

博士論文

緑膿菌の硝酸イオン及び亜硝酸イオンの膜輸送機構に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
応用微生物学研究室

岡本 洸彰

2024 年 3 月 15 日

目次

【序章】	5
第1節 緑膿菌の病原性と環境遍在性	5
第2節 緑膿菌の呼吸システムと膜輸送	6
第1項 緑膿菌の好気呼吸	6
第2項 緑膿菌の <i>cbb₃</i> 型 cytochrome <i>c</i> oxidase と病原性	6
第3項 <i>cbb₃</i> 型 cytochrome <i>c</i> oxidase の4タイプの特徴	7
第4項 <i>ccoN3</i> オペロンの構成	8
第5項 緑膿菌の嫌気呼吸	9
第6項 緑膿菌の硝酸同化	10
第3節 緑膿菌のトランスポーター	10
第1項 トランスポーター概論	10
第2項 薬剤ターゲットとしてのトランスポーター	11
第3項 硝酸同化トランスポーター近傍の遺伝子構造	12
第4項 脱窒トランスポーター近傍の遺伝子構造	13
第4節 本研究の目的	13
【材料と方法】	15
【第1章】 <i>NasA</i> 、 <i>NarK1</i> 、 <i>NarK2</i> の機能解析	30
第1節 序論	30
第1項 Major Facilitator Superfamily (MFS)	30
第2項 NNP family 内の <i>NarK</i> 様タンパク質群	31
第3項 大腸菌 <i>NarK</i> の機能解析	32
第4項 <i>NarK</i> 様タンパク質群のサブグループ： <i>NarK1</i> タイプと <i>NarK2</i> タイプ	37
第5項 <i>NarK1</i> タイプと <i>NarK2</i> タイプの機能的差異に関する研究	39
第6項 <i>NarK1</i> と <i>NarK2</i> の相互作用に関する研究	41
第7項 亜硝酸イオンの膜透過性と pH	43
第8項 注目したその他の遺伝子	44
第9項 本章の目的	44
第2節 一重破壊株を用いた生育試験	44
第1項 $\Delta nasA$ 、 $\Delta nasA+nasA$ 、 $\Delta narK1K2$ の作製	44
第2項 硝酸同化試験による $\Delta nasA$ の評価	45
第3項 脱窒試験による $\Delta nasA$ 、 $\Delta narK$ の評価	47
第4項 考察	47
第3節 四重破壊株を用いた生育試験	47
第1項 四重破壊株 $\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta napPA1854$ ($\Delta 4$) 及び各遺伝子相補株の作製	47
第2項 硝酸同化試験による $\Delta 4$ 相補株の評価	49
第3項 脱窒試験による $\Delta 4$ 相補株の評価	50

第4項	$\Delta 4+narK2$ の挿入配列のシーケンシング	53
第5項	ウェスタンブロッティングによる相補タンパク質の検出	53
第6項	考察	55
第4節	プラスミド相補株を用いた生育試験	56
第1項	プラスミド相補株の作製	56
第2項	脱窒試験によるプラスミド相補株の評価	56
第5節	脱窒生育への NAR の影響についての検証	57
第1項	異化型硝酸還元酵素 NAR	57
第2項	NAR の活性測定	58
第3項	ウェスタンブロッティングによる NarG の検出	59
第6節	緑膿菌における先行研究との差異	60
第7節	生育試験による NarK1-NarK2 の相互作用の解析	61
第1項	背景	61
第2項	不活性型 NarK1 と野生型 NarK2 の共発現株の作製	62
第3項	脱窒試験の結果と考察	62
第4項	NasA-NarK2 の相互作用の解析	64
第8節	ウェスタンブロッティングによる NarK1-NarK2、NarK2-NAR の相互作用の解析	64
第9節	<i>narK2</i> の点変異の解析	67
第1項	点変異による <i>narK2</i> 相補株の硝酸同化能の獲得	67
第2項	Phe269 残基の役割	68
第3項	変異型 <i>narK2</i> の機能の比較	69
第10節	$\Delta 4$ 変異株のドラフトゲノム解析	71
第11節	第1章のまとめ	77
【第2章】	<i>ccoN3Q3-PA1854</i> 遺伝子領域の解析	78
第1節	序論	78
第1項	<i>ccoN3</i> オペロンと亜硝酸イオンセンシングレギュレーター NirY	78
第2項	<i>ccoN3</i> オペロン上の機能未知遺伝子 <i>PA1854</i>	79
第3項	本章の目的	80
第2節	<i>ccoN3</i> オペロンの転写開始点決定	80
第3節	NirY レギュロンの決定	81
第4節	<i>PA1854</i> 破壊株を用いた生育試験	82
第1項	亜硝酸耐性試験による $\Delta PA1854$ の評価	82
第2項	亜硝酸同化試験による $\Delta PA1854$ の評価	83
第3項	VB9.6 を使用した低濃度の亜硝酸同化試験	84
第4項	ジャーファーメンターによる亜硝酸塩フィード培養	85
第5項	結果のまとめ	86
第5節	微好気培養による比較	87
第1項	WT、 $\Delta PA1854$ の微好気脱窒試験	87

第2項 $\Delta nirS$ 、 $\Delta PA1854\Delta nirS$ の微好気脱窒試験	87
第6節 四重破壊株を用いた生育試験	90
第1項 $\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854+PA1854$ ($\Delta 4+PA1854$) の作製	90
第2項 ウェスタンブロッティングによる PA1854 の検出	90
第3項 亜硝酸同化試験による評価	91
第4項 硝酸同化試験による $\Delta 4+PA1854$ の評価	92
第5項 脱窒試験による $\Delta 4+PA1854$ の評価	92
第6項 亜硝酸脱窒試験による $\Delta 4+PA1854$ の評価	93
第7節 第2章のまとめ	94
【総括と展望】	96
【参考文献】	99
【謝辞】	108

【序章】

第1節 緑膿菌の病原性と環境遍在性

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (図 0-1) は、 γ -proteobacteria 綱に属する通性嫌気性のグラム陰性細菌であり、土壌や海洋、動植物の体表面や組織など、環境中に遍在する (1)。また日和見感染性を持つことから、院内感染の対策が重要な病原菌でもある。遺伝性の難病である嚢胞性線維症 (cystic fibrosis, CF) の患者においては、肺への緑膿菌感染が特に重大なリスクであり、死亡要因の大きな割合を占める (2)。アメリカの Cystic Fibrosis Foundation が 2019 年に医療機関から取得したデータでは、細菌感染が確認された CF 患者の約 4 割から緑膿菌が検出され、一部が多剤耐性を獲得していた (3)。CF 患者では気道などにおいて分泌液の粘度が高くなるが、その結果生じる嫌気的環境にも緑膿菌は適応していると考えられている (4)。

緑膿菌は多様な環境に適応できるだけでなく、種々の薬剤に対して高い耐性を持つ。すなわち、感染防止と治療の両面において対処が難しい病原菌である。加えて、治療過程でさらに多剤耐性を獲得しやすいことも大きな問題となっている (5)。世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は、2017 年に新規抗生物質の研究開発が重要な病原菌として 12 種を発表し、カルバペネム耐性緑膿菌を 3 段階のランク (critical、high、medium) の中で最高の critical に分類した (6)。

以上のような“robustness”こそ緑膿菌の特徴のひとつだと言える。その生化学的な要因として、好気呼吸、嫌気呼吸、発酵という複数のエネルギー獲得様式を保持しており、それらを柔軟に使い分けている (7) ことが挙げられる。実際に、緑膿菌のゲノムは 6.3Mb と細菌としては比較的大きく (8)、エネルギー代謝と遺伝子発現制御系の遺伝子を多く持っている (9)(10)。

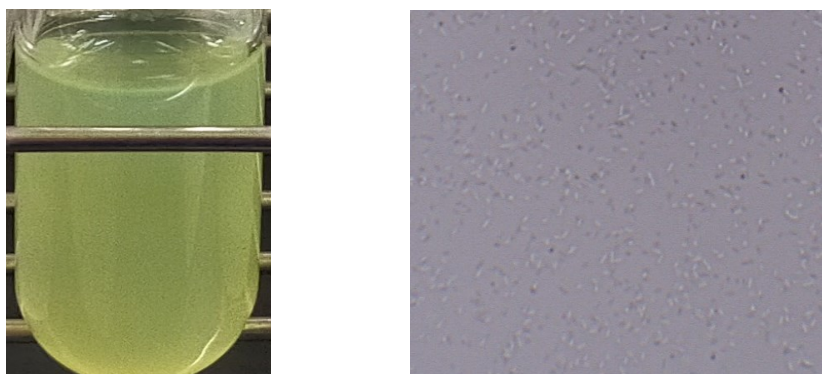


図 0-1 本研究で使用した緑膿菌の写真

(左) 定常～死滅期の培養液の写真。透明な VB 培地 (材料と方法参照) で緑膿菌を培養すると、対数期から緑色を呈し始める。これは緑膿菌が生産する色素に由来し、菌名の由来にもなっている。

(右) 位相差顕微鏡写真。緑膿菌は運動性を持つ桿菌であり、図では白色または黒色であらわれている。なお、これは LB 培地で培養した $\Delta 4+PA1854$ 株 (第 2 章参照) の写真である。

第2節 緑膿菌の呼吸システムと膜輸送

第1項 緑膿菌の好気呼吸

緑膿菌は呼吸鎖の最終電子受容体として、好氣的な環境では酸素分子 (O_2) を、嫌氣的な環境では硝酸イオン (NO_3^-) を利用する。さらに好気呼吸では、環境に応じて異なる末端酸化酵素が使い分けられる (図 0-2)。これまでの研究により、各酵素の発現条件や特性が明らかになっている (11)(12)(13)(14)(15)。ユビキノンを酸化する quinol oxidase には、 bo_3 型酵素と cyanide insensitive oxidase (CIO) があり、それぞれ鉄欠乏とシアン化物イオン (CN^-) 存在下で発現する。また cytochrome *c* oxidase には、ヘムの構成が異なる caa_3 型酵素と cbb_3 型酵素がある。 caa_3 型酵素は栄養飢餓で発現する。 cbb_3 型酵素は、活性中心を持つサブユニットである CcoN の種類から 4 タイプ (N1 タイプ、N2 タイプ、N3 タイプ、N4 タイプ) が存在し、互いに発現条件が異なっている (後述)。

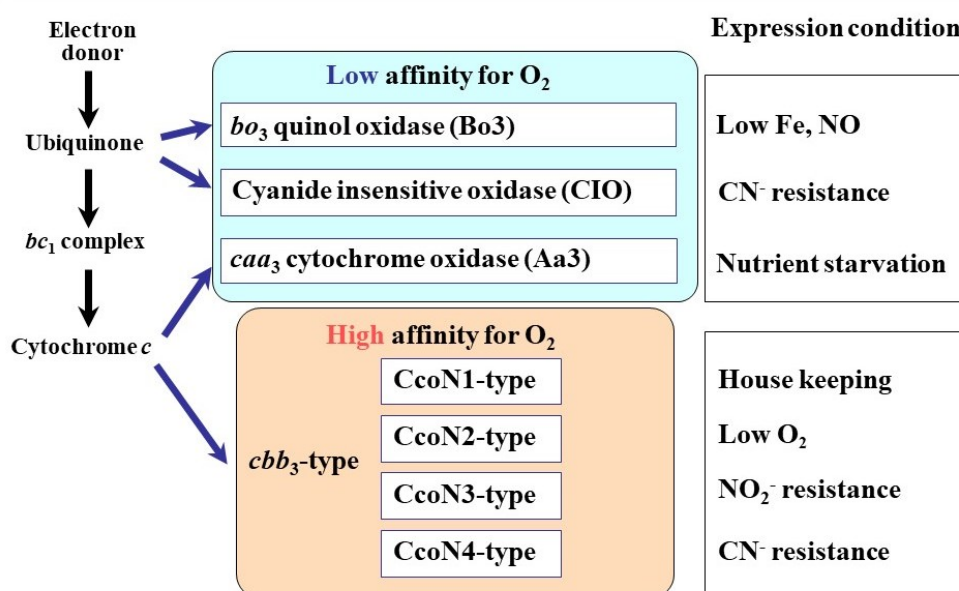


図 0-2 好気呼吸における末端酸化酵素の使い分け

矢印は電子の流れを表す。真ん中の列には酵素名を、右の四角形内には各酵素の発現条件を記した。緑膿菌の好気呼吸鎖は高度に分岐しており、環境に応じて異なる末端酸化酵素を発現して利用する。 cbb_3 型酵素は酸素高親和性、その他の酵素は酸素低親和性である。

第2項 緑膿菌の cbb_3 型 cytochrome *c* oxidase と病原性

cbb_3 型 cytochrome *c* oxidase (Cbb3) は、酸素高親和性の末端酸化酵素である。一般に cbb_3 型酵素の遺伝子はゲノム上に *ccoNOQP* オペロンとして存在する。CcoN、CcoO、CcoP はいずれもヘムタンパク質である。CcoN が酸素還元活性中心となり、CcoO と CcoP は cytochrome *c* から CcoN へと電子を供給する (図 0-3)。CcoQ は複合体のアセンブリに関わると考えられている。

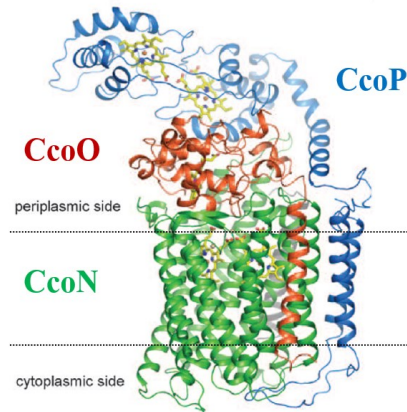


図 0-3 Cbb3 の構造 ((16)より改変して引用)

近縁種 *Pseudomonas stutzeri* の Cbb3 の結晶構造を示す。ヘムは stick モデルで表示されている。cytochrome *c* から CcoP、CcoO を経て CcoN の活性中心へ電子が伝達され则认为られている。点線は、便宜的に細胞膜のおおよその位置を示す。

Cbb3 は *Pseudomonadota* 門 (旧 *Proteobacteria* 門) の細菌を中心に分布し、一般に低酸素環境で働く酵素だと考えられている (17)。実際に微好気性細菌である *Helicobacter pylori* や *Campylobacter jejuni* が有すること (18) (19)、*Paracoccus denitrificans* や *Rhodobacter sphaeroides* において低酸素条件で発現すること (20) (21)、根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* において低酸素で発現し機能すること (22) (23) などが分かっている。しかし緑膿菌は Cbb3 を 4 タイプ持っており、そのうち 3 つは低酸素条件により誘導されるものではない (図 0-2)。緑膿菌が N1 タイプの Cbb3 を構成的に発現し、好気条件でも使用するということは大きな特徴だと言える。Cbb3 の構成的利用は酸素の積極的な消費につながるため、自ら微好気環境を作り出すという緑膿菌特有の生存戦略 (24)に関わっていると考えられる。

感染病巣の緑膿菌は、アルギン酸を主体とした粘性の多糖類 (ムコイド) を細胞外に蓄積する (25) (26) ことで悪名高い。こうして形成されたバイオフィルム内では、深部にいくほど急速に酸素濃度が下がる (7) (27)。このような微好気条件下において、緑膿菌は病原性物質であるエラスターゼなどを特に分泌する (24)。さらに、宿主の免疫細胞が産生する過酸化水素や、抗生物質などへの耐性が高まり (26) (28)、頑強に定着する。緑膿菌によるムコイド産生の要因のひとつが酸素である (29) ことから、緑膿菌は自ら積極的に微好気環境を作り出し、感染性・病原性を発揮する性質を持つと言える。

第 3 項 *cbb3* 型 cytochrome *c* oxidase の 4 タイプの特徴

N1 タイプ複合体と N2 タイプ複合体の遺伝子は、それぞれ *ccoN1O1Q1P1*、*ccoN2O2Q2P2* というオペロンとして存在する。前者は構成的に発現し、後者は低酸素下で誘導される。N3 タイプ複合体と N4 タイプ複合体の遺伝子は、それぞれ *ccoN3Q3* と *ccoN4Q4* の形で、それぞれオペロンの一部として存在する。この 2 つの遺伝子群は、複合体に必要な CcoO と CcoP の遺伝子を欠いているため orphan gene clusters と呼ばれる。しかし、これらは発現すると CcoO1 または CcoO2、CcoP1 または CcoP2 と複合体を形成し、

完全な Cbb3 として cytochrome *c* oxidase 活性を示す (図 0-4、(15))。

ccoN3Q3 は亜硝酸イオン (NO_2^-) 存在下で発現する。亜硝酸イオンは細胞毒性を持つ物質として知られており、緑膿菌においても、好気呼吸鎖の酵素が持つ Fe^{2+} を酸化することで反応を阻害する (30)。また微好気環境において、緑膿菌は好気呼吸と脱窒を併用することが知られている (31)(32)。脱窒の第一反応では硝酸イオンから亜硝酸イオンが生じるため、好気呼吸を維持するには、亜硝酸イオン耐性を持つ末端酸化酵素が求められる。実際に、亜硝酸イオンで誘導される N3 タイプの酵素は、N1 タイプ、N2 タイプの酵素と比べて亜硝酸イオンに対する耐性が高いことが示唆された (15)。このことから、N3 タイプの酵素は、微好気環境でのエネルギー獲得に重要な役割を担っていると考えられている。

ccoN4Q4 はシアン化物イオン存在下で発現する。シアン化物イオンはシアン化カリウム (青酸カリ) の成分としても知られ、heme-copper superfamily の呼吸鎖末端酸化酵素の働きを強く阻害する。緑膿菌は低酸素条件及び定常期にシアン化物イオンを自ら産生することが知られ、実験室条件の培養では線虫を殺すほどの高濃度で蓄積する (33)。緑膿菌が持つ N4 タイプの酵素は、N1 タイプ、N2 タイプの酵素と比べてシアン化物イオンに対する耐性が高い (15)。また、緑膿菌の quinol oxidase である CIO もシアン化物イオンで誘導され、シアン化物イオン耐性を持つ酵素であるが、酸素に対して低親和性である。そのため、宿主組織のような低酸素環境では、酸素高親和性の N4 タイプ酵素が重要な役割を持つと考えられている。

Expression condition

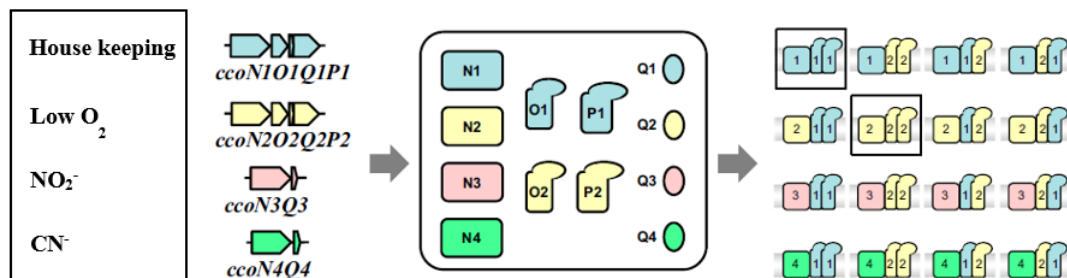


図 0-4 *cbb3* 型酵素 4 タイプの遺伝子構造と、複合体のアセンブリ ((15)より改変して引用)
左の四角形内に N1 タイプから N4 タイプの発現条件を、その横に遺伝子構造を記した。遺伝子はそれぞれ、*ccoN1O1Q1P1*、*ccoN2O2Q2P2*、*ccoN3Q3*、*ccoN4Q4* の形で存在する。よって理論上、CcoN が 4 種類、CcoO が 2 種類、CcoP が 2 種類存在し、*cbb3* 型酵素複合体は 16 通りの isoform が存在しうる。そのすべてが活性を持っていることが示された。N3 タイプと N4 タイプのサブユニットについては、発現すると CcoO1 または CcoO2、CcoP1 または CcoP2 と複合体を形成し、完全な *cbb3* 型酵素として活性を示す。

第 4 項 *ccoN3* オペロンの構成

Cbb3 の 4 タイプのうち、本研究では亜硝酸イオンで誘導される N3 タイプの遺伝子群に注目した。orphan gene cluster である *ccoN3Q3* の下流には、機能未知遺伝子 *PA1854* が存在している。この 3 つの遺

伝子はオペロンを構成し、隣接してコードされる亜硝酸イオン応答性アクチベータである NirY により制御されることが示されている(34) (図 0-5)。PA1854 は膜タンパク質であることが予想され、ラン藻の亜硝酸イオントランスポーターと相同である。このことから、PA1854 の亜硝酸イオンの輸送能に興味を持たれた。

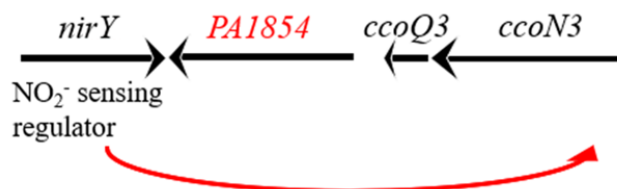


図 0-5 *ccoN3* オペロンの構造

亜硝酸イオン応答性のアクチベータ NirY により、*ccoN3* から *PA1854* までの発現が誘導される。

第 5 項 緑膿菌の嫌気呼吸

一方、嫌気条件では、硝酸イオンから分子状窒素 (N_2) までの 4 段階の還元反応と共役して酸化のリン酸化を行う (図 0-6、(35))。この反応は脱窒と呼ばれる。ただし第一反応のみ細胞内で行われ、その後の反応はペリプラズムで行われる。そのため、反応の進行には硝酸イオンの細胞内への取り込みと、亜硝酸イオンのペリプラズムへの排出が必要である。

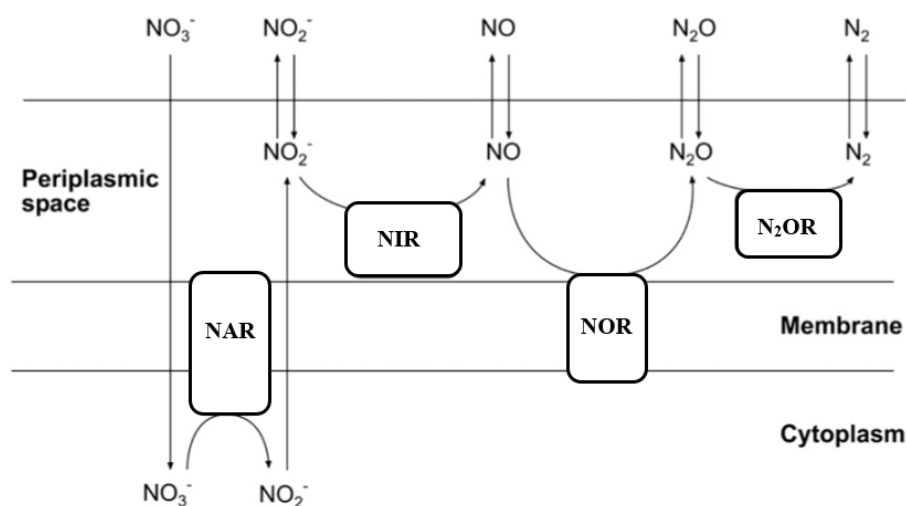


図 0-6 脱窒反応を触媒する酵素とその局在 ((35)より改変して引用)

NAR：硝酸還元酵素、NIR：亜硝酸還元酵素、NOR：一酸化窒素還元酵素、N₂OR：亜酸化窒素還元酵素。

図のような硝酸イオンから窒素分子への還元反応と共役し、膜内外にプロトン濃度勾配が形成される。ただし図ではプロトン排出系を省略している。脱窒の第一反応のみ細胞内で行われ、その後の反応はペリプラズムで行われる。そのため、硝酸イオンの細胞内への取り込みと、亜硝酸イオンのペリプラズムへの排出が必要となる。

以上のように、緑膿菌は高度に分岐した電子伝達鎖を持ち、環境に応じて使用する経路を調節することで、多様な条件下で呼吸を維持することが可能となっている。

第6項 緑膿菌の硝酸同化

脱窒は硝酸イオンの異化的な代謝であるが、緑膿菌は硝酸イオンの同化的な代謝も行う。すなわち、アンモニア制限下においては硝酸イオンを窒素源として生育する。硝酸イオンはトランスポーターである NasA を介して細胞内に取り込まれると考えられ、細胞質で亜硝酸イオン、アンモニウムイオン (NH_4^+) へと2段階の還元反応を受けた後に利用される（詳細は第3節第3項で述べる）。

第3節 緑膿菌のトランスポーター

第1項 トランスポーター概論

単細胞生物である緑膿菌にとって、細胞膜を介した物質の出し入れは critical な機構である。リン脂質からなる細胞膜は、親水性であるイオンを通さない。そのため、各イオン専用の輸送タンパク質が膜には多数埋まっている。一般に膜輸送タンパク質は、膜の内外をつなぐ通路を形成するチャンネルと、内と外のいずれかのみにアクセスした状態を反復するトランスポーターとに分けられる。このトランスポーターの輸送の仕組みは alternate access model と呼ばれる（図 0-7、(36)）。トランスポーターはその輸送形式によって3タイプに分類される（図 0-8）。すなわち、単一基質を輸送するユニポーター、二種以上の物質を同方向に輸送するシンポーター、二種以上の物質を逆方向に輸送するアンチポーターである。

基質の輸送には、膜内外の電気化学ポテンシャル勾配に従う受動輸送（passive transport）と、エネルギーを消費して勾配に逆らう能動輸送（active transport）が存在する。そして能動輸送は、エネルギー源として ATP を利用する primary active transport と、共輸送物質の電気化学ポテンシャル勾配を利用する secondary active transport とに区別される（37）。後者の例として、大腸菌の lactose/ H^+ シンポーター LacY による基質輸送がある。LacY は、電気化学的勾配に従った H^+ の輸送と共役させることで、濃度勾配に逆らった lactose の輸送を可能にする。

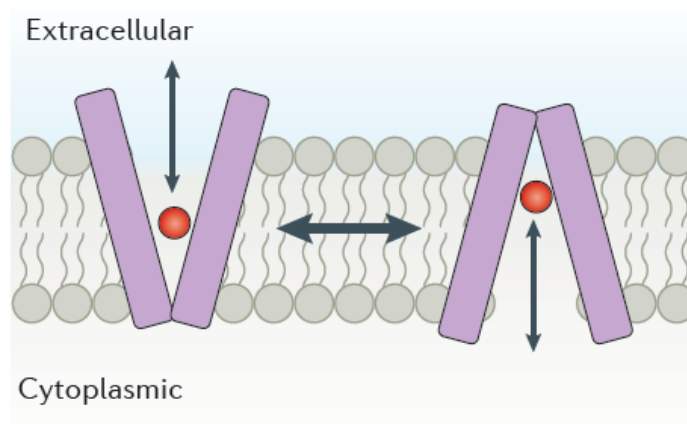


図 0-7 alternate access model の模式図 ((36)より引用)

細胞膜に通路を開くチャネルとは異なり、トランスポーターは基質結合部位がペリプラズムと細胞内のいずれかだけにアクセスした 2 種の構造に反復して切り替わることで基質を輸送する。これは alternate access model と呼ばれる。

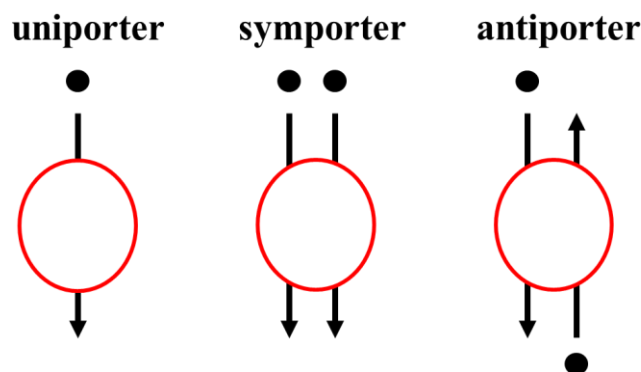


図 0-8 トランスポーターの輸送形式

赤い楕円はトランスポーター分子を、黒い点は基質を示す。トランスポーターは基質輸送の形式から、単一基質を輸送するユニポーター、二種以上の物質を同方向に輸送するシンポーター、二種以上の物質を逆方向に輸送するアンチポーターに分けられる。

第 2 項 薬剤ターゲットとしてのトランスポーター

膜輸送は様々な細胞機能を発現するための基盤となるため、膜輸送タンパク質は薬剤の標的分子となりうる。医学的な重要性から、緑膿菌の active transport 阻害剤についても研究がなされてきた。例えば、緑膿菌は 4 つの多剤排出トランスポーター系 (MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY) を持ち、高い薬剤耐性を示す。これら全てに対して阻害剤が発見されている (38) (39)。また、前述の硝酸同化トランスポーター NasA がバイオフィーム形成にはたらくという報告があり、この阻害剤の重要性も指摘されている (40)。バイオフィームの形成は、宿主の免疫機構から菌体を防御する機能を持つため

ある。この *nasA* 遺伝子について次項で述べる。

第3項 硝酸同化トランスポーター近傍の遺伝子構造

硝酸同化は以下のような流れで進行すると予想される。まずトランスポーターの NasA によって、硝酸イオンが細胞内に取り込まれる。そして硝酸還元酵素の PA1779 及び亜硝酸還元酵素の NirBD により、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンへと2段階の還元反応が起こる。

硝酸イオンをアンモニウムイオンまで還元するには8個の電子が必要であり、エネルギー的に高コストである。そのため、一般的にこの経路を持つ細菌では、関連遺伝子群の発現が厳密に制御されており(41)、緑膿菌も例外ではない。緑膿菌の硝酸同化遺伝子群の構造を示す(図0-9A、(42))。*nasA-PA1782*、*nirB-cobA* がそれぞれオペロンであると予想されている。後者の発現は、細胞内のアンモニア態窒素量を感知する系と、硝酸イオンを感知する系によって二重に制御されるというモデルが提唱されている(図0-9B、(42))。細胞内のアンモニア態窒素が減少すると、glutamine/2-ketoglutarate 比の低下として σ^{54} -NtrBC 系によって感知され(43)、nitrogen assimilation leader A (*nalA*) 内のプロモーターが活性化する。しかし硝酸イオン非存在下では、すぐ後ろのターミネーターで転写が終結してオペロンは最後まで発現しない。硝酸イオンを NasST 系が感知した場合のみ、アンチターミネーター活性によって、オペロンの完全な転写が誘導される(42)。

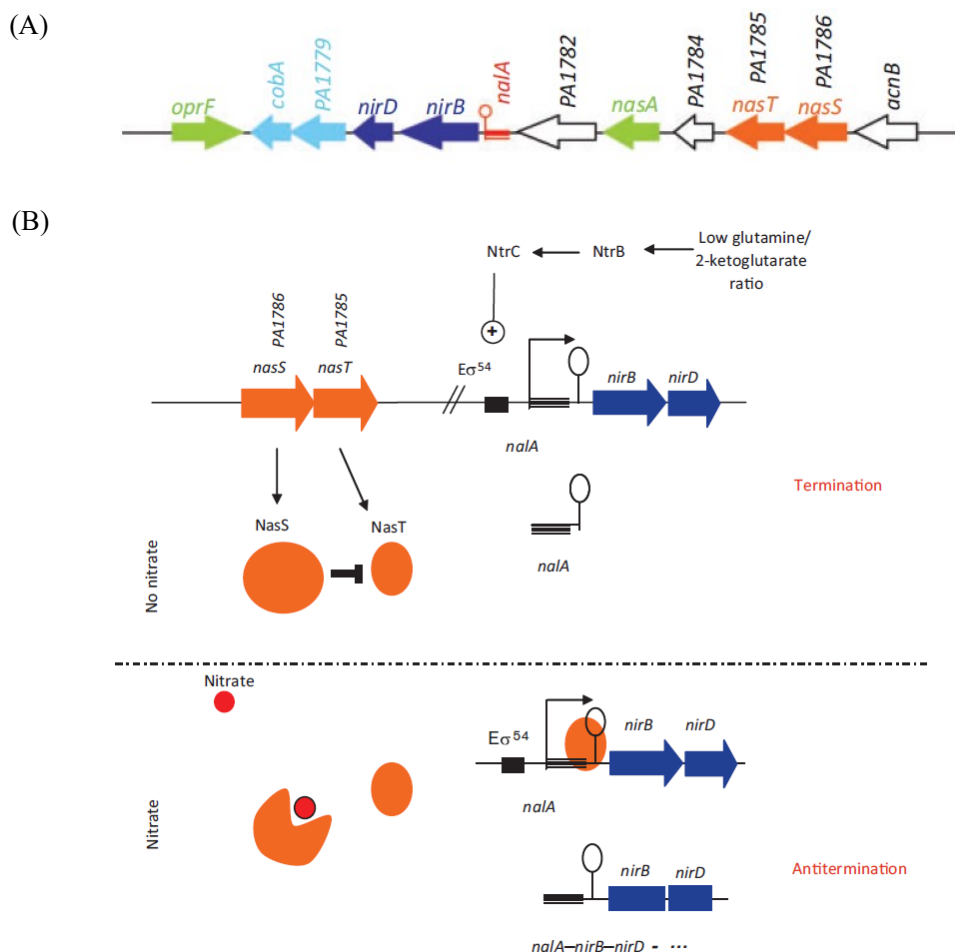


図 0-9 硝酸同化遺伝子群の構造と発現制御機構 ((42)より改変して引用)

(A) 硝酸同化遺伝子群の構造。NtrBC：硝酸感知系、NasA：硝酸イオントランスポーター、NirBD：亜硝酸還元酵素、PA1779：硝酸還元酵素。*nalA* 内には、*nirB-cobA* オペロンのプロモーターとターミネーターが存在するため、二重の制御機構がはたらく。ターミネーターの位置は円で示されている。

(B) *nirB-cobA* オペロンの発現制御モデル。細胞内のアンモニア態窒素が不足すると (“low glutamine signal”)、 σ^{54} -NtrBC 系により、*nalA* プロモーターが活性化する。しかし硝酸イオン非存在下では、すぐ後ろのターミネーターで転写が終結して、オペロンは発現しない (“Termination”)。硝酸イオンが存在する場合のみ、NasST 系が感知し、アンチターミネーター活性によりオペロンの完全な転写を誘導する (“Antitermination”)。

第 4 項 脱窒トランスポーター近傍の遺伝子構造

脱窒において、硝酸イオンは 4 段階の還元反応を経て分子状窒素となる。しかし、第一反応を触媒する硝酸還元酵素 (dissimilatory nitrate reductase, NAR) の活性中心が細胞内にある一方、第二反応以降の酵素の活性中心はペリプラズムに存在する (図 0-6)。そのため、反応の進行には細胞膜を介した硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの排出が必要である。緑膿菌ではトランスポーターとして、異化型硝酸還元酵素 NAR の遺伝子上流にコードされる NarK1 と NarK2 の片方あるいは両方が機能すると考えられている (図 0-10)。*narK1* と *narK2* は連続で配置しており、その後ろの NAR の遺伝子群 *narGHJI* と合わせて 1 つのオペロンを構成する。隣接してコードされる NarXL は低酸素下で誘導される二成分のレギュレーターであり、硝酸イオンを感知すると *narK1K2-narGHJI* オペロンの転写を活性化する (44)。

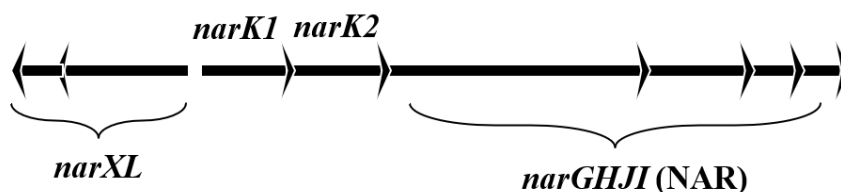


図 0-10 NAR オペロンの構造

低酸素下で発現する二成分レギュレーターの NarXL が、硝酸イオンを感知すると *narK1* 以下の発現を誘導する。

第 4 節 本研究の目的

緑膿菌の病原性には、呼吸の柔軟な制御とトランスポーターによる物質輸送が深く関わっており、トランスポーターは薬剤の標的分子としても期待される。生体におけるトランスポーターの機能を理解するためには、基質は何か、また、ユニポート、シンポート、アンチポートのいずれの仕組みであるか、という輸送機構を解明する必要がある。

本研究では、緑膿菌の環境遍在性に寄与している硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの膜輸送機構に注目

した（図 0-11）。第 1 章では、緑膿菌の硝酸代謝（脱窒と硝酸同化）に重要な硝酸イオン及び亜硝酸イオントランスポーターの輸送機構の解明を目指した。また、緑膿菌の好気呼吸に関わる *cbb*₃ 型 cytochrome *c* oxidase のうち、N3 タイプは毒性物質である亜硝酸イオン存在下で誘導される。そこで第 2 章ではまず、この *ccoN3Q3-PA1854* オペロンの発現について、先行研究の知見を受けた解析を行った。次に、機能未知の PA1854 は亜硝酸イオントランスポーターであるという仮説を立て、PA1854 の亜硝酸イオンの膜輸送機能を解析した。

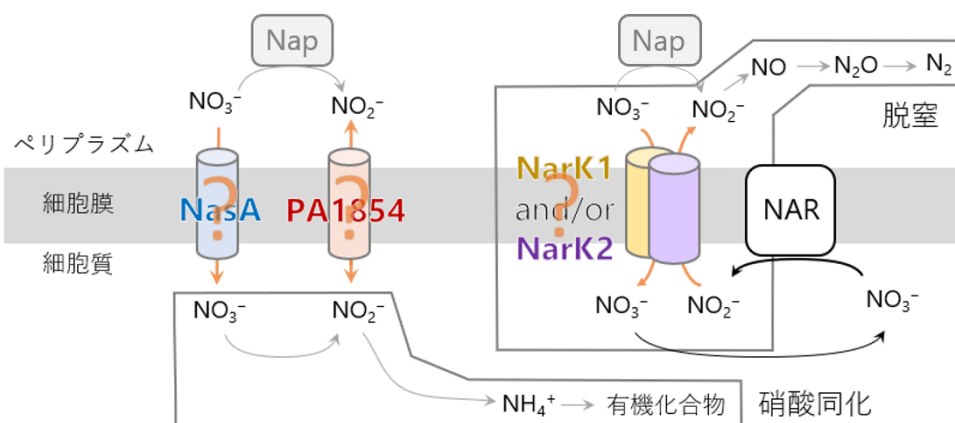


図 0-11 緑膿菌の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ の膜輸送機構の予想図

硝酸同化では NasA が硝酸イオンを取り込むと予想される。脱窒では NarK1 と NarK2 の片方あるいは両方が働き、硝酸イオンの取り込み／亜硝酸イオンの排出が行われると予想される。また、N3 タイプ cytochrome *c* oxidase のオペロン上にコードされる PA1854 は、亜硝酸イオントランスポーターの可能性はあるが、その機能や輸送方向は未知である。

【材料と方法】

〈菌株〉

本研究で使用した菌株を表 0-1 に示す。野生株として、緑膿菌の reference strain のひとつである PAO1 株 (45) に由来する MPAO1 株 (46) または PAO1-ut 株 (12) を用いた。MPAO1 はワシントン大のトランスポゾン変異株ライブラリーの株であり、PAO1-ut は当研究室（東京大学応用微生物学研究室）において継代培養されてきた株である。以後、この 2 株を wild type (WT) と表記する。

