HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the extracellular electron transfer mechanism of exoelectrogens in microbial fuel cells [an abstract of dissertation and summary of dissertation review]
Author(s)	木村, 善一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第11056号
Issue Date	2013-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53223
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Zen-ichiro_Kimura_abstract.pdf, 「論文内容の要旨」

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　内　容　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　　博士（工学）　　氏名　木村　善一郎

学　位　論　文　題　名

Study on the extracellular electron transfer mechanism of exoelectrogens in microbial fuel cells
(微生物燃料電池における電気生産細菌の細胞外電子伝達機構に関する研究)

微生物燃料電池 (MFC) は細菌の持つ細胞外電子伝達作用を工学的に応用した発電装置であり、炭素電極のような固体基質を電子受容体として利用する細菌 (電気生産細菌) を電池リアクター内で活動させ、電流を発生させる仕組みである。MFC は様々な応用が期待されるが、嫌気的廃水処理プロセス (=エネルギー回収) への応用は数多くの研究が行われている。これは MFC が燃料電池であることに由来し、従来行われてきたメタン発酵によるエネルギー回収等と比較し理論上は高効率なエネルギー回収が可能となるためである。しかしながら現在のところ MFC はメタン発酵を凌ぐ性能を持つに至っていない。この理由は、MFC の持つ様々な制限因子 (プロトン交換膜の材料、陽極の触媒性能、陰極上の微生物群集など) の最適化がなされていないことによるものである。最適条件での運用が可能となれば MFC は有用なエネルギー回収技術として運用し得るが、そのためには制限因子に関わる要素研究の蓄積が不可欠である。特に電池陰極上の微生物群集は重要な制限因子であり、今後のプロセスの向上に向けては、微生物群集内に存在する微生物を直接的に制御する技術が求められる。そのためには、これまで主にブラックボックスとして扱われてきた微生物群集内において、個々の微生物の持つ機能を把握することが必要である。MFC 内に存在する微生物は通常の微生物とは異なり細胞外に電子を運搬し電子受容 (呼吸) を行う。MFC の最適化にはこの電子運搬機能の制御が不可欠であるが、電子伝達様式は電気生産細菌種ごとに様々な種類が存在し、不明な点が数多い。本論文は、MFC 陰極槽内の微生物群集と機能解析を行い、電気生産に関わる細菌種の同定、更にはそれらの細菌種が電子運搬に利用する物質の特定を目的とした。研究の遂行には各種分子生物学的手法 (Stabele-Isotope-Probing 法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)、化学的バイオマーカー法 (キノンプロファイル)、電気化学的手法 (ポテンショスタット培養、Cyclic voltammetry 解析) 等を組み合わせて用いた。

本論文は、7 章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章では, 本論文の序論として, 研究の背景や目的, 本論文の構成を示した.

第 2 章では, 本研究の対象である微生物燃料電池研究の現状を示すとともに、電池技術を取り巻く要素研究を電子運搬体についての知見を中心に整理した。

第 3 章では、構築した酢酸をエネルギー源とする MFC を対象に、電子伝達に関わる微生物の同定と、その電子伝達経路の解明に取り組んだ。DNA-SIP-DGGE 及びキノンプロファイル解析を実施し、酢酸分解に関わる微生物群集の同定を試みた。結果、酢酸酸化細菌 *Geobacter* と水素酸化細菌 *Hydrogenophaga* が MFC 陰極の真正細菌群集において優占したことが判明した。MFC における *Hydrogenophaga* 属細菌は、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析による検出報告があるものの、同生態系からの分離例が存在せず、生理生態学的役割については不明であった。本章においては *Hydrogenophaga* 属の分離株 (AR20 株) を MFC 陰極中より獲得し、MFC 生態系における同細菌の生態が水素資化性電気生産であることを明らかにした。また

Geobacter 属細菌と *Hydrogenophaga* 属細菌のみから構成される共培養 MFC を構築することで、共培養 MFC がそれぞれの純粋培養 MFC と比較し高い電流を生産すること、そして共培養 MFC 内においてのみ *Hydrogenophaga* 属細菌の菌数が増加することを確認した。これらの成果に基づき *Hydrogenophaga* 属細菌が MFC 内で *Geobacter* 属細菌と共生関係にあり、共生における電子運搬体が水素である可能性が高いことを結論した。

第 4 章では、3 章において分離に成功した水素資化性電気生産細菌 *Hydrogenophaga* sp. AR20 株に対し、遺伝学的、形態学的分類試験を実施し、種レベルで新規な細菌種であることを明らかにした。電気生産能を有することを意味する種小名“ *electricum* ”を考案し、*Hydrogenophaga* “ *electricum* ” AR20 株と命名し、新種提唱を行った。

第 5 章では、独自に開発した細胞外キノンの検出手法を利用して、MFC 内に存在するユビキノン (UQ)-10 が細胞外に特異的に存在することを明らかにした。また本章では、外部から添加された酸化型 UQ-10 が MFC を構成する微生物群集によって生物的に還元され、同様に還元型 UQ-10 が四酸化三鉄 (マグネタイト) あるいは炭素電極によって無生物的に酸化されることを見出した。これらの結果は UQ-10 が微生物細胞と電極の間を結ぶ電子運搬体であることを示唆した。更に本章では UQ-10 及びマグネタイトを最終電子受容体とする条件で集積培養系を構築し、培養物の微生物群集構造を解析した。その結果、UQ-10 及びマグネタイト存在下において *Hydrogenophaga* 属、*Geobacter* 属、*Acinetobacter* 属及び *Pseudomonas* 属の集積が確認された。これら 4 属の分離株について UQ-10 還元能試験した結果、いずれも還元能を有し、従って電気生産細菌であることが判明した。最後に *Hydrogenophaga*“ *electricum* ”AR20 株をモデルに純粋培養 MFC を構築し UQ-10 を添加することで、電力が大幅に向上することを確認した。電力増大作用は UQ-10 のみに認められ、UQ-8、UQ-9 からは確認されなかった。これらの成果に基づき UQ-10 が *Geobacter* 属、*Hydrogenophaga* 属を始めとする電気生産細菌群集に利用される新規電子運搬体であることを結論した。

第 6 章では、5 章の研究過程において分離に成功した電気生産細菌 *Raoultella* sp. 1GB 株に対し、遺伝学的、形態学的分類試験を実施した。同分離株は極微量ながら UQ-10 を細胞外に生産する性質を有した。また分類困難な分類群である腸内細菌科に属したため、DNA-DNA 交雑形成試験を中心に詳細な試験を実施した。結果として、種レベルで新規な細菌種であることが明らかとなり、*Raoultella*“ *electricum* ” AR20 株と命名し、新種提唱を行った。

第 7 章は、総括であり、MFC 陰極槽内における電子運搬体が、水素及び UQ-10 であることを示した。