

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03314

研究課題名(和文) 地下圏における炭素循環：微生物によるリグニン様物質からのメタン生成プロセスの解明

研究課題名(英文) Subsurface carbon cycle: Investigation of the microbial methanogenic process from lignin derivatives

研究代表者

石井 俊一 (Ishii, Shun'ichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・副主任研究員

研究者番号：10556913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：地下圏においてリグニン等の難分解性有機物を分解しメタンを生成する微生物プロセスを明らかにするため、水溶性天然ガス鉱床(南関東ガス田)に生息する地下圏のメタン生成微生物群集の研究を行った。まず、異なる6個の天然ガス井の湧出地下水中に生息するメタン生成古細菌を同定した。その後、リグニン様物質分解の中間代謝物(芳香族メトキシ化合物、安息香酸、酢酸、水素など)を唯一の炭素源・エネルギー源として、地下圏微生物の集積培養を行った。その中で芳香族メトキシ化合物を分解する機能を担うと推定されたBathyarchaeota門の古細菌のさらなる集積培養を行い、そのゲノム構造や生理機能の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、南関東ガス田の地下圏において働いている微生物群集の機能の一端を理解することができた。南関東ガス田は、可採埋蔵量が3,685億m<sup>3</sup>にも達する国内最大の水溶性天然ガス田であり、わが国の重要な資源の生産地である。また、埋蔵量としては1兆m<sup>3</sup>を超えると言われる南海トラフ海底下のメタンハイドレートを胚胎する層準とも地質学的に類似しており、その「微生物起源のメタン」の成因を明らかにすることはわが国の資源的観点から見ても、非常に重要である。本研究で得られた知見、用いられた解析技術は、今後、世界中の各種天然ガスサイトにおける、メタン生成の成因解明の基盤となるであろう。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the subsurface microbial processes that degrade persistent organic matter such as lignin and generate methane, we studied the subsurface methanogenic microbial community of a Minami-Kanto natural gas field. At first, methanogenic archaea in the brine formation water from six different natural gas wells were identified using metagenomic analyses. Subsequently, we performed enrichment cultures of the subsurface microorganisms using intermediate metabolites of lignin degradation (aromatic methoxy compounds, benzoic acid, acetic acid, hydrogen, etc.) as the sole carbon and energy source. Among them, archaea of the phylum Bathyarchaeota, which were presumed to be responsible for the degradation of aromatic methoxy compounds, were further cultured and their genome structures and physiological functions were analyzed.

研究分野：生物プロセス工学、地球生命工学

キーワード：天然ガス田 地下圏微生物 バチアーキオータ門 メタゲノム解析 芳香族メトキシ化合物 メタン生成微生物群集 mRNAseq

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

近年の掘削科学技術の発展により、様々な海洋・陸域地下圏が調査され、地下にも活発な生命活動が存在することが示され始めている (Inagaki et al. 2015. Science 349:420)。地球のほぼすべての生命は光合成により作られる有機物に支えられている。地下圏もその例外ではなく、地表・地下表層で分解を受けた光合成産物の分解残渣、すなわち、植物性の難分解性有機物 (リグニン様物質など) が堆積し、それらが、地下圏の微生物の栄養源・炭素源となり、最終的に炭素循環の最終生成物であるメタンが作られると考えられている。事実、植物性の難分解性有機物が含まれる層準やその近傍、例えばコールベッドメタンを吸着している石炭層準、水溶性天然ガスや油田ガスを胚胎している層準、そして海底下や永久凍土層に眠るメタンハイドレード層準近傍など、地下の莫大な空間において、現在も (あるいは過去において) 活発に地下圏微生物がメタンを生成していることが示されている。研究代表者も、これまで南関東ガス田の水溶性ガス田のメタンを胚胎する砂層層準からくみ出された嫌気の地下水を対象とした研究を行ってきており (Ishii et al. 2019. Front Ener Res 6:144)、その湧出地下水が高濃度のメタンを含むこと、それらが微生物起源であることを明らかにしている。

