

## 論文の内容の要旨

### 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

橋本研究室 37127107 石居拓己

#### 1.緒言

CO<sub>2</sub>還元による有機物生産は、エネルギー・環境などの面から重要視されている。自然界では、植物や化学独立細菌などが有機物生産を行なうが、化学独立生物に関する研究は光合成に比べて進んでいない。本研究では、鉄酸化化学独立細菌に着目し、電気化学的に代謝によるCO<sub>2</sub>還元を駆動することを試みた。これにより、新規なCO<sub>2</sub>還元系を構築するとともに、鉄酸化化学独立細菌の代謝を物理化学的に理解することを目的とした。実験ではモデル微生物を用い、カソード型の細胞外電子伝達の駆動とCO<sub>2</sub>還元に関する電子伝達経路を調べた。

#### 2.Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>存在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<sub>2</sub>還元[1]

鉄酸化化学独立細菌における電気化学培養はFe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>を利用した系が報告されている[2][3]。しかし、それらは一般に菌体増殖に着目したものであり、菌体による有機物生産という観点では検討がなされていない。そこで本実験では、実際に電気化学実験系を組み、系中の有機炭素濃度を計測することで、微生物の有機物生産量に関する検討を行なった。

【実験】*A. ferrooxidans*はDSMZにFeSO<sub>4</sub> (72 mM)を加えた培地中で前培養し、十分に洗浄したのちに電気化学実験に用いた。電気化学培養は、2槽式電気化学リアクターを利用し、作用極にPt板(2 cm<sup>2</sup>)、対極にPt板、参照極にAg|AgCl|KCl sat.電極を用いた。炭素源は大気中のCO<sub>2</sub>とした。電解液にはpH2に調整したDSMZ培地を用いた。電位を+0.4 V vs. SHEに固定し、電気化学的にFe<sup>3+</sup>を還元しながら有機物濃度の変化を測定した。

【結果と考察】微生物存在下で電位を固定し電流を測定すると、連続した還元電流が観測された。これは微生物によって酸化されたFe<sup>3+</sup>が還元されることによる電流である。電流を流しながら系中の全有機炭素濃度(TOC)および溶解有機炭素濃度(DOC)の測定を行うと、連続的に有機炭素量が増加していることがわかった(図1)。DOCの値がTOCの60%程度を維持していることから、固定された有機物の多くが細胞外に放出されていることがわかる。放出された有機物の中にはピルビン酸などの有機酸が含まれている。ピルビン酸は細胞の代謝活性を抑制するが、電気化学培養条件では代謝抑制の効果が弱まることを見出した。これは、電極反応による連続的なエネルギー供給が、代謝抑制の効果を上回ったためだと考えられる。

#### 3-1.メディエーター不在条件における酸性鉄酸化化学独立細菌による電気化学的CO<sub>2</sub>還元[4]

従来の*A. ferrooxidans*の電気化学培養は、Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>を電子メディエーターとして利用している[2][3]。そのような間接電子伝達系では、有機生産物を分離することや微生物代謝を電気化学的に追跡することが困難であった。そこで本研究では、鉄イオンを介さずに微生物-電極間の直接電子伝達反応が進行するかを明らかにすることを目的とし、非鉄含有系における電気化学測定を行った。

【実験】電気化学培養は、1槽式電気化学リアクターを利用し、作用極にF-doped SnO<sub>2</sub> (FTO、表面積: 3.14 cm<sup>2</sup>)、対極にPt線、参照極にAg|AgCl|KCl sat.電極を用いた。リアクターの下部にFTO電極を設置することで、細胞が沈降して電極に接触するようにした。

【結果と考察】図2に鉄非含有系における微生物による代謝電流生成の結果を示す。微生物なしの系では

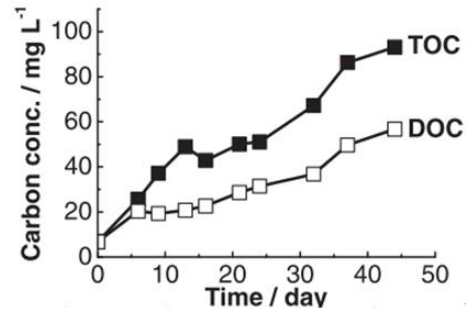


図1. 溶液中有機炭素濃度の変化

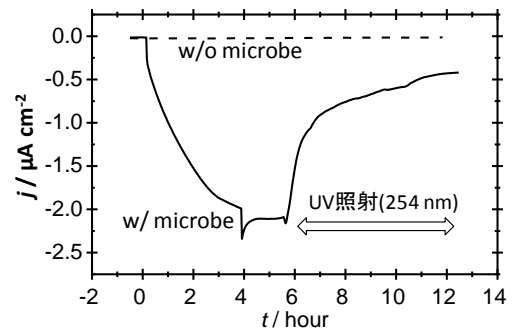


図2. カソード型細胞外電子伝達による電流生成

電流生成は全く観測されなかったが、微生物を添加した場合には即座に還元電流が立ち上がった。更に、UV (254 nm) 光照射を行うと、還元電流の大幅な減少が観測された。これは UV 光照射によって微生物が殺菌され、代謝活動が抑制されたことに対応する。すなわち、電極-微生物間で直接的な電子授受反応が進行していることがわかる。

