

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：82641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14242

研究課題名(和文)電気駆動型新規二酸化炭素変換プロセスの構築

研究課題名(英文)Construction of novel process for electron driven microbial CO₂ conversion

研究代表者

松本 伯夫 (Matsumoto, Norio)

一般財団法人電力中央研究所・環境科学研究所・上席研究員

研究者番号：40371512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では当所独自の電気培養技術を鉄酸化細菌に適用することで、電気を還元力としてCO₂を有価物へ変換する新しい技術コンセプトの立証を目的とした。乳酸菌由来 lactate dehydrogenase 遺伝子を鉄酸化細菌へ導入することで構築した乳酸生産能を強化した遺伝子組換え株を対象として、作用極に還元電位を印加し、電極から細胞に電子を供給しながら電気培養を行った。非通電時にはほぼ乳酸の蓄積が見られなかったのに対して、電気培養試験区では菌体密度の向上に伴って、乳酸の蓄積量の増加が見られた。以上、従来の光合成等によるCO₂変換技術とは異なる電気駆動型CO₂変換技術のコンセプトを立証することができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to prove a novel technical concept to convert carbon dioxide into valuable substances by using electricity as a reducing power for iron oxidizing bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A recombinant strain of *A. ferrooxidans* that were constructed by introducing the lactate dehydrogenase gene derived from *Lactococcus lactis* was cultivated by providing electron to cells using electrochemical cultivation technology. Although a lactate accumulation was hardly observed during cultivation without electrochemically providing electrons, significant increases of lactate accumulation was observed with providing electrons by electrochemical cultivation method. Therefore, the novel concept of electrochemically conversion of carbon dioxide by using *Acidithiobacillus ferrooxidans* was proved.

研究分野：生物電気化学

キーワード：鉄酸化細菌 電気培養 二酸化炭素 乳酸 メタボローム解析 遺伝子組み換え 還元力

1. 研究開始当初の背景

産業活動によって排出される二酸化炭素 (CO₂) は温室効果ガスのひとつであり、その削減が重要な課題となっている。その一方で、産業活動の最終産物である CO₂ を原料とした化学原料やアルコールなど有価物に変換する手法は低炭素・循環型社会の構築に有効と考えられており、この考え方に基づいて様々な CO₂ 変換研究が進められている。CO₂ を高分子に変換するためには外部からエネルギー (還元力) の投入が必須であり、CO₂ 変換反応の還元力としては光や水素を用いた研究が多くなされている (人工光合成、化学触媒、微細藻類、水素細菌など)。しかし、実用的な活用を考えた場合、光利用のためには必要となる膨大な敷地面積、光エネルギーの日内・季節間変動の問題、水素利用においては保存・輸送の問題を抱えているため、安定的な供給ができる還元力を選択し、それ活用する CO₂ 変換技術の開発がブレイクスルーとなりうる。一方、我々のグループでは培養槽に設置した電極から還元力として電子を供給することで鉄酸化細菌をはじめとした微生物の増殖を促進する電気培養法の開発を行っている。鉄酸化細菌は培養液に含まれる還元鉄から電子を獲得し、CO₂ を固定しながら増殖する。還元鉄が全て酸化された時点で増殖は停止するが、電極上で鉄を電気的に還元することで、連続的に還元鉄を鉄酸化細菌に供給することが可能である。その結果、これまでに 100 倍程度の菌体密度向上に成功している (松本ら、電中研報告 U99012)。この活性化された増殖は実質的には鉄を介し電極から供給される電子を還元力としたものである。よって、遺伝子組換えにより鉄酸化細菌に有用物質生産能を付与することにより電気を還元力としたこれまでにない電気駆動型 CO₂ 変換技術を構築しよう。

2. 研究の目的

鉄酸化細菌に他種微生物由来の遺伝子を導入することで、有価物生産能を付与した遺伝子組換え株を構築するとともに、組換え株の培養に電気培養法を適用することで電気を還元力とした CO₂ 変換技術のコンセプトを立証する。

3. 研究の方法

(1). 鉄酸化細菌の電気培養およびメタボローム解析

鉄酸化細菌 *Acdithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 19859) の電気培養を図 1 の構成の培養槽、9K 培地を用い実施した。培養開始時は通電せず、鉄酸化細菌の増殖に伴って上昇する酸化還元電位が 0.5V (vs Ag/AgCl) 付近に到達した時点で作用電極に還元電位 0 V を印加した。一方で、通電しない試験を対照区として設定した。電気培養試験区、対照区ともに対数増殖期後期にサンプリングを行い、培養上清は HPLC、菌体はメンブレン上

に捕集後、メタノールで溶解し、CE-TOF MS による代謝産物分析に供した。

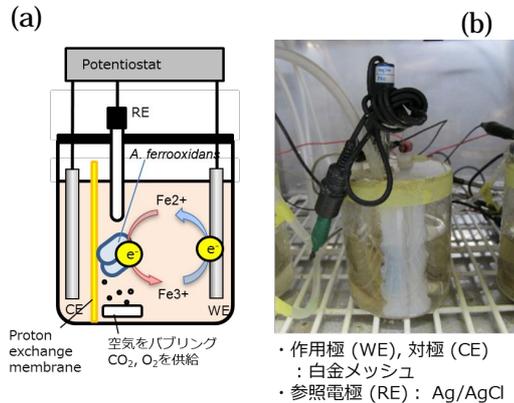


図 1. 電気培養槽 (a). 模式図、(b). 写真

(2). 鉄酸化細菌の遺伝子組換え

既報の文献 (Peng. et al., J.Bac, 176, 2892-2897 (1994), Wei. et al., Biotech Appl Biotech, 60, 623-628 (2013)) を参考に下記の手順で鉄酸化細菌の遺伝子組換えを接合伝達法により実施した。

乳酸菌 *Lactococcus lactis* の乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase 遺伝子 (*ldh*, WP_023188973) のコドン *A. ferrooxidans* での発現に対して最適化 (*AF-ldh*)

広宿主域ベクター pJRD215 に *AF-ldh* をクローニング

pJRD215_ *AF-ldh* で *E. coli* S17-1 を形質転換し、得られた組換え株を培養
並行して *A. ferrooxidans* を培養

E. coli S17-1 (pJRD_ *AF-ldh*) 対数増殖期、*A. ferrooxidans* 対数増殖期後期 で回収

2:2 basal salt medium (pH4.5) で洗浄

両菌を 2:1 (donor:recipient) で混合

メンブレン (0.45 μm) 上に混合液をスポット、2:2 固体培地 (yeast extract 0.05%, pH4.5) の上で 30、72h 培養

メンブレンから菌体を回収後、適宜希釈し、2:2 basal salt medium (pH2.0, Km) で 30、7 日間培養

固体培地で培養を行い、形成される Km^r 鉄酸化細菌のコロニーを選抜

PCR により *AF-ldh* が *A. ferrooxidans* に導入されていることを確認

(3). 遺伝子組換え鉄酸化細菌の電気培養

(2) と同様の手法で鉄酸化細菌組換え株の電気培養を実施した。継時的に菌体の増殖、

電位、電流値を計測するとともに、培地中および菌体内の乳酸濃度を HPLC により定量した。

4. 研究成果

(1). 鉄酸化細菌の電気培養およびメタボローム解析による通電時の代謝変動

鉄酸化細菌を使った電気培養による有機物質生産プロセスの構築に向けて、電氣的に還元力を供給した際の鉄酸化細菌細胞内の代謝変動を把握することで、生産に適した物質を絞り込み、遺伝子組換えの指針を得ることを試みた。培養を開始し、電気培養試験区、対照区ともに対数増殖期後期にサンプリングを実施し、培養液上清および細胞内の代謝産物の分析を行ったところ、培養上清中には顕著な代謝産物の蓄積は確認されなかった。その一方で、細胞内の代謝産物を CE-TOFMS で分析した結果、カチオン 37 種、アニオン 25 種の化合物が検出された。そのなかで、通電時に蓄積量が増加した物質として、Arg, Glu, Lys, Lactate が見出された。これら 4 種の化合物のうち、生産経路がシンプルであり、1 遺伝子 (Lactate dehydrogenase) の導入で生産経路を強化可能である乳酸を本研究での生産ターゲットとして選定した。

(2). 鉄酸化細菌の遺伝子組換え

鉄酸化細菌の乳酸生産能を強化するために、乳酸菌 *Lactococcus lactis* の乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase 遺伝子 (*ldh*) を鉄酸化細菌に導入することを試みた。まず、乳酸菌由来 *ldh* の遺伝子配列を鉄酸化細菌内での活性発現に適するようにコドン使用頻度および GC 含量を最適化した。アミノ酸配列は変更せずに、912 bp のうち 245 bp を改変した結果、Codon adaptation index は 0.5 から 0.93 に向し、GC 含量は 36.11% から 56.54% に上昇した。最適化された *AF-ldh* 遺伝子を pMAL-c4x に一度クローニングし、得られたプラスミドから pMAL-c4x の P_{tac} terminator を含む形で *AF-ldh* を増幅し、広宿主域ベクター pJRD215 の NotI/SpeI サイトにクローニングした (pJRD215_*AF-ldh*)。次に pJRD215_*AF-ldh* で大腸菌 S17-1 株を形質転換し (*E. coli* pJRD215_*AF-ldh*)、*E. coli* pJRD215_*AF-ldh* と鉄酸化細菌を混合し、接合伝達により大腸菌を介して鉄酸化細菌へ pJRD215_*AF-ldh* を導入することで遺伝子組換え株を得た (図 2)。

メンブレン上での接合 Km^r 鉄酸化細菌

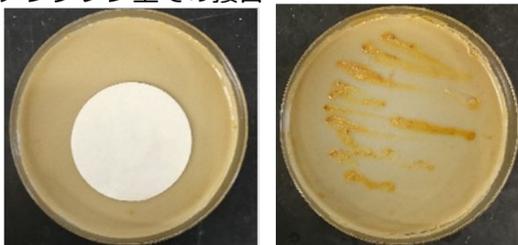


図 2、鉄酸化細菌の遺伝子組換え

得られた Km^r 鉄酸化細菌を対象として、*AF-ldh* の導入を PCR、細胞内での発現を SDS-PAGE により確認した (図 3)。確認が得られた株を遺伝子組換え株として、電気培養試験に使用した。

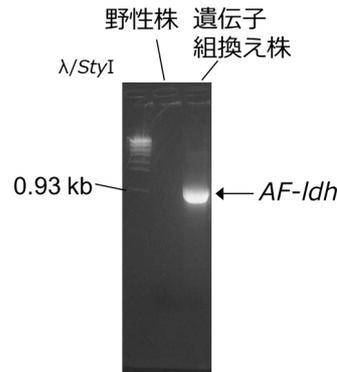


図 3、PCR 法による *AF-ldh* 導入の確認

(3). 遺伝子組み換え株の電気培養

遺伝子組換え鉄酸化細菌を対象として、図 1 に示す電気培養槽を用いた電気培養試験を実施した。電気培養試験区では培養開始から 2 日後に還元電位 0 V を印加し、7 日目まで培養を行った。電位印加開始直後から還元電流は増加し、最大で -18 mA/reactor となり、電極から細胞に電子が供給されていることが確認された。一方、対照区として 7 日間電位を印加せず鉄酸化細菌の培養を行い、電気培養試験区と増殖および乳酸生産量を比較した。対照区では、培養 4 日目以降ほぼ菌体増殖が停止したのに対して、電気培養試験区では増殖が継続し、7 日目の菌体密度は対照区の約 4.3 倍となった (図 4)。また、対照区では培養液中においてほぼ乳酸の蓄積が見られなかったのに対して、電気培養試験区では電流値の増加に伴って、乳酸の蓄積量の増加が見られ、最終的な培養液中の乳酸密度は約 0.6 mM に到達した (図 5)。以上より、組換え鉄酸化細菌を用いることで、光合成等による二酸化炭素変換技術とは異なる電気駆動型の二酸化炭素変換技術のコンセプトを立証することができた。