地下圏においては、図 1 に示すようなプロセスで、リグニン様物質が、多段階の生物分解反応を経て、メタンへと変換されると推定されるが、嫌気環境におけるリグニン様物質およびその中間代謝物の分解についての知見はほとんどいない。好気環境でのリグニン等の分解は、ペルオキシダーゼ (Froudas et al. 2012. Science 336:1715) や各種オキシダーゼが司るとされる (樋口 1990. 木材研究・資料 26:1) が、これらの酵素は酸素がなければ機能しないため、嫌気環境では機能しない。近年、未培養の Bathyarchaeota 門に属する古細菌が嫌気環境においてリグニン様物質を分解する可能性が示されたが (Yu et al. 2018. PNAS 115:6022)、その特定には至っていない。また、分解の最終ステップであるメタン生成に関しても、これまで水素と二酸化炭素、もしくは、酢酸などを基質としてメタンが作られるとされていたが、近年、リグニンのメトキシ基もまたメタン生成基質になるといった新たな代謝基質が同定されるなど (Mayumi et al. 2016. Science 354:222)、環境中には未同定のメタン生成基質・代謝経路が存在する可能性がある。メタン生成反応は、これまで Euryarchaeota 門の 7 つの系統目に属する、いわゆる「メタン生成古細菌」が担うと考えられていたが、近年の環境ゲノム解析により、未培養の複数の系統門に属する古細菌がメタン生成反応の鍵遺伝子であるメチル補酵素 M 還元酵素 (Mcr) をコードすることが示され、より多様な古細菌がその役割を担うことが示唆された (Evans et al. 2019. Nat Rev Microbiol 17:219)。これらの事実は、地下圏で広く起こる「微生物によるリグニン分解を伴うメタン生成」の一連の反応を担う機能微生物群集・代謝経路については未解明の事実が多く存在することを示している。

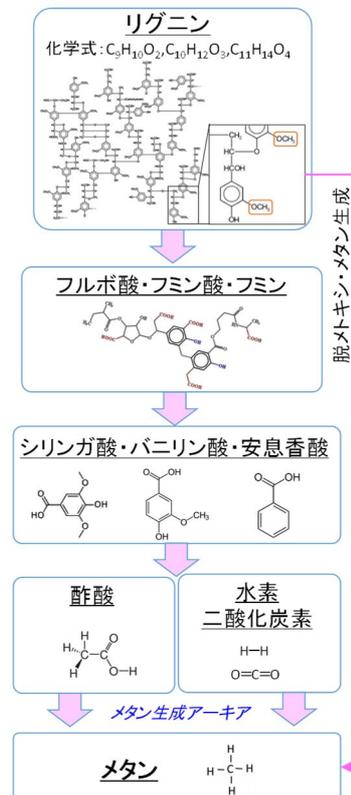


図 1. 推定される地下圏微生物による嫌気的リグニン分解、メタン生成経路

### 2. 研究の目的

本研究課題では、「地下圏においてどの微生物が、どこで、どのようにして植物性の難分解性有機物を分解しメタンを生成しているのか？」を核となると問いとし、その答えに迫る。この問いの答えを得るため、本研究では関東平野南部一帯に賦存する南関東ガス田に存在する微生物群集を対象とし、「水溶性天然ガス鉱床における難分解性有機物からのメタン生成プロセスの解明」を目的として研究を行う。この研究目的を達成するために、異なる深度 (層準) から採取された化学特性の異なる湧水サンプルを用いて、比較メタゲノミクス・メタトランスクリプトミクスを行い、地下圏におけるメタン生成生態系の解析を行う。同時に、リグニン様物質分解の中間代謝物 (シリンガ酸、パニリン酸、安息香酸、酢酸、水素など) を唯一の炭素源・エネルギー源として、地下圏微生物の集積培養を行い、それぞれの基質の分解とメタン生成に関わる微生物の情報を取得する。その中で特徴的な機能を担う微生物群の分離培養を行い、その生理学的特性 (難分解性有機物の分解活性やメタン生成活性など) を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) 異なる深度 (層準) から採取された湧水サンプルを用いて、比較メタゲノミクス・メタトランスクリプトミクスを行い、地下圏のメタン生成微生物生態系を解明し、(2) リグニン様物質分解の中間代謝物を唯一の炭素源・エネルギー源として、地下圏微生物の集積培養を行い、何をエサとしてメタン生成が行われるのかを明らかにすると共に、(3) Bathyarchaeota 門古細菌などの特徴的な機能を担う微生物群の分離培養に挑戦した。

