

絶対嫌気性の光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* における 外来遺伝子発現系[§]

¹大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻

²現所属：名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻（物理系）

浅井 智広^{1,2*}、大岡 宏造¹

1. はじめに

緑色硫黄細菌は偏性嫌気性のグラム陰性細菌で、還元型の硫黄化合物を電子源とした非酸素発生の光合成によって生育する光独立栄養細菌である¹⁾。その光合成系は非常に単純であり、細胞内にチラコイド様の膜系はなく、光化学系I型の光合成反応中心（RC）とシトクロム bc 複合体から構成される電子伝達系が細胞膜内で駆動している^{2,3)}。その一方、他の多くの光合成生物とは異なり、「RCコアタンパク質がホモダイマー構造である」、「光合成細菌でありながら一次電子受容体がクロロフィル a である」、「既知のものでは最大の集光装置であるクロロソームをもつ」、「Calvin回路ではなく還元的TCA回路で炭素固定を行う」など数多くの興味深い特質をもつ²⁻⁵⁾。

緑色硫黄細菌の光合成系に関する研究は、紅色光合成細菌と同じくらい古い歴史をもつ。しかしながら光合成系が酸素で失活しやすく、利用できる解析手法には限界があるため、解明すべき問題が数多く残されたままである。ようやく近年になって、好熱性の緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* の全ゲノム情報と相同組換えによる形質転換系が確立され、遺伝子破壊株を使った分子生物学的な研究が報告されはじめた^{3,6,7)}。しかし緑色硫黄細菌は光合成でしか生育できないため、光合成反応に必要な遺伝子の機能解析はほとんど進んでいない。

私たちは緑色硫黄細菌のホモダイマーRCの構造と機能に注目して研究してきた。近年次々に立体構造が解かれたヘテロダイマーRCでは、電子伝達コファク

ターが軸対称な2本の電子移動経路を形成し、電子は片方の経路を排他的または優先的に移動する^{8,9)}。一方、ホモダイマーRCでは2本の電子移動経路は同等に機能すると考えられており、ホモダイマーからヘテロダイマーに進化する過程でRCは電子移動を非対称化させたと推測されている^{4,5)}。私たちは、ホモダイマーRCをモデルとして電子移動を非対称化した因子を探りたいと考えているが、ホモダイマーRCでは立体構造の決定はおろか電子伝達コファクターの同定すら完了していない。この状況を打破するためには、どうしても分子生物学的手法による解析が必要である。

そこで私たちは、光合成に必要な遺伝子进行操作する技術として異なる2つの遺伝子発現系を考案した。1つは「遺伝子の偽二倍体化」であり、RCコアタンパク質への部位特異的変異の導入、およびホモダイマー型RCの人工的なヘテロダイマー化を可能にした¹⁰⁾。もう1つは「広宿主域プラスミドの開発」であり、*Cba. tepidum* にプラスミドをもたせることで、より汎用的な遺伝子発現系の構築にも成功した。ここでは私たちが開発した手法を紹介し、緑色硫黄細菌の遺伝子発現系を使った研究の今後の展開を議論したい。

2. 遺伝子の偽二倍体化

先に述べたように、私たちは、緑色硫黄細菌のホモダイマーRCの構造と機能、分子進化に興味をもって研究している。*Cba. tepidum* で相同組換えによる形質転換系が確立されて以来、RCコアタンパク質（PscA）への部位特異的な変異導入を試みてきた。しかし、こ

[§] 第2回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: cazai@bio.phys.nagoya-u.ac.jp

