

地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明

—地球科学と生命科学の融合で創成される革新的資源技術への道標—

坂田 将

深部地下環境におけるメタン生成プロセスの詳細、すなわち反応経路と関与微生物は不明である。この問題への効果的対応は、メタン生成ポテンシャルの高い地下水/堆積物試料を用いた培養実験と、そこで獲得される集積培養系へのメタゲノム、メタトランスクリプトーム、メタボローム解析、および安定同位体トレーサー実験の適用によって可能となる。メタン生成プロセスの解明は、枯渇油田に残留する原油の天然ガス変換・エネルギー増進回収等の革新的資源技術の開発に必要な基盤的情報を提供する。

キーワード: 地圏微生物、メタン生成プロセス、天然ガス、革新的資源開発、地球科学、生命科学、融合研究

Elucidation of methanogenic processes by subsurface microorganisms

—A milestone to innovative resource technology created by the integration of earth and life sciences—

SAKATA Susumu

Details of the methanogenic processes in deep subsurface environments, i.e., reaction pathways and responsible microorganisms are unclear. This issue can be effectively addressed by incubation experiments using subsurface water/sediment samples with high methanogenic potential, followed by subjecting the obtained enrichment culture to the analyses of metagenome, metatranscriptome, and metabolome as well as stable isotope tracer experiments. Elucidation of the methanogenic processes provides basic information required to develop innovative resource technologies such as bio-conversion of residual crude oil in a depleted oil field to natural gas for enhanced energy recovery.

Keywords: Subsurface microorganism, methanogenic process, natural gas, innovative resource development, earth science, life science, interdisciplinary research

1 はじめに

深部地下圏の微生物、すなわち地圏微生物の存在が最初に示唆されたのは1920年代で、シカゴ大学の地質学者が微生物学者の協力を得て硫化水素を含む油田の水を培養した結果、硫酸還元菌を見いだしたことに端を発する^[1]。その後、地圏微生物の存在に関し、地上からの汚染の可能性が疑われる状況が長く続いたが、コアと掘削流体の接触を極力少なくすることによって地表からの汚染リスクを低くする方法や、掘削流体にトレーサーを加えてコア内部への汚染の有無を判定する方法が用いられるようになり、油ガス田・鉱山の開発や国際海洋 (IODP)・陸上科学掘削計画 (ICDP) で得られる地下試料の培養や分析によって、地圏微生物の存在が証明されるに至った^[2]。地圏微生物の分布は陸上の地下 5,000 m、海底下 2,000 m にまで及んでおり、その細胞密度 (1 cm³ あたりの細胞数) が

深度の増加とともに減少する傾向や、堆積速度に依存する傾向が示されている^{[3][4]}。遺伝子情報から推定される地圏微生物の多様性は地球表層の生物多様性にも匹敵し、アーキア、バクテリア、ユーカリアのすべてのドメインに渡っている。またそのバイオマスは地球全体のバイオマスの13%を占め、特にアーキアとバクテリアが多く、地球上の全原核生物バイオマスの90%を占めると見積られている^[5]。地圏微生物の多くは未培養でその機能が未知であるものの、メタンの生成・消費等のグローバルな炭素循環において重要な役割を果たしていると予想される。例えば、地球上最大のメタンリザーバーであるメタンハイドレートは主に微生物起源であり地圏微生物の代謝産物であることが知られている^[6]。産業技術総合研究所では、地球科学と生命科学の分野融合研究課題「地圏・海洋における微生物のメタン生成・消費プロセスの解明」が2004-2006年の内部グラン

産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 〒305-8567 つくば市東 1-1-1 つくば中央第7
Institute for Geo-Resources and Environment, AIST 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8567, Japan E-mail: su-sakata@aist.go.jp

Original manuscript received August 18, 2020, Revisions received December 1, 2020, Accepted December 24, 2020

トによる研究プロジェクトとして実施された。また 2007 年には地圏微生物のポテンシャルを資源開発や環境保全に活用する研究を推進するために、地圏資源環境研究部門内に地圏微生物研究グループ (以下、当グループと略記) が創設された。その後も、産総研戦略予算、科研費、JOGMEC 受託研究費、民間企業共同研究費による多くの研究プロジェクトが実施され、生物プロセス研究部門と共同で、地圏微生物によるメタン生成プロセスを解明し天然ガス資源の成因解明や効率的開発に資する研究が推進されてきた。この論文では当グループにおける研究戦略とこれまでの研究成果について紹介する。

2 地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明: 背景と目的

2.1 背景 (メタン生成プロセスの概要)

光のない環境において、地圏微生物は酸化還元 (電子の授受) によって発生する化学エネルギーを利用して生きる^[7]。エネルギー源となる電子供与体としては、岩石破碎や蛇紋岩化作用のように岩石と水の反応で生成する水素が利用される場合もあるが^{[8][9]}、より一般的には堆積物とともに地球表層から地下に供給された有機物が利用される^{[7][10]}。地圏微生物がアクセス可能な有機物は、若い堆積物に含まれる新鮮な有機物 (アミノ酸、糖、リグニン、脂質等) から古い堆積物中の化石有機物 (ケロジェンや石炭) やその熱分解産物 (ピチュメンや原油) に至るまで多様である。微生物は利用・分解しやすい (得られるエネルギーが大きい) 新鮮な有機物を先に利用・消費した後、残った化石有機物を利用する。電子受容体としては、最初に酸素ガスが好気微生物によって利用され、続いて硝酸、マンガン (IV)、鉄 (III)、硫酸がそれぞれの還元菌によって順次利用される。そしてこれらがすべて消費され尽くされると、最後に二酸化炭素が電子受容体としてメタン生成菌によって利用されメタンが生成される^[7]。有機物が電子供与体として利用される (酸化される) 際に二酸化炭素が過剰に生成されるため、電子受容体としての二酸化炭素が消費され尽くされることはない。したがって、二酸化炭素以外の電子受容体が消費された時点で、電子供与体として残っている有機物の量と質 (利用しやすさ) がメタン生成量やメタン生成速度を支配する要因と考えられる。なおメタン生成菌には水素 + 二酸化炭素をメタンに変換するもの以外に、酢酸やメチル化合物 (メタノール、メチルアミン類、硫化ジメチル等) をメタンに変換するものがある。酢酸を利用する菌はメチルとカルボニルを開裂してカルボニル基を電子供与体 (二酸化炭素に酸化) に、メチル基を電子受容体 (メタンに還元) に用いる。メチル化合物を利用する菌は不均化反応により 4 モルのメ

チル基のうちの 1 モルを電子供与体に、3 モルを電子受容体に用いる。また酢酸は他の微生物も利用 (メタン生成菌と競合) するので、例えば硫酸イオンがある環境ではメタン生成菌ではなく硫酸還元菌が利用する一方、メタノール、トリメチルアミン、硫化ジメチルは硫酸還元菌と競合せずメタン生成菌が利用できることが知られている^[11]。

有機物を電子供与体としてメタンが生成されるというプロセスは、湖沼や水田、ルーメンやシロアリ後腸等、さまざまな環境におけるメタン生成に共通するものであり、地下圏に特有ではない。例えばメタン発酵槽の微生物によるメタン生成プロセス^[12]では、まず①加水分解菌が細胞外酵素を用いてタンパク質、炭水化物、脂質等の高分子有機物を分解し、次に②発酵菌が生成する糖、アミノ酸、高級脂肪酸・アルコールを分解し、さらに③嫌気共生菌 (水素生成型酢酸生成細菌) が生成する低分子有機物 (低級脂肪酸、乳酸、エタノール等) をメタン生成菌の基質 (水素 + 二酸化炭素、ギ酸、酢酸、メタノール等のメチル化合物) にまで分解する (図 1 左)。メタン生成経路の相対的な比率は、一般に酢酸利用が約 70 %、水素利用が約 30 %とされている^[12]。地下圏におけるメタン生成も同様に、現場の高分子有機物であるケロジェンや石炭、あるいはその熱分解産物である原油やピチュメンが、加水分解菌や発酵菌、共生菌によってメタン生成菌の基質に分解されると推測される (図 1 右)^[13]。しかし、その反応経路や生成する代謝中間体、およびそのプロセスを担う微生物の実態に関する情報が極めて少ない。例えば、嫌氣的にケロジェンや石炭等の高分子 (ジオポリマー) が分解されるプロセス (細胞外酵素、反応経路、関与微生物等) は不明である^[13]。また、3 つのメタン生成経路の相対的な重要性に関しても、主にメタンの炭素・水素同位体比等の地球化学的評価法^[14]に基づいて、水素利用が最も重要と推定されている一方、酢酸利用・メチル化合物利用経路の相対的な重要性に関しては明らかにされていない^[10]。

2.2 メタン生成プロセス解明の目的

地圏微生物によるメタン生成は、比較的低温 (60 °C 以下) の条件で地下圏の有機物が分解される際の主要なプロセスであり、地球システムにおける炭素循環やメタンの収支を理解するためにこのプロセスを解明することが不可欠である。また地圏微生物が生成するメタンは天然ガス資源としても重要である。現在世界で、資源として生産されている天然ガスの約 20 % は微生物起源と推定されており^{[15][16]}、関東平野・新潟平野等の地下帯水層に胚胎する水溶性天然ガスも主に微生物起源である^[17]。さらに、地球システムにおける最大のメタンリザーバーであり、将来のエネルギー資源として注目されているメタンハイドレートも主に微生物

起源である^[6]。このような天然ガス資源のポテンシャル評価や探鉱技術の開発・高度化のために、地圏微生物のメタン生成プロセスを解明することが必要である。

油ガス田の地下に生息する微生物のメタン生成活動を人為的に促進することができれば、天然ガスの資源量を増大させることが可能となる。もともと地圏微生物のメタン生成速度は遅く、油ガス田の天然ガスは数万年から数百万年に渡って微生物が生成したメタンが蓄積したものと考えられている。メタン生成プロセスの解明によって、律速となっている反応、およびその担い手である微生物が特定され、その生理学的・生態学的特徴が明らかになれば、その微生物の機能を活性化しメタン生成速度を高める技術開発への道が拓かれる。メタン生成プロセスに関与している微生物の生育に必要な栄養物質が不足しているとわかれば、それを添加することによって促進することが可能になる。メタン生成速度を飛躍的に高め、天然ガス資源の増大に繋げる革新的資源技術を開発するために、メタン生成プロセスの解明を進める必要がある。

3 地圏微生物によるメタン生成プロセスの多様性

3.1 メタン生成環境の多様性

地下圏の環境は深度に応じて温度が変化し、地圏微生物の活動に大きな影響を与える。例えば温度に関して、海底熱水噴出孔においてマグマ起源の水素を利用する超好熱性メタン生成菌が122℃で生育可能である一方^[18]、有機物を分解するバクテリア・アーキアの多くはそのような高温で生息することが困難である。実際、石油貯留層に棲息

する微生物による原油分解メタン生成活動は、原油の生分解(炭化水素成分の選択的消失)の観察結果から、50℃以上で温度の上昇とともに減少し80℃で停止すると推定されている^[19]。

地圏微生物の活動は原位置の水である地層水の水質、例えばpH、酸化還元電位、塩分濃度等に大きく影響される。地層水は古海水、天水、マグマ水等異なる割合で混合したものであり、古海水起源であれば塩分濃度が高く、天水起源であれば酸化還元電位が高い等、水の起源が水質と深い関わりを有する。当グループでは、関東平野の帯水層や完新世泥質堆積物に関する研究を通じて、地圏微生物のメタン生成活性が地層水の流動や天水の侵入によって影響を受ける事例を報告している^{[20][21]}。

地圏微生物が棲息する空間である孔隙や孔隙口(pore throat)のサイズもメタン生成環境の重要な因子である。地層の埋没に伴ってこれらが縮小するため、地圏微生物の活動が制約される。具体的には、孔隙が小さくなって細胞の移動が抑制され、さらに細胞のパンクや細胞膜の引張疲労をもたらすこと、浸透率が低下して栄養物質や代謝産物のキャリアーである水の流れが途絶えること等が想定されている^{[22][23]}。同じ深度であれば粒径が小さいほど孔隙が小さくなるため、砂岩の方が泥質岩より微生物が棲息しやすい。その反面、エネルギー源となる有機物は泥質岩の方が大きい。このため、砂と泥の互層における微生物の活性は、砂層の中で有機物へのアクセスが有利な泥層との境界部分で高い傾向が見いだされている^[24]。

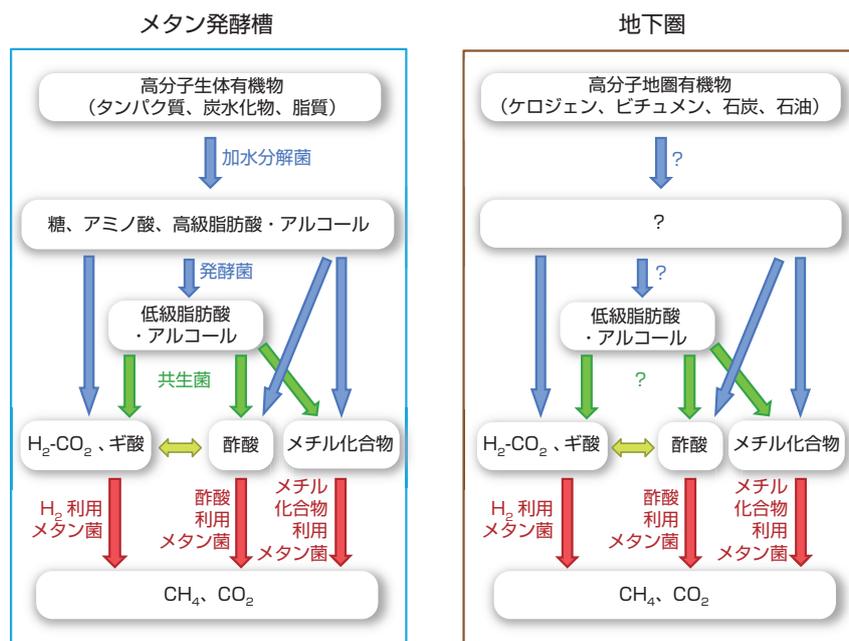


図1 メタン発酵槽と地下圏におけるメタン生成プロセス

3.2 根源有機物の多様性

地圏微生物がメタン生成に利用する根源有機物としては、堆積物中に広く分散して存在するケロジェン（有機溶媒に不溶）やピチュメン（可溶）と、それらが濃集した状態で偏在する石炭や石油等がある。これらの有機物の起源は、過去に海洋・湖沼に棲息していた動植物プランクトンや陸上で棲息していた高等植物であり、その起源によって有機物の質的な違いが生じる^[25]。例えばケロジェンは、主に高等植物起源でリグニン由来の芳香族骨格と酸素に富むタイプ III、主に藻類起源で脂肪族構造が多いタイプ I、両者の中間であるタイプ II に区分される。石炭も等しく多様で、タイプ I ケロジェンと同様に藻類起源の有機物に富むもの（ボグヘッド炭）も知られているが、多くの場合、陸上高等植物起源の有機物に富んでおり、タイプ III ケロジェンと類似している。石油は C と H のみからなる炭化水素と NSO を含むヘテロ化合物を含み、炭化水素も鎖状と環状、脂肪族と芳香族といった多様な成分からなる。

3.3 メタン生成微生物の多様性

メタン生成菌は、低温菌から超高熱菌まで、生育温度に関する多様性が極めて大きい。これまで 150 種以上の菌が分離されている。深部地下環境に棲息するメタン生成菌は他の環境から見出されているものと異なる（新種や新属に分類される）ことが多く、これまで当グループでも油ガス田の地下から 3 種の新しいメタン生成菌を分離することに成功している^{[26][27][28]}。メタン生成菌が利用する基質に関しては、通常、水素 + 二酸化炭素、酢酸、メチル化合物のいずれかであり、そのバリエーションは高くない。ただし当グループでは最近、油田から分離した *Methermicoccus* 属のメタン生成菌が多種類のメトキシ芳香族化合物を利用してメタンを生成する新たな機能を発見した^[29]。このように、メタン生成菌の基質利用性に関するこれまでの認識が

