

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 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。その中で現在、水素エネルギーが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、ここ最近では、燃料電池の発展により水素エネルギーはより重要性を増している。さらに近年、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、廃棄物処理の有用な手法としても確立できる可能性を秘めている。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 H₂/mol glucose と高い収率を得ることに成功している¹⁾。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 molH₂/mol glucose 生産することに成功している。

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 H₂/mol glucose の水素を得ているが、理論収率の 12 mol H₂/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。昨年度、我々は遺伝子組換え技術を利用し、アルコール資化能を有する組換え RV を作製した。しかし、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。本研究では、そのアルデヒドを資化するために 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す。

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で知られている RV および ALDH を持つ *Rhodospirillum rubrum* の 2 種類の光合成細菌を使用した。また、遺伝子組換えに用いた大腸菌として TOP10 Chemically Competent *E.coli* cells (Invitrogen)を用いた。plasmid は、pLP-1.2 を使用した (Fig. 1)。

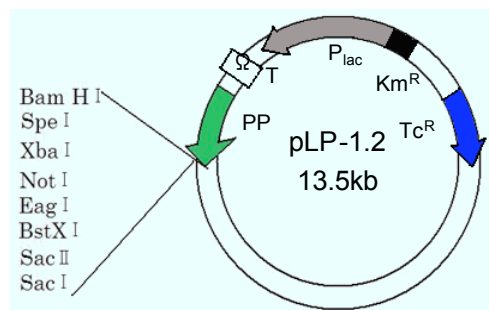


Fig. 1 Map and feature of pLP-1.2

この plasmid の特徴は、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ことである。

2.2 遺伝子抽出

Rhodospirillum rubrum のゲノム DNA 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 遺伝子の上流に *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。

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 をコンピテント状態にした *E. coli* S17-1 に導入した。組換え *E. coli* S17-1 と RV を寒天培地上で 7 日間、混合培養することにより接合伝達させ、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。

2.5 酵素活性

RV の組換え株を集菌し、液体窒素、クライオプレスを使って凍結粉後、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用いて、アセトアルデヒドを基質として ALDH の酵素活性を測定した。

3. 結果および考察

PCR 法による ALDH 遺伝子の増幅結果を Fig. 2 に示した。なお、ALDH 遺伝子は 1521 bp である。

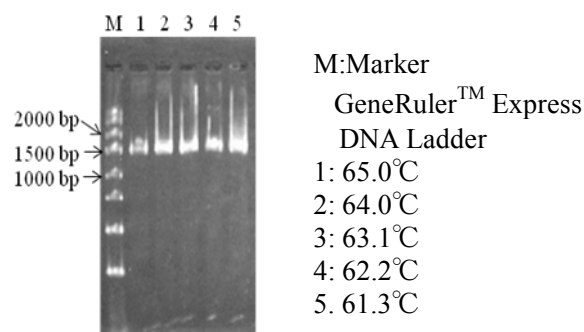


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of amplified ALDH gene

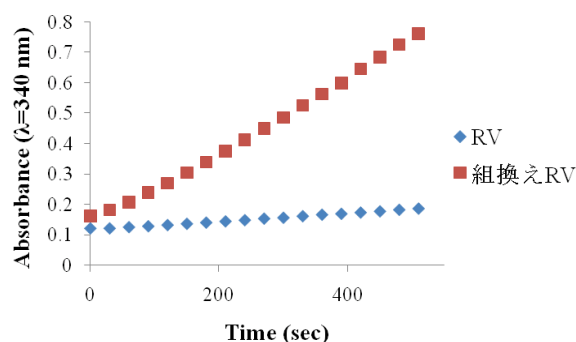


Fig. 3 Activity of by transfected ALDH at 30°C

1500 bp 付近にバンドが確認できたことから ALDH 遺伝子が増幅されたと考えられる。また、最適アニーリング温度は 62°C と考えられる。この ALDH 遺伝子を精製し、pLP-1.2 と制限酵素処理および Ligation を経て、組換え plasmid を作製した。この plasmid を RV に導入し、アセトアルデヒドの酵素活性を測定した。その結果を Fig. 3 に示した。この結果より、組換え RV が NADH を生成していることが分かった。

4. まとめ

Rhodospirillum rubrum の遺伝子の ALDH を RV に導入することに成功した。酵素活性の結果から、組換え RV にアルデヒド資化能が備わったことが示唆された。

【参考文献】

- 1) Miyake J, Mao XY, and 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.