

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21770015

研究課題名 (和文) ナノワイヤーを介した微生物間シグナル伝達機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of novel signal transduction mechanism observed between bacteria and archaea

研究代表者

下山 武文 (SHIMOYAMA TAKEFUMI)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10534878

研究成果の概要 (和文)：

以前の研究で、発酵共生細菌とメタン生成古細菌の間でナノワイヤーを介し、シグナル伝達が行われている現象を発見した。この現象は今まで全く知られていないシグナル伝達機構と考えられ、また異種微生物間、特にバクテリアとアーキアという進化系統上非常に離れた種間での現象であることから、生物学上非常に興味深い研究になると考える。本研究ではこのシグナル伝達機構の解明を目的に、メタン菌のシグナル受容体タンパクの同定、また、微生物燃料電池を用いた異種微生物間における電子移動の検出を試みた。

研究成果の概要 (英文)：

In our previous research, we revealed a novel phenomenon in a symbiotic cultivation of fermentative bacteria and methanogen. We identified a role of a bacterial flagellum in maintaining a symbiosis between prokaryotes, not only to ensure proximity between specific partners but also to synchronize their metabolism. The liaison between fermentative bacteria and methanogen represents a protein-mediated communication system that has specifically evolved for interspecies interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生態・環境

科研費の分科・細目：分科：基礎生物学，細目：生態・環境

キーワード：微生物生態学，シグナル伝達，発酵，微生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

メタン発酵において、プロピオン酸酸化共生細菌とメタン生成古細菌との間では、水素授受を介した共生関係が築かれていることが知られている。これまでの研究で我々は異種微生物間における全く新しいシグナル伝達機構を発見した。嫌気発酵槽内で共生関係にある水素産生細菌とメタン生成古細菌との間で、共生開始時にワイヤーで連結される様子を観察した。この2種微生物は水素の授受を行う共生関係にある。このとき水素は水中を拡散してメタン菌に届くが、共生細菌からのびるナノワイヤーがメタン菌を捕らえ“能動的に”微生物間の距離を縮めることで水素を受け渡しやすくしていることが示唆された。さらに驚くべきことにナノワイヤーの接着をメタン菌が“認識”し、メタン生成経路の遺伝子を活性化させることが確認された。

最もよく研究されてきた微生物間コミュニケーションとしてクオラムセンシングがある。クオラムセンシングは細胞密度を感知し、物質産生を制御する機構である。これは同種の微生物間に限られた現象である。しかし、我々の発見したシグナル伝達は、異種微生物間、特にバクテリアとアーキアという進化上非常に離れた生物間での現象であり、さらにナノワイヤーの接着でメタン菌の遺伝子発現が変動する特別な機構の存在が示唆され、生物学的、また電子移動の電気化学的にも広く興味を引く研究課題と考える。

2. 研究の目的

本提案では2年間の研究期間内に以下4項目の研究を完了し、微生物間シグナル伝達機構に関する知見・理解を深めることを目的とした。

(1)他共生系での同様な機構の確認

他の共生関係にある微生物種において同様なナノワイヤーを介したシグナル伝達機構があることを確認する。これによって異種微生物間のシグナル伝達は普遍的に存在することを証明する。

(2)ナノワイヤーを介した電子移動の確認

共生微生物が有機物を分解する際に生じる還元力を電子移動として捨てている場合、ナノワイヤーを介して電子の移動があるはずである。これを微生物燃料電池の原理を利用して測定し、異種微生物間で電子移動があることを電気化学的に測定する。

(3)電位がある状態での発現変動の調査

メタン生成古細菌が共生細菌のナノワイヤーの作用によってメタン生成経路の遺伝子発現が変動することが確かめられている。電子移動が起因となって遺伝子発現の変動が起きている場合、電位をかけることによって遺伝子発現に変動が生じる可能性がある。この遺伝子発現変動と共生開始時の発現変動を比較することで、共生開始時の合図が電子の感知であるか調査する。

(4)接着物質と進化経路の解明

ナノワイヤーを構成するタンパクが共生関係を築けるメタン菌にのみ特異的に接着することが確認されている。しかしメタン菌の何を認識しているのかは不明である。この認識物質を特定し、さらに他の共生関係を築けないメタン菌との違いを進化系統の比較から考察し、共生関係獲得の経路を解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1)他共生系での同様な機構の確認

