

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880030

研究課題名(和文) 遺伝子工学及び電気化学的手法による微生物代謝制御のための基盤研究

研究課題名(英文) Regulation of bacterial metabolism by genetic engineering and electrochemical approaches

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) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子工学手法と電気化学的手法を組み合わせることによって微生物の代謝活性を制御し、有用物質生産プロセスへと応用するための技術基盤の構築を行った。電極への電子伝達が可能な細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 株を遺伝子改変することによって糖代謝能を付与し、電極電位を制御可能な電気化学リアクター内にて培養を行った結果、電極電位の変化によって遺伝子発現および糖代謝産物に差異が生じることが明らかとなった。また電極への電子伝達に關与する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活性化に必要な制御因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a method for controlling bacterial metabolism and for producing useful chemicals by a combination of genetic engineering and electrochemical approaches. An engineered strain of *Shewanella oneidensis* MR-1 with the ability to utilize glucose was constructed and cultivated in electrochemical cells with different electrode potentials. The analysis of transcripts and metabolites revealed the alteration of gene expression and metabolite profiles in response to the change of electrode potentials. We also investigated the regulatory mechanisms for the genes involved in electron transfer to electrodes and identified a transcriptional activator for these genes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：微生物電気化学 遺伝子発現 細胞外電子伝達

1. 研究開始当初の背景

近年の環境問題の深刻化に伴い、化石燃料に依存しないエネルギー・物質生産システムの確立が急務となっている。我々の研究グループでは環境調和型のエネルギー生産システムとして微生物燃料電池 (microbial fuel cell; 以下 MFC) に着目し、これまで研究を行ってきた。MFC は鉄還元菌等の微生物が嫌気条件下において有機物を分解して呼吸を行う際に、細胞外の導電性固体 (電極) を最終電子受容体として使用できるという性質 (細胞外電子伝達) を利用している。MFC にはバイオマスからエネルギーを直接電力として回収できるという利点があり、省エネルギー・エネルギー回収型の废水处理装置などへの応用を目指した研究が多数報告されている。

また、微生物と電極との電子伝達を利用して物質生産を促進するシステム (microbial electrosynthesis system; 以下 MES) も新しいバイオプロセスとして注目を集めている。従来の微生物プロセス (発酵法) では細胞内の物質変換反応に必要な還元力 (NADH 等) の過不足により生産収率が制限されてしまうことが課題となるが、MES では細胞内の酸化還元バランスを電極との電子授受によって制御することができるため、従来法を上回る収率での物質生産が可能になると考えられる。しかし MES によって産業上有用な化合物の大量生産を達成した例は報告されていない。MES では電極との間で電子伝達が可能であり、かつ有用物質生産能力を有する菌株を使用する必要があるが、そのような能力を生来的に有する微生物は見つかっておらず、実用可能なプロセスの構築に至っていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では実用的な MES プロセスの構築に向け、微生物の代謝活性を遺伝子工学的、さらに電気化学的手法を用いて制御するための技術的基盤を確立することを目的とした。具体的には電気化学制御 (電極との電子授受) が可能であり、遺伝子操作による代謝経路の改変が容易な菌株として *Shewanella oneidensis* MR-1 株に着目し、本株をベースとして分子生物学的知見にもとづく遺伝子改変と、電極電位の制御やリアクター形状の改良などの電気化学・工学的技術を組み合わせることによって、MES プロセスの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) MR-1 株へのグルコース資化能力の付与  
有用生産の基質としてはコスト面からグルコースが最も望ましいと考えられるが、MR-1 株はグルコースを資化することができず、生育基質として主に乳酸を使用する。ゲ

ノム配列情報、および解糖系におけるグルコース 6-リン酸以降の代謝活性を有していることから、MR-1 株がグルコースを資化できない理由はグルコースのトランスポーター (GalP) とリン酸化酵素 (Glc) をコードする遺伝子を欠損しているためであると推定された。そこで本研究では大腸菌由来の *galP* および *glk* 遺伝子を含むプラスミドを作製し、MR-1 株の形質転換を行うことによって本株へのグルコース資化能力の付与を試みた。

(2) 酢酸合成遺伝子の破壊

MR-1 株を物質生産のベース菌株として使用する際に最も障害となると考えられたのが、代謝産物として酢酸を蓄積しやすいという性質であった。そこで本研究では酢酸生成を抑制するため、MR-1 株 (グルコース資化変異株) の酢酸合成に関与する遺伝子の破壊を行った。ゲノム情報から MR-1 株には 2 種類の酢酸合成遺伝子 (*pta* 及び *acs*) が存在することが推定されたため、本研究ではこれらの遺伝子の一重および二重遺伝子破壊株を相同性組換えによって破壊した。作製した遺伝子破壊株をグルコース最少培地に植菌後、好気およびフマル酸呼吸条件下で培養し、各条件での生育能を評価した。

(3) 細胞外電子伝達系遺伝子の発現制御機構の解析

電気化学制御を効率的に行うためには、電極との電子伝達に必要な細胞外電子伝達系 (Mtr pathway; 図 1) が常に高発現していることが望ましい。しかし MR-1 株の Mtr pathway を構成する遺伝子 (*mtr* 遺伝子群; 図 2) の発現制御機構には未解明な点が多い。*mtr* 遺伝子群はクラスターを形成しているが、単一のオペロンを形成しているかどうかは不明であった。また転写開始点も不明であり、プロモーター領域や転写制御因子も同定されていなかった。そこで本研究では *mtr* 遺伝子群を高発現させるための足がかりを得ることを目的として、*mtr* 遺伝子のオペロン構造および転写制御に関するプロモーター領域について RT-PCR、*lacZ* レポーターアッセイ等の手法を用いて解析した。

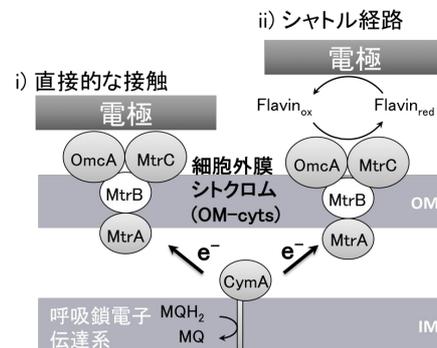


図1. *Shewanella oneidensis* MR-1の細胞外電子伝達経路 (Mtr経路)  
i) 細胞外膜シトクロム (OmcA, MtrC) との直接的な接触、もしくは ii) 電子伝達シャトル物質 (フラビン) を介した間接的な経路を介して電極に電子が伝達される。MQ: 酸化型メナキノン, MQH<sub>2</sub>: 還元型メナキノン

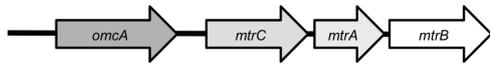


図2. 細胞外電子伝達タンパク質をコードする*mtr*遺伝子群

(4) 電気化学制御を行うリアクターの構築

電極電位の制御が可能な 3 電極系の 2 槽式電気化学セルを設計した(図 3)。作用極にはグラファイトフェルト(約 8 cm<sup>2</sup>)、対極にはプラチナ線、参照電極には銀塩化銀電極 (Ag/AgCl) を使用し、ポテンショスタットを用いて作用極の電位制御 (-0.6 V ~ +0.4 V vs Ag/AgCl) を行った。



作用極: グラファイトフェルト(8 cm<sup>2</sup>)  
対極: 白金線(10 cm)  
参照電極: 銀塩化銀電極 (Ag/AgCl)  
プロトン交換膜: nafion  
培地: グルコース最少培地 (150 ml)

図3. 本研究で使用した3電極系2槽式電気化学リアクター

(5) 電位制御培養による代謝産物の解析

グルコース資化能を付与した MR-1 変異株を、グルコース最少培地を添加した電気化学リアクターにおいて電位制御を行いながら培養した。異なる電極電位で培養後、培養上清に含まれる代謝産物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および酵素法 (F-kit) により定量した。

電極電位が MR-1 株の遺伝子発現に与える影響を解析するため、電位制御培養後の菌体をグラファイトフェルト(作用極)から回収し、RNA を抽出した。本研究では D/L-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*dld*, *lld*) の発現変動に着目し、これらの発現量を定量的 RT-PCR によって解析した。

4. 研究成果

(1) MR-1 株へのグルコース資化能力の付与  
*glk* および *galP* 遺伝子を導入した MR-1 変異株をグルコース最少培地に植菌し、好気条件下およびフマル酸を電子受容体として添加した嫌気呼吸条件下において培養した。その結果、両条件下ともに変異株の生育が確認され、これらの遺伝子の導入によりグルコース資化能が付与されることが明らかとなった。しかし本変異株は電子受容体を含まない発酵条件下においては増殖しなかった。その理由として、*glk* と *galP* の導入によって形成される解糖系は Entner- Doudoroff 経路 (ED 経路) であり、発酵細菌によく見られる解糖経路 (Embden-Meyerhof 経路; EM 経路) と比較して、グルコースの発酵分解に伴って生成する ATP 量が少ない(グルコース 1 分子につき ED 経路では 1 分子、EM 経路では 2 分子の ATP が生成する)ためであると考えられた。

(2) 酢酸合成遺伝子の破壊

ゲノム情報から推定された 2 つの酢酸合成遺伝子 (*pta*, *acs*) について、それぞれの遺

伝子の破壊株 ( $\Delta pta$ ,  $\Delta acs$ ) および *pta/acs* 二重遺伝子破壊株 ( $\Delta pta/acs$ ) を作製し、好気およびフマル酸呼吸条件下における生育能を調べた。その結果、 $\Delta acs$  の生育速度は両条件下とも野生株と有意な差がなかったが、 $\Delta pta$  および  $\Delta pta/acs$  はフマル酸呼吸条件下において生育せず、嫌気条件下での生育に *pta* 遺伝子が必須であることが明らかとなった。このことから、MR-1 株が嫌気的環境でグルコースを基質として生育するためには、酢酸生成に伴って生成する ATP が必要であることが示唆された。(1) の結果と合わせると、MES において MR-1 株に物質変換反応を行わせるためには、ATP の供給が課題となると考えられた。

(3) 細胞外電子伝達系遺伝子の発現制御機構の解析

*mtr* 遺伝子群 (*omcA*, *mtrC*, *mtrA*, *mtrB*) の転写開始点をプライマー伸長法および 5'-RACE PCR 法により解析した結果、*omcA* 上流と *mtrC* 上流に転写開始点が存在することが明らかとなった。*mtrA* と *mtrB* の上流には転写開始点が見出されず、また RT-PCR 解析によって *mtrC* から *mtrA* までを含む転写単位の存在が確認されたことから、これら 3 遺伝子はオペロンとして転写されることが示された。

また *omcA* と *mtrC* の発現量を定量的 RT-PCR により解析した結果、*omcA* の発現量は嫌気条件下において増加したが、*mtrC* の発現量は逆に好気条件下において増加しており、両遺伝子の発現パターンには明確な違いが存在することが明らかとなった。

そこで *omcA* と *mtrC* の転写制御に關与する配列について、*lacZ* レポーター遺伝子を使用した 5'-デリーション解析によって詳細に解析した。その結果、両遺伝子の転写活性化に必要な領域が同定されるとともに、*omcA* の転写活性化領域の上流には好気条件下において *omcA* の転写を抑制するための配列が存在することが明らかとなった。

また *omcA* の転写活性化領域には cAMP receptor protein (CRP) の結合モチーフ配列が見出されたため、CRP がこの領域に結合し、*omcA* の転写を活性化していると予想された。そこで *crp* 遺伝子の欠損変異株 ( $\Delta crp$ ) を作製し、本変異株における *omcA* および *mtrC* の発現量を *lacZ* レポーターアッセイにより評価した。その結果、*omcA*, *mtrC* ともに発現量が著しく低下したため、両遺伝子とも CRP による転写活性化を受けていることが明らかとなった。さらに *omcA*, *mtrC* 上流配列と CRP との相互作用をゲルシフトアッセイによって解析した結果、これらの上流配列と CRP との結合が確認された。

以上の結果より、*omcA*, *mtrC* とも CRP により直接的に転写活性化されることが明らかとなった。また *omcA* の上流には未知の転写抑制因子が結合し、それにより好気条件下

において *omcA* の発現が抑制されていることが推定された(図4)。以上の知見は *omcA*, *mtrC* の発現を活性化し,電極との電子伝達を促進させる手法を確立するうえで,重要な足がかりになると考えられる。

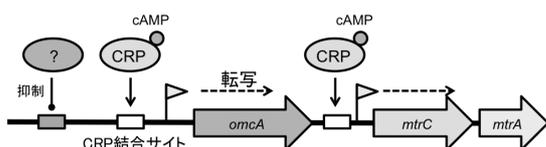


図4. 推定された*mtr*遺伝子群の転写制御機構

#### (4) 電位制御培養による代謝産物の解析

当初の計画では電極電位を菌体よりも負に設定することで菌体に電子を注入し,還元力を供給することによって物質変換反応を促進させることも予定していたが,(1)の結果から電極電位を菌体よりも低くした場合,MR-1株は電極を電子受容体として利用できないため生育しないことが判明した。そのため本研究では電極電位を菌体よりも高い範囲で変化させ,電位変化がMR-1株の糖代謝に与える影響を解析した。

0 V及び+0.4 V (vs. Ag/AgCl)に電極電位を設定した電気化学リアクターにおいてMR-1変異株(グルコース資化株)を培養し,培養上清に含まれるグルコース代謝産物をHPLC及び酵素法によって分析した。その結果,いずれの電位においても最終生成物として酢酸が蓄積し,代謝中間体として乳酸が生じることが明らかとなった。しかし0 Vの電位設定ではL-乳酸が検出されたのに対し,+0.4 VではD-乳酸のみが検出され,電極電位によって糖代謝経路が異なることが示唆された。

以上の結果から,電極電位によってD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*dld-II*)とL-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*lldF*)の発現バランスが変化している可能性が考えられたため,電極からRNAを抽出し,定量的RT-PCRにより両遺伝子の発現量を解析した。その結果,*dld-*は高電位条件下で発現量が増加していたのに対し,*lldF*の発現量には電位による変動が見られなかった。以上の結果から,MR-1株の乳酸代謝遺伝子が電極電位によって変動することが明らかとなり,電極電位によってMR-1株の遺伝子発現を制御し,代謝経路を変化させることが可能であることが示唆された。

以上の成果を元に,今後はMR-1株に対しEM経路の遺伝子導入等によりATP供給経路を追加し,電極からの電子注入を行った場合においても物質変換反応が可能なシステムを構築する予定である。

#### 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 0件)

[学会発表](計 11件)

1. 中川元,高妻篤史,渡邊一哉「電流生成条件下における *Shewanella oneidensis* 変異株の糖代謝産物の同定」日本農芸化学会,2014年3月28日,神奈川

2. 笠井拓哉,高妻篤史,渡邊一哉「細胞外電子伝達系シトクロム遺伝子の転写活性化因子の同定」日本農芸化学会,2014年3月28日,神奈川

3. 中川元,高妻篤史,渡邊一哉「*Shewanella oneidensis* MR-1 変異株のグルコース代謝に伴う電流生産と代謝産物の解析」第12回微生物研究会,2013年10月5日,東京

4. 笠井拓哉,高妻篤史,渡邊一哉「*Shewanella oneidensis* の細胞外電子伝達系遺伝子の発現に必要な転写因子の同定」第12回微生物研究会,2013年10月5日,東京

5. 高妻篤史,大場瞳,渡邊一哉「Electrochemical selection and characterization of *Shewanella oneidensis* mutants with enhanced capability for electricity generation」FEMS2013,2013年7月23日,ドイツ,ライプツィヒ

6. 中川元,高妻篤史,渡邊一哉「Electric current and metabolite production from glucose in engineered *Shewanella oneidensis* MR-1」FEMS2013,2013年7月23日,ドイツ,ライプツィヒ

7. 笠井拓哉,高妻篤史,渡邊一哉「Differential transcriptional regulation of outer-membrane cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1」FEMS2013,2013年7月23日,ドイツ,ライプツィヒ

8. 笠井拓哉,高妻篤史,渡邊一哉「細胞外電子伝達に関与する外膜シトクロム遺伝子の発現制御機構の解析」日本農芸化学会,2013年3月26日,仙台

9. 中川元,高妻篤史,渡邊一哉「グルコース資化能を付加した *Shewanella oneidensis* MR-1 変異株の電流生産能力の解析」日本農芸化学会,2013年3月25日,仙台

10. 高妻篤史,大場瞳,但馬望,橋本和仁,渡邊一哉「電気化学集積法による高電流 *Shewanella oneidensis* MR-1 変異株の単離と解析」日本農芸化学会,2013年3月25日,仙台

11. 高妻篤史,笠井拓哉,渡邊一哉「細胞外電子伝達系遺伝子の発現制御機構の解析」第

11 回微生物研究会，2012 年 9 月 22 日，東京

6。研究組織

(1)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