

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19092

研究課題名（和文）メタン生成触媒を用いた革新的バイオガス生産システムの創製

研究課題名（英文）Development of biogas generation system with methanogenic biocatalyst

研究代表者

金子 雅紀（Kaneko, Masanori）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：80633239

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はメタン生成アーキアが特有に持つメタン生成の鍵となる補酵素F430の活性を電気化学的に制御し、メタン生成触媒として用いることで新たなバイオガス生産システムを創製することを目的とする。当該研究期間中に、メタン生成菌より抽出・精製した補酵素F430を炭素電極上で還元することに成功し、生体内で起こるCH₃-S-CoMのメタンへの変換と類似の反応を再現することに成功した。また、補酵素F430単体では、生体内基質以外にもアルキルチオホスホン酸、ジアルキルスルフィド、アルコキシ化合物、ハロゲンカルキルなど多様な炭素化学種が作用するという未知機能が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成功は、「太陽エネルギーを化学エネルギー（メタン）に変換する技術の創出」と従来のバイオガス生産システムに置き換わる革新的メタン生成システムの創製を意味する。わずか10kgの補酵素F430で年間最大160万トンのバイオガス生産が可能になり、我が国のエネルギー自給率向上と持続可能な社会の実現への貢献につながる。

研究成果の概要（英文）：Coenzyme F430 is a key compound for microbial methanogenesis. In this study, we developed a new biogas generation system in which coenzyme F430 is electrochemically activated and used as a biocatalyst for methanation. Coenzyme F430 extracted and purified from methanogenic archaea was successfully activated on a working electrode and methane was produced from CH₃-S-CoM which is a substrate for coenzyme F430 in vivo reaction. We revealed unrecognized functions of coenzyme F430 catalyzing methanation from various chemical species including alkylthioethylphosphonate, dialkylsulfide, alkoxycompounds, and alkyl halides.

研究分野：生物地球化学、有機地球化学

キーワード：メタン生成アーキア メタン精製補酵素 電気化学 メタン生成

1. 研究開始当初の背景

補酵素 F430 はメタン生成アーキアがメタン生成のために特有にもつ補酵素である。本研究において補酵素 F430 に着目した理由は、当該物質の希少な触媒作用にある。補酵素 F430 はメタン生成反応の最も重要な最終段階を触媒するメチルコエンザイム M レダクターゼ (MCR) の活性部位として存在し、基質特異的にメチルコエンザイム M をメタンに変換している。しかしながら、単離した補酵素 F430 自体はチオメチル化合物やハロメタンなど様々なメチル化合物をメタンに変換する潜在的機能を持つと推定できる。そこで、この類い希少な機能を「メタン生成触媒」として用いれば、課題の多い従来のバイオガス生産システムに置き換わる、革新的なバイオガス生産技術を創出できるのでは無いかとの着想に至った。

従来のメタン発酵によるバイオガス生産システムは、多段階の微生物による分解反応により構成され、最終的にメタン生成アーキアがメタンを生産している。しかしながら、与えた炭素源の多くは微生物自体のバイオマスやエネルギーに消費され、わずかな部分がメタンとして放出されているに過ぎない。それに対し、本研究で創出を目指すメタン生成システムは、メタン生成反応の最も重要な最終段階だけを人工的にコントロールすることで、高効率・省スペース・省コストなシステムを目指す。また、補酵素 F430 を用いることで、酵素の基質特異性のためにメタン生成アーキアでは実現できない、様々なメチル化合物をメタンに変換することを可能にする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、補酵素 F430 の活性化法を確立し、「メタン生成触媒」として用いた革新的なバイオガス生産システムの創製を行うことである。本研究が成功すれば、微生物を用いたメタン発酵によるバイオガス生産と比較して、極めて小スケールで、高度に制御可能なバイオガス生産システム構築への発展が期待できるだけでなく、炭素基質に培養藻類や、低品位石炭や枯渇油田などの未利用化石燃料、家畜の糞尿や食品残渣などを用いたバイオガス生産が可能になる。これは我が国のエネルギー自給率を飛躍的に高め、持続可能社会の実現に直結する。

3. 研究の方法

1) メタン生成アーキアの大量培養法確立と補酵素 F430 大量精製法の確立

補酵素 F430 は市販されていないため、実験に使用する mg-g スケールの補酵素 F430 を得るためには、大量のメタン生成菌から補酵素 F430 を抽出、精製する必要がある。本研究では近年開発した 10L スケールの絶対嫌気培養装置を用いて、メタン生成菌を大量に培養する手法を確立する。菌体から補酵素 F430 を抽出・精製する手法は、研究代表者が開発した環境試料からの補酵素 F430 の超高感度定量分析法の前処理を原理的には踏襲しつつ、より簡便に大量抽出・精製できるように最適化を行う。

2) 補酵素 F430 の電気化学的活性化法の確立

補酵素 F430 の電気化学的活性化法を確立するために、精製した補酵素 F430 の電極応答を様々な溶媒、電解質、電極材、メディエーターを用いて検討する。

3) 電極電解セルを用いたメタン生成システムの開発

上記で確立した手法をスケールアップし、10-20 ml 程度の半密閉型の電極電解セルを作成し、メタン生成実験を行う。発生したガスをガスクロマトグラフィーで分析し、メタン発生の有無および発生量を明らかにする。

4) 補酵素 F430 に作用可能な炭素源化学種の探索

生体内において補酵素 F430 に作用する基質は $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ であるが、それ以外のアルキル化合物が基質として作用し、炭化水素ガスが発生するような未知機能があるかを実証する。候補となる基質は、アルキル基をもつアルキルチオエチルスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルコキシベンゼン、ジメチルスルフィドなどである。

4. 研究成果

1) メタン生成アーキアの大量培養法確立と補酵素 F430 大量精製法の確立

培養のコストを抑えつつも、目的とする補酵素 F430 の高い収率を目指し、候補となるメタン生成菌の中から、*Methanosarcina barkeri* の標準株 (至適生育温度 37°C) を選定し、炭素・エネルギー源としてメタノールを用いた培養系を作成した。結果として、150 g/week

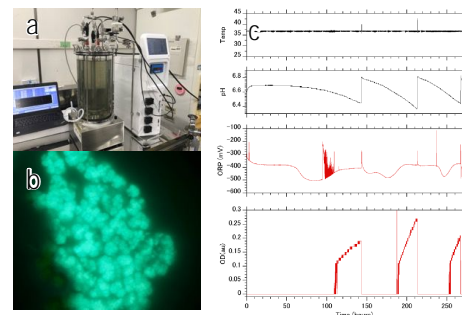


図 1. 絶対嫌気培養装置 (a), *Methanosarcina barkeri* の蛍光顕微鏡写真 (b)、連続培養における各種パラメーター。上から温度、pH、酸化還元電位、濁度 (c)。

の菌体量および 1mg/100g wet cell 程度の補酵素 F430 が安定的に回収できるようになった(図 1)。一方で、連続培養の過程で雑菌の繁殖を防ぐことが困難であること、研究全体が進行するにつれて、大量培養による補酵素 F430 準備段階が律速になることが問題であった。そこで、培養菌体を *Methanothermobacter marburgensis* (至適生育温度 65°C) に変更し、炭素・エネルギー源として CO₂/H₂ を用いた培養系に変更した。その結果、120g/week の菌体量および、14mg/100g wet cell 程度の補酵素 F430 が安定的に回収できるようになった。これにより、回収量が *M. barkeri* 株を用いた系の最大 25 倍となり、1 年かけて回収していたものが 2 週間にまで短縮され、研究遂行の律速要因を解決することができた。また、高温環境であるため雑菌も繁殖せず、安定した培養環境を維持することが出来た。一方で、CO₂/H₂/H₂S のプレミックスガスを常時培養槽にバブリングしており、コスト面では課題が残った。

Culture media (C source)	Biomass (g/week)	F430 content (mgF430/100g wet cell)
MeOH	90-210 w. contami.	0.5-1.0
CO ₂ / H ₂	60-150 w/o contami.	8-14

図 2. 培養系におけるバイオマスおよび補酵素 F430 収量の違い。

2) 補酵素 F430 の電気化学的活性化法の確立

作用電極、対極、参照電極からなる三電極系の電気化学セルおよびポテンショスタットを用いて、補酵素 F430 の電極応答性を活性化が可能な反応系(溶媒、電極材、pH、メディエーター)を検討した。最終的に、溶媒は pH 10.4 の CAPS buffer 水溶液、作用電極にグラッシーカーボン電極、メディエーターにメチルピオロゲンをを用いた図 3 の系により、補酵素 F430 の電気化学応答を確認した。これにより、本反応系において補酵素 F430 中の Ni が -1.1V 付近で還元され、活性化するとともに、生体内で起こっている反応と類似した CH₃-S-CoM からのメタン生成が起こっていることが示唆された(図 3)。

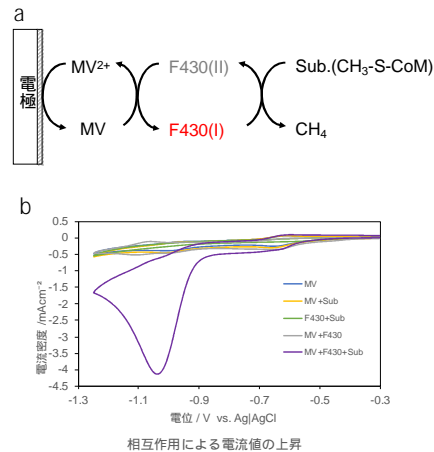


図 3. 最適化した補酵素 F430 の電気化学的活性化法の反応系 (a), 補酵素 F430 の電極応答を示すボルタモグラフ (b)。

3) 電極電解セルを用いたメタン生成システムの開発

上記で確立した補酵素 F430 の電気化学的活性化法を応用して、図 4 に示す電解セルを作成、実際に生じたガスをガスクロマトグラフィーで分析し、メタン発生の有無および発生量を定量した。作成した電解セルは、嫌気的環境を保つために、H 型セルとし、電極の比表面積を大きくするために、カーボンクロスを用いた。電気化学的メタン生成実験の結果、メタン生成が確認された(0.05 μmol)。また、メタンと等モル程度のエチレンの発生も確認された。また途中で、プロトン供与体としてトリエチルアミンを添加したところ、メタンおよびエチレンの生成速度が増加した。一方で、基質である CH₃-S-CoM を含まない系で同様の電解実験を行ったところ、エチレンのみ生成したことから、トリエチルアミン添加後に発生したエチレンの一部は、トリエチルアミン由来であることが分かった。メタン生成においてはプロトン供与体の効果が認められたことから、プロトン量が反応律速およびエチレンの生成要因であることが示唆された。

