

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20244089

研究課題名（和文） 地下圏内メタン生成・消費活動に関わる未知微生物群の分離培養と動態解析ツールの開発

研究課題名（英文） Community analysis of subsurface biosphere responsible for methane cycling

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）：

本研究では地下圏微生物群集において実体が明らかになっていないメタン生成古細菌ならびにメタン酸化微生物の動態解析を行った。その結果(1) 天然ガス胚胎地下圏に優占する *Methanothermobacter* 類縁のメタン生成古細菌を実環境濃度に近い低濃度ガス供給を基本とした共生培養法により完全純粋培養に成功した。(2) 深部地下油層環境におけるメタン生成においては酢酸が重要な中間体であることを明らかにした。(3) 陸地地下圏試料において顕著な嫌氣的メタン酸化活性を認めた。(4) 好氣的メタン酸化をおこなう共生系を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

To shed light on the subsurface methane cycling microbial communities, we have analyzed the community structures, cultivated the dominant organisms, and analyzed the basic traits of isolated organisms: (1) we were successful in isolating dominant hydrogenotrophic methanogens in an association water sample in a natural gas field. The isolate was found to be distinct from know methanogens; (2) acetate was found to be the most important intermediate in a deep subsurface oil reservoir in which syntrophic acetate oxidation occurred; (3) anaerobic methane oxidation was detected in terrestrial subsurface samples; (4) a syntrophic aerobic methane oxidizing community that comprised at least three members of bacteria was constructed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2009年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2010年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
年度			
年度			
総計	37,300,000	11,190,000	48,490,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：天然ガス・油田・地下圏生物・メタン菌・メタン酸化菌・地球化学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初には、地下圏において多様かつ多数の微生物が存在し、物質循環に関与していることが明らかになりつつあった。中で

もメタンは主要代謝産物の一つであり、メタンの生成と消費に関わる微生物の活動を理解することは地下圏の微生物活動全体を解明す

ることに直結するのみならず、ガスハイドレート形成・大気や海洋圏への拡散・放出を含めたメタンのフラックスを解明する上で非常に重要な研究課題になりつつあった。そしてこの重要性は今日まで変わっていない。しかし、実際の地下圏からのメタン生成・消費に関わる微生物の分離・培養例は非常に少ない。メタンを生成する微生物とメタンを酸化する微生物はそれぞれ水素+二酸化炭素とメタン+二酸化炭素というガス状物質を炭素源かつエネルギー源として生育する。これらのガス状基質を資化する微生物を集積・分離・培養する場合、多量のガスを気相に封入して培養するのが一般的である。しかしながら、地下圏や土壌環境試料を接種して高濃度ガス基質雰囲気下で培養を行なったときに出現する微生物種はごく限られていて、その多くは既知菌種であり、16S rRNA を用いた現場環境試料の多様性解析の結果と常に大きな乖離があることはこれまでの研究ならびに提案者らの研究によっても明らかになっている。地下圏生態系にとって重要な未培養微生物菌群を捕捉し、その機能を解明するためには、新たな培養手法や解析手法の導入が必要不可欠であると考え、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでに分子系統解析等から存在が知られているものの、実体がほとんど明らかにされていない、地下圏メタン生成・メタン酸化微生物群の実体を解明するための集積・分離・培養手法を確立し、地下圏におけるメタンフラックスの中核的微生物群の果たす役割を明らかにしようとするものである。本研究では (1)ガス田として千葉県ならびに新潟県において中新世から第四紀に形成されたガス堆積層、(2)深部油田層として秋田県秋田市八橋の枯渇油田層、(3) 陸上地下圏として東京ならびに埼玉周辺の沖積層、(4) 海洋地下圏のモデルとしては鹿児島湾堆積物を対象試料として用い、ガス基質として特に重要な水素とメタンに焦点を絞り、 $^{13}\text{C}$  安定同位体、 $^{14}\text{C}$  放射性同位体メタンを用いてメタンの生成な

らびに酸化経路の解明ならびにメタンの生成ならびに酸化に関わる圧倒的多数を占める未知微生物群の集積・分離・培養手法を確立し、地下圏におけるメタン生成・消費活動に関わる微生物本体の実体を把握することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) メタン生成古細菌の分離培養と生理特性の解明：微生物の分離培養については、常法ならびに共生培養法による分離を試みた。ここで用いた共生培養法とは、メタン生成古細菌がエネルギー源として用いる水素を直接基質として高濃度で加えず、水素を発生する間接基質並びに当該間接基質から水素を発生する微生物を共存させながら集積培養を行う技術である。本研究では酢酸から水素を生成する酢酸資化性細菌 *Thermacetogenium phaeum* を用い、本細菌を予めピルビン酸で単独培養した菌体を限界希釈したガス田試料に添加し、基質として酢酸を用いて培養を行った。嫌気培養、分離、生理試験、系統解析、定量 PCR、ゲノム解析等は常法に基づき行った。

(2) 放射性同位体を用いた深部油田層試料のメタン生成経路解析

秋田県八橋油田より採取した油層水と原油を用いて、1L 容ステンレス製耐圧培養容器に油層水 800ml と原油 8ml で構成されるマイクロコズムを作成した。このマイクロコズムを窒素ガスで油層環境と同じ 5MPa に加圧し、55°Cにて培養を行った。培養後 96 日後の油層水をマイクロコズムから回収し、 $^{14}\text{C}$  でラベル化された酢酸もしくは重炭酸を培養後油層水に添加し、再度 55°Cで培養した。一定期間後に生成される  $^{14}\text{CH}_4$  を測定し、添加した  $^{14}\text{C}$  基質からのメタン生成速度を評価した。

(3) 嫌気性メタン酸化活性の測定

東京都内において、約 25 m の沖積層試料を掘削により採取した。嫌氣的メタン酸化活性の測定には 11m, 20m から採取した試料を用いた。堆積物は窒素下で無機塩培地に懸濁させ、気相を  $\text{N}_2\text{-CO}_2$  (80/20, v/v) で置換後、メタンを添加 (0.1MPa)、さらに  $^{13}\text{C}$ -メタンを

添加した。電子受容体としては硫酸や硝酸を添加した。20℃で培養、一定期間毎に液相試料を採取し、溶存無機炭酸の同位体比は GC-C-IRMS を用いて測定した。

#### (4) 好氣的海洋性メタン酸化細菌の培養

鹿児島湾堆積物から得られたメタン酸化集積培養系を試料とした。メタン酸化細菌並びに関連細菌の分離は有機物を含まない人工海水を基本とした NMS 培地を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 天然ガス胚胎地下圏におけるメタン生成古細菌の実体解明

新潟県天然ガス胚胎地下圏にはこれまでに知られていない *Methanothermobacter* に類縁の微生物が優占的に存在していることが予察的研究結果から明らかになっていた。しかし、この微生物の分離は通常メタン生成古細菌の分離培養手法では捉えることができなかった。そこで、標的メタン生成古細菌の集積・分離培養にあたっては、実環境濃度に近い低濃度ガス供給を基本とした共生培養法を確立した。本手法を用いて当該地下圏に優占的に存在することがあらかじめ知られていた *Methanothermobacter* に近縁なメタン生成古細菌の完全純粋培養に成功した。また当該メタン生成古細菌の完全長ゲノム配列を決定した。当該菌株は *Methanothermobacter* (中度高温菌) と *Methanothermus* (超高温菌) の中間的温度特性を示すこと、さらにはメタン生成経路の基幹酵素である methyl-CoM reductase の遺伝子配列や 16S rRNA 遺伝子配列の解析から当該微生物の分子系等学的モザイク特性 (*Methanobacterium* のような中温性メタン生成古細菌、*Methanothermobacter* に代表される中度高温ならびに超高温菌 *Methanothermus* の特性を併せ持つ系統的位置) が明らかになった。

#### (2) 深部油田層試料のメタン生成経路の解明

油層水と原油のみで構成されるマイクロコズムを 55℃、5MPa で培養した結果、培養後 20 日からメタン生成が観察された。それと共

に、油層水に元々含まれる酢酸の減少が観察された。高温高压培養実験における酢酸からのメタン生成経路を明らかにするため、放射性同位体トレーサー法により水素資化性メタン生成速度および酢酸資化性メタン生成速度を評価した。その結果、酢酸資化性メタン生成速度よりも水素資化性メタン生成速度のほうが 68 倍速いメタン生成活性を示した。

同じく高温高压培養実験における酢酸からのメタン生成に関与する微生物を特定するため、培養後油層水中の細菌および古細菌群集構造解析を行った。その結果、古細菌の群集構造は好熱性の水素資化性メタン生成古細菌として知られる *Methanothermobacter thermoautotrophicus* が優占していることを明らかにした。一方、細菌の群集構造は *Thermacetogenium phaeum* と極めて近縁な細菌が優占した。この種の細菌は水素資化性メタン生成古細菌との共生条件下でのみ酢酸を水素と二酸化炭素に酸化する、酢酸酸化共生細菌として知られている。

以上の結果を総合すると、深部地下油層環境においてメタンは酢酸を基質に、水素資化性メタン生成古細菌と酢酸酸化共生細菌による酢酸酸化水素資化性メタン生成経路によって生成されることが明らかとなった。

#### (3) 陸域地下圏における嫌氣的メタン酸化活性の解明

地下圏における嫌氣的メタン酸化微生物の実体解明を試みた。約 25 m の沖積層試料を掘削により採取し、<sup>13</sup>C-メタンを用いて嫌氣的メタン酸化活性の測定を試みた。20 m の試料を用いた際の嫌氣的メタン酸化活性の測定を行った結果、硫酸添加時に大きく活性が増大した。以上の結果から、関東平野の沖積層では嫌氣的メタン酸化が進行していると考えられる。また硫酸添加時に大きく活性が促進されたことから、海底で生じている嫌氣的メタン酸化反応と同様に、陸域でも嫌氣的メタン酸化反応は硫酸還元とリンクしている可能性が示された。

#### (4) 海洋圏から好氣的メタン酸化細菌の単離

の試み

限界希釈法により、*Methylocaldum tepidum* に 98%近縁なメタン酸化細菌の他、2種類の  $\alpha$ -*Proteobacteria* に属する微生物から構成される共生系を得た。2種類の  $\alpha$ -*Proteobacteria* に属する微生物は有機物添加培地により分離培養に成功した。そこで、メタン酸化共生系のメカニズム解明にはゲノム解析が有効と考えられたことから、文部科学省ゲノム支援プロジェクトにより、本共生系のゲノム解析を開始したところである。

#### 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 6 件)

①Takeuchi, M., H. Yoshioka, Y. Seo, S. Tanabe, H. Tamaki, H. A. Takahashi, S. Igari, D. Mayumi, S. Sakata: A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan. *Environmental Microbiology in press* (2011.3.31). 査読有り

②Nakamura, K., H. Tamaki, M.S. Kang, H. Mochimaru, S-T Lee, K. Nakamura, and Y. Kamagata: A six-well plate method: less laborious and effective method for cultivation of obligate anaerobic microorganisms. *Microbes and Environments, published on line* (2011. 6.1). 査読有り

③Mayumi, D., H. Mochimaru, H. Yoshioka, S. Sakata, H. Maeda, Y. Miyagawa, M. Ikarashi, M. Takeuchi, Y. Kamagata: Evidence for syntrophic acetate oxidation coupled to hydrogenotrophic methanogenesis in the high-temperature petroleum reservoir of Yabase oil field (Japan). *Environmental Microbiology published on line* (2011. 3.1). 査読有り

④ Maeda H., Y. Miyagawa, M. Ikarashi, D. Mayumi, H. Mochimaru, H. Yoshioka, S. Sakata, H. Kobayashi, K. Sato: Research for microbial conversion of residual oil into methane in depleted oil fields to develop new EOR process.

*Proceedings of Abudabi Oil and Gas Conference and Exhibition 2010*, Abudabi. OnePetro, No. 138135-MS (2010. 9.3). 査読無し

⑤Sakai, S., H. Imachi, Y. Sekiguchi, I-Cheng Tseng, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata: Cultivation of methanogens under low hydrogen conditions by using the coculture method. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4892-4896 (2009. 7.1). 査読有り

⑥Mochimaru, H., H. Tamaki, S. Hanada, H. Imachi, K. Nakamura, S. Sakata, and Y. Kamagata: *Methanolobus profundus* sp. nov., a new methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 714-718 (2009. 4.1). 査読有り

[学会発表] (計 16 件)

①Kamagata, Y.: Cultivation and large-scale community analysis of methanotrophic organisms. Hong Kong University special lecture. Hong Kong University (2011.3.19).

②眞弓大介・坂田将・前田治男・宮川喜洋・五十嵐雅之: 安定同位体トレーサー法を用いた油層内共生微生物によるメタン生成経路の解明. 第2回メタンハイドレート総合シンポジウム, 東京(2010.12.2).

③Takeuchi M., H. Yoshioka, Y. Seo, S. Tanabe, H. Tamaki, Y. Kamagata, H. A. Takahashi, S. Igari, D. Mayumi, S. Sakata. Anaerobic oxidation of methane in the terrestrial subsurface environment. AGU fall meeting, San Francisco (2010.12.14).

④持丸華子・眞弓大介・吉岡秀佳・坂田将, 玉木秀幸・鎌形洋一: 深部地下油層環境における原油分解とメタン生成. 第26回日本微生物生態学会, つくば, 茨城 (2010.11.24).

⑤眞弓大介・坂田将・前田治男・宮川喜洋・五十嵐雅之: 安定同位体トレーサー法を用いた油層内共生微生物によるメタン生成経路の解明. 第26回日本微生物生態学会, つくば, 茨城 (2010.11.24).

⑥徐維那・竹内美緒・鎌形洋一・坂田将.  
Raman-FISHを用いた微生物共生系における  
炭素・窒素の移動経路の解明. 第26回日本  
微生物生態学会大会, つくば, 茨城 (2010. 11.  
24).

⑦Kamagata, Y.: Syntrophy based upon  
interspecies H<sub>2</sub> transfer in anaerobic digestion.  
International Symposium on Environment and  
Renewable Energy. Pusan National Univ.  
(2010.10. 25).

⑧Takeuchi M., H. Yoshioka, Y. Seo, S.  
Tanabe, H. Tamaki, Y. Kamagata, H. A.  
Takahashi, S. Igari, D. Mayumi, S. Sakata.  
Anaerobic oxidation of methane in the terrestrial  
subsurface environment. 13<sup>th</sup> International  
Symposium on Microbial Ecology. Seattle, USA  
(2010. 8. 24).

⑨Mayumi, D., S. Sakata, H. Maeda, Y.  
Miyagawa, M. Ikarashi. Methanogenic pathway  
in a high-temperature petroleum reservoir  
assessed by stable isotope tracer and molecular  
biological techniques. 13<sup>th</sup> International  
Symposium on Microbial Ecology. Seattle, USA  
(2010. 8.24).

⑩竹内美緒・吉岡秀佳・徐維那・田邊晋・玉  
木秀幸・鎌形洋一・高橋浩・猪狩俊一郎・眞  
弓大介・坂田将: 陸域地下圏における微生物  
による嫌氣的メタン酸化の解明. 2010年度日  
本地球惑星科学連合大会, 幕張, 千葉  
(2010.5.25).

〔図書〕(計1件)

①鎌形洋一: 難培養微生物研究の最新技術II  
(シーエムシー出版) 分担執筆(2010.12.1).

## 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

### (2) 研究分担者

玉木 秀幸 (TAMAKI HIDEYUKI)  
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・研究員  
研究者番号: 00421842

坂田 将 (SAKATA SUSUMU)  
独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源  
環境研究部門・研究グループ長  
研究者番号: 70357101

吉岡 秀佳 (YOSHIOKA HIDEYOSHI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源  
環境研究部門・研究員  
研究者番号: 30415765

竹内 美緒 (TAKEUCHI MIO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源  
環境研究部門・研究員  
研究者番号: 20357403

鈴木 庸平 (SUZUKI YOHEI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源  
環境研究部門・研究員  
研究者番号: 00359168

(3) 連携研究者 なし