

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23244109

研究課題名(和文) 深部地下圏を模擬した高圧条件下における生物的メタン生成過程の解明

研究課題名(英文) Methanogenesis under high pressure conditions mimicking 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,500,000円、(間接経費) 11,250,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生物的メタン生成が高圧下(地下深部環境)で起こりうるか否かを明らかにすることを目的とした。その結果、(1)純粋なメタン生成菌のみならず、メタン生成共生系においても15 MPa程度の高圧条件下でメタン生成が確認され、高圧条件下でメタン生成が進行可能であることを実証した。(2) ケロジェン等根源物質の部分分解物と考えられるメトキシ芳香族化合物からメタンを生成する微生物群集を得ることに成功した。(3) 異なるCO₂濃度でメタン生成微生物群集を酢酸を基質として高圧培養したところ、CO₂濃度によって酢酸からの主要なメタン生成経路が大きく変化することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether biological methanogenesis occurs under high pressure conditions (mimicking subsurface environments). We used pure cultures of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogens, and an acetate oxidizing hydrogen producing syntroph as well as environmental subsurface samples taken from an oil field. We obtained the following results: 1) pure cultures of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogens, and syntrophic coculture were successfully cultivated under high pressure conditions (up to 15MPa). Note that the syntrophic coculture grew and produced methane under such high pressure conditions. 2) Methoxylated benzoates were used as model kerogen derivatives to enrich communities that were capable of degrading them to produce methane. 3) In the acetate-utilizing methane-producing community, CO₂ concentration is the crucial factor driving either acetoclastic methanogenesis or syntrophic acetate oxidation and subsequent methanogenesis from H₂ and CO₂.

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：メタン生成菌 メタンハイドレート 天然ガス 高圧培養 微生物間共生 地下圏微生物 安定同位体比 水素

1. 研究開始当初の背景

メタンハイドレートは水分子の籠状構造の空隙にメタンがトラップされた包接水和物 ($\text{CH}_4 \cdot 5.75\text{H}_2\text{O}$) であり、一定の高圧・低温条件下で形成される。シベリアを初めとする永久凍土地下圏や大陸周辺の海底地下圏に埋蔵されており、日本においては東部南海トラフ海底タービダイト砂岩層に膨大な埋蔵量 (数兆立方メートル) があると推定されており、将来の資源として期待されている。

メタンハイドレートの起源については未だ多くの議論があるが、(1) 深部地下圏における根源有機物の熱化学的分解に伴う生成、(2) 根源有機物もしくはそれに由来する有機物の生物的分解にともなう生成、の2つの可能性が示唆されている。これまで行われてきたメタンの安定同位体測定の結果、 ^{13}C の相対的な低さからメタンハイドレート中のメタンの多くは生物起源と考えられている。もしメタンが生物起源であるならば、メタン生成古細菌 (methanogenic archaea) の存在なくしてその生成・蓄積はあり得ない。1988年 Miller らは熱水噴出口から単離した高温性メタン生成古細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* が 75MPa (750 気圧) の高圧下、90 °C で培養可能であることを明らかにした (*Appl. Environ. Microbiol.* 1988)。2008年には Takai らが 20-40MPa (200-400 気圧) の高圧、122 °C という超高温条件下でメタン生成古細菌の一種である *Methanopyrus* 属がメタンを生成することを見いだした (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008)。

一方、このような超高温条件下でケロジェン等の根源物質起源と考えられる低分子有機化合物 (有機酸や芳香族化合物等) からメタン生成古細菌のエネルギー源である水素や酢酸を供給する微生物の存在はまったく知られておらず、超高温環境において、これらの給源は地殻由来もしくは根源物質の熱分解由来であると考えるのが妥当である。しかし、地下圏には地温勾配により低温域から超高温域までの生物生存域があり、有機物由来の水素や酢酸などの供給が生物的に活発に行われる温度域が存在するはずである。これまでの微生物学知見から、こうした温度帯は 50-70 °C の中度高温帯域であると考えられる。この温度域帯には超高温帯域に比べ、はるかに多様なメタン生成古細菌や発酵性微生物が存在しているのみならず、生物的水素ならびに酢酸の給源となりうる中間物質の存在も知られている。これまでの調査から深部地下圏の天然ガス付随水 (50-70 °C) や原油埋蔵地帯の中度高温地下圏では酢酸、プロピオン酸などの有機物が検出されており、そのような場でメタン生成が起こりうることを実験的に確認している。メタンハイドレートや天然ガス等を形成するメタンの生成反応場は超高温高圧下に限られたものではなく、むしろ中度高温帯域において活発に行われていると考えられる。メタンが生物的

に生成される場合、基質 (メタン生成菌が用いる炭素源かつエネルギー源) は水素+ CO_2 、ギ酸、単純なメチル化合物ならびに酢酸のいずれかである可能性が高い。特に地下圏環境においてはさまざまな有機物起源の水素+ CO_2 、酢酸が重要である。これは非常に多くの微生物学的研究から広く知られた事実でもある。しかし、メタン生成に必要な水素を供給する微生物と水素からメタンを生成する微生物間での種間水素伝達が 100 気圧以上の高圧下で果たして起こりうるか、実験的に証明されたことはなかった。また、(根源物質起源と思われる) 低分子物質から酢酸を生成する微生物と、酢酸からのメタンを生成する反応が 100 気圧以上の高圧下で起こりうるのか、まったく不明である。本研究はこうした課題を解き明かすことを目的に行ったものである。

2. 研究の目的

本提案で用いる微生物はすべて地下圏での存在が予見される 50-70 °C に生育最適温度を持つ発酵性微生物ならびにメタン生成古細菌であり、いずれも提案者らにより長年の研究の結果、分離培養に成功したものである。本研究では筒状高圧容器を用いて、1) 実際に高温高圧下で微生物間水素伝達にもとづくメタン生成が起こりうるのか、2) 水素や酢酸を供給する発酵微生物やメタン生成古細菌が高圧環境下においてどのような遺伝子発現制御を行い高圧ストレスに適應しているのか、3) 前駆体物質と考えられる根源物質からのメタン生成が起こりうるのか、4) 地下圏における環境変動に対しメタン生成微生物群集はどのように応答するのか、という地下圏微生物の生存戦略をゲノム情報を活用して明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) メタン生成微生物の高圧培養

高圧培養には内容積 150 mL のステンレス製耐圧容器を使用した。本耐圧容器の両端には 0.2 μm の焼結フィルターを装着し、微生物の流出・外部からの汚染を防止した。耐圧容器に微生物培養用培地、酢酸等のメタン生成基質を添加、 N_2/CO_2 ガス通気をおこなった後オートクレーブ滅菌した。シリンジで微生物の前培養液を添加した後、シリンジポンプを利用し容器内の圧力 (静水圧) を 5-20 MPa (50-200 気圧相当) の範囲で制御し、55 °C の湯浴内で培養した。各条件下での、微生物の生育、メタン生成を適宜測定し、圧力による影響を定量的に評価した。

2) 高圧ストレスへの遺伝子発現応答

酢酸資化性メタン生成菌 *Methanosaeta thermophila* のゲノム情報をもとにマイクロアレイスライドをデザインした。高圧条件下およびコントロール条件 (大気圧下) で培養した *M. thermophila* の菌体を回収し、RNA 抽

出、逆転写反応、蛍光ラベリングをおこなったのちマイクロアレイ解析に供した。コントロールと比較して2倍以上の発現変動がみられた遺伝子をリストアップし、その予測される遺伝子機能に基づき分類分けした。

3) 根源物質からのメタン生成

根源物質のモデル化合物であるシリング酸、バニリン酸、トリメトキシ安息香酸を唯一の炭素源とし、無酸素条件下でメタン生成微生物の集積培養をおこなった。培養過程のメタン生成量、分解中間代謝産物をGC、HPLC-MSにて定量下。集積後の微生物菌体を回収し、DNA抽出、16S rRNA 遺伝子のPCR増幅、クローンライブラリー解析をおこない、優占している微生物種を特定した。

4) 地下圏メタン生成微生物群集の環境応答
環境中のCO₂濃度の変動が地下圏メタン生成微生物群集にもたらす影響を調査すべく、地下原油貯留層構造水微生物群集を高圧条件下(5 MPa)、異なるCO₂濃度条件下で培養した。培養時に¹³Cラベル酢酸を添加し培養後のメタン、CO₂の同位体比を見ることで2種類のメタン生成経路(単独型、共生型)のどちらが優占的に機能しているのかを調べた。また培養後の微生物菌体を回収し、DNA抽出、16S rRNA 遺伝子のPCR増幅、クローンライブラリー解析をおこない、優占している微生物種を特定した。

4. 研究成果

1) メタン生成微生物の高圧培養

新規に作製した微生物高圧培養システムを用いて、酢酸資化性メタン生成菌、水素資化性メタン生成菌、および酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の共培養系を培養した。メタン生成菌単独の場合のみならず、酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の共培養系においても15 MPa程度の高圧条件下でメタン生成が確認され、高圧条件下でも種間水素伝達に基づくメタン生成が進行可能であることが実証された。しかし高圧ストレスによる生育、メタン生成への阻害の影響は酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の共培養系で特に顕著であった。

2) 高圧ストレスへの遺伝子発現応答

高圧条件が微生物生理に与える影響を評価するため、酢酸資化性メタン生成菌 *M. thermophila* を対象としてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析をおこなった。コントロール(大気圧下)と比較して、高圧条件下(5, 15 MPa)では特に変性したタンパクの再構成をおこなうシャペロンタンパク質、および細胞膜、細胞壁の合成に関与するタンパクの遺伝子発現の増加が顕著であった。この結果は、高圧により変性したタンパクの構造回復、ならびに細胞膜や細胞壁の構造変化が高圧条件下での生育、メタン生成に

重要であることを強く示唆する。

3) 根源物質からのメタン生成

ケロジェン等根源物質において普遍的に見出されるメトキシ芳香族化合物(シリング酸、バニリン酸、トリメトキシ安息香酸)をモデル物質として微生物の集積をおこない、これらの物質を完全分解しメタンを生成する微生物群集を得ることに成功した。16S rRNA 遺伝子配列にもとづく微生物群集構造解析、ならびに中間代謝産物の定量分析の結果、*Sporomusa* 属細菌によるメトキシ基からの酢酸生成、*Methanosarcina* 属メタン生成菌による酢酸からのメタン生成、*Syntrophus* 属細菌と *Methanoculleus* 属メタン生成菌との種間水素伝達を介した共生による芳香環の完全分解・メタン生成が起こっていることが示唆された。

4) 地下圏メタン生成微生物群集の環境応答
高圧条件下、異なるCO₂濃度でのメタン生成微生物群の培養の結果、高いCO₂濃度条件下においてより活発なメタン生成活性が確認された。16S rRNA 遺伝子配列にもとづく微生物群集構造解析、ならびに¹³Cラベル酢酸を用いた同位体分析の結果、高いCO₂濃度条件下においては酢酸資化性メタン生成菌が、低いCO₂濃度条件下においては酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の共生系が、それぞれ主要なメタン生成経路を担っていることが明らかとされた。酢酸酸化反応が高いCO₂濃度条件下において熱力学的に不利になることがその主要な要因であると推察された。

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6件)

- ①Mayumi D., Mochimaru H., Yoshioka H., Sakata S., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Takeuchi M., Kamagata Y., Evidence for syntrophic acetate oxidation coupled to hydrogenotrophic methanogenesis in the high-temperature petroleum reservoir of Yabase oil field (Japan), 2011, Environmental Microbiology, 13, 1995-2006. (査読有)
- ②Nakamura K., Takahashi A., Mori C., Tamaki H., Mochimaru H., Nakamura K., Takamizawa K., Kamagata Y. *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic, thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field. Int J Syst Evol Microbiol, 2013, 63, 715-22. (査読有)
- ③Mayumi D., Dolfing J., Sakata S., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Tamaki H., Takeuchi M., Nakatsu CH., Kamagata Y.

Carbon dioxide concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoirs. Nat Commun, 2013, 4, 1998. (査読有)

④前田治男,五十嵐雅之,宮川喜洋,小林肇,佐藤光三,眞弓大介,坂田将,地下常在微生物を利用した二酸化炭素のメタン変換システム構築, 2011, 石油技術協会誌, 76, 530-537. (査読無)

⑤眞弓大介,坂田将,鎌形洋一,深部地下油層環境における原油の生分解と生物的メタン生成, 2013, 化学工業, 64, 498-504. (査読無)

⑥眞弓大介,坂田将,鎌形洋一,深部地下油層環境のメタン生成経路に与えるCO₂地中貯留の影響, 2014, バイオサイエンスとインダストリー, 72(1), 14-18. (査読無)

〔学会発表〕(計 7 件)

①鎌形洋一,メタン生成古細菌による地下圏メタン生成活動. 2011年度日本地球化学会年会, 2011.9.16, 札幌. (招待講演)

②眞弓大介,坂田将,前田治男,宮川喜洋,五十嵐雅之,高温油層へのCO₂の注入が常在微生物のメタン生成活動に与える影響, 2011年度日本地球化学会年会, 2011.9.16, 札幌.

③Mayumi D., Sakata S., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Impact of a high CO₂ partial pressure on the methanogenic pathway in a high-temperature petroleum reservoir, 25th International Meeting on Organic Geochemistry, 2011.9.22, Interlaken.

④Mayumi D., Yoshioka H., Sakata S., Tamaki H., Kamagata Y., Methanogenic diversity and activity in a high-temperature biodegraded oil field, International Society for Microbial Ecology, 2012.8.21., Copenhagen.

⑤Mayumi D., Sakata S., Dolfing J., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Tamaki H., Takeuchi M., Kamagata Y., Possible impact of carbon capture and storage on the methanogenic activity and pathway in a high-temperature petroleum reservoir, 4th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems, 2013.8.28., Rio de Janeiro.

⑥眞弓大介,坂田将,前田治男,宮川喜洋,五十嵐雅之,玉木秀幸,竹内美緒,鎌形洋一,深部地下油層環境のメタン生成経路はCO₂濃度依存的に変化する, 2013年度日本地球化学会年会, 2013.9.11, つくば.

⑦眞弓大介,坂田将,玉木秀幸,竹内美緒,鎌形洋一,前田治男,宮川喜洋,五十嵐雅之, Dolfing J., 高いCO₂分圧が油層微生物のメタン生成活動に与える影響, 第31回日本有機地球化学シンポジウム, 2013.8.20., 倉敷.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌形 洋一 (KAMAGATA, Yoichi)
産業技術総合研究所 生物プロセス研究
部門 部門長
研究者番号: 70356814

(2) 研究分担者

坂田 将 (SAKATA, Susumu)
産業技術総合研究所 地圏資源環境部門
研究グループ長
研究者番号: 70357101

吉岡 秀佳 (SAKATA, Susumu)
産業技術総合研究所 地圏資源環境部門
主任研究員
研究者番号: 30415765

皆川 秀紀 (SAKATA, Susumu)
産業技術総合研究所 メタンハイドレ
ート研究センター 研究チーム長
研究者番号: 70202348

(3) 連携研究者

なし