

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05784

研究課題名(和文) ギ酸代謝関連遺伝子の探索とそれらを利用した高速ギ酸資化菌の創出

研究課題名(英文) Exploration of Formate Metabolism-Related Genes and Creation of high performance Formate-assimilating Bacteria

研究代表者

伊原 正喜 (Ihara, Masaki)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：50391868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ギ酸を有用物質に変換するギ酸資化菌バイオプロセスに注目が集まっている。しかし、ギ酸資化菌に関する研究例は少なかった。そこで我々は、新規ギ酸資化菌を単離して、それらの増殖能力を比較することで、実用に適した株の条件を探ろうと考えた。まず、単離方法を確立し、さらに培養のボトルネックを調査した。その結果、多数の新規株の単離に成功し、pHと溶存酸素濃度がボトルネックであることを明らかにした。さらに、pHおよび溶存酸素濃度を、6.8～7.5、および5 ppm以上に保つことによって、それぞれの増殖能を引き出せることが分かった。その条件で増殖比較することで、従来株よりも高増殖能を示す株を同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後の脱炭素社会では、再生可能エネルギーを用いて、CO₂から様々な物質を合成することになる。この物質生産をカーボンリサイクルと呼ぶ。ギ酸は、CO₂から電気化学的に生成でき、水溶性や安全性に優れているため、カーボンリサイクルの出発物質として重要視されている。そのため、ギ酸から生分解性プラスチックなど高分子までがワンポット変換が可能である、ギ酸資化菌を用いたバイオプロセスに注目が集まっている。今回我々は、増殖能に優れた新規ギ酸資化菌を単離でき、培養を確立するためのデータを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Attention has been focused on the formic acid bioconversion process using formic acid-utilizing bacteria, in which it can convert formic acid into useful substances. However, there have been few studies on formic acid-utilizing bacteria. Therefore, we tried to isolate novel formic acid-utilizing bacteria and compare their growth capabilities to identify strains suitable for practical use. First, we established an isolation method and investigated the bottleneck in cultivation. As a result, we successfully isolated numerous novel strains and identified pH and dissolved oxygen concentration as the bottlenecks. Furthermore, we found that maintaining pH between 6.8 and 7.5 and dissolved oxygen concentration above 5 ppm could enhance their growth capabilities. By comparing the growth under these conditions, we identified strains that exhibited higher growth capabilities than conventional strains.

研究分野：カーボンリサイクル

キーワード：ギ酸 ギ酸資化菌 カーボンリサイクル

1. 研究開始当初の背景

エネルギー媒体物質として、水素分子(H₂)とともに、ギ酸が注目されている。ギ酸は、CO₂から電気化学的に生成される(CO₂ + 2H⁺ + 2e⁻ → HCOOH)。H₂と比較すると、生産コストは高いものの、酸化還元電位は同等であり、水溶性や安全性に優れているため、カーボンリサイクルの出発物質として重要であると考えられる。ギ酸変換プロセスとして、ギ酸から生分解性プラスチックなど高分子までがワンポット変換が可能である、ギ酸資化菌を用いたバイオプロセスに注目が集まっている[1-4]。しかし、旺盛な増殖能を示す水素酸化細菌が多く単離されているのに対して、当初知られていたギ酸資化菌の増殖能はそれらに大きく劣っていた。

2. 研究の目的

研究に先立ち、我々はギ酸資化菌の中で最も研究されている *Methylorubrum extorquens* AM1 (*M. extorquens* AM1) の培養を行った。その結果、同様に調製し同時に培養開始した複数のサンプルのうち一部は開始後すぐに増殖するが、残りは数日～1週間経過後に増殖し始めるという現象が頻繁に観察された。また、すぐに増殖するサンプルでも到達濁度に大きなバラツキがあった。これら再現性の問題は、*M. extorquens* AM1 は休止状態に入りやすいことを示唆している。そこで、我々は 休止状態に入りにくい新規ギ酸資化菌の探索と 培養条件の最適化を目的に設定した。

3. 研究の方法

休止状態に入りにくい新規ギ酸資化菌の探索

多様な自然サンプルから新規ギ酸資化菌を単離して、それらの増殖速度や到達濁度を比較することで、より実用に適した株の条件を探ろうと考えた。そのため、まず単離方法の確立を目指した。特に、平板培養でのクローニングにおいて、ギ酸を炭素源とした場合には pH 変化のためにコロニー形成が困難となるため、様々なアイデアを検討した。

培養条件の最適化

ギ酸資化菌はギ酸イオンを消費する際にプロトンと同時に取り込むため、増殖と共に pH が上昇する。そのため、ギ酸自動添加系を導入することで、培地中の pH を一定に保ちつつ、消費分のギ酸を補充する培養系を検討した。また、培養中の休止細胞と、溶存酸素濃度や凝集体形成との相関についても検討した。

4. 研究成果

休止状態に入りにくい新規ギ酸資化菌の探索

独自に確立した単離方法によって、海水、汽水域、湖水、土壌、植物サンプルから、多数の新規ギ酸資化菌を単離できた。その中で、*Methylorubrum* 属の na_s_72 株は、*M. extorquens* AM1 よりも増殖速度に優れていた。また、再現性問題は十分に解決できていなかったが、大きく軽減されていた。

