



地下微生物のメタン生成ポテンシャルを評価する技術

Techniques to Assess the Methane Production Potential of Subsurface Microbes

地圏微生物研究グループ 坂田 将

2015.12.10

1



- イントロ
 - 天然ガスの起源 (地下微生物の寄与の重要性)
 - 地下微生物によるメタン生成プロセス
- 培養依存的メタン生成ポテンシャルの評価技術
 - 集積培養
 - 環境模擬培養
 - ¹⁴C-トレーサー添加培養
- 培養非依存的メタン生成ポテンシャルの評価技術
 - 遺伝子解析
 - 脂質バイオマーカー分析
 - 補酵素(F₄₃₀)分析
- 培養依存的・非依存的評価技術の融合

2

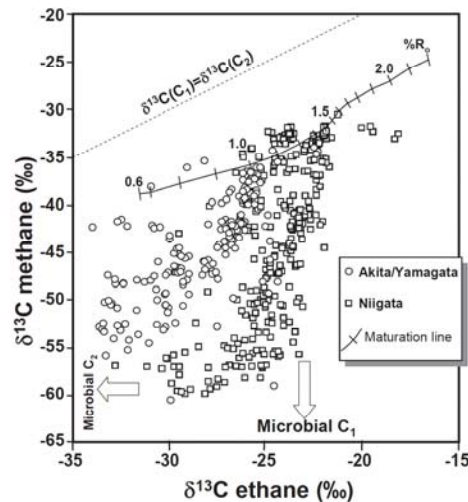


天然ガスの起源



【微生物起源メタンの重要性】

- 世界中で開発・生産されている天然ガスの少なくとも20%は微生物起源 (Katz The Open Geology Journal 2011)
- 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メタンハイドレートも微生物起源
- 東北日本の油ガス田の殆どの天然ガス中に微生物起源メタンが含まれる (右図)

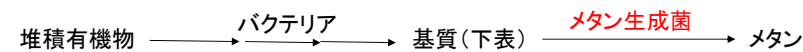


(Waseda & Iwano Geofluids 2008)

3



地下微生物によるメタン生成プロセス



基質	反応式	ΔG ⁰ (kJ/mol CH ₄)
水素 + 二酸化炭素	$CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	-139
ギ酸	$4 HCOO^- + 2 H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2 HCO_3^-$	-127
酢酸	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	-28
メタノール	$4 CH_3OH \rightarrow 3 CH_4 + CO_2 + 2 H_2O$	-103
トリメチルアミン	$4 (CH_3)_3N + 6 H_2O + 4 H^+ \rightarrow 9 CH_4 + 3 CO_2 + 4 NH_4^+$	-80
硫化ジメチル	$2 (CH_3)_2S + 2 H_2O \rightarrow 3 CH_4 + CO_2 + 2 H_2S$	-74

微生物のメタン生成ポテンシャル=メタン生成菌の活性や量を評価

4



地下微生物の培養



試料採取



分注



ガス置換



培養

嫌気性！
酸素への暴露を
最小限に！

5

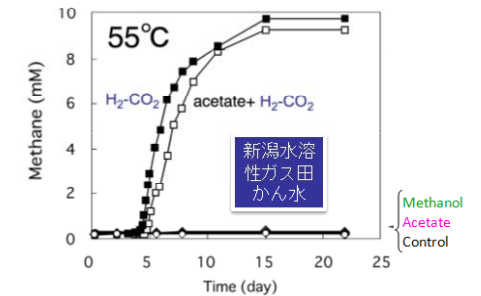
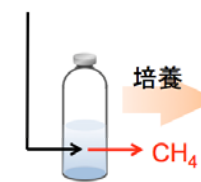


集積培養



- 地下から採取した堆積物やかん水に基質を過剰に添加して、メタン生成をモニタリング
- 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
- メタンの収率(添加した基質とメタンの生成量の比較)はメタン生成ポテンシャルの指標

- H_2/CO_2
- 酢酸
- メタノール/TMA



(Mochimaru et al. Extremophiles 2007)

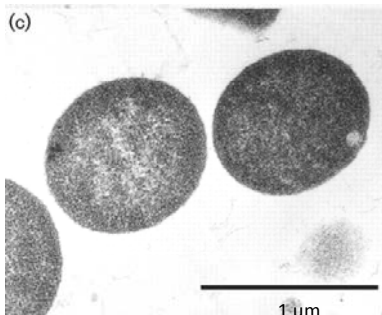
6



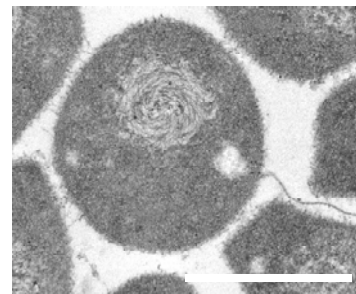
集積培養



- 実環境よりも過剰な基質を添加、必ずしも原位置メタン生成プロセスを再現しない
- 地下環境から未知のメタン生成菌を分離して、その進化系統や生態を明らかにすることも可能



