

アンモニア酸化細菌の分子生物学

Molecular Biology of Ammonia-Oxidizing Bacteria

廣田 隆一, 加藤 純一*, 黒田 章夫

RYUICHI HIROTA, JUNIOCHI KATO, AKIO KURODA

池田 宰, 滝口 昇, 大竹 久夫

NOBORU TAKIGUCHI and HISAO OHTAKE

広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

* TEL: 0824-24-7757 FAX: 0824-24-7047

* E-mail: jun@hiroshima-u.ac.jp

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University,
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: アンモニア酸化細菌, 硝化, 窒素循環, 分子生物学, *Nitrosomonas*

Key words: Ammonia-oxidizing bacteria, nitrification, nitrogen cycle, molecular biology, *Nitrosomonas*

(原稿受付 2002年6月8日/原稿受理 2002年12月7日)

1. はじめに

生命に必須な窒素は、様々な酸化状態をとって生態系を循環している(図1)。窒素のほとんどは大気中の N_2 として存在する。その N_2 を根粒菌, *Azotobacter* やシアンバクテリア等の窒素固定菌が NH_3 に還元する。 NH_3 は生物酸化を受け NO_3^- に酸化される。多くの生物は NH_3 と NO_3^- を窒素源として同化することができ、生体を構成する有機窒素化合物を生成する。生物の排泄物や遺体は主に微生物によって分解され、 NH_3 にまで無機化される。 NH_3 は NO_3^- にまで酸化された後、再び還元され、 N_2 となって大気に戻っていく。生態系での窒素循環で NH_3 から NO_3^- への酸化過程は硝化と呼ばれる。硝化は、 $NH_3 \rightarrow NO_2^-$ と $NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ の2ステップから成っている。このうち、前者の反応を担っているのがアンモニア酸化細菌である。

生活排水, 都市排水, 工業排水中の窒素は、内海や湖沼の富栄養化の原因物質であり、富栄養化を防止するためにはこれら排水から窒素を除去する必要がある。排水からの窒素除去法には、アンモニアストリッピング法, 吸着法, 塩素処理法などの物理化学的な方法と生物学的窒素除去法があるが、日々大量に発生する下水からの窒素除去は、処理能力及び経済性から生物学的窒素除去法に依存しているのが現状である。この生物学的窒素除去法は、まさに生態系で行われている窒素循環を活用している。すなわち、排水中の有機窒素を無機化して NH_3 にし、 NH_3 を硝化($NH_3 \rightarrow NO_3^-$)について脱窒($NO_3^- \rightarrow N_2$)することで窒素除去している。この硝化段階でもやはりアンモニア酸化細菌が活躍している。

18世紀後半にはすでに土壌中で NH_3 が NO_3^- にまで

酸化されることが見いだされていた。このアンモニア酸化反応が生物によるものであることを証明したのは、S. Winogradsky である。Winogradsky は、硝化に関与する細菌(アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌)を単離し、硝化の過程が上記の2段階で行われていることを明らかにした。さらに、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌が、 NH_3 もしくは NO_2^- の酸化の際生じたエネルギーを利用して炭酸固定をする化学独立栄養生物であることを見出した。発見から100年以上もの歴史を有する硝化作用とアンモニア酸化細菌は、常識的な存在となっている。著者のひとり(加藤)は20数年前に使った高校の生物の参考書にもアンモニア酸化細菌(亜硝酸菌と記載されていた)と*Nitrosomonas*の記述があったことを記憶している。高校生にまで知られる存在であるアンモニア酸化細菌であるが、培養の困難さが災いしてその分子生物学の進展は極めて遅れた。しかし、1990年代後半に入り分子生態学的な解析が非常に盛んになり、また、分子レベルでの生理機能の解析も進んできた。そして、2002年には代表的なアンモニア酸化細菌である*Nitrosomonas europaea*の全ゲノム配列が決定された。本総説では、これまでの分子生物学的な解析から描かれるアンモニア酸化細菌像について述べていきたい。

2. アンモニア酸化細菌の分子生態学

1989年出版のBergey's Manual of Systematic Microbiologyでは絶対化学独立栄養性のアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌をひとつの科(*Nitrospiraceae*科)にまとめた³⁾。その後16S rRNAの配列の情報が蓄積し、現在では、亜硝酸酸化細菌は δ -Proteobacteriaの*Nitro-*

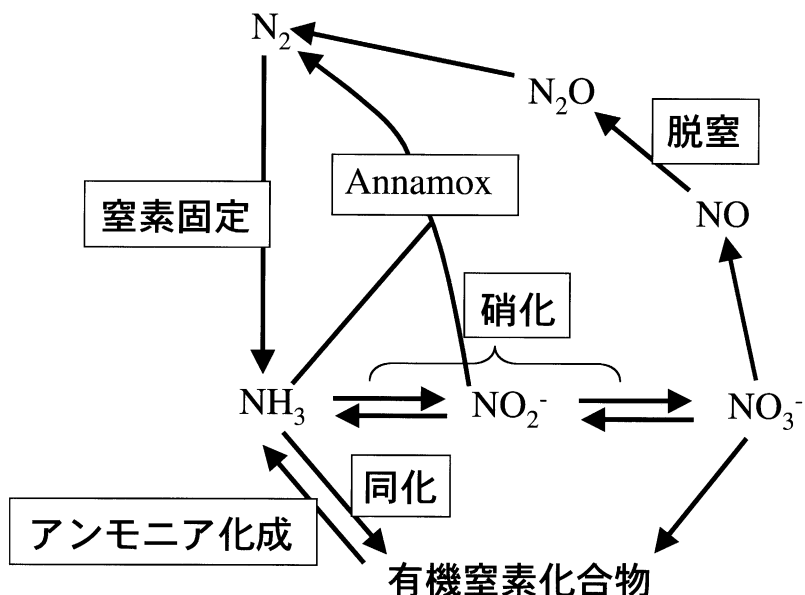


図1. 生態系における窒素循環。

NH_3 と NO_2^- から N_2 を生成する反応は、annamox (嫌気的脱窒) と呼ばれている。最近、annamox の活性汚泥から annamox を行う *Planctomyces* 属細菌が単離された³⁵⁾。

spina, α -Proteobacteria の *Nitrobacter* および *Nitrospira* グループの *Nitrospira* に分類されている²³⁾。また、アンモニア酸化細菌は海洋性の *Nitrosococcus oceanii* 一種のみが γ -Proteobacteria に属し、他の *Nitrosospira*, *Nitrosomonas* および *Nitrosococcus marina* は β -Proteobacteria に分類されている。

