

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05399

研究課題名(和文) 微生物電気合成の基盤となる電気代謝制御工学の確立

研究課題名(英文) Development of electrogenetic and metabolic engineering as a basis for microbial electrosynthesis

研究代表者

高妻 篤史 (Kouzuma, Atsushi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：20634471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電気化学活性細菌(EAB)の遺伝子発現と代謝活性を電気化学的・遺伝子工学的に制御し、有用物質生産を促進させるための基盤技術を開発した。具体的には、(i)電気化学活性細菌に適用可能なCRISPR/Cas9システムの開発、(ii)有用物質(3-ヒドロキシ酪酸、アンモニア)を合成可能な遺伝子改変EABの構築、(iii)細胞内シグナル分子(cAMPおよびc-di-GMP)を利用した電極上へのバイオフィーム形成と電流生成の促進技術の開発、および(iv)電極を用いた遺伝子発現制御システム("電気遺伝学")の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、次世代のバイオプロセスとして、微生物電気合成(MES)が注目を集めている。MESとは電極と電子のやり取りを行う微生物(EAB)に電極から電子を与えて還元物質の生産を促すプロセスであり、その生産効率はEABの代謝活性に依存する。しかしEABの代謝活性は電極電位の変化や代謝産物の蓄積によって複雑に制御されるため、高活性状態を維持することが難しい。本研究ではこの課題を解決するため、EABの電位認識機構と代謝制御機構を応用し、EABの電気合成能力を高めるための技術基盤を確立した。これらの技術を利用すれば、電極とEABの相互作用を促進させ、MESを高効率化できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed fundamental technologies for electrochemically and genetically engineering the gene expression and metabolic activities of electrochemically active bacteria to promote the production of value-added chemicals. Specifically, we have developed (i) a CRISPR/Cas9 system applicable to electrochemically active bacteria (EAB), (ii) a genetically modified EAB capable of synthesizing value-added chemicals (3-hydroxybutyrate and ammonia), and (iii) a technology to promote biofilm formation and current generation on electrodes using intracellular signaling molecules (cAMP and c-di-GMP), and (iv) a system to control gene expression using electrodes ("electrogenetics").

研究分野：応用微生物学

キーワード：代謝工学 遺伝子工学 遺伝子発現制御 微生物電気化学 細胞外電子伝達 バイオフィーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、欧米を中心に微生物電気合成 (MES) の研究が進められている。MES とは電極と電子のやり取りを行うことのできる微生物 (電気化学活性細菌; EAB) に電極から電子を与えて還元的化合物の生成を促すプロセスのことであり、自然エネルギーから供給可能な電力を用いて有用物質を生産できる可能性があるため、次世代のバイオプロセスとして期待されている。MES には高い汎用性があり、発酵産物の制御や CO<sub>2</sub> からの有機物合成に利用できると考えられている。また、窒素固定能力を持つ EAB を利用すれば、大気中の窒素からアンモニアを電気合成するプロセスも構築できると期待される。アンモニアは化学肥料の主成分であり、食糧生産に必須であるが、現在は大量の化石燃料を消費する化学合成法 (ハーバー・ボッシュ法) により合成されている。MES によるアンモニア合成を実現できれば、従来法に替わる持続可能なアンモニア製造法を提供できる可能性がある。

これらの MES プロセスでは、電極から電子を受容し還元的代謝を行う微生物 (“電気合成菌”) が重要な役割を果たす。なかでも、*Acidithiobacillus ferrooxidans* や *Shewanella oneidensis* 等の細菌は生来の細胞外電子伝達経路 (EET 経路) を介して電子を受容できるため、電気合成菌として優れた性質を示す (Sydow *et al.*, 2014, *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8481)。*A. ferrooxidans* は炭酸固定および窒素固定が可能な独立栄養細菌であり、大気成分 (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) からの有機物合成やアンモニア合成が可能である。一方、従属栄養細菌である *S. oneidensis* はこれらの能力を持たないが、有機物を基質とした電気合成 (electro-fermentation; 電気制御発酵) に利用できると期待される (Kouzuma, 2021, *Biosci Biotechnol Biochem*)。また本細菌は遺伝子操作が容易なため、炭酸固定経路や有用物質生産経路を人為的に導入し、様々な MES プロセスを実現するためのプラットフォーム生物としての利用に適している (Ikeda *et al.*, 2021, *Essays Biochem*)。

