

微生物燃料電池での電流生産を可能にする *Shewanella oneidensis* の細胞外電子伝達機構

Extracellular Electron Transfer Mechanisms of *Shewanella oneidensis* That Facilitate Current Generation in Microbial Fuel Cells

高妻 篤史^{1*}, 橋本 和仁^{1,2}, 渡邊 一哉^{1,3}
ATSUSHI KOUZUMA, KAZUHIITO HASHIMOTO and KAZUYA WATANABE

¹ 科学技術振興機構 ERATO 橋本光エネルギー変換システムプロジェクト 〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

² 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

³ 東京大学先端科学技術研究センター 〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

* TEL: 03-5452-5749 FAX: 03-5452-5749

* E-mail: kouzuma@light.t.u-tokyo.ac.jp

¹ Hashimoto Light Energy Conversion Project, ERATO/IST, Komaba Open Laboratory, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

² Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

³ Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

キーワード: 微生物燃料電池, 細胞外電子伝達, 異化的金属還元, *Shewanella*

Key words: Microbial Fuel Cell, Extracellular Electron Transfer, Dissimilatory Metal Reduction, *Shewanella*

(原稿受付 2009年10月3日/原稿受理 2009年10月19日)

1. はじめに

電子伝達反応は生物が生存していくために必要なエネルギーを得るための基本的な反応であり, 呼吸鎖の電子伝達系は光合成と並んでその代表例として挙げられる。呼吸鎖において, 電子は酸化還元電位の低い物質 (電子供与体) から高い物質 (電子受容体) へと受け渡され, その際に放出されるエネルギーはプロトン駆動力へと変換される。生物はその力を利用して ATP を合成し, 細胞の維持や増殖に必要なエネルギーを得ている。生物の中でもバクテリアと古細菌は非常に多様なエネルギー代謝能を備えており, 有機物, 無機物を問わず様々な化合物を電子供与体とし, また受容体とすることができる。この多様なエネルギー代謝能によって, これらの微生物は他の生物種ではエネルギー獲得が不可能な環境 (例えば深海熱水噴出孔など) においてもエネルギーを生産することが可能となっている。

多くのバクテリアは真核生物と同様に酸素を最終電子受容体とする好気呼吸を行い, また硝酸イオン (NO_3^-) や硫酸イオン (SO_4^{2-}) を用いて嫌氣的な呼吸を行うが, 中には鉄やマンガンの酸化物などの金属化合物を最終電子受容体として利用できるバクテリアも存在する。このようなバクテリアは異化的金属還元細菌 (dissimilatory metal-reducing bacteria) と呼ばれ, 約 20 年前に *Shewanella oneidensis* MR-1 株¹⁾ と *Geobacter metallireducens*²⁾ の 2 株が発見された。それ以来, *Shewanella* 及

び *Geobacter* 属細菌に限らず, グラム陽性細菌や, さらには古細菌が異化的金属還元能を示す例が報告されている³⁾。

酸化鉄 (III) や酸化マンガン (IV) は中性付近の pH では水にはほぼ不溶であるので, それらの化合物を還元して呼吸を行うためには細胞内膜上の呼吸鎖から細胞外へと電子を伝達する経路が必要となる。細胞外電子伝達の分子機構は *Shewanella* 及び *Geobacter* 属細菌において徐々に解明されつつあり, これらの微生物は i) 細胞外膜に局在するシトクロム $c^4)$ または導電性の繊維 (nanowire)^{5,6)} による直接的な接触, もしくは ii) 電子伝達を介在する化合物 (メディエーター) を介した間接的な経路⁷⁻⁹⁾ により細胞外の電子受容体を還元することが明らかになってきた (*Geobacter* 属細菌は i, *Shewanella* 属細菌は i と ii の両方の経路を使用する)。また近年, このような細胞外電子伝達機構を有する微生物に電極を電子受容体として呼吸させることで, 微生物を触媒として有機物から電流を生産することが可能であることも明らかになってきた。こうしたシステムは微生物燃料電池 (microbial fuel cell; 以下 MFC) と呼ばれ, 次世代型バイオエネルギープロセスとして注目を集めている^{10,11)}。本総説では, MFC の基本的なメカニズムと近年分子レベルで急速に解明が進んでいる *S. oneidensis* MR-1 株の細胞外電子伝達機構について解説した後, 遺伝子改変により MR-1 株の電流生産能力を向上させることに成功した筆者らの研究成果について紹介したい。

2. 微生物燃料電池の基本原理解

MFCは微生物の異化代謝能を利用して有機物から電力を生産するシステムであり、廃棄物系バイオマス処理すると同時に電力という形で直接エネルギーを回収できるという利点がある^{10,11}。現在のところ生産できる電力が低く、また大規模なリアクターを製造することが難しいなどの理由から廃棄物処理の現場で実用化はなされていないが、今後の技術改良により大幅に性能が改善される余地があると期待されている。MFCにおいて、微生物から放出された電子はアノード電極（負極）へと受け渡される（図1）。アノード電極の素材としては、導電性があり、表面積が大きいグラファイトフェルトなどが使われる。電子はアノードから外部負荷を経てカソード（正極）へと移動し、そこで酸化剤（電子受容体）となる化合物およびアノード側から拡散してきたプロトンと反応し、回路が完結する。酸化剤としてはフェリシアン化カリウムや酸化マンガンが使われることもあるが、多くのMFCではコストがかからない大気中の酸素を使用している。カソード反応の触媒としては白金がよく使われる。

MFCの形状としては様々なタイプが報告されているが、大きく分けて2槽型（double-chamber）と1槽型（single-chamber）のものが存在する。2槽型MFCではアノード槽とカソード槽がプロトン交換膜で仕切られており、酸素などの酸化剤はカソード槽へと供給される。このタイプは気密性が高いという利点があるが、酸素の水への溶解度が低いことから、酸素を酸化剤として使用する場合には通気が必要となる。一方1槽型のMFCではエアカソード（酸素正極）と呼ばれる膜タイプのカソードが使用される。エアカソードは酸素の透過性を持ち、大気から透過した酸素は内側にコーティングされた白金触媒によりプロトンと反応し水となる。このシステムでは槽内に透過した余剰の酸素が微生物によって消費されるため有機物からのエネルギー回収効率率は低くなるが、2槽型と比較してランニングコストが低く抑えられ、また内部抵抗が低くなるため得られる出力が高い傾向にある。こうした利点から1槽型のMFCは近年多くの研究者に使用されており、筆者らの研究グループでも主にこのタイプのMFCを用いて研究を行っている。

3. *Shewanella oneidensis* MR-1 株の細胞外電子伝達機構

S. oneidensis MR-1株はグラム陰性の通性嫌気性菌であり、酸化鉄（III）、酸化マンガン（IV）をはじめ、コバルト、ウランなどの様々な化合物を最終電子受容体として利用できる。全ゲノム配列が公開されており¹²、また好気条件でも培養可能で取扱いが容易である上に遺伝子操作の方法も確立されていることから、異化的金属還元細菌のモデル微生物として最もよく研究が進んでいる。MR-1株において、これまでの遺伝学的・生化学的解析から、図2に示した細胞外電子伝達経路が提唱されている^{13,14}。この経路においては、CymA, MtrA, MtrC, OmcAといったシトクロムcタンパク質が電子伝達に関与している。NAD(P)Hから呼吸鎖複合体Iを經由して細胞内膜中のキノンへと受け渡された電子は、まずCymAへと受け渡される。CymAは細胞内膜につながれた状態でペリプラズム内に局在しており、そこからMtrAへと電子が伝達されると推定されている。MtrBはシトクロムcではなく、その実際の機能については不明であるが、金属還元必須であり、MtrC及びOmcAを細胞外膜上に適切に配置するために必要であると考えられている。MtrC及びOmcAが細胞外の電子受容体の還元において重要な働きをしており、i) これら細胞外シトクロムcとの直接的な接触、もしくはii) メディエーターとして自身が分泌するフラビン類（フラビンモノヌクレオチドもしくはリポフラビン）を介した間接的な経路により、細胞外に電子が伝達される。最近の報告では、*Shewanella*属細菌においては特にii)の経路が不溶性の電子受容体（電極または不溶性金属）への電子伝達において重要であることが示されてきている。Marsiliら⁸は電極表面に形成される*Shewanella*のバイオフィームにフラビンが蓄積することで、電流量が約370%上昇することを報告している。また精製タンパク質を用いた動力学的解析により、OmcAまたはMtrCによる直接的な酸化鉄（III）の還元速度は非常に遅く、それだけでは生理学的な電子伝達速度は説明できないが、フラビンを反応系に添加した場合にはその還元速度が大幅に上昇することが示されている¹⁵。