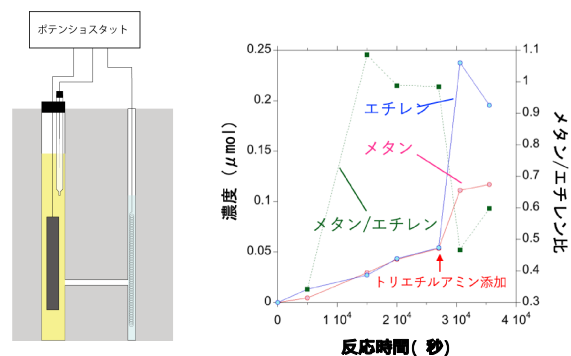


図 4. 作成した半閉鎖系 H 型電解セルおよび発生したガスの時間変化。

4) 補酵素 F430 に作用可能な炭素源化学種の探索

嫌気的な密閉バイアル(pH10.4)内で、補酵素 F430 をクエン酸チタンおよびピオロゲンをを用いて還元し、各種炭素基質(CH₃-S-CoM、ジメチルスルフィド、ヨウ化メタン、アニス酸、メタノール)を反応させたところ、メタノール以外の炭素基質からメタンおよびエチレンの発生が確認された。反応は一次反動的に進み、平衡に達していることが、CH₃-S-CoM の再添加などから明らかになった(図 5)。

また、上記の電極電解セルを用いた電気化学的メタン生成実験において、 $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ ($\text{C}_1\text{-S-CoM}$) の代わりに、 $\text{C}_2\text{-S-CoM}$, $\text{C}_3\text{-S-CoM}$, $\text{C}_4\text{-S-CoM}$ の混合物を炭素基質用いて電解実験を行ったところ、炭素基質のアルキル側鎖に対応するアルカンおよびアルケンが発生した。以上のことから、補酵素 F430 単体では、生体内反応基質である $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ 以外にも多様な有機化合物と反応し、炭化水素ガスを発生する未知触媒能力があることが明らかになった。本研究から少なくとも、短鎖のアルキルチオホスホン酸、ジアルキルスルフィド、ハロゲン化アルキル、アルコキシ化合物などが基質となり得ることが示された。

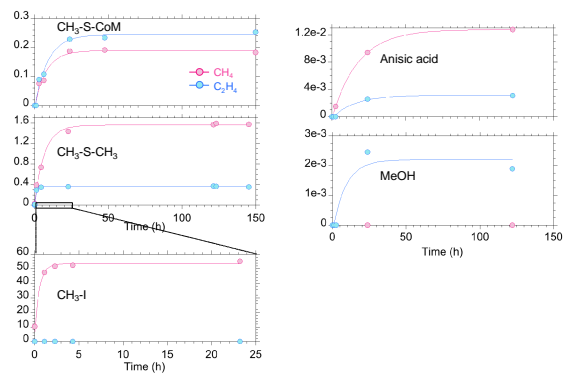


図 5 . 様々な炭素化学種を用いた化学的メタン生成実験結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 金子雅紀 原川翔太 辻村清也
2. 発表標題 補酵素F430の未知機能と応用研究
3. 学会等名 日本有機地球化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Kaneko Matsui Y. Kawagucci S. Yoshikawa C. Nunoura T. Ohkouchi N.
2. 発表標題 Distribution of methanogenic coenzyme F430 in the subsurface water columns at north Pacific Ocean
3. 学会等名 Goldschmidt2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Kaneko Harakawa S. Tsujimura S.
2. 発表標題 Unrecognized functions of coenzyme F430 and its applications to geomicrobiology and catalyst chemistry
3. 学会等名 IMOG2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原川 翔太 辻村 清也 金子 雅紀
2. 発表標題 補因子F430を電極触媒とした電気化学的メタン生成
3. 学会等名 電気化学会2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原川翔太 辻村清也 金子雅紀
2. 発表標題 補因子F430を電極触媒とした電気化学的メタン生成
3. 学会等名 日本化学会第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Harakawa Seiya Tsujimura Masanori Kaneko
2. 発表標題 Electrochemistry of cofactor F430 as a methane generation catalyst
3. 学会等名 Electrochemistry of cofactor F430 as a methane generation catalyst (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 メタン生成補酵素を用いた電気化学的バイオガス生産システム	発明者 金子雅紀、辻村清也	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-118681	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 メタン生成補酵素を用いた電気化学的バイオガス生産システム	発明者 金子雅紀、辻村清也	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/023715	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻村 清也 (Tsujimura Seiya) (30362429)	筑波大学・数理物質系・准教授 (12102)	