

平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (S)) 研究状況報告書

ふりがな		しょううん ひろふみ		所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	
研究代表者氏名		祥雲 弘文					
研究課題名	和文	真核・原核生物の複合窒素呼吸系の分子機構解明					
	英文	Molecular mechanism of multiple dissimilatory nitrogen metabolisms by eukaryotic and prokaryotic cells					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		29,200	17,200	17,200	15,500	8,600	87,700
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)	
祥雲 弘文		東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授		酵素学・微生物学		研究全体	
当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)							
<p>カビや放線菌は従来、好氣的生物と考えられていた。研究代表者は真核生物で初めてとなるカビの脱窒を始め、共脱窒、アンモニア発酵など、これら微生物による新規窒素異化代謝を幾つか発見した。その結果、土壌に生息する一般的なカビや放線菌は窒素を利用した多彩なエネルギー代謝系を持つこと(下式)と、それ故にこれら微生物が実は様々な通気環境に適応可能な通性嫌気性菌であることが明らかとなった。本基盤研究ではこれら新規窒素代謝の分子レベルでの機構解明を行う。</p> <p>(1) $\text{NO}_3^- \quad \text{NO}_2^- \quad \text{NO} \quad \text{N}_2\text{O}(\text{N}_2)$ (脱窒; ミトコンドリア嫌気呼吸)</p> <p>(2) $\text{NO}_3^- \quad \text{NO}_2^- \quad \text{NH}_3$ (アンモニア発酵; 基質レベルのリン酸化による ATP 生成)</p> <p>(3) RNH_2 (有機態窒素または NH_4^+) + $\text{NO}_2^- \quad \text{N}_2$ (共脱窒; hybrid の N_2 生成)</p> <p>(4) RNH_2 (有機態窒素) $\quad \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \quad \text{N}_2$ (有機態窒素からの脱窒)</p> <p>(1) 真菌脱窒系: これまで行ってきた糸状菌 <i>Fusarium oxysporum</i> などの脱窒系(上式(1)) 解明をさらに進め、細菌脱窒系との比較により真核生物と原核生物の硝酸呼吸系のは進化的関連を明らかにする。</p> <p>(2) アンモニア発酵(上式(2)): 脱窒真菌 <i>F. oxysporum</i> が脱窒よりもさらに嫌気条件で別の硝酸代謝を行うことが発見された。この真核生物で初めてのエネルギー代謝に関わる酵素系を明らかにする。</p> <p>(3) 共脱窒: 糸状菌と放線菌に初めて見出された興味深い現象、共脱窒(codenitrification) (上式(3)) は脱窒活性と同時に誘導される。放線菌では共脱窒による N_2 生成活性の方が遥かに強い。</p> <p>(4) 有機態窒素からの脱窒: ある種の放線菌はアミノ酸など有機態窒素から亜硝酸とアンモニアを生成し、培地中に蓄積する。さらにこの両者から hybrid の N_2 を生成する(上式(4))。この現象は通気(酸素)では抑制されず、グルコースで強く抑制される。まったく新しいタイプのエネルギー代謝であることが予想される。</p> <p>(5) その他の試みとして、窒素固定真菌の検索と真菌 Stickland 反応の解析を行う。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

(1) 真菌脱窒系の解明：脱窒真菌 *Fusarium oxysporum* におけるミトコンドリア脱窒系は微好気条件下で誘導され、脱窒による嫌気呼吸とシトクロムオキシダーゼによる好気呼吸が並行して働く、ハイブリッド呼吸と呼べる新たな呼吸形態をとることを明らかにした。また硝酸塩還元酵素への電子供給系であるギ酸脱水素酵素へのギ酸供給系として働くピルビン酸-ギ酸リアーゼの存在を明らかにした。この経路はこれまで大腸菌の嫌気呼吸系でしか知られておらず、脱窒細菌ですら報告が無い。それが真核生物であるカビに見出されたことは驚くべきことである。*Cylindrocarpon tonkinense* は硝酸塩を脱窒できないと思われていたが、条件によっては同化型の硝酸塩還元酵素の関与により硝酸塩を脱窒できることが見出された。従来、硝酸同化系と硝酸異化（呼吸）系は互いに無縁であると考えられ、接点が無かったが、この結果は脱窒に同化系の酵素が関わることを示した初めての例である。また、下記アンモニア発酵の例と合わせ、硝酸同化系の硝酸塩還元酵素および亜硝酸塩還元酵素が異化的に（ATP 生産のために）使われる例を我々は世界で初めて、しかも 2 例も発見した。

