

細菌のバイオエレクトロカタリシス反応の 微生物分類法への応用

高山勝己*、上島晃智、吉村忠与志
福井工業高等専門学校物質工学科（〒916-8507 福井県鯖江市下司町）
*takayama@fukui-nct.ac.jp

Application of bioelectrocatalysis as a method of bacterial classification

Katsumi TAKAYAMA,* Akinori UEJIMA, Tadayosi YOSHIMURA
Department of Chemistry & Biology Engineering, Fukui National College of Technology
(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

(Received July 3, 2013; Accepted August 1, 2013)

Abstract

This paper proposes an electrochemical bacterial classification method based on bioelectrocatalysis. Five kinds of quinone compounds (2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, 1,4-naphthoquinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone, 1,4-benzoquinone, and 2,6-dimethyl-1,4-benzoquinone) were used as electron mediators between the anode electrode and the bacterial redox respiratory chain. *Escherichia coli* (IAM 1264), *Staphylococcus aureus* (IAM 1011), *Lactobacillus casei* (IAM 12473), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469), and *Pseudomonas oleovorans* (IAM 12410) were selected as typical bacterial cells for the classification test. The data of steady-state current obtained from 25 combinations of quinone and bacteria were analyzed based on principal component analysis. Five bacteria were classified into three groups: *Lactobacillus casei* (IAM 12473) and *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469), *Escherichia coli* (IAM 1264) and *Pseudomonas oleovorans* (IAM 12460), and *Staphylococcus aureus* (IAM 1011). The *Lactobacillus* sp. group was closer to the *Escherichia coli* group than to the *Staphylococcus aureus* group. These results coincide with classifications based on the 16S rRNA-based sequence homology.

Key Words: Bioelectrocatalysis, Bacterial classification, Principal component analysis, 16S rRNA-based sequence homology analysis

1. はじめに

細菌の 16S rRNA 塩基配列解析に基づいた分類と同定は、その分析法の簡便さとコストパフォーマンス、そしてデータベースの充実化に伴

い、今や簡易な細菌同定の常套手段として用いられている[1]。一方で、遺伝子解析とは別の指標に基づいた方法（細胞壁成分による分類、細胞内キノンによる分類、DNA-DNA ハイブリダ

イゼーション等) も新たな方法として広く利用されている[1]。

我々は以前、外部から添加したキノン系化合物を介する細菌と電極間の電子移動反応(バイオエレクトロカタリシス反応)に基づいた細菌の検出法について報告した[2]。生物(細菌)は有機物を細胞内に取り込み代謝を行うことで、生命活動に必要なエネルギーや、自らを構成するために必要とされる化学物質を合成している(異化・同化代謝プロセス)。この化学反応プロセスの代表例が酸化・還元系であり、いわゆる生物体内における電子伝達系である。この電子移動の終点は、好気呼吸の場合は酸素(酸素の還元)であるが、その途中の位置(ある酸化還元電位)から電子を人為的に別の流れに切り変えることが可能である。その一つの手法が、適当なキノン類の添加である。例えば、電気化学セルに大腸菌の懸濁液を入れておき、作用電極(陽極)に0.5V(vs. Ag/AgCl sat.KCl)程度の電圧を印加する。適当な濃度のグルコースを添加し、さらにベンゾキノン(BQ)を添加すると、BQのみや、BQと大腸菌のみを添加した場合に比べて、明らかに大きな電流応答(バイオエレクトロカタリシス)がみられる[3]。この原理(図1)は、バイオセンサーや微生物そのものの検出だけでなく、近年あらためて注目されはじめているバイオ燃料電池のアノード極側の代表的基本原理(メディエータ電子移動型)の一つでもある。

