

25

助成番号 0125

好塩性光合成細菌による水素発生とその応用

Mikio Kataoka, Yasushi Imamoto, Yoichi Yamazaki and Hironari Kamikubo
Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

紅色硫黄細菌、*Ectothiorhodospira halophila*、は、2-4Mという至適生育塩濃度を持つ好塩性細菌であり、絶対嫌気条件下で光合成によって生育する。我々は、この細菌の産生する光受容蛋白質の構造、物性、機能を研究してきているが、細菌の培養中に水素を発生することを見出した。本研究では、この細菌による光合成的水素発生の応用の可能性を考察するために、発生水素の定量的解析、水素発生にかかわる酵素ニトロゲナーゼ遺伝子のクローニング及びこの細菌の遺伝子組み替え系の開発を目的とした。

アンモニア 15mM を含む標準培地で培養した場合の水素発生量は、痕跡量にとどまることが明らかになったため、アンモニアの濃度を 5mM に下げたところ、1 週間の培養で培地 1L あたり 80ml の水素発生が見られた。次いで、窒素源をアンモニアから各種アミノ酸に変更し、その効果を調べた。トリプトファンを用いた場合、菌体の増殖が見られなかった。また、グリシン、メチオニン、アスパラギン、グルタミンを使用したときには水素発生が認められなかった。これら以外のアミノ酸を使用した場合は、菌体の増殖ならびに水素の発生が確認された。水素発生量はアスパラギン酸がもっとも優れており、次にアラニン、フェニルアラニン、アルギニンの順に良好な結果を得た。またバリン、ロイシン、リジン、ヒスチジン、システイン、グルタミン酸、セリンにおいてはアンモニア 5mM の場合と同程度の水素発生がみられた。イソロイシン、スレオニン、チロシンを用いた場合、水素発生量はアンモニア 5mM を用いた場合より少なく、効率的ではなかった。

水素発生は、*E. halophila* の対数増殖期においてのみ起き、対数増殖期から静止期への移行の直前に最大水素発生速度を示すことが明らかになった。静止期の移行直前に培養液の半分を廃棄し、新たな培養液を追加したところ、水素発生が持続した。これらから、光合成的水素発生を応用するためには、菌体密度を制御し、対数増殖期が継続するようにすればよいことが示された。

水素発生を分子レベルで考察するために、ニトロゲナーゼ遺伝子のクローニングを試みた。窒素固定を行う細菌においては、ニトロゲナーゼは、*nifH*、*nifK*、*nifD* の3種の金属蛋白質から構成されることが知られている。*NifD* の部分断片のクローニングに成功し、この部分を用いて、*NifH* の3'端 77bp、*NifH* と *NifD* のリンカー領域 (18bp)、*NifD* の全長 (1461bp)、*NifD* と *NifK* のリンカー領域 (82bp)、*NifK* の5'端 (296bp) をクローニングし、配列を決定することができた。これは、*E. halophila* において、ニトロゲナーゼの存在を確認した最初の例である。現在、*NifH* 及び *NifK* の全長のクローニングと、*nifD* の発現を試みている。

E. halophila については、遺伝子操作の系が確立していない。そこで、トランスポゾンを用いた遺伝子操作系の開発を試みた。培地に 10%ベタインを添加することにより、4%NaCl において、大腸菌と *E. halophila* の共培養に成功した。次いで、ストレプトマイシン耐性のプラスミドを含む大腸菌と *E. halophila* の共培養により、ストレプトマイシン耐性遺伝子を *E. halophila* に組み込むことに成功した。これにより、大腸菌のプラスミドに目的遺伝子を組み込むことで、*E. halophila* の形質転換が可能であることが示された。今後は、この方法を改良し、任意の遺伝子組換えを可能にしたい。

助成番号 0125

好塩性光合成細菌による水素発生とその応用

助成研究者：片岡 幹雄（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）
共同研究者：今元 泰（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）
山崎 洋一（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）
上久保 裕生（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）
研究協力者：Remco Kort（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）
對比地 久義（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）
飯田 和俊（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）

1. 研究目的

紅色硫黄細菌、*Ectothiorhodospira halophila*、は、4 Mという至適生育塩濃度を持つ好塩性細菌であり、絶対嫌気的条件下で光合成によって生育する[1]。我々は、この細菌の産生する光受容蛋白質（イエロープロテイン）の構造、物性、機能について研究してきているが[2]、この細菌の培養中に、この細菌が光合成的に水素を発生することを見出した。持続的な光合成による水素発生が得られれば、それは燃料電池への応用が可能になる。また、この細菌は、無機培地で生育するため、例えば海水をそのまま培養液として用いる可能性があるため、これまで光合成的水素発生に利用されてきた紅色非硫黄細菌よりも工業的応用の利点があると考えた。すなわち、この細菌を利用することにより、汚染海水の浄化と光合成的水素発生との複合的効果が得られる可能性がある。これらの応用を念頭において、この細菌の光合成的水素発生能の検討と遺伝子工学的アプローチの可能性の開発を目標として研究を行った。

