

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22923

研究課題名(和文) 二酸化炭素微生物固定における低濃度水素利用法の開発

研究課題名(英文) Utilization of gas mixture with low hydrogen content for microbial carbon dioxide fixation

研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：70332260

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)：本課題では、水素細菌を用いた独立栄養培養において、爆発下限界の低濃度水素を活用することに着目した。爆発下限界の水素濃度は4%であり、この水素濃度であれば理論上、水素を安全に取り扱って培養することができる。しかしながら、この低濃度水素で水素細菌がどの程度の二酸化炭素固定能を示し、どの程度の菌体増殖を行うのかについては調査されておらず、その利用可能性は未知数である。そこで、爆発下限界の水素濃度において水素細菌の二酸化炭素固定能を調査することで、その有用性の検証を行うことを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低濃度水素を用いた独立栄養培養法は、水素の爆発を回避し、安全な培養技術としてのプラットフォームになり得るものである。水素の爆発下限界での効率的な培養法が確立できれば、水素細菌による物質生産系は非常に大きな発展性を有している。また、太陽光などの再生可能なエネルギーから水の電気分解によって生産されたグリーン水素を利用すれば、究極の持続可能な物質生産系として環境保全に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to use gas mixture with low hydrogen content for autotrophic culture of hydrogen-oxidizing bacteria. The lower explosive limit of hydrogen is 4%, at which hydrogen can be safely handled during cultivation. However, the ability of carbon dioxide fixation by the hydrogen-oxidizing bacteria at low hydrogen concentration has not been investigated. This study validated the use of low-concentration hydrogen gas mixture in terms of the bacterial cell growth and biopolyester production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリヒドロキシアルカン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素の再資源化のなかでも生物固定化は、生物の代謝機能を活用することで高付加価値物質に変換することができるため、非常に魅力的な手法である。多くの研究者が藻類やラン藻による二酸化炭素の固定化について研究を行っているが、太陽光を効率よく照射するためにはリアクターを平面的にして広い面積を確保する必要がある。そのため解放系での培養を余儀なくされ、遺伝子改変した組換え株を用いることが難しくなる。

一方で水素細菌は、化学合成独立栄養細菌の一つで、高い二酸化炭素固定能、高い増殖速度、そして、その細胞内に 80%以上の含有率で生分解性プラスチック (PHA) を合成する。水素細菌は、光エネルギーを要しない代わりに、水素を酸化して二酸化炭素の固定を行う。藻類などとは異なり、密閉した小型リアクターで培養できるため、管理が容易で、組換え株の利用も可能である。

これまでに、水素、酸素、二酸化炭素からなる混合ガスにおいて水素細菌である *Ralstonia eutropha* の独立栄養培養が研究されてきた。それらの研究により、非常に高い二酸化炭素固定能力と高い PHA 生産性が示されてきた。しかし一方で、水素の取り扱いが難しく、混合ガスが漏洩すると爆発の危険があるため、大規模な培養の実施には至っていない。

### 2. 研究の目的

本課題では、水素細菌を用いた独立栄養培養において、爆発下限界の低濃度水素を活用することに着目した。爆発下限界の水素濃度は 4% であり、この水素濃度であれば理論上、水素を安全に取り扱って培養することができる。しかしながら、この低濃度水素で水素細菌がどの程度の二酸化炭素固定能を示し、どの程度の PHA を合成するのかについては調査されておらず、その利用可能性は未知数である。そこで、爆発下限界の水素濃度において水素細菌の二酸化炭素固定能を調査することで、その優位性や有用性の検証を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

通常、水素細菌を培養する場合は、80%程度の高い水素濃度で培養する。これは、水素細菌の増殖において、二酸化炭素や酸素より多量の水素を要求するためであり、爆発組成の範囲外ではあるもののリアクター外に漏洩すれば、空気と混和して容易に爆発する。一方本研究では、爆発下限界の低濃度の水素 (4%) で培養系を構築することをコンセプトとしており、仮に漏洩しても爆発の危険はない。そこでまず、水素濃度を 4% に維持した振とうフラスコを用いた培養システムを構築し、水素細菌である *R. eutropha* H16 株およびその組換え株の培養を行った。次に、*R. eutropha* H16 株の炭素固定能を増強させるために、二酸化炭素供給の律速になっていると思われる炭酸脱水反応を触媒する酵素の遺伝子数を増強し、その効果の検証を行った。最後に、ミニジャーを用いた混合ガス連続供給培養系を構築し、安全性に配慮した水素濃度 4% の培養条件で、どの程度まで菌の生育とポリマーの合成量を高めることができるのかについて検討を行った。