今後変わる可能性もある (図 2)。地下圏には多様なバクテリアやメタン生成菌以外のアーキアの存在が見出されており、環境や有機物の多様性に応じて、さまざまな嫌気性微生物が根源有機物を段階的に低分子化合物に分解し、メタン生成菌の基質へと変換する働きを担っていると推測される。しかし、個々の微生物の機能、すなわちどのような生化学反応を担うのか、これまで得られている知見は極めて限定的である。端的な例として、東部南海トラフのメタンハイドレート濃集域の海底堆積物に優占する微生物は、Atribacteria (バクテリア)、Marine Benthic Group B、Bathyarchaeota (アーキア) 等の未培養系統群 (候補門) に属するものであるため、その機能は未知である^[30]。メタン生成プロセスの解明を目指した今後の研究の重点の対象と考えられる。

4 地圏微生物によるメタン生成プロセス解明の要素技術

メタン生成プロセスを解明するための要素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。培養する／しないというアプローチによって、培養依存的技術と培養非依存的技術に大別される。

4.1 培養依存的技術

培養は地下微生物のメタン生成プロセスを解明する直接的なアプローチである。培養依存的技術は、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をモニタリングすることによって、メタン生成活性を評価する方法である。

4.1.1 試料採取

培養に使用する試料は、微生物源や基質として使用する地層水・堆積物・原油等である。メタン生成ポテンシャルの存在が期待される油ガス田の貯留層、石炭層、水溶性

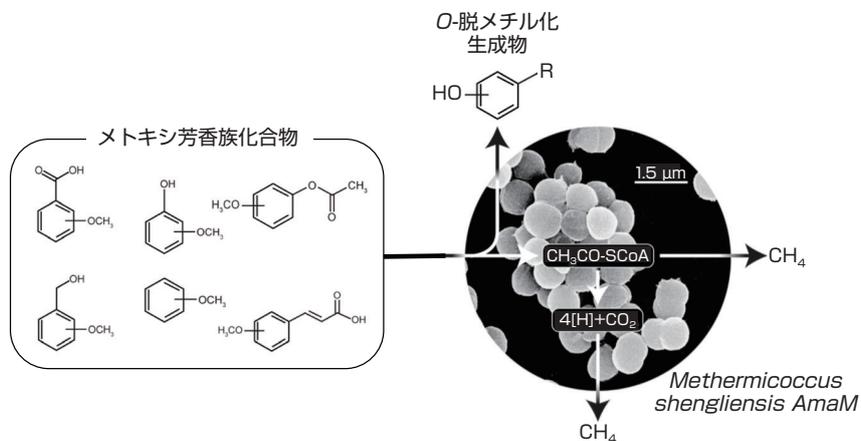


図 2 *Methermicoccus* 属のメタン生成菌が多種類のメトキシ芳香族化合物を利用してメタンを生成する新たなメタン生成経路

ガス田の帯水層、メタンハイドレート濃集帯等を対象とし、地層水や原油は既存の生産井から、堆積物や石炭は掘削コアとして採取する。試料採取の過程で汚染に注意する必要がある、掘削試料であればコアライナーに接触する外側を避けるとともに、掘削流体に蛍光ビーズを投入している場合はその有無を確認する^[31]。試料採取・保存の過程でなるべく酸素に触れないように、コア試料は酸素の吸収剤と一緒にガスバッグ中に密封する^[32]。地層水・原油試料については、あらかじめ窒素またはアルゴンガスで内部の空気を置換したガラスバイアルに注入し、ヘッドスペースをこれらのガスでフラッシュしながら密栓する^{[33][34]}。油ガス井の維持管理や生産性・回収効率の向上を目的として薬剤や海水が坑井に注入されることがあるため、そのような人為的な影響が少ないフィールド・坑井を選択することも重要である。

4.1.2 集積培養

他の環境と同じように、地下環境においても、直接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(水素+二酸化炭素、酢酸、メタノール、トリメチルアミン、硫化ジメチル等)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^{[20][35][36]}。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、ビタミン等を含む無機塩培地を添加すると収率が上がることもある^[37]。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。一方で、集積培養は基質を利用できる特定の微生物を環境から分離する方法として有効である。地下環境からメタン生成菌を分離して、その系統や生理・生態を明らかにすることも、メタン生成プロセスを解明するための有効なアプローチである^{[26][27][28]}。

4.1.3 環境模擬培養

原位置でのメタン生成プロセスを実験室で再現することは、地圏微生物によるメタン生成プロセスを解明するための重要なアプローチである。具体的には、地層水、堆積物、原油等を用いてマイクロコズム(制御実験生態系)を構築し、メタン生成を経時的に観測する。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、恒温槽で加温するほか、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^{[33][34][38]}。地下環境において、微生物は砂や

粘土の粒子の隙間に棲息している。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ある^[38]。

4.1.4 ¹⁴C-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、培養が長期に渡ることが多い。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と現場と異なるプロセスが起きる可能性が高くなるため、メタン生成プロセスを解明する観点で好ましくない。¹⁴C-トレーサー添加培養は、この問題を極力抑えるために短時間の培養でメタン生成経路ごとに活性を評価する方法である^{[20][32][39]}。¹⁴Cでラベル化した微量の基質($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 、 $^{14}\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ 等)を試料(堆積物や地層水)に添加して、検体ごとに異なる期間(数時間から数週間)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。メタンを二酸化炭素に変換しトラップする装置(図3)を用いて、バイアル中のヘッドスペースガスをキャリアガス(ヘリウム)とともにアスカライト、シリカゲル、酸化銅、アミン溶液を通し、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¹⁴C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。¹⁴C-トレーサー法は、添加する基質が極微量(環境模擬)であり、かつ比較的短期間の培養で評価が可能のため、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。

4.2 培養非依存的技術

培養に依らず、メタン生成菌や共生菌、発酵菌、加水分解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プロセスを担う地圏微生物の多様性、機能、バイ

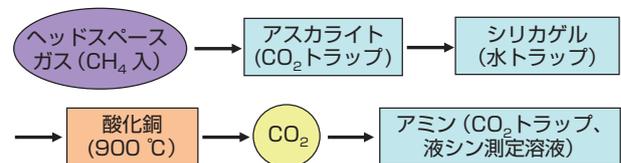


図3 メタンを二酸化炭素に変換しトラップする装置

オマスに関する情報を取得することが可能である。対象となる分子は、核酸、脂質、補酵素等である。

4.2.1 核酸 (DNA、RNA) 分析

地層水や堆積物から核酸を抽出し、その塩基配列の解読によって試料中の微生物の多様性や機能に関する情報を解読する。通常は安定性・濃度が高く分析しやすいという理由で DNA を対象とする。ただし DNA は地下環境において長期間保存される可能性もあるため、現在活動中の地圏微生物の情報を抽出するために、DNA より不安定で寿命が短い RNA を対象とすることも試みられている^[40]。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。RNA の分析は、逆転写によって RNA を DNA に変換してその塩基配列を解読することによる。

地圏微生物のメタン生成プロセスを解明するためには、バクテリアやアーキアの群集構造、特にアーキア中のメタン生成菌の優占度や多様性を評価することが重要である。その目的に沿って、まずは微生物全般に有効な分類指標である 16S rRNA 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅し、シーケンス解析(クローンライブラリー法やパイロシーケンス法で塩基配列を解読しデータベースと比較すること)によって個々の微生物の系統や優占度を評価することが広く行われる^{[20][30][33][34][35][36]}。また *mcrA* 遺伝子(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機能遺伝子)を対象としたシーケンス解析もメタン生成菌に焦点を当てた系統解析法として有効である^[30]。さらに PCR の増幅度から DNA を定量するリアルタイム PCR も、対象とする遺伝子によって微生物を包括的(アーキア・バクテリア全般)あるいは個別(系統別メタン生成菌等)に定量する方法として使われる^{[33][34]}。

近年、環境・培養試料から抽出される DNA を PCR で増幅せず、全微生物のゲノムを網羅的に解析するメタゲノム解析が行われるようになり、地圏微生物によるメタン生成プロセスを解明する研究にも応用されつつある^[41]。この場合、16S rRNA 領域のみを対象とする解析より群集構造解析の精度が高くなることに加え、酵素遺伝子の解読によって個々の微生物が持つ機能を推定できる可能性がある。さらに試料から抽出される RNA を対象とするメタトランスクリプトーム解析によって、推定された酵素遺伝子の存在、すなわち機能の発現を検証することが可能となる。ただしこれらの総体分析技術は、得られる情報が膨大であり、そこから有用な情報を抽出・解析するための知識と経験が必要になる。試料の集積培養によってあらかじめ微生物の多様性を下げることができればこのような網羅的遺伝子解析

