The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	水素細菌 Alcaligenes hydrogenophilus の水素資化能の異種微生物への付与
Author(s)	梅田, 房子
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38460
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

【 6 】

氏名	梅田房子（うめだふさこ）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 10929 号
学位授与年月日	平成 5 年 9 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	**水素細菌 *Alcaligenes hydrogenophilus* の水素資化能の異種微生物への付与**
論文審査委員	（主査）教授 三浦 喜温 （副査）教授 近藤 雅臣　教授 三村 務　教授 宮本 和久

論文内容の要旨

水素細菌は水素の酸化エネルギーを用いて炭酸ガスを固定して生育する細菌の総称である。実際の培養は水素，酸素，炭酸ガスよりなる混合ガス気相下，無機塩培地を用いて行われるが，細菌をこのような条件下で培養すると1）基質が気体であるため除去が簡単であり，基質と菌体，基質と生産物の分離が用意である，2）菌濃度が10^{11}cells/ml, 60g/l という高濃度培養が可能である等の利点を持つ。水素細菌 *Alcaligenes hydrogenophilus* 1978は1978年に水素と炭酸ガスからの微生物蛋白生産を目的として土壌より単離された通性独立栄養細菌で，当初培養工学的な研究が行われた。本研究では水素細菌が炭酸ガスを唯一の炭素源として生育できることに着目し，炭酸ガスからの物質生産系の開発を目的として *A. hydrogenophilus* の水素資化能を異種微生物へ付与するための検討を行った。

A. hydrogenophilus では水素資化に働く水素酸化遺伝子はプラスミド pHG21-a（270Md）上に存在し，炭酸固定遺伝子は染色体上に存在する。先ずこの pHG21-a を接合伝達することにより異種微生物への水素資化能の付与を試みた。しかし pHG21-a に宿主域が狭いという問題があることが分かったので，pHG21-a 上の水素酸化遺伝子を宿主域の広い IncP1のR-プラスミドをベクターに用いて *in vivo* クローニングすることを計画した。*in vivo* クローニングはクローニングそのものは簡単で，目的とする遺伝子が存在するプラスミドや染色体と R-プラスミドを1つの細胞の中に共存させることにより自然に起こる。しかし組換えプラスミドの出現が低頻度であるため，これを検出するには組換えプラスミドが高頻度で伝達される必要がある。そこで検出可能な系を捜すため *A. hydrogenophilus*, *P. oxalaticus* OX1/OX4（OX1/OX4両株は *A. hydrogenophilus* よりpHG21-a を接合伝達されることにより水素資化能を獲得する株である）の3株における pHG21-a, R-プラスミドの伝達性について検討した。その結果 *P. oxalaticus* OX1株同士の掛け合わせではR-プラスミドの伝達頻度が高く，逆に pHG21-a の伝達頻度は低く，この系が pHG21-a 上の遺伝子や染色体遺伝子の *in vivo* クローニングに使用可能なことが分かった。またプラスミドの *in vivo* 組換えにおける新しい組換えプラスミドの検出にも利用された。

pHG21-a 上の水素酸化遺伝子が R-プラスミド R68.45を用いて *in vivo* クローニングされ組換えプラスミド pFU7が得られた。pFU7はpHG21-aからベクターとなったR68.45へ47.9Md の DNA が挿入されたもので，この

ような大きいDNA断片は通常の*in vitro*の実験では無理であり，*in vivo*クローニングの利点を活したものである。また当初，水素酸化能だけを保持していると考えられていたpHG21-a上に炭酸固定能やギ酸資化能も存在することが分かり，pFU7に水素酸化能／炭酸固定能／ギ酸資化能全てがクローニングされていることが分かった。*A. hydrogenophilus*のpHG21-a上に水素資化に必要な水素酸化能・炭酸固定能の両方が存在することが分かったが，それでは水素資化時に働くのはどちらの炭酸固定系かということになった。炭酸固定能を保持する又は保持しない宿主や組み換えプラスミドを用いて検討した結果，染色体またはプラスミドのどちらか最低一方に炭酸固定系があれば水素資化できることが分かった。よって水素酸化能のみがpHG21-a上に存在すると考えられていた実験開始時には，水素資化能付与の対象となる菌株は炭酸固定系を有する菌株に限られていたが，今回の結果より炭酸固定系保持の有無にこだわる必要がなくなった。

水素資化に関する遺伝学的知見を得るために，トランスポゾンを変異源として水素資化変異株が作製された。その結果，水素資化に染色体遺伝子も関与していることが分かった。この遺伝子はpHG21-a上のヒドロゲナーゼ遺伝子の発現に働き，その変異株の性質よりRNAポリメラーゼのコア部分と結合して転写に働くσ^{54}様因子の遺伝子であることが分かった。σ^{54}因子はマイナーな因子であり，これを保持する菌株の報告例は現在の所少ない。σ^{54}因子を保持しない菌株にpFU7が伝達された場合には水素酸化遺伝子は発現できないことになる。そこで同遺伝子もR68.45を用いてクローニングし先のpFU7と一緒に接合伝達し，水素資化能の付与をより効果的にすることを計画した。ここでも組換えプラスミドの検出のため，実験は*P. oxalaticus* OX1で行われた。先ずOX1株でσ^{54}様因子欠損変異株を作製し，これを相補する遺伝子をR68.45を用いて*in vivo*クローニングし組換えプラスミドpSG8を得た。

pFU7，pSG8共R68.45-primeであるため1個の細菌細胞に伝達・共存するときには表面排斥，不和合性などの問題が予想される。検討した結果かなり障害が大きく出現するtransconjugant数に10^3-10^5の低下が見られた。これを解決するため両プラスミドの*in vivo*組換えを行い，両プラスミドにクローニングされている遺伝子を1つのR68.45に再クローニングしpFUSを得た。pFUSはpFU7由来の水素酸化／炭酸固定／ギ酸資化能とpSG8由来のσ^{54}様遺伝子をクローニングしていた。このような大きいDNA断片の組換えは*in vivo*組換えの利点を活かしたものである。

pFUSを用いて異種微生物への水素資化能の付与が行われた。対象とする菌株は1）元の*A. hydrogenophilus*がグラム陰性菌であること，2）R68.45がグラム陰性菌を広く宿主とすること，3）水素資化時に分子状酸素で生育する必要があることから好気性菌であること，4）接合伝達時に栄養培地で生育させるため従属栄養的生育可能であること等から*Azotobacter, Escherichia, Pseudomonas, Thiobacillus*に属する45株を選んだ。又実験の都合上栄養要求性の無い株を用いたが，有用物質生産菌を含む17株が*A. hydrogenophilus* 1978由来の水素資化能を獲得した。

論文審査の結果の要旨

本研究は炭酸ガスを唯一の炭素源とする物質生産系の開発を目的として，水素細菌*A. hydrogenophilus*の水素資化能を遺伝子工学的手法を用いて異種微生物へ付与した。先ず*A. hydrogenophilus*のプラスミドpHG21-a上の水素資化遺伝子群を薬剤耐性R-プラスミドR68.45を用いて*in vivo*クローニングし，その組み換えプラスミドpFU7の機能を調べ，この上には水素資化能だけではなく，炭酸固定能をも存在することを明らかにし，これによって炭酸固定能の有無に拘らず広範囲の微生物に水素資化能を付与し得ることを明らかにした。このpFU7の水素資化能の発現には染色体上のσ^{54}因子の必要なことを証明し，σ^{54}因子のR68.45による*in vivo*クローニングを行い，pSG8を得た。さらに1つのR68.45上にpFU7，pSGにクローニングされている両方の遺伝子をクローニングしなおしてpFUSを得た。pFUSを接合伝達させることにより，有用物質生産菌を含む17株の細菌が水素資化能を獲得した。よって本研究論文は博士（薬学）論文に価すると判定された。