

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23241012

研究課題名(和文) 富栄養化内湾堆積物における異種微生物間長距離細胞外電子伝達の実証

研究課題名(英文) Long distance microbial interspecies electron transfer in eutrophicated coastal marine sediment

研究代表者

左山 幹雄 (SAYAMA, Mikio)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：20344145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円、(間接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：自然環境中の物質循環は、段階的に連続して進行する様々な酸化-還元反応により構成されている。自然環境中の物質循環において、電子が長距離(mm～cmスケール)を直接移動(電流)することにより酸化-還元反応が共役しているという概念は、それを支持する多くのデータが蓄積されつつあるが、未だ実証には至っていない。我々は、現場環境下の堆積物中における電子の長距離移動を観察できる微小電位電極を開発し、それをを用いて東京湾湾央部の堆積物表層において電子が実際に長距離を移動していること、その機構として導電性鉄鉱物(磁鉄鉱)と細胞内に導電性構造を有する繊維状細菌の寄与が考えられることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Biogeochemical element cycling under natural environments consists cascades of oxidation-reduction processes. The concept that spatially segregated (mm to cm scale) oxidation&-reduction reactions can be coupled by electric currents in nature are now to be widely supported, but still no firm evidence exist to verify it under in situ conditions. We have developed a novel microsensor that is able to measure electric potential (EP) at micrometer and microvolt scales, and got significant positive in situ EP-microporfiles at the sediment surface in Tokyo Bay. There may be two mechanisms contributing for the long distance electron transfer in Tokyo Bay sediment, one is conductive mineral nanoparticles (magnetite) and the other is conductive filamentous bacteria (Desulfobulbaceae). Magnetite can transfer electrons through solid state cycling of structural Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>. The filamentous bacteria contain strings with distinct properties in accordance with a function as electron transporters.

研究分野：沿岸堆積物の生物地球化学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：細胞外電子伝達 酸化還元反応 堆積物 物質循環 微生物

1. 研究開始当初の背景

透水性の低い富栄養化内湾堆積物における生物地球化学的物質循環過程は、段階的に進行する酸化還元反応で構成されており、酸化還元反応の共役（酸化還元種間の電子の授受）には、酸化還元種とその反応を触媒する微生物との直接接触が必須であり、その主要な物理過程は酸化還元種の分子拡散または大型底生動物の生物攪拌による移流であると考えられてきた。しかしある種の微生物（Geobacter, Shewanella 等）は、固体導電体（鉄含有鉱物、腐植物質等）、溶存電子運搬体及び導電性微生物ナノワイヤー等により構成される細胞外電子伝達系（extracellular electron transfer, EET）を通じて、細胞外の酸化還元種と電子の授受を行えることが明らかにされ、空間的に隔たって存在している異種微生物間の酸化還元反応の EET による共役の可能性が指摘されるようになった。EET による微生物-電極間の電子伝達機能は、微生物燃料電池 (Microbial Fuel Cell) 等の生物電気化学システムの基盤技術として一部はすでに工学的に利用されている。しかし自然環境下の堆積物中における EET の実在とそのメカニズムについては、研究開始当初まだ研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

細胞外電子伝達系 (EET) を通じた長距離細胞外電子伝達により、空間的に大きく隔たって存在している異種微生物間での酸化還元反応の共役（酸化還元種間の電子の授受）が、富栄養化内湾堆積物の生物地球化学的物質循環過程において実際に機能していることを実証し、そのメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では東京湾を調査対象海域とし、H<sub>2</sub>S（硫化水素）酸化反応と O<sub>2</sub>（酸素）還元反応を解析対象の酸化還元反応とし、以下の方法で研究を行った。

(1) EET 実験堆積物コアの構築：堆積物中の細胞外電子伝達系 (EET) を解析するために、EET の実在が示唆された東京湾湾中部から採取した堆積物を用いて実験堆積物コアを構築した (図 1)。構築した実験堆積物コアについて、微小電極を用いて H<sub>2</sub>S、O<sub>2</sub>、および pH の鉛直微細プロファイルを測定し、EET が実際に機能していることを確認した (図 2)。作製した EET 実験堆積物コアを用いて、EET のメカニズムの解析を行った。

(2) 微小 EP 電極の開発：堆積物中における電子の長距離移動を観察するために、地球物理学の分野で自然電位分布の測定に用いられている銀-塩化銀非分極電極を微小化し、堆積物中の鉛直方向の 2 点間の電位差 (Electric Potential, EP) の微細分布を測定できる微小 EP 電極を開発した (図 3)。

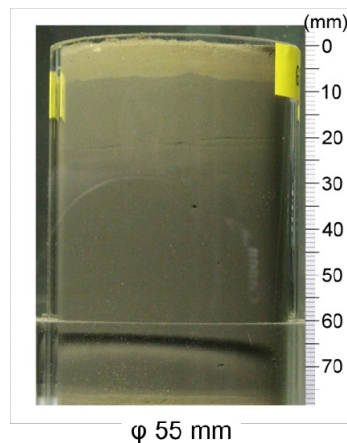


図 1 EET の解析に用いた実験堆積物コア

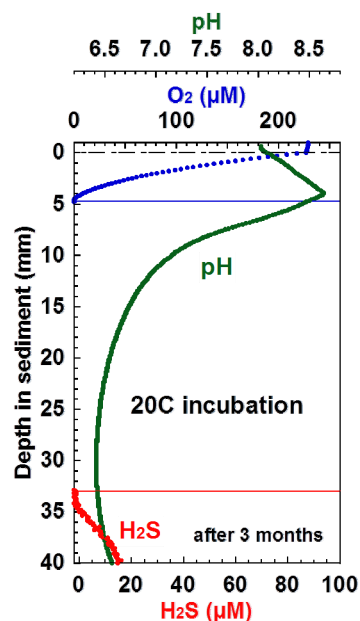


図 2 実験堆積物コアについて測定した H<sub>2</sub>S、O<sub>2</sub>、および pH の鉛直微細プロファイル。EET が実際に機能していることを示している



図 3 微小 EP 電極

(3) 現場環境下における EET の実証：微小 EP 電極を現場設置型水-堆積物界面微細環境

測定装置に取り付け、現場環境下で EP 鉛直微細プロファイル測定する手法を確立した (図 4)

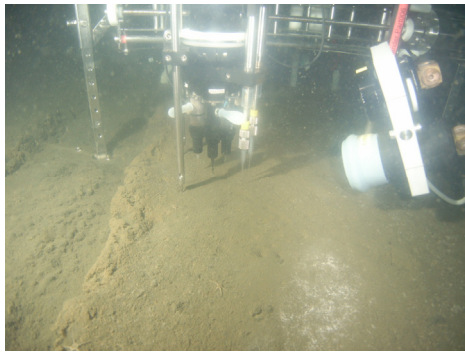


図 4 東京湾湾央部水深 20 m 地点における EP 鉛直微細プロファイルの現場測定の様子

(4) 自然環境下の堆積物中における EET メカニズムの解析: EET のメカニズムとしては、導電性 (鉄) 鉱物、微生物および微生物-鉱物ネットワークが考えられる。

① 導電性 (鉄) 鉱物: EET に寄与すると考えられる導電性 (鉄) 鉱物としては、磁鉄鉱 (magnetite) が最有力である。そこで EET 実験堆積物コアに磁鉄鉱の微粉末 (nanoparticle) を添加し、 $H_2S$ 、 $O_2$ 、pH および EP の鉛直微細プロファイルを経時的に測定し、EET のメカニズムとして磁鉄鉱が機能している可能性について検討を行った。

② 細胞内に導電性構造を有する繊維状細菌: EET に寄与すると考えられる微生物としては、本研究の協力研究者であるデンマークオーフス大学の L. P. Nielsen 教授らが Cable bacteria (通称) と呼ぶ特異な微生物を発見しているため、東京湾湾央部から採取した堆積物をオーフス大学に送り、Cable bacteria の確認とその現存量の鉛直微細分布および分類学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 自然環境下の堆積物中における EET の実証: 微小 EP 電極を用いて 10 月下旬~11 月下旬の 3 回にわたり EP 鉛直微細プロファイルの現場測定を行い、11 月下旬に現場環境下において EET が発現していることを示す明瞭な EP 鉛直微細プロファイルを検出した (図 5)

(2) 自然環境下の堆積物中における EET メカニズム:

① 磁鉄鉱: 磁鉄鉱の微粉末を添加した EET 実験堆積物コア中の EP 鉛直微細プロファイルの経時変化から、培養初期 (2 週間前後) には磁鉄鉱が EET メカニズムとして主要な役割を果たしていることが示された (図 6)

② Cable bacteria: 東京湾湾央部から採取した堆積物中に生息している微生物についての分子生物学的解析から、東京湾の堆積物中にも Cable bacteria が生息していることが確認された (図 7)。現場環境下において EET が発現していることを示す明瞭な EP 鉛直

微細プロファイルが得られた堆積物についての Cable bacteria の現存量の鉛直微細分布の測定結果は現在解析中であるが、堆積物の深い層まで Cable bacteria が高密度に生息していることを示す予備的結果が得られている。このことは、東京湾の堆積物中における EET メカニズムとして、Cable bacteria も重要な役割を果たしている可能性が高いことを示唆している。

③ 磁鉄鉱 vs Cable bacteria: EET 実験堆積物コア中の EP 鉛直微細プロファイルの経時変化は、培養後期 (3 ヶ月後) においても EET が活発に機能していることを示していた。しかし培養後期には堆積物に添加した磁鉄鉱の濃度は検出限界以下まで低下しており、EET メカニズムへの磁鉄鉱の寄与は非常に低いと考えられた。この結果は EET 実験堆積物コアについては、培養初期は磁鉄鉱が、培養後期は cable bacteria が EET の主要メカニズムであることを示唆していると考えられる。

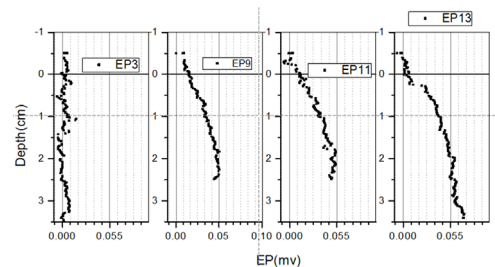


図 5 東京湾湾央部水深 20 m 地点の現場環境下における EP 鉛直微細プロファイル。EET が発現していることを明瞭に示している

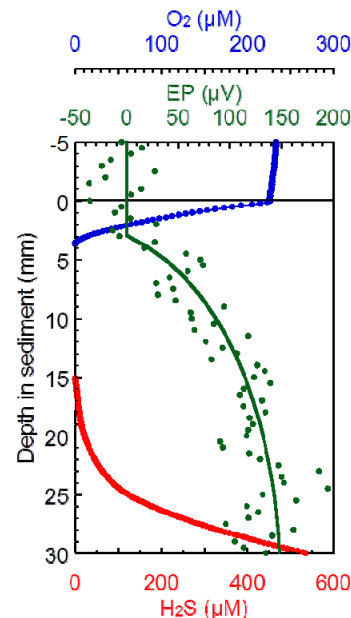


図 6 磁鉄鉱の微粉末を添加した EET 実験堆積物コア中の EP 鉛直微細プロファイル (培養 2 週間後)

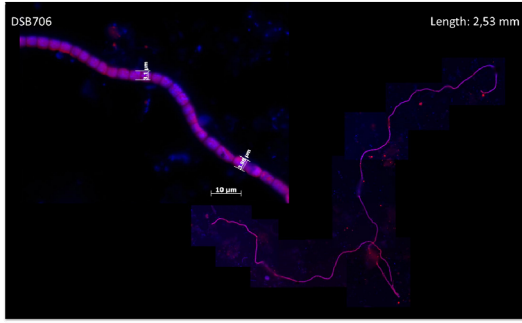


図7 東京湾湾央部の堆積物中に生息している Cable bacteria

自然環境下の堆積物中で EET が実際に機能していることは、水-堆積物界面及び堆積物中の物質循環速度や循環過程、エネルギー代謝に対して EET が大きな影響を与えており、これまでの自然環境下における生物地球化学および微生物生態学の概念を大きく書き換えなければならないことを示している。また東京湾では底層水の貧酸素化が慢性化しており、堆積物から溶出した  $H_2S$  により頻繁に青潮が発生し「死の海」と化しているが、EET が現場環境下において  $H_2S$  溶出抑制機構として機能していることは、自然環境に調和した効率の良い青潮対策技術の開発につながる可能性を示唆している。

#### 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1件)

- ① 左山 幹雄、富栄養化内湾堆積物における硫化水素溶出抑制機構:長距離細胞外電子伝達が機能している可能性、環境バイオテクノロジー学会誌、査読有、11 巻、2011、25-32

[学会発表] (計6件)

- ① 左山 幹雄、沿岸堆積物における硫化水素の動態と magnetite、2013 年度日本海洋学会秋季大会、2013 年 9 月 17 日～21 日、北海道大学 (札幌)
- ② M. Sayama, Effect of magnetite addition on  $H_2S$  dynamics in coastal marine sediment, Goldschmidt2013, August 25-30, 2013 in Florence, Italy
- ③ 左山 幹雄、沿岸堆積物における硫化水素の動態と magnetite (空間的に大きく隔たっている反応が共役することは可能か?)、生物工学会夏のセミナー、2013 年 7 月 13 日～14 日、フェニックスシーガイアリゾート (宮崎)
- ④ M. Sayama, Effect of magnetite addition on  $H_2S$  dynamics in coastal marine

sediment, Workshop: Cable bacteria and biogeoelectric currents, April 14-17, 2013 in Aarhus, Denmark

- ⑤ 左山 幹雄、富栄養化内湾堆積物における EET を通じた細胞外電子伝達、2011 年度日本海洋学会秋季大会、2011 年 9 月 26 日～28 日、九州大学 (福岡)
- ⑥ M. Sayama, Seasonal dynamics of sulfide oxidation processes in Tokyo Bay dead zone sediment, Goldschmidt2011, August 14-19, 2011 in Prague, Czech Republic

[図書] (計1件)

- ① 左山 幹雄、恒星社厚生閣、詳論沿岸海洋学、2014、261 (190-207)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

左山 幹雄 (SAYAMA, Mikio)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員  
研究者番号: 20344145

##### (2) 研究分担者

中島 善人 (NAKAJIMA, Yoshito)

独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・主任研究員  
研究者番号: 80357623

鳥村 政基

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・計測技術研究グループ長  
研究者番号: 40357588

佐藤 浩昭

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員  
研究者番号: 70357143

##### (3) 研究協力者

Lars Peter Nielsen

Professor of Microbial Ecology

Department of Bioscience, Microbiology  
Aarhus University, Denmark