小牧で麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻 *Alexandrium tamar-ense* が出現している時期の水温が、酵素が活性を示す温度と一致することから、サラガイの酵素が天然でも機能していることが示唆される。

サラガイとバカガイの酵素を比較すると、両者とも活性部位にセリンを有するホモダイマーの加水分解酵素という点は共通しているが、分子量、サブユニットの結合様式、糖鎖構造、基質特異性、組織分布などに違いがみられ、異なる分子種の酵素と推定している (図2)。

自然界のカルバミラーゼとしては細菌の *N*-カルバミル-D/L-アミノ酸アミドヒドラーゼや β -ウレイドプロピオナーゼが知られている。これらは *N*-カルバミル化合物のアミド結合を加水分解する酵素である。今回紹介したサラガイの Sulfocarbamoylase I は *O*-カルバミル化合物のエステル結合を加水分解する酵素であり、カルバミル基の窒素にスルホン基が結合した *N*-スルホカルバメート毒群のみを認識する。このような酵素は筆者らの知る限り他に例がない。

近年新たな麻痺性貝毒のグループとして見いだされた

ヒドロキシベンゾエート型の同族体を加水分解し、デカルバメート毒群を生成する変換酵素の存在も明らかになるなど、麻痺性貝毒の動態についての研究に新たな展開がみられつつある⁽⁵⁾。麻痺性貝毒変換酵素の本来の機能は何なのか、酵素の真の基質が他にあるのか、貝は何のために、また、どのようにしてこのような酵素をもつに至ったのか、など分子進化の観点からも興味はつきない。今後は、分子生物学的研究によってこれらの謎が明らかになっていくことを期待したい。

- 1) J. J. Sullivan, W. T. Iwaoka & J. Liston: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 465 (1983).
- 2) Y. Oshima: "Harmful Marine Algal Blooms", Lavoisier/Intercept, 1995, p. 475.
- 3) H. P. Lin, Y. Cho, H. Yashiro, T. Yamada & Y. Oshima: *Toxicon*, **44**, 657 (2004).
- 4) Y. Cho, N. Ogawa, M. Takahashi, H. P. Lin & Y. Oshima: *Biochem. Biophys. Acta-Proteins & Proteomics*, **1784**, 1277 (2008).
- 5) P. Vale: *J. Chromatogr. A*, **1190**, 191 (2008).

(長 由扶子^{*1}, 小川徳之^{*2}, 大島泰克^{*3}, ^{*1}東北大学大学院農学研究科, ^{*2}東京大学大学院生命農学研究科, ^{*3}北里大学海洋生命科学部)

環境中のアナモックス細菌と窒素循環 嫌氣的アンモニア酸化にあずかる多様な細菌群集の存在と棲み分け

1990年代に発見されたアナモックス(嫌氣的アンモニア酸化; ANaerobic AMMonium OXidation)は、アンモニアを亜硝酸により酸化することでエネルギーを獲得する独立栄養的な微生物代謝($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$)である。無機態の窒素を窒素ガス(N_2)に変換することから一種の脱窒と考えられ、効率的な窒素除去システムとして排水処理業界では早くから注目されていた。この代謝に関わるアナモックス細菌の一種、*Kuenenia stuttgartiensis*の全ゲノムが2006年に発表されるなど⁽¹⁾、微生物学的な情報も徐々に蓄積されつつある。

地球全体の窒素循環を考えるうえでも、この反応は硝化-脱窒や空中窒素固定と並んで、生物圏と気圏をつなぐ新たな経路と考えられる。二酸化炭素吸収源としての海洋の一次生産が窒素で制限されていること、また硝化-脱窒の過程で生産される亜酸化窒素も温暖化ガスの一つであることなどから、海洋における窒素の挙動は地球温暖化に深く関わっている。そのため、新たに発見されたアナモックスを取り入れ、新たな窒素循環モデルを

