

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04670

研究課題名(和文) 枯渇油田の再生化のための油層微生物による原油分解メタン生成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of methanogenic crude oil degradation by reservoir microorganisms for the rejuvenation of depleted oil fields

研究代表者

坂田 将 (Sakata, Susumu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・招聘研究員

研究者番号：70357101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：すでに国内油田の油層水から獲得しているトルエン分解メタン生成微生物コミュニティのメタボライト分析、メタゲノム解析、及びメタトランスクリプトーム解析を行った結果、優占するペプトコッカス科細菌、アトリバクテロータ門細菌、水素利用性メタン生成菌メタノサーモバクター、及び酢酸利用性メタン生成菌メタノサエタが、ベンジルコハク酸、ベンゾイルCoAを経由する反応経路でトルエンをメタンに変換していることが推定された。新たに獲得した長鎖アルカン分解メタン生成微生物コミュニティについて同様の解析を行った結果、優占する未培養古細菌メタノリパラムが単独でアルカンを分解しメタンに変換している可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、国内油田に棲息する古細菌が単独でアルカンを分解しメタンに変換している可能性を発見したことである。これはメタン生成菌が水素・二酸化炭素や酢酸、メチル、メトキシ化合物などの限られた化合物しか利用できないというこれまでの常識を覆す発見である。また油層に残存する原油のメタン変換・エネルギー回収という観点では、もしこの微生物が油層環境において効率よく原油をメタンに変換できるとしたら、継続的に原油をメタンに変換し回収するための微生物のモニタリングやメンテナンスが飛躍的に容易となる。よって本研究の成果は枯渇油田の天然ガス再生技術の実用化にも大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Application of metabolomics, metagenomics, and metatranscriptomics to the toluene-degrading methanogenic microbial community, which has already been acquired from the oil reservoir water of a domestic oil field, suggested that dominant Peptococcaceae bacterium, Atribacterota bacterium, hydrogenotrophic methanogen Methanothermobacter, and acetoclastic methanogen Methanoseta convert toluene to methane through a pathway involving benzy succinic acid and benzoyl CoA. Similar analysis of a newly acquired long-chain alkane-degrading methanogenic microbial community revealed the possibility that the dominant uncultured archaea Methanoliparum alone degrades alkanes and converts them to methane.

研究分野：生物地球化学

キーワード：油層微生物 原油分解 メタン生成 トルエン アルカン メタボローム メタゲノム メタトランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ガス田・油田・炭田などの地下環境に賦存するメタン(すなわち天然ガス)の埋蔵量は膨大であり、世界の総エネルギー需要の約24%を担っている(経済産業省統計)。原子力発電所の事故を契機に化石燃料資源の重要性が再認識される中、石油・石炭に比べて地球環境への負荷が小さい天然ガスへの期待は大きい。実際に、シェールガス、タイトサンドガス、コールベッドメタン、メタンハイドレートなどの非在来型天然ガス資源の探鉱・開発が進められている。一方、枯渇油田に大量に(初期埋蔵量の50%以上)残留する原油を油層微生物の機能でメタンに変換し回収する枯渇油田の再生化を目指す研究にも世界的に高い関心が集まっている。油層環境において微生物が原油を分解してメタンを生成するプロセスの存在は、古くから原油と天然ガスの組成・安定同位体データに基づいて予見されていた(Ekzerceev, *Geokhimiya*, 1960 他)。2010年代になりようやく、油層に存在する微生物コミュニティが実験室で培養されるようになり原油分解メタン生成反応を観察できるようになったが(Berdugo-Clavijo & Gieg, *Front. Microbiol.*, 2014 他)、機能未知の未培養微生物がその多くを占めており、原油分解メカニズム(反応経路と介在微生物)の解明が当該関連分野のホットトピックである。

