

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24244091

研究課題名(和文) 深海熱水海底発電と電気合成微生物群集の存在証明

研究課題名(英文) Proof of electrotrophic microbial community development and electric power production in deep-sea hydrothermal vents

研究代表者

高井 研 (TAKAI, Ken)

独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・分野長

研究者番号：80359166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間において、(1)現場深海熱水噴出孔において硫化物チムニーの内外で600mV程度の起電力が潜在的に存在し、実際の電子伝達能を有していること、(2)にもかかわらず、実験室内実験において、チムニーに生息する微生物群集を植種源として、天然チムニー電極や様々な電極を支持体とした電気合成微生物群集の増殖が観察されないこと、が明らかになった。これらの結果を踏まえて、深海熱水現場環境での電気合成微生物群集の増殖実験を行い、電気合成微生物群集の形成を示唆する結果を得た。自然深海熱水噴出孔のチムニーにおいて電気合成微生物群集が生育可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this project, enrichment of possible electrotrophic microbial communities has been tested under 600 mV redox potential in the laboratory. However, we have not successfully found biomass production of electrotrophic microbial community. Next, it has been conducted in natural deep-sea hydrothermal vent environments. In the Iheya North hydrothermal field, a fuel cell has been deployed for two weeks using platinum-coated titanium electrodes, deployed in a hydrothermal fluid and ambient seawater. During the deployment, generation of 600 mV redox potential has been achieved. After the recovery, dense biofilm has been identified on the surface of cathode. The efficient electron conductivity and the dense biofilm development both point to the possible enrichment and biomass production of microbial community significantly based on the electroautotrophy. This research project reveals the possible existence of electrotrophic microbial community in natural deep-sea hydrothermal environments.

研究分野：地球生物学

キーワード：電気合成 化学合成 深海 熱水噴出孔 独立栄養 電子伝達 硫化鉱物

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 地球における自然環境中のすべての生命活動は、究極的には、光励起反応あるいは酸化還元発熱反応を介したエネルギー獲得によって支えられている。生化学的な立場から定義される3つの生命エネルギー代謝様式 = 発酵、呼吸、光合成のうち、光合成は光励起反応と酸化還元発熱反応の共役、発酵と呼吸は酸化還元発熱反応、に基づくエネルギー獲得代謝である。また、最終的に酸化的リン酸化によってアデノシン三リン酸(ATP)を合成する呼吸と光合成は、本質的には生体膜での電子伝達を通じてエネルギーポテンシャルを作り出す電気化学的なシステムと考えられることもできる。

(2) 現世の地球における生物地球化学的物質循環系の大きな駆動力が、太陽光を利用した光合成一次生産であることに疑問の余地はない。しかしながら一方で、太陽光が届かない暗黒の深海や地下環境では、光を直接的なエネルギー源として利用できないために、無機物の酸化還元発熱反応を利用したエネルギー獲得(化学合成)を行う微生物の一次生産が極めて重要である。そのような地球内部の還元物質を利用した化学合成独立栄養微生物生態系が、地球最大の生命圏である暗黒の深海や地下環境におけるエネルギー・物質循環に重要な役割を果たしていることが徐々に明らかになりつつある。

(3) 従来、これらの化学合成独立栄養微生物のエネルギー代謝には、細胞接触面および内部の溶液空間で直接的な酸化還元化学反応が進行する必要があると考えられてきた。すなわち、エネルギー源となる還元型物質(水素、硫化水素、メタン、二価鉄等)と酸化型物質(酸素、硝酸、硫酸等)が、微生物が生息する微小空間に実際に共存・反応することが絶対的な必要条件だと考えられてきた。例えば、研究代表者が精力的に研究を行ってきた深海熱水活動域では、還元型物質に富んだ熱水と酸化型物質に富んだ海水が混合するミキシングゾーンと呼ばれる環境において、地球上最も活動的と考えられる化学合成微生物群集が形成され得る。その一次生産のためのエネルギー代謝には、化学合成独立栄養微生物が生息する場に熱水から供給される還元物質と海水から供給される酸化物質が共存することが必要であり、単純な流体の拡散・混合過程に支配される化学合成エネルギー代謝が可能な領域を仮定した場合、化学合成独立栄養微生物生態系の存在は空間的に極めて限定されるはずである。しかしながら、実際の海底における化学合成独立栄養微生物群集の形成は、熱力学的な計算により予想される還元酸化物質の共存領域を遙かに超える空間にまで及んでいる。その理由として、これまで「流体の拡散・混合過程を単純化した仮定が現場環境で起きている複雑な現象

と大きく異なる」ことが指摘されてきた。

(4) 「空間を隔てた酸化還元反応を利用する化学合成微生物」の例として、微生物燃料電池と呼ばれる系がある。この微生物燃料電池の研究の中で極めて興味深い現象が見つかった。陰極側で起きる微生物代謝に伴って生成される酸化鉄や水酸化鉄、硫化鉄の微小な鉱物粒子が半導体的な性質を有し、微生物細胞と集合体を形成することで、微生物細胞膜の電子伝達系と共役して長距離間(数百 $\mu\text{m}$ から数 $\text{mm}$ )の電子伝達を駆動するという現象である。さらに最近海洋堆積物において、深部の硫酸還元菌の代謝によって生成された硫化水素と硫化鉄鉱物との化学反応が、微生物細胞と微小な硫化鉄鉱物複合体の電子伝達を駆動し、最終的に堆積物表層の酸化環境で酸素によって消費されている可能性が示された。この発見は、自然環境中の酸化鉄や水酸化鉄、硫化鉄の微小な鉱物粒子と微生物群集の複合体が、その電子伝達能を利用して空間を隔てた化学合成微生物生態系を形成し得ることを強く示すものであった。また、研究代表者と分担者の研究グループは、深海熱水環境の硫化物チムニーについて、世界で初めての電気化学的な解析と実験を行い、微小な硫化金属鉱物で形成される硫化物チムニーが隔てる熱水と海水と数 $\text{cm}$ を超える長距離間の電子伝達が可能であり、熱水化学反応(硫化水素による黄鉄鉱生成)による700mV程度の起電力の発生を可能とすることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

地球におけるすべての生物活動は、光励起あるいは酸化還元反応を介したエネルギー獲得によって支えられている。光合成と化学合成というエネルギー獲得様式のうち、化学合成エネルギー獲得は、細胞内外の化学物質そのものの酸化還元反応を介して起きる現象であると信じられてきた。それは真実であろうか?近年、自然環境中で、金属硫化物や金属酸化物のナノ鉱物粒子を介した電子伝達による遠隔的酸化還元反応が起きることが次々と証明されている。本研究提案は、この遠隔的酸化還元反応によって生じる電子を直接的なエネルギー源とする微生物、電気合成微生物(electrolithotroph)と呼ぶことができる、によって支えられた深海・地殻内微生物生態系の存在を明らかにすること、さらにその化学環境を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 既に、深海熱水環境の硫化物チムニーの内外において、熱水化学反応(硫化水素による黄鉄鉱生成)による700mV程度の起電力の発生が確認されている。まず500-1000mV程度の起電力をエネルギー源とする電気培養法により、電気合成独立栄養微生物の培養

実験を行う。植種源として様々な物理・化学的特徴を有する世界各地の深海熱水活動域のチムニーを用いると同時に、電気合成微生物群集の形成が可能かどうか、またその形成速度や形成条件の定量を行う。一方、様々な物理・化学特徴を有する熱水環境での起電力を生み出す熱水化学反応の多様性と電気化学的特徴を、実験室内再現実験によって明らかにする。最終的には、各熱水環境において、電気合成エネルギー代謝が微生物生態系の一次生産や機能にどの程度寄与しているかを定量する。

