

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820430

研究課題名(和文) 原油回収技術の開発に向けたメタン発酵共生系の鍵微生物の獲得と分子機構の解明

研究課題名(英文) Studies on key microorganisms and molecular mechanism of methanogenic consortium directing enhanced oil recovery techniques

研究代表者

中村 浩平 (Nakamura, Kohei)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40456538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原油回収技術のひとつに、原油のメタン発酵が挙げられる。原油の主成分であるアルカンを基質にメタン発酵する微生物群集を構築し、その構成微生物から鍵となる微生物の獲得と分解機構の推定を試みた。アルカン分解メタン発酵微生物群集中には、未培養のPeptococcaceae科細菌と酢酸資化性メタン生成アーキアが優占した。更にメタゲノム解析によって、Peptococcaceae科細菌には嫌氣的炭化水素分解に関わる遺伝子が存在し、更にホモ酢酸生成経路の遺伝子群を有したことから、アルカンを酢酸に分解している可能性が示唆された。生じた酢酸は酢酸資化性メタン生成アーキアによってメタンに変換された可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Methane fermentation from crude oil could be one of oil recovery strategies. We have constructed methanogenic community amended with alkane, which is a major component of oil, as a substrate to elucidate key microorganisms and molecular mechanisms there. Pyrosequencing analysis on 16S rRNA gene revealed that uncultured Peptococcaceae bacterium and aceticlastic methanogen were predominated in the methanogenic alkane-degrading culture. In addition metagenomic analysis demonstrated that uncultured Peptococcaceae bacterium might have genes relating to hydrocarbon degradation in anoxic environments and homoacetogenesis, indicating that this microbe could be involved in the degradation of alkane coupling to acetate production. Produced acetate might be converted to methane by the aceticlastic methanogen.

研究分野：応用微生物学，環境微生物学，微生物生態学

キーワード：メタン発酵 アルカン分解細菌 未培養微生物 エネルギー回収 MEOR メタン生成アーキア

### 1. 研究開始当初の背景

原油は主に油田地下の油層圧力により自噴させて回収するが、様々な既存技術を用いても原油の半分以上が油層に残り残される。原油資源には限りがあるうえ、新たな油田開発にも様々な問題がある。2010年のメキシコ湾沖で起きた原油流出事故は、新たな油田が沖合、海底に残されている現状を反映し、開発に伴うリスクの大きさを示している。そのため、油田埋蔵原油の新たな回収技術の開発が必要とされており、『メタン発酵による原油分解 原油の粘度低下 & 産生メタンで油層圧力上昇 埋蔵原油と天然ガス(メタン)の回収』が可能となる。

原油主成分であるアルカンのメタン発酵の報告以降(Zengler et al, 1999), メタン発酵による原油(とメタン)回収技術の可能性が議論されてきた。原油のメタン発酵は、原油を分解して水素生成する発酵菌群と、水素を利用してメタン生成するメタン生成アーキアによって起こると考えられている(Gray et al, 2010)。しかし、原油メタン発酵は非常に遅く(Jones et al, 2008), それは分解で生じる水素そのものが、極めて低濃度(数 Pa 程度)で原油分解を阻害するためである(Dolfing et al, 2008)。よって、原油メタン発酵の成否は、原油主成分のアルカンを分解する水素発酵菌(アルカン分解菌)や低濃度水素を利用できるメタン生成アーキアにあると考えられるが、申請者が知る限り、原油貯留層から分離されたアルカン分解菌や低濃度水素利用性メタン生成アーキアに関する報告は皆無である。

### 2. 研究の目的

本研究は、原油メタン発酵共生系のカギ反応を担うと考えられる、アルカン分解水素発酵菌と水素利用性メタン生成菌(以降メタン生成アーキア)に着目し、これらの未解明な微生物群の獲得と分子機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) アルカン分解メタン発酵系の構築

先行研究にて、日本各地から油田跡地などの土壌や生産水試料を、アルカン混合物(オクタン, ドデカン, ヘキサデカン等を等モル含む)を唯一のエネルギー、炭素源とする嫌気無機塩培地に植菌した。ガラスバイアル瓶に入った培地をテフロンコートされたブチルゴム栓とアルミキャップで密栓した。植菌後、バイアル瓶の口を下向きにした水封状態にて、30℃で静置培養した。アルカンを添加しない培養系(非添加コントロール)と滅菌した植菌源を添加した培養系(滅菌コントロール)を更に準備し、すべての培養系を3連で実験した。

メタン量の測定は GC-FID を用いてを行った。定期的にバイアル内の気相をサンプリングして、GC-FID に供した。アルカン量の測定

は GC-MS を用いた。培養開始 441 日目に培養系と滅菌コントロールにヘプタメチルノナンを添加し、残存するアルカンを溶解させた。ヘプタメチルノナンを採取し、ヘキサンで適当に希釈後、GC-MS に供しアルカン量の定量を行った。

#### (2) 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析には 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー法とパイロシーケンサーによる解析を用いた。クローンライブラリー法によって細菌優占種の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を決定した。パイロシーケンサーによって、細菌とアーキアの 16S rRNA 遺伝子をそれぞれ別に特異的プライマーで増幅し、そのアンプリコンの解析を行った。パイロシーケンサーで得られた結果は、Mothur (Schloss et al, 2009) によって配列の整理(キメラ配列の除去など)を行い、SILVAngs (<https://www.arb-silva.de/ngs/>) によって系統分類を行った。

#### (3) メタゲノム解析

Fasmac 株式会社に依頼して行った。培養系 DNA を NEXTERA XT(illumina)で増幅し、Miseq(illumina)で解析した。得られた配列から、群集構造解析で最優占種であった細菌、未培養 *Peptococcaceae* 細菌のゲノム配列を de novo 合成した。その際のテンプレートとして、データベースに登録された *Peptococcaceae* SCADC\_1\_2\_3 を用いた。

#### (4) 水素利用性メタン生成アーキアの低濃度水素利用試験

メタン生成アーキアの休止細胞に水素を添加し、各菌株の至適生育条件でバッチ培養する。水素濃度を GC-TCD を用いて経時的に測定し、プログレス曲線から速度パラメーター( $K_m$  と  $V_{max}$ )を求めた(Robinson et al., 1982)。

前述の反応速度論解析の培養系を使って、水素濃度の減少が停止するまで測定し、利用可能水素濃度(下限)を求めこれを用いて  $\Delta G_c$  を算出した(下式)。

$$\Delta G_c = \Delta G_T^0 + RT \ln \frac{[\text{CH}_4]}{([\text{H}_2'] - [\text{H}_2])^4 [\text{CO}_2]}$$

$$([\text{H}_2'] \neq [\text{H}_2])^4$$

$\Delta G_T^0$ : 培養温度でのメタン生成反応の標準自由エネルギー変化;

R, 気体定数; T, 培養温度(絶対温度);

$[\text{H}_2']$ ,  $\Delta G_c^0 = 0$  のときの理論水素濃度;  $[\text{H}_2]$ , 水素の利用限界濃度;

$[\text{CH}_4]$ ,  $[\text{CO}_2]$ , 各ガス濃度の実験値。

### 4. 研究成果

#### (1) アルカン分解メタン発酵培養系

新潟県から採取した油兆からの生産水でアルカン分解メタン発酵培養系の構築に成功した。アルカンを添加しなかった非添加コントロールと比較して、顕著なメタン生成が確認できた(図1)。

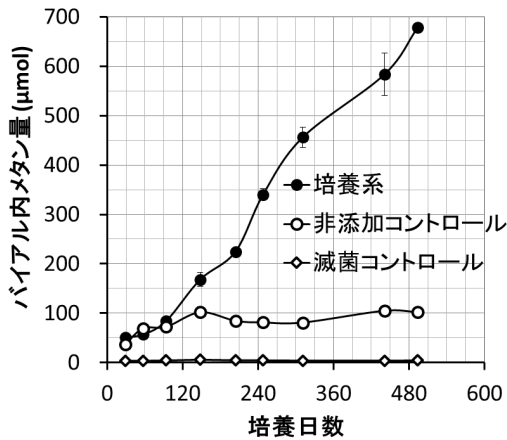


図1. アルカン分解メタン発酵培養系からのメタン生成。平均値(3連)をプロットし、バーは標準偏差を示す。

アルカンの分解を GC-MS で確認した。滅菌コントロールの残存アルカン量と比較して、培養系ではオクタンの減少に有意差が確認できた。オクタンの減少量を基に、メタン生成がオクタンの分解のみに由来すると仮定すると、オクタンの分解によって生じた電子の 85%がメタン生成に用いられたと推定された。このように新潟県油朶からの生産水からアルカン(おそらくオクタン)分解メタン発酵培養系の構築に成功した。続いて、この培養系の微生物群集構造解析を行った。

(2) アルカン分解メタン発酵培養系の微生物群集構造解析

培養系と非添加コントロールに加え、植菌源となった生産水から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的としたパイロシーケンスによるアンプリコン解析を行った(図2a, b)。

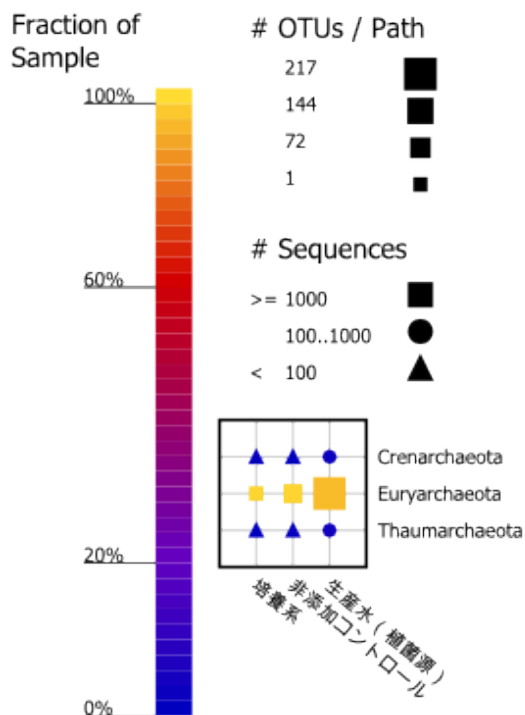


図2a. パイロシーケンスによるアーキア 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析結果(系統分類)

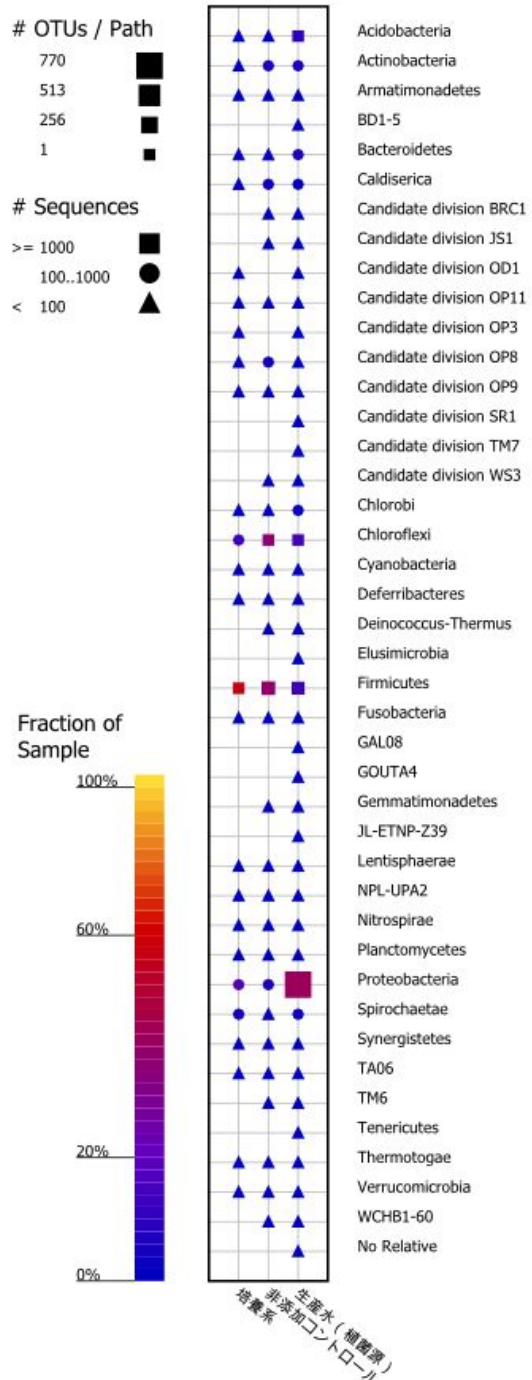


図2b. パイロシーケンスによる細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析結果(系統分類)

図2a, bはそれぞれアーキアと細菌の系統分類の結果を門レベルで表している。アーキアではすべての系で Euryarchaeota 門が 99%以上を占めていた。培養系では Euryarchaeota 門に属する OTU(操作上分類単位)が生産水のものに比べ大きく減少した。培養系のこの Euryarchaeota 門の最優占 OTU は酢酸資化性メタン生成アーキアである *Methanosaeta* 属に分類され、また *Methanosaeta* 属に比べ割合は低いものの水素資化性メタン生成アー

キアである *Methanoregula* 属らも存在した。細菌ではアーキアに比べ多くの門が確認できた。生産水では Proteobacteria 門に属する細菌が多く検出され、その OTU 数も最も多かった。一方、培養系では Firmicutes 門に属する細菌が最も多く、OTU は生産水の Proteobacteria 門のものに比べ、極めて少なかった。培養系の Firmicutes 門最優占 OTU は未培養の *Peptococcaceae* 科細菌に分類された。この未培養 *Peptococcaceae* 科細菌は培養系の解析配列の 54% をも占めた。また、この細菌の一群はカナダや中国の原油生産施設の生産水等からも検出されていた。クローンライブラリー法で未培養 *Peptococcaceae* 科細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を取得し、BLAST 検索したところ、硫酸塩還元細菌である *Desulfotomaculum* 属が最も高い相動性を示したが、90% 以下と低く、この未培養細菌の性状の推定は困難であった。

未培養の *Peptococcaceae* 科細菌に次いで優占種であった Proteobacteria 門では、*Syntrophaceae* 科の細菌群が優占した。*Syntrophaceae* 科細菌はこれまでにアルカン分解や原油分解メタン発酵系で度々報告されている細菌であり、そのアルカン分解能について議論されている。しかしながら、アルカン分解メタン発酵系からの *Syntrophaceae* 科細菌の分離報告例はない。そこで、既知の *Syntrophaceae* 科細菌の性状を基に、脂肪酸を炭素・エネルギー源とした培地にアルカン分解メタン発酵培養系を植菌し、*Syntrophaceae* 科細菌の分離を試みた。

その結果、酪酸、長鎖脂肪酸（ノナン酸とパルミチン酸）といった脂肪酸からメタン生成が確認された。しかしながら、それらの培養系に増殖した細菌は Firmicutes 門の *Syntrophomonadaceae* 科に属する細菌であった（図 3）。このことからアルカン分解メタン生成培養系に存在する *Syntrophaceae* 科細菌は試験した脂肪酸では生育できない可能性が考えられた。

