

地下微生物の メタン生成ポテンシャルを評価する技術

坂田 将¹⁾

1. はじめに

地下微生物は堆積物や堆積岩中の有機物を嫌氣的に分解して、二酸化炭素とともにメタンを生成する。このプロセスは天然ガス資源の形成に重要な役割を果たしている。世界の天然ガス資源の少なくとも2割は地下微生物が生成したものと考えられており、国産天然ガスの約18%を占める水溶性天然ガス、将来の資源化が期待される南海トラフの海底ガスハイドレートも微生物起源である。このような天然ガス資源の探鉱、開発を効率的に進めるためには、地下微生物のメタン生成ポテンシャルを理解することが必要である。地圏微生物研究グループ（以下、当グループと略記）では部門重点研究課題「燃料資源に関する評価技術の開発」に取り組むため、国内の油ガス田や海洋メタンハイドレート賦存域を対象として、地下微生物のメタン生成ポテンシャルを評価する研究を進めてきた。その結果、メタンを生成する微生物であるメタン生成菌（メタン生成アーキア）がこれらの地下環境に広く分布し、メタン生成活性を有することを見出してきた。本講演では、当グループがこれまで適用してきたメタン生成ポテンシャルの評価技術について、概要を紹介する。

2. メタン生成ポテンシャルの評価技術

メタン生成ポテンシャルを評価する技術は多様でそれぞれ特徴があり、得られる情報も異なるため、相補的な関係にある。区分としては、培養する／しないというアプローチによって、培養依存的評価技術と培養非依存的評価技術に二分することができる。

2.1. 培養依存的評価技術

新地下微生物のメタン生成ポテンシャルを評価する直接的な方法は培養である。培養依存的評価技術は、地下から採取される試料を嫌気条件で容器内に密閉してから、恒温装置で原位置の温度に保ち、ヘッドスペースのメタン濃度のモニタリングによって、メタン生成量（積算量）や生成速度を測定する方法である。

2.1.1. 集積培養

他の環境と同じように、地下環境においても、メタンを生成する微生物はメタン生成菌であり、限られた化合物（ $H_2 + CO_2$ 、酢酸、メタノール、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミンなど）を基質として利用する。集積培養は、地下から採取した堆積物や地層水等の試料に基質を過剰に添加して、メタン生成を経時的にモニタリングする方法である。メタン生成が検出されれば、その基質を利用するメタン生成菌が試料中に生息していたことがわかる。また添加した基質とメタンの生成量を比較することによってメタンの収率が計算され、メタン生成ポテンシャルの指標となる。これまで当グループでは水溶性ガス田のかん水の集積培養を行い、高い収率を得ている（Katayama *et al.*, 2015；Mochimaru *et al.*, 2007a, 2007b）。メタンの収率が低い場合、基質供給以外の規制要因が示唆され、ミネラル、ビタミン等の添加で収率の変化を調べることによってその詳細を調べることも可能である。このような情報は、バイオスティミュレーションによって天然ガスを増産する資源技術の可能性を判断する手がかりとなる。集積培養は実際の地下の環境よりも過剰な基質を添加するため、必ずしも原位置メタン生成プロセスを再現するものではない点を留意する必要がある。集積培養は基質を利用できる微生物を環境から分離する方法でもある。地下環境からメタン生成菌を分離して、その進化系統や生態を明ら

