

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04970

研究課題名(和文) 枯渇油田再生化技術開発を志向した原油分解メタン生成機構の解明と新規微生物の獲得

研究課題名(英文) Cultivation of uncultured microorganisms involved in anaerobic crude oil biodegradation

研究代表者

持丸 華子 (Mochimaru, Hanako)

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

研究者番号：90462861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：枯渇油田に残された原油をメタンに変換し、天然ガスとして回収する技術の開発を目指し、深部地下油層環境の一部で起きていることが示唆されている生物的原油分解メタン生成メカニズムを解明することを目的としている。本研究では、現地環境を模擬した高圧培養および常圧培養を行い、原油分解メタン生成培養系の構築を行った。さらに、原油分解過程の中間代謝産物であると想定される脂肪酸を用いてメタン生成培養系の構築を行った。原油分解メタン生成培養系で優占する微生物を安定的に培養できる脂肪酸を明らかにし、門レベルで新規な微生物の集積系の獲得に成功した。これにより、地下深部におけるメタン生成メカニズムの一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原油の回収率は一般に20-60%であり、枯渇油田とされてもその半量ほどは地下に残されている。本研究では、この原油をメタンに変換し、天然ガスとして回収する技術の開発を目指している。原油分解メタン生成がどのような微生物によりどのような反応経路で起きているのか、そのメカニズムを明らかにすることで、その反応を利用し促進させることが可能となるはずである。本研究ではその反応を担う、未培養で機能が未知であった微生物の役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：The development of technology to convert crude oil currently remaining in depleted oil fields into methane is necessary to ensure we efficiently use our natural resources. The purpose of this study is to elucidate the mechanism of biogenic crude oil degradation and methane formation that is thought to occur in deep underground oil reservoir environments. In this study, cultures grown in high-pressure and atmospheric-pressure conditions simulating the reservoir environment, were carried out to obtain a crude oil-degrading, methane producing microbial culture. We obtained a methanogenic culture using fatty acids that are likely intermediate metabolites of the crude oil degradation process. Furthermore, we succeeded in obtaining both enrichment cultures and pure cultures of uncultured bacteria. The cultivation of these novel microorganisms and the elucidation of the substrates they utilize have contributed to the understanding of the mechanism by which methanogenesis occurs.

研究分野：微生物生態学

キーワード：原油分解 メタン生成 メタン生成菌 培養 油田 ガス田 嫌氣的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、シェールガスやメタンハイドレートなどの未利用化石燃料の資源開発が注目されている。それと同様に、これまで利用することが技術的に不可能であった枯渇油田の残留原油を、油層微生物の機能を最大限に活用し、硫黄分を含まないクリーンなメタンガスに変換し回収する枯渇油田再生化技術の開発への関心が高まっている。既に、原油の主成分である直鎖炭化水素の嫌気微生物による分解とその分解産物を利用したメタン生成反応の存在は報告されている (Jones et al., 2008, Nature)。これに続き、これまでに数多く報告がなされているが、その試料のほとんどは 35 以下の中温環境のものであった。しかし、火山国日本の油田は主に北海道、秋田、山形、新潟に存在し、そのほとんどが高温・高圧の地下深部に存在する。これまでに、これらの日本の油ガス田の地層水試料の遺伝子解析を行ったところ、検出される微生物は系統的に未培養のものが大多数であり、微生物の生態については推測が困難であった。原油分解メタン生成反応では複数の微生物種による多段階の分解反応によって生成する酢酸や水素が最終的にメタン生成菌によってメタンへと変換されると考えられている。このような一連の反応では原油分解反応の中間代謝産物が次の分解者によって即座に消費される必要があり、特に水素や酢酸が系内に蓄積すると即座に反応系全体が崩壊してしまう。これまでに、我々は深部地下油層環境におけるメタン生成反応において、酢酸が重要な中間代謝産物として存在し、酢酸酸化細菌と水素利用性メタン生成菌の密接な共生関係でメタン生成が進行することを明らかにした (Mayumi et al., Environ. Microbiol. 2011)。しかし、このような原油分解反応の初発反応を担う原油分解細菌については、未培養細菌がほとんどを占めていたため、どの微生物がどの反応を担っているのかその機能については明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、枯渇油田に残された原油をメタンに変換し、天然ガスとして回収する技術の開発を目指し、一部の深部地下油層環境で起きていることが示唆されている生物的原油分解メタン生成反応のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料採取

これまでに原油の炭化水素組成分析 (原油の生分解度) やメタン~ブタンおよび二酸化炭素の安定同位体比分析 (メタンの生成起源) などの地球化学的観点から、山形県と秋田県の 2 カ所の油田で原位置の原油分解メタン生成ポテンシャルの存在を確認してきた。本研究では、原油分解メタン生成培養系の構築に山形県および秋田県の油田の試料を用いた。また、原油分解メタン生成系で優占した微生物に近縁の新規微生物の単離試料として、新潟のガス田の地層水試料を用いた。

(2) 原油分解メタン生成培養系の獲得

山形県および秋田県の油田の試料を用いて、現地環境を模擬した高圧培養 (50MPa) および培養条件を多様化させた常圧培養を行った。培養器には地層環境を再現するために海砂を充填した。試料の封入は嫌気チャンパー内で行った。常圧培養培の気相は N_2-CO_2 (80:20, v/v) とした。それぞれ現地温度に近い 55 で培養を行った。新潟ガス田の試料については、現地地層水の採取温度に近い温度でそれぞれ培養を行った。

(3) 脂肪酸分解メタン生成培養系の獲得

脂肪酸は原油の主成分である n-アルカンから次に生成されると想定されており、n-アルカン分解微生物獲得のためにその分解過程の下流を担う微生物の同定ならびに集積培養は重要である。そこで、原油分解過程の中間代謝産物であると想定される脂肪酸を用いてメタン生成培養系の構築を行った。この脂肪酸で集積された微生物について 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。このとき基質として複数添加していた炭素数が 10 から 20 の比較的長鎖の脂肪酸について、それぞれ個別に添加した培養系を作成し、2 代目の培養を行うことで、微生物による各脂肪酸の分解のされやすさを評価した。

(4) 新規微生物の集積と単離

原油分解メタン生成培養系で優占する新規微生物の脂肪酸を用いた集積系の構築を行った。さらに、この新規微生物と同門に属するがおそらく目レベルで系統の異なる微生物の単離を行った。

4. 研究成果

(1) 原油分解メタン生成培養系の獲得

山形県と秋田県の 2 カ所の油田の複数の坑井から採取した試料を用いて、現地環境を模擬するため海砂を充填した高圧培養および常圧培養を行った。培養は 1 年間継続した。この結果、常圧培養を行った原油入りの培養系の一つで 50 日を経過したところから優位なメタン生成が確認された。メタン生成は 300 日近く継続した。

(2) 脂肪酸分解メタン生成培養系の獲得

原油を添加しメタン生成が確認された培養系の試料を、炭素数が 10 から 20 の比較的長鎖の脂肪酸を複数種類基質として添加した培地に接種して培養を行った。その結果、良好なメタン生成が確認された。この集積された微生物について 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析し、関与して

いるメタン生成菌および細菌の種類を明らかにした。その結果、この脂肪酸を用いた培養系の中に、原油分解メタン生成培養系で優占する新規微生物が優占していることが明らかとなった。次に、複数添加していた脂肪酸をそれぞれ個別に添加した培地を作成し、基質利用性について試験を行った。この結果、脂肪酸の炭素数により、メタン生成の抑制が起こるものと起こらないものがあることが明らかとなった。

(3)新規微生物の集積と単離

原油分解メタン生成培養系で優占する微生物を安定的に培養できる脂肪酸の種類を明らかにし、新規微生物の集積系を獲得した。また、この新規微生物と同じ門レベルで未培養の系統に属するが、集積微生物とはおそらく目レベルで系統の異なる新規性の高い微生物について単離培養に成功した。この単離株の性質決定のため、ゲノム解析を行った。

以上のように、本研究では原油分解メタン生成系で優占する門レベルで新規な微生物について、集積培養を行い、その基質利用性について明らかにした。この未培養微生物が原油分解の中間代謝産物であると考えられる脂肪酸を基質として利用することは、これまでに他の研究者がゲノム解析によっても推定し得なかった新しい知見であり、原油分解メタン生成メカニズムの一端を明らかにすることに成功した。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoshi Tamazawa, Daisuke Mayumi, Hanako Mochimaru, Susumu Sakata, Haruo Maeda, Tatsuki Wakayama, Masayuki Ikarashi, Yoichi Kamagata, Hideyuki Tamaki	4. 巻 67
2. 論文標題 Petrothermobacter organivorans gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly anaerobic bacterium of the phylum Deferribacteres isolated from a deep subsurface oil reservoir	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 3982-3986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.002234	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hanako Mochimaru, Susumu Sakata, Hideyoshi Yoshioka, Daisuke Mayumi, Hideyuki Tamaki, Yoichi Kamagata
2. 発表標題 Methanogenic activity and microbial diversity in a high-temperature biodegraded oil reservoir.
3. 学会等名 International Meeting on Organic Geochemistry（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞弓大介、持丸華子、玉木秀幸、山本京祐、吉岡秀佳、鈴木祐一郎、鎌形洋一、坂田将
2. 発表標題 石炭を直接利用するメタン生成菌の新しい代謝様式
3. 学会等名 日本有機地球化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Mayumi, Hanako Mochimaru, Hideyuki Tamaki, Kyosuke Yamamoto, Hideyoshi Yoshioka, Yuichiro Suzuki, Yoichi Kamagata, Susumu Sakata
2. 発表標題 Novel mode of methanogenesis by a methanogen isolated from a deep subsurface oil reservoir.
3. 学会等名 International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 持丸華子、眞弓大介、坂田将、吉岡秀佳、玉木秀幸、鎌形洋一
2. 発表標題 深部地下高温油層環境における原油分解とメタン生成
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤創一郎、高篠素子、五十嵐健輔、持丸華子、眞弓大介、玉木秀幸
2. 発表標題 鉄腐食反応を利用した低水素濃度環境を好むメタン生成菌・酢酸生成菌の新規培養法
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞弓大介、持丸華子、玉木秀幸、山本京祐、吉岡秀佳、鈴木祐一郎、鎌形洋一、坂田将
2. 発表標題 石炭を直接利用するメタン菌の新たなメタン生成経路
3. 学会等名 日本地球化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 持丸華子
2. 発表標題 メタン生成菌との共生培養を用いたリグニン関連物質分解微生物の分離培養
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----