

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658026

研究課題名（和文）窒素輸送タンパク質の同定による細菌の窒素固定反応制御機構の解析

研究課題名（英文）Molecular identification of nitrogen-transporter and analysis of nitrogen-fixing reaction in bacteria

研究代表者

村田 幸作（MURATA KOUSAKU）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90142299

## 研究成果の概要（和文）：

窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* は、大気窒素（約 80%）を窒素源として増殖する。しかし、窒素ガスの認識と輸送に関する知見はない。そこで、本細菌における窒素ガス輸送体（窒素ガスチャネル）の有無を明らかにすることを目的として研究を進め、本菌を低窒素濃度（0-5%）下で増殖させることにより、強く発現する遺伝子群を見出し、その解析を進めた。

## 研究成果の概要（英文）：

Although *Azotobacter vinelandii* can grow by using atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) gas as a sole nitrogen source, the knowledge on the nitrogen transport across the cell membrane has not been accumulated. In this study, the existence of nitrogen gas channel was examined by growing the bacterial cells in the presence of extremely low nitrogen gas concentrations, and found that some genes are strongly induced under the conditions.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：窒素輸送体、窒素固定、細胞表層構造、ポーリン様構造体、ガス生物学、*Azotobacter vinelandii*、アルギン酸、トランスアルジソーム

## 1. 研究開始当初の背景

非共生的窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* は、大気中の窒素を窒素源として増殖することができる。窒素ガスは、細胞内で窒素固定酵素（ニトロゲナーゼ）によってアンモニアに転換され、アミノ酸などの細胞

成分の合成に利用される。しかし、窒素ガスの細胞内侵入機構には不明なところが多い。窒素ガスチャネルに関する知見もない。

しかし、大腸菌においては、アンモニアガスチャネルが存在し、このことは窒素ガスチ

チャネルの存在を示唆する [PNAS, 105, 5040-5045 (2008)]。そこで、*A. vinelandii* の窒素ガスチャネルの実証に重心を置いた研究を進めた。*A. vinelandii* の全ゲノム構造 [J. Bacteriol., 191, 4534-4545 (2009)] も決定され、窒素ガスチャネルの分子生物学的基盤も整った。

## 2. 研究の目的

非共生的・好氣的窒素固定細菌である *A. vinelandii* は、大気窒素(濃度 78%)を固定し、それを窒素源として増殖する。しかし、その窒素固定反応は未だ十分に理解されておらず、特に窒素ガスの細胞内への浸透機構に関する知見が無い。従来、低分子で無極性の窒素ガスは、単純拡散によって細胞内に浸透すると考えられて来た。しかし、科学的証拠に欠ける常識は、信じるに値しない。

好氣的窒素固定細菌である *A. vinelandii* にとって、大気窒素ガスは重要な栄養源である。その窒素ガスが細胞内に自由に、且つ大量に入り込むことは、必ずしも都合ではないであろう。栄養源となり得る物質の透過は、膜系によって制御されるのが一般的だからである。栄養源である窒素ガスの細胞内透過が、膜系で制御されていても不思議ではない。

そこで、*A. vinelandii* を対象に、窒素ガスの細胞内輸送に関わるタンパク質(窒素ガスチャネル)の存在を想定し、その同定と機能に関する挑戦的な研究を展開した。

窒素ガスの細胞内輸送機構の解明に関して得られる成果は、生化学の概念を大幅に書き換えるのみならず、作物への窒素固定能付与など、食糧科学や植物科学に強いインパクトとなる。

