



Title	水素細菌Alcaligenes hydrogenophilusの水素酸化に関与する遺伝子のcloning
Author(s)	関, 洪基
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35138
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	関	洪	基
学位の種類	薬	学	博 士
学位記番号	第	7 2 4 9	号
学位授与の日付	昭和 61 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	水素細菌 <i>Alcaligenes hydrogenophilus</i> の水素酸化に 関与する遺伝子の cloning		
論文審査委員	(主査)		
	教 授 三浦 喜温		
	(副査)		
	教 授 近藤 雅臣	教 授 岩田平太郎	教 授 池原 森男

論 文 内 容 の 要 旨

当研究室で単離された水素細菌 *Alcaligenes hydrogenophilus* 1978 は分子状の水素の酸化によってエネルギーを得、CO₂ を唯一の炭素源として増殖できる。本菌は水素酸化を触媒する酵素 soluble hydrogenase（以下 s-Hase）及び membrane-bound hydrogenase（以下 m-Hase）を持っている。

Hydrogenase（以下 Hase）が nitrogenase によって発生する水素をエネルギー源として回収することによって窒素固定能の向上が期待され、水素細菌の Hase の強い水素取り込み活性を用いようとする研究がさかに行われている。また水素細菌代謝における Hase の重要性および窒素固定菌に対する水素細菌の Hase の有用性にもかかわらず、水素代謝に関する遺伝的な解析はほとんど行われていない。

そこで、*A. hydrogenophilus* の水素酸化能の異種微生物への賦与および、Hase 遺伝子の解析を目的とし、そのクローニングを試み m-Hase を含む水素酸化能に関与する遺伝子の単離に成功した。

先ず本菌の水素酸化能に関わる遺伝子が plasmid 上に存在するか否かを検討した。curing 剤 acridine orange で本菌を処理したところ水素依存の autotrophic growth の能力を失った。矢野らの方法によって plasmid を抽出した結果、本菌は 230 Md (pAH 1) と 160 Md (pAH 2) の 2 つの plasmid を持ち、cured 株では pAH 1 が消失し、pAH 2 だけが残る、水素酸化能が pAH 1 に code されていることが示唆された。

cured 株と野生株を 30℃ で接合を行った結果、pAH 1 は 3.2×10^{-4} の頻度で cured 株に伝達され水素依存 autotrophic growth の能力を回復させた。一方 cured 株は formate 資化能及び RuBP Carboxylase 活性は保持していたが、両 Hase 活性を失っていた。

これらの結果より本菌の水素酸化能に関わる遺伝子は巨大 plasmid pAH 1 に存在することが明らか

となった。

水素酸化能を担う巨大 plasmid pAH 1 を炭酸固定系を持つ異種微生物へ伝達することにより水素酸化能を賦与しうるか否かを検討した plasmid pAH 1 の最適な伝達条件をみつけるため野生株 *A. hydrogenophilus* と cured 株 *A. hydrogenophilus* CH 30SR を、20°C、25°C、30°C、37°C で接合させた結果、pAH 1 は 25°C で一番よく伝達され、以下の異種微生物との接合は 25°C で行った。

炭酸固定能を有する異種微生物 *Pseudomonas oxalaticus* OX 1 と *A. hydrogenophilus* との接合を試みた結果 plasmid pAH 1 は 3.8×10^{-7} の頻度で *P. oxalaticus* OX 1 に伝達され、水素酸化能を発現し水素依存の autotrophic growth を可能とさせた。また m-Hase 及び s-Hase の活性も確認することができた。接合伝達体のうち約 70Md の欠損を起した plasmid (pAH 3) を保有する株 *P. oxalaticus* -C 301 が得られた。

類縁の *P. oxalaticus* OX 4、OX 6、OX 23 との接合を試みたところ plasmid pAH 1 は OX 4 には伝達されたが OX 6、OX 23 には水素酸化能を賦与することはできなかった。

水素酸化能を担っている pAH 1 は巨大であり、その上伝達される宿主が限られており、有用微生物への伝達が困難である。そこで Hase の構造を解明する意味も含め広宿主域を持つベクターを用い Hase 遺伝子をクローニングすることを試みた。

精製した pAH 3 を制限酵素で処理した結果、EcoRI は 20 個以上、XhoI は 28 個以上、KpnI は約 22 個、SalI は 19 個以上、HindIII は約 24 個、BamHI は 28 個の切断部位を pAH 3 内に有していた。

Pseudomonas に広く使われている広宿主域ベクター pKT 210 を選びその形質転換条件を決定し、HindIII 処理 pAH 3 及び pKT 210 を T₄ DNA ligase を用いて連結し *A. hydrogenophilus* CH 14 に形質転換を試みたが Hase を有する形質転換体は得られなかった。

A. hydrogenophilus の cured 株を宿主とし、pKT 210 をベクターとしたショットガンクローニングの系は形質転換率が低かったため、既に条件が確立された *E. coli* 系のクローニングを試みることにした。HindIII 処理 pAH 3 及び pBR 322 を T₄ DNA ligase で繋いで Hyd⁻ 株 *E. coli* C 600 H 1 に形質転換を試みたが Hase を有する形質転換体は得られなかった。

そこで、広宿主域 cosmid ベクター pVK 102 を用い、plasmid pAH 3 の gene bank を *E. coli* 内で作成し、その組み換え cosmid を接合により *P. oxalaticus* OX 1 に伝達させ水素酸化能を有する接合伝達体を単離することを試みた。矢野らの方法で抽出した pAH 3 の粗 plasmid 抽出液を 15 から 30Kb になるように SalI で部分分解し、SalI 処理した pVK 102 と T₄ DNA ligase で繋ぎ、in vitro packaging 後 *E. coli* に形質導入させ μg DNA 当り 2,600 個、総計 3,600 個のコロニーを得た。組み換え cosmid を *P. oxalaticus* に伝達させ約 800 個の水素酸化能を持つ接合伝達体を得た。

約 800 個のコロニーから 1 株 *P. oxalaticus* OX 1 (pYM 11) を選び、無機塩液体培地、H₂、O₂、CO₂ の混合ガス下で培養し両 Hase 活性を測定した結果、s-Hase の活性は検出できなかったが *P. oxalaticus* C 301 及び *A. hydrogenophilus* より約 4 倍高い活性の m-Hase が検出された。また pYM 11 の制限酵素地図を作成した。

また 800 個のコロニーから s-Hase を持っている菌株をみつけるため種類の大きさのコロニー 10 株

を純化し autotrophic growth 及び両 Hase 活性の測定をした。その結果、調べた 10 株のすべてが m-Hase のみを保持し、m-Hase は 3 倍から 6 倍程度、元の *P. oxalaticus* -C 301 より高い活性を示した。

10 個の組み換え cosmids の制限酵素地図を作成し比較した結果、挿入 DNA の大きさは 26 から 29 Kb で、その分解パターンより 8 種類に大別できた。そのうち、pYM 39 と pYM 41 は他のものと比べ逆向きに挿入されていた。10 個の組み換え cosmids は 22 Kb の共通部分を持ち、共通部分に水素酸化能に関わる遺伝子がのっている事が分かった。

また、共通部分より左の領域が長い方が増殖がよいという傾向があり、今後この近傍の遺伝子構造を解析することにより autotrophic growth の制御に関する興味ある知見が得られることが期待される。また pVK 102 の宿主となりうる根粒細菌、光合成細菌、硫黄細菌等にも水素酸化能を賦与しうることが期待される。

論文の審査結果の要旨

水素をエネルギー源、炭酸ガスを炭素源とする水素細菌、*A. hydrogenophilus* の水素酸化に関する遺伝子の所在を探り、その cloning に成功した。先ず curing test によって水素酸化遺伝子 (Hox gene) が巨大 plasmid pAH 1 に code されていることを確かめ、pAH 1 の接合伝達により CO₂ 固定細菌 *Pseudomonas oxalaticus* に水素酸化能が賦与されたが、pAH 1 の宿主域がせまく、Hox gene の cloning が必要となった。種々の宿主、Vector を用いて cloning が試みられたが、cosmid vector pVK 102 を用い *E. Coli* LE 392 内に pAH 1 の gene bank をつくり、これを donor とし、*P. oxalaticus* OX1 を recipient とし、*E. Coli* HB 101 を mobilizer とする triparental conjugation によって Hox gene の cloning に成功した。さらにその制限酵素地図をつくった。この研究の成果は有用微生物に水素酸化能の賦与、それによる低費用による有用物質生産、窒素固定菌に水素酸化能の賦与による農産物の生産性の向上等広い範囲に応用され得る。

よって本論文は博士論文に価すると認められた。