(2) われわれはこれまで、油層環境を模擬する条件(嫌気、温度55℃、圧力5MPa、砂充填による微小孔隙環境)で、原油が生分解を受けている山形県の油田(以後、山形油田と略記)から採取した油層水と原油(アルカンの残量が少ない)を無機塩培地とともに培養することによって、原油の炭化水素成分であるトルエンをメタンに変換する微生物コミュニティを獲得した。また山形油田の油層水を、生分解を受けていない秋田県の油田(以後、秋田油田と略記)の原油、無機塩培地、酵母エキスとともに培養することによって、原油の主成分である直鎖アルカンをメタンに変換する微生物コミュニティを獲得・維持することに成功した。さらにこのアルカン分解微生物コミュニティを無機塩培地・酵母エキスとともに、秋田油田の油層水と原油に添加し、油層環境を模擬する条件で培養しても、その微生物コミュニティが生育可能であり、アルカン分解メタン生成過程が進行することを明らかにした。これは、もともと原油を分解する微生物がいない秋田油田の油層に山形油田由来の原油分解ポテンシャルが高い微生物コミュニティを注入し、バイオオーグメンテーションを行うことによって、生分解を受けていない未回収原油を油層内でメタンに変換し、既存生産設備で天然ガスとして回収できる可能性を示している。

(3) バイオオーグメンテーションによる天然ガス再生化技術を実油田に適用する場合、既存の坑井を使用し、高活性の原油分解メタン生成微生物コミュニティを油層内に注入するとともに、微生物の生育を促進し分解活性を高めるための栄養剤(無機塩や酵母エキス)も注入する。残留原油のメタン変換が進行し油層のガス圧が上昇した後、既存の坑井から天然ガスを回収する。このプロセスを適切に制御するためには、原油分解反応の特徴的な代謝産物や介在微生物のマーカー遺伝子をモニタリングし、油層内での反応の進行並びに微生物の増殖状況を詳細に追跡することが必要となる。換言すれば、原油分解メタン生成メカニズムを理解することが枯渇油田の再生化技術を開発するための大前提となる。一般に、嫌気微生物が原料有機物からメタンを生成するプロセスは、複数種の微生物とメタン生成菌が共役して進む多段階の生物反応である。すなわち、発酵菌が最初に原料有機物からカルボン酸などの代謝中間体を生成し、共生菌がそれをさらに分解して水素+二酸化炭素、酢酸、メチル化合物などをメタン生成菌に供給し、最後にメタン生成菌がこれらをメタンに変換する。しかしながら、これまでわれわれが山形県の油田から獲得したトルエン微生物コミュニティの中での原油分解に貢献する主要なプレイヤーや代謝経路については未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、枯渇油田の石油貯留層において嫌気微生物が原油を分解しメタンを生成する機能を最大限に活用して残留原油を天然ガス=新たなエネルギー資源として再生・回収するための革新的な基盤技術の創成を志向するものである。特に本研究では、われわれが長年培ってきた絶対嫌気高圧培養法・分子生態学的微生物機能解析法・地球化学的代謝産物同定法を駆使し、すでに国内油層から獲得している高活性の原油分解微生物コミュニティが原油中の炭化水素成分をメタンに変換するプロセスの全容(反応経路と介在微生物)を解明するとともに、その機能を賦活化する条件とメカニズムを明らかにし、メタン変換効率を最大化する技術を開発することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、すでに山形油田の油層水から獲得したトルエン分解メタン生成微生物コミュニティ、アルカン分解メタン生成微生物コミュニティを対象として、反応経路と介在微生物の全容を解明するため、以下の分子生態学的・地球化学的解析技術を適用した。

(1) 原油分解メタン生成反応経路の地球化学的解析(¹³C-メタボローム解析)

安定炭素同位体(¹³C)化合物を用いた同位体トレーサー法を適用する。すでに山形油田から獲

得しているトルエン分解メタン生成微生物コミュニティ、アルカン分解メタン生成微生物コミュニティの培養液を無機塩培地に添加し、原油を炭素源として油層環境を模擬する温度・圧力条件下で継代培養を行う。その際、 ^{13}C でラベル化されたトルエンやアルカンを原油に添加し、培養過程で生成する ^{13}C 化合物(メタンを含む各種代謝産物)をガスクロマトグラフ燃焼同位体比質量分析計(GC-C-IRMS)とガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)で検出・同定することで、添加した ^{13}C 化合物からメタンへと至る反応経路を明らかにする。

(2) 分子生態学的解析技術による原油分解メタン生成微生物コミュニティの代謝機能の推定

最新の網羅的遺伝子解析技術に基づく分子生態学的手法により、山形油田の油層から獲得したトルエン分解微生物コミュニティ、アルカン分解微生物コミュニティを構成する微生物の群集構造を明らかにするとともに、主要微生物の代謝機能を推定する。具体的には、同微生物コミュニティの全 DNA を対象としたメタゲノム解析を行い、構成する微生物種、個々の代謝機能、共生システムを推定する。次に、全 RNA を対象としたメタトランスクリプトーム解析によって、原油分解メタン生成反応として実際に機能している代謝経路を特定する。

