 2011）。

エーテル脂質の構造解析の先駆的研究を経て（*e.g.*, Koga and Morii, 2007; Koga and Nakano, 2008）、その知見がアーキアの生化学から1990年後半に地球生命科学に導入されるようになった。例えば、広汎的に存在する海洋性アーキアのイソプレノイド分子による証拠（DeLong *et al.*, 1998; Shouten *et al.*, 2000）、アーキアによる嫌氣的メタン酸化プロセス（Hinrichs *et al.*, 1999; Elvert *et al.*, 1999）、クレンアーキオール分子の発見（Sinninghe Damsté *et al.*, 2002）、天然

存在比の ^{13}C -あるいは ^{14}C -分子レベルでの炭素同位体比（Pearson *et al.*, 2001; Ingalls *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2008）、水素同位体比（Kaneko *et al.*, 2011）、D-および ^{13}C -二次元標識法（Wegener *et al.*, 2012）の測定等に応用されるようになった。原核生物の極性脂質の多様性（*e.g.*, Lipp and Hinrichs, 2009; Schubotz, 2010）が明らかになっている一方、 ^{13}C -Stable Isotope Probing (^{13}C -SIP) 法と極性頭部の炭素同位体比の計測により、アーキア代謝における極性頭部の挙動が理解されるようになった（Lin *et al.*, 2010）。極性頭部は、置き換わりやすい炭素貯蔵場所としても重要な部位であることが示唆されている（Lin, 2009）。

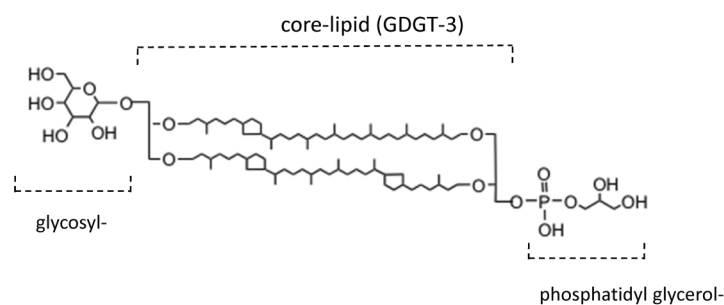
3. エーテル脂質分子および分子内同位体比の応用研究

クロマトグラフによる分離を行えば、個々の分子部位である極性頭部そしてイソプレノイドの同位体的特徴を読むことができる。では、エーテル結合の基軸分子であるグリセロールは、どのようなものだろうか。我々は、分子内同位体比を測定する分析法の最適化（Takano *et al.*, 2010a）の後、応用研究として海洋堆積物中に含まれるエーテル脂質のグリセロールの炭素同位体比を調べた（Fig. 2）。

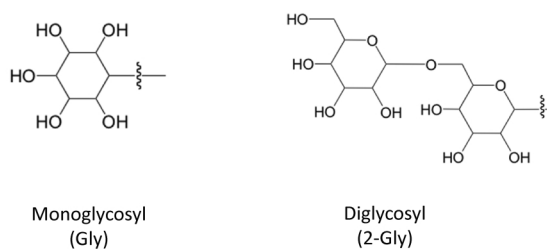
我々は、Nomaki *et al.* (2006) による現場培養実験の手法を応用して、海底堆積物中のアーキア膜脂質の代謝を ^{13}C -トレーサー法を用いて解析した（Takano *et al.*, 2010a）。ここでは、標識基質として ^{13}C -グルコースを用いた結果について述べる。まず、Fig. 3に北太平洋ベリング海、北西太平洋下北沖、メキシコ湾沖、滋賀県琵琶湖、相模湾の海底堆積物から得られたアーキア由来エーテル脂質分子（カルドアーキオールおよびクレンアーキオール）の炭素同位体比（‰ PDB）と ^{13}C -現場培養実験（最大405日）による ^{13}C -取り込みの証拠を示す。エーテル脂質分子の炭素同位体比でみると、天然存在比に比べて炭素同位体比がプラス側にシフトしていることから、現場培養実験（0～405日間）でのアーキア群集（Appendix 1, 2）による ^{13}C -取り込みは、明らかであった。

次に、それらのエーテル脂質分子の分子内炭素同位体比に着目した。Fig. 4に相模湾海底で行った現場培養（405日間）から得られたエーテル脂質分子（例：クレンアーキオール）および分子内同位体比（グリセロール、ビフィタン-2、ビフィタン-3）の計測、および分子内の炭素同位体的不均質性（Takano *et al.*,

(a) Achaean intact polar lipid (e.g., phosphoglycolipid-GDGT)



Other polar head groups: e.g., glyco-based groups



(b) Achaean core-lipids

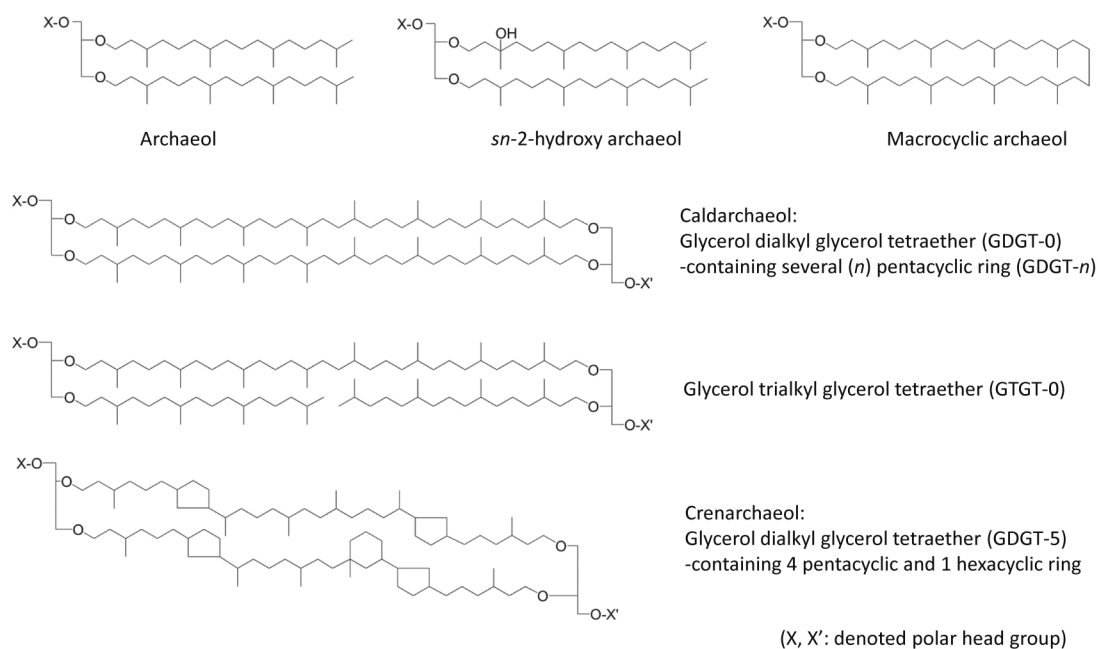


Fig. 1 (a) a structure of archaeal intact polar lipid (e.g., phosphoglycolipid-GDGTs from *Thermoplasma acidophilum*) analyzed by high performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) in Takano *et al.* (2010b). (b) representative structures of archaeal core-lipid. GDGTs occasionally contains several (n) pentacyclic ring (GDGT-n). Some examples of sugar-head groups are shown. See also, archaeal lipid data bank from Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids (JCBL) in <http://lipidbank.jp/>.

