

平成30年6月11日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14895

研究課題名(和文) 金属鉄を唯一のエネルギー源として生育する鉄腐食・酢酸生成菌の代謝機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism of iron corroding acetogens that grow on metallic iron as the sole energy source

研究代表者

加藤 創一郎 (Kato, Souichiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30597787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では金属鉄を唯一のエネルギー源として二酸化炭素から酢酸を生成し生育する鉄腐食・酢酸生成菌のエネルギー代謝の分子機構解明を目的とした。鉄腐食・酢酸生成菌 *Sporomusa* sp. GT1株および近縁の酢酸生成菌の鉄腐食能を比較した結果、*Sporomusa*属の数株は鉄腐食能を示したものの、それ以外の酢酸生成菌は明確な鉄腐食活性を示さなかった。複数種の酢酸生成菌のドラフトゲノムを決定し比較ゲノム解析を行った結果、鉄腐食能を有する *Sporomusa*属細菌のゲノムからはマルチヘム型のc型シトクロムが検出されず、既知のグラム陰性細菌とは異なる細胞外電子伝達機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of energy metabolism of iron corroding acetogens that produces acetate from carbon dioxide using metallic iron as the sole energy source. We investigated iron corrosion activities of an iron corroding acetogen (*Sporomusa* sp. GT1) and related acetogens, and found that only some *Sporomusa* strains had iron corroding activities and the other acetogens not. Then we conducted comparative genomic analysis on the acetogenic strains. The *Sporomusa* strains that showed iron corroding activities did not encode the genes for multiheme c-type cytochromes, indicating that they have a different extracellular electron transfer mechanism than known Gram-negative bacteria.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微生物 鉄腐食 酢酸生成菌 ゲノム解析 シトクロム 細胞外電子伝達

1. 研究開始当初の背景

鉄構造物の腐食において、全体の1~2割、特に無酸素環境下ではそのほとんどに微生物が関与していると思われていた。鉄の腐食は表面に電位差が生じ、負電位箇所での鉄酸化反応($Fe^0 \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$)と正電位箇所での還元反応(有酸素環境では酸素還元、無酸素環境では水素発生)が共役することで進行する(図1A, B)。鉄表面での水素発生は非常に遅い反応であるため、理論上は無酸素条件下での腐食はほとんど進行しえない。しかし地下パイプライン等、無酸素環境下での深刻な鉄腐食は古くからたびたび報告されている。多くの場合その腐食部には微生物バイオフィームが検出されており、ある種の微生物の代謝活動が無酸素環境下での鉄腐食を促進していることが予想されていた。近年になり、金属鉄中の自由電子をエネルギー源として利用可能な一部の硫酸還元菌、メタン生成菌が鉄腐食を促進することが報告された。我々のグループでは金属鉄を唯一のエネルギー源として生育可能な新規酢酸生成菌 *Sporomusa* sp. GT1 株の単離に成功し、酢酸生成が硫酸還元・メタン生成に続く第3の腐食促進微生物代謝であることを発見した(図1C)。しかし鉄腐食促進微生物が、固体である金属鉄といかにして電子の授受をおこなっているのか、その分子メカニズムは不明であった。

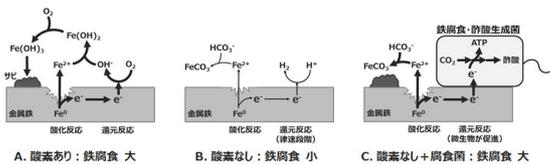


図1. 無機な鉄腐食のメカニズム(A: 有酸素条件、B: 無酸素条件)と微生物による無酸素条件下での腐食促進メカニズム(C)。

近年、固体である鉄鉱物や人工的な電極を呼吸の電子受容体・供与体として利用可能なすなわち細胞外電子伝達能を持つ微生物の研究が活発化している。その分子メカニズムについては、鉄還元能を有する(固体に電子を渡す) *Geobacter* 属や *Shewanella* 属細菌、好酸性で鉄酸化能を有する(固体から電子を受け取る) *Acidithiobacillus* 属細菌で詳細に研究されてきた。これらの微生物では、細胞の内部~表層に存在する複数種の酸化還元タンパク(主に c 型シトクロム)がバケツリレーのように電子を運搬することで細胞外電子伝達を可能にしている。これらのモデル微生物はすべて Proteobacteria 門に属するグラム陰性細菌である。一方で近年、グラム陽性細菌やアーキアなど、細胞表面構造が大きく異なる幅広い系統群の微生物が細胞外電子伝達能を持つことがわかってきた。本研究で対象とする *Sporomusa* 属は Firmicutes 門に属するグラム陽性細菌であり、その細胞

