

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06906

研究課題名(和文) 微生物電解セルにおけるCO<sub>2</sub>からの有用物質生産メカニズムの解明研究課題名(英文) Bioelectrochemical production of valuable products from CO<sub>2</sub> in a microbial electrolysis cell

研究代表者

石井 俊一 (Ishii, Shunichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・研究員

研究者番号：10556913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物電解セルを約一年間運転し、微弱な電圧印加によりCO<sub>2</sub>から電気を用いてメタンを合成する微生物群集を電極上に作成した。微生物群集構造の変遷を解析した所、メタンを電気合成している陰極バイオフィームには、Euryarchaeota門に属する異なるメタン菌が見られ、電子を電極に輸送している陽極には、Deltaproteobacteria綱に属するGeoalkalibacterが集積されていた。それぞれのゲノム構造を解析した所、メタン菌は電極から発生する水素を介してメタンを生成し、GeoalkalibacterはシトクロームCを介して直接的に電子を電極に輸送している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we operated a microbial electrolysis cell (MEC) for the stimulation and acceleration of microbial methanogenesis via voltage input to fix CO<sub>2</sub> to valuable compounds such as methane. A MEC system was operated for 11 months where 600 mV of voltage was applied between anode and cathode, resulting in a successful conversion of CO<sub>2</sub> to methane with electrical current consumption. The 16S rRNA-based community analyses revealed that genera Methanocalculus and Methanobacterium were located in the electromethanogenic cathode, while genus Geoalkalibacter was shown in the electrode-respiring anode. The metagenomic analysis revealed that the Geoalkalibacter genome coded numerous numbers of multi-heme c-type cytochromes, whereas methanogenic archaeal genomes contained many hydrogenases. These results suggest that direct electron transfer via cytochromes occurred on the anode, and hydrogen-mediated electron transfer functioned on the cathode.

研究分野：工学 (生物機能・バイオプロセス)

キーワード：微生物電解セル 菌体外電子移動 バイオカソード 微生物電気合成 電極酸化メタン菌 微生物群集構造解析 メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

微生物電解セルは、電気化学セルの中で、陽極反応（電子の抜き取り）、陰極反応（電子の受け取り）、もしくはその両方を、微生物生体触媒を用いて行うバイリアクターである（図1）。その中でも、陰極反応は、電子（すなわち還元力）により  $\text{CO}_2$  を還元し、エネルギー物質に変換するポテンシャルを秘めており、保存困難な電気エネルギーを用いて、 $\text{CO}_2$  を固定しつつエネルギー物質を作る技術として、近年、大きな注目を集めている。この様な「微生物電気合成」反応を行う微生物群集を用いる事で、 $\text{CO}_2$  からのメタン生成、 $\text{CO}_2$  からの酢酸生成、さらにはグリセロールからの有用物質（1,3-プロパンジオール）生成などの可能性が、報告されてきている。しかしながら、どのような微生物が陰極バイオフィーム上に集積し、どのように物質転換（および物質生産）に関わっているのかは、ほとんど分かっていない。特に、この生体触媒反応の鍵となる「電子（還元力）を電極から微生物に移送する反応」に関しては、全く未知である。

我々は、この菌体外電子移送反応に関して、その逆反応である電子を電極に捨てて電気を発生する発電微生物群集について、様々な角度から研究を行って来た。発電プロセスにおける鍵反応である「電子を微生物から電極へ移送する反応」に関して、複雑な微生物群集の中から電子授受に関わる微生物群を同定し、その微生物のゲノム情報を得ると共に、反応に関わる遺伝子群を抽出する事に世界で初めて成功した。この技術を用いる事により、微生物電解セルにおける未解明な電子

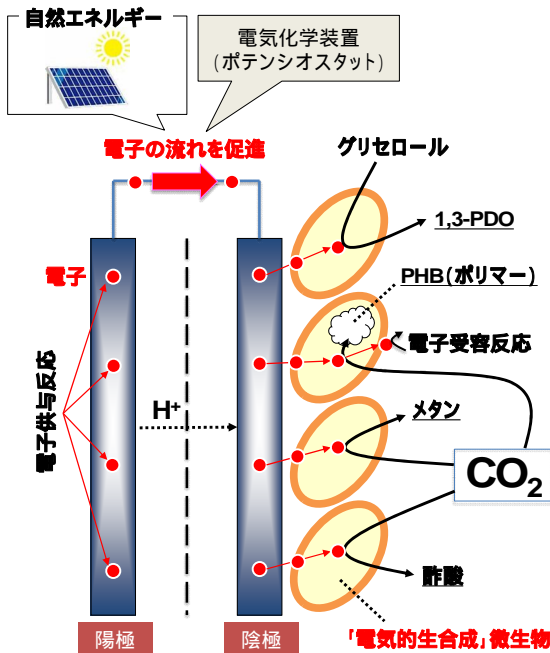


図1. 微生物電解セルによる物質転換

授受機構、および物質生産プロセス（ $\text{CO}_2$  固定化と物質生産経路）に関して、飛躍的な機能解明が可能になると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、地球温暖化対策技術としての持続的  $\text{CO}_2$  循環サイクル構築の必要性から、微生物電解セルによる  $\text{CO}_2$  の固定、およびメタン生産にターゲットを絞る事とし、一槽式の微生物電解セルを用いた電気合成微生物群集の集積培養を行った。その性状を様々な角度から解析する事により、「どのような微生物種が電氣的メタン生成を行うのか？」および「どのような遺伝子の機能を用いて電子を電極から微生物に輸送しているのか？」を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 微生物電解セルの運転

二器の一槽式微生物電解セルを用いて、電極上で  $\text{CO}_2$  を固定しメタンを生成する微生物群集の集積培養を行った。陽極、陰極共に炭素織布（3 cm × 6 cm、有効表面積 3.6 cm<sup>2</sup>）を使用し、電極間に 0.6V の電圧を印加し、発生する電流をモニタした。液相および微生物源として、沿岸堆積層からの砂層を含む湧き出しかん水を用い、ガス相は、 $\text{N}_2:\text{CO}_2$ （= 80:20）に置換した。液相は、スターラーにて攪拌し、30 日に一年の長期培養を行った。必要に応じ、電子の供給源として、酢酸を 10mM 添加した。

$\text{CO}_2$  の物質転換速度を知るため、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて酢酸の濃度を定量し、ガスクロマトグラフィー（GC）を用いてメタンの存在比率を定量した。ガスの産生量は、ガスパックに捕集し、定量した。

### (2) 微生物群集構造の変遷

微生物電気合成を行う微生物種を同定するため、微生物群集構造解析を行った。活発に微生物電気合成反応を行っている微生物電解セル中から、陰極バイオフィーム、陽極バイオフィーム、そして浮遊微生物のサンプリングを行った。2 器の微生物電解セルから、経時的に 4 回のサンプリングを嫌気条件下で行い、MOBIO PowerBiofilm DNA isolation kit を用いて DNA を抽出した。それぞれの DNA サンプルから、16S rRNA の配列をユニバーサルプライマーを用いて増幅し、次世代シーケンサ（MiSeq）にて網羅的にシーケンスした。得られたリードはアセンブリ後、QIIME プログラムを使用して OTUs を作成し、SILVA にて各 OTUs の系統的位置を同定した。得られた微生物群集構造遷移と環境メタデータを統計的解析に供し、微生物電気合成反応に関わる微生物群（もしくは種）を同定した。

(3) メタゲノム解析による機能遺伝子解析  
微生物群集構造に供した DNA サンプル中から、運転後期の集積が進み、安定的に微生物電気合成反応を行っている微生物群集をメタゲノムシーケンスした。得られたシーケンスリードをアセンブリしてコンティグを作成後、微生物群集中に高頻度で存在する微生物のゲノム再構築を行った。得られたドラフトゲノムより、微生物群集中の構成メンバーの遺伝的バックボーンを取得、および代謝ネットワークングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 微生物電解セルの運転

電圧印加を行ったバイオリアクターでは、数日のラグタイムの後、電流の産生が始まり、最終的に 1-2mA ほどの安定的な電流産生が見られた。物質転換速度の解析を行うため、ガス相の分析を行った所、ごく初期に水素産生が見られ、その後、二酸化炭素の減少およびメタンの生成が見られた。電圧を印加しない対照運転では、そのようなメタンの生成が見られなかった事から、陰極にて電子を受け取りメタン生成を行う微生物が集積され、微生物電気合成反応が起きている事が示唆された。

その後、300 日の長期運転を行い、電気合成反応が安定的に長期間保持される事が確認された。また、各電極上にはバイオフィルムの産生が見られ(図2)、微生物が電子授受反応に強く関与している事が示唆された。



図2. メタンガスを活発に産生している微生物電解セル

##### (2) 微生物群集構造の変遷

定期的に 16S rRNA を用いた微生物群集構造解析を行い、リアクター中の異なる位置(陰極、陽極、浮遊微生物)での群集構造の変遷を追った。その結果、培養が進むにつれて、微生物群集の経時的に変遷して行く様子が確認された(図3)。リアクター中のそれぞれの位置には、特定のグループに属する機能微生物群が優占化して行く事が分かり、CO<sub>2</sub> と電子からメタンを電気合成している陰極バイオフィilm中には *Euryarchaeota* 門に属する *Methanoculculaceae* 科、および *Methanobacteriaceae* 科の微生物群が増えていた。これらの微生物群は、メタン菌と呼ばれる系統群であり、メタン生成を行う事が知られている。有機物(酢酸)から電子を取り出し電極に供与している陽極バイオフィilm中には *Deltaproteobacteria* 綱が多く見ら

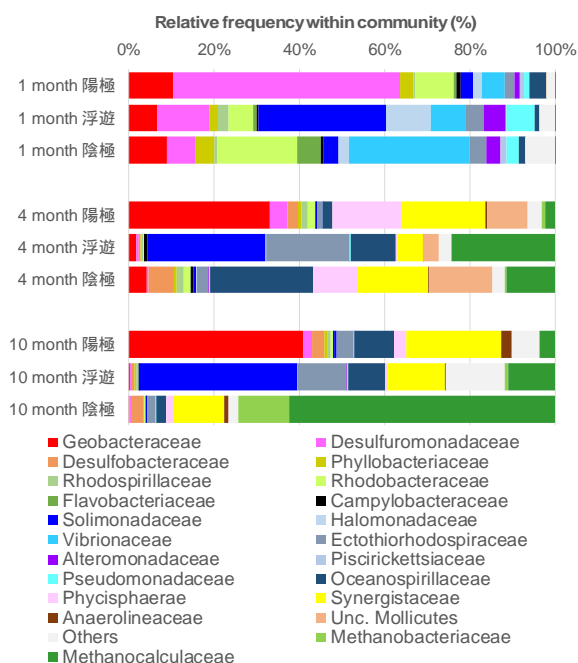
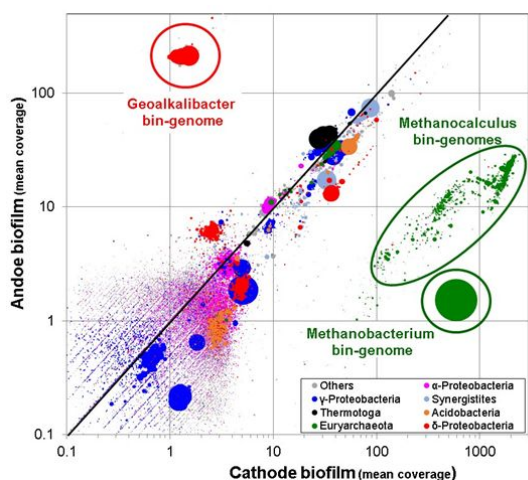