他の共生関係にある微生物種において同様なナノワイヤーを介したシグナル伝達機構があることを確認するため、微生物保存機関から共生関係にある微生物を取り寄せ、共生関係確立後電子顕微鏡観察で同様のナノワイヤーの存在を確認する。これによって異種微生物間のシグナル伝達は普遍的に存在することを証明する。また、ナノワイヤーの存在を確認できた場合、構成成分がタンパク質ならば大腸菌でクローニングし分子的な相互作用を調べる。メタン菌のようにナノワイヤーから影響を受ける微生物の作用部位は細胞表面の膜タンパクである可能性が高いと考えられる。そのため作用部位を特定するためには酵母 Two-hybrid 法を用いる。これは特定のタンパクと相互作用するタンパクを検出する方法である。本研究ではメタン菌の遺伝子ライブラリーを酵母で作成し、ナノワイヤータンパクと相互作用するタンパクを発現させている酵母を検出することで、ナノワイヤーと作用するメタン菌の遺伝子、つまりタンパクを検出する。このタンパクを特定できた場合はタンパク同士の結合性などの相互作用を BIACORE システム（分子間相互作用の特異性、結合・解離速度、結合の強さを高感度で測定できる装置）で分析する。

(2)ナノワイヤーを介した電子移動の確認

共生微生物が有機物を分解する際に生じる還元力を電子移動として捨てている場合、ナノワイヤーを介して電子の移動があるはずである。これを微生物燃料電池 (microbial

fuel cell, MFC) の原理を利用して測定し、異種微生物間で電子移動があることを電気化学的に測定する。MFC は、微生物による有機物の分解に伴う還元力を電子として負極から取り出し、正極に流すことで電気エネルギーを回収する装置である。今回は正極および負極に例えば共生細菌とメタン菌を入れ、微生物間の電子移動を測定する。また、メタン生成古細菌が共生細菌のナノワイヤーの作用によってメタン生成経路の遺伝子発現が変動することが確かめられている。電子移動が起因となって遺伝子発現の変動が起きている場合、電位をかけることによって遺伝子発現に変動が生じる可能性がある。この遺伝子発現変動と共生開始時の発現変動を比較することで、共生開始時の合図が電子の感知であるか調査する。ナノワイヤーを構成するタンパクが共生関係を築けるメタン菌にのみ特異的に接着することが確認されている。しかしメタン菌の何を認識しているのかは不明である。この認識物質を特定し、さらに他の共生関係を築けないメタン菌との違いを進化系統の比較から考察し、共生関係獲得の経路を解明することを目指す。

4. 研究成果

(1) 他共生系での同様な機構の確認

水素授受がある発酵共生系を図 1 に示す。この共生系において、本研究対象であるメタン生成古細菌とプロピオン酸酸化共生細菌の繊維構造物質で連結した現象は、他の共生系では確認されなかった。これは培養条件によって繊維状物質の生成に差があることが考えられるため、検出には至らなかった可能性があり、繊維状物質の生成を否定するものではない。ここから、本研究対象である共生系はシグナル伝達を研究する上で重要なモデル系であることが確認された。

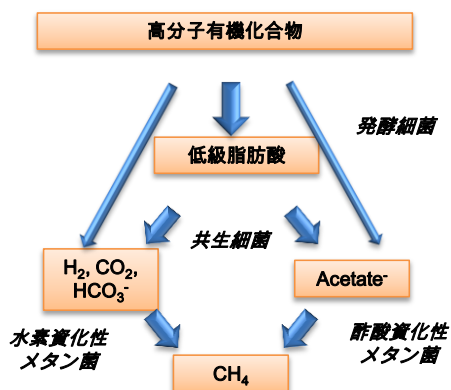


図 1. 共生による有機物からのメタン生成

プロピオン酸酸化共生細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* の鞭毛がメタン生成古細菌

菌 *Methanobacter thermautotrophicum* に連結している状態が観察されているため、本研究では鞭毛タンパクを特異的に認識する受容体タンパクがメタン菌の細胞表面に存在すると予想した。これを確認するため、異種発現した鞭毛タンパク、FliC を精製後、酵母 Two-hybrid 法でメタン菌タンパク質ライブラリから相互作用するタンパクの同定を試みた。その結果 FliC と相互作用していると考えられるタンパク質を組み換えられた酵母が数株生育してきた。現在はこれらの酵母の保有するプラスミドについて解析を行っている (図 2)。

今後はこのタンパク質の機能解明が進むことによって、外部の異種微生物のタンパクからシグナルがメタン菌の細胞内へ伝達される新たな機構の解明が期待される。

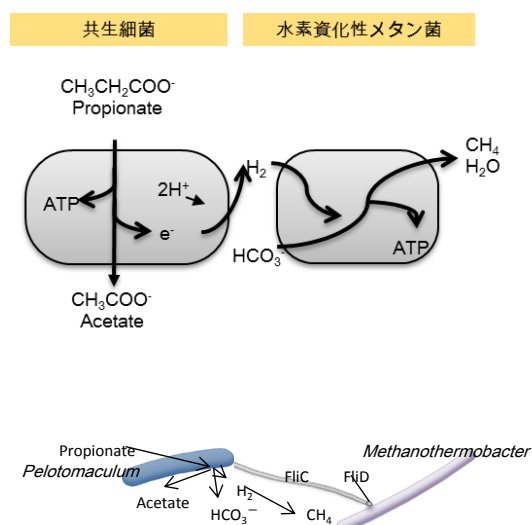


図 2. FliC を認識したときのシグナル伝達機構の推定

(2) ナノワイヤーを介した電子移動の観察

細胞が連結している状態で、繊維状物質を電子が移動する場合、微生物細胞 1 つあたりの電子移動、つまり電流量はピコアンペアほどのごく微量の電流量であることが予想され、検出は非常に困難である。そこで本研究では微生物燃料電池を用いて、微生物の細胞外電子伝達を観察した。微生物燃料電池において、負極槽では、微生物が有機物を分解する過程で電子を電極に放出する反応が起きている。一方、正極槽では、負極から移動してきた電子が正極上で酸素と反応し水が生成する反応が起きている。そのため、微生物が有機物を代謝することで生じた電子を電気エネルギーとして観察することができる。この機構を利用し、電流生産微生物を新たに分離し、電子移動を観察することを目的に次

の実験を行った。

①微生物電池を用いた電流生産の観察

はじめに、電流生産微生物を集積させるため、田んぼ由来の土を微生物燃料電池に播種し、電流生産を試みた。模擬廃水を合成し、これを基質として電流生産を試みたところ、運転開始後2週間ほどで安定した電流生産が観察された。この電流生産が安定している状態では、電子伝達物質（メディエーター）を介して電子を電極に伝達している微生物と、電極に付着して電子を電極に直接伝達している微生物の2種が考えられる。そこで電極を取り出し、穏やかに洗浄後、電極に強固に付着している微生物分離を試みた。

②電流生産微生物の分離

微生物燃料電池から電極を採取後、嫌気状態で微生物の分離を行った。数種のコロニーが得られ、純粋培養に成功した微生物について系統分類を行った。その結果、*Dysgonomonas* に分類される微生物が電流生産に関与していることを見いだした。これについて、様々な基質を用いた微生物燃料電池によって電流生産を確認し、細胞外電子移動の可能性を見いだした。

今後は、ここで発見された微生物の電子伝達機構の解明を通じて、微生物を用いたエネルギー生産の利用と応用が期待される。

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）

- ① Kodama, Y., T. Shimoyama, K. Watanabe (2012). "*Dysgonomonas oryzae* sp. nov., isolated from a microbial fuel cell." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
doi: 10.1099/ijs.0.039040-0
(査読あり)
- ② Watanabe, K., M. Miyahara, T. Shimoyama, K. Hashimoto (2011). "Population dynamics and current-generation mechanisms in cassette-electrode microbial fuel cells." Applied microbiology and biotechnology 92(6): 1-8.
(査読あり)

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Shimoyama, T., Nakayama, T., Watanabe, K., Fermentative bacteria communicates with methanogens by using its flagellum. 4th FEMS Congress of European Microbiologists, Geneva, Switzerland
June 29, 2011

〔図書〕（計 1 件）

- ① 下山武文, 渡辺一哉『難培養微生物研究の最新技術 II』p. 159-169 シーエムシー出版（2010）

〔その他〕

ホームページ等

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/9d84e20abc15c81f1d2cdfedb0311d99.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下山 武文 (SHIMOYAMA TAKEFUMI)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：10534878