

Enterobacter aerogenes の遺伝子操作による水素収率の改善

原田 慎子*、谷生 重晴
横浜国立大学大学院環境情報学府
E-mail: weather_cock2002@yahoo.co.jp

Improvement of H₂ yield of *Enterobacter aerogenes* by Gene Manipulation

Makiko Harada. Shigeharu Tanisho

Department of Environmental and Information Sciences, Yokohama National University

Abstract

Enterobacter aerogenes is a facultative anaerobic bacterium. It evolves hydrogen via NADH oxidation through membrane-bound hydrogenase under anaerobic condition[1]. The reaction is like follows; $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$. Therefore the more NADH remains unused for the metabolite production, the more hydrogen evolves. Basing on this concept, we have planned to improve the yield up to 10mol-H₂/mol-glucose by inhibiting the function of complex I of the electron transport chain which re-oxidizes NADH under aerobic condition. In case of *Escherichia coli*, complex I is encoded by 14 structural genes from nuoA to nuoN. In particular, nuoG is essential for the function of NADH dhI[2] [3]. So we constructed a cassette for gene disruption of nuoG of *E. aerogenes* by means of the Fusion PCR method then shot it into *E. aerogenes* by the electroporation. Unfortunately any transformant has not been obtained yet.

Keywords: hydrogen production, *Enterobacter aerogenes*, complex I, gene disruption

1. まえがき

近年、低環境負荷・高効率に利用できるエネルギーとして水素が注目を集めている。数ある水素製造技術の中でも、発酵水素生産は二酸化炭素増加による地球温暖化に寄与しないという利点を持ち、さらに有機性廃棄物や未利用バイオマスの有効利用といった点からも期待されている。しかし発酵水素生産の実用化に向けては、水素収率が低いことや発酵後に有機酸やアルコールを含んだ廃液が大量にでることなどのいくつかの課題が残る。そこで本研究では遺伝子操作によって水素発生細菌 *Enterobacter aerogenes* の水素収率改善を試みた。

1.1 *E. aerogenes* の水素発生機構

通性嫌気性グラム陰性桿菌 *E. aerogenes* は種々の炭素源を資化し、代謝産物として酢酸、乳酸、2,3-ブタンジオール、H₂、CO₂などを生ずる。その水素発生機構は補酵素 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form) の再酸化によると考えられており、反応式は次のようになる[1]。

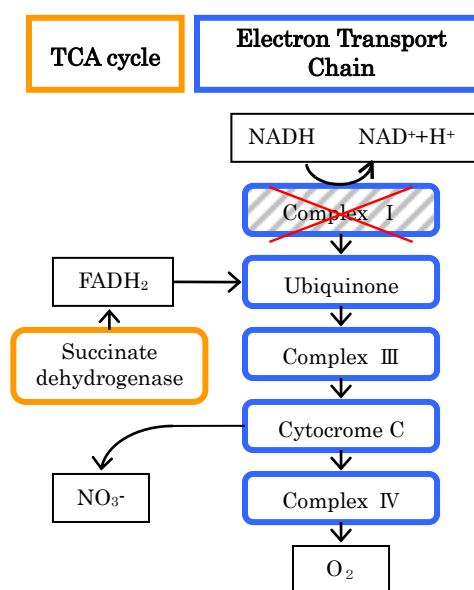
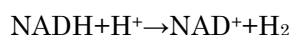


図1 ミトコンドリアの電子伝達系の模式図

通常、*E. aerogenes* は嫌気状態では解糖系にて 2mol の NADH を生成し、そのうち 1mol を代謝産物生成に、残り 1mol を水素生成に用いて水素を 1mol 生産する。一方好気状態では、TCA サイクルと合わせて 10mol の NADH を生成するが、この NADH は電子伝達系にて全て再酸化されてしまうため、水素は発生しない。したがって TCA 回路を働かせつつ NADH の再酸化を行っている電子伝達系の NADH デヒドロゲナーゼ複合体 (complex I) の働きを阻害すれば、NADH は H₂ を発生して酸化され、収率は最大で 10mol-H₂/mol-glucose にまで改善されると考えられる。そこで相同組み換えによる置換破壊によって *E. aerogenes* の complex I 欠損株の作製を試みた。