Methanobolus profundus
(Mochimaru et al. IJSEM 2009)



Methanohalophilus levihalophilus
(Katayama et al. IJSEM 2014)

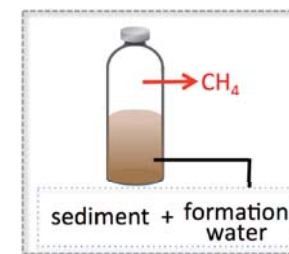
7



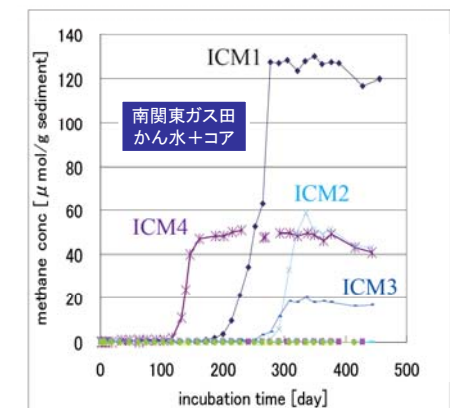
環境模擬培養



- 基質を添加せず、地下から採取した地層水、堆積物、原油等を用いてマイクロゾムを構築し、メタン生成を経時的にモニター
- 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できる



堆積物コア試料+かん水のスラリーを長期間培養、ヘッドスペース中のメタン濃度を測定
→ メタン積算生成量を測定



(Yoshioka et al. Chem Geol. 2015)

8



環境模擬培養



- 深部地下の**高い圧力を模擬**する場合、耐圧容器に試料を入れて、ヘッドスペースに窒素ガスを充填するかポンプで水を圧入



高静水圧培養器



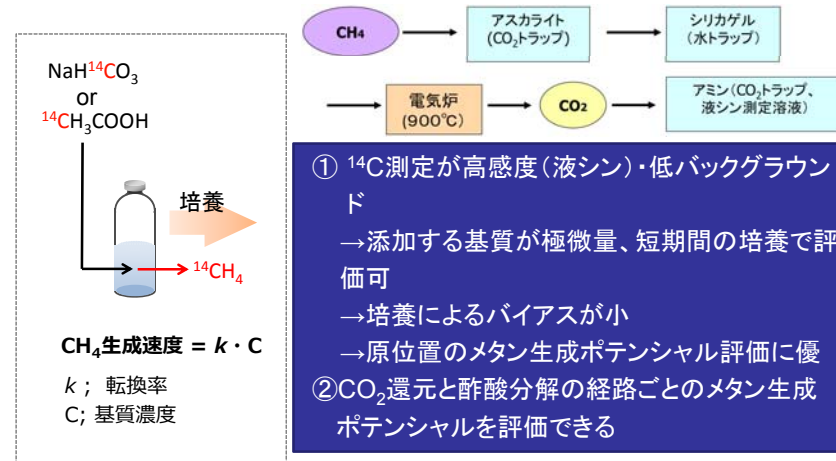
培養器に水を圧入・採取する装置



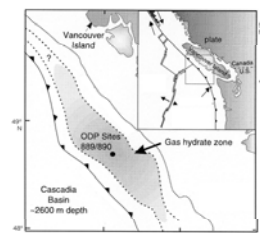
¹⁴C-トレーサー添加培養



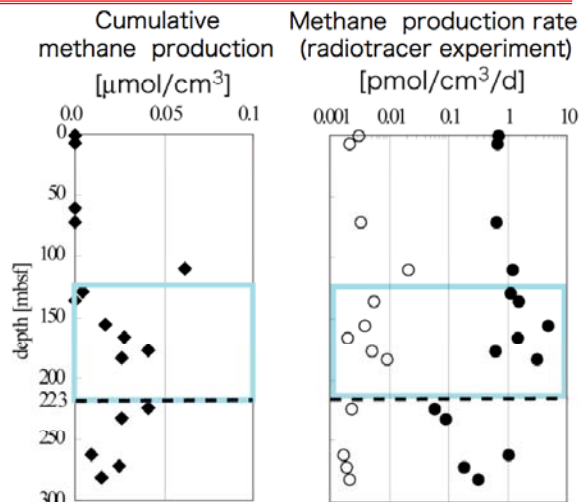
- かん水、堆積物等に¹⁴Cでラベル化した基質を添加、短期間(数日から2週間)培養、生成するメタンの¹⁴Cを計量



¹⁴C-トレーサー添加培養



バンクーバー沖(カスカディア・マージン)の海底堆積物(統合国際深海掘削計画第311次航海)のメタン生成ポテンシャル



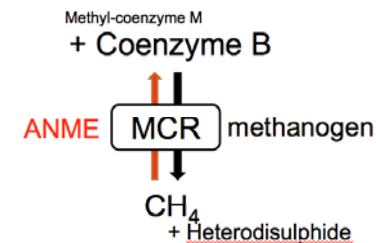
深部・MH濃集帯でメタン生成活性が高い



遺伝子解析

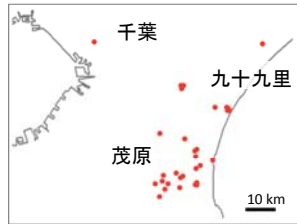


- 地下試料(地層水、堆積物)からDNAを抽出し、増幅、塩基配列をもとにメタン生成菌の情報を抽出
 - 16S rRNA遺伝子解析:メタン生成菌の系統、アーキア全体(または原核生物全体)に占めるメタン生成菌の割合
 - *mcrA*遺伝子解析: *mcr*(メチル補酵素M還元酵素)のαサブユニットを符号化したもの、メタン生成菌の系統
 - リアルタイムPCR:メタン生成菌の塩基配列を定量
- DNAは地下環境において長期間保存される可能性があり
 - より不安定で寿命が短いRNAの塩基配列を解読:生息している生物の情報が得られる

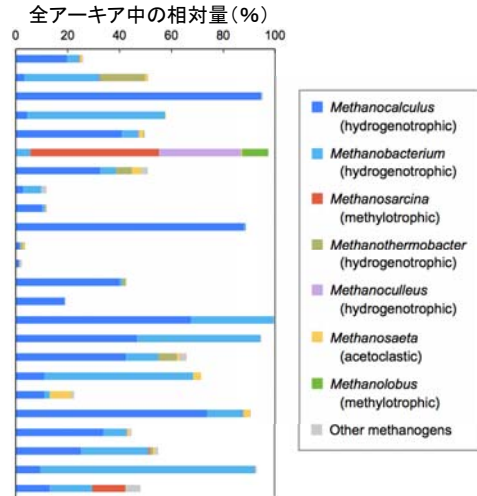
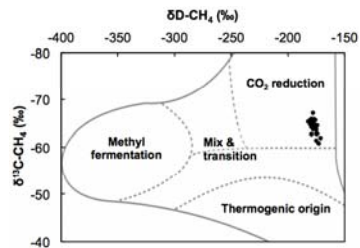




遺伝子解析



16S rRNA遺伝子に基づく、南関東ガス田(24坑井)のかん水中のアーキアの群集構造



水素利用性メタン生成菌が多い

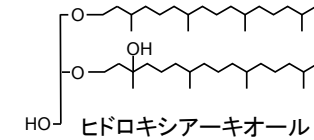
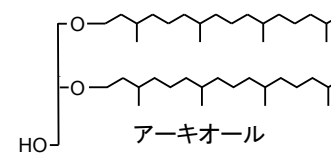
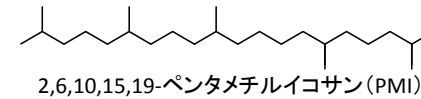
(Katayama et al. ISME J. 2015)



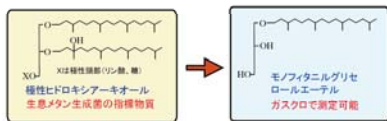
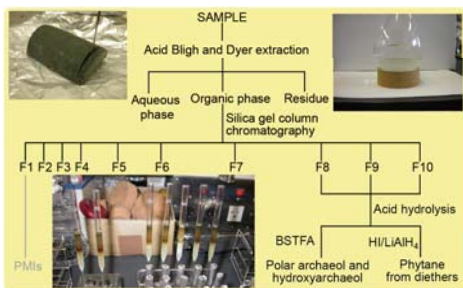
脂質バイオマーカー分析



- メタン生成菌に細胞膜を構成する特徴的な脂質成分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
- 遺伝子解析に比べて定量分析の精度が高い
- 指標性に要注意:メタン生成菌以外の微生物が作る(アーキオール),一部のメタン生成菌は作らない(PMI、ヒドロキシアーキオール)
- 脂質の寿命(安定性)に要注意:死んだ細胞にも由来

