

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 15 年度博士課程 入学  
氏 名 吉田 浩爾  
指導教員名 五十嵐 泰夫 教授

論文題目 微生物生態学への電気化学的手法の適用

嫌気微生物生態系において有機物は、複数種の微生物によって段階的な酸化を受け、最終的には二酸化炭素及びメタンとなる。こうした嫌気的な有機物分解は、バイオマスからのエネルギー生産、あるいはメタンによる地球温暖化といった観点から、注目を集めてきた。嫌気環境下における有機物の段階的酸化において、最終還元等量処理を担う微生物(ex.メタン菌)とその栄養共生菌(以下、メタン共生菌)との共生関係は、しばしばボトルネックとなる事が知られており、極めて重要である。従来、それらの関係は、極めて低分圧の溶存水素あるいはギ酸を介した、メタン共生菌からメタン菌への還元等量伝達(あるいは電子伝達)によるものとされてきたが、これを直接観察した報告はなかった。そこで、電子メディエータを介した種間電子伝達の存在を想定し、この還元等量(電荷)移動をより直接的に観察することを試みた。

### 第一章 電気化学的分離共培養

まず、電気化学的分離共培養法を考案し、そのための培養槽を構築した。プロトン交換膜を介してメタン共生菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* DSM 13744<sup>T</sup> と水素資化性メタン菌として *Methanothermobacter thermautotrophicus* NBRC 100330<sup>T</sup> を置き、分離共培養槽を構築する。そうして、それぞれの槽に炭素電極を挿入して、両極間を移動する電荷量をコンデンサによって積分し、積分値をコンデンサの両端電圧として検出する方法である。

## 1 節 分離共培養槽の開発

これは、謂わば **Anodic reaction** をメタン共生菌に、**Cathodic reaction** をメタン菌に行わせる微生物電池という見方ができる。ゆえに、この分離共培養には従来の微生物電池の技術を応用する事ができる。ただし、既存の微生物電池をそのまま本研究の培養槽に転用するには、①偏性嫌気的条件が維持しにくい、②オートクレーヴ滅菌が不可能である、③小型化しにくく、並列試験が難しい、等の問題が生じる。

そこで、これらの難点を克服すべく培養槽を開発した。

培養槽は、100ml のメディウム瓶

(Scott Duran)を加工した外槽と、φ18mm のねじ口試験管(IWAKI)を加工した内槽から成っている。外槽には、植菌口としてねじ口試験管の上部を溶接して取り付けている。内槽のねじ口試験管は底部が平滑に切断されており、ここにプロトン交換膜として **Nafion (DuPont)** を接着した。外槽の植菌口及び、内槽のねじ口試験管の口はポリカーボネート製の穴開きキャップとブチル中栓で密栓した。内槽のねじ口試験管は、φ17mm の穴の開いたブチル製のパッキンに通し、これをメディウム瓶に押し込み、メディウム瓶の口を穴開きキャップで締めて密栓した。

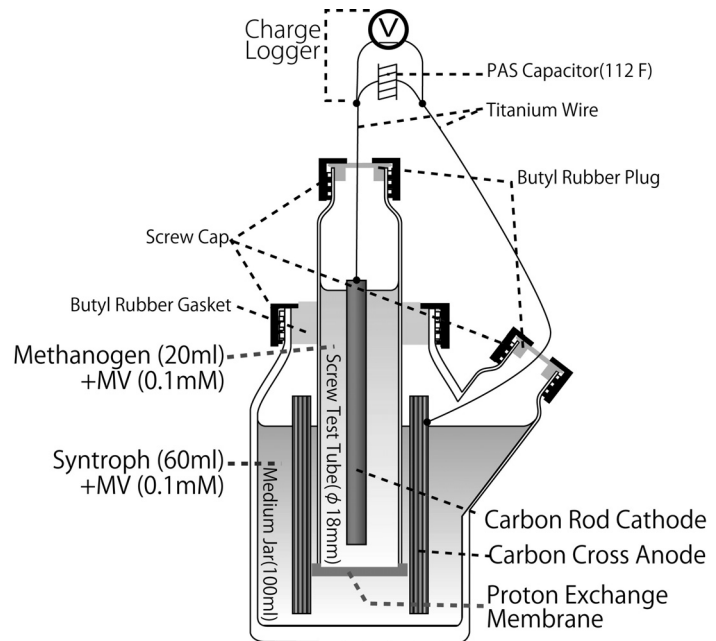
内槽の電極には、カーボングラファイト棒を用いた。そこにチタン製のリード線を取り付け、リード線をブチル中栓を通して培養槽外部に引き出した。外槽の電極にはカーボンクロスを用い、これをねじ口試験管の外周に巻きつけ、チタン製のリード線で固定した。リード線はブチル製のパッキンまたは植菌口のブチル中栓を通して培養槽外部に引き出した。使用前には、オートクレーヴを用いて滅菌した。

## 2 節 メタン共生菌の電気培養による分離共培養槽の評価

作成した分離共培養槽が、メタン共生菌の生育に適しているか、また、分離共培養槽として十分な電気化学的特性を持つか、を調べるため、メタン共生菌を電氣的に培養する事を試みた。

メタン共生菌は脂肪酸やアルコールなどを酸化してエネルギーを得る。この際余剰還元等量として水素が出てくるが、水素の生成を伴う脂肪酸酸化は標準状態においてしばしば吸エルゴン反応となる。そのため、極めて強い生育阻害を受け、多くの基質では単独培養がほぼ不可能となっている。この場合、水素資化性のメタン菌や硫酸還元菌と共培養すると、水素が除去されるためこのような基質でも生育させる事が可能である。そこで、白金触媒を用いて水素を除去する事で、単独生育不可能な基質でのメタン共生菌の純粋培養を試みた。

メタン共生菌として、*P. thermopropionicum* 及び *Anaerolinea thermophila* NBRC100420<sup>T</sup> を用いた。*P. thermopropionicum* はピルビン酸を基質とした場合には、単独で生育するが、プロピオン酸、乳酸、エタノールなどは、単独では利用する事が出来ない(メタン菌との共培養では生育可能)。一方、*A. thermophila* は単独でグルコースを酸化することが出来るが、メタン菌と共培養した場合、



生育が上昇する。

培地には DSM medium 960 Pelotomaculum Medium を、基質を変えて用いた。基質としては *P. thermopropionicum* にはエタノール 10mM を、*A. thermophila* にはグルコース 20mM を用いた。気相は O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 混合ガスとし、操作は完全な嫌気下で行った。培養には上述の培養槽内槽を用い、外槽はカウンター槽とした。内槽には 20ml、外槽には 60ml の培地を入れ、内外槽とも、電極として白金黒めっきを施した白金線(φ 0.3mm)を挿入した。培地を分注後、内槽を外槽の底につくまで押し込み、オートクレーヴ滅菌(121°C 15 分)した後、少しだけ引き上げて内槽と外槽底部の間に隙間を作った。その後、内槽と外槽の培養液がクロスコンタミネーションしないことを確認した。次いで前培養液を容量 1%接種し、電気培養を行った。電気培養は内槽電極を作用極としてグラウンド電位を掛けて行った。また外槽電極を対極として -0.6V を印加した。また、コントロールとして、電圧をかけない培養も用意した。培養は 55°C で 2 週間行った。生育の評価は酢酸塩の増加を指標とし、酢酸塩は HPLC で測定した。

*P. thermopropionicum* は、コントロールでは生育が見られなかったが電圧を掛けた場合、有意な生育が見られた。*A. thermophila* は 3 倍程度の生育の向上が見られた。この事から、メタン共生菌の電気培養が可能である事が示された。またこの試みによって、培養槽が電気化学的分離共培養槽に十分なプロトン交換能を持ち、長期に亘った偏性嫌気条件の維持が可能であること、培養槽の構成材に生育阻害は見られないこと、などを評価する事が出来た。

