

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20248009

研究課題名(和文) 微生物の新規窒素代謝系の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel nitrogen metabolisms of microbes

研究代表者

祥雲 弘文 (SHOUN HIROFUMI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：70012036

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：微生物代謝、窒素代謝

## 1. 研究計画の概要

生命による無機窒素循環系である窒素サイクルは地上における主要な物質循環系の一つとして、また生命への窒素供給源として、生物圏において重要な役割を果たしている。我々はこれまで、カビの脱窒、カビのアンモニア発酵、放線菌の脱窒など、窒素サイクルに関わる新規代謝あるいは新規メンバーを幾つか見出し、微生物による窒素サイクルが従来知られていたものより遥かに多彩であることを明らかにした。本研究では、これらの発見をさらに発展させ、微生物窒素代謝の総合的理解のための基盤を創成することを目的とし、それらの分子機構を明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) カビ脱窒系の解明

当研究室で長年研究してきた脱窒真菌 *Fusarium oxysporum* より、脱窒に関わる亜硝酸還元酵素(dNir)遺伝子(*nirK*)の単離に成功し、それが細菌脱窒系の *nirK* のオルソログであることを明らかにした。その後、麹菌 *Aspergillus oryzae* から、*nirK* 遺伝子の単離に成功し、その性質と細胞内の局在を明らかにした。フラボヘモグロビン(Fhb)は真核および原核微生物に普遍的に見出される融合タンパク質であり、その生理機能として一酸化窒素(NO)ジオキシゲナーゼが知られている。我々は *A. oryzae* ゲノムに Fhb 遺伝子を二つ見出し(*fhb1*, *fhb2*)、それらのクローニング、異種宿主での発現と蛋白質の精製、酵素活性の確認と性質解明を行った。さらに両遺伝子の発現条件の検索や遺伝子破壊の影響などを検討し、これら2種の Fhb の細胞内局在、生理機能などを明らかにした。その後、両 Fhb 遺伝子の欠損株および高発現株の過酸化水素に対する耐性を調べた結果、

両 Fhb は過酸化水素に対する酸化ダメージを亢進することが明らかになった。さらに、Fhb1 と Fhb2 はそれぞれ細胞質とミトコンドリアでの酸化ストレスに関わることが分かった。カビ脱窒に NO 還元酵素(Nor)として関わるシトクロム P450nor は、Nor 活性以外に共脱窒活性や NADH-ペルオキシダーゼ活性(NPO)を示す多機能解毒酵素である。この NPO 活性の反応機構について詳細な検討を行い、新たなペルオキシダーゼ反応機構の存在を明らかにした。

## (2) 共脱窒現象の解明

カビの共脱窒現象の動力学的な解析を行った結果、それが化学反応ではなく、生物反応によることを示すことができた。さらに、cell-free の活性も再構成できた。

## (3) 放線菌の硝酸呼吸と新規窒素代謝

放線菌は絶対好気性の生物であると一般的に信じられているが、我々は放線菌に脱窒を行うものの存在を示した。実際、代表的放線菌のひとつである *Streptomyces coelicolor* に脱窒や硝酸呼吸に関わる硝酸還元酵素(dNar)ホモログ遺伝子が3種類も存在することが明らかとなっている。また我々は有機態窒素が放線菌により亜硝酸に変換される興味深い現象を見出している。*S. coelicolor* の3種の dNar ホモログの発現解析や遺伝子破壊の結果から、dNar と亜硝酸生産の関連性を明らかにした。さらに、培養条件の検討を通じて亜硝酸生産に対する影響を検証し、総合的に、これら dNar と亜硝酸との関連、また本代謝系の意義を検討した。様々な嫌気条件下でのプロテオーム解析を行ったところ、各条件での蛋白質の生産状態を検証した。一方、2種類の放線菌から5種の Fhb ホモログの遺伝子を単離し、酵素活性測定、遺伝子

発現解析、遺伝子破壊などの手法を通じてその生理的意義を検証した。

#### (4) 脱窒エキスパート微生物の発見

廃水処理の過程で強力な温室効果ガスである亜酸化窒素( $N_2O$ )が発生することはよく知られている。その主要な原因の一つが、硝化細菌(アンモニア酸化細菌)による脱窒であることを明らかにした。好気脱窒(酸素分圧があっても $N_2O$ を放出しない)細菌として知られる *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の脱窒特性を詳細に検討し、脱窒エキスパートというべき性質を明らかにした。さらに、 $N_2O$ 還元活性が異常に高い、まさに $N_2O$ 抑止型微生物といえる新規な細菌を複数単離することに成功した。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

*F. oxysporum*からの *nirK* 遺伝子の単離は、真核生物から初めての例であり、新規性が極めて高い発見である。真核生物ゲノム中の *nirK* ホモログは系統樹で同じクラスターに含まれた。このことは真核生物 *nirK* が同一起源(おそらくプロトミトコンドリア)であることを意味し、ミトコンドリアの起源と進化に関して新たな視点を投じた。その後、*A. oryzae*からも *nirK* 遺伝子の取得に成功した。さらに、真核生物の Fhb の生理機能をオルガネラのレベルで明らかにしたのも本研究が初めてである。P450<sub>nor</sub>の研究では、この酵素が持つ NPO 活性が新たな反応機構によることを見出した。

放線菌の新規窒素代謝に関しても、様々な手法を用いて、総合的な検証を進めており、その全貌が明らかになりつつある。

硝化過程で $N_2O$ が発生することは知られていたが、その原因が硝化細菌の脱窒によることを示したのは本研究が初めてである。また、本研究で新規に単離された $N_2O$ 抑止型細菌はいずれも新種であり、そのうち2つは新属であることが分かっている。

以上のことから、本研究は、これまでに発見した微生物窒素代謝の解明という当初の目的だけでなく、真核生物のオルガネラの進化(機能分化)や、新属新種に属する $N_2O$ 抑止型脱窒細菌の発見に成功しており、予想外の進展が見られた。

### 4. 今後の研究の推進方策

カビ脱窒系の解明は順調に進んでおり、今後はその分子機構を、X線結晶構造解析などの手法を用いてさらに詳細に明らかにしていく。

カビの共脱窒現象はそれが生物反応であることを示して、cell-free の活性も再構成できたことから、現在遺伝子の取得にとりかかっている。

放線菌の新規窒素代謝は、dNar 遺伝子の亜

硝酸生産における役割、プロテオーム解析から変動が確認されたタンパク質の機能などをさらに詳細に調べていく。

脱窒エキスパートである TR2 株は、水処理プラントへの応用を視野に入れ、実際の処理条件での生残性をチェックし、より効率的な脱窒を行える条件を探る。新規な $N_2O$ 抑止型細菌は、脱窒遺伝子の取得を目指す。

### 5. 代表的な研究成果

(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9件 全て査読有)

①S. Zhou, S. Fushinobu, S.-W. Kim, Y. Nakanishi, J.-I. Maruyama, K. Kitamoto, T. Wakagi, and H. Shoun, Functional analysis and subcellular location of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **48**, 200-207 (2011)

②S.-W. Kim, S. Fushinobu, S. Zhou, T. Wakagi, and H. Shoun, The possible involvement of copper-containing nitrite reductase (NirK) and flavohemoglobin in denitrification by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1403-1407 (2010)

③S. Zhou, S. Fushinobu, S.-W. Kim, Y. Nakanishi, T. Wakagi, and H. Shoun, *Aspergillus oryzae* flavohemoglobins promote oxidative damage by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **394**, 558-561 (2010)

④Y. Nakanishi, S. Zhou, S.-W. Kim, S. Fushinobu, J. Maruyama, K. Kitamoto, T. Wakagi, and H. Shoun, A eukaryotic copper-containing nitrite reductase derived from a NirK homolog gene of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 984-991 (2010)

⑤S.-W. Kim, S. Fushinobu, S. Zhou, T. Wakagi, and H. Shoun, Eukaryotic *nirK* genes encoding copper-containing nitrite reductase: originating from the protomitochondrion? *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2652-2658 (2009)

[学会発表](計16件)

①石山正宗、矢嶋俊介、大澤貫寿、祥雲弘文、佐々木康幸、嫌気条件下における *Streptomyces coelicolor* のプロテオーム解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京

②山崎良、佐々木康幸、高谷直樹、矢嶋俊介、池田治生、高野英晃、大澤貫寿、祥雲弘文、放線菌における異化型硝酸塩還元酵素の関連した新規窒素代謝系の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京