外電子伝達機構の解明は Proteobacteria のモデル微生物以外では初の快挙であり、細胞外電子伝達の系統学的な差異、あるいはその進化を理解するうえで非常に大きな意義を持つ。

2. 研究の目的

本研究では申請者らが単離した鉄腐食・酢酸生成細菌 *Sporomusa* sp. GT1 株を主な対象とし、各種培養実験や近縁種との比較ゲノム解析などを行うことで、金属鉄との電子授受に基づくエネルギー代謝の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多様な環境からの鉄腐食酢酸生成菌の集積・分離培養

物理化学的環境が異なるサンプルとして、低 pH 環境である美唄湿原土壌、高温環境である堆肥サンプルや地下油田構造水サンプル、高塩濃度環境である炭鉱地下水、などを微生物源として採取した。これらのサンプルを植種源とし、固体金属鉄物のモデルである金属鉄を唯一のエネルギー源として生育する酢酸生成微生物の集積培養を試みた。無酸素条件下、無機淡水培地をベースとし、pH や培養温度は採取サンプルの現場環境に準拠した。培養過程で酢酸生成を HPLC によりモニターし、酢酸生成がみられた集積培養系については適宜継代培養をおこなうことで酢酸生成微生物を集積した。数回の継代培養により十分に目的の微生物を集積したのち、微生物群集構造解析に供した。

集積した微生物群集から DNA を抽出し、バクテリア・アーキアの 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマーによる PCR 増幅、クローンライブラリの作成、塩基配列決定をおこない、各培養条件で優占した微生物種の系統学的位置を特定した。

優占種として同定された酢酸生成微生物をターゲットとし、その純粋分離を試みた。鉄鉱物を唯一のエネルギー源とした条件下でのコロニー生成は不可能であるため、酢酸生成微生物が好んで利用する一般的なエネルギー源(水素、ギ酸、メタノール、イーストエキストラクトなど)を使用し、無酸素条件下、固体培地上で酢酸生成微生物のコロニー形成を試み、その作業を繰り返すことで対象の微生物種を純化した。

(2) 多様な酢酸生成菌の細胞外電子伝達能

鉄腐食酢酸生成細菌 *Sporomusa* sp. GT1 株と、その近縁種である *Sporomusa sphaeroides*、*Sporomusa ovata*、*Acetobacterium woodii* の鉄腐食能および酸化鉄還元能を比較した。鉄腐食能は金属鉄を唯一のエネルギー源として添加した無機培地中における酢酸生成量で比較した。また同様の無機培地に水素(1.6 atm)を唯一の電子供与体として添加し、電子受容体となる非

結晶性酸化鉄（フェリハイドライト）を鉄原子として 20 mM 相当添加し、鉄還元能を比較した。培養過程の培養液の 2 価鉄量をフェロジン法により定量し、鉄還元速度を算出した。

(3) 鉄腐食・非腐食酢酸生成菌の比較ゲノム解析

鉄腐食・酢酸生成菌 *Sporomusa* sp. GT1 株と近縁種 *Sporomusa sphaeroides* のドラフトゲノム解析を行った。フェノールクロロホルム法によりゲノム DNA を抽出し、Illumina shotgun paired-end (2 × 101 bp) sequence libraries の作成に供し、Illumina HiSeq 2500 platform により塩基配列解析を行った。得られた配列をもとに SPAdes v3.10.1 によりアセンブルし、Prokka v1.12 によりコンティグを作製した。2 株のドラフトゲノムデータ、およびデータベース上の他の酢酸生成菌のゲノムデータを使用し、比較ゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 多様な環境からの鉄腐食酢酸生成菌の集積・分離培養

研究開始時点で分離されていた鉄腐食酢酸生成菌は、水田土由来の *Sporomusa* sp. GT1 株のみであった。鉄腐食酢酸生成の分子機構解明のためには、系統の異なる鉄腐食酢酸菌の新たな分離が必要であった。そこで様々な環境サンプルを微生物源とし、鉄腐食酢酸生成菌の集積・分離培養を試みた。