これまで、紅色非硫黄細菌については、光合成的水素発生が詳細に調べられてきているが、この細菌での水素発生を調べた文献例はない。さらに、海水を用いて培養を行うためには、窒素源および炭素源を加える必要があり、効率的な水素発生に適した窒素源や炭素源を選択することも重要である。そこで、*E. halophila* の光合成的水素発生について、発生量の定量、培養条件と発生量の関係など定量的な解析を行うことを第一の研究目的とした。一方、紅色非硫黄細菌を用いた光合成的水素発生への応用は、実用レベルに達していないのが現状である。水素発生系に対する蛋白質科学的あるいは遺伝子工学的な分子レベルからのアプローチが欠けていることが原因の一つと考えられた。紅色非硫黄細菌での光合成的水素発生は、ニトロゲナーゼによる窒素固定の副産物であることが知られている。しかし、紅色硫黄細菌については、光合成的水素発生の研究例が少ないばかりでなく、ニトロゲナーゼの存在さえ確認されていなかった。そこで、*E. halophila* のニトロゲナーゼ遺伝子群のクローニングを行い、光合成的水素発生に関する分子レベルでの考察を行うことを第二の研究目的とした。さらに、*E. halophila* については、遺伝子操作の系が確立していない。そこで、トランスポゾンを用いた遺伝子操作の系を

開発することを第三の研究目的とした。

2. 研究方法

2-1. *E. halophila* の培養と発生水素量の定量

E. halophila は、2.2M の食塩を含む無機培地により、定常光照射により培養した[3]。光強度は、培養器の受光面で 5000lux となるように調節し、培養温度は 32℃に保った。標準培地は、窒素源として 15mM NH₄Cl を含んでいる。水素発生に適した窒素源の探索のために、各種アミノ酸を窒素源とした培地で培養を行い、水素発生量を比較した。培養中の発生気体は、水上置換により捕集し、水素電極を用いて発生水素量を評価した。また、500nm での散乱により増殖曲線を得た。

2-2. ニトロゲナーゼ遺伝子群のクローニング

PCR 法により、*E. halophila* 遺伝子 DNA から、ニトロゲナーゼ遺伝子群のクローニングを行った。根粒菌、紅色非硫黄細菌および藍藻のニトロゲナーゼの既知配列を参照し、保存性の高い領域を選んで、プライマーを作成した。また、プライマーにはクローニングのための EcoRI サイトを付加した。プライマーは、エスペックオリゴサービスに作成を依頼した。PCR は、TAKARA Thermal Cycler MP (寶酒造) および Biometra T-Gradient を用いて行った。PCR 断片の塩基配列は、DNA シーケンサーSEQ4x4 (ファルマシア) により決定した。

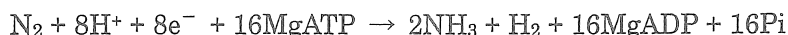
2-3. 遺伝子操作系の開発

E. halophila は、絶対嫌気性細菌であるため、通常の寒天培地での培養はできない。嫌気条件下の寒天培養は、密閉プラスチックバッグ (P. T. Pouch, Sakami) により行った。遺伝子の導入は大腸菌による接合によって行った。

3. 研究結果と考察

3-1. *E. halophila* による光合成的水素発生

標準培地による *E. halophila* の培養では、痕跡量の水素発生が見られた (5L 培養で 10ml 以下)。標準培地には、窒素源として 15mM の NH₄Cl が含まれている。一方、光合成細菌による光合成的水素発生は、ニトロゲナーゼの作用によることが知られている [4]。ニトロゲナーゼは、窒素固定に関与する酵素群であり、窒素ガスからアンモニアを産生する反応を触媒する。



したがって、アンモニアはこの反応の阻害剤として働くと考えられる。そこで、窒素源として各種アミノ酸を用いた場合の水素発生について検討を行った。その結果を表 1 に示す。まず、培地のアンモニア濃度を 5mM に下げた場合、水素発生量は増加した。この結果は、*E. halophila* による光合成的水素発生も、ニトロゲナーゼの作用によることを示唆するものである。代替窒素源としてトリプトファンを使用したときには菌体の生育がみられなかった。またグリシン、メチオニン、アスパラギン、グルタミンを使用したときには水素発生が認められなかった。これら以外のアミノ酸を使用した場合は、菌