さらに本研究の最大の成果の一つは、脱窒真菌 *C. tonkinense* およびゲノム解析の終了した麹カビ (*Aspergillus oryzae*) から異化型亜硝酸塩還元酵素遺伝子 (*nirK*) を単離できたことである。*A. oryzae* の遺伝子を大腸菌で発現し、異化型亜硝酸塩還元酵素活性を確認した。また *A. oryzae* 用の高発現ベクターに組み込んで発現させることにより、脱窒活性の顕著な上昇を示した。現在、遺伝子破壊株の取得を試みている。

カビ脱窒に一酸化窒素(NO)還元酵素として関与する P450nor の構造・反応機構の解明においても大きな成果が得られた。本 P450 は、NAD(P)H から直接電子を受け取るという、生体電子伝達のセントラルドグマに反する反応を行う。NADH アナログとの複合体の結晶化および構造解析に成功し、NADH から P450nor へのハイドライド直接伝達の機構を明らかにした。

(2) アンモニア発酵：アンモニア発酵とは、硝酸塩のアンモニアへの還元が呼吸や同化ではなく、基質レベルのリン酸化（発酵）に共役するというユニークなエネルギー代謝であり、これも我々のオリジナルな発見である。既に酵素活性の面から、アンモニア発酵における硝酸塩の還元と同化型の硝酸塩および亜硝酸塩還元酵素が関与することを明らかにしたが、新たに、*niaD*（同化型硝酸塩還元酵素遺伝子）破壊株を用いてこのことを遺伝子の面から証明した。さらにアンモニア発酵における ATP 生産過程であるアセチル CoA の酢酸への分解系のユニークな調節機構を明らかにした。

(3) 共脱窒反応の解明：共脱窒はカビで初めて発見されたユニークな現象で、亜硝酸と他の窒素化合物からハイブリッドの二原子窒素(N₂)あるいは亜酸化窒素(N₂O)を生じる。共脱窒活性の強い *Fusarium solani* などの共脱窒現象を詳しく検討した。その結果、共脱窒産物のタイプ (N₂ か N₂O か) はカビの種類ではなく共脱窒基質（亜硝酸塩の相方）の種類で決まること、生菌による共脱窒がロテノン、アンチマイシン、シアンなどの呼吸阻害剤で強く阻害されることを明らかにした。この結果は、共脱窒が化学反応で起こるのではなく、生体反応であることを強く支持する。さらに、精製 P450nor が NO とアザイド（またはアンモニウム塩）から N₂O を生じる強い活性をもつことを見出した。従って少なくとも N₂O を生じる共脱窒においては、直接の基質は亜硝酸塩ではなく NO であり、その反応は P450nor により触媒されることを明らかにした。

(4) 放線菌による有機態窒素の無機化：有機態窒素を多く含む培地（無機態窒素は含まない）で放線菌を培養すると、培地中にアンモニアと亜硝酸を蓄積するという興味深い現象を見出している。この有機態窒素の無機化現象は、新規のエネルギー代謝であることを作業仮説として解明を試みている。亜硝酸の蓄積には、NO 合成酵素(NOS)、フラボヘモグロビン(Fhb; NO dioxygenase)、異化型硝酸塩還元酵素などの関与を予想している。これまでに Fhb の精製と誘導条件の検討、NOS 遺伝子破壊の影響、などの検討を行った。Fhb は非常に多くの細菌や真核微生物に普遍的に存在するが、その生理機能に関してはよく分かっていない。NO ストレスで誘導されるという、大腸菌の結果があるだけである。我々は放線菌の Fhb が NO ストレスと無関係に生産されることを示し、エネルギー代謝への関与を示唆した。

(5) その他のサブテーマ：新しい窒素固定菌の検索を行っている。カビや酵母にいくつかの候補を見出している。無窒素培地で ¹⁵N₂ を菌体に有意に取り込むカビ 2 株を単離した。現在の常識では、窒素固定を行う生物は細菌のみであるので、これら真核微生物の窒素固定能の解明は大きなインパクトを発する可能性がある。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

- (1) **P450nor-NADH アナログ複合体の結晶構造の解明**: カビ脱窒系に NO 還元酵素(Nor)として関与するシトクロム P450nor は NAD(P)H から直接電子を受け取ることで知られる。これまで ligand-free(resting), CO-bound, NO-bound forms などの結晶構造が解かれていた。その結果、異常な機能を示すにもかかわらず、P450nor の構造は他の P450 スーパーファミリーメンバーの構造とよく似ていた。しかし NADH からヘムへの直接電子伝達という他に例のない機構の解明には NADH あるいはそのアナログとの複合体の構造解明が不可欠であった。P450nor と NAD アナログであるニコチン酸アデニンジヌクレオチド(NAAD)との複合体の結晶化および X 線結晶構造解析に成功した(投稿中)。その結果、NADH から NO-ヘム複合体への立体特異的ヒドリドイオン(H⁻)伝達の興味深い機構が明らかとなった。
- (2) **カビ脱窒系酵素遺伝子の発見**: 脱窒真菌 *C. tonkinense* および麹カビ(*Aspergillus oryzae*)から、細菌脱窒系の脱窒酵素である銅含有型亜硝酸塩還元酵素遺伝子(*nirK*)のホモログを単離することに成功した。*A. oryzae* の *nirK* を大腸菌にクローニングし、発現させたタンパク質は NADH-PMS (人工電子供与系)依存の亜硝酸塩還元活性や銅キレーターによる強い阻害など、細菌酵素と同様の性質を示した。また *nirK* を *A. oryzae* で高発現させると脱窒活性が数十倍増加した。現在 *nirK* の遺伝子破壊を試みている。さらに *nirK* 以外にも脱窒酵素遺伝子候補を発見している。研究代表者は真核微生物(カビ)脱窒の発見者として認知されつつある。しかし未だカビの脱窒を、何か artificial な現象の結果ではないかと疑っている研究者も多い。これまでカビ脱窒系構成成分のうち、遺伝子レベルの解明がなされたものは P450nor のみであった。このカビの Nor は細菌脱窒系の Nor(cytochrome *cb*)とは性質が異なり、また呼吸鎖には連結していない(NADH から直接電子を受取る)ため、カビ脱窒の生理的意義の証明には脱窒の他のステップに関わる酵素遺伝子の取得と解明が必須であった。上記の preliminary な結果は、カビに発見された *nirK* ホモログが細菌脱窒系遺伝子の counterpart であることを確信させるに足るものである。細菌脱窒系構成成分と起源を一つにするカビ遺伝子の発見は、カビの脱窒が細菌系と同様の生理的意義(嫌気呼吸)をもつことを最終的に証明するものであり、研究代表者のオリジナルな発見であるカビ脱窒を世界的に認知させる重要な成果となる。
- (3) **同化型硝酸還元系の硝酸異化代謝への関与**: 教科書にも記載されているように、生物の硝酸還元系は同化型と異化型に大別される。同化型還元は植物と微生物で知られ、硝酸塩を亜硝酸を経てアンモニアに還元する系である。その後アンモニアとなった窒素はグルタミン合成酵素などにより有機態窒素となり、細胞成分となる。この同化型還元系には同化型硝酸塩(aNar)および亜硝酸塩還元酵素(aNir)が関与する。一方異化型は硝酸呼吸とも呼ばれ、嫌気呼吸として働く。我々のカビ脱窒やアンモニア発酵の発見以前は、異化型硝酸還元は細菌でしか知られていなかった。異化型還元系にも同名の酵素が関与するが、異化型の硝酸塩および亜硝酸塩還元酵素(dNar, dNir)と呼んで区別する。これら同化型と異化型の還元酵素は電子供与体と目的が異なり、またタンパク質的にも異なっている。これまで硝酸同化系と硝酸異化代謝系とは互いに無縁であると考えられており、接点は無かった。我々はアンモニア発酵という新たな硝酸還元系を多くのカビに見出したが、硝酸塩のアンモニアへの還元が呼吸ではなく基質レベルのリン酸化による ATP 生産に共役することを明らかにした。そしてこの硝酸還元系に aNar および aNir の関与を酵素活性の面から示していた。本研究では、*Aspergillus nidulans* の aNar 遺伝子(*niaD*)破壊株がアンモニア発酵能を失うことを示し、同化型酵素の硝酸異化(ATP 生産のための)代謝への関与を遺伝子の面からも証明した。さらに脱窒カビ *Cylindrocarpon tonkinense* は亜硝酸からしか脱窒できないと思われていたが、条件によっては硝酸塩も脱窒できることが判明し、硝酸塩から亜硝酸塩への還元系に aNar の関与が示唆されている。現在 *niaD* 破壊株を作成中である。近年植物の aNar が Nir 活性(亜硝酸塩から NO 生成)を示すことが見出されているが、この活性の生理的意義は不明である。少なくともエネルギー代謝としての意義は示されていない。本研究によるカビアンモニア発酵や脱窒における結果は、硝酸同化系の硝酸異化代謝への関与を示す初めての例である。
- (4) **真菌(カビ、酵母)の新たな窒素固定菌発見の可能性**: 窒素サイクルを構成する 3 過程は窒素固定、硝化および脱窒である。近年、硝化と脱窒に真核生物の関与が発見されたが、これまで窒素固定に真核生物の関与を明確に示した例はない。唯一、カビ菌体内に共生する窒素固定細菌の報告がある。本研究により、¹⁵N₂ 由来の窒素を菌体内に取り込むカビ、酵母が 2~3 種発見されている。これら真核微生物の窒素固定反応の解明は、重要発見につながる可能性をもつ。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)
の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会
等における発表状況について記入してください。)

1. Takaya, N., Kuwazaki, S., Adachi, Y., Suzuki, S., Kikuchi, T., Nakamura, H., Shiro, Y., and Shoun, H. Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.* 133 (4), 461-465 (2003)
2. Kuwazaki, S., Takaya, N., Nakamura, A., and Shoun, H. Formate-forming fungal catabolic pathway to supply electrons to nitrate respiration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (4), 937-939 (2003)
3. Watsuji, T., Takaya, N., Nakamura, A., and Shoun, H. A possible role of NADPH-dependent cytochrome P450nor isozyme in glycolysis under denitrifying conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (5), 1109-1114 (2003)
4. Watsuji, T., Takaya, N., Nakamura, A., and Shoun, H. Denitrification of nitrate by the fungus *Cylindrocarpum tonkinense*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (5), 1115-1120 (2003)
5. Takaya, N., Catalan-Sakairi, M. A. B., Sakaguchi, Y., Kato, I., Zhou, Z., and Shoun, H. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), 3152-3157 (2003)
6. Su, F., Takaya, N., and Shoun, H. Nitrous oxide-forming codenitrification catalyzed by cytochrome P450nor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2), 473-475 (2004)
7. Takasaki, K., Shoun, H., Yamaguchi, M., Takeo, K., Nakamura, A., Hoshino, T., and Takaya, N. Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. *J. Biol. Chem.* 279 (13), 12414-12420 (2004)
8. Sasaki, Y., Takaya, N., Nakamura, A., and Shoun, H. Isolation of flavohemoglobin from the actinomycete *Streptomyces antibioticus* grown without external nitric oxide stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (5), in press (2004)
9. Su, F., Fushinobu, S., Takaya, N., and Shoun, H. Involvement of a Glu71-Arg64 couple in the access channel for NADH in cytochrome P450nor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (5), in press (2004)
10. Takasaki, K., Shoun, H., Nakamura, A., Hoshino, T., and Takaya, N. Unusual transcription regulation of the *niaD* gene under anaerobic conditions supporting fungal ammonia fermentation. *Biosci. Biotech. Biochem.* (2004) in press.
11. Umemura, M., Su, F., Takaya, N., Shiro, Y., and Shoun, H. D88A mutant of cytochrome P450nor provides kinetic evidence for direct complex formation with electron donor NADH. *Eur. J. Biochem.* (2004) in press.
12. Oshima, R., Fushinobu, S., Su, F., Zhang, L., Takaya, N., and Shoun, H. Structural evidence for direct electron transfer from NADH to cytochrome P450nor. *J. Biol. Chem.*, submitted.
13. Kaya, M., Matsumura, K., Higashida, K., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akita, O., Takaya, N., and Shoun, H. Cloning and enhanced expression of cytochrome P450nor gene (*CYP55A5*) encoding nitric oxide reductase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, submitted.
14. Kim, D.-H., and Shoun, H. Codenitrification by the fungus *Fusarium solani*. In preparation.
15. Sasaki, Y., Takaya, N., Nakamura, A., and Shoun, H. Mineralization of organic nitrogen by the actinomycete *Streptomyces antibioticus* and possible involvement of nitric oxide in the metabolism as an intermediate. In preparation.
16. Su, F., Fushinobu, S., Takaya, N., and Shoun, H. A unique mechanism for attaining a high catalytic turnover of cytochrome P450nor involving a salt bridge network and anion hole. In preparation.
17. Zhou, Z., Takaya, N., Kobayashi, M., and Shoun, H. Multi-energy metabolic mechanisms of the fungus *Fusarium oxysporum* under lower oxygen environments. In preparation.
18. Nakanishi, Y., Kim, S.-W., Fushinobu, S., Wakagi, T., and Shoun, H. Copper-containing nitrite reductase gene (*nirK*) of the denitrifying fungus *Aspergillus oryzae*. To be submitted.

[学会発表]

1. COST Action 856: Ecological Aspects of Denitrification, with Emphasis on Agriculture. March 25 2004, Marburg, Germany. [基調講演]
2. 日本農芸化学会 2004 年度大会、2004 年 3 月 28 日、広島。[受賞講演]
3. 日本薬学会 2004 年度大会、2004 年 3 月 30 日、大阪。[特別招待講演]
4. The 9th Southeast Asian-Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists. August 19-23 2003, Busan, Korea. [招待講演]
5. The 3rd International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of *Nitric Oxide*. May 24-28 2004, Nara, Japan. [招待講演]

[受賞]

1. 平成 14 年度有馬啓記念バイオインダストリー協会賞
2. 2004 年度日本農芸化学会賞