

令和元年6月6日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H01753

研究課題名(和文)電気共生を利用した革新的嫌気消化プロセスに関する基盤研究

研究課題名(英文) Fundamentals for innovative anaerobic digestion processes using electric syntrophy

研究代表者

渡辺 一哉 (Watanabe, Kazuya)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40393467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：導電性微物質を嫌気微生物群集に添加することにより微生物間の還元力のやりとり(電気共生)を促進し、メタン発酵を高効率化する検討を行った。その結果、酸化鉄微粒子を添加した場合にメタン発酵が顕著に促進され、またこの促進効果は静置条件および攪拌条件の両方で観察された。この2条件において形成される菌叢を解析したところ、静置条件においてはGeobacterとMethanosarcinaの増加が確認され、電気共生によりメタン発酵が促進されたと考えられる。一方攪拌条件においては、Methanosarcinaのみが増加した。メタゲノム解析により、酸化鉄微粒子が酢酸分解メタン生成経路を促進する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌気消化メタン発酵プロセスはバイオマス廃棄物の処理およびバイオガス回収に広く用いられている。しかし、プロセスの効率や安定性に課題があり、性能の向上が求められている。今までに装置の形状などの検討が行われてきたが、微生物群集自体の活性を上げることは難しかった。近年、導電性微粒子を微生物群集に添加し、微生物間の還元力の移動を促進させることでメタン発酵を効率化できる可能性が示されている。しかし、培養条件などによりその効果が安定しないと言われてきた。本研究では、微粒子の種類や攪拌条件をかえてその効果を検証し、酸化鉄微粒子には今までに知られていないメタン発酵促進効果があることをつきとめた。

研究成果の概要(英文)：Methanogenic microbiomes were supplemented with conductive nanoparticles for examining their effects on electric syntrophy and methanogenesis. Stimulatory effects of iron-oxide (magnetite) nanoparticles were observed both under static and agitated conditions. Microbiome structures were analyzed under these two conditions, and it was found that Geobacter and Methanosarcina were increased in the presence of magnetite nanoparticles under static conditions, suggesting that electric syntrophy accelerated methanogenesis. On the other hand, only Methanosarcina overgrew in the presence of magnetite nanoparticles under agitated conditions. Metagenomic analyses demonstrated acetoclastic methanogenesis was activated by magnetite nanoparticles.

研究分野：応用微生物学

キーワード：電気共生 嫌気消化 メタン発酵 メタゲノム

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

1. 研究開始当初の背景

食品工場や畜産業などから排出される含水性有機廃棄物や高濃度有機廃水の処理およびエネルギー回収を目的として、嫌気消化メタン発酵プロセスが社会に広く普及している。燃料として利用できるメタンガスが生産されることからバイオガスプラントとも呼ばれる嫌気消化プラントは、エネルギー問題に社会の関心が集まる昨今、バイオマスエネルギー利用技術として注目が集まっている。一方で、過負荷や負荷有機物組成の変動などが原因でプロセスが不安定化し、ガス生産が低下・停止する現象が頻繁に発生しており、嫌気消化を安定化する技術への要望は大きい。さらに、プラントのサイズの縮小とコスト削減に繋がる処理の高速化を可能にする技術への期待も大きい。

嫌気消化メタン発酵においては、多数の微生物の代謝連携により高分子のバイオマスが徐々に分解され、メタンが生成される。過去に多くの微生物学的研究がなされ、各ステップを担う微生物やそれらの代謝能力などが明らかにされてきた。その結果、上流の代謝は比較的速く、一方で下流の代謝は遅いことが明らかになっている。そのため、過負荷などが原因で中間産物の低級脂肪酸が系内に蓄積し、系が崩壊してしまう。そこで、下流の代謝反応を高効率化する技術が求められている。

下流の脂肪酸分解は、共生菌とメタン菌の相利共生的な代謝連携によりなされる。共生菌は余剰還元力(電子)の放出に水素を使い、一方メタン菌はそれを取り込み、二酸化炭素を還元してメタンを生成する。よってこの水素移動は微生物間電子伝達と見ることができ、これがメタン発酵における律速段階となる。最近我々は、導電性鉱物粒子を介して微生物間に電子伝達が起こること、このような電子伝達が水素等の拡散によるものより10倍以上効率が良いことを発見した(Kato et al. 2012 Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 109:10042-10049)。また、嫌気条件下、土壌に導電性鉱物粒子を添加するとメタン発酵が促進されることも発見し(Kato et al. 2012 Environ. Microbiol. 14:1646-1654)、我々はこの現象を“電気共生(electric syntrophy)”と命名した。