体の増殖ならびに水素の発生が確認された。ニトロゲナーゼについて、グルタミンあるいはアスパラギンを窒素源として使用した場合ニトロゲナーゼの合成が抑制される、あるいはグルタミン、アスパラギン、尿素によってニトロゲナーゼ活性が阻害されるといった報告がなされており[5]、今回の結果はこれらの報告とは矛盾しない。

水素発生量はアスパラギン酸がもっとも優れており、次にアラニン、フェニルアラニン、アルギニンの順に良好な結果を得た。またバリン、ロイシン、リジン、ヒスチジン、システイン、グルタミン酸、セリンにおいてはアンモニア 5mM の場合と同程度の水素発生がみられた。なおイソロイシン、スレオニン、チロシンを用いた場合、水素発生はみられたものの発生量はアンモニア 5mM を用いた場合より少なく、効率的ではなかった。

E. halophila の増殖と水素発生との関係を示したのが、図 1 である。一般に、増殖の静止した培養液から細菌を同じ組成の新鮮培地に移すと、まず遅延期(誘導期)とよばれる増殖のおこらない状態となる。この遅延期の後に、細菌が分裂を繰り返すことによって対数的に増殖していく対数増殖期にいたる。細菌の増殖は、利用可能な栄養素の消耗あるいは有毒代謝産物の蓄積によって増殖速度が低下していき停止する。こうして対数増殖期から細菌の増殖が静止した静止期へと移行する。静止期におかれた細菌も細胞内エネルギー貯蔵物の欠如などによっていずれ死滅をむかえ、死滅期と呼ばれる減少状態となる。死滅速度は環境や細菌の特殊性による[6]。図 1 には NH₄Cl (1)、Cys (2)、Asp (3) をそれぞれ窒素源として用いた場合の増殖曲線と水素発生を示している。典型的な例として Cys を窒素源にしたものをみると培養開始から 40 時間ほど遅延期が続き、培養開始から 50~130 時間において対数増殖期となり、130 時間以降は静止期となる。遅延期では、水素発生が見られず、対数増殖期になって水素発生が始まり、停止期の直前に水素発生はピークに達する。また、静止期に移行すると水素発生も停止する。アンモニア 5mM を用いた場合や、効率的な水素発生を示す Asp を窒素源として用いても、同様の結果が認められた(図 1)。この結果から、継続的な光合成的水素発生を実現するためには、常に対数増殖期になるように、菌体密度を制御すればよいことが示唆される。図 3 は、停止期に移行する直前に培養液の半分を取り去り、同量の新鮮な培地を加えた場合の水素発生を、そのまま培養を続けた場合の水素発生と比較したものである。培地を加えることで対数増殖期が継続し、水素発生も継続していることがわかる。

炭素源についても検索した結果、通常用いている酢酸以外にリンゴ酸が良好な結果を与えた。

3-2. ニトロゲナーゼ遺伝子群のクローニング

窒素源を変えた培養についての水素発生状況から、*E. halophila* における光合成的水素発生は、ニトロゲナーゼによることが強く示唆された。分子レベルでの水素発生機構の検討のために、ニトロゲナーゼ遺伝子群のクローニングを試みた。*E. halophila* 由来ニトロゲナーゼの塩基配列及びアミノ酸配列は決定されていない。しかしながら、ニトロゲナーゼは細菌の種類に関係なく、多くの保存領域もつタンパク質である。そこで、本研究では、その保存領域から予測される塩基配列をもとにプライマーを設計し、Polymerase Chain Reaction(PCR)法によりニトロゲナーゼ遺伝子を増幅することでクロー

ニングを行った。既知のニトロゲナーゼ遺伝子とプライマー設計部位を図3に示した。次にクローニングした遺伝子の塩基配列を決定し、相同性検索を行うことで目的とする遺伝子が増幅できたかどうかを確認した。最後に決定した塩基配列およびアミノ酸配列を解析することで、*E. halophila* 由来ニトロゲナーゼの検証を行った。

ニトロゲナーゼを構成する遺伝子群は nifH, D, K からなる。まずはじめに、nifH について、複数のプライマー対で、PCR によるクローニングを行ったところ、2種類の PCR 断片を得ることができた。しかし、PCR 産物1、PCR 産物2とも、塩基配列のホモロジー検索結果は、nifH と相同性の高いタンパク質として知られる bchL (バクテリオクロロフィリド リダクターゼサブユニット L) [7]と判定された。また、それぞれのアミノ酸配列と紅色非硫黄細菌 *R. capsulatus* 由来 NifH、BchL とで比較を行ったところ、ともに BchL との相同性がより高いことが示された。しかし、PCR 産物1と2のアミノ酸配列は異なっていた。PCR 産物1と NifH とのアミノ酸の相同性は27%、BchL との相同性は34%、PCR 産物2と NifH との相同性が28%、BchL との相同性が62%であった。以上から、PCR 産物1も2も NifH ではないと判断された。また、PCR 産物2が BchL であると考えられる。

次にニトロゲナーゼ構成タンパク質の NifD と NifK に着目した。NifD は NifK よりも他の細菌間での相同性が高く、NifH のように類似したタンパク質も報告されていないことから図4に示した nifDF1 と nifDR1、nifDR2 を用いて nifD のクローニングを試みた。プライマー-nifDF1 と nifDR2 (約450bp) において目的とする大きさの PCR 産物が増幅され (PCR 産物3)、塩基配列を決定することができた。

塩基配列をホモロジー検索した結果は、根粒菌の1種である *Azotobacter vinelandii* の nifD と86%の相同性がある領域が存在するというものであった。PCR 産物3の塩基配列をアミノ酸に変換し、他の細菌由来 NifD と比較した結果を図5に示す。この結果は、完全に保存された領域が77%と非常に高く、ホモロジー検索の結果も nifD であることから、PCR 産物3は nifD であると推定できる。これは、*E. halophila* 由来ニトロゲナーゼ複合体サブユニットの1つ nifD の部分断片を初めてクローニングしたものとなった。

nifH、D、K は現在報告されている例ではすべて、ゲノム上に H、D、K の順に並んでコードされている。そこで、nifD のクローニングに用いたプライマー-nifDF1、nifDR2 をそれぞれ nifD、K 間でのセンス側のプライマー、nifH、D 間でのアンチセンス側のプライマーとして用いることで nifH、D、K 間でのクローニングを試みた。PCR におけるセンス側のプライマーには nifH のクローニングの際に用いた nifHF1、nifHF2、アンチセンス側のプライマーには、nifDR2 を用いた。その結果、PCR 産物4を得ることができ、その塩基配列を決定した。

PCR 産物4の両端から200~300塩基決定した配列をホモロジー検索した結果は、5'側が nifH、3'側が nifD となり、さらに nifD 側のアミノ酸配列も PCR 産物3 (nifD) と完全に一致したことから、nifH と nifD 間で増幅されたと結論した。この実験結果により、NifH の C 末端部位を含んだ部分断片771bp と NifD の N 末端部位を含んだ部分断片600bp を決定することができた。

次に nifD のクローニングの際に用いたセンス側のプライマー-nifDF1 と図4に示したプライマーを用いて nifD、K 間でのクローニングを試みた。この結果、PCR 産物5を得る

ことができ、その塩基配列を決定した。ホモロジー検索した結果、5′側が *nifD*、3′側が *nifK* であると確認された。また、5′側の *nifD* においては、PCR産物4における *nifD* 側の塩基配列と100%一致していたので *nifD*、*K*間のクローニングに成功したことが確認された。以上から、*nifD*の全長と *nifH*のC末端部位を含む部分断片、*nifK*のN末端部位を含む部分断片の塩基配列を決定することができた。図4には今回全長の配列を決定できた *NifD*の配列を相同性の高い *Azotobacter vinelandii*の *NifD*とともに示した。これらの結果に基づき、今後は、ニトロゲナーゼ遺伝子群の全貌を明らかにする予定である。

3-3. 遺伝子操作系の開発

ニトロゲナーゼ遺伝子情報に基づき、効率よいニトロゲナーゼ変異体を設計できれば、その遺伝子を *E. halophila*に組み込む必要がある。*E. halophila*は、プラスミドを持たず、遺伝子組換え実験が不可能であったため、*E. halophila*の遺伝子組換え系を確立することから開始した。このために、大腸菌と共培養し、大腸菌のプラスミドを *E. halophila*に転換する。さらにトランスポゾンを利用して、変異PYP遺伝子をクロモゾームに組み込む、という方針で進めた。