### (1) 異なる天然ガス井から採取した湧水のメタゲノム解析

千葉県茂原市および長南町に点在する天然ガス井のうち、外房の海岸線からの距離および泉温（採取層準によって変動する）の異なる6個のガス井を選別し、各井戸の湧出地下水2L以上を0.2 μmのステリベクスでろ過し、現場で即座にドライアイスを用いて凍結した。その後、ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kitsを用いて、フィルター上に集められた微生物のDNAとRNAを共抽出した。得られたDNAからメタゲノムライブラリーを作成し、Illumina HiSeqXを用いて150bp x2 PEのDNAシーケンスを行った。得られたリードは、CLC Genomics Workbenchを用いてアセンブルし、MetaGeneMarkを用いてORF callingを行った。その後ORFの機能アノテーションをGhostKOALAおよびKAASを用いて行い、RpsCの情報を使用した群集構造解析を行った。

### (2) 天然ガス井から採取した地下圏微生物の集積培養

南関東ガス田から採取した微生物サンプルに、難分解性有機物やその中間代謝産物（図1）を人為的に添加し、ラボでの集積培養を行った。現場の湧出地下水を嫌氣的にバイアル瓶に閉じ込め、地下圏におけるエネルギー源、炭素源となり得る化学物質を添加した。用いた化学物質は、バニリン酸、シリンガ酸の混合芳香族メトキシ化合物、安息香酸、一酸化炭素、酢酸、水素、メタンであり、電子受容体として硫酸、硝酸、固体鉄を加える系を作成した。また、メタン生成や分解系の直接の基質に関しては、抗生物質を添加する系も作成し、メタン生成古細菌や嫌氣的メタン酸化古細菌の集積を試みた。

それぞれの集積培養系は、経時的に微生物数の計数、適切なクロマトグラフィー装置にて添加した基質の減少量およびメタン生成量の定量分析を行った。さらに、(1)と同様の手法でメタゲノムを用いた微生物群集構造解析を行い、地下圏における有機物分解およびメタン生成反応に関与する微生物種とその機能性遺伝子を同定した。

### (3) Bathyarchaeota 門古細菌の分離培養

難分解性有機物を用いた集積系の中で、シリンガ酸とバニリン酸を用いた集積系に特異的に存在した未培養系統門のBathyarchaeotaについて、さらなる集積培養を行い、その分離培養を試みた。安定してBathyarchaeotaの増殖が見られる集積系に関しては、合成培地を用いた培養系への移行や、限界希釈法を用いた単離を試みると共に、どのように芳香族メトキシ化合物を利用しているのかを明らかにするため、集積系のmRNAseqを行い、Bathyarchaeota門微生物の遺伝子発現プロファイルを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 異なる天然ガス井から採取した湧水のメタゲノム解析

南関東ガス田の千葉県外房域に存在する6個の異なるガス田のガス-湧出地下水の分離槽より、湧出地下水の化学特性を表1に示した。その結果、今回選別した湧出地下水の温度は、19-35の間で推移し、異なる層準の地下水中に存在する微生物を採取できたことが分かった。また、その他の化学組成のうち、pHは8近傍で安定して推移しているものの、その他の酸化還元電位、全有機炭素量（TOC）、微生物量（細胞濃度）は井戸によって異なることが分かった。

表 1. 今回採取した湧出地下水の性状比較

	水温 ( )	酸化還元電位 ( mv )	pH	TOC (mg/L)	細胞濃度 (cells/ml)
井戸1	29.0	-307	7.9	45	14064
井戸2	29.1	-254	7.9	48	2147
井戸3	19.7	-170	8.1	48	9928
井戸4	33.0	-234	7.9	55	662
井戸5	21.2	-212	7.9	51	6619
井戸6	19.5	-261	8.2	69	2127

