

真核・原核生物の複合窒素呼吸系の分子機構解明
Molecular mechanism of dissimilatory nitrogen
metabolisms by eukaryotic and prokaryotic cells

祥雲 弘文 (Shoun Hirofumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



研究の概要

研究代表者（代表者）が見出したカビの脱窒、アンモニア発酵、共脱窒、放線菌の脱窒や新規窒素異化代謝について分子生物学的解析を行い、嫌氣的窒素異化代謝系としての機構を分子レベルで明らかにする。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：カビ脱窒、NirK、放線菌、アンモニア発酵、共脱窒

1. 研究開始当初の背景・動機

代表者が発見したカビの脱窒、アンモニア発酵、共脱窒、放線菌の脱窒と窒素異化代謝などの現象は一部を除き、分子（遺伝子）レベルでの解明が進んでいない。これら新現象に関して分子生物学的解明を行い、それら機構を分子レベルで明らかにする。

2. 研究の目的

- (1) カビ脱窒に関わる硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素、その他の構成成分遺伝子取得
- (2) ミトコンドリア嫌気呼吸系としてのカビ脱窒機構解明
- (3) 硝酸同化系の硝酸異化代謝（カビのアンモニア発酵、脱窒）への関与の証明
- (4) P450nor の構造・機能相関解明
- (5) 放線菌の新規窒素異化代謝の解明

3. 研究の方法

(1) 目的遺伝子の取得：ゲノム解読された生物では目的遺伝子に相同性を示す遺伝子を探索し、クローニングする。ゲノム解読されていない場合、一般的には精製タンパク質ペプチド断片の部分アミノ酸配列から縮重プライマーを設計し、PCR, RACE 法などにより目的の cDNA を得る。誘導酵素の場合、SSH (subtractive suppression hybridization) 法による発現遺伝子 cDNA をクローン化する方法が有力である。“マルチソルベント送液システム外” はペプチドの精製に必須である。また、代謝や酵素反応産物の定量など、汎用性が高い。

(2) 脱窒産物 (N₂, N₂O) の定量はガスクロおよびガスマスをを用いる。N₂測定の場合はとくに重窒素 (¹⁵N) でラベルした基質（硝酸、亜硝酸など）を用いる。

(3) 嫌気条件下で生育するカビ・ミトコンドリアの形態および電子伝達系成分の観察は電子顕微鏡、低温スペクトル測定などによった。好気と嫌気での生育における菌の形態観察は蛍光顕微鏡で行った。組み替え宿主の大腸菌や放線菌の菌体破碎は密閉式超音波細胞破碎装置で行った。亜硝酸イオンやタンパク質など、その定量に発色に依存する場合、マイクロプレートリーダーPC システムを用いることが効率的である。

4. 研究の主な成果

(1) カビ脱窒に関わる銅含有型亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*) の取得：カビの本酵素遺伝子が初めて単離され、細菌の同型遺伝子のオルソログであることが明らかとなった。この発見によりカビ脱窒系が細菌の系と同じ起源を持つこと、地球環境の窒素サイクルに貢献していることが示された。さらにそれはミトコンドリア嫌気呼吸系としての最終的証明を与え、内部共生で発生したミトコンドリアの起源と進化に関わる有力な知見を提供した（投稿準備中）。

(2) 硝酸同化系の硝酸異化代謝への関与の証明：カビのアンモニア発酵やある種のカビ脱窒に硝酸同化系（同化型の硝酸および亜硝酸還元酵素）が関与することを証明した。従来これら2種の硝酸代謝系の接点はなかった。硝酸同化系が硝酸異化（ATP生産が目的）に関わる初めての例である。

(3) P450norにおける異常な電子伝達機構の解明

一電子酸化還元中心しか持たないヘムタンパク質であるP450norはNADHから2電子を直接受取るといふ、生体電子伝達セントラルドグマに反する反応を行う。また通常モノオキシゲナーゼ反応を行うP450スーパーファミリーにおいて、一酸化窒素(NO)還元反応という特殊な機能を持つ。これらの性質から当該分野では世界的に注目を集めている。本研究においてP450nor-NAAD(NADアナログ; nicotinic acid adenine dinucleotide)複合体のX線結晶構造解析に成功し、その異常な電子伝達の機構が明らかとなった。