*E. halophila*は絶対嫌気性細菌であるため、通常の寒天培養はできない。密閉プラスチックバッグ内で寒天培養を行い、コロニーを得ることに成功した。また、高塩濃度下で生育する *E. halophila*と、高塩濃度下では生育できない大腸菌を適当な培地条件下で共培養することを試みた。一般に、好塩性細菌は、体内にベタインなどの糖を高濃度に作り出すことで、浸透圧を調整している。培養液に10%ベタインを添加することで、4%NaCl下で、大腸菌と *E. halophila*の共培養に成功した。引き続き、大腸菌プラスミドに含まれる抗生物質耐性遺伝子を *E. halophila*のクロモゾームに組み込むことを試みた。試行した抗生物質は、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、アンピシリン、ストレプトマイシン、カナマイシン及びグラムシジンである。クロラムフェニコールは、*E. halophila*に対し最も有効な抗生物質であったが、大腸菌の耐性遺伝子を組み込むことはできなかった。ストレプトマイシンに対して、100倍の耐性を持つ *E. halophila*を得ることに成功した(図5)。クローニングの結果、ストレプトマイシン耐性遺伝子が *E. halophila*のクロモゾームに組み込まれていることが確認できた。また、ストレプトマイシン存在下での嫌氣的寒天培養により耐性 *E. halophila*のシングルコロニーを得ることができた。これにより、大腸菌と *E. halophila*の共培養により、標的遺伝子を *E. halophila*に導入することが可能であり、ストレプトマイシン耐性を指標とすることで、選択できることが確認された。この方法を洗練させることで、*E. halophila*の遺伝子操作系を確立することができると期待できる。

参考文献

- [1] Clayton, R. K. & Sistrom, W. R., The Photosynthetic Bacteria, Plenum Press, New York (1978)
- [2] Y. Imamoto, K. Mihara, F. Tokunaga & M. Kataoka, Biochemistry 40, 14336 (2001)

- [3] Y. Imamoto, M. Kataoka & F. Tokunaga, *Biochemistry* 35, 14047 (1996)
- [4] 北村博, 森田茂廣, 山下仁平, 光合成細菌, 学会出版センター, 東京 (1984)
- [5] Zumft, W. G. & Castillo, F., *Arch. Microbiol.* (1978) 117, 53
- [6] Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. and Wheelis, M. L.,
INTRODUCTION TO THE MICROBIAL WORLD, Prentice-Hall, Inc.
- [7] Fujita, Y. & Bauer, C. E., *J. Biol. Chem.* (2000) 80, 195

Table 1. The effect of nitrogen source for the cultivation and hydrogen generation of *E. halophila*

Nitrogen Source	Turbidity ^a	Generation Rate (ml/h/L culture)	Total amount of generated H ₂ (ml/L culture)	Relative amount ^b of generated H ₂
NH ₄ 15mM	1.76	N. D.	trace	—
NH ₄ 5mM	1.65	3.1	80	1
Glycine 15mM	0.62	N. D.	trace	—
Alanine 15mM	0.52	4	280	11.1
Valine 15mM	0.33	1.9	140	8.8
Leucine 15mM	0.38	1.1	125	6.8
Isoleucine 15mM	0.41	0.2	20	1.0
Methionine 15mM	0.34	N. D.	trace	—
Phenylalanine 15mM	0.58	4	240	8.5
Tryptophane 15mM	—	—	—	—
Serine 15mM	0.62	1.3	240	4.7
Threonine 15mM	0.35	10.0	47.5	2.8
Asparagine 15mM	1.04	—	—	—
Glutamine 15mM	0.82	—	—	—
Tyrosine 15mM	0.51	10.0	32.5	1.3
Cysteine 15mM	1.69	2.2	82.5	1.0
Lysine 15mM	0.38	1.8	127.5	6.9
Arginine 15mM	0.74	3.7	182.5	5.1
Histidine 15mM	0.52	0.9	92.5	3.7
Aspartate 15mM	1.02	9.6	560	11.3
Glutamate 15mM	0.36	1.7	145	8.3

N. D., not determined. —, not observed.

a. Absorbance at 500nm, which indicates the cell density.

b. Relative value of total H₂/turbidity to the value obtained for NH₄(5mM).

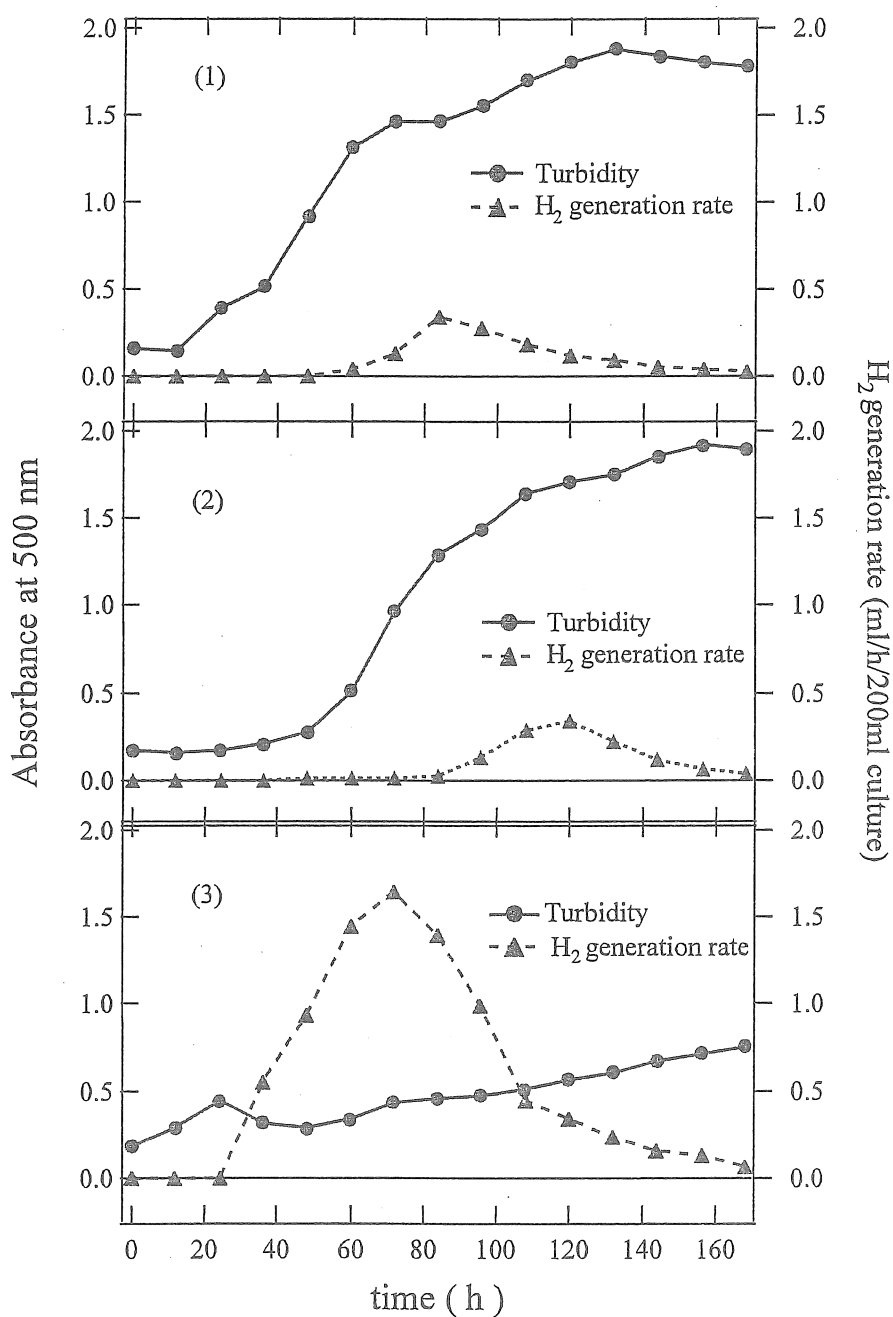


Figure 1. Turbidity change and H₂ generation rate change of *E. halophila* culture including 5mM NH₄Cl (1), 15mM cystein (2) or 15mM aspartic acid (3) as a nitrogen source.

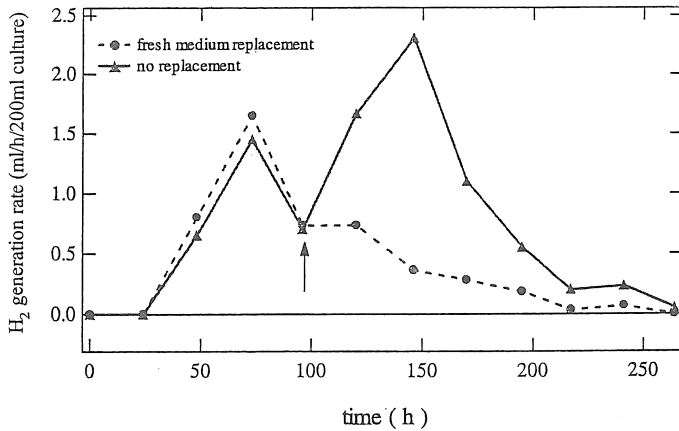


Figure 2. H₂ generation rate change of *E. halophila* culture including 15mM aspartic acid as a nitrogen source. Solid line shows H₂ generation rate change of a culture in which a half of the culture was replaced by the same volume of fresh medium at the arrowed point. Broken line shows H₂ generation rate change of a culture which medium was not replaced.

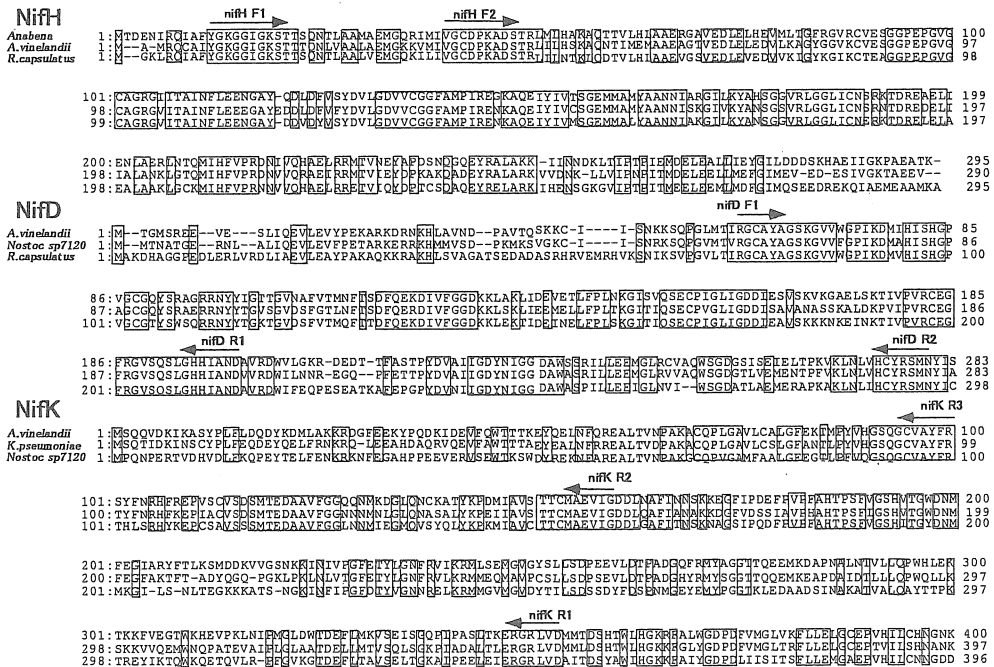


Figure 3. Multiple alignment of nitrogenase protein, NifH, D, K, amino acid sequences. Boxed region show conserved amino acids. Oligo nucleotid primers for PCR are designed by use of the arrowed regions.

```

1: MSSMTQDEFAQALTEEVLEVYPEATREFRAKHLAAVGD-CQPSKQVTSNR 49
1: MTQMSREEVESLITQEVLEVYPEKARKLDFNKHLAVNDPAVTQSKKCIISNK 50

50: KSVFPGVMTQRCAYAGSKGVVWGP IKDMHI SHGPVGGQQLSRAGRNNY 99
51: KSQFGLMTIRGCAYAGSKGVVWGP IKDMHI SHGPVGGQMSRAGRNNY 100

100: TGHVGVDTFGTINFTSDFQERDIVEFGGDEKLEKIIDEVEMLFPLNKGITIV 149
101: TGTIGVNAEIVTMNFTSDFQERDIVEFGGDKKLAKIIDEVEITLFPLNKGISV 150

150: QSECFVGLIGDDIISVGRQATERLQKPVIPVRCFAFRGVSQSLGHHIAND 199
151: QSECFVGLIGDDIISVSKVKGAEISKTIIVPVRCEGFRGVSQSLGHHIAND 200

200: TIRRHVLENRDGDGH-OAGPYDVAIVGDYNI GGDAWASRILLEEMGINVM 248
201: AVRDNVILGKRDFDITTFASTPYDVAITGDYNI GGDAWSSRILLEEMGLRCV 250

249: AQWSGDGLAEEMNTPKVQLNLIHCYRSMNYICEHMEKTHGIPWMEFHFF 298
251: AQWSGDGSISEITLTPKVKLNLIHCYRSMNYISRHMEKYGIPWMEYNFF 300

299: GEMRIACSLREITAAHFDEITICANAEAVIAKYQPMQAVIAKYRPRLEGKK 348
301: GETKTIEISLRAIAAKFDESIOKKCEEVIKAYKPEWEAVIAKYRPRLEGKR 350

349: VMLYVGGLRSRHVI GAYEDLGMEVLTGYEFAHDDYDRITYPELKEGTLV 398
351: VMLYVGGLRSRHVI GAYEDLGMEVLTGYEFAHDDYDRITMKEMGDSTLL 400

399: YDDANAEFLERFIERVQPDLVAAAGIKEKYVFQKMGLPFROMHSDYSGPY 448
401: YDDVTGYEF----- 409

449: HGYDGFALFARDMDMTLNNPVWDRMTPPWKATGEPASKAA 488
410: ----- 410

```

Figure 4. Amino acid sequences of NifD of *E. halophila* (upper) and *A. vinelandii* (lower). NifD sequence of *E. halophila* is decided in this study. Boxed region shows same amino acid between *E. halophila* and *A. vinelandii*.

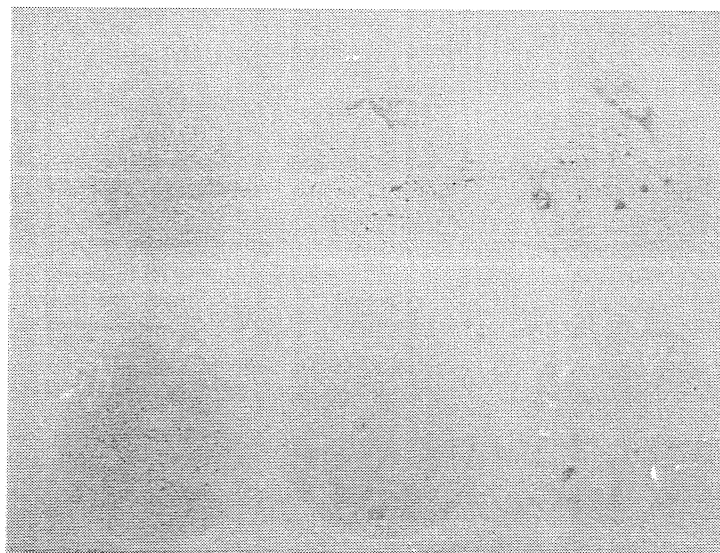


Figure 5. Pouches showing single *E. halophila* colonies after mating with streptomycin resistant *E. coli* S17/pKT210 (1st row) and negative control, streptomycin sensitive *E. coli* S17 (2nd row). Dilutions are 10^{-1} (1st column), 10^{-2} (2nd column) and 10^{-3} (3rd column).

Hydrogen Generation by Halophilic Photosynthetic Bacterium and its Application

Mikio Kataoka, Yasushi Imamoto, Yoichi Yamazaki and Hironari Kamikubo
Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

Summary

Ectothiorhodospira halophila is a salt-loving photosynthetic bacterium, which lives under 2 - 4 M NaCl. We have been studying photoactive yellow protein, a putative photoreceptor of negative phototaxis of this bacterium. During a culture of the bacterium, we noticed that the bacterium produces hydrogen gas. In order to examine the possibility of the application of hydrogen generation by this bacterium, we carried out the quantitative analysis of hydrogen generation, DNA cloning of nitrogenase genes which is a key enzyme for hydrogen generation and the development of the gene handling system with this bacterium.

A trace amount of hydrogen was generated photosynthetically by *E. halophila* with a standard culture medium containing 15mM NH₄Cl. It is known that hydrogen generation by photosynthetic bacteria is mediated by nitrogenases, enzymes for nitrogen fixation. NH₃ acts as an inhibitor of the enzymes. Thus, we examined the effect of various kinds of amino acids as a substitutive nitrogen source for the culture. When the concentration of NH₄Cl was decreased to 5mM, the improvement of hydrogen generation was observed, 80ml/L culture for 1 week. No cell growth was observed with tryptophane, and no hydrogen generation was observed with glycine, methionine, asparagin, glutamin. Among the amino acids tested, aspartate gives the most effective hydrogen generation. Alanine, phenylalanine and arginine gave also good results for hydrogen generation. Hydrogen generation was only observed at the logarithmic growth phase. The total amount of generated hydrogen increased, when the density of cells were controlled to keep the logarithmic growth phase.

It is known with various nitrogen-fixation bacteria that nitrogenase is composed of NifH, NifK and NifD. First, two PCR products for the candidate of nifH were obtained and DNA sequences were determined. Homology search indicated that these two products were close to a gene for bacteriochlorophyllide reductase, but not for nifH. Although we designed and examined various kinds of primers, we could not succeed to clone nifH gene. We could succeed to clone a part of nifD. Using the cloned region of nifD, we also succeeded to clone the entire region of nifD, the 771bp of nifH including the C-terminal region of NifH, the 5' end of nifK and the connecting regions for nifH and nifD, and nifD and nifK. We are now trying to clarify the entire sequence of nif genes.

In order to consider the nitrogenase function with molecular level, we tried to develop the genetic engineering system for *E. halophila*. First, a new method was developed to obtain single *E. halophila* colonies without the need for an anaerobic cabinet. Mating experiments of *E. coli* S17/pKT210 with *E. halophila* resulted in a 100-fold increase of streptomycin resistant *E. halophila* colonies compared to control matings with *E. coli* S17. These results indicate that (i) plasmid transfer occurs between *E. coli* and *E. halophila* (ii) appropriate plasmids replicate in the extremely halophilic bacterium *E. halophila* and (iii) streptomycin is a suitable antibiotic. We will develop the gene handling system for *E. halophila* based on these results.