

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21297

研究課題名（和文）電気をを用いた遺伝子発現制御：電気微生物の電気刺激応答システムの解明とその応用

研究課題名（英文）Regulation of gene expression using electricity: Lesson from electro-active microorganisms

研究代表者

石井 俊一（Ishii, Shun'ichi）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門（超先鋭研究プログラム）・副主任研究員

研究者番号：10556913

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、電気を利用して遺伝子発現制御を行う方法の可能性を探索するため、アノードバイオフィルムに生息する発電性のジオバクター属細菌の電位認識に関わる遺伝子群を有効利用する事を目指した。

23種のジオバクター属細菌の比較ゲノムにより、電位認識に関連するマルチヘムシトクロームC、および1ヘムを有する二成分制御系のセンサータンパク質が、この属に普遍的に存在している事が分かった。モデルジオバクター属微生物において、これらのシトクロームC遺伝子の欠損株の作成に成功し、これらの変異株は、鉄還元活性が変化する事が分かった。これらの成果は、電気をを用いた遺伝子発現制御法の開発につなげる事が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「電気」を利用する方法の可能性を探索する。バイオプロセスを用いた物質生産では、遺伝子の発現制御が重要であり、光、温度、電気などの物理刺激を用いて代謝経路のオン-オフを精密に制御するシステムの開発が待たれている。本研究では、化学物質を添加する遺伝子発現誘導方法に代わる新たな遺伝子発現の制御法として「電気」を利用する方法の可能性を探索した。その結果、ジオバクター属細菌に、電子授受を担うタンパク質であるシトクロームCが、転写制御因子内に多数含まれると共にこの属に保存的である事が示された。これらの遺伝子群は、電気をを用いた遺伝子発現制御法の開発に利活用可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）： This study aimed to explore the possibility of using electricity to regulate gene expression more effectively. We used the genes involved in potential recognition of redox potentials in the electrogenic bacteria, *Geobacter* sp. within anodic biofilm.

Comparative genomics of 23 *Geobacter* species revealed that several multi-heme c-type cytochromes were universally present in this genus, while sensor proteins with one heme binding domain in a two-component regulatory system were also conserved, which could associate with the recognition of redox potentials. We have succeeded in generating strains deficient in two c-type cytochromes and one b-type cytochrome genes in the model strain of genus *Geobacter*, and found that these mutant strains have altered iron-reducing activity. These results are expected to lead to the development of gene expression control methods using electricity in the future.

研究分野：生物プロセス工学

キーワード：電気微生物 シトクロームC ジョバクター属細菌 比較ゲノミクス 転写制御因子

1. 研究開始当初の背景

近年、合成生物技術の急速な進展により、人工的に代謝プロセスを設計し、細胞が持つ物質生産能力を最大限に引き出す「人工細胞」の構築が推し進められている。この人工細胞を用いたバイオプロセスでは通常、生命の持つ複雑な代謝機能を模してプロセス設計される事から、各種生体触媒（酵素）を多段で使用する必要がある。その際には、酵素をコードする遺伝子の発現制御が重要となるが、現在使用される化学物質を添加する誘導方法では、スイッチをオンにする事は容易だが、オフにする事ができず、物質生産量を最大化するための多段プロセスを組む事も困難である。この問題を解決するため、光、温度、電気など化学物質によらない物理刺激を用いて、代謝経路のオン-オフを精密に制御するシステムの開発が待たれている（図1）。

