

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03633

研究課題名(和文) 微生物制御の新展開：電気的代謝スイッチング制御機構の解明

研究課題名(英文) New field of managing microbes: Elucidation of electrically metabolic switching mechanisms

研究代表者

二又 裕之 (Futamata, Hiroyuki)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：50335105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物代謝の電気的制御のため、代表的嫌気微生物であり地球規模での物質循環や金属腐食にも関与する硫酸還元細菌に着目した。分離株は最適電位+0.4 V (vs SHE)の細胞外電子伝達(EET)能を示した。完全長ゲノム解読後、EETおよび硫酸還元条件下で培養した細胞を用いてヘム染色を行った結果、EET条件下のみ細胞外膜画分にヘムタンパク質が検出された。網羅的転写遺伝子解析の結果、EET条件下でPiliA遺伝子と局在不明のシトクロムの高転写が観察され、細胞外環境に応答した劇的な代謝変化が推察された。以上、電気的代謝応答関与遺伝子およびタンパク質を見出し環境変化に伴う発現動態の理解に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外電子伝達機構(EET)は生物の新規なエネルギー生産機構として着目され、地球規模での生態系の理解に不可欠と認識されつつある。しかし、その詳細な機構は特定の微生物2種に限定されている。その様な状況下において、代表的嫌気微生物であり地球規模での物質循環や金属腐食にも関与する硫酸還元細菌のEETが遺伝子およびタンパク質レベルで理解を得たことは学術的に大いにインパクトがある。また、電気化学的にEET関連遺伝子およびタンパク質が動的に変化していることは、電気的代謝制御の可能性を示しており金属腐食の軽減化技術に昇華できれば社会的意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：For electrical control of microbial metabolism, we focused on sulfate-reducing bacteria, which are representative anaerobic microorganisms and involved in global material cycling and metal corrosion. Isolates showed extracellular electron transfer (EET) ability at an optimum potential of +0.4 V (vs. SHE). After decoding the full-length genome, heme staining of cells cultured under EET and sulfate-reducing conditions revealed that heme proteins were detected in the extracellular membrane fraction only under EET conditions. Comprehensive transcriptome analysis revealed high transcription of the PiliA gene and cytochrome with unknown localization under EET conditions, suggesting a dramatic metabolic change in response to the extracellular environment. In conclusion, we have succeeded in identifying genes and proteins involved in electrical metabolic responses and understanding their expression dynamics in response to environmental changes.

研究分野：微生物生態学

キーワード：代謝 細胞外電子伝達 硫酸還元細菌 微生物燃料電池

1. 研究開始当初の背景

硫酸還元細菌 (SRB: sulfate reducing bacteria) は嫌気環境中に普遍的に存在する微生物である。多種多様な有機物・硫黄化合物を利用可能であることから、地球規模の炭素・硫黄循環に寄与している。一方で、パイプライン等の金属腐食の原因微生物でもある。このように、SRB の代謝は地球規模の元素循環だけにとどまらず、金属腐食による人間社会への経済的損失にまで影響を及ぼしていることから、SRB 代謝の理解は生態学・工学的に非常に意義があると考えられる。我々は、これまでに汽水湖底泥より硫酸還元細菌 *Cupidesulfobivrio* sp. HK-II 株を分離し、当該微生物が細胞外電子伝達 (EET: Extracellular electron transfer) 能を有することを明らかにした。近年、EET 機構は微生物燃料電池や微生物電気合成等バイオテクノロジーへの応用が期待されており、EET 機構の理解は産業上および学術上重要である。一方、微生物の EET 機構に関しては *Shewanella oneidensis* MR-1 株や *Geobacter sulfurreducens* PCA 株などの特定の微生物株に限定されており、SRB に関する知見はほぼ無いのが実情である。

2. 研究の目的

本研究では、微生物代謝の電氣的制御技術構築を究極の目標とし、当該微生物の細胞外電子伝達機構とそれに伴う代謝スイッチング制御機構の解明を目的として、本研究では HK-II 株の電極電位応答性および EET 関連遺伝子・タンパク質の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) HK-II 株の硫酸還元条件下における培養

乳酸 (40 mM) を電子供与体、硫酸 (20 mM) を電子受容体とする嫌気性培地で前培養した後、同条件で本培養した。

(2) HK-II 株の EET 条件下における培養

上記(1)の条件下で前々培養および前培養した対数増殖期後期の菌体を嫌気チャンバー内で洗浄・集菌し、乳酸 (10mM) を電子供与体とする電気化学セルにて培養した。ポテンショスタットを用いて電極電位をそれぞれ-0.3 から+0.6 (V vs. SHE) に設定し、経時的に有機酸濃度および電流生産を測定した。

(3) SDS-PAGE

硫酸還元および EET 条件下 (0 V および+0.4 V [vs. SHE]) で培養した菌体からタンパク質を抽出し、細胞質とペリプラズムの混合物 (CP+PP)、内膜 (IM) および外膜 (OM) に分画した。非還元 SDS-PAGE 後、シトクロムに特異的なヘム染色を行った。

(4) RNAseq 解析

2-1 および 2-2 に従って、硫酸還元および EET 条件 (+0.2 V および+0.4 V [vs. SHE]) 下で培養した菌体から RNA を抽出し、RNAseq 解析を行った。

(5) PilA に関する解析

HK-II 株の PilA と II 型分泌系 (T2SS)、IV型線毛 (T4aP) および *Geobacter* 属の導電性線毛 (PilA-N-C) の系統樹を MEGA11 により作成した。タンパク質の構造予測は AlphaFold2 により行った。

4. 研究成果

(1) HK-II 株の電極電位応答性の評価

-0.3 V から-0.1 V (vs. SHE) において電流生産が確認されなかった。一方で、0 V から+0.6 V (vs. SHE) においては乳酸消費に伴う電流生産が確認された。そのため、HK-II 株は 0 V (vs. SHE) よりも正の電位において EET 可能であることが示された。クーロン効率を比較すると、+0.4 V (vs. SHE) において最も高い値を示したことから、HK-II 株は+0.4 V (vs. SHE) において EET 至適電位を持つことが示唆された (図 1)。

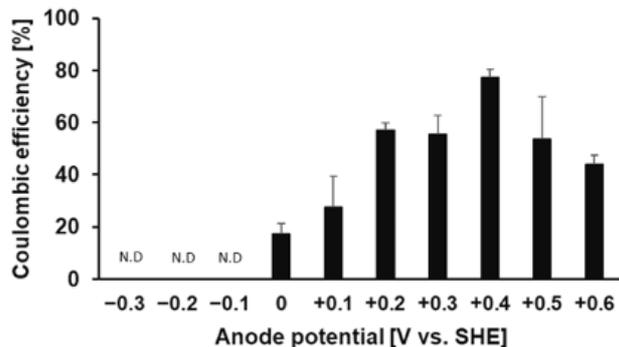


図 1. 電極電位がクーロン効率に及ぼす影響

(2) EET 関連タンパク質の解析

硫酸還元および EET 条件 (0 V および +0.4 V [vs. SHE]) において、CP+PP、IM および OM における全ての画分でヘム染色バンドが観察された(図 2)。特に留意したいのは、+0.4 V (vs. SHE) における OM 画分 15-17 kDa のバンドである。EET 活性が高い +0.4 V (vs. SHE) 条件にて、高発現していることから、EET に関与していると示唆された。LC-MS/MS 解析により、当該バンドのシトクロム同定を試みたが、シトクロムは検出されなかった。そのため、ゲノム情報から予測される分子量およびタンパク質の局在予測から推定した。その結果、外膜シトクロムは予測されなかったものの、局在不明のシトクロム (RVX_R28140 および RVX_R03310) が見出された。両シトクロムは *Shewanella oneidensis* MR-1 株の EET に必須である内膜シトクロム CymA と 25.7% および 27.2% の相同性を示し、タンパク質構造も類似していた。そのため、両シトクロムの EET 機構への関与が示唆された。しかし、EET 条件時において外膜画分にシトクロムが局在する理由は不明である。

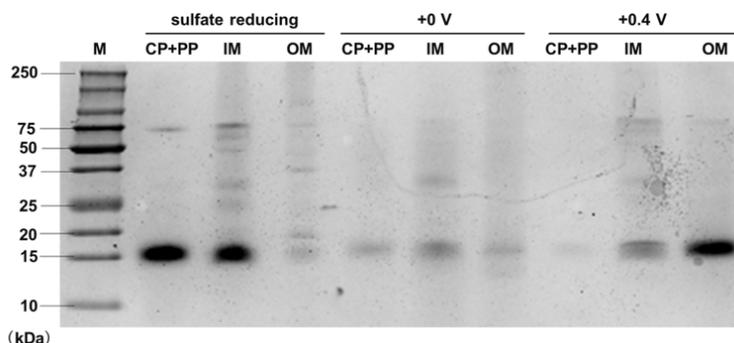


図2. 各培養条件におけるシトクロム発現

(3) RNAseq による EET 関連遺伝子の解析

RNAseq の結果、EET 条件である +0.2 V および +0.4 V (vs. SHE) 間の遺伝子転写に大きな違いは見られなかった。一方、硫酸還元および EET 条件間では遺伝子転写が大きく異なっていた。そのため、HK-II 株は EET 時に特異的な遺伝子転写が生じていることが明らかになった。特に留意したいのが、硫酸還元条件に対し EET 条件時に極高転写されている *pilA* (RVX_R24740 から RVX_R24760) である。EET モデル微生物の *Geobacter sulfurreducens* PCA 株は PilA を介して EET を行う⁽¹⁾。そのため、HK-II 株においても PilA を介した EET 機構が示唆された。経験則的基準⁽²⁾からは PilA の導電性は予測されなかった。系統解析の結果、HK-II 株の PilA は T2SS、T4aP および PilA-N-C のいずれとも進化距離が離れていた (図 3 A)。AlphaFold2 によるタンパク質構造予測の結果、3 つの PilA の構造が類似し (図 3 B-D)、また *G. sulfurreducens* の PilA-N とも類似していた (図 3 E)。一方、PilA-C に該当する構造は HK-II 株の PilA には含まれていなかった (図 3 F)。これらの特徴から、HK-II 株の PilA が導電性を示す場合、新規の導電性線毛である可能性が示唆された。

一方で、EET への関与が示唆された RVX_R28140 および RVX_R03310 の両シトクロムは高転写されていた。Yangqi 等の報告では、*G. sulfurreducens* が PilA を介してシトクロムを外膜へ分泌しており、PilA 自体には導電性がないことが報告されている⁽³⁾。このことは、EET 条件において HK-II 株の外膜上にシトクロムが局在していた結果と合致する (図 2)。そのため、HK-II 株は PilA によるシトクロム分泌機構により RVX_R28140 および RVX_R03310 等のシトクロムを外膜に分泌し、EET を発揮している可能性が示唆された。

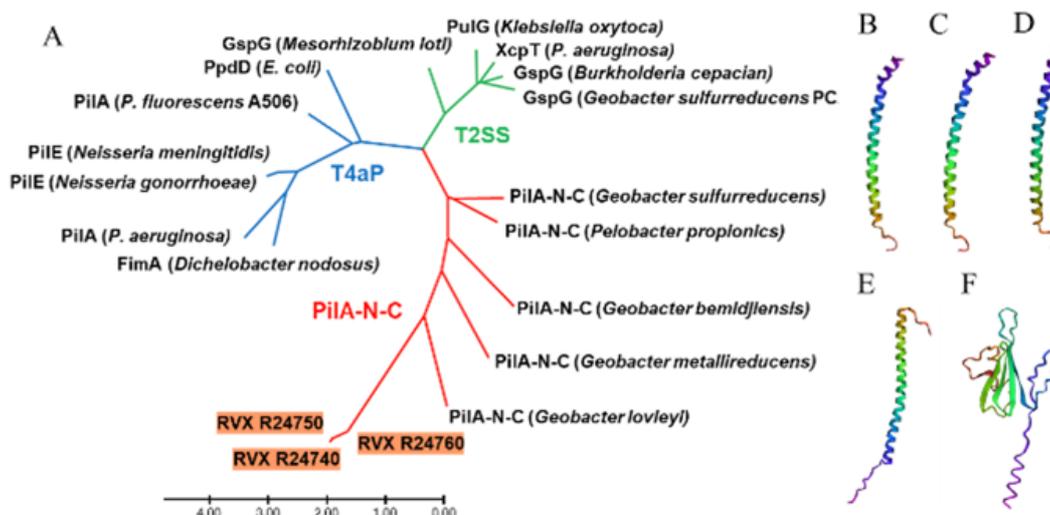


図3. HK-II株のPilA解析

(A) Piliの系統学的解析、(B) RVX_R24740、(C) RVX_R24750、(D) RVX_R24760、(E) HK-II株のPilA-N、(F) PCA株のPilA-C

<引用文献>

- ① Liu, X., Walker, D. J. F., Nonnenmann, S. S., Sun, D. & Lovley, D. R. Direct observation of electrically conductive pili emanating from *geobacter sulfurreducens*. *MBio* **12**, 1–7 (2021)
- ② Walker, D. J. F. *et al.* Syntrophus conductive pili demonstrate that common hydrogen-donating syntrophs can have a direct electron transfer option. *ISME J.* **14**, 837–846 (2020).
- ③ Gu, Y. *et al.* Structure of *Geobacter* pili reveals secretory rather than nanowire behaviour. *Nature* **597**, 430–434 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 林稜也、安池一貴、片桐美紀、大前貴裕、窪野一郎、田代陽介、二又裕之	4. 巻 1
2. 論文標題 微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく嫌気バイオプロセスの向上	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本生物工学会トピックス集	6. 最初と最後の頁 36 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Arashi Yui, Mochihara Hiroki, Kubota Hiroko, Suzuki Kei, Chiba Yusuke, Kato Yutaka, Kogure Toshihiro, Moriuchi Ryota, Dohra Hideo, Tashiro Yosuke, Futamata Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Rechargeable Biomineral Induced by Sulfate Reducing Bacterium Cupidesulfobivrio sp. HK-II	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.08.07.552368	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19件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林稜也、安池一貴、片桐美紀、大前貴裕、窪野一郎、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく嫌気バイオプロセスの向上
3. 学会等名 生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 微生物を用いた水質浄化への試みと微生物燃料電池の将来展望
3. 学会等名 水産技術研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 微生物のチカラで生ゴミから電気を
3. 学会等名 2021年度第1回静岡大学サステナビリティセンター公開講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大前貴裕、安藤翔太、窪野一郎、工藤優輝、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 Desulfovibrio sp. HK-II株の電気化学的代謝制御に向けた電極電池応答性の評価
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪野一郎、大前貴裕、工藤優輝、林稜也、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌Desulfovibrio sp. HK-II株の電子受容体変化に伴う代謝変換
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林稜也、安池一貴、片桐美紀、大前貴裕、窪野一郎、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく嫌気バイオプロセスの向上
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林稜也、安池一貴、片桐美紀、大前貴裕、窪野一郎、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性鉱物による嫌気物質変換能向上に寄与する微生物電子共生系の特性
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林稜也、安池一貴、市川幸太、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 嫌気微生物生態系の活性に及ぼす鉄系化合物の影響評価
3. 学会等名 土壤微生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪野一郎、大前貴裕、川島京介、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌Cupidesulfovibrio sp. HK-11株における細胞外電子伝達に関する導電性膜タンパク質析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林稜也、安池一貴、中野修作、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性鉱物により形成される微生物電気共生系の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪野一郎、大前貴裕、川島京介、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 Cupidesulfovibrio sp. HK-II株の電極電位応答性および細胞外電子伝達関連タンパク質の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪野一郎、大前貴裕、川島京介、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌Cupidesulfovibrio sp. HK- 株の導電性線毛を介した細胞外電子伝達
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林稜也、安池一貴、中野修作、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性鉱物により構築される微生物電子共生系の解析
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島 京介、矢田 祐喜、田代 陽介、二又 裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌Cupidesulfovibrio sp. HK-II株のギ酸を電子供与体とする細胞外電子伝達機構の解析
3. 学会等名 日本水環境学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島京介、窪野一郎、池内元太、二又裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌Cupidesulfovibrio sp. HK-II株における新規PilAとcytochromesを介した細胞外電子伝達機構
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性ミネラルの解析と微生物電気システム
3. 学会等名 生物工学会中部支部会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由井嵐、林稜也、安池一貴、窪野一郎、小暮敏博、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 蓄電性バイオミネラルから見た微生物生態系とは
3. 学会等名 日本微生物生態学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 微生物燃料電池に関する基盤研究と応用に向けて
3. 学会等名 静岡県工業技術研究所学習会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 微生物燃料電池の社会・学術への新しい可能性
3. 学会等名 第5回静岡大学浜松キャンパス - 浜松ホトニクス(株)中央研究所研究交流会(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修：渡辺一哉、分担：二又裕之(第4章)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 245
3. 書名 微生物による発電・水素生産技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学工学部 環境微生物生態工学研究室 http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/futamatalab/

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
研究 分 担 者	田代 陽介 (Tashi ro Yosuke) (30589528)	静岡大学・工学部・講師 (13801)	

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			
インド	Indian Institute of Technology Hyderabad			