

特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

高度好塩環境における窒素循環，特に脱窒作用に関する生化学

吉松 勝彦, 藤原 健智

脱窒能を持つ好塩性アーキアは、塩水湖や天日塩田などの極端な塩水環境における窒素循環を担っていると考えられる。脱窒反応の第一段階を触媒する異化型硝酸塩還元酵素の遺伝子を好塩性アーキアからクローニングしたところ、Nar型硝酸塩還元酵素の遺伝子と、呼吸鎖電子伝達系の構成成分であるシトクロム bc_1 複合体の遺伝子とが連結したオペロン構造を持つことがわかった。また遺伝子改変実験により、好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素が、実際にシトクロム bc_1 と Nar型硝酸塩還元酵素とのハイブリッド酵素である NarBC-NarD-NarGH 複合体として機能することが示唆された。

1. 背景

硝酸塩 (NO_3^-) を、窒素 (N_2) あるいは亜酸化窒素 (N_2O) ガスに変換する生物学的過程を脱窒と呼ぶ。環境中に過剰に蓄積されたアンモニウム塩は、微生物による硝化作用によって硝酸塩へと酸化され、さらに脱窒性の微生物によって大気中に再還元される (図1)。

脱窒能はバクテリアの多くのグループに広く見出されるが、真核生物とアーキアにも脱窒活性を有する種が報告されている¹⁾。真核微生物である菌類の一部は、 N_2O ガスを最終産物とする特徴的な脱窒を行う³⁾。またユーリアーキオータに属する好塩性アーキアとクレナーキオータに属する超好熱性アーキアに脱窒活性を示す種が知られ^{4,5)}、それぞれ飽和濃度の塩水、および沸騰温度に近い高温という極限環境における窒素循環を担っていると考えられる。死海やソルトレイクなどの塩水湖、あるいは天日塩田には、好塩性アーキア、好塩性バクテリア、高度に耐塩性の藻類などの微生物のみからなる生態系が存在する⁶⁾。外部から流入する窒素化合物はこれらの微生物に吸収同化され繰り返

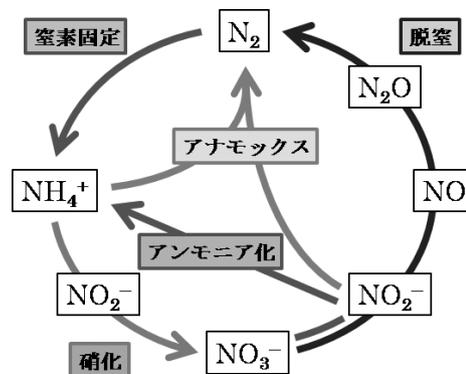


図1 微生物による窒素代謝と窒素循環

脱窒反応は、酸素のかわりに硝酸塩を電子受容体とする嫌気的な呼吸である¹⁾。多くの通性嫌気性バクテリアが脱窒を行う他、真菌とアーキアの一部にも脱窒能が見出されている。硝酸塩を呼吸基質とするが、最終産物として亜硝酸塩、あるいはアンモニウム塩を生じるアンモニア化を行うバクテリアも多い。硝酸塩を2電子還元し亜硝酸塩を生じる異化型硝酸塩還元酵素は、脱窒とアンモニア化の第一段階を触媒する酵素である。硝化細菌の一つである亜硝酸塩酸化細菌は、亜硝酸塩を2電子酸化し硝酸塩を生じる亜硝酸塩酸化酵素を持つが、その構造は Nar型硝酸塩還元酵素とよく似ている。アンモニウム塩と亜硝酸塩から窒素ガスを生成する嫌気的硝化作用として近年注目を集めているアノモックス細菌にも、Nar型の硝酸塩還元酵素が存在するらしい²⁾。

返し利用されるが、最終的には、脱窒により N_2 ガスとして大気中へと還元されていくのであろう。

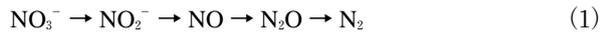
バクテリアによる脱窒は、以前から活発に研究が行われ、その生化学的性質や誘導制御の分子機構は詳しく明ら

静岡大学大学院理学研究科生物科学専攻 (〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836)

Nitrogen cycle in the extremely halophilic environment: biochemistry of haloarchaeal denitrification

Katsuhiko Yoshimatsu and Taketomo Fujiwara (Department of Biological Science, Graduate School of Science, Shizuoka University, 836 Oh-ya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan)

かにされている¹⁾。脱窒は、亜硝酸塩、一酸化窒素(NO), N₂Oを中間生成物とする4段階の連続する還元反応により進行し(式1), 各反応を触媒する還元酵素は、プロトン駆動力の形成に共役することでATP合成に寄与している。すなわち脱窒は、酸素の代わりに硝酸塩を電子受容体として用いる嫌氣的な硝酸塩呼吸として理解することができる。



4種の還元酵素は種々のバクテリアから分離精製されている。硝酸塩の2電子還元を触媒し亜硝酸塩を生成する異化型硝酸塩還元酵素には、それぞれNar型とNap型と呼ばれる2種類の酵素が知られている。Nar型硝酸塩還元酵素はヘテロ三量体NarGHIを機能単位とする膜結合酵素であり、Nap型硝酸塩還元酵素はペリプラズムに局在するヘテロ二量体NapABの可溶性酵素であるが、いずれも活性中心としてモリブデン補酵素を含む。亜硝酸塩をNOに還元する異化型亜硝酸塩還元酵素にもNirK型とNirS型の2種類が知られている。NirKは青～緑色を呈する銅タンパク質であるが、NirSは活性中心としてヘムc, ヘムd₁を含むシトクロムである。両者は同じ酵素機能を持つが、アミノ酸配列の相同性は全くない。2分子のNOからN₂Oを生成する一酸化窒素還元酵素NorBCは、酸素呼吸における電子伝達系末端酵素であるシトクロム酸化酵素と構造・機能の両面で高い共通性を示し、酸素呼吸と脱窒との進化的関係は興味深い⁷⁾。また、亜酸化窒素還元酵素NosZは、特異な4核銅中心Cu₄を活性中心とする不安定な酵素である⁸⁾。

祥雲らは、真核生物である菌類が脱窒を行うことを発見し、その分子メカニズムについて精力的な研究を行っている³⁾。菌類による脱窒はミトコンドリアで行われ、Nar型硝酸塩還元酵素とNirK型亜硝酸塩還元酵素が見出されている。特筆すべきは、菌類の脱窒にシトクロムP450が関与することである。シトクロムP450は、酸素添加酵素として生体分子の生合成や薬剤代謝を触媒するヘム酵素であるが、脱窒性の菌類には一酸化窒素還元活性を示すP450norが存在し、NirKの作用により生成したNOをN₂Oに変換する。菌類には亜酸化窒素還元酵素NosZが存在せずN₂Oガスが最終産物となるが、このN₂Oは二酸化炭素、メタンに次ぐ温室効果ガスであるため、耕作地から発生するN₂Oと菌類による脱窒との関係が議論の対象となっている。

アーキアの脱窒については、好塩性アーキアに古い報告があり⁴⁾、また好熱性アーキアでは、通性好気性の*Pyrobaculum aerophilum*に脱窒能が報告されている⁵⁾。アーキアの一般的な特質として、代謝的な性質はバクテリアに、また遺伝情報伝達に関するメカニズムは真核生物にそれぞれ共通する点が多いことが以前から指摘されている。この

観点から、アーキアによる脱窒の生化学、さらにその誘導制御のメカニズムを研究することで、新しい現象を見出すことができるのではないかと期待した。我々の研究開始時点で、好塩性アーキアについては*Haloferax*属の数種の菌を用いた分析が行われており、硝酸塩還元酵素^{9,10)}と亜硝酸塩還元酵素¹¹⁾に関する初歩的な解析結果が報告されていた。そこで我々は、脱窒活性が知られている*Haloarcula*属の菌株を用い、好塩性アーキアによる脱窒の分子機構を明らかにする研究を開始した。本稿では、脱窒の第一段階である硝酸塩の還元を触媒する酵素の生化学的性質を中心として、未発表のデータもまじえて好塩性アーキアの脱窒機構を解説する。

2. 好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素

*Haloarcula marismortui*は通性好気性であり、硝酸塩存在下に嫌氣的に培養を行うと、N₂とともにN₂Oガスを発生しつつ増殖する。この菌は、ジメチルスルフォキシドなどの硫黄化合物も呼吸基質とすることから、窒素だけでなく硫黄循環にも関与しているのかもしれない。脱窒の第一段階を触媒する硝酸塩還元酵素の構造と機能を明らかにするため、その精製を試みた。目的の酵素活性は細胞膜画分に回収されたので、界面活性剤を用いて可溶化し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製を行った¹²⁾。好塩性アーキアの酵素タンパク質は、その安定性・活性に高濃度の塩を要求することが多いが、本酵素の場合は塩が無くとも安定であり、また高い活性を示した(ただし、2M以上のNaClを添加することで、酵素活性は約2倍に上昇する)。得られた硝酸塩還元酵素は、それぞれ117,000と47,000の分子量を示すα, βサブユニットからなるヘテロ二量体構造を示し、モリブデン補酵素および複数の鉄イオウ中心を含んでいた。得られた酵素標品はバクテリアのNar型酵素と共通する分子的・酵素的性質を示し、さらに遺伝子クローニングの結果、α, βサブユニットのアミノ酸配列は、活性中心であるモリブデン補酵素を含むNarGサブユニット、4個の鉄イオウ中心を含むNarHサブユニットとそれぞれ相同であった¹³⁾。一方、得られた酵素には、バクテリアのNar型酵素に存在するNarIサブユニットが欠けていた。NarIは、Nar型酵素の生理的電子供与体であるキノールとの反応をつかさどるヘムbを含む疎水性のサブユニットである。

