Mini Review

化学独立栄養アンモニア酸化細菌
—— *Nitrosomonas* のアンモニア酸化・ヒドロキシルアミン
酸化系を中心にして ——

高橋 令二・徳山 龍明

日本大学農獣医学部農芸化学科微生物学研究室

〒154 東京都世田谷区下馬 3-34-1

(受付 1993年6月24日—受理 1993年7月28日)

Chemoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria, with
Special Reference to Ammonia and Hydroxylamine
Oxidation by *Nitrosomonas*

REIJI TAKAHASHI and TATSUAKI TOKUYAMA

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and
Veterinary Medicine, Nihon University, Setagaya, Tokyo 154, Japan

Ammonia and nitrite-oxidizing bacteria contribute to nitrification, a part of the nitrogen cycle in natural environments. These bacteria are important since they decompose accumulated inorganic nitrogen compounds and toxic substances such as nitrogen oxides and consume (fix) of CO_2 , a factor implicated in global warming. *Nitrosomonas europaea*, a chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium which contributes to the first stage of nitrification has been studied in detail. It oxidizes ammonia as the sole nitrogen source of nitrite via hydroxylamine as an intermediate. It grows under completely inorganic conditions using energy (65 kcal) produced by the oxidation of ammonia and atmospheric CO_2 , its sole carbon source. Its growth rate is thus quite low and no extensive biochemical studies have been conducted. This paper reviews recent studies on the ammonia-oxidizing system (ammonia and hydroxylamine oxidation) in *Nitrosomonas europaea*. Data obtained with two strains of *Nitrosomonas* including a pure isolated strain of *Nitrosomonas* sp. TK794 are presented.

Key words: Chemoautotrophic bacteria, nitrifying bacteria, *Nitrosomonas*, ammonia oxidation, hydroxylamine oxidation

はじめに

自然界の元素循環のうち、窒素の循環には種々の生物種が関与しており、とりわけ微生物の果たす役割は大きい。土壌中の高分子窒素化合物から生物学的分解を経て生じたアンモニアの一部の酸化には、アンモニア酸化細菌が関与しており、アンモニアを亜硝酸に酸

化する、いわゆる硝化作用 (nitrification) の前段を行っている。硝化の後段を行うのは亜硝酸酸化細菌であり、亜硝酸を硝酸に酸化する。一方、逆の経路である、硝酸から亜硝酸を経てアンモニアに至る還元系、および分子状窒素に至る脱窒についても多くの微生物種が関与しているのは周知の事実である。

近年、地球環境汚染についての関心が高まり、元素

循環を担う微生物種への注目度も高まっている。窒素循環に着目しても、微生物は有機・無機窒素化合物の蓄積、あるいは窒素酸化物等の有害物質に対する分解者として、また地球温暖化の一要因である二酸化炭素の消費(固定)者としての役割に期待されるものが少なからずあり、これらのメカニズムの応用という面でも大きい可能性を秘めている。

細菌には、生物個体としての絶対数ばかりでなく、生育速度としては数値的に低い独立栄養細菌と比較すると、個体数としては格段に多数を占め、生育速度も速い従属栄養細菌とがあるが、両者のアンモニア酸化能を乗じてみると、その総変換能は前者が若干優勢なのではないかと考えられている²⁵⁾。現在、化学独立栄養アンモニア酸化細菌は5属7種に分類されており⁵¹⁾、そのうち最もよく研究されてきたのは *Nitrosomonas europaea*⁵³⁾ である。*Nitrosomonas* はアンモニアを唯一の窒素源、大気中の二酸化炭素を唯一の炭素源として、アンモニアの酸化によって得たエネルギー(約65 kcal)により、完全な無機環境下(無機塩培地)で生育する化学合成絶対独立栄養性細菌(chemoautotrophic bacteria)である。生育速度は非常に遅く、通常7日間の培養で得られる湿菌体重量は0.03~0.05 g/lと僅かであり、生化学的研究の進展を妨げる大きな一因となっている。

Nitrosomonas によるアンモニアから亜硝酸への酸化経路の概略を Fig. 1 に示した。アンモニアは、先ずアンモニア(モノ)オキシゲナーゼ²⁷⁾によりヒドロキシルアミンに酸化され⁷⁾、さらにヒドロキシルアミン酸化還元酵素⁸⁾ [EC 1.7.3.4] により亜硝酸に酸化される。後段の反応では、同時にシトクロムの電子伝達系においてシトクロム *c* を還元することから、別名ヒドロキシルアミン—シトクロム *c* 還元酵素とも呼称されている。

本稿では、近年の *Nitrosomonas europaea* によるアンモニア酸化系(アンモニア酸化・ヒドロキシルアミン酸化)に関する知見を概説するとともに、*Nitrosomonas* の2菌株について著者らが得た研究結果について報告する。

1. *Nitrosomonas* の培養と分離

現在、我々の研究で用いているのは、主に基準菌株である *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 株⁵⁰⁾、並びに最近著者らが未耕地土壌より純粋分離及び大量培養に成功した、*Nitrosomonas* sp. TK794 株⁴⁰⁾ である。

Fig. 1. Scheme of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. c-554; cytochrome c-554.