Sample: Shimokita, 48.2m (sec 6-3), compound: caldarchaeol

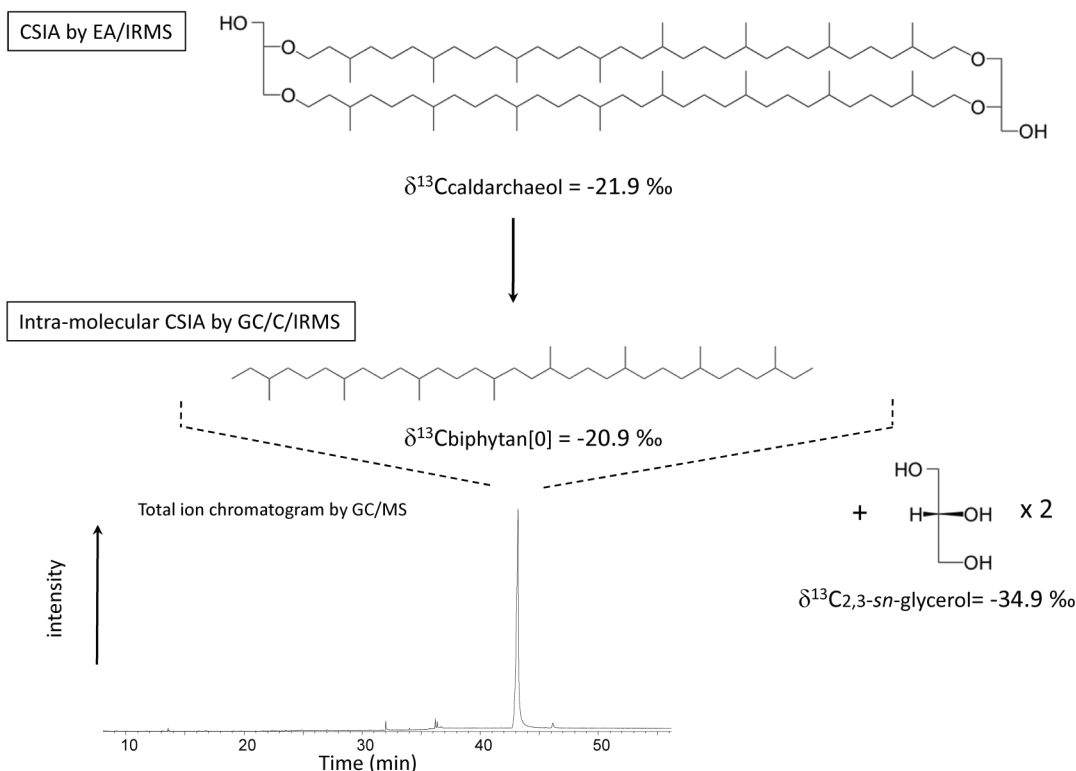


Fig. 2 Verification of the present compound-specific isotope analysis (CSIA) and intramolecular isotopic analysis. Here, the marine sediment was collected from off-shore Shimokita, Japan, Western Pacific (CK06-06, section 6-3; depth, 48.2 m below the sea-floor). Theoretically, the mass balance equation takes the form

$$n_X \delta^{13}\text{C}_X = n_Y \delta^{13}\text{C}_Y + n_Z \delta^{13}\text{C}_Z$$

where n is the number of moles of carbon, resulting in $n_X = n_Y + n_Z$. The subscripts X , Y and Z represent whole-molecule compounds, a specific group, and a second specific group, respectively. Hence, the 86 comes from carbon number of caldarchaeol and crenarchaeol (i.e., $\text{C}_{86}\text{H}_{172}\text{O}_6$ and $\text{C}_{86}\text{H}_{162}\text{O}_6$, respectively). For caldarchaeol: $86 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{caldarchaeol}} = 80 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{BP}[0]} + 6 \times \delta^{13}\text{C}_{2,3\text{-sn-glycerol}}$, for crenarchaeol: $86 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{crenarchaeol}} = 40 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{BP}[2]} + 40 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{BP}[3]} + 6 \times \delta^{13}\text{C}_{2,3\text{-sn-glycerol}}$. Then, We determined carbon isotopic compositions for each isoprenoid (BP [0], BP[2], and BP[3]) using GC/C/IRMS, resulting in the determination of carbon isotopic compositions for 2,3-*sn*-glycerol ($\delta^{13}\text{C}_{2,3\text{-sn-glycerol}}$) using the mass balance equation between $\delta^{13}\text{C}_{\text{CSIA}}$ and its intra-molecular $\delta^{13}\text{C}_{\text{BP}}$.

2010a) を示す。アーキア由来エーテル脂質の分子内同位体比を評価するには、マスバランス（分子全体から分子部位の差分を算出）で分子内同位体比を計測する方法と個々の分子部位を直接計測する方法がある。その両者での測定の結果、エーテル脂質分子内同位体比には、最大2200‰を超える同位体的不均質性があることが判明した。ここで重要なことは、イソプレノイド鎖の炭素同位体比は、天然存在比とほぼ同一であるのに対して、グリセロールには、 ^{13}C -濃集が存在す

ることである。炭素同位体比の標準試料の精度および確度 (Chikaraishi and Naraoka, 2007; Tayasu *et al.*, 2011), 極微量分析用に最適化された Ultra sensitive-EA/IRMS システム 開発 (Ogawa *et al.*, 2010) は, Figs. 2・3に示した分析の信頼性をサポートしている。

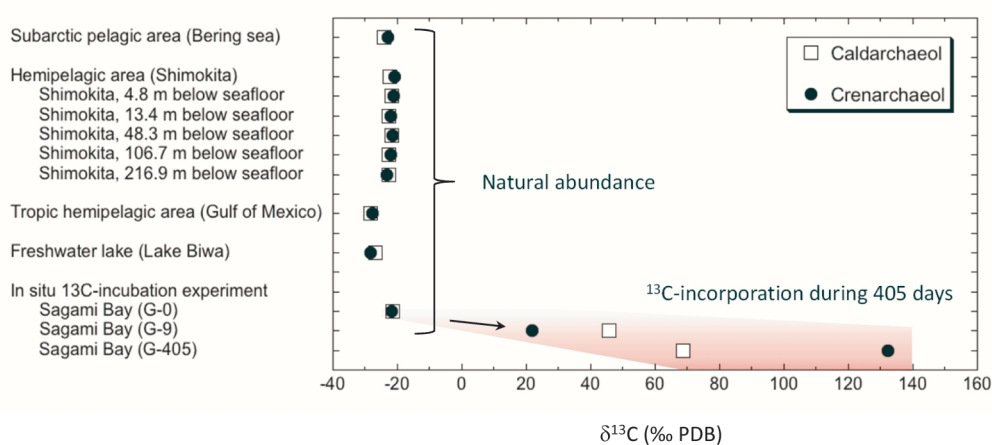
4. 分子で診断するアーキアの生態学

405日間の現場培養実験で明らかになったことは,

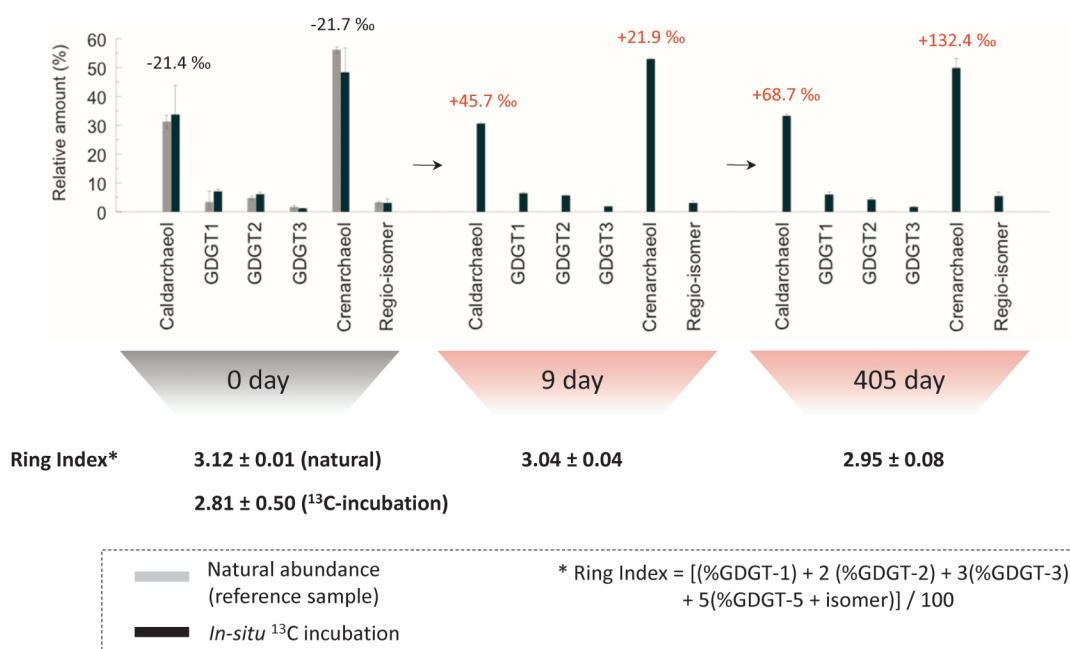
(i) 海底下のアーキアが「生きている」証拠を確実に得たこと、(ii) アーキアは、エーテル脂質のグリセロール部位は自ら合成しているが、イソプレノイド鎖は、アーキアの先祖あるいは仲間の遺骸としてのイソプレノイド鎖を再利用（リサイクル）していること、に集約される。つまり、グリセロール部位は、自ら作る新生経路（*de novo pathway*）の寄与が大きいものに対して、イソプレノイド鎖は、過去に作られたものを使い回すサルベージ経路（*salvage pathway*）を

利用しているのである。既報およびその解釈 (Takano *et al.*, 2010a) に基づいて、Fig. 5にエーテル脂質の新生経路およびサルベージ経路からみたエーテル脂質の生合成経路を示した。炭素数1あるいは2の化合物から炭素数86のエーテル脂質骨格をボトムアップに生合成する過程が、多段階的で多くのエネルギー投与が必要なことは明白である。一方、リサイクルできる生合成の材料（前駆体を含む）を有効に再利用することは、エネルギー的に無駄が少ないことと同義である。

(a) Compound-specific carbon isotopic composition of benthic GDGTs



(b) Relative abundance and stepwise ^{13}C -enrichment during *in-situ* ^{13}C -incubation



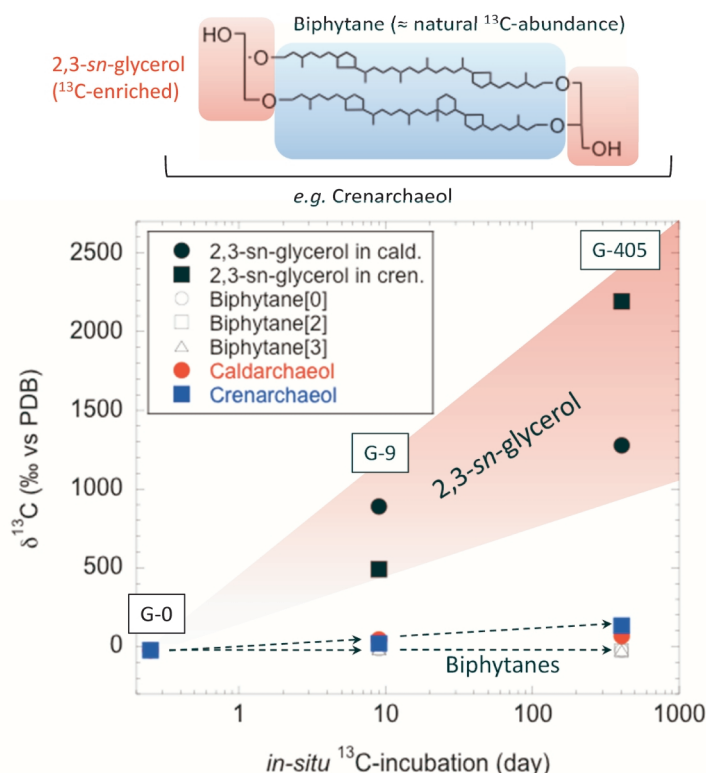
(c) intra-molecular ^{13}C -isotopic composition during *in-situ* ^{13}C -incubation

Fig. 3 (a) Comparison of $\delta^{13}\text{C}_{\text{caldarchaeol}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{crenarchaeol}}$ values from various locations and *in situ* ^{13}C -tracer incubation experiments. (b) Long-term monitoring for relative abundances of archaeal lipids (mole%, $n = 3$) and ring index of GDGTs during *in-situ* ^{13}C -incubation for 405 days. (c) intra-molecular ^{13}C -isotopic composition during *in-situ* ^{13}C -incubation for 405 days. See, Supporting Information from Takano *et al.* (2010a).