遺伝子クローニングの結果、いくつかの興味深い事実が判明した。図2に示したのが、*H. marismortui*の硝酸塩還元酵素の遺伝子構造である。おそらく一つのオペロンであろう計12個のORFから成る遺伝子クラスター構造は、*narGHJI*の4種のORFのみからなるバクテリアのNar型酵素遺伝子オペロンと比較して複雑である。第5, 6, 9番目のORFが、それぞれ*narG*, *narH*, およびシャペロン

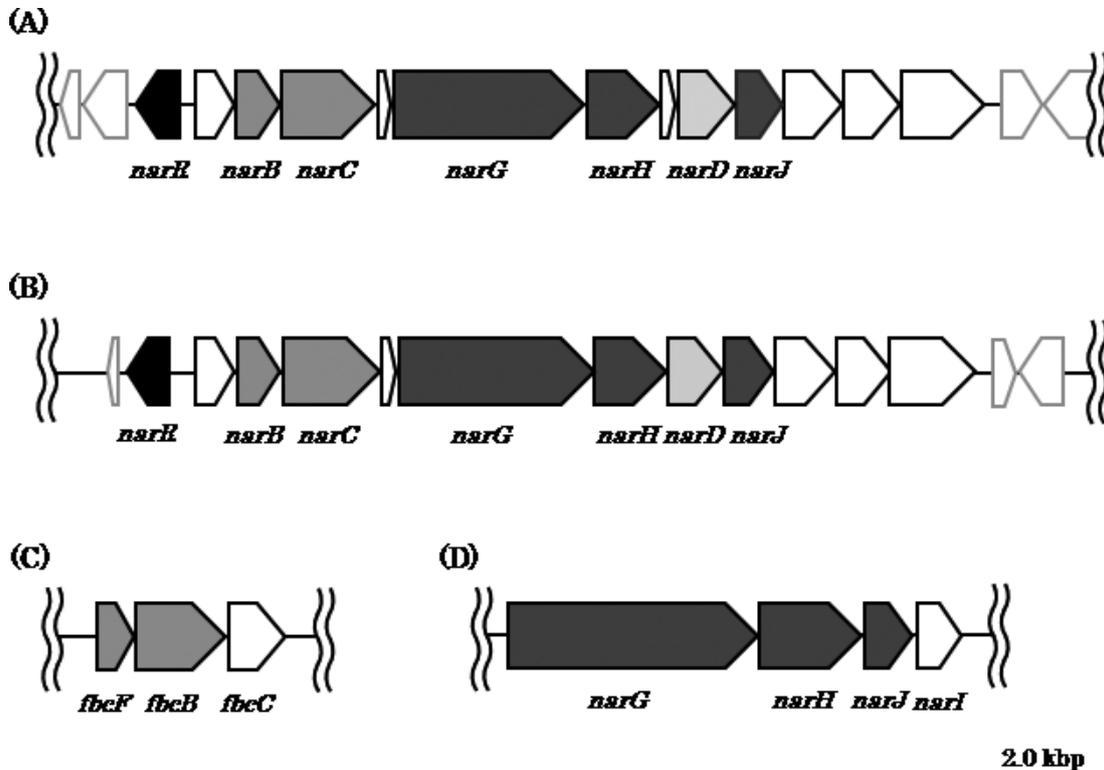


図2 好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素の遺伝子構造

Haloarcula marismortui と *Haloferax volcanii* は系統的関係は離れているが、いずれも脱窒能を有する。(A), (B)は、それぞれ *H. marismortui* ATCC43049 と *H. volcanii* ATCC 29605 (strain DS2) の硝酸塩還元酵素遺伝子の構造である。また、(C)は光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* のシトクロム *bc₁* 遺伝子 *fbcFBC*, (D)は大腸菌の Nar 型硝酸塩還元酵素遺伝子 *narGHJI* である。*H. marismortui* の *narB*, *narC* 遺伝子は、シトクロム *bc₁* の FbcF, FbcB とそれぞれ相同なタンパク質をコードしている。5, 6, 9 番目の ORF はそれぞれ *narG*, *narH*, *narJ* に相同であるが、*narI* 遺伝子は存在しない。*narD* 遺伝子は、疎水性の *b* 型シトクロムをコードしている。他の ORF の機能は不明である。硝酸塩還元酵素遺伝子オペロンの直ぐ上流の *narR* 遺伝子にコードされる DNA 結合タンパク質は、脱窒の誘導に関与している。

