

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656607

研究課題名(和文) 燃料ガス産生微生物資源の高効率スクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel screening method to isolate microorganisms that produce potential fuel biogas

研究代表者

上田 岳彦 (Ueda, Takehiko)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80293893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ培養器とは、1個体の微生物を格納して培養することのできる非常に小さなガラス製容器です。環境中に存在する様々な微生物をこのマイクロ培養器に入れて培養すると、一部の微生物は、水素やメタンなど燃料となるガスを生産して容器を満たし、容器とともに浮上して分離されます。

この分離方法を研究することは、非常に効率よくガスを生産する微生物だけを容易にかつ効率的に選り出す方法を確立することにつながり、未発見の新微生物が発見されて廃棄物等からエネルギーを生産する新しい発酵工学を生み出すきっかけとなるものです。

本研究ではその具体的方法論を確立し、既に候補となる複数の新種微生物を単離することができました。

研究成果の概要(英文)：Microsphere incubator is a microscale carrier for incubation of a single cell of microorganism. One can isolate microorganisms one by one that can produce potential fuel gas, such as hydrogen, methane and so on, in significantly high efficiency from a huge variety of candidate microorganisms in natural environments, because the produced gas is accumulated inside the microsphere incubator which gives them buoyancy for driving them up to the medium/air interface.

Developing and improving this method leads us to establish a novel fermentation methodology to find out undiscovered microorganisms with highly potent activity to produce fuel gases from wastes or materials of low utility.

In this research, the authors succeeded to prepare specially designed microsphere incubators and to isolate several kinds of candidate microorganisms that produced biogas from natural environment including some of extreme volcanic environments in Kagoshima prefecture.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学 エネルギー学

キーワード：マイクロ培養器 スクリーニング 燃料ガス プレーティング 微生物 マイクロ流路 育種 コンビナトリアル

1. 研究開始当初の背景

応募者はこれまで、既存の水素産生微生物をガラス製のマイクロ培養容器(大きさ 50 μ m)内に閉じ込めることにより、内部に蓄積した高濃度水素を拡散させることなく、容器の一端に開けた微細孔から電極表面と接触させて利用する生物化学電池を形成する試みを行ってきました。しかし、生成した高濃度水素は容易に気泡を形成し、その浮力が原因でマイクロ培養容器ごと電極アセンブリから剥離することが問題でした。この現象は水素産生能力が高いほど容易に発生することから、逆にこの現象を能力の高い微生物の分離に応用できるという発想を得ました。持続可能なエネルギー生産法の確立が急務となっている今日、太陽光または鉱物資源の酸化還元力を燃料合成に利用する微生物の発見は、エネルギー開発の方向性に大きく影響する可能性を秘めています。しかしながら、既に知られている微生物資源は種類において全体の数%未満と見積もられており、未知の微生物資源の中には、燃料ガスの生産効率の高いものが未発見のまま残されていると考えられます。本単離法を確立することで、新規なガス産生微生物の探索が飛躍的に進み、エネルギー開発の分野で大きな波及効果を生むと期待されます。

2. 研究の目的

本研究は、水素ガスなどの有用燃料ガスを効率よく産生する未発見の微生物資源を、簡便かつ効果的に発見する、新規な微生物単離法を確立することを目的とします。本研究が提案する単離法は、ガス産生能力に基づいた自らの浮力で微生物を単離するものであり、難培養性の微生物にも適用できます。それが確立すれば、今まで発見されていない国内の環境からの新発見も期待できます。土壌や湖沼などから、前処理なしに直接ガス産生能力のある微生物が単離されれば、その成果を燃料ガスの生物生産などの分野に速やかに応用できます。

本法は、マイクロ培養容器に取り込んだ雑多な微生物集団から、そのガス産生能力により培養容器が浮上して単離されるという全く新しい原理に基づいた微生物単離法です。既存の微生物の単離法はほとんどが薬剤耐性で生き残るかどうかを利用するものですが、水素ガスを発生する能力がなければその微生物が死滅するようなくみの単離法は構成が困難です。対して本研究では微生物自身が産生するガスによりそれが自発的に選別される方法であり、他に例の無い全く独創的な微生物単離法であると言えます。また、微生物の増殖を前提にしないため、未知微生物の圧倒的多数を占めるとされる難培養性微生物に対しても適用可能であり、今まで発見されなかった新規微生物が発見されるチャンスが飛躍的に増大し、新たなエネルギー源の発見につながると期待されます。

3. 研究の方法

既にマイクロ培養容器としての穴の開いた中空体の製造法は確立しており、既知の複数の異なる微生物をそれぞれその培養容器に取り込んで培養すれば、そのガス産生能力の大小により培養容器が浮上して、能力の高い微生物を選択的に分離することができることを確認しました。しかしながら、環境試料中には CO_2 産生に基づき浮上するもの、光合成による O_2 産生により浮上するものが混在しており、浮上したマイクロ培養器のそれぞれについて、その内部のガスを特定する課題が残っています。そこで本研究では、産生された水素を検知する半導体ガスセンサを装備した分離装置を試作し、次いで実際に鹿児島県周辺の火山性土壌や温泉水などの極限環境から組織的にガス産生微生物の単離を試み、遺伝子解析による同定を行う計画です。

(1) 浮上したマイクロ培養器の外部に非特異的に結合した微生物の除去

浮力による微生物単離実験は、微生物をマイクロ培養器に取り込み、外部を洗浄して培養を開始します。増殖が比較的速く、かつ浮遊性の微生物は、培養中に培地内を浮遊して、浮上したマイクロ培養器の外部に付いたまま回収される恐れがあります。当初、かなり頻繁にこのようなコンタミネーションが発生し、16S rRNA 遺伝子配列解析を行うと、複数の微生物が検出されることがありました。これを回避するため、マイクロ培養器外部への Ni 無電解プレーティングを試行し、このような金属薄膜の形成と紫外線による外部微生物の殺菌を試行しました。

薄膜の厚さはマイクロ培養器のガラス厚である約 100 nm に匹敵する厚さとなりました。マイクロ培養器の回収後、紫外線を照射しながらのプレート培地上での培養試験により、内部の微生物を生存させながら外部だけ殺菌するために、60 min の紫外線照射(15 W)が必要であることが分かりました(微生物として *Enterobacter*, 10^6 CFU/mL を使用)。この試行実験では、金属薄膜によりマイクロ培養器の見かけの比重が大きくなり、浮力による浮上条件がより厳しくなったこと、また、回収したマイクロ培養器を照射する手法では、マイクロ培養器の裏側が陰になり、効果的に殺菌できずに、内部の微生物にも弱い散乱光が長時間照射されてしまう問題があります。

そこで、マイクロ培養器が浮上するときに通過する経路を、紫外線を透過する石英材料で構成し、浮上実験を紫外線照射下で行うことで、浮上と同時に紫外線殺菌する装置を試作します。試験管状の容器を傾け、中にマイクロ培養器を入れ、浮上が起こると管内壁に沿って上昇し、その途中を紫外線ランプで照射することで培養器外部全面の殺菌を実現します。

また、金属薄膜の厚さをより薄くすることで、紫外線の遮蔽効果を維持したまま、マイクロ培養器の見かけの比重を下げ、浮力による浮上が起きるための最小気泡サイズの条件を緩和する最適化を行います。無電解プレATINGの厚さは還元剤濃度と処理時間で制御できます。

(2) 浮上したマイクロ培養器からの水素の検出

培養器が浮上して到達する液面にパーティションを設置し、微小に構成した C-Pt/電極により、微生物の水素産生を個別に検出します。

液面パーティションは浮上したマイクロ培養器を個別に捕獲するために設置します。素材として、化学的に不活性な PDMS 材料によりマイクロモールド法により作成します。100 μm 程度のパターンを形成するために必要な機器は全て現有しており、またマイクロリアクタ開発の経験から必要な精度を持つ液面パーティションを設計・製造する技術を現有しています(地域新生コンソーシアム研究開発事業(経済産業省)「バイオ集積化チップの開発と農畜産物の安全性評価技術の確立」平成17~18年度採択)。各パーティションには、酸化還元電位を決定するために用いられる標準水素電極と同じ原理の Pt または Pd 微粒子をコートした電極を採用し、全てのコンパートメントの電位をモニターすることにより、水素産生を検知します。この場合、小さな区画に捕獲することにより、少量の水素産生でも高い濃度に至るため、高感度の MOSFET 型センサなどを採用する必要はありません。この装置の試作により、浮上したガス産生微生物のうち、さらに水素産生により浮上した微生物のみを選択的に回収できます。

(3) 一般環境試料からの水素産生微生物の単離・同定

鹿児島県周辺の火山性土壌、温泉水、貧栄養土壌からの試料から水素産生微生物の単離を試み、16S rRNA 遺伝子配列解析により同定を試みます。

燃料ガスを産生する微生物の多くが、火山性土壌(高いイオウ化合物濃度)、温泉水(高い硫化水素、二酸化イオウ濃度、高温、高 pH または低 pH)、貧栄養土壌(泥炭地、深海底など)などから発見されています。極端な極限環境や低炭素源環境において発見されやすい傾向にあることは、これらの微生物が、増殖力の強い一般的な微生物との競争がない過酷な環境で、しかも特殊な代謝系を発達させることにより初めて今日まで生存できたものと考えられます。研究代表者が所属する鹿児島大学は、多くの火山と温泉環境を周辺に有し、また九州最高峰の屋久島高山地帯など、極限環境や貧栄養土壌が周辺から孤立しているような環境が多く、微生物サンプリン

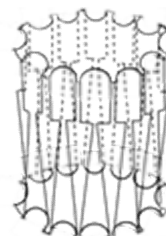
グの対象が非常に多いという特徴がありません。

既に鹿児島県十島村島嶼域の硫化水素泉や火山灰堆積土壌、湖沼泥炭、高山表土などから試料採取を試み、数百種のマイクロ培養器の浮上を、またそのうち十数種 of ガス産生微生物を単離し、遺伝子配列解析から新規微生物であることを確認しました。これらが水素産生していることは、強い酸化剤と接触させることによりマイクロ培養器が気泡を失って沈降することにより判別できましたが、微生物も生き残れませんでした。新発見する可能性が高い候補地の情報が既に得られており、サンプリングした試料から水素産生微生物を選択的に単離して、本法の汎用性を確立し、またその新水素産生微生物を広く提供する計画です。

4. 研究成果

Ni プレATINGによるマイクロ培養器の被覆と紫外線照射による外部微生物のコンタミの抑制に成功した。プレATING膜の厚さは無電解還元法による反応時間を制御することで比較的容易に調整することができた。紫外線による殺菌効果から内部を保護するのに必要なプレATINGを施す条件が確立し、これ以降の実験に置いて応用が可能となった。

浮上したマイクロ培養器を単離する液面パーティションが PDMS 素材により作成された。より有効に浮上マイクロ培養器を誘導できるように図のようなデザイン



の形状を持った PDMS 素材の造形を作り、軸周りに回転させた培養試験管の液面から挿入して気液界面をこの素材とガラス面の間の細い空間に制限することにより、その後の分離と燃料ガス産生の確認に供することができた。

しかしながら、Pt/C 電極による水素産生を検出できる程度にまではガスが蓄積せず、PDMS 素材中へのガスの拡散も疑われたため、テフロン等別の素材についても検討したが大きな改善は見られなかった。嫌気条件で水素を産生することが知られている *Enterobacter* を用いた実験では、マイクロ培養器の浮上が確認され、浮上した培養器の回収も技術的に容易になったことはひとつの成果であった。さらに、マイクロ培養器の浮上挙動に注目することで、特異な現象を観測するに至った。ガス産生微生物が含まれるマイクロ培養器の場合、その内容積がほぼ一定であるため、浮上時間の長短が内包している微生物のガス産生活性と関連すると考えられた。ガス産生速度が一定だとした場合、内容積が浮上時間とガス産生速度の積に対応するため、早い浮上は高いガス産生活性に対応する。実際、

Enterobacter を用いた実験では、単離微生物で試験しているにもかかわらず、浮上時間に分布を生じ、その分布のパターンはマイクロスフィア内容積の分布からは説明できないものであった。さらに、短時間に浮上したものを単離して培養を経てから再び浮上時間を測定すると、その分布は短時間側にシフトしており、同一ゲノム集団から活性に差のある複数のグループを分離することができたことになる。この結果はコロニー形成法による単離法が実際に完全に同じゲノムの集団を単離できているのかどうか、またそうだとすれば同一ゲノムの微生物エコシステムの中に活性の異なる複数のグループが発生して共存している事実があるのか、という重大な問題を提起するものとなった。また、この方法で確実にガス産生能力の高い微生物が単離されていくことになると考えられるため、変異原との接触などの遺伝的損傷を与えることで、新たにマイクロ培養器を用いた微生物育種が可能であることが判明した。極限環境からのガス産生微生物の単離の試みとして、従来から試みてきた鹿児島県トカラ列島火山性諸島での実験例に倣い、鹿児島県霧島地域の八幡地獄および新湯地獄の火山性土壌を採取し、その懸濁液中からのマイクロ培養器による浮上分離実験を行った。どの場合も、土壌のコンダクタンスが低いサンプルからより多数のマイクロ培養器の浮上が確認された。火山性土壌で呼吸作用を行う硫酸還元菌の代謝経路では、不要性の硫酸塩が還元されて硫化水素を生成しながら金属カチオンを放出するため、土壌中の遊離金属イオン濃度は高くなる。すなわちコンダクタンスが高いほどその代謝は不利になるため、適切な頻度で遊離カチオンが洗い流されるような環境の土壌にそのような微生物が多くみられ、その結果マイクロ培養器による浮上（硫化水素産生による）が観測されやすかったのではないかと考えられる。この仮説は依然として更なる証拠を必要とするが、このマイクロ培養器の挙動を調べることで、環境中の微生物分布の特徴を捉えることができ、新規微生物を発見しやすい土壌を見積もるための基礎的な情報を蓄積するために利用できることが判明した。温泉水サンプルの場合と異なり、このような土壌から得られた浮上マイクロ培養器の中の微生物の直接的な遺伝子配列解析は困難であった。16S rRNA 解析のためには少なくともサンプル中のゲノムが1種類であるべきであるが、八幡地獄および新湯地獄のサンプルの遺伝子配列解析ではほとんどの場合にヘテロな複数のゲノムが検出され、配列決定に至った例はごく一部であった。このことからマイクロ培養器の浮上をもたらすようなバイオガスの生産が現象として発生するためには、複数の微生物の共存と代謝経路上の相互依存があるのではないかと考えられた。これはいわゆる代謝共生系が作られている場

合に相当し、多くの廃棄物由来メタン発酵系などで通常みられる形態である。通性嫌気性微生物と嫌気性微生物が共存しながら互いの代謝産物を利用して自己の代謝を行うことで複雑な物質変換系が形成されていることから、バイオガスの産生を指標とした本マイクロ培養器による微生物の単離法は、単一の微生物がガスを産生する場合にとどまらず、代謝共生系のセットを偶然内包した場合も浮上する効果があることが判明した。このような代謝共生系は既知の微生物でも構成することができ、*E. coli* と *Enterobacter* をマイクロ培養器に内包してから好気培養条件で共培養した後のマイクロ培養器を破壊して内部を電子顕微鏡で観察したところ、両方の微生物が共存するマイクロ培養器が複数見つかり、その内包のための穴の近くに通性嫌気性の *E. coli* が配置され、より奥の酸素濃度が低く保たれる位置に *Enterobacter* が配置される形をとることがわかった。この結果は多様な微生物から単一でガス産生微生物を分離することのみならず、本方法は微生物の多様な組み合わせの中でコンビナトリアルなアプローチによりうまく機能する微生物代謝共生系を発見することにも利用可能であることがわかった。以上の複数の結果は本研究を多方面に大きく発展させる道筋を与えるものであり、本研究がその重大な契機となったと結論できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Takehiko Ueda, Yuta Kodani, Masayo Fukuya, Ryu Imoto, Fukuichi Kaida, ISOLATION AND BREEDING OF MICROORGANISMS FOR HIGHER BIOGAS-PRODUCING ACTIVITY BY A NOVEL BIO, Proceedings Venice 2012, Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste, 420, pp.1-12(2012). (査読あり)