表 0-1 本研究で使用した菌株

Strains	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
JM109	Host strain for DNA manipulation	(47)
S17-1	Strain for DNA transfer by conjugation	(48)
DH5α	Host strain for DNA manipulation	(49)
HB101	Host strain for DNA manipulation	(49)
<i>P. aeruginosa</i>		
MPAO1	wild type strain PAO1 (WT)	(46)
PAO1-ut	wild type strain PAO1 (WT)	(12)
WT+空ベクター	MPAO1 retaining pMMB67EH	This work
$\Delta nasA$	MPAO1 <i>nasA</i> mutant	This work
$\Delta nasA+nasA$	$\Delta nasA$ complemented with <i>nasA</i> by Tn7	This work
$\Delta narK1K2$	MPAO1 <i>narK1K2</i> mutant	This work
$\Delta narK1K2$ +空ベクター	$\Delta narK1K2$ retaining pMMB67EH	This work
$\Delta narK1K2$ +p- <i>narK1</i>	$\Delta narK1K2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK1</i>	This work
$\Delta narK1K2$ +p- <i>narK2</i>	$\Delta narK1K2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i>	This work
$\Delta narK1K2$ +p- <i>narK1K2</i>	$\Delta narK1K2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK1K2</i>	This work
$\Delta narK1K2$ +p- <i>narK1</i> *- <i>K2</i> *	$\Delta narK1K2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK1</i> ^{R62L} - <i>narK2</i> ^{R91L}	This work
$\Delta narK1K2$ +p- <i>narK1</i> *- <i>K2</i>	$\Delta narK1K2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK1</i> ^{R62L} - <i>narK2</i>	This work
$\Delta PA1854$	MPAO1 <i>PA1854</i> mutant	(34)
$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$ ($\Delta 4$)	MPAO1 <i>nasA narK1K2 nap PA1854</i> quadruple mutant	This work
$\Delta 4+nasA$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work

	complemented with <i>nasA</i> by Tn7	
$\Delta 4+narK1$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented with <i>narK1</i> by Tn7	
$\Delta 4+narK2$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented with <i>narK2</i> by Tn7	
$\Delta 4+PA1854$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented with <i>PA1854</i> by Tn7	
$\Delta 4+narK2$ +空ベクター	$\Delta 4+narK2$ retaining pMMB67EH	This work
$\Delta 4+narK2$ +p- <i>narK2</i>	$\Delta 4+narK2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i>	This work
$\Delta 4+narK2$ +p- <i>narK1</i>	$\Delta 4+narK2$ complemented by pMMB67EH- <i>narK1</i>	This work
$\Delta 4+narK2$ +p- <i>narGHJI</i>	$\Delta 4+narK2$ complemented by pMMB67EH- <i>narGHJI</i>	This work
$\Delta 4+p-narK2^{R91L}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R91L}	
$\Delta 4+p-narK2^{F269L}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R269L}	
$\Delta 4+p-narK2^{F269V}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R269V}	
$\Delta 4+p-narK2^{F269T}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R269T}	
$\Delta 4+p-narK2^{F269C}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R269C}	
$\Delta 4+p-narK2^{F269A}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R269A}	
$\Delta 4+p-narK2^{F269S}$	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented by pMMB67EH- <i>narK2</i> ^{R269S}	
$\Delta 4+nasA$ +p- <i>narK2</i>	$\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$	This work
	complemented with <i>nasA</i> by Tn7 and with pMMB67EH- <i>narK2</i>	
$\Delta nirY$	PAO1-ut <i>nirY</i> mutant	Unpublished

$\Delta nirS$	MPAO1 <i>nirS</i> mutant	This work
$\Delta PA1854\Delta nirS$	MPAO1 <i>PA1854 nirS</i> mutant	This work

〈培地〉

本研究で使用した培地の組成を表 0-2 に示す。本研究では、Lurina-Bertani (LB) 培地または窒素源非添加の Vogel and Bonner (VB) 合成培地を用いた。LB 培地 (nacalai tesque、NIPPON Genetics) は大腸菌及び緑膿菌の富栄養培地として用いた。VB 培地は、Vogel と Bonner による組成 (50) を Kerschen らが改変したもの (51) を参考にし、栄養制限培地として用いた。VB 培地は pH 7.0-pH 9.6 の範囲で調製した。VB 培地については pH を以下のように併記する：pH 7.0 の VB 培地→VB7.0、pH 8.2 の VB 培地→VB8.2、など。

表 0-2 本研究で使用した培地

LB (/L)		VB (N 源なし) (/L)	
Tryptone	10 g	K ₂ HPO ₄	10.0 g
Yeast Extract	5 g	NaH ₂ PO ₄	3.5 g
NaCl	10 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
		Trisodium citrate dihydrate	4.0 g
		Glucose	5.0 g
		pH 7.0, 8.0, 8.2 or 9.6 (adjusted by KOH)	

必要に応じて、培地に以下の化学物質を添加した。Ampicillin (Ap): 100-110 µg/ml、Gentamycin (Gm): 30-37.5 µg/ml、Carbenicillin (Cb): 300-390 µg/ml、Tetracycline (Tc): 150 µg/ml、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) : 0.5-1.0 mM、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES)、N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES)、NaNO₃、NaNO₂。

〈培養条件〉

大腸菌及び緑膿菌は、断りが無い限り全て 37°C で往復振とう培養した。生育試験以外の培養では、-80°C で保存している 20% glycerol stock から、大腸菌は爪楊枝で掻いたものを、緑膿菌は約 7-10 µl を 2-6 mL の培地に接種し、ステンレスキャップをして 200 rpm で振とう培養した。

生育試験の前培養では、LB 培地 3 mL を試験管に入れ、-80°C で保存している緑膿菌の 20% glycerol stock を 5-30 µl 植菌し、ステンレスキャップをして 200 rpm で約 16 時間振とうした。本培養では、培地 5 mL と添加物質を試験管に入れ、基本的には初発 OD₆₀₀ = 0.04 となるように植菌した。ただし一部の実験では、前培養液からの植菌量を 1-2% (v/v) とした。好気培養は、リム付試験管 (φ18×180 mm、AGC) にシリコ栓をして、200 rpm で行った。嫌気培養は、同様の試験管をブチルゴム栓で密封し、気相をアルゴン

ガス（純度 > 99.999 vol%）で置換して、150 or 200 rpm で行った。

〈濁度測定〉

本培養開始時の濁度を 0.04 に揃えるため、植菌する菌液の濁度を V-630 Bio Spectrophotometer (JASCO) により測定した。本培養中の濁度は、振とうしながらの測定が可能な OD-monitor C & T (TAITEC) を使用し、1 時間おきまたは 30 分おきに測定した。

〈プラスミド〉

本研究で使用したプラスミドを表 0-3 に示す。形質転換体培養液からのプラスミド抽出には、FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics) または GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いた。方法は付属のプロトコルに従った。

表 0-3: 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pMMB67EH	IncQ, expression vector; Ap ^r , Cb ^r	(52)
pMMB67EH-narK1	plasmid for <i>narK1</i> expression, a derivative of pMMB67EH	This work
pMMB67EH-narK2	plasmid for <i>narK2</i> expression, a derivative of pMMB67EH	This work
pMMB67EH-narK1K2	plasmid for <i>narK1K2</i> expression, a derivative of pMMB67EH	This work
pMMB67EH-narGHJI	plasmid for <i>narGHJI</i> expression, a derivative of pMMB67EH	This work
pEX18Ap	gene replacement vector with MCS from pUC18; Ap ^r , Cb ^r , <i>oriT</i> ⁺ , <i>sacB</i> ⁺	(53)
pEX18Ap-narK1K2	plasmid for <i>narK1K2</i> mutation, a derivative of pEX18Ap	This work
pEX18Ap-nasA	plasmid for <i>nasA</i> mutation, a derivative of pEX18Ap	This work
pEX18Ap-nap	plasmid for <i>nap</i> mutation, a derivative of pEX18Ap	This work
pEX18Ap-PA1854	plasmid for <i>PA1854</i> mutation, a derivative of pEX18Ap	This work
pTNS2	RK6 replicon; encodes the TnsABC+D specific transposition pathway; Ap ^r	(54)
pRK2013	ColE1 replicon; containing RK2 transfer region; Km ^r	(55)
pFLP2	Flp recombinase-expressing plasmid; Ap ^r	(53)
pUC18-mini-Tn7T-LAC	mini-Tn7T; Ap ^r , Gm ^r	(56)
pUC18-mini-Tn7T-LAC-narK1	plasmid for <i>narK1</i> complementation, a derivative of pUC18-mini-Tn7T-LAC	This work
pUC18-mini-Tn7T-LAC-narK2	plasmid for <i>narK2</i> complementation, a derivative of pUC18-mini-Tn7T-LAC	This work
pUC18-mini-Tn7T-	plasmid for <i>nasA</i> complementation, a derivative of pUC18-	This work

LAC-nasA	mini-Tn7T-LAC	
pUC18-mini-Tn7T-LAC-PA1854	plasmid for <i>PA1854</i> complementation, a derivative of pUC18-mini-Tn7T-LAC	This work
pHA488	<i>nirS::tet</i> on pUC119	(57)

〈エタノール沈殿〉

エレクトロポレーションに用いるプラスミドは、抽出後にエタノール沈殿により濃縮してから使用した。抽出したプラスミド溶液に 2.5 倍容量の 99%エタノールと 1/10 倍容量の 3M 酢酸ナトリウムバッファー (pH5.2) を加え、-20℃で 10 分間静置した。その液を 4℃、14000 rpm、20 分間遠心した。上清を捨て、1 ml の 70%エタノールを静かに加え、4℃、14000 rpm、5 分間遠心した。上清を捨て、遠心式濃縮器 VC-15S (TAITEC) により、加熱しながら遠心して乾燥させた。その後、当初のプラスミド液の 1/10 倍または 1/20 倍容量の水でピペッティングして溶かした。

〈ゲノム DNA 抽出〉

緑膿菌からのゲノム DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いた。方法は製品のプロトコルに従った。

〈Polymerase chain reaction (PCR)〉

本研究で使用したプライマーを表 0-4 に示す。DNA polymerase には、Ex Taq (Takara)、Prime STAR Max (Takara)、KOD plus NEO (TOYOBO)を用いた。反応液組成、反応温度は各製品のプロトコルに従った。PCR の温度制御にはサーマルサイクラー PC707 または PC818 (ともに ASTEC)を用いた。PCR 断片は 1%アガロースゲルを用いた電気泳動により確認した。GeneClean Kit (Funakoshi)をゲルから切り出した DNA の精製に用いた。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)または QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を、ゲルから切り出した DNA の精製及び PCR 産物の脱塩、精製に用いた。

表 0-4 本研究で使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3', <u>restriction site</u>)	Restriction enzyme
dnaA1	TGC CAC GTG AAG AGC TGC CG	
dnaA2	AGC GCA CCT TCG ACC TGG AC	
M13 Forward Primer	GTAAA ACGAC GGCCA GT	
dnarK12_A(BamHI)	GCA <u>GGA TCC</u> GGG TCG GCT TGA ACG CGC	BamHI
dnarK12_B	GTG CAG AGA GTT TAG CCA TGA GTC ACC TGC TCG ACC GCC TGC AG	
dnarK12_C	GGT CGA GCA GGT GAC TCA TGG CTA AAC TCT CTG CAC GGA CAG C	
dnarK12_D(HinfIII)	TCG <u>AAA GCT</u> TTC TCC AAC TGG TTC AGC	HinfIII

DnasA_A(BamHI)	GCC <u>GGG ATC</u> CAG CAG GCG CAG CTC GCC G	BamHI
DnasA_B	TCC GCT GGA TAC GAG GTG TTC GGT GGT CAC CCC GGC GCC GGC CCT GG	
DnasA_C	GCC GGC GCC GGG GTG ACC ACC GAA CAC CTC GTA TC C AGC GGA ATC G	
DnasA_D(HindIII)	CTG <u>GAA GCT</u> TAC CAT TCC CAC CGA AC	HindIII
Dnap_A	GGC <u>GAA GCT</u> TGC CCA GCA CGA CAA GCT G	HindIII
Dnap_B	CGA CCA GGG ACG CGT CAA GGG GAT CGC CCA CCA CC T GCC G	
Dnap_C	CAG GTG GTG GGC GAT CCC CTT GAC GCG TCC CTG GTC GGG TTG	
Dnap_D	TCG CTG ACC <u>CGG TAG</u> AGG GCT TCC TCG	KpnI
DnarK12_S1	ACG ATG CTG GCC CAG GCG TTC AC	
DnasA_S1	CGT CGC TGA CCA GTA GCC ACT G	
Dnap_S1	CTG GTG GCG TCC TGG CCG ACC G	
Dnap_S2	CGA CGC GCT GGT CTA CAT GC	
nap_S3	GTC GGA GAT GTT CTC GTA GG	
PAnarK1_check1	GAT CCT CAC CGG CTC CCT GGT G	
PAnarK1_check2	CAT GCA GAC CAC GGT CAG GCC G	
PAnarK2_check1	CGC CTT CGC CGT GTG GAT GAT C	
PAnarK2_check2	CCC ACT CGT TGC GGA AGA TCA C	
narK2_check3	TCG GCA CCA TGA ACG AAT AG	
narK2_check4	TAC GCG CTG ATG ATC GGC GG	
PAnasA_check1	TCA TGG TCT GGT ACG TGC TCG G	
PAnasA_check2	CAC AGG CCG AGC TGG TAG TCG C	
PA1854_check1	GGT GCT GCA GCC AGT TGC GGT AG	
PA1854_check2	CTC CCC CAG CAC CGC CGT ACG C	
narK1K2_F1	ATA GGA ATT CCT TCC CTA GGC TCT CGC	
narK1K2_R1	TAC AAA GCT TAT CAG AGG TTG CCG CGG G	
narG_F(XbaI)	CCG GTC TAG ACC GGG TGA GGA GAT CAA G	
narG_R(HindIII)	CGT CAA GCT TCA AAT GTC CTG GGG CAG C	
narI_R(HindIII)	GCC CAA GCT TCA GGC AGG ACG TTT CTG AC	
narI_checkF	AAG TGG CGC ACA TCC TCG GCC	
ccoN3_C	GCA <u>TAA GCT</u> TCG CGA CGA CCC GAT CCT G	HindIII
ccoN3_F(EcoRI)	GAG <u>GGA ATT</u> CCC GGC CAC GCC GTG CGG G	EcoRI
glmSA	AGG CCT TCA CCA CCC AGT TG	
Tn7R	CCA CGC CCC TCT TTA ATA CG	
Tn7_LAC_F1	TTC TGA AAT GAG CTG TTG AC	

Tn7_LAC_R1	TAG CGT CGT AAG CTA ATA CG	
narK1R1L_checkF	TCC TGC CGC TGG GCC TGA TC	
narK1R1L_checkR	AGC AGG GTG GCG CCG GAG A	
K1R1Lout_F	CTG GTG CTC CTG CCG CTG GGC CTG ATC	
K1R1Lout_R	CGG CAG GAG CAC CAG GGA GCC GGT GAG	
K2R1Lout_F	ACC CTG CTG GTG TTC TAT TCG TTC ATG	
K2R1Lout_R	GAA CAC CAG CAG GGT GGC GCC GGA GAT	
narG_F(XbaI)	CCG <u>GTC TAG ACC</u> GGG TGA GGA GAT CAA G	XbaI
narI_R(HindIII)	GCC <u>CAA GCT TCA</u> GGC AGG ACG TTT CTG AC	HindIII
narK2F2L_F	GCC ACC CTC GGC TCG TTC ATC GGC TTC TCG GCC	
narK2F2L_R	CGA GCC GAG GGT GGC CAC GTA CAG CCA GCA CAT	
narK2F2V_F	GCC ACC GTC GGC TCG TTC ATC GGC TTC TCG GCC	
narK2F2V_R	CGA GCC GAC GGT GGC CAC GTA CAG CCA GCA CAT	
narK2F2T_F	GCC ACC ACC GGC TCG TTC ATC GGC TTC TCG GCC	
narK2F2T_R	CGA GCC GGT GGT GGC CAC GTA CAG CCA GCA CAT	
narK2F2C_F	GCC ACC TGC GGC TCG TTC ATC GGC TTC TCG GCC	
narK2F2C_R	CGA GCC GCA GGT GGC CAC GTA CAG CCA GCA CAT	
narK2F2A_F	GCC ACC GCC GGC TCG TTC ATC GGC TTC TCG GCC	
narK2F2A_R	CGA GCC GGC GGT GGC CAC GTA CAG CCA GCA CAT	
narK2F2S_F	GCC ACC TCC GGC TCG TTC ATC GGC TTC TCG GCC	
narK2F2S_R	CGA GCC GGA GGT GGC CAC GTA CAG CCA GCA CAT	
nirY_RT	[PHO] GGC AGC AAT GCG TGG	
nirY_A1	ACA ACG CGC TGC CGC CGA AGG	
nirY_A2	TCA CCA GGC TGC AGT GGA TCG G	
nirY_S1	TGG TGC AGC GCA CCA GCG G	
nirY_S2	GGC TGA TCT CCG CGG CCC TGG	
PAnirS_check1	CGT CGT GCT GGG TGT TGT AGA CG	
PAnirS_check2	GCC ATT TGG CAA GCC ACT GGT GG	

〈遺伝子破壊株の作製〉

緑膿菌の遺伝子破壊は、接合伝達またはエレクトロポレーションによりプラスミドを細胞内に輸送し、染色体 DNA との間で相同組換えを起こさせることにより行った。その作業過程を図 0-12 に示す。まずゲノム DNA を鋳型とした PCR により、目的領域の上流及び下流の DNA 断片約 1-6 kbp を増幅した。その際、遺伝子全長を in-frame で欠失するようにプライマーを設計した。増幅した DNA 断片を pEX18Ap に組み込み、大腸菌コンピテントセル ECOS Competent *E.coli* JM109（ニッポン・ジーン）をプロトコルに従い形質転換した。Ap 入り LB 寒天培地に生えたコロニーを形質転換体として選抜した。形質転換体からプラスミドを抽出し、シーケンシングを行うことで、プラスミドに挿入した配列にエラーがない

ことを確認した。

(a) 接合伝達

上で抽出されたプラスミドを使用し、当研究室で作製された大腸菌 S17-1 または S17-1 (λ *pir*) のコンピテントセルを、JM109 と同様の方法で形質転換した。二親接合を行うため、S17-1 形質転換体と緑膿菌の親株をそれぞれ LB 培地で一晚培養した。LB 寒天培地上の MEMBRANE FILTER (MIXED CELLULOSE ESTER、孔径 0.2 μ m) (ADVANTEC) に S17-1 と緑膿菌を載せ、37°C で一晚インキュベートした。翌日、フィルターから菌体を LB 培地 1 ml に懸濁し、Cb 入りの Difco *Pseudomonas* Isolation Agar (BD Biosciences) 培地に塗布した。このプレートに生えてきた一点交叉体を LB 培地で一晚培養し、10 % スクロース入り LB 寒天培地に塗布した。この培地では自殺遺伝子 *sacB* を持つ一点交叉体は生えない。このプレートに生えてきたコロニーから、PCR で二点交叉体を選抜した。

(b) エレクトロポレーション

JM109 の形質転換体から抽出したプラスミドを、エタノール沈殿法により濃縮した。緑膿菌の親株を 6 ml の LB 培地で一晚培養し、4 ml の Wash buffer (300 mM スクロース、1 mM $MgCl_2$) で 2 度洗浄した後、上清を捨て、残った約 120 μ l の液に懸濁した。この菌液に 10 倍濃縮のプラスミドを約 2 μ l 加え、Gene Pulser (BIO RAD) により、2500 V、25 μ F、200 Ω 、2 mm の設定でエレクトロポレーションした。この菌液を LB 培地 1 ml に懸濁し、一晚培養した。翌日、Cb 入り LB 寒天培地に塗布した。このプレートに生えてきたコロニーを一点交叉体として選抜し、後は(a)と同様の操作を行った。

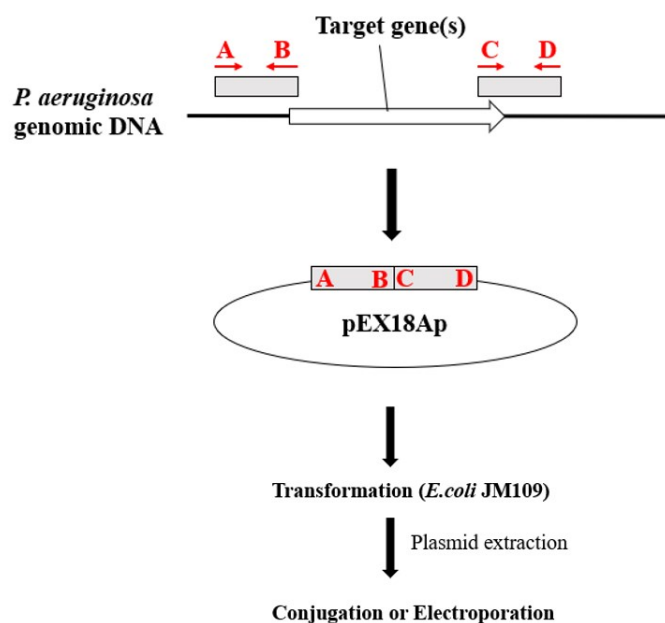


図 0-12 遺伝子破壊用プラスミドの構築

遺伝子破壊用プラスミドの構築に当たっては、標的遺伝子上流及び下流の遺伝子を PCR で増幅し、制限酵素により pEX18Ap に組み込んだ。PCR には 4 種のプライマー「d(D)遺伝子名_A/B/C/D」を使用した。

このプラスミドを用いて、大腸菌 JM109 を形質転換した後プラスミドを抽出し、シーケンス解析により配列にエラーがないことを確認した。その後、接合伝達またはエレクトロポレーションにより、緑膿菌に導入した。

〈Tn7 を利用したゲノム DNA への遺伝子導入〉

緑膿菌の相補株作製は、後で述べるプラスミド相補株を除いて、遺伝子を pUC18-mini-Tn7T-LAC の *lac* プロモーター下流に組み込み、Tn7 によりゲノム DNA へ位置特異的に挿入することで行った (図 0-13)。なお、後にタンパク質を精製して解析できるように、相補遺伝子は、翻訳産物の C 末に 6×His タグ (His タグ) が付与されるように設計した。緑膿菌へのプラスミド導入は、接合伝達またはエレクトロポレーションで行った。当研究室で作製された大腸菌の形質転換体 DH5α (pTNS2 を保持、transposase をコードするプラスミド) と HB101 (pRK2013 を保持、pUC18-mini-Tn7T-LAC の緑膿菌細胞への移行のためのヘルパープラスミド) を使用した。

(a) 接合伝達

上記の〈遺伝子破壊株の作製〉(a)と同様の方法で行った。ただし、緑膿菌の親株と JM109 (目的の遺伝子を組み込んだ pUC18-mini-Tn7T-LAC を保持)、DH5α (pTNS2)、HB101 (pRK2013) を使用した四親接合とした。また、選択培地には Gm 入り *Pseudomonas* Isolation Agar 培地を使用した。このプレートに生えてきたコロニーから、PCR で相補株を選抜した。

(b) エレクトロポレーション

JM109 (目的の遺伝子を組み込んだ pUC18-mini-Tn7T-LAC)、DH5α (pTNS2) からプラスミドをそれぞれ抽出した。エタノール沈殿により、目的の遺伝子を組み込んだ pUC18-mini-Tn7T-LAC は 10 倍に、pTNS2 は 20 倍に濃縮した。これらのプラスミドを用いて、上記の「遺伝子破壊株の作製」(b)と同様の方法でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後の菌液は、LB 培地 1 ml に懸濁して 1-2 時間ほど培養した後、Gm 入り LB 寒天培地に塗布した。このプレートに生えてきたコロニーから、PCR で相補株を選抜した。

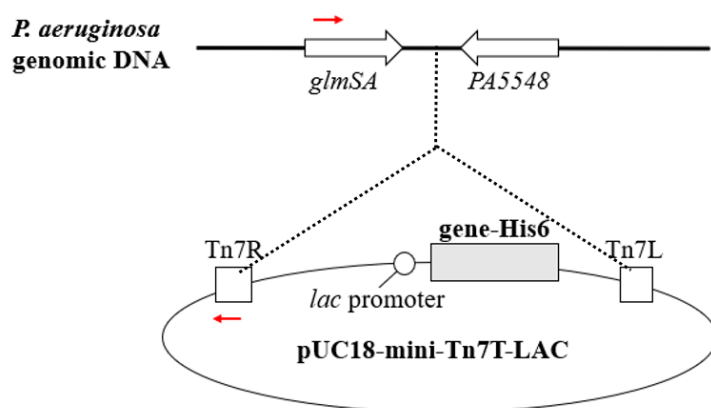


図 0-13 Tn7 を利用したゲノム DNA への遺伝子挿入

翻訳産物の C 末に His タグが付与されるよう設計した遺伝子配列を、pUC18-mini-Tn7T-LAC の *lac* プロモーター下流に組み込んだ。このプラスミドを、接合伝達またはエレクトロポレーションにより緑膿菌に組み込んだ。プラスミドの Tn7R-Tn7L 間の配列が位置特異的に緑膿菌ゲノム DNA に挿入される。標的遺伝子がゲノム DNA に挿入されたことは、プライマーの組「glmSA/Tn7R（上図の赤矢印）」及び、各遺伝子の特異配列を持つプライマーの組「遺伝子名_check1/2」を用いた PCR により、二重に確認した。

〈プラスミドによる遺伝子相補株の作製〉

緑膿菌の発現プラスミド pMMB67EH に標的遺伝子を組み込み（図 0-14）、プラスミドで相補遺伝子を発現する株を作製した。相補プラスミドはエレクトロポレーションにより緑膿菌に導入した。相補株は Cb 入りの LB 寒天培地で選抜し、PCR により目的遺伝子の保持を確認した。pMMB67EH は *lac* プロモーターを持つため、プラスミド相補株を用いた生育試験においても、IPTG により相補遺伝子を発現誘導した。

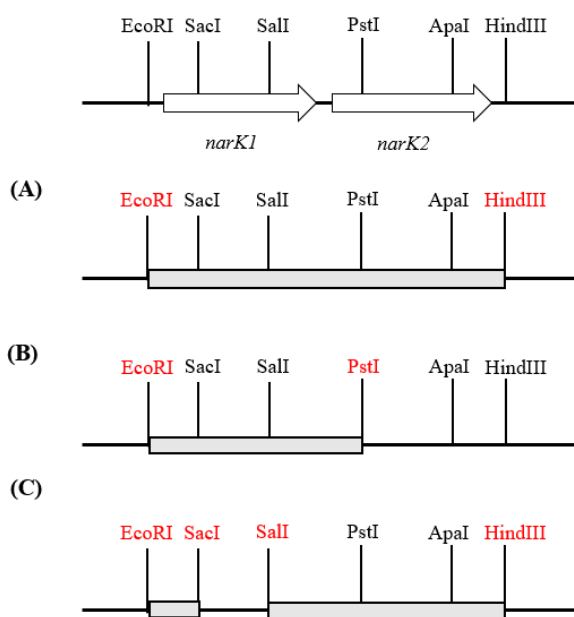


図 0-14 *narK1K2/narK1/narK2* 相補プラスミドの構築

最上段は緑膿菌ゲノム上の *narK1K2* 遺伝子と制限酵素サイトの模式図である。(A) *narK1K2* 相補、(B) *narK1* 相補、(C) *narK2* 相補となるように、制限酵素を選択して処理し、pMMB67EH に標的遺伝子を組み込んだ。それぞれの場合に使用した制限酵素を赤字で示した。(A) *narK1K2* 相補では、EcoRI-HindIII の PCR 断片を pMMB67EH の EcoRI-HindIII サイトに挿入した。(B) *narK1* 相補では、*narK1K2* 相補プラスミドの EcoRI-PstI 断片を、pMMB67EH の EcoRI-PstI サイトに入れ直した。(C) *narK2* 相補では、*narK1K2* 相補プラスミドを SacI と SalI で切断し、blunt end にしてから再結合することで、SacI-SalI 領域を取り除いた。

〈pMMB67EH-*narK1**-K2 相補株の作製〉

機能に必須な Arg 残基を Leu に置換した *narK1*^{R62L}-*narK2*^{R91L} の DNA 作製は、人工合成遺伝子作製サービス GENEART (Thermo Fisher)を利用した。以後これらの配列を、遺伝子名の右肩に*を付けた形で表記する。pMMB67EH-*narK1K2* と納品された pUK-*narK1**-*narK2** をそれぞれ制限酵素で切断してライゲーションすることで、pMMB67EH-*narK1**-K2*、pMMB67EH-*narK1**-K2 を得た。制限酵素はそれぞれ SacI と XhoI、SacI と SalI を使用した。狙い通りの変異が入り、他の変異が無いことをシーケンシングにより確認した。

〈細胞の破碎〉

(a) 超音波

1.5 mL チューブに 300 μ L ほど菌液を分注し、BIORUPTOR (COSMO BIO)により氷浴しながら超音波をかけた。

(b) フレンチプレス

培養液から遠心分離して得た菌体ペレットを 14-16 mL の 20 mM Tris-HCl (pH7.5)または 25 mM HEPES-NaOH (pH 7.0)バッファーに懸濁し、フレンチプレス FA-078 (Aminco)で約 4000 lb/in² (psi)の圧力をかけることを 3-6 回繰り返した。

〈膜画分の調製〉

1. 菌の培養

緑膿菌を 2 mL の LB 培地で一晚培養した。好気培養では、この前培養液を 500 mL 容量三角フラスコに調製した LB 培地 200 mL に全量 (1%) 植菌し、100 mM IPTG 2 mL (1 mM)を加えた。シリコ栓をして 37°C、150 rpm で一晚培養した後集菌した。嫌気培養では、500 mL 容量枝付き三角フラスコに LB+40 mM NaNO₃ 培地 200 mL を調製し、同様に前培養液と IPTG を加えた。大きな方の口にシリコンゴム栓を、枝の口にブチル栓をして 37°C、150 rpm で一晚培養した。Ar ガスで気相を置換し、さらに 24 時間培養した後集菌した。なおプラスミド相補株の培養では、前培養と本培養の両方において培地に Cb を 300 μ g/mL となるように加えた。

2. 膜画分の調製

フレンチプレスで得た細胞破碎液を 4°C、12,000 rpm、15 分遠心し未破碎菌体を除去した。この試料を 4°C、30,000 rpm、60 分間超遠心し、沈殿を懸濁バッファー (0.5 mM EDTA、10% glycerol、20 mM Tris/HCl (pH 7.5)) に懸濁して膜画分とした。懸濁に当たっては、タンパク質濃度が約 1-3 mg/mL の範囲になるようにした。

〈タンパク質定量〉

試料中のタンパク質濃度の測定には、Bradford 法または BCA 法を用いた。試料は 3 連、スタンダードとしての Bovine Serum Albumin は 2 連で測定した。

(a) Bradford 法

タンパク質定量法として、基本的には BIO-RAD の Bradford 法キットを用いた。96 穴マイクロプレー

トに適宜希釈した試料 10 μ L を加え、発色試薬 200 μ L を混合した。室温で約 5 分静置した後 595 nm の吸光度を測定した。

(b) BCA 法

界面活性剤が入っている試料に対しては、TaKaRa BCA Protein Assay Kit を用いた。96 穴マイクロプレートに希釈した試料 100 μ L を加え、発色試薬 100 μ L を混合した。37°C で 65 分静置した後 562 nm の吸光度を測定した。

〈NAR 活性測定〉

異化型硝酸還元酵素 (NAR) の活性は、菌体の crude extract に硝酸塩を加え、一定時間で生成した亜硝酸イオンの量を測定することにより行った。反応液は Kameya らの組成 (58) を参考にした。

1. Crude extract の作製

LB 培地に緑膿菌を植菌し、好気、37°C で 24 時間前培養した。50 mL 容量バイアルに LB+20 mM NaNO₃ 20 mL を調製し、100 mM IPTG 200 μ L (終濃度 1 mM) と前培養液 200 μ L (1%) を加えた。37°C、150 rpm で 16 時間培養した後、2% O₂ で気相を置換した。さらに 37°C、150 rpm で 24 時間培養し、遠心して菌体ペレットを得た。

菌体ペレットをリン酸ナトリウムバッファ (pH 7.2) に懸濁し、上記の「超音波」項目の記述に従い細胞を破碎した。未破碎菌体を除くため、15,000 rpm、15 分間遠心し、膜画分を含む上清を crude extract として活性測定に使用した。

2. 酵素反応

5 mL 容バイアル瓶に表 0-5 の組成で反応液を調製し、気相を Ar ガスで置換した。37°C で水浴しながら 50 rpm、15 分間振とうして反応させた。反応後は速やかに氷浴して反応を止めた。反応液を 4°C、15,000 rpm、5 分間遠心し、上清の亜硝酸イオンを定量した。

表 0-5 The composition of NAR assay mixtures

Crude extract	10 μ L (WT) or 80 μ L (WT 以外の株)
リン酸バッファ (pH8.0)	40 mM
ベンジルビオロゲン	5 mM
硝酸ナトリウム	1 mM
Sodium dithionite	5 mM
Total volume	1.0 mL

〈亜硝酸イオン定量〉

亜硝酸イオンの定量は、一般的に用いられている Griess Reagent による反応 (59) を利用した。これは亜硝酸イオンを sulfanilamide と反応させてジアゾニウム塩を生成し、さらに N-(1 naphthyl) ethylenediamine (NED) とのカップリング反応により、色素であるアゾ化合物を生成させる (図 0-15) 方法である。まず試

料に 1% sulfanilamide 水溶液(塩酸酸性)を等量加え、30 分氷浴した。次に 0.02 % NED 水溶液を sulfanilamide 水溶液と等量加え、30℃で 30 分インキュベートした。この溶液の 540 nm の吸光度を測定した。

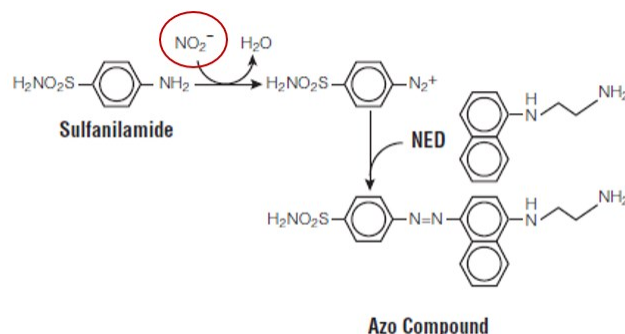


図 0-15 Griess Reagent の反応 (Griess Reagent System TB229 (Promega)の資料(60)から改変して引用)

まず酸性条件下で NO_2^- を sulfanilamide と反応させ、次に NED と反応させて色素を生成させた。

〈SDS-PAGE〉

ポリアクリルアミドゲルは 7.5%、10%、13%のものを使用した。電気泳動槽 Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD)または WSE-1165 RAPIDAS Mini-Slab (ATTO)に泳動バッファー (25 mM Tris-Base、192 mM Glycine、0.1% SDS) を注いだ。ゲルをセットして試料をアプライした後、電源装置 AE-8135 myPowerII 300 (ATTO)により、「定電圧 200V で 40-45 分」または「定電流 15-20 mA/gel で 70-85 分」常温で泳動した。マーカーとして CBB 染色用に Protein Molecular Weight Marker (Broad) (Takara)、ウェスタンブロッティング用に BLUE Star Prestained Protein-Ladder (NIPPON Genetics)を用いた。ゲルの CBB 染色には、染色液 (Coomassie brilliant blue R-250 0.25%、メタノール 5%、酢酸 7.5%) 及び脱色液 (メタノール 25%、酢酸 7.5%) を用いた。

〈ウェスタンブロッティング〉

Immun-Blot PVDF メンブレン (厚さ 0.2 μm 、BIO-RAD) を 100%メタノールに 20-30 秒浸した後、ブロッティング用 CB-13A ろ紙 (厚さ 0.9 mm、ATTO) とともに転写バッファー (20%メタノール、25 mM トリス塩基、192 mM Glycine) に浸した。ブロッティング装置の電極板に下からろ紙 4 枚、メンブレン、ゲル、ろ紙 4 枚の順に重ね、電源装置 AE-8135 myPowerII 300 (ATTO)により定電流で 90 分泳動した。電流はゲルの面積(cm^2)に対して 1.5-2.0 倍の値(mA)に設定した。転写後のメンブレンは TBST バッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) に 1%スキムミルクを懸濁したブロッキングバッファーに浸して 4℃で一晩静置した。ブロッキング後のメンブレンを TBST バッファーで 2 度洗浄し、一次抗体を溶かした TBST バッファーに浸し 1-3 時間程度振とうした。一次抗体反応後のメンブレンを TBST バッファーで 2 度洗浄し、二次抗体を溶かした TBST に浸し 1 時間程度振とうした。二次抗体反応後のメンブレンを TBST バッファーで 2 度洗浄し、さらに TBS バッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM

NaCl) で一度洗浄した。このメンブレンを発色液 (TBS バッファー 50mL、メタノール 10 mL、4-Chloro-1-naphthol 30 mg、H₂O₂ 30-36 μ L) に浸し、15-30 分ほど置いてから観察した。本研究で使用した一次抗体及び二次抗体を表 0-6 に記す。

表 0-6 本研究で使用した抗体

抗体	抗原	製造元
抗 NarK1_1	NarK1 (191-204): KGAAEASQRPNLAK	Eurofins
抗 NarK2_1	NarK2 (460-468): ARKGAESPC	Eurofins
抗 NarK1_2	NarK1 (33-45): GIRIKDELGLSES	Sigma-Aldrich
抗 NarK2_2	NarK2 (200-214): GGEPQQLGDGGRLWL	Sigma-Aldrich
抗 NarG	NarG (525-538): VAREFADSADKTRG	Eurofins
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (既製品)	ウサギ IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories
Anti 6×Histidine, Monoclonal Antibody(9F2) (既製品)	6×Histidine	Wako
Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (既製品)	マウス IgG (H+L)	Promega

〈Total RNA 抽出〉

培養液からの RNA の抽出には RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いた。方法は付属のプロトコルに従った。また RNA 抽出前に *in vivo* で RNA を安定化するため、培養液に RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN)を加えた。

細胞の溶解は、細胞懸濁液 200 μ L に対しリゾチーム (1 mg/mL) を 200 μ L 加えて 5 分間静置し、キット付属の Lysis buffer 700 μ L を添加することにより行った。DNA が共溶出する可能性があるため、一度 total RNA を 80 μ L で抽出した後、RQ1 RNase-Free DNase (QIAGEN)を加えて 37°C で 30 分間インキュベートした。この反応液をもう一度キット付属のカラムにかけて洗浄し、最終的に 50 μ L で溶出したものを total RNA 抽出液とした。

抽出液中に DNA の混入が無いことを PCR により確認した。この PCR のプライマーには、chromosomal replication initiator protein をコードする *dnaA* 遺伝子を増幅するオリゴヌクレオチドの組 (*dnaA1/dnaA2*) を用いた。

〈RNA-seq 用試料の調製〉

培養は各株 2 連で行った。PAO1-ut と $\Delta nirY$ を LB 培地 3 mL で 16.5 時間培養した。この前培養液 10 μ L を LB 培地 2 mL に植菌 (0.5 vol%) して培養した。3.5 時間後、培養液に 4 M NaNO_2 を 10 μ L (終濃度 20 mM) 加えてさらに培養した。 NaNO_2 添加前の培養液の濁度は表 0-7 のようであった。15 分後、培養液 0.6 mL から total RNA を抽出した。RNA が分解されていないことをバイオアナライザ 2100 (Agilent) による電気泳動で確認した。抽出した total RNA は -80°C で保管し、ドライアイスで冷却しながら RNA-seq 委託先の Novogene に送付した。

表 0-7 本培養 3.5 h 後 (亜硝酸ナトリウム添加前) の OD₆₀₀

WT_1	WT_2	$\Delta nirY$ _1	$\Delta nirY$ _2
0.847	0.686	0.713	0.626

〈5'-RACE 法による転写開始点の決定〉

1. RNA 試料の調製

MPAO1 を LB 培地 3 mL に植菌して 16 時間培養した。この前培養液 10 μ L を LB 培地 2 mL に植菌 (0.5 vol%) して培養した。3.5 時間後、OD₆₀₀=0.795 の培養液に 4 M NaNO_2 を 20 μ L (終濃度 40 mM) 加え、さらに培養した。20 分後、培養液 1.0 mL から RNA を抽出した。

2. 5'-RACE 法

方法は 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa) のプロトコルに従った。Total RNA 2.2 μ g をテンプレートとして、プライマー「nirY_RT」による逆転写を行った。このプライマーの配列は *ccoN3* 内部の 15 塩基であり、逆転写用に 5'末端がリン酸化されている。RNase H により Hybrid RNA を分解した後、T4 RNA Ligase を加えて一晩反応させ、一本鎖 cDNA を環化した。これをテンプレートとして、Ex Taq (TaKaRa) を用いた二段階の PCR により二本鎖 DNA を増幅した。プライマーの組は first PCR に「nirY_S1-A1」を使用し、second PCR に「nirY_S2-A2」を使用した。得られた増幅断片を T-Vector である pGEM-T Easy Vector (Promega) に、T4 DNA Ligase によって挿入し、ライゲーション後のプラスミドを大腸菌 JM109 コンピテントセルに導入して形質転換した。LB アンピシリンプレートに生えたコロニー 7 個からプラスミドを抽出し、M13 Forward Primer により挿入部位の配列を読むことで mRNA の 5'末端を決定した。

