

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651070

研究課題名(和文)一酸化炭素資化微生物の分離と炭素再利用

研究課題名(英文)Exploration of carbon monoxide utilizing microorganisms towards carbon recycling.

研究代表者

左子 芳彦 (Sako, Yoshihiko)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60153970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)の再利用を目指し、一酸化炭素(CO)とCO<sub>2</sub>との酸化還元両反応を触媒可能なCOデヒドロゲナーゼを有するCO資化性微生物を海洋熱水環境や温泉から分離し、その生態学的分布を明らかにすることを目的とした。鹿児島県海底カルデラより、酸化鉄や硫黄化合物など多様な電子受容体と共役したCO酸化により水素を生成する新属細菌を分離した。熱水環境において細菌群集の約10%を占める主要な環境微生物であることを示した。

研究成果の概要(英文)：To construct a platform towards next-generation technology for recycling of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), we explored novel hyperthermophilic microorganisms possessing carbon monoxide dehydrogenases (CODHs) that can catalyze both CO oxidation and CO<sub>2</sub> reduction (carboxydrotrophic bacteria). We isolated a novel carboxydrotrophic hydrogenogenic bacterium strain KKC1 from a marine sediment core sample. This bacterium grew chemolithotrophically producing H<sub>2</sub> from CO oxidation with reduction of oxidized iron or sulfides. We also showed that carboxydrotrophic bacteria may be dominate in hot environments.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 ・ 環境技術・環境材料

キーワード：熱水環境 水素 一酸化炭素 一酸化炭素資化性菌 好熱菌 COデヒドロゲナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)は炭素の不完全燃焼により生じる無味、無臭、無色の可燃性有毒ガスで、極めて強い還元性を有している。そのためCOは、ニッケル等常磁性金属の精製や還元作用の強い水素ガスと触媒中で反応させ、メタン、メタノール等C1以上の有機化合物を合成するC1化合物工業分野において極めて重要な物質の1つである。石油資源の枯渇が危惧される将来、C1化合物の供給が問題となるが、その初発物質となるCOを石油やコークス等から生産しているため真の持続可能な物質生産とはなりえない。そこでCO<sub>2</sub>の直接還元によりCOを生産する新手法が模索されているが、触媒金属と錯体を形成しやすい性質により無機触媒化学的なアプローチではその生産が困難である。そこで、CO<sub>2</sub> + 2e<sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> → CO + H<sub>2</sub>Oの反応を自然界で行なうCarbon monoxide dehydrogenase (CODH)が新規触媒として注目されている。本酵素はメタン菌をはじめとする絶対嫌気性菌から見出されているが、培養困難種で本酵素は酸素暴露で直ちに失活し大量発現系も確立されていない。そのため細胞収量が高い微生物の分離と酸素耐性が強く高比活性を有するCODHが求められている。

### 2. 研究の目的

人類の増加とその産業活動等により急速な地球温暖化が深刻な問題となっているが、その原因物質であるCO<sub>2</sub>の再利用を目指し、CO/CO<sub>2</sub>の酸化還元両反応を触媒可能な酵素CODH(CO dehydrogenase)を有する一酸化炭素資化性微生物を海洋熱水環境から分離し、本酵素を利用することによりCO<sub>2</sub>からメタン、メタノール等C1化学物質の初発物質であるCOを生産し持続的低炭素社会の基盤を創生する。

具体的な全体構想としては、化石燃料から生じる地球温暖化ガスであるCO<sub>2</sub>を再利用するため、CO等を含む火山性ガス成分の多い海洋熱水環境から高いCODH活性を有するCO資化性微生物を分離する。次に本種由来CODH遺伝子の発現系を確立し、CO<sub>2</sub>からメタン、メタノール等炭素数1の有機化合物合成の初発物質であるCOを本酵素の触媒反応により生産し、石炭、石油に代わり得るCO<sub>2</sub>からのC1化合物やポリマーの生産基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

(1)サンプリング候補地の検証と環境測定  
利用価値の高い高酸素耐性で好熱性CO資化性微生物の生息域として、高温で高濃度COが存在する火山性海洋熱水環境に生息するCO資化微生物には耐塩性も期待できる。本研究では、鹿児島県指宿市山川の沿岸熱水孔、周辺の火山性温泉である鰻温泉、長崎県雲仙温泉および静岡県伊豆半島に位置する6か所の温泉源泉を代表的な試料採取地とした。ま