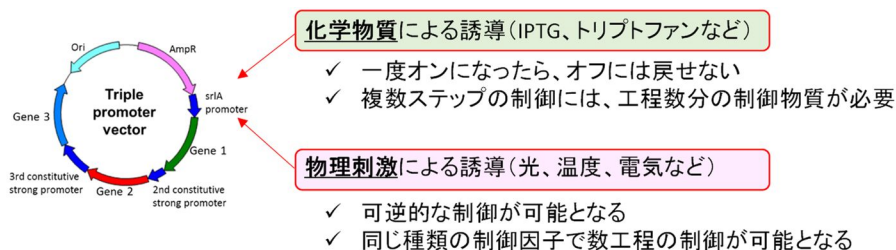


図 1. 外部刺激による遺伝子発現制御システムの特徴

物理刺激での代謝経路のオン-オフスイッチの候補である「温度」「光」「電気」のうち、最近、藻類由来の光感受性タンパク質 CcaS/CcaR を、物質生産能を持つ大腸菌に導入し、光を用いた代謝経路のオン-オフスイッチが可能となる事が報告され(Tander et al. 2019. Metabolic Engineer 55:68)、光による繰り返し制御による代謝の流れの最適化が期待されている。しかしながら、光は培養液中で減衰する上、光感受性タンパクの認識波長の限界から、より高精度な制御プロセスを行うための多段スイッチに用いるのは困難であると考えられる。

一方、電気微生物は、地球上のありとあらゆる酸化還元電位に適応して生存している事から、その電位の認識レンジは広く、多様な制御システムを有していると考えられる。また、電極近傍に微生物を固定するか、バイオリクター中の培養液に電子授受反応を媒介する電子メディエータを添加する事により反応系中の微生物すべてに同等の電気刺激を加える事が可能となる事から、「電気」は、非常に優れた遺伝子発現制御方法になる事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究課題では、外部からの物理刺激のうち、『電気』を用いた遺伝子発現制御システムに着目する。電気化学装置を用いる事により、反応系中の電位を簡便、精確、かつ瞬間的に制御する事が出来る事から、『電気』はプロセス制御に適した環境因子である。近年、電極と直接電子授受を行う事ができるという特徴を持つ『電気微生物』が、鉱物で充填された地下環境から見出されてきた。電気微生物は、廃水を分解しながら発電するバイオプロセス（微生物燃料電池）や、電気エネルギーを用いた CO₂ 固定・物質生産プロセス（微生物電気合成）に利用されており、主に電極上でバイオフィームを形成する事が分かっている。

最近、電極上で生育する様々な電気微生物が、外部の電気化学信号を感受して、大きく遺伝子発現プロファイルを変化させる事が、研究代表者の研究(Ishii et al 2013. Nat Commun 4:1601)などから分かってきた。特に、環境中に広範に存在するジオバクター属細菌には、電位の変化に対して 45 分で 3 倍、2 時間で 10 倍以上もの遺伝子発現量を変化させる遺伝子群が確認されており(Ishii et al. 2018. ISMEJ 12: 2844)、そこには電子授受反応に関わるシクローム C と転写制御に関わると推定されるタンパク質が多数含まれていた（図2）。この結果は、電極電位の変化を認識して作動する遺伝子発現制御システムが存在する事を示唆しており、それを活用すれば、『電気』を用いた代謝制御システムを創成する事が可能である。そこで本研究課題では、電気微生物のもつ電気化学信号を感受する仕組みを利用し、電極の電位制御を用いた簡易で精確、かつ可逆的な遺伝子発現制御システムの開発を目指し、これらの遺伝子群の解析を行った。

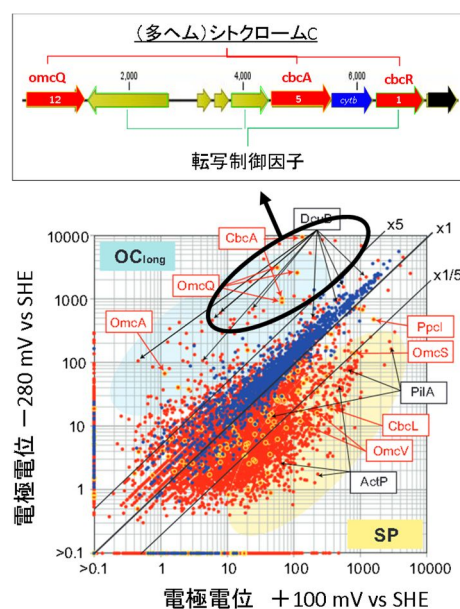


図 2. ジョバクター属細菌の電極電位に対する遺伝子発現変化と遺伝子発現量を大きく変動させた遺伝子群(上枠内)

