

Shewanella における嫌気呼吸鎖の制御機構

Regulatory Mechanisms for Anaerobic Respiratory Chains in *Shewanella*

笠井 拓哉, 廣瀬 篤弥, 高妻 篤史*, 渡邊 一哉

TAKUYA KASAI, ATSUMI HIROSE, ATSUSHI KOUZUMA and KAZUYA WATANABE

東京薬科大学生命科学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

* TEL & FAX: 042-676-6755

* E-mail: akouzuma@toyaku.ac.jp

School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-0392, Japan

キーワード: 電気活性微生物, *Shewanella*, 細胞外電子伝達, 異化代謝, 嫌気呼吸

Key words: Electrochemically Active Bacteria, *Shewanella*, Extracellular Electron Transfer, Catabolism, Anaerobic Respiration

(原稿受付 2018年4月10日/原稿受理 2018年4月17日)

1. はじめに

Shewanella 属細菌はガンマプロテオバクテリア綱の通性嫌気性細菌であり, 多様な電子受容体を用いて呼吸を行う能力を持つことで知られている。本属細菌が利用可能な電子受容体には酸素, フマル酸, 硝酸, 亜硝酸, ジメチルスルホキシド (DMSO), トリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) 等の可溶性物質に加え, 酸化鉄や二酸化マンガン等の不溶性の金属化合物も含まれる¹⁾。*Shewanella* 属細菌は湖沼や海洋の底泥堆積物等から多数単離されていることから²⁾, 酸化還元状態が変わりやすいこれらの環境において効率的にエネルギーを獲得し, 生存を図るために多様な呼吸能を発達させてきたと考えられている。

Shewanella oneidensis MR-1 株は *Shewanella* 属において最もよく研究されている菌株であり, 二酸化マンガン還元して呼吸を行う異化的金属還元細菌として 1988 年に単離された³⁾。それ以降, 金属還元細菌, あるいは多様な呼吸能を持つ環境細菌のモデル菌株として研究され, その嫌気呼吸系に関して詳細な解析が行われてきた。また, 本株は固体金属の還元経路 (細胞外電子伝達経路) を介して電極に電子を伝達する能力 (電極呼吸能) も備えているため⁴⁾, 近年では電気活性微生物 (電極と電子の授受を行う微生物) のモデル菌株としても利用され, 微生物燃料電池 (電気活性微生物を触媒として燃料物質の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置) における電流生成メカニズムの解明研究等に用いられている⁵⁾。

MR-1 株はペリプラズムと細胞外膜に複数のシトクロム c タンパク質から構成される導電性ネットワークを備えており, これにより細胞内の異化代謝によって放出された電子を様々な電子受容体へと伝達する (図 1)⁶⁾。この導電性ネットワークでは, 細胞内膜にアンカーされた

ペリプラズムタンパク質である CymA⁷⁾ が中心的な役割を果たす。CymA はネットワークのハブとして機能し, ほぼ全ての嫌気電子受容体 (酸素以外の電子受容体) の還元を介在する。電子伝達に伴うエネルギー保存 (プロトン濃度勾配の形成) は細胞内膜を経由する CymA までの電子伝達過程で行われると考えられており⁸⁾, CymA 以降 (ペリプラズムと細胞外膜) の電子伝達経路は各電子受容体に特異的な電子の排出経路として機能する。

MR-1 株をモデルとした研究により, *Shewanella* の嫌気呼吸鎖を構成するタンパク質とその遺伝子については多くのことがわかってきている^{6,9)}。一方, *Shewanella* がどのように嫌気呼吸鎖を含むエネルギー代謝系を制御しているのかについては不明な部分が多く残されている。*Shewanella* の生息環境を考慮すると, 環境中の酸化還元状態 (電子受容体の酸化還元電位) の変化に応じて適切にエネルギー獲得経路を切り替えることが生存戦略上重要であると考えられる。そのため, *Shewanella* は優れた呼吸能に加え, 環境変化を認識し, エネルギー代謝系を柔軟に制御する能力も発達させていると予想される。*Shewanella* の環境応答と代謝制御メカニズムの解明は環境微生物の生理・生態を理解するうえで重要であるだけでなく, 電気活性微生物の代謝制御技術の開発にもつながる可能性があり, MR-1 株はそのためのモデル生物として有用である。本稿では, 現時点で明らかになっている *Shewanella* の嫌気呼吸鎖の制御因子と, MR-1 株が酸化還元環境 (電極電位) の変化に応じてエネルギー代謝系を制御するメカニズムについて, 筆者らの研究成果を中心に紹介する。

2. *Shewanella* の嫌気呼吸鎖の制御因子

これまでの研究から, cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) が *Shewanella* の嫌気呼吸鎖の制御にお