### 3 節 電気化学的分離共培養

そこで、次にこの培養槽を用いてメタン共生菌とメタン菌の電気化学的分離共培養を行った。

メタン共生菌の培養には外槽を用い、培養液の量は 60ml とした。また、メタン菌の培養には内槽を用い、培養液の量は 20ml とした。内槽の気相は約 15ml であった。メタン共生菌側には電子供与体としてピルビン酸を入れ、内外槽ともに電子メディエータとして Methyl Viologen を 0.1mM 添加した。まず、内槽の気相を H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 混合ガスへと置換し、メタン菌を植菌して 1 週間前培養を行った。次にその後内槽の気相を再び N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 混合ガスへと戻し 2 日ほど置き、気相を GC-MS で測定してメタンが生成していない事を確認した。次いで培養液の電位差による起電力の影響を極力抑えるために、両槽の電位差電圧計で測定しながら還元剤を用いて電位差が ±30mV 以内になるように電気化学滴定を行った。外槽にメタン共生菌を接種して、培養を開始した。

炭素電極は、チタニウム製のリード線とコンデンサを介して互いに接続した。また、培養終了後にもメタン菌側気相中のメタンガスを測定した。

コントロールとして行った、電極を接続しなかった場合、Methyl Viologen を添加しなかった場合、および Methyl Viologen を添加し、メタン共生菌を添加しなかった場合のメタンの生成は 0~3 μmol であったが、電極の接続、Methyl Viologen、メタン共生菌の植菌の全てを行ったものでは、9~18 μmol のメタン生成がみられ、有意に上昇した。さらに、外槽から内槽に移動した電荷の一部を観測することにも成功した。本研究の結果はメタン共生菌からメタン菌への種間電子伝達を直接的に示すものである。

## 第二章 嫌気消化汚泥の電気化学的評価

本研究では Methyl Viologen 及び電極を介した種間電子伝達を示した。しかし、Methyl Viologen は人工的に添加したものであり、こうしたメディエータを介した種間電子伝達が自然界で成り立っているのかは分からない。そこで、嫌気環境に対して電気化学的分析を行い、Methyl Viologen に相当するような電気化学的活性を有した物質が存在しているか否か、調査した。

嫌気環境として嫌気消化汚泥を対象に解析を行った。2%ドッグフード懸濁液を基質として、かつその水理学的滞留時間が 10 日になるような運転を行っているベンチスケール(7 L)のメタン発酵槽から嫌気消化汚泥を採取した。電気化学分析として Cyclic Voltammetry(CV)と Differential Pulse Voltammetry(DPV)を行った。その結果、DPV によって Methyl Viologen に近い $-0.45\text{V}$ (vs. SHE)付近に電気化学的活性を有する物質の存在が認められた。このピークは CV では検出されず、こうした環境の電気化学的解析において DPV が強力なツールとなりうる事が示された。上記の実験結果は、分離共培養槽を用いて示されたような種間電子伝達が、実際の嫌気環境下でも起こりうる事を示唆するものである。

### 総括

メタン共生菌 *P. thermopropionicum* からメタン菌 *M. thermoautotrophicus* への電荷移動が観察され、また、それによるメタン生成が観察された。これにより、従来、低分圧の水素によるものとされていたメタン共生菌からメタン菌への還元等量の移動が、人工的に添加した電子メディエータを介しても行われうる事が示された。さらに、嫌気環境において添加した電子メディエータと同様の電気化学的活性を有する物質の存在が認められたことから、こうした還元等量伝達が自然環境下でも起こりうる事が示唆された。また、DPV による嫌気環境の電気化学的活性の探査が有効である事を示した。なお、細胞外に電子伝達を行うメディエータは鉄還元細菌が不溶性の鉄(III)を利用する際に用いる事が報告<sup>1)</sup>されている。こうした知見は、従来の嫌気環境における還元等量処理の研究に新たな観点を与えるものである。また、難培養微生物であるメタン共生菌の電気培養技術の開発にも筋道をつけた事は、嫌気微生物生態系のさらなる解明に大いに貢献するであろう。

1) Lovley, D.R. et. al. 2005. *Nature* 382: 445-448