これらの湧出地下水中に生息する微生物の生理・生態を明らかにするため、メタゲノム解析を行った。井戸6に関しては、研究期間中に明確にサンプルの性状（一緒に汲み出される砂量）の変化が見られたため、砂量が増える前後での微生物サンプルの解析を行った。その結果、これらの6個の井戸はすべて天然ガスを胚胎する地下水であるにも関わらず、メタン生成微生物を含有する系統群であるEuryarchaeota門（ユーリアーキオータ門）の微生物の存在量比は不均一であった（図2）。また、井戸2と井戸3は、ユーリアーキオータ門の微生物がほぼ検出されず、湧出地下水中に地下圏でのメタン生成に関与している微生物が含まれていないことが示

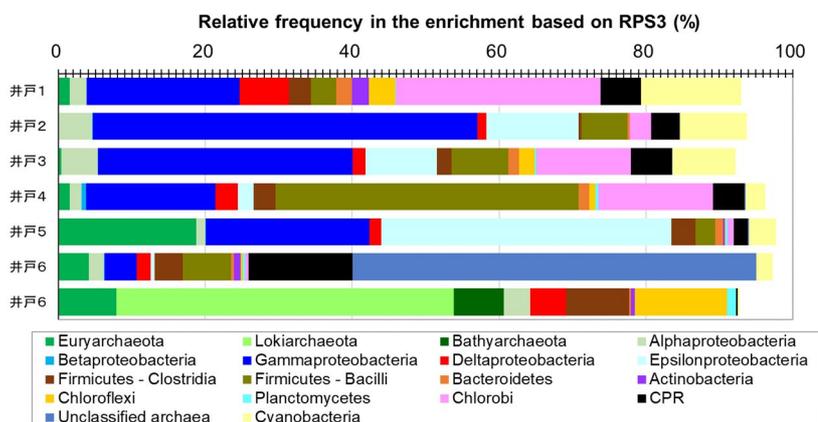


図 2. 6 個の天然ガス井の湧出地下水中に存在する微生物の群集構造解析

唆された。井戸 6 は砂の湧き出し増量の前後で大きく微生物群集構造が変化しており、増量前は DPANN や CPR などの存在量が多くを占めていたのに対し、増量後は Lokiarchaeota、Bathyarchaeota、Firmicutes、Chloroflexi の存在量が増えた。これらは、海洋堆積物中で多く見られる微生物系統群であり、砂に付着して地下圏に存在していたと考えられた。井戸 1~5 において多く見られる微生物系統群は、Gammaproteobacteria、Chlorobi、Cyanobacteria、Epsilonproteobacteria、Firmicutes であり、そのうち Cyanobacteria は、分離井中で地下水が太陽光に晒された後に増殖した地表の微生物の混入であると考えられた。

続いて、より詳細にメタン生成菌の存在の有無を明らかにするため、各井戸の古細菌に着目した群集構造比較を行った(図 3)。その結果、井戸 2、3、5 はメタン生成古細菌を含む系統群を含んでおらず、またメタゲノム中にもメタン生成反応の鍵遺伝子であるメチルコエンザイム M 還元酵素 (MCR) の遺伝子が見られなかった。井戸 3 においては、嫌氣的メタン酸化反応を行う rMCR をゲノム中にコードする ANME 古細菌が見られたのに対し、井戸 5 では独立栄養的に CO<sub>2</sub> を固定して酢酸を生成する

Altiaarchaeum 古細菌が多く見られた。それ以外の 3 個の井戸では、複数の系統群のメタン生成古細菌の存在が確認され、地下圏において数種のメタン生成古細菌が活動していることが示唆された。また、砂

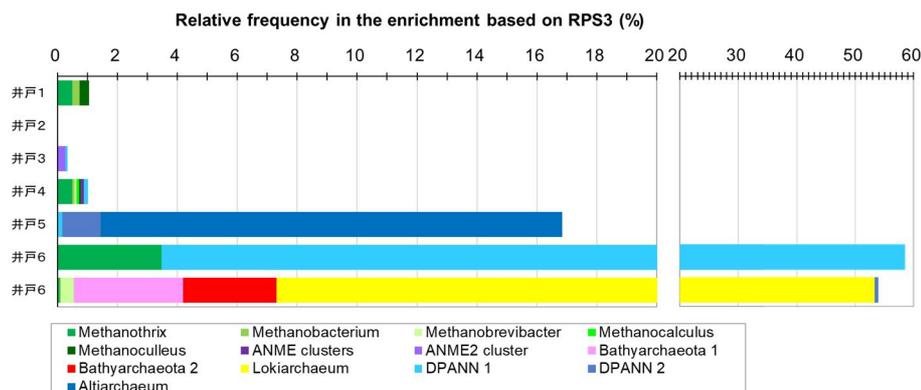


図 3. 6 個の天然ガス井の湧出地下水に存在する古細菌の群集構造解析

量増量後の井戸 6 には、Lokiarchaeota と Bathyarchaeota が大量に存在しており、これらの古細菌が地下圏においてメタン生成反応を支えている可能性が示唆された。既報の研究より、Lokiarchaeota はアミノ酸やポリペプチドを嫌氣的に分解する機能を有し、Bathyarchaeota はリグニン様化合物を用いた培養系で集積されることが示唆されている。そこで、本研究では、井戸 6 の地下水および分離井に生息する微生物群を種菌として、地下圏のメタン生成微生物群集の集積培養を試みることにした。

## (2) 天然ガス井から採取した地下圏微生物の集積培養

井戸 6 の湧出地下水、および分離井の地下水に浸漬している部分(水面下 40cm)の壁面に形成されたバイオフィルムを播種源として、地下圏微生物の集積培養を行った。基質として芳香族メトキシ化合物の混合物(シリンガ酸+バニリン酸, SyrVan)、メタンガス(CH<sub>4</sub>)、水素ガス(H<sub>2</sub>)、カザミノ酸(カゼインの酸加水分解物, Casa)、安息香酸(Benzoate, Benz)、一酸化炭素ガス(CO)

