

アセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子を発現する  
組換え *Rhodobacter sphaeroides* RV の水素生産に関する研究

日大生産工(院) ○長谷川 晋也 小林 淳平 日大生産工 吉宗 一晃  
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、化石燃料の代替となる環境調和型の新しい持続可能エネルギーとして水素エネルギーが注目されている。しかし、現状は化石燃料を用いた工業的な水素生産方法が主となっており、化石燃料の代替物として考えると大きく矛盾している。そこで近年、有機性廃棄物の処理を兼ねることが出来、クリーンなエネルギーの製造方法である微生物を利用した水素生産方法が注目を集めている。

光合成細菌は嫌気・明条件下で有機酸を基質とした水素生産を行うことで知られており、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大変有望である。しかし、実際の有機廃棄物の多くを占める糖や炭水化物への活性は低い。そのため、有機酸を生成する嫌気性発酵菌との混合培養による水素生産が研究されている。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 7.0 mol H<sub>2</sub>/mol glucose の高い収率を得ることに成功している<sup>1)</sup>。しかし、理論収率の 12 mol H<sub>2</sub>/mol Glucose にはまだ至っていない。これは、嫌気性菌が生成する酢酸濃度(主に 30mM 以下)では、RV の活性が低いためだと考えられる。従って本研究では、低濃度の酢酸でも効率よく資化できる組換え株の取得を目的とし、酢酸代謝に関連するアセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子(以下 *aldh*)を導入した組換え RV を作製した。

## 2.実験方法

### 2.1 使用菌体および plasmid

本研究では、光合成細菌として RV を用いた。*aldh* は *Rhodospirillum rubrum* 由来のものを使用した。組換え plasmid のクローニングは TOP10 Chemically Competent *E. coli* cells (Invitrogen)を用い、RV への接合伝達には *E. coli* S17-1 を用いた。plasmid は pLP-1.2 を使用した。この plasmid の特徴は、RP4 由来の接合伝達 vector に光合成細菌の接合伝達ベクターであるパフオペロンの発現制御に関わる *puf* プロモーターと kanamycin 耐性遺伝子を有することである。

### 2.2 組換え plasmid の作製

まず、目的の *aldh* の上流に *Xba* I 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 *Xba* I と *Sac* I を用いて増幅した *aldh* と pLP-1.2 の制限酵素処理を行い、DNA Ligation Kit Ver 2.1(TaKaRa Bio)を用いて両 DNA の Ligation を行った。得られた組換え plasmid は TOP10 と混合し形質転換を行い、kanamycin を含む LB 寒天培地で一晚培養した。培地に生育したコロニーは、PCR にて *aldh* の有無を判別後、抽出精製した。抽出精製した組換え plasmid は同様の手順で *E. coli* S17-1 に形質転換し、組換え S17-1 を作製した。また、塩基配列は CEQ8800(Beckman Coulter)を用いて解析した。

---

Study on Hydrogen Production of *Rhodobacter sphaeroides* RV Transformant Expressing the  
Acetaldehyde Dehydrogenase Gene

Shinya HASEGAWA, Jyumpei KOBAYASHI, Kazuaki YOSHIMUNE, Tomoe KOMORIYA,  
Yasuo ASADA and Hideki KOHNO

## 2.3 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 S17-1 との混合培養を行うことで可能である。方法は、組合え S17-1 と RV を寒天培地上で 6 日間混合培養し、接合伝達法を用いて RV に組換え plasmid を組込んだ。その後、スクリーニングを行い陽性コロニーを培養した。得られた組換え株を RV(*aldh*)とした。

## 2.4 水素発生実験

RV の菌株を拡大培養し、遠心分離(9,000 rpm、15min)により集菌後、上清を捨て、Basal medium で懸濁し、分光光度計を用いて波長 600nm 時の OD を測定した。OD から菌量が等しくなるように懸濁液と Basal medium、水素発生用培地(酢酸、グルタミン酸)を加え、嫌気条件、10,000 lux、30°Cで 5 日間 24 時間ごとに水上置換法により水素発生量を測定した

## 3.結果および考察

### 3.1 組換え plasmid の作製

作製した plasmid のシーケンス解析を行ったところ、制限酵素を挟んで目的の塩基配列を確認できたことから、plasmid に DNA が導入されたことが確認できた。

### 3.2 組換え RV の作製

作製した plasmid を用いて RV の形質転換を行った結果、目的部分(*aldh* は 1521bp)にバンドが確認できたことから、RV が kanamycin 耐性を有したことより、RV に plasmid が導入され、組換え RV(*aldh*)が作製できたと考えられる。

### 3.3 水素発生実験

水素発生実験の結果を Fig. 1 に示す。酢酸濃度 25mM において、野生株の RV よりも組換え株の方が多くの水素発生量を示したことから導入した酵素が効率よく働いていると考えられる。また、濃度が上がるにつれて、組換え株は野生株よりも水素発生量が減少したが、これは生成したアセトアルデヒドが菌の生育および水素生産を阻害しているためと考えられる。

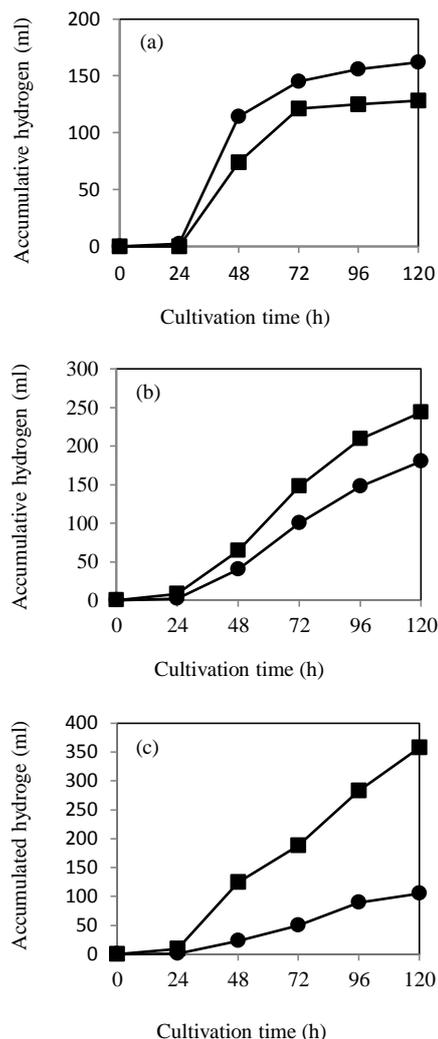


Fig. 1 Accumulative hydrogen production of the RV and RV(*aldh*) strains in 25(a), 50(b) and 75mM(c) of acetate concentration for 120 h. The RV(square), RV(*aldh*)(circle) strains were cultured under illumination (14.6 W/m<sup>2</sup>) for 120 h

## 4.まとめ

低濃度で高い活性を示した組換え株を用いることで、嫌気性発酵菌との混合培養において、より高い水素生産量を得られる可能性が示唆された。今後は作製した菌と嫌気性菌との混合培養を行い、水素生産の向上を目指す。

## 5.参考文献

1)Miyake J,et al. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and Clostridium butyricum. J. Ferment Technol, 62,531-535,(1984)