

## 遺伝子組換え法による *Rhodobacter sphaeroides* RV の水素生産能の向上に関する研究

日大生産工（院）○宇佐美 翔太 日大生産工 小森谷 友絵  
日大・理工 浅田 泰男 日大生産工 神野 英毅

### 1. 緒言

近年、化石燃料の大量消費などによって炭酸ガスが増加し、大気汚染や地球温暖化など多くの環境問題が顕在している。さらには最近のエネルギー消費の急増が埋蔵化石燃料資源枯渇の時期を早めているともみられている。そのような中で現在、水素エネルギーは、化石燃料に代わるエネルギーとして注目されている。水素は燃焼によって温暖化の原因とされる二酸化炭素を生じないためクリーンであり、近年の燃料電池の発展により水素エネルギーの重要性は、より増している。さらに、微生物を利用したバイオコンバージョンによる水素製造が注目を集めている。この方法はクリーンなエネルギーの生産手法としてだけでなく、廃棄物処理の手法としても有用である。しかし、工業的な製法に比べて、生産量が少ないという問題点もある。

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が知られている。未利用の有機性廃棄物の処理を兼ねて水素を生産できるという点で光合成細菌による水素生産は大変有望である。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 7.0 mol H<sub>2</sub>/mol glucose と高い収率を得ることに成功している<sup>1)</sup>。また Chittibaku らは遺伝子組換えによって大腸菌 BL-21 に *Enterobacter cloacae* II-BT-08 由来のヒドロゲナーゼを発現させ 3.12 molH<sub>2</sub>/mol

glucose 生産することに成功している<sup>1)</sup>。

我々は、光合成細菌と嫌気性発酵細菌の混合培養による水素生産の研究を行い、7.7 mol H<sub>2</sub>/mol glucose の水素を得ているが、理論収率の 12 mol H<sub>2</sub>/mol glucose にはまだ至っていない。そこで、副産物として生成されるアルコールに注目し、組換え RV によるアルコールからの水素生産を目的とした。我々は、まず *adh* を RV に導入し、アルコール資化能を有する組換え RV を作製した。さらに、そのアルコールを資化した際、人体に害となるアルデヒドが生成されてしまうことから、作製したアルコール資化能を持つ組換え RV にさらに ALDH を発現する RV を遺伝子組換え法により作製し、水素生産能の向上を目指した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 使用菌体および plasmid

本研究では、有機酸を資化し水素発生することによって知られている RV、*adh* を持つ *Rhodospseudomonas palustris* No.7 (以下 No.7)、および *aldh* を持つ *Rhodospirillum rubrum* (以下 *R.rub*) の 3 種類の光合成細菌を使用した。また、組換え plasmid のクローニングに TOP10 Chemically Competent *E.coli* cells (Invitrogen) を用いた。plasmid は、RP4 由来の接合伝達 vector 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制御に関わる *puf* プロモーターと kanamycin 耐性遺伝子を有している pLP-1.2 を使用した (Fig. 1)。

---

## Study on High Yield Hydrogen Production by Genetic Recombination of *Rhodobacter sphaeroides* RV

Shota USAMI, Tomoe KOMORIYA, Yasuo ASADA and Hideki KOHNO

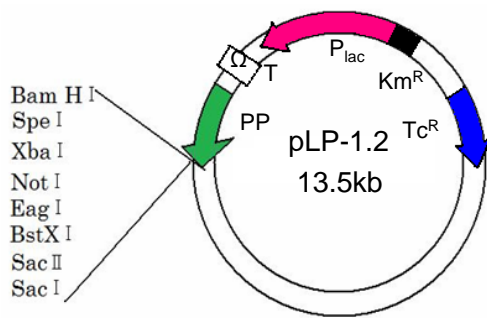


Fig. 1 Map and feature of pLP-1.2

## 2.2 遺伝子抽出

*Rhodospirillum rubrum* のゲノム DNA の抽出は Magstration System 6GC(Precision System Science)を用いて行った。

## 2.3 組換え plasmid の作製

最初に、目的の ALDH 遺伝子上流に *Xba* I サイト、下流に *Sac* I サイトを持つ primer を設計し、PCR 法を用いて ALDH 遺伝子の増幅を行った。その後、制限酵素 *Xba* I と *Sac* I を用いて pLP-1.2 および増幅した ALDH 遺伝子の制限酵素処理を行い、両 DNA を DNA Ligation Kit Ver.2.1. (TaKaRa Bio) を用いて Ligation を行った。また、それと同時に、*adh* と *aldh* の Ligation を行い、組換え plasmid を作製した。

得られた組換え plasmid は TOP10 Chemically Competent *E.coli* cells と混合し、形質転換を行った。培地に生育したコロニーをコロニー PCR でスクリーニングした。その陽性コロニーを液体培地で培養後、組換え plasmid を回収した。

## 2.4 RV の形質転換

得られた plasmid を competent solution でコンピテント状態にした *E.coli* S17-1 に導入した。組換え S17-1 と RV を寒天培地上で 7 日間混合培養し、接合伝達法を用いて RV に組換え plasmid を組み込んだ。その後、スクリーニングを行い、陽性コロニーを培養した。この組換え RV を RV(*aldh*) とする。

## 2.5 酵素活性

RV の組換え株を回収し、クライオプレスを使って凍結粉碎し、Tris-HCl buffer(pH8.8)に溶解し、無細胞抽出液を作製した。この無細胞抽

出液を使って ADH と ALDH の酵素活性を測定した。

## 3. 結果および考察

基質にエタノール、1-プロパノール、1-ブタノールを用いて No.7 の *adh* を組込んだ RV の ADH 酵素活性を測定した。その結果を Fig.1 に示した。また、基質にアセトアルデヒドを用いて、*R.rub* の *aldh* を組込んだ RV の ALDH 酵素活性の結果を Fig.2 に示した。これらの結果より、RV により高いアルコール・アルデヒド資化能が備わったことが示唆された。

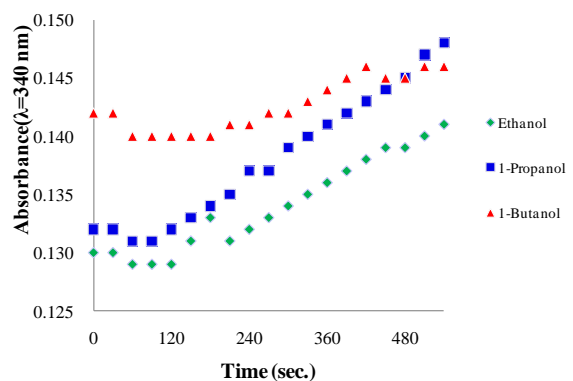


Fig.2 Activity of by transfected *adh* at 30°C

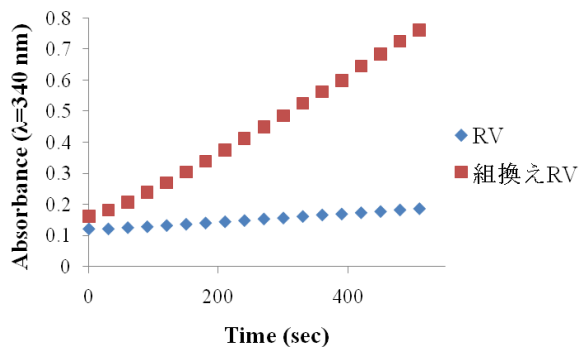


Fig.3 Activity of by transfected *aldh* at 30°C

## 4. まとめ

No.7、*R.rub* の遺伝子の組込んだ組換え RV にアルコールおよびアルデヒド資化能が備わったことが示唆された。

## 5. 参考文献

- 1) 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.