

# 博士論文（要約）

Study on environmental adaptation by current producing  
bacteria in terms of microbial electrocatalysis

（微生物電極触媒反応における電流生成菌の環境適応  
機能に関する研究）

齋藤 淳貴

(Junki Saito)

## 1. 緒言

電流生成菌は、有機物などの電子供与体を酸化してエネルギーを獲得し、不要になった電子を細胞外へ放出するという一連の呼吸を行う<sup>[1]</sup> (図 1)。例えば、代表的な電流生成菌である *Shewanella oneidensis* MR-1 では、10 個のヘムを有する複数のシトクロム蛋白が細胞膜を貫通する形で複合体を作り、細胞外への電子伝達を媒介することが明らかとなっている<sup>[2]</sup>。このように、生体酵素が媒介する細胞内の代謝反応を、細胞外への電子移動と共役させる能力が電流生成菌の特徴であり、単離・精製した酵素にはない機能として、自己修復・増殖能を持つ他、遺伝子発現の調節等により、環境に合わせて代謝を変化させる能力を持つと考えられる。しかし、これまでの研究では、電流生成菌を単離酵素の延長と捉えていたため、この生物特有の環境適応機能が電極触媒能に与える影響については、これまで詳しく検討されてこなかった。

以上の背景に基づき、本研究では、電子供与体の量や種類を変化させることにより、電流生成菌が持つ代謝の環境適応機能を電極触媒の観点から明らかにすることを目的とした。環境適応の機構として、微生物の集団的挙動、及び機能未知遺伝子の利用の二点に着目した。始めに、電気化学測定による代謝の経時的追跡法、及び微生物代謝の集団的挙動の分析に必要な単細胞代謝解析法をそれぞれ開拓した。次に、微生物集団内に代謝経路の不均一性があると集団全体として環境変化に適応しやすくなるという報告に基づき<sup>[3]</sup>、開拓した二つの手法を用いて、代謝経路の不均一性を指標とした電流生成菌の環境適応機能の分析を行った。さらにその過程で、電子供与体となる有機物が全く無い環境下では、予想に反し電流生成菌がアンモニアを利用することを発見したため、その反応機構について検討した。

## 2. 電気化学測定による代謝追跡【1,2,3】

電流生成菌による代謝が細胞外電子移動と共役するという特徴を利用し、高感度かつリアルタイムに情報が得られる電気化学的手法を用いた代謝速度測定法の開拓を試みた。この分析法では、代謝に加え細胞外電子移動に由来する情報も測定結果に含まれるため、それらを分離して代謝由来の情報のみを抽出する必要がある。ここで、微生物による電流生成過程は、代謝と細胞外電子移動の二つに大きく分けられるが(図 1)、観測される電流値には電流生成の律速過程の速度が反映されと考えられる。そこで本章では、代謝が電流生成の律速段階となる状況を作ることで、代謝を電気化学測定により追跡するための方法論を構築した。

【実験】酸化インジウム錫(ITO)電極、Ag/AgCl 電極、白金線をそれぞれ作用極、参照極、対極とした 3 電極系を嫌気に保ち、作用極電位を+0.4 V (versus 標準水素電極)に保持したものを反応器として使用した。ここに培地と 10 mM 乳酸ナトリウムを加え、電流生成菌 *S. oneidensis* MR-1 を添加して電流値を測定した。培地中の乳酸濃度はイオンクロマトグラフィを用いて測定した。

【結果と考察】まず、代謝が電流生成の律速段階となっているか検討するため、リボフラビン(Riboflavin, RF)を用いた。RF は細胞外電子移動を媒介するシトクロム蛋白に補酵素として結合し、細胞外電子移動の速度を大幅に高めるため<sup>[4]</sup>、RF の添加により電流値が大きく増加すれば細胞外電子移動が、そうでなければ代謝が電流生成の律速段階だと分かる。電子供与体である乳酸が培地中に 9 mM 以上残っている時点で RF を加えると電流値の大幅な増加が見られたが、乳酸濃度が 3 mM 以下まで下がった時点で加えると電流値は増加しなかった(図 2)。これは、電子供与体濃度が下がるにつれて代謝が遅くなり、電流生成の律速段階となったことを示している。この結論は、代謝に必要な酵素の反応中心として働く微量金属を培地から除去し、除去しない系と比較した場合、乳酸濃度が下がった状