このプロセスは、従来のイソプレノイド分子のみを分析する方法では、見出せなかった事象であり、分子内同位体比にまで評価を行ったゆえの発見といえる。原核生物のサルベージ経路は、バクテリアの脂肪酸 (Silbert *et al.*, 1968; Rock and Jackowski, 1985), コレステロール (Razin, 1975), アルコール (Larsen *et al.*, 1995), DNA および遺伝情報 (Dubnau, 1999; Chen and Dubnau, 2004) 等で以前から研究されている。真核生物のスフィンゴ脂質の分子内では、サルベージ経路により最大50~90%程度の再利用が行われている (e.g., Kitatani *et al.*, 2008), との報告もある。エネルギー源に枯渇した海底下に棲息するアーキアがイソプレノイドを再利用していることは見えてきたが、その前駆物質や詳しいメカニズムは、未解明な部分もあり、いま様々な調査研究が進められている。

5. エーテル脂質の二次生成物と再利用の経路

アーキア由来のエーテル脂質は、生化学的な分解あるいは続成作用を受けると、イソプレノイド両端にヒドロキシル基を有するジアルコール (e.g., Hoefs *et al.*, 1997; Teske *et al.*, 2002; Saito and Suzuki, 2010) のような二次生成物を作る。エーテル結合を解裂できる原核生物は、バクテリアで以前から研究されている (White *et al.*, 1996)。

近年, Fig. 6に示した2,3-sn-グリセロール部位を一つ有するアーキア由来のエーテル脂質が、海底堆積物から検出されている (Liu *et al.*, 2012; Knappy and Keely, 2012)。それらは、GDDs (glycerol dialkanol diethers) あるいはGDTs (glycerol dialkanol triols) と称され、その存在意義に注目が集まっている。

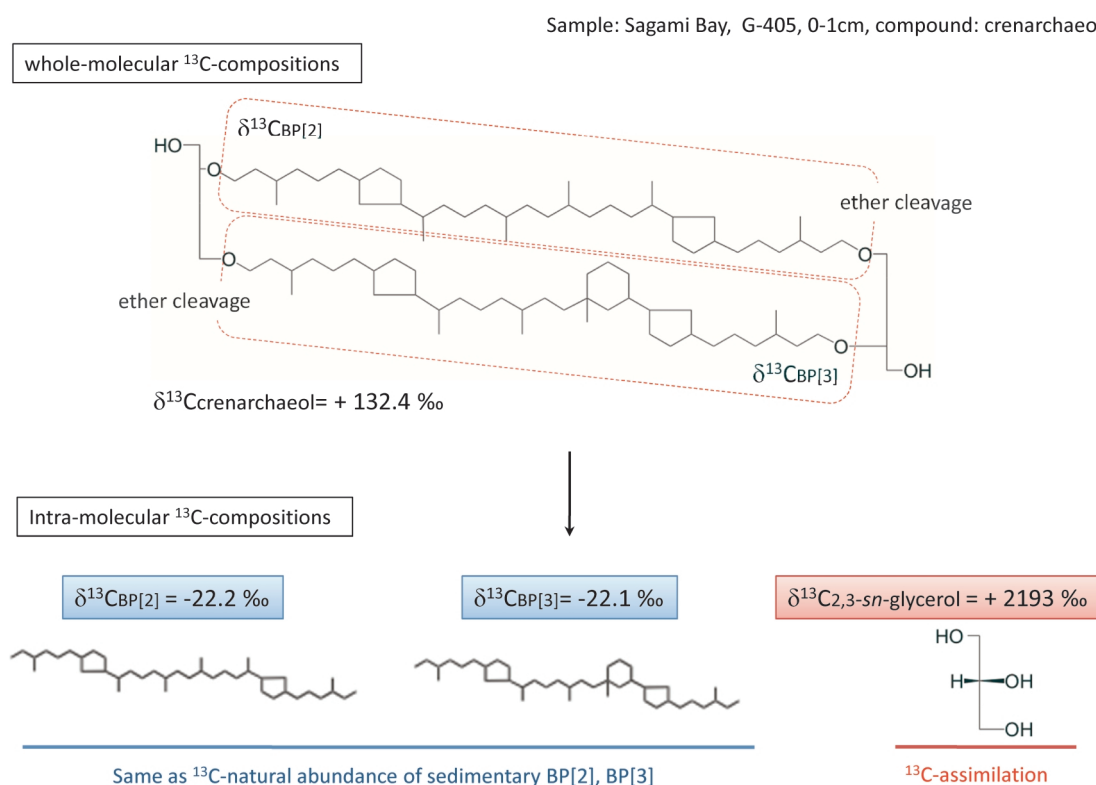


Fig. 4 Carbon isotopic compositions of crenarchaeol after 405 days of the *in situ* ^{13}C -tracer experiment at Sagami Bay. We determined the carbon isotopic compositions of resulting biphytane and glycerol derivatives using an online gas chromatograph/combustion/isotope ratio mass spectrometer (GC/C/IRMS), enabling the calculation of 2,3-*sn*-glycerol ($\delta^{13}\text{C}_{2,3\text{-sn-glycerol}}$) using the mass balance equation between caldarchaeol, crenarchaeol and their isoprenoid moieties (cf. direct measurement of $\delta^{13}\text{C}_{2,3\text{-sn-glycerol}}$ in Takano *et al.*, 2010a).

