

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：22654066

研究課題名（和文） メタンハイドレート成因解明をめざした生物学的メタン生成とハイドレート形成の再現

研究課題名（英文） Biological methane formation in deep subsurface environments

研究代表者

鎌形 洋一 (KAMAGATA YOICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究部門長

研究者番号：70356814

研究成果の概要（和文）：

本課題は、生物学的メタン生成を高圧下で起こす事が可能か否かを検証することによって、海洋ならびに陸地地下圏において今なお起きつつあると推定される生物学的メタンの成因解明をめざすものである。本研究ではまず生物学的メタン生成を高圧下で起こす事が可能か否かを検討した。本研究において、地下圏に広く存在する典型的な高温性メタン生成古細菌である *Methanothermobacter thermautotrophicus* の高圧培養を試みた。その結果温度 55° C, 圧力 5MPa, 10MPa, 15MPa の条件で生育しメタン生成を行うことを捉えた。また、地下圏に広く存在する酢酸を炭素源として酢酸酸化水素生成型微生物と水素資化性メタン生成古細菌の共生高圧培養を試みた。その結果、上述のメタン生成古細菌単独の培養と同様に、5MPa, 10MPa, 15MPa の条件で生育しメタン生成を行うことを明らかにした。メタン生成古細菌のみならず酢酸酸化共生微生物もこうした圧力に耐えられることから、深部地下圏において微生物間共生によってメタン生成が起こりうることを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Methane is known to be a storage gas in deep subsurface environments. Controversy over biological methanogenesis under subsurface environments still remains unsolved. We cultivated 1) *Methanothermobacter thermautotrophics* in pure culture using formate as substrate 2) *Thermacetogenium phaeum* and *Methanothermobacter thermautotrophics* in pure defined coculture under high pressure conditions. It was found that both pure culture and coculture were able to grow under high pressure conditions ranging from 5 to 15 MPa, strongly suggesting that methanogens and related organisms could be active contributing to methanogenesis in deep subsurface environments

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	900,000	0	900,000
23年度	800,000	240,000	1040,000
24年度	800,000	240,000	1040,000
総計	2500,000	480,000	2,980,000

研究分野：地球宇宙化学

科研費の分科・細目：地球宇宙化学

キーワード：メタン生成古細菌 深部地下圏 高圧培養 共生微生物 メタンハイドレート

### 1. 研究開始当初の背景

地下圏の高温高圧条件下でメタン生成が生物学的に行われるか否かについては純粹培養を用いた実験はほとんど行われていなかった。特に、メタン生成微生物とメタン生成微生物に基質である水素・二酸化炭素を供給する酢酸酸化水素発酵型発酵微生物との共培養系を高圧で試みた例は全く存在しなかった。

### 2. 研究の目的

本課題は、生物的メタン生成を高圧下で起こす事が可能か否か、さらには生物的メタン生成とメタンハイドレートを同一の高圧容器内で起こす事が可能か否か、を検証することによって、海洋ならびに陸地地下圏において今なお起きつつあると推定される生物学的メタン生成ならびにメタンハイドレート形成を実験室的に再現することを試み、メタンの成因解明をめざすものである。

### 3. 研究の方法

まず地下圏に広く存在する典型的な高温性水素資化性メタン生成古細菌 *Methano-*

*thermobacter thermotrophicus* の培養を試みた。前培養はバイアル瓶を用い Widdel らの無機塩培地ならびに水素・二酸化炭素を炭素源かつエネルギー源として約1週間培養を行った。また酢酸酸化水素生成型微生物 *Thermacetogenium phaeum* と高温性水素資化性メタン生成古細菌 *Methanothermobacter thermotrophicus* の共生培養の前培養を行った。図1は共生培養時の蛍光染色画像である。

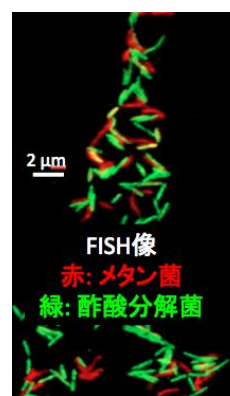


図1. 酢酸を用いた共生培養の蛍光顕微鏡による撮像

共生培養はバイアル瓶を用い 80 mM の酢酸をエネルギー源として用い窒素・二酸化炭素存

在下で約3週間培養を行い、酢酸の消費ならびにメタンの生成を確認した。本培養における高压培養は、高压培養容器を用い培養はシリンジポンプにより圧力容器内部の圧力を保持しながら上述した2系列の微生物の培養液ならびに基質を注入し、カラム状容器に高温ヒーターを装填して行った(図2)。



図2. 高压培養装置による高压培養系

解析は背圧制御弁を通して排出される溶液をセプタム法でシリンジにより抽出し、溶存ガスを測定した(図3)。

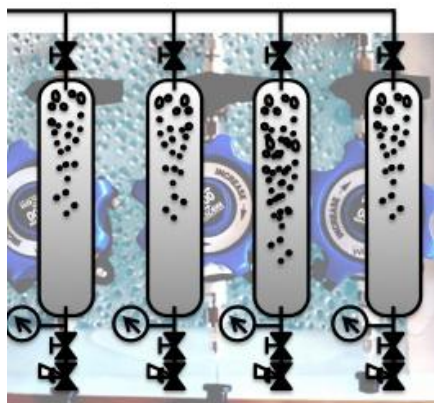


図3. 高压培養装置における溶存ガスの測定

#### 4. 研究成果

本研究ではまず生物的メタン生成を高压下で起こす事が可能か否かを検討した。まず高温性水素資化性メタン生成古細菌である

*Methanothermobacter thermautotrophicus* の培養を試みた。当該微生物と類似の微生物は多くの地下圏環境で環境クローンとして検出されており、これらの微生物が地下圏で生存し、メタンを生成していることが期待された。なお当該微生物は水素・二酸化炭素を用いて生育するメタン生成菌であるが、同時にギ酸を用いることもできる。高压培養にあたってはギ酸を用いた培養を行いメタンの生成の確認を試みた。その結果、温度 55° C で、圧力 0.1MPa, 5MPa, 10MPa, 15MPa で生育することが確認された。上述の圧力はそれぞれ、1, 50, 100, 150 気圧に相当する。次に、酢酸を炭素源として酢酸酸化水素生成型微生物 *Thermacetogenium phaeum* と水素資化性メタン生成古細菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* の共生培養を試みた。高压培養を行った結果、本共生培養も同様に 55° C で圧力 0.1MPa, 5MPa, 10MPa, 15MPa の条件で生育しメタン生成を行うことを捉えた(図4)。

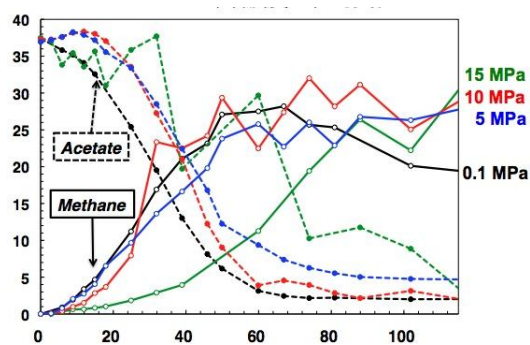


図4. 酢酸分解メタン生成共生系の高压培養時におけるメタン生成ならびに酢酸消費の経時変化(横軸は days)

メタン生成古細菌のみならず酢酸酸化共生微生物もこうした圧力に耐えられること、高压培養であるがゆえに、生成物であるメタンが培養液に溶解状態になっていることが考

えられることから、生成物であるメタンそのものには生物学的メタン生成を阻害する要因がないものと推定できた。このことは反応の熱力学的計算結果からも明らかとなった(図5)。

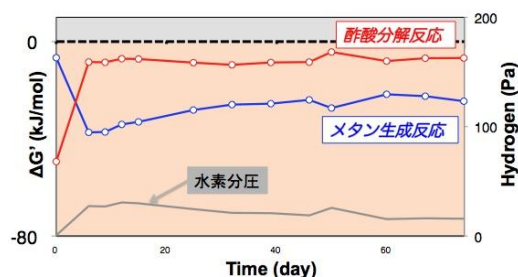


図5. 酢酸分解メタン生成共生系の高圧培養時におけるメタン生成ならびに酢酸消費の自由エネルギー変化計算結果

これらの実験とともにメタンの水素の同位体分別比に関する予備的知見を得ることができた。

また、天然ガス産出地帯深部地下圏試料から水素資化性メタン生成古細菌の完全純粋分離にも併せて成功した。本微生物は、上記の水素資化性メタン生成菌と極めて類似性が高くこうした微生物の地下圏における存在が明らかになった。なお、本微生物はその培養特性の若干の差異から *Methanothermobacter* 属の新種微生物として提案記載した(図6)。

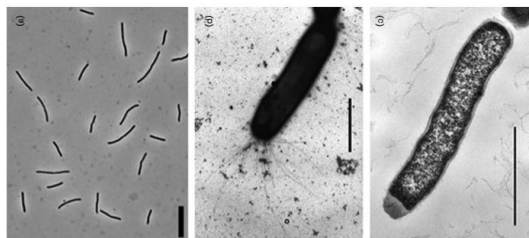


図6. 地下圏から分離した新たな *Methanothermobacter* 属メタン生成菌

なお、メタンハイドレートの生成を高圧培養

容器内で再現する実験は装置の改良等を実施し、時間的制約から行うことができなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Nakamura, K., A. Takahashi, C. Mori, H. Tamaki, H. Mochimaru, K. Nakamura, K. Takamizawa, and, Y. Kamagata: *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013. DOI 10.1099/ijs.0.041681-0. 査読有り.

[学会発表] (計1件)

鎌形洋一：メタン生成古細菌の多様性と機能. 第3回メタン高度利用技術シンポジウム. 12/05/2011. 長岡技術科学大学.

[図書] (計1件)

鎌形洋一：無酸素環境における共生微生物の実態解明 *生物工程*: 90 (11): 706-707 (2012).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鎌形洋一 (KAMAGATA YOICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究部門長

研究者番号：70356814