

氏名（本籍）	上岡 永佳（東京都）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第117号
学位授与の日付	平成31年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	新規電気化学培養法の開発および未知電気化学活性菌の単離・解析
論文審査委員	（主査） 渡邊 一哉 教授 熊澤 義之 教授 藤原 祥子 教授 玉腰 雅忠 准教授

論文内容の要旨

近年、電気化学活性を持つ細菌（electrochemically active bacteria, EAB）に注目が集まり、バイオ電気化学システム

（bioelectrochemical system、BES）中での利用が期待されている（図1）。EABは細胞外に存在する酸化還元物質や電極と電子の授受をしながら細胞内の代謝反応を進めることができる細菌である。細胞内の酸化的代謝反応により発生する電子を細胞外の電極に渡すことができる EAB は発電菌と呼ばれ、微生物燃料電池（microbial fuel cell, MFC）におけるバイオマス発電などに利用されている。一方、細胞外の還元的物質や低電位電極から電子を受け取り、生合成のための還元的代謝反応に利用する EAB は電気合成菌と呼ばれ、電気エネルギーを用いて有用物質を合成する微生物電気合成（microbial electrosynthesis, MES）において利用されようとしている。

今までの研究により、水田土壌や海洋底泥に電極を設置すると電流が生成される（発電する）ことが示されている。これは、土壌や底泥中に EAB が存在することを示しており、今までにこれら環境から発電菌が単離されている。これらのうち、*Shewanella oneidensis* や *Geobacter sulfurreducens* などの幾つかの EAB は詳細に研究され、発電や代謝のメカニズムが解明されている。一方、水田土壌や海洋底泥に付着したバイオフィーム中に存在する微生物について 16S rRNA 遺伝子を用いた分子生態解析やメタゲノム解析が行われている。しかし、これらの解析において *S. oneidensis* や *G. sulfurreducens* など既知の発電菌は検出されることは稀であり、多く

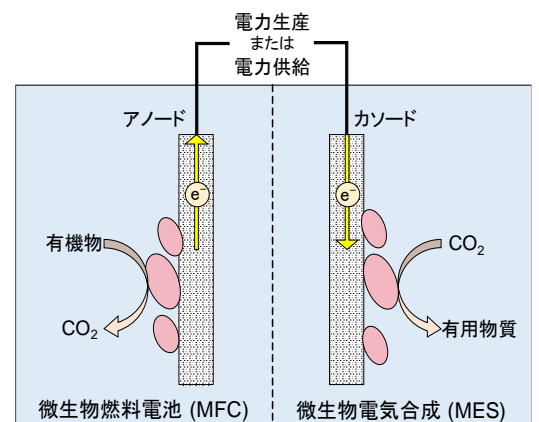


図1：微生物電気化学システム (BES) の概要図

の研究において未だに単離培養されていない EAB の発電への関与が示唆されている。このような研究結果は、環境中には未知の EAB が多数存在することを示唆しているが、それらの性質は未だ明らかになっていない。

以上を背景に、本学位申請者は、環境中に存在する未知の EAB を単離しその性質を明らかにすることを目的として、以下の I～III の研究を行ってきた。発電菌と電気合成菌の両者を研究対象とし、それらを単離する方法の開発にも成功している。以下に、これまで行ってきた研究の成果を項目ごとに要約する。

I) *Acidithiobacillus* 属の新奇 EAB の単離と解析（研究業績 1）

申請者の研究室では、電気合成菌の一種である好酸性独立栄養細菌の *Acidithiobacillus* に属す鉄酸化細菌に着目している。この細菌は 2 価鉄を電子供与体にした酸素呼吸により独立栄養的に生育する。また BES 中では、代謝により生じた 3 価鉄をカソードで再還元して 2 価鉄にすることにより増殖を促進させることができる。鉄酸化能力を生かして鉱物中の有価金属（銅や金など）を回収するバイオリッチングに利用されており、また近年、電気エネルギーを供給して CO₂ から有用物質を合成する MES への利用も期待されている。しかし、*Acidithiobacillus* の生育は遅く、物質生産への利用における大きな障害となっている。よって、現在より増殖能力の高い菌株の獲得が望まれている。

申請者は、菌株保存機関から取り寄せたモデル電気合成菌の *Acidithiobacillus ferrooxidans* の基準株（ATCC23270 株）を継代培養する過程で、継代培養を重ねると共に最大菌体密度が増加することを発見した。コンタミネーションの確認のため、増殖促進後の培養物からコロニー分離を試みたが、アガロースで固化した平板培地にはコロニーが出現しなかった。一方、無機物であるコロイダルシリカで固化した平板培地を試したところコロニーが出現したので、単離されたコロニーの 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、ATCC23270 株とは異なる菌株が培養液中で優占化していたことが明らかになった。この際の単離株の一つを *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株と命名し、生理学的諸性質の解析およびゲノム解析を行った。

16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果、NU-1 株は最近新種登録された *A. ferrophilus* に近縁であることが明らかになった。しかし、この属の細菌による鉄酸化に関与するラスチシアニン遺伝子は *A. ferrophilus* のものとは分子系統学的に大きく異なっており、既知の *Acidithiobacillus* のどの株とも異なる特殊な鉄酸化機構を持っている可能性が示唆された。また、NU-1 株は本来の ATCC23270 株と比較して、低い濃度のグルコースやグリセロールで増殖阻害を受けることも明らかとなった。一方、2 価鉄を含む無機液体培地（pH 2.0）における増殖能を他の株と比較した結果、

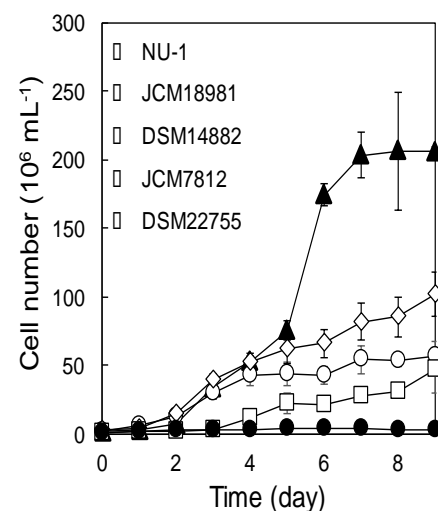


図2 菌株による増殖の違い

NU-1 株はどの既知株よりも高い増殖能を示した（図 2）。これらの結果は、NU-1 株がバイオリーディングや MES において高いポテンシャルを示す可能性を示唆している。また、環境中には有機物耐性が低いために検出・単離できなかった高活性の *Acidithiobacillus* が存在する可能性を示唆している。本研究により新たに単離された EAB である NU-1 株が、今後 MES などにおいて利用されることが期待される。

II) 水田発電による EAB の集積と電極付着菌叢の解析（研究業績 2）

申請者の所属する研究室では MFC を水田に応用し、水田発電が可能であることを実証している（図 3）。これまでの水田 MFC による発電実験においては、より高い出力を得るために電極素材や埋める深さなどが検討されてきた。また、イネの根圏に設置されたアノードに付着した微生物を検出する目的で、分子生態解析やメタゲノム解析が行われてきた。その一方で水田発電に関与する発電菌はこれまでに単離されておらず、そのメカニズムが十分に解明されたとは言えない。また、関与する発電菌を単離・同定するには、アノードにおける電流密度を上昇させ、発電菌を十分に集積する必要があると考えられた。

