

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07492

研究課題名(和文) 海洋性電極代謝微生物群の取得とそのシングルセル機能解析

研究課題名(英文) Enrichment of electrode-respiring microorganisms derived from marine environments and their functional analyses

研究代表者

鹿島 裕之 (KASHIMA, Hiroyuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・ポストドクトラル研究員

研究者番号：70780914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞外電子伝達によって電極から電子を取込むことで独立栄養的に生命活動を営む能力を有する電気合成微生物を探索し、その機能を理解することを目的とした。探索対象とした海底熱水域由来の環境試料から、電極を唯一の電子源として与えた電気化学リアクタ培養で当該微生物の集積を行うとともに、電極上微生物細胞集団の電子授受機能評価実験を行った。集積培養実験では電気合成微生物群の有意な集積には至らなかったが、細胞代謝活性染色を利用した新たな細胞集団機能評価手法を用いて、深海熱水域由来の微生物単離株において、細胞外からの電子の取込み反応による電気栄養的代謝活動の兆候を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study intended to survey novel electrosynthetic microorganisms that extracellularly uptake electrons from poised electrodes in bioelectrochemical systems (BESs), and to understand their cellular functions. Cathodic BES reactor operations targeted to obtain novel electrosynthetic microbial communities with inoculums derived from marine hydrothermal environments did not result in solid enrichment of microorganisms capable of cathodic electron uptake due to low biomass growth. On the other hand, this study developed a method incorporating microscopic cellular metabolic activity imaging techniques to examine cells colonized on electrodes. As a result of screening tests examined metal reducing/oxidizing bacterial isolates with the developed method, electrotrophic activity was revealed in an iron-oxidizing isolate derived from a deep-sea hydrothermal field.

研究分野：工学(生物機能・バイオプロセス)

キーワード：微生物電気化学 細胞外電子伝達 電極呼吸 鉄酸化細菌

### 1. 研究開始当初の背景

微生物は環境に応じて多様な代謝機構を進化させてきたが、その一部は細胞外電子伝達を行い、鉱物等の細胞外にある固体物質を呼吸基質としてエネルギーを獲得することができる。そしてこの代謝機構を介し微生物と人工的な電極との間に電子授受反応が見出されて以来、これら細胞外電子伝達を行う微生物を生体電気化学触媒とした微生物電気化学プロセスの研究開発が行われている。

その中でも、電極から電子(還元力)を取込み独立栄養的に生命活動を営む微生物電気合成反応は、二酸化炭素を固定しつつ電気エネルギーを有用化合物に変換する新たな微生物電気化学プロセスの創出につながるものとして注目されている。また、これは電気エネルギーに支えられた生命活動であることから、電気合成は光合成・化学合成に続く第3の生命エネルギー獲得様式であると位置付けられ、学術的な関心も集めている。

しかしながら、電気合成反応とそれを担う微生物に関する知見は非常に限定的である。まず、固体電極から直接的に取り込んだ電子を唯一のエネルギー源としたバイオマス増殖の報告は鉄酸化単離株による数例のみで、それも僅かな増殖が認められたにすぎない(なお、電極からの電気エネルギー供給でメタン生成を行う電氣的メタン生成(Electromethanogenesis)の一連の報告ではバイオマス合成が確認されているが、これらは電極表面で電気化学的に作られた水素を電子供与体とした、言わば間接的に電気エネルギーを利用したバイオマス合成であるという説に立ち、これらを議論から除外する)。また、バイオマス合成は確認できないが細胞外電極からの電子取込みで得たエネルギーで細胞代謝を行うことができる電気栄養微生物が報告され、これらも生体電気化学触媒としての利用が期待されている。しかし、これらの報告のほとんどは既知の化学合成細菌株・金属酸化細菌の通性電気栄養代謝能力の証明であり、上述した電氣的メタン生成の報告を除き、自然環境または複合微生物系から電気栄養微生物反応が見出された例はほとんどない。これは、細胞外からの電子取込み反応の逆反応である細胞外固体物質への電子排出反応に関して、電極を電子受容体とした集積培養で環境中から様々な微生物が発見され、利用可能な微生物資源と関連反応に関する知見を蓄積してきたことと対照的である。このように、これまでもっぱら限られた単離株を対象として電気合成・電気栄養微生物代謝能の探索が行われてきたことは、当該反応とそれを担う微生物に関する知見が限定的であることの主要因のひとつであると推測された。