環境試料や活性汚泥から培養によって単離されてくるアンモニア酸化細菌の多くは *Nitrosomonas* 属細菌であったので、自然界や活性汚泥中の主要なアンモニア酸化細菌は *Nitrosomonas* 属細菌であると考えられてきた。16S rRNA を対象にした PCR 検出解析技術や蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 技術の向上により、現時点で培養が不可能なアンモニア酸化細菌の定量的解析も可能になった。これら分子生態学的技術を駆使して、森林土壌、農地土壌、活性汚泥、河川および海洋におけるアンモニア酸化細菌の分布を改めて分析する研究が数多く行われるようになった (文献23) を参照のこと)。その結果、*Nitrosomonas* 属細菌よりむしろ *Nitrosospira* 属細菌の方が優先している環境が多々見い出され、従来のアンモニア酸化細菌の分布に対する認識の見直しが迫られている。アンモニア酸化細菌の分子生態学については、2001年に Kowalchuk と Stephen が優れた総説²³⁾ を発表している。この総説では218もの文献を集め、アンモニア酸化細菌の分子生態学の動向、その活用と問題点、今後の展望について論じている。さらにアンモニア酸化細菌の 16S rRNA と *amoA* の配列およびそれら遺伝子の増幅に用いられた PCR プライマーを網羅的にまとめた一覧表をウェブ上 (<http://www.nioo.knaw.nl/projects/AOB>) に公開している (一覧表はデータの増加に伴い更新されるとのことである)。分子生態学を行う研究者にとって極めて有用な情報であるので、一覧することをお勧めする。

3. アンモニア酸化細菌の分子遺伝学的ツール

アンモニア酸化細菌の生理機能の分子生物学は、比較的培養が容易な *Nitrosomonas* 属細菌を中心に進展している。この *Nitrosomonas* 属細菌にしても培地成分に対して極めてデリケートなので、用いる試薬等にも神経を配る必要がある。例えば、いつもと異なる試薬メーカーもしくはグレードの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (エネルギー源および N 源) や HEPES (緩衝剤) を用いたら増殖しなくなったという経験を何度かした。現在筆者らは、和光純薬の酵素精製用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ とナカライの分子生物学研究用の HEPES を用いている。*Nitrosomonas* 属細菌は寒天 (ナカライ寒天末、精製寒天末および Difco Bacto agar) で固化した平板培地ではコロニーを形成しない。形質転換株等のコロニーを形成させる時には、Gellan Gum カシリカゲルで固化した平板培地を用いる。筆者らは、和光純薬の植物組織培養用の Gellan Gum を用いている。液体培養が首尾よくいくと、菌体濃度は最終的に OD_{600} で0.1程度になる。また、平板培養では1週間程で1 mm 程度のコロニーに成長する。

Nitrosomonas 属細菌では、遺伝子導入 (遺伝子増幅) と遺伝子破壊の技術が確立している。遺伝子導入では、和合性グループ IncQ の広宿主域プラスミド pKT240 由来のプラスミドベクター pKLUX20²¹⁾ が利用できる。遺伝子マーカーとしては、Tn903 由来のカナマイシン耐性遺伝子が使える。また、高濃度アンモニア排水の生物処理施設から分離された *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株が保有する 1.8 kb (pAYS) と 1.9 kb (pAYL) のプラスミドを用いた *Nitrosomonas*-大腸菌のシャトルベクター pCSL1 (図2)³⁹⁾ が構築されている。これらプラスミドの導入は、エレクトロポレーションによって行われている^{21,39)}。

in vivo の DNA 相同組み換えを利用した染色体上の特定の遺伝子の挿入・欠失変異も可能である^{12,13,40)}。ま

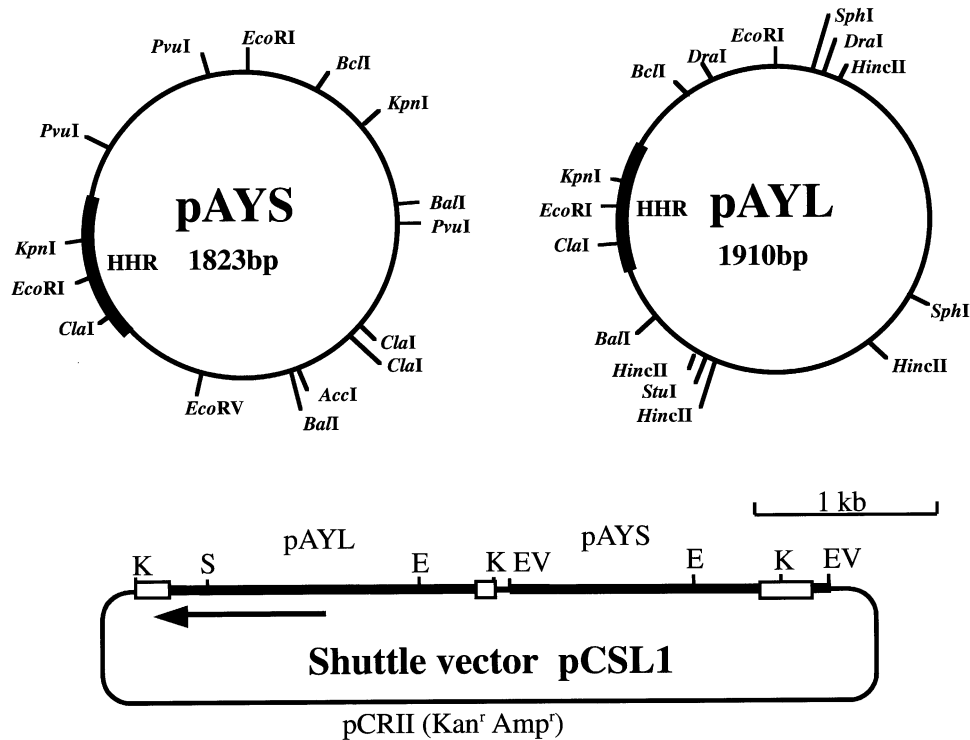


図2. *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株が有する2種類のプラスミド pAYL と pAYS および大腸菌-*Nitrosomonas* 間のシャトルベクター pCSL1 の制限酵素地図。
Nitrosomonas sp. ENI-11 株は高濃度のアンモニアを含んだ工業排水を処理する活性汚泥から分離されたアンモニア酸化細菌³⁹⁾。pCSL1 は、pAYS, pAYL および大腸菌のプラスミドベクター pCRII の三者を連結した組換えプラスミドで、大腸菌と *Nitrosomonas* 属細菌で複製する。HHR, pAYS と pAYL に存在する 262 bp の共通配列。 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株と *N. europaea* の染色体にも存在する。複製起点と考えられている。