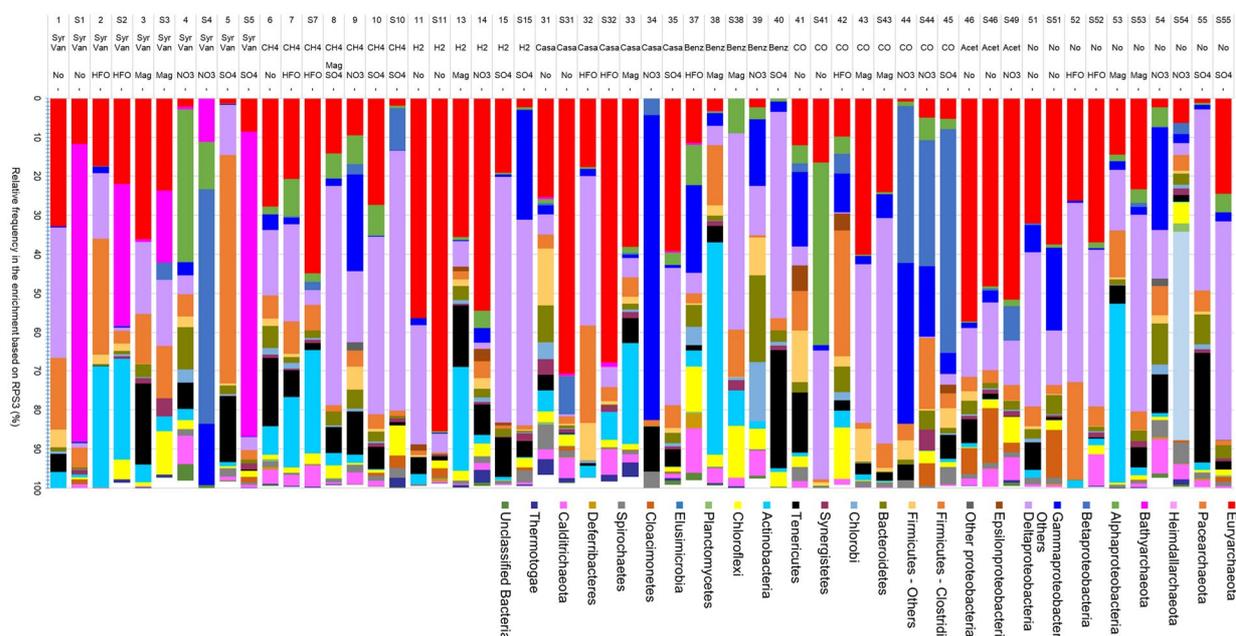


図 4. 井戸 6 に生息する地下圏微生物を播種源とした集積培養における微生物群集構造比較

ラベル最上段: 培養系番号、S は継代系、中段: 添加した栄養基質、下段: 添加した電子受容体

酢酸 (Acetate, Acet) 地下水のみ (No) の 8 個の培養系を作成した。また、地下圏で考え得る電子受容体として、固体鉄 (HFO) 磁鉄鉱 (Magnetite, Mag) 硝酸 (NO3) 硫酸 (SO4) 添加無し (No) の 5 系統を準備し、合計で 40 個の培養系での集積試験を行い、(1) と同様にメタゲノムを用いた微生物群集構造解析を行った (図 4)。これらの集積培養系では、1 カ月おきに基質の減少やメタン生成、微生物数の計数を行い、3 カ月経過後には各サンプル、同条件の継代培養を行った (図 4 で S と記載)。

その結果、基質、電子受容体それぞれにおいて、添加した化合物に関連した代謝を行う微生物の集積が見られた。電子受容体においては、硫酸を添加したのものには硫酸還元反応を行う Deltaproteobacteria の増殖が見られ、硝酸を添加したのものには硝酸還元反応を行う Gammaproteobacteria の増殖が見られた。共に固体状の鉄である HFO と磁鉄鉱の添加系では、Actinobacteria の増殖が確認された。一方で、基質に着目すると、メタン生成古細菌の直接の栄養基質である水素や酢酸を添加した系で、ユーリアーキオータ門のメタン生成古細菌が多く増殖することが分かった。本研究での重要なターゲット物質である芳香族メトキシ化合物を添加した系では、集積 2 代目において未培養系統群である Bathyarchaeota 門古細菌が集積することが分かった。これより、地下圏におけるリグニン様化合物の分解を伴うメタン生成反応において、Bathyarchaeota 門古細菌が重要な機能を果たしていることが強く示唆された。

### (3) Bathyarchaeota 門古細菌の分離培養

芳香族メトキシ化合物 (シリング酸 + バニリン酸) を用いた培養系で集積された未培養の Bathyarchaeota 門古細菌の分離培養および機能特性解析を行うため、さらなる継代培養を行った (図 5)。その結果、4 代目の継代においても、硝酸を電子受容体として使用した培養系を除き、Bathyarchaeota 門微生物が保持される事が示された。相対的な Bathyarchaeota 門古細菌の頻度は電子受容体を何も加えない系 (No) が一番多かったが (50-70%)、増殖は非常に遅く、メトキシ化合物の分解および細胞数が定常期になるまでに半年以上を要した。逆に磁鉄鉱を入れた培養系 (Mag) では、Bathyarchaeota の存在比は少ないものの (10-30%)、一か月の培養期間で 2mM のバニリン酸と 0.5mM のシリング酸の減少が見られ、二か月の培養期間で残った 1.5mM のシリング酸の減少が見られた。これより、磁鉄鉱には明確な芳香族メトキシ化合物の分解促進効果があることが分かった。微生物群集構造としては、硫酸還元条件が安定しており、硫酸還元菌である *Desulfomicrobium* と芳香族メトキシ化合物分解菌である Bathyarchaeota、メタン生成古細菌である *Mathanocalculus* の 3 者培養系が構築されていた。

これらの培養系から、3 種の Bathyarchaeota 門古細菌の Metagenome-assembled genome (MAG) が作成され、そのうちの二種は Bathy-8 グループ、一種は Bathy-6 グループに属した。Bathy-8 に属する古細菌はリグニンをを用いた集積培養系で良く集積されていることが知られており、本研究では Bathy-8 に属する古細菌 (SV1 株) の環状ゲノムの構築に成功した。今後は、この古細菌の集積培養系での役割と、芳香族メトキシ化合物の分解機序を明らかにするため、集積系の全群集 mRNAseq (メタトランスクリプトミクス解析) を行う予定である。

