

金属還元細菌のストレス応答に着目した電流生産機構の解明

尾島 由紘

大阪大学大学院 基礎工学研究科/現所属：大阪市立大学大学院 工学研究科

研究の目的

異化的金属還元細菌である *Shewanella oneidensis* は、その細胞外電子伝達機能を利用した微生物発電などへの応用が期待される有用環境微生物である。微生物発電は、汚水処理とエネルギー生産を同時に達成する革新的な技術イノベーションとなりうるが、実用化への最大の障害は出力密度の低さにある。そこで本研究では、特に *S. oneidensis* のストレス応答に着目し、電流生産機構の基礎的理解を行うことを目的とする。*S. oneidensis* と同じ通性嫌気性、グラム陰性である大腸菌の *rpoS* 遺伝子は、微生物の飢餓ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレスなどの非常に多くのストレスに対して応答する重要制御因子であり、大腸菌においては全遺伝子の約 10 %にも及ぶ 400 遺伝子のレギュレーターであることが報告されている。一方で、大腸菌と *S. oneidensis* には実に多くの共通点が確認されており、いくつかの大腸菌用プラスミドが保持されることを確認している。従って本研究では、大腸菌の遺伝子組み換え技術を応用することで、*S. oneidensis* の *rpoS* 遺伝子欠損を行い、電流生産能に及ぼす効果について実験を行った。

方法

接合法による *S. oneidensis* の遺伝子欠損

PCR により、ORF を消失した *rpoS* 遺伝子の前後配列を自殺プラスミド pRE112 に挿入し、性線毛を持つ大腸菌 SM10 λ pir に導入した。自殺プラスミドを保持した大腸菌 SM10 λ pir と *S. oneidensis* 野生株に関して、試験管中の 5 ml LB 培地で、それぞれ 37 °C、30 °C で一晩前培養した。10 mM の硫酸マグネシウム溶液 4 ml に大腸菌と *S. oneidensis* の培養液をそれぞれ 100 μ l ずつ加えた混合液を孔径 0.2 μ m のフィルターにより濾過し、フィルター上に集菌した。集菌された面をクロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に付着させ、30 °C で *S. oneidensis* の赤いコロニーが出現するまで培養した。この操作により性線毛を介して SM10 λ pir から *S. oneidensis* へプラスミドを導入し、*S. oneidensis* 細胞内で相同組み換えを引き起こした。*S. oneidensis* のコロニーを単離し、不要となった自殺プラスミドはスクロース制限培地で脱落させ、レプリカ法によりクロラムフェニコール感受性のコロニーを *rpoS* 遺伝子欠損株の候補として回収した。

選択した欠損株候補コロニーに関して、Real-time PCR による mRNA 発現量の測定と、ゲノム DNA の抽出ならびに *rpoS* 遺伝子部位の増幅に伴う電気泳動により、*rpoS* 遺伝子欠損の確認を行った。

S. oneidensis の野生株と *rpoS* 欠損株を用いた微生物燃料電池の比較

構築した微生物燃料電池の構成としては、プロトン交換間膜として Nafion で隔てたガラス製の H 型電解槽(2 槽)を用いた²⁾。アノード、カソードとも電解液は 300 ml とし、アノードの電解液には、2 g/L の乳酸を含む LB 培地、カソードには、320 mM のヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウムを含むリン酸緩衝液(pH 7.0、50 mM)を用いた。アノード、カソード共に、0.2 g のカーボクロス巻きつけた炭素棒を電極に用いた。*S. oneidensis* の野生株と *rpoS* 欠損株をそれぞれ 300 ml の LB 培地で前培養し、遠心分離 (5000 rpm、10 min) により菌体を回収し、アノード側の電解液中で OD₆₆₀=1.0 となるように菌体を播種した。室温条件で 60 時間反応を行い、アノードとカソード間に 10 Ω の外部抵抗を接続し、出力電位の経時変化を測定した。

結果

接合法による *rpoS* 遺伝子欠損

電気泳動の結果を図 1 に示した。野生株より抽出した染色体 DNA からの増幅結果では、*rpoS* (981 bp) とその上流 250 bp を合わせた 1.2 kbp 対応するバンドが確認された。一方で、欠損候補株については、250 bp 付近にバンドが確認され、これは相同組み換えにより ORF を失った *rpoS* 遺伝子の長さに対応した。またこの候補株に関して、Real-time PCR により *rpoS* 遺伝子の発現が検出されなかった。これらの結果より、*S. oneidensis* の *rpoS* 遺伝子の欠損に初めて成功したことが明らかとなった。

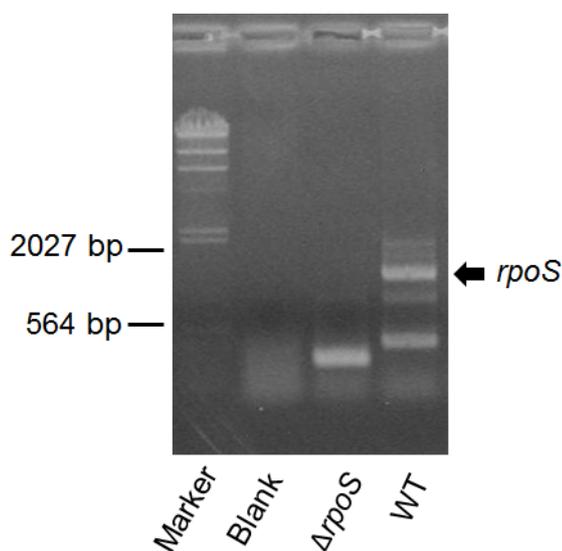


図 1 電気泳動による *rpoS* 遺伝子欠損の確認

S. oneidensis の野生株と *rpoS* 欠損株を用いた微生物燃料電池

構築した微生物燃料電池を用いた野生株の実験結果を図 2 に示す。電圧に関して、25 mV 程度で反応が開始されたのち、徐々に上昇を続け、100 mV を超えたあたりで緩やかになり、最終的には、150 mV 付近で安定した。この間、生存細胞数に関しては、多少の増減はあるものの、ほぼ反応開始時点から一定数を保っていることが分かった。基質である乳酸は、初期濃度 2 g/L で添加された後、若干の消費が確認されたものの、反応開始 48 時間後においても十分な濃度が残存していることから、電圧の上昇が停止し

た原因ではないと考えられる。以上より、構築した微生物燃料電池の野生株の挙動が明らかとなったため、続いて *rpoS* 欠損株についても同様に、出力電圧の確認を行った。図 3 に示すように、*rpoS* 欠損株の出力は 100 mV 付近までは野生株よりも短い 5 時間程度で上昇したが、すぐに頭打ちとなり 90 mV 付近で一定値を取ることがわかった。また、生存細胞数や乳酸の消費に関しては、野生株と比較し、大きな違いは確認されなかった。これらの結果から、微生物燃料電池における *rpoS* 欠損株の出力は野生株よりも低下することが明らかとなり、*S. oneidensis* の電流生産機構においてストレス応答遺伝子である *rpoS* が重要な役割を果たしていることがわかった。

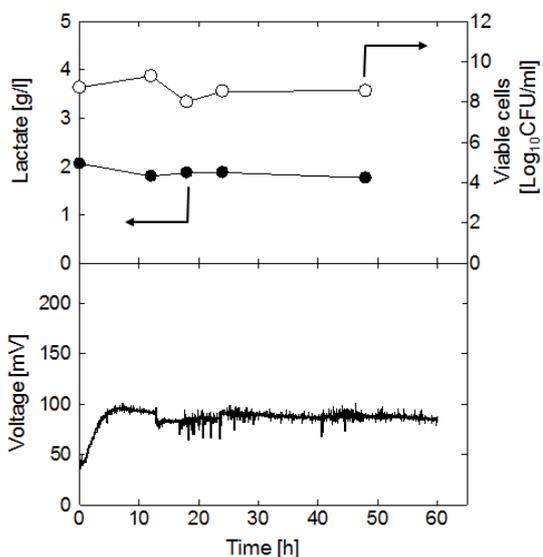


図 3 *rpoS* 欠損株の増殖，乳酸消費ならびに起電力

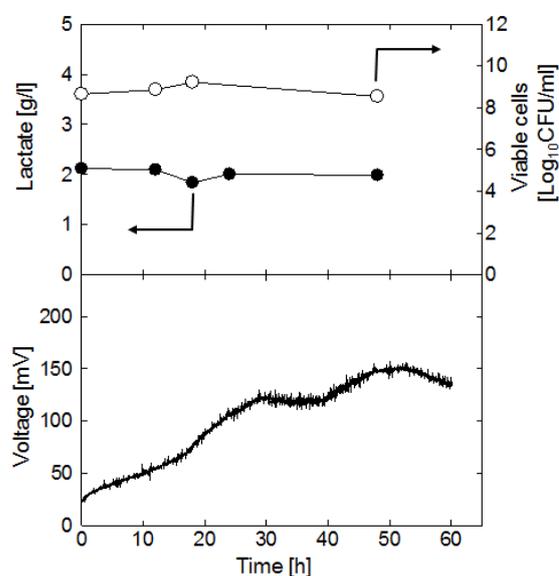


図 2 野生株の増殖，乳酸消費ならびに起電力

結論

In-frame 欠損法を応用することで、*S. oneidensis* のストレス応答遺伝子である *rpoS* の欠損にはじめて成功した。構築した *rpoS* 欠損株と野生株の微生物燃料電池での起電力を評価したところ、*rpoS* 欠損株では野生株よりも低い電圧を示し、*rpoS* 遺伝子が電流生産機構において重要な役割を果たしていることが判明した。

文献

- 1) Myers, C. R., and Nealson, K. H. (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* **240**: 1319-1321.
- 2) Ojima, Y., Kawata, T., Matsuo, N., Nishinoue, Y., and Taya, M. (2014) Recovery of electric

energy from formate by using a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **37**: 2005-2008.