

機関番号：13801

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510007

研究課題名 (和文) 海洋性硝化細菌による温室効果ガス N₂O の生成メカニズムの解明研究課題名 (英文) Studies on the biochemical mechanism of N₂O generation by marine nitrifying bacterium

研究代表者

藤原 健智 (FUJIWARA TAKETOMO)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：80209121

研究成果の概要 (和文)：

海洋性アンモニア酸化細菌 NS58 からヒドロキシルアミン酸化酵素 (HAO) を精製し、本酵素の副反応によって温室効果ガスである亜酸化窒素 (N₂O) が生成することを *in vitro* 実験で明らかにした。また、HAO 反応によって生成する N₂O が、特有の同位体的性質を持つことを確認した。さらに、もうひとつの N₂O 生成経路である硝化的脱窒に関与する亜硝酸塩還元酵素の分子のおよび酵素的性質を、組換え体を用いて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Hydroxylamine oxidoreductase (HAO) was purified from marine ammonia-oxidizing bacterium (AOB) strain NS58. Generation of N₂O as a by-product of HAO reaction was evidenced by *in vitro* experiment using the purified enzyme. Unique isotopic property of the N₂O generated by HAO reaction was also revealed. Molecular and enzymatic features of nitrite reductase, that was involved in the nitrifier denitrification pathway (another N₂O generation mechanism in AOB), was investigated using the recombinant enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：地球温暖化、亜酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 (N₂O) ガスは微量大気成分 (310ppbv) の一つであるが、CO₂ の 150 倍もの温室効果を持ち、地球温暖化現象への寄与は大きい。大気中に放出される N₂O ガスの 23 は海洋からのものであり、その総量は年間 4TgN にのぼるとされている。

N₂O は、微生物による異化的窒素代謝 (脱窒や硝化作用) の副産物として生成する。海洋から放出される N₂O は、脱窒菌ではなく、主としてアンモニア酸化細菌 (ammonia-oxidizing bacteria: AOB) によって生成されると考えられている。Nitrosomonas や Nitrospira など、β-

ロテオバクテリアに属する AOB が土壌、陸水、海洋に広く分布するのに対して、γ-プロテオバクテリアである Nitrosococcus 属 AOB は海洋環境のみに生息する。Nitrosococcus 属 AOB の海洋における存在量は 10³~10⁴ cells/ml と推定され、β-AOB とは同等程度とされる。従って、海洋からの N₂O ガス放出過程を定量的に理解するためには、Nitrosococcus 属 AOB による N₂O 生成のメカニズムを明らかにすることが重要となる。

2. 研究の目的

当研究室で純粋分離された NS58 は、*N. oceanus*

ATCC19707 に極めて近縁な海洋性 γ -AOB である。この NS58 を用い、海洋環境からの N_2O 発生の生物学的メカニズムを分子レベルで解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

人工海水をベースとする無機培養液を用いて、NS58 を大スケールで培養した。培養菌体から、HAO、およびその生理的電子供与体であるシトクロム *c554* を精製しその分子的性質を分析した。また培養菌体および精製 HAO を用いた *in vivo*, *in vitro* N_2O 生成実験を行った。生成した N_2O の定量と、 ^{15}N , ^{18}O 同位体比の測定を行った。さらに、亜硝酸還元酵素 NirK の遺伝子をクローニングし、発現させた組換え体を用いて酵素的・分子的性質を分析した。

4. 研究成果

(1) 培養した NS58 菌体から、HAO を精製した。精製 HAO は、分子量 62,000 のサブユニットから成るホモ三量体構造を持ち、複数のヘム *c* と、修飾ヘムである P468 を補欠分子族として含む大分子量の水溶性タンパク質であった。分子的性質とともに、その酵素的性質についても、表 1 に示すように、*N. europaea* 酵素と顕著な差異は観察されなかった。しかし、*N. europaea* 酵素がヒドロキシルアミン (NH_2OH) 酸化活性とともに、ヒドラジン (NH_2NH_2) を窒素ガス (N_2) に還元する HZO 活性を示すのに対して、NS58 酵素は NH_2NH_2 とは全く反応しない点で特徴的であった。

