

Knockout gene による *Rhodobacter sphaeroides* の水素生産の効率化に関する研究

日大生産工（院） ○小林亮太 日大・理工 浅田泰男 日大生産工 神野英毅

1 緒言

世界の平均地上温度の上昇幅は 1906～2005 年の 100 年間で 0.74 °C であった。今後 20 年間の気温上昇幅は 10 年当たり 0.1～0.2 °C と予想されている¹⁾。この地球温暖化の主な原因は化石燃料を消費する際に発生する温室効果ガスの影響といわれている。そのため化石燃料の代替エネルギーが求められている。水素は燃焼させても水しか発生させないので次世代エネルギーとして注目されている。工業的に水素を発生させる方法として、水蒸気改質などがあるが、工場からの排ガスや多くのエネルギーを消費し、環境に大きな負荷を与える。我々は植物や光合成細菌が行う光合成によるバイオ水素に注目した。嫌気性光合成細菌の光合成による水素生産法は通気などの必要は無く水槽に太陽光などの光を照射するだけで行うことができる。一般廃棄物である生ごみのほとんどは有機物なので微生物で比較的容易に分解し、そこから水素生産を行うことができる。光合成細菌の水素生産にはヒドロゲナーゼとニトロゲナーゼという 2 種類の酵素が関与している。ヒドロゲナーゼは菌体内で生産した水素を基質として吸収することがある。この反応により全体の水素生産量が低下してしまう²⁾。本研究は光合成細菌の遺伝子組換えによって水素取込み型ヒドロゲナーゼを失活させ、水素生産量の向上を目指した。

2 実験方法

本研究は光合成細菌に *Rhodobacter sphaeroides* 株（以下 *R. sphaeroides*）を使用した。*R. sphaeroides* の培養法は、試験管

に *R. sphaeroides* を入れ aSy 培地で満たし、10000 lux、嫌気条件、30 °C で 3 日間培養した。培養したものを 500 ml のルー瓶に継代し、aSy 培地で満たし、上記と同様の条件で 3 日間培養した。培養した後、遠心分離器の条件を 9000 rpm、15 min で集菌し、実験用の培地で攪拌した後、吸光光度計で OD を決定した。

ヒドロゲナーゼ活性はメチレンブルーを用いて測定した。実験用容器に 20 mM の Tris-HCl と 10 mM メチレンブルーを加えた後、OD を決定した *R. sphaeroides* の溶液を加えた。その後、気相を水素で置換し嫌気状態で、25 °C、30 min 静置し、波長 565 nm で吸光度を測定した³⁾。

水素生産量測定法は *R. sphaeroides* の一種である *R. sphaeroides* I-2A-H（以下 I-2A-H）を固定化して行った。固定化の方法は、Basal Madium と OD を決定した I-2A-H の溶液を合わせて 15 ml、4 %の寒天を入れた Basal Madium を 15 ml、200 ml のルー瓶の中で混合し、Fig. 1

の様な状態で 15 分間静置し、GL 培地で満たしたも

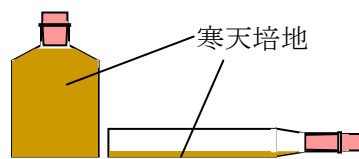


Fig. 1 光合成細菌の固定化

のをサンプル用と水素測定用の 2 本を作製した。水素生産に必要な基質は乳酸を使用した。10000 lux、嫌気条件、30 °C で 7 日間 24 h ごとに水素生産量を測定し、サンプル用から 1.5 ml ずつフィルターを通して培地を採取した。採取したサンプルは液体クロマトグラフィーを用いて基質濃度を測定した。

Study on High Improvement of Hydrogen Production of *Rhodobacter sphaeroides* by Knockout Gene.

Ryota KOBAYASHI, Yasuo ASADA and Hideki KOHNO

3 結果及び考察

I-2A-H 野生株による水素生産実験の結果は Fig. 2 に示した。基質の消費量は 100 mM と 50 mM それぞれ 68 mM と 44 mM であった。この結果から水素の理論収量と比較すると 100 mM は 33.9 %、50 mM は 27.2 % となり 70 % 近くが回収できなかった。このことから水素取込み型ヒドロゲナーゼを失活させれば水素生産量が大幅に上昇する可能性がある。

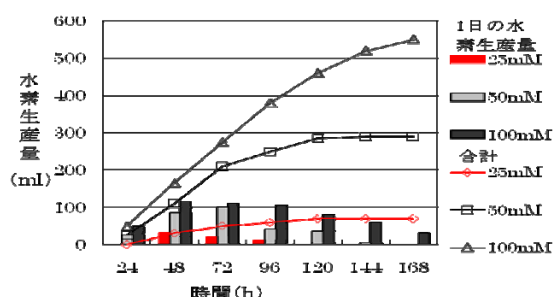


Fig. 2 I-2A-H 野生株による水素生産量

メチレンブルーでヒドロゲナーゼ活性測定実験を行った結果、静置していた実験用容器に衝撃を与えると元の色に戻ってしまい、吸光度はほとんど変わらなかった。これは容器が完全には密封されていなかったか気相の置換が不十分だったというどちらかの理由で *R. sphaeroides* が空気と接してしまいメチレンブルーの代謝が上手くいかなかったことにある。気相と触れ合っていない容器の底ではほとんどメチレンブルーの色素は確認できなかった。

4 まとめ

結果で述べたとおり水素取込み型ヒドロゲナーゼの Knockout により水素生産量が大幅に上昇する可能性がある。その方法以下に記す。

水素取り込みヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子である *hupL* を目的遺伝子として行う。まず、*R. sphaeroides* から *hupL* を抽出し、PCR で増幅させ、プラスミドベクターに挿入する。次に、抗生物質耐性遺伝子をもつベク

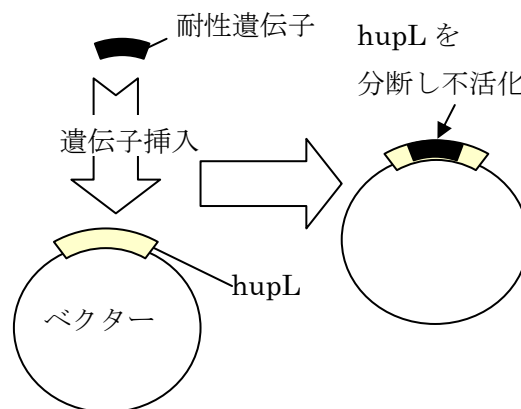


Fig. 3 *hupL* の Knockout gene

ターを制限酵素で処理する。*hupL* を挿入したベクターも *hupL* の内部が切れるように同じ制限酵素で処理する。*hupL* の内部に抗生物質耐性遺伝子を連結させることによって *hupL* の分断を引き起こし、失活させることができる^{4) 5)}。今後の研究方針は上記の方法による水素生産の向上を目指す。

5 参考文献

- 1) 気象庁・環境省・経済産業省監修, IPCC 地球温暖化第四次レポート—気候変動 2007, 中央法規出版(2009)
- 2) 北村博 森下茂廣 山下仁平, 光合成細菌
- 3) Yavuz Ozturk, Hydrogen production by using *Rhodobacter capsulatus* mutants with genetically modified electron transfer chains.(2006)
- 4) Gokhan K, Evaluation of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and its *hupSL* deficient mutant using acetate and malate as carbon sources. (2009)
- 5) 日本生物工学会編, 生物工学実験書, 培風館, (2002), p-194~197