これらの電気合成菌を利用した MES プロセスには高いポテンシャルがあると考えられるが、実用化には目的物質の生産速度を高めることが課題となる。これまでに申請者らは *A. ferrooxidans* にグルタミン合成阻害剤 (methionine sulfoximine; MSX) を添加することにより、電気培養槽中にアンモニアを分泌させることに成功している (特願 2017-33404)。しかし現状の生産速度は約 0.6 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> であり、これによって国内の年間アンモニア需要量 (約 110 万トン; 日本アンモニア肥料協会資料) を賄うには、莫大なリアクター体積が必要となる。したがって実用化を目指すには、生産速度を少なくとも現在の 100 倍以上に高め、リアクター規模を現実的なスケールに引き下げなければならない。現状では電気化学リアクターや培養条件の最適化をほとんど行っていないため、これらによっても 10 倍程度の速度向上は期待できる。しかしそれ以上の生産速度を達成するには、電気合成細菌の能力を代謝制御工学的に高めることが不可欠であると考えられる。しかし、比較的研究が進んでいる *A. ferrooxidans* や *S. oneidensis* においても、電気化学培養時の生理挙動 (遺伝子発現や代謝応答) は十分に解析されておらず、代謝制御工学のベースとなる知見が圧倒的に不足しているという課題があった。

一方、研究代表者らは、*S. oneidensis* MR-1 株が EET 経路と Arc system (内膜キノンの酸化還元状態を認識する制御系) を用いて電極電位の変化を認識し、その変化に応じて遺伝子発現と代謝経路を制御していることを見出した (Hirose *et al.*, 2018, *Nat Commun* 9:1083)。この発見は電気合成細菌の代謝活性が電極電位に強く依存することを示しており、“電極によって電気合成細菌の代謝を制御できる可能性”を示唆するものであった。そこで研究代表者らは電気合成細菌の電極電位認識・応答機構を利用し、関連する遺伝子発現と代謝系を適切に制御することが MES の高効率化において極めて有効であると考えた。しかし、これらの制御機構は十分に解明されておらず、有用な代謝活性化技術は確立されていなかった。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では EAB の電位認識機構と代謝制御機構を解明し、これらの知見を応用して EAB の電気合成能力を電気化学的・代謝工学的に高めるための技術基盤を確立することを目的とした。MES における物質生産効率は EAB の電子受容能力 (電気化学活性) と代謝活性に依存するが、これらの活性は電極電位の変化や代謝産物の蓄積によって複雑に制御されるため、高活性状態を維持することが難しい。そこで本研究では、2 種の代表的な EAB、*Acidithiobacillus ferrooxidans* と *Shewanella oneidensis* を用いて、これらの細菌の電気合成能力を電気化学的・遺伝子工学的に制御する手法を確立し、これにより MES プロセスを高効率化することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) CRISPR/Cas9 発現プラスミドの構築

pKCcas9dO (Huang *et al.*, 2015, *Acta Biochim Biophys Sin* 47:231) に含まれる *Streptococcus*

*pyogenes* 由来の *cas9* 遺伝子を pBBR1MC-2 にクローニングし、CRISPR/Cas9 発現プラスミド (pBBR1-Cas9) を構築した。また、CRISPR 干渉法 (CRISPRi) による遺伝子発現抑制システムを構築するため、*cas9* 遺伝子の 10 残基目のアスパラギン酸と 840 残基目のヒスチジンをそれぞれアラニンに置換し、Cas9 のヌクレアーゼ活性を不活性化した。不活性化 Cas9 (dCas9) を発現する遺伝子カセットを pBBR1MCS-2 にクローニングし、pBBR1-dCas9 を構築した。

