

2007/02/13

酪酸発酵の 遺伝子操作による制御設計の研究

A Control Design by Gene Manipulation of Butyric Acid
Fermentative Hydrogen Production



環境生命学専攻 生命環境コース

責任指導教員: 谷生重晴

05HA019 金子隆史 (Takashi KANEKO)



Introduction

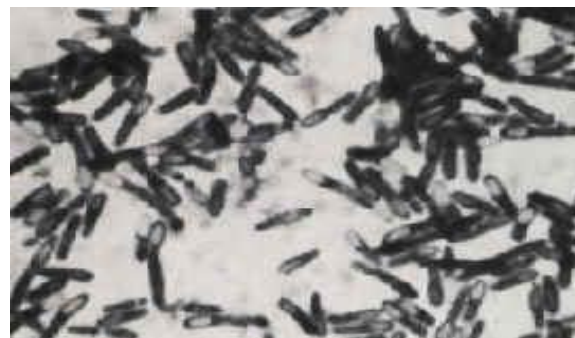
- 酪酸発酵について
- 研究背景と目的

酪酸発酵とは

- 絶対嫌気性をしめすクロストリジウム属細菌により行われ、主な産物として酪酸を生成する発酵

Ex:

- *Clostridium butyricum*
- *Clostridium kluyveri*
- *Clostridium pasteurianum*



Clostridium butyricum



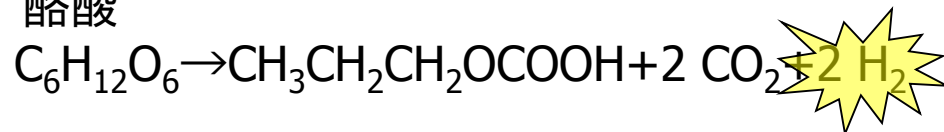
酪酸

水素

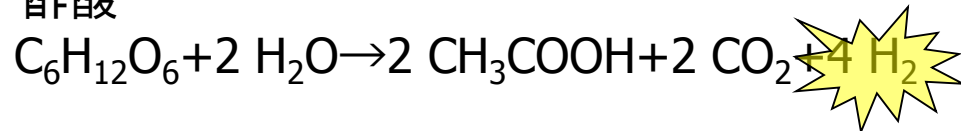
酪酸発酵水素生産について

属名	種名	収率	代謝産物			
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	2.35	Butyrate	Acetate		
	<i>acetophilus</i>	1.82	Butyrate	Acetate		
	<i>perfringens</i>	2.14	Butyrate	Acetate	Lactate	Ethanol
	<i>acetobutylicum</i>	1.35	Acetate	Butanol	Acetone	
	<i>butylicum</i>	0.78	Butyrate	Acetate	Butanol	Isopropanol

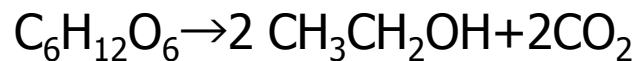
- 酪酸



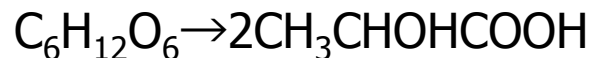
- 酢酸



- エタノール



- 乳酸



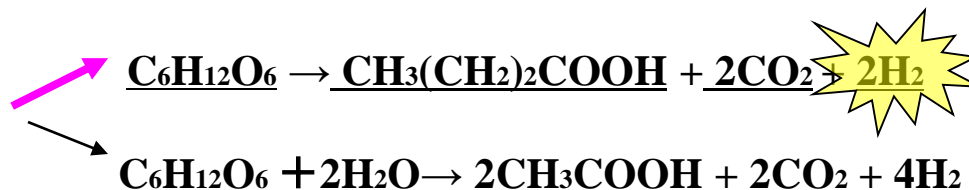
研究背景と目的

- 研究背景:

現状の酪酸発酵による水素生産性は酪酸と酢酸の比率により左右されるが、酪酸に偏っているため、報告されている最大収率は $2.35\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$ である。

- 研究目的:

酪酸生成から、水素生産性の高い酢酸生成に向かわせ、理論最大収率 $4\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$ に近づけること。



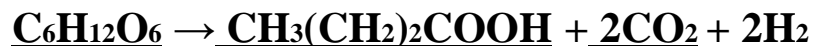
研究背景と目的

- 研究背景:

現状の酪酸発酵による水素生産性は酪酸と酢酸の比率により左右されるが、酪酸に偏っているため、報告されている最大収率は $2.35\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$ である。

- 研究目的:

酪酸生成から、水素生産性の高い酢酸生成に向かわせ、理論最大収率 $4\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$ に近づけること。

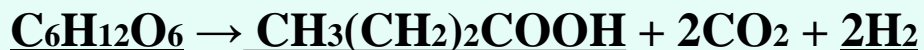
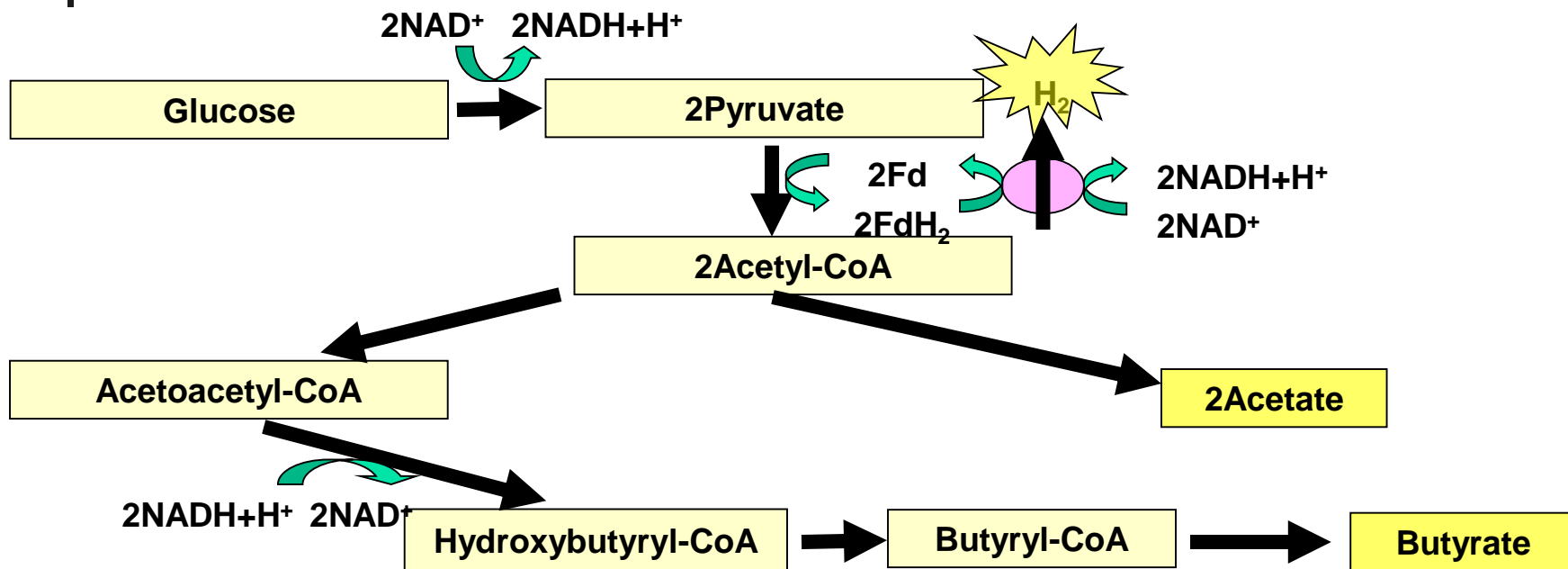




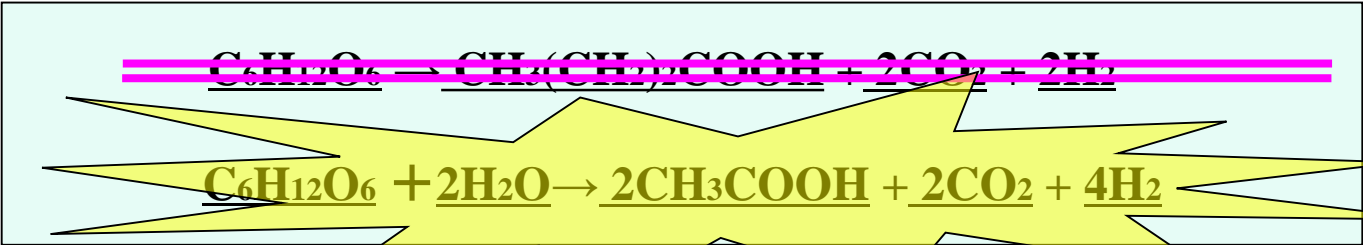
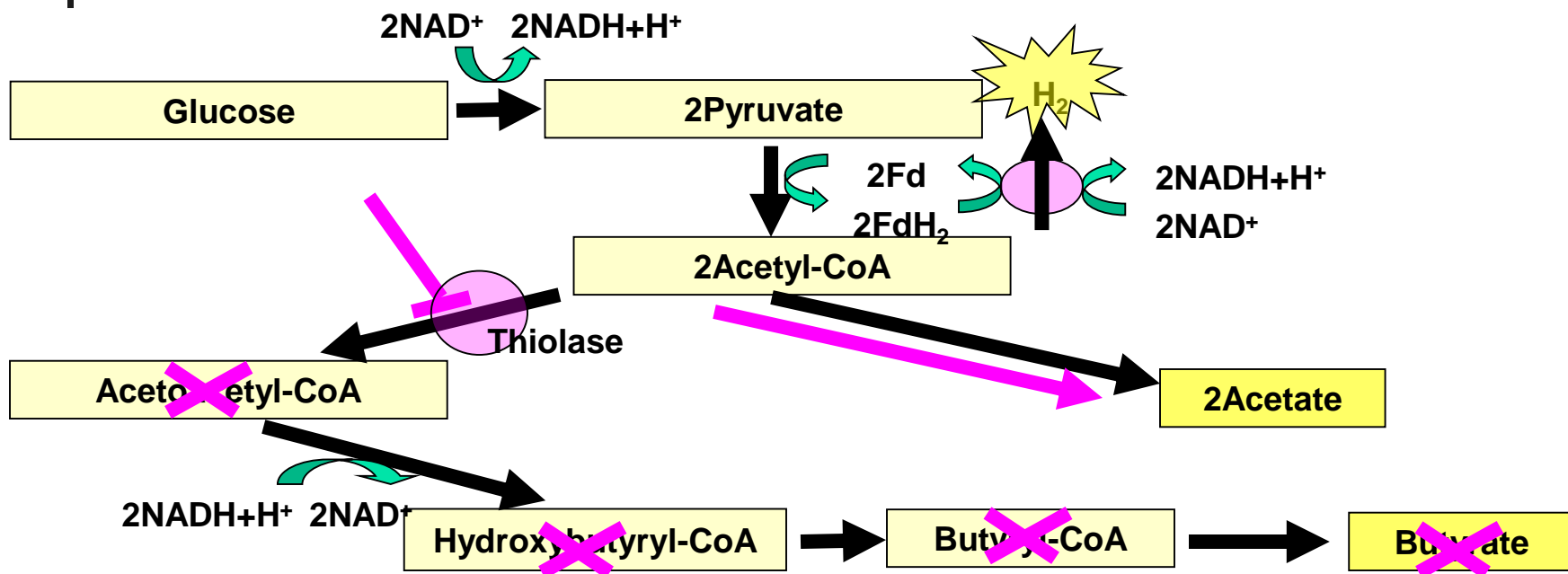
Materials and Methods