TK794 株は ATCC 25978 株とその性質を比較すると、生育の至適温度、pH が類似している他は、以下の相違点を有している。TK794 株は電子顕微鏡像によると細胞全体が膜組織に富み、より明確なラメラ構造を呈している。また、培地中の至適リン酸濃度は ATCC 25978 株より低く、至適硫酸(窒素源)濃度は逆に若干高かった。至適培養条件での生育(集菌後の湿菌体重で把握)は TK794 株においてさらに優勢であった。GC 含量 (mol%) は 50.6 (ATCC 25978 株, 51.0) であった。

従来より硝化細菌の固体(寒天)培養基上でのコロニー形成はほとんど不可能であり、そのためこの細菌の純粋分離は困難を究めていた。我々は寒天の代替として *Pseudomonas* 菌が生成する Gellan gum¹⁵⁾ をゲル化剤に用いることにより、固体培養上でのコロニーの形成($\phi 3\sim 5$ mm)に成功し、純粋分離法を確立した⁴⁵⁾。この方法により、容易に多数の硝化細菌を得ることが可能となった。ATCC 25978 株及び TK794 株の培養には、Table 1 に示した Lewis & Pramer¹⁸⁾ の考案した完全無機培地を改変して使用しており、それぞれ 100 ml—培養から、1 l, 10 l, 60 l (10 l $\times$ 6) —培養へとスケールアップを行い、1 l までは回転振盪培養を、10 l 以降は静置通気培養を行っている。至適生育温度は 28~29°C であり、特に 29°C 以上の高温側への温度のずれは、生育の低下を如実に引き起こすことを認めている。この培養法によると、対数増殖後期~定常初期に至るまで通常 7~10 日間を要し、60 l の大量培養系が

Table 1. Media for culture of *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 and *Nitrosomonas* sp. TK794.
Medium for *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 (Lewis & Pramer¹⁸⁾)

P Medium		
Na ₂ HPO ₄		13.5 g
KH ₂ PO ₄		0.7 g
NaHCO ₃		0.5 g
Chelated Iron (0.74 mg/ml) ^a		1.0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (5 mg/ml)		1.0 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.0 g
Phenol Red (1 mg/ml)		0.5 ml
Deionized Water		1000 ml
pH 8.0		

Medium for <i>Nitrosomonas</i> sp. TK794 (modified Lewis & Pramer ¹⁸⁾)		
	PM70 Medium	PM50 Medium
Na ₂ HPO ₄	9.37 g	6.84 g
KH ₂ PO ₄	0.55 g	0.26 g
NaHCO ₃	0.5 g	0.5 g
Chelated Iron (0.3 mg/ml) ^a	1.0 ml	1.0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (5 mg/ml)	1.0 ml	1.0 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g	2.5 g
Cresol Red (1 mg/ml)	0.5 ml	0.5 ml
Deionized Water	1000 ml	1000 ml
pH 8.0		

a: EDTA-Fe (III)

ら集菌菌体を得るまでには約1カ月間を要している。また先にも述べたとおり、60 l—培養から得られる菌体量は僅かに3~4 gである。なお、TK794株に使用しているPM70培地はリン酸塩濃度をP培地の70%に設定し種菌の継代維持用に、また同じくPM50培地はリン酸塩濃度をP培地の50%に設定し1 l以上の大量培養用に用いている。

Winogradsky⁵²⁾により独立栄養性細菌が定義されてから、有機物の存在は硝化細菌の生育に対して、阻害を及ぼす要因として位置づけられてきた。しかしながらこの細菌の本来の生育環境である陸上・水圏あるいは生物的排水処理槽等は、各種有機物の存在する場所であるので、今日に至るまで多くの論議的になってきている。例えばMatin¹⁹⁾により独立栄養細菌の有機物による阻害、或いはその利用については、問題とし

ないことが提唱されてる。また著者らは*Nitrosomonas*の生育において、炭素源とはなり得ないとされている各種TCA回路関連有機酸を培養時に添加したところ、特にビルビン酸、ホスホエノールビルビン酸などで顕著な生育(アンモニア酸化—亜硝酸生成)効果を認めている¹⁶⁾。さらに著者らは、自然界に存在する有機物のアナログの一つとして、糖および糖+アミノ酸(グリシン)を加熱褐変化させた加熱反応生成物(HRP)を培養系に添加し、ATCC 25978株の培養液中の生成亜硝酸量とpH値、生育菌体量を経時的に測定した³⁸⁾。なお*Nitrosomonas*の対数増殖期における、生成亜硝酸量の増加とそれによって引き起こされるpHの低下は、菌の生育と相関しており、生育の指標となり得ることを認めている⁴²⁾。Fig. 2に示したとおり、糖単独および糖—グリシンの両者のHRPとも、亜硝酸

Fig. 2. Effects of various HRP (products formed by heating reaction) on the growth and nitrite production in the P-medium (Incubation for 7 days.) (A) HRP of sugar, (B) HRP of sugar-glycine, Control: P-buffer only. Klett units represent growth³⁸⁾.