〈ジャーファーマンターによる培養〉

1L 容量の微生物培養装置 BMJ-01 (ABLE) のジャーに N 源なし VB 培地 (pH 9.6) を 500 mL 調製してオートクレーブした。LB 培地 5 mL の前培養液を N 源なし VB 培地 (pH 9.6) 5 mL で洗浄した後に全量植菌した。コントローラーで培養温度 37°C、回転数 150 rpm、通気 0.5 L/min に設定した。N 源として 1 時間に一度、50 or 100 mM NaNO_2 溶液をコンセントタイマー FT-01 (ABLE) に接続した小型卓上マイクロポンプ RP-23 (ABLE) で 500 μ L ずつ送液した (培地中の濃度: 50 or 100 μ M)。1 時間に一度培養液を採取し、OD₆₀₀ の測定及び亜硝酸イオンの定量に供した。

【第 1 章】NasA、NarK1、NarK2 の機能解析

第 1 節 序論

第 1 項 Major Facilitator Superfamily (MFS)

本章では、緑膿菌の硝酸同化または脱窒に関わると考えられる NasA、NarK1、NarK2 に注目する。この三者は互いにアミノ酸配列が似ており、いずれも major facilitator superfamily (MFS) の nitrate/nitrite porter (NNP) family のトランスポーターである。

MFS はトランスポーターの分類において ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily と並ぶ巨大なグループである。Transporter Classification Database (TCDB、(61)(62)) においても MFS [TCDB number: 2.A.1] は “the largest superfamily of secondary carriers known” と説明されている。進化的に古く、全ての界の生物種に分布する。一般に MFS のタンパク質は ATP 結合部位を持たず、受動輸送または secondary active transport のいずれかを行う。前者の例としてヒトのグルコース輸送体 GLUT1 があり、後者の例として大腸菌の LacY がある。MFS トランスポーターの中には、疾病に関わっており、薬剤の標的分子になりうるものも存在する (36)。

MFS の典型的な構造として、大腸菌の fucose/H⁺シンポーターFucP、multidrug/H⁺アンチポーターEmrD、そして LacY の結晶構造を示す (図 1-1、(63)(64)(65)(66))。1 分子中に α -ヘリックスからなる膜貫通領域 (transmembrane helices, TMs) が 12 個存在し、N 末側と C 末側の 2 つのドメイン (N-bundle と C-bundle) がそれぞれ 6TMs ずつ持つ。この両ドメインの境界域に基質結合部位が形成される。基質の輸送に当たっては、一般に alternate access model に従い、基質結合部位がペリプラズムと細胞内のいずれかのみにアクセスした状態を反復すると考えられている。しかし、より複雑な構造変化の可能性も提唱されている (36) (63)。なお、輸送サイクルにおけるこの代表的な 3 状態をそれぞれ「外側に開いた状態 (outward-facing, OF)」「閉じた状態 (occluded, OC)」、「内側に開いた状態 (inward-facing, IF)」と呼ぶことにする。

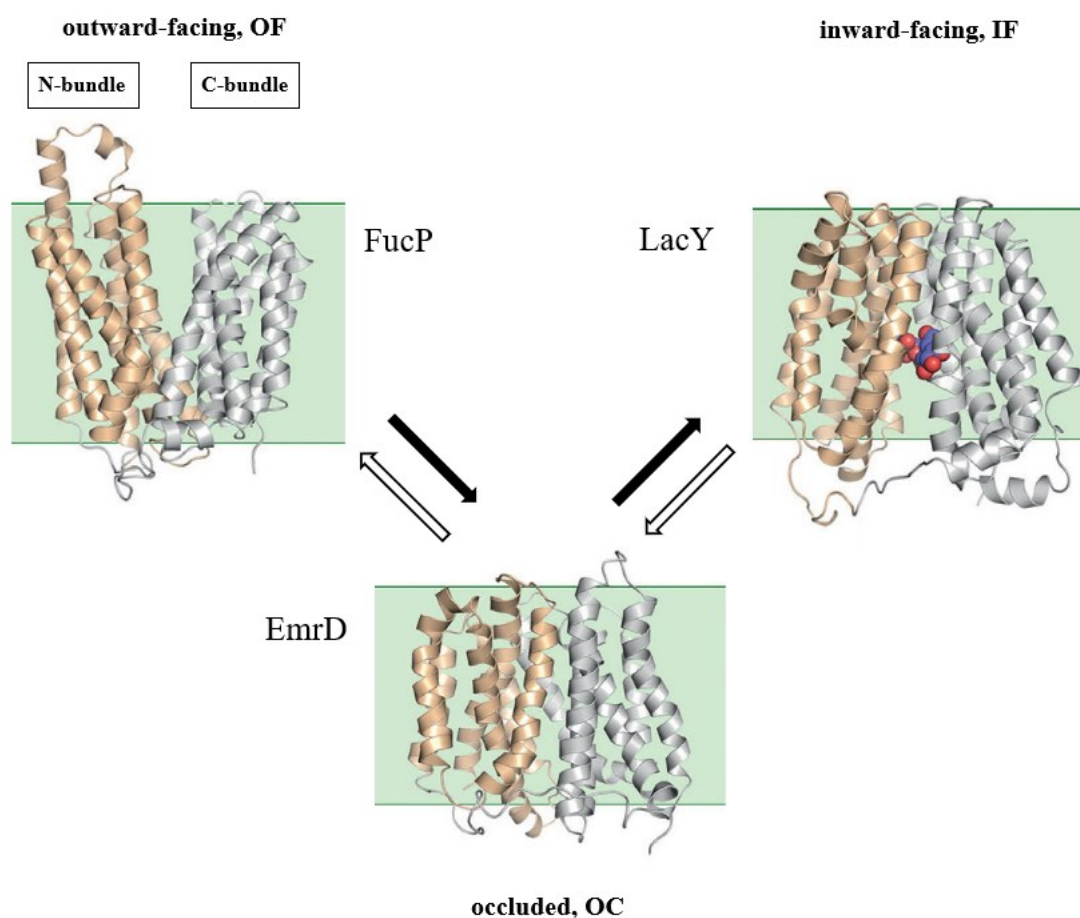


図 1-1 MFS の基本構造 (図は(63)より改変して引用、結晶構造の出典は(64)、(65)、(66))

(左上) ペリプラズム側に開いている FucP。基質とは結合していない。

(中下) 閉じている EmrD。基質とは結合していない。

(右上) 細胞内側に開いている LacY。基質と結合している。

1 分子中に 12 個の TM が存在し、6 個ずつ N-bundle (金色) と C-bundle (銀色) に分かれる。両ドメインの構造変化によって「ペリプラズム側に開いている状態 (左上、OF)」「閉じている状態 (中下、OC)」「細胞内側に開いている状態 (右上、IF)」を往復することで、alternate access model に従った基質輸送を行う。細胞内に輸送するときは、(左上) から黒い矢印の向きに (右上) の構造まで変化する。細胞外に輸送するときは、(右上) から白抜きの矢印の向きに (左上) の構造まで変化する。

第 2 項 NNP family 内の NarK 様タンパク質群

Nitrate/nitrite porter (NNP) family [TCDB number: 2.A.1.8] のタンパク質は、一般に high affinity の NO_3^- トランスポーターだと考えられており、細菌、酵母、真菌、藻類、植物などに分布する(67)。2 か所の特徴的な配列を持ち (図 1-2、(68))、MFS に属する他の family には存在しないことから nitrate signature (NS) motif と言われる。NS 部位には Gly 残基が多く存在する。また、2 つの Arg 残基が全ての既知 NNP family タンパク質において保存されている。これらは NNP family に固有の特徴であり、基質の輸送に重要であ

ることが示されている (69)(70)。

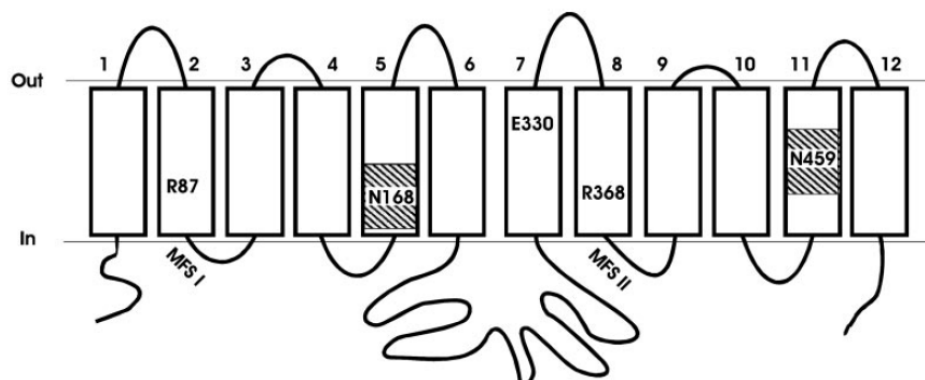


図 1-2 *Aspergillus nidulans* NrtA の構造模式図 ((69)より引用)

NNP family のタンパク質は、N-bundle の TM2 に Arg 残基、TM5 に NS motif を持ち、C-bundle の TM8 に Arg 残基、T11 に NS motif を持つ。図では Arg 残基は R87 と R368、NS motif は斜線の区画で示されている。

NNP family 内で系統解析を行うと、細菌の硝酸異化または同化に関わるものが 1 つのクラスターを形成する (71)。このグループのタンパク質では、大腸菌の嫌気硝酸呼吸ではたらく NarK が最も有名なため、本論文では NarK 様タンパク質群と総称することにする。なお、大腸菌の硝酸呼吸では分子状窒素ではなく亜硝酸イオンまたはアンモニアが生じるため、緑膿菌とは異なり脱窒とは呼ばれない (72)。

緑膿菌の NarK1、NarK2、NasA は全て NarK 様タンパク質である。このように NarK 様タンパク質を複数持つ種も存在し、緑膿菌(*Pseudomonadota* 門 γ -Proteobacteria 綱)、*Paracoccus denitrificans* (*Pseudomonadota* 門 α -Proteobacteria 綱)、*Thermus thermophilus* (*Deinococcota* 門) など、必ずしも系統的に近縁ではない (71)。

第 3 項 大腸菌 NarK の機能解析

NarK 様タンパク質について、輸送機構を明らかにするための様々な研究がなされてきた。しかし、異なる研究グループが、異なる手法によって、異なる生物種のタンパク質を解析してきたため、結論は必ずしも一致していない。研究の難点として、窒素の放射性同位体は、半減期が短い上に希少なことが挙げられる。そのため、膜輸送研究で強力な手段である *in vitro* の再構成系を用いて、硝酸イオン・亜硝酸イオンの輸送を直接観察することが難しい。結果として、手法の異なる多くの論文が発表された。

NarK 様タンパク質の中では、大腸菌の NarK で最も解析が進んでいる。結晶構造や、*in vivo*、*in vitro*、*in silico* の総合的な解析から、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーターだということが支持されている。大腸菌の NarK が単独で硝酸呼吸を成立させることから、この結論は妥当である。この分子レベルでの輸送機構について次に説明する。

精製した NarK を人工脂質二重膜に再構成したプロテオリポソームによって、NarK が $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポート機能を持つことが示された (70)。この研究では、特定のアニオンを内包するプロテオリポソームを、亜硝酸イオンを含むバッファーに懸濁し、室温で 1 時間置いた後、プロテオリポソーム内に移動した

亜硝酸イオンを定量した (図 1-3)。その結果、硝酸イオンを内包させたときに顕著に亜硝酸イオン濃度が高かった。この結果は、NarK が硝酸イオン特異的な亜硝酸イオンの対向輸送を行ったことを示す。また、膜内外の H^+ 濃度勾配は輸送に影響が無く、プロトン駆動力による輸送は行われなかったことが示唆された。

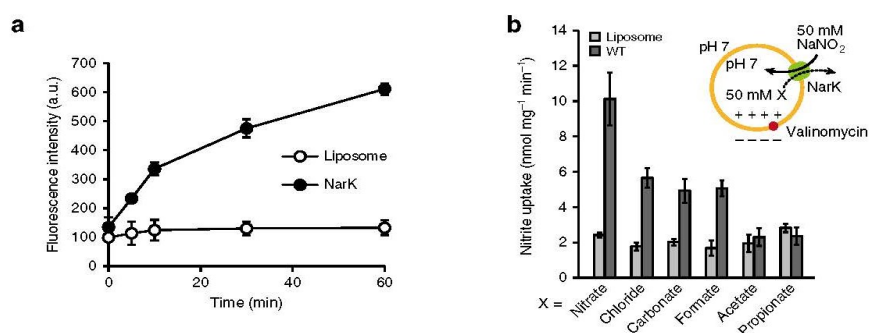


図 1-3 プロテオリポソームによる NarK の輸送機能評価 ((70)より引用)

- (a) 脂質からなる膜小胞単体では、硝酸イオンを内包させても亜硝酸イオンを蓄積しない。精製 NarK を組み込んだプロテオリポソームでは、時間経過に応じた亜硝酸イオンの蓄積が見られた。
- (b) 亜硝酸イオンと各種アニオンの対向輸送を調べた実験。硝酸イオンを内包するとき亜硝酸イオンの蓄積量が最も多かった。一方、塩化物イオンなどでも半分程度の活性は見られたが、これはイオンのサイズが関係すると思われる。なお膜中の Valinomycin は、膜電位を生じさせるために組み込まれている。

基質に結合した NarK の結晶構造が解かれたことで、基質結合ポケットにおける硝酸イオンとアミノ酸残基の相互作用の様式が判明した(73)(70)。すなわち、NNP family で保存された 2 つの Arg 残基が硝酸イオンの認識に重要な水素結合を形成し、2 つの Phe 残基が上下から π - π スタッキング相互作用を形成して硝酸イオンを挟み込む形をとっていた (図 1-4)。2 つの Arg 残基間の電気的反発により、基質が結合していない (*apo*) 状態の OC 構造は不安定であるが、アニオンが結合することで安定化すると考えられた。また、NNP family は NS motif などに Gly 残基を多く持つという特徴があるが、OC 構造と IF 構造を比較すると、複数の Gly 残基を起点に膜貫通ヘリックスが屈曲していた (図 1-5)。Gly 残基が持つ高い柔軟性が分子全体のダイナミックな構造変化に寄与していると考えられ、実際にいくつかの Gly 残基は輸送機能に必須であることも示された。

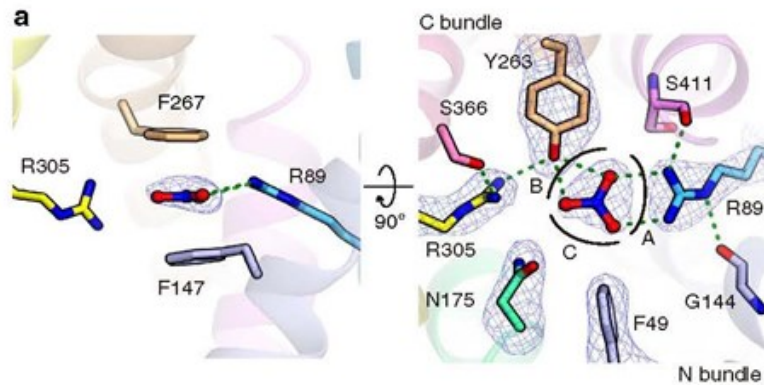


図 1-4 大腸菌 NarK の基質結合様式 ((70)より引用)

NarK の結晶構造が解かれ、硝酸イオンの結合様式が判明した。図は「nitrate-bound, OC」の結晶構造であり、左は細胞膜に水平な方向、右は細胞膜に垂直な方向でペリプラズム側から見ている。緑の点線は水素結合を示す。NNP family で強く保存された 2 つの Arg 残基 (R89 と R305) が基質認識に重要な水素結合を形成し、上下から 2 つの Phe 残基 (F147 と F267) が挟み込む形をとる。2 つの Phe 残基と硝酸イオンは π - π スタッキング相互作用により安定化すると考えられる。

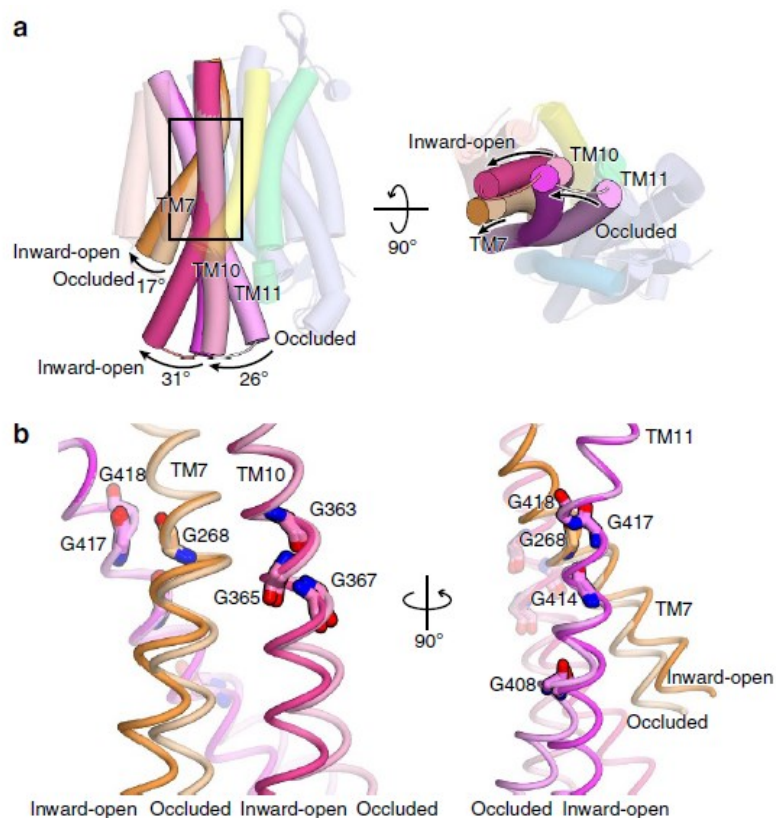


図 1-5 大腸菌 NarK の構造変化 ((70)より引用)

(a) NarK 全体の構造。左は細胞膜に水平な方向、右は細胞膜に垂直な方向で細胞内側から見た図。構造変化の大きい、C 末ドメインの TM7、10、11 に注目して描かれている。閉じている状態は薄い色で、細胞内側

に開いている状態は濃い色で表示されている。細胞内側に開く際、剛体のように動くのではなく、TM7、10、11 がそれぞれ 17 度、31 度、26 度曲がる。なお、黒い四角は (b) で拡大表示されている部分を示す。

(b) NarK の一部の拡大図。TM7、10、11 は、NNP family に保存された Gly 残基の周辺で曲がっている。Gly 残基は二面角の制限が緩いため、タンパク質が柔軟な構造変化を起こし、そのことは NNP family の特徴のひとつだと考えられている。これらの Gly 残基が基質輸送に重要であることは、*in vivo* の実験からも示された。なお図において、Gly 残基のみ stick model で表示されている。

現在に至るまで NarK の OF 構造は得られていないが、Feng らは $\sim 300 \mu\text{s}$ に及ぶ全原子 MD シミュレーションなどの *in silico* の解析によって、NarK の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポートの輸送サイクルを再現した (74)。この研究では NarK の輸送サイクル全周において、8 つのコンフォメーションが見られた (図 1-6 左)。*apo* 状態 (コンフォメーション 2、6) では比較的高い自由エネルギー値 $\sim 2.0 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$ だが、基質が結合するとその値は $\sim 1.5 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$ 減少する。すなわち、基質結合がコンフォメーション変化の可能性を増大させる。また、 $\text{IF} \rightleftharpoons \text{OC}$ 状態間のエネルギー障壁は、 NO_3^- 結合時には $\sim 1.0 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$ (コンフォメーション 1 \rightleftharpoons 8) である一方、 NO_2^- 結合時には $\sim 2.5 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$ (コンフォメーション 3 \rightleftharpoons 4) と高いため、基質としての NO_3^- の親和性は NO_2^- の親和性の 10-12 倍程度と見積もられた。

以上の結果などから、NarK の完全な輸送機構を以下のように提唱した (図 1-6 右)。

- (A) ペリプラズム側で正に帯電した残基が NO_3^- をリクルートする。
- (B) 基質通路には、全ての原核生物 NNP family で Trp 残基が保存されている。この残基などを介して、 NO_3^- が急速に基質結合ポケットへと拡散する。
- (C) NO_3^- が基質結合ポケットの R89、R305 と相互作用し、*apo* 状態で働いていた両 Arg 残基間の電気的反発を弱める。これに伴い、ポケットでは広範な水素結合ネットワークが形成され、ヘリックスの屈曲を駆動する。
- (D) ヘリックスの屈曲により、ペリプラズム側が閉じて細胞質側が開く。ポケットでは R89 と R305 が離れ、空いたスペースに細胞質から NO_2^- が侵入する。
- (E) NO_3^- と NO_2^- の電気的反発により、 NO_3^- が中心から脱離する。
- (F) 細胞質側の正に帯電している残基などと相互作用しながら、 NO_3^- は細胞内へと放出される。
- (G) ポケットでは残った NO_2^- のみがアミノ酸残基と結合し、構造変化が起こる。
- (H) ヘリックスの屈曲により細胞質側が閉じる。R89、R305 と NO_2^- が水素結合する。これによりペリプラズム側の開放が引き起こされる。
- (I) NO_2^- が NO_3^- と同じ経路で、W52 を介してペリプラズムへ向かう。
- (J) NO_2^- が正に帯電した残基を介して細胞外へ放出される。

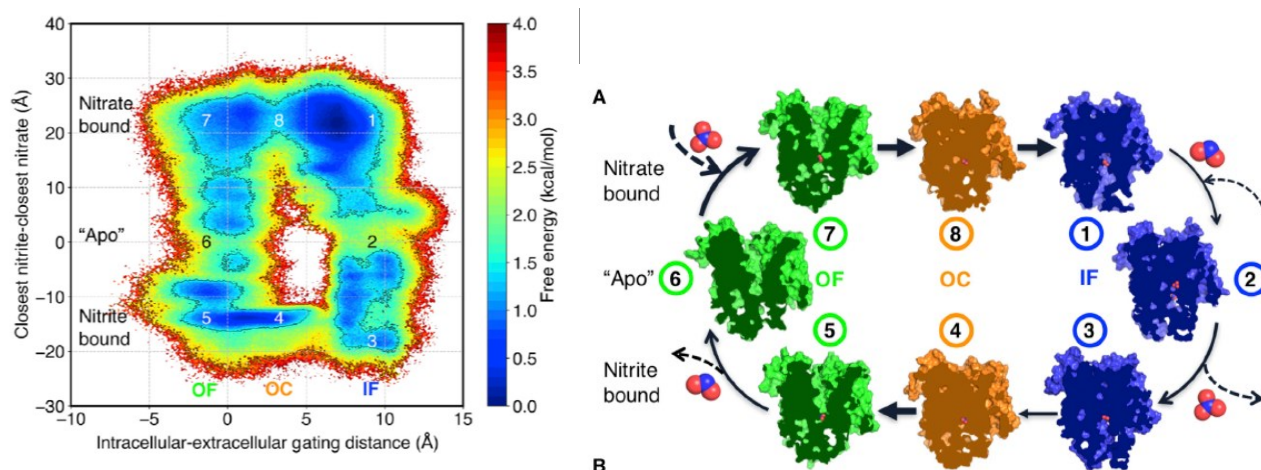


図 1-6 NarK の輸送サイクル全周におけるコンフォメーション変化 ((74)より引用)

(左) 自由エネルギー地形のグラフ。OF、OC、IF 状態を区別するため、横軸に細胞質側とペリプラズム側の開き具合 (距離) の差をとり、基質の NO_3^- と NO_2^- を区別するため、縦軸に R89 と R305 の中心に対する両基質の最短距離の差をとった。図中の 1-8 の数字は、本文中のコンフォメーションの数字と一致する。エネルギー地形の中央に見られる白い領域は高い自由エネルギー障壁を表し、基質結合ポケットの R89 と R305 の電氣的反発によって *apo* 状態 (2 \leftrightarrow 6) 間が直接遷移できないことに対応する。

(右) 図中の数字は異なるコンフォメーションを表し、左図の数字と一致する。基質の結合によって R89 と R305 の電氣的反発が弱まり、広範な水素結合ネットワークが形成されることでヘリックスの屈曲が駆動される。この仕組みを通して分子全体のダイナミックな構造変化が起こる。

また他グループによる *in silico* の解析では、steered MD シミュレーションによって NO_3^- 及び NO_2^- が NS モチーフに沿って動く様子 (図 1-7) や、QM/MM 法によって両アニオンから基質結合ポケットの残基に負電荷が移動する様子 (表 1-1) などが観察されている (75)。なおこの論文の著者のひとりは、NarK 結晶構造を最初に報告した論文 (73) の first author である。

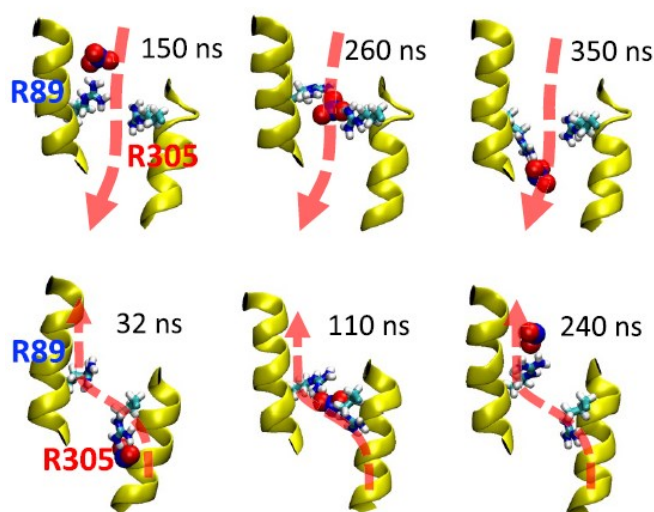


図 1-7 steered MD シミュレーションによる基質移動の様子 ((75)より改変して引用)

NS モチーフの主鎖が黄色の α -ヘリックスで、基質結合ポケットの R89 と R305 が ball-and-stick model で図示されている。NO₃⁻及び NO₂⁻は NS モチーフに沿って移動した。

(上) NO₃⁻を外側から内側へ輸送する動き。R89 は常に、R305 はその間の一部でアニオンを牽引した。

(下) NO₂⁻を内側から外側へ輸送する動き。輸送の途中で R305 から R89 へとアニオンが受け渡された。

表 1-1 QM 計算による各残基／アニオンの電荷 ((75)より作成)

基質結合ポケットの各残基及びアニオンが持つ電荷について、anion-free (*apo*)、NO₃⁻結合、NO₂⁻結合の3条件について表示した。NO₃⁻または NO₂⁻の結合により、ポケットのアミノ酸残基に負電荷が移動した（それぞれ総量で -0.12 e、-0.17 e）。ただしそのほとんどは、アニオンに最も近接する R89 が受け取った。

	anion-free	NO ₃ ⁻ -bound	NO ₂ ⁻ -bound
R89	0.992 e	0.873 e	0.817 e
F147	0.003 e	-0.004 e	-0.003 e
Y263	0.009 e	0.004 e	0.007 e
F267	0.007 e	-0.0010 e	-0.002 e
R305	0.989 e	0.982 e	0.983 e
anion	/	-0.845 e	-0.803 e

第4項 NarK 様タンパク質群のサブグループ：NarK1 タイプと NarK2 タイプ

硝酸呼吸のトランスポーターとして、大腸菌などが NarK のみを使用する一方、緑膿菌のように NarK1 と NarK2 の2つを持つ種も存在する。NarK1 と NarK2 のアミノ酸配列には、系統的な違いがはっきりと見られるため、NarK 様タンパク質は NarK1 タイプか NarK2 タイプに分類できる (71) (図 1-8)。このことから、NarK1 と NarK2 は相異なる機能を持ち、両方を持つことに生物学的な利益があると考えられる。大腸菌の NarK は NarK2 タイプである。緑膿菌の場合、NasA と NarK1 が NarK1 タイプ、NarK2 が NarK2 タイプであるが、三者間の sequence identity はそれほど高くない (表 1-2)。

ある NarK 様タンパク質の輸送機構を解析する際、一般的にはこの分類を利用し、NarK1 タイプのタンパク質ならば NO₃⁻/H⁺シンポーター（硝酸イオンの取り込み）、NarK2 タイプのタンパク質は NO₃⁻/NO₂⁻アンチポーター（硝酸イオンの取り込み及び亜硝酸イオンの排出）だと予想される (71)(76)。その理由については次段落で述べる。ただし、この2タイプはアミノ酸配列に基づく分類であり、輸送機構のタイプがこの分類と一致している証拠はない。

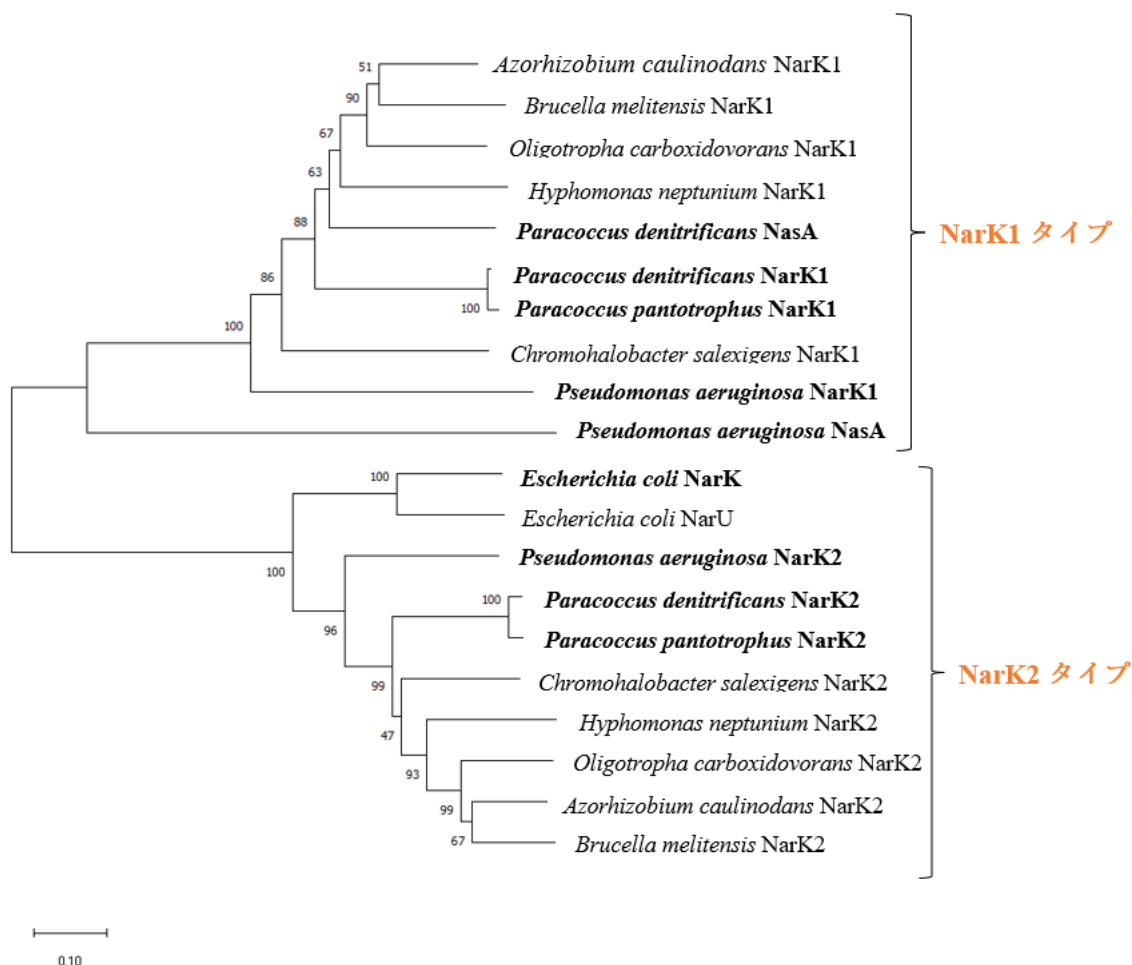


図 1-8 NarK 様タンパク質群の分子系統樹

NarK 様タンパク質群の分子系統樹を示す。各タンパク質のアミノ酸配列は NCBI で取得し、系統樹は MEGA-X (77) を使用して近隣結合法 (78) により作成した。各ノードの数字は、1000 回の復元抽出による Bootstrap 値を示す。本文中で言及したタンパク質は太字で示した。

NarK 様タンパク質は明確に NarK1 タイプと NarK2 タイプに分かれる。緑膿菌の場合、NarK1 と NasA が NarK1 タイプ、NarK2 が NarK2 タイプである。

表 1-2 緑膿菌 NasA、NarK1、NarK2 及び大腸菌 NarK 間の sequence identity (%)

	NasA	NarK1	NarK2	大腸菌 NarK
NasA (403 aa)		30	25	28
NarK1 (431 aa)	30		23	25
NarK2 (468 aa)	25	23		59
大腸菌 NarK (463 aa)	28	25	59	

前述のように、大腸菌 NarK は単独で硝酸イオンの取り込み及び亜硝酸イオンの排出を担う。大腸菌 NarK が NarK2 タイプであることから、一般に NarK2 タイプのタンパク質は $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーターだと予想される (71)(79)。一方で、大腸菌 NarK のような $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーター機構では、1 個の硝酸イオンの取り込みと 1 個の亜硝酸イオンの排出が交互に行われるため、細胞内の正味の窒素量が増加しない。したがって、硝酸同化で働く NasA を含んでいる NarK1 タイプは、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーターではない輸送機構を持つと考えられている (71)(79)。Wood らは、*Paracoccus pantotrophus* の *narK1* 発現株と *narK2* 発現株を作製し、呼吸の脱共役剤 (uncoupler) の作用を観察した (76)。脱共役剤の添加によって、*narK1* 発現株の硝酸イオン還元活性が 20%ほどにまで減少したことから、NarK1 はプロトン駆動力に依存した NO_3^-/H^+ シンポーターだと推定した。

第 5 項 NarK1 タイプと NarK2 タイプの機能的差異に関する研究

P. denitrificans が持つ NarK 様タンパク質は、緑膿菌と同様に NarK1、NarK2、NasA である。いずれも立体構造は解かれておらず、これまでの報告は、遺伝子破壊と相補による *in vivo* の実験結果が中心である。遺伝子破壊実験により *narK1K2* が脱窒に不可欠であること、相補実験によりそれぞれ単独でも脱窒可能となること、硝酸イオンに対する affinity は NarK1K2、NarK1、NarK2 の順に高いことが示された (図 1-9、(80))。また、硝酸同化能が著しく低い *nasA* 破壊株に *narK1* または *narK2* を相補したところ、前者でのみ硝酸同化能が回復した (図 1-10、(79))。これらから、著者らは NasA と NarK1 は NO_3^-/H^+ シンポーター (ただし NarK1 単独で脱窒生育が回復することから、NarK1 は NO_2^- の排出も行える)、NarK2 は $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーターだと推測した。

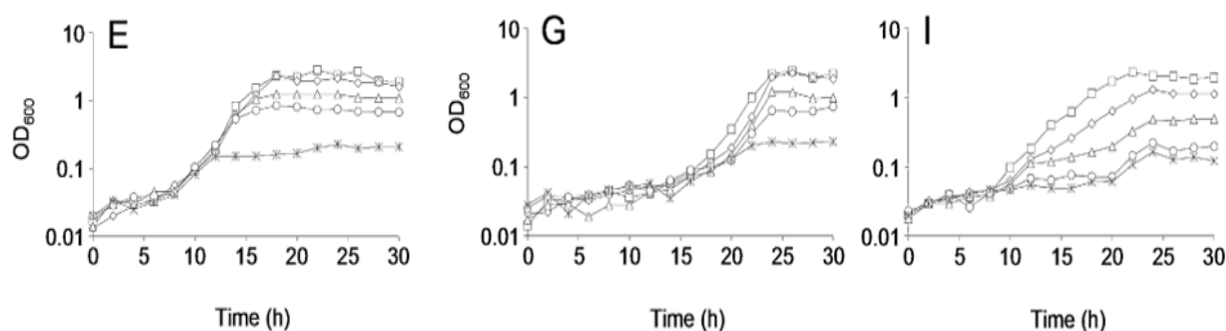


図 1-9 *Paracoccus denitrificans* のトランスポーター相補株の脱窒生育 ((80)より引用)

(E) $\Delta napD \Delta narK1K2 + narK1K2$ (G) $\Delta napD \Delta narK1K2 + narK1$ (I) $\Delta napD \Delta narK1K2 + narK2$

縦軸は OD₆₀₀、横軸は培養時間 (hour) を示す。NapD は、ペリプラズムの硝酸還元酵素である Nap 複合体のサブユニットである。詳しくは後述する。この実験で $\Delta napD \Delta narK1K2$ は、脱窒能のない破壊株として用いられている。記号はそれぞれ、□: 硝酸イオン 50 mM、◇: 20 mM、△: 10 mM、○: 5 mM、※: 1 mM、を表す。この結果から、Monod equation (81)により硝酸イオンに対する affinity が計算され、NarK1K2、NarK1、NarK2 の順に高かった。

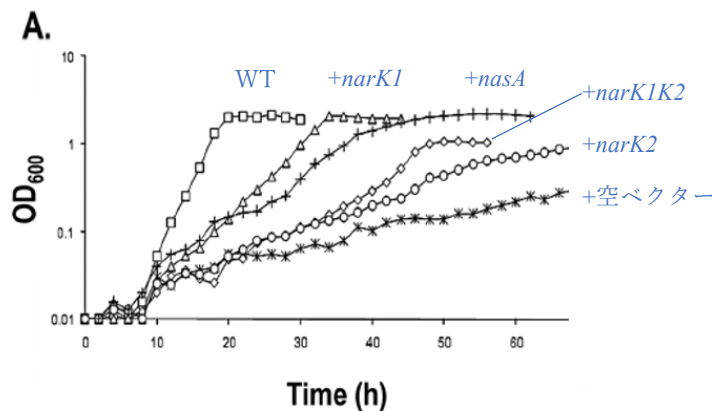


図 1-10 *Paracoccus denitrificans* のトランスポーター相補株の硝酸同化生育 ((79)より改変して引用)

縦軸は OD₆₀₀、横軸は培養時間 (hour) を示す。記号はそれぞれ、□: 野生株、△: $\Delta nasA + narK1$ 、+: $\Delta nasA + nasA$ 、◇: $\Delta nasA + narK1K2$ 、○: $\Delta nasA + narK2$ 、※: $\Delta nasA +$ 空ベクター、を表す。*+nasA* と *+narK1* が類似した良好な生育を示した一方で、*+narK2* は *nasA* 破壊株 (空ベクター入り) とあまり変わらなかった。

緑膿菌における NarK1 と NarK2 の役割の違いについての報告は、2006 年に発表された論文のみであり (82)、その後も新規の知見は得られていない。この論文では *narK1*、*narK2*、*narK1K2* の破壊株 (図 1-11) と相補株をそれぞれ作製し、脱窒条件での生育試験を中心に考察されている。著者らは生育試験の結果 (図 1-12) などから、緑膿菌において NarK1 は少量の硝酸イオンしか輸送できず、脱窒においては NarK2 のみが必要であると示唆された、としている。しかしこの考察は、前述した *P. denitrificans* が *narK1* の相補によって脱窒生育を回復したという結果や、NarK1 が high affinity の NO_3^-/H^+ シンポーターであるという推定と一致していない。この実験で問題となりうる点として、*narK1* 破壊株として $\Delta narK1::Gm$ が用いられていた (図 1-11) ことがある。すなわち、Gm 耐性遺伝子の転写様式によっては、下流遺伝子 (*narK2*、*narGHJI*) の転写が影響を受ける。そのことによる表現型変化を、*narK1* 破壊によるものと誤って解釈していた可能性がある。これは *narK2* 破壊株、*narK1K2* 破壊株も同様である。

このような観点から、緑膿菌における追試が必要であり、また脱窒条件だけでなく硝酸同化条件での実験も有効だと考えた。本論文では *narK1K2* の全域を in-frame で欠失させ、*narK1* または *narK2* のみを相補することで機能を評価した。