1.2 破壊の標的遺伝子の決定

E. aerogenes の電子伝達鎖に関する遺伝子研究は見つからなかったが、この菌に非常に近いとされる通性嫌気性菌 *Escherichia coli* の complex I は図 2 のように 14 の構造遺伝子 nuo(NADH:ubiquinone oxidoreductase) A~N から成るとされている[2][3]。そのなかでも nuoG は特に主要な働きをされるとされているので *E. aerogenes* の破壊のターゲットとした。現在 nuoG 破壊のための遺伝子破壊カセットを構築し、エレクトロポレーション法による *E. aerogenes* への導入を試みている。本報ではその実験経過を報告する。

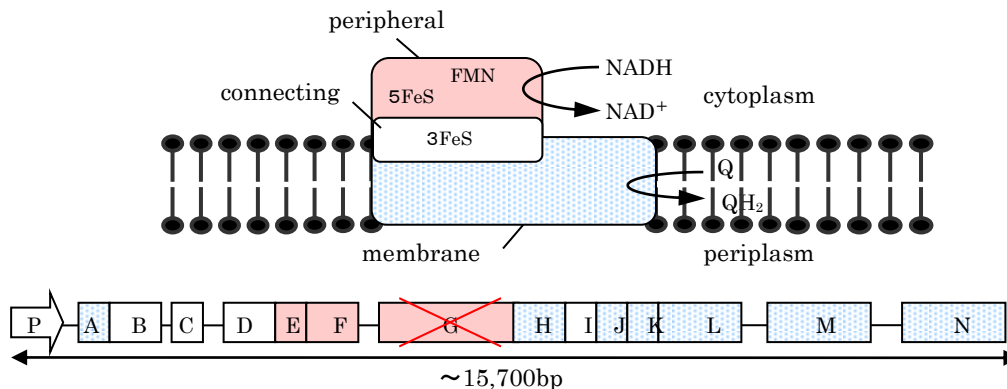


図 2 *Escherichia coli* の complex I および nuo 遺伝子座の模式図[3]

2. 実験方法

2.1 使用菌株および培地

本研究では、*E. aerogenes* JCM 1235^T を使用した。*E. aerogenes* の培養は、YNUB 培地 (水 1L あたり グルコース 15g、ペプトンもしくはカザミノ酸 5g、(NH₄)₂SO₄ 2g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 1g、Na₂HPO₄·12H₂O 14g、KH₂PO₄ 6g) を使用した。

2.2 ゲノム DNA の抽出および PCR による nuoG の増幅

ゲノム DNA の抽出には YNUB 培地で 37℃、16 時間培養した菌体を使用し、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN)を用いて行った。

PCR は TaKaRa Ex TaqTM (TaKaRa) を使用した。条件は(cycle1-30 : 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 1.5min)とし、鋳型として抽出した *E. aerogenes* のゲノム DNA、プライマーとして表 1 の nuoG_395-416f と nuoG_1818-1838r を用いて nuoG の一部(約 1,450bp)の増幅を行った。ここで増幅した nuoG は制限酵素 *Sse8387I* の認識配列を一箇所含み、*Sse8387I* によって上流側が約 850bp、下流側が約 600bp のサイズに切断される。

2.3 PCR によるクロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^r)の増幅

PCR の条件は(cycle1-30 : 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 1.5min)とし、鋳型として Cm^r を持つプラスミド pHSG398、プライマーとして表 1 の Sse_Cmr_3-17f と Sse_Cmr_1145-1131r を用いて Cm^r (約 1,100bp)の増幅を行った。この Cm^r は *Sse8387I* の認識配列を付加したプライマーを用いて増幅されているため、両末端に *Sse8387I* の認識配列をもつ。

2.4 遺伝子破壊カセットの作製

前報では[5]1ステップのPCRによる遺伝子破壊カセットの作製を試みたが非特異的な増幅が見られ良好な増幅が行われなかったため、今回は図3に示した流れでFusion PCR法[4]による遺伝子破壊カセットの作製を行った。遺伝子破壊カセットは*nuoG*(約1,450bp)の間に Cmr^r (約1,100bp)が挟み込まれ、サイズは約2,550bpとなる。

Step1ではPCRによって増幅した*nuoG*および Cmr^r を制限酵素*Sse8387I*で処理し、末端の形状を整えた。両産物をまとめてエタノール沈殿による精製を行った後、DNA Ligation Kit Ver.I (TaKaRa)を用いて制限酵素処理産物の連結反応を行った。その後アガロース電気泳動によりDNA断片の分離を行い、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて約2,550bp付近のバンドの抽出を行った。

Step2では得られたDNA断片を鋳型とし、プライマーとしてDNA断片上流(約1,950bp)には*nuoG_395-416f*と*Sse_Cmr_1145-1131r*を、下流(約1,700bp)には*Sse_Cmr_3-17f*と*nuoG_1818-1838r*を用いてそれぞれPCRによって増幅した。

Step3では上流・下流のPCR産物を混ぜ合わせたものを鋳型とし、プライマーとして Cmr^r 増幅の際に使用した*nuoG_395-416f*と*nuoG_1818-1838r*を用いてFusion PCRによる全長の増幅を行った。

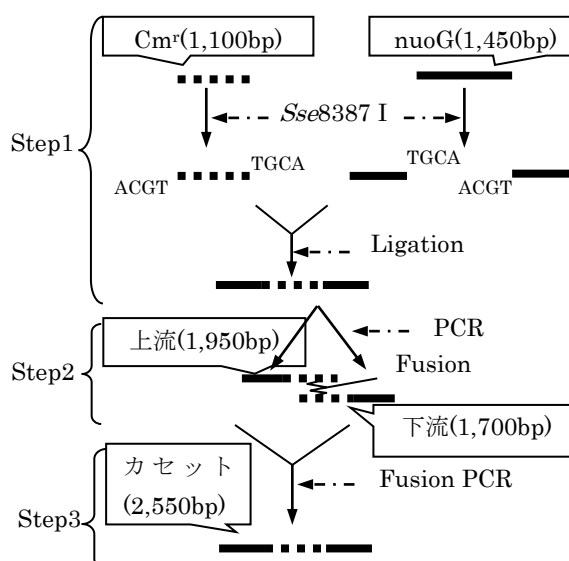


図3 遺伝子破壊カセット作製の流れ図

表1 使用したプライマー一覧

プライマー名	配列(5'→3')	向き
<i>nuoG_395-416f</i>	CCGGTAACCTGGTTGAAGTCTG	Forward
<i>nuoG_1818-1838r</i>	GCATCGATGACGTGGTCCAAC	Reverse
<i>Sse_Cmr_3-17f</i>	TATATCCTGCAGG*CTGGTAGCGGTGGTT	Forward
<i>Sse_Cmr_1145-1131r</i>	TAAAACCTGCAGG*CGGGAAACCTGTTCGT	Reverse

**Sse8387I* 認識配列

2.5 エレクトロポレーション法による菌体への遺伝子破壊カセットの導入

文献[6]のプロトコールに従って、*E. aerogenes*のコンピテントセルを調整した。Fusion PCR法で作製した遺伝子破壊カセットをエタノール沈殿によって濃縮したものをコンピテントセルに混合し、電圧1.8kV、1pulseという条件でエレクトロポレーションを行った。その後形質転換体の選別のため、YNUB培地1ml中で37°C、30分間静置培養し、クロラムフェニコール入り寒天培地(水1Lあたりグルコース5g、NaCl5g、 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 1g、カザミノ酸20g、寒天15g、クロラムフェニコール150mg)に塗布して37°Cで約一週間培養した。

3. 結果と考察

3.1 遺伝子破壊カセットの作製

それぞれのPCR産物を1%アガロースを用いて電気泳動に供した結果を図4~7に示す。レーンM1,M2はDNAサイズマーカーで、M1は1kb DNA Ladder(Promega)DNA marker、レーン2はpHY Marker (TaKaRa)である。図4は*nuoG*、図5は Cmr^r 、図6のレーン1は下流、レーン2は上流、図7は遺伝子破壊カセットで、それぞれの産物は予想通りのサイズの位置にバンドを確認することができた。以上の結果より、各操作は正しく行われ、目的の遺伝子破壊カセットを作製できたと考えた。

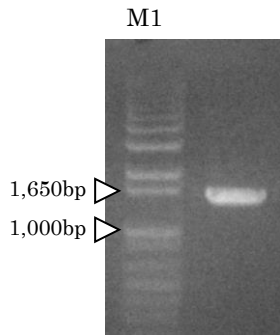


図4 電気泳動結果
nuoGの増幅

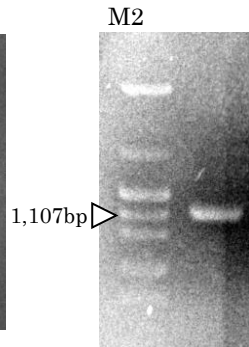


図5 電気泳動結果
Cm^rの増幅

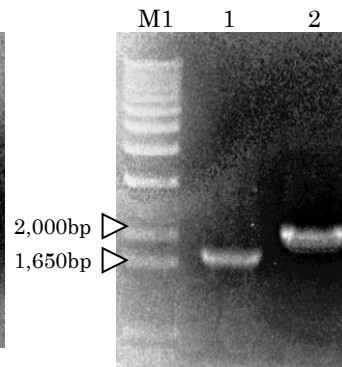


図6 電気泳動結果
上流・下流の増幅

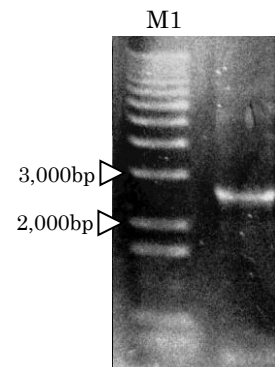


図7 電気泳動結果
カセットの増幅

3.2 エレクトロポレーション法による菌体への遺伝子破壊カセットの導入

エレクトロポレーションおよびクロラムフェニコール入り寒天培地への塗布による形質転換体の選別を行ったが、一週間を経ても菌体の増殖は確認されなかった。よって今回の実験では遺伝子破壊カセットと標的遺伝子の相同組み換えは起こっておらず、遺伝子破壊には至らなかったと考えられる。したがって、再度導入実験を試みている。

4. まとめ

- ・ Fusion PCR 法によって遺伝子破壊用カセットを作製することができた
- ・ エレクトロポレーションによる菌体への遺伝子破壊カセットの導入の結果、形質転換体は得られなかった

5. 謝辞

本研究は公益信託 ENEOS 水素基金の援助を受けて行っています。ここに深く感謝いたします。

6. 参考文献

- [1] Tanisho S, Kamiya N, Wakao N: "Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH", *Biochim. Biophys. Acta*, 973(1), P1-6, 1989
- [2] BIRGIT M. PRUB, JENNIFER M. NELMS, CHANKYU PARK, and ALAN J.WOLFE : "Mutations in NADH:Ubiquinone Oxidoreductase of *Escherichia coli* Affect Growth on Mixed Amino Acids", *J. Bacteriol.* Vol.176, No.8, P2143-50, 1994
- [3] H. Falk-Krzesinski and A. Wolfe: "Genetic Analysis of the *nuo* Locus, Which Encodes the Proton- Translocating NADH Dehydrogenase in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* Vol.180, No.5, P1174-84, 1998
- [4] 桑山修一, 田中可昌:"PCR法による遺伝子破壊コンストラクトの作製法", *日本農芸化学会誌*, 第77巻, 第2号, 2003
- [5] 原田槇子, 谷生重晴: "遺伝子操作による通性嫌気性菌の水素発生能力の改善の研究", 第25回水素エネルギー協会大会 予稿集, P179-182, 2005
- [6] 田村隆明:『改訂 遺伝子工学実験ノート 上』, 羊土社, P79-80, 2004