生成能は無添加 (control) と比較して全体的に阻害傾向を示した。この時、pH 低下は阻害程度に対応して緩慢であった。Klett O.D. 値による生育菌体量も、マルトースとラフィノース以外はこれらにほぼ対応し、その傾向は更に端的であった。HRP が ATCC 25978 株の生育に対して、いかなるメカニズムを持って影響を

及ぼしているのかは未だ不明であるが、後述するヒドロキシルアミン酸化還元酵素反応への影響と併せて興味深い。

2. アンモニア酸化—ヒドロキシルアミン生成系

Nitrosomonas のアンモニアから亜硝酸への酸化の

前段の反応はアンモニアモノオキシゲナーゼによって触媒されている。この酵素については、Rees&Nason²⁷⁾によってその存在が確認されて以来、現在まで本酵素の分離精製及び生化学的諸性質の解明は、菌体から抽出すると急速に著しく失活する⁴³⁾ので、ほとんど成されていない。またアンモニアモノオキシゲナーゼと同じく、膜結合酵素として混在するヒドロキシルアミン酸化還元酵素により、ヒドロキシルアミンが亜硝酸に速やかに酸化されてしまうため、本酵素単独の活性、すなわちアンモニアからヒドロキシルアミンへの酸化系のみを捉えるのも困難であると考えられる。

著者ら⁴²⁾は Fig. 3 に示した方法により、ATCC 25978 株について、アンモニア酸化—亜硝酸生成の活性画分について検討した。フレンチプレスあるいは超音波による菌体破碎を施し、また低張液によるスフェロプラストの処理等によって得られたそれぞれのホモジネートから、種々の破碎画分を調製した。各画分に対し、基質として硫酸アンモニウム (窒素量として 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を与え、生成された亜硝酸を Griess&Hosvey 試薬による方法⁶⁾で定量した。Table 2 に示したとおり、無細胞抽出液 (可溶性画分) にはアンモニア酸化—亜硝酸生成活性は全く認められず、Engel&Alexander⁴⁾による結果と同様であった。また、不溶性

画分では、いずれの破碎処理を行った場合にも 24,000 xg, 30 min による菌体破片画分 (沈澱) に最も高い活性が認められた。この活性画分は、その大部分を未破壊のラメラ様細胞質内膜組織が有していることが、電顕像およびショ糖密度勾配遠心によって明らかとなった。また、この反応の至適 pH は 8.0、至適温度は 30°C、15 分間処理での熱安定性は 40°C までであった。

Hooper & Terry⁹⁾は、アンモニアモノオキシゲナーゼがジピリジル、アリルチオ尿素で阻害されることを、Suzuki *et al.*³¹⁾は、この酵素の基質は NH_4^+ ではなく NH_3 であること、また Tsang & Suzuki⁴⁸⁾は一酸化炭素を酸化することを示した。また近年の知見では、Hyman & Wood¹⁴⁾が酵素本体あるいはサブユニットが、28,000 の分子量からなるポリペプチドであることを報告しており、Hyman & Arp¹³⁾は、このポリペプチドを指標としたアセチレンとアンモニアモノオキシゲナーゼ活性との関係を更に検討し、光による本活性の阻害に関する検討も報告している。また、Frijlink *et al.*⁵⁾により、*N. europaea* は pH 7 以下において生育と代謝活性が著しく減少することと、アンモニア酸化はヒドロキシルアミン酸化に比較して、pH の低下による活性低減が著しいことを報告した。最近、McTavish *et al.*²⁰⁾は、*N. europaea* においてアンモニアモノオキ

Fig. 3. Flow sheet of fractionation procedures for ammonia monooxygenase⁴²⁾.

Table 2. Ammonia-oxidizing activity of disrupted cells obtained by various methods.⁴²⁾

Cell disruption method Fraction	French pressure cell	Sonic oscillator	French pressure cell and sonic oscillator	Disrupted spheroplast cells
1	0.50	0.80	0.10	3.78
2	3.33	30.20	0.30	5.45
3	1.27	0.60	0.18	0.00
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

Ammonia-oxidizing activity was expressed as $\text{NO}_2\text{-N}$ produced ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein).

French pressure: 400–600 kg/cm^2

Sonic oscillator: 20 kHz, 10 min

シグナーゼ活性を有すると予想される、ポリペプチドの2コピーの遺伝子を見出し、32 kDaのアセチレン結合ポリペプチドの遺伝子と、そのすぐ下流に位置する40 kDaのポリペプチドの遺伝子のクローニングと塩基配列決定を報告した。

3. ヒドロキシルアミン酸化—亜硝酸生成系

Nitrosomonas によるアンモニア酸化の後段は、前述のとおりヒドロキシルアミンを基質とするヒドロキシルアミン酸化還元酵素（ヒドロキシルアミン—シトクロム *c* 還元酵素）によって触媒されており、この酵素については報告も多く、特に電子伝達系のシトクロムについては非常に良く研究が進められている。Yamanaka & Shinra⁵⁵⁾ によると本酵素が直接還元するのはシトクロム *c*-554 であることが明らかとなっている。さらに、Yamanaka⁵⁴⁾ や Hooper *et al.*¹¹⁾ によりその全容が明らかにされつつあり、その概略を Fig. 4 に示した。このシトクロム *c* 還元電子供与体とし

ては、Hooper & Nason⁸⁾ によりヒドロキシルアミン、ヒドラジンが認められており、この他の（特に窒素化合物からは）基質となり得るものは未だ報告されていない。また同じく Hooper & Nason⁸⁾ により、電子受容体であるシトクロム *c* の他の電子受容体としては、フェリシアン化カリウムを還元することが報告されている。通常、この酵素の活性は Hooper & Nason⁸⁾ の方法により、ヒドロキシルアミン存在下に、酸化型シトクロム *c* の還元を 550 nm の吸光度上昇で測定することによっている。一方、この反応後に生成亜硝酸を Griess & Ilosvey 試薬によって比色定量して酵素活性を表示する場合、赤色のシトクロム *c* の存在が測定を困難にするため、亜硝酸イオンの定量は高速液体クロマトグラフィーを用いるのが適当と考えられる。

