

研究報告書

「付加体エネルギー生産システム創成に向けた基盤技術開発」

研究タイプ：通常型

研究期間：平24年10月～平成28年3月

研究者：木村 浩之

1. 研究のねらい

2011年3月の東北地方太平洋沖地震による地震動と津波が原因で発生した福島第一原子力発電所の事故の影響で、日本国内の多くの原発が停止している。そして、日本のエネルギー自給率は6%まで低下した。その後、日本政府は原発を重要なベースロード電源の1つとして位置付け、2030年までに原発の電源構成比率を約20～22%まで回復させるとともに、水力を含む再生可能エネルギーの電源構成比率を22～24%とする方針を明らかにした。また、日本のエネルギー自給率を東日本大震災前の20%を上回る25%まで引き上げる計画も示した。このような背景から、近年では純国産エネルギーとして日本近海の海底下に眠るガスハイドレートに注目が集まっている。ガスハイドレートは、日本海や太平洋の水深1,000メートルの深海の海底下数百メートルの地層中に分布している。現在、ガスハイドレートを採掘するための技術開発が進められているが、深海のさらに海底下という低温・高圧条件下に存在するガスハイドレートから天然ガス(メタン)を経済的に採掘することは非常に困難である。このような日本のエネルギー事情から、新たなエネルギー生産技術の開発が求められている。

本研究課題では、西南日本の太平洋側の地域に広く分布する厚い堆積層(“付加体”と呼ばれている)に着目し、付加体の深部帯水層に由来する嫌気性地下水、メタンを主成分とする付随ガス、地下水に含まれる微生物群集を利用したメタン・水素ガス生産システムの創成に向けた基盤技術を開発する。特に、西南日本の付加体が分布する地域に構築された深度1,000メートル以上の大深度掘削井にて深部地下水、付随ガス、微生物群集を採集し、地球化学および微生物学的解析を試みる。そして、付加体の深部帯水層に生息する地下圏微生物の活性およびメタン生成メカニズムを明らかにするとともに、高性能の付加体エネルギー生産システムの構築が可能な地域を選定する。次に、付加体の深部帯水層に生息する微生物群集を対象としたメタトランスクリプトーム解析を試み、メタン・水素ガス生成の代謝パスウェイおよび微生物共生メカニズムを遺伝子の発現レベルで明らかにする。さらに、メタン生成・水素ガス生成リアクターに利用可能な有機基質の特定および微生物の培養条件の検討を行うことにより、メタン・水素ガスの生産能力向上を目指した技術開発を行う。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、南西日本の太平洋側の地域に広く分布する付加体に構築された大深度掘削井にて深部帯水層に由来する地下水と付随ガスを採取した。そして、付加体の深部帯水層には高温の嫌気性地下水が存在すること、付随ガスには高い割合でメタンが含まれている

こと、付加体の深部帯水層では水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌が共生することにより、堆積層中の有機物を分解してメタンが生成されていることを明らかにした。

さらに、12 リットル容量の中型嫌気培養槽を用いたバイオガス生成リアクターの開発にも着手した。付加体の嫌気性地下水を中型嫌気培養槽に採取し、酵母エキス、ペプトン、グルコースからなる混合有機基質を添加してインキュベートしたところ、短時間でのメタン生成に成功した。さらに、付加体の嫌気性地下水に混合有機基質とメタン生成菌に特異的な阻害剤を添加し、インキュベートしたところ、短時間での水素ガス生成を実現した。

(2) 詳細

研究テーマ A「付加体の地下圏微生物の活性およびメタン生成メカニズムの解明」

静岡県中西部、宮崎県南東部、沖縄本島南部の付加体が分布する地域に構築された深さ 1,000 メートル以上の大深度掘削井(それぞれ 14 カ所、6 カ所、4 カ所)にて、地下水および付随ガスを採取した。地上部にて、地下水の水温、pH、酸化還元電位、電気伝導率といった環境データを測定した。その結果、地下水は水温 30～52℃の範囲で比較的高温であること、pH は 7.2～8.9 と弱アルカリ性であること、酸化還元電位は -300～-110 mV と還元的(嫌気性)であることが示された。また、付加体の深部地下水の電気伝導率は、111～5,690 mS m⁻¹(NaCl 濃度に換算した場合、0.1～3.6%)と多様性があることが明らかになった。特に、静岡県中西部および宮崎県南東部の山間部の付加体の地下水の塩濃度は低く、これらの地域の深部帯水層は天水の影響を受けていることが示された。一方、沖縄本島の付加体の地下水の塩濃度は高く、これらの地域の深部帯水層は海水の影響を受けていることが示唆された。

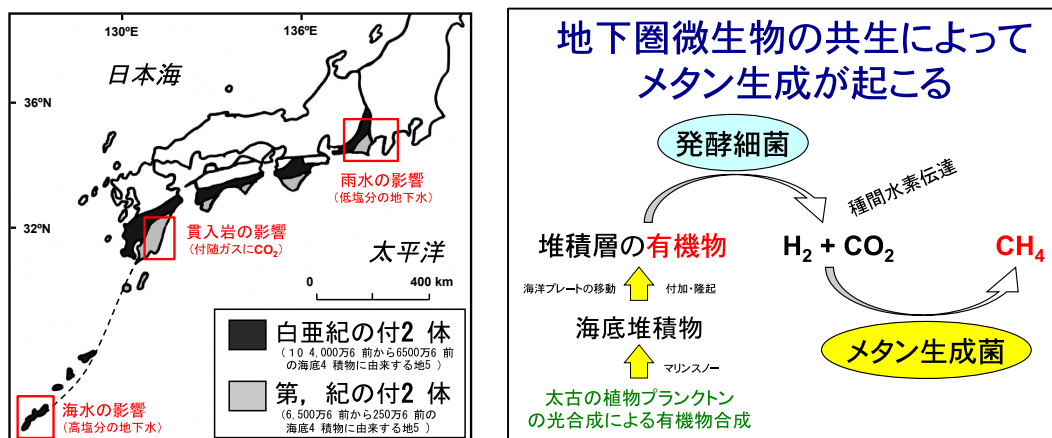
付加体の深部帯水層に由来する付随ガスの化学分析を行った結果、多くの大深度掘削井にて採取された付随ガスは、90～98%という高い割合でメタンを含んでいることが示された。一方、静岡県中西部の山間部に位置する大深度掘削井にて採取された付随ガスにおいては、50～80%の割合でメタンが含まれていることに加えて、20～50%の割合で窒素ガスが含まれていることが示された。このことは、深部帯水層中でメタン生成に加えて微生物脱窒による窒素ガス生成の可能性を示唆する結果であった。

次に、付随ガスに含まれるメタンおよび地下水に溶存する無機炭素(主に、重炭酸イオン)の炭素安定同位体比分析を行った。その結果、多くの付加体サイトにおいて微生物起源のメタンが含まれることが示された。

また、地下水に含まれる微生物群集を対象とした嫌気培養も試みた。付加体の大深度掘削井から採取した嫌気性地下水にメタン生成菌の各種栄養基質(酢酸、ギ酸、メタノール、H₂/CO₂)を添加した嫌気培養を行ったところ、地下水に H₂/CO₂ を添加した培養系からのみメタンが検出され、水素資化性メタン生成菌の高い活性が示された。一方、地下水に混合有機基質(酵母エキス+ペプトン+グルコース)とメタン生成菌に特異的な阻害剤(bromoethanesulfonate, 20 mM)を添加した嫌気培養においては、ほとんどのサイトにて発酵細菌が増殖し、高速での水素ガス生成が確認された。さらに、地下水に混合有機基質(酵母エキス+ペプトン+グルコース)を添加した水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌からなる微生物共生コンソーシアを対象とした嫌気培養を行ったところ、ほぼ全てのサイトにおいて高速でのメタン生成が確認された。

以上の結果より、付加体の深部帯水層では水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌が共生することにより、堆積層中の有機物を分解してメタンが生成されていることが示された。また、このような現象は、静岡県中西部、宮崎県南東部、沖縄本島南部といった西南日本の太平洋側の付加体が分布する広い地域で共通して観察されたことから、付加体の深部帯水層での地下圏微生物によるメタン生成は普遍的な現象であることが示された。

