



Title	Study of the Rate-Limiting Step on Extracellular Electron Transfer of <i>Shewanella Oneidensis</i> MR-1 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	黄, 文元
Citation	北海道大学. 博士(理学) 甲第15402号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89833
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	HUANG_Wenyuan_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 黄 文元

審査担当者	主査	教授	村越 敬
	副査	教授	大和 徹
	副査	客員教授	野口 秀典
	副査	客員教授	岡本 章玄

学位論文題名

Study of the Rate-Limiting Step on Extracellular Electron Transfer of *Shewanella Oneidensis* MR-1
(*Shewanella Oneidensis* MR-1 の細胞外電子伝達の律速段階に関する研究)

バクテリアの嫌気代謝と共役する細胞外電子伝達 (EET) において、有機物の代謝で生じた還元力は外膜シトクロムを介して細胞外の電子受容体に運ばれる。EET 能を有する微生物を用いることで多様な電気化学酵素反応を駆動できるため、微生物燃料電池をはじめとした下水中の重金属処理、バイオセンサー、微生物電気化学合成など、さまざまな技術への応用が可能である。これらの技術は盛んに研究されているが、反応効率を実用化レベルまで引き上げるには律速となる EET の大幅な加速が必須である。モデル細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 において、フラビン分子は外膜シトクロムの補酵素として働くことで EET を大幅に加速することが知られている。しかし、電極電位や溶液組成が不安定な微生物燃料電池において、フラビン補酵素の安定性に関する知見はない。本論文では、フラビンが効率的に EET を加速する電気化学系の条件とその機構の解明し、補酵素状態のフラビンが安定化するために外膜シトクロムのヘム酸化還元状態や膜電位が重要であることを決定し、遺伝子ノックアウトライブラリによって遺伝子変異に対する安定性の評価も行い議論している。

第一章では、EET や微生物燃料電池、関連技術の背景および課題に関して総括している。

第二章では、再現性が高いハイスループット電気化学測定プラットフォームを開発し、得られたデータから電極電位とフラビン濃度の二次元ベイズ推定を適用し、微生物電流生成 (I_c) をフラビンが増大させる条件を決定し、その機構を解明している。ハイスループット電気化学測定系では、96 チャンネルを同時に測定することが可能であり、ピーク I_c は 1 割未満の標準偏差を示すことを決定した。電極電位と酸化還元剤濃度は EET 速度を制御するための重要なパラメータである。*Shewanella* 菌と *Geobacter* 菌の 2 種類のモデル EET 細菌において、リボフラビン等の電子メディエーター濃度の効果を異なる電位差条件において測定した。576 個の I_c の時間プロファイルから、*Shewanella* では広い電位範囲においてリボフラビンが EET を加速することを見いだしている。また、外膜酸化還元酵素を欠損した変異株を用いた電気化学的解析により、その基礎となるメカニズムを決定している。

第三章では、細胞内電子経路を調節することにより、リボフラビンが外膜シトクロムと結合する際にヘム反応中心が還元状態であることで、親和性が高まることを決定している。紫外可視吸収および円偏光二色性分光法によるその場観察から、10mM の乳酸が電子ドナーとして存在していても電子アクセプターである 1 mM 以下のフマル酸によって外膜シトクロムのヘム中心が酸化されることを決定している。フマル酸の存在下で外膜シトクロムが酸化されると、補酵素状態のフラビンが微分パルスボルタンメトリーによって検出できないことを決定している。一方で、フマル酸還元酵素を欠く遺伝子変異株においては補酵素状態がフマル酸が存在しない状態と同程度に検出されることを決定している。これらの結果から、還元されたヘム中心がリボフラビン補酵素状態を安定化させることを解明している。

第四章では、フラビン補酵素の安定化に膜電位が関与していることを決定した。光学活性を持つプロトントランスポーターを用いて、膜電位を変化させると EET 速度が増加し、フラビン補酵素が安定化することを決定している。

第五章では、ハイスループット電気化学測定系を活用して、遺伝子破壊ライブラリから EET 速度に大きな影響を与える遺伝子群を決定している。ライブラリから 1,000 株を培養し、シルクスクリーン印刷炭素電極を作用極として電気化学系で測定、異常検出アルゴリズムにより、野生株では統計的

に取りえない低 I_c を示した 25 遺伝子破壊株を決定している。Indium tin-doped oxidized 電極を用いた系において、25 株のうち 15 株が野生型よりも低い I_c を生成することを決定している。すなわち、偶発的な遺伝子変異によって微生物燃料電池の出力が大幅に減少する可能性は 0.2 第六章では、本研究で得られた結果を総括し、今後の展開について述べている。

以上本研究は、微生物燃料電池におけるリボフラビンを介した高出力状態の安定性に関して重要な基礎的知見を与えた。関連原著論文は 1 編あり、英文で国際誌に掲載されている。よって審査委員一同は、申請者が北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。