#### (2) 電極バイオフィルムの観察

MR-1 株が電極上に形成するバイオフィルムの観察は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) および電気化学フローセル (Kitayama *et al.* 2017. *Appl Environ Microbiol* 83:e00903-17) を用いて行った。

#### (3) 電気化学セルの運転

MR-1 及びその変異株が生成する電流量の測定には 15 mL 容の小スケール電気化学セル、もしくは 150 mL 容の中スケール電気化学セル (Hirose *et al.*, 2018) を使用した。作用極にはグラファイトフェルト、対極には白金線、参照極には銀/塩化銀 (Ag/AgCl) 電極を用い、培地には電解質として 10 g/L の NaCl を添加した。

#### (4) 遺伝子発現解析

MR-1 及びその変異株における遺伝子発現は、定量的 RT-PCR (qRT-PCR)、DNA マイクロアレイ、及び LacZ レポーターアッセイにより行った。qRT-PCR は LightCycler 1.5 instrument と LightCycler RNA Master SYBR Green I (Roche) を用いて、添付の説明書の指示に従って行った。検量線は PCR で増幅した DNA 断片の希釈系列を使用して作製した。定量的 PCR の特異性は融解曲線分析により確認した。DNA マイクロアレイ解析は 60 mer の DNA プロブが配置されたカスタム DNA マイクロアレイ (8×15 K; Agilent Technologies) を用いて行った。cDNA の合成、ラベル化とハイブリダイゼーションは原核生物用の遺伝子発現解析プロトコル (Agilent One-Color Microarray-Based Prokaryote Analysis, version 1.4, <http://www.chem.agilent.com>) に従って行った。LacZ レポーターアッセイはプラスミド pMElacZ を用い、発表論文 (Koga *et al.*, 2020, *Environ Microbiol* 22:3671) に記した方法に従って行った。

#### (5) 電気泳動移動度シフト解析 (EMSA)

電気泳動移動度シフト解析 (EMSA) は Cy3 でラベル化した DNA プロブと精製した転写因子タンパク質 (CRP, ArcA) を用いて、Hirose *et al.* (2018) および Kasai *et al.* (2019) に記した方法に従って行った。

### 4. 研究成果

#### (1) EAB に適用可能な CRISPR/Cas9 システムの開発

MES による物質生産を実現するには、EAB の遺伝子操作技術の拡充が必要である。そこで研究代表者は、効率的なゲノム編集技術として注目されている CRISPR/Cas9 システムに着目した。本システムは従来法 (ダブルクロスオーバー法等) より簡便に遺伝子変異を導入可能であるほか、CRIPR 干渉法 (CRISPRi) 等の遺伝子発現制御技術にも応用することができる。しかし、EAB に対して CRISPR/Cas9 システムを適用した研究は少なく、簡便に利用できるベクター系は確立されていなかった。そこで本研究では、*Shewanella* や *Acidithiobacillus* 等の EAB の多くが属するガンマプロテオバクテリアが保持できる広宿主プラスミド (pBBR1MC-2; Kovach *et al.*, 1995, *Gene* 166:175) をベースに、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集用ベクターを構築した。

pBBR1-Cas9 は pKCas9dO (Huang *et al.*, 2015) に含まれる *cas9* 遺伝子を pBBR1MCS-2 にクローニングすることによって作製した。このベクターの有用性を評価するため、*S. oneidensis* MR-1 株の *crp* 遺伝子が本ベクターを用いたゲノム編集 (フレームシフト変異導入) によって破壊できるかを検証した。*crp* 内の DNA 配列と相補的に結合するガイド RNA を発現する DNA 断片、および *crp* 遺伝子にフレームシフト変異を導入した配列を含む DNA 断片 (ドナー DNA) を pBBR1-Cas9 にクローニングし、pBBR-Cas9gd を作製した。このプラスミドを MR-1 株に導入し、得られた形質転換体の *crp* 内の DNA 配列を解析したところ、解析した全ての形質転換体 (9 コロニー) において目的のフレームシフト変異が導入されていることが確認された。この結果から、本ベクター (pBBR1-Cas9) を用いることによって高効率なゲノム編集が可能になることが確認された (Suzuki *et al.*, 2020, *J Gen Appl Microbiol* 66: 41)。

