

総説

天然ガス・石油の成因と微生物の寄与に関する有機地球化学的研究 *

坂田 将 **

(2018 年 9 月 27 日受付, 2018 年 11 月 12 日受理)

Abstract

Compositions of hydrocarbon components and their carbon and hydrogen isotopic ratios suggest that natural gases from oil and gas fields in Japan are of biogenic origin, i.e., either thermogenic and/or microbial, that contribution of abiogenic hydrocarbons to the gases accumulated in volcanic rocks in the Green Tuff region is small, and that contribution of microbial methane is important even to the gases coproduced with crude oils. Diverse methanogens were detected with methanogenic activities mostly via CO₂ reduction in the brines from Minami-Kanto gas field of dissolved-in-water type, where the gases have been estimated to be microbial in origin. A large amount of methane was produced in the experiments incubating brines and sediments from Mobarra in this gas field, which has revealed a high potential of *in situ* subsurface microorganisms to produce methane from kerogen. Methanogens, mostly classified to hydrogenotrophic type, are present in deep seafloor sediments in the eastern Nankai Trough, and particularly abundant in those from methane hydrate concentrated zone. Anaerobic methanotrophic archaea being adapted to a low-salinity environment were also found in sediments characterized by a high percentage of methane hydrate pore saturation. In high pressure incubation experiments mimicking the oil reservoir conditions of Yabase field, a syntrophic community of acetogens and hydrogenotrophic methanogens converted acetate in the formation water to methane via a sequential reactions of acetate oxidation and CO₂ reduction. By contrast, in a high CO₂ partial pressure incubation experiments mimicking the oil reservoir conditions after CCS, acetoclastic methanogens became dominant, which converted acetate directly to methane. *Methermicoccus shengliensis* strain AmaM, a methanogen isolated from an oil reservoir in Amarume field was revealed to convert methoxy aromatic compounds to methane via a novel pathway including *O*-demethylation, CO₂ reduction, and acetyl-CoA metabolism, and also to produce methane directly from coals ranging from lignite to bituminous coal. Oils produced from Green Tuff region, including those accumulated in volcanic rocks, contain abundant >C₁₅ isoprenoid alkanes, which dictates their biogenic origin. The δ¹³C values of the oils fall in the range of those of argillaceous rocks from the same region. Maturity data such as the C₂₉ sterane 20S/(20S+20R) ratios suggested that condensates are most mature among the oils, and that the oils in the Akita Basin are generally less mature than those in the Niigata Basin. Carbon isotopic fractionations associated with the biosynthesis of hopanoids by a cyanobacterium (vs. cell) differ significantly between C₃₀ (diploptene and diplopterol) and >C₃₁ (bacteriohopanepolyols), which is consistent with the distribution of δ¹³C values among C₂₉-C₃₅ hopanes in Miocene Monterey crude oil.

*Organic geochemistry of natural gas and petroleum formation with a focus on the contribution of microorganisms

**産業技術総合研究所 地質調査総合センター 地圏資源環境研究部門 地圏微生物研究グループ

〒 305-8567 茨城県つくば市東 1-1-1

Susumu Sakata: Institute for Geo-Resources and Environment, Geological Survey of Japan, AIST

1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8567, Japan

e-mail: su-sakata@aist.go.jp Tel: 029-861-3898; Fax: 029-861-3666

1. はじめに

地下資源の成因（起源や生成過程）を理解することは、学術的な意義とともに、資源ポテンシャル評価の精度を高め、探鉱を効率的に進めるために必要である。天然ガス・石油の成因については、一般に、地下圏の有機物の分解で生成するもの（生物起源）と、無機化合物（水素、一酸化炭素、二酸化炭素等）の反応で生成するもの（非生物起源）に区分される。前者についてはさらに、有機物の地熱によるクラッキング反応で生成するもの（熱分解起源）と、微生物の代謝産物として生化学反応で生成するもの（微生物起源）に区分される（Schoell, 1988）。日本の天然ガス・石油の特徴として、砂岩のみならず火山岩を貯留岩とする油ガス田が東北日本の日本海側（グリーンタフ地域）に多く存在すること（藤田, 1985）と、地層水（かん水）にガスが溶解する形で帯水層に濃集する水溶性ガス田が北海道から沖縄まで広く分布していること（地質調査所, 1980）が挙げられる。また日本の周辺海域（太平洋側及び日本海側）の海底にメタンハイドレートが分布・濃集し、将来の天然ガス資源として期待されている（松本, 2009）。これまで筆者は共同研究者とともに、国内油ガス田の天然ガス・石油の成因や日本近海のメタンハイドレート濃集帯の天然ガスの成因を解明することを課題とし、特に地下微生物がメタンを生成するプロセスに焦点を当てた有機・生物地球化学的研究に取り組んできた。本稿はその研究成果を概説するものである。

2. グリーンタフ地域油ガス田の火山岩に貯留する天然ガスの起源

東北日本の日本海側（グリーンタフ地域）に分布する油ガス田は火山岩に貯留するものが多く存在し、天然ガス中のヘリウムの同位体比（ $^3\text{He}/^4\text{He}$ 比）が高く、深部流体の寄与が示唆される。この特徴から、本天然ガスが非生物起源である可能性が指摘されている（Wakita and Sano, 1983; Wakita et al., 1990）。一方で、メタン～プロパンの成分組成やメタンの炭素・水素同位体比からは、同じ地域の砂岩に貯留する天然ガスと有意の差が認められず、

メタン / (エタン+プロパン) vs. $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ (Bernard et al., 1976) や $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ vs $\delta\text{D}-\text{CH}_4$ (Whiticar et al., 1986) の起源評価図に従えば、生物起源（熱分解起源、微生物分解、もしくは両者の混合）と推定される（坂田ら, 1986; Sakata et al. 1989; Sakata, 1991; Sakata et al., 1997b; 坂田, 1997）。また、ヘリウム同位体比がメタン・ヘリウム濃度比（ $\text{CH}_4/{}^3\text{He}$ ）と明瞭に相関しており、その関係を「放射性起源のヘリウムを伴う生物起源のメタン」と「メタンを伴わない深部マントル起源のヘリウム」という2端成分の混合モデルによって説明することが可能である（Sakata et al. 1989; Sakata, 1991; Sakata et al., 1997b; 坂田, 1997）。

グリーンタフ地域の天然ガスは、メタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値が最も低く、エタン、プロパン、*n*-ブタンと炭素数が増えるとともに $\delta^{13}\text{C}$ 値が高くなる（Sakata, 1991; 坂田, 1997）。対照的に、蛇紋岩化システム、隕石、火花放電実験などから得られる非生物起源のガスは、メタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値が最も高く、炭素数が増えるとともに $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなる（Suda et al., 2017）。前者の傾向は、高分子有機物のクラッキング反応によって炭化水素が生成する際に、 $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$ 結合が $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ 結合より速く切れること（McCarty and Felbeck, 1986; Chung et al., 1988）と整合的である。後者の傾向は、 C_1 化合物（メタン、一酸化炭素、あるいは二酸化炭素）の重合で C_2 以上の化合物が生成する際に $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$ 結合が $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ 結合より速くできることと整合的である（Suda et al., 2017）。したがって、グリーンタフ地域の天然ガスは、メタン～*n*-ブタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値の関係から、ケロジェンや原油の熱分解プロセスによって生成された可能性が支持されている（Sakata, 1991; 坂田, 1997）。

グリーンタフ地域のガスのエタン～プロパン～*n*-ブタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値をより定量的に解析すると、Chung et al. (1988) のモデルから想定される熱分解起源の炭化水素の相関式：

$$\delta^{13}\text{C}_4 - \delta^{13}\text{C}_3 = 0.50 \times (\delta^{13}\text{C}_3 - \delta^{13}\text{C}_2)$$

と整合的 (Fig. 1a) である。その一方、メタン～エタン～プロパンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は同モデルから想定される相関式：

$$\delta^{13}\text{C}_3 - \delta^{13}\text{C}_2 = 0.33 \times (\delta^{13}\text{C}_2 - \delta^{13}\text{C}_1)$$

から系統的にシフト (Fig. 1b) しており、熱分解起源のメタン～プロパンに $\delta^{13}\text{C}$ 値が低い微生物

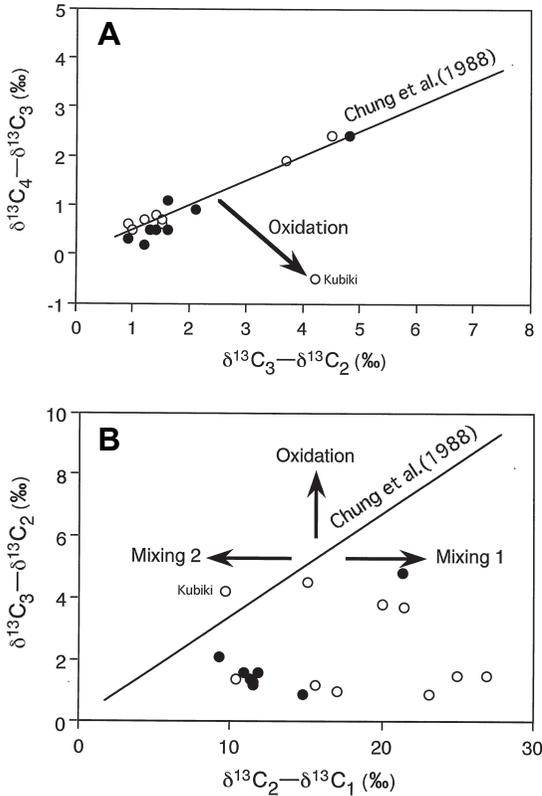


Fig. 1. Plots of $\delta^{13}\text{C}_4 - \delta^{13}\text{C}_3$ vs. $\delta^{13}\text{C}_3 - \delta^{13}\text{C}_2$ (A) and $\delta^{13}\text{C}_3 - \delta^{13}\text{C}_2$ vs. $\delta^{13}\text{C}_2 - \delta^{13}\text{C}_1$ (B), where $\delta^{13}\text{C}_1$, $\delta^{13}\text{C}_2$, $\delta^{13}\text{C}_3$, and $\delta^{13}\text{C}_4$ are carbon isotopic values (vs. PDB) of methane, ethane, propane, and n-butane in natural gases from Northeast Japan (Sakata, 1997). Solid and open circles indicate gases accumulated in volcanic and sandy reservoir rocks, respectively. Solid lines indicate correlation expected for thermogenic hydrocarbons, according to the model by Chung et al. (1988). Three arrows indicate the directions in which thermogenic gas would be shifted by mixing with isotopically light microbial methane (Mixing 1), mixing with isotopically heavy abiogenic methane (Mixing 2), and microbial oxidation of propane (James and Burns, 1984), respectively.

起源のメタンが付加しているためと解釈されている (Sakata, 1991; 坂田, 1997)。このことは石油とともに生産される天然ガスにおいても微生物起源のメタンの寄与が重要である可能性を示すものである。後の研究では、ケロジェンの熟成度とその熱分解で生成するメタン-エタン-プロパンの $\delta^{13}\text{C}$ 値の関係が室内 (開放系非含水熱分解) 実験と速度論的解析に基づいてモデル化されている

(Berner and Faber, 1996)。また、このモデルにグリーンタフ地域を含む国内油ガス田の天然ガスのデータを適用すると、多くの場合において微生物起源のメタンの寄与が大きいことが推定されている (Waseda and Iwano, 2008)。

3. 水溶性ガス田における天然ガスの起源と生物的メタン生成プロセス

水溶性天然ガスは我が国における天然ガス生産量の約15%を占める重要なエネルギー資源であり、その代表例である南関東ガス田は国内ガス田の中で埋蔵量が最大である。メタン~プロパンの成分組成とメタンの炭素・水素同位体比等から、南関東や新潟地域の水溶性天然ガスは主としては微生物起源である一方、西南日本地域の一部の水溶性天然ガスは熱分解起源のガスの寄与が推定されている (Igari and Sakata, 1989; Sakata et al., 1997b; 金子ら, 2002; Sakata et al., 2012; Katayama et al., 2015)。南関東や新潟地域の水溶性ガス田のかん水中にメタン生成の基質 (水素 + CO_2 , 酢酸, メタノール) を添加し嫌気条件で培養すると短期間でも高い収率でメタンに変換される (Mochimaru et al., 2007a, b; Katayama et al., 2015)。また南関東 (茂原) ガス田のかん水から新規の水素資化性 (Mochimaru 2016) 及びメチル化合物資化性メタン生成菌 (Mochimaru 2009, Katayama 2014) が分離されている。さらに、このかん水に同じガス田の堆積物 (コア及びスラッジ) を添加し、基質や栄養剤を添加せず長期間培養すると、大量 (堆積物中の有機炭素量の5-18%に匹敵) のメタン生成が観察され、現地の地下微生物がケロジェンをメタンに変換する高いポテンシャルを有することが推定されている (Yoshioka et al., 2015)。 ^{14}C -トレーサー法で原位置のメタン生成活性を経路別に評価すると、 CO_2 還元速度が酢酸分解速度よりも2桁以上高い値が得られる (Katayama et al., 2015)。これと整合的に、遺伝子 (16S rRNA 遺伝子) 解析によるアーキアの群集構造において、水素資化性メタン生成菌が酢酸資化性メタン生成菌よりも多い (Katayama et al., 2015)。多数の坑井試料の培養・分析結果を解析すると、生産年数が浅い坑井のかん水中にメチル資化性メタン生成菌が多いことや、茂原型 (生産とともにガス水比が