## 3. 研究の方法

*A. vinelandii* (ATCC12837) は、スクロース Modified Burk' s Medium (MB 培地) を用

いて 30°C で好氣的に培養した。窒素源としての窒素ガスは、人工大気(窒素ガス・酸素ガス・ヘリウムガスの分圧を変えて調整)として供給した。

## 4. 研究成果

### (1) 窒素ガスチャネルの検索

#### ① 窒素/酸素ガス濃度と増殖

窒素ガスと酸素ガスに対する応答を調べるため、種々の混合ガスを用いて *A. vinelandii* の生育を測定した結果、酸素濃度が高くなる(25%, 50%, 75%)ほど生育は阻害された。高濃度酸素(50%)存在下で培養した対数期細胞について DNA マイクロアレイを行った結果、アルギン酸合成遺伝子クラスターが 6~28 倍、ポリヒドロキシ酪酸合成遺伝子クラスターが 20~60 倍強く発現し、逆に鞭毛形成関連遺伝子の発現レベルは 1/4 から 1/30 に減少した(細胞が運動性を喪失し、シスト休眠状態に入ったと考えられる)。

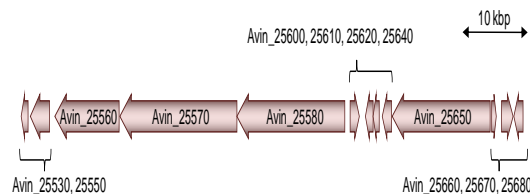


図 1. 低窒素応答性アイランド

一方、酸素濃度を 25% に固定し、窒素ガス濃度を変化(5%, 50%, 75%)させた場合、窒素ガス 5% でも良好な生育を示し、ゲノム上の特定箇所(Contig91/640,000~700,000)に位置する複数(約 20 個)の機能不明遺伝子が 3~17 倍強く発現することを見出した。この DNA 領域(約 64kb)を「低窒素応答性アイランド」(図 1)と称し、その機能の解析を進めた。

#### ② 低窒素応答性アイランド

*A. vinelandii* DJ のゲノム情報を参照して

低窒素応答性アイランドに含まれる各遺伝子の機能を推定したところ、多くがシデロフォア的一种であるアゾトバクチン (図 2) の生合成に関与することが判った。

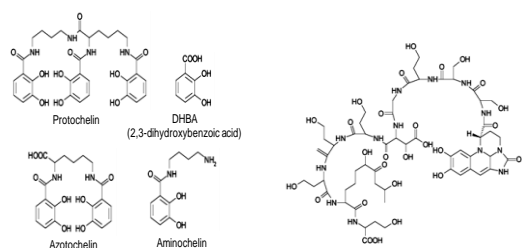


図 2. *A. vinelandii* のシデロフォア アゾトバクチン型シデロフォア (左) とカテコール型シデロフォア (右) の構造

シデロフォアは、鉄の枯渇に応じて分泌され、菌体外で鉄をキレートして細胞内に輸送する機能をもつ。実際、アゾトバクチンの生合成に関与すると予想される各遺伝子の破壊株では、アゾトバクチンに特徴的な緑青色の蛍光が消失する (図 3)。また、破壊株ではアゾトバクチンに特異的な 380 nm 付近の吸収が消失し、分子内にカテコールを持つシデロフォア (図 4) に特異的な 310 nm 付近の吸収が新たに観察された。

*A. vinelandii* のゲノム中には、カテコールシデロフォアの推定生合成遺伝子群 (Avin\_21180 - Avin\_21230) が見出されるが、アゾトバクチン生合成遺伝子群の領域とは約 500 kb 離れていた (図 5)。*A. vinelandii* のシデロフォアは、鉄などの金属イオンによってその合成が制御されていることが知られているが、本研究により、2 種の異なる型のシデロフォアが互いに影響していることが明らかになった。

つまり、ニトロゲナーゼは、鉄、モリブデンやバナジウムなどの金属を触媒反応に必要とする。そのため、*A. vinelandii* は低窒素環境下で両タイプのシデロフォアを高生

産し、ニトロゲナーゼに鉄を供給することにより窒素固定能を高めていると理解される。

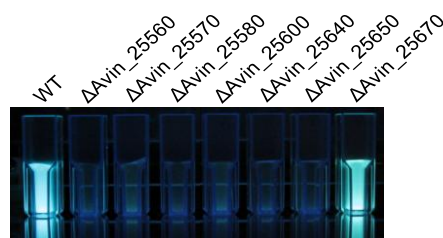


図 3. 遺伝子破壊株による蛍光 (アゾトバクチン) 消失 WT:野生株

尚、破壊株 ΔAvin\_25670 (グルタミン酸合成酵素をコード) では、アゾトバクチンに特徴的な 380 nm 付近の吸光が見られるが (図 4)、これは Avin\_25670 を破壊しても代替的なグルタミン酸合成酵素を用いてシデロフォアが合成されるためと考えられる。

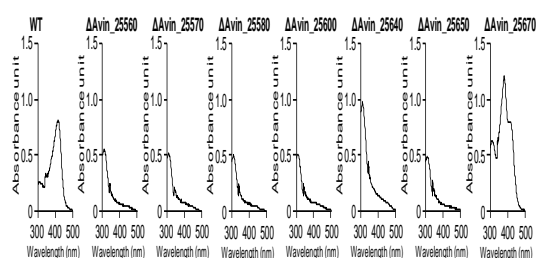


図 4. 鉄非含有スクロース MB 培地における破壊株培養上清の吸収スペクトル

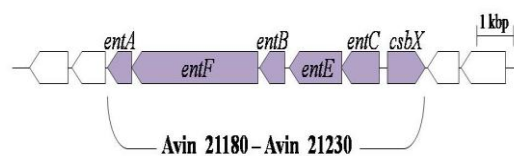


図 5. 推定カテコール型シデロフォア遺伝子群の構造

以上の結果より、窒素ガス 5% で *A. vinelandii* に見出した「低窒素応答性アイランド」は、シデロフォア生合成関連遺伝子クラスターであると同定され、目的の窒素チャネルには辿りつかなかった。つまり、窒素ガス 5% は、窒素固定反応に十分であり、窒素

チャンネルの指標としている増殖抑制を引き起こすには至っていないと考えられた。

### ③窒素輸送体「窒素チャンネル」の追求

窒素ガスチャンネル伝子を更に探索するため、*A. vinelandii* を対数増殖期まで増殖させた後、培養液を二分した。一方は通常大気で、もう一方には窒素を含まないガスを充填して（つまり、窒素源飢餓状態とし）、それぞれ 30 分間培養した。両細胞における遺伝子発現を DNA マイクロアレイによって比較し、窒素ガスを除いて培養した細胞で高発現している遺伝子を窒素ガスチャンネル候補とした。各遺伝子のアノテーション情報や周辺遺伝子の機能を考慮し、特に低分子物質の取り込みに関与する外膜タンパク質（ポーリン）をコードすると推定される遺伝子 Avin\_48920 に注目した（図 6）。Avin\_48920 の約 4 kb 下流には、ニトロゲナーゼをコードする *anf* 遺伝子群も存在している（図 6）。

これまでに無機ガスの輸送に関わる遺伝子は同定されていないが、有機ガスの輸送体として唯一、アンモニアのトランスポーター

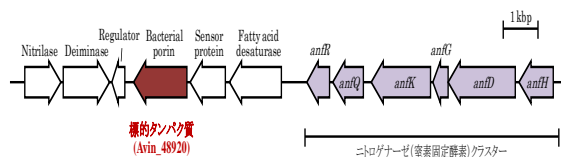


図 6. 推定ポーリンをコードする遺伝子 (Avin-48920) とその周辺

(AmtB) が報告されている。AmtB のホモログ中に、他のガス分子の輸送に関わるトランスポーターの存在が考えられる。*A. vinelandii* のゲノムから、相同性検索によって AmtB のホモログが 5 つ同定され、その中の一つは相同性の高さから既知の AmtB と同等の機能を有するタンパク質であると考えられた。別の AmtB ホモログをコードする Avin\_20360 と相

同性の高い配列が、*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Dickeya*, *Burkholderia* などの窒素固定細菌にも見出される。

そこで、Avin\_48920、Avin\_20360 および *amtB* の 3 つの遺伝子について、窒素ガス取り込みとの関連を解析したが、「窒素チャンネル」と断定し得る明確な機能は明らかにできなかった。

しかし、機能の同定においては、対象遺伝子の破壊による増殖抑制を指標にしているため、他のホモログが機能を代替する可能性は否定できず、これらの遺伝子が窒素ガスチャンネルでないとも断定できない。今後の問題である。

### (2) 窒素ガスによるアルギン酸輸送制御

*A. vinelandii* は、大気窒素ガスを窒素源、スクロースなどを炭素源とし増殖し、多糖アルギン酸を合成・分泌する。アルギン酸は細胞外に分泌され、細胞周囲に層状構造を形成する。

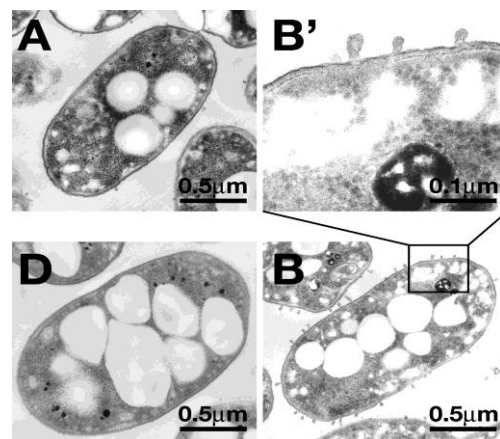


図 7. 低窒素環境での細胞表層構造

A, 野生株（大気窒素環境）；B, 野生株（低窒素環境）；B', B 細胞表層の拡大；D, アルギン酸合成欠損株

ここでは、細胞表層に形成される小胞がアルギン酸分泌を担うと仮定し、その機能をアルギン酸生産との関連も含めて解析した。

### ①トランスアルジソーム

定常期における *A. vinelandii* の細胞表面層には、多数の突起状の小胞構造が形成される (図 7. B, B' は細胞表面層の拡大写真)。アルギン酸合成欠損株 (AlgD 欠損株) では、小胞の形成は見られない (図 7. D)。更に、抗アルギン酸抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析は、小胞状構造体の中にアルギン酸が濃縮されていることが判明した (図 9)。

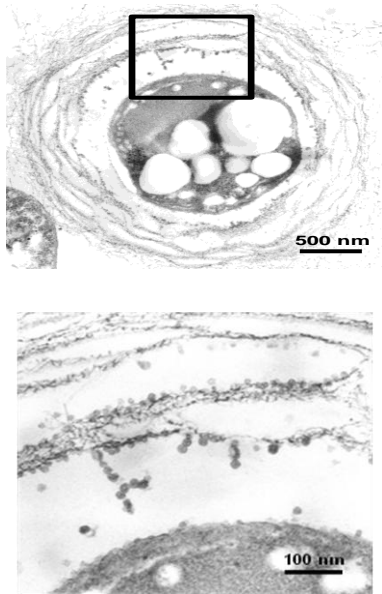


図 8. 小胞の細胞表面層遊離とアルギン酸の多重層化

上、細胞周囲に形成されたアルギン酸多重層構造 (白色顆粒はポリヒドロキシ酪酸); 下、上図枠内の拡大図

これらの結果から、小胞状構造体はアルギン酸分泌ベジクルと考えられ、この小胞状構造体を「トランスアルジソーム」(transalgisome) と名付けた。つまり、このベジクル様トランスアルジソームは、アルギン酸を内包したまま細胞表面層から脱離し、細胞周囲にアルギン酸の多重層を形成する役割をもっていることが明らかになった。実際、細胞表面層からトランスアルジソームが遊離し、それらがアルギン酸多重層の細胞側層に集積する様子が確認される (図 8 下)。

トランスアルジソームのような突起構造に関しては、タンパク質の分泌小胞や DNA の取り込み小胞 (トランスフォーマソーム) の報告がある。これらの小胞構造の意義に関しては、(a) タンパク質、DNA あるいは多糖のよ

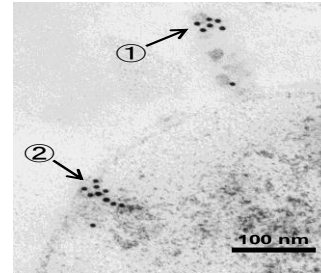


図 9. トランスアルジソーム

窒素 50%/酸素 25%環境下で培養した細胞切片

うな物質が分解されないように保護して細胞外に輸送する、(b) 小胞内物質を他の細菌に輸送し、一種の Cell-Cell Communication を行うなど諸説ある。いずれにせよ、小胞 (blebe) 構造は巨大分子の膜内外への輸送に優れた機構であり、巨大分子の生産法への応用が考えられる。

尚、*A. vinelandii* は、低水分活性の環境下でアルギン酸やポリヒドロキシ酪酸 (PHB) を主成分とする cyst (胞嚢) を形成し、乾燥耐性を示す。これらに加え、本研究では、酸素・窒素環境も *A. vinelandii* における cyst 形成の誘導要因であることを明らかにした。

### ③アルギン酸の生産

*A. vinelandii* は、シヨ糖やマンニトールを炭素源として良好に増殖するが、産業廃棄物グリセロールを炭素源、大気窒素を窒素源としても良好な増殖を示す。この場合も、細胞表面層には小胞状構造体の形成が確認され、グリセロール資化においてもトランスアルジソームによってアルギン酸が分泌されていると考えられる。また、細胞質内にはポリヒドロキシ酪酸 (PHB) の著量蓄積も認められ、安価なグリセロールと空気から、アルギン酸や生分解性プラスチック素材の生産が期待される。

グリセロール炭素源としてアルギン酸を高生産株する株を育種するため、*A. vinelandii* のムコイド性の上昇を指標に変異株の分離を試みた。得られた変異株 MT

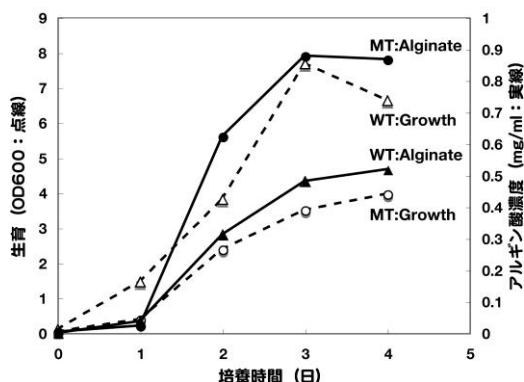


図 10. アルギン酸の生産  
WT、野生株 A1 ; MT、変異株

は、約 2 倍のアルギン酸生産性 (野生株 : 0.5 g/L ; 変異株 MT : 0.9 g/L) を示した (図 10) が、変異株の生育は野生株 (A1 株) のその半程度に止まるなど問題も残された。

### (3) おわりに

好氣的細菌であり、かつ大気窒素ガスを固定して増殖を図る *A. vinelandii* にとって、窒素ガスと酸素ガスの細胞内取り込みは重要な機能である。しかも、窒素固定系は酸素分子に鋭敏である。この相反する現象は、本菌の激しい酸素代謝能、つまり無毒化法によって保障されるとされるが、かかる考え方が生化学的に支持されている訳でもない。細胞周囲に分泌されたアルギン酸が、スクャベンジャーとして活性酸素種を捕捉して細胞を保護しているという説もあるが、アルギン酸合成欠損株の酸素耐性レベルはそれおも否定する。酸素センサーや窒素センサーが感知した情報の運命も定かではない。

窒素ガスチャネルの特定は、一重にその検出法にかかっている。窒素ガスチャネルの増殖抑制現象以外の検出法の確立が、窒素ガス

チャネルに到着する最も効果的な手段となるであろう。

## 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は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Fuminori Yoneyama, Mayumi Yamamoto, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum. *J. Appl. Microbiol.*, 111, 932-938 (2011).

DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05109.x.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* のシデロフォア生合成遺伝子クラスター。米山 史紀、山本 真由美、橋本 渉、村田 幸作：2010 年 3 月 29 日 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 幸作 (MURATA KOUSAKU)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号 : 90142299

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者