

e-バイオ的戦略に基づく炭素代謝の改変

松本 伯夫

はじめに

微生物の生育にはさまざまな酸化還元因子“e⁻”が関与している。一例をあげれば、呼吸因子としての電子供与体や電子受容体、環境因子としての酸化還元電位、代謝経路におけるNAD⁺/NADHといった酸化還元物質などがこれにあたる。微生物を利用した物質生産系において、“e⁻”を意図的に調整することで、従来の培養手法ではなしえない新たな効果が期待できるのではないかと。たとえば、呼吸の促進による生育の向上、酸化還元環境の改変による特定の微生物の選択培養、そして代謝の調整による物質生産の最適化などが達成できるのではないだろうか。このような発想に基づき、我々はe-バイオ構想において、微生物培養の際の“e⁻”をコントロールする「電気培養法」という手法について研究開発を進めている。本稿では、この電気培養法について解説するとともに、この方法を使い、特に微生物の炭素代謝の改変を狙った培養事例を紹介する。さらに、今後の課題としてe-バイオ的戦略による代謝制御を行うための要点について述べたい。

e-を操る培養法～電気培養～

我々が実施するe-を操るための電気培養法は、微生物の培養槽に電極を設置し、この電極に特定の電位を与えることによって培養液の酸化還元状態をコントロール

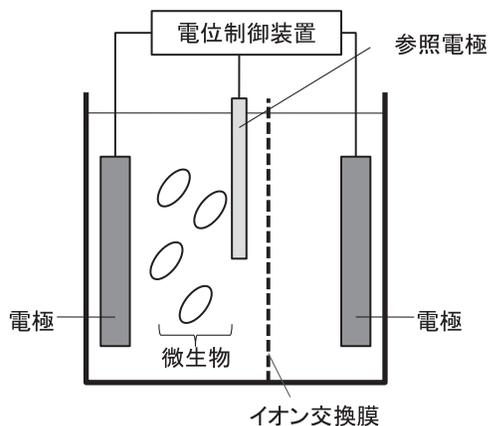


図1. 電気培養装置の構成

し、ひいては培養液中の微生物に酸化還元状態の変化を作用させようとするものである。この際に、電極に与えた酸化還元電位が効果的に微生物に伝わるようにするために、培養液中にメディエータとよばれる酸化還元を担う物質を溶存させる。電気培養装置の基本構成は図1に示すように、水槽をイオン交換膜で区切り、各槽に電極を設置し、その一方を培養槽としたものである。この際に、培養槽に設置した電極の電位を正確に保つために「参照電極」という第三の電極を培養槽側に設置する。この構成を基に、培養槽や電極の形状を、それぞれの培養条件に合わせて改変させている。たとえば、嫌気性の微生物を電気培養に供する際には、密閉系の培養槽を使用し、槽内を嫌気状態に保つ工夫が必要となる。なお、両槽に設置する電極は腐食を避けるために白金や金などの貴金属または炭素を使用するのが通例である。

電気培養の事例

ブタノール生産菌の電氣的代謝改変 *Clostridium acetobutylicum* は、グルコースからアセトン、ブタノール、エタノールを生産する微生物として知られている。この微生物は、対数増殖期には酢酸や酪酸といった酸を生産し、増殖が止まった後の定常期において、エタノール、ブタノールといったアルコール類を生産する。*C. acetobutylicum* の代謝経路は図2のように説明されているが、本菌によるブタノール生産を考える場合には、経路の前半部での還元力の放出、最終段階での還元力の供給を適切にコントロールするという戦略が考えられる。そこで我々は、*C. acetobutylicum* の培養の際に、種々の酸化還元物質（メディエータ）を共存させた培養を実施したところ、メチルビオロゲン（MV）を共存させた際に、菌体の生育に伴うMVの還元が観測された。そこでまず、対数増殖期にある本菌に対し、MVを共存させ、酸化電位（+0.3～+0.6 V vs. Ag/AgCl）を与える電気培養を実施したところ、生育の活性化ならびにブタノール生産性の向上（非通電時の1.5倍）が見られた¹⁾。一方、定常期に達した*C. acetobutylicum* を対象とした電気培養試験では、単発的な還元電位（-0.7 V vs. Ag/AgCl）を与えることによってブタノールの生産量を非通電時の3倍に向上させることができた²⁾（図3）。このように、同じ