本系においてリニアスイープボルタンメトリーを用いて検討したところ、代謝電流が+0.82 V から立ち上がることがわかった。この結果から、*A. ferrooxidans* は、 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  の酸化還元電位(0.68 V)よりさらに正の電位にある電子を利用可能であると言える。

### 3-2. 直接電子注入条件下における代謝過程の検討[4]

*A. ferrooxidans* は外膜から内膜にかけて二つに分岐する電子伝達経路と、二つのプロトンサーキットを持つ。*A. ferrooxidans* の電子伝達経路では、プロトン駆動力を利用した電子の還元力獲得のプロセスを備えている。この電子昇圧型のプロトンサーキットでは、プロトン駆動力を生み出す経路 (downhill electron transfer) と電子を昇圧する経路 (uphill electron transfer) の両方を利用し、 $\text{NAD}^+$  の還元を行っている。この系が成立するためには膜電位が-0.18 V から+0.18 V の間にある必要があり、実際には 70 mV 程度とされていることから[5]、本条件を満たしている。この電子の昇圧機構は光合成における光吸収に相当する重要なプロセスであるが、*in vivo* 環境でのその電子伝達反応を直接観測した報告はない。

前実験結果から、*A. ferrooxidans* が固体を電子源として利用可能であることが示されたが、uphill electron transfer を伴う昇圧型プロトンサーキットが機能しているかどうかについての知見はなかった。そこで、電子伝達タンパク質に対する阻害剤を利用し、微生物内部での電子昇圧経路について検討を行った。

【実験】阻害剤として Antimycin A、KCN、CO を電流生成中のリアクターに添加した。CO による阻害実験では、光照射を行うことで、代謝阻害が起こっているタンパク質を調べた。

【結果と考察】図3は uphill electron transfer における電子伝達酵素の一つである bc1 複合タンパク質の阻害剤 (Antimycin A) を加えた際の電流値の変化である。電流が部分的に抑制されている様子が見られる。これは uphill electron transfer に流れる電流が抑制されているためである。

一方、downhill electron transfer の阻害には電子伝達酵素の一つである aa3 複合タンパク質に阻害効果を及ぼすことが知られる KCN、CO を用いた。まず KCN を系中に添加することで、代謝電流の抑制が見られた。しかし、細胞の代謝系には複数のシトクロムが含まれており、どの部位に阻害効果が起こっているのか不明確である。そこで CO を阻害剤として用い、光照射によって代謝阻害の起こっているタンパク質を特定する実験を行った。CO を注入した系に対して光照射を行うと、還元電流の上昇、すなわち阻害効果の消失が見られた。また、照射光の波長をモノクロメーターで調節して光応答電流の測定を行うと図4に示すアクションスペクトルが得られた。アクションスペクトルは3つのピークをもち、それぞれ 430 nm, 545 nm, 595 nm である。この値は既報の CO 吸着 aa3 複合タンパク質の吸収スペクトルとよく一致した[6]。すなわち、CO を阻害剤として用いることで、プロトン駆動力の発生過程である aa3 複合タンパク質までの電子伝達反応が進行し、その活性を特異的かつ可逆的に光で制御出来たことを示している。

本実験結果より、微生物-固体間直接電子伝達条件下での細胞内電子伝達に関して、bc1 複合タンパク質を介した uphill electron transfer が駆動していること、および、aa3 複合タンパク質を介した downhill electron transfer が駆動していることを確認した。これは、電極から電子を引き抜いて代謝に利用する場合の細胞内の電子伝達が鉄イオン代