実験室でのアーキアの培養研究では、イソプレノイド前駆物質としてのゲラニルゲラニオールがアーキア細胞内のキナーゼ酵素によりリン酸基が付加される (Fig. 7-a)。このことから、間接的にイソプレノイドの再利用を実証した報告例がある (Ohnuma *et al.*, 1996)。この反応のホストであるキナーゼ酵素に、Fig. 7-b に示したようなゲスト分子を識別する基質特異性があることは、極めて興味深い事象である。

Fig. 8に海底下のアーキアが駆動していると考えられる膜脂質代謝のまとめを示した。性状未知のアーキアに関して、極性脂質の分解挙動 (*e.g.*, Logemann *et al.*, 2011) を含め、新生経路そしてサルベージ経路の知見がこれから蓄積されていくだろう。大局的に言えば、最初の基礎生産者による一次的な独立栄養性と二次的な従属栄養性の分子レベルでのリンケージは、プランクトン性アーキアと底生性アーキアによる分子を介したエネルギーフローと表現できる。

6. 地球炭素循環におけるアーキアの役割

アーキアは、地球炭素循環のミクロな担い手である。炭素循環のうち、最も酸化的な形態である「二酸化炭素」の固定能を浮遊性アーキアは有している (Wuchter *et al.*, 2003)。一方で、ユーリアーキオータ門の一部のアーキア群は、最も還元的な形態である「メタン」の生産者でもある。このアーキアによる生物起源メタン生成のプロセス (Thauer *et al.*, 2008; Conrad, 2009; Valentine, 2011) は、これから資源科学的にも注目されていくだろう。この観点から我々は、メタン生成に必須である補酵素430の分子レベル同位体比を包括した分析手法の開発を現在進めている (Takano *et al.*, 2011)。分子自身の「現物 (オリジナル)」の情報を提供できる「化学」的手法の技術開発は、将来、分子生物学と地球生命科学の因果を精度良く読み解く「鍵」になる。なぜなら、機能遺伝子を

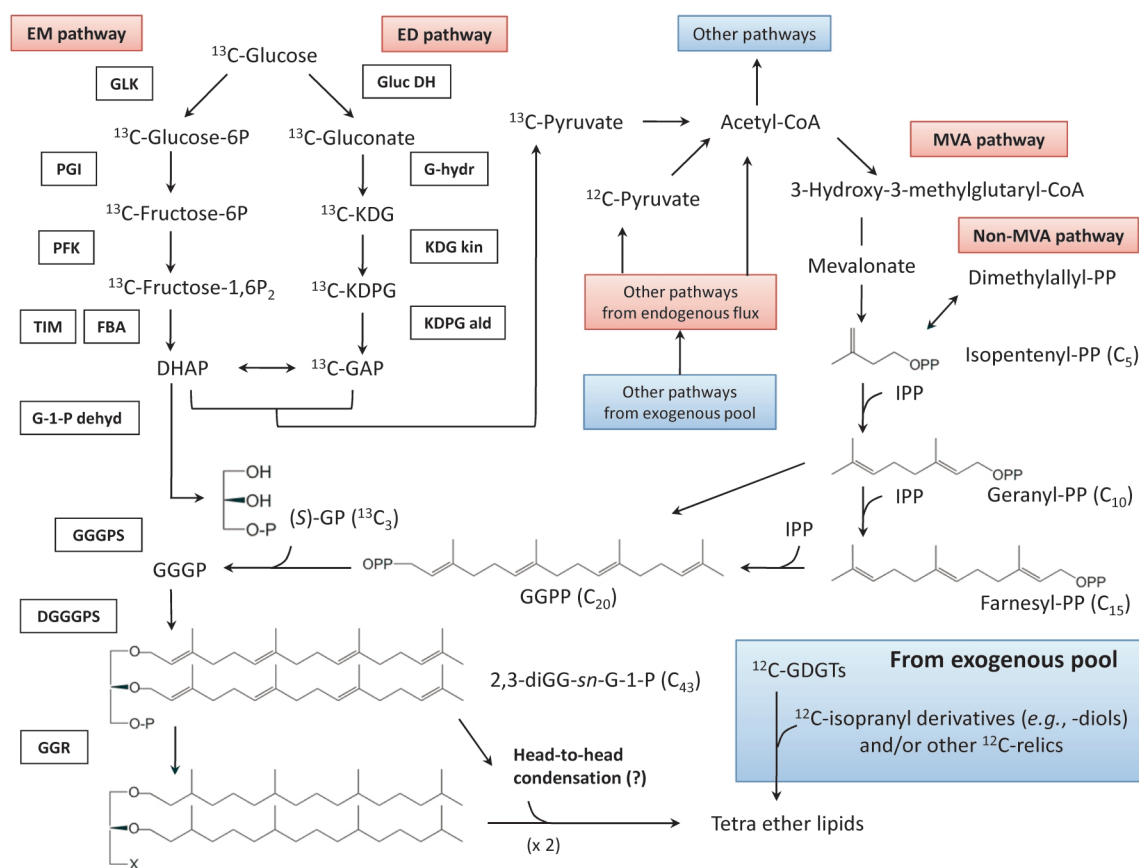


Fig. 8 Biosynthesis of core lipids in Archaea focusing on isoprenoid and 2,3-*sn*-glycerol moieties compiled from Hemmi *et al.* (2004), Murakami *et al.* (2007), Morii *et al.* (2000), Zhang and Poulter (1993), Nemoto *et al.* (2003), Nishihara *et al.* (1999), Ohnuma *et al.* (1996), Takano *et al.* (2010a). Red and blue squares stand for endogenous and exogenous processes for benthic archaea, respectively. Abbreviations and enzymes (black squares): EM, Embden-Meyerhof; ED, Entner-Doudoroff; GLK, glucokinase; PGI, phosphoglucose isomerase; PFK, phosphofructokinase; TIM, triosephosphate isomerase; FBA, Fructose-1,6-bisphosphate aldolase; Gluc DH, Glucose dehydrogenase; G-hyd, Gluconate dehydratase; KDG kin, 2-keto-3-deoxygluconate kinase; KDPG ald, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase; G-1-P DH, G-1-P dehydrogenase; GGGPS, 3-*O*-geranylgeranylgeranyl phosphate synthase; DGGGPS, 2,3-di-*O*-geranylgeranylgeranyl phosphate synthase; GGR, geranylgeranyl reductase; IPP, isopentenyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; (S)-GP, (S)-glyceryl phosphate. X denotes a polar head group.

