

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：82641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14704

研究課題名(和文) 廃金属を電子源とした革新的二酸化炭素変換システムの構築

研究課題名(英文) Construction of an innovative carbon dioxide conversion system using metal iron as an electron source for acetogens

研究代表者

平野 伸一 (Hirano, Shin-ichi)

一般財団法人電力中央研究所・環境科学研究所・主任研究員

研究者番号：20392748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：固体金属から電子を獲得し、二酸化炭素を固定しながら生育する金属腐食微生物の能力を活用することで、他の独立栄養生物とは異なる革新的二酸化炭素変換システムを構築できる可能性がある。本研究では、環境中より酢酸生産能を有する新規腐食微生物を単離するとともに、既報の酢酸菌から腐食能を示す株の特定に成功した。腐食能を有する酢酸菌のうちClostridium carboxidivoransを対象として固体鉄を電子供与体とした際の転写解析により、固体鉄からの電子獲得に関与する遺伝子を絞り込んだ。今後、これらの情報を活用することで、鉄を電子源とした二酸化炭素変換システムの確立ならびに効率化が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：There is a possibility of constructing an innovative carbon dioxide conversion system different from other autotrophic organisms by utilizing the ability of metal corroding microorganisms that acquire electrons from solid metal and grow with fixing carbon dioxide. In this study, we isolated a novel corrosive microorganism which has acetate producing ability from the environment and identified acetogenic strains showing corrosive ability from acetogens deposited in type culture collection. Genes involved in electron acquisition from solid iron were estimated by transcriptomic analysis when solid iron was used as an electron donor for corrosive acetogen, Clostridium carboxidivorans. In the future, these information obtained in this study might be contribute to construct a novel carbon dioxide conversion system using iron as an electron source and to improve its efficiency.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 金属 腐食 二酸化炭素 酢酸 網羅的転写解析

### 1. 研究開始当初の背景

火力発電所などから排出される二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) を炭素源として有価物質に変換する CO<sub>2</sub> リファイナリー技術の開発が近年進められている。二酸化炭素を炭素源とする独立栄養生物の機能を利用した変換技術が有望と考えられている。CO<sub>2</sub> を高分子に変換するためには外部からのエネルギー (還元力) の投入が必要である。これまでに、光をエネルギー源とする光合成生物や、水素をエネルギー源とする水素細菌を中心に研究が進められてきた。しかし、実用を考えた場合、光利用のためには必要となる膨大な敷地面積、光照射時間の日内・季節間変動の問題、水素利用においては保存・輸送の問題を有していることから、異なる還元力を用いたアプローチが革新的な CO<sub>2</sub> 変換技術開発のブレイクスルーとなりうる。一方、固体鉄から電子を獲得し、鉄を腐食する微生物としてメタン菌が近年新たに報告されており (Uchiyama, 2010) 固体鉄を還元力とした新しい CO<sub>2</sub> 変換反応の存在が示唆されている。本研究の開始までに、我々は CO<sub>2</sub> を唯一炭素源、固体鉄 (鉄顆粒) を単一電子源とした培養条件下で、湖沼底泥の集積培養を行うことで、固体鉄の還元力を利用し、酢酸を生産しながら増殖する微生物群集の獲得に成功している。この集積微生物群集には固体鉄を還元力とし、CO<sub>2</sub> を酢酸に変換する能力を有する新規の微生物が存在することが推定されるが、その実体は明らかとなっていない。また、鉄腐食能を持った酢酸菌の能力を活用することで、従来の光合成生物とは異なる革新的 CO<sub>2</sub> 変換システムを構築できる可能性があるが、これまで報告されている酢酸菌において腐食能が評価された事例はない。そのため、利用可能な酢酸菌の情報は不足し、かつ酢酸生産性の向上に必要な鉄腐食反応に関与する遺伝子についての知見が無い。

### 2. 研究の目的

鉄腐食能を有する微生物群集から鉄腐食性酢酸菌を単離し、この単離株に加え、菌株保存機関に登録されている代表的な酢酸菌の鉄腐食・酢酸生成能を評価する。さらに、評価の結果、高い鉄腐食活性を示した酢酸菌を対象として、酢酸生産性の向上に向け、腐食反応 (固体鉄からの電子獲得反応) に関与する遺伝子の知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1). 鉄腐食能を有する酢酸菌の探索

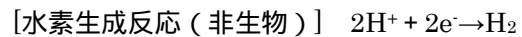
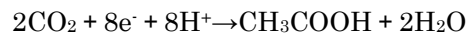
湖沼底泥より集積した微生物群集を植菌源として、ロールチューブ法により培養を行った結果、無機塩寒天培地中に形成されたコロニーをピックアップすることで酢酸菌の単離を行った。

菌株保存期間に登録されている5種類の酢酸菌 *Moorella thermoacetica* (DSM 527), *Clostridium carboxidivorans* (DSM 15243),

*Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061), *Clostridium ljungdahlii* (ATCC 55383), *Acetobacterium woodii* (DSM 2396), *Sporomusa ovata* (DSM 2662), *Sporomusa sphaeroides* (DSM 2875) を取得し、本研究で得られた単離株とともに鉄腐食活性を評価した。鉄腐食活性の評価試験は、100ml 容バイアル瓶に無機塩培地 30 ml と鉄顆粒 (粒径 1 mm, 3 g) を密閉し、気相を N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>=8:2 で充填した嫌気条件において酢酸菌の培養を行い、鉄の腐食に伴って増加する培養液中の酢酸 (酢酸菌による生成物) および気相部の水素濃度 (非生物的腐食反応) を測定することで行った。腐食量は下記の化学式に基づき生物学的な酢酸生産、無生物的水素生産から電子当量換算し、評価した。



[酢酸生成 (生物反応)]



#### (2). 腐食反応に関与する遺伝子を推定するための網羅的遺伝子発現解析

*C. carboxidivorans* は鉄顆粒を電子供与体として酢酸を生成しながら増殖する一方で、ガス基質である H<sub>2</sub>/CO を電子供与体として増殖することが可能である。鉄顆粒を添加した条件ならびに鉄顆粒の代わりに H<sub>2</sub>/CO を添加した条件で培養を行い、それぞれ対数増殖期において菌体を回収し、PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MOBIO) を用いて RNA の抽出を行った。この RNA を試料として、*C. carboxidivorans* の全遺伝子情報 (NZ\_CP011803.1) をもとに設計したマイクロアレイを用い、鉄もしくは H<sub>2</sub>/CO を還元力とした条件での遺伝子発現量を網羅的に比較解析した。データの解析は Gene Spring GX14 (トミーデジタルバイオロジー) を用い、統計処理により培養条件に依存して有意に発現量に差のあった遺伝子を選別した。

### 4. 研究成果

#### (1). 鉄腐食能を有する酢酸菌の特定

集積培養液から、複数のコロニーを分離し、そのなかで鉄腐食能および酢酸生産能を有する 1 株 (EE-1 株) を取得した。単離株は 16S rRNA 遺伝子配列情報をもとに、*Desulfovibrio* sp. と同定された (図 1)。

菌株保存機関に登録されている取得可能な酢酸菌 7 種についても同様に固体鉄を還元力とした酢酸生産能および鉄腐食能力を評価・比較した。7 種のうち 4 種については本培養条件では全く酢酸を生成しない、もしくは酢酸は生産されるが、その量は非生物的な腐食に伴って発生する水素と同程度に留まった (図 2)。これらの株については固体金属から電子を獲得し、腐食を促進する能力を有していないものと判断された。一方、7 種

のうち 3 種 (*C. carboxidivorans*, *C. autoethanogenum*, *S. ovata*) が鉄から電子を獲得し、腐食を促進すると共に、非生物的水素発生量から換算される酢酸量を大きく上回る生産能力有していることが明らかとなった (図 3)。また、この結果はこれまで酢酸菌における腐食能は評価がなされてこなかっただけであり、既往の酢酸菌のなかにも多くの腐食能、すなわち固体金属を電子供与体として利用することができる種が存在することを示唆している。

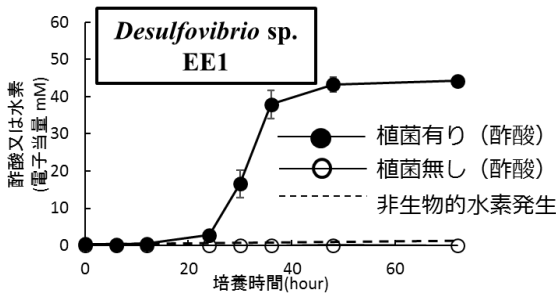


図 1、単離株の酢酸生成能力

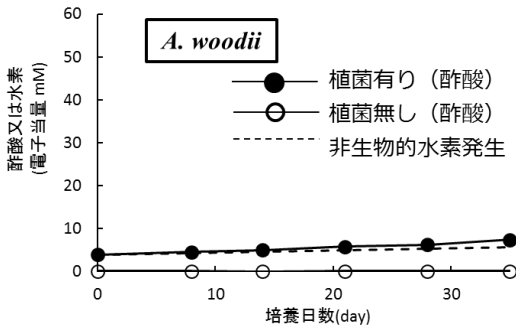


図 2、*A. woodii* の酢酸生産 (腐食活性無し)

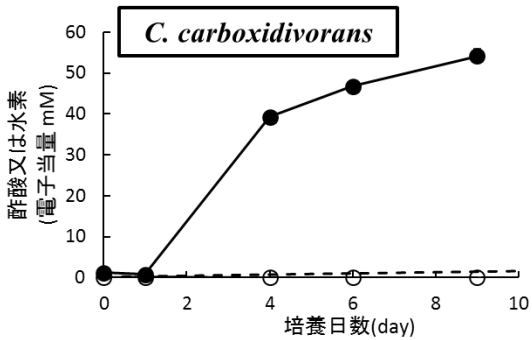


図 3、*C. carboxidivorans* の酢酸生産 (腐食活性有り)

(2). 腐食反応に関与する遺伝子を推定するための網羅的遺伝子発現解析

本研究において明らかとなった固体金属を電子供与体として利用し、CO<sub>2</sub> を酢酸に変換する酢酸菌のグループは、これまでに知見のない機能グループであるため、CO<sub>2</sub> からの有価物生産プロセス並びにその効率化を考えた場合には固体金属からの電子獲得や腐食反応のメカニズムやそれらに関わるタン

パク質の解明が必要である。そこで、集積培養液から腐食性酢酸菌として単離された EE-1 株とならび高い腐食能・酢酸生産能を持ち、ゲノム情報が公開されている *C. carboxidivorans* を対象として腐食反応に関与する遺伝子を絞り込むことを試みた。

*C. carboxidivorans* の腐食反応に関与する遺伝子を推定するために、還元力として水素を用いた培養条件と固体鉄を用いた腐食培養条件で遺伝子発現量の網羅的比較解析をマイクロアレイにより行った。その結果、全遺伝子 5167 個のうち半数以上に大きな変化は見られなかった一方で、電子供与体の違いにより、5 倍以上発現量が変化した遺伝子が 10%程度存在した。さらに、固体鉄からの電子獲得に関与する遺伝子を特定するため、固体鉄を用いて培養した際に発現量が増加した遺伝子群に着目したところ 10 倍以上発現量が増加している遺伝子が 44 個 (全体の 1%未満) 見出され、これら遺伝子の腐食反応との関連性が推定された (図 4)。

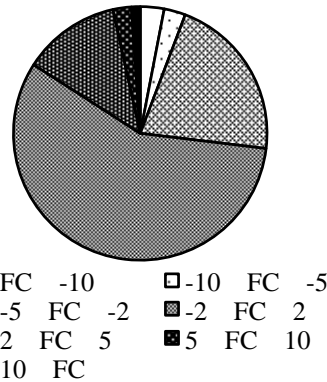


図 4、固体鉄培養時に発現量が変化した遺伝子の割合

次に、これら 44 遺伝子を既報の遺伝子との相同性に基づき機能分類した (図 5)。

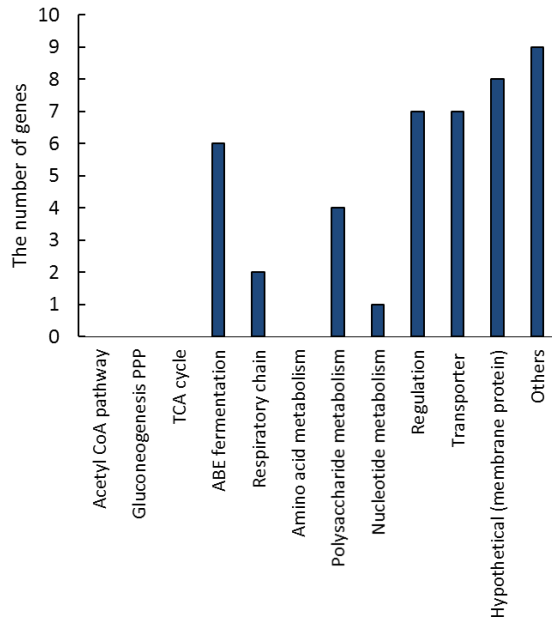


図 5、発現量が増加した遺伝子の機能分類  
これら発現量が増加した遺伝子の中には、固

相表面でのバイオフィーム形成に關与する多糖合成酵素をコードする遺伝子や、細胞内外の物質輸送に關わるトランスポーターをコードする遺伝子、そしてそれらの転写制御に關わる転写因子が含まれていた。また、発現量が大きく増加した遺伝子には、既報の情報からは機能を推定することができない膜タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。特に、gene number 09875, 12005は固体鉄を電子供与体として用いた培養時に100倍程度発現量が増加している遺伝子であるとともに、他の酢酸菌に類似の遺伝子は存在しなかったことから、本菌の高い腐食能（固体金属から電子を獲得する能力）に寄与している可能性が推定された（表1、図6）。

Gene name	Fold change	Mt	Aw	Ca	So	Da
09875 membrane protein	141.7					
12005 membrane protein	92.0					
11170 hypothetical	66.4					
02580 membrane protein	52.0					
12195 membrane protein	11.2					
09675 FMN-binding protein	40.3					

表1、機能未知の膜タンパク質をコードする遺伝子、右は本研究で使用した酢酸菌においてホモログが存在するかを示す（灰色：該当遺伝子有り、白色：無し）

Mt: *M. thermoacetica*, Aw: *A. woodii*, Ca: *Clostridium autoethanogenum*, So: *S. ovata*, Da: *D. alaskensis*

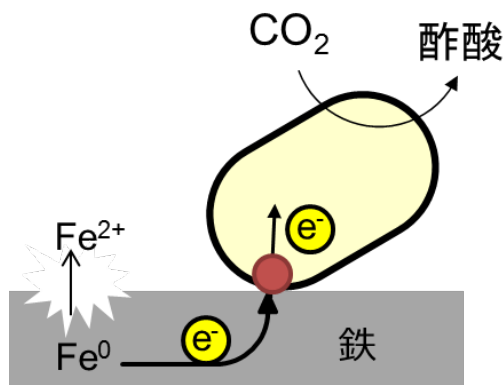


図6、推定される膜タンパク質の寄与

以上、固体鉄から電子を獲得することでCO<sub>2</sub>を酢酸に変換する能力を有する腐食性酢酸菌を見出し、既存の光合成や水素細菌とは異なる新たなCO<sub>2</sub>変換プロセスの可能性を提示することができた。また、腐食性酢酸菌の代表菌株において固体鉄を電子供与体とし

て用いた場合に発現が誘導される遺伝子を絞り込み、腐食反応ならびに電子獲得に寄与する遺伝子群を見出すことができた。今後、これら絞り込まれた遺伝子に対して、機能解析を進めることにより、固体鉄から電子を獲得する能力に関する知見を獲得することで、電子獲得機能増強などCO<sub>2</sub>変換プロセスの効率化が可能となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌発表〕(計 2件)

Masaki Y, Hirano S, Okibe N, Microbial community profiling of Chinoike Jigoku ("Blood Pond Hell") hot spring in Beppu, Japan and isolation and characterization of Fe(III)-reducing *Sulfolobus* sp. Strain GA1, 167, 595-603 (2016)

平野 伸一、長岡 亨、伊勢孝太郎、天野由記、松本伯夫  
 土壤微生物群集によって誘引される炭素鋼腐食とそのメカニズムの解析  
 材料と環境：64(12)、535-539

〔学会発表〕(計 14件)

井上 達也、平野 伸一、石井 正治「微生物による金属鉄腐食プロセスの解析」

農芸化学会 2017年度大会

平野 伸一、電気事業に關わる設備の微生物腐食とその評価、第185回腐食防食シンポジウム-微生物が關与する腐食と電気化学現象-

平野 伸一、長岡 亨、松本伯夫、炭素鋼の微生物腐食と炭素鋼表面に形成されたバイオフィームの關係、農芸化学会關東支部例会

平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫、金属腐食に及ぼす硫酸還元菌およびメタン菌の影響、生物工学会 2016年度大会

井上達也、平野伸一、新井博之、石井正治、好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のヒドロゲナーゼ機能の解析、生物工学会 2016年度大会

Hirano S, Nagaoka T, Matsumoto N, Microbial community of biofilm formed on carbon steel and its correlation with corrosion. The 3<sup>rd</sup> AP-ISMET

平野伸一、長岡 亨、松本伯夫、亜鉛メッキ鋼材の土壌腐食と土壌の微生物学的な特徴、材料と環境 2016

井上 達也、平野伸一、松本伯夫、新井博之、石井正治

金属を電子源として利用する有用物質生産菌の探索

日本農芸化学会 2016年大会

平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫

炭素鋼の微生物腐食と炭素鋼表面に形成されたバイオフィルムの関係  
日本農芸化学会 2016 年大会  
平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫  
炭素鋼の腐食を誘引する環境微生物とその解析  
「相界面科学を視点とした材料と微生物の相互作用」シンポジウム  
井上 達也、平野伸一、松本伯夫、新井博之、石井正治  
「鉄腐食性微生物を用いた新たな有用物質生産プラットフォームの構築」  
生物工学会東日本支部大会  
平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫  
「硫黄酸化細菌を含む金属腐食微生物群集の構築とその解析」  
第 67 回 日本生物工学会大会  
Ishii M, Nguyen HT, Hirano S, Arai H, Studies on the carbon and energy metabolism of the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1,  
第 67 回 日本生物工学会大会  
平野伸一、長岡亨、松本伯夫、電気事業関連設備での微生物腐食対策に資するための環境微生物研究、材料と環境 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 伸一 (HIRANO, Shin-ichi)  
(一財)電力中央研究所・環境科学研究所・主任研究員  
研究者番号：20392748