図3. 微生物電解セル中の各位置における微生物群集構造の変遷の比較。培養開始後、1ヶ月、4ヶ月、10ヶ月に、サンプリングを行った。

れたが、培養初期では *Desulfuromonadaceae* 科が多く存在し、培養後期では *Geobacteraceae* 科に属する微生物群が優占化してきた。この二つの系統群は、共に電極を含む固体物質に電子を輸送して呼吸する微生物群として知られている。そして電極とは直接的な電子授受を行う事が出来ない浮遊微生物群には *Gammaproteobacteria* 綱が優占化しており、様々な科に属する微生物群が、合計で群集の 50-60% を占めていた。微生物電解セルに添加したかん水は、海水性であり、ここで見られる微生物群は、海水中に見られる微生物と系統学的に近縁な物が多かった。

##### (3) メタゲノム解析による機能遺伝子解析

これらの微生物電解セル中の各環境に生息する微生物群の代謝機能を知るため、10ヶ月のサンプルを用いて、メタゲノムシーケンスを行った。その結果、合計で31種の構成微生物の高品位なドラフトゲノムを抽出する事に成功し、それぞれの微生物の代謝機能を推定する事が出来た(図4)。陰極には、*Methanobacterium* 属と *Methanocalculus* 属の二種の微生物が見られ、その遺伝子解析から、どちらの微生物も水素と CO<sub>2</sub> からメタンを作ると考えられた。これは、陰極上に分泌型のヒドロゲナーゼが吸着し水素が作られ、その水素を用いて CO<sub>2</sub> が還元された事を示唆している。陽極には、一種の *Geoalkalibacter* 属に属する微生物が優占化しており、そのゲノム中には、電極に電子を移送と電極還元反応を担うマルチヘム外膜シトクロームCを多数保有している事が分かった。浮遊菌からは



**図4. 陰極(Cathode)と陽極(Anode)におけるゲノム重複度(coverage)比較法による構成微生物種のゲノムのクラスタリング**

*Gammaproteobacteria* 網に属する *Marinobacterium* 属や *Thioalbus* 属などのゲノムが見出され、それらは海水性の炭化水素資化菌である事が示唆された。これにより、微生物電解セル中の各微生物群集中において、どの微生物群(種)が、どのような遺伝子を用いて微生物電気合成的な CO<sub>2</sub> 固定・メタン生産を行っているかを推定する事が出来た。今後は、当該物質転換を行うために必要な遺伝子機能を同定するため、遺伝子発現解析や各タンパク質の発現量解析や機能解析を行い、さらに効率的な CO<sub>2</sub> 固定・メタン生成を目指す。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Shunichi Ishii, Shino Suzuki, Yuko Yamanaka, Angela Wu, Kenneth H. Nealson, Orianna Bretschger (2017), Population dynamics of electrogenic microbial communities in microbial fuel cells started with three different inoculum sources. *Bioelectrochemistry*, 査読有り、*In press*

[学会発表](計3件)

石井俊一、「電気産生微生物群集における電極の酸化還元電位の変化に対する多様な遺伝子発現応答」、日本微生物生態学会第31回大会、2016.10.22 横須賀市文化会館(神奈川県、横須賀市)

石井俊一、「微生物群集内の電子輸送メカニズム」、超循環型社会の創出に向けた微

生物電気化学イノベーションワークショップ(招待講演) 2016.7.20 東京大学弥生講堂(東京都、文京区)  
Shunichi Ishii, Stimulus-induced metatranscriptomic analysis for exoelectrogenic microbial communities adapted to different surface potentials, The 9th Asian Symposium on Microbial Ecology (招待講演) 2017.4.26 釜山、韓国

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 俊一 (Ishii, Shunichi)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・  
海底資源研究開発センター・研究員  
研究者番号: 10556913