持っていることと、それが発現して代謝の反応場を実際に提供していること、あるいは代謝生成物を実際に駆動・生成していることは同一の事象と言い切れないためである。理想的には、機能遺伝子と機能性分子の両面的な符合が求められる。

本稿で例示したような、分子および分子内同位体比という極微小スケールの分析技術が、マクロスケールに駆動されている生物地球化学プロセスの解明に大きな役割を果たすと考えている。

謝 辞

本稿は、2名の匿名研究者によって査読して頂き、有用なコメントを頂いた。海洋研究開発機構の野牧秀隆博士と小川奈々子博士には、試料の一部提供とアドバイスを頂いた。本研究の一部は、科学研究費補助金 (Y. T., N. O., 19GS0211) および海底資源プロジェクト (FY 2011) で行った。

引用文献

- Albers, S. V. and Meyer, B. H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 414–426.
- Biddle, J. F., Lipp, J. S., Lever, M. A., Lloyd, K. G., Sorensen, 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 of United States of America*, **103**, 3846–3851.
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. and Stetter, K. O. (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles*, **1**, 14–21.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. and Forterre, P. (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 245–252.
- Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 331–343.
- Cavicchioli, R. (2011) Archaea - timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 51–61.
- Chen, I. and Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 241–249.
- Chikaraishi, Y. and Naraoka, H. (2007) $\delta^{13}\text{C}$ and δD relationships among three *n*-alkyl compound classes (*n*-alkanoic acid, *n*-alkane and *n*-alkanol) of terrestrial higher plants. *Organic Geochemistry*, **38**, 198–215.
- Conrad, R. (2009) The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, **1**, 285–292.
- Dekas, A. E., Poretsky, R. S. and Orphan, V. J. (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science*, **326**, 422–426.
- DeLong, E. F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **89**, 5685–5689.
- DeLong, E. F. (2007) Microbial domains in the ocean: a lesson from the Archaea. *Oceanography*, **20**, 124–129.
- DeLong, E. F., Wu, K., Prezelin, B. and Jovine, R. (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature*, **371**, 695–697.
- 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.
- Dubnau, D. (1999) DNA uptake in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, **53**, 217–244.
- Edwards, K., Bach, W. and McCollom, T. (2005) Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology*, **13**, 449–456.
- Elkins, J. G., Podar, M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B. P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E. V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M. and Stetter, K. O. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 8102–8107.
- Elvert, M., Suess, E. and Whiticar, M. J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C_{20} and C_{25} irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften*, **86**, 295–300.
- Engelen, B., Ziegelmüller, K., Wolf, L., Kopke, B., Gittel, A., Cypionka, H., Treude, T., Nakagawa, S., Inagaki, F., Lever, M. A. and Steinsbu, B. O. (2008) Fluids from the oceanic crust support microbial activities within the deep biosphere. *Geomicrobiology Journal*, **25**, 56–66.
- Fry, J., Parkes, R., Cragg, B., Weightman, A. and Webster, G. (2008) Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **66**, 181–196.
- Hallam, S., Putnam, N., Preston, C., Detter, J., Rokhsar, D., Richardson, P. and DeLong, E. (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, **305**, 1457–1462.
- Hemmi, H., Shibuya, K., Takahashi, Y., Nakayama, T. and Nishino, T. (2004) (*S*)-2,3-Di-*O*-geranylgeranylglycerol phosphate synthase from the thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Molecular cloning and characterization of a membrane-intrinsic prenyltransferase involved in the biosynthesis of archaeal ether-linked membrane lipids*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 50197–50203.
- 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. and Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In: *Ocean Margin Systems* (eds. Wefer G., Billett D., Hebbeln, D., Jørgensen B. B., Schlüter M. and Van Weering T.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 457–477.
- Hoefs, M. J. L., Schouten, S., deLeeuw, 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.
- Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, E., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., Yamaguchi, T., Tomaru, H., Takeuchi, R., Morono, Y., Inagaki, F. and Takai, K. (2011) Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *ISME Journal*, **5**,

- 1913–1925.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F., 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 the National Academy of Sciences*, **103**, 2815–2820.
- Ingalls, A., Shah, S., Hansman, R., Aluwihare, L., Santos, G., Druffel, E. and Pearson, A. (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **103**, 6442–6447.
- Jørgensen, B. B. and Boetius, A. (2007) Feast and famine-microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 770–781.
- Kaneko, M., Kitajima, F. and Naraoka, H. (2011) Stable hydrogen isotope measurement of archaeal ether-bound hydrocarbons. *Organic Geochemistry*, **42**, 166–172.
- Karner, M. B., DeLong, E. F. and Karl, D. M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, **409**, 507–510.
- Kashefi, K. and Lovley, D. R. (2003) Extending the upper temperature limit for life. *Science*, **301**, 934–934.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. and Hannun, Y. A. (2008) The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular Signalling*, **20**, 1010–1018.
- Knappy, C. S. and Keely, B. J. (2012) Novel glycerol dialkanol triols in sediments: transformation products of glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids or biosynthetic intermediates? *Chemical Communications*, **48**, 841–843.
- Koga, Y. (2011) Early evolution of membrane lipids: how did the lipid divide occur? *Journal of Molecular Evolution*, **72**, 274–282.
- 古賀洋介・亀倉正博 (1998) 古細菌の生物学. 東京大学出版, pp. 1–301.
- Koga, Y. and Morii, H. (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **71**, 97–120.
- Koga, Y. and Nakano, M. (2008) A dendrogram of archaea based on lipid component parts composition and its relationship to rRNA phylogeny. *Systematic and Applied Microbiology*, **31**, 169–182.
- Koga, Y., Kyuragi, T., Nishihara, M. and Sone, N. (1998) 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.
- Larsen, K. L., Miller, M. and Cox, R. P. (1995) Incorporation of exogenous long-chain alcohols into bacteriochlorophyll-*c* homologs by *Chloroflexus aurantiacus*. *Archives of Microbiology*, **163**, 119–123.
- Lin, Y. S. (2009) In vitro study of microbial carbon cycling in subseafloor sediments. PhD Thesis, Univ Bremen. pp.1–151.
- Lin, Y. S., Lipp, J., Yoshinaga, M., Lin, S., Elvert, M. and Hinrichs, K. -U. (2010) Intramolecular stable carbon isotopic analysis of archaeal glycosyl tetraether lipids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **24**, 2817–2826.
- Liu, X. L., Lipp, J. S., Schroder, J. M., Summons, R. E. and Hinrichs, K. -U. (2012) Isoprenoid glycerol dialkanol diethers: a series of novel archaeal lipids in marine sediments. *Organic Geochemistry*, **43**, 50–55.
- Lipp, J. and Hinrichs, K. (2009) Structural diversity and fate of intact polar lipids in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 6816–6833.
- 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.
- Logemann, J., Graue, J., Koester, J., Engelen, B., Rullkoetter, J. and Cypionka, H. (2011) A laboratory experiment of intact polar lipid degradation in sandy sediments. *Biogeosciences*, **8**, 2547–2560.
- Morii, H., Nishihara, M. and Koga, Y. (2000) CTP: 2, 3-di-*O*-geranylgeranyl-*sn*-glycero-1-phosphate cytidyl transferase in the methanogenic archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36568–36574.
- Morono, Y., Terada, T., Nishizawa, M., Ito, M., Hillion, F., Takahata, N., Sano, Y. and Inagaki, F. (2011) Carbon and nitrogen assimilation in deep subseafloor microbial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 18295–18300.
- Murakami, M., Shibuya, K., Nakayama, T., Nishino, T., Yoshimura, T. and Hemmi, H. (2007) Geranylgeranyl reductase involved in the biosynthesis of archaeal membrane lipids in the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *FEBS Journal*, **274**, 805–814.
- Nemoto, N., Shida, Y., Shimada, H., Oshima, T. and Yamagishi, A. (2003) Characterization of the precursor of tetraether lipid biosynthesis in the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Extremophiles*, **7**, 235–243.
- Nichols, D. S., Miller, M. R., Davies, N. W., Goodchild, A., Raftery, M. and Cavicchioli, R. (2004) Cold adaptation in the Antarctic archaeon *Methanococcoides burtonii* involves membrane lipid unsaturation. *Journal of Bacteriology*, **186**, 8508–8515.
- Nishihara, M., Yamazaki, T., Oshima, T. and Koga, Y. (1999) *sn*-Glycerol-1-Phosphate-forming activities in Archaea: separation of archaeal phospholipid biosynthesis and glycerol catabolism by glycerophosphate enantiomers. *Journal of Bacteriology*, **181**, 1330–1333.

- Nishihara, M., Nagahama, S., Ohga, M. and Koga, Y. (2000) Straight-chain fatty alcohols in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles*, **4**, 275–277.
- Nomaki, H., Heinz, P., Nakatsuka, T., Shimanaga, M., Ohkouchi, N., Ogawa, N., Kogure, K., Ikemoto, E. and Kitazato, H. (2006) Different ingestion patterns of delta ^{13}C -labeled bacteria and algae by deep-sea benthic foraminifera. *Marine Ecology Progress Series*, **310**, 95–108.
- Ogawa, O. N., Nagata, T., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2010) Ultra-sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses. In: *Earth, Life and Isotopes* (eds. N. Ohkouchi, I. Tayasu and K. Koba), Kyoto University Press, pp. 339–353.
- Ohnuma, S., Watanabe, M. and Nishino, T. (1996) Identification and characterization of geranylgeraniol kinase and geranylgeranyl phosphate kinase from the Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Biochemistry*, **119**, 541–547.
- Orphan, V., House, C., Hinrichs, K., McKeegan, K. and DeLong, E. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, **293**, 484–487.
- Pearson, A., McNichol, A. P., Benitez-Nelson, B. C., Hayes, J. M. and Eglinton, T. I. (2001) Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: a case study using compound-specific $\Delta^{14}\text{C}$ analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 3123–3137.
- Razin, S. (1975) Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *Journal of Bacteriology*, **124**, 570–572.
- Rock, C. and Jackowski, S. (1985) Pathways for the incorporation of exogenous fatty acids into phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 12720–12724.
- Roussel, E. G., Cambon-Bonavita, M. A., Querellou, J., Cragg, B. A., Webster, G., Prieur, D. and Parkes, R. J. (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, **320**, 1046–1046.
- Saito, H. and Suzuki, N. (2010) Distribution of acyclic and cyclic biphytanediols in recent marine sediments from IODP Site C0001, Nankai Trough. *Organic Geochemistry*, **41**, 1001–1004.
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R. K. and Jaun, B. (2010) The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **465**, 606–608.
- Schouten, S., Hopmans, E. C., Pancost, R. D. and Sinninghe Damsté, J. S. (2000) Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 14421–14426.
- Schubotz, F. (2010) Microbial community characterization and carbon turnover in methane-rich marine environments - case studies in the Gulf of Mexico and the Black Sea. Univ Bremen PhD Thesis. pp. 1–198.
- Shah, S. R., Mollenhauer, G., Ohkouchi, N., Eglinton, T. I. and Pearson, A. (2008) Origins of archaeal tetraether lipids in sediments: Insights from radiocarbon analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 4577–4594.
- Shima, S., Krueger, M., Weinert, T., Demmer, U., Kahnt, J., Thauer, R. K. and Ermler, U. (2012) Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, **481**, 98–101.
- Shimada, H. and Yamagishi, A. (2011) Stability of heterochiral hybrid membrane made of bacterial *sn*-G3P lipids and archaeal *sn*-G1P lipids. *Biochemistry*, **50**, 4114–4120.
- Silbert, D. F., Ruch, F. and Vagelos, P. R. (1968) Fatty acid replacements in a fatty acid auxotroph of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **95**, 1658–1665.
- 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.
- Stetter, K. (1996) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **18**, 149–158.
- Takai, K. and Nakamura, K. (2011) Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Current Opinion in Microbiology*, **14**, 282–291.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T. and Horikoshi, K. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH_4 production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 10949–10954.
- 高野淑識・大河内直彦 (2010) 海底下の地下生物圏：過去と現世のリンクを担う生物地球化学プロセス。地球化学, **44**, 185–204.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Nomaki, H., Morono, Y., Inagaki, F., Kitazato, H., Hinrichs, K. -U. and Ohkouchi, N. (2010a) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geoscience*, **3**, 858–861.
- 高野淑識・力石嘉人・大河内直彦 (2010b) 微量湿式分析による分子レベル同位体比の品質管理と確度向上：特に天然存在比の正確な評価と Stable Isotope Probing (SIP) 法の応用に向けて。Researches in Organic Geochemistry, **26**, 81–93.
- Takano, Y., Imachi, H., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2011) Coenzyme factor 430: abundance and isotopic compositions for tracing a key molecule of methanogenesis and reverse-methanogenesis. Abstract for the 25th International Meeting on Organic Geochemistry.

- Thauer, R., Kaster, A., Seedorf, H., Buckel, W. and Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 579–591.
- Tayasu, I., Hirasawa, R., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N. and Yamada, K. (2011) New organic reference materials for carbon-and nitrogen-stable isotope ratio measurements provided by Center for Ecological Research, Kyoto University, and Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology. *Limnology*, **12**, 261–266.
- Teske, A. and Sorensen, K. B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME Journal*, **2**, 3–18.
- Teske, A., Hinrichs, K. -U, Edgecomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S., Sogin, M. and Jannasch, H. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1994–2007.
- Valentine, D. L. (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 316–323.
- Valentine, D. L. (2011) Emerging topics in marine methane biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science*, **3**, 147–171.
- Wegener, G., Bausch, M., Holler, T., Thang, N. M., Prieto Mollar, X., Kellermann, M. Y., Hinrichs, K. -U. and Boetius, A. (2012) Assessing sub-seafloor microbial activity by combined stable isotope probing with deuterated water and ^{13}C -bicarbonate. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02739.x.
- White, G., Russell, N. and Tidswell, E. (1996) Bacterial scission of ether bonds. *Microbiological Reviews*, **60**, 216–232.
- Weijers, J. W. H., Schouten, S., Hopmans, E. C., Geenevasen, J. A. J., David, O. R. P., Coleman, J. M., Pancost, R. D. and Sinninghe Damsté, J. S. (2006) Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits. *Environmental Microbiology*, **8**, 648–657.
- 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.
- Wuchter, C., Schouten, S., Boschker, H. T. S. and Sinninghe Damsté, J. S. (2003) Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota. *FEMS Microbiology Letters*, **219**, 203–207.
- Zhang, D. and Poulter, C. (1993) Biosynthesis of archaeobacterial lipids in *Halobacterium halobium* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Organic Chemistry*, **58**, 3919–3922.

Ecology of deep-sea benthic archaea: insight from intra-molecular isotope signatures for salvage and *de novo* pathway

Yoshinori TAKANO^{*}, Yoshito CHIKARAISHI^{*} and Naohiko OHKOUCHI^{*, **, ***}

^{*} Institute of Biogeosciences and Submarine Resources Research Project,
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC),
2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan

^{**} Department of Environmental Science and Technology,
Tokyo Institute of Technology,
4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502, Japan

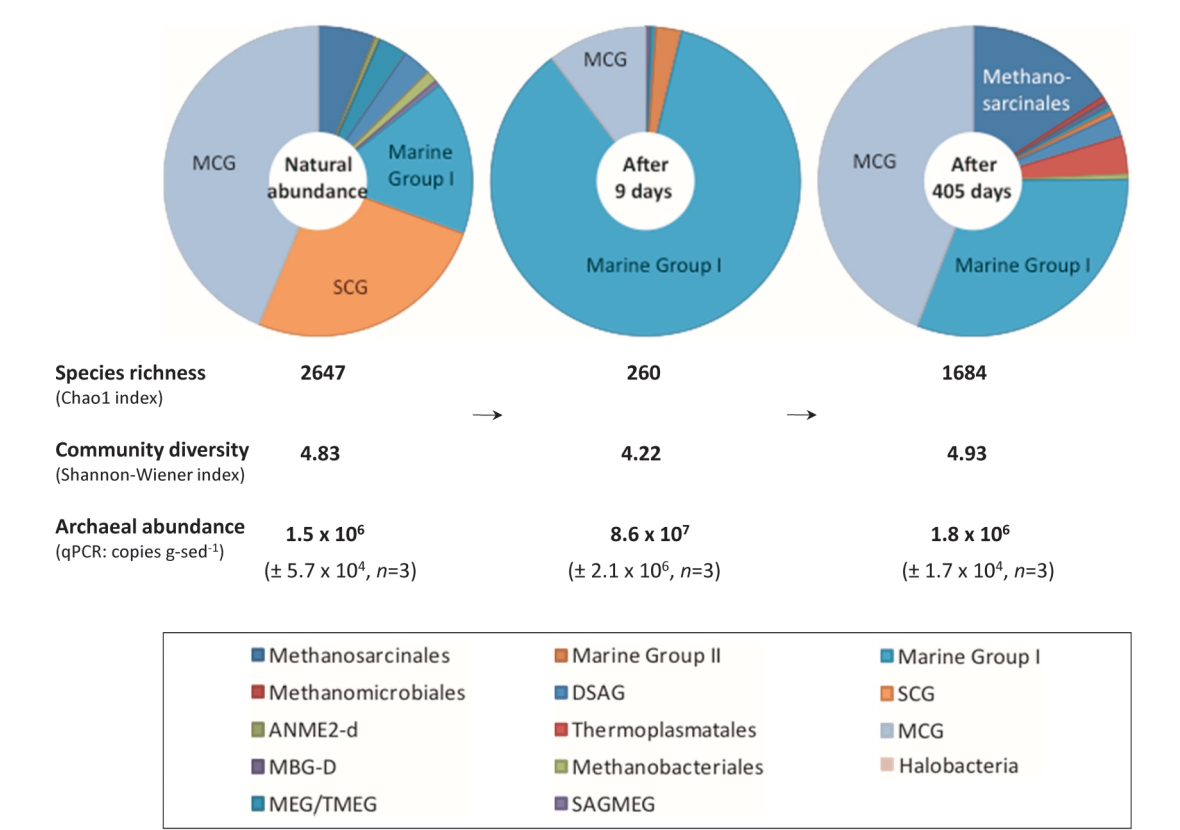
^{***} Department of Earth and Planetary Sciences, University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Since the first classification by Woese and Fox (1977), Archaea, one of three domains of life, had been originally believed to exist in extreme environments including high temperature, high salinity, low oxygen concentration. However, recent advances in molecular and phylogenetic approaches revealed their widespread distribution in marine and terrestrial environment including deep subsurface biosphere. The planktonic and benthic archaeal assemblages include two major phyla *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*. The novel phylum have been also proposed recently as *Thaumarchaeota*, *Korarchaeota*, and *Nanoarchaeota*. To elucidate unknown archaeal ecology, we evaluated intra-molecular isotopic composition to focus into archaeal membrane lipid biosynthesis using ¹³C-tracing techniques. The novel molecular diagnosis showed heterogeneous ¹³C-incorporation driven by salvage (recycling) and *de novo* pathways in energy-limited environment such as deep-sea environments. Here, we reviewed the recent knowledge of prokaryotic ecology and biogeochemistry from intra-molecular isotopic signatures.

Key words: Intra-molecular isotope analysis, Physico-chemical condition, Benthic archaea, Prokaryotic ecology, Sub-seafloor biogeochemical processes

Appendix. 1

Phylogenic analysis and quantitative PCR of the benthic archaeal community during 405 days. Abbreviations; ANME 2-d, Anaerobic methanotrophic archaea 2-d; MBG-D, Marine Benthic Group D; MEG/TMEG, Miscellaneous Euryarchaeotal Group/Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; GSAG, Deep-Sea Archaeal Group; SAGMEG, South African Goldmine Euryarchaeotal Groups; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group (Takano *et al.*, 2010a).



Appendix. 2

The remotely operated vehicle *Hyper-Dolphin* and *in-situ* ¹³C-incubation experiment for the experiment at Sagami Bay, Western Pacific during NT06-04&05, NT08-02 cruise. Photo courtesy from Dr. Hidetaka Nomaki & JAMSTEC.