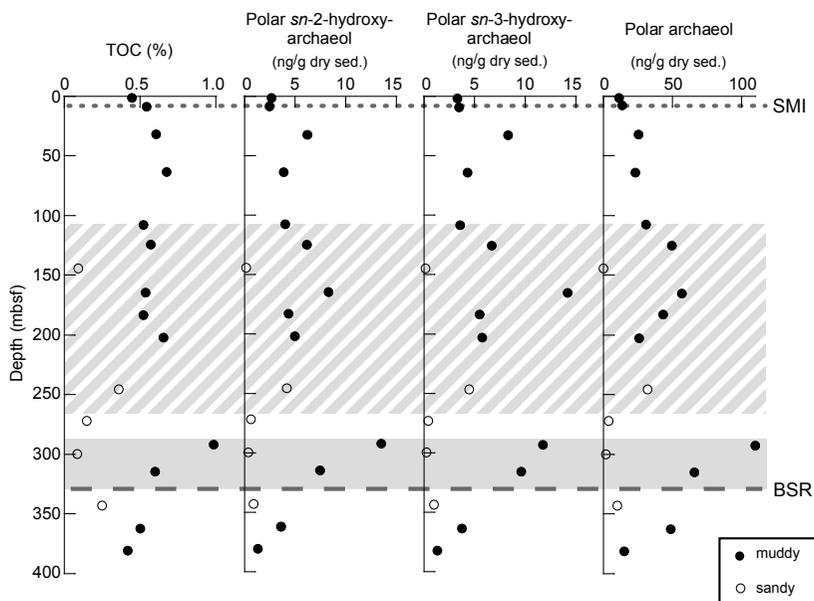


Fig. 2. Depth profiles of the concentrations of total organic carbon (TOC) and archaeal polar lipids in muddy and sandy sediment core samples from eastern Nankai Trough off the Pacific coast of Japan (Oba et al., 2015). Shaded and hatched areas represent hydrate zones with high and low pore saturations, respectively. SMI, sulfate-methane interface; BSR, bottom simulating reflector.

上昇する特徴を有する) 坑井においてメタン生成活性が経年的に高くなるなど、天然ガスの開発・生産がかん水中の微生物のメタン生成活動に影響を与える可能性が見出された (Katayama et al., 2015)。このことは、南海トラフのメタンハイドレートを作った過去のメタン生成菌の活動も高い頻度の地震活動による岩盤の破壊・流体移動等で刺激を受けた可能性を示唆している (Katayama et al., 2015)。

4. 海洋メタンハイドレート分布域における生物学的メタン生成・消費プロセス

海洋メタンハイドレートは大陸縁辺部に多く分布しており、将来の天然ガス資源として期待されている。例えば、東部南海トラフのメタンハイドレート濃集帯に存在するメタンの量は、地震探査データと掘削試料の解析結果から、日本のLNG輸入量の5.5年分(5,739億 m^3 :藤井ら, 2009)と見積もられている。東部南海トラフのケースを含め、海洋メタンハイドレートの多くは微生物起源と評価されている (Milkov, 2005)。したがってメタンハ

イドレート濃集帯の成因を解明するために海底微生物のメタン生成活性やメタン生成菌の多様性・分布を知ることが必要である。メタン生成活性については東部南海トラフやカスカディアマージンの堆積物コア試料に ^{14}C トレーサーを添加し培養する方法で CO_2 還元と酢酸分解の活性が検出されている (Yoshioka et al. 2009, 2010)。東部南海トラフコア試料におけるメタン生成菌の多様性は、16S rRNA 遺伝子や *mcrA* 遺伝子の塩基配列をもとに、水素資化性メタン生成菌が酢酸資化性メタン生成菌よりも多いことが推定されており (Katayama et al., 2016)、ハイドレートメタンの炭素・水素同位体比から推定されるメタンの成因 (Waseda and Uchida, 2004) と整合的である。メタン生成菌の深度分布は脂質バイオマーカーの測定をもとに評価することが可能であり、東部南海トラフのコア試料に含まれる極性態のアーキオール、*sn-2*-ヒドロキシアーキオール等の分析結果 (Fig.2) から、深部メタンハイドレート濃集帯でメタン生成菌が多いことや、有機炭素量との相関性が高いことが見出されている (Oba et al., 2015)。

海洋堆積物中にはメタンを消費する嫌氣的メタン酸化古細菌 (ANME) の存在も知られている。ANME は硫酸還元菌との共生系を構築し、硫酸を電子受容体としてメタンを酸化することから、メタンと硫酸が多い環境、例えばメタン冷湧水域に多く生息する。東部南海トラフでも第二天竜海丘 (東海沖) の表層付近の堆積物コア (海底下 0.82 m) から ANME に特徴的な炭素同位体比が低い ($\delta^{13}\text{C} < -100\text{‰}$) ペンタメチルイコサン、クロセタン、アーキオール、ヒドロキシアーキオールが検出されている (Oba et al., 2006)。一方、メタンハイドレートが賦存する海域の深部地下圏においても ANME の存在が示唆されている (Yoshioka et al., 2010; Katayama et al., 2016)。例えば東部南海トラフのメタンハイドレート濃集帯の堆積物 (特にハイドレートの孔隙飽和率が高いもの) から、ANME-1 の遺伝子に近い塩基配列が検出され、その試料に硫酸と ^{13}C -メタンを添加するトレーサー実験でメタン酸化活性が検出されている (Katayama et al., 2016)。このメタン酸化活性は塩濃度が高い (海水) 条件と低い条件 (淡水) ではほぼ同レベルであったため、かつメタンハイドレートが分解して間隙水の塩濃度が低下する環境変動にこの古細菌が順応したものと推定されている (Katayama et al., 2016)。関連する情報として、関東平野の完新世海成堆積物で間隙水が淡水化しているコア試料において ANME-1 のクローンが優占し、塩濃度が低い条件で高いメタン酸化活性が検出されており (Takeuchi et al., 2011)、東部南海トラフメタンハイドレート濃集帯の ANME-1 はこの ANME-1 と極めて近縁であることが判明している (Katayama et al., 2016)。

5. 油ガス田貯留層における生物的メタン生成プロセス

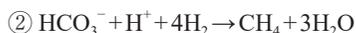
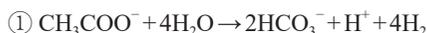
油ガス田貯留層内での原油の生分解は主に嫌気微生物の作用で起きると考えられており、その分解産物として CO_2 とともにメタンがもたらされる (Head et al., 2003)。この天然ガスは二次的生物起源ガスと呼ばれており、原油とともに生成する熱分解起源ガス (メタン、エタン、プロパン等) と混合した状態で存在するため、その検知や定量的評価が難しい。Milkov (2011) は、在来型油ガス田貯

留層中の二次的生物起源メタンの存在を判定する基準として、その貯留層かまたはその下部層に生分解を受けた原油があること、メタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値が $-55 \sim -35\text{‰}$ の範囲でメタンの濃度 (エタン以上の成分との比) が高いこと、そして最も重要な基準として CO_2 の $\delta^{13}\text{C}$ 値が $+2\text{‰}$ より高いことなどを提案した。またその基準にしたがって評価すると、二次的生物起源メタンが世界の回収可能な在来型ガスの 5–11% に匹敵し、熱分解前の未熟成根源有機物の生分解による一次的微生物起源ガス (3–4% に匹敵) よりも多いと論じている。

