

氏名（本籍）	笠井 拓哉（静岡県）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第105号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	<i>Shewanella oneidensis</i> におけるcAMP/CRP 制御系の役割の解明
論文審査委員	（主査） 渡邊 一哉 教授 山岸 明彦 教授 玉腰 雅忠 准教授

論文内容の要旨

Shewanella oneidensis MR-1 株は通性嫌気性の金属還元細菌であり、酸素や硝酸などの可溶性物質以外にも、細胞外に存在する金属化合物を電子受容体に用いて呼吸を行う。*Shewanella* 属細菌の多様な異化代謝能力は激しい環境変化に適応するために発達してきたと考えられており、MR-1 株は環境微生物の生理機能と生存戦略を解明するためのモデル微生物として世界中で広く研究されている。また MR-1 株は、電極への電子伝達も可能なことから、微生物燃料電池等の微生物電気化学システム (BES) におけるモデル電流生成細菌としても精力的に研究されている (参考文献 1、参考文献 2)。本株を研究する利点としては、全ゲノム情報が利用可能であること、遺伝子組換えが容易であること、通性嫌気性であるため培養が容易であること、などが挙げられる。

Shewanella 属細菌等の金属還元細菌は、湖沼や海洋底泥などの堆積物環境中に生息している。これらの環境では酸化還元状態が頻繁に変化し、これに呼応して利用可能な電子受容体も変化するため、*Shewanella* は多様な呼吸能を獲得したと考えられる。このような細菌がどのように環境中の酸化還元状態や電子受容体の有無を認識し、異化代謝系を制御しているかを解明することは、環境微生物の生態を理解するうえで非常に重要である。しかし大腸菌等の他のモデル菌株と比較して、金属還元細菌の代謝制御機構に関する知識は乏しいのが現状である。

これまでの研究から、MR-1 株が電極等の細胞外電子受容体を利用して呼吸を行う際、主に5つのタンパク質 (CymA, OmcA, MtrA, MtrB, MtrC) から構成される細胞外電子伝達 (EET) 経路を利用することが明

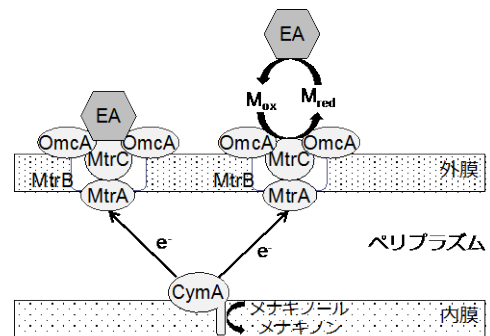


図 1. 細胞外電子伝達経路の模式図。M; 電子メディエーター, EA; 電子受容体。

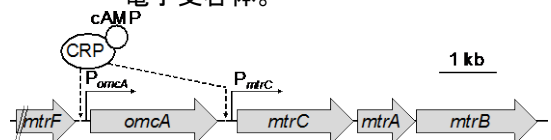


図 2. *mtr* 遺伝子群の構造と転写制御機構のモデル。

らかとなっている（参考文献 1）。この際には、細胞内の異化代謝反応で放出された電子は内膜キノンと CymA を介してペリプラズムへと伝達される。その後、電子は外膜に局在する Mtr タンパク質複合体 (MtrA, MtrB, MtrC, OmcA) を介して、細胞外に存在する電子受容体へと伝達される (図 1)。CymA 以外の EET 経路の構成タンパク質をコードする遺伝子 (*mtr* 遺伝子群) は MR-1 株ゲノム上で同一方向に並び、遺伝子クラスターを構成している (図 2)。これまでに、*mtr* 遺伝子群の発現量は嫌気条件下で上昇し、その発現には cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) と cAMP 合成酵素 (CyaC) が関与する可能性が示唆されている。CRP は多くの細菌に保存されている転写因子であり、補因子である cAMP と複合体を形成することで DNA に結合し、標的遺伝子の発現を制御する。CRP の生理機能は腸内細菌においてよく研究されており、CRP が糖代謝のカタボライト抑制に関与することが知られている。しかし、*Shewanella* 等の環境細菌において cAMP/CRP が嫌気呼吸系の制御に関与する可能性が示唆されているが、その詳細な制御機構やシグナル伝達経路には不明な点が多い。

Shewanella 属細菌のように酸化還元状態が頻繁に変化する環境に生息する細菌は、環境中のエネルギー状態に応答して異化代謝系の発現を制御しており、これには cAMP/CRP 系が重要な役割を果たしていると予想される。また、*Shewanella* の異化代謝系の制御機構を理解することは、BES の高効率化を図る上での重要な知見を提供すると考えられる。そこで本研究では、*Shewanella oneidensis* MR-1 株をモデル菌株とし、cAMP/CRP 系による細菌の異化代謝系の制御機構を解明することを目的とした。

これまでに申請者は細胞外電子伝達系の発現制御機構の解析 (項目 I) および D-乳酸代謝系の発現制御機構の解析 (項目 II) を行い、cAMP/CRP 系による MR-1 株の異化代謝系の制御機構を明らかにしてきた。また、研究の過程で MR-1 株の cAMP 加水分解酵素 (CpdA) がアミノ酸代謝の制御に関与する未知の生理機能を有することを見出した (項目 III)。さらに、本研究で得られた知見を元に MR-1 株を遺伝子改変し、BES における高電流生成株を構築した (項目 IV)。以下に各項目の概要を記す。以上の研究により、金属還元菌や電流生成菌において cAMP/CRP 転写制御系が極めて重要な役割を担うことが示され、これら細菌を工学的に応用する際の基盤情報を提供することができたと考えられる。

I) 細胞外電子伝達系の発現制御機構の解析 (研究業績 1)

EET 経路を構成する主要タンパク質をコードする *mtr* 遺伝子群の転写開始点および転写単位を解析した結果、*omcA* と *mtrC* 上流にそれぞれ転写開始点が存在すること、*mtrC*, *mtrA*, *mtrB* がオペロンとして転写されることが明らかとなった (図 2)。さらに、これらの遺伝子上流のプロモーター活性を LacZ レポーターアッセイにより解析することにより、各遺伝子上流に位置するプロモーター (P_{omcA} および P_{mtrC} : 図 2) を同定した。これらのプロモーターの転写活性化に必要な領域には大腸菌等に保存されている CRP 結合モチーフと類似した配列が含まれていた。そこで、これらの配列と CRP との相互作用をゲルシフトアッセイ (EMSA) によって解析した結果、CRP はこれらの配列に直接結合することが示された。また、 P_{omcA} と P_{mtrC} の転写活性は *crp* の遺伝子欠損株 (Δcrp) において著しく減少した。以上の結果から、*mtr* 遺伝子群の発現は P_{omcA} と P_{mtrC} の上流に

CRP が結合することにより活性化されることが明らかとなった (図 2)。

II) D-乳酸代謝系の発現制御機構の解析 (研究業績 2)

前述の結果から、MR-1 株の細胞外電子伝達系の制御において CRP が中心的な役割を果たしていることが示された。一方、これらの呼吸系に電子を供与する炭素異化代謝系の発現制御機構には不明な点が多い。MR-1 株は炭素源・電子源として乳酸を好んで使用し、乳酸の酸化を触媒する乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) には内膜キノンを経由して細胞外電子伝達系や他の嫌気呼吸系に電子を供給するものが存在する。そこで私は、これら代謝系 (乳酸異化代謝系と嫌気呼吸系) は協調的に制御されているとの仮説をたて、cAMP/CRP による乳酸異化代謝系制御の可能性を検証した。

上記の仮説を検証するため、まず CRP の欠損が乳酸代謝に与える影響を調べた。 Δcrp を DL-乳酸 (D/L 体混合物) を炭素源とした最少培地 (LMM) 中で好氣的に培養した結果、 Δcrp では最終菌体密度が野生株 (WT) の約半分までしか到達しないことを見出した。培養終了後の培地中の乳酸濃度を測定した結果、 Δcrp は D-乳酸をほとんど消費しないことが明らかとなった。この結果から、CRP は D-乳酸異化代謝系の活性化に関与すると考えられた。

MR-1 株のゲノムには Dld と LdhA の 2 種類の D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) がコードされており、Dld は D-乳酸からピルビン酸への酸化反応を触媒する NADH 非依存的 D-LDH、LdhA はピルビン酸から D-乳酸への還元反応を触媒する NADH 依存的 D-LDH として働くと考えられている。そこで、 Δcrp 株の D-乳酸代謝能の欠損は *dld* 遺伝子の発現低下によるものと予想し、 Δcrp において *dld* を相補的に発現させて D-乳酸代謝能が回復されるかを調べた。その結果、*dld* を相補した Δcrp は野生株と同様に D-乳酸を酸化できることが示され、CRP は *dld* の転写活性化因子として働くことが結論付けられた。

MR-1 株のゲノムにおいて、*dld* は乳酸パーミアーゼをコードする *lldP*、L-LDH をコードする *lldEFG* と同一方向に並び、遺伝子クラスターを構成している (図 3A)。この遺伝子クラスターの転写単位と転写開始点を解析した結果、*dld* は *lldP* とオペロンを形成するが、*lldEFG* とは転写単位が異なること、*lldP* 上流に転写開始点が存在することが明らかとなった。また *lldP* 上流のプロモーター (P_{lldP}) の活性を LacZ レポーターアッセイにより解析し、転写活性化に必要な領域を同定した。*lldP* の上流域には CRP 結合モチーフの類似配列が含まれていたため、CRP との相互作用を EMSA によって解析した結果、CRP がこの配列に結合することが示された。以上の結果から、CRP が *lldP*-*dld* オペロンの発現を直接制御していることが示された (図 3A)。

また、もう一つの D-LDH をコードする *ldhA* の上流にも CRP 結合モチーフに類似した配列が見出された。そこで CRP が *ldhA* の発現にも関与するかを調べた結果、 Δcrp において *ldhA* の発現量が低下すること、

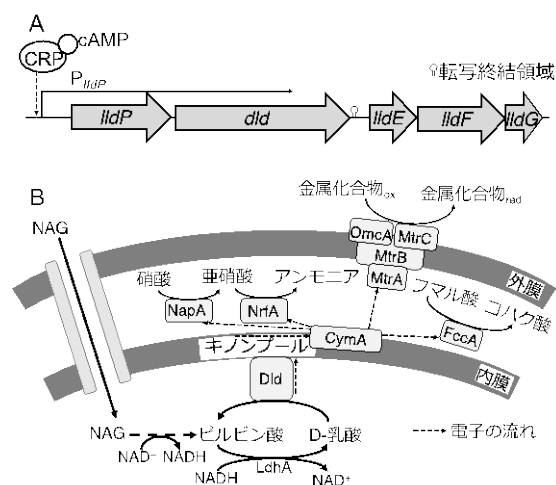


図 3. (A) D-乳酸代謝系の発現制御機構の模式図。

また *ldhA* の上流配列に CRP が結合することが示された。したがって、CRP は *dld* に加えて *ldhA* の転写活性化にも関与し、LdhA と Dld から構成される MR-1 株の D-乳酸代謝系を一括して制御していることが明らかとなった (論文準備中)。

以上、MR-1 株は cAMP/CRP 系を用いて D-乳酸代謝系と嫌気呼吸系を協調的に制御し、嫌気条件下での異化代謝を効率的に行っていると考えられた (図 3B)。

III) CpdA の新規生理機能の発見 (研究業績 3)

MR-1 株のゲノムにコードされる cAMP 加水分解酵素 (CpdA) は、細胞内の cAMP 濃度の調整において重要であることが示唆されている。そこで CpdA が MR-1 株の増殖に及ぼす影響を調べたところ、CpdA 欠損株 ($\Delta cpdA$) は乳酸最少培地で増殖できないことを発見した。 $\Delta cpdA$ では WT よりも細胞内 cAMP 濃度が増加していたが、興味深いことに $\Delta cpdA$ において cAMP 合成酵素を欠損させ、cAMP 濃度を低下させても乳酸最少培地での増殖能が回復しなかった。このことは、この現象が細胞内 cAMP 濃度とは無関係であることを示している。

$\Delta cpdA$ の最少培地における増殖障害の原因を探索するため、本変異株のトランスクリプトーム解析を行った結果、本変異株では多くのアミノ酸合成系遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。そこで、合成酵素遺伝子の発現量が著しく低下していたメチオニン、S-アデノシルメチオニンおよびヒスチジンを最少培地へ添加すると、 $\Delta cpdA$ の増殖は大幅に改善された。以上の結果から、MR-1 株にはアミノ酸合成をグローバルに制御する未知の機構が存在し、CpdA はそれに関与している可能性が示唆された。

IV) 高電流生成株の構築および電流生成能の評価 (論文準備中)

上記の I~III の結果から、MR-1 株において細胞外電子伝達系や乳酸異化代謝系が CRP によって協調的に制御されていることが明らかとなった。CRP は cAMP と結合して標的遺伝子の転写を活性化するため、MR-1 株において cAMP 濃度を向上させれば電流生成に関与する異化代謝系が一括して高発現し、電流生成能力が向上すると予想された。そこでこの仮説を検証するため、cAMP 合成酵素遺伝子 (*cyaC*) の過剰発現プラスミド (pBBR*cyaC*) を MR-1 株に導入し、電気化学リアクターにおける電流生成量を測定した。その結果、pBBR*cyaC* を導入した MR-1 株の最大電流密度はベクターコントロール株の約 2 倍に上昇した (図 4)。この結果は、異化代謝制御系の改変が BES の高効率化において有効なアプローチであることを示している。

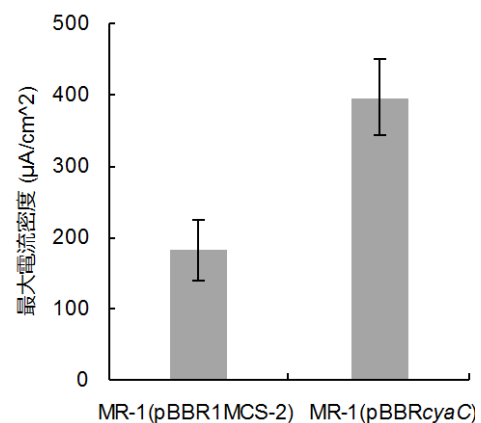


図 4. CyaC 高発現株の電気化学培養における最大電流密度

【学位論文申請に用いる研究業績】

1. Kasai T, Kouzuma A, Nojiri H, Watanabe K. 2015. Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes *omcA* and *mtrC* in *Shewanella oneidensis* MR-1.

BMC Microbiol. **15**:68.

2. Kasai T, Kouzuma A, Watanabe K. 2017. CRP regulates D-lactate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol.* **8**:869.
3. Kasai T, Kouzuma A, Watanabe K. 2018. CpdA is involved in amino acid metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* **82**:166-172.

【参考文献】

1. Kouzuma A, Kasai T, Hirose A, Watanabe K. 2015. Catabolic and regulatory systems in *Shewanella oneidensis* MR-1 involved in electricity generation in microbial fuel cells. *Front. Microbiol.* 6:609.
2. Nakagawa G, Kouzuma A, Hirose A, Kasai T, Yoshida G, Watanabe K. 2015. Metabolic characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. *Plos One* 10:e0138813.

審査結果の要旨

Shewanella oneidensis MR-1 株は通性嫌気性の金属還元細菌であり、環境微生物の生理機能と生存戦略を解明するためのモデルとして広く研究されている。また、電極への電子伝達も可能なことから、微生物電気化学システムにおけるモデル電流生成細菌としても精力的に研究されている。今までに、この細菌の多様な異化代謝系酵素や電子伝達系タンパク質が同定され、それらを基に環境微生物の異化代謝機構やエネルギー獲得機構が理解されてきた。しかし、これら機構がどのように発現制御されているかについての知見は極めて少なかった。そこで本論文の研究では、発電時に重要な細胞外電子伝達系の発現制御機構の解析に取り組み、サイクリック AMP 受容タンパク質 (cAMP receptor protein, CRP) が直接転写活性化をすることを発見した。その後 cAMP/CRP 制御系の役割の解明を進め、この系が MR-1 株の D-乳酸脱水素酵素 (Dld, LdhA) の直接の転写活性化因子であることを発見した。また、CRP 破壊株の解析から、CRP が cAMP 非依存的にいくつかのアミノ酸合成系の転写誘導に関与するという新しい知見を得ている。さらに、cAMP/CRP 制御系がエネルギー代謝系の重要活性化因子であるという知見を基に、この系を活性化することにより MR-1 株による発電を上昇できるという仮説をたて、cAMP 合成酵素遺伝子 *cyaC* の過剰発現株による電流生成が親株の 2 倍程度になることを示してこの仮説を実証した。以上の成果は、今後微生物発電を高効率化していくうえでの基盤として大きな価値があるものである。