Terry & Hooper¹¹⁾ により、この酵素が非常に複雑な構造を持ち、なおかつサブユニット構造にまでわけて分析するのに、種々の分解反応を加えなければならないことが示された。分子量 11,000 の α 、63,000 の β の

Fig. 4. A scheme for the electron transfer system coupled to oxidations of ammonia and hydroxylamine in *N. europaea*. $2[\text{H}]$ may be supplied to ammonia monooxygenase from hydroxylamine oxidoreductase via cytochrome *c*-554⁵⁴⁾.

サブユニットが $(\alpha, \beta)_3$ 構造を取り、さらに 18~21 分子のヘム *c* と、Hooper *et al.*¹⁰⁾ によって認められた 1~3 分子のクロモフォア P-460 (この機能については未だ不明である) が結合して native の酵素タンパクを形成している。従ってその分子量も Yamanaka *et al.*⁵⁶⁾ により 175,000~180,000, Mikami *et al.*²²⁾ により 190,000~195,000, Rees²⁶⁾ により 196,000~202,000, Andersson *et al.*²⁾ により 220,000 が報告され、著者らは ATCC 25978 株について 175,000⁴⁴⁾ と報告したが、未だ確定的な結論に至っていないのが現状である。

著者らが行っている本酵素の分離法³⁸⁾ (及び未発表) を Fig. 5 に示した。Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィー後に、ディスク型ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、固定・染色等の操作は行わずに肉眼で確認できる本酵素画分 (シトクロム *c* に富むため赤色を呈する) のバンドを切り出した。この画分から低温で緩衝液中に浸出させるか、電気的にゲルから分離する方法を用い、回収された活性画分は未変性のポリアクリルアミドゲル電気泳動上で、単一のバンドを呈する精製標品に至っている。

また著者らが ATCC 25978 株と TK794 株の両者から分離した本酵素の諸性質について、比較した結果を Table 3 (未発表) に示した。ATCC 25978 株の方が至適反応温度は 10℃ 高く、熱安定性についても 15℃ 高い温度まで安定であった。両株とも、Table 3 に示した温度まで 100% の残存活性を認めた。pH 安定性では両株とも、示した pH で 50% の残存活性を認めた。阻害剤の影響に対しては両者に相違が認められ興味深い。Hooper & Nason⁸⁾ によって示されたシアン化カリウムによる阻害は両者に認められたが、アジ化ナトリウム、モノヨード酢酸、*o*-フェナントロリンについては TK794 株のみに阻害を認めた。なおここでは、1 mM の濃度で反応系に添加した場合に、20% 以上の阻害を与える化合物を示した。また金属イオンについては、ATCC 25978 株では数種の金属イオンによって若干の賦活を認めたが、TK794 株においては概ねの金属イオンで阻害傾向を認めた。

著者らは、先に述べた有機物の生育に対する影響とともに、ATCC 25978 株から単離したヒドロキシルアミン酸化還元酵素のヒドロキシルアミン酸化-亜硝酸生成活性に及ぼす影響についても検討し、以下の結果を得ている³⁸⁾。糖単独の HRP ではほとんど阻害が認められなかったのに対し、各種の糖とグリシンとの HRP については、ラクトース、マルトース、セロビオー

Fig. 5. Procedures for preparation of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*. PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis

ス等の二糖類で顕著な阻害が認められ、アラビノース、キシロース、リボース等の五炭糖でも阻害が認められた。この傾向は糖-アラニンの HRP でも同様であった。また、これらのアミノ酸のジおよびトリペプチドとの HRP についても同傾向の阻害を認めた。このように土壌や水圏、生物的排水処理槽内に流入する生活排水中等に、その存在が予想される糖-アミノ酸の褐変物質は、*N. europaea* のエネルギー獲得系に参与する本酵素に対して阻害的傾向を与えた。先に述べた有

Table 3. Properties of hydroxylamine oxidoreductases (hydroxylamine-cytochrome *c* reductases) derived from *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 and *Nitrosomonas* sp. TK794.

	<i>N. europaea</i> ATCC 25978	<i>Nitrosomonas</i> sp. TK794
Optimum temperature (°C)	55	45
Optimum pH	9.5	9.5
Heat stability (°C) ^a	60	45
pH stability ^b	5.0-8.5	5.5-7.5
Inhibitor ^c	KCN	KCN, NaN ₃ , CH ₂ ICOOH Orthophenanthroline

a: Enzyme was treated at various temperatures for 10 min, and the enzyme activity was measured.

b: Enzyme was stored at different pH at 0°C for 72hr, and the enzyme activity was measured.

c: 1.0 mM of chemical was added to the reaction mixture.

