

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07820

研究課題名(和文) バイオマスから微生物発電における電子フローのメタゲノム解析

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of electron flow in microbial electricity generation from biomass

研究代表者

横山 浩 (Yokoyama, Hiroshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：40391370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物燃料電池(MFC)は、様々な有機性排水から直接発電できる新規リアクターである。しかし、発電のメカニズムは殆ど解明されていない。本研究はメタゲノム解析により電子フローを解析して、発電メカニズムを解明することが目的である。それぞれ異なる負極を持つ3台のMFCを培養した。比較として、開回路で培養したMFCも培養した。負極上に形成されたバイオフィルムの遺伝子配列をWGS法で決定して、メタゲノム解析を行った。その結果、シグナル伝達系遺伝子群が開回路サンプルで多く検出され、微生物発電において重要な役割がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microbial fuel cells (MFCs) are bioreactors that directly generate electricity from various organic wastewaters. The mechanism of electricity generation remains unknown. The aim of this study is to reveal the electron flow in the microbial electricity generation.

Three MFCs equipped with different anodes were operated under closed-circuit conditions. A MFC was operated under an open-circuit condition. The DNA-sequence data of the anodic biofilms was obtained with a whole-genome shotgun method. Genes involved in signal transduction were detected more frequently in the MFCs with the closed-circuit operation, rather than in the MFC with the open-circuit operation, suggesting that the genes were involved in the microbial electricity generation.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：発電細菌 バイオマス 水処理 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

MFC は、食品残渣や都市下水など様々なバイオマスから発電 (エネルギー回収) できる新しいバイリアクターであり、環境にやさしい技術として注目されている。MFC は微生物が嫌気性条件下 (無酸素) で有機物を分解する際に発生する余剰の還元力 (電子) を電極で回収して発電する。MFC は微生物が電子を渡す負極と H⁺透過膜、空気中の O₂ に電子を渡す正極から構成されるシンプルな装置である (図 1)。

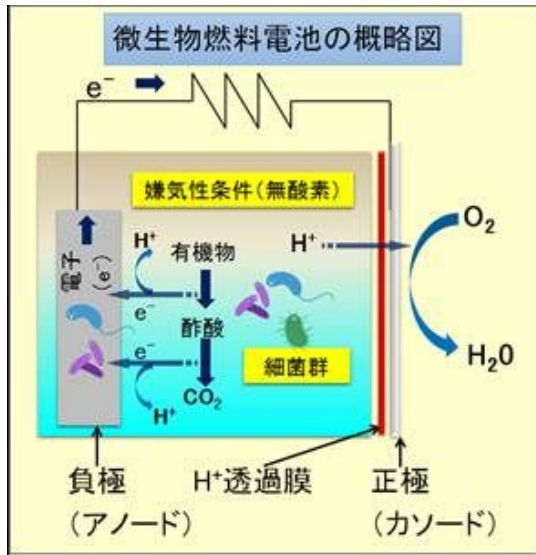


図 1 MFC の模式図

土壌や牛ルーメンなど様々な環境で微生物集団は共同で有機物を段階的 (連続的) に分解してエネルギーを獲得している。この分解は酸化還元反応であり、電子受容体が有機物から放出される電子を受け取る必要がある。嫌気性条件下では微生物は SO₄²⁻などを外部電子受容体として利用する (嫌気呼吸)。外部電子受容体が存在しない場合、有機物はメタン菌によって最終的にメタンと CO₂ に分解される (発酵的分解)。これらの多段階の分解反応で発生する電子は、電子そのものではなく様々な電子運搬キャリアーと結合して細菌外に排出され、細胞間で電子の授受が行われている (電子フロー)。MFC は、細胞膜上または細胞外に放出された電子キャリアーが電極と反応して電極に電子を伝達することで発電する。電極が最終的な電子受容体であるため「電極呼吸」と呼ぶことができる。電極と反応する物質 (発電中間体分子) として、細胞外膜に存在するシトクロム c や細胞膜上または細胞外に分泌されるリボフラビン類、さらに微生物がナノワイヤーと呼ばれる伝導性線毛を形成して電子伝達を行う経路が示唆されている。MFC の研究は細胞外にある不溶性の酸化鉄などを電子受容体として利用できる *Shewanella oneidensis* や *Geobacter sulfurreducens* などの金属還元細菌から始まった。当初、電極を酸化金属と勘違いして電子伝達をしているのではな