様タンパク質をコードする *narJ* に相同であるが、NarI をコードする ORF は存在しない。すなわち、この硝酸塩還元酵素には、NarI に相当するサブユニットは元々存在しないことがわかった。また、2, 3 番目の ORF である *narB*, *narC* 遺伝子は、シトクロム *bc₁* 複合体の Rieske 型鉄イオウサブユニット FbcF, シトクロム *b* サブユニット FbcB と、それぞれ相同なタンパク質をコードしていた。シトクロム *bc₁* はミトコンドリアや様々なバクテリアの呼吸鎖電子伝達系の構成成分であり、呼吸鎖複合体Ⅲとも呼ばれる。この酵素はキノール：シトクロム *c* 酸化還元酵素活性を持ち、酸化的リン酸化による ATP 合成に共役している。このシトクロム *bc₁* 複合体はキノールを酸化する際に、生じる 2 電子のうち 1 電子を再びキノンの還元を用いることによって、効率的に細胞膜の内側から外側へプロトン運び出し、プロトン駆動力を生じる¹⁴⁾。残りの一電子は、FbcF サブユニット、シトクロム *c₁* サブユニット FbcC, さらにシトクロム *c* へと受け渡されていくが、FbcC に対応するタンパク質をコードする ORF は、好塩性

アーキアの遺伝子クラスター中には存在しなかった。以上の結果、*H. marismortui* の硝酸塩還元酵素遺伝子は、Nar 型酵素とシトクロム *bc₁* の遺伝子が連結した構造を持つことが明らかとなった。

また本酵素の細胞内局在性についても、興味深い結果が得られている。バクテリアの Nar 型酵素では、細胞膜表在性の NarG, NarH サブユニットは細胞質側に局在する。一方、*H. marismortui* の *narG* 遺伝子産物の N 末端には、膜間輸送シグナルである TAT (*twin-arginine translocation*) シグナル配列が存在する。すなわち、*H. marismortui* の硝酸塩還元酵素では、バクテリアの Nar 型酵素とは逆に、NarG サブユニットが細胞膜のペリプラズム側に局在することを示唆する。細胞膜透過性の異なる人工電子供与体を用いた分析によって、NarG サブユニットがペリプラズム側に存在することが実際に示された¹⁵⁾。これらの諸性質は、Lledó らにより行われた *Haloferax mediterranei* 硝酸塩還元酵素の生化学的・分子生物化学的解析によっても確認されている¹⁵⁾。

上述のように、好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素は、Nar型酵素とシトクロム *bc₁* とが融合したハイブリッド構造を持つ酵素である可能性が示された。細胞膜画分中のキノール：硝酸塩酸化還元活性が、シトクロム *bc₁* の特異的阻害剤であるアンチマイシン A によって完全に抑えられることもこれを支持する（吉松ら、未発表）。ところが *H. marismortui* 酵素は NarGH というヘテロ二量体として精製され、その後、*narC* 遺伝子産物である *b* 型シトクロムも単独で精製されている¹⁶⁾。これは、酵素分子を細胞膜から抽出する際に、可溶化力が非常に強い界面活性剤 Triton X-100 を用いたため、各サブユニット分子間の結合が弱められ分離してしまったためと考えられる。そこで、生体中でこの酵素が実際にハイブリッド構造をとっていることを確かめることを目的として、NarB サブユニットをターゲットとする分子生物学的実験を行った。

この実験を行うにあたり、*H. marismortui* にかわり、系統的關係は離れているが、同じく脱窒能を有する好塩性アーキアである *Haloferax volcanii* を実験対象として用いることとした。この菌は、全ゲノム情報がすでに明らかになっていること、プラスミドや各種の変異株などのツールが整備されつつあることから、近年、好塩性アーキアの分子生物学的研究によく用いられるようになってきている。*H. volcanii* の硝酸塩還元酵素遺伝子は *H. marismortui* と同様に、2, 3 番目の *narB*, *narC* 遺伝子にシトクロム *bc₁* の FbcF, FbcB と、また 5, 6, 8 番目の *narG*, *narH*, *narJ* 遺伝子に Nar 型酵素との相同タンパク質がそれぞれコードされている（図 2）。まず我々は、*H. volcanii* のウラシル合成酵素 PyrE2 の欠損株である H26 株を用い、*narB* 遺伝子欠損株を作成した。これは、オロト酸のアナログであるフルオロオロト酸 (5-FOA) が、ウラシル合成酵素によって毒性の高いフルオロウラシルに変換されることを利用した方法である。*pyrE2* 遺伝子を載せたプラスミド DNA を、ゲノム上の *narB* 遺伝子の位置に相同組換えにより挿入した後、再度の組換えによって得られる $\Delta narB$ 株を、5-FOA 耐性を指標として選択した¹⁷⁾。また、大腸菌と好塩性アーキアとのシャトルプラスミド¹⁸⁾を用いて、リコンビナント NarB を $\Delta narB$ 株に発現させた。

得られた $\Delta narB$ 株は脱窒による増殖能を失っていたが、リコンビナント NarB を発現させることにより回復した（図 3）。これにより、*H. volcanii* の硝酸塩還元酵素の機能に、NarB サブユニットが必須であることが確かめられた。さらに、His₆ タグ配列を付加した NarB を発現させた $\Delta narB$ 株からの硝酸塩還元酵素の精製を試みた。2M NaCl の共存下に、界面活性剤としてデシルマルトシドを用いて可溶化を行った。その後、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより得られた酵素標品を、SDS-PAGE で分析したのが図 4 である。図中の各バンドの N 末端アミ

