

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 Studies of Heme-Mediated Extracellular Electron Transfer Mechanism in Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria

(鉄還元細菌におけるヘムを介した細胞外電子移動機構に関する研究)

氏名 岡本 章玄

### 1. 緒言

近年、ヘムを電子移動中心を持つ膜タンパク質を介し酸化鉄などの不溶性材料を還元する細胞外電子伝達能を有する微生物が発見され注目されている。細胞外電子移動によって作り出される電子の流れは、微生物燃料電池におけるアノード性能、ならびに自然界における鉄や硫黄の循環において本質な役割を担っている。そのため、細胞外電子移動の機構解明や、その制御法の開拓を目的とし、遺伝子解析に基づく重要タンパク質の同定、および精製膜タンパク質の電気化学的性質の検討などが精力的に行われている。しかし、微生物が作り出す電子の流れは、個々のタンパク質の働きに加え、代謝活性や遺伝子発現などの生体特有の動的挙動に強く依存する。したがって、細胞外電子移動機構の理解のためには、生きた細胞を研究対象とし、どのように電子移動過程が制御され、それが代謝活性と相互作用しているのかを明らかにする必要がある。

以上の観点から、本研究では細胞外電子移動機構に迫ることを目的に、生きた微生物を用いて電子移動過程の電気化学的追跡、および代謝電流の制御因子の決定の二点から研究を進め、これを通じて機構の解明を行ってきた。鉄還元細菌 *Shewanella* は膜タンパク質 (シトクロム) の活性中心であるヘムを介した細胞外電子伝達能を有し、その機構として (1) 直接型電子移動、(2) 導電性ワイヤーによる電子移動と (3) 自己分泌したフラビン分子を介した間接型電子移動が提案されている (図1)。本論文ではヘムを介した電子移動過程

の (1) と (3) に焦点をあて、それぞれの電気化学的追跡を試みた。そして、そこで得た知見を用いて微生物が自己分泌するシグナル分子が電子移動過程や代謝活性に与える影響を調べた。また、電子移動中心であるヘムと酸化鉄などの鉱物材料との相互作用、ならびに人工無機錯体との複合化の可能性を検討した。

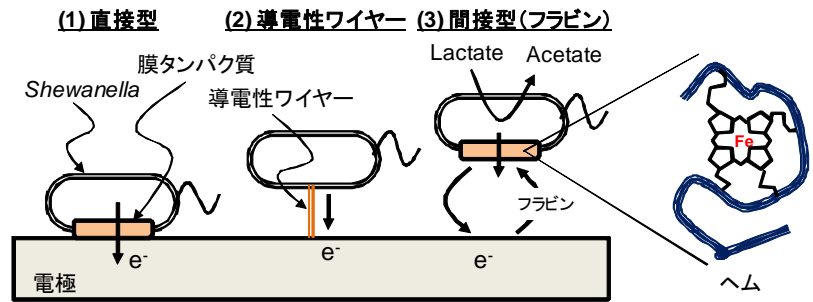


図1 ヘムを介した細胞外電子移動過程。

### 2. 外膜シトクロムを介した界面電子移動過程の電気化学的追跡 (論文4, 6)

直接型電子移動パスの存在を検証することを目的に、微生物と電極界面における電子移動の電気化学的追跡を行った。電極上で培養した *Shewanella* の Cyclic voltammetry (CV) 測定より、50 mV vs SHE に中点電位 ( $E_m$ ) をもつ酸化還元波が観測された (図2)。ここで、このピーク電流値と電位走印速度が正の相関を示したことから、観測した電子移動反応が拡散過程を含まない直接型であることが確認できた。そこで、この酸化還元種が生きた細胞中の外膜シトクロムであることを検討するため、活性中心であるヘムが NO に高い反応性を有することに着目し、微生物懸濁液に NO

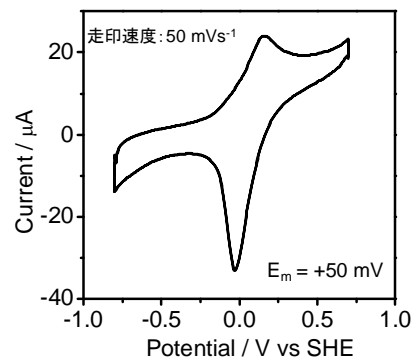


図2 *Shewanella* の CV 測定結果。

を暴露した。ヘム/NO 錯体が生細胞において形成すると、観察された酸化還元波が正に 600 mV シフトすることを確認した。さらに外膜シトクロム遺伝子破壊株を用いると、酸化還元電流が 80%減少した。このことから、 $E_m = 50 \text{ mV}$  の酸化還元種がシトクロムに帰属されることがわかる。以上の結果は、ヘムを介した直接型電子移動が微生物と電極界面において進行していることを示している。

