

論文の内容の要旨

論文題目 Construction of photoelectric conversion system and metabolism regulation system based on microbial extracellular electron transfer (微生物の細胞外電子移動に基づく光電変換系及び代謝制御系の構築)

氏名 西尾 晃 一

1. 諸言

近年、細胞内と細胞外固体間の電子移動、すなわち細胞外電子移動(Extracellular electron transfer; EET)が世界的に注目されている。これは、固体状金属あるいは金属酸化物を還元する能力を備える特殊な細菌の発見に端を発している。この種の金属還元細菌は細胞膜上に電子伝達タンパク質・シトクロムを多量に発現し、これを電導パスとして細胞内と(電極を含む)固体金属との間での電子授受を行うことができる。近年になり、EETは、ミネラル循環や腐食といった観点から自然界においてEETは極めて重要なプロセスであると認識されてきている。こうした中、EETをベースとした電気化学系の研究が活発に行われており、有機物を燃料とする微生物燃料電池や、電気化学的な微生物代謝制御など、新しい概念の電気化学系が提唱されてきている。本研究においては、外膜シトクロムを有する微生物によって得られた従来の知見を、外膜シトクロムを持たない一般微生物を用いた新しい電気化学系へと拡張した。具体的には、微生物太陽電池の構築、そして一般微生物に対する電気化学的な代謝制御系の構築を行った。

2. 光合成微生物と金属還元細菌の共生を利用した微生物太陽電池¹⁾⁴⁾⁵⁾

EETを利用することによって、金属還元細菌を触媒として有機物を分解し発電する微生物燃料電池が広く研究されている。この有機物を、光合成によって、 CO_2 から合成することができれば、微生物を用いた太陽電池が構築できると考えられる(図1)。これは、金属還元細菌を用いることで実現する、究極の環境調和型太陽電池と捉えることができる。このような着想のもと、本研究では、光合成微生物と金属還元菌との間に構築される共生関係を利用した微生物太陽電池システムの構築を行った。

【実験】 図1のようなリアクターに微生物を含んだ無機培地を導入し、明暗周期下で電流を測定した。微生物には、光合成微生物 *Chlamydomonas reinhardtii* と、金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* を利用した。

【結果と考察】 実験の結果、明暗周期に応じた電流生成が観測され、その光電変換効率は0.1%を示した(図2)。これは、自然微生物群集を用いた微生物太陽電池と同程度であり、変換効率の向

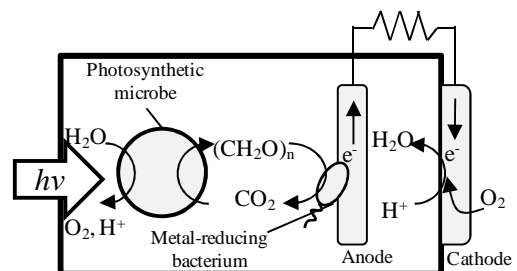


図1. 共生系微生物太陽電池の模式図

上が課題として残った。*C. reinhardtii* の有機酸生産を調べると、光合成産物から有機酸への変換のステップにおいて、大きく効率が制限されていたことが示唆された。この理由の一つとして、光合成由来有機物のほとんどが澱粉として細胞内に蓄積し、有機酸に変換されていないことが考えられた。

このことを考慮し、*C. reinhardtii* 細胞内澱粉を乳酸に変換することのできる *Lactobacillus amylovorus* を共培養し、生産された乳酸を *G. sulfurreducens* の基質として電流を生成する三者培養系の検討を行ったところ、全体の光電変換効率は 0.47% と大きく向上した。この結果は、藻類バイオマスを有機酸へと高効率に変換することが効率向上に向けて重要であることが示している。

3. 細胞膜透過性及び生体親和性を有するメディエーターを用いた細胞外電子移動系の構築⁶⁾

一般微生物の EET 経路構築のためには EET を媒介するメディエーター分子を添加し、これが細胞膜を透過する必要がある。従来から、ビタミン K₃ などの脂溶性分子がメディエーターとして使用されてきたが、こうした分子は細胞膜傷害性や細胞毒性を示し、生体親和性に欠けるといった問題を抱えていた。そこで本研究では、リン脂質中のホスホリルコリン基を骨格として含む両親媒性リン脂質ポリマーに着目した。このポリマーは細胞膜を単純拡散で透過し、かつ細胞毒性および細胞膜傷害性が低いという性質をもつ[1]。本研究では、このポリマーに酸化還元活性部位としてフェロセンが導入された両親媒性リン脂質ポリマーを新規合成し、これが生体親和性を有する細胞膜透過型メディエーターとして機能するかを評価した(図 3)。

【実験】 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) とビニルフェロセン(VF)のラジカル重合により、Poly(MPC-co-VF) (PMF; 図 4)を合成した。PMF を PBS 溶液に溶かして微生物とともに三電極系電気化学セルに導入し測定を行った。微生物は、細胞膜構造の異なるグラム陰性細菌 *Escherichia coli* とグラム陽性細菌 *Lactobacillus plantarum* を採用した。

【結果と考察】 合成した PMF は MPC 52 mol%、VF 48 mol% からなり、分子量(M_w)は 6.6 kDa ($M_w/M_n = 1.7$)であり、酸化還元電位は +0.5 V vs. SHE (以下全て SHE を基準とする)であった。次に、PMF (1 g L⁻¹)を含む電気化学セルに *E. coli* と *L. plantarum* 細

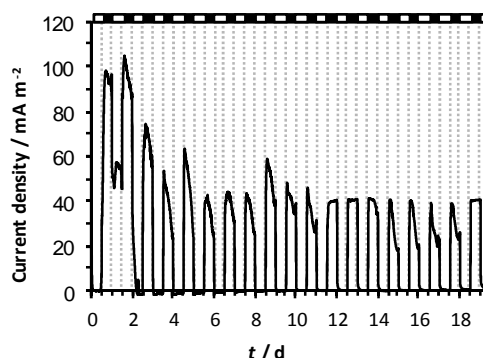


図 2. *C. reinhardtii*/*G. sulfurreducens* 共生系微生物太陽電池における電流測定。(上部バー：白、光照射；暗闇)

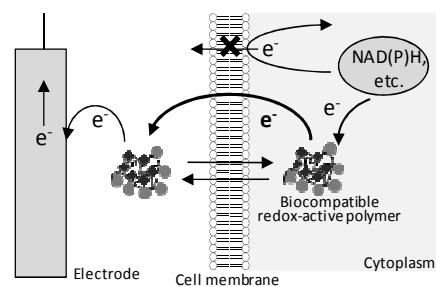


図 3. 酸化還元活性部位をもつ両親媒性リン脂質ポリマーによる EET の模式図

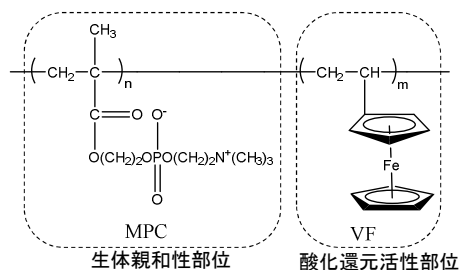


図 4. PMF の分子構造

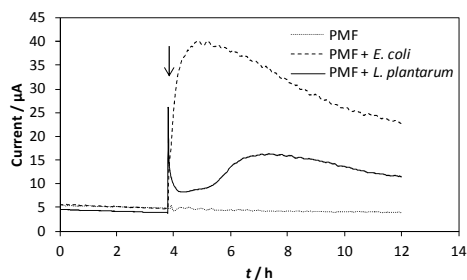


図 5. PMF 存在下での電流測定。(矢印：各種微生物細胞添加)

胞をそれぞれ導入して、電極電位を+0.6 V に設定し、嫌気条件下においてグルコースを基質として電流測定を行った。その結果、いずれの微生物からも、PMF を介した代謝電流が観測された(図 5)。この結果は、当初の目論見通り、PMF が細胞膜を透過して生細胞内—細胞外電極間の電子移動を媒介していることを示している。また、PMF 存在下においても生育や生存率は低下せず、PMF の生体親和性が高いことが確認された。本研究では以後、この PMF を用いて一般微生物を用いた電気化学代謝制御系の構築を行った。

