

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成11年度博士課程進学
氏名 鈴木 美帆
指導教官 五十嵐 泰夫

論文題目

絶対独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の
硝酸呼吸に関する研究

Hydrogenobacter thermophilus TK-6株は生育至適温度 70°Cの絶対独立栄養性水素細菌であり、分子状水素あるいはチオ硫酸をエネルギー源として利用し、還元的 TCA サイクルによって炭酸固定を行っている。そして、16S rDNA 塩基配列による解析から、系統分類学的に最も初期に分岐した真正細菌であることが知られている。また、本菌と近縁にある真正細菌 *Aquifex pyrophilus* は硝酸呼吸によって生育が可能であることが報告されている。TK-6株が利用可能な呼吸の最終電子受容体としてこれまでに分子状酸素だけが知られていたが、以上のことから本菌が硝酸呼吸能を有するのではないかということに着目した。

本研究では、このような興味深い系統分類学的位置付けにある TK-6株を対象とし、微生物における呼吸代謝の進化に関する知見を得ることを目的とした。まず本菌が硝酸呼吸を行うかどうかを明らかにし、さらにその特徴を生化学的に解明するために、異化型硝酸呼吸の鍵酵素である亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase; NIR) と一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase; NOR) がどのような性質を持つのかについて解析を行った。

1. 硝酸呼吸能の実証と生育特性

本菌が分子状水素をエネルギー源とし、嫌気条件下で硝酸を最終電子受容体として利用

するか否かを調べた結果、生育が認められたうえ、中間体である亜硝酸が培養液中に検出され、硝酸呼吸能を有していることが明らかとなった。続いて、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ を用いた培養により得られた気相のGC-MSによるガス分析を行い、どのような経路で硝酸呼吸を行うかを調べた。その結果、 ^{15}NO 、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 、 $^{15}\text{N}_2$ が検出され、本菌が N_2 生成型硝酸呼吸（脱窒）を行うことが示された。

次にジャーファーマンターを用いて、培養経過の解析を行った。菌の増殖とともに NIR 活性をモニタリングした結果、培養液中の硝酸が消費されるにしたがい NIR 活性が減少していくことが示された。また、Feの量を通常の無機培地の5倍含む培地を用いて培養を行った場合に、培養液中に亜硝酸がほとんど検出されないという特徴が見られた。微生物の NIR は cytochrome cd_1 型と Cu 型とに分類されることが知られているが、本菌がどちらの NIR を持つのかを調べるため、硝酸呼吸により生育した菌体の粗酵素液に対し、cytochrome cd_1 型 NIR を持つ *Pseudomonas aeruginosa* および Cu 型 NIR を持つ *Alcaligenes faecalis* S6 の NIR 抗体を用いて Western blotting を行った。その結果、前者とだけに結合が観察され、発色強度も NIR 活性に対応していた。さらに、同粗酵素液を用いヘム染色を行い、Western blotting と同様の発色を呈することを確認した。以上の結果により、本菌の NIR は cytochrome cd_1 型であることが示された。

2. NIR の精製およびその遺伝子の解析

本菌の NIR の特徴を明らかにするために、硝酸により培養した菌体からその完全精製を行った。cell-free extract を調製し、硫安分画を行ったところ、50-70%飽和硫安画分において高い比活性が検出された。この画分を疎水性カラム（Phenyl Sepharose および Resource PHE）、陽イオン交換カラム（MonoS）に通すことにより SDS-PAGE 上で単一のバンドとなり、精製酵素が得られた。これを用い、ゲル濾過カラムにより分子量の測定を行った。その結果、native enzyme の分子量は 75kDa と決定された。これは、これまでに知られているホモダイマーのサブユニット構造を持つ NIR の分子量と比較して非常に小さい数値であった。一方、SDS-PAGE により決定したモノマーの分子量は 61.5 kDa であることを考えあわせると、本酵素がゲル濾過において実際よりも低分子域に溶出されるような構造を取っていることが考えられた。

次に、NIR 遺伝子 (*nirS*) の解析を行うために、プローブ作製に必要な N 末端アミノ酸配列の決定を試みたが、この部分が修飾されており配列は得られなかった。そこで、加水分

解して内部配列の決定を行ったところ、*Pseudomonas stutzeri* の NIR との間に相同性を持つペプチドの配列が得られた。この配列と *nirS* 保存領域の配列を基としてプローブを作製した。このプローブを用いて PCR 断片を取得し、さらに primer walking により *nirS* と周辺領域の塩基配列を決定した。その結果、*nirS* のプロモーター領域には -10 および -35 配列が存在した。*nirS* は通常 DNR タイプか σ^{54} 依存型の NorR タイプの NO 応答転写調節因子によって制御されているが、本菌の *nirS* にはこれらのタイプに見られるプロモーター配列が存在しなかったことから、既知のものとは異なる調節機構が働いていると考えられた。また、ホモロジー解析により、*nirS* 上流には未知の遺伝子が、下流には *nirN* が存在することがわかった。

3. NOR 遺伝子のクローニング

norCB 保存領域の配列を基にプローブを作製し、本菌の *norCB* のクローニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションにより、4.5 kb の *SacI* 断片と 5.2 kb の *SacI*-*BamHI* 断片が取得され、この二つの断片により *norCB* とその近傍の塩基配列を決定した。*norC* の上流には未知の遺伝子が、*norB* の下流には *orf85*, *orf91*, *def*, *orf95*, *lysR2* が存在したが、周辺には NOR の活性化に必要とされる *norQ* や *norD* 等の遺伝子が存在せず、他の脱窒菌とは異なる構造を持っていた。また、*nirS* と同様に *norCB* のプロモーター領域にも -10 および -35 配列が存在しており、*norCB* においても本菌の調節機構が DNR タイプや NorR タイプとは異なるものであることが示唆された。さらに、決定された配列から NorCB のハイドロパシープロットを作成したところ、他の菌では NorC は1回膜貫通型であるのに対し、本菌のものは2回膜貫通構造であることが示された。これに対し、NorB は12回膜貫通構造を持つことが示され、他の菌の NorB の構造と一致していた。NorC および NorB の配列から近隣結合法により系統樹を作成し、他菌種由来のものと比較したところ、どちらのサブユニットも *Methylococcus capsulatus* と最も近い位置にあることがわかった。

4. NIR・NORの発現

H. thermophilus の chromosomal DNA をテンプレートとして、決定された *nirS* および *norCB* の配列を用いて PCR により両遺伝子を増幅し、これらを広宿主域発現プラスミド pMMB67HE (*nirS*) あるいは pMMB67EH (*norCB*) に連結して発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドを用いて、脱窒菌である *P. aeruginosa* を宿主として発現を試み

た。菌株には RM488 (−*nirS* 株)、RM495 (−*norCBD* 株)、PAO1 (wild type) を用いた。50mM NaNO₃、1mM IPTG を含む培地を用い、好氣的に振盪培養を行ったところ、TK-6 株の *nirS* を導入した RM488 (RM488+HT*nirS*) は生育が観察されたが、PAO1 と比較して菌の増殖が抑制されていた。一方、同条件での培養で *norCB* を導入した RM495 (RM495+HT*norCB*) は生育がかなり悪くなっていた。これは、宿主の NIR, NOR との間に構造的な相違があるため、宿主の生育に阻害的な影響を及ぼしていることが考えられた。また、どちらの形質転換体でも脱窒による嫌氣的生育は相補できなかった。続いて、粗酵素液に対しヘム染色を行ったところ、RM488+HT*nirS* はバンドが出たが、RM495+HT*norCB* は出なかった。RM488+HT*nirS* については Western blotting も行い、バンドの出現を確認した。さらに、活性測定を行い、RM488+HT*nirS* の粗酵素液が活性を持つことが示された。以上の結果から、TK-6 株の NIR は *P. aeruginosa* の細胞内で機能的に発現していることが示されたが、ヘム染色で確認した酵素量よりも活性が低いことから、heme d₁ の供給が律速になっていると考えられた。また、RM495+HT*norCB* の粗酵素液に NO 還元活性は認められなかったため、NOR は機能的に発現していないと考えられた。

まとめ

本研究では *H. thermophilus* TK-6 株が硝酸呼吸 (脱窒) により嫌氣的に生育し、cytochrome *cd*₁ 型の NIR と cytochrome *bc* 型の NOR を持つことを示し、両酵素の構造遺伝子 *nirS*, *norCB* の解析を行った。プロモーター領域の解析から、本菌の *nirS* と *norCB* の発現は、他の脱窒菌で報告されている DNR や NorR タイプの NO 応答転写調節因子と異なる機構で発現制御されていることが示唆された。また、NorC が 2 回膜貫通のヒドロパシーを示すなど、他の脱窒菌由来の酵素とは異なる特徴を持っていた。さらに、*P. aeruginosa* の *nirS*, *norCB* 欠損株を用いた相補実験では、活性型の NIR は発現するが、NOR は機能的に発現しなかった。TK-6 株由来の *nirS* と *norCB* は *P. aeruginosa* の欠損株の嫌氣的生育を相補せず、むしろ好氣条件での生育を阻害した。この結果からも TK-6 株由来の NIR と NOR の特異性が示された。今後、本菌の脱窒遺伝子の発現調節機構や脱窒酵素の特徴をさらに解析することで、硝酸呼吸の進化的起源に関する知見が得られることが期待される。