

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658063

研究課題名(和文) 土壌中の亜酸化窒素還元酵素群の「活性メタプロテオーム」解析

研究課題名(英文) Activity based metaproteomic analysis of nitrous oxide reductase in soil

## 研究代表者

横山 和平 (Yokoyama, Kazuhira)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：10230658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：土壌中の脱窒菌が発現する一酸化二窒素還元酵素(N2OR)を活性状態のまま抽出後、二次元Native電気泳動により展開し活性染色することで、多様性を解析する手法の開発を目指した。二次元電気泳動の1次元目の等電点電気泳動中にタンパク質が等電点沈殿し失活することが回避できなかった。また、土壌からの抽出において、比重液を用いて脱窒菌体を抽出後、破碎してN2ORを含むタンパク質を抽出しようと試みたが、十分量のタンパク質を抽出できる条件確立には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to extract active nitrous oxide reductases (N2ORs) of denitrifying bacteria in soil and to analyze their diversity by detecting them based on the activity-dependent staining on a two-dimensional native PAGE gel. It was not successful to avoid isoelectric precipitation of the proteins during the isoelectric electrophoresis, the first step of the 2-D native PAGE. The activity of N2OR preparations was lost irreversibly. The extraction of active N2ORs from soil was conducted by indirect methods where bacterial cells were separated from soil particles by density gradient centrifugation. The amount of proteins thus extracted was not sufficient to create a Coomassie Brilliant Blue-positive spots on the native PAGE gel.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：一酸化二窒素還元酵素 二次元電気泳動 活性染色 土壌 脱窒菌 一酸化二窒素

### 1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) は、二酸化炭素の 300 倍の温室効果を持つガスであり、農耕地への窒素肥料の瀬肥後、強い発生ピークが生じ、また、降雨後にもブロードな発生ピークが生じることが知られている。脱窒菌の  $N_2O$  還元酵素 ( $N_2OR$ ) は  $N_2O$  を還元消去することが期待されている。これまで、土壤中の脱窒菌  $N_2OR$  の多様性については、既知の脱窒菌の  $N_2OR$  をコードする遺伝子 *nosZ* を PCR 増幅して解析する例が多かった。また、近年は、これまでよく知られているものとは異なる atypical な *nosZ* の配列も土壤中に多数存在することが分かってきた。土壤中での  $N_2OR$  を発現している脱窒菌群、すなわち、実際に  $N_2O$  を還元している菌群の推定には、*nosZ* 遺伝子とユニバーサルである 16S リボソーム RNA 遺伝子の多寡を比較する必要があった。一方で、mRNA レベルでの研究例は僅かしかない。一連のオミクスと呼ばれる網羅的研究手法のうち、土壤中のタンパク質を抽出し解析するメタプロテオーム研究が近年開始されたが、この手法はタンパク質を変性させポリペプチドとして二次元電気泳動後、全てのアミノ酸配列を解析するもので、実際に土壤中での活性な  $N_2OR$  の解析には適当ではない。これまで、土壌から脱窒に関する未変性酵素を抽出し、解析した例はない。電気泳動後のゲルに対して活性染色法を適用できる場合には、特異性を高くすると同時に、反応時間を長くすることで微量のタンパク質でも検出できる可能性も期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、土壌から活性状態の  $N_2OR$  を抽出・精製し、等電点電気泳動と Native ポリアクリルアミド電気泳動を組み合わせることで二次元に展開 (以下、二次元ネイティブ電気泳動) 後、 $N_2OR$  を特異的に検出する活性染色法で、土壌中で活性な  $N_2OR$  の多様性を解析する手法を確立することを目的とした。これまでにデータベースに登録された *nosZ* 遺伝子の完全長配列から等電点と *NosZ* アポタンパク質モノマーの分子量を比較すると、図 1 のように、二次元展開したゲル状で十分に解析可能であると予想された。このため、本研究では、等電点電気泳動と活性  $N_2OR$  の土壌からの抽出法の 2 点について条件を検討した。

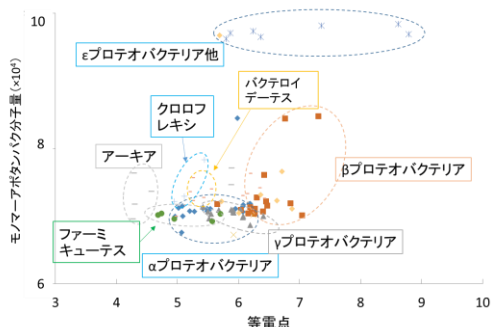


図1. *NosZ*モノマーアポタンパク質の等電点と分子量の分布

### 3. 研究の方法

(1) 各種の既知脱窒菌からペリプラズム画分を抽出し、Native PAGE に供した。ゲルを  $N_2O$  気相中で、酸化還元指示薬としてのメチルピオロゲンを含む亜二チオン酸塩溶液に浸漬し、 $N_2OR$  により亜二チオン酸塩から  $N_2O$  に電子が流れる時にだけメチルピオロゲンが青色から白色に変色する特異性が高い系<sup>①</sup>で、Native PAGE ゲル中の  $N_2OR$  バンドを検出した。