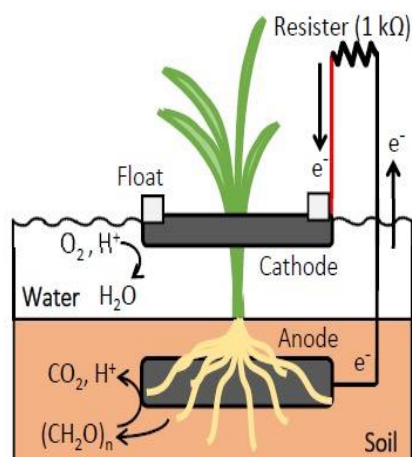


図3 田んぼ発電の概要図

そこで本研究では、電極サイズの影響を調べる目的で、アノードとカソードの面積が同じ標準型（CT）、アノードを小さくしたアノード律速型（AL）、カソードを小さくしたカソード律速型（CL）の 3 型の MFC を水田に設置し、出力経過を観察した。その結果、運転を継続するにつれてアノードの性能は向上するが、カソードの性能は低下することが示された。また AL 型において、それまでの水田発電研究で報告された中で最も高い最大出力密度（約 140 mW m⁻²）が測定され、EAB が高度に集積されたと考えられた。AL 型水田 MFC のアノードに付着した菌叢および水田土壌中の菌叢の解析を行ったところ、*Geobacter* に属す細菌がアノード菌叢において顕著に増加し、中でも *G. pelophilus* および *G. psychrophilus* に近縁な細菌が発電に関与することを示す結果が得られた。これらは新種の発電菌である可能性が考えられたが、従来の研究で *Geobacter* を単離する際に用いられたプレート培養法では、これらの細菌が単離できなかった。

III) 新規電気化学プレート培養法の開発とそれを用いた水田由来 EAB の単離（研究業績 3）

EAB を単離することは難しいと考えられており、また EAB を高効率に単離する方法は確立されていない。そこで申請者は、EAB を単離する新規な手法として電極プレート培養法の開発を行った。電極プレート培養（EPC）とは、培地プレート上に平板電極を設置し、電極を電子受容体または電子供与体としてコロニーを形成させる手法である（図 4）。まず、電極を唯一の電子受容体とするプレート培養法（electron-acceptor EPC、EA-EPC）の構築を目的に、*G. sulfurreducens* のコロニー形成試験を行った。作用極に透明な FTO

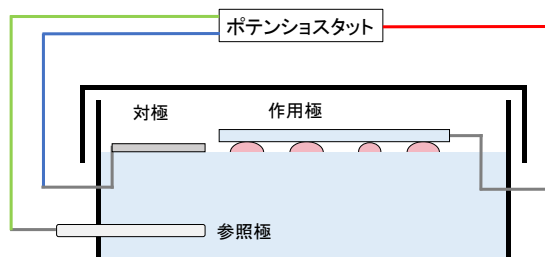


図4 電極プレート培養の概要図

ガラス電極、対極にチタンメッシュ、参照極に Ag/AgCl 電極を用い、対極と参照極はアガロースに埋め込み、菌液をアガロースプレートの上に塗布後、作用極をその上に被せた。これら電極をポテンシ

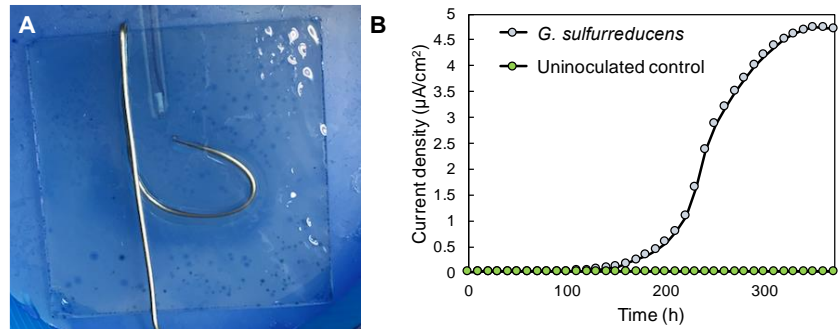


図5 EA-EPCで得られたコロニーの写真(A)および電流値の経時変化(B)

ョスタットに繋ぎ、作用極電位を -0.2 V に設定して酢酸を基質としてコロニー形成させたところ、作用極下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成が確認された(図5)。また、植菌しない条件では電流が流れず、オープンサーキット条件ではコロニーが出現しないことが確認された。

そこで、EA-EPCを用いた水田土壌中の発電菌の単離を行った。まず、約4か月運転した水田発電のアノードを作用極として酢酸を基質としたBESを立ち上げ、発電菌のさらなる集積を行った。その後、アノード付着微生物を培地に懸濁し、EPCに植菌した。その結果、FTO作用極下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成も確認された。得られたコロニーは発電菌として知られる *Citrobacter* の近縁種であったが、これは水田発電のアノード付着菌叢の中ではマイナーなものであった。マイナー種が単離された原因として作業途中の酸素曝露が考えられたので、EPCへの菌懸濁液の塗布など全工程を嫌気条件下で行ったところ、*Sulfurospirillum* や *Geobacter* を含む複数の菌種からなるコロニーが得られた。そこで、これらコロニーの菌の懸濁液を作り、EA-EPCによる再単離と純化を行ったところ、水田発電でメジャーな発電菌として検出されている *Geobacter* 属細菌の単離に成功した。これらの結果は、EA-EPCが環境中のEABを単離する手法として有用なことを示している。今後、単離されたEABの生理学的・遺伝学的解析を行えば、水田発電の分子メカニズムの解明に繋がると期待される。

【学位論文申請に用いる研究業績】

1. Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2016). Missing Iron-Oxidizing Acidophiles Highly Sensitive to Organic Compounds. *Microbes and environments*, 31(3), 244-248.
2. Ueoka, N., Sese, N., Sue, M., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2016). Sizes of anode and cathode affect electricity generation in rice paddy-field microbial fuel cells. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 6(01), 10.
3. Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2018). Electrode plate-culture methods for colony isolation of exoelectrogens from anode microbiomes. *Bioelectrochemistry*. 124, 1-6.

審査結果の要旨

近年電気化学活性を持つ細菌 (electrochemically active bacteria, EAB) が発見され、微生物燃料電池 (microbial fuel cell, MFC) などにおける産業利用が期待されている。EAB は細胞外の酸化還元物質や電極との間で電子授受をしながら細胞内の代謝反応を進めることができる細菌である。今までの研究により、*Shewanella oneidensis* や *Geobacter sulfurreducens* など、幾つかの EAB が水田土壌や海洋底泥から単離され、その電子伝達系や代謝系が解明されている。一方、各種 MFC の電極バイオフィームに存在する微生物の分子生態解析やメタゲノム解析が数多く行われているが、*S. oneidensis* や *G. sulfurreducens* 等、既知の発電菌が検出されることは稀であり、未だに単離培養されていない EAB が環境中に多数存在することが示唆されている。そこで本学位申請者は、環境中に存在する未知の EAB を単離しその性質を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。

学位論文は、「*Acidithiobacillus* 属の新奇 EAB の単離と解析」、「水田発電による EAB の集積と電極付着菌叢の解析」、「新規電気化学プレート培養法の開発とそれを用いた水田由来 EAB の単離」を主な内容とするもので、EAB の単離・解析に関して幅広い研究を行ってきたことが記されている。これら 3 つの研究成果は、それぞれ筆頭著者原著論文としてすでに発表されている。特に、申請者が開発した新規電気化学プレート培養法は、今まで単離が難しかった EAB を効率よく単離できる新手法として注目されるものであり、この成果を利用すれば、EAB の多様性や生態学的役割に関する我々の知識が今後迅速に深まっていくと期待される。また、序章は EAB に関する現在の知見を詳しくまとめており、申請者の関連分野に関する深い知識が示されている。

申請者は今までに、学位論文に関する筆頭著者原著論文 3 報に加え、総説を 2 報執筆し、また国際学会で 2 回、国内学会で 7 回発表している。また、博士論文発表会での発表およびその後の最終試験における質疑に対する応答は十分なものであった。さらに、研究室においては後輩の指導を精力的に行い、研究者・教育者としての資質が高いと判断された。

以上、研究成果、研究業績、発表会、最終試験、研究姿勢のすべてにおいて、本申請者は学位授与に値すると判断された。