

## 102p-3 熱水環境における一酸化炭素資化性好熱菌の定量的検出

○米田 恭子, 吉田 天士, 北村 崇行, 大福 高史, 井上 喬裕, 川市 智史, 左子 芳彦  
京都大学・院農

Key Word : carboxydrotroph, carbon monoxide, thermophile

【背景・目的】一酸化炭素資化性菌は一酸化炭素 (CO) を炭素源やエネルギー源として増殖できる。COは毒ガスとして知られる反面、代謝副産物や有機物分解、火山ガスによって生じ、常に環境へ供給され続ける物質である。CO資化性菌はCOを低濃度に保つCOスカベンジャーとしての重要性が指摘されているが、熱水環境における生態は明らかにされてこなかった。本研究では生態学的研究の端緒として定量的PCR法によるCO資化性菌の定量を試みた。

【方法】CO資化性好熱菌*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*と当研究室で鹿児島県温泉より分離した*C. pertinax*のゲノムより定量的PCR法の標的遺伝子を探し、プライマーを設計した。温泉試料よりi soil for Beads Beating (ニッポンジーン) を用いて抽出したDNAを鋳型に用いて、試料中の遺伝子コピー数を定量的PCR法により定量した。

【結果・考察】CO代謝系の鍵酵素である*cooS-II*はNADPH生産に関与すると推定され、*C. hydrogenoformans*と*C. pertinax*の*cooS-II*は93%の高い相同性を示したため、定量的PCR法の標的遺伝子とした。定量的PCRの結果、試料中の*cooS-II*は $4.5 \times 10^8$  copies/mlであり、直接計数法による細胞密度は $5.4 \times 10^8$  cells/mlであった。*C. hydrogenoformans*はゲノム中に1コピーの*cooS-II*を有することから、本遺伝子を1 copy/genomeとすると、微生物群集の約10%を*Carboxydotherrmus*属細菌に近縁なCO資化性好熱菌が占めると推察された。*C. pertinax*は水素生成CO資化性好熱菌であり、CO濃度を制御すると同時に水素を供給できることから、代謝副産物としてCOを生産し得る硫酸還元菌やメタン生成菌などの微生物と共生関係にあると考えられる。

## 102p-5 CO資化性好熱菌*Carboxydotherrmus* spp.由来CODH Vの性状とその機能

○井上 喬裕<sup>1</sup>, 吉田 天士<sup>1</sup>, 和田 啓<sup>2</sup>, 大福 高史<sup>1</sup>, 米田 恭子<sup>1</sup>, 福山 恵一<sup>2</sup>, 左子 芳彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大・院農, <sup>2</sup>大阪大・院・理

Key Word : CO dehydrogenase, Carboxydotherrmus, carbon cycle, Carboxydrotroph

【背景・目的】火山性熱水環境をはじめとし、様々な環境において嫌気性CO資化性菌は炭素循環に重要な役割を果たしている。本菌の多くはCOを電子供与体とした、呼吸やNADHの再生産等、特異なCO代謝系を有し、Ni-Carbon monoxide dehydrogenase (CODH) が中心的な機能を担っている。近年のゲノム解析や様々な環境のメタゲノム解析からCODHの多様性が明らかとなり、本酵素はCO代謝以外にも様々な代謝機能を担う可能性が示唆されている。本研究では、CODHの中でもこれまで研究のなされてこなかった「変わり者」のCODHに注目しその性状や機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】データベースよりCODH (cooS) ホモログを探し、その分布や分子系統解析を行った。本結果より*Carboxydotherrmus*属細菌の有するCODH Vに注目し、大腸菌を用いて本属細菌由来CODH V発現系を構築し、*C. hydrogenoformans*由来CODH IIと比較した。最後に両酵素で相違のみられた活性中心配位子を改変した変異酵素を作製し、各々性状を比較した。

【結果・考察】CODHホモログは系統的に2つにグルーピングされた (Group1, Group2)。また、CODH IIを含むGroup1では各鉄硫黄クラスター配位子が完全に保存されていたのに対し、CODH Vを含むGroup2では配位子に多様性がみられた。組み換えCODH Vでは組み換えCODH IIと比べCO酸化活性が1/50と低く、CO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>OHに対して各々15、100倍高い還元活性を示した。またCODH II活性中心配位子をCODH V型に変えた変異体はNH<sub>2</sub>OH還元活性が増大したことより配位子の相違が上記性状の相違の原因の1つと考えられた。現在、*C. hydrogenoformans*を用いて*cooS V*の転写解析を進めている。