(2) 等電点電気泳動用の既製ゲル中の各種成分について  $N_2OR$  への阻害的影響の有無を確認した。既知脱窒菌から抽出したペリプラズム画分のタンパク質を Native PAGE 後、活性染色して  $N_2OR$  の活性を確認した。その後、被験液にゲルを 210 分間浸し、再びゲルを活性染色し、 $N_2OR$  の活性を確認した。

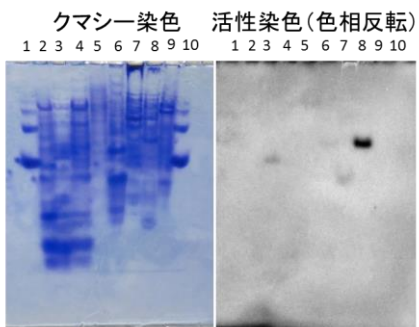
(3) 等電点電気泳動ゲル中で等電点沈殿したタンパク質の Native PAGE ゲルへの移行を促進するために、高解像度クリーンネイティブ PAGE<sup>②</sup>あるいは、希薄 SDS 溶液を上部電極液とした PAGE を試みた。

(4) 牛糞堆肥を混和した畑あるいは水田土壌を嫌氣的に培養して脱窒菌を集積した。 $N_2OR$  活性が発現していることをアセチレン阻害法で確認した後、Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、遠心分離により浮遊画分を集めヒスコロンで処理した。これを分子量分画後、Native PAGE に供した。

また、別途、滅菌土壌に既知脱窒菌である *Pseudomonas* sp. CM1 株を接種し、嫌氣的に培養した。土壌をリン酸緩衝液に分散し、低速遠心分離の上清を集めた。これを密度勾配遠心分離し、細菌画分を得た。再吸着防止剤として 0.1% DNA を含むリン酸緩衝液に再懸濁して、ビーズビーターで破碎後、分子量分画して Native PAGE に供した。

### 4. 研究成果

(1) 既知脱窒菌数株から Native PAGE 後の活性染色で、クマシー染色で得られた多数のバンド (図 2 左) の中で異なる移動度の活性スポットを各々 1 本ずつ得た (図 2 右、色相を反転してある)。供試脱窒菌はいずれもプロテオバクテリアだったが、Native PAGE の移動度に明瞭な差が見られたので、等電点電気泳動と組み合わせることで高い解像度が得られると期待された。



1, 10: BSA, 2: *Geobacillus thermodenitrificans* NCIMB 11730, 3: *Pseudomonas* sp. CM1, 4: *Thauera* sp. PM2, 5: *Sinorhizobium fredii* USDA 250, 6: *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, 7: *Paracoccus pantotrophus* NCIMB 13217, 8: *Paracoccus denitrificans* 96, 9: *Paracoccus denitrificans* NCIMB 11627

図2. 純粋培養脱窒菌から得たN<sub>2</sub>ORの活性染色

(2) 二次元電気泳動の一次元目の等電点電気泳動用の既製ゲルに含まれるチオ尿素がN<sub>2</sub>ORの活性を阻害することが明らかになった。図3は、*Paracoccus denitrificans* 96株(左レーン)と*Pseudomonas* sp. CM1株(右レーン)のN<sub>2</sub>ORの活性スポット(色相を反転したものを)を示している。等電点電気泳動ゲル中の濃度に相当する2Mチオ尿素に浸漬した場合のみ、活性スポットが消失した。以後、チオ尿素を含まない等電点電気泳動ゲルを自作した。

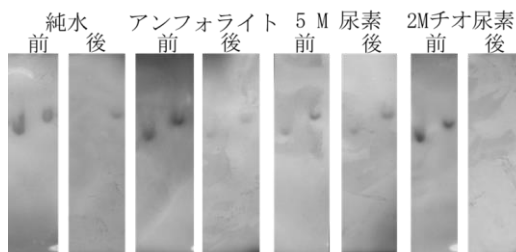


図3. チオ尿素によるN<sub>2</sub>ORの阻害

(3) 等電点電気泳動中にロードしたタンパク質が等電点沈殿し、二次元目のNative PAGE後も残存した。特に、中性～アルカリ性側のpI領域のタンパク質のNative PAGEゲルへの移動が不十分だった(図4矢印)。

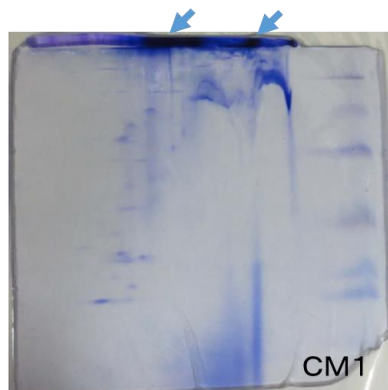


図4. 等電点電気泳動ゲル中の残留タンパク質

高解像度クリーンネイティブPAGEあるいは、希薄SDS溶液を上部電極液としたPAGEにより、二次元目Native PAGEゲルへの移動は改善されたが、活性スポットは得られなかった(図5)。この時、Native PAGEゲルでの移動度から、N<sub>2</sub>ORと考えられるスポットが視認できた(図5の矢印)ので、一度等電点沈殿したN<sub>2</sub>ORは、Native PAGEゲル状でも活性を復活しないと推察された。

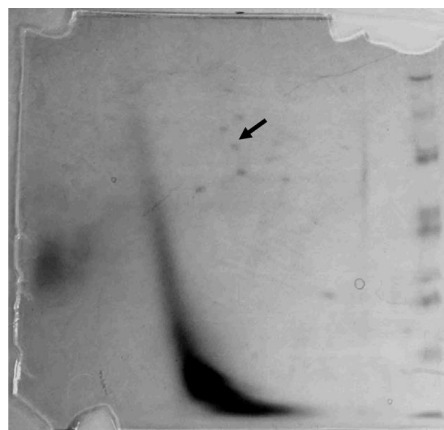


図5. 高解像度クリーンNative PAGEゲルのCBB染色画像。

等電点電気泳動中の等電点沈殿を防止するために、ゲル中に予めpH勾配を形成した後に、酸性pI側からタンパク質をロードし、短時間電気泳動したが、失活を防げなかった。

(4) 土壌から、菌体抽出の条件を変えた2つの方法で活性N<sub>2</sub>ORの分離を試みたが、クマシー染色では、いずれの方法でもNative PAGEゲルにタンパク質のバンドが得られず、脱窒菌菌体が十分に抽出されていないか、あるいは、菌体破碎時に、遊離したタンパク質が、同時に混入した土壌粘土鉱物に吸着された危険性が示唆された。

#### (5)今後の展望

本研究の範囲内では、当初の目標を達成できなかった。温室効果ガスの排出による地球規模の気候変動は、看過できない状況となっている。食糧生産の場からの強力な温室効果ガスであるN<sub>2</sub>Oの発生を抑制することは急務であり、依然として本研究の着想は重要である。今後は、等電点電気泳動以外の手法での二次元展開を検討する。また、土壌からのタンパク質の抽出においては、菌体破碎後にタンパク質が混入した粘土鉱物に吸着された危険性がある。本研究では、吸着防止のために、菌体破碎時にDNAを添加したが、不十分だったと考えられる。今後は、分子量分画で排除可能な分子量域のタンパク質をより高濃度で添加するなどの対策を検討する。また、グラム陽性のファーミキューテスに含まれる脱窒菌のN<sub>2</sub>OR抽出効率についても検

討する必要がある。

( )

#### 参考論文

①Berks, B. C., Baratta, D., Richerdson, D. J. and Ferguson, S.J. (1993) Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*, Implication for the mechanism of aerobic nitrous oxide redustion. Eur. J. Biochem., 212, 467-476.

②Wittig, I., Michael Karas, M. and Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. Molecular & Cellular Proteomics, 6, 1215-1225.

#### 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 0件)

〔学会発表〕 (計 2件)

①横山和平・藤田大介・藤本博子 (2014). 土壤中での活性な亜酸化窒素還元酵素の二次元電気泳動による検出方法の模索. 2014年度(第110回)日本土壌肥料学会関西支部講演会. 2014年12月11日, サポートホール高松(香川県高松市).

②横山和平・藤田大介・藤本博子 (2014). Native二次元電気泳動を用いた活性な亜酸化窒素還元酵素の検出方法の検討. 環境微生物系学会合同大会2014. 2014年10月22日, 浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県浜松市).

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

横山 和平 (YOKOYAMA, Kazuhira)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 10230658

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

研究者番号: