

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15428

研究課題名（和文）複合微生物系における発電機構の解明とその高効率化

研究課題名（英文）Acceleration of bacterial extracellular electron transfer based on understanding of inter-species interaction

研究代表者

徳納 吉秀 (Tokunou, Yoshihide)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：80865816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、電極上の異種菌体同士の相互作用に着目し、分子レベルで相互作用の機構を解明した。さらにそれを基に微生物発電の高効率化を実現した。また、本研究で用いた菌体を共培養する過程で硝酸消費速度が上昇することを見出した。この分子機構解明のため、上澄み成分の分析を行い、硝酸消費を促進する分子の特定に成功した。今後は、その分子を介した硝酸消費の詳細な作用機構の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物を利用したバイオ発電技術は、環境調和型のエネルギーシステムとして世界的に注目を集めており、その出力が実用化のボトルネックの一つになっている。本研究成果は発電出力の向上につながる成果であり、化合物の電気合成、バイオ電気化学センサーなど多岐に渡る技術への応用が期待できる。

また、本研究ではエネルギー代謝経路の一部である発電や硝酸消費呼吸の促進現象が明らかになった。本研究で使用した菌は土壌や河川など様々な環境中に生息する菌であるため、この協力的な相互作用は実環境中で働いている可能性が考えられる。本成果はバイオ発電の観点のみならず、微生物の生態学的観点からも興味深い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the interaction between different bacterial species on the electrode and elucidated the mechanism of interaction at the molecular level. Based on this, we realized the current enhancement from bacteria. We also found that the nitrate consumption rate increased during the process of co-cultivation of the bacteria used in this study. To elucidate the molecular mechanism, we analyzed the supernatant components and succeeded in identifying the molecule that promotes nitrate consumption. In the future, it is expected to elucidate the detailed action mechanism of nitrate consumption mediated by the molecule.

研究分野：微生物電気化学

キーワード：細胞外電子移動 微生物燃料電池 シュワネラ 緑膿菌 脱窒 膜小胞 微生物間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

発電菌と呼ばれる微生物は、呼吸の過程で生じた電子を細胞外の金属酸化物や電極へと伝達することができる。近年、発電菌を利用した電力生産(微生物燃料電池)や電子注入を伴う物質生産(電気微生物合成)技術の開発が進められており、その発電機構が盛んに研究されている。こうした電気バイオプロセス技術の効率は微生物の発電能に依存することから、発電反応の高速化が望まれている。これまで、多くの研究者がモデル発電菌である鉄還元細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 (シュワネラ菌)を純粋培養し、その発電機構の解明に取り組んできたが、シュワネラ菌の純粋培養により得られる電流値は、活性汚泥を電極培養することで得られる複合微生物系よりも一般に低い。シュワネラ単独系と複合微生物系の間大きな発電量の差を生む鍵となる因子はほとんど特定されておらず、鍵因子を明らかにできれば電気バイオプロセスを更に高速化する基盤技術を創出することが期待できる。

そこで本研究ではシュワネラ単独系と複合系の違いの一つとして、細菌叢における非発電菌に着目した。電極上では発電菌に比べ発電能が極めて低い菌(これを非発電菌とする)も生息し、細菌叢を形成している。そこで、発電菌・非発電菌間の相互作用こそが複合微生物系における高効率発電の鍵なのではないかという仮説を立てた。例えば、発電菌であるシュワネラ菌と発電能が低い非発電菌とされる緑膿菌を電極上で共培養することで、数十倍まで発電量が増加する。発電量を向上する相互作用の実態を分子レベルで明らかにすることができれば、電気バイオプロセスを更に高速化する基盤技術の創出が期待できる。

## 2. 研究の目的

事前準備として、それぞれの菌の培養上清から発電能を向上する成分を精製したところ、シュワネラ菌が産生する膜小胞(メンブレンベシクル, MV)と呼ばれる生体膜からなる直径約 100nm 程度の球状構造体、緑膿菌が産生する「ピオシアニン」という酸化還元分子が微生物間を媒介することを明らかにした。膜小胞による発電能の向上についてはこれまで報告が無く、またピオシアニンについては両菌間での分子機構は解明されていない。そこで、本研究では膜小胞とピオシアニンの作用機構の解明を目的とし、電気バイオプロセスを高速化する基盤技術の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) シュワネラ菌と緑膿菌の電気化学測定

ITO 電極、銀塩化銀電極、白金線をそれぞれ作用極、参照極、対極とする三電極電気化学系を作成し、電解質中にシュワネラ菌もしくは緑膿菌を注入した。ピオシアニンや膜小胞を系内に添加し、その触媒電流や酸化還元特性を定電位測定、サイクリックボルタンメトリー測定、微分パルスボルタンメトリー測定などにより評価した。

### (2) ピオシアニンと膜小胞の毒性評価

ピオシアニンと膜小胞の毒性を評価するため、ピオシアニンと膜小胞をそれぞれシュワネラ菌と緑膿菌に添加し、増殖曲線、生成電流値、代謝物定量を行った。ピオシアニンは精製品を購入し、膜小胞は培養上清のフィルタリング、超遠心、密度勾配遠心により精製し実験に用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ピオシアニンと膜小胞による発電促進機構の解明

シュワネラ菌、緑膿菌の電気化学測定(定電位測定、サイクリックボルタンメトリー測定、微分パルスボルタンメトリー測定)により、ピオシアニンと膜小胞による発電能向上の速度論的性質を明らかにした。さらに、微分パルスボルタンメトリーの結果により、シュワネラ菌 - ピオシアニン、緑膿菌 - 膜小胞間の結合強度を明らかにした。さらに、本技術を遺伝子欠損株に適用することで、ピオシアニンによる発電促進に必要なシュワネラ菌膜タンパク質の特定に成功した。

シュワネラ菌と緑膿菌を共培養することで、シュワネラ菌の単培養時に比べ最大約 15 倍の電流値が観測された。本系でもサイクリックボルタンメトリー測定と微分パルスボルタンメトリー測定を行うことで、共培養時でもピオシアニンが発電を促進していることを示した。

### (2) 膜小胞による緑膿菌の硝酸消費の促進

膜小胞の毒性評価の過程で、シュワネラ菌由来の膜小胞が緑膿菌の硝酸消費速度を向上させることを見出した。緑膿菌は硝酸を窒素に変換する脱窒反応を進行する菌である。本機構解明のため、硝酸から窒素へ変換する過程での中間代謝産物の定量や、緑膿菌の遺伝子欠損株の硝酸消費速度の測定を行った。現在、その詳細な機構解明を行っている。

(3) 光合成細菌の発電機構の解明

「(1)ピオシアニンと膜小胞による発電促進機構の解明」で得られた電気化学の知見と技術を用いて、光合成細菌の発電に関する分子機構を明らかにした。本成果は、ChemElectroChem 誌に掲載され、雑誌カバーに採択された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tokunou Yoshihide, Vieira Lemos Rita, Tsujimura Seiya, Okamoto Akihiro, Ledezma Pablo, Freguia Stefano	4. 巻 8
2. 論文標題 Synechococcus and Other Bloom Forming Cyanobacteria Exhibit Unique Redox Signatures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemElectroChem	6. 最初と最後の頁 360 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/celec.202001274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokunou Yoshihide, Vieira Lemos Rita, Tsujimura Seiya, Okamoto Akihiro, Ledezma Pablo, Freguia Stefano	4. 巻 8
2. 論文標題 Cover Feature: Synechococcus and Other Bloom Forming Cyanobacteria Exhibit Unique Redox Signatures (ChemElectroChem 2/2021)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemElectroChem	6. 最初と最後の頁 271 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/celec.202001558	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 徳納 吉秀	4. 巻 99
2. 論文標題 微生物電気化学のすすめ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 79 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.2_79	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tokunou Yoshihide, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Physiological Benefits of Oxygen-Terminating Extracellular Electron Transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01957-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.01957-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Y. Amano, T. Yanagida, T. Yasui, N. Nomura, Y. Tokunou
2. 発表標題 BMV surface components control association with ZnO nanowire
3. 学会等名 EMBO The Company of Biologists Workshop: Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions, and medical applications (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田理久、野村暢彦、豊福雅典、徳納吉秀
2. 発表標題 メンブレンベシクルによる脱室促進の機構解明
3. 学会等名 MiCS ワークショップ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳納吉秀
2. 発表標題 微生物集団の中ではたらく電気
3. 学会等名 第57回緑膿菌感染症研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 A. Okamoto, and Y. Tokunou
2. 発表標題 Submicromolar level additives boost microbial electrocatalysis of <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA by two orders of magnitude
3. 学会等名 8th International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Sato-Soto, Y. Tokunou, and S. Tsujimura
2. 発表標題 Evaluation of flavin-modified anodes and its interaction with <i>Shewanella oneidensis</i>
3. 学会等名 73rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Savege Thomas、野村暢彦、豊福雅典、徳納吉秀
2. 発表標題 膜小胞に内包されたギ酸脱水素酵素の活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 頓宮弘将、豊福雅典、野村暢彦、徳納吉秀
2. 発表標題 酸素濃度と細胞外電子伝達をもたらす空間的なバイオフィルム内代謝の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武田理久、豊福雅典、野村暢彦、徳納吉秀
2. 発表標題 異種微生物間でのメンブレンベシクルを介した緑膿菌の呼吸促進
3. 学会等名 第57回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徳納吉秀、頓宮弘将、豊福雅典、野村暢彦
2. 発表標題 二光子励起顕微鏡を用いたバイオフィルム内NADH/NAD+比の空間分布解析
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第48回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Savege Thomas、野村暢彦、豊福雅典、徳納吉秀
2. 発表標題 Shewanella oneidensis MR-1膜小胞のギ酸脱水素酵素活性評価
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 頓宮弘将、豊福雅典、野村暢彦、徳納吉秀
2. 発表標題 電子の移動に着目したバイオフィルム内代謝の空間分布解析
3. 学会等名 第35回微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳納吉秀、頓宮弘将、野村暢彦
2. 発表標題 コロニーバイオフィルム内NADH/NAD+比の可視化と制御
3. 学会等名 第54回ピブリオシンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------