機酸添加による、生育（アンモニア酸化—亜硝酸生成）の賦活化と併せて考察すると、生育環境における、その種類・構造とも複雑多岐にわたる有機物の本菌への干渉は、一概に単純な図式によって表せるものではなく、今後更に系統的且つ総合的な検討を要し、硝化細菌、ひいては独立栄養細菌に対する有機物の影響について、解析し得るデータの蓄積が必要となろう。

我々は本酵素に対して、酵素化学的アプローチと同時に遺伝子レベルでのアプローチも行っている。ATCC 25978 株染色体 DNA とプラスミド RSF1010, 宿主に *Pseudomonas putida* ATCC 12633 株 (*Trp*⁻) を用いショットガンクローニングを行い、ヒドロキシルアミン酸化—亜硝酸生成能を発現する 1 クローンを取得した。このクローンの有する組み換えプラスミドを pTT54 と命名した⁴⁷⁾。本クローンは *N. europaea* 染色体由来の約 4.5 kbp の領域を持ち、その制限酵素地

図を Fig. 6 に、作製した欠失変異株の概略を Fig. 7 に、その活性発現については Table 4 に示した。その結果、pTT54 を有する形質転換株のヒドロキシルアミン酸化—亜硝酸生成能は、*N. europaea* の約 7~12% であった。

この全領域の塩基配列を解析した結果、当領域には 7 つの ORF が存在した (Fig. 6)³³⁾。それぞれの遺伝子構造を検討したところ、プロモーター領域、ターミネーター領域、SD 配列等と想定される領域が存在したが、大腸菌に認められるような一般的なプロモーター構造は認められず、SD 配列も一部で開始コドンからの距離の遠いものが存在した。また 7 つの ORF から想定されたアミノ酸配列と、Numata *et al.*²⁴⁾ によって既に明らかにされた本酵素の 2 種類のサブユニットおよび P-460, Miller & Nicholas²³⁾ によって明らかにされた本菌のシトクロム *c*-552 の (N-末端) アミノ酸配列

Fig. 6. Restriction map of a *N. europaea*-derived region of pTT54 and predicted open reading frames (ORF). a.a.; number of amino acid residues, arrows show polarity of ORF and its regions^{33,47)}.

Fig. 7. Construction and expressed activity of deletion mutants from pTT54. HAO; Hydroxylamine oxidoreductase, arrows and numbers are the same in Fig. 6^{33,47)}.

とはホモロジーが無かった。また、全ての ORF にヘム *c* 結合部位、シグナルペプチドに相当する部位は認められなかった。しかしながら Fig. 6, Table 4 の結果から、*Bgl* II-*Eco*RI 領域の ORF4 と *Sal* I-*Bam*HI 領域の ORF1 がヒドロキシルアミンの酸化に何らかの形で関与していることは明らかである。Hooper *et al.*¹²⁾ は、本酵素の 63 kDa サブユニットをコードする遺伝子は少なくとも 3 コピー存在することを報告している。更に McTavish *et al.*²¹⁾ は、本酵素遺伝子の 1 つはシトクロム *c*-554 遺伝子の、2.7 kbp の中に位置していること、シトクロム P-460 遺伝子は本酵素遺伝子とは全く異なる位置に存在することを示した。生育の遅い *Nitrosomonas* のエネルギー獲得系の中核であるこの酵素は、全可溶性タンパクの約 5% に相当する多量なタンパクであるため、Hooper のグループは転写効率の問題とは別個に複数の遺伝子が独立して存在し、平行に転写、翻訳される可能性を提唱している^{12,21)}。非常に興味深い知見として今後の彼らの詳細な解析結果が待たれる。

4. 従属栄養微生物におけるアンモニア酸化系

先に述べてきたように、アンモニア→ヒドロキシルアミン→亜硝酸への酸化経路、およびそれぞれを司る酵素系の存在は、独立栄養アンモニア酸化細菌に特徴

的なものであるが、従属栄養性細菌による硝化作用についても報告が成されている。古くは 1894 年に Stutzer & Hartleb³⁰⁾ による糸状菌についての記述があり、Amarger & Alexander¹⁾ は *Pseudomonas aeruginosa* によるヒドロキシルアミン、オキシムから亜硝酸への酸化を示し、Verstraete & Alexander⁴⁹⁾ は *Arthrobacter* sp. のアンモニアからヒドロキシルアミンへ、および若干の亜硝酸への活性を示した。また、近年 Kurokawa *et al.*¹⁷⁾ は *Arthrobacter globiformis* の有するヒドロキシルアミン—シトクロム *c* 還元活性が、反応機作としては *N. europaea* に類似しているが、酵素本体はシトクロムタイプでも膜結合型でもないことを示した。最近では Robertson *et al.*²⁸⁾ による通性独立栄養性で従属栄養的硝化作用を示す *Thiosphaera pantotropha* について、また Papen *et al.*²⁵⁾ による従属栄養細菌 *Alcaligenes faecalis* についても報告がある。このような従属栄養微生物の硝化作用についての知見については、酒井²⁹⁾ により簡潔にまとめられている。

著者らは *Pseudomonas putida* においては、誘導的にヒドロキシルアミン酸化活性が存在し⁴⁶⁾、それに対し構成的にヒドロキシルアミン—シトクロム *c* 還元活性が別個に存在すること³⁵⁾ を示した。*P. putida* ATCC 12633 株における、両活性を Table 5 に示した。興味深いのは、ヒドロキシルアミン酸化—亜硝酸生成

Table 4. Hydroxylamine oxidoreductase activity expressed by pTT54 and deletion mutants.⁴⁷⁾

Strain	HAO activity ^a
<i>N. europaea</i> ATCC25978	1.9 (100)
<i>P. putida</i> ATCC12633/pTT54	0.145 (7.6)
<i>P. putida</i> ATCC12633/pTT541	0.226 (12.0)
<i>P. putida</i> ATCC12633/pTT542	0.012 (0.6)
<i>P. putida</i> ATCC12633/pTT543	0 (0)
<i>P. putida</i> ATCC12633/pTT45	0.158 (8.3)

HAO; Hydroxylamine oxidoreductase

a: produced NO₂-N [μ g/ml], (); relative activity

活性画分にはシトクロム *c* 還元活性は含まれず、その逆についても同様の結果を得た。またシトクロム *c* 還元活性画分についてはその吸収スペクトルは 417, 522, 551 nm に還元型のピークを認め、ピリジンフェロヘモクロムの吸収スペクトルからシトクロム *c* に富む画分であることを確認した³²⁾。現在まで *P. putida* の両活性それぞれについて電子伝達のメカニズム等については解明に至っていない。

5. おわりに

N. europaea を中心に硝化作用の前段、アンモニアから亜硝酸への酸化系について概説した。硝化細菌はその生育の緩慢さ、並びに固体培養の困難さから、純粋な培養系を維持し、大量に菌体を得ることがなかなか容易でないため、研究者も少なく未だに未解明の部分も多い。国内ではこれまでに東工大の山中健生教授(現日大)のグループによる、シトクロム *c* の電子伝達系を中心とした生化学的な研究が進められ、すぐれた総説⁵⁴⁾ も出されている。また国外においては、Hooper のグループによる酵素化学的なアプローチによる精力的な研究¹¹⁾ が進展している。しかしながら、それぞれヒドロキシルアミン酸化系を中心としているため、その他の生合成代謝経路、特に炭酸固定経路、或いはこれらに関連する酵素類の遺伝子レベルでの解明などは、ほとんど未知の領域として残されている。新たに分離された独立栄養アンモニア酸化細菌、特に *Nitrosomonas* 属菌の分離についても先に述べた理由により、なかなか困難な状態であった。しかしながら、近年とみに地球環境問題がクローズアップされ、多種多様な環境における窒素循環系、とりわけ硝化のプロセスを語るためには、アンモニア酸化菌の生理・生態

Table 5. Hydroxylamine oxidase activity and hydroxylamine-cytochrome *c* reductase activity of *P. putida* ATCC12633.³⁵⁾

		A	B
Constitutive	FI	ND	10.8
	FII	0.02	1.5
NH ₂ OH induced	FI'	0.01	8.1
	FII'	0.50	ND

A: Hydroxylamine oxidase activity; produced NO₂-N [μ g/mg protein] .B: Hydroxylamine-cytochrome *c* reductase activity; reduced cytochrome *c* [n mol/mg protein].

FI, FI': Supernatant fractions of 8,000 xg centrifugation after disruption of cells in a French pressure cell.

FII, FII': Precipitation fractions of 8,000 xg centrifugation after disruption of cells in a French pressure cell.

ND: Not detected (below 0.01).

学的あるいは遺伝生化学的情報の蓄積無くしては、その全容を解明するには至らないと思われる。したがって著者らは引き続き陸上(土壌)ならびに水圏(河川、湖水、海水)から種々のアンモニア酸化細菌の純粋分離を行っている。現在まで、*Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 株、*Nitrosomonas* sp. TK794 株の両株より分離した 2, 3 の TCA 回路関連酵素の諸性質を比較した結果³⁾ (及び未発表)、両菌株間で相違点が認められている。この点からも明らかのように、自然界における硝化作用を論ずるに当たって、一菌株のアンモニア酸化菌、或いは亜硝酸酸化菌のみを材料として研究を展開しても、自ずからその結果の解析には限界がある。したがって、なるべく生育環境の異なる多くの硝化細菌について検討し、且つ論ずるのが妥当であるのは言うまでもない。しかも、公的な機関(ATCC等)より分離可能な菌株は、現在 *Nitrosomonas europaea* の 2 株のみであり、これらの菌株を材料とする研究者も少なく、新規分離株の報告も非常に少ない。このような状況にある最大の理由は、硝化細菌の分離が困難であるだけでなく、これら分離菌株を長期的に保存・維持することが極めて難しいことが上げられている。著者らはシリカゲル保存法により、*Nitrosomonas* は 10 年間、*Nitrobacter* は 5 年間以上の保存菌を復元することに成功しており、その結果についてはいずれ発表する予定である。さらに著者らは *Nitrosomonas* の生合成

