

Pseudomonas aeruginosa の脱窒遺伝子群の
構造と発現調節

新井博之

①

*Pseudomonas aeruginosa*の脱窒遺伝子群の構造と発現調節

応用生命工学専攻
平成4年度博士課程入学
氏名 新井 博之
指導教官 児玉 徹

目 次

序論	1
第1章 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> の脱窒遺伝子群の取得と構造解析	9
第1節 序	9
第2節 使用菌株および培地	10
第3節 チトクロム <i>c</i> -551遺伝子のクローニング	11
3-1 <i>Pseudomonas</i> cytochrome <i>c</i> -551	11
3-2 クローニング	12
3-3 チトクロム <i>c</i> -551遺伝子の同定と周辺領域の塩基配列の決定	15
第4節 脱窒遺伝子群 (<i>nir-nor</i> 領域) のクローニングと塩基配列の決定	17
4-1 亜硝酸還元酵素遺伝子上流域の塩基配列	17
4-2 一酸化窒素還元酵素遺伝子の取得と塩基配列の決定	20
4-3 新規転写調節遺伝子の取得と塩基配列	22
4-4 亜硝酸還元酵素遺伝子下流領域の取得	22
第5節 考察	24
第2章 亜硝酸還元酵素関連遺伝子の構造	35
第1節 序	35
第2節 C23Oアッセイ法	36
第3節 亜硝酸還元酵素、チトクロム <i>c</i> -551遺伝子のプロモーター領域の同定	37
第4節 <i>nir</i> 遺伝子構造の比較	39
第5節 考察	43
第3章 一酸化窒素還元酵素関連遺伝子の構造	44
第1節 序	44
第2節 翻訳アミノ酸配列の特徴とホモロジー比較	45
第3節 <i>norCBA</i> 遺伝子産物のハイドロパシー	47

第4節	<i>nor</i> 遺伝子変異株の作製と嫌氣的生育	50
4-1	Marker exchange mutagenesis	50
4-2	変異株の作製	51
4-3	相補プラスミドの作製	51
4-4	変異株の嫌氣的生育	53
第5節	考察	53
第4章	<i>nirQ</i> オペロンの構造と機能	56
第1節	序	56
第2節	<i>nirQ</i> オペロンの構造	56
第3節	<i>nirQOP</i> 遺伝子産物の一次構造とホモロジー解析	57
3-1	疎水性解析	57
3-2	<i>nirQ</i> 遺伝子産物のホモロジー解析	57
3-3	<i>nirOP</i> 遺伝子産物のホモロジー解析	60
第4節	<i>nirQ</i> オペロン欠損株の作製と嫌氣的生育	62
4-1	<i>nirQOP</i> 変異株の作製	64
4-2	相補プラスミドの作製	64
4-3	変異株の嫌氣的生育	64
第5節	<i>nirQ</i> の相同遺伝子 <i>cbbQ</i> によるRubisCOの活性化	67
第6節	考察	67
第5章	脱窒の新規転写調節遺伝子 <i>dnr</i> の構造	70
第1節	序	70
第2節	ORF7, <i>dnr</i> の欠損株の作製と嫌氣的生育	70
2-1	ORF7, <i>dnr</i> の欠損株の作製	70
2-2	ORF7, <i>dnr</i> 変異株の嫌氣的生育	72
第3節	<i>dnr</i> の翻訳開始点の同定	72
第4節	ホモロジー検索	74
第5節	考察	77

第6章 脱窒遺伝子の転写調節機構	78
第1節 序	78
第2節 プロモーター活性測定用転写融合プラスミドの作製	81
第3節 培養方法	81
第4節 酸素による脱窒遺伝子の発現制御	83
第5節 亜硝酸による脱窒遺伝子の発現調節	83
第6節 一酸化窒素による調節	85
6-1 亜硝酸還元酵素遺伝子欠損株の作製	85
6-2 <i>nirS</i> 変異株での亜硝酸による脱窒遺伝子の転写誘導	88
6-3 <i>norCBA</i> 変異による脱窒遺伝子の転写量の変化	90
6-4 一酸化窒素添加による転写誘導	90
第7節 <i>anr</i> 遺伝子欠損による脱窒遺伝子の転写量の変化	93
第8節 <i>dnr</i> 遺伝子欠損による脱窒遺伝子の転写量の変化	93
第9節 <i>nirQ</i> オペロンの変異による脱窒遺伝子の転写量の変化	95
第10節 考察	95
総括と展望	98
引用文献	105
謝辞	113
論文の内容の要旨	114

序 論

地球上における窒素化合物の存在形態は、主に、分子状窒素などのガス状の化合物や、硝酸、亜硝酸、アンモニアといった水溶性の化合物などに代表される無機窒素化合物と、生体の構成成分や生物反応に由来する有機窒素化合物とに大別される。生態系におけるこれらの窒素化合物の濃度比は、様々な生物反応や自然現象による化学反応によって恒常性が保たれている[1]。このうち、生態系の維持という観点から特に重要な生物反応は、(1)生物がアンモニアを有機化合物に変換して生体に取り込む反応。(2)腐敗菌による有機窒素化合物のアンモニアへの分解。(3)窒素固定生物による窒素ガスをアンモニアに還元する反応。(4)硝酸をアンモニアにまで還元する同化型硝酸還元反応。(5)硝酸を最終的に窒素ガスまで還元する異化型硝酸還元反応(脱窒)。(6)硝化細菌によるアンモニアの硝酸への酸化。などが挙げられる(Fig.1)。

脱窒とは、通常硝酸イオンがガス状化合物として大気中に放出される現象と定義されている[2,3]。この現象は、100年以上も前から観察されており[4]、脱窒(denitrification)という言葉から連想されるように、植物にとってしばしば生育の律速因子となる窒素源を、土壌および水中から損失する要因となるため、マイナスのイメージでとらえられることが多い。生物はアンモニアをグルタミンやカルバモイルリン酸に取り込むことによってしか窒素源を有機化合物に固定することができないため、窒素ガスや硝酸などの無機体窒素を利用するには、これらを一度アンモニアに還元しなければならない。しかし、大気中には窒素ガス(N_2)が約80%も存在するにもかかわらず、これをアンモニアに還元して生育に利用できる生物は非常に少ない。このため、脱窒によって結合型窒素が放出されてしまうことは、植物の生育にとっては非常に不都合であり、農作物の収穫量を左右するため農業上大きな問題となっている。実際、最大で80%もの施肥窒素肥料が脱窒によって損失していると言われており、大量の化学肥料が消費される原因の1つとして経済的な影響も大きい[2]。しかし、環境科学的な観点からとらえてみると、脱窒は結合型窒素を分子窒素に戻す唯一の生物反応であり、もしこの反応がなかったとしたら、地球上の窒素原子は水溶性のイオンか有機体窒素として最終的には海洋に集積してしまい、陸圏での生態系が維持できなくなってしまう。このため、脱窒は窒素固定、硝化と並んで地球上の窒素循環の一翼を担う重要な反応とすることが出来る。また、1908年にハーバー・ボッシュ法によるアンモニ

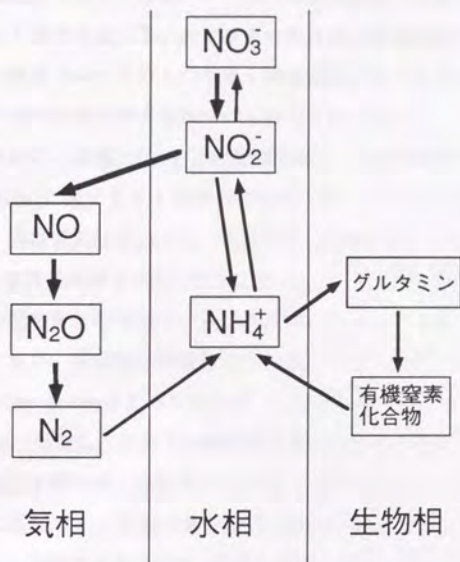


Fig.1. 生態系における窒素循環

アの化学合成が工業的に開始されて以来、近年では人工的に環境中に放出される窒素化合物の量が増加し続けており、難分解性物質の蓄積、水質の富栄養化や酸性雨といった深刻な環境汚染を引き起こしている。このような環境問題を解決するために、微生物の脱窒能を積極的に活用することは、バイオレメディエーションの重要なテーマの1つとして今後の進展が大いに期待されている。実際に、現在でも脱窒作用は排水処理施設で環境浄化に有効に利用されている。現在、富栄養排水に含まれる有機窒素化合物は、腐敗菌によるアンモニアへの分解、硝化細菌による硝酸、亜硝酸への酸化に続いて、脱窒により窒素ガスに還元して大気中に放出するという方法で処理されている。脱窒は嫌氣的条件下で誘導される形質であるため、この方法では好気と嫌気の2段階の処理を効率よく転換させることが最も重要な課題となっている。嫌気化が不完全であると、酸性雨の原因となる温室効果ガスの一種である一酸化窒素や亜酸化窒素、あるいは、発ガン性物質生成の要因となる亜硝酸イオンが生成してしまい不都合を生じる。このため、脱窒反応の人為的な制御を可能にすることが今後大いに期待さ

れる。また、施肥窒素肥料の節約という点では負の制御も必要となるであろう。しかし、脱窒に関わる酵素や遺伝子、およびその発現調節機構に関する研究は、脱窒と同じく窒素循環の重要なルートの一つである窒素固定に比べると非常に遅れており、最近になって漸くその概要が解明されつつあるところである。

完全な脱窒反応は、硝酸(NO_3^-)を、亜硝酸(NO_2^-)、一酸化窒素(NO)、亜酸化窒素(N_2O)を経て窒素ガス(N_2)に還元する4段階の反応が必要とされる。各段階を触媒する酵素は、それぞれ、硝酸還元酵素(NAR)、亜硝酸還元酵素(NIR)、一酸化窒素還元酵素(NOR)、亜酸化窒素還元酵素(NOS)である(Fig.2)。これらの窒素酸化物還元酵素を有する一群の細菌が脱窒菌と呼ばれている。脱窒菌の中には、4種すべての酵素を持たないものもある。また、脱窒能は細菌に特有の能力と長い間考えられていたが、最近になって*Fusarium oxysporum*などの不完全菌(カビの一種)でも脱窒能を有するものが発見されている[5]。ただし、カビでは亜酸化窒素還元酵素を持つものは知られていない。現在までに、4種の還元酵素すべての性質が調べられている*Pseudomonas stutzeri*のものをTable 1に示した[6]。脱窒の第一段階の硝酸から亜硝酸への還元反応は同化型硝酸還元と共通した経路である(Fig.1)。初期の遺伝学的な研究では、同化型と異化型の酵素は別のものであるという報告もあるが[7,8]、脱窒菌から精製した硝酸還元酵素は、硝酸同化しか行わない大腸菌の硝酸還元酵素と類似したモリブデンと鉄を含むタンパ

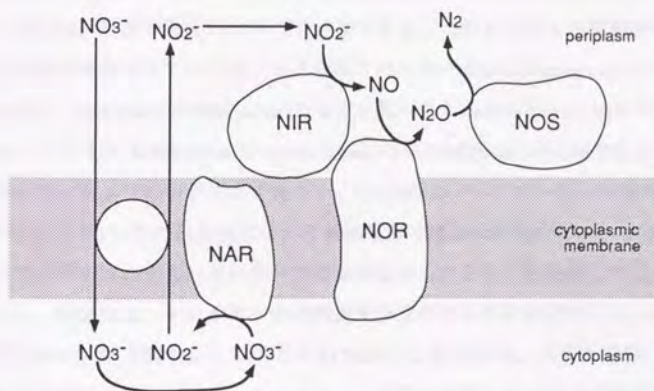


Fig.2. 細菌の脱窒酵素の存在位置と脱窒経路

Table 1. *Pseudomonas stutzeri*由来脱窒酵素の性質

property	Nitrate reductase (NAR)	Nitrite reductase (NIR)	Nitric oxide reductase (NOR)	Nitrous oxide reductase (NOS)
Reaction	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$	$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$
Location	cytoplasmic membrane	periplasm	cytoplasmic membrane	periplasm
Molecular mass				
gel filtration (kDa)	140	120	170	120
SDS-PAGE	112, 60	61	38, 17	70
Quaternary structure	$\alpha \beta$	α_2	$\alpha \beta$	α_2
Metal	Mo, Fe	Fe	Fe	Cu
Prosthetic groups	FenSn, MGD	Hemes c, d1	Hemes c, b	Cu complex
Physiological electron donor	Cyt b563	Cyt c551	?	?

ク質であって[6,9,10]、この酵素は同化、異化に共通したものである可能性もある。このため、亜硝酸還元以下の3反応が、脱窒特有の反応といえることができる。また、脱窒の反応中間体のうち、一酸化窒素については常に微量しか検出されないため、亜硝酸を亜酸化窒素へ還元する際の副産物である可能性も考えられていたが、最近になって酵素学的、遺伝学的な研究から、これが絶対的な脱窒の中間体であることが明らかとなっている[11,12]。

脱窒酵素のうち、最も研究が進んでいるものは亜硝酸還元酵素である。この酵素は、狭義での脱窒、すなわち水溶性の窒素酸化物をガス状の化合物に変換する反応を触媒するため、脱窒の鍵反応といえることができる。これまで多くの脱窒菌由来の亜硝酸還元酵素が報告されているが、それらはすべて *Pseudomonas aeruginosa*[13-15]、*P. stutzeri*[16]、*Paracoccus denitrificans*[17]などに見られる heme c と heme d1 を持つ cytochrome cd型か、もしくは *Achromobacter cycloclastes*[18]や *Alcaligenes faecalis* S6[19]などに見られる銅を含むタイプのいずれかであった。Coyne等はポリクローナル抗体を用いた免疫学的手法により174株の脱窒菌について亜硝酸還元酵素の同定を行い、どの菌株においても2つのタイプのうちいずれか一方のみが認められることを報告している[20]。この結果から、脱窒菌は、それが持つ亜硝酸還元酵素がヘム型か銅型かによって、大きく2つのグループに分類することができる(Table 2)。脱窒菌は、グラム陽性、陰性を問わず、多くの種属に渡って遍在しているが、ヘム型、銅型のいずれの亜硝酸還元酵素を持つかは微生物の系統分類との関連性は低い。また、根粒菌[21]や *Alcaligenes eutrophus*

Table 2. 亜硝酸還元酵素の種類による脱窒菌の分類

Cytochrome cdh type	Copper-containing type
<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM 1015	<i>Achromobacter cycloclastes</i>
<i>Azospirillum brasilense</i> SP7	<i>Alcaligenes faecalis</i> S6
<i>Erythrobacter</i> sp. OCh14	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Bacillus halodenitrificans</i>
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17591	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> f.
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZoBell	sp. <i>denitrificans</i>
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
	<i>Thiosphaera pantotropha</i>

[22]など、脱窒遺伝子がプラスミド上にあるものも存在することから、脱窒能は遺伝子の水平伝播によって獲得された形質であると考えられる。

微生物における脱窒の生理的な意義は、酸素欠乏時に窒素酸化物を代替呼吸基質とする嫌気呼吸によるATPの生産である。脱窒の呼吸鎖電子伝達系のコンポーネントについてはまだ不明点が多いが、呼吸鎖の末端付近以外は好気呼吸とほとんど共通していると考えられている(Fig.3,4)[23,24]。このような呼吸鎖の類似性から、脱窒は大気中に酸素が出現する以前の原始的な呼吸形態であって、好気呼吸の進化的な起源であるという説もある。脱窒菌はすべて通性好気性菌であって、低酸素濃度下で好気呼吸鎖の末端酵素を窒素酸化物還元酵素と置き換えることによって電子伝達系を再構成し、酸化的リン酸化に必要なプロトン濃度勾配の形成を可能にしているのである。酸素が存在する条件では好気呼吸によって効率よいエネルギー生産が可能であるため、脱窒形質の発現は基本的には酸素濃度が低下した際にのみ誘導されると考えられる。このことは、酵素活性と酵素蛋白発現量の測定から確認されている[25]。また、前述の亜硝酸還元酵素の同定の実験では、ヘム型、銅型のいずれの酵素についても嫌気的条件下で培養した細胞にのみ発現が観察されていることから[20]、酸素の有無による脱窒酵素の発現調節は、翻訳以前のレベルで起こっていると予想される。

酸素の有無による好気-嫌気の発現調節機構に関しては、大腸菌で最も研究が進んでおり、FNRとArcABの2系統の調節機構があることが判明している[26,27]。これらは同化型硝酸還元やフマル酸還元などの嫌気呼吸関係の酵素や、TCAサイクルの酵素など、広範な調節を行っている。FNRはカタボライトリプレッションの調節因子として有名なCRP(CAP)と類似した調節蛋白である。CRPと異なる点は、N末にCys richな領域

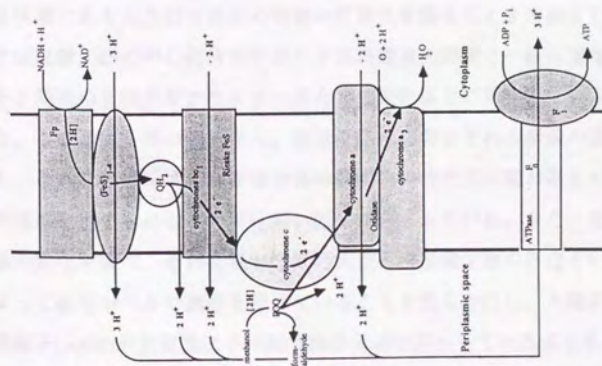


Fig.3. 脱窒菌の推定好気呼吸鎖電子伝達系

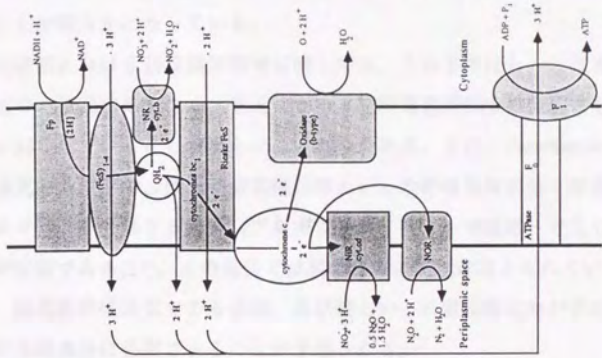


Fig.4. 脱窒菌の推定嫌気呼吸鎖(脱窒)電子伝達系

があり、ここに鉄が配位しており、この鉄の酸化還元によって酸素の有無による細胞内の酸化還元レベルの変化を認識していると考えられている(Fig.5)。ArcAB系は、細菌の転写調節系としては一般的なTwo-componentのシグナル伝達システムであり、これが感知するエフェクターについてはまだ明らかにはなっていない(Fig.6)。大腸菌以外でも、根粒菌などで嫌気条件下での遺伝子発現に、FNRに相当する調節因子が必要であることが明らかになっている。

脱窒菌における発現調節機構に関しては、これまでほとんど報告がなかったが、本論文での研究結果を含め、最近になって脱窒関連遺伝子の発現にもFNRに相当する因子が関与していることが明らかにされつつある。また、*Pseudomonas aeruginosa*などでは嫌気的条件下で、酸素や窒素酸化物といった呼吸基質が全く存在しない条件でも、アルギニンを分解する過程（アルギニンデイミナーゼ経路）で生じるATPを用いて生育が可能である[28]。この条件では脱窒酵素の発現は抑えられていると考えられるため、嫌気的呼吸基質である硝酸、亜硝酸といった窒素酸化物が存在することも脱窒遺伝子発現誘導に必要であることが予想される。

以上のような背景に基づき、本研究では代表的な脱窒菌である*P. aeruginosa*を材料に用い、これまでほとんど報告がなかった脱窒関連遺伝子の構造を解析し、その発現調節機構を調べて基礎的な知見を得るとともに、微生物の脱窒作用を利用する際の最終的な目標である人為的な反応の制御の可能性を探ることを目的とした。その結果、本菌では脱窒反応の中心的役割を果たす亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素の構造遺伝子と関連の遺伝子がクラスターをなして染色体上に局在していることが明らかとなった。この遺伝子群の解析から、脱窒反応に必要なとされる新規の遺伝子も複数同定された。これらの中には、酵素複合体の翻訳後の活性化に関わるものや、呼吸形態の進化の痕跡を示すものなどの興味深い因子が含まれていた。また、脱窒関連遺伝子の発現量の変化を調べ、その発現が酸素の欠乏と窒素酸化物の存在という2種のシグナルによって転写レベルで調節を受けていることを明らかにし、大腸菌のFNRに相当する調節因子(ANR)が脱窒遺伝子の嫌気誘導発現に関わっていることを初めて証明した。さらに、ANRと同じくCRPファミリーに属する新規の転写調節因子を発見し、ANRとこの因子がともに存在することが脱窒遺伝子発現に必要であることを明らかにした。

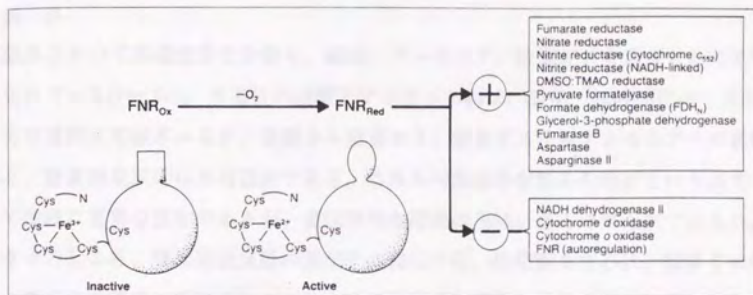


Fig.5. 大腸菌のFNRによる発現調節

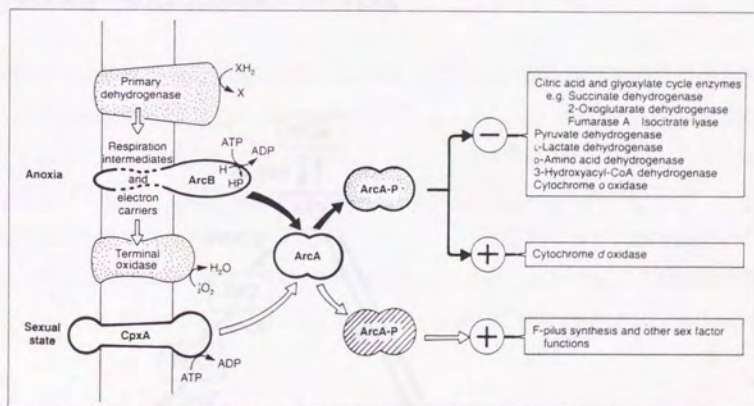


Fig.6. 大腸菌のArcA-ArcB系による発現調節

第1章 *Pseudomonas aeruginosa*の脱窒遺伝子群の取得と構造解析

第1節 序

生態系において無機窒素化合物は、硝酸、アンモニア、窒素ガスを頂点として生物変換されている(Fig.1-1)。水溶性の硝酸とアンモニア間は、硝化・硝酸同化の2反応によって可逆的に変換されるが、硝酸から窒素ガス、窒素ガスからアンモニアへの脱窒反応と、窒素固定反応は非可逆的である。これらの反応は生態系の維持という点ではすべて同様に重要な反応であるが、遺伝学的な研究は同様に進んで来た訳ではない。これまでのところ、窒素固定反応の遺伝子に関しては、根粒菌を中心に、数多くの種由来の遺伝子の構造が報告されており、その発現調節機構の解明も盛んに行われている[29]。窒素固定は、植物の生育に対して律速因子となる窒素源の確保という点で農業上重要であったことがその理由の一つとして考えられる。それに加えて、窒素固定関係の遺伝子がほとんどメガプラスミド上にあつて、*supraoperon clustering*と呼ばれるような大きなクラスターを形成していたため、逆遺伝学的なアプローチが容易であったことも研究が進んだ大きな原因であろう。窒素固定以外では、大腸菌などの硝酸同化の遺伝子の発現調節の研究が比較的進んでいる[30]。

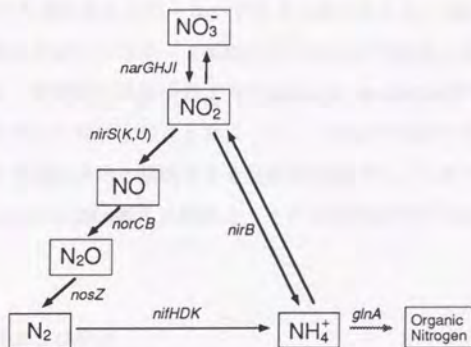


Fig.1-1. 生態系における無機窒素化合物の循環と各変換酵素遺伝子
narGHJ, nitrate reductase; *nirS*, cytochrome *cd* type nitrite reductase; *nirK,U*, Copper type nitrite reductase; *norCB*, nitric oxide reductase (cytochrome *bc* complex); *nosZ*, nitrous oxide reductase; *nirB*, assimilatory nitrite reductase; *nifHDK*, nitrogenase; *glnA*, glutamine synthetase.

脱窒は窒素固定とは逆に、結合型窒素を窒素ガスとして大気中に戻す反応である。大気中の窒素ガス濃度が約80%に保たれているのは両者の反応量がほぼ同程度に保たれているためである。ところが、近年では化学工業の発達に伴い、人工的に環境中に放出される結合型窒素の量が増加し、淡水の不栄養化や酸性雨などさまざまな環境問題を引き起こしつつある。このような窒素バランスの乱れを解消するためには、微生物による脱窒能を強化する必要がある。脱窒の遺伝子やその発現調節に関する研究は窒素固定に比べると非常に遅れていたが、以上の様な背景から、最近になって急速に知見が蓄積されつつある。

完全な脱窒には、硝酸還元酵素(nitrate reductase, NAR)、亜硝酸還元酵素(nitrite reductase, NIR)、一酸化窒素還元酵素(nitric oxide reductase, NOR)、亜酸化窒素還元酵素(nitrous oxide reductase, NOS)の4種の還元酵素が必要とされる(Fig.2, Table 1参照)。これらの酵素の構造遺伝子のうち、現在までにクローニング、塩基配列が報告されているものは本論文の結果を含めて、*P. stutzeri* ZoBellのNIR,NOR,NOS[31-33]、*P. aeruginosa*のNIR,NOR,NOS[34-36]、*Paracoccus denitrificans*のNIR,NOS[37,38]、*Alcaligenes eutrophus*のNOS[36]、*P. stutzeri* JM300[39]、*A. faecalis* S6[40]、*Pseudomonas* sp. strain G-179[41]、*P. aureofaciens*[42]のNIRである。

本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)におけるNIRの生理的電子供与体であるチトクロム*c*-551の遺伝子のクローニングをきっかけとして、NIRとNORの構造遺伝子とその関連の遺伝子がクラスターを形成していることを発見した。このことから、脱窒関連遺伝子も、窒素固定遺伝子のようにsupraoperon clusteringの構造になっており、この周辺の遺伝子構造を解析することによって、これまで未知であった脱窒関連の新規の因子や機能を逆遺伝学的に解明できる可能性が開けた。本章では、この遺伝子群(*nir-nor* subcluster)を含むDNA断片の取得と、その一次構造解析の結果をまとめて述べる。

第2節 使用菌株および培地

亜硝酸還元酵素、チトクロム*c*-551遺伝子の取得源として*P. aeruginosa* PAO1161[43]を用いた、それ以後の脱窒遺伝子群のクローニングには、野生株のPAO1[43]を取得源とした。クローニングのベクターには、pUC19、pUC119、およびCharomid 9-36 (ニッポ

ンジーン)を使用し、ホストには、pUCベクターに対しては*Escherichia coli* JM109、Charomidベクターに対してはDH5を用いた。RIを使用したdideoxy法による塩基配列決定のための鋳型一本鎖DNAの調整にはM13mp18を用い、宿主にはMV1184を使用した[44]。

*P. aeruginosa*および*E. coli*は、L-broth (1% polypepton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.3)、L-plate (L-broth + 1.5% agar)の培地で37℃で培養した。M13ファージの鋳型一本鎖DNAの調整には、2×YT (1.6% trypton, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.3)、2本鎖の鋳型DNAの調製にはterrific broth[44]を用いた。プラスミドを保持する菌の培養には、100 μg/mlのampicillinを培地に添加した。

第3節 チトクロムc-551遺伝子のクローニング

3-1 *Pseudomonas cytochrome c-551*

チトクロムcは呼吸鎖電子伝達系のコンポーネントとして多くの生物種に存在している。また、生物間でアミノ酸配列の保存性が高く、比較的分子量で精製が容易なことから、生物進化による系統的分類の指標として用いられたこともあり[45]、多くの生物由来のチトクロムcのアミノ酸配列が報告されている。*P. aeruginosa*のチトクロムc-551に関しては、Horio等によって1960年に結晶化されて以来[46]、その物理化学的性質に関して深く研究がなされており、Ambler等によって1963年にアミノ酸の全配列が報告されている[47](Fig.1-2)。

Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Leu-Phe-Lys-Asn-Lys-Gly-Cys-Val-Ala-Cys-	15
His-Ala-Ile-Asp-Thr-Lys-Met-Val-Gly-Pro-Ala-Tyr-Lys-Asp-Val-	30
Ala-Ala-Lys-Phe-Ala-Gly-Gln-Ala-Gly-Ala-Glu-Ala-Glu-Leu-Ala-	45
Gln-Arg-Ile-Lys-Asn-Gly-Ser-Gln-Gly-Val-Trp-Gly-Pro-Ile-Pro-	60
Met-Pro-Pro-Asn-Ala-Val-Ser-Asp-Asp-Glu-Ala-Gln-Thr-Leu-Ala-	75
Lys-Trp-Val-Leu-Ser-Gln-Lys	82

Fig.1-2. Cytochrome c-551のアミノ酸配列

このチトクロムは、アミノ酸82残基からなり、最も小型のグループに属するヘムタンパク質であり、既にX線結晶解析により3次元構造が明らかとなっている[48,49]。最近では、NMRによって、溶液状態での3次元構造の解析も盛んに行われている[50-52]。*P. aeruginosa*におけるチトクロムc-551の役割は、その高い酸化還元電位(250mV)[53]から、好気、嫌気ともに呼吸鎖末端酸化還元酵素への電子供与体であると考えられ

てきた。(Fig.3,4 参照)[23]。このチトクロムは、*P. aeruginosa*由来の亜硝酸還元酵素(NIR)、青色銅蛋白アズリンへ直接電子を伝達することができる。また、アズリンもNIRへの直接の電子供与体となり得る。このことから、チトクロムc-551とアズリンは相互互換可能な電子伝達体であると考えられ(Fig.1-3)、3者の電子伝達機構は呼吸鎖のモデルとしても興味を持たれていた[54]。以上のような背景から、チトクロムc-551は酸化還元蛋白の研究の最も適したモデルと考えられたため、当初は、チトクロムc-551の蛋白工学的研究を行う際に必要となるアミノ酸残基置換した変異蛋白を作製する系を確立することを目的とし遺伝子のクローニング、塩基配列の決定を行った。

3-2 クローニング

(1) プロープの合成

*P. aeruginosa*由来のチトクロムc-551のアミノ酸配列(Fig.1-2)[47]をもとにして、報告されている*P. aeruginosa*のコドン使用頻度[55]を考慮しながら、2本のオリゴヌクレオチドPA-1とPA-2を合成した(Fig.1-4)。PA-1は20残基1種であり、PA-2は20残基16種のミックスプロープである。

(2) Gene libraryの作製とクローンの同定

制限酵素、修飾酵素処理やプラスミド抽出法など、以下の実験に用いた基本的な遺伝子操作法に関してはSambrook等の方法[44]に従った。

Murmarによる一般的な抽出方法[56]をもとに、*P. aeruginosa* PAO1161から染色体DNAを抽出した。ただし、本菌のcell lysateは非常に粘性が高くphenol処理後の分離が困難であったため、phenol処理前にethanol沈澱を行う変法を用いた。

得られた染色体DNAをEcoRI, PstI, SalIでそれぞれ切断し、0.9% agarose-TAE gelで電気泳動後、ナイロンメンブレン(GeneScreen Plus, DuPont)にblottingした。[γ -³²P]ATPで放射能ラベルしたPA-1, PA-2をプロープとして、45°CでSouthern hybridizationを行った結果、PA-1とPA-2ともに、EcoRI 3.5kb, PstI 9kb, SalI 1.5kb付近にハイブリダイズした。そこで、染色体DNAの9kb付近のPstI切断断片をアガロースゲルからGENECLEAN(BIO101)を用いて切り出し、pUC19, *E. coli* JM109の宿種ベクター系を用いてgene libraryを作製した。このうち97コロニーを、PA-1をプロープとして45°Cでcolony hybridizationしたところ、1個のポジティブなクローン(pHA-P1)が得られた(Fig.1-5)。

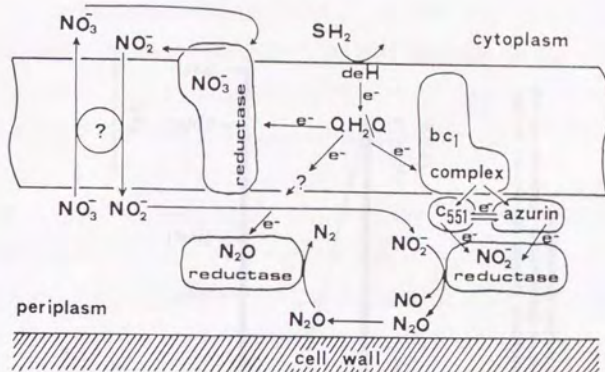


Fig.1-3. *P. aeruginosa*の推定嫌気呼吸鎖電子伝達系

	7	8	9	10	11	12	13
Amino acid sequence	-Phe	-Lys	-Asn	-Lys	-Gly	-Cys	-Val-
possible anticodons	AAR	TTY	TTR	TTY	CCN	ACR	CAN
probe PA-1	3'	AAG	TTC	TTG	TTC	CCG	ACG CA 5'

	45	46	47	48	49	50	51
Amino acid sequence	-Ala	-Gln	-Arg	-Ile	-Lys	-Asn	-Gly-
possible anticodons	CGN	GTY	KCN	TAZ	TTY	TTR	CCN
probe PA-2	3'	CGN	GTC	GCN	TAG	TTC	TTG CC 5'

N=A, T, G, C R=A, G Y=C, T K=G, T Z=A, G, T

Fig.1-4. *P. aeruginosa* cytochrome c-551遺伝子クローニングのための合成DNA

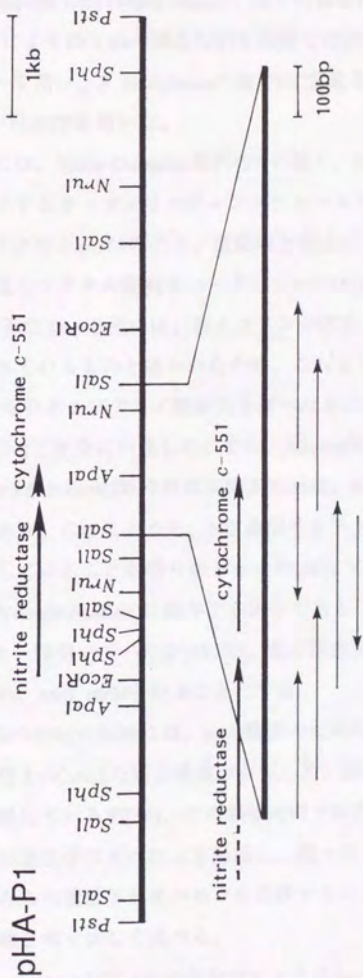


Fig. 1-5. Restriction map and sequencing strategy for the gene encoding cytochrome *c-551* from *P. aeruginosa*. The thick lines represent the DNA fragment containing the cytochrome *c-551* gene. The upper arrows indicate the spans and transcriptional directions of the cytochrome *c-551* and nitrite reductase genes. The lower arrows indicate the directions and lengths of sequence determinations.