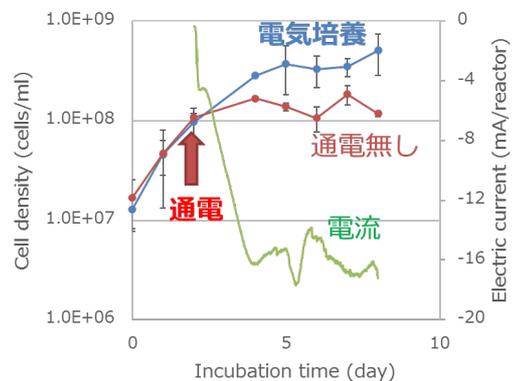


図 4、通電/非通電条件における鉄酸化細菌の増殖および電流値の変化

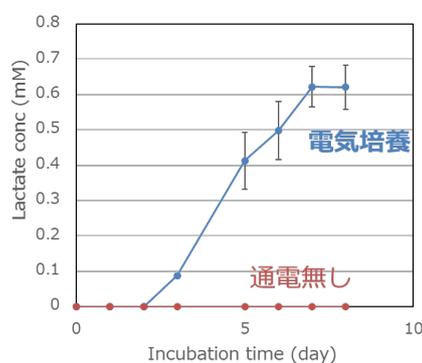


図5、通電/非通電条件における鉄酸化細菌の増殖および電流値の変化

最後に電気培養試験において、投入した還元力としての電子が乳酸生産にどの程度利用されたか、その電子収率を算出した。電位印加後に検出された電流値から算出された電子量は 60 mmol-electron であったのに対して、培養終了時まで生産された乳酸は 72 μmol であった。1mol の CO_2 固定に必要な還元力は 22.4 mol-electron という既報の数値を元に、電子の乳酸としての収率を算出したところ、乳酸生産に利用された電子は細胞に供給された 60 mmol-electron のうち 8.5%であった(図6)。残りの電子は細胞増殖やその他の代謝産物の生産に使用されていると推定され、今後高効率化のためには大幅な代謝変化が必要と考えられる。

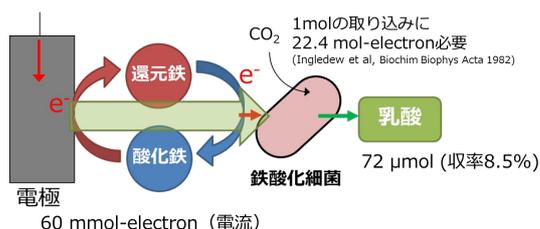


図6、電気駆動型二酸化炭素変換プロセスのコンセプトと本研究で得られた電子収率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masaki Y, Hirano S, Okibe N,
Microbial Community Structure
Analysis of Blood Pond Hell Hot Spring
in Japan and Search for
Metal-Reducing Microbes
Advanced Materials Research, 1130,
45-49

〔学会発表〕(計 4 件)

平野伸一、長岡亨、松本伯夫、「電気を還元力とした鉄酸化細菌による二酸化炭素からの有用物質生産」農芸化学会 2017 年度大会

平野伸一、長岡亨、松本伯夫「電気化学的な微生物代謝制御と二酸化炭素の資源化」産学官学術交流フォーラム、技術交

流会

Matsumoto N, Hirano S, 「Improvement of metabolic processes for biofuel production by cathodic electron supply」 The 3rd AP-ISMET 2016

石井正治、Huu Tri Nguyen、平野伸一、新井博之

Studies on the carbon and energy metabolism of the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermoluteolus* TH-1
第 67 回生物工学会大会

〔その他〕

平野伸一、長岡亨、松本伯夫、「電気を還元力とした鉄酸化細菌による二酸化炭素からの有用物質生産」農芸化学会 2017 年度大会 トピックス賞

Matsumoto N, The 3rd AP-ISMET 2016
Best Poster Presentation Award

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 伯夫 (MATSUMOTO, Norio)

(一財)電力中央研究所・環境科学研究所・
上席研究員

研究者番号：40371512

(2)研究分担者

平野 伸一 (HIRANO, Shin-ichi)

(一財)電力中央研究所・環境科学研究所・
主任研究員

研究者番号：20392748