(2) 平成 24 年度には、具体的に沖縄トラフ伊平屋北熱水フィールドの無人潜水機を用いた潜航調査および中央インド洋海嶺のきれい、ドードー、ソリティア熱水フィールドの有人潜水艇を用いた潜航調査が予定されている。このような地質学的背景、物理・化学的性質の異なる熱水活動域から得られた極めて新鮮な熱水チムニーや金属酸化物マットサンプルを用いて、電気合成独立栄養微生物の培養実験を行う。ポテンショガルバナスタットを用いた電気培養法により、500-1000mV 程度の電圧下で、陽極側に元素状硫黄、硫酸、三価鉄、硝酸、酸素の各電子受容体を補強した培地中で、電子そのものをエネルギー源とする電気合成独立栄養微生物の培養を行う。

(3) 一方で、電気合成独立栄養微生物の生育が全く検出されないような状況は想定される。その対応策として、直接的な電気合成独立栄養微生物の培養だけでなく、化学合成独立栄養微生物群集のバイオマスや生育速度に与える電気合成エネルギー代謝の影響評価実験も計画する。すなわち、電流(電子)のみをエネルギー源として与えるのではなく、電子供与体と電子受容体の両方を与えた化学合成エネルギー代謝が可能な条件に加えて、500-1000mV 程度の電圧下で、陽極側での培養を行う。電圧を加えた条件と加えない条件下での、微生物群集のバイオマスや生育速度、機能を比較することによって、電気合成エネルギー代謝の寄与を定量することが可能となる。

(4) さらに平成 24 年度には、電気合成独立栄養微生物の培養実験と平行して、様々な物理・化学特徴を有する熱水環境での起電力を生み出す熱水化学反応の多様性と電気化学的特徴を明らかにする実験室内再現実験の準備を進める。世界各地の熱水活動域から得られた極めて新鮮な熱水チムニーや金属酸化物マットサンプルを用いて、熱水側での電子を生み出す酸化的熱水反応(陰極側反応)の多様性を検証する実験系の構築を行う。

(5) 平成 25 年度には、直接的な電気合成独立栄養微生物の培養が成功した場合には、電

気培養系において電気合成独立栄養一次生産者を起点とする微生物群集が形成されることが予想され、世界各地の熱水活動域における電気合成独立栄養微生物群集のバイオマスや生育速度、機能を、それぞれの熱水活動の環境条件で比較検討を行う。

(6) 平成 24 年度において直接的な電気合成独立栄養微生物の培養がうまくいかなかった場合、既に述べたように化学合成独立栄養微生物群集のバイオマスや生育速度に与える電気合成エネルギー代謝の影響評価実験を行う。また平成 25 年度には、様々な物理・化学特徴を有する熱水環境での起電力を生み出す熱水化学反応の多様性と電気化学的特徴を明らかにする実験室内再現実験を進める。世界各地の熱水活動域から得られた熱水チムニーや金属酸化物マットサンプルを用いて、熱水側での電子を生み出す酸化的熱水反応(陰極側反応)の多様性を検証する実験を行う。また、近年研究代表者の研究グループによって示された太古代の強アルカリ高温熱水環境での電気化学的性質についても検討を進める。特に太古代の強アルカリ高温熱水環境では、分子状水素の電解によっても大きな起電力を発生することができ、チムニー状熱水構造物の鉱物の触媒反応によって、大きな起電力が供給されていた可能性もあり、生命誕生以前の化学進化や初期生命進化を考える上で重要である。このような実験室内再現実験を推進する。

(7) 平成 26 年度には、電気培養による電気合成独立栄養微生物の培養、電気合成独立栄養微生物群集のバイオマスや生育速度、機能の定量・比較、化学合成と電気合成エネルギー代謝の生産量及び物質循環への寄与の定量、実験室内再現実験による電気合成エネルギー代謝のポテンシャル評価を統合し、電気合成エネルギー代謝の地球規模での生物地球化学物質循環における役割を明らかにする。さらに、深海熱水系における電気化学的なエネルギー発生が、現世の地球における生物地球化学物質循環だけでなく、約 40 億年に及ぶ生命と地球と共進化過程においてどのような役割を果たしてきた可能性があるかについて、さらなる研究の原動力となりうる作業仮説やモデルの構築に結びつける。

#### 4. 研究成果

(1) 平成 24 年度には、計画通り、沖縄トラフ伊平屋北熱水フィールドの無人潜水機を用いた潜航調査および中央インド洋海嶺におけるきれい、ドードー、ソリティア熱水フィールドの有人潜水艇を用いた潜航調査で得られた極めて新鮮な熱水チムニーや金属酸化物マットサンプルを用いて、電気合成独立栄養微生物の培養実験を行った。ポテンショガルバナスタットを用いた電気培養法により、500-1000mV 程度の電圧下で、陽

極側に元素状硫黄、硫酸、三価鉄、硝酸、酸素の各電子受容体を補強した培地中で、電子そのものをエネルギー源とする電気合成独立栄養微生物の培養を行ったが、明確な微生物の増殖は確認できなかった。本結果から、電気合成独立栄養微生物の増殖には、電極への微生物の吸着と微生物細胞表面に電子を受け取る導体が必要であることが考えられた。また対象微生物を鉄酸化菌に絞る事により最適な培養条件を設定できることも分かった。直接的な電気合成独立栄養微生物の培養だけでなく、化学合成独立栄養微生物群集のバイオマスや生育速度に与える電気合成エネルギー代謝の影響評価実験についても準備を進めた。

(2) 平成 25 年度には、様々な物理・化学特徴を有する熱水環境での起電力を生み出す熱水化学反応の多様性と電気化学的特徴を明らかにする実験室内再現実験を進めた。熱水側での電子を生み出す酸化的熱水反応(陰極側反応)の多様性を検証した。まずは、高温高压条件の自然環境中での陽極側電極を含めた電気化学特性を沖縄トラフ伊平屋北熱水フィールドでの現場実験によって明らかにした。直接的な電気合成独立栄養微生物の培養だけでなく、化学合成独立栄養微生物群集のバイオマスや生育速度に与える電気合成エネルギー代謝の影響評価実験についても実験を行い、マリアナ島弧の熱水フィールドから得られた金属酸化物マットにおいて、化学合成エネルギー代謝が電気培養系において促進されていることが明らかになった。

(3) これまでの研究進捗状況を踏まえて、研究最終年度には、当初の計画通り実験室内培養実験で明確なデータが得られなかった場合の計画として、深海熱水現場環境での電気合成微生物群集の増殖実験を行った。沖縄トラフ伊平屋北熱水フィールドの人工熱水噴出孔に白金コートチタン電極を設置し、現場ポテンショガルバナスタットによる計測を約 2 週間にわたって行った。設置当初、熱水に設置した陰極と海水に設置した陽極の間には 200-300mV 程度の起電力しか生じていなかったのに対し、陰極側に硫化金属が付着し 4 日目より起電力が 300-400mV に上昇し、7 日目から突如起電力が 600mV に上昇し、以後その起電力を保持した。この 600mV の起電力は熱水と海水との酸化還元電位差に相当し、全くエネルギーロスのない電流生成が保持されたことを意味している。特に 7 日目に見られる起電力の上昇は、熱水に設置した陰極側の変化よりは、海水側の陽極側に起きた変化に起因すると考えられ、約 2 週間の現場実験終了後の陽極には微生物フィルムが形成されていたことから、電気合成微生物群集による海水中の酸素を用いた電子合成酸化還元反応が電子伝達を触媒した可能性

が考えられた。現在、陽極に形成された微生物群集の群集構造の解析を進めており、その結果から現場における電気合成微生物群集の存在と機能を明らかにできることが期待される。一方、これまでの研究によって、現場深海熱水噴出孔において硫化物チムニーの内外で 600mV 程度の起電力が潜在的に存在し深海熱水チムニーの中を電子伝達している可能性は明らかになっていたが、実際の深海熱水チムニーを介して電子伝達が起きていることを現場で測定・実証した例はなかった。研究最終年度には、現場電気伝導度計を開発し、チムニーの内外での電子伝達が起きていることの直接計測を行った。その結果、フランジと呼ばれるチムニー構造の上下(つまり熱水の内外)で、600mV の電位差が生じている計測データが得られた。この結果も、熱水と海水との理論的酸化還元電位差に相当し、自然深海熱水噴出孔のチムニーにおいて、常に 600mV の起電力に導かれる電流生成が起きていることが世界で初めて証明された。つまり、自然深海熱水噴出孔のチムニーにおいて電気合成微生物群集が生育可能であることが明らかになった。