3-3 チトクロムc-551遺伝子の同定と周辺領域の塩基配列の決定

染色体DNAのSouthern hybridizationの結果から、チトクロムc-551遺伝子は、中央の1.5kb *SalI-SalI*の領域中に存在することが予想される。そこで、この断片をM13mp18にクローニングし、正逆両方向に断片が挿入されたファージをそれぞれ作製した。挿入断片をKilo-Sequence, Deletion Kit (Takara Shuzo)で種々の長さにdeletionし、Sequenase 2.0を用いて、dideoxy法により約1 kbの塩基配列を決定した(Fig.1-5)。プライマーにはユニバーサルプライマーを用い、*P. aeruginosa*の高いGC含量を考慮して、dGTPの代わりに7-deaza-dGTPあるいはdITPを用いた。

決定した塩基配列中には、Shine-Dalgarno配列[57]に続く、104アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームが存在した。このうちC末端側の82残基が、チトクロムc-551のアミノ酸配列と完全に一致し、N末端側の22残基はペリプラズム分泌型のシグナル配列をコードしていた(Fig.1-6)。

チトクロムc-551遺伝子の50bp上流には、終止コドンが存在し、その上流に何らかのタンパク質がコードされているものと思われたため、これまで報告されている*P. aeruginosa*由来の遺伝子配列およびアミノ酸配列を調べたところ、亜硝酸還元酵素(NIR)のC末のアミノ酸配列[34]と完全に一致した。また、Silvestrini等によってクローニングされたNIR遺伝子を含む3.5kb *EcoRI*断片の制限酵素地図は、*EcoRI-EcoRI* 3.5kb領域内の制限酵素地図と同一であり、このことから、NIR遺伝子とチトクロムc-551遺伝子は染色体上、隣接して存在していることが明らかとなった[58]。なお、NIR、チトクロムc-551の遺伝子名は、脱窒(denitrification)に関与する因子であることから、それぞれ、*denA*、*denB*という名称を一時用いていたが[59,60]、他の菌由来のものと命名法を統一するため、以後はそれぞれ、*nirS*、*nirM*と呼ぶことにする。

nirS、*nirM*両遺伝子間の50bpの領域には、*nirM*翻訳のためのリボソーム結合部位と、強いステム構造を取り得るGC-richな回文構造が存在した。Silvestrini等は、これが*nirS*の転写終結部位だと示唆しているが[34]、この領域にはプロモーターらしい配列が存在しないことから、2つの遺伝子はオペロンを形成し、同一のプロモーターから転写されると考えられた。これらの遺伝子がオペロンを形成すること、嫌気的条件下で転写されることの証明は、第2章で詳しく述べる。

Nordling等は、*P. aeruginosa* ATCC 10145由来のチトクロムc-551遺伝子の塩基配列をほぼ同時期に発表した[61]が、タンパク質をコードしている領域の塩基配列は本研究の

PAO1161由来の結果と完全に一致していた。また、*nirM*上流域の塩基配列はSilvestrini等が決定したもの(NCTC 6750由来)[34]と完全に一致しており、菌株間による塩基配列の相違は少ないと思われる。

*nirSM*の下流には、小型のc型チトクロムをコードする遺伝子(*nirC*)と機能未知の遺伝子(*nirF*)が存在した(Fig.1-6)。*nirC*も、分泌型のシグナル配列をコードしており、本遺伝子産物も、ペリプラズムに存在し、おそらく亜硝酸呼吸鎖電子伝達系のコンポーネントとして働くと思われる。

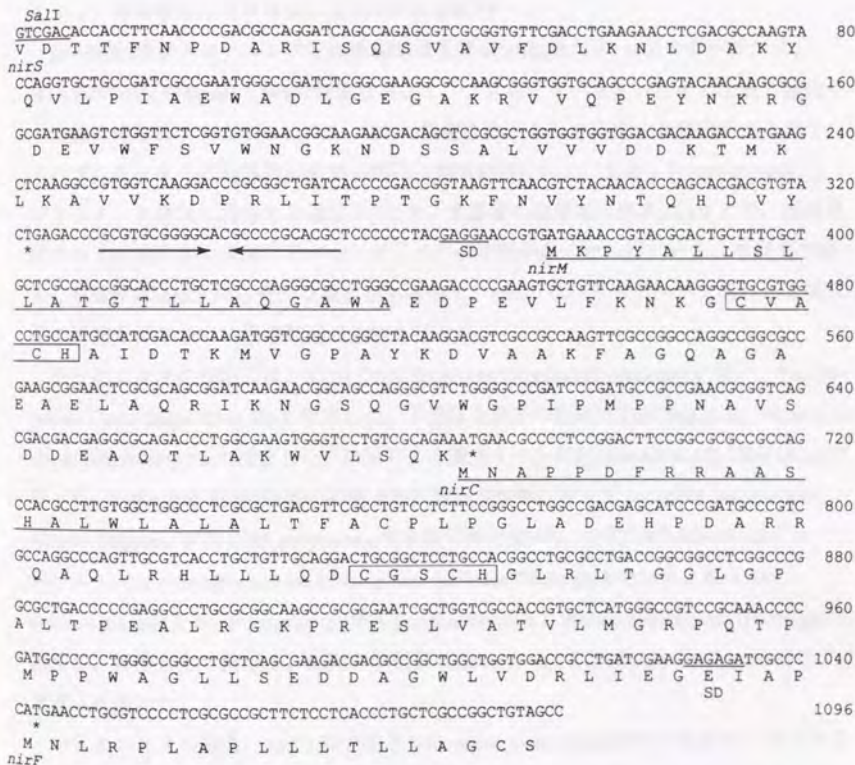


Fig.1-6. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the cytochrome c-551 gene and its flanking region. Underlined sequences are signal peptides for membrane translocation. Boxed amino acids are heme c binding motifs.

第4節 脱窒遺伝子群 (*nir-nor*領域) のクローニングと塩基配列の決定

本研究では、前節で述べた亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirS*)の前後の塩基配列の決定と gene walking を繰り返すことによって、現在までに4断片で合計約24kbにわたる *P. aeruginosa* 染色体由来のDNAをクローン化し、部分配列を含めて6個の転写単位で13個の遺伝子を同定している(Fig.1-7)。本節でシーケンスとgene walkingの結果をまとめて述べ、各遺伝子産物の配列の特徴、機能、発現調節に関する結果は第3章以降で詳しく説明する。

4-1 亜硝酸還元酵素遺伝子上流域の塩基配列

Silvestrini等がクローニングした亜硝酸還元酵素(NIR)遺伝子(*nirS*)を含む断片は、pHA-P1の中央のEcoRI 3.5kbの領域であって、プロモーターあるいはその上流の遺伝子の情報は得られていなかった[34]。NIRは脱窒条件下のみで発現する酵素であるので、そのプロモーターと転写調節領域の構造に興味を持たれた。また、*P. aeruginosa*のトリプトファン合成に関与する遺伝子[62]や、大腸菌の硝酸還元酵素[63]などで、構造遺伝子の上流逆向きに調節因子がコードされている例が多く知られている。本研究で取得した断片は*nirS*上流に十分な長さがあるので、*nirS*のプロモーターや上流にある遺伝子の情報を得るために塩基配列の決定を行った。

シーケンスの決定には、373A DNA Sequencer (Applied Biosystems)を用い、Taq Dye primer Cycle Sequencing Kitを使用した。不明確な部分の配列はTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kitで決定した。PCRによる蛍光ラベルはZymoreactor AB-1800 (Atto)で行った。2.4kb *Pst*I-EcoRI領域中の種々の制限酵素切断断片を *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragmentかT4 DNA polymeraseで末端平滑化後[44]、pUC119の *Hinc*II siteにサブクローニングし、ExoIII nucleaseとMung bean nucleaseでdeletionを行った。得られたdeletion plasmidをWizard miniprep DNA purification resinとWizard minicolumn (Promega)で精製し、鋳型として用いた。配列の解析にはGenetyx ver. 8 (Software development)のプログラムを用いた。

シーケンスの結果、*nirS*とは逆向きにdivergent transcription[64]の構造で、3つの遺伝子(*nirQOP*)からなるオペロンが存在した(Fig.1-8)。*nirS-nirQ*間是非常にAT含量が高く、ANR(FNR) binding site (第6章参照) [26,27]が1つ存在した[59]。*nirQ*は、260アミノ酸残基、29kDaで、ATP binding motifを持つ親水性タンパク質、*nirO*は175アミノ酸残

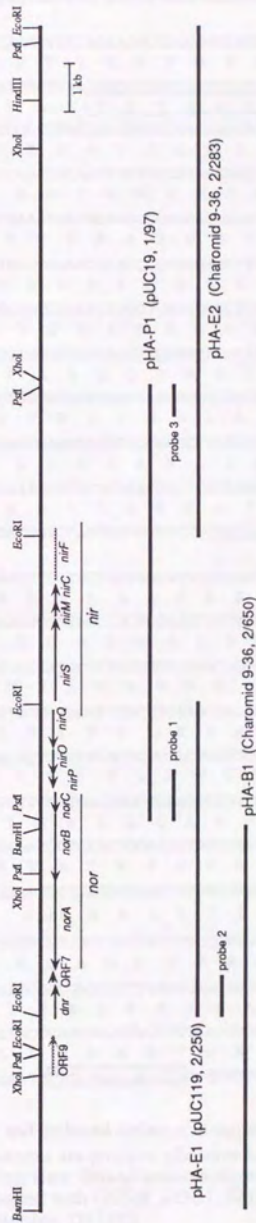


Fig.1-7. *Pseudomonas aeruginosa*脱窒遺伝子群(*nir-nor* region)の構造クローニングした4断片とプローブは下に示した。かつこ内は、クローニングベクターとコロニーハイブリダイゼーションの頻度を示す。

GAATTCATGGCGCAAAGGATCATAGAAGCAGGGTCTTTACCCCTTGCTTGACCGGAATCAATTGGCGT 70
 TGCTTTGGCGCTTGTGGCACCTTCCAACCTGTGAATAGCGTGGCGTCTTAATCCCTAGCGCAGGAGTAGGAC 140
nirQ
 ATGCGGGACGCGCACCCCTTCTACGAGGGCCACCGCCATGAGATCGAAGTCTTCGAGCGCGCTGGCGGC 210
 M R D A T P F Y E A T G H E I E V F E R A W R H
 ACGGCTTGGCGTATTGCTCAAGGGCCCCACCGTTGCGGCAAGACCCGCTTCGTCAGTACATGGCGCG 280
 G L P V L L K G P T G C G K T R F V Q Y M A R
 GCGCTGGAATGCGCGTGTACAGCGTGCCTGGCCAGCAGCACCTGGCGCGCGGACCTGCTCGCGCGC 350
 R L E L P L Y S V A C H D D L G A A D L L G R
 CATCTGATCGGCGCGACCGCACCTGGTGGCAGGACGCGCCGCTGACCCGCGCGTGGCGGAAGGCGGTA 420
 H L I G A D G T W W Q D G P L T R A V R E G G I
 TCTGCTACCTGGACGAAGTGGTGGAGGCGCGCCAGGACACCAGCGTCCGATCCACCCGCTGGCGGACA 490
 C Y L D E V V E A R Q D T T V A I H P L A D D
 CCGCGCGAGCTGTACCTGGAGCGCACCGCGGAGAGTTCAGCGCGCCCTTCGTTTCATGCTGGTGGTG 560
 R R E L Y L E R T G E T L Q A P P S F M L V V
 TCCTACAACCCCGCTACCAAGAACCTCTCAAGGGCCTGAAGCCAGCACCCGCGAGCGTTCGTCGCGT 630
 S Y N P G Y Q N L L K G L K P S T R Q R F V A L
 TGCCTTCGACTACCCGCGCGCAGCAGGAGGCGACGATCTGGTTCGGCGAGAGCGGTTGTGCCGAGAC 700
 R F D Y P A A Q Q E A R I L V G E S G C A E T
 CCTGGCGCAGCGCTGTACAGTTGGGCCAGCGCTCGCGCGCTGGAGCAGCAGCTGGAGGAGAAATC 770
 L A Q R L V Q L G Q A L R R L E Q H D L E E V
 GCCTCGACCCCGCTGTGATCTTCGCGCGCGCCATCGGGCAGCGCATGGACCCGCGCGAGCGGTGCC 840
 A S T R L L I F A A R L I G D G M D P R E A C R
 GGGTGGCGCTGGCGAACCCTCTCGGACGACCCGGCGCGGTGGCGCGCTGATGGACATCGTCGATCT 910
 V A L A E P L S D D P A T V A A L M D I V D L
 CCATGCGCTGATACCGTCGAGCGCGCTGCCCGGACCTGGCGATGGTCTTCATCCTCGCGCA 980
 H V A *nirO* M W F F I L A E
 ACTCAGCGTTCAGCCTGCTGCTGCTGGCGTTCGCGCGCGCCAGGCTGGCAGCGGAGCTGTTCGCT 1050
 L S V F S L L L A F A G A Q A W Q P E L F R
 GCGGCGGGAGCAACTGATAGCCGCTGGGCGCTGTGCTGACCGTGGCCCTGCTCAGCTCCGCGTGGC 1120
 A G R E Q L D S R W G L L L T V A L L S S G W L
 TCGCCGCGTGGCGGTGCATCGGCTGGCGCGGACCGCGCGCCAGGCGAGCGGCTGGTGTGGCGGC 1190
 A A L A V H A V R R G R P R Q A S G W L L A A
 GCTGCTGCTGGCGTGTCTACGTCGGCCTGAAGCTGCACGAGTACGGCGCGCTCGCCGATCTCGGCCG 1260
 L L L A L V Y V G L K L H E Y G R L A D L G L
 GACATCGAGCAGCACTTTCTCACCTCTACTGGTGCCTGACCGCTTCATTTCCTCCAGCTCCTGC 1330
 D I E H D T F T L Y W C L T G F H F L H V L L
 TCGGCTGCTGATCCTCGCTGGCTGGCGGAGCGCTGCTGGCGCGGTATTACGCGCGAGGCTTGCTC 1400
 G L L I L G W L A Q A C W R R C Y T P Q A C S
 GGGACTGGAGTCGGGAGTGTCTACTGGCACATGGTGCACCTGGTCTGGGTGCTGGGTGCTGCTGCT 1470
 G L E S G V L Y W H M V D L V W V L L F P L V
 TACGTCCTGCAATGAGTGCGGATGCGAACCCCTGACCCCTCTGCTGGCTGGCGTGTGCTGGCGCTGGCCG 1540
 Y V L Q *nirP* M R T L T L C W L A L L A L A V
 ACCGGTGTGCTGCTGGGTGGCGCGGCGACTCTCCCTGGCTGCTGGCGCGGTGCTGCTGCGCGGTGG 1610
 T G V L L G G A G D S P W L L A A V L A C A V A
 CCAAGGGTTGCTGATCGCGAGCGCTTATGAGAGCTGGCCATGCCCGCGGCTATGGCGCGCGCTGCT 1680
 K G W L I G E R F M E L A H A P A L W R R L L
 GCTGGCTGGCGCTGCTGATGGCCCTGGCGTGGCGGCTGGCGTGTACCTGGCGCGGATGAATAACTGA 1750
 L A W P L L M A L A V G A A L Y L A R M N N
 GTAATCGTTCGGGAATCTTGATTGCCATCATCGGGTTGCGCGCGCGCTTCTAGAAATCGCGCCACC 1820

Fig.1-8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *nirQ* operon from *P. aeruginosa*.
 The underlined sequences are putative ribosome binding sites. Boxed DNA sequences are
 potential ANR binding sites. Boxed amino acid sequence is an ATP binding motif. The sequence
 data have been deposited with GSD, DDBJ, EMBL and NCBI nucleotide sequence databases
 with the accession number, D37883.

基, 20kDa、*nirP*は85アミノ酸残基, 9kDaの膜タンパク質をそれぞれコードしていた[65] (第4章参照)。

4-2 一酸化窒素還元酵素遺伝子の取得と塩基配列の決定[35]

*nirQOP*の下流には、ANR(FNR)結合配列(ANR box)が存在する(Fig.1-8)。ANRは*P. aeruginosa*での嫌気的条件下で誘導される遺伝子発現に必要な因子であり[66,67]、ここにANR boxが存在することから、この下流の遺伝子も脱窒に関わる因子である可能性が考えられたため塩基配列の決定を行った。なお、以後の実験では、PCRによる蛍光ラベルにProgram temp control system PC-800 (Astec)を使用した。その結果、heme c結合配列を持つ小型のc型チトクロムの遺伝子(*norC*)と、非常に疎水性の高いタンパク質をコードする遺伝子(*norB*)のN末部分が確認された。これらの遺伝子産物の特徴は、*Pa. denitrificans*[68-70]、*P. stutzeri*[71]で精製され、最近になって、*P. stutzeri*からその遺伝子がクローニング[32,72]された一酸化窒素還元酵素の2つのサブユニット(cytochrome c, cytochrome b)と類似していたことから、*norB*の全構造を決定するために、pHA-P1からのgene walkingによるpHA-E1のクローニングを行った。

pHA-P1は、*P. aeruginosa* PAO1161からクローニングしたものである。PAO1161株は、PAO1の制限修飾系の変異株(*rmo-10*)であり[43]、脱窒関連遺伝子は正常と考えられるが、念のため以下の実験のDNAの取得源としては、*P. aeruginosa*の野生株PAO1を用いることにした。

シーケンシングの際に作製した*Pst*I siteから約1kbの断片(Fig.1-7, probe 1)をプローブとし、種々の制限酵素で切断した染色体DNAとDIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。blotting membraneはAmershamのHybond Nを用いた。その結果、*Eco*RI 6.5kb、*Sph*I 2.6kb付近等にバンドが検出されたので、6.5kb付近の*Eco*RI断片をアガロースゲルからGeneClean II (Bio101)を用いて切り出し、pUC119-*E. coli* JM109の宿主ベクター系でgene libraryを作製した。このうち、250コロニーをHybond Nにblottingし、probe 1とコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、2個のポジティブなクローンが得られた(pHA-E1, Fig.1-7)。断片の挿入方向は2つとも同一であった。得られた断片について塩基配列の決定を進めたところ、3つの遺伝子(*norCBA*)がオペロン様の構造を取って存在していた(Fig.1-9)。なお、PAO1161からクローニングしたpHA-P1と、PAO1から取得したpHA-E1で

GTAAATCGTCGGAAATCGTAGATGGCAACAACCGGGTTCGCCGCCGCCCTTCTAGATCGCCACACCCATCCAGGAGGCCGATGCCAGCTTACCAAAAGGATGCCCA 120
 ANR box
 norC M E E T F T K G H A R

GAACACTTATTCGGGCGAGGTGTCTTCCTCTCCTGCCCTGACCTACCAACAGAGACCTGCCAGCCAGCACAGCGCCGATGACCGCCGGGGTGTGC 240
 N I Y F G G S V F F I L L F L A L T Y H T E K T L P E R T I N E A A M S A A V V R

GGCGACGTGGTCTGGGACAGACAACTGGTCCGCTGCCACCTCTGCCGAGGGCCGCTACTTCGGCCGAGCTGGGACAGGTGCGGACGGCTGGCGGAGAGDGT 360
 G K L L V M R Q N N C V G C S T L L L G E G A Y F A P E L G N V G R R G G E E G F

TCAACACTTTCCTCAGCCGTGGATGAATATCCAGCCGCTGAACCTGCCGGCCGCCGCCATGCCGAGTTCATCTCAGCGAGGCCGATGCCAGCTGCCCGAGTTCCTCAAGT 480
 N T F L D A W M H I Q P L H V F G R R A M P Q D F H L S E G Q V D D L A E S F L K W

GGAGCTCGAGATGATACCAACATGGCCCGGCAACAGGAGGGTGTATGATGTGCCCAATGCCCTCGTAATTCGCCGCGAGGGGTGCCGAAACCACTACTCGTGTGCCCT 600
 S S K I D T N G W P P P P P N K E G A
 norB H M H S P F G S L K F A S Q A V A K P Y F V F A L

GATCCTCTTCGTCGGGAGATCCTGTCGCCCTGATCAGCCGCTGAGTACGTGTGGGACTTCTGTGCCCGGATCCCTTCAAGCTGCCGGCATGCCCTCACACCAACTGCT 720
 I L F V G Q I L F G L I M G L Q Y V V G D F L F P A I P F N V A R M V H T N L L

GATCCTCTGCCCTGCTGTCCGGCTTACAGCCGCTGCTACTACTGTCGGAGGAGAGGCACTCGAGCTGTACAGCCGAGCTGGCTGGATCTGTCTGGGTATTCGCCCGCCG 840
 I V W L L F G F M G A A Y Y L V P E E S D C E L Y S F X L A W I L L F M V F A A A

CGGCTGCTGACACTTCGGTACTCTGCTGTCCTAGCCGCGCCGTCACCCGCAACCACTGTGCCGACACTGGCCGCGGAGTTCCTCGAACAGCCACCATCGACAA 960
 G V L T I L G Y L L V P Y A L L T V P A G L A R L T G N E L W P T M G R E F L E Q P T T I S K

GGCCGATCGTATGTCGCCCTGGCTTCTGTCAAAGTCGCAGTACCCGCTGCCCGCCGCAAGCCGACACAGCTACTGATGACCGGCTGATGCCCTGCCCTGCT 1080
 A G I V I V A L G F L F N V G M T V L R G R K T A I S M V L N T G L I G L A L L

GTCTCTTCTCTTCAACACCCGAAACCTCACCCCGCAAGTCTACTGCTGGTGGTGGTCCACTGTGGTGGAGGGCTGTGGGACATGATCATGCCATCTCGCTT 1200
 F L R P E N F T R D K P F Y M M W V V H L W V E G V M E I N G A I L A F

GTGCTGTGAAGATCACCCGGGTGACCCCGAGTGTAGAGAAAGTGCCTACGTGATCATGCCAGCCGCTGATCAGCGGATCATCGGACCGGCCCACTACTCTGGATGG 1320
 V L I X I T G V D R E I V E K M W L Y V I I A M A L I S G I I G T G H R Y F I G

GTGCGCGCTACTGGCTGTGGCTGGCTGGTATTCCGGCCGTGGAGCCGCTGCCCTTCTGCCATGTGTCTGCCCTCAACACATCAACCGCCGCCCAGGCGGACATCT 1440
 V P G Y W L M G S V L E L F L P P F A H V L F A F N T I N R R C R R R R D D Y P

GAACCCGGCTGCGGCTGGGCTAGGCAACAGATGGCTTCTCGCCGCGGAGTGTGGGCTTCATCATCCCTGCCGCGGTCACTACTACAGCCAGCCACT 1560
 N R A V A L M A M G T T M A M F L G A G V W G F M H T L A P V N Y T H G Q T O L

CACCGCCAGCCAGCAGTGCCTTCTAGGCTCATCGGATGAGTGTGATGACATGATCTTCAAGCCTGCCCGCCGCGCGGAGTGGCAGGAGCAGGACAGCCCTGCCA 1680
 T A A H G H M A F Y I V M T I I S Y A M F P L R G I G E M A D N R S Q

GGTCTCGAGATGTGGGCTTTCGGCTGATACCGTGGCAGTGTTCATCACCTGTCTCTCCGCCCGGGTGTCTGAGGCTGGCTGCAACGGATGCCGGGAGCGCCGCC 1800
 F L E M W G F M L M T V M A V V F I T L F L S A A G V L Q V W L Q R M P A D G G A A

GATACCTTATGGCCAGCAGCAGCGAGTGTTCATCTGCGGAGGCGCCGGGGTGTCTCTCATGCCCTGGCTGGCTGATGCTTCTGGCTGCGCCAGGAG 1920
 H T F M A T Q D Q L A I F Y W L R E G A G V V F L I G L V A Y L L S F R R G K A

GCCCGCTCGATGGCTTCCGCTGCTGAGTGGAGGATGGTCCGCGCCACTGGCAGCCCTCATCACCCGCGCATGCCAGCGGAGTTCAGCGCCGCGGAGCTGGAGCA 2040
 A A
 norA M A F A V E L E E W V G A H M H R F I T R H A S G E F E A A R V T L E S H

TGCGGCTCGCTCGGCTGCTTCGCCGGCTGCCGGGCAACCGGGGTGAGCCCTGAGCGGACCCGCGCCGCGCTGCTGCTCACCGCCAGCTGTGACAGGGCTGCCGGCA 2160
 R R P L G M L F R A L G A P G V A L E A T P A R R L L R T W L Q R V A G T

CTGCGCGAGCCGCGCTGCTGCTGCTCAACGGCAGCAGCGCCGCTGCCGGAATCCCTGCCGCTCATCGCGCCGAGCTGAAACCCGAACTGATGCTGGCTGGCTGCTG 2280
 C E Q A P V S W F N G D S I R L P E S L A V Y P Q A E L N R E L N R L L A L L A

CGGCGAGCCGCGCCGCTGCCGGCAGCAGCAGCAACAGCCGCGGAGTGTCTGATGCTATCCGCGCTGCCCGCCGCTAGCCGCGCCTGGCTGCCGCGCAGCTG 2400
 A S A G P L R H W A Q D N Q R M A R Q L L D A Y P A L R P R Y A R L V A A H L R

GCGAGCCCGCTGCTGAGCATTGCCTGCCGCGGACAGCCGAACTGGAAATGCCCTGCCGCGGCGCTTGCAGCGCGGCGAGCTGAGCGCTTCCCGGAGTCCAGCGCGCCCT 2520
 Q R P S L D D C F A A D A E L E I A L R R A L A S P G S V E R P F R V E R A P W

GGCCGCTGCCGCTGGCTGATTCGCCGCGGAGCTGTGAGCAGCTTCCCGCAGTCGCGAGGAGCGCGAGGAGCGCCGCGCCGCGCGCAAGCGCCAGCTGCCCGAGCGAGCCGCA 2640
 F V P L W L Y P G E R M T P S A S A E D G E E A A A G A G K R Q V A R S G A R K

AGCGCGCGAGCCGCTTGGAGGACAGCAGGCAACCGCTGCTTCCCGCTGAAAGCTGCTCAGTGTGTCGAGAGCAGCTGGCCGCGAGCGCTGTGAGCGAGCAGGAGC 2760
 R A E R I E E R N S E R N L L L F R L E S L S W S E H L A L D R C S D D E D D

ACCDSAGCCGCGCCGCTGCCGAGGACTGCTACTCTGCTGCTGCCAGCGCACGAGAGGGCGGGGCGCTGCCGCTGGATCTGCACTGCCGCGCCGCTGAGCAGCTGATGAC 2880
 P D G A R V A E D L D Y L S L S R Q R T Q K G G G L R L D L D L P A A D Y D D L

TGCCGCTGGCCCGGCTGAAGCTGCCGAGTGGGACTCGGACGAGCGCTCTGAGGACACAGCTGCTGCTGCAACCGCTGCCGCGCGCCGCGCGCAGCAGCCGCGGCTGCCG 3000
 F L G P L E M L F E M L D Y R Q R L L S D H V L L Q P M R P R G A T S A B L P A

GCGACTGGAGAGACCCGCTGATCTGCCGCGCCAGTTCGCCCTGCCGCGCAGCGCCGCAACCGCTGCCGCGGAGCGCGCAAGCGCCAGCTGATGCTGCTGACT 3120
 H L E K T A L H I E R R Q F A C L R D G R Q R L R Q Q P D Q D E I D L A M L D F

TCCAGTTCGAGCGGGCGCGCTGCTCACCCAGCAGCGCTTCTCGACAGCGCGCGCCGCGCGCAGCTGCTGCTGCTGGCGGACTGTGATGTCCAGCCAGCAGCT 3240
 Q V E R R R G G S T O P G L F L E Q R P R R R D I A C L L L A D L S M S T E A Y

ACTCGACCCAGCGGAGTATGACAGCATGTCGACAGCCGCTGCTGCTGTCGGCGAGCGTTCGAGCAGCTGGGCGACCCCTGCCGCTGTACGGSTTCTTCGCTGGCG 3360
 L D D Q R R V I D S I V S L L L F G E A L Q A L G D P F A L Y D S V V R R Q

AGCAGTCGCTGGCAGTGTGAGGACTTGCAGAGACTGCGCGGAGGCGGCGGCGCTGCCGCTGCTGCCGCGCTTACAGCGGATGGCCGCGGATCGCCCGG 3480
 Q V R W L K D F P D E G Y G G E V R G R V L A L S P G Y Y T R M G A A I R R A

CCAGCAGTCTGCCCGCGCGCGGAGAGCGTGCCTGTGCTGTGGCGGACGGCAAGCCAGCAGCTGAGCCCTAGCGGCGCTACGGGCGCTACGGACACCGCCAG 3600
 S Q V L G G Q P P Q R R L L L L L S D G M P H D L D R Y E G R Y G I E D T R Q A

CGTGTGGAGGCGCGAGCGAGGCTGGTGGCTTCTGATCACCATCGCAAGAGCGCGCGGACTACTGCGCTACTGTGCCGCGCGAGGCTTCCGCTGTGAGCGCGCG 3720
 V I E A R S Q G L V P F C I T I D K E A A D Y L F Y L F G A D G F A L V E R A G

GGAGTTCGCCGAGCCGCTGCTCACCTATGGCGCTTCCGCGCTGAGAT 3773
 Q L P E R L L Q L Y R R L R R *

Fig.1-9. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *norCBA* from *P. aeruginosa*.
 The underlined sequences are putative ribosome binding sites. Boxed DNA sequence is a potential ANR binding site. Boxed amino acid sequence is a heme *c* binding site.
 The sequence data have been deposited with GSDB, DDBJ, EMBL and NCBI nucleotide sequence databases with the accession number, D38133.

オーバーラップしている部分の塩基配列は全く同一であった。*norC*は146アミノ酸、16kDa、*norB*は465か466アミノ酸、52kDa、*norA*は612アミノ酸、69kDaのタンパク質をそれぞれコードしていた(第3章参照)。

4-3 新規転写調節遺伝子の取得と塩基配列

*norCBA*の下流に*nor*オペロンとは逆向きのオープンリーディングフレーム(ORF7)の存在が確認されたため、さらにシーケンスを進めることにした。ORF7は64アミノ酸残基の小型のタンパク質をコードしており、その5'領域にはANR(FNR)結合配列が存在したことから(Fig.1-10)、この遺伝子も、脱窒に関係あるものと考えられた。その下流には、親水性タンパク質をコードする遺伝子(*dnr*)があり、翻訳配列を蛋白質データベースでホモロジー検索したところ、CRP/FNRファミリーの転写調節因子と高い相同性を示した(第5章参照)。pHA-E1には、このオープンリーディングフレームのN末部分が欠けていたので、さらに上流域のDNA断片をクローニングすることにした。

pHA-E1の上流末端部分の約0.8kbのEcoRI-SphI断片(probe 2)をプローブとし、PAO1株の染色体DNAの種々の制限酵素切断断片とのサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、BamHIの約8kbに単一のバンドが検出された。そこで、BamHI 8kb付近の断片をアガロースゲルから切り出し、Charomid 9-36, *E. coli* DH5の宿主ベクター系を用いて、ニッポンジーンのプロトコルに従いgene libraryを作製した。このうち、650コロニーをHybond Nにblottingしてprobe 2とのコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、3個のポジティブなコロニーが得られ、このうち2コロニーに目的の断片が挿入されていた(pHA-B1, Fig.1-7)。得られた断片についてさらにシーケンスを続けたところ、*dnr*遺伝子の開始コドンと思われるATG配列が2個存在し、配列からだけではいずれが翻訳開始点かは判断できなかった。その上流域は比較的AT含量が高く、*dnr*遺伝子のプロモーター領域と考えられる。さらに上流に、ORF6、*dnr*と同一転写方向で何らかの遺伝子(ORF9)が存在したが、C末部分の翻訳アミノ酸配列でタンパク質データベースとのホモロジー検索を行ったが、有為な配列は見いだされなかったので、塩基配列の決定はここまでで打ち切ることとした。

4-4 亜硝酸還元酵素遺伝子下流領域の取得

*P. aeruginosa*の亜硝酸還元酵素(NIR)はチトクロム*cd*タイプである。この酵素はペバ

GAATTGAGGAGGTGTCCTGGCCAGGCGCGGAGTTGCCGATGCTGCTCGGCGAGGAGTTCGCTGCGCGCCAGAT 80
 E F R K V S L A Q A A E L P M L L L G E E F R A R Q I
ORF9
 CTGGCAGGAGCAACTCGCCGCGATCGGCCGCGCGCGGCGGTGACGGCGAACTGAACCATGAGCGGGATTCTCGACA 160
 W Q E Q L A A I G R R R P R V Q A E L N H M S G I L D S
 GCCTGCCGAGACCCGCTTCGCCACCGTTTACC GGGAAGGCACGGCAGATGCACTCGAACCCAGCGGCTGCTGTGGAAA 240
 L P Q T R F A T V L P G K A R Q M H S N Q R R L A S E
 CCGCTCAGCGAACCGCGCATCCCGCTGAAGTTCGGCTGGTCTACCGCGACGGCAACCGCAGCACGCCAGCGTCGAGCT 320
 P L S E P R I P L K V G L V Y R D A Q R Q H A S V E L
 GCTGCGCTCGTCTGGAAGCGGTGGTCTGAGCGACGGGTTTTCTCGGGCAATAAAAAACCCCGCTTTTGGGGGGGG 400
 L R S L L E G V V *
 TTTTGCAGACCTCTATCTGACATCCGTGCTACGCCACCATCCATGGTGGATTCCCTGAGTTTCCGTATTGCTTTGGCG 480
 CTCCTCGGCAATGTCCTGACGGTTTGAAGATTACGCATCTCTGCGAGGGGGAGAAAGCAGCAAAAACCCAGCGCTTTG 560
 TAAGCCTTGGCTTACACGCTGTAATAGTTCCGCTCGCCGACCGACGGCAACACCCAGCGCGGGGAGCTTGCCTGCGT 640
 CAAGATGATCTGGCCGGGCGGCTACAGTGGCCATCCCTCATCATCGCGAGCCTTCCAGCATGGAATCCAGCGCG 720
 (M I C A G P A T V A S P L I I A S L P S) M E F Q R V
dnr
 TTCACAGCAGTGTGTCGAAAGCCACCACTGTCGAAACCGCTTCTCCGCTCCAGTCCAGGAACTGCTCGCCAGCAGC 800
 H Q Q L R L Q S H H L F E P L S P V Q L Q E L L A S E
 GACCTGGTCAACCTCGAACGGGCGCTACGTGTTTCGCGCAGGGCGAGCGGGCGCACGCTTCTACTACCTGATTCCGG 880
 D L V N L D K G A Y V F R Q G E P A H A F Y Y L I S G
 CTGCGTGAAGATCTACCGGCTGACCCCGAAGGCCAGGAGAAGATTCTCGAAGTACCAACGAACGCAACACCTTCCGCG 960
 C V K I Y R L T P E G Q E K I L E V T N E R N T F A E
 AGGCGATGATGTTTCAATGGACACCCCGAATCACTGTGGCCACCGCCAGCGGCTGGTCCCGAGCAGCTGTTCCGTTTCTCC 1040
 A M M F M D T P N Y V A T A Q A V V P S Q L F R F S
 AACAGGGCTACCTGCGCCAGTTGCGAGCAACACCCCGTTGGCCCTGGCCCTGCTGGCCAGCTCAGCACCCCGCTGCA 1120
 N K A Y L R Q L Q D N T P L A L A L L A K L S T R L H
 CCAGCGCATCGACGAGATCGAGCGCTTCCCTGAAGAACGCCACCCACCGGCTGGTGGCTACCTGCTGACCCCTCGCCG 1200
 Q R I D E I E T L S L K N A T H R V V R Y L L T L A A
 CCCAGCGCGGGGGAGAACTCGCGGTTGAAATCCCGGTTGGCCAAGCAACTGGTGGCGGTCACCTGTCGATCCAGCG 1280
 H A P G E N C R V E I P V A K Q L V A G H L S I Q P
 GAAACCTTCTCGGAAATCATGACCCGCTCGGCGAGGGCATCATCCACCTCGACGGCGCGAAATCAGCATCTCTCGA 1360
 E T F S R I M H R L G D E G I I H L D G R E I S I L D
 CCGCGAACCGCTGGAGTGCCTGAGTGAACAGCGCCCGCGCTTGTATCGCGGTCAAGCGCGCCACGGCCCGCTCGCCGGCA 1440
 R E R L E C F E * ANR box
 AGCTGGCGGGTTCGAGCCCGGAGAACGCCCATGCGCCAATGCCTGTATTGCCTCCATGAAACCGAAGCGCGGAAAGCG 1520
ORF7 M R Q C L Y C L H E T E G A E S A
 CCTGCAACAGTCCGGCTGCGCCAGCGCTTCCAGCACCAGCTCCAGGGTCCGCGCGAGCGGCGCTTCCGCTGG 1600
 C E Q R L G M P L P S A S Q H Q L Q G R R Q R R F A W
 * R
 TTCTGCGTCCGGCTGGCGTGTCTGCTGGGCATGATGCTCTGGTTGCCGCGGATGCTCCCTGAGGCATCTCAGCGCG 1680
 F C V G L A L F C L G M M L W L P R D A P * *nozA*

Fig.1-10. Nucleotide and deduced amino acid sequences of ORF7, *dnr* and ORF9.
 The underlined sequence is a putative ribosome binding site. Boxed DNA sequence is a potential ANR binding site.

