

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660056

研究課題名(和文)メタンガスを発酵原料とした有用物質生産菌取得法の開発

研究課題名(英文)development of a novel screening system for methanotrophs producing useful compounds

## 研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA-KAMBE, Toshiaki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80241777

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)：有用物質を生産するメタン酸化性菌のスクリーニング法を開発した。メタン酸化性菌が他の炭素源を利用できない点と、大腸菌等の一般細菌がメタンを利用できない点に着目した。炭素源を含まない平板培地に、大腸菌等の検定菌を混合した平板培地を考案した。この培地に生育したメタン酸化性菌が物質生産を行えばコロニー周辺に大腸菌が増殖して白く濁る。この培地を用いて実際に有用物質を生産するメタン酸化性菌を取得した。

研究成果の概要(英文)：A novel screening system of isolating methanotrophs that produce useful compounds was developed. The facts that methanotrophs cannot use any carbon sources except methane and general bacteria cannot use methane as sole carbon source were the key point of this method. The mixture of assay strains (E. coli, etc) was added in the minimal salt medium and cultured with methane as the sole carbon source. If methanotrophs that produce several organic compounds, assay strains can grow and become clouded around the colony of it. Finally, some methanotrophs that produce organic compound were isolated using this screening system.

研究分野：産業微生物資源学

キーワード：発酵生産 スクリーニング技術

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 再生可能な資源としてのメタン

メタンは我が国の地下に相当量埋蔵されており、その一部はガス田として採掘・実用化されている。また、日本周辺の海底にはメタンハイドレートの存在が確認され、その埋蔵量は我が国の100年分の需要をまかなえると試算されている。

一方、近年廃棄物系バイオマスの有効利用が注目されており、廃油からのバイオディーゼル燃料生産や植物非可食部からのバイオエタノール生産などが盛んに研究されている。しかし、これらの研究は、特に我が国においてははまだ実用化段階とはいえない。

廃棄物系バイオマスからの有用物質生産として、コンポスト(有機肥料)を別とすれば、実用レベルまで利用が拡大しているものとしては、メタンの生産がもっとも一般的である。実際に、高濃度有機廃棄物の処理として、メタン発酵は第一選択肢であり、多くの処理施設で稼働している実績がある。しかしこのメタン発酵で生成したメタンガスは、現状ではほとんどがエネルギー源として燃焼されているのが現実である。この理由としては、生成するメタンガスの濃度・純度が化学工業における原材料としては不適であり、精製にコストがかかる点が挙げられる。

### (2) メタン資化性菌による発酵生産

原料物質に比較的高い純度を必要とする化学工業とは異なり、微生物を用いた発酵プロセスは、純度に関しては許容度が高い。たとえば発酵原料としてポピュラーな廃糖蜜やコーンステープリカーなどは、廃棄物系バイオマス的一种でもあり、多くの不純物を含んでいるが、生産への影響は無い場合がほとんどである。これは生物酵素の持つ基質特異性によるものが大きい。

そこで、発酵原料としてメタン、特にメタン発酵で生じるメタンを利用して物質生産が行えれば、理想的なバイオマス有効利用システムが構築できると考えた。だが、これまでメタン資化性菌を用いた生産プロセスの研究は、ほぼすべてがメタノール生産に向けられてきた。その理由としては、メタンをメタノールに変換する酵素であるメタンオモノオキシゲナーゼが、メタン資化性菌のみが持つユニークな酵素である点と、メタンからメタノールへの変換が化学プロセスとしては困難な反応であり、この部分をクリアすることにより化学プロセスにおける利便性が飛躍的に高まることにある。

しかし、残念ながらこれまでに実用レベルでメタノールの生産に成功した例はない。この理由としては、生成するメタノール自身が菌にとって毒物であることが挙げられる。また、メタンオモノオキシゲナーゼは菌体中では安定であるが、タンパクとして精製すると極めて不安定であるため、酵素プロセスとしても適応できない。

一方でメタノール以外の物質生産としてはPHAやチトクロームの生産等、ごくわずかしか研究されていない。メタン資化性菌は一般細菌とは炭素源の資化性が異なるため、有用物質の生産菌のスクリーニングを行うためには、メタン資化性菌に特化した培地、培養法を用いる必要がある。このため、方法が煩雑な割に得られる菌のバリエーションが低いために、目的物質を限定してスクリーニングを行っても成功率が低いことが大きな理由であると考えられる。また、発酵生産を専門とする研究者の中にメタン資化菌の取り扱いに長けた研究者が少ないことも原因の一つとなっている。

## 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究ではメタン資化性菌の栄養特性を利用して、ターゲットを限定しない網羅的スクリーニング法を考案した。原理としてはグルタミン酸生産菌のスクリーニングに用いられた、栄養要求株によるバイオアッセイプレート法がヒントとなっている。原報では供試菌をグルタミン酸を含まない平板上でコロニー化し、そこにグルタミン酸要求性の大腸菌を混ぜた軟寒天を重層する。供試菌の中にグルタミン酸生産菌がいれば、その周囲に大腸菌が生育し、コロニー周辺が白く濁る。これを指標にして生産菌の検定を行う。

本研究では、メタン資化性菌が他の炭素源を利用しない(できない)点と、大腸菌がメタン、メタノールを利用できない点に着目した。すなわち、炭素源を含まない平板培地の上に大腸菌を混合した軟寒天を重層する。ここにサンプルを塗布し、メタンガス存在下で培養することにより、平板上にメタン資化性菌のコロニーを形成させる。このコロニーのうち大腸菌が利用可能な【何か】を生産するものがあれば、コロニー周辺に大腸菌が増殖し、白く濁る。また、濁りの大きさを大体の生産量を検定することも可能である。具体的にはアミノ酸や糖、 $C_2$ 以上のアルコールや有機酸などを想定している。