ず、*Nitrosomonas* 属細菌で複製しないプラスミド（例えば pUC 系のプラスミド）にターゲットとなる遺伝子をクローニングする。次いで、遺伝子の読み取り枠 (ORF) 内に pUC4K 由来のカナマイシン耐性遺伝子カセットやアンピシリン耐性遺伝子を挿入し、遺伝子破壊用プラスミドを構築する。構築した遺伝子破壊用プラスミドを電圧ポレーションにより *Nitrosomonas* 属細菌に導入し、カナマイシン耐性もしくはアンピシリン耐性の形質転換株を選択することで遺伝子破壊株を取得できる。現在までのところ、遺伝子導入よりも遺伝子破壊株を用いた遺伝学的解析が主に行われている。

4. アンモニア酸化系の分子生物学

4.1 アンモニア酸化系の生化学

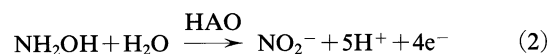
環境バイオテクノロジーの観点からのアンモニア酸化細菌の最も重要な機能は、アンモニア酸化能である。また生態学や生物学の観点からも、やはりアンモニア酸化系が最も重要なポイントである。ということで、*Nitrosomonas* 属細菌で進展している分子生物学もアンモニア酸化系を焦点にあてている研究がほとんどである。

NH₃ はまず細胞膜に存在するアンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) によって NH₂OH (ヒドロキシルアミン) に酸化される (1式) (図3)。



この反応は、還元力を消費して酸素 1 原子を付加する典型的なモノオキシゲナーゼ反応である。AMO は Cu²⁺ によって活性化される膜結合型蛋白質であり⁷⁾、アルチオウレアやキサントゲン酸などの Cu キレート剤¹⁶⁾、アセチレンおよび光によって阻害される¹⁷⁾。AMO のアミノ酸配列はメタン酸化細菌の膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) と高い相同性を示すほか、基質特異性 (例えば両者ともトリクロロエチレンを基質とする) や阻害剤の効果³⁴⁾ など多くの類似した性質を持つ。このことから、AMO と MMO は進化的に関連した酵素であると考えられている¹⁰⁾。

AMO によって生じた NH₂OH は、続いてペリプラズム空間に存在するヒドロキシルアミノオキシドレダクターゼ (HAO) によって NO₂⁻ に酸化される (2式) (図3)。



HAO は分子量 63 kDa のサブユニットが三量体構造をとっている³⁾。それぞれのサブユニットにつき 8 分子のヘムを含む非常にユニークな蛋白質である²⁰⁾。HAO のアミノ酸配列と高い相同性を示す蛋白質は今のところは知られておらず、アンモニア酸化細菌特有の酵素といえよう。

HAO による NH₂OH の酸化によって引き抜かれた 4 つの電子はシトクローム c₅₅₄ が受け取る²⁾。4 つの電子のうち 2 つは AMO のモノオキシゲナーゼ反応に使わ

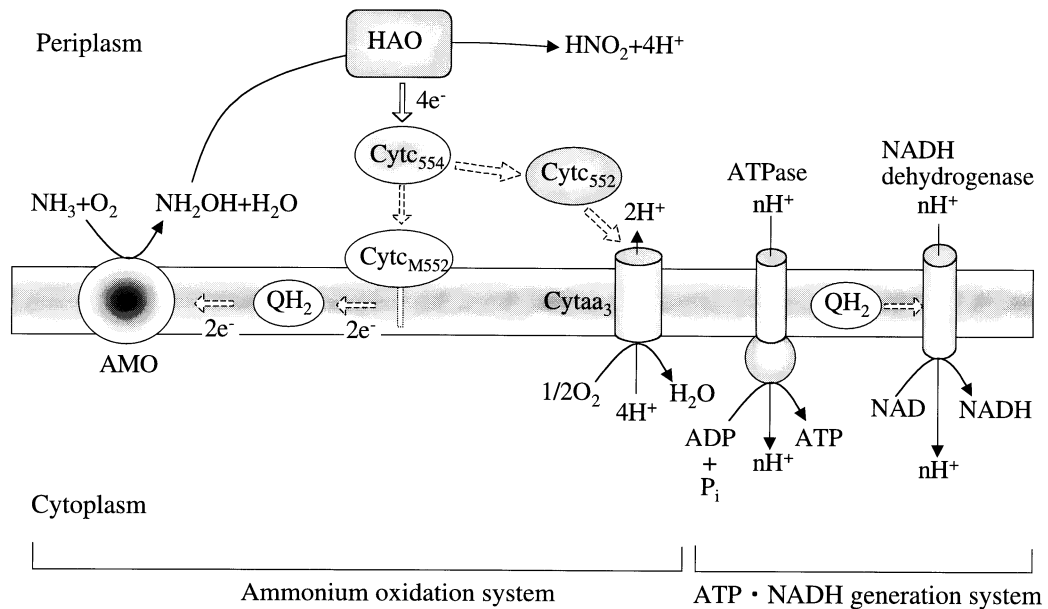


図3. *N. europaea* のアンモニア酸化系。

実線の矢印は物質の流れ、白抜き矢印は電子の流れを表す。白抜き矢印で点線のもの、はまだ実験的な証明が行われていない経路。AMO, アンモニアモノオキシゲナーゼ; Cyt_{aa3}, シトクロームaa₃; Cyt_{c552}, シトクロームc₅₅₂; Cyt_{c554}, シトクロームc₅₅₄; Cyt_{cM552}, シトクロームc_{M552}; HAO, ヒドロキシルアミノオキシドレダクターゼ; QH₂, 還元型ユビキノロン。

れる。残り2つの電子が末端酸化酵素（シトクロームaa₃⁶⁾に受け渡され、エネルギー生成に使われる。一方、NAD(P)⁺の還元はATPを消費し逆行電子伝達系を駆動して行われる⁷⁾。このNAD(P)の還元反応のエネルギー効率の悪さが、アンモニア酸化細菌の増殖速度の遅さに反映しているものと思われる。