た、鹿児島県薩摩硫黄島近海の海底カルデラ(鬼界カルデラ)内より採取された堆積物のコアサンプルを入手したのでCO資化性微生物の探索試料とした。各地の火山性熱水環境の温度、pH、CO濃度および酸素濃度を測定し、CO資化菌の分布状況を調査した。

### (2) 微好気性好熱性CO資化性微生物の探索と分離

熱水環境試料からの微好気性好熱性CO資化微生物の分離培養を行った。炭素源を含まず鉄や硫黄化合物を電子受容体とする数種類の培地を準備し、気相のCO濃度を100%としてプチルゴム栓付き試験管を用いて集積培養を行った。細菌の増殖が確認された試験管より培養液を採取し、限界希釈法を繰り返すことによって純粋培養株を得た(図1)。

また、現場熱水環境試料の一部はDNAクローン解析に供し、16S rDNAと既知CODH遺伝子を対象としたPCR法による遺伝子の検出を行った。得られた結果から、サンプリング地点に分布するCO資化性微生物とその系統学的近縁種を推定した。

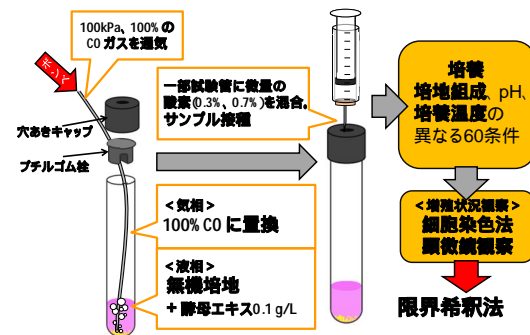


図1 培養方法

### (3) 分離株の性状解析

分離株の生理学的性状は、気相中CO濃度の測定をガスクロマトグラフィーを用いて分析し、細胞密度をはじめCO資化能と水素生産量を測定して調べた。CO資化性分離株については、分子系統解析と詳細な分類学的性状および生理学的性状の解析を行った。次に、培養細胞を遠心分離した後集菌して嫌気下にて菌体を破碎し、nativePAGEを行って活性染色法によりCODH活性を測定し、本酵素活性の有無を調べる。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規CO資化性菌の分離と性状

鹿児島県薩摩硫黄島近海の海底カルデラ(鬼界カルデラ)内より採取された堆積物のコアサンプルTKR04(2.46 m)を用いた。TKR04コアの中央部の堆積物を無機人工海水培地ASW(pH 7.5)の入った試験管に接種し、気相を100%COに置換した。還元剤として硫化ナトリウム水溶液を加えて培地を嫌気条件

にした後、種々の温度と pH 条件下で集積培養を行った。

その結果、65 °C の培養条件下で H<sub>2</sub> 生成を伴った CO 消費と、桿菌の増殖が見られた。この集積培養をチオ硫酸添加 ASW 培地を用いて嫌気チャンバー内で限界希釈法に供し、水素と硫化水素を生成する KKC1 株の分離に成功した。

KKC1 株の 16S rRNA 遺伝子配列について ML 系統解析を行った。KKC1 株は、最近縁な *Moorella* 属細菌との相同性は 89 - 91% と低く、分子系統学的に新規性の高い株であることが分かった。KKC1 株は 1.0 - 3.0 μm の桿菌であり、孢子形成能を有していた。最適増殖条件は 65 °C、pH 7.5、塩濃度 2.4% (w/v) であった。*Moorella* 属細菌は土壌や温泉などから分離されており、海洋環境由来の株は報告されておらず、増殖塩濃度は 2% w/v 以下である。一方、KKC1 株は 14% w/v (最適 2.4% w/v) と高い塩濃度条件下でも増殖できた。*Moorella* 属細菌が有機物発酵により増殖できるのに対して、KKC1 株は有機物を資化するのに電子受容体が必要とした。また、KKC1 株は、酸化鉄(III)、チオ硫酸、亜硫酸、フマル酸など多様な電子受容体を用いて CO を資化することができ、特に水素生成 CO 資化性好熱細菌において亜硫酸還元と共役した CO 酸化は初めての報告である。KKC1 株は分子系統学的かつ生理学的に新規な微生物であったため、KKC1 株を標準株とした新属新種細菌 *Calderihabitans maritimus* を提唱した(図 2)。