### 3. フラビンを介した間接型細胞外電子移動過程 (論文 9)

間接型電子移動過程パスについて高感度な電気的手法である Differential pulse voltammetry (DPV) を用い、さらなる電気化学検討を行った。すると、細胞膜シトクロムに帰属される酸化還元波のほかに、新たに  $-145 \text{ mV}$  に酸化還元ピークが存在することが確認できた。このピーク電流値は、外部からフラビンを添加するこ

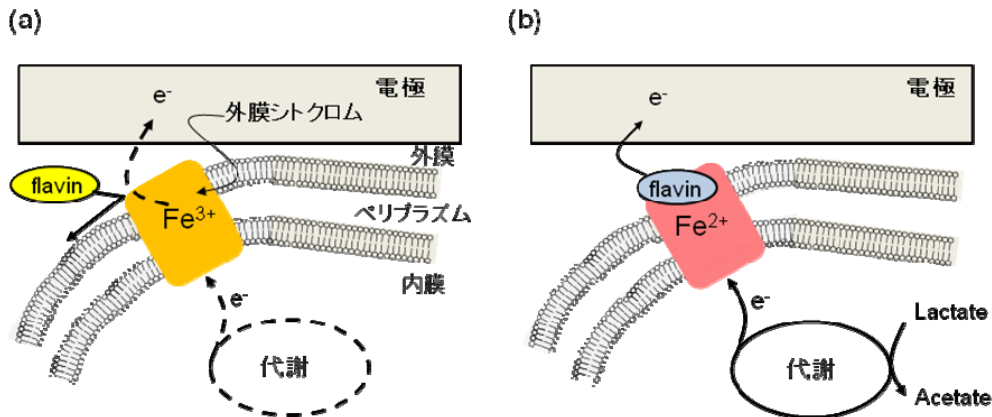


図3 外膜シトクロムとフラビン分子の相互作用。電子源である乳酸無し(a)、有り(b)。

とで増大したことから、自己分泌フラビンに帰属される。ここで、細胞を含まない電極上で測定したフラビンの酸化還元電位は  $-260 \text{ mV}$  である。また、細胞膜シトクロムを持たない遺伝子破壊株を用いて測定した際や、電子源である乳酸欠乏下においてフラビンは  $E_p = -240 \sim -250 \text{ mV}$  を示した。これらの結果は、分泌フラビンが還元状態にある細胞膜シトクロムとの特異的に相互作用し、その結果溶存状態にあるフラビンとは異なる電子状態を形成していることを示している (図3)。また、 $E_p = -145 \text{ mV}$  の電流値と、微生物の代謝に由来する電流値が正の相関を示したことからヘムと相互作用を行っているフラビン分子が細胞外電子移動過程を媒介していることが示唆された。以上の結果は、シトクロムと相互作用したフラビン分子が間接型電子移動を媒介することを示す最初の報告であり、還元体のシトクロム量が増える条件において、フラビンによる電子移動過程が促進されることを示している。

### 4. 微生物による電子移動パスの自己調整 (論文 8)

代謝活性を増大させるシグナル分子が存在するとの仮説を立て、細胞が増殖する過程における一細胞当たりの触媒電流の時間変化を追跡した(図4)。電気化学セルに *Shewanella* 細胞を添加すると、代謝電流値は約5時間、1 nA程度の値を保った後に上昇を始め、10時間後には、1.0

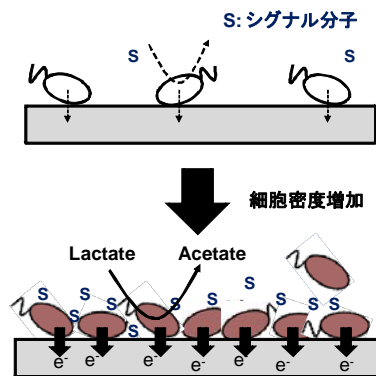


図4 シグナル分子蓄積による代謝の活性化。

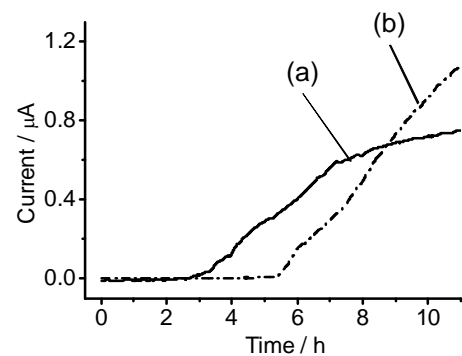


図5 代謝電流値の時間変化。(a)微生物分泌物添加有り、(b)無し。

$\mu\text{A}$  の電流が観測された (図 5(b))。この時、細胞一体あたりの代謝電流値を算出すると、電流上昇前後で 100 倍以上にまで増加しており、それに伴い DPV で観測されるフラビンの酸化還元電位が  $-260\text{ mV}$  から  $-145\text{ mV}$  までシフトした。このことは、シトクロムに供給される電子量が増大した結果、還元されたシトクロムとフラビンが相互作用し、細胞外電子移動過程が促進されていることを示している。ここで、急激な電流上昇が起こる際の電極表面の細胞密度を測定すると、初期添加細胞濃度を変化させても常に  $10^7\text{ cells/cm}^2$  (電極被覆率約 50%) 程度の値を示した。また、微生物が分泌した上澄み液を反応容器内に添加すると、電流値が増加するまでの時間が短縮された (図 5(a))。以上の結果は、細胞分泌物の蓄積によって微生物一体あたりの代謝活性が増加していることを示しており、代謝活性に関与するシグナル分子が存在するとの仮説の正当性が示唆された。以上は、微生物の自発的な代謝活性制御によって、フラビン分子による間接型電子移動パスが誘起される、微生物の動的挙動と細胞外電子移動過程の相互作用を明確に示している。

### 5. 鉱物/微生物界面におけるヘムを介した細胞外電子移動過程 (論文 3, 5, 7)

*Shewanella* は、自然界においては酸化鉄を電子受容体として利用している。そこで、酸化鉄などの鉱物材料においても、ヘムやシグナル分子によって制御された細胞外電子移動過程が進行するという考えの元、酸化鉄を豊富に含む環境を電気化学反応容器内に構築した。その結果、細胞からの電流生成能が 50 倍以上に飛躍的に向上することが観測された。遺伝子破壊株ならびに電気化学測定の結果、細胞がヘムを介して酸化鉄の伝導帯に電子注入を行い、その後、半導体コロイドを用いた電子ホッピング反応を行うことで、長距離電子伝達経路を細胞凝集体内部に自発構築していることを明らかにした (図 6)。また、同様の現象は微生物の生成によって金属導電性を有する硫化鉄ナノ粒子が形成した際にも観測された。以上の結果から、酸化鉄や硫化鉄に対しても微生物がヘムを介した電子伝達を行っていることが電気化学的に示された。さらに、微生物は固体材料の導電性を認識し、固体材料とヘムによる導電性ネットワークを形成する能力を有していることが示された。酸化鉄や硫化鉄は自然界において *Shewanella* が共存している鉱物であり、深海や土壌内においてもこのような導電性ネットワークが形成され、微生物のエネルギー獲得において重要な役割を担っていると考えられる。

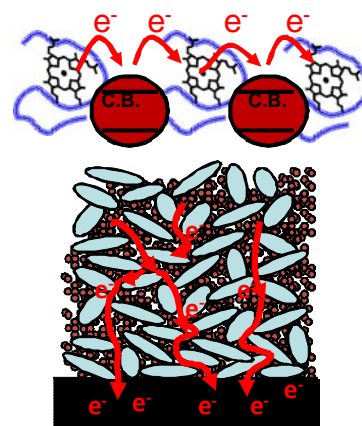


図 6 微生物と酸化鉄コロイドによる導電性ネットワーク。

### 6. 人工錯体におけるヘム酸化還元反応の光誘起 (論文 1, 2)

ヘムの酸化還元反応が、細胞外電子移動過程において本質的な重要性を有することをここまでで示した。ここでは、光励起した電子によって鉄錯体の酸化還元反応を駆動することを目的に、人工錯体触媒の開発を行った (図 7)。錯体  $\text{CO}_2$  還元触媒である鉄コロールとメソポーラスシリカ細孔内に担持した光吸収中心  $\text{TiO}_4$  サイトを結合させた錯体を合成した。そして、光励起した電子を異種金属間で移動させ、鉄錯体を還元することで触媒反応を駆動した。このことは、人工無機材料と生体材料を組み合わせれば、光駆動性などの機能を微生物に付加出来ることを示唆しており、無機生体ハイブリッド材料開発への展開が期待で

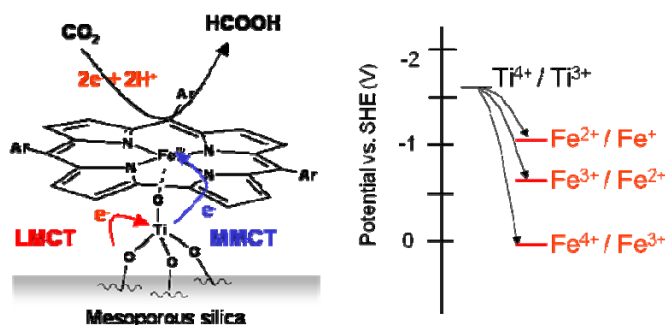


図 7 合成した無機錯体における光励起電子による鉄錯体触媒の還元反応。

人工無機材料と生体材料を組み合わせれば、光駆動性などの機能を微生物に付加出来ることを示唆しており、無機生体ハイブリッド材料開発への展開が期待で

きる。

## 7. 総括

本研究では、細胞外電子移動過程を電気化学的に追跡することで、ヘムの酸化還元状態が、直接型パスだけではなく間接型パスにおけるフラビン分子とシトクロム間の相互作用を制御していることを明らかにした。さらに、ヘムの酸化還元状態の制御を行う代謝を活性化するシグナル分子の存在を見出した。これらの細胞外電子移動機構は、まさに生体の動的挙動によって細胞外電子移動過程が制御されていることを示している。これらの生体機構がヘム、フラビンやシグナル分子などの分子特性に基づいていることは、微生物が作る電子の流れを制御する手法の確立へ向けて重要な知見である。また、鉱物との導電性ネットワーク形成の有効活用、無機材料との複合材料化やシグナル分子の機構解明が進めば、微生物燃料電池や微生物電極触媒など近年注目を浴びている生体を用いたエネルギー変換技術の効率化に貢献できると期待できる。

## 8. 投稿論文リスト

1. “Site-specific Synthesis of Oxo-bridged Mixed-valence Binuclear Complexes on Mesoporous Silica” A. Okamoto, R. Nakamura, H. Osawa, K. Hashimoto, *Langmuir*, 2008, 24, 7011-7017.
2. “Anchored Oxo-Bridged Bimetallic Complexes, (SiO)<sub>2</sub>-Ti-O-Fe(corrole), on Silica Mesopores as Multi-Electron-Transfer Photosystems” A. Okamoto, R. Nakamura, H. Osawa, K. Hashimoto, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 19777-19783.
3. “Self-constructed Electrically Conductive Bacterial Networks” R. Nakamura, F. Kai, A. Okamoto, G. J. Newton, K. Hashimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 508-511.
4. “*In vivo* Electrochemistry of C Type Cytochrome-Mediated Electron-Transfer with Chemical Marking” A. Okamoto, R. Nakamura, K. Ishii, K. Hashimoto, *ChemBioChem*, 2009, 10, 2329-2332.
5. “Biological Iron-Monosulfide Production for Efficient Electricity Harvesting from a Deep-Sea Metal-Reducing Bacterium” R. Nakamura, A. Okamoto, N. Tajima, G. J. Newton, F. Kai, T. Takashima, K. Hashimoto, *ChemBioChem*, 2010, 11, 643-645.
6. “*In vivo* Identification of Direct Electron Transfer from *Shewanella oneidensis* MR-1 to Electrodes via Outer Membrane OmcA-MtrCAB Protein Complexes” A. Okamoto, R. Nakamura, K. Hashimoto, *Electrochimica Acta*, 2011, 56, 5526-5531.
7. “Electrochemical Monitoring of Intercellular Electron Transfer in Biofilm of *Shewanella oneidensis* MR-1 Mediated by Outer-membrane C-type Cytochromes” A. Okamoto, R. Nakamura, K. Hashimoto, *Electrochem. Comm.* submitted.
8. “Cell density triggers flavin-mediated electron transfer pathway” A. Okamoto, R. Nakamura, K. Hashimoto, in preparation.
9. “Water molecule governs the flavin-mediated electron transfer pathway” A. Okamoto, R. Nakamura, K. Hashimoto, in preparation.

## 博士論文以外論文リスト

10. “Design of All-Inorganic Molecular-based Photocatalysts Sensitive to Visible Light: Ti(IV)-O-Ce(III) Bimetallic Assemblies on Mesoporous Silica” R. Nakamura, A. Okamoto, H. Osawa, H. Irie, K. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 9596-9597.
11. “Biological Electron Transfer Associated with Anode Performance in Microbial Fuel cells” A. Okamoto, R. Nakamura, K. Hashimoto, *Electrochemistry*, InTech, (総説) in preparation..