2. 研究の目的

電気共生を利用すれば、嫌気消化の律速段階である共生的脂肪酸分解反応を促進できる可能性がある。これによりプロセス全体の高速化・安定化が図れると期待できるが、沈降しやすいなどの問題から導電性鉱物粒子をそのまま嫌気消化で利用することは難しい可能性がある。そこで本研究では、導電性担体上でのメタン発酵群集の解明、導電性粒子利用法の確立、電気共生微生物群集の構造や代謝機構の解明、等の研究を行い、幅広く嫌気消化プラントの高効率化に適用できる電気共生利用技術にかんする基盤的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メタン発酵

水田土壌を植種源、グルコース、酢酸などを基質とし、37℃でメタン発酵実験を嫌気バイアル中で行った。培地にはPS培地を用いた(Kato et al. 2012 Environ. Microbiol.)。また、カーボンクロスを担体とした高温固定床嫌気消化槽(55℃)に嫌気性消化汚泥を植菌し、酢酸を主要とする培地を連続的に流入させてメタン発酵実験を行った。

気相成分(メタン、水素、二酸化炭素、など)はガスクロマトグラフィーを用いて測定し、ガス発生量からメタン生成速度を計算した。培地中の有機酸は液体クロマトグラフィー、エタノールとグルコースは酵素法を用いて測定した。

(2) 菌叢解析

バイアル中の微生物を懸濁して培地とともに回収し、そこから核酸の抽出を行った。消化槽実験においては、発酵液、および担体上に生成したバイオフィルムを採取した。これらの菌体バイオマスより核酸を抽出し、解析に供した。抽出したDNAから16S rRNA遺伝子断片をPCR増幅し、Miseqシーケンサーを用いた配列解析に供した。得られたリードについてQiimeを用いたOperational Taxonomical Unit(OTU)のクラスタリングを行い、そこから代表配列の抽出を行った。また、推定された優占種の存在量をグラフ化し、MEGAを用いて配列のアライメント及び近隣接合法による系統樹の作成を行なった。

(3) メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析

上記で抽出したDNAおよびRNAを用いた。解読にはNovaSeq6000(Illumina)を使用し、ペアエンド法で配列を決定した。得られたリードをCLC Genomic Workbench Version 8.5にインポートしてクオリティーの低いリードを除去後、コンティグを作成した。得られたコンティグについて、PhyloPythias(<https://phylopythias.bifo.helmholtz-hzi.de//index.php?phase>)により系統学的分類を行った。ピングノムを作成するため、リードの重複度を二次元グラフ上にクロスマッピングした。また、四連塩基出現頻度(Tetra nucleotide frequency: TNF)を基に主成分分析によりピングノム中のコンティグを精査し、ピングノムを確定した。各ピングノムの完成度を把握するため、バクテリアとアーキアにおいて保存されている1コピー遺伝子(約100遺伝子)の存在する割合を算出した。

4. 研究成果

(1) 導電性担体上のメタン発酵微生物群衆

16S rRNA 遺伝子解析により低負荷時及び高負荷時の菌叢を比較した結果、どちらのサンプルにおいても発酵液中と担体上で菌叢が異なり、メタン生成菌は主に担体上に存在していることがわかった。また、低負荷時は *Methanosarcinaceae* が最も主要であったが、高負荷時は *Methanobacteriaceae* が主要であり、優占種が異なる傾向が見られた。*Bacteria* に関しては、*Coprothermobacter*、*Anaerobaculum*、*Thermacetogenium* が主要な菌種だった。pH 低下によるバイオフィルムの剥離と機能不調が観察された時は、発酵液中と担体上で菌叢に顕著な違いが見られなかった。

メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析において、低負荷時に 39 種類、高負荷時に 35 種類のピンゲノムが構築された。この解析においてもメタン生成菌は主に担体上に存在していることが示された。主要な *Bacteria* として *Coprothermobacter*、*Anaerobaculum*、*Clostridium*、*Thermacetogenium*、および *Desulfotomaculum* が検出され、パイロシーケンス解析とほぼ同様の結果となった。一方、数種の優占的 *Archaea* については完成度の高いピンゲノムが得られ、これらは *Methanosarcina thermophila* の近縁種であった。また水素資化性メタン生成菌として、3 種の *Methanothermobacter* が検出され、そのうち最も存在量が高かったものは *Methanothermobacter crinale* の近縁種であった。一方、広く研究に用いられている *Methanothermobacter thermautotrophicus* の近縁種はあまり検出されなかった。低負荷時には *Methanothermobacter* より *Methanosarcina* の存在量が高かったが、高負荷時には *Methanothermobacter* が圧倒的に多く、遺伝子発現も活発であった。これらの結果は、負荷により菌の存在量だけでなく遺伝子発現が変化することを示している。

メタトランスクリプトーム解析によりメタン生成経路の遺伝子発現変動をみたところ、水素/CO₂ からメタンを生成する経路とともに酢酸からメタンを生成する経路も高負荷時に発現上昇していた。さらに、優占種の *Bacteria* においては鞭毛遺伝子などが担体上で高発現していることが明らかになり、これらのメタン発酵への関与が示唆された。

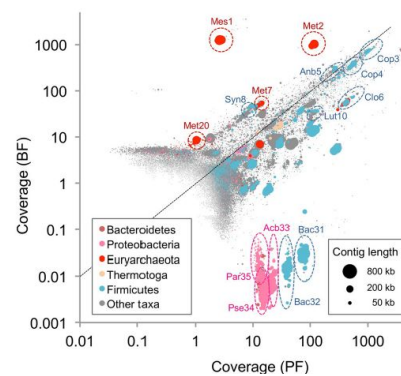


図1. クロスマッピングによるピンゲノムの作製

(2) カーボンブラックの影響

導電性微粒子として、本実験ではカーボンブラック (CB) を用いた。CB は粒径約 30 nm の炭素粒子であり、ゴムなどへの導電性付与剤として用いられている。この CB を嫌気消化汚泥液に添加し、グルコース、酢酸、H₂/CO₂ のいずれかを基質としたバッチ式中温メタン発酵におけるバイオガス生成量と有機酸蓄積量を測定した。その結果、CB を 0.5% (w/v) 添加するとメタン生成が著しく低下し、さらに添加量を 2.0% (w/v) に増やすとほとんどメタンが生成されなくなった (図2)。この結果より、CB はメタン発酵微生物群に対する阻害活性を持つことが示された。またグルコースを基質とした場合、CB 添加培養系では酢酸が蓄積していた。グルコースは酸発酵菌 (バクテリア) により酢酸まで分解され、その後にメタン生成アーキアが酢酸をメタンに変換する。したがって、酢酸の蓄積は CB がメタン生成アーキアを特異的に阻害したためと考えられた。そこで定量 PCR を行ったところ、CB 添加によりアーキアが有意に減少し、一方バクテリア量には変化がないことが判明した。この結果から、CB がメタン生成アーキアを特異的に阻害することが確認された。また 16S rRNA 遺伝子を用いた分子生態解析を行ったところ、CB 添加系では *Clostridiales* が優占化しており、その中でも *Clostridium butyricum* に近縁な種が増加していたことが明らかとなった。*C. butyricum* は電気化学活性 (細胞外と直接電子をやりとりする能力) を有する菌であることが知られており、また導電性物質を嫌気消化汚泥や水田土壌に添加することで電気化学活性を有する菌が増加することが報告されている。さらに、*C. butyricum* の純粋培養系に導電性微粒子を添加すると水素生成量が向上するという報告もある。以上を総合して考えると、CB を添加したことで電気化学活性を持つ *C. butyricum* の近縁菌が増加したと考えられる。今までにも、導電性微粒子がメタン発酵微生物群全体に対する毒性を示すことが報告されている。しかし本研究では、CB がバクテリアよりメタン生成アーキアに対し強い抑制作用を示すという今までにない現象が確認された。我々の研究室では、この発見を応用し、CB 添加により微生物電気分解における水素生産を安定化させることに成功している。

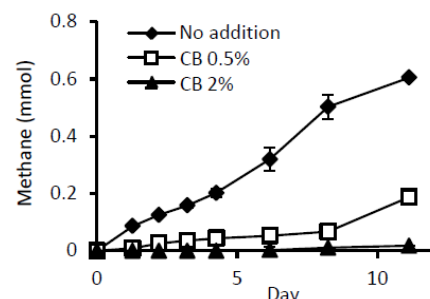


図2. CB 添加のメタン発酵への影響

(3) マグネタイト微粒子の影響

メタン発酵の基質として酢酸ナトリウム、植菌源として水田土壌を使用した。導電性物質として静置条件では活性炭、カーボンブラック、マグネタイトを、攪拌条件ではカーボンブラックとマグネタイトを加え、嫌気条件で培養を行った。経時的に酢酸及びメタンの濃度を測定し、メタン発酵を評価した。また、培養終了時に菌体から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子解析により条件間での菌叢を比較した。その結果、静置、攪拌の両条件においてマグネタイトの添加によりメタン生成は促進された(図3)。これらの結果より、加えた導電性物質の表面の性質や粒径はメタン生成に大きく影響すると考えられた。また、静置と攪拌の両条件では菌叢には相違がみられた。静置培養においてはマグネタイトの添加により *Geobacter sulfurreducens*、*Methanosarcina barkeri*、*Methanobacterium palstre* の近縁種が増加した。*Geobacter sulfurreducens* と *Methanosarcina barkeri* が電気共生を行うことでメタン発酵が促進されることが知られている。一方、*Geobacter sulfurreducens* と *Methanobacterium palstre*の間では、マグネタイトとヒドロゲナーゼを介した電子伝達が行われた可能性がある。一方攪拌条件においては、*Geobacter* が出現しないにもかかわらず *Methanosarcina* が顕著に増加しており、電気共生以外の未知のメカニズムで *Methanosarcina* が増加したと考えられた。

そこで攪拌条件でのマグネタイト添加によるメタン生成促進の作用機序を明らかにするために、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析を行った。その結果、マグネタイト添加条件で *Methanosarcina* に属すビンゲノム Mes1 の顕著な増加が確認され、またこの際に Mes1 の酢酸資化性メタン生成経路が顕著に発現上昇していることが示された(図4)。これは、Mes1 が酢酸を直接分解してメタンを生成したことを示しており、マグネタイトを介した電気共生により得た電子で CO₂ の還元が促進されたのではないことが明らかになった。攪拌条件におけるマグネタイトの添加が酢酸資化性メタン菌 Mes1 をどのように活性化したかについては大変興味をもたれるが、メタトランスクリプトーム解析の結果では、*flaB*(鞭毛形成タンパク質)に加え、機能未知のいくつかの遺伝子が高発現していることが示された。これら遺伝子は Mes1 とマグネタイトの相互作用に関与すると予想される。

本研究により、様々な導電性微粒子の中でも、マグネタイトナノ粒子が最も高いメタン発酵促進効果をもつことが示された。また、導電性物質がメタン発酵に与える影響は、静置条件と攪拌条件では異なることも示された。静置条件では、当初予想されたように電気共生によりメタン生成が促進される。一方攪拌条件では、酢酸分解メタン発酵が促進されることが示されたが、これは今まで知られていなかった現象である。今後、メタトランスクリプトーム解析の結果を踏まえ、促進機構の詳細を明らかにしていきたい。この際に、*Methanosarcina* Mes1 の単離株を得て、この株の純粋培養物におけるマグネタイトナノ粒子の影響も調査する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 31 件)

- Miyahara M, Kouzuma A, Watanabe K (2016) Sodium chloride concentration determines exoelectrogens in anode biofilms occurring from mangrove-grown brackish sediment. *Bioresour. Technol.* 218:674-679.
- Miyahara M, Sakamoto A, Kouzuma A, Watanabe K (2016) Poly iron sulfate flocculant as an effective additive for improving the performance of microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 221:331-335
- Fujinawa K, Asai Y, Miyahara M, Kouzuma A, Abe T, Watanabe K (2016) Genomic features of uncultured methylotrophs in activated-sludge microbiomes grown under different enrichment procedures. *Sci. Rep.* 6:26650.
- Ueoka N, Kouzuma A, Watanabe K (2016) Missing iron-oxidizing acidophiles highly sensitive to organic compounds. *Microbes Environ.* 31:244-248.

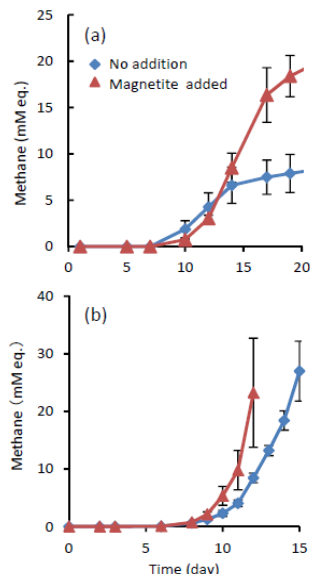


図3. マグネタイトの添加によるメタン発酵の促進。(a) 静置条件、(b) 攪拌条件。

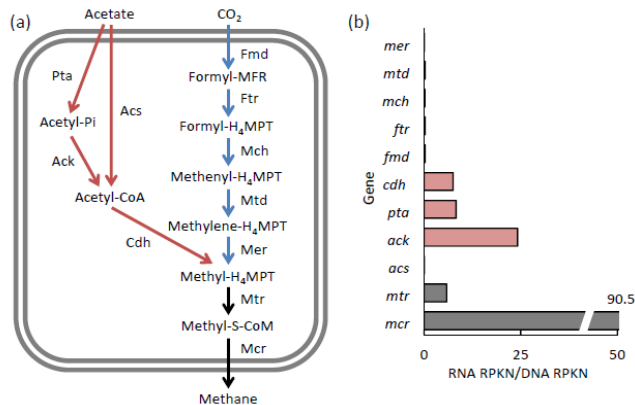


図4. マグネタイト存在下の攪拌条件で優占化した *Methanosarcina* Mes1 のメタン生成経路 (a) の遺伝子の発現量 (b)

- Takahashi S, Miyahara M, Kouzuma A, Watanabe K (2016) Electricity generation from rice bran in microbial fuel cells. *Bioresour. Bioprocess.* 3:50.
- 上岡永佳、渡邊一哉 (2016) 微生物燃料電池技術を用いた水田発電. *Electrochemistry* 84:104-106.
- 廣瀬篤弥、高妻篤史、渡邊一哉 (2016) 微生物燃料電池による廃水処理の現状と課題. *用水と廃水* 58:33-38.
- Kouzuma A, Tsutsumi M, Ishii S, Ueno Y, Abe T, Watanabe K (2017) Non-autotrophic methanogens dominate in thermophilic anaerobic digesters. *Sci. Rep.* 7:1510.
- Kasai T, Kouzuma A, Watanabe K (2017) CRP regulates D-lactate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front. Microbiol.* 8:869.
- Kitayama M, Koga R, Kasai T, Kouzuma A, Watanabe K (2017) Structures, compositions and activities of live *Shewanella* biofilms formed on graphite electrodes in electrochemical flow cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:00903-17.
- Asai Y, Miyahara M, Kouzuma A, Watanabe K (2017) Comparative evaluation of wastewater-treatment microbial fuel cells in terms of organics removal, waste-sludge production and electricity generation. *Bioresour. Bioprocess.* 4:30.
- 渡邊一哉 (2017) 水田にいる発電菌で電池をつくる. *現代農業* 4:328-332
- 茂木久恵、渡邊一哉 (2017) 微生物電気化学システムの排水処理技術への応用. *水環境学会誌* 40:325-328
- 渡邊一哉 (2017) 発電型廃水処理. *ケミカルエンジニアリング* 62:18-23.
- Kasai T, Kouzuma A, Watanabe K (2018) CpdA is involved in amino acid metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82:166-172.
- Amano N, Yamamuro A, Miyahara M, Kouzuma K, Abe T, Watanabe K (2018) *Methylomusa anaerophila* gen. nov., sp. nov., an anaerobic methanol-utilizing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68:1118-1122.
- Hirose A, Kasai T, Aoki M, Umemura T, Watanabe K, Kouzuma A (2018) Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nature Commun.* 9:1083.
- Ueoka N, Kouzuma A, Watanabe K (2018) Electrode plate-culture methods for colony isolation of exoelectrogens from anode microbiomes. *Bioelectrochem.* 124:1-6.
- Miyauchi T, Kouzuma A, Abe T, Watanabe K (2018) Complete genome sequence of *Acidithiobacillus ferridurans* JCM 18981. *Microbiol. Resour. Announc.* 7:e01028.
- 茂木久恵、高妻篤史、渡邊一哉 (2018) 微生物燃料電池を用いた廃水処理. *環境浄化技術* 17:6-11.
- Kouzuma A, Ishii S, Watanabe K (2018) Metagenomic insights into the ecology and physiology of microbes in bioelectrochemical systems. *Bioresour. Technol.* 255:302-307.
- 笠井拓哉、廣瀬篤弥、高妻篤史、渡邊一哉 (2018) *Shewanella* における嫌気呼吸鎖の発現制御機構. *環境バイオテクノロジー学会誌* 18:43-50.
- 上岡永佳、渡邊一哉 (2018) 発電菌の基礎と応用. *酵素工学* 80:19-22.
- 猪鼻淑乃、渡邊一哉 (2018) 発電する微生物. *麻醉* 67:S1-S9.
- Kasai T, Suzuki Y, Kouzuma A, Watanabe K (2019) Roles of D-lactate dehydrogenases in the anaerobic growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 on sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e02668
- Suzuki Y, Kouzuma A, Watanabe K (2019) CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Shewanella oneidensis* MR-1 using a broad host-range pBBR1-based plasmid. *J. Gen. Appl. Microbiol.* In press.
- Hirose A, Kouzuma A, Watanabe K (2019) Towards development of electrogenetics using electrochemically active bacteria. *Biotechnol. Adv.* In press,
- Kasai T, Tomioka Y, Kouzuma A, Watanabe K (2019) Overexpression of the adenylate cyclase gene *cyaC* facilitates current generation by *Shewanella oneidensis* in bioelectrochemical systems. *Bioelectrochemistry* In press
- Fujinawa K, Nagoya M, Kouzuma A, Watanabe K. Conductive carbon nano-particles inhibit methanogens and stabilize hydrogen production in microbial electrolysis cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* In press.
- Hirose A, Kasai T, Koga K, Suzuki Y, Kouzuma A, Watanabe K (2019) Understanding and engineering electrochemically active bacteria for sustainable biotechnology. *Bioresour. Bioprocess.* 6:10.
- 名古屋美紗、渡邊一哉 (2019) 発電微生物を利用した水素生産. *Ceramics Japan* 54:429.

〔学会発表〕(計 104 件)

以下、主な招待講演

渡邊一哉、「微生物がつくる電子の謎とその最前線」第 16 回マイナスイオン応用フォーラム . 東京大学山上会館 . 2016 年 11 月 21 日

渡邊一哉. 電気をを用いた微生物の制御: その基礎と応用. BioJapan、パシフィコ横浜. 2017年10月12日.

渡邊一哉「The ecology and evolution of methanogens in anaerobic digesters」中国微生物生態学会年会. 北京. 2018年10月24日.

渡邊一哉. 発電する微生物. 麻酔学会, 横浜, 2018年5月17日.

Kazuya Watanabe. The ecology, physiology and genetics of electrochemically active bacteria (EAB). 59th Annual Conference of Association of Microbiologists of India, 2018年12月1日

〔図書〕(計3件)

宮原盛雄、高妻篤史、渡邊一哉 (2016) 微生物燃料電池の開発と展望. 表面・界面技術ハンドブック NTS 出版 482-490.

廣瀬篤弥、宮原盛雄、渡邊一哉 (2016) 第12章 微生物燃料電池. バイオマスエネルギーの技術と市場 CMC 出版 133-142.

Kazuya Watanabe (2018) Foreword. In Venkataraman Sivasankar, Prabhakaran Mylsamy, Kiyoshi Omine (eds.) Microbial fuel cell technology for bioelectricity, Springer, London.

〔産業財産権〕出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 阿部 貴志

ローマ字氏名: Abe, Takashi

所属研究機関名: 新潟大学

部局名: 自然科学系

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 30390628

研究分担者氏名: 上野 嘉之

ローマ字氏名: Ueno, Yoshiyuki

所属研究機関名: 鹿島建設株式会社技術研究所

部局名: 地球環境・バイオグループ

職名: 上席研究員

研究者番号(8桁): 60416724

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 高妻篤史

ローマ字氏名: Kouzuma, Atsushi