

称号及び氏名 博士（工学） 石木 健吾

学位授与の日付 令和2年3月31日

論文名 「Electroanalysis for Quantitative Assessment of Bacterial Activity
(細菌活性の定量的評価のための電気化学分析)」

論文審査委員 主査 井上 博史

副査 久本 秀明

副査 原田 敦史

論文要旨

細菌は、細胞内部、外界との界面での電子やイオン、分子の流れによって種々の機能が的確に制御されており、生物圏に広く生存している。集団食中毒や流行感染症などの原因となり、人命に危害を与える細菌が存在する一方、酒やヨーグルトなどの発酵食品の製造や污水浄化、有用物質の生成など、有用細菌も数多く存在する。また、人体内に常在する約 1000 種類の細菌は、数にして 1000 兆個におよび、生活習慣や環境に応じてそれらの種類や分布が変化し、健康維持のために機能的にはたらいっている。人類と微生物がさらに効率的に共存するためには、微生物機能の理解を深化するとともに、それらを定量的に評価することが重要である。

微生物機能の計測は培養に基づいた手法によって実現されている。細胞内での電子移動や分泌物に着目した計測や細胞増殖に基づいたコロニー計数など、細胞の活性を様々な視点から評価するものである。しかし、そのほとんどが色素の発色を利用した計測であり、十分な検出感度を得るために半日程度のインキュベーションを要し、細胞活性のリアルタイム計測が困難であった。電気化学的手法は、細胞内での電子移動や分泌物を直接計測することが可能であるため、細胞活性の評価に有用であるのみならず、電位によって選択的な計測が可能であるため、種々の反応に着目したリアルタイム計測が実現できる。また、計測の高感度化によって、微量の代謝物や酸素消費量を定量できることから、単一細胞レベルの評価に有用な手法となる。

本研究では、細胞内/細胞外に存在する酸化還元種、タンパク質や電子移動に着目し、細菌の代謝活性の電気化学的定量について詳細な検討を行った。

第1章では、本研究の背景、および概要について述べた。

第2章では、微生物に親和的な導電性高分子を利用して細菌を基板に固定化する方法について述べた。細菌の基板への固定化によって、光学的小および電気化学的に代謝活性を直接観察、計測することに成功した。導電性ポリピロール (PPy) の合成の際、反応溶液に大腸菌を混合し、透明ガラス電極上に PPy 膜を電解析出させた。暗視野顕微鏡下、この電極上にロッド状の光散乱スポットが分散して観察されたことから、大腸菌細胞が PPy 膜に固定されていることが明らかになった。この電極を液体培地に浸漬し、好気および嫌気条件下で大腸菌を培養した。18 時間後、電極を取り出して暗視野観察したところ、ロッド状の光散乱スポットの増加と凝集が見られ、細胞の増殖とともにバイオフィルムの形成が確認された。次に、大腸菌を固定した PPy 電極にフィルターメンブレンをのせ、別の透明ガラス電極で挟むことで薄層電気化学セルを作製した。電解液としてリン酸緩衝液をメンブレンに浸み込ませ電気化学測定すると、溶存酸素の還元電流のみが観察された。この電解液にグルコースを添加し、30 分後に再度測定を行うと、溶存酸素の還元電流は大幅に減少した。グルコースを添加しない場合や PPy 膜に大腸菌が存在しない場合は、電流の減少は見られなかった。これらのことから、PPy 膜に固定した細菌の好気呼吸によって、溶存酸素が消費されることが明らかになった。酸素還元起因する通電量から細菌の酸素消費量を見積もったところ、単一細胞あたり $1.6 \times 10^{-17} \text{ mol min}^{-1}$ と算出された。この結果は、市販の酸素センサによる溶存酸素量の測定結果とほぼ一致した。本研究によって、基板に固定した細菌細胞の活性を単一細胞レベルで評価できたことから、食中毒菌検査、薬剤感受性試験や抗菌性物質のスクリーニングなど、細菌活性を利用した分析・計測へ応用できることがわかった。