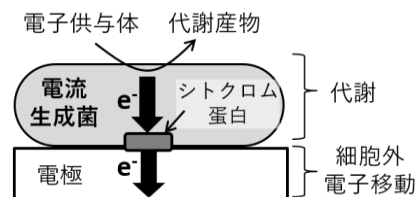


図 1 電流生成菌による代謝と細胞外電子移動の模式図。

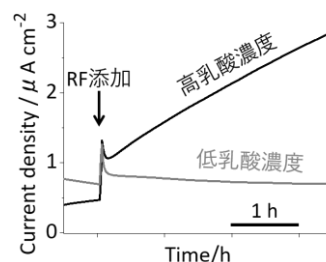


図 2 リボフラビン(RF)を加えた際の電流値の変化。

態でのみ電流値が低下した事からも支持された。以上の結果から、電子供与体濃度を制御して代謝速度を下げれば、代謝過程を電気化学的に測定できることが示された。

### 3. 単細胞代謝解析【4,5】

電流生成菌の代謝が示す集団的な挙動を分析する手段として、本章では高分解能二次イオン質量分析装置 (NanoSIMS) を用いた。この分析法では、微生物の代謝活動を止めてから電極の洗浄および測定を行うため、微生物の状態を変えることなく浮遊個体を取り除き、電極に付着して細胞外電子移動を行う個体のみを選択的に分析できる。窒素標識同位体  $^{15}\text{NH}_4^+$  を用いて、一般に生合成活性の指標とされている培地からの  $^{15}\text{N}$  取り込み量を測定し<sup>[5]</sup>、その分布が RF の添加の有無により変化するかを見ることで、NanoSIMS により代謝応答の差が観測できるか検討した。

【実験】 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を窒素源とし、RF を加えた場合、加えない場合のそれぞれにおいて、**2** と同様の反応器を用いて *S. oneidensis* MR-1 を 24 時間培養した。その後、電極上の各 *S. oneidensis* MR-1 個体について、NanoSIMS を用いて全窒素に占める  $^{15}\text{N}$  の割合 ( $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$ ) を測定した。

【結果と考察】NanoSIMS により *S. oneidensis* MR-1 の各個体を識別し、それぞれの  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  を測定することができた(図 3)。その結果、微生物集団内の生合成活性には大幅なばらつきが見られ、RF を加えた場合は細胞内の  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  の分布が二極化した (図 4)。なお、RF を加えない場合と加えた場合の生合成活性の分布には、統計学的に有意な差が見られた ( $P < 10^{-8}$ )。  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  の平均値にはほぼ差がなかったため、この差異は単細胞分析だからこその明らかにできた結果だと言える。観測された二極化は、電子移動速度の増大に適応して生合成を加速させる個体と、細胞内が過度に酸化的になり生合成活性が落ちる個体が両方存在することで生じたと考えられる。この結果から、NanoSIMS を用いることで微生物個体ごとの代謝状態を分析できることが示された。

### 4. 利用できる電子供与体の変化に伴う代謝経路の不均一性【6】

微生物集団内における代謝経路の不均一性を指標として、利用できる電子供与体が変化する状況下での *S. oneidensis* MR-1 の環境適応機能について分析した。主要な電子供与体である乳酸が欠乏した場合、*S. oneidensis* MR-1 は乳酸代謝の産物である酢酸を新たに利用すると考えられる。そこで、まず **2** で開拓した手法を利用し、代謝の変化が実際に起きているか検討した。次に、**3** で開拓した分析法を用い、生合成の材料として使われる物質の差を利用して代謝経路の不均一性を観測した。また、この代謝経路の不均一性は、電流生成菌が電極触媒として働く電極系に特有の現象なのか検討するため、溶存物質が電子受容体となる非電極系でも同様の実験を行った。

【実験】電極系の実験では、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を窒素源とし、 $1\text{-}^{13}\text{C}$  乳酸濃度を 10 mM または 1 mM とした培地を用いて、*S. oneidensis* MR-1 による電流値を **2** と同様の反応器で 24 時間測定した後、NanoSIMS により電極上の各個体の  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$ ,  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  を測定した。非電極系の実験は、培地に 20 mM のフマル酸を加え、ITO 電極の代わりに絶縁性のガラス板を用いた以外は、上記と同様の手順で行った。また、培地中の乳酸濃度はイオンクロマトグラフィにより定量した。

【結果と考察】乳酸濃度を 10 mM とした場合、電流値はピークに達した後下がり続けたのに対し、1 mM の場合は電流値が一旦減少した後緩やかに回復するという挙動が見られた。**2** の結果より、電子供与体濃度が低い場合は代謝の変化が電流値に反映されるため、電流値の減少と回復は、乳酸の欠乏と酢酸利用の開始にそれぞれ対応していると考えられる。これは、電流値の一時的減少が乳酸の欠乏と近いタイ

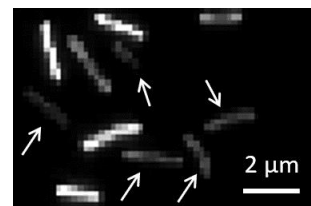


図 3 電極上の  $^{15}\text{N}$  量を表す二次イオン像。矢印を付けた個体は  $^{15}\text{N}$  取り込み量が少なく活性が低い。

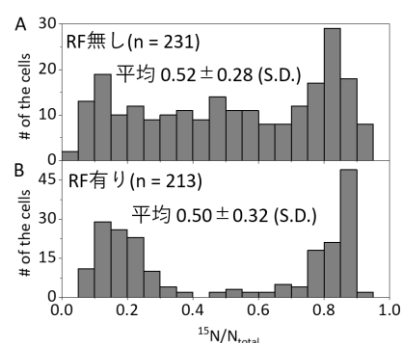


図 4 電流生成菌各個体における細胞内の  $^{15}\text{N}$  割合のヒストグラム。

ミングで起きたことから支持された。そこで、乳酸の欠乏に伴い代謝経路の不均一性が生じているか検討するため、電子源として  $1\text{-}^{13}\text{C}$  乳酸を用いた。この場合、乳酸を利用する個体は同位体標識された  $1\text{-}^{13}\text{C}$  ピルビン酸と  $^{13}\text{CO}_2$  を使って生合成を行うのに対し、酢酸を利用する個体は同位体標識されていないアセチル CoA を利用する。従って、乳酸を利用する個体では全炭素に占める同位体炭素の割合 ( $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$ ) が増加し、酢酸を利用する個体では増加しないため、 $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  を基に各個体の代謝経路の差を分別できると考えられる。ただし、**3** で示したように、生合成活性には大きなばらつきがあるため、利用する代謝経路が同じであっても  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  の値は大きくばらつくと予想される。そこで、 $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  は代謝経路に関わらず生合成活性が高ければ上昇することから、 $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  と  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  の増加量の比 ( $\Delta(^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}})/\Delta(^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}})$ ) をとることで生合成活性のばらつきを規格化し、代謝経路の差に由来する違いが見えないか検討した。 $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$ ,  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  の増加量を縦軸、横軸にとってプロットすると、乳酸濃度 10 mM の場合は増加量の比がほぼ一定なのに対し、1 mM の場合は  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  が下がる方向にばらつきが見られた。 $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}} > 0.2$  の個体について、 $\Delta(^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}})/\Delta(^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}})$  の値を統計的に分析すると、乳酸濃度 1 mM の場合は 10 mM の場合に比べて標準偏差が 1.4 倍大きく、その差は統計的に有意だった ( $P < 1\%$ )。このようなばらつきは電流値の回復以前には見られなかったこと、及び酢酸を利用すると  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  が下がることを踏まえると、 $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  に対する  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  が低い細胞ほど酢酸を多く利用したと考えられる。なお、低生合成活性の細胞において  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$  の低下が見られないのは、エネルギー不足により必要な酵素が合成できず、酢酸が利用できなかったためと考えられる。 $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$ ,  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  の増加量の比が代謝経路と対応しうるのは、遺伝子欠損株を用いた実験でも確認された。以上の結果により、各細胞が利用した代謝経路は  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{total}}$ ,  $^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}}$  の増加量の比を基に推測できること、及び電流生成菌が電極系で電子供与体の欠乏に遭遇した場合、代謝経路の切り替えを行う個体と行わない個体が混在する不均一な状態となることが示された。なお、非電極系で乳酸が欠乏した場合には、低活性の個体を除いたすべての個体が酢酸利用へと代謝経路を切り替えたことから、本章で観測された代謝経路の不均一性は電極系に特有であることが分かった。この知見は、電流生成菌が電極系において集団全体として新しい環境に適応する能力を持つことを示唆しており、この能力を活かせば、電子供与体濃度が大きく変動する廃水処理の現場において、電流生成菌による触媒能の安定性向上に貢献できると期待される。

## 5. 細胞外電子移動と共役した新規なアンモニア酸化反応の発見及び反応機構解析【7】

現在知られている限り *S. oneidensis* MR-1 は電子供与体として有機物しか利用できないため、**4** で示した適応機構を利用しても、有機物が全く無い環境には適応できない。しかし、電子供与体となる有機物が全く存在しない系で *S. oneidensis* MR-1 による電流値を測定したところ、予想に反しわずかながら電流生成が見られた。*S. oneidensis* MR-1 は既知のアンモニア酸化代謝経路を有していないことから、この結果は、*S. oneidensis* MR-1 が未知の代謝経路を有している可能性を示唆している。そこで本章では、*S. oneidensis* MR-1 が実際にアンモニア酸化代謝を行うのか検討し、さらにこの代謝経路の新規性の検討と、これを媒介する酵素の探索を行った。

【実験】20 mM の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む無機培地において、*S. oneidensis* MR-1 による電流値を **2** と同様の反応器で測定した。培地中の  $\text{NH}_4^+$  濃度はイオンクロマトグラフィにより測定した。また、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を加えた培地で同様の測定を行った後、電極上の個体の生合成活性を NanoSIMS により測定した。生成物分析には質量分析器とイオンクロマトグラフィを用いた。

【結果と考察】電気化学測定の結果、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  や菌体を加えない系では電流値増加が見られず、電子移動を媒介する主要なシトクロム蛋白の欠損株 ( $\Delta mtrC/\Delta omcA$ ) では電流値が大幅に減少した。さらに、 $\text{NH}_4^+$  濃度の減少と細胞の生合成活性が電極の存在下でのみ見られたことから、観測された電流値は *S. oneidensis* MR-1 によるアンモニア酸化代謝と共役した細胞外電子移動に由来することが分かった。なお、減少した  $\text{NH}_4^+$  はすべて酸化されたわけではないものの、その消費速度を既知の嫌気アンモニア酸化反

応であるアナモックスの反応速度と比較すると<sup>[6]</sup>、6~11 倍大きかった。質量分析の結果、一酸化窒素 NO の生成が見られ、NO 検出用蛍光試薬 DAF-2 DA を加えると約 25%の細胞で NO の蓄積が見られた。この割合は  $\text{NH}_4^+$  または電極の非存在下で低下したことから、*S. oneidensis* MR-1 は  $\text{NH}_4^+$  を酸化して NO を作ることが示された。なお、 $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  といった他の生成物は検出されなかった。主生成物が既知の反応と異なることから、*S. oneidensis* MR-1 によるアンモニア酸化は新規な機構を有していると考えられる。次に、NO 中の酸素原子の由来を検討するため、培地中の  $\text{NaHCO}_3$  を他の安定な緩衝剤に変更したところ、NO 生成活性の減少などの影響は見られなかった。培地中の酸素原子を含む主要な溶質は  $\text{NaHCO}_3$  のみであるため、NO の酸素源は水であることが分かった。この結論は、 $\text{H}_2^{18}\text{O}$  を加えた培地を用いた場合に  $\text{N}^{18}\text{O}$  の生成が検出されたことから支持された。

