

*Rhodobacter sphaeroides*의 질소고정효소에 미치는 암모늄 이온 효과 제거를 통한 수소생성 증진

¹진 상 훈 · ²김 미 선 · † ¹이 정 국

¹서강대학교 생명과학과 바이오융합과정, ²한국 에너지기술연구원 바이오매스 연구팀

(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

Improvement of Photoheterotrophic H₂ production of *Rhodobacter sphaeroides* by Removing Ammonium Ion Effect Exerted on Nitrogenase

Sang-Hoon Jin¹, Mi-Sun Kim², and Jeong Kug Lee^{1†}

¹Department of Life Science and Interdisciplinary Program of Integrated Biotechnology,
Sogang University, Seoul 121-742, Korea

²Biomass Research Team, Korea Institute of Energy Research, Daejeon 305-343, Korea

(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

Photoheterotrophic evolution of molecular hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by nitrogenase that is regulated transcriptionally and post-translationally by ammonium ion. Two PII-like proteins, *GlnB* and *GlnK*, play key roles in mediating inhibition and repression of nitrogenase in the presence of ammonium ion. *glnB* and *glnK* of *R. sphaeroides* were interrupted to abolish the ammonium ion effect controlling nitrogenase. Ammonium ion effect was still observed in mutant having an interruption in either *glnB* or *glnK*. However, the nitrogenase activity of *glnB-glnK* double mutant is not affected by ammonium ion. H₂ evolution was improved by increasing gene dosages of nitrogenase-coding genes, *nifHDK* in trans in *glnB-glnK* double mutant.

Key Words : *Rhodobacter sphaeroides*, nitrogenase, H₂ evolution, *glnB*, *glnK*

서 론

비유황 자색 (purple-nonsulfur) 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides*는 광합성 성장을 하는 도중 nitrogenase에 의해 수소를 생성할 수 있다(1, 2). 수소는 기존의 화석연료를 대체할 수 있는 청정에너지로서 많은 주목을 받고 있으며, 최근 그 생성 증대와 저장 방법에 관한 연구가 활발하다. 생물학적 수소 생성 방법의 대상 생체로서 비유황 자색 광합성 세균은 그 높은 수소 생성능으로 인해 주된 연구 대상으로 사용되어 왔다.

*R. sphaeroides*를 포함한 비유황 자색 광합성 세균에 의한 수소생성은 질소고정 효소인 nitrogenase에 의해 매개된다.

† Corresponding Author : Department of Life Science and Interdisciplinary Program of Integrated Biotechnology, Sogang University, Mapo, Shinsu 1, Seoul 121-742, Korea

Tel : +82-2-705-8459, Fax : +82-2-704-3601.

E-mail : jgklee@sogang.ac.kr

하지만, 세포내에 존재하는 암모늄 이온에 의해 nitrogenase는 발현과 활성이 크게 억제와 저해를 받는다. Nitrogenase의 효소 활성은 효소의 구성 단백질인 NifH가 dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase인 DraT에 의해 ADP ribosylation이 되면서 저해받는다(3, 4). 두 PII 계열 단백질인 *GlnB*와 *GlnK*가 암모늄 이온이 있을 때, DraT를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(5). Nitrogenase 유전자를 코딩하는 *nifHDK* operon은 전사활성 인자인 NifA의 조절을 받는다. NifA는 암모늄 이온이 있을 때, *GlnB*와 *GlnK*에 의해 전사활성 성질을 잃는다(5). 또한, NifA의 발현은 다시 전사활성 인자인 NtrC가 인산화 되었을 때, 증진되고 그 인산화는 kinase인 NtrB에 의해 매개된다. 암모늄 이온이 충분할 때, NtrB는 *GlnB*에 의해 그 활성이 저해받아 NtrC 인산화를 못하고, 결국 NifA가 발현되지 못해 nitrogenase가 발현되지 못한다(5-7). 이와 같이 암모늄 이온이 존재할 경우, nitrogenase는 세포 내의 두 단백질인 *GlnB*와 *GlnK*에 의해 그 활성과 발현이 감소되게 조절받는다.

본 연구 그룹은 수소생성능이 실험실 균주에 비해 5배

이상 높은 비유황 자색 광합성 세균을 우리나라의 대부도 인근 하천변의 수계 혐기층에서 분리, 동정하고 유전자은행 KCTC에 기탁하여 *R. sphaeroides* KCTC 12085로 명명하였다. 분리균의 수소생성능을 높이기 위해, uptake hydrogenase를 제거했다. 광합성 조건에서 생성된 수소는 autotrophic 성장 도중 생성된 수소를 reductant로써 사용할 수 있고(1), 이때, 수소는 세포막에 있는 uptake hydrogenase를 통해 세포 내로 들어온다. 한편, 성장 도중 β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) synthase의 연속된 작용을 통해 세포는 PHB를 합성할 수 있다(8-11). 이미, 본 연구 그룹은 이러한 수소 uptake와 PHB 합성 효소를 coding 하는 유전자를 파괴시켜 수소 생성을 증대 시켰다(12).

균체의 광합성 성장도중 흔히 접할 수 있는 세포내 암모니움 이온은 nitrogenase의 활성과 발현을 감소시킨다. 본 연구는 nitrogenase에 미치는 암모니움 이온의 감소 효과를 없애기 위해 *glnB*, *glnK*가 각각, 혹은 모두 파괴된 변이주를 제작하였다. 그 결과, 암모니움 이온 효과가 *glnK-glnB* double mutant에서 나타나지 않았다. 반면, *glnK* mutant 혹은 *glnB* mutant에서는 여전히 암모니움 이온 효과가 나타났다. 또한, nitrogenase 유전자인 *nifHDK*의 gene dosage를 증진시켰을 경우, 수소 생성능의 증진이 *glnK* mutant 혹은 *glnB* mutant에서는 나타나지 않았으나, *glnK-glnB* double mutant에서 수소 생성 증진이 관찰되었다.

재료 및 방법

균주와 성장조건

균주로서 *R. sphaeroides* KCTC 12085(11)의 uptake hydrogenase (*hupSL*)와 PHB synthase (*phbC*)가 파괴된 변이주인 HP1을 모균주 (parental strain)로 사용했다. *R. sphaeroides* 2.4.1은 유전체 정보가 확립된 실험실 균주로서 유전자 추출을 위한 균주로 사용했다. 두 균주 모두 succinate가 주된 탄소원으로 포함된 Sistrom's minimal medium을 사용해서 성장시켰다(11). 또한 수소 생성을 위한 변형된 Sistrom's minimal medium으로 (NH₄)₂SO₄를 제거하고 질소원으로 glutamate의 양을 늘렸고, ammonium molybdate 대신 sodium molybdate를 사용하였다. 탄소원으로는 succinate 대신 DL-malate를 사용하였다. 암모니움 이온은 NH₄Cl을 사용하여 공급했다. 사용된 균주와 plasmid는 Table 1에 정리되어 있다.

필요할 경우, kanamycin (Km)은 25 μ g/ml, tetracyclin (Tc)은 1 μ g/ml의 농도로, ampicillin (Ap)은 50 μ g/ml의 농도로 사용했다(13, 14). 세포의 성장은 Klett Summerson colorimeter (No. 66 filter, Manostat Co., USA)를 사용해서 측정했고, 세포 성장 정도는 Klett Unit (KU)로 나타났다. 광도는 10 W/m², 배양온도는 *R. sphaeroides*의 경우 28°C, *E. coli*는 37°C를 유지했다(13, 14).

수소 측정

광합성 조건에서 성장한 세포 (80-100 KU)를 side-arm serum vial (60-70 ml)에 800 μ l을 접종한 후 총량이 8 ml 이 되게 변형된 조성의 Sistrom's medium을 채웠다. 그리고

rubber cap을 씌운 후, 1분간 vacuum을 걸어주고, argon gas (Ar)로 내부공기를 1분간 치환하였다. 광도는 10 W/m²를 유지하였다.

수소 함량은 gas-tight microsyringe로 side-arm serum vial 내의 head space의 gas를 300 μ l 뽑아 gas chromatography (Shimadzu 17ATT ver. 3)로 분석하였다. Molecular sieve 5A (Supelco)로 충전된 2 mm x 2 m column을 사용했으며, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였고, carrier gas (flow rate : 50 ml/min)는 Ar을 사용하였다. Column 온도는 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었다 (12).

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant characteristic(s)	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α phe	F' ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r_km_k) supE44λ thi1 gyrA relA1 phe::Tn10dCm</i>	17
S17-1	C600::RP-4 2-(Tc::Mu) <i>thi pro hsdR hsdM^r recA</i>	18
<i>R. sphaeroides</i>		
2.4.1	wild type	W. Sistrom
HP1	KD131 derivative Δ (<i>hupSL phbC</i>)	12
HP1 Δ <i>glnK</i>	HP1 derivative Δ <i>glnK</i>	This study
HP1 Δ <i>glnB</i>	HP1 derivative Δ <i>glnB</i>	This study
HP1 Δ <i>glnBK</i>	HP1 derivative Δ (<i>glnK glnB</i>)	This study
Plasmids		
pUI8352	pLA2917 containing <i>nifHDK</i>	19
pGEM-T ez	Ap ^r <i>lacZ</i> flori	Promega
pLO1	Km ^r <i>sacB⁺</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE <i>ori</i>	16
pLO Δ <i>glnK</i>	pLO1/ <i>PstI-SalI</i> + ~1.3-kb <i>PstI-XhoI</i> fragment containing 77-bp <i>BglII-SmaI</i> fragment with <i>glnK</i> deleted	This study
pLO Δ <i>glnB</i>	pLO1/ <i>SacI-SalI</i> + 668-bp <i>SacI-SalI</i> fragment containing internal 243-bp <i>PstI-NsiI</i> fragment with <i>glnB</i> deleted	This study
pRK415	tet ^r <i>lac^r</i> IncP1 <i>ori</i>	20
pNifHDK	pRK415/ <i>HindIII-KpnI</i> + 4160-bp <i>HindIII-KpnI</i> fragment containing <i>nifHDK</i> genes	This study