代謝系酵素^{34,36,37,39)}、炭酸固定系等の解明を目指して研究を継続している。

文 献

- Amarger, N., and M. Alexander. 1968. Nitrite formation from hydroxylamine and oximes by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **95**: 1651-1657.
- Andersson, K.K., T.A. Kent, J.D. Lipscomb, A. B. Hooper, and E. Münck. 1984. Mössbauer, EPR, and optical studies of the P-460 center of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*. A ferrous heme with an unusually large quadrupole splitting. J. Biol. Chem. **259**: 6833-6840.
- 浅井智英, 岡村教正, 高橋令二, 徳山龍明. 1993. アンモニア酸化菌 *Nitrosomonas* sp. TK794 のリソコ酸脱水素酵素. 日本農芸化学会 1993 年度大会講演要旨集 p. 309
- Engel, M.S., and M. Alexander. 1959. Enzymatic activity of *Nitrosomonas* extracts. J. Bacteriol. **78**: 796-799.
- Frijlink, M.J., T. Abee, H.J. Laanbroek, W. de Boer, and W.N. Konings. 1992. The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas europaea* at acid and alkaline pH. Arch. Microbiol. **157**: 194-199.
- Hewitt, E.J., and D.J.D. Nicholas. Enzymes of inorganic nitrogen metabolism, in "Modern methods of plant analysis", Vol. 7, Springer-Verlag, Goettingen, Heidelberg, 1964, pp. 167-172.
- Hofman, T. and H. Lees. 1953. The biochemistry of the nitrifying organisms 4. The respiration and intermediary metabolism of *Nitrosomonas*. Biochem. J. **54**: 579-583.
- Hooper, A.B., and A. Nason. 1965. Characterization of hydroxylamine-cytochrome *c* reductase from the chemoautotrophs *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosocystis oceanus*. J. Biol. Chem. **240**: 4044-4057.
- Hooper, A.B., and K.R. Terry. 1973. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. J. Bacteriol. **115**: 480-485.
- Hooper, A.B., P.C. Maxwell, and K.R. Terry. 1978. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: absorption spectra and content of heme and metal. Biochemistry, **17**: 2984-2989.
- Hooper, A.B., M. Logan, D.M. Arciero, and H. McTavish. 1991. *c*-Cytochromes of the ammonia-oxidizing chemolithoautotrophic bacteria. Biochim. Biophys. Acta, **1058**: 13-16.
- Hooper, A.B., D.M. Arciero, A.A. Dispirito, J. Fuchs, M. Johnson, F. LaQuier, G. Mandfrom, and H. McTavish. Production of nitrite and N_2O by the ammonia-oxidizing nitrifiers, in "Nitrogen fixation: achievements and objectives" ed. by Gresshoff, P.M., L.E. Roth, G. Stacey, and W.E. Newton, Chapman and Hall, New York, 1990, pp. 387-392.
- Hyman, M., and D.J. Arp. 1992. $^{14}C_2H_2$ - and $^{14}CO_2$ -labeling studies of the de Novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. J. Biol. Chem. **267**: 1534-1545.
- Hyman, M.R., and P.M. Wood. 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. Biochem. J. **227**: 719-725.
- Kang, K.S., G.T. Veeder, P.J. Mirrasoul, T. Kaneco, and I.W. Cottrel. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. 1982. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 1086-1091.
- 児玉雅章, 高橋令二, 加養知義, 徳山龍明. 1989. *Nitrosomonas europaea* による亜硝酸生成に及ぼす TCA 回路関連物質の影響. 平成元年度日本土壤肥料学会関東支部大会講演要旨集 p. 17.
- Kurokawa, M., Y. Fukumori, and T. Yamanaka. 1985. A hydroxylamine-cytochrome *c* reductase occurs in the neterotrophic nitrifier *Arthrobacter globiformis*. Plant Cell Physiol. **26**: 1439-1442.
- Lewis, R.F., and D. Pramer. 1958. Isolation of *Nitrosomonas* in pure culture. J. Bacteriol. **76**: 217-222.
- Matin, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **32**: 433-468.
- 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.
- McTavish, H., F. Laquier, D. Arciero, M. Logan, G. Mundfrom, 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.
- Mikami, T., N. Tanaka, T. Sato, H. Moriyama, M. Numata, T. Fujiwara, Y. Fukumori, T. Yamanaka, M. Sato, K. Kakiuchi, Y. Katsube, and S. Kishimoto. 1991. Crystallization and preliminary X-ray studies of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. J. Biochem. **110**: 681-682.
- Miller, D.J., and D.J.D. Nicholas. 1986. N-

- terminal amino acid sequence of cytochrome *c*-552 from *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Int.* **12**: 167-172.
- 24) Numata, M., T. Saito, T. Yamazaki, Y. Fukumori, and T. Yananaka. 1990. Cytochrome P-460 of *Nitrosomonas europaea*: further purification and further characterization. *J. Biochem.* **108**: 1016-1021.
 - 25) Papen, H., R. von Berg, I. Hinkel, B. Thone, and H. Rennenberg. 1989. Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO_2^- , NO_3^- , N_2 O, and production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2068-2072.
 - 26) Rees, M.K. 1968. Studies of the hydroxylamine metabolism of *Nitrosomonas europaea*. II. Molecular properties of the electron-transport particle, hydroxylamine oxidase. *Biochemistry*, **7**: 366-372.
 - 27) Rees, M., and A. Nason. 1966. Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**: 398-401.
 - 28) Robertson, L.A., E.W.J. van Niel, R.A.M. Torremans, and J.G. Kuenen. 1988. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2812-2818.
 - 29) 酒井謙二. 1992. 従属栄養微生物の硝化作用. 醸酵工学会誌 **70**: 495-496.
 - 30) Stutzer, H., and R. Hartleb. 1894. Über Nitratbildung. Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe A **22**: 701.
 - 31) Suzuki, I., U. Dular, and S.C. Kwok. 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**: 556-558.
 - 32) 高橋令二, 徳山龍明. 1992. *Nitrosomonas* 菌および *Pseudomonas putida* におけるヒドロキシルアミン酸化-亜硝酸生成. 1992年度土壌微生物研究会講演要旨集 p. 3.
 - 33) 高橋令二, 徳山龍明. 1992. *Nitrosomonas europaea* のヒドロキシルアミン酸化酵素系の遺伝子構造. 第8回日本微生物生態学会講演要旨集 p. 84.
 - 34) Takahashi, R., K. Sakuma, and T. Tokuyama. 1990. Properties of partially purified glutamate dehydrogenase from *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *Soil Microorganisms*, **35**: 21-29.
 - 35) 高橋令二, 佐藤美和, 徳山龍明. 1990. *Pseudomonas putida* および *Nitrosomonas europaea* におけるヒドロキシルアミン存在下でのシトクロム *c* の還元とヒドロキシルアミンの酸化. 醸酵工学会誌 **68**: 219-223.
 - 36) Takahashi, R., T. Kayo, T. Ohmori, and T. Tokuyama. 1992. Purification and characterization of NADP-specific isocitrate dehydrogenase from *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*. **7**: 19-26.
 - 37) Takahashi, R., T. Ohmori, H. Kondo, and T. Tokuyama. 1992. Purification and some properties of citrate synthase from ammonia-oxidizing chemoautotrophic *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*. **7**: 47-54.
 - 38) 高橋令二, 岡田 健, 石崎良平, 徳山龍明. 1991. 化学独立栄養性アンモニア酸化菌 *Nitrosomonas europaea* に及ぼす糖-アミノ酸加熱反応生成物の影響. 日本微生物生態学会報 **6**: 95-101.
 - 39) Takahashi, R., M. Kodama, K. Igi, M. Kobayashi, and T. Tokuyama. 1992. Purification and properties of malate dehydrogenase from ammonia-oxidizing chemoautotrophic *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *Soil Microorganisms*. **40**: 23-30.
 - 40) Takahashi, R., N. Kondo, K. Usui, T. Kanehira, M. Shinohara, and T. Tokuyama. 1992. Pure isolation of a new chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium on Gellan gum plate. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 52-54.
 - 41) Terry, K.R., and A.B. Hooper. 1981. Hydroxylamine oxidoreductase: a 20-heme, 200,000 molecular weight cytochrome *c* with unusual denaturation properties which forms a 63,000 molecular weight monomer after heme removal. *Biochemistry*, **20**: 7026-7032.
 - 42) 徳山龍明, 浅野浩司. 1978. *Nitrosomonas europaea* の菌体破片によるアンモニアの酸化. 醸酵工学会誌 **56**: 725-732.
 - 43) 徳山龍明, 浅野浩司. 1978. *Nitrosomonas europaea* のアンモニア酸化系に及ぼす各種添加物の影響. 醸酵工学会誌 **56**: 739-744.
 - 44) 徳山龍明, 角田修次. 1988. *Nitrosomonas europaea* のヒドロキシルアミン-シトクロム *c* 還元酵素によるヒドロキシルアミンからの亜硝酸生成. 土と微生物 **31**: 1-11.
 - 45) 徳山龍明, 高橋令二. 1989. GELRITE 培地によるアンモニア酸化細菌の純粋分離. 日本微生物生態学会報 **4**: 101-105.
 - 46) 徳山龍明, 高橋令二, 富田祐介. 1988. *Pseudomonas putida* によるヒドロキシルアミンの酸化. 醸酵工学会誌 **66**: 401-404.
 - 47) 徳山龍明, 富田祐介, 高橋令二. 1988. *Nitrosomonas europaea* のヒドロキシルアミンオキシダーゼ遺伝子の *Pseudomonas* におけるクローニングと発現. 醸酵工学会誌 **66**: 103-107.
 - 48) Tsang, D.C.Y., and I. Suzuki. 1982. Cytochrome *c*-554 as a possible electron donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monoxide in *Nitrosomonas europaea*. *Can. J. Bio-*

- chem. **60**: 1018-1024.
- 49) Verstraete, W., and M. Alexander. 1972. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp.. J. Bacteriol. **110**: 955-961.
- 50) Watson, S.W. 1971. Taxonomic considerations of family the *Nitrobacteraceae* Buchanan. Requests for opinions. Int. J. Syst. Bacteriol. **21**: 254-270.
- 51) Watson, S.W., E. Bock, H. Harms, H.P. Koops, and A.B. Hooper. Ammonia-oxidizing bacteria, in "Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3." ed. by Stanley, J.T., M.P. Bryant, N. Pfennig, and J.G. Holt, The Williams&Wilkins Company, Baltimore, 1989, pp. 1818-1834.
- 52) Winogradsky, S. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. Annales de l'Institut Pasteur, **4**: 760-771.
- 53) Winogradsky, S. 1892. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. Arch Sci. Biol. (St. Petersb.) **1**: 86-137.
- 54) Yamanaka, T., in "The biochemistry of bacterial cytochrome", Japan Scientific Societies Press (Tokyo), [Springer-Verlag, Tokyo], 1992.
- 55) Yamanaka, T., and M. Shinra. 1974. Cytochrome *c*-552 and cytochrome *c*-554 derived from *Nitrosomonas europaea*. J. Biochem. **75**: 1265-1273.
- 56) Yamanaka, T., M. Shinra, K. Takahashi, and M. Shibasaka. 1979. Highly purified hydroxylamine oxidoreductase derived from *Nitrosomonas europaea*, some physicochemical and enzymatic properties. J. Biochem. **86**: 1101-1108.