

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658071

研究課題名(和文)大腸菌への独立栄養的生育能付与

研究課題名(英文)Change of *E. coli* to an autotroph

研究代表者

石井 正治 (Ishii, Masaharu)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30193262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：従属栄養細菌である大腸菌を独立栄養生物に変換しようという考えのもと、大腸菌にリブローズ1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ、ホスホリブプロキナーゼ、さらには *Ralstonia eutropha* 由来のNAD還元型ヒドロゲナーゼを発現させることを試みた。NAD還元型ヒドロゲナーゼは、嫌気的な条件で機能的に発現させることができた。リブローズ1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼとホスホリブプロキナーゼに関しては、数種の生物由来の酵素を組み合わせ発現させており、こちらも機能的に発現していることが確認されている。独立栄養化に向けて、現在も研究を続けている。

研究成果の概要(英文)：In order to change *E. coli* to an autotroph, heterologous expression of RubisCO (Ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase), PRK (Phosphoribulokinase), and NAD reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* were attempted. NAD reducing hydrogenase was successfully expressed under anaerobic growth condition. Also, expression of RubisCO and PRK has been done successfully. Now, final experiment for the checking of the change is being performed.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：大腸菌 独立栄養

1. 研究開始当初の背景

独立栄養生物は二酸化炭素ガスから全ての自らの炭素成分を生合成する能力を有している。その特質から、昨今の「低炭素化」においては、バイオ部門での研究対象の花形となっている。しかしながら、実際はどうか？確かに二酸化炭素ガスを有機化する能力を有しているものの、大部分の独立栄養生物の増殖能は極めて低いものであり、そのまま産業的あるいは工業的に利活用できる生物種は限られたものである、と言わざるを得ない。

申請者は、バイオ版「低炭素化」達成の王道が、独立栄養的生育能の生物工学的開発研究にあることは信じている。実際、申請者は、好熱性水素細菌を用いた研究開発において、基礎的あるいは応用的な分野で多くの業績をあげている、と自負している。しかしながら、独立栄養生物に、バイオ版「低炭素化」の全てを頼るべきとは考えていない。寧ろ、物質生産などにおいて多用されている微生物種の元株に、独立栄養的生育能を付与した上で、今一度物質生産性の付与あるいは向上を図ることも上策であろうと、考えるに至った。では、そのような多用されている微生物種は何か、と言えば、間違いなく大腸菌である。ここまでの論拠から、大腸菌に独立栄養的生育能を付与することの、低炭素化に向けた必然性は明らかであろう。

2. 研究の目的

以上のことから、申請者は以下の項目に沿い、大腸菌に独立栄養能を付与することを目的とした研究を行う。この研究が成功した暁には、独立栄養能を有した大腸菌をベースとした物質生産システムの構築への道筋が見えてくる。

(1) NAD還元型ヒドロゲナーゼ発現株の特徴づけ

(2) リプロースピスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RubisCO) と、ホスホリプロキナーゼ (PRK) を、大腸菌で発現させる。このようにして、カルビン-ベンソンサイクルが機能する生化学的基盤を構築する。

(3) 必要であれば、トランスヒドロゲナーゼをさらに発現させ、NADHの効率的なNADPHへの変換系を大腸菌に付与する。

(3) 形質転換株の独立栄養能を精査する。

(4) 形質転換株を各種従属栄養あるいは独立栄養条件で培養した後、トランスクリプトーム解析さらにはメタボローム解析を行うことで、形質転換株の培養条件に応じた代謝系変化について、生化学的に精査する。

(5) 大腸菌への独立栄養的生育能付与について、総合的な考察を行い、さらなる展開研究を提案する。

3. 研究の方法

E. coli JM109株を用いた。ニッポン・ジン社製の ECOSTM Competent *E. coli* JM109

を heat shock 法により以下のように形質転換した。

氷上で融解したコンピテントセル 50 μ L に、氷上で冷却したプラスミド溶液を 2 μ L 加え、ボルテックスで 1sec 撹拌した。氷上で 5 min インキュベートし、直ちに 42 $^{\circ}$ C で 45 sec インキュベートし、再び氷上で 2 min インキュベートした。その後、予め 37 $^{\circ}$ C で保温しておいた SOC 培地を 900 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 h インキュベートした。培養液を 5,800 g, 20 sec で集菌し、上清を 700 μ L ほど捨て、クリーンベンチ内でゆっくりピペティングして懸濁し、25 μ g/mL カナマイシン入り LB プレートに 3 つに分注して塗布した。その後、37 $^{\circ}$ C で 12-16 h インキュベートし、単一コロニーを得た。試験管に 25 μ g/mL カナマイシン入り LB 培地 3 mL を分注し、得られたコロニーを加えた後、37 $^{\circ}$ C, 300 rpm で一晩振盪培養した。この培養液適量に滅菌したグリセロールを終濃度 20% 添加しグリセロールストックにして、-80 $^{\circ}$ C で保存した。また、活性測定のコントロールとして *R. eutropha* H16 株 (WT) を用いた。

本研究では、RubisCO・PRK 共発現プラスミドを使用した。このプラスミドはカナマイシン耐性遺伝子の載った pBBR1MCS-2 プラスミドの lacZ 遺伝子上に RubisCO 遺伝子、PRK 遺伝子を挿入したものである。挿入遺伝子については、RubisCO 遺伝子は、*Hydrogenovibrio marinus* 由来の cbbM (約 1.4 kbp) と *R. eutropha* H16 由来の rbcL2S2X2 (約 3.0 kbp) の 2 種類、PRK 遺伝子は *S. elongatus* PCC 7942 由来の Synpcc7942_0977 (約 1.0 kbp) と *R. eutropha* H16 由来の cbbP2 (約 0.9 kbp) の 2 種類であり、これらを組み合わせた 4 種類のプラスミドを用いた。

E. coli はカナマイシン 25 μ g/mL 入り LB 培地で 37 $^{\circ}$ C, 300 rpm の条件で一晩前培養し、新たなカナマイシン入り LB 培地 (培養規模に応じて、試験管に 4 mL、または 500 mL 容三角フラスコに 50 mL) に前培養液 1/100 量添加し、37 $^{\circ}$ C, 300 rpm または 150 rpm の条件で培養した。OD₆₀₀ = 0.4-0.6 (約 1.5-2.0 h 後) の時点で IPTG を終濃度 0.5 mM になるよう添加し、4 h 培養した。なお、濁度測定には Beckman DU 7400 Diode Array Spectrophotometer (以下 Beckman) を用いた。

R. eutropha は、試験管に LB 培地 3 mL、グリセロールストック 50 μ L を添加し、30 $^{\circ}$ C, 300 rpm の条件で一晩前培養した。培地に前培養液を OD₆₀₀ = 0.1 になるよう添加し、100 mL 容バイアルに 10 mL 分注した。プチルゴム栓、アルミキャップで密封し、ガスブレンダーを用いて、H₂:O₂:CO₂ = 8:1:1 となるように気相置換し、30 $^{\circ}$ C, 300 rpm で対数増殖中後期 (16-24h) まで培養した

Cell-free extract (CFE) は、以下のように調製した。培養液を 15 mL 容チューブまたは 50 mL 容チューブに入れ、前者なら 11,000 g、後者なら 5,800 g で 10 min 遠心し集菌し

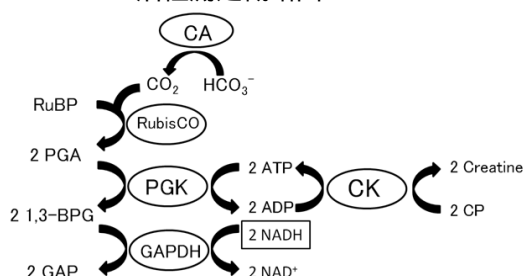
た。上清を除去し、培地除去のため培地の1/10量の20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で懸濁し、集菌時と同条件で遠心する操作を2回繰り返した。上清を除去し、湿菌体重量を測定した後、湿菌体重量[g]×4 mL程度の20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)を添加し、ボルテックスで十分懸濁した。その後、COSMO BIO製超音波破碎機(BIORUPTOR)を用いて、20 kHz, 200 Wで10 min超音波破碎(sonication)した。破碎溶液を20,400 g, 30 minで遠心し、上清をCFEとし、1.5 mLチューブに分注して-80℃で保存した。

CFE中のタンパク質濃度はThermo Fisher Scientific製Pierce BCA Protein Assay Kitを用いて測定した。

BCA Reagent AとBを50:1で混合し、Working Reagent (WR)とした。1.5 mLチューブにスタンダードとして10, 50, 100, 150, 200 µg/mLのBovine serum albumin (BSA)、そして適当に希釈したCFEをそれぞれ10 µL添加し、200 µLのWRを混合した後、ボルテックスした。60℃で30 minインキュベートした。その後直ちにBeckmanを用いて、光路長1 cmの石英セルで562 nmの波長吸光度(Abs562)を測定し、BSAより作製した検量線からCFE中のタンパク質濃度を算出した。

RubisCOとPRKの活性測定はNADHが340 nmの波長を特異的に吸収することを利用して、以下のように行った。なお、詳細な使用試薬、機構についてはそれぞれの章で記述する。光路長1 cmのスクリーキャップ付き石英セルにReaction mixture(後述)を960 µLになるように入れて密封し、Arで気相置換したのち、10 mM NADHを20 µL(終濃度0.2 mM)マイクロシリンジで添加した。日立製ダブルビーム分光光度計(U-2910)を用いて30 または37、340 nmの条件で約200秒間ベースラインを引いた。100 mMの基質を20 µL(終濃度2 mM)添加して吸光度の変化を約800秒まで経時的に観察し、NADHの減少速度から比活性[U/mg-protein]を算出した。酵素活性1 Uは基質を1分間に1 µmol消費する量と定義し、比活性を算出した。

RubisCO活性測定概略図



測定系の機構としては、RuBPを添加すると、RubisCOの働きによって1分子のRuBPと1分子のCO₂が反応し、2分子の3PGが生成される。その後、PGA kinase (PGK, EC 2.7.2.3)によって、3PG + ATP → 1,3-BPG + ADP + Piという反応が起こり、NADHを利用するGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH, EC 1.2.1.12)によって1,3-BPG + NADH → GAP + NAD⁺とNADHからNAD⁺に変換される。Creatine phosphokinase (CK, EC 2.7.3.2), Carbonic anhydrase (CA, EC 4.2.1.1)はそれぞれ、ADP + Creatine phosphate → ATP + Creatine, HCO₃⁻ → CO₂という反応を触媒し、ATP, CO₂が反応の律速になるのを防ぐために添加している

4. 研究成果

NAD還元型ヒドロゲナーゼは、嫌気的な条件で機能的に発現させることができた。

リブロース1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼとホスホリプロキナーゼに関しては、数種の生物由来の酵素を組み合わせて発現させており、こちらも機能的に発現していることが確認されている。独立栄養化に向けて、現在も研究を続けている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 正治 (MASAHARU, Ishii)
東京大学、大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：30193262

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：