これまでにメタノール以外の生産物をターゲットとしてメタン資化性のスクリーニングを行った例はほとんど無く、かつ上記スクリーニングのアイディアは他に試みられた例はない。

メタン資化性菌の大量培養技術に関しては、旧ソ連や東欧各国において飼料(SCP)として大量生産の可能性が盛んに研究されていたこともあり、当時の膨大な資料が残っているため、スケールアップは困難ではない。実践例とともにこの方法を広く公開すれば、メタンガスからの有用物質生産に関する研究が一気に拡大し、廃棄物系バイオマス有効利用のための中間原料としてのメタンの価値を確立できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、ほとんどのメタン資化性菌が他の炭素源を利用しない(できない)点と、大腸菌等の一般細菌がメタン、メタノールを利用できない点に着目した。すなわち、炭素源を含まない平板培地に、大腸菌等の検定菌を混合した寒天を重層する。ここにサンプルを塗布し、メタンガス存在下で培養することにより、平板上にメタン資化性菌のコロニーを形成させる。このコロニーのうち検定菌が利用可能な【何か】を生産するものがあれば、コロニー周辺に大腸菌が増殖し、白く濁る。また、濁りの大きさで大体の生産量を検定することも可能である。具体的にはアミノ酸や糖、C<sub>2</sub>以上のアルコールや有機酸などを想定している。

メタン資化性菌の培養には下記の培地を用いた。平板培地の場合は、ここにOxoid社製の寒天1%を加えて作成した。

Table 1 The composition of *methylococcus* medium

Components	Concentration (mL/L)
Stock A	100
Stock B	5

Table 2 The composition of Stock A

Components	Concentration (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.45
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.17
NH <sub>4</sub> Cl	1.00

Table 3 The composition of Stock B

Components	Concentration (mg/L)
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	121.00
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	28.00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	4.80
MnSO <sub>4</sub> -4-5H <sub>2</sub> O	0.60
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.10
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0.06
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05

メタン資化性菌の培養にはメタンガスを添加する必要がある。そこで、液体培養においてはバイアル瓶を、平板培養においては嫌気ジャーを使用した。

(下写真)



### 4. 研究成果

#### (1) 検定培地の作成

まず、スクリーニングに最適な指標菌の選択、その濃度について検討を行い、アッセイ系の最適化を行った。各種大腸菌野生株、研究室保存の細菌、酵母を用いて、検定プレートを作成し、その表面に各種物質(グルコース、有機酸、アミノ酸等)を含浸させたペーパードイスクを置き、30、24時間培養後にドイスク周囲に生じる白濁をノギスで測定し、検定菌の評価を行った。

その結果、研究室保存の細菌2種(TB-8 (*Escherichia coli*)およびTB-21 (*Serratia marcescens*))を混合して作製した場合において、広いスペクトル、感度を有する検定培地を作成することに成功した。一方、酵母は生育が遅く、感度低下を招いたため除外した。なお、作成した培地が冷蔵で一週間程度は保存可能であることも確認した。さらに、研究室保存のメタン資化性菌を用いて培養を行い、本検定培地がメタン資化性菌の生育を阻害しないことも確認した。

#### (2) 有用物質生産性メタン資化性菌のスクリーニング

次いで、環境から有用物質生産能を持ったメタン資化性菌のスクリーニングを行った。分離源としては水田土壌を用いた。水田は夏期に灌水されるため、嫌気性菌であるメタン生成菌が優勢となり、メタン生成菌由来のメタンガスに常時暴露されている。一方、冬期は水が抜かれるために好気性菌であるメタン資化性菌が優勢となる。つくば市周辺の各種水田(秋季~冬期)を中心にサンプリングした土壌を20種ずつ混合して、無機塩培地30mLを加えた125mL容のバイアルビンにいれ、ヘッドスペースの空気を30mL引き抜き、同量のメタンと置換した。これを30で振とう培養し、1週間毎に3回植え継いだ。

生育の見られたバイアルビン73本から培養液を適宜希釈して平板培地に塗布し、嫌気ジャーに入れ、ジャー内部のガスをメタン:空気=2:8(v/v)に置換して7日間培養した。

培養後生じたコロニーを無機塩培地の平板と栄養培地(nutrient agar)の平板に移植し、メタンを加えた無機塩培地でのみ生育したコロニーをメタン資化性菌として、選抜し、-80にて凍結保存した。

ついで、得られた候補株の検定を行った。検定菌TB-8およびTB-21株をnutrient agar平板培地に植菌後30で培養し、これをオートクレーブした検体培地に加えて、検定平板を作成した。なお検定菌が熱により死滅するのを防ぐため、培地45の湯浴中で1時間保持した後に菌を混合した。そこに、メタン資化性菌候補株を滅菌爪楊枝で1平板当たり25株植菌した。これを嫌気ジャーに入れ、ジャー内部のガスをメタン:空気=2:8(v/v)に置換して7日間培養した。コントロールとして、0.1%グルコース溶液5μLを同じプレート上

に滴下し、白濁の形成を確認した。

約 350 株の候補株を取得し、検定に供した結果 28 株に白濁の形成が見られた。これらの株について再度検定平板を用いて二次スクリーニングを行った結果、最も大きな白濁を形成した株 1 株を得た。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中島敏明 (NAKAJIMA-KAMBE Toshiaki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80241777

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし