

幌延深地層研究施設を活用した環境バイオテクノロジー研究 - 地下微生物によるメタン生成とその応用展望 -

公益財団法人北海道科学技術総合振興センター 幌延地圏環境研究所
地下微生物環境研究グループ 清水 了

1. はじめに

近年、国内外において地下圏に生息するメタン生成微生物（以下、メタン菌とする）を活用した枯渇油ガス田の天然ガス鉱床としての再生や炭層メタンの増産など、あるいはそれらとCO₂ 地中隔離(CCS)とを合わせたシステムの実現を目指した研究が行われるようになってきた。いずれの場合も基礎研究の域を出ないが少資源国である我が国において、これらの研究の重要度は非常に高いと考えられる。著者らは、北海道の幌延に建設中の深地層研究施設を活用して比較的早い段階からこれらの研究テーマに着手してきた。著者らの研究グループでは、図1に示すビジョンのもとに研究を進めている。具体的には深地層研究施設等のメタン菌が生息する地下圏^{1,2,3}から探索・分離した微生物を活用して、(1)天北炭田の褐炭層や珪藻岩層等に含まれる未利用有機物を微生物の作用によりバイオメタンに変換する方法を開発すること、(2)CO₂を褐炭層に貯留し、さらに微生物により有機物に変換する方法を開発することを長期的な目標としている。これらの研究のアウトカムとしては図2に示した「研究成果を活用したローカルエネルギー地産地消モデル(幌延モデル)」を想定している。このモデルは珪質岩や石炭層が分布する地域に適用が可能であり、エネルギーの地産地消、未利用資源の活用および低炭素社会の実現などによって地域振興および国際貢献が期待できる。著者らも基礎研究の段階にあるが、本発表ではこれまでに北海道の石炭層や珪藻岩層を対象とした研究から得られた知見について、国内外の研究事例を織り交ぜながら紹介したい。

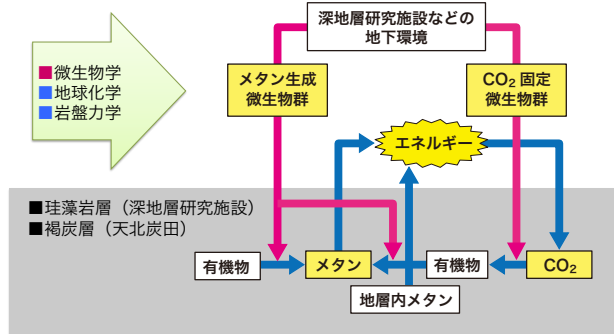


図1 幌延地圏環境研究所の目指す長期ビジョン。

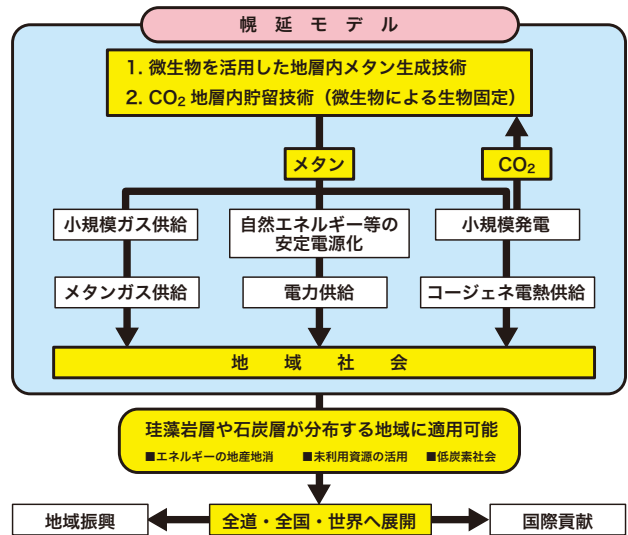


図2 幌延地圏環境研究所の長期ビジョンのアウトカム。研究成果を活用したローカルエネルギー地産地消モデル

2. 石炭層におけるバイオメタン生成

(1) 微生物起源の炭層メタン

はじめに「微生物によって石炭からメタンを商業的に作ることは可能なのか」について考えてみたい。これに類する自然現象(ナチュラルアナログ)として微生物起源の炭層メタンが考えられる。微生物起源の炭層メタンの分布は既出の総説⁴⁾に詳しいが、全世界で30箇所以上が報告されており、アメリカ合衆国においては生産されている天然ガスのうち約10%が炭層由来のメタンであり、その約半分が微生物起源のメタンであるといわれている。このように石炭層におけるバイオメタン生成については多くのナチュラルアナログが存在する。これらのメタン生成プロセスやそれに関与している微生物を明らかにすることにより、石炭層におけるメタン生成を促進する手段やバイオメタンの商業生産技術についてのヒントが得られるかもしれない。

(2) 石炭層の微生物と特徴

日本国内における石炭層を対象とした微生物研究は非常に少なく、北海道の石狩炭田で著者らが行った研究が一例あるのみである⁵⁾。最近、(独)海洋研究開発機構の海洋資源研究プロジェクトの地球生命工学研究グループが地球深部探査船「ちきゅう」を用いて下北沖の褐炭層の採取に成功しており、今後、石炭層における微生物研究が大きく進展することが期

待されている。ここでは、著者らが石狩炭田夕張地域で行われた CO₂-ECBM (CO₂ の炭層隔離により炭層メタンの回収増進を目指した事業)実証サイトから得られた知見について概説する。我々は炭層メタン生産井(採水深度 843.1-907.0 mbgl)から得られた地下深部の瀝青炭層の地層水についてどのような微生物が存在しているのか調査を行った。炭層地層水中からはメタン生成に関わる微生物群集の 16S rRNA 遺伝子が検出され、遺伝子解析により構築された古細菌の遺伝子ライブラリーは驚くべきことに 90%がメタン菌の系統で占められていた(図3)。その内訳は、CO₂ 基質型(4H₂+CO₂→CH₄+2H₂O)のメタン菌が 53.4%, メチル化合物基質型(CH₃OH+H₂→CH₄+H₂)あるいは酢酸基質型(CH₃COO⁻+H₂O→CH₄+HCO₃⁻)の系統が 36.7%を占めていた。これらの系統は海外の炭田から検出されているメタン菌の系統とも属レベルで一致していた。一方、真正細菌ではメタン菌との共生あるいは共生が報告されているホモ酢酸生成微生物および *Syntrophus* 属が優占しており、メタン生成に関わる微生物集団の存在が強く示唆された。しかし、これらの結果は石炭層のメタンが熱分解起源であるとする安定同位体比の結果とは相反していた。この解釈としては、炭層内の大部分のメタンは、微生物起源によるものではなく、石炭化反応過程の高温高压下で熱分解反応により生成され、メタン菌群は、その後の地層の隆起などによる地層温度の低下にともない地下水中出现した可能性が考えられる。

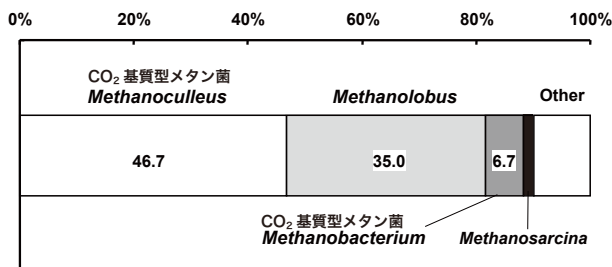


図3 石狩炭田瀝青炭層地層水から得られた古細菌遺伝子の組成比。ほとんどメタン生成菌で占められていることがわかる。

海外の石炭層における微生物研究のうち微生物の系統については著者らの総説⁵⁾に詳しいので、興味ある方は参照されたい。この総説を執筆した時点(2011年)では、地域的に最も報告が多いのが、北米(5例)とオーストラリア(4例)であり、日本と欧州はそれぞれ1例しか報告がない。報告の多い北米についても、すべての商業用炭層について報告がある訳ではなく Powder river に報告が集中しており限定的である。石炭のランクに着目した場合、最も報告が多いのが瀝青炭 4例、次いで亜瀝青炭で 3例、褐炭で 2例となっており、石炭ランクによって検出されているメタン生成古細菌の系統に特徴がみられ