表 1. NS58, *N. europaea* HAO の酵素活性の比較

Electron acceptor	NS58 HAO		<i>N. europaea</i> HAO	
	K_m (μM)	MA (sec^{-1})	K_m (μM)	MA (sec^{-1})
$K_3[Fe(CN)_6]$	0.9	111	-	1533b
Mito. cyt. <i>c</i>	1.5, 1.1 ^a	45.2, 40 ^a	3.6 ^a	86 ^a , 35 ^c
<i>N. europaea</i> cyt. <i>c554</i>	0.9	1.5	-	3.9 ^c
NS58 cyt. <i>c554</i>	1.1	3.4	-	-

この酵素的特徴、および(3)で述べる N_2O 合成活性は、結晶構造解析によって NS58 の HAO の分子構造を明らかにし、*N. europaea* 酵素の構造と比較することで、分子レベルで理解することが可能であろう。すでに本酵素の結晶化に成功し、X 線構造解析を進めている。

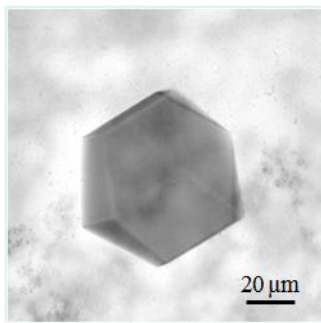


図 2. NS58 HAO 結晶

(2) HAO の生理的電子供与体であるシトクロム *c554* についても、NS58 から精製し、分子的性質および HAO との反応について分析した。両タンパク質ともペリプラズム局在と考えられ、海洋性の細菌である NS58 では、両者の反応共塩耐性である必要があるが、実際、海水濃度に相当する 0.6 M の NaCl 溶液中で十分な反応速度が観察された。この現象を、NS58 シトクロム *c554* 分子の表面電荷に基づいて考察した。

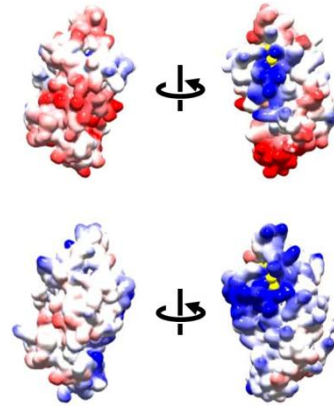


図 2. NS58 シトクロム *c554* (上) と *N. europaea* シトクロム *c554* (下) の分子表面電荷の比較。青：負電荷、赤：正電荷

(3) NS58 から精製された HAO を用い、 NH_2OH 酸化反応に伴って *in vitro* で生成する N_2O を定量した。すると、基質である NH_2OH に対する電子供与体の量比が低い場合に、本来の生成物である亜硝酸塩の代わりに N_2O が生成することが明らかになった (図 3)。この結果は、酸素供給の不足、あるいはアンモニウム塩の供給過多の条件下で、AOB が N_2O を生成することを示唆する。この予想は、*in vivo* 実験で実際に確かめられ、NS58 菌体を微好気～嫌気条件でインキュベートした場合の N_2O : NO_2^- 生成比は、好気条件での値より高かった。

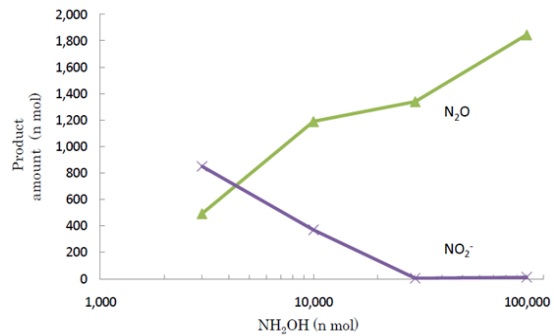


図 3. 精製 NS58 HAO を用いた *in vitro* N_2O 生成。電子供与体として 10,000 nmol のフェリシアン化物、3,000 ~ 100,000 nmol の NH_2OH を含む反応液中で HAO 反応を行い、生成する亜硝酸塩 (紫) と N_2O (黄緑) を定量。

また、精製 HAO によって *in vitro* 生成した N_2O の同位体的性質についての分析を行った。 N_2O は $[O-N\alpha-N\beta]$ 構造を持つ非対称な分子であり、また窒素の安定同位体として ^{14}N と ^{15}N 、酸素の安定同位体として ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O が存在するため、総計で 12 種類もの同位体分子種 (isotopomer) が存在する。ここで、 N_α と N_β における同位体比の差として定義される Site Preference ($SP = \delta^{15}N_\alpha$

$-\delta^{15}\text{N}\beta$) は、 N_2O の放出・消費過程を追跡するための有効な指標となると考えられている。すなわち、比較的嫌氣的で脱窒作用が盛んな環境から放出される N_2O の SP 値は低い値をとるのに対し、硝化作用が卓越する好氣的環境から発生する N_2O の SP は高い値を示す。これは、脱窒による N_2O 生成は酸化窒素還元 (NO) 酵素によって触媒されるが、硝化菌からの N_2O はその大きな部分が HAO 由来であり、それぞれ異なる反応メカニズムが、生成物である N_2O の同位体的性質に反映された結果とされている。

NS58 から精製された HAO によって *in vitro* 生成した N_2O の SP 値は、 $+38.1 \pm 1.1\%$ ($n=6$) と測定された (図 4)。また *N. europaea* 酵素を用いた場合には $+38.1 \pm 1.1\%$ ($n=6$)、脱窒菌から精製した NO 還元酵素を用いた場合には $-58 \pm 1.8\%$ ($n=4$) であった。これらの結果は、純粋に精製した酵素を用いた *in vitro* 実験で、 N_2O の SP 値を測定した初めての例であろう。この測定によって、同位体的性質に基づく N_2O の環境動態を分析するための基盤となるデータを提供することができた。

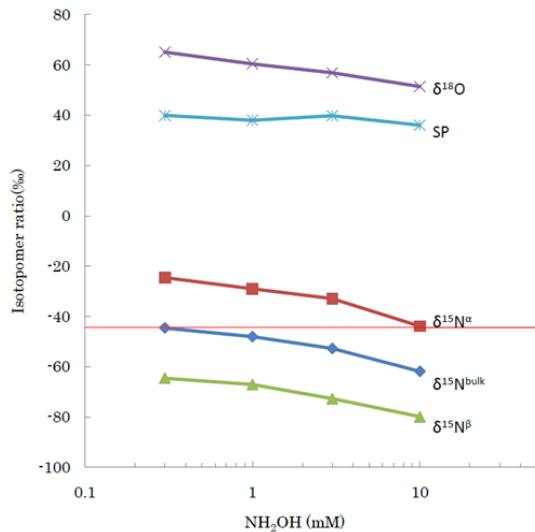


図4. NS58 HAO によって生成した N_2O の同位体的性質。

(4) AOB には、HAO 反応によって生じた有毒な亜硝酸塩を細胞内から効率的に除去するための「硝化的脱窒」と呼ばれる経路が存在する。硝化的脱窒には亜硝酸塩還元酵素 NirK と、NO 還元酵素 NarX/NarG の 2 種類の酵素が関与するが、いずれも脱窒酵素と相同である。我々は NS58 による硝化的脱窒のメカニズムを明らかにするため、NirK の精製と分析を試みた。培養菌液中の亜硝酸塩還元酵素は検出限界以下だったので、NirK の遺伝子をクローニングし、発現系を構築した。得られた細胞は高い亜硝酸塩還元活性 ($4.8 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$) を示し、また亜硝酸塩に対する親和定数は $52 \mu\text{M}$ であった。この結果は、NirK が細胞中の亜硝酸塩濃度を低く保つために十分な能力を持つことを示す。また *N. europaea* の NirK が青色銅タンパク質であるのに対して、NS58 の酵素が緑色を呈すること、また両者は分子系統的にかなり離れていること (NS58 NirK : class 1, *N. europaea* NirK : class 2) などが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に以下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Motrescu I, Ogino A, Tanaka S, Fujiwara T, *et al.* (2011) Mechanism of peptide modification by low-temperature microwave plasma. *Soft Matter* accepted. (査読有)
- ② Hozuki T, Ohtsuka T, Arai K, Yoshimatsu K, Tanaka S, and Fujiwara T. (2010) Effect of salinity on hydroxylamine oxidation in marine ammonia-oxidizing γ -proteobacterium, *Nitrosococcus oceanii*: molecular and catalytic properties of tetraheme cytochrome *c*-554. *Microbe. Environ.* 25:95-102. (査読有)
- ③ Motrescu I, Ogino A, Tanaka S, Fujiwara T, *et al.* (2010) Modification of peptide by surface wave plasma processing. *Thin Solid Films* 518:3585-3589. (査読有)
- ④ Motrescu I, Hara T, Ogino A, Tanaka S, Fujiwara T, *et al.* (2009) Investigation of low temperature plasma capabilities to modify the structure and function of bio-polymers. *J Automation, Mobile Robotics and Intelligent Systems* 3:150-152. (査読有)
- ⑤ Aino K, Hirota K, Matsuno T, Naoki Morita N, Nodasaka Y, Fujiwara T, *et al.* (2008) *Bacillus polygonumii* sp. nov., moderate halophilic non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo ball. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(1):120-124. (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 保月勇志, 山崎哲明, 吉松勝彦, 吉田尚弘, 藤原健智 「ヒドロキシルアミン酸化酵素による亜硝酸塩生成の分子機構」第83回日本生化学会大会 (2010年12月7-10日, 神戸)
- ② 吉松勝彦, 藤原健智 「脱窒性アーキアの硝化還元酵素・ハイブリッド複合体の構造と機能」第37回生体分子科学討論会 (2010年6月18,19日, 山口)
- ③ Hozuki *et al.* 'Molecular and functional analysis of cytochrome *c*-554 from marine ammonia-oxidizing γ -proteobacteria' 第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日, 神戸)
- ④ 志波宏峻, 吉松勝彦, 藤原健智 「好塩性アーキアの脱窒を制御する DNA 結合タンパク質 NarR について」第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日, 神戸)
- ⑤ 田中達, 吉松勝彦, 藤原健智 「好塩性アーキアの新規なヘムタンパク質 PstA の構造と機能」第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日, 神戸)
- ⑥ 吉松勝彦, 藤原健智 「好塩性アーキアの硝化還元酵素・ハイブリッド複合体の精製と生化学的性質」第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日, 神戸)
- ⑦ Arai, K., Y. Katsuhiko, and T. Fujiwara. 'Ammonia monooxygenase activity of marine gamma-proteobacterium NS58 isolated from anoxic coastal sediment' The 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (16-21 Nov. 2008, Shizuoka)

[図書] (計3件)

- ① Yoshimatsu K, and Fujiwara T. (2009) Nitrogen cycle in

the extremely halophilic environment: biochemistry of haloarchaeal denitrification. Seikagaku 81(12): 1087-1093.
Review in Japanese.

- ② Fujiwara T. (2009) Development of halophilic protein expression system capable of creating a productive enzyme. Noda Inst. Sci. Res. Grant Rep. 53:34-36.
- ③ 藤原健智 (共著) 酵素ハンドブック第3版 (朝倉書店, 2008年5月)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~sbtfuji/TF-Lab-J.html>

(研究室ホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原健智 (FUJIWARA TAKETOMO)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：80209121