



東京薬科大学生命科学部 高 妻 篤 史

電気活性細菌のエネルギー代謝と電流生成を制御する分子機構の解明

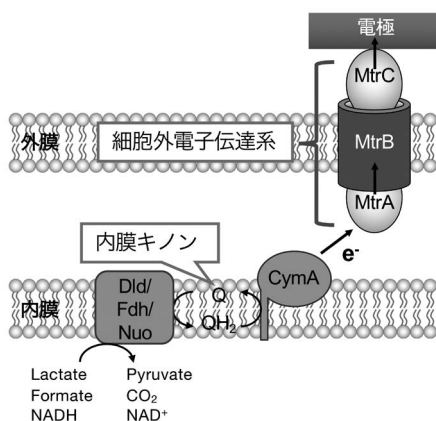
はじめに

近年、電極と電子のやり取りが可能な微生物（電気活性細菌；electroactive bacteria; 以下EAB）が発見され、大きな注目を集めている。EABはその特異な代謝形態から学術的な興味の対象であるとともに、微生物燃料電池（EABによって有機物等の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置）や、微生物電気合成（電極からEABに電子を与え、二酸化炭素等の単純な物質から有用物質を合成するプロセス）等のバイオ電気化学プロセスへの応用が期待されている。これらのプロセスはEABのエネルギー代謝に基づくものであるため、その代謝活性を適切に制御し、できるだけ高い状態で保つことが重要となる。しかしEABの生理学的性質には未解明の部分が多く、その電氣的な活性を維持することが難しいことが課題となっている。

我々はEABの代謝活性と電流生産を制御するための分子生物学的基盤を確立することを目的とし、*Shewanella oneidensis* MR-1株の電気活性に関与する新規因子（遺伝子）の探索・同定、および電流生成を制御する分子機構に関する研究を行ってきた。本講演ではその成果の概要を紹介する。

1. 電極との相互作用に関与する新規因子の同定

S. oneidensis MR-1株はEABのモデル生物として世界的に最もよく研究されている菌株であり、細胞内有機基質の酸化酵素（Dld等）と細胞外電子伝達系酵素（CymA および MtrCAB）を介して、基質の分解により生じた電子を電極に伝達することが知られている（図1）。しかし、MR-1株においても電流生成を制限する因子は十分に解明されていなかった。そこで我々はMR-1株において電流生成に関与する遺伝子を探索するため、本株のランダムトランスポゾン挿入ライブラリーを電気化学リアクター内で集積し、野生株よりも高い電流を生成する変異株を単離・解析した。興味深いことに、単離された高電流生成株

図1. *S. oneidensis* MR-1株の電流生成経路

の多くは細胞表層多糖等の欠損により電極に対して高い付着性を示すようになっており、EABの電流生成において“電極表面に対するバイオフィーム形成能力”が極めて重要であることが明らかになった^{1,2,3)}。この結果はEABの細胞表層と電極の界面における電子移動が電流生成を律速していることを示唆しており、バイオ電気化学プロセスのエンジニアリングにおいて重要な知見であると思われる。

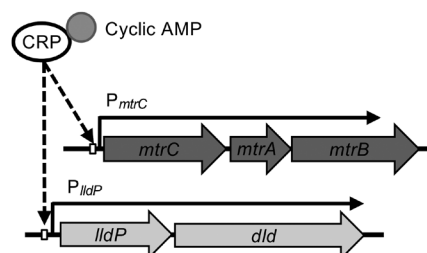
2. 電流生成に関与する遺伝子の発現制御機構の解明

MR-1株は乳酸を好んで資化し、乳酸脱水素酵素（Dld）による乳酸の酸化によって生じた電子を細胞外電子伝達系タンパク質（MtrCAB）によって菌体外に放出し、呼吸を行う（図1）。我々はこれらのタンパク質をコードする遺伝子（電流生成遺伝子群）の発現制御機構を解析し、これらの遺伝子の転写がCRP（cyclic AMP receptor protein）により包括的に活性化されることを明らかにした（図2）^{4,5)}。Dldは内膜キノン依存性の乳酸脱水素酵素であり、細胞内の基質を酸化して内膜の呼吸鎖電子伝達系に電子を供給する役割を果たすため、NADH脱水素酵素（呼吸鎖複合体I）と同様、呼吸鎖の一部とみなすことができる（図1）。CRPが*mtrCAB*遺伝子に加えて*dld*の発現制御も担うことは、呼吸鎖の包括的な制御が*Shewanella*の生存において有利に働くことを示唆している。