さらに、不活性型 Cas9 (dCas9) を発現するベクター (pBBR1-dCas9) を構築し、本ベクターが CRISPRi (dCas9 を利用した遺伝子発現抑制法) に適用できるかを検証した。標的遺伝子には *gltA* (TCA 回路を構成するクエン酸合成酵素遺伝子) を選定し、本遺伝子内の配列に相補的に結合するガイド RNA を発現する DNA 断片を pBBR1-dCas9 にクローニングした。このプラスミドを *S. oneidensis* に導入したところ、酢酸を基質とした場合の好氣的増殖が顕著に抑制された。この結果は *gltA* の発現抑制によって TCA 回路の活性が低下したことを示唆するものであり、本システムによる CRISPRi が有効に機能したと考えられた。

## (2) *Acidithiobacillus* によるアンモニア電気合成プロセスの改良

*A. ferrooxidans* は電気エネルギーを利用して培養可能であり、炭酸固定能力に加えて窒素固定能力を持つことから、空気と電気からアンモニアや含窒素有機化合物を合成するためのホスト菌株としての利用が期待されている。研究代表者らはこれまでに本細菌の電気培養によってアンモニアが生産可能なことを示しているが（特願 2017-33404）、アンモニアを分泌させるためにグルタミン合成阻害剤（MSX）を添加する必要がある、アンモニア合成速度も非常に低いという課題があった。アンモニア生産を安定化・高効率化するためには、本細菌を遺伝子改変し、窒素固定反応を担うニトロゲナーゼを恒常的に活性化させる必要があると考えられる。しかし、本細菌は遺伝子組換えの効率が極めて低いため、遺伝子破壊株を得ることが非常に難しい。そこで本研究では CRISPRi によってニトロゲナーゼの不活性化に関与する遺伝子の発現を抑制し、これにより *A. ferrooxidans* のアンモニア生産能力の向上を図った。

ニトロゲナーゼはアンモニア等の窒素源が豊富に存在すると DraT タンパク質による翻訳後修飾を受け、不活性化されることが知られている。そこで本研究では前項で開発した CRISPRi システムを用いて、*draT* 遺伝子の発現抑制株（*draT* ノックダウン株; Kd *draT* 株）を作製した。定量的 RT-PCR 解析によって Kd *draT* 株における *draT* 遺伝子の転写量を測定した結果、本株では野生株と比較して *draT* の転写量が約 60%減少しており、*A. ferrooxidans* においても CRISPRi が機能することが確認された。Kd *draT* 株を電気培養してアンモニア生産量を測定した結果、本株は MSX を添加しない場合でもアンモニア生産が可能であり、その最大生産速度は  $1.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$  に達した。この値は以前に達成していた生産速度（ $0.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ）の約 3 倍であり、*A. ferrooxidans* によるアンモニア生産能力の向上には *draT* の発現抑制が極めて有効であることが示された（山田ら、2021、日本農芸化学会）。

## (3) *Shewanella* による炭素代謝・細胞外電子伝達系の協調的制御機構の解明と活性化

MES では、EAB が EET 経路を介して電極から電子を受容し、これにより細胞内の還元的代謝が促進されて物質が合成される。したがって、MES の効率を高めるには、EAB において EET 経路と細胞内代謝系（主として炭素代謝系）を協調的に活性化させる必要がある。*S. oneidensis* MR-1 株においては、EET 経路の発現は主に cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) によって制御されることが明らかになっている。一方、MR-1 株の炭素代謝系の制御機構には不明な点が多い。そこで本研究では MES プロセスにおける MR-1 株の代謝活性化技術を確認することを目的に、本株が好んで利用する炭素源である乳酸の代謝系の発現制御機構について解析した。

MR-1 株は Dld と LdhA の 2 種類の D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) を有しており、Dld は D-乳酸をピルビン酸へ酸化するキノン依存的 D-LDH、LdhA は NADH を使用してピルビン酸を D-乳酸へ還元する NADH 依存的 D-LDH として機能する。以前の研究において、*dld* の発現が CRP によって制御されることが明らかになっていた（Kasai *et al.*, 2017, *Front Microbiol* 8:869）。一方、*ldhA* の発現制御機構は未解明であったが、本遺伝子の上流にも CRP の結合モチーフ配列が存在しており、CRP が *dld* と *ldhA* の発現を協調的に制御していると予想された。そこで本研究では CRP が *ldhA* の発現制御にも関与するかどうかを検証した。 $\Delta crp$  株における *ldhA* の発現量を解析した結果、 $\Delta crp$  では本遺伝子の発現量が低下していることが示された。また精製 CRP タンパク質を用いた EMSA 解析により、*ldhA* の上流に CRP が結合することが示された。以上の結果から、MR-1 株の D-乳酸代謝系 (Dld と LdhA) は EET 経路と同様、CRP による発現制御を受けていることが示された（Kasai *et al.*, 2019, *Appl Environ Microbiol* 85:e02668-18）。

CRP は cAMP を受容して標的遺伝子の転写を活性化する。したがって、上記の結果から、cAMP は MR-1 株の電流生成能力を決定する重要なシグナル因子であり、本因子の合成を促すことで MR-1 株による電流生成を増強できると考えられた。MR-1 株には CyaA、CyaB、CyaC の 3 つの cAMP 合成酵素（アデニル酸シクラーゼ；AC）が存在し、特に CyaC が主要な AC として働くことが知られている。そこで本研究では *cyaC* を過剰発現する MR-1 変異株（*cyaC*-OE 株）を作製し、細胞内 cAMP 濃度と遺伝子発現（トランスクリプトーム）変動、および電流生成量を評価した。その結果、*cyaC*-OE 株では野生株よりも約 5 倍多くの cAMP が合成されており、電流生成に関与する炭素代謝系（乳酸・ピルビン酸代謝系）と EET 経路の遺伝子発現量が増加していることが示された。また、*cyaC*-OE 株は電気化学セルにおいて野生株よりも約 2 倍高い電流を生成した。以上の結果から、cAMP が MR-1 株の炭素代謝系と EET 経路を協調的に活性化する役割を果たしており、cAMP の合成促進が本株の電流生成能力を向上させるうえで有効な手段であることが示された（Kasai *et al.*, 2019, *Bioelectrochemistry* 129:100）。

## (4) 電気化学活性バイオフィルムの形成を促進する細胞内シグナル分子の同定

MR-1 株は電極表面にバイオフィルム（電気化学活性バイオフィルム）を形成し、効率的に電極との電子授受を行うと考えられている。しかし、本株の電極へのバイオフィルム形成やバイオフィルム内での電流生成に関与する分子メカニズムは未解明であった。そこで本研究では、電気化学フローセル（Kitayama *et al.* 2017, *Appl Environ Microbiol* 83:e00903-17）における MR-1 株

の遺伝子発現変動を解析し、本株の電気化学活性バイオフィーム形成および電流生成に関与する因子を探索した。

MR-1 株を電気化学フローセルを用いて培養し、流水および非流水条件下における電極付着菌体の遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、流水条件下では extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子をコードすると推定される遺伝子 SO\_3096 が著しい発現上昇を示すことが明らかとなった。SO\_3096 の破壊株 ( $\Delta$ SO\_3096 株) を作製し、電気化学フローセルにおける電流生成量を野生株と比較した結果、 $\Delta$ SO\_3096 株は野生株よりも低い電流を生成した。次に流水発電条件下における  $\Delta$ SO\_3096 株と野生株の遺伝子発現を比較した結果、 $\Delta$ SO\_3096 株ではシトクロム *c* の成熟に関与する遺伝子 (*dsbD*) を含む多く遺伝子の発現量が低下していた。MR-1 株による電極への電子伝達にはシトクロム *c* が関与するため、 $\Delta$ SO\_3096 株における電流量の低下は *dsbD* の発現低下に起因すると予想された。そこで *dsbD* の破壊株 ( $\Delta$ *dsbD* 株) を作製し、電流量を測定した結果、 $\Delta$ *dsbD* 株はほとんど電流を生成しないことが示された。以上の結果から、SO\_3096 は流水条件において電極への電子伝達に関連する遺伝子の発現を制御する役割を果たしており、MR-1 株による電気化学活性バイオフィームの形成において極めて重要な因子であることが示された (Koga *et al.*, 2020, *Environ Microbiol* 22:3671)。

また、電気化学フローセルにおける流水条件下では、c-di-GMP 合成酵素 (グアニル酸シクラーゼ) をコードすると予想された遺伝子 SO\_1646 (本研究において *dgcS* と命名) が顕著に発現上昇していた。c-di-GMP は緑膿菌等においてバイオフィーム形成の制御因子として働くことが知られているが、*Shewanella* 等の EAB による電気化学活性バイオフィームの形成における c-di-GMP の役割は十分に解明されていなかった。そこで本研究では電気化学活性バイオフィームの形成における *dgcS* の機能を解析した。*dgcS* 遺伝子の破壊株 ( $\Delta$ *dgcS*) を作製し、細胞内 c-di-GMP の定量を行った結果、野生株と比べ c-di-GMP の細胞内濃度が著しく低下していた。この結果から、*dgcS* の遺伝子産物 (DgcS) が MR-1 株において主要な c-di-GMP 合成酵素として働くことが示された。また電気化学フローセルを用いて野生株と  $\Delta$ *dgcS* の流水条件下でのバイオフィーム形態と電流生成を調べた結果、 $\Delta$ *dgcS* ではバイオフィーム形成が抑制され、電流生成量も低下していた。これらのことから、MR-1 株において DgcS が電気化学活性バイオフィームの形成と電流生成に重要な役割を示すことが示された (Matsumoto *et al.*, 2021, *Appl Environ Microbiol* 87:e00201-21)。

さらに本研究では、MR-1 株による電気化学活性バイオフィームの形成を促進させるため、*dgcS* 過剰発現株 (*dgcS*-OE 株) を作製し、電気化学フローセルにおけるバイオフィーム形成量と電流生成量を評価した。その結果、*dgcS*-OE 株のバイオフィーム形成量および電流生成量は MR-1 野生株と比較して顕著に増加しており、*dgcS* の過剰発現によって MR-1 株による電気化学活性バイオフィームの形成と電流生成を促進できることが示された (特願 2021-023828)。*dgcS*-OE 株と野生株の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により比較したところ、*dgcS*-OE 株において type IV pili 合成遺伝子や細胞外シトクロム *c* 遺伝子である MtrABC および OmcA の発現量が有意に増加していることが明らかになった。これらの結果から、*dgcS* の過剰発現によって細胞内 c-di-GMP レベルが上昇し、これにより電極への付着および電子伝達に関与する遺伝子の発現が誘導されたことが示唆された (松元ら、2021、日本農芸化学会)。

#### (5) 3-ヒドロキシ酪酸を合成する遺伝子改変 MR-1 株の構築

*S. oneidensis* MR-1 株は炭酸固定能力を持たないものの、電極から電子を受容し、細胞内の還元的代謝に利用することができる (Rowe *et al.*, 2018, *mBio* 9:e02203-17)。したがって、本株を利用すれば酢酸等の低分子・低エネルギー物質から高エネルギーの有用物質を電気合成するプロセス (電気制御発酵プロセス) を構築できる可能性がある。そこで本研究では MR-1 株をホスト菌株とし、酢酸から 3-ヒドロキシ酪酸 (3-hydroxybutyrate; 3-HB) を合成するプロセスの開発を目指した。MR-1 株に 3-HB 合成経路を導入するため、アセチル CoA から 3-HB を合成する酵素群 (Gao *et al.*, 2002, *FEMS Microbiol Lett* 213:59) をコードする人工遺伝子カセットを構築した。この遺伝子カセットを TCA 回路を抑制したノックダウン株 (*Kd\_gltA* 株) に導入し、酢酸を基質として培養した結果、約 20 mg/g の収率で 3-HB が合成された。

#### (6) 電気遺伝学に適用可能なプロモーターの探索

MR-1 株は EET 経路と Arc system を用いて電極電位の変化を認識し、その変化に応じて遺伝子発現を制御する機構を持つ (Hirose *et al.*, 2018, *Nat Commun* 9:1083)。この MR-1 株の電極電位認識機構を応用すれば、電極によって生物の遺伝子発現を制御する技術 (“電気遺伝学”) を開発できると考えられる (Hirose *et al.*, 2019, *Biotechnol Adv* 37:107351)。これまでに、MR-1 株においてトランスクリプトームの電位応答性を解析した結果、低電位と高電位で Arc system 依存的に発現誘導される遺伝子が複数見出されている (Hirose *et al.*, 2018)。そこで本研究では、Arc system 制御下にある遺伝子の発現領域を探索し、低電位 (-0.4 V vs. 標準水素電極) と高電位 (+0.7 V) でそれぞれ遺伝子発現を誘導するプロモーター (*P<sub>ngl</sub>* および *P<sub>feoA</sub>*) を同定した (廣瀬ら、2020、日本農芸化学会; Tanaka *et al.*, 2021, *World Microbe Forum*)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki Yusuke, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 66
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing of <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 using a broad host-range pBBR1-based plasmid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kasai Takuya, Tomioka Yuki, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 129
2. 論文標題 Overexpression of the adenylate cyclase gene <i>cyaC</i> facilitates current generation by <i>Shewanella oneidensis</i> in bioelectrochemical systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 100 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioelechem.2019.05.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Atsumi, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 37
2. 論文標題 Towards development of electrogenetics using electrochemically active bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Advances	6. 最初と最後の頁 107351 ~ 107351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biotechadv.2019.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kouzuma Atsushi	4. 巻 18
2. 論文標題 Electrical control of microbial metabolism: Towards development of electrogenetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Extremophiles	6. 最初と最後の頁 45-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Takuya, Suzuki Yusuke, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 85
2. 論文標題 Roles of D-Lactate dehydrogenases in the anaerobic growth of <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 on sugars	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02668-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyachi Tomoko, Kouzuma Atsushi, Abe Takashi, Watanabe Kazuya	4. 巻 7
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Acidithiobacillus ferridurans</i> JCM 18981	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01028-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高妻篤史	4. 巻 96
2. 論文標題 電気で微生物を制御する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌「バイオメディア」	6. 最初と最後の頁 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Atsumi, Kasai Takuya, Koga Ryota, Suzuki Yusuke, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Understanding and engineering electrochemically active bacteria for sustainable biotechnology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioresources and Bioprocessing	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40643-019-0245-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Takuya, Tomioka Yuki, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 129
2. 論文標題 Overexpression of the adenylate cyclase gene <i>cyaC</i> facilitates current generation by <i>Shewanella oneidensis</i> in bioelectrochemical systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 100 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioelechem.2019.05.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koga Ryota, Matsumoto Akiho, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that facilitates c type cytochrome maturation and current generation under electrolyte flow conditions in <i>Shewanella oneidensis</i> MR 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 3671 ~ 3684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Atsumi, Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 131
2. 論文標題 Hydrogen-dependent current generation and energy conservation by <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 in bioelectrochemical systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 27 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Akiho, Koga Ryota, Kanaly Robert A., Kouzuma Atsushi, Watanabe Kazuya	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification of a Diguanylate Cyclase That Facilitates Biofilm Formation on Electrodes by <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00201-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Kouzuma Atsushi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Molecular mechanisms regulating the catabolic and electrochemical activities of <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Atsushi Kouzuma, Atsumi Hirose, Hisae Mogi, Takuya Kasai, and Kazuya Watanabe
2. 発表標題 A novel mode of regulation for electrochemical activities of <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1
3. 学会等名 The 7th International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (ISMET7) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiho Matsumoto, Ryota Koga, Atsushi Kouzuma, Robert Kanaly, Kazuya Watanabe
2. 発表標題 SO_1646 encodes a diguanylate cyclase that determines intracellular cyclic di-GMP levels and regulates biofilm formation and current generation by <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1
3. 学会等名 The 7th International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (ISMET7) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高妻篤史
2. 発表標題 電気で微生物を制御する: 電気遺伝学の基礎と応用
3. 学会等名 極限環境生物学会第20回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高妻篤史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高妻篤史
2. 発表標題 電気活性細菌の電極電位認識機構とその応用
3. 学会等名 2019年電気化学秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀亮太，松元陽歩，高妻篤史，渡邊一哉
2. 発表標題 Shewanella oneidensisのバイオフィルム形成とシトクロムc合成を制御するECFシグマ因子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邊一哉
2. 発表標題 Shewanella oneidensis MR-1株における電極電位応答性プロモーターの同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富岡優樹、笠井拓哉、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 Cyclic AMP合成促進による <i>Shewanella oneidensis</i> の電流生成能力の向上
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木祐介、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いた <i>Shewanella oneidensis</i> への遺伝子ノックイン技術の開発
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬篤弥、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1株の電位認識機構の解明とその利用に向けて
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木祐介、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 CRISPR-Cas9を用いた <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1株のゲノム編集法の開発
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古賀亮太、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 流水条件下のバイオフィルム形成や電流生成に関与する <i>Shewanella oneidensis</i> の遺伝子の同定
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬篤弥、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1株におけるNADH酸化経路の電位依存性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口聡師、廣瀬篤弥、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 <i>Shewanella oneidensis</i> におけるピルビン酸代謝系の電気制御
3. 学会等名 第17回微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮内友子、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 生物学的ハーバーボッシュ法の基盤確立
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高妻篤史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀亮太、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 Shewanella oneidensisのバイオフィルム形成と電流生成を制御するECFシグマ因子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Yamada, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe
2. 発表標題 Bioelectrochemical production of ammonia using an engineered iron-oxidizing bacterium
3. 学会等名 International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (ISMET7) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松元陽歩、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 c-di-GMPの合成促進による電気化学活性バイオフィルムの活性化
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高妻篤史、廣瀬 篤弥、渡邊一哉
2. 発表標題 電気を感ずるバクテリア: 電気化学活性細菌の電位応答機構とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田祥平、高妻 篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 Acidithiobacillus ferrooxidansにおけるCRISPRシステムを用いた遺伝子発現抑制技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中勇吾、富岡優樹、鈴木志野、石井俊一、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 電気制御発酵に向けたShewanella oneidensis MR-1株の電子受容能力の向上
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sota Ikeda, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe
2. 発表標題 Supplementation with tryptone enables the fermentative growth of Shewanella oneidensis on sugars
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yugo Tanaka, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe
2. 発表標題 Development of electrogenetics for facilitating electro-fermentation
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Takamatsu, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe
2. 発表標題 Fermentative succinate production from glucose by an engineered <i>Shewanella oneidensis</i> strain
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田祥平、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 好酸性鉄酸化細菌による電気化学的アンモニア生産の高効率化
3. 学会等名 極限環境生物学会2019年度(第20回)年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬篤弥、高妻篤史、渡邊一哉
2. 発表標題 電気をを用いた微生物代謝制御法の確立に向けて
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会微生物電気化学研究部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 微生物凝集促進遺伝子およびその利用法	発明者 渡邊一哉、高妻篤史、松元陽歩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-023828	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------