

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871209

研究課題名(和文)電気化学的なアルコール発酵の制御とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)Study about electrochemical regulation of alcohol fermentation

研究代表者

平野 伸一 (Hirano, Shin-ichi)

一般財団法人電力中央研究所・その他部局等・その他

研究者番号：20392748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、Clostridium acetobutylicumへ電極から電子を供給する(電気培養)によりブタノール生産量を顕著に向上することに成功している。そのメカニズム解明を目指し、本研究では通電時と非通電時での比較トランスクリプトーム解析を実施した。10分間の通電によって転写量が増減した472遺伝子の情報から、通電により遺伝子発現をON/OFFする制御機構およびブタノール増産メカニズムが推定された。また、ブタノールによる発酵阻害を回避するため、有機溶媒を培養液に重層した二相式電気培養法を考案し、既存の一相式電気培養よりブタノールの生産量を約5倍向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To date, we revealed supplying electrons from the electrode to Clostridium acetobutylicum by electrochemical cultivation significantly improved butanol productivity. In this study, transcriptome of C. acetobutylicum in cultivating experiment with electrolysis and that without electrolysis were compared to clarify the mechanism of increasing butanol production. Transcriptional levels of 472 genes (309 genes were increased, 163 genes were decreased) were changed among 10 min electrolysis. Based on these results, mechanisms for turning ON/OFF the gene expression and for increasing butanol production in C. acetobutylicum were estimated. Moreover, in order to avoid inhibiting effect on fermentation by butanol, the organic solvent (oleyl alcohol) was overlaid on culture medium in electrochemical cultivation system (two-phase). Two-phase electrochemical cultivation system improved about 5 times production of butanol by C. acetobutylicum from one-phase electrochemical cultivation system.

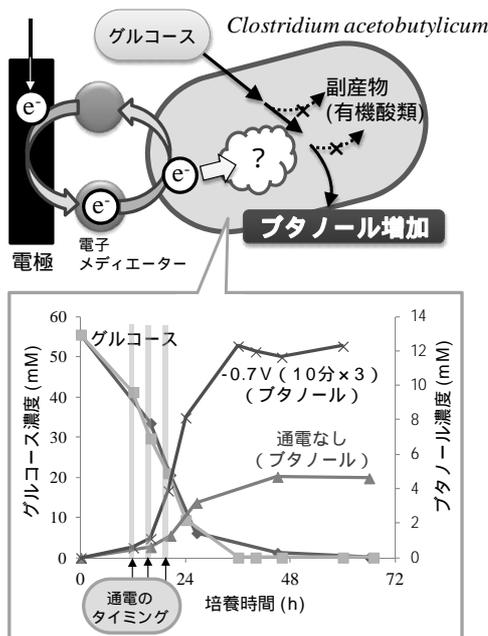
研究分野：応用微生物学

キーワード：アルコール発酵 電気培養 還元力 Clostridium ブタノール エタノール トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

Clostridium acetobutylicum の発酵によって糖類から生産されるブタノールは次世代燃料として注目されているが、糖類から得られる炭素および還元力は細胞構成成分の合成や種々の代謝産物の生産に分散されるため、その生成に多くの還元力を必要とするブタノールの生産性は低い。これまでに研究代表者らは細胞外に設置した電極と微生物間で電気化学的に電子授受を行うことで微生物の生育および代謝を制御する「電気培養法」を開発している(文献1)。

研究代表者らは電気培養法を *C. acetobutylicum* のブタノール発酵に適用した結果、培養期間中にごく短時間(10分間×3回)通電し、細胞外から還元力(電子)を供給することで、ブタノールの生産量を約3倍向上できることを明らかにしている(図1、特願2012-194316)。この増産量は、電流として供給された還元力が全量ブタノールに使用されたと仮定して算出される理論上のブタノール増産量よりも約10倍大きく、単純な還元力の追加効果ではこの増産量は説明できない。通電により大規模な代謝変動が生じていることが推定されるが、そのメカニズムは不明である。また、この手法の他の培養方法との融合可能性、他の微生物種への適用可能性といった波及効果についても未知であった。