4. 細胞外電子移動によるポリヒドロキシ酪酸生産の促進⁷⁾

ポリヒドロキシ酪酸(PHB)は微生物が生合成するバイオマス由来のプラスチックである。*Ralstonia eutropha* H16 は PHB を活発に生産するモデル生物であり、特に窒素飢餓条件のような生育が制限される培養条件下において PHB が活発に生合成されることが知られている。一方、生育制限下においては酸素呼吸系や TCA 回路が低下調節されるため、解糖に必要な NADH/NAD⁺ 循環が低下し、PHB 生産を含めた代謝全体が遅くなってしまう。本研究では、EET プロセスにより NADH/NAD⁺ 循環を加速することで上記のトレードオフを解消し、代謝全体、ひいては PHB 生産速度を向上させることを試みた。

【実験】 *R. eutropha* を電気化学セル内に導入し、PMF 存在下で電極電位を+0.6 V または開放電位(約+0.3 V)に設定し、窒素制限及び好気条件下において培養を行った。このとき、PMF は+0.6 V において酸化体、開放電位において還元体である。

【結果と考察】 *R. eutropha* を PMF 存在下、+0.6 V において培養したところ、開放電位の場合に比べて PHB 生産速度が約 60% 増加した(図 6)。このとき、EET による代謝電流とフルクトース消費速度が PHB 生産と連動して増加する現象が観測され、このことはフルクトース消費から PHB 生産にわたる代謝の流れが EET によって加速したことを示している。この結果は、PMF による EET プロセスの構築によって、電極が新たな呼吸の電子受容体として機能し、*R. eutropha* の PHB 合成や解糖系を含む代謝全体が促進されたことによると考えられた(図 7)。

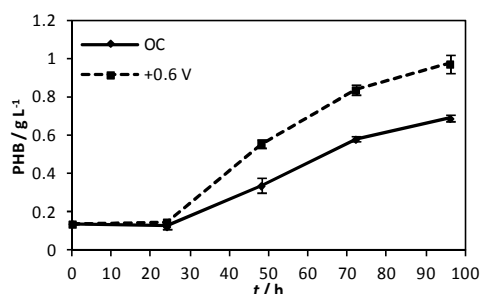


図 6. 電極電位印加時における *R. eutropha* による PHB 生産

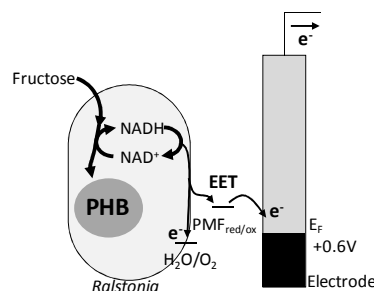


図 7. EET による PHB 生産代謝活性化の模式図

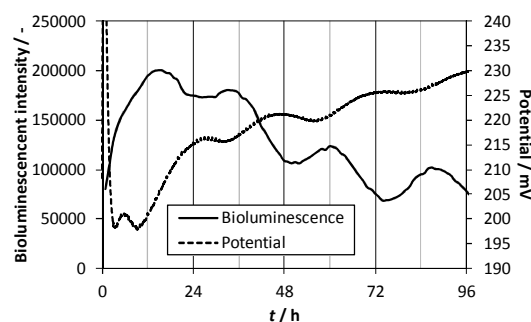
5. シアノバクテリア概日リズムの電気化学的制御系の構築⁸⁾⁹⁾

生物の多くは、生体システム中に概日リズム(環境の明暗条件変化に適応するための約 24 時間リズム)を有し、ほぼ全ての代謝と遺伝子の発現が概日リズムの支配下で協動的・協奏的に機能している。したがって、この概日リズムを電気化学的に制御する技術は、代謝や遺伝子発現全体を制御する全く新しい技術となることが期待される。シアノバクテリア *Synechococcus elongates* PCC7942 は、概日リズムを持つモデル生物として活発に研究されてきたが、この微生物においては、外界の明暗変化に応じて細胞内キノン分子の酸化還元状態が変化し、これがトリガーとなって概日リズムが調整されていることが知られていた[2]。このことを考えると、EET プロセスにより細胞内キノン分子と電極を電気化学的に接続すれば、概日リズムを電気化学的に制御することができると期待された。こうした着想に基づき、これまで、*S. elongatus* において、PMF を用いて EET 経路を構築することで、概