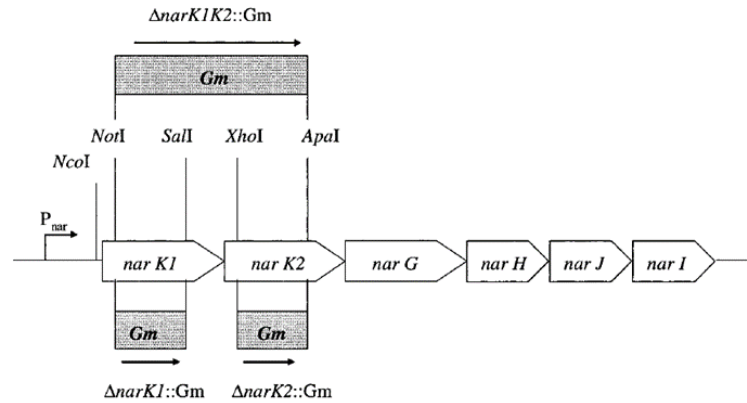


図 1-11 緑膿菌の先行研究における遺伝子破壊の模式図 ((82)より引用)

(82)の論文における遺伝子破壊の模式図を示す。図 1-2 に関して述べたように、*narGHJI* は NAR の各サブユニットの遺伝子であり、*narK1* から *narI* まではオペロンである。*narK1*、*narK2*、*narK1K2* を破壊するために、それぞれ *NcoI*-*SalI*、*XhoI*-*ApaI*、*NotI*-*ApaI* の領域に Gm 耐性遺伝子を挿入している。各遺伝子の相補には、ハイコピーのプラスミド pUCP18 (83)が使用された。

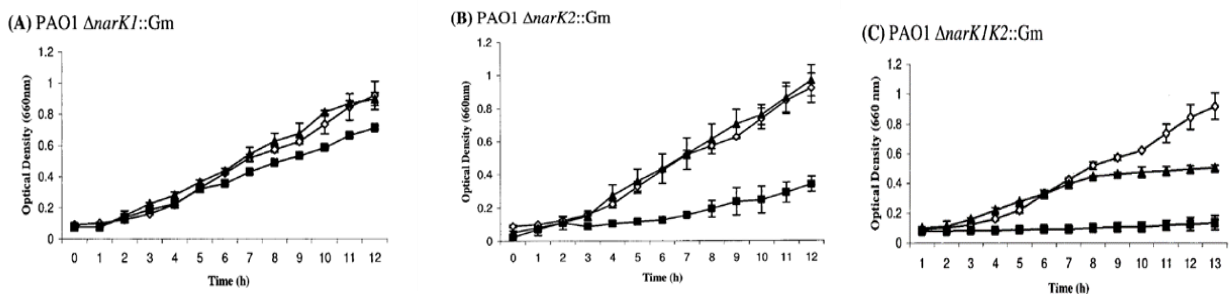


図 1-12 緑膿菌の *narK1* と *narK2* 相補株の脱窒生育 ((82)より改変して引用)

縦軸は OD₆₆₀、横軸は培養時間 (hour) を示す。

(A) *narK1* に関する実験。記号は◇：野生株、■：Δ*narK1*::Gm、▲：Δ*narK1*::Gm + *narK1*、を表す。

Δ*narK1*::Gm の生育は野生株とあまり変わらなかった。

(B) *narK2* に関する実験。記号は◇：野生株、■：Δ*narK2*::Gm、▲：Δ*narK2*::Gm + *narK2*、を表す。

Δ*narK2*::Gm の生育は野生株と比べてかなり悪くなり、Δ*narK2*::Gm + *narK2* において回復した。

(C) *narK1K2* に関する実験。記号は◇：野生株、■：Δ*narK1K2*::Gm、▲：Δ*narK1K2*::Gm + *narK1K2*、を表す。

Δ*narK1K2*::Gm はほとんど生育せず、Δ*narK1K2*::Gm + *narK1K2* において部分的に回復した。

著者らはこの結果などから、緑膿菌において NarK1 は少量の硝酸イオンしか輸送できず、脱窒においては NarK2 のみが必要であると示唆された、としている。

第 6 項 NarK1 と NarK2 の相互作用に関する研究

緑膿菌などにおいては、NarK1 と NarK2 はそれぞれ独立した遺伝子にコードされている。一方 *P. denitrificans* などでは、*narK1* と *narK2* が融合した単一の遺伝子となっているため、翻訳産物は NarK1 と

NarK2 がリンカーでつながったような構造をとる。フュージョン型 NarK1K2 を持つ種は α -Proteobacteria と γ -Proteobacteria で知られており、リンカー部分の長さやアミノ酸配列は様々である (80)。20 を超える種のリンカー配列を比較した結果、完全に保存されていたのはわずか 2 残基で、この位置のアミノ酸置換による表現型の変化は見られなかった (79)。すなわち、リンカーの配列は重要ではなく、NarK1 と NarK2 の空間的な近接自体に意義があると考えられる。

Goddard らは *Paracoccus denitrificans* の NarK2 単独相補株、及び不活性型 NarK1 と野生型 NarK2 の相補株を作製して脱窒試験を行った (80)。そして Monod 式 (81) ($\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$)、ただし μ は増殖速度、 S は成長を制限する基質の濃度、 K_s は $\mu = 0.5\mu_{\max}$ となる基質濃度を表す) における定数 K_s をトランスポーターの硝酸イオンに対する K_m と仮定することで、Hanes plots から最大増殖速度 μ_{\max} 及び NarK2 の硝酸イオンに対する K_m を算出した (図 1-13、表 1-3)。その結果、NarK2 単独の発現株よりも不活性 NarK1 と野生型 NarK2 の発現株の方が K_m は 1 桁小さく、NarK1-NarK2 間の functional interaction が示唆された。

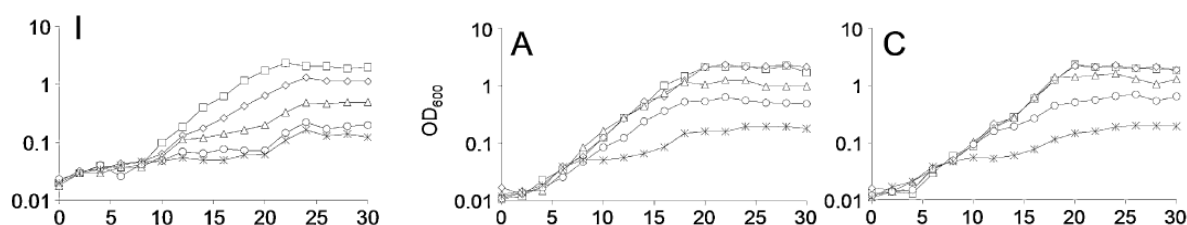


図 1-13 *Paracoccus denitrificans* の脱窒試験 ((80)より引用)

(I) $\Delta napD \Delta narK1K2 + narK2$ 、(A) $\Delta napD \Delta narK1K2 + narK1^{R66L} - narK2$ 、(C) $\Delta napD \Delta narK1K2 + narK1^{R269L} - narK2$ をそれぞれ使用。

縦軸は OD₆₀₀、横軸は培養時間 (hour) を示す。NapD は、ペリプラズムの硝酸還元酵素である Nap 複合体のサブユニットであり、この実験で $\Delta napD \Delta narK1K2$ は、脱窒能のない破壊株として用いられている。記号はそれぞれ、□: 硝酸イオン 50 mM、◇: 20 mM、△: 10 mM、○: 5 mM、※: 1 mM、を表す。この結果から各株の μ_{\max} 及び NarK2 の硝酸イオンに対する K_m が算出された (表 1-3)。

表 1-3 生育試験を基に算出された μ_{\max} と K_m

μ_{\max} は株間で差がないが、 K_m は単独相補株が 1 桁大きい。

相補した遺伝子	$\mu_{\max} (h^{-1})$	$K_m (mM)$
<i>narK2</i>	0.41 ± 0.02	15.0 ± 1.8
<i>narK1^{R66L} (inactive) - narK2</i>	0.35 ± 0.04	1.2 ± 0.1
<i>narK1^{R269L} (inactive) - narK2</i>	0.38 ± 0.02	1.2 ± 0.1

P. denitrificans はフュージョン型のタンパクを持つ種であるため、両者が相互作用するという主張は妥当である。一方、緑膿菌は NarK1 と NarK2 が別の遺伝子としてコードされており、両者の間で相互作用が起きるかどうかは未知である。

第7項 亜硝酸イオンの膜透過性と pH

イオンは脂質二重膜をほとんど透過しないが、非イオン性の低分子は受動拡散により膜を透過する。硝酸イオン及び亜硝酸イオンの膜輸送機構を調べる上で、それぞれのプロトン化による膜透過を考慮することは重要である。

硝酸の酸解離定数 (pK_a) は -1.8 と低く、水溶液中ではほとんどがイオンとして存在する。また、細胞膜の内外に生じる電位差は、約 180 mV 内側が低く、受動輸送では細胞外の硝酸イオンの 0.001% しか取り込めないとされる (84)。したがって、細菌が硝酸を細胞内に取り込むためには、トランスポーターによる能動輸送が必須となる。

亜硝酸の pK_a は 3.4 と比較的高く、水溶液中では一部が HNO_2 の分子状態で存在する。 HNO_2 は受動拡散により膜を透過する場合がある。そして溶液中の pH が高いほど電離平衡は NO_2^- 側に傾き、膜透過が抑制される。ラン藻の一種を用いた実験では、水溶液が中性付近だと亜硝酸分子の膜透過が観察されたが、pH が高くなるにつれて透過量が減少し、pH 8.8 以上では透過しなくなった (図 1-14、(85))。このことから、トランスポーター依存的な亜硝酸イオン輸送が観察しやすいように、本研究では基本的に合成培地の pH を比較的高い pH 8.0 以上に設定した。

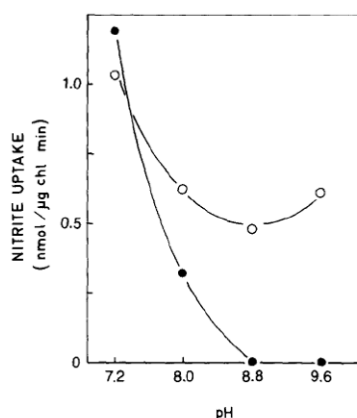


図 1-14 ラン藻における亜硝酸取り込みの pH 依存性 ((85)より改変して引用)

0.5 mM KNO_2 を含むバッファーにラン藻 *Synechococcus elongatus* を懸濁し、30 分後に上清の亜硝酸イオン濃度を測定した。グラフの縦軸は亜硝酸イオンの取り込み量 (バッファーからの減少量)、横軸は pH を示す。この菌において亜硝酸イオンの能動輸送を阻害する N,N' -Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) で処理した場合 (●) と処理しなかった場合 (○) が表示されている。DCCD 処理した場合、亜硝酸の取り込みは HNO_2 の膜透過のみと考えられる。中性付近では亜硝酸の膜透過が観察されたが、pH 8.8 以上では観察されなくなった。

第8項 注目したその他の遺伝子

緑膿菌はペリプラズムの硝酸還元酵素である Nap を持ち、*napEFDABC* 遺伝子群としてゲノム上にコードされている。Nap は定常期に σ 因子である RpoS 依存的に発現し、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元することで細胞の酸化還元バランスを整えたり、脱窒の第一反応を触媒したりする場合があることが分かっている (86)。ペリプラズムでの硝酸イオン還元は、NarK1、NarK2、NasA の機能解析に影響を与える可能性があるため、本研究において Nap の遺伝子も破壊のターゲットとした。

緑膿菌の N3 タイプの *cbb₃* 型 cytochrome *c* oxidase のサブユニットをコードする *ccoN3Q3-PA1854* オペロンには、機能未知の PA1854 が存在する。PA1854 は亜硝酸イオントランスポーターとして NarK1、NarK2、NasA の機能解析に影響を与える可能性があり、第1章でも PA1854 を破壊した実験を行った。PA1854 については、第2章で解析をしている。

第9項 本章の目的

緑膿菌が持つ3つの硝酸イオントランスポーター NarK1、NarK2、NasA について、その輸送機構や生体における役割に関する知見は未だ十分に得られていない。本章では、遺伝子破壊株と相補株を用いて、それぞれの輸送機構を解明することを目的とした (図 1-15)。さらに、NarK1 と NarK2 の機能の違いに注目し、2つの遺伝子を持つ生物学的意義を明らかにすることも目指した。

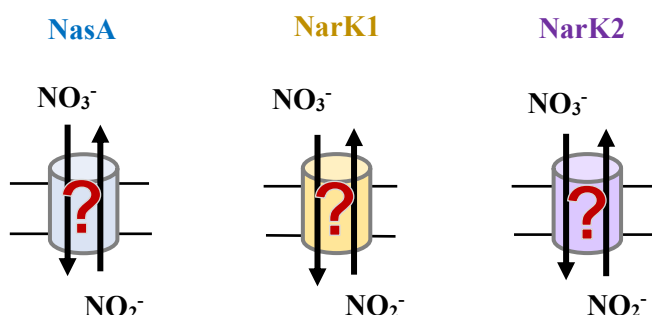


図 1-15 本章の目的

緑膿菌が持つ3つの NarK 様タンパク質について、輸送機構は未知の点が多い。第1章では、NasA、NarK1、NarK2 のそれぞれについて輸送機構を解明することを目的とした。

第2節 一重破壊株を用いた生育試験

第1項 $\Delta nasA$ 、 $\Delta nasA+nasA$ 、 $\Delta narK1K2$ の作製

相同組換えにより、MPAO1 株 (WT) から $\Delta nasA$ 、 $\Delta narK1K2$ をそれぞれ作製した。標的遺伝子が破壊されたことは PCR により確認した (図 1-16、1-17)。得られた $\Delta nasA$ に対し、Tn7 を利用してゲノム上の特定の位置に *nasA* 遺伝子を挿入することで、 $\Delta nasA+nasA$ を作製した。標的遺伝子が相補されたことは PCR により確認した。

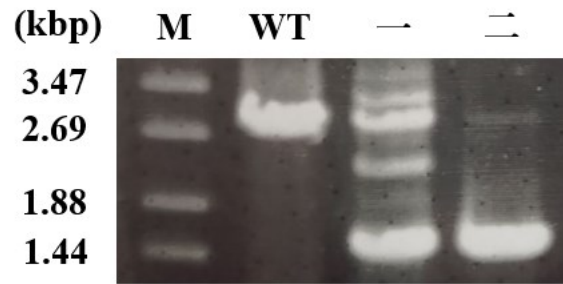


図 1-16 $\Delta nasA$ 作製における標的遺伝子破壊の確認

WT : 2.78 kb、一点交叉体 : 2.78 kb と 1.47 kb、二点交叉体 : 1.47 kb のバンドが確認された。

レーン上の表記は M : マーカー、WT : 野生株、一 : 一点交叉体、二 : 二点交叉体を示す。プライマーの組「DnasA_S1/D」を使用して増幅した PCR 断片を、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

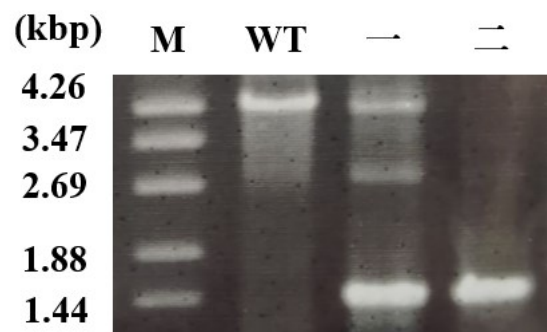


図 1-17 $\Delta narK1K2$ 作製における標的遺伝子破壊の確認

WT : 4.24 kb、一点交叉体 : 4.24 kb と 1.43 kb、二点交叉体 : 1.43 kb のバンドが確認された。

レーン上の表記は M : マーカー、WT : 野生株、一 : 一点交叉体、二 : 二点交叉体を示す。プライマーの組「DnasA_S1/D」を使用して増幅した PCR 断片を、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

第 2 項 硝酸同化試験による $\Delta nasA$ の評価

(1) WT、 $\Delta narK1K2$ 、 $\Delta nasA$ 、 $\Delta nasA+nasA$ に対し、硝酸ナトリウムを唯一の N 源とした培地で好気培養を行い、硝酸イオンを取り込んで増殖することができるかを調べた（硝酸同化試験）。本培地は、VB8.2 に NaNO_3 を 20 mM、IPTG を 1 mM それぞれ加えたものを使用した。

WT と $\Delta narK1K2$ が同等の生育を示した一方、 $\Delta nasA$ は全く増殖しなかった（図 1-18 左）。この結果から、*nasA* は硝酸同化に必須であることが示された。また、*narK1K2* は硝酸同化には寄与しないことが示唆された。 $\Delta nasA+nasA$ は 20 時間程度の長いラグの後に増殖した（図 1-18 右）。この結果から、*NasA* は硝酸イオンを取り込むことが示された。

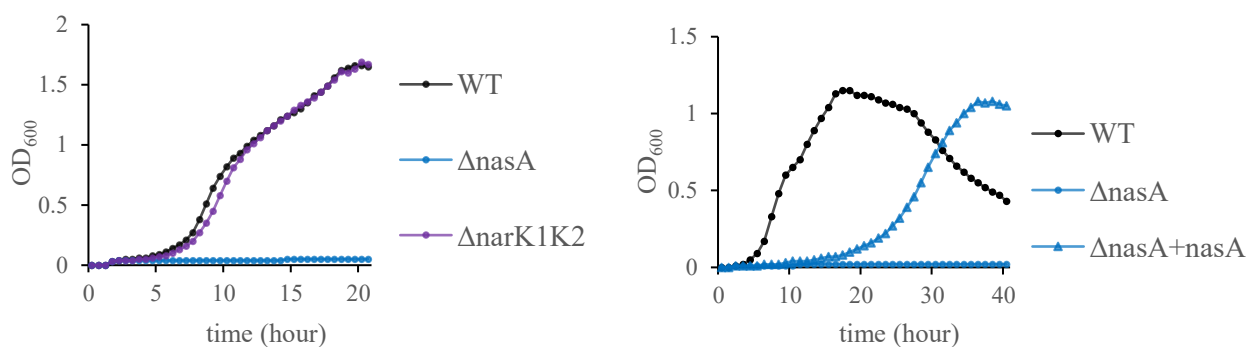


図 1-18 $\Delta narK1K2$ 、 $\Delta nasA$ の硝酸同化試験

WT、 $\Delta narK1K2$ 、 $\Delta nasA$ 、 $\Delta nasA+nasA$ を、好気、37°C、200 rpm で培養した。ネガティブコントロールとして、 NaNO_3 を添加しない培地でも各株を培養し、同時に測定した。いずれも増殖しなかったが、グラフの視認性を上げるため、上の図では省略した。図はいずれも 2 回の実験のうち 1 回の結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

(2) $\Delta nasA+nasA$ は硝酸同化生育を示したものの、20 時間程度の長いラグを有していたため、ゲノムに変異が入ったことにより増殖を始めた可能性が考えられた。そこで、硝酸同化条件で増殖した $\Delta nasA+nasA$ を植え継ぎ、同程度のラグが見られるかどうかを観察した。本培地は(1)と同じ組成とした。植え継ぎ試験は以下のようにして行った。 $\Delta nasA+nasA$ を本培地に初発 $\text{OD}_{600}=0.04$ となるように植菌し、培養開始から約 48 時間が経過した時点で培養を止めた。この菌液をすぐに同じ組成の fresh な培地に 1% (v/v) 植菌し、再度本培養した。

植え継いだ後も、20 時間程度のラグが観察された (図 1-19)。このことから、 $\Delta nasA+nasA$ による硝酸同化生育は、 $nasA$ の相補によるものであることが示唆された。

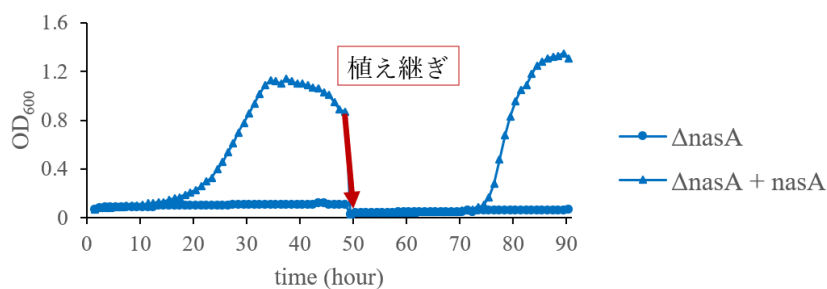


図 1-19 $\Delta nasA+nasA$ の硝酸同化植え継ぎ試験

$\Delta nasA+nasA$ を、好気、37°C、200 rpm で培養した。培養開始後約 48 時間後に、同組成の新しい本培地に植え継いだ。図は 1 回の実験結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第3項 脱窒試験による $\Delta nasA$ 、 $\Delta narK$ の評価

WT、 $\Delta nasA$ 、 $\Delta narK$ に対し、硝酸イオンを最終電子受容体とした嫌気培養を行い、増殖することができるかを調べた（硝酸脱窒試験）。本培地は LB+40 mM NaNO_3 を使用した。

WT と $\Delta nasA$ が同等の生育を示した一方、 $\Delta narK1K2$ は全く増殖しなかった（図 1-20）。この結果から、 $narK1K2$ は脱窒に必須であることが示された。すなわち、NarK1 と NarK2 の片方または両方によって、硝酸イオン取り込みと亜硝酸イオン排出が行われると考えられる。また、 $nasA$ は脱窒には寄与しないことが示唆された。

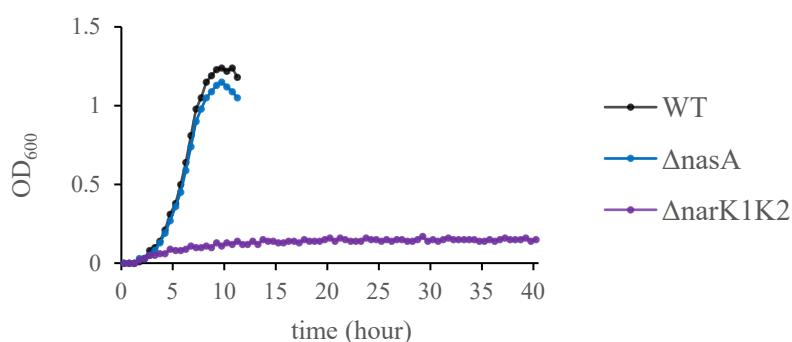


図 1-20 $\Delta nasA$ 、 $\Delta narK1K2$ の脱窒試験

WT、 $\Delta nasA$ 、 $\Delta narK1K2$ の 3 株を、嫌気、37°C、200 rpm で培養した。図は二連の実験の 1 回の結果を示す。

なお、この実験では前培養液からの植菌量を 1% (v/v) とした。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第4項 考察

硝酸同化試験において、 $\Delta nasA$ は増殖できず、 $\Delta nasA+nasA$ は WT より長いラグがあるものの増殖した。この結果から、NasA は硝酸イオンを取り込むこと、さらには硝酸同化生育に NasA が必須であることが示された。また、硝酸脱窒試験において、 $\Delta narK1K2$ は増殖しなかった。この結果から、NarK1 と NarK2 の片方あるいは両方が、緑膿菌の脱窒生育に必要なことが示された。

第3節 四重破壊株を用いた生育試験

第1項 四重破壊株 $\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$ ($\Delta 4$)及び各遺伝子相補株の作製

各トランスポーターの機能を個別に評価するためには、それらの遺伝子の多重破壊株に各遺伝子を 1 つずつ相補し、生育を比較することが有効だと考えた。そこで $\Delta nasA$ を親株として、 $narK1K2$ 、 $napEFDABC$ 、 $PA1854$ の順に各遺伝子を破壊し、 $\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$ を作製した。なお、Nap 複合体はペリプラズムの硝酸イオン還元酵素、PA1854 は亜硝酸イオントランスポーターの可能性がある膜タンパク質である。ともに本章での解析に影響を及ぼすと考えられるため破壊した。

標的遺伝子が破壊されたことは PCR により確認した（図 1-21）。この四重破壊株（図 1-22）を今後 $\Delta 4$ と表記する。次に $\Delta 4$ を親株として、ゲノム上に位置特異的に相補遺伝子を挿入した相補株 $\Delta 4+nasA$ 、

$\Delta 4+narK1$ 、 $\Delta 4+narK2$ を作製した。この際、相補する遺伝子には、翻訳産物の C 末に His タグが付与されるように配列を設計した。His タグの付与は、後に発現したタンパクを検出・精製するためである。標的遺伝子が相補されたことは PCR により確認した。

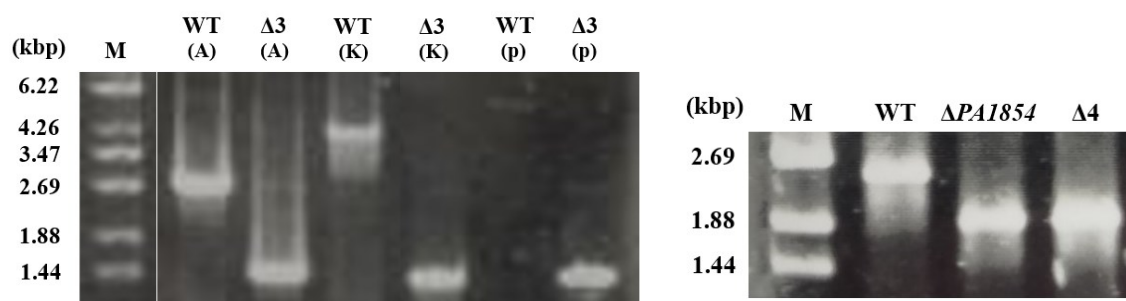


図 1-21 四重破壊株作製における標的遺伝子破壊の確認

(左) 三重破壊株における *nasA*、*narK1K2*、*napEFDABC* 破壊の確認

レーン上の表記は M：マーカー、WT：野生株、 $\Delta 3$ ：三重破壊株を示す。表記の最後の文字は使用したプライマーの組を示し、(A)は「DnasA_S1/D」、(K)は「DnarK12_S1/dnarK12_D」、(p)は「DnapA/S3」をそれぞれ表す。増幅した PCR 断片を 1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

(A)では WT：2.78 kb、二点交叉体：1.47 kb、(K)では WT：4.24 kb、二点交叉体：1.43 kb のバンドが確認された。(p)の WT では、6.02 kb のバンドが明確には観察されなかったが、二点交叉体で 1.50 kb のバンドが確認された。

(右) 四重破壊株における *PA1854* 破壊の確認

四重破壊株は、三重破壊株から *PA1854* を破壊することで作製した。

レーン上の表記は M：マーカー、WT：野生株、 $\Delta PA1854$ ：*PA1854* 破壊株、 $\Delta 4$ ：四重破壊株を示す。プライマーの組「ccoN3_C/F」を使用して増幅した PCR 断片を、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す。WT で 2.50 kb、 $\Delta PA1854$ と $\Delta 4$ で 1.96 kb のバンドが確認された。

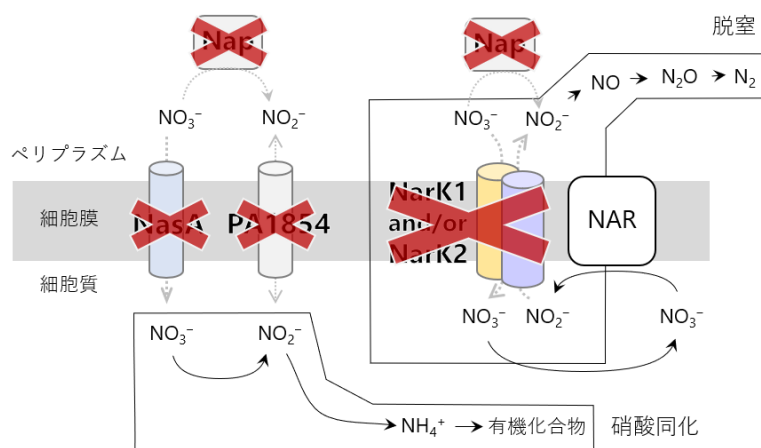


図 1-22 四重破壊株作製の目的

一重破壊株の生育試験では、ゲノム上に他のトランスポーター遺伝子が残っているという問題がある。そこで、それらの遺伝子及びペリプラズムの硝酸還元酵素 Nap を破壊した四重破壊株 $\Delta 4$ を作製した。さらに $\Delta 4$ を親株として、各トランスポーター遺伝子の相補株を作製した。相補にあたっては、上流に *lac* プロモーター、C 末に His タグの配列を付加し、ゲノム中に位置特異的に挿入した (図 0-13)。オリジナルの遺伝子を破壊し、*lac* プロモーターで相補したことにより、native の遺伝子発現制御の影響を排除し、各トランスポーターについて発現量を揃えて比較することができる。

第 2 項 硝酸同化試験による $\Delta 4$ 相補株の評価

(1) $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+nasA$ 、 $\Delta 4+narK1$ 、 $\Delta 4+narK2$ に対し、硝酸イオンを唯一の N 源とした好気培養を行い、硝酸イオンを取り込んで増殖することができるかを調べた。本培地は、VB8.2 に NaNO_3 を 20 mM、IPTG を 1 mM それぞれ加えたものを使用した。

$\Delta 4+nasA$ は、 $\Delta nasA+nasA$ の結果 (図 1-18 右) と同様、長いラグの後に増殖した (図 1-23 左)。ラグは約 40 時間であった。 $\Delta 4+narK1$ は WT と同程度に増殖した (図 1-23 右)。 $\Delta 4+narK2$ は増殖しなかった。この結果から、NarK1 も硝酸イオンを取り込み、細胞内の正味の窒素量を増やすことが示された。

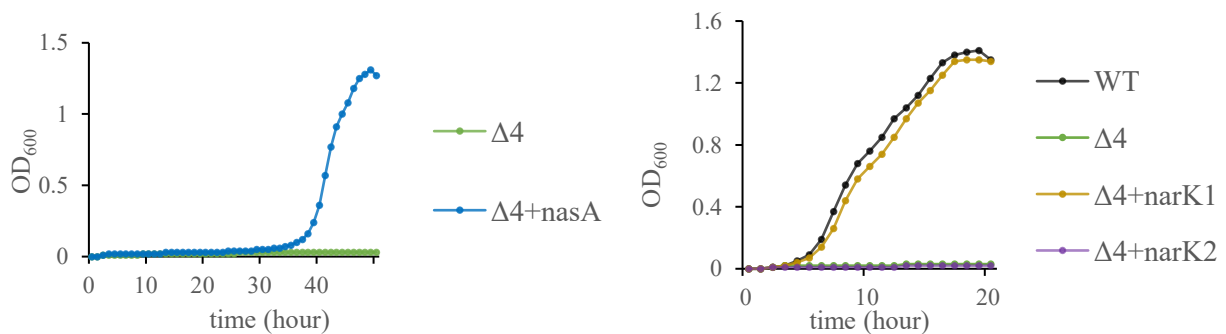


図 1-23 硝酸同化試験

$\Delta 4$ 、 $\Delta 4+nasA$ 、WT、 $\Delta 4+narK1$ 、 $\Delta 4+narK2$ を好気、37°C、200 rpm で培養した。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

(2) $\Delta 4+nasA$ のラグは 40 時間程度と長かった。近傍の遺伝子などから NasA は硝酸同化のためのトランスポーターだと予想され、硝酸イオンに対し high affinity である可能性が高い。そのため $\Delta 4+nasA$ では、細胞内に急速に流入した硝酸イオンの還元反応により、毒性の亜硝酸イオンが高濃度に蓄積し、生育が遅延したことが考えられた。そこで、硝酸塩の濃度を 5-60 mM の範囲で振った硝酸同化試験により、 $\Delta 4+nasA$ の増殖を見た。硝酸イオン濃度が低いほど、生成する亜硝酸イオンによる生育阻害は小さいと考えられた。ただし、この実験では pH 7.0 の VB 培地 (VB 7.0) を用いた。

ラグは長く、どの条件でも 25 時間程度で揃っていた (図 1-24)。このことから、硝酸同化試験における $\Delta 4+nasA$ の長いラグは、上記で予想したような単純な理由ではない可能性がある。ただし、設定した

最小濃度である硝酸イオン 5 mM において、既に NasA は基質飽和状態であった可能性も考えられる（図 1-25）。

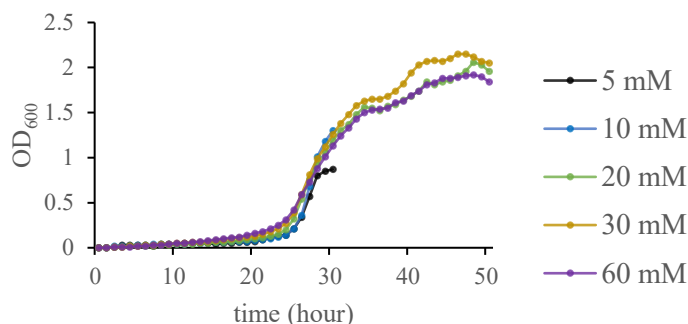


図 1-24 異なる硝酸イオン濃度における $\Delta 4+nasA$ の硝酸同化生育

$\Delta 4+nasA$ を好気、37°C、200 rpm で培養した。培地中の硝酸ナトリウム濃度は 5、10、20、30、60 mM のいずれかである。1 回の実験の結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

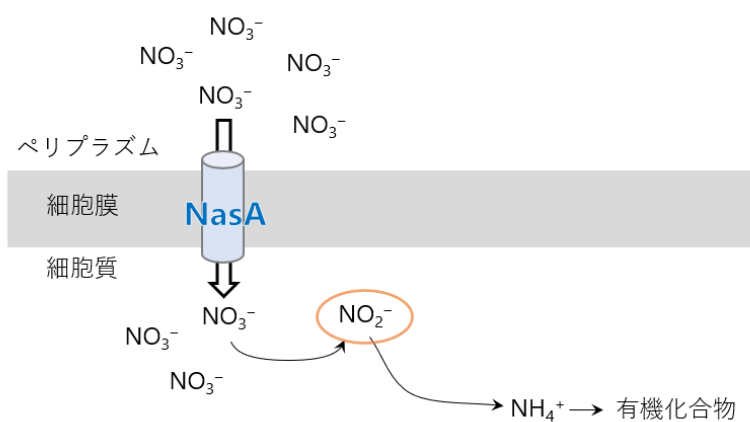


図 1-25 本実験結果の原因の予想図

硝酸イオン濃度 5 mM において、既に NasA は基質飽和状態であった可能性がある。結果としていずれの濃度条件でも、細胞内には概ね等量の亜硝酸イオンが生じ、ラグが揃う原因となった。また WT ではラグが 5 時間程度（図 1-18）と短いことから、 $\Delta 4+nasA$ における NasA の発現量は WT より顕著に多く、細胞内に亜硝酸イオンがより高濃度に蓄積しやすいとも考えられる。

第 3 項 脱窒試験による $\Delta 4$ 相補株の評価

(1) NasA 相補による脱窒生育への影響を見るため、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+nasA$ に対し、硝酸イオンを最終電子受容体

とした嫌気培養を行い、増殖することができるかを調べた。本培地は LB+40 mM NaNO₃ に IPTG を 1 mM 加えたものを使用した。なお、グラフには同時に測定した WT 及び $\Delta nasA+nasA$ の結果も示す。

$\Delta 4$ は *narK1K2* を破壊しているため、増殖しなかった。 $\Delta 4+nasA$ は、50-80 時間程度の長いラグの後に増殖した (図 1-26 左)。しかし増殖速度も濁度の最大値も小さかったため、変異による増殖が疑われた。そこで約 118.5 時間の培養液を fresh な培地に 1%(v/v) 植え継いで培養した。植え継ぎ後も 45 時間ほどのラグを要して増殖した (図 1-26 右) ことから、この株は脱窒条件で増殖することが示された。したがって、NasA は「硝酸イオンの取り込み」と「亜硝酸イオンの排出」の両方を行うことが示唆された。Goddard らは *P. denitrificans* の *narK1K2* (遺伝子名は *narK*) 破壊株で *nasA* を発現させたが、脱窒条件での生育は回復しなかったと報告している (79)。しかし、本実験のような長いラグの後の増殖を見逃した可能性もある。なお、この長いラグは pH 非依存的であった (図 1-27)。ラグの原因が亜硝酸イオンの蓄積にあるとすれば、NasA による NO₃/NO₂⁻ の交換速度は、NAR による NO₂⁻ の生成よりも顕著に遅いと考えられる (図 1-28)。

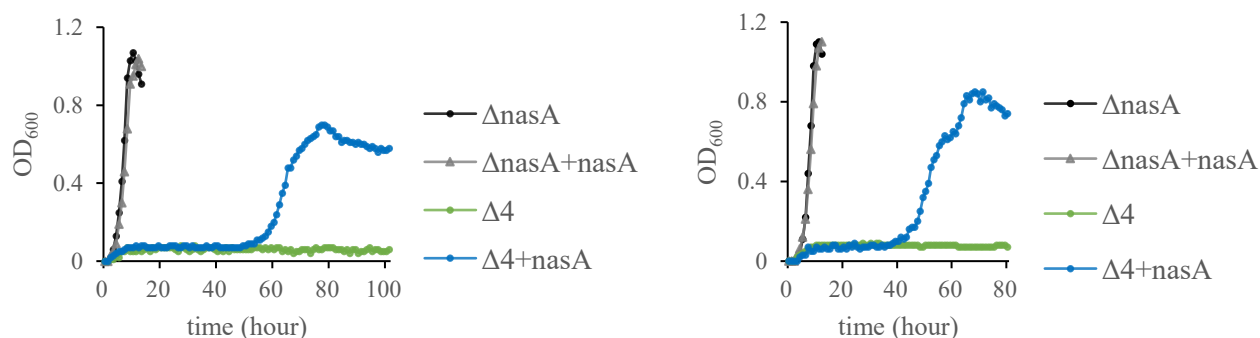


図 1-26 $\Delta 4+nasA$ の脱窒試験

(左) $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+nasA$ の 2 株を嫌気、37°C、150 rpm で培養した。3 回の実験のうち 1 回の結果を示す。ただし図示した 1 回のみ、比較のため $\Delta nasA$ と $\Delta nasA+nasA$ も培養し、植え継ぎ試験も行った。

(右) 植え継ぎ試験。1 回の実験の結果を示す。

横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

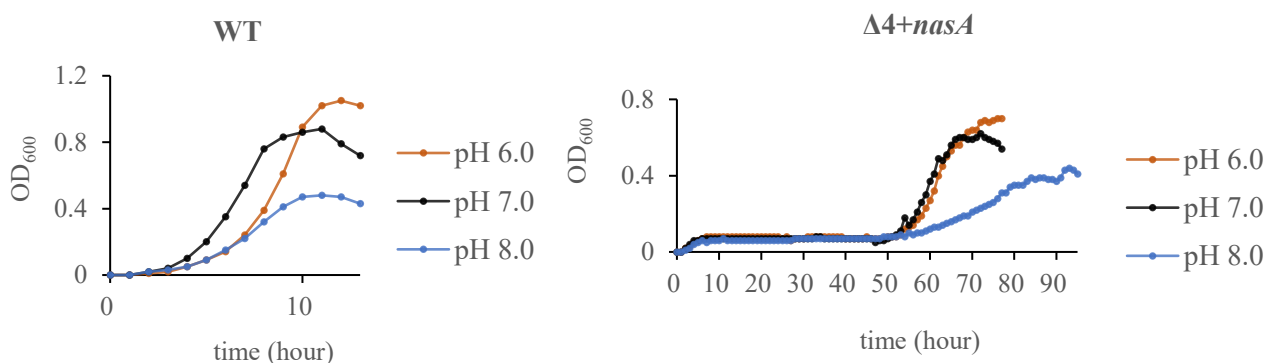


図 1-27 異なる pH における $\Delta 4+nasA$ の脱窒生育

WT (左図) と $\Delta 4+nasA$ (右図) に対し、LB+40 mM NaNO_3 (pH 6.0/7.0/8.0)における脱窒生育を調べた。培養条件は嫌気、37°C、150 rpm とした。1 回の実験の結果を示す。ただし培地は、buffer として pH 6.0 用に 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)、pH 7.0 用に 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bis-Tris)、pH 8.0 用に HEPES を各 20 mM 加え、HCl または NaOH を適量滴下して調製した。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