(4) 放線菌脱窒と窒素異化代謝の発見と解析

絶対好気性生物とされる放線菌(*Streptomyces antibioticus*)にも脱窒や硝酸呼吸、基質レベルのリン酸化(発酵)などの嫌氣的エネルギー代謝が存在することを示し、あるいは示唆した。

(5) 共脱窒系の解明：共脱窒とは代表者が見出したユニークな脱窒反応で、亜硝酸(または硝酸)と他の(アミノ酸など)窒素化合物の窒素が結合し、hybridのN₂, N₂Oを生成する現象で、カビに続いて放線菌でも見出された。この共脱窒反応がP450norにより触媒されるなど生理反応であることを示し、今後の興味深い課題を提供した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

(1) 脱窒とは地上の重要な物質循環の一つである窒素サイクルの一過程であり、環境問題や農業などにおいてきわめて重要である。代表者はカビ(真核生物)による脱窒の発見者として世界的に認知されているが、カビ脱窒の生理的意義や自然界における窒素サイクルへの貢献などを疑っている研究者も少なくない。カビ *nirK* 遺伝子の発見はそのような疑問を解消させるものである。さらにこの発見はカビ脱窒系がミトコンドリア嫌気呼吸系として働くことの最終的証明であり、また内部共生により発生したミトコンドリアの起源や進化に重要な知見をもたらした。これらは呼吸や窒素サイクルという普遍的な生命現象における重要発見であり、そのインパクトは大きい。

(2) 硝酸同化系とは、植物や微生物が窒素栄養源として硝酸イオンを利用する際働く普遍的かつ重要な酵素系である。アンモニア発酵の機構解明は、硝酸同化系の異化的利用の初めての例であり、世界的なインパクトを与える。

(3) P450nor における異例の電子伝達は外国グループによる量子化学的解析の対象になるなど、大きな注目を集めている。P450nor-NAAD 複合体構造の解明は、この

課題に一つの決着を与えるものである。

(4) 絶対好氣的と思われる放線菌に嫌気呼吸の存在を初めて示し、そのことを発信している研究者も世界で代表者だけである。カビに続いて放線菌においても普遍性を持つ現象の開拓的研究を進めている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1) シトクロムP450norの生理機能・反応機構・構造 **祥雲弘文**、伏信進矢 生化学 80, 560-568 (2008)

2) ミトコンドリア嫌気呼吸とカビの通性嫌気性 **祥雲弘文** *PNE 蛋白質核酸酵素* 51 (5), 419-429 (2006)

3) Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450nor R. Oshima, S. Fushinobu, F. Su, L. Zhang, N. Takaya, and **H. Shoun** *J. Mol. Biol.* 342 (1), 207-217 (2004)

4) D88A mutant of cytochrome P450nor provides kinetic evidence for direct complex formation with electron donor NADH M. Umemura, F. Su, N. Takaya, Y. Shiro, and **H. Shoun** *Eur. J. Biochem.* 271 (14), 2887-2894 (2004)

5) Isolation of flavohemoglobin from the Actinomycete *Streptomyces antibioticus* grown without external nitric oxide stress Y. Sasaki, N. Takaya, A. Nakamura, and **H. Shoun** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (5), 1106-1112 (2004)

6) Fungal ammonia fermentation - A novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol - Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis K. Takasaki, **H. Shoun**, M. Yamaguchi, K. Takeo, A. Nakamura, T. Hoshino, and N. Takaya *J. Biol. Chem.* 279 (13), 12414-12420 (2004)

7) Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum* N. Takaya, S. Kuwazaki, Y. Adachi, S. Suzuki, T. Kikuchi, H. Nakamura, Y. Shiro, and **H. Shoun** *J. Biochem.* 133 (4), 461-465 (2003)

8) Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways by which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus* Y. Kumon, Y. Sasaki, I. Kato, N. Takaya, **H. Shoun**, and T. Beppu *J. Bacteriol.* 184 (11), 2963-2968 (2002)

ホームページ等 <http://133.11.226.178/>