

博士論文

鉄酸化化学独立細菌を利用した電気化学的有機物生産に関する研究

Study on the electrochemical organic production using Fe-oxidizing
bacteria

指導教官 橋本和仁教授

東京大学大学院 工学系研究科 応用化学専攻

橋本研究室 3 7 1 2 7 1 0 7 石居 拓己

目次

第 1 章. 序論.....	- 4 -
1-1 研究背景.....	- 5 -
1-2 本研究の目的と構成.....	- 17 -
第 2 章. 酸性鉄酸化化学独立細菌を用いた電気化学的 CO ₂ 還元と有機物生産.....	- 19 -
2-1 緒言.....	- 20 -
2-2 鉄酸化化学独立細菌による電気化学的 CO ₂ 還元実験.....	- 29 -
2-2-1 実験.....	- 29 -
2-2-2 結果と考察.....	- 36 -
2-3 細胞外に放出される低分子有機酸の代謝活動への影響.....	- 41 -
2-3-1 実験.....	- 41 -
2-3-2 結果と考察.....	- 42 -
2-4 総括.....	- 45 -
第 3 章. メディエーター不在条件下における酸性鉄酸化化学独立細菌による電気化学的 CO ₂ 還元	- 46 -
3-1 緒言.....	- 47 -
3-2 微生物に対する電極からの直接電子注入と CO ₂ 還元.....	- 50 -
3-2-1 実験.....	- 50 -
3-2-2 結果と考察.....	- 53 -
3-3 直接電子注入条件下における細胞内代謝過程の検討.....	- 59 -
3-3-2 実験.....	- 65 -
3-3-3 結果と考察.....	- 69 -
3-4 総括.....	- 83 -
第 4 章. 中性化学独立細菌への発展.....	- 85 -
4-1 緒言.....	- 86 -
4-2 実験.....	- 89 -
4-3 結果と考察.....	- 91 -
4-4 総括.....	- 97 -
第 5 章. 総括.....	- 98 -
参考文献.....	- 106 -
謝辞.....	- 116 -

第1章. 序論

1-1 研究背景

20 世紀における人類の発展は大量生産大量消費によって成り立っていた。

しかしながら 21 世紀に至り、資源の枯渇が表面化した。特に、石油の枯渇はエネルギー、化学合成品原料の両面から深刻化している。日本では 2011 年 3 月に東日本大震災が起これ、同時に福島第一原子力発電所での事故が発生した。それによって、エネルギー問題の切り札になりうると思われていた原子力発電は再検討を余儀なくされた。現在、一部の原子力発電所が再稼働し、他の原子力発電所についても再稼働が進められているが、完全な原子力の復帰や増設に至るにはまだ時間がかかることが予想される。このような中で求められるのは持続可能なエネルギーデバイスの活用である。代表的なものとして太陽電池や燃料電池がある。

太陽電池は光エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスであり、我が国でも重要な一次エネルギーとして見込まれている。石油に頼らないエネルギーとして期待されているが、太陽電池のデバイス寿命の問題や安定した電力供給の上で課題があるとされる。

燃料電池は主に水素やメタンを空気中の酸素と反応させて電気エネルギーを得るデバイスである。都市部において、発電時に CO_2 を発生させないという利点があり、次世代のエネルギーとして期待されている。すでに家庭用燃料電池は普及しているが、今後燃料電池自動車などの分野への発展が期待される。

こういったデバイスに関する研究は大きく「高効率化」「長寿命化」「低コスト化」などに分かれる。太陽電池や燃料電池のようなデバイスは、高い効率を求める研究が盛んに行われている。また、長期間駆動するエネルギーデバイスの開発も進められてきた。デバイスが長寿命であることは、総合的なエネルギー効率の向上に寄与するのみでなく、ユーザビリティの点からも優れており、商業的に展開する上で不可欠の要素である。特に触媒反応を伴うデバイスでは、触媒の劣化は極めて重要な問題になる。触媒には価格の高い貴金属 (Pt や Ru など) が用いられることが多く、コスト的な観点からも頻りに交換することができない。

デバイスを長寿命化するためには丈夫で劣化しにくい仕組みを作ればよい。デバイスは時間がたつにつれ機能を低下させていく。これを熱力学的に解釈すると、系のエントロピーが上昇していくと言い換えることができる。初期の状態では、デバイスは低いエントロピー状態に維持されており、秩序だった状態によって機能を発現する。使用が続くと、徐々にエントロピーが上昇し、部分的に破損し、あるいは触媒構造が破壊されるといった現象が起こる。熱力学の第二法則からもわかるとおりこの劣化は原理的には防ぐことができない。

しかし近年、エントロピーの上昇という劣化に対して、新しい考え方で解決するデバイスが考案されている[1]。それは、系の中で上昇したエントロピーに相当するエネルギーを消費し、上がった分のエントロピーを再び減少させるという仕組みである。すなわち、デ

バイスの自己修復である[2][3]。例えば燃料電池の触媒で言えば、燃料によって得られるエネルギーの一部を使って、劣化した部分を修復し、初期状態を維持することで長寿命化を狙う。

デバイスの自己修復という観点から研究されている分野の一つに、微生物を触媒的に利用したエネルギー分野がある[4][5][6]。従来技術では貴金属等の無機触媒が利用されることが多かったが、微生物を触媒的に利用することで目標とする反応を達成する。微生物は自身の代謝活動の一環として様々な反応を起こす。この反応の一部を我々人類が利用できる形で取り出し、触媒として機能させる。

生命は、鉄や銅に代表されるような自然環境に豊富にある元素を利用し、様々な化学反応を高効率・高選択率で行う。一例として、ミトコンドリアの電子伝達系において電子の授受を行うのは、鉄、銅といったアバンダントな金属と有機物である。このように自然界に多量にある物質を巧みに利用し、ミトコンドリアは40%以上の高い効率でエネルギー変換を行っている[7]。また、生命には環境適応力、自己修復力があり、自己増殖が可能である。特に、自己修復・自己増殖という機能は生命が本質的に有している特徴である。生物が自己修復能を持つということは、生物をデバイスの一部として利用することで、デバイス自身の劣化を防ぐことにつながる。

特に我々が着目したのは自然界における有機物生産過程である。エネルギー変換による有機物生産は、石油の枯渇と戦う人類にとって重要な役割を果たすと考えられる。生成した有機物はエネルギーとして発電などに利用するのみならず、様々な化学製品の原料となる。我々は自然界のエネルギー変換を利用して、有機物生産システムを組み上げることを目指した。

微生物の工業利用

人類は古来より様々な場所で微生物を利用してきた[8]。代表的なものは発酵による物質生産、食糧生産としての利用であろう[9][10][11]。発酵とは微生物が有機物の一部を分解し、別の物質に変化させることをいう。納豆・ヨーグルト・チーズなどの発酵食品は現代日本においても広く食されている。20世紀以降には微生物工学の発展により、より高度な産業利用もなされるようになってきた。例えばクエン酸や酢酸などを微生物によって発酵生産する技術が発明され[12]、医学の分野ではペニシリンなどの抗生物質が微生物培養によって生み出された。これらは生物の持つ機能を人類が利用できる形で引き出した最たる例である[13]。

今後、微生物の利用はエネルギー分野においても広がっていくことが予想される。現在、*Euglena gracillis* と呼ばれる微生物が作り出す油分がジェット燃料として利用可能だという研究がなされている[14]。また、のちに述べる微生物燃料電池では、微生物を燃料電池の

触媒として利用することで、燃料として利用できる物質の幅を大きく広げた燃料電池システムが提案されている[15][16]。

生物の工業利用では、反応に貴金属を使用しないという利点がある。有機合成や燃料電池のような分野では、貴金属触媒を用いた反応が多い。一方、微生物を利用した場合には、微生物の酵素が触媒として機能することになる。一般に微生物の酵素に利用される金属は鉄や銅などの第4周期遷移金属が主であり、希少金属に頼らない。

また、微生物を利用する場合、高温高圧のような条件が必要ないという点も重要である。生物酵素は人工系では高温が必要になるような反応も低温条件で効率よく駆動することができる優秀な触媒である。

有機物資源の枯渇

我々の社会では有機物資源の枯渇が極めて重要な問題になっている。有機物資源は、食物・燃料・プラスチック材料など様々なところで利用される。特に石油は有機物資源の代表であるが、サステナビリティが低く、石油資源の枯渇の問題が現在顕在化している。石油埋蔵量は現在 50 年程度と言われている[17]。採掘技術の発展によってこの数字そのものは伸びる可能性があるが、それでも限られた未来の中で脱石油の考え方が重要になってくるのは間違いない。燃料としての石油に関しては太陽光・原子力発電などの新たな発電技術や、シェールガスやメタンハイドレートなどの新たな燃料の供給によって部分的にはあるが脱石油が進んでいる。また、トウモロコシなどの穀物からエタノールを生成するバイオエタノール技術などは、石油ではなく植物の固定した有機物を燃料として利用することができるため、脱石油のため利用できると同時に、CO₂による地球温暖化対策としても有効と考えられている。しかし、バイオエタノールでは穀物を有機物源として利用しているため食糧需給に対する影響が問題視されている[18]。

こういった問題のなかで、いかにして“有機物”を獲得していくかというのは、我々人類社会が成立していくために重要なポイントといえる。そのうえで特に重要なのはサステナビリティを維持できる仕組みを提供できるか否かということである。

自然界における有機物生産

自然界における有機物生産では、どのように行われているのだろうか。一般によく知られている生物のCO₂還元として、光合成によるCO₂還元がある。光合成反応とは植物の葉緑体内部で進行し、光エネルギーを利用してCO₂の還元を行う機構である。太陽光をエネルギー源とした光合成では、年間に何百億トンという量のCO₂が固定されており[19][20]、地上での有機物生産を担っている。光合成は明反応と暗反応に大分され、明反応で光エネルギーを吸収して高い還元力を生み出し、暗反応でそのエネルギーを用いて有機物生産を

行う [21][22][23]。明反応では光学系 I と光学系 II と呼ばれる二つのクロロフィルが存在し、ここが光吸収を行う(図 1-1)。この光吸収による電子励起では、1 回あたり約 1.8 eV というエネルギーの吸収が起こり、これが CO₂ 還元に必要な高い還元力を持つ NADPH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸) と高いエネルギーを持つ ATP (アデノシン三リン酸) を合成する。また、光励起によって生成したホールは水の酸化反応に利用され、酸素発生を担う。このような光励起による電子移動は Z スキームと呼ばれる。ここで生成した NADPH、及び ATP は葉緑体内部のストローマに移動し、そこで暗反応に利用される。

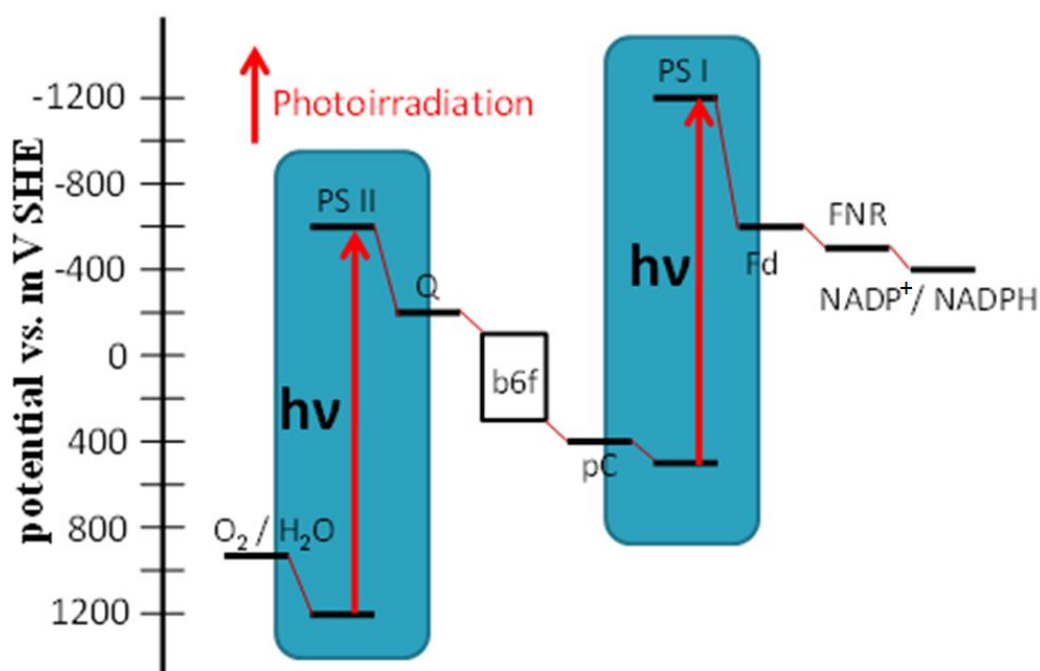


図 1-1 光合成における電子伝達プロセス。

赤矢印は光吸収を意味し、二度の光吸収によって高い還元力を獲得している。発生したホールは水の酸化に利用される。電子は最終的に NADPH の生成に利用される。

暗反応では明反応によって得られた NADPH と ATP が利用され有機物生産が行われている。これはカルビン・ベンソン回路の駆動によってなされる。カルビン・ベンソン回路は 1950 年に Melvin Calvin らによって報告された炭素固定機構である [24]。CO₂ を固定し、フルクトース-6-リン酸を合成することで糖新生経路に入り、多糖を生成する。この反応において CO₂ 固定を担う酵素はリブローズ 1,5-二リン酸カルボキシラーゼ : RubisCO と呼ばれ、地球上で最も多い酵素と言われている [25]。Calvin はこの発見によって 1961 年にノーベル化学賞を受賞した。

このような光合成によるエネルギー生産は地上における有機物生産の基礎となっている。合成された有機物は、食物連鎖の仕組みにそって草食動物や肉食動物に取り込まれ、炭素循環が成り立っている。光合成ではこの炭素循環における最初のステップを担うという意味で一次生産と呼ばれ、地上における食物連鎖の起点として機能している。

一方で自然界には光合成を利用することなく CO₂ 還元を行う生物が存在することが知られている。このような生物は化学独立細菌 (chemoautotroph) と呼ばれ、還元性物質を酸化することでエネルギーを獲得し、CO₂ 還元を行っている[26]。化学独立の“化学”とはすなわちエネルギー源として化学エネルギーを利用することを意味し、“独立”とは CO₂ 固定を行い自ら有機物を作り出すという意味である。ここでいう還元性物質とは H₂, S⁰, Fe²⁺, H₂S などの化合物で、光合成における光エネルギーの代替としてこれらの物質を酸化して得られる化学エネルギーを利用し、CO₂ 還元に必要な高い還元力を獲得する機構を備えている。特に深海のような光が届かない環境下ではこのような化学独立細菌が熱水噴出孔や火山岩から放出される H₂ や CH₄ や Fe²⁺ や H₂S などをエネルギー源として利用し、食物連鎖の一次生産者を担っているといわれる[27][28][29]。

中でも Fe²⁺ を酸化することで CO₂ 還元を行う生物は鉄酸化化学独立細菌 (iron-oxidizing chemoautotroph) と呼ばれ、一部の酸性湖や海底などに存在することが知られている[30][31][32]。また、地球科学的研究結果として、海底での有機物生産の 50 % を鉄酸化化学独立細菌が行っていることが示唆されている[33][34]。Fe²⁺ は酸化によって得られる自由エネルギーが非常に小さいという特徴を持っている。表 1-1 にはいくつかの無機物質を酸化した際に得られるエネルギーを示した。

物質名	化学式	反応	ΔG / kJ mol ⁻¹
メタン	CH ₄	CH ₄ +2O ₂ →HCO ³⁻ +H ⁺ +H ₂ O	-803
硫化水素	H ₂ S、HS ⁻	HS ⁻ +2O ₂ →SO ₄ ²⁻ +H ⁺	-790
		HS ⁻ +1/2O ₂ +H ⁺ →S ⁰ +H ₂ O	-182
第一鉄イオン	Fe ²⁺	Fe ²⁺ +1/4O ₂ +3/2H ₂ O→FeOOH+2H ⁺	-26
水素	H ₂	H ₂ +1/2O ₂ →H ₂ O	-263

表 1-1 還元性の無機物を酸化することで獲得できるエネルギー[35]

鉄の酸化によって獲得されるエネルギーは、Fe²⁺/Fe³⁺の酸化還元電位と O₂/H₂O の酸化還元電位の差から計算される。細かな値は、溶液の状態 (温度やイオン濃度など) によって変化するが、おおよそ数 100 meV 程度のエネルギーである。一方 CO₂ 還元を行うのに要求されるエネルギーは CO₂/(CH₂O)_n の酸化還元電位と Fe²⁺/Fe³⁺の酸化還元電位の差から求められ、数 eV 程度の大きさになる。鉄の酸化によって得られるエネルギーが CO₂ 還元に必要なエネルギーに満たないため、鉄の酸化と CO₂ 還元を直接的に結び付けることはできない。鉄酸化化学独立細菌は後述する独特の電子エネルギー昇圧メカニズムを有しており、

それが Fe^{2+} の持つ還元力の低い電子を CO_2 還元利用可能な高い還元力を持つ電子に引き上げる機能を果たしている。

以上に述べたように、生物による有機物生産過程には大きく分けて光合成によるものと化学合成によるものが存在する。光合成に関しては CO_2 削減や有機物生産といった工業的な視点から、生体内部の機構に迫るといった生物学的な視点まで、幅広い研究がなされている。その結果光合成の細かなプロセスについても様々な知見が得られている[36][37]。また、一部の藻類などを用いて、燃料となる有機物を作る研究なども進められ、実用化が期待されている[38]。一方で化学独立細菌による有機物生産プロセスのメカニズムについては不明点が多く、化学独立細菌の工業的な利用は限られた範囲に留まっている。

そこで本研究では特にこのメカニズムを物理化学的視点で捉え直して解析をし、鉄酸化化学独立細菌によって光合成とは異なる形でのエネルギー昇圧型 CO_2 還元を行った。

鉄酸化化学独立細菌の電子伝達系とミトコンドリアの電子伝達系の比較

鉄酸化化学独立細菌の電子伝達は、ミトコンドリアの電子伝達プロセスと類似性がある。

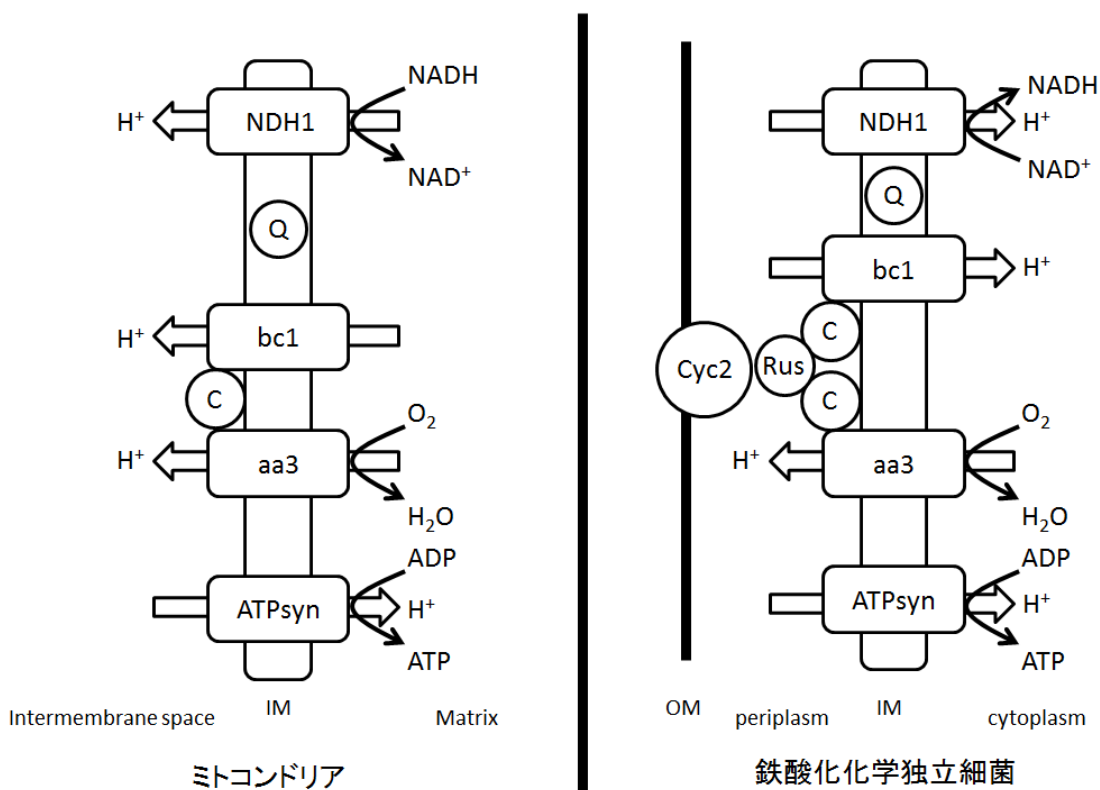


図 1-2 ミトコンドリアと鉄酸化化学独立細菌の電子伝達プロセスの比較

図 1-2 にミトコンドリアと鉄酸化化学独立細菌のそれぞれの膜タンパク質を模式的に示した。図の左側がミトコンドリアの電子伝達系[21]、右側が鉄酸化化学独立細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の代謝電子伝達系である[39][40][41][42][43]。

ミトコンドリアの電子伝達系では、解糖系やクエン酸回路などによる有機物の分解で生じた NADH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を利用し、最終的に ATP を合成する。ミトコンドリアでは NADH が分解して得られた電子は NDH1、bc1 複合体、aa3 複合体と経由し、酸素に渡される。ここではそれぞれの膜タンパク質を電子が通過する際、Matrix 側から Intermembrane 側にプロトンが移動する。このプロトンの移動によって生じたプロトンの電気化学ポテンシャル差を利用して、膜貫通型の ATP 合成酵素によって ATP が合成される。ATP 合成酵素はプロトンの電気化学ポテンシャル差を解放する方向にプロトンを輸送するタンパク質であり、このポテンシャル差を利用して ATP を合成する。

鉄酸化化学独立細菌の場合は、ミトコンドリアにおける bc1 複合体と aa3 複合体の中間に鉄イオンの酸化によって得られた電子の入り口が存在しており、そこから uphill electron transfer と downhill electron transfer に分岐する構造をしている。プロトンの移動に関して、aa3 複合体と ATP 合成酵素は、鉄酸化化学独立細菌とミトコンドリアで同様の方向に動く。一方、NDH1 と bc1 複合体では電子の方向、及びプロトンの移動方向がミトコンドリアと鉄酸化化学独立細菌では、逆方向になる。

ここまで述べてきたミトコンドリア、光合成生物、鉄酸化化学独立細菌について、電子伝達代謝の電子源 (electron donor)、電子受容体 (electron acceptor)、エネルギー源、RubisCO の駆動の有無についてまとめた (表 1-2)。

	electron donor	electron acceptor	エネルギー源	RubisCO
ミトコンドリア	NADH	O ₂	NADHの化学エネルギー	×
光合成生物	H ₂ O	NADP ⁺	光エネルギー	○
鉄酸化化学独立細菌	Fe ²⁺	NAD ⁺ 、O ₂	Fe ²⁺ の化学エネルギー	○

表 1-2 代謝の電子伝達における比較

鉄酸化化学独立細菌の場合、エネルギー源は化学エネルギーを利用しながら、光合成生物と同様に、RubisCO を利用した有機物生産を行っている。

鉄酸化化学独立細菌の電子エネルギー昇圧メカニズム

鉄酸化化学独立細菌において提唱されている電子エネルギー昇圧メカニズムを解説する。鉄酸化化学独立細菌の電子エネルギー昇圧メカニズムについては、代表的な微生物を使った検討がなされている[39][40][41][42][43]。図 1-3 に示したのは酸性鉄酸化化学独立細菌の細胞膜上に発現する電子伝達経路の模式図である。

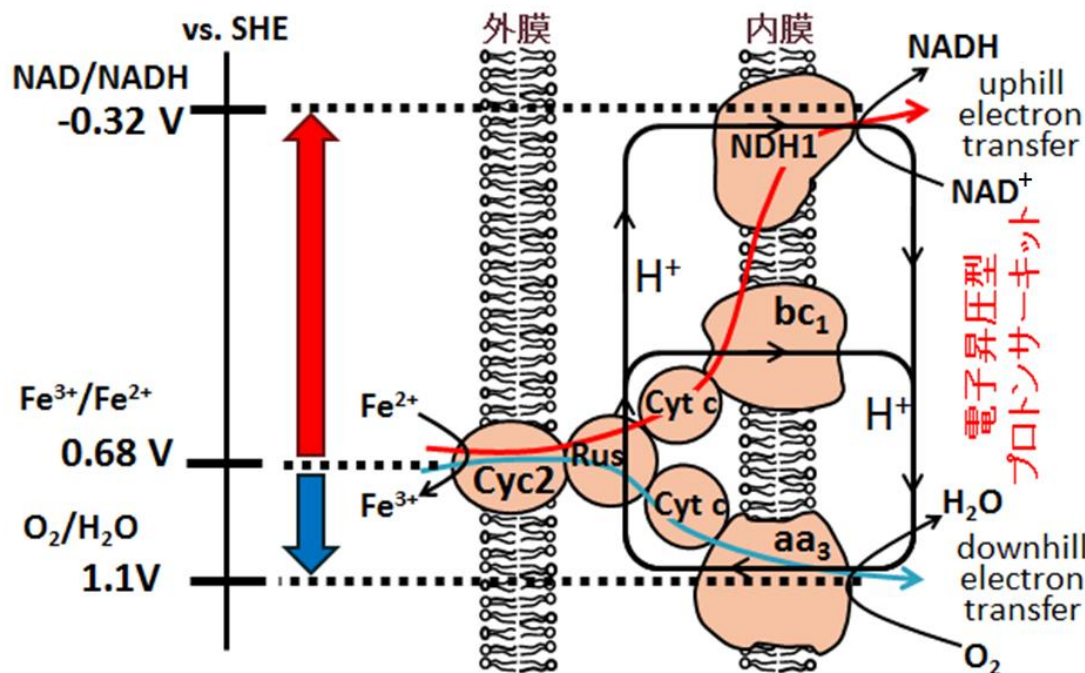


図 1-3 鉄酸化化学独立細菌の細胞膜上に発現する分岐型電子伝達経路

左側が細胞の外側であり、左の脂質膜が細胞外膜、右の脂質膜が細胞内膜、さらに右側が細胞内部である。細胞外膜上に存在する Cyc2 というタンパク質が Fe^{2+} の酸化反応が駆動する場所であり、取り出された電子は枝分かれした電子伝達タンパク質によって、downhill electron transfer と uphill electron transfer に分岐して伝達される。まず、downhill electron transfer は電子がエネルギーを失う機構であり、最終電子受容体は O_2 である。 Fe^{2+} から取り出された電子はタンパク質内を伝達し、最終的に aa3 複合体と呼ばれるタンパク質上で O_2 に渡される。aa3 複合体は電子授受を担うタンパク質であると同時に、プロトンの細胞内膜を隔てた輸送を担うタンパク質でもある。aa3 複合体で電子移動が起こる際に、プロトンが細胞内側から外側へ輸送される。この機構によって細胞内膜の内側と外側でプロトンの電気化学ポテンシャル差（プロトン駆動力：proton motive force：PMF）が生成する。すなわち downhill electron transfer は電子がエネルギーを失い、代わりにプロトンの電気化学ポテンシャル差として細胞膜にエネルギーが蓄えられる。一方 uphill electron transfer は電子がエネルギーを獲得し高い還元力を得る機構であり、最終電子受容体は NAD(P)^+ である。この uphill electron transfer では電子が bc1 複合体、及び NDH1 という二つの膜貫通タンパク質を通過する。これら二つのタンパク質は電子伝達を担う際に、aa3 複合体と同様、膜内外でのプロトンの輸送を行う。プロトン輸送は細胞内膜の外側から内側に流れ込む方向で起こる。このプロセスはプロトンの電気化学ポテンシャル差を解放する方向であり、downhill electron transfer における aa3 複合体によるプロトン輸送と逆の方向である。解放された電気化学ポテンシャル差のエネルギーは、電子の還元力を高めるために利用され

るため、このプロセスは電子がエネルギーを獲得するプロセスとなる。 Fe^{2+} の酸化反応では、酸化還元電位が+0.7 V vs. SHE (standard hydrogen electrode) 付近にあるが、uphill electron transfer で bc1 複合体と NDH1 を通過することで還元力を獲得し、最終的に-0.32 V vs. SHE に至る。こうして高い還元力を獲得することで NAD(P)^+ を還元できる。生成した NAD(P)H はカルビン・ベンソン回路を通じて CO_2 還元を利用される。

これらの二つの分岐した電子伝達経路によって、鉄酸化化学独立細菌は Fe^{2+} の酸化と CO_2 還元を結びつけている。uphill electron transfer と downhill electron transfer はプロトンの循環 (プロトンサーキット) を通じて相互に関係しており、 Fe^{2+} の酸化で得られる低いエネルギーの電子を利用するための機能を担っている。

前述したとおり Fe^{2+} の酸化が O_2 の還元反応とカップルしたときに得られるエネルギーは $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ の酸化還元電位と $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ の酸化還元電位の差から求められ、数 100 meV 程度である。これは Fe^{2+} の酸化に伴って CO_2 を還元するのに必要なエネルギー (1~2eV) に満たない。そのため、downhill electron transfer と uphill electron transfer の駆動率は downhill electron transfer の方が高くなる。すなわち、 Fe^{2+} を酸化して得られた電子の多くを O_2 に受け渡すことで (つまり、downhill electron transfer を駆動することで) エネルギーを細胞膜間に蓄え (プロトン電気化学ポテンシャル差)、蓄えたエネルギーを解放して CO_2 還元 (uphill electron transfer) を行うためのエネルギーとする。

細胞膜の内外におけるプロトンの電気化学ポテンシャル差によってエネルギーを蓄える仕組みは、ミトコンドリアの電子伝達系における ATP 合成や、原核生物の鞭毛運動などでも利用されるエネルギー機構である[21]。鉄酸化化学独立細菌の場合には、このエネルギー利用の一形態として、 Fe^{2+} のイオンの持つ低い還元力を高めるのに利用しているということができる。また鉄酸化化学独立細菌において、downhill electron transfer によって生成したプロトンの電気化学ポテンシャル差は、ATP 合成などにも利用されている。

プロトン移動に伴う熱力学的制約

鉄酸化化学独立細菌の代謝プロセスにおいては、幾つかの熱力学的制約が存在するため、それについて考察する。

まず、downhill electron transfer では酸素還元が行われると同時に、プロトン駆動力が生成する。この機構として、2つのメカニズムが提唱されている[44]。一つは酸素が消費される際に内膜の外側(pH2)のプロトンを消費し、膜内部から外側にプロトンを輸送するプロセス(i)、もう一つは膜内部のプロトンを消費することで、プロトン駆動力を生成するプロセス(ii)である。(ii)のプロセスではプロトンが膜の内側から外側に輸送されていないが、膜内側のプロトンが酸素還元反応で消費されることで、プロトン駆動力を生成している。

以下、膜間の pH 差を ΔpH 、膜電位を $\Delta\phi$ （膜内側が正）、 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ と $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ の酸化還元電位の差を ΔE_1 とし、電子 1 つあたりのエネルギーを計算する。(i) のケースでは aa3 複合体上での反応のために、以下の制約が生じる。反応のギブスエネルギー変化について

$$-e\Delta E_1 + (-e\Delta\phi + e \times 59.2 \text{ mV} \times \Delta\text{pH}) < 0$$

ここで、酸素還元のプロトンソースが酸性域であることに注意して、

$$\Delta E_1 = 1.13 \text{ V} - 0.68 \text{ V} = 0.45 \text{ V}$$

$$\Delta\text{pH} = 6.5 - 1.8 = 4.7$$

を代入して整理すると

$$\Delta\phi > -0.18 \text{ V}$$

となる。

(ii) の場合も同様に計算すると、

$$-e\Delta E_1 + (-e\Delta\phi) < 0$$

ここで、酸素還元のプロトンソースが膜の内側（pH \sim 6.5）であることを考慮して、

$$\Delta E_1 = 0.86 \text{ V} - 0.68 \text{ V} = 0.18 \text{ V}$$

よって、

$$\Delta\phi > -0.18 \text{ V}$$

となる。これは、(i) のケースと同様である。

次に、uphill electron transfer においても、同様の関係式を導く。反応は bc1 複合体、及び NDH1 で進行し、それぞれ反応に伴って、4 つずつ（合計 8 つ）のプロトンが膜外側から内側に移動する。 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ と NAD^+/NADH の酸化還元電位の差を ΔE_2 とし先ほどと同様に計算すると、反応に伴う自由エネルギー変化は、

$$-e\Delta E_2 + (-e\Delta\phi) - 8 \times (-e\Delta\phi + e \times 59.2 \text{ mV} \times \Delta\text{pH}) < 0$$

ここで

$$\Delta E_2 = -0.29 \text{ V} - 0.68 \text{ V} = -0.97 \text{ V}$$

をもとに計算すると、

$$\Delta\phi < 0.18 \text{ V}$$

以上の考察から、膜電位が

$$-0.18 \text{ V} < \Delta\phi < 0.18 \text{ V}$$

の範囲にあるとき、本系は成立する。pH2 の条件で膜電位は 10 mV 程度とされており[44]、条件を満たす。

微生物電気化学

生物のエネルギー機構をいかに我々人類に利用できる形にするか、すなわち、いかにしてデバイスとして組み立てるかという問題がある。その答えの一つが微生物電気化学の利用である。微生物電気化学は微生物学と電気化学を融合した分野であり、近年活発に研究されている[45][46][47]。微生物電気化学では、生物の代謝活動を電気化学的視点で捉え、電極反応として追跡することを考える。

鉄酸化化学独立細菌による Fe^{2+} の酸化反応などの生物の代謝活動は究極的には酸化還元反応の駆動であり、電子の流れである。そのため、電子の流れをなんらかの形で外部に取り出し電極上で観測すれば、電気化学手法によって解析を行うことができ、電気エネルギーと結びつけることができる。

微生物電気化学の分野では微生物の代謝プロセス（電子の移動）を電気化学的に追跡する[48]。この際重要となるのが、微生物が細胞外の物質と電子のやり取りをする細胞外電子伝達である。一般的な電子伝達は生物が体内に代謝物質を取り込みすべての酸化還元反応が細胞の内側で完結する。例えばミトコンドリアにおける電子伝達はミトコンドリア内部に取り込まれた有機物と酸素が反応し、細胞外との電子のやりとりはない。一方、細胞外電子伝達の場合には、酸化還元反応が細胞内で完結せず、細胞外との電子のやりとりをすることになる[49]。すなわち、細胞の外側にある物質を酸化して得られた電子を細胞内部の物質の還元を利用したり、逆に細胞の内側の物質を酸化して得られた電子を細胞外部の物質の還元を利用したりする。細胞外部との電子のやりとりであるから、電気化学的な方法論によって、追跡研究することが可能となる。

細胞外電子伝達能力を備える代表的な微生物として、*Shewanella* や *Geobacter* が知られている。これらの微生物は、外部の固体や化合物を電子アクセプターとして利用することが可能であり、これまで様々な研究がされてきた[50]。*Shewanella* や *Geobacter* はいずれも細胞膜上に電子伝達タンパク質を有しており、そこから外部に電子を吐き出す仕組みを有している。そのため、電子受容体を体内に取り込むことなく、細胞外にある固体を電子受容体として利用することができる。

細胞外電子伝達的能力を持つ微生物は、代謝の結果として固体に電子を受け渡すことのできるため、一種の電極触媒のように利用することができる。それを利用し、微生物燃料電池への応用が特に期待され、研究が進められている(図 1-4)。微生物燃料電池とは微生物の代謝活動を燃料電池の触媒として利用するシステムである。微生物が電子源として利用可能なものであれば、エネルギー源として利用可能であるため、多様な有機物をエネルギー源として利用できる。現在、廃棄物処理過程への利用や水田における発電などへの応用が研究されている[51][52]。

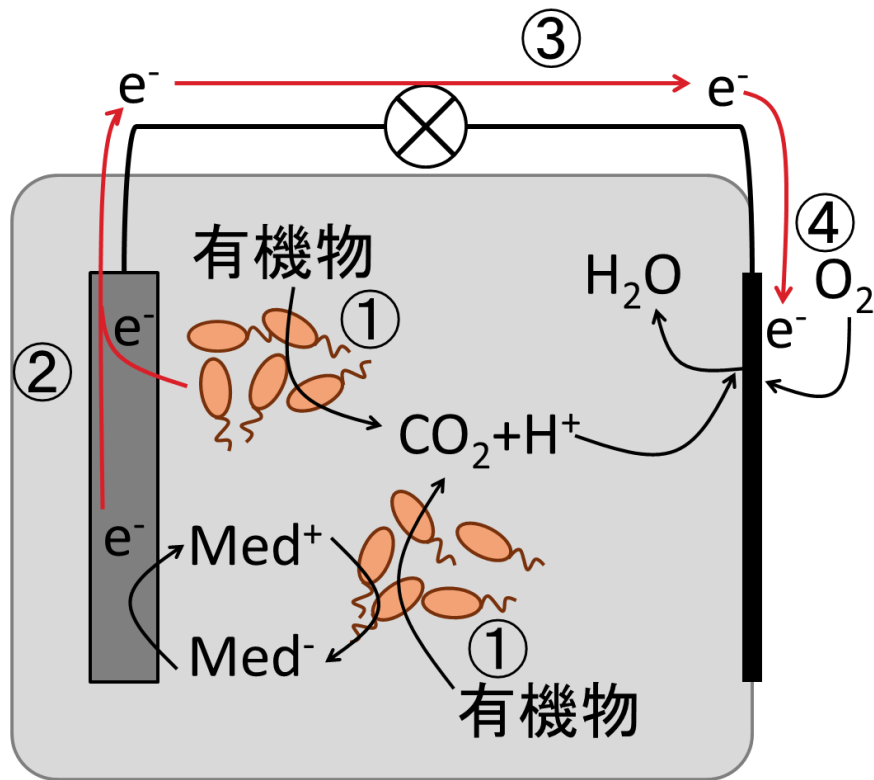


図 1-4 微生物燃料電池のメカニズム

①微生物によって有機物が酸化される。②有機物の酸化で得られた電子が電極に回収される。この際、微生物が直接的に電子を受け渡す直接型電子伝達とメディエーター(Med)を介して電子を受け渡す間接型電子伝達がある。③外部回路を通して電子が対極に送られる。この際電気エネルギーが取り出される。④空気中の酸素が水中のプロトン、及びアノードから運ばれた電子と反応し水が生成する。

微生物電気化学の研究は工学的な側面のみならず、実際の生態系の理解を進めるという観点においても重要である。Kai らは細胞外電子伝達を行う鉄還元細菌の培養環境に、コロイド状のヘマタイト (Fe_2O_3) を加え、細胞外電子伝達への影響を観測した[53]。その結果このような環境では長距離電子伝達に依って多数の微生物にとって生存しやすい環境が作りだされることを見出した。これは細胞外電子伝達を行える環境下において、生物が積極的に、固体に対する電子伝達を利用していることを意味している。他の生物や他の鉱物に関しても細胞外電子伝達が生物の生命活動に積極的に利用されている可能性があり、今後の研究が期待される。

これまで微生物電気化学で細胞外電子伝達が検討されてきたのは、細胞外に電子を放出する微生物に関するものがほとんどであった。しかしながら、細胞外から細胞内に電子を取り込む微生物については、電子を放出する微生物に比べて研究が進んでいない。鉄酸化

化学独立細菌を電気化学的に培養する手法に関してはいくつか報告されているものの、主として菌体増殖の最適化検討などが行われているにすぎず、微生物と固体が電子授受を行う際の詳細な電気化学的検討はなされてこなかった。しかしながら、鉄酸化化学独立細菌による電子授受の場合にも、鉄還元細菌で報告されているような間接型の細胞外電子伝達、及び直接型の細胞外電子伝達が存在する可能性は考えられる。

細胞外電子伝達過程は生命活動を電気化学的に追跡する上で重要な役割を示すものであり、これを利用することで代謝活動を物理化学的視点から捉えることができ、さらには微生物を利用した電気的な CO₂ 還元にも発展させることができる。また、鉄酸化化学独立細菌による細胞外電子伝達過程は、自然界においても重要な役割を果たしている可能性があり、細胞外電子伝達に関する知見を得ることは、生態系を理解するという生物学的観点からも重要な意義を持つものといえる。本研究ではこのような鉄酸化化学独立細菌による細胞外電子伝達に着目し研究を進めた。

1-2 本研究の目的と構成

以上のような背景のもと、本研究では鉄酸化化学独立細菌による CO₂ 還元に着目し、鉄酸化化学独立細菌を用いた電気化学系を組むことで、極小エネルギーを利用したエネルギー変換デバイスが構築を目指した。具体的には *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 株 (*A. ferrooxidans*) と *Mariprofundus ferroxydans* PV1 株 (*M. ferroxydans*) という 2 種類の細菌をモデル微生物として利用し、電気化学系を用いて電気化学応答を追跡しながら CO₂ 還元反応を駆動させた。

第 2 章では酸性鉄酸化化学独立細菌である *A. ferrooxidans* を用いて、電気化学実験を行った結果を報告する。第 2 章の目的は鉄酸化化学独立細菌を電気化学的に培養可能であることを示すとともに、電気化学培養条件下で振盪培養とは異なる挙動が観測されることを示すことである。実験は、2 層型電気化学セルに微生物を添加し、電位をコントロールすることで微生物培養を行った。この電気化学培養では、電子メディエーターとして Fe³⁺/Fe²⁺ を含む系を構築して行った。Fe³⁺/Fe²⁺ を含む電気化学培養に関しては既報が存在するが、それらは専ら菌体増殖にのみ着目したものであり、CO₂ 還元能や物質生産への応用に主眼を置いたものではなかった。本研究では Fe³⁺/Fe²⁺ を含む実験による検討から、電気化学的に微生物培養を行った系において、鉄酸化化学独立細菌が細胞外に固定した有機物を 60 % 以上の割合で放出しているという結果を得た。これは、鉄酸化化学独立細菌を用いた物質生産技術を検討する上で重要な報告である。最終的なデバイス構築を視野に入れた場合、微生物によって固定化された有機物が細胞外に放出されることは、固定された有機物の抽出を容易にする。

また、本実験結果から放出された物質が低分子有機酸の一種であるピルビン酸であることが明らかにした。ピルビン酸は細胞のプロトンの電気化学ポテンシャル差を脱共役し、

ATP 合成や NADH 合成を阻害する。この阻害効果が振盪培養系と電気化学培養系では異なり、電気化学培養の優位性を示した。

第 3 章では *A. ferrooxidans* を用いた電気化学実験を $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ を含まない条件下で行った結果を報告する。ここでは微生物細胞が電極と接触することで電子のやりとりをすることを示し、その電子伝達機能を利用することで代謝過程の追跡を行うことを目的とした。実験では、 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ を含まない系では微生物をフッ素ドープ酸化スズ(FTO)電極と直接接触させることで電子授受を行わせ、その条件下での電気化学応答、及び菌体増殖を観測した。その結果、微生物と電極が直接接触している条件下において、生物代謝に由来する電流が観測されることを発見し、微生物と電極間の電子伝達について考察した。また、鉄イオンを利用せずに電極と電子のやりとりをする条件下で、有機物合成が進行することを確認した。さらにこのような電子伝達条件下における細胞内電子伝達プロセスを追跡するために阻害剤を用いた実験を行い、**uphill electron transfer**、及び **downhill electron transfer** のそれぞれの駆動を観測することに成功した。さらに光応答性代謝阻害剤を用いた検討を行うことで **downhill electron transfer** に流れる電子の流れを追跡することに成功した。これらの結果により、鉄酸化化学独立細菌がカソード方向の細胞外電子伝達を行うこと、その代謝過程が直接電子伝達または補酵素を介した短距離型電子伝達であること、及び細胞外電子伝達過程では鉄代謝系のタンパク質が電子伝達を担っていることを示した。

第 4 章では中性鉄酸化化学独立細菌である、*M. ferrooxydans* を用いた電気化学実験を行った。中性鉄酸化化学独立細菌は酸性鉄酸化化学独立細菌に比べて培養が難しく、菌体量を確保しにくいという欠点がある一方で、より小さなエネルギーを電子エネルギー昇圧システムに利用可能であることが推察されることや多糖類を合成するなど魅力的な面もある。本章では中性鉄酸化化学独立細菌による細胞外電子伝達プロセスの電気化学的な追跡を行うことで、第 2 章、第 3 章で報告した内容が、モデルとした *A. ferrooxidans* のみならず他の鉄酸化化学独立細菌においても成立する普遍的なものであることを示すことを目的とした。実験では第 3 章と同様の電気化学系を組んで検討を行い、固体から中性鉄酸化化学独立細菌への電子注入が可能であること、及びその条件下で有機物生産が行われていることを明らかにした。さらに、生成した有機物が多糖の形で合成されていることを示した。

第 5 章では総括として、研究によって得られたことをまとめ、本研究の意義について述べた。本研究によって得られた結果は、今後カソード型の細胞外電子伝達によって生物の代謝活動がコントロールされている可能性を示しており、電極電位によって代謝活性を制御する手法につなげられる可能性がある。また、本検討によって発見したカソード型の細胞外電子伝達は海底の生態系を理解するうえで重要な役割を担っている。さらに、このような微生物のカソード型細胞外電子伝達を利用することでこれまでとは異なるエネルギー変換系を構築することができる。

第2章. 酸性鉄酸化化学独立細菌を用いた電気化学的
CO₂還元と有機物生産

2-1 緒言

化学独立細菌は従属栄養細菌に比べると、成長が遅く培養も困難という問題があり、従属栄養細菌に比べて研究が遅れていた[54]。しかしながら、化学独立細菌を利用した有機物生産を行う上では、培養の基礎技術検討や代謝産物の検討をする必要がある。

そこで本章ではモデル微生物である *A. ferrooxidans* を用い、振盪培養、及び電気化学培養を行い、鉄の酸化速度、菌体増殖、CO₂ 固定量について調べた。また、代謝産物を調べ、振盪培養に対する電気化学培養の優位性について議論した。

A. ferrooxidans

第2章の実験では、モデル微生物として鉄酸化化学独立細菌の一種である *A. ferrooxidans* を用いた。*A. ferrooxidans* は古くから知られた鉄酸化化学独立細菌であり、高濃度の鉄が存在する pH 2 以下の酸性条件に生息する極限微生物の一種である [30][55][56][57]。*A. ferrooxidans* は電子源として、Fe²⁺, S⁰, S₄O₆²⁻などを用いることができ、これらの還元性物質を酸素で酸化することでエネルギーを獲得し生存することができる [58][59][60]。すでにゲノム情報が明らかにされている菌体であり、代表的な鉄酸化化学独立細菌といえる。*A. ferrooxidans* は今までバイオリーチングの分野で盛んに研究されてきている [61][62][63][64]。バイオリーチングとは、鉱物から目的の金属を抽出する際に微生物を利用する方法のことであり、日本語では細菌採鉱法と呼ばれる。*A. ferrooxidans* は硫化物系の鉱物中からの銅や亜鉛などの金属を抽出することへの応用が研究されてきた。銅生産においてバイオリーチングは特に重要であり、世界の銅生産量の 20 %程度がバイオリーチング技術によって生産されている [65]。*A. ferrooxidans* を用いた銅の生産では、鉱山で採掘された黄鉄鉱を菌体を含んだ pH 2 程度の培地に浸漬する。菌体の作用で硫黄が酸化されて銅と鉄が溶出し、銅を回収できる。バイオリーチングは日本では適用例が少ないものの、海外で広く用いられている技術であり、銅以外にも亜鉛やウラン、金などの金属の回収にも利用されている。また、日本での *A. ferrooxidans* の利用例としては、酸性の工業廃水に含まれる鉄イオンの除去がある [66]。これは、酸性溶液中の Fe²⁺ を *A. ferrooxidans* の機能で酸化し、適切な対イオンを加えることで沈殿させるものである。

バイオリーチングや廃水の処理では、微生物に期待される機能は硫黄の酸化や Fe²⁺ の酸化などであり、有機物生産の機能は重要ではない。*A. ferrooxidans* が利用される理由は酸性条件下で効率よく硫黄や鉄を酸化する機能を持つためである。前述の鉄酸化化学独立細菌の代謝機構の項で説明したように、微生物による鉄、あるいは硫黄酸化が起こるとき、電子受容体としては O₂ を利用する過程 (downhill electron transfer) と有機物生産に利用される過程 (uphill electron transfer) に分類される。この際それぞれの電子伝達を通る電子量を比較すると、downhill electron transfer が優位になる。そのため、鉄や硫黄を効率よく酸化

するという観点の研究においては、有機物の合成に関してはあまり重要視されてこなかった。鉄酸化化学独立細菌の高密度培養に関する研究は多数存在するが、目的は主として Fe^{2+} の酸化速度の向上である。

一方で化学独立細菌である *A. ferrooxidans* は CO_2 を炭素源として有機物を合成する。そのため、炭素源を含まない培地を用いて培養しても、空気中の CO_2 を利用して増殖することができる[42]。 *A. ferrooxidans* の CO_2 固定能を調査することは、有機物生産技術として *A. ferrooxidans* を利用する上で重要である。

A. ferrooxidans はカルビン・ベンソン回路によって CO_2 を固定していることがゲノム解析などの結果から既に判明している [42][67][68]。

カルビン・ベンソン回路は光合成の暗反応における、 CO_2 固定反応である。1950年にM. Calvinらが発見した[24]。生物の CO_2 固定のメカニズムはこれまで5つのメカニズムが報告されているが、カルビン・ベンソン回路はほぼすべての光合成生物が有しており、最も一般的な CO_2 固定経路である[69]。カルビン・ベンソン回路では、光合成明反応によって生成したNADPHを電子源、ATPをエネルギー源として利用することで CO_2 を固定して最終的に多糖を合成する。このプロセスにおいて特に重要なのはRubisCO（リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ-オキシゲナーゼ）上で起こる CO_2 還元プロセスである。RubisCOはカルビン・ベンソン回路内において、 CO_2 還元を触媒し、 3 s^{-1} 程度のターンオーバーをで反応を担う。植物細胞中に含まれるRubisCOの割合は多く、地球上で最も多く存在する酵素ともいわれている[25]。反応の収支としては、12分子のNADPHと18分子のATPを利用し、 CO_2 を炭素源としてフルクトース 1,6-ビスリン酸を合成する[21]。図 2-1は、カルビン・ベンソン回路の概要であり、右下に示されているリブローズ二リン酸からグリセリン酸リン酸が生じる反応がRubisCOに触媒された CO_2 固定化反応である。

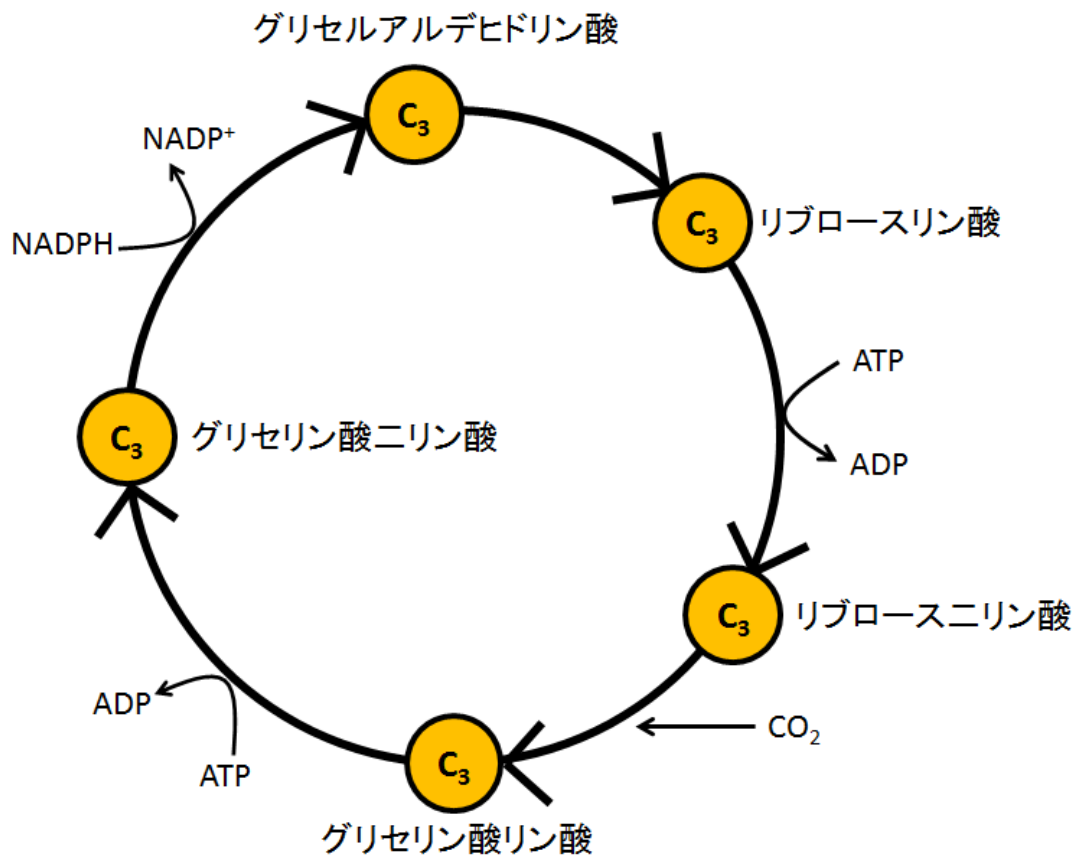


図 2-1 カルビン・ベンソン回路

A. ferrooxidans の場合には、光合成の明反応で生成する NADPH の代わりに鉄の代謝によって生成する NADH が電子源、及び還元力として利用される。カルビン・ベンソン回路によって固定された CO_2 は、グリコリシスやグリコーゲン代謝、TCA 回路(Tricarboxylic acid cycle)等の過程を経てアミノ酸や脂肪等へと変化する[42]。微生物を利用した有用物質生産の観点からみると、 CO_2 を起源として生体に必要な物質が合成されることは、生産対象となる物質の多様性を示唆する知見であるといえる。また、J.P. Cardenas らは、多数の鉄酸化細菌の代謝プロセスをまとめており、*A. ferrooxidans* を含む多数の微生物がカルビン・ベンソン回路や還元的 TCA 回路による有機物固定のゲノムを有していることがわかった[71]。そのため、*A. ferrooxidans* の持つ CO_2 固定は菌種に特有のものではなく、自然界で普遍的な機能であるといえる。

細胞の生合成や代謝にかかわる代謝産物を一次代謝産物と呼ぶ[70]。一次代謝産物は微生物培養の環境によって様々に変化するが、条件を適切に整えてやると、微生物は代謝産物を細胞外に放出することが知られる。従属栄養菌を利用したアミノ酸生産などの分野ではこれを利用してアミノ酸を高濃度で採取する技術が開発されている。*A. ferrooxidans* におい

でも、カルビン・ベンソン回路から TCA 回路などを介してアミノ酸や脂肪が合成される。適切に環境を整え、場合によっては遺伝子操作などの技術も合わせて用いることで、アミノ酸や脂肪、有機酸の合成などに利用可能であると考えられる。

A. ferrooxidans の好酸性

A. ferrooxidans の重要な性質の一つとして、酸性環境で増殖する好酸性菌であるということがあげられる [57][59]。好酸性菌はいわゆる極限環境微生物の一種であり、pH 5 以下の環境で増殖する。

A. ferrooxidans の場合培地の組成にもよるがおおむね pH 1.6~4 程度で培養され、特に pH 1.8~2 程度でよく増殖する。また、培地の適正 pH は酸性であるが、細胞内は中性(pH 6 付近)に保たれている。

代表的な中性菌を培養した場合には、電子伝達系によって膜内外にプロトンの電気化学ポテンシャル差が生じる。プロトンの電気化学ポテンシャル差は膜電位とプロトン濃度勾配に由来する項の和になる。プロトン濃度勾配による項は $-0.0592 \text{ V} \times \Delta \text{pH}$ で求められる。中性菌の場合には膜電位、プロトン濃度勾配によるポテンシャル差がいずれも -100 mV 程度であり、プロトン電気化学ポテンシャル差は -200 mV 程度となる。

	膜電位	プロトン濃度勾配	プロトン電気化学ポテンシャル差
中性菌 (<i>E. coli</i>)	-94mV	-99mV	-193 mV
<i>A. ferrooxidans</i>	0~+30mV	-220mV	-200 mV

表 2-1 中性菌、及び *A. ferrooxidans* におけるプロトン電気化学ポテンシャル差[65]

一方、酸性鉄酸化化学独立細菌である *A. ferrooxidans* の場合には、最終的なプロトン電気化学ポテンシャル差は -200 mV 程度とほぼ同様であるが、その内訳は大きく異なる (表 2-1)。細胞外部の pH が大きく異なるために、プロトン濃度勾配に由来する化学ポテンシャル差が -220 mV と中性菌に比べて大きく負になっている。中性菌の場合には細胞内 pH がおよそ 7.7~8.2 程度、細胞外 pH がおよそ 6~6.5 程度であり、pH 差はおよそ 1.7 程度であり、 $-0.0592 \text{ V} \times \Delta \text{pH} \approx 100 \text{ mV}$ となる。一方酸性菌である *A. ferrooxidans* では細胞内 pH がおよそ 6、培地 pH が 2~3 程度であり、pH 差は 4 程度となる。相当するプロトン濃度勾配項の大きさは $-0.0592 \text{ V} \times \Delta \text{pH} \approx 220 \text{ mV}$ である。化学ポテンシャルが異なるにもかかわらず、トータルでのプロトン電気化学ポテンシャル差がほぼ同一とするために、*A. ferrooxidans* の膜電位は 0 ~ 30 mV のやや正の値をとる。これは、細胞膜の内側が正に帯電していることを意味しており、一般的な中性菌やミトコンドリアなどの膜電位とは逆

の傾向である。このような膜電位は K^+ の取り込みによって起こることが示唆されている [65]。

培養に用いる培地が酸性であることから、*A. ferrooxidans* の培地では他の一般的な微生物は増殖することができない。そのため実験作業において他の微生物のコンタミネーションによる影響が少なく、取扱いが容易である。例えば、*Escherichia coli* を培養するのに用いる LB 培地などは、クリーンベンチの外に放置すると 1 週間以内にカビなどの空気中の微生物が増殖し懸濁するが、*A. ferrooxidans* の培地の場合 2 週間以上空気中にさらしていても、他の微生物の増殖が確認されることはなかった。

他の微生物が生育困難であるということは、単に実験場の取り扱いが容易になるというのみではなく、工業的にも重要な意味を持っている。微生物を工業的に用いる際、コンタミネーションを防止する方法としては大きく 2 つの方法が考えられる。1 つには、クリーンベンチのような菌体の存在しない環境で培養を行うことである。大規模な施設と厳しい管理が必要になり、大規模なクリーン施設の場合、建設時のみならず、施設環境の維持にも大きなコストがかかる。2 つ目に考えられるのは抗生物質を用いる方法である。抗生物質とは、細菌の代謝活動の阻害剤であり代表的なものとしてペニシリンやカナマイシンなどが知られる。培養させたい微生物が耐性を持っている抗生物質を培地に混合することで、特定の微生物のみを選択的に培養することができる。しかしながら、抗生物質は高価であると同時に、通常の培養環境では 1 か月程度で破壊されてしまう。また、培養させたい微生物が耐性を持つ抗生物質を発見しなくてはならないうえ、その抗生物質に対して耐性を持つ他の微生物に対しては、コンタミネーションを防ぐ効果を示さない。

好酸性細菌の場合、培地そのものが他の微生物にとって育成困難な環境であることから、こういった方法でコンタミネーションの対策を行う必要がなく、単純な培養環境を整えるだけで良い。実際に、*E. gracilis* という菌体はジェット燃料を作るのに利用できるとして期待されているが、培養環境が酸性であるため、コンタミネーション対策が必要なく、生産コストの削減につながっている [14]。また、*A. ferrooxidans* の場合、化学独立細菌であることから、初期培地中に有機物を含む必要がない。このことも他の微生物の生育に不適切であり、コンタミネーションの防止に寄与する。

また、鉄酸化細菌には中性鉄酸化細菌も存在する（第 4 章にて議論する）が、酸性鉄酸化細菌である *A. ferrooxidans* を用いた場合には、培地中で酸化された Fe^{3+} が大部分溶液中に残存し、析出量はわずかである。そのため菌体を洗浄することで菌体と鉄を分離できる。また、中性菌の場合には、微生物不在条件でも Fe^{2+} の酸化が進行するため、微生物による鉄酸化の影響を見ることが困難である。酸性溶液中では Fe^{2+} は空気中でも安定であり、鉄イオンの酸化を追跡することで微生物の代謝を確認することができる。

A.ferrooxidans の遺伝子操作

さらに、*A. ferrooxidans* に関しては遺伝子操作技術の報告が既になされているという特徴がある[72][73][74][75]。*A. ferrooxidans* の場合、寒天培地による培養や大腸菌共存下での培養が可能であり、それを利用した遺伝子操作が可能である。遺伝子操作技術は基礎研究においては特定のタンパク質の発現を抑制して機能を調べるときなどに利用される。また、産業利用上では、より高機能を有した菌体をスクリーニングする際や、薬剤耐性菌を作ることによってコンタミネーションの防止に利用される。遺伝子操作が可能であることは、研究・応用のいずれの面においても、利便性に優れた菌体であることを意味している。

通常、微生物の遺伝子操作技術では、抗生物質に対する耐性の有無を用いてスクリーニングを行うことが多いが、*A. ferrooxidans* ATCC23272 株の場合、抗生物質として例えばクロラムフェニコールを用いることで、スクリーニングが可能である(図 2-2)。

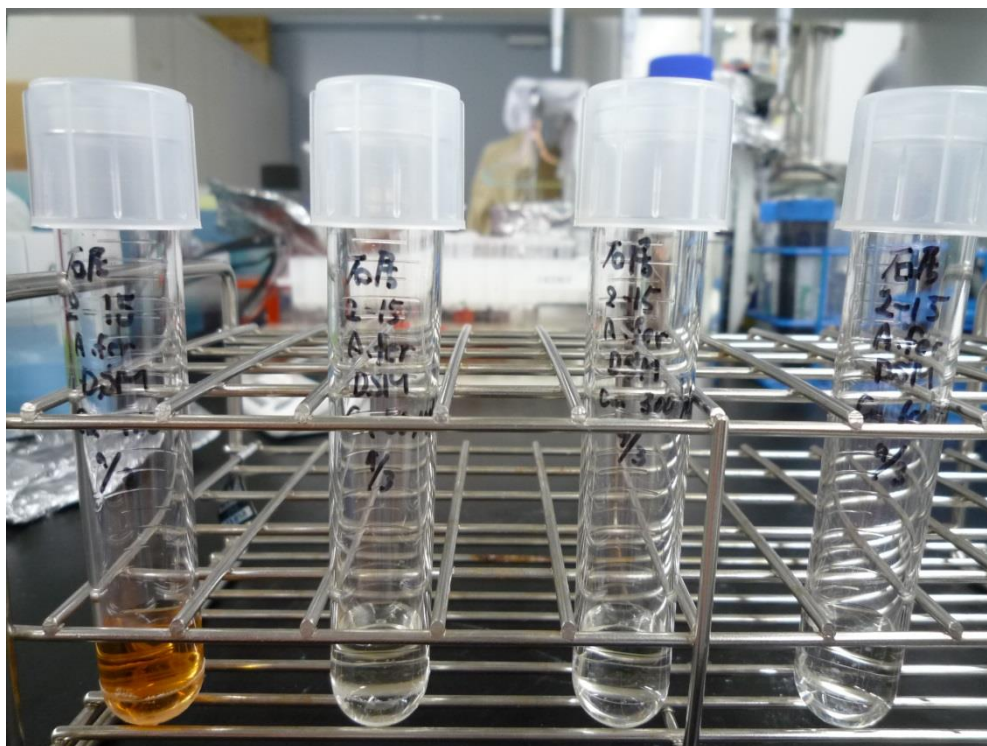


図 2-2 クロラムフェニコールを含む培地中での微生物培養結果
左からクロラムフェニコール濃度が、0、50、300、600 mg /L となる。
クロラムフェニコール存在下では微生物が増殖していない（クロラム
フェニコールが抗生物質として機能している）ことがわかる。

鉄酸化化学独立細菌の培養

一般に化学独立細菌は従属栄養細菌に比べて、倍加時間が長く、定常期での菌体密度も低い場合が多い[76]。代表的な従属栄養細菌である *E. coli* の倍加時間は約 30 分であるが、*A. ferrooxidans* を同様の振盪培養で培養した場合、倍加時間は約 8 時間である。培地の組成や温度などの環境によって変化はあるものの、この菌体増殖の遅さは *A. ferrooxidans* の研究において一つの課題となっていた。*A. ferrooxidans* をバイオリーチングなどに利用するための高密度培養の手法として提案された方法の一つが電気化学培養である [76]。

電気化学培養とは溶液中に電極を浸し、電極反応と微生物の代謝を結びつけることで細胞増殖を促す培養方法である。電極はアノードとして働く場合とカソードとして働く場合が考えられる。電極がアノードとして働く場合には、微生物は代謝によって得られた電子のアクセプターとして電極を利用することになる。一方電極がカソードとして働く場合には、微生物は代謝の起点である電子ドナーとして電極を利用する。鉄酸化化学独立細菌である *A. ferrooxidans* の場合には、電極はカソードとして利用される。1986 年に S. B. Yunker らは、電気化学培養を用いて *A. ferrooxidans* を培養し、最大菌体濃度を 3.7 倍、菌体増殖速度を 6.5 倍にまで高めた[76]。通常、*A. ferrooxidans* を Fe^{2+} によって培養する場合、 Fe^{2+} を溶かした培地を利用し、 Fe^{2+} を *A. ferrooxidans* が酸化することでエネルギーを得て増殖する。そのため、微生物の増殖はエネルギー源である Fe^{2+} の初期濃度によって制限を受ける。一方、 Fe^{2+} の濃度が 10 % を超すと、菌体が多量の Fe^{2+} によって増殖阻害を受けることが報告されている。電気化学培養では、微生物培養液中に電極を挿入し、溶存鉄の電位より負の電位をかけることで、微生物によって酸化されて生じた Fe^{3+} を再還元し、 Fe^{2+} を供給する。この方法を用いると、初期 Fe^{2+} 量以上の Fe^{2+} を連続的に供給することが可能となる。*A. ferrooxidans* の電気化学培養は、N. Matsumoto ら [77][78]や M. Taya ら[79]、R.C. Blake II ら [80]などによって最適化の検討がなされており、N. Matsumoto らの研究によって[78]、従属栄養細菌の菌体濃度に匹敵する 10^{10} cells mL⁻¹ という量の菌体を培養可能であることが示された。

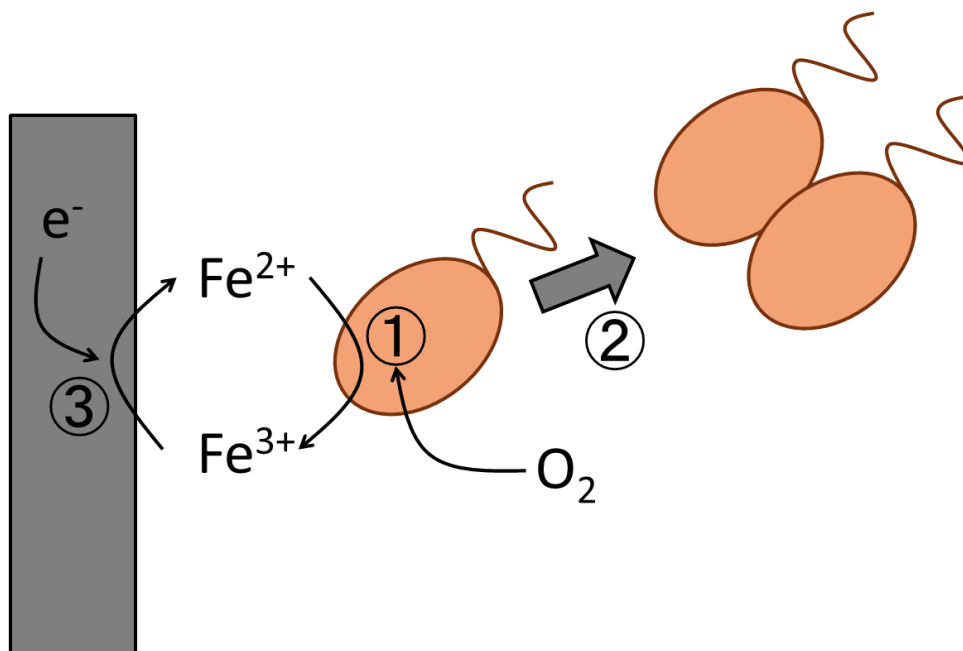


図 2-3 *A. ferrooxidans* の電気化学培養の模式図

- ①微生物が Fe^{2+} を電子ドナー、 O_2 を電子アクセプターとして代謝を行い、エネルギーを取り出す。②得られたエネルギーを利用して細胞分裂する。③微生物代謝で生成した Fe^{3+} が電極上で還元され Fe^{2+} が再生産される。その後、再び①に戻り連続的に培養が進行する。

しかしながら、従来の *A. ferrooxidans* の電気化学培養は主としてバイオリッチングに向けた応用が期待されていたために、菌体を効率よく増殖させることに目的が置かれていた。我々はこの電気化学培養の手法を有機物合成の観点から考察することを目的とし、研究を行った。

微生物をカソード触媒として利用した有用物質生産

第 1 章でも述べたように微生物の持つ細胞外電子伝達能力に関する研究が多数存在し[81]、中でも細胞外の固体に電子を受け渡す微生物について、様々な報告がなされている。代表的なものとして、*Shewanella* や *Geobacter* などの菌体がよく研究されており、微生物学と電気化学を融合した形で工学利用するものとして、新たな検討が進められている[50]。

一方で、微生物が電極から電子を引き抜く、カソード型の細胞外電子伝達プロセスについての研究が、近年新たな分野として注目されている[82][83]。このような系では電気化学的に有用物質生産をする系が特に期待されている。カソード型の細胞外電子伝達プロセスは、大きく分けて次の 4 つが存在する。1)固体からの直接電子伝達により CO_2 固定がなされるプロセス。 2)水が分解することで生成した水素を利用し、有機物を生産するプロセス。

3)電極上で酸化還元メディエーターが還元され、それを酸化することで物質変換をするプロセス。 4)直接電子伝達によって CO_2 をギ酸に変換し、それを更に別の微生物が有用物質へ変換するプロセス。 このそれぞれについて、検討されている[81][84] (図 2-4)。

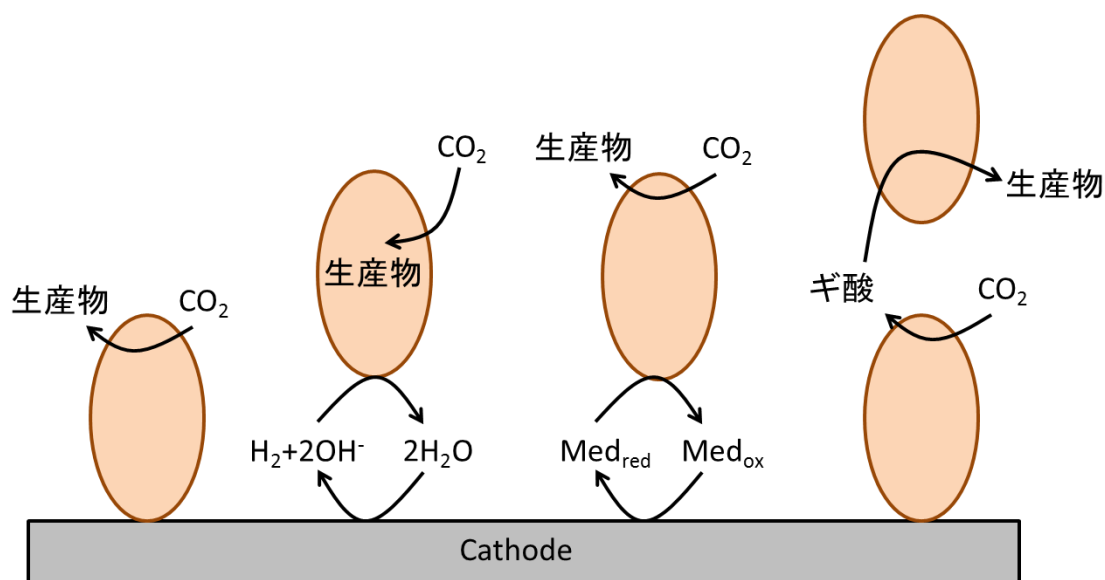


図 2-4 微生物によるカソード型電子伝達の模式図[84]

本章の内容

これらの背景のもと、本章では *A.ferrooxidans* の電気化学培養を行い、大量培養の方法を確立するとともに、 CO_2 還元の進行と生成有機物の形態について調べることを目的とした。また、電気化学培養の振盪培養に対する優位性を明らかにすることを目的とした。振盪培養、及び電気化学培養条件で固定された有機物の培地中の溶存量を調べることで、 CO_2 固定で生成した有機物が細胞の材料となるのみならず、細胞外に放出されていることを明らかにした。また、代謝によって生成する有機物が微生物に与える影響について調査し、一部の代謝生成物が溶液中に放出され、代謝を阻害していることを明らかにした。低分子の有機酸においてこの阻害効果が観測されたが、電気化学培養条件では抑制されるということを確認した。これらの結果について報告する。

2-2 鉄酸化化学独立細菌による電気化学的CO₂還元実験

2-2-1 実験

培地

実験で用いた培地は DSMZ 培地と DSMZ 培地にエネルギー源として FeSO₄を加えたものの二種類である。

鉄を含まない DSMZ 培地はまず下の表 2-2 のように Solution A と mineral solution を調整する。

(NH ₄) ₂ SO ₄	132mg	MnCl ₂ · 2H ₂ O	62 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	53mg	ZnCl ₂	68 mg
KH ₂ PO ₄	27mg	CoCl ₂ · 6H ₂ O	64 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147mg	H ₃ BO ₃	31 mg
dH ₂ O	1000 mL	Na ₂ MoO ₄	10 mg
		CuCl ₂ · 2H ₂ O	67 mg
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	50 mg
		dH ₂ O	1000 mL

表 2-2 (左) Solution A、(右) mineral solution の組成

いずれも 1L の瓶に調製し、5 mol L⁻¹ の硫酸で pH 1.8 に調整したのちにオートクレーブを用いて 20 分間 121 °C で加熱滅菌する。これを室温にて放置し、温度が下がってから Solution A に mineral solution を 1ml 加える。未使用の培地は冷蔵保存とし、作成から 1 か月以内に使用した。

エネルギー源として鉄を含む DSMZ 培地の作成は、まず表 2-3 に示したような組成で Solution A, Solution B, mineral solution を調製する。

(NH ₄) ₂ SO ₄	132 mg	FeSO ₄ · 7H ₂ O	20 g	MnCl ₂ · 2H ₂ O	62 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	53 mg	H ₂ SO ₄ (0.25N)	50 mL	ZnCl ₂	68 mg
KH ₂ PO ₄	27 mg			CoCl ₂ · 6H ₂ O	64 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147 mg			H ₃ BO ₃	31 mg
dH ₂ O	1000 mL			Na ₂ MoO ₄	10 mg
				CuCl ₂ · 2H ₂ O	67 mg
				dH ₂ O	1000 mL

表 2-3 (左)solution A、(中央)solution B、(右)mineral solution の組成

次に得られた Solution A と mineral solution を 5 mol L⁻¹ の硫酸により pH 1.8 に調整する。これら 3 つの溶液をそれぞれオートクレーブによって 20 分間 121 °C で加熱滅菌する。これを室温で放置し、十分冷めてから Solution A と Solution B を混合、更に mineral solution 1 mL を加える。未使用の培地は冷蔵保存とし、作成から 1 か月以内に使用した。酸性溶液中の Fe²⁺ は本条件での保存によって、自然酸化されない。

以下の文中では、鉄を含まない培地を DSMZ と、鉄を含む培地を DSMZ w/ Fe と記す。またオートクレーブ後の培地操作はすべてクリーンベンチ内で行った。

A. *ferrooxidans* の前培養

A. *ferrooxidans* の前培養は 300 mL と 3 L の溝付き三角フラスコの 2 通りで行った (図 2-5)。溝付き三角フラスコは、振盪培養時に気相中の空気を効率よく取り入れることができるため、好気性の微生物を培養するのに適している。使用するフラスコはあらかじめオートクレーブで加熱滅菌したものをを用いた。300 mL のフラスコを用いて培養する場合には作成した DSMZ w/ Fe を 150 mL 入れ、これに微生物を添加した。フラスコは通気性のあるシリコセンでふたをし、30 °C の恒温槽中に入れて 150 rpm で回転培養した。3 L のフラスコを用いる場合には、上述の DSMZ の 1.5 倍量をフラスコ内で調製、そのまま利用した。微生物添加後は 300 mL のケースと同様、通気性のあるシリコセンでふたをしたのちに 30 °C、150 rpm で培養した。浸透培養には TAITEC の BIO-SHAKER BR-40LF、及び New Brunswick Scientific の Excella E24 Incubator Shaker Series をを用いた。

実験的に A. *ferrooxidans* の菌体活性は長く安定であることを確認しており、実験には用い前培養 5~10 日の菌体を用いた。



図 2-5 : 培養後期の *A. ferrooxidans* の振盪培養フラスコ
上部にシリコセンがしてある。側面の溝は振盪によって培地に対する
通気量を増加させ、効率的に空気中の O_2 、 CO_2 を培地に取り込む。
赤色は鉄イオンが酸化して生成している。下部に赤褐色の沈殿が生成
している。

菌体濃度の測定

溶液中の菌体濃度は光学密度 (Optical Density:OD) を用いて測定した。OD は吸光度測定器によって測定することができるが、測定されているのは吸収ではなく、主として散乱の影響である。微生物の懸濁液では細胞によって光が散乱するため、OD と菌体量が正の相関を持つ。特に $OD < 1.2$ 程度では菌体量と OD が比例する。

A. ferrooxidans 懸濁液の OD の測定では、溶液中の固体酸化鉄と溶存鉄イオンを取り除くため以下の前処理をしたのちに測定を行った。測定は *A. ferrooxidans* の懸濁液を 1 mL をエッペンドルフチューブに分取し、1000 rpm で 2 分間遠心分離を行う。この上澄みを 900 μ L を別のエッペンドルフチューブに移す。*A. ferrooxidans* はこの遠心では沈殿せず、上澄みとして回収され溶液中の鉄酸化物固体が沈殿し取り除かれる。得られた上澄みは鉄のイオンを含んでいるため、10000 rpm で 10 分間遠心分離を行う。この遠心分離によって *A. ferrooxidans* の細胞は沈殿する。上澄みには鉄イオンが含まれているため、これを捨て新たに DSMZ を 900 μ L 加え懸濁させる。この洗浄操作を合計 2 回繰り返して、OD の測定を行う。

測定波長は 500 nm とした (OD_{500})。これは *A. ferrooxidans* 細胞による散乱波長であると同時に鉄イオンによる影響が小さい波長である。

OD 測定のセルは、光路長が 1 cm、液量が 150 μ L のものを利用した。また、菌体濃度が高い ($OD_{500} > 0.5$ 程度) の懸濁液の場合、時間経過によって菌体が沈降してしまう可能性があるため、ピペッティングを行ったのちに素早く測定した。また、前培養の菌体を回収す

る際に菌体培養液の濃縮を行うと、菌体濃度が高くなり $OD_{500} > 1$ となってしまう。そのような場合には、希釈によって $OD_{500} < 1$ になるように調整して測定を行い、希釈倍率をかけて OD_{500} の換算値として求めた。

鉄濃度の測定

鉄濃度の測定はフェロジンアッセイを用いて行った[85]。

フェロジンアッセイでは Fe^{2+} を測定することができる。 Fe^{3+} の測定は溶液中の鉄イオンを還元し Fe^{2+} の状態にしてから測定を行うことで Fe^{2+} と Fe^{3+} の合計量を求め、還元操作を行わなかった測定値との差分から Fe^{3+} の濃度を求める。

手順は以下のとおりである。

(1) 50 mM の HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) の pH 7 緩衝液を用意する。HEPES は中性付近で利用される代表的な緩衝剤である。次にその溶液を用いてフェロジン (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-sulfophenyl)-1,2,4-triazine, disodium salt) (図 2-6) 2 mM 溶液を調製する。また、1 M の HCl 溶液、及び 1.5 M のヒドロキシアミンの溶液を調製する。

(2) 1.5 mL のエッペンドルフチューブに HCl 溶液を 125 μ L 加える。そこにサンプルと水を合わせて 125 μ L になるように適宜希釈して加える。サンプルの量は想定される鉄濃度から換算し、希釈後の Fe^{2+} 濃度が 4 mM 以下になるように調整する。また、 Fe^{3+} と Fe^{2+} の合計量を求めるには、上と同様に HCl を準備し、そこにヒドロキシアミン溶液を 40 μ L 加える。そこに上と同様に適宜希釈したサンプルと水を加える。得られた混合液を十分に攪拌した後、室温で 15 分静置する。ヒドロキシアミンは還元剤であり、この操作によって系中の Fe^{3+} が還元され、 Fe^{2+} となる。

(3) このサンプルを遠心し (5000 rpm, 3 min) 上澄み 10 μ L を 1.5 mL のエッペンドルフチューブに分注する。ここにあらかじめ調製しておいたフェロジン溶液を 190 μ L 加え即座にピペティングをして、1 分間反応させたのちに波長 562 nm での吸光度の測定を行う。なお、フェロジン試薬の反応は時間によって進行するがおおむね 1 分経過後は吸光度が安定する。吸光度の測定は OD の測定と同様のセルを用いて行った。実際の濃度は検量線を用いて算出した。

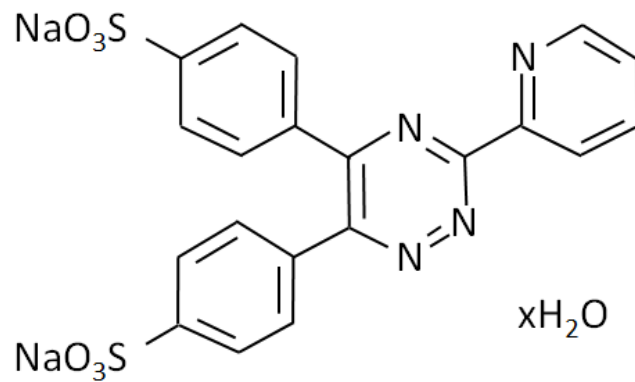


図 2-6 フェロジンの化学構造。
 Fe^{2+} に対して N 原子が配位し、562 nm に吸光が生じる。

電気化学培養

実験に用いた電気化学リアクターを図 2-7 に示す。電気化学リアクターは微生物培養槽と対極槽を、プロトン交換膜を介して分離した構造をしている（以下、H 型リアクターと呼ぶ）。

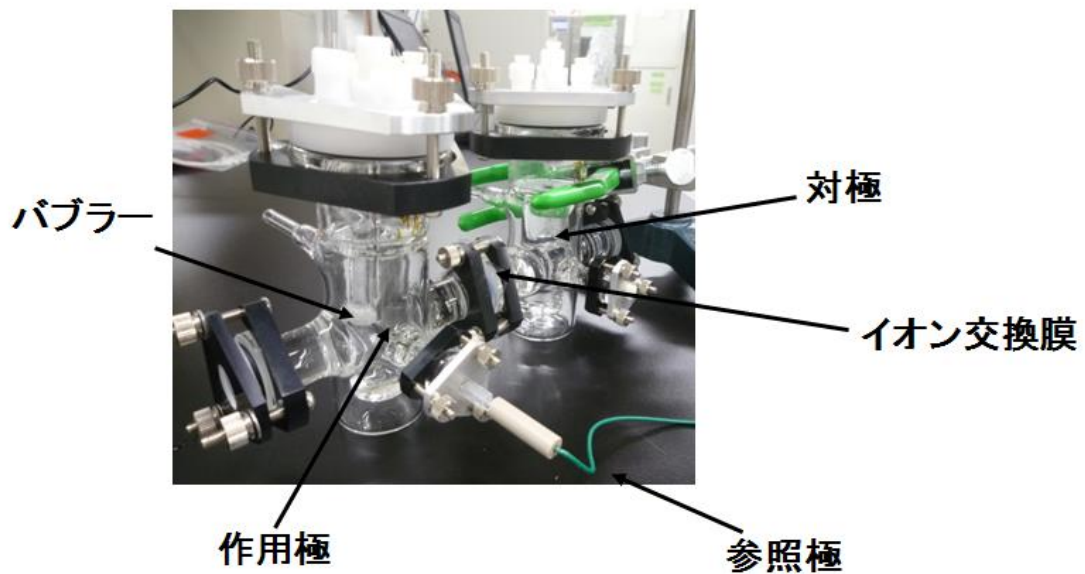


図 2-7 H 型電気化学リアクター

H型リアクターの作用極に Pt 板(8 cm²)、対極に Pt 板(2 cm²)、参照極に Ag|AgCl sat. 電極を用いた。電極電位を+0.4 V vs. SHE に固定してクロノアンペロメトリーによって電流値を計測、及びサイクリックボルタンメトリーの測定を行った。サイクリックボルタンメトリーの測定電位は-0.1 ~+1.5 V vs. SHE とし、スキャン速度は 50 mV s⁻¹ とした。

参照極は作用極から 1 cm 以内になるように設置した。対極側の槽には DSMZ を 50 mL 加え、培養槽には DSMZ w/ Fe を 50 mL 加えた。両槽を隔てる膜として Nafion117 (膜厚 183 μm) を利用した(図 2-8)。両槽は半径 2 cm の円形部の隔膜によって隔てられている。Nafion117 はカチオンを透過する代表的な膜である[86]。Nafion117 は初期状態で水酸基の一部が塩で置換されているため、後述する前処理を行ってから用いた。培養槽の温度は流水によって 30 °C に調整した。また培養槽側にはバブラーを取り付け、約 0.1 mL min⁻¹ の速度で空気を送り込んだ。培養槽、及び対極側の槽のそれぞれにスターラーチップをいれ、攪拌しながら実験を行った。攪拌速度は 300 rpm とした。なお写真では両槽をつなぐ腕とは逆側にも腕が伸びているが、この端部はガラスでふたをした。

菌体の添加は以下の手順で行った。前培養した *A. ferrooxidans* の培養液を 50 mL チューブに移した。これを 15000 rpm、4 °C で 10 分間遠心分離し、上澄みを除去した。これで得られた沈殿物は、培養によって得られた *A. ferrooxidans* の細胞と、Fe²⁺の酸化によって生じた鉄酸化物を含む。そこで、回収した菌体を 2 mL チューブに移し、遠心分離機で数秒回転させて上澄みを回収するという作業を数回繰り返した。鉄酸化物は *A. ferrooxidans* の細胞よりも沈降しやすいため、この方法で大部分の鉄酸化物固体を取り除くことができる。更にこれを DSMZ で数回洗い、実験に用いた。

実験に用いた電気化学リアクターは十分に洗浄したものを超純水で洗いながし、オートクレーブを用いて 121°C で 20 分間の加熱滅菌処理をしたのちに乾燥させて実験に用いた。

また、全有機炭素量 (total organic carbon、以下 TOC)、及び溶存有機炭素量 (dissolved organic carbon、以下 DOC) の測定を行う実験系においては、通常の洗浄操作に加えて、水で流した状態で清潔なブラシで洗浄し、超純水で 10 回以上残液を洗い流して実験に用いた。なお、これらの測定の詳細は後述する。

Nafion 117 は以下に示す手順の前処理を行ったものを超純水中に保管し、適宜実験に利用した。前処理では表面の汚れを落とすほか、水酸基が置換されているものを水酸基に戻す働きがある。なお、Nafion117 は保存状態等により表面がやや黄色に着色している場合があるが、この洗浄操作で透明な膜になる。

Nafion 117 の前処理工程

- (1) 3%過酸化水素水で1時間煮沸を行う。
- (2) 蒸留水で1時間煮沸を行う。
- (3) 1M硫酸で1時間煮沸を行う。
- (4) 蒸留水で1時間煮沸を行う。

(5) オートクレーブを用いて 120 °C で 20 分間、加熱滅菌処理を行う。

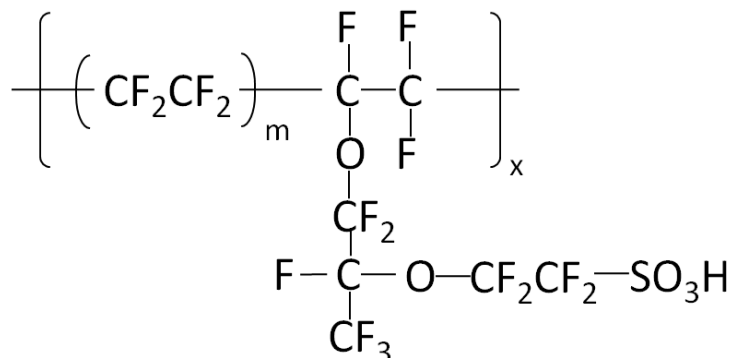


図 2-8 Nafion 117 の構造

側鎖のスルホ基が膜中でのカチオンの移動を仲介する。

TOC、DOC 測定

菌体培養液中に分散している有機物には細胞自身と細胞によって生成され、細胞外に放出された有機物がある。また、放出された有機物も固体状態で存在しているもの（特に酸化鉄に付着しているなど）と溶液中に溶けているものが存在すると考えられる。このうち、細胞自身、及び固体状態で存在している有機物を合わせて TOC と呼ぶ。また、溶存状態で存在している有機物を DOC と呼ぶ。

TOC と DOC を Total Organic Carbon Analyzer (TOC-5000A, Shimadzu)を用いて測定した。微生物側のチャンバーから 2.5 mL の溶液を分取し、試料原液とした。試料原液のうち 1 mL を 4 mL の硫酸 (pH 2) で希釈したものを TOC 測定用のサンプルとした。次に試料原液 1.5 mL を 15000 rpm で 10 分間遠心分離して *A. ferrooxidans* の細胞と、鉄酸化物の析出物を沈降させる。その後、上澄みから 1 mL 分取し、4 mL の硫酸 (pH 2) で希釈したものを DOC 測定用のサンプルとした。両サンプルは測定用の試験管にいれ、口にパラフィン製フィルムで封をした。その試験管を適切なサイズの水をはった三角フラスコにいれ、超音波洗浄機 (USK-3R 出力 120 W、発振周波数 40 kHz) によって、均一に分散するようにした。この際、水温が上昇することで有機物が揮発してしまわないように、温度が 30 °C 以下の条件で超音波振動を加えた。

また、コントロール実験として、サンプルの希釈に利用した硫酸水溶液を 5 mL 利用し、この有機炭素量を TOC、DOC の測定と同時に測定した。

使用するガラス器具はすべて通常の洗浄操作に加えて、純水と洗剤のついていないブラシで洗浄したのちに、超純水で 10 回以上流してから乾燥させたものを用いた。

2-2-2 結果と考察

振盪培養

300 mL のフラスコを用いて培養した場合の OD₅₀₀、TOC、DOC、及び鉄濃度変化を測定した結果を図 2-9 に示す。なお OD₅₀₀ の測定は卓上遠心機を用いて 1000 rpm で析出した固体酸化鉄を除いたのちに、菌体を洗浄してから行った。

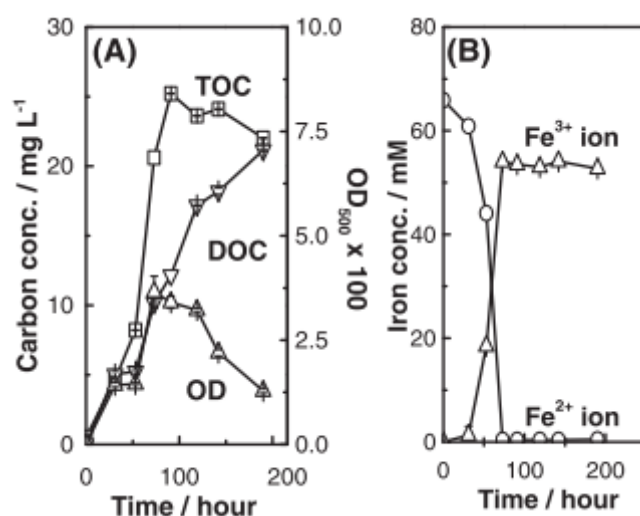


図 2-9 (A) *A. ferrooxidans* の振盪培養における TOC、DOC、OD₅₀₀ の変化 (B) Fe²⁺ と Fe³⁺ の濃度変化 (T. Ishii et al, *Electrochemistry*, **80**, 327 (2012)より引用[87])

図 2-9(A)に *A. ferrooxidans* の振盪培養系における TOC、DOC、OD₅₀₀ の時間変化のグラフを示した。TOC と DOC は時間経過とともに増加し、OD₅₀₀ は約 100 時間まで増加したのちに徐々に減少した。測定された OD₅₀₀ の値から倍加時間を計算すると 5.1 時間となる。

倍加時間は、対数増殖期の OD₅₀₀ の値を以下の式で近似する。

$$OD_{500} = A 2^{t/\tau}$$

(A:初期 OD τ :倍加時間)

対数増殖期における測定値の対数を取り、最小二乗法から直線の係数を求めた。

A. ferrooxidans において過去に報告されている倍加時間は報告によって様々であるが、おおそ 4~10 時間程度である。倍加時間は温度や攪拌速度、培養器の形状などの要因によって変化するため、測定で得られた値はおおよそ妥当な値であるといえる。また、対数増殖期はおおよそ培養初期から 2~3 日程度で終了し、徐々に菌体濃度が減少する。

DOC が連続的に増加していることは、固定された有機物が細胞外に一部放出されていることを示している。一般に菌体が有機物生産をする場合、体内に有機物を蓄え、条件を整

えることで細胞外に排出させる場合が多いが[70]、*A. ferrooxidans* では一般的な培養条件で細胞外に固定した有機物を放出していることがわかる。

TOC は細胞として存在する有機物と溶液中に溶存する有機物の合計、DOC は溶液中に溶存する有機物量である。TOC に占める DOC の割合を求めると、*A. ferrooxidans* の場合はおおよそ 4~6 割程度の有機物が溶液中に放出されていることがわかる。溶存有機物は *A. ferrooxidans* の細胞増殖の老廃物、*A. ferrooxidans* の死細胞の分解物、クォーラム・センシング物質などの可能性が考えられる。クォーラム・センシングとは細胞同士のコミュニケーションのことである[88]。微生物は個々の細胞同士が物質のやりとりをすることで集団挙動をコントロールしている。この際のやりとりされる物質がクォーラム・センシング物質である。

A. ferrooxidans によって固定された有機物は TOC の形で計測される。TOC が増加している期間でのプロットから TOC 増加速度を見積もると、 $0.25 \text{ mg L}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ となる。系中における炭素源は空気中の CO_2 のみであり、これが *A. ferrooxidans* によって CO_2 が固定され有機物が生成する速度を意味する。

同一系における Fe^{2+} と Fe^{3+} の濃度変化を、フェロジンアッセイを用いて測定した(図 2-9 (B))。 Fe^{2+} 濃度が時間経過に合わせて急激に減少し、 Fe^{3+} 濃度が増加した。微生物を含まない条件下において、pH 2 の溶液中で Fe^{2+} は溶液中に安定に存在する。そのため、この Fe^{2+} の酸化反応は *A. ferrooxidans* の代謝に由来するものであるといえる。

Fe^{2+} の酸化に合わせて TOC、及び OD_{500} が増加し、 Fe^{2+} が系中で枯渇するのに合わせて TOC と OD_{500} の増加が止まった。これは、 Fe^{2+} をエネルギー源として *A. ferrooxidans* による CO_2 固定がなされている様子を示している。この結果は、*A. ferrooxidans* による有機物固定の限界が供給される Fe^{2+} によって規定されていることを意味している。

また、測定系において、 Fe^{2+} の始濃度が Fe^{3+} の終濃度より高い結果が得られた。これは、培養によって酸化されて生じた Fe^{3+} の一部が酸化鉄の形で析出したことを意味している。フラスコの外観は培養 2 日目程度で褐色になり、その後固体の析出物が見られる。これは観測された鉄イオン濃度の変化と合致している。

A. ferrooxidans による鉄イオン酸化速度を、 Fe^{2+} 濃度のグラフから求めると、 $1.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ となる。

H 型リアクター電気化学測定

以上の実験では振盪培養による *A. ferrooxidans* の培養とその際の有機物生産に関して検討を行ってきた。一方で、電気化学培養は振盪培養と比較し菌体増殖に対して有利であることが報告されており、有機物生産という観点からの優位性を示すために、以下に示す実験を行った。

Fe²⁺存在下において、電極電位を+0.4 V vs.SHE に固定して測定した電流-時間曲線を図 2-10 に示す。

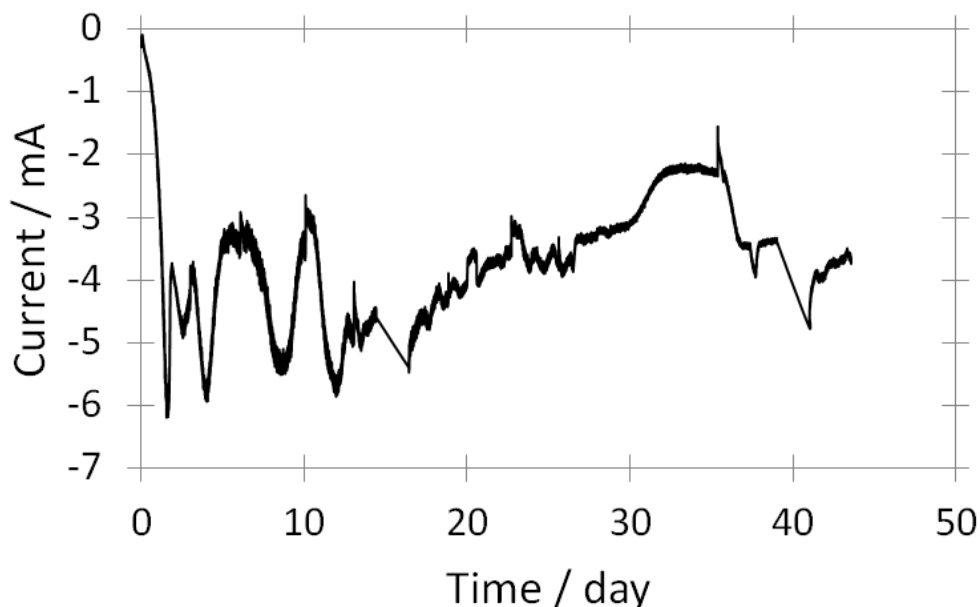


図 2-10 H 型電気化学リアクターで測定された *A. ferrooxidans* の電気化学培養の電流値の時間変化のグラフ。
培養槽の培地は DSMZ w/ Fe を利用した。

A. ferrooxidans 無しの状態では約-0.1 mA の小さなカソード電流が観測された。系に存在する Fe²⁺は微生物が存在しない環境では安定に存在すると考えられるため、ここで観測された電流はバブラーによって供給される空気中の O₂ が、作用極の Pt 板表面で還元することに由来する還元電流だと考えられる。この系に対して *A. ferrooxidans* を添加すると還元電流が急激に立ち上がり、-3~-6 mA の間で安定した還元電流を生成することがわかる。これは *A. ferrooxidans* の代謝に由来するものであると考えられる。*A. ferrooxidans* が Fe²⁺を酸化することで得られた Fe³⁺が、電極上で還元し再度 Fe²⁺が得られるという過程で流れる還元電流である。ここで電極上で還元された Fe²⁺は *A. ferrooxidans* による再酸化と電極での再還元を連続的に繰り返すことで、電極から *A. ferrooxidans* の細胞に連続的に電子とエネルギーを供給する。

振盪培養系では 4 日程度で Fe²⁺が枯渇し、*A. ferrooxidans* による Fe²⁺の酸化反応は停止した (図 2-9) が、電気化学系を利用することで連続的に Fe²⁺を供給した場合には 1 か月以上にわたって *A. ferrooxidans* による Fe²⁺の酸化反応が観測された。

また定常的に流れた電流値 $-3\sim-6\text{ mA}$ を Fe^{2+} の酸化速度に換算すると、 $2.2\sim 4.4\text{ mmol L}^{-1}\text{ hour}^{-1}$ となる。振盪培養における鉄イオンの酸化速度は $1.4\text{ mmol L}^{-1}\text{ hour}^{-1}$ であったことから、電気化学培養条件下では、*A. ferrooxidans*の Fe^{2+} の酸化が促進されていることがわかる。

さらに*A. ferrooxidans*の細胞を含む系と含まない系のそれぞれについて、サイクリックボルタンメトリーを測定したのでその結果を図 2-11 に示す。

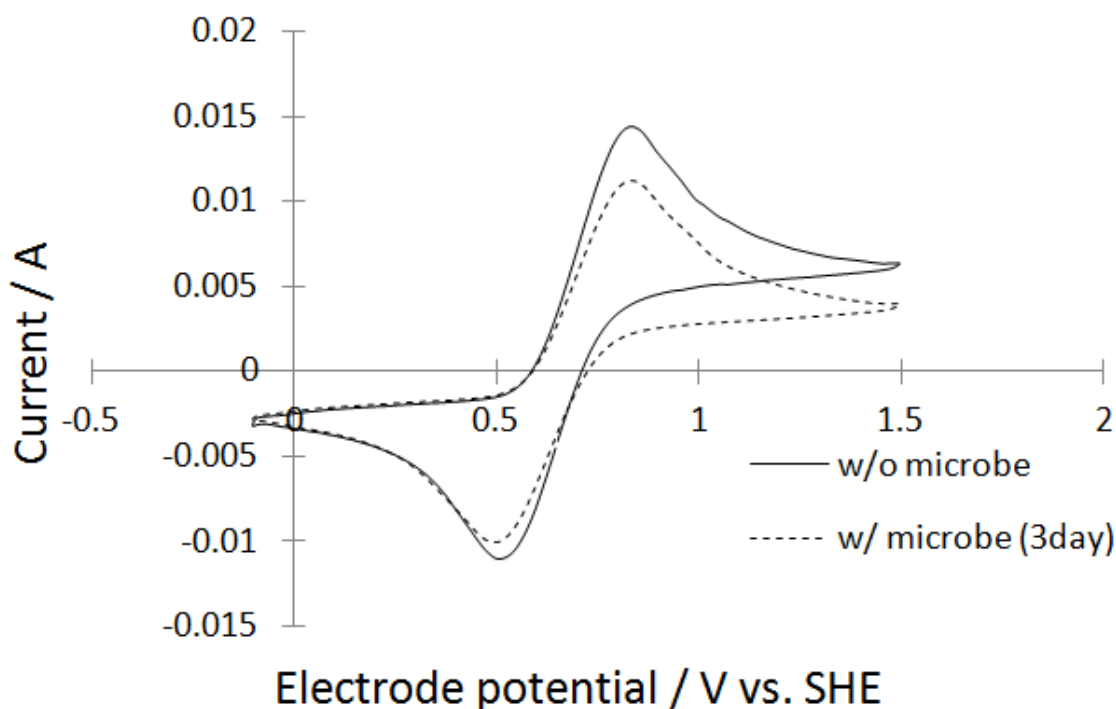


図 2-11 サイクリックボルタンメトリー (50 mV s^{-1} , solid line: without microbe, dot line: with microbe (3 day))

サイクリックボルタンメトリーの測定は微生物添加前と添加 3 日後の 2 回行った。*A. ferrooxidans*の有無によらずほぼ同一の結果が得られた。これはサイクリックボルタンメトリーのピークが溶液中 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ の酸化還元反応に由来するためである。3 日後の曲線が w/o microbe の曲線に比べて若干小さなピークを持つのは、溶液中の鉄イオンが酸化鉄の形で一部沈殿し、溶液中濃度が下がったためである。サイクリックボルタンメトリーの結果から得られた中点電位は $+0.66\text{ V vs. SHE}$ であり、系中 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ の酸化還元電位に対応する。

電気化学培養での TOC、及び DOC 測定結果

電気化学培養での TOC と DOC の経時変化を測定した結果を図 2-12 に示す。

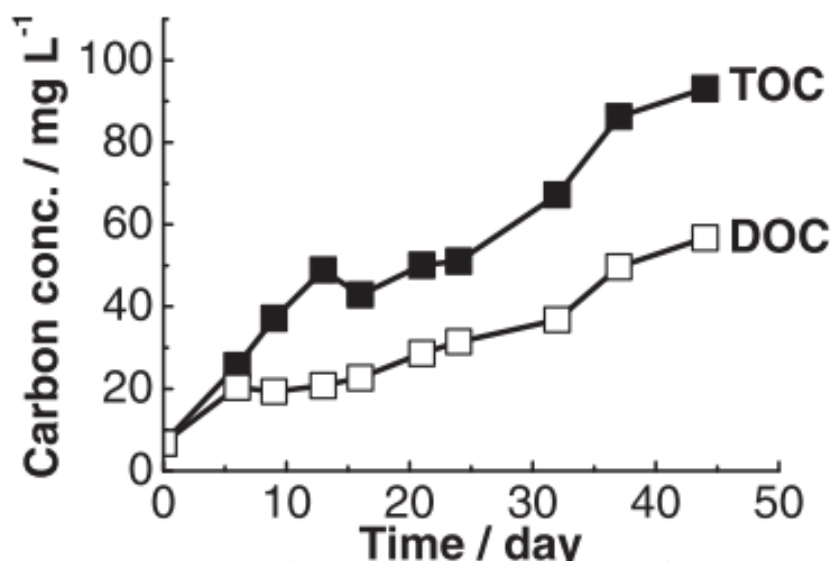


図 2-12 TOC、及び DOC の時間変化 (T. Ishii et al, *Electrochemistry*, **80**, 327 (2012)より引用[87])

約 50 日間の長期間にわたって、TOC、DOC が連続的に増加していく様子が観測された。最終的な TOC は振盪培養系の 4 倍以上に達した。また、DOC 値が TOC 値の約 60 % となり、固定された有機物の大部分が *A. ferrooxidans* の細胞外に有機物として放出されていることが明らかとなった。微生物細胞外に排出された有機物の割合は、振盪培養 (図 2-9) とほぼ同等となった。また、培養の時間に伴って有機物排出量が大きく変化せず、常にほぼ一定の割合で細胞外に有機物を放出していることが明らかになった。このことは、鉄酸化化学独立細菌を有機物生産に利用する際、特別な抽出操作をしなくても溶液中から有機物を取り出せることを意味している。

一方、振盪培養では培養後期 (3~5 日目) 程度で TOC に占める DOC の割合が増殖している様子がみられた。これは、系中の細胞が死滅し溶菌することで溶液中に有機物が溶け出したためだと考えられる。電気化学培養では TOC、DOC がともに増加し、およそ 60 % を維持した。これは、電気化学培養では連続的に Fe^{2+} を供給したことで、エネルギーを消費しながら微生物が機能を維持できたためだと考えられる。

電気化学 CO_2 還元を行った際の電気化学リアクターの写真を図 2-13 に示す。

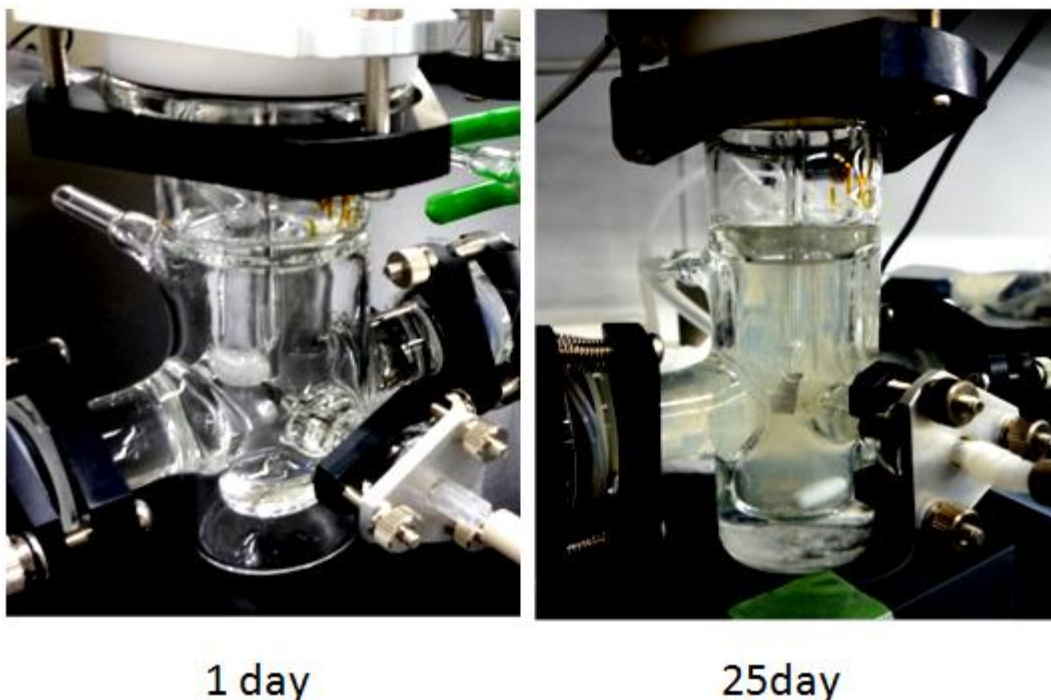


図 2-13 1 日目と 25 日目の電気化学リアクターの写真

培養初期には溶液は硫酸鉄に由来する薄い青色をしているが、培養 25 日目では培地は懸濁した。この懸濁は *A. ferrooxidans* の細胞増殖と酸化鉄の析出の二つの要因によるものであると考えられる。析出する酸化鉄は振盪培養に比べると少なくなる。これは振盪培養では Fe^{3+} が蓄積していくのに対して、電気化学培養では常に Fe^{2+} へと再還元されていくためである。

2-3 細胞外に放出される低分子有機酸の代謝活動への影響

2-3-1 実験

高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

溶液中に放出された生成物を、HPLC を用いて検出した。前処理として以下の処理を行った。まず、振盪培養した鉄酸化細菌の培地を 10000 rpm、4 °C で 10 分間遠心分離して細菌と鉄コロイドを分離した。上澄みを別の容器に移し替え、1 M の水酸化カリウム水溶液を用いて、pH を 13 から 14 に調整し、60 °C の温水中に 30 分間浸した。その後、10000

rpm、4 °Cで3 分間遠心分離した後、上澄みを分取し、10 %の塩酸を用いて pH を2 から3 に調整した。その後、1 mL 分取し、0.1 %2,4-dinitrophenyl-hydrazin 溶液を0.5 mL (2 規定の塩酸で溶解させた) を加え、室温で1 日反応させた。未反応ヒドラジンのコロイドを除くために1000 rpm、4 °Cで3 分間遠心分離を行い、上澄みを用いて測定した。

HPLC のカラムには Imtakt 製の unison UK-C18(3 μm,150×2 mm) を用いた。移動相にはアセトニトリルとギ酸水溶液の混合液を用い、流速 0.2 mL min⁻¹ で分離した。移動相は0 分から20 分までをアセトニトリル40 %、20 分から25 分までをアセトニトリル100 %、25 分から30 分までをアセトニトリル40 %とした。

ピルビン酸の影響の測定

細胞外に放出している物質の一つとしてピルビン酸 (CH₃COCOOH) がある。ピルビン酸のような弱酸の有機物は、細胞の pH 環境の維持に対して影響を与えることが予想されるため、DSMZ / Fe 培地に対してピルビン酸を加え、振盪培養、及び電気化学培養を行い、培養に対する影響を観測した。

2-3-2 結果と考察

HPLC によってピルビン酸を検出したため、ピルビン酸が培養に与える影響を調査した。ピルビン酸を含む培地を用いて振盪培養を行った結果を図 2-14 に示す。

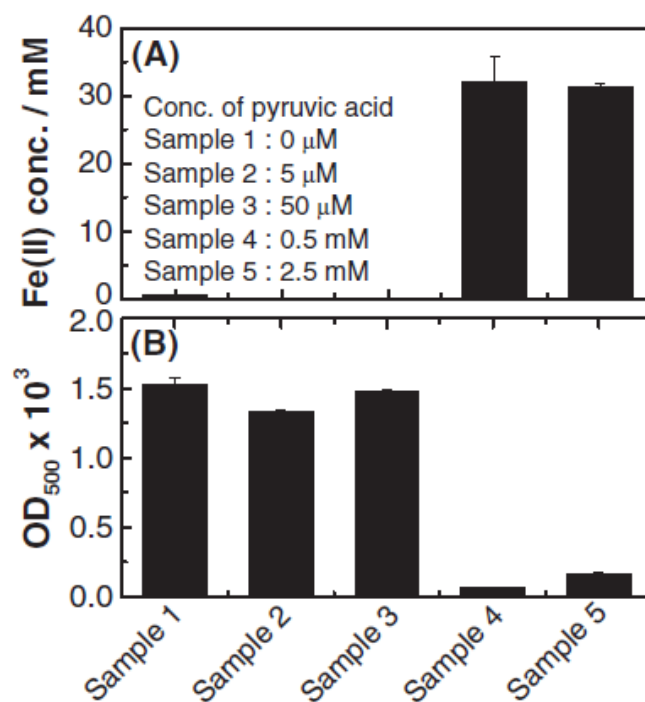


図 2-14 (A) Fe^{2+} の酸化に対するピルビン酸濃度の影響 (B) 微生物増殖に対するピルビン酸濃度の影響 (T. Ishii et al, *Electrochemistry*, **80**, 327 (2012)より引用[87])

この結果、ピルビン酸濃度 0.5 mM 以上で微生物代謝が抑制されるという結果が観測された。これは、ピルビン酸が酸性溶液内でアンカップラーとして機能し、微生物の代謝活動を抑制させた結果であると考えられる。

アンカップラーとは膜内外のプロトンの電気化学ポテンシャル勾配を解消し、細胞のエネルギー代謝効率を減少させる物質のことである。1-1 で述べたとおり、通常の下では細胞は膜内外にプロトンの電気化学ポテンシャル差を持ち、それを利用して電子のエネルギーを高めて uphill electron transfer を駆動する。また、プロトンの電気化学ポテンシャル差は鞭毛の運動や ATP 合成にも利用される。*A. ferrooxidans* の培地環境は通常 pH 2 付近の酸性環境であり、弱酸の低分子有機化合物が存在すると、培地中ではプロトン付加体として中性分子として存在することになる。中性の有機分子は細胞膜を通過するため、細胞の内部に侵入することができる。一方細胞膜内部は pH 6 付近の中性環境にあり、外部から侵入した弱酸は乖離し、プロトンが放出される。その結果、細胞内部の pH は減少し、外部との pH 差が減少する (図 2-15)。このような機構で細胞内外の pH 差を減少させる場合、弱酸有機分子の pK_a がおよそ細胞内外の pH の中間にあることが要求される。ピルビン酸の場合には、 $pK_a = 2.5$ となっており、この条件を満たす[89]。

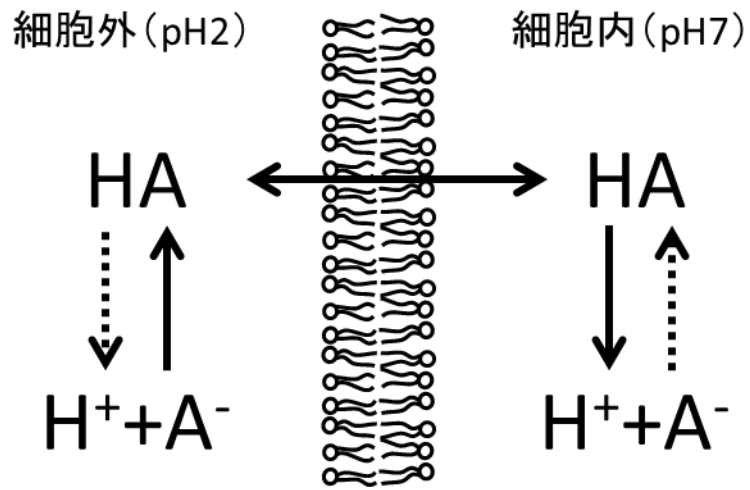


図 2-15 アンカプラーによるプロトン移動の模式図

一方、電気化学培養で同様にピルビン酸を加えて還元電流を観測した実験結果を図 2-16 に示す。

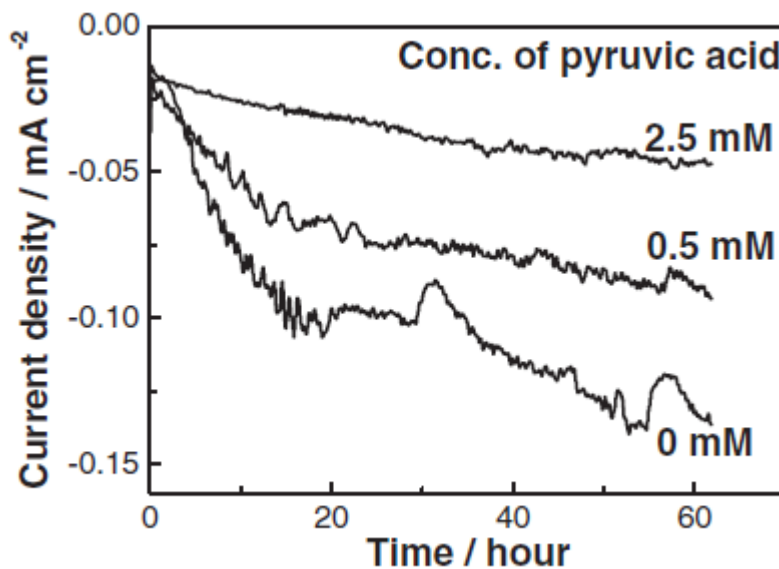


図 2-16 電気化学培養に対するピルビン酸の影響 (T. Ishii et al, *Electrochemistry*, **80**, 327 (2012)より引用[85])

電気化学培養では 0.5 mM 以上のピルビン酸存在下で代謝に由来する電流が観測された。振盪培養で 0.5 mM 以上のピルビン酸によって代謝活動が完全に抑制されたのとは異なる結果が得られた。これは電気化学培養で連続的にエネルギーを供給することでピルビン酸の脱共役の効果を上回るほどエネルギー供給がなされ、*A. ferrooxidans* が代謝活動を行うことができたためだと考えられる。電気化学培養ではこのように微生物の生成物による代謝抑制の効果が弱まるため、図 2-12 で見たように高濃度の TOC、DOC が達成されたものと思われる。

2-4 総括

本章では酸性鉄酸化化学独立細菌をカソード触媒として用いた電気化学的 CO₂ 還元の実験を行った。実験には *A. ferrooxidans* をモデル微生物として用い、電子メディエーターとして Fe²⁺/Fe³⁺が存在する条件下で電気化学培養を行った。培養による CO₂ 固定を TOC、及び DOC を計測することで評価した。その結果 30 日程度の培養期間に渡って、安定的に CO₂ 固定がなされることが明らかとなった。さらに TOC のうちおおよそ 60 %が溶存有機炭素の形で細胞外に放出されていることが明らかとなった。この結果は、固定された CO₂ が細胞増殖以外にも用いられていることを意味しており、酸性鉄酸化化学独立細菌を有用物質生産に利用する上で非常に重要な知見である。

さらに、代謝産物のなかにピルビン酸が存在することから、ピルビン酸が代謝に与える影響を調べた。通常ピルビン酸はアンカップラーとして働き、*A. ferrooxidans* の代謝抑制をする効果がある。電気化学培養条件では振盪培養に比べて、その代謝抑制の効果が弱まることを見出した。これは微生物による物質生産を行ううえで、電気化学培養が有用な手法となりうることを示している。

緒言で述べた電気化学培養[76][77][78][79][80]では、電気化学培養を行うことで極めて高い菌体密度や菌体増殖速度を達成している。本研究では、温度や空気量等の最適化を行っていない一方で、微生物増殖のみならず、代謝によって細胞外に放出される物質にも着目した。*A. ferrooxidans* による有機物固定は細胞増殖へとつながることが期待されてきたが、本検討では、有用物質生産の観点から、細胞外への放出に着目し、固定された有機物の 60 %が細胞外に放出されていることを見出した。また、放出している物質にはピルビン酸が含まれていることを示した。ピルビン酸は低分子有機酸として有用な物質であり、CO₂ を原料として電氣的に合成可能であることが示された。

第3章. メディエーター不在条件下における酸性鉄酸化
化学独立細菌による電気化学的CO₂還元

3-1 緒言

第 2 章の序論でも述べたように、カソード型細胞外電子伝達は微生物による電気化学的物質生産において期待される技術である。第 2 章では、カソード型細胞外電子伝達の中でも、特に Fe^{2+} が存在する条件下において、鉄酸化化学独立細菌の細胞外電子伝達を駆動し、有機物生産を行わせる実験を行った。その結果、鉄酸化化学独立細菌が電気化学培養条件下で合成した有機物の約 60 % を細胞外に放出していることを明らかにした。また、電気化学培養条件では代謝産物であるピルビン酸による阻害効果が抑制されることを示した。これらの結果は、鉄酸化化学独立細菌による有機物生産において、電気化学的手法を用いることの重要性を示している。

一方で、第 2 章で観測された電流値は、鉄酸化化学独立細菌の代謝によって酸化された鉄イオンが電極上で還元される過程を追跡しているため、鉄酸化化学独立細菌の代謝を直接的に観測するものではなく、鉄イオンを介して間接的に観測している。このような条件では、サイクリックボルタンメトリーの midpoint 電位が鉄イオンの酸化還元電位を示したことからわかるように、電極上で代謝過程を詳細に検討する上で適切ではない。ここで、鉄イオンを介さずに電極と鉄酸化化学独立細菌の間で電子授受を行う系を構築することができれば、代謝を電極反応によって制御・観測することが可能となると考えられ、鉄酸化化学独立細菌の代謝に関する理解が深まるとともに、カソード型電子伝達を利用した有機物生産に対して新規な方法論を提案できると考えた。よって本章では、鉄イオンを含まない電気化学系を組み、微生物-電極間の電子伝達を観測した。

微生物-電極間電子伝達

微生物-電極間の電子伝達としてはアノード型電子伝達過程がよく研究されている。代表的な微生物は *Shewanella* や *Geobacter* などであり、細胞表面に発現したシトクロムを起点として、固体を最終電子受容体として利用する[90][91]。微生物から固体への電子伝達としては、メディエーターを利用した間接型電子伝達機構、固体との接触による直接電子伝達機構、ナノファイバーを介した電子伝達機構などが提唱されている[90]。このような機能を持つ菌体は自然界において普遍的に存在することが示唆されており、例えば水田に電極を備え付けることで、土中の細菌が細胞外電子伝達を行い、それを利用した発電が可能であることが示されている[92]。

また、カソード型直接電子伝達による CO_2 還元系として、酢酸菌を用いた電気化学系が報告されている[84]。この実験系では酢酸菌を電極に直接接触させることで代謝を還元電流として測定している。実験には -0.4 V vs. SHE の電位を電極にかけており、負に大きく偏っている。この電位は酢酸菌が本質的には電子源として水素を利用するため、水素に相当する還元的な電位にある電子しか利用できないためである。鉄酸化化学独立細菌の場合

には、鉄の酸化還元電位付近 (+0.7 V vs. SHE 程度) のより正の電位から代謝電流が観測できると予想できる。

鉄酸化化学独立細菌については、Z. M. Summers らが中性鉄酸化化学独立細菌 *M. ferrooxydans* を用いて電気化学的に培養を行っている[93]。鉄酸化化学独立細菌では、水素酸化する細菌とは異なり、水素に相当する電位よりも正の電位から代謝が可能であり、彼らは-0.076 V vs. SHE の電位で微生物代謝を確認している。しかしながら、鉄の酸化還元電位 (+0.7 V vs. SHE 程度) に対しては 0.7 V 以上の差が存在し、より正の電位からの代謝が可能であると予想される。電極電位がより正の状態でも電子を取り込み代謝できるということは、よりエネルギー供給が少ない環境においても微生物が生存可能であることを意味するが、この代謝電位の関係は明らかになっていない。また、鉄酸化化学独立細菌を電極触媒としてみたとき、より正の電位から電極反応を駆動することは、効率的な CO₂ 還元の観点から重要である。

また、微生物群衆を用いることで化学独立細菌のカソード型電子伝達が駆動することが報告されており[94]、様々な微生物がカソード型の電子伝達機構を備えていることが予想される。しかしながら、個々の微生物がカソード型電子伝達においてどのような電子伝達機構を備えているのかは不明である。

微生物と固体の間のカソード型の電子伝達は、近年金属腐食の分野でも注目されている。硫酸還元を行う細菌によって腐食が促進されることは知られていたが[95][96]、金属表面からの水素発生速度よりも早く腐食が進むメカニズムについて、近年固体から直接電子を引き抜くプロセスが提案されている[97][98][99]。硫酸還元細菌が固体から電子を引き抜くプロセスについては、*Desulfovibrio ferrophilus* という菌を用いて、電極上で電流として観測されており、腐食防止のための検討に利用されている[100]。

このようにカソード型の電子伝達について、生体の理解のみならず工業的に今後幅広い発展が期待されており、中でも鉄酸化化学独立細菌は CO₂ 還元への応用が期待される。そこで本章の実験では、*A. ferrooxidans* のカソード型電子伝達を駆動するとともに、その際の電子伝達プロセス、および電位関係について検討を行った。

A. ferrooxidans の電子伝達系

本研究で着目している酸性鉄酸化化学独立細菌 *A. ferrooxidans* は細胞表面に Fe²⁺の酸化反応場である Cyc2 を発現させ、Fe²⁺の酸化を行うことが報告されている[101] (図 3-1)。

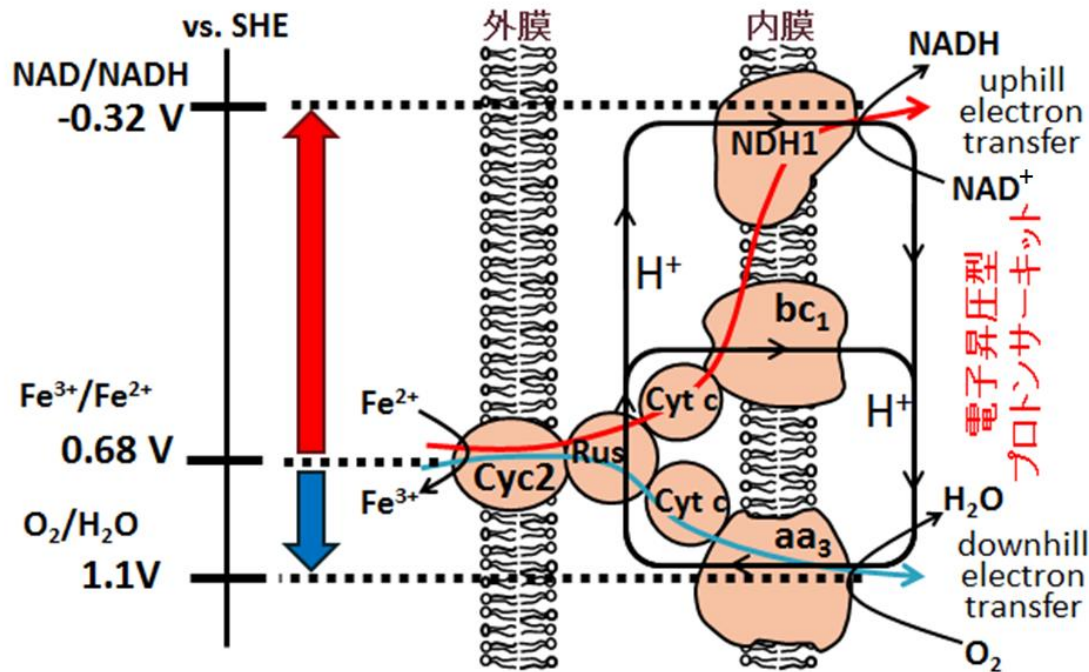


図 3-1 鉄酸化化学独立細菌の細胞膜上に発現する分岐型電子伝達経路
(再掲)

鉄還元菌で細胞表面に発現したシトクロムが細胞外直接電子伝達を駆動するように、*A. ferrooxidans* においても、固体電極との電子授受も細胞表面のシトクロムを起点にして起こすことが可能ではないかと推察できる。すなわち、電極上に *A. ferrooxidans* を接触させた状態で電極に電位をかけることで、電極から *A. ferrooxidans* 細胞内に電子が注入されると考えた。この際、*A. ferrooxidans* に注入された電子は図 3-1 の電子伝達プロセスと同様の過程を経て代謝に用いられ、その過程は電極電流として観測される。

また、鉄イオンを利用して *A. ferrooxidans* を培養した走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope : SEM) 像を示す (図 3-2)。

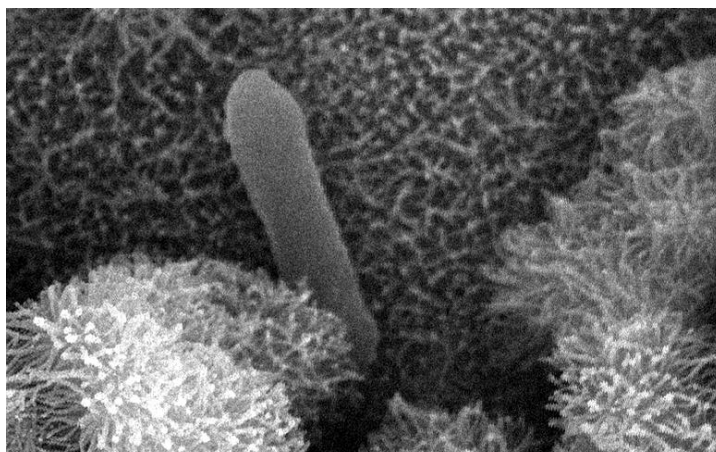


図 3-2 振盪培養における *A. ferrooxidans* の SEM 像

菌体は鉄の固体酸化物に接触した状態で培養されており、固体を積極的に代謝に利用している可能性がある。

本章の内容

以上のような背景のもと、本研究では鉄イオンを介さずに電極と鉄酸化化学独立細菌の間で電子授受を行う系を構築することで、生体の代謝の理解に大きく貢献できると考えた。そこで、本章では酸性鉄酸化化学独立細菌の一種である *A. ferrooxidans* を用い、固体との間の電子伝達を観測し微生物活性を電気化学的に追跡することを行った。また、*A. ferrooxidans* と電極の間で鉄イオンを介さない電子伝達を行わせた条件下で、阻害剤による光応答性の付与や細胞増殖を観察することで、細胞内の電子の流れについて考察した。

実験では鉄イオンを含まない電気化学リアクターを組み、そこに *A. ferrooxidans* を添加し、電流の観測を行った。その条件下で、代謝による CO_2 還元量を測定した。また、図 3-1 に示した代謝プロセスに対する阻害剤を添加することで、電極から注入された電子がどのように代謝に利用されているのか考察した。

3-2 微生物に対する電極からの直接電子注入と CO_2 還元

3-2-1 実験

電気化学培養には一槽型電気化学リアクターを用いた（図 3-3）。作用極は FTO 電極 (3.14 cm^2)、参照電極は $\text{Ag}|\text{AgCl sat.}$ 、対極は Pt 線とした。Pt 線は 10cm ほどのものをコイル状に丸めて使用した。



図 3-3 第 3 章で用いた一層型電気化学リアクター

培地には DSMZ を用い、培地の量は 4 mL とした。作用極 FTO は電気化学リアクターの下部に設置され、微生物が沈降することで電極と接触するようにした。クロノアンペロメトリーでは電極電位を +0.4 V vs. SHE に固定して電流値の観測を行った。

リアクターの上部にはシリコン製のセプタムがつけられており、注射針を利用してサンプリングや微生物の添加などが行える。セプタムの一つにフィルターを付けた針を設置することで、通気状態にし、空気中の O₂、及び CO₂ を供給した。

リアクターの周りには温度調節用の水を流すためのジャケットが取り付けられており、実験中は 30°C の水を流すことで系の温度を一定に保った。

クロノアンペロメトリーの測定を開始し、電流値が安定するまで約 10 分待ったのちに、*A. ferrooxidans* を添加した。DSMZ w/ Fe を用いて前培養した *A. ferrooxidans* を十分に洗浄し、鉄イオンを除去した状態で添加を行った。初期 OD は OD₅₀₀ = 0.05 とした。菌体を添加してから 5.5 時間経過後に、リアクター下部から紫外光の照射を行った。紫外光の波長は 254 nm である。これは一般に核酸へのダメージにより微生物が死滅する波長であり、微生物が死滅し還元電流が抑制されることを期待した。

リニアスイープボルタンメトリーの測定

微生物代謝電流が流れている状態でリニアスイープボルタンメトリーの測定を行った。スキャン速度は 0.1 mV s⁻¹ とし、+0.8 ~ -0.3 V vs. SHE の範囲で負方向にスキャンした。このスキャン速度は、電極反応を追跡する時間スケールに比べて長く、*A. ferrooxidans* 細胞内

でのタンパク質発現が起こり、代謝活性が変化する時間スケールに比べて短い。また、比較のために DSMZ w/ Fe を培地として用い、同様に *A. ferrooxidans* を添加したリアクターにおいてもリニアスイープボルタンメトリーを測定した。

電流生成時の電極表面観察

電流生成時の電極表面の様子を光学顕微鏡で観察した。観察には倒立顕微鏡(OLYMPUS)を用いた。電極にはスライドガラス型の薄膜 ITO (indium tin oxide) 電極を用いた。ガラス表面に導電性を持たせるとともに、スライドガラスであることから、倒立顕微鏡による下部からの観察を行うことができる。観察時にリアクター上部のセプタムを一つ取り外し、そこからライトをあてて、下部より観察を行った。観察時は、光照射による昇温に注意し、長時間にならないように実験を行った。

SEM 像の観察

電気化学培養後の電極表面上に存在する微生物の状態を観察するために、*A. ferrooxidans* の SEM 像の取得を行った。DSMZ 培地を用いてクロノアンペロメトリーを行った後にリアクターを分解し、電極を SEM 像観察用のサンプルとした。

一般に、微生物細胞の SEM 像をそのまま観察しようとする、観察室内を真空状態にした際に細胞の水分が気化し、細胞の形状が破壊されてしまう。そこで、形状を維持したまま観察するために、細胞膜を固定化する操作を行った後にアルコール溶媒に置換し、凍結乾燥を行う。固定・乾燥した微生物サンプルは電気伝導性を持たず、SEM 観察時にチャージアップしてしまうため、凍結乾燥後に Pt 蒸着を行い、サンプルに電気伝導性を付与する。以下に具体的なサンプルの調製方法を示す。

まず電気化学リアクターから取り外した FTO 電極を pH 2 硫酸で軽く洗い、吸着していない沈殿物を除いた後、Tris-HCl 緩衝液(pH 7)で洗浄する。

次に電極上の細胞の固定化を行う。固定化の作業は 2 mL のエッペンドルフチューブを用いて行う。リアクターから取り外した電極の大きさは 3 cm×3 cm である。適宜切断し、2 mL のエッペンドルフチューブに入るサイズにする。まず、サンプルの FTO 電極をグルタルアルデヒド 10 %を含む pH 7.4 に調整されたリン酸ナトリウム緩衝液に浸し、一昼夜放置する。この作業によって、微生物表面のアミノ基がグルタルアルデヒドと反応して架橋構造をつくり、細胞表面が強固なものとなり固定化される。

固定化の後、脱水操作を行う。細胞を固定した FTO 電極を 10 %エタノール溶液で洗浄する。更に 10 %エタノール溶液に浸し、10 分間静置する。同様の操作を、10 %,30 %,50 %,

70 %,90 %,95 %のエタノール溶液でそれぞれ行う。この操作で細胞内部の水分がエタノールに置換される。低濃度のエタノール溶液から徐々に濃度を大きくするのは、急激な脱水によってサンプル形状が崩れるのを防ぐためである。

上述の操作を終えた後に、t-ブタノール置換を行う。高純度 t-ブタノールを用い、洗浄後に溶液に 15 分間浸して静置する。この操作を 3 回行う。

次に凍結乾燥を行う。新しい t-ブタノールに FTO 電極を浸し、その状態で冷却し、t-ブタノールを凍結させる。凍結を確認したら、ポンプで減圧し、凍結した t-ブタノールを昇華させ、凍結乾燥を行う。

次に白金蒸着を行う。微生物細胞は絶縁体であり、そのまま SEM を観察しようとする、表面がチャージアップしてしまい、適切な観察を行うことができない。SEM によって表面観察を行うには、金属で表面をコーティングすることで、表面に導電性を持たせる必要がある。白金は絶縁体の SEM 観察に利用される代表的なコーティング剤である。操作には Quick quarter (三友電子) を用い、真空状態で白金を蒸着した。蒸着は、電流が約 10 mA になるように調整しながら 90 秒行った。

3-2-2 結果と考察

DSMZ を培地として用いた *A. ferrooxidans* の代謝電流観察

A. ferrooxidans が鉄イオンが存在しない条件においても固体と電子の授受を行うことができるという仮説を検証するために、鉄イオンを培地中に含まない条件で電気化学リアクターを組み、*A. ferrooxidans* を添加する実験を行った。

下に DSMZ を用いて行った *A. ferrooxidans* に対する電気化学実験の結果を示す(図 3-4)。横軸は時間、縦軸は電流密度である。*A. ferrooxidans* を添加しない条件では $0.05 \mu\text{A cm}^{-1}$ 以下の電流しか観測されないのに対して、*A. ferrooxidans* を添加した場合には添加直後から還元電流が立ち上がる様子が観測された。ここで観測された還元電流の増加は、主に微生物がリアクター内部を沈降し、電極に接触することで起こるものだと考えられる。

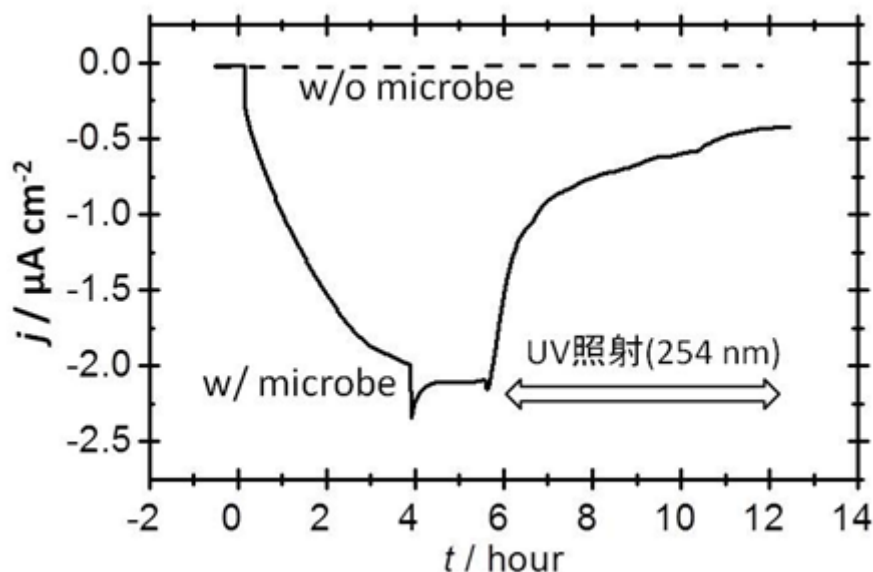


図 3-4 微生物固体間直接電子伝達における電流値の応答 (T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

還元電流の観測は *A. ferrooxidans* の添加による反応であるものの、*A. ferrooxidans* の代謝によるものなのか、細胞の分解などの非生物学的な化学反応に由来するものなのか判断できない。そこで、この系に対する紫外光照射($\lambda=254$ nm)を行った。この紫外光の照射によって還元電流が大幅に抑制された。紫外光はリアクター中の *A. ferrooxidans* に対する殺菌効果があると考えられるため、還元電流が抑制したことは *A. ferrooxidans* による代謝が停止したことを反映していると考えられる。すなわち、還元電流は微生物が体内に電子を取り込み、代謝に利用することで流れている。酸性鉄酸化化学独立細菌 *A. ferrooxidans* が鉄イオンを含まない系において、電極から電子を取り込み、代謝活動を行うというのは、本検討によって初めて得られた結果である。

電極表面の光学顕微鏡観察

A. ferrooxidans が電極との間で電子授受を行う際の様子を観察するために、*A. ferrooxidans* を添加した直後の電極表面の様子を光学顕微鏡で観測した。実験ではまず代謝電流の観察で用いたものと同様のリアクターを組み、*A. ferrooxidans* を添加した。初期 OD_{500} は 0.02 とした。これは OD_{500} が 0.05 の条件では菌体量が過剰で電極表面が飽和してしまうためである。電流を流しながら、電極表面の経時変化を光学顕微鏡で観察した。観察は微生物添加の 5 分後、2 時間後、3.5 時間後、9.5 時間後に行った。

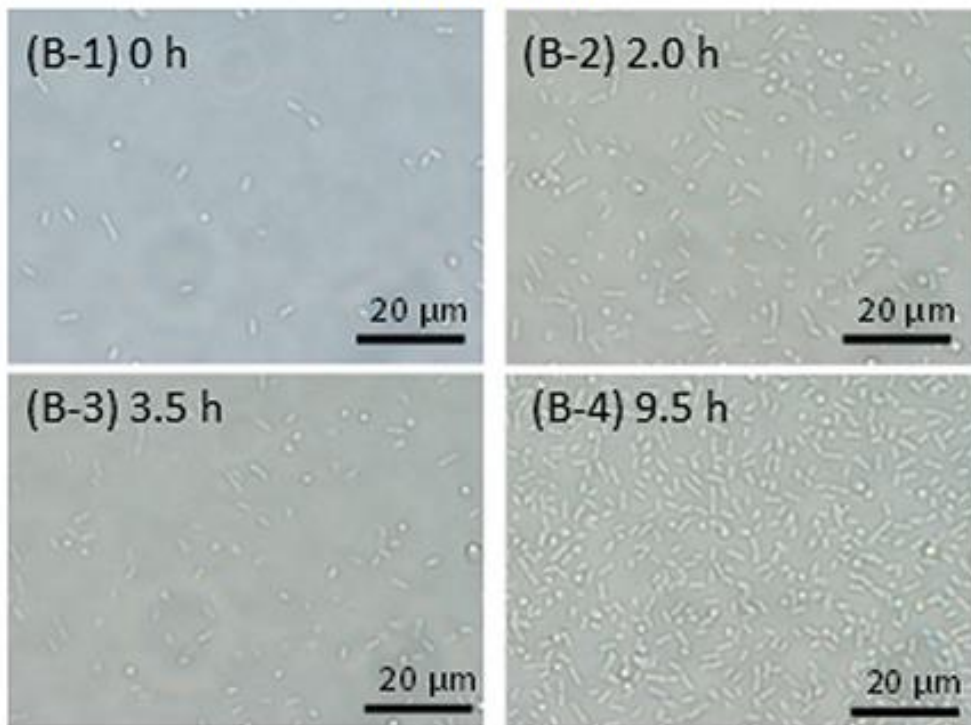
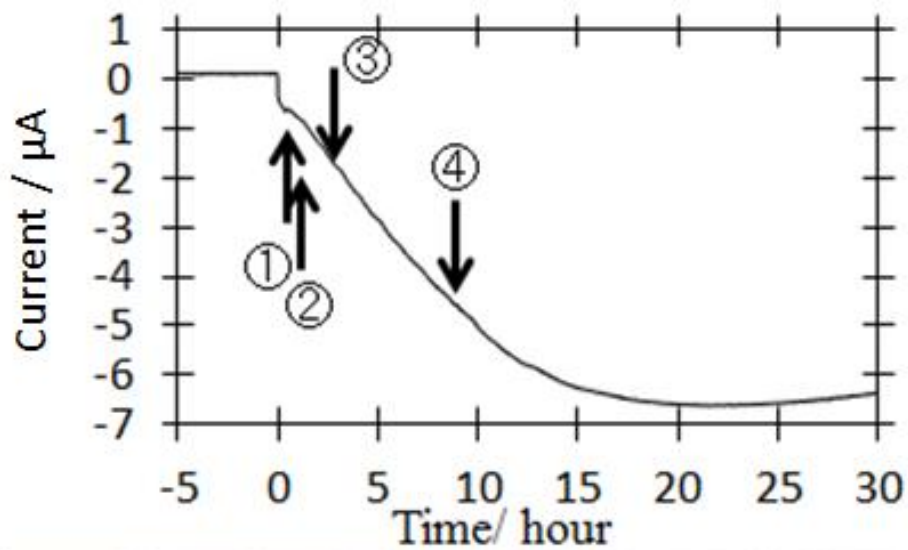


図 3-5 微生物の代謝電流とそれに伴う電極の光学顕微鏡写真
 リアクターに微生物を添加し、グラフの矢印で示した①～④のそれぞ
 れの時点における顕微鏡写真を下に示した。(T. Ishii, et al, *Frontiers in
 Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

図 3-5 に代謝電流と電極表面の光学顕微鏡像を示した。電極表面に *A. ferrooxidans* の細胞
 が付着するのに合わせて、電流が増加していく様子が見られる。電極表面の菌体数は 9.5 時
 間で 15 倍に増加した。第 2 章 (図 2-9) で得られた結果より、*A. ferrooxidans* の倍加時間

が 5.1 時間であったことから、通常の細胞分裂に由来すると仮定した場合、9.5 時間では $2^{9.5/5.1}=3.6$ 倍の増殖となる。このため、電極表面での菌体数の増加の大部分は、*A. ferrooxidans* の細胞分裂に由来するものではなく、溶液中を浮遊していた細胞が沈降し電極に接触することに由来することがわかる。電極表面に付着した菌体は横方向にはほとんど移動せず、その場で回転するような動きをした。

ここで、電極表面に存在する微生物数を顕微鏡画像からカウントし、横軸に菌体数、縦軸に電流値をとったグラフを次に示す（図 3-6）。

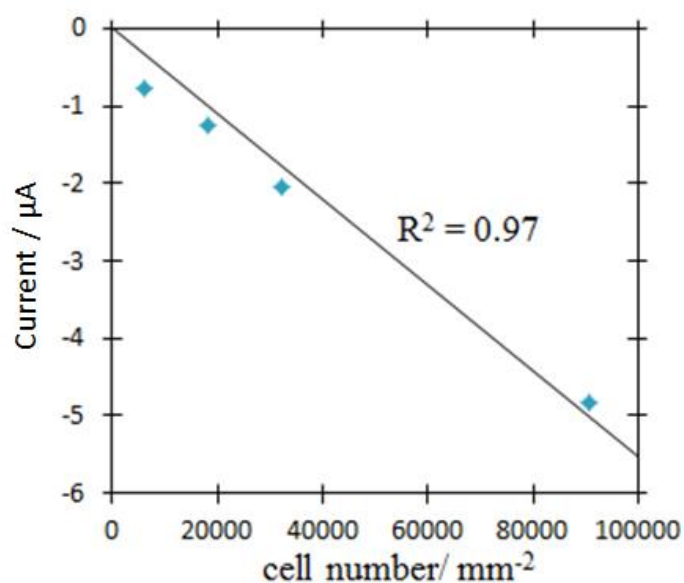


図 3-6 電極表面の菌体数に対する電流値の応答 (T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

電流値と菌体数の間に高い相関係数を持つ比例関係が観測された。この結果は電流に寄与する代謝活動を行っているのが、電極に直接接触している微生物であることを意味している。ここで、電極上で観測された微生物数で電流値を除した計算から菌体 1 個体あたりの電流量を求めると、

$$\frac{-4.8 \mu\text{A}}{314 \text{ mm}^2 \times 9.1 \times 10^4 \text{ cell mm}^{-2}} = -1.7 \times 10^2 \text{ fA cell}^{-1}$$

となる。カソード型電子伝達において、微生物 1 個体あたりの代謝電流を求めた例は過去にない。一方で、アノード型電子伝達に関しては過去に Liu らが *S. lohica* を用いた検討で明らかにしており、電位に依存するもののおおよそ数 10~数 100 fA cell⁻¹ の電流となる [103]。観測された電流値は、菌体 1 個体あたりの電流値として妥当な値であることがわかる。

リニアスイープボルタンメトリーによる代謝電位の観測

代謝電流の電気化学的考察のために、リニアスイープボルタンメトリーを測定した。図 3-7 上図はリニアスイープボルタンメトリーの生データ、図 3-7 下図はターフェルプロットである。また、下図には、DSMZ w/ Fe を用いて測定したリニアスイープボルタンメトリーの結果を合わせて示した。

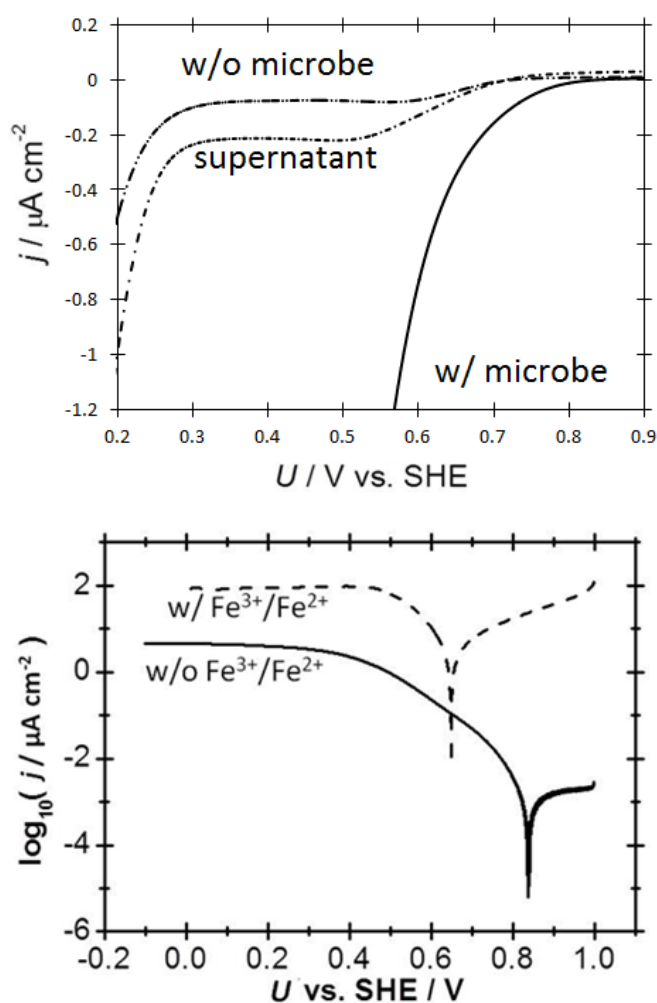


図 3-7 鉄酸化化学独立細菌を用いた電気化学系に対するリニアスイープボルタンメトリーの測定結果。上図は縦軸を電流値、下図は縦軸を電流値の対数としている。(T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, **6**,1(2015)より引用[102])

まず、図 3-7 上図に示した通り、微生物なしの条件では観測されていない還元電流の立ち上がりが見られた。この電流は上澄みを用いて測定したリニアスイープボルタンメトリーでは観測されず、代謝によるものであることがわかる。更に、図 3-7 下図に示した通り、DSMZ w/ Fe におけるリニアスイープボルタンメトリーでは、電流は+0.65 V vs. SHE から立ち上がっている。ここで観測された電流は、*A. ferrooxidans* に対する直接電子伝達ではなく、*A. ferrooxidans* によって酸化された Fe^{3+} の還元である。鉄イオンは *A. ferrooxidans* と電極の間の電子伝達を仲介している。また、立ち上がり電位は系中の鉄イオンの酸化還元電位に対応していると考えられる。第 2 章で測定したサイクリックボルタンメトリーで測定された中点電位は+0.66 V vs. SHE であり、この結果に矛盾しない (図 2-11)。一方、鉄イオンが存在しない系では電流は+0.82 V vs. SHE から立ち上がった。観測されたカソード電流は電極に直接接触した微生物によるものであり、リニアスイープボルタンメトリーで得られた結果は、*A. ferrooxidans* の外膜上に+0.82 V vs. SHE の中点電位を持つ酸化還元タンパク質が存在し、電極との間での電子伝達、及びそれによる CO_2 還元を担っていることを示唆している。

ここで得られた+0.82 V vs. SHE という電位は、過去に微生物のカソード型直接電子伝達として報告されている系[84][93]の電位よりも 0.8 V 以上正であり、過去の報告よりはるかに小さなエネルギーが、*A. ferrooxidans* によってカソード型電子伝達によって利用されていることを示している。

なお、この電子が downhill electron transfer によって酸素還元を利用された場合、約 0.3 eV のエネルギーが得られる。*A. ferrooxidans* の膜に蓄えられているプロトンの電気化学ポテンシャル差は 0.2 V 程度であり、このエネルギー差は downhill electron transfer による細胞外へのプロトンの汲み出しを起こすのに十分なエネルギー差である。微生物鉄代謝系では Fe^{2+} の電子を利用しているため、*A. ferrooxidans* 表面に観測されるべき酸化還元酵素の電位は鉄イオンの酸化還元電位より正にあることが期待される。鉄イオンを含まない電気化学系で観測された立ち上がり電位 (+0.82 V vs. SHE) は、この条件を満たしており、観測された還元電流が鉄系代謝パスを利用した電子伝達である可能性を示唆するものである。

A. ferrooxidans の SEM 観察

鉄イオンを含まない環境で電気化学培養を行った場合の、*A. ferrooxidans* の状態を観察するために、培養後の電極を取り出して SEM 像の観察を行った。

DSMZ で電気化学培養を行った後に電極を処理して *A. ferrooxidans* の SEM 像を観察した (図 3-8)。SEM 上で黒い部分のが微生物である。

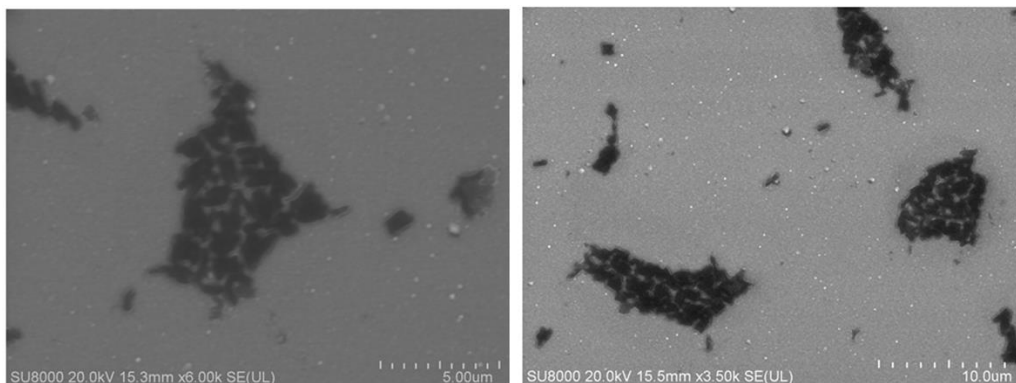


図 3-8 電極上で培養された *A. ferrooxidans* の SEM 画像

像をみると、*A. ferrooxidans* が集合し、コロニー状になっていることが見て取れる。*A. ferrooxidans* は自己移動するもののその活性は低い。このような集合体構造は、増殖を繰り返す過程で自然に得られたものであると考えられる。

3-3 直接電子注入条件下における細胞内代謝過程の検討

3-2 で鉄イオンが存在しない条件での電極から *A. ferrooxidans* への電子伝達を観測した。その結果、*A. ferrooxidans* が電極に接触することで、電子の授受がなされることが明らかになった。しかし、電子の授受が起こり、代謝活動を行うことは明らかになったものの、*A. ferrooxidans* の細胞内で電子がどのような電子伝達タンパク質を通り、どのように利用されるのかについては、不明なままである。

そこで、本項ではまず代謝阻害剤を用いることで、直接電子伝達過程における微生物の電子伝達経路を特定することを試みた。

代謝阻害剤は、微生物の持つ特定のタンパク質に結合し、その機能を不活性化させる。そのため、阻害剤を添加した際の微生物応答を観察することで、特定のタンパク質が代謝活動にどのように寄与しているのかを明らかにすることができる。

次に伝達された電子によって有機物生産がなされ、生命活動が維持されていることを示すために細胞増殖を確認するための実験を行った。

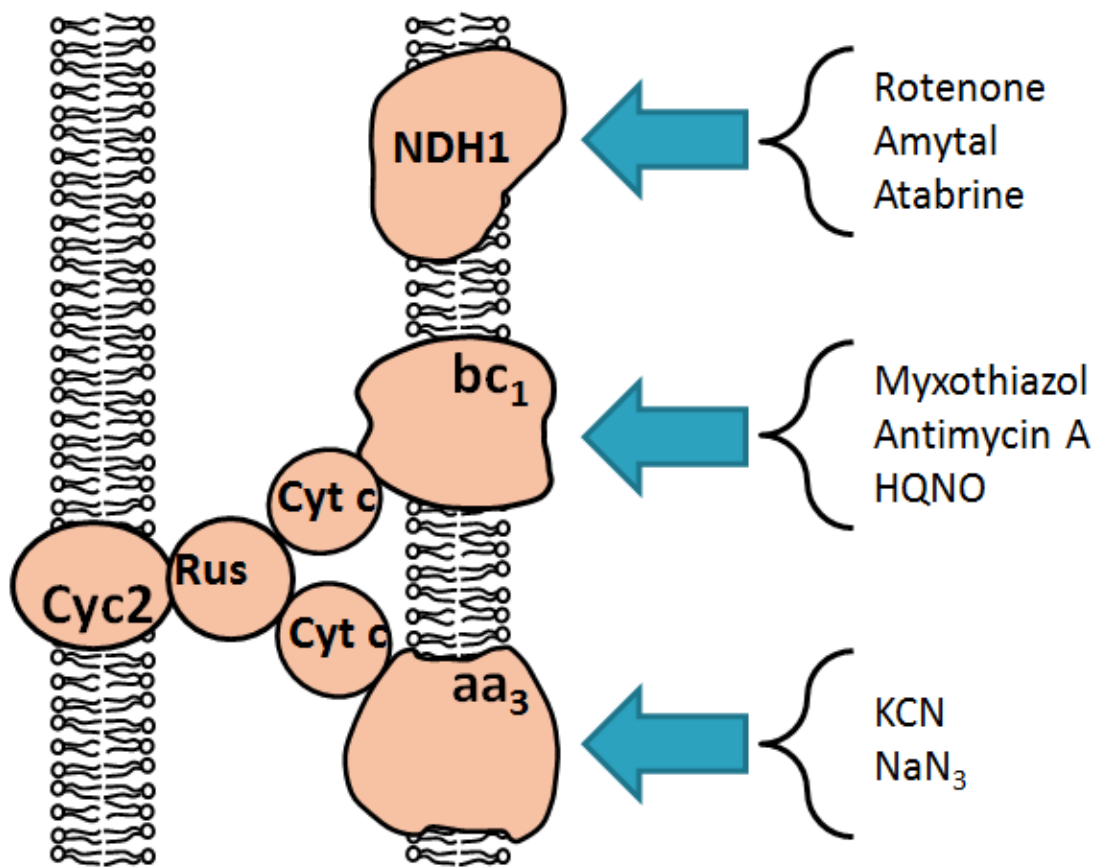


図 3-9 *A. ferrooxidans* の電子伝達系に対して知られる代謝阻害剤[103]

A. ferrooxidans の電子伝達系に対する阻害剤は、既に様々なものが報告されている（図 3-9）。本実験ではその中から KCN、CO、及び Antimycin A を用いた。KCN、及び CO は aa₃ 複合体への阻害剤、Antimycin A は bc₁ 複合体への阻害剤である。それぞれの阻害機構について説明する。

KCN、及び CO による阻害

KCN や CO は電子伝達タンパク質のなかでも特に aa₃ 複合体に特異的に作用する阻害剤である[103][104]。

aa₃ 複合体はシトクロム c オキシダーゼあるいは複合体 IV と呼ばれる。このタンパク質は様々な生物に普遍的に存在し、ミトコンドリア内での ATP 合成において重要な働きをしている[21]。

aa3 複合体には 3 つの銅イオンと 2 つの鉄イオンが含まれており、鉄イオンはシトクロム a、及びシトクロム a₃ の形で存在している。aa3 複合体によるシトクロムの酸化反応は銅イオンが活性点となって起こり、シトクロム a₃ で酸素が還元する[105]。

シトクロム a₃ は第 5 配位場をヒスチジンによる配位で埋められているが、第 6 配位場は開いた状態である。通常の状態ではこの解放された第 6 配位場の位置に酸素が配位し、還元反応が駆動される。

阻害剤である CN⁻や CO はこの第 6 配位場に配位することで還元反応を阻害する。CN⁻や CO は空の π^* 軌道を持つ分子であり、鉄の d 軌道の電子から、 π^* 軌道へ電子の逆供与が起こる。これは鉄の電子状態を安定化させ、酸化還元活性を低下させる[106]。

CO による光応答性の付与

鉄酸化化学独立細菌の downhill electron transfer の阻害剤は一般にシトクロム鉄に配位子を配位させることで電子伝達活性を失わせるものである。しかしながら、鉄酸化化学独立細菌は細胞表面にもシトクロム鉄を有しており、downhill electron transfer の酵素である aa3 複合体に特異的に阻害が起こっているかについては疑問が残る。そこで、本実験では事後的に代謝阻害されているタンパク質を確認できる手法として、CO を利用した代謝阻害実験を行った。CO は、in vivo で代謝を阻害し、その阻害効果を光化学的にコントロール可能なことで知られる[106]。

前述のとおり、シトクロムに CO を曝露すると CO がヘム鉄に配位し、 π^* 軌道への逆供与によって酸化還元活性を変化させる[107]。

さらに、CO の吸着によって変化したシトクロムの酸化還元活性は、光を照射することによって回復する。シトクロムは Soret 帯、Q 帯という光吸収を持つ。これらに対応する光を照射すると、シトクロムから CO が脱離し、再度吸着するまでの間酸化還元活性が回復する (図 3-10)。光による酸化還元活性の回復はシトクロムの吸収スペクトルに対応した波長依存性を示す。そのため、CO 存在下で代謝活性の変化の波長依存性を観測することで、CO によって阻害されている酵素を決定することができる。

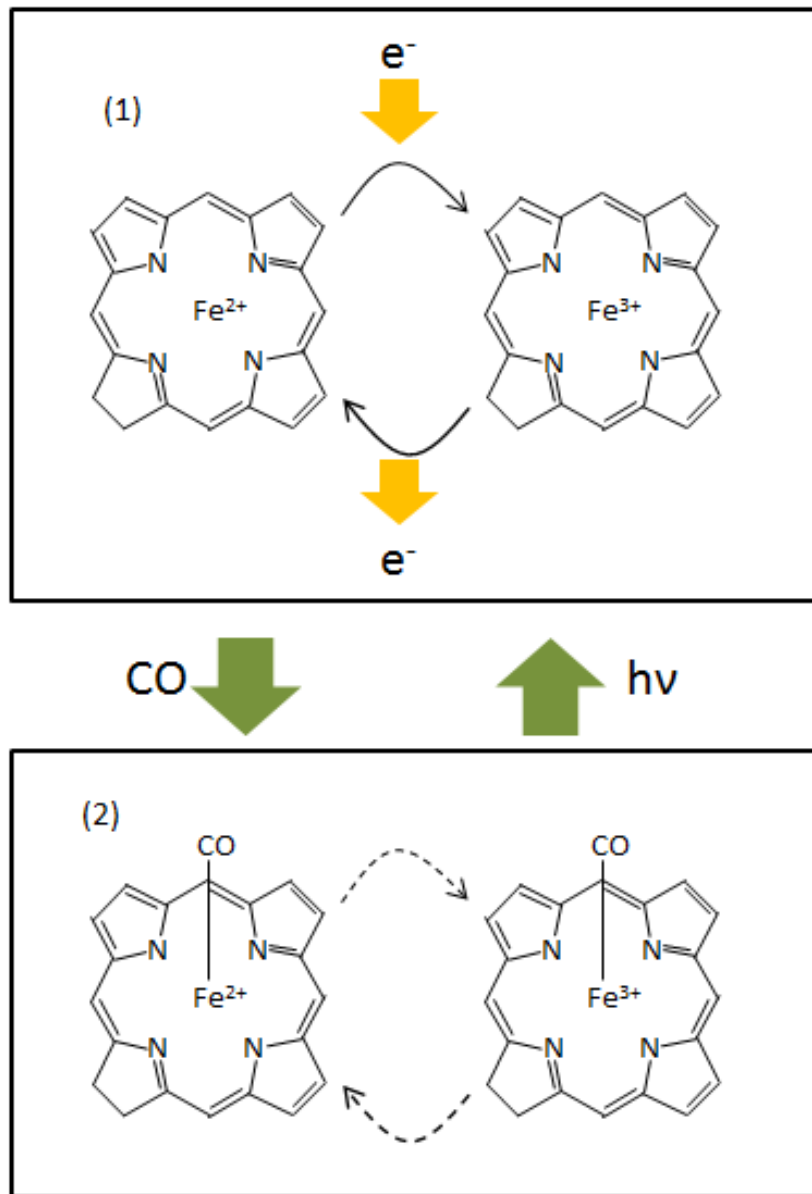


図 3-10 CO によるシトクロムの電子伝達阻害の模式図

また、光照射の切り替えによって微生物代謝活動の切り替えを制御できるため、系中の微生物の活性を可逆的にコントロールしているといえる。これは、細胞に対する影響を小さくした形での（可逆的）測定であると言い換えることができ、微生物に与える影響を小さくした形で阻害実験を行うことができる。一方、例えば KCN による阻害実験では一度阻害された微生物はそのまま死滅してしまう（不可逆的）。

CO を用いた光照射によるシトクロムの酸化還元コントロールは、50 fs 程度のオーダーで行うことができるという特徴がある[106][108]。光の照射は、特定波長の制御やパルス波の照射など、細かなコントロールが可能である。さらに、CO の光脱離現象は数 fs 以内に

起こることが知られている。また脱離した CO が細胞のシトクロムに再吸着する時間スケールは、ms 程度のオーダーであり、短い時間分解能での細かな検討が可能になる。一方、通常の阻害剤を実験系内に滴下するような方法では、攪拌に数秒、あるいは攪拌ができない環境なら拡散によって数十秒から数分の時間をかけて生物の代謝コントロールを行うため、制御の時間スケールに限界がある。CO による光制御のように、短い時間スケール(ms オーダー)コントロールが可能であることは動的挙動の追跡に有用である[109][110][111]。

光を用いた生体化学の解明については、例えば P. Joliot らによる光合成機構の解明がある[112]。光の短時間照射を繰り返したとき、光合成応答に周期性があることを突き止め、PSII の機構を解明した。このように代謝を光制御することは、代謝機構の解明において有用なツールとなりうる。

CO を用いて代謝に光応答性を付与した観察について、2011 年に Shibamura らは鉄還元細菌 *Shewanella loihica* PV4 を用いて、シトクロムに対して CO を阻害剤とし、光応答性を付与して代謝制御を行った。その結果鉄酸化化学独立細菌の細胞外電子伝達機構の動的挙動を観測することに成功している[106]。鉄還元細菌 *Shewanella* は細胞表面に多数のシトクロム c をもち、そのシトクロムを起点に固体との電子伝達を行い、代謝を行うことが知られている。*Shewanella* に対して CO に暴露すると表面シトクロム c が CO に配位され酸化還元活性を失う。光照射によってその活性は復活し、酸化電流が増殖する様子が観測されている。ここで、代謝活性の回復量に波長に対する依存性が存在し、その CO 存在下での *Shewanella* に対する光アクションスペクトルは紫外可視分光スペクトル (UV-vis スペクトル) と良く一致する。*Shewanella* の UV-vis スペクトルは細胞内に多量に発現したシトクロム c の吸収を反映しており、シトクロム c に対する CO の配位がコントロールされていることが報告された。このような事実を元に、Shibamura らはシトクロムに対する CO の阻害効果と光化学的手法の組み合わせによって代謝の切り替えを緻密にコントロールし、*Shewanella* の代謝速度にを解析した。

本検討は、同様の手法を *A. ferrooxidans* に用いることで、鉄酸化化学独立細菌の代謝活性を CO によってコントロールすることを試みる。これによって、代謝の阻害効果が起きているシトクロム種を特定し、電極から *A. ferrooxidans* への電子伝達プロセスについて、細胞内部での電子伝達経路に関する知見を得る。このような手法を確立させることは、今後電子伝達プロセスの動的挙動を観測していく上で、利用可能な手法となると考えている。

Antimycin A による阻害

Antimycin A は電子伝達タンパク質のうち bc1 複合体に作用する阻害剤である。

bc1 複合体はユビキノール-シトクロム c リダクターゼや複合体 III などともよばれるタンパク質であり、様々な生物に普遍的に存在するタンパク質である。人体の中にも存在し、ミトコンドリア膜における ATP 合成で重要な役割を果たしている[113]。

bc1 複合体は *A. ferrooxidans* の電子伝達プロセス内で以下のように機能する[39][60]。

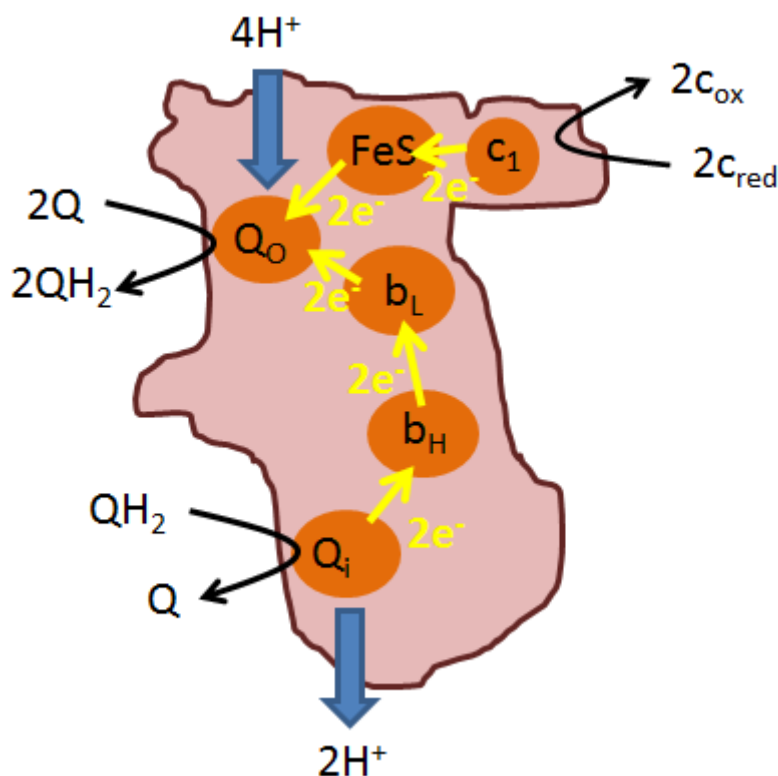


図 3-11 bc1 複合体内部での電子伝達模式図

Q ; ユビキノロン、QH ; ユビキノール、b : シトクロム b、
c : シトクロム c、FeS : 鉄硫黄クラスター

図 3-11 に、bc1 複合体内部での電子伝達の模式図を示した。bc1 複合体は膜貫通型のタンパク質であり、図の下側が細胞内側方向、図の上側が細胞外側方向である。bc1 複合体は還元体のシトクロム c を酸化し、膜中に存在するユビキノンを還元してユビキノールとする働きを持つ。bc1 複合体における電子伝達反応はまずシトクロムの酸化が起こる。シトクロムから取り出された電子は鉄-硫黄クラスター (FeS) に回収される。また一方でユビキノールの酸化が細胞膜内側で起こる。ここではユビキノールを酸化して生じたプロトンが膜内部に放出される。電子はシトクロム b_H、シトクロム b_L と移動する。FeS と b_L に回収された電子は細胞膜外側において 2 分子のユビキノンの還元利用される。ユビキノンは還元時に膜外側からプロトンを回収する。これによってトータルでは膜外部から内部にプロトンが流入し、シトクロムからキノンへと電子が受け渡されることになる。

Antimycin A (図 3-12) は初期のユビキノール酸化部位に特異的に結合し[114]、ユビキノールの酸化反応を抑制する。このためキノンの還元に必要な電子が供給されず、反応が停止し、bc1 複合体の活性が抑制される。

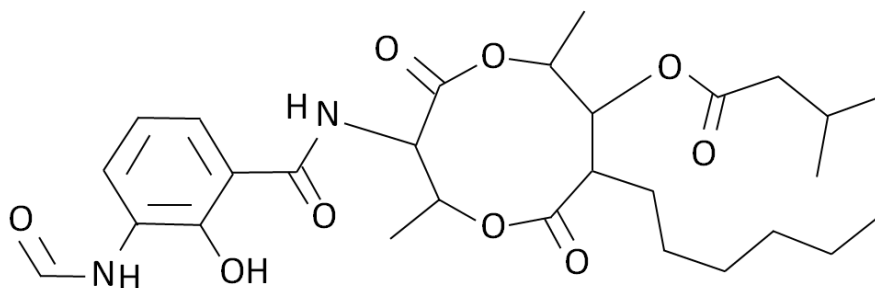


図 3-12 Antimycin A の分子構造

3-3-2 実験

電気化学リアクターによる downhill electron transfer の代謝阻害実験

A. ferrooxidans を電極と接触させ代謝電流を観測している状況下において、代謝経路を追跡するために、阻害剤を用いた実験検討を行った。

まず、downhill electron transfer に対する阻害剤として、KCN、及び CO を用いた阻害実験を行った。KCN は純水を用いて 2 M の溶液を調製し、直接電子伝達によって代謝活性を示している電気化学セルに対して終濃度が 2 mM になるように添加した。滴下時は、液の流れによって電極表面に吸着した *A. ferrooxidans* が舞い上がらないように、静かに滴下を行った。

CO ガスは 10 分間フローし停止した。数分後、電流が安定したところで光照射実験を行った (図 3-13)。こうして系中に CO を暴露し、光を照射することで還元電流が増減する様子を観測した。

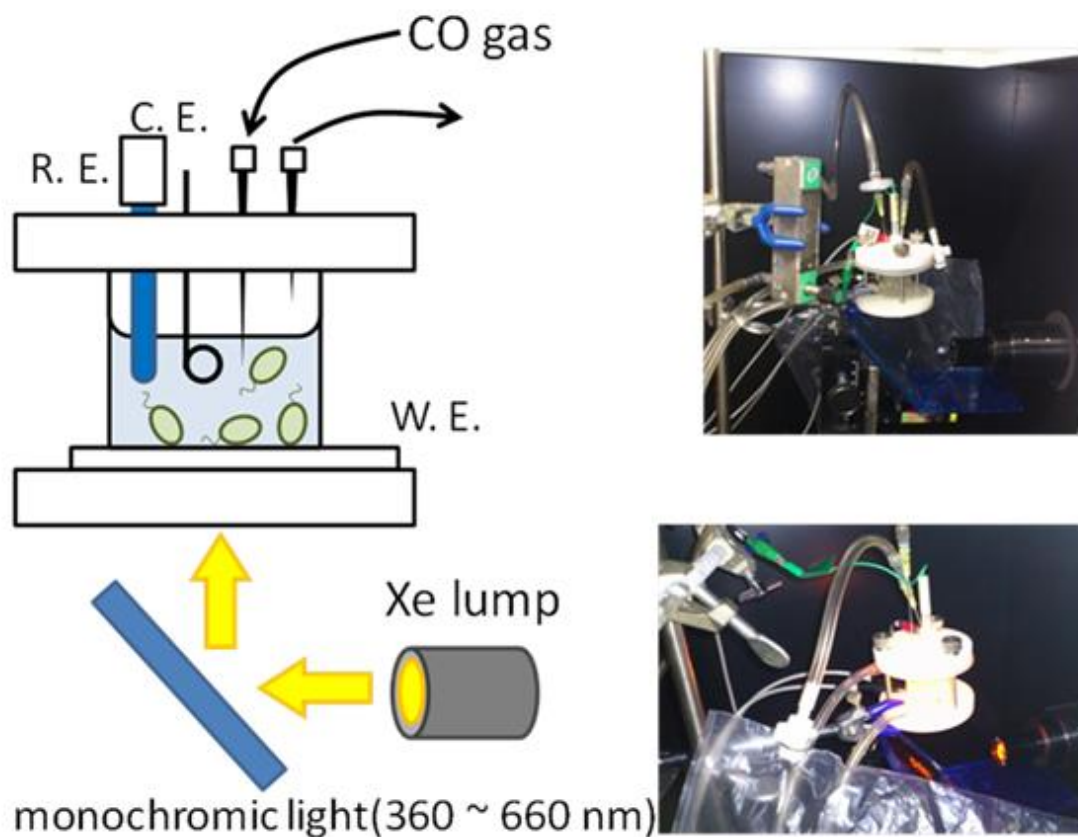


図 3-13 光照射実験の模式図

光源から横方向に光が照射されるため、鏡で反射させ、リアクター下部から光照射が行えるようにした。光照射にはキセノンランプ（1000-W, USIO）を用い、波長はモノクロメーターを用いて制御した。照射波長は 360~660 nm とし、5 nm 刻みで光を照射した。照射時間は 1 つの波長に対して 5 秒間とし、そののち 15 秒待ってから、次の波長の照射を行った。この測定では全行程で 20 分程度の時間がかかる。代謝電流実験の結果から、この時間スケールでは微生物活性に大きな変化はないものの、わずかな代謝電流の増減は存在する。そこで、360 nm から 660 nm の方向に波長を変化させながら実験を行ったのち、660 nm から 360 nm の方向に波長を変化させる実験を行い、アクションスペクトルに差がないか検討した。

電気化学リアクターによる uphill electron transfer の代謝阻害実験

次に、uphill electron transfer の電子伝達タンパク質の中で bc1 複合体に対して阻害効果が知られている Antimycin A を阻害剤として利用した。Antimycin A は通常の水系の溶媒に溶けにくいいため、電気化学実験では培地中にメタノールを 10 % となるように加えた。また

Antimycin A はメタノールを用いて 100 mM の溶液を調製したのちに、固体-微生物間の電伝達が起こる条件で培地量の 1/1000 になるように加えた。また、コントロール実験として、電気化学リアクターに Antimycin A を加えていない純粋なメタノールを滴下する実験を行った。滴下時には液流の発生によって、電極上の微生物が舞い上がることを無いう、上部から静かに滴下を行った。

電気化学条件下における有機物量の観測実験

代謝電流観測時の細胞増殖を観測するために、電気化学リアクター内の培地の濁度の測定実験を行った。通常の電気化学リアクターを組み、定期的に培地を 200 mL サンプリングし、濁度計を用いて菌体密度を測定した。サンプリングの際は培地を十分にピペッティングし、沈降した *A.ferrooxidans* が一時的に均一に分散するようにしてサンプリングを行った。

また、同様の実験系において、電気化学培養条件における TOC の変化を追跡した。リアクターからサンプルを 0.5 mL 分取し、第 2 章と同様の手順によって TOC の測定を行った。

A. ferrooxidans の UV-vis 測定

A. ferrooxidans の UV-vis 測定を行う場合、上部の気層をコントロールするために、特殊な石英ガラスセルを用いた。通常のセルは上部が解放されており、気層環境をコントロールすることが困難である。パラフィン製フィルムなどをはることである程度の密閉性は確保できるものの、十分とはいえない。使用したセルは光路長が 1 mm の石英ガラスセルの上部にセプタムによってふたができるようにしており、密封可能にしたものである。セプタムに針を刺すことで気相の交換を行うことが可能であり、必要に応じて密閉を保ったまま試薬を添加できる。このセルを用いて、気相をコントロールした条件での UV-vis スペクトルを観測した。

前培養した *A. ferrooxidans* を十分に洗浄して、このセルに入れた。十分な信号強度を得るためには、非常に高い菌体濃度の培地を用意する必要がある。実験では OD 換算で $OD_{500} > 5$ の非常に濃い微生物懸濁液を使用した。これはおおよそ 1.5L の培地で培養した *A. ferrooxidans* を洗浄し 1 mL 程度にまで濃縮して得られる。洗浄の手順は第 2 章の手法と同様である。

ここでは、*A. ferrooxidans* の吸光度の測定を行うために、拡散透過法によって UV-vis スペクトルの測定を行った。拡散透過法の模式図を示す (図 3-11)。

微生物懸濁液のようなサンプルを通常の UV-vis で測定しようとする、懸濁している粒子による散乱の効果が表れる。散乱した光はサンプルの光吸収の情報を有しているにもか

かわらず、検出器に入らない。そのため、測定のベースラインが高まり、適切な測定が困難になってしまう。

拡散透過法は、このような懸濁液による光散乱の影響を考慮しながら吸光度を測定することができる手法である(図 3-14)。そのため微生物サンプルのように懸濁した液体について UV-vis スペクトルを測定する場合に適した方法である。拡散透過法ではサンプル部の背後に内面を炭酸バリウムで覆った球が設置されており、この球は積分球と呼ばれる。炭酸バリウムは UV-vis 測定波長に対しては高い光反射をする。サンプルによって散乱された光は積分球内部で反射され、一点に集光する。この集光地点で吸光度を測定することで、懸濁による拡散の影響を最小化して、測定を行うことができる。

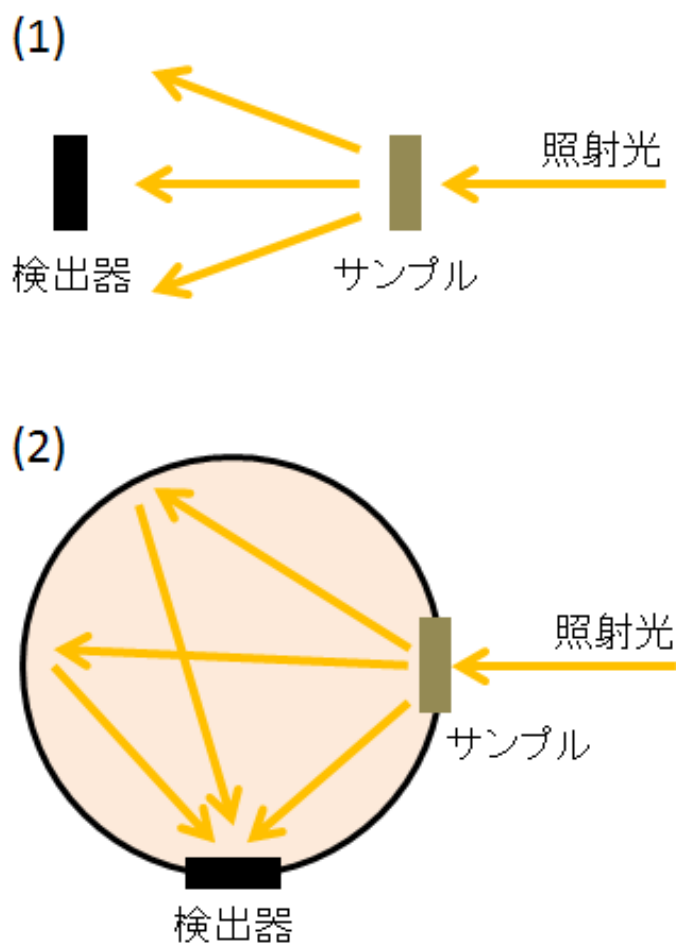


図 3-14 積分球を利用した UV-vis スペクトル測定の模式図

(1)通常の測定。散乱光は検出器に入らない。

(2)拡散透過法による測定。散乱光を検出器に集光し、散乱光まで含めた吸光度を求めることができる。

A. ferrooxidans の UV-vis スペクトルの測定は N_2 条件、次亜硫酸ナトリウム： $Na_2S_2O_4$ 添加条件、CO 条件のそれぞれで測定した。この状態では *A. ferrooxidans* 中のシトクロムの大部分は酸化状態にあると予想できる。そこで、還元剤である $Na_2S_2O_4$ を添加して測定を行った。また次に、CO を系中にバブリングし、測定を行った。 $Na_2S_2O_4$ はシトクロムを還元させる還元剤として代表的な試薬であり、系中に存在するシトクロムを還元し、 Fe^{3+} を Fe^{2+} へ変化させることを期待している[109][110]。

CO は還元体のシトクロムに配位するため、CO 導入はシトクロムを Na_2SO_4 にて還元してから行った。

3-3-3 結果と考察

KCN による代謝阻害

まず、代謝プロセスの追跡のために、aa3 複合体に対する阻害剤である KCN を、電子伝達を起こしている条件のリアクターに添加する実験を行った。

微生物代謝環境にあるリアクターに対して、シトクロムへの阻害剤である KCN を添加した際の電流値の応答を図 3-15 に示す。

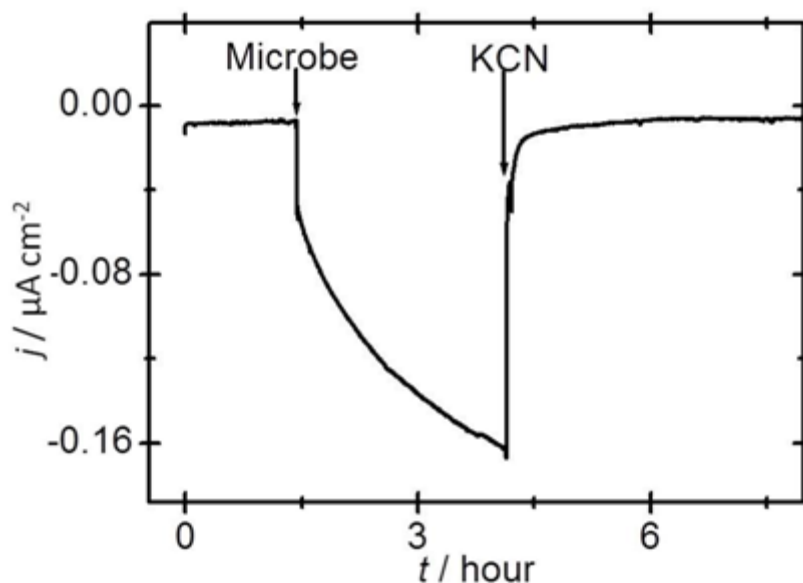


図 3-15 代謝電流観測中に阻害剤 KCN を添加して得られた電流挙動
(T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, **6**,1(2015)より引用[102])

KCN を添加した条件では、電流値が完全に阻害される結果が得られた。KCN は一般にヘム鉄の酸化還元反応に対して強い阻害効果を及ぼし酸素の消費を抑制することが知られている。ここでは aa3 複合体が完全に阻害された結果、downhill electron transfer によってプロトン電気化学ポテンシャル差を生み出すことができなくなり、結果として全電流が抑制されたものと考えられる。

しかしながら、KCN の阻害効果はヘム鉄に対して強い結合をすることによって起こるため、細胞表面の C_{yc}2 に対しても阻害効果を及ぼしている可能性がある。aa3 複合体のみの阻害効果を確認するために以下に示す CO 阻害実験を行った。

CO による電流阻害実験

いくつかのシトクロムを電子伝達タンパク質に有する *A. ferrooxidans* において、aa3 複合体に対する阻害効果を観察するために、CO による阻害実験を行った。*A. ferrooxidans* を電極と接触させて電流が観測されている条件で CO の注入を行った。

CO を注入すると、代謝電流の値は 3 割ほどに減少する。これは代謝プロセスが CO で阻害される影響と、CO のバブリングによって *A. ferrooxidans* が電極表面から舞い上がったことによると考えられる。KCN の場合とは異なり、CO の場合には溶液にバブリングを行わないと阻害効果があらわれず、電極表面に沈降した微生物を舞い上がらせないように穏やかに添加することができない。そのため、CO 注入後、電流値が安定するまで待機し、その後の光照射実験を行った。

伝達条件下で、光照射(全光)を行った結果を示す(図 3-16)。CO 雰囲気での光照射を行うと、還元電流の増加が確認された。シトクロムに CO が吸着することで失われていた酸化還元活性が光照射による CO の脱離で回復したためだと考えられる。対照実験として行った N₂ 条件では、同様の電流の応答は見られなかった。N₂ の系で見られる僅かな変化は、電極として使用している FTO が光吸収することの影響であると予想できる。

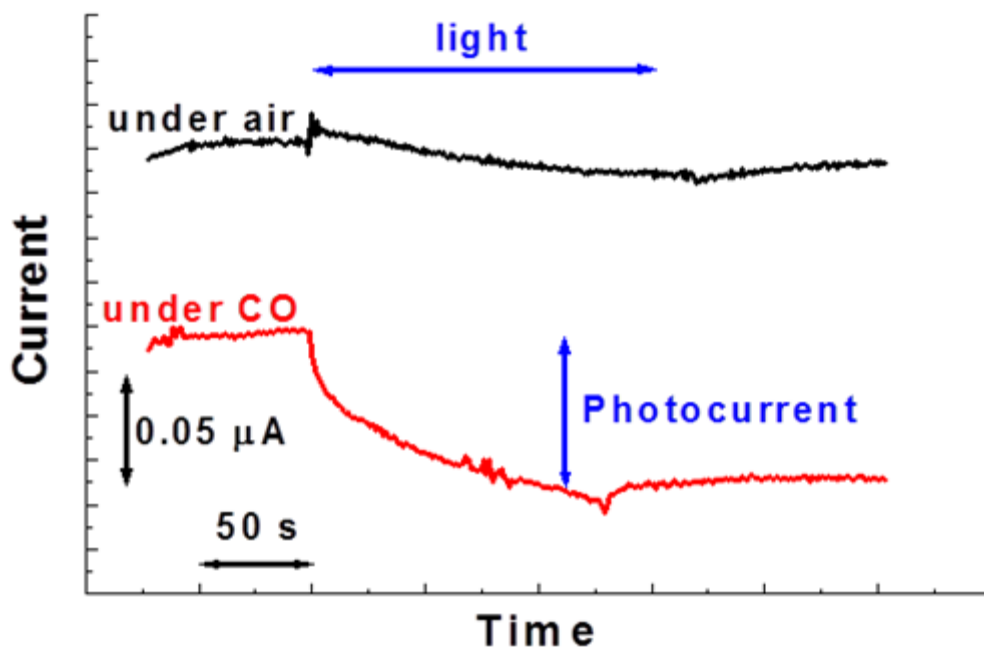


図 3-16 光応答電流

air 条件では光照射によって還元電流の変化がほとんど観測されなかった。CO 雰囲気下では、光照射にあわせて還元電流の上昇が観測された。

(T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

この結果は通常光応答性を持たない微生物の代謝に対して光応答性を付与したことを意味している。

ここで行った CO 雰囲気中の電気化学リアクターに対する光照射実験では、光照射を終了した後も照射前のレベルまで電流値が減少していない、これは光照射を行っている時間に系中で微生物が沈降する影響、光吸収による系の温度変化の影響、脱離した CO が拡散し、微生物近傍から離れていく影響などが考えられる。このような影響は照射時間が長くなるほど現れやすいため、アクションスペクトルの測定では、光照射時間を 5 秒間として、検討した。

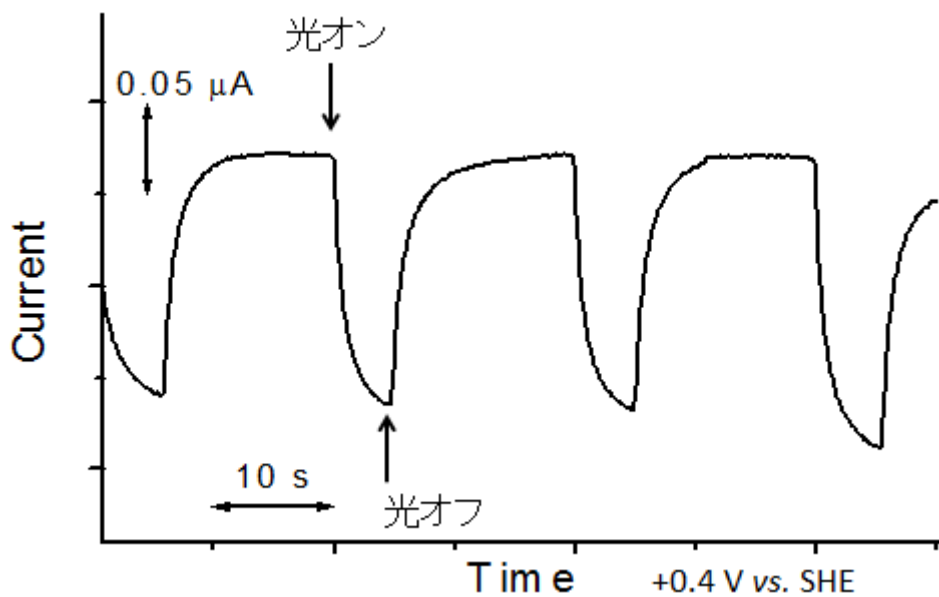


図 3-17 光照射(5 秒間)による電流応答 (T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

図 3-17 にアクションスペクトル測定過程の光照射 5 秒間での電流値応答を示した。光照射時間を 5 秒間とした場合には、光をオフにすることで光照射前のレベルにまで電流値が低下する。そのため、CO 雰囲気下での微生物の光応答を調査する実験条件として、本条件を用いた。

ここで、光をオンにしたときとオフにしたときの電流値の差を光波長に対してプロットすることで、CO 雰囲気下での還元電流応答の波長依存性のグラフを得る。(図 3-18 (A))

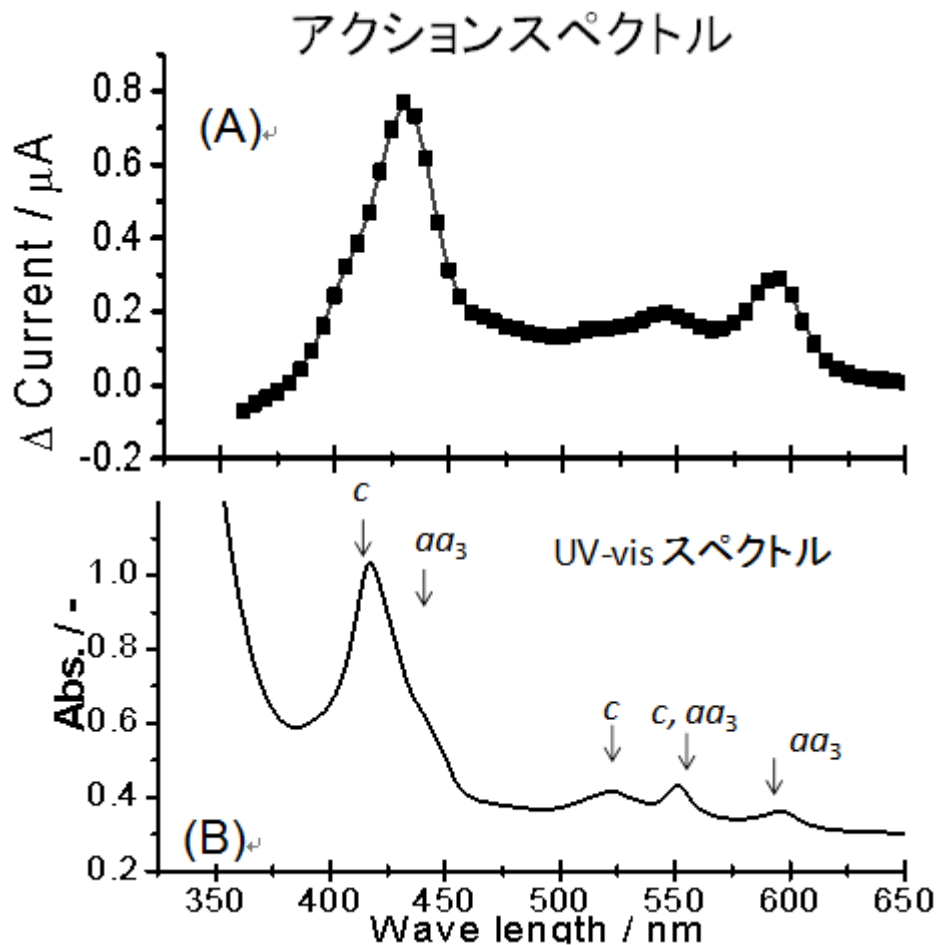


図 3-18 (A)光応答性電流の波長依存性 (アクションスペクトル) : 波長をモノクロメーターで調整した。(B)CO 雰囲気での *A. ferrooxidans* の UV-vis スペクトル : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加してシトクロムを還元し、拡散透過法にて測定を行った。(T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

アクションスペクトルを見ると、400~480 nm、500~650 nm のそれぞれの領域にピークが観測され、それぞれ Soret 帯、Q 帯に対応したピークであると考えられる。またピーク波長は 430 nm、545 nm、595 nm であり、既に報告されているシトクロム aa₃ 複合体の吸光スペクトル ($\text{a}^{3+}, \text{a}_3^{2+}$ -CO) に一致している[115][116]。また、Q 帯が鋭く観測されていることから、CO 吸着は還元型のシトクロムに対して起こっていることがわかる。

アクションスペクトルが aa₃ 複合体の吸光スペクトルと一致していることは、阻害効果が aa₃ 複合体に対して特異的に起こっていることを意味している。KCN の実験では阻害効果が他のシトクロムに影響している可能性を排除できなかったが、この実験結果より aa₃ 複合体のみの阻害効果を観測することに成功した。このことから、*A. ferrooxidans* の電極微

生物間電子伝達環境において、aa3 複合体による downhill electron transfer が駆動していることが確認された。

A. ferrooxidans の UV-vis スペクトル

A. ferrooxidans の細胞全体における UV-vis スペクトルは条件によって変化することが予想されるため、拡散透過法によって UV-vis スペクトルを測定した。得られた UV-vis スペクトルを図 3-19 に示す。

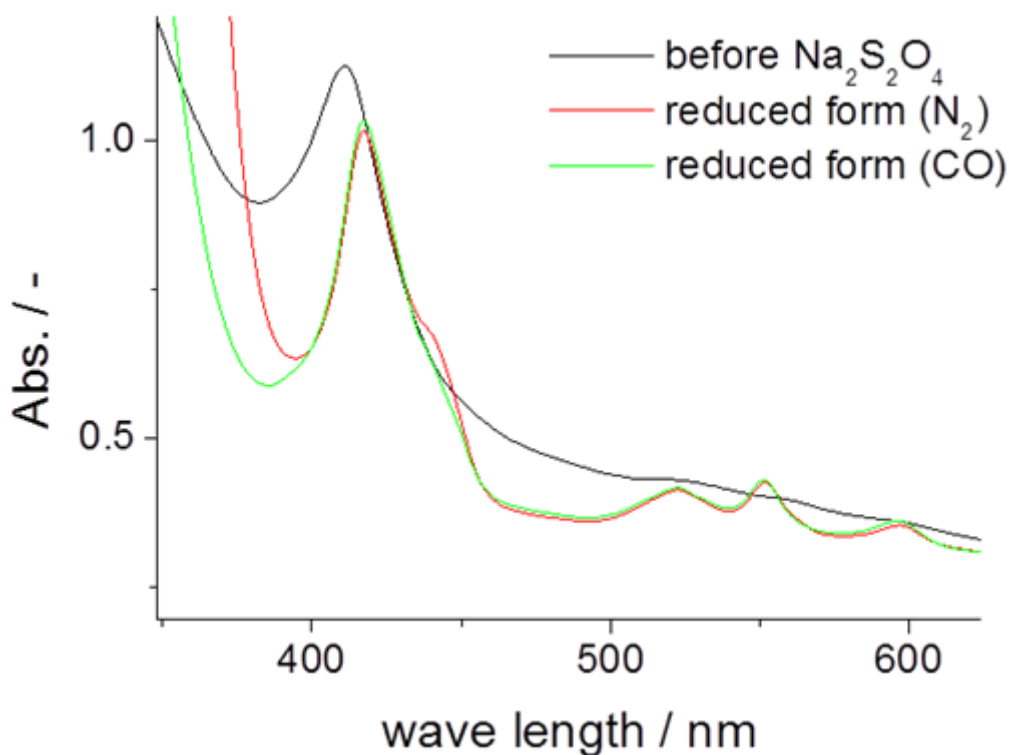


図 3-19 A. ferrooxidans の UV-vis スペクトル

鉄で前培養した菌体を DSMZ で十分に洗浄して鉄イオン、及び鉄酸化物を取り除き、DSMZ 中に分散させて測定した。

N₂ 雰囲気ではシトクロムに特有の Q 帯の吸収が小さく、シトクロムの大部分は酸化状態であったと考えられる。この系に対して還元剤である Na₂S₂O₄を加えると、A. ferrooxidans 中のシトクロムが還元され、520~650 nm の区間に 3 つのピークが現れた。このピークがシトクロムの Q 帯である。それぞれのピークは 600 nm : シトクロム a、525、及び 554 nm : シトクロム c、シトクロム b に対応する。Soret 帯に関しては還元によって長波長側にシフトする。また、Na₂S₂O₄の還元の効果によって、414 nm にピークが、還元後は 425 nm

にシフトした。また 445 nm 付近に小さなショルダーピークが生じた。系をさらに CO 雰囲気下にしてから再度 UV-vis スペクトルの測定を行うと、Q 帯にはほとんど変化が見られなかった一方で、Soret 帯では 425 nm に存在するピークが増加し、445 nm 付近のショルダーが減少した。これはミトコンドリアに対して CO 雰囲気で UV-vis スペクトルを測定した場合とはほぼ同じ傾向であり[117]、第 1 章で述べたとおり、ミトコンドリアの電子伝達系は鉄酸化化学独立細菌である *A. ferrooxidans* と類似性が高く、本測定得られた結果は、ミトコンドリアを CO 曝露した場合と同様の効果が現れていると予想することができる。このミトコンドリアに対する CO 曝露の影響は aa3 複合体に対する阻害を反映していると考えられており、本研究の成果を示唆するものである。

Antimycin A による阻害実験

aa3 複合体は downhill electron transfer を担うタンパク質であり、電子伝達によって膜内外にプロトンの電気化学ポテンシャル差を生み出す。CO による阻害実験の結果、電極から微生物への電子注入条件下において、aa3 複合体が駆動していることが明らかになった。ここで生み出されたプロトンの電気化学ポテンシャル差は、ATP の合成や NAD⁺の還元に利用されていることが推察できる。そこで、プロトンの電気化学ポテンシャル差を利用した uphill electron transfer の駆動を in-vivo 環境で観測するために、uphill electrontransfer に対する阻害実験を行った。阻害剤として、bc1 複合体への阻害剤である Antimycin A を用いた。図 3-20 に Antimycin A による代謝電流阻害実験の結果を示す。

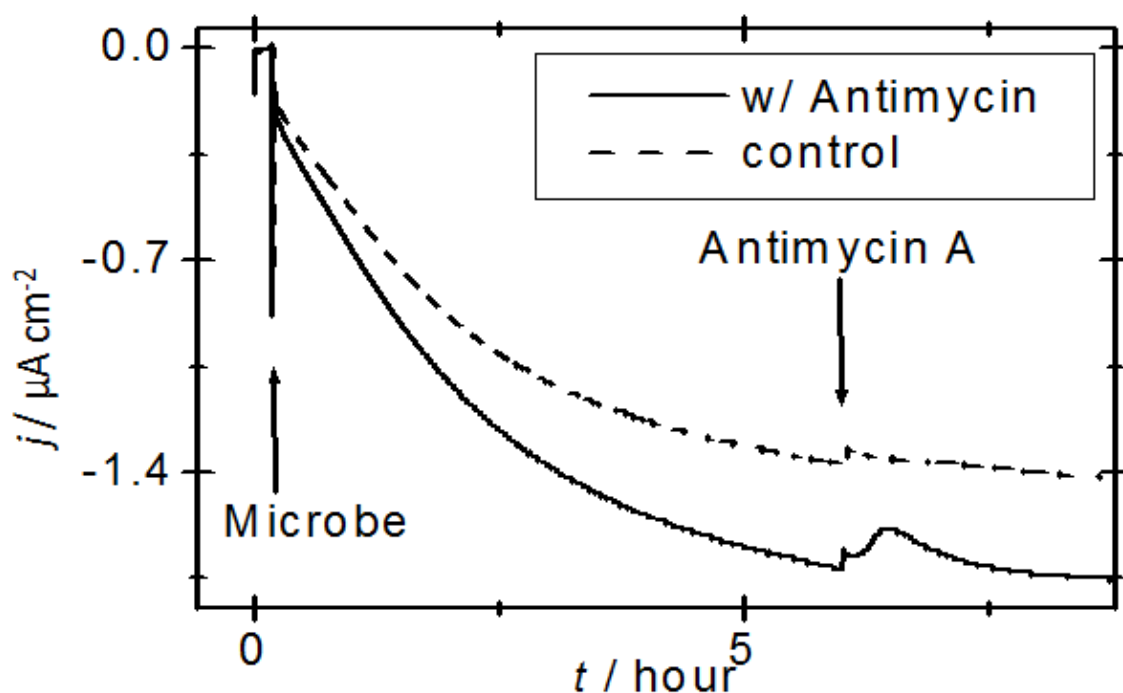


図 3-20 直接電子伝達条件において、代謝阻害剤 Antimycin A を添加して得られたグラフ (T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, 6,1(2015)より引用[102])

微生物の添加によって還元電流が上昇するのは先の直接電子伝達実験と同様である。その後 Antimycin A を添加した場合には、添加後に電流値の部分的な抑制が見られた。この結果は、微生物の代謝電流に対して bc1 複合体を電子が通過するパスが存在し、しかもそれが部分的であることを意味している。

有機物生産への電子利用の観測

Antimycin A による阻害実験によって、bc1 複合体による uphill electron transfer の駆動を示唆する結果を得た。*A. ferrooxidans* におけるプロトンの電気化学ポテンシャル差を利用した uphill electron transfer は、カルビン・ベンソン回路による CO₂ 還元過程と結びついている。*A. ferrooxidans* のような鉄酸化化学独立細菌は、CO₂ 還元によって有機物を獲得しており、生命活動において uphill electron transfer が極めて重要であるといえる。そこで、本実験系において、有機物生産を示すために、OD₅₀₀ の変化、及び系中の TOC 変化を追跡した。

まず、電極-微生物間電子伝達による代謝を駆動している条件で、リアクター内部の OD₅₀₀ の経時変化を下図に示した (図 3-21)

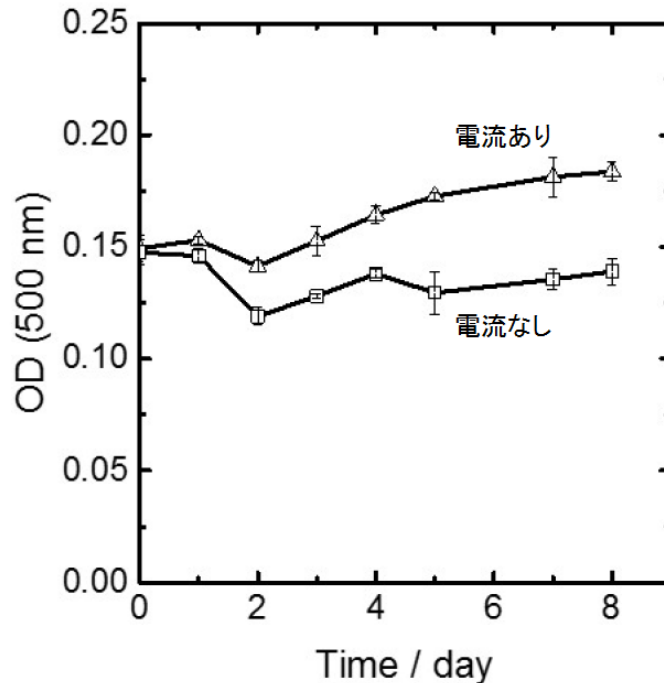


図 3-21 電気化学培養における *A. ferrooxidans* 懸濁液の OD₅₀₀ の時間変化 (T. Ishii, et al, *Frontiers in Microbiology*, **6**,1(2015)より引用[102])

実験の結果、電流なしの条件 (open circuit 条件) に比べて、電流あり (+0.4 V vs. SHE) の条件下では、時間経過とともに微生物量が増加していくことが観測された。系中のカーボンソースは空気中の CO₂ に限定されているため、時間経過とともに起こる微生物量の増加は CO₂ 固定の進行を意味している。また、電流なしの条件下では菌体量が増加しなかったことから、前培養時にすでに菌体内部に蓄えられていたエネルギーによる増殖でないことがわかる。すなわち、電流生成条件下における電流は、プロトンの電気化学ポテンシャル差を利用した uphill electron transfer を経て、CO₂ 還元を利用され、生命活動の維持が行われていることがわかる。

過去の報告で Z. M. Summers らが中性鉄酸化化学独立細菌を用いて直接電子伝達による細胞増殖を報告している [93]。細胞の増殖は SEM による観察で細胞分裂中の細胞を確認することで確認している。しかしながら、この方法では系として増殖が細胞の死滅を上回っているかが確認できていない、前培養で蓄えられたエネルギーが利用されている可能性がある、といった問題がある。図 3-21 の検討では培養液中の細胞数の増殖を確認しており、電流による電子が代謝に利用されることをより直接的に観察したものといえる。

ここで、観測された電流値から微生物代謝に利用された電子数を求め、増殖細胞数との比をとることで、細胞 1 個増加するのに必要な電子数の算出を行った。本実験系において、*A. ferrooxidans* の細胞 1 個増殖するのに使われた電子数は電流値を時間で積分した値から電子数を求め、増殖した細胞数で除することで得られる。計算を行うと、

$$\frac{1.54 \times 10^{-1} C \times 6.0221 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{0.325 \times 10^8 \text{ cells} \times 96483 C \text{ mol}^{-1}} = 3.0 \times 10^{10} \text{ cells}^{-1}$$

である。

一方、第 2 章で行った振盪培養の結果 (図 2-9) から、同様に細胞 1 個増殖するのに使われた電子数を求めると、消費された Fe^{2+} の量を増殖した細胞数で除することで、

$$\frac{7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \times 6.0221 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{5.17 \times 10^9 \text{ cells}} = 8.7 \times 10^{10} \text{ cells}^{-1}$$

と求まる。

これらを比較すると、電極から微生物に対して直接電子注入を行った系では、*A. ferrooxidans* の増殖に必要な電子数が $3.0 \times 10^{10} \text{ cells}^{-1} / 8.7 \times 10^{10} \text{ cells}^{-1} = 34\%$ となっている。本章で行った実験系においては、電極電位を +0.4 V に設定しており、これは振盪培養における鉄の酸化還元電位 (0.68 V) によりも負にある。そのため、uphill electron transfer の駆動がより優位に働き、菌体増殖が促進された可能性がある。

次に、同様の実験系において測定した TOC の変化を示す (図 3-22)。

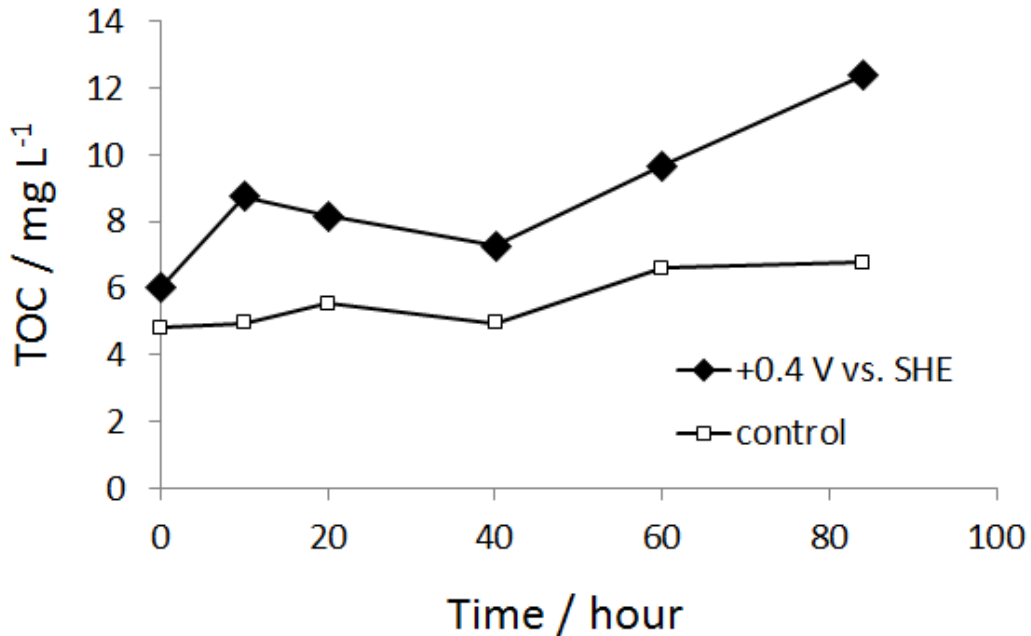


図 3-22 電気化学培養条件における TOC の変化

TOC においても OD_{500} の変化と同様、時間経過とともに増加を示した。系中の有機物量が増加していることから、鉄イオンが存在しない条件下における電気化学培養で、有機物固定が進行することがわかる。

カソード型細胞外電子伝達機構

本系では、鉄イオンが培地中に含まれていないことを考慮すると、電極から *A. ferrooxidans* に電子が受け渡されるカソード型細胞外電子伝達の機構として、以下に述べる3つの可能性が考えられる[81]。

1. 電極表面で水素が発生し、それを微生物が代謝する。
2. カソードから微生物に直接的に電子注入をする。
3. 電子メディエーターを介して、電極から微生物に電子が受け渡される。

これらについて考察する。

まず1. の可能性について、水素の酸化還元電位から考える。水素の酸化還元電位は培地条件である pH 1.8 の元では+0.11 V vs. SHE である。実験では電極電位を+0.4 V vs. SHE とした条件で定常的な代謝電流が観測されており、この電位では電極では水素は発生しえない。そのため、1. の仕組みによる電子伝達プロセスは不適當である。このように、水素発生が原理的にできない正の電位から電子注入が起こるのは過去に報告されているいくつかのカソード型電子伝達機構と大きく異なる点である[81][119][120]。

次に2. について考える。カソードから *A. ferrooxidans* に直接的に電子が注入される場合、細胞表面に酸化還元反応を仲介するタンパク質が発現している必要がある。*A. ferrooxidans* の場合、細胞表面に発現する電子伝達タンパク質は2種類の報告がある。1つは硫黄代謝に利用されるタンパク質(Tqr)であり、もう1つは鉄イオンを代謝する際に利用されるタンパク質(Cyc2)である。このうち前者は酸化還元電位が+0.1 V vs. SHE より負に存在し、後者は+0.7 V vs. SHE より正に存在する。リニアスイープボルタンメトリーの結果から、微生物に対する電子注入は+0.82 V vs. SHE より起こっているため、鉄イオン代謝に利用されるタンパク質である Cyc2 を介して電子伝達が行われている可能性が考えられる。

最後に3. について考える。3. の場合、さらに酸化還元物質がメディエーターとし溶液中を拡散することで電子伝達をする場合（メディエーター型長距離電子伝達）と、メディエーター分子が細胞表面に付着して補酵素として働き電子伝達をするメディエーター型短距離電子伝達の2つの可能性が考えられる。光学顕微鏡による観察実験の結果から、電流は電極表面に付着した微生物数に比例しており、溶液中の微生物は電流生成に寄与していないことが確認されている。このことから、メディエーターの拡散による長距離電子伝達の可能性は考えられない。短距離型電子伝達については、光学顕微鏡観察上は電極に接触している微生物が電子伝達を担うことになるので、実験結果に矛盾しない。補酵素として機能するメディエーター化合物はリニアスイープボルタンメトリーの立ち上がり電位である+0.82 V vs. SHE 付近に酸化還元電位を持つことが期待されるが、微生物の電子伝達を担うメディエーターとして報告されているものには、この付近に酸化還元電位を持つものではなく（表 3-1）、新規なメディエーター化合物が利用されている可能性が考えられる。

酸化還元電位 / V vs. SHE (pH1.8)	
p-BQ (parabenzquinone)	0.601
vitamine K ₃	0.317
AQDS (anthraquinone-2,6-disulphonate)	0.124
Riboflavin	0.100
FMN (flavin mononucleotide)	0.089
FAD (flavin adenine dinucleotide)	0.089

表 3-1 代表的なメディエーター化合物と酸化還元電位[118]

以上のことから、電極-微生物間の電子伝達は直接接触型か、メディエーター化合物が細胞表面に付着した電子伝達のいずれかであるといえる。

bc1 複合体の電子伝達

A. ferrooxidans が細胞表面で電子を受け取り代謝するプロセスは、これまでに大きく分けて 2 つのプロセスが報告されている [39][40][121][122]。これを模式的に表したものを図 3-23 に示す。

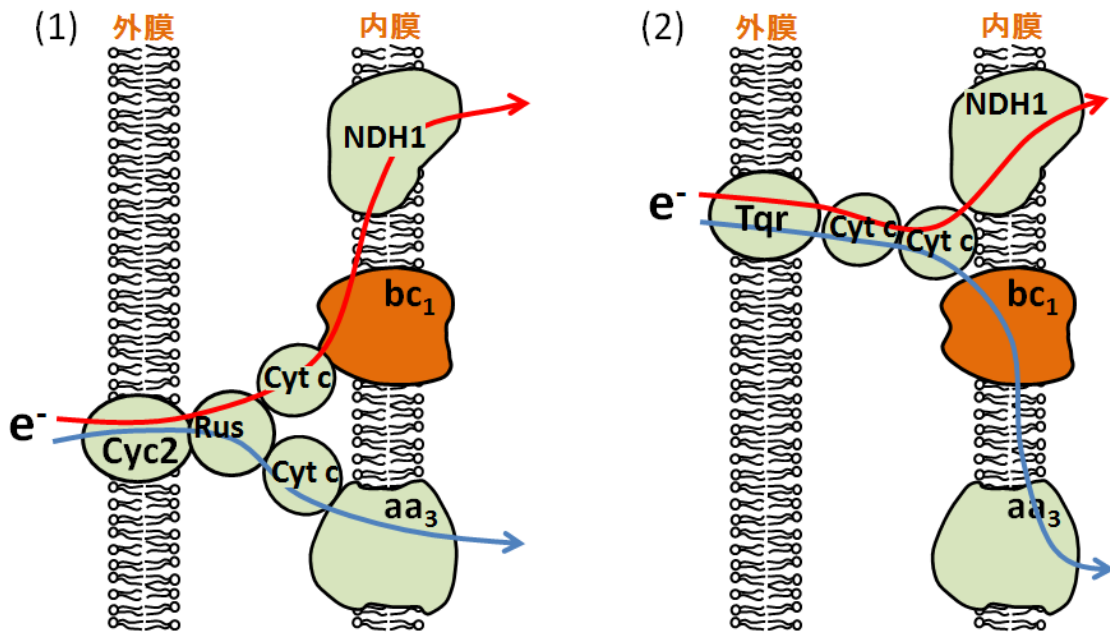


図 3-23 *A. ferrooxidans* の 2 種類の電子伝達プロセス

(1)のプロセスでは比較的エネルギーの低い（より酸化的な）電子を細胞が受け取り代謝に利用する。電子は分岐した電子伝達ネットワークを通して、aa3 複合体を通る downhill electron transfer と bc1 複合体、NDH1 を通る uphill electron transfer に分岐する。鉄イオンの代謝はこの経路による。

一方(2)のプロセスでは比較的エネルギーの高い（還元的な）電子を細胞が受け取り代謝に利用する。この経路でも電子は分岐した二つの電子伝達経路を通る。一方は bc1 複合体、aa3 複合体を通る downhill electron transfer、もう一方は NDH1 を通る uphill electron transfer である。このプロセスは硫黄系の化合物の代謝に利用される。

これら二つの電子伝達プロセスにおいて特に重要なのが bc1 複合体の機能である。(1)のプロセスでは bc1 複合体は電子のエネルギーを上昇させ還元力を高めている。この際必要になるエネルギーは膜内外のプロトンの電気化学ポテンシャル差を解放することで得られており、電子が bc1 複合体を通過する際に細胞外側から内側にプロトンが流れる。一方(2)のプロセスはそれと逆の反応である。電子はエネルギーを失い、その際に放出されるエネルギーを利用してプロトンの電気化学ポテンシャル差が生じる。電子が bc1 複合体を通過する際にプロトンは細胞内側から外側に流れる。

これらのプロセスはいずれも分岐型の電子伝達であるが、電子がエネルギーを獲得する uphill electron transfer は downhill electron transfer によって供給されるエネルギーがあって初めて駆動することができる。一方で downhill electron transfer によって膜に蓄えられたエネルギーは uphill electron transfer へと供給されるとは限らず、例えば ATP 合成などにエネルギーを供給することが考えられる。

(1)のようなプロセスの場合には bc1 複合体を失活させた場合にも downhill electron transfer によって電子伝達が持続することが考えられるため、電流値が部分的に抑制された実験結果と合致する。一方(2)のプロセスの場合には bc1 複合体を失活させたとき downhill electron transfer の抑制によってすべての代謝電流が停止することが予想される。このため、電流値の部分的な抑制が観測された実験結果に適さない。

Antimycin A によって抑制された電流は、全体の 1/15 程度に相当した。このため、(1)のプロセスのうち、1/15 程度の電子が uphill electron transfer による還元力の獲得過程に利用されていると考えられる。

bc1 複合体に関するエネルギー論

bc1 複合体は前述のとおり uphill electron transfer に利用されるケースと downhill electron transfer に利用されるケースが存在する。本実験で用いた培地条件では bc1 複合体が uphill electron transfer として利用されたが、これはミトコンドリアや大腸菌などで観測されている一般的な bc1 複合体の機能とは逆の反応である。この方向の反応はどのように駆動されているのであろうか。

これについて考察するための重要な知見が、A. Elbehti らによってなされている[123]。彼らは光学的手法と滴定反応を組み合わせることで、bc1 複合体の内部での酸化還元種それぞれの酸化還元電位について報告をした。報告された酸化還元種の電位を模式的に示したものを図 3-24 に示す。

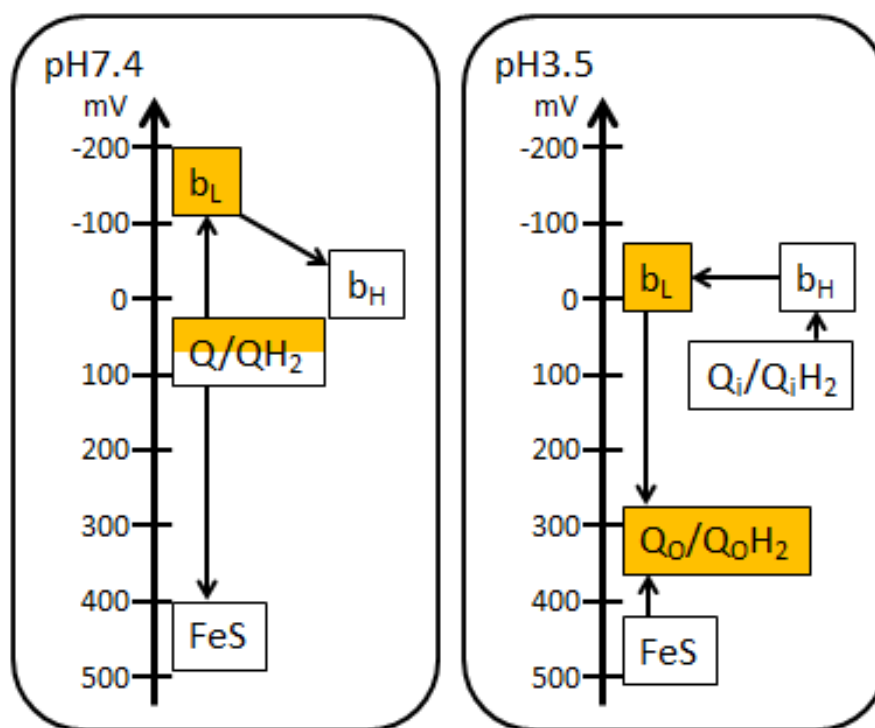


図 3-24 *A. ferrooxidans* の bc1 複合体内部の酸化還元種の電位
着色で示した酸化還元種の電位が pH に依存して大きく変化している。

pH を変化させることで、シトクロム b とユビキノンの酸化還元電位が変化することが見出された。先にも述べたとおり、bc1 複合体は膜貫通型のタンパク質であり、一面が細胞外方向を向いている。酸化還元電位が変化したシトクロム bL と Q_0/Q_0H_2 はいずれも細胞外側方向に面している酸化還元種であり、外部環境 pH の影響を受ける部位である。

図中の b_L、Q/QH₂、FeS の電位をまとめた表 3-2 を次に示す。

酸化還元電位 vs. SHE	pH7.4	pH3.5
FeS	430 mV	470 mV
Q/QH ₂	80 mV	330 mV
b _L	-150 mV	-10 mV

表 3-2 bc1 複合体内部での酸化還元種の酸化還元電位[121]

bc1 複合体の反応では FeS と b_L に回収された電子がユビキノンの還元を利用される反応が含まれる。pH 3.5 の環境では b_L とユビキノンの酸化還元電位の差が FeS とユビキノンの酸化還元電位の差を上回っている。そのため、トータルでの反応のギブスエネルギー変化が負となり反応がユビキノンの還元が進行する。一方 pH 7.4 の環境では b_L とユビキノンの酸化還元電位の差を FeS とユビキノンの酸化還元電位の差を上回る。そのため、ユビキノンの還元反応は自発的に進行しなくなり、逆にユビキノンが酸化し b_L と FeS に電子が受け渡される反応が起こる。

pH 7.4、pH 3.5 のそれぞれの場合について、キノンがキノールへと還元される際のギブスエネルギー変化 ΔG^0 を計算すると、

$$\text{pH 7.4: } \Delta G^0 = (430 - 80) + ((-150) - 80) = 120 \text{ meV}$$

$$\text{pH 3.5: } \Delta G^0 = (470 - 330) + ((-10) - 330) = -200 \text{ meV}$$

となる。

これは酸性条件下において bc1 複合体が uphill electron transfer 方向に駆動することを示唆している。

3-4 総括

本章では鉄酸化化学独立細菌 *A. ferrooxidans* が細胞表面に発現させたシトクロムを介して Fe^{2+} を酸化することに着目し、このシトクロムが Fe^{2+} のみではなく固体電極からも直接電子を受けとることができるのではないかと仮定をたて、それを立証する実験を行った。

微生物を直接電極に接触させる実験によって、還元電流が流れることを観測し、それが代謝に由来するものであることを明らかにした。また微生物が電極から電子を受け取る反応において +0.82 V vs. SHE から還元電流が立ち上がることも明らかにした。この電流値の立ち上がり電位は $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ の酸化還元電位より正に位置しており、 Fe^{2+} の代謝経路と同様のプロセスが直接電子伝達過程においても利用されていることが示唆された。このとき微生物の増殖、TOC の増加を観測しており、流れた電流が有機物合成に利用されていることを突き止めた。

また、微生物電極間の反応が、直接電子伝達型か細胞表面に付着したメディエーターによる補酵素的反応のいずれかであることを突き止めた。いずれの場合も微生物は電極表面に接触し、電子伝達を行う。

さらに、直接電子伝達過程における電子伝達経路を特定するために、阻害剤を用いた実験を行った。阻害実験として、KCN、CO、Antimycin A を用いて直接電子伝達条件での電

流の応答を観測した。KCN、CO を用いた阻害実験によって downhill electron transfer の駆動を確認し、CO 阻害効果は光照射によってコントロール可能であることを示した。また、Antimycin A を用いた阻害実験によって uphill electron transfer の駆動を確認した。

これらの実験から、微生物を電極と直接接触させることで、電子伝達を行わせることが可能であるということを示した。この結果は微生物の代謝プロセスを電気化学的に直接追跡できることを示しており、代謝過程を物理化学的に理解する上で非常に有用な知見になるといえる。

第4章. 中性化学独立細菌への発展

4-1 緒言

第2章、第3章では、鉄酸化化学独立細菌として古くから知られてきた *A. ferrooxidans* を用いて電気化学培養の可能性を調べ、固体との電子伝達プロセスについて考察した。*A. ferrooxidans* は好酸性菌という特徴があり、pH 2 の生育する極限環境微生物である。一方で、鉄酸化化学独立細菌が生態系において重要な役割を果たしていると考えられる例として、深海深くにおける有機物生産がある。このような環境では、中性鉄酸化化学独立細菌が生態系の一次生産者となっている[34][124]。中性鉄酸化化学独立細菌は工業的にはコンタミネーションの防止など酸性菌にあったメリットのいくつかを失うものの、酸性菌より小さなエネルギーを利用して有機物生産を行うことができるなどの特徴もある。また、中性鉄酸化化学独立細菌の代謝の理解は、深海環境における生態系の理解に対しても重要な知見を与える。また、中性鉄酸化化学独立細菌の代謝活動は、人工物の微生物腐食において大きな影響を与えることが示唆されており[125]、中性鉄酸化化学独立細菌の代謝メカニズムの検討が待たれている。

本章では実際に深海環境で発見された中性鉄酸化化学独立細菌 *M. ferrooxydans* を用いて、電気化学的に培養、及び有機物合成を試みた。第3章で利用したのと同様のリアクターを用いて電気化学系を組み、代謝電流を流し、有機物合成が行われることを確認した。

深海環境における生態系

第1章でも述べたように、自然界における CO₂ 還元には、光合成生物によるものと化学合成生物によるものの2種類が考えられる。光合成は光をエネルギー源として CO₂ 固定を行う。一方化学合成生物は化学物質のエネルギーを利用して CO₂ 還元を行う。化学合成生物の機能が特に重要になるのは水深 200 m 以上の深海環境である。海洋において、水深が 100 m 深くなると、到達する光は 1 %程度に減少する。水中の海藻や植物性プランクトンが光合成を行うことができるのは、水深 200 m 程度までである。それ以上に深い海は光の届かない暗黒環境であり、光合成による有機物合成は行われない。そのため、古くはこのような暗黒環境では生命はほとんど存在せず、海洋表面付近の魚やプランクトンなどが沈降した結果到達する有機物を利用してわずかな生命活動が営まれているに過ぎないと考えられてきた。

しかし、19世紀後半に潜水艦の技術が向上し、水深数 1000 m というような未知の領域における生物のありようが明らかになってきた[126]。潜水艦の調査によって、光が届かない暗黒環境である深海においても、カニやエビのような高等生物を含む生態系が成立していることがわかった[127][128]。このような環境で、CO₂ 還元を担っているのが化学合成生物である。

このような生態系は、化学合成生物が地球内部から湧き出る還元物質のエネルギーを利用して CO_2 還元を行うことで維持されている (図 4-1 (A))。海底の熱水噴出孔では、熱水に溶けた還元性物質が、高温で噴き出している。このような環境で生態系の維持に利用されるのは H_2S 、 H_2 、 Fe^{2+} などの無機物質である[26][27]。一次生産者である化学独立生物は還元力を持つ無機物をエネルギー源、及び電子源とし、炭素源として CO_2 のみを利用して増殖し、生態系を担っている。中でも Fe^{2+} を酸化して有機物を生産するプロセスは深海における有機物生産の 50 % 程度を担っていることが示唆されており、非常に重要なプロセスであるといえる[34][129]。深海熱水噴出孔付近には、赤茶色をした鉄マットが海底の広範囲にわたって堆積していることが確認されている。ここでは、地球内部から湧き出た Fe^{2+} が酸化され酸化鉄が生成している。深海において、実際に Fe^{2+} をエネルギー源として利用している生物の一つに鉄酸化化学独立細菌の一種である *M. ferrooxydans* が存在する。本章ではこの菌体をモデル微生物として利用し、電気化学的に CO_2 還元反応を駆動する実験を行った。

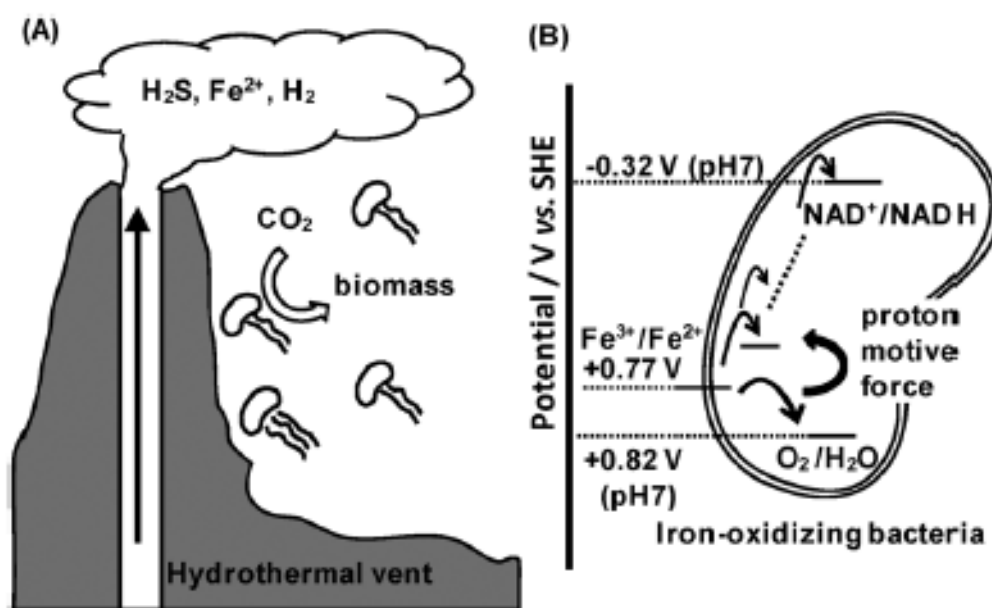


図 4-1 (A)海底から噴き出す還元性物質を利用して微生物が CO_2 固定を行っている状態の模式図 (B)中性鉄酸化化学独立細菌の電子伝達におけるエネルギーダイアグラム (T. Mogi et al, *ChemComm*, **49**, 3967 (2013) より引用[130])

Mariprofundus ferrooxydans PV-1

M. ferrooxydans はハワイの Loihi 火山にある熱水噴出孔近くの鉄マットから単離された中性鉄酸化化学独立細菌である [131]。すなわち、*M. ferrooxydans* は Fe^{2+} を電子源として利用し、 CO_2 を炭素源として増殖することができる。

M. ferrooxydans が Fe^{2+} を代謝する際の電子伝達経路は、ゲノム解析からすでに予想されている [132]。報告された内容では細胞外によって Fe^{2+} が酸化され、細胞に取り込まれた電子は分岐した電子伝達ネットワークを介して酸素還元と NAD^+ の還元を利用される (図 4-1 (B))。これは、酸性鉄酸化化学独立細菌のケースと同様である。*M. ferrooxydans* の aa3 複合体と同様の機能をする酸素還元サイトが cbb3 複合体、シトクロム d の 2 種類が存在することが予想されている。

中性鉄酸化細菌は酸化した鉄イオンを元に様々な構造体を生成することが知られている [133][134][135][136]。中でも、*M. ferrooxydans* は細胞外にバイオポリマーを生成するという特徴を持つ。代謝生成物として細胞外にねじれたストークス状のポリマーを生成することが知られている。これは多糖からなるものと考えられており、*M. ferrooxydans* は 2.2 $\mu\text{m}/\text{h}$ という速度でポリマーを合成する [136][137]。

このポリマーは細胞が分裂するたびにおよそ 26 μm も伸長していることから、微生物によって固定される有機物は細胞分裂に優先してストークスポリマーの合成に利用されている。ポリマーは酸性多糖からなることが予想されており、大量の酸化鉄が吸着している。鉄イオンの酸化によって生成する Fe^{3+} は中性環境では溶液中に存在することが難しく、固体として析出する。そのため、*M. ferrooxydans* は細胞外に生成したストークスポリマーに酸化鉄を析出させることで、細胞外部が酸化鉄に取り囲まれてしまうことを防いでいると考えられている。

海底熱水噴出孔付近で採取された鉄マットの SEM 画像では、*M. ferrooxydans* によって合成されるストークス状の構造物が大量に含まれており、鉄マットの生成において *M. ferrooxydans* が重要な役割を担っていることが示唆されている。

また、*M. ferrooxydans* は化学独立細菌の中でも特に培養が難しい。そのため、グラディエントチューブ培養という特殊な方法で培養されることが多い。この培養では、3 %程度の柔らかい寒天培地で *M. ferrooxydans* を培養する。培養部の下部に FeS を上層に空気を注入したものを用いる。この培地内では上部より酸素が徐々に浸透し、下部からは Fe^{2+} が徐々に浸透する。これによって寒天培地内に酸素と Fe^{2+} の濃度勾配 (グラディエント) が生じる。このようにして生じた勾配のうち、微生物の生存に適した部分でのみ、微生物が増殖し、酸化鉄が生じる。この方法では気層中の O_2 濃度や液相の Fe^{2+} の濃度を厳密にコントロールしなくても生じた勾配によって微生物増殖に適した環境が自動的に生成するという特徴がある。

本章の内容

本章は中性鉄酸化化学独立細菌 *M. ferrooxydans* を用い、酸性菌で得られた知見と比較検証することを目的とした。酸性菌で得られた固体-微生物間の電子伝達が中性菌でも利用可能であれば、電気化学的有機物合成に利用可能な微生物の幅が広がるとともに、地球環境中での生態系の理解にもつながる。

固体-微生物間の電子伝達を観測するために、第 3 章で利用したものと同様の電気化学リアクターを用い、代謝電流を観測した。その環境下で電極表面に代謝産物として多糖ポリマーが生成することを確認した。更に、中性菌を有機物合成に利用することの利点についても議論した。以下に詳細を報告する。

4-2 実験

培地

実験に用いた培地は Artificial Sea Water 培地（以下 ASW）である。

Nitritotriacetic acid	1.5 g	Biotin	2 mg	NaCl	27.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 g	Folic acid	2 mg	MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.38 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.5 g	Pyridoxine hydrochloride	10 mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O	6.78 g
NaCl	1 g	Thiamine	5 mg	KCl	0.72 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g	Riboflavin	5 mg	NaHCO ₃	0.2 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.1 g	Nicotinic acid	5 mg	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.4 g
CaCl ₂	0.1 g	Calcium D-(+)-pantothenate	5 mg	NH ₄ Cl	1 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g	Vitamin B12	0.1 mg	K ₂ HPO ₄	0.05 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g	p-Aminobenzoic acid	5 mg	dH ₂ O	1 L
AlK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	0.01 g	Thioctic acid	5 mg		
H ₃ BO ₃	0.01 g	dH ₂ O	1 L		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.01 g				
Na ₂ SeO ₃ (anhydrous)	0.001 g				
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.01 g				
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 g				
dH ₂ O	1 L				

表 4-1 培地の組成。左から Mineral Solution、Bitamin Solution、ASW。

まず表 4-1 に示した組成で Mineral Solution、Bitamin Solution、ASW を調製した。ASW はオートクレーブによって 121 °C で 20 分間加圧滅菌した。Mineral Solution、及び Bitamin Solution は滅菌フィルターを通して滅菌環境とした。ASW に対して Mineral Solution と Bitamin Solution を 1 mL ずつ加え、さらにカーボン源として 0.5M の NaHCO₃ 溶液を作成し、

滅菌フィルターを通したのちに 10 mL 加えた。また Fe 源として FeCl 溶液を実験直前に終濃度が 60 mM になるように加えた。Fe²⁺は中性溶液中では空気中の酸素と反応し短期間で Fe³⁺に酸化され、酸化鉄として沈降してしまう。それを防ぐため、FeCl 溶液は N₂ で十分通気し、酸素による酸化が起こらないようにした。また、FeCl 溶液は冷蔵環境で保存し、1 か月以内に作成したものを用いた。

前培養

ASW を培養液として利用し、*M. ferrooxydans* の前培養を行った。培養には 20 mL 試験管を用いた。これに ASW を 10 mL 加えた。ブチルゴム栓で密栓したうえで滅菌フィルターを介して N₂:CO₂=8:2 のガスを通気した。その後気相中の酸素濃度が 1 % となるように空気を注入した。Fe²⁺濃度は 60 mM とし、Fe²⁺は培養直前に加えた。植え継ぎは液体培地 10 mL あたり 0.2 mL の菌体培養液を加えて行った。培養は 25°C の恒温槽中に静置して行った。

グラディエントチューブ培養

グラディエントチューブ培養は、培地中に酸素と鉄イオンの濃度勾配が存在する条件を整え、微生物を培養する[136][138]。この方法では菌体の生存を目視によって確認できる方法である。*M. ferrooxydans* の場合、液体培養では菌体の増殖の有無によって外観が変化しないため、明瞭に菌体の生存を確認するにはグラディエントチューブ培養が適切である。

グラディエントチューブでは下層に鉄源として硫化鉄 (FeS) を含む寒天 (1.3 %) で固めた相を作り、中間層には濃度勾配を付けるために寒天 (0.15 %) で柔らかく固めた 6 cm ほどの層をつくる。上相は気相とし、O₂ 濃度 20 % とした。

植え継ぎは、培養液を注射器で 200 μL 分取し、中間層に縦方向に移動しながら少しずつ注入していく。この際、寒天が崩れないように注意する。

中間層は、下層から浸透してくる Fe²⁺ と気相から浸透してくる O₂ が濃度勾配をつくっており、およそ 3~5 日程度で、最適な濃度環境の高さで菌体が増殖し、生成した酸化鉄が赤いバンド状に観測される。

本研究では基本的に微生物培養では液体培地を利用したが、微生物が系中で適切に増殖していることを確認するため、定期的にグラディエントチューブによる培養を行い、微生物の生存を確かめた。

電気化学培養

電気化学培養は第 3 章で用いたものと同様の電気化学リアクターによって行った。培養液は ASW 培地 4 mL を使用した。CO₂(20 %)、N₂(80 %)のガスを用いて十分な通気をしたのちに、気相中の酸素濃度が 3 %になるように酸素を注入した。前培養した菌体を洗浄したのちに 0.1 mL 加え、電気化学培養を行った。

また、代謝電流を観測しながら適宜リニアスイープボルタンメトリーの観測を行った。スキャン範囲は+0.7~-0.3 V vs. SHE とした。

染色による多糖の顕微鏡観察

M. ferrooxydans は合成した有機物を、酸性多糖のポリマーとして体外に放出することが報告されている [132][136]。このポリマーはレクチンという糖鎖に結合するタンパク質を利用することで検出することができる。

電気化学培養後に得られた電極を取り外し、ASW 培地を用いて軽く洗浄した。次に、レクチン-ローダミン指示薬 (100 µg mL⁻¹) の溶液を電極上に滴下した。溶液は作用極部位を覆うように滴下した (約 1 mL)。レクチン-ローダミン指示薬は、多糖に結合するレクチン部位と蛍光物質ローダミンが結合した試薬であり、多糖部位の蛍光観察を可能とする。試薬を滴下してから、30 分静置したのちに、電極上の上澄みを取り除き、ASW 培地で再度洗浄した。その後、イマージョンオイルを一滴垂らしたのちにカバーガラスをかぶせ、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) にて観察を行った。

4-3 結果と考察

代謝電流の観測

電気化学リアクターにて *M. ferrooxydans* の電気化学培養を行って得られた電流-時間曲線を図 4-2 に示す。

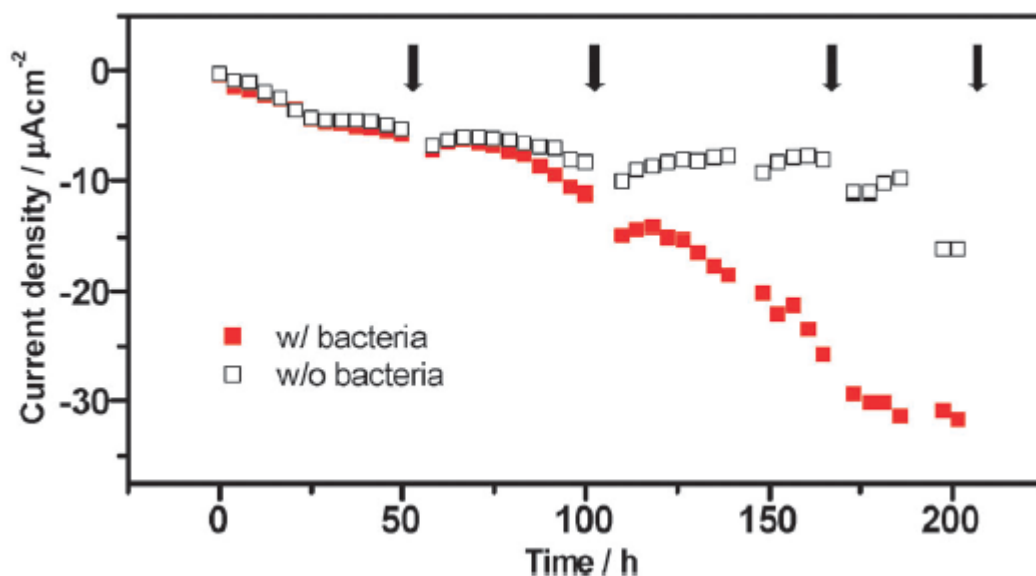


図 4-2 *M. ferrooxydans* による電流-時間変化のグラフ (+0.1 V vs SHE)
 (T. Mogi et al, *ChemComm*, **49**, 3967 (2013)より引用[130])

電流は約 200 時間にわたって計測した。微生物が存在しない条件では小さな電流が生じた。これは非微生物的に酸素と Fe^{2+} が反応し、生成した Fe^{3+} 水酸化物が電極上で還元されることによって生成する電流である。一方、微生物が存在する条件では徐々に電流値が上昇し最終的に $-30 \mu\text{A cm}^{-2}$ 程度の電流が生成した。216 時間の培養で最終的に FTO 電極を介して流れた電荷は 119 C に達した。これを電子数に換算すると、初期に培地中に加えた Fe^{2+} の 4 倍以上の量である。微生物電流は気相中の酸素濃度を 3 % から 20 % に変化させることで大きく抑制された。この結果はグラディエントチューブ内で微生物を培養した際に適切な酸素濃度環境でのみ *M. ferrooxydans* が増殖するという結果を反映しており、過度の酸素供給がある環境下では *M. ferrooxydans* は適切な代謝を行うことができない。これらの結果は電気化学培養によって鉄イオンを介して電極から微生物に連続的に電子が供給されていることを意味している。

M. ferrooxydans は独特のストークス状のポリマーを生成することで知られる。このストークスが電気化学培養条件で順次生成していることを示すために電気化学培養 5 日目と 24 日目の電極を取り出しそれぞれレクチン-ローダミン指示薬によって染色して蛍光顕微鏡によって観察した。レクチンローダミン指示薬にはいくつか種類が存在するが、過去の検討から、*M. ferrooxydans* の合成する多糖の検出に適切とされる UEA 型のレクチンを用いた。その結果を下に示す (図 4-3、図 4-4)

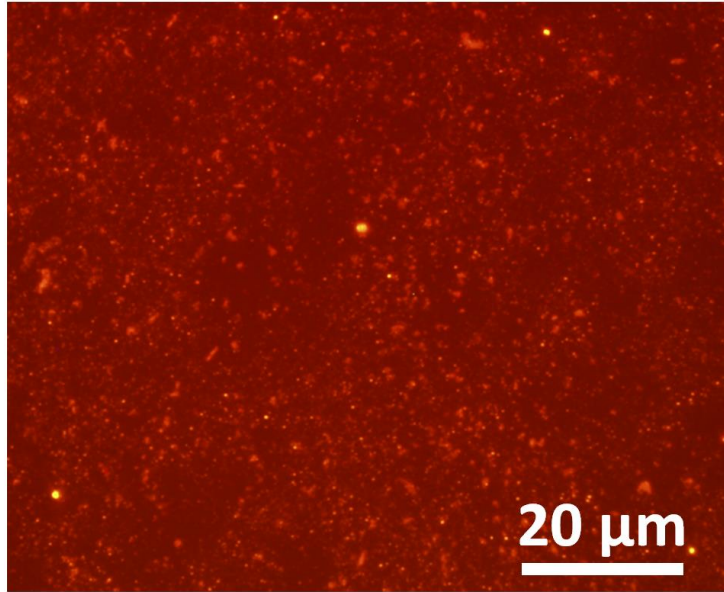


図 4-3 培養 5 日目の電極上の多糖の染色画像

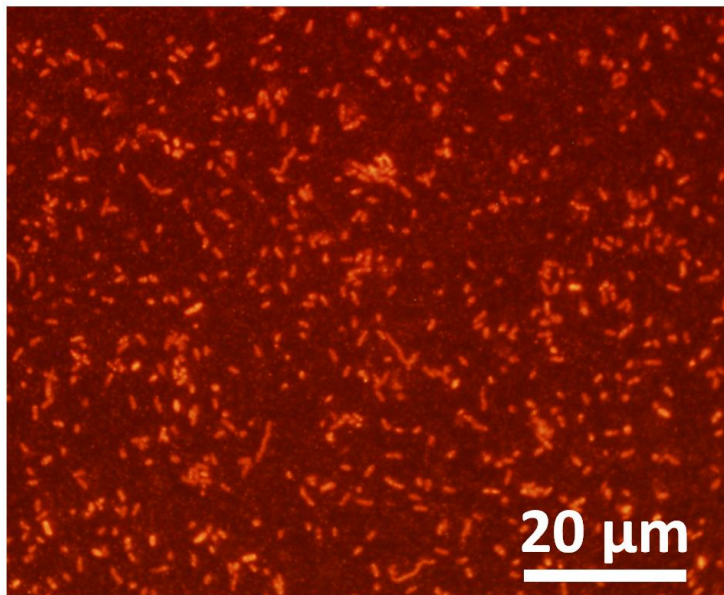


図 4-4 培養 24 日目の電極上の多糖の染色画像

培養 24 日目では電極上の多糖量が 5 日目に比べて増殖しており、電気化学培養によって CO_2 が多糖ポリマーに変化していることが示された。本実験で用いたレクチン (UEA) は、 α -L-fucose、 β -D-galactose、 β -D-N-acetyl glucosamin の多糖鎖を染色する。本実験結果より電気化学培養でこの構造を含む多糖ポリマーが *M. ferrooxydans* によって合成されていることが示された。

電気化学培養条件で微生物によって代謝される電子の電位関係を調べるために、微生物による代謝電流が観測されている条件で、リニアスイープボルタンメトリーの測定を行った。リニアスイープボルタンメトリーの測定は電気化学培養を行いながら期間をあけて数回測定をした。その結果を図 4-5 に示す。

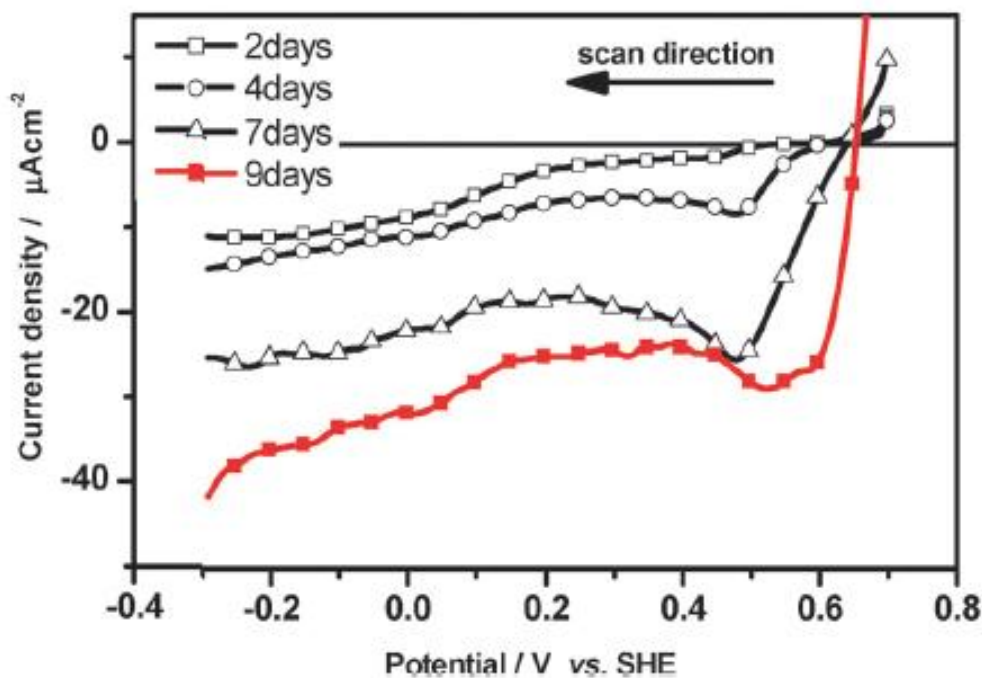


図 4-5 電気化学培養条件で測定したリニアスイープボルタンメトリー
(T. Mogi et al, *ChemComm*, **49**, 3967 (2013)より引用[130])

リニアスイープボルタンメトリーは図 4 の矢印部分のタイミングで測定した。電流密度が小さいとき (48 時間) には還元電流は+0.52 V vs. SHE から立ち上がった。還元電流が上昇するのに合わせて立ち上がり電位は正にシフトし (96 時間、168 時間)、培養 216 時間後には最終的に+0.63 V vs. SHE から還元電流が立ち上がった。この電位は pH 7 における鉄水酸化物の酸化還元電位に近い。このことは細胞と電極の間で Fe^{3+} と Fe^{2+} が循環していることを意味している。RubisCO の駆動による CO_2 還元反応を細胞内で進行させるためには、*M. ferrooxydans* は細胞内で NAD^+ を NADH に還元するのに十分な還元力を獲得しなければならない。 NAD^+/NADH の酸化還元電位は-0.32 V であり、電子注入が+0.63 V vs. SHE から立ち上がることを合わせて考えると、*M. ferrooxydans* は細胞内で約 0.95V 分だけ電子のエネルギーを昇圧しているといえる。

リニアスイープボルタンメトリーの結果より、 O_2/H_2O の酸化還元電位と Fe^{3+}/Fe^{2+} の酸化還元電位の差は 0.19 V である。この電圧は H_2O を電子源として CO_2 を $CO_2^{\cdot-}$ まで還元するのに必要な電圧より一桁小さな電圧である。

M. ferrooxydans の電気化学培養に関しては、Z. M. Summers らがカーボン電極を用いた培養を行い、電氣的に CO_2 還元を駆動することに成功している [93]。彼らの検討では、電極電位を -0.076 V vs. SHE としているが、本実験によって、*M. ferrooxidans* がこれよりさらに 0.71 V 正の電位にあたる +0.63 V vs. SHE で電極から電子を引き抜き、利用可能であることが示された。

A. ferrooxidans との比較

A. ferrooxidans では、微生物への電子注入の電位は +0.82 V vs. SHE であった。溶液の pH が 1.8 であることから、酸素の酸化還元電位は +1.1 V vs. SHE である。そのため、微生物が downhill electron transfer にて獲得できるエネルギーはこの差によって計算され、1 電子あたり、 $(1.1 - 0.82) \text{ eV} = 0.3 \text{ eV}$ となる。

一方で *M. ferrooxydans* の場合には電子注入の電位が +0.63 V vs. SHE にあった。溶液の pH は中性環境 (pH 7) であり、酸素の酸化還元電位は +0.82 V vs. SHE となる。ここから downhill electron transfer によって獲得できる電子のエネルギーを計算すると 0.2 eV となり、*A. ferrooxidans* の場合よりさらに小さなエネルギーを利用して、代謝活動を行っていることがわかる。

このような差が生まれる要因は、水の酸化還元反応は pH によってネルンスト式に依存して変化する一方で、鉄イオンの酸化還元反応がネルンスト式依存ではないことに由来する。 $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ の純粋な反応の場合は、反応は pH に依存しない。実際には、配位環境の変化や Fe^{3+} がイオンではなく固体析出することなどの効果が総合的に関与して酸化還元電位を決定するため、pH 7 と pH 1.8 で電子注入の電位は変化するものの、その幅はネルンスト式に依存した場合より小さい。そのため、pH 1.8 から pH 7 に変化させたとき、電子注入の電位の変化を酸素の酸化還元電位の変化が上回り、downhill electron transfer に利用できる電子のエネルギー幅が変化した。

また、第 1 章で述べたとおり、微生物の膜ではおよそ 200 mV のプロトンの電気化学ポテンシャル差が存在する。鉄酸化菌におけるプロトンの電気化学ポテンシャル差は、downhill electron transfer による酸素還元によって形成されるが、*M. ferrooxydans* が downhill electron transfer で獲得可能な電子のエネルギーが 0.2 eV (=200 meV) であることから、*M. ferrooxydans* のプロトン汲み出しの反応は非常に高効率で行われていることがわかる。

電気化学的 CO₂ 還元システムへの応用

ここで見られた電気化学培養は、電気化学的 CO₂ 還元システムへの応用が期待できる。

一般に無機触媒をカソード触媒として利用し、CO₂ 還元を行う場合には、2 V 以上の高電圧が必要となる。本実験で得られた結果より、*M. ferrooxydans* は 0.2V の電圧に相当するエネルギーを供給すれば有機物合成を行うことができるため、既存の技術の 1/10 程度の電圧で CO₂ 還元が可能となる。

M. ferrooxidans を用いた電気化学的 CO₂ 還元システムの模式図を図 4-6 に示した。外部電源として、0.19 V に過電圧分を加算した電圧をかけることで、水を電子源とした有機物生産を行うことができる。

IrO₂ 電極を電極触媒として利用して H₂O の酸化反応を行う場合、過電圧が 0.1 V 以下であることを考慮すると、図のような系で H₂O を電子源としてバイオマス生産をする際必要となる電圧は 1.24V (通常の水電解反応の理論電圧) より大幅に小さくなる。

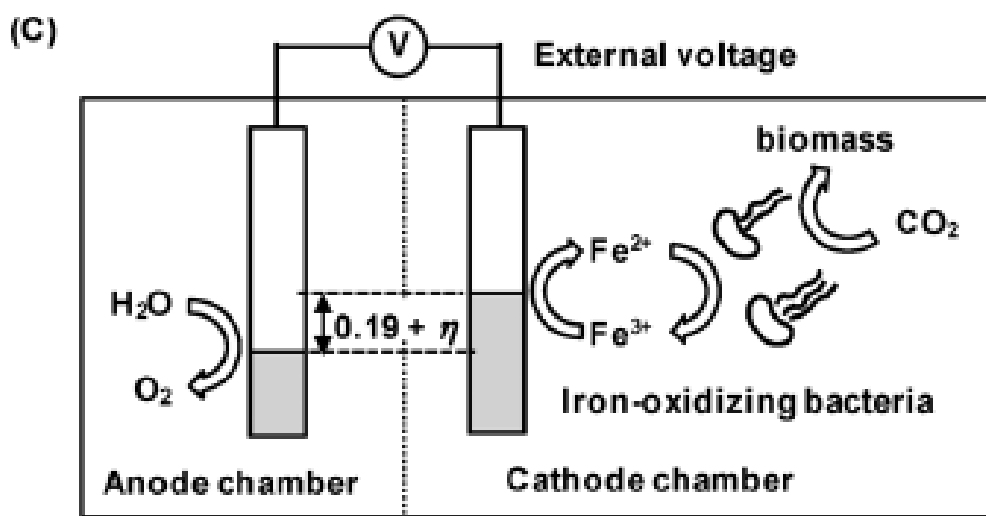


図 4-6 鉄酸化化学独立細菌を用いたバイオマス生産系 (T. Mogi et al, ChemComm, **49**, 3967 (2013)より引用[130])

本実験系で示したような、中性鉄酸化化学独立細菌を用いた系では、既存の技術では CO₂ 還元を利用できなかった低電圧を CO₂ 還元のために利用することができる。微生物によるエネルギー昇圧システムが非常に低い電圧を利用可能であるという事実は、低電圧エネルギー源を用いた化学燃料などの合成に道を開くものである。

4-4 総括

本章では中性鉄酸化化学独立細菌 *M. ferrooxydans* を用いて、電気化学的な系によってその代謝プロセスを駆動・観測することを行った。*M. ferrooxydans* は海底において生態系の一次生産を担っていると考えられる細菌である。上記実験の結果、*M. ferrooxydans* によって電気化学的な系による代謝由来の還元電流が生成することを示した。この還元電流を駆動した条件で多糖のポリマーが合成されることを明らかにした。更に立ち上がり電位を検討した結果、+0.63 V vs. SHE から電子注入が起こることを確認した。以上のことから、*M. ferrooxydans* はこの電位の電子を利用して有機物生産が可能であると考えられる。

M. ferrooxydans が利用している電気化学エネルギーはこの立ち上がり電位と酸素還元電位の差である。このエネルギーは、酸性鉄酸化化学独立細菌である *A. ferrooxidans* の利用している電気化学エネルギーの7割程度であり、*M. ferrooxydans* はさらに小さなエネルギーを利用して有機物合成を行っていることが明らかになった。

第5章. 総括

各章のまとめ

本研究では、鉄酸化化学独立細菌に着目し、電気化学的な有機物生産プロセスへとつなげ、その代謝過程を物理化学的に追跡することを行った。鉄酸化化学独立細菌は、 Fe^{2+} を酸化してエネルギーを取り出し、有機物生産を行う生物である。自然界では酸性湖や深海熱水噴出孔近くなどに生息している。このような有機物生産プロセスは、光合成と並んで自然界における CO_2 固定を担う重要な働きを持つものであるが、鉄酸化化学独立細菌を有機物生産に利用しようという観点はこれまでになかった。そこで、鉄酸化化学独立細菌を触媒的に利用することで有機物生産を行った。さらに、その鉄酸化化学独立細菌による有機物生産プロセスに対して、代謝系を電気化学的に理解した。

第 2 章では、鉄酸化化学独立細菌を利用した電気化学的な有機物生産を行った。電気化学系には $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ を含ませ、電極電位を固定することで、微生物によって酸化されて生成した Fe^{3+} が電極上で還元されるようにした。このような電気化学的コントロールによって、微生物に対して連続的にエネルギーとなる電子を供給できる。実験によって、長期間にわたり連続的に微生物による有機物生産が行われることを明らかにした。この際生成される TOC が振盪培養系に比べて 4 倍以上になることを見出した。微生物によって固定された有機物は微生物の細胞を構成する要素として利用される以外に、細胞外に放出される場合がある。本系において TOC と DOC をそれぞれ測定することで、微生物が固定した有機物の 60 % 程度を細胞外に放出していることがわかった。

また、固定した有機物の一部はピルビン酸として体外に放出されていることを見出した。ピルビン酸は酸性培地中ではアンカップラーとして機能し、プロトンの電気化学ポテンシャル差を低減させ、微生物の代謝活性を低下させる。電気化学培養と振盪培養の両方で、ピルビン酸の影響を調べたところ、電気化学培養ではピルビン酸による代謝活性の低下が起こりにくいことが明らかになった。

第 3 章では、鉄酸化化学独立細菌の代謝系に電気化学的にアクセスするために、 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ を含まない電気化学系を組み、微生物代謝を電氣的に測定する実験を行った。 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ を含む系では、電極から微生物への電子伝達は鉄イオンをメディエーターとして利用する形で行われるが、 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ を含まない系では、電極から微生物に直接的に電子伝達が行なわれることが期待できる。実際にリアクターを組んで実験したところ、微生物代謝に由来すると考えられる還元電流が生成することが明らかになった。さらにその際の電子注入の電位が +0.82 V vs. SHE から立ち上がることを明らかにした。この電位は $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ の酸化還元電位より正に位置しており、この代謝電流が Fe^{2+} の酸化反応を担うタンパク質によって駆動していることが示唆された。また、本実験系によって CO_2 固定が行なわれていることを確かめるために、微生物量の変化を測定した。その結果、系において鉄酸化化学独立細菌が徐々に増加していく様子が観察できた。この結果により、直接電子伝達系によってカルビン・ベンソン回路による CO_2 固定を駆動することに成功したといえる。さらに、直接電子

伝達条件における代謝プロセスを追跡するために、阻害剤を用いた実験を行った。 uphill electron transfer の阻害実験では電流値の部分的な抑制が、 downhill electron transfer の阻害実験では電流値の完全な抑制がみられた。この結果は、 Fe^{2+} の酸化系と同様の分岐したプロトン依存型の電子伝達が駆動していることを示唆するものである。また、代謝阻害を可逆的に制御する手法として、CO を用いた阻害実験も行った。CO はヘム鉄に配位して酸化還元反応の活性を抑制する阻害剤であり、ヘム鉄に対する光照射によって配位した CO を脱離させることができる。これによって、代謝過程を光化学的に可逆制御することが可能となる。実際に CO によって還元電流に光応答性を付与することに成功した。また、その光依存性から、CO による代謝阻害が aa3 複合体に対して起こっていることを明らかにした。

第 4 章では、実際に海底で CO_2 還元を行っている中性鉄酸化化学独立細菌を用いて電気化学的に CO_2 を還元する実験を行った。その結果中性鉄酸化化学独立細菌を用いた系でも、電気化学的に CO_2 還元が駆動することを明らかにした。また、この際、電子注入が +0.63 V vs. SHE から立ち上がることを示した。

これらの実験結果によって、本論文では、鉄酸化化学独立細菌の代謝活動に対して電気化学的にアクセスし、 CO_2 固定することが可能であることを示した。鉄酸化化学独立細菌の代謝プロセスには未解明点も多く残されており、代謝プロセスを理解するうえで重要な手法となる。

本研究の意義

本研究において得られた結果は、今後のカソード型の微生物固体間電子伝達について、電気化学的な手法を利用してその代謝機構を明らかにするうえで重要な知見になると考えられる。微生物と固体電極との間の相互作用についてはアノード型の微生物固体間電子伝達についてよく研究がされており、一部の鉄還元菌が電極電位に応じてその代謝プロセスを変化させていることが報告されている[139]。自然環境中では微生物を取り巻く環境における電位環境は常に変化していると考えられ、これに対する微生物応答を知ることは、生物学的に非常に意義のあることである。特に、電極からの直接電子伝達や細胞表面に付着したメディエーターによる非拡散の電子伝達を利用することで、微生物の細胞に対してくわえられる電位を mV オーダーで即座にコントロールすることができる。鉄酸化化学独立細菌について代謝を電極電位によって電気化学的に観測・制御していくことで、鉄酸化化学独立細菌の代謝機構をより詳細に理解することができる。

また、本研究で示した鉄酸化化学独立細菌の細胞外電子伝達は、海底環境における生命活動に新たな可能性を与えるものである。当研究室の過去の報告で、深海に存在するブラックスモーカーチムニーの構造体が、電気伝導性を持つことが報告されている[140]。ブラックスモーカーチムニーとは、海底マグマの活動による、地面から熱水が噴き出す箇所に生成する構造体である。1976 年に太平洋で発見されたのを皮切りに、様々な海底で発見さ

れている。噴き出す熱水は岩石の内部を高温で通過する際に、硫黄、鉄、銅などの物質を溶かし込む。これらの物質が周囲の海水によって急激に冷やされることでチムニーと呼ばれる構造体ができる。ブラックスモーカーチムニーの黒色は析出した金属硫化物による。ブラックスモーカーチムニーの内壁は $S^{2-} \rightarrow S^0$ の反応を触媒し、内壁から外壁方向への電子の流れを生み出す。この事実と、本研究で示した細胞外電子伝達を合わせて考えると、海底には岩石中を流れる電流に依存する形での代謝系が存在し、それによって生態系が支えられているのではないかという仮説を立てることができる（図 5-1）。

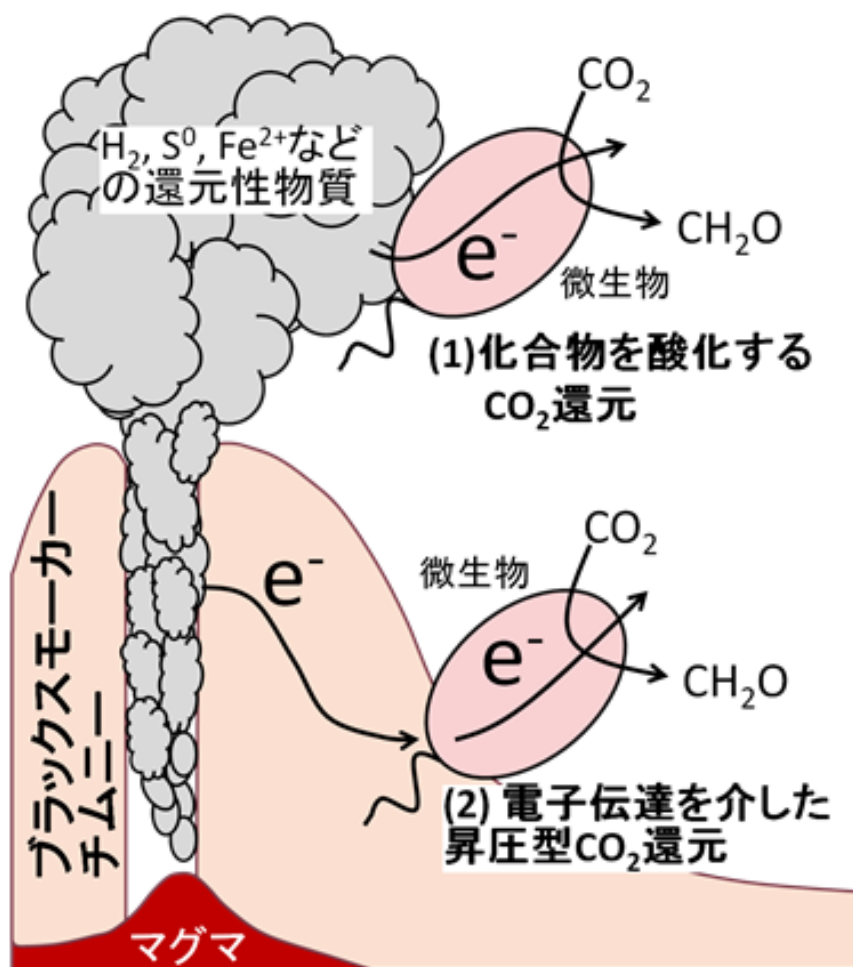


図 5-1 海底に存在する微生物代謝の模式図.

従来考えられてきた海底におけるエネルギー供給は、ブラックスモーカーチムニーから噴き出す還元性物質が、海中を拡散し、微生物がそれを直接代謝することでなされていると考えられてきた（図中（1））。しかしながら、第4章で見たように、化学独立細菌による一次生産は、細胞外の還元性物質濃度、酸素濃度が極めて限られた条件でしか生存しないため、この機構によるエネルギー供給の場合にはチムニー近傍の限られた物質濃度領

域でしか一次生産が行えない。実環境中では海底中の広範囲にわたって様々な生物が生態系をなしており、これまで鉱物中を少しずつしみだした還元性物質によってエネルギーが供給されているなどの仮説が立てられてきた。

一方で、電流に依存したエネルギー供給の場合にはどのようなようになるであろうか。我々の成果から、鉄酸化化学独立細菌は固体物質から電子を引き抜き、代謝に利用することができる。これは鉄イオンをメディエーターとして利用する場合や直接電子伝達、細胞外部にメディエーター物質が付着し補酵素として機能する場合などを含む。固体中の電子伝達は物質の拡散に比べて、速く遠くまで到達することが予想される。そのため、微生物は固体導電体が続いている範囲で連続的に CO₂ 還元を行うことができる。

具体的に硫黄がチムニー内壁で反応し電子供給がなされ、鉄酸化化学独立細菌による代謝活動がチムニー外側で起きた場合を想定する。供給される硫黄の酸化還元電位は -0.4 V vs. SHE、鉄酸化化学独立細菌が利用可能な固体の電位は本研究第 4 章で得られた結果より、中性環境では +0.6 V vs. SHE 程度である。また第 4 章の結果から、中性鉄酸化化学独立細菌は 30 μA cm⁻² 程度の電子供給があれば CO₂ 還元を連続的に行うことができる。チムニー壁の抵抗がおおよそ 5 × 10 Ω cm であることから計算すると、固体導電体を通した電子供給がなされる範囲は

$$\frac{(0.6 - (-0.4)) \text{ V}}{30 \mu\text{A cm}^{-2} \times 50 \Omega \text{ cm}} = 1 \times 10^1 \text{ m}$$

となり、10 m オーダーの距離にまで瞬時にエネルギー供給が行われることがわかる。

このような電流依存型の CO₂ 還元は、従来知られてきた CO₂ 還元系である、(1)光合成(2)化学合成に続く第三の CO₂ 還元系(3)電気合成の可能性を示唆するものであり、生態系の理解の上で極めて重要な意義がある (図 5-2)。

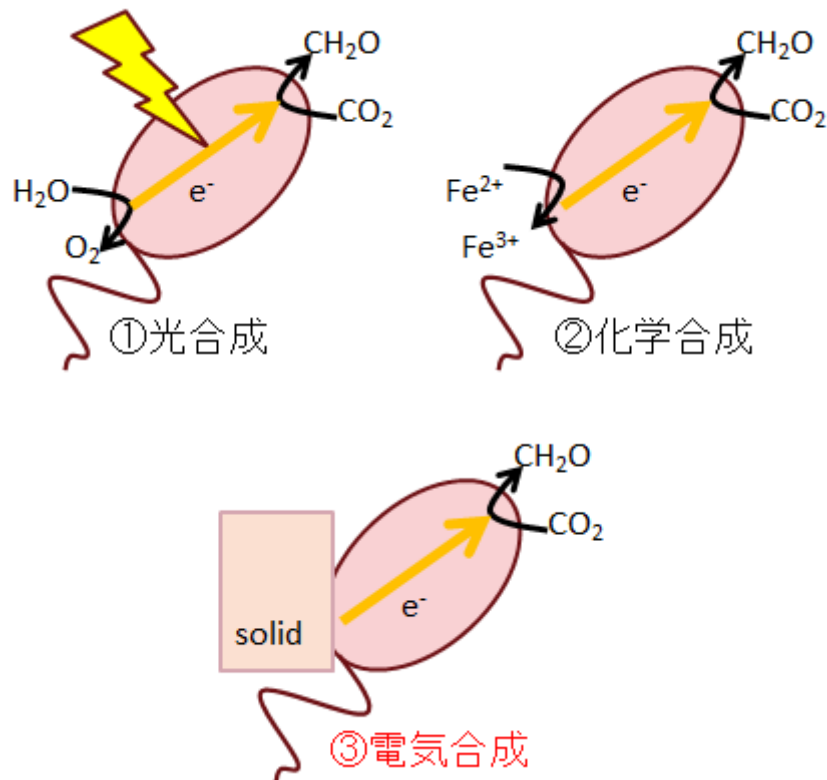


図 5-2 生物による CO_2 還元の種類

従来は①と②が知られてきたが、本研究の結果から③のプロセス存在することが示された。実際の生態系でもこのプロセスを仮定することで広範囲にわたる生態系の維持が説明できる。

さらに、本研究で着目してきた鉄酸化化学独立細菌の電極との間の電子伝達は、鉄酸化化学独立細菌を電極触媒的に利用したあらたな有機物生産系への可能性を示すものといえる。鉄酸化化学独立細菌による CO_2 還元を電気化学的に駆動させた場合、 CO_2 還元に必要な電位は $+0.6 \sim +0.8 \text{ V vs. SHE}$ と非常に正の値を持つ。そのため、従来とは異なるエネルギー源を利用した CO_2 還元、及び有機物生産が可能となる。エネルギー源に要求される電位差は最小で 0.2 V 程度でよく、これは利用可能なエネルギー源の範囲を大幅に広げるものである (図 5-3)。



図 5-3 鉄酸化化学独立細菌を用いたバイオマス生産の模式図

具体的には、0.3 eV 程度のバンドギャップを持つ素材を利用した光 CO₂ 還元系や、微生物燃料電池のように大きな電圧が確保できなかつた電池デバイスと組み合わせた有機物生産系が構築できるのではないかと考えている。

半導体材料を利用した光有機物生産系の模式図を示す（図 5-4）。

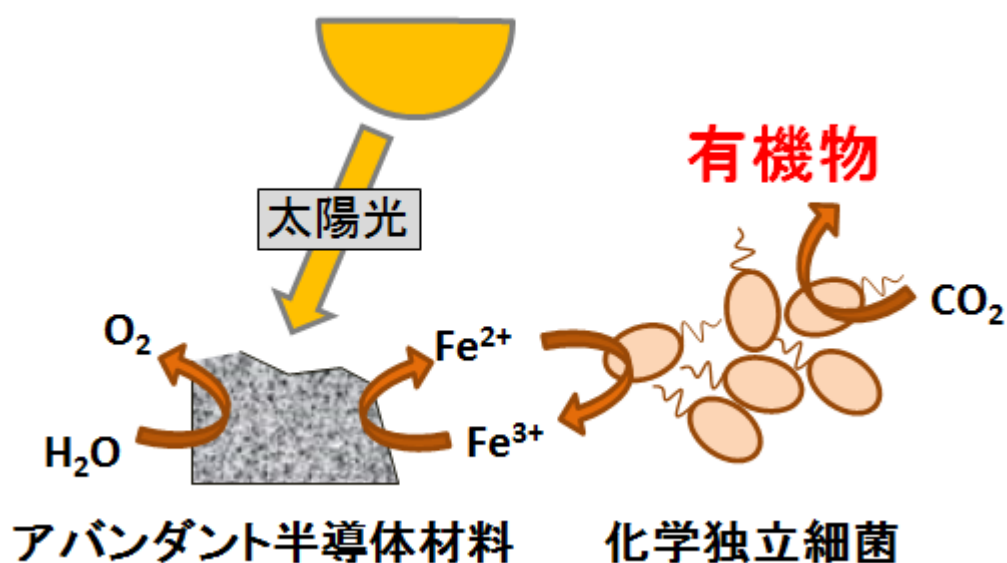


図 5-4 化学独立細菌を半導体光反応とカップルさせた有機物生産系

ここで半導体材料に要求されるバンドギャップは 0.2 V 以上となっており、従来利用不可能と考えられてきた材料に利用の可能性を開くものである。具体的にはヘマタイト(Fe₂O₃)やパイライト(FeS₂)などの材料が利用可能であると考えている。

これまで微生物を利用した有機物生産では光合成による検討が広く行われてきた。しかしながら光合成生物の光エネルギー変換では、光強度が低い領域では高活性を示すが、光強度が強まるにつれて変換効率の減少や微生物が光の弱い領域に移動するなどの問題が残

っていた。ここで提案する系では高強度の光を高効率に利用するための戦略として光エネルギーの吸収は無機材料によって行い、CO₂ 固定を化学独立細菌に行わせるという方法をとっている。

また、本研究で得られた微生物による電気化学的有機物生産プロセスは既存の電池技術と組み合わせることで、電気エネルギーから有機物生産を行うこともできる。ここで必要な電圧が 0.2 V 程度であることから、低電圧のデバイスや電圧が不安定なデバイスが利用可能である。

今後、微生物直接電子伝達における代謝制御などを詳細に検討していくことでより効率的な CO₂ 還元触媒として機能させるための研究が必要になる。

参考文献

- [1] D. P. Pratim, Review of solar cell, *International Journal of Advanced Research in IT and Engineering*, **4**, 23(2015)
- [2] T. Ebina, Self-Repairing Gas-Barrier-Film, *Journal of The Surface Finishing Society of Japan*, **65**, 475(2014)
- [3] D.V. Andreeva, D. Fix, H. Mohwald, D. G. Shchukin, Self-Healing Anticorrosion Coatings Based on pH-Sensitive oleyelectrolyte/Inhibitor Sandwichlike Nanostructures, *Adv. Mater.*, **20**,2789(2008)
- [4] S. Malik, E. Drott, P. Grisdela, J. Lee, C. Lee, D. A. Lowy, S. Gray, and L. M. Tender, A self-assembling self-repairing microbial photoelectrochemical solar cell, *Energy Environ. Sci.*, **2**, 292(2009)
- [5] R. W. Bradley, P. Bombelli, S. J. L. Rowden, and C. J. Howe, Biological photovoltaics; intra- and extra-cellular electron transport by cyanobacteria, *Biochem. Soc. T.*, **40**, 1302(2012)
- [6] M. Hambourger, G. F. Moore, D. M. Kramer, D. Gust, A. L. Moore, and T. A. Moore, Biology and technology for photochemical fuel production, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 25(2009)
- [7] P. R. Rich, The molecular machinery of Keilin's respiratory chain, *Biochem. Soc.*, **31**, 1095(2003)
- [8] A. Demain, Industrial microbiology, *Science*, **214**, 987(1981)
- [9] J. S. Kim, B. G. Kim, C. H. Lee, S. W. Kim, H. S. Jee, J. H. Koh, and A. G. Fane, Development of clean technology in alcohol fermentation industry, *J. Cleaner Prod.*, **5**, 263(1997)
- [10] D. Kumar, V.K. Jain, G. Shanker, A. Srivastava, Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse, *Proc. Biochem.*, **38**, 1731(2003)
- [11] J. B. Gonzalez, A. Tomasini, G. V. Gonzalez, L. Lopez, Penicillin production by solid state fermentation, *Biotechnol. Lett.*, **10**, 793(1988)
- [12] J. N. Currie, The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*, *J. Biol. Chem.*, **31**, 15(1917)
- [13] E. P. Abraham, A. D. Gardner, E. Chain, N. G. Heatley, C. M. Fletcher, M. A. Jennings, H. W. Florey, Further observation on penicillin, *The Lancet*, **238**, 177(1941)
- [14] H. Ooka, T. Ishii, K. Hashimoto, and R. Nakamura, Light-induced cell aggregation of *Euglena gracilis* towards economically feasible biofuel production, *RSC Adv.*, **4**, 20693(2014)
- [15] D. Pant, G. V. Bogaert, L. Diels, and K. Vanbroekhoven, A review of substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresource Technol.*, **101**, 1533(2010)
- [16] A. E. Franks and K. P. Nevin, Microbial Fuel Cells, A Current Review, *Energies*, **3**, 899(2010)

- [17] BP, Statistical Review of World energy 2015, 2016-2-12, <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2015/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf>
- [18] T. Silalertruksa, and S. H. Gheewala, Security of feedstocks supply for future bio-ethanol production in Thailand, *Energy Policy*, **38**, 7476(2010)
- [19] H. H. Janzen, Carbon cycling in earth systems – a soil science perspective, *Agr. Ecosyst. Environ.*, **104**, 399(2004)
- [20] T. Hilker, N. C. Coops, M. A. Wulder, T. A. Black, R. D. Guy, The Use of Remote Sensing in Light Use Efficiency Based Models of Gross Primary Production: A Review of Current Status and Future Requirements, *Sci. Total Environ.*, **44**, 411(2008)
- [21] 細胞の分子生物学 第5版(Molecular Biology of The Cell Fifth Edition), B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, (訳 中村桂子, 松原謙一, 青山聖子, 滋賀陽子, 滝田郁子, 中塚公子, 羽田裕子, 宮下悦子), Newton Press (2010)
- [22] 生命科学 改定第3版, 東京大学生命科学教科書編集委員会, 羊土社(2009)
- [23] H.J. Rurainski, J. Randles and G.E. Hoch, A Comparative Study of Photosynthetic Electron Transport in Algal Cells and Spinach Chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 254 (1970)
- [24] J.A. Bassham, A.A. Benson, and M. Calvin, The Path of Carbon in Photosynthesis VIII. The Role of Malic Acid, *J. Biol. Chem.*, **185**, 781 (1950)
- [25] R. J. Ellis, The most abundant protein in the world, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 241(1979)
- [26] J.M. Shively, G. V. Keulen, and W.G. Meijer, Something from Almost Nothing: Carbon Dioxide Fixation in Chemoautotrophs, *Annu. Rev. Microbiol.*, **52**, 191 (1998)
- [27] S. Nakagawa and K Takai, Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **65**, 1 (2008)
- [28] K. Takai, M. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, J. Querellou, and A. Godfroy, Isolation and physiological characterization of two novel piezophilic thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney, *Environ. Microbiol.*, **11**, 1983 (2009)
- [29] A. Boetius, Lost City Life, *Science*, **307**, 1420 (2005)
- [30] C.H. Gammons, D.A. Nimick, S.R. Parker, D.M. Snyder, R.B. McCleskey, R. Amils, and S.R. Poulson, Photoreduction fuels biogeochemical cycling of iron in Spain's acid rivers, *Chem. Geol.*, **252**, 202 (2008)
- [31] B.J. Baker and J.F. Banfield, Microbial communities in acid mine drainage, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**, 139 (2003)
- [32] D. Emerson, E. J. Fleming, and J. M. McBeth, Iron-Oxidizing Bacteria: An Environmental and Genomic Perspective, *Annu. Rev. Microbiol.*, **64**, 561(2010)

- [33] W. Bach and K.J. Edwards, Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: Implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **67**, 3871 (2003)
- [34] K.J. Edwards, W. Bach, and D.R. Rogers, Geomicrobiology of the Ocean Crust: A Role for Chemoautotrophic Fe-Bacteria, *Biol. Bull.*, **204**, 180 (2003)
- [35] C. Schmidt, R. Vuillemin, C. L. Gall, F. Gaill and N. L. Bris, Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps, *Marine Chemistry*, **108**, 18 (2008)
- [36] E. M. Sproviero, J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig, and V. S. Batista, Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Study of the Catalytic Cycle of Water Splitting in Photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3428(2008)
- [37] Y. C. Cheng, and G. R. Fleming, Dynamics of Light Harvesting in Photosynthesis, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **60**, 241(2009)
- [38] M. Sharma, N. Thukral, N. K. Soni, and S. Maji, Microalgae as Future Fuel: Real Opportunities and Challenges, *J. Thermodyn. Catal.*, **6**, 139(2015)
- [39] A. Elbehti, G. Brasseur, and D. Lemesle-Meunier, First Evidence for Existence of an Uphill Electron Transfer through the bc₁ and NADH-Q Oxidoreductase Complexes of the Acidophilic Obligate Chemolithotrophic Ferrous Ion-Oxidizing Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Bacteriol.*, **182**, 3602(2000)
- [40] G. Brasseur, G. Levican, V. Bonnefoy, D. Holmes, E. Jedlicki, and D. Lemesle-Meunier, Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc₁ complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1653**, 114 (2004)
- [41] R. Quatrini, C. Appia-Ayme, Y. Denis, E. Jedlicki, D. S. Holmes, and V. Bonnefoy, Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *BMC Genomics*, **10**, 394, (2009)
- [42] J. Valdes, I. Pedroso, R. Quatrini, R.J. Dodson, H. Tettelin, R. Blake II, J.A. Eisen, and D.S. Holmes, *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications, *BMC Genomics*, **9**, 597 (2008)
- [43] L. J. Bird, V. Bonnefoy, D.K. Newman, Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms, *Trends Microbiol.*, **19**, 330(2011)
- [44] S. J. Ferguson, and W. J. Ingledew, Energetic problems faced micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 1471(2008)
- [45] U. Schroder, Microbial Fuel Cells and Microbial Electrochemistry: Into the Next Century!, *ChemSusChem*, **5**, 959(2012)

- [46] S. Dulon, S. Parot, M. L. Delia, and A. Bergel, Electroactive biofilms: new means for electrochemistry, *J. Appl. Electrochem.*, **37**, 173(2007)
- [47] O. Modin, and D. J. I. Gustavsson, Opportunities for microbial electrochemistry in municipal wastewater treatment – an over view, *Water Sci. Technol.*, **69**, 1359(2014)
- [48] E. Marsili, J. B. Rollefson, D. B. Baron, R. M. Hozalski, and D. R. Bond, Microbial Biofilm Voltammetry: Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7329(2008)
- [49] Y. Yang, M. Xu, J. Guo, and G. Sun, Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems, *Process Biochem.*, **47**, 1707(2012)
- [50] L. Shi, D.J. Richardson, Z. Wang, S.N. Kerisit, K.M. Rosso, J.M. Zachara, and J.K. Fredrickson, The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer, *Environ. Microbiol. Reports*, **14**, 220 (2009)
- [51] N. Kaku, N. Yonezawa, Y. Kodama, and K. Watanabe, Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field, *Appl. Microbiol. Biot.*, **79**, 43(2008)
- [52] Z. Du, H. Li, and T. Gu, A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy, *Biotechnol. Adv.*, **25**, 464(2007)
- [53] R. Nakamura, F. Kai, A. Okamoto, G.J. Newton, and K. Hashimoto, Self-Constructed Electrically Conductive Bacterial Networks, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 508 (2009)
- [54] 齐藤浩三, 化学合成独立栄養細菌の工業利用, *駒場地理*, **23**, 61(1987)
- [55] M. Esparza, J.P. Cardenas, B. Bowien, E. Jedlicki, and D.S. Holmes, Genes and pathways for CO₂ fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *BMC Microbiol.*, **10**, 229 (2010)
- [56] P. Hugenholtz, C. Pitulle, K.L. Hershberger, and N.R. Pace, Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring, *J. Bacteriol.*, **180**, 366 (1998)
- [57] M.P. Asta, C. Ayora, P. Acero, and J. Cama, Field rates for natural attenuation of arsenic in Tinto Santa Rosa acid mine drainage (SW Spain), *J. Hazard. Mater.*, **177**, 1102 (2010)
- [58] T. Sugio, T. Tano, and K. Imai, Two Factors Affecting on Iron-oxidizing Activities of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 393(1981)
- [59] L.G. Leduc and G.D. Ferroni, The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**, 103 (1994)
- [60] W.J. Ingledew, *Thiobacillus ferrooxidans* the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph, *Biochim. Biophys. Acta.*, **683**, 89 (1982)
- [61] C. Solisio, A. Lodi, and F. Vegio, Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Waste Manage.*, **22**, 667 (2002)
- [62] D.K. Newman, Feasting on Minerals, *Science*, **327**, 793 (2010)

- [63] D.E. Rawlings, Heavy Metal Mining Using Microbes, *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**, 65 (2002)
- [64] T. Rohwerder, T. Gehrke, K. Kinzler, and W. Sand, Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 239(2003)
- [65] 極限環境生命-生命の起源を考え,その多様性に学ぶ-, 伊藤政博, 道久則之, 鳴海一成, 東端啓貴, 為我井秀行, 國枝武和, 伊藤隆, 佐藤孝子, 中村聡 著, コロナ社(2014)
- [66] 箕浦潤, 孫田裕美, and 白鳥寿一, 鉄酸化細菌の鉱工業への利用, *鐵と鋼: 日本鐵鋼協會々誌*, **72**, 2010(1986)
- [67] N.L. Gale and J.V. Beck, Evidence for the Calvin Cycle and Hexose Monophosphate Pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Bacteriol.*, **94**, 1052 (1967)
- [68] M. Esparza, J.P. Cardenas, B. Bowien, E. Jedlicki, and D.S. Holmes, Genes and pathways for CO₂ fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Carbon fixation in *A. ferrooxidans*, *BMC Microbiol.*, **10**, 229 (2010)
- [69] C.A. Raines, The Calvin cycle revisited, *Photosynth. Res.*, **75**, 1 (2003)
- [70] 微生物工学, 百瀬春生 著, 丸善株式会社(1997)
- [71] J.P. Cardenas, J. Valdes, R. Quatrini, F. Duarte, and D.S. Holmes, Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 605 (2010)
- [72] J. B. Peng, W.M. Yan, and X.Z. Bao, Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Bacteriol.*, **176**, 2892(1994)
- [73] Z. Liu, F. Borne, J. Ratouchniak, V. Bonnefoy, Genetic transfer of IncP, IncQ, and IncW plasmids to four *Thiobacillus ferrooxidans* strains by conjugation, *Hydrometallurgy*, **59**, 339(2001)
- [74] W. Liu, J. Lin, X. Peng, S. Cui, S. Mi, and J. Lin, Overexpression of Rusticyanin in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC19859 Increased Fe(II) Oxidation Activity, *Curr. Microbiol.*, **62**, 320(2011)
- [75] Z. Liu, N. Guiliani, C. A. Ayme, F. Borne, J. Ratouchniak, and V. Bonnefoy, Construction and Characterization of *arecA* Mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by Marker Exchange Mutagenesis, *J. Bacteriol.*, **182**, 2269(2000)
- [76] S.B. Yunker and J.M. Radovich, Enhancement of Growth and Ferrous Iron Oxidation Rates of *T. ferrooxidans* by electrochemical reduction, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1867 (1986)
- [77] N. Matsumoto, H. Yoshinaga, N. Ohmura, A. Ando and H. Saiki, Numerical Simulation for Electrochemical Cultivation of Iron Oxidizing Bacteria, *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 17 (2002)
- [78] N. Matsumoto, S. Nakasono, N. Ohmura, and H. Saiki, Extension of Logarithmic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* by Potential Controlled Electrochemical Reduction of Fe(III), *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 716 (1999)

- [79] M. Taya, H. Shiraishi, T. Katsunishi, and S. Tone, Enhanced Cell Density Culture of *Thiobacillus ferrooxidans* in Membrane-type Bioreactor with Electrolytic reduction unit for Ferric Ion, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **24**, 291 (1991)
- [80] R.C. Blake II, G.T. Howard, and S. McGinness, Enhanced Yields of Iron-Oxidizing Bacteria by In Situ Electrochemical Reduction of Soluble Iron in the Growth Medium, *Appl. Environ. Microb.*, **60**, 2704 (1994)
- [81] K. Rabaey and A. Rozendal, Microbial electrosynthesis – revisiting the electrical route for microbial production, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 706 (2010)
- [82] A.V. Pandit and R. Mahadevan, In silico characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals, *Microbial Cell Factories*, **10**, 76 (2011)
- [83] M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, and L. T. Angenent, Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved?, *Bioresour. Technol.*, **102**, 324(2011)
- [84] K.P. Nevin, T.L. Woodard, A.E. Franks, A.M. Summers, and D.R. Lovley, Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity To Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds, *mBio*, **1**, 1 (2010)
- [85] L.L. Stookey, Ferroozine- A New Spectrophotometric Reagent for Iron, *Anal. Chem.*, **42**, 779 (1970)
- [86] T. D. Gierke, G. E. Munn and F. C. Wilson, The morphology in nafion perfluorinated membrane products, as determined by wide- and small-angle x-ray studies, *Journal of Polymer Science*, **19**, 1687 (1981)
- [87] T. Ishii, H. Nakagawa, K. Hashimoto and R. Nakamura, *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a Bioelectrocatalyst for Conversion of Atmospheric CO₂ into Extracellular Pyruvic Acid, *Electrochemistry*, **80**, 327 (2012)
- [88] C. Farah, M. Vera, D. Morin, D. Haras, C. A. Jerez, and N. Guiliani, Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7033(2005)
- [89] M. Fisher, and P. Warneck, The Dissociation Constant of Pyruvic Acid: Determination by Spectrophotometric Measurements, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **95**, 523(1991)
- [90] Martin Lanthier; Kelvin B. Gregory; Derek R. Lovley, Growth with high planktonic biomass in *Shewanella oneidensis* fuel cells, *FEMS microbiology letters* 2008, 278(1), 29-35
- [91] C. R. Myers, and J. M. Myers, Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1, *J. Bacteriol.*, **174**, 3429(1992)
- [92] K. Takanezawa, K. Nishio, S. Kato, K. Hashimoto, and K. Watanabe, Factors Affecting Electric Output from Rice-Paddy Microbial Fuel Cells, *Biosci Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1271(2010)

- [93] Z. M. Summers, J. A. Gralnick, and D. R. Bond, Cultivation of an Obligate Fe(II)-Oxidizing Lithoautotrophic Bacterium Using Electrodes, *MBio.*, **4**, e00420(2013)
- [94] A. R. Rowe, P. Chellamuthu, B. Lam, A. Okamoto, and K. H. Nealson, Marine sediments microbes capable of electrode oxidation as a surrogate for lithotrophic insoluble substrate metabolism, *frontiers in Microbiology*, **5**, 784(2015)
- [95] C. A. H. von Wolzogen Kuhr, and L. S. van der Vlugt, The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soil, *Water*, **18**, 195(1934)
- [96] W. P. Iverson, Direct Evidence for the Cathodic Depolarization Theory of Bacterial Corrosion, *Science*, **151**, 986(1966)
- [97] D. Enning, and J. Garrelfs, Corrosion of Iron by Sulfate-Reducing Bacteria: New Views of an Old Problem, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 1226(2014)
- [98] H. Venzlaff, D. Enning, J. Srinivasan, K. J. J. Mayrhofer, A. W. Hassel, F. Widdel, and M. Stratmann, Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria, *Corros. Sci.*, **66**, 88(2013)
- [99] H. T. Dinh, J. Kuever, M. Mußmann, A. W. Hassel, M. Stratmann, and F. Widdel, Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms, *Nature*, **427**, 829(2004)
- [100] X. Deng, R. Nakamura, K. Hashimoto, and A. Okamoto, Electron Extraction from an Extracellular Electrode by *Desulfovibrio ferrophilus* Strain IS5 Without Using Hydrogen as an Electron Carrier, *Electrochemistry*, **83**,529(2015)
- [101] A. Yarzabal, G. Brasseur, J. Ratouchniak, K. Lund, D. Lemesle-Meunier, J.A. DeMoss, and V. Bonnefoy, The High-Molecular-Weight Cytochrome c C_{yc2} of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Is an Outer Membrane Protein, *J. Bacteriol.*, **184**, 313 (2002)
- [102] T. Ishii, S. Kawaichi, H. Nakagawa, K. Hashimoto, and R. Nakamura, From chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO₂ fixation by Fe(II)-oxidizing bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources, *Frontiers in Microbiology*, **6**,1(2015)
- [103] Y. Chen and I. Suzuki, Effects of electron transport inhibitors and uncouplers on the oxidation of ferrous iron and compounds interacting with ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Can. J. Microbiol.* **51**, 695 (2005)
- [104] J. R. Alonso, F. Cardellach, S. Lopez, J. Casademont, and O. Miro, Carbon Monoxide Specifically Inhibits Cytochrome C Oxidase of Human Mitochondrial Respiratory Chain, *Pharmacol. Toxicol.*, **93**, 142(2003)
- [105] R. A. Capaldi, Structure and Function of Cytochrome c Oxidase, *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 569(1990)
- [106] T. Shibanuma, R. Nakamura, Y. Hirakawa, K. Hashimoto, and K. Ishii, Observation of In Vivo Cytochrome-Based Electron-Transport Dynamics Using Time-Resolved Evanescent Wave Electroabsorption Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed*, **50**, 1 (2011)

- [107] J. Hofrichter, J. H. Sommer, E. R. Henry, and W. A. Eaton, Nanosecond absorption spectroscopy of hemoglobin: Elementary processes in kinetic cooperativity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2235(1983)
- [108] S. Franzen, L. Kinger, C. Poyart, and J. L. Martin, Heme Photolysis Occurs by Ultrafast Excited State Metal-to-Ring Charge Transfer, *Biophys. J.*, **80**, 2372(2001)
- [109] D.C. White, Cytochrome and Catalase Patterns during Growth of *Haemophilus parainfluenzae*, **83**, 851 (1962)
- [110] M. Du, X. Xie, L. Mets, and G.R. Fleming, Direct Observation of Ultrafast Energy-Transfer Processes in Light Harvesting Complex II, *J. Phys. Chem.*, **98**, 4736 (1994)
- [111] G.S. Engel, T.R. Calhoun, E.L. Read, T.K. Ahn, T. Mancal, T.C. Cheng, R.E. Blankenship, and G.R. Fleming, Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems, *Nature*, **446**, 782 (2007)
- [112] P. Joliot, and B. Kok. Oxygen evolution in photosynthesis. *Bioenergetics of Photosynthesis*, 388(1975)
- [113] A. R. Crofts, J. T. Holland, D. Victoria, D. R. J. Kolling, S. A. Dikanov, R. Gilbreth, S. Lhee, R. Kuras, M. G. Kuras, The Q-cycle reviewed; How well does a monomeric mechanism of the bc1 complex account for the function of a dimeric complex?, *BBA-Bioenergetics*, **1777**, 1001(2008)
- [114] L. Huang, D. Cobessi, E. Y. Tung, E. A. Berry, Binding of the Respiratory Chain Inhibitor Antimycin to the Mitochondrial bc1 Complex: A New Crystal Structure Reveals an Altered Intramolecular Hydrogenbonding Pattern, *J. Mol. Biol.*, **351**, 573(2005)
- [115] S. Horie, T. Watanabe, and K. Awa, Studies on the Ferricytochrome a-Ferrocyanide a3-Carbon Monoxide Complex of Mammalian Cytochrome Oxidase. Conditions for Preparation and Some Properties, *J. Biochem.*, **93**, 997 (1983)
- [116] S. Horie and M. Morrison, Cytochrome c Oxidase Components, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1855 (1963)
- [117] T. Takahashi and T. Ogura, Resonance Raman Spectra of Cytochrome c Oxidase in Whole Mitochondria, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **75**, 1001 (2002)
- [118] ベーシック電気化学, 大塚利行, 加納健司, 桑畑進 著, 化学同人(2000)
- [119] D. R. Lovley, and K. P. Nevin, Electrobiocommodities; powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, 385(2013)
- [120] P. L. Tremblay, and T. Zhang, Electrifying microbes for the production of chemicals, *Front. Microbiol.*, **6**, 201(2015)
- [121] P.A. Trudinger, Thiosulphate Oxidation and Cytochromes in *Thiobacillus X*, *Biochem. J.*, **78**, 673 (1961)

- [122] R. Quatrini, C. A. Ayme, Y. Denis, E. Jedlicki, D. Holmes and V. Bonnefoy, Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *BMC Genomics*, **10**, 394 (2009)
- [123] A. Elbehti, W. Nitschke, P. Tron, C. Miche., and D.L. Meunier, Redox components of Cytochrome bc-type Enzymes in Acidophilic Prokaryotes, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16760 (1999)
- [124] W. Bach and K.J. Edwards, Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: Implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **67**, 3871 (2003)
- [125] J. M. McBeth, B. J. Little, R. I. Ray, K. M. Farrar, and D. Emerson, Neutrophilic Iron-Oxidizing “*Zetaproteobacteria*” and Mild Steel Corrosion in Nearshore Marine Environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1405(2011)
- [126] F. N. Spiess, K. C. Macdonald, T. Atwater, R. Ballard, A. Carranza, D. Cordoba, C. Cox, V. M. D. Garcia, J. Francheteau, J. Guerrero, J. Hawkins, R. Haymon, R. Hessler, T. Juteau, M. Kastner, R. Larson, B. Luyendyk, J. D. Macdougall, S. miller, W. Normark, J. Orcutt, and C. Rangin, East Pacific Rise: Hot Springs and Geophysical Experiments, *Science*, **207**, 1421(1980)
- [127] T. Watsuji, A. Yamamoto, K. Motoki, K. Ueda, E. Hada, Y. Takaki, S. Kawagucci, and K. Takai, Molecular evidence of digestion and absorption of epibiotic bacterial community by deep-sea crust *Shinkaia crosnieri*, *The ISME Journal*, **9**,821(2015)
- [128] C. T. Yam, L. D. An, and L. C. Sing, The first deep-sea hydrothermal animal reported from Taiwan: *Shinkaia crosnieri* Baba and Williams 1998 (Crustacea: Decapoda: Galatheidae), *Bulletin of Marine Science*, **67**, 799(2000)
- [129] W. Bach and K.J. Edwards, Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: Implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **67**, 3871 (2003)
- [130] T. Mogi, T. Ishii, K. Hashimoto and R. Nakamura, Low-voltage electrochemical CO₂ reduction by bacterial voltage-multiplier circuits, *Chem. Commun.*, **49**, 3967 (2013)
- [131] D. Emerson, J. A. Rentz, T. G. Lilburn, R. E. Davis, H. Aldrich, C. Chan and C. L. Moyer, A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities, *PLoS ONE*, **8**, e667 (2007)
- [132] E. Singer, D. Emerson, E. A. Webb, R. A. Barco, J. G. Kuenen, W. C. Nelson, C. S. Chan, L. R. Comolli, S. Ferriera, J. Johnson, J. F. Heidelberg and K. J. Edwards, *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 the First Genome of a Marine Fe(II) Oxidizing Zetaproteobacterium, *PLoS ONE*, **6**, e25386 (2011)
- [133] J. Miot, K. Benzerara, M. Obst, A. Kappler, F. Hegler, S. Schadler, C. Bouchez, F. Guyot, and G. Morin, Extracellular Iron Biomineralization by Photoautotrophic Iron-Oxidizing Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5586(2009)

- [134] D. Emerson, and C. L. Moyer, Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3085(2002)
- [135] C. S. Chan, S. C. Fakra, D. C. Edwards, D. Emerson, and J. F. Banfield, Iron oxyhydroxide mineralization on microbial extracellular polysaccharides, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **73**, 3807(2009)
- [136] C. S. Chan, S. C. Fakra, D. Emerson, E. J. Fleming and K. J. Edwards, Lithotrophic iron-oxidizing bacteria produce organic stals to control mineral growth; implications for biosignature formation, *The ISME Journal*, **5**, 717 (2011)
- [137] M. S. Colomina, G. Morin, K. enzerara, G. Nguema, J. J. Pernelle, G. Esposite, and E. D. V. Hullebusch, *Sphaerotilus natans*, a Neutrophilic Iron-Related Sheath-Forming Bacterium: Perspectives for Metal Remediation Strategies, *Geomicrobiol. J.*, **31**, 64(2014)
- [138] G. K. Druschel, D. Emerson, R. Sutka, P. Suchecki, and G. W. Luther III, Low-oxygen and chemical kinetic constraints on the geochemical nich of neutrophilic iron(II) oxidizing microorganisms, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **72**, 3358(2008)
- [139] H. Liu, S. Matsuda, S. Kato, K. Hashimoto and S. Nakanishi, Redox-Responsive Switching in Bacterial Respiratory Pathways Involving Extracellular Electron Transfer, *ChemSusChem*, **3**, 1253 (2010)
- [140] R. Nakamura, T. Takashima, S. Kato, K. Takai, M. Yamamoto, K. Hashimoto, Electrical Current Generation across a Black Smoker Chimney, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 7692 (2010)

謝辞

本研究を進め、学位論文をまとめるにあたり、多くの方々からのご支援とご指導を賜りました。

指導教官である東京大学大学院 工学系研究科 応用化学専攻 橋本和仁教授に深く感謝申し上げます。研究の方向性から詳細に至るまで、忍耐強く多大なご指導ご助言を賜りました。研究生活全般を支えてくださり、心より厚く感謝申し上げます。

理化学研究所 環境資源科学研究センター 生体機能触媒研究チーム 中村龍平博士には研究を進めるための心構えや実験指導など多くのことについて丁寧にご助言を賜りました。学位論文の内容に関しても、細部まで細かなご指導をいただきました。心より感謝申し上げます。

東京大学 大学院 工学系研究科 応用化学専攻 野地博行教授、東京大学大学院 工学系研究科 応用化学専攻 石井和之教授、東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 長棟輝行教授には学位論文審査において貴重なお時間をいただき、ご助言、ご指導をいただきました。心より感謝いたします。

海洋研究開発機構の高井研博士、牧田寛子博士は実験に用いる *M. ferrooxidans* を無償で提供してくださり、細菌の基本的な取り扱いについても多くのご支援・ご助言を頂きました。また、特に深海における生態系に関してご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

元東京大学大学院 工学系研究科 渡邊一哉特任准教授（現東京薬科大学 生命科学部教授）は、微生物に関する基礎的な知識や実験手法を丁寧にご指導くださいました。心より感謝申し上げます。

元東京大学大学院 工学系研究科 中西周二准教授（現大阪大学 太陽エネルギー科学研究センター教授）には微生物電気化学に関する数多くのご指導ご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

理化学研究所 環境資源科学研究センター 生体機能触媒研究チーム 川市智史博士は微生物に関する実験について様々なアドバイスを頂き、時に厳しい助言もいただきました。熱心なご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

東京大学大学院応用化学専攻（2010 年度修了）中川広崇先輩は、様々な実験をともに行い、丁寧なご助言を多数いただきました。特に *A. ferrooxidans* に関して、菌体の取り扱いを教えていただくと共に、電気化学的な考察についても様々なご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

東京大学大学院応用化学専攻（2013 年度修了）茂木岳人さんは、実験をともに行い、また様々なディスカッションを繰り返すことでお互いに高めあうことができました。*M. ferrooxydan* についての取り扱いを細かく教えて下さり、深海の生態系の理解に関するディスカッションを行っていただきました。心よりの感謝を申し上げます。

渡辺鮎子さんは、微生物の取り扱いや実験について共に考え、様々な作業を行ってくださいました。ここにお礼申し上げます。

山口晃さん、林徹さん、大岡英史さん、柿崎宏昂さんは、同じ研究チームの仲間として、日々の実験や考察までお世話になりました。心より感謝申し上げます。

研究活動・執筆活動を陰で支えてくれた家族に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、研究を進めるにあたりご支援ご協力を頂きながらここにお名前を記すことができなかった多くの方々に心より感謝申し上げます。