

審査の結果の要旨

氏名 ナラダス デイビア

細胞外電子移動とは、細菌外膜を貫通する電子伝達タンパク質を介して、代謝で生成された細胞内の還元力が細胞外の固体材料へと輸送される生物電気化学過程である。環境中の鉄還元細菌は、酸化鉄などの鉱物に対して電子伝達を行い、 NAD^+ の再生や ATP 合成等と共役した代謝反応を進め、エネルギーを獲得する。近年、鉄還元細菌に加え、ヒトを宿主とする多種多様な細菌集団（ヒト細菌叢）においても細胞外電子移動を行う細菌株が確認されている。しかし、電子を受け取る固体材料がほとんど存在しないヒト体内での細胞外電子移動の役割に関しては不明である。ここで、環境中の鉄還元細菌は高密度な細菌集団であるバイオフィルムを形成すると、電子を細菌間で移動させ外部に存在する酸素へと渡すことで嫌気空間の代謝活性を保つ「電気共生」を行うことが知られる。そこで本論文では、特にヒトの感染症に関連したバイオフィルムを形成する病原細菌において細胞外電子移動が重要な機能を有すると仮説を立て、その検証を目的とした。そこで、バイオフィルムを形成するモデルとして複数の口腔病原細菌を用いて、各株における細胞外電子移動の有無、および電子移動に伴う代謝機構について研究した。本論文の構成は以下の通りである。

第 1 章では、研究の背景や目的、手法について記述している。細菌の電子伝達過程とそれに伴う代謝、口腔内プラークの代表的な口腔内病原体と、その代謝反応の研究背景と重要性を議論した。各細菌の培養方法、電気化学的解析法、金属酵素の化学染色法、電子顕微鏡法、同位体分析などについても解説した。

第 2 章では、う蝕細菌である *Streptococcus mutans* における細胞外電子移動の有無と代謝経路・活性への寄与を検討した。*S. mutans* は Rex と呼ばれる NAD^+ の酸化還元状態に依存して遺伝子発現を制御する酵素を持つため、細胞外電子移動との関連を調べた。三電極系電気化学システムを用いて定電位電流測定を行い、代謝生成物追跡、同位体標識を用いた電極上細菌の 1 細胞代謝活性を解析すると、電流値は環境中の鉄還元細菌に比べて 3 桁以上小さいにも関わらず、電流生成に伴い代謝生成物がエタノールから乳酸へと変化し、代謝活性は有意

に増加した。一方で、この様な代謝の変化は Rex 遺伝子を欠損させた遺伝子破壊株では見られなかった。*S. mutans* の持つ Rex は既知のものに比べて 2 桁以上 NAD⁺ に対して高い親和性を示した。しかも、高い相同性を持つ配列は細胞外電子移動能を持つ多くの病原細菌株に特異的に保存されていた。これらの結果は、バイオフィルムを形成する多くの病原細菌が微小な細胞外電子移動によって代謝を変化・活性化させる機構を有することを示している。

第 3 章では、*S. mutans* が持つ pH 感受性が細胞外電子移動に与える影響を検証した。酸性条件で細菌培養をした場合には、電流生成、1 細胞レベルの代謝活性化、細胞表面に酸化還元酵素の局在が確認できたが、中性条件の場合にはそのいずれも見られなかった。これらの結果は、酸性ストレス環境であるバイオフィルム内において細胞外電子移動能が発現することを示唆している。

第 4 章では、各種口腔内病原細菌の細胞外電子移動機構を電気化学的に解析した。代表的な歯周病細菌 4 株を用いて電気化学測定を行うと、いずれの細菌からも電流生成が確認された。細菌表面の電子伝達酵素の酸化還元電位を測定、各細菌の口腔バイオフィルム内分布から、エネルギー準位の空間分布を示し、バイオフィルム内の長距離電子移動や電気共生の可能性について議論した。

第 5 章では、ヒト腸内サンプルから細胞外電子移動を行う細菌を単離し、その電流生成能を検証した。電極上でヒト腸内試料を集積培養すると *Enterococcus avium* と *Klebsiella pneumoniae* が単離され、いずれの細菌においても電流生成と細胞表面の酸化還元反応が確認された。これらはいずれもバイオフィルムを形成することで疾患をもたらす病原細菌であり、細菌群集からこれらの細菌が電極集積されたことは、病原性と細胞外電子移動の関連性を示唆している。

第 6 章では、本研究の総括を行っている。また、病原細菌の電流生成能を利用した医療技術やセンサー応用の可能性についての展望が論じられている。

以上の内容から、本論文はヒトを宿主とする様々な病原細菌が細胞外電子移動を行い、その代謝過程と重要な関連があることを電気化学、分子生物学的に示した。これらの成果は、ヒト病原細菌における電気細菌学という新分野の創成・発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。