

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV の遺伝子組換えによる

水素生産の向上に関する研究

日大生産工（院） ○玉山 周平

日大・理工 浅田 泰男 日大生産工 神野 英毅

1. 緒言

化石燃料の大量消費や使用済み石油化学製品の大量廃棄によって炭酸ガスの増加による地球の温暖化、海の汚染、河川の汚染、酸性雨による環境変化など多くの環境問題が顕在化しつつある。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。そのため石炭や石油に代えてCO₂を排出しない水素エネルギーに期待が高まっている¹⁾。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で知られている。このようなバイオマスによる水素発生の研究が盛んに行われている。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7.0mol H₂/mol グルコースと高い収率を得ることに成功している²⁾。また Chittibakuらは遺伝子組換えによる大腸菌の水素生産について報告している³⁾。この方法は、大腸菌BL21に *Enterobacter cloacae* II-BT-08由来のヒドロゲナーゼを発現させ3.12 mol H₂/mol グルコース生産することに成功している³⁾。この報告により遺伝子組換えによって水素生産能力を向上させる可能性があることが示唆された。微生物を用いた水素生産の実用化のためには生産速度を改良する必要があるが、現状は90%以上が化石燃料によるものである⁴⁾。嫌気性発酵細菌と光合成細菌の混合培養の際に

副産物としてアルコールが生成される場合があるがRVはアルコールを資化することができない。本研究では、遺伝子組換え技術を用いて混合培養系において糖質の持つ還元力をすべて水素に変換可能にすることを目的としている。そこで我々はRVにアルコール脱水素酵素（以下ADH）遺伝子を導入しその酵素活性を試みた。

2. 実験方法

2.1 使用菌体と ADH

本研究では光合成細菌として *Rhodobacter sphaeroides* RV と *Rhodopseudomonas palustris* No.7 を使い、組換えに用いた大腸菌として TOP 10 competent chemically *E.coli* cells と S17-1 菌体を用いた。使用した ADH は *Synechocystis* PCC6803 由来の sll1825、slr0886、slr0942 および No.7 由来(rNo.7)を用いた。

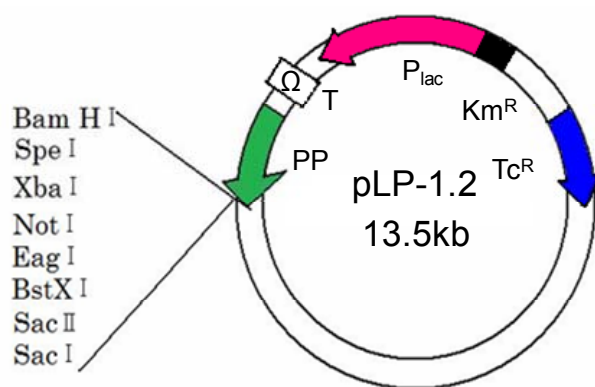


Fig. 1 Used of vector

Study on Improvement of High Hydrogen Production by Genetic Recombination of

Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* RV

Shuhei TAMAYAMA

Table 1 Primers used to amplify ADH gene

primer	sequence 5'-3'	Tm
1825-Forward	CGGGATCCAAATGC	56.3°C
1825-reverse	CAGAGCTCCTACGGATAGA	57.0°C
No.7-Forward	CGGGATCCCGATGACGCAAAT	73.8°C
No.7-Reverse	CGTCTAGATTAGTTCGCCAGCATGATGC	73.0°C
0886-Forward	CGGGATCCCGATGACGGCATTAAACGGCAC	68.1°C
0886-Reverse	CAGAGCTCTTAGAACATTACCATGCCG	69.9°C
0942-Forward	CGGGATCCCGGTGCAGAGTTTCAATA	75.9°C
0942-Reverse	CAGAGCTCTTAAATTTTCATCCCATACG	66.3°C

使用したベクターの特徴は光合成細菌の集光タンパク質遺伝子であるパフプロモーターとカナマイシン耐性遺伝子を有していることである

2.2 PCR

sll1825、slr0886、slr0942 がそれぞれ導入されているベクターpET32-EK/LIC を TOP 10 を用いてクローニングを行い、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System(promega)でベクターを精製し PCR の鋳型とした。No.7 のゲノム DNA の抽出方法は、まず培養液を遠心分離で菌体を回収した。そこに TE buffer、Lysozyme solution、RNase A を加え菌体を溶解させ 37°C で 10 分間インキュベートしたあと、DNA を Magstration system 6GC(プレシジョンシステムサイエンス社)を用いて回収し、PCR の鋳型とした。次に ADH 遺伝子のみを増幅するプライマーを設計し PCR を行った。その後、制限酵素配列を含むプライマーを設計し (Table 1) 先ほど増幅させた DNA を鋳型にし、再び PCR を行った。

2.3 組換えベクターの作製

PCR によって得た制限酵素配列を含む ADH 遺伝子と pLP-1.2 を制限酵素 BamH I、Sac I、Xba I のうち二種類を用いて(選択する制限酵素は用いる ADH 遺伝子によって異なる)37°C、30 分間インキュベートし切断した。反応溶液を Wizard® SV Gel and PCR

Clean-Up System(promega) を用いて精製

した後、両 DNA をタカラバイオ社の DNA Ligation Kit Ver.2.1 を用いて 16°C、1 時間インキュベートし結合させた。

Table 2 Used of restriction enzyme

BamH I	5'-GGATCC-3'
Sac I	5'-GAGCTC-3'
Xba I	5'-TCTAGA-3'

その後、作製したベクターは TOP 10 の形質転換系を用いてクローニングを行い回収した。具体的な形質転換方法はまず、TOP 10 と作製したベクターを混合し氷上で 30 分間インキュベートした。そしてヒートショックを 42°C で行った後、SOC 培地を加え 37°C で 1 時間インキュベートした。その後カナマイシンを含む LB 寒天培地に菌液を塗布し一晩培養を行った。形成したコロニーから組換えベクターが導入されているコロニーを選択するためコロニーを鋳型とした PCR を行った。PCR でバンドが確認できたコロニーのみをカナマイシンを含む LB 培地に継代し 16 時間培養した (200 rpm、37°C)。培養液から Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System(promega)を用いて作製したプラスミドを回収し、CEQ 8800(BECKMAN COULTER)を用いてシーケンス解析を行った。

次に、作製したプラスミドを用いて接合伝達が可能で大腸菌 S17-1 への形質転換を行った。

まずLB液体培地10 mlにS17-1菌液を50 μ l加えOD₆₆₀が0.4になるまで培養した。次に菌体を遠心分離(4℃、5分、8,000 rpm)で回収した。その菌体にcompetent solution を100 μ l加え攪拌した後、作製したベクターを加え4℃で1時間インキュベートした。その後20 mMグルコースを含むLB培地を900 μ l加え37℃で1時間インキュベートした。その後カナマイシンを含むLB寒天培地に菌液を塗布し一晚培養した。そしてLB寒天培地に生育したコロニーを形質転換体とした。

2.4 接合伝達法を用いた 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。両菌体を適切な培地で培養した後、S17-1 菌体を RV の寒天培地上で 6 時間培養を行った。次に aSy 液体培地を 1ml 添加し両菌体を懸濁し、カナマイシンを含む aSy 寒天培地で 6 日間、嫌気培養を行った。その後形成したコロニーをコロニーPCR で ADH 遺伝子の増幅の確認を行い、陽性となったものを組換え株とした。

2.5 無細胞抽出液の作製と酵素活性測定

RV の組換え株をねじ口付き試験管で 3 日間、前培養を行った後、250 ml のルー瓶で 3 日間拡大培養した。その後、遠心分離(8,000 rpm、15 分間)によって菌体を回収した。回収した菌体はクライオプレスを用いて液体窒素で冷却しながら凍結破碎した。破碎した菌体を Tris-HCl 緩衝液(pH 8.8)で懸濁し、懸濁液を遠心分離して得られた上清を無細胞抽出液として酵素活性測定に用いた。なお無細胞抽出液の全タンパク質濃度は BSA を用いた Bradford 法による検量線($y=0.0185x+0.4175$ $R^2=0.9915$)から求めた。酵素活性測定は NAD⁺が NADH に還元される速度を波長 340 nm で吸光度の上昇を測定し確認した。

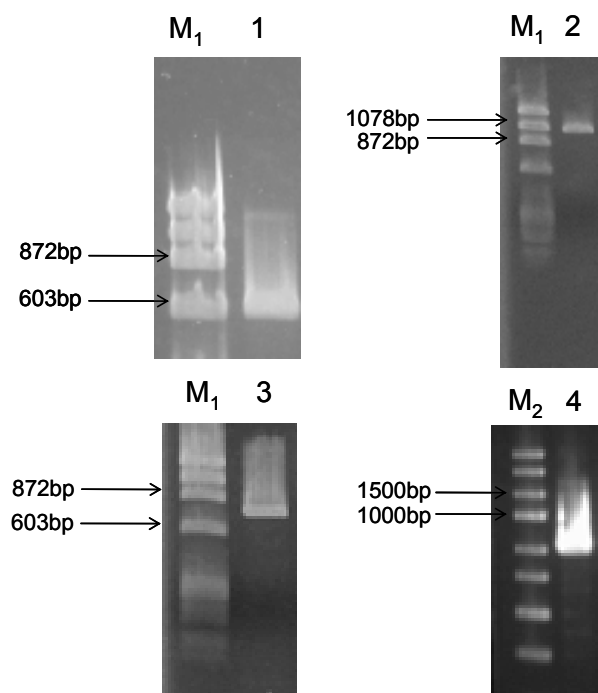
3. 結果および考察

3.1 組換え体の作製

Table 1 に示した各プライマーを用いて増幅させた遺伝子産物の結果を Fig. 2 に示す。このことより目的とする ADH 遺伝子の増幅を確認した。陽性率の高いコロニーを選択するためにコロニーPCR を行った結果、各々目的の増幅位置にバンドが確認できた。

さらに確認のために CEQ8800 を用いた DNA sequence の解析を行った。

DNA sequence においても確認ができたため、4 種類の組換えベクターの作製に成功したといえる。



M₁: Marker4($\Phi \times 174$ /HaeIII digest)

M₂: GeneRuler Express DNA ladder

1: Amplified sll1825 2: Amplified slr0886

3: Amplified slr0942 4: Amplified No.7

Fig. 2 Result of amplified DNA

Table 3 React solution of enzyme activity

cell-free extract	
(sll1825,slr0886,slr0942, rNo.7), (mg)	0.0477, 0.0151, 0.0188, 0.1099
Tris-HCl buffer (pH 8.8)	40mM
NAD ⁺	2.5mM
alcohol	500mM

※ It is indicate by Table 3 that the concentration of sample solution in 1ml

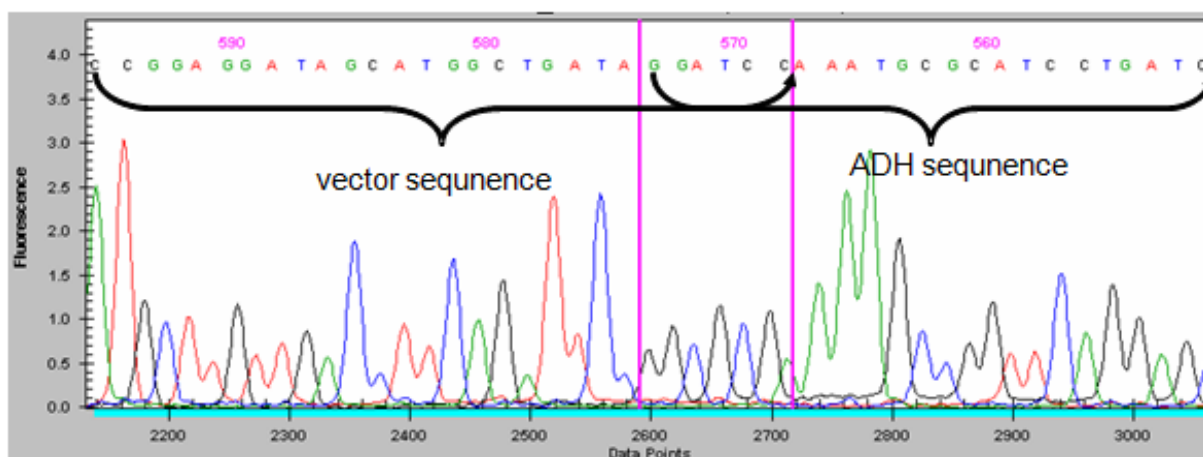


Fig.3 Sequence of recombinant plasmid by CEQ8800

3.2 無細胞抽出液の作製と酵素活性

組換え RV における無細胞抽出液を用いた ethanol、1-propanol、1-butanol に対する酵素活性を Table 4 に示す。

Table 4 よりほぼすべての基質において No.7 由来の ADH が最も活性が高い結果となった。しかし、無細胞抽出液には共雑物が多く含まれている。そのため活性の阻害の有無と、阻害の程度を考えると必ずしも No.7 由来が最も活性が高いと断言することはできない。しかし異種発現系において活性が認められたことは確かである。今後は酵素活性において生成したアルデヒドの酸化酵素遺伝子を導入してアルコールの完全酸化をはかることで糖質の持つ還元力をすべて水素に変換可能にすることが可能であり、遺伝子組換え技術を用いた水素生産の向上が期待できる。

4. 謝辞

本研究で使用した *Synechosystis* PCC6803 由来の ADH 遺伝子を供与していただいた東京理科大学の太田先生および No.7 の分与と適切な助言をくださいました千葉大学園芸学部の藤井先生に深謝いたします。

Table 4 Enzyme activity of ADH

ADH	ethanol	1-propanol	1-butanol
sl1825	4.73	5.53	9.86
slr0886	—	6.56	—
slr0942	3.76	4.13	4.51
rNo.7	13.48	20.54	9.15

※ Unit is mU/mg

The straight line, indicating that not activity

5. 参考文献

- (1) 市川 勝：水素エネルギーが分かる本
オーム社(2007年2月5日)
- (2) 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.
- (3) G. Chittibabu, K. Nath, D. Das
: Feasibility studies on the fermentative
hydrogen production by recombinant
Escherichia coli BL-21. *Process*
Biochemistry (2006), 41:682–688
- (4) CC. Ekam, CE . Gregoire Padro,
G .Sandrock, A. Luzzi, P. Lindblad,
E-F.Hagen :Realizing the hydrogen future
the International Energy Agency's effort to
advance hydrogen energy technologies. *Int.*
J. Hydrogen Energy (2003), 28:601–607