

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 九州大(院) 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 *Rhodobacter sphaeroides* RV(以下 RV 株)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を基質とした水素生産能は低い。そのため糖から水素を生成し副生成物として酢酸等の有機酸を生成する *Enterobacter aerogenes* 等の嫌気性発酵菌との混合培養による水素生産が効率的である。混合培養時、嫌気性発酵菌が副生成物として生成する酢酸は多くとも 25 mM 程度であり、RV 株による水素生産には低すぎる¹⁾。本研究では酢酸の代謝に関わる *Rhodospirillum rubrum* 由来アルデヒド脱水素酵素遺伝子(以下 *aldh*)および *Escherichia coli* 由来アセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子(以下 *acdH*)を RV 株に導入した組換え RV 株を作製し、低濃度の酢酸からの水素生産能を測定した。

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 株を用

いた。*aldh* は *R. rubrum* 由来のものを 2 種類、*acdH* は *E. coli* 由来のものを使用した。組換え plasmid のクローニングは *E. coli* TOP10 (Invitrogen)を用い、RV 株への接合伝達には *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 由来の接合伝達ベクター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

R. rubrum および *E. coli* のゲノムを鋳型として PCR により *aldh* および *acdH* を増幅した。増幅後、増幅した遺伝子と pLP-1.2 の制限酵素処理を行い、両 DNA の Ligation を行った。得られた組換え plasmid はそれぞれ *E. coli* TOP10 を用いてクローニングした。また、組換え plasmid の塩基配列は CEQ8800(Beckman Coulter)を用いて解析した。

2.3 組換え RV 株の作製

抽出精製した組換え plasmid で *E. coli* S17-1 を形質転換し、組換え S17-1 を作製した。作製後、組換え S17-1 と RV 株を aSy 寒天培地上で 6 日間混合培養し、接合伝達法を用いて RV 株に組換え plasmid を導入した。その後、スクリーニングを行い陽性コロニーを培養した。*aldh* を発現する組換え株を RVAD1 株、RVAD2 株、*acdH* を発現する組換え株を RVAC 株とした。また、plasmid のみを導入した組換え株を RVI 株とした。

2.4 酵素活性測定

25 mM の GA 培地で、72 時間の水素生産実験を行った培養液 20 mL を遠心分離し(16,500

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

×g, 15 min)、上清みを捨てたペレットに 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 1 mL を加えて再懸濁した。再懸濁した菌液をソニケーターを用いて氷上で破碎処理を行い、破碎液を遠心分離した(16,500 ×g, 15 min)。これにより得られた上清みをクルードの酵素液として用い、340 nm の吸光度変化を 30 °C で 5 分間測定し、アセトアルデヒドを基質として生成された NADH 濃度を定量した。

2.5 水素生産実験

RV 株の菌株を拡大培養し、遠心分離(9,000 rpm, 15 min)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 600 nm 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、水素生産用 GA 培地(酢酸、グルタミン酸)および GL 培地(乳酸、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生産量を測定した。

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 株の作製

接合伝達の結果、目的部分(*aldh* は 1521 bp、*acdH* は 951 bp)にバンドが確認できたことから、RV 株が kanamycin 耐性を有したことより、RV 株に組換え plasmid が導入され、組換え RV 株が作製できたと考えられる。

3.3 酵素活性測定

アルデヒド脱水素酵素活性を測定したところ RVAD1 株、RVAD2 株は野生株と比較して活性が約 13 倍向上した。このことから、*aldh* の発現を確認することができた。

3.4 水素生産実験

水素生産実験の結果を Fig. 1 に示す。低濃度の酢酸(25mM)存在下で水素生産したところ、RVAD1 株、RVAD2 株は野生株と比較して約 1.4 倍の水素生産量を示したことから導入した酵素により水素生産効率が向上していると考えられる。しかし、基質濃度が上がるにつれて、組換え株は野生株よりも水素生産

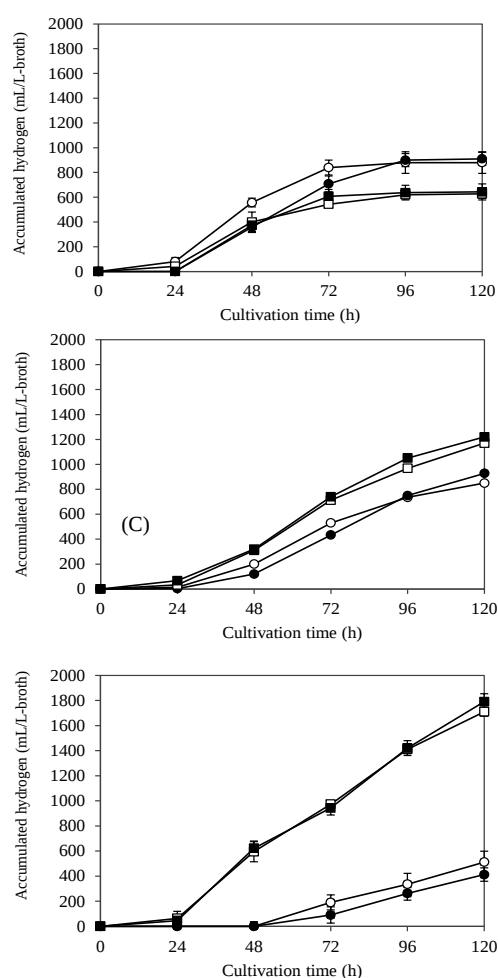


Fig. 1 Hydrogen production by the wild-type and recombinant RV strains at various concentrations of acetate the RVAD1(open circle), RVAD2(closed circle), RV(closed square), and RVI(open square) strains were cultured with 25(A), 50(B), 75(C) mM acetate, at 30°C under an illumination of 14.6 W/m².

量が減少した。一方、乳酸を基質とした場合水素生産量は上昇しなかった。また、*acdH* を導入した RVAC 株の酵素活性測定、水素生産実験を現在行っており、その結果についても併せて報告する。

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、さらなる水素生産の向上を目指す。

5. 参考文献

1) J. Kobayashi, et al., *Journal of Bioscience and Bioeng.*, **112**, 602-605 (2011)