

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340006

研究課題名(和文) 海洋性アンモニア酸化細菌による温室効果ガス亜酸化窒素の生成

研究課題名(英文) Emission of nitrous oxide from marine ammonia-oxidizing bacterium

研究代表者

藤原 健智 (FUJIWARA, Taketomo)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：80209121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、硝化に伴う亜酸化窒素の生成の過程を明らかにすることである。海洋性のアンモニア酸化細菌(AOB)から抽出したヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)によって亜酸化窒素が生成することを直接証明した。また、変異導入による機能解析を目的として、HAOの発現系構築に取り組んだ。既存の手法の適用が困難であることが明らかとなったため、別種のAOBを宿主とする系を新たに設計した。さらに、従属栄養性の硝化菌からピルビン酸オキシム酸素添加酵素を精製し、アルドラーゼの相同タンパク質であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this project is to clarify biochemical process of nitrous oxide (N₂O) emission by nitrifying microorganisms. In this project, generation of N₂O as a by-product of hydroxylamine oxidoreductase (HAO) reaction was proved by using the enzyme purified from marine ammonia-oxidizing bacterium (AOB), *Nitrosococcus oceani*. Kinetic analysis of the HAO reaction was carried out. Construction of HAO expression system has also been attempted. Because unique chemical modification is essential for maturation of HAO, new expression system is now preparing by utilizing another AOB as the host cells. Biochemical analysis of heterotrophic nitrification was also started in this project. Pyruvic oxime dioxygenase (POD) was purified from *Alcaligenes faecalis*. Surprisingly, POD was a homologous enzyme to class II aldolase. This finding may give new perspectives not only in the biochemistry of heterotrophic nitrification but also in the catalytic mechanism of oxygenase.

研究分野：環境微生物生化学

キーワード：硝化 アンモニア酸化細菌 亜酸化窒素 温室効果ガス ヒドロキシルアミン酸化還元酵素 従属栄養的硝化

1. 研究開始当初の背景

強力な温室効果とオゾン破壊作用を持つ亜酸化窒素 (N_2O) ガスの主たる放出源は海洋であり、アンモニア酸化細菌 (AOB) の作用によると考えられる。我々の研究によって、海洋性 AOB の優先種の一つである *Nitrosococcus oceani* が N_2O を活発に放出すること、HAO と呼ばれる酵素が N_2O の合成に直接関わっていることが明らかとなった (H20~22 基盤 C、課題番号 20510007)。

2. 研究の目的

AOB による N_2O 生成メカニズムの詳細な解明には、HAO の変異酵素の作成と機能解析が必要である。しかし HAO の活性化には特異な翻訳後修飾が必須と考えられており、その過剰発現に成功したとする報告はこれまで無い。本研究の目的は、*N. oceani* HAO の発現系を構築し、作成した組み換え体を用いて、推定される HAO による N_2O 生成の反応メカニズムを検証することである。

3. 研究の方法

c 型ヘムを含む高分子量タンパク質の発現用宿主として実績のある *Shewanella oneidensis* を用いた系を作成したが、HAO の発現には成功しなかった。そこで、HAO を持つ別種の AOB である *Nitrosomonas europaea* を宿主として用いることとした。*N. oceani* の HAO 遺伝子のプロモーターとシグナル配列を *N. europaea* の HAO 遺伝子のものと置き換えるとともに、塩基配列全長を *N. europaea* のコドン頻度を用いて最適化することで、*N. oceani* HAO 発現プラスミドを作成した。

4. 研究成果

今後は (研究期間終了後であるが) このプラスミドで *N. europaea* を形質転換するこ

とで、*N. oceani* HAO 組み換え体の発現を確認する。また、H26 年度からサブテーマとして開始した、従属栄養的硝化に関する研究では、*Alcaligenes faecalis* からのピルビン酸オキシム酸素添加酵素 (POD) の精製と遺伝子クローニングを行った。その結果、POD が、解糖や糖新生に関わるアルドラーゼの相同タンパク質であることを見出した。本来は炭素間結合の切断や連結を触媒する酵素であるアルドラーゼが、酸素添加反応という、まったく異なる化学反応を触媒するという今回の発見は、酵素機能の新たな可能性を示している。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hattori T, Shiba H, Ashiki K, Araki T, Nagashima Y, Yoshimatsu K, and Fujiwara T (2016) Anaerobic growth of haloarchaeon *Haloferax volcanii* by denitrification is controlled by the transcription regulator NarO. *Journal of Bacteriology* 198(7): 1077-1086.
2. Qi Q, Ito Y, Yoshimatsu K, and Fujiwara T (2016) Transcriptional regulation of dimethyl sulfoxide respiration in a haloarchaeon, *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* 20(1): 27-36.
3. Yamazaki T, Hozuki T, Arai K, Toyoda S, Koba K, Fujiwara T, and Yoshida N (2014) Isotopomeric characterization of nitrous oxide produced by reaction of enzymes extracted from nitrifying and denitrifying bacteria. *Biogeoscience* 11: 2679-2689.

[学会発表] (計 14 件)

1. 齊秋子、服部達哉、吉松勝彦、藤原健智「好塩性アーキアにおける DMSO 還元酵素の誘導制御」第 26 回日本アーキア研究会第

- 26 回講演会 (2013 年 7 月 19-20 日、東京)
2. 西ヶ谷有輝、熊谷美穂、土屋渉、藤本瑞、鮫島玲子、藤原健智、山崎俊正「ヒドロキシルアミン酸化還元酵素を標的とした構造ベース創農薬 - アンモニア酸化細菌の代謝を抑制して持続可能な農業をめざす - 」日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会 (2013 年 12 月 18-20 日、静岡)
 3. 西ヶ谷有輝、熊谷美穂、土屋渉、藤本瑞、鮫島玲子、藤原健智、山崎俊正「構造生物学的アプローチによるヒドロキシルアミン酸化還元酵素を標的とした硝化抑制剤の開発」日本農芸化学会 2014 年度大会 (2014 年 3 月 27-30 日、神奈川)
 4. 小杉直揮、須田一成、田中達、吉松勝彦、藤原健智「好塩性アーキアに特有のヘムタンパク質 PitA の機能解析」第 27 回日本 Archaea 研究会講演会 (2014 年 7 月 25-26 日、滋賀)
 5. 荒木琢磨、藤田純平、吉松勝彦、鮫島玲子、藤原健智「好塩性アーキア *Haloferax volcanii* の脱窒関連遺伝子の機能解析」第 15 回極限環境生物学会 (2014 年 11 月 1-3 日、沖縄)
 6. 天田隼人、吉松勝彦、三本木至宏、藤原健智「 γ -アンモニア酸化細菌 *Nitrosococcus oceani* に特有のシトクロム *c₅₅₃* の精製と諸性質」日本生体エネルギー研究会第 40 回討論会 (2014 年 12 月 11-13 日、愛媛)
 7. 塩谷惟、吉松勝彦、藤原健智「海洋性アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas cryotolerans* のシトクロム *c₅₅₄* の精製と発現系の構築」日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015 年 3 月 26-29 日、岡山)
 8. 荒木琢磨、藤田純平、吉松勝彦、藤原健智「好塩性アーキア *Haloferax volcanii* の脱窒関連遺伝子 *mcoA* および *pqqE2* の機能解析」日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015 年 3 月 26-29 日、岡山)
 9. 荒木琢磨、藤田純平、吉松勝彦、鮫島玲子、藤原健智「好塩性アーキア *Haloferax volcanii* の脱窒関連遺伝子の機能解析」極限環境生物学会第 16 回講演会 (2015 年 11 月 18-19 日、東京)
 10. 仲真亮太、荒木琢磨、吉松勝彦、藤原健智「好塩性アーキア *Haloferax volcanii* のマルチ銅オキシダーゼ McoA の機能解析」極限環境生物学会第 16 回講演会 (2015 年 11 月 18-19 日、東京)
 11. 小杉直揮、須田一成、田中達、吉松勝彦、藤原健智「好塩性アーキアに特有のヘムタンパク質 PitA の機能解析」極限環境生物学会第 16 回講演会 (2015 年 11 月 18-19 日、東京)
 12. 金宗鉉、荒木琢磨、藤原健智「好塩性アーキア *Haloferax volcanii* の嫌気代謝を制御する転写因子 NarO2 の機能解析」極限環境生物学会第 16 回講演会 (2015 年 11 月 18-19 日、東京)
 13. 金宗鉉、鈴木利幸、Beatriz E. CASARETO、鈴木款、藤原健智「サンゴ虫体内に共生する微生物の遺伝子解析」日本サンゴ礁学会第 18 回大会 (2015 年 11 月 26-29 日、東京)
 14. 辻野修平、植松千紗都、岡俊彦、吉松勝彦、藤原健智「従属栄養硝化を駆動する『Pyruvic Oxime Dioxygenase』の分子的性質」日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016 年 3 月 27-30 日、札幌)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称：
- 発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

藤原 健智 (FUJIWARA Taketomo)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：80209121

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：