(2) 榎園 千里知、鳥越 祐作、上田 岳彦、マイクロスフィアスクリーニング法による屋久島土壌中のガス産生微生物の高度分布解析、鹿児島大学工学部研究報告、53、pp.37-41(2011). (査読なし)

(3) Takehiko Ueda, Chisato Enokizono, Yuta Kodani, Masayo Fukuya, Ryu Imoto and Fukuichi Kaida, Breeding of Microorganisms for Higher Biogas-producing Activity by a Novel Screening Method using Surface Modified Porous Glass Microspheres, Proceedings of the 4th International Conference on Biotechniques for Air Pollution Control, pp.319-326(2011). (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Takehiko Ueda, Mio Bansho, and Naoki Mori, Thermally Responsible Microfluidic Valves Composed of Agarose Hydrogel with Partially Hydrophobized Chitosan, Japan-Taiwan Bilateral Workshop on Nano-Science 2013, 2013, 10 月 2 日, Kagoshima University, Kagoshima

(2) Takehiko Ueda, Yuta Kodani, Masayo Fukuya, Ryu Imoto, Fukuichi Kaida, ISOLATION AND BREEDING OF MICROORGANISMS FOR HIGHER BIOGAS-PRODUCING ACTIVITY BY A NOVEL BIOSPHERE SCREENING METHOD, 4th International Symposium On Energy From Biomass And Waste, 2012, 11 月 12 日, Rimini, Italy

(3) 榎園 千里知、迫田 唯、上田 岳彦、表面機能化した微生物担持マイクロスフィアを利用した環境試料からのガス産生微生物の単離と同定、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 22 日、神奈川県

(4) 大久保 洋志、上坂元 志、上田 岳彦、音叉型水晶発振子と複合した高分子ワイヤのレオロジー変化を用いた化学センサ、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 22 日、神奈川県

(5) Takehiko Ueda, Breeding of Microorganisms for Higher Biogas-producing Activity by a Novel Screening Method using Surface Modified Porous Glass Microspheres, Japan-Taiwan Bilateral Workshop on Nano-Science, 2011, 11 月 21 日, National Cheng Kung University, Taiwan

(6) Hiroshi Okubo, Shingo Mori, Motonori Akano, Mio Bansho, Takehiko Ueda, Gas Sensing through Rheological Responses of Polymer Matrix between Quartz Crystal Tuning Forks, Japan-Taiwan Bilateral Workshop on Nano-Science, 2011, 11 月 21 日, National Cheng Kung University, Taiwan

(7) Chisato Enokizono, Yuta Kotani, Masahiro Furuno, Yusei Mori, Ryu Imoto, Fukuichi Kaida, Takehiko Ueda, Elevation Distribution of Gas-producing Microorganisms in Yakushima Island. Determined by Microsphere Buoyant Screening Method, Japan-Taiwan Bilateral Workshop on Nano-Science, 2011, 11 月 21 日, National Cheng Kung University, Taiwan

(8) Takehiko Ueda, Chisato Enokizono, Yuta Kodani, Masayo Fukuya, Ryu Imoto, Fukuichi

Kaida, Breeding of Microorganisms for Higher Biogas-producing Activity by a Novel Screening Method using Surface Modified Porous Glass Microspheres, Biotechniques 2011(IVth International Conference on Biotechniques for Air Pollution Control), 2011, 10 月 12 日, University of A Coruna, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 岳彦 (UEDA TAKEHIKO)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号 : 80293893