る。瀝青炭および亜瀝青炭では多様な系統が検出されているのに対して褐炭ではCO₂基質型メタン菌 *Methanobacterium* の一系統のみが検出されている。瀝青炭および亜瀝青炭で検出されているメタン生成古細菌についても CO₂ 基質型の系統が多く報告されており、炭層ではCO₂基質型のメタン生成が主要プロセスであると推測されている。一方、真正細菌については紙面の都合上省略するが、石炭の微生物分解プロセスについて Strapoc⁶⁾がイリノイの瀝青炭から検出された真正細菌の遺伝子の系統をもとに考察を行なっている。

以上のように炭層における微生物生態学的な報告はまだまだ少ない。今後、炭層のCO₂-ECBM利用や炭層メタンの商業生産に対する関心の高まりにともない炭層微生物に関する知見が増えることが望まれる。

(3) 石炭層におけるバイオメタン生産の試み

1) 海外における先行研究

海外の石炭層におけるバイオメタン生産研究についても著者らの総説⁵⁾に詳しいので、興味ある方は参照されたい。この総説を執筆した時点(2011年)では、すべての報告が北米の炭層に関するものに限定されており、Powder River の亜瀝青炭(4例)に報告が集中している。他には South Texas の亜瀝青炭、アラスカの褐炭についての報告があるのみである。この中でもっとも研究が進んでいるのがアメリカ合衆国地質調査所の Jones らのグループであり、South Texas と Powder River の亜瀝青炭を用いてバイオスティミュレーション(Bio-stimulation)とバイオオーグメンテーション(Bio-augmentation)技術によりメタン生成に成功している^{7,8)}。両技術を比較した場合、バイオスティミュレーションのみではメタン生成反応が定常値に達するまでに約 100 日間を要しているが、バイオオーグメンテーション技術を併用することにより、反応日数を約半分まで短縮することに成功している。Jones らの実験系では 50-60 日間で約 80 μmole(1.8ml)/g coal のメタン生成がなされており、この数値は商業用炭層ガス鉱床のメタンガス包蔵量に匹敵する。Jones らは石炭からのバイオメタン生成プロセスについて、彼らが検出した微生物の系統や石炭関連化合物の分解反応に関する過去の報告などをもとに考察を行っている(図4)⁸⁾。今後、石炭中の有機物の特徴付けとバイオメタン生成の実験系から単離された微生物を用いた各反応プロセスの検証により、石炭からのバイオメタン生成プロセスの詳細が明らかになることを期待したい。

2) 天北炭田におけるバイオメタン研究

著者らは、北海道北部の天北炭田の褐炭を中心に北海道内の他の石炭(釧路コールマインの亜瀝青炭や空知炭田の瀝青炭)を対象として、これらのバイオメタン化方法の検討とメタン生成プロセスの検討を行なっている。現在、天北炭田の褐炭からメタン菌群の培養に成功しており、これらのメタン菌群の特徴付けおよびその基質(餌)となる有機物や根源物質の探索を進めている。その結果、海外の先行研究と同様に酢酸が重要な中間代謝物かつメタン生成の基質となっていることを示

唆するデータが得られている。さらには、後述する幌延地域の深部地下水から単離した真正細菌が褐炭由来のフミン酸の分子構造に影響を与えることを示唆するデータ等が得られており、褐炭中のメタン生成プロセスの一端が少しずつではあるがわかりはじめています。

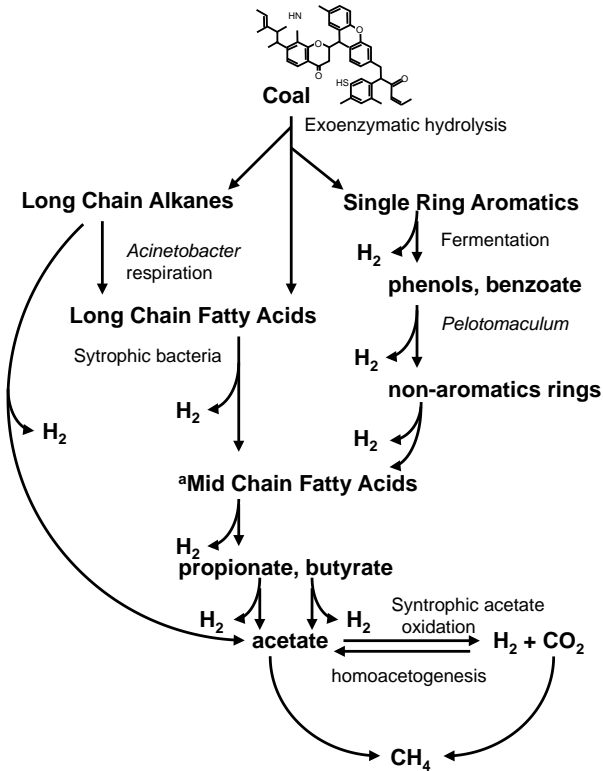


図4 Jones らが彼らの研究や他のラボの研究に基づいて提案している石炭からのバイオメタン生成モデル⁸⁾。*Mid-chain fatty acids は培養試験において検出されていない。

3. 幌延地域の珪質岩におけるバイオメタン生成

(1) 幌延地域の珪質岩層のメタンの包蔵量と起源

北海道北部の幌延地域には、新第三紀中新世～鮮新世の堆積岩である珪藻質泥岩(声問層)および珪質頁岩(稚内層)が広く分布している。両層は整合関係で接し、声問層の上位には、鮮新世～更新世初頭に堆積したやや軟質な細粒砂岩からなる勇知層が漸移している。幌延では(独)日本原子力研究開発機構が深地層研究施設の建設を行っている。この施設は通常はアクセスが困難な地下から、研究用試料の採取が可能な世界的にもユニークなサイトである。この珪藻岩層の地層水にはメタンを主成分とするガスが含まれており、エネルギー資源としての可能性が期待できる(図5)。また、溶存ガス中のメタンおよびCO₂の安定同位体分析の結果から、溶存するメタンはCO₂を基質とする微生物起源であることが著者らの研究から明らかになっている。著者らは、この地層水中からメタン菌群の培養に成功しており、現在そのメタン生成プロセスの解明と地層内メタンの増産方法の開発めざして研究を進めている。

(2) 幌延地下深部のメタン菌と特徴

幌延の稚内層(地下約 300m-600m)の地層水について、どのような微生物が生息しているのか調査を行った。遺伝子解析による結果、石狩炭田の石炭層と同様に、メタン菌が非常に高い割合で存在することが明らかになっている¹⁾。その内訳は、CO₂基質型(4H₂+CO₂→CH₄+2H₂O)のメタン菌が圧倒しており、次いで、メチル化合物基質型(CH₃OH+H₂→CH₄+H₂O)あるいは酢酸基質型(CH₃COO⁻+H₂O→CH₄+HCO₃⁻)の系統が多く分布していた(図6)。著者らは、幌延珪藻岩層の地層水中から遺伝子解析により明らかになった優占種のメタン菌の単離に成功している(図7)。そのうちのひとつである *Methanosarcina horonobensis*(メタノサルシナ・ホロノベンシス)は単離源となった幌延の地名に因んで命名し⁹⁾、日本国内とドイツのカルチャーコレクションを通して、全世界の研究者が利用できるように公開されている。この他にも最近、新種論文が受理された *Methanoculleus horonobensis*(メタノクレウス・ホロノベンシス)も公開準備中となっている¹⁰⁾。これらの幌延の優占種であるメタン菌の生化学的な機能を詳細に研究することにより、幌延の地圏におけるメタン生成プロセスの一端を明らかにすることができ、地層中におけるバイオメタン増産の手がかりが得られると考えられる。また、褐炭の場合と同様に著者らは、珪藻岩中のフミン酸の分子構造に影響を与える真正細菌の単離に成功しており、珪藻岩中におけるメタン生成プロセスが少しずつではあるがわかりはじめています。

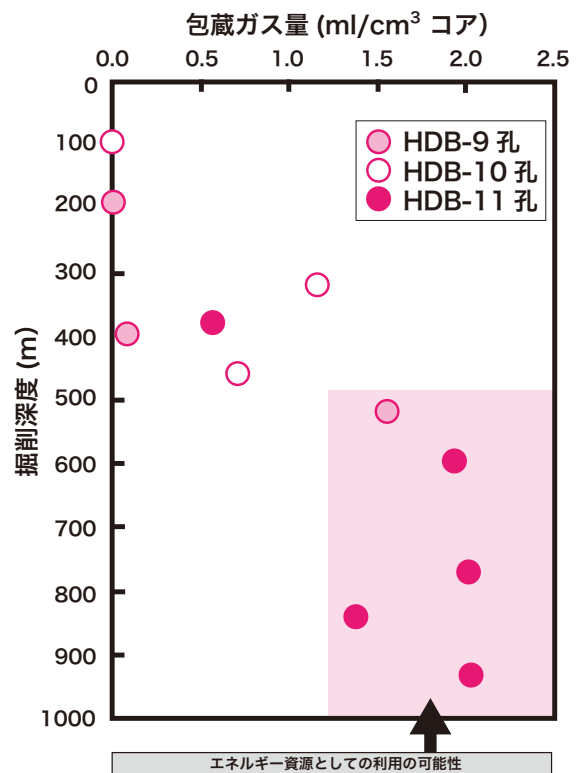
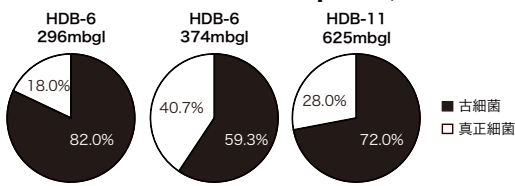


図5 幌延地域の珪藻岩層から採取したコアに含まれるガス包蔵量。

古細菌と真正細菌の 16S rDNA量の比率 (qPCR)



古細菌の群集構造の特徴 (16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリー)

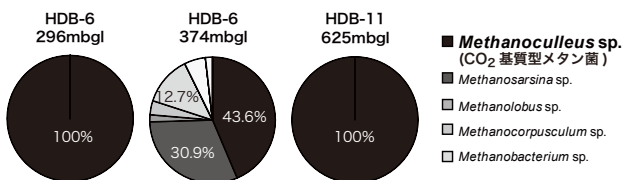


図6 幌延珪藻岩層の微生物群集構造. メタン生成菌はすべて古細菌に分類される。古細菌の群集構造の円グラフでは白色以外はすべてメタン菌であり、幌延の地下ではその比率が非常に高いことがわかる。

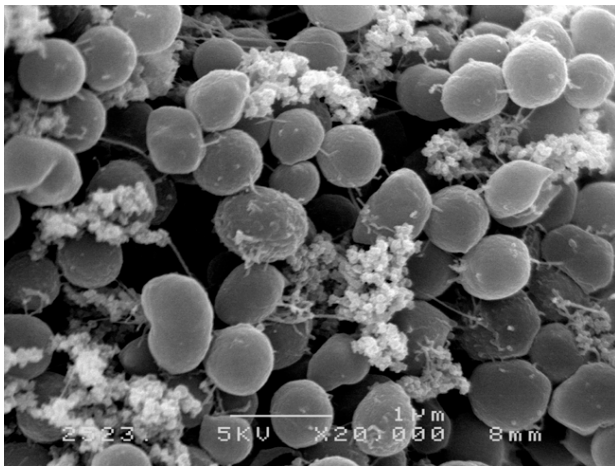


図7 幌延珪藻岩層から単離されたメタン菌の SEM 画像。図6の遺伝子調査で主要な系統と16S rRNA 遺伝子の一致率は 99.9%である。このように環境中で優占している微生物を単離できる事例は非常に稀である。

(3) 幌延地域から単離された CO₂ 固定微生物と応用

著者らは図1および図2における地層内メタンからエネルギーを生産する際に発生する CO₂ の地中隔離とその生物固定に関する研究も推進している。著者らはこれまでに数百株の CO₂ 固定微生物 (CO₂ を炭素源とし、有機物の存在しない環境で生育可能な微生物) の単離に成功しているが、その中でも図8に示した好気性の CO₂ 固定微生物は非常に生育速度が速い特徴を有している¹¹⁾。著者らは CO₂ を地中に注入する際に酸素 (空気) も同時に注入することにより、褐炭層などの地

下環境でこれらの微生物を利用した CO₂ の有機炭素化を行うための研究を計画している。なお、ここで生成された有機炭素は他の分解微生物の作用によりバイオメタンの原料への変換を狙っている。これらの一連の反応プロセスのコントロールが可能になれば、図1および図2に示した CO₂ を排出しないエネルギー生産システムの実現が期待できる。

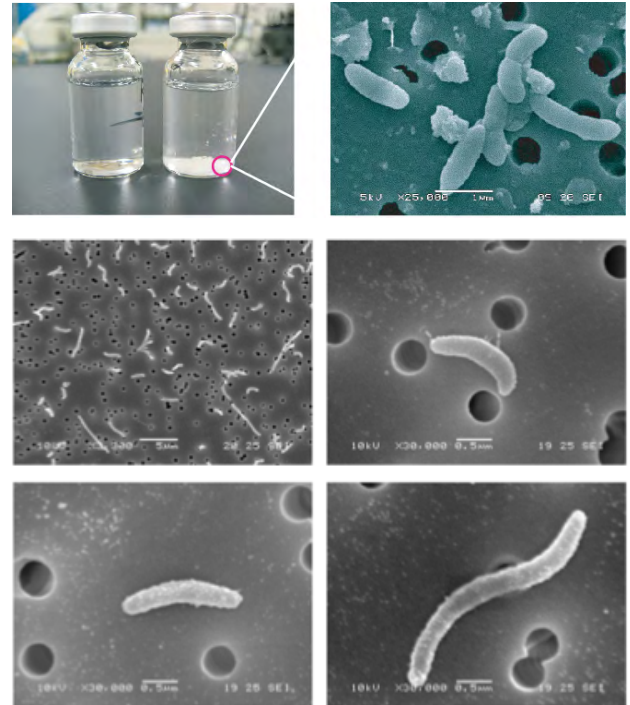


図8 幌延珪藻岩層から単離された好気性の CO₂ 固定微生物の SEM 画像。幌延地圏環境研究所で行った調査の結果、下図の CO₂ 固定細菌の生育速度は既知の CO₂ 固定微生物の中では非常に高速である。

4. 参考文献

- 1) Shimizu *et al.* (2006) *Geobiology* **4**, 203-213.
- 2) Shimizu *et al.* (2007) *Geobiology* **5**, 423-433.
- 3) Shimizu *et al.* (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1835-1837.
- 4) Strapoč *et al.* (2011) *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* **39**, 617-656.
- 5) 清水ら (2012) 環境バイオテクノロジー学会誌. **12**, 15-24.
- 6) Strapoč *et al.* (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2424-2432.
- 7) Jones *et al.* (2008) *Int. J. Coal Geol.* **76**, 138-150.
- 8) Jones *et al.* (2010) *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7013-7022.
- 9) Shimizu *et al.* (2011) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2503-2507.
- 10) Shimizu *et al.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* In press.
- 11) 清水ら (2010) 日本生物工学会誌 **88**, 452.