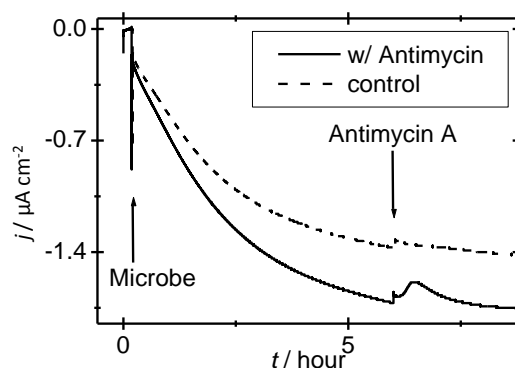


図3. Antimycin A による微生物代謝電流の阻害効果

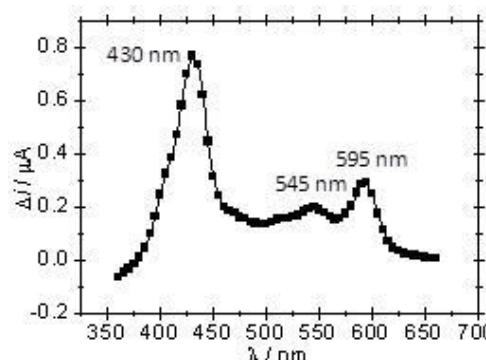


図4. CO 阻害条件下におけるアクションスペクトル

謝系と同一であることを示唆している。また、本実験条件で系中の菌体量の測定を行ったところ、時間経過とともに増殖していることが観測され、uphill electron transfer を通過した電子が CO<sub>2</sub>還元を利用されていることが分かった。

#### 4. 中性鉄酸化化学独立細菌への発展[7]

海底に存在する鉄酸化化学独立細菌は中性菌であり[8]、海底のモデルとしては中性菌が望ましい。また、中性条件下では酸性条件下よりも酸素の酸化還元電位が負にずれるため、より小さなエネルギーを利用した昇圧エネルギーデバイスが構築できる可能性がある。このような観点から中性菌を用いた電気化学的有機物生産の検討を行った。

【実験】 中性鉄酸化化学独立細菌のモデル微生物として *M. ferrooxydans* を用いた。人工海水に FeCl<sub>2</sub> を 2 mM 加えた溶液で前培養したものを用いた。

【結果と考察】 代謝電流の様子を図 5 に示した。微生物が存在する条件下では、存在しない条件と比較して大きな還元電流が観測された。更に、この条件下においてリニアスイープボルタンメトリーを行ったところ、本系での微生物への電子注入は

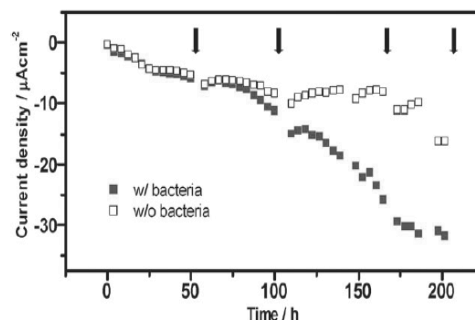


図 5. 中性鉄酸化菌からの代謝電流生成

0.63 V からおこることがわかった。酸性鉄酸化細菌による検討の時と同様に、微生物が利用している最小のエネルギーを見積もると、酸素の酸化還元電位との差である約 0.2 V がこの系によってエネルギー昇圧される最小のエネルギーということが出来る。

#### 5. 総括

本研究では極小エネルギーを利用した電気化学的 CO<sub>2</sub>還元系の構築を目指しモデル微生物を用いてその実証を試みた。その結果、酸性菌である *A. ferrooxidans* を用いて電氣的に CO<sub>2</sub>還元が可能であることを示し、更に固体材料を電子ドナーとして利用し、プロトン駆動力を介した昇圧電子伝達により CO<sub>2</sub>固定を行う能力を持つことを明らかにした。更に阻害剤を用いた実験より、CO<sub>2</sub>固定における昇圧回路では aa3 複合体および、bc1 複合体を介して、電子の昇圧を行っていることが明らかとなった。また、中性鉄酸化化学独立細菌 *M. ferrooxydans* を用いた検討を行い、この系では 0.2 V という極小の電圧から CO<sub>2</sub>還元が可能であることを示した。本研究によって示した固体から直接電子を引き抜き代謝する代謝系は生態系の理解や化学独立細菌の CO<sub>2</sub>還元を観測・制御する手法としての展開が期待できる。また、微小電圧による CO<sub>2</sub>還元は低バンドギャップ半導体を利用した光 CO<sub>2</sub>還元系の構築に発展させることができると考えられる。さらに、本実験で示した微生物のカソード型細胞外電子伝達は、海底において電気エネルギーを利用した生物が存在する可能性を示唆しており、生態系の維持における新たな可能性を示すものである。

#### 引用

- [1] T. Ishii, et al., *Electrochemistry*, **80**, 327 (2012) [2] S.B. Yunker, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1867 (1986) [3] N. Matsumoto, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 716 (1999) [4] T. Ishii, et al., *Frontiers in Microbiology*, **6**, 994 (2015) [5] S. J. Ferguson, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 1471 (2008) [6] S. Horie, et al., *J. Biochem.*, **93**, 997 (1983) [7] T. Mogi, et al., *Chem. Commun.*, **49**, 3967 (2013) [8] D. Emerson, et al., *PLoS ONE*, **8**, e667 (2007)