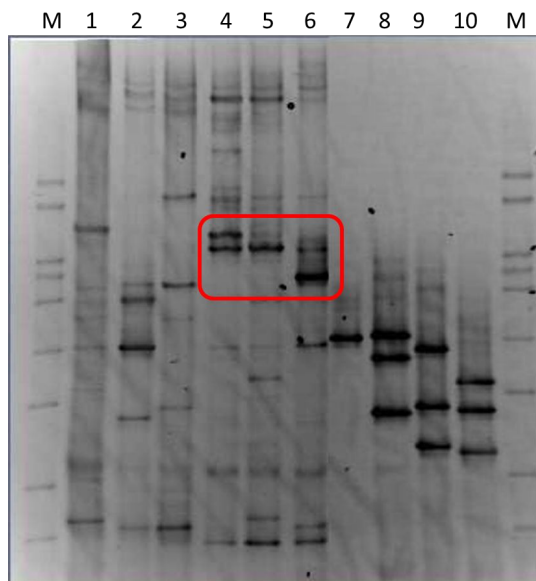


図 3. 脂肪酸を基質とした継代培養液中の PCR-DGGE 解析。16S rRNA 遺伝子 V3 領域を標的とした。M, マーカー; 1, 生産水; 2, 培養系 (アルカン添加); 3, 非添加培養系; 4, 継代培養液 (酪酸添加, 培養 42 日間); 5, 継代培養液 (酪酸添加, 培養 73 日間); 6, 継代培養液 (調査脂肪酸添加, 培養 118 日間); 7, クローン (未培養 *Peptococcaceae* 科細菌); 8-10, クローン (*Syntrophaceae* 科細菌)。赤枠内の主要バンドを切り出し、シーケンス解析した結果、*Syntrophomonadaceae* 科に関連づけられた。

### (3) メタゲノム解析

アルカン分解に関与するとされる *Syntrophaceae* 科細菌とは異なり、我々が取得したアルカン分解メタン生成培養系で優占化した未培養 *Peptococcaceae* 科細菌に関する情報は殆どなく、その生化学性状に関する情報は皆無であった。この細菌は培養系内の細菌 16S rRNA 遺伝子が大半を占めたことから、メタゲノム解析を行いその機能の推定を試みた。メタゲノム解析を開始して間もなく、データベース上に同じくメタゲノム情報として *Peptococcaceae* SCADC\_1\_2\_3 が公開された。これはカナダの oil sand tailing ponds から集積培養されたもので、その 16S rRNA 遺伝子は我々の取得した未培養 *Peptococcaceae* 科細菌と非常に高い相同性を有していた。そこで、このメタゲノム情報をテンプレートに用いて、未培養 *Peptococcaceae* 科細菌のゲノム配列の de novo 合成を試みた。

その結果、コンティグ数 113, 全塩基数約  $2.4 \times 10^6$ , 推定遺伝子数 2,467 のメタゲノム情報が取得できた。推定遺伝子を KAAS (Moriya et al, 2007) に供し、その代謝経路を推定した。いくつかの推定代謝経路の中でも、嫌氣的トルエン代謝経路とホモ酢酸生成経路 (Acetyl CoA/CODH 経路) に注目した。未培養 *Peptococcaceae* 科細菌には嫌氣的トルエン代謝経路に必須である Benzylsuccinate synthase 遺伝子が存在し、この遺伝子は嫌氣的アルカン分解に関与する Alkylsuccinate synthase 遺伝子と高い相同性を有し、この細菌のアルカン分解への寄与が推定される。また、ホモ酢酸生成経路に関連する遺伝子が殆ど見つかったことから、アルカン分解で生じた還元力を酢酸生成に利用することが推定でき、培養系内に酢酸資化性メタン生成アーキアが多く検出されたこととも合致する。