4. 研究成果

(1) トルエン分解微生物コミュニティの ^{13}C -メタボローム解析

山形油田から獲得しているトルエン分解メタン生成微生物コミュニティを、油層環境を模擬する条件(55 °C、5MPa、微小孔隙)で、原油、無機塩培地とともに培養した結果、予め ^{13}C -トルエンを原油に添加した系においてメタンと DIC(溶解無機炭素)の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比が顕著に高い(^{13}C に富む)傾向が見出され、コントロール(原油にノンラベルのトルエンを添加した系)と明瞭に区別された。このことからトルエンがメタンと二酸化炭素に変換されていることが実証された。この培養系の脂質成分の化合物ごとの炭素同位体比を測定した結果、ベンジルコハク酸と安息香酸が顕著に高い $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を有しており、これらのマススペクトルから、 ^{13}C -トルエンに由来するフラグメントも検出された。この結果から、トルエンの分解過程でこれらの脂質成分が中間代謝産物であることが明らかとなり、トルエンのフマル酸付加によるベンジルコハク酸の生成、ベンジルコハク酸の酸化による安息香酸の生成、及び安息香酸の分解によるメタンと二酸化炭素の生成という反応経路が推定された(図1)。

(2) トルエン分解微生物コミュニティのメタゲノム解析

山形油田の油層水から集積したトルエン分解メタン生成微生物コミュニティの全 DNA を対象としたメタゲノム解析を行った。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシングにより、この微生物コミュニティは水素利用性メタン生成菌メタノサーモバクター、酢酸利用性メタン生成菌メタノサエタ、ペプトコッカス科細菌(以下、P 細菌と略記)、およびアトリバクテロータ門細菌(以下、A 細菌と略記)が優占していることが判明し、これらがメタン生成性トルエン分解プロセスを主導していることが示唆された(図1)。

われわれはさらに、P 細菌と A 細菌について高品質なメタゲノムアッセムブリゲノム(metagenome-assembled genomes、以下 MAG と略記)を回収し、機能遺伝子の解析に基づいて潜在する代謝系を推定した。P 細菌の MAG は、トルエン代謝の初期段階であるベンジルコハク酸合成酵素やベンゾイル CoA 経路に関与する一連の酵素をコードする遺伝子を保有していた。また、A 細菌の MAG もベンジルコハク酸合成酵素の遺伝子を保有していたが、ベンジルコハク酸より下流の代謝に関与する酵素の遺伝子が見出されなかった。その一方で、A 細菌の MAG にはアミノ酸の代謝に関与する様々な酵素の遺伝子が含まれており、P 細菌の MAG との相違が認められた。

(3) トルエン分解微生物コミュニティのメタトランスクリプトーム解析

全 RNA を対象とするメタトランスクリプトーム解析により、P 細菌の MAG はトルエン代謝の初期段階であるベンジルコハク酸合成酵素やベンゾイル CoA 経路に関与する一連の遺伝子を高発現していることが明らかとなった。この結果は、ベンジルコハク酸と安息香酸が中間代謝産物として検出された(1)の ^{13}C -メタボローム解析の結果とも整合的であり、トルエンがメタンと二酸化炭素に変換される代謝経路が、トルエンのフマル酸付加によるベンジルコハク酸の生成 => ベンジルコハク酸の酸化によるベンゾイル CoA の生成 => ベンゾイル CoA の分解によるメタンと二酸化炭素の生成、という一連の反応であることが推定された(図1)。また、細菌 A の MAG もベンジルコハク酸合成酵素をコードする遺伝子を高発現しており、これらのバクテリアがトルエン分解に主要な役割を果たしていることが示された。しかしながら細菌 A の MAG はベンジルコハク酸より下流の代謝に関与する既知の酵素の遺伝子を欠いており、この微生物がトルエンを分解するための未確認の経路を持っている可能性も示唆された。