以上の一連の研究結果より、西南日本の付加体の深部帯水層に生息する水素発生型発酵細菌および水素資化性メタン生成菌は非常に高い活性を有することが明らかとなった。さらに、西南日本の太平洋側の非常に広い地域において付加体エネルギー生産システムの構築が可能であることが示された。よって、高性能の付加体エネルギー生産システムの構築が可能なエリアを選定するという本研究課題の目的が達成されたといえる。



研究テーマ B「付加体の地下圏微生物の代謝パスウェイおよび微生物共生の解明」

静岡県中西部、宮崎県南東部、沖縄本島南部の付加体分布域に構築された大深度掘削井より、嫌気性の地下水を採取した。2リットルの地下水を孔径 $0.22 \mu m$ のハウジングフィルターでろ過し、地下水に含まれる微生物細胞を濃縮した。次に、微生物細胞を濃縮したフィルターから Total DNA を抽出し、PCR 法を用いてバクテリアおよびアーキアに由来する 16S rRNA 遺伝子を増幅した。次に、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq を用いて、1 サンプルあたり約 3 万リードのシーケンスを決定した。16S rRNA 遺伝子を対象とした網羅解析の結果、アーキアよりもバクテリアに分類される細菌が優占することが明らかとなった。さらに、バクテリアにおいては、水素発生型発酵細菌が優占していた。また、静岡県中西部の山間部の付加体エリアから採取した低塩分の嫌気性地下水においては、脱窒細菌も数多く検出された。一方、アーキアにおいては、水素資化性メタン生成菌が優占していた。また、割合は高くないが酢酸資化性メタン生成菌の 16S rRNA 遺伝子も検出された。

メタン生成菌の現場での活性を検証するために、メタン生成菌に特異的な補酵素 F430 の直接検出、定量を行った。静岡県中西部の付加体分布域に構築された大深度掘削井より、嫌気性地下水を採取した。10 リットルの地下水を孔径 $0.22 \mu m$ の大型フィルターでろ過し、地下水に含まれる微生物細胞を濃縮した。その後、有機溶媒を用いて酵素群および補酵素群を抽出した。抽出物を生成したのち、Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) にて補酵素 F430 の構造を確認し、LC-MS-MS を用いて F430 の定量を行った。その結果、すべての

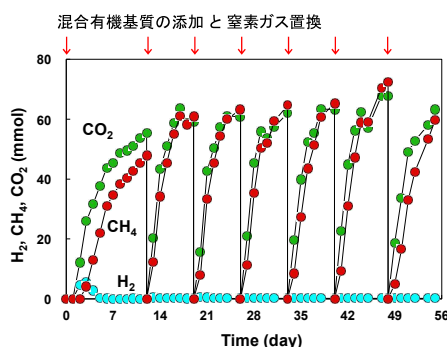
サイトからメタン生成菌に特異的な補酵素 F430 が検出された。この結果より、付加体の深部帯水層にてメタン生成菌が現在も高い活性を有し、活発なメタン生成を行っていることが示された。さきがけ期間中に当初の研究目的が、概ね達成されたといえる。

研究テーマ C「付加体の地下圏微生物を利用したメタン・水素ガス生成リアクターの開発」

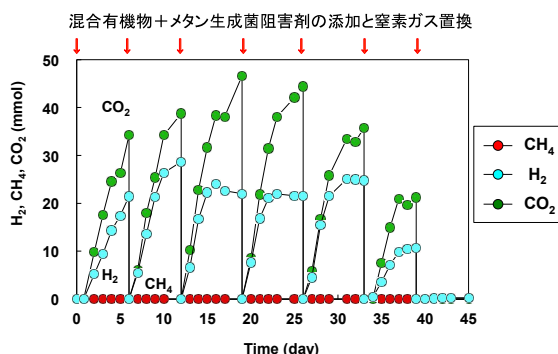
静岡県島田市の温泉施設が所有する大深度掘削井(深度 1,489 メートル)より嫌気性地下水を採取し、中型嫌気培養槽へ嫌気的に注入した。地下水に含まれる付随ガスを窒素ガスで置換したのち、酵母エキス、ペプトン、グルコースからなる混合有機基質を添加した。その後、地上にて計測した地下水の水温(40℃)プラス 15℃の温度(55℃)にてインキュベートした。24 時間毎に、液相の pH と吸光度(OD_{600})、気相の圧力をそれぞれ測定した。また、ガスクロマトグラフを用いて、気相の水素ガス、窒素ガス、メタン、二酸化炭素の濃度を測定した。さらに、ミリガスカウンターを用いて、生成されたバイオガス量を 1 時間毎に測定するとともに、メタン生成速度を算出した。その結果、最終濃度 1.0%の混合有機基質を添加したメタン生成リアクターにおいて、地下水 1 リットルあたり $17.8 \text{ mmol day}^{-1}$ (399 ml day^{-1}) のメタン生成を実現した。

一方、水素ガス生成リアクターの開発においても、静岡県島田市の温泉施設が所有する大深度掘削井より嫌気性地下水を採取し、中型嫌気培養槽へ嫌気的に地下水を注入した。地下水に含まれる付随ガスを窒素ガスで置換したのち、酵母エキスとグルコースからなる混合有機基質を添加した。さらに、メタン生成菌に特異的な阻害剤(2-bromoethanesulfonate, 20 mM)も添加した。その後、55℃ にて嫌気的にインキュベートした。24 時間毎に、液相の pH および吸光度(OD_{600})と気相の圧力を測定した。また、ガスクロマトグラフを用いて、気相の水素ガス、窒素ガス、メタン、二酸化炭素の濃度を測定した。さらに、ミリガスカウンターを用いて、生成されたバイオガス量を 1 時間毎に測定するとともに、水素ガス生成速度を算出した。その結果、最終濃度 0.2%の混合有機基質を添加した水素ガス生成リアクターにおいて、地下水 1 リットルあたり最速 $23.4 \text{ mmol day}^{-1}$ ($1,213 \text{ ml day}^{-1}$) の水素ガス生成を記録した。

メタン生成リアクター



水素ガス生成リアクター



付加体の嫌気性地下水とそこに含まれる微生物群集を利用したバイオガス生成リアクターの開発において、培養開始から2~3日という短時間でのメタン生成および水素ガス生成に成功した。また、有機基質とともにメタン生成菌に特異的な阻害剤を添加することにより微生物群集のコントロールが可能となり、高速で水素ガスを生成する技術の開発に繋がった。一連の研究により、付加体の地下圏微生物を用いたメタン・水素ガス生成リアクターの技術開発が進み、さきがけ研究期間における研究目的は達成されたといえる。

3. 今後の展開

付加体は、静岡県中西部から中部、近畿、四国、九州、そして沖縄の太平洋沿岸の広い範囲に分布している。特に、東海や中部地方においては、日本有数の工業地帯と付加体の分布域が一致する。今後、電力需要の高い工場の敷地内等において付加体エネルギー生産システムを構築することにより、送電ロスのない地産地消エネルギーの生産を目指す。一方、付加体が分布する太平洋沿岸の地域は年間の日射量が多く、農業の盛んな地域でもある。この地域では、温室やビニールハウス内にてメロンやトマト、キュウリ、イチゴ、ナス、エダマメといった農作物が盛んに栽培されている。付加体エネルギー生産システムは、付加体の深部帯水層にて生成されたメタンと陸上のバイオリアクターにて生成されたメタンを使ってガスエンジン発電機を作動させ、電気と熱を生産する。さらに、メタンを燃焼させた際に二酸化炭素も発生する。将来的には、西南日本の付加体が分布する地域の農業施設において、本システムを構築することにより、電気、温水、熱風、二酸化炭素を自家的に生産・供給する次世代の農業施設の開発も試みる。

近年、日本では巨大地震や大規模な水害、土砂崩れなどが発生した災害時にインフラを確保するための技術の開発が急務の研究課題となっている。付加体エネルギー生産システムは、“地下水・ガス・電気”を自家的に供給することができるエネルギー生産システムでもある。よって、災害時には、避難所や病院、広域防災拠点、空港、救援物資輸送基地、自衛隊・警察・消防の人命救助活動基地などにおいて重要な役割を担うことが期待できる。特に、付加体が分布する西南日本の太平洋側の地域は、東海・東南海・南海地震の被害想定域である。今後、地元自治体と連携して、防災分野での付加体エネルギー生産システムの高度利用を推進する。

海洋プレートが沈み込むことによって形成される付加体は、台湾、インドネシア、トルコ、ペルー、チリ、イタリア、ニュージーランド、米国アラスカ州・ワシントン州といった諸外国においてもその分布を見ることができる。今後は、付加体エネルギー生産システムおよび災害ステーションでの高度利用に関する基盤技術を海外へ移転する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さきがけ期間中に、付加体の深部帯水層に存在するメタンの生成メカニズムについて明らかにすることができた。特に、付加体の深部帯水層において水素発生型発酵細菌と水素酸化性メタン生成菌が高い活性を有すること、これらの微生物群集が共生して堆積層中の有機物を分解してメタンを生成すること、西南日本の付加体の深部帯水層において微生物によるメタン生成は普遍的な現象であることを見出した。一連の研究成果により、南西日本の太平洋側の付加体が分布する広大な地域において、付加体エネルギー生産システムの創成が可能であることが示されるに至り、本研究課題の目的が達成されたといえる。

加えて、付加体の嫌気性の地下温水とそこに含まれる微生物群集を利用したバイオガス生成リアクターの開発においては、高効率のメタン生成および水素ガス生成に成功した。さらに、有機基質とともにメタン生成菌に特異的な阻害剤を添加することによりリアクター内の微生物相のコントロールが可能となり、高速水素ガス生成のための技術開発に繋がった。本研究成果により、付加体の地下圏微生物を用いたメタン・水素ガス生成リアクターの開発が

進み、さがけ研究期間における研究目的は十分に達成されたといえる。

さらに、地元自治体と協力して温泉施設の大深度掘削井より湧出するメタンを利用した発電事業の立ち上げにも貢献した。特に、地元の温泉施設が改正鉱業法に基づく特定区域の指定を受けるに至ったことは特記に値する。温泉メタンガスの利活用事業の立ち上げに関する成果は社会・経済への波及効果も大きく、評価できる研究成果である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

バイオエネルギー生産に付加体という厚い堆積層とその深部帯水層に生息する微生物群集を利用するという、ユニークで面白い研究課題であった。さがけ期間中に当初の研究計画を進めるとともに、実際のエネルギー生産の地産地消モデルの立ち上げにも尽力した。応用面でも研究を進め、社会的なインパクトは非常に高いといえる。実用化にほぼ目処がついたことは非常に評価できる。本研究プロジェクトは社会実装にまで発展する研究成果を上げており、将来的に全国的な波及も大いに期待できる。

今後、更に付加体の地下圏微生物の生物学的解析を進めれば、この一連の研究開発の深みも増し、インパクトも大きくなると期待できる。また、微生物群集のメタン生成への寄与をより具体的に解明することによって、産業応用に貢献してもらいたい。

本さがけ研究者は、さがけ期間内の研究成果が認められ、所属機関において講師から准教授へ昇任した。また、国内学会および国際学会での招待講演や新聞報道も増えるなど、本研究分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。今後の展開が大いに期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hiroyuki Kimura, Kousuke Mori, Toshiro Yamanaka, Jun-Ichiro Ishibashi. Growth temperatures of archaeal communities can be estimated from the guanine-plus-cytosine contents of 16S rRNA gene fragments. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5, 468-474
2. Chie Katsuyama, Hiroaki Nashimoto, Kazuyo Nagaosa, Tomotaka Ishibashi, Rakeshi Kinoshita, Hideki Yoshikawa, Kazuhiro Aoki, Takahiro Asano, Toshito Sasaki, Rumi Sohrin, Daisuke Komatsu, Urumu Tsunogai, Hiroyuki Kimura, Yuichi Suwa, Kenji Kato. Occurrence and potential activity of denitrifiers and methanogens in groundwater at 140 m depth in Pliocene diatomaceous mudstone of northern Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 86, 532-543
3. Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Susumu Asakawa, Takeshi Watanabe, Seigo Shima, Nanako O. Ogawa, Martin Krüger, Makoto Matsushita, Hiroyuki Kimura, Naohiko Ohkouchi. Quantitative analysis of coenzyme F430 in environmental samples: a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Analytical Chemistry*, 2014, 86, 3633-3638
4. Koji Mori, Atsushi Yamazoe, Akira Hosoyama, Shoko Ohji, Nobuyuki Fujita, Jun-ichiro Ishibashi, Hiroyuki Kimura, Ken-ichiro Suzuki. *Thermotoga profunda* sp. nov., and *Thermotoga caldifontis* sp. nov., anaerobic thermophilic bacteria isolated from terrestrial hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64, 2128-2136
5. Kyohei Baito, Satomi Imai, Makoto Matsushita, Miku Otani, Yu Sato, Hiroyuki Kimura. Biogas production using anaerobic groundwater containing a subterranean microbial community associated with the accretionary prism. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8, 837-845

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表

- Makoto Matsushita, Hiroyuki Kimura. Microbial methane production and carbon cycle in deep aquifer associated with the accretionary prism. 9th International Symposium on Subsurface Microbiology (ISSM 2014). California, USA. 2014 年 10 月
- Hiroyuki Kimura. Microbial methane production and carbon cycle in subterranean environment associated with the accretionary prisms. 9th Japanese-French Frontiers of Science (JFFoS) Symposium. Kyoto, Japan. 2015 年 1 月
- 木村浩之、松下 慎、石川修伍. 付加体の深部地下水循環と微生物メタン生成・脱窒ポテンシャル. 日本地球惑星科学連合 2015 年大会「同位体水文学 2015」セッション、千葉市、2015 年 5 月

- Hiroyuki Kimura, Makoto Matsushita, Shugo Ishikawa. Regional variation of CH₄ and N₂ production processes in deep aquifers associated with the accretionary prism in Southwest Japan. 14th Taiwan–Japan International Workshop on Hydrological and Geochemical Research for Earthquake Prediction. 2015 年 9 月
- 松下 慎、石川修伍、眞柄健太、平田悠一郎、木村浩之. 付加体の深部帯水層におけるメタン生成及び窒素ガス生成メカニズムの地域特性. 日本微生物生態学会第 30 回大会、土浦市、2015 年 10 月

2. 受賞

- 静岡大産学連携奨励賞(2014 年 4 月 14 日)

3. 著作物

- 木村浩之. 南西日本の地下圏微生物を利用した付加体エネルギー生産システム. クリーンエネルギー. 2013, 22, 27–32
- 木村浩之. 付加帯エネルギー生産システム ～地下圏微生物を利用した新たな創エネ技術～. 配管技術. 2013, 55, 31–36
- 木村浩之. 付加体の深部地下圏に生息する微生物群集を利用した自立分散型エネルギー生産システム. ケミカルエンジニアリング. 2013, 58, 8–13
- 木村浩之、松下 慎、梅藤恭平、今井里弥、津島一平、大谷実来、佐藤 悠. 陸上掘削による地域資源革命 ～付加体の地下圏微生物を利用したメタン・水素ガス生産～. 月刊地球. 2014, 36, 101–108
- 木村浩之. 難培養微生物研究の最新技術 III, 第 26 章 地下圏微生物によるメタン生成と分散型エネルギー生産技術への応用. 2015, シーエムシー出版

4. 新聞報道

- 静岡新聞朝刊 19 ページ(2013 年 1 月 18 日)
- 静岡新聞朝刊 19 ページ(2013 年 3 月 15 日)
- 静岡新聞朝刊 17 ページ(2013 年 3 月 18 日)
- 中日新聞朝刊 11 ページ(2014 年 4 月 15 日)
- 静岡新聞朝刊 7 ページ(2014 年 4 月 15 日)
- 日本経済新聞朝刊 15 ページ(2016 年 1 月 18 日)
- 静岡新聞朝刊 21 ページ(2016 年 1 月 24 日)
- 静岡新聞朝刊 21 ページ(2016 年 2 月 11 日)