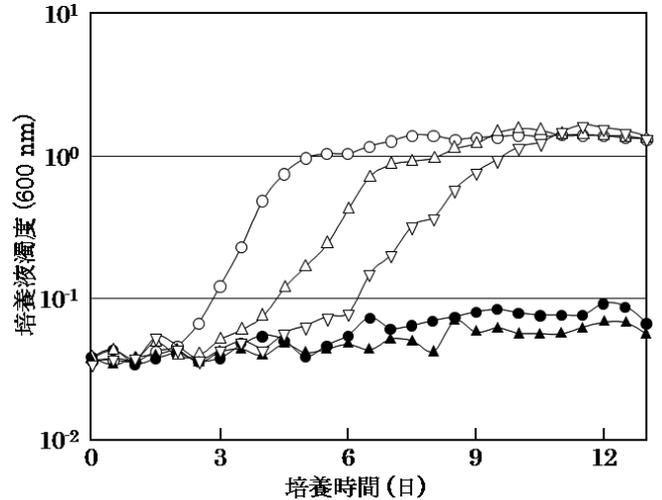


図 3 NarB 欠損株を用いた培養実験

嫌気条件下に硝酸塩を含む培養液中で静置培養すると、H26 株 (○) は脱窒により増殖するが、 $\Delta narB$ 株 (●) は全く増殖しない。しかしシャトルプラスミド pMLH32S を用い、亜硝酸塩還元酵素遺伝子 *nirK* のプロモーターを利用して、 $\Delta narB$ 株に NarB (Δ)、あるいは C 末端に His₆ タグを付加した NarB (▽) を発現させることで、脱窒による増殖能が回復した。▲は pMLH32S を導入した $\Delta narB$ 株の培養の結果である。

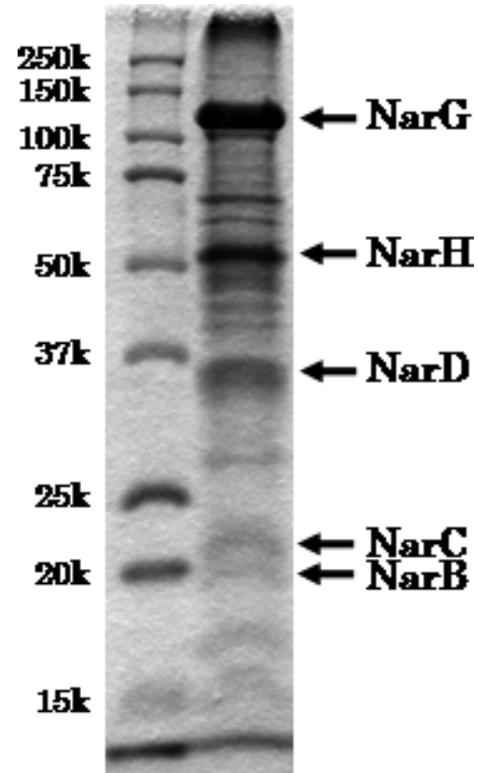


図 4 好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素の精製

His₆ タグ配列を C 末端に付加した NarB を発現させた $\Delta narB$ 株の細胞膜画分から、デシルマルトシドを用いて硝酸塩還元酵素を可溶化し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーによる精製と SDS-PAGE を行った。矢印で示したタンパク質バンドの N 末端アミノ酸配列は、プロセッシング後の NarB, NarC, NarG, NarH, NarD の推定配列とそれぞれ一致した。

ノ酸配列は、プロセッシング後の NarB, NarC, NarG, NarH, NarD タンパク質の推定配列とそれぞれ一致した。これらの結果は、*H. volcanii* の硝酸塩還元酵素が、Nar 型酵素とシトクロム *bc*₁ とが融合した構造を持つハイブリッド酵素として存在することを示す。

3. 構造と機能

以上の結果を踏まえ、好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素の構造とその働きについて考察したい。図5に示すように、この酵素は、バクテリアの Nar 型酵素のコアサブユニットである NarG, NarH と、シトクロム *bc*₁ の FbcF, FbcB サブユニットにそれぞれ相同な NarB, NarC とが複合体化した構造を持つと考えられる。NarD サブユニットは、おそらく *b* 型シトクロムと考えられるが、NarI とは相同性は示さない。ここで注意すべきなのは、Nar 型酵素

の生理的電子供与体であるキノールとの反応部位である NarI, シトクロム *bc*₁ からの電子をシトクロム *c* に渡す機能を持つ FbcC, それぞれに対応するサブユニットが、いずれもこの複合体の中に存在しないことである。一つの可能性として、NarD サブユニットが、NarBC と NarGH との間の電子伝達を仲介しているのではないかと、今のところ考えている。このようなシトクロム *bc*₁ とのハイブリッド酵素は、すでに報告例がある。好気性の好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* の呼吸鎖末端酵素は、シトクロム酸化酵素のサブユニット I, II に対応する SoxM, SoxH, シトクロム *bc*₁ の FbcF, FbcB にそれぞれ相同な SoxF, SoxG, さらに SoxMH と SoxFG 間の電子伝達を行う銅タンパク質 SoxE からなる‘超’複合体として精製されている¹⁹⁾。