## 102p-4 好気性超好熱古細菌*Aeropyrum pernix* K1の遺伝子組換え系の構築

○野村 敬吾, 井上 喬裕, 吉田 天士, 左子 芳彦  
京都大・院農

Key Word : Aeropyrum pernix K1, targeted gene disruption, homologous recombination

【目的】*Aeropyrum pernix* は中性好気性の超好熱古細菌で、その代謝に関して不明点が多い。遺伝子組換え系は、代謝系を解析する際の強力な手法であるが、本種に対する系は構築されていない。本研究では、二重交差相同組換えを利用して*A. pernix* K1株ピリミジン合成系の遺伝子*pyr E*、及び*pyr F*を標的とし遺伝子組換え系の構築を試みた。

【方法】K1株が保有する制限系 (*Ape* K1) が導入DNAに及ぼす影響を調べるため、メチル化酵素M.GpC、及び*M.Hae*IIIを用いて導入用の環状プラスミドをメチル化し、*Ape* K1処理を行った。組換え実験の概略を次に記す。メチル化した環状、あるいは直鎖状DNAを、電気穿孔法を用いて本株に導入した。増殖阻害剤である5-フルオロオロト酸 (5-FOA) の取り込み能を消失した*pyr E/pyr F*の遺伝子破壊候補株を、ウラシル要求性を指標として選抜した。その後、破壊領域を標的としたPCRにより破壊株の遺伝子型を決定した。

【結果と考察】メチル化したプラスミドを制限処理した結果、M.GpCによって切断を免れることが示唆された。その為、組換え実験ではM.GpCを用いた。遺伝子の導入後、選抜培地上で増殖したコロニーをPCRに供した結果、直鎖・環状DNAのいずれを用いた場合でも、野生株より約1.1kb短い増幅産物が得られた。塩基配列解析の結果、標的とした両遺伝子が破壊されていることが示された。PCRの結果、約半数のコロニーで野生株由来と考えられる増幅産物が混在していた。これらのコロニーから純化操作により破壊株を確立することが可能であった。一連の操作により、本株の標的遺伝子組み換え株の作成が可能となった。形質転換効率が低いことなどの解決に向け最適化を試みている。

## 102p-6 亜酸化窒素還元脱窒菌*Azoarcus*属KH32C株の全ゲノム解析と窒素固定エンドファイトBH72株、芳香族化合物分解脱窒菌EbN1株との比較ゲノム

○西澤 智康<sup>1</sup>, 多胡 香奈子<sup>2</sup>, 大島 健志朗<sup>3</sup>, 服部 正平<sup>3</sup>, 石井 聡<sup>4</sup>, 大塚 重人<sup>1,4</sup>, 妹尾 啓史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大・院農生科, <sup>2</sup>農環研, <sup>3</sup>東京大・院新領域, <sup>4</sup>北海道大・工

Key Word : *Azoarcus*, paddy soil, denitrifying bacterium, comparative genomic analysis

我々はこれまでに、農耕地土壌から発生する温室効果ガスN<sub>2</sub>Oの低減化への応用を目指して、日本各地の水田土壌から脱窒細菌を多数分離してきた。本研究では、分離菌株の中でN<sub>2</sub>OをN<sub>2</sub>に還元する能力の高い*Azoarcus*属 KH32C株についてゲノム全塩基配列を決定した。さらに、KH32C株と同じ*Rhodocyclaceae*科に属しゲノム解読された窒素固定エンドファイトの*Azoarcus*属BH72株と芳香族化合物分解脱窒菌*Aromatoleum*属EbN1株との比較ゲノム解析を行った。KH32C株は5.08Mbの環状ゲノムと737kbの環状プラスミドを保有していた。ゲノム解読3株の二つをそれぞれゲノム・アライメントした結果、多数の相同する遺伝子は見つかったが、ゲノム上のその配置や構成はそれぞれ異なる場合が多かった。*Azoarcus/Aromatoleum*属細菌の16S rRNA遺伝子配列による系統解析からKH32C株はBH72株やEbN1株とは異なるグループに属することが示された。また、RNAポリメラーゼ酵素の相同性は83~86% (BH72) と86~94% (EbN1)、 $\sigma^{70}$ 因子では82% (BH72) と86% (EbN1)であり、EbN1株に近縁であることが示唆された。一方、KH32C株のゲノム上に窒素代謝、窒素固定や芳香族化合物分解に関わる遺伝子を見出したが、BH72株やEbN1株が保有する各々の遺伝子構成と異なる部分があった。KH32C株は両株の特性を有する新奇な*Azoarcus*属細菌種であることが示された。本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援を受けた。