

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	細胞外電子移動による脱窒制御
Title(English)	Controlling Denitrification by Extracellular Electron Transfer
著者(和文)	山田哲也
Author(English)	Tetuya Yamada
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10749号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松下 伸広,田中 寛,原 正彦,矢野 哲司,稲木 信介,中村 龍平
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10749号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

## 学位論文の概要

論文題目：(英) Controlling Denitrification by Extracellular Electron Transfer

(和) 細胞外電子移動による脱窒制御

本論文は“Controlling Denitrification by Extracellular Electron Transfer” (細胞外電子移動による脱窒制御)というタイトルで英文にて記述し、Chapter 1~6 の6章から構成している。

### Chapter 1 “Background and Objective of This Study”

では、タンパク質を構成し、生命に欠かすことのできない元素である窒素の自然界における循環について記し、それに関わる脱窒菌の役割を概説した (Fig. 1 a). 今後の世界人口増加を考えると固定窒素を含んだ肥料を無駄なく利用する必要ある。一方で、環境汚染という観点からは脱窒反

応を促進することで固定窒素を取り除く必要があり、環境に応じた脱窒反応の制御が重要となる。脱窒とは呼吸の一種であり電子の流れによりエネルギーを作り出す役割を生体内で担っている (Fig. 1b)。そこで、本論文では細胞外電子移動という概念を脱窒菌に適用し、細胞外からの電子授受により脱窒菌の代謝を制御することを目的とした。

### Chapter 2 “Anodic and Cathodic Extracellular Electron Transfer by the Filamentous Denitrifier, *Ardenticatena Maritima* 110S”

では、鉄が豊富に存在する環境から単離されたフィラメント状脱窒菌 *Ardenticatena Maritima* 110S における細胞外電子移動について調査を行った。110S は固体状の水酸化鉄を還元できるので、この菌が細胞外電子移動能力を持つという仮説を立てた。細胞外からの電子授受を検証するために電気化学セル内で培養した上で電気応答性を検証した結果、硝酸イオンを電子受容体として含んだ培地内で電位を負に固定した場

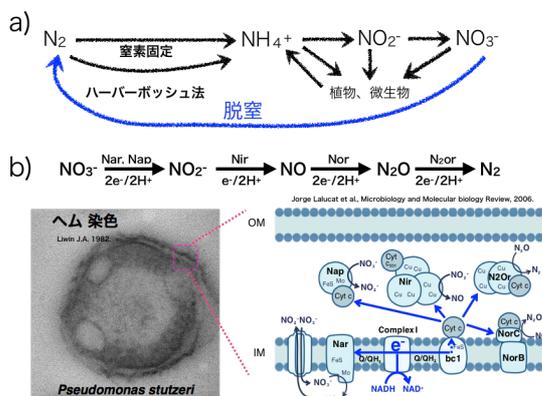


Fig.1 a) 窒素循環と脱窒菌の役割 b) 脱窒反応の電子伝達系, *Pseudomonas stutzeri* のヘム染色した TEM 像

合には還元電流(Fig. 2 a), 一方で電子供与体としての有機物を含んだ培地内で電位を正に固定した場合には酸化電流がそれぞれ観測された(Fig. 2 b). また、ゲノム配列情報, GC-MS/MS ならびに抗体染色により発現する膜タンパク質の調査から外膜シトクロム(ARMA\_0580)の存在を示し, 110S は細胞外の電位と培養環境によって酸化ならびに還元という双方向的な直接細胞外電子移動を行うことがわかった(Fig. 2 c). さらには水酸化鉄などの鉄鉱物を加えることで酸化電流の増加も確認し, 脱窒菌である 110S が鉄鉱物の酸化還元状態に影響を受け代謝を変える可能性を示した.

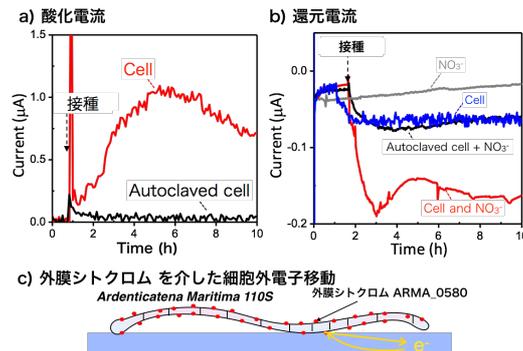


Fig.2 a) 酸化電流; 0.2 V で電子供与体としてイーストとトリプトンを含む b)還元電流; -0.2 V で電位受容体として硝酸イオンを含む c) 外膜シトクロムを介した双方向的な細胞外電子移動の模式図

Chapter 3 “Metabolic Monitoring of *Pseudomonas stutzeri* Using Extracellular Electron Transfer Driven By Iron Minerals”では, 脱窒菌のモデルのひとつである *Pseudomonas stutzeri* を電極上で培養し, 発生する電流のモニタリングを試みた. *P. stutzeri* に関して BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) によって外膜シトクロムを有していないことを把握した上で, 実際にサイクリックボルタンメトリー及びクロノアンペロメトリーの測定で代謝電流が計測されないことを確認した. 次に硫酸鉄を加えて電気培養を行なった場合には鉄化合物を介して電極と電子授受が可能になり, 硝酸イオンを加えた系においては還元電流が流れることを確認した (Fig. 3 a). つまり, 外膜シトクロムを持たない *P. stutzeri* においても鉄化合

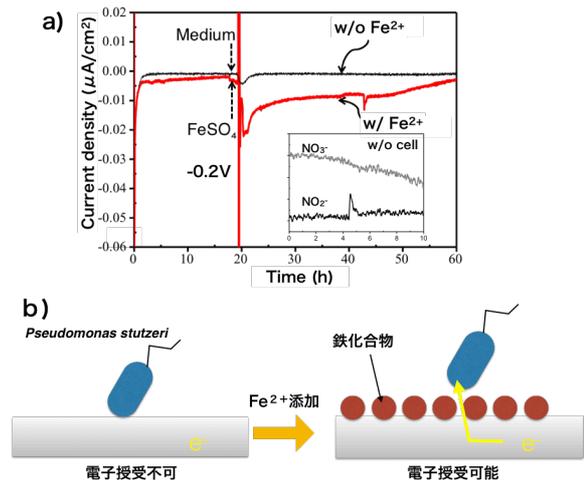
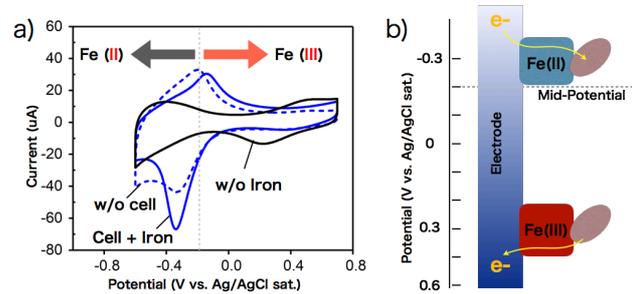


Fig.3 a)  $Fe^{2+}$  を介した細胞外電子移動; 矢印は  $Fe^{2+}$  を添加した時間を示し, 硝酸イオンを含んだ系で還元電流が流れる. 菌を含まない系では電流が見られない(inset). b)  $Fe^{2+}$  添加による細胞外電子移動の模式図

物を介し電極との電子授受が可能であることを示した (Fig. 3 b) .

Chapter 4 “Rate Enhancement of Microbial Denitrification of *Pseudomonas Stutzeri* Coupled with Iron Mineral Oxidation”では、鉄の酸化還元状態を電極電位により調整することで脱窒反応の制御を試みた。サイクリックボルタンメトリーから鉄鉱物の mid-potential が-0.2 V であることから、鉄の価数は-0.3 V で2価の状態、+0.3 V で3価の状態になることが分かった(Fig 3 a-b). よって、電位の条件は-0.3 V または+0.3 V (vs

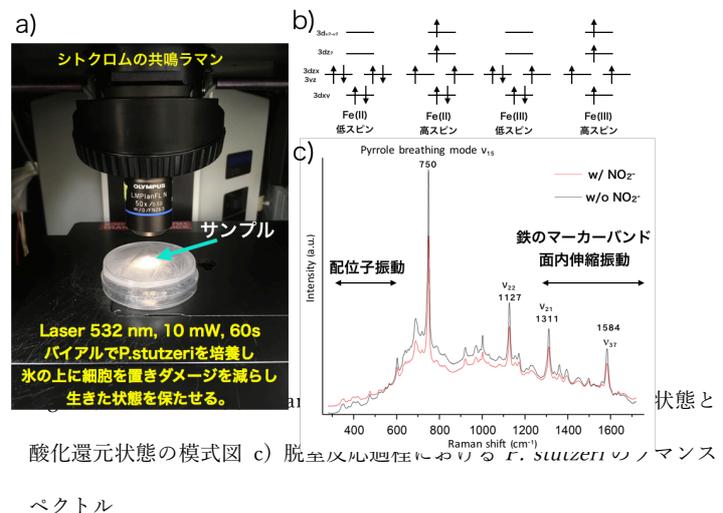
Ag/AgCl sat.)および電位を印加しない Open circuit の3条件とし、電子供与体として酢酸ナトリウムを加えて測定し、脱窒量は同位体  $^{15}\text{N}$  を用いて GC-MS により窒素ガス量を厳密に定量した。その結果、-0.3 V の脱窒量は+0.3 V のものと比べて 20%程度増加した。さらに細胞外電子移動量と脱窒に必要な電子量の関係を調査したところ、硝酸イオンから  $\text{N}_2$  を一分子生成させるために必要な電子量は 10 電子であるが、細胞外電子移動で流れる電子総量は脱窒代謝に必要な電子の 1000 分の 1 と極めて少ないことが分かった (Fig. 3 c).



電位	電極を流れた電子総量 (μmol)	窒素発生量 (μmol)	窒素発生に必要な電子量 (μmol)
Open Circuit	0	58 ± 10	580 ± 100
-0.3 V	0.17 ± 0.05	64 ± 12	640 ± 120
+0.3 V	-0.09 ± 0.03	53 ± 12	530 ± 120

Fig.4 a) サイクリックボルタンメトリー;  $\text{Fe}^{2+}$ 添加と菌を含む(青字線),  $\text{Fe}^{2+}$ 添加と菌なし(青点線) b)電位による鉄の価数変化と細胞外電子移動の模式図, Mid-potential -0.2 V c) 電極電位と電極に流れた電子総量, 窒素発生量, 窒素発生に必要な電子量の関係

Chapter 5 “Detecting Nitrosyl Iron Complexes Formed during Denitrification by Spectroscopy”では、脱窒反応におけるシトクロムの働きを明らかにするために、生きたままの細胞をラマン分光により観測した(Fig. 5 a). ラマン分光法によりシトクロムのスピン状態と酸化還元状態を



酸化還元状態の模式図 c) 脱窒反応過程における *P. stutzeri* のラマンスペクトル

調べることができる(Fig. 5 b). ラマン分光スペクトルの解析により低スピン状態のシトクロムは亜硝酸イオン存在下で酸化されること,そして,シトクロムと NO が結合する状態が存在することが分かった. また, UV-Vis により Fe(II)によりシトクロムは電子を受け取って還元状態になることをそれぞれ示した. シトクロムと NO の結合を考えた場合に Fe(II)は Fe(III)に比べ 1000 倍の吸着特性が知られており, 細胞外電子移動による電子注入はシトクロムのレドックス状態を変化させそれにより NO の結合を強め, 結果として NO による細胞毒性を下げている可能性が考えられる.

Chapter 6 “Conclusions and Perspective”では, 本研究で得られた結果と議論を総括するとともに将来の展望として細胞外電子移動と速度論的同位体効果に関して記した. 速度論的同位体効果は物質の循環を知る上で地球化学的に重要な指標であるが, 細胞の酸化還元状態などにより変化し得る. 本論文から細胞外電位により脱窒速度が変化すること及び, 細胞外電子移動により細胞の状態をその場でモニタリングできる可能性を示している. そこで, 本論文から得られた知見を細胞外電子移動活かし, 速度論的同位体効果を検出するための手法を考案した. この手法では同位体  $^{14}\text{N}$  と  $^{15}\text{N}$  をそれぞれ含んだ2つの系を用意し得られた電流値の比を取るという測定方法になる(Fig. 6 a). *P. stutzeri* においてこの手法を適用したところ電流比の変化をモニタリングすることに成功した. 本論文は細胞外電子移動を用いた脱窒菌の代謝制御だけでなく, 細胞外レドックス, そして, 地球化学的に重要な速度論的同位体効果の関係を繋げる一助となると考えられる.

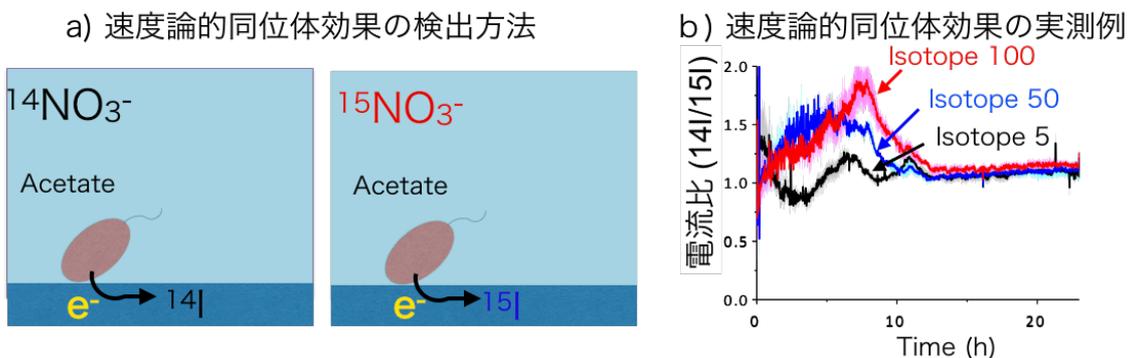


Fig.6 a) 細胞外電子移動を用いた速度論的同位体効果の検出方法. 左図  $^{14}\text{NO}_3^-$  を含む系, 右図  $^{15}\text{NO}_3^-$  b) 細胞外電子移動を利用した同位体効果の検出実測例,  $^{15}\text{NO}_3^-$  濃度が 100, 50, 5 %における電流比を示している.