日リズムを電気化学的に制御することに成功している。本研究ではこの知見をさらに発展させることで、EET に基づいたメディエーターの電位振動によって、概日リズムの電気化学的計測ができると考え、研究を行った。

【実験】 酸化還元活性部位としてオクタメチルフェロセン (Me_8Fer) を有する Poly(MPC-co- Me_8Fer) ($\text{Me}_8\text{-PMF}$) を合成し、従来の PMF に代えて使用した。*S. elongatus* を $\text{Me}_8\text{-PMF}$ 含有培地に添加した後、電気化学セル(作用極: ITO)へ導入し、電極電位を制御しながら、蛍光や *S. elongatus* 変異株 (発光株) の生物発光の測定を行った。

【結果と考察】 微生物を含んだ電気化学セルに $\text{Me}_8\text{-PMF}$ を添加したところ、目論見通り、概日リズムに応じた開放電位の周期的変化が観測された(図 8)。この開放電位の周期変化は、クロロフィル蛍光により観測したプラストキノンの酸化還元状態の周期的変化と同位相で推移していた。開放電位の周期の温度依存性を示す Q_{10} の値を調べると、概日リズムの特徴を顕著に示す約 1 の値を示した。以上のことは、概日リズムにおける細胞内代謝の周期的変化が EET に基づき電気化学的に計測できたことを明確に示している。



6. 総括及び今後の展望

本研究では、外膜シトクロムを持つ微生物を用いた電気化学系の知見を、一般微生物を用いた電気化学系に展開した。その方法論として、光合成微生物と金属還元細菌の共生、そして生体親和性メディエーターの開発という、2つの異なるアプローチから研究を展開することで、微生物太陽電池や、PHB 生産菌及びシアノバクテリアの電気化学的代謝制御系の構築に成功することができた。一般微生物を用いた電気化学系の研究は、環境浄化やエネルギー・物質変換の観点にとどまらず、医療・創薬の基礎研究として、今後ますます活発化すると期待される。本研究で得られた成果は、そのいずれにも貢献する成果であり、電気化学を基礎とした生物の利用・解析技術の発展に寄与するものと期待している。

図 8. $\text{Me}_8\text{-PMF}$ 存在下における *S. elongatus* の生物発光と開放電位の推移

7. 発表状況

(1) **K. Nishio**, K. Watanabe, K. Hashimoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 86, 957. (2) K. Takanezawa, **K. Nishio**, S. Kato, K. Hashimoto, K. Watanabe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2010**, 74, 1271. (3) X. Lin, **K. Nishio**, T. Konno, K. Ishihara, *Biomaterials*, **2012**, 33, 8221. (4) **K. Nishio**, K. Watanabe, K. Hashimoto, *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, 115, 412. (5) **K. Nishio**, K. Hashimoto, K. Watanabe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2013**, 77, 670. (6) **K. Nishio**, R. Nakamura, X. Lin, T. Konno, K. Ishihara, S. Nakanishi, K. Hashimoto, *ChemPhysChem*, **2013**, 14, 2159. (7) **K. Nishio**, Y. Kimoto, J. Song, T. Konno, K. Ishihara, K. Hashimoto, S. Nakanishi, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **2014**, 1, 40. (8) Y. Lu, **K. Nishio**, S. Matsuda, Y. Toshima, H. Ito, T. Konno, K. Ishihara, S. Kato, K. Hashimoto, S. Nakanishi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, In-press. (9) **K. Nishio**, S. Kato, K. Hashimoto, S. Nakanishi, in preparation.

8. 参考文献

[1] T. Goda *et al.*, *Biomaterials*, **2010**, 31, 2380. [2] Y. I. Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, 109, 17765.