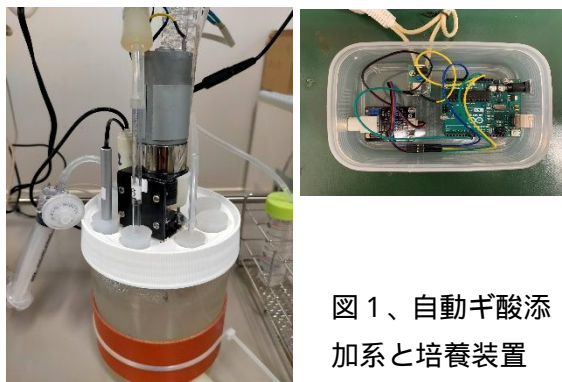


図1、自動ギ酸添加系と培養装置

培養条件の最適化

市販のギ酸自動添加系は高価なため、実験で必要となる十数台をそろえることは困難であった。そのため、マイコン制御のギ酸自動添加系を自作し、自作培養槽に実装した。

溶存酸素濃度を制御するために、攪拌方法としてマグネチックスターラーや、モーターに直結した攪拌羽根、水中ポンプを利用した方法などを、空気供給方法としてシリコンチューブ（内径 3 mm）や散気管（ケラミフィルター 8x11 mm）を検討した。na_s_72 株の培養の結果、図 2 上に示すように溶存酸素を高くキープできる#3 機や、増殖に伴い 3 日以内に大きく減少する#1 機など、溶存酸素量を変える

培養系を用意できることができた。さらに、溶存酸素濃度の高い#3 機では、増殖速度が高く、また増殖開始の遅延再現性はほぼ観察されなくなり、再現性問題も大きく解消された。最適化した条件での増殖比較においても、na_s_72 株は、*M. extorquens* AM1 よりも増殖速度に有意に優れていることが明らかになった。なお、培養中に凝集体を形成することがあり、その傾向は低酸素濃度において顕著であった。一方、高酸素濃度においても、高凝集傾向と低い凝集傾向を示す培養系があったが、それぞれの収量には有意な差がなかった。凝集体を、細胞生死判定試薬である PI で染色したところ、凝集体の核になる部分の一部には死細胞もしくは休止細胞が観察されたが、大多数の細胞は生細胞であった。これらの結果から、低酸素濃度などの影響によって死細胞もしくは休止細胞が増加し、凝集の核となるが、凝集自体は収量減少の原因にはならないことが明らかになった。

また、約 1 週間で定常期から死滅期に移行することが分かった。これらの培養液中のアンモニウムや硝酸濃度を調べたところ検出圏外であった。今後は、リン酸やアンモニアを連続投入し、菌体を連続回収する培養系（連続培養系）を構築し、さらなる収量向上を目指す。

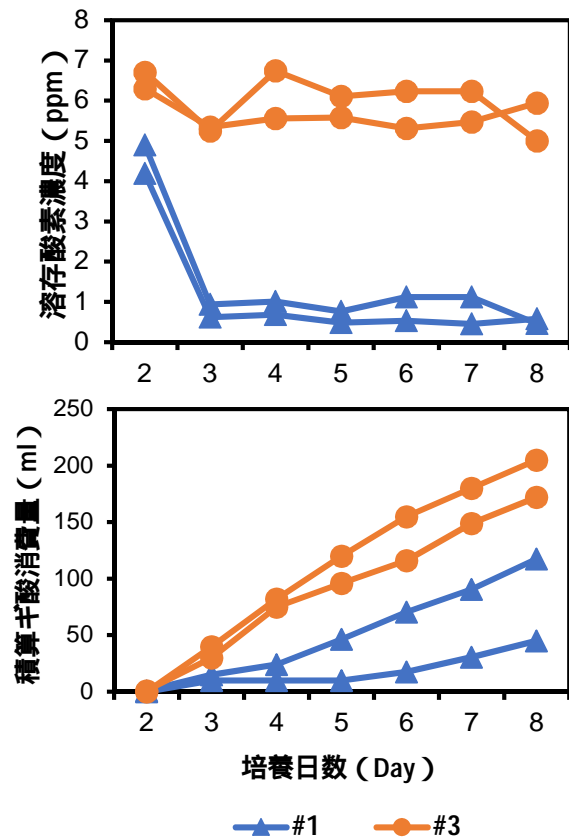


図 2、新規ギ酸資化菌 (na_s_72 株) の培養における溶存酸素濃度およびギ酸消費量

#1 機()は散気管なしマグネチックスターラー攪拌。#3 機()は散気管曝気、モーター攪拌。

参考文献

- 1, Chang et al., Biotechnology and Bioprocess Engineering 27: 268-275 (2022)
- 2, Cui et al., Biochemical Engineering Journal 119 (2017) 67-73
- 3, ギ酸資化菌を利用したカーボンリサイクル, アグリバイオ 10月号, 42-44, 北隆館 2022
- 4, 微生物によるカーボンリサイクル, 二酸化炭素の分離・回収・貯蔵技術の開発, 情報機構 2022

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 Rintaro FUJI, Koji UMEZAWA, Manami MIZUGUCHI, Masaki IHARA	4. 巻 37
2. 論文標題 Engineering of the Soluble Metal-dependent Formate Dehydrogenase from Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 733-739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCP15	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 伊原正喜	4. 巻 10
2. 論文標題 ギ酸資化菌を利用したカーボンリサイクル	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ10月号	6. 最初と最後の頁 42-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴田和紘、伊原正喜
2. 発表標題 新規ギ酸資化菌の探索方法の開発
3. 学会等名 2021年度生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤谷 隼史、伊原 正喜、柴田 和弘、長野 宙、北原 真悠、森本 巧人、山下 雅樹
2. 発表標題 Methylobacteriumのバイオマス収量向上に向けた培地の攪拌及び曝気法の改良
3. 学会等名 2023年農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Ihara
2. 発表標題 The topic of sheath formation in the cyanobacterium Nostoc commune
3. 学会等名 Basic & Applied Research on Photosynthetic microalgae and cyanobacteria (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊原正喜ほか	4. 発行年 2022年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 586
3. 書名 二酸化炭素の分離・回収・貯蔵技術の開発、微生物によるカーボンリサイクル	

〔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
---------	---------