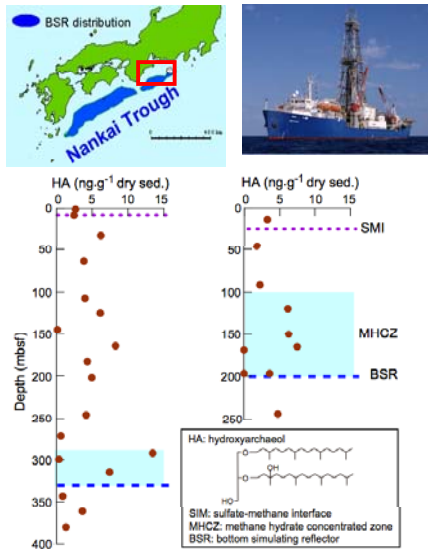


脂質バイオマーカー分析



(Oba et al. Org Geochem. 2006)

深部・MH濃集帯でメタン生成菌が多い



(Oba et al. Org Geochem. 2015)

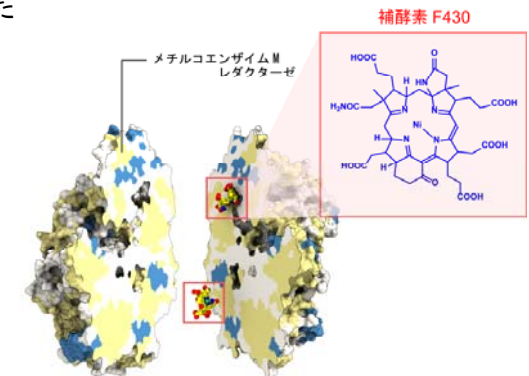


補酵素(F₄₃₀)分析



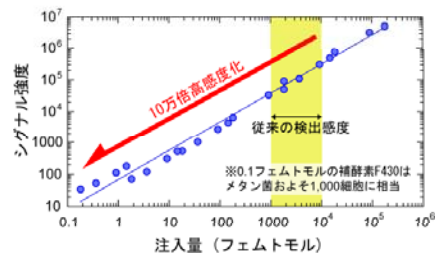
- すべてのメタン生成菌が保有する酵素mcr(メチルコエンザイムMリダクターゼ)の活性部位
- テトラピロール環の中心にニッケルを含む有機金属化合物
- LC-MS/MSによる分析法の開発によって、 $0.1 \times 10^{-15} \text{mol}$ (fmol) のF₄₃₀を定量することが可能となった (10^2 - 10^4 細胞に相当)

- メタン生成菌マーカーとしての**指標性**において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

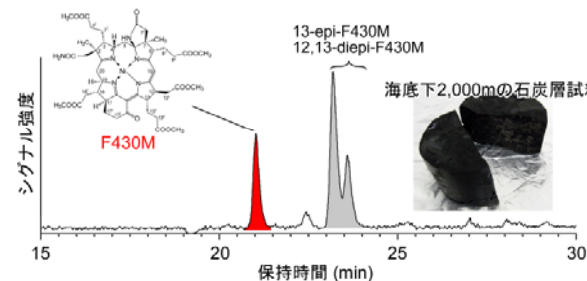




補酵素(F₄₃₀)分析



高速液体クロマトグラフィー/質量分析法における補酵素F₄₃₀の検出感度 (Kaneko et al. Anal. Chem. 2014)



17



培養依存的・非依存的評価技術の融合



- 培養依存的評価技術: 現在生息するメタン生成菌のシグナル, 培養によるバイアスを避けることは困難
- 培養非依存的評価技術: 培養によるバイアスなし, 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



