総説

微生物代謝経路・遺伝子発現・タンパク質の電気化学制御

松田翔一^{1,2}, 劉 歆³, 橋本和仁^{1,2}, 中西周次²¹東京大学大学院工学系研究科²東京大学先端科学技術センター³北京航空航天大学

Energy-conversion systems mediated by bacterial metabolism have recently attracted much attention, and therefore, demands for tuning of bacterial metabolism are increasing. It is widely recognized that intracellular redox atmosphere is one of the important factors influencing on bacterial metabolism. Although intracellular redox atmosphere had been conventionally tuned by dissolved oxygen concentration or by appropriate selection of an electron acceptor for respiration, we are developing novel method based on electrochemical technique for on-line (dynamic) tuning. Here we review our recent studies on electrochemical tuning of intracellular redox environment toward the control of bacterial metabolic pathway and activity.

Metabolism Pathway / Bacterial Metabolism / Electrochemistry / Gene Expression / Electron Transfer

1. はじめに

微生物（生細胞）の代謝反応は数多くの酸化還元反応から構成されており、反応物と生成物間の中で電子の授受がなされている。たとえば、光合成においては、水を電子ドナーとして光エネルギーを元に二酸化炭素が還元・固定化される。また、酸素呼吸プロセスでは、環境中の酸素を電子アクセプターとして有機物が酸化分解される（図 1）。光合成における水の酸化反応や二酸化炭素還元反応、あるいは微生物呼吸における酸素還元反応などは、我々人類が今まさに環境・エネルギー問題の観点から注目している反応である。工学的観点でとらえると、白金などのレアメタルを触媒として利用し、場合によっては高温・高圧でのみ進むこれらの反応を、微生物（生細胞）はユビキタス元素を利用して常温・常圧で高効率に進行させている。環境調和型の新エネルギーシステムや、環境浄化技術の開発を行う上で、生細胞におけるこうしたエネルギー・物質変換系に学ぶべき点は非常に多い。

近年、このような考え方にに基づき、微生物をある種の「生きた電極触媒」として捉えて利用した研究が活発化している。微生物燃料電池（Microbial fuel cell, MFC）^{1),2)}、や微生物電解還元（Microbial electrolysis cell, MEC）³⁾ がその代表的事例である。MFC においては、酸素還元反応など適切なカソード反応の存在下、微生物

図 1

微生物代謝における酸化還元反応。(a) 光合成。(b) 呼吸。

物の呼吸電子がアノードへと渡ることによって電池回路が形成され、化学エネルギー（微生物のエサとなる有機物）が電気エネルギーへと変換される（図 2a）。一方、MEC では、高エネルギーの電子をカソードから微生物に注入し、その代謝過程を利用して微生物に有用な物質を生産させる（図 2b）。これは電気エネルギーから化学エネルギーへの変換プロセスと捉えることができる。

微生物を「生きた電極触媒」として捉えたエネルギー・物質変換系をよりよいものとするためには、我々のニーズに合う形で自由に微生物代謝のあり方を制御することが重要である。これはきわめて挑戦的な課題であるが、我々は電気化学をツールに、そして分子生物学的な遺伝子操作に頼らずに、この難題に取り組んでいる。本稿では、そうした我々の最近の研究の一端を紹介したい。

Electrochemical Regulation of Bacterial Metabolism Pathway and Gene Expression Profiles

Shoichi MATSUDA¹, Huan LIU³, Kazuhito HASHIMOTO^{1,2} and Shuji NAKANISHI²¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo²Research Center of Advanced Science and Technology, The University of Tokyo³Beihang University (Beijing University of Aeronautics and Astronautics)

図 2

微生物電極触媒におけるエネルギー・物質変換系。(a) 微生物燃料電池。(b) 微生物電解還元 (E_A , E_C : アノードおよびカソード電極電位)。

図 3

Shewanella の乳酸代謝における電子の流れ。

2. 微生物代謝と生体内電子移動

はじめに、微生物の乳酸代謝を例に、代謝における電子の流れを詳しく見てみよう(図3)。代謝経路に取り込まれた乳酸は、解糖系によりピルビン酸に変換される。その後、ピルビン酸はクエン酸回路(TCA回路)へ取り込まれ、二酸化炭素にまで完全に酸化分解される。この過程で生じる還元力は、生体内酸化還元種 NAD^+ が $NADH$ に還元されることで蓄えられる。

