

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：80128

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15953

研究課題名（和文）含生物起源メタン炭層に生息する未培養微生物群のメタン生成ポテンシャル解析

研究課題名（英文）Methanogenic potential of subsurface coal field

研究代表者

玉澤 聡 (Tamazawa, Satoshi)

公益財団法人北海道科学技術総合振興センター・幌延地圏環境研究所・研究員

研究者番号：90808627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生物的石炭分解メタン生成機構の末端プロセスである低分子有機化合物からのメタン生成機構の解明を目標とし、褐炭層微生物群のメタン生成ポテンシャルを解析した。褐炭層由来地層水および獲得に成功したメタン生成集積培養系の微生物群集構造解析の結果、褐炭層における低分子量有機化合物からのメタン生成は、原位置褐炭層に優占するMethanobacterium, MethanoculleusおよびMethanolobusが担っているものと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の代謝機能を利用して石炭をメタンに変換して回収する生物炭層メタン増進回収法（MECBM）は、次世代のエネルギー開発技術として有用視されているものの、関与する微生物群や代謝経路等に関する知見は非常に限られていた。生物的石炭分解メタン生成機構における低分子量有機化合物からのメタン生成を解析した本研究は、いまだ研究例の乏しいMECBMの実用化への基盤的知見の提供となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Methanogenic potential of microbial communities in lignite seams was investigated to reveal the mechanism of methanogenesis from low molecular weight organic compounds. The results of microbial community analysis of lignite formation water and enriched methanogenic cultures suggested that Methanobacterium, Methanoculleus and Methanolobus, which dominate the in situ lignite seam, are responsible for methanogenesis from low molecular weight organic compounds.

研究分野：環境微生物学

キーワード：石炭分解メタン生成 CBM メタン生成集積培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エネルギー需要は世界的に増加の一途を辿っており、将来的な枯渇が避けられない在来型資源(石炭、石油や天然ガス)に替わる、非在来型資源(炭層メタン、シェールオイル・ガス等)の開発利用が積極的に進められている。その中で、生物的炭層メタン増進回収法(Microbially enhanced coalbed methane, MECBM) - 微生物の代謝機能を利用して原位置にて石炭をメタンに変換して回収する同手法^[1]は、本来地質年代的速度で進行する生物的炭層メタン生成過程を加速させ、かつ採炭せずに天然ガスとして回収可能という優れたメリットを持つことから、採掘コストが見合わないために放置されている閉山炭鉱や、現存技術では採炭困難な深部地下炭層の再生・利用の次世代技術として有用視されている。エネルギー資源に乏しいといわれる日本でも、地下 1000-3000 m の深部非可採炭層に三千億トン以上、同 3000 m 以深には三兆トン以上もの莫大な量の石炭を賦存すると概算されており^[2]、将来的にこれら未利用石炭をガス資源として利用できれば、エネルギー資源の大半を諸外国に依存している現状の我が国にとって非常に有望である。近年、生物的炭層メタン生成反応について、石炭に栄養源を添加することで達成されたとの報告があり^[3]、MECBM 実現化への期待が高まっている。同知見をベースに提唱された同反応のモデルでは、石炭が未知の多段階微生物反応により分解され、種々の低分子有機化合物を経て収束的な中間代謝産物として酢酸や水素/二酸化炭素が生じ、続いて酢酸や水素/二酸化炭素がメタンに変換されると示されている。しかし、どの微生物がどの物質をどの経路によってメタンに変換しているのかについては極めて限定的にしか解析されておらず、特に、本経路のキーとなる最終的なメタン生成に利用される低分子有機化合物の種類や、それに関与する微生物系統群は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究は、微生物起源メタンを産生する炭層にて活発に生息する微生物群を新鮮な炭層試料から抽出した環境 DNA および RNA を用いた網羅的なシーケンス解析により特定し、同炭層試料を用いた微生物培養によるメタン生成ポテンシャル(基質利用性)の評価と、基質ごとに得られたメタン生成集積培養物中の微生物群集構造を精緻に解析し、得られたデータを包括的に解析することによって、生物的炭層メタン生成機構の末端キープロセスである低分子有機化合物からのメタン生成機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炭層由来地層水および石炭それぞれから DNA と RNA を同時抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。特に、RNA を解析することにより採取時点において高活性な微生物の特定を試みた。

(2) 石炭の生物学的あるいは非生物学的分解により生じることが推定される低分子有機化合物および水素/二酸化炭素を基質に、嫌氣的に採取してきた石炭および炭層由来地層水を接種源に用いた集積培養実験を実施した。具体的には、基質としてギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、メタノール、エタノール、プロパノール、メチルアミン、安息香酸、メトキシ安息香酸とそれらの組み合わせを使用した。集積培養容器のヘッドスペースに生成するメタンを経時的に定量した。培養温度は 20 とし、使用培地は炭層由来地層水のイオン濃度のカスタマイズした無機塩合成培地を調製使用した。メタンが検出された集積培養系を少なくとも 4 回植え継ぎ、安定したメタン生成集積培養系が得られた時点で DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより集積微生物群を網羅的に解析した。

(3) 上記の結果を包括的に解析し、低分子量有機化合物からのメタン生成プロセスを推定した。

4. 研究成果

(1) 褐炭層試料採取および微生物群集構造解析

北海道道北地域の複数の褐炭層サイトから、地層水またはボーリングコアの採取と基礎的な地化学データの収集を行った。地層水については、目的とする炭層のみから嫌氣的に採水可能なシステムを構築した後に採水した。褐炭層サイト 1 の地層水の DNA および RNA ベースの微生物群集構造解析の結果、DNA と RNA の結果ともに水素資化性メタン生成アーキアが高い相対存在量で検出された。これは、同地層水から検出される微生物起源のメタンは主に CO₂ 還元経路と示唆する先行的な同位体分析の結果と整合的であった。

(2) メタン生成集積培養系の獲得

褐炭層由来地層水を微生物接種源、水素/二酸化炭素や低分子量有機化合物(有機酸、アルコール、メチル化合物等)を基質とした微生物培養実験を開始し、複数のメタン生成集積培養系を獲得した。継代培養と経時的なメタンガス分析を行い、少なくとも4回以上の植え継ぎを経てもメタン生成能を有するメタン生成集積培養系を確立した。同集積培養物の微生物群集構造について、16S rRNA 遺伝子ユニバーサルプライマーを用いた次世代シーケンスにより解析した結果、水素/二酸化炭素、有機酸やアルコール添加系では、水素(ギ酸)資化性の *Methanobacteriales* 目や *Methanomicrobiales* 目に属するメタン生成アーキアの配列が高い相対的存在量を示し、メチル化合物添加系では、メチル化合物資化性の *Methanosarciniales* 目に属するメタン生成アーキアの配列が高頻度に検出された。一方、いずれの基質添加系(酢酸添加系を含む)からも、酢酸資化性メタン生成アーキアに近縁な配列は検出されなかったことから、褐炭層における低分子量有機化合物からの主たるメタン生成経路は、水素(ギ酸)/二酸化炭素およびメチル化合物を介するものと示唆された。加えて、接種源として用いた褐炭層由来地層水の微生物群集構造解析においても、水素(ギ酸)資化性メタン生成アーキアおよびメチル化合物資化性メタン生成アーキアの配列は高い相対存在量を示す一方、酢酸資化性メタン生成アーキアの配列は未検出であり、本培養実験を支持する結果が得られた。

褐炭層由来地層水中のどのメタン生成アーキアがどの経路に対応しているかを明らかにするため、原位置地層水および同地層水を接種源として得られたメタン生成集積培養物の微生物叢を比較解析した。原位置地層水では、*Methanobacterium* (ユニバーサルプライマーによる相対存在割合 5.0-20.1%)、*Methanoculleus* (6.3-13.7%) に属する配列が高頻度に検出され、*Methanolobus* (0.008-0.012%) も検出された。いずれも、RNA ベースの解析からも検出されたことから、原位置地層水における主要で活性の高いメタン生成アーキアと示唆された。メタン生成集積培養物において、水素/二酸化炭素添加系では *Methanobacterium* が、ギ酸添加系では、*Methanobacterium* に加えて *Methanoculleus* が、メチル化合物添加系では *Methanobacterium* に加えて *Methanolobus* が高頻度に検出された。特にメチルアミン類では、*Methanolobus* の相対存在割合が高かった。また、イソプロパノールとジメチルサルファイド添加系では *Methanobacterium* と *Methanoculleus* の検出頻度が高かった。よって、褐炭層における低分子量有機化合物からの主要なメタン生成は、*Methanobacterium*、*Methanoculleus* および *Methanolobus* が担っており、*Methanobacterium* は水素/二酸化炭素、*Methanoculleus* はギ酸、イソプロパノールおよびジメチルサルファイド、*Methanolobus* はメチル化合物からのメタン生成に関与しているものと示唆された。

< 引用文献 >

- [1] Ritter *et al.*, *Int J Coal Geology*, 2015, 146:28-41; [2] Shimada *et al.*, *MMIJ*, 2010, 126:602-607; [3] Jones *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, 76:7013-7022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉村修司、木山保、上野晃生、猪股英紀、村上拓馬、玉澤聡、金子勝比古
2. 発表標題 地層中の未利用有機物のメタン化に向けた幌延地圏環境研究所の取り組み
3. 学会等名 日本腐植物質学会2019年度第35回講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野晃生、玉澤聡、玉村修司、村上拓馬、木山保、猪股英紀、荒牧憲隆、青山秀夫、山口眞司、長沼毅、金子勝比古
2. 発表標題 地下環境を利用したバイオメタン鉱床造成/生産法(Subsurface Cultivation and Gasification; SCG) - バイオメタン生産成功の条件は何か？
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野晃生、玉澤聡、玉村修司、村上拓馬、木山保、猪股英紀、山口眞司、長沼毅、五十嵐 敏文
2. 発表標題 北海道・天北炭田における嫌氣的採水装置設置後の褐炭層中の微生物群集構造調査：ボーリング掘削後の微生物群集モニタリング調査は毎年必要か
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akio Ueno, Satoshi Tamazawa, Shuji Tamamura, Takuma Murakami, Tamotsu Kiyama, Hidenori Inomata, Noritaka Aramaki, Shinji Yamaguchi, Takeshi Naganuma, Katsuhko Kaneko
2. 発表標題 Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) - What is the condition for the successful generation of biomethane in the SCG?
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------