

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18273

研究課題名(和文) 自発的に無機材料とハイブリッド化する微生物細胞の創製と微生物燃料電池への応用

研究課題名(英文) Development of microbial cell able to spontaneously form hybrid with inorganic materials and application to microbial fuel cell

研究代表者

中島 一紀 (Nakashima, Kazunori)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：50540358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌*E. coli*で発現したシリカテインの凝集性について検討を行った。コールドショック発現系を用いることで、シリカテインの発現に成功した。タンパク質は不溶性として得られたが、リフォールディング操作により可溶化した。リフォールディングしたシリカテインを用いて凝集性を調査したところ、シリカテインはバッファー中では自己集合により凝集体を形成したが、尿素存在下では凝集が抑制された。シリカテインを細胞表層に配向させるために、*Pseudomonas syringae*由来InaK、および*E. coli*由来OmpAを用いて細胞表層提示系を構築した。また、微生物燃料電池の基本システムを作製した。

研究成果の概要(英文)：Silicatein is an enzyme which catalyzes silica polycondensation in marine sponge. The enzyme can produce silica from siliceous substrate such as tetraethoxysilane under mild condition, i.e. room temperature and neutral pH. In the present work, we examined the aggregation of silicatein expressed in *E. coli*. Silicatein gene optimized for the expression in *E. coli* was successfully expressed using cold shock vector. Although most of the protein was expressed in insoluble fraction, silicatein could be solubilized by refolding. The refolded silicatein was used for the self-assembly test under several conditions. Silicatein self-assembled to form aggregation in buffer solution while the aggregation was suppressed in the presence of chaotropic reagent, urea. Cell surface display system has been developed using InaK from *Pseudomonas syringae* and OmpA from *E. coli*. Furthermore, microbial fuel cell system is also constructed.

研究分野：酵素工学

キーワード：生物環境プロセス バイオミネラリゼーション

1. 研究開始当初の背景

微生物などの細胞を有機あるいは無機材料と複合化することにより、細胞機能を強化したり、新たな機能を付与することができる。シリカ(SiO₂)は、物理的に堅強かつ化学的に安定であり、多孔質性であるため物質の拡散性が高く、また光学特性に優れているという利点をもつ。シリカと細胞(微生物、動植物)を複合化したバイオハイブリッドは、バイオリアクター、バイオセンサー、バイオエレクトロニクスなど多岐にわたる分野においてその応用性について研究が行われている。

従来の微生物とシリカの複合化法では、ケイ酸ナトリウムやテトラエトキシシラン(TEOS)などのシリカ前駆体を加熱あるいは酸で加水分解し、そこに微生物細胞を添加して固化させるゾル-ゲル法が一般的であった。しかし、この手法は微生物を、培養、菌体回収、洗浄、前処理し、そこにシリカ前駆体を添加してゲル化させる、という非常に煩雑なプロセスであり、さらに生細胞へのダメージも大きいという問題があった。したがって、少ないステップで簡便に、かつ細胞への負担が少ない複合化技術が開発されれば、微生物と無機物から構成されるバイオハイブリッド素子の応用範囲は大きく拡大すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞を培養するだけで自発的に無機物とハイブリッド化する新技術の開発を行う。この技術を開発するにあたり、申請者はシリカテインというタンパク質に注目した。シリカテインは海綿動物(*Tethya aurantia*や*Suberites domuncula*)のガラス骨格中から発見された酵素であり、常温・常圧、中性pHの温和な条件下でシリカの重縮合を行うことができる[Shimizu et al., PNAS, 1998, 95, 6234]。本研究では、細胞表面にシリカテインを配向させることで、細胞自身が増殖とともにシリカの重縮合を行い、自らを自発的に無機物と複合化する新機能微生物細胞を創製する。

3. 研究の方法

具体的なアプローチを以下に述べる。シリカテイン遺伝子と細胞膜結合タンパク質遺伝子を融合し、微生物細胞に導入する。細胞を培養することでシリカテイン-膜結合タンパク質が発現し、細胞表面へと移行する。細胞表面に配向されたシリカテインは、培地中に添加されたシリカ前駆体を重縮合し、生成したシリカゲルマトリックスに細胞自身が包括される。