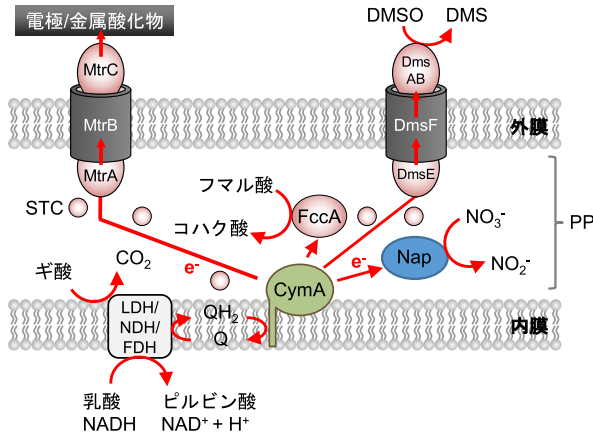


図1. *Shewanella oneidensis* MR-1 株の嫌気呼吸経路

LDH, 乳酸脱水素酵素; NDH, NADH 脱水素酵素; FDH, ギ酸脱水素酵素; MtrABC, 金属(電極)還元酵素; FccA, フマル酸還元酵素; Nap, 硝酸還元酵素; DmsABEF, DMSO 還元酵素; DMS, ジメチルスルフィド; Q, 酸化型キノン; QH₂, 還元型キノン; PP, ペリプラズム。

いて中心的な役割を果たすことが示されている^{10,11)}。CRPは大腸菌においてグルコース代謝のカタボライト抑制に関与することで知られる転写因子である¹²⁾。*Shewanella*におけるCRPの機能は大腸菌とは異なるが、これは*Shewanella*が生育基質として糖をあまり利用せず、乳酸等の低分子有機酸を好んで資化することと関連していると思われる。MR-1株においてCRPを欠損させると、*cymA*遺伝子の発現量が顕著に減少し、ほぼ全ての嫌気電子受容体の利用能が失われる^{10,11)}。また、細胞外電子伝達(*omcA*, *mtrCAB*)やフマル酸(*fccA*)、硝酸(*nap*)、DMSO(*dms*)の還元の特異的に関与する遺伝子の発現もCRPの欠損により減少する¹¹⁾。さらに、筆者らはCRPが*omcA*および*mtrCAB*オペロンの上流に位置するプロモーター領域に結合し、これらの遺伝子の転写を直接的に活性化することを明らかにしている(図2)¹³⁾。これらの結果から、CRPはMR-1株の嫌気呼吸系遺伝子を包括的に制御する正の転写制御因子であるとみなされている。

また、筆者らはMR-1株においてCRPがD-乳酸の資化に関与することも明らかにした¹⁴⁾。MR-1株において、D-乳酸とL-乳酸はそれぞれD-乳酸脱水素酵素(D-LDH)であるDldと、L-乳酸脱水素酵素(L-LDH)であるLldEFGによってピルビン酸へと酸化される¹⁵⁾。これらの酵素はキノン依存性の乳酸脱水素酵素(LDH)であり、乳酸の酸化によって生じた電子を内膜キノンに伝達すると考えられている。これらの酵素をコードする遺伝子(*dld*および*lldEFG*)はMR-1株のゲノムにおいてクラスターを形成している(図2)。筆者らがこの遺伝子クラスターの転写制御機構を解析した結果、*dld*と*lldEFG*は異なるプロモーターから転写されること、またCRPは*dld*の上流に位置するプロモーター領域に結合し、本遺伝子の転写を活性化することが明らかになった(図2)¹⁴⁾。キノン依存性のLDHは細胞内の基質を酸化して内膜の呼吸鎖電子伝達系に電子を供給する役割を果たしているため、NADH脱水素酵素(NDH;呼吸鎖複合体I)と同様、呼吸鎖の一部とみなすことができる

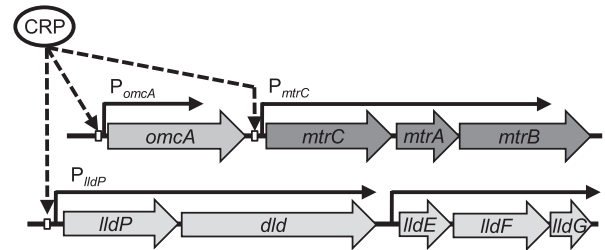


図2. CRPによる細胞外電子伝達系(*omcA*, *mtrCAB*)およびD-乳酸脱水素酵素遺伝子(*dld*)の制御

(図1)。CRPが*cymA*やその下流の電子受容体還元酵素の遺伝子に加え、*dld*の発現制御も担うことは、呼吸鎖の包括的な制御が*Shewanella*の生存において有利に働くことを示唆している。しかし*dld*とは異なり、L-LDH遺伝子(*lldEFG*)はCRPによる制御を受けず、L-乳酸を特異的に認識する転写因子LlpR(L-lactate-positive regulator)によって制御される¹⁶⁾。したがって、なぜD-乳酸代謝のみがCRPに依存するのかは興味深い。MR-1株はD-乳酸を発酵的に産生する酵素(LdhA)を有しており、電子受容体が不足した際に電子シンクとしてD-乳酸を自ら合成する¹⁷⁾。このことから、筆者らはD-乳酸の代謝が嫌気条件下で特に重要であり、そのためCRPによる制御を受けると予想している¹⁴⁾。

CRPはcAMPをリガンドとするため、CRPの標的遺伝子の発現量は細胞内のcAMP濃度に依存する¹²⁾。大腸菌では細胞内のグルコース濃度に応じてcAMP合成酵素(アデニル酸シクラーゼ)の活性が調節されることが知られているが¹⁸⁾、*Shewanella*における細胞内cAMP濃度の調節メカニズムは未解明である。MR-1株は3種類のアデニル酸シクラーゼ(CyaA, CyaB, およびCyaC)を持ち、特に内膜結合型のクラスIIIアデニル酸シクラーゼであるCyaCが嫌気呼吸系の発現に重要であることが報告されている¹¹⁾。また、CRPによって制御される細胞外電子伝達系遺伝子の発現量は、利用できる電子供与体に対して電子受容体が不足した場合に増加することが示されている¹³⁾。したがって、細胞内の酸化還元バランスやエネルギー状態に関連した何らかのシグナルを介してCyaCの活性が制御され、これにより細胞内cAMP濃度が調節されているのではないかと予想される。しかし、バクテリアのクラスIIIアデニル酸シクラーゼの活性制御機構は全くの未解明であり、現時点でその分子メカニズムを予想することは難しい。

3. *Shewanella*の電位認識・応答メカニズム¹⁹⁾

*Shewanella*は酸素(+0.82 V)、二酸化マンガン(+0.53 V)、硝酸(+0.43 V)、フマル酸(+0.03 V)等の、様々な標準酸化還元電位を持つ電子受容体を利用して呼吸を行う(本稿の電位は全て標準水素電極に対して表記する)。この際、これらの電子受容体と電子供与体との酸化還元電位の差に相当するエネルギーが放出されるが、細胞が実際にその差に応じてエネルギーを獲得するためにはプロトン濃度勾配の形成に関与する電子伝達経路を変化させる必要がある。酸素が電子受容体となる

好気呼吸では、プロトンポンプ活性を持つ呼吸鎖タンパク質（複合体 I, III, および IV）が機能し、効率的にエネルギーが保存されることが知られている。一方、*Shewanella* が嫌気呼吸を行う場合、ほぼ全ての電子受容体が *CymA* を介して還元される（図 1）。*CymA* 以降の電子伝達はプロトン濃度勾配の形成に寄与し得ないため、*Shewanella* が嫌気呼吸時に電子受容体の酸化還元電位に応じてエネルギーを獲得しているとする、*CymA* より上流の電子伝達経路が変化しているはずである。*CymA* は内膜キノン酸化酵素であるため、その上流には内膜キノン還元酵素が位置する。*Shewanella* が乳酸を酸化分解する場合、LDH 以外にも NDH（呼吸鎖複合体 I）とギ酸脱水素酵素（FDH）が内膜キノン還元酵素として働く（図 1）。NDH はピルビン酸脱水素酵素（PDH）や TCA サイクルによって生じた NADH を、FDH はピルビン酸ギ酸リアーゼ（PFL）によって生じたギ酸を酸化し、内膜キノンを電子を伝達する役割を果たす（図 3）。しかし、好気呼吸時には NDH、フマル酸呼吸時には FDH が使われることが報告されていたものの²⁰、電子受容体の酸化還元電位に応じてこれらの酵素の寄与が変化するのかどうかは不明であった。

筆者らは *Shewanella* が電子受容体の酸化還元電位を感知する能力を持ち、これによりエネルギー獲得に関与する内膜呼吸鎖を柔軟に変化させていると予想した。この仮説を検証するため、筆者らは 3 電極系電気化学セルを用いた実験を行った。3 電極系電気化学セルは作用極、参照極、対極の 3 つの電極から構成され、参照極に対する作用極の電位をポテンショスタット（電位制御装置）によって任意の値に設定することができる。*Shewanella* は電極呼吸能を持つため、この系を用いれば電子受容体の種類を変えずにその酸化還元電位（電極電位）のみを変更し、純粋に電位変化に対する細胞の応答を調べることが可能になる。*Shewanella* は嫌気条件下では +0.5 V ~ 0 V 程度の酸化還元電位の電子受容体を利用するため、この範囲で電極電位を変化させ、MR-1 株の増殖、

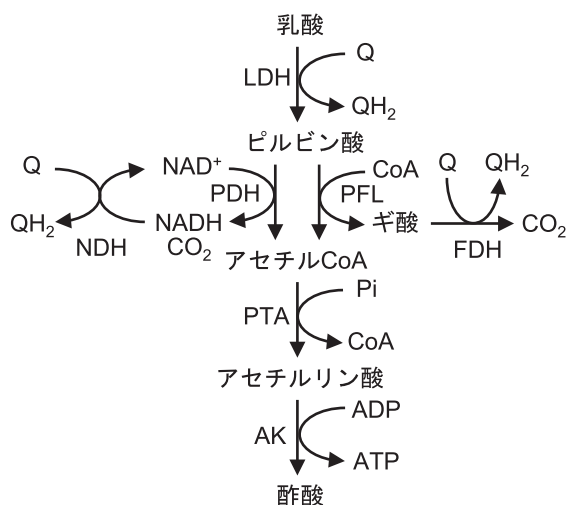


図 3. MR-1 株における乳酸から酢酸への異化代謝経路¹⁹⁾

LDH, 乳酸脱水素酵素; PFL, ピルビン酸ギ酸リアーゼ; PDH, ピルビン酸脱水素酵素; NDH, NADH 脱水素酵素; PTA, ホスホトランスアセチラーゼ; AK, 酢酸キナーゼ; Q, 酸化型キノン; QH₂, 還元型キノン。

