

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06191

研究課題名(和文) 導電性鉱物を介した電気共生型メタン生成の分子機構および実環境における寄与の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism and environmental contribution of methanogenesis via electric syntrophy

研究代表者

加藤 創一郎 (Kato, Souichiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30597787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：導電性粒子を流れる電流を介した電子授受に基づく共生的メタン生成(電気共生型メタン生成)を行うモデル共生系を構築し、その網羅的遺伝子発現を行うことで、電気共生時に機能する遺伝子群の特定に成功した。また地下圏原油貯留槽由来の微生物群集が導電性マグネタイトの存在下で電気共生型メタン生成を行うこと、微生物自身が産生した硫化鉄鉱物が電気共生型メタン生成を媒介していることを実証し、多様な自然環境における電気共生型メタン生成の重要性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタンは強力な温室効果ガスであり、また重要な持続可能なエネルギー源ともなりうる。そのため微生物によるメタン生成反応の理解は、環境・エネルギー問題の解決に向け重要なものとなる。電気共生型メタン生成反応は近年我々のグループが見出した新たなメタン生成プロセスであり、通常のプロセスよりも高効率であることが知られている。本研究課題により得られた成果は、地球規模での物質循環の理解、並びに将来的な微生物メタン生成プロセスの制御に向けた、重要な基盤知識となる。

研究成果の概要(英文)：A model microbial consortium that performs electric syntrophy-dependent methanogenesis was successfully constructed. Comprehensive gene expression analysis on the model consortium disclosed proteins required for electric syntrophy. Furthermore, we clarified that conductive iron oxides induce electric syntrophy and promote methanogenesis by microbial communities in a high-temperature petroleum reservoir, and biogenic iron sulfide can also induce electric syntrophy-dependent methanogenesis, which demonstrated importance of electric syntrophy-dependent methanogenesis in diverse natural environments.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 メタン生成 共生 電子伝達 導電性鉱物 遺伝子発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

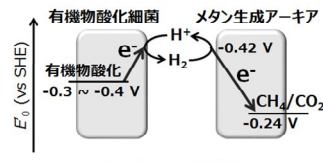
メタンは「温室効果ガス」、「クリーンエネルギー源」という二つの異なる側面から注目を集めている。地球上におけるメタンの大部分は微生物（メタン生成アーキア）により作られている。メタン生成アーキアは水素・二酸化炭素、酢酸など限られた基質しか利用できないため、複雑な有機物からのメタン生成には利用可能な基質を供給する微生物との共生が不可欠である。水素共生型メタン生成では、水素がエネルギー（電子）のキャリアとして有機物酸化菌からメタン生成アーキアに渡されることで共生が成立する（図1上）。しかし「水素発生の酸化還元電位が非常に低いためにエネルギーギャップが生じる」、「微生物間の水素拡散が律速となる」という理由から、水素共生は非常に遅い、非効率的な反応として知られている。

我々は自然界に豊富に存在する鉄鉱物などの導電性粒子を流れる電流が微生物間電子伝達を媒介しうることを実証し、新規微生物共生機構、電気共生を提唱した（図1下）。また電気共生型メタン生成では、「反応電位が可塑的でありエネルギーギャップが生じない」、「通常の律速段階である物質拡散に依存しない」という理由から、水素共生よりも高効率であることを実証した（図2）。またこの時、*Geobacter* 属細菌が有機物を酸化し導電性粒子に電子を渡し、*Methanosarcina* 属のメタン生成アーキアがその電子をエネルギー源として利用しメタンを生成することを明らかにした。

導電性固体と電子を授受する反応（細胞外電子伝達）の分子機構については、固体に電子を渡す側の微生物については、*Geobacter* 属細菌などをモデル微生物とし多くの研究がなされており、細胞外膜に位置するc型シトクロムタンパクの重要性など、多くの研究成果が挙げられていた。一方、固体から電子を受け取る側の微生物、特に本研究のターゲットであるメタン生成アーキアについては、どのように固体から電子を受け取っているのか、その分子機構は明らかにされていなかった。また電気共生型メタン生成は実験室内の集積培養・モデル共培養でこそ実証されているが、自然環境においても機能しうるのか、物質循環にどの程度寄与しうるのか、も明らかにされていなかった。