続いて、*S. oneidensis* MR-1 が  $\text{NO}_2^-$  存在下で未知の機構を介し NO を生成するという報告を踏まえ<sup>[7]</sup>、 $\text{NO}_2^-$  を  $\text{NH}_4^+$  へ還元する酵素 *NrfA* の逆反応が  $\text{NH}_4^+$  酸化に関与しているという仮説を立て、*NrfA* をコードする遺伝子の欠損株  $\Delta nrfA$  を作成し検討した。 $\Delta nrfA$  は野生株と異なり、反応器に導入してから約 20 時間は明確な電流値の増加が見られず、その間は NO 生成や生合成の活性も低かった。しかし、その後電流値は増加し、この時点では  $\text{NH}_4^+$  酸化を示す結果が得られた。このため、*NrfA* はアンモニア酸化に必須ではないものの反応に関与していると考えられる。本章の結果は、電流生成菌による電極触媒反応の応用範囲をアンモニア酸化にまで拡大しうる有益な知見である。

## 6. 総括と今後の展望

本研究では、これまで単離酵素の延長とみなされてきた電流生成菌を、環境適応機能を持った生物として捉え直し、その機能を電極触媒の観点から分析した。その結果、*S. oneidensis* MR-1 は電極系特有の代謝経路の不均一性と、未知代謝機能の発現によって、環境変化に適応することが示された。これらの知見は、電流生成菌を用いた環境配慮型廃水処理技術の開発・効率化に貢献すると考えられる。なお、本研究で構築した単細胞代謝経路分析法は、電流生成菌に限らず基本的に全ての微生物に適用可能であり、蛍光蛋白遺伝子の導入も不要であるため、環境から新たに単離された種など、遺伝子操作ができない微生物の分析にも広く利用できる。このため、微生物代謝の集団的挙動という、生態系から人の感染症まで幅広く影響を与える重要な現象の理解に貢献すると考えられる。さらに、本研究で発見されたアンモニア酸化は自然界の窒素循環に関与している可能性が考えられ、地球科学分野に新たな視点を与える他、この反応を媒介する酵素が特定されれば、酵素学や触媒設計といった分野への貢献も期待される。

## 7. 発表状況

【1】 **J. Saito**, K. Hashimoto, A. Okamoto, *Electrochimica Acta*, **2016**, 216, 261-265. 【2】 A. Okamoto, Y. Tokunou, **J. Saito**, *Biophysics and Physicobiology*, **2016**, 13, 71-76. 【3】 岡本章玄, 徳納吉秀, **齋藤淳貴**, バイオサイエンスとインダストリー, **2016**, 74(4), 284-288. 【4】 **J. Saito**, K. Hashimoto, A. Okamoto, *Electrochemistry*, **2017**, 85(8), 444-446. 【5】 **J. Saito**, M. Murugan, X. Deng, A. Guionet, W. Miran, A. Okamoto, A chapter of “Bioelectrochemical Interface Engineering” (Wiley), **2019**, ISBN:978-1-119-53842-4, 37-53. 【6】 **J. Saito**, X. Deng, A. Okamoto, under revision. 【7】 **J. Saito**, S. Kalathil, K. Nealson, K. Hashimoto, A. Okamoto, in preparation. 【8】 X. Deng, **J. Saito**, A. Okamoto, under revision. 【9】 E. L. Cava, A. Guionet, **J. Saito**, K. Hashimoto, A. Okamoto, in preparation.

## 8. 参考文献

[1] B. E. Logan *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, 7, 375. [2] M. Breuer *et al.*, *J. R. Soc. Interface*, **2014**, 12, 20141117. [3] A. Solopova *et al.*, *PNAS*, **2014**, 111(20), 7427 [4] A. Okamoto *et al.*, *PNAS*, **2012**, 110(19), 7856. [5] S. H. Kopf *et al.*, *Environ. Microbiol.*, **2015**, doi:10.1111/1462-2920.12752. [6] M. M. M. Kuypers *et al.*, *Nature*, **2003**, 422, 608. [7] M. S. Price *et al.*, *Biochemistry*, **2007**, 46(48), 13677