1) 産総研 地質調査総合センター地圏資源環境研究部門

キーワード：地下微生物、天然ガス、メタン生成、メタン生成菌、環境模擬培養、トレーサー、核酸分析、脂質バイオマーカー

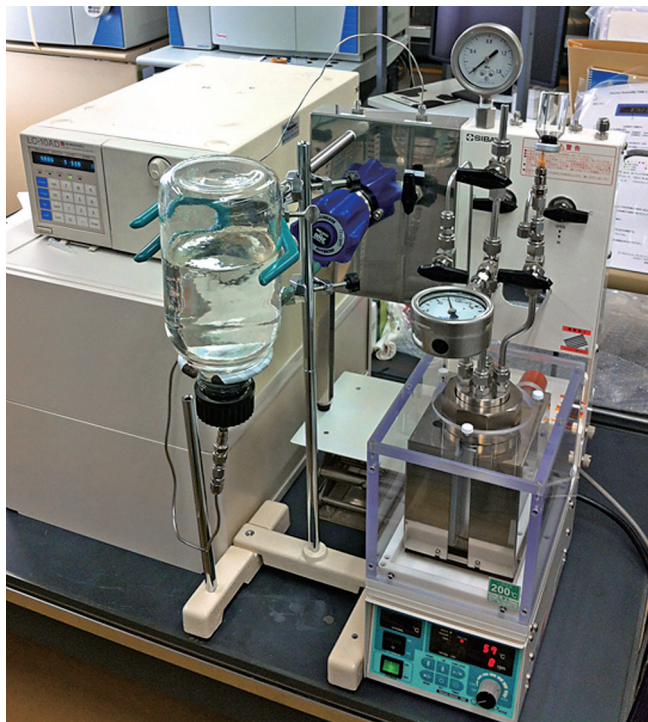
この原稿は地圏資源環境研究部門が発行した「GREEN Report 2015」より転載したものです。

かにすることも、天然ガス資源の成因解明のための有効なアプローチである。これまで当グループでは、水溶性ガス田のかん水から新種のメチル資化性メタン生成菌を2種分離している (Katayama *et al.*, 2014; Mochimaru *et al.*, 2009)。

2.1.2. 環境模擬培養

天然ガス資源の成因解明や効率的開発のためには、地下微生物の原位置でのメタン生成ポテンシャルを評価することが必要である。そのため、当グループでは地下から採取したかん水、堆積物、原油等を用いてマイクロコズムを構築し、メタン生成を経時的にモニターする実験を行っている。深部の地下環境は温度に加え圧力も高い。その環境を模擬する場合、恒温槽で加熱するほか、耐圧容器に試料を入れて、ヘッドスペースに不活性ガスを充填するかポンプで水を圧入することによって加圧する (第1図)。地下環境において、微生物は主に砂や粘土の粒子の隙間に生息している。この孔隙環境を模擬するために、粒度を調整した砂をマイクロコズムに加えることも試みている。

これまで当グループでは、常圧で水溶性ガス田の堆積物 (Yoshioka *et al.*, 2015)、メタンハイドレート分布域の海底堆積物 (Yoshioka *et al.*, 2010)、高圧条件で油田かん水 (Mayumi *et al.*, 2011, 2013) のメタン生成ポテンシャルを評価している。特に水溶性ガス田の堆積物のメタン生



第1図 当研究グループで構築した高静水圧培養システム。砂を充填して孔隙環境を模擬することもできる。

成ポテンシャルが大きく、最大で堆積物中の全有機炭素の18%に相当するメタン生成を観察している (Yoshioka *et al.*, 2015)。

2.1.3. ^{14}C -トレーサー添加培養

環境模擬培養では、基質や栄養塩を添加しないため、メタン生成が遅く、培養が長期にわたることが多い。実験室で地下の環境を完全に模擬することは不可能であり、培養期間が長くなることは、原位置のメタン生成ポテンシャルを評価する上で好ましくない。

^{14}C -トレーサー添加培養は、この問題を解消するために短時間の培養でメタン生成ポテンシャルを評価する方法である。 $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ または $^{14}\text{CH}_3\text{COO}^-$ を測定試料に添加して、比較的短期間 (通常、数日から2週間)、検体ごとに異なる期間培養したのち、水酸化ナトリウム水溶液を含むバイアル中に封入して培養を停止する。ヘッドスペース中のメタンを CO_2 に変換してアミン溶液にトラップし、液体シンチレーションカウンターで放射能を検出する。最初に基質として添加した ^{14}C が単位時間あたり $^{14}\text{CH}_4$ に変換される割合を求め、これに試料中の基質濃度を乗じることで、この基質からのメタン生成速度を計算できる。 ^{14}C -トレーサー法は、添加する基質が極微量であり、環境模擬ながらも短期間の培養で評価可能なため、原位置のメタン生成ポテンシャルを推定する方法として優れている。しかも添加する基質ごと、つまり CO_2 還元と酢酸分解の経路ごとのメタン生成ポテンシャルを評価できる。

これまで当グループでは、水溶性ガス田の堆積物 (Yoshioka *et al.*, 2015) とかん水 (Katayama *et al.*, 2015)、油田かん水 (Mayumi *et al.*, 2011)、メタンハイドレート分布域の海底堆積物 (Yoshioka *et al.*, 2009, 2010) のメタン生成ポテンシャルを評価しており、海底堆積物では深部メタンハイドレート濃集帯でメタン生成活性が高い傾向を見出している (Yoshioka *et al.*, 2009, 2010)。

2.2. 培養非依存的評価技術

培養に依らず、メタン生成菌のマーカとなる分子を同定・定量することによってメタン生成ポテンシャルを評価することが可能である。対象となる分子は、核酸、脂質、補酵素などである。

2.2.1. 核酸 (DNA, RNA) 分析

核酸によるメタン生成ポテンシャルを評価する方法としては、DNAの塩基配列の解読によってメタン生成菌の系統解析・優占度を評価するシーケンス解析と、(特定の)

メタン生成菌の塩基配列を計数するリアルタイム PCR が挙げられる。

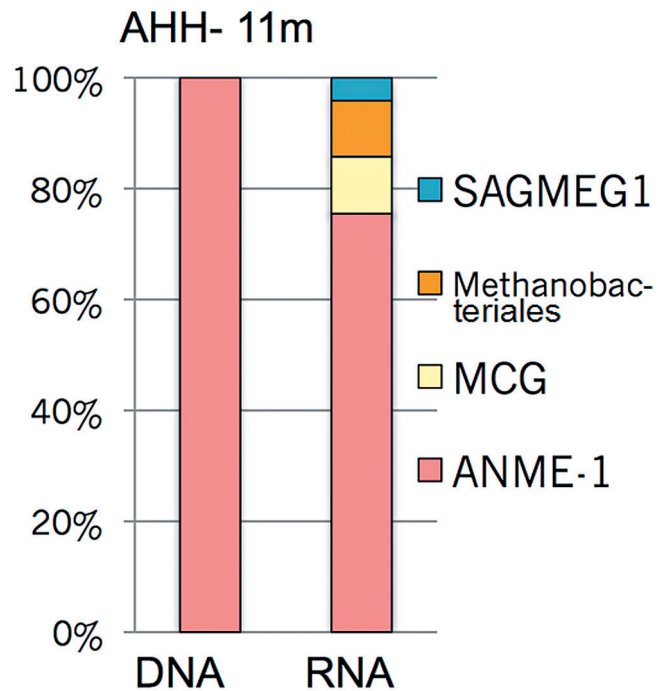
シーケンス解析では、16S rRNA 遺伝子と *mcrA* 遺伝子が対象となる。16S rRNA 遺伝子は原核生物全般の進化系統を解析するために有効である。一方 *mcrA* 遺伝子はメタンの代謝に関係するメチル補酵素 M 還元酵素の α サブユニットを符号化したものであり、メタン生成菌と嫌氣的メタン酸化古細菌 (ANME) の系統分類に有効である。これまで当グループでは、水溶性ガス田のかん水 (Katayama *et al.*, 2015 ; Mochimaru *et al.*, 2007a, 2007b), 油田かん水 (Mayumi *et al.*, 2011, 2013) の 16S rRNA 遺伝子、メタンハイドレート分布域の海底堆積物 (Yoshioka *et al.*, 2010) の *mcrA* 遺伝子のシーケンス解析を行っている。

リアルタイム PCR は、特定の塩基配列を有する DNA を対象としてポリメラーゼ連鎖反応による増幅を経時的に測定し、レファレンスと比較することで初期のコピー数を計測する方法である。当グループでは、八橋油田のかん水中の全アーキアとメタン生成菌 (メタノバクテリウム目、メタノミクロビウム目、メタノサルシナ目) を定量し、メタノバクテリウム目が優占していることを明らかにしている (Mayumi *et al.*, 2011, 2013)。

DNA は地下環境において長期間保存される可能性があり、原位置の地下微生物の情報を反映するか、必ずしも明らかではない。この問題を検討するために、DNA より不安定で寿命が短い RNA の塩基配列を解読することが試みられている。RNA は DNA からタンパク質が作られる際に、DNA を鋳型として合成 (転写) される。そのため、RNA の塩基配列を解読すれば、生息している生物の存在とともに、その機能 (代謝) に関する情報が得られる。RNA の塩基配列は、逆転写によって DNA に変換してその塩基配列を解読することによる。当グループでは RNA ベースのシーケンス解析で陸域地下堆積物 (沖積層) 中のメタン生成菌や ANME の生存を実証している (Takeuchi *et al.*, 2011 ; 第 2 図)。

2.2.2. 脂質バイオマーカー分析

メタン生成菌に特徴的な脂質バイオマーカーを分析することによってメタン生成ポテンシャルを評価することが可能であり、アーキオール、ヒドロキシアーキオール (HA)、カルドアーキオール、2, 6, 10, 15, 19-ペンタメチルイコサンなどが対象とされている。脂質は溶媒抽出、誘導体化、ガスクロ分析という手順で測定され、PCR による増幅を行う核酸の測定に比べて定量分析の精度が高い。一方、メタン生成菌に対する特異性が脂質成分によって異なっており、メタン生成菌以外の微生物にも由来する可能性や、

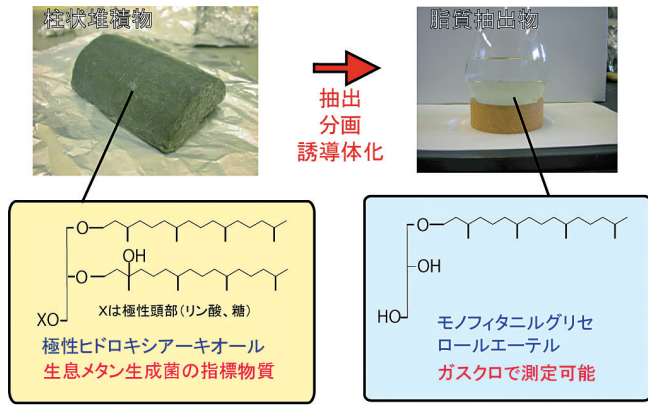


第 2 図 DNA ベースと RNA ベースのシーケンス解析による沖積層コア試料 (深度 11m, 海成粘土層) 中のアーキアの群集構造。

一部のメタン生成菌にしか由来しない可能性を考慮する必要がある。例えばアーキオールやカルドアーキオールはメタン生成菌以外の多様な古細菌も作る一方、HA はメタノサルシナ目とメタノコッカス目に属するメタン生成菌に限定される。また ANME はメタン生成菌と共通の脂質成分を作ることが知られており、炭素同位体比を測定することなどによって識別することが必要となる。核酸と同様、脂質の寿命 (安定性) も地下微生物のメタン生成ポテンシャルを評価する上で重要である。当グループでは極性頭部が脱離しやすくコア脂質が分解しやすいという理由から、極性 HA が原位置のメタン生成菌の指標として有効と考え、これをモノフィタニルグリセロールエーテルに変換 (第 3 図) して GC で分析する方法を確立するとともに、東部南海トラフの海底堆積物中の同成分を測定し、メタン生成菌の深度分布を評価している (Oba *et al.*, 2006, 2015)。

2.2.3. 補酵素 (F₄₃₀) 分析

すべてのメタン生成菌はメチル補酵素 M 還元酵素を有しており、他の微生物でこれを有するのは ANME に限定される。補酵素 F₄₃₀ はこの酵素の活性部位であり、テトラピロール環の中心にニッケルを含む有機金属化合物である。近年、LC-MS/MS による分析法の開発によって、 0.1×10^{-15} mol (fmol) の F₄₃₀ を定量することが可能となった (Kaneko *et al.*, 2014)。これは 10^2 - 10^4 細胞 (メタン生成菌) に相当する。実際、八戸沖海底掘削で海底下 2,500 m の



第3図 極性ヒドロキシアキオールからモノフィタニルグリセロールエステルへ変換。

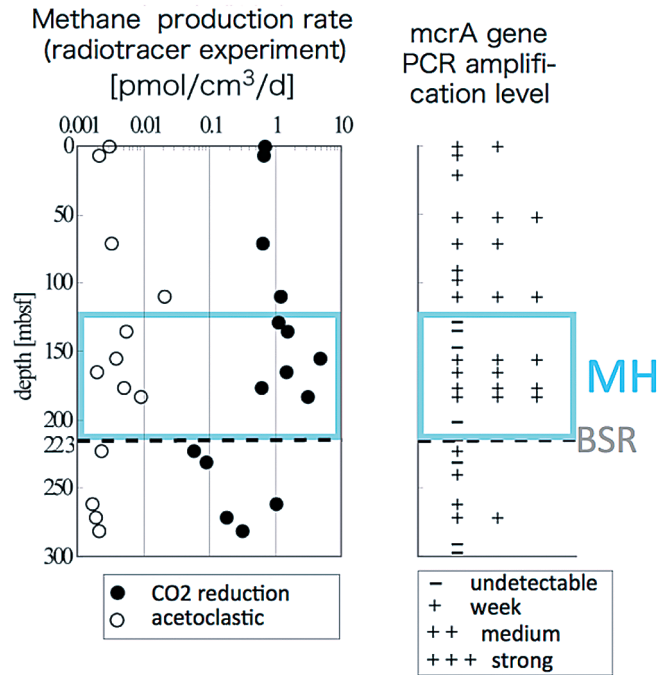
堆積物から F₄₃₀ が検出されている (Inagaki *et al.*, 2015)。メタン生成菌マーカーとしての普遍性と特異性において上記の脂質バイオマーカーより優れており、定量性において上記の mcrA 遺伝子より優れていると期待される。

2.3. 培養依存的・非依存的評価技術の融合

培養による方法は、現在試料中に生息するメタン生成菌のシグナルである一方、地下の環境を完全に模擬することは不可能であり、培養によるバイアスを避けることは困難である。一方、培養非依存的評価技術は、地下試料をそのまま分析するので、その場の情報が直接得られる一方、死んだメタン生成菌や他の菌のシグナルも拾っている可能性がある。このように、培養依存的評価技術と非依存的評価技術は、メタン生成ポテンシャルに関して異なる情報を提供するもので、相補的である、両者を組み合わせることによってより信頼性の高い評価を行えるものと期待される。

例えば、メタンハイドレートが分布するカスカディア縁辺域の海底コア試料について、メタン生成ポテンシャルの深度分布を培養依存的評価技術 (¹⁴C-トレーサー法) と非依存的評価技術 (mcrA 遺伝子) を適用した結果、整合的なデータが得られている (第4図)。

油田の地下微生物のメタン生成ポテンシャルに関しても、かん水と原油を用いた油層環境を模擬する培養実験によって、メタン生成ポテンシャルを見出すとともに、CO₂分圧によって優占するメタン生成菌の基質利用性が変化することをリアルタイム PCR 法によって見出し、CO₂分圧の高い条件で酢酸からのメタン生成速度が高くなる原因を解明した (Mayumi *et al.*, 2013)。この発見は枯渇油田を対象とした CCS と天然ガス再生の両立の可能性を示す技



