

令和 4 年 10 月 22 日現在

機関番号：55401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01574

研究課題名(和文) 電気を食べる微生物でバイオものづくりの新地平を拓く

研究課題名(英文) Pioneering the new horizon of bio-production using electron utilizing bacteria

研究代表者

木村 善一郎 (Kimura, Zen-ichiro)

呉工業高等専門学校・環境都市工学分野・准教授

研究者番号：60756617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：電気発酵プロセスは電気を食べる細菌(電極酸化細菌)と電気を作る細菌(電極還元細菌)を利用したバイオものづくりプロセスである。本研究では電気発酵プロセスの高度化を目指し、電極還元槽の電子フラックス強化に資する二種の細菌の分離(報告書本文4.1-4.2)、電極酸化槽の電子フラックス強化に資する好気性電極酸化細菌の集積培養(報告書本文4.3)、電極酸化細菌のバイオリソース拡大に資する固相電気培養装置の開発(報告書本文4.4)及び電極酸化細菌のゲノム編集技法確立による電極酸化細菌遺伝子改変の高速化(報告書本文4.5)に取り組み、それぞれの項目で複数の原著論文の執筆に足る成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気発酵プロセスは廃棄物系バイオマスをはじめとする余剰なエネルギー・物質を有価物に変換するデバイスである。本研究遂行により複数の電極酸化・還元細菌の分離株及び集積物が得られた。本成果は電気発酵プロセスの高度化に直接利用しうる重要な成果である。また本研究遂行で得られた最大の成果は好熱性電極酸化細菌であるMoorella属細菌に対するゲノム編集システムが構築できたことにある。本成果により従来遺伝子操作が困難であった当該属に対し自在な操作が可能となり、従ってバイオものづくりプロセスとして今一層の高度化につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The electrofermentation process is a biomufacturing process that utilizes bacteria that eat electricity (electrode oxidizing bacteria; EUB) and bacteria that generates electricity (electrode reducing bacteria). In this study, we aimed to improve the electro-fermentation process by isolating two types of bacteria that contribute to the enhancement of electron flux in the electroreduction tank (4.1-4-2 in the main text of the report), cultivating an accumulation of aerobic EUB that contribute to the enhancement of electron flux in the cathode chamber (4-3), the development of solid phase culture system to expand the bioresources of EUB (4 4), and the establishment of a genome editing systems for EUB to accelerate the genetic modification of EUB (4.5).

研究分野：応用微生物学

キーワード：ゲノム編集 環境微生物 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

廃棄物系バイオマスからの有価物生産は、現在までにメタン・水素発酵に代表される様々な技法が研究されている。化石資源依存脱却に向け、これらの研究課題は今後ますます重要性を増していくが、有価物生産手法の更なる発展には以下の2点の課題解決が重要である。

◆課題 (I) 物質変換効率の向上 ◆課題 (II) 生産物の高付加価値化

課題 (I) に対し、メタン・水素発酵プロセスは前世紀より極めて多くの取り組みがなされており、ほぼ実用化に至っている。その一方でこのプロセスにより生産されたメタンおよび水素は主として燃料として利用されるに留まっている。この点は木質系バイオマスの利用法開発がエタノール等燃料生産に留まらず、化学工業原料となる様々な高級炭化水素 (e.g. 高級アルコール、高級脂肪酸、セルロース繊維等) の生産にシフトしてきており、幅広くリファインされていることと対照的である。雑多な組成を持つ「ゴミ」であるこれらのバイオマスは単一の化学触媒や微生物を用いて有価物に変換することが困難である。メタン・水素発酵においては嫌気微生物叢の食物連鎖を利用してこの点を克服しているが、前述の通りこれらの化合物は主として燃料用途である。無論燃料生産は重要な意義を持つが、より多用途かつ高付加価値な高級炭化水素 (i.e. 化学品) を廃棄物系バイオマスから直接生産できれば上記課題 (II) を満たすこととなりその産業的価値は大きい。筆者らは現在までにその方法論として、次項目に示す電気発酵プロセスを研究してきている。

電気発酵とは電極還元細菌と電極酸化細菌の二種類の微生物群が電極・導線を通じ電子をやり取りして物質生産を行う電気化学培養装置である (Nevin et al., Mbio, 2010)。陰極反応槽においては図 1-1 の通り①嫌気微生物による有機物の低分子化、②電極還元細菌による低分子分解・電極への電子受容 (電極還元) が起こる。有機物から変換された電流は陽極反応槽において③電極から微生物菌体へと受容され CO_2 還元/有価物変換される。反応槽を 2 槽に分割し槽間の物質移動を電子及び H^+ 、 HCO_3^- のみに制限することで ①②③ 反応を触媒する微生物を反応槽内で局在化出来るため、最終電子受容を行う電極酸化細菌の純菌を陽極反応槽に隔離し、純菌に遺伝子改変を加えることで様々な有価物 (化学品) を高純度に生産できる。最終電子受容反応の陽極反応槽隔離化により本プロセスは過去・現在 (おそらく未来) を通じ原理的に唯一、遺伝子改変生物を触媒として利用可能な廃水・廃棄物処理プロセスとなり得る。この点は廃棄物処理・有価物生産の現在の主役であるメタン発酵プロセス等より明確に優れた点である。一方で電気発酵は新技術の常として発酵生産物となる有価物濃度が産業化可能な水準に達していない (最も発酵生産実績のある酢酸でも商業化には現チャンピオンデータから最低 10 倍超の高濃度化が必要)。プロセス全体を俯瞰すると、濃度の問題は下図③に示す電極酸化細菌に関連する電子移動、特に陽極反応槽の電極から細胞への電子移動が系全体を律速していることに起因する。そのため陽極反応槽の律速解消、より具体的には電極酸化細菌への電子入力量増加こそが実用化に必須である (入口課題)。他方で本プロセスでは目的有価物を生産するための代謝改変に関する方法論 (出口課題) については、触媒となる微生物の共通性より合成ガス発酵細菌の知見を流用できることから、現時点で多くの知見が高度に集積されつつある。しかしながら入口課題同様に発展途上にあり、ホスト細菌である電子資化性細菌への遺伝子導入・削除法は確立されとは言い難い。

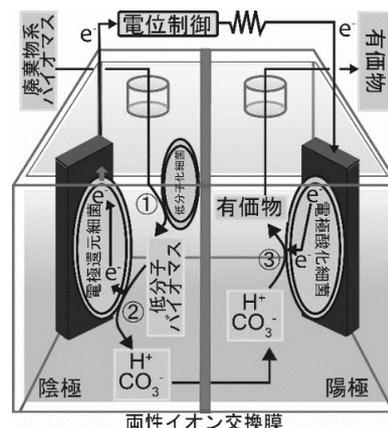
2. 研究の目的

入口・出口両面の課題解決には、第一に電極酸化細菌への簡便な遺伝子導入・削除法の確立、第二に遺伝子資源となる有用な物質生産株の獲得が不可欠である。本研究では上記第一・第二目的の達成のため電極酸化細菌のゲノム編集システムの確立と、新奇微生物分離・培養技術の確立に取り組んだ。

3. 研究の方法

3. 1 第 10 族元素吸着細菌のスクリーニング

前頁図②の反応は菌体→電極への電子伝達反応である。当該反応のフラックス増大には微生物反応のみならず、電極の材料的な修飾が有効であることが明らかとなっている。3. 1 では電極の修飾材として多用される第 10 族元素 (パラジウム、白金など) を特異的に吸着する細菌のスクリーニングに取り組んだ。当該細菌を含むバイオフィルムが電極表面に形成されることにより MES 陰極の電子受容が増大することが予想される。従って第 10 族元素吸着細菌により MES 陰極触媒細菌叢を構成することが出来れば陰極への希土類金属付加を自律的に行う生体触媒として利用できる。特にパラジウムは電子受容能が高いことが知られている。そこで本