これまでに得られた結果から、単純化したアルカン（オクタン）からの電子の流れを推定した（図 4）。

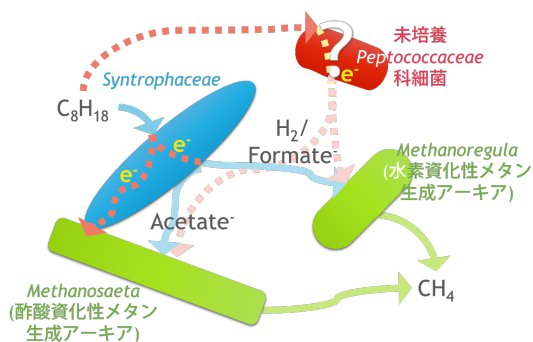


図 4. オクタンを基質としたアルカン分解メタン生成機構の推定図。

オクタン ( $C_8H_{18}$ ) を *Syntrophaceae* 科細菌と未培養 *Peptococcaceae* 科細菌が分解し、そこで生じた還元力 ( $e^-$ ) を水素 ( $H_2$ ) やギ酸 (Formate), または酢酸 (Acetate) の形で放出し、それらを水素資化性メタン生成アーキア (*Methanoregula* 属) や酢酸資化性メタン生成アーキア (*Methanosaela* 属) が利用してメタンが生じていると推定された。しかしながら、両細菌ともに分離されておらず、またそのゲノム情報も完全なものではなく、嫌氣的アルカン (トルエン) 分解経路やホモ酢酸生成経路のいくつかの遺伝子が未検出である。よって、詳細なアルカン分解メタン生成機構の確立にはこれらのアルカン分解細菌の分離培養 (または高度集積培養系の確立) が不可欠である。

(4) 水素利用性メタン生成アーキアの低濃度水素利用試験

好温性水素資化性メタン生成アーキア 2 株 (*Methanothermobacter* 属  $\Delta H$  株と RMA5 株) の水素資化速度パラメーターと、メタン発酵による ATP 生産効率の指標  $\Delta G_c$  を解析した (表 1)。

表 1. 水素利用能の速度論解析と熱力学的解析結果

	$\Delta H$ 株	RMA5 株
$V_{max}$ ( $Pa \cdot h^{-1}$ )	$1,570 \pm 562$	$1,100 \pm 247$
$K_m$ (Pa)	$35,000 \pm 21,000$	$25,000 \pm 11,300$
利用可能水素濃度 (Pa)	$29 \pm 8$	$6 \pm 1$
$\Delta G_c$ ( $kJ \cdot mol^{-1}$ )	$-22.9 \pm 3.88$	$-1.29 \pm 4.29$

両菌株において、水素親和性および最大水素資化速度には有意差はなかったものの、利用可能水素濃度 (下限) に有意差が見られた。これから算出される  $\Delta G_c$  において、RMA5 株の数値はより 0 に近く、ATP 生産に必要なエネルギーがより少なくて済むと考えられる。これは低水素濃度環境においては有利に働くと考えられ、ATP 生産効率の差が水素資化性メタン生成アーキアの優占化に寄与する可

能性が示唆された。

(5) 総括

アルカン分解メタン生成培養系の構築に成功し、その微生物群集構造を解明した。細菌群集中最優占種であった未培養 *Peptococcaceae* 科細菌の機能は現時点で未知であるが、メタゲノム解析からアルカン分解に寄与する可能性が示唆された。また、同様に *Syntrophaceae* 科細菌も多く存在し、これら 2 種の細菌のアルカン分解への寄与が考えられた。

アルカン分解や原油分解における低水素濃度環境における水素資化性メタン生成アーキアのニッチ獲得機構のひとつとして、水素利用能の熱力学的解析 ( $\Delta G_c$ ) から説明できることが示された。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Kohei Nakamura, Naoya Shinzato, Seikoh Saitoh, Hiroaki Aoyama, Kazuhiro Takamizawa. Analysis on alkane-oxidizing methanogenic community from a production water of an oil seep in Japan. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014). 2014 年 07 月 30 日 ~ 2014 年 07 月 30 日. モントリオール(カナダ)

Kohei Nakamura, Naoya Shinzato, Seikoh Saitoh, Hiroaki Aoyama, Kazuhiro. Analysis on Alkane-oxidizing Methanogenic Community from a Production Water of an Oil Indication in Japan. 4th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems. 2013 年 08 月 24 日 ~ 2013 年 08 月 29 日. リオデジネイロ (ブラジル) Takamizawa

[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

中村 浩平 (NAKAMURA, KOHEI)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40456538