

研究成果報告書

研 究 題 目		電気駆動による CO ₂ 固定型汎用プラスチック原料 生産微生物触媒の開発	実 施 年 度
			2012年度
代 表 研 究 者	所 属	広島大学大学院先端物質科学研究科	
	氏 名	中島田 豊 印	
1. 研究の目的・背景 現在、地球温暖化への懸念から原因物質である二酸化炭素（CO₂）排出量の大幅な削減が求められている。このことから、再生可能資源・エネルギーからの液体燃料・石油化学製品製造技術の開発が急務となっている。中国地域の大きな産業の一つである自動車製造工程での樹脂部品はポリプロピレン系樹脂が約半分を占めており、自動車用樹脂の代表格とされている。もしプロピレンを再生可能資源・エネルギーから効率的に生成できれば、産業的インパクトは非常に大きい。 再生可能資源・エネルギーからのプロピレン原料製造法としてはバイオマスからの 2-プロパノール生産が報告されている。しかし、バイオマス量には限りがあることや、バイオマス粉碎・糖化工程が煩雑かつ高コストであり実用化に至っていない。そこで申請者らは、バイオマス以外の太陽光、風力、水力などの再生可能資源・エネルギーの大部分が電気として得られることに着目し、電気エネルギーにより発生した水素(H₂)を高効率で菌体内に取り込み、CO₂を酢酸に変換する能力を持つホモ酢酸菌を用いた電気駆動型 CO₂固定微生物触媒による物質生産系を提案する。もし、電気をエネルギー源として CO₂から 2-プロパノール等の汎用プラスチック原料を生産出来れば、再生可能エネルギー全体を有用物質生産資源として活用出来ることになり、バイオマスのみを使う以上に化石資源使用量の削減に寄与する。しかし、これまでの類似の研究は行われていない。 そこで本研究では、H₂-CO₂ 資化能を有するホモ酢酸菌 <i>Acetobacterium woodii</i> に着目し、電極反応により再生可能資源由来の電気エネルギーをエネルギー源として CO₂を固定、有用物質生産する微生物触媒の開発を行うことにより環境調和型有用物質生産プロセスを構築するための要素技術開発を行った。			

2. 研究成果及び考察（申請時の計画に対する達成度合を織込む）

1) H₂-CO₂ 資化性菌電気培養装置の開発

本研究では *A. woodii* ATCC 29683 株の電気培養法の確立を目的として検討を行った。まず *A. woodii* が偏性嫌気性微生物であることから、完全嫌気条件下で電気培養を行うための培養装置を製作した。基本的な構成は水の電気分解装置と同様であるが、陰極槽を培養槽とし、塩橋を設置することにより陽極槽からの O₂ の流入を防いだ。本装置において、培養槽に H₂-CO₂ 混合ガスを封入しガス培養を行った結果、酢酸を生産したことから *A. woodii* が生育可能な電気培養装置を確立できた。

そこで、ポテンショスタットを用いて電極電位を一定に制御し非通電、-0.5 V、-0.8 V、-1.0 V、-1.2 V、-1.4 V で電気培養を行ったところ、通電時のみに酢酸生成が確認されたことから、*A. woodii* の電気培養が可能であることが明らかとなった。

電極電位の増加に従い、酢酸生成速度は高くなったが、-1.0 V と -1.2 V の間で酢酸生成速度に大きな差が観られた。この電圧間で急激な電流上昇が見られるとともに、電流値と酢酸生成量が概ね比例していることから、-1.0V 以下が電極での直接電子授受による酢酸生成、-1.2V では電極表面での電気分解により生成した水素利用による酢酸生成が示唆された。

2) 2-プロパノールを生産する微生物変異株の分子育種

ここでは CO₂ を炭素源、バイオマスを含む再生可能エネルギーから製造可能な H₂ をエネルギー源として、ポリプロピレン合成原料である 2-プロパノールの発酵生産菌行育種法を検討した。まず、*A. woodii* ATCC 29683 株へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入試効率を改良した。その結果、OD₆₆₀:0.3、GAP 0.4 cm、2.1 kV、200 Ω、25 μF の条件時に、最大 1.9×10² CFU/μg DNA の形質転換効率を得た。

遺伝子導入法が確立されたので、*Clostridium acetobutylicum* 由来のアセトン生合成遺伝子 (*thil*, *ctf*, *adc*) と、*Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*sadh*) を *A. woodii* へ導入し、2-プロパノール生産を試みた。しかし目的物質の生産は確認出来ず、遺伝子導入株のプラスミド解析の結果、*A. woodii* からの導入遺伝子の脱落が示唆された。これは申請時には想定されていなかった事態であり、現在は 2-プロパノール生産に向けて、安定した遺伝子導入ならびに保持のための技術開発を行っている。このため、申請時予定していた 2-プロパノール生産変異株の電気培養による 2-プロパノール生産を検討できなかった。

しかし電極-菌体間での電気エネルギー授受の機構は野生株と 2-プロパノール生産変異株では変わらないので、1) の成果より、CO₂ を炭素源、電気を直接エネルギー源として *A. woodii* 電気培養による物質生産が可能であることから、今後、2-プロパノール生産変異株の育種に成功すれば、電気培養による汎用プラスチック原料生産は可能であると思われる。

3. 経費の使用状況（申請時の計画に対する実績を記述）

備品設備費は申請時の計画通り、ポテンシオスタット一定電圧発生装置及び、データ整理用コンピューターを購入した。消耗品類については、申請時の計画より使用が増えたため、印刷費、借料損金、謝礼金をゼロとして消耗品類購入に充当した。

4. 将来展望（今後の発展性、実用化の見込み等について記述）

本研究開発により、CO₂を炭素源、電気を直接エネルギー源として *A. woodii* 電気培養による物質（酢酸）生産に成功した。また、*A. woodii* への遺伝子導入法は確立できた。しかし、2-プロパノール生産遺伝子を導入したとき、導入遺伝子が脱落するなど、安定した 2-プロパノール生産遺伝子導入株の作出には至らなかった。これは、DNA 分解酵素や制限修飾系などの染色体防御機構による外来遺伝子の排除が起きていることが推定された。

今後、上記防御機構を回避することで安定した 2-プロパノールの生合成遺伝子導入および生産株の育種を図る。製作した変異株に本研究で開発した電気培養法を適用し、装置デザイン、培養条件の最適化を図ることにより、様々な再生可能エネルギー・資源から生産可能な電気エネルギーを基盤とした有用物質生産が可能となることが期待できる。本研究をさらに発展させ、導入する遺伝子を変えることにより 2-プロパノール以外にも、ブタノールや油類などの液体燃料・化成品原料も電気エネルギーにより生産することが可能となる。

5. 成果の発表（学会での発表、学術誌への投稿等を記載。予定を含む）

- 1) 福本 直樹, 田島 誉久, 加藤 純一, 中島田 豊 : H₂-CO₂ 資化性菌 *Acetobacterium woodii* の電気培養法の開発、平成 25 年度日本生物工学会大会（広島 9/18-20 開催）にて発表予定
- 2) 森分 勇人, 田島 誉久, 加藤 純一, 中島田 豊 : 中温性 H₂-CO₂ 資化性菌 *Acetobacterium woodii* における遺伝子導入技術の開発及び、2-プロパノール生産への応用、平成 25 年度日本生物工学会大会（広島 9/18-20 開催）にて発表予定