その後、細胞内膜に存在する呼吸鎖電子伝達系によって $NADH$ は NAD^+ に再酸化される。その過程で生じた電子は、種々の酸化還元反応を経て、最終的に酸素などの電子アクセプターに受け渡されることで電子移動プロセスが完了する。この一連の過程の中で、酸化還元反応を媒介する酵素が数多く活躍するが、酵素活性や関連遺伝子の発現レベルそのものに($NADH/NAD^+$ 比など)微生物体内の酸化還元状態が大きく影響を及ぼす。このような事情を鑑みると、体内の酸化還元状態そのものを制御することが体内の電子移動活性や電子移動経路を操る上で重要であることが見えてくる。

3. 細胞外電子移動と電気化学

では、どのようにして、電極と生細胞内部との間での電子移動を実現するのか? 一般に、生細胞は電気絶縁性の生体膜で覆われているため、生体内分子と電極の間で電子のやり取りをすることはできない。そこで

図 4

金属還元菌の細胞外電子伝達。(a) 間接電子伝達。(b) 直接電子伝達。

我々は、ある種の**金属還元菌**の持つ細胞外電子伝達能と呼ばれる性質に着目した。*Shewanella* や *Geobacter* といった金属還元菌は、電子伝導性タンパク質シトクロム *c* を細胞膜外膜に多量に発現しており、これにより酸化鉄や酸化マンガンといった固体状の金属酸化物を呼吸の最終電子受容体として利用することができる(図4)⁴⁾。この外膜シトクロムから固体状電子受容体への細胞外電子移動には、2つの機構があることが知られている。1つは、間接電子伝達と呼ばれる方法である。代表的なのは電子メディエーター(酸化還元活性のある小分子)による電子伝達で、細胞の内外で電子を受け取ったメディエーターが電子受容体まで拡散し、酸化され、再び微生物に利用される(図4a)。*Shewanella* の場合にはキノンやフラビンの誘導体を自ら分泌し、これらをメディエーターとして使うことが報告されている⁵⁾。もう1つの直接電子伝達と呼ばれる過程は、分子の拡散を伴う間接電子伝達と異なり、細胞表面にある外膜シトクロムを介して、電子は細胞から電子受容体へ直接的に受け渡される⁶⁾(図4b)。

ここで、金属酸化物の代わりに電位が適切に制御された電極を、呼吸の最終電子受容体として用いると、生体内の代謝過程で生じた電子を電極へと導くことができる^{1)~6)}。すなわち、金属還元菌を含んだ電気化学回路を構築すると、代謝電子は電気化学回路へと導かれ、代謝活性を電流(電気シグナル)として直接的に検出することが可能となる。また、電極電位の操作を介することで電子受容体のエネルギーレベルを連続的に、かつ定量的に制御することができる。このように、金属還元菌の持つ細胞外電子伝達能に着目することで、生体内酸化還元状態、ひいては代謝経路・代謝活性に対して電気化学的にアプローチすることが可能となる。

4. クエン酸回路活性の電気化学的制御

外膜シトクロムの酸化還元状態に応じた *Shewanella* の電流生成能変化を明らかにすることを目的として、電極電位を様々な値に設定し、微生物代謝電流の時間

変化を検討した。前述したとおり、外膜シトクロムは直接的/間接的に、微生物体内から電極への電子伝達チャンネルとして機能している。電極電位を外膜シトクロムが還元される電位（たとえば $0.0\text{ V vs. 標準水素電極 (SHE)}$ ）に保持すると、微生物から電極への電子移動反応は起こりにくくなり、微生物体内は還元状態となることが期待される（図 5a）。一方、外膜シトクロムが酸化される電位（たとえば $+0.4\text{ V vs. SHE}$ ）では、微生物体内は 0.0 V の場合に比べて相対的に酸化状態となることが期待される（図 5b）。図 5c には、これらの異なる電位における微生物電流を示す。 0.0 V において $+0.4\text{ V}$ よりも高い電流値が得られることが見て取れる。ここで、外膜シトクロムが酸化される $+0.4\text{ V}$ の場合の方が、外膜シトクロムから電極への電子移動反応が起こりやすいことから高い電流値が期待されたが、実際にはこの予想に反する結果が得られた⁷⁾。

