

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810085

研究課題名(和文) in-vivo微生物電気化学を使った好アルカリ細菌のプロトン集積機構の研究

研究課題名(英文) Periplasmic proton accumulation mechanism in alkaliphilic bacteria capable of extracellular electron transport

研究代表者

岡本 章玄(okamoto, akihiro)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70710325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：pH12の極限環境にアノード電極を電子受容体とするオンサイト電極システムを構築し、電極上に集積された微生物叢から世界初となる細胞外電子伝達能を有する好アルカリ性グラム陽性細菌を単離し、電気化学的評価、ならびに全ゲノム解読を行った。また、生細胞を用いてペリプラズム内のプロトン濃度を追跡する技術を開発することで、細胞外電子移動過程が電子と共にプロトンを細胞外へと放出することを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Alkaliphilic gram-positive microbe capable of extracellular electron transport (EET) was enriched and isolated from The Cedars spring at pH 12, using on-site microbial fuel cell system with anode connected with air cathode. Also, we developed a method to monitor the periplasmic proton concentration using the EET-capable microbe.

研究分野：微生物電気化学

キーワード：好アルカリ細菌 プロトン局在性 細胞外電子移動 微生物燃料電池

1. 研究開始当初の背景

呼吸により電子伝達系から得られるエネルギーは、微生物の脂質膜内外に形成されるH⁺濃度差(プロトン駆動力、 Δp)に変換され、生体内エネルギー物質であるATP合成に用いられる。極限環境微生物の一種である好アルカリ細菌では、その細胞質pHは外部環境よりも2程度低く、見かけ上はH⁺濃度差が得られない。しかし、興味深い事に細胞外pHがより高くなる程、より多くのATPが Δp によって合成される。すなわち、より多くのH⁺が細胞外pHとは逆相関して、細胞表面に引きつけられ、集積していることになる。この好アルカリ菌に見られる膜上へのH⁺の引きつけ・集積は、生体エネルギー論における長年の謎である。

近年、高pH条件下、中性時に較べて数倍量の膜シトクロムタンパク質(Cyt)が好アルカリ菌の細胞膜上に存在していることが明らかになった。Cyt群に電子が充填されている状態になると静電的にH⁺が局在化し、局所的に生まれるH⁺濃度差によってATP合成が駆動される機構が提案されている。しかし、このような生細胞内で進行する平衡状態とは程遠い電子状態とATP合成との関係性を直接検証することは、既存の単離タンパク質を用いた実験系では“不可能”であり、提案されたモデルの検証は極めて難しい。

申請者は、これまで細胞外にある電極と直接電子のやり取り(Extracellular Electron Transport, EET)を行う電流生成微生物を使って生細胞を電気化学的に理解・制御する手法を開発してきた。この微生物電気化学とでも言うような研究手法を使えば、細胞内で進行するATP合成とプロトン局在性を追跡する方法論を開発することは可能である。一方で、微生物電気化学を行うには、EETを行う微生物が必要だが、上述したような好アルカリ性のグラム陽性菌でEET能を有するものは報告されていない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では

- (1)細胞外の電極へと電子を伝達するEET能を持つ好アルカリ微生物を環境中から単離すること、ならびに
- (2)生細胞内におけるH⁺の局在性をEET細菌を用いて追跡する技術の開発、

を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

微生物の単離を行うために、アルカリ性の

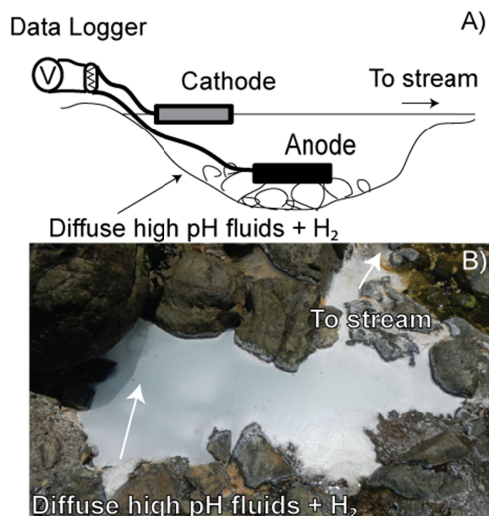


図1 “The Cedars”に設置した on-site 細菌集積システム(A)。電極を設置した高アルカリ性サイトの様子。

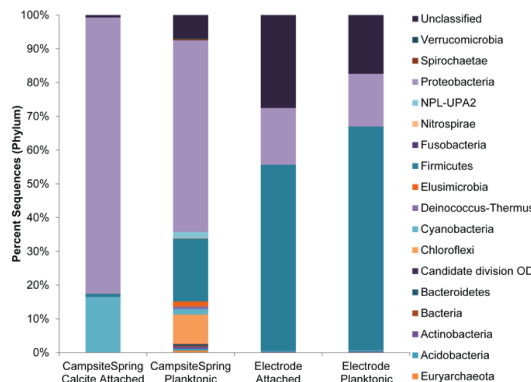


図2 電極システムで集積する前後の微生物叢の16S rRNA解析結果の比較。

環境中において、電極システムを設置し、高アルカリ性の条件下でEETを行う微生物を集積した。また、中性条件下でEETを行うモデル細菌である*Shewanella oneidensis* MR-1株を用いて生細胞内H⁺の局在性に関して電気化学的に追跡する技術を開発した。

4. 研究成果

(1) Cedars Springからの好アルカリ電流生成微生物の集積

カリフォルニア山岳部のpH~12かつ低Na⁺濃度の極限環境(Cedars Spring)において、申請者が考案したOn-site電気化学システムを使って環境微生物のサンプリングを行った(図1)。3ヶ月間に渡り環境中で微生物を電気集積・培養した電極には、環境中とは全く異なる菌叢が見られた(図2)。得られた微生物叢を用いてpH~11の高アルカリ条件下において、様々な有機酸を電子源として嫌気条件下で酸化マンガンを還元を進行することを

確認した。

(2) EET を行う好アルカリグラム陽性菌の単離と全ゲノム解読

得られた好アルカリ電流生成細菌叢培地から連続希釈法によって *Paenibacillus* 属の細菌を単離した。その際、希釈液中の菌体増殖は嫌気酸化マンガン培地で行った。連続希釈法を行った後に、顕微鏡によって細胞の形状観察を行い均一な形状を持つ単一種のグラム陽性菌であることを確認した。さらに、鉱物の還元(表1)や電気化学的性質(図3)に関する pH 依存性も測定し、pH 9 を代謝活性のピークに持つ好アルカリ細菌であることを確認した。単離した *Paenibacillus* 属の全ゲノム情報は既に得られており、現在解析を行っている。この研究成果に関しては、現在 *Environmental Microbiology* 誌に投稿中である。

Media pH	Manganese	Magnetite	Control (no cells)
7	++	-	-
8	++	++	-
9	++	++	-
10	-	-	-
11	-	-	-

表1 単離した *Paenibacillus* 属の酸化鉄、酸化マンガンを含む培地中での増殖(+)と金属酸化物還元の有無(+)

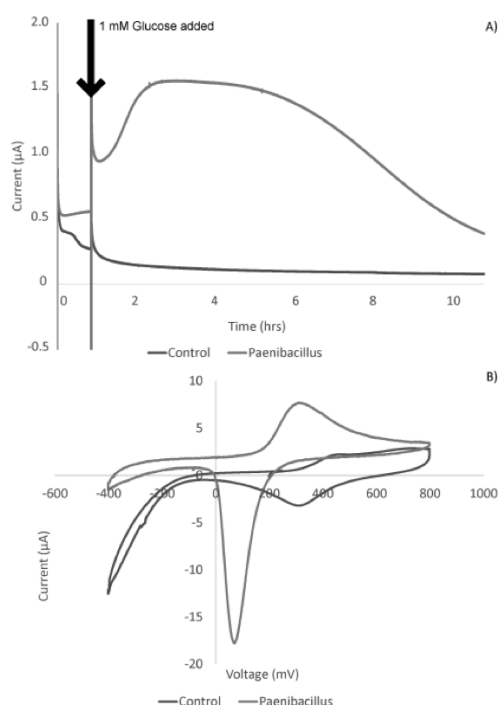


図3 単離した *Paenibacillus* 属を用いた pH 9 における電気化学測定結果。(A)定電位印可時 (+0.2 V vs Ag/AgCl KCl sat.) の電流生成の時間変化。(B)サイクリックボルタンメトリーの結果(掃引速度 10 mV/s)。

(3) *S. oneidensis* MR-1 株を用いたプロトン局在性の電気化学追跡

S. oneidensis MR-1 株はグラム陰性の中性細菌であり、細胞内では有機物を酸化した電子が内膜、ペリプラズム、そして外膜に局在するシトクロム複合体へと伝達され、代謝の最終ステップとして細胞外の電極へと電子が輸送される。この際、MR-1 株が生合成、分泌するフラビン分子が外膜シトクロムの補酵素として機能することで、EET を促進する。すなわち、フラビン濃度と MR-1 株による電流生成には相関がある。そこで本研究では、ペリプラズム内 pH (pH_p) によってフラビン分子の膜透過性が変化する性質を利用することで、MR-1 由来の EET 電流の変化を追跡することでペリプラズム pH_p に迫った。その結果、好気条件では pH_p の減少が進行するのに対して、EET を行って代謝を行う場合には、 pH_p は中性付近に止まることが示された。これは、EET が進行する際にペリプラズムにプロトンが全く蓄積しないことを示しており、電子が外膜を通過する際にペリプラズム内の電化中性を保つためにプロトンが細胞外へと放出されたことを示唆している。この研究成果に関しては、1本の論文を国内誌に、2本の論文を国際誌に投稿、受理されている。また、本研究成果について招待講演を含む2件の国際学会で発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. **A. Okamoto***, Y. Tokunou, J. Saito, "Cation-limited kinetic model for microbial extracellular electron transport via an outer membrane cytochrome C complex" *Biophysics and Physicobiology*, 13, 71-76 (2016). doi: 10.2142/biophysico.13.0_71 (査読有)
2. Y. Tokunou, K. Hashimoto, **A. Okamoto*** "Extracellular Electron Transport Scarcely Accumulates Proton Motive Force in *Shewanella oneidensis* MR-1" *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 88, 690-692 (2015). doi:/10.1246/bcsj.20140407 (査読有)
3. 岡本章玄*, 徳納吉秀, 斎藤淳貴 "微生物燃料電池の効率化と資する細胞外電子移動の速度論研究" *Bioscience & Industry*, in press. (査読無)

[学会発表](計 2 件)

1. **A. Okamoto**, "Electrical Interaction in Biofilms through Outer-Membrane Heme Proteins" World Gene Convention-2015, Qingdao, China, 1-4 (Nov. 2015).

2. A. Okamoto, Y. Tokunou, K. Hashimoto,
“Scarce Accumulation of Proton Motive
Force in *Shewanella oneidensis* MR-1
During Extracellular Electron Transport”
The 5th International Meeting on Microbial
Electrochemistry and Technologies, Tempe,
Arizona, USA (Oct.2015).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://scholar.google.co.jp/citations?user=oPWBby8AAAAJ&hl=ja>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 章玄 (OKAMOTO, Akihiro)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：70710325