

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：27101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K05404
研究課題名(和文)化石バイオマスを活用した高効率バイオメタン生産

研究課題名(英文)Methane production from fossil biomass

研究代表者

柳川 勝紀 (Yanagawa, Katsunori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：50599678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：石炭などの化石バイオマスに内包されているメタンを主成分とするガスの生成に関与する微生物の特定と応用研究の展開を目的として、微生物生態学と地球化学を駆使した学際研究を進めた。石炭の国内大規模産地である北部九州の複数地点で取得した亜歴青炭および泥炭には大量の微生物が存在していた。それら試料中の微生物多様性は高く、メタン生成への関与が期待される未培養のアーキアも含まれていた。メタネーションのポテンシャル評価では、微生物代謝はpHに依存することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

石炭中に大量に内包されているメタンを主成分とするガスは、コールベッドメタンと呼ばれる。コールベッドメタンは、非在来型エネルギー資源に位置づけられ新たな天然ガス資源として世界中での注目度も高い。本研究により、物理化学条件を適切に制御したバイオリクターを設計することで、コールベッドメタン生産の持続的運用に繋がる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Coalbed methane is abundant in coal seams. This study aims to elucidate the unknown biogeochemical cycle of methane in fossil biomass and to develop applied research for future sustainable methane production through an interdisciplinary approach of microbial ecology and geochemistry. Numerous microorganisms were found in subbituminous coal and peat samples collected from several sites in northern Kyushu. These samples showed that the microbial diversity was relatively high and included an uncultivated archaeal lineage, which is likely involved in situ methane production. Evaluation of the methanation potential showed that the microbial metabolism depended on the in vitro pH condition.

研究分野：地球微生物学

キーワード：コールベッドメタン メタン生成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

石炭中に大量に内包されているメタンを主成分とするガスは、コールベッドメタンと呼ばれる。コールベッドメタンは、非在来型エネルギー資源に位置づけられ新たな天然ガス資源としての注目度も高い。アメリカ、ロシア、中国、オーストラリアといった海外では実際に採掘が行われ、その商業的利用・開発が進み、一部は国内にも輸入されている。コールベッドメタンには様々な利点があり、(1)もガスとして回収できるため石炭の採掘より安価、(2) NO_x や SO_x の排出が他の化石燃料に比べ少なく環境負荷が少ない、(3) エネルギーの地産地消の観点に沿う、などといった特長がある。国内でも北海道石狩炭田が分布する夕張市においてコールベッドメタンの試掘が行われ、商業的な開発に向けて検討が始まっている。

コールベッドメタンの起源は、メタンの炭素・水素安定同位体など地球化学分析結果から、非生物的な成因のみならずメタン生成アーキアが作り出した生物起源の可能性も指摘されている。諸外国ではコールベッドメタン生産井での微生物生態系調査も実施されており、Methansarcinales など多様なメタン菌が瀝青炭や亜歴青炭から報告されている。また、石炭層中の微生物を活発化させるために、有機物や栄養塩を添加してメタン生成速度を増加させる biostimulation に関する取り組みも始まっている。国内では夕張地域で行われた科学研究があり、炭層地下水のアーキアの 9 割がメタン生成アーキアであるという注目すべき結果が提示されている。また、石炭の主成分であるメトキシ芳香族化合物をメタンに変換する能力を有するメタン生成アーキア *Methermicoccus shengliensis* も発見されている。しかしながら、そのメタン菌は石油貯留層から分離された微生物であり、石炭層で実際にメトキシ芳香族化合物からメタンが生成されているかは不明である。コールベッドメタンの現場生産における微生物の寄与に関する研究は十分とはいえない状況下にある。

2. 研究の目的

本研究は、化石バイオマスを材料に微生物反応によるメタネーションを実施し、資源として新たに活用するための要素技術を検討するものである。特に石炭を利用したバイオメタネーションは、その採算性や現場環境の制御が困難といった多くの課題があり、まだ初期段階と言える。そこで、本研究はメタン生成アーキアが優占する石炭試料の同定とそれを決定付ける環境因子の特定から着手した。北海道を除けば石炭の国内大規模産地である北部九州に焦点を当て、未知のメタン生成-消費サイクルの解明を試みた。事前調査では酸素に比較的触れやすいと考えられる石炭露頭にも絶対嫌気性のメタン生成アーキアが検出される試料を見つけており、それらの内部はメタン生成のホットスポットになっている可能性が期待される。試料の選定後は、メタン生成アーキアの生理学的性質、特にメタン生成基質とその反応速度の好適条件を決定した上で、微生物のポテンシャルを最大限に生かすリアクターの立案に繋げる。本研究により、微生物生態学と地球化学の知識と思考法を組み合わせ、さらに生物工学技術を駆使したメタン発酵リアクターを用いることで、地下に眠る未利用化石バイオマスの有効利用の可能性や、採掘の難しい深部の石炭層や低品位炭もガス資源として回収させる微生物変換技術の開発に繋げることを目指した。

3. 研究の方法

試料採取 北部九州には国内有数の大規模な炭鉱が複数存在する。その中からコールベッドメタンの生産ポテンシャルが高い研究調査地を選定するために、九州の代表的な炭田のうち自然露頭や露天掘り跡が残るなど調査の比較的容易な候補地を複数選定し、実地調査を行い、実際に瀝青炭や亜歴青炭を採取した。また、品位のより低いものとして、大分県竹田市の坊ガツル湿原から泥炭も採取した。それらは、メタン生成アーキアの分布プロファイルが分かるように鉛直方向など複数箇所でのサブサンプリングを実施し、適宜保管をした。

化学成分分析 石炭化度（褐炭、亜歴青炭、瀝青炭、無煙炭に関する分類）、品位、およびその根源物質の特定のために、石炭試料の元素分析と炭素安定同位体比分析を必死した。また、一部の試料では地下に分布する石炭層の物理・化学環境の推定のための、地下水の水質、ガス分析も実施した。

微生物群集構造解析 生息する微生物の群集組成を決定するために、各試料を粉末状に粉碎し、原核生物由来 16S rRNA 遺伝子を抽出・PCR 増幅し、次世代シーケンスによるアンプリコン解析を実施した。また、メタン生成反応の鍵酵素遺伝子である *mcrA* を対象とした分子生態学的解析も実施した。そして、メタン生成アーキアの相対的割合、分子系統、メタン生成基質を考察した。また、メタン生成アーキアとともに検出される特定微生物系統群の分布も調査した。

微生物数の定量 試料中の全微生物数は、蛍光顕微鏡下でのイメージング解析を採用することで、試料 1cm³ もしくは 1g あたりの微生物細胞数を求めた。また、試料から原核生物 DNA を抽出

し、特異的プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を対象としたリアルタイム定量 PCR 解析も実施した。また、*mcrA* についても同様の解析を実施し、メタン生成アーキアの存在量と環境条件との対応関係について探った。

メタン生成活性 メタン生成アーキアの優占が見られた試料を用いて、石炭もしくは泥炭がメタンに変換する反応速度を決定するために、ガスクロマトグラフを用いて経時的にガス分析を実施した。この分析は中和処理の有無と反応速度の関係性に着目した。

4. 研究成果

試料の選定は、かつて炭田が存在した北部九州を調査対象とした。御館山炭鉱、日炭高松炭鉱、貝島炭鉱、三井三池炭鉱が存在していた福岡県直方市、水巻町、宮若市、大牟田市で自然露頭の調査を実施し、石炭試料を採取することができた(図1)。また、いくつかの試料では周辺地下水の水質分析とガス分析も並行して実施した。採取した石炭試料は粉末状にし、有機元素分析に供した。試料中の炭素、窒素、水素、硫黄の含量から試料の多くは亜歴青炭で一部は瀝青炭に分類される石炭化度であることが示された。また、それらの炭素安定同位体比は-24.2~-26.2‰の範囲内にあり、針葉植物などの C3 植物が起源であることが推測された。これらの結果は、露頭試料がその地域を代表したかつての炭鉱由来の石炭と同様のものであることを示唆していた。石炭試料中の微生物バイオマスは直接計数法で観察・定量化した。ホルマリン固定した石炭粉末の微生物を孔径 0.2 μm のポリカーボネートメンブレン上に捕集し、脱着しないよう低融点アガロースで保護した後に、核酸染色試薬 SYBR Green I で微生物核酸を染色し、落射蛍光顕微鏡で計数をした。その結果、石炭 1g 当たり数千万もの微生物細胞が存在することが示された(図2と図3)。また、粉末石炭試料から DNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR で 16S rRNA 遺伝子の定量も実施した。石炭 1g あたり約 10⁷ genes もの遺伝子が検出され、顕微鏡係数法で得られた定量結果を支持していた。また、試料のうち一部では、原核生物由来 16S rRNA 遺伝子のうちアーキアの相対的割合が高かった(図3)。