バクテリアのCRPは主に大腸菌において糖代謝のカタボライト抑制に関連して研究されてきたが、CRPは糖代謝能を持たない細菌にも多く保存されており、その生理機能には未知の部分が多い。一方、本研究ではMR-1株においてCRPが異化代謝系を包括的に制御するグローバル転写因子として働くことを明らかにした。この発見は環境細菌の生理・生態を理解する上で重要な成果であると考えられる。

3. 電極電位に対する代謝応答機構の解明

*Shewanella*をはじめEABは酸化還元状態の変化が激しい環境に生息しているため、環境中の酸化還元電位を認識する機構はEABの生存と深く関わっていると考えられる。しかし、EABは細胞外の固体電子受容体（金属酸化物・電極等）を利用

図2. CRPによる細胞外電子伝達系遺伝子（*mtrCAB*）および乳酸脱水素酵素遺伝子（*dld*）の発現制御。ildP: 推定乳酸パーミターゼ遺伝子

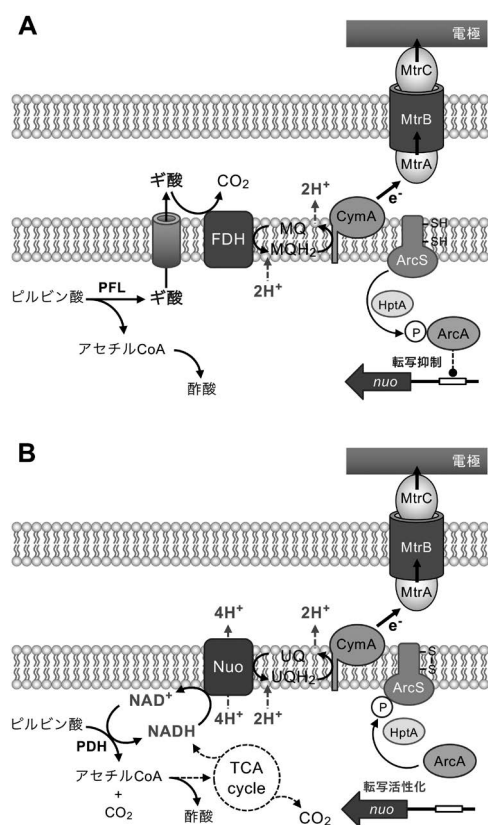


図3. MR-1株における低電位時 (A) と高電位時 (B) のピルビン酸代謝経路。電極電位が低い場合には、MR-1株はピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFL) とギ酸脱水素酵素 (FDH) を用いてピルビン酸を酸化分解し、電流を生成する (A)。一方、電極電位が高くなると、Arc system によって NADH 脱水素酵素遺伝子 (*nuo*) の発現が誘導され、ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) と Nuo を用いてピルビン酸を分解するようになる (B)。Nuo はプロトンポンプ活性を持つため、高電位時の経路 (B) は低電位時の経路 (A) に比べ、1 電子あたりに汲み出されるプロトン量 (H^+/e^- 比) が多くなる。MQ, 酸化型メナキノン; MQH_2 , 還元型メナキノン; UQ, 酸化型ユビキノン; UQH_2 , 還元型ユビキノ

できるものの、これらの物質の電位を感知する能力を持つのかどうかは不明であった。そこで我々は電極電位が MR-1 株の代謝挙動と遺伝子発現変化に与える影響を詳細に解析した。その結果、本株は低電位 (0 V vs. SHE) と高電位 (+0.5 V) 時に異なる異化代謝経路を用いること、またその制御に Arc system (内膜キノンの酸化還元状態を認識する制御系) が関与することを明らかにした⁶⁾。電極電位が変化すると、細胞外電子伝達系を介して内膜キノンの酸化還元バランスが変化する。本研究により、MR-1 株はこの変化を Arc system によって感知し、電位が低い場合にはエネルギー効率 (H^+/e^- 比) が低い代謝経路 (ギ酸依存経路) を用いるが、電位が高い場合には H^+/e^- 比が高い経路 (NADH 依存経路) を利用することが示された (図3)。これらの結果は EAB が細胞外の電位を認識する能力を持ち、これにより酸化還元環境の変化に柔軟に適應していることを示している。電位認識は細胞外電子伝達系と電気的につながった Arc system によって行われるため、*Shewanella* の細胞外電子伝達系は単に電子排出経路としてだけでなく、外部環境を認識するためのセンサーの一部として機能しているとも考えられる。

おわりに

本研究により、EAB の電流生成 (異化代謝) に起因する電極への電子伝達) にこれまで知られていなかった生物学的因子 (細胞外多糖類、転写制御因子等) が関与することが明らかになった。また、MR-1 株が電極電位を感知し、異化代謝系を切り替える機構を持つことが示された。これらの成果は EAB の育種や代謝制御において有用な知見であると考えられる。

EAB には、細胞内の異化代謝系 (エネルギー代謝に関与する一連の酸化還元反応) と電極 (電位) が細胞外電子伝達系を介して連動するという特性がある。すなわち、電極によって細胞内の酸化還元状態と、それに関連する代謝反応を直接的に制御することが可能である。この特性と本研究で明らかにした *Shewanella* の電位認識機構を応用すれば、電極によって微生物の遺伝子発現と代謝を任意に制御する技術を開発できる可能性がある。今後は本研究の成果を進展させ、EAB を利用した有用バイオプロセスの開発に取り組んでいきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Kouzuma A *et al.* 2010. Disruption of the putative cell surface polysaccharide biosynthesis gene SO3177 in *Shewanella oneidensis* MR-1 enhances adhesion to electrodes and current generation in microbial fuel cells. *Appl Environ Microbiol* 76: 4151-4157.
- 2) Tajima N *et al.* 2011. Selection of *Shewanella oneidensis* MR-1 gene-knockout mutants that adapt to an electrode-respiring condition. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 2229-2233.
- 3) Kouzuma A *et al.* 2014. Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiol* 14: 190.
- 4) Kasai T *et al.* 2015. Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes *omcA* and *mtrC* in *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol* 15: 68.
- 5) Kasai T *et al.* 2017. CRP regulates D-lactate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol* 8: 869.
- 6) Hirose A *et al.* 2018. Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat Commun* 9: 1083.

謝 辞 本研究は、科学技術振興機構 ERATO 橋本光エネルギー変換システムプロジェクトおよび東京薬科大学生命科学研究部生命エネルギー工学研究室で行われたものです。本研究に携わる機会を与えていただき、多くのご指導、ご鞭撻を賜りました ERATO 研究統括・橋本和仁先生 (現物質・材料研究機構理事) に深く感謝申し上げます。東京薬科大学教授・渡邊一哉先生には、ERATO プロジェクトから今日に至るまで日々懇切なご指導とご支援を賜り、本奨励賞にご推薦下さいましたことを心より感謝申し上げます。また、学生時代にご指導いただき、卒業後も親身なご支援をいただきました東京大学教授・野尻秀昭先生と産業技術総合研究所・羽部浩先生に深謝いたします。本研究の成果は、多くの共同研究者の先生方と研究員の修了生、在学生、研究補助員の方々のご支援とご尽力によるものです。笠井拓哉博士 (現名古屋大学助教)、廣瀬篤弥氏をはじめ、ここに全ての方のお名前を挙げることはできませんが、皆様に深く感謝申し上げます。