

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19208010

研究課題名（和文） 電気伝導性ナノワイヤーを介した微生物間相互作用の解析

研究課題名（英文） Analyses of microbial interactions via conductive nanowires

研究代表者

渡邊 一哉 (WATANABE KAZUYA)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：40393467

研究成果の概要（和文）：様々な微生物が導電性細胞外繊維（ナノワイヤー）を利用している可能性が示唆されているが、その役割はほとんど解明されていない。本研究では、微生物ナノワイヤー（鞭毛や繊毛等）の物性や生態学的機能を解明し、微生物学やバイオ（ナノ）テクノロジーに新たな分野を切り開くことを目的とした。その結果、鞭毛が共生相手との情報伝達に使われていることを発見し、微生物生態系形成プロセスの重要ステップが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Although it has been suggested that various microbes use conductive extracellular filaments (nanowires), their roles remain unexplored. In the present study, we aimed at examining physical properties and physiological and ecological functions of microbial nanowires (including, flagella and pili) and opening up new fields in microbiology and (nano)biotechnology. We have found that a flagellum is used for communication between syntrophic partners, contributing to the understanding of processes for the formation of microbial communities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2008年度	10,300,000	3,510,000	13,810,000
2009年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
年度			
年度			
総計	36,400,000	11,340,000	47,740,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物生態学、細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

最近、電気伝導性のある細胞外微細繊維（ナノワイヤーと呼ばれている）を微生物が生産・利用している可能性が示唆されてきた。例えば鉄還元菌は、繊毛様ナノワイヤーを使って、余剰の還元力を細胞外の黄鉄鉱結晶へ放出する可能性が示されている (Reguera G, et al. 2005. Nature 435:1098-1101)。我々は、アメリカのグループと共同でメタン発酵

系内の嫌気性微生物をつなぐナノワイヤー（発酵細菌が生産しメタン菌との間を繋ぐ微細繊維）の分析を行い、これも導電性ナノワイヤーであることを発見した (Gorby, Y. et al. 2006. PNAS 103:11358-11363)。この研究においては、光合成細菌のナノワイヤーにも導電性があるという結果が示され、導電性ナノワイヤーが微生物界に広く分布する可能性が示唆された。微生物の導電性ナノワ

ワイヤーは、広く生物学的・材料科学的に広く興味を引く研究課題と考えられるにもかかわらず、その基盤となる情報（物性、役割、分子構造、など）はほとんど得られていないのが現状である。

2. 研究の目的

本提案の研究では、導電性ナノワイヤーの基本特性や微生物間相互作用における役割が解明し、微生物学やバイオ（ナノ）テクノロジーに新たな分野を切り開くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微生物ナノワイヤー（鞭毛や繊毛など）の導電性の調査

微生物保存機関などから微生物を取り寄せ、それらの細胞構造やナノワイヤーを透過型電子顕微鏡（TEM）や導電性原子間力顕微鏡（conductive atomic force microscopy: cAFM）を用いて観察する。

(2) 接着や導電性の分子機構の調査

ナノワイヤーの主要タンパク質を、ホスト微生物のゲノム情報や分子生物学的解析などから推定する。次に、微生物間相互作用を構成すると考えられる蛋白質を組換え生産し、それらの活性（付着性、シグナル機能、導電性、など）を調査する。

(3) 微生物間相互作用におけるナノワイヤーの役割の解明

異種微生物をつなぐナノワイヤーが微生物間相互作用においてどのような役割を果たすかを調査するために、組換え生産したナノワイヤー構成蛋白質を、共生相手の培養液に添加し、共生相手のレスポンスをマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析等により明らかにする。

4. 研究成果

各種微生物の細胞外繊維の構造を TEM を用いて観察した。その結果、*Pelotomaculum thermopropionicum* の微生物ナノワイヤーと言われる繊維の先端には、*Escherichia coli* や *Shewanella oneidensis* には見られない特殊なキャップ構造が存在することが明らかになった。また、cAFM を用いた導電性の調査を行い、*Shewanella oneidensis* への細胞外繊維に垂直方向の導電性があることが確認された。また、この細菌の細胞表面の導電性は検出できなかった。さらに、この細菌は、数百ナノメートルの直径の微細粒子を細胞外に生成する可能性が示された。この微細粒子の一部は導電性を示し、細胞外電子伝達への関与が考えられた。