4.2 アンモニア酸化系の分子遺伝学

(1) アンモニア酸化系の遺伝子

Nitrosomonas 属細菌のアンモニア酸化系の酵素の遺伝子で最初にクローニングされたのは、*Nitrosomonas europaea* のAMOをコードする遺伝子(*amoA*と*amoB*)で1993年のことである²⁵⁾。*amoA*のクローニングが1993年と遅れた理由は2つある。ひとつは、AMOはアンモニア酸化細菌にとって必須な酵素であるから、その変異は致死変異と予想される。そのため、AMO遺伝子の変異株の取得の試みがまったくされていなかったことが挙げられる。もうひとつは、活性を持った形でAMOの精製が困難であったことである。そのような状況の中、アセチレンによりAMOが不可逆的に失活すると同時に約27 kDaの膜結合型蛋白質にアセチレンが結合する事実に着目し¹⁸⁾、McTavishらは¹⁴Cアセチレンで標識される*N. europaea*の27 kDaの膜結合型蛋白質を精製した²⁵⁾。その精製蛋白質のアミノ酸配列を基にクローニングされたのが*amoA*である²⁵⁾。*amoA*のすぐ下流にある遺伝子は、27 kDaの蛋白質と同時に精製されてくる40 kDaの蛋白質をコードしていたことから、*amoB*と命名された⁴⁾。*amo*遺伝子の機能発現に成功したとの報告は今だもってないので、*amoAB*がAMOをコードしていることを証明する厳密なデータはまだない。しかし、アセチレンの結合性、MMOとの相同性、今のところすべてのアンモニア酸化細菌から*amoAB*が検出され

ていることから、*amoAB*はAMOの遺伝子であると受け入れられている。*amoAB*のクローニングから4年後、第3の*amo*遺伝子とされる*amoC*が報告された²²⁾。*amoC*は*amoAB*のすぐ上流に存在すること、*N. europaea*だけでなく*Nitrosospira*, *Nitrosococcus*にも存在すること、*amoAB*とポリシストロニックに転写されることから³¹⁾、AMOの遺伝子のひとつであると考えられている。しかし、*amoC*の遺伝子産物の機能についてはまったく不明である。HAO³⁾とシトクロームc₅₅₄²⁾は活性を持った蛋白質として精製できるので、クローニングされた*hao*²⁹⁾と*hcy*^{5,11)}がHAOとシトクロームc₅₅₄をコードしていることは容易に受け入れられた。

(2) アンモニア酸化系遺伝子の重複

アンモニア酸化系の分子遺伝学的解析が始まった当初から、*amoCAB*, *hao*および*hcy*が複数コピー存在することが話題になっていた²⁶⁾。*N. europaea*のゲノムには*amoCAB*と*hyc*が2コピー、*hao*が3コピー存在する。*Nitrosomonas* sp. ENI-11株でも同様であった⁸⁾。さらにNortonらは13株のアンモニア酸化細菌の*amoCAB*オペロンを調べ、β-Proteobacteriaのアンモニア酸化細菌はこれを2~4コピー有するのを見出している²⁷⁾。アンモニア酸化系の遺伝子の重複は、β-Proteobacteriaのアンモニア酸化細菌の共通の遺伝学的特徴のようである(ちなみにγ-Proteobacteriumの*Nitrosococcus*には1コピーの*amoCAB*しか存在しない²⁷⁾)。

*N. europaea*と*Nitrosomonas* sp. ENI-11株でそれぞれの*hao*遺伝子、また、*N. europaea*でそれぞれの*amoA*遺伝子の破壊が試みられ、いずれの破壊株も取得できた^{12,13,40)}。このことから、いずれの遺伝子も生育に必須ではないことがわかった。*Nitrosomonas* sp. ENI-11株については、3つの*hao*遺伝子(*hao*₁, *hao*₂および*hao*₃)のうち2つ(*hao*₁と*hao*₃)を同時に破壊した変異株も構

築でき、*hao*₂ 遺伝子のみあれば生育できることがわかった⁴⁰⁾。

N. europaea では2つの*amo*遺伝子のいずれの破壊株も取得できているので、両遺伝子とも機能していることは明らかである¹³⁾。*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株では、*hao*₁-*hao*₃ 二重破壊株が取得できるので、*hao*₂ は機能しているはずである。さらに、プロモーターを欠失したカナマイシン耐性遺伝子カセットを *hao* の転写方向と順方向に挿入するような破壊株の構築を行ったところ、やはりすべての *hao* 遺伝子についてカナマイシン耐性を示す破壊株が構築できた⁴⁰⁾。このことから、*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の3つの *hao* 遺伝子はすべて転写されていることが示唆された。このように、アンモニア酸化系の重複した遺伝子コピーは擬遺伝子ではなく機能的な遺伝子である。

遺伝子重複の意義として次のことが考えられる。

1) 新しい遺伝子の獲得のための機構²⁸⁾。遺伝子に重複があれば、その遺伝子が細胞の生存に必須の機能を持つものであったとしても、余分な遺伝子は細胞に必須ではなく、その生物の存在を脅かすことなく変異を受け入れられる。その変異が個体に対して有利に働けば、新機能を持つ遺伝子として集団に固定すると考えられる。真核生物のグロビン遺伝子ファミリーやアルドラーゼ遺伝子ファミリーがこの例に相当する。

2) 遺伝子産物の要求量充足能力の獲得。物質代謝で一定の時期にある遺伝子産物が多量に要求される場合、遺伝子を重複して遺伝子産物の生産量を上げれば、その要求に応じることができる。rRNA 遺伝子や転写伸長因子 EF-Tu 遺伝子³²⁾ がそれに相当する。

3) バックアップ。生存に必須な遺伝子が複数コピーあれば、そのひとつに変異が入ったとしても致死変異は免れる。

N. europaea には、2組の *amoCAB* オペロンから離れて第3の *amoC* 遺伝子が存在する²²⁾。*amoCAB* オペロン内の *amoC* の遺伝子産物の間には99%の相同性がある。しかし、オペロンから離れた *amoC* の遺伝子産物は、オペロン内のものと83%の相同性しかない。このことから、第3の *amoC* は1) の例にあてはまるかもしれない。一方、*amoAB* と *hao* に関しては *N. europaea* でも *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株でも互いに99%以上の相同性を示すことから、1) に該当するとは言いがたいようである。また、やはりアンモニア酸化細菌の生存に必須な遺伝子であるリブローズ 1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ/オキソゲナーゼ(炭酸固定酵素) 遺伝子 *cbbL* と *cbbS* は1コピーずつしかない^{9,36)}、*Nitrosomonas* 属細菌が積極的に3) の戦術をとっているようには思えない。標準自由エネルギー変化がさほど大きくない NH₃ から NO₂⁻ の酸化反応から生育に必要なエネルギーを掻き集めるためには、著量のアンモニア酸化系の酵素群が必要であり、遺伝子重複はその要求を満たすための算段ではないかと思う。*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株ではどの *hao* 遺伝子を破壊しても親株より HAO 活性および比増殖速度が低下することは⁴⁰⁾、この考えを支持するものである。一方、*N. europaea* ではどの *hao* 遺伝子の破壊株も親株と同等の増殖を示した¹²⁾。*N. europaea* では HAO 活性が増殖の律速になっ

ていないため、このような結果になったのかもしれない。あるいは、ひとつの *hao* 遺伝子が機能を失うと、他の *hao* 遺伝子の発現量が増加して変異による HAO 供給量の減少を補うような機構があるのかもしれない。

(3) アンモニア酸化系遺伝子のゲノムマッピング

それぞれの遺伝子コピーにコードされている AMO や HAO はわずか1アミノ酸残基程度しか違わないことから、酵素学的な性状は大きな差はないと思われる。それでは、遺伝子コピーの発現はどのようになっているのだろうか? それぞれのコピーで異なる発現様式を示すのであろうか? この疑問に答えるためには、それぞれのコピーを区別して分析できるようにしなければならない。そこで、筆者らは *amoCAB* 遺伝子と *hao* 遺伝子を *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株のゲノム上にマッピングした⁸⁾。2.8 Mb の *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株ゲノムは制限酵素 *PmeI* で4つの断片に切断される。2コピーの *amoCAB* 遺伝子と3コピーの *hao* 遺伝子はすべて最小の *PmeI* 断片である 485 kb PmD 断片に存在した(図4.A)。*amoCAB* と *hao* を PmD 断片上により詳細にマッピングし、それぞれ *amoCAB*₁, *amoCAB*₂ および *hao*₁, *hao*₂, *hao*₃ と命名した(図4.B)。*hao*₁ と *amoCAB*₁ および *hao*₂ と *amoCAB*₂ はそれぞれ23および15 kb と近接して存在する。2つのペアの間には388 kb の距離がある。*hao*₃ はこれらペアからすくなくとも87 kb 離れて存在する。*hao*₁ と *amoCAB*₁ および *amoCAB*₂ と *hao*₂ の遺伝子間の領域に存在する遺伝子はほとんどが転写伸長因子、RNA ポリメラーゼ、tRNA、リボゾーム蛋白質サブユニットなど転写や翻訳に関与するもので、アンモニア酸化に関与する遺伝子はシトクローム c₅₅₄ とシトクローム c_{M552} 遺伝子のみであった。解読された *N. europaea* のゲノム配列を見てみると、*N. europaea* も2組の *hao* と *amoCAB* がペアを作っている。また、遺伝子ペアの遺伝子間に存在する遺伝子とその並びは *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株と同一であり、これら領域が両株において高度に保存されていることがわかった。ただし、*N. europaea* では遺伝子ペア間の距離は1165 kb も離れている。

(4) ヒドロキシルアミノオキソレダクターゼ(*hao*) 遺伝子の解析

図5は *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の *hao*₁, *hao*₂ および *hao*₃ の周辺領域である。各 *hao* 遺伝子の下流は同様な構造である。機能が不明な *orfX* とシトクローム c₅₅₄ をコードする *hcy* 遺伝子がすべての *hao* 遺伝子の下流に存在する。*hao*₂ と *hao*₃ ではさらにシトクローム c_{M552} をコードする *cycB* が *hcy* に続いて存在する。一方、上流の構造は互いに異なる。いずれの *hao* 遺伝子の上流にも *hao* と転写が同方向である遺伝子が近接して存在している。*hao*₁ の0.2 kb 上流には RNA ポリメラーゼ β' サブユニット遺伝子が、*hao*₂ の0.2 kb 上流には機能不明な ORF が、*hao*₃ ではわずか30 bp 上流にリボゾーム蛋白質 S20 サブユニット遺伝子(*rpsT*)が存在する。図6は *hao* 遺伝子上流の塩基配列を比較したものである。開始コドンの上流15 bp までは3遺伝子ともまったく同じ配列である。*hao*₁ と *hao*₂ ではさらに159 bp 上流まで完全に一致している。このように塩基配列と遺伝子の配置の比較では、*hao* 遺伝子コピーの発現様

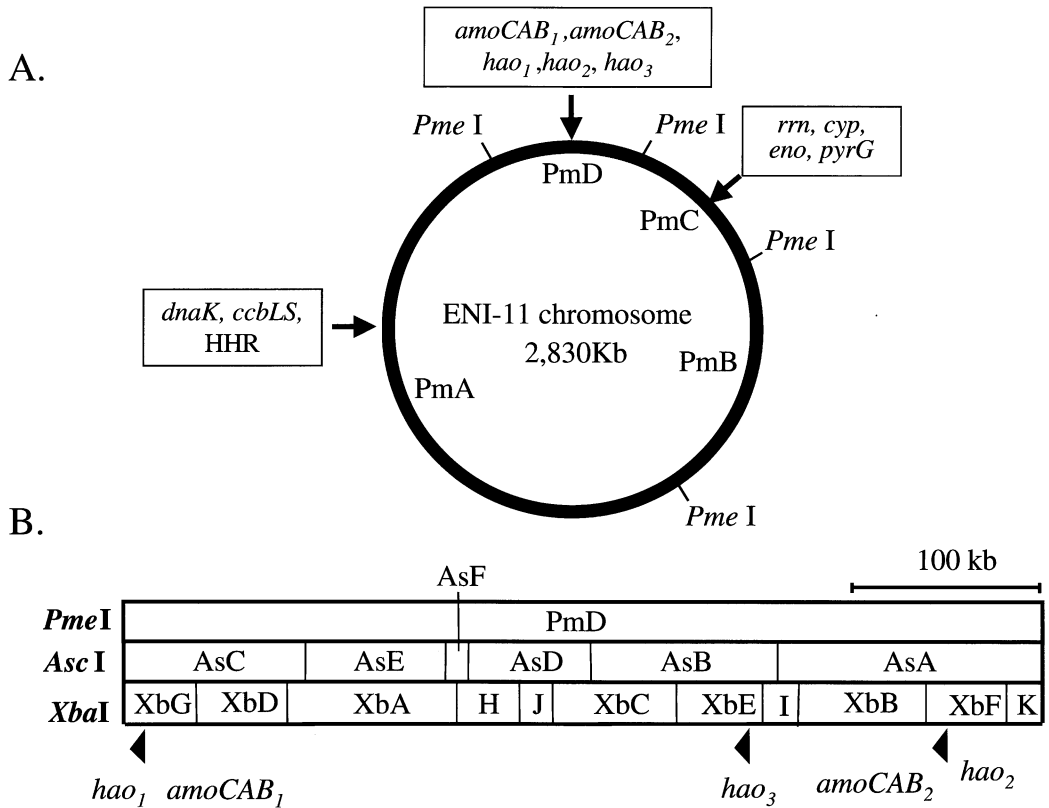


図4. *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株のゲノムの *PmeI* 制限酵素地図 (A) と *PmD* 断片上への *amoCAB* と *hao* 遺伝子のマッピング (B)。
A. 染色体の外側に記載した遺伝子は、それぞれの *PmeI* 断片にハイブリダイズした遺伝子。B. *PmeI*, *AscI* および *XbaI* はそれぞれの制限酵素断片を表す。