遺伝子発現、およびエネルギー代謝経路に与える影響を解析した¹⁹⁾。

3.1 電位による増殖効率の変化

電極電位が MR-1 株の増殖効率（エネルギー保存効率）に影響するかどうかを調べるため、本株を +0.5 V (high potential; HP), +0.2 V (middle potential; MP), 0 V (low potential; LP) の 3 つの電位条件で乳酸を基質として培養し、各条件における電流生成量、代謝産物、および菌体（タンパク質）収率を比較した（図 4）。その結果、電極電位が高いほど多くの電流が流れ、乳酸が速やかに消費された（図 4A）。代謝産物としては主に酢酸が検出されたが、これは MR-1 株が嫌気条件下で乳酸を代謝する場合、酢酸が最終生成物として蓄積する（図 3）という既知の知見²¹⁾と一致するものであった。しかし、消費された乳酸に対する酢酸の収率は、電位が高くなるにつれて有意に減少した（図 4B）。また、培養後の菌体のタンパク質量を測定して菌体収率を比較した結果、等量の乳酸を消費した場合でも電位が高い方が多くの菌体を生じることが示された（図 4C）。以上の結果から、電極電位の変化によって乳酸の異化代謝経路が変化し、高電位時にはより多くのエネルギーが保存されることが示唆された。

3.2 電位による遺伝子発現と異化代謝経路の変化

電極電位の変化が MR-1 株の遺伝子発現に与える影響

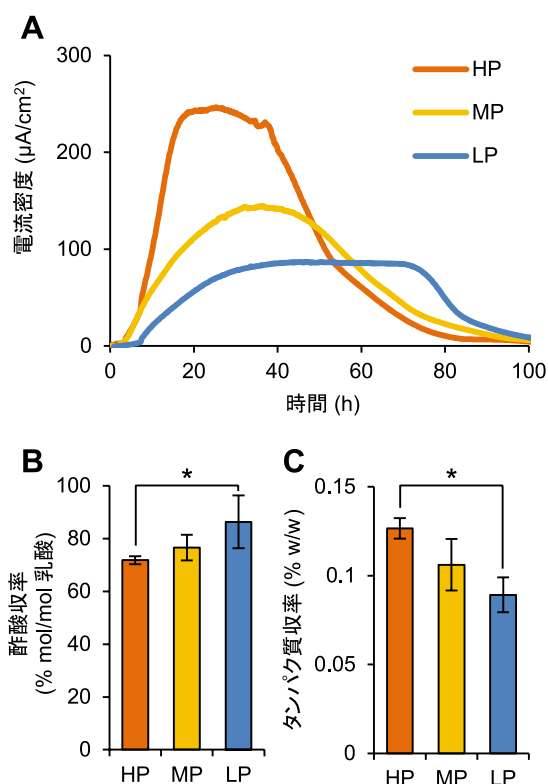


図 4. MR-1 株の電位変化に対する代謝応答¹⁹⁾

(A) 高電位 (HP; +0.5 V), 中電位 (MP; +0.2 V), 低電位 (LP; 0 V) における乳酸からの電流生成。(B, C) 異なる電位条件における乳酸からの酢酸収率 (B) と菌体タンパク質収率 (C)。エラーバーは 3 連の実験における標準偏差、アスタリスクは統計的有意差 ($P < 0.05$) を示す。

表 1. MR-1 株における電位応答性遺伝子 (抜粋)¹⁹⁾

Process	Locus tag	Gene	Annotation	Log ₂ FC*
Lactate and pyruvate oxidation	SO_1521	<i>dld</i>	Respiratory FAD-dependent D-lactate dehydrogenase	2.32
	SO_0425	<i>aceF</i>	Dihydroliipoamide acetyltransferase	1.52
Formate oxidation	SO_0101	<i>fdnG</i>	Nitrate-inducible formate dehydrogenase molybdopterin-binding subunit	2.97
	SO_0102	<i>fdnH</i>	Nitrate-inducible formate dehydrogenase iron-sulfur subunit	3.33
	SO_0103	<i>fdnI</i>	Nitrate-inducible formate dehydrogenase cytochrome b subunit	2.89
	SO_4509	<i>fdhA</i>	Formate dehydrogenase molybdopterin-binding subunit	-1.43
	SO_4510	<i>fdhB</i>	Formate dehydrogenase fes subunit	-1.08
	SO_4511	<i>fdhC</i>	Formate dehydrogenase cytochrome b subunit	-1.00
	SO_4513	<i>fdhA</i>	Fnr-inducible formate dehydrogenase molybdopterin-binding subunit	1.96
	SO_4515	<i>fdhC</i>	Fnr-inducible formate dehydrogenase cytochrome b subunit	1.94
TCA cycle	SO_1930	<i>sucA</i>	2-Oxoglutarate dehydrogenase complex dehydrogenase E1 component	1.75
	SO_1931	<i>sucB</i>	2-Oxoglutarate dehydrogenase complex succinyl-CoA: dihydroliipoate S-succinyltransferase E2 component	1.77
NADH oxidation	SO_1933	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA synthase alpha subunit	1.66
	SO_1010	<i>nuoM</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit M	2.85
	SO_1012	<i>nuoK</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit K	2.68
	SO_1013	<i>nuoJ</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit J	2.58
	SO_1014	<i>nuoI</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit I	2.46
	SO_1015	<i>nuoH</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit H	2.89
	SO_1016	<i>nuoG</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit G	2.61
	SO_1017	<i>nuoF</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit F	2.46
	SO_1018	<i>nuoE</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit E	1.78
ATP synthesis	SO_1019	<i>nuoCD</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit CD	1.90
	SO_4746	<i>atpC</i>	ATP synthase F1 epsilon subunit	2.19
	SO_4747	<i>atpD</i>	ATP synthase F1 beta subunit	2.22
	SO_4748	<i>atpG</i>	ATP synthase F1 gamma subunit	2.50
	SO_4749	<i>atpA</i>	ATP synthase F1 alpha subunit	2.43
	SO_4750	<i>atpH</i>	ATP synthase F1 delta subunit	1.94
	SO_4751	<i>atpF</i>	ATP synthase F0 B subunit	1.85
SO_4752	<i>atpE</i>	ATP synthase F0 C subunit	1.71	
SO_4753	<i>atpB</i>	ATP synthase F0 A subunit	1.37	