いかと推測された。しかし、その後の研究から金属還元細菌以外の多くの細菌種でも発電活性を示すことが判明している。従って、有機物の分解で生じる電子は、様々な経路 (電子フロー) で MFC の負極に伝達されていると推測されている。しかし、その大部分は未知であり、発電メカニズムを解明するためには全ての経路を特定する必要がある。電子フローの特定は電池出力の改良において極めて重要なデータである。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析は、環境中に存在する全遺伝子を網羅的に解析する強力な手法である。複合微生物系の MFC では、多くの細菌が培養できない細菌種であるため、培養によらないメタゲノム解析は非常に有効である。本研究の目的は複合微生物系 MFC における電子フロー (有機物の酸化で生じる電子が電極へと流れる経路) を比較メタゲノミクスにより解明することである。電極上に生育する細菌叢の DNA 配列を次世代シーケンサーにより網羅的に取得する。発電していない別の細菌叢メタゲノムデータと比較して MFC 菌叢に高頻度で出現する遺伝子 (発電遺伝子) を特定し、電子フローを推定する。

3. 研究の方法

本研究では 2 つの実験系で解析を行った。第 1 の実験系では、電極を電子受容体、活性汚泥を種汚泥 (種菌)、そして酢酸を唯一の炭素・エネルギー源とした培地で 3 台の MFC を培養した。培地に酵母抽出液など他のエネルギー源や SO₄²⁻など電極以外の外部電子受容体を一切加えなかった。酢酸の発酵的分解を防ぐために、メタン生成阻害剤も培地に加えた。この条件で MFC 培養した場合、電極しか電子受容体が存在しないために電極を最終的な電子受容体として利用する経路 (発電、つまり電極呼吸) でしか微生物は酢酸を分解することができない。比較として、MFC 培養とは別に試験管で酸化鉄または SO₄²⁻を電子受容体として利用する嫌気培養も行った。集積培養の後、それぞれの培養系に含まれるゲノム DNA 配列を抽出した。そのゲノム DNA から 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を PCR で増幅して、次世代シーケンサー (イルミナの Miseq) で解読して DNA 配列を決定した。QIIME で DNA 配列を解析した。

第 2 の実験系では、負電極としてカーボックロス (CCA)、炎酸化ステンレス鋼 (FO-SSA)、またはモリブデン (MoA) を持つ MFC をそれぞれ培養して、酢酸と酵母エキスを含む培地で集積培養を行った。比較として、外部抵抗に接続せず開回路状態の MFC も培養した。その後、負極上に形成されたバイオフィルムのゲノム DNA を回収した。その DNA を使って HiSeq 2500 (Illumina) を用いた Whole-genome Shotgun 法で細菌群の遺伝子配

列を取得した。リードデータを FastQC で quality check を行い、MEGAN6 などの解析ソフトを利用してメタゲノム解析を行った。

4. 研究成果

第 1 の実験系において MFC では *Geobacter* 属細菌が高度に優先化 (46%) していることが判明した (図 2)。一方、酸化鉄を電子受容体として培養した系 (FRC) では、*Pseudomonas* 属細菌が高頻度に検出された。SO₄²⁻を電子受容体として培養した系 (SRC) では、Deltaproteobacteria (38%), Bacteroidia (31%), Gammaproteobacteria (23%) に属する細菌種が多く検出された。

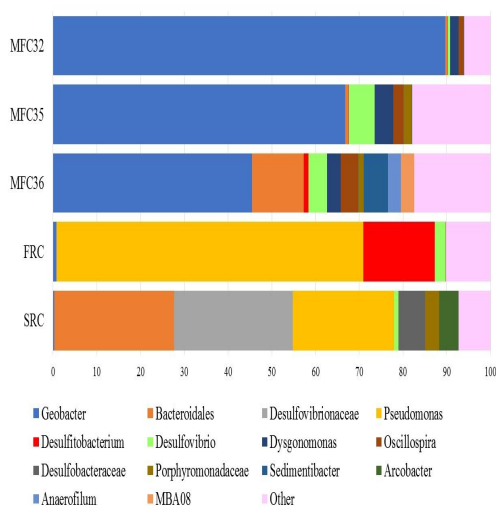


図 2 MFC 負極上バイオフィームと酸化鉄 (FRC) または硫酸イオン (SRC) で集積培養された菌叢の属レベルの解析結果

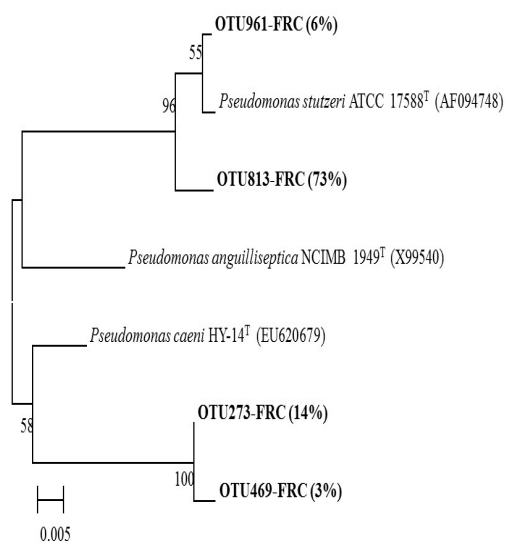


図 3 検出された *Pseudomonas* 属細菌の 16SrRNA 遺伝子配列に基づく系統樹

酸化鉄還元細菌は酸化鉄が存在しない環境

では、酸化鉄の代わりに MFC の電極を電子受容体として利用すると考えられている。従って、MFC 系と酸化鉄の系で集積される細菌群の構造は類似していると推測された。実際、多くの MFC で酸化鉄還元細菌であり、かつ発電活性を持つ *Geobacter* 属細菌が優先化することが知られている。しかし、今回の結果から *Geobacter* 属細菌は MFC の環境では非常に優先的に増殖するが、酸化鉄を電子受容体として用いた場合、必ずしも優先化する訳ではないことを示している。

第 2 の実験系では、1 サンプルあたり 83 ~ 120 x 10⁶ のリードを得た。全ゲノム遺伝子を使用した菌叢解析では、閉回路で運転した MFC では *Geobacter* 属細菌が高度に優先化していることが分かった。開回路では、多様な細菌種が含まれていた。機能遺伝子カテゴリに着目したメタゲノム解析では、サンプル間に大きな違いは見られなかったが、シグナル伝達系遺伝子群が閉回路サンプルで多く検出される傾向が観察された。この結果から、シグナル伝達系遺伝子群に分類されている遺伝子の中に微生物発電に何らかの重要な役割を果たしている遺伝子が含まれている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

- 1) Yamashita T, Yokoyama H., Molybdenum anode: a novel electrode for enhanced power generation in microbial fuel cells, identified via extensive screening of metal electrodes, *Biotechnol Biofuels*. 2018 Feb 13;11:39. doi: 10.1186/s13068-018-1046-7. eCollection 2018. 査読有り
- 2) Eyiuche NJ, Asakawa S, Yamashita T, Ikeguchi A, Kitamura Y, Yokoyama H., Community analysis of biofilms on flame-oxidized stainless steel anodes in microbial fuel cells fed with different substrates, *BMC Microbiol*. 2017 Jun 29;17(1):145. doi: 10.1186/s12866-017-1053-z. 査読有り
- 3) Yokoyama H., Ishida M, Yamashita T., Comparison of Anodic Community in Microbial Fuel Cells with Iron Oxide-Reducing Community, *J Microbiol Biotechnol*. 2016 Apr 28;26(4):757-62. doi: 10.4014/jmb.1510.10037. 査読有り

4) Yamashita T, Ookawa N, Ishida M, Kanamori H, Sasaki H, Katayose Y, **Yokoyama H.**, A novel open-type biosensor for the in-situ monitoring of biochemical oxygen demand in an aerobic environment, Sci Rep. 2016 Dec 5;6:38552. doi: 10.1038/srep38552. 査読有り

5) Yamashita T, Ishida M, Ogino A, **Yokoyama H.**, Evaluation of organic matter removal and electricity generation by using integrated microbial fuel cells for wastewater treatment, Environ Technol. 2016;37(2):228-36. doi: 10.1080/09593330.2015.1066874. Epub 2015 Jul 24. 査読有り

横山 浩 (YOKOYAMA, Hiroshi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・畜産研究部門畜産環境研究領
域・上級研究員
研究者番号：40391370

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()

〔学会発表〕(計 1件)

Hiroshi Yokoyama, Takahiro Yamashita, Mitsuyoshi Ishida, Community structure analysis of anodic biofilm in microbial fuel cells fed with four kinds of substrates, 5th Asian Federation of Societies for Lactic Acid Bacteria International Symposium, Nov. 2016, Taipei, Taiwan

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者