上記のとおり、原油生分解による二次的生物起源ガスの資源的な重要性が認識されつつある一方、その生成プロセスの詳細、すなわち原油炭化水素がどのような反応経路でメタンに変換され、どのような微生物が各反応を担っているのか、その全容はほとんど未解明である。関連する最初の研究としては、Zengler et al. (1999) が側溝堆積物中に生息し長鎖のアルカン (ヘキサデカン) を嫌氣的に分解しメタンを生成する微生物集積系を獲得したことが挙げられる。彼らは、アーキアとバクテリアの群集構造を 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーに基づいて解析しており、酢酸生成菌がヘキサデカンを酢酸と水素・ CO_2 に分解し、酢酸資化及び水素資化メタン生成菌がそれらをメタンに変換するという反応経路を推定している。また ^{13}C トレーサー法によって水素資化経路より酢酸資化経路の寄与が大きいと評価している。Jones et al. (2008) は、River Tyne 河川堆積物から獲得した微生物を原油とともに培養すると、北海の原油の生分解を模擬するように原油炭化水素成分が分解されメタンに変換されることを見出した。その初期の段階では *n*-アルカンが選択的に分解されてメタンが生成されるとともに、その生成経路は CO_2 還元が優占することを示した。

これらの研究では、非油ガス田環境の微生物を接種源とした培養実験で、ミネラル (窒素やリン)、ビタミン、金属を含む培地を用いており、油ガス田の地下環境における微生物プロセスを必ずしも再現していない可能性がある。これに対して Mayumi et al. (2011) は他の環境から採取した微生物の接種や培地の添加を行わず、同じ油田 (八橋) の原油と油層水のみを用いて油田の地下環境 (温

度、圧力)を模擬する高圧培養系を構築した結果、油層水中の酢酸からメタンが生成される現象を見出した。同位体トレーサー法をもとにその反応経路を解析した結果、以下の連続反応：



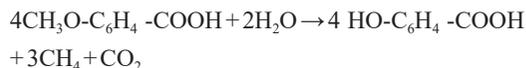
でメタンが生成されることを示した。また、クローンライブラリー法で微生物の群集構造を解析した結果、バクテリアの中では①の反応を担う酢酸生成菌が、アーキアの中では②の反応を担う水素酸化メタン生成菌が優占していることを示した。さらに Mayumi et al. (2013) は、同様の高圧培養実験を CO_2 分圧が高い条件で行うと、油層水中の微生物の群集構造が大きく変化して酢酸酸化メタン生成菌が優占となり、酢酸から直接メタンが生成されるとともに、メタン生成速度が2倍以上速くなることを見出した。この発見は、 CO_2 -EOR や CO_2 地中貯留の目的で枯渇油ガス田に CO_2 を圧入した後で、油層内微生物の働きで天然ガス資源が再生される可能性を示すものである。

6. 生物的炭分解メタン生成プロセス

炭層メタン (コールベッドメタン, CBM) は米国、オーストラリア、中国等では商業的に生産され、非在来型天然ガス資源として重要である。CBM に対する微生物起源メタンの寄与は大きく、例えば米国の CBM の 40% は微生物起源と評価されている (Strapóć et al., 2011)。しかしながら微生物が石炭をメタンに変換するメカニズムについてはほとんど解明されていない。過去の研究から、炭層にはメチル酸化性のメタン生成菌が多いことが知られている (Shimizu et al., 2007; Guo et al., 2012)。一方、石炭にはリグニンに由来する分子構造として、芳香族メトキシ基が存在する (Fig. 3A: Salmon et al., 2009)。これらの点を考慮し、すべてのメチル酸化性メタン生成菌が属するメタノサルシナ目の代表的な菌株を対象として、アニス酸 (メトキシ安息香酸) など多様なメトキシ芳香族化合物 (Fig. 3B) を添加する培養培養 (基質利用性を試験) を行ったところ、*Methermicoccus* 属のメタン生成菌がこれを効率的に利用してメタンを生成した (Mayumi et al., 2016)。

このメトキシ酸化性メタン生成の代謝経路を理解

するために、アニス酸をモデル化合物としてメタン生成菌 *Methermicoccus shengliensis* AmaM 株を培養し、基質と代謝産物の量的関係を分析した結果、



という反応式に当てはまることが示された。これはメタノールからのメタン生成 (メチル酸化性メタン生成) の反応式：



と類似しているため、共通の反応経路、すなわちメチル基の不均化反応 (4つのメチル基の中の3つがメタンに還元され、残りの1つが CO_2 に酸化されること) という可能性が予察された。しかしながら、 ^{13}C でラベル化したメタノール、アニス酸、または重炭酸 (培地成分) を添加する培養実験をもとにメタンの炭素源を解析した結果、メタノール基質で生成されるメタンがすべてメタノールのメチル基に由来するのに対し、アニス酸基質で生成されるメタンは 2/3 がアニス酸のメトキシ基に、1/3 が重炭酸に由来することが判明した。このことは、メトキシ酸化性メタン生成経路の中に CO_2 還元が含まれていることを示唆する。また、メタノールまたはアニス酸を基質とする培養系に、メチル基を ^{13}C でラベル化した酢酸を添加すると、メタン生成の過程で酢酸濃度が変化しないにもかかわらず、メタンと重炭酸がともに ^{13}C でラベル化される現象がアニス酸の培養系においてのみ観察された。このことから、メトキシ酸化性メタン生成経路における中間体と細胞外 (培地中) の酢酸の間でアセチル基の交換があり、アセチル CoA がその中間体の候補と推定された。AmaM 株のゲノム情報によれば、アセチル CoA 合成、アセチル CoA 酸化、および CO_2 還元の酵素をコードする遺伝子を含む一方、酢酸生成菌によるメトキシ基の *O*-脱メチル化や従来のメタン生成に必要な電子伝達系に対応する遺伝子が部分的に欠損している。以上のことから、メトキシ酸化性メタン生成経路は、なお代謝様式の詳細が不確定ではあるものの、*O*-脱メチル化、 CO_2 還元、及び (恐らく) アセチル CoA 代謝の組み合わせ (Fig. 3B) であり、既知の3つのメタン生成経路経路 (水素酸化、酢酸酸化、メチル酸化) とは異なる新規のものと認識された (Mayumi et al., 2016)。

