

## 発電微生物群集中の発電菌とその機能遺伝子

### Identification of Electrogenic Microbes and Their Functions within Electrogenic Microbial Community

石 井 俊 一 \*  
SHUN'ICHI ISHII

海洋研究開発機構海底資源研究開発センター 〒 783-8502 高知県南国市物部乙 200

\* TEL: +81-88-878-2279 FAX: +81-88-878-2192

\* E-mail: sishii@jamstec.go.jp

R&D Center for Submarine Resources, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 200  
Monobe-otsu, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

キーワード : 微生物燃料電池, 発電微生物, 群集構造解析, 菌体外電子輸送, メタトランスクリプトミクス

**Key words:** Microbial fuel cell, Electrogenic microbe, Microbial community analysis,  
Extracellular electron transfer, Metatranscriptomics

(原稿受付 2018年4月11日 / 原稿受理 2018年4月14日)

#### 1. はじめに

次世代型のバイオエネルギー回収プロセスとして期待されている微生物燃料電池 (MFC: Microbial Fuel Cell) は、廃水等のバイオマスが持つ化学エネルギーを、微生物生体触媒を用いた生物化学的変換により直接的に電気エネルギーに転換するバイオリクターである。MFCは、環境中に生息する発電微生物 (発電菌) により比較的容易に発電が開始され、圧力や温度条件が温和で、運転中も発電菌が電極上で自己増殖・自己回復しメンテナンスが容易である、といったメリットがある。これらのメリットから、MFCは、発電を伴う分散型の廃水処理技術としての応用が特に期待されている。

MFCの実応用に向けては、さらなる出力の向上が必要であるが、生物工学と電気化学が融合した技術である事から、様々な方向からの研究開発が必要となって来

る<sup>1)</sup>。現在までの技術的な発展は、主にMFCの材料である電極、イオン交換膜、装置形状の改良や、運転条件の最適化によって成されて来た。一方で、電気を産生する「土台」である、微生物生体触媒に関する研究も進んで来ている。負極電極に電子を輸送して生きる発電菌 (図1) の研究は、固体の金属酸化物に電子を輸送する呼吸反応によって生きる異化的金属還元微生物をモデル微生物として進展して来た<sup>20)</sup>。特に鉄還元菌 *Geobacter sulfurreducens* PCA とマンガン還元菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 は、遺伝子組み換え系等を用いて、かなり詳細な解析が進められ<sup>3)</sup>、それらの菌体外電子輸送 (EET: Extracellular Electron Transfer) メカニズムまで分かって来た。その結果、発電菌のEETプロセスとして、電極への直接接触、導電性の繊維 (ナノワイヤー)、電子シャトルの3種のプロセスと、それらのプロセスが複合的に起こる導電性のマトリックス化が報告された (図1)<sup>1,19)</sup>。

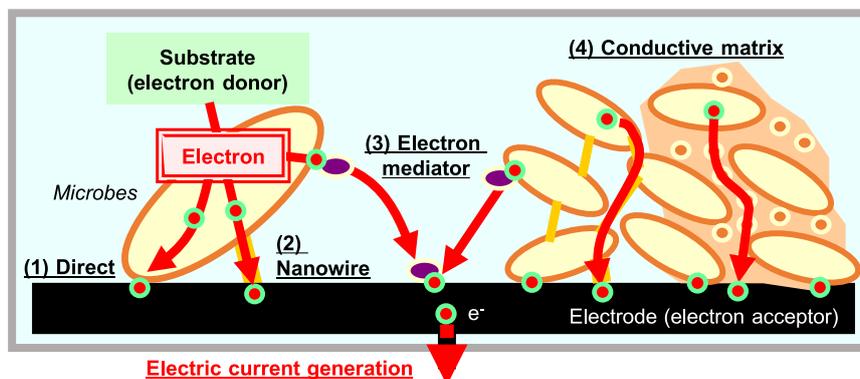


図1. 発電微生物の菌体外電子輸送パスウェイ

電極との直接接触、導電性繊維、電子シャトルの媒介の三つの経路が提唱されている。電極上でバイオフィルムが厚くなると、三つの経路が複合的に起こる導電性マトリックスが形成されると考えられる。

また、微生物の細胞質から外部に電子を輸送するためには、絶縁性の脂質二重膜を通過させる必要があり、その輸送に関わるタンパク質として、多種多様な多ヘム型のシトクローム *c* や導電性の線毛 (*e*-Pili) が重要である事も分かってきた<sup>2,19</sup>。しかしながら、純粋菌をそのまま実应用到に使用する事は、物質生産系を除いて稀であり、廃水処理発電等の実応用を指向した MFC の研究においても、電極上に自然に形成される複雑な微生物群集を用いる事が多い。そこで本稿では、MFC における電気産生を媒介する発電微生物群集に着目し、現在までに私の行ってきた研究から得られた知見を概観し、微生物群集が発電するメカニズムについて紹介すると共に、今後の発電微生物群集の研究の方向性について考察する。

## 2. 微生物群集構造解析を用いた発電微生物の同定

### 2.1 異なる基質を分解する発電微生物群集

MFC に供する栄養基質は、酢酸、ギ酸やエタノール等の C1-C2 化合物、乳酸、プロピオン酸、酪酸等の C3-C4 化合物、グルコースやセルロース等の単糖や多糖、さらにはより複雑な都市下水、酒類の醸造廃水、各種工場排水や農業排水等があり、単純なものから高次の複雑系まで多種多様である<sup>16</sup>。一般的には、発電 (= 電極呼吸) 以外の反応が起こりにくく、高い電子回収率 (50-100%) が期待できる酢酸の研究が多く成されており、その発電微生物群集中にはモデル微生物である *Geobacter sulfurreducens* に近縁の微生物が集積される事が多い<sup>8,9,16</sup>。それに対して、糖を消費し発電する微生物群集中には、*Firmicutes* 門などの発酵菌や *Proteobacteria* 門などの糖を消費し様々な呼吸、時には発電を行うタイプの微生物が見られる<sup>6,7,16</sup>。さらに複雑な廃水を使用す

ると、一般的に電子回収率は 10-30% 程度に低下し、発電菌の群集構造も複雑化し、発電菌の比率が減少する事が知られている<sup>10,11,16</sup>。

実際に発電を行っている負極電極上のバイオフィームの様子を、走査型電子顕微鏡を用いて観察すると、供給する基質によって異なる様相を示している (図 2)<sup>7,10,13</sup>。酢酸やプロピオン酸などの低級脂肪酸を基質として使用すると、繊維状の細胞外構造体が多く見られ、導電性のナノワイヤーを基にしたバイオフィームが形成される事が強く示唆された (図 2AB)。逆にグルコースやスクロースなどの糖を使用すると、バイオフィームが非常に厚くなり、その表面には繊維状の構造体が減少していた。これは、電極から遠く離れた場所で発電反応には直接的に関与せず、発酵的に生きる微生物が生息している事を示唆している (図 2CD)。実際に、微生物量当たりの EET 速度を比較すると、脂肪酸を使用した方が糖を使用した場合に比べて約二倍速い事が分かった<sup>13</sup>。セルロースを分解しているバイオフィーム中には、細胞の極から直径 100 nm、長さ 10  $\mu\text{m}$  もの長さのストーク状構造体を持つ鉄還元微生物 (*Alphaproteobacteria* 綱) が多く見られ<sup>17</sup>、この微生物が EET 反応に重要な役割を果たしている事が示唆された (図 2E)<sup>6,7</sup>。さらに複雑な都市下水を使用すると、下水中に含まれる雑多な無機化合物や難分解性有機物と共に微生物群集が形作られ、また存在する微生物の形状も多種多様で繊維状構造体によるネットワークも随所に確認された (図 2F)。これより、複雑な廃水から形成される発電微生物群集は、種の多様性が非常に高い事が推察された。

次に、種のタイピングに良く使用される 16S rRNA 遺伝子を用いた微生物群集構造比較により、発電反応に関わる微生物や、各構成微生物の基質利用性を推察した。

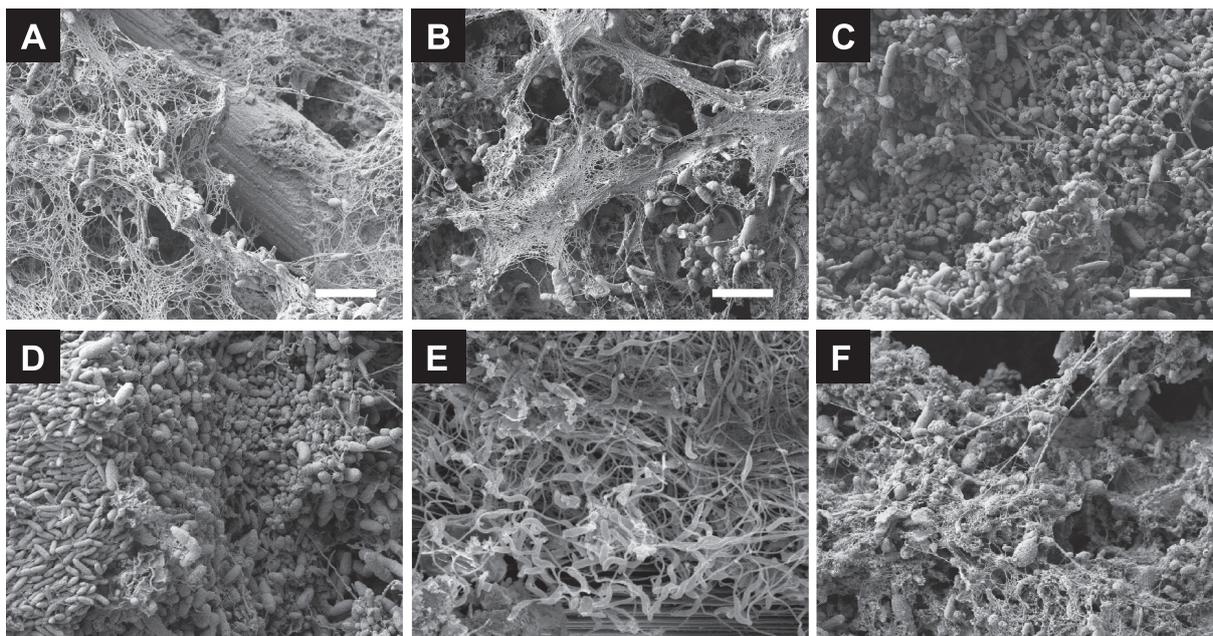


図 2. 発電微生物群集の電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) 像

(A) 酢酸添加 MFC の負極バイオフィーム<sup>13</sup>, (B) プロピオン酸・酪酸添加 MFC の負極バイオフィーム<sup>13</sup>, (C) グルコース添加 MFC の負極バイオフィーム<sup>13</sup>, (D) スクロース添加 MFC の負極バイオフィーム<sup>13</sup>, (E) セルロース添加 MFC の負極バイオフィーム<sup>7</sup>, (F) 都市下水排水添加 MFC の負極バイオフィーム<sup>10</sup>, Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

まずは、八個の全く同型の MFC を準備し、四種の異なる栄養基質（酢酸、プロピオン酸と酪酸の混合、グルコース、スクロース）を、それぞれ二リアクターに添加し、発電微生物群集の集積培養を行った<sup>13)</sup>。すると、発電菌バイオフィームの形成に伴い、発電量やバイオフィーム量当たりの EET 速度の変化が見られた。その電極バイオフィームを数週間あるいは数ヶ月おきにサンプリングし、16S rRNA 遺伝子を用いた微生物群集構造解析に供した。得られた結果を統計的に解析する事により、リアクター中の基質・反応中間代謝産物および電流産生量と、発電微生物群集中の各構成微生物系統群を関連付けた。我々はそのための手法として、生態学者が多数の種を環境変数に関係づけることを目的に開発された正準コレスポネン分析 (CCA : Canonical Correspondence Analysis) を用いた。その結果、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低級脂肪酸を分解する系に相関を示すのは、モデル発電菌の *G. sulfurreducens* を内包する *Geobacter metallireducens* clade と海洋性堆積物 MFC で良く見られる発電菌である *Desulfuromonas* 属、酢酸を水素・二酸化炭素に分解（あるいはその逆反応を行う）*Acetobacterium* 属、酪酸分解を行う *Syntrophomonas*、そして老廃物や死菌などを分解しバイオフィームの安定化に寄与すると考えられている *Bacteroidetes* 門であった (図 3A)。逆に、堆積物 MFC に良く見られる *Geobacter subsurface* clade に属する微生物群は、主に糖を分解する反応と高電流産生との相関を示した。また、*Aeromonas* 属と *Trichococcus* 属はグルコース、*Tolomonas* 属はスクロースあるいはグルコース、*Anaerococcus* 属はプロピオン酸、そして *Lactococcus* 属はプロピオン酸あるいは乳酸と相関している事が分かった (図 3A)。これは、それぞれの系統群が糖をどのように発酵し、その発酵産物と考えられるプロピオン酸や乳酸をどの微生物群が分解しているのか、を示していると考えられる。これらの解析の結果は、糖などの比較的高分子の栄養基質を分解する反応系においては、あまり研究の進んでいない *Geobacter subsurface* clade に属する発電菌が、他の発酵菌や共生菌と協調しながら発電微生物群集を形作る事を強く示唆している<sup>13)</sup>。逆に低級脂肪酸などのよく使われる栄養基質を使用すると、モデル発電菌の *G. sulfurreducens* に近縁の微生物が良く集積してくる事が分かった<sup>16)</sup>。

## 2.2 異なる電極電位に適応した発電微生物群集

電極に電子を輸送する反応速度は、電極の表面電位をポテンシオスタット等の電気化学機器を使用して人為的に制御する事でコントロールする事が可能である。電極電位をより正の方向に設定すると、電極が電子を受け取り易くなり電流がより多く流れる。逆に電極電位をより負の方向に設定すると、電子を受け取り難くなり産生する電流が減少して行く。最終的に、発電微生物の作り出す細胞表面の電位と同じ電極電位に設定されると電流値はゼロになる。このような特性から、発電菌や発電微生物群集の電子授受機能特性を解析する際に、様々な電極電位に設定してリアクターを運転する手法が用いられてきた<sup>22)</sup>。

我々は、栄養基質を比較した際に使用したリアクターと

同型の MFC を用意し、銀塩化銀参照電極を対照として 3 種の異なる電位 (+100 mV, -50 mV, -200 mV vs. SHE) に設定し、スクロースを唯一の基質として培養を行った<sup>13)</sup>。その結果、設定電位を -200 mV にすると、MFC 運転とほぼ同量の 5 mA 程度の電流産生が見られた。設定電位をより正の電位に設定すると、4 倍の約 20 mA (-50 mV)、6 倍の約 30 mA (+100 mV) のように、電流産生値の向上が見られた。これらの異なる電極電位に適応した発電微生物群集の群集構造解析の結果を、CCA で解析すると、主要な発電菌と考えられる *Geobacter* 属と *Desulfuromonas* 属は、異なる電極の表面電位との相関がある事が分かった (図 3B)。*Desulfuromonas* 属と *G. metallireducens* clade は、負の電極電位を好み、逆に *Geobacter subsurface* clade は、正の電極電位あるいは、それに伴う高電流、高い EET 速度に相関を示した。その他の発酵に関連する微生物にも明確な電極電位との相関関係が見られた。例えば、*Bacilli* 綱に属する *Trichococcus* 属は負の電位を好むが、同じく *Bacilli* 綱に属する *Lactococcus* 属は正の電位を好む事が分かった。この発酵を主に行う *Lactococcus* 属は発電菌である *Geobacter subsurface* clade 1 と非常に良く似た群集中の存在量比ダイナミクスを示し、この二微生物群は正の電極電位条件下で協調してスクロースからの発電を行っている事が示唆された<sup>13)</sup>。また、*Gammaproteobacteria* 綱に属し、糖を処理する MFC 中で良く見られる *Aeromonas* 属<sup>4)</sup> と *Tolomonas* 属にも、それぞれ異なる電極電位との相関が見られた。このように、発電微生物群集では、発電菌だけでなく、発酵などの他の代謝反応に関わる微生物群も電極表面電位および EET 速度の影響を受ける事が分かって来た。

## 2.3 異なる播種源から形成される発電微生物群集

栄養基質、電極電位だけでなく、播種源が発電微生物群集の形成に影響を与えていると考えられている<sup>23)</sup>。そこで我々は、異なる環境に生息する微生物群集を播種源に使用し、同型のスクロースを基質とする MFC において形成される発電微生物群集の差異を解析した。微生物の播種源として、都市下水廃水処理場の嫌気性汚泥と活性汚泥の混合物、稲水田の土壌、そして沿岸部ラグーン堆積物の三つを使用した。MFC の電気化学的特徴は三つの播種源間でわずかに異なり、ラグーン堆積物を播種したリアクターが、処理時間と電流産生の点で比較的高い性能を示した<sup>15)</sup>。そして、定期的に 16S rRNA 遺伝子を使用した微生物群集構造解析を行い、電流産生や播種源と各構成微生物群との相関を CCA で解析した (図 3C)<sup>15)</sup>。その結果、播種源の微生物群集は非常に多様であり、かなり異なっているにも関わらず、*Deltaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱、*Bacilli* 綱、*Clostridia* 綱、*Bacteroidetes* 門に属する 12 種の微生物群のみが、すべての発電微生物群集において高頻度に見られた事から、この 12 属はスクロースを基質とする発電微生物群集のコアメンバーである事が示唆された (図 3C)。それらの中で、いくつかの発酵性の微生物群は播種源により明らかに異なり、播種源特異的な発電微生物群も存在する事が分かった。例えば、発電菌の *Desulfuromonas* 属と発酵性の *Trichococcus* 属は、ラグーン堆積物から形成される微生物群に特異的に見られ、発酵菌の

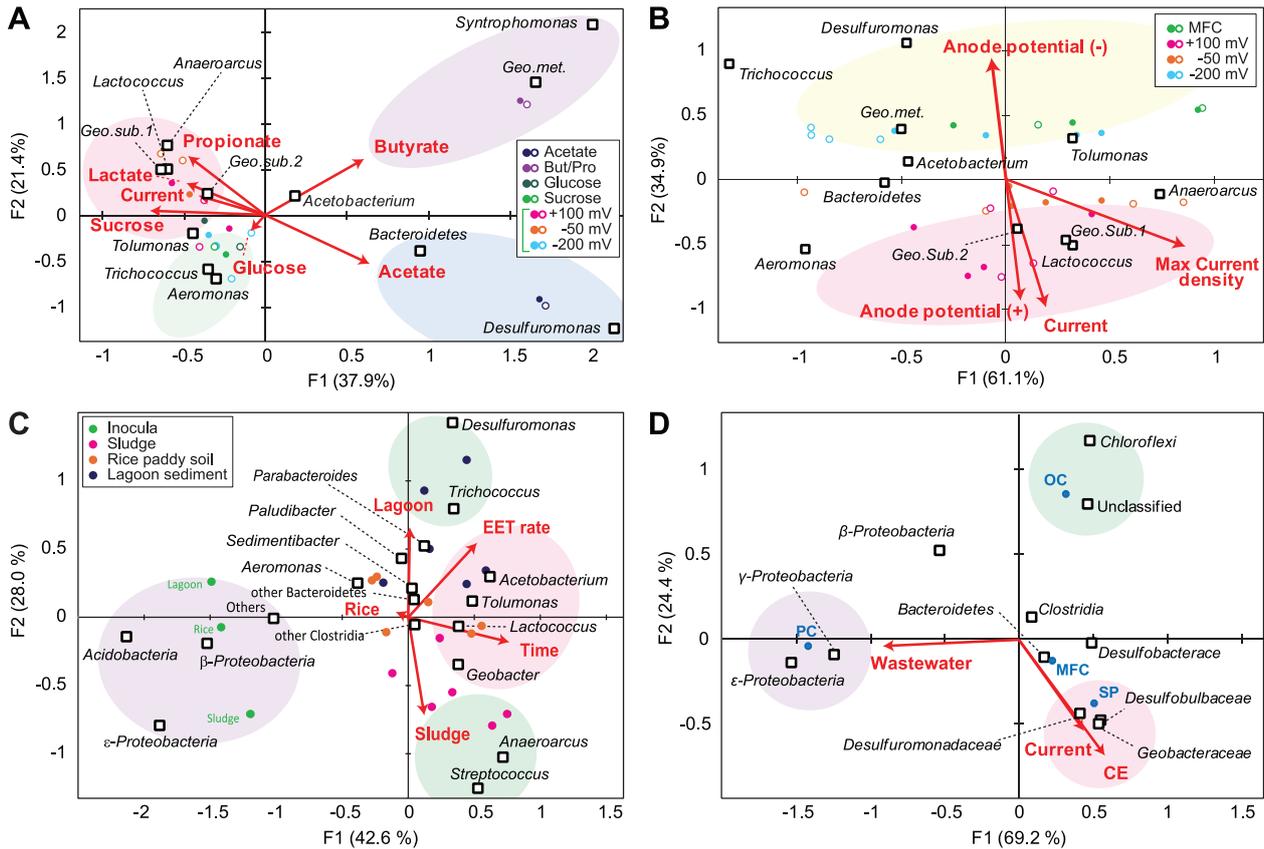


図3. 正準相関分析 (CCA) による発電微生物群集中の構成微生物群と環境因子との相関関係

赤矢印: 運転時の各種変数 (環境因子), 白四角: 構成微生物群, 丸・白丸: 微生物群構造解析サンプル (サンプル名と対応する色は枠内に別記)。Geobacter 属は, 3 クレード (Geo.met., Geobacter metallireducens clade; Geo.Sub.1, Geobacter Subsurface clade 1; Geo.Sub.2, Geobacter Subsurface clade 2) に分割して記載。環境因子は (A) 栄養基質と電流<sup>13)</sup>, (B) 電極電位と電流<sup>13)</sup>, (C) 播種源<sup>15)</sup>, (D) 都市下水排水と電流<sup>13)</sup>。

*Streptococcus* 属と発酵代謝物分解菌の *Anaerococcus* は, 下水汚泥から形成される微生物群に特異的であった (図 3C)。また, 培養時間に相関を示す微生物群も存在し, モデル発電菌の一つである *Geobacter metallireducens* に近縁の微生物の相対存在量は, 播種源に関わらず全ての発電菌群集の集積後期に増加した<sup>15)</sup>。これらの結果は, 機能的な発電菌群集を形成するための主要な微生物メンバーは自然界の生態系に幅広く存在するが, 接種源の微生物叢は発電菌群集の構成に影響を与え, ひいては MFC のパフォーマンスに影響を与える事を示している。

以上の結果より, 栄養基質, 電極電位, 播種源が発電微生物群集の形成に与える影響と, 集積された微生物群集中の各微生物群の予想される役割が分かった。どのような基質, 電極電位, 播種源を使用しても, 集積されてくる微生物の系統は決まっており, *Deltaproteobacteria* 綱, *Clostridia* 綱, *Bacteroidetes* 門は, 脂肪酸を分解する発電菌群集, *Gammaproteobacteria* 綱, *Bacilli* 綱は, 主に糖を分解する発電菌群集に見られた。さらに属レベルでも, 十数種の特異的な微生物系統群のみが集積されて来た。これらの微生物群が, 発電微生物群 (30°C, Freshwater 培地, CO<sub>2</sub> 緩衝条件) のコアメンバーであると考えられ, その予想される代謝ネットワークを図 4 にまとめた。微生物群集構造ダイナミクスより, この中には協調的に代謝を行うものや, 高 EET 速度を好むもの,

そして電極電位に依存するものが居る様子であった。今後, さらなる解析を進める事により, 各コアメンバーの機能が同定される事が期待される。

## 2.4 都市下水の廃水処理を行う発電微生物群集

ここまでは, 培地使用および栄養基質の添加により発電微生物群集を形成させる場合の挙動であるが, 実際に廃水を処理する MFC 中の発電微生物群集は, どのようなものであろうか? 例えば都市下水の場合, その水質の季節変動や天候の影響, そして下水中に含まれる微生物叢の継続的な混入など, 発電微生物群集に影響を与える要因が不安定である。そこで我々は, 都市下水処理場の一次沈降槽の上清を定期的に MFC に添加し, 一年以上の長期運転を行い, その発電挙動, 廃水処理挙動, そして微生物群集構造の変遷を解析した<sup>10)</sup>。その結果, 10 日程度の発電運転で, 投入した廃水の濁度は著しく低下し, 生物学的酸素要求量 (BOD: Biological Oxygen Demand) の 97% が除去された。発電能力は, 限界電流密度が 1,000 mA/m<sup>2</sup>, 最大出力が 13 mW/m<sup>2</sup>, 電気回収率が 25% であった。興味深いことに, 廃水試料の季節変動があるにもかかわらず, 発電性能および BOD 除去率は, 一年を通して再現性があった。逆に, 電極上の発電微生物群集は経時的に変動し, 一年にわたる実験を通して高い多様性を見せた<sup>10)</sup>。これらの結果

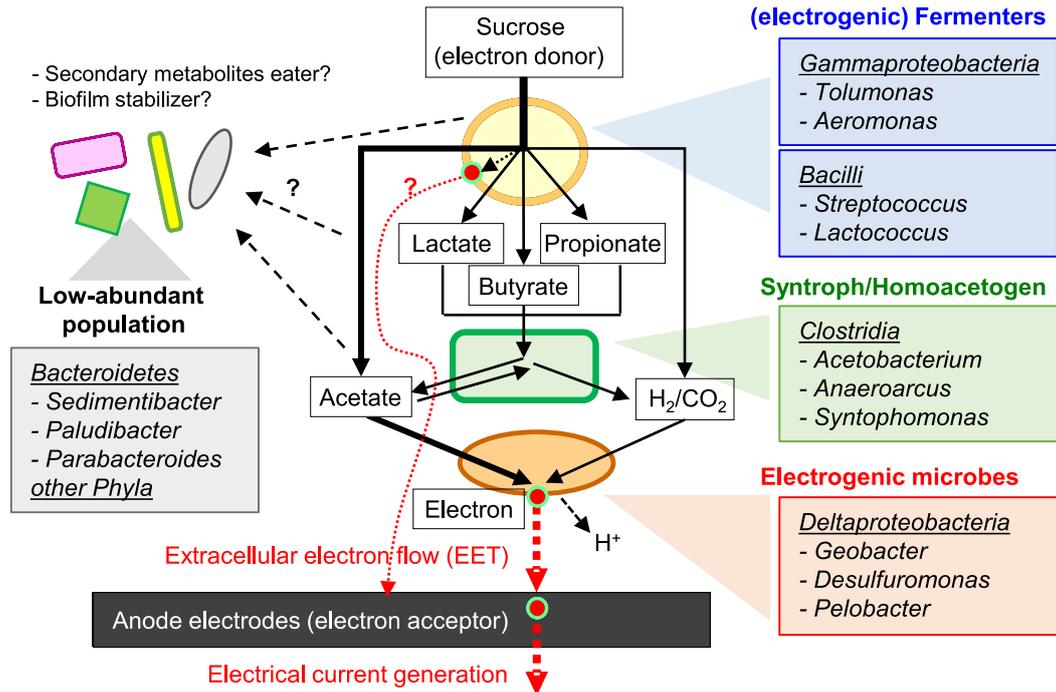


図 4. スクロースを分解する発電微生物群集における潜在的な代謝経路および菌体外電子輸送  
群集中の 4 つの異なるグループを色塗りの枠内に示し、潜在的な役割をその上方に記載。矢印は代謝フローを示す。

は、発電微生物群集が自己選択と自己最適化の両方を行うことにより、炭素源の変動や競合微生物の定期的な導入があるにも関わらず、機能的安定性を維持できることを示唆している。これは、MFC に自発的に形成される発電微生物群集を用いて、廃水処理発電を長期間行う事が可能である事を示している。

続いて、この発電微生物群集の中で、どの微生物群が実際に EET 反応に寄与しているかを調べるため、三つの異なる運転条件を用いて比較解析した。三つの条件とは、1) 外部抵抗 750 Ω を使用した MFC 運転 (0.3 mA の電流産生)、2) 電極電位を +100 mV vs. SHE に設定する (SP: set potential) 電位設定運転 (4.0 mA 電流産生)、3) 開回路運転 (OC: open circuit) (電流ゼロ) である。各運転条件における廃水処理時間は、MFC 条件で 8-12 日、SP 条件で 4-6 日、OC 条件で 15-20 日であり、廃水中の有機物分解が高電流により促進される事を示している<sup>12)</sup>。続いて、16S rRNA 遺伝子を用いた微生物群集構造解析を行い、各運転条件と構成微生物群の相関を CCA で解析した (図 3D)。処理前の廃水中には、*Epsilonproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門の微生物群が多く見られたが、MFC および SP 運転を行ったリアクター中の発電微生物群集中には *Deltaproteobacteria* 綱と *Bacteroidetes* 門が優占していたことから、*Deltaproteobacteria* 綱が発電に重要な系統群であると考えられた<sup>12)</sup>。*Deltaproteobacteria* 綱に属する微生物をより詳細に分析すると、*Desulfobulbaceae* 科と *Geobacteraceae* 科に分類される微生物群が、高電流の SP 条件下で有意に増加し、無電流の OC 条件下では見られなかった。CCA の結果、*Desulfobulbaceae* 科、*Desulfuromonadaceae* 科、および *Geobacteraceae* 科の微生物群が発電量と強い相関を示し (図 3D)、これらの

微生物群が、廃水処理 MFC プロセスにおける処理速度、およびエネルギー回収を最適化するための重要なキープレイヤーである事が分かった。

### 3. 刺激応答型メタトランスクリプトームによる発電機構の同定

#### 3.1 電気刺激にตอบสนองする遺伝子群

16S rRNA 遺伝子を用いた解析によって、どのような微生物が発電微生物群集中に存在しているのか? という情報を得る事が出来るが、各構成微生物が何をしているのか? どのようなメカニズムで発電しているのか? さらには、発電反応に直接関わっている遺伝子は何なのか? までは分からない。そこで、我々は安価になった次世代シーケンサを使用した DNA・mRNA シーケンシングと、最新のバイオインフォマティクスを駆使して、発電微生物群集の発電反応に関与する遺伝子を同定する手法を開発した。それは、電気刺激の前後での全微生物群集の遺伝子発現プロファイルと比較し、発電反応に関わる遺伝子を網羅的に炙り出す手法であり、刺激応答型メタトランスクリプトームと名付けた (図 5)<sup>11,14)</sup>。

まずはメタゲノム解析により、廃水処理を行う発電微生物群集中の優占種のドラフトゲノム (ビンゲノム) を再構成し、合計で 11 種の構成メンバーのゲノム構造とその潜在的な代謝能力を可視化に成功した<sup>11,14)</sup>。その後、廃水添加後の MFC に、高電流の SP 条件、そして無電流の OC 条件という電気刺激を順次加え、刺激前 (5 時間の MFC 運転後) と各刺激後 45 分で電極上のバイオフィルムを採取し、mRNA を抽出した。この mRNA をシーケンスし、ビンゲノムにマッピングする事により、構成微生物種およびその遺伝子の各条件での遺伝子発現