NarG, NarH が、バクテリアの Nar 型酵素とは逆に、細

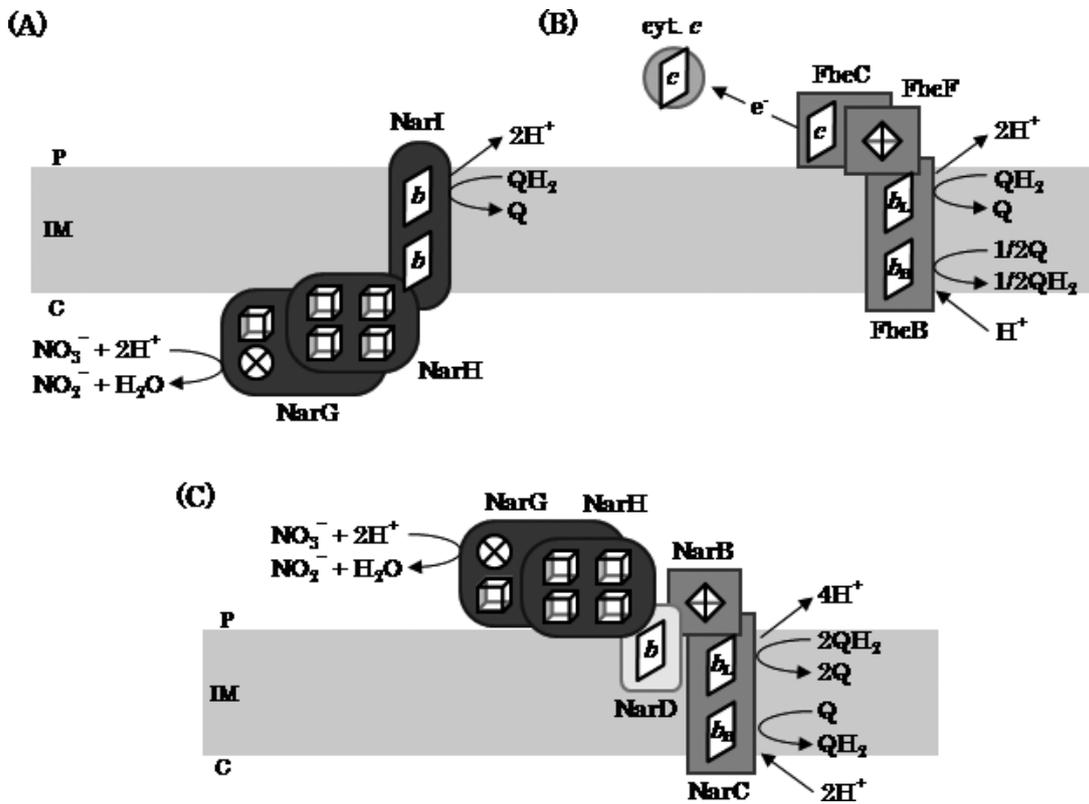


図5 好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素の構造と機能 (A)に示すバクテリアの Nar 型硝酸塩還元酵素は、キノールの酸化をペリプラズム側 (図中 P)、硝酸塩還元を細胞質側 (図中 C) で行うことで、ペリプラズム側が酸性化されプロトン駆動力が生じる。シトクロム *bc*₁ の触媒するキノール：シトクロム *c* 酸化還元反応(B)では、まず、細胞膜 (図中 IM) のペリプラズム側でキノールが2電子酸化される。2電子のうちの1電子は FbcF, FbcC サブユニットを経てシトクロム *c* の還元用いられる。残る1電子は、FbcB サブユニット中のヘム *b*_L を経てヘム *b*_H に渡り、細胞膜の細胞質側でキノールの還元用いられる。Q サイクルと呼ばれるこの過程によって、ペリプラズム側の酸性化が起こる。好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素は、Nar 型酵素の NarG, NarH, シトクロム *bc*₁ の FbcF, FbcB にそれぞれ相同な NarB, NarC, および *b* 型シトクロムと考えられる NarD が NarBC-NarD-NarGH 複合体を構成し、NarGH による硝酸塩還元が NarBC による Q サイクルと共役することで、プロトン駆動力が生じうる (式2)。図中の ⊗ はモリブデン補酵素, ⊠ は [4Fe-4S] 型または [3Fe-4S] 型鉄イオウ中心, ⊡ は Rieske 型鉄イオウ中心, ⊢, ⊣ はそれぞれヘム *b*, ヘム *c* を示す。