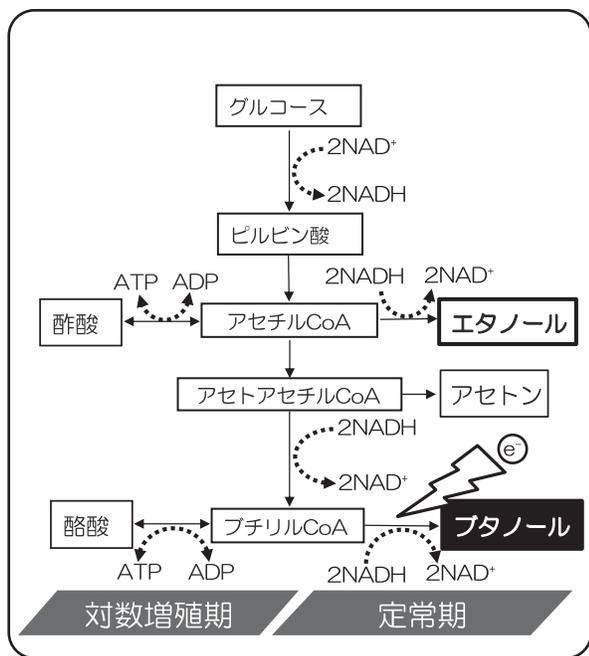


図2. *C. acetobutylicum* のブタノール生産経路

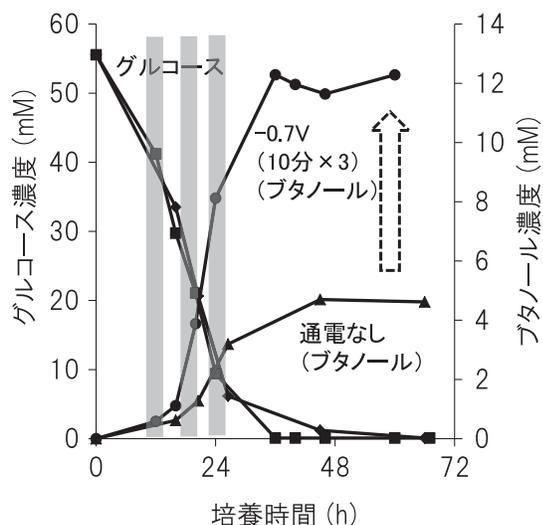


図3. 定常期の *C. acetobutylicum* に対する電気培養の効果. 通電ありの培養では網掛けの期間に10分間, -0.7 V (vs Dg/AgCl) の電位を印加. ◆: グルコース濃度 (通電なし), ■: グルコース濃度 (通電あり), ▲: ブタノール濃度 (通電なし), ●: ブタノール濃度 (通電あり).

菌体において、増殖時期の違いで異なる電位応答が生じる興味深い結果となった。対数増殖期に酸化電位を与えると、菌体の増殖速度は早まる一方で、最終的な菌体密度は非通電時よりも低くなっていた。このことから、酸化電位を与えることで、炭素代謝を菌体の生育からブタノールの生成に改変させることができたのではないかと

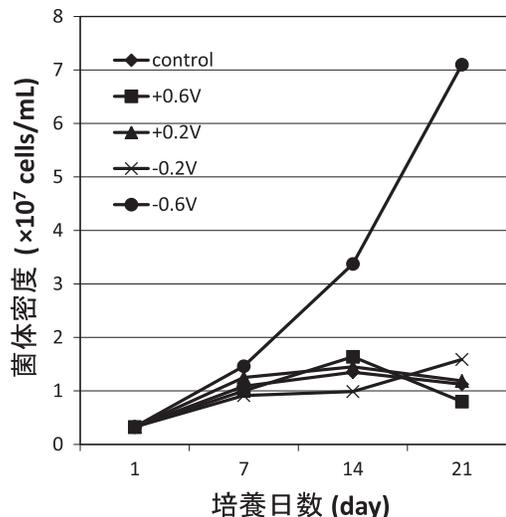


図4. 環境微生物を対象としたグリセロール含有培養液中での電気培養結果

考えている。一方、定常期の菌体では、すでに増殖が停止しているため酸化電位の効果は現れず、むしろブタノール生成に関わる代謝の最終段階の、還元力を必要とする部位に、適切に還元力が充当されたことでブタノールの生産量が向上したと考えられる。以上の考察はあくまで一つの可能性を示すものであり、裏づけとなる解析が待たれるところではあるが、少なくとも *C. acetobutylicum* の代謝を、外部からの酸化還元電位の操作によりコントロールできたと考えている。

グリセロール変換微生物の電氣的活性制御 近年バイオディーゼル燃料 (BDF) の生産が世界的に増加している。BDFは食物性の油脂などにメタノールと触媒を添加することで得られる脂肪酸メチルエステルであるが、BDF生産に伴い、原料の約10%にあたる量のグリセロールが副生する。この副生グリセロールには不純物が含まれ低品位である上にグリセロール自体が過剰供給状態であることなどから、有効な使い道がないのが現状である。このような背景を受け、微生物によるグリセロール変換に関する研究が盛んに行われるようになってきた。微生物によるグリセロールの代謝経路にも、NADHなどを介した酸化還元反応が多分に含まれており、外部からの電気化学的作用による代謝改変の可能性が見込める系である。我々は、環境中の微生物に対し、グリセロール変換を指標として種々の酸化還元電位の下での電気培養を実施した。その結果、還元電位 (-0.6 V vs. Ag/AgCl) に設定した電気培養槽において顕著な菌体の増殖 (図4) とグリセロールからエタノールへの変換が観察された。DGGE法による微生物群集解析の結

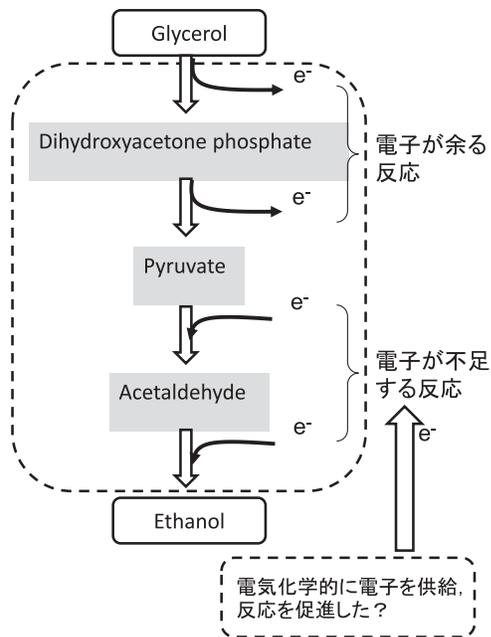


図5. グリセロールからエタノールへの微生物変換代謝経路 (大腸菌の経路を簡略化)

果、電気培養で生育したのは、*Paenibacillus*属の菌であることが分かった³⁾。これまでに大腸菌などを用いたグリセロールからのエタノール生産において、酸化電位の下で反応を促進させる事例は報告されているが、還元電位の下での促進については報告がない。今回、電気培養によって特異的な増殖を示した*Paenibacillus*属については、外部からの還元力の供給が、グリセロールからエタノールを生産する菌体内の代謝の中の還元力を必要とする個所に、効果的に作用した結果ではないかと考えている(図5)。ただし、ここでは微生物群集を対象に電気培養を実施しており、単一菌体のみの酸化還元収支にとどまらない可能性があるため、対象の微生物を単離した上での詳細な調査が必要と考えている。

今後の課題

e-バイオの戦略による代謝制御の究極の目標は、菌体内の酸化還元に関わる代謝を外部から自在にコントロールすること、である。現時点ではまだほんの一例が示されたのみであり、今後事例の蓄積が待たれるが、電気化学的代謝制御のバリエーションを増やすことを考えれば、電極と微生物の間をつなぐ役目をこなす酸化還元物

表1. 酸化還元反応が期待される物質の例

分類	物質名
キノン類	アントラキノン-1-スルホン酸ナトリウム
	アントラキノン-1,5-ジスルホン酸ジナトリウム
	アントラキノン-1,8-ジスルホン酸ジカリウム
	アントラキノン-2,6-ジスルホン酸ジカリウム
	2-メチル-1,4-ナフトキノ
色素類	インジゴカルミン
	ニュートラルレッド
	レマゾールプリリアント
	クリスタルバイオレット
	2,6-ジクロロフェノール-インドフェノール
金属系	ヘキサシアノ鉄酸カリウム
	Fe(III)-EDTA
	Mn(II)-EDTA
農薬系	メチルビオロゲン

質(メディエータ)の選定が重要な要素となるだろう。メディエータの候補としては、金属イオン、キノン類、色素類、そしてMVのような農薬系物質などがあげられよう。この中で色素系の化合物であるニュートラルレッドは細胞表面に吸着する特性があり、これをメディエータに用いた通電培養で、コハク酸やキシリトールの生成量が増加したとする報告が知られている^{4,5)}。このような事例は、今後e-バイオの戦略による物質生産系の構築を考えるうえでヒントになるかもしれない。

本稿で紹介した電気培養は、微生物培養の際の酸化還元電位をコントロールするものであるが、メディエータの種類、さらには通電時間といったパラメータの選択、調整により、微生物への通電の効果を変化させることが可能となる。本手法が微生物培養の可能性を広げるものとなり、実用的な物質生産プロセスの構築につながることを期待したい。

文 献

- 1) 平野伸一ら：電力中央研究所報告，V10028 (2011)。
- 2) 松谷政導ら：日本農芸化学会2012年度大会講演要旨集，3C01p11 (2012)。
- 3) 松本伯夫ら：電力中央研究所報告，V10033 (2011)。
- 4) Park, D. H. and J. G. Zeikus: *J. Bacteriol.*, **181**, 2403 (1999)。
- 5) Park, S. M. et al.: *J. Microbiol.*, **43**, 451 (2005)。