チド鎖に共有結合したheme cの他に、共有結合していないheme dを持つ。このヘムは今までのところ、異化型亜硝酸還元酵素にのみ見いだされる特異的なものである[73]。本菌と同じくチトクロムcd型のNIRを持つ*P. stutzeri*では、NIR関連の遺伝子*nirSTBMC*の下流域に変異が入ると、heme dが抜けたNIR蛋白を生産する。この変異酵素にはheme cは正常に結合している[74]。また、*E. coli*と*P. aureofaciens*（銅型NIRを持つ）を宿主として*nirS*を発現させると活性型酵素は発現しないが、無細胞抽出液に精製heme dを加えると、NIR活性が発現することが報告されている[42]。このような結果から、*P. stutzeri*では*nir*遺伝子群の下流域にheme dの生合成やプロセッシングに関わる遺伝子が存在し、活性型酵素の発現に必要であると考えられている。*P. fluorescens*でも、*nirS*の下流に変異が入った株は非活性型のNIRを作ることが報告されている[75]。

*Paracoccus denitrificans*では、*E. coli*で*nirS*だけを発現させてもNIR活性を示さないものの、下流の約10kbを入れることによってNIR活性が発現し、この菌でも*nirS*下流域にheme d合成関係の遺伝子が存在すると示唆されている[37]。

*P. aeruginosa*においても、*nirS*を含むEcoRI 3.5kb断片を*P. putida*で発現させるとheme dが抜けたNIR蛋白が生産され、精製したheme dの添加で活性型になることが報告されている[76]。本菌でも、*nirS*オペロンの下流域にheme d生合成遺伝子が存在する可能性が高いと考え、下流のDNA断片をクローニングすることにした。

pHA-P1の末端の0.6kb *SphI*-*PstI*断片(Fig.1-7, probe 3)をプローブとして用い、サザンハイブリダイゼーションでこれとハイブリダイズした、PAO1染色体由来の約10kb付近のEcoRI断片を回収し、Charomid 9-36、*E. coli* DH5の宿主-ベクター系でgene libraryを作製した。このうち、283コロニーについて、probe 3とのハイブリダイズを調べたところ、2コロニーが目的の断片(pHA-E2)を含んでいた。挿入断片の向きは互いに逆向きであった。

第5節 考察

本章では、*P. aeruginosa*の亜硝酸還元酵素(NIR)と一酸化窒素還元酵素(NOR)の構造遺伝子を含む染色体由来のDNA断片のクローニングと塩基配列の決定をまとめて述べた。なお、決定した全塩基配列と遺伝子産物の翻訳アミノ酸配列は本章の最後にまとめて示した(Fig.1-13)。

現在、脱窒酵素の構造遺伝子の塩基配列の解析が行われている微生物は、本章第1

節で述べたように、*P. stutzeri*、*Paracoccus denitrificans*、*Alcaligenes eutrophus*、*A. faecalis* S6、*Pseudomonas* sp. strain G-179、*P. aureofaciens*である。今後は、すでに取得された遺伝子をプローブとすることにより、さらに多くの菌由来の脱窒遺伝子がクローニング、構造解析されていくことが期待される。これまでのところ、脱窒特有の亜硝酸還元以下の3つの酵素の構造遺伝子がすべてクローニング、シーケンスされているのは*P. aeruginosa*と*P. stutzeri*のみである。*P. stutzeri*では、3種の酵素遺伝子は染色体上約30kbの領域に、関連の遺伝子を伴い局在している(Fig.1-11)[72]。*P. aeruginosa*では、亜酸化窒素還元酵素(NOS)の構造遺伝子*nosZ*は*Zumfi*等によってクローニングされており[36]、制限酵素地図の比較では、本研究で取得した合計約24kbの領域には、彼らがクローニングした*nosZ*を含むDNA断片(Fig.1-12)は含まれていないと考えられる。しかし、NIRとNORの遺伝子は、*P. stutzeri*とは位置関係が異なるものの近接していることが本研究で明らかとなった(Fig.1-7)。*nos*領域と*nir-nor*領域が隣接しているかどうかを判断するためには、さらにgene walkingを試みる必要があるだろう。

他の脱窒菌ではまだ複数の遺伝子の位置関係が分かるほど解析が進んでいないが、*Rhizobium*[21]や*A. eutrophus*[22]では脱窒遺伝子がプラスミド上にあることが報告されていることから、おそらくクラスターをなしていることが期待される。このような関連の遺伝子がまとまって存在するsupraoperon clusteringは分解系遺伝子などでよくみられる構造で、遺伝子の水平伝播(horizontal genetic transfer)による形質の移動を示唆していると言われている。脱窒能が種属を問わず多くの微生物間に渡って遍在していることや、ヘム型と銅型によるNIRの分類 (Table 2 参照)も菌の系統分類との関連性が低いことも脱窒遺伝子群のセットでの移動を裏付けているように思われる。また、関連の遺伝子がまとまって存在するということは、この領域の遺伝子を解析することによって、逆遺伝学的に脱窒に必要な新たな機能を持った因子などが発見できる可能性がある。

脱窒は酸素欠乏時に窒素酸化物を代替呼吸基質とする嫌気呼吸であり、大気中に酸素が蓄積される以前の原始的な呼吸形態であって、好気呼吸の進化的な起源であるという説もある[77]。電子伝達系の構成も、好気呼吸と脱窒では類似点が多い (Fig.3,4 参照) [23]。このため、脱窒は、呼吸のより単純化されたモデルとしても興味を持たれている。本研究で得られた脱窒遺伝子群中の遺伝子の解析によって、呼吸に関与する新たな因子や機能が発見される可能性も期待できる。

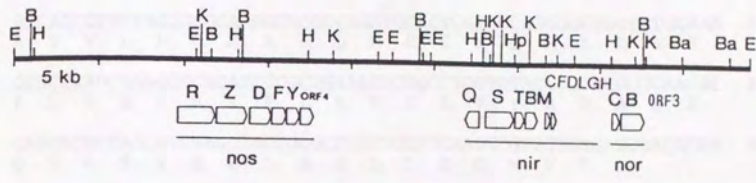


Fig.1-11. Denitrification gene cluster from *Pseudomonas stutzeri* [72].

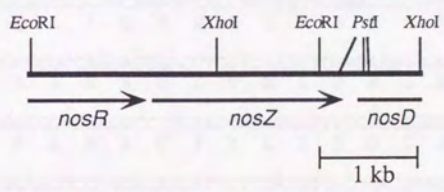


Fig.1-12. Physical map of the *nos* genes for nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* [36].

Fig.1-13. DNA sequence of the *nir-nor* region from *P. aeruginosa*.

GAATTCAGGAAGTGTCCCTGGCCAGGCCGCGGAGTTGCCGATGCTGCTCGGCGAG 60
 E F R K V S L A Q A A E L P M L L L G E
ORF9
 GAGTTCGGTGC GCGCCAGATCTGGCAGGAGCAACTCGCCGCGATCGGCCGGCGCCGCGG 120
 E F R A R Q I W Q E Q L A A I G R R P R
 GTGCAGGCGGAACTGAACCACATGAGCGGATTCTCGACAGCCTGCCGAGACCCGCTTC 180
 V Q A E L N H M S G I L D S L P Q T R F
 GCCACCGTTCTACCGGCAAGGCACGGCAGATGCACTCGAACCAGCGGCTGCTGTGGAAA 240
 A T V L P G K A R Q M H S N Q R L L W K
 CCGCTCAGCGAACCCGCGCATCCCGCTGAAGGTGGCCTGGTCTACCGCGACGCGCAACGC 300
 P L S E P R I P L K V G L V Y R D A Q R
 CAGCAGCCAGCGTGCAGCTGCTGCGCTCGTCTGGAAGGCGTGGTCTGAGCGACGCGG 360
 Q H A S V E L L R S L L E G V V *
 TTTTCTCGGGCAATAAAAAACCCCGCCTTTTGGGCGGGTTTTGCAGACCTCTATCCTG 420
 ACATCCGTGCTACGCCACCATCCATGGTGGATTCCCTGAGTTCCGTATTGTCTTTGGCG 480
 CTTCTGCGCAATGTCTTGACGGTTTGAAGATTACGCATCTCTGCGAGGGGGAGAAAACA 540
 GCCAAAACCACCGCCGTTTGTAAAGCCTTGGCTTACACGCTGTAATAGTTCGCTCGCCGG 600
 ACCGACGGCAACACCCAGCCGCGGGAGCTTGGCTGCGTCAAGATGATCTGCGCCGGGC 660
 (M I C A G P
 CCGCTACAGTGGCCAGTCCCTCATCATCGCGAGCCTTCCCAGCATGGAATTCAGCGCGG 720
 A T V A S P L I I A S L P S) M E F Q R V
dnr
 TCCACCAGCAGTTGTGCAAGGCCACACCTGTTGCAACCGCTTCTCCCGTCCAGCTCC 780
 H Q Q L L Q S H H L F E P L S P V Q L Q
 AGGAACTGCTCGCCAGCAGCGACTGGTCAACCTCGACAAGGGCGCCTACGTGTTCCGCC 840
 E L L A S S D L V N L D K G A Y V F R Q
 AGGGCGAGCCGGCGCAGCCTTCTACTACCTGATTTCCGGTGCCTGAAGATCTACCGGC 900
 G E P A H A F Y Y L I S G C V K I Y R L
 TGACCCCGGAAGGCCAGGAGAAGATTCTCGAAGTGACCAACGAACGCAACACCTTCGCCG 960
 T P E G Q E K I L E V T N E R N T F A E
 AGCGATGATGTTTCATGACACCCGAACTACGTGGCCACCGCCAGGCGGTGGTGCCCA 1020
 A M M F M D T P N Y V A T A Q A V V P S
 GCCAGCTGTTCCGTTTCTCCAACAAGGCCTACCTGCGCCAGTTGCAGACAACCCCGT 1080
 Q L F R F S N K A Y L R Q L Q D N T P L
 TGGCCTGGCCCTGCTGGCCAAGCTCAGCACCCGCTGACCCAGCGCATCGACGAGATCG 1140
 A L A L L A K L S T R L H Q R I D E I E
 AGACGCTTCCCTGAAGAAGCCACCCACCGCGTGGTGGCTACCTGCTGACCCCTCGCCG 1200
 T L S L K N A T H R V V R Y L L T L A A
 CCCACGCGCCGGGGGAGAAGTCCCGGGTGGAAATCCCGGTGGCCAAGCAACTGGTGGCCG 1260
 H A P G E N C R V E I P V A K Q L V A G
 GTCACCTGTGATCCAGCCGGAACCTTCTCGGAATCATGCACCGCCTCGGCGACGAGG 1320
 H L S I Q P E T F S R I M H R L G D E G

GCATCATCCACCTCGACGGCCGCGAAATCAGCATCCTCGACCGGAAACGCCTGGAGTGTCT 1380
I I H L D G R E I S I L D R E R L E C F

TCCAGTGAACAGCGCCGCCGCTTGTATCGCGGTCAAAGCGCGCCACGGCCCGTCCGCCGGCA 1440
E *

AGCTGGCGGGGTTCGAGCCCGGAGAACGCCCATGCGCCAATGCCTGTATTGCCTCCATGA 1500
M R Q C L Y C L H E

AACCGAAGGCGCGAAAGCGCCTGCGAACAGTGGCGCATGCGCGCTGCCAGCGCTTCCCA 1560
T E G A E S A C E Q C G M P L P S A S Q

GCACCAGTCCAGGGTTCGCGCGGACGCGGCTTCGCCTGGTTCTGCGTCGGGCTGGCGT 1620
H Q L Q G R R Q R R F A W F C V G L A L

GTTCTGCCTGGCATGATGCTCTGGTTGCCGCGGATGCTCCCTGAGGCATCTCAGCGGC 1680
F C L G M M L W L P R D A P * R

R L R R Y L Q L L R E P L Q G A R E V L
GCAGGCGCCGATAGAGCTGGAGCAGGCGCTCGGGCAACTGCCCGGCGCTCGACCAGGC 1740

A F G G D A G F L Y P L Y D A A E K D I T
CGAAGCGTTCGCGCGCAACAGGTAGGCGAGTTCGCGCGCTCCTTGTGCGATGTGA 1800

I C F P V L G Q S R A E I V A Q R T D E
TGCAGAAGGGCACAGTCCCTGGCTGCGCGCCTCGATCACCGCCTGGCGGGTGTCTCGA 1860

I G Y R G E Y R D L D N P K G D S L L L
TGCCGTAGCGCCCTCGTAGCGTCCAGGTCGTGGGCTGCGCTCAACAGCAACA 1920

L L R R K Q P Q G G L V Q S A R R I A A
GCAGGCGAGCTTCTGCGGCTGCCCGGAGCACCTGGCTGGCCCGGCGGATCGCCGCGC 1980

G M R T Y Y G P S L A L V R G R V E G G
CCATCCGCGTGTAGTAGCCCGGAGAGCGCCAGCACGCGACCGCGACCTCGCCGCGT 2040

Y G E D F D K L V Q W R V Q Q R R V S S
AGCCTTCGTGAAGTCCCTCAGCACCTGCCAGCGCACCTGCTGCCGCGCACCGAGGAAA 2100

F G Y L A F P D G L A Q L A E G F L L L
ACCCGTACAGCGCAAGGGGTTCGCCAGTGCCTGCAACGCTCGCCGAACAGCAGCAGGC 2160

S D V I S D I V R R Q D D L Y A E T S M
TGTGAGGATGCTGTGATCACTCGCCGCTGGTTCGTGAGGTAGGCTTCGGTGGACATCG 2220

S L D A L L L C A L D R R R P R Q E L F
ACAGGTCCGCCAGCAACAGGCGAGGTCGCGCCGGCGCGGCGCTGTTTCGAGGAACA 2280

L G P Q T S G G R R R E V Q F D L W A D
GGCCTGGCTGGGTGGAACCGCGCGCCGCTCGACCTGGAAGTCGAGCCAGGCATCGA 2340

L D I E D G Q P Q Q R L R Q R G D R L C
GGTCGATCTCGTTCGCTTGGCGTGTGGCGAGGCTTGGCGCGCTCGCGCAGGCAGG 2400

A F Q R R L H L A T K E L H A P L S A S
CGAAGTGGCGCGCAGATGCAGCGGCTTCTCCAGGTGCGCCGGGAGGCTGGCGCTGG 2460

T A G R P R M P Q L L V H D S L L R Q Q
TCGCGCGCGCGGCGCATCGGTTGACAGCAGCAGTGGTTCGCTCAGCAGGCGCTGCTGCC 2520

R Y D W E P L K L G P G L P L D D Y D A
 GATAGTCCCCTCGGGCAGCTTCAGCCCGGGCCGAGCGGCAGGTTCATCGTAGTCGGCGG 2580

A P L D L D L R L G G G K Q T R Q R S L
 CCGGCAGGTCGAGATCCAGGCGCAGGCCGCCCTTCTGCGTGCCTGGCGCGACAGCG 2640

S L Y D L D E A V R A G D P D D E D D S
 ACAGGTAGTCGAGGTCTTCGGCGACGCGCGCCGTCCGGTCTCTCGTCTGCTGCTAC 2700

C R D L A L H E S W S L L S E L R F L L
 AGCGGTCCAGGCCAGGTGCTCCGACCACTGAGCAGGCTTTCAGGCGGAACAGCAGCA 2760

L N R E S N R E E I R E A R K R A G S R
 GGTGCGTTCGCTGTTGCGTTCCTCAATGCGCTCGGCGCGCTTGC GCGCTCCGCTGCGGG 2820

A V Q R K G A G A A A E E G D E A S A S
 CGACCTGGCGTTCGCGCGCGCGCGCGCTTCTCGCGCTCTCCGACTGGCGGAAG 2880

P T W R E G P Y L W L P V P W P A R E V
 GCGTCCAGCGCTCGCCGGGATACAGCCACAGCGGCACCGGCCAGGGCGCCGCTCGACTC 2940

R P F R E V S G P E A L A R R L A I E L
 GCGGGAAGCGCTCGACGCTGCCGGTTCGGCAAGCGCGCGCGCAGGGCGATTTCAGTT 3000

E A D A A P C D D L S P R Q R L H A A V
 CGGCGTTCGCGCGGGCAATCGTCCAGCGACGGCGCTGGCGCAGATGCGCGCGACCA 3060

L R A Y R P R L A P Y A D L L Q R A W R
 GCCGGCGTAGCGCGGGCGCAGCGCGGATAGGCATCGAGCAACTGCCGCGCCAGCGCT 3120

Q N D Q A W H R L P G A S A A L L A L W
 GGTGCTCGGGCCAGTGCCTCGCGCGCGCGCTGGCGCGCAGCAGCGCCAGCCAGC 3180

R Y L E R N L E A Q P Y V A L S E P L R
 GATACAGTTCGCGGTTAGCTCGGCTGCGGATAGACCGCGAGGGATTCCGGCAGGGCGCA 3240

L S D G N F W S V P A Q E C T G A V R Q
 GGCTGTGCGCGTTGAACCAGGACACCGGGCGCTGCTCGCAGTCCCGCGACCCGCTGCA 3300

L W T R R L L L R R A P T A E L A V G P
 ACCAGGTGCGGCGTAGCAGCAGGCGCGCGCGGGTTCGCTCGAGGGCTACCCCGGTG 3360

A G G L A R F L M G L P R R M S E L T V
 CGCGCGGAGCGCCGGAAGAGCATGCCGAGCGGACCGCGCATGCTCTCCAGGGTCAACC 3420

R A A E F E G S A H R T I F R H W H A G
 GCGCCGCTCGAACTCGCCGCTGGCATGGCGGGTATGAAGCGGTGCCAGTGGGCGCGCA 3480

V W E E L E V A F A M *norA*
 * A A A K G R R F
 CCCATTCTCCAGTTCGACGGCGAAGGCCATCTCAGGCGCGCGCTTGC GCGCGCGGAAG 3540

S L L Y A V L G I L F V V G A G E R L W
 CTCAGCAGGTAGGCGACCAGGCCATGAGGAACACCACCCCGCGCTTTCGCGCAGCCAG 3600

Y F I A L Q D Q T A M F T M A A G D A P
 TAGAAGATCGCCAGCTGGTCTGGTGGCCATGAAGGTTCATCGCGCGCGCTCCGCCGCG 3660

M R Q L W V Q L V G A A S L F L T I F V
 ATCCGTTGCGACGACCTGCAGCACCCCGCGCGGAGAGGAACAGGGTTCATGAACACC 3720

M A V T M L W F G W M E L V Q S R N D M
 ATCGCCACGGTCATCAGCCAGAAGCCCCACATCTCCAGGACCTGCGAGCGGTTGTCCATC 3780

A E G I G R L R P M A Y S I I T M V I M
 GCCTCGCCGATCCCCGCGAGGCGCGGCATGGCGTAGGAGATGATGGTCATCACGATCATC 3840

A Y A G Y F A M H G H A A T L Q T G H T
 CCGTAGGCGCCATAGAAGGCCATGTGGCCGTGGGCGGCGGTGAGCTGGGTGCCGTGGT 3900

Y Y N V P A L T H M F G W V G A G L F A
 TAGTAGTTGACCGGCCAGGGTATGCATGAAGCCCCACACTCCCCGCCGAGGAAGGCC 3960

M V T T G M A W L A V A R N P Y D R R R R
 ATCACTGTGGTGCCCATGGCCACAGCGCGACCGCGCGGTTCCGATAGTTCGCGCGGCGG 4020

R R N I T N F A F L V M A F F P L P E L
 CCGCGGTTGATGGTGTGAAGGCGAACAGCACCATGGCGAAGAACGGCAGCGGCTCCAGC 4080

A S F V S G L W L W Y G P V G I W F Y H
 GCCGAGAATACCGAGCCGAGCCACAGCCAGTAGCCGGCAGCCGATCCAGAAGTAGTGG 4140

H G T G I I G S I L A M A I I V Y L W K
 TGGCCGTTGCCGATGATGCCGCTGATCAGCGCCATGGCGATGATCACGTAGAGCCACTTC 4200

E I V E R D V G T I K V L V F A L I A G
 TCGATCACCTCGCGGTCGACCCCGGTGATCTTACCAGCACGAAGGCGAGGATCGCACC 4260

M I L E W V G E V W L H V V W W W Y F K
 ATGATCAGTTCCCACAGCCTTCCACCCACAGGTGCACCACCACCACCAGTAGAACTTG 4320

D R T L N E P N Y F S F L F L L A L G I
 TCGCGGTTGAGGTTTTCCGGTGTAGAAGGAGAACAGGAACAGCAGGGCGAGGCCGATC 4380

L G T M L V M S I A T K R G R L V T M G
 AGGCCGGTCATCAGGACCATGCTGATGGCGGCTTGGCCCGCGCAGCACGGTCATGCCG 4440

V N F L F G L A V I V I G A K S I T P Q
 ACGTTGAACAGGAAGCCAGGGCGACGATCACGATGCCCGCCTTGTCTGATGGTCGGCTGT 4500

E L F E R G M T P W L E N G T L R A L G
 TCGAGGAACTCGCGCCATGGTCGGCCACAGTTCTGTTGCCGTTGAGCCTGGCCAGGCCG 4560

A Y P V L L Y G L I T L V G A A A F V W
 GCGTAGGGCACCAGCAGGTAGCCGAGGATGGTCAGCACGCCGCGCGCGGCGGAATACCCAG 4620

F L I W A L K P S Y L E C D S E E P V L
 AACAGGATCCAGGCCAGCTTCGGGCTGTACAGTCTGCAGTTCGCTCTCCTCCGGCACCAGG 4680

Y Y A A G M F G F L L W V I L L N T H V
 TAGTAGGCAGCCCATGAAGCCGAACAGCAGCCAGACGATCAGCAGGTTGGTGTGCACC 4740

M R A V N F P I A P F L F D G V V Y Q L
 ATCGCCGCGAGCTTGAAGGGGATCGCCGGGAACAGGAAGTCGCCGACCACGTACTGCAGG 4800

G M I L G F L I Q G V F L I L A F V F Y
 CCCATGATCAGGCCGAACAGGATCTGCCCGACGAAGAGGATCAGGGCGAACACGAAGTAG 4860

P K A V A Q S A F K L S G N P S M M *norB*
 * G
 GGTTTGGCAGCCGCTGCGAGGCGAATTTAGGGAGCCATTGGGCGACATCATCAACCCT 4920

E K N P P W Q N T D I K S S W K L F E A
 CCTTGTTCGGCGCCATTGGTTGGTATCGATCTTCGAGCTCCACTTGAGGAACCTCGGCCA 4980

L D D V Q G G E S L H F Q P M A R R G P V
 GGTGCTCGACCTGGCCCTCGTSGAGATGGAACCTGCGGCATGGCGCGGGCCCGGCACGT 5040

N L P Q I N M W A Q L F T N F G E E G G
 TCAGCGGCTGGATATTTCATCCAGGCCTGGAGGAAGGTGTTGAAGCCCTCCTCGCCGCCAC 5100

R R G V V N G L E P A F Y A G E G L L T
 GCGCTCCGACCACGTGCCCAGCTCCGGCGCGAAGTAGGCGCCCTCGCCGAGCAGGGTGT 5160

H C G V C N N Q E W V L K G R V V A A S
 GGCAGCCGACGAGTTGTTCTGTTCAGACCAGCTTGCAGCGCACCCCGCGGGCTCA 5220

M A A E N T R E P L T K E T H Y T L A L
 TCGCGGCTCGTTGGTGCCTCGGGCAGGTCTTCTCGGTGGTAGGTGAGGGCCAGGA 5280

F L L I F F V S G G F Y I N R A M G K T
 ACAGCAGGATGAAGAACACACTCCC GCCAAATAGATGTTCTTGGCCATGCCTTTGGTAA 5340

F T E S M *norC*
 AGGTCTCGGACATGCGCCCTCCTGGAATGGGTGGTGCAGGATTCAGGAAGCGCGGGC 5400

* N N M R A
 GCGAACCCGCTTGATGGCAATCAAGATTCCCGAACGATTTACTCAGTTATTCATCCGGC 5460

L Y L A A G V A L A M L L P W A L L L R
 CAGGTACAGCCGAGCGCCACCAGCCAGGGCCATCAGCAGCGGCCAGGCCAGCAGCAGGGC 5520

R W L A P A H A L E M F R E G I L W G K
 GCGCCATAGCCCGGGGCATGGCCAGTCCATGAAGCGCTCGCCGATCAGCCAAACCCTT 5580

A V A C A L V A A L L W P S D G A G G L
 GGCACCCGCGCAGGCCAGCACCGCCAGCAGCCAGGGAGAGTCGCCGGGCCACCCAG 5640

L V G T V A L A L L A L W C L T L T R M
 CAGCACCCGCTCAGGCCAGCCAGCAACGCCAGCCAGCAGAGGGTCAAGGTTTCGCAT 5700

* Q L V Y V L P F L L V W V L D V
 CGGCACTCATTGACGAGCAGTAGACCAGCGGGAACAGCAGCACCCAGACCAGGTCGACCA 5760

M H W Y L V G S E L G S C A Q P T Y C R
 TGTGCCAGTAGAGCACTCCCGACTCCAGTCCCGAGCAAGCCTGCGGGGTATAACACCGGC 5820

R W C A Q A L W G L I L L G L L V H L F
 GCCAGCAGGCTGCGCCAGCCAGCCGAGGATCAGCAGGCCAGCAGGACGTGGAGGAAAT 5880

H F G T L C W Y L T F F T D H E I D L G
 GGAAGCCGGTCAGGCACCAGTAGAGGGTGAAGAAAGTGTCTGCTCGATGTCAGGCCCGA 5940

L D A L R G Y E H L K L G V Y V L A L L
 GATCGCGGAGCCCGCTACTCGTGACGTTTCAAGCCGACGTAGACCAGGCCAGCAGCA 6000

L A A L L W G S A Q R P R G R R V A H V
 GCGCCGCGCAGAACAGCCGCTCGCTGCGCGGGCCGTCCGCGGCGCACCGCATGCACCG 6060

A L A A L W G S S L L A V T L L L G W R
 CCAGCCGCGGAGCCAGCCGAGCTGAGCAGGGCCACGGTCAGCAACAGGCCCGCAGCGC 6120

S D L Q E R G A R F L E P Q W A Q A G A
 TATCCAGTTGCTCCCGCGCGCACGGAACAGCTCCGGCTGCCAGGCTGGGCGCGGCCA 6180

F A L L L L S F V S L E A L I F F W M *nirO*
ACGCCAGCAGCAGCAGGCTGAACACGCTGAGTTCGGCGAGGATGAAGAACCACATCGCCA 6240

* A V H L D V I D M
GGTCGCCGGGCGAGCGCCGCTCGACGGTATCAGGCGACATGGAGATCGACGATGTCCATC 6300

L A A V T A P D D S L P E A L A V R C A
AGCGCCCGCACCGTCGCCGGTTCGTCGAGAGCGGTTTCGGCCAGCGCCACCCGGCAGCC 6360

E R P D M G D G I L R A A F I L L R T S
TCGCGCGGGTCCATGCCGTCGCCGATGAGGCGCGCGGAAGATCAGCAGCGGGTCGAG 6420

A V E E L D H Q E L R R L A Q G L Q V L
GCGACTTCTCCAGGTCGTGCTGCTCCAGCCGCGCAGCGCCTGGCCCAACTGCACCAGG 6480

R Q A L T E A C G S E G V L I R A E Q Q
CGTGCGCCAGGGTCTCGGCACAACCGCTCTCGCCGACCAGGATGCGTGCCTCCTGCTC 6540

A A P Y D F R L A V F R Q R T S P K L G
GCCGCCGGGTAGTCGAAGCGCAACGCGACGAAACGCTGCCGGGTGCTGGGCTTCAGGCC 6600

K L L N Q Y G P N Y S V V L M F S P P A
TTGAGCAGGTTCTGGTAGCCGGGTTGTAGGACACCACCAGCATGAACGAAGCGCGGCC 6660

Q L T E G T R E L Y L E R R D D A L P H
TGCAACGTCCTCGCGGTGCGCTCCAGGTACAGTTCGCGCGGTCGTGCGCCAGCGGGTGG 6720

I A V T T D Q R A E V V E D L Y C I G G
ATGGCGACCGTGGTCTCTGGCGCGCTCCACCACCTTCGTCCAGGTAGCATACCGCT 6780

E R V A R T L P G D Q W W T G D A G I L
TCGCGCACCGCGGGTTCAGCGGGCGCTCTGCCACCAGGTGCCGTCGCGCCGATCAGA 6840

H R G L L D A A G L D D H C A V S Y L P
TGGCGCCGAGCAGGTTCGCGCGCGCCAGGTCGTGCGCAGGCGACGCTGTACAGCGCC 6900

L E L R R A M Y Q V F R T K G C G T P G
AGTTCAGGCCCGCGCCATGTACTGGACGAAGCGGGTCTTGCCGCAACCGTGGGGCC 6960

K L L V P L G H R W A R E F V E I E H G
TTGAGCAATACCGGAGCCGTGCCGCCAGGCGCGCTCGAAGACTTCGATCTCATGGCCG 7020

T A E Y F P T A D R M *nirQ*
GTGGCCTCGTAGAAGGGTTCGCGTCCCAGCATGCTACTCCTGCGCTAGGATTAGGAC 7080

CGCAGCTATTACAGTTGGAAGGTGCCACAAGCGCAAAGCAACGCAATCTTGATTCCCG 7140

TCAGGCAAGGGTAAAGACCCTGCTTTCTATGATCCTTTCGCGCATGAATCCCGGGAGT 7200

TCCCGACGCGCCACCCCAAAACTGCTAAGGGAGCGCCTCGCAGGGCTCCTGAGGAG 7260

ATAGACCATGCCATTTGGCAAGCCACTGGTGGGCACCTTGCTCGCCTCGCTGACGCTGCT 7320
nirS M P F G K P L V G T L L A S L T L L

GGGCTTGGCCACCGCTCAGCCAAGGACGACATGAAAGCCGCCGAGCAATACCAGGGTGC 7380
G L A T A H A K D D M K A A E Q Y Q G A

CGTTCGCGCTCGATCCCGCTCACGTGGTGGCACCACCGCGCTCCCAGCATGAGTGA 7440
A S A V D P A H V V R T N G A P D M S E

AAGCGAGTTCAACGAGGCCAAGCAGATCTACTTCCAACGCTGCGCCGGTTGCCACGGCGT 7500
 S E F N E A K Q I Y F Q R C A G C H G V
 CCTGCGCAAGGGCGCCACCGGCAAGCCGCTGACCCCGGACATCACCCAGCAACGCGGCCA 7560
 L R K G A T G K P L T P D I T Q Q R G Q
 GCAATACCTGGAAGCGCTGATCACCTACGGCACCCCGCTGGGCATGCCGAAGTGGGGCAG 7620
 Q Y L E A L I T Y G T P L G M P N W G S
 CTCGGCGAGCTGAGCAAGGAACAGATCACCCCTGATGGCCAAGTACATCCAGCACACCC 7680
 S G E L S K E Q I T L M A K Y I Q H T P
 GCCGCAACCGCGGAGTGGGGCATGCCGGAGATGCCGGAATCGTGGAAGGTGCTGGTGAA 7740
 P Q P P E W G M P E M R E S W K V L V K
 GCCGGAGGACCGGCCAAGAAACAGCTCAACGACCTGGACCTGCCAACCTGTTCTCGGT 7800
 P E D R P K K Q L N D L D L P N L F S V
 GACCCGCGCGACCGGGCAGATCGCCCTGGTCGACGGCGACAGCAAAAAGATCGTCAA 7860
 T L R D A G Q I A L V D G D S K K I V K
 GGTATCGATACCGGCTATGCCGTGCATATCTCGGGATGTCCGCTTCCGGCCGCTACCT 7920
 V I D T G Y A V H I S R M S A S G R Y L
 GCTGGTGATCGCCCGGACGCGCGGATCGACATGATCGACCTGTGGGCCAAGGAGCCGAC 7980
 L V I G R D A R I D M I D L W A K E P T
 CAAGGTCGCCGAGATCAAGATCGGCATCGAGGCGCGCTCGGTGGAAAGCTCCAAGTTCAA 8040
 K V A E I K I G I E A R S V E S S K F K
 GGGCTACGAGGACCGCTACACCATCGCCGGCGCCTACTGGCCCGCAGTTCGGGATCAT 8100
 G Y E D R Y T I A G A Y W P P Q F A I M
 GGACGGCGAGACCTGGAACCGAAGCAGATCGTCTCCACCCGCGGATGACCGTAGACAC 8160
 D G E T L E P K Q I V S T R G M T V D T
 CCAGACCTACCACCGGAACCGCGGTGGCGGCGATCATCGCCTCCCACGAGCACCCCGA 8220
 Q T Y H P E P R V A A I I A S H E H P E
 GTTCATCGTCAACGTGAAGGAGACCGGCAAGGTCCTGCTGGTCAACTACAAGGATATCGA 8280
 F I V N V K E T G K V L L V N Y K D I D
 CAACCTCACCGTACCAGCATCGGTGCGGCGCGTTCCTCCACGACGGCGGCTGGGACAG 8340
 N L T V T S I G A A P F L H D G G W D S
 CAGCCACCGTACTTCATGACCGCCGCAACAACCTCAACAAGGTTGCCGTGATCGACTC 8400
 S H R Y F M T A A N N S N K V A V I D S
 CAAGGACCGTGCCTGTGCGCCCTGGTCGACGTCGGCAAGACCCCGACCCGGGGCGTGG 8460
 K D R R L S A L V D V G K T P H P G R G
 CGCCAACCTCGTGCATCCAAAGTACGGCCCGGTGTGGAGCACCAGCCACTGGGCGACGG 8520
 A N F V H P K Y G P V W S T S H L G D G
 CAGCATCTCGTGCATCGGCACCGATCCGAAGAACCATCCGAGTACCGCTGGAAGAAAGT 8580
 S I S L I G T D P K N H P Q Y A W K K V
 CGCCGAACCTACAGGGCCAGGGCGGGCTCGCTGTTTCATCAAGACCCATCCGAAGTCTC 8640
 A E L Q G Q G G G S L F I K T H P K S S
 GCACCTCTACGTCGACACCCTTCAACCCCGACGCCAGGATCAGCCAGAGCGTCCGGT 8700
 H L Y V D T T F N P D A R I S Q S V A V

GTTCGACCTGAAGAACCTCGACGCCAAGTACCAGGTGCTGCCGATCGCCGAATGGGCCGA 8760
 F D L K N L D A K Y Q V L P I A E W A D
 TCTCGGCCAAGCGCCAAAGCGGGTGGTGCAGCCCGAGTACAACAAGCGCGGCGATGAAGT 8820
 L G E G A K R V V Q P E Y N K R G D E V
 CTGGTTCTCGGTGTGGAACGGCAAGAACGACAGCTCCGCGTGGTGGTGGTGGACGACAA 8880
 W F S V W N G K N D S S A L V V V D D K
 GACCATGAAGCTCAAGGCCGTGGTCAAGGACCCGCGGCTGATCACCCCGACCGGTAAGTT 8940
 T M K L K A V V K D P R L I T P T G K F
 CAACGTCTACAACCCAGCAGCAGCTGTACTGAGACCCGCGTGCGGGGCAGCCCCGCA 9000
 N V Y N T Q H D V Y *
 CGTCCCCCTACGAGGAACCGTGATGAAACCGTACGCACTGCTTTCGCTGCTCGCCACC 9060
 nirM M K P Y A L L S L L A T
 GGCACCTGCTCGCCAGGGCCCTGGGCCGAAGACCCCGAAGTGTGTTCAAGAACAAG 9120
 G T L L A Q G A W A E D P E V L F K N K
 GGTCGCTGGCTGCCATGCCATCGACACCAAGATGGTCGGCCCGGCTACAAGGACGTC 9180
 G C V A C H A I D T K M V G P A Y K D V
 GCCGCCAAGTTCGCGGCCAGGCCGGCCGAAGCGGAAGTTCGCGCAGCGGATCAAGAAC 9240
 A A K F A G Q A G A E A E L A Q R I K N
 GGCAGCCAGGGCGTCTGGGGCCCGATCCCGATGCCCGCAACGCGGTTCAGCGACGACGAG 9300
 G S Q G V W G P I P M P P N A V S D D E
 GCGCAGACCTGGCGAAGTGGGTCTGTGCGAGAAATGAACGCCCTCCGGACTTCCGGC 9360
 A Q T L A K W V L S Q K *
 M N A P P D F R R
 nirC
 GCGCCGCCAGCCACGCCTTGTGGCTGGCCCTCGCGCTGACGTTGCGCTGCTCTTCCGG 9420
 A A S H A L W L A L A L T F A C P L P G
 GCCTGGCCGACGAGCATCCCGATGCCCGTCGCCAGGCCAGTTGCGTACCTGCTGTGC 9480
 L A D E H P D A R R Q A Q L R H L L L Q
 AGGACTGCGGCTCTGCCACGGCTGCGCTGACCGCGGCCCTCGGCCGGCGCTGACCC 9540
 D C G S C H G L R L T G G L G P A L T P
 CCGAGCCCTGCGCGCAAGCCGCGCAATCGTGGTCGCCACCGTGTGCTCATGGCCGTC 9600
 E A L R G K P R E S L V A T V L M G R P
 CGCAAACCCGATGCCCCCTGGGCCGGCTGCTCAGCGAAGACGACCGCGGTGGCTGG 9660
 Q T P M P P W A G L L S E D D A G W L V
 TGGACCGCCTGATCGAAGGAGAGATCGCCCCATGAACCTGCGTCCCTCGCGCGCTTCT 9720
 D R L I E G E I A P *
 M N L R P L A P L L
 nirF
 CCTCACCTGCTCGCCGCTGTAGCC 9746
 L T L L A G C S

Fig.1-13. Nucleotide sequence of the *nir-nor* region of the denitrification gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa*.

Boxed sequences are potential ANR binding sites.

