

Knockout gene による *Rhodobacter sphaeroides* の水素生産の高産生に関する研究

日大生産工 (院) ○小林亮太 日大生産工 小森谷友江  
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<sup>1)</sup>。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。水素は燃焼により、水しか発生しないため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。また、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 hydrogenase と nitrogenase という 2 種類の酵素が関与している。hydrogenase 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り、この反応により全体の水素生産量が低下することが報告されている<sup>2)</sup>。本研究は光合成細菌を Knockout gene により、水素取込み型 hydrogenase 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* は、試験管に aSy 培地を満たし、10000 lux、嫌気条件、30 °C で 3 日間培養し実験に使用した。培養したものを 500 ml のルー瓶に継代し、aSy 培地を満たし、上記と同様の条件で 3 日間培養した。培養後、遠心分離器の条件を 9000 rpm、15 min で集菌し、Basal Medium で懸濁した後、吸光光度計で OD を決定した。

hydrogenase 活性は methylene blue を用いて測定した。セルに 20 mM の Tris-HCl と 10 mM の methylene blue を加えた後、OD を決定した *R. sphaeroides* の溶液を加えた。気相を水素で置換し、25 °C で 30 min 静置した後、波長 565 nm で吸光度を測定した<sup>3)</sup>。

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 Medium 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 Medium を 15 ml、200 ml のルー瓶の中で混合し、Fig. 1 で

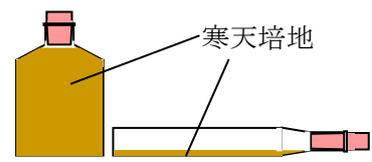


Fig. 1 光合成細菌の固定化

を示した様に 15 分間静置し、寒天培地を固定化した。さらに、GL 培地を満たしたも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

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

Ryota KOBAYASHI, Tomoe KOMORIYA, Yasuo ASADA and Hideki KOHNO

質濃度を測定した。

次に、水素取込み型 hydrogenase の一つと言われている *hupL*<sup>4)5)</sup> を目的遺伝子として組換え実験を行った。その方法は *hupL* の内側を切断し、異なる遺伝子を連結させることによって失活させるというものである。本実験では ampicillin (以下 Amp) 耐性遺伝子を用いる。培養した *R. sphaeroides* からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により *hupL* を増幅させた。PCR 産物は agarose 電気泳動法により確認した。その後、pET-100 から抽出し増幅させた Amp 耐性遺伝子を *hupL* に ligation した。

### 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。

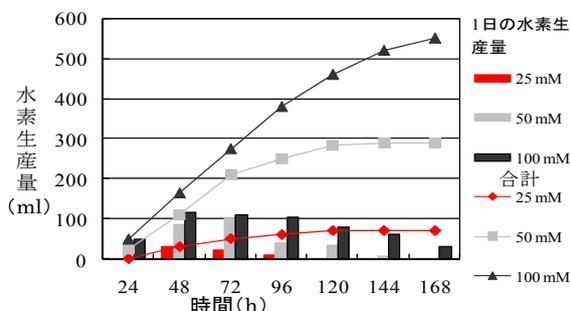


Fig. 2 *R. sphaeroides* I-2A-H 野生株による水素生産量

methylene blue で hydrogenase 活性測定実験を行った結果、30 min 後の吸光度は -0.174 となり、気相を水素に置換しなかったものに比べ色素が大きく減少した。これらのことから水素取込み型 hydrogenase 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。

遺伝子組換え実験の結果、目的遺伝子である *hupL* (1800 bp) を確認できた (Fig. 3)。その後、Amp 耐性遺伝子 (900 bp) を *hupL* に ligation し、agarose 電気泳動法により確認できた (Fig. 4)。

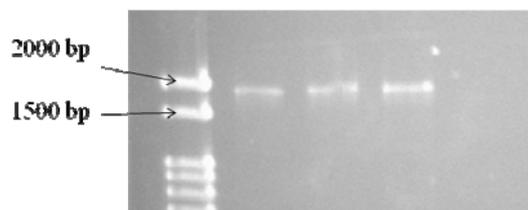


Fig. 3 *hupL* のコロニー PCR 結果

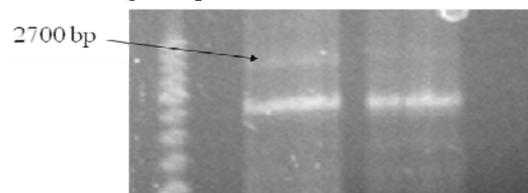


Fig. 4 tandem した *hupL* の PCR 結果

今後の予定は、tandem させた *hupL* を大腸菌に形質転換を行い、接合伝達法により遺伝子欠損株を取得し、野生株との水素生産量の比較検討を行っていく予定である。

### 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