の効率や精度を高めることに繋がる。

4.2.2 脂質バイオマーカー分析

アーキオール、ヒドロキシアーキオール、カルドアーキオール、2,6,10,15,19-ペンタメチルイコサン等、特徴的な膜脂質成分(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菌の分布やバイオマスを評価することが試みられている^[42]。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 増幅によるバイアスを伴う核酸の測定に比べて定量分析の精度や確度が高い。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、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アーキアも作る一方、ヒドロキシアーキオール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^[43]。また嫌気条件でメタンを資化(酸化、消費)するアーキア (ANME) がメタン生成菌と共通の脂質成分を作ることも知られており、炭素同位体比を測定するか遺伝子情報を参照することによって識別することが必要となる^{[21][42]}。核酸と同様、脂質の寿命(安定性)もメタン生成菌のバイオマス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、極性ヒドロキシアーキオールが原位置のメタン生成菌の指標として有効と考え、その分析法を確立した。図 4 に示したとおり、堆積物からアーキア脂質を溶媒抽出し、シリカゲルで分画した後、極性画分を酸加水分解することによって極性ヒドロキシアーキオールをモノフィタニルグリセロールエーテルに変換し、ガスクロマトグラフで同定・定量するとともに、質量分析計で炭素同位体比を測定している^[44]。

4.2.3 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^[45]。これは 10^2 - 10^4 個の細胞数(メタン生成菌)に相当する。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、検出感度・定量性において上記の *mcrA* 遺伝子より優れている。実際に、下北半島沖の海底下約 2,000 m の炭層コア試料から検出された補酵素 F430 は、海洋地下圏で最も深い環境に棲息するメタン生成菌のシグナルと捉えられている^[46]。

5 メタン生成プロセス解明における研究の展開：研究目標実現のための構成的方法

地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明の研究展開を図5に示した。まず堆積物や地層水等の地下環境試料を採取し、そのメタン生成ポテンシャルを評価した後、地下環境を模擬する培養実験でメタン生成プロセスを担う微生物群を集積する。これにメタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析を適用し、中核的微生物の種・存在比率および機能を推定することによって、根源有機物からメタンに至るメタン生成プロセス（反応経路と関与微生物）の概要を推定する。さらにメタボローム解析と安定同位体トレーサー実験によって、推定された代謝経路と微生物の関与を検証し、メタン生成プロセスの全容（代謝マップ）を明らかにする。この目標を達成するための大きいハードルは、このメタン生成微生物群を高度に集積した培養系を獲得することである。その成功の鍵を握るのは、地下環境を模擬しつつ高いメタン生成活性を有する実験生態系を構築し、培養の繰り返し（継代）によってメタン生成微生物群の集積度を高めることである。

地下環境は多様であり、環境によってメタン生成活性が異なることが予想される。一方、地下環境を模擬する培養実験は圧力容器内に培養系を構築して恒温槽に設置する必要があるため、培養系の本数をあまり多くすることができない。またメタン生成活性が低い試料を用いると、地下のメタン生成プロセスを再現するために非常に長い期間（数年）を要する。以上の理由から、メタン生成ポテンシャル

が高い地下環境試料を厳選することが効率的にメタン生成プロセスを解明するための重要な鍵となる。そのために、予察的に多数のフィールド・坑井から試料を採取して、高いメタン生成ポテンシャルが期待される試料のスクリーニングを行なう。具体的には天然ガス組成、原油炭化水素組成、水質、脂質バイオマーカー、補酵素 F430 等の地球化学分析、16S rRNA 遺伝子や *mcrA* 遺伝子等の機能遺伝子をターゲットとした分子生態学的分析、メタン生成菌の基質を添加する集積培養や ^{14}C -トレーサー添加培養に基づいてメタン生成ポテンシャルを評価する。

もともとメタン生成ポテンシャルが高い試料であっても、その中の地圏微生物にはメタン生成プロセスに直接関与していないものも多く含まれている可能性が高い。メタン生成プロセスを解明するためには、あらかじめそのプロセスに直接関与している微生物群を高度に集積してから解析に供することが重要な戦略となる。そのために、地下環境を模擬する実験生態系において、微生物の活性を高めるためにビタミン、ミネラル、微量元素、アミノ酸（酵母エキス）等を適宜添加し、メタン生成速度をモニタリングする。地層水と堆積物を混ぜてスラリー状にすることや地層水と原油の系に砂粒を添加することによっても、根源有機物と微生物の接触効率が向上しメタン生成速度が高くなる。そのようにメタン生成の活性が高くなる培養条件を探索し、その継代培養によってメタン生成微生物群を集積する。ここで注意すべきことは、集積された個々の微生物がもともとの環境試料中でもメタン生成の中心的な担い手であったか

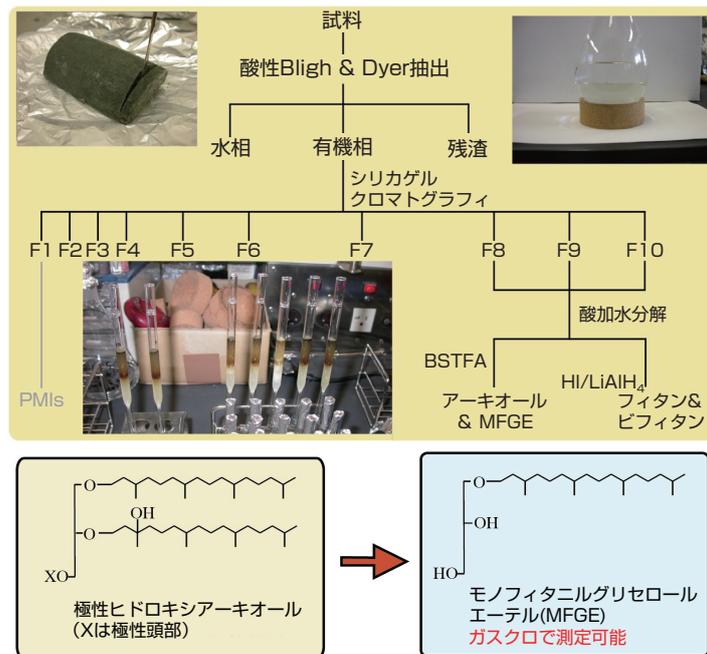


図4 堆積物中の極性ヒドロキシアーキオールを抽出しモノフィタニルグリセロールエーテルに変換する方法

どうかという点であり、集積前後の微生物の群集構造を比較して、集積された微生物がもとの試料においても主要な構成員となっていることの確認が必要である。

高度に集積したメタン生成微生物群が得られたら、そこから全 DNA を抽出し、メタゲノム解析によって主要な微生物のゲノムを個々に再構築する。ゲノム情報から、その微生物の種類や優占度がわかるとともに、潜在的に有する代謝機能を酵素遺伝子から推定することができる。さらに RNA を対象とするメタトランスクリプトーム解析を行って酵素遺伝子の発現を調べることで、メタン生成プロセスの中でその微生物が担う生化学反応を推測する。中核的な微生物による生化学反応を組み合わせることによって、根源有機物からメタンまでの反応経路を概観する。

遺伝子解析によってメタン生成プロセスの概要が推測されたら、次にそれを検証するためにメタボローム解析（代謝産物の網羅的分析）を行い、想定される代謝中間体を探索する。代謝中間体は試料の有機溶媒抽出物を分画・誘導体化の後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) で測定する。まずはスキャンモードで GC-MS 分析を行い、マススペクトルによる検索で全イオンクロマトグラム (Scan-TIC) 上の主要ピークの同定を行う。ただし代謝中間体は生成されたものがすぐに消費されるため低濃度である可能性が高い。スキャンモードで想定される代謝中間体が検出されない場合は、選択イオンモードで GC-MS 分析を行い、特徴的なフラグメントイオンのマスプロトモグラム (SIM-MC) 上でこの代謝中間体の検出を試みる。もし代謝中間体の標品があれば、これを集積培養系に添加し、その消

費量とメタン生成量の関係から代謝経路の合理性を検証する。特に ^{13}C でラベル化された標品が入手可能であれば、それを添加するトレーサー実験が極めて有効である。例えば原油のアルカン分解メタン生成活性を有する培養系に ^{13}C -ヘキサデカンを添加すると、生成されるメタンの炭素同位体比が非添加系（コントロール）に比べて顕著に高くなる^[47]。また ^{13}C 標品を過剰に添加することによってその代謝を担う微生物の細胞も ^{13}C でラベル化されれば、メタン生成プロセスに関与する微生物を識別することが容易になる。具体的には、 ^{13}C 添加培養系から核酸 (DNA または RNA) を抽出し、密度勾配超遠心法による比重分画を行い、相対的に（非添加系と比較して）比重が高い画分に濃集される核酸の塩基配列を解読する^[48]。

あらかじめゲノム情報によってメタン生成プロセスを担う中核的微生物の代謝機能を推定することができれば、上記のメタボローム解析による代謝経路の検証作業が効率良く進められる。しかし、微生物がこれまで全く知られていない新規な代謝機能を持つとすれば、ゲノム情報でそれを推定することが困難となる。地圏微生物は未培養系統群（候補門）に属するバクテリア・アーキアが多く^[30]、未知の代謝機能を有する可能性も低くない。地圏微生物によるメタン生成プロセスを解明するためには、当該微生物の培養（もし可能であれば分離培養）とトレーサー実験・メタボローム解析によって新規代謝機能を模索しつつ、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析に加えタンパク質（ペプチド）を網羅的に分析するメタプロテオーム解析も併用する等、多様な解析手法を駆使し総合的に解析することが必要となる。

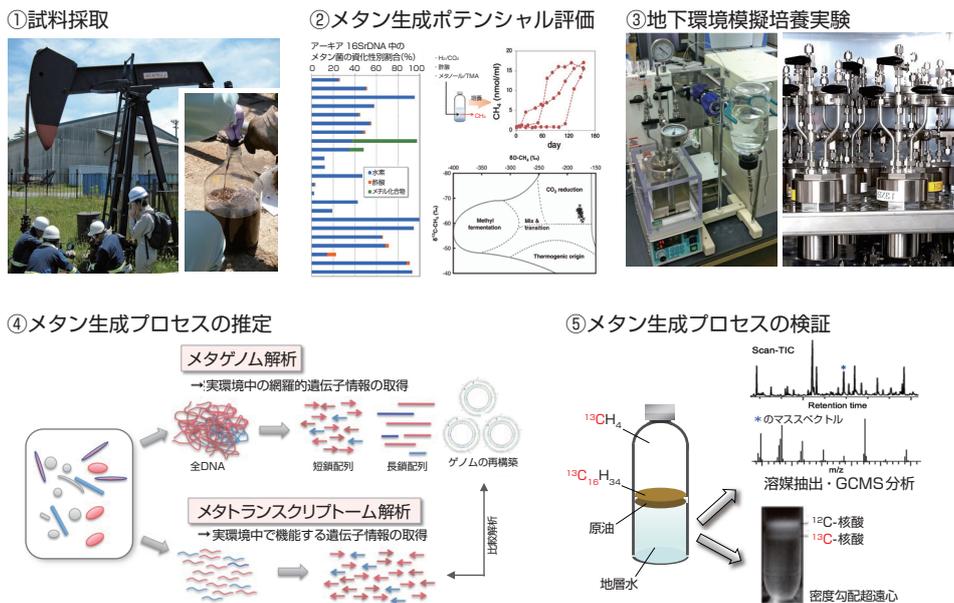


図5 地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明における研究の展開

6 メタン生成プロセスの解明がもたらす資源技術

6.1 枯渇油田に残留する原油の天然ガス変換・増進回収

現在の資源技術では、油田からの原油の回収率は 50 % にも満たない場合が多く、枯渇油田の油層にはなお大量の原油が残留している。一方油層には原油を分解してメタンを生成する機能を有する微生物生態系の存在が認められている^[49]。この微生物によるメタン生成プロセスを解明し、その中核的な微生物の機能を活性化できれば、効率的に未回収の原油を油層内でメタンに変換し天然ガスとしてエネルギーを回収することが可能となる^{[38][49]}。その実用性をラボ実験で検証するため、当グループは国際石油開発帝石(株)との共同研究において、油層水(微生物源)と原油(基質)を油層の温度・圧力条件(55℃、5MPa)で静置培養する環境模擬実験を長く継続し、高いメタン生成ポテンシャルを有する微生物群の獲得・安定培養化を実現するとともに、栄養物質の添加や砂の充填(孔隙環境の提供)によってメタン生成が促進される効果を見出している^[38]。なお、残留原油のメタン変換が進行すると、油層が再加圧されるとともにガスが原油に溶存して油の粘性が下がる効果もあり、原油の増進回収につながる可能性も期待される。

油層環境を模擬する培養実験は、10年以上にも渡る試行錯誤を重ねてようやく、原油のメタン変換プロセスを安定的に再現できるようになった。まず油層水と原油だけの培養からスタートし、無機塩培地成分(ビタミン・ミネラル・微量元素)の添加、砂の充填(水と原油の接触面積の拡大)、酵母エキスの添加という流れで培養条件を変更することで、メタン生成量の増大に成功した。しかしどの培養条件においても長いラグタイム(培養開始からメタン生成開始

までの期間)があり、個々の実験に500日以上要するという悩みがあった。この問題に関しては、水溶性ガス田の泥質堆積物を用いた培養実験の結果(6.3)を検討する中で、微生物は培養液よりも砂の表面に多くいるのではないかと考え、培養の接種源を油層水や培養液(前培養)から砂(前培養)に変更したところ、ラグタイムがなくなり培養日数を大幅に短縮することに成功した。

油田に残留する原油を回収する方法として、油層に二酸化炭素を圧入する増進回収法(CO₂-EOR法)が注目されている。圧入した二酸化炭素を油層中に固定(地中貯留)することで大気中への二酸化炭素の排出を削減し地球温暖化の抑制にもつながることも大きな利点である^[50]。しかし、CO₂地中貯留によって油層環境は大きく変化すると予想され、上述の油層微生物による原油メタン変換・エネルギー回収技術と両立できるか、不明であった。この問題への取り組みとして、当グループと国際石油開発帝石(株)の共同研究では、油層微生物のメタン生成活動が二酸化炭素分圧の上昇に伴ってどう変化するかを実験的に検証した。その結果、メタン生成菌を含む微生物の群集組成が大きく変化し、主要なメタン生成経路がCO₂還元から酢酸分解に変化するため、メタン生成が継続するだけでなく、メタン生成速度はむしろ速くなる現象を見出した^[34](図6)。

6.2 メタンハイドレート濃集帯形成モデルの構築

メタンハイドレートは高濃度のメタンが低温高压条件下で水と共存する場合に生成する氷状の結晶(包接化合物)であり、自然界では大陸縁辺で水深が深い海域と、高緯度地域の陸地の地下に分布することが知られている^[51]。日本の近海でも、南海トラフや日本海の海底にメタンハイドレー

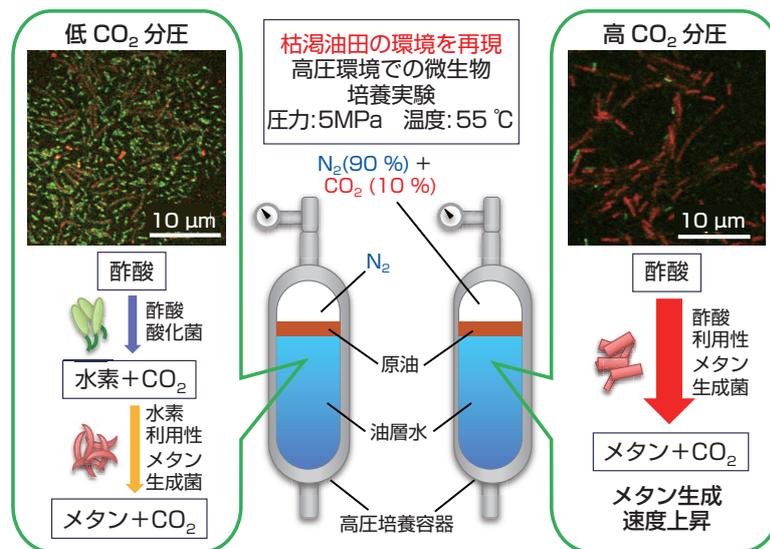


図6 CO₂分圧の上昇に伴う油層微生物の群集組成と酢酸からのメタン生成経路の変化

トが分布しており、将来の天然ガス資源として開発するための研究が、産総研を含む多くの機関が参画する MH21-S 研究開発コンソーシアム (MH21-S) によって進められている^[52]。これまでの研究で、東部南海トラフの深海底メタンハイドレートはタービダイト起源の砂岩層の孔隙を充填する形で濃集していることや、そのメタンは主に微生物起源であることが明らかにされている^{[53][54]}。当グループは、英国カーディフ大学との連携のもと、¹⁴C-トレーサー添加培養によって、東部南海トラフの海底堆積物のメタン生成活性を検出するとともに、その活性がメタンハイドレート濃集帯において相対的に高い傾向を見出した^[39]。またメタン生成菌の分布を調べるために脂質バイオマーカー (極性態ヒドロキシアーキオールやアーキオール等) の濃度と炭素同位体比を分析し、有機炭素濃度が高い泥質堆積物、特に深部のメタンハイドレート濃集帯においてメタン生成菌が多い傾向を見出した^[42]。さらに 16S rRNA 遺伝子や *mcrA* 遺伝子の塩基配列に基づいて堆積物中のアーキアの群集構造を解析した結果、過去の海洋堆積物の報告例に比べアーキア中のメタン生成菌の比率が高いこと、水素資化性の菌 (Methanomicrobiales や Methanobacteriales 等) が酢酸 / メチル化合物資化性の菌 (Methanosarcinales) よりも優占していること、メタンハイドレートを多く含有する試料に特異的に ANME-1 が存在することを明らかにした^[30]。MH21-S では、メタンハイドレートの探鉱や資源ポテンシャル評価のために濃集帯の形成プロセスを復元するシミュレーターの開発が進められている。当グループによるメタン生成プロセスの研究によって、海底堆積物中のメタン生成速度の実態や温度・圧力等に対する依存性が明らかになれば、シミュレーターに入力するデータの正確さや精度が向上し、信頼性の高いメタンハイドレート濃集帯形成モデルの構築や精緻化が可能になる。

6.3 水溶性ガス田における資源量の拡大

水溶性ガス田は、天然ガスが地層水に溶存した状態で帯水層中に胚胎するガス田であり、我が国の天然ガス生産量の約 22 % を占める重要なエネルギー資源である^[17]。多くの場合、地層水は塩分濃度が高い化石海水であり、天然ガスはメタン~プロパンの成分組成やメタンの炭素・水素同位体比から主に微生物起源と推定されている^{[17][20][55]}。当グループではこれまでに、地層水中に多様なメタン生成菌が生息していることを示すとともに、地層水に¹⁴C-トレーサーを添加して培養した結果、CO₂還元を主とするメタン生成活性を検出した^{[20][35][36]}。また、帯水層を構成する泥質堆積物と地層水を混ぜて長期間培養を継続すると、堆積物中の有機物 (主に陸源高等植物に由来するタイプ III ケロジェン) の 5-18 % (炭素換算) が微生物によって分解さ

れメタンに変換されることを見出した^[56]。この実験結果は、水溶性ガス田の地下に棲息する地圏微生物のメタン生成ポテンシャルが大きいことを示すものであり、この微生物の活動を刺激することによって天然ガスの資源量を増やせる可能性を示唆している。

6.4 コールベッドメタン (CBM) の資源量の拡大

CBM は炭層から採取されるメタンを主成分とするガスで、現在、日本国内では生産されていないものの、海外では米国、オーストラリア、カナダ、中国等で商業生産されており、重要な非在来型天然ガス資源の一つとなっている^[13]。CBM に対する微生物の寄与は大きく、例えば米国産 CBM の 40 % は微生物起源と推定されている^[13]。炭層中に多様なメタン生成菌が存在することも知られており^[10]、微生物のメタン生成ポテンシャルを活用した CBM 増産技術の実用性を検証するパイロット試験が海外で進められている^[57]。例えば北米 Powder River Basin において、ビタミン、ミネラルを含む独自の栄養物質を炭層に注入した結果、260 坑井中 58 坑井でメタン生成の増量に成功し、成功井でのメタンの増量は約 50 % と見積もられている。

現在採炭している国内の炭田は釧路コールマインのみであり、当グループが微生物源として採取できる炭層試料 (地下水等) が少ない状況にある。そのため、他の地圏環境から採取した地下水についても石炭やその構成分子であるメトキシ芳香族化合物を利用できる微生物がないか、多くの試験を重ねた結果、余目油田の油層水から分離された *Methermicoccus* 属のメタン生成菌が石炭に含まれる芳香族メトキシ化合物からメタンを生成することを発見した^[29]。従来、メタン生成菌が利用できる基質は炭素数が 1-2 個の低分子化合物と考えられており、芳香族メトキシ化合物 (炭素数が 7 以上) を基質とすることは、これまでの常識を覆す新規性の高い発見である。当グループではこの新たなメタン生成過程であるメトキシ資化メタン生成の代謝経路 (図 2) の生化学的解明をオランダ・デンマーク・中国の研究機関と連携して進めるとともに、地圏環境における本経路の分布を調査し、グローバルな炭素循環や天然ガス資源の形成における重要性を評価する研究を進めている。また、このメタン生成菌に限らず、バクテリアも含め石炭を高い速度と収率でメタンに変換する微生物集積系を獲得し、その機能を活性化する方法を確立することによって CBM を増産するバイオ技術の開発に導くことを目指している。

謝辞

この研究は産業技術総合研究所地圏資源環境研究部門の吉岡秀佳研究グループ長、持丸華子主任研究員、片山泰樹主任研究員、眞弓大介主任研究員、金子雅紀主任研

究員、前田治男客員研究員、生物プロセス研究部門の鎌形洋一招聘研究員、玉木秀幸研究グループ長、バイオメディカル研究部門の竹内美緒主任研究員らとの協力体制で実施されました。また国際石油開発帝石(株)、関東天然ガス開発(株)との共同研究、(独)石油天然ガス・金属鉱物資源機構受託研究、メタンハイドレート資源開発研究コンソーシアム(MH21)、および科学研究費補助金(課題番号17H01363、18H05295)の研究成果を含んでいます。ご協力、ご支援いただきました以上の方々、諸機関に感謝いたします。

参考文献

- [1] E.S. Bastin, F.E. Greer, C.A. Merritt and G. Moulton: The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. *Science*, 63(1616), 21-24 (1926).
- [2] F.S. Colwell and S. D'Hondt: Nature and extent of the deep biosphere. *Rev. Mineral. Geochem.*, 75 (1), 547-574 (2013).
- [3] R.J. Parkes, B.A. Cragg, S.J. Bale, J.M. Getliff, K. Goodman, R.A. Rochelle, J.C. Fry, A.J. Weightman and S.M. Harvey: Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, 371, 410-413 (1994).
- [4] J. Kallmeyer, R. Pockalny, R.R. Adhikari, D.C. Smith and S.D'Hondt: Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(40), 16213-16216 (2012).
- [5] Y.M. Bar-On, R. Phillips and R. Milo: The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115(25), 6506-6511 (2018).
- [6] A.V. Milkov: Molecular and stable isotope composition of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings. *Org. Geochem.*, 36(5), 681-702 (2005).
- [7] D.R. Lovely: Deep subsurface microbial processes. *Rev. Geophys.*, 33(3), 365-381 (1995).
- [8] M. Crespo-Medina, K.I. Twing, M.D.Y. Kubo, T.M. Hoehler, D. Cardace, T. McCollom and M.O. Schrenk: Insights into environmental controls on microbial communities in a continental serpentinite aquifer using a microcosm-based approach. *Front. Microbiol.*, 5, article 604 (2014).
- [9] M.E. Dzaugis, A.J. Spivack, A.G. Dunlea, R.W. Murray and S. D'Hondt: Radiolytic hydrogen production in the subseafloor basaltic aquifer. *Front. Microbiol.*, 7, article 76 (2016).
- [10] D.S. Vinson, N.E. Blair, A.M. Martini, S. Larter, W.H. Orem and J.C. McIntosh: Microbial methane from in situ biodegradation of coal and shale: a review and reevaluation of hydrogen and carbon isotope signatures. *Chem. Geol.*, 453, 128-145 (2017).
- [11] R. Oremland and S. Polcin: Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(6), 1270-1276 (1982).
- [12] L.T. Angenent, K. Karima, M.H. Al-Dahhan, B.A. Wrenn and R. Domínguez-Espinosa: Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.*, 22(9), 477-485 (2004).
- [13] D. Strapoć, D., M. Mastalerz, K. Dawson, J. Macalady, A.V. Callaghan, B. Wawrik, C. Turich and M. Ashby: Biogeochemistry of microbial coal-bed methane. *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.*, 39, 617-656 (2011).
- [14] M.J. Whiticar: Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.*, 22(9), 477-485 (1999).
- [15] Milkov, A. V. Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs. *Org. Geochem.*, 42, 184-207 (2011).
- [16] Katz, B. J. Microbial processes and natural gas accumulations. *Open Geol. J.*, 5, 75-83 (2011).
- [17] 金子信行, 前川竜男, 猪狩俊一郎: アークアによるメタンの生成と間隙水への濃集機構. *石油技術協会誌*, 67(1), 97-110 (2002).
- [18] K. Takai, K. Nakamura, T. Toki, U. Tsunogai, A. Miyazaki, J. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura and K. Horikoshi: Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(31), 10949-10954 (2008).
- [19] I.M. Head, D.M. Jones and S.R. Larter: Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, 426, 344-352 (2003).
- [20] T. Katayama, H. Yoshioka, Y. Muramoto, J. Usami, K. Fujiwara, S. Yoshida, Y. Kamagata and S. Sakata: Physicochemical impacts associated with natural gas development on methanogenesis in deep sand aquifers. *ISME J.*, 9(2), 436-446(2015).
- [21] H. Yoshioka, M. Takeuchi, S. Sakata, H.A. Takahashi, M. Takahashi, S. Tanabe, T. Hayashi, A. Inamura and M. Yasuhara: Microbial methane production and oxidation in the Holocene mud beneath the Kanto Plain of central Japan. *Geochem. J.*, 54, 243-254 (2020).
- [22] V. Rebata-Landa and J.C. Santamarina: Mechanical limits to microbial activity in deep sediments. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 7, Q11006 (2006).
- [23] W. Tanikawa, O. Tadai, Y. Morono, K.-H. Hinrichs and F. Inagaki: Geophysical constraints on microbial biomass in subseafloor sediments and coal seams down to 2.5 km off Shimokita Peninsula, Japan. *Prog. Earth Planet. Sci.*, 5, 58 (2018).
- [24] L.R. Krumholtz, J.P. McKinley, G.A. Ulrich and J.M. Suflita: Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock. *Nature*, 386, 64-66 (1997).
- [25] V. Kiliops and S. Kiliops: Long-term fate of organic matter in the geosphere. *An Introduction to Organic Geochemistry, Second Edition*, 117-165, Blackwell, Malden (2005).
- [26] H. Mochimaru, H. Tamaki, S. Hanada, H. Imachi, K. Nakamura, S. Sakata and Y. Kamagata: *Methanobolus profundus* sp. nov., a new methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 714-718 (2009).
- [27] T. Katayama, H. Yoshioka, H. Mochimaru, X.Y. Meng, Y. Muramoto, J. Usami, H. Ikeda, Y. Kamagata and S. Sakata: *Methanohalophilus levihalodurans* sp. nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the genus *Methanohalophilus*. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2089-2093 (2014).
- [28] H. Mochimaru, H. Tamaki, T. Katayama, H. Imachi, S. Sakata S. and Y. Kamagata: *Methanomicrobium antiquum* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from deep sedimentary aquifers in a natural gas field. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4873-4877 (2016).
- [29] D. Mayumi, H. Mochimaru, H. Tamaki, K. Yamamoto, H. Yoshioka, Y. Suzuki, Y. Kamagata and S. Sakata: Methane

- production from coal by a single methanogen. *Science*, 354, 222-225 (2016).
- [30] T. Katayama, H. Yoshioka, H. Takahashi, M. Amo, T. Fujii and S. Sakata (2016) Changes in microbial community structures associated with gas hydrates in subseafloor sediments from the Nankai Trough. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 92, fw093.
- [31] D.C. Smith, A.J. Spivack, M.R. Fisk, S.A. Haveman, H. Staudigel and ODP Leg 185 Shipboard Scientific Party: Tracer-based estimates of the drilling-induced microbial contamination of deep sea crust. *Geomicrobiol. J.*, 17, 207-219 (2000).
- [32] H. Yoshioka, A. Maruyama, T. Nakamura, Y. Higashi, H. Fuse, S. Sakata and D.H. Bartlett: Activities and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin. *Geobiology*, 8, 223-233 (2010).
- [33] D. Mayumi, H. Mochimaru, H. Yoshioka, S. Sakata, H. Maeda, Y. Miyagawa, M. Ikarashi, M. Takeuchi and Y. Kamagata: Evidence for syntrophic acetate oxidation coupled to hydrogenotrophic methanogenesis in the high-temperature petroleum reservoir of Yabase oil field (Japan). *Environ. Microbiol.*, 13, 1995-2006 (2011).
- [34] D. Mayumi, J. Dolfing, S. Sakata, H. Maeda, Y. Miyagawa, M. Ikarashi, H. Tamaki, M. Takeuchi, C.H. Nakatsu C. and Y. Kamagata: Carbon dioxide concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoirs. *Nature Comm.*, DOI: 10.1038/ncomms2998 (2013).
- [35] H. Mochimaru, H. Uchiyama, H. Yoshioka, H. Imachi, T. Hoaki, H. Tamaki, K. Nakamura, Y. Sekiguchi and Y. Kamagata: Methanogen diversity in deep subsurface gas-associated water at Minami-Kanto gas field in Japan. *Geomicrobiol. J.*, 24, 93-100 (2007).
- [36] H. Mochimaru, H. Yoshioka, H. Tamaki, K. Nakamura, N. Kaneko, S. Sakata, H. Imachi, Y. Sekiguchi, H. Uchiyama and Y. Kamagata: Microbial diversity and methanogenic potential in high temperature natural gas associated water in Japan. *Extremophiles*, 11(3), 453-461 (2007).
- [37] N.D. Gray, A. Sherry, S.R. Larter, M. Erdmann, J. Leyris, T. Liengen, J. Beeder and I.M. Head: Biogenic methane production in formation waters from a large gas field in the North Sea. *Extremophiles*, 13, 511-519 (2009).
- [38] 岩間弘樹, 五十嵐雅之, 若山 樹, 米林英治, 眞弓大介, 前田治男, 須田 好, 玉木秀幸, 坂田 将, 鎌形洋一: 微生物原油分解EORフィールドパイロットに向けて~微生物培養実験からパイロット 計画策定まで~. *石油技術協会誌*, 83, 455-460 (2018).
- [39] H. Yoshioka, S. Sakata, B. Cragg, J. Parkes and T. Fujii: Microbial methane production rates in gas hydrate-bearing sediments from the eastern Nankai Trough, off central Japan. *Geochem. J.*, 43, 315-321 (2009).
- [40] M. Takeuchi, H. Yoshioka, Y. Seo, S. Tanabe, H. Tamaki, Y. Kamagata, H.A. Takahashi, S. Igari, D. Mayumi and S. Sakata: A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan. *Environ. Microbiol.*, 13, 3206-3218 (2011).
- [41] A. Vigneron, E.B. Alsop, B.P. Lomans, N.C. Kyrpides, I.M. Head and N. Tsesmetzis: Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle. *ISME J.*, 11, 2141-2154 (2017).
- [42] M. Oba, S. Sakata and T. Fujii: 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. *Org. Geochem.*, 78, 153-160 (2015).
- [43] Y. Koga and H. Morii: Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(11), 2019-2034 (2005).
- [44] M. Oba, S. Sakata and U. Tsunogai: Polar and neutral isopranylglycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Org. Geochem.*, 37, 1643-1654 (2006).
- [45] M. Kaneko, Y. Takano, Y. Chikaraishi, N.O. Ogawa, S. Asakawa, T. Watanabe, S. Shima, M. Krüger, M. Matsushita, H. Kimura and N. Ohkouchi: Quantitative analysis of coenzyme F430 in environmental samples; a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Anal. Chem.*, 86, 3633-3638 (2014).
- [46] F. Inagaki, K.-U. Hinrichs, Y. Kubo, M. W. Bowles, V. B. Heuer, W.-L. Hong, T. Hoshino, A. Ijiri, H. Imachi, M. Ito, M. Kaneko, et al.: Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science*, 349, 420-424 (2015).
- [47] D.M. Jones, I.M. Head, N.D. Gray, J.J. Adams, A.K. Rowan, C.M. Aitken, B. Bennett, H. Huang, A. Brown, B.F.J. Bowler, T. Oldenburg, M. Erdmann and S.R. Larter: Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 451, 176-180 (2008).
- [48] T. Aoyagi, T. Inaba, H. Aizawa, D. Mayumi, S. Sakata, A. Charfi, C. Suh, J.H. Lee, Y. Sato, A. Ogata, H. Habe and T. Hori: Unexpected diversity of acetate degraders in anaerobic membrane bioreactor treating organic solid waste revealed by high-sensitivity stable isotope probing. *Water Res.*, 176, 115750 (2020).
- [49] L.M. Gieg, K.E. Duncan and J.M. Suflita: Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(10), 3022-3029 (2008).
- [50] V. Núñez-López and E. Moskal: Potential of CO₂-EOR for near-term decarbonization. *Front. Climate*, DOI: 10.3389/fclim.2019.00005 (2019).
- [51] K. Kvenvolden: A primer on gas hydrates. *U.S. Geol. Surv. Prof. Paper*, 1570, 279-291 (1993).
- [52] MH21-S研究開発コンソーシアム (MH21-S) . <https://www.mh21japan.gr.jp>. 閲覧日2021-03-17.
- [53] T. Fujii, M. Nakamizu, Y. Tsuji, T. Namikawa, T. Okui, M. Kawasaki, K. Ochiai, M. Nishimura and O. Takano: Methane-hydrate occurrence and saturation confirmed from core samples, eastern Nankai Trough, Japan. In: Collett, T., Johnson, A., Knapp, C., Boswell, R. (Eds.), *Natural Gas Hydrates—Energy Resource Potential and Associated Geologic Hazards. Amer. Assoc. Petrol. Geol. Mem.*, 89, 385-400 (2009).
- [54] T. Uchida, A. Waseda, and T. Namikawa: Methane accumulation and high concentration of gas hydrate in marine and terrestrial sandy sediments. In: Collett, T., Johnson, A., Knapp, C., Boswell, R. (Eds.), *Natural Gas Hydrates—Energy Resource Potential and Associated Geologic Hazards. Amer. Assoc. Petrol. Geol. Mem.*, 89, 401-413 (2009).
- [55] S. Igari and S. Sakata: Origin of natural gas of dissolved-in water type in Japan inferred from chemical and isotopic compositions: Occurrence of dissolved gas of thermogenic origin. *Geochem. J.*, 23, 139-142 (1989) .
- [56] H. Yoshioka, H. Mochimaru, S. Sakata, H. Takeda and S. Yoshida: Methane production potential of subsurface microbes in Pleistocene sediments from a natural gas field of the dissolved-in-water type, central Japan. *Chem. Geol.*, 419,

92-101 (2015).

- [57] D. Ritter, D. Vinson, E. Barnhart, D.M. Akob, M.W. Fields, A.B. Cunningham, W. Orem and J.C. McIntosh: Enhanced microbial coalbed methane generation: A review of research, commercial activity, and remaining challenges. *Intl. J. Coal Geol.*, 146, 28-41 (2015).

執筆者略歴

坂田 将 (さかた すずむ)

1982年、東京大学理学部化学科卒業。同年、旧工業技術院地質調査所(現産総研)入所。博士(理学)。国内天然ガスの起源・成因を推定する有機地球化学の研究を進める中で、地圏微生物の寄与の重要性に注目し、微生物のメタン生成プロセスを解明する地球微生物学の研究に重点をシフト。2007年から2018年まで地圏資源環境研究部門地圏微生物研究グループ長。2013年度有機地球化学会学術賞、2017年度産総研論文賞(*Science*誌、共著)を受賞。



査読者との議論

議論1 全体について

コメント(牧野 雅彦:産業技術総合研究所)

著者は地圏微生物によるメタン生成プロセスについて素晴らしい研究成果を積み上げてきて、それを分かりやすくまとめています。研究内容の説明としては特に問題ありませんので、ジャーナルへの掲載を推薦します。

コメント(後藤 雅式:産業技術総合研究所)

深部地下環境における多様な微生物によるメタン生成プロセスの解明に道筋をつけた興味深い論文です。ストラテジーを論理的に構築し、幅広い分析技術を駆使し研究を進めたという点や、枯渇油田からの革新的な資源回収へ繋げるという将来展望という点でもシンセシオロジー誌の研究論文としてふさわしいものと考えます。

議論2 研究開発の目標について

コメント(牧野 雅彦)

第1章では地圏微生物の研究が取りまとめられていますが、「地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明」という研究開発の目標が何であるか、その目標が社会的にどのような価値があるのかという記述がありません。

具体的には、「地圏微生物によるメタン生成プロセスの解明を目指す研究が推進されてきた。」と記述されており、研究開発が自己目的化しているという誤解を招くかもしれません。第6章では「メタン生成プロセスを解明し、・・・未回収の原油を油層内でメタンに変換し天然ガスとしてエネルギーを回収する」と書かれています。

回答(坂田 将)

重要なお指摘をいただき、ありがとうございます。ご指摘を踏まえ、第1章の後半部分に「地圏微生物のポテンシャルを資源開発や環境保全に活用する研究を推進するため」、「地圏微生物によるメタン生成プロセスを解明し天然ガス資源の成因解明や効率的開発に資する」という記載を追加しました。社会的な価値に関するより具体的な記載が「2.2. メタン生成プロセス解明の目的」にあるため、第1章では簡潔な表現に留めました。

議論3 油層由来のメタン生成菌発見の経緯について

コメント(後藤 雅式)

「5. メタン生成プロセス解明における研究展開」に研究のストラテジーが記載され、「6. メタン生成プロセスの解明がもたらす資源技術」に結果と今後の展開が記載されています。それぞれの結果は十分レベルが高いと思われますが、シンセシオロジーという雑誌の特徴として、どのように研究者が実験の構築し、成功に導いたのかを説明して頂くのも有効かと思えます。このような観点で、6.に坂田さんの考えや苦労された点を追記して頂くことは可能でしょうか。

回答(坂田 将)

大変貴重なご指摘をいただきありがとうございます。ご指摘を踏まえ、6.1.に油層微生物の培養条件を試行錯誤しながら改善していった経緯を、また6.4.に油層由来のメタン生成菌の石炭利用性を発見した経緯を追記しました。

議論4 連携体制について

コメント(牧野 雅彦)

地圏微生物によるメタン生成プロセスの研究は、一つの研究グループだけでは困難であったと思います。産総研内の地球科学と生命科学の分野融合研究をきっかけとして、いろいろな外部資金や民間企業との共同研究を通じて推進されてきました。さらに研究を進展させるために、国際的な連携体制も重要と思えますが、いかがでしょうか?

回答(坂田 将)

ご指摘のとおり、地圏微生物によるメタン生成プロセスの研究を進展させるために、国際的な連携体制も極めて重要と考えます。これまで産総研(地圏微生物研究グループ)は、英国カーディフ大学と連携して、東部南海トラフの海底深部堆積物のメタン生成活性を¹⁴C-トレーサー法で評価する研究を行っておりますので、その内容を「6.2.メタンハイドレート濃集帯形成モデルの構築」に加筆しました。また最近では、*Methermicoccus*属メタン生成菌によるメタン生成の代謝経路の生化学的解明をオランダ・デンマーク・中国の研究機関と共同で進めており、「6.4. コールベッドメタン(CBM)の資源量の拡大」にその旨を加筆しました。水溶性ガス田とメタンハイドレート濃集帯に関しては、国内における探査・開発が盛んなため、対象フィールドから試料を採取する機会を得られる一方、油田と炭田に関しては研究対象となる国内のフィールドが少ないため、国際連携を通じて研究対象を海外のフィールドに広げることが重要であり、この分野で世界的に有名なカナダのカルガリー大学との共同研究を推進しています。