我々は、このバイオエレクトロカタリシス反応の簡易微生物識別システムへの応用の可能性について検討したので報告する。

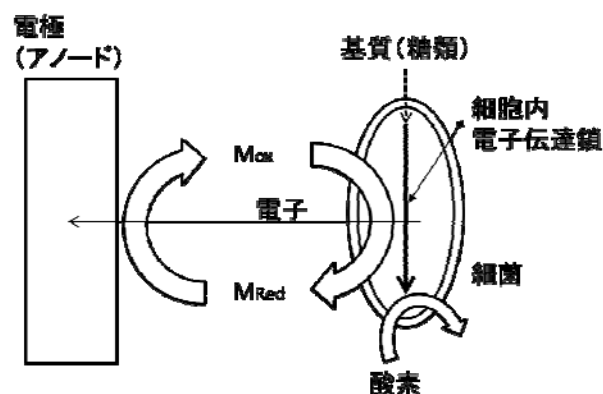


図1. 細菌のバイオエレクトロカタリシス

M_{ox} : 酸化型メディエータ, M_{red} : 還元型メディエータ

2 実験

図2に実験に用いた細菌によるバイオエレクトロカタリシス反応測定系の概略図を示した。1mL容積の円柱型の自作の亚克力セルには、3つの穴が設けてあり、1つ目には参照電極(vs. Ag/AgCl sat.KCl)を挿入し、2つ目には窒素通気用の管を挿入し溶液の脱気(除酸素)を行い、3つ目の穴を通してサンプル溶液等を注入する。電極はグラッシーカーボン(GC)電極(内径5mm, BAS製)を用い、電極表面はポリカーボネート膜(ポア内径0.2 μ m、ミリポア製)で被覆し、膜が攪拌により剥がれ落ちないようにナイロンネットで固定した。対極は白金の円盤(内径5mm)でセルの底面に埋め込んである。

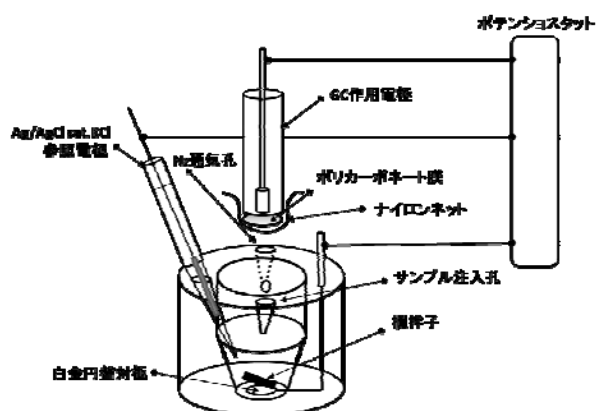


図2. バイオエレクトロカタリシス反応のモニタリングシステム

まず電気化学セルに 200mM リン酸緩衝液 (50mM グルコース含、pH7.0) を 0.9mL 注入し、GC 電極にポテンシostat (BAS100BW, BAS 製) を用いて 500 mV(vs. Ag/AgCl sat.KCl) 印加し、窒素通気を行いながら、スターラーを用いて溶液の攪拌を行った。応答電流値が安定したところで、50mM キノン水溶液 (ただし水に不溶性のキノンはエタノールに溶解) を 0.1mL 注入し (5mM に希釈される)、これにより電流値の増大が起こるので、再び電流値が一定値となるまで待ち、最後に各種菌体懸濁液 (OD₆₆₀=10) を 0.1mL 添加した。電流-時間曲線は菌体懸濁液を添加する直前から記録した。

実験に用いたキノンは、2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (Aldrich)、1,4-Naphthoquinone (Aldrich)、2-Methyl-1,4-napthoquinone (一般名: Vitamin K)(ナカライテスク)、1,4-Benzoquinone (ナカライテスク)、2,6-Dimethyl-1,4-benzoquinone (Aldrich) の市販品である。1,4-Benzoquinone のみ昇華法を用いて精製したものを用了。細菌類は公共の微生物分譲機関から入手*した *Escherichia coli* (IAM 1264)、*Staphylococcus aureus* (IAM 1011)、*Lactobacillus casei* (IAM 12473)、*Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469)、*Pseudomonas oleovorans* (IAM 12410) の 5 株を選定した。それぞれの菌体は、分譲機関推奨の培養条件で培養した後で遠心分離 (8,000 r.p.m, 5min, 4°C) により集菌し、菌体ペレットを滅菌生理食塩水 (0.145 M NaCl 水溶液) で洗浄した。洗浄操作を 3 回行った後、最終的に 200mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に菌体を懸濁 (OD₆₆₀=10) した。

*IAM: Institute of Applied Microbiology The University of Tokyo, 東京大学分子細胞生物学研究所が提供していたもので、現在は JCM (理研) に移管されている。

3 結果と考察

200mM リン酸緩衝液 (50mM グルコース含、pH7.0) を電気化学セルに 0.9mL 注入し、ポリカーボネート膜被覆 GC 電極をセットし、ポテンシostat を用いて 500mV(vs. Ag/AgCl sat.KCl) の電圧を印加し、窒素ガス通気による除酸素を行い、かつスターラーを用いて溶液を攪拌した。

さらに、一例として、5mM になるように 1,4-Benzoquinone を溶液に添加し、電流応答が安定になったところで、電流-時間曲線を記録しはじめ、OD₆₆₀=1.0 になるように 5 種類の各菌体懸濁液を添加したときの結果を図 3 に示した。