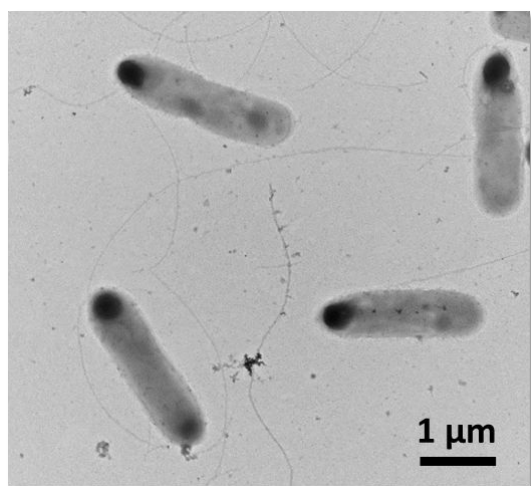


図 2 . KKC1 株のネガティブ染色像

既知の海洋性の水素生成 CO 資化性好熱細菌や古細菌には、KKC1 株のように鉄をはじめとする様々な電子受容体を用いた CO 代謝系は報告されていない。本研究により、海洋環境においても、CO を基質とした多様な微生物代謝系が存在する可能性が示された。

静岡県伊豆半島に位置する 6 か所の温泉源泉を中心に CO 資化菌の探索を試みた。その結果、慈雲寺地区試料より 9 つの CO 資化集積培養系を得た。これらに対して 16S rRNA ク

ローン解析を行ったところ、国外において分離事例のある CO 資化性菌 *Carboxydocella* と *Thermolithobacter* の近縁配列を得た。また、CO 資化性能の知られていない菌に近縁な配列も得られ、本地点の細菌群集は多様な CO 資化細菌から構成されているものと推察された。

一方、雲仙温泉試料や山川温泉試料からは明確に CO 資化を示す集積培養を得ることはできなかった。

## (2) 環境における CO 資化性菌の定量的検出

(1) で示した通り、これまで分離事例のない海底堆積物中より水素生成 CO 資化性好熱菌の分離に成功した。また、伊豆半島から国内では初発となる複数の CO 資化菌を含む集積培養を得た。また、当研究室での以前の研究により、鹿児島県の酸性高温温泉である鰻温泉からも水素生成 CO 資化性好熱菌を分離することに成功しており、本微生物が多様な環境に幅広く分布する可能性を示してきた。そこで、CO 資化性菌の生態とその環境における役割を明らかにすることを目的とし、鰻温泉において *Carboxydotherrmus* 属細菌の分布を定量的に明らかにした。

*Carboxydotherrmus* 属細菌として当研究室で分離した *C. pertinax* に加え、現在 *C. hydrogenoformans*、*C. ferrireducens*、*C. siderophilus* および *C. islandicus* の 4 種が発見されており、*C. ferrireducens* を除いた 4 種は CO 代謝産物として H<sub>2</sub> を生成する。そこで、*Carboxydotherrmus* 属細菌の CODH の一つである CODH-II 遺伝子 (*cooS-II*) を標的とした qPCR 法を開発した。*Carboxydotherrmus* 属細菌は嫌気性好熱菌であるため、温度依存的に分布し、嫌気度の高い環境に多く分布すると考えられたため、鰻温泉より温度の異なる 3 地点(低温、中温、高温)から堆積物を採取し、表層からの 1.5 cm 毎に区切った 3 つの層準を試料画分とした。これらの試料から環境 DNA を抽出し、*cooS-II* および細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数を qPCR 法により定量した。

まず、温泉環境からの効率的な DNA 抽出法を検討したところ、市販の土壌 DNA 抽出キット(ニッポンジーン社製)を用いると、得られる DNA の精製度と回収率ともに高く PCR の阻害も認められなかった。