式はまったく同一とは考えにくく、異なった発現調節を受けている可能性が考えられた。

そこで、*lacZ* をレポーター遺伝子に持つ pKZ27³⁸⁾ を用いて *hao*₁~*hao*₃ と *lacZ* との転写融合遺伝子を作成して *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株に導入し、それぞれの遺伝子の転写活性を調べた (図7)。いずれの *hao* も増殖に伴い転写量が増加した。*hao*₃ の転写量が最も高く、最も低い *hao*₁ の転写量の約2.5倍あった。さらに様々な長さの上流領域を *lacZ* と転写融合して転写活性を調べ

た結果、*hao*₁ の上流 -400~-550 の領域 (図5) は *hao*₁ の転写の負の制御に必要なことがわかった。また、*hao*₃ の転写の約4分の1は上流の *rpsT* 遺伝子のリードスルーによるものであった。

ついで O₂, NO₂⁻ および NH₂OH への応答を調べたところ、いずれの *hao* 遺伝子の転写も好気条件で転写が高まり、NO₂⁻ および NH₂OH の存在で転写が低下する傾向にあったものの、コピー特異的に大幅に転写が変化することはなかった。また、飢餓状態からの復帰にお

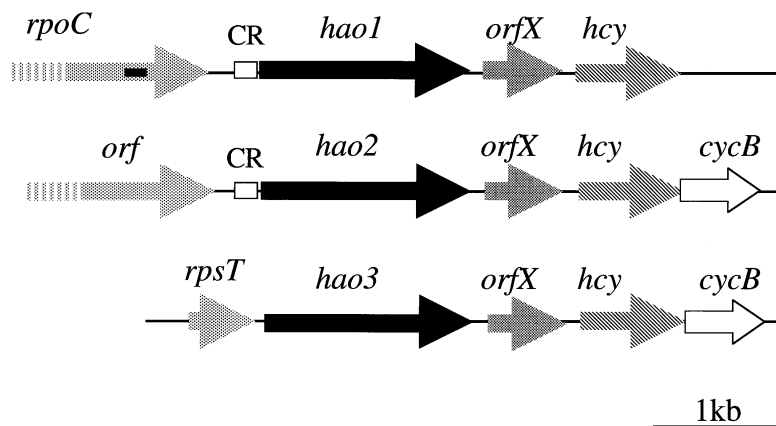
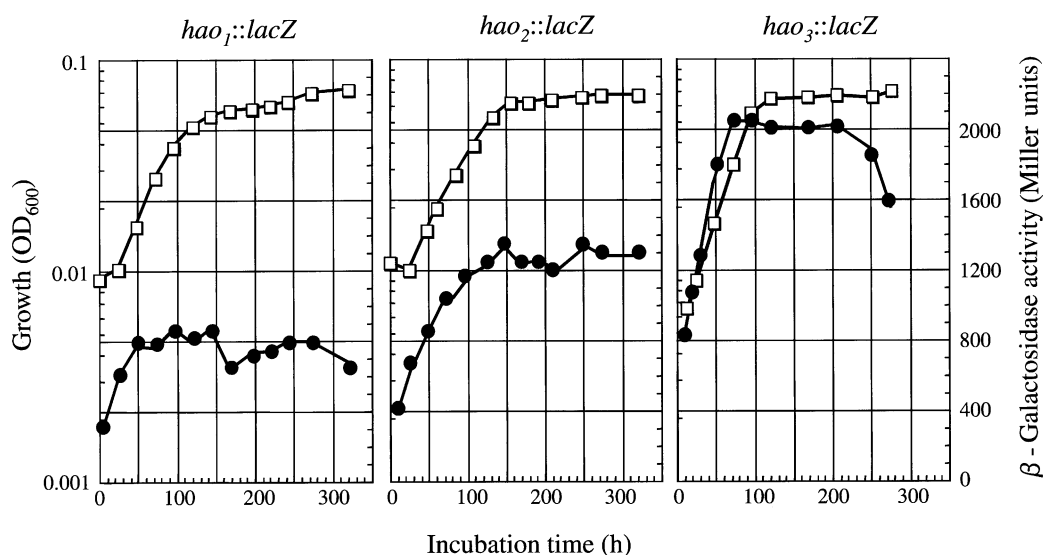


図5. それぞれの *hao* 遺伝子周辺の遺伝子構造。

orfX, 3 コピーの *hao* 遺伝子すべての下流に存在する機能不明の ORF; *hcy*, シトクローム *c*₅₅₄ 遺伝子; *cycB*, シトクローム *c*_{M552} 遺伝子; *rpoC*, RNA ポリメラーゼ β' サブユニット遺伝子; *rpaT*, リボゾーム蛋白質 S20 サブユニット遺伝子; CR, *hao*₁ と *hao*₂ に共通な 159 bp の上流配列。■: *hao*₁ の転写の負の制御に必要な領域。

図6. *Nitrosomonas* sp. ENI-11株の *hao*₁, *hao*₂ および *hao*₃ の上流の配列。図7. *hao*₁~*hao*₃ と *lacZ* の転写融合遺伝子を搭載したプラスミドを有する *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の形質転換株の増殖 (□) と β -ガラクトシダーゼ活性 (●)。

ける発現応答について検討した。*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株をアンモニアを抜いた培地に懸濁して 4°C で保存した。3 日間保存後、飢餓状態になった株をアンモニアを含む培地に植菌し 3 時間培養した後の転写活性を調べた。その結果、*hao*₃ のみの転写が活性化され、*hao*₁ と *hao*₂ の転写は活性化されなかった。*N. europaea* でも同様な操作で 1 mM までの NH_4^+ に濃度依存的に応答して *hao* の転写が活性化されることが報告されているが¹⁴⁾、おそらく *N. europaea* の *hao*₃ に相当する遺伝子が応答しているのであろうと思われる。

以上の結果をまとめると、*hao* 遺伝子の役割分担について次のようなことが考えられる。リボゾームは菌が増殖する上で必須である。その構成蛋白質の遺伝子 (*rpsT*) のリードスルーを受けていること、3 つの *hao* 遺伝子の中で最も転写活性が強いことから、*hao*₃ は増殖に連動して主な HAO を供給していると考えられる。*hao*₃ ほど転写活性は強くないが、*hao*₂ も増殖に連動して HAO を供給する役割を果たしていると考えられる。何らかの転写調節を被る *hao*₁ は、環境条件に応答して HAO 量を調整する役割を持つと考えられる。

amo の転写発現制御は、*N. europaea* で解析されている。*N. europaea* の 2 つの *amoCAB* は *amoC* と *amoA*

間の配列も含め 99% 以上の相同性がある。さらに *amoC* の 328 bp 上流まで配列は同一であるので、両コピーは同様な発現様式を示すと考えられる。*amo* の転写は NH_4^+ 濃度に依存している^{19,30)}。 NH_4^+ 濃度が高まると *amoC*, *amoA* および *amoB* をコードするポリシストロニック転写物が増加する¹⁴⁾。それに伴い、AMO の蛋白質量も増加する¹⁹⁾。

アンモニア酸化系は多くの蛋白質がからみ合った電子伝達系である。また、その下流には ATP 生成系や炭酸固定系がある。これら代謝系がスムーズに機能するためには、構成している蛋白質の量比が適切になるように協調的な制御が働いているに違いない。現在のところ、協調的な制御の観点からの解析はまだ手付かずの状況である。今後の大きな課題である。

5. *N. europaea* のゲノムプロジェクト

2001年9月、アメリカのエネルギー省 (DOE) ジョイントゲノム研究所はついに *N. europaea* sp. Schmidt (ATCC25978) の全ゲノム配列 (2812099 bp) の解読を完了した (<http://genome.ornl.gov/microbial/neur/>)。7.5 kb の正確なくり返し配列、6.3 kb にわたる 315~340 bp

の配列のくり返し, および 8 種類もの IS (挿入配列) の存在により, 配列データのアセンブリは困難をきたしたが, それを克服してやっと解読完了にこぎつけたのである。

解読されたゲノム配列は, *N. europaea* の代謝, 特に絶対独立栄養性について興味ある情報を提供している。独立栄養性のアンモニア酸化細菌を従属栄養的に増殖させる試みは何回も行われたものの, 現在まで成功例はない^{24,33)}。生化学的解析から, TCA 回路やグリオキシル酸経路が不完全なことや^{24,33)} ATP 生成と共役した NADH オキシダーゼ系が欠除していることが指摘され¹⁹⁾, それがアンモニア酸化細菌が有機物を生育基質として利用できない理由であると考えられてきた。そして, ゲノム配列もそれを反映したものであろうと予想されてきた。しかし驚いたことに, グリオキシル酸経路は不完全であるものの, TCA 回路と NADH 依存的酸化的リン酸化系の遺伝子はすべてゲノム上に見い出されたのである (<http://genome.ornl.gov/keggmaps/neur/1/html/map01100.html> を参照)。ただ, グルコースからピルビン酸までの解糖系の遺伝子はすべてあるものの, ピルビン酸からアセチル-CoA を生じる NAD 依存型のピルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は見い出されなかった。このことから, 解糖系と TCA 回路との連携が弱く, グルコースの異化では増殖を支える程のエネルギーを獲得できないとも考えられる。今後 TCA 回路や NADH 依存的酸化的リン酸化系の遺伝子が機能しているか確認する必要があるが, 今までの「絶対独立栄養性」の解釈を見直さなければならなくなるかもしれない。また, アミノ酸, 核酸, 脂肪酸, 補酵素等の生合成系遺伝子は完備している一方, 異化系の遺伝子は多数欠除していた。さらに, 糖類の取り込み系が極めて貧弱であった。これらの特徴は, アンモニア酸化細菌が独立栄養性に特化していることとつながることである。

ひとつめだった特徴として, Fe 輸送に関与すると思われる外膜レセプター蛋白質遺伝子が多数存在する (http://genome.ornl.gov/microbial/neur/1/neur_P.cogs.html)。アンモニア酸化系の蛋白質の多くは多数のヘムを有するため, 増殖には多量の Fe が必要となる。その必要量を満足させるために, 多数の外膜レセプター蛋白質遺伝子が存在していると考えられる。しかし奇妙なことに, クエン酸生合成系を除いてシデロクロム合成に関与する遺伝子はまったくない。この一見矛盾するような事柄は, あるいはアンモニア酸化細菌と環境中の生物との物質面での相互作用を明らかにするための鍵を提供してくれるかもしれない。

2002年5月に開催されたアメリカ微生物学会第102回大会(ソルトレークシティ, ユタ州)で, *N. europaea* のゲノムプロジェクトの結果を報文にまとめている最中であるとのアナウンスがあった。おそらく本総説が読者の手許に届くころには, その報文も発表されていることと思う。

6. おわりに

PCR, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE), キャピラリー DNA シーケンサおよび FISH 等の技術の活用

で, これまで解析が不可能であった培養困難もしくは培養不可能なアンモニア酸化細菌を解析対象にすることができるようになってきた。それにより, 文献²³⁾に見られるように多数のアンモニア酸化細菌の分子生態学の報告が堰を切ったように発表され出した。そして, 従来の培養に依存した解析から形作られてきた環境中のアンモニア酸化細菌像を大幅に塗り替えつつある。これらいわゆる分子生態学的技術は, アンモニア酸化細菌を解析する上で非常に強力な武器であることは間違いない。しかし, これだけではアンモニア酸化細菌の生態学および生物学を解明することは不可能である。菌叢の定量的解析や 3 次元空間的分布の解析には非常に適した技術であるが, 機能解析には不向きである。確かに RT-PCR である程度の機能解析はできるが, とても十分とは言えない。やはり, 培養できるアンモニア酸化細菌を用いて, 生化学, 生理学, 分子生物学を「地道」に押し進めて得た情報も, アンモニア酸化細菌を解釈する上で欠かせないものである。その意味で, アンモニア酸化細菌のモデル生物的存在の *N. europaea* のゲノムプロジェクトが完了したことは極めて重要である。当然のことながら, ゲノム配列だけから *N. europaea* を解釈し尽くすのは不可能である。しかし, ゲノム配列はアンモニア酸化細菌の分子生物学的研究および微生物生態学的研究の方向性を示唆する情報を与えてくれる。例えば, 前述した絶対独立栄養性の解釈や Fe の獲得をめぐる多種生物との相互作用などが挙げられる。ゲノム情報を精査することで, 他にいくつも新たな研究の方向を示すヒントが得られよう。

おおかたのモデル生物と病原菌のゲノムプロジェクトが完了した現在, ゲノムプロジェクトは生態系の物質循環で重要な役割を果たしている環境微生物を主な対象に据えつつある。例えば, 先のアメリカ微生物学会第102回大会では, *N. europaea* と合わせて, *Geobacter*, *Prochlorococcus* および *Rhodospseudomonas* のゲノムプロジェクトが報告された。このようなゲノムプロジェクトの動向は, 環境バイオテクノロジーや微生物生態学にとって大きな追い風である。そう遠くない将来, *Nitrosospira* など *N. europaea* 以外のアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌のゲノム配列も決定されるであろう。こうした順風をうまく捕らえて, アンモニア酸化細菌の分子生物学や, 生態系での機能を分子レベルで解明する分子生態機能学が大きく発展することを願って止まない。

文 献

- 1) Aleem, M.I. 1966. Generation of reducing power in chemosynthesis. II. Energy-linked reduction of pyridine nucleotides in the chemoautotroph, *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 113: 216-224.
- 2) Arciero, D.M., C. Balny, and A.B. Hooper. 1991. Spectroscopic and rapid kinetic studies of reduction of cytochrome c554 by hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry* 30: 11466-11472.
- 3) Arciero, D.M., and A.B. Hooper. 1993. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* is a multimer of an octa-heme subunit. *J. Biol. Chem.* 268: 14645-14654.
- 4) Bergmann, D.J., and A.B. Hooper. 1994. Sequence of the gene, *amoB*, for the 43-kDa polypeptide of ammonia

- monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 759–762.
- 5) Bergmann, D.J., D.M. Arciero, and A.B. Hooper. 1994. Organization of the *hao* gene cluster of *Nitrosomonas europaea*: genes for two tetraheme c cytochromes. *J. Bacteriol.* 176: 3148–3153.
 - 6) Dispirito, A.A., J.D. Lipscomb, and A.B. Hooper. 1986. Cytochrome aa₃ from *Nitrosomonas europaea*. *J. Biol. Chem.* 261: 17048–17056.
 - 7) Ensign, S.A., M.R. Hyman, and D.J. Arp. 1993. In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.* 175: 1971–1980.
 - 8) Hirota, R., A. Yamagata, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2000. Physical map location of the multicopy genes coding for ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.* 182: 825–828.
 - 9) Hirota, R., J. Kato, H. Morita, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2002. Isolation and characterization of *cbbL* and *cbbS* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large and small subunits in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 632–635.
 - 10) Holmes, A.J., A. Costello, M.E. Lidstrom, and J.C. Murrel. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* 132: 203–208.
 - 11) Hommes, N.G., L.A. Sayavedra-Soto, and D.J. Arp. 1994. Sequence of *hcy*, a gene encoding cytochrome c-554 from *Nitrosomonas europaea*. *Gene* 146: 87–89.
 - 12) Hommes, N.G., L.A. Sayavedra-Soto, and D.J. Arp. 1996. Mutagenesis of hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea* by transformation and recombination. *J. Bacteriol.* 178: 3710–3714.
 - 13) Hommes, N.G., L.A. Sayavedra-Soto, and D.J. Arp. 1998. Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 180: 3353–3359.
 - 14) Hommes, N.G., L.A. Sayavedra-Soto, and D.J. Arp. 2001. Transcript analysis of multiple copies of *amo* (encoding ammonia monooxygenase) and *hao* (encoding hydroxylamine oxidoreductase) in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 183: 1096–1100.
 - 15) Hooper, A.B. 1969. Biochemical basis of obligate autotrophy in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 97: 776–779.
 - 16) Hooper, A.B., and K.R. Terry. 1973. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* 115: 480–485.
 - 17) Hooper, A.B., and K.R. Terry. 1974. Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* 119: 899–906.
 - 18) Hyman, M.R., and P.M. Wood. 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* 227: 719–725.
 - 19) Hyman, M.R., and D.J. Arp. 1995. Effects of ammonia on the de novo synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. *J. Bacteriol.* 177: 4974–4979.
 - 20) Igarashi, N., H. Moriyama, T. Fujiwara, Y. Fukumori, and N. Tanaka. 1997. The 2.8 Å structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* 4: 276–284.
 - 21) Iizumi, T., M. Mizumoto, and K. Nakamura. 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3656–3662.
 - 22) Klotz, M.G., J. Alzerreca, and J.M. Norton. 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 65–73.
 - 23) Kowalchuk, G.A., and J.R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 485–529.
 - 24) Matin, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 433–468.
 - 25) McTavish, H., J.A. Fuchs, and A.B. Hooper. 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175: 2436–2444.
 - 26) McTavish, H., F. LaQuie, D. Arciero, M. Logan, G. Muddifrom, J.A. Fuchs, and A.B. Hooper. 1993. Multiple copies of genes coding for electron transport proteins in the bacterium *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175: 2445–2447.
 - 27) Norton, J. M., J.J. Alzerreca, Y. Suwa and M.G. Klotz. 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177: 139–149.
 - 28) Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag New York Inc., New York, NY, USA.
 - 29) Sayavedra-Soto, L.A., N.G. Hommes, and D.J. Arp. 1994. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 176: 504–510.
 - 30) Sayavedra-Soto, L.A., N.G. Hommes, S.A. Russell, and D.J. Arp. 1996. Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. *Mol. Microbiol.* 20: 541–548.
 - 31) Sayavedra-Soto, L.A., N.G. Hommes, J.J. Alzerreca, D.J. Arp, J.M. Norton, and M.G. Klotz. 1998. Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 81–88.
 - 32) Sela, S., D. Yogev, S. Razin, and H. Bercovier. 1989. Duplication of the *tuf* gene: a new insight into the phylogeny of eubacteria. *J. Bacteriol.* 177: 581–584.
 - 33) Smith, A.J., and D.S. Hoare. 1978. Specialist phototrophs, lithotrophs, and methylophs: a unity among a diversity of prokaryotes? *Bacteriol. Rev.* 41: 419–448.
 - 34) Stirling, D.I., and H. Dalton. 1977. Effect of metal-binding and other compounds on methane oxidation by two strains of *Methylococcus capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 114: 71–76.
 - 35) Strous, M., J.A. Fuerst, E.H. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. T. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J.G. Kuenen, and M.S. Jetten. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature.* 400: 446–449.
 - 36) Utaker, J.B., K. Andersen, A. Aakra, B. Moen, and I.F. Nes. 2002. Phylogeny and functional expression of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the autotrophic ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira* sp. isolate 40KI. *J. Bacteriol.* 184: 468–78.
 - 37) Watson, S.W., E. Bock, H. Harms, H.-P. Koops, and A.B. Hooper. 1989. Nitrifying bacteria, Vol. 3 pp. 1808–1834. In J. T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt(ed.), *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
 - 38) Wu, H., J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2000. Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182: 3400–3404.
 - 39) Yamagata, A., J. Kato, R. Hirota, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 1999. Isolation and characterization of two cryptic plasmids in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.* 181: 3375–3381.
 - 40) Yamagata, A., R. Hirota, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2000. Mutational analysis of the multicopy *hao* gene coding for hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1754–1757.