第2章 亜硝酸還元酵素関連遺伝子の構造

第1節 序

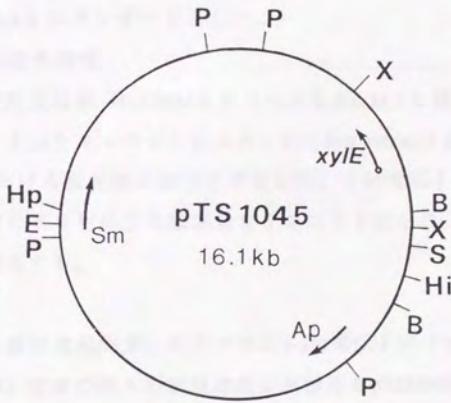
第1章において、*Pseudomonas aeruginosa*のチトクロムc-551遺伝子(*nirM*)が亜硝酸還元酵素(NIR)遺伝子(*nirS*)の下流に存在することを示した。*nirS-nirM*間の50bpの領域にはプロモーターらしい配列が存在しなかったことから(Fig.1-6 参照)、両遺伝子はオペロンを構成していると考えられる。

*P. aeruginosa*のNIRは、1958年に精製され、緑がかった褐色を呈することから、チトクロムGBと呼ばれていたが[78,79]、これが還元型チトクロムc-551を酸化することから、*Pseudomonas*チトクロム酸化酵素と呼ばれるようになった。つまり、この酵素はミトコンドリアの好気呼吸の末端還元酵素cytochrome oxidaseに相当する酵素と考えられていたのである。そういう経緯で、EC 1.9.3.2に分類されている。しかし、ミトコンドリアの酵素は膜蛋白であるのに対して本酵素は可溶性であったり、チトクロム酸化酵素活性が非常に弱いなどの相違点も見られた。当時、この酵素精製の際に硝酸塩を入れた培地で培養していたため、Yamanaka等は硝酸還元活性等を調べたところ、本酵素が強い亜硝酸還元活性を有することが明らかとなった[80,81]。また、この酵素活性は嫌氣的条件で誘導されることが後に判り、(亜)硝酸呼吸特有の酵素であると考えられるようになった[82]。これは、脱窒関連酵素としては初めてそのタンパク質の本体が単離、同定されたものである。一方、チトクロムc-551は、依然好気呼吸、嫌気呼吸の両方の末端還元酵素と考えられていた[23,53]。チトクロムc-551遺伝子(*nirM*)はNIR遺伝子(*nirS*)の下流にあり[58,61]、共転写されるとしたら、このチトクロムは専らNIRへの電子供与体として働き、好気呼吸のチトクロム酸化酵素への電子供与体として働くチトクロムcは別にあるということになる。

本章では、*xyIE*をレポーター遺伝子として用い、*nirS*と*nirM*の転写活性を調べることにより両遺伝子の共転写を確認した。また、*P. aeruginosa*の*nir*オペロンの構造と、現在までに報告されているチトクロムcd型のNIRを持つ他の脱窒菌の*nir*遺伝子の構造との比較を行った。

第2節 C23Oアッセイ法

転写活性の測定には *xyIE* のプロモーター検索ベクター pTS1045 (IncQ, Ap^r, Sm^r, *xyIE*) (Fig.2-1)[85]を使用した。TOLプラスミド由来の *xyIE* の遺伝子産物であるカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ(C23O)は、カテコールを分解して黄色の2-オキシムコン酸セミアルデヒドを生成する。そこで、黄色(375nm)の吸光度の変化から、次のような方法で酵素活性測定を行った[84,85]。



B, BamHI E, EcoRI Hi, HindIII Hp, HpaI
 P, PstI S, SmaI X, XhoI

Fig.2-1. *xyIE* promoter probe vector, pTS1045

(1) 培養

100mlの坂口フラスコを用いて10mlのYT培地で培養を行った。嫌氣的条件では100mMのNaNO₃を培地に添加した。嫌氣的に培養する際には気相をN₂ガスで置換した。

(2) Cell free extractの調製

14-20時間培養した後に、遠心(5000rpm, 5min)で集菌し、リン酸バッファー(50mM, pH7.5) 5mlで洗浄後、10%アセトンが入ったバッファー 800-1000 μ lに懸濁した。菌体懸濁液をsonication (sonifier cell disruptor, 特別マイクロチップを用いて、目盛 5, サイクル 50 で 30秒 2-3回) で菌体破壊し、遠心(15000rpm, 10min)により上清を回収した。タンパク質濃度は、BIO-RADのプロテインアッセイキットを用いて求め、BSAをスタンダードとした。

(3) C23O活性測定

活性測定用反応液(0.33mMカテコールを50mMリン酸バッファー(pH7.5)に溶かしたもの) 1mlをキュベットに入れ、Cell free extractを適量加えてから、1分後の375nmにおける吸光度の変化を測定した。1分間に1 μ molの2-オキシムコン酸セミアルデヒドを生成する酵素量を1ユニットとした。上記条件では、44のODの変化に相当する。

第3節 亜硝酸還元酵素、チトクロムc-551遺伝子のプロモーター領域の同定

nirS, *nirM*上流域の種々の制限酵素切断断片をpTS1045の*xyIE*の上流に導入した(Fig.2-2 pHA301-308)。これらのプラスミドを*P. aeruginosa* PAO1161に接合伝達し、種々の条件下でC23O活性を測定した(Table 2-1)。pHA303, pHA305を保持する菌体においては、好気、嫌気いずれの条件においてもC23Oの活性は認められなかったが、pHA301, 302, 304, 306では、嫌氣的条件下でのみC23O活性が確認された。この結果から、プロモーターと転写調節に関与する領域は、約240bpの*ApaI-SmaI*内にすべて含まれていることが証明された。また、このことから、*nirS*の発現は転写レベルで調節されていることが明らかとなった。

*nirS*のプロモーターから*nirS*, *nirM*の一部までをふくむpHA307と、*nirS*プロモーター部分が欠如したpHA308を用いた場合には、pHA308では好気、嫌気ともに発現しなかったが、pHA307では嫌氣的条件下でのみ発現した。このことから、

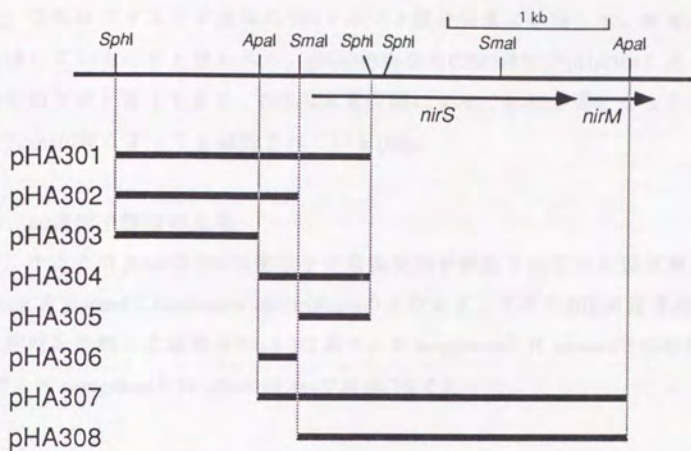


Fig.2-2. C230アッセイに用いた制限酵素切断断片
各断片をpTS1045の*xyIE*の上流に順方向に挿入し、C230活性の測定を行った。

Table 2-1. *nirS*, *nirM*のプロモーター領域同定のためのC230アッセイ

plasmids	C230 activity (u/mg protein)	
	aerobic	anaerobic
pTS1045	1.61	1.70
pHA301	1.47	20.94
pHA302	1.67	29.78
pHA303	1.62	2.21
pHA304	1.59	18.66
pHA305	1.17	1.10
pHA306	1.43	20.00
pHA307	1.32	10.12
pHA308	1.20	1.69

*nirM*は*nirS*とともに、同一のプロモーターから嫌氣的条件下でのみ発現することが明らかとなった。pHA307を保持する菌は、嫌氣的条件下では非常に生育が悪かった。これはプラスミド由来のNIRタンパク質が大量に発現して、生育に悪影響を及ぼしているためと思われる。pHA307由来のC23O活性がpHA304に比べて低いのはこのためと考えられる。NIRの大量発現によって生育が悪くなるという現象は、Zennaro等によっても報告されている[86]。

第4節 *nir*遺伝子構造の比較

現在、チトクロム*cd*型のNIR遺伝子の塩基配列が決定されている脱窒菌は、*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*と*Paracoccus denitrificans*のみである。3者のNIR構造遺伝子*nirS*の翻訳配列を比較した結果をFig.2-3に示す。*P. aeruginosa*と*P. stutzeri*での相同性は55.3%で、*P. aeruginosa*と*Pa. denitrificans*では66.7%であった。

Fig.2-4に*nirS*周辺領域の遺伝子構造を比較した図を示した。

*P. stutzeri*では、NIR構造遺伝子*nirS*は、その下流にある*nirT*, *nirB*とオペロンを形成しており、さらに下流に*nirM*, *nirC*が別の転写単位として存在している[31]。*nirTBM*Cはそれぞれ、4-heme, 2-heme, 1-heme, 1-hemeの*c*型チトクロムをコードしており、*NirB*はcytochrome peroxidase (cytochrome *c*-552)、*NirM*はNIRへの直接の電子供与体cytochrome *c*-551である。*NirT*, *NirC*の機能はまだ分かっていない。*nirC*下流の遺伝子構造は公表されていないが、約3kb下流に一酸化窒素還元酵素遺伝子*norCB*があり[72]、*nirC*-*norC*間には5つの遺伝子(*nirFDLGH*)が存在し、これらの遺伝子を欠損させるとNIR活性が発現しなくなる(Zumft, W.G. 私信)。この中にheme *d*の生合成に関わる遺伝子が存在するようである[74]。

*Pa. denitrificans*の*nir*遺伝子は、文献上は*nirS*のみしか発表されていないが[37]、データベースにはその下流域の3つの遺伝子(*nirECF*)が登録されている(U05002)。*nirE*はS-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III methyltransferaseと相同性が高く、hemeのプロセッシングに関わる可能性が高い。*nirF*は、データベースでホモロジー検索したところ、有為な相同性を示す配列は見つからなかった。*nirC*はmono-hemeのチトクロム*c*をコードしている。

*P. aeruginosa*の構造は、NIRの生理的電子供与体チトクロム*c*-551の遺伝子*nirM*が

```

Pae:          MPFGKPLVGTLLASLTLLGLATAHAKDDMAAEQYQGAASAV---DPAHVV 48
Pst:          MSNVGKPILAGLIAGLSLLGLAV 23
Pde: MRQRTPFARFGLLASAALALVLGP LAVA AQEQAAPPKDPAAALEDHKTNDNRYP SLDNAQQDVAALG 70

* * * * *

Pae: RTNGAPMSESEFNEAKQIYFQRCAGCHGVLKRGATGKPLTP-----DITQQRGQQYLEALI 105
Pst: AQAAPPEMTAEKEASKQIYFERCAGCHGVLKRGATGKNLEPHWSKTEADGKKTEGGLNLGTRKLENI 93
Pde: APEGIPALSDAQYNEANKIYFERCAGCHGVLRLKRGATGKALTP-----DLTRDLGFDYLSQSP I 127

* * * * *

Pae: TYGTP LGM PNWSSGSLKEQITLMAKYIQHTPPQPPPEWGMPEMRESWKVLVKP XDRPKKQLNDLDPNL 175
Pst: AYTGE GGMVNYD--DILTKEEINMMARYIQHTPDIPPEFSLQDMKDSWNLIVPVEKRVTKQMNKINLQNV 161
Pde: TGYSPAGMPNWTSGELTAEQVDLMANYLLLDPAAPPEFGMKEMRESWQVHVAPEDRPTQQENDWLENL 197

* * * * *

Pae: FSVTLRDAGQIALVDGSKKIVKVIDTGYAVHISRMSASGRYLLVIGRDARIDMIDLWAKEPTKVAEIKI 245
Pst: FAVTLRDAGKLAALIDGDTHKIKWVLESYAVHISRMSASGRYVYVYTGDRGLTTIIDLWPEEPMTVATVRF 231
Pde: FSVTLRDAGQIALIDGTYEIKSVLDTGYAVHISRMSASGRYLVIGRDGKVNMDLWMKEPATVAEIKI 267

* * * * *

Pae: GIEARSVESKFKGYEDRYT IAGAYWPQFAIMDGETLEPKQIVSTRGMTVDVTQYHPEPRVAAI IASHE 315
Pst: GSDMRSVDVSKFEGYEDKYLIGGTWYPQYSIVDGLTLEPKVIVSTRGQTVDEG-YHPEPRVASIVASHI 300
Pde: GSEARSSETSMEGWEDKYA IAGAYWPQYVIMDGETLEPMKIQSTRGMIYDEQEYHPEPRVAAILASHY 337

* * * * *

Pae: HPEFIVNVKETGKVLVNYKIDIDNLTVTSIGAAPFLHDGGWDSHRYFMTAANNNSNKVAVIDSKDRRLSA 385
Pst: KPEWVNVKETGQIILVDYD LKNLKTIT IESAKFLHDGGWDYSKRYFMVAANASNKVAAVDTKTGKLA 370
Pde: RPEFIVNVKETGKILLVDYD LKNLKTTEIEAERFLHDGGLDGSHRYFITAAANRNKLVVIDTKEGKLV 407

* * * * *

Pae: LVDV-GKTPHPGRGANFVHPKYPVWSTSHLGDGSI SLIGT----DPKNHPQYAWKVAELQGGGGSL 449
Pst: LID-TAKIPHPGRGANFVHPQFGP VWSTGHLGDDVSLISTPSEESKYAKYKEHNWVQELKMPGAGNL 439
Pde: IEDTGGQTPHPGRGANFVHP TFGPVWATSHMGDDSV ALIGT----DPEGHPDNAWKILDSFPALGGGSL 472

* * * * *

Pae: FIKTHPKSSHLYVDTTFNPDARISQSVAVFDLKNL---DA--KYQVLP IAEWADLGE GAKRVVQPEYNKR 514
Pst: FVKTHPKSKHFWADAPMNPEREVAESVYVDFMNDLSKAP IQ--LNVAKDSGLPE-SKAIRRAVQPEYNKA 506
Pde: FIKTHPNSQYLYVDATLNPEAEISGSVAVFDTKAMTGDGSDPEFKTLP IAEWAGIAEGQPRVVQGEFNKD 542

* * * * *

Pae: GDEVVFSVWNGKNDSSALVVDDKTMKLVKAVVDKPRITPTGKFNVYNTQHDVY 568
Pst: GDEVVISLWGGTKDQSAIVIYDDKTLKLRVITDPAVVTPTGKFNVNTMNDVY 560
Pde: GTEVWFVSWNGKDQESALVVVDDKTLKLVKIDERLVPTGKFNVYNTMTDTY 596

```

Fig.2-3. *nirS*遺伝子産物の比較

Pae: *Pseudomonas aeruginosa*, Pst: *Pseudomonas stutzeri*, Pde: *Paracoccus denitrificans*.
 3株で共通したアミノ酸残基は*で示した。下線で示した配列はheme c結合部位である。

*nirS*のすぐ後ろにあり、その後ろにmono-hemeのチトクロム *c* をコードする遺伝子 *nirC* が存在する。その後ろにある遺伝子は、粗アータから判断して、*Pa. denitrificans* の *nirF* と非常に類似していた。*P. fluorescens* の塩基配列は公表されていないが、この菌では *P. aeruginosa* と同様に *nirSMC* の順で並んでいる [75]。

なお、*c* 型チトクロムをコードする遺伝子はすべてペリプラズム分泌用のシグナル配列をコードしていた。

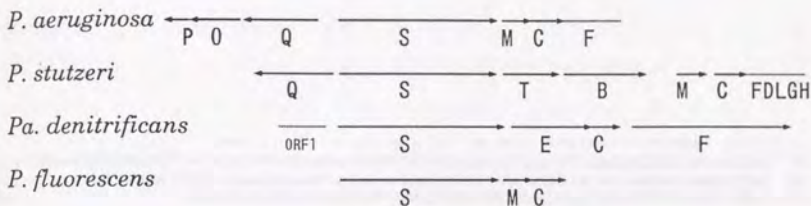


Fig.2-4. *nir*遺伝子構造の比較

各菌の *nirM*, *nirC* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列を比較した結果を Fig.2-5、Fig.2-6 にそれぞれ示した。

P. aeruginosa と *P. stutzeri* の *nirS* 上流には、逆転写方向に、ATP結合タンパクをコードする遺伝子 *nirQ* が存在する [65,87] (第4章参照)。*Pa. denitrificans* でも、逆向きに転写される遺伝子が存在するが (ORF1)、*nirQ* との相同性は全くなかった。この遺伝子の N 末部分の翻訳配列をタンパク質データベースでホモロジー検索したところ、興味深いことに、*P. stutzeri* の *nosR* の N 末部分と若干の相同性 (24.8%) があつた (Fig.2-7)。*nosR* は亜酸化窒素還元酵素遺伝子 *nosZ* の転写調節因子で、*nosZ* の上流に同一転写方向に存在する [88]。この配置は、*nos* 遺伝子がクローニングされている *P. aeruginosa*, *A. eutrophus*, *Pa. denitrificans* ですべて同じである [36,38]。*Pa. denitrificans* の *nosR* は 3' 末端部分の配列しか報告されていないので、今の段階では ORF1 が *nosR* と断定することは出来ないが、もしそうなら、この菌では *nir* 領域と *nos* 領域が隣接していることになる。

Pae:	MKPYALLSLLA-TGTLLAQAWAEDPEVLFKNGKCVACHAIDTKMVGPAYKDVAAKFAGQ	59
	...*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.	
Pst:	MKKILIPMLALGGALAMPALAQDGEALFKSKPCAACHSVDTKMVGPALKEVAAKNAGV	59
Pae:	AGAEAEALQRIKNGSQGVWGP IPMPNNAVSDDEAQTAKWVLSQK	104
	..*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.	
Pst:	EGAADTLALHIKNGSQGVWGP IPMPNPFVTEEEAKILAEWVLSLK	104

Fig.2-5. *nirM*遺伝子産物の比較

Pae; *Pseudomonas aeruginosa*, Pst; *P. stutzeri*.

*は同一のアミノ酸、ピリオドは類似のアミノ酸を示す。下線で示した配列はheme c結合部位である。

	***	* * * * *	*****	*****	*
Pae:	MNAPDFRRAASHALWLALALTFACPLPGLADEHPDARRQAQLRHLQLDQCGSCHGLRLTGGLGPAITPE	70			
Pst:	MTVARHAVSRLGLALASFLLFPLALAAPAAERQATLDHLLQDCGSCHGLRMTGGLGPALTRE	64			
Pde:	MARLALLVLLAGTAVAGPPDAARQDELRLHLVQRDCGSCHGLRMTGGLGRPIAA	55			
	***	*	* * * * *	* * *	
Pae:	ALRGKPRESLVATVLMGRPQTFMPPWAGLLSEDDAGWLVDRLEGEIAP	119			
Pst:	ALAGKPRDSLIATVTHGRPGTAMPGWNALLDEQDIAYLVRLLLEGYKPK	113			
Pde:	ALAGRDVEDLSDVILDGMPTAMPGWRPLLTEDDARWIADYLLKTETE	103			

Fig.2-6. *nirC*遺伝子産物の比較

Pae; *Pseudomonas aeruginosa*, Pst; *Pseudomonas stutzeri*, Pde; *Paracoccus denitrificans*.

3株で共通したアミノ酸残基は*で示した。下線で示した配列はheme c結合部位である。

Fde:	MAMPGKSHAPSRLLALLTLILLALPARPEPLAAPDAALAQAALFGADGP-VVLDRRREPVPVWGVS RDGRMLGV	74
	..*.*.*..*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.	
Pst:	MASREINSLAGTFTSTWVKGPFILLLLSVCASSLQAEYAAEQQLDKFFPGASLSAAEGDYQVRTITKGEVLGY	75
Fde:	IGSTWEIAATTGYSKPLDVLVAVTPQGVIAGARLVQTEPVLSLGISEAHIAAYVDGFRGV DLSQGG	143
	..*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.	
Pst:	AFQSIRVTDMPAYS GKP INMQILLDEPGVIVDAYMLEHHEP IVLIGIPEQKVHDFNANYSGIHVDQRVVGRSSD	150

Fig.2-7. *Paracoccus denitrificans* ORF1 (Pde)と *Pseudomonas stutzeri nosR* (Pst) 遺伝子産物の比較 (N末部分配列)

*は同一のアミノ酸、ピリオドは類似のアミノ酸を示す。

第5節 考察

本章では、亜硝酸還元酵素とその生理的電子供与体チトクロム*c*-551の遺伝子が*nirS*上流にあるプロモーターから、嫌氣的条件下でのみ発現されることを明らかにした。この結果から、チトクロム*c*-551が好気呼吸のチトクロム酸化酵素への生理的電子供与体ではないことが決定づけられた[59]。なお、好気呼吸鎖電子伝達系のコンポーネントであるチトクロム*c* (cytochrome *c*-550)は最近になって精製されている[89,90]。

*P. aeruginosa*のNIRはチトクロム*c*-551だけでなく、青色銅タンパク質アズリンも酸化することができ[79,91]、3者の電子伝達機構にも興味を持たれている[23,54,92]。アズリンとチトクロム*c*-551は相互交換可能なNIRへの電子伝達体と考えられていたこともある(Fig.1-3 参照)[23]。しかし、クローニングされたアズリン遺伝子は本研究でクローニングした約24kbの領域中にはなく[93,94]、嫌氣条件下で誘導されるプロモーターだけでなく、好気条件下でも転写されるプロモーター活性も強い[94,95]、アズリンの生理的役割は脱窒、あるいは亜硝酸呼吸とは別のところにあるのかも知れない。なお、銅型のNIRの生理的電子供与体はアズリンに類似の青色銅タンパクであり[96,97]、銅タンパクは銅タンパク同士、ヘムタンパクはヘムタンパク同士の電子伝達になっているようである。

*nir*遺伝子サブクラスターの構成は、*P. aeruginosa*と*P. stutzeri*で、*nirT*、*nirB*が余分に入っている点をのぞいては、非常によく似ている。*P. aeruginosa*の*nirCF*下流域にも、*P. stutzeri*に存在する遺伝子がおそらく存在するであろう。*Pa. denitrificans*の遺伝子構成は*P. aeruginosa*、*P. stutzeri*とは若干異なっていた。機能不明の*nirC*、*nirF*が共通して存在するにも関わらず、NIRの電子供与体の遺伝子*nirM*がここに存在しないことは意外であった。また、S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III methyltransferaseと相同なタンパク質をコードする遺伝子*nirE*はこの菌にしか見られない。今後は、今のところ機能不明な遺伝子産物の生理的役割を解明することによって、脱窒、特に亜硝酸呼吸の反応機構に関する理解が深まることを期待する。

第3章 一酸化窒素還元酵素関連遺伝子の構造

第1節 序

一酸化窒素(NO)は、1987年以来、マクロファージなどの免疫担当細胞、血管内皮細胞や中枢-末梢神経細胞などで、広範に重要な生理作用を示すことが次々に発見されている[98]。1992年にはScience誌の“The Molecule of the year”に選ばれるなど、現在、医学・生化学分野で最も注目を集めている生理活性物質である[99]。動物ではこのような生理作用が発見される前は、NOは単なる毒性の化合物として扱われていたのであるが、細菌ではNOが嫌気呼吸（異化型硝酸呼吸）の基質として働くことが知られていた。特に、NOの還元ともなって水素イオンの排出が起こることが観察されており[100]、酸化的リン酸化に必要なプロトン濃度勾配の形成という脱窒の呼吸としての機能に対して、NO還元反応が中心的役割を果たしていると考えられる[11,12]。さらに、一酸化窒素還元酵素(NOR)の構造が、蛋白的、遺伝学的に解明されるに従い、これがミトコンドリアの好気呼吸につながるエネルギー獲得形態の進化的な起源である可能性も指摘され始めている[77,101]。

NOは脱窒の中間体として40年ほど前から観察されていたが[102]、これが脱窒の絶対的な反応中間体であるか、単なる副産物であるのかについては長い間不明であった。その理由として、亜硝酸(NO_2^-)、亜酸化窒素(N_2O)は脱窒菌の培養の際に一時的な蓄積が見られるのに対して、NOは非常に微量にしか検出されないことや、どの脱窒菌もNOのみを基質としては生育できないことなどがあげられる。しかし、最近になって、亜硝酸還元酵素(NIR)遺伝子の変異株でも亜酸化窒素を生成するNO還元活性があること[74,75,103]、精製NIRの主要な反応生成物がNOであって、亜酸化窒素は少量しか検出されず、これはNOから非酵素的に生成したものと考えられたこと[68,104,105]、さらに、NOR酵素タンパクの本体が精製され[69-71,106]、NOR遺伝子欠損株がNOを蓄積することが確認されるに至り[107]、NOが絶対的な反応中間体であることが明らかとなった[11,12]。脱窒過程でNOが遊離されてこないのは、高い毒性のあるNOの蓄積を防ぐために必要なことである。これは、NORがNIRに比べて K_m が低く、 V_{max} が高いという酵素自体の性質に加えて[12]、NIRとNORの活性が協調して発現しているためと考えられる[32]。

脱窒菌でNOR酵素本体が単離、精製されているのは、現在のところ、*Paracoccus*

denitrificans[68-70], *Pseudomonas stutzeri*[71]と *Achromobacter cycloclastes*[106]のみである。これらはいずれも膜結合型のチトクロム *b c* 複合体であり、SDS-PAGE上での分子量は、cytochrome *c* subunitが17-18kDa、cytochrome *b* subunitが37-38kDaであった。*Pa. denitrificans*と *P. stutzeri*はチトクロム *cd*型のNIRを持ち、*A. cycloclastes*のNIRは銅型であるが(Table 2 参照)、NORのタイプはNIRの違いによらず同一であった。なお、*Fusarium oxysporum*などのかびでも脱窒するものが発見されているが[5]、かびのNORはチトクロム P-450であって、細菌由来のものとは全く違うタイプであった[108]。

脱窒菌のNORの遺伝子は、これまでのところ *P. stutzeri*由来のものと、本研究の *P. aeruginosa*由来のものしか報告されていない[32,35]。*P. stutzeri*ではNOR遺伝子はNIR遺伝子(Fig.1-11 参照)の下流域に同一転写方向で存在し、cytochrome *c* subunit (*norC*)、cytochrome *b* subunit (*norB*)の順で並んでいるのに対して[72]、*P. aeruginosa*でも *norC*、*norB*の順にオペロンになっているが、NIR遺伝子の上流域に逆方向に存在し、*P. stutzeri*とは配置が異なっていた(Fig.1-7 参照)。

本章では、*nor*オペロンの遺伝子産物の特徴、遺伝子変異の嫌氣的生育への影響を調べた。

第2節 翻訳アミノ酸配列の特徴とホモロジー比較

脱窒菌の一酸化窒素還元酵素(NOR)は膜結合型のチトクロム *b c* 複合体であって、*norC*がcytochrome *c* subunit、*norB*がcytochrome *b* subunitの構造遺伝子である。

*norC*の遺伝子産物は146アミノ酸残基で、heme *c*の結合配列(CXXCH)があり、*P. stutzeri*のものとは80.8%の相同性があった(Fig.3-1)。

*norB*は翻訳開始点にATGが2つ並んでいて、その上流にあるAG-richな部分はどちらのATGに対してもSD配列となり得るので、どちらが開始コドンとして働くかは配列の上からだけではわからず、465か466アミノ酸残基のタンパク質をコードしている(Fig.1-9 参照)。*P. stutzeri*のNorBとの相同性は81.5%であった(Fig.3-2)。また、NorBはFixN複合体の主要なsubunitである *fixN*遺伝子産物とわずかに相同性を示す[77,101]。FixN oxidaseは *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pa. denitrificans*などから最近発見された酸素濃度が低くなると誘導されてくるチトクロム酸化酵素で、酸素に対するアフィニティーが非常に高く、低酸素濃度環境下に適応した性質を持つ[77,109]。このため、FixN oxidaseは大気中の酸素濃度が低かった時代の古い形質を残しているものと考

```

Pae MSETFTKGMARNIYFGGSVFFILLFLALTYHTEKTLPERTNEAAMSAAVVRGKLVWEQNNCGCHTLLGEGA 72
*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
Pst MSETFTKGMARNIYFGGSVFFLVFLGLTYHTTEQTFPERTNESEMTEAVVRGKEVWENNCCIGCHSLLGEGA 72

YFAPELGNVVRGRGEGFNFLQAWMNIQPLNVPGRRRAMPQFHLESEGQVDDLAEFLKWSSKIDTNQWPPNKEG 146
*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
YFAPELGNVVRGRGEGETFKPFLHAWMKAQPLGAPGRRRAMPQFNLSEQQVDDMAEFLKWTSKIDTNQWPPNKEG 146

```

Fig.3-1. *norC*遺伝子産物の比較

Pae; *Pseudomonas aeruginosa*, Pst; *P. stutzeri*.
 *は同一のアミノ酸、ピリオドは類似のアミノ酸を示す。下線で示した配列はheme c結合部位である。

```

* * * * *
Pae MMSPNGSLKFFASQAVAKPYFVFALILFVQGILFGLIMGLQYVVGDFLF--PAIPFNVARMVHTNLLIVWLLF 70
Pst MSSFNPHLKFQSQAVAKPYFVFALILFVQGVLFGILMGLQYVVGDFLF--PLLPFNVARMVHTNLLIVWLLF 70
Bja PAEINGRPNYMGPIKFFSSFM-AMFWGIAGFLVGLIIASQLAWPALNFOLDPWFISFGRLRPLHSTSAVIFAFGG 141

* * * * *
GFMGAAAYLVPEESDCELYSPKLAWLIFWVFAAGVLTILGYLLVPYAGLARLTGNELWFTMGREFLEQPTISKA 145
GFMGAAAYLVPEESDCELYSPKLAWLIFWVFAAGVLTILGYLVFPYAALAEMLTRNDLLPTMGREFLEQPTITKI 145
NVLIATSPFYVQKSCRV----RLAGDLAPWVWVGYNFFILVAGTGYLLGV-----TQSKYEAPEPEWYADL 203

* * * * *
GIVIVALGFLFNVTGLRGRKTAISMVMTGLIGLALLFLFSFYNPENLTR-----DKFYWWWV 205
GIVIVALGFLYINIGMTLKRKTVVSTVMMTGLIGLAVFFLFAFYNPENLSR-----DKFYWVWV 205
WLTIVVWVYLLVFLATIIRKKEPHIFVANWFYLAIVTIAVHLGNNPALPVSAFGSKSVAVAGGIQDAMPQWVY 278

* * * * *
VHLWVEGVWELIMGALFVLVKIVGVDR-EVIEKWLYVIIAMALISGIIGTGHYFPWIGVPGYWLWLGVSFVSAL 279
VHLWVEGVWELIMGAMFVLIKVTGVDR-EVIEKWLYVIIAMALITGIIGTGHYFPWIGAPTIVLWVGSIFPSAL 279
GHNVAVGFFLTAGFLAIMYFIPKRA--ERP IYSYRLSIIHFWALIFLYIWAGPHHLHYTALPDWQTGLMTGFSIM 351

* * * * *
EPLPFFAMVLFANFTINRRRRRDPYPRNAVALWAMGTTVMVAFVGAGVW-GFMHTLAPVNYTHGTQTLTAAGHMAF 353
EPLPFFAMVLFALNMVN--RRRREHPNKAASLWAGTTVTAFLGAGVW-GFMHTLAPVNYTHGSQLTAAGHMLAF 352
LWVSWGGMINGL-MTL-SGAWDKLRDPVLRMLVSV-AFYGMSTFEGPMMSIKVNVSLSHYTDWTLIGVHSGA 423

* * * * *
YGAYAMIVMTIISYAMPRLRIGIEMDNRSQVLEMWGFVWMTVAVMVFITLFLSAGVQLVQLRMPADGAAM--T 426
YGAYAMIVMTIISYAMPRLRGLGEAPDARAQRIEYVWGFVWMTISMAIATLFLTAAAGVQIWLQRIPADGAAM--S 425
LGWGFVFSFGALYCLVPAW---NRKGLYSKLVNWHFVAVTLGIVLYISAMWVSGILQGLMWRAYTSLGFLFYS 495

* * * * *
FMATQDQLAIFYWLREGAGVVFLLGLVAYLLSFR-RGKAAA 466
FMNTADQLAIFWFLRF IAGVFLLGLVCLYSFRQRGRVPPVVAAPAAA 474
FIETVEAMHFFYIIRAAGGGLFLIGALIMAYNLWMTVRVGEAEVQMPVALQPAE 549

```

Fig.3-2. *norB*遺伝子産物とFixNの比較

Pae; *Pseudomonas aeruginosa* NorB, Pst; *P. stutzeri* NorB, Bja; *Bradyrhizobium japonicum* FixN. *は共通したアミノ酸残基を示す。太く示したMet残基はCOI, FixNで保存されているリガンドである。

えられている[77,110]。FixNは酸素還元酵素活性中心を持つサブユニットで、一般的なチトクロム酸化酵素のsubunit I (COI)と相同性がある。COIでヘムと銅(CuB)の結合のリガンドとなる6個のヒスチジン残基はFixNでも保存されている。精製したNORは、複合体当たり2個のヘムしか検出されておらず、NorBにはheme *b*が一個ついているだけと考えられていたが、6個のヒスチジンリガンドは*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*の両方のNorBともに保存されていたため(Fig.3-2)、精製の過程で金属がはずれた可能性も否定できない[101]。Saraste等はこの様な類似性から、NORが大気中に酸素が存在しないときの原始的な呼吸酵素で、酸素ガス濃度の増加につれてFixN oxidase, cytochrome oxidaseへと進化していったという説を唱えている(Fig.3-3)。脱窒が好気呼吸の起源であるという説を支持するもう一つの類似性は、亜酸化窒素還元酵素(NOS)とcytochrome oxidaseのsubunit II (COII)とに見られる。NOSの可視、EPRスペクトルはCOIIのものと非常によく似ており、COIIのCuA結合配列がNOSでも保存されている[36,111]。このbinuclear copper centerを持つ酵素はCOHとNOSしか知られていない。なお、筆者により発見された脱窒と酸素呼吸の進化的な関連を示す第3の類似性[65]については第4章で述べる。

*norCB*の下流には比較的大型のタンパク質(612アミノ酸残基)をコードする遺伝子*norA*がある。*P. stutzeri*でも*norCB*の下流には何らかの遺伝子があり(ORF3)、5'の部分配列が報告されている[32]。N末部分の翻訳配列を比較してみると、64.3%と比較的相同性が高く、これもNO還元に対して何かの機能を持っている可能性が高いと考えられる(Fig.3-4)。*norA*の翻訳配列を、DDBJ FASTA e-mail serverでタンパク質データベース(SwissProt rel.28, PIR rel.41)に対しホモロジー検索したところ、*P. stutzeri*のORF3以外には有為なホモロジーを示すものは存在しなかった。

第3節 *norCBA*遺伝子産物のハイドロパシー

Fig.3-5に*nor*遺伝子の翻訳アミノ酸配列のハイドロパシープロットの結果を示す。プロットの作製に当たっては、Genetyx (Software Development Co.)のプログラムで、Kyte and Doolittleのパラメーター[112]を用いた。

NORのcytochrome *c* subunit (NorC)は、N末に疎水性の領域があり、ここで細胞膜とcytochrome *b* subunit (NorB)へ結合をし、親水性のC末部分がペリプラズム側にあると考えられる。NorBは非常に疎水性が高く、膜を貫通する疎水性領域が12個存在した。このようなハイドロパシーの特徴は、*P. stutzeri*で推定されているNORの構造[11]とよく一

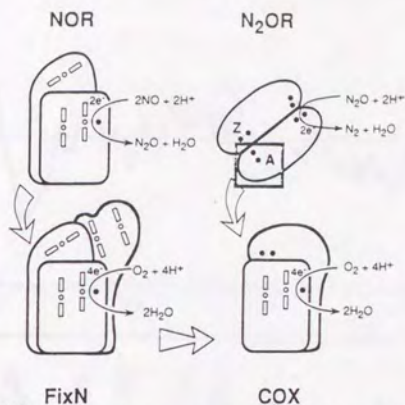


Fig.3-3. [77] The proposed evolutionary history of cytochrome oxidase. The first oxidase (FixN) developed from nitric oxide reductase. This adaptation may have required a change in the affinity of the iron/copper active site for NO and O₂. The mitochondrial-type cytochrome c oxidase (COX) evolved from the FixN complex which lost the cytochrome c domains and acquired the Cu₂-binding domain from the N₂OR lineage. A and Z refer, respectively, to the electron acceptor and active site in N₂OR. The reactions catalysed by the four enzymes are shown. Each enzyme may use cytochrome c as electron donor. Haem irons are shown with open circles and coppers with filled circles.

```

Pae MAFAVELEEWVGAHWHRFITRHSAGFEFAARVTLESRRPLGMLFRALGGAPGVALEATPARRLLLRRTWLQ 72
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Pst MAFTIEVEEWVGSVWHRFITRRASPDFPEARVLESMQRSLSLMFRAMGGASGVGVEAASARDLVLRNLLQ 72

RVAGTCEQAPVSWFNGLSLRLESLAVYPQAEINRELYRWLALLAASAGPLRH 125
   . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
QVAGTCMQLPVAWCDSNLRQLQSLAVYPEVSLNQDLYRWLAL 115
  
```

Fig.3-4. *norA*遺伝子産物の比較

Pae; *Pseudomonas aeruginosa*, Pst; *P. stutzeri* (ORF3)
 *は同一のアミノ酸、ピリオドは類似のアミノ酸を示す。

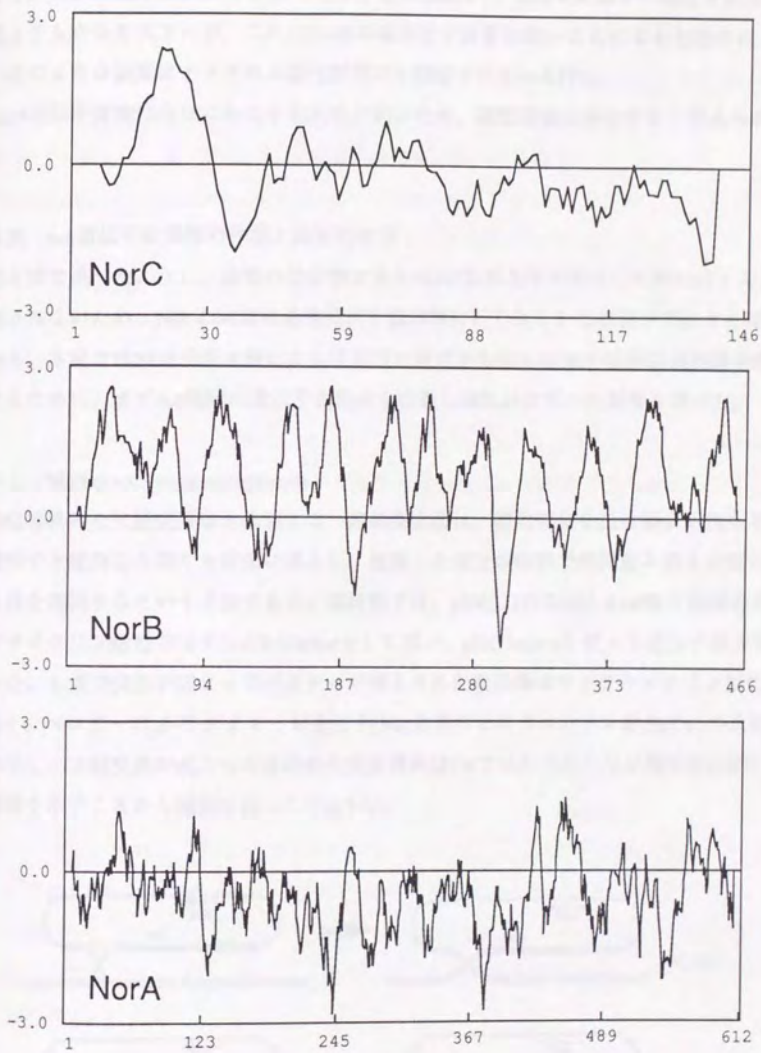


Fig.3-5. Hydropathy profiles of the *norC*, *norB* and *norA* gene products. Analyses were done by Genetyx program with the algorithm of Kyte and Doolittle [112]. Range to average was 15.

致した。NorBの翻訳配列から計算した分子量は52kDaで、SDS-PAGEから推定される分子量よりもかなり大きい、これはNorBの疎水性が非常に高いことによると思われる。このような現象はチトクロム酸化酵素でも観察されている[77]。

*norA*遺伝子産物は全体にわたり親水性が高いため、細胞質側に存在すると考えられる。

第4節 *nor*遺伝子変異株の作製と嫌氣的生育

第1節で述べたように、毒性の化合物であるNOは脱窒条件で培養した際にほとんど遊離されないため、NIRとNORの活性発現を協調的に行う何らかの機構が存在するはずである。本節ではNOR活性欠損による表現型の変化からNIR-NORの協調発現機構を解明するために、まず*nor*領域の遺伝子変異株を作製し嫌氣的生育への影響を調べた。

4-1 Marker exchange mutagenesis

部位特異的な欠損変異株を作製する一般的な方法は、標的部分を抗生物質耐性などの遺伝子と置換した断片を菌体に導入し、置換した部分の両側で相同組み換えが起こった株を選択するという手法である。本研究では、pBR322のEcoRI-AvaI断片由来のテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet*)をMarkerとして用い、pUC vectorを使って遺伝子導入を行った。1点で交差が起こってベクターが挿入された変異株はテトラサイクリン耐性(Tc^r)と、ベクターのβ-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*)由来のカルベニシリン耐性(Cb^r)の表現型を示し、2回交差が起こった目的の欠損変異株はTc^rでカルベニシリン感受性(Cb^s)の表現型を示すことから選別を行った(Fig.3-6)。

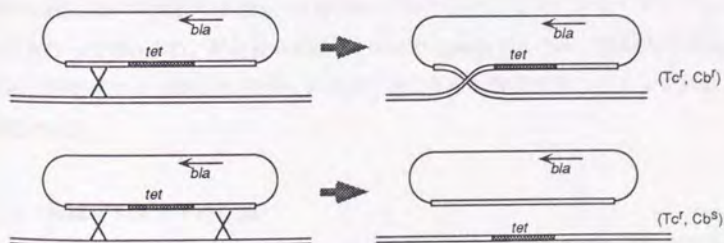


Fig.3-6. Marker exchange mutagenesisの模式図

4-2 変異株の作製

norCB, *norCBA*および*norA*のみに変異が入るようにテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet*)を置換、あるいは挿入した断片をpUC119上に構築したプラスミド(pHA476, 495, 496)を作製し(Fig.3-7)、pHA476についてはElectroporationで、pHA495, 496についてはMgCl₂で処理したCompetent cellを用いて*P. aeruginosa*の野生株PAO1に導入した。

ElectroporationにはCell-Porator (BRL Life Technologies)を用いた。

Competent cellは、2×YT培地[44]で、37°C、約2時間培養した菌体を集菌し、1/2 volのbuffer (100mM MgCl₂, 10mM Tris, pH7.5)に懸濁し氷上で30分放置後、集菌し1/10 volのbufferに懸濁したものをを用いた。この懸濁液100μlに、約10μgのプラスミドDNAを加え氷上に4時間放置後、45°Cで2分間熱処理、2分間氷冷した後、1mlのL-brothに懸濁して37°Cで一晩振とう培養してから、175μg/mlのテトラサイクリン入りのL-plateにplatingした。出現したTc^rのコロニーについて、カルベニシリン200μg/mlを含むL-plateに植え継ぎ、Cb^rの変異株を選抜した。変異株は以下のような頻度で得られた。なお、Tc^r株は10⁹~10¹⁰の確率で出現した。

プラスミド	Cb ^r コロニー/Tc ^r コロニー
pHA476	3/17
pHA495	4/5
pHA496	2/18

得られたTc^r,Cb^rの変異株について、それぞれ1株選択し、RM476, RM495, RM496と名付けた。

RM476についてはその染色体DNAを抽出し、*SphI*分解物に対して*tet*遺伝子(A)および*norB*中の約1.1kbの*Psd*断片(B)(Fig.3-7参照)をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った(Fig.3-8)。野生株のPAO1についてはprobe Bとのみ、RM476ではprobe Aとのみ、予想される位置にハイブリダイズしたことから変異が正しく入っていることが確認できた。

4-3 相補プラスミドの作製

*nor*遺伝子変異を相補するように、*norCBA*までと、*norCB*のみを含む断片を広宿主域の発現ベクター-pMMB67HE[113]に入れたプラスミド(pHA493, pHA494)を構築した。

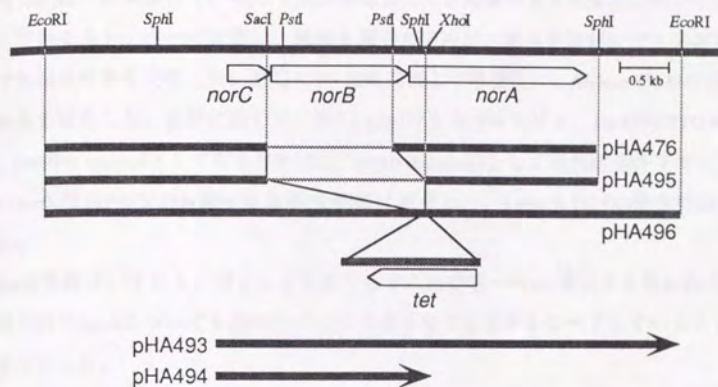


Fig.3-7. *nor*変異株作製用および相補用プラスミド

pHA476: *EcoRI*～*SphI*断片をpUC119の*EcoRI*-*SphI* siteに導入してから、*norC*の3'末端と*norB*の5'部分を含む*SacI*～*PstI*領域を切り出し、*tet* geneと交換した。*tet* geneはpBR322の*EcoRI*-*AvaI*断片を末端平滑化してからpUC119の*HincII* siteに入れたもの(pUC119-*tet*)から、*SacI*, *PstI*で切り出して使用した。

pHA495: pHA476から*norB*の3'から*norA*の5'部分を含む*PstI*-*XhoI*断片を切り出し、再結合した。

pHA496: pHA-E1 (Fig.1-7)を*XhoI*で切断し、末端平滑化して*tet* geneを挿入した。*tet*断片はpUC119-*tet*から*PstI*, *XbaI*で切り出し末端平滑化したものを用いた。

pHA493: *norCBA*を含む*HinI*から*EcoRI*までの断片をpMMB67HEの*HincII*, *EcoRI* siteに入れた。

pHA494: *norCB*のみを含む*HinI*断片をpMMB67HEの*HincII* siteに入れた。

4-4 変異株の嫌氣的生育

嫌氣培養には、50ml (70ml容)の密閉バイアル瓶を使用し、0.5%のNaNO₃を含む2×YT培地15mlに、好気条件でL-brothで試験管培養した前培養液を1%植菌してからブチル栓、アルミストッパーで密閉し、綿栓を通したアルゴンガスを注射針で5分間吹き込んで気相のガスを交換した。37°Cで14-15時間振とう培養後に、660nmのODの変化から生育量を推定した。必要に応じて、200 μg/mlのカルベニシリン、1mMのIPTGを添加した。positive controlとして野生株PAO1、negative controlとして嫌氣的条件下で生育できない*anr*欠損株PAO6261(第6章参照)を同時に培養した。Table 3-1にOD測定の結果を示した。

*nor*変異株はいずれも、ほとんど生育できずこれが唯一の*nor*遺伝子と思われた。また機能不明の*norA*についても嫌氣的生育に必要な不可欠な因子をコードしていることが明らかとなった。

*P. stutzeri*では、ノーザン解析の結果から*norCB*は約2kbのmRNAとして転写され、*norA*に相当するORF3は別の転写単位と推定されている[32]。*P. stutzeri*では*norB-norA*(ORF3)間は82bp離れているのに対して、*P. aeruginosa*では1bpしか離れていないので、この菌では同一の転写単位になっていると考えられる。*norCBA*がオベロンを形成していることは、RM476に*norCBA*(pHA493)を相補した際には、生育速度が遅いものの、IPTGに依存した生育の回復が見られ、*norCB*(pHA494)のみでは生育は回復しなかったことから確認できた(Table 3-1)。

なお、作製した変異株の好気条件での生育は、いずれも野生株との差異は見られなかった。

第5節 考察

一酸化窒素還元酵素(NOR)は、その構造と性質が解明されるにつれ、呼吸としての脱窒作用の中でおそらく最も重要な酵素であると考えられるようになってきている[11,12]。しかし、最近になって酵素本体の精製が行われるまではNORの存在自体はっきりしてはいなかった。NORに関する研究が遅れてきた理由は、NO自体が非常に不安定で、酸素に触れることによって容易にNO₂に酸化されてしまうことに加えて、NOR酵素が膜に非常に強く結合したタンパク質であり、精製が困難であったためと思われる。*P. stutzeri*においてNORの一次構造が初めて決定されるまでには長い年月がかかっている

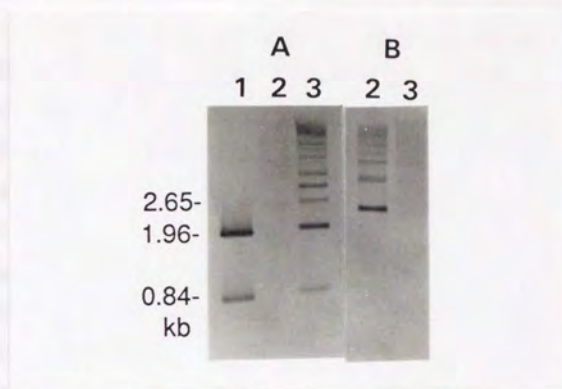


Fig.3-8. サザンハイブリダイゼーションによる変異の確認

1; pHA476, 2; PAO1 chrDNA, 3; RM476 chrDNA. *Sph*I処理後電気泳動した。

A; *tet* gene (pBR322のEcoRI-AvaI断片)をプローブとしたもの。B; *norB* (1.1kb *Pst*I断片)をプローブとしたもの。

Table 3-1. *nor*変異株の嫌気条件下での生育

Strains [genotype]	IPTG (1 mM)	OD660
PAO1 [wild]	-	1.56
PAO6261 [<i>anr</i>]	-	0.06
RM476 [<i>norCB</i>]	-	0.08
RM495 [<i>norCBA</i>]	-	0.09
RM496 [<i>norA</i>]	-	0.08
RM476 (pHA493)	-	0.11
	+	0.30
RM476 (pHA494)	-	0.06
	+	0.04

が、本研究では逆遺伝学的にNORの一次配列を容易に決定できた。これは*nor*遺伝子構造を明らかにした2番目の例であり、今のところ、この2種以外の菌でのNOR構造は解明されていない。

NORの一次配列の解析から、この酵素の特にcytochrome *b* subunitが好気呼吸のチトクロム酸化酵素の進化的起源であるという可能性が指摘されている[77,110]。少なくとも、NORと好気呼吸酵素とは、大気中に酸素が存在していなかった時代の原始的な嫌気呼吸酵素から進化・分化していったことは間違いないと考えられる。NORとチトクロム酸化酵素の構造、機能の類似性の解析から、酸化的リン酸化によるエネルギー獲得系に関する新たな知見が得られるかもしれない。

本章で*nor*変異株を作製した本来の目的は、NIRとNORの酵素活性が協調して発現する機構を解明するためにNOR欠損株でのNIR活性の変化を調べることと、*norA*欠損株でのNOR活性等の変化からその役割を解明することである。現時点では変異株の嫌気条件下での生育の有無までしか調べられなかったが、その結果、*norA*も嫌気（脱窒）条件下での生育に必須であることが明らかになった。精製酵素はNorBとNorCだけで*in vitro*での一酸化窒素還元活性があるので、*norA*遺伝子産物は生理的条件下での活性発現か酵素活性以外の何らかの機能を担っているであろう。

現在、予備的な実験では、*nor*変異株では培地中に添加した硝酸が定量的に亜硝酸に変換されていることを確認しており、NOR変異によって*in vivo*でのNIR活性も失活していると考えられる。NIR、NORなどの脱窒関連酵素は、嫌気的条件下で誘導されてくる酵素であるが[25,59,114]、*nor*遺伝子欠損株は嫌気的条件下では生育できない。今後NIR-NORの活性相関等を調べるためには、好気呼吸による生育が可能だが、脱窒遺伝子のプロモーターが充分働くような低通気での安定した発現条件を確立することがブレイクスルーすべき問題として残っている。また、各酵素の抗体を作製して、酵素タンパクの発現量と活性の強さの関係や、*in vivo*と*in vitro*の活性の差異などを調べるような実験が今後の課題であると考えられる。

第4章 *nirQ*オペロンの構造と機能

第1節 序

一酸化窒素(NO)は脱窒反応の中間体であるが、遊離の中間体としてはごく微量しか検出されない。これは、NOを生成する亜硝酸還元酵素(NIR)とNOを還元除去する一酸化窒素還元酵素(NOR)の反応が密接に連動しているためと考えられている[11,12]。このようにNIR-NOR反応を協調発現させるのは、毒性のNOを遊離しないことに加えて、ATPの生産とカップリングできる酸化還元エネルギーを得るためにも必要であるともいわれている[3]。脱窒菌の一酸化窒素還元酵素(NOR)の構造遺伝子 *norCB* は、現在までに *Pseudomonas aeruginosa* と *P. stutzeri* でしか解析されていないが、どちらの菌でも *norCB* はNIRの構造遺伝子 *nirS* の近傍に位置していた[35,74]。染色体上に近接して存在していることも両酵素遺伝子を協調して発現させるために都合がよいのかも知れない。

P. aeruginosa では、*norCB* は *nirS* の上流域に逆の転写方向に存在しており、*nirS-norCB* 間には3つの遺伝子 *nirQOP* が存在している (Fig.1-7 参照)。*nirS* と *nirQ* はプロモーター領域を挟んで互いに逆向きに転写される divergent transcription[64] の構造を取っている。*P. stutzeri* では *norCB* は *nirS* の下流域に存在しているが、やはり *nirS* と *nirQ* が divergent transcription の構造になっている[87]。本章では、*nirQOP* 遺伝子産物の一次構造の特徴から、これらがNIR、NOR酵素の翻訳後の活性化や呼吸酵素複合体の形成などに関与している可能性について考察する。

第2節 *nirQ*オペロンの構造

nirQ は *nirS* とプロモーター領域を挟んで互いに逆向きに転写される形で存在している。*nirS-nirQ* 間には嫌氣的転写活性化に必要な ANR binding site が1つ存在し、両遺伝子ともに嫌気条件下で誘導発現することから、両者の発現量にはある種のバランスを保つ機構が働いていると思われる[65]。*nirQ* は、その下流に存在する *nirO*、*nirP* とオペロンを構成していると考えられるが (Fig.1-8 参照)、これらに相当する遺伝子は今ところ本菌以外では報告されていない。本節ではまず、実際に *nirOP* が *nirS-nirQ* 間のプロモーターに依存して脱窒条件下で *nirQ* と共転写されるかを調べ、これらが脱窒に対して何らかの役割を持つのかどうかについて検討することにした。

pTS1045 (Fig.2-1 参照)[85] よりも高感度な *xyIE* のプロモーター検索ベクター-pHA50

(Fig.4-1)を作製し[60]、これにFig.4-2に示すような*nirQOP*付近の3つの断片を導入したプラスミド(pHA443-445)を作製した。これらで*P. aeruginosa*の野生株PAO1を形質転換し、好気、および嫌気条件下での*xyIE*の遺伝子産物であるカテコール2,3ジオキシゲナーゼ(C23O)の酵素活性からプロモーター活性を測定した(Table 4-1)。培養は100mlの坂口フラスコを用い、好気条件ではL-broth 10ml、嫌気条件では2×YTにNaNO₂を0.05%添加した培地20mlで行った。好気条件には綿栓を用い、嫌気条件の場合は綿栓付きの二方コックを取付け、気相の空気を真空ポンプで吸引してからアルゴンガスで置換した。

好気条件下ではいずれのプラスミドを用いた場合にも活性は検出されなかった。pHA443とpHA444では、嫌気条件で同程度の活性の強さを示したが、pHA445ではほとんど活性はなかった。この結果から、*nirP*までは*nirQ*上流にあるプロモーターの支配を受けて脱窒条件下でのみ発現していることが明らかとなり、*nirOP*は*nirQ*と共に、脱窒反応に対して何らかの役割を担っていることが予想される。

第3節 *nirQOP*遺伝子産物の一次構造とホモロジー解析

3-1 疎水性解析

Fig.4-3に*nirQOP*の翻訳アミノ酸配列のハイドロパシープロットの結果を示す。NirQは全体的に親水性であり、細胞質タンパクであると考えられる。*nirO*と*nirP*の遺伝子産物は疎水性が高く、膜タンパク特有の疎水性領域が見られた。NirOは5回膜を貫通し、NirPは3回膜を貫通するタンパク質であると考えられる。

3-2 *nirQ*遺伝子産物のホモロジー解析

*nirQ*は260アミノ酸、29kDaのタンパク質をコードしており、翻訳アミノ酸配列中にはATP結合のコンセンサス配列(GPXXXGKT)が存在することから、ATP結合タンパクであることが推測される。Jünger and Zumftは、NirQとNtrCタイプの転写調節因子との類似性を指摘しているが[87]、タンパク質全体の相同性は低く、これがNtrCファミリーに属するとは考えにくい。現在までのところ、タンパク質データベース(SwissProt, PIR)上、*nirQ*の翻訳配列と有為な相同性を示す配列は*P. stutzeri*のNirQを除いては存在しない。ところが、偶然にも当研究室で取得された好熱性水素細菌*Pseudomonas hydrogenothermophila* [116]のribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)の

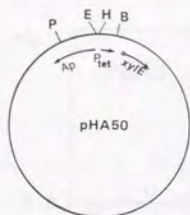


Fig.4-1. *xylE*プロモーター検索ベクター pHA50 pMFY40[115]の *Bam*HI, *Sal*I siteに pTS1045[85]の *xylE*を含む *Bam*HI-*Xho*I断片を導入することによって作製した。
B; *Bam*HI, E; *Eco*RI, H; *Hind*III, P; *Pst*I. P_{tet}; テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター。

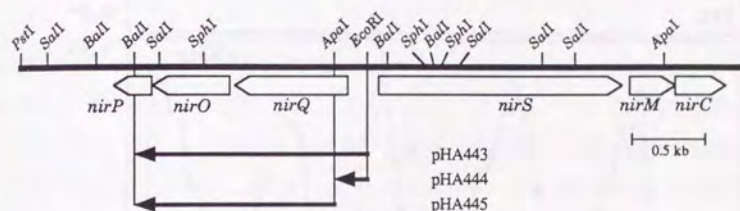


Fig.4-2. *nir*領域の制限酵素地図とプロモーターアッセイに用いたプラスミド
pHA443: *Bcl*I-*Eco*RI断片を末端平滑化してから pUC119の *Xba*I(末端平滑化), *Hinc*II siteに導入し、*Hind*III, *Bam*HIで切り出し、pHA50の *Hind*III-*Bam*HI断片と取り替えた。
pHA444: pHA443を *Apa*I, *Bam*HIで切断し、末端平滑化してから再結合した。
pHA445: pHA443を *Apa*I, *Hind*IIIで切断し、末端平滑化してから再結合した。

Table 4-1. Transcriptional Activity of *nirQOP* in *P. aeruginosa* PAO1 Probed by *xylE* Gene Fusion.

Plasmids	C23O activity (u mg protein)	
	Aerobic ^a	Anaerobic ^b
pHA443	1.78	23.8
pHA444	1.48	26.6
pHA445	1.44	1.18

^a Cells were grown under the highly aerated conditions in LB medium.

^b Cultivation medium was 2 × YT with 0.05% sodium nitrite.

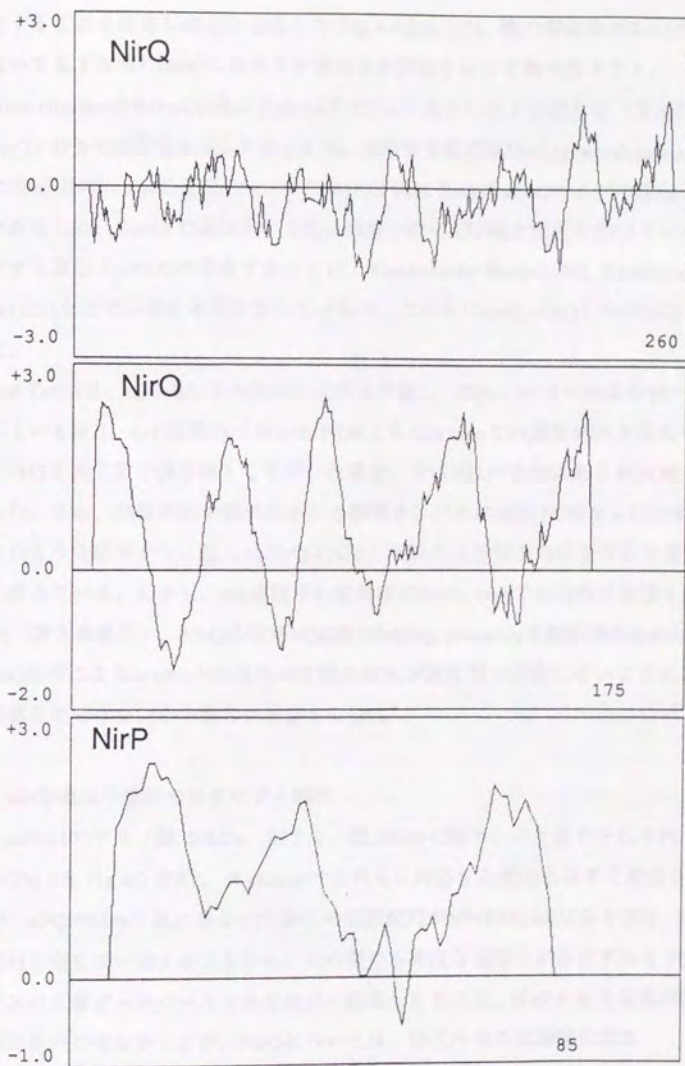


Fig.4-3. Hydropathy profiles of the *nirQ*, *nirO* and *nirP* gene products. Analyses were done by Genetyx program with the algorithm of Kyte and Doolittle [112]. Range to average was 15.

構造遺伝子 *cbbLS* の下流域に *nirQ* と非常に高い相同性(翻訳アミノ酸で53.5%)を示す遺伝子が存在することを発見し *cbbQ* と命名した(Fig.4-4)[65,117]。他の菌由来の RubisCO 遺伝子についても下流域に *cbbQ* に相当する遺伝子が存在するかを調べたところ、*Chromatium vinosum* の RubisCO 遺伝子 *rbcLS* の 153bp 下流から始まる読み枠 (N 末部分) [118] が *nirQ* と 49% の相同性を示した(Fig.4-4)。海洋性水素細菌 *Hydrogenovibrio marinus* MH110 の Form II の RubisCO 遺伝子 (*cbbM*) [119] の下流にも *nirQ*, *cbbQ* タイプの遺伝子らしい配列が存在した。RubisCO 遺伝子の下流に機能不明の ATP 結合配列を持つタンパク質をコードする遺伝子 (*cbbX*) が存在することは、*Xanthobacter flavus* [120], *Alcaligenes eutrophus* [121] など以前から報告されているが、これらは *nirQ*, *cbbQ* との相同性は全くなかった。

Jüngst and Zumft は、*nirQ* 遺伝子の欠損変異株を作製し、NIR と NOR の酵素活性への影響を調べている [87]。*nirQ* 変異株では NIR, NOR とともに *in vivo* での酵素活性が発現せず、*in vitro* (PMS を人工電子供与体として用いた場合) では NIR の活性はあるが NOR の活性はなかった。なお、抗体反応で調べたところ酵素タンパクは NIR, NOR とともに発現していた。このような結果から、彼らは NirQ は NIR と NOR の活性発現の相互依存を媒介する因子と考えている。しかし、*nor* 遺伝子の変異は NIR の *in vivo* での活性に影響を与えるので [107] (第 3 章参照)、NirQ の役割は NOR の folding, assembly か翻訳後の activation にあり、*nirQ* 変異による *in vivo* NIR 活性の欠損は NOR が活性型で存在しないことによる間接的な影響なのではないかと筆者は推定する [65]。

3-3 *nirOP* 遺伝子産物のホモロジー解析

nirO と *nirP* は 175 アミノ酸, 20kDa、85 アミノ酸, 9kDa の膜タンパク質をそれぞれコードしている(Fig.1-8, Fig.4-3 参照)。*P. stutzeri* でこれらに対応する遺伝子はまだ報告されていないが、*nirQ* の 44bp 下流にある ATG からの翻訳配列が MWFFILAE になり [87]、NirO の N 末の配列と完全に一致することから、この菌でも同様な遺伝子が存在すると予想される。タンパク質データベースでホモロジー検索したところ、NirP と有為な相同性を示す配列は見いだせなかったが、NirO については、好気呼吸の末端酸化酵素 (cytochrome oxidase) の subunit III (COIII) との相同性を示した(Fig.4-5)。好気呼吸の酵素は cytochrome c oxidase (cytochrome *aa*), quinol oxidase (cytochrome *bo*) とともに 3 つの主要なサブユニット (COI, COII, COIII) と、いくつかのマイナーなサブユニットからなる。

```

Pae 1 MRDATEFFYEATGHEIEVFERANRHGLPVLLKGGTGGCKTRFVQYMARRLELPLYS
Pst 1 MRYLPVNAIEIPTTAGTPDAPFYQPLGNEEQLFQQAQWQHGMPVLIKGTGCGKTRFVQHMARRLNPLYT
Phy 1 MDLRNQYLVRSEPYHVGDEIERFEAAYANRIEMMLKGTGCGKSRFVEYMAWKLKPLIT
Cvi 1 MSDIDRNQFLIDHEPYRFPVSNEVALYEAA YAARMPVMLKGTGCGKTRFVEYMAWKLKPLIT

Pae 56 VACHDDLGAADLLGRHLIGADGTWQDGPLTRAVREGGICYLDEVVEARQDTTVAIHPLADDRRELYLER
Pst 71 VACHDDLSAADLVGRHLIGACGTWQDGPLTRAVREGGICYLDEVVEARQDTAVVHLPLADDRRELFIER
Phy 63 VACNEDMTAADLVGRFELDKEGTRWQDGPLTTAARIGAIICYLDEVVEARQDTTAVVHPLDHRRIPLDK
Cvi 65 VACNEDMTAS

Pae 126 TGETLQAPPSPMLVSVSNPGYQNLKGLKLPSTRQRFPVALRFDPYAAQOEARILVGEESGCAETLAQRLVQL
Pst 141 TGEALKAPPSPMLVSVSNPGYQNLKGLKLPSTRQRFPVAMRFDPYPTAEERIVANEQVDAALAAQVVKL
Phy 133 KGEVVEAHEDEQIVISYNGYQSAMKDLKSTKORFAAMDFDYPAEVESEIVAHESGVDAATAKLLVEV

Pae 196 QQALRRLEQHDLEEVASTRLLIFAAARLIGDGMDPREACRVALAEPLSDDPATVAALMDIVDLHVA
Pst 211 QQALRRLEQHDLEEVASTRLLIFTARMIRSGMTPROACLAELAEPLSDDPQTVAAALMDVYVYVHG
Phy 203 AIRSRHLKGGHGEDGEGISTRLLVYAGSLITKGIAPLIACEMALICEITDDEDLRDLRAAAQTFLFA

```

Fig.4-4. Alignment of Amino Acid Sequences of NirQ Type Proteins.

NirQ from *P. aeruginosa* (Pae) is compared to NirQ from *P. stutzeri* (Pst) [87] and gene products from putative open reading frames downstream of the RubisCO genes from *P. hydrogenothermophila* (Phy) [117] and *C. vinosum* (Cvi) (partial) [118]. Presumed nucleotide-binding motif is overlined. Identical residues are meshed.

```

NirO 1 MWPFILAELESVESLLLLAPGAQAQWQPELFRAGREQLDSRWGLLTVALLSSGWLAAALVAH-VRRGRPR
PADE 105 FWAF--IKNALYPMGDPSP IKDGVWPPPEGIVTFDPWHLP---LINTLILLSGVAVTWAHRAFLVLEGDRK
BOV 98 FWAF--YHSS---LAP-TPELGGCWPTGIHPLNPLEVP---LNTSVLLASGVSIWAHHS-LMEGDRK
ECO 29 FWIYLMSDCILESLIFATYAVLVNGTAGGPTGKDI FELP-FVLVETFLLEFSSITYGMAAIAMYKN-NKS

NirO 70 QASGWLLAALLLALVYVGLKHEYGRDLADLGLDIEHDTFTLYWCLTGFHFLHVLGLLILGWLAQACWR
PADE 170 TTINGLIVAVILGVCFTEGQAYEY---SHAAFGLADTVYAGAFYMATGFHGAHVIGTIFLFPVCLIRLLK
BOV 158 HMLQALFITITLGVYFTLLOASEY---YEAPFTISDGVYGSTFFVATGFHGLHVIIGSTFLIVCFRQLK
ECO 97 QVISWALATWLFAGAGFIGMEIYEFHHLIVNGMGPDRSGELSAPFALVGTGHLHVTSGLIWMVLMVQIAR

NirO 140 RCYTPQACSGLESGLVYWHMVDLVVWLLPPLVYVLQ
PADE 237 GQMTQRQHVGFEEAAAWYWHFVDVVVLFLEWVIYIWR
BOV 225 FHFTSNHHFGFEAGAWYWHFVDVVVLFVLYSYWNGS
ECO 167 RGLTSTNRTRIMCLSLFVHFLDVVVICVFTVYVLMGAM

```

Fig.4-5. Alignment of Amino Acid Sequences of *nirO* Gene Product from *P. aeruginosa* (NirO) with Subunit III of Cytochrome Oxidases. PADE, BOV; cytochrome *c* oxidase from *Pa. denitrificans* [122] and bovine, [123] respectively. ECO; cytochrome *o* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* [124]. Identical residues are meshed and gaps are indicated by -.

COIIIには酵素活性や電子伝達に関わる酸化還元中心がなく、複合体からCOIIIを取り除いてもCOIとCOIIだけで酵素活性を持っているため、その役割についてははっきりとはわかっていないが、電子伝達に伴うプロトンの排出[125,126]か、cytochrome oxidase複合体の形成、安定化に関わっていると予想されて来た[127,128]。Haltia等は、*Paracoccus denitrificans*でcytochrome aa₃のCOIIIの遺伝子欠損株を作製し、酵素活性の発現を調べた結果、COIIIはcytochrome oxidase complexのアセンブリーの後期の段階でシャペロニ的な役割を果たしているのではないかと予想している[128]。NirOについてもNORのcytochrome bc complexかNIR-NOR complexの形成、安定化に関与しているのではないかと考えられる。前述のNirQの役割と重ね合わせてみると、*nirQ*オペロンはNORあるいはNIR-NORの翻訳後の酵素活性発現を促進する因子のための遺伝子と予想される。また、NOの還元はプロトン濃度勾配の形成を伴う反応であるので[100]、NirOがプロトン排出の役割を持っている可能性も否定はできない。

第3章で述べたように、チトクロム酸化酵素のCOIがNORのcytochrome b subunit (Norb)、COIIのCuAセンターが亜酸化窒素還元酵素(NosZ)と類似している。このことから、Saraste等は好気呼吸酵素が脱窒関連の酵素の組み合わせによって進化してきたという説を展開している(Fig.3-3 参照)[77,110]。この考えは、生物が進化の過程で新しい機能を獲得するときには、全く新しい酵素をde novoで設計するのではなくて、既にある材料を使って、組み合わせを換えたり改造したりして作るのだというF. Jacobの説[129]に非常によく適した例である。NirOがCOIIIと類似しているという発見は、Sarasteの説を裏付ける3番目の例となり、これでチトクロム酸化酵素の3つの主要サブユニットがすべて脱窒関連因子と対応付けられたことになる(Fig.4-6)。

第4節 *nirQ*オペロン欠損株の作製と嫌氣的生育

*nirQ*オペロンの遺伝子産物は、一次配列の特徴や*P. stutzeri*での実験によりNOR、あるいはNIRとNORの翻訳後の酵素活性化因子であると考えられた。本節では、これらの因子の生理的役割を解明するために、まず遺伝子欠損株を作製し、その嫌氣的生育への影響を調べることにした。変異株の作製には、第3章と同様にテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet*)をマーカーとするMarker exchange mutagenesisの手法を用いた(Fig.3-6 参照)。

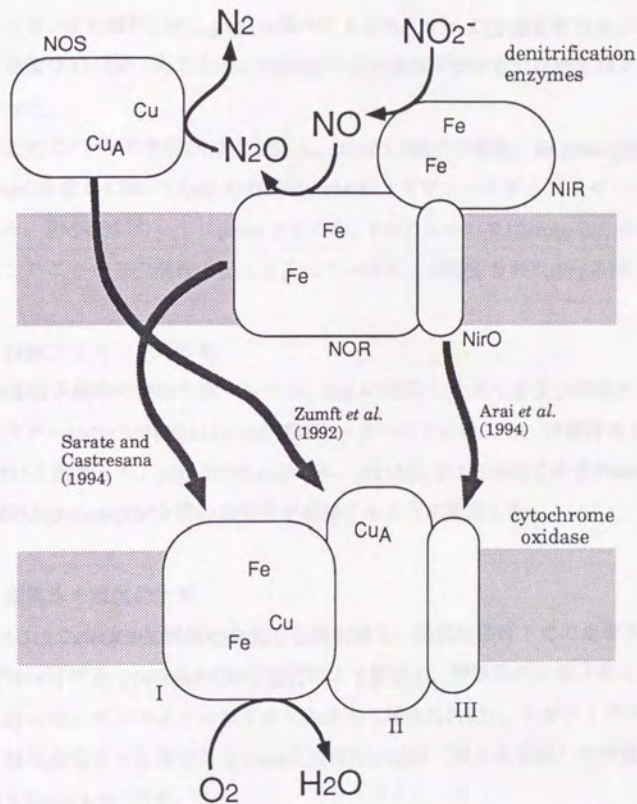


Fig.4-6. 脱窒関連酵素と好気呼吸酵素（チトクロム酸化酵素）の類似性

4-1 *nirQOP*変異株の作製

*nirQOP*すべての遺伝子が欠損するように *tet* gene で置き換えた断片を pUC119 上に構築したプラスミド pHA450 を作製し (Fig. 4-7)、Electroporation で *P. aeruginosa* PAO1 に導入した。テトラサイクリン (Tc) プレート (175 μ g/ml) 上に生育した 3 株の形質転換体についてカルベニシリン (Cb) 耐性 (200 μ g/ml) を調べたところ、すべて Cb 感受性であった。このうち 1 株を選び RM450 と命名した。RM450 の好気条件下での生育は野生株との差は見られなかった。

RM450 と PAO1 から染色体 DNA を抽出し、*EcoRI*-*PstI* で分解後、*tet* gene (probe A) および *nirQ* と *nirO* を含む 1.2 kb の *ApaI*-*SaII* 断片 (probe B) とサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、RM450 については probe A とのみ、PAO1 については probe B とのみハイブリダイズしたことから、変異が正しく入っていることが確認された (Fig. 4-8)。

4-2 相補プラスミドの作製

nirQOP 遺伝子産物の機能を調べるため、Fig. 4-7 に示したような 5 つの断片を広宿主域発現ベクター pMMB67EH[113] の *lac* プロモーターの下に導入し、相補用のプラスミド pHA511-515 を構築した。pHA511 は *nirQ* のみ、pHA512, 513, 514 はそれぞれ *nirQO*, *nirOP*, *nirQP*、pHA515 は *nirQOP* 全部の遺伝子を相補するように設計した。

4-3 変異株の嫌氣的生育

pHA511-515 で *nirQOP* 欠損株 RM450 を形質転換し、嫌氣的条件下での生育を調べた。生育は培養 14 時間後の 660 nm の OD の変化により測定し、培養条件は第 3 章 4-4 (p53) と同様に行った。ポジティブコントロールとして野生株 PAO1、ネガティブコントロールとして嫌気条件下で生育できない *anr* 欠損株 PAO6261 (第 6 章参照) も同様に培養した。結果を Table 4-2 に示す。

RM450 では嫌気 (脱窒) 条件下での生育ができなくなっていたが、*nirQ* のみ (pHA511) を相補することによって IPTG に依存して野生株と同程度に生育の回復がみられた。この結果から、プラスミド由来の *nirQ* 遺伝子だけで RM450 の嫌氣的生育を可能とし、*nirO* と *nirP* は必ずしも必要ではないことがわかった。また、*nirQ* 遺伝子をフレームシフトで失活させた断片 (pHA513) を入れた場合では生育は全く回復せず、*nirQ* が絶対に必要であることが明らかとなった。なお、*nirQ* に加えて *nirO* か *nirP* を一緒に相補さ

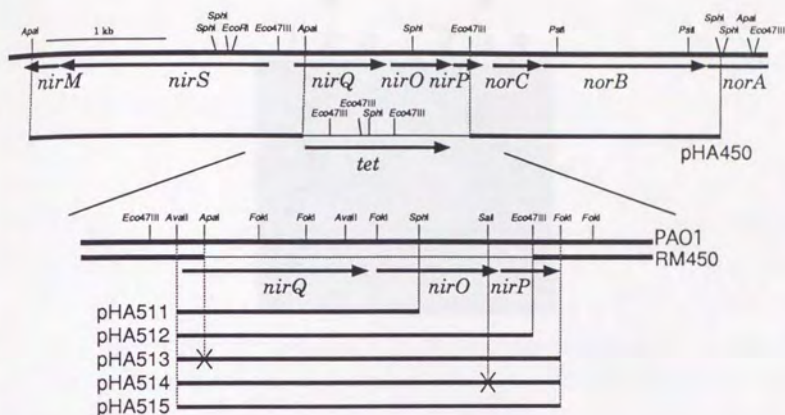


Fig.4-7. *nirQOP*変異株作製用および相補用プラスミド

pHA450: 2.3kb *ApaI*-*ApaI* (end-blunted)断片をpUC119の*SmaI* siteに、2.2kbの*Eco47III* (end-blunted)-*SphI*断片を*HincII*-*SphI* siteに導入してから、*BamHI* site (end-blunted)に*tet* geneを含むpBR322の*EcoRI*-*AvaI*断片 (end-blunted)を挿入した。

pHA511-515の*AvaII* siteはpMMB67EHの*SmaI* site、*Eco47III*、*FokI* siteは*HincII* siteに、それぞれ平滑末端化してからligationしてある。pHA513、514については、pHA515の挿入断片を*ApaI*、*SalI*でそれぞれ切断してから末端平滑化して再結合することにより、フレームシフト変異を導入した。

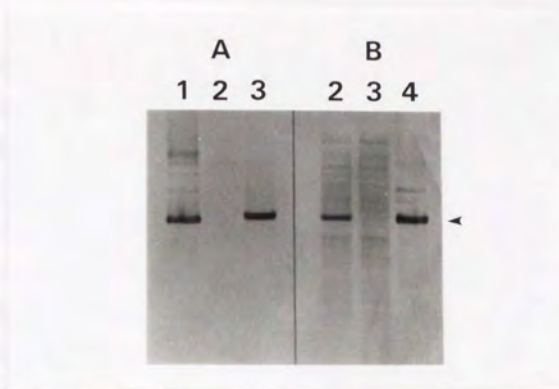


Fig.4-8. サザンハイブリダイゼーションによる変異の確認

1; pHA450, 2; PAO1 chrDNA, 3; RM450 chrDNA, 4; pHA-E1. *EcoRI*, *PstI*処理後電気泳動した。A; *tet* gene (pBR322の*EcoRI*-*AvaI*断片)をプローブとしたもの。B; *nirQO*の一部を含む1.2kb *ApaI*-*SaII*断片をプローブとしたもの。矢印は2.4 kbのサイズを示す。

Table 4-2. *nirQOP*変異株の嫌気条件下での生育

Strains [genotype] (Plasmid)	OD ₆₆₀	
	IPTG 0mM	1mM
PAO1 [wild]	1.56	1.48
PAO6261 [<i>anr</i>]	0.06	0.06
RM450 [<i>nirQOP</i>]	0.11	0.11
RM450 (pHA511)	0.60	1.42
RM450 (pHA512)	1.42	1.49
RM450 (pHA513)	0.07	0.08
RM450 (pHA514)	1.48	1.48
RM450 (pHA515)	1.44	1.49

せた場合(pHA512, 514, 515)にはIPTGを添加しなくても野生株並みの生育が見られた。これは、pHA511由来の*nirQ*のmRNAが不安定なのか、あるいは*nirO*か*nirP*があると*nirQ*の濃度が低くても効果があるのかもしれない。

第5節 *nirQ*の相同遺伝子*cbbQ*によるRubisCOの活性化

第3節において*nirQ*と相同な遺伝子が、*P. hydrogenothermophila*のRubisCO遺伝子*cbbLS*の下流にも存在することを発見した(Fig.4-4 参照)[65,117]。この菌の活性型RubisCOは、Large subunit 8個、Small subunit 8個からなるL8S8の高次構造を取っている[130]。このような複雑な活性型RubisCOの発現にはGroELSタイプのシャペロニンが必要であることが報告されている[131-133]。脱窒における*nirQ*オペロン遺伝子産物の特徴と*cbbQ*遺伝子の存在する位置を考え合わせると、*cbbQ*はRubisCOの翻訳後のfolding, assembly, activationのいずれかの段階に関わる因子をコードしているのではないかと予想された(Fig.4-9)。そこで、Fig.4-10に示すような*P. hydrogenothermophila*のRubisCO遺伝子*cbbLS*と*cbbQ*以降までを含む断片(pYAH302)と、*cbbLS*のみを含む断片(pYAH303)をpUC119に導入したプラスミドを作製し、*E. coli* JM109を宿主とした際の無細胞抽出液中のRubisCO活性[130]を測定した(Table 4-3)。その結果、明らかに*cbbQ*以降を含む断片の方が高いRubisCO活性を示したことから、*cbbQ*がRubisCOの活性発現に対して何らかの役割を担っていると考えられた。

第6節 考察

本章では、*P. aeruginosa*において亜硝酸還元酵素構造遺伝子*nirS*と一酸化窒素還元酵素構造遺伝子*norCB*の間に存在する*nirQOP*遺伝子について、これらがオペロンとして脱窒条件下で共転写されること、翻訳配列の特徴、欠損変異株の生育について調べた。また、*nirQ*と相同な遺伝子が一部の独立栄養細菌の炭酸固定関連の遺伝子群中にも存在し、これがRubisCOの翻訳後の活性化に関与している可能性を示した。

*P. aeruginosa*の嫌氣的(脱窒)条件下での生育に対して*nirQ*の存在は絶対に必要であるが、*nirO*と*nirP*に関しては必ずしも必要ではなかった。今後はこれらの遺伝子の有無がNIR, NORの酵素活性にどのような影響を及ぼすかを調べる必要がある。脱窒による生育の場合、一酸化窒素(NO)還元と酸化的リン酸化によるエネルギー生産がリンクできなくなっていたとしても、NOR活性によって毒性のNOが除去できれば、硝酸、亜酸

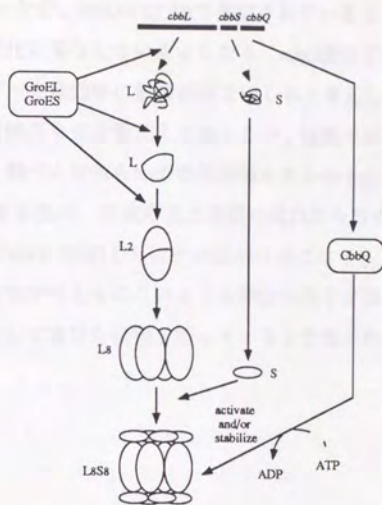


Fig.4-9. RubisCOの活性化機構の模式図

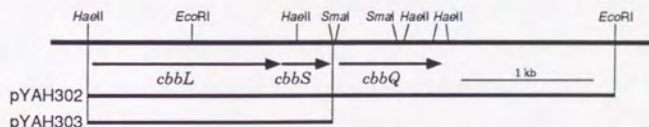


Fig.4-10. *Pseudomonas hydrogenothermophila* のRubisCO遺伝子クラスター *cbbLSQ* の制限酵素地図と活性測定に用いた断片
pYAH302, 303は *HaeII*~*SmaI*, *HaeII*~*EcoRI*断片をそれぞれpUC119の導入して作製した。

Table 4-3. *E. coli* JM109を宿主とした *P. hydrogenothermophila* のRubisCO活性発現

Plasmid	RubisCO activity (u/mg)
pUC119	0.00
pYAH302	0.36
pYAH303	0.18

化窒素の還元力だけでも充分生育できるはずである。NirOはチトクロム酸化酵素のCOIIIと類似していたが、NirOがCOIIIで推定されているようなプロトンの排出や呼吸複合体の形成・安定化に関与しているとしたら、*nirO*遺伝子欠損によって生育は可能であっても、エネルギー生産効率に影響が出ていくと考えられる。本章の培養実験では呼吸基質として硝酸塩を充分量加えてあったが、硝酸や亜硝酸の一定消費量当たりの生育量の変化等を調べれば何らかの情報が得られるかも知れない。

NirOとCOIIIの類似性は、好気呼吸と脱窒の進化的な関連性を示す第3の証拠となった(Fig.4-6 参照)。NirO、COIIIともにその役割は未だはっきりとは明らかになっていないが、好気呼吸と嫌気呼吸ともにこのような類似の因子が存在していることから考えても、呼吸機能に対して重要な役割を担っていると予想される。

第5章 脱窒の新規転写調節遺伝子 *dnr* の構造

第1節 序

一酸化窒素還元酵素の遺伝子 *norCB* の下流域には、逆の転写方向に3つの遺伝子 (ORF7, *dnr*, ORF9) が存在する (第1章 Fig.1-10 参照)。ORF7は64アミノ酸残基(7.3kDa) からなる小型のタンパク質をコードしており、5'領域に転写活性化因子ANR (第6章 参照) の認識配列が存在することから、嫌気条件下で単独に転写されると予想された。*dnr*は247(28kDa)か227(26kDa)のアミノ酸残基からなり、CRP/FNRタイプの転写調節因子[26,134]と類似のタンパク質をコードしている。*dnr*の名称は、本章および第6章で述べるように、脱窒による嫌気条件下での生育と、*nirSMC*, *nirQOP*, *norCBA*の各オペロンのプロモーター活性に必要であることが判明したので、*dissimilatory nitrate/nitrite reduction regulator*あるいは*denitrification regulation*から命名した。本章では、ORF7と*dnr*の遺伝子欠損株の作製と嫌気条件下での生育、翻訳アミノ酸配列のホモロジー解析の結果をまとめた。

第2節 ORF7, *dnr*の欠損株の作製と嫌氣的生育

ORF7および*dnr*の役割を調べるために、遺伝子欠損株を作製し表現型の変化を調べることにした。変異株の作製法は第3章と同様にpBR322のテトラサイクリン(Tc)耐性遺伝子*tet*をMarkerとした遺伝子置換の方法を用いた(Fig.3-6 参照)。

2-1 ORF7, *dnr*の欠損株の作製

ORF7と*dnr*のみに特異的に挿入変異が入るように、ORF7中の*SphI* siteおよび、*dnr*中の*BsPI* siteに*tet gene*を挿入した断片をそれぞれpUCベクター上に構築した(Fig.5-1)。作製したプラスミド(pHA535, pHA536)を*P. aeruginosa*の野生株PAO1のCompetent cellに導入し、Tc耐性(Tc^r)になった変異株を選抜した。得られたTc^r株について、pUCベクターに由来するカルベニシリン(Cb)の耐性を調べ、Tc^r、Cb感受性(Cb^s)の株を選抜した。Cb^r/Tc^r比は、pHA535では3/3で、pHA536では12/15であった。このうちそれぞれ1株を選び、RM535, RM536と命名した。

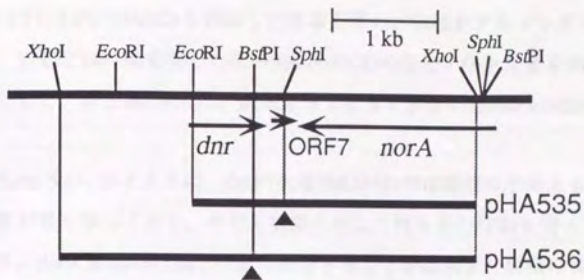


Fig.5-1. ORF7, *dnr*変異株作製用プラスミド

▲は *tet* geneの挿入位置を示す。*tet*はORF7, *dnr*と同じ向きに挿入した。

pHA535: 2.6kbの *EcoRI*-*XhoI*断片をpUC119の *EcoRI*, *HindIII* siteに、*XhoI*, *HindIII*の切断部分のみを末端平滑化してからligationした。その後、*SphI*で切断し、末端平滑化してから *tet* geneを挿入した。

pHA536: 約4.2kbの *XhoI*断片をpUC19の *SaI* siteに導入した後 *BstPI*で切断し、末端平滑化してから *tet* geneを挿入した。

tet geneはpBR322の *EcoRI*-*AvaI*断片を末端平滑化したものを使用した。

Table 5-1. ORF7, *dnr*変異株の嫌気条件下での生育

Strains [genotype]	OD660
PAO1 [wild]	1.56
PAO6261 [<i>anr</i>]	0.06
RM535 [ORF7]	0.61
RM536 [<i>dnr</i>]	0.06

2-2 ORF7, *dnr*変異株の嫌氣的生育

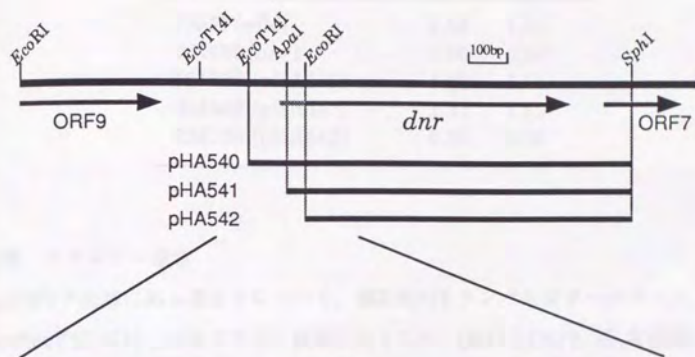
RM535, 536株について、脱窒による嫌氣的生育を調べた。培養方法は、第3章と同様に、2×YTに0.5%のNaNO₃を添加した培地を用い、気相をアルゴンガスで置換して嫌氣的にし、37℃で14時間培養した後の660nmのODの変化から生育量を測定した。コントロールとして、野生株PAO1と、嫌氣条件下で生育できない*dnr*株PAO6261も同様に培養した。

結果はTable 5-1に示すように、ORF7欠損株RM535では増殖は出来るものの、野生株よりは生育が悪くなっており、やはり脱窒に対して何らかの役割を持っていることが考えられる。*dnr*欠損株RM536では全く生育することが出来ず、脱窒には必要不可欠な因子であることが明らかとなった。なお、RM535, 536ともに、好氣条件下では野生株と同様に生育することが出来る。

第3節 *dnr*の翻訳開始点の同定

*dnr*の5'部分には、同一フレーム中に20アミノ酸残基分離してATGトリプレットが存在し、どちらも上流に典型的なリボソーム結合配列[57]がなく、フレーム解析[135]でもどちらが翻訳開始点かは判断できなかった。そこで、2つのATGの上流(pHA540)、中間(pHA541)、および下流(pHA542)から、*dnr*の終始コドンの下流までの3種のDNA断片を広宿主域発現ベクターpMMB67EH [113]に導入したプラスミドを構築し(Fig.5-2)、これらで*dnr*欠損株RM536を相補して嫌氣条件下での生育の回復を調べた(Table 5-2)。

pHA540, 541で相補した場合にはRM536の生育はIPTG添加時に野生株と同程度に回復しているため、2番目のATGが開始コドンとして働くと考えられる。また、IPTGを添加しない場合にもほとんど生育は変わらないことから、この断片中に*dnr*自身のプロモーター活性があるか、*dnr*の発現量は微量でも効果があると予想される。pHA542で相補した場合には、IPTG無添加ではほとんど生育しなかったが、IPTGの添加によって、野生株ほどではないにしても生育が回復した。pHA542では*dnr*の5'末端部分が開始コドンの直後で切っただけであるが、ベクターからのread throughで発現するN末の不完全なタンパク質でも多少の効果はあるのかも知れない。



```

                /EcoT14I
GCCAAAACCACCGCCGTTTGTAAAGCCTTGGCTTACACGCTGTAATAGTCCGCTGCGCGG 60
ACCGACGGCAACACCCAGCCCGGGAGCTTGCCGTGCGTCAAGATGATCTGCGCCGGCC 120
                M I C A G P
/ApaI                                /EcoRI
CCGCTACAGTGGCCAGTCCCCTCATCATCGCGAGCCTTCCCAGCATGGAATCCAGCGCG 180
A T V A S P L I I A S L P S M E F Q R V
TCCACCAGCAGTTGCTGCAAAGCCACCACCTGTTCGAACCGCTTCTCCCGTCGAGCTCC 240
H Q Q L L Q S H H L F E P L S P V Q L Q

```

Fig.5-2. *dnr*変異株の相補用プラスミド

pHA540: *EcoT14I* (end-blunted)-*SphI*断片をpUC118の*HincII*, *SphI* siteに導入後、*Bam*HI, *Hind*IIIで切り出しpMMB67EHに導入した。

pHA541: *ApaI* (end-blunted)-*SphI*断片をpUC118の*HincII*, *SphI* siteに導入後、*Bam*HI, *Hind*IIIで切り出しpMMB67EHに導入した。

pHA542: *EcoRI*-*SphI*断片をpMMB67EHの*EcoRI*, *SphI* siteに導入した。

Table 5-2. *dnr*変異株の嫌氣的生育の相補と翻訳開始点の同定

Strains [genotype] (Plasmid)	OD660	
	IPTG 0mM	1mM
PAO1 [wild]	1.56	1.50
RM536 [<i>dnr</i>]	0.06	0.06
RM536 (pHA540)	1.43	1.51
RM536 (pHA541)	1.31	1.59
RM536 (pHA542)	0.20	0.73

第4節 ホモロジー検索

*norCB*の下流域にある遺伝子について、翻訳配列をタンパク質データベース (SwissProt, PIR) に対してホモロジー検索したところ、ORF7とORF9 (C末部分) については有為な相同性を示す配列は見つからなかったが、*dnr*遺伝子産物については CRP/FNRタイプの転写調節因子との相同性を示した (Fig.5-3)。CRPは大腸菌などで働くカタボライトリプレッションの調節因子で、グルコースの欠乏時にラクトースなどを異化する酵素遺伝子 (*lac operon* など) の発現を活性化する因子であり、グルコース濃度の変化をcAMPをセカンドメッセンジャーとして関知する [134]。FNRは大腸菌の嫌気条件下で発現する様々な遺伝子の転写活性化因子であり (Fig.5 参照) [26,27]、これに相当する因子は *P. aeruginosa* (ANR) [66,67] や *P. stutzeri* (FnrA) [136] でも発見されている。FNRはN末にCys richな領域があり、ここに配位する鉄の酸化還元によって酸素の有無を関知すると考えられている [26,27]。NtcAはらん藻の硝酸同化やヘテロシスト分化などの広範な現象に関わっている転写調節因子 [137-139] で、FixKは *Bradyrhizobium japonicum* [140]、*Rhizobium meliloti* [141] などの窒素固定菌に見られる調節因子である。

*dnr*の翻訳アミノ酸配列中には、CRPに共通するcAMP結合配列やFNR(ANR)特有のN末のCysクラスターが存在しない (Fig.5-3)。また、CRPファミリーの転写調節因子とはいずれも20%程度の相同性を示すものの、特別に高い相同性を持つものはデータベース上には存在しなかった (Table 5-3)。このようなことから考えて、DNRはこれまでに報告されている調節因子とは異なるエフェクターを関知する新規のタイプの調節因子であると考えられた。

DNR	1:	MEFQ-RVHQQLLQSHHLEPELSPVQLQELASSDLVNLKDGAVYFRQGEPAHAFYYLI-SG-CVKIYRL	
CRP (E)	1:	M-----VLGKPKQ--T--DPTLEWFLSHCHHKYPKSTLIHQGEKAETLYY	
CRP (H)	1:	MSNELTEIDEVVTSSQEEATQRDPVLDWFLTHCHLHKYPKSTLIHQGEKAETLYY	
FNR	1:	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIERKKR1QKGGTFLKAGDELKSLYA	
ANR	1:	MAE--TI-KVRALP-QAHCKDCSLAFLCLPLSLTVEDMDSLDEIVKGRRLKKGFEFLRQGDFFGVSVA	
NTCA	1:	MDQSLTQDRPLAAVFRRLG-SE-IMPVV-VETFDRSKTIFFPGDPAERVYFL-LKG-AVKLSRV	
FIXK	1:	MKPSVVMIEPNGHFCSDCAIRTSAVCSSLDAELREFEHLGRRVHFSSETVTFSEEDITT	
DNR	67:	TPEG---QEKILEVTNE-RNTE----AE--AMFMDDTPNYVATAQAVVPSQLFRFSNKAYLRLQDNTB-	
CRP (E)	43:	IVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKFRQLIQVNDP	
CRP (H)	57:	VIKGSMVSSKDEGKEMILTYLGAGQFFGEAGLFDGEGSKRSWVKTKTTCIEIAEISYKRYQLIQANPE	
FNR	71:	IRSGTIKSYTITEQGDQITGF-HLAGDL-VGFDAGSGHHPFAQALETSMVCEIPFETLDDLSGKMPN	
ANR	66:	VRSGALKTFSTIDAGEQITGF-HLPSL-VGLSGMDTETYPVSAQALETTSVCEIPFERLDELSEQLQ	
NTCA	60:	YEAG--EETVALLRE-NSVE---GVL-SLVTGQRSDRFYHVAFTVEVLLSAPIEQVEQAL-KEHPD	
FIXK	61:	SFYNVLEGMREYKLLPDGRRQIVGFALPGDFLGMNLSGRHNSADAI GAVTVCFQAKAFGRFIERPQ	
DNR	126:	LALALLAKLSTRLHQRIIDEIETLSLKNATHRVVRYLLTAAH-Å-PG-ENCRVEIFVAKQLVAGHLSIQP	
CRP (E)	113:	ILMRLSAQMARRLQVTSKVGNLAFLDVTRIAQTLLENLAKQ-PDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSR	
CRP (H)	127:	ILMFLTAQLARRLQNTSRQVNLAFLDVAGRIAQTLMLAKQ-PEAMTHPDGMQIKITRQEIGQVMGCSR	
FNR	139:	LRQMMRLMSGEIKGDQDMILLSSKKNAEERLAAFIYNLSRRFAQRGFSRPREFLTMTRGDI GNYLGLTV	
ANR	134:	ERRQLMRLMSREIRDDQMMILLSSKKTADERTATFVNL SARFARGFSAQQFLRAMSRNEIGNYLGLAV	
NTCA	120:	LSLLMLQGLSSRIIQTEMMIETLAHRDMGSRIVSFLILCRDFGVPAPDGIRIDLKSHQAIÆAIGSTR	
FIXK	131:	ELRRINELAI RELSQARDHMVLLGRRSADKVAFLGWRELLALKGASDTPVLPMSRQDIADYLGITL	
***** *			
DNR	193:	ETFSRIMHRLGDEGIIHLDRGREGISILDRERL-ECFE	227
CRP (E)	182:	ETVGRILKMLEDQNLISAHGKTVVYGR	210
CRP (H)	196:	ETVGRILKMLEDQNLISAHGKTVVYGAR	224
FNR	209:	ETISRLRLGRFQKSGMLAVGKGYITENNDALAGLHTRNVA	250
ANR	204:	ETVSRVTRFQONGLISAEGKEVHILDSIELCALAGGQLEG	244
NTCA	190:	VTVTRLLGDLREGNMISITKKKIIVHNPVALSQOFT	225
FIXK	201:	ETVSRFTTFLERHGATAIHHGGISLLDPARVEALAAA	237

Fig.5-3. Alignment of Amino Acid Sequences of DNR and CRP Type Regulatory Proteins.

DNR; *Pseudomonas aeruginosa* *dnr* gene product, CRP(E); CRP from *Escherichia coli* [142,143], CRP(H); CRP from *Haemophilus influenzae* [144], FNR; FNR from *E. coli* [145], ANR; ANR from *P. aeruginosa* [66,67], NTCA; NicA from *Synechocystis* sp. PCC 6803 [139], FIXK; FixK from *Bradyrhizobium japonicum* [140].
DNRと同一のアミノ酸残基は網掛けで示した。下線で表したアミノ酸残基はCRPのcAMP結合部位、FNR, ANRのCysクラスターである。*はDNA結合のヘリックスターンヘリックスの部位を示す。

	Percent Amino Acid Identity with:						
	DNR	CRP(E)	CRP(H)	FNR	ANR	NTCA	FIXK
DNR	100 (227)	23.5 (204)	23.9 (218)	22.3 (211)	27.2 (191)	23.7 (211)	25.2 (210)
CRP(E)		100 (210)	77.9 (204)	22.3 (179)	24.3 (181)	27.0 (189)	22.2 (189)
CRP(H)			100 (224)	19.6 (179)	22.1 (181)	24.5 (192)	20.6 (189)
FNR				100 (250)	53.5 (226)	24.9 (193)	27.9 (240)
ANR					100 (244)	20.9 (191)	30.3 (231)
NTCA						100 (225)	22.8 (189)
FIXK							100 (237)

Table 5-3. *dnr* 遺伝子産物とCRPファミリーの転写調節因子との相同性
タンパク質名の記号はFig.5-3と同一である。表中の数字は同一アミノ酸のパーセン
テージ。カッコ内の数字はオーバーラップするアミノ酸残基数を示す。計算は
Genetyx ver. 8 (Software development)のプログラムを用いて行った。

第5節 考察

本章では一酸化窒素還元酵素遺伝子 *norCB* の下流域の遺伝子構造を解析することによって、転写調節遺伝子 *dnr*、および、今のところ機能未知ではあるが脱窒に対して何らかの役割を持つと予想される遺伝子 ORF7 を同定した。ORF7 は 64 アミノ酸残基の非常に小型のタンパク質をコードしているが、単独の転写単位として発現する構造をとっていた。*dnr* 遺伝子産物は CRP/FNR ファミリーに属する新規の転写調節因子と予想される。脱窒遺伝子の発現は FNR タイプの転写調節因子の支配下にあることは以前から指摘されており、*P. aeruginosa* にも FNR に相当する ANR が存在する [66, 67]。しかし、FNR (ANR) と同じく CRP と類似な調節因子である DNR の様な調節因子の存在はこれまでまったく報告がなかった。*P. stutzeri* では、FNR, ANR に相当する FnrA の欠損によっても脱窒条件での生育が可能で、脱窒酵素も通常に発現し、FNR 依存プロモーターも働くことが最近になって報告された [137]。このことから Cuypers and Zumft は、*P. stutzeri* には FnrA とは別に、脱窒遺伝子に特異的なもう 1 つの FNR タイプの調節因子 (FnrD) が存在するのではないかと予想している。この仮想上の調節因子 FnrD が DNR に相当するものである可能性も考えられる。しかし、*P. aeruginosa* では、*P. stutzeri* とは異なり ANR の遺伝子欠損によって嫌氣的生育が出来ず、脱窒遺伝子の発現も起こらなくなる (第 6 章参照)。両菌では、脱窒酵素の構造遺伝子の相同性は非常に高いものの、遺伝子クラスターの構成や配置は微妙に異なっており (Fig. 1-11 参照)、遺伝子発現調節機構も若干異なっている可能性もある。*dnr* 遺伝子欠損による脱窒遺伝子発現への影響に関する実験は次章で解説する。

第6章 脱窒遺伝子の転写調節機構

第1節 序

*Pseudomonas aeruginosa*は、通常の好気的環境下ではミトコンドリアにおけるものと同様な酸素呼吸によって生育している[23]。しかし、低酸素濃度で、硝酸、亜硝酸が存在する環境下では、これらを代替電子受容体とする嫌気呼吸（異化型硝酸呼吸）によって生育が可能である。この際に、水溶性の硝酸イオン、亜硝酸イオンがガス状の亜酸化窒素や窒素ガスに還元されて大気中に放出される現象が脱窒と呼ばれているものである。また、この菌はアルギニンデアミナーゼ(ADI)経路(Fig.6-1)という嫌気的なアルギニンの代謝経路を持っており、アルギニンを分解する過程で生じるATPを膜電位の維持に用いることが出来るため、酸素や窒素酸化物といった呼吸基質が存在しなくても嫌気的に生育することが可能である[28,146]。ADI経路によるATPの生産は、基質レベルのリン酸化であって、一種の発酵といえることができる。

脱窒関連の硝酸還元酵素(nitrate reductase, NAR)、亜硝酸還元酵素(nitrite reductase, NIR)、一酸化窒素還元酵素(nitric oxide reductase, NOR)、および亜酸化窒素還元酵素(nitrous oxide reductase, NOS)の4種の還元酵素(Fig.2参照)は、低酸素濃度下で発現する誘導酵素である[25]。また、ADI経路の酵素(arginine deiminase, catabolic ornithine carbamoyltransferase, carbamate kinase)も嫌気条件下で誘導されるが、硝酸、亜硝酸が存在すると酵素発現が部分的に阻害される[147]。このように、*P. aeruginosa*は酸素の有無、硝酸・亜硝酸の有無という外界の環境変化に応じて、好気呼吸→脱窒→ADI経路の優先順位で、最も効率の良いエネルギー獲得形態を選択して生育をし、好気性細菌でありながら酸素が存在しない嫌気的環境下にも高度に適応している(Fig.6-2)。

これまでに、遺伝子のクローニング・塩基配列の決定が行われた脱窒関連の遺伝子のほとんどには、そのプロモーター領域に大腸菌の転写調節因子FNRが認識するコンセンサス配列(TTGAT---ATCAA)と類似した配列が存在した[6,32,36,38-40,59]。FNRはカタボライトリプレッションの調節因子であるCRP(CAP)と類似の転写調節因子で、大腸菌などの種々の好気-嫌気の遺伝子発現調節に関わっている(Fig.5参照)[26,27]。このことから、脱窒菌でもFNRに相当する調節因子が存在し、脱窒遺伝子の嫌気誘導発現に関わっていると予想された。脱窒菌におけるFNR様の転写調節因子は、現在、*P. aeruginosa*と*P. stutzeri*でのみ発見されており、ANR [66,67]、FnrA [137]とそれぞれ名付け

られている。

*P. aeruginosa*の*anr*遺伝子欠損株では、脱窒でもADI経路によっても嫌気条件下での生育が出来ない[67]。また、ADI経路の酵素をコードするオペロン(*arcDABC*)にも、プロモーター部分にFNR結合配列が存在することから[148]、脱窒もADI経路もANRによって転写レベルで発現調節を受けていると予想される[149]。*P. stutzeri*でFNRに相当する因子FnrAの遺伝子*fnrA*は、*P. aeruginosa*の*anr*遺伝子をプローブとしてクローニングされ、翻訳アミノ酸レベルでANRと86.1%もの高い相同性を示す。しかし、*fnrA*遺伝子欠損変異株は、脱窒による嫌氣的生育が可能で、脱窒酵素も通常に発現していた[137]。また、外来のFNR依存性のプロモーターの転写も嫌気誘導的に起こった。ところが、*fnrA*株ではアルギニンデヒミナーゼの酵素活性がなくなっていることから、Cuypers and Zumftは、FnrAはADI経路専用の調節因子で、脱窒用のFNR homologは別にもう1つ存在するのではないかと予想し、この因子を仮にFnrDと名付けている。このように、*P. aeruginosa*と*P. stutzeri*では、ANR、FnrAに対する脱窒遺伝子の依存性が異なっている。しかし、*P. aeruginosa*でもANR以外にもう1つCRP/FNRファミリーに属する転写調節因子DNRが存在することが前章で発見されたので、このDNRがFnrDに相当するものである可能性も考えられる(第5章参照)。

脱窒遺伝子の発現には、酸素による発現調節以外にも、嫌気条件下で硝酸・亜硝酸の有無を感知して嫌気呼吸と発酵の転換を行う発現調節機構も存在する筈である。硝酸・亜硝酸による転写調節を行う因子については大腸菌で深く研究されている。大腸菌は脱窒菌ではなく、硝酸をアンモニアまで還元する同化型の硝酸呼吸を行い、硝酸還元酵素と同化型亜硝酸還元酵素の遺伝子の発現は、FNRによる好気-嫌気の制御と、sensor protein (*narX*, *narQ*)とregulator protein (*narL*, *narP*)の2コンポーネントのシグナル伝達システムによる硝酸・亜硝酸の制御を受けている[30,150]。脱窒菌におけるFNR相当物以外の転写調節因子としては、前章で述べたDNRの他には、*P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus*のNOSの構造遺伝子*nosZ*の上流にある*nosR*の遺伝子産物が*nosZ*の発現調節を行っていると考えられているものしか知られていない[36,38,88]。

本章では、酸素、および、基質となる窒素酸化物が、亜硝酸・一酸化窒素の還元に関与する*nirSMC*, *nirQOP*, *norCBA*の各オペロンの転写に及ぼす影響を調べた。また、これまで推定されていただけで証明されたことのなかったFNR様調節因子が脱窒遺伝子

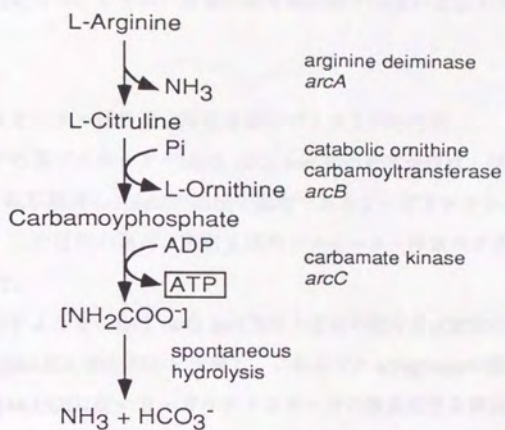


Fig.6-1. アルギニンデイミナーゼ経路

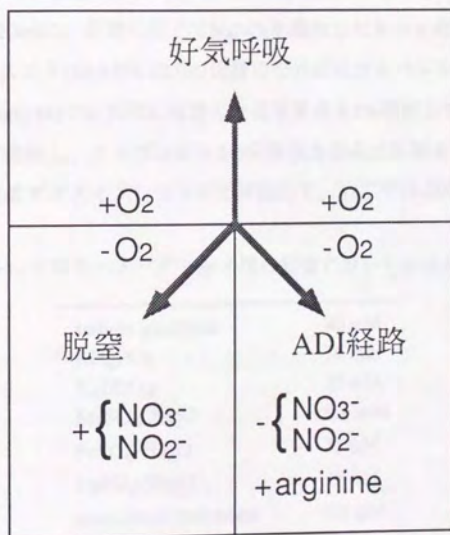


Fig.6-2. *P. aeruginosa*のエネルギー獲得形態の転換

の発現を制御していることを確認するために、*anr*遺伝子欠損による各オペロンの転写量の変化を測定した。さらに、新規の転写調節因子DNRの遺伝子欠損の影響も同様に調べた。

第2節 プロモーター活性測定用転写融合プラスミドの作製

脱窒遺伝子の各プロモーター(*nirS*, *nirQ*, *norCB*)の転写活性は、プロモーター領域を *lacZ*遺伝子と転写融合し、*lacZ*の遺伝子産物である β -ガラクトシダーゼの酵素活性から測定した。この目的の為に、広宿主域のプロモーター検索ベクターpQF50 (Fig.6-3) [151]を用いた。

Fig.6-4に示すような、*nirS*, *nirQ*, *norCB*の上流域の断片をpQF50の*lacZ*の上流に入れたプラスミド (pHA531, 532, 533)を作製し、これらで*P. aeruginosa*の菌株を形質転換し、Millerの方法[44,152]に従い β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した。

第3節 培養方法

酸素制限条件での培養には、50ml (70ml容)の密閉バイアル瓶を使用し、合成培地 (Table 6-1)[153]20mlに、必要に応じて NaNO_3 を添加したものを培地として用いた。pQF50由来プラスミド(pHA531-533)の保持のためにはカルベニシリン(Cb)を150 μ g/ml 添加した。L-broth[44]で好氣的に培養した前培養液を1%植菌してからブチル栓、アルミストッパーで密封し、アルゴンガスを5分間吹き込んで気相を置換し、必要に応じて酸素ガスを一定量ガスタイトシリンジで添加して、37 $^{\circ}\text{C}$ で18-20時間振とう培養した。

Table 6-1. プロモーターアッセイ用の培養に用いた合成培地

sodium glutamate	40 mM
KH_2PO_4	35 mM
K_2HPO_4	35 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15 μM
ammonium molybdate	0.5 μM
pH 6.7	

Woodの硝酸呼吸用の培地[153]から NaNO_3 を除いたもの。

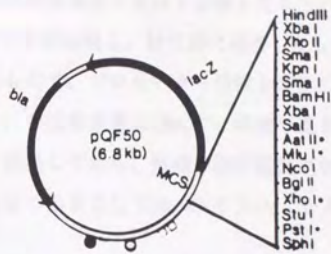


Fig.6-3. *lacZ*の広宿主域プロモーター検索ベクター pQF50 [151]

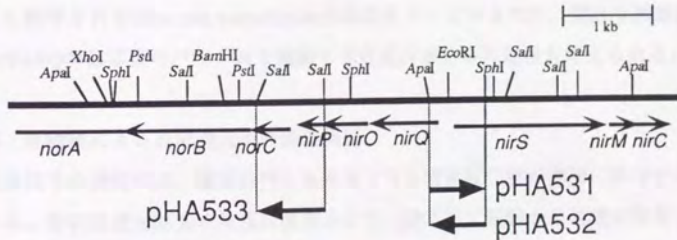


Fig.6-4. プロモーターアッセイに用いた制限断片

*nirS*と*nirQ*のプロモーター領域を含む0.65kbの*Apal*-*SphI*断片を末端平滑化してからpUC119の*HincII* siteに導入し、互いに逆向きに断片が挿入されたプラスミドから、それぞれ挿入断片を*BamHI*, *HindIII*で切り出し、pQF50に導入した。*nirS*と*lacZ*の転写方向が同一のものがpHA531、*nirQ*と同一のものがpHA532である。pHA533は*norCB*のプロモーター領域を含む0.77kbの*Safl*断片をpUC119の*Safl* siteに導入してから、ベクターの*EcoRI*→*HindIII*の転写方向で挿入されたものから挿入断片を*BamHI*, *HindIII*で切り出し、pQF50に導入して作製した。