胞膜のペリプラズム側に存在するという点は奇妙に思える。バクテリアの Nar 型酵素は、キノールの酸化をペリプラズム側、硝酸塩の還元を細胞質側で行うことでプロトン駆動力を生じる。従って、硝酸塩還元をペリプラズム空間で行いプロトンを消費する場合、その反応は酸化のリン酸化に寄与しないばかりか、かえって ATP 合成を邪魔することになりかねない。ところが、NarBC-NarD-NarGH 複合体の存在を考えれば、図5に示すように NarGH による硝酸塩還元反応が NarBC による Q サイクルと共役するため、効率的なプロトン駆動力の生成が可能であろう (式2)。精製した複合体を用いた、硝酸塩還元と Q サイクルの直接的な共役の証明が今後の課題である。



4. 進化的位置付け

好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素は、バクテリアの Nar 型酵素よりは、特殊な活性を持つ数種のモリブデン酵素と、分子進化的により近縁であることがわかった。図6は、*H. marismortui* の硝酸塩還元酵素の NarG, NarH サブユニットのアミノ酸配列を、いずれもヘテロ三量体構造を持つ膜結合性のモリブデン酵素である、超好熱性アーキア (*P. aerophilum*, *Aeropyrum penix*) およびバクテリア (大腸菌 *Escherichia coli*, 枯草菌 *Bacillus subtilis*, 好熱菌 *Thermus thermophilus*) の硝酸塩還元酵素, *Thauera selenatis* のセレン酸還元酵素, *Azoarcus* EbN1 のエチルベンゼン脱水素酵素と比較したものである。*T. selenatis* は、セレン酸塩を呼吸基質として従属栄養的に増殖することのできるバクテリアであり、この‘セレン酸塩呼吸’の末端酵素である

セレン酸還元酵素は、SerABC 構造を持つ膜結合性酵素である²⁰⁾。また *Azoarcus* EbN1 は、エチルベンゼンを唯一の炭素源として増殖可能なバクテリアであり、エチルベンゼンを酸化し資化する酵素 EbdABC もまた、同様の構造を持つ²¹⁾。図6の A, B は、各酵素のモリブデン補酵素を含む α サブユニット, 鉄イオウ中心を含む β サブユニットそれぞれのアミノ酸配列に基づく系統樹であるが、好塩菌の硝酸塩還元酵素の NarG, NarH が、セレン酸還元酵素の SerA, SerB, エチルベンゼン脱水素酵素の EbdA, EbdB と近縁であることが、一見して見てとれる。また SerA, EbdA, 好塩性・好熱性アーキアの NarG には上述の TAT シグナル配列がそれぞれ存在し、ペリプラズム局在と考えられる。さらに、*H. marismortui* 硝酸塩還元酵素の NarD サブユニットの配列は、セレン酸還元酵素の SerC, エチルベンゼン脱水素酵素の EbdC と非常によく似ている。飛躍を恐れずに言えば、モリブデン酵素タンパク質の共通祖先からバクテリア・菌類の Nar 型硝酸塩還元酵素が分岐する一方、セレン酸還元酵素やエチルベンゼン脱水素酵素などに变化していくグループの中にも硝酸塩還元活性を獲得した酵素が出現し、これがシトクロム *bc*₁ とハイブリッド化したものが好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素となった、というシナリオもあり得るのではなからうか。

5. 展 望

好塩性アーキアの脱窒に関与する酵素タンパク質としては、硝酸塩還元酵素とともに、亜硝酸塩還元酵素が *H. marismortui* から精製され、活性中心として銅を含む NirK タイプの酵素であった²²⁾。また *H. marismortui* のゲノ

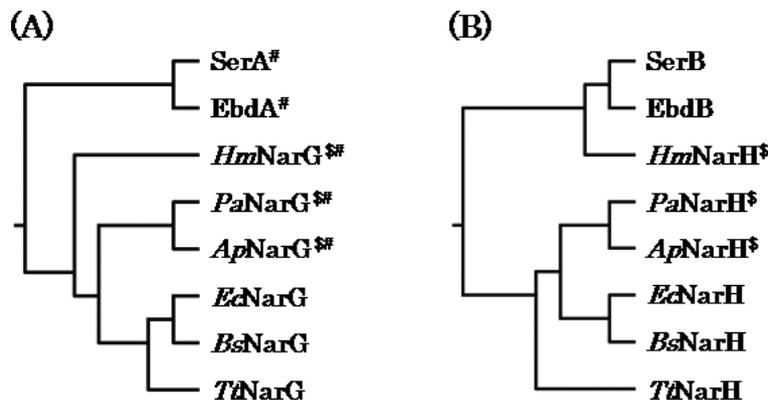


図6 好塩性アーキアの硝酸塩還元酵素の系統関係

H. marismortui の硝酸塩還元酵素 (NarG, NarH) のアミノ酸配列を、超好熱性アーキア *P. aerophilum* (図中 Pa), *A. penix* (Ap) の硝酸塩還元酵素, *E. coli* (Ec), *B. subtilis* (Bs), *T. thermophilus* (Tt) の硝酸塩還元酵素, *T. selenatis* のセレン酸還元酵素 (SerA, SerB), *Azoarcus* EbN1 のエチルベンゼン脱水素酵素 (EbdA, EbdB) と比較し、 α サブユニット (A), β サブユニット (B) それぞれについて、ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) を用いて系統樹を作成した。\$ はアーキアを、# は TAT シグナル配列を持つことを示す。