Nitrogenase 활성 측정

Nitrogenase 활성은 acetylene reduction 방법에 의해서 측정했다. 광합성 조건에서 성장한 세포에 chloramphenicol (Cm)을 최종 농도가 10 μ g/ml이 되도록 투여한다. 이 때, 필요할 경우 NH₄Cl을 같이 투여한다. 이어, Ar 개스를 사용하여 1분간 vial 내의 개스층을 치환시키고, 암 조건에서 10분간 배양한다. 이후, 기질로서 acetylene gas를 vial 개스층의 10% 부피에 해당되는 양으로 주입한다. Nitrogenase에 의해 환원된 ethylene gas의 양은 gas chromatography (Shimadzu 17A)를 이용해서 측정했다. Column (2 mm x 2 m)은 Porapack type R로 충전한 후 사용하였으며, flame-ionization detector (FID)로 분석하였다. Carrier gas는 flow rate이 40 mL/min가 되도록 했으며 N₂ gas를 사용하였다. Column 온도는 80°C, injector 온도는 100°C, detector

온도는 200°C가 되도록 하였다(12).

***glnK* mutant, *glnB* mutant 제작**

glnB mutant를 제작하기 위해 *glnB* 유전자 내의 243-bp의 *Pst*I-*Nsi*I DNA 지역을 제거시킨 후(Fig. 1), 668-bp의 *Sac*II-*Sal*I 절편(Fig. 1A, 굵은 선)을 pLO1 plasmid (Km^r)에 cloning하여 pLOΔ*glnB*를 만들었다. 이를 본 연구의 모균주로 사용한 HP1에 이동시켜 single crossover를 유도했다. Plasmid 유전자를 이동시키는 conjugation은 이미 보고된 방법에 따라 수행했다(12). Single crossover의 exconjugant로부터 double crossover의 재조합 균주, HP1Δ*glnB*는 15%

sucrose가 함유된 Sistrom 배지에서 선별했다(15, 16).

glnK mutant를 얻기 위해, *glnK* 유전자의 C-말단 부분에 해당하는 77-bp의 *Bgl*II-*Sma*I DNA 지역을 제거시킨 후(Fig. 2), 1,291-bp의 *Pst*I-*Xho*I 절편(Fig. 2A, thick line)을 suicide vector인 pLO1 (Km^r)에 cloning하여 pLOΔ*glnK*를 만들었다. 이 plasmid를 사용해서 위의 사실상 동일한 방법에 의해, *glnK* mutant인 HP1Δ*glnK*를 얻었다.

한편, *glnK-glnB* double mutant는 *glnB* mutant에 pLOΔ*glnK*를 이동시킨 후, double crossover하여 HP1Δ*glnBK*를 얻었다. 모든 mutant는 Southern hybridization 분석을 통해 확인했다.

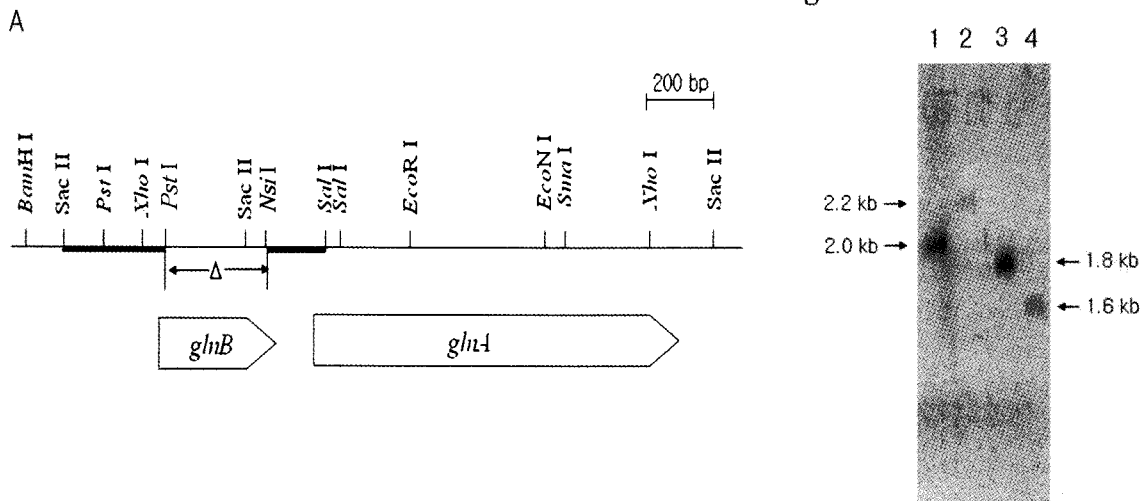


Figure 1. Chromosome of *glnB* mutant. A. Restriction map of *glnB* and *glnA*. The deleted DNA from *glnB* from the chromosome of *glnB* mutant is shown. B. Genomic Southern hybridization analyses of *glnB* mutant. The chromosomal DNA from HPI (lanes 1 and 3) and HP1Δ*glnB* (lanes 2 and 4) were digested with *Sac*II (lanes 1 and 2) and *Xho*I (lanes 3 and 4). A 2.3-kb DNA fragment encompassing *glnB* and *glnA* was used as a probe.

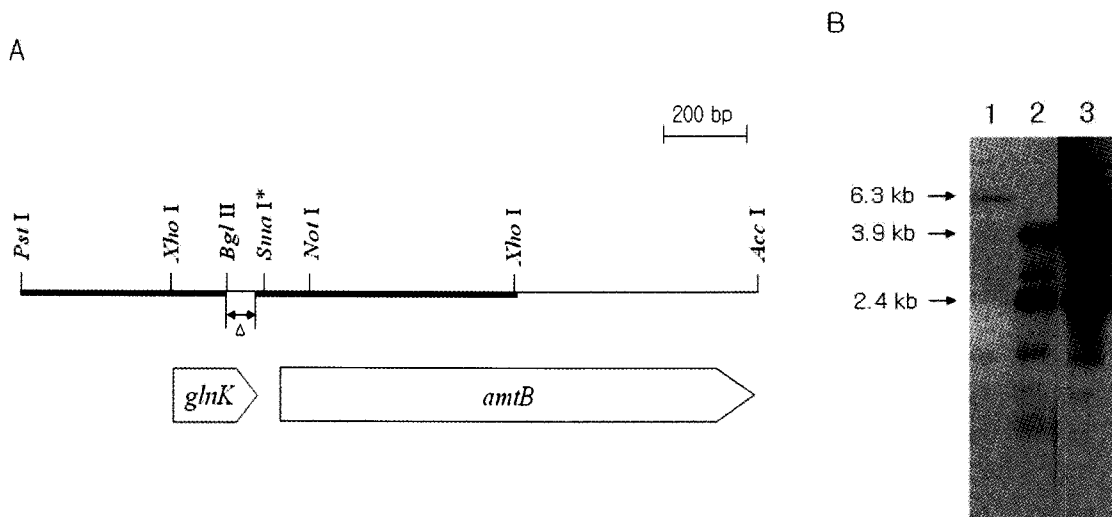


Figure 2. Chromosome of *glnK* mutant. A. Restriction map of *glnK* and *amtB*. The deleted DNA from *glnK* from the chromosome of *glnK* mutant is shown. B. Genomic Southern hybridization analyses of *glnK* mutant. The chromosomal DNA from HPI (lane 1), HP1Δ*glnK* (lane 2) and HP1Δ*glnBK* (lane 3) were digested with *Sma*I. *Sma*I* was generated by PCR. A 1.3-kb DNA fragment containing *glnK* and *amtB* was used as a probe.

Southern hybridization analysis

균주 HP1, HP1ΔglnK, HP1ΔglnB, HP1ΔglnBK의 chromosomal DNA를 분리하여, 제한효소로 자른 후, 0.8% agarose gel에 전기영동하고 Hybond-N membrane (Amersham, UK)에 blotting을 했다(2). DNA를 UV-cross linking을 통해 고정시킨 후, probe 표지와 검출은 Gene Images (Amersham, UK)를 사용하여 X-ray film (Agfa, Belgium)에 현상하였다.

Cloning of nifHDK

우선, nifK의 중앙 650-bp의 XhoI-SphI DNA를 pLO1에 클로닝했다. 이어, *R. sphaeroides* KCTC 12085 염색체상의 nifK 지역에 crossover를 일으켰다. 이 crossover가 된 균주의 염색체 DNA를 뽑아 BgIII로 cutting하여 self-ligation을 통해 nifH와 nifD를 얻었고, *R. sphaeroides* 2.4.1의 cosmid library 중, pU18352의 EcoRI-SacI fragment로 nifK를 얻어 전체 nifHDK operon 유전자를 재조합했다. 이를 HindIII와 SacI으로 잘라 pRK415의 HindIII-SacI site에 옮긴 후, pNifHDK를 제작했다.

결과 및 고찰

HP1의 glnK와 glnB 유전자 파괴

glnB는 downstream에 glutamine synthetase를 코딩하는

glnA 유전자와 operon을 이루기 때문에 polar effect를 피하기 위해 항생제 marker를 사용하지 않고 in-frame deletion mutant를 제작하였다(Fig. 1). *R. sphaeroides* 2.4.1의 염색체 DNA를 template로 glnB의 upstream과 downstream을 포함하는 약 2.3-kb의 DNA 부분을 PCR (polymerase chain reaction)하여 pGEM-T ez vector에 cloning하여 확보했다. glnB 유전자 내의 243-bp의 PstI-NsiI DNA를 제거하기 위해 451-bp의 SacI-PstI DNA와 217-bp의 NsiI-SalI DNA를 pLO1 suicide plasmid (Km^r)에 클로닝해서 재조합 plasmid인 pLOΔglnB를 제조했다. PstI, NsiI site는 PCR로 DNA fragment를 얻을 때 임의로 만들었다. pLOΔglnB를 HP1에 이동시켜 single crossover (Km^r)를 유도했고, 이것을 다시 15% sucrose가 함유된 Sistrom's medium에 도말하여 levan sucrase (sacB)에 의한 levan 형성을 통한 negative selection을 통해 double crossover (Km^s)를 얻어냈다. 이 double crossover의 염색체 구조는 Southern hybridization analysis로 확인했다. Probe로는 glnBA operon을 포함하는 2,310-bp의 PCR DNA fragment를 사용했다. 그 결과, glnB mutant, HP1ΔglnB는 SacII로 자른 시료에서 2.2 kb의 band가 나왔고, HP1은 예상대로 2 kb의 band가 나왔다. 또 XhoI으로 자른 시료에서 HP1은 1.8 kb의 band를 보였고, HP1ΔglnB는 1.6 kb의 band를 보여, HP1ΔglnB의 염색체 구조가 맞는 것으로 판명했다(Fig. 1).

그리고, glnK mutant를 얻기 위해, 476-bp의 PstI-BgIII

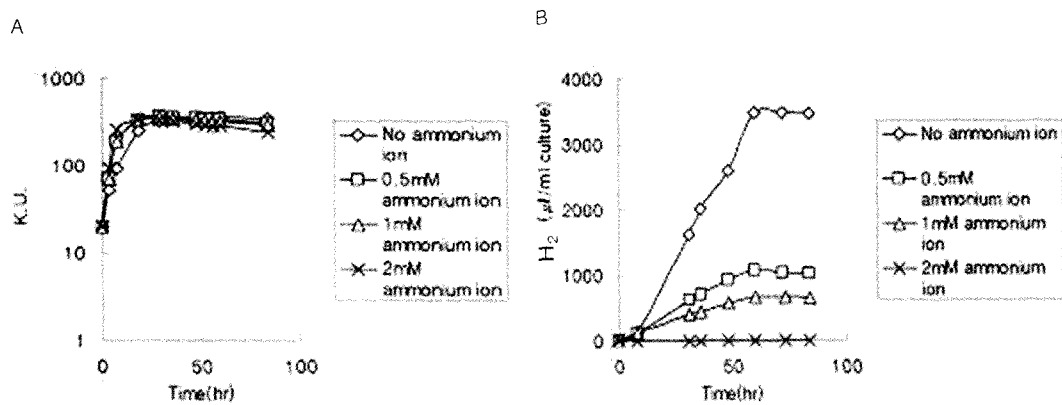


Figure 3. Growth (A) and hydrogen evolution (B) of HP1 (Diamond, no NH₄⁺; square, 0.5 mM NH₄⁺; triangle, 1 mM NH₄⁺; cross, 2 mM NH₄⁺).

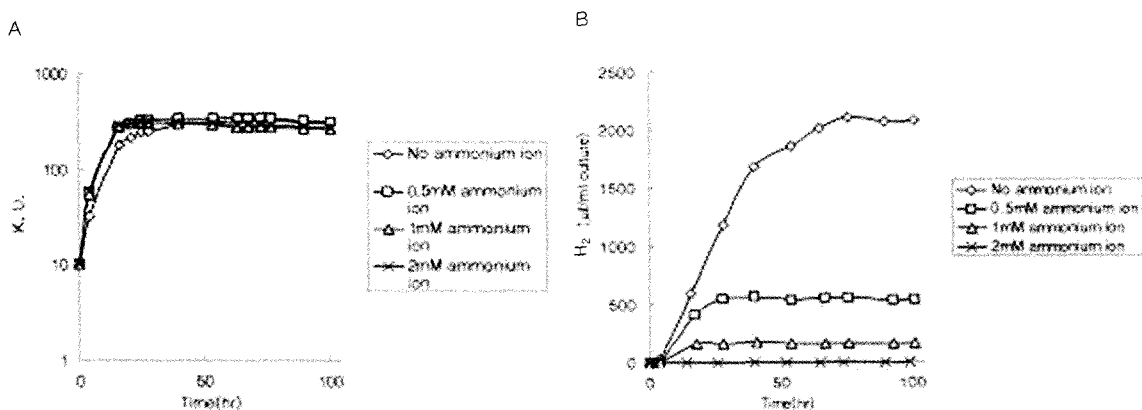


Figure 4. Growth (A) and hydrogen evolution (B) of HP1ΔglnK (Diamond, no NH₄⁺; square, 0.5 mM NH₄⁺; triangle, 1 mM NH₄⁺; cross, 2 mM NH₄⁺).

DNA와 815-bp의 *SmaI-XhoI* DNA를 PCR로 얻은 후, pLO1에 클로닝해서 pLOΔglnK를 만들었고 이를 HP1에 이동시켰다(Fig. 2). 위와 유사한 방법으로 얻은 *glnK* mutant인 HP1ΔglnK의 염색체를 *SmaI*으로 잘라 분석한 결과, HP1은 6.3 kb 부근에 하나의 band가 보였지만, HP1ΔglnK는 3.9 kb와 2.4 kb 부근에 두 개의 band가 보였다. 즉, PCR에 의해 의도적으로 만든 *SmaI* site가 존재한다는 것을 확인하였다. 그 외의 흐린 bands는 blocking이 잘 되지 않아 나타난 non-specific band이다(Fig. 2). *glnB-glnK* double mutant (HP1ΔglnBK)는 HP1ΔglnB strain을 사용하여 위와 같은 방법으로 *glnK*를 파괴했고 그 염색체 구조도 확인했다(Fig. 2).

각 mutants의 수소 생성

HP1과 HP1에서 유래된 변이주 HP1ΔglnK, HP1ΔglnB, HP1ΔglnBK를 광합성 조건에서 배양하여 수소 생성을 측정했다(Fig. 3-6). 각 균주의 성장 속도는 큰 차이 없으나, 암모니움 이온이 존재하지 않을 때, 최대 KU에 늦게 도달한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A-6A). 또한 HP1과 HP1ΔglnBK는 암모니움 이온이 존재하지 않을 경우, 최대 수소 생성량이 ml 배양액 당 3.5 ml 이상을 기록하였으나(Fig. 3 and 6) HP1ΔglnK와 HP1ΔglnB는 2 ml 정도의 최대 수소 생성을 보였다(Fig. 4 and 5). HP1과 HP1ΔglnK, HP1ΔglnB의 암모니움 이온 농도에 따른 수소 생성은 암모니움 이온

농도가 2 mM이 되었을 때, nitrogenase의 활성이 완전히 저해가 되었으나, HP1ΔglnBK의 경우, 2 mM 농도의 암모니움 이온이 존재하는 조건에서도 ml 배양액 당 약 300 μl의 수소가 생성되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 6). 이는 암모니움 이온이 없을 경우의 약 10%에 해당한다. 따라서, HP1ΔglnBK는 HP1에 비해 뚜렷한 수소 생성증가는 관찰되지 않았어도, 암모니움 이온에 의한 감소효과는 덜 받고 있음을 의미한다.

암모니움 이온에 의한 HP1ΔglnBK의 nitrogenase 활성 저해

HP1과 HP1ΔglnBK 균주의 nitrogenase 활성을 acetylene 개스 환원법을 사용해 측정했다. HP1의 경우, 암모니움 이온이 없을 때, 66.2 nmole ethylene /KU · h의 활성도를 보였고, 2 mM의 암모니움 이온을 을 투여했을 때, 약 1/2에 해당하는 35.7 nmole ethylene /KU · h의 활성도를 나타냈다. 따라서, 2 mM의 암모니움 이온에 의해 nitrogenase 활성은 약 50% 저해받았다. 반면, HP1ΔglnBK는 암모니움 이온이 없을 때, 모균주인 HP1과 비슷한 69.4 nmole ethylene /KU · h의 활성도를 나타냈으나, 암모니움 이온을 2 mM 투여했을 때에도 여전히 67.6 nmole ethylene /KU · h의 활성도를 나타내어 nitrogenase의 활성이 거의 저해받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7).

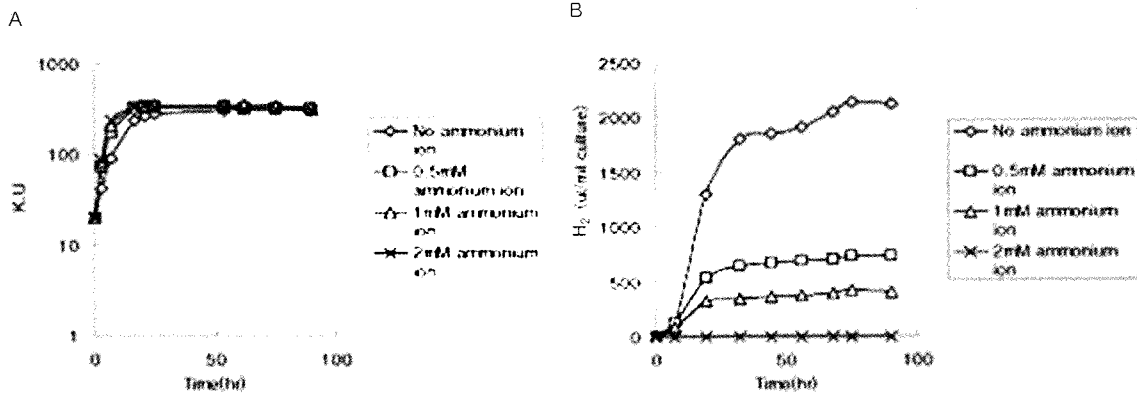


Figure 5. Growth (A) and hydrogen evolution (B) of HP1ΔglnB (Diamond, no NH₄⁺; square, 0.5 mM NH₄⁺; triangle, 1 mM NH₄⁺; cross, 2 mM NH₄⁺).

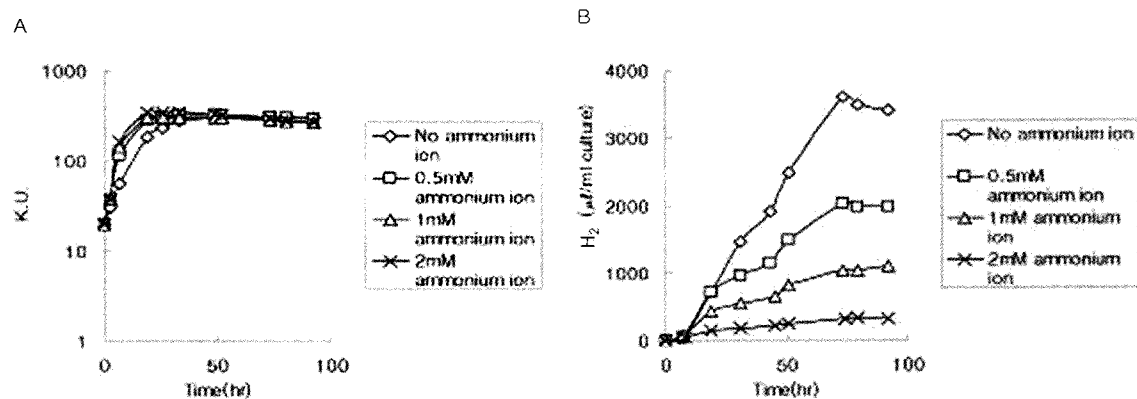


Figure 6. Growth (A) and hydrogen evolution (B) of HP1ΔglnBK (Diamond, no NH₄⁺; square, 0.5 mM NH₄⁺; triangle, 1 mM NH₄⁺; cross, 2 mM NH₄⁺).

nifHDK의 gene dosage 증가를 통한 수소 생성 증진

Nitrogenase 유전자인 *nifHDK*의 gene dosage를 moderate promoter로 알려진 Tc promoter로 증진시켰을 경우, HP1의 수소생성은 큰 증가가 없었다(Table 2). 이는 moderate promoter에 의한 전사조절을 받는 *nifHDK*의 gene dosage 증진을 통한 nitrogenase 효소의 양적 증가가 수소생성에 효과 없음을 의미한다. 또한, 외부에서 암모니움 이온을 추가로 넣어주지 않는다고 해도 내부에서 생성되는 암모니움 이온에 의한 nitrogenase 활성 저해 효과가 HP1의 GlnK와 GlnB를 통해 매개됨을 의미한다. 하지만, HP1ΔglnBK에서 *nifHDK*의 gene dosage를 증진시켰을 경우, 약 30% 이상의 수소생성 증진이 관찰되었다. 이 결과는 암모니움 이온에 의한 nitrogenase 활성 저해 효과가 GlnK와 GlnB의 파괴를 통해 없어졌고, 이를 이용한 수소 생성능의 증진이 가능함을 의미한다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 암모니움에 의한 저해 효과는 GlnK와 GlnB를 모두 제거했을 때 나타났고, HP1ΔglnBK에서 *nifHDK*의 gene dosage를 strong promoter로 증진시키면 수소생성의 더욱 큰 증진이 있을 것으로 예측할 수 있다.

Table 2. Maximum H₂ evolution of HP1 and HP1ΔglnBK in the presence of additional gene dosages of *nifHDK*

Strains	Maximum H ₂ evolution (ml/ml culture)
HP1 (pRK415)	3.17
HP1 (pNifHDK)	3.07
HP1ΔglnBK (pRK415)	3.40
HP1ΔglnBK (pNifHDK)	4.14

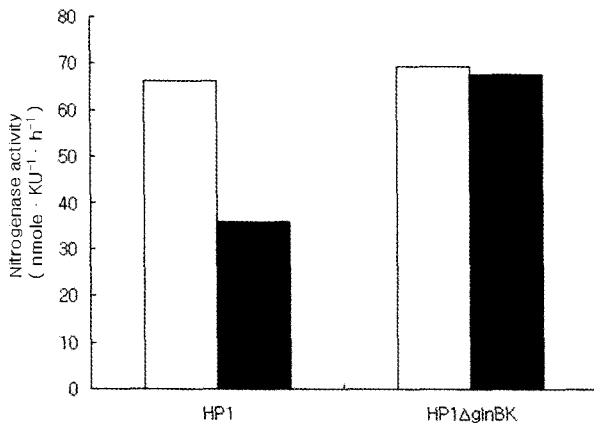


Figure 7. Effect of ammonium ion on nitrogenase activities of HP1 and HP1ΔglnBK. Ammonium ion was added at 2 mM, and enzyme activities were determined after 30-min reaction under illuminated conditions at 10 W/m². Open bar, no NH₄⁺; Closed bar, 2 mM NH₄⁺.

요 약

*Rhodobacter sphaeroides*는 photoheterotrophic 조건에서 성장을 하면서 질소고정효소인 nitrogenase에 의해 수소를 발생시킨다. 이 nitrogenase는 ammonium ion이 존재할 때, PII 계열 단백질인 GlnB와 GlnK에 의해 negative regulation을 받게

된다. 본 연구에서는 *glnB*와 *glnK* 유전자를 interruption하여 수소생성의 증진을 꾀하였다. 그 결과, parental strain이나 *glnB* 혹은 *glnK* 유전자 하나만을 interruption 시켰을 경우, 암모니움 이온에 의해 nitrogenase 활성이 저해를 받고 있었으나, *glnB*, *glnK* 모두를 interruption 시켰을 때, 암모니움 이온에 의한 저해 효과가 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 또한 이러한 *glnB-glnK* double mutant에 *nifHDK* gene을 in trans로 넣어 nitrogenase의 dosage를 높였을 경우, 수소 생성이 약 30% 가량 증진되었다는 것을 볼 수 있었다.

감 사

이 연구논문은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업 (수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Hillmer, P. and H. Gest (1977), H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: Production and utilization of H₂ by resting cells, *J. Bacteriol.* **129**, 732-739.
- Shah, V., N. Garg, and D. Madamwar (2001), Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production, *FEMS Microbiol. Lett.* **194**(1), 71-75.
- Liang, J. H., G. M. Nielsen, D. P. Lies, R. H. Burris, G. P. Roberts, and P. W. Ludden (1991), Mutations in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation, *J. Bacteriol.* **173**, 6903-9.
- Yakunin, A. F. and P. C. Hallenbeck (1998), Short-term regulation of nitrogenase activity by NH₄⁺ in *Rhodobacter capsulatus*: multiple in vivo nitrogenase response to NH₄⁺ addition, *J. Bacteriol.* **180**, 6392-6395.
- Drepper, T., S. Groß, A. F. Yakunin, P. C. Hallenbeck, B. Masepohl, and W. Klipp (2003), Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Microbiology* **149**, 2203-2212.
- Ninfa, A. J. and M. R. Atkinson (2000), PII signal transduction proteins, *Trends Microbiol.* **8**, 172-9.
- Pawlowski A., K. U. Riedel, W. Klipp, P. Dreiskemper, S. Gross, H. Bierhoff, T. Drepper, and B. Masepohl (2003), Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* **185**, 5240-7.
- Anderson, J. A. and E. A. Dawes (1990), Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.* **54**, 450-472.
- Kiley, P. J. and S. Kaplan (1988), Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*, *Microbiol. Rev.* **52**, 50-69.
- Peoples, O. P. and A. J. Sinskey (1990), Poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaigenes eutropus* H16, *J. Biol. Chem.* **264**, 15298-15303.
- Sistrom, W. R. (1962), The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *J. Gen. Microbiol.* **28**, 607-616.
- Lee I. H., Park J. Y., Kho D. H., Kim M. S., and J. K. Lee (2002), Reductive effect of H₂ uptake and poly-beta-hydroxybutyrate

- formation on nitrogenase-mediated H₂ accumulation of *Rhodobacter sphaeroides* according to light intensity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**(1-2), 147-153.
13. Puskas, A., E. P. Greenberg, S. Kaplan, and A. L. Schaefer (1977), A Quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol.* **179**, 7530-7537.
 14. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed. Cold spring Harbor laboratory, Cold spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 15. Jeffke, T., N. H. Gropp, C. Kaiser, and C. Grzesik (1999), Mutational Analysis of the *cbb* operon (CO₂ assimilation) promoter of *Ralstonia eutropha*, *J. Bacteriol.* **181**, 4374-4380.
 16. Lenz, O., E. Schwartz, J. Demedde, M. Eitingner, and B. Friedrich (1994), The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation, *J. Bacteriol.* **176**, 4385-4393.
 17. Eraso, J. M. and S. Kaplan (1994), *prrA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol.* **176**, 32-43.
 18. Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler (1983), A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria, *Bio/Technology* **1**, 37-45.
 19. Dryden, S. C. and S. Kaplan (1990), Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*, *Nucleic Acids Res.* **18**, 7267-7277.
 20. Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger (1998), Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene* **70**, 191-197.