水素共生

- エネルギーギャップが存在（低水素分圧でのみ進行）
- 水素拡散律速



電気共生

- エネルギーギャップなし（反応電位は可塑的）
- 物質拡散に依存しない

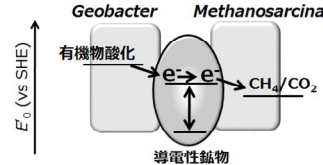


図1. 水素共生と電気共生によるメタン生成の比較。

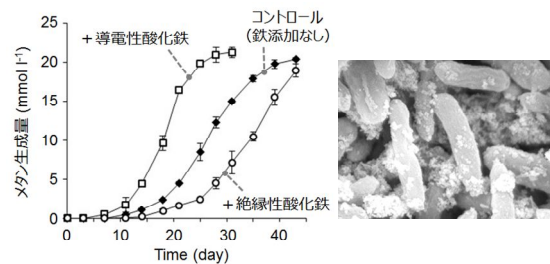


図2. 導電性酸化鉄添加によるメタン生成の促進（水田土壌微生物集積培養、基質：エタノール）。右図は導電性酸化鉄添加培養時のSEM画像。微生物同士が酸化鉄ナノ粒子を介してつながっている。

2. 研究の目的

上記の研究背景をうけ、本研究では以下の2項目を目的とした。

- (1) 網羅的遺伝子発現解析によるメタン生成アーキアが導電性固体から電子を受け取る分子機構の解明
- (2) 電気共生型メタン生成が様々な自然環境で機能していることの実証

3. 研究の方法

- (1) メタン生成アーキアが導電性固体から電子を受け取る分子機構の解明

1A) モデル共生系の構築

微生物の培養には淡水無機培地を使用し、30℃、静置条件で行った。水素共生のモデル系としては既に報告例がある *Desulfovibrio burgaris* と *Methanosarcina barkeri* の組み合わせに乳酸をエネルギー源とした条件で行った。電気共生のモデル系の構築には、電子供給側の微生物として5種類の *Geobacter* 属細菌、電子受容側の微生物として3種類のメタン生成アーキアを使用した。様々なパートナー微生物の組み合わせ、および異なる基質を利用し、導電性粒子であるマグネタイト (Fe_3O_4) の存在下で良好なメタン生成を示す共生系を探索した。

1B) 網羅的遺伝子発現解析

1Aで構築したモデル共生系、および *M. barkeri* の純粋培養を淡水無機培地で対数増殖期まで培養した。菌体を回収し、ビーズビーティング法により全RNAを回収し、DNase処理によるDNAの除去、カラムによる生成を行った。精製したRNAに対しRiboMinus Transcriptome Isolation KitによるrRNA除去を行った後、Illumina HiSeq 2500による塩基配列解析に供した（外注分析）。取得した生データをFastpで処理し高クオリティリードのみのデータセットにまとめ、データセット中の各リードをBBmapにより *M. barkeri* ゲノム上にマッピングした。各遺伝子に帰属されたリード数を、その中央値を基準にノーマライズ後、遺伝子発現の増減を

数値化した。

(2) 電気共生型メタン生成が様々な自然環境で機能していることの実証

2A) 地下原油貯留層における電気共生型メタン生成の実証

原油貯留層構造水を微生物源とした集積培養は、酢酸を基質とした模擬海水培地を使用し、55℃、静置条件で行った。導電性酸化鉄としてマグネタイト、絶縁性酸化鉄としてフェリハイドライトを添加した培養系に加え、鉄鉱物を添加しない系をコントロールとして実施した。気相中のメタンガス分圧をガスクロマトグラフィーにより経時的に測定しメタン生成活性を評価した。また5回の継代培養ののち、回収した菌体からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、その増幅産物についてIllumina MiSeq platformにより塩基配列情報を取得した(外注分析)。得られた塩基配列情報をMacQIIMEにより解析し、優占微生物種を特定した。

2B) 微生物自身が生成する導電性硫化鉄による電気共生型メタン生成

水田土壌を微生物源とした集積培養は、酢酸を基質とした無機淡水培地を使用し、30℃、静置条件で行った。硫化鉄生成条件(硫酸イオンとフェリハイドライトの同時添加)に加え、硫酸もしくはフェリハイドライトのいずれかを単独で添加した培養系、どちらも加えない系をコントロールとして実施した。気相中のメタンガス分圧をガスクロマトグラフィーにより経時的に測定しメタン生成活性を評価した。5回の継代培養ののち、項目2Aと同様の手法で微生物群集構造解析を実施し、優占微生物種を特定した。

4. 研究成果

(1) メタン生成アーキアが導電性固体から電子を受け取る分子機構の解明

1A) モデル共生系の構築

電子受容反応の分子機構解明に向けた網羅的遺伝子発現解析の実施には、電気共生型メタン生成反応をおこなうモデル共生系の構築が必須であった。そこで様々な微生物種の組み合わせ、およびエネルギー源となる基質を変えた培養試験を行い、モデルとして利用可能な共生系の構築を試みた。その結果、電子供与微生物として*Geobacter sulfurreducens*、電子受容メタン生成アーキアとして*Methanosarcina barkeri*、エネルギー源としてエタノールを使用した条件下で、導電性粒子であるマグネタイトの存在に依存したメタン生成活性が確認された。この結果を受け、この共生系をモデルとして網羅的遺伝子発現解析に供した。

1B) 網羅的遺伝子発現解析

電子受容反応の分子機構解明に向け、1Aで構築したモデル共生系の網羅的遺伝子発現解析を実施した。また比較対象となるコントロール培養系として、*M. barkeri*の純粋培養系、ならびに水素の拡散輸送に依存した水素共生型メタン生成のモデル共生系(*D. vulgaris*と*M. barkeri*の共生系、基質は乳酸)について同様の網羅的遺伝子発現解析を実施した(図3)。その結果、*M. barkeri*が電気共生時に特異的に高発現している遺伝子群の同定に成功した。*M. barkeri*は電気共生培養時に二酸化炭素還元型のメタン生成経路の遺伝子群を高発現していた。このことは電気共生時に通常の条件下で主に機能する酢酸開裂型のメタン生成反応に加え、導電性固体由来の電子を還元力とした二酸化炭素還元型のメタン生成反応を同時に機能させていることが示唆された。また細胞膜上に位置するRnf様タンパクやヒドロゲナーゼなど電子伝達に深くかかわる遺伝子群にも電気共生時に大きく発現が増加・減少しているものが確認された。さらにいくつかのシトクロム様電子伝達タンパクが電気共生時に特異的に発現上昇していることも確認されていた。以上のことから、*M. barkeri*が電気共生培養時に導電性固体由来の電子を二酸化炭素還元型のメタン生成反応に利用しており、そのために細胞内の電子伝達フラックスが大きく変化していること、また導電性固体からの電子受容にはシトクロム様タンパクが寄与していること、が強く示唆された(投稿論文準備中)。

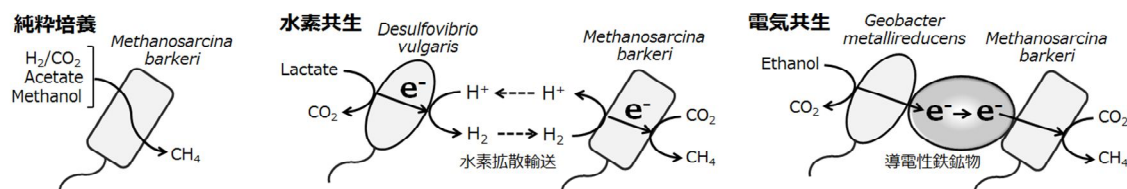


図3. 網羅的遺伝子発現解析に使用した培養条件。

(2) 電気共生型メタン生成が様々な自然環境で機能していることの実証

2A) 地下原油貯留層における電気共生型メタン生成の実証

電気共生型メタン生成は水田や湿地等の中温条件下で機能することは頻りに報告されていたが、高温の地下圏環境を対象とした研究例はなかった。本研究では高温環境である地下原油貯留層を対象とし、導電性鉱物の存在下で電気共生型メタン生成が進行するかを検証した。原油貯留層構造水を微生物源、酢酸をエネルギー源としメタン生成微生物群の集積培養を行った結果、導電性鉱物であるマグネタイトの存在下で、鉄添加なしのコントロール培養系よりもメタン生

成活性が有意に高い群集が集積された。一方で絶縁性の酸化鉄（フェリハイドライト）を添加した系ではメタン生成は抑制された。16S rRNA 遺伝子配列解析により各集積系の優占微生物種を特定した結果、マグネタイト添加培養系では細胞外電子伝達能を有する *Petrothermobacter* 属や *Petrobacter* 属の有機物分解細菌、および *Methanosarcina* 属のメタン生成アーキアが優占しており、これらの微生物が電気共生型メタン生成に寄与していることが示唆された(図4)。一方、フェリハイドライト添加培養系では鉄還元細菌の *Desulfacinum* 属、*Thermincola* 属細菌が優占しており、単純な鉄還元反応と電気共生反応では細胞外電子伝達能を有する微生物の中でも異なるものが機能することが示唆された。本研究は地下高温環境で電気共生型メタン生成反応が進行しうることを世界に先駆けて実証した(発表論文1)。

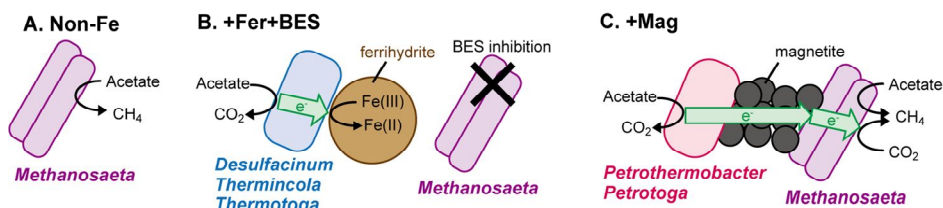


図4. 地下原油貯留層に由来する集積培養系における、導電性(C, マグネタイト添加)および絶縁性(B, フェリハイドライト)酸化鉄存在下での代謝フローと関与する微生物種。