炭鉱地下水（中温、中性、高塩濃度）、湿原土壌（中温、酸性、低塩濃度）、地下油田構造水（高温、中性、高塩濃度）といった、温度、pH、塩濃度が異なる環境サンプルを微生物源として集積培養を行った。その結果、メタン生成菌の生育を抑制する 2-bromoethanesulfonate (BES) を系に添加することで、化学的な水素生成速度よりも有意に早く酢酸を生成する培養系をすべての系で得ることができた（図 2）。

16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析の結果、炭鉱地下水集積系では *Acetobacterium submarinus* (相同性 99%)、湿原土壌集積系では *Clostridium magnum* (相同性 98%) と *Desulfovibrio arcticus* (相同性 99%)、地下油田構造水集積系では *Moorella stamsii* (相同性 96%) に近縁な微生物種が優占しており、これらの微生物が鉄腐食酢酸生成に寄与していることが示唆された（図 3）。それぞれの集積系を対象とし酢酸生成菌の分離培養を試みた結果、地下油田構造水集積系で優占していた *Moorella stamsii* に近縁な微生物の分離培養に成功した。この分離株の鉄腐食能を確認した結果、集積系と比較すると活性は弱いものの、鉄腐食酢酸生成活性を有していることが明らかにされた。これは好熱性の鉄腐食酢酸生成細菌を分離に成功した世界で初めての事例である（投稿

論文準備中）

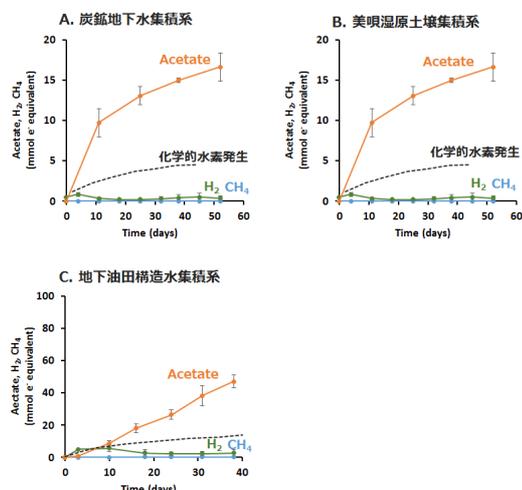


図 2. 炭鉱地下水 (A)、湿原土壌 (B)、地下油田構造水 (C) を微生物源とした鉄利用酢酸生成細菌の集積培養結果。破線は微生物源無添加時の水素発生量から算出した非生物学的な水素発生速度。

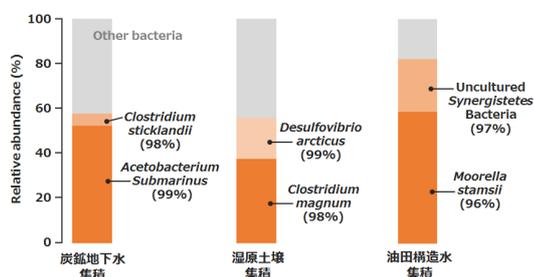


図 3. 炭鉱地下水、湿原土壌、地下油田構造水由来の集積培養物の微生物群集構造解析結果。いずれかの系で優占している酢酸生成菌（オレンジ）のみを示し、それらの最近縁種（相同性、%）を付記した。

(2) 多様な酢酸生成菌の細胞外電子伝達能

鉄腐食酢酸生成能を有する分離株 *Sporomusa* sp. GT1 株と、近縁の酢酸生成菌 4 株 (*Sporomusa sphaeroides*, *Sporomusa ovata*, *Acetobacterium woodii*, *Acetobacterium carbinolicum*) について、その鉄腐食能および酸化鉄還元能を調べ、各微生物の細胞外電子伝達能を評価した。

金属鉄を唯一の電子供与体とした条件下で酢酸生成能を比較した結果、旺盛な酢酸生成能を示したのは *Sporomusa* sp. GT1 株と *Sporomusa sphaeroides* のみであり、そのほかの 3 株の培養系では化学的な水素発生量とほぼ変わらない量の酢酸生成しか検出されなかった（図 4）。この結果から、系統的に近縁な酢酸生成菌であっても、鉄腐食能、ひいては細胞外電子伝達能には大きな違いがあることが示唆された。

さらに鉄腐食反応とは電子授受の向きが逆となる酸化鉄還元活性を比較し、細胞外電

子伝達能の有無を評価した。その結果、3種の *Sporomusa* 属細菌は比較的高い鉄還元能を示したものの、*Acetobacterium* 属細菌ではほとんど鉄還元活性がみられなかった(表1)。この結果から、鉄還元活性と鉄腐食活性には完全ではないがある程度の相関があり、どちらも細胞外電子伝達能の有無に関連していることが示唆された。

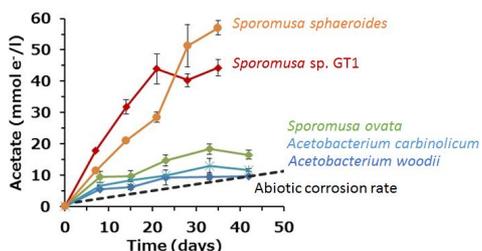


図4. 5種の酢酸生成菌の鉄腐食活性。金属鉄を唯一の電子供与体として添加した無機培地中での酢酸生成量を示している。

表1. 4種の酢酸生成菌の酸化鉄還元活性の比較。

Acetogens	Rates of Fe(III) reduction ($\mu\text{mol Fe(II) day}^{-1}$) [†]
<i>Sporomusa</i> sp. GT1	93
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	87
<i>Sporomusa ovata</i>	75
<i>Acetobacterium woodii</i>	21

(3) 鉄腐食・非腐食酢酸生成菌の比較ゲノム解析

酢酸生成菌による鉄腐食・鉄還元機構が、既知の鉄還元モデル菌のそれと同じなのかを調べるため、鉄腐食・鉄還元能を示した *Sporomusa* sp. GT1 株、*Sporomusa sphaeroides* のドラフトゲノム配列を決定し、データベース上の複数種の酢酸生成菌のゲノムも含めた比較ゲノム解析を行った。各酢酸生成菌のゲノムを対象として、直接的な細胞外電子伝達に重要であると考えられているマルチヘム型の *c*-type cytochrome の遺伝子の存在をヘム結合モチーフ (CXXCH) をクエリー配列として検索した。本研究で鉄還元能が示された3種の *Sporomusa* ゲノム中には、ヘム結合モチーフが二つ以上あるタンパク質、例えば *c*-type cytochrome がいくつか検出されたが、既存のモデル鉄還元菌がもつような decaheme 型の *c*-type cytochrome は検出されなかった。以上から、酢酸生成菌における鉄還元では、マルチヘム型の *c*-type cytochrome 非依存的な機構がはたらいっている可能性が示唆された(投稿論文準備中)。

先行研究によると、固体状酸化鉄還元能をもつ Firmicutes 門に属するグラム陽性細菌である *Clostridium* sp. FGH 株は、他の多くの *Clostridium* 属細菌と同様に *c*-type cytochrome をもたない(あるいはもっていても多くて二つである)ことが示されている。よって、マルチヘム型非依存的な直接的な鉄

還元と同じ Firmicutes 門に属する *Sporomusa* 属細菌にも存在する可能性がある。Firmicutes 門の中では、Clostridia 綱に属する *Thermincola potens* や *Thermicola ferriacetica* が Proteobacteria 門に属するグラム陰性細菌 *Geobacter* や *Shewanella* などと同様に multiheme 型の *c*-type cytochrome 依存型の直接的な鉄還元を行っていることが報告されている。以上から、Firmicutes 門の細菌であっても、綱内で全く異なる鉄還元機構を有している一方で、綱をまたいで類似の機構を共有している場合もある可能性が考えられた。

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 2 件)

Sasaki K, Sasaki D, Kamiya K, Nakanishi S, Kondo A, Kato S. (2018) Electrochemical biotechnologies minimizing the required electrode assemblies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 50:182-188.

Igarashi K, Kato S. (2017) Extracellular electron transfer in acetogenic bacteria and its application for conversion of carbon dioxide into organic compounds. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 101:6301-6307.

[学会発表](計 2 件)

加藤創一郎、田中あすか、高篠素子、田村具博. 多様な嫌気環境に存在する鉄腐食性メタン生成菌・酢酸生成菌の培養. 材料と環境 2016 (つくば国際会議場、2016 5/26)

Kato S. Acetogenic bacteria that induce biocorrosion via extracellular electron transfer. 6th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (ISMOS-6) (San Diego, US, 2017 6/6-9, 招待講演)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 創一郎 (KATO, Souichiro)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部

門・主任研究員
研究者番号：30597787

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし