

【緒言】

21世紀のエネルギー源として実用化が目前に迫っているのが水素エネルギーである。水素は現在問題となっているCO₂、SO_x、NO_xの排出がないクリーンエネルギーである¹⁾。一方、光合成細菌は嫌気・明条件下で有機酸を基質とした水素発生を行うことで知られている。このようなバイオマスによる水素発生の研究が盛んに行われている。この利点は環境調和性に優れている点、太陽電池や風力発電のように大きな初期投資が不要な点、さらに活性を失った微生物は分解して自然の循環系に入れるため、非生物的方法に比べて環境に負荷がかからない点である。これまでにMiyakeらは、発酵菌として *Clostridium butyricum* と 光 合 成 細 菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV (以下RV) との混合培養によって7.0molH₂/mol glucoseと高い収率を得ることに成功している²⁾。またChittibakuらは遺伝子組換えによる大腸菌の水素生産について報告している。この方法は、大腸菌BL21に *Enterobacter cloacae* II-BT-08由来のヒドロゲナーゼを発現させ3.12molH₂/mol glucose生産することに成功している³⁾。この報告により遺伝子組換えによる水素生産の実行可能性があると示唆された。しかし微生物を用いた水素生産は、生産量が絶対的に少ないため全世界の水素生産量の90%以上が化石燃料によるものであるのが現実である⁴⁾。本研究では、最終的に遺伝子組換え技術を用いて混合培養系において糖質の持つ還元力をすべて水素に変換可能にすることを目的としている。そのために我々は混合培養の際に副産物として生成されるアルコールを資化するためにRVにアルコール脱水素酵素（以下ADH）を分泌するRVの作製を目指している。本学術講演では、RVに導入するベクターの作製の結果について報告する。

【実験方法】

・使用菌体およびプラスミド

本研究で使用している大腸菌TOPO 10 competent cellsはinvitrogen社を用い、S-17菌体およびpLP-1.2プラスミドは日本大学理工学部の浅田泰男先生に供与していただいたものを使用した。

1・PCR

まず、目的のADH遺伝子をPCR法により増幅させた。ADH遺伝子は目的のプラスミドに結合させる際、Xba I (TCTAGA)配列とSac I (GAGCTC)配列が必要になる。しかし、DNAの末端に制限酵素部位を配置するとPCR産物を切断することが不可能である。そのため制限酵素部位が末端にならないようにprimerを設計し、目的部位の増幅を行った。その後、アガロースゲル電気泳動を用いて増幅の確認を行った。

2・制限酵素処理

200μlマイクロチューブにpLP-1.2 プラスミド 3μl、制限酵素 Xba I と Sac I を1μlずつ、10×buffer 2μl、超純水13μl加え、37℃で30分間インキュベートした。その後、酵素を失活させるために65℃で30分間インキュベートした。ADH遺伝子の制限酵素処理も上述の方法で行った。なお使用した制限酵素および制限酵素 buffer は Fermentas UAB(Lithuania)社のものを用いた。

3・ライゲーション

制限酵素処理したADH遺伝子とpLP-1.2プラスミドの結合はタカラバイオ社のDNA Ligation Kit Ver.2.1を用いて行った。まず200μlマイクロチューブにそれぞれのDNA溶液4.5μlと酵素溶液であるI液を7.5μl混合して16℃で1時間インキュベートし遺伝子の結合を行った。

Study on the improvement of the hydrogen production by the genetic recombination of photosynthetic bacteria

Shuhei TAMAYAMA, Yasuo ASADA, and Hideki KOHNO

4・TOPO 10 competent cellsへの形質転換

ライゲーションによって作製したプラスミドはinvitrogen社のTOPO 10 competent cellsに形質転換させた。コンピテントセルに先ほどのベクターを5 μ l混合し氷上で30分間インキュベートした。その後42 $^{\circ}$ Cで30秒間インキュベートした後ただちに氷上に移し、SOC培地を200 μ l加え37 $^{\circ}$ Cで一時間インキュベートした。その後カナマイシンを含むLB寒天培地に菌液を塗布し一晩培養を行った。LB寒天培地に生育したコロニーはコロニーPCRによって目的のプラスミドが形質転換されているコロニーのみを選択し、それを形質転換体とした。その後プラスミドを回収し、塩基配列の解析をBECKMAN COULTER社のCEQ 8800を用いて行った。

5・大腸菌S-17への形質転換

LB液体培地10mlにS-17菌液を50 μ l加えOD₆₆₀が0.4になるまで培養を行った。その菌液1mlを遠心分離(5分、4 $^{\circ}$ C、8000rpm)し、集菌を行った。その菌液にcompetent solution 100 μ l加え穏やかに攪拌した後、作製したプラスミドを10 μ l加え4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後20mMグルコースを含むLB培地を0.9ml加え37 $^{\circ}$ C、200rpmで1時間インキュベートした。その後カナマイシンを含むLB寒天培地に菌液250 μ lを塗布し一晩培養した。その後、LB寒天培地に生育したコロニーをコロニーPCRによって目的のプラスミドが形質転換されているコロニーのみを選択した。その後プラスミドを回収し、塩基配列の解析を行った。

【結果と考察】

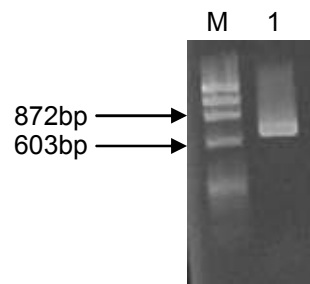
ADH遺伝子を増幅させるのに設計したprimerをTable. 1に示す。PCR法で増幅させたADH遺伝子をアガロースゲル電気泳動の結果をFig. 1に示す。目的の遺伝子は664bpでありFig. 1の結果よりPCRによるADH遺伝子の増幅に成功したといえる。次にライゲーションしたプラスミドの塩基配列の結果をFig. 2に示す。pLP-1.2プラスミドにはBamH I、Spe Iの制限酵素配列が存在しており、ADH遺伝子にはXba Iが存在している。そのためFig. 2よりADH遺伝子とpLP-1.2プラスミドのライゲーションが正確に行われていることがいえる。この結果から我々が目的としていたプラスミドを完成させることに成功したといえる。今後は作製したプラスミドをRVに挿入し、水素

生産等を比較していく予定である。

Table 1 設計したprimer

	sequence(5' to 3')
forward	GCTCTAGAGCTAATGCGCATCCTGATC
reverse	CAGAGCTCGAATTCGGATCCGATATC

* 下線部は制限酵素配列を示す



M:Marker4(ϕ ×174/HaeIII digest)

1:ADH遺伝子

Fig. 1 アガロースゲル電気泳動の結果

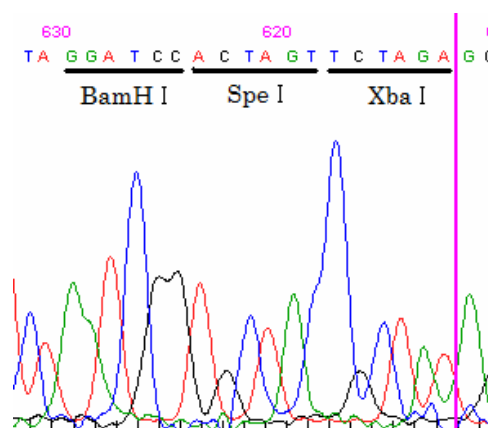


Fig. 2 ADH遺伝子の塩基配列の結果

【参考文献】

- 1) バイオマスハンドブック (社)日本エネルギー学会編 2002 p.190
- 2) Miyake, J. et al.: J. Ferment. Technol., (1984)62, 531-53
- 3) G. Chittibabu, Kaushik Nath, Debabrata Das Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21 (2006), 682-688
- 4) Elam CC, Gregoire Padro CE, Sandroock G, Luzzi A, Lindblad P, Hagen E-F. Realizing the hydrogen future: the International Energy Agency's effort to advance hydrogen energy technologies. Int J Hydrogen Energy (2003), 28:601-7