3. 研究の方法

本挑戦研究では、1) シトクローム C に着目したジオバクター属細菌の比較ゲノム解析を行い、電位認識に関わると考えられる遺伝子群の重要性を解明し、2) モデルジオバクター属細菌である *Geobacter sulfurreducens* PCA 株を用いて、対象のシトクローム C 遺伝子群の欠損株を作成後、欠損株の電子授受活性の変化を解析すると共に、3) 物質転換を行うバイオプロセスに使用可能なモデル電気微生物のシュワネラ菌 (*Shewanella oneidensis* MR-1 株) に、対象のシトクローム C 遺伝子群を代導入し、電位制御による遺伝子発現制御に挑戦する。

(1) 発電性ジオバクター属細菌の比較ゲノム解析

GenBank などの公共のデータベースに登録されている 20 種のジオバクター属細菌のゲノム情報に、新たに電気化学リアクターの電極上に見出された 3 種のジオバクター属細菌 (H1geo, H2geo, L1geo) のゲノム情報を加え、ジオバクター属微生物の持つ遺伝子群を網羅的に比較した。KBase プラットフォーム上で OrthoMCL を用いた比較ゲノム解析を行い、オルソログ (種分岐によって共通の祖先遺伝子から生じた相同遺伝子) 解析する事により、この属に普遍的に存在する遺伝子群を同定した。特に電子授受に関わるシトクローム C に着目し、図 2 に示された電位認識に関わると考えられる遺伝子群が、どの程度ジオバクター属細菌に普遍的に存在しているのかを調べた。

(2) 発電性ジオバクター属細菌の電位認識に関わるシトクローム C 遺伝子の破壊株の作成

図 2 に示された電気刺激に強く発現応答する遺伝子クラスターには、3 つの電子授受タンパク質 (OmcQ, CbcA, CytB) からなる導電素子が含まれている。そこで、モデル電気微生物である *Geobacter sulfurreducens* PCA 株を用いて、これらの各遺伝子の破壊株を作成した。遺伝子の破壊は、ギブソンアッセムブリーを使ったカナマイシン耐性遺伝子の導入により行った。その後、各変異株の電子授受特性の変化を解析した。

(3) シュワネラ菌への電位認識遺伝子群の形質転換試験

図 2 に示された電気刺激に強く発現応答する 3 つの電子授受タンパク質と、このタンパク質クラスターの下流に連続してコードされるヘム鉄を一個有する転写制御因子を合わせ、4 つの遺伝子を連続的に配位したベクターを、より汎用性の高いモデル電気微生物であるシュワネラ菌に導入した。これらの遺伝子カセットをシュワネラ菌で発現させるため、コドン頻度を大腸菌 (シュワネラ菌と同じガンマプロテオバクテリア綱) に人為的に合わせた配列を作成し、化学的に合成した。その後、作成されたベクターをシュワネラ菌に遺伝子導入した。

4. 研究成果

(1) 発電性ジオバクター属細菌の比較ゲノミクスによるシトクローム C 解析

2021 年の時点で公共のゲノムデータベース (GenBank) に高品質ゲノムとして登録されていた 20 個のジオバクター属細菌のゲノムと、ショ糖からの発電微生物群集のメタゲノムから抽出した 3 個の Metagenome-assembled genomes (MAGs) の比較ゲノム解析を行ったところ、1181 個のオルソログが、コア遺伝子 (全 23 ゲノム中、22 個以上のゲノムがコードしている) として同定

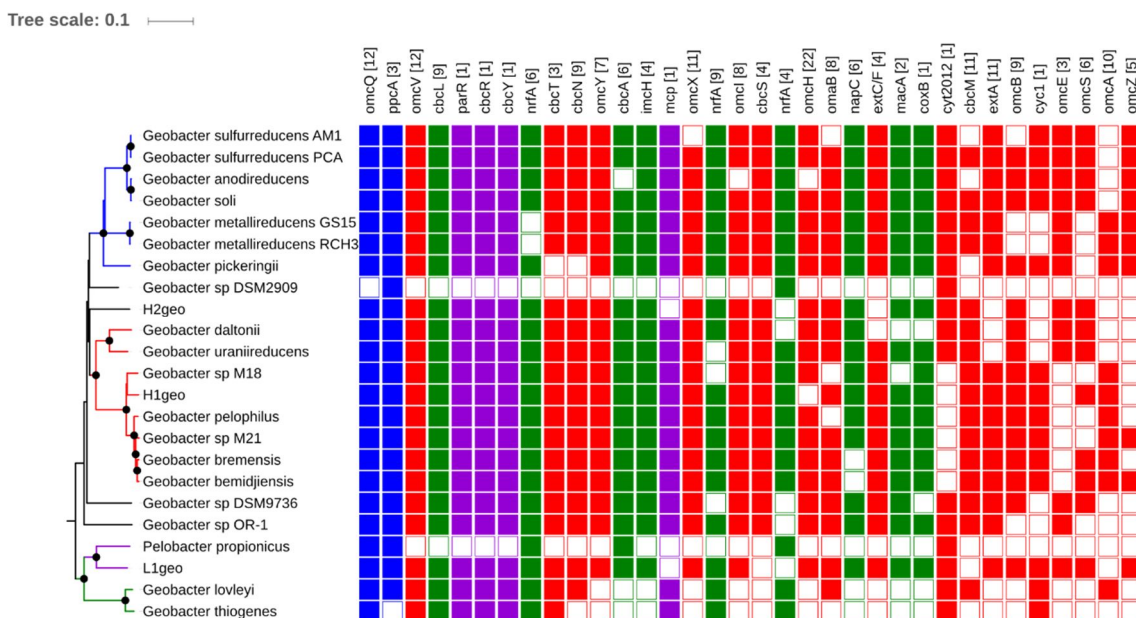


図 3. ジオバクター属細菌の比較ゲノム解析により見出された高頻度に存在しているシトクローム C 遺伝子。分類にはゲノム系統樹を使用し、ゲノム中に遺伝子がコードされているものを示した (青は属のコア遺伝子、赤は外膜局在性シトクローム C、緑は内膜局在性シトクローム C、紫は転写制御因子)。遺伝子名の後に平均ヘム数を示した。

された。その中には、二個のマルチヘムシトクローム C が含まれており、ペリプラズムに局在するシトクローム C3 の PpcA と、外膜に局在する 12 ヘムのシトクローム C である OmcQ であった (図 3)。これらのシトクローム C は、この属に保存的に存在しており、ジオバクター属細菌の代謝戦略において重要な機能を果たしていると考えられた。

続いて、電子授受反応において重要な機能を果たす事が知られているシトクローム C に着目した解析を行った (図 3)。その結果、上記の二種のマルチヘムシトクローム C 以外にも様々なシトクローム C が保存的である事が示された。電子授受活性が限定的と考えられる *Pelobacter propionicus* では、様々な保存的シトクローム C を欠落している一方で、モデル発電菌である *Geobacter sulfurreducens* における菌体外電子授受プロセスの必須タンパク群 (OmcS、OmcZ、OmcAB) は、この属のゲノムに保存的では無い事が分かった。面白い事にジオバクター属細菌で保存的なシトクローム C には、遺伝子発現の制御因子が多く存在していた。これらの制御因子は二成分制御系のセンサータンパク質が多く、微生物の内膜上に存在して酸化還元電位を認識し、ヘム鉄への電子授受により転写を制御するタイプの制御因子である事が強く示唆された。また、図 2 で示された酸化還元状態を認識して遺伝子発現が強く変化した遺伝子クラスター中に見られるシトクローム C は、全て *Geobacter* 属に保存的である事が分かった。これは、これらの電位を認識して発現量を変化するための制御因子および実際に発現量を変化させるシトクローム C が、ジオバクター属細菌の生育にとって重要な意味をもっている事を強く示唆している。

(2) *Geobacter sulfurreducens* PCA 株の omcQ、cbcA、cytB 遺伝子破壊株の作製

Geobacter sulfurreducens PCA 株 (標準株) からゲノムを抽出し、omcQ、cbcA、cytB 遺伝子それぞれの上流、下流領域 600 bp の DNA 断片を PCA によって調製した。ただし、上流側は 3' 末端、下流側は 5' 末端に 20 bp のジョイント配列 (上流側をジョイント配列 1、下流側をジョイント配列 2) を付加する形で作製した。続いて、カナマイシン耐性遺伝子 (広宿主域ベクター pBBR1-MCS2 由来) およびそのプロモーターを含む DNA 断片を調製した。このとき、上流側にジョイント配列 1、下流側にジョイント配列 2 を付加した。上流側、カナマイシン耐性遺伝子+プロモーター、下流側の 3 断片をギブソンアッセムブリーによって結合することで、omcQ、cbcA、cytB 遺伝子それぞれの破壊株用 DNA 断片を作製した。

各破壊株用 DNA 断片はエレクトロポレーション法によって PCA 株に導入し、カナマイシンを含む NBAF 培地 (酢酸-フマル酸培地) にて嫌氣的に培養した。現れたコロニーについて、PCA によるインサートチェックを行った。omcQ については、NBAF 培地で培養した菌体の全タンパク質について SDS-PAGE を行い、PCA 株と比較したところ、CBB 染色では大きな違いは見いだせなかったが、ヘム蛋白質を特異的に染色するヘム染色を行ったところ、バンド強度の異なるタンパク質が見出された。今後、このタンパク質について、SDS-PAGE から切り出し、MALDI-TOF/MS によって分子量を決定することによって由来遺伝子を決定していく予定である。

続いて、これらの微生物の培養試験による比較を行った (図 4)。その結果、標準的な培養条件である酢酸を電子供与体、フマル酸を電子受容体とした培養では、培養初期の微生物凝集体の形成に差異が見られたものの、最終的には同様に増殖する事が分かった。同じく酢酸を電子受容体として可溶鉄 (ピロリン酸鉄 (III)) を電子受容体とした培養では、鉄還元反応の立ち上がりから様子の変化が見られ、最終的な反応産物も異なる様相であった。この結果より、今回欠落さ

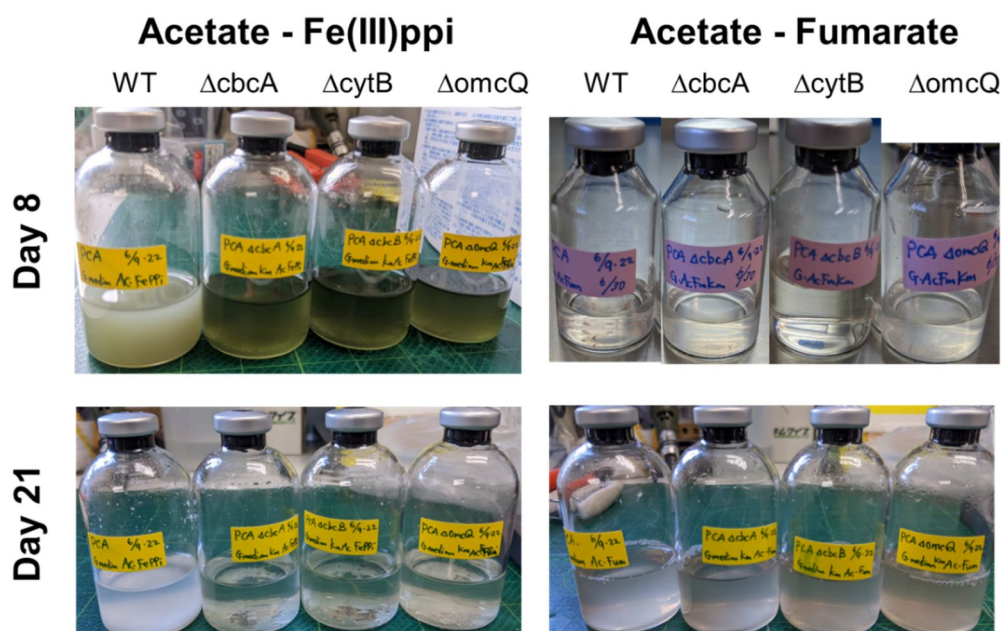


図 4. ジオバクター属標準株と omcQ、cytB、cbcA の欠落株のボトル培養試験。
左) 酢酸 10mM とピロリン酸鉄 (III) 50mM、右) 酢酸 10mM とフマル酸 40mM、それぞれ接種後 8 日目と 21 日目の様子を観察した。

せた3個のタンパク質は、PCA株の鉄還元活性に何らかの機能を果たしていたと考えられた。今後は、固体鉄を用いた培養試験や電気化学リアクターを用いた電位制御培養試験を行っていく必要がある。

(3) シュワネラ菌への cbcA-cytB-omcQ-cbcY の形質転換試験

続いて、これらの電位認識に関わると推定される遺伝子クラスターを異種発現するため、発現ベクターを作成した。配列は、電気化学リアクター中から同定した L1geo の4遺伝子の遺伝子クラスター (cbcA-cytB-omcQ-cbcY) をゲノム中でのコード順に並べ、アミノ酸配列を保持しつつ、各コドンのヌクレオチド配列を大腸菌のコドン頻度に合わせた。コドン頻度を修正した配列は、長鎖ヌクレオチドの化学合成法により作成し、大腸菌およびもう一個のモデル電気微生物であるシュワネラ菌へも導入可能な pUC57-km ベクターに挿入した (図5)。

これらの遺伝子群の導入により、電子授受活性や電位認識能力に変化が起こるかどうかを調べるために、シュワネラ菌への導入を試みた。微生物株は、もう一個のモデル電気微生物である *Shewanella oneidensis* MR-1 株を用いた。遺伝子導入を行った変異株は、野生株よりも増殖が遅くなる事から、4個のタンパク質を大量に発現させるのは微生物に対する負荷が大きすぎる事が示唆された。そこで、発現量を制御可能なプロモーターに付け替えた変異株の作成を検討中である。

本研究項目に関しては、コロナ禍による様々な研究制限により、予定された転写制御因子を用いた解析まで進展できなかったが、遺伝子の導入までは完了しており、今後解析を進めていく予定である。

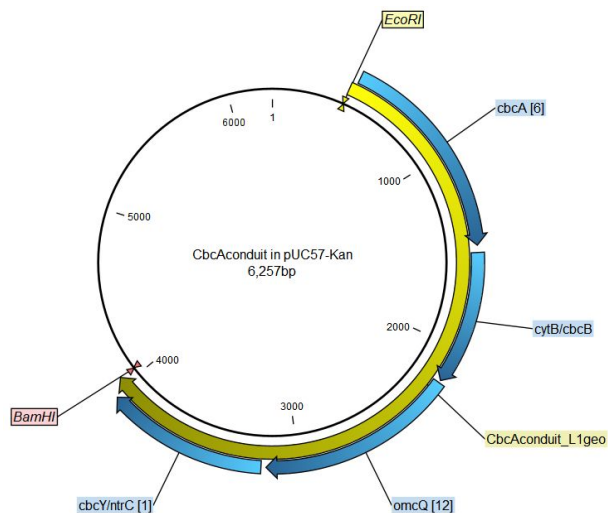


図5. omcQ, cytB, cbcA, cbcY の導入のために作成した発現ベクター

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井俊一
2. 発表標題 固体から電子を抜き取る電気合成微生物群集を用いた電気メタン生成
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会 自由集会 1 : 電気合成微生物の生理・生態と産業利用の可能性（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井俊一
2. 発表標題 地下圏における電気微生物の探索と電気メタン発酵
3. 学会等名 農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	井上 謙吾 (Kengo Inoue) (70581304)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

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
---------	---------