電子を電極から電子メディエーターを介して細胞に断続的に供給(3時間おき、10分×3)することでブタノール生産量が増加。しかし、その増産メカニズムは不明。

図1、通電によるブタノール増産の効果

2. 研究の目的

本研究では、電気培養によるアルコール生産促進のメカニズム解明と、本手法の有用性を検証するために3つの目的を設定した。

(1) 通電/非通電時の比較トランスクリプトーム・メタボローム解析による電気化学的な代謝制御メカニズムの解明

(2) 更なるアルコール生産性向上を目指した電気培養法と工学的な手法との融合

(3) *C. acetobutylicum* 以外のアルコール発酵微生物に対する電気化学的な代謝制御手法の適用可能性の検証

3. 研究の方法

(1) 電気培養槽に定常期と同程度の高菌体密度で充填した状態で *C. acetobutylicum* ATCC824 の培養を開始し、23時間後に、作用電極に-0.7 V (Ag/AgCl)の電位を10分間、印加することで、電極から電子メディエーター(メチルピオロゲン)を介して電子を *C. acetobutylicum* に供給する。10分間の通電期間中に、培養細胞を回収し、total RNAをPCI法により抽出、精製した(通電サンプル)。対照として、電位を印加せず同じ培養時間を経た細胞を回収し、total RNAを調整した(非通電サンプル)。精製したRNAを用いて、*C. acetobutylicum* のゲノム情報を基にデザインしたカスタムアレイを対象に、SureScan (Agilent社)によるマイクロアレイ解析を実施した。得られたデータをGeneSpring GX ver 12.5にて比較解析を実施した。メタボローム解析は、*C. acetobutylicum* の培養開始、23時間後から3時間おきに-0.7 V (Ag/AgCl)の電位を作用極に10分間印加しながら、培養を行い、グルコース(炭素源、初期濃度55.5 mM)が減少し、10 mMに到達したタイミングで培養液を採取し、菌体内代謝産物を抽出後、Agilent CE-MSに供した。

(2) 培養液中に蓄積する高濃度ブタノールは *C. acetobutylicum* の発酵を阻害する。その阻害効果を回避し、通電による更なるブタノール生産性向上を達成するために、有機溶媒抽出法と電気培養法の融合を試みた(2相式電気培養)。有機溶媒としてはオレイルアルコールを選定し、基質として555 mMのグルコースおよび電子メディエーターとして2 mMのメチルピオロゲン(MV)を含むTYA培地200 mlにオレイルアルコール40 mlを重ねた状態で電気培養を実施した。通電条件としては、10分×3回/日、作用極に-0.7 Vを印加することとした。対照として、従来の1相式非通電培養(メチルピオロゲン有り/無し)、1相式電気培養、2相式培養で通電しない培養系を設定した。

(3) *C. acetobutylicum* 以外のアルコール発酵微生物として、研究代表者らが単離したグリセロールを炭素源としてエタノールに変換する新規微生物 *Paenibacillus macerans* NS-1株を対象として電気培養法を実施した。電気培養の条件としては、基質: グリセロール(5g/L)、電子メディエーター: アントラキノン2,6-ジスルホン酸(AQDS) 2mM、印加電位: +0.6 V, -0.6 Vとした。培養過程における増殖および代謝産物の推移を通電、非通