さらに、本研究で開発した新規細胞を微生物燃料電池への展開を目指す。

(1) シリカテインの発現検討および酵素機能解析

大腸菌発現用に塩基配列を最適化した*Suberites domuncula*由来のシリカテイン遺伝子をコールドショックベクターpCold II(タカラバイオ)に挿入することでシリカテイン発現ベクターpCold-Sil1を構築した。このベクターにより形質転換した大腸菌BL21(DE3)株をアンピシリンを含むLB培地中で培養し、コールドショック誘導発現を行った。菌体破碎後、上清と沈殿を分取し、SDS-PAGEによりシリカテインの発現と存在画分を確認した。

沈殿画分(封入体)を変性・可溶化し、透析を行うことでシリカテインのリフォールディングを行った。また、リフォールディングにより可溶化したシリカテインの凝集性を尿素共存下で調査した。

作製したシリカテインを用いてTEOSを基質としたシリカ重合実験を行った。コントロール実験として酵素非添加系でも同様の実験を行った。シリカテイン溶液と基質TEOSを混合し、20°Cで反応を行った。反応後、遠心分離を行い、得られた沈殿を洗浄することでシリカに付着した酵素と未反応物を除去した。回収したシリカを凍結乾燥した後、デジタルマイクロスコブによる観察を行った。

(2) 微生物細胞表面提示系の確立

本研究では、シリカテインを細胞外に配置させるために、この細胞表面提示技術を用いる。これは、細胞膜(壁)に結合するアンカータンパク質と目的酵素をタンパク質レベルで融合することにより、細胞表面に提示することができる技術である。具体的な方法を以下に示す。

アンカータンパク質としては、*Pseudomonas syringae*由来氷核タンパク質InaK、大腸菌由来外膜タンパク質OmpA、を主に検討した。いずれもグラム陰性菌の外膜に結合することが知られている膜タンパク質である。

(3) 微生物燃料電池への応用を指向した基礎検討

微生物燃料電池(Microbial Fuel Cell; MFC)は、有機物が代謝により酸化分解していく際に生成する電子を電極に受け渡すことで電流を得るシステムである(図1)。特に、微生物が有機物を分解し電極への電子供与を行うアノード側では、電極上での微生物のバイオフィーム形成がMFCの高出力化に大きく影響する。本研究ではシリカ-微生物ハイブリッドをMFCアノード電極に適用する。そのために、MFCの基礎的知見を得るために、固体バイオマスを用いたMFCの作製を試みた。

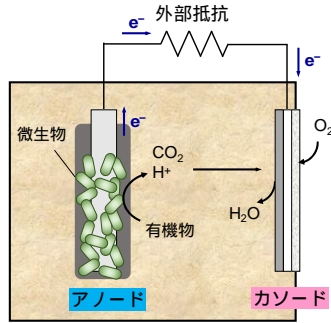


図1 微生物燃料電池の概念図

4. 研究成果

(1) シリカテインの発現検討および酵素機能解析

これまでの予備実験により、pET 発現系を用いた通常の大腸菌発現系ではシリカテインは効率的に過剰発現されないことが分かっている。そこで本研究では、低温誘導発現により、タンパク質の効率的な発現が可能になると期待される pCold 発現系を用いた。図2に pCold 系で発現した菌体破碎液の上清と沈殿の SDS-PAGE を示す。上清(可溶画分)には、シリカテインの思われるバンドは観測されなかった。一方、沈殿(不溶画分)には、シリカテインの分子量である 23 kDa 付近のバンドが時間とともに濃くなり、シリカテインの過剰発現が観察された。以上の結果より、シリカテインは pCold 発現系を用いることにより、大腸菌での過剰発現が可能となることが明らかとなった。

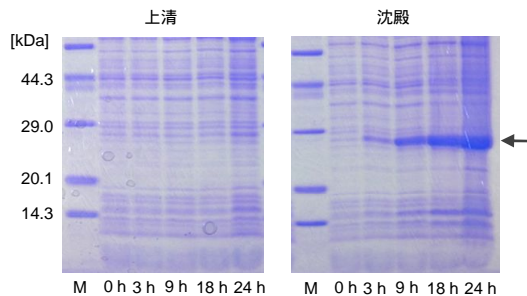


図2 pCold 発現系を用いたシリカテインの発現

凝集した不溶性シリカテインは、リフォールディング操作を行うことで可溶化した。しかし、そのまま放置しておくとも時間とともに再凝集し、沈殿することが明らかとなった。そこで、リフォールディングにより可溶化したシリカテインの再凝集性を種々の濃度の尿素共存下で調査した。尿素濃度が低い系では時間とともにシリカテインの凝集が見られ、尿素濃度が高いほど凝集しにくいことが明らかとなった。尿素はタンパク質の変性剤として用いられるが、その作用機序として疎水性相互作用の低下が知られている。つまり、本実験においても尿素の添加によりシリカテインのタンパク質間の相互作用が弱められ、凝集体の形成が抑制されたと考えられる。

図3にリフォールディングにより可溶化したシリカテインを用いたシリカ重合実験(基質 TEOS, 25 °C で 24 h 反応)の結果を示す。酵素添加系において白色の凝集体が見られ、シリカテインによるシリカの合成が確認された。一方、酵素非添加系では凝集体は得られなかった。生成したシリカを乾燥凍結した後、走査型電子顕微鏡(SEM)により確認したところ、粒子状のシリカが生成していることが確認された。

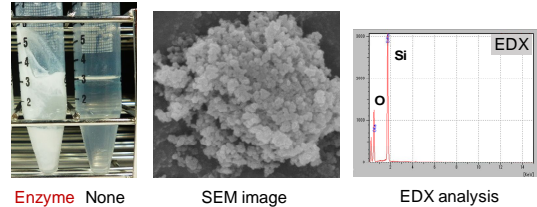


図3 シリカテインによるシリカの合成(左)と合成したシリカの SEM 像(中)および EDX 分析(右)

(2) 微生物細胞表面提示系の確立

最終的にシリカテインを細胞表面に提示することを目標として、バクテリアでの細胞表面提示系の構築を行った。

Pseudomonas syringae 由来氷核タンパク質 InaK は主に 3 つのドメインからなっており、膜に結合する N 末端の InaK-N, 繰り返し配列からなる氷核部位, 細胞表面に出ている C 末端側の InaK-C である。これらの情報をもとに、InaK-N のみ, InaK-N に InaK-C を組み合わせた InaK-NC, InaK-N に InaK-C を 2 つタンデムに組み合わせた InaK-NCC をそれぞれアンカータンパク質とした表面提示系(提示ペプチド: His6 タグ)を検討した(図4A)。

しかしながら、作製した大腸菌を用いて、Ni²⁺の吸着実験を行ったところ、比較として用いた表面提示していない大腸菌といずれも同程度の金属吸着性であった。これらの原因については不明であるが、His6 タグが膜内に埋もれているか、InaK 自体が外膜に移行していない可能性が考えられる。

また、大腸菌 *E. coli* の外膜タンパク質 OmpA を用いた表面提示系を構築した(図4B)。表面提示するペプチドとしては、チタンに結合する TBP (Titanium binding peptide) を選択し、OmpA の Loop3 の細胞外部分に提示した。TBP はファージディスプレイにより選抜されたペプチドで、チタン(実際には表面の酸化チタン)やガラスに結合し、銅には結合しないことが知られている。

OmpA-TBP を提示した *E. coli* をチタン、ガラス、銅の平板への吸着・結合を調査したところ、チタンとガラスには菌の付着が見られ、銅へは付着しなかったことから、細胞表面に提示された TBP が選択性を持って機能していると考えられる。以上より、OmpA を用いた細胞表面提示系が有用であると考えられる。

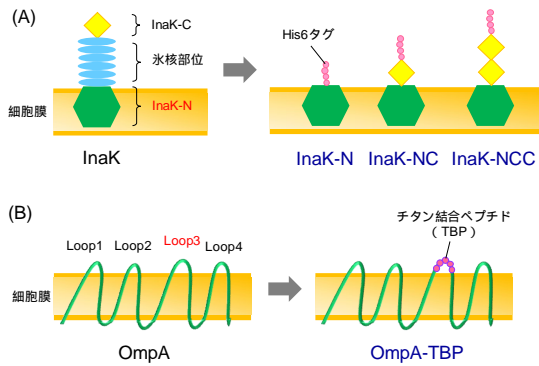
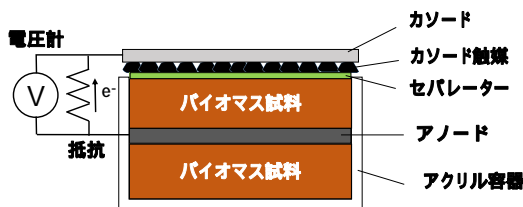


図4 構築した表層提示系
(A) InaK (B) OmpA

(3) 微生物燃料電池への応用を指向した基礎検討

本研究では、固体バイオマスを用いた微生物燃料電池システムを作製した(図5)。電池作製における基本的な材料として、アノードおよびカソードにはカーボクロス(平織カーボクロス)、セパレーターにはセロファン、触媒には活性炭を用いた。また、モデルバイオマスとして、米ぬか、油粕、鶏糞、EM菌と蒸留水を混合したバイオマス試料を使用した(表1)。



装置模式図

図5 固体バイオマスを用いたMFC装置

表1. バイオマス組成

米ぬか	80 g
油粕	40 g
鶏糞	40 g
EM菌	50 g
蒸留水	140 g

作製したMFCを用い、表1の条件を基本として、含水量およびカソード触媒の種類について検討を行い、発電効率増加に関するファクターを調査した(表2)。

表2 検討した発電条件

条件	含水量	カソード
(1)	140 g	活性炭
(2)	280 g	活性炭
(3)	140 g	Pt 担持カーボン

<含水量の影響>

固体バイオマス中の多糖類やタンパク質は微生物が分泌する分解酵素によって低分子化され、生成した糖やアミノ酸が発電原料となる。バイオマス分解は主に加水分解であり、そのために基質としての水が必須となる。そこで、発電における含水量の調査を行った。

図6にバイオマス中の含水量が発電効率に及ぼす影響を示す。条件(2)(含水量 280g)では、徐々に値が上昇し、7日目でピークを迎えた後一旦下降するも、9日目以降再度上昇した。条件(1)と条件(2)の最大電力密度は、それぞれ 1.35 mW/m^2 、 6.92 mW/m^2 であり、条件(2)において5倍以上高い値が得られた。

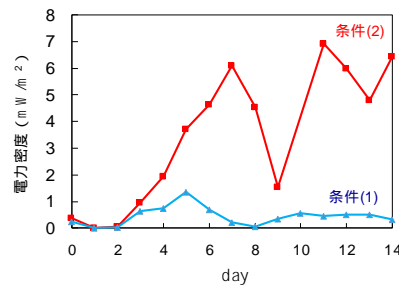


図6 固体バイオマスMFCにおける含水量の影響

本システムではエアカソード(空気電極)を用いており、最終電子受容体として大気中の酸素を利用する。カソード側では、酸素が電子、プロトンと反応し、水が生成するが、通常この反応には酸素還元触媒が必要となる。基本条件(1)のカソードでは触媒として活性炭を用いているが、より効率的にカソード反応を促進させるために白金担持カーボンをカソード触媒として用いた電池を作製し、発電効率の比較を行った(図7)。

基本条件(1)では、5日目以降電力密度が下がるのに対し、白金担持カーボンを触媒とした条件(3)ではそのまま電力密度が上昇し続けた。条件(3)の最大電力密度は 4.83 mW/m^2 であり、基本条件(1)の最大電力密度よりも3倍以上の値を示した。

白金担持カーボンをカソード触媒に用いることにより、カソード側の水生成反応における活性化エネルギーが下がることで反応がスムーズに進行し、発電効率が増加したと考えられる。カソード触媒の性能が発電効率に大きく影響することが明らかとなった。

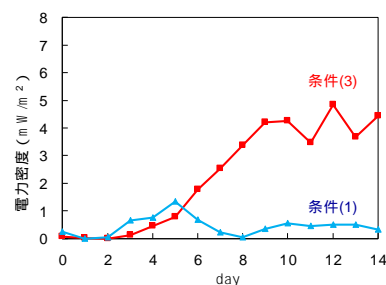


図7 固体バイオマスMFCにおけるカソード触媒の影響

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6件)

1. “Whole-cell evaluation of urease activity of *Pararhodobacter* sp. isolated from peripheral beachrock” Masahiro Fujita, Kazunori Nakashima, Varenyam Achal, Satoru Kawasaki, Biochemical Engineering Journal, 124, 1–5 (2017)
DOI: 10.1016/j.bej.2017.04.004 [査読有]
2. “Evaluation of porosity in biogROUTED sand using microfOCUS X-ray CT” Shumpei Mitsuyama, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki, International Journal of GEOMATE, 12 (31), 71-76 (2017)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.21660/2017.31.6547>
[査読有]
3. “Direct ethanol production from ionic liquid-pretreated lignocellulosic biomass by cellulase-displaying yeasts” Ryosuke Yamada, Kazunori Nakashima, Nanami Asai-Nakashima, Wataru Tokuhara, Nobuhiro Ishida, Satoshi Katahira, Noriho Kamiya, Chiaki Ogino, and Akihiko Kondo, Applied Biochemistry and Biotechnology, 182, 229–237 (2017)
DOI: 10.1007/s12010-016-2322-2 [査読有]
4. “Effectiveness of Adjustable-volume Packed-bed Reactor with an Ion-exchange Resin Catalyst for Continuous Production” Kota Yamazaki, Naomi Shibasaki-Kitakawa, Kazunori Nakashima, Toshikuni Yonemoto, Journal of Chemical Engineering of Japan, 49 (7), 668–672 (2016)
DOI: 10.1252/jcej.15we243 [査読有]
5. “Hydrodynamic cavitation reactor for efficient pretreatment of lignocellulosic biomass” Kazunori Nakashima, Yuuki Ebi, Naomi Shibasaki-Kitakawa, Hitoshi Soyama, Toshikuni Yonemoto, Industrial & Engineering Chemistry Research, 55, 1866–1871 (2016)
DOI: 10.1021/acs.iecr.5b04375 [査読有]
6. “Pretreatment combining ultrasound and sodium percarbonate under mild conditions for efficient degradation of corn stover” Kazunori Nakashima, Yuuki Ebi, Masaki Kubo, Naomi Shibasaki-Kitakawa, Toshikuni Yonemoto, Ultrasonics Sonochemistry, 29, 455–460 (2016)

DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.10.017 [査読有]

[学会発表](計9件)

1. F. Mizuno, K. Nakashima, S. Kawasaki: Improvement of biogROUTED materials for conducting a field test, Proceedings of the 4th Joint Seminar on Geoenvironmental Engineering and Recycling (GER 2016), November 4, 2016, Seoul(Korea).
2. M. Fujita, K. Nakashima, S. Kawasaki: Whole-cell evaluation of bacterial urease activity for ground improvement techniques based on MICP, Proceedings of the 4th Joint Seminar on Geoenvironmental Engineering and Recycling (GER 2016), November 4, 2016, Seoul(Korea).
3. K. Nakashima, H. Oguri, S. Kawasaki: Expression and aggregation property of silica-polymerizing enzyme from sponge, Proceedings of the 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YBEC2016) (invited), October 28, 2016, フェニックスシーガイアリゾート(宮崎県・宮崎市)
4. 大腸菌により異種発現した海綿由来シリカ重合酵素の自己集合体形成と機能評価
中島一紀, 小栗秀俊, 川崎了
第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場(富山県・富山市), 2016 年 9 月 28 日
5. シリカ重合酵素の異種発現と機能性評価
中島一紀, 小栗秀俊, 川崎了
資源・素材 2016, 岩手大学(岩手県・盛岡市), 9 月 15 日
6. 廃棄物を用いた発電条件が微生物燃料電池の電力に与える影響
今成堯之, 吉村侑太, 中島一紀, 川崎了
資源・素材 2016, 岩手大学(岩手県・盛岡市), 2016 年 9 月 13 日
7. シリカ重合酵素の作製と機能解析
小栗秀俊, 中島一紀, 川崎了
平成 28 年度資源・素材学会北海道支部春季講演会, 室蘭工業大学(北海道・室蘭市), 2016 年 6 月 18 日
8. 固体バイオマスを用いた微生物燃料電池における基礎的検討
吉村侑太, 今成堯之, 中島一紀, 川崎了
平成 28 年度資源・素材学会北海道支部春季講演会, 室蘭工業大学(北海道・室蘭市), 2016 年 6 月 18 日

9. 金属親和性ペプチドを表層提示した微生物の開発

岡本知之, 中島一紀, 川崎了

平成 28 年度資源・素材学会北海道支部春季講演会, 室蘭工業大学(北海道・室蘭市), 2016年6月18日

〔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

中島 一紀 (NAKASHIMA, Kazunori)

北海道大学大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 50540358

(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

()