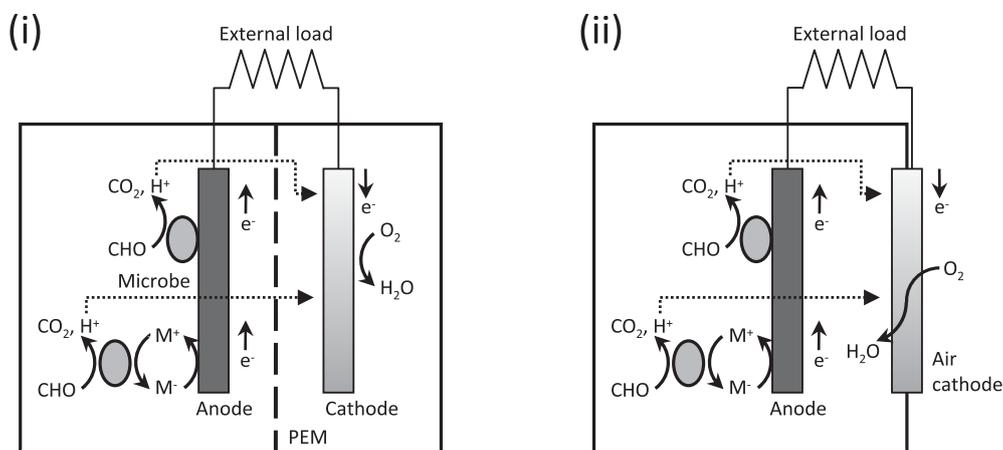


図1. MFCの基本構造¹⁰⁾

(i) 2槽型MFC, (ii) エアカソードを使用した1槽型MFC. M, メディエーター; CHO, 有機化合物; PEM, プロトン交換膜。

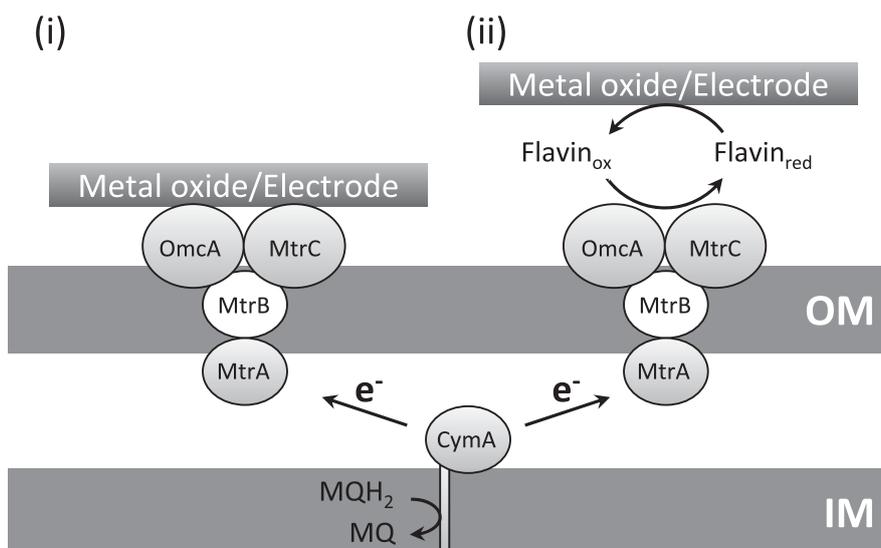


図2. *Shewanella oneidensis* MR-1 株の推定細胞外電子伝達機構^{13,14)}

(i) 直接的, (ii) 間接的な電子伝達経路. OM, 細胞外膜; IM, 細胞内膜; MQH₂, 還元型メナキノン; MQ, 酸化型メナキノン.

4. 遺伝子改変による電流生産能力の向上

MFCにおける発電量のボトルネックの一つとなっているのは微生物からアノードへの電子伝達であり, その効率を向上させることがMFCの実用化に向けた大きな課題となっている. 電子伝達効率の向上には電極の改良(素材の最適化や導電性化合物による修飾)も効果的であるが¹⁵⁻¹⁷⁾, 遺伝子改変によって微生物自体の電子伝達活性を向上させることができれば, さらなる発電量の向上が見込まれる. MR-1株においては電極への電子伝達には先に述べたようにOmcAやMtrCといったシトクロムcタンパク質が関与しており, これらを含む様々なシトクロムの遺伝子破壊株もしくは過剰発現株による電流生産量がBretschgerらにより報告されている¹⁸⁾. この報告では, *mtrC*を過剰発現させた変異株では野生株よりも約35%電流生産量が上昇することが示されている. また理由は不明だが, 酸素呼吸, もしくは硝酸やジメチルスルホキシド(DMSO)を最終電子受容体とする嫌気呼吸系に必要なシトクロム遺伝子を破壊することで, 20-100%電流生産量が上昇することも報告されており, このような遺伝子破壊及び過剰発現を組み合わせることで今後さらに電流生産能力を向上させることも可能であると期待される.

一方, シトクロムなどの電子伝達に直接関与する因子のほかに, 電極に対する菌体の物理化学的な吸着力も発電効率に影響を及ぼすことが, 遺伝子変異株を用いた筆者らの研究により明らかになってきた. 筆者らはMR-1株のトランスポゾン挿入ライブラリーをMFC内で培養し, その中で選択的に増殖する変異株を単離することにより, アノード電極(グラファイトフェルト)への付着量, および電流生産量がともに野生株よりも約50%上昇した変異株を取得することに成功した. この変異株では細胞外表面の多糖合成に関与すると推定される遺伝子(SO3177)が欠損しており, また細胞表面の疎水性が増加していることが明らかとなっている. またSO3177欠損株は菌体の凝集性も増加しており, 細胞間の付着性も

上昇していると思われる. これらのことから菌体と電極間の, または菌体同士の疎水性相互作用等による付着力が電極への電子伝達効率において重要であると考えられる. MR-1株ではメディエーターとなるフラビンを介した間接的な電子伝達経路が主流であるが, この場合においても電極と菌体の距離が離れていればメディエーターの拡散が律速段階となり電子伝達速度が制限されるはずである. したがって電極と菌体との距離が近いほうが電子伝達には効率的であり, SO3177変異株では電極への付着量が増加した結果, 電流生産量も増加したものと考えられる.

5. おわりに

先に述べたようにMFCは環境調和型かつ再生可能なエネルギー変換システムであるが, 実用化を阻む一番の問題点は生産できる電力が低いことである. その課題を克服するために, 微生物の電子伝達能力の増強^{19,20)}, 電極の修飾¹⁵⁻¹⁷⁾やデザインの改良²¹⁾などの様々なアプローチが試みられてきている. 特に微生物から電極への電子伝達効率を改善することは重要であるが, そのためには微生物と電極との相互作用を理解し, その知見をもとにして微生物と電極の双方を改良することにより両者の相互作用を最適化することが有効な戦略であろう. しかし電極への電子伝達メカニズムは最もよく研究されている*Shewanella*や*Geobacter*属細菌においてさえも未解明の部分が多いのが現状であり, 特に関連する遺伝子の発現制御機構や電子伝達タンパク質の立体構造, およびその動力学的パラメーターに関する知見は乏しく, 今後の重要な研究課題となっている. またMFCのアプリケーションとしては, 例えば廃水処理施設に組み込まれるような大規模なシステムや家庭用生ゴミ処理, さらにポータブルなMFCといったものまで様々な可能性が考えられ, それぞれの用途に応じたシステムの最適化が求められる. このようにMFCの技術を確立するまでには多くの課題が残されているが, 持続的発展が可能な循

環型社会を実現するために再生可能なエネルギー源の確保は急務であり、MFCはその一角を担う可能性を持った技術であると期待される。MFCを真に有用な技術として発展させていくために、基礎的なメカニズムの解明から応用技術までを含めて、今後さらに精力的な研究が必要であろう。

謝 辞

本研究は科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (ERATO) として行われた。

文 献

- Myers, C.R., and K.H. Nealon. 1988. Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor. *Science*. 240: 1319–1321.
- Lovley, D.R., and E.J. Phillips. Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1472–1480.
- Lovley, D.R., D.E. Holmes, and K.P. Nevin. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol.* 49: 219–286.
- Xiong, Y., L. Shi, B. Chen, M.U. Mayer, B.H. Lower, Y. Londer, S. Bose, M.F. Hochella, J.K. Fredrickson, and T.C. Squier. 2006. High-affinity binding and direct electron transfer to solid metals by the *Shewanella oneidensis* MR-1 outer membrane *c*-type cytochrome OmcA. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 13978–13979.
- Reguera, G., K.D. McCarthy, T. Mehta, J.S. Nicoll, M.T. Tuominen, and D.R. Lovley. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. 435: 1098–1101.
- Gorby, Y.A., S. Yanina, J.S. McLean, K.M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T.J. Beveridge, I.S. Chang, B.H. Kim, K.S. Kim, D.E. Culley, S.B. Reed, M.F. Romine, D.A. Saffarini, E.A. Hill, L. Shi, D.A. Elias, D.W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. Ishii, B. Logan, K.H. Nealon, and J.K. Fredrickson. 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 11358–11363.
- von Canstein, H., J. Ogawa, S. Shimizu, and J.R. Lloyd. 2008. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 615–623.
- Marsili, E., D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick, and Bond. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 3968–3973.
- Newman, D.K., and R. Kolter. 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*. 405: 94–97.
- Watanabe, K. 2008. Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 528–536.
- Logan, B.E., B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, and K. Rabaey. 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5181–5192.
- Heidelberg, J.F., I.T. Paulsen, K.E. Nelson, E.J. Gaidos, W.C. Nelson, T.D. Read, J.A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R.A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R.T. DeBoy, R.J. Dodson, A.S. Durkin, D.H. Haft, J.F. Kolonay, R. Madupu, J.D. Peterson, L.A. Umayam, O. White, A.M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T.R. Utterback, L.A. McDonald, T.V. Feldblyum, H.O. Smith, J.C. Venter, K.H. Nealon, and C.M. Fraser. 2002. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat. Biotechnol.* 20: 1118–1123.
- Shi, L., T.C. Squier, J.M. Zachara, and J.K. Fredrickson. 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme *c*-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* 65: 12–20.
- Fredrickson, J.K., M.F. Romine, A.S. Beliaev, J.M. Auchtung, M.E. Driscoll, T.S. Gardner, K.H. Nealon, A.L. Osterman, G. Pinchuk, J.L. Reed, D.A. Rodionov, J.L. Rodrigues, D.A. Saffarini, M.H. Serres, A.M. Spormann, I.B. Zhulin, and J.M. Tiedje. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 592–603.
- Cheng, S.A., and B.E. Logan. 2008. Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 9: 492–496.
- Qiao, Y., C.M. Li, S.J. Bao, and Q.L. Bao. 2007. Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *J. Power Source.* 170: 79–84.
- Adachi, M., T. Shimomura, M. Komatsu, H. Yakuwa, and A. Miya. 2008. A novel mediator-polymer-modified anode for microbial fuel cells. *Chem. Commun.* 7: 2055–2057.
- Bretschger, O., A. Obraztsova, C.A. Sturm, I.S. Chang, Y.A. Gorby, S.B. Reed, D.E. Culley, C.L. Reardon, S. Barua, M.F. Romine, J. Zhou, A.S. Beliaev, R. Bouhenni, D. Saffarini, F. Mansfeld, B.H. Kim, J.K. Fredrickson, and K.H. Nealon. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7003–7012.
- Izallalen, M., R. Mahadevan, A. Burgard, B. Postier, R. Jr. Didonato, J. Sun, C.H. Schilling, and D.R. Lovley. 2008. *Geobacter sulfurreducens* strain engineered for increased rates of respiration. *Metab. Eng.* 10: 267–275.
- Yi, H., K.P. Nevin, B.C. Kim, A.E. Franks, A. Klimes, L.M. Tender, and D.R. Lovley. 2009. Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 24: 3498–3503.
- Shimoyama, T., S. Komukai, A. Yamazawa, Y. Ueno, B.E. Logan, and K. Watanabe. 2008. Electricity generation from model organic wastewater in a cassette-electrode microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 325–330.