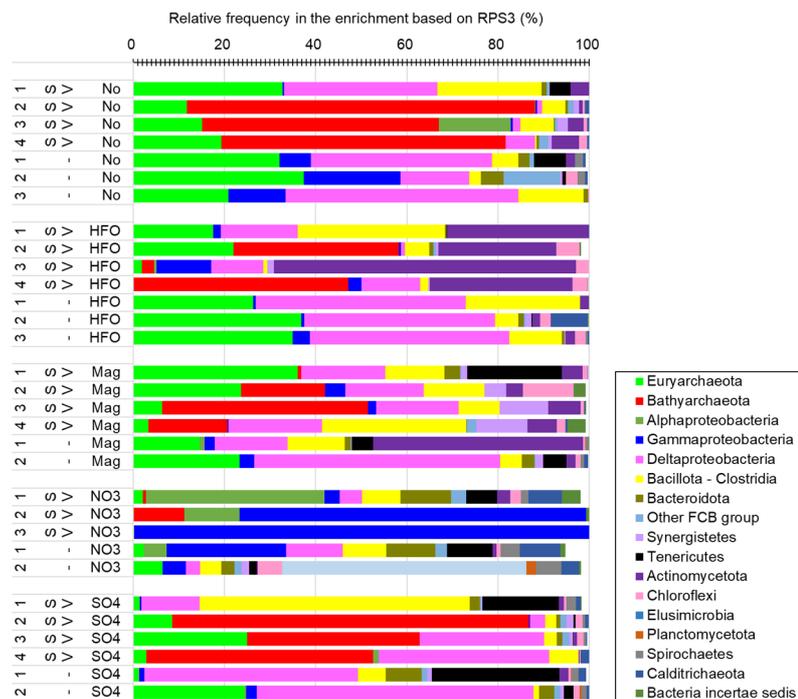


図 5. シリング酸・バニリン酸を用いた集積培養系の継代培養  
ラベル左: 継代数、中: 基質 (SV) 添加の有無、右: 電子受容体

本研究を通して、南関東ガス田の地下圏において働いている微生物群集の機能の一端を理解することができた。南関東ガス田は、可採埋蔵量が 3,685 億 m<sup>3</sup> にも達する国内最大の水溶性天然ガス田であり、わが国の重要な資源の生産地である。また、埋蔵量としては 1 兆 m<sup>3</sup> を超えると言われる南海トラフ海底下のメタンハイドレートを胚胎する層準とも地質学的に類似しており、その「微生物起源のメタン」の成因を明らかにすることはわが国の資源的観点から見ても、非常に重要である。本研究は、南関東ガス田を対象としたケーススタディーであるが、本研究で得られた知見、用いられた解析技術は、今後、世界中の各種天然ガスサイトにおける、メタン生成の成因解明の基盤となるであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Shino, Ishii Shun'ichi, Chadwick Grayson L., Tanaka Yugo, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya, Inagaki Fumio, Albertsen Mads, Nielsen Per H., Nealson Kenneth H.	4. 巻 15
2. 論文標題 A non-methanogenic archaeon within the order Methanocellales	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-48185-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石井俊一
2. 発表標題 地下圏に生息する電気メタン合成菌を使用したCO <sub>2</sub> と電気からのメタン生成
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井俊一
2. 発表標題 固体から電子を抜き取る電気合成微生物群集を用いた電気メタン生成
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会 自由集会1：電気合成微生物の生理・生態と産業利用の可能性（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun'ichi Ishii
2. 発表標題 Methane production from CO <sub>2</sub> and electricity using subsurface electro-methanogenic microbes
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (ICMaSS2021)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井俊一
2. 発表標題 地下圏における電気微生物の探索とCarbon Capture and Utilization (CCU)への応用展開
3. 学会等名 極限環境生物学会 第24回シンポジウム 電気微生物フェス2023 in 北海道 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井 俊一, 星野 辰彦, 鈴木 志野, 清川 昌一
2. 発表標題 薩摩硫黄島の鉄リッチなチムニーに生息する電気微生物の網羅的解析
3. 学会等名 微生物生態学会第36回大会 シンポジウム 微生物電気化学が切り拓く未来 ~電気微生物の探索・創成・応用~ (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 BIOREACTOR AND CARBON DIOXIDE RECYCLING SYSTEM	発明者 石井俊一、稲垣史生、井町寛之、河野憲二郎、村井大助	権利者 海洋研究開発機構、関東天然瓦斯開発株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、W02023/033037	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 志野  (Suzuki Shino)  (10557002)	国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所・准教授   (82645)	

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
---------	---------