微生物ナノワイヤーの X 方向の導電性を測定することを目的に、微細加工した櫛状電極の作成および改良を行った。まず非導電性の

ガラス基板の上に金薄膜の櫛状構造を作成したが、導電性が低く微生物サンプルの測定に適さないことが判明した。そこで、導電性のグラファイト基板の上に非導電性の樹脂の櫛状構造を作成し、微生物ナノワイヤーの測定への利用を試みた。*Pelotomaculum thermopropionicum* や *Shewanella oneidensis* の微生物ナノワイヤーの導電性の測定を行ったが、電流が検出されたのは 10 V 以上の非生理学的な電圧をかけた時であり、導電性の証明には至らなかった。

微生物間相互作用における役割の解明においては、昨年度までに発見した発酵細菌 *Pelotomaculum* のナノワイヤー蛋白質が異種微生物間の情報伝達物質になるという可能性について検証を行った。組換え生産した *Pelotomaculum* の鞭毛の構成蛋白質（FliC）、先端キャプタンパク質（FliD）の付着特性を調べたところ、これらは *Pelotomaculum* の共生相手になる *Methanothermobacter thermotrophicus* 及び *Methanosaeta thermophila* に特異的に吸着することが明らかになった。これは、*Pelotomaculum* がこれらの蛋白質を使って共生相手を探し出していることを示すものである。次に、FliC または FliD を *Methanothermobacter* に吸着させた際の *Methanothermobacter* の反応についてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、このアーキアの中の数多くの遺伝子の発現が FliD の細胞表面への吸着により上昇することが示された。また、この蛋白質に対する抗体を作成し、抗体存在下、および非存在下における共生的メタン生成速度の比較を行ったところ、FliD に対する抗体はメタン生成速度を顕著に低下させたが、鞭毛主要成分の FliC に対する抗体は大きな影響がなかった。これは、FliD がシグナルの本体であることを示すものである。今後、FliD に結合するメタン菌細胞表面タンパク質の同定が期待される。この発見は広く興味を集め、Science 誌のコラム “Getting in Touch with Your Friends” (Marx CJ, 2009, 324:1150-1151) でも紹介された。

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 25 件）

①Ishii, S., T. Shimoyama, Y. Hotta and K. Watanabe. (2008) Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiol.* 8:6.

②Kato, S., T. Kosaka, and K. Watanabe. (2008) Comparative transcriptome analysis of responses of *Methanothermobacter*

thermautotrophicus to different environmental stimuli. Environ. Microbiol. 10:893-905.

③Kosaka, T., S. Kato, T. Shimoyama, S. Ishii, T. Abe, and K. Watanabe. (2008) The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. Genome Res. 18:442-448.

④Ishii, S., Y. Hotta and K. Watanabe. (2008) Methanogenesis versus electrogenesis: morphological and phylogenetic comparisons of microbial communities. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:286-294.

⑤Kaku, N., N. Yonezawa, Y. Kodama, and K. Watanabe. (2008) Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79:43-49

⑥Kodama, Y., and K. Watanabe. (2008) An electricity-generating prosthecate bacterium strain Mfc52 isolated from a microbial fuel cell FEMS Microbiol. Lett., 288:55-62.

⑦Ishii, S., K. Watanabe, S. Yabuki, B. E. Logan, and Y. Sekiguchi. (2008) Comparison of electrode reducing activities of *Geobacter sulfurreducens* and an enriched consortium in an air-cathode microbial fuel cell. Appl. Environ. Microbiol. 74:7348-7355.

⑧Shimoyama, T., S. Kato, S. Ishii, and K. Watanabe. (2009) Flagellum mediates symbiosis. Science 323:1574.

⑨Kato, S., T. Kosaka, and K. Watanabe. (2009) Substrate-dependent transcriptomic shifts in *Pelotomaculum thermopropionicum* grown in syntrophic coculture with *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Microb. Biotechnol. 2:575-584.

⑩Kato, S., and K. Watanabe. (2009) Analysis of gene transcripts in a crude oil-degrading marine microbial community. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73:1665-1668.

⑪Nishiyama, T., A. Ueki, N. Kaku, K. Watanabe, and K. Ueki. (2009) *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., novel, xylanolytic anaerobic rods isolated from a methanogenic reactor of cattle waste. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1901-1907.

⑫加藤創一郎、渡邊一哉. (2009) 遺伝子発現に基づいたメタゲノムの解析・利用技術. マリンメタゲノムの有効利用、シーエムシープレス. 3-13.

⑬加藤創一郎、渡邊一哉. (2009) メタン発酵共生系の進化と生存戦略. 化学と生物、47:253-260.

⑭高坂智之、渡邊一哉. (2009) ゲノム情報を基に微生物共生のメカニズムを探る. 日本バイオインフォマティクス学会ニュースレター 19: September 4-5.