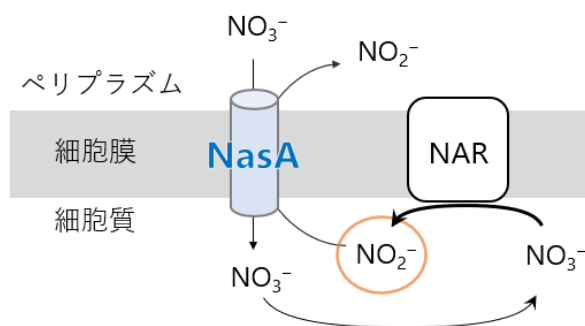


図 1-28 本実験における $\Delta 4+nasA$ の生育遅延メカニズムの予想図

NasA は「硝酸イオンの取り込み」と「亜硝酸イオンの排出」の両方を行うが、両イオンの交換速度は NAR による還元反応の速度よりも遅く、細胞内に亜硝酸イオンが高濃度に蓄積しやすい可能性がある。ただしここでの速度とは、1 分子あたりではなく、発現している各タンパクの総量あたりの比較である。

(2) NarK1 または NarK2 相補による脱窒生育への影響を見るため、WT、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+narK1$ 、 $\Delta 4+narK2$ の 4 株に対し、硝酸イオンを最終電子受容体とした嫌気培養を行い、増殖することができるかを調べた。ただし、NarK1 と NarK2 の使い分けは、硝酸イオンに対する affinity の違いに起因する可能性が考えられた。そのため硝酸イオンの濃度を 10 mM と 100 mM の 2 段階に設定し、本培地として LB+10 or 100 mM NaNO_3 に IPTG を 1 mM 加えたものを使用した。

$\Delta 4+narK1$ はいずれの濃度でも増殖した (図 1-29)。一方、 $\Delta 4+narK2$ はいずれの濃度でも増殖しなかった。この結果から、NarK1 は硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの排出の両方が可能であり、単独で脱窒を成立させることが示された。NarK2 は、硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの排出の少なくとも片方が行えないことが示された。 $\Delta 4+narK2$ が硝酸同化試験でも増殖しなかったこと (図 1-23 右) を考えると、NarK2 はそもそも硝酸イオンの取り込みが行えず、亜硝酸イオンを排出する可能性は残る。また、NarK1 と NarK2 の役割の違いは、硝酸イオンに対する affinity の違いに起因するわけではないことが示唆された。

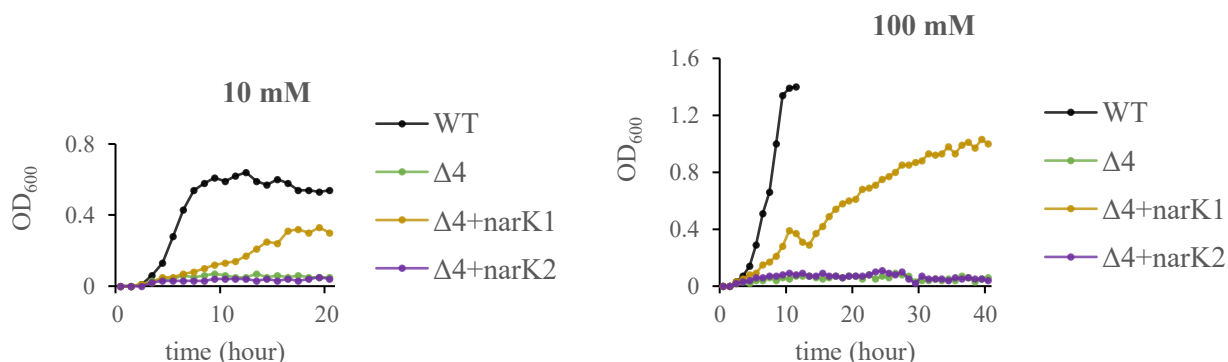


図 1-29 $\Delta 4+narK1$ 、 $\Delta 4+narK2$ の硝酸脱窒試験

WT、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+narK1$ 、 $\Delta 4+narK2$ の 4 株を嫌気、37°C、200 rpm で培養した。2 回の実験のうち 1 回の結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 4 項 $\Delta 4+narK2$ の挿入配列のシーケンシング

前項において、 $\Delta 4+narK2$ が脱窒生育をしなかった。このことは、緑膿菌の先行研究 (82) 及び *P. denitrificans* の先行研究 (80) の結果に反している。*narK2* 相補用のプラスミドを作製する際、配列にエラーが入った可能性は否定できない。そこで、*narK2* の正しい配列がゲノムに組み込まれたことを確認するため、 $\Delta 4+narK2$ 株において Tn7 により挿入された配列をシーケンシングした。

$\Delta 4+narK2$ のゲノム DNA を抽出して鋳型とし、相補領域を増幅する 1 組のプライマー「Tn7_LAC_F1/R1」を用いて PCR した。この反応液を脱塩し、*narK2* の配列を網羅する 4 種のプライマー「PAnarK2_check1/2/3/4」をそれぞれ加えた 4 種のサンプルのシーケンシングを FASMAC に委託した。その結果、組み込んだ配列にエラーは存在せず、*narK2* が正しく相補できていたことが確認された。

第 5 項 ウェスタンブロッティングによる相補タンパク質の検出

相補株間に相補タンパク質の発現量に差があった場合、各トランスポーター機能について誤った論理を展開する可能性がある。そこで、ウェスタンブロッティングによる各相補タンパク質の検出を試みた。まず NarK1 及び NarK2 に対してそれぞれ特異的な抗体を使用して実験を行ったが、標的タンパク質との特異的な結合を観察できなかった (図 1-30)。このとき、一次抗体はそれぞれ 2 種、「抗 NarK1_1」「抗 NarK1_2」「抗 NarK2_1」「抗 NarK2_2」を試し (抗原部位は【材料と方法】に記載)、二次抗体は Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories) を使用した。

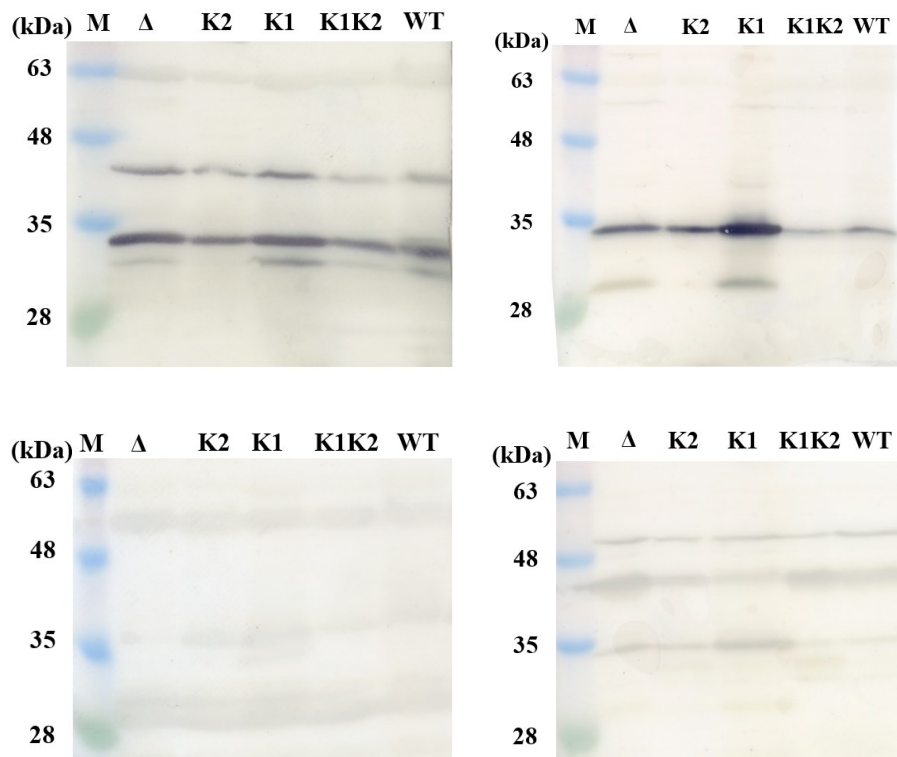


図 1-30 NarK1 抗体、NarK2 抗体によるウェスタンブロッティング

(M)はマーカー、(Δ)は $\Delta narK1K2$ + 空ベクター、(K1)は $\Delta narK1K2$ + p-*narK1*、(K2)は $\Delta narK1K2$ + p-*narK2*、(K1K2)は $\Delta narK1K2$ + p-*narK1K2*、(WT) は WT + 空ベクターを表す。嫌気培養した各菌株の膜画分を泳動し、抗 NarK1_1 (左上)、抗 NarK1_2 (右上)、抗 NarK2_1 (左下)、抗 NarK2_2 (右下) をそれぞれ一次抗体として検出した。いずれの抗体でも、標的タンパク質を特異的に検出できなかった。

次に、His タグに対する一次抗体「Anti 6×Histidine, Monoclonal Antibody (Wako)」及び二次抗体「Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega)」を用いたところ、相補タンパク質由来と見られるバンドが確認された。実験は次のように行った。好気培養した WT、 $\Delta 4$ +*nasA*、 $\Delta 4$ +*narK1*、 $\Delta 4$ +*narK2* をフレンチプレスで破碎し、未破碎菌体を除去した後、超遠心して膜画分を調製した。タンパク質 3.6 μ g を 98°C で 5 分間処理した後、10%ポリアクリルアミドゲルにアプライして泳動した。泳動後のゲルから PVDF メンブレンに転写し、His タグに対する抗体を使用して検出した。

NasA のレーンでは、やや薄いバンドがマーカーの ~28 kDa と ~35 kDa の間に見られた (図 1-31)。NasA の予測質量が 42.4 kDa であることから、NasA 由来としては移動度が大きい。ただし、疎水性の高いタンパク質は SDS 結合量が多くなることや、His タグ抗体による検出では理論値より小さくなる例が知られている。実際に、*Paracoccus denitrificans* の His タグ付与 NasA を His タグ抗体で検出した結果では、理論値 42.2 kDa に対してバンドは約 28 kDa の位置であった (79)。これらのことを考慮すると、本実験における当該のバンドは NasA 由来だと考えられる。

NarK1 のレーンでは、濃い発色が ~35 kDa のマーカーの前後に見られた (図 1-31)。NarK1 の予測質量が 47.2 kDa であることから、NarK1 由来としては移動度が大きい、NasA と同じ理由でこの発色が NarK1

由来だと考えられる。*Paracoccus denitrificans* の His タグ付与 NarK1 を His タグ抗体で検出した結果では、理論値 48.3 kDa に対してバンドは 28 kDa の少し上の位置であった (79)。また条件を変えてはいるが、同じ試料と同じ抗体を用いた実験により、ちょうど 35 kDa ほどの発色が NarK1 をよく検出していると思われた。

NarK2 のバンドは観察されなかった (図 1-31)。このことから、 $\Delta 4+narK2$ において *narK2* は発現していないか、NarK2 は不安定なタンパク質であると考えられる。いずれの場合も、 $\Delta 4+narK2$ が硝酸同化条件及び脱窒条件で増殖しないこと (本章第 3 節第 2 項、同第 3 項) と整合する。

NarK1 は NasA より顕著に濃いバンドが観察されたことから、より発現量が大きかった可能性がある。一方で NarK2 のバンドが観察されなかったことから、これらタンパク質間で安定性が異なる可能性があり、本実験によって *in vivo* での発現量を反映した結果が得られたとは言えない。*in vivo* での発現量を比較するには、試料調製や泳動条件などをさらに検討する必要があると考えられた。

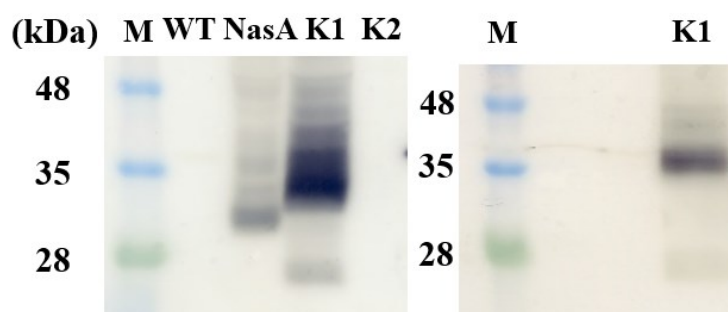


図 1-31 His タグ抗体による相補タンパク質の検出

(左) 10%ゲル、(右) 15%ゲルの結果。膜画分を泳動し His タグ抗体で検出した。左右の図で同じ量のタンパク質を泳動した。

(M)はマーカー、(WT)は野生株、(NasA)は $\Delta 4+nasA$ 、(K1)は $\Delta 4+narK1$ 、(K2)は $\Delta 4+narK2$ を表す。

第 6 項 考察

$\Delta 4$ を親株として His タグ付きの遺伝子をゲノムに挿入した相補株を作製し、生育試験に供した。 $\Delta 4+nasA$ と $\Delta 4+narK1$ は硝酸同化条件、硝酸脱窒条件の両方で増殖した。この結果から、NasA と NarK1 は硝酸イオンを N 源として取り込み、細胞内の正味の窒素量を増やすことができる一方、硝酸イオンと亜硝酸イオンのアンチポートも行えることが示された (図 1-32)。NarK2 は硝酸同化条件、脱窒条件のいずれにおいても増殖しなかった。この結果のみからは、NarK2 が亜硝酸イオンを排出する可能性はあるものの、硝酸イオンを取り込めないことが示唆された。ただしウェスタンブロッティングの結果から、NarK2 は *in vivo* においても不安定であり、今回の生育試験では輸送活性を検証できていない可能性がある。

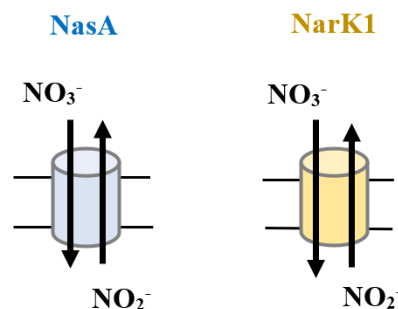


図 1-32 NasA、NarK1 の輸送モデル

$\Delta 4+nasA$ 、 $\Delta 4+narK1$ に対する硝酸同化試験及び脱窒試験により、両者は硝酸イオン取り込みと亜硝酸イオン排出の両方を行えることが示された。

第 4 節 プラスミド相補株を用いた生育試験

第 1 項 プラスミド相補株の作製

前節第 4 項で、 $\Delta 4+narK2$ には、正しい配列の *narK2* が相補されていたことは示された。しかし、C 末に付加した His タグによってトランスポーター活性に影響が出た可能性も考えられた。また、緑膿菌における先行研究では His タグを付加していないため、His タグを付加しない native の遺伝子配列を発現プラスミド pMMB67EH に組み込んで緑膿菌に導入し、プラスミド相補株 $\Delta narK1K2+p-narK1$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK2$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK1K2$ を作製した。またコントロールとして、pMMB67EH を導入した MPAO1+空ベクター、 $\Delta narK1K2$ +空ベクター、 $\Delta 4$ +空ベクターも同様に作製した。空ベクターまたは標的遺伝子が相補されたことを PCR により確認した。

第 2 項 脱窒試験によるプラスミド相補株の評価

WT、 $\Delta narK1K2$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK1$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK2$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK1K2$ の 5 株に対し、硝酸イオンを最終電子受容体とした嫌気培養を行い、増殖することができるかどうかを調べた。本培地は、LB+40 mM NaNO_3 に IPTG を 1 mM 加えたものを使用した。

$\Delta narK1K2+p-narK1$ と $\Delta narK1K2+p-narK1K2$ は増殖した (図 1-33)。一方、 $\Delta narK1K2+p-narK2$ は増殖しなかった。この結果から、前節の結果と同様に、NarK1 は単独で脱窒生育を成立させることが可能であり、NarK2 は不可能であることが示唆された。ただし、*narK1K2* 相補株の方が *narK1* 相補株よりも良好に生育した。この原因については本章第 7 節で考察する。

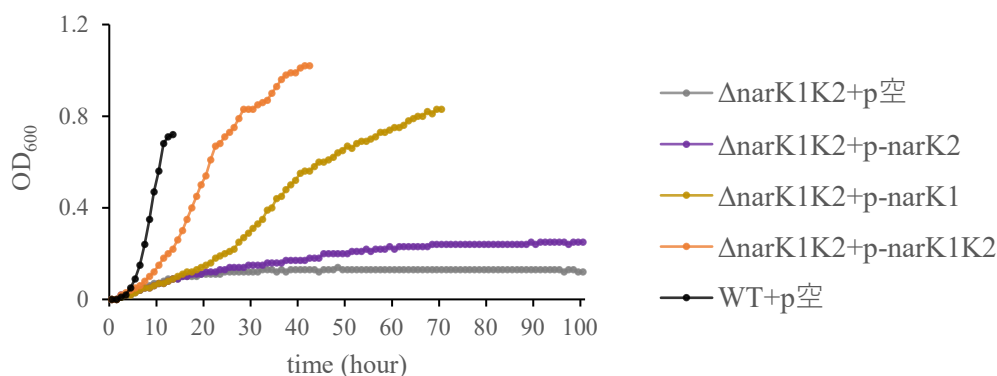


図 1-33 *narK1*、*narK2*、*narK1K2* の各プラスミド相補株の脱窒試験

WT+空ベクター、 $\Delta narK1K2$ +空ベクター、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK2*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1K2* の 5 株を嫌気、37°C、150 rpm で培養した。3 回の実験のうち 1 回を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

前節と同様に、NarK1 と NarK2 で基質に対する affinity が異なる可能性を考え、硝酸イオンの濃度を 10、100 mM にも設定したが、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1* はいずれの濃度でも増殖し、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK2* はいずれの濃度でも増殖しなかった。さらに pH 条件 (pH 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)、温度条件 (23°C)、栄養条件 (LB に代えて合成培地を使用) などを変えて同様の試験を行ったが、いずれも NarK1 のみが活性を持つことを示唆する結果となった (data not shown)。

ウェスタンブロッティングの結果 $\Delta 4+narK2$ でバンドが見られなかった (図 1-31) ことから、この株で *narK2* は発現していないか、NarK2 は不安定なタンパク質であると考えられた。これに対し、ゲノムへの挿入とプラスミドからの発現という 2 通りの *narK2* 相補株でいずれも脱窒生育を示さなかったこと (本項、第 3 節第 3 項) を考慮すると、NarK2 が不安定である可能性が高いと考えられた。

第 5 節 脱窒生育への NAR の影響についての検証

第 1 項 異化型硝酸還元酵素 NAR

NAR は脱窒における最初の還元反応 ($\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) を担う酵素で、嫌気呼吸における H^+ ポンプの一種である。すなわち、細胞膜の還元型キノンから細胞質の硝酸イオンへと電子を流し、その還元反応と共役して H^+ を細胞質からペリプラズムへと輸送する (図 1-34)。NAR の各サブユニット及びシャペロンをコードする *narGHJI* 遺伝子群は *narK1K2* の後ろにコードされており、この 6 遺伝子は嫌気条件かつ硝酸イオン存在下で発現するオペロンを構成する (図 0-10)。そのため、*narK1K2* の破壊に伴い *narGHJI* の発現も影響を受けた可能性がある。また、NAR が NarK1 and/or NarK2 と相互作用して、NAR 活性が変化する可能性も考えられる。相補株間で NAR 活性に差が生じていた場合、脱窒試験における生育プロファイルの差は、単純にトランスポーターの輸送機能の違いに起因するとは言えない。実際、本章第 4 節の脱窒試験において、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1K2* は WT ほど良好な増殖を示さなかった (図 1-33)。そこで、*narK1K2* 遺伝子破壊が生育試験の結果に影響を与えているかどうかを調べるため、NAR の活性測定及び NarG に対するウェスタンブロッティングを行った。

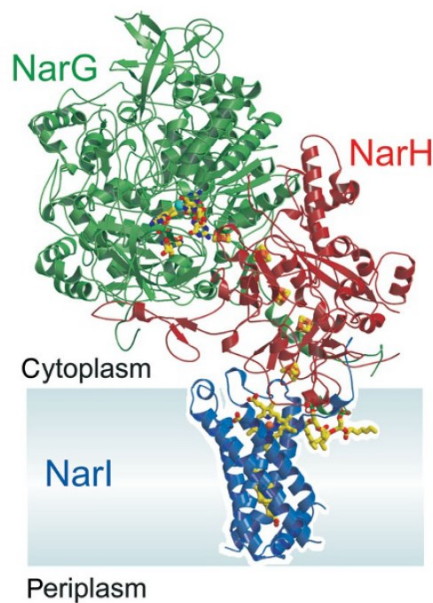


図 1-34 大腸菌 NAR の結晶構造 ((87)より引用)

この図では、グレーで示された膜の上側が細胞質、下側がペリプラズムである。cofactor として 2 つのヘム、1 つの molybdenum-bis-molybdopterin guanine dinucleotide cofactor (Mo-bis-MGD)、5 つの鉄硫黄クラスターが ball-and-stick model で描かれている。還元型キノンから NarI、NarH を経て NarG の活性中心へと電子が供給される。なお、同一オペロン上にコードされている NarJ は Mo-bis-MGD の結合を担うシャペロンであり (88)、この結晶構造には含まれない。

第 2 項 NAR の活性測定

株間で NAR 活性に違いがあるか検証するため、WT、 $\Delta narK1K2$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK1$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK2$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK1K2$ の 5 株における NAR 活性を測定して比較した。

Crude extract の代わりに水を用いたサンプルでは、亜硝酸イオン濃度は検出限界以下だった。また、crude extract は加えたが硝酸イオンを加えなかったサンプルでも、亜硝酸イオン濃度は検出限界以下だった。各株の測定値は表 1-4 のようであった。WT と比較して *narK1K2* 遺伝子を破壊した 4 株は活性が 1 桁ほど低かった。また、*narK1* 相補株、*narK2* 相補株、*narK1K2* 相補株の間で有意な差は認められなかった。これらの原因として、*narK1K2* 遺伝子を破壊した株で「*narGHJI* の発現量が少ない」か「NAR1 分子あたりの活性が低い」という 2 つの可能性が考えられた。しかしながら NAR 活性測定の結果から、前項までの脱窒生育プロファイルの株間の差は、NAR 活性の差ではなく相補したトランスポーターの輸送機能の差によることが示唆された。

表 1-4 NAR 活性測定値

3 回の試行の平均値 (活性値) と標準偏差を示す。

strains	活性値 nmol/(min・mg protein)	標準偏差 (%)
WT	166.7	6.02
$\Delta narK1K2$	17.95	6.06
$\Delta narK1K2+p-narK1$	21.19	10.4
$\Delta narK1K2+p-narK2$	21.94	10.4
$\Delta narK1K2+p-narK1K2$	17.89	14.2

第3項 ウェスタンブロッティングによる NarG の検出

さらに、NAR 複合体の活性中心を持つサブユニットである NarG に対するウェスタンブロッティングを行った。

WT+空ベクター、 $\Delta narK1K2$ +空ベクター、 $\Delta narK1K2+p-narK1$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK2$ 、 $\Delta narK1K2+p-narK1K2$ の 5 株について、それぞれ嫌気培養した菌体をフレンチプレスで破碎し、未破碎菌体を除去した後、超遠心により膜画分を得た。各株由来の膜画分について、BCA 法でタンパク質濃度を測定した。タンパク質 1.5 μ g を SDS-PAGE のサンプルバッファーと混ぜて 98°C、3 分間の熱処理で変性させた後、7.5%ポリアクリルアミドゲルにアプライして泳動した。PVDF メンブレンに転写した後、一次抗体「抗 NarG」と二次抗体「Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)」により検出した。

野生株において、他の 4 株より顕著に太く濃いバンドが観察された (図 1-35)。バンドはマーカーの ~130 kDa の少し上に見られ、NarG の予測質量が 141 kDa であることから、NarG 由来のバンドと考えられる。前項において NAR 活性は *narK1K2* 遺伝子を破壊した株において WT より低かった。この原因は *narGHJI* 遺伝子群の発現量の低さに起因することが示唆された。

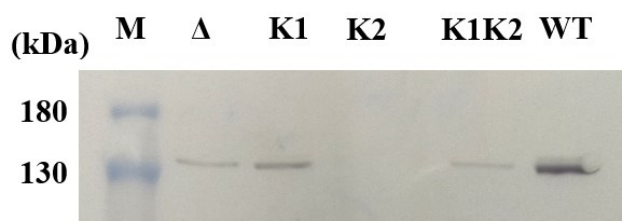


図 1-35 ウェスタンブロッティングによる NarG の検出

(M)はマーカー、(Δ)は $\Delta narK1K2$ +空ベクター、(K1)は $\Delta narK1K2+p-narK1$ 、(K2)は $\Delta narK1K2+p-narK2$ 、(K1K2)は $\Delta narK1K2+p-narK1K2$ 、(WT) は WT+空ベクターを表す。膜画分を泳動し NarG に対する抗体で検出した。WT において顕著に太いバンドが観察された。

第6節 緑膿菌における先行研究との差異

本研究における緑膿菌の NarK1 と NarK2 に関する結果は、先行研究 (82) と異なるものであった。先行研究では、脱窒生育には NarK2 が重要であり NarK1 は寄与しないとされており、逆の結果だと言える。本研究では、シーケンシングにより *narK2* 相補株が正しく作製されたことを確認し、また His タグを付与しない野生型遺伝子の相補株も用いたが、結果は先行研究とは一致しなかった。

結果が一致しない要因としてまず考えられたのは、遺伝子破壊株構築の方法が異なっている点であった。先行研究では標的遺伝子中に Gm カセット (*aacC1*) を挿入することで、*narK1*、*narK2* をそれぞれ破壊していた(図 1-11)。膜タンパク質トポロジー予測プログラム Phobius (89)(90)を利用し、NarK1 と NarK2 の膜貫通部位を予測した。また *aacC1* の挿入に使われた制限酵素部位を調べて比較した (図 1-36)。*narK1::aacC1*、*narK2::aacC1* ともに、挿入配列の両側の断片は、ヘリックスの端または非ヘリックス部で切られていた。結果として、N 末側または C 末側のペプチド断片がほとんど完全長のヘリックスとして綺麗にフォールディングされ、細胞膜に挿入された可能性がある。この影響については、次の第7節で実験結果を踏まえて考察した。

ID	UNNAMED				ID	UNNAMED			
FT	TOPO_DOM	1	11	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	1	39	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	12	34		FT	TRANSMEM	40	57	
FT	TOPO_DOM	35	45	NON CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	58	76	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	46	65		FT	TRANSMEM	77	94	
FT	TOPO_DOM	66	71	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	95	105	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	72	92		FT	TRANSMEM	106	125	
FT	TOPO_DOM	93	97	NON CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	126	130	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	98	122		FT	TRANSMEM	131	150	
FT	TOPO_DOM	123	133	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	151	170	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	134	161		FT	TRANSMEM	171	199	
FT	TOPO_DOM	162	166	NON CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	200	218	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	167	184		FT	TRANSMEM	219	239	
FT	TOPO_DOM	185	213	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	240	259	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	214	235		FT	TRANSMEM	260	281	
FT	TOPO_DOM	236	246	NON CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	282	292	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	247	267		FT	TRANSMEM	293	312	
FT	TOPO_DOM	268	278	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	313	323	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	279	297		FT	TRANSMEM	324	342	
FT	TOPO_DOM	298	316	NON CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	343	347	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	317	335		FT	TRANSMEM	348	366	
FT	TOPO_DOM	336	354	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	367	405	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	355	377		FT	TRANSMEM	406	427	
FT	TOPO_DOM	378	382	NON CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	428	438	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	383	402		FT	TRANSMEM	439	459	
FT	TOPO_DOM	403	431	CYTOPLASMIC.	FT	TOPO_DOM	460	468	CYTOPLASMIC.
//					//				

制限酵素名	制限酵素サイト	ペプチド断片	制限酵素名	制限酵素サイト	ペプチド断片
NotI	219 塩基目	1-73 番残基	XhoI	450 塩基目	1-150 番残基
SalI	1,261 塩基目	421-431 番残基	ApaI	1,152 塩基目	384-468 番残基

図 1-36 *aacC1* 挿入後の N 末及び C 末側ペプチド断片のトポロジー予測

(左) 上：Phobius による NarK1 トポロジー予測。下：*aacC1* の挿入に使われた制限酵素サイト。
(右) 上：Phobius による NarK2 トポロジー予測。下：*aacC1* の挿入に使われた制限酵素サイト。

次に、培養方法の違いによる影響を検討するため、当該論文の脱窒試験の条件を確認し、本研究のものと比較した（表 1-5）。

表 1-5 先行研究と本研究における脱窒試験の条件比較

	先行研究 (82)	本研究
温度	37°C（共通）	
培地	LB（共通）	
硝酸イオン濃度	"supplemented with nitrate at a final concentration of 1%" NaNO ₃ で計算すると 117.7 mM KNO ₃ で計算すると 98.9 mM NO ₃ ⁻ で計算すると 161.3 mM	10-100 mM
濁度測定	OD ₆₆₀	OD ₆₀₀
容器、攪拌等	“magnetic stirring in 125-ml Erlenmeyer flask” 培地量は不明。	200 rpm で往復振とう。 試験管に培地 5ml。
嫌気条件の構築法	培地に 2% (wt/vol) Oxyrase を加えて溶存酸素を除去、 Ar で気相置換。	Ar による気相置換のみ。

先行研究の培養条件は詳細には書かれていないため、表 1-3 に記したものの以外に差があった可能性はあるが検証できない。硝酸イオン濃度については、本研究では 10-100 mM という広い範囲で実験しているため、結果の不一致を生じさせる原因ではないと考えられる。濁度測定における波長の違いは生育曲線の形を変えうるが、OD₆₆₀ と OD₆₀₀ の値には相関があると考えられる。よって本研究において *narK2* 相補株がほとんど増殖しなかったという結果は、600 nm の波長で濁度測定したからだとは考えにくい。容器や攪拌等の違いは、増殖の有無には大きく影響しないと思われる。また、本研究では本培地中の溶存酸素は除去していないが、 $\Delta narK1K2$ や $\Delta 4$ が脱窒生育をしなかったため、十分に嫌氣的であったと考えられる。以上のことから、結果の不一致の原因となるような培養条件の違いは無かったと考えられた。

第 7 節 生育試験による NarK1-NarK2 の相互作用の解析

第 1 項 背景

本章第 1 節第 6 項で述べた通り、フュージョン型 NarK1K2 を持つ細菌では、NarK1 と NarK2 が相互作用していることが示唆された (80)。また本章第 4 節の実験では、*narK2* 相補株は増殖しなかったにも関わらず、*narK1K2* 相補株が *narK1* 相補株よりも良好に生育した。この原因として、*narK1K2* 相補株では共発現した NarK1-NarK2 間に相互作用が形成され、片方あるいは両方の活性が変化した可能性が考えられた。そこで (80) の論文の方法に倣い、不活性型 NarK1 と野生型 NarK2 の相補株を作製して生育試験を行った。

第2項 不活性型 NarK1 と野生型 NarK2 の共発現株の作製

NNP family で完全に保存されている 2 つの Arg 残基 (大腸菌 NarK では Arg89 と Arg305、*P.denitrificans* NarK1 では Arg66 と Arg269) は、いずれも基質結合に関わり (図 1-37)、変異により活性が失われる例が複数知られている (69)(70)(80)。NarK の Arg89 残基にあたる緑膿菌 NarK1 の Arg62 残基及び NarK2 の Arg91 残基について、それぞれ Leu に置換した遺伝子を *narK1**、*narK2** と表記する。4 種の発現プラスミド pMMB67EH-*narK1*-K2**、pMMB67EH-*narK1*-K2*、pMMB67EH-*narK1-K2** を作製し、エレクトロポレーションにより $\Delta narK1K2$ に導入した。これらの株の生育試験を行うことで、NarK1-NarK2 間に相互作用が働くかどうかを検証した。

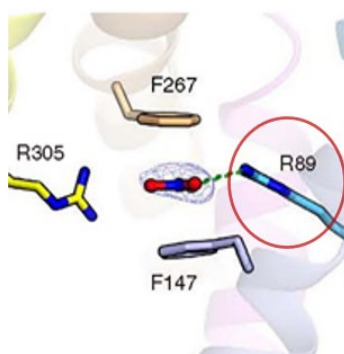


図 1-37 Leu に置換した Arg 残基 ((70)より改変して引用)

図は大腸菌 NarK の基質結合ポケットを表している。NarK の Arg89 にあたる、NarK1 の Arg62 及び NarK2 の Arg91 をそれぞれ Leu に置換した遺伝子を $\Delta narK1K2$ に導入した。

第3項 脱窒試験の結果と考察

$\Delta narK1K2$ +p-*narK1*-K2**、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK2*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1*-K2*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1-K2**、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1-K2* に対して脱窒試験を行った。培地は LB+40 mM NaNO₃ に 1 mM IPTG を添加したものを使用した。

$\Delta narK1K2$ +p-*narK1*-K2** 及び $\Delta narK1K2$ +p-*narK2* は増殖せず、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1*-K2* は増殖した (図 1-38)。このことから、緑膿菌の NarK1 及び NarK2 についても、この変異により輸送機能が失われることが示唆された。また $\Delta narK1K2$ +p-*narK1*-K2* の増殖は $\Delta narK1K2$ +p-*narK1* と同程度であり、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1-K2* には及ばなかった (図 1-39)。これらの結果から、NarK1 の存在により、NarK2 が NarK1 と同程度の輸送機能を持つようになったことが示唆された。言い換えれば、NarK2 の活性には NarK1 との共存が必要であることが示唆された。加えて、第3節のウェスタンブロッティングにおいて、 $\Delta narK2$ の His タグが検出されなかったのは、発現させた単体の NarK2 が不安定であったためと考えられた。NarK1 と NarK2 が複合体を形成しているとすれば (図 1-40)、図 1-36 から、NarK1 の N 末側 1-73 番残基 (TM1 と TM2 を含む) または C 末側 421-431 番残基 (TM を含まない) により NarK2 が安定化する可能性がある。すなわち、先行研究で $\Delta narK1::Gm$ が脱窒生育したのは、NarK1 由来のペプチド断片が NarK2 を安定させたからだという可能性が考えられた。ただしその場合でも、 $\Delta narK2::Gm$ が脱窒増殖しなかったことの説明がつかないことには注意が必要である。

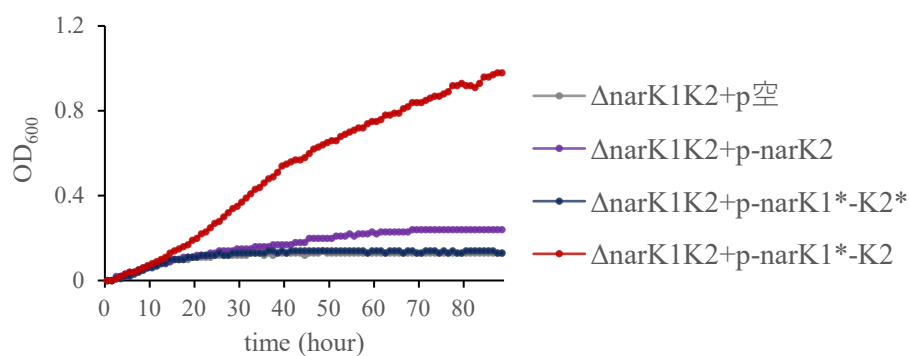


図 1-38 NarK1*, NarK2*への変異の影響

$\Delta narK1K2$ +空ベクター、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK2*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1**-K2*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1**-K2 の 4 株を LB+40 mM NaNO₃ 培地で嫌気、37°C、150 rpm で培養した。3 回の実験のうち 1 回の結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

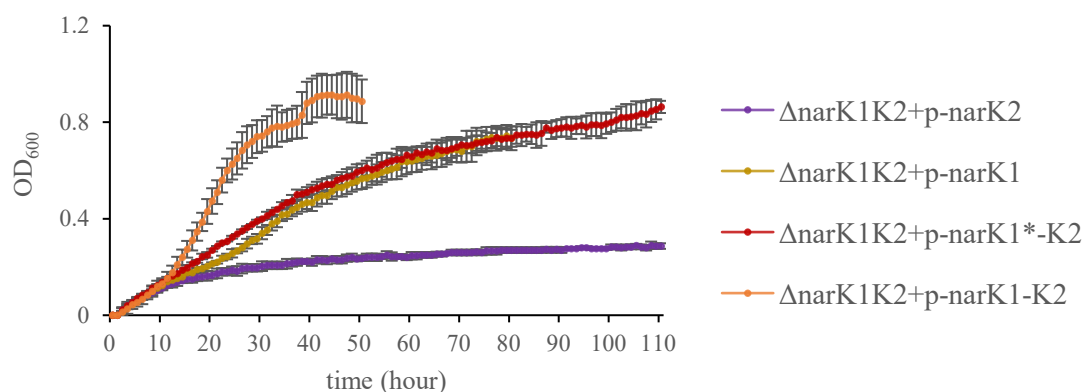


図 1-39 NarK1、NarK1*-NarK2、NarK1-NarK2 の比較

$\Delta narK1K2$ +p-*narK1*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK2*、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1**-K2、 $\Delta narK1K2$ +p-*narK1*-K2 の 4 株を LB+40 mM NaNO₃ 培地で嫌気、37°C、150 rpm で培養した。3 連で行った平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで示した。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

NarK1 NarK2

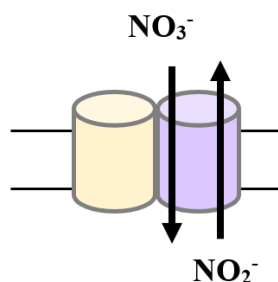


図 1-40 NarK1-K2 相互作用の模式図

NarK2 は NarK1 存在下で $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポート活性を示す。このことから、両者は複合体を形成している
と予想される。その際 NarK1 自体は輸送活性を失っていても良い。また、NarK1 の一部構造でも十分であ
る可能性がある。

第 4 項 NasA-NarK2 の相互作用の解析

前項により、NarK2 の活性には NarK1 との共存が必要なことが示唆された。次に、系統的に NarK1 タ
イプである NasA が、NarK2 の活性に影響を与えるかどうかに興味を持たれた。

エレクトロポレーションにより $\Delta 4+nasA$ に pMMB67EH-*narK2* を導入し、 $\Delta 4+nasA+p-narK2$ を作製し
た。この株に対して脱窒試験を行った。培地は LB+40 mM NaNO_3 に 1 mM IPTG を添加したものを使用
した。 $\Delta 4+nasA+p-narK2$ は $\Delta 4+nasA$ と同様、40 時間程度では増殖しなかった (図 1-41)。この結果から、
脱窒条件において NasA と NarK2 の間には機能的な相互作用が無いことが示唆された。

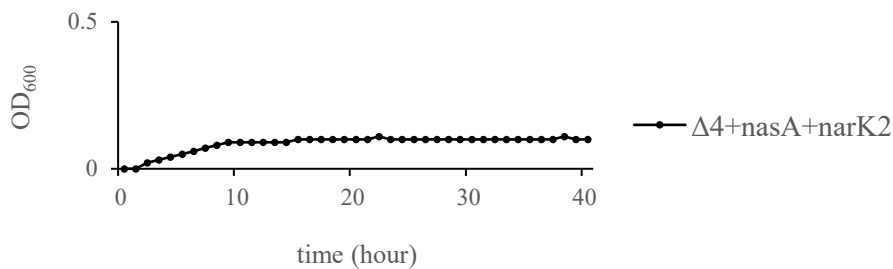


図 1-41 $\Delta 4+nasA+p-narK2$ の脱窒試験

$\Delta 4+nasA+p-narK2$ を嫌気、37°C、200 rpm で培養した。3 回の実験のうち 1 回を示す。横軸は培養開始から
の経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 8 節 ウェスタンブロッティングによる NarK1-NarK2、NarK2-NAR の相互作用の解析

$\Delta 4+narK2$ は硝酸同化試験及び脱窒試験で増殖せず (図 1-23、1-29)、ウェスタンブロッティングでバン
ドが観察されなかった (図 1-31)。その原因として NarK2 が単体では不安定であった可能性がある。また
前節において、NarK1 と NarK2 の相互作用が示唆され、NarK1 により NarK2 が安定化すると考えられた。
この仮説を検証するため、NarK2 と NarK1 の共発現株 $\Delta 4+narK2+p-narK1$ を作製し、第 3 節と同様のウ
ェスタンブロッティングを行った。NarK2 に付加した His タグが検出されれば、NarK1 による NarK2 の
安定化作用、分子機構としては複合体の形成が強く示唆される。また、*narK1-narK2-narGHJI* はオペロン
を構成している。NarK2 の下流にコードされる NAR が NarK2 と複合体を形成すれば、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ antiporter
と NO_3^- 還元酵素が空間的に近接することになり、効率よく脱窒を行えると考えられる (図 1-42)。しか
し、このような脱窒用トランスポーターと異化型硝酸還元酵素の複合体形成については、私の知る限り
検証されていない。そこで NarK2 と NAR の共発現株 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ において同様の実験を行っ

た。コントロールとして $\Delta 4+narK2$ +空ベクター、 $\Delta 4+narK2+p-narK2$ の 2 株も作製し、ウェスタンブロッティングに供した。

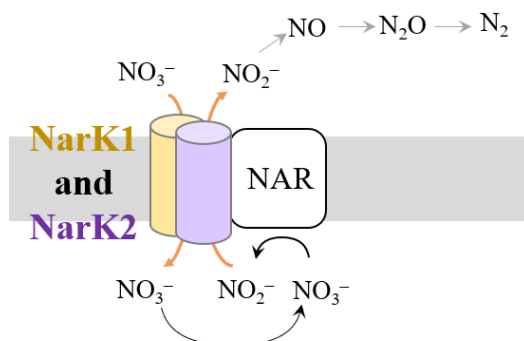


図 1-42 NarK1-NarK2-NAR の複合体モデル

$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ antiporter と NO_3^- 還元酵素が複合体を形成すれば、脱窒が効率的に進行すると予想される。

$\Delta 4+narK2$ +空ベクター、 $\Delta 4+narK2+p-narK2$ 、 $\Delta 4+narK2+p-narK1$ の作製にあたっては、 $\Delta 4+narK2$ に対しそれぞれ pMMB67EH、pMMB67EH-*narK2*、pMMB67EH-*narK1* をエレクトロポレーションで導入して作製した。また、野生株ゲノムをテンプレートにしてプライマーの組「narG_F(XbaI)/narI_R(HindIII)」で PCR を行い、*narGHJI* 配列を増幅した。この PCR 断片を pMMB67EH の XbaI-HindIII サイトに組み込み、pMMB67EH-*narGHJI* を作製した。大腸菌コンピテントセルに導入してクローニングし、抽出したプラスミドをエレクトロポレーションで $\Delta 4+narK2$ に導入した。選択培地に生えたコロニーに対してプライマーの組「narI_R(HindIII)/narI_checkF」を用いた PCR を行い、 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ であることを確認した。

$\Delta 4+narK2$ +空ベクター、 $\Delta 4+narK2+p-narK2$ 、 $\Delta 4+narK2+p-narK1$ 、 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ の 4 株について、それぞれ好気培養した菌体から膜画分を得た。各株由来の膜画分について、BCA 法でタンパク質濃度を測定した。タンパク質 2.7 μg を SDS-PAGE のサンプルバッファーと混ぜて熱変性させた後、10%ポリアクリルアミドゲルにアプライして泳動した。泳動後のゲルは CBB 染色またはウェスタンブロッティングに供した。ウェスタンブロッティングでは、His タグに対する一次抗体「Anti 6×Histidine, Monoclonal Antibody (Wako)」及び二次抗体「Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega)」により検出した。

CBB 染色では、 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ における NarG 及び NarH 由来と思われるバンドが太く観察され、プラスミド上の遺伝子が発現していることが強く示唆された (図 1-43 左)。しかし、NarK2 が分離されると予想される位置のバンドには、株間で違いが見られなかった。

ウェスタンブロッティングでは、 $\Delta 4+narK2$ の結果 (図 1-31) とは対照的に、いずれの株でも sharp ではないバンドが観察された (図 1-43 右)。本実験は NarK1 または NarG の共発現による、NarK2 の安定化を検出する目的で行った。しかしこのバンドは 4 株のいずれにおいても観察されたため、NarK1-NarK2、NarK2-NAR 複合体形成を示唆する結果は得られなかった。なお、NarK2 の予測質量 50.6 kDa に対し、当該のバンドは ~35 kDa のマーカーの少し下の位置であった。しかし、*Paracoccus denitrificans* の His タグ付与 NarK2 を His タグ抗体で検出した結果では、理論値 50.1 kDa に対してバンドは約 35 kDa の位置であっ

た (79)。また本研究においても、緑膿菌 NarK1 は 35 kDa ほどの位置で検出された (図 1-31)。以上のことから、NarK2 由来としては移動度が大きいものの、この発色は NarK2 由来の可能性はある。

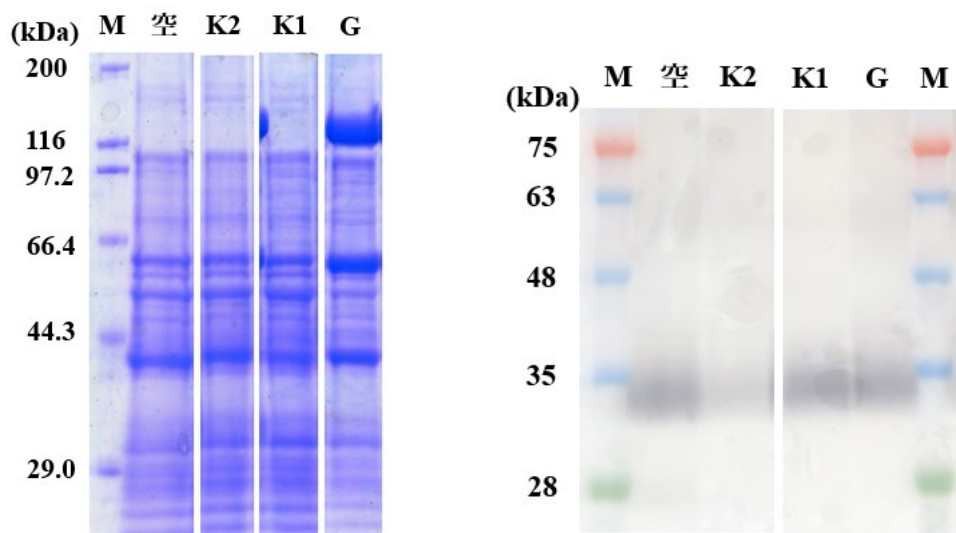


図 1-43 $\Delta 4+narK2$ 系列の SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

膜画分を 10%アクリルアミドゲルで泳動した。左右の図では同じ量のタンパク質を泳動した。

(左) CBB 染色によりタンパク質を観察した。 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ では、NarG (141 kDa) 及び NarH (58.1 kDa) と思われる太いバンドが観察された。

(右) His タグ抗体で NarK2 の検出を試みた。4 株とも sharp ではないバンドが見られた。

(M) はマーカー、(空) は $\Delta 4+narK2$ +空ベクター、(K2) は $\Delta 4+narK2+p-narK2$ 、(K1) は $\Delta 4+narK2+p-narK1$ 、(G) は $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ を表す。

各株に対して脱窒試験を行った。培地は LB+40 mM NaNO₃ に 1 mM IPTG を添加したものを使用した。 $\Delta 4+narK2$ +空ベクター、 $\Delta 4+narK2+p-narK2$ 、 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ は増殖しなかった (図 1-44)。この結果から、NAR の存在下では NarK2 は NO₃⁻/NO₂⁻ アンチポートを行わないことが示唆された。また、 $\Delta 4+narK2+p-narK1$ は $\Delta 4+p-narK1$ よりも良好に増殖した。このことから、NarK1 の存在下で NarK2 は NO₃⁻/NO₂⁻ アンチポートを行うことが改めて示唆された。

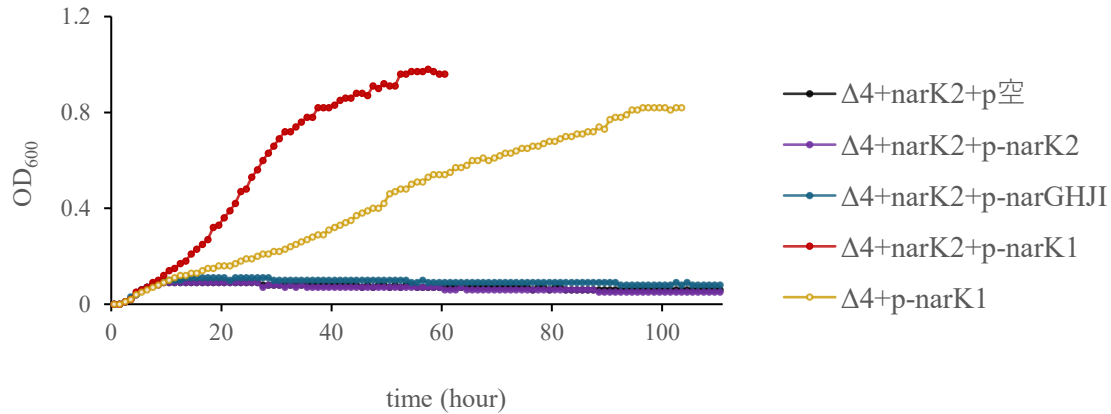


図 1-44 $\Delta 4+narK2$ 系列の生育試験

$\Delta 4+narK2$ +空ベクター、 $\Delta 4+narK2+p-narK2$ 、 $\Delta 4+narK2+p-narK1$ 、 $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ の 4 株を嫌気、37°C、150 rpm で培養した。2 回の実験のうち 1 回の結果を示す。ただしこの 1 回では、比較として $\Delta 4+p-narK1$ も同時に培養して図示した。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 9 節 *narK2* の点変異の解析

第 1 項 点変異による *narK2* 相補株の硝酸同化能の獲得

$\Delta 4+p-narK2$ を作製して pH 8.0 の硝酸同化試験に供したところ、40-80 時間ほどの長いラグの後に増殖を始めることが観察された (図 1-45)。同じコロニーから取得したストックでも試行によってラグの長さが大きくばらつくこと、増殖後の菌液を fresh な培地に添加すると速やかに増殖することから、変異による硝酸同化能の獲得が疑われた。また $\Delta 4+pMMB67EH$ (空ベクター) は増殖しないことから、相補プラスミド中で変異が起きていると考えられた。そこで、 $\Delta 4+p-narK2$ を硝酸同化条件で培養し、増殖後の培養液から菌を採取し、プラスミド上の挿入配列をシークエンシングした。

増殖した 10 株全てにおいて、プラスミド上の *narK2* 遺伝子の同じ位置に点変異が起きていた。806 塩基の T が 9 株で C、1 株で G に変異しており、これにより 269 番アミノ酸の Phe 残基がそれぞれ Ser または Cys に変異していた。

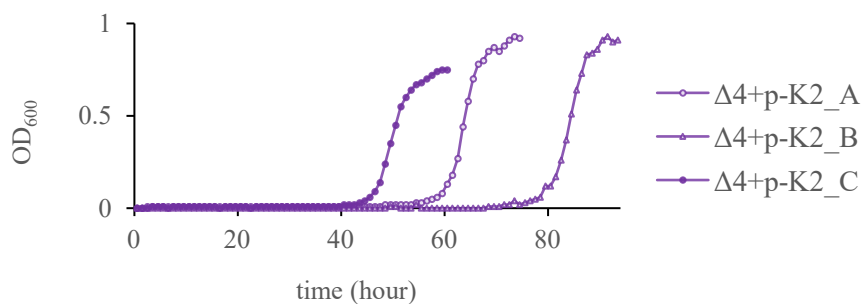


図 1-45 $\Delta 4+p-narK2$ の点変異による増殖

$\Delta 4+p\text{-narK}2$ を VB8.0、好気、37°C、200 rpm で培養すると、40-100 時間程度のラグの後増殖を始める。図の A、B、C をはじめ、 $\Delta 4+p\text{-narK}2$ 作製時に複数の異なるコロニーから菌株ストックを採取したが、そのいずれもがこのような増殖を示した。また、同一ストックでも試行によりラグの長さは変動したため、変異が疑われた。増殖後の培養液から菌を採取し、プラスミド上の挿入配列をシーケンシングしたところ、269 番の Phe 残基が Ser または Cys に変異していた。なお前培養液の菌体では、プラスミド上の *narK2* は完全に野生型の配列だった。

第 2 項 Phe269 残基の役割

Phe269 残基は NNP family 内で保存性が高く、基質結合ポケットを構成する残基の 1 つである (図 1-46)。反対側の Phe147 とともに、挟み込むようにして硝酸イオンとスタッキング相互作用を形成すると考えられている。この位置に変異が入って増殖を始めたことに興味を持たれた。ただし大腸菌の NarK では、Phe267 または Phe147 (図 1-46) は輸送機能に必須ではないことが、*in vivo* の変異実験から示唆されている (70)。

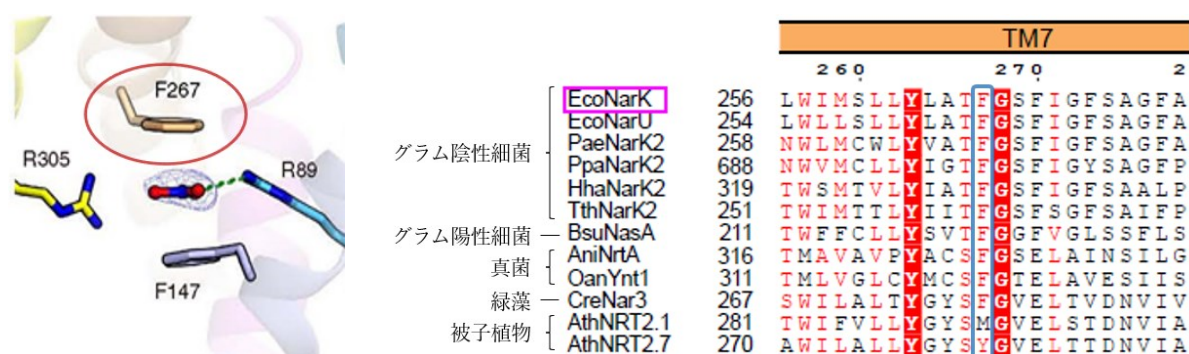


図 1-46 Phe269 の役割と保存性 ((70)より改変して引用)

(左) 大腸菌 NarK の基質結合ポケット。大腸菌 NarK の Phe267 が緑膿菌 NarK2 の Phe269 に相当する。

(右) NNP family のタンパク質のマルチプルアラインメント。NarK の Phe267 に相当する残基を青の枠で囲った。この Phe 残基の保存は、原核生物の NarK 様タンパク質群に留まらず、真核生物の NNP family タンパク質にも見られる。ただしシロイヌナズナでは Met または Tyr となっている。各タンパク質の略称は以下の通りである。EcoNarK: *Escherichia coli* NarK、EcoNarU: *Escherichia coli* NarU、PaeNarK2: *Pseudomonas aeruginosa* NarK2、PpaNarK2: *Paracoccus pantotrophus* NarK2、HhaNarK2: *Halomonas halodenitrificans* NarK2、TthNarK2: *Thermus thermophilus* NarK2、BsuNasA: *Bacillus subtilis* NasA、AniNrtA: *Aspergillus nidulans* NrtA、OanYnt1: *Ogataea angusta* Ynt1、CreNar3: *Chlamydomonas reinhardtii* Nar3、AthNRT2.1: *Arabidopsis thaliana* NRT2.1、AthNRT2.7: *Arabidopsis thaliana* NRT2.7。

第3項 変異型 *narK2* の機能の比較

次に変異型 *narK2* を搭載した発現プラスミドを $\Delta 4$ に導入し、硝酸同化能を獲得するか調べることにした。生育試験で確認された Phe269 の Ser または Cys 変異に加え、Ala、Thr、Val、Leu の各変異型を発現する株もそれぞれ作製し、生育試験を行った。

野生型の相補遺伝子が挿入されている pMMB67EH-*narK2* をテンプレートとし、各種変異型プライマーと PrimeSTAR Max を使用した PCR により、6 種のプラスミド pMMB67EH-*narK2*^{F269S}、pMMB67EH-*narK2*^{F269C}、pMMB67EH-*narK2*^{F269A}、pMMB67EH-*narK2*^{F269T}、pMMB67EH-*narK2*^{F269V}、pMMB67EH-*narK2*^{F269L} を作製した。それぞれ $\Delta 4$ にエレクトロポレーションで導入し、変異型 NarK2 を発現する相補株 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269S}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269C}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269A}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269T}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269V}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269L} を作製した。これらを硝酸同化条件及び脱窒条件で培養した。培地は硝酸同化試験で VB8.0+20 mM NaNO₃ を使用し、脱窒試験で LB+40 mM NaNO₃ を用いた。また 1 mM IPTG を添加した。

硝酸同化試験において、Ser 及び Ala 変異株は非常に良好な増殖を示した (図 1-47)。Cys 変異株もラグが 3 時間ほど長い、良好に増殖した。Thr 変異株はラグがさらに少し長くなり、Val 変異株はラグが 20 時間以上あった。Leu 変異株は全く増殖しなかった。3 回の試行とも、増殖した株について相補遺伝子全域をシーケンシングした。Val 変異株以外に変異は無かったが、Val 変異株において 3 回の試行のうち 1 回変異があった。やはり 806 番塩基で T から C の変異が起きており、269 番残基が Val から Ala へと変異していた。この位置は変異の hot spot になっている可能性がある。

脱窒試験において、Ser、Ala、Cys 変異株は良好に増殖した一方、Thr、Val、Leu 変異株は増殖しなかった (図 1-48)。3 回の試行のうち 1 回について、増殖した株の相補遺伝子全域をシーケンシングしたが、変異は無かった。

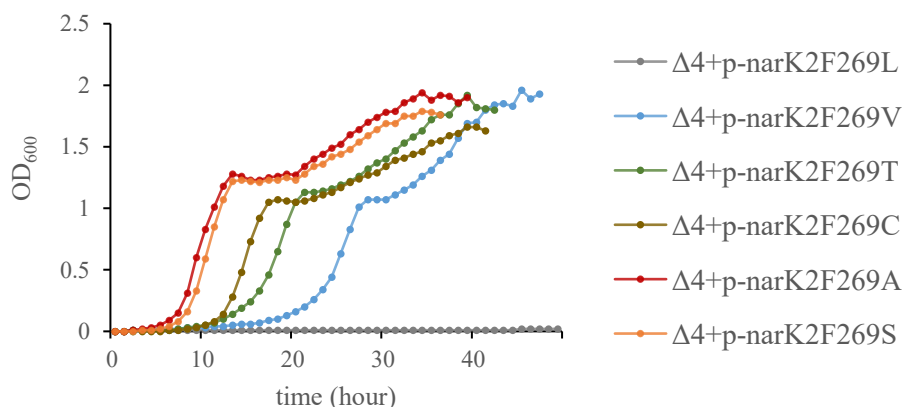


図 1-47 NarK2 点変異株の硝酸同化試験

$\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269S}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269A}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269C}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269T}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269V}、 $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269L} を VB8.0、好気、37°C、200 rpm で培養した。3 回の実験のうち 1 回の結果を示す。なお、このグラフは $\Delta 4$ +p-*narK2*^{F269V} に変異が入っていない試行のものである。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

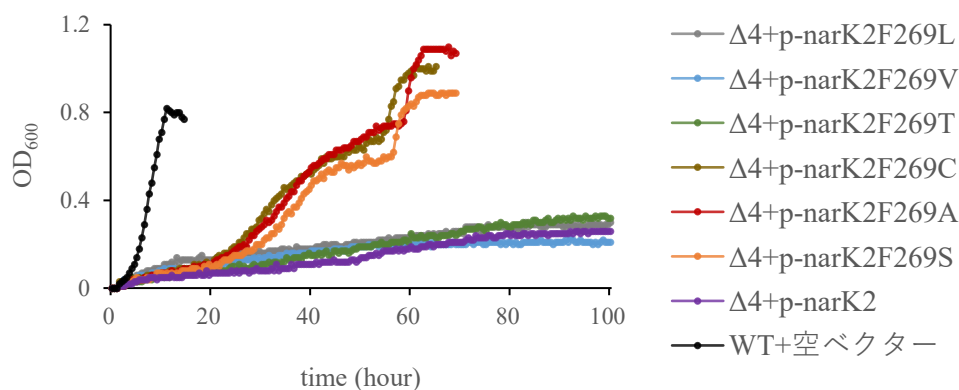


図 1-48 NarK2 点変異株の脱窒試験

$\Delta 4+p\text{-narK2}^{\text{F269S}}$ 、 $\Delta 4+p\text{-narK2}^{\text{F269A}}$ 、 $\Delta 4+p\text{-narK2}^{\text{F269C}}$ 、 $\Delta 4+p\text{-narK2}^{\text{F269T}}$ 、 $\Delta 4+p\text{-narK2}^{\text{F269V}}$ 、 $\Delta 4+p\text{-narK2}^{\text{F269L}}$ を LB 培地、嫌気、37°C、150 rpm で培養した。コントロールとして WT+空ベクターと $\Delta 4+p\text{-narK2}$ も培養した。3 回の実験のうち 1 回の結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

以上の結果から、変異型 NarK2 により硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの排出が行われたことが示唆された。ただし、Phe が Ser、Ala、Cys という比較的小さなアミノ酸に変異した場合は相補株が良好に硝酸同化生育した一方、Thr、Val 変異型の順に生育が悪化し、Leu 変異型の相補株は増殖しなかった。このことから、この位置のアミノ酸残基のサイズが小さいことが重要であり、親水性／疎水性は関係ないと考えられる (表 1-6)。

基質結合ポケットに位置する保存性の高い Phe 残基の変異により、NarK2 が単体で硝酸同化及び脱窒の膜輸送を行うようになったことは興味深い。この原因として、基質結合ポケットの物理化学的特性が変化することで基質特異性が変化し、硝酸イオンまたは亜硝酸イオンの輸送能力が向上したことが考えられる。

表 1-6 野生型及び変異型 NarK2 の 269 番残基の性質

アミノ酸種	性質など
Phe	野生型、疎水性
Leu	疎水性
Val	疎水性
Thr	Ser と同様に-OH 基がある、親水性
Cys	側鎖が小さい、親水性
Ala	側鎖が小さい、疎水性
Ser	側鎖が小さい、親水性

第 10 節 Δ4 変異株のドラフトゲノム解析

Δ4 及び Δ4+空ベクターについて、VB 7.0 を用いた硝酸同化条件に供すると、40 時間以上のラグの後に増殖を始めることが複数回観察された。増殖後の菌液を fresh な培地に植え継ぐと速やかに増殖すること、また、この株のストックを種菌に硝酸同化試験を行うと速やかに増殖することから、ゲノムに何らかの変異が起きていると考えられた。硝酸イオン取り込みの向上の原因となった変異を同定するため、これらのストックからそれぞれシングルコロニーを単離し、ゲノム DNA を抽出してドラフトゲノムを読んだ。なお、変異株はいずれも脱窒条件で増殖しなかったため、亜硝酸イオンの排出能力は変化していないと考えられた。

コントロールとして、Δ4 及び Δ4+空ベクターをグリセロールストックから LB 培地で培養した。培養液を LB プレートで線画培養し、生えてきたシングルコロニーから DNA を抽出した（コントロール株）。また、Δ4 及び Δ4+空ベクターを pH 7.0 の硝酸同化条件で培養し、増殖が見られた培養液からグリセロールストックを作った。このストックを LB 培地で培養した。培養液を LB プレートで線画培養し、生えてきたシングルコロニーから DNA を抽出した（変異株）。コントロール各 1 株、変異株各 2 株の計 6 株（表 1-6）について、ドラフトゲノム解析を Novogene に委託した。

表 1-7 ドラフトゲノムを読んだ株

株	Δ4	Δ4_変異株_1	Δ4_変異株_2	Δ4 +空ベクター	Δ4 +空ベクター_変異株_1	Δ4 +空ベクター_変異株_2
省略名	Δ4	Δ4_mut1	Δ4_mut2	Δ4p	Δ4p_mut1	Δ4p_mut2
取得条件 培地の硝酸 イオン濃度、 ラグの長さ	/	NaNO ₃ 60 mM、 ラグ 65 時間の後 に増殖	NaNO ₃ 30 mM、 ラグ 90 時間の後 に増殖	/	NaNO ₃ 60 mM、 ラグ 45 時間の後 に増殖	NaNO ₃ 30 mM、 ラグ 45 時間の後 に増殖

変異株で共通の変異が見られた遺伝子は無く、単一遺伝子が原因で硝酸イオンの膜透過性が上昇したわけではないことが示唆された。重要だと思われる点変異（SNPs）は見られなかった。また、既知の主な small RNA（表 1-8、(91)）に変異は無く、遺伝子間領域の変異で重要だと予想されるものも無かった。

表 1-8 緑膿菌の主な small RNA ((91)より作成)

いずれにも変異は見られなかった。

small RNA	PAO1 ゲノム中の位置
Sr006	0,182,570-0,182,693
Sr0161	0,184,211-0,184,458
RsmY	0,586,867-0,586,990

PhrD	0,785,498-0,785,570
PA0805.1	0,883,307-0,883,582
RsmV	1,011,621-1,011,812
RgsA	3,318,663-3,318,859
PhrS	3,705,309-3,705,521
RhlS	3,889,700-3,899,900
ReaL	3,958,000-3,958,200
RsmZ	4,057,543-4,057,658
P27	4,781,786-4,781,978
RsmW	5,117,971-5,118,195
PrrF1/F2	5,283,960-5,284,110 /5,284,172-5,284,319
PrrH	5,283,995-5,284,319
CrcZ	5,308,587-5,308,993
NrsZ	5,775,397-5,775,623
ErsA	6,183,500-6,183,700

そこで、コントロール株では見られず、変異株の少なくとも 1 種で見られた遺伝子領域の欠失に注目した。特に「膜構造に影響を与えうる変異（脂質代謝など）」「トランスポーター遺伝子の変異」「トランスクリプトームのプロファイルを変えうる変異（転写因子など）」を抜粋して表 1-9 に示す。なお各遺伝子のアノテーション及び局在性予測は、Pseudomonas Community Annotation Project (PseudoCAP) (92)、UniProt (93) または Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (94) (95) の記述に従った。

変異株においてトランスポーター遺伝子や転写制御遺伝子領域に多く欠失が見られたため、膜輸送系やトランスクリプトームが大きく影響を受けていると考えられる。特に probable sigma-70 factor である PA0149 と PA1351、sulfate transport protein である PA0280 は、硝酸イオン取り込み能の変化に関わっている可能性がある。PA2536 (probable phosphatidate cytidylyltransferase) は、遺伝子そのものに変化はないが、オペロン上流の PA2538、PA2539 領域に欠損があったため表に加えた。この遺伝子はグリセロリン脂質代謝に関わると予想され、細胞膜の構造に影響を与える可能性がある。変異株が硝酸同化生育した原因の特定のため、今後は注目した遺伝子を人為的に変異させ、表現型への影響を確認する必要がある。

表 1-9 ドラフトゲノム解析で注目した遺伝子変異

各株の列の×印は、その行の遺伝子の一部または全部が欠失していたことを示す。PA2536 は遺伝子中に欠失がないため、区別のため Locus Tag に*印を付けた。

Locus Tag	遺伝子名、アノテーション	局在	Δ4	Δ4_mut1	Δ4_mut2	Δ4p	Δ4p_mut1	Δ4p_mut2
-----------	--------------	----	----	---------	---------	-----	----------	----------

PA0072	tagS1, ABC-4 integral membrane protein family. LolC/E subfamily.	細胞膜		×				
PA0073	tagT1, Probable ATP-binding component of ABC transporter	細胞膜		×				
PA0149	probable sigma-70 factor, ECF subfamily	細胞質		×	×		×	
PA0150	anti-sigma factor	ペリプラズム		×	×		×	
PA0151	probable TonB-dependent receptor	外膜		×	×		×	
PA0225	erfA, transcriptional regulator	細胞質			×			
PA0278	hypothetical protein, Probable membrane transporter protein	細胞膜		×				
PA0279	ydfF, probable transcriptional regulator	不明		×				
PA0280	cysA, sulfate transport protein	細胞膜		×				
PA1052	yhaD, conserved hypothetical protein, Glycerate kinase	細胞質			×			
PA1236	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	細胞膜			×			
PA1237	probable multidrug resistance efflux pump	細胞膜		×				
PA1258	lhpM, Permease of ABC transporter	細胞膜			×			
PA1260	lhpP, ABC transporter periplasmic-binding protein	ペリプラズム			×			
PA1261	lhpR, Transcriptional regulator	細胞質			×			
PA1262	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	細胞膜			×			
PA1263	hypothetical protein, HTH cro/C1-type domain-containing protein	細胞膜			×			

PA1264	probable transcriptional regulator	細胞質			×			
PA1265	hypothetical protein, EamA domain-containing protein	細胞膜			×			
PA1268	lhpB, D-hydroxyproline dehydrogenase beta-subunit	細胞膜			×			
PA1269	lhpA, Hydroxyproline 2-epimerase-probable transcriptional regulator	細胞質			×			
PA1270	hypothetical protein, FUSC family protein	細胞膜			×		×	
PA1275	cobD (or cbiB), cobalamin biosynthetic protein	細胞膜			×			
PA1281	cobV (or cobS), cobalamin (5'-phosphate) synthase	細胞膜			×			
PA1282	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	細胞膜			×			
PA1283	probable transcriptional regulator	不明			×			
PA1351	probable sigma-70 factor, ECF subfamily	細胞質					×	
PA1352	conserved hypothetical protein, Major facilitator superfamily (MFS) profile domain-containing protein	細胞膜					×	
PA1908	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	細胞膜		×				
PA1911	femR, sigma factor regulator	ペリプラズム					×	
PA1912	femI, ECF sigma factor	細胞質					×	
PA1922	cirA (or feuA), probable TonB-dependent receptor	外膜			×		×	
PA1923	hypothetical protein, Cobaltochelate subunit CobN	不明			×		×	
PA1924	hypothetical protein, MotA/TolQ/ExbB proton channel domain-containing protein	細胞膜			×		×	

PA1973	pqqF, pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein F	不明		×			×	
PA2054	cynR, transcriptional regulator	細胞質					×	
PA2055	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	細胞膜					×	
PA2328	hypothetical protein, ABC transporter substrate-binding protein	細胞膜					×	
PA2329	probable ATP-binding component of ABC transporter	細胞膜					×	
PA2536*	probable phosphatidate cytidyltransferase	細胞膜		×			×	
PA2538	hypothetical protein	細胞膜		×			×	
PA2539	ynbD, conserved hypothetical protein, Tyrosine specific protein phosphatases domain-containing protein	細胞膜		×			×	
PA2671	hplX, hypothetical protein, General secretion pathway protein GspK	不明			×			
PA2874	hypothetical protein, DUF58 domain-containing protein	細胞膜					×	
PA2875	conserved hypothetical protein, AAA family ATPase	細胞質					×	
PA3358	hypothetical protein, EamA domain-containing protein	細胞膜		×				
PA3359	hypothetical protein, DUF2955 domain-containing protein	細胞膜		×				
PA3457	probable membrane transporter protein	細胞膜		×			×	
PA3458	probable transcriptional regulator	不明		×			×	
PA3491	rfnC, probable ferredoxin	細胞質		×			×	

PA3492	rnfD, conserved hypothetical protein, Ion-translocating oxidoreductase complex subunit D	細胞膜		×			×	
PA3560	fruA, phosphotransferase system transporter fructose-specific IIBC component	細胞膜		×				
PA3565	probable transcriptional regulator	細胞質		×				
PA3689	yhdM, probable transcriptional regulator	細胞質				×		
PA3898	probable transcriptional regulator	細胞質				×		
PA3914	moeA1, molybdenum cofactor biosynthetic protein A1	細胞質		×				
PA3920	copA1 (or yvgX or cue A), Probable metal transporting P-type ATPase	細胞膜			×			
PA3921	probable transcriptional regulator	不明			×			
PA4029	dedA, conserved hypothetical protein, DedA family protein	細胞膜			×			
PA4207	mexI, probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux transporter	細胞膜		×				
PA4222	pchI, probable ATP-binding component of ABC transporter	細胞膜		×			×	
PA4223	pchH, probable ATP-binding component of ABC transporter	細胞膜		×			×	
PA4489	magD, alpha-2-macroglobulin, Alpha-2-macroglobulin homolog	細胞膜		×				
PA4888	desB, acyl-CoA delta-9-desaturase	不明		×				
PA4889	probable oxidoreductase	不明		×				

PA4894	hypothetical protein, hupE	細胞膜		×				
PA4895	probable transmembrane sensor	ペリプラズム		×				
PA5084	dguA, D-amino acid dehydrogenase 2	細胞膜			×			
PA5085	dguR, Probable transcriptional regulator	細胞質			×			
PA5201	tex (or yhgF), transcriptional accessory protein Tex	細胞質				×		
PA5287	ammonium transporter AmtB	細胞膜		×				
PA5530	C5-dicarboxylate transporter	細胞膜			×			

第 11 節 第 1 章のまとめ

緑膿菌が持つ NarK 様の硝酸イオントランスポーター NasA、NarK1、NarK2 について、遺伝子破壊株と相補株を作製し、生育試験による機能解析を試みた。第 3 節の硝酸同化実験と脱窒実験により、NasA と NarK1 が硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの排出を行うことが示された。また第 7 節の $\Delta narK1K2+p-narK1*-K2$ を使用した実験により、NarK2 は NarK1 存在下で硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの排出を行うことが示唆された。さらに第 9 節の変異型 NarK2 の相補株を使用した実験により、NNP family で保存性の高い Phe 残基が比較的サイズの小さい残基に置き換わると、NarK2 が高い活性を獲得することが示唆された。

【第2章】*ccoN3Q3-PA1854* 遺伝子領域の解析

第1節 序論

第1項 *ccoN3* オペロンと亜硝酸イオンセンシングレギュレーター NirY

ccoN3Q3-PA1854 オペロンは、隣接してコードされるレギュレーター NirY により誘導発現する (図 0-5)。NirY は 287 残基からなるタンパク質で、細菌で広く見られる LysR type transcriptional regulator (LTTR) の一種である。LTTR の一般構造として、N 末端側にゲノム DNA と相互作用する helix-turn-helix (HTH) 構造があり、C 末端側に基質結合ドメインがある (図 2-1、(96))。ColabFold (97)(98) による NirY の予測構造においても、LTTR に典型的な HTH と基質結合ドメインのフォールディングが見られる (図 2-2)。

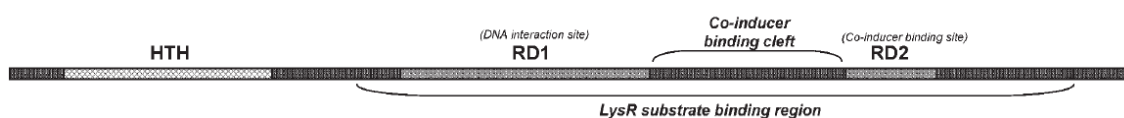


図 2-1 大腸菌 LysR の構造 ((96)より引用)

LTTR の一般構造として、N 末側に HTH 構造があり、C 末側に基質結合ドメインがある。

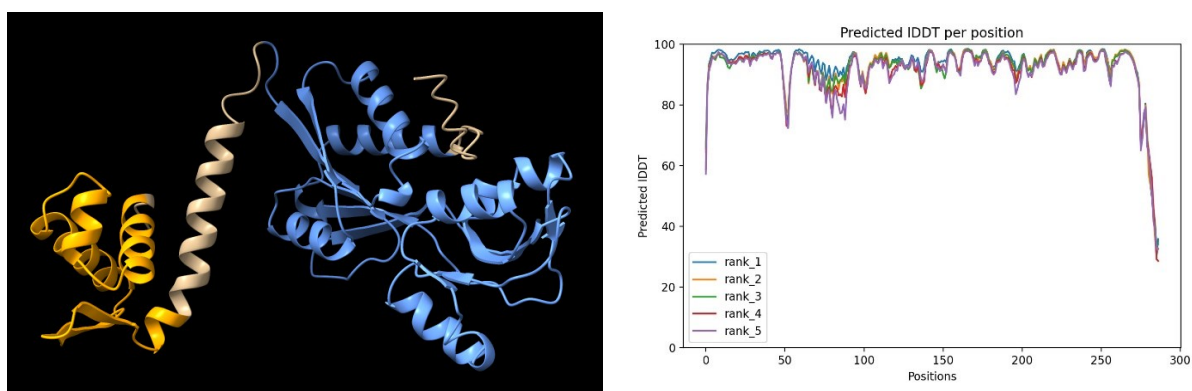


図 2-2 NirY の予測構造

Pfam (99)では 4-62 番残基が“regulatory helix-turn-helix protein, lysR family (PF00126)”、87-273 番残基が“LysR substrate binding domain (PF03466)”と予測された。

(左) ColabFold による予測構造を UCSF Chimera X (100)で表示した。HTH をオレンジ、基質結合ドメインを青で示した。

(右) predicted Local Distance Difference Test (pLDDT)のグラフ。左図の構造は rank1 のモデルであり、各ドメインはほぼ全域で信頼性が高かった (pLDDT > 90)。

当研究室において $\Delta nirY$ が作製され、*ccoN3* の上流域の転写活性が調べられた。その結果、NirY が亜硝酸イオンに応答して *ccoN3* の転写を誘導することが示された (15)。加えて、*ccoQ* の上流域、*PA1854* の上流域からは亜硝酸イオン存在下での転写活性が見られなかったことから、*ccoN3Q3-PA1854* がオペロンを構成することが示された (34)。

第2項 *ccoN3* オペロン上の機能未知遺伝子 *PA1854*

PA1854 は 385 アミノ酸からなるタンパク質である。機能は未知であり、実験に基づく解析が待たれる。近縁種である *Pseudomonas putida* KT2440 株や *Pseudomonas stutzeri* A1501 株は、*ccoN3Q3* を持たない一方で、*PA1854* と相同な遺伝子を持っている。また、この遺伝子は *nirY* とタンデムに存在しているため、緑膿菌と同様に亜硝酸イオン存在下で発現すると考えられる。これらのことから、*PA1854* は呼吸ではなく亜硝酸イオンの代謝に関わる機能を持つと予想される。細胞における亜硝酸イオンの特性を考慮すると、窒素源として取り込んで利用するか、毒性物質として排出することが *PA1854* の役割として考えられる。

PA1854 の機能を予測するため、アミノ酸配列を利用した *in silico* での解析を行った。*PA1854* のアミノ酸配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から取得した [accession number: NP_250545.1]。Pfam でドメイン検索を行った結果、*PA1854* は N 末側の 58-176 番残基に HPP family ドメイン [Pfam ID: PF04982] が、C 末側の 245-298 番残基と 317-370 番残基に cystathionine β -synthase (CBS) ドメイン (101) [Pfam ID: PF00571] がアノテーションされた (図 2-3)。PF04982 の記述として、HPP family タンパク質の一般的な機能は明らかになっていないが、His-Pro-Pro の局所構造が広く保存されており、4 つの膜貫通領域を持つトランスポーターであることが予想されている。加えて、CBS ドメインは様々な種類のタンパク質においてその活性を制御する機能を持ち、チャンネルやトランスポーターを制御する例も知られている (102) (103) (104)。なお CBS ドメインは、通常 2 つまたは 4 つが空間的に隣接して機能する。

Phobius によるトポロジー予測では、*PA1854* は N 末側に 5 回の膜貫通領域を持ち、C 末側は細胞内に位置するという結果が得られた (図 2-3)。Pfam での解析結果と合わせると、HPP family ドメインを含む N 末側の膜貫通領域が基質を輸送し、細胞内に位置する C 末側の CBS ドメインがトランスポーター活性を制御すると予想された。

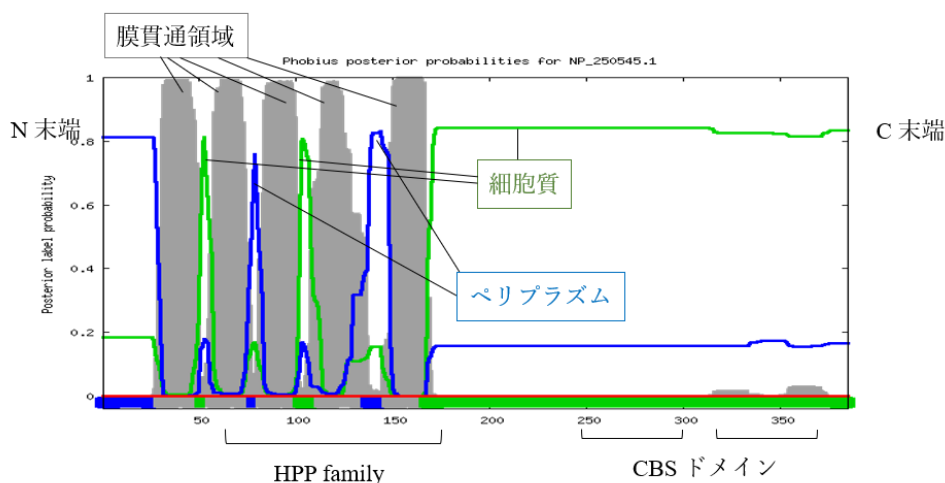


図 2-3 Phobius によるトポロジー予測

横軸は PA1854 の 1 番から 385 番の各アミノ酸残基番号を示す。左端が N 末 (1 番)、右端が C 末 (385 番) である。縦軸は各アミノ酸残基の領域ごとの存在確率を示す (灰色: 膜貫通領域、緑: 細胞質、青: 細胞外)。各アミノ酸残基は、縦軸の値が最も大きい領域に存在すると予想される。Pfam 検索によれば、PA1854 の N 末側は HPP family ドメインを含み、5 回の膜貫通領域を持つ。HPP family に特徴的な His-Pro-Pro モチーフは 126-128 番残基であり、第 4 膜貫通ヘリックスの先端付近だと予想された。一方、C 末側には 2 つの CBS ドメインが存在する。

ラン藻の一種である *Synechococcus elongatus* PCC7942 株とシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の葉緑体において、HPP family のタンパク質が亜硝酸イオントランスporterであったという事例が報告されている (105)。緑膿菌 PAO1 株ゲノムと *S. elongatus* PCC7942 株ゲノムの双方向の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索によって、ラン藻の HPP family 亜硝酸イオントランスporterと PA1854 はホモログであることが示された。両者のアラインメントによる sequence identity は 37% で、PA1854 (385 aa) の N 末側の領域 (HPP family ドメインの部分) と、ラン藻タンパク質 (182 aa) の 7-8 割ほどの領域が相同であった。以上の解析と、PA1854 が亜硝酸イオンで誘導されるという実験結果 (34) から、PA1854 が亜硝酸イオントランスporterであるという仮説を立てた。

第 3 項 本章の目的

亜硝酸イオン応答性の転写調節因子 NirY は *ccoN3* オペロンを誘導発現することが分かっている。この機構に関して未知である「*ccoN3* オペロンの転写開始点」及び「NirY レギュロン」の解明を目指した。また *ccoN3* オペロンには、*cbb₃* 型 cytochrome *c* oxidase のコンポーネントである CcoN3 と CcoQ3 に加え、機能未知の PA1854 がコードされている。PA1854 は、細胞の亜硝酸イオン利用または耐性に関わると考えられるが、実験的な解析が行われていないため、このタンパク質の機能を解明することを目的とした。

第 2 節 *ccoN3* オペロンの転写開始点決定

5'-RACE 法により、このオペロンの転写開始点 (transcription start site, TSS) を決定した。

対数期の MPAO1 培養液に NaNO₂ 40 mM を加え、さらに 20 分培養した後、total RNA を抽出した。5'-RACE 法に従い、*ccoN3Q3-PA1854* 遺伝子群から転写された mRNA の未知の 5'末端を含む DNA を得た。Total RNA をテンプレートとした逆転写には、*ccoN3* の内部配列を持つプライマーを使用した。未知配列を含む DNA を T-Vector に挿入し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。選択培地に生えた 7 コロニーからプラスミドを抽出し、挿入断片の配列を読むことで mRNA の 5'末端を決定した。

7 コロニーとも 5'末端の配列は一致した。*ccoN3* の開始コドンの 1 塩基前を -1 位として -29 位の G が転写開始点であることが示された (図 2-4)。

P. putida KT2440 株及び *P. stutzeri* A1501 株は、*nirY* と PA1854 のホモログ遺伝子を緑膿菌と同様にゲノム中でタンデムに有する。両株が持つ HPP family protein は、緑膿菌の *ccoN3* と同様に亜硝酸イオン存在下で NirY により誘導すると考えられた。三者で共通の配列モチーフが存在する可能性があるため、上流域の配列を比較した。しかし、緑膿菌の *ccoN3* 上流域と類似の配列やパリンδροーム様の配列は見つからなかった。

-29
5'-ggcc**g**gaccccggggcccggcgtgccagcgacc**atgaac**-3'
ccoN3

図 2-4 *ccoN3* の上流域の DNA 配列と転写開始点

5'末端側を左にして、*ccoN3* の上流域の DNA 配列を記載した。*ccoN3* の開始コドンの atg を太字で、決定した転写開始点の g をオレンジ色で示した。

第 3 節 NirY レギュロンの決定

NirY が *ccoN3Q3-PA1854* 以外に発現を誘導する遺伝子があるかどうか調べるため、野生株と $\Delta nirY$ の亜硝酸イオン存在下での全転写産物を比較した。

対数期の PAO1-ut (WT) と $\Delta nirY$ の培養液に NaNO_2 20 mM を加え、さらに 15 分培養した後、total RNA を抽出した。抽出した total RNA において DNA 混入や RNA 分解が起きていないことを確認し、RNA-seq 解析を Novogene に委託した。以上の作業は各株 2 連で行った。

WT に対して $\Delta nirY$ で発現量が変動したと思われる、 $p\text{-value} < 0.05$ かつ $\text{padj} < 0.10$ を満たす遺伝子を表 2-1 に記載した（ただし *nirY* は除いた）。表では遺伝子発現量として、リードカウントを補正した fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced (FPKM) を用いた。NirY の制御下にある遺伝子の候補として、2 倍または 1/2 倍以上の発現量変化が見られた 4 遺伝子を太字で記した。この中で発現量の減少が見られたのは *ccoN3Q3* のみであり、この 2 つと *PA1854* がオペロンを構成することは実験的に分かっている。一方発現量が上昇したのは、Chaperone protein DnaJ (PA4760) であった。*nirY* 破壊株では、亜硝酸イオンの毒性に対してより脆弱になり、ストレス応答として *dnaJ* が間接的に発現上昇したと考えられる。

以上の結果から、NirY のレギュロンは *ccoN3Q3-PA1854* のみであることが示唆された。なお、約 5850 種の転写産物のうち、 $p\text{-value} < 0.05$ で有意に変動した遺伝子は 83 個程度と少なく、Pearson の相関係数は異なる株のサンプル間でも比較的高い値 ($> \text{約 } 0.95$) を取った (図 2-5)。このことは NirY が広範な制御を行っていないことを示唆し、上の考察を支持する結果である。

表 2-1 WT と $\Delta nirY$ 間で遺伝子発現量が変動していた遺伝子
遺伝子は $p\text{-value}$ の低い順にリストアップした。

Locus Tag	遺伝子名またはアノテーション	FPKM WT	FPKM $\Delta nirY$	Fold change (log2)	p-value	padj
<i>PA1856</i>	<i>ccoN3</i>	135.7	2.9	-5.5	1.5E-108	8.6E-105
<i>PA1855</i>	<i>ccoQ3</i>	261.1	6.3	-5.4	6.4E-55	1.9E-51
<i>PA4760</i>	Chaperone protein DnaJ	306.8	618.7	1.0	2.7E-05	3.8E-02
<i>PA4759-PA4760</i> の一部	dihydrodipicolinate reductase- <i>dnaJ</i>	45.5	83.3	0.9	3.3E-05	3.8E-02

<i>PA1202</i>	probable hydrolase	263.0	456.9	0.8	4.1E-05	4.0E-02
<i>PA1854</i>	conserved hypothetical protein	51.4	26.7	-0.9	7.3E-05	6.1E-02
<i>PA1857</i>	conserved hypothetical protein	39.6	21.2	-0.9	1.1E-04	8.3E-02

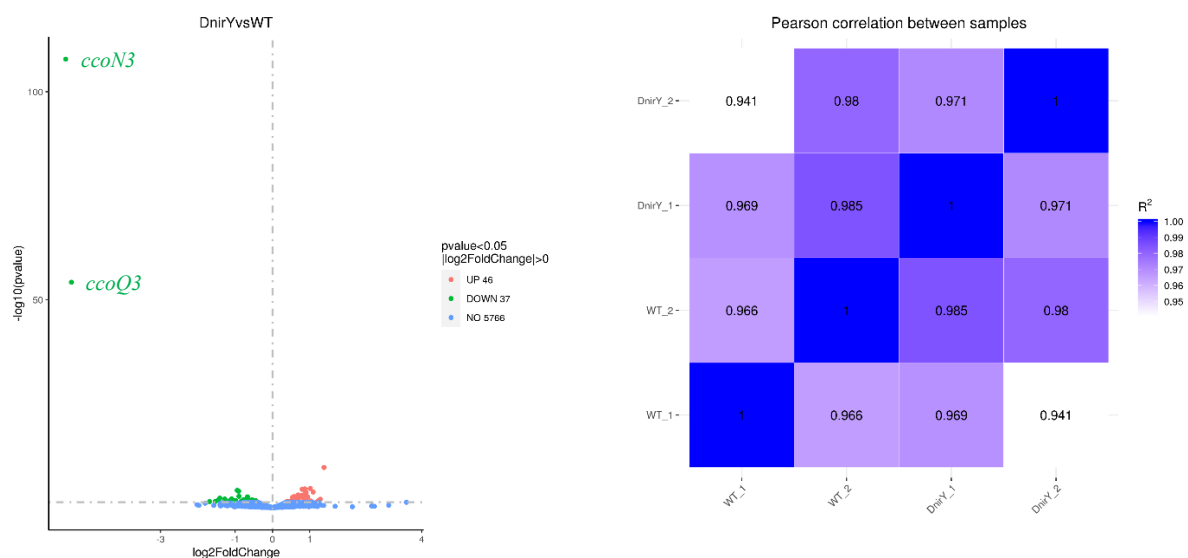


図 2-5 全転写産物の株間比較

(左) volcano plot。横軸は発現量の比の対数、縦軸は p-value の逆数の対数。WT に対して $\Delta nirY$ で有意に発現量が上昇したものは赤、減少したものは緑、変わらなかったものは青でプロットされている。*ccoN3*、*ccoQ3* の点はラベリングした。

(右) 各サンプル間の Pearson の相関係数。2 株を 2 連で操作したため計 4 サンプルであり、6 組の比較がある。

第 4 節 *PA1854* 破壊株を用いた生育試験

第 1 項 亜硝酸耐性試験による $\Delta PA1854$ の評価

第 1 節で述べたように、亜硝酸イオンは細胞毒性を持つ物質である。実際に、LB 培地に NaNO_2 を添加すると緑膿菌の生育は悪くなる。具体的にはラグが長くなり、増殖速度と最終到達濁度が小さくなる。

亜硝酸イオントランスポーターの機能を *in vivo* で解析する際、培地中に亜硝酸イオン化合物を添加し、耐性を見る手法が取られる場合がある。*Thermus thermophilus* を用いた実験では、NarK 様タンパク質の高発現株を用いて、 NaNO_2 を培地に加えて好気生育を調べていた (106)。そこで、WT 及び当研究室で作製された $\Delta PA1854$ を用いて、LB+20 mM HEPES-KOH (pH 8.2) に亜硝酸ナトリウムを添加した培地で類似の実験を行った。

PA1854 が亜硝酸イオン取り込み型のトランスポーターであった場合、 $\Delta PA1854$ は WT と比べて細胞内

への亜硝酸イオン流入量が少なく、生育が良くなると予想される。逆に、亜硝酸イオン排出型のトランスポーターであった場合、 $\Delta PA1854$ は WT と比べて生育が悪くなると予想される。

WT、 $\Delta PA1854$ に対し、亜硝酸ナトリウムを加えた培地で好気培養を行い、生育に株間で差があるかを調べた（亜硝酸耐性試験）。本培地は、LB+20 mM HEPES-KOH (pH 8.2) に NaNO_2 を 0-60 mM 加えたものを使用した。

NaNO_2 の添加により両株ともに生育の遅延が見られたが、株間に大きな生育差は見られなかった（図 2-6）。ただし試行間のばらつきが大きく、ラグの長さや増殖速度については再現性が得られなかった。本実験では培地の pH を比較的高い 8.2 に設定したが、一部の亜硝酸イオンはプロトン化されて亜硝酸分子となり、膜透過した可能性がある。また両株とも、20 mM 以上の高濃度 NO_2^- 条件でも速やかに増殖し、15 時間ほどで濁度が測定可能上限値（2.55）に達した。このことから、LB 培地は栄養豊富であるため、亜硝酸イオンの毒性が生育の違いとして表れにくいと考えられた。

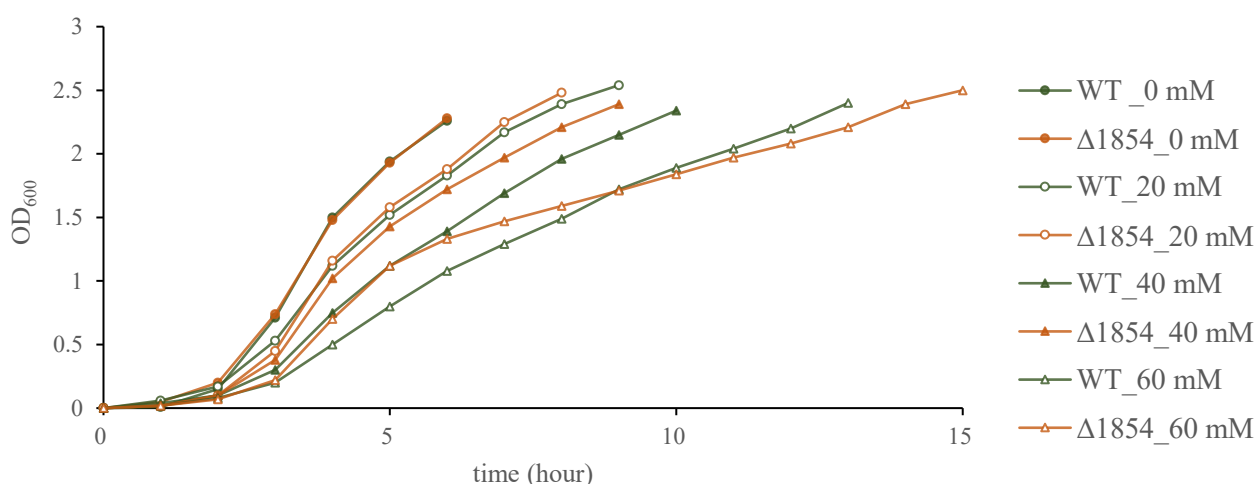


図 2-6 $\Delta PA1854$ の亜硝酸耐性試験

WT、 $\Delta PA1854$ の 2 株を LB 培地 (pH 8.2) で好気、37°C、200 rpm で培養した。株間で生育差は見られなかった。ただしこの生育曲線の形は再現性が取れておらず、試行によってラグの長さや増殖速度にばらつきがあった。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 2 項 亜硝酸同化試験による $\Delta PA1854$ の評価

より亜硝酸の細胞毒性を観察しやすいように、WT、 $\Delta PA1854$ に対して、亜硝酸ナトリウムを唯一の N 源とした合成培地で好気培養を行った（亜硝酸同化試験）。本培地は VB 8.2 に NaNO_2 を 1-20 mM 加えたものを使用した。

ラグの長さ、増殖速度、濁度の最大値について再現性が得られなかった。特に、添加した亜硝酸塩の濃度が高いほど結果が不安定になった。このことから、結果のばらつきの要因として、試行により膜透過した亜硝酸分子の量が異なっていた可能性が考えられた。しかし亜硝酸 10 mM 以上の濃度条件では、 $\Delta PA1854$ の方が良好に生育する傾向が見られた（図 2-7）。この結果から、WT では PA1854 が亜硝酸イオ

ンを過剰量取り込み、生育が悪化したことが示唆された。

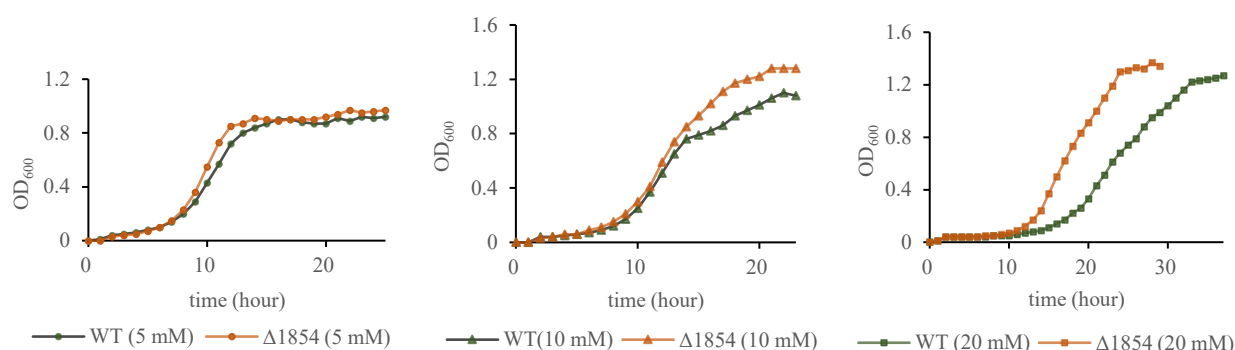


図 2-7 $\Delta PA1854$ の亜硝酸同化試験

WT、 $\Delta PA1854$ の 2 株を VB8.2 培地で好気、37°C、200 rpm で培養した。図は 5 回の実験のうち 1 回の結果であり、左から亜硝酸ナトリウムを 5 mM、10 mM、20 mM の濃度で添加した実験を示す。亜硝酸ナトリウム 10 mM 以上の条件では、 $\Delta PA1854$ の方が WT より良好に生育した。ただしこの生育曲線の形は再現性が取れておらず、試行によりラグの長さ、増殖速度、最大到達濁度にはばらつきがあった。ネガティブコントロールとして、 NaNO_2 を添加しない培地でも各株を培養した。いずれも増殖しなかったが、グラフの視認性を上げるため上の図では省略した。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 3 項 VB9.6 を使用した低濃度の亜硝酸同化試験

ここまでの実験条件では、膜透過した亜硝酸分子の絶対量が多く、亜硝酸イオントランスポーターによる輸送の効果がマスクされてしまった可能性が考えられた。そこで、亜硝酸分子の膜透過量を少なくするため、より低い亜硝酸濃度 (500 μM) かつ高 pH (9.6) での亜硝酸同化試験を行った。pH 9.6 という値に関しては、ラン藻における亜硝酸同化実験 (105) を参考にした。

WT、 $\Delta PA1854$ に対し、亜硝酸ナトリウムを唯一の N 源とした培地で好気培養を行い、亜硝酸イオンを取り込んで増殖することができるかを調べた。本培地は VB9.6 に NaNO_2 を 500 μM となるように加えたものを使用した。

いずれの株も、窒素源として亜硝酸を添加した際に増殖促進が見られた (図 2-8)。ただしその増殖量はわずかであり、野生株と破壊株の生育量の間で有意な差があるかは明確にならなかった。

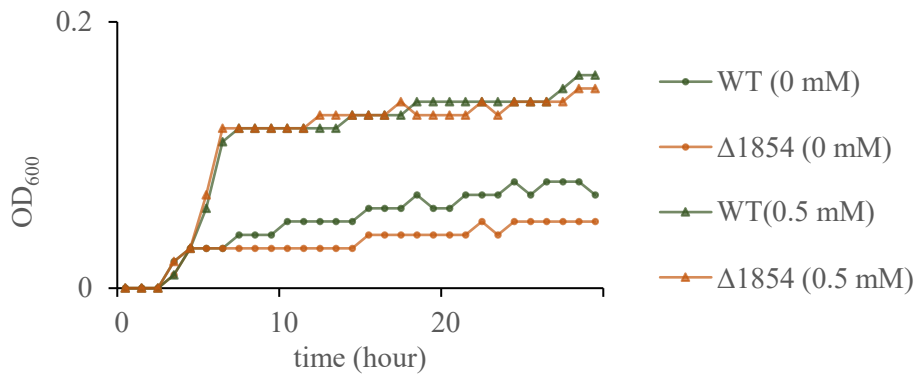


図 2-8 $\Delta PA1854$ の亜硝酸同化試験

WT、 $\Delta 1854$ の 2 株を VB9.6 培地で好気、37°C、200 rpm で培養した。図は 2 回の実験のうち 1 回の結果を示す。コントロールとして、 NaNO_2 を添加しない培地でも各株を培養し、同時に測定した (0 mM)。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 4 項 ジャーファーマンターによる亜硝酸塩フィード培養

第 1、2 項は pH 8.2 の実験で、添加した亜硝酸塩の濃度も高かったため、亜硝酸分子の膜透過量のばらつきが大きくなり、結果が安定しなかったと考えられる。第 3 項の pH 9.6、500 μM の亜硝酸同化試験では膜透過の絶対量を低く抑えられている可能性はあるが、増殖が低いレベルで頭打ちとなってしまう、株間の比較が難しかった。そこで、ジャーファーマンターと送液ポンプを用いて流加培養を行った。

ジャーに VB9.6 を 500 mL 調製し、一晩前培養した菌液を 1% 加えた。培養温度 37°C、回転数 150 rpm、通気 0.5 L/min に設定して本培養を開始した。N 源として 1 時間に一度、終濃度 100 μM または 50 μM に相当する亜硝酸ナトリウムをマイクロポンプで送液した。また採取した培養液を OD_{600} の測定及び亜硝酸イオンの定量に供した。培養系の全体を図 2-9 に示す。

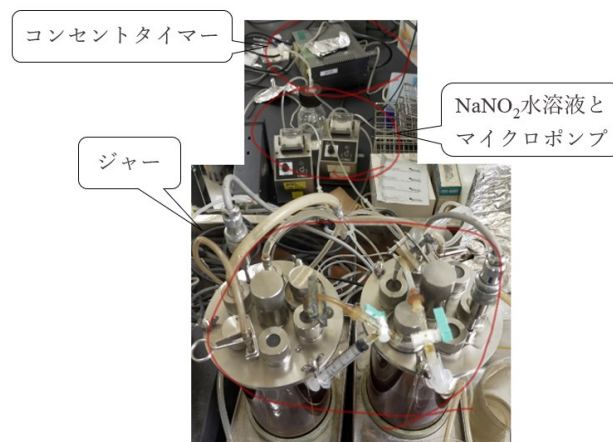


図 2-9 流加培養系

タイマーとポンプを用いて、1 時間に一度一定量の亜硝酸ナトリウム水溶液をジャーに送液した。

各濃度条件について2回ずつの結果を示す(1回目と2回目で、各株に使用するジャーを入れ替えている)(図 2-10)。いずれの濃度条件においても、生育差はジャーフェーマンターの差によるところが大きく、株間で系統的な差は見られなかった。また培地上清の亜硝酸イオン濃度についても、株間で系統的な差は見られなかった。

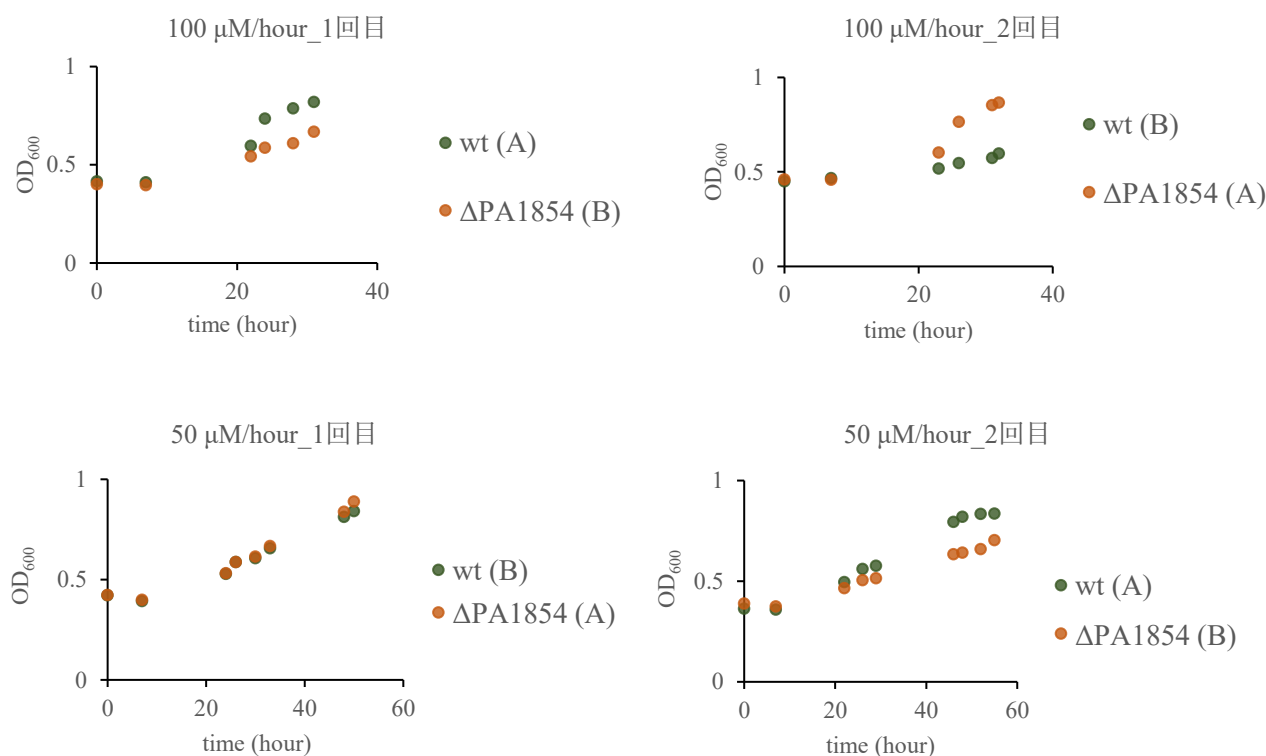


図 2-10 ジャーフェーマンターによる亜硝酸塩フィード培養

亜硝酸ナトリウムの送液量 100 $\mu M/hour$ の (左上) 1 回目の結果と (右上) 2 回目の結果

亜硝酸ナトリウムの送液量 50 $\mu M/hour$ の (左下) 1 回目の結果と (右下) 2 回目の結果

ジャーフェーマンターは A と B の 2 台を使用した。凡例において株名の後ろに書かれている文字は、ジャーフェーマンターの番号を表す。

第 5 項 結果のまとめ

富栄養の LB 培地を用いた亜硝酸耐性試験では、10 mM 以上の亜硝酸ナトリウムを添加しても、WT と $\Delta PA1854$ で再現性ある生育差は観察されなかった。これは、栄養豊富な状態の細胞が、亜硝酸イオンストレスに対して高い耐性を持っていたからだと考えられる。異なる種の結果ではあるが、実際に *Thermus thermophilus* を用いた実験では、富栄養培地 (TB) に 120 mM の亜硝酸イオンを加えた培地でも菌は生育した (106)。このことから、菌の亜硝酸イオン耐性を評価する際、栄養制限培地に窒素源として亜硝酸イ

オンを培地に添加した方が、生育差が見やすいと考えられた。そこで亜硝酸同化試験を行った。

亜硝酸同化試験において、10 mM 以上の高濃度条件では、 $\Delta PA1854$ の方が WT より良好な生育を示す傾向が見られた。このことから、PA1854 は亜硝酸イオン取り込み型のトランスポーターであることが示唆された。しかしジャーファーマンターを用いた低濃度の亜硝酸フィード試験では、WT と $\Delta PA1854$ で生育差は観察されなかった。

第5節 微好気培養による比較

第1項 WT、 $\Delta PA1854$ の微好気脱窒試験

序章第2節で述べたように、PA1854 を含む *ccoN3* オペロンは、好気呼吸と脱窒が共存（共呼吸）する微好気環境で重要な役割を果たすと予想される。PA1854 が NO_2^- 排出トランスポーターであれば、共呼吸時に有害な NO_2^- を細胞外に捨てる機能を持つと考えられ、整合的である。そこで WT と $\Delta PA1854$ に対し、微好気培養を行って生育を調べた。培地は LB または LB+40 mM NaNO_3 を使用し、気相は O_2 (2%)+ N_2 で置換した。

硝酸イオン非添加（好気呼吸のみ）の条件では、WT と $\Delta PA1854$ は同等の生育を示した。一方硝酸イオン 40 mM（好気呼吸+脱窒）の条件では、 $\Delta PA1854$ の方がわずかに良好に増殖した（図 2-11）。この結果から、PA1854 は微好気呼吸と脱窒の共存時に不利であることが示唆された。PA1854 が毒性の NO_2^- を取り込んだと考えられる。

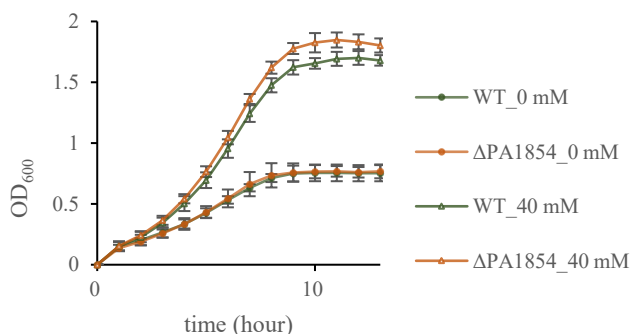


図 2-11 WT、 $\Delta PA1854$ の微好気脱窒試験

WT または $\Delta PA1854$ を微好気 (O_2 : 2%)、37°C、150 rpm で培養した。培地は LB または LB+40 mM NaNO_3 を使用し、前培養液は 1% (v/v) 植菌した。図のプロットは 4 回の実験の平均値を示し、エラーバーは 4 回の標準偏差を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第2項 $\Delta nirS$ 、 $\Delta PA1854\Delta nirS$ の微好気脱窒試験

(1) $\Delta nirS$ 、 $\Delta PA1854\Delta nirS$ の作製

NirS はペリプラズムの亜硝酸還元酵素 NIR の構造遺伝子である。複数の転写因子の制御のもと嫌気条件下で発現し (107)、脱窒の第 2 還元反応 ($\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$) を担う。また結晶構造からは、一酸

化窒素還元酵素 NOR との複合体形成が示唆されている（図 2-12）（108）。このような仕組みは、細胞毒性の強い NO の発生を抑え、近傍で速やかに分解するためと考えられる。第 1 項と同じ微好気脱窒試験において、*nirS* の破壊により細胞内に NO_2^- が蓄積しやすくなり、より PA1854 の機能を評価しやすいと考えられた（図 2-13）。

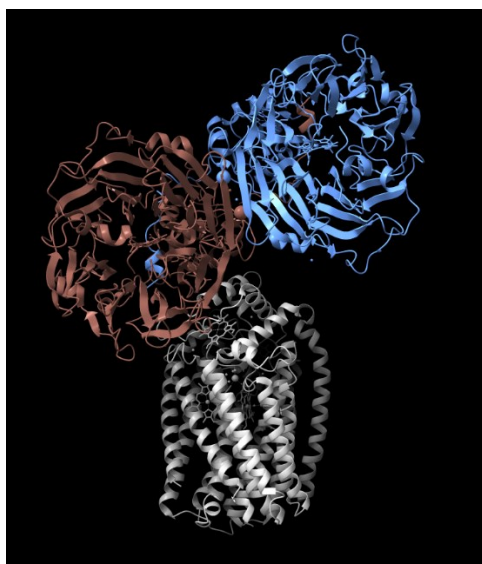


図 2-12 緑膿菌 NIR-NOR 複合体の結晶構造（PDB ID: 5GUW、(108)）

上部の赤いタンパク質と青いタンパク質はともに NIR であり、ホモダイマーを形成している。下部の白いタンパク質は NOR であり、膜貫通ヘリックスを複数持っている。

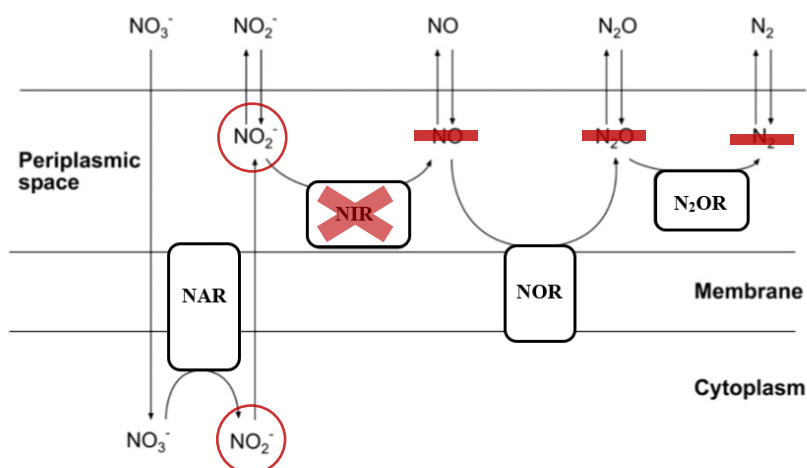


図 2-13 NirS 破壊の目的 ((35)より改変して引用)

NirS の欠損により、脱窒は NO_3^- を NO_2^- に還元する反応で止まる。その結果、細胞内に NO_2^- が蓄積しやすくなると考えられる。

破壊株の作製は、相同組換えでテトラサイクリン耐性遺伝子を *nirS* 遺伝子中に挿入することによって行った。MPAO1 (WT) または $\Delta PA1854$ に対し、*nirS* 破壊用プラスミド pHA488 をエレクトロポレーションで導入した。Tc 入り LB プレートに生えたコロニーから、Tc^r かつ Cb^s の株を取得し、二点交叉体であることを PCR で確認した (図 2-14)。

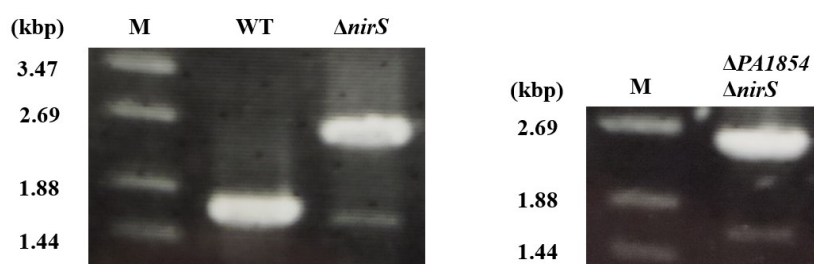


図 2-14 *nirS* 遺伝子破壊の確認

WT : 2.5 kb、破壊株 : 1.7 kb のバンドが確認された。

レーン上の表記は M : マーカー、WT : 野生株、 $\Delta nirS$: *nirS* 破壊株、 $\Delta PA1854\Delta nirS$: *PA1854* と *nirS* の二重破壊株を示す。プライマーの組「PAnirS_check1/check2」を使用して増幅した PCR 断片を、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

(2) $\Delta nirS$ 、 $\Delta PA1854\Delta nirS$ の微好気脱窒試験

$\Delta nirS$ と $\Delta PA1854\Delta nirS$ に対し、微好気培養を行って生育を調べた。培地は LB または LB+40 mM NaNO_3 を使用し、気相は O_2 (2%)+ N_2 で置換した。

nirS の破壊により、硝酸イオン 40 mM での OD は WT を用いた培養 (図 2-11) よりも大きく減少した (図 2-15)。ただし硝酸イオン非添加での培養よりも良好に増殖したことから、緑膿菌の硝酸呼吸は第一還元反応 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) のみでも、一定程度エネルギー獲得に寄与することが示唆される。硝酸イオンの有無に関わらず、 $\Delta nirS$ と $\Delta PA1854\Delta nirS$ とは同等の生育を示した。*PA1854* の有無による生育差を見るための実験であったが、この条件では OD の最大値が小さく、両株の差を検出できなかった。すなわちこの条件では、*PA1854* 破壊よりも *nirS* 破壊の影響が大きかったと考えられた。

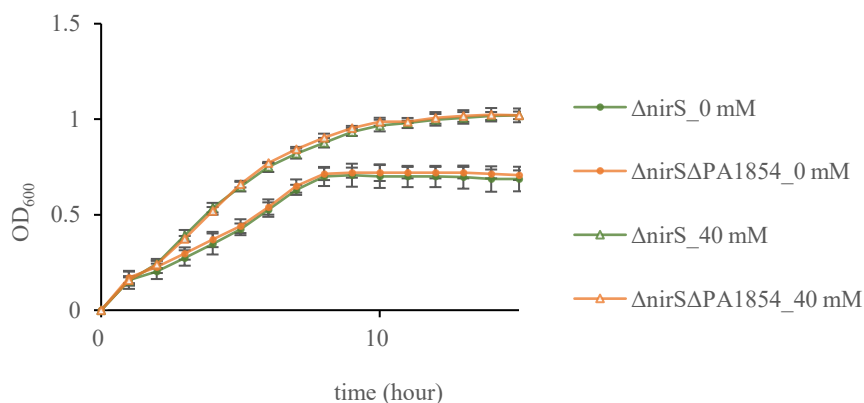


図 2-15 $\Delta nirS$ 、 $\Delta PA1854\Delta nirS$ の微好気脱窒試験

$\Delta nirS$ または $\Delta PA1854\Delta nirS$ を微好気 (O_2 : 2%)、37°C、150 rpm で培養した。培地は LB または LB+40 mM $NaNO_3$ を使用し、前培養液は 1% (v/v) 植菌した。図のプロットは 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 6 節 四重破壊株を用いた生育試験

第 1 項 $\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854+PA1854$ ($\Delta 4+PA1854$) の作製

第 1 章の $\Delta nasA\Delta narK1K2\Delta nap\Delta PA1854$ ($\Delta 4$) を親株として、C 末に His タグの配列を付加した $PA1854$ を Tn7 でゲノムに挿入し、 $\Delta 4+PA1854$ を作製した。標的遺伝子が相補されたことを PCR により確認した。

第 2 項 ウェスタンブロッティングによる $PA1854$ の検出

$\Delta 4+PA1854$ において $PA1854$ が発現していることを確かめるため、His タグに対する一次抗体を使用したウェスタンブロッティングを行った。

好気培養した $\Delta 4+PA1854$ をフレンチプレスで破碎し、未破碎菌体を除去した後、超遠心して膜画分を調製した。タンパク質 3.6 μg を 98°C で 5 分間処理した後、10% ポリアクリルアミドゲルにアプライして泳動した。泳動後のゲルから PVDF メンブレンに転写した後、一次抗体に「Anti 6×Histidine, Monoclonal Antibody (Wako)」を、二次抗体に「Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega)」を使用して検出した。

濃くはっきりとしたバンドがマーカーの ~35 kDa と ~48 kDa の間に観察された (図 2-16 右)。 $PA1854$ の質量は 42.1 kDa と予測され、バンドの位置と整合する。また、ネガティブコントロールとして泳動した WT の膜画分では発色が見られなかった (図 2-16 左) ことから、 $\Delta 4+PA1854$ において $PA1854$ が発現していることが示唆された。

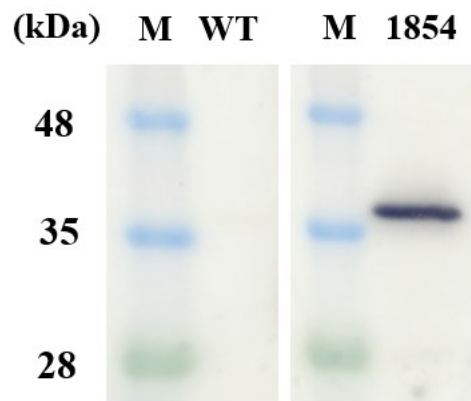


図 2-16 ウェスタンブロッティングによる PA1854 の検出

レーン上の(M)はマーカ、(WT)は野生株、(1854)は $\Delta 4+PA1854$ を示す。膜面分を泳動し His タグ抗体で検出した。 $\Delta 4+PA1854$ で 35 kDa のマーカ、の少し上にはっきりとしたバンドが観察された。

第 3 項 亜硝酸同化試験による評価

亜硝酸イオンに対する耐性試験として、亜硝酸同化条件での WT、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+PA1854$ の生育を見た。本培地は VB 8.0 に NaNO_2 を 5 mM、IPTG を 1 mM 加えたものを使用した。ただし、 $\Delta 4+PA1854$ は IPTG を加えないサンプルも同時に培養した。

$\Delta 4$ 及び IPTG 非添加の $\Delta 4+PA1854$ に対し、IPTG を添加した $\Delta 4+PA1854$ は増殖が遅れた (図 2-17)。この結果から、 $PA1854$ の発現により亜硝酸同化生育が悪化することが示された。これは、 $PA1854$ が毒性物質の亜硝酸イオンを過剰量取り込んだ結果であると考えられた。

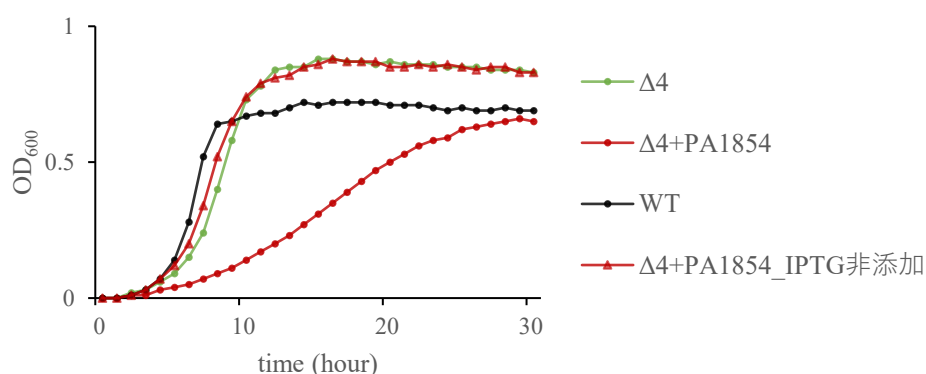


図 2-17 $\Delta 4+PA1854$ の 5 mM 亜硝酸同化試験

WT、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+PA1854$ の 3 株を VB8.0 培地で好気、37°C、200 rpm で培養した。 $\Delta 4+PA1854$ のみ IPTG 非添加でも培養を行った。図は 3 回の実験のうち 1 回の結果を示す。培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第4項 硝酸同化試験による $\Delta 4+PA1854$ の評価

シロイヌナズナの葉緑体において HPP family の亜硝酸イオントランスポーターが2つ見つかっており、いずれも硝酸イオン応答性の転写因子により誘導される (105)。また、硝酸イオンと亜硝酸イオンはともに1価のアニオンであり部分的な構造も類似している。第1章で触れた大腸菌の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーター NarK は、硝酸イオンと亜硝酸イオンに対し共通の基質結合ポケットを利用すると考えられている。そこで、亜硝酸ではなく硝酸に対する PA1854 の活性を調べるため、 $\Delta 4+PA1854$ を用いた硝酸同化試験を行った。

WT、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+PA1854$ に対し、硝酸ナトリウムを唯一の N 源とした培地で好気培養を行い、硝酸イオンを取り込んで増殖することができるかを調べた。本培地は、VB 8.2 に NaNO_3 を 20 mM、IPTG を 1 mM 加えたものを使用した。

$\Delta 4+PA1854$ は WT と同程度に増殖した (図 2-18)。このことから、PA1854 は硝酸イオンを取り込むことが示された。PA1854 が亜硝酸イオンで誘導発現することを考えると、この結果は意外であった。一方で「PA1854 は本来亜硝酸イオンを取り込むためのトランスポーターであるが、基質認識の精度が硝酸イオンを排除するのには十分でなく、硝酸イオンに対しても取り込む能力を有する」という可能性も考えられた。

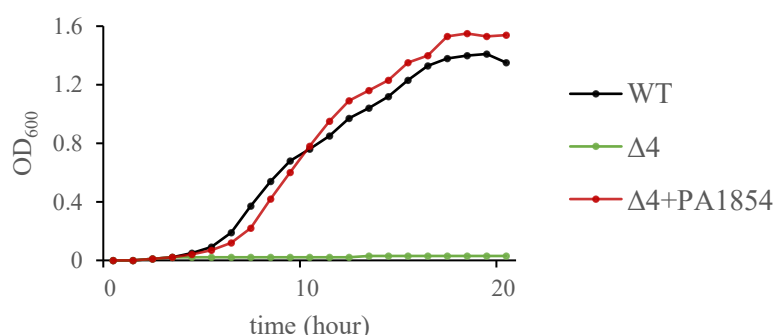


図 2-18 $\Delta 4+PA1854$ の硝酸同化試験

WT、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+PA1854$ の3株を、好気、37°C、200 rpm で培養した。図は2回の実験のうち1回の結果を示す。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第5項 脱窒試験による $\Delta 4+PA1854$ の評価

第4項の実験により、PA1854 が硝酸イオンを取り込むことが分かった。もし PA1854 が亜硝酸イオンを排出するのであれば、NarK1K2 に代わって脱窒時の硝酸イオン/亜硝酸イオンの交換輸送を成立させられる可能性がある。そこで $\Delta 4$ 、 $\Delta 4+PA1854$ の2株に対し、硝酸イオンを最終電子受容体とした嫌気培養を行い、増殖することができるかを調べた。本培地は、LB+40 mM NaNO_3 に IPTG を 1 mM 加えたものを使用した。

$\Delta 4+PA1854$ は増殖しなかった (図 2-19)。この結果から、PA1854 は亜硝酸イオンを排出しないことが

示唆された。

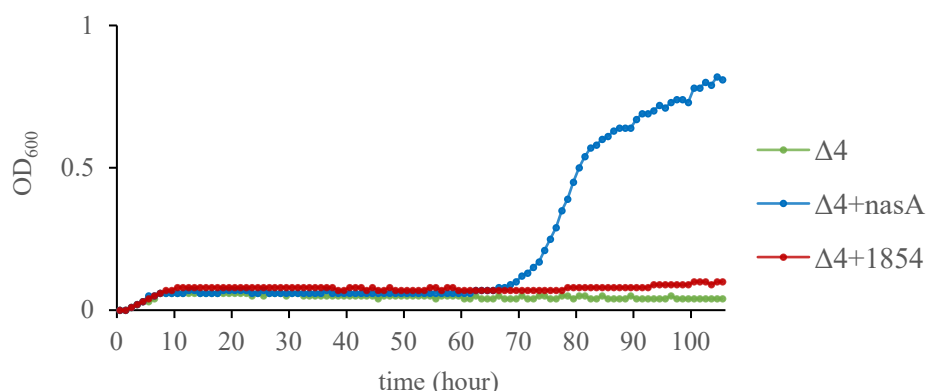


図 2-19 硝酸脱窒試験

$\Delta 4$ 及び $\Delta 4+PA1854$ を嫌気、37°C、150 rpm で培養した。3 回の実験結果のうちの 1 回を示す。ただし、ポジティブコントロールとして $\Delta 4+nasA$ を用いたのはこの 1 回のみであり、残る 2 回は WT または $\Delta 4+narK1$ を用いた。 $\Delta 4+PA1854$ は 100 時間培養しても増殖しなかったことから、長いラグを要する $\Delta 4+nasA$ とは異なり、この条件では増殖しないことが示唆された。横軸は培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 6 項 亜硝酸脱窒試験による $\Delta 4+PA1854$ の評価

PA1854 が亜硝酸イオンを輸送するのであれば、亜硝酸イオンを最終電子受容体とする脱窒条件で、 $\Delta 4$ と $\Delta 4+PA1854$ で差が見られる可能性があると考えられた。そこで、 $\Delta 4+PA1854$ に対し、亜硝酸イオンを最終電子受容体とした嫌気培養を行い、増殖することができるかを調べた。本培地は、LB に NaNO_2 を 20 mM 加えたものを使用した。

$\Delta 4+PA1854$ は IPTG 非添加では増殖したが、IPTG で PA1854 を誘導発現すると増殖しなくなった (図 2-20)。この結果から、PA1854 では亜硝酸イオンを最終電子受容体とする脱窒生育が阻害されることが示された。この原因として、PA1854 が過剰量の亜硝酸イオンを取り込み、生育阻害が起きた可能性が考えられた。

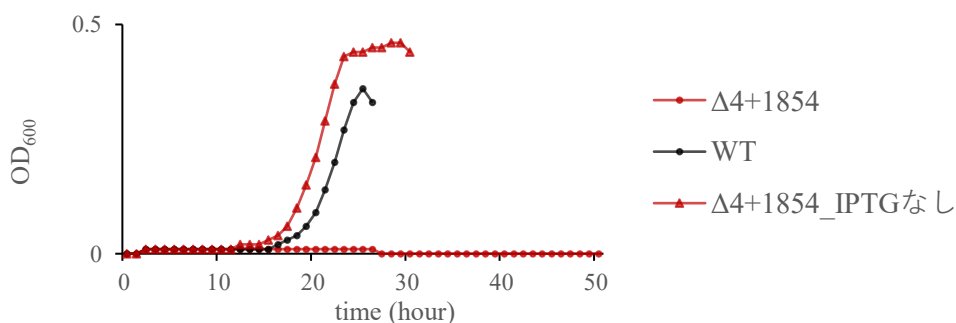


図 2-20 亜硝酸脱窒試験

WT、 $\Delta 4+1854$ の 2 株を LB+20 mM NaNO₂ 培地で嫌気、37°C、150 rpm で培養した。 $\Delta 4+1854$ のみ IPTG 非添加でも培養を行った。図は 2 回の実験のうち 1 回の結果を示す。培養開始からの経過時間 (hour) を示し、縦軸は測定波長 600 nm における濁度を示す。

第 7 節 第 2 章のまとめ

第 2 節と第 3 節の実験から、NirY は *ccoN3Q3-PA1854* のみの制御を行うレギュレーターであり、このオペロンの転写開始点は *ccoN3* の上流-29 位であることが示唆された。

第 5 節で $\Delta 4+PA1854$ が硝酸同化条件で増殖し、脱窒条件で増殖しなかったことから、PA1854 は硝酸イオンを取り込むが亜硝酸イオンを排出しないことが示唆された。5 mM の亜硝酸同化試験では、 $\Delta 4+PA1854$ の生育が $\Delta 4$ と比べ悪化した。また第 4 節の亜硝酸同化試験では、亜硝酸イオン濃度 10 mM 以上で、 $\Delta PA1854$ が WT より良好な生育を示す傾向があった。これらの結果から、PA1854 は亜硝酸イオンを取り込むことが示唆された (図 2-21)。



図 2-21 PA1854 の輸送モデル

機能未知だった PA1854 は、亜硝酸イオン取り込み型のトランスポーターであることが示唆された。

ゲノム情報から、PA1854 は亜硝酸イオンの利用に関わると予想された。実際に本研究の実験では、*PA1854* を発現する株で亜硝酸イオンによる生育阻害作用を強く受けた。これらを総合すると、PA1854 は high affinity のトランスポーターであり、環境中の低濃度の亜硝酸イオン利用に働くと思われる。ただし濁度による生育測定では明確な結果が得られていないため、今後は株間での差が明確に出るような実験系を考える必要がある。

緑膿菌の亜硝酸イオン応答機構をまとめると以下ようになる。毒性物質である亜硝酸イオンの存在下で、緑膿菌は専用のレギュレーター NirY により *ccoN3Q3-PA1854* を誘導発現する。*ccoN3Q3* によって亜硝酸イオン耐性の高い N3 タイプ Cbb3 が作られ、さらに PA1854 は亜硝酸イオントランスポーターと

して働くと予想される (図 2-22)。

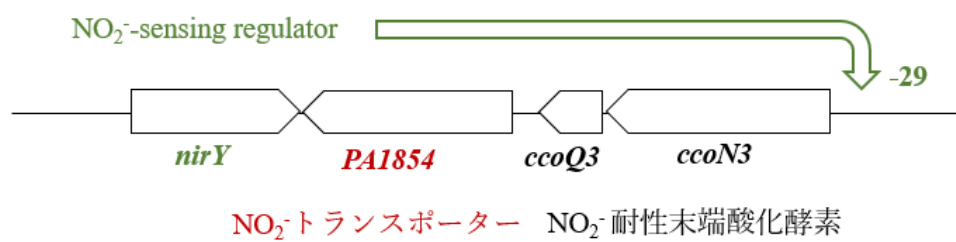


図 2-22 緑膿菌の亜硝酸イオンに対する応答機構

亜硝酸イオン存在下で NirY が *ccoN3Q3-PA1854* オペロンを誘導発現する。

【総括と展望】

緑膿菌において、硝酸同化及び脱窒は環境遍在性に寄与する重要な機構である。これらの代謝には基質の能動輸送が不可欠であることから、輸送を担うトランスポーターが存在するはずであり、ゲノム情報からいずれも NarK 様タンパク質であると予想された。これまで NarK 様タンパク質の機能解析は、大腸菌及び *Paracoccus denitrificans* を中心に行われてきた。緑膿菌においては薬物の標的分子として医学的な観点からも重要なテーマであるが、十分な知見が得られていない。そこで第 1 章では、緑膿菌が持つ 3 つの NarK 様タンパク質、NasA、NarK1、NarK2 について、輸送機構を明らかにすることを目指して実験を行った。

まず各種遺伝子破壊株・相補株に対し、硝酸同化条件及び硝酸脱窒条件での生育試験を行った。その結果、異なるタンパク質の発現株間で生育プロファイルに明確な差異が見られ、細胞にとって異なる役割があることが示唆された。NasA と NarK1 は $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ のアンチポートが可能であることに加え、硝酸イオンの取り込みによって細胞内の正味の窒素量を増やすことも可能であることが示された。NarK2 の単独相補株は硝酸同化、脱窒のいずれでも生育しなかった。ウェスタンブロットイングの結果を踏まえると、これは NarK2 が単体では不安定であることを示唆する結果かもしれない。

緑膿菌をはじめ複数の種が NarK1 と NarK2 の 2 つを持つことから、両方を利用または両者を使い分けることで、生存に有利になる条件があると考えられる。本研究では *narK1* 相補株と *narK2* 相補株を様々な条件（基質濃度、温度、pH、栄養条件を変更）の脱窒試験に供したが、役割の違いについては明らかにならなかった。一方で、NarK2 が NarK1 の存在下で $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポート活性を持つことが示された。その原因としては、両者が複合体を形成することが考えられる。

本研究において NarK1 と NasA は、硝酸同化における硝酸イオンの取り込みも、脱窒における $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ のアンチポートも行った。しかし硝酸同化で働く際、共輸送基質が何であるかはまだ明らかになっていない。NarK 様タンパク質の硝酸同化時の輸送機構については、大腸菌 NarK を扱った論文では明確な議論がなされないことが多く、得られている知見も少ない。

結晶構造が解かれて以来の大腸菌 NarK 研究においては、 NO_3^- 1 個を取り込み NO_2^- 1 個を排出するのが輸送 1 サイクルである、という前提に立って解析されているようである。なぜなら、基質結合ポケットの 2 つの Arg 残基が互いの正電荷で強く反発し、アニオンが両残基の間に割り込まなければコンフォメーションチェンジを起こさないと考えられるからである。この輸送 1 サイクルでは、N 原子 1 個を取り込み 1 個を排出するので、細胞内の正味の N 原子は増えない。しかし Goddard らが *P. denitrificans* $\Delta nasA$ で大腸菌の NarK を異種発現させると、硝酸同化条件で増殖した (79)。これは、NarK により正味の N 原子の取り込みが行われたこと、すなわち NarK が厳格な $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ antiporter ではないことを示唆する。

Fukuda らは、大腸菌 NarK を組み込んだプロテオリポソームを作製し、様々な anion を対向基質とした時の NO_2^- の輸送を蛍光により検出した (70)。その結果、 NO_3^- や NO_2^- と同じかそれより小さいサイズの anion である Cl^- 、 HCO_3^- 、 HCOO^- を対向基質とした場合、 NO_3^- を対向基質とした時の 5 割程度の NO_2^- 輸送が見られた (図 1-3)。この結果を踏まえると、*in vivo* の輸送においても「一価の小さなアニオンを排出す

ることで硝酸イオンを取り込む」というサイクルを回している可能性は考えられる。

一般に、NarK1 タイプは NO_3^-/H^+ シンポーターであり、NarK2 タイプは $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーターだと言われている。Goddard らは *P. denitrificans* においてこの予想を支持しているが、同時に NarK1 による脱窒生育や NarK2 による硝酸同化生育も報告している(79)(80)。すなわち、NarK1 タイプと NarK2 タイプはともに、硝酸同化における N 原子の取り込みも、硝酸呼吸における $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポートも行えると述べている。そのメカニズムは明らかではないが、上記の通り NarK 様タンパク質は基質認識に曖昧さを残しており、NarK1 タイプと NarK2 タイプではその度合い、すなわち基質特異性が異なるということが考えられる。この場合、単純に NasA 及び NarK1 は $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ アンチポーター、すなわち両者の逆方向の輸送が tight にカップリングしているとは言えない可能性もある。したがって、今後は NasA、NarK1、NarK2 の各種基質に対する affinity を解析する必要がある。基質特異性については、第 1 章第 9 節の基質結合ポケットの Phe269 残基の変異実験により、NarK2 の輸送活性が大きく変化したことが重要な手掛かりになるはずである。

第 2 章では、亜硝酸イオン応答性の呼吸酵素オペロンにコードされる PA1854 について、機能の解明を目指した。アミノ酸配列を利用した *in silico* の解析から、PA1854 は HPP family に属する亜硝酸イオントランスポーターであると予想されたため、第 1 章と同様の手法で機能を解析した。硝酸同化実験から、PA1854 は硝酸イオンを取り込むトランスポーターであることが示された。また、亜硝酸同化試験で $\Delta 4 + \text{PA1854}$ の生育が悪化したこと、硝酸脱窒試験及び亜硝酸脱窒試験で $\Delta 4 + \text{PA1854}$ が増殖しなかったことから、PA1854 は亜硝酸イオンを取り込むが、排出しないことが示唆された。ただし本実験の系では、亜硝酸イオンが亜硝酸分子となり膜透過する量をコントロールできておらず、特に実験の再現性に影響を与えた可能性がある。そのため、PA1854 の亜硝酸イオン輸送機能についてはさらなる解析が必要である。また、 $\Delta 4$ が亜硝酸同化試験で増殖したことから、緑膿菌には未知の亜硝酸イオントランスポーターが存在する可能性もある。今後こうした観点を踏まえ、PA1854 のより詳細な機能解析が必要である。

本研究では様々な条件で生育試験を行うことで、各トランスポーターの機能を検証した。今後は以下の 3 点が主たる研究方針となるだろう。

1. 精製タンパク質を用いた解析

本研究において、*nasA*、*narK1*、*narK2*、*PA1854* のそれぞれについて His タグ付きの遺伝子相補株を作製した。各種タンパク質を精製し立体構造を取得することで、機能の違いについて一分子スケールの解析ができるはずである。構造に基づいた MD シミュレーションなどの *in silico* 解析も考えられる。なお、NarK1 タイプのトランスポーターではまだ立体構造が解かれていないことも、この実験が重要な理由の一つである。

2. *in vitro* の輸送アッセイ

第 1 章第 1 節で述べたように、 NO_3^- 、 NO_2^- の輸送を直接検出するのは難しい。そのためか、著者が知る限り *in vitro* の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 輸送アッセイ系は論文によって様々であり、明確な結果を得られていない実験が多い印象である。しかしトランスポーターの輸送機構の解明には、最終的には *in vitro* の実験が重

要となる。各トランスポーターの基質特異性や輸送速度を明らかにするために、反転膜小胞や、人工脂質二重膜に精製タンパク質を組み込んだプロテオリポソームを利用した実験系の構築が求められる。

3. NarK1-NarK2-NAR 複合体の検出

オペロンを構成する NarK1、NarK2、NAR が複合体を形成すれば、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ antiporter と NO_3^- 還元酵素が空間的に近接することになり、効率よく脱窒を行えると考えられる（図 1-42）。脱窒は自然界の窒素循環において重要な役割を果たしているため、この複合体形成の有無を明らかにする実験には科学的な価値がある。

$\Delta 4+narK2$ は、ウェスタンブロッティングで NarK2 由来のバンドが観察されなかった（第 1 章第 3 節）。その原因として NarK2 が単体では不安定であった可能性がある。それを逆手に取り、NarK2 と NarK1 の共発現株（ $\Delta 4+narK2+p-narK1$ ）、NarK2 と NAR の共発現株（ $\Delta 4+narK2+p-narGHJI$ ）において同様の実験を行ったが、明確な結果は得られなかった（第 1 章第 8 節）。

NarK1 と NarK2 に対してそれぞれ特異的な抗体を作製できれば、Native-PAGE と SDS-PAGE の二次元泳動及びウェスタンブロッティングによって、複合体形成を検出できる可能性がある。本実験で用いた NarK1 抗体 2 種と NarK2 抗体 2 種では、いずれも標的タンパク質との特異的な結合が見られなかった（第 1 章第 3 節）。そのため、これらとは異なる抗原部位での抗体が必要となる。

最後に成果の要約として図 A を載せる。本研究の実験により、緑膿菌の硝酸イオン及び亜硝酸イオンの膜輸送機構について、このモデルを構築することに成功した。

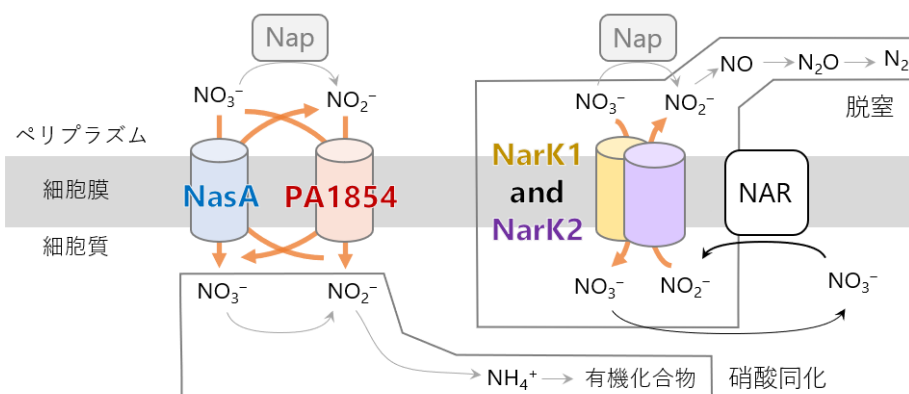


図 A 本研究の成果を踏まえた緑膿菌の硝酸イオン及び亜硝酸イオンの膜輸送機構モデル
 今後はそれぞれの精製タンパク質を用いた構造解析、*in vitro* のアッセイによる基質特異性及び輸送速度の解析、NarK1-NarK2-NAR の複合体形成についての実験が有用であると考えられる。

【参考文献】

- (1) Hardalo C, Edberg SC. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk from Drinking Water. Critical Reviews in Microbiology, 2008 -09-25;23(1).
- (2) Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect, 2000;2:1051-1060.
- (3) CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. 2019 Patient Registry Annual Data Report. 2019.
- (4) Worlitzsch D, Boucher RC, Döring G, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest, 2002;109:317-325.
- (5) Paramythiotou E, Lucet J, Timsit J, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet J, et al. Acquisition of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Patients in Intensive Care Units: Role of Antibiotics with Antipseudomonal Activity. Clinical Infectious Diseases, 2004 Mar 01;38(5):670-677.
- (6) World Health Organization. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. 2017.
- (7) Williams HD, Zlosnik JEA, Ryall B. Oxygen, Cyanide and Energy Generation in the Cystic Fibrosis Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Advances in Microbial Physiology, 2006.
- (8) Olson MV, Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 2000 Aug 31;406(6799):959-964.
- (9) Gooderham WJ, Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev, 2008 -10-13;33(2).
- (10) Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environmental Microbiology, 2005 -01-28;7(4).
- (11) Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil ML. GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. Molecular Microbiology, 2002 Sep;45(5):1277-1287.
- (12) Kawakami T, Kuroki M, Ishii M, Igarashi Y, Arai H. Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. Environmental Microbiology, 2010 Jun;12(6):1399-1412.

- (13) Cooper M, Tavankar GR, Williams HD. Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2003 May 01;149(5):1275-1284.
- (14) Comolli JC, Donohue TJ. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb₃* cytochrome oxidases. *Molecular Microbiology*, 2004 Feb;51(4):1193-1203.
- (15) Hirai T, Osamura T, Ishii M, Arai H. Expression of multiple *cbb₃* cytochrome *c* oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016 Nov 08;113(45):12815-12819.
- (16) Sabine B, Eberhard W, Hao X, Julian D. L, Ulrich E, Hartmut M. The Structure of *cbb₃* Cytochrome Oxidase Provides Insights into Proton Pumping. *Science*, 2010;329(5989):327-330.
- (17) Pitcher RS, Watmough NJ. The bacterial cytochrome *cbb₃* oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2004 -04;1655.
- (18) Jackson RJ, Elvers KT, Lee LJ, Gidley MD, Wainwright LM, Lightfoot J, et al. Oxygen Reactivity of Both Respiratory Oxidases in *Campylobacter jejuni* : the *cydAB* Genes Encode a Cyanide-Resistant, Low-Affinity Oxidase That Is Not of the Cytochrome *bd* Type. *J Bacteriol*, 2006 -12-15;189(5).
- (19) Tsukita S, Koyanagi S, Nagata K, Koizuka H, Akashi H, Shimoyama T, et al. Characterization of a *cb*-Type Cytochrome *c* Oxidase from *Helicobacter pylori*. *J. Biochem.*, 1999;125:194-201.
- (20) Otten MF, Stork DM, Reijnders WNM, Westerhoff HV, Van Spanning RJM. Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.*, 2001;268:2486-2497.
- (21) Mouncey NJ, Kaplan S. Oxygen Regulation of the *ccoN* Gene Encoding a Component of the *cbb₃* Oxidase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1^T : Involvement of the FnrL Protein. *Journal of Bacteriology*, 1998 Apr 15;180(8):2228-2231.
- (22) Preisig O, Anthamatten D, Hennecke H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993;90:3309-3313.
- (23) Preisig O, Zufferey R, Thöny-Meyer L, Appleby CA, Hennecke H. A High-Affinity *cbb₃* -Type Cytochrome Oxidase Terminates the Symbiosis-Specific Respiratory Chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 1996;178(6):1532-1538.
- (24) Sabra W, Kim E, Zeng A. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Frontiers in Microbiology*, 2002 Oct 01;148(10):3195-3202.

- (25) Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, 1992;47(1):6-13.
- (26) Pritt B, O'brien L, Winn W. Mucoid *Pseudomonas* in Cystic Fibrosis. *Microbiology and Infectious Disease*, 2007-07;128(1):32-34.
- (27) Worlitzsch D, Boucher RC, Döring G, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest.*, 2002;109(3):317-325.
- (28) Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Campbell JIA, Jensen P, Johnsen AH, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, 1999;145:1349-1357.
- (29) Bayer AS, Eftekhari F, Tu J, Nast CC, Speert DP. Oxygen-Dependent Up-Regulation of Mucoid Exopolysaccharide (Alginate) Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 1990;58(5):1344-1349.
- (30) Rowe JJ, Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 1979 Jan;2(1):51-54.
- (31) Chen F, Xia Q, Ju L. Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* Monitored by Online NAD(P)H Fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003 Nov 01;69(11):6715-6722.
- (32) Schwermer CU, De Beer D, Stoodley P. Nitrate respiration occurs throughout the depth of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* submerged agar colony biofilms including the oxic zone. *Sci Rep* 2022 -05-20;12(1).
- (33) Gallagher LA, Manoil C. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Kills *Caenorhabditis elegans* by Cyanide Poisoning. *Journal of Bacteriology*, 2001 Nov 01;183(21):6207-6214.
- (34) 石田菜津美. *Pseudomonas aeruginosa* における亜硝酸応答遺伝子群の解析. 東京大学農学部卒業論文, 2019.
- (35) Sagar S, Jha N, Deslippe J, Bolan NS, Luo J, Giltrap DL, et al. Denitrification and N₂O:N₂ production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment*, 2013 Nov 01;465:173-195.
- (36) Esben M. Quistgaard, Christian Löw, Fatma Guettou, Pär Nordlund. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016;17:123-132.

- (37) Wolfersberger MG. UNIPORTERS, SYMPORTERS AND ANTIPORTERS. J. exp. Biol., 1994 Nov 01,;196(1):5-6.
- (38) Lomovskaya O, Warren MS, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, et al. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. Antimicrob. Agents Chemother, 2001 Jan 01,;45(1):105-116.
- (39) Morita Y, Nakashima K, Nishino K, Kotani K, Tomida J, Inoue M, et al. Berberine Is a Novel Type Efflux Inhibitor Which Attenuates the MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Microbiol., 2016 -08-05;7.
- (40) Park J, Choi H, Kim W. The Nitrite Transporter Facilitates Biofilm Formation via Suppression of Nitrite Reductase and Is a New Antibiofilm Target in *Pseudomonas aeruginosa*. mBio, 2020 Aug 25,;11(4).
- (41) Luque-Almagro VM, Gates AJ, Moreno-Vivián C, Ferguson SJ, Richardson DJ, Roldán MD. Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. Biochemical Society Transactions, 2011 Dec 01,;39(6):1838-1843.
- (42) Romeo A, Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, Nakano M, Eisenhaber B, Bläsi U. Transcriptional regulation of nitrate assimilation in *Pseudomonas aeruginosa* occurs via transcriptional antitermination within the *nirBD-PA1779-cobA* operon. Microbiology, 2012 Jun 01,;158(Pt 6):1543-1552.
- (43) Reitzer L. NITROGEN ASSIMILATION AND GLOBAL REGULATION IN *ESCHERICHIA COLI*. Annu. Rev. Microbiol., 2003 Jan 01,;57(1):155-176.
- (44) Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M, Arai H, Schobert M, et al. The Anaerobic Regulatory Network Required for *Pseudomonas aeruginosa* Nitrate Respiration. Journal of Bacteriology, 2007 Jun 01,;189(11):4310-4314.
- (45) Holloway BW. Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J. gen. Microbiol., 1955 Dec;13(3):572-581.
- (46) Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, et al. Comprehensive Transposon Mutant Library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003 Nov 25,;100(24):14339-14344.
- (47) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
- (48) R. Simon, U. Priefer, A. Pühler. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nature Biotechnology, 1983;1:784-791.
- (49) Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 1983 Jun 05,;166(4):557-580.

- (50) Vogel H, Bonner D. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J. Biol. Chem., 1956(218):97-106.
- (51) Kerschen EJ, Irani VR, Hassett DJ, Rowe JJ. *snr-I* Gene Is Required for Nitrate Reduction in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of Bacteriology, 2001 Mar 01;;183(6):2125-2131.
- (52) Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M, et al. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. Gene, 1986;48(1):119-131.
- (53) Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. Gene, 1998 May 28;;212(1):77-86.
- (54) Choi K, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR, et al. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. Nature Methods, 2005 Jun 01;;2(6):443-448.
- (55) Flgurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans (plasmid replication/replication origin/trans-complementation/broad host range/gene cloning). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979;76(4):1648-1652.
- (56) Choi K, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. Nature Protocols, 2006 Jun;1(1):153-161.
- (57) Arai H, Hayashi M, Kuroi A, Ishii M, Igarashi Y. Transcriptional Regulation of the Flavohemoglobin Gene for Aerobic Nitric Oxide Detoxification by the Second Nitric Oxide-Responsive Regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2005 -06-15;187(12).
- (58) Kameya M, Kanbe H, Igarashi Y, Arai H, Ishii M. Nitrate reductases in *Hydrogenobacter thermophilus* with evolutionarily ancient features: distinctive localization and electron transfer. Molecular Microbiology, 2017 -08-09;106(1).
- (59) Griess. Griess reagent: a solution of sulphanilic acid and α -naphthylamine in acetic acid which gives a pink colour on reaction with the solution obtained after decomposition of nitrosyl complexes. Chem.Ber., 1879;12:427; 427.
- (60) Promega. Technical Bulletin Griess Reagent System INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G2930. 2009.
- (61) Saier MH, Tran CV, Barabote RD. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. Nucleic Acids Research, 2006 Jan 01;;34(1):D181-D186.

- (62) Saier MH, Reddy VS, Moreno-Hagelsieb G, Hendargo KJ, Zhang Y, Iddamsetty V, et al. The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 update. *Nucleic Acids Research*, 2020 -12-29.
- (63) Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013 Mar 01,;38(3):151-159.
- (64) Wang J, Yan N, Dang S, Sun L, Huang Y, Lu F, et al. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature*, 2010 Oct 07,;467(7316):734-738.
- (65) Kumar H, Kasho V, Smirnova I, Finer-Moore JS, Kaback HR, Stroud RM. Structure of sugar-bound LacY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014 Feb 04,;111(5):1784-1788.
- (66) Yong Yin, Xiao He, Paul Szewczyk, That Nguyen, Geoffrey Chang. Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science*, 2006 May 05,;312(5774):741-744.
- (67) Pao SS, Paulsen IT, Saier MH. Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998;62(1):1-34.
- (68) Trueman LJ, Richardson A, Forde BG. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 1996 Oct 10,;175(1):223-231.
- (69) Unkles SE, Rouch DA, Wang Y, Siddiqi MY, Anthony D. M. Glass, Kinghorn JR, et al. Two Perfectly Conserved Arginine Residues Are Required for Substrate Binding in a High-Affinity Nitrate Transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004 Dec 14,;101(50):17549-17554.
- (70) Fukuda M, Takeda H, Kato HE, Doki S, Ito K, Maturana AD, et al. Structural basis for dynamic mechanism of nitrate-nitrite antiport by NarK. *Nature Communications*, 2015 May 11,;6(1):7097.
- (71) Moir JW, Wood NJ. Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001 Feb 01,;58(2):215-224.
- (72) Rowe JJ, Ubbink-Kok T, Molenaar D, Konings WN, Driessen A. NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1994;12(4):579-586.
- (73) Zheng H, Wisedchaisri G, Gonen T. Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature*, 2013 May 30,;497(7451):647-651.
- (74) Feng J, Selvam B, Shukla D. How do antiporters exchange substrates across the cell membrane? An atomic-level description of the complete exchange cycle in NarK. *Structure*, 2021 Aug 05,;29(8):922-933.e3.
- (75) Chon NL, Schultz NJ, Zheng H, Lin H. Anion Pathways in the NarK Nitrate/Nitrite Exchanger. *J. Chem. Inf. Model.* 2023 -08-16;63(16):5142.

- (76) Nicholas J. Wood, Tooba Alizadeh, David J. Richardson, Stuart J. Ferguson, James W. B. Moir. Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. *Molecular Microbiology*, 2002;44(1):157-170.
- (77) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018 -05-02;35(6):1547.
- (78) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987 Jul 01;4(4):406-425.
- (79) Goddard AD, Bali S, Mavridou DAI, Luque-almagro VM, Gates AJ, Dolores Roldán M, et al. The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters—probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Molecular Microbiology*, 2016 -10-27;103(1).
- (80) Goddard AD, Moir JWB, Richardson DJ, Ferguson SJ. Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Molecular Microbiology*, 2008 Nov;70(3):667-681.
- (81) Monod J. THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annual review of microbiology*, 1949:371-394.
- (82) Sharma V, Noriega CE, Rowe JJ. Involvement of NarK1 and NarK2 Proteins in Transport of Nitrate and Nitrite in the Denitrifying Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006 Jan 01;72(1):695-701.
- (83) Schweizer HP. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 (Recombinant DNA; broad-host-range expression vectors; multiple cloning site; DNA sequencing). *Gene*, 97 (1991) 109-112
- (84) Parsonage D, Greenfield AJ, Ferguson SJ. The high affinity of *Paracoccus denitrificans* cells for nitrate as an electron acceptor. Analysis of possible mechanisms of nitrate and nitrite movement across the plasma membrane and the basis for inhibition by added nitrite of oxidase activity in permeabilised cells. *BBA*, 1985;807:81-95.
- (85) Flores E, Herrero A, Guerrero MG. Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *BBA*, 1987 January 1;896(1):103-108.
- (86) Lin Y, Sekedat MD, Cornell WC, Silva GM, Okegbe C, Price-Whelan A, et al. Phenazines Regulate Nap-Dependent Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 2018 May 01;200(9).
- (87) Bertero MG, Rothery RA, Palak M, Hou C, Lim D, Blasco F, et al. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Mol Biol* 2003 -08-10;10(9):681.

- (88) Blasco F, Dos Santos J, Magalon A, Frixon C, Guigliarelli B, Santini C, et al. NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 1998 -04;28(3).
- (89) Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *J. Mol. Biol.*, 2004 May 14;338(5):1027-1036.
- (90) Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, 2007 Jul 01;35(Web Server issue):W429-W432.
- (91) Liu P, Yue C, Liu L, Gao C, Lyu Y, Deng S, et al. The function of small RNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *PeerJ - the Journal of Life & Environment*, 2022 -07-21.
- (92) Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FSL. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the Pseudomonas genome database. *Nucleic Acids Research*, 2016 Jan 04;44(D1):D646-D653.
- (93) Bateman A, Martin M, Orchard S, Magrane M, Ahmad S, Alpi E, et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 2023;51(D1):D523.
- (94) Kanehisa M. Toward Pathway Engineering: A New Database of Genetic and Molecular Pathways. *Science & Technology Japan*, 1996;59:34-38.
- (95) Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2022 -10-27;51(D1):D587.
- (96) Maddocks SE, Oyston PCF. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 2008 Dec 01;154(12):3609-3623.
- (97) Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021 -07-15;596(7873):583.
- (98) Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods*, 2022;19(6).
- (99) Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, et al. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 2020;49(D1):D412.
- (100) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 2020 -10-22;30(1):70.

- (101) Bateman A. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *TIBS*, 1997;22(1):12-13.
- (102) Ereño-Orbea J, Oyenarte I, Martínez-Cruz LA. CBS domains: Ligand binding sites and conformational variability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013 Dec 01;540(1-2):70-81.
- (103) Hattori M, Iwase N, Furuya N, Tanaka Y, Tsukazaki T, Ishitani R, et al. Mg^{2+} -dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg^{2+} homeostasis. *EMBO J*, 2009 -10-01;28(22).
- (104) De Angeli A, Moran O, Wege S, Filleur S, Ephritikhine G, Thomine S, et al. ATP Binding to the C Terminus of the *Arabidopsis thaliana* Nitrate/Proton Antiporter, AtCLCa, Regulates Nitrate Transport into Plant Vacuoles. *Journal of Biological Chemistry*, 2009 -07-27;284(39):26526.
- (105) Maeda S, Konishi M, Yanagisawa S, Omata T. Nitrite Transport Activity of a Novel HPP Family Protein Conserved in Cyanobacteria and Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 2014 Jul 01;55(7):1311-1324.
- (106) Alvarez L, Sanchez-Hevia D, Sánchez M, Berenguer J. A new family of nitrate/nitrite transporters involved in denitrification. *Int Microbiol*, 2018 Jul 20;22(1):19-28.
- (107) Kuroki M, Igarashi Y, Ishii M, Arai H. Fine-tuned regulation of the dissimilatory nitrite reductase gene by oxygen and nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*, 2014 -10-23;6(6).
- (108) Terasaka E, Yamada K, Wang P, Hosokawa K, Yamagiwa R, Matsumoto K, et al. Dynamics of nitric oxide controlled by protein complex in bacterial system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016 -12-26;114(37):9888.

【謝辞】

本研究を行い、博士論文を完成させるにあたり、多くの方々からご指導、ご助言をいただきましたので、ここに感謝の意を表します。

積み重なった知という財産を惜しみなく分け与えてくださり、いついかなる時も現象に誠実に向き合うことの大切さ、研究者としての生き様を示してくださった東京大学教授 石井 正治 博士に深く感謝いたします。石井先生に師事した5年間は、私の中でかけがえのない思い出となりました。

心技体のいずれも未熟な私に的確なご助言を与えてくださり、5年という月日を忍耐強く見守りながらご指導してくださった東京大学准教授 新井 博之 博士に深く感謝いたします。研究室生活における楽しさとやりがいは、何より新井先生がいらしたからこそのものでした。

建設的で価値ある言葉と行動によって、前進する力をくださった東京大学助教 亀谷 将史 博士に深く感謝いたします。理性的な慈悲を湛えていらっしゃる先生には、研究室生活のあらゆる面でお世話になり、本当にありがとうございました。

研究生生活をともに送った、2019-2023 年度の応用微生物学研究室の学生の皆様に感謝いたします。

大学院での時間をより豊かにしてくれた友人 Y に感謝します。

最後に、大学院で研究するにあたり、支援してくださった家族に感謝いたします。

2024 年 3 月