### 4. 研究成果

まず、化学合成独立栄養細菌 *R. eutropha* H16 株によって二酸化炭素から独立栄養的に PHA を合成することを検討した。その際、供給するガスが漏洩しても爆発しないようにするために、水素を爆発下限界の低い濃度で維持することで、高い安全性を確保しつつ培養を行った。具体的には、密栓した 500 mL 容バツフル付き三角フラスコに、水素 6%、二酸化炭素 20%、窒素 74% の混合ガスを封入した 1L 容ガスパックを取り付け、三角フラスコ内の空気を半分抜き取ることに

より陰圧にし、取り付けたガスパックと三角フラスコのヘッドスペース内の空気を混合し、水素：酸素：二酸化炭素：窒素 = 3.6:7.6:12.3:76.5 の組成を作り出した。そのフラスコを 30 で旋回振とうにより培養し、24 時間毎にガスパックを新しいものに取り換えた（図 1）。培養は 144 時間まで行った。

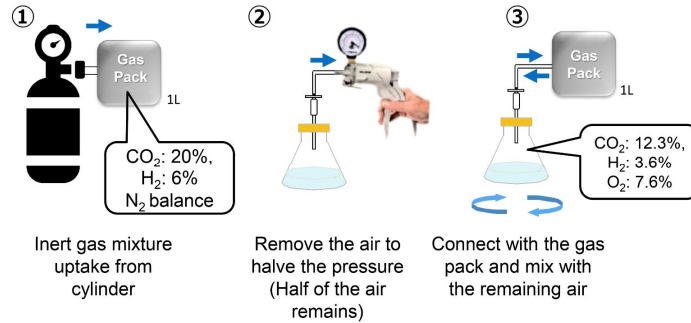


図 1 バッフル付き三角フラスコでの培養方法

その結果、爆発下限界より低い水素濃度でも、*R. eutropha* H16 株が増殖することを確認し、また、窒素源やリン源を欠乏させた培養条件において、細胞内に最大で 70 wt% の PHA を蓄積することを確認した。その PHA は、ガスクロマトグラフィー (GC) および核磁気共鳴 (NMR) 分析によりポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] であることを確認した。また、ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) による分子量測定を行い、十分に高い分子量を有していることを確認した。

P(3HB) は高結晶性であり、硬くて脆い材料物性を示すため、*R. eutropha* の改変株 1F2 を用い、二酸化炭素からの共重合体 PHA の合成を試みた。その結果、3-ヒドロキシバレリン酸 (3HV) や 3-ヒドロキシ-4-メチルバレリン酸 (3H4MV) を少量含む P(3HB-co-3HV-co-3H4MV) 共重合体を合成することに成功した。この共重合体をガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)、NMR、GPC、示差走査熱量測定 (DSC) の各分析に供し、P(3HB) よりも低結晶性で、実用性の高いポリマーであることを確認した。

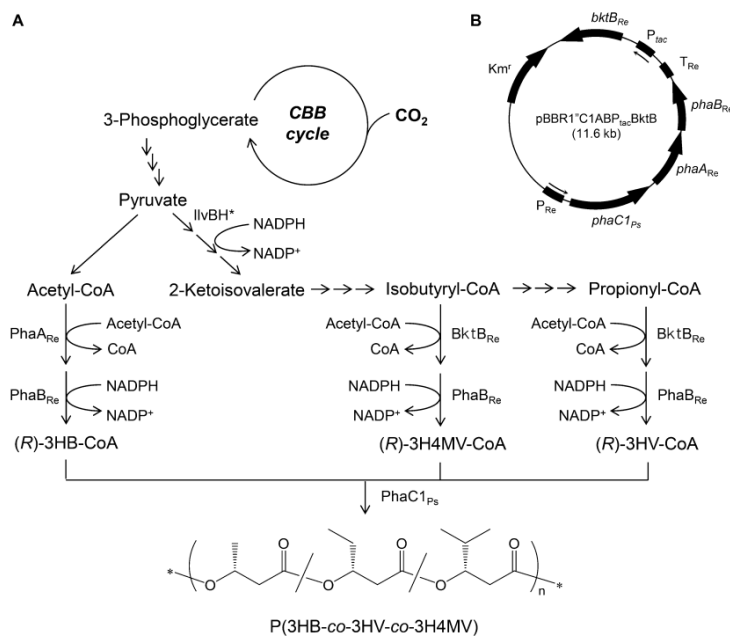


図 2 二酸化炭素からの共重合体 PHA の合成 (A) 代謝経路、(B) 作成したプラスミド

これらの株について、ミニジャーを用いた混合ガス連続供給培養系を構築し、水素濃度 4% の培養条件でどの程度まで菌の生育とポリマーの合成量を高めることができるのかについて検討を行った。その結果、フルクトースを炭素源とした従属栄養条件には若干及ばなかったものの、良好な菌体生育と PHA 蓄積を確認した。これにより、水素濃度 4% でも十分に独立栄養培養を実施できることが分かった。

一方で、細胞内で二酸化炭素供給の律速になっていると思われる炭酸脱水酵素の遺伝子数を増強し、その効果の検証を 4% 水素濃度下の独立栄養および混合栄養条件で行った。その結果、窒素源制限下の独立栄養条件およびグリセロールを添加した混合栄養条件において、菌体増殖および PHA 蓄積の増強が見られた。この効果は、細胞内に取り込まれた炭酸イオンが炭酸脱水酵素により効率的に二酸化炭素に変換された結果、カルビン回路のターンオーバーが上昇したことによるものと思われる。

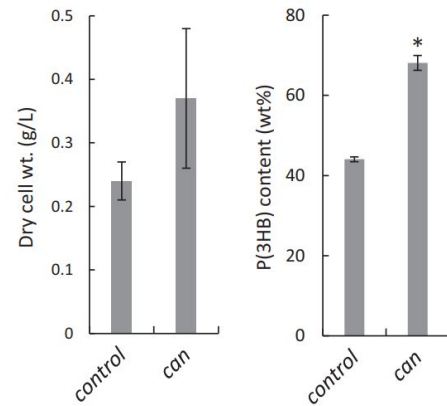


図3 炭酸脱水酵素 (*can*) の遺伝子増強効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Romeo Thorbecke, Masahiro Yamamoto, Yuki Miyahara, Mino Oota, Shoji Mizuno, Takeharu Tsuge.	4. 巻 53
2. 論文標題 The gene dosage effect of carbonic anhydrase on the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) under autotrophic and mixotrophic culture conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 209-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-020-00409-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Miyahara, Masahiro Yamamoto, Romeo Thorbecke, Shoji Mizuno, Takeharu Tsuge	4. 巻 -
2. 論文標題 Autotrophic biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by <i>Ralstonia eutropha</i> from non-combustible gas mixture with low hydrogen content	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10529-020-02876-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Miyahara, Masahiro Yamamoto, Thorbecke Romeo, Shoji Mizuno, Takeharu Tsuge
2. 発表標題 Autotrophic biosynthesis of biodegradable polyester by <i>Ralstonia eutropha</i> from a non-explosive gas mixture
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮原 佑宜、山本 真大、Thorbecke Romeo、水野 匠詞、柘植 丈治
2. 発表標題 非爆発性混合ガスを用いた二酸化炭素からの生分解性ポリエステル生合成
3. 学会等名 第10回JAC1/GSCシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Romeo Thorbecke、山本真大、宮原佑宜、水野匠詞、柘植丈治
2. 発表標題 Autotrophic biosynthesis of PHA with low hydrogen supply
3. 学会等名 エコマテリアルシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮原佑宜, 柘植丈治ほか80名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 515
3. 書名 バイオリクターのスケールアップと物質生産事例集	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------