⑮Watanabe, K. (2009) Environmental mining of biological activities on hydrocarbons. In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology: microbial interactions with hydrocarbons oils, fats and related hydrophobic substrates and products. Ken Timmis ed., Springer Verlag 1213-1217.

⑯Watanabe, K., Manefield, M., Lee, M., and Kouzuma, (2009) A. Electron shuttles in biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 20:633-641.

⑰Watanabe, K. and Bennett, G. (2009) Chemical biotechnology: an expanding discipline that contributes to sustainable development in the 21st century. Curr. Opin. Biotechnol. 20:607-609.

⑱下山武文、渡邊一哉. (2009) メタン発酵-ゲノム解析から明らかになった共生細菌の進化と生存戦略- 難培養微生物研究の最新技術 II -ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望- 大熊盛也、工藤俊章 監修、シーエムシープレス. 159-169.

⑲Ueki, A., Y. Kodama, N. Kaku, T. Shiromura, A. Satoh, K. Watanabe, and K. Ueki. (2010) *Rhizomicrobium palustre* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative stalked bacterium in the class *Alphaproteobacteria* isolated from rice plant roots. J. Gen. Appl. Microbiol. 56:193-203.

⑳Kato, S., and K. Watanabe. (2010) Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia. Microbes Environ, 25:145-151.

㉑Watanabe, K. (2010) Biofuel cells, Performance characterization. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. Wiley, 1-8.

㉒Shimoyama, T., and K. Watanabe. (2010) Chapter 15 Emerging techniques for metagenome screening. In METAGENOMICS and its applications in agriculture, biomedicine, and environmental studies. Li, R. W. ed., Nova Science Publishers.

㉓Ueki A, K. Abe, Y. Ohtaki, N. Kaku, K. Watanabe, and K. Ueki. (2011) *Bacteroides paurosaccharolyticus* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. Int. J. Syst. Evol.

Microbiol. 61:488-453.

④Suzuki, C., C.-S. Yun, T. Umeda, T. Terabayashi, K. Watanabe, H. Yamane, and H. Nojiri. (2011) Oligomerization and DNA-binding capacity of Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded on IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75:711-717.
⑤Kodama, Y., and K. Watanabe. (2011) *Rhizomicrobium electricum* sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative, prosthecate bacterium isolated from a cellulose-fed microbial fuel cell. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. in press.

[学会発表] (計 11 件)

- ①Watanabe, K. (2008. 5. 28) A long-tailed bacterium occurring in cellulose-fed MFC reactors and rice paddy-field MFC. 1st International symposium for microbial fuel cells. Penn State Univ.
②Watanabe, K. (2008. 6. 4) Flagellum-mediated interspecies communication for syntrophy. 108th American Society for Microbiology General Meeting, Boston.
③Watanabe, K. (2008. 8. 14) Interspecies interactions for anaerobic biodegradation. 12th International symposium for microbial ecology, Cairns.
④渡邊一哉 (2008. 9. 18) 微生物生態系を用いる燃料電池. 平成20年度水環境学会シンポジウム、大阪.
⑤渡邊一哉 (2008. 11. 25) 微生物燃料電池研究開発の現状. 電気化学会境界領域セミナー、東京.
⑥渡邊一哉 (2008. 11. 27) 微生物燃料電池と電気生成微生物生態系. 日本微生物生態学会シンポジウム、札幌.
⑦渡邊一哉 (2009. 2. 26) 石油分解菌群集のメタトランスクリプトーム解析. 平成20年度第3回かずさバイオテクノロジーセミナー、幕張.
⑧渡邊一哉 (2009. 3. 7) メタン発酵共生系の進化と生存戦略. ゲノム微生物学会、東京.
⑨渡邊一哉 (2009. 6. 11) Cassette-electrode microbial fuel cells for sustainable bioenergy. 2nd International Symposium for Microbial Fuel Cells. Gwangju Institute of Science and Technology, Korea.
⑩Watanabe, K. (2009. 11. 5) Microbial fuel cells for sustainable bioenergy. Northeastern Asian Symposium on Renewable Energy (JSPA/NSFC/NRF joint symposium). 広島.
⑪Watanabe, K. (2009. 11. 12) Our trials to

improve the performance of microbial fuel cells. International Conference on Environment Simulation and Pollution Control, -The Second Symposium on Microbial Fuel Cell in China-. 北京.

[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]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 一哉 (WATANABE KAZUYA)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授
研究者番号 : 40393467

(2) 研究分担者

末永 智一 (MATSUE TOMOKAZU)
東北大学・工学部・教授
研究者番号 : 70 173797