

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850052

研究課題名(和文)鉄還元細菌のマルチヘムc型シトクロムの生産・分泌機構の解明

研究課題名(英文)Secretion and maturation of multiheme cytochromes in iron-reducing bacteria

## 研究代表者

井上 謙吾 (Inoue, Kengo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：70581304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Geobacter sulfurreducensゲノムにおいて、型分泌系関連遺伝子(群)は2か所に存在している。それぞれの型分泌系が機能しなくなる遺伝子破壊株を作製し、生産されるシトクロムを調べたところ、一方の破壊株では野生株と同様であったが、もう一方の破壊株では、微生物燃料電池で発電に必要なシトクロムOmcZが正常に生産されていなかった。また、微生物燃料電池での発電能力を検証したところ、両者とも発電能力が欠損していることが明らかになった。本研究により、いずれの型分泌系も発電に、一方の破壊株ではOmcZの正常な生産(機能する状態までの成熟)に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Geobacter sulfurreducens is a key player in current production by mixed-culture microbial fuel cells. Among known essential genes for optimal current production, omcZ is the only c-type cytochrome. To reveal the molecular mechanisms of OmcZ secretion and maturation process, we have investigated type-II secretion system (T2SS) by which OmcZ is proposed to be secreted. In G. sulfurreducens genome, there are two T2SS gene clusters (T2SS-I and -II, respectively). We generated disruption mutants of these T2SS-related genes and investigated their cytochrome production and capability of current production in microbial fuel cell. According to the cytochrome production profile results, T2SS-I disrupted mutant could not produce matured OmcZ but T2SS-II disrupted mutant did not show difference from wild-type G. sulfurreducens strain. However, both mutants could produce current in microbial fuel cell as well as wild-type.

研究分野：応用微生物学

キーワード：鉄還元菌 Geobacter 細胞外電子伝達 型分泌システム シトクロムc ヘム修飾

## 1. 研究開始当初の背景

*Geobacter sulfurreducens* をはじめとする鉄還元菌は、自然界では主に嫌気環境下に分布し、有機酸などの有機化合物を電子供与体、酸化鉄( )などの金属を電子受容体とする、「異化的鉄還元」と呼ばれる呼吸様式をとる。鉄還元菌による異化的鉄還元は自然界における鉄循環に極めて重要な役割を担っている。*G. sulfurreducens* を含む一部の鉄還元細菌は金属のみならず電極のような電導性の剛体に対しても電子を伝えることができるため、微生物燃料電池における発電に中心的な役割を果たしている。*G. sulfurreducens* は純粋培養系の微生物燃料電池で最も高い発電能力を有する菌種で、複合系の微生物燃料電池においても電極表面で近縁種が優占的に増殖し、発電に寄与することが知られている。

異化的鉄還元では、有機物分解によって細胞内に生じた電子が細胞外の電子受容体へ伝達される。*G. sulfurreducens* ゲノム中には *c* 型シトクロムをコードする遺伝子がそれぞれ 111 個見出されており、大腸菌の 7 個と比較すると格段に多く、また、細胞外電子伝達に *c* 型シトクロムが重要であることが実験的にも証明されてきた。*G. sulfurreducens* において細胞外へ分泌されることが知られているシトクロム OmcB、OmcS、OmcZ はそれぞれ 12、6、8 個の *c* 型ヘムを分子内に持ち、OmcB、OmcS は不溶性の酸化鉄( )の還元、OmcZ は微生物燃料電池での発電に必須である。しかし、その重要性にもかかわらず、これまで *Geobacter* 属細菌におけるマルチヘム *c* 型シトクロムのヘム修飾系と分泌機構について研究された例はほぼ皆無である。*G. sulfurreducens* の *c* 型シトクロムのうち OmcZ を含めた 22 種のシトクロムは分子内に一般的な *c* 型ヘム結合モチーフ (CXXCH) とは異なるヘム結合モチーフ

(CX<sub>n</sub>CH, n=4,5,8,9,13,14,15) を持つため、特殊なヘムリアーゼを含むヘム修飾系が必要であると考えられている。

## 2. 研究の目的

*Geobacter sulfurreducens* が他の生物と一線を画す最大の特徴は細胞外への電子伝達能力にあるといえるが、細胞外電子伝達の全容解明に至るまでにはいまだ未解明な点が多く残っているのが現状である。特に、これまでにマルチヘム *c* 型シトクロムの重要性は証明されてきたにも関わらず、その正常な生産と機能を発揮させるために必須であるヘム修飾系や細胞外分泌についての本格的な研究がなされた例がない。これまでの国内外の研究にはランダム変異による鉄還元能力に関わる因子の探索例があるものの、変異ライブラリーの規模(ゲノム 3.7 Mbp に対して 8000 クローン)を考慮しても網羅的とは言えず、さらに、鉄還元に関わると思われた遺伝子の多くがトランスポーターやシグナル伝達に関わる遺伝子であり、直接的に鉄還元と関連する遺伝子以外のものが大半を占めていたため、細胞外電子伝達に関わる他の遺伝子探索の余地は十分に残されていた。本研究では、別のアプローチとして、これまでの知見からより明確にその重要性が示されているヘム修飾系と分泌系を解析することで、鉄還元菌の細胞外電子伝達に関する分子基盤を明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

*G. sulfurreducens* ゲノム中に存在する型分泌システム関連遺伝子群、*pul* 遺伝子群と *gsp* 遺伝子群の中からマルチヘム *c* 型シトクロムの細胞外分泌に必須な遺伝子を同定する。また、*G. sulfurreducens* ゲノム中に存在するヘム *c* とペプチド鎖の結合反応を触媒するヘムリアーゼ遺伝子のうち、細

胞外電子伝達に特に重要なマルチヘム *c* 型シトクロムタンパク質 (OmcB、OmcS、OmcZ など) のヘム修飾を担っている遺伝子を同定する。

#### 4. 研究成果

鉄還元菌・発電菌として代表的な *G. sulfurreducens* の標準株である PCA 株は鉄還元菌による細胞外電子伝達のモデル生物として研究が行われてきた。細胞外電子伝達に必要である *c* 型シトクロムはペリプラズムで *c* 型ヘムが付与され、特定の *c* 型シトクロムは細胞外へ分泌されることが知られている。シトクロムの細胞外分泌に関わることが明らかになっている *c* 型分泌系について、*pul* 遺伝子群を構成する遺伝子破壊株について、生産されるシトクロムタンパク質を調べたところ、微生物燃料電池で必須な OmcZ が正常に生産されていなかった。すなわち、ペリプラズムでその多数が水溶性の高い 50 kDa のシトクロム OmcZ<sub>L</sub> として存在するが、その後、プロテアーゼによる切断を受けて 30 kDa の水溶性の低い OmcZ<sub>S</sub> になる。本研究により、

*c* 型分泌系の破壊によって、OmcZ<sub>S</sub> の生産が阻害されたことから、OmcZ<sub>L</sub> の切断は分泌後の細胞外で行われる可能性が示唆された。シトクロムタンパク質のヘム修飾は、大腸菌などではペリプラズムで行われることが知られている。PCA 株の全ゲノムデータの解析により、ヘム *c* とペプチド鎖の結合反応を触媒するヘムリアーゼ遺伝子 (*ccmF/ccyK/ccsA*) ホモログが 6 個存在することが明らかとなっている。過去に行われた最終電子受容体をフマル酸、あるいは電極とした場合のトランスクリプトーム解析の結果からこれらヘムリアーゼ遺伝子のうち 2 つは、電極を電子受容体とした場合に発現が低下することが報告されていた。そのため、それ以外の GSU0705、GSU2880、

GSU2890、GSU3316 の遺伝子について、破壊株の作製を試み、遺伝子破壊を行うために必要な DNA 断片 (それぞれの遺伝子の両末端の配列と周辺配列を含む遺伝子断片がカナマイシン耐性遺伝子カセットを挟むよう配置されている) を作成した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

(査読あり) Okamoto, A., Saito, K., Inoue, K., Nealon, K., Hashimoto, K., Nakamura, R. Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species, *Energy Environ. Sci.*, 7:1357-1361, 2014

[学会発表](計 3 件)

1. 井上謙吾, 河野好裕, 小椋義俊, 林哲也「ゲノム解析による微生物燃料電池での高い発電に関わる遺伝子の探索」日本農芸化学会, 2016 年 3 月 28 日, 札幌
2. 井上謙吾, 河野好裕, 小椋義俊, 林哲也「*Geobacter sulfurreducens* の比較ゲノム解析による高い発電能力に必要な遺伝子の探索」極限環境生物学会 2015 年 11 月 8 日, 東京
3. 井上謙吾, 徳石崇宏, 河野好裕, 榊原陽一, 水光正仁, 「微生物燃料電池の発電に関わる遺伝子に関する研究」蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2014 年 9 月 11 日, 福岡

[図書](計 3 件)

1. 井上謙吾「家畜糞尿を活用した微生物燃料電池の開発」p.43-46, 2015 年 12 月, 『化学経済, 2015.12』, 化学工業日

報社

2. 井上謙吾「微生物燃料電池による有機性廃棄物の処理と発電」p.38-42, 2015年1月, 『再生と利用, vol.146』, 日本下水道協会
3. 井上謙吾「微生物燃料電池を用いた未利用バイオマスの燃料化」p.56-59, 2014年9月, 『ケミカルエンジニアリング, vol.59』, 化学工業社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/kinoue/top>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 謙吾 (INOUE, Kengo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 70581304

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし