

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

原田 槇子*、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 Facultative Anaerobic Bacterium 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 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 NADH dehydrogenase(NADH dh) which re-oxidizes NADH through the electron transport chain under aerobic condition. In case of *Escherichia coli*, it possesses two membrane-bound NADH dhs, such as NADH dhI and NADH dhII, and NADH dhI is similar to eukaryotic mitochondrial complex I. NADH dhI 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 the cassette for gene disruption of *nuoG* in this study.

Keywords: hydrogen production, genetic recombination, NADH dehydrogenase, *Enterobacter aerogenes*

1. まえがき

近年、環境への負荷が少ないクリーン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、発酵水素生産は製造過程で発生した二酸化炭素は植物によって固定されているため、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つ。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。

本研究で用いる通性嫌気性菌 *Enterobacter aerogenes* は、NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form) からヒドロゲナーゼを介して水素を発生するとされている^[1]。

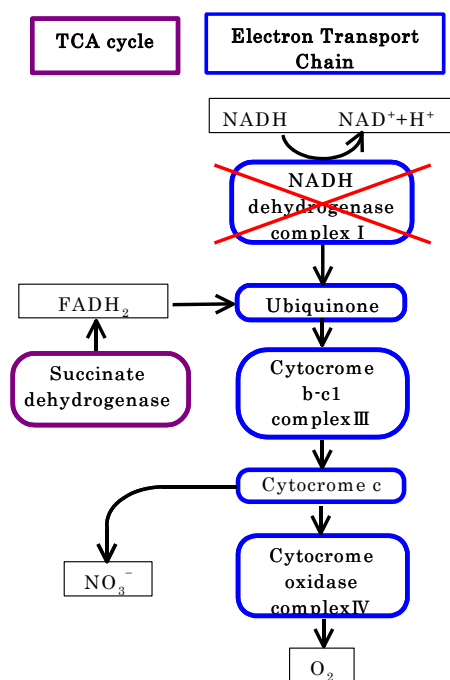


図1 ミトコンドリアの電子伝達系の概要

通常、嫌気状態では解糖系にて 2mol の NADH が生成され、そのうち 1mol が代謝産物生成に、残り 1mol が水素生成に用いられて水素を 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 が生成されるが、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。つまり 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) の働きを阻害できれば、収率は最大で 10mol-H₂/mol-glucose にまで改善されると考えられる。そこで本研究では遺伝子操作によって *E.aerogenes* を NADH デヒドロゲナーゼ複合体を欠いた細菌に改良し、基質当たりの水素収率を改善することを目的とした。

なお、*E.aerogenes* に非常に近いとされる通性嫌気性菌 *Escherichia coli* は 2 種類の膜結合型 NADH デヒドロゲナーゼを持ち、電子伝達系の NADH デヒドロゲナーゼ複合体は 14 の構造遺伝子 nuo(NADH:ubiquinone oxidoreductase)A~N から成るとされている [2]。そこで今回は *E.aerogenes* の NADH デヒドロゲナーゼ複合体欠損株を得るために、14 の nuo 遺伝子の内、特に主要な働きをするとされる nuoG 遺伝子を破壊するための直鎖状コントラストの構築を目指した。

2. 実験方法

2.1 使用菌体および培地

本研究では、*E.aerogenes* JCM 1235^T を使用した。

E.aerogenes の培養は、表 1 に示す YNUB 培地を使用し、37°C で行った。

2.2 ゲノム DNA の抽出および PCR による nuoG 遺伝子の増幅

E.aerogenes のゲノム DNA の抽出を行った。抽出は YNUB 培地で 37°C、16 時間培養した菌体を使用し、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN)によって行った。

PCR は TaKaRa Ex TaqTM (TaKaRa) を使用した。条件は(cycle1-30 : 94°C,30s; 55°C,30s; 72°C,2min)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 2 の nuoG_395-416f と nuoG_2110-2092r を用いて nuoG 遺伝子の一部(約 1700bp)の増幅を行った。

2.3 PCR によるクロラムフェニコール耐性(Cm^r)遺伝子の増幅

PCR の条件は(cycle1-30 : 94°C, 30s; 55°C,30s; 72°C,1.5min)とし、鋳型として Cm^r 遺伝子を持つプラスミド pHSG398、プライマーとして表 2 の Sse_Cmr_3-17f と Sse_Cmr_1145-1131r を用いて Cm^r 遺伝子(約 1,100bp)の増幅を行った。

2.4 直鎖状遺伝子破壊用コンストラクトの作製

2.2 で nuoG 遺伝子増幅の際使用したプライマーは、制限酵素 *Sse8387I* の認識部位が DNA 配列のほぼ中央に位置するように設計してある。また、2.3 の Cm^r 遺伝子は *Sse8387I* の認識部位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* の認識部位をもつ。ここでは、図 2 に示した流れで、nuoG 遺伝子(約 1700bp)の間に Cm^r 遺伝子(約 1,100bp)を挟み込む、約 2,800bp のサイズの DNA 断片の作製を目指した。

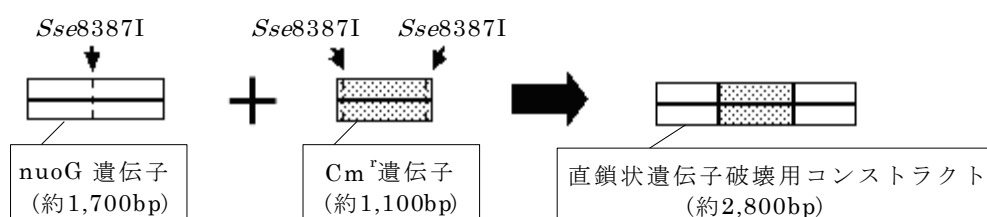


図 2 直鎖状遺伝子破壊用コンストラクトの作製の流れ図

表 1 YNUB 培地の組成

	容量(g/L)
グルコース	15
ペプトン	5
硫酸アンモニウム	2
硫酸マグネシウム	0.2
クエン酸ナトリウム 2 水和物	1.0
リン酸水素二ナトリウム 12 水塩	14
リン酸二水素カリウム	6

まず、*nuoG* 遺伝子および *Cmr^r* 遺伝子を制限酵素 *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、1×TE buffer に溶解した。DNA Ligation Kit Ver.I (TaKaRa) を用いて制限酵素処理産物のライゲーションを行った。その後アガロース電気泳動により DNA 断片の分離を行い、約 2,800bp 付近のゲルを切り出し、TaKaRa RECOCHIP (TaKaRa) を用いてゲルからの DNA 断片の抽出を行った。ここで得られた DNA 断片を鋳型とし、プライマーは表 2 の *nuoG_395-416f* と *nuoG_2110-2092r* を用いて PCR を行った。PCR の条件は(cycle1-30 : 94°C, 30s; 55°C,30s; 72°C,3min)とした。

表 2 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	F
<i>nuoG_2110-2092r</i>	TCCAGGCTTGTGGGGAGTT	R
<i>Sse_Cmr_3-17f</i>	TATATCCTGCAGG*CTGGTAGCGGTGGTT	F
<i>Sse_Cmr_1145-1131r</i>	TAAAACCTGCAGG*CGGGAAACCTGTTCGT	R

**Sse8387I* 認識配列

3. 実験結果および考察

3.1 PCR による *nuoG* 遺伝子の増幅

2.2 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 3 に示す。これは上が-極、下が+極となっており、DNA 産物は上から下へと移動する。約 1,700bp の位置にバンドが確認されることから、目的の *nuoG* 遺伝子が増幅されたと考えられる。

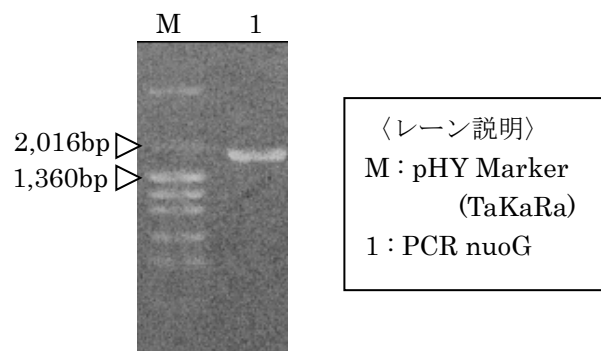


図 3 電気泳動結果—*nuoG* 遺伝子の増幅

3.2 PCR による *Cmr^r* 遺伝子の増幅

2.3 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 に示す。約 1,100bp の位置にバンドが確認されたことから、目的の *Cmr^r* 遺伝子が増幅されたものと考えられる。

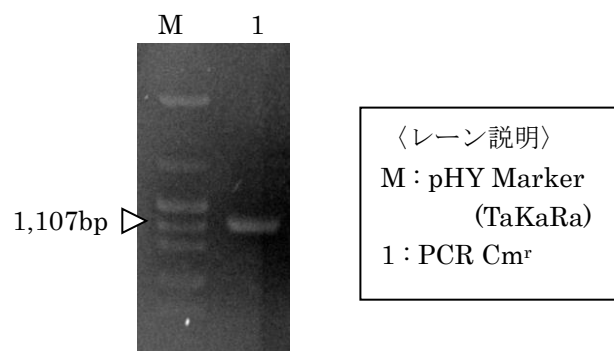


図 4 電気泳動結果—*Cmr^r* 遺伝子の増幅

3.3 直鎖状遺伝子破壊用コンストラクトの作製

nuoG 遺伝子および *Cmr^r* 遺伝子の制限酵素 *Sse8387I* 処理産物を 1%アガロースを用いて電気泳動に供した結果、*nuoG* 遺伝子については約 850bp の位置にバンドが確認でき、制限酵素処理が正しく行われているものと考えられる。*Cmr^r* 遺伝子については認識配列が末端にあり処理前後の変化がわかりにくいため、電気泳動の結果からは制限酵素処理が正しく行われているかどうかの判断は困難である。

2.4 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 に示す。サイズの小さいほうから順に、約 850bp, 1,700bp, 2800bp 付近にバンドが見られる。よって約 2,800bp のバンドは目的の DNA 断片であると考えられる。以上の結果より、制限酵素処理およびライゲーション反応は正

しく行われ、目的の直鎖状遺伝子破壊用コンストラクトを作製することができたと考えられる。ただし、この実験は一度しか成功しておらず、今後追試が必要である。

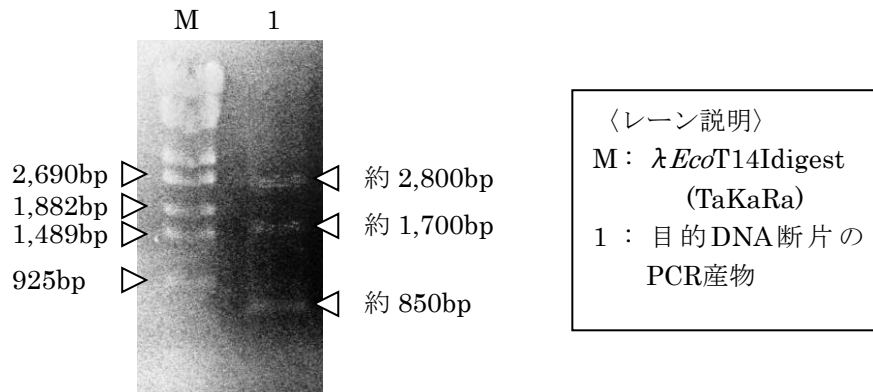


図5 電気泳動結果—目的 DNA 断片の増幅

4. まとめ

- *E.aerogenes* からゲノム DNA を抽出し、nuoG 遺伝子を増幅することができた。
- プラスミド pHSG398 を鋳型として Cm^r 遺伝子を増幅することができた。
- 一度は目的の直鎖状遺伝子破壊用コンストラクトの作製に成功したが、再現性が取れていない。

5. 参考文献

- [1] Tanisho S, Kamiya N, Wakao N. Biochim Biophys Acta 1989; 973(1): 1-6
- [2] BIRGIT M. PRUB, JENNIFER M. NELMS, CHANKYU PARK, and ALAN J.WOLFE : Journal of Bacteriology, Apr.1994,p.2143-2150
- [3] HOLLY J.FALK-KRZESINSKI and ALAN J.WOLFE : Journal of Bacteriology, Mar.1998,p.1174-1184