(4) アルカン分解微生物コミュニティの解析

山形油田から獲得しているアルカン分解メタン生成微生物コミュニティを、油層環境を模擬する条件(55 °C、5MPa、微小孔隙環境)で原油、無機塩培地、酵母エキスとともに培養した結果、予め ^{13}C -テトラコサンを原油に添加した系においてメタンと DIC の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比が顕著に高い傾向が見出され、コントロール(原油にノンラベルのテトラコサンを添加した系)と明瞭に区別

された。このことから直鎖アルカンがメタンと二酸化炭素に変換されていることが実証された。

このアルカン分解メタン生成微生物コミュニティを新たに無機塩培地に接種し、原油を基質とする常圧培養（55℃、微小孔隙環境）を数代に渡って繰り返した結果、極めて高いメタン生成活性を有する微生物コミュニティが得られ、メタン生成に伴う長鎖アルカン（炭素数 14 以上）の減少が観察された。アルカンをトレーサーとして添加するメタボライト分析、およびメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析の結果、本微生物集積系は未培養古細菌メタノリパラムが優占しており、この古細菌が単独でアルカンを分解しメタンに変換している可能性が見出された。この発見はメタン生成菌が水素・二酸化炭素や酢酸、メチル、メトキシ化合物などの限られた化合物しか利用できないというこれまでの常識を覆すものであり、生態学的意義のみならず地球上の堆積有機物の炭素循環を議論する上での生物地球化学的な意義も極めて高い。加えて油層に残存する原油のメタン変換・エネルギー回収という観点では、もしこの微生物が油層環境において効率よく原油をメタンに変換できるとしたら、残存する原油を継続的にメタンに変換し回収するための微生物のモニタリングやメンテナンスが飛躍的に容易となる。本研究の成果は枯渇油田の天然ガス再生技術の実用化にも大きく貢献するものと考えられる。

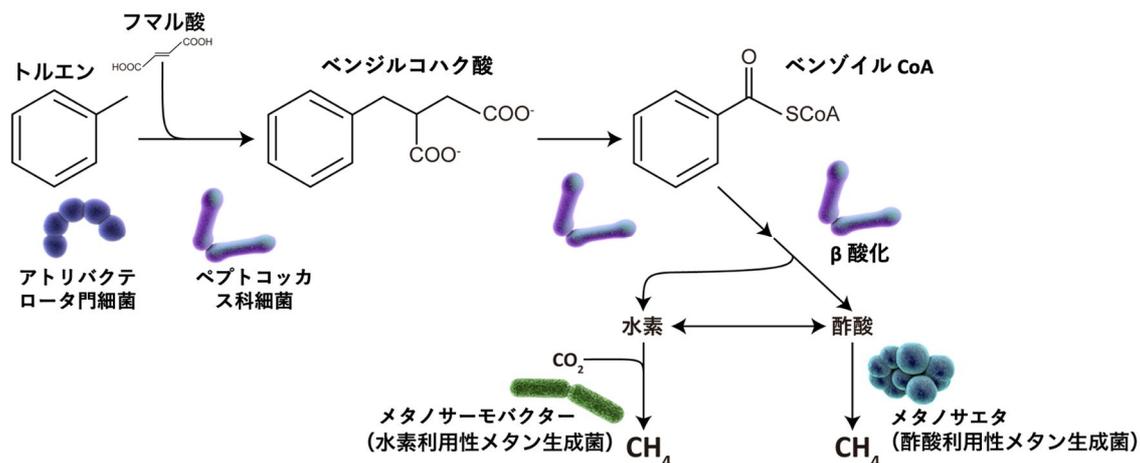


図 1 トルエン分解メタン生成反応に関する微生物と反応経路

< 引用文献 >

Ekzerceva VA (1960) Formation of methane by microorganisms in oil fields. *Geokhimiya* 1: 362–370 (in Russian).

Berdugo-Clavijo C, Gieg LM (2014) Conversion of crude oil to methane by a microbial consortium enriched from oil reservoir production waters. *Frontiers in Microbiology* 5: Article 197.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suda K., Ikarashi M., Tamaki H., Tamazawa S., Sakata S., Maeda H., Kamagata Y., Kaneko M., Ujiie T., Shinotsuka Y., Wakayama T., Iwama H., Mayumi D., Yonebayashi H.	4. 巻 201
2. 論文標題 Methanogenic crude oil degradation induced by an exogenous microbial community and nutrient injections.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Petroleum Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 108458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.petrol.2021.108458	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 -
1. 著者名 Kurth J.M., Nobu M.K., Tamaki H., de Jonge N., Berger S., Jetten M.S.M., Yamamoto K., Mayumi D., Sakata S., Bai L., Cheng L., Nielsen J.L., Kamagata Y., Wagner T., Welte C.U.	4. 巻 15
2. 論文標題 Methanogenic archaea use a bacteria-like methyltransferase system to demethoxylate aromatic compounds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 3549-3565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-021-01025-6	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 坂田 将	4. 巻 2021
2. 論文標題 地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明 - 地球科学と生命科学の融合で創成される革新的資源技術への道標	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Synthesiology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5571/synth.2021.3_1	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 Katayama T., Yoshioka H., Kaneko M., Amo M., Fujii T., Takahashi H.A., Yoshida S., Sakata S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Cultivation and biogeochemical analyses reveal insights into methanogenesis in deep seafloor sediment at a biogenic gas hydrate site.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 1464-1472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-021-01175-7	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 Katayama T, Ikawa R, Koshigai M, Sakata S	4. 巻 20
2. 論文標題 Microbial methane formation in deep aquifers associated with the sediment burial history at a coastal site	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biogeosciences	6. 最初と最後の頁 5199-5210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/bg-20-5199-2023	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 Sakata S, Tsunogai U, Oba M, Ujiie T, Tanahashi M	4. 巻 188
2. 論文標題 Archaeal lipid biomarkers in near-surface sediments at a giant colony of the bivalve Calyptogena: molecular records of a massive methane release event associated with methane hydrate dissociation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Organic Geochemistry	6. 最初と最後の頁 104739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.orggeochem.2024.104739	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9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hideyuki Tamaki
2. 発表標題 Cultivation Renaissance in the Post-Metagenomics Era: Combining the New and Old
3. 学会等名 NeLLi-Symposium on New Lineages of Life, DOE-JGI (Joint Genome Institute, Department of Energy, USA), Berkeley, CA, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞弓 大介、中原 望、風呂田 郷史、金子 雅紀、延 優、玉澤 聡、須田 好、前田 治男、鎌形 洋一、坂田 将、玉木 秀幸
2. 発表標題 原油を分解するメタン生成菌の発見
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉木秀幸
2. 発表標題 Cultivation Renaissance: 未知の微生物を"培養"して新たな生命機能を探る
3. 学会等名 第69日本放線菌学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉木秀幸
2. 発表標題 知の微生物を"培養"して新たな生物機能を探る-未利用微生物遺伝子資源開拓と利活用に向けて-
3. 学会等名 創立100周年記念第74回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中原望、延優、玉澤聡、原英里、眞弓大介、前田治男、坂田将、玉木秀幸、鎌
2. 発表標題 Actinobacteriota 門の新目の C1 代謝経路の理解と生態学的意義
3. 学会等名 2022年度日本水環境学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本幸子, Nobu Masaru Konishi, 眞弓大介, 玉澤聡, 中原望, 草田裕之、米林英治、岩間弘樹、五十嵐雅之、若山樹、前田治男、坂田将、田村具博、野村暢彦、鎌形洋一、玉木秀幸
2. 発表標題 地下根源有機物を巡るFirmicutes門新目細菌の生存戦略
3. 学会等名 日本微生物生態学会35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Mayumi
2. 発表標題 Methane production from crude oil by a single methanogen
3. 学会等名 JpGU 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawamoto H, Nobu MK, Kaneko M, Furota S, Asahina K, Tamazawa S, Suda S, Maeda H, Sakata S, Kamagata Y, Mayumi D, Tamaki H
2. 発表標題 Meta-omics analysis for a deep subsurface microbial community degrading toluene under methanogenic condition
3. 学会等名 9th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川本大輝, 延優, 金子雅紀, 風呂田郷史, 朝比奈健太, 玉澤聡, 須田好, 前田治男, 坂田将, 鎌形洋一, 眞弓大介, 玉木秀幸
2. 発表標題 深部地下油層環境から集積されたトルエン分解メタン生成微生物群集のメタオミクス解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会36回大会
4. 発表年 2023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	玉木 秀幸 (Tamaki Hideyuki) (00421842)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	眞弓 大介 (Mayumi Daisuke) (30549861)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員 (82626)	

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