#### 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 7 件)

山本正浩 (2014) 深海熱水燃料電池による発電事業の可能性. 化学経済, 62, 77-81. (査読無)

山本正浩 (2014) 燃料電池を用いて深海熱水噴出孔から電力を取り出す. ペトロテック, 37, 366-371. (査読無)

Y Yamaguchi, A., Yamamoto, M., Takai, K., Ishii, T., Hashimoto, K., Nakamura, R. (2014) Electrochemical CO<sub>2</sub> reduction by Ni-containing iron sulfides: how is CO<sub>2</sub> electrochemically reduced at bisulfide-bearing deep-sea hydrothermal precipitates? *Electrochimica Acta*, 141, 311-318. DOI:10.1016/j.electacta.2014.07.078 (査読有)

山本正浩, 中村龍平 (2014) 深海熱水噴出孔での発電: 熱水-海水燃料電池の開発. *燃料電池*, 13, 83-87. (査読無)

Yamamoto, M., Nakamura, R., Oguri, K., Kawagucci, S., Suzuki, K., Hashimoto, K., Takai, K. (2013) Generation of electricity and illumination by an environmental fuel cell in deep-sea hydrothermal vents. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 10758-10761.

DOI: 10.1002/anie.201302704 (査読有)  
Nakamura, R., Kai, F., Okamoto, A., Hashimoto, K. (2013) Mechanisms of

long-distance extracellular electron transfer of metal-reducing bacteria mediated by nanocolloidal semiconductive iron oxides. Journal of Material Chemistry A, 1, 5148-5157. DOI: 10.1039/C3TA01672B (査読有)  
Mogi, T., Ishi, T., Hashimoto, K., Nakamura, R. (2013) Low-voltage electrochemical CO2 reduction by bacterial voltage-multiplier circuits. Chemical Communications, 49, 3967-3969. DOI: 10.1039/C2CC37986D (査読有)

究センター・チームリーダー  
研究者番号： 10447419

山本 正浩 (YAMAMOTO, Masahiro)  
独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻  
内生物圏研究分野・研究員  
研究者番号： 60435849

〔学会発表〕(計4件)

山本正浩 深海熱水噴出孔表面における電気的化学進化の検証～還元的 TCA 回路の再現実験～. 第3回宇宙における生命ワークショップ. 2015年3月9日. 一橋講堂, 東京都千代田区.

Yamamoto, M., Nakamura, R., Oguri, K., Kawagucci, S., Suzuki, K., Hashimoto, K., Takai, K. Possibility of electro-ecosystem around deep-sea hydrothermal vents. International Astrobiology Workshop 2013. 2013年11月29日. JAXA 相模原キャンパス, 神奈川県相模原市.

山本正浩 深海熱水孔での発電：環境燃料電池を熱水孔に設置する. Blue Earth Symposium 2013. 2013年3月14日. 東京海洋大学, 東京都品川区.

高井研 (招待) Potential electroautotrophic microbial ecosystem based on electric power production in deep-sea hydrothermal vent. 第28回日本微生物生態学会. 2012年9月19日. 豊橋科学技術大学, 愛知県豊橋市.

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：発電システム

発明者：山本正浩, 高井研, 中村龍平他6名

権利者：山本正浩, 高井研, 中村龍平他6名

種類：特許

番号：PCT/JP2013/058373

出願年月日：2013年3月22日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 研 (TAKAI, Ken)

独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻  
内生物圏研究分野・分野長

研究者番号：80359166

(2) 研究分担者

中村 龍平 (NAKAMURA, Ryuhei)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研