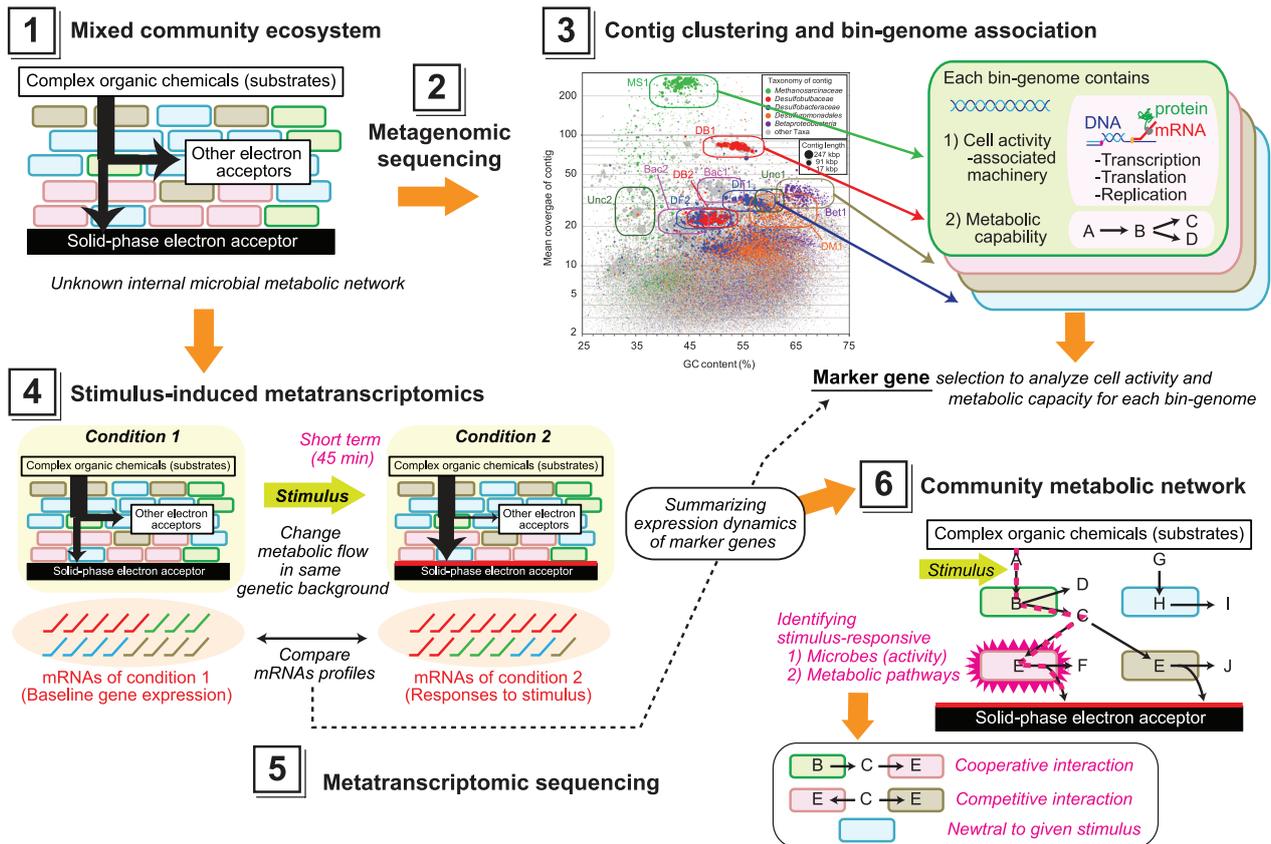


図5. 発電微生物群集の刺激応答型メタトランスクリプトームの解析スキーム<sup>14)</sup>

ステップ1, 発電微生物群集の集積; ステップ2, メタゲノムシーケンシング; ステップ3, コンティグクラスタリングによるビンゲノム構築と推定代謝経路の同定; ステップ4, 群集にEET関連の電気刺激を与える; ステップ5, mRNAシーケンシング; ステップ6, 群集内の代謝ネットワークの構築と電気刺激応答の同定。

量を定量した。そして、その発現プロファイルを比較する事により、電気刺激に応答する微生物および遺伝子を同定した(図5)<sup>11,14)</sup>。その結果、*Deltaproteobacteria* 綱に属する2つの *Desulfobacteraceae* 科の微生物(DF1, DF2)が、硫酸還元反応の鍵遺伝子(*dsr*, *apr* および *sat*)の顕著に高い遺伝子発現を示した。*Euryarchaeota* 門に属する1つの *Methanosarcinaceae* 科の微生物(MS1)も同様に、主にメチルアミンやジメチルアミンからのメタン生成反応の鍵遺伝子(*mcr*, *mtm*, *mtt*, *mtb* など)の高い遺伝子発現を示した。しかし、これらの遺伝子の発現レベルは電気刺激に反応して変化しなかった事から、これらの微生物とその代謝は発電に関与していないことが示唆された。これらの、硫酸還元菌やメタン生成菌は、MFC中に生きる発電菌の潜在的な競合相手であると考えられている。

一方で、*Deltaproteobacteria* 綱に属する *Desulfobulbaceae* 科の微生物(DB1)と *Desulfuromonadaceae* 科の微生物(DM1)は、電気刺激に対して有意な転写応答を示した<sup>11,14)</sup>。これらの2つの微生物は、海洋堆積物を播種源としたMFCに見られる既知の発電菌と系統的に近縁であり<sup>9)</sup>、廃水処理発電においても重要であると考えられた。高電流のSP条件で発現量が増加した遺伝子には、*omcS*, *omcX*, *cbcL* および *imcH*<sup>2,18)</sup> などの多ヘム型のシトクロームcが見られ(図6)、これらの遺伝子がコードするタンパク質がEET反応に直接的に関

与していると考えられた。さらに、発電菌DB1とDM1のゲノム上には、電気刺激に反応して激しく発現変動している遺伝子アイランドが数個見出された。これらの遺伝子アイランドは機能未知のタンパク質を多数コードしており、未知のEET経路あるいは遺伝子発現応答システムが存在していることが示唆された。今後は、これらの未知遺伝子の機能解明に向けて、生理学的および分子生物学的なアプローチを進めて行く必要がある<sup>11)</sup>。

### 3.2 発電微生物群集中の代謝ネットワーク

上記のように、微生物群集中の優占種のゲノム情報、遺伝子発現量、そして電気刺激に対する遺伝子発現応答から、各構成微生物種の群集中での機能が推測できる。その結果をシステムティックに統合して、廃水中の多様な有機物を分解する発電微生物群集内の微生物間代謝ネットワーク図を作成した(図6)<sup>14)</sup>。電流産生に関わる微生物は *Desulfobulbaceae* 科のDB1と *Desulfuromonadaceae* 科のDM1であり、そのEET反応には多ヘム型のシトクロームc経路を用い、電子供与体は酢酸、水素、硫化水素を用いている事が示唆された。DB1は、嫌氣的硫酸還元も行うことができると推定されたが、元来その反応は電極還元反応と競合的であり、我々は、*Desulfobulbaceae* 科の近縁種で報告されたように<sup>21)</sup>、硫酸還元経路の逆反応により硫化水素を電子供与体として使用していると考えている。面白い事に、この二種の発電菌は、電気刺激

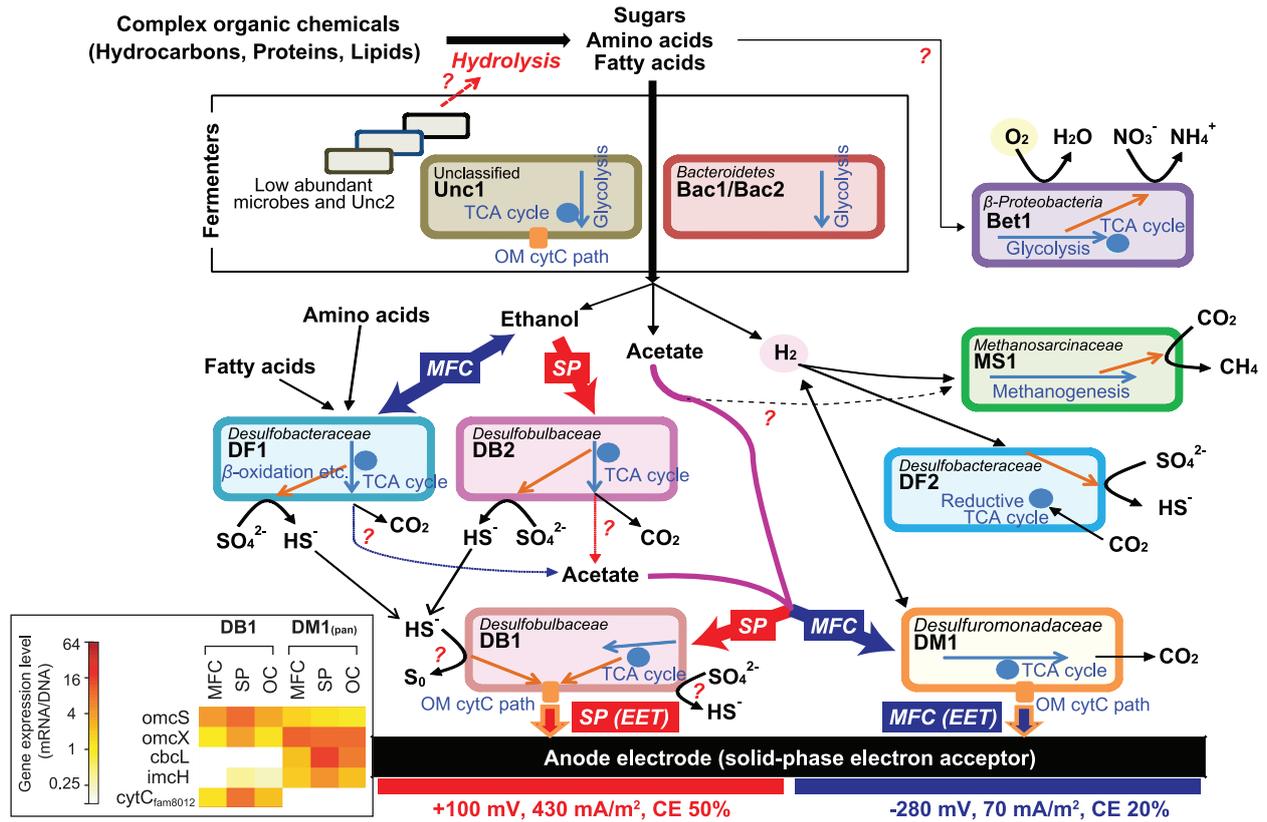


図6. 都市下水を処理する発電微生物群内の優占微生物間の代謝ネットワークの推定<sup>14)</sup>  
 11個のビンゲノム(色をついた四角形)の代謝的役割を推定。MFCと電位設定(SP)条件の代謝経路のスイッチングを、青色(MFC)または赤色(SP)の太矢印で表示。ビンゲノムDB1およびパンゲノムDM1の持つ5つの異なる多ヘム型シトクロームcのMFC, SPおよび開回路(OC)条件<sup>11)</sup>の遺伝子発現レベルをヒートマップで表示<sup>11)</sup>。

に対して、かなり異なる応答を示した。DB1は、SP条件下でEET反応を媒介するシトクロームcと酢酸分解経路を高発現化した事から、+100 mVの電極表面電位あるいは高EET速度を好み、逆にDM1は、SP条件下で、*cbcL*や*imcH*などの電極電位への応答に関わるシトクロームc<sup>18)</sup>に加えて水素を使用する系を発現させた。この結果は、これらの二種の発電菌は競合的であり、電極電位の差異によって、機能するパスウェイを調整している事を示している(図6)<sup>14)</sup>。

発電菌以外の微生物種で高い遺伝子発現量を見せたDF1, DF2, DB2, MS1は、群集中で電極還元反応の競合反応である硫酸還元反応やメタン生成反応を行っており、その電子供与体として水素やエタノールなどを使用している事が示唆された。この中でDF1とDB2はエタノールの代謝に関して競合的であり、DB1と同じく*Desulfobulbaceae*科に属するDB2が、SP条件を好む事が分かった(図6)<sup>14)</sup>。廃水中の多様な有機化合物を、どの微生物がどの様に加水分解・発酵しているかは、今回の11種の抽出ゲノムの解析からは判明しなかったが、多様かつ低頻度で存在する*Bacteroidetes*門や*Firmicutes*門などに属する微生物群がそれらの反応を媒介していると考えられた。

このように、刺激応答型メタトランスクリプトーム手法を用いた解析により、発電微生物群集内の代謝ネットワークおよび構成メンバー間の協同・競合関係に関する知見を得る事が出来た。さらには、発電微生物群集中で

重要な機能を果たす可能性の高い未知遺伝子も同定され、発電微生物群集のさらなる機能解明に向けての重要なヒントが得られた。

#### 4. おわりに

MFCにおける発電微生物群集は、まさに発電反応の中心たる微生物生体触媒として機能している。その電気微生物生態系(Electro-microbiome)中の発電菌の挙動や発電メカニズムを理解する事は、MFCの実応用に向けて非常に重要な命題である。現在までに、様々な研究が16S rRNA遺伝子を用いた群集構造解析をベースに行われてきたが、今後はスナップショット的な群集構造解析だけでなく、MFCの運転条件からシステムティックに研究を設計し、CCAなどの統計的な解析を駆使して、発電反応や内部の代謝ネットワークの動態に迫る必要があると考えられる。さらには、最新のシーケンス技術の飛躍的な大容量化、低価格化により、微生物生態系のメタゲノムを容易に解読し、系中の構成微生物群のドラフトゲノムを網羅的に知る事が出来るようになってきた。我々が提案した刺激応答型メタトランスクリプトームのような、新たな手法も次々に開発されており、今後は16S rRNAをベースにした解析から、メタゲノムをベースにした解析に徐々に移行すると思われる。また、ElectricMicrobe100(NCBI Bioproject: PRJNA417841)のような、電気微生物のゲノム情報を統合したデータベー

スの構築もスタートしたばかりである。このように、発電微生物群集が電気を産生する仕組みの解明に向けた研究は未だに道半ばであるが、MFC中の最も重要な因子の一つであるので、今後さらなる研究の進展が期待される。

## 文 献

- 1) Borole, A.P., G. Reguera, B. Ringeisen, Z.W. Wang, Y.J. Feng, and B.H. Kim. 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Ener. Environ. Sci.* 4: 4813–4834.
- 2) Butler, J.E., N.D. Young, and D.R. Lovley. 2010. Evolution of electron transfer out of the cell: Comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics.* 11: 40.
- 3) Chan, C.H., C.E. Levar, F. Jimenez-Otero, and D.R. Bond. 2017. Genome scale mutational analysis of *Geobacter sulfurreducens* reveals distinct molecular mechanisms for respiration and sensing of poised electrodes versus Fe(III) Oxides. *J. Bacteriol.* 199: e00340-17.
- 4) Chung, K. and S. Okabe. 2009. Characterization of electrochemical activity of a strain ISO2-3 phylogenetically related to *Aeromonas* sp. isolated from a glucose-fed microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* 104: 901–910.
- 5) Holmes, D.E., D.R. Bond, R.A. O’Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, and D.R. Lovley. 2004. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48: 178–190.
- 6) Ishii, S., Y. Hotta, and K. Watanabe. 2008. Methanogenesis versus electrogenesis: morphological and phylogenetic comparisons of microbial communities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 286–294.
- 7) Ishii, S., T. Shimoyama, Y. Hotta, and K. Watanabe. 2008. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiol.* 8: 6.
- 8) Ishii, S., K. Watanabe, S. Yabuki, B.E. Logan, and Y. Sekiguchi. 2008. Comparison of electrode reduction activities of *Geobacter sulfurreducens* and an enriched consortium in an air-cathode microbial fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7348–7355.
- 9) Ishii, S., B.E. Logan, and Y. Sekiguchi. 2012. Enhanced electrode-reducing rate during the enrichment process in an air-cathode microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 1087–1094.
- 10) Ishii, S., S. Suzuki, T.M. Norden-Krichmar, K.H. Nealon, Y. Sekiguchi, Y.A. Gorby, and O. Bretschger. 2012. Functionally stable and phylogenetically diverse microbial enrichments from microbial fuel cells during wastewater treatment. *PLoS One.* 7: e30495.
- 11) Ishii, S., S. Suzuki, T.M. Norden-Krichmar, A. Tenney, P.S. Chain, M.B. Scholz, K.H. Nealon, and O. Bretschger. 2013. A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer. *Nat. Commun.* 4: 1601.
- 12) Ishii, S., S. Suzuki, T.M. Norden-Krichmar, A. Wu, Y. Yamanaka, K.H. Nealon, and O. Bretschger. 2013. Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water Res.* 47: 7120–7130.
- 13) Ishii, S., S. Suzuki, T.M. Norden-Krichmar, T. Phan, G. Wanger, K.H. Nealon, Y. Sekiguchi, Y.A. Gorby, and O. Bretschger. 2014. Microbial population and functional dynamics associated with surface potential and carbon metabolism. *ISME J.* 8: 963–978.
- 14) Ishii, S., S. Suzuki, A. Tenney, T.M. Norden-Krichmar, K.H. Nealon, and O. Bretschger. 2015. Microbial metabolic networks in a complex electrogenic biofilm recovered from a stimulus-induced metatranscriptomics approach. *Sci. Rep.* 5: 14840.
- 15) Ishii, S., S. Suzuki, Y. Yamanaka, A. Wu, K.H. Nealon, and O. Bretschger. 2017. Population dynamics of electrogenic microbial communities in microbial fuel cells started with three different inoculum sources. *Bioelectrochemistry.* 117: 74–82.
- 16) Kiely, P.D., J.M. Regan, and B.E. Logan. 2011. The electric picnic: Synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 378–385.
- 17) Kodama, Y. and K. Watanabe. 2008. An electricity-generating prosthecate bacterium strain Mfc52 isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 288: 55–61.
- 18) Levar, C.E., C.L. Hoffman, A.J. Dunshee, B.M. Toner, and D.R. Bond. 2017. Redox potential as a master variable controlling pathways of metal reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *ISME J.* 11: 741–752.
- 19) Lovley, D.R. 2012. Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 66: 391–409.
- 20) 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 multihaem c-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* 65: 12–20.
- 21) Thorup, C., A. Schramm, A.J. Findlay, K.W. Finster, and L. Schreiber. 2017. Disguised as a sulfate reducer: Growth of the *Deltaproteobacterium Desulfurivibrio alkaliphilus* by sulfide oxidation with nitrate. *MBio.* 8: e00671-17.
- 22) Wagner, R.C., D.F. Call, and B.E. Logan. 2010. Optimal set anode potentials vary in bioelectrochemical systems. *Environ. Sci. Technol.* 44: 6036–6041.
- 23) Yates, M.D., P.D. Kiely, D.F. Call, H. Rismani-Yazdi, K. Bibby, J. Peccia, J.M. Regan, and B.E. Logan. 2012. Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells. *ISME J.* 6: 2002–2013.