さらに、メタン生成菌 (AmaM 株) を多様な石炭

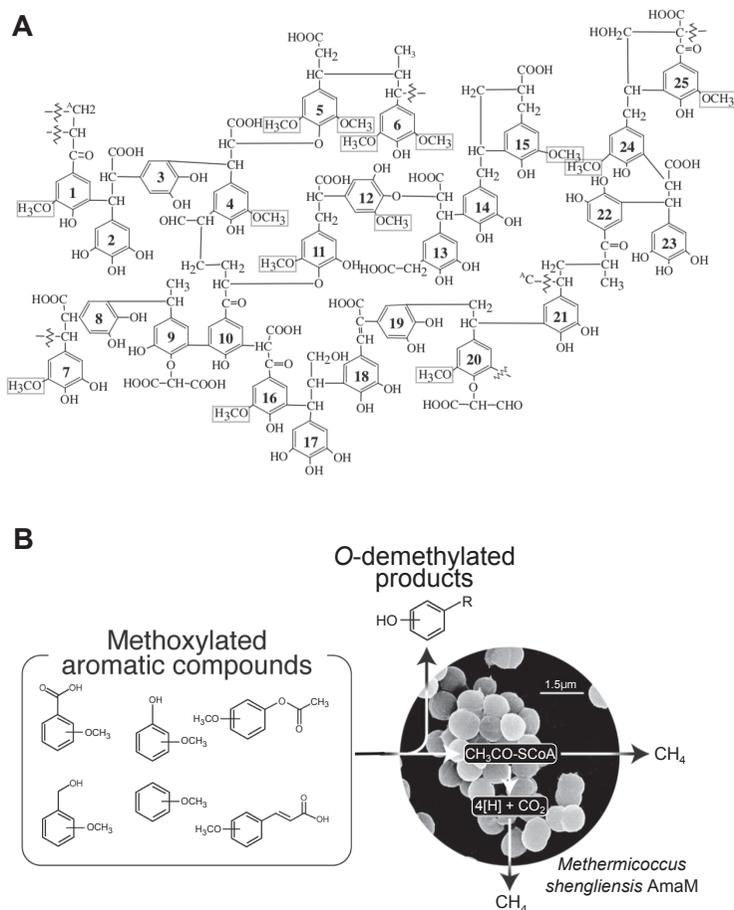


Fig.3. Structural model of the early Miocene Morwell Formation coal (lignite B) with a formula of $C_{234}H_{216}O_{96}$ (Salmon et al., 2009), which includes 14 methoxy groups indicated by gray squares (A), and a novel mode of methanogenesis by *Methermicoccus shengliensis* strain AmaM using methoxy aromatic compounds, which couples *O*-demethylation of the methoxy group, CO_2 reduction, and acetyl-CoA metabolism (B).

(褐炭～瀝青炭)と培養するとメタンを生成することが示され、試薬のメトキシ芳香族化合物のみならず、石炭中のメトキシ芳香族化合物も利用できることが推定された。実際に石炭を添加した培養液からはメタノールやメチルアミンとともに4種類のメトキシ安息香酸類が検出されたが、それらの総量に比べてメタン生成量が多かったため、メタン生成菌が石炭の表面に物理的・化学的に結合しているメトキシ基を利用している可能性も示唆された(Mayumi et al., 2016)。今後の研究では、地下環境における本メタン生成プロセスの広がりや天然ガスへの寄与の重要性を評価することが期待される。

7. 石油炭化水素の成因

一般に石油は生物起源と考えられている一方、古くから非生物(無機)起源の石油が存在する可能性も指摘されており、フィッシャー・トロプシュ型反応のように無機物(水素ガスと一酸化炭素または二酸化炭素)から石油に類する炭化水素混合物を生成するプロセスが知られている。この反応で生成する炭化水素の特徴(Anders et al., 1974)としては、*n*-アルカンが主成分で、5種類のメチルアルカン、ジメチルアルカン異性体が次いで多い一方、イソプレノイドアルカンのような多分枝成

分は少なく、 $>C_{15}$ のイソプレノイドアルカンは検出されていない。そのような非生物起源の炭化水素組成との比較に基づいて、天然の石油の起源が判定されている。日本の石油に関しても、強く生分解を受けて変質している場合を除き、炭化水素の主成分は n -アルカンであるが、炭素数が奇数の成分が偶数の成分より有意に多いこと (C_{24} - C_{32} の範囲で CPI 値が 1.02 から 1.19 の範囲にあること) が示されている (坂田, 1992)。これは高等植物が作るワックスの主要成分であり奇数炭素数に富む n -アルカンが石油炭化水素に含まれているためと考えられる。一方、プリスタンやフィタンなどの鎖状イソプレノイドアルカンが n -アルカンについて多く含まれており (坂田, 1992; Sakata et al., 1994; 坂田, 1997)、分枝アルカンの中でイソプレノイドが選択的に多いことは、脂質の生合成経路 (イソペンテニル二リン酸の重合) を反映したものと考えられる。その炭素数分布に関して、 $>C_{15}$ の成分が多く含まれており、その中で C_{17} が少ない。これらの特徴は、当該成分がクロロフィルを構成するフィトールに由来することを示す証拠と考えられる。貯留岩の種類 (火山岩 vs. 砂岩) によって、 n -アルカンの奇数炭素成分の優位性やイソプレノイドアルカンの相対的含有量 (n -アルカンに対する比) に系統的な相違はなく、火山岩に貯留する石油も生物起源であることが明らかである (坂田, 1992; Sakata et al., 1994; 坂田, 1997)。またこのことは火山岩中の天然ガスが石油とともに生成したもの、すなわち生物起源 (熱分解起源) である可能性を支持する。火山岩に貯留する天然ガスを生物起源と考える解釈における重要な問題点として、火山岩の上部に分布する細粒の火山灰層か、根源岩から貯留岩へのガスの移動を困難にする可能性が指摘されている (Wakita et al., 1990)。しかしながら、ガスと共存する石油が生物起源であるならば、根源岩から火山岩 (貯留岩) への流体移動が可能であったことを意味しており、ガスの移動が困難という指摘に対する反証になる。

石油の生物起源説では、根源岩が深く埋没して地熱によりケロジェンの熱分解反応が起きてピチュメンが生成し、これが石油として排出され (石油の一次移動)、孔隙率や浸透率の高い貯留岩に移動・集積することによって鉱床形成に至るものと考えら

れている (Tissot and Welte, 1984; 坂田, 2004)。したがって、根源岩が石油を排出するために必要な被熱の程度、すなわち熟成度は、石油鉱床の形成を支配する重要な因子であり、石油の熟成度がこれを推定する手がかりを与える。石油の中にはステラン、ホパンなどの環状炭化水素が含まれており、その分子構造が熟成度を示す指標となる。例えば東北日本の石油について、これらの熟成度指標が測定されており (鈴木ら, 1987; Sakata et al., 1988; 坂田ら, 1990)、新潟堆積盆地の石油のステランの $20S/(20S+20R)$ 比を泥質堆積岩 (南長岡ガス田の坑井掘削試料) のデータ (坂田ら, 1987) と比較することにより石油の熟成度がビトリナイト反射率が 0.6–0.7% 相当と評価されている (鈴木ら, 1987)。コンデンセートの熟成度が通常原油と比べて明瞭に熟成度が高く (鈴木ら, 1987; Sakata et al., 1988; 坂田ら, 1990)、本地域のコンデンセートの成因が原油の熱分解産物である可能性 (Tissot and Welte, 1984) が支持されている。また秋田・山形堆積盆地の石油が新潟堆積盆地の石油に比べて熟成度が低い傾向があり (Sakata et al., 1988; 坂田ら, 1990)、後に報告されているケロジェンの石油生成活性化エネルギー (鈴木ら, 1995) や天然ガスの熟成度の傾向 (Waseda and Iwano, 2008) と調和的である。環状炭化水素の組成は石油の起源有機物に関する情報も包含しており、例えば秋田・山形堆積盆地の石油が新潟堆積盆地の石油に比べて、一芳香族ステロイド炭化水素の C_{27}/C_{29} 比が高く C_{30} オレアナン / C_{30} ホパンや C_{30} ホパン / C_{29} ステラン比が低いことから、陸源有機物の寄与が相対的に低いと推定されている (Sakata et al., 1988; 坂田ら, 1990)。

石油や堆積岩の炭素同位体比も石油の起源に関する重要な情報を提供する。東北日本の石油のバルクの $\delta^{13}C$ 値は、堆積岩の有機物の $\delta^{13}C$ 値の分布範囲内にあり、特に寺泊・七谷層の泥質堆積岩の値とよく一致することから、これらが根源層と推定される (Sakata et al., 1994)。また貯留岩の相違 (火山岩 vs. 砂岩) によって石油の $\delta^{13}C$ 値に有意の差が認められないことから、火山岩に貯留する石油もケロジェンの熱分解生成物である可能性が支持される (Sakata et al., 1994)。

GC-C-IRMS を使用することによって、石油の特定炭化水素成分の炭素同位体比を測定すること

が可能となり、*n*-アルカンやステラン、ホパンなどのバイオマーカーの起源生物をより詳細に推定する試みがなされている。例えば、中新世モンテレー原油に含まれるホパン類のうち、 C_{29} - C_{30} ホパンの $\delta^{13}C$ 値(約-26‰)と C_{31} - C_{35} ホパン(約-28‰)は藻類起源の C_{27} ステランの値(約-26‰)と近いことから藍藻(シアノバクテリア)起源と推定される一方、28,30-ビスノルホパン(約-32‰)の値はこれより顕著に低いことから未知の化学合成独立栄養微生物(H_2S 酸化)が起源生物と推定されている(Schoell et al., 1992)。このようにバイオマーカーの炭素同位体比から起源生物を評価する際、想定される起源生物が利用する炭素源(独立栄養微生物であれば CO_2)の炭素同位体比とともに、炭素固定と脂質生合成に伴う炭素同位体分別に関する情報が必要となるため、その生物を実験室で培養して同位体分別が測定されている。例えば藍藻の場合、炭素固定に伴う同位体分別(細胞 vs. CO_2)が20-22‰、脂質生合成に伴う同位体分別(脂質 vs. 細胞)はフィトール、ジプロプテン、ジプロプテロールで6.4-6.9‰、バクテリオホパンポリオール(ビスホモホパノールとして測定)で8.4‰である(Sakata et al., 1997a)。藍藻が作るバクテリオホパンポリオールとジプロプテン、ジプロプテロールの炭素同位体比の関係は、モンテレー原油の C_{29} - C_{30} ホパンと C_{31} - C_{35} ホパンの炭素同位体比の関係とよく一致している。このことは、同じ藍藻が作るホパノイドの炭素同位体比のバリエーションによって、モンテレー原油の C_{29} - C_{30} ホパンと C_{31} - C_{35} ホパンの炭素同位体比の相違を説明することが可能であり、鎖長の異なるホパン類が生息域の異なる複数の藍藻に由来する可能性(Schoell et al. 1992)を想定する必要はないことを意味している。一方、28,30-ビスノルホパンと $>C_{29}$ ホパン類の δ 値の相違は、藍藻のホパノイド成分間の同位体比のバリエーションを超えており、異なる微生物(化学合成独立栄養微生物)を起源とする解釈(Schoell et al., 1992)が支持される。

脂質生合成に伴う同位体分別は、同位体効果異なる複数の反応が想定される代謝経路の分岐点において発生する(Hayes, 2001)。イソプレノイド脂質の生合成に関しては、イソペンテニル二リン酸を合成する経路として、古典的に知られるメバ

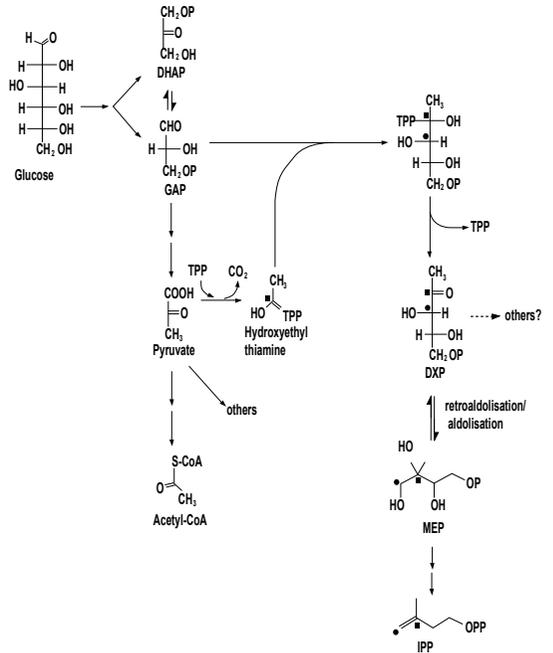


Fig. 4. Hypothetical reaction networks showing the initial stages of lipid biosynthesis in *Nitrosomonas europaea* using the non-mevalonate pathway (Rohmer et al., 1996) for the biosynthesis of isopentenyl diphosphate (IPP). Carbon positions indicated by solid squares and circles may be depleted in ^{13}C relative to glucose as a result of isotopic fractionation at the branch points of pyruvate and D-glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), respectively (Sakata et al., 2008). Abbreviations: P, phosphate; PP, diphosphate; TPP, thiamine diphosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate.

ロン酸経路とは別に、非メバロン酸経路の存在が見出され(Rohmer et al., 1996)、ほとんどのバクテリアと植物の色素体における脂質合成に利用されている(Eisenreich et al., 2004)。亜硝酸菌によるホパノイドの生合成も非メバロン酸経路を想定した同位体分別の可能性が議論されており(Sakata et al., 2008)、ピルビン酸の脱炭酸反応でヒドロキシエチルチアミンが生成するプロセスと、D-グリセルアルデヒド-3-リン酸(GAP)とヒドロキシエチルチアミンが結合するプロセスで同位体分別を伴う結果、イソペンテニル二リン酸のエチレン部の2つの炭素が同位体分別を受ける($\delta^{13}C$ 値が低い)ことが推定されている(Fig.4)。メバロン酸経路

でもイソペンテニル基の5つの炭素の中でアセチル-CoAのカルボニル基に由来する2つの炭素が同位体分別を受けることが予想されており (Hayes, 2001), メバロン酸経路と非メバロン酸経路の相違はイソプレノイド脂質の生合成に伴う同位体分別に大きな相違をもたらさないものと考えられる。

謝 辞

有機地球化学賞 (学術賞) を授かり、身に余る光栄と感じています。有機地球化学研究会の頃から、毎年の有機地球化学シンポジウムにおいて会員の皆様から多くのご助言、ご指導をいただきました。東京大学の故増田彰正名誉教授、東京都立大学の石渡良志名誉教授、広島大学の清水洋名誉教授には地球化学への道を開いていただきました。インディアナ大学の故 John Hayes 名誉教授には個別有機物同位体分析法と生物地球化学的プロセスにおける同位体分別についてご指導いただきました。本研究は工業技術院地質調査所、産業技術総合研究所地質調査総合センターの研究課題として遂行した研究成果をまとめたものです。諸先輩や同僚の皆様には、指導・討論・助言をいただきました。とりわけ故永田松三氏、星野一男氏、松久幸敬氏にはそれぞれ天然ガス地球化学、燃料資源、同位体地球化学についてご指導いただきました。北海道大学大学院の鈴木德行教授と沢田健准教授には査読者として貴重な助言をいただき、本稿を改善することができました。これらの方々には深く感謝いたします。

引用文献

- Anders E., Hayatsu R. and Studier M. H. (1974) Catalytic Reactions in the Solar Nebula: Implications for Interstellar Molecules and Organic Compounds in Meteorites. In: Oró J., Miller S.L., Ponnampereuma C., Young R.S. (eds.) *Cosmochemical Evolution and the Origins of Life*. Springer, Dordrecht.
- Bernard B. B., Brooks J. M. and Sackett W. M. (1976) Natural gas seepage in the Gulf of Mexico. *Earth Planet. Sci. Lett.* **31**, 48-54.
- Berner U. and Faber E. (1996) Empirical carbon isotope/maturity relationships for gases from algal kerogens and terrigenous organic matter, based on dry, open-system pyrolysis. *Org. Geochem.* **24**, 947-955.
- 地質調査所 (1980) 日本および世界における水溶性天然ガスの分布と鉱床の概要. 水溶性天然ガス総覧, 天然ガス鉱業会, 東京, 1-28.
- Chung H. M., Gormly J.R. and Squires R. M. (1988) Origin of gaseous hydrocarbons in subsurface environments: theoretical considerations of carbon isotope distribution. *Chem. Geol.* **71**, 97-103.
- Eisenreich W., Bachera A., Arigonib D. and Rohdicha F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1401-1426.
- 藤井哲哉・佐伯龍男・小林稔明・稲盛隆穂・林雅雄・高野修・高山徳次郎・川崎達治・長久保定雄・中水勝・横井研一 (2009) 確率理論的手法による東部南海トラフのメタンハイドレート資源量評価, 地学雑誌 **118**, 814-834.
- 藤田嘉彦 (1985) 火山岩体石油鉱床の起源. 地学雑誌 **94**, 612-619.
- Guo H., Yu Z., Liu R., Zhang H., Zhong Q. and Xiong Z. (2012) Methylophilic methanogenesis governs the biogenic coal bed methane formation in Eastern Ordos Basin, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1587-1597.
- Hayes J. M. (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Rev. Mineral. Geochem.* **43**, 225-277.
- Head I.M., Jones M. and Larter S. (2003) Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* **426**, 344-352.
- Igari S. and Sakata S. (1989) 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.
- James A. T. and Burns B. J. (1984) Microbial alteration of subsurface natural gas accumulations. *AAPG Bull.* **68**, 957-960.
- Jones D. M., Head I. M., Gray N. D., Adams J. J., Rowan A. K., Aitken C. M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B. F. J., Oldenburg T., Erdmann

- M. and Larter S. R. (2008) Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* **451**, 176-180.
- 金子信行・前川竜男・猪狩俊一郎 (2002) アーケアによるメタンの生成と間隙水への濃集機構, 石技誌 **67**, 97-110.
- Katayama T., Yoshioka H., Mochimaru H., Meng X.Y., Muramoto Y., Usami J., Ikeda H., Kamagata Y. and Sakata S. (2014) *Methanohalophilus levihalodurans* sp. nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the genus *Methanohalophilus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 2089-2093.
- Katayama T., Yoshioka H., Muramoto Y., Usami J., Fujiwara K., Yoshida S., Kamagata Y. and Sakata S. (2015) Physicochemical impacts associated with natural gas development on methanogenesis in deep sand aquifers. *ISME J.* **9**, 436-446.
- Katayama T., Yoshioka H., Takahashi H., Amo M., Fujii T. and Sakata S. (2016) Changes in microbial community structures associated with gas hydrates in seafloor sediments from the Nankai Trough. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**, fiw093.
- McCarty H. B. and Felbeck G. T. Jr. (1986) High temperature simulation of petroleum formation-IV. Stable carbon isotope studies of gaseous hydrocarbons. *Org. Geochem.* **9**, 183-192.
- 松本良 (2009) 総説 メタンハイドレート - 海底下に氷状巨大炭素リザーバ発見のインパクト. 地学雑誌 **118**, 7-42.
- Mayumi D., Doling J., Sakata S., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Tamaki H., Takeuchi M., Nakatsu C. H. and Kamagata Y. (2013) Carbon dioxide concentration dictates alternative methanogenic pathways in oil reservoirs. *Nature Comm.*, DOI: 10.1038/ncomms2998.
- Mayumi D., Mochimaru H., Tamaki H., Yamamoto K., Yoshioka H., Suzuki Y., Kamagata Y. and Sakata S. (2016) Methane production from coal by a single methanogen. *Science* **354**, 222-225.
- Mayumi D., Mochimaru H., Yoshioka H., Sakata S., Maeda H., Miyagawa Y., Ikarashi M., Takeuchi M. and Kamagata Y. (2011) 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.
- Milkov A.V. (2005) Molecular and stable isotope compositions of natural gas hydrates: A revised global dataset and basic interpretations in the context of geological settings. *Org. Geochem.* **36**, 681-702.
- Milkov A.V. (2011) Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs. *Org. Geochem.* **42**, 184-207.
- Mochimaru H., Tamaki H., Hanada S., Imachi H., Nakamura K., Sakata S. and Kamagata Y. (2009) *Methanobrevibacterium profundum* sp. nov., a new methylotrophic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 714-718.
- Mochimaru H., Tamaki H., Katayama T., Imachi H., Sakata S. and Kamagata Y. (2016) *Methanomicrobium antiquum* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from deep sedimentary aquifers in a natural gas field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 4873-4877.
- Mochimaru H., Uchiyama H., Yoshioka H., Imachi H., Hoaki T., Tamaki H., Nakamura K., Sekiguchi Y. and Kamagata Y. (2007a) Methanogen diversity in deep subsurface gas-associated water at Minami-Kanto gas field in Japan. *Geomicrobiol. J.* **24**, 93-100.
- Mochimaru H., Yoshioka H., Tamaki H., Nakamura K., Kaneko N., Sakata S., Imachi H., Sekiguchi Y., Uchiyama H. and Kamagata Y. (2007b) Microbial diversity and methanogenic potential in high temperature natural gas associated water in Japan. *Extremophiles* **11**, 453-461.
- Oba M., Sakata S. and Fujii T. (2015) Archaeal polar lipids in deep marine sediments from the Nankai Trough. Archaeal polar lipids in seafloor sediments from the Nankai Trough: implications for the distribution of methanogens in the deep marine subsurface. *Org. Geochem.* **78**, 153-160.
- Oba M., Sakata S. and Tsunogai U. (2006) Polar and neutral isoprenylglycerol ether lipids as biomarkers