第4節 酸素による脱窒遺伝子の発現制御

脱窒遺伝子の発現に酸素濃度の及ぼす影響を見るために、*P. aeruginosa*の野生株 PAO1をpHA531-533で形質転換し、好氣的に培養したものと、気相の酸素濃度を種々に変えて密閉培養したもので、プロモーター活性を測定した。好気培養には、100mlの坂口フラスコを使用し、合成培地量は10mlで、綿栓で蓋をして振とう培養した。密閉培養はアルゴンガスで置換してから、気相の酸素濃度が0, 1, 5%になるように酸素ガスを注入した。なお、脱窒の基質として NaNO_2 を5mMになるようにすべての系に添加した。

菌体の増殖量は、酸素濃度に応じて顕著な差がみられ、酸素0%ではほとんど菌体量は増えていなかった。*lacZ* assayの結果(Fig.6-5, Table 6-2)、プロモーター活性は、好気条件下ではいずれのプロモーターもほとんど転写されず、脱窒酵素の発現調節は完全に転写レベルで行われていることが確認できた。酸素制限条件では、還元酵素の構造遺伝子をコードしている*nirS*と*norCB*に関しては、酸素濃度が低いほどプロモーター活性が強く、0%で最大の転写量を示した。*nirQ*については、好気培養ではほとんど転写されていないので、低酸素濃度で誘導されると考えられるが、*nirS*, *norCB*とは逆に酸素0%よりも5%の方が高い値を示した。*nirS*と*nirQ*はプロモーター領域をはさんで互いに逆向きに転写されるdivergent transcriptionの構造をとっているため、微妙な酸素濃度の差で*nirS-nirQ*の転写量のバランスを調節する仕組みがある可能性も考えられる。

第5節 亜硝酸による脱窒遺伝子の発現調節

脱窒遺伝子の発現には、酸素以外にも基質となる窒素酸化物が調節に関与すると考えられる。亜硝酸還元酵素の発現は脱窒条件下（嫌氣的で硝酸か亜硝酸が存在する場合）に誘導され、硝酸イオンか亜硝酸イオン、あるいは両方がinducerになると考えられる。嫌気条件では硝酸イオンはNARによって直ちに還元されて亜硝酸イオンを生じるので、NIRの発現は直接の基質である亜硝酸イオンである可能性が高い。実際、硝酸を亜硝酸に変換しない*Alcaligenes faecalis* S6 [154], *P. stutzeri* [155]のNARの遺伝子欠損株では、NIRの酵素発現量は亜硝酸では誘導されるが硝酸での誘導量は低かった。

本節では、亜硝酸の添加量に対する*nirS*, *nirQ*, *norCB*の各プロモーターの転写活性の変化を観察した。培養は、気相をアルゴンガスで置換後に酸素ガスを1% (500 μ l)添加した酸素制限条件下で行った。これは、*P. aeruginosa*は完全嫌気条件下では亜硝酸無添

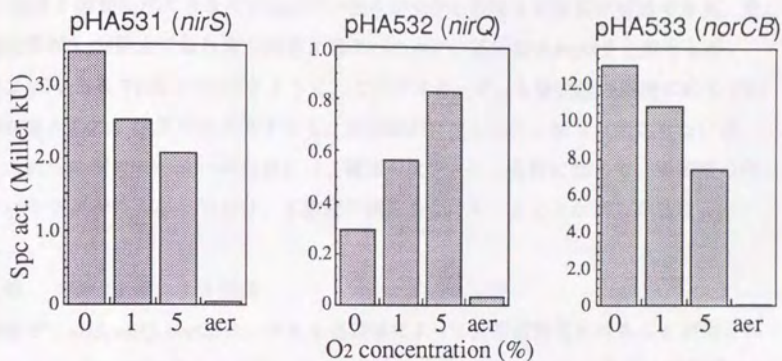


Fig.6-5. 気相中の酸素濃度によるプロモーター活性の変化

密閉培養条件下では気相をアルゴンガスで置換後、酸素ガスを0~5%添加した。aerは開放系で好気培養した場合。

Table 6-2. 気相中の酸素濃度によるプロモーター活性の変化

strain (plasmid)	β-Galactosidase (Miller units)				
	O2 (%)	0	1	5	air
PAO1 (pHA531)		3410	2490	2040	37.8
PAO1 (pHA532)		294	564	828	31.8
PAO1 (pHA533)		13100	10900	7450	42.3

加時にまったく生育せず、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性が測定出来ないためと、次節以降で嫌気的条件下で生育出来ない遺伝子欠損株での実験と条件を揃えるためである。この条件では、酸素の濃度は遺伝子発現のためには充分低く(Fig.6-5, Table 6-2 参照)、酸素を消費し尽くすまでは*lacZ*アッセイができる程度まで菌体が増殖できる。亜硝酸濃度が5mM以上では生育の障害が起こったので、添加量は5mMを上限とした。

結果はFig.6-6, Table 6-3に示すように、どのプロモーターも亜硝酸の濃度に応じて転写量が増大した。酸素制限条件下でも、亜硝酸が存在しないと転写は起こらないので、これらのプロモーターの発現には、酸素の欠乏という条件に加えて、亜硝酸の存在というシグナルが必要であり、2段階の調節を受けていることが明らかとなった。

第6節 一酸化窒素による調節

前節で、*nirS*, *nirQ*, *norCB*はいずれも亜硝酸によって転写活性化されることが示された。しかし、*norCB*の遺伝子産物である一酸化窒素還元酵素(NOR)の基質は亜硝酸ではなくて一酸化窒素(NO)である。*nirQ*もおそらく亜硝酸還元酵素(NIR)よりもNORの翻訳後の活性化に関わっていると予想される(第4章参照)。野生株では亜硝酸はNIRによって還元されて直ちにNOを生じるので、*norCB*, *nirQ*のinducerは亜硝酸であるのかNOであるのか区別出来ない。NIRとNORの反応は、毒性のNOを遊離しないように緊密に活性発現が連動しているため、NORの活性発現が亜硝酸かNOのいずれで誘導されるのか非常に興味を持たれる。そこで、本節では亜硝酸からNOを生成しないNIRの遺伝子欠損株と、NOを蓄積する*nor*遺伝子欠損株を宿主とした際の亜硝酸によるプロモーター活性の発現量を調べた。また、気相にNOを添加することによる転写活性の誘導も試みた。

6-1 亜硝酸還元酵素遺伝子欠損株の作製

NIRの構造遺伝子*nirS*のみ(pHA488)、および*nirSMCF*まで(pHA490, pHA490R)の遺伝子の特異的に欠損させるようにテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet*)で置換した断片をpUC119上に構築し、Marker exchange mutagenesis(Fig.3-6 参照)で変異株を作製した(Fig.6-7)。第3章と同様に、pHA488, 490, 490Rを*P. aeruginosa*の野生株PAO1のCompetent cellに導入し、テトラサイクリン耐性(Tc)になった組み換え体のうち、カルベニシリン感受性(Cb^r)の2点交差が起こった変異株を選別した。Cb^r/Tc^rの頻度は以下

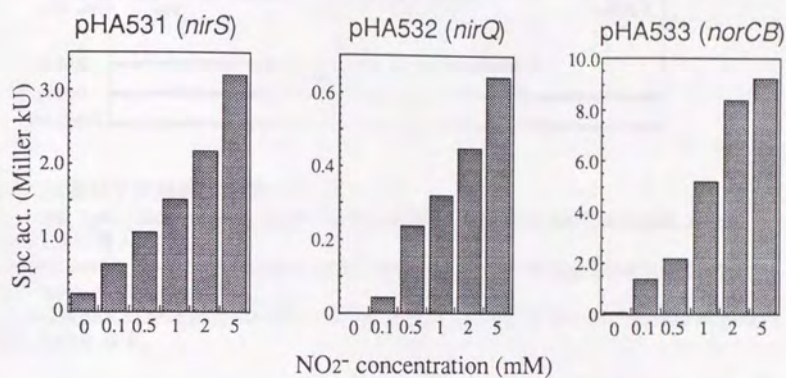


Fig.6-6. 培地中の亜硝酸濃度によるプロモーター活性の変化
 気相をアルゴンガスで置換後、酸素ガスを1%添加して密閉培養した。

Table 6-3. 培地中の亜硝酸濃度によるプロモーター活性の変化

strain (plasmid)	β -Galactosidase (Miller units)						
	NO_2^- (mM)	0	0.1	0.5	1	2	5
PAO1 (pHA531)		248	645	1080	1510	2170	3200
PAO1 (pHA532)		4.1	44	237	320	450	644
PAO1 (pHA533)		97	1410	2160	5190	8360	9220

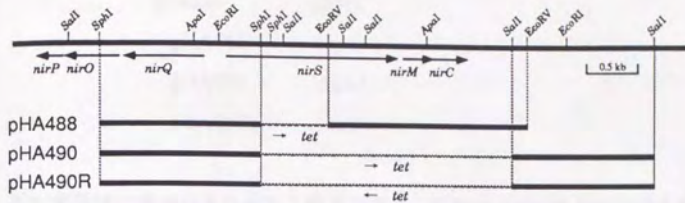


Fig.6-7. *nir*遺伝子欠損株作製のプラスミド

pHA488: *SphI* 1.6kb, *tet* gene, *EcoRV* 約2kbの断片をそれぞれpUC119の*SphI*, *HincII*, *SmaI* siteに導入した。

pHA490, 490R: *SphI* 1.6kb, *tet* gene, *SmaI* 1.4kbの断片をそれぞれpUC119の*SphI*, *PstI* (end-blunted), *SmaI* siteに導入した。

tet geneはpBR322の*EcoRI*-*AvaI*断片を末端平滑化したものを用いた。矢印は*tet* geneの挿入方向を示す。

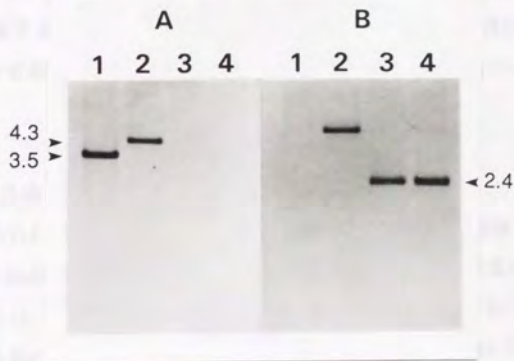


Fig.6-8. サザンハイブリダイゼーションによる変異の確認

1; PAO1, 2; RM488, 3; RM490, 4; RM490R のchrDNAを*EcoRI*処理後電気泳動した。

A; *nirM*を含む1.5kb *SmaI*断片をプローブとしたもの。B; *tet* gene (pBR322の*EcoRI*-*AvaI*断片)をプローブとしたもの。

の通りであった。

plasmid	Cb'/Tc'
pHA488	6/6
pHA490	12/13
pHA490R	8/8

得られた変異株の中からそれぞれ1株ずつ選び、RM488, RM490, RM490Rと命名した。これらの変異株はいずれも嫌気条件下では生育できなかった。

作製した変異株からそれぞれ染色体DNAを抽出し、EcoRIによる分解後に、*nirM*を含む1.5kbのSalI断片(probe A)と、*tet* geneを含むpBR322のEcoRI-AvaI断片(probe B)とのサザンハイブリダイゼーションを行った(Fig.6-8)。probe AはRM490とRM490Rの染色体DNAとはハイブリダイズせず、RM488では野生株での3.5kbよりも大きい4.3kb付近にバンドが検出された。これは、目的部分が*tet* geneと置換された大きさとちよほど一致する。また、probe BはPAO1とはハイブリダイズしないが、変異株ではすべて目的の位置にバンドが検出されたので、変異が正しく入っていることが確認された。

RM490, 490Rは、チトクロムc-551のタンパク質工学的研究を行うための変異チトクロムc-551を生産するホストとして用いるため[156]と、*nirCF*以下の遺伝子産物の役割を解明することを目的として作製したもので、本論文での以下の実験にはRM488のみを用いた。

6-2 *nirS*変異株での亜硝酸による脱窒遺伝子の転写誘導

RM488をpHA531-533で形質転換し、第5節と同様に酸素の初期濃度1%の条件で、亜硝酸濃度を0.5mM加えて密閉培養し、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した(Fig.6-9, Table 6-4)。どのプロモーターも、亜硝酸の添加量に応じて転写活性が増大しているが、野生株PAO1の値に比べると活性は下がっていた。RM488では嫌気条件で生育できないので、生育量の影響も考えられるが、*nirS*では1/3程度の活性であるのに対して、*nirQ*では1/5、*norCB*では1/10程度まで活性が低下しており、亜硝酸による誘導量は明らかに少ない。おそらく亜硝酸が還元されてNOが発生しないと*norCB*, *nirQ*の最大限の発現は起こらないと予想される。

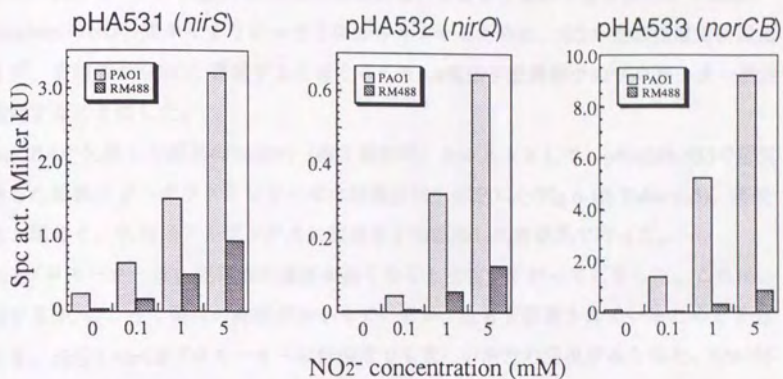


Fig.6-9. *nirS*変異株(RM488)におけるプロモーター活性

Table 6-4. *nirS*変異株(RM488)におけるプロモーター活性

strain (plasmid)	β -Galactosidase (Miller units)				
	NO_2^- (mM)	0	0.1	1	5
RM488 (pHA531)		36.3	176	496	956
RM488 (pHA532)		2.51	7.43	55.5	128
RM488 (pHA533)		2.84	33.7	345	864

6-3 *norCBA*変異による脱窒遺伝子の転写量の変化

亜硝酸からNOを生じない*nirS*変異株では亜硝酸による*norCB*と*nirQ*プロモーターの転写活性が低くなり、endogenousのNOが発現誘導に必要なことが予想された。そこで、endogenousのNOの効果をよりいっそうはっきりさせるために、NOを亜酸化窒素に還元できず、亜硝酸からNOを蓄積すると考えられる*nor*遺伝子変異株でのプロモーター活性を測定することにした。

*norCBA*が欠損した変異株RM495 (第3章参照) をホストとして、pHA531-533で形質転換した菌株の β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した(Fig.6-10, Table 6-5)。培養は上と同じく、気相はアルゴンガスに酸素を1%添加した密閉系で行った。

*nirS*プロモーターは、亜硝酸の濃度が高くなると活性が下がってしまった。これは、生成するNOによって発現の抑制がかかっているか、生育が阻害されているためと予想される。*nirQ*と*norCB*プロモーターは低濃度でも著しい活性の発現がみられた。RM495では生成したNOは還元除去されないため、微量でも誘導効果が持続するためと考えられる。亜硝酸の添加量が多くなるとやはり活性が下がるのは、NOの毒性によるものと考えられた。

以上の結果から、*norCB*と*nirQ*の発現は、亜硝酸よりもむしろNOによって誘導されると考えられる。

6-4 一酸化窒素添加による転写誘導

前述の*nirS*変異株と*norCBA*変異株を用いた亜硝酸による転写誘導の実験から、*norCB*と*nirQ*の発現が内生(endogenous)のNOによって活性化されることが示唆された。実際にNO分子が発現を誘導するかを確かめるには、外来(exogenous)のNOの添加によるプロモーター活性の変化をみる必要がある。しかし、NOは非常に不安定な物質であり、酸素の触れると容易にNO₂に酸化されて亜硝酸イオンとして水に溶けてしまう。また、NOは細胞にとって非常に毒性が高く、微量でも生育の阻害を起こす。そこで、NOが酸化されて亜硝酸が生じて、その効果があまり現れないと期待される*nirS*欠損株RM488と、野生株PAO1で、NOの添加効果を調べた。培養は、アルゴンガス置換後に酸素を1%と、NOガスを0-500 μ l (0-1%)、ガスタイトシリンジで添加して密閉培養した。プロモーター活性の測定結果はFig.6-11, Table 6-6に示す。いずれのプロモーターもNOの添加量に応じて活性の上昇がみられたが、RM488での*norCB*と*nirQ*の活性は野生

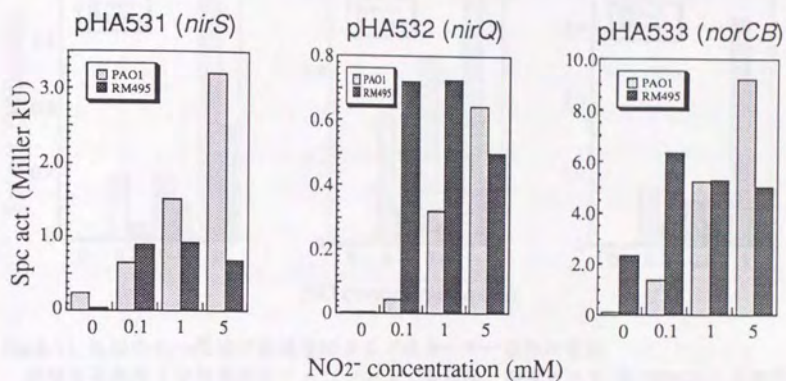


Fig.6-10. *norCBA*変異株(RM495)におけるプロモーター活性

Table 6-5. *norCBA*変異株(RM495)におけるプロモーター活性

strain (plasmid)	β-Galactosidase (Miller units)				
	NO ₂ ⁻ (mM)	0	0.1	1	5
RM495 (pHA531)		34.0	903	939	695
RM495 (pHA532)		3.26	720	725	500
RM495 (pHA533)		2340	6340	5290	5010

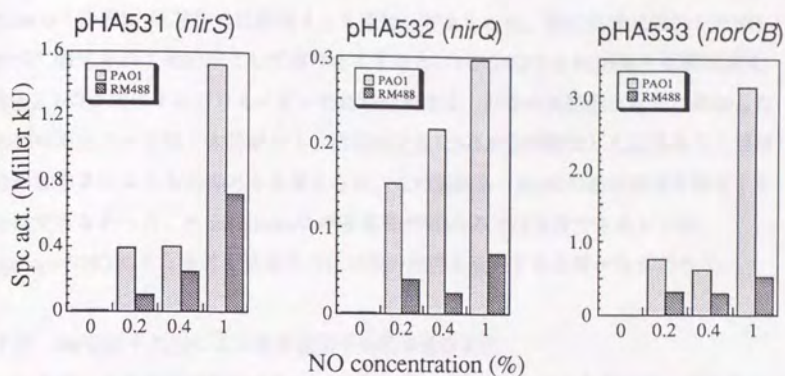


Fig.6-11. 気相中の一酸化窒素濃度によるプロモーター活性の変化

密閉培養条件下では気相をアルゴンガスで置換後、酸素ガスを1% (500 μ l)と亜酸化窒素を0~1% (0~500 μ l)添加した。

Table 6-6. 気相中の一酸化窒素濃度によるプロモーター活性の変化

strain (plasmid)	β -Galactosidase (Miller units)			
	NO (%)	0	0.2	0.4
PAO1 (pHA531)	7.86	393	396	1530
PAO1 (pHA532)	1.45	152	216	297
PAO1 (pHA533)	2.75	766	607	3100
RM488 (pHA531)	4.97	101	247	726
RM488 (pHA532)	2.21	40.5	23.7	70.2
RM488 (pHA533)	3.67	323	298	526

株に比べるとかなり低くなっており、亜硝酸の添加の実験と同様の傾向を示した(Fig.6-9, Table 6-4 参照)。気相中には酸素を1%添加してあるため、仮に気相に添加したNOがすべて酸化されて亜硝酸として溶けたとすると、1%のNOでは約1mMの亜硝酸濃度となる。NO添加によるプロモーターの活性発現量は、同量の亜硝酸を培地に添加した際のプロモーター活性と大差がなく、活性の上昇はNOが自然酸化した結果生じた亜硝酸の添加効果によるものであると考えられ、この実験系ではNOの添加効果を測定することはできなかった。*P. aeruginosa*は呼吸基質がNOのみでは生育できないため、exogenousのNOによる誘導を見るためには他の条件を検討する必要があるだろう。

第7節 *anr*遺伝子欠損による脱窒遺伝子の転写量の変化

これまでに塩基配列が報告されている脱窒関連の遺伝子のほとんどには、プロモーター領域に大腸菌の嫌気-好気の転写調節因子FNRが認識するコンセンサス配列と類似した配列が存在することから[6,32,36,38-40,59]、脱窒遺伝子の嫌気誘導発現はFNR様の転写調節因子の支配下にあると考えられている。しかし、脱窒菌の中で実際にFNRに相当する因子が脱窒遺伝子の発現を調節しているという証明がなされたことはない。*P. aeruginosa*ではFNRに相当する因子ANRが存在し、この遺伝子*anr*の変異株では脱窒による嫌氣的生育ができないことが報告されている[67]。そこで、本節では、*anr*遺伝子欠損株での*nirS*, *nirQ*, *norCB*の各プロモーター活性を測定した。ホストとして用いた*anr*欠損株PAO6261はHaas等によって作製されたものである(unpublished)。

結果はFig.6-12, Table 6-7に示すように、野生株PAO1に比べると、どのプロモーターも転写量は激減しており、転写活性化にはANRが必要であることが明らかとなった。しかし、微量ではあるが、*anr*欠損株でも亜硝酸の添加量に応じて転写の活性化がみられる。ANRは酸素の有無に応答する調節因子であるから、窒素酸化物に応答する調節因子は別にあるが、*anr*が欠損しても作用している可能性も考えられた。

第8節 *dnr*遺伝子欠損による脱窒遺伝子の転写量の変化

前章において、ANRと同じくCRP/FNRファミリーに属する転写調節因子DNRが*P. aeruginosa*の脱窒による嫌氣的生育に必要であることを明らかにした。本節では、*dnr*遺伝子欠損による脱窒遺伝子の転写活性化への影響を調べた。*dnr*変異株RM536(第5章参照)をpHA531-533で形質転換し、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した

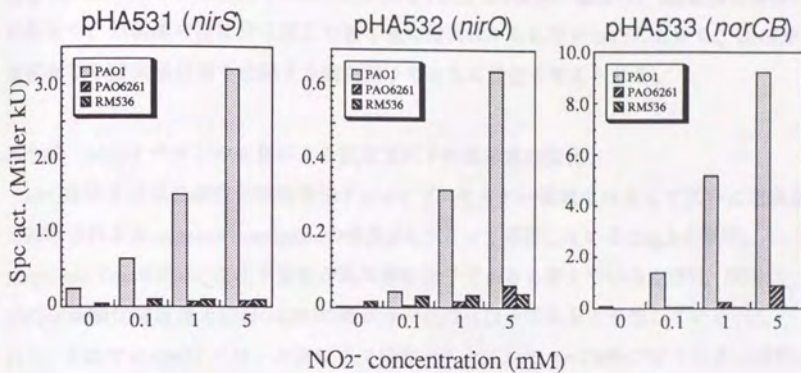


Fig.6-12. 転写調節遺伝子変異株PAO6261(*anr*)、RM536(*dnr*)におけるプロモーター活性

Table 6-7. 転写調節遺伝子変異株PAO6261(*anr*)、RM536(*dnr*)におけるプロモーター活性

strain (plasmid)	β-Galactosidase (Miller units)				
	NO ₂ ⁻ (mM)	0	0.1	1	5
PAO6261 (pHA531)		5.05	6.70	71.2	80.2
PAO6261 (pHA532)		2.56	4.75	18.7	59.6
PAO6261 (pHA533)		18.6	28.3	241	908
RM536 (pHA531)		41.6	106	95.4	99.4
RM536 (pHA532)		16.2	31.0	34.7	37.3
RM536 (pHA533)		13.9	36.5	39.0	51.4

(Fig.6-12, Table 6-7)。いずれのプロモーターもほとんど転写が起こらず、DNRも *nirS*, *nirQ*, *norCB* の転写には必要であることが示された。*dnr* 変異の場合は、*anr* 変異の場合とは異なり、亜硝酸の添加量に応じた転写量の増大はみられなかったことから、DNRが基質となる窒素酸化物を認識する調節因子である可能性も考えられる。

第9節 *nirQ* オペロンの変異による脱窒遺伝子の転写量の変化

nirQ 遺伝子は亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* とプロモーター領域をはさんで互いに逆向きに転写される divergent transcription の構造 [64] をとって存在している (Fig.1-7 参照)。*Jüngst and Zumft* は *nirQ* 遺伝子産物が転写調節因子であると考えているが [87]、筆者は *NirQ* は亜酸化窒素還元酵素 (NOR) の翻訳後の活性化因子であると予想している [65, 117]。本節では *nirQ* オペロンの遺伝子欠損株での *nirS*, *nirQ*, *norCB* のプロモーター活性を測定し、*nirQ* 遺伝子産物の脱窒遺伝子の転写への影響を調べることとした。*nirQ* オペロンの欠損株 RM450 (第4章参照) に pHA531-533 を導入し、気相は酸素1%の密閉系で培養し、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した (Fig.6-13, Table 6-8)。結果は、*nirS* では亜硝酸高濃度での転写活性が低くなり、*nirQ* と *norCB* の場合は低濃度でも非常に高い転写活性を示した。この結果は、NOR 遺伝子 *norCBA* 欠損株 RM495 の場合とほとんど同様の傾向であった (Fig.6-10, Table 6-5 参照)。このことから、*nirQ* オペロンは少なくとも *nirS*, *nirQ*, *norCB* の発現に対しては直接に転写調節を行っているとは考えられず、*nirQ* オペロンの欠失による表現型の変化は NOR の翻訳後の活性化が行われないことによるものと考えられる。

第10節 考察

本章では、脱窒関連の遺伝子のうち、亜硝酸と一酸化窒素の還元に関わっている *nirSMC*, *nirQOP*, *norCBA* の各オペロンの転写活性を、*lacZ* をレポーター遺伝子として用い、種々の培養条件と、種々の遺伝子欠損株について調べた。これらの遺伝子は、酸素濃度が低いことに加えて、亜硝酸還元に関わる *nirS* には亜硝酸イオン、一酸化窒素還元に関わる *norCB* と *nirQ* には一酸化窒素 (NO) という、それぞれの遺伝子産物の反応基質が存在することが転写活性化には必要であり、2段階の調節を受けていることが明らかとなった。この結果から脱窒酵素の発現が遺伝子レベルで調節を受けていることが証明された。また、*anr* 遺伝子欠損によってこれらの遺伝子のプロモーター活性が著し

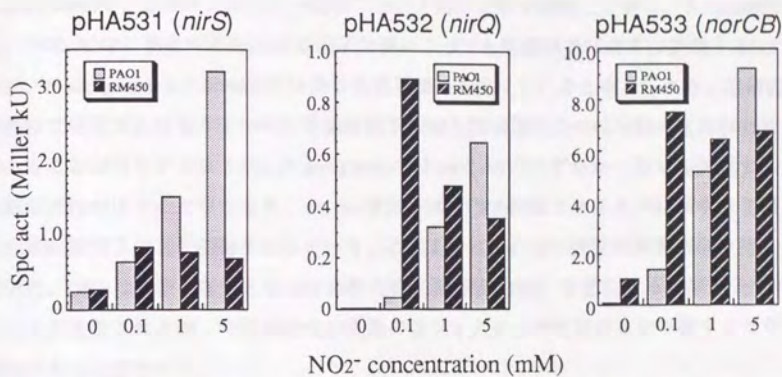


Fig.6-13. *nirQOP*変異株(RM450)におけるプロモーター活性

Table 6-8. *nirQOP*変異株(RM450)におけるプロモーター活性

strain (plasmid)	β -Galactosidase (Miller units)				
	NO_2^- (mM)	0	0.1	1	5
RM450 (pHA531)		279	841	767	692
RM450 (pHA532)		5.9	889	479	350
RM450 (pHA533)		1020	7500	6450	6760

く減少することから、FNR様の転写調節因子が脱窒遺伝子の発現に必要であることを初めて明らかとした。本論文では述べなかったが、*anr*欠損株PAO6261での*nirS*と*nirQ*の転写活性は、*anr*遺伝子をプラスミドによって相補することによって回復することと [65]、大腸菌の*fnr*遺伝子でも*anr*よりは弱いものの転写活性を回復できること (unpublished)を、*xyIE*をレポーター遺伝子として用いた系で確認してある。*P. stutzeri*では、FNR, ANRに相当するFnrAの遺伝子欠損によっても脱窒酵素は通常に発現する [137] ので、*P. aeruginosa*と*P. stutzeri*では異なる発現調節を受けていると考えられた。本研究で初めて発見されたもう1つの転写調節因子DNRも脱窒遺伝子の転写活性化には必要であることが明らかとなった。*P. aeruginosa*では*anr*と*dnr*のいずれか一方でも欠損すると転写活性がほとんどなくなり、*nir*, *nor*遺伝子は、CRP/FNRファミリーに属する2種の転写調節因子により制御されるという、これまでに例のない独特の調節機構を持っていた。DNRは脱窒の基質となる窒素酸化物 (亜硝酸、NO) を感知する調節因子であることが予想されるが、今後はDNRの実際のエフェクターが何であるかを探すことが課題であると思われる。

総括と展望

大気中の分子状窒素は、主に窒素固定生物によってアンモニアに還元されてから有機窒素化合物として生物体に取り込まれる。固定された結合型の窒素のほとんどは、脱窒菌によって窒素ガスが亜酸化窒素に変換されるまでは大気中に戻ることはない。窒素ガスは大気の80%もの割合を占める主成分であるが、脱窒反応に依らなければこの割合を一定に保つことはできないのである。しかし、近年ではHaber法による化学的窒素固定などの工業活動によって、窒素化合物の循環は結合型窒素の方向へ偏りつつある。化学合成された窒素化合物は化学肥料などの形で環境中に放出され、さまざまな環境問題を引き起こしている。このような問題を解決するためには、微生物による脱窒作用を強化して窒素循環のバランスを保つ必要がある。逆に、化学肥料の使用量を節約するためには耕作地中の脱窒反応を抑えることも有効であろう。このため、脱窒の人為的な制御を可能にすることが期待される。このように、脱窒という現象は近年次第にその重要性が認識されつつあるが、脱窒に関する酵素や遺伝子、あるいはその発現調節機構などに関する基礎的な知見は非常に少なかった。

微生物による完全な脱窒反応では、硝酸還元酵素(NAR)、亜硝酸還元酵素(NIR)、一酸化窒素還元酵素(NOR)、亜酸化窒素還元酵素(NOS)の4種の酵素が協奏的に働き、硝酸が亜硝酸、一酸化窒素、亜酸化窒素を経て最終的に分子状窒素に変換される。このうち、亜硝酸還元以下の3反応が脱窒特有の反応である(Fig.1-1参照)。水溶性の亜硝酸イオンがガス状の一酸化窒素(NO)に変換される反応は狭義での脱窒であって、脱窒の鍵反応と言われている。この反応を触媒するNIRは古くから多くの菌で研究が進んでいたが、NOの還元に関する部分の反応機構は、最近になってNORの酵素本体の精製が行われるまでは未知の点が多かった[11,12]。しかし、NORの一次構造や反応機構が解明されると、この酵素は最近発見された低酸素濃度に適応した古い形質を残した好気呼吸酵素と考えられるFixN複合体と類似しており、ミトコンドリアなどの一般的なcytochrome aaタイプのチトクロム酸化酵素へと至る呼吸酵素の進化的な起源ではないかと考えられるようになっている(第3章)[77,101,110]。脱窒は窒素酸化物を最終電子受容体とする呼吸であり、酸化的リン酸化のために必要なプロトン濃度勾配の形成はNOの還元に伴って起こることが観察されている[100]。したがって、エネルギー生

産という観点からとらえてみると、脱窒の鍵酵素はNIRよりはむしろNORであると言った方がよいのかも知れない。NOは1987年に免疫機能や神経伝達などに対して重要な生理活性を持つことが発見されて以来、医学・生化学分野では現在最も注目を集めている化合物である[99]。このような重要な作用が最近まで発見されなかったのは、NOが非常に不安定な物質で、酸素に触れると直ちに酸化されてしまうことが原因であった。おそらく、大気中に酸素がほとんど存在しなかった原始的な環境下では、NOは呼吸基質、生理活性物質として様々な生命活動に関与していたが、酸素濃度の上昇に従い、その役割の多くはより安定な酸素ガスに取って代わられていったのではないだろうか。

本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) において、NOの生成と還元除去に関わる遺伝子群(*nir-nor* region)をクローニング・構造解析を行い、遺伝子の発現調節機構について調べた。現在までに脱窒関連の遺伝子に関する研究例はそれほど多くなく、本研究の結果により、*P. aeruginosa*は、Zumft等の研究による*Pseudomonas stutzeri*と並び、脱窒に関する遺伝学的研究が最も進んでいる菌となった。特に、NORの構造遺伝子*norCB*は今のところ両菌でしか報告されておらず、脱窒特有の3酵素(NIR, NOR, NOS)の構造遺伝子がすべて解析されている菌は他にはない。*P. stutzeri*ではこれらの遺伝子はすべて染色体上の約30kbの領域内に局在していたが、*P. aeruginosa*においては*nir-nor*領域とNOSの構造遺伝子*nosZ*がクラスターを形成しているかどうかはまだ明らかではない(Fig.1-7, 1-11, 1-12 参照)。

第2章では、NIRの構造遺伝子*nirS*と、*nirS*とオペロンとして共転写される遺伝子の構造解析を行った。*nirS*の下流の*nirM*にコードされるチトクロム*c-551*は、微生物由来の*c*型チトクロムとしては最も研究の進んでいるものであり、現在でもX線[48,49]やNMRによる構造解析[50-52]や、電子伝達機構の解析[54]などが盛んに行われている。本研究では、*nirM*が*nirS*とともに脱窒条件下でのみ転写されることから、チトクロム*c-551*の生理的機能はNIR専用の電子供与体であることを確認した[59]。また、本論文では述べなかったが、筆者はクローン化チトクロム*c-551*を選択的に大量発現する系を確立している[156,157]。この発現系を使用することでアミノ酸残基置換した変異型チトクロム*c-551*を生産することができ、チトクロム*c-551*の蛋白工学的研究が飛躍的に発展することが期待される。*nirM*の下流には、もう1つの*c*型チトクロムの遺伝子*nirC*があ

り、さらに下流にも *nirF* 等の遺伝子が続いていた。本菌の NIR は heme *c* と heme *d* を持つ cytochrome *cd* であり、おそらく、*nirF* 以下の遺伝子は heme *d* の生合成等に関わるものと予想される。NIR の活性発現機構の全体像を理解するためには、今後さらにこの領域の遺伝子構造の解析と遺伝子産物の機能の解明を進める必要がある。

第 3 章では、NOR の遺伝子の構造解析を行った。NOR は cytochrome *c* と cytochrome *b* からなる膜結合型の cytochrome *bc* complex であり、それぞれのサブユニットの構造遺伝子 *norC* と *norB* は、この順で並んで存在していた。本研究では、*norCB* 以下にもう一つ、比較的大型の親水性タンパク質をコードする遺伝子 *norA* が存在し、*norCB* とオペロンを形成していることを発見した。*norA* 変異株では脱窒による嫌氣的生育が全くできなかった。今後は *norA* 変異株での NOR, NIR 活性などを測定し、*norA* 遺伝子産物の機能を調べていくことが課題であると思われる。

第 4 章では、NIR と NOR の構造遺伝子の間に存在する *nirQOP* の構造解析と遺伝子産物の機能の推定を行った。*nirQ* は ATP 結合タンパク質をコードし、この遺伝子欠損株では脱窒による嫌氣的生育が全くできなくなり、脱窒には必要不可欠な因子であった。*nirQ* に類似した遺伝子 (*cbbQ*) は一部の独立栄養細菌の炭酸固定酵素 RubisCO の遺伝子下流にも存在することを発見し、これが RubisCO の翻訳後の活性化に関与している可能性を示した [117]。*nirQ* の機能については NOR の翻訳後の活性化ではないかと予想しているが、正確な機能と作用機構を解明することが今後の課題であろう。NOR と RubisCO のような全く異なる酵素の活性化に NirQ, CbbQ といった類似した因子が関わっていることは非常に興味深い事実であり、NirQ タイプの因子は今後多くの酵素の活性化因子として発見されてくるのではないだろうか。*nirQ* とオペロンを形成して共転写される *nirO* は嫌氣的生育に必ずしも必要ではなかったが、その翻訳配列はチトクロム酸化酵素の COIII と類似していることから、脱窒の呼吸としての機能に何らかの役割を担っていると予想される [65]。この発見により、以前から指摘されていた COI と NorB、COII と NosZ の類似性 [77, 110] に加えて、好気呼吸のチトクロム酸化酵素の 3 つの主要サブユニットが脱窒関連因子とすべて対応付けられたことになる。

第 5 章では、遺伝子クラスターの解析から逆遺伝学的に発見された調節遺伝子 *dnr* の構造解析を行った。脱窒遺伝子の発現には FNR 様の転写調節因子が関わっていることは以前から指摘されていたが、*dnr* の遺伝子産物 DNR は FNR と同じく CRP ファミリーに属する新規の転写調節因子であった。*dnr* の存在する位置から考えて、DNR は脱窒遺伝

子発現専用の調節因子であると考えられる。

*P. aeruginosa*は好気性菌であるが、酸素が存在しなくても、脱窒による嫌気呼吸か、嫌気的なアルギニン異化反応であるアルギニンデアミナーゼ(ADI)経路による一種の発酵によって生育が可能であり、環境変化に応じてエネルギー獲得形態の転換を行っている(Fig.A)。したがって、脱窒関連の遺伝子は、酸素の有無と、窒素酸化物の有無という2段階の制御を受けると考えられる。第6章では、本研究で取得した亜硝酸と一酸化窒素還元に関与する*nirSMC*, *nirQOP*, *norCBA*の各オペロンについて、その転写調節機構を解析した。その結果、いずれのプロモーターも嫌気条件で誘導発現する事が確認された。また、酸素欠乏条件に加えて、亜硝酸還元に関わる*nirS*プロモーターには亜硝酸イオン、NO還元に関わる*norCB*と*nirQ*のプロモーターにはNOという、それぞれの反応基質が発現誘導に必要であることが示された。さらに、CRP/FNRファミリーに属する2種の転写調節因子ANR, DNRが転写活性の発現に必要であることを初めて明らかにした。おそらく、ANRは酸素の有無による調節を行い、DNRは嫌気条件下での窒素酸化物の有無による脱窒とADI経路の転換を行っているのではないかと予想されるが(Fig.A参照)、この事を確かめるには、DNRのADI経路関連遺伝子*arcDABC*の発現への寄与を調べる必要がある。

以上のように、本研究では、微生物による脱窒作用の中心に位置する亜硝酸と一酸化窒素の還元反応に関わる遺伝子の構造と発現調節機構について多くの基礎的な知見を得た。これまでに確認または推定された*nir-nor*関連の遺伝子構造と遺伝子産物の機能については、Fig.Bにまとめて示した。

本研究で得られた情報は、基礎的に重要であるだけでなく、脱窒反応の応用面にもいくつかの示唆を与えるものであった。現在、微生物による脱窒作用は廃水処理に利用されており、今後はその効率の向上と人為的な反応の制御が望まれている。脱窒の制御には2通りの方法が考えられる。第1の方法は、脱窒に必要な遺伝子を別の菌に入れ強制的に発現させる方法で、第2の方法は、脱窒菌を利用して、その菌固有の脱窒能の発現をコントロールする方法である。*P. aeruginosa*や*P. stutzeri*で明らかとなったように、脱窒関連の遺伝子はクラスターをなして存在している。このような関連遺伝子の局在した構造は、*supraoperon clustering*と呼ばれており、窒素固定や分解系の遺伝子などによく見られる構造で、遺伝子の水平伝播(Horizontal genetic transfer)による形質

の移動が起こった形跡であると考えられている。したがって、脱窒関連の遺伝子を一まとまりのセットして扱うことにより、他の菌で強制発現させる第1の方法の可能性も開けてきた。しかし、脱窒関連酵素の活性発現には、NirQやNorAなどの複数の因子が関わっており、まだ未知の点が多いので、当面の実現可能な課題としては、第2の方法による菌の育種になると考えられる。現在の微生物を利用した硝化-脱窒による廃水処理施設では、好気条件による硝化と、嫌気条件による脱窒の2段階の処理系の転換が常に問題となっている。このため、好気条件でも高度に脱窒能のある菌の検索と育種が期待されている。脱窒は嫌気条件下で誘導発現する形質であり、その酸素濃度による調節は、*P. aeruginosa*においては、大腸菌のFNRに相当するANRがこの役割を担うことが本研究で明らかとなった。ANRやFNRのようなCRPファミリーの転写調節因子はdimerとして働き、FNRでは不活型-活性型の転換はmonomer-dimerの転換で行われるという説もある。実際、FNRはアロステリック部位のアミノ酸1残基の置換だけで活性型にlockされた状態の変異タンパク質を容易につくることができ、このような変異FNRでは、好気条件でもFNR依存性プロモーターは構成的に発現する[158]。したがって、ANRや、脱窒遺伝子の発現をコントロールするもう一つのCRPファミリーの転写調節因子DNRを構成的に活性化する変異を導入することにより、好気条件でも高度に脱窒能を発現する菌の育種も可能かも知れない[159]。

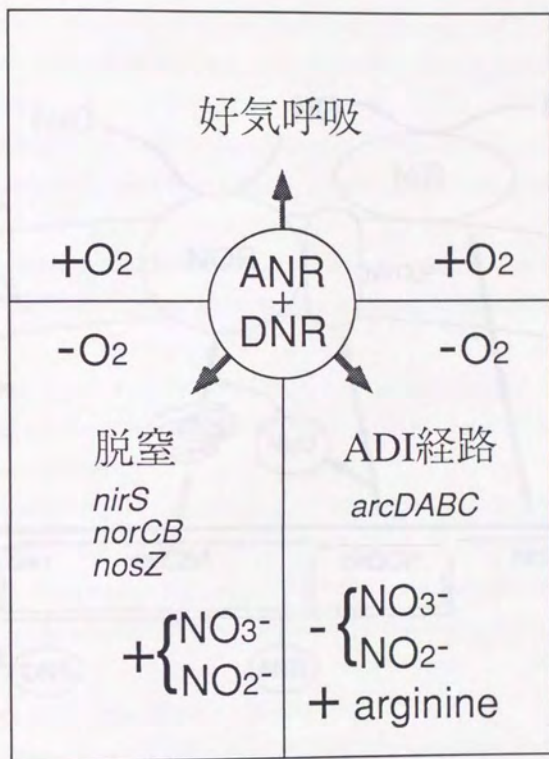


Fig.A *P. aeruginosa*のエネルギー獲得形態の転換

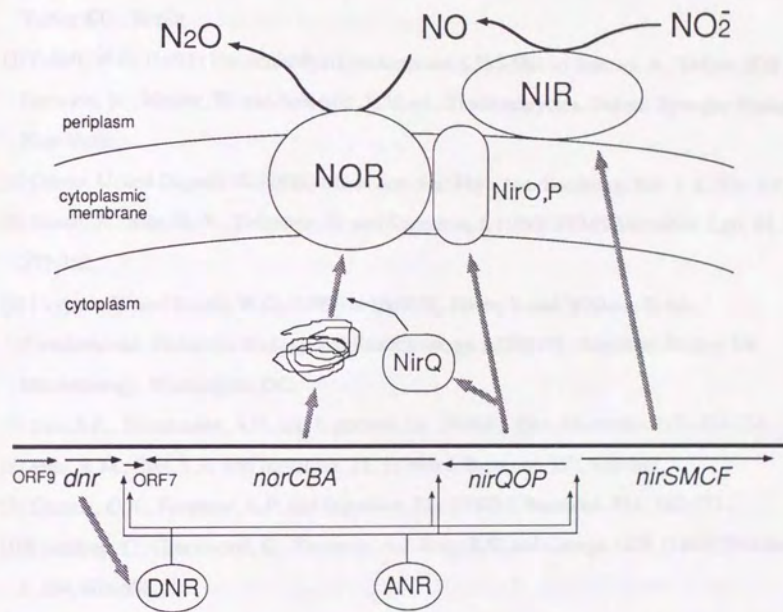


Fig.B *P. aeruginosa*の*nir-nor*領域の遺伝子構造と機能

引用文献

- [1] Cole, J. (1993) TIBTECH 11, 368-372.
- [2] Jeter, R.M. and Ingraham, J.L. (1981) The denitrifying prokaryotes, p.913-925, in Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Barows, A., and Schlegel, H.G. ed., The Prokaryotes, Springer-Verlag KG., Berlin.
- [3] Zumft, W.G. (1992) The denitrifying prokaryotes, p.555-582, in Barows, A., Trüper, H.G., Drowkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. ed., The Prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- [4] Gayon, U. and Dupetit, G. (1886) Mém. Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux, Sér. 3, 2, 201-307.
- [5] Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H. and Sugiyama, J. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 94, 277-282.
- [6] Cuyppers, H. and Zumft, W.G. (1992) in Galli, E., Silver, S. and Without, B. ed., *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology, p.188-197. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- [7] Sias, S.R., Stouthamer, A.H. and Ingraham, J.L. (1980) J. Gen. Microbiol. 118, 229-234.
- [8] Jeter, R.M., Sias, S.R. and Ingraham, J.L. (1984) J. Bacteriol. 157, 673-677.
- [9] Carlson, C.A., Ferguson, L.P. and Ingraham, J.L. (1982) J. Bacteriol. 151, 162-171.
- [10] Godfrey, C., Greenwood, C., Thomson, A.J. Bray, R.C. and George, G.N. (1984) Biochem. J. 224, 601-608.
- [11] Zumft, W.G. (1993) Arch. Microbiol. 160, 253-264.
- [12] Ye, W.R., Averill, B.A. and Tiedje, J.M. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60, 1053-1058.
- [13] Kronen, T. and Ellfolk, N. (1972) Biochim. Biophys. Acta 275, 308-318.
- [14] Gudat, J.C., Singh, J. and Harton, D.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 376-390.
- [15] Silvestrini, M.C., Colosimo, A., Brunori, M., Walsh, T.A., Barber, D. and Greenwood, C. (1979) Biochem. J. 183, 701-709.
- [16] Zumft, W.G., Sherr, B.F. and Payne, W.J. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 1230-1236.
- [17] Newton, N. (1969) Biochim. Biophys. Acta 185, 316-331.
- [18] Iwasaki, H. and Matubara, T. (1972) J. Biochem. 71, 645-652.

- [19] Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K. and Beppu, T. (1981) *J. Biochem.* 89, 453-461.
- [20] Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A. and Tiedje, J.M. (1989) *Appl. Env. Microbiol.* 55, 2924-2931.
- [21] Chan, Y.-K. and Wheatcroft, R. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 19-26.
- [22] Römermann, D. and Friedrich, B. (1985) *J. Bacteriol.* 162, 852-854.
- [23] Zannoni, D. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 975, 299-316.
- [24] van Verseveld, H.W. and Stouthamer, A.H. (1992) The genus *Paracoccus*, p.2322-2334, in Barows, A., Trüper, H.G., Drowkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. ed., *The Procaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- [25] Körner, H. and Zumft, W.G. (1989) *Appl. Env. Microbiol.* 55, 1670-1676.
- [26] Spiro, S. and Guest, J.R. (1990) *FEMS Microbil. Rev.* 75, 399-428.
- [27] Guest, J.R. (1992) *J. Gen. Microbiol.* 138, 2253-3363.
- [28] Shoesmith, J.G. and Sherris, J.C. (1960) *J. Gen. Microbiol.* 22, 10-24.
- [29] Kranz, R.G. and Foster-Hartnett, D. (1990) *Mol. Microbiol.* 4, 1793-1800.
- [30] Stewart, V. (1993) *Mol. Microbiol.* 9, 425-434.
- [31] Jüngst, A., Wakabayashi, S., Matsubara, H. and Zumft, W.G. (1991) *FEBS Lett.* 279, 205-209.
- [32] Zumft, W.G., Braun, C. and Cuypers, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* 219, 481-490.
- [33] Viebrock, A. and Zumft, W.G. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 4658-4668.
- [34] Silvestrini, M.C., Galeotti, C.L., Gervais, M., Schininà, E., Barra, D., Bossa, F. and Brunori, M. (1989) *FEBS Lett.* 254, 33-38.
- [35] Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. *Biochim. Biophys. Acta* in press.
- [36] Zumft, W.G., Dreusch, A., Löchelt, S., Cuypers, H., Friedrich, B. and Schneider, B. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 31-40.
- [37] Ohshima, T., Sugiyama, M., Uozumi, N., Iijima, S. and Kobayashi, T. (1993) *J. Ferment. Bioeng.* 76, 82-88.
- [38] Hoeren, F.U., Berks, B.C., Ferguson, S.J. and McCarthy, J.E.G. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218, 49-57.
- [39] Smith, G.B. and Tiedje, J.M. (1992) *Appl. Env. Microbiol.* 58, 376-384.

- [40] Nishiyama, M., Suzuki, J., Kukimoto, M., Ohnuki, T., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139, 725-733.
- [41] Ye, R.W., Fries, M.R., Bezborodnikov, S.G., Averill, B.A. and Tiedje, J.M. (1993) *Appl. Env. Microbiol.* 59, 250-254.
- [42] Glockner, A.B., Jüngst, A. and Zumft, W.G. (1993) *Arch. Microbiol.* 160, 18-26.
- [43] Dunn, N.W. and Holloway, B.W. (1971) *Genet. Res.* 18, 185-197.
- [44] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [45] Dickerson, R.E., Timkovich, R. and Almassy, R.J. (1976) *J. Mol. Microbiol.* 100, 473-491.
- [46] Horio, T., Higashi, T., Sasagawa, M., Kusai, K., Nakai, M. and Okunuki, K. (1960) *Biochem. J.* 77, 194-201.
- [47] Ambler, R.P. (1963) *Biochem. J.* 89, 349-378.
- [48] Almassy, R.J. and Dickerson, R.E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2674-2678.
- [49] Matsuura, Y., Takano, T. and Dickerson, R.E. (1982) *J. Mol. Biol.* 156, 389-409.
- [50] Timkovich, R. and Cai, M. (1993) *Biochemistry* 32, 11516-11523.
- [51] Moratal, J.M., Donaire, A., Salgado, J., Jiménez, H.R., Castells, J. and Piccioli, M. (1993) *FEBS Lett.* 324, 305-308.
- [52] Detlefsen, D.J., Thanabal, V., Pecoraro, V.L. and Wagner, G. (1991) *Biochemistry* 30, 9040-9046.
- [53] Yamanaka, T. (1959) *J. Biochem.* 46, 1289-1301.
- [54] Henry, Y. and Bessières, P. (1984) *Biochimie* 66, 259-289.
- [55] West, S.E.H. and Iglewski, B.H. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 9323-9335.
- [56] Marmur, J. (1961) *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
- [57] Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) *Nature* 254, 34-38.
- [58] Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1990) *FEBS Lett.* 261, 196-198.
- [59] Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1991) *FEBS Lett.* 280, 351-353.
- [60] Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1991) *FEBS Lett.* 288, 227-228.
- [61] Nordling, M., Young, S., Karlsson, B.G. and Lundberg, L.G. (1990) *FEBS Lett.* 259, 230-232.
- [62] Chang, M., Hadero, A. and Crawford, I. P. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 172-183.

- [63] Nohno, T., Noji, S., Taniguchi, S. and Saito, T. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 2947-2957.
- [64] Beck, C.F. and Warren, R.A.J. (1988) *Microbiol. Rev.* 52, 318-326.
- [65] Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1286-1291.
- [66] Sawers, R.G. (1991) *Mol. Microbiol.* 5, 1469-1481.
- [67] Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M. and Haas, D. (1991) *Mol. Microbiol.* 5, 1483-1490.
- [68] Carr, G.J., Page, M.D. and Ferguson, S.J. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 683-692.
- [69] Carr, G.J. and Ferguson, S.J. (1990) *Biochem. J.* 269, 423-429.
- [70] Dermastia, M., Turk, T. and Hollocher, T.C. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10899-10905.
- [71] Heiss, B., Franzke, K. and Zumft, W.G. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 3288-3297.
- [72] Braun, C. and Zumft, W.G. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 2394-2397.
- [73] Matthews, J.C. and Timkovich, R. (1993) *Bioorganic Chem.* 21, 71-82.
- [74] Zumft, W.G., Döhler, K., Körner, H., Löchelt, S., Viebrock, A. and Frunzke, K. (1988) *Arch. Microbiol.* 149, 492-498.
- [75] Ye, R.W., Arunakumari, A., Averill, B.A. and Tiedje, J.M. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 2560-2564.
- [76] Silvestrini, M.C., Cutruzzolà, F., D'Alessandro, R., Brunori, M., Fochesato, N. and Zennaro, E. (1992) *Biochem. J.* 285, 661-666.
- [77] Saraste, M. and Castresana, J. (1994) *FEBS Lett.* 341, 1-4.
- [78] Horio, T. (1958) *J. Biochem.* 45, 195-205.
- [79] Horio, T. (1958) *J. Biochem.* 45, 267-279.
- [80] Yamanaka, T., Ota, A. and Okunuki, K. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 44, 397-398.
- [81] Yamanaka, T. (1964) *Nature* 204, 253-255.
- [82] 山中建生 「呼吸酵素の生化学」 (1993) 共立出版.
- [83] Inoue, S., Asai, Y., Nakazawa, A. and Nakazawa, T. (1986) *J. Bacteriol.* 166, 739-745.
- [84] Nakazawa, T. and Yokota, T. (1973) *J. Bacteriol.* 115, 262-267.
- [85] Nakazawa, T. and Yokota, T. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 39-46.
- [86] Zennaro, E., Ciabatti, I., Cutruzzola, F., D'Alessandro, R. and Silvestrini, M.C. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* 109, 243-250.
- [87] Jünger, A. and Zumft, W.G. (1992) *FEBS Lett.* 314, 308-314.

- [88] Cuypers, H., Viebrock-Sambale, A. and Zumft, W.G. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 5332-5339.
- [89] Fujikawa, T., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1992) *J. Biochem.* 112, 290-298.
- [90] Reichmann, P. and Gorisch, H. (1993) *Biochem. J.* 289, 173-178.
- [91] Horio, T., Higashi, T., Yamanaka, T., Matsubara, H. and Okunuki, K. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 944-951.
- [92] van de Kamp, M., Silvestrini, M.C., Brunori, M., van Beeumen, J., Hali, F.C. and Canters, G.W. (1990) *Eur. J. Biochem.* 194, 109-118.
- [93] Canters, G.W. (1987) *FEBS Lett.* 212, 168-172.
- [94] Arvidsson, R.A., Nordling, M. and Lundberg, L.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 195-200.
- [95] Hoitink, C.W.G., Woudt, L.P., Turenhout, J.C.M., van de Kamp, M. and Canters, G.W. (1990) *Gene* 90, 15-20.
- [96] Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K. and Beppu, T. (1981) *J. Biochem.* 87, 463-472.
- [97] Liu, M.-Y., Liu, M.-C., Payne, W.J. and Legall, J. (1986) *J. Bacteriol.* 166, 604-608.
- [98] 大柳善彦 「NOと医学」 (1993) 共立出版.
- [99] Koshland, D.E. (1992) *Science*, 258, 1861.
- [100] Shapleigh, J.P. and Payne, W.J. (1985) *J. Bacteriol.* 163, 837-840.
- [101] van der Oost, J., de Boer, A.N.P., de Gier, J.-W.L., Zumft, W.G., Stouthamer, A.H. and van Spanning, R.J.M. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 1-10.
- [102] Wijler, J. and Delwiche, C.C. (1954) *Plant Soil* 5, 155-169.
- [103] Ye, R.W., Averill, B.A. and Tiedje, J.M. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 6653-6658.
- [104] Kim, C.H. and Hollocher, T.C. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2092-2099.
- [105] Wegg-Aerssens, E., Wu, W., Ye, R.W., Tiedje, J. M. and Chang, C.K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7496-7502.
- [106] Jones, A.M. and Hollocher, T.C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 359-366.
- [107] Braun, C. and Zumft, W.G. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 22785-22788.
- [108] Shoun, H. and Tanimoto, T. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 11078-11082.
- [109] Preisig, O., Anthamatten, D. and Hennecke, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3309-3313.
- [110] Saraste, M. (1994) *Antonie van Leeuwenhoek* 65, 285-287.
- [111] Lappalainen, P. and Saraste, M. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 222-225.

- [112] Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- [113] Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarjan, M. and Lanka, E. (1986) *Gene* 48, 119-131.
- [114] Körner, H. (1993) *Arch. Microbiol.* 159, 410-416.
- [115] Fukuda, M. and Yano, K. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 2719-2724.
- [116] Goto, E., Kodama, T. and Minoda, Y. (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42, 1305-1308.
- [117] Yokoyama, K., Hayashi, N.R., Arai, H., Chung, S.Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1995) *Gene* in press.
- [118] Viale, A.M., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 2391-2400.
- [119] Yaguchi, T., Chung, S.Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1733-1737.
- [120] Meijer, W.G., Arnberg, A.C., Enequist, H.G., Terpstra, P., Lidstrom, M.E. and Dijkhuizen, L. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225, 320-330.
- [121] Kusian, B., Yoo, J.-G., Bednarski, R. and Bowien, B. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 7337-7344.
- [122] Raitio, M., Jalli, T. and Saraste, M. (1987) *EMBO J.* 6, 2825-2833.
- [123] Anderson, S., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R.I., Eperon, C., Sanger, F. and Young, I.G. (1982) *J. Mol. Biol.* 156, 683-717.
- [124] Chepuri, V., Lemieux, L., Au, D.C.-T. and Gennis, R.B. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11185-11192.
- [125] Casey, R.P., Thelen, M. and Azzi, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3994-4000.
- [126] Prochaska, L.J., Bisson, R., Capaldi, R.A., Steffens, G.C.M. and Buse, G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 637, 360-373.
- [127] Cao, J., Hosler, J., Shapleigh, J., Revzin, A. and Ferguson-Miller, S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 24273-24278.
- [128] Haltia, T., Finel, M., Harms, N., Nakari, T., Raitio, M., Wikström, M. and Saraste, M. (1989) *EMBO J.* 8, 3571-3579.
- [129] Jacob, M. (1982) *The Possible and the Actual*, Pantheon Books, New York, p34.
- [130] Chung, S.Y., Yokoyama, K., Gomi, M., Teamroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1994) *J. Ferment. Bioeng.* 78, 469-471.

- [131] Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. and Ellis, R.J. (1988) *Nature* 333, 330-334.
- [132] Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H. (1989) *Nature* 337, 44-47.
- [133] Viitanen, P.V., Lubben, T.H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D.P. and Lorimer, G.H. (1990) *Biochemistry* 29, 5665-5671.
- [134] Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. and Adhya, S. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62, 749-795.
- [135] Bibb, M.J., Findlay, P.R. and Johnson, M.W. (1984) *Gene* 30, 157-166.
- [136] Cuyper, H. and Zumft, W.G. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 7236-7246.
- [137] Vega-Palas, M.A., Madueño, F., Herrero, A. and Flores, E. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 643-647.
- [138] Wei, T.-F., Ramasubramanian, T.S., Pu, F. and Golden, J.W. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 4025-4035.
- [139] Frías, J.E., Mérida, A., Herrero, A., Martín-Nieto, J. and Flores, E. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 5710-5713.
- [140] Anthamatten, D., Schebb, B. and Hennecke, H. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 2111-2120.
- [141] Batut, J., Daveran-Mingot, M.-L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M. and Kahn, D. (1989) *EMBO J.* 8, 1279-1286.
- [142] Aiba, H., Fujimoto, S. and Ozaki, N. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 1345-1361.
- [143] Cossart, P. and Gicquel-Sanzey, B. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 1363-1378.
- [144] Chandler, M.S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1626-1630.
- [145] Shaw, D.J. and Guest, J.R. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 6119-6129.
- [146] Armitage, J.P. and Evans, M.C.W. (1983) *FEBS Lett.* 156, 113-118.
- [147] Mercenier, A., Simon, J.-P., van der Wauven, C., Haas, D. and Stalon, V. (1980) *J. Bacteriol.* 144, 159-163.
- [148] Galimand, M., Gamper, M., Zimmermann, A. and Haas, D. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 1598-1606.
- [149] Haas, D., Gamper, M. and Zimmermann, A. (1992) in Galli, E., Silver, S. and Without, B. ed., *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology, p.177-187. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- [150] Rabin, R.S. and Stewart, V. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 3259-3268.
- [151] Farinha, M.A. and Kropinski, A.M. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 3496-3499.
- [152] Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics: Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [153] Wood, P.M. (1978) *FEBS Lett.* 92, 214-218.
- [154] Kakutani, T., Beppu, T. and Arima, K. (1981) *Agric Biol. Chem.* 45, 23-28.
- [155] Zumft, W.G., Blümle, S., Braun, C. and Körner, H. (1992) *FEMS Microbiol. Lett* 91, 153-158.
- [156] Arai, H., Zhang, Y., Sambongi, Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. *J. Ferment. Bioeng.* submitted.
- [157] Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55, 2431-2432.
- [158] Lazazzera, B.A., Bates, D.M. and Kiley, P.J. (1993) *Genes and Development* 7, 1993-2005.
- [159] 新井博之 「*Pseudomonas*属細菌の脱窒遺伝子クラスター」 (1994) *生物工学会誌* 第72巻 p.123.

謝 辞

本論文を終えるに当たり、終始有益な御指導、御助言を賜りました

東京大学教授 児玉 徹 博士

東京大学助教授 五十嵐泰夫 博士

に深く感謝の意を表します。

また、有益な御助言を頂きました

東京大学微生物利用学教室助手 山川 隆 博士

同 石井正治 博士

に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、菌株、プラスミド等の分与、データ解析や情報の提供などでご協力を頂きました

Prof. Stephen Busby Univ. of Birmingham

Dr. Mark A. Farinha Univ. of Alberta

Prof. John R. Guest Univ. of Sheffield

Prof. Dieter Haas Univ. de Lausanne

Prof. Matti Saraste EMBL

Prof. Robert Tabita Ohio State Univ.

Prof. Walter G. Zumft Univ. of Karlsruhe

中沢晶子 教授 山口大学医学部

加藤純一 博士 広島大学工学部

鄭 宣龍 博士 Univ. of Illinois

以上の先生方に深く感謝の意を表します。

最後に、共同研究者として共に研究を行った

三本木至宏 博士

横山敬一 氏

林 信博 氏

川崎信治 氏

および、微生物利用学研究室の皆様にも深く感謝いたします。

1995年 2月

新井 博之

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成4年度博士課程入学
氏名 新井 博之
指導教官 児玉 徹

論文題目 *Pseudomonas aeruginosa*の脱窒遺伝子群の構造と発現調節

Structure and regulation of the denitrification gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa*

序論

微生物による脱窒（異化型硝酸還元反応）は、酸素の代わりに窒素酸化物を電子受容体とする嫌気呼吸の一種で、水溶性の結合型窒素を最終的に窒素ガスとして大気中に還元する唯一の生物反応であり、窒素固定、硝化と並んで、地球上の無機窒素循環の一翼を担っている。この反応は酸素が地球上に出現する以前からある原始的な呼吸形態で、好気呼吸の進化的な起源と考えられているため、その反応機構は呼吸系のモデルとしても興味を持たれる。微生物による脱窒作用は富栄養排水の処理等、環境浄化に実際に利用されており、バイオレメディエーションの主要なテーマの一つである反面、施肥窒素肥料の損失の主要因として農業上大きな問題ともなっている。このため、脱窒反応の人為的な正・負両方向の制御を可能にすることが期待されている。また、脱窒は酸素濃度が低下した際に誘導される形質であり、その発現は酸素と基質となる窒素酸化物の存在により2段階の調節を受けると考えられ、このような環境変化に応答した発現調節機構にも興味を持たれる。硝酸から分子状窒素への完全な脱窒が行われるためには、硝酸還元酵素(NAR)、亜硝酸還元酵素(NIR)、一酸化窒素還元酵素(NOR)、亜酸化窒素還元酵素(NOS)の4種の還元酵素が協調して発現する必要がある。特に、NIRとNORは毒性の強い一酸化窒素(NO)を遊離しないように活性発現の各段階で緊密に連動していると考えられる。本研究では、代表的な脱窒菌である*Pseudomonas aeruginosa*の脱窒関連遺伝子のう

ち、亜硝酸と一酸化窒素の還元に関与する遺伝子群の全構造を解明し、その遺伝子産物の機能と発現調節機構を明らかにすることを目的とした。

第1章 *P. aeruginosa*の脱窒遺伝子群の取得と構造解析

*P. aeruginosa*の染色体DNAから、脱窒の鍵反応を触媒するNIRの構造遺伝子(*nirS*)の周辺領域をpUCまたはCharomidベクターを用いて、4断片で合計約24kbの長さによりクローニングした。このうち約10kbの塩基配列を決定し、NORの構造遺伝子(*norCB*)と新規転写調節遺伝子(*dnr*)など、部分配列を含めて13個の遺伝子を同定した(図2参照)。NOSの構造遺伝子(*nosZ*)はこの領域中には存在しなかった。

第2章 亜硝酸還元酵素関連遺伝子の構造

本菌のNIRはチトクロム*cd*タイプのもので、その構造遺伝子(*nirS*)の下流にはチトクロム*c-551*(*nirM*)と、おそらく亜硝酸呼吸鎖電子伝達系のコンポーネントと予想される機能未知の*c*型チトクロム(*nirC*)などの遺伝子が存在した。*nirM*は*nirS*とオペロンとして、*nirS*上流域のプロモーターから嫌気(脱窒)条件下でのみ転写され、それまで好気呼吸にも働いていると考えられていたチトクロム*c-551*はNIR専用の電子供与体であることが示唆された。

第3章 一酸化窒素還元酵素関連遺伝子の構造

NORは最近になって発見された膜結合型の酵素で、cytochrome *c*とcytochrome *b*の2つのサブユニットからなるチトクロム*bc*複合体である。各サブユニットの構造遺伝子(*norC*, *norB*)は、*nirS*の約2kb上流に逆の転写方向で存在し、親水性タンパク質をコードする遺伝子(*norA*)とオペロンを構成していた。*norB*の翻訳アミノ酸配列はFixNと相同性が見られた。FixNは最近発見された低酸素濃度の環境に適応したタイプのチトクロム酸化酵素の主要サブユニットで、通常のcytochrome oxidaseのsubunit I (COI)に相当するものである。NorBのco-factorとしては、ヘム*b*が1個しか同定されていないが、COI, FixNにあるヘムと銅のリガンドとなる6個のヒスチジン残基がすべて保存されていた。NorAの機能は不明だが、その遺伝子欠損株は嫌氣的に生育ができなかった。

第4章 *nirQ*オペロンの構造と機能

NIRとNORの構造遺伝子の間には3つの遺伝子(*nirQOP*)が存在する。*nirQ*はATP結合配列を持つ親水性タンパク質をコードしており、これに相当する遺伝子は*P. stutzeri*でも発見され、NIRとNOR両方の*in vivo*での活性発現に必要であることが報告されている。タンパク質データベース上には、NirQと有為な相同性を示す配列は存在しなかったが、*P. hydrogenothermophila*など、一部の独立栄養細菌の炭酸固定酵素RubisCOの遺伝子下流に

相同な遺伝子を発見し *cbbQ* と命名した。CbbQ は RubisCO の翻訳後の活性化を促進する新規の機能を持ったタンパク質であった。*nirO*、*nirP* の遺伝子産物はともに膜タンパク質であって、これらに相当する遺伝子はこれまで報告がないが、*nirQ* とオペロンとして嫌気条件下で転写されることから、亜硝酸・一酸化窒素還元に対して何らかの役割を持っていると考えられた。NirO はホモロジー検索の結果、好気呼吸鎖の complex IV の形成・安定化か、プロトンの排出の役割を果たしていると考えられている cytochrome oxidase subunit III (COIII) と類似していた。この発見は前述の NorB と COI との類似性に加えて、好気呼吸と脱窒の進化的な関連性を裏付けた。*nirQOP* の欠損株は嫌気的条件下での生育ができなかったが、*nirQ* のみを相補することによって生育が可能となった。

第5章 脱窒の新規転写調節遺伝子 *dnr* の構造

norCBA の下流域には、CRP や FNR などの転写調節因子と非常に高い相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 *dnr* が存在した。*dnr* の翻訳アミノ酸配列中にはカタボライトリプレッションに働く CRP の cAMP 結合配列、嫌氣的遺伝子発現に働く FNR や ANR 特有の N 末の Cys クラスターが存在せず、新規の調節因子と考えられた。この遺伝子の変異株は脱窒による嫌気条件下での生育が全く出来なくなった。

第6章 脱窒遺伝子の転写調節機構

P. aeruginosa は通常は好気呼吸により生育をしているが、酸素欠乏時に硝酸などの窒素酸化物が存在すると脱窒による嫌気呼吸を行う。呼吸基質が存在しない場合にはアルギニン代謝過程 (ADI 経路) で ATP を生産でき、環境変化に応じたエネルギー獲得形態の転換を巧妙に行っている (図1)。脱窒関連酵素の発現調節機構を調べるために *lacZ* をレポーター遺伝子として、*nirSMC*、*nirQOP*、*norCBA* の *P. aeruginosa* 内での転写活性を測定したところ、各オペロンともに、低酸素濃度下で亜硝酸イオンの添加量に応じた転写量の増大が見られた。また、*nirS* 変異株では亜硝酸添加による

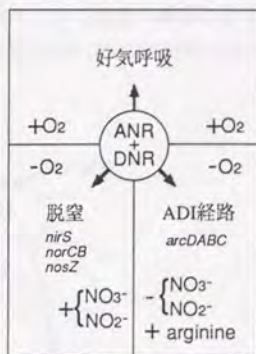


図1 *P. aeruginosa* のエネルギー獲得形態の転換

norC のプロモーター活性発現量が非常に低く、一酸化窒素が *norCBA* の inducer であると考えられた。これらの結果から、脱窒酵素の発現は、酸素と基質となる窒素酸化物の有無という最低2つのシグナルにより転写レベルで調節を受けていることが明らかとなった。各オペロンのプロモーター領域には大腸菌の嫌気条件下での転写活性化因子 FNR の認識配列が存在した。*P. aeruginosa* には FNR に相当する ANR があり、*anr* 欠損変異株では各プロモーターからの転写は全く起こらず、FNR タイプの調節因子が脱窒遺伝子にも働

くことを初めて証明した。また、*dnr*の欠損株でも*anr*と同様にプロモーター活性が全くなく、脱窒遺伝子の発現はCRPファミリーに属する2種の調節因子(ANR, DNR)の支配を受けていることが明らかとなった。

まとめ

*P. aeruginosa*の脱窒に関与する遺伝子クラスターを単離し、NIR、NORと新規転写調節因子DNRなどの遺伝子を同定した。現在までに脱窒特有の3種の還元酵素(NIR, NOR, NOS)の構造遺伝子がすべて同定されているのは本菌と*P. stutzeri*のみである。さらに、新規に発見された遺伝子についてはMarker exchange mutagenesisで欠損変異株を作製し、脱窒による嫌氣的生育への影響を調べた。NIRとNORの構造遺伝子間には*nirQOP*オペロンが存在し、その翻訳配列の特徴などから、酵素の翻訳後の活性化や呼吸機能に関与している可能性を示した。また、NorB, NirOはチトクロム酸化酵素のCOI, COIIIとそれぞれ類似していた。NosZとCOIIの類似性は以前から指摘されており、この発見によりチトクロム酸化酵素の3つの主要サブユニットがすべて脱窒関連因子と対応づけられ、好気呼吸と脱窒の進化的な関連性が示された。

*lacZ*をレポーター遺伝子として用い、*P. aeruginosa*の野生株、および各種の遺伝子欠損変異株における脱窒関連遺伝子の転写活性を種々の条件下で測定した。この結果から、脱窒遺伝子は酸素の欠乏と、基質となる窒素酸化物の存在という2段階の調節を受け、転写活性化にはCRPファミリーに属する2種の転写調節因子(ANR, DNR)が必要であることを明らかにした。

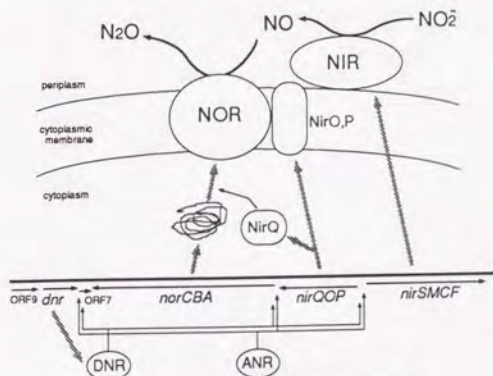
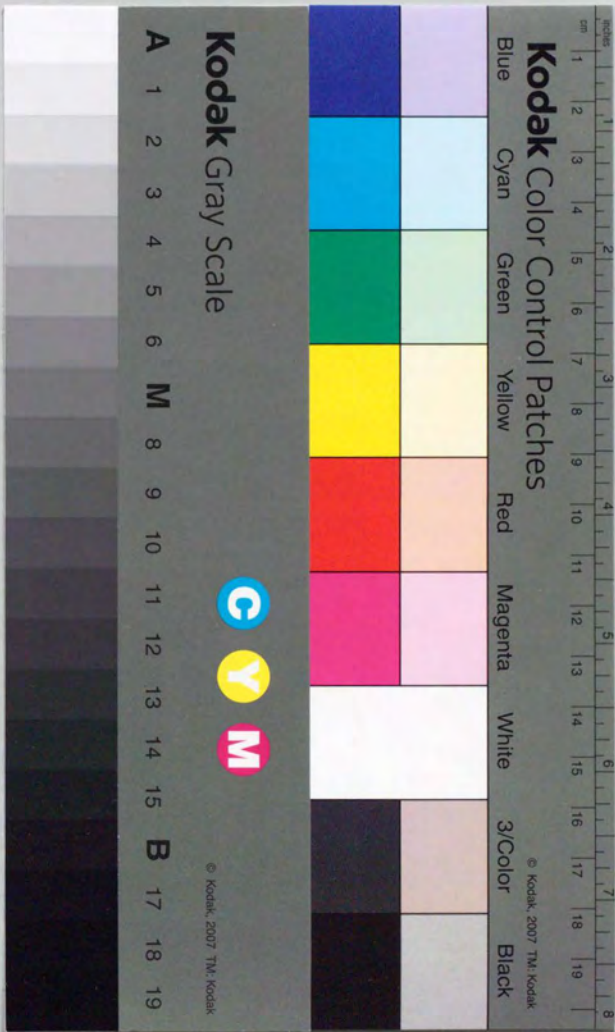


図2 *P. aeruginosa*の*nir-nor*領域の遺伝子構造と機能





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM, Kodak