培養依存的評価技術と非依存的評価技術は相補的, 両者を組み合わせることによってメタン生成ポテンシャルに関してより信頼性の高い評価を行える ← 当グループの強み

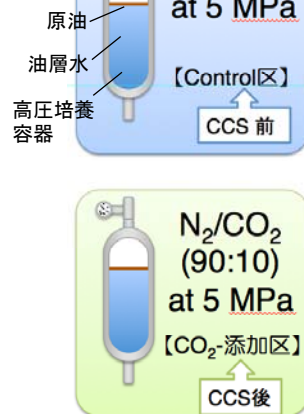
18



環境模擬培養



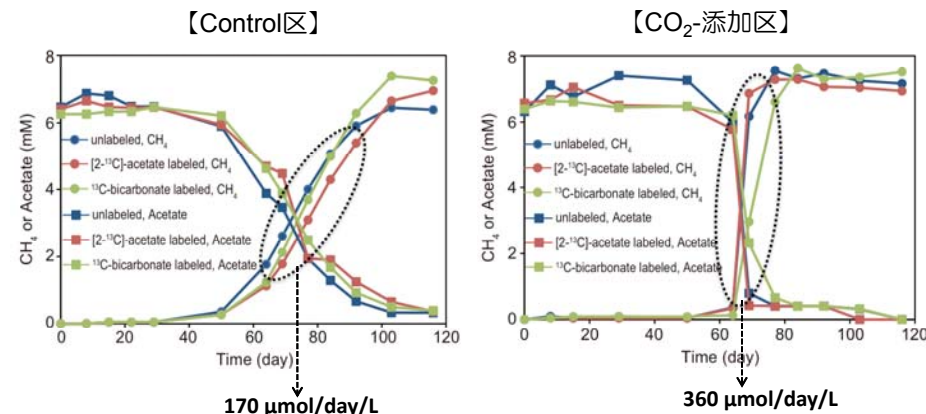
秋田県八橋油田
深度: 1,000-1,300m
油層温度: 53-65°C
油層圧力: 5 MPa



19



環境模擬培養



酢酸が消費、ほぼ等モルのメタンが生成

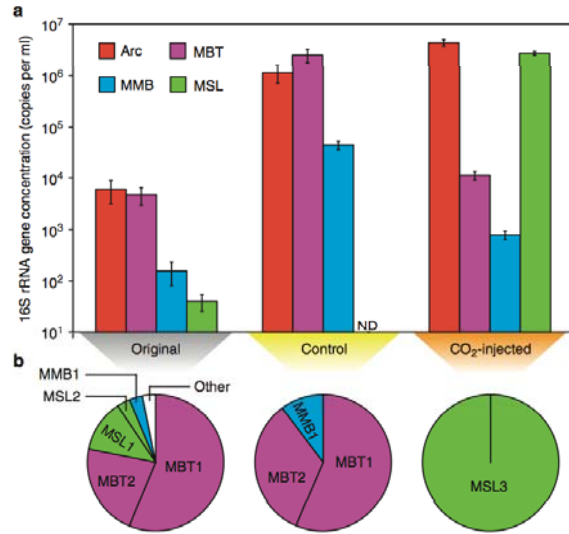
CO₂-添加でメタン生成速度が2倍強

(Mayumi et al. Nature Comm. 2013)

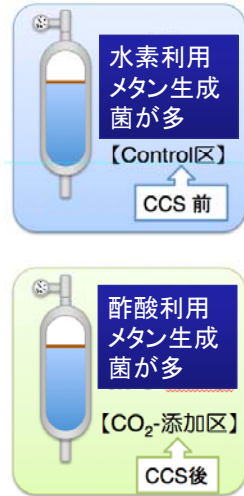
20



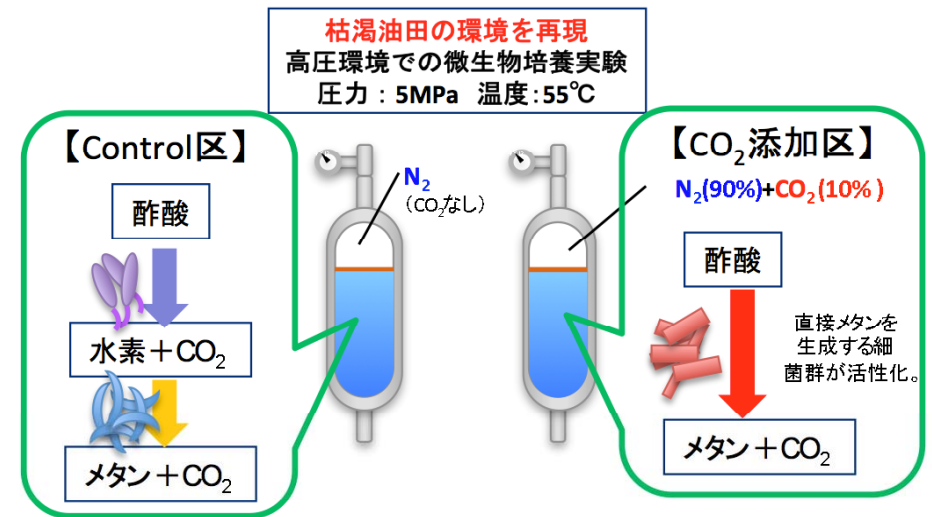
遺伝子解析



(Mayumi et al. Nature Comm. 2013)



環境模擬培養 & 遺伝子解析



CCSと天然ガス生成の両立の可能性を示唆！



地圏微生物研究グループ