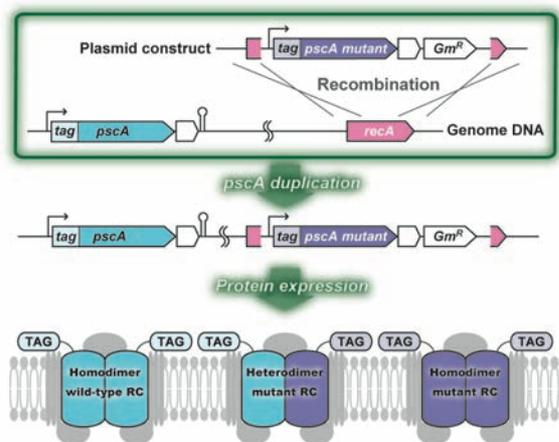


図1 RCコアタンパク質遺伝子 (*pscA*) の偽二倍体化の戦略。

あらかじめ相同組み換えで、本来の*pscA*遺伝子にタグを付加しておく。その後、それとは異なるタグを付加した変異*pscA*遺伝子を*recA*遺伝子のコード領域に挿入する。各々の*pscA*遺伝子によるホモダイマーRC以外に、ヘテロダイマーRCも発現可能である。本文中で述べた3つの戦略項目を検証するのに用いたのは*recA::(HisAB-aacC1)*株で、本来の*pscA*遺伝子にはタグを付加していないことに注意。

れまでに導入を試みた変異は全て致命的であり、私たちのグループを含め、RCコアタンパク質の変異体作製に成功したものはいない。

そこで任意の変異をRCに導入する方法として、私たちが最初に考案したのが、「RCコアタンパク質遺伝子 (*pscA*) の偽二倍体化」である(図1)。この方法では、野生型の*pscA*遺伝子を機能的なまま残し、*recA*遺伝子のコード領域に変異*pscA*遺伝子を挿入する。野生型RCの発現が変異株の生育を補償するので、任意の変異体RCの発現が可能になると考えた。この方法には以下の3つの戦略項目も同時に含まれている。①*recA*遺伝子の破壊により相同組換えを抑制し、偽二倍体化した遺伝子をゲノム上に安定に保持させること、②野生型遺伝子と変異遺伝子にそれぞれ異なるアフィニティ精製用タグ配列を付加し、変異体RCを特異的に精製すること、③野生型と変異型のコアタンパク質から成る、人工的なヘテロダイマーRCを発現することである。これらの項目の有効性について、N末端にHisタグを付加した*pscA*遺伝子を*recA*遺伝子領域に組み込んだ変異株、*recA::(HisAB-aacC1)*を作製することにより検証することにした(図2A)。

まず確認したのが偽二倍体化した遺伝子の安定的な

保持である。得られた*recA::(HisAB-aacC1)*株を継代培養したところ、偽二倍体化した2つの*pscA*遺伝子座の再編や配列の変化は全く生じなかった。また、*recA*遺伝子破壊による光合成系や生育自体への大きな影響は見られず、期待通り相同組換え能のみが著しく抑制されていた。

次に、Hisタグ付きRCコアタンパク質が発現されているかを調べた。変異株から調製した粗精製膜をn-octyl-β-D-glucosideで可溶化後、Ni²⁺固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを行ったところ、比較的高純度のRC標品を大量に得ることができた(図2B)。またこのRC標品は、電子伝達成分を全て保持しており、高い光電荷分離活性を有していた。

最後にヘテロダイマーRCの発現を確認した。先のアフィニティ精製で得られたHisタグRC標品は、Hisタ

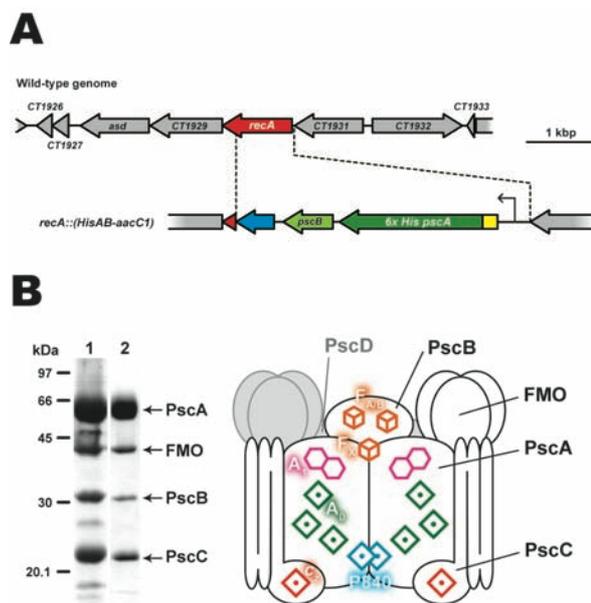


図2 (A) *recA::(HisAB-aacC1)*のゲノムの模式図。

N末端に 6x Hisタグを付加した*pscA*遺伝子と*pscB*遺伝子 (F_A/F_Bタンパク質) のクラスターを野生型*pscAB*遺伝子クラスターと同じプロモーターにつないで、野生株の*recA*遺伝子領域に相同組換えによって組み込んだ。青で示した遺伝子は選択マーカーとして使用したゲンタマイシン耐性遺伝子 (*aacC1*) 。

(B) *recA::(HisAB-aacC1)*から嫌氣的なアフィニティ精製で得られたHisタグRC標品のSDS-PAGE (左) とRC複合体モデル (右) 。

SDS-PAGEのレーン1はNi²⁺固定化カラムの溶出画分、レーン2はそれをゲルろ過 (Sephacryl S-200) にかけたもの。各種分光分析で検出された電子伝達コファクターは複合体モデルに色つきで示した。赤：ヘムc、青：バクテリオクロフィルa、緑：クロロフィルa、ピンク：メナキノン、オレンジ：4Fe-4Sクラスター。

グ付きのPscAからなるホモダイマーRCと、Hisタグ付きとタグなしのPscAからなるヘテロダイマーRCの混合物となるはずである(図1の下段を参照:ただし、*recA::(HisAB-aacC1)*株では本来の*pscA*遺伝子にはタグを付加していない)。従って、この標品中にタグなしのPscAが含まれることがわかれば、ヘテロダイマーRCが発現している証拠となると考えた。そこでHisタグRC標品をトリプシン分解し、液体クロマトグラフィー-タンデムマスペクトル分析(LC/MS/MS)でPscAのN末端ペプチドを探索したところ、Hisタグ付きのN末端ペプチドだけでなく、タグなしのN末端ペプチドも含まれていることがわかった(図3A)。このタグなしのN末端ペプチドの信号強度は、等モルの野生型RC複合体(タグなしのホモダイマーRC)を分析した場合の約10%に相当していた。これは、HisタグRC標品中に含まれる全PscAのうち約10%がタグなしであることを意味する。タグなしのPscAは全てヘテロダイマーRCに由来するはずなので、HisタグRC標品に含まれるRC複合体の約20%がヘテロダイマーRCであると見積もることができた(図3B)。

以上の検証により、「RCコアタンパク質遺伝子(*pscA*)の偽二倍体化」はホモダイマーRCを人工的にヘテロダイマーに作りかえる方法として有効であることがわかった。実際、発現量は少ないが変異を導入したヘテロダイマー反応中心の存在を確認しており、近いうちに報告したい(未発表データ)。私たちの考案したこの方法が、*Cba. tepidum*のRCを分子生物学的に解析する非常に有効な方法論として浸透していくことを期待している。この方法は*Cba. tepidum*のゲノム上に相同な配列をもつ遺伝子を組み込むことを前提としているが、結果的に*recA*遺伝子領域は相同組換えが抑制される以外はニュートラルサイトとして機能しており、基本的にどのような遺伝子でも発現させることができる。したがって同様の方法が、他の必須タンパク質や、コファクターが多くて他の生物種では発現させられないタンパク質の解析にも適用できると考えている。

3. 広宿主域プラスミドの開発

前項の遺伝子の偽二倍体化による発現系は、遺伝子発現系として十分に機能するものの、二重交差型の相同組換えによって発現DNAコンストラクトをゲノムに組み込むため、目的の変異株の単離までには手間と時

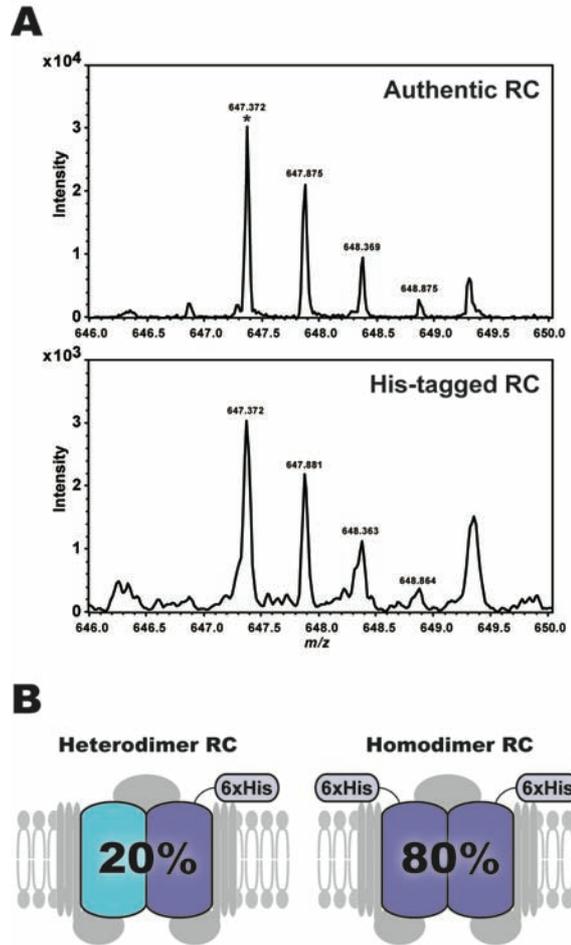


図3 (A) タグなしPscAのトリプシン消化断片のマスペクトル。

同じモル濃度の野生株から精製したタグなしのRC標品(上)と、*recA::(HisAB-aacC1)*から得られたHisタグRC標品(下)をLC/MS/MSで分析したときのマスペクトルを示している。*印はMS/MSによりタグなしPscAのN末端ペプチドであることを確認したピーク。HisタグRC標品で検出されたピークは、野生型RC標品の約1/10となっていることがわかる。

(B) LC/MS/MS分析から推定されたHisタグRC標品中に含まれるヘテロダイマーRCとホモダイマーRCの量比。

HisタグRC標品中の全PscAのうち約10%がタグなしであり、これは全てヘテロダイマーRCに由来するので、全体の約20%がヘテロダイマーRCである。

間を要する。また、組み込む遺伝子は基本的に1コピーとなるため、高発現は期待できない。さらに、必然的に*recA*遺伝子を破壊してしまうので、以後、相同組換えを利用したゲノムの改変はできなくなってしまう。これを解決するには、より広範な遺伝子を対象にした、汎用性の高い*Cba. tepidum*の遺伝子発現系の構築が必要である。

RK2やRP4 (IncPグループ)、RSF1010 (IncQグルー

プ) などの接合プラスミドは、細菌間の接合過程によって伝達されるので^{11,12)}、事実上、全てのグラム陰性細菌を宿主とすることができる(図4)。このような広宿主域プラスミドを用いた遺伝子発現系は、非光合成細菌はもちろん、紅色光合成細菌やシアノバクテリアの研究では一般的に使用されている^{11,13-16)}。緑色硫黄細菌でも接合プラスミドの導入が1995年に報告された¹⁷⁾。ところが報告された方法では誰も結果を再現することができず、緑色硫黄細菌にプラスミドを保持させるのは長い間不可能であると考えられてきた。しかし私たちが再現実験を行った際、自然変異体と思われる偽陽性のコロニーが多いことに気がついた。これまでに用いられてきた抗生物質では、プラスミドを保持したクローンの選択が不十分であったと考えられた。また報告されている抗生物質を使う限り、たとえプラスミドの導入に成功しても、その後の継代培養でプラスミドが安定には保持されないと推測された。

そこで適切な選択が可能な抗生物質を再検討し、エリスロマイシン (Em) や、ストレプトマイシンとスペクチノマイシンの混合物 (Sm/Sp) が有効であることがわかった。RSF1010由来プラスミドpDSK519¹⁸⁾に、これらの抗生物質の耐性遺伝子 (*ermC*、*aadA*) を組み込んだ新たな接合プラスミドpDSK5191、pDSK5192を作製して接合実験を行ったところ、再現よく *Cba. tepidum* にプラスミドを導入することに成功した(図5A)。また、薬剤を含む培地での継代培養では得られるプラスミドの収量や配列に変化は見られず、導入したプラスミドは非常に安定に保持されることが確認できた(図5B)。

次に、任意の遺伝子を発現させるためのプラスミドの構築に着手した。私たちのグループは、過去の研究

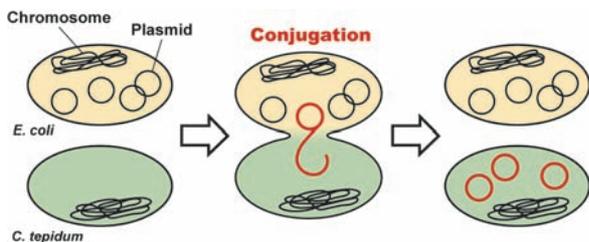


図4 接合によるプラスミド伝達の模式図。

プラスミドの伝達には、供与菌(図では *E. coli*) と受容菌(図では *C. tepidum*) の物理的な接触と、プラスミドの複製過程が必要である。また、導入されたプラスミドが受容菌に保持されるためには、細胞分裂の際に安定に複製され、娘細胞に均等に分配されなければならない。

A

Plasmid	Antibiotics		Conjugation frequency
-	Em	1 µg/ml	< 10 ⁻¹⁰
pDSK5191	Em	1 µg/ml	1.6 ± 0.8 × 10 ⁻⁶
-	Sm/Sp	100/50 µg/ml	< 10 ⁻¹⁰
pDSK5192	Sm/Sp	100/50 µg/ml	1.2 ± 0.5 × 10 ⁻⁶

B

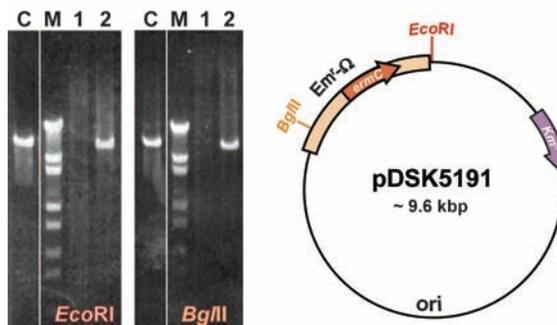


図5 (A) 大腸菌S17-1と *Cba. tepidum* 野生株との接合実験。接合プラスミドpDSK5191はエリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子、pDSK5192はストレプトマイシン (Sm) とスペクチノマイシン (Sp) の二重耐性遺伝子をもつ。どちらを使った場合も、プラスミドなしの場合と比較して有意に *Cba. tepidum* 形質転換体の出現頻度が増える。

(B) pDSK5191を導入した *Cba. tepidum* 形質転換体から抽出したプラスミドのアガロース電気泳動像(左)とpDSK5191の遺伝子地図。

C: 導入前のpDSK5191、M: λStyI digests (分子量マーカー)、1: 野生株から抽出したプラスミド、2: 形質転換体から抽出したプラスミド。

で、野生型 *Cba. tepidum* とは生長速度が異なる変異株、Δ*cycA*株とΔ*soxB*株を作成している^{19,20)}。Δ*cycA*株は、ペリプラズムの可溶性シトクロム*c-554*をコードする遺伝子を欠失しており、培養後期の生長速度が野生株より顕著に遅くなる。Δ*soxB*株は、チオ硫酸の酸化に必要な遺伝子群の1つ*soxB*遺伝子を欠失しており、こちらは培養後期から全く生長しなくなる。これらの変異株の表現型の相補を指標にして、各々の変異株の欠損した遺伝子を発現するプラスミドの作製を試みた。その結果、*pscA*遺伝子のの上流領域を構成プロモーターとして使用することで、変異株の表現型を、コントロールプラスミドを導入した野生株と同等にまで回復させられることがわかった(図6)。

作製した発現プラスミドを用いてHisタグを付加した*pscA*遺伝子の発現についても調べたところ、アフィ

ニティ精製によって形質転換体からHisタグ付きのRC複合体を特異的に得ることもできた。その収量は、ゲノムから発現させた場合に比べて、3~5倍程度高かった。この発現量の上昇は、細胞内でのプラスミドのコピー数（他の細菌種では5~10コピー程度と見積もられている）とゲノムのコピー数（*Cba. tepidum* では数コピー存在すると考えられている）の相対量比を反映していると推測される。私たちが開発した新たな接合プラスミドpDSK5191、pDSK5192による遺伝子発現は、*Cba. tepidum* での興味ある遺伝子の過剰発現やタンパク質の大量生産に有効であると考えている。

一般に広宿主域プラスミドを用いた発現系は、プラスミド導入株を維持するために培地に適切な薬剤を添加する必要があり、大量培養や生理学的な実験にはやや不向きな面もある。しかし複数コピーのゲノムをもつ生物種の場合、ゲノムの相同組換えを利用した形質転換法では、形質転換体が得られても変異ゲノムが完全に分離するまでコロニーの純化を繰り返す必要がある。作業時間を考えると、DNAコンストラクトの導入から変異株の樹立までに、少なくとも1ヶ月はかかり、場合によっては最後まで純化できないこともある。それに対して接合による発現プラスミドの導入は原理的にコロニー純化を必要としない上、緑色硫黄細菌の光独立栄養性を利用して、対抗選択（プラスミド供与菌である大腸菌を殺す選択）を薬剤による形質転換体の選択と同時に行える。そのため、接合からクローンの樹立まで1週間程度で完了することができる。広宿主域プラスミドを用いた方法は、現状ではもっとも簡便かつ迅速な *Cba. tepidum* の遺伝子発現系であると言えるだろう。

4. 今後の研究展開

遺伝子発現系が構築できたことで、緑色硫黄細菌の分子生物学的な研究を行うための最低限必要なツールは整備された。これにより、これまで不可能と考えられていたような研究が可能になることを期待している。

第一に、実験進化学的な研究である。冒頭でも触れたように、緑色硫黄細菌の光合成系の特徴は、進化のごく初期の光エネルギー変換機構を持つと考えられている点にある^{4,5)}。それゆえエネルギー代謝系の進化を考察するためのよいモデルとなりうる。例えば、「2. 遺伝子の偽二倍体化」で述べたホモダイマーRCの人

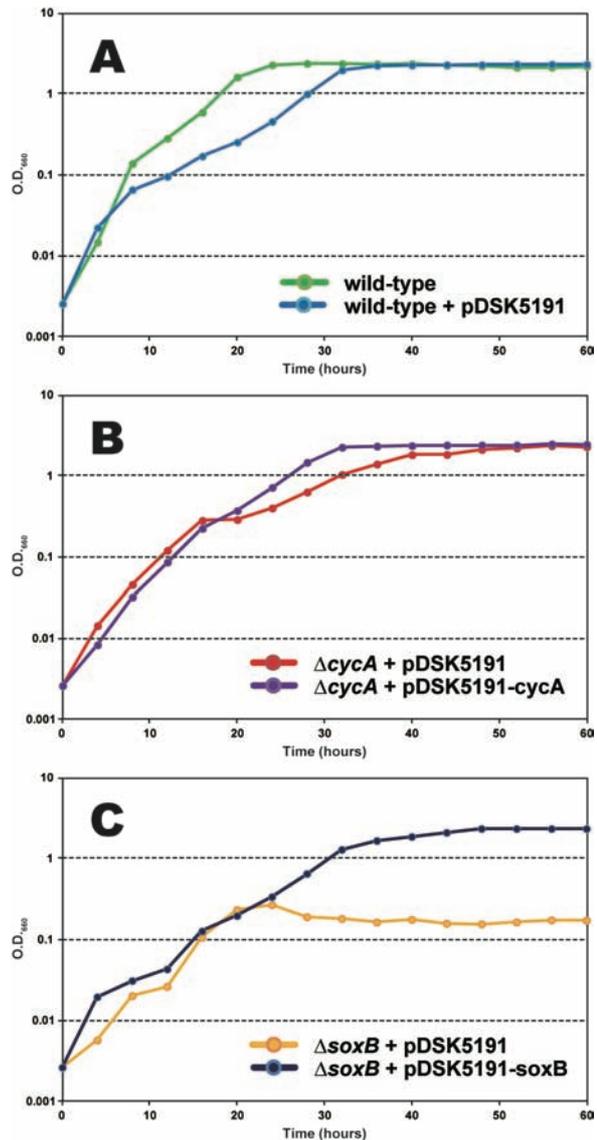


図6 *Cba. tepidum* 変異株の発現プラスミドによる表現型相補。

(A) 野生株とpDSK5191導入株のバッチ培養での生長曲線。*Cba. tepidum* は硫化物が存在するときは排他的に硫化物を電子源として使用する。培養初期(0~15時間)の生長曲線のふくらみは、硫化物酸化時に細胞外に放出される単体硫黄によるもの。pDSK5191導入株の生長が遅いのは培地にエリスロマイシンが含まれているためである。

(B) $\Delta cycA$ のpDSK5191導入株とpDSK5191-cycA相補株の生長曲線。*cycA*遺伝子の発現により、pDSK5191導入株に見られる培養後期の生長速度の遅れが、野生株のpDSK5191導入株(A、青線)と同等まで回復している。

(C) $\Delta soxB$ のpDSK5191導入株とpDSK5191-soxB相補株の生長曲線。*soxB*遺伝子の発現により、pDSK5191導入株の培養後期での生長が、野生株のpDSK5191導入株(A、青線)と同等まで回復している。

工的ヘテロダイマー化である。今日の光化学系I、IIをはじめとするヘテロダイマーRCの構造・機能上の相関や、その成立過程を解明できるのではないかと考え

ている。他にも、緑色硫黄細菌に光化学系II型のRCを発現させて、光化学系I、IIが成立した初期段階を再現することを計画している。また、緑色硫黄細菌はバクテリオクロフィルaとクロロフィルaの両方をもつので、生合成系の改変や他の生物種由来のクロロフィル結合タンパク質の発現などにより、複雑な色素系が出来上がってきた過程を考察することも可能かも知れない。

第二に、これまで精製や解析が困難とされてきたタンパク質の研究である。緑色硫黄細菌にはゲノム情報から存在が推測されているものの、タンパク質レベルでの存在や生化学的な活性、生理的な機能が調べられていない遺伝子が未だに数多く存在する^{3,6)}。例えば、シトクロムbc複合体やNADH脱水素酵素のホモログ、末端酸化酵素であるシトクロムbd複合体などで、ゲノム情報からはサブユニット構成やアミノ酸配列などに特徴が見られる。これらは発現量が少なく、酸素に対して非常に不安定であることが生化学的解析の障害となっているが、遺伝子発現系が整備されたことで過剰発現やアフィニティタグの付加による精製の簡便化を図る試みが可能である。また *Cba. tepidum* は生長が速く、培養も比較的容易なため、ヒドロゲナーゼやニトロゲナーゼなど、嫌気性タンパク質生産のための発現ホストとして利用することもできるだろう。

今後は、これら分子生物学的ツールを駆使した研究を精力的に進め、未だ謎の多い緑色硫黄細菌の光合成系を解明していきたいと考えている。

Received November 22, 2011, Accepted November 25, 2011,
Published December 31, 2011

参考文献

1. Imhoff, J.F. and V. Thiel, (2010) Phylogeny and taxonomy of Chlorobiaceae, *Photosynth. Res.* 104, 123-136.
2. Hauska, G., T. Schoedl, H. Remigy, and G. Tsiotis, (2001) The reaction center of green sulfur bacteria(1), *Biochim. Biophys. Acta.* 1507, 260-277.
3. Frigaard, N.U., A.G. Chew, H. Li, J.A. Maresca, and D.A. Bryant, (2003) *Chlorobium tepidum*: insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence, *Photosynth. Res.* 78, 93-117.
4. Olson, J.M. and R.E. Blankenship, (2004) Thinking about the evolution of photosynthesis, *Photosynth. Res.* 80, 373-386.
5. Hohmann-Marriott, M.F. and R.E. Blankenship, (2011) Evolution of photosynthesis, *Annu. Rev. Plant. Biol.* 62, 515-548.
6. Eisen, J.A., K.E. Nelson, I.T. Paulsen, J.F. Heidelberg, M. Wu, R.J. Dodson, R. Deboy, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.H. Haft, E.K. Hickey, J.D. Peterson, A.S. Durkin, J.L. Kolonay, F. Yang, I. Holt, L.A. Umayam, T. Mason, M. Brenner, T.P. Shea, D. Parksey, W.C. Nierman, T.V. Feldblyum, C.L. Hansen, M.B. Craven, D. Radune, J. Vamathevan, H. Khouri, O. White, T.M. Gruber, K.A. Ketchum, J.C. Venter, H. Tettelin, D.A. Bryant, and C.M. Fraser, (2002) The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9509-9514.
7. Frigaard, N.U. and D.A. Bryant, (2001) Chromosomal gene inactivation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* by natural transformation, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2538-2544.
8. Santabarbara, S., L. Galuppini, and A.P. Casazza, (2010) Bidirectional electron transfer in the reaction centre of photosystem I, *J. Integr. Plant Biol.* 52, 735-749.
9. Heathcote, P., P.K. Fyfe, and M.R. Jones, (2002) Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power, *Trends Biochem. Sci.* 27, 79-87.
10. Azai, C., K. Kim, T. Kondo, J. Harada, S. Itoh, and H. Oh-oka, (2011) A heterogeneous tag-attachment to the homodimeric type 1 photosynthetic reaction center core protein in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1807, 803-812.
11. Rawlings, D.E. and E. Tietze, (2001) Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 481-496.
12. Zatyka, M. and C.M. Thomas, (1998) Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements, *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 291-319.
13. Gomelsky, M. and S. Kaplan, (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, *J. Bacteriol.* 179, 128-134.
14. Kim, E.J., J.S. Kim, H.J. Rhee, and J.K. Lee, (2009) Growth arrest of *Synechocystis* sp. PCC6803 by superoxide generated from heterologously expressed *Rhodobacter sphaeroides* chlorophyllide a reductase, *FEBS Lett.* 583, 219-223.
15. Koksharova, O.A. and C.P. Wolk, (2002) Genetic tools for cyanobacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 123-137.
16. Nomata, J., L.R. Swem, C.E. Bauer, and Y. Fujita, (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1708, 229-237.
17. Wahlund, T.M. and M.T. Madigan, (1995) Genetic

- transfer by conjugation in the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*, *J. Bacteriol.* 177, 2583-2588.
18. Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger, (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*. 70, 191-197.
19. Azai, C., Y. Tsukatani, J. Harada, and H. Oh-oka, (2009) Sulfur oxidation in mutants of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* devoid of cytochrome c-554 and SoxB, *Photosynth. Res.* 100, 57-65.
20. Tsukatani, Y., R. Miyamoto, S. Itoh, and H. Oh-oka, (2006) Soluble cytochrome c-554, CycA, is not essential for photosynthetic electron transfer in *Chlorobium tepidum*, *FEBS Lett.* 580, 2191-2194.

Expression Systems of Exogenous Gene
in the Obligatory Anaerobic Photosynthetic Bacterium *Chlorobaculum tepidum*

Chihiro Azai^{1,2,*}, Hirozo Oh-oka¹

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University

²Present affiliation: Division of Material Science (Physics), Graduate School of Science, Nagoya University