- of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Org. Geochem.* **37**, 1643-1654.
- Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S. and Sahn H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564-2566.
- Sakata S. (1991) Carbon isotope geochemistry of natural gases from the Green Tuff Basin, Japan. *Geochim. Cosmochim. Acta* **55**, 1395-1405.
- 坂田将 (1992) 火山岩を貯留岩とする石油炭化水素の起源について. *Res. Org. Geochem.* **8**, 41-45.
- 坂田将 (1997) 東北日本グリーンタフ地域の天然ガスの地球化学 — 火山性貯留岩中の軽質炭化水素の起源に関する基礎研究. *石油学会誌* **40**, 252-262.
- 坂田将 (2004) 堆積有機物の熱化学変化. 地球化学講座 4, 有機地球化学, 159-200, 培風館.
- Sakata S., Hayes J. M., McTaggart A. R., Evans R. A., Leckrone K. J. and Togasaki R. K. (1997a) Carbon isotopic fractionation associated with lipid biosynthesis by a cyanobacterium: Relevance for interpretation of biomarker records. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 5379-5389.
- Sakata S., Hayes J. M., Rohmer M., Hooper A. and Seeman M. (2008) Stable carbon isotopic compositions of lipids isolated from an ammonia-oxidizing chemoautotroph. *Org. Geochem.* **39**, 1725-1734.
- 坂田将・金子信行・鈴木徳行 (1990) 東北日本の堆積盆地における油のバイオマーカー. *石技誌* **55**, 48-53.
- Sakata S., Maekawa T., Igari S. and Sano Y. (2012) Geochemistry and origin of natural gases dissolved in brines from gas fields in southwest Japan. *Geofluids* **12**, 327-335.
- Sakata S., Matsuhisa Y. and Igari S. (1994) Organic geochemistry of petroleum from the Green Tuff basin, Japan. *Org. Geochem.* **21**, 27-34.
- Sakata S., Sano Y., Maekawa T. and Igari S. (1997b) Hydrogen and carbon isotopic composition of methane as evidence for biogenic origin of natural gases from the Green Tuff Basin, Japan. *Org. Geochem.* **26**, 399-407.
- Sakata S., Suzuki N. and Kaneko N. (1988) A biomarker study of petroleum from the Neogene Tertiary sedimentary basins in Northeast Japan. *Geochem. J.* **22**, 89-105.
- 坂田将・鈴木祐一郎・金子信行 (1987) 長岡周辺新第三系ガス田の生物指標化合物. *石技誌* **52**, 221-230.
- 坂田将・高橋誠・星野一男 (1986) 深部火山岩中の天然ガスの成因に関する地球化学的考察. *石技誌* **51**, 228-237.
- Sakata S., Takahashi M., Igari S. and Suzuki N. (1989) Origin of light hydrocarbons from volcanic rocks in the Green Tuff region of Northeast Japan. *Chem. Geol.* **74**, 241-248.
- Salmon E., Behar F., Lorant F., Hatcher P. G. and Marquaire P. -M. (2009) Early maturation processes in coal. Part 1: Pyrolysis mass balance and structural evolution of coalified wood from the Morwell Brown Coal seam. *Org. Geochem.* **40**, 500-509.
- Schoell M. (1988) Multiple origins of methane in the Earth. *Chem. Geol.* **71**, 1-10.
- Schoell M., McCaffrey M. A., Fago F. J. and Moldowan J. M. (1992) Carbon isotopic compositions of 28, 30-bisnorhopanes and other biological markers in a Monterey crude oil. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**, 1391-1399.
- Shimizu S., Akiyama M., Naganuma T., Fujioka M., Nako M. and Ishijima Y. (2007) Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology* **5**, 423-433.
- Strapoć D., Mastalerz M., Dawson K., Macalady J., Callaghan A. V., Wawrik B., Turich C. and Ashby M. (2011) Biogeochemistry of microbial coal-bed methane. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **39**, 617-656.
- Suda K., Gilbert A., Yamada K., Yoshida N. and Ueno Y. (2017) Compound- and position-specific carbon isotopic signatures of abiogenic hydrocarbons from on-land serpentinite-hosted Hakuba Happo hot spring in Japan. *Geochim. Cosmochim. Acta* **206**, 201-215.
- 鈴木徳行・坂田将・金子信行 (1987) バイオマーカー組成からみた新潟堆積盆地新第三系原油,

- コンデンセート油の熟成度と一次移動の時期. 石技誌 **52**, 499-510.
- 鈴木徳行・三瓶良和・松林英樹 (1995) 秋田, 新潟地域における根源岩の有機地球化学的相違. 石技誌 **60**, 62-75.
- Takeuchi M., Yoshioka H., Seo Y., Tanabe S., Tamaki H., Kamagata Y., Takahashi H.A., Igari S., Mayumi D. and Sakata S. (2011) A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan. *Environ. Microbiol.* **13**, 3206-3218.
- Tissot B. P. and Welte D. H. (1984) Petroleum Formation and Occurrence, 2nd Edition. 1-699, Springer-Verlag.
- Wakita H. and Sano Y. (1983) $^3\text{He}/^4\text{He}$ ratios in CH_4 -rich natural gases suggest magmatic origin. *Nature* **305**, 792-794.
- Wakita H., Sano Y., Urabe A. and Nakamura Y. (1990) Origin of methane-rich natural gas in Japan: formation of gas fields due to large-scale submarine volcanism. *Appl. Geochem.* **5**, 263-278.
- Waseda A. and Iwano H. (2008) Characterization of natural gases in Japan based on molecular and carbon isotope compositions. *Geofluids* **8**, 286-292.
- Waseda A. and Uchida T. (2004) The geochemical context of gas hydrate in the eastern Nankai Trough. *Resour. Geol.* **54**, 69-78.
- Whiticar M. J., Faber E. and Schoell M. (1986) Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO_2 reduction vs. acetate fermentation—Isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 693-709.
- Yoshioka H., Maruyama A., Nakamura T., Higashi Y., Fuse H., Sakata S. and Bartlett D. H. (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., Takeda H., Yoshida S. (2015) 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.
- Yoshioka H., Sakata S., Cragg B., Parkes J. and Fujii T. (2009) Microbial methane production rates in gas hydrate-bearing sediments from the eastern Nankai Trough, off central Japan. *Geochem. J.* **43**, 315-321.
- Zengler K., Richnow H.H., Rosselló-Mora R., Michaelis W. and Widdel F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**, 266-269.