微生物の新規窒素代謝の発見とその解明

(2004 年度日本農芸化学会賞受賞)

祥雲弘文

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Key words: denitrification; codenitrification; ammonia fermentation; cytochrome P450nor

はじめに

生命による無機窒素循環系である窒素サイクル(図1)は地上の物質循環や生命への窒素供給源として重要である。窒素サイクルは従来、窒素固定、硝化、および脱窒の3過程で構成され、そこに関与する生命は原核生物のみであると考えられていた¹⁾。筆者らは真核生物であるカビの脱窒をはじめとして窒素サイクルに関与する新規代謝あるいは新規メンバーをいくつか発見し、その機構解明を試みた。その結果、従来硝酸異化代謝として細菌の脱窒型および非脱窒型硝酸呼吸が知られるのみであった窒素異化代謝はそれよりはるかに多彩であり、また好気的生物と考えられていた土壌真菌や放線菌の少なくとも一部は、実は通性嫌気性菌であることが判明した。

(1; 硝酸同化, 非脱窒型硝酸呼吸, アンモニア発酵)

(2; 脱窒)

(3; 共脱窒)

生命は固定窒素の最も酸化された形である硝酸イオン(NO_3^-)をその活動に利用できる。そのための硝酸還元系(上記1~3式)は同化型と異化型に大別される。1式で表される硝酸還元系には3種類あるが、電子供与体と目的が異なる。硝酸同化は微生物と植物が行い、 NO_3^- の窒素栄養

源としての利用が目的である。 NO_3^- はアンモニアに還元(1式)された後グルタミン合成酵素などにより細胞成分に取り込まれる。一方、異化型硝酸還元はエネルギー(ATP生産のための)代謝であり、硝酸呼吸とも呼ばれる。そこで NO_3^- は呼吸の最終電子受容体として利用される。硝酸呼吸はさらに脱窒型(2式; denitrification)と非脱窒型(アンモニア生成型; 1式, ammonification)に分類される。アンモニア生成型硝酸呼吸は腸内細菌や *Bacillus* 属細菌で知られるが、脱窒は極めて多種の細菌に分布する。脱窒は4段階の還元ステップからなり(2式), それぞれ異化型硝酸塩還元酵素(dNar), 同型硝酸塩還元酵素(dNir), 一酸化窒素還元酵素(Nor), および亜酸化窒素還元酵素(Nos)が関与する。これら還元酵素の反応に必要な電子は呼吸鎖電子伝達系から供給される。

1. *Fusarium oxysporum* の脱窒

20年以上も昔の話である。不完全菌 *Fusarium oxyspo-*

図1 窒素サイクルと新規窒素代謝
黒矢印, 従来の窒素サイクル過程(窒素固定, 硝化, および脱窒). 青矢印が新規窒素代謝. ①, カビ脱窒; ②, 放線菌脱窒; ③, カビ・アンモニア発酵; ④, 放線菌・有機態窒素の無機化(推定); ⑤, 共脱窒(青点線)

Novel dissimilatory nitrogen metabolisms by microorganisms

Hirofumi SHOUN (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

rum からオキシゲナーゼのつもりで奇妙なシトクロム P450 を精製した²⁾。P450 といえば解毒や薬物代謝、ステロイド合成などに関与するモノオキシゲナーゼ（好氣的酵素）、と定義されていた。のちに判明したこの P450（現在の P450nor）の生理機能はあまりに異例であったので、どうやってこんな P450 を見つけたのか、という質問をよく受けた。P450nor やそれに関連するカビ脱窒の発見は、それを目指してできたものでは決してなく、まさにセレンディピティー（予想外の発見）の賜物である。その経緯は多少のご参考になるかもしれないと考え、ご紹介したい。

真核生物の P450 は膜タンパク質であると解説書に書いてあるが、上記 P450 は可溶性画分に回収される。カビがなぜ可溶性 P450 をもつかわからなかったが（P450nor は真核生物で唯一の例外であるので、わからなくて当然である）、あまりそのことは気にせず、過去の例にならってこの P450 の生理機能を探し始めた。候補はじきに見つかった。*F. oxysporum* 無細胞抽出液中に NADPH および酸素 (O_2) 依存性の、典型的な P450 反応の一つである脂肪酸亜末端水酸化活性を見いだした。実はこの活性は別の P450 (P450foxy) によるものであるのだが、そのときは精製した P450 の生理機能であると思い込んだ。セルフリーの活性再構成を目指した。P450 反応の再構成には P450 還元酵素 (CPR) が必要である。CPR の精製では便宜的に、人工的活性である NADPH-シトクロム c 還元酵素活性で酵素を追いかける。確かに *F. oxysporum* 無細胞抽出液中にこの活性も検出されるが、P450 と同様、他の例と異なり可溶性である。何か変だと思いつつ、このシトクロム c 還元酵素の精製を始めた。ところが CPR はフラビン酵素のはずであるのに、精製が進むにつれヘムの吸収が顕著になった。投稿した論文のレフェリーから、同化型の亜硝酸塩還元酵素 (aNir) が CPR と同様に NADPH-シトクロム c 還元酵素活性をもつことを指摘された。aNir について調べると、FAD とともにシロヘムという変わったヘムをもつことを知った。しかも CPR のつもりで精製したヘムタンパク質の吸収スペクトルはシロヘムに特徴的なものであった。何年もかけた結果が間違いであると悟ったときほど悲しいことはなかった。しかしこのレフェリーの指摘が一大転機となり、結果的に幸運を呼んだ。今でも感謝している。これだけ時間をかけて、後へは引けなかった。カビの培地をよく見ると、窒素源のつもりで大豆粉とともに硝酸ナトリウムが加えてあった。ハハアーンこの硝酸のせいで変なヘムタンパク質が誘導されるのだな、と思い、培地の NO_3^- をアンモニウム塩に代えてみた。変なヘムタンパク質が aNir であれば、アンモニアで抑制されるはずであるので、ところが思いがけない変化が P450 の方に現れた。あ

れほどたくさん存在した可溶性 P450 が消滅したのである³⁾。この P450 の誘導には NO_3^- が必要？ さらに高通気条件では、 NO_3^- 存在下でも P450 誘導は抑制された。これら誘導条件は P450 として異例であり、新発見を確信した。恋の予感にも似た、至福のときであった。

カビが脱窒する？ NO_3^- の存在と通気抑制という誘導条件は、この P450 が脱窒に関与するとはしか考えられなかった。実は硝酸呼吸にはいくつかのタイプがあり、これら硝酸呼吸の条件は必ずしも脱窒を意味しないのであるが、当時そんなことは知らなかった。結果的にカビの硝酸呼吸が脱窒型であったのは幸運であった。酵素研究者のつもりでいた筆者が脱窒を研究することになるとは夢にも思っていなかった。このような研究分野の一大転換には通常高い障壁が立ちはだかるが、重要発見への予感ほそれを乗り越えるための十分な活性化エネルギーをもっていた。また幸いなことに農芸化学には脱窒に近い研究分野の研究室があり、技術的な指導を受けることができた。学生実験の経験も役に立った。そこで行った脱窒菌の試験方法として、デュラム管によりガスの蓄積を見る簡便法を試した。カビを試験管の液体培地で静置培養すると、培地水面に菌層を形成するように生育する（好気条件で圧倒的に生育が良いから）。ところが培地に硝酸または亜硝酸塩を加えた培地では、この菌層はやがて培地液面と分離された。デュラム管にも粟粒よりも小さい泡が 1 粒できていた。一方、(亜)硝酸塩を加えない培地では、そのような菌層の分離や泡は観察されなかった。この結果は、培地表面に生育した菌層が何かガスを発生したためと推測された。これら二つの結果 (P450 の誘導条件、ガス発生) は、*F. oxysporum* の脱窒を確信させるものであった。しかし脱窒による窒素ガス (N_2) の発生はなかなか観察されなかった。実はカビ脱窒の主要産物は N_2O であるのだが、そのことに気づくのに数年を要した⁴⁾。可溶性 P450 の精製から 10 年近くが経っていた。

2. ミトコンドリア嫌気呼吸としての脱窒

細菌の脱窒系では嫌気呼吸としての意義が確立している。脱窒細菌の大半は通性嫌気性菌である。つまり O_2 が十分に存在する環境では酸素（好気）呼吸を行い、嫌気になると脱窒に切り替える。両者では末端酸化酵素と最終電子受容体が異なるが、呼吸鎖電子伝達系は共有する。フサリウムのようなありふれた土壤真菌は当然、酸素呼吸を行う。それが脱窒も行うとなると、両者の関係に大きな興味をもたれた。真核生物の呼吸器官はミトコンドリアである。では、カビ脱窒系もミトコンドリアに局在して嫌気呼吸として働いているのであろうか？ 答えはイエスであっ

た⁵⁾。脱窒条件で生育したカビ (*F. oxysporum* および *Cylindrocarpum tonkinense*) のミトコンドリア画分に、dNarあるいはdNir活性を検出できた。これら活性はピルビン酸+リンゴ酸、コハク酸などの生理的呼吸基質を電子供与体にでき、酵素活性に共役したATP生成が観察された。さらにこれら脱窒酵素活性はアンチマイシン、ロテノンなどの呼吸鎖阻害剤により強く阻害された。

生化学の教科書には、ミトコンドリアは“真核生物の好氣的呼吸器官”と定義されている。また真核生物の起源に関する内部共生説によれば、ミトコンドリアの祖先は宿主に共生した好氣的細菌である。ミトコンドリアは生物間で種類によらずよく似ている。その事実が、内部共生説の有力根拠の一つとなった。では、現役のカビのミトコンドリアが嫌気呼吸を行うとは、それはどのような進化をたどったのであろうか。ミトコンドリアは現役細菌の中では α プロテオバクテリアに最も近縁であり、そのサブクラスには多数の脱窒細菌が属する。ということは、カビ・ミトコンドリアの脱窒系は祖先の遺物なのであろうか？ カビ脱窒はこのような真核生物の進化にかかわるヒントを与える、興味深い課題も提供する^{6), 7)}。ミトコンドリア嫌気呼吸の他の例として、ある種の原生動物の硝酸呼吸（硝酸塩から亜硝酸塩への1段階の還元；脱窒ではない）⁸⁾と、寄生虫（回虫）の成虫が行うフマル酸呼吸⁹⁾が知られている。

これまでカビ脱窒系構成成分の中ではP450norしか遺伝子が単離されていなかった。P450norは細菌には見いだされていないので、カビと細菌の脱窒系の接点はなかった。筆者らは最近カビゲノムに、細菌脱窒系構成成分の一つdNirのcounterpartを見いだしている（日本農芸化学会2004年大会）。カビと細菌で共通の脱窒遺伝子の発見はカビ脱窒研究における大きなブレイクスルーとなるはずである。ミトコンドリアの起源に関しても大きな情報が期待できる。

3. P450norの構造と反応機構の解明

カビ脱窒発見のきっかけになったP450は下記反応を触媒する一酸化窒素還元酵素(Nor)であることが明らかになり、P450norと命名された¹⁰⁾。しかし驚くべきことに、

P450norはNADHから直接電子を受け取ることが判明した。細菌のNorはシトクロムcbタイプであり、脱窒系の他の還元酵素と同様に呼吸鎖電子伝達系から電子を受け取る。P450norの活性は通常モノオキシゲナーゼとして働くP450において特異である。さらにヘムのような1電子酸化還元中心がNADH(2電子を同時に手放す)から直接

電子を受け取る機構はほかに例がなく、生体電子伝達のセントラルドグマに反する反応として大きな関心を集めた。P450norの反応機構に関しては、X線結晶構造解析その他の物理化学的解析や酵素学的解明を詳細に行った。最近P450norとNADHアナログとの複合体の結晶構造解析にも成功し、NADHからの直接電子伝達のユニークな機構が明らかとなっている。

4. カビのアンモニア発酵

*F. oxysporum*の脱窒に対する通気の影響を厳密に調べるため、学生がジャーファーマンターを使って脱窒の時間経過を調べていた。培地に NO_3^- とアンモニウム塩(NH_4^+)が共存する場合、菌が NH_4^+ を先に食べることは鉄則である（硝酸同化系はアンモニアで抑制される）。このとおりに始めのうちは培地中の NH_4^+ が減少し、 NO_3^- は減らなかった。ところがある時間経つと減少を続けていた NH_4^+ が一時的に増加に転じ、その後再度減少を始めた。菌の増殖途中で NH_4^+ が一時的に増加することは考えにくかったので、周囲の学生らはこの増減を実験誤差と思い、データへの標準偏差の記入を助言していた。実はこの学生のデータは極めて正確であり、 NH_4^+ の増加は NO_3^- の還元によるものであることがやがて判明した。*F. oxysporum*は脱窒（微好気）よりさらに嫌氣的な条件で、発酵における電子の捨場として NO_3^- を NH_4^+ へ還元する。この還元はアセチルCoAの酢酸への分解によるATP生産と共役している（図2）。類似の現象は*Clostridium*属細菌で硝酸発酵として知られていたが、最終産物や関与する酵素が異なる。筆者らはこの NH_4^+ 生成をカビ独自の新規エネルギー代謝として、アンモニア発酵と命名した¹¹⁾。

アンモニア発酵は調べた土壤真菌のほとんどに見いだされ、脱窒よりも広い範囲でカビに分布すると思われる。したがって、*F. oxysporum*などのありふれたカビはこれまで好氣的生物と思われていたが、嫌気（アンモニア発酵）、微好気（脱窒）、好気（酸素呼吸）の3段階もの通気条件にそれぞれ適応してエネルギー代謝を切り替える通性嫌気性菌であることが明らかとなった。またカビのミトコンドリアはアンモニア発酵の条件では、中身の抜けた不完全なものが増えていた。

5. 新規な脱窒反応・共脱窒

カビ脱窒の主要産物は N_2O であると上に述べたが、正確に言うと、条件によっては N_2 も発生する。ただしカビによる N_2 生成は全く新しい機構であった。脱窒産物の N_2 や N_2O の窒素原子は、両方とも NO_3^- 由来である。一方、多くのカビは脱窒基質 NO_2^- と他の窒素化合物（アミノ酸、

図2 アンモニア発酵

電子供与体がエタノールの場合（最も効率が良い）、エタノールの（4電子）酸化と NO_3^- の（8電子）還元が共役している（青矢印）。酢酸と NH_4^+ の生成比は正確に2:1である。アンモニア発酵の登場により、1式の NO_3^- 還元過程は3種類存在することになった。硝酸同化系では aNar と aNir が関与し、電子供与体は NAD(P)H である。アンモニア生成型硝酸呼吸では、 dNar および hemC をたくさんもつ dNir が関与し、電子供与体は呼吸鎖電子伝達系である。アンモニア発酵では、関与する酵素も電子供与体も硝酸同化系と同じであるが、目的が ATP 生産である点で同化系と異なる。

アニリンなどのアミン）共存下で N_2 を生成するが、この場合 N_2 を構成する窒素原子は一方が NO_2^- 由来でもう一方は他の窒素化合物由来であった（3式）。この新現象を共脱窒（codenitrification）と命名した¹²⁾。類似の現象としてリソトロフ嫌気性細菌のアナモックスが*Nature*誌に発表されて¹³⁾有名になったが、筆者らの共脱窒の方が7年早い。各々独立の発見である。共脱窒による N_2 生成は多くのカビに認められ、その後放線菌にも見いだされた。

共脱窒反応ではときに N_2O も発生する。反応産物のタイプ（ N_2 か N_2O か）は脱窒カビの種類ではなく、 NO_2^- に共存する窒素化合物（共脱窒基質）に依存する。すなわち、アザイド、 NH_4^+ などからは N_2O が生成し、アミノ酸やアニリンなどのアミンからは N_2 が生成する。前者（ N_2O 生成）では P450nor が共脱窒酵素であることが