- 酪酸の生成を阻害するために
- 遺伝子操作による制御設計

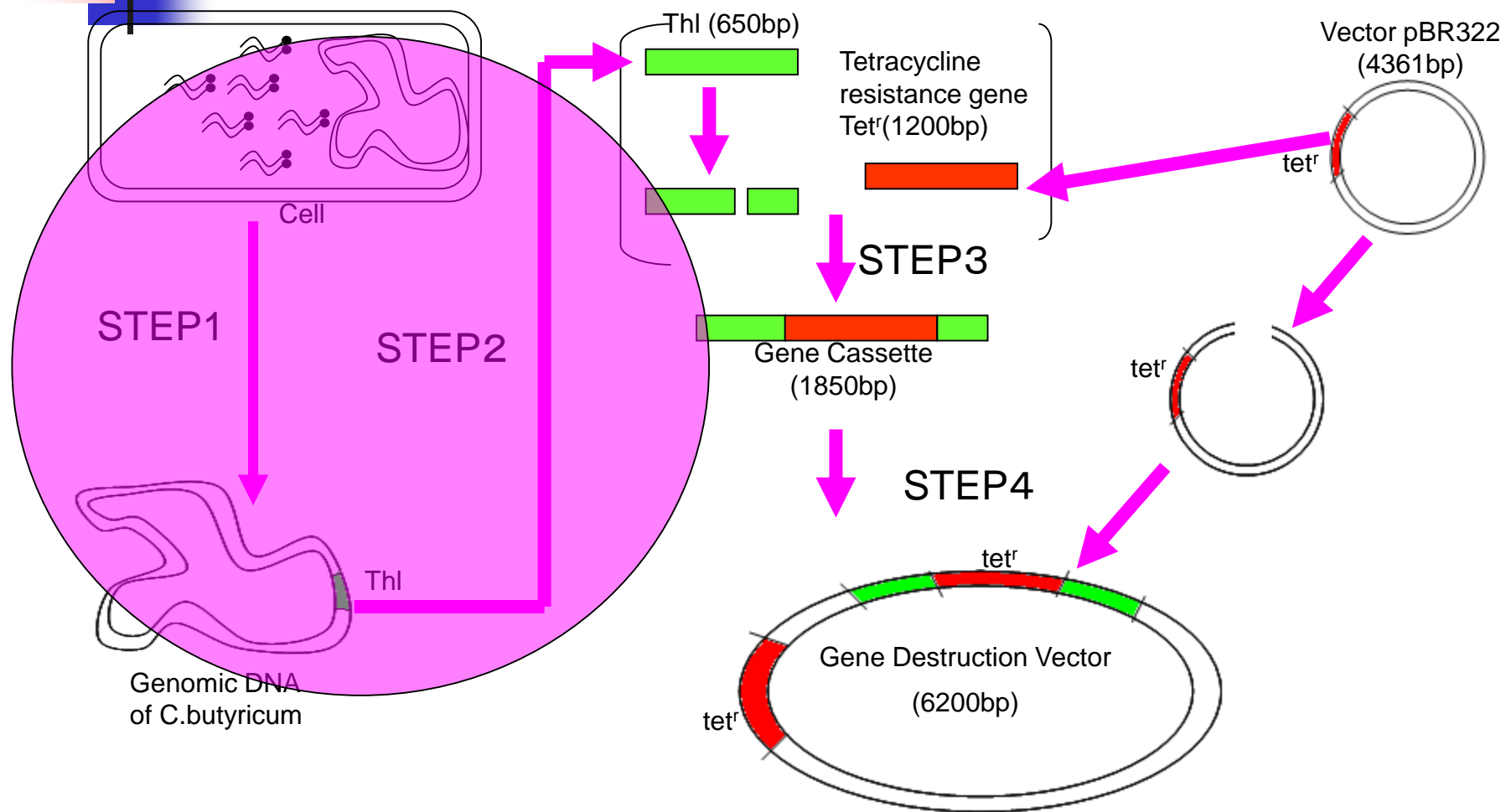
酪酸の生成を阻害するために



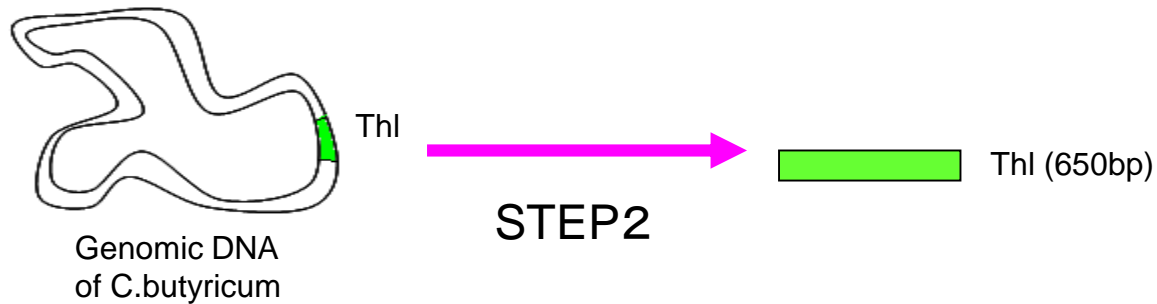
酪酸の生成を阻害するために



遺伝子操作による制御設計



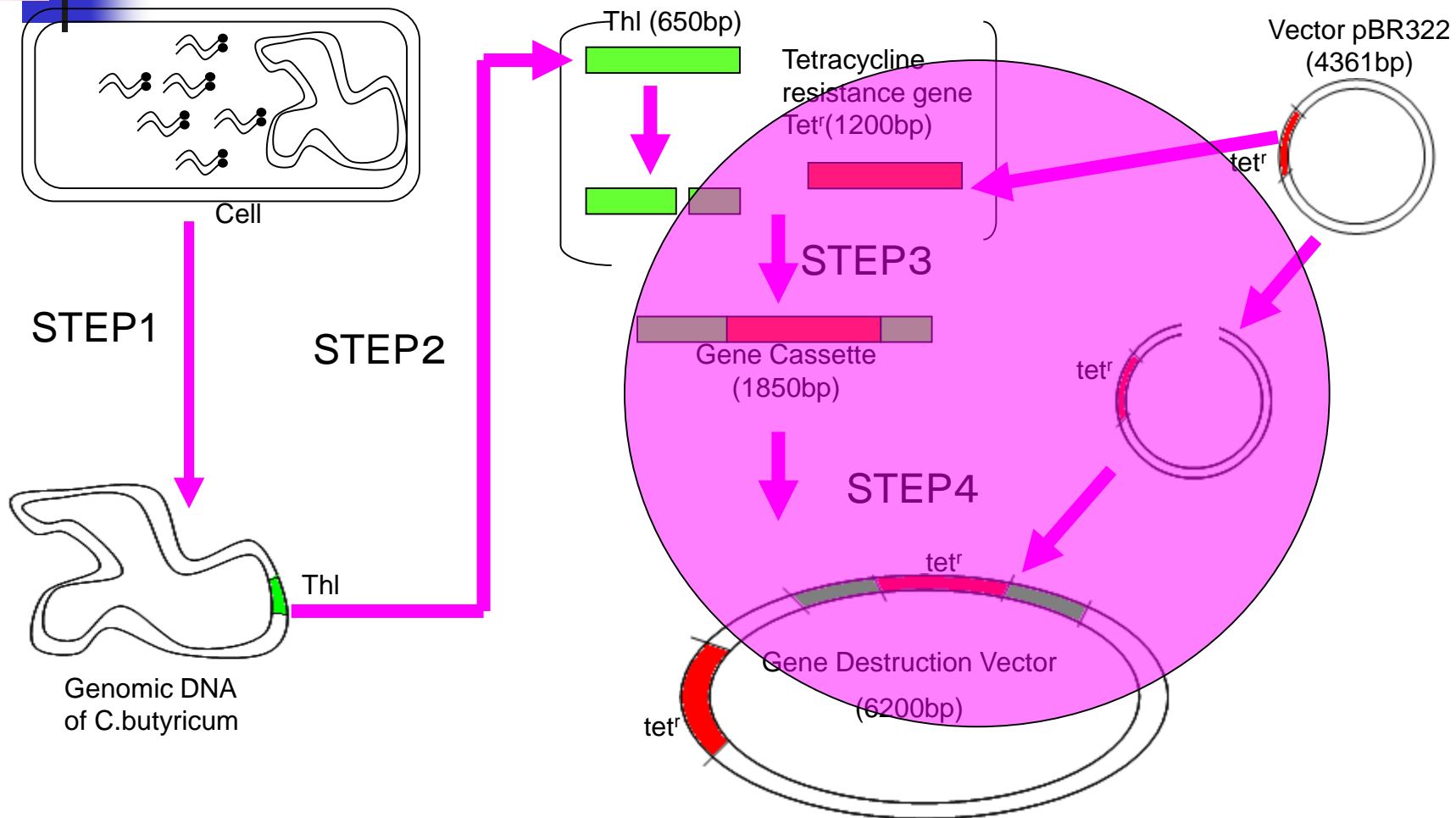
チオラーゼの遺伝子をコードしている遺伝子領域の単離(STEP1・2)



C. tetani vs. *C. perfringens* vs. *C. acetobutylicum*

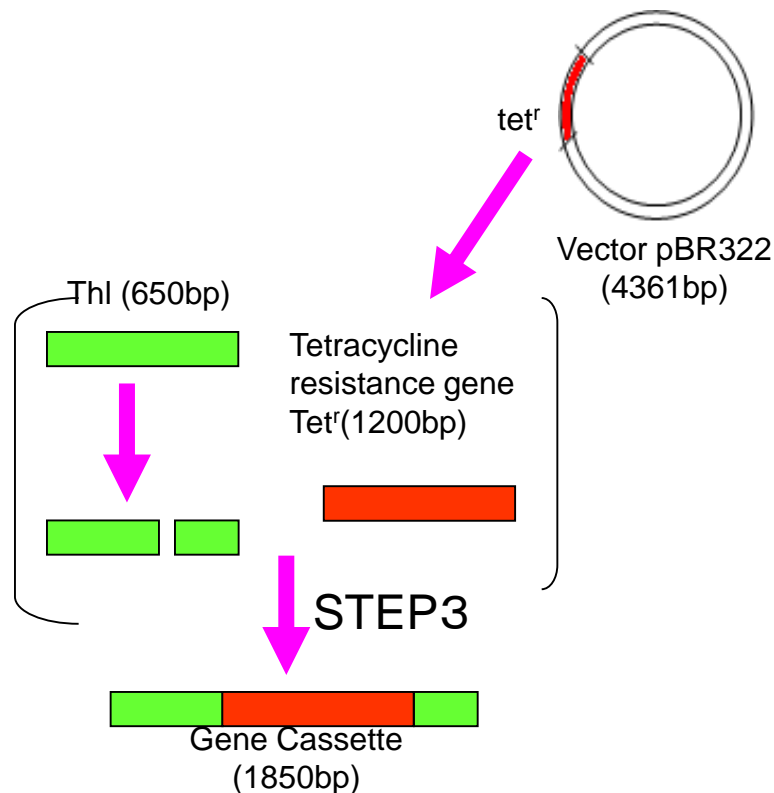
- A T G A A A G A A G T T G T T A T T G T T --
- A T G A G A G A G G T A G T T A T T G C A --
- A T G A A A G A A G T T G T A A T A G C T --

遺伝子操作による制御設計

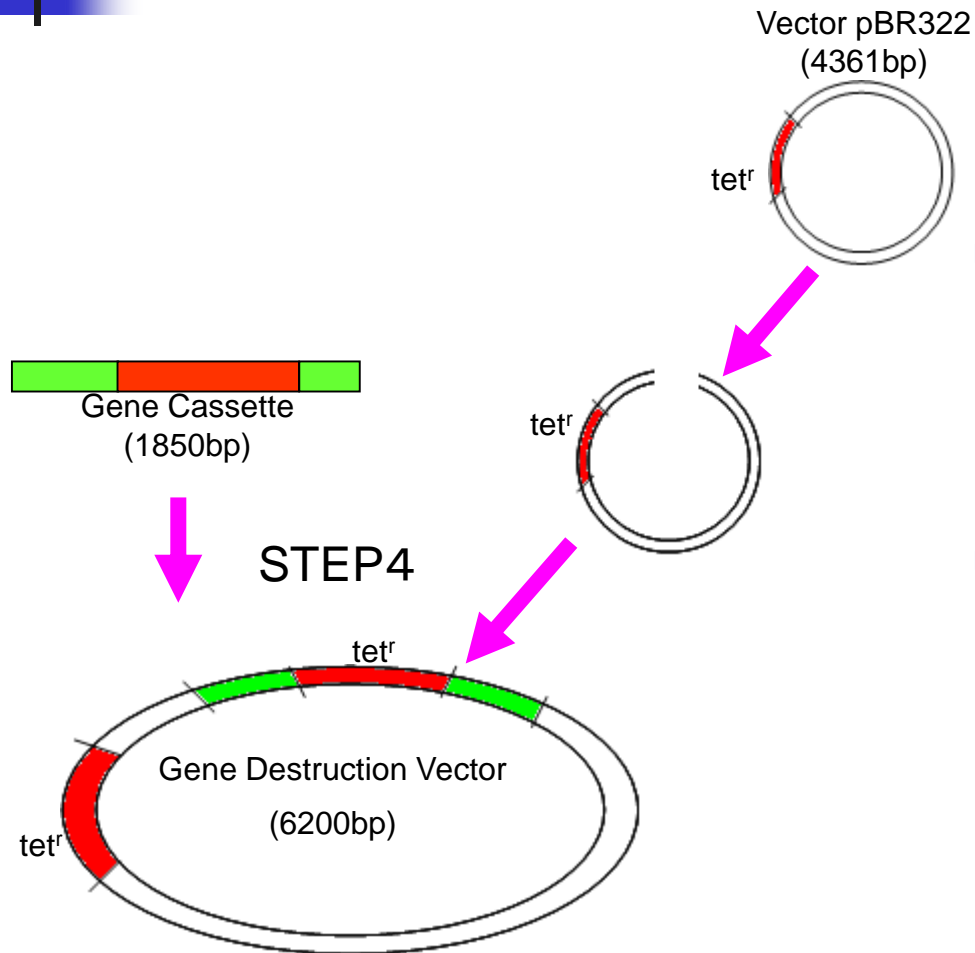


遺伝子カセットの作製(STEP3)

- thl遺伝子(650)を制限酵素で2つの断片に分断
→ *Eco* R I を使用(400+250)
- tet遺伝子(1200)の抽出精製
→ PCR法+電気泳動を使用
- ライゲーション反応(1850)
→ T4 DNA Ligaseを使用

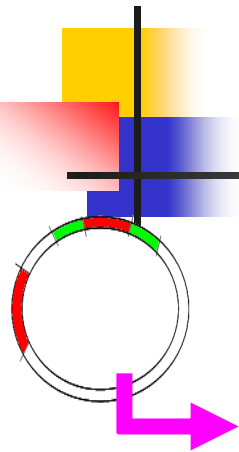


遺伝子破壊ベクター作製(STEP4)

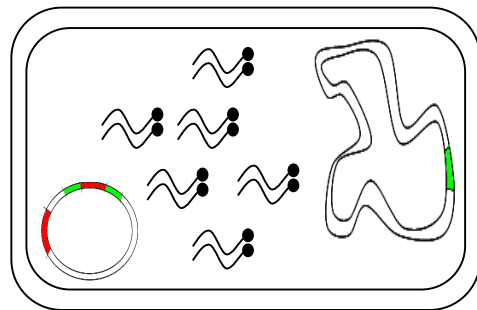


- 抽出精製{遺伝子 (1850)}
→ PCR法 + 電気泳動を使用
- ライゲーション反応
→ T4 DNA Ligaseを使用
→ 電気泳動により確認(6200)

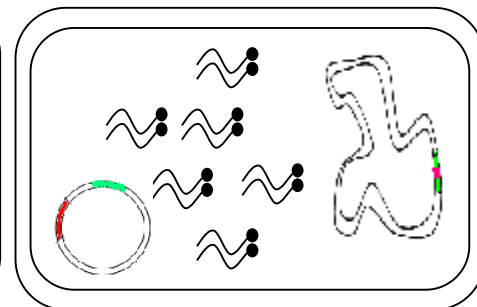
遺伝子操作による制御設計



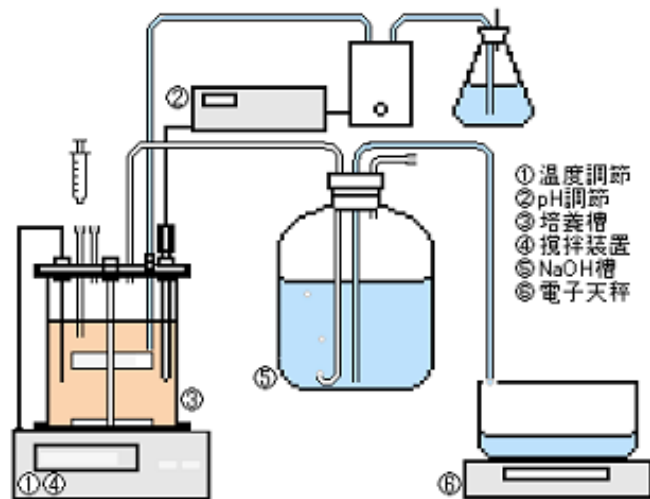
STEP5



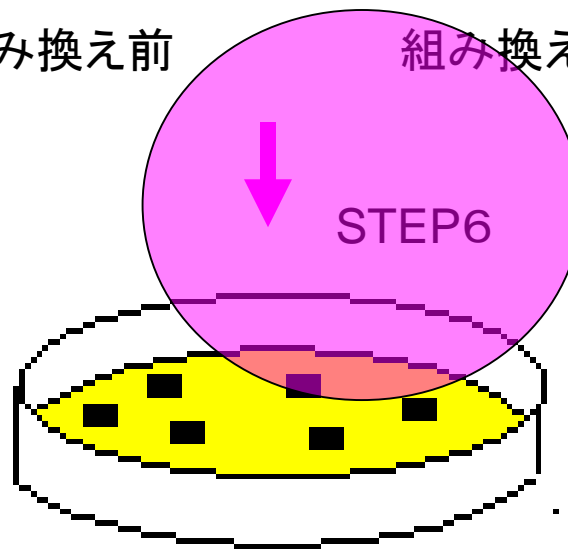
組み換え前



組み換え後

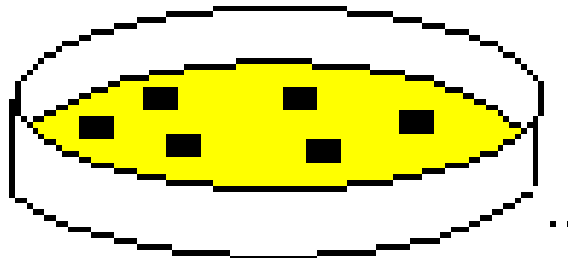
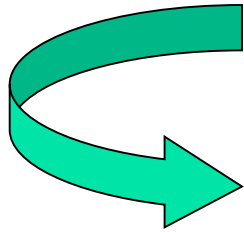
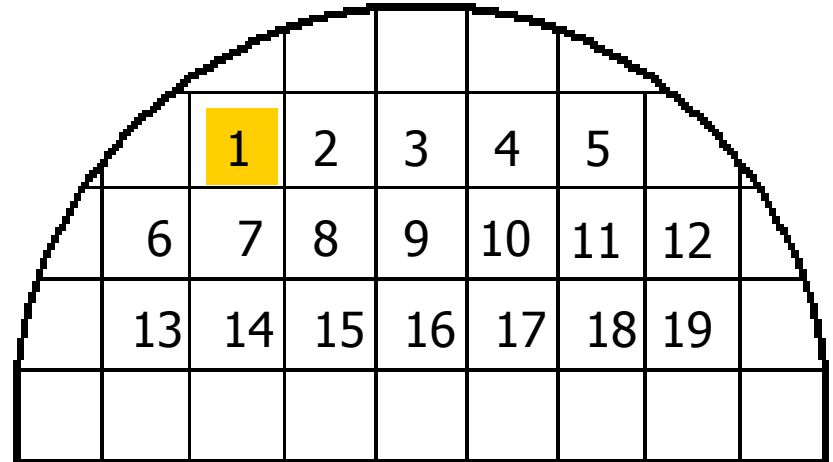


STEP7



テトラサイクリン添加培地

形質転換体のスクリーニング (STEP5・6)



テトラサイクリン添加培地

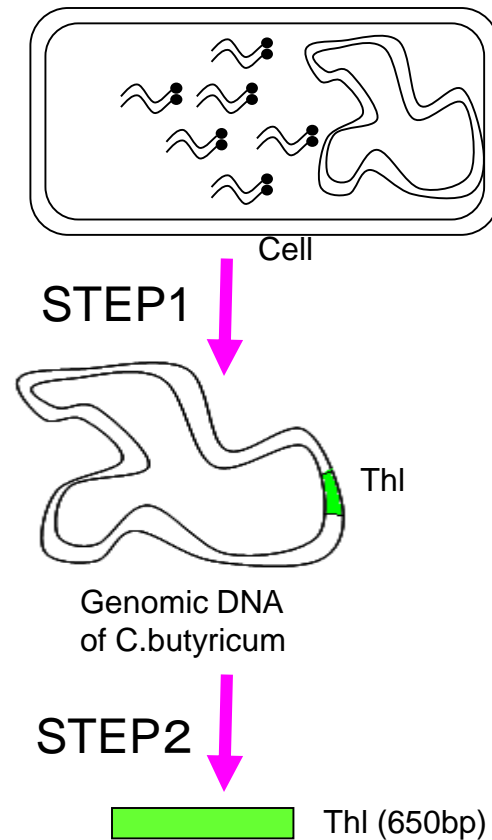
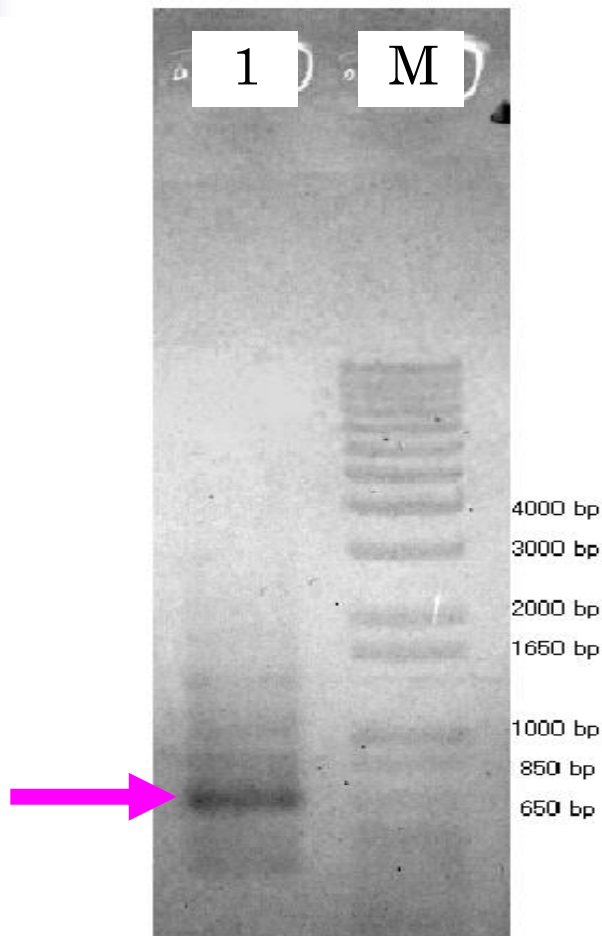




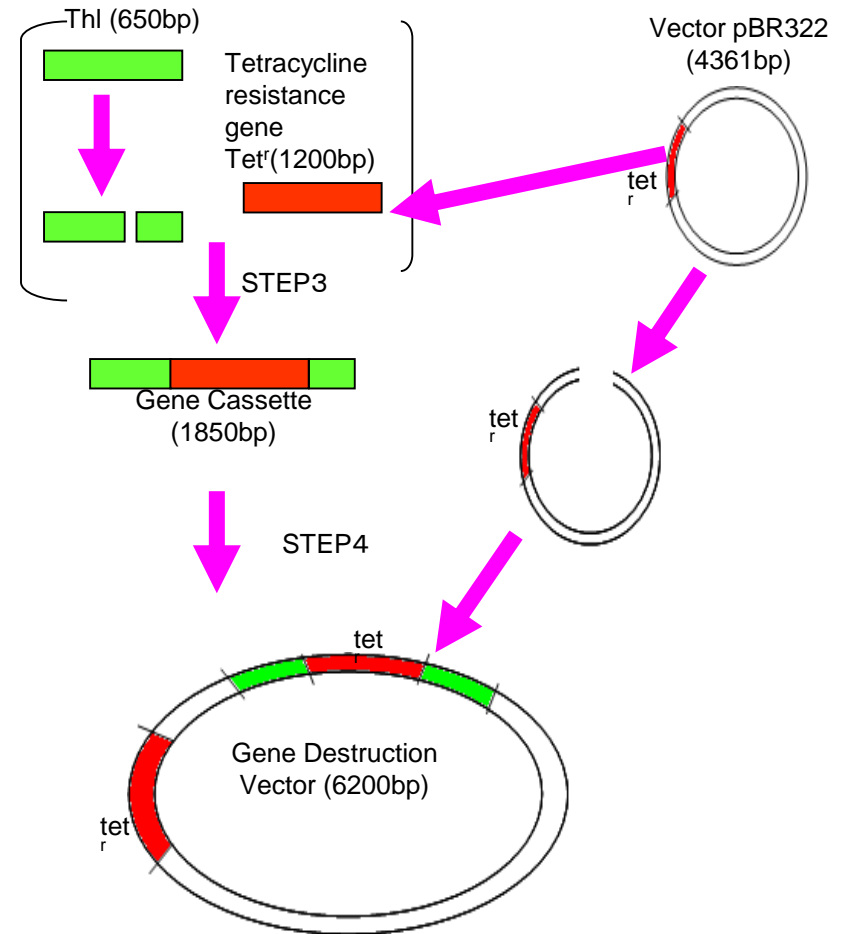
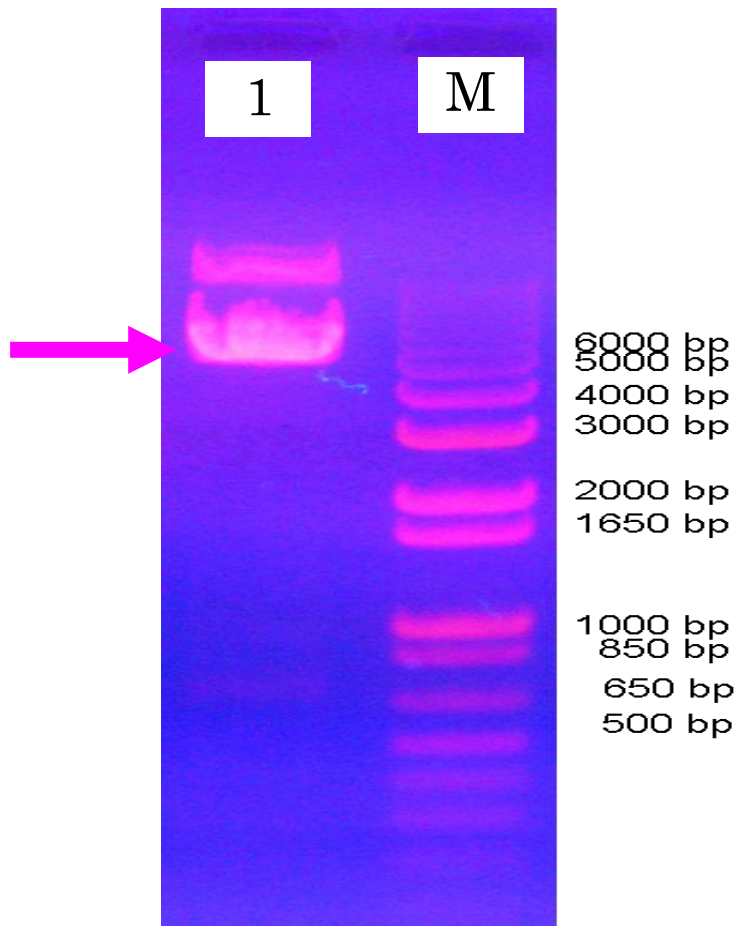
Results and Discussion

- チオラーゼ遺伝子の単離 (STEP1・2)
- 遺伝子破壊ベクター構築 (STEP3・4)
- 遺伝子導入・スクリーニング (STEP5・6)
- 水素発生実験 (STEP7)
- まとめ

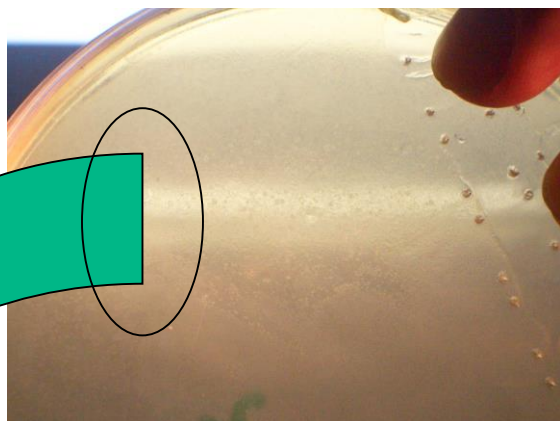
チオラーゼ遺伝子の単離結果



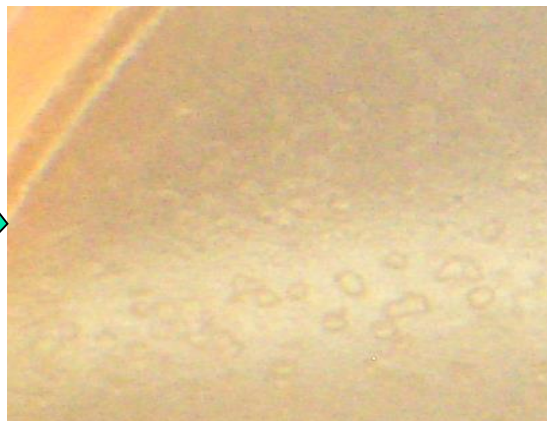
遺伝子破壊ベクター構築結果



遺伝子導入の結果

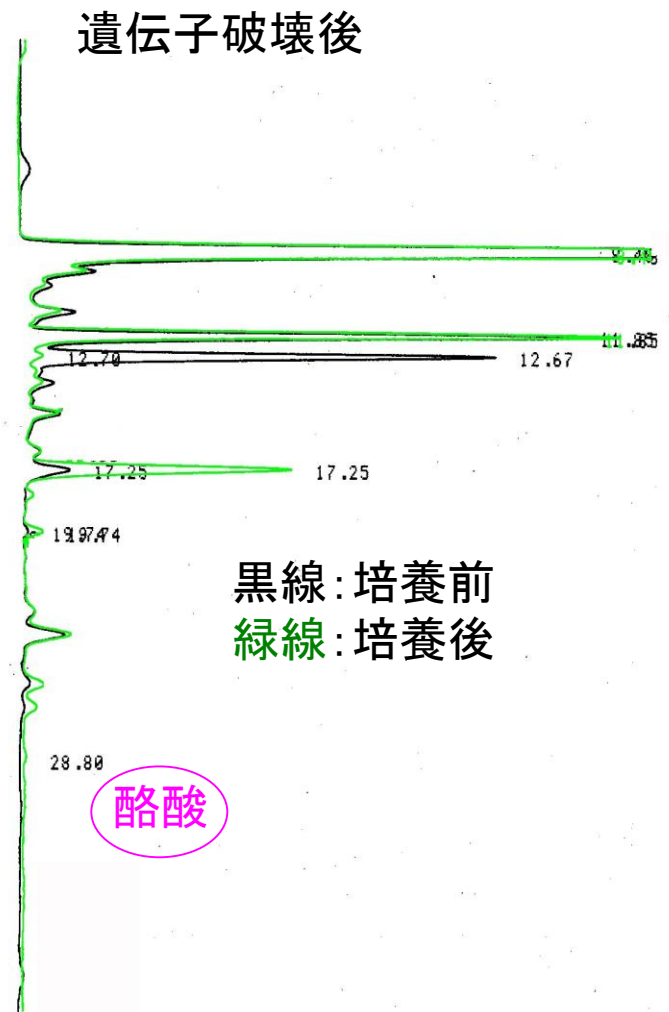
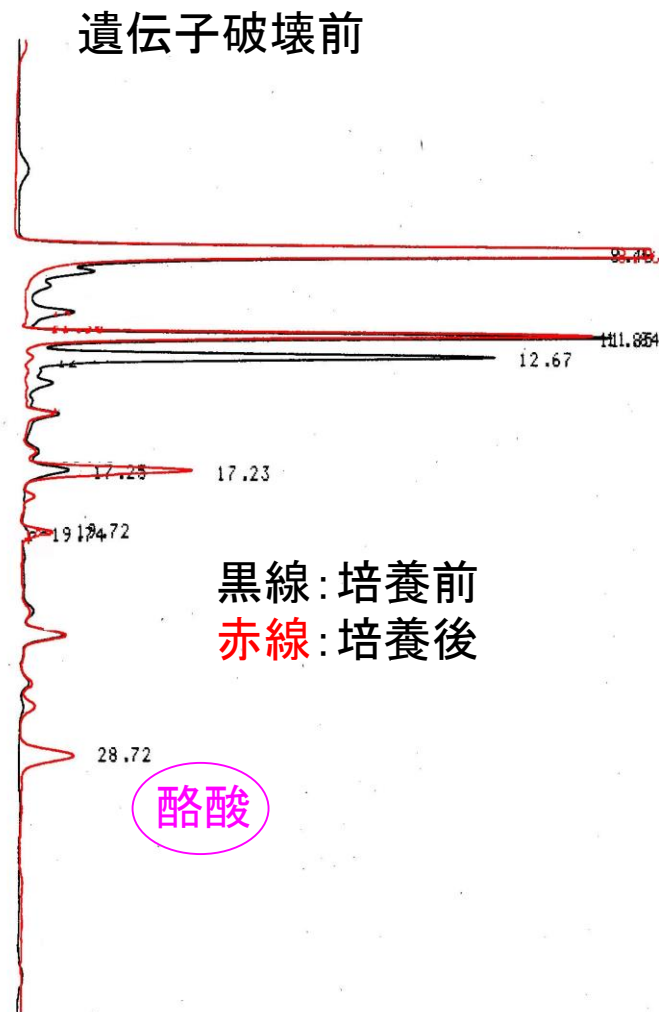


拡大

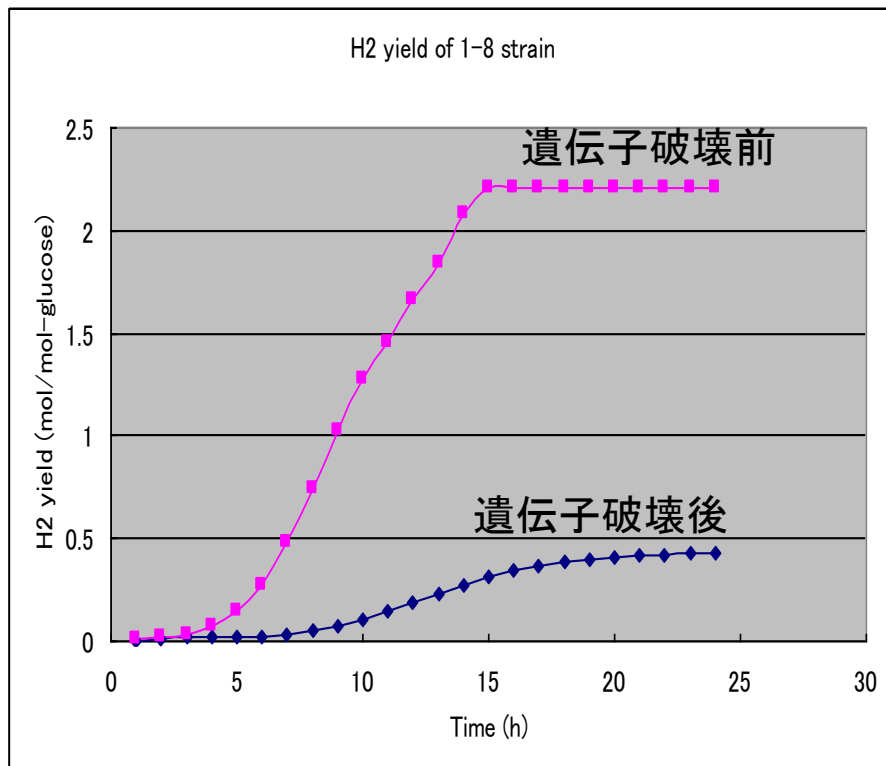


スクリーニング結果		
番号	増殖	ガス発生
1の1	N. D	N. D
1の2	N. D	N. D
1の3	○	N. D
1の4	○	N. D
1の5	N. D	N. D
1の6	N. D	N. D
1の7	N. D	N. D
1の8	○	○
1の9	○	N. D
1の10	○	N. D
1の11	N. D	N. D
1の12	N. D	N. D
1の13	○	N. D
1の14	N. D	N. D
1の15	N. D	N. D

酪酸生産性試験 ～培養後の代謝産物比較～



酪酸生成阻害株における水素発生実験結果

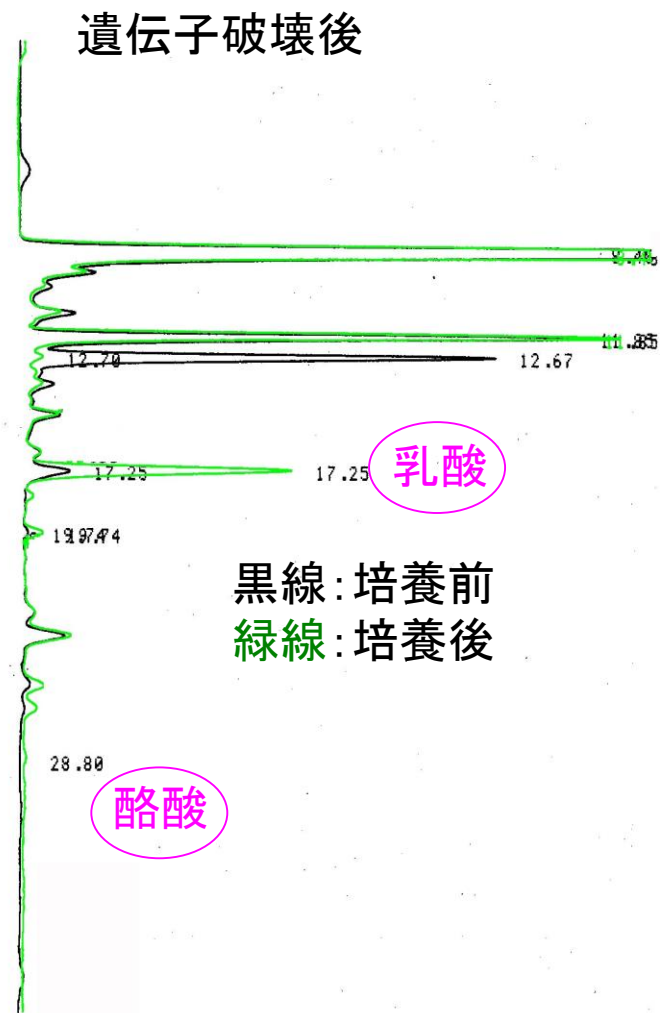
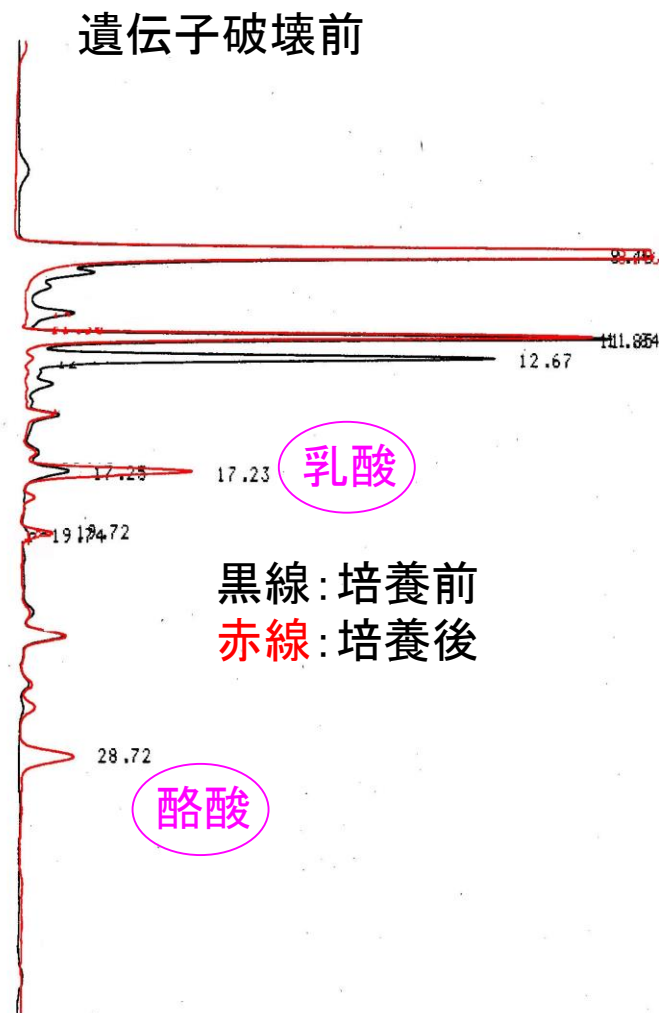


- 本培養培地: YNU嫌気培地700ml
- グルコース濃度: 1.0%
- 培養温度: 38°C
- 培養pH: 5.5

YNU嫌気培地組成(g/L)

■ カザミノ酸:	10
■ Dried Yeast Extract-S:	10
■ L-システイン塩酸塩-水和物:	0.3
■ メルカプト酢酸:	0.3

酪酸生産性試験 ～培養後の代謝産物比較～





まとめ・今後の課題

- 酪酸発酵による水素生産性向上のために、Acetyl-CoA縮合反応に関わるThiolaseという酵素の遺伝子破壊を行い、3株の形質転換体を得ることができた。
- 1-8株の酪酸生成阻害が生じていることをHPLCを用いて確認し、水素発生実験を行なった。
- 今後の課題として、更なる条件検討により酪酸生成阻害株の水素生産性の向上を達成する。