一方、近年の自然環境の電気化学調査から、深海熱水噴出孔周辺では、導電性の硫化鉱物を介した海底下の還元的な熱水から酸化的な海水に向かう電子の流れが発生している

こと、そして電気栄養的な生命活動が存在しうる条件が整っていることが明らかになった(Nakamura et al., 2010, Yamamoto et al., 2013 Angew. Chem. Int. Ed. など)。このことは、酸化的海水環境と還元的海底下環境との間に電子移動の駆動力となる酸化還元電位勾配が安定的に存在する海底面の近傍環境、特に電流としての電子移動を担保する導電性鉱物・硫化物に富む海底熱水活動域の海底面近傍環境では、電気栄養的な未知の生命活動が育まれている可能性があることを示唆していた。

### 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて代表者は、電気栄養・電気合成反応とそれを担う微生物に関する新たな知見を得ることは、微生物電気化学プロセスの発展という応用的関心と、生命の未知のエネルギー獲得様式に関する学術的興味にこたえる意義があると考えた。そしてそのために、未知の電気栄養・電気合成微生物活動の潜在が予想される海底熱水活動域環境において電気栄養・電気合成微生物を探索し、それらの代謝反応、特に細胞外からの電子取込み反応について理解することが重要であると考えに至った。

また、電気栄養反応・電気合成反応の報告では、電気化学データで電子授受反応を捉え、代謝に関わる反応物・生成物の物質収支から対象微生物反応が起こったことを結論づけたものが見られるが、これらの結果は解釈が難しい場合があり、十分な証拠を挙げられていないと思われる例も見られた。その一方でより厳密な証明・解析で報告のあるオミクス解析や遺伝子破壊株検討には大きなコストがかかるため、これらの間を取り持つような新たな方法論を生み出すことで、当該研究の進展が見込まれると考えた。

そこで本研究では、集積培養により海底熱水活動域環境由来の新規電気合成微生物を探索すること、また電気栄養・電気合成代謝反応を検出・解析する新たな方法を開発すること、そして、開発した評価法を微生物単離株に適用することで、これら単離株として利用可能な微生物資源からも新たな電気栄養微生物を探索し、その代謝反応に関する知見を蓄積することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 電気化学リアクタ培養法による電極代謝微生物群の集積

自然環境中に潜在する電気合成微生物群を取得するため、還元的電位に印加したカソード電極を唯一の電子源とした独立栄養培養条件のもとで電気化学リアクタを用いた数週間~2ヶ月間の集積培養実験を行った。播種源として、電気合成微生物活動を支え得る物理・化学条件を備えていると考えられた深海・浅海熱水活動域の岩石・堆積物を選定して複数の実験で供試した。電子受容体として

は溶存酸素と硝酸をそれぞれ供試した。集積培養期間を通して、電子取り込み反応速度の指標であるカソード電流をモニタリングし、定期的な基質・反応生成物の定量で集積培養状態を評価した。また代表的なリアクタでは16S rRNA 遺伝子解析で構成微生物の系統情報を得た。

(2) 代謝活性染色法を用いた電極上微生物細胞群の新規機能評価法による電気栄養生命活動の検出

まず、単離培養株などの微生物細胞集団、または集積培養産物などの複合微生物群集における電気栄養(または電気合成)微生物反応の証明・検出を行うために、新たな手法を開発した。具体的には、シングルセルレベルで細胞の代謝活性状態を可視化する代謝活性染色技術に注目し、これと電気化学リアクタ培養法とを組み合わせ、電極表面で電極との電子授受反応を行っている微生物細胞集団の代謝活性を評価する方法を開発した。

次に、当法を用いて複数の微生物単離株の電気栄養代謝能・電気合成代謝能を検証した。既往研究では細胞外からの電子取込みが報告されている多くの細菌が金属酸化・金属還元を行う能力を有していたことから、同様の代謝能が確認されている複数の単離株を選択し、検討を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 電気化学リアクタ培養法による電極代謝微生物群の集積

深海熱水域由来の硫化鉱物と鉄水酸化物に富む微生物マット堆積物を播種源としたリアクタ培養系で、安定的なカソード電流と電子受容体の減少、電極表面への微生物細胞集団の活着・集積を確認した。非電位印加対照、および非植菌対象との比較から、電極表面には電気合成(または電気栄養)微生物を含む微生物群集が集積したものと考えたが、集積微生物の系統解析と更なる集積培養実験の結果から、電極表面への細胞群集積のほとんどは播種源に含まれる僅かな化学エネルギーに依存した微生物活動に由来するもので、電気合成・電気栄養微生物の有意な増殖・集積は確認することができなかった。ただし、試行錯誤の検討を行った中から、電位印加に伴う電極表面への培養液成分の不都合な析出反応が起こる条件など、電気化学リアクタ培養系の改良につながると期待される知見を得ることができた。

(2) 代謝活性染色法を用いた電極上微生物細胞群の機能評価による電気栄養生命活動の検出

細胞外からの電子取込みにより駆動される細胞代謝活動(電気栄養生命活動)をシングルセルレベルで検出・解析するために、電極を唯一の電子源として与えるカソード電

極培養と、細胞代謝活性染色とを組み合わせた電気化学代謝活性評価法を開発した。具体的には、透明導電膜付ガラスを作用極、銀塩化銀電極を参照極、プラチナ線を対極として作成した電気化学セルに検討対象の微生物細胞集団を植菌し、ポテンシostatを用いて作用極に任意の電位を印加し電流をモニタリングすることで、特定の電極電位/溶液環境における細胞集団と作用極との電子授受反応を捉えた。そして同時に電位印加条件下で細胞代謝活性染色反応を行い、一定時間経過後に作用極表面を顕微鏡観察することで、電極表面に活着した細胞集団の代謝活性を解析した。以上を非電位印加・非電子受容体添加などの条件下での対照実験と合わせて行うことで、電極からの電子取込み反応と細胞代謝活性状態の関係をシングルセルレベルで捉える評価法を開発した。

そして、当評価法を用いて電極からの電子取込み能を有する可能性があるかと判断した複数の金属酸化・金属還元細菌単離株について検討したところ、深海熱水活動域から単離された独立栄養性鉄酸化細菌株において電気栄養生命活動の兆候を捉えることに成功した。具体的には、当該株の検討では、水酸化鉄(III)を生じる二価鉄イオン酸化反応に準じた電位を印加した系において、安定したカソード電流(すなわち還元的電極から引き抜かれる電子のフラックス)が検出され、顕微鏡観察から細胞集団の電極表面への活着が確認された。さらに、定電位印加条件下で電極からの電子供給を続けた細胞集団と、電子供給を停止し電子飢餓状態を再現した細胞集団との間の代謝活性染色実験結果の比較から、電極表面の細胞集団は電極からの電子供給により代謝活性を維持していたことが示唆された。

当該株と近縁な鉄酸化細菌は、二価鉄イオンを外膜表面で酸化し、得られた電子を細胞内の呼吸鎖に引き入れると報告されているが、これは細胞外の還元力を電子の形で細胞内に移動させる点において、電気栄養的代謝に必要な細胞外からの電子取り込み反応と同様だと考えられる。よって今回確認された電極からの電子取込み反応は同様の鉄酸化機構によって行われた可能性があると考えられた。現在未解明である当該株の鉄酸化反応分子機構についての理解を深めることは、当該株の電気栄養代謝に関する分子機構解明に向けて重要であると考え、今後これらの検討を行う予定である。

(3) 成果の総括

電気化学リアクタ培養法による環境試料を播種源とした電気合成微生物の集積培養は、ほとんど前例のない挑戦的な試みであったが、当該培養系での微生物増殖が想定より悪く、課題期間内で電気合成反応によるものと見なせる微生物群の有意な増殖・集積は確認できなかった。しかしながら、当該集積培

養系の改善に繋がる知見を得ることができた。これを基に集積培養系を改良しながら検討を継続することで、電気合成微生物群の集積に至ると期待できる。

また、新たに開発した電極上微生物細胞群の機能評価法を用い、深海熱水域由来の鉄酸化細菌単離株において、細胞外からの電子の取込み反応による電気栄養的代謝活動の兆候を捉えることに成功した。これは、現在非常に数少ない電気栄養代謝微生物資源に新たな一つを加えるという意義をもち、単離微生物資源の中から新規電気栄養代謝を見出すという研究目的を達成する成果であったと考える。今後は当該株の電気栄養代謝に関する分子機構の解明を行うとともに、電極から取り込む電子を唯一のエネルギー源としたバイオマス増殖能力を検証することが期待される。

そして、本研究で開発した電気化学代謝活性評価法は、電極表面の微生物細胞集団の電気栄養生命活動をシングルセルレベルで検出・解析するため新たな方法論として、今後の電気栄養・電気合成微生物の探索に活用されることが期待される。当法は、比較的簡便に細胞集団の電極との電子授受反応と細胞状態の情報をもたらすため、単離微生物株を対象とした電気栄養代謝能判定や、関連する仮説検証型検討の方法として有用である。また、複合微生物試料においても電気栄養代謝シグナルの違いを細胞毎に判定できることから、自然環境からの電気合成・電気栄養微生物の探索、特に増殖の遅いものの検出・選抜に活用できる可能性がある。今後これらの技術展開について検討を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

鹿島裕之. 環境中の電子移動と微生物, 生物工学会誌, 95 (2017): 739. 査読無  
[https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9512/9512\\_biomed\\_1.pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9512/9512_biomed_1.pdf)

Zhang, Liang, Xun Zhu, Jun Li, Hiroyuki Kashima, Qiang Liao, and John M. Regan. Step-feed strategy enhances performance of unbuffered air-cathode microbial fuel cells. RSC Advances, 7.54 (2017): 33961-33966. 査読有  
DOI: 10.1039/C7RA03769D

Ou, Shiqi, Hiroyuki Kashima, Douglas S. Aaron, John M. Regan, and Matthew M. Mench. Full cell simulation and the evaluation of the buffer system on air-cathode microbial fuel cell. Journal of Power Sources, 347 (2017): 159-169. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jpowsour.2017.02.031

〔学会発表〕(計4件)

設樂真莉子, 山本正浩, 谷崎明子, 鹿島裕之, 布浦拓郎, 高井研. 電気培養を用いての深海熱水噴出域からの電気利用微生物の探索. ブルーアースサイエンス・テク 2018, 2018年1月16日

Hiroyuki Kashima, Hiroko Makita, Masahiro Yamamoto, and Ken Takai. Electrotrophic activities of iron-oxidizers derived from marine hydrothermal environments. 6th General Meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology 2017 (ISMET6), 2017年10月4日

鹿島裕之, 牧田寛子, 山本正浩, 高井研. 電極を電子源とした鉄酸化細菌の培養に見る電気栄養的微生物活動の兆候. 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017年8月29日

Hiroyuki Kashima and John M. Regan. Shift between extracellular electron discharge and uptake by electrode-associated *Geobacter metallireducens* biofilms. 日本微生物生態学会第31回大会, 2016年10月23日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鹿島 裕之 (KASHIMA, Hiroyuki)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・ポストドクトラル研究員  
研究者番号: 70780914