

# 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV の遺伝子組換えによる水素生産の向上に関する研究

日大生産工(院) ○玉山 周平

日大・理工 浅田 泰男 日大生産工 神野 英毅

## 【緒言】

現在、石炭や石油に代えてCO<sub>2</sub>を排出しない水素エネルギーに期待が高まっている<sup>1)</sup>。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7.0mol H<sub>2</sub>/mol グルコースと高い収率を得ることに成功している<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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3.12 mol H<sub>2</sub>/mol グルコース生産することに成功している<sup>3)</sup>。この報告により遺伝子組換えによって水素生産能力を向上させる可能性があることが示唆された。微生物を用いた水素生産は、生産速度を改良する必要がある。現状は90%以上が化石燃料によるものである<sup>4)</sup>。本研究では、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）を発現するRVの作製を目指している。本学術講演では、組換えRVの酵素活性の結果について報告する。

## 【実験方法】

### 1・使用菌体およびプラスミド

本研究ではベクターの構築のためにinvitrogen

社の大腸菌TOP 10 コンピテントセルを用い、RVの形質転換のための接合伝達能を有する大腸菌S-17を用いた。使用したベクターはpLP-1.2でありVasilyevaらに供与されたものを使用した。特徴としてはR P 4由来の接合伝達ベクターに、光合成細菌の集光タンパク質遺伝子であるパフオペロンの発現制御にかかわるプロモーターを持つベクターである。使用したADHは *synechocystis* PCC6803由来 (cyanobase sll1825)を用いた。

### 2・ベクターの作製

まず、目的のADH遺伝子の*Bam*HI サイト、下流に*Sac*I サイトを持つプライマーを設計し、PCR法を用いて目的遺伝子の増幅を行った。その後、制限酵素 *Bam*HI と *Sac*I を用いてp-LP1.2と増幅させたADH遺伝子をそれぞれ37°C、30分間インキュベートした後、両DNAをタカラバイオ社のDNA Ligation Kit Ver.2.1を用いて16°C、1時間インキュベートした。それにより作製されたベクターはinvitrogen社のTOP 10コンピテントセルの形質転換を用いて回収した。

形質転換方法はまず、コンピテントセルと作製したベクターを混合し氷上で30分間インキュベートした。そしてヒートショックを42°Cで行った後、SOC培地を加え37°Cで1時間インキュベートした。その後カナマイシン (Km) を含むLB寒天培地に菌液を塗布し一晩培養を行い、培地に生育したコロニーを形質転換体とした。その後プラスミドを回収し、BECKMAN COULTER社のCEQ 8800を用いてシーケンス解析を行った。

---

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

Shuhei TAMAYAMA, Yasuo ASADA and Hideki KOHNO

Table 1 設計したプライマー

	sequence(5'-3')
forward	<u>CGGGATCC</u> AAATGC
reverse	CAGAGCTCCTACGGATAG <u>A</u>

\* 下線部は制限酵素配列を示す

### 3・大腸菌S-17への形質転換

LB液体培地10mlにS-17菌液を50 $\mu$ l加えOD<sub>660</sub>が0.4になるまで培養した。菌体は遠心分離によって回収した。その菌体にcompetent solutionを加え攪拌した後、作製したベクターを加え4°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培地を加え37°Cで1時間インキュベートした。その後kmを含むLB寒天培地に菌液を塗布し一晩培養した。そしてLB寒天培地に生育したコロニーを形質転換体とした。

### 4・接合伝達法によるRVの形質転換

RVの形質転換は接合伝達ベクターを保持するS-17との混合培養を行うことで可能である。具体的な方法は、両菌体を適切な培地で培養した後、S-17菌体をRVの寒天培地上で培養を行いaSy液体培地を添加し両菌体を懸濁し、kmを含む寒天培地に添加し培養した。形成したコロニーをPCRでADH遺伝子の増幅の確認を行い、陽性となったものを組換え株とした。

### 5・無細胞抽出液の作製と酵素活性測定

RVの組換え株をルー瓶で拡大培養した後、遠心分離で菌体を回収した。回収した菌体はクライオプレスを用いて液体窒素で冷却しながら凍結破砕した。破砕した菌体をTris-HCl緩衝液で懸濁し、懸濁液を遠心分離して得られた上清を無細胞抽出液として酵素活性測定に用いた。酵素活性測定はNAD<sup>+</sup>がNADHに還元される速度を波長340nmで吸光度の上昇を測定し確認した。その組成をTable 2に示す。

#### 【結果と考察】

次に酵素活性測定の結果をFig.3に示す。この結果より異種発現系において酵素活性を明確に示していることが分かった。今後はより活性の高い条件を決定するとともに生成したアルデヒドの酸化酵素遺伝子を導入してアルコ

ールの完全酸化をめざす。

#### 【参考文献】

- 1) 市川 勝：水素エネルギーが分かる本オーム社(2007年2月5日)
- 2) Miyake J, Mao XY, Kawamura S. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment Technol* (1984), 62:531-535.
- 3) G. Chittibabu, K. Nath, D. Das : Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21. *Process Biochemistry* (2006), 41:682-688
- 4) CC. Ekam, CE . Gregoire Padro, G .Sandrock, A. Luzzi, P. Lindblad, E-F.Hagen :Realizing the hydrogen future the International Energy Agency's effort to advance hydrogen energy technologies. *Int. J. Hydrogen Energy* (2003), 28:601-607

#### 【謝辞】

本研究で使用したADH遺伝子を供与していただいた東京理科大学の太田先生に深謝いたします。

Table 2 酵素活性測定の組成

基質(終濃度)	buffer(pH8.8)	補酵素
ethanol(500mM)		
1-propanol(500mM)	0.1M Tris-HCl	50mM NAD <sup>+</sup>
1-butanol(500mM)		

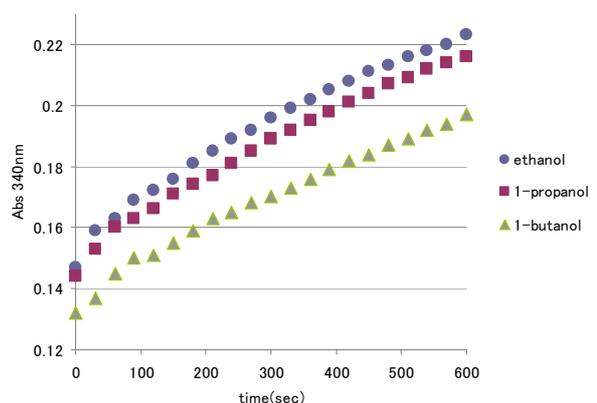


Fig. 3 各種アルコールを基質としたADH活性