2B) 微生物自身が生成する導電性硫化鉄による電気共生型メタン生成

これまでに実施されてきた環境中における電気共生型メタン生成の研究では、導電性鉄鉱物としてマグネタイトが使用されてきた。一方、メタン生成が起こる嫌気的環境では硫化鉄が主要な鉄鉱物種であることが知られている。しかし硫化鉄は自然酸化を受けやすいなど実験的な扱いが難しいこともあり、その電気共生型メタン生成への寄与は調べられてこなかった。そこで本研究ではメタン生成の集積培養系に硫酸イオンと易還元性の酸化鉄(フェリハイドライト)を添加し、微生物による還元反応により系内で硫化鉄鉱物を生成させることで、微生物自身が生成する導電性硫化鉄による電気共生型メタン生成が進行しうるかを検証した。水田土壌を微生物源、酢酸を基質とした集積培養を行った結果、硫酸とフェリハイドライトを添加した系では、硫化鉄の生成が確認され、未添加系と比較し高いメタン生成活性が確認された。一方、硫酸もしくはフェリハイドライトを単独で添加した系ではメタン生成が抑制された。微生物群集構造解析の結果、硫酸とフェリハイドライトの同時添加系では、硫酸還元菌 *Desulfotomaculum*、鉄還元菌 *Geobacter*、メタン生成菌 *Methanosarcina* の優占が観察された。*Desulfotomaculum* による硫酸還元により生成するスルフィドと *Geobacter* による鉄還元により生成する2価鉄イオンから硫化鉄鉱物が生成され、その鉱物を介して *Geobacter* と *Methanosarcina* による電気共生型メタン生成反応が誘発され、高いメタン生成活性を示していると予想された。本研究は硫化鉄鉱物を介した電気共生型メタン生成を世界に先駆けて実証したものである(発表論文2)。

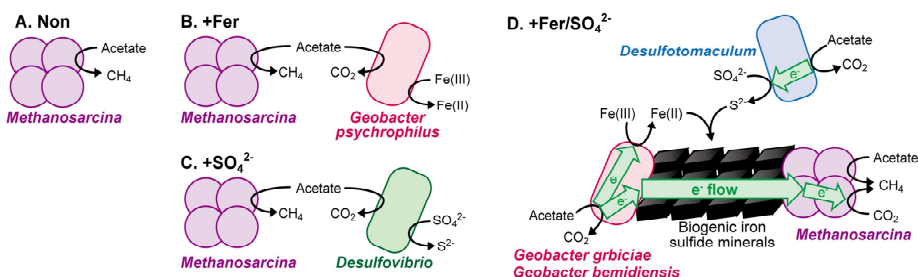


図5. 水田土壌に由来する集積培養系における、硫酸イオン (SO_4^{2-}) およびフェリハイドライト (Fe) 存在下での代謝フローと関与する微生物種。硫酸とフェリハイドライトの共存下 (D) では微生物が生成した硫化鉄を介した電気共生反応が進行することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Kato S, Wada K, Kitagawa W, Mayumi D, Ikarashi M, Sone T, Asano K, Kamagata Y. (2019) Conductive iron-oxides promote methanogenic acetate degradation by microbial communities in a high-temperature petroleum reservoir. *Microbes Environ.* 34: 95-98.

(2) Kato S, Igarashi K. (2019) Enhancement of methanogenesis by electric syntrophy with biogenic iron-sulfide minerals. *MicrobiologyOpen* 8: e647.

[学会発表](計 4 件)

(1) Kato S. Acetogenic bacteria that induce biocorrosion via extracellular electron transfer.

6th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (ISMOS-6) (San Diego, US, 2017 6/6-9, 招待講演)

(2) Kato S. Electric syntrophy: Syntrophic methanogenesis via electric current through conductive materials. 2017 Anaerobic Microbial Syntrophy Forum (Chengdu, China, 2017 10/25, 招待講演)

(3) Kato S. Microbial energy metabolisms based on electrochemical interaction with solid surfaces. IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (Nagoya Univ., Japan, 2017 12/1, 招待講演)

(4) Kato S. Microbial metabolisms based on electron exchange with solid materials. The 3rd Solar Fuel Material workshop (Osaka Univ., Japan, 2018 3/13, 招待講演)

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。