第3章では、テトラゾリウム塩 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) を用いた細菌検出法について検討した。MTT は黄色の酸化還元指示薬であり、細胞内の酵素や電子伝達体から電子を受け取り、還元されて不溶性のホルマザンに変換される。その際、特徴的な紫色を示すことから、比色分析に利用されている。MTT を用いた比色分析は、4 時間以上の培養を要する。それにもかかわらず、酵素活性や呼吸などの評価が可能であるため、医学や生物学の分野において幅広くされている。大腸菌懸濁液に MTT を加えて培養すると、細胞内においてホルマザンが生成した。培養後の懸濁液を遠心分離し、電極に滴下した後、細菌を熱溶解させることで電極表面にホルマザン結晶を析出させた。電気化学計測において、+0.1 V (vs. Ag|AgCl) に酸化電流が得られた。この電流は、電極表面に析出したホルマザン結晶の量、つまり、滴下した懸濁液中の細胞数に強く依存した。3 σ 法により検出限界を算出したところ、28 cells mL⁻¹ と見積もられた。これは MTT を利用した比色分析における検出限界の約 1/10,000 であった。また、サンプル採取から検出まで 1.5 時間以内であった。滅菌処理した細菌を用いた実験では、ホルマザンの酸化に基づく電流応答は観察されなかったことから、本法は生細胞の検出に有用であり、電流応答に基づく

いた細胞の活性評価にも有用であった。

第 4 章では、金属還元細菌 *Shewanella oneidensis* の金属イオン還元能を評価した。*S. oneidensis* は、細胞膜に多数のシトクロム *c* を配置し、独自の電子伝達経路を有する。そのため、有機物を消費して生成した電子を細胞膜外に存在する電子受容体に供給できる。電子受容体として金属イオンを用いると、細胞表面に金属ナノ粒子が生成する。このため、環境浄化や金属回収、微生物燃料電池などに有用であり、最も注目される微生物資源の一つである。炭素源としてギ酸塩を含む水溶液に *S. oneidensis* を添加し、テトラクロリド金酸イオンを加えて培養した。培養後の細胞を透過型電子顕微鏡に観察した。培養の初期段階（～3 時間）において、細胞表面に粒径 2 nm 程度の金ナノ粒子が生成し、培養時間の経過とともに粒径が増大した。7 時間後、金ナノ粒子は凝集体として観察された。この過程において、金ナノ粒子は細胞表面にのみ観察された。これらのことから、テトラクロリド金酸イオンは細胞表面で還元され、金ナノ粒子の生成と成長は細胞表面の同一サイトで進行するものと考えられる。これらの現象は、パラジウムや白金、銀ナノ粒子にも同様に観察された。また、暗視野顕微鏡により細胞表面に形成された金属ナノ粒子の光散乱特性を評価した。塩化パラジウムイオンを含む水溶液で培養した場合、細胞は白色の散乱光として観察された。テトラクロリド金酸イオンの場合、黄橙色の強い散乱光として観察された。その他、銀や白金など、金属種に基づいた特徴的な光散乱スペクトルが得られた。そこで、複数の金属イオンを含む水溶液に *S. oneidensis* を添加して培養を行った。培養時間の経過とともに、パラジウム、白金、金に基づく散乱光が得られた。細胞表面に形成される金属ナノ粒子の光散乱特性に着目することで、水溶液中に含まれる金属種の同定することに成功した。本研究は、環境からの金属回収とその金属種の同定が同時に達成できる新しい金属元素分析に有用である。

第 5 章では、*S. oneidensis* の電子生成能を定量的に評価した。近年、同位体標識法やクロマトグラフィー、スペクトロメトリーにより細胞内の電子伝達機構が定性的に解明された。これらの手法は前培養や遠心分離・ろ過などのプロセスを要し、細胞の電子生成のリアルタイム計測が困難であったため、定量的な評価についてはこれまで報告がなかった。そこで、細胞外電子メディエータを用い、*S. oneidensis* の細胞内での電子生成反応の定量評価を試みた。*S. oneidensis* の懸濁液にフェロシアン化カリウムを添加すると、*S. oneidensis* の電子生成に伴ってフェリシアン化物イオンがフェロシアン化物イオンに還元された。このときの電位は、フェリシアン化物イオンとフェロシアン化物イオンの濃度比に依存するため、*S. oneidensis* が生成した電子の定量が可能であった。有機塩を含む懸濁液にフェリシアン化物イオンを添加すると、電位は+0.05V (vs. Ag|AgCl) から+0.30 V まで急激に上昇し、時間経過とともに緩やかに減少した。式量電位に達した後、しばらくすると電位は急激に下降し、終点に達した。このとき、懸濁液中のすべてのフェリシアン化物イオンが還元された。この実験後の生菌率は 99% 以上であり、電子メディエータが細菌の活性に影響しないことを確認した。フェリシアン化物イオンの初期濃度と終点に達する時間から、還元速度を算出することが可能であった。そこで、菌数や電子メディエータ濃度、有機塩の種類や濃度について

様々な条件下で電位プロファイルを得た。還元速度は懸濁液中のフェリシアン化物イオン濃度には依存しなかったことから、フェリシアン化物イオンの反応速度が大きく、電子メディエータとして機能していることがわかった。還元速度は菌数に比例して増大した。また、有機塩の種類と濃度に強く依存し、得られた反応速度はミカエリス・メンテン式に従った。以上のことから、見かけの反応速度は細胞内の酵素反応に支配されていることが明らかになった。そこで、有機塩が十分に存在する懸濁液中で電位プロファイルを取得した。ギ酸塩、乳酸塩、ピルビン酸塩に基づく電子生成速度は、それぞれ $1.1 \times 10^{-15} \text{ Ms}^{-1}$, $2.8 \times 10^{-16} \text{ Ms}^{-1}$, $1.6 \times 10^{-16} \text{ Ms}^{-1}$ と算出された。これらの結果から、単一細胞あたり約 1.6 pA の電流が得られることを実証した。

第 6 章では、本研究から得られた結論を総括した。

本研究では、細菌の活性を電気化学的に評価する手法を開発し、細菌活性をリアルタイムで計測することに成功した。電気化学的手法は、既存法における種々の課題を克服する新しい細菌活性の計測手段として今後発展するものと考えられる。

審査結果の要旨

本論文は、細菌の機能、または細菌細胞の活性の定量的評価における電気化学的計測法の有用性に関する研究成果をまとめたものであり、以下の成果を得ている。

(1) 導電性高分子であるポリピロールが微生物に親和的な環境を提供することを明らかにし、ポリピロールを利用した細菌の基板固定について検討した。細菌の固定化によって、光学および電気化学的に細菌の代謝活性を直接観察、計測することに成功した。

(2) 細菌細胞内においてテトラゾリウム塩 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) がホルマザンに還元されることに着目し、ホルマザンの電気化学特性を利用した生菌検出について検討した。不溶性を利用したホルマザンの電極上への濃縮によって、高感度な電気化学測定が可能となり、迅速かつ高感度な検出を実現した。

(3) 金属還元細菌 *Shewanella oneidensis* は、細胞膜に多数のシトクロムタンパク質を配置し、独自の電子伝達経路を有する。細胞膜における金属ナノ粒子の生成機構を、光学計測や顕微鏡観察によって明らかにした。また、金属ナノ粒子の光学特性を利用した分析法に応用可能であることを見出した。

(4) 電位差測定によって、金属還元細菌 *Shewanella oneidensis* の電子生成能の定量評価を行った。細胞内の酵素反応が律速段階であることを見出した。また、ギ酸脱水素酵素が最も電子生成速度が高いことを明らかにした。乳酸代謝系においては、乳酸脱水素酵素の反応速度が最も高く、クエン酸回路が律速段階であった。これらの結果から、細胞における電子生成の理論量を算出することに成功した。

以上の諸成果は、細菌活性の定量評価を可能にするものであり、既存法における種々の課題を克服する新しい手法として今後の発展が期待される。また、申請者が自立して研究活動を行うのに十分な能力と学識を有することを証したものである。

学位論文審査委員会は、本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。