

研究終了報告書

「溶菌を伴うバイオフィルム内導電機構の解明と制御」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：徳納 吉秀

1. 研究のねらい

微生物の代謝は医療や健康の観点から世界的に注目を集めている。微生物の代謝により産生される毒素は感染症の原因となり、腸内細菌叢の代謝により産生される化合物は宿主(ヒト)の健康に大きく影響する。さらに微生物代謝は創薬や廃水処理、物質生産に至るまで様々な分野で利用されている。特に、微生物代謝に関連した医学的な課題として、病原菌による感染症の問題が挙げられる。2019 年の全世界での死亡数の内約 14% (770 万人) が病原性微生物の感染症に起因している。感染症の有力な治療法の一つは抗生物質の投与であるが、抗生物質感受性の多くは病原菌の代謝に依存するため、微生物代謝を制御する技術が盛んに研究されてきた。環境中での微生物は 80%以上が三次元構造を有する集団を形成して代謝を行うが、これまで実用化されてきた制御法のほとんどは浮遊状態の微生物に限られたものである。本課題では、微生物集団の代謝活性を空間的に明らかにし、その知見を基にした代謝制御手法を開拓することを目指した。さらに、本手法を活用した抗生物質耐性制御法の開発を試みた。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、顕微鏡観察技術、電気化学測定技術の開発を通じて、微生物集団の代謝機構を空間的に明らかにし、その知見を基に代謝制御手法を開拓することに成功した。また、本技術を基に、微生物集団の抗生物質耐性を制御することに成功した。

(2)詳細

研究テーマ A. 微生物集団の三次元観察法の開発

共焦点蛍光顕微鏡を用いて微生物集団を三次元的に可視化する手法を開発した。

研究テーマ B. 微生物集団の導電モデルの提唱

コロニー深部の微生物が電子伝達を利用してコロニー表層の酸素を使って代謝の駆動に必要なエネルギーを獲得している現象について論じた総説が *mBio* 誌に掲載された(Y. Tokunou *et al*, *mBio*, **2022**, 13 (6), e01957-22)。また、酸素への電子伝達現象を oxygen-terminating extracellular electron transfer と自身で命名した。

研究テーマ C. 微生物集団の導電性測定法の開発

コロニー内導電率測定法を開発した。これまで、微生物集団内を流れる電子の定量は困難とされてきた。既存の手法では、電極上に十分な厚みを持つ均一な微生物集団を自己組織化させる必要があり、電極上に集団を形成しない、もしくは不均一な集団が形成されてしまう菌

が多く、ほとんどの微生物に適用されてこなかった。本研究では、アガー上に形成したコロニーに電極を貼り付けるといった簡便かつ安定な新規手法を確立することで、微生物種や遺伝子欠損株の種類に依らず導電性を測定可能であることを示した(図 1)。本技術により、*Shewanella oneidensis* MR-1 のコロニーには導電性があることが明らかにした。さらに、*Shewanella oneidensis* MR-1 の外膜に局在するシトクロム c にフラビン分子が結合することで、コロニーの導電性が上昇することを明らかにした (図 1)。(Y.Tokunou, H.Tongu, Y.Kogure, A.Okamoto, M.Toyofuku, and N.Nomura, “Colony-Based Electrochemistry Reveals Electron Conduction Mechanisms Mediated by Cytochromes and Flavins in *Shewanella oneidensis*” *Environ. Sci. Technol.*, 58, 10, 4670–4679, 2024)

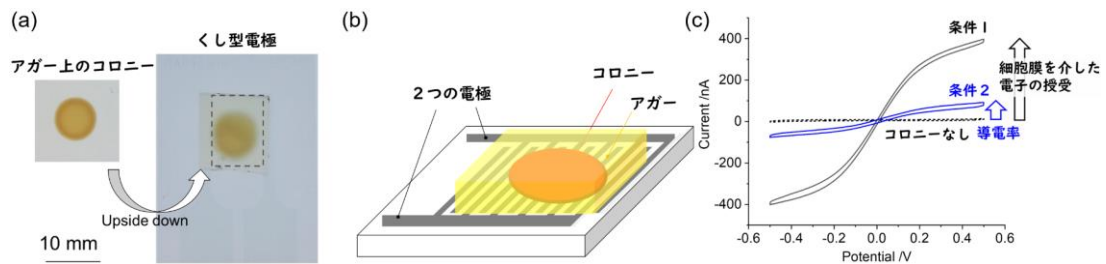


図 1.本研究で開発したコロニーの導電率測定手法。(a)実験手法手順。(b)実験手法の概要図。(c)本手法により得られる電流－電圧曲線。

研究テーマ D. 微生物代謝の可視化

共焦点蛍光顕微鏡を用いて微生物集団の代謝分布を三次元的に可視化する手法を開発した。

研究テーマ E. 病原菌の抗生物質感受性の制御

微生物の抗生物質感受性の制御を試みた。

3. 今後の展開

本研究では、電気と微生物集団の代謝について多角的に研究を進めてきた。その成果の一つとして、微生物集団の抗生物質耐性制御につながる結果を得ることができた(研究テーマ E)。今後は様々な病原菌の抗生物質耐性の評価実験を行うことを予定している。

また、微生物は様々な環境に存在し、既に多くのバイオ技術に応用されているため、本研究で開発した技術はその制御と評価に活用できる可能性がある。また、長期的な展望として超小型半導体技術によるナノロボットを利用した電気制御への展開を考えている。健康長寿社会の形成へ向けて、体内にナノロボットを巡らせて健康を管理するという先制医療の構想があるが、そこに体内の微生物集団の制御機能を付与することができればヒト細胞、微生物両方の管理による健康寿命の維持が期待できる。もしくは対象を微生物に絞れば、体内のヒト細胞に直接働きかけるよりも心理的な抵抗を低減して社会に普及できる可能性があるため、ナノロボット利用を広めるための手段としても期待できる。

4. 自己評価

研究目的の達成状況、研究の進め方

本研究では、当初の研究目的をおおむね達成することができた。特に、微生物集団中の電気と代謝の関係を解明するための新規技術(顕微鏡観察技術、電気化学測定技術)の開発に成功し、実際に微生物集団の代謝機構を空間的に明らかにすることができた点は、評価できる点だと考えている。今後は様々な病原菌の抗生物質耐性の評価実験を行う予定である。現在、本 ACT-X 研究に関して受理された原著論文は 1 件である。現在成果をまとめ複数本の論文を執筆中であり、内 1 報は既にプレプリントとして公開されている。

本研究は、研究代表者(徳納吉秀)と、補助者である修士課程学生(頼宮弘将)の2名により行われた。また、研究費の多くは研究テーマ C で必要になる電気化学装置(ポテンシオスタット)の購入に充てられた。研究費の増額をしていただき、本装置の故障の際に速やかに修理することができた。こうした迅速なサポートにより研究目的をおおむね達成することができた。また、本装置は微生物集団中の電気と代謝の関係の解明に基づく今後の研究展開に必須となる装置であり、研究者としての個を確立するために大きく貢献するものと考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

今後、本手法を活用し微生物集団の抗生物質耐性制御が可能となれば、世界的に主要な死因の一つである感染症の予防や治療に大きく貢献できる。また、本成果は電気を利用して微生物集団を制御する技術につながるため、今後は様々な環境に生息する微生物の代謝を制御するための基盤技術としての展開が期待できる。例えば、医療技術の開発(腸内細菌叢の制御、嫌気性細菌の酸素耐性能の制御など)やバイオ技術の開発(廃水処理、嫌気消化など)への応用が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

- (1) **Y.Tokunou**, H.Tongu, Y.Kogure, A.Okamoto, M.Toyofuku, and N.Nomura, “Colony-Based Electrochemistry Reveals Electron Conduction Mechanisms Mediated by Cytochromes and Flavins in *Shewanella oneidensis*” *Environ. Sci. Technol.*, 58, 10, 4670–4679, **2024**

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【プレプリント】

- (1) **Y.Tokunou**, K.Saito, R.Hasegawa, K.H.Nelson, K.Hashimoto, H.Ishikita, and A.Okamoto, “A Basified Phenothiazine at Submicromolar Level Boosts Microbial Electrocatalysis by Two Orders of Magnitude.” *SSRN*, **2022**

【総説】

- (1) **Y.Tokunou**, M.Toyofuku, and N.Nomura, “Physiological Benefits of Oxygen-Terminating

Extracellular Electron Transfer” *mBio*, 13 (6), e01957–22, **2022**

- (2) Y.Tokunou, “Interdisciplinary research on electrons and biofilms” *Science Impact*, 1 (2), p8–9, **2024**

【招待講演】

- (1) Y.Tokunou, H. Tongu, M. Toyofuku, and N. Nomura “Energy conservation mechanisms in multicellular assemblages of *Shewanella oneidensis*”, 16th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine & Engineering (IEEE–NANOMED 2023), Okinawa, Japan, December, 2023
- (2) Y.Tokunou, H. Tongu, M. Toyofuku, and N. Nomura, “Energy conservation strategies of *Shewanella oneidensis* biofilms” The 20th Young Scientist Seminar YSS2023, online, November, 2023
- (3) Y.Tokunou, H. Tongu, M. Toyofuku, and N. Nomura “Three-dimensional imaging of NADH/NAD⁺ ratio in bacterial colonies”, BIT’s 8th Annual Conference of Analytix–2023, Osaka, Japan, May, 2023
- (4) 徳納吉秀,「微生物集団の中ではたらく電気」、第 57 回緑膿菌感染症研究会内シンポジウム「緑膿菌の生存戦略とその制御」,つくば, 2023 年 2 月