研究ではパラジウム吸着細菌の環境中からの分離を実施した。

分離源として呉高専内の池の水を用いた。水系微生物には貧栄養細菌が多く生息していると推測され、分離源として有望と考えた。また貧栄養分離条件として**エラー! 参照元が見つかりません**。に示す 1/5 R2A 培地を用いた。この培地は微量元素成分が一般的な LB 培地などくらべて多量に含まれていることから、多様な細菌の獲得が期待されるため用いた。獲得サンプルは室温にて 24 時間培養したのちに発現したコロニーを回収した。獲得したコロニーは連携先である産業技術総合研究所においてパラジウム吸着性を試験した。パラジウム吸着性能は菌体をパラジウム飽和水溶液に混和し 1 時間培養した後の菌体を透過型電子顕微鏡で撮影することで評価した。また分離した細菌は MiSeq・MinION による全ゲノム解析を実施し、系統学的位置を比較・同定した。

3. 2 貧栄養電極還元細菌のスクリーニング

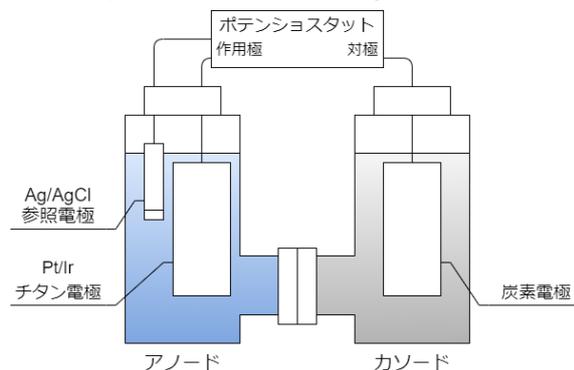
貧栄養細菌は組み換えが容易にできること・また栄養要求性が低いことから MES リアクター陰極での実運用する際のコスト低減が期待できる。また貧栄養条件においては遺伝子の変異が起きづらいことから、リアクター運用において安定的な運転成績が期待できる。そこで本研究では貧栄養性細菌かつ電極還元細菌として知られる *Enterobacter* 属細菌を分離対象とした。この菌種は貧栄養かつ電子受容を行うことが知られており、MES 応用上有利であると考えた。こうした高付加価値な触媒能を持った細菌分離することができれば、その能力を組み合わせたバイオフィルムの構築により、陰極の高性能化が期待できる。

Enterobacter 属細菌分離源となる環境試料として活性汚泥を用いた。試料は標的となる *Enterobacter* 属細菌を含む *Proteobacteria* 門が優占系統であるため、分離源として好適と予想された。これの試料に対して水とゲランガムのみで構成された極貧栄養培地で微生物を培養し得られたコロニー群に対し、エレクトロポレーション法によるプラスミドの導入を行った。エレクトロポレーションの条件として電圧：2.5kV・電気量：25 μ F・抵抗値：200 Ω を用いた。導入したプラスミドとして、pUC19(大腸菌で発現可能)を使用した。エレクトロポレーションによる導入後に SOC 培地を用いて後培養を行った。条件は 37°C・1 時間である。形質転換操作後の試料は、必要に応じ寒天平板法で転換体を選別した。獲得した菌株は MiSeq・MinION による全ゲノムシーケンスを実施し、系統解析をあわせて実施した。

3. 3 好気性電極酸化細菌の集積

もう一つの反応槽である電極酸化槽の効率改善のために好気性電極酸化細菌の集積に取り組んだ。既存の電極酸化槽に用いられる細菌種は嫌気性細菌が大多数を占めているが嫌気による資化は代謝効率が悪く、電極上での集積度が低いといった代謝構造上の問題も抱えている。更にリアクター運用時には嫌気環境を維持必要があり、実運用する際のコスト増大も懸念されている。そこで本研究ではこの抜本的効率改善を目指して好気性電極酸化細菌の集積・分離培養を実施した。こうした好氣的に電子資化を行うことのできる細菌種の存在は近年指摘されており、その代表的な細菌種として *Candidatus Tenderia*・*Marinobacter sp.*などの存在が挙げられる。しかしながらこうした細菌種の分離は実施されておらず、好気性電極酸化細菌の微生物学的特徴は明らかにされていない。また MES での応用に関してもこれまでに試みられた例はなく、分離・とその細菌種の解析は MES リアクターを深化させる上で意義深い。

集積リアクターとして以下の右図に示す装置を作成した。装置はアノード・カソードの 2 槽からなり、それぞれプロトン交換膜を介して接続した。またこの 2 槽はポテンシostatを用いて電位制御し、電位が -1V となるように調整した。参照極として Ag/AgCl 電極を用いている。電位制御の作用極はアノード側に設定しており、これにより、カソードからアノードへ向けて電子が流れる構造となっている。カソード内の培地の組成 ATCC medium: 1754 PETC medium をベースとし、



有機炭素源炭素源となる Yeast Extract を除外した無機培地を用いた。また電子受容体となりうる硫酸イオンを排除するため、 $MgSO_4$ から $MgCl$ に変更した。以上 2 点によりエネルギー源を供給されている電子のみに制限した。カソード槽に活性汚泥サンプルを 1%(v/v)で接種した。アノード槽は蒸留水で満たし、アノードの電極は Pt/Ir 炭素電極を用いた。この電極は触媒能をもち、水の電気分解を促進することでカソードでの反応を助け、電極酸化を促進する効果が期待できる。それぞれのリアクターの容積は 200ml に設定し、1 ヶ月間培養を行った。を用意し同様の条件でサンプリング・菌叢解析を行った。

3. 4 電極酸化細菌の特異的培養技術の開発

筆者は電気発酵プロセスの実用化に当たって、高付加価値物質生産能を持つ電子資化性細菌（電極酸化細菌）を得ることが重要課題であるという考えから、当該微生物の「特異的」分離装置の開発に取り組んできた。従来の電子資化性細菌分離過程は極めて煩雑であり、有用株のスクリーニングにはスループットの向上が不可欠である。筆者はこのためには電極酸化細菌「だけ」が菌体コロニーを形成し生育するような培養法を用いれば良いと考え、「固相電気培養装置（Solid-Phase Electrochemical Isolation Equipment Systems; SPECIES）」を考案した。SPECIESは寒天や、ゲランガム、コロイダルシリカなどのハイドロゲルにカーボンナノチューブを添加し、固体培地そのものを電極化することで酸化還元電位を制御しながら未培養環境微生物のコロニー形成を促す装置である。

3. 5 電極酸化細菌 Y72 株のゲノム編集システムの確立

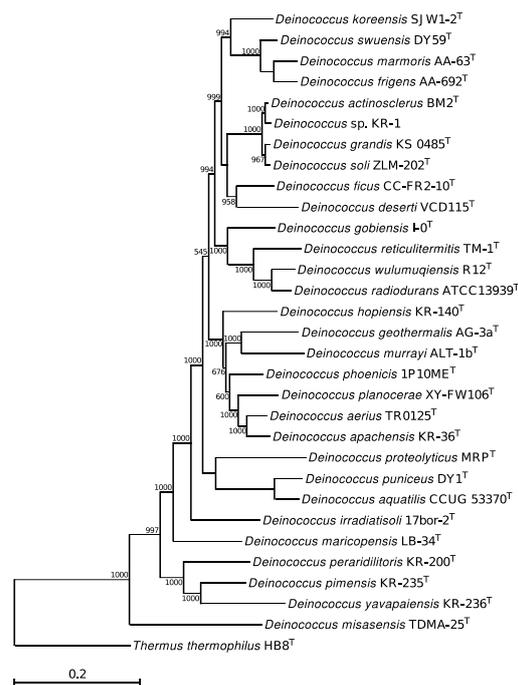
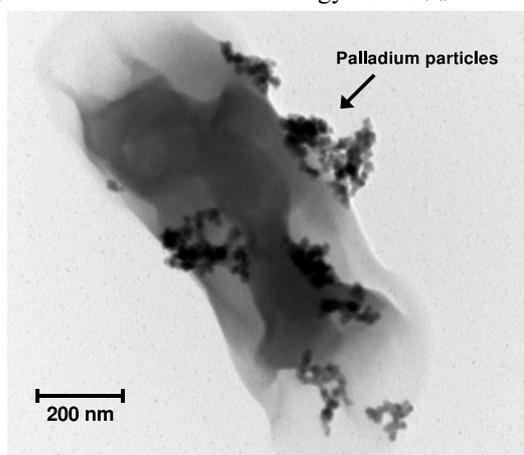
電気発酵に求められるブレイクスルーは、端的には酢酸以外の高付加価値物質を高濃度に生産可能な系を構築することにはほかならない。またその達成には触媒微生物への外部遺伝子導入や不要遺伝子破壊による代謝最適化が必須である。本取り組みではハイスループットかつメーカーレスに任意の遺伝子破壊・導入が可能な CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法確立による代謝改変研究の高速化を目指し実験を遂行した。

4. 研究成果

4. 1 第 10 族元素吸着細菌スクリーニング結果

環境サンプルより分離した株のうち 1 株においてパラジウム吸着能を持つことが TEM 撮影により確認できた。その際の TEM 像を左図に示した。

またこのパラジウム吸着能を持つ細菌の全ゲノム解析を実施した。アセンブル後のゲノムサイズは 4,556,772 bp となった。またコンティグ数は 7、カバレッジは、250.0 倍となった。このゲノムデータを元に MLSA で用いられる *atpD*, *dnaA*, *gyrA*, *rpoB* の 4 つの遺伝子の特定をアノテーションにより成功した。またこの遺伝子配列を組み合わせ MLSA 系統解析を実施した。本分離株は右図中に示す *Deinococcus* sp. KR-1 株である¹⁾。この系統樹の最も下方にある *Thermus thermophilus* HB8T はアウトグループであり、この系統樹のルートを決断するために用いている。この系統樹からこの分離株は *Deinococcus* 属であることが同定できた。また遺伝的距離が十分に遠いことから新種提唱を行った。この提唱論文は *Archives of Microbiology* 誌に掲載された



2)。またこの株は *Deinococcus kurensis* として

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 誌の Validation List に掲載され従って新種として認められた。現在当該株を用いた陰極電子フラックスの増大に取り組んでいる。

4. 2 貧栄養細菌の分離同定

水・ゲランガムのみで構成される極貧栄養条件下で生育可能な *Enterobacter* 属細菌の分離株 AS-1 に対し MinION によって DNA を 2,640,146,690bp 解析できた。またリード数は 1,102,715 であった。これより、平均リードあたり塩基数は 2,394.2bp となる。このデータのリード長は短く、De novo アセンブルに適したデータであるとは言えないが、全体として十分なデータ量を獲得することができ、De novo アセンブルすることができた最類縁種は *Enterobacter chengduensis* であることが分かった。また ANI の最大値は 94.783% となり、この獲得株が新種である可能性が高いことを示唆しており、現在新種提唱論文を執筆中である。

3. 3 好気性電極酸化細菌の集積培養

電流推移を見ると次第に電流量が減少するように変化している。これは電極表面に電子資化を行う細菌が集積することで、電流の伝達性が低下したことによるものと推測された。またサンプリングタイミングで電流量が大きく増大しているのは、電極表面のバイオフィルムがサンプリングによる衝撃で剥離しているものと考えられる。また電流印加系と非印加系で菌叢を比較すると菌叢の多様性・種類ともに全く異なり印加することによってコミュニティに大きな影響を与えていることが言える。

本電圧印加集積系における優占菌種である *Thiocapsa* 属細菌は膜貫通型の[NiFe]ヒドロゲナーゼを持っている。またこのタンパク質は光合成電子伝達系に直接接続した膜タンパク質であることが報告されており、したがって *Thiocapsa* 属細菌は電子受容能力を持っていることが強く示唆された。現在集積系内の優占種の分離に取り組んでおり、分離にあたっては4.4で後述する固相電気培養装置を用いている。

4.4 固相電気培養装置 SPECIES の開発とコロニー形成特性

SPECIES 装置内に形成された菌叢は植種源と明確に異なった。電極印加による大きな影響として、培地上に形成されるコロニーの多様性が高まることが判明した。電圧印加系においては、0.5%超の検出頻度となった属が20以上存在したのに対し、非印加系では11属にとどまった。また印加系から得られたコロニーには種レベルで新規と考えられる *Proteobacteria* 門に属する株が含まれており、当該株群については現在電子資化性調査及びゲノム解読を実施中である。またこのことは電極印加による培養化の可能性を示唆した。すなわち、SPECIES は培養可能微生物圏を拡大し得る培養技術であることが判明した。またコロニー菌叢の優占種は、電子資化性細菌であることが示唆されている *Thermoanaerobacter* 属だった。従って本研究により SPECIES の持つ電子資化性細菌培養装置及び菌体細胞培養装置という性質が明らかとなった。以上の成果について現在論文執筆中である。一方で、現状として本技法は、電子資化性細菌を除く一般的な細菌の培養可能性をも拡大する可能性があり、今後の課題として「培養性の拡大」及び「電子資化性細菌培養の特異性向上」の2つの指向性を切り分け、新規微生物培養装置、電子資化性細菌特異分離装置、それぞれの方向性に合致する装置運用条件を検討する必要があることが判明した⁴⁾。

4.5 Y72株のゲノム編集システムの構築

好熱性細菌である *Moorella* sp. Y72株を編集対象に設定し、*Staphylococcus pyogenes*の「中熱性」Cas9タンパク質を用いたゲノム編集システムの構築に現時点で成功した。これは好熱性細菌を宿主細菌とするゲノム編集システムとして新規のものであると考えて間違いなく、42°C条件で当該ゲノム編集システムによりY72株ゲノムの切断を試行した結果、編集対象とした当該菌株 10^9 cellsの内の10%以上のゲノムを切断 (i.e. 切断した細胞を殺す) 可能であることを解明した。

一方で、上述した10%という切断効率から、切断と同時にドナーDNAの存在を必要とする相同組換えの最終的組換え効率を算出した場合、編集に成功する細胞の発生確率は当初の細胞数の0.1%以下となることが明らかとなった。この効率は何らかの抗生物質耐性や栄養要求性をマーカーとして利用して遺伝子導入・破壊を行うことを想定した場合には十分な確率であるが、Y72株内の遺伝子を任意かつ自在に破壊し、遺伝子の機能を解明するという本研究の目的を達成するためには、十分な確率とは言い難く、細胞とCasタンパク質の動作環境の温度ギャップを埋める必要があることが判明した。現在までにこの温度ギャップを克服した編集システムの確立に成功しているが、当該技法については知財化が未完了であるため本報告書では割愛した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasaki Yuki, Itoiri Yuya, Ihara Sota, Akita Hironaga, Oshiki Mamoru, Kimura Zen-ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Enterobacter sp. AS-1, a Potential Eurytrophic Recombination Host	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 6~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jgen.53040	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 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Ihara Sota, Takeda Noriyo, Matsushika Akinori, Kimura Zen-ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Deinococcus kurensis sp. nov., isolated from pond water collected in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	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/s00203-020-01845-8	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 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Kumagai Akio, Takeda Noriyo, Matsushika Akinori, Oshiki Mamoru, Kimura Zen-ichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft genome sequence of Deinococcus sp. KR-1, a potential strain for palladium-leaching	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 21~24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jgen.42020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akita Hironaga, Matsushika Akinori, Kimura Zen ichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Enterobacter oligotrophica sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	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) 10.1002/mbo3.843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村善一郎
2. 発表標題 酸化還元電位制御下でのコロニー形成「固相電気培養装置：SPECIES」で拓く培養可能微生物圏のフロンティア
3. 学会等名 公益財団法人発酵研究所第13回助成研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zen-ichiro Kimura, Hiroki Kuriyama, Tamotsu Hoshino and Katsuji Murakami
2. 発表標題 Cultivation of Electron Utilizing Bacteria using Solid-phase Electrochemical Colonization System
3. 学会等名 17th International Synposium of Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井原奏太、栗山大輝、木村善一郎
2. 発表標題 電子資化性細菌を用いた廃棄物処理・有価物生産プロセスの創出
3. 学会等名 土木学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村善一郎、糸入祐也、栗山大樹、岩崎祐樹、村上克治
2. 発表標題 固相電気培養による電気発酵微生物分離培養の検討
3. 学会等名 日本エネルギー学会・第14回バイオマス科学会議
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 好熱菌のゲノム改変方法、ゲノム改変好熱菌の製造方法、及び好熱菌のゲノム編集キット	発明者 木村善一郎、岩崎祐樹、村上克治、松鹿昭則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-031806	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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	村上 克治 (Murakami Katsuji) (40358148)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	松鹿 昭則 (Matsushika Akinori) (90443225)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究グループ長 (82626)	

	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
研究協力者	岩崎 祐樹 (Iwasaki Yuki)		

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
---------	---------