ム中には、一酸化窒素還元酵素 NorB、亜酸化窒素還元酵素 NosZ にそれぞれ相同なタンパク質の遺伝子も見出されているが、未だ両酵素の精製の報告はない。好塩性アーキアによる脱窒は、バクテリアと同様の4段階の連続還元反応によるものであるが、バクテリアや菌類との間には、硝酸塩還元酵素の構造と機能という点で大きな相違があるといえるだろう。一方、超好熱性アーキアについても、 α (NarG) β (NarH) γ サブユニット構造を持つ硝酸塩還元酵素、および一酸化窒素還元酵素として NorB が精製されているが^{23,24)}、ゲノム情報から NirS 型と考えられる亜硝酸塩還元酵素、および亜酸化窒素還元酵素 NosZ は未精製である。

最近、好塩性アーキアにおける脱窒の誘導制御についても、興味深い結果が得られはじめている。バクテリアによる脱窒は、2成分転写制御系である FixJL、および FNR と呼ばれる転写制御系によってコントロールされているが²¹⁾、これらの転写制御因子のホモログはアーキアには存在しない。我々は、硝酸塩還元酵素遺伝子オペロンの直ぐ上流にコードされている NarR が脱窒の誘導に必須であることを見出している(図2; 志波ら, 未発表)。NarR は DNA 結合タンパク質であり、好塩性アーキア特有の光合成タンパク質であるバクテリオロドプシンの誘導に関わる転写制御因子 Bat と、ある程度相同性を示す²⁵⁾。ところが、Bat 中にある酸素センサーとして機能すると考えられる PAS モチーフは NarR には存在しない。NarR による脱窒の誘導制御のメカニズムもまた、今後さらに研究を進めるべき課題である。

謝辞

執筆に際し激励下さいました亀倉正博先生(好塩菌研究所)に感謝いたします。またこの研究は、野田産業科学研究所、日本宇宙フォーラム、ソルト・サイエンス研究財団、住友財団からの研究助成、日本学術振興会からの科学研究費によって行ったものです。この場をお借りして改めて感謝いたします。

文 献

- Zumft, W.G. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533-616.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Se-

- gurens, B., Schenowitz-Truong, C., Medigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op den Camp, H.J., Drift, C. van der, Cirpus, I., Pas-Schoonen, K.T. van de, Harhangi, H.R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., Vossenbergh, J. van de, Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H. W., Weissenbach, J., Jetten, M.S., Wagner, M., & Le Paslier, D. (2006) *Nature*, **440**, 790-794.
- Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., & Shoun, H. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8350-8355.
- Werber, M.M. & Mevarech, M. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**, 60-65.
- Volkl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A., & Stetter, K.O. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2918-2926.
- Elevi-Bardavid, R., Khristo, P., & Oren, A. (2008) *Extremophiles*, **12**, 5-14.
- Saraste, M. & Castresana, J. (1994) *FEBS Lett.*, **341**, 1-4.
- Brown, K., Tegoni, M., Prudêncio, M., Pereira, A.S., Besson, S., Moura, J.J., Moura, I., & Cambillau, C. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 191-195.
- Bickel-Sandkötter, S. & Ufer, M. (1995) *Z. Naturforsch. C*, **51**, 365-372.
- Hochstein, L.I. & Lang, F. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 380-385.
- Inatomi, K. & Hochstein, L.I. (1996) *Curr. Microbiol.*, **32**, 72-76.
- Yoshimatsu, K., Sakurai, T., & Fujiwara, T. (2000) *FEBS Lett.*, **470**, 216-220.
- Yoshimatsu, K., Iwasaki, T., & Fujiwara, T. (2002) *FEBS Lett.*, **516**, 145-150.
- Iwata, M., Björkman, J., & Iwata, S. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 169-175.
- Lledó, B., Martínez-Espinosa, R.M., Marhuenda-Egea, F.C., & Bonete, M.J. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1674**, 50-59.
- Yoshimatsu, K., Araya, O., & Fujiwara, T. (2007) *Extremophiles*, **11**, 41-47.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., & Mevarech, M. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 772-778.
- Holmes, M.L., Nuttall, S.D., & Dyal-Smith, M.L. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 3807-3813.
- Komorowski, L., Verheyen, W., & Schäfer, G. (2002) *Biol. Chem.*, **383**, 1791-1799.
- Schröder, I., Rech, S., Krafft, T., & Macy, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 23765-23768.
- Kniemeyer, O. & Heider, J. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 21381-21386.
- Ichiki, H., Tanaka, Y., Mochizuki, K., Yoshimatsu, K., Sakurai, T., & Fujiwara, T. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 4149-4156.
- Afshar, S., Johnson, E., de Vries, S., & Schröder, I. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5491-5495.
- de Vries, S., Strampraad, M.J., Lu, S., Moënne-Loccoz, P., & Schröder, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 35861-35868.
- Gropp, F. & Betlach, M.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 5475-5479.