本手法により得た DNA を qPCR 法に供したところ、中温の 0 - 1.5 cm 層準で *cooS-II* コピー数が  $9.45 \times 10^5$  copies/g sediment と最も大きく、細菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数 ( $8.72 \times 10^6$  copies/g sediment) の 10.8% に相当した。同様に、中温の 1.5 - 3.0 cm 層準でも *cooS-II* と細菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数の比が 4.17% と高い値が得られた。qPCR 産物の配列を解読したところ *C. pertinax* の *cooS-II* 部分配列と 99 - 100% 一致した。中温サンプルで *cooS-II* コピー数が最大となったのは、温度が *C. pertinax* の増殖可能な

範囲にあるためだと考えられた。また、嫌気的かつ温度条件が適していた下層よりも表層に多く *cooS-11* が検出されたため、*Carboxydotherrmus* 属細菌には温度や酸化還元電位の他にも分布に影響を与える環境要因（有機物濃度、栄養条件、共生菌の存在など）があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

##### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoneda, Y., Yoshida, T., Daifuku, T., Kitamura, T., Inoue, T., Kano, S. and Sako, Y. 2013. Quantitative detection of carboxydotrophic bacteria *Carboxydotherrmus* in a hot aquatic environment. *Fundam. Appl. Limnol.*, 182, 161-170.  
DOI: 10.1127/1863-9135/2013/0374 査読有

##### 〔学会発表〕(計 8 件)

井上喬裕・吉田天土・和田啓・大福高史・米田恭子・福山恵一・左子芳彦. CO 資化性好熱菌 *Carboxydotherrmus* spp. 由来 CODH V の性状とその機能. 第 27 回日本微生物生態学会大会, 京都大学, 京都府京都市, 2011 年 10 月 8 日 ~ 10 月 10 日.

米田恭子・吉田天土・北村崇行・大福高史・井上喬裕・川市智史・左子芳彦. 熱水環境における一酸化炭素資化性好熱菌の定量的検出. 第 27 回日本微生物生態学会大会, 京都大学, 京都府京都市, 2011 年 10 月 8 日 ~ 10 月 10 日.

Yoneda, Y., Yoshida, T., Imada, C., Yasuda, H. and Sako, Y. A novel carboxydotrophic thermophilic bacterium isolated from a marine sediment core. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 13S2-2, 高知市文化プラザかるぽーと, 高知県高知市, 2012 年 7 月 13 日 ~ 16 日.

Yoneda, Y., Yoshida, T., Kawaiichi, S., Daifuku, T., Kitamura, T., Inoue, T., Kano, S., Takabe, K. and Sako, Y. Characterization of H<sub>2</sub>-producing CO-oxidizing bacterium *Carboxydotherrmus pertinax* from an acidic hot spring in Japan. 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. Microbial Life in Extreme Environments 174A. Copenhagen, Denmark. 2012 年 8 月 19 日 ~ 24 日.

米田恭子・吉田天土・安田尚登・今田千秋・左子芳彦. 海底コア由来の新規海洋性一酸化炭素資化性好熱菌の分離と性状解析. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学, 三重県津市, 2013 年 9 月 19-22 日

米田恭子・吉田天土・川市智史・大福高史・北村崇行・井上喬裕・鹿野早苗・高部圭司・安田尚登・今田千秋・左子芳彦. 一酸化炭素を資化する好熱菌の分離と性状解析. 微生物科学研究の多様性と新展開シンポジウム, 京都大学, 京都府京都市, 2013 年 11 月 8 日.

鹿野早苗・米田恭子・吉田天土・北村崇行・大福高史・井上喬裕・福山宥斗・高尾郷介・左子芳彦. 熱水環境中の一酸化炭素資化性好熱 *Carboxydotherrmus* の分子生態学的研究. 第 29 回微生物生態学会大会, 鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市 2013 年 11 月 23-25 日.

福山宥斗・米田恭子・高尾郷介・大福高史・井上喬裕・吉田天土・左子芳彦. 一酸化炭素資化性好熱菌 *Carboxydotherrmus pertinax* の CO 代謝. 第 29 回微生物生態学会大会, 鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市 2013 年 11 月 23-25 日.

##### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbiology.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

左子 芳彦 (SAKO, Yoshihiko)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号: 60153970

##### (2) 研究分担者

吉田 天土 (YOSHIDA, Takashi)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 80305490