再構築する必要がある。そのような状況で、2003年に Kuypers らによって、黒海の成層化した水塊中の好気-嫌気境界層にアナモックス細菌が存在し、アナモックス代謝によって N_2 ガスを生産していることが実質的に証明された⁽²⁾。その後、世界各地の海水中や堆積物からアナモックス活性や関連する細菌に関する報告がなされており、海域における N_2 ガス生産の実に50%がこの経路によるとの試算もある⁽³⁾。

さて、環境中のアナモックス細菌群集の生息場を考えた場合、代謝の基質である酸化型窒素(NO_2^- および NO_3^-)と NH_4^+ が共存する場所は限られている。海洋では、上述のような好気-嫌気境界層付近や外洋海水の亜表層に見られる酸素極小層(OMZ)、海洋深層水が流入する沿岸湧昇域、さらには堆積物のごく表層などが考えられ、実際にアナモックス活性の存在が確認されている例の多くもこのような局所である(図1)。いずれも従来の脱窒細菌の生息域と重なっており、脱窒細菌とアナモックス細菌は酸化型窒素をめぐる競争していると考えら

図1 ■ 環境中のアナモックス反応への基質の供給経路 (A), 種々の水圏環境のアナモックス活性と基質の供給源 (B)

(B) の白抜き矢印は (A) に示す供給経路を示す。DNRA: 異化的硝酸還元アンモニア化, DO: 溶存酸素濃度

れる。Dalsgaard らは、従属栄養性の脱窒細菌にのみ必要な有機物の供給が生息場をめぐる両者の優位性を決めていると考え、陸域からの有機物負荷が多い沿岸域の貧酸素水塊や堆積物よりも、貧栄養な水塊や外洋の堆積物のほうがアナモックス細菌に適していると述べている⁽³⁾。しかし、Trimmer らは英国テムズ川河口域からもアナモックス活性を検出し、またその活性が低濃度の NO_3^- 添加で飽和することから、 NO_3^- に対する親和性の違いによって脱窒細菌と共存しているのではないかと述べている⁽⁴⁾。いずれにせよ、増大した人間活動に由来する大量の窒素が流入している湖沼や河川、そして汽水域や閉鎖的な沿岸海域では、脱窒細菌に加えてアナモックス細菌の挙動を知ること今後の沿岸環境管理のために不可欠であろう。

しかし、自然環境下のアナモックス細菌の微生物生態学的な研究は容易ではない。なぜなら、アナモックスがきわめて測定しにくい反応であることに加え、アナモックス微生物が slow grower で難培養性だからである。通常アナモックス活性は、 ^{15}N で標識した NH_4^+ か NO_2^- のいずれかとともに試料を嫌気培養し、アナモックス反応によって生成する $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ガスを GC-MS で定量する方法がとられる。ところが、環境中の微弱なアナ

モックス活性を測定するためには、かなり洗練された実験環境と技術を要する。また、培養法によるアナモックス細菌の検出・計数が不可能なため、必然的に 16S rRNA を分子マーカーとした分子生態学的手法が主流となる。ところが、既知のアナモックス細菌の属する Planctomycetes 門の遺伝的多様性はきわめて高く、またアナモックス細菌どうしの 16S rDNA 配列の相同性も低いことから、群集組成解析に有効な PCR 系を構築することすら困難であった。

そこで筆者らが、データベース中のアナモックス細菌を含む Planctomycetes (培養株と未培養クローン) の 16S rDNA を比較してみると、確実にアナモックス活性と関連があると思われる配列は既知の 7 種のアナモックス細菌を含む枝 (branch) に含まれ、かつ、この枝には非アナモックス性の Planctomycetes が含まれないことがわかった (図 2)。さらにこの枝のメンバー (アナモックス様 16S rDNA) に共通する配列からデザインした PCR プライマーを用いることで、アナモックス活性が確認された自然環境試料から高頻度でアナモックス様 16S rDNA を回収し、構築したクローンライブラリーからアナモックス細菌群集組成を解析することに成功した⁽⁵⁾。

この手法を用いて、アナモックス活性が確認された日

図2 ■ 既知の7種のアナモックス細菌とその他の非アナモックス性の Planctomycetes との系統関係 (Amano *et al.*, 2007 を改変)

部分 16S rRNA 遺伝子配列 (386-819; 大腸菌配列) から作成した。ブートストラップ値 95% 以上を黒丸, >70% 以上を白丸で示す。Ca.: *Candidatus*

本各地の湖沼や河川, そして都市沿岸の閉鎖性海域の堆積物中のアナモックス細菌群集組成を解析したところ, 興味深いことに, 播磨灘や紀伊水道などの海域の堆積物中では *Scalindua sorokinii* とクラスターを形成するアナモックス様 16S rDNA クローンが優勢であったのに対して, 琵琶湖や霞ヶ浦北浦などの淡水域の堆積物では *Scalindua* 属のクローンはまったく存在せず, 代わって *Brocadia* 属や *Kuenenia* 属とクラスターを形成する新奇なクローンが多数得られた (未発表)。淀川河口域などの汽水域では, 上記の3属が混在する多様な群集を形成すると同時に, 他ではあまり見られない *S. wagneri* に近縁なクローンが優勢であった⁽⁵⁾。以上のように, アナモックス細菌は水圏全体に存在するものの, その種組成は異なり, 明らかにそれぞれの種が環境に適応した固有の生息場所を形成していることが示唆された。実は, これまでに諸外国で報告されている数少ない環境由来のアナモックス様 16S rDNA クローンは, 大部分が *Scalindua* 属と近縁であり, それ以外の遺伝子型はほとんど見つかっていなかった。今回の発見は, 多様なアナモックス細菌が場所に依拠して棲み分けていることを示すもので興味深い。

環境中のアナモックス細菌の生き様はほとんど未解明である。アナモックス代謝の基質であるアンモニアや亜硝酸の供給経路も複雑で (図1), 多くの環境要因や微生物代謝が関与している。最近, アナモックス細菌の従属栄養的な側面や, 自らが異化的に硝酸をアンモニア化すること (dissimilatory nitrate reduction to ammonium; DNRA) など報告されており⁽⁶⁾, 変化する自然環境下でアナモックス細菌がどのような生存戦略をとっているのか, 興味がつきない。

- 1) M. Strous *et al.* : *Nature*, **440**, 790 (2006).
- 2) M. M. M. Kuypers, A. O. Silekera, G. Lavik, M. Schmid, B. B. Jørgensen, J. G. Kuenen, J. S. Sinninghe Damste, M. Strous & M. S. M. Jetten : *Nature*, **422**, 608 (2003).
- 3) T. Dalsgaard, B. Thamdrup & D. E. Canfield : *Res. Microbiol.*, **156**, 457 (2005).
- 4) M. Trimmer, J. C. Nicholls, N. Morley, C. A. Davies & J. Aldridge : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1923 (2005).
- 5) T. Amano, I. Yoshinaga, K. Okada, T. Yamagishi, S. Ueda, A. Obuchi, Y. Sako & Y. Suwa : *Microb. Environ.*, **22**, 232 (2007).
- 6) B. Kartal, M. M. M. Kuypers, G. Lavik, J. Schalk, H. J. M. Op Den Camp, M. S. M. Jetten & M. Strous : *Environ. Microbiol.*, **9**, 635 (2007).

(吉永郁生^{*1}, 天野皓己^{*1}, 諏訪裕一^{*2}, ^{*1}京都大学大学院農学研究科, ^{*2}中央大学理工学部)

薬用植物甘草のグリチルリチン生合成遺伝子の発見 組換え酵母で生合成中間体の生産に成功

マメ科の薬用植物「甘草」(カンゾウ)の地下部が含有するトリテルペンサポニンの一種「グリチルリチン」は, 抗炎症作用, 肝機能補強作用, 抗ウイルス作用など多様な薬理作用の他, 砂糖の150~300倍の甘さをもつこと

が知られている。そのため, 「甘草根」は医薬品原料および食品添加物原料としての需要が多く, 世界市場における年間輸出額は4,200万ドルにも上るとされている⁽¹⁾。

しかし, 甘草根の供給は, 中国, 中近東などの乾燥地