菌体の添加直後から電流値の著しい増大がみられる菌体 (*E. coli*, *S. aureus*, *P. oleovorans*) と、ゆっくり電流値が増加する傾向にある菌体 (*L. casei*, *L. rhamnosus*) とに分けられた。いずれの菌体に対しても定常電流が得られるまでに 30~60 分を必要とした。これに対して、他の 4 種のメディエータを用いた場合は、ほぼ 30 分以内ですべての菌体に対して定常電流が得られた (データは示さない)。

電流/μA

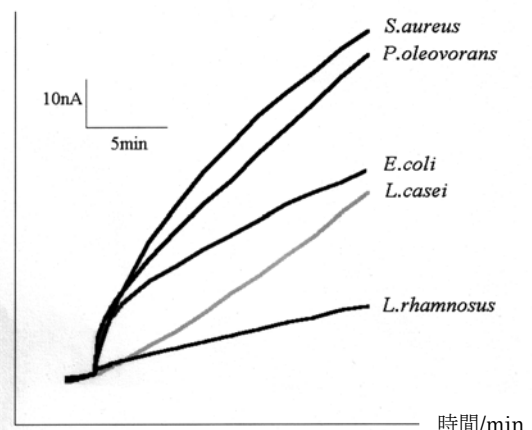


図 3. 各種菌体に対する電流-時間曲線 (バイオエレクトロカタリシス応答曲線) メディエータとして 1,4-Benzoquinone を使用

各種菌体と各種キノン類の組み合わせに対する電流応答値（菌体を添加してから 30 分後の電流値）を表 1 にまとめた。このデータを、それぞれの菌体を独立変数（S(1)~S(5)）に、多変量解析の一つである主成分分析を行ったところ、それぞれのキノン化合物(メデイエータ)を主成分軸（PC(1)~PC(5)）とした結果を表 2（主成分スコア値）に示した。なお、一連の主成分分析解析は吉村らが提供している Excel マクロを使用した[4]。

PC(1)はすべて、0.085~0.995 まで関与し累積寄与率は 87%であった。PC(2)において因子負荷量の寄与の差がみられ、累積寄与率は 98.6%であった。PC(3)でほぼ 100%寄与していた。一例として、各種菌体に対する PC(1)と PC(2)の各スコア値を 2 次元プロットしたものを図 4 に示した。*Lactobacillus casei* (IAM 12473)と *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469)が一群として、*Escherichia coli* (IAM 1264)と *Pseudomonas oleovorans* (IAM 12460)が一群として、*Staphylococcus aureus* (IAM 1011)が単独として認識され、加えて *Lactobacillus* の一群は *Escherichia coli* に近いと判定された。

この結果は、図 5 に示した DDBJ データベース**に基づいて作成した 16S rRNA 配列の相動性解析から作成される分子系統樹と相関性があると言える。

さらに、3次元プロットの事例として、PC(1)、PC(2)、PC(3)の 3 つのスコア値を用いて 3次元虫ピン散布図を作成した結果を図 6 に示した。2次元プロットと同様の分類が可能であることがわかる。ただし、今回分類対象とした 5 種類の菌体に対しては、2成分（PC(1)と PC(2)）プロットのみで、菌体間の類似性分類が可能と言えるが、菌体種の数が増えれば 3次元プロットの有効性は格段に高くなる。

表 2. 主成分分析より求められたスコア値

データ数	5 主成分				
	PC(1)	PC(2)	PC(3)	PC(4)	PC(5)
分散	4.34863	0.582759	0.063445	0.005179	0
標準偏差	2.085337	0.763386	0.251884	0.071968	0
累積寄与率	0.869726	0.986278	0.998967	1.000003	1.000002
主成分スコア					
S(1)	-0.06096	-0.16406	0.313853	0.091042	-0.02226
S(2)	-3.49663	-0.22218	-0.12696	-0.01629	-2.5844
S(3)	0.421185	1.30059	0.037389	-0.03484	0.534693
S(4)	1.383213	-0.72658	0.125136	-0.09121	0.980264
S(5)	1.753193	-0.18777	-0.34942	0.051293	1.091706

** : DDBJ:DNA Data Bank of Japan の略称であり、各種生物の DNA 配列情報をインターネット経由で自由に入手できる。

表 1. 各種キノン化合物をメデイエーターとして用いた場合における各種菌体の応答電流値(菌体添加後30分後) / nA

Quinone	Bacteria				
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.oleovorans</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.rhamnosus</i>
2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone	11	34	6	2	1
1,4-Naphthoquinone	5	10	6	1	1
2-Methyl-1,4-naphthoquinone	6	15	10	1	1
1,4-Benzoquinone	31	59	57	24	5
2,6-Dimethyl-1,4-benzoquinone	12	65	14	2	2

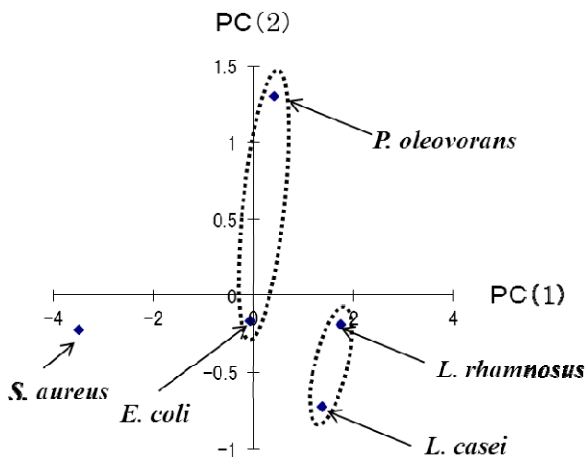


図 4. 各種菌体に対する PC(1)と PC(2)スコア値の 2次元プロット

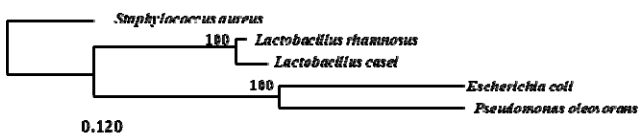


図 5. 各細菌の 16S rDNA 遺伝子配列相同性解析に基づいた系統樹

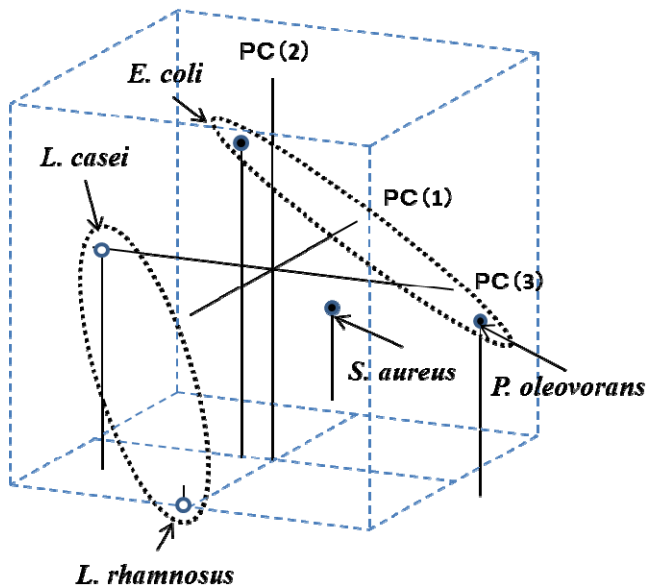


図 6. PC(1), PC(2), PC(3) の各スコア値を用いた 3次元虫ピン散布図

4: 結論

本実験系は、1:それぞれの菌体の濃度(単位体積当たりの菌体数)は濁度値が同じであれば同じであるとみなしている(細菌懸濁液の場合、 $OD_{660}=1.0$ の時に $10^8\sim 10^9$ 個/mL程度の細菌が存在すると概ねみなせるという経験則がある)2:生菌と死菌の存在比は考慮していない、3:電極電位はキノン化合物の種類によらず、同一の $500mV(vs. Ag/AgCl sat.KCl)$ を用いている(ただし、今回用いた全てのキノン類の酸化還元電位は少なくとも $500mV$ より負にある)。4:各種キノン化合物間の純度(市販で入手できる最もグレードの高いものを使用した)や水に対する溶解性の相違は考慮していない等、実験測定条件に幾つかの曖昧さが存在するが、細菌のバイオエレクトロカタリシス反応により生じる電流測定値データを、統計的に処理(主成分分析)することで、細菌間の類似性を大まかに判定できるシステムが構築できる可能性が示せたといえる。

今後は、より多くの細菌を対象とした実験データを蓄積することにより、本手法の細菌の簡易分類システムとしての有用性を検討したいと考えている。

参考文献

- 1) 中村和憲、関口勇地: 微生物相解析技術、米田書店(2009)。
- 2) 高山勝己、吉村忠与志、末信一朗、宮崎幸司、南保幸男、技術教育論文誌、9(1)、2000、75-79。
- 3) 高山勝己、バイオサイエンスとインダストリー、57(7)、1999、30-33。
- 4) 吉村忠与志、吉村三智頼、佐々和洋、青山義弘: Excelで数値計算の解法がわかる本、秀和システム(2009)。