では、この 0.0 V および $+0.4\text{ V}$ における代謝電流の大きな違いは何を意味しているのだろうか。ここで、その違いを考察するために、*Shewanella* の乳酸代謝における電子の流れをもう一度考えてみたい（図 3）。菌体内に取り込まれた乳酸は Acetyl-CoA へと変換され、その過程の中で 2 分子の NADH が生成される。その後、クエン酸回路が機能する場合には、さらに NADH が 3 分子と FADH₂ が 1 分子生成される。図 5d に乳酸 1 分子が代謝される場合に電極へと流れる電子数を、クエン酸回路が機能する場合、しない場合に分けてまとめた。ここからわかるように、クエン酸回路が機能する場合には、しない場合に比べ 3 倍の数の電子が流れる（図 5d）。我々は、 $+0.4\text{ V}$ と 0.0 V の異なる電位における微生物電流の大きさの違いが、このクエン酸回路の開閉と関連しているとの仮定のもとに以下の実験を行った。

図 5 *Shewanella* における電流生成能の電極電位依存性。(a), (b) 電極電位操作による微生物体内の酸化還元状態の制御。(c) 0.0 V (実線) および $+0.4\text{ V}$ (破線) における微生物電流の時間変化。(d) 乳酸 1 分子が代謝される場合に電極へと流れる電子数。

(このように *Shewanella* における呼吸電子の流れをクエン酸回路経路が完全に機能する場合とそれ以外のみに分けてしまうのは、いささか簡略化しすぎてはいるが、それでもこれから述べるように多くのことがわかる。)

一般に、クエン酸回路が機能しているか否かは、クエン酸回路阻害剤を加えることで調べることができる。たとえば、マロン酸はそのようなクエン酸回路阻害剤の一種である。クエン酸回路の一部を成す Complex II においてはコハク酸がフマル酸へと変換されるが、コハク酸と構造が酷似したマロン酸を適当量加えると、それが Complex II に優先的に結合し、結果としてクエン酸回路が止まることになる（図 6a）。図 6b には 0.0 V および $+0.4\text{ V}$ で微生物電流が流れている状態で系内にマロン酸を加えたときの結果を示す。より大きな電流が流れている 0.0 V においてのみ、マロン酸を加えた瞬間に電流が大きく減少し、ここでクエン酸回路が機能していたことが示唆された。このマロン酸添加の効果の電位依存性をより詳しく調べるために、様々な電位で同様の実験を行い、マロン酸添加前後の電流値を電位に対してプロットしたものを図 6c に示す。ここからわかるように、外膜シトクロムの midpoint 電位より負側の領域ではマロン酸添加後に大きく電流が減少したのに対し、正側の領域では何の影響も見られなかった。また、同じような結果が、マロン酸以外の他のクエン酸阻害剤を加えた場合にも観察された。

これらの結果は、クエン酸回路の活性が外膜シトクロムの酸化還元状態に支配されていることを明確にしている。すなわち、外膜シトクロムが還元状態となるような負側の電位領域では、クエン酸回路が効率的に機能しているのに対して、外膜シトクロムが酸化状態となるような正側の電位領域では、クエン酸回路が効

図 6 クエン酸回路阻害剤添加の効果。(a) マロン酸のクエン酸回路阻害機構。(b) マロン酸添加に対する微生物代謝電流の応答。(c) マロン酸添加効果の電極電位依存性。(d) 電位スイッチングに対する微生物電流の応答。

図 7

Geobacter の電流生成能の電極電位依存性.