* Log₂-transformed fold change (+0.5 V/-0.1 V)

を調べるため、本株を +0.5 V (HP) と -0.1 V (LP) の 2つの電位条件で培養し、トランスクリプトームの変化を解析した。その結果、HP 条件では LP 条件と比較してエネルギー代謝に関与する遺伝子の多くが高発現しており、特に MR-1 株が持つ 4つの NDH のうち、NADH: ubiquinone oxidoreductase (Nuo) をコードする遺伝子 (*nuo*) の発現量が顕著に増加していることが示された (表 1)。また PDH の遺伝子 (*aceF*) と一部の TCA サイクル関連遺伝子 (*sucAB*) も HP 条件で高発現していた。これらの遺伝子は全て NADH 依存性の酵素をコードするものであったため、高電位条件では NADH を電子キャリアとする異化代謝経路が活性化していると考えられた。

この仮説を検証するため、異なる電位条件下における細胞内の NADH 蓄積量 (NADH/NAD⁺ 比) を測定した (図 5)。その結果、電極電位の上昇に伴って NADH/NAD⁺ 比も増加することが示された。また、NADH の蓄積は NDH 欠損株 (Δ NDH; 4つの NDH を全て欠損させた変異株) においてさらに顕著に見られた。

高電位条件における NADH 依存性代謝経路の寄与をさらに詳しく調べるため、MR-1 の野生株 (WT) と Δ NDH

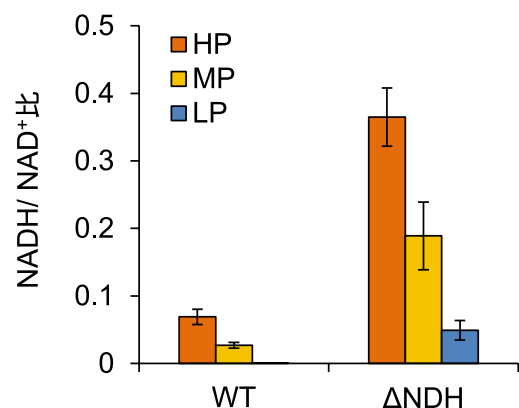


図 5. 異なる電位条件における MR-1 株細胞内の NADH/NAD⁺ 比¹⁹⁾
MR-1 株の細胞は作用極電位を +0.5 V (HP), +0.2 V (MP), 0 V (LP) に印加した電気化学セル内で培養した。エラーバーは 3 連の実験における標準偏差を示す。

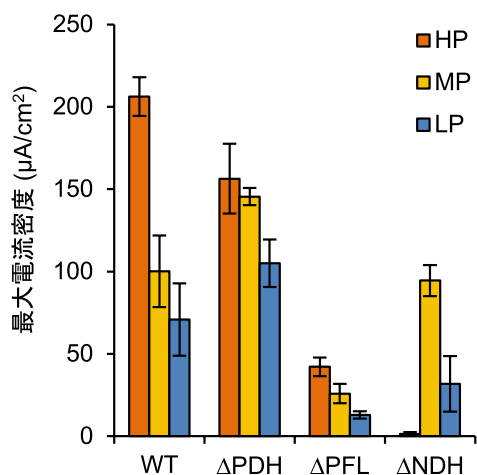


図6. *S. oneidensis* の野生株 (WT) と変異株によるピルビン酸からの電流生成¹⁹⁾
HP (+0.5 V), MP (+0.2 V), LP (0 V) 条件における各株の最大電流密度を示す。エラーバーは3連の実験における標準偏差を示す。

の最大電流量を異なる電位条件下で比較した (図6)。ピルビン酸以降の代謝経路 (図3) が電位によって変化すると予想されたため、本実験ではピルビン酸を基質に用いた。またピルビン酸の分解に関与する PDH と PFL についても欠損株 (ΔPDH と ΔPFL) を作製し、同様に最大電流量を測定した。WT と ΔNDH の電流量を測定した結果、ΔNDH は高電位 (HP) 時にほとんど電流を生産しないことが明らかとなり、高電位時の電流生成には NDH が必要であることが示された。一方、ΔPDH と ΔPFL は HP 条件下においてそれぞれ WT の 80%、20% の電流を生産した。また、MP および LP 条件下では ΔPDH は WT よりもむしろわずかに高い電流を生産したが、ΔPFL では電流量が顕著に減少した。以上の結果から、いずれの電位条件下においても主に PFL (と FDH) による経路 (ギ酸依存経路) がピルビン酸分解に利用されるが、電位が高い場合は PDH と NDH による経路 (NADH 依存経路) が活性化し、ピルビン酸分解に寄与することが示された。しかし、HP 条件においても PDH の寄与は PFL よりも少なかったため、電位が高い場合でもピルビン酸の多くはギ酸依存経路によって代謝されると考えられた。このことは ΔNDH が HP 条件下でほとんど電流を流さなかったことと矛盾するように見えるが、NDH の欠損は過剰な NADH の蓄積を引き起こすため (図5)、これにより HP 条件では ΔNDH の増殖と電流生成が抑制されたと考えられる。

3.3 電極電位の感知メカニズム

上記の結果は MR-1 株が細胞外に存在する電極の電位変化に応じて細胞内の代謝経路を変化させることを示しており、どのようなメカニズムによって電極電位が感知されるのかに興味を持たれた。筆者らは MR-1 株の細胞外電子伝達が内膜キノンの酸化還元を伴うことから、MR-1 株では細胞外電子伝達経路を介して電極電位と内膜キノンの酸化還元状態が連動しており、その変化が感知されているのではないかと予想した。この仮説を検証するため、まず電極電位の変化が MR-1 株の内膜キノ

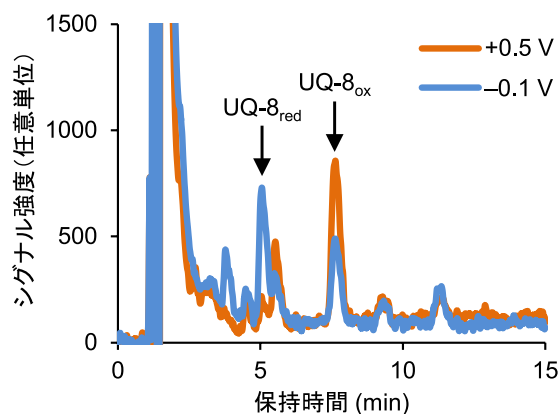


図7. 電極電位によるユビキノン酸化還元比の変化¹⁹⁾
MR-1 株を +0.5 V と -0.1 V の作用電位に設定した電気化学セルにて培養後、キノン類を抽出して HPLC に供した。矢印は還元型ユビキノン-8 (UQ-8_{red}) と酸化型ユビキノン-8 (UQ-8_{ox}) の保持時間を示す。

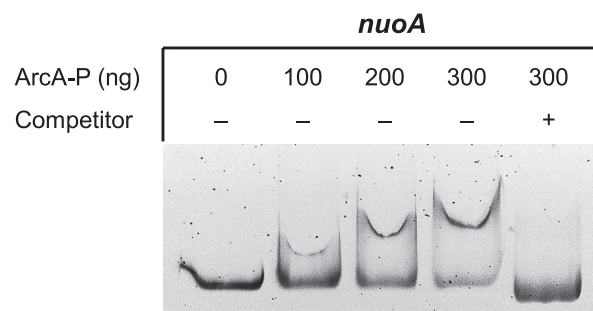


図8. ArcA と *nuoA* 上流配列を用いたゲルシフトアッセイ¹⁹⁾
0~300 ng のリン酸化 ArcA タンパク質と *nuoA* 上流配列を含むラベル化プローブをコンペティター (50 倍過剰量の非ラベル化プローブ) の存在下 (+) または非存在下 (-) でインキュベートした。

(ユビキノン) の酸化還元比に影響を与えるかどうかを分析した。その結果、確かに高電位時では酸化体、低電位時では還元体のユビキノンの割合が増加することが示され、電極電位と内膜キノンの酸化還元状態が連動することが示された (図7)。

大腸菌では、内膜キノンの酸化還元状態を感知する機構として、Arc 制御系が知られている²²⁾。MR-1 株にもそのホモログ (ArcS, HptA, ArcA から構成される三成分制御系) が存在するため²³⁾、これらのタンパク質が電位応答に関与している可能性が考えられた。そこでセンサーキナーゼである ArcS の欠損株 (Δ*arcS* 株) を作製し、電極電位 (+0.5 V および -0.1 V) に応じたトランスクリプトーム変化を野生株と比較した。その結果、*nuo* 遺伝子を含む野生株で電位応答を示した遺伝子 (表1) の多くが Δ*arcS* では電位応答性を示さなかった。また、レスポンスレギュレーターである ArcA を精製し、*nuo* 遺伝子のの上流領域への結合をゲルシフトアッセイにより解析した結果、リン酸化された ArcA が *nuo* 遺伝子のの上流に結合することが示された (図8)。大腸菌の ArcA は還元型のキノンが増加するとセンサーキナーゼ (ArcB) によりリン酸化され、異化代謝系遺伝子の発現を抑制することが知られている²²⁾。したがって、MR-1

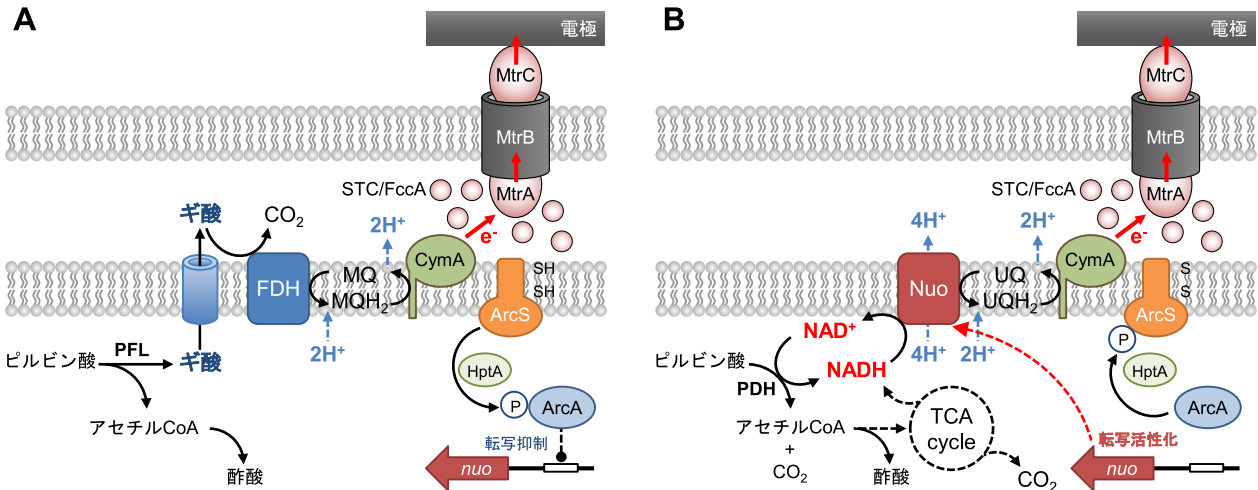


図9. MR-1株におけるピルビン酸異化代謝系の電極電位応答¹⁹⁾

(A) 低電位時のピルビン酸代謝経路, (B) 高電位時に活性化されるピルビン酸代謝経路。MQ, 酸化型メナキノン; MQH₂, 還元型メナキノン; UQ, 酸化型ユビキノン; UQH₂, 還元型ユビキノン。

株の *ArcA* も還元型キノンが増加する低電位条件下でリン酸化され, *nuo* 遺伝子の発現を抑制していると考えられた。これらの結果から, MR-1株において *Arc* 制御系が主要な電極電位感知システムとして働き, *nuo* を含む遺伝子の発現を電位に応じて制御していることが示された。

3.4 電極電位に応じたエネルギー保存メカニズム

以上の結果から, MR-1株が電極電位を感知し, それによりエネルギー獲得に関与する異化代謝経路を変化させることが明らかになった(図9)。低電位(~0 V)条件では, MR-1株はPFLとFDHによるギ酸依存経路によってピルビン酸を酸化分解する。この際, FDHとCymAの間の内膜キノンの酸化還元サイクルによってプロトン濃度勾配が生じるが, その効率は低く, 電子1個あたりに1個のプロトンが汲み出されると考えられる(H^+/e^- 比=1)。一方, 高電位(~+0.5 V)条件では, PDHとNDH(Nuo)が活性化し, NADH依存経路が利用されるようになる。またTCAサイクルの活性化によって酢酸(アセチルCoA)の一部がCO₂まで完全酸化され(図4B), これによってもNADHが産生されると考えられる。Nuoは高いプロトンポンプ活性(H^+/e^- 比=2)を持つため, NADH依存経路を利用するとギ酸依存経路よりも多くのプロトン濃度勾配が形成される(図9)。そのため高電位時には低電位時よりも細胞に多くのエネルギーが保存され, 増殖効率が増加すると考えられる。

4. おわりに

本稿では, *Shewanella*の嫌気呼吸鎖の制御メカニズムについて, 現在得られている知見を紹介した。MR-1株では, CRP/cAMP制御系と*Arc*制御系が呼吸鎖の制御において重要な役割を果たす。これらの制御系により, *Shewanella*は外部環境や細胞内の状態に応じて柔軟に呼吸鎖を切り替え, 生育環境に適応していると考え

られる。*Shewanella*は複数の電子受容体還元経路を持つが, これらの多くが電子受容体の種類に非依存的なメカニズム(CRP/cAMP制御系)によって制御されることは興味深い。これは*Shewanella*が酸化還元状態の変化が激しい環境に生息しており, その変化に迅速に適応するために複数の嫌気呼吸経路を同時に発現させておくという生存戦略を取っているためだと考えられる。また細胞外に存在する金属化合物を電子受容体を利用する場合は, 電子受容体の種類ではなく, その酸化還元電位を感知することが特に重要となる。*Shewanella*が還元可能な金属化合物には酸化鉄(ヘマタイト等)や二酸化マンガン等が含まれるが, これらの化合物の標準酸化還元電位は0 V(ヘマタイト)~+0.5 V(二酸化マンガン)と幅広い²⁴⁾。今回紹介した研究結果は, *Shewanella*がこのような細胞外物質の酸化還元電位を敏感に感知し, その電位に応じてエネルギーを保存する能力を発達させてきたことを示唆している。細胞外の電位認識は細胞外電子伝達系と電氣的につながった*Arc*制御系によって行われるため, *Shewanella*の細胞外電子伝達系は単に電子排出経路としてだけでなく, 外部環境を認識するためのセンサーの一部として機能しているとも考えられる。*Shewanella*の電位認識・応答メカニズムを応用すれば, 電極によって微生物の遺伝子発現と代謝を制御する技術を創出できる可能性がある。本稿で紹介した研究成果を契機に, *Shewanella*を含む電気活性微生物についての基礎研究と応用技術開発がさらに進展することを期待したい。

文 献

- 1) Fredrickson, J.K., M.F. Romine, A.S. Beliaev, J.M. Auchtung, M.E. Driscoll, T.S. Gardner, K.H. Nealson, A.L. Osterman, G. Pinchuk, J.L. Reed, D.A. Rodionov, J.L.M. Rodrigues, D.A. Saffarini, M.H. Serres, A.M. Spormann, I.B. Zhulin, and J.M. Tiedje. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. Nat. Rev. Microbiol. 6: 592-603.
- 2) Hau, H.H. and J.A. Gralnick. 2007. Ecology and biotechnology

- of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 237–258.
- 3) Myers, C.R. and K.H. Nealson. 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science.* 240: 1319–1321.
 - 4) Shi, L., H. Dong, G. Reguera, H. Beyenal, A. Lu, J. Liu, H.-Q. Yu, and J.K. Fredrickson. 2016. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 651–662.
 - 5) Sydow, A., T. Krieg, F. Mayer, J. Schrader, and D. Holtmann. 2014. Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 8481–8495.
 - 6) Kouzuma, A., T. Kasai, A. Hirose, and K. Watanabe. 2015. Catabolic and regulatory systems in *Shewanella oneidensis* MR-1 involved in electricity generation in microbial fuel cells. *Front. Microbiol.* 6: 609.
 - 7) Myers, J.M. and C.R. Myers. 2000. Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J. Bacteriol.* 182: 67–75.
 - 8) Simon, J., R.J.M. van Spanning, and D.J. Richardson. 2008. The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777: 1480–1490.
 - 9) Kouzuma, A., K. Hashimoto, and K. Watanabe. 2009. 微生物燃料電池での電流生産を可能にする *Shewanella oneidensis* の細胞外電子伝達機構. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 9: 105–108.
 - 10) Saffarini, D.A., R. Schultz, and A. Beliaev. 2003. Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* 185: 3668–3671.
 - 11) Charania, M.A., K.L. Brockman, Y. Zhang, A. Banerjee, G.E. Pinchuk, J.K. Fredrickson, A.S. Beliaev, and D.A. Saffarini. 2009. Involvement of a membrane-bound class III adenylate cyclase in regulation of anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* 191: 4298–4306.
 - 12) Botsford, J.L. and J.G. Harman. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 56: 100–122.
 - 13) Kasai, T., A. Kouzuma, H. Nojiri, and K. 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.
 - 14) Kasai, T., A. Kouzuma, and K. Watanabe. 2017. CRP regulates D-lactate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front. Microbiol.* 8: 869.
 - 15) Pinchuk, G.E., D.A. Rodionov, C. Yang, X. Li, A.L. Osterman, E. Dervyn, O.V. Geydebrekht, S.B. Reed, M.F. Romine, F.R. Collart, J.H. Scott, J.K. Fredrickson, and A.S. Beliaev. 2009. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 2874–2879.
 - 16) Brutinel, E.D. and J.A. Gralnick. 2012. Preferential utilization of D-lactate by *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 8474–8476.
 - 17) Nakagawa, G., A. Kouzuma, A. Hirose, T. Kasai, G. Yoshida, and K. Watanabe. 2015. Metabolic characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. *PLoS ONE* 10: e0138813.
 - 18) Green, J., M.R. Stapleton, L.J. Smith, P.J. Artymiuk, C. Kahramanoglou, D.M. Hunt, and R.S. Buxton. 2014. Cyclic-AMP and bacterial cyclic-AMP receptor proteins revisited: Adaptation for different ecological niches. *Curr. Opin. Microbiol.* 18: 1–7.
 - 19) Hirose, A., T. Kasai, M. Aoki, T. Umemura, K. Watanabe, and A. Kouzuma. 2018. Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat. Commun.* 9: 1083.
 - 20) Pinchuk, G.E., O.V. Geydebrekht, E.A. Hill, J.L. Reed, A.E. Konopka, A.S. Beliaev, and J.K. Fredrickson. 2011. Pyruvate and lactate metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 8234–8240.
 - 21) Hunt, K.A., J.M. Flynn, B. Naranjo, I.D. Shikhare, and J.A. Gralnick. 2010. Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *J. Bacteriol.* 192: 3345–3351.
 - 22) Bekker, M., S. Alexeeva, W. Laan, G. Sawers, J. Teixeira de Mattos, and K. Hellingwerf. 2010. The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J. Bacteriol.* 192: 746–754.
 - 23) Lassak, J., A.L. Henche, L. Binnenkade, and K.M. Thormann. 2010. ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3263–3274.
 - 24) Nealson, K.H. and D. Saffarini. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 311–343.