第4図 カスカディア縁辺域の海底堆積物のメタン生成速度と mcrA 遺伝子増幅度。

術シーズとして注目されている。水溶性ガス田のマイクロコズム (堆積物コア+かん水) の実験でも、大きなメタン生成ポテンシャルを見出したが、培養後に優占しているメタン生成菌 (酢酸資化性) がもともとかん水に優占しているもの (水素資化性) と相違しており、培養で生成したメタンの炭素同位体比が実際の天然ガス中のメタンの値と異なる理由が合理的に説明された (Yoshioka *et al.*, 2015)。このように、地下微生物のメタン生成ポテンシャルを評価する技術は多様で、それを融合することによって現象の解明が進展し、資源評価や効率的な資源開発に有用な情報を獲得することができる。

文 献

Inagaki, F., Kaneko, M., *et al.* (2015) Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~ 2.5 km below the ocean floor. *Science*, **349**, 420-424.

Kaneko, M., *et al.* (2014) Quantitative analysis of coenzyme F₄₃₀ in environmental samples: a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Analytical Chemistry*, **86**, 3633-3638.

Katayama, T., Yoshioka, H., Sakata, S., *et al.* (2015) Physicochemical impacts associated with natural

- gas development on methanogenesis in deep sand aquifers. *The ISME Journal*, **9**, 436–446.
- Katayama, T., Yoshioka, H., Mochimaru, Y., Sakata, S., *et al.* (2014) Methanohalophilus levihalodurans sp. nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the genus Methanohalophilus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 2089–2093.
- Mayumi, D., Mochimaru, H., Yoshioka, H., Sakata, S., Takeuchi, M., *et al.* (2011) Evidence for syntrophic acetate oxidation coupled to hydrogenotrophic methanogenesis in the high-temperature petroleum reservoir of Yabase oil field (Japan). *Environmental Microbiology*, **13**, 1995–2006.
- Mayumi, D., Sakata, S., Takeuchi, M., *et al.* (2013) Carbon dioxide concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoirs. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/ncomms2998.
- Mochimaru, H., Yoshioka, H., Sakata, S., *et al.* (2007a) Microbial diversity and methanogenic potential in high temperature natural gas associated water in Japan. *Extremophiles*, **11**, 453–461.
- Mochimaru, H., Yoshioka, H., *et al.* (2007b) Methanogen diversity in deep subsurface gas-associated water at the Minami-Kanto gas field in Japan. *Geomicrobiology Journal*, **24**, 93–100.
- Mochimaru, H., Sakata, S., *et al.* (2009) Methanobrevibacterium profundum sp. nov., a new methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, 714–718.
- Oba, M., Sakata, S. and Tsunogai, U. (2006) Polar and neutral isopranyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry*, **37**, 1643–1654.
- Oba, M., Sakata, S. and Fujii, T. (2015) Archaeal polar lipids in deep marine sediments from the Nankai Trough. Archaeal polar lipids in subseafloor sediments from the Nankai Trough: Implications for the distribution of methanogens in the deep marine subsurface. *Organic Geochemistry*, **78**, 153–160.
- Takeuchi, M., Yoshioka, H., Mayumi, D., Sakata, S., *et al.* (2011) A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan. *Environmental Microbiology*, **13**, 3206–3218.
- Yoshioka, H., Sakata, S., *et al.* (2009) Microbial methane production rates in gas hydrate-bearing sediments from the eastern Nankai Trough, off central Japan. *Geochemical Journal*, **43**, 315–321.
- Yoshioka, H., Sakata, S., *et al.* (2010) Activities and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin. *Geobiology*, **8**, 223–233.
- Yoshioka, H., Mochimaru, H., Sakata, S., *et al.* (2015) Methane production potential of subsurface microbes in Pleistocene sediments from a natural gas field of the dissolved-in-water type, central Japan. *Chemical Geology*, **419**, 92–101.
-
- SAKATA Susumu (2016) Technologies to assess the methane production potential of subsurface microbes.
-

(受付：2016年3月3日)