率的に機能していないといえる. さらに, この設定する電極電位に依存したクエン酸回路活性の変化は, 電極電位操作に対して可逆的であることが明らかになっている (図 6d). 以上の結果から, 外部からの電気化学的操作により, エネルギー生産や生合成において大きな役割を果たしているクエン酸回路を任意のタイミングで開閉できることが明らかとなった.

5. 遺伝子発現様式の電気化学的制御

Shewanella で得られた知見をもとに, 別属の電流生成菌 *Geobacter* の電流生成能の電極電位依存性の検討を行った. 様々な電極電位における代謝電流値を, 電位に対してプロットした結果を示す (図 7). ここでも外膜シトクロムの酸化還元状態を境に代謝活性が大きく変化していることが明らかとなり, *Shewanella* で得られた知見の一般性が確認されたといえる.

さらに, *Geobacter* の場合は電極上に形成されるバイオフィームが *Shewanella* の場合に比べ厚いことから, ここから分子生物学的手法を用いるのに十分量の mRNA を採取することができた. そこで, 代謝活性 (電流値) が高い電位 (0.0 V), 低い電位 (+0.4 V) それぞれでサンプルを採取し, それぞれの場合における遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法により解析を行った. その結果, 全 3402 遺伝子のうち, +0.4 V に比べ 0.0 V において発現量が 2 倍以上向上したものが 102 遺伝子 (3.0%), 低下したものが 33 遺伝子 (1.0%) あることがわかった. 発現量が向上した遺伝子の多くは, 転写やエネルギー生産にかかわるタンパク質に対応する遺伝子であった. さらに, 高い電流生成能を示した 0.0 V では呼吸鎖複合体や外膜シトクロムといった電流生成に直接関与するタンパク質にかかわる遺伝子の発現が高くなっていることもわかった⁸⁾. 以上の結果から, 代謝活性のみならず, 遺伝子発現様式も外部からの電気化学的操作により制御可能であることが明らかとなった.

6. まとめと今後の展望

本稿では, 金属還元菌の代謝経路および遺伝子発現パターンの電気化学的制御に関する我々の最近の研究成果を紹介した. 冒頭でも述べたように, 微生物 (生細胞) 体内の代謝経路・代謝活性が体内の酸化還元バランスに強く影響を受けることは広く知られている. 近年では, 有用物質生産菌に関する研究が盛んであるが, こうした研究においても, 代謝電子を「体外へ捨てたいときに捨てる」, 「体内に入れたいときに入れる」ことの重要性が認知されつつある. 今後は, *Shewanella* や *Geobacter* などのモデル微生物で得られた知見を, 広く一般の微生物へと展開することがきわめて重要である.

文 献

- 1) Logan, B. E. *et al.* (2009) *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 375-381.
- 2) Watanabe, K. (2008) *Biosci. Bioeng.* **106**, 528-536.
- 3) Logan, B. E. *et al.* (2008) *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8630-8640.
- 4) Fredrickson, J. K. *et al.* (2008) *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 592-603.
- 5) Marsili, E. *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3968-3973.
- 6) Liu, H. *et al.* (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 6596-6599.
- 7) Liu, H. *et al.* (2010) *Chem. SusChem.* **3**, 1253-1256.
- 8) Matsuda S, *et al.* (2011) *Environ. Sci. Technol.* **45**, 10163-10169.

松田翔一

松田翔一 (まつだ しょういち)

東京大学大学院工学系研究科博士課程

連絡先: 〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

E-mail: matsuda@light.t.u-tokyo.ac.jp

劉 歆

劉 歆 (りゅう ふあん)

北京航空航天大学・准教授

E-mail: liuh@buaa.edu.cn

橋本和仁

橋本和仁 (はしもと かずひと)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

連絡先: 〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

E-mail: hasimoto@light.t.u-tokyo.ac.jp

URL: <http://www.light.t.u-tokyo.ac.jp/>

中西周次

中西周次 (なかにし しゅうじ)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

連絡先: 〒 153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1

E-mail: nakanishi@light.t.u-tokyo.ac.jp