電時で比較、評価した。

4. 研究成果

(1) 通電/非通電時の比較トランスクリプトーム・メタボローム解析による電気化学的な代謝制御メカニズムの解明

C. acetobutylicum のゲノム情報を基にデザインしたマイクロアレイを用いて、トランスクリプトーム解析を行ったところ、全遺伝子 3848 個 (chromosome, pSOL) の中で通電時に有意に転写量が増加している遺伝子が 309 個、減少している遺伝子が 163 個見出された。転写量が増加した遺伝子カテゴリーとしては、炭水素類の代謝 (アルコール発酵に関わる一連の遺伝子など)、エネルギー代謝 (フェレドキシンなど)、無機化合物の輸送 (鉄、硫酸イオン、窒素化合物輸送など) が挙げられた。一方で、転写量が減少した遺伝子カテゴリーとしては、脂質輸送・代謝、細胞膜・壁の生合成、二次代謝産物の生産 (テトラヒドロプテリン、モリブドプテリンなど) が挙げられた。これらの傾向から、通電によって *C. acetobutylicum* の細胞は自己の細胞構成成分の合成を抑え、アルコール生産に適した代謝へと切り替わっていることが推定された。さらに、転写量の増加した遺伝子の多くは既報の 3 つの転写制御システム (鉄濃度依存、酸化還元電位依存、ブタノールストレス応答) の制御下にあることが示された。

、低鉄濃度による転写誘導システム (Fur) : Fe(II), Fe(III) の取り込みタンパク質の生産、鉄を必要としない電子キャリアー Flabodoxin の生産、Flabodoxin の活性に必要な Riboflavin の生合成

中央代謝系の反応を担う酸化還元酵素の活性化

、細胞内酸化還元環境に応答する転写制御システム (Rex (NADH/NAD⁺ redox responsive repressor)) : solvent genic shift に関与が報告されている酵素 (*adhE1*, *ctfAB*, *thIA*) の生産 アルコール生産の活性化

、ブタノールストレス応答システム : 分枝アミノ酸による細胞膜の強化、糖輸送、ペントースリン酸経路の強化

ブタノール耐性の向上

これらの転写制御システムの応用を通じて、通電によってブタノール生産促進に向けた細胞内変化が引き起こされていることが推定された。通電による直接的な作用として、酸化還元電位依存的な転写活性化は容易に理解可能であるが、10 分間という短い通電によって培養液中の鉄濃度、ブタノール濃度の大きな変動は生じないため、通電と、の制御システムを繋ぐ制御システムの存在が示唆される。

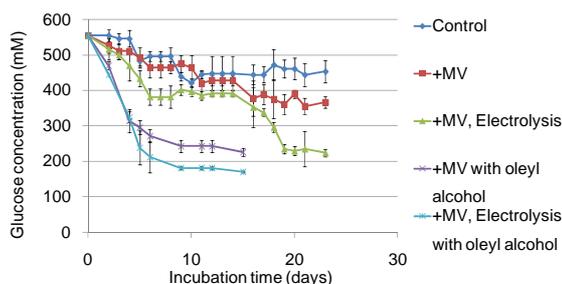
一方、メタボローム解析の結果からは、通電により細胞内代謝産物のパターンは大きく変化し、多くの代謝産物の蓄積が抑制される傾向が得られた。蓄積が抑制された代謝産物としては細胞構成成分であるアミノ酸や

核酸類が挙げられる一方で、タンパク質の分解産物であるプトレシンやイノシン、核酸の骨格成分である小分子のカルバモイルアスパラギン酸、ヒポキサンチンが増加していた。これらの結果より、細胞構成成分の合成を抑制、もしくは細胞構成成分を分解することで、炭素・還元力を節約し、ブタノール生産に集中している変化が通電によって生じていることが示唆された。

転写・代謝産物解析の結果より、詳細な機構は不明であるが、通電によって上記の 3 つの遺伝子転写制御系が活性化される機構が存在し、それによってブタノール生産酵素の量・活性の増強、ブタノールに対する耐性向上、ブタノール生産に関与しない細胞構成成分や 2 次代謝産物等の副産物の生産抑制が引き起こされた結果、ブタノール増産が起こるメカニズムが推定された。

(2) 更なるアルコール生産性向上を目指した電気培養法と工学的な手法との融合

高濃度グルコース 555 mM を基質とした *C. acetobutylicum* の培養を、電子メディエーター (MV) の添加無し、. . . 1 相式培養システム (通電・非通電)、. . . 2 相式システム (通電・非通電) の 5 条件で実施した。これまでの結果と同様に、MV の添加によりグルコースの消費量およびブタノール生産量は向上し、さらに 1 相式培養システムにおける通電によってそれらは促進された (図 2)。一方、オレイルアルコールを重層した 2 相式培養法 (非通電) の採用により、1 相式 (非通電) と比較してグルコースの消費速度が顕著に向上 (約 1.7 倍) し、その分解量