図 1. 宮若市に存在する石炭自然露頭

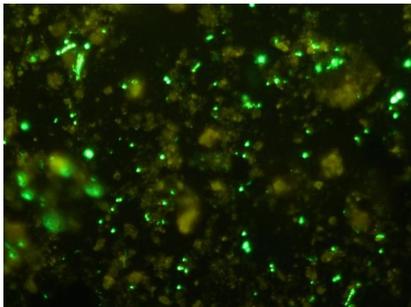


図 2. 石炭試料中の微生物観察

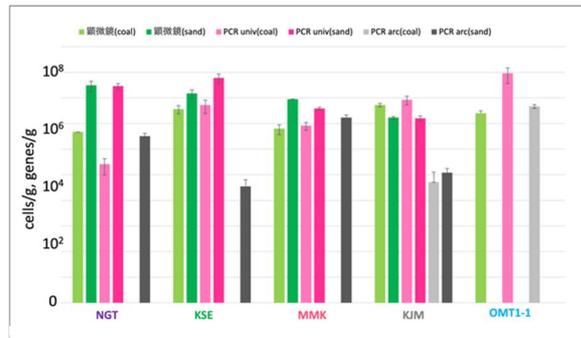


図 3. 石炭試料中の微生物定量

試料中の微生物群集組成は、16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンサーによるアンプリコン解析で決定した。また、methyl-coenzyme M reductase サブユニットをコードする遺伝子 (*mcrA*) の PCR 増幅も行い、クローニング法で phylotype 組成解析を実施し、石炭中に生息している微生物群集の組成、機能、分子系統を確認した。それらの結果、大牟田市で取得した試料では、メタン生成アーキアである *Methanomassiliicoccus* が全群集の 10% を占めるほど優占していた(図4)。また、嫌氣的メタン酸化アーキアに近縁な配列も検出された。いずれも石炭から検出された報告例は少なく、石炭中の未知のメタン生成と消費という未知の循環やメタンに依存的な生態系の構築が期待された。今後その活性や反応基質についての更なる解析が望まれる。一方、大牟田市のものを除くと、メタン生成能を有するアーキアは全く検出されなかった。これらの試料では、石炭中の多環芳香族化合物を分解する能力を有する Actinobacteria や酢酸生成菌である Acetobacteraceae の存在が確認された。これらは、亜歴青炭などの成熟度の低い石炭の分解に関わる微生物相の特徴かもしれない。また、より低品位の石炭として泥炭試料中の微生物分析も実施した。大分県竹田市に位置する坊ガツル湿原より採取した泥炭土壌を、石炭試料と同様に、16S rRNA 遺伝子や *mcrA* 遺伝子を対象とした微生物相解析を実施した。その結果、Actinobacteria や Acetobacteraceae の存在が確認された。またメタン生成アーキアとして Methanomicrobiales, Methanosarcinales,

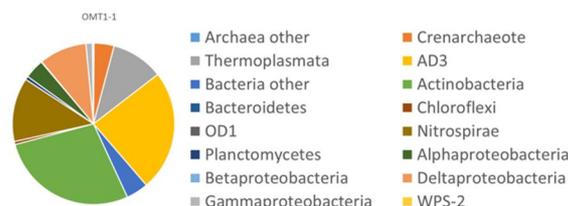


図 4. 三池炭鉱近傍の石炭露頭試料中の微生物群集構造

Methanobacteriales, Methanomassiliicoccales に近縁な配列も取得され、泥炭環境でのメタン生産の可能性が示された。さらに、嫌気環境に広く分布し、多様な代謝能力を有する未培養アーキア "Candidatus Bathyarchaeia" も検出された。さらに、このグループを対象とした定量 PCR を実施したところ、メタン生成アーキア群集のバイオマスに匹敵するかそれ以上であることが分かり、多いものではアーキア群集の 9 割以上を占めるといった結果であった。さらに、この泥炭試料でショットガンメタゲノム解析を実施し、Bathyarchaeia 由来 *mcrA* に類似性の高い部分配列をすることもできている。これらの結果は泥炭環境でのメタン生成に Bathyarchaeia が寄与する可能性を提示していた。

分析した石炭試料の一部にはメタン生成アーキアの分布が確認されたが、必ずしも優占する系統ではなかった。成熟度の低い石炭では有機酸が含まれ酸性環境が形成されている可能性があり、それがメタン生成アーキアの分布を規定している可能性がある。実際に分析試料の pH を測定したところ、石炭は pH3.7~4.3 であった。なお泥炭は 6.4 と比較的高かった。泥炭ではメタン生成アーキアが検出されているため、この仮説を支持する結果であった。さらに、アルカリ処理による中和を施した石炭試料のメタン生成基質としてのポテンシャル評価を実施した(図 5)。未処理および処理済みの石炭もしくは泥炭試料を 35 °C の嫌気的条件下で 29 日間の培養で発生したメタン量を測定した。中和処理を施した泥炭のメタンガスの生産効率率は 29.4 mL/g と未処理のものに比べ有意に高かった。

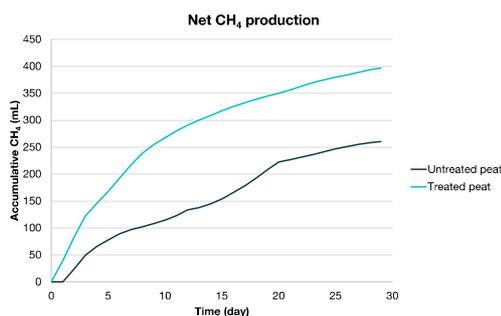


図 5. 中和処理後のメタン生成ポテンシャル

本研究は、北部九州の炭田におけるコールベッドメタンの生成に微生物が関わっている証拠とその寄与について微生物生態学と生物地球化学の観点からの検証を進め、微生物を活用したメタン生成反応を活性化し、コールベッドメタンの持続的開発に繋げていく可能性について検討した。コールベッドメタンを微生物活動で増産させるためには、石炭の熟成度に関連した pH が大きな因子である可能性を本研究は示していた。中性環境を構築することで、石炭という難分解性バイオマスに微生物がアクセスしやすい状態を形成させ、地下に埋没している大量の石炭の有効利用に繋がる可能性がある。今後、石炭試料内部の微生物の局在や多環芳香族化合物分解バクテリアの割合、メタン生成アーキアの増殖を左右する物理・化学条件などの他の制御因子も考慮したりアクターの設計ができれば、エネルギー資源に乏しい我が国にとっては大きな活力となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yanagawa Katsunori, Haraguchi Akira, Yoshitake Kai, Asamatsu Katsuhiko, Harano Masanari, Yamashita Kei, Ishibashi Jun-ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Ubiquity of <i>Euglena mutabilis</i> Population in Three Ecologically Distinct Acidic Habitats in Southwestern Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 1570 ~ 1570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/w13111570	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 -
1. 著者名 Asamatsu Katsuhiko, Yoshitake Kai, Saito Makoto, Prasitwuttisak Wipoo, Ishibashi Jun-ichiro, Tsutsumi Akihi, Mustapha Nurul Asyifah, Maeda Toshinari, Yanagawa Katsunori	4. 巻 36
2. 論文標題 A Novel Archaeal Lineage in Boiling Hot Springs around Oyasukyo Gorge (Akita, Japan)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME21048	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 -
1. 著者名 Sun Meng, Liu Bing, Yanagawa Katsunori, Ha Nguyen Thi, Goel Rajeev, Terashima Mitsuharu, Yasui Hidenari	4. 巻 179
2. 論文標題 Effects of low pH conditions on decay of methanogenic biomass	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 115883 ~ 115883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2020.115883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Prasitwuttisak Wipoo, Hoshiko Yuki, Maeda Toshinari, Haraguchi Akira, Yanagawa Katsunori	4. 巻 37
2. 論文標題 Microbial Community Structures and Methanogenic Functions in Wetland Peat Soils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME22004	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 -

1. 著者名 Sun Meng, Yanagawa Katsunori, Prasitwuttisak Wipoo, Goel Rajeev, Watanabe Ryuichi, Harada Hidenori, Liu Bing, Terashima Mitsuharu, Yasui Hidenari	4. 巻 21
2. 論文標題 Kinetics for the Methanogen's Death in the Acidic Environments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2965/jwet.22-113	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 -

1. 著者名 Okumura T., Takashima C., Yanagawa K., Harijoko A., Kano A.	4. 巻 440
2. 論文標題 Stromatolite formation by Anaerolineae-dominated microbial communities in hot spring travertine in North Sumatra, Indonesia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sedimentary Geology	6. 最初と最後の頁 106263 ~ 106263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sedgeo.2022.106263	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

1. 著者名 Wipoo Prasitwuttisak, Shingo Araki, Katsunori Yanagawa	4. 巻 29
2. 論文標題 Methanogenic archaeal community structure in estuary sediments of the Onga River, northern Kyushu Island, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laguna	6. 最初と最後の頁 133-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 PRASITWUTTISAK, W., YASUI, H., YANAGAWA K.
2. 発表標題 Characterization of microbial community responsible for the methane cycling in peat ecosystem in Bogatsuru Wetland, Oita Prefecture, Japan
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wipoo Prasitwuttisak, Shingo Kato, Katsunori Yanagawa
2. 発表標題 Members of the microbial dark matter Bathyarchaeia in the wetland ecosystem and their genetic potentials to generate methane
3. 学会等名 日本Archaea研究会
4. 発表年 2022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
研究分担者	前田 憲成 (Maeda Toshinari) (00470592)	九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授 (17104)	
研究分担者	原口 昭 (Haraguchi Akira) (50271630)	北九州市立大学・国際環境工学部・教授 (27101)	

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