は約 3 倍増加し、その結果、ブタノール生産量は約 2 倍向上した。

図 2、オレイルアルコールの重層・通電がグルコース消費に及ぼす影響

2 相式培養システムにおいて、還元電位を印加することにより、代謝がブタノール生産が集中した結果、ブタノール生産量はさらに約 2.5 倍向上した (図 3)。2 相式電気培養法の適用により通常の培養法と比べ、顕著にブタノール生産性が向上し、そのブタノール生産量は通常の培養法では発酵阻害が生じるブタノール濃度 250mM を超える 325mM (培養液中のブタノール + オレイルアルコールによって抽出されたブタノール) に至った。

通電によって消費された電気エネルギー（投入エネルギー）に対するブタノール増産量に由来するエネルギー増加量の比（エネルギー効率）は3.7であり、本手法はエネルギー生産手法として有効であることが示された。

以上、電気培養法と有機溶媒抽出法を融合することで、ブタノールの毒性を回避しながら、通電によるブタノール増産効果を最大限得ることができる手法に目途を得た。

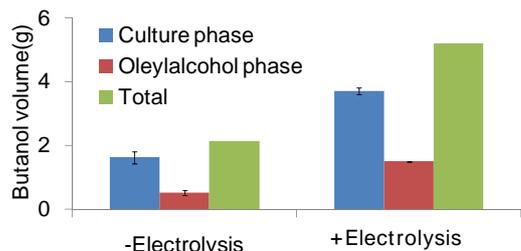


図3、2相式培養システムにおけるブタノール生産量（通電/非通電）

(3) *C. acetobutylicum* 以外のアルコール発酵微生物に対する電気化学的な代謝制御手法の適用可能性の検証

C. acetobutylicum 以外のアルコール発酵微生物に対する電気培養法の有用性を検討するために、エタノール発酵微生物である *P. macerans* NS-1 株の電気培養をグリセロールを基質として実施した（還元電位 $-0.6V$ ）。対照として、非通電培養、酸化電位（ $+0.6V$ ）を印加した培養条件を設定し、NS-1 株の増殖およびグリセロール分解、エタノール、 CO_2/H_2 生産をそれぞれ比較した。NS-1 株はグリセロールの代謝産物としてエタノール、 CO_2 、 H_2 を生産し、その他の副産物は蓄積しない。電気培養の結果、還元電位印加時には増殖速度、最終菌体密度が非通電時と比較して約2倍向上したのに対して、酸化電位を印加した場合には増殖が抑制され、最終到達菌体密度は非通電時の約半分にとどまった。また、通電時のグリセロールからのエタノールの生産は増殖と同様の傾向を示し、グリセロール分解・エタノール生産量ともに還元電位印加時に非通電時の約2倍向上し、酸化電位印加時に約1/2に抑制された（図4）。

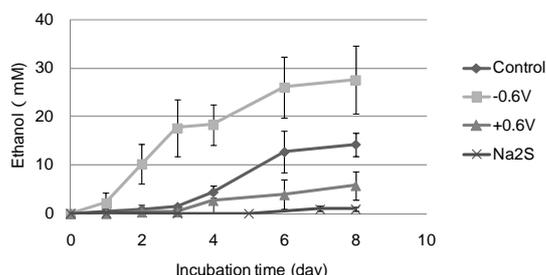


図4、還元電位、酸化電位の印加がNS-1株のエタノール生産に及ぼす効果

還元電位印加時のエネルギー効率は10.8と算出され、電気培養法の適用により投入した電気エネルギーに比べ、顕著に多いエネルギー（エタノール）増産効果が得られたことが示された。

さらに、本手法をBDF（Bio-diesel fuel）生産過程で発生するグリセロール含有アルカリ性廃液の有効活用へと応用することを検討した。食用油からBDFを合成する際に発生した実廃液を1%濃度で基質として無機塩培地に添加し、NS-1株の培養を行ったところ、グリセロール分解は阻害され、全くエタノール生産は確認されなかった。一方、還元電位（ $-0.6V$ ）を印加しながら電気培養を実施したところ、初期濃度約40 mMのグリセロールがNS-1株によって2週間で完全に分解され、約50 mMのエタノールへと変換された。還元電位の印加によりNS-1株の代謝が活性化された結果、BDF廃液を基質とした場合でも効率的なエタノール生産が可能であることが示された。この結果は、*C. acetobutylicum* だけでなく、本手法の適用により、同様の代謝経路を有するアルコール発酵微生物の代謝を通電により制御し、アルコールの生産性を向上できるという手法の波及効果を示すものである。

以上、本研究によって、通電によってブタノール生産が向上するメカニズムの一部を明らかにすると共に、本代謝制御手法の波及効果について示すことができた。今後は部分的に明らかになった通電依存的な転写制御因子の情報を基に更なるメカニズムの解明を進めると共に、汎用的微生物代謝制御技術として電気培養法を発展させていく予定である。

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)

(1). 有機性廃棄物のメタン発酵：電気化学的手法による高負荷運転時の反応安定化
平野伸一, (2014) バイオサイエンスとインダストリー 72 (6), 488-489

〔学会発表〕(計 6 件)

(1). *Clostridium acetobutylicum* の二相式電気培養によるブタノール生産性の向上

平野伸一、松本伯夫、大村直也
日本生物工学会 2013 年大会

(2). 電気培養法によるグリセロール変換微生物 *Paenibacillus macerans* NS-1 株の代謝促進

椎葉千慧、平野伸一、松本伯夫、大村直也、安藤昭一

千葉大学大学院 園芸学研究科、千葉大、電力中央研究所 応用生物学領域

日本生物工学会 2013 年大会

(3). 電気培養によるグリセロール廃液から

のエタノール生産の促進

椎葉千慧、平野伸一、松本伯夫、大村直也、
安藤昭一

日本農芸化学会 2014 年大会

(4). 電気培養法による微生物の代謝制御

松本伯夫、平野伸一

日本農芸化学会 2014 年大会シンポジウム
「電子の流れを基に、紐解く・利用する微生物代謝 (4SY25)」

(5). 電気培養による *Clostridium acetobutylicum* のブタノール増産とそのメカニズム

平野伸一、松本伯夫、大村直也

日本生物工学会 2014 年大会

(6). 電子の流れを切り口とした発酵制御と微生物腐食研究

平野伸一、長岡亨、松本伯夫

日本農芸化学会 2015 年大会シンポジウム
「微生物と電子と金属の複雑な関係を解き明かす微生物腐食研究の最前線 (4SY08)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：微生物を利用したブタノール生産方法

発明者：平野 伸一、松本 伯夫

権利者：平野 伸一

種類：特許

番号：特願 2014-025671

出願年月日：2014 年 2 月 13 日

国内外の別：国内

名称：パエニバチルス(Paenibacillus)属細菌

菌のグリセロール代謝促進方法

発明者：平野 伸一、松本 伯夫

権利者：平野 伸一

種類：特許

番号：特願 2014-031328

出願年月日：2014 年 2 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://recruit.denken.jp/jobfile/filer05/>

タイトック(株)電気培養装置

[電気培養システム]

http://taitec.net/products/products-detail.php?machine_name=%E9%9B%BB%E6%B0%97%E5%9F%B9%E9%A4%8A%E3%82%B7%E3%82%B9%E3%83%86%E3%83%A0

[電気培養アレイシステム]

http://taitec.net/products/products-detail.php?machine_name=%E9%9B%BB%E6%B0%97%E5%9F%B9%E9%A4%8A%E3%82%A2%E3%83%AC%E3%82%A4%E3%82%B7%E3%82%B9%E3%83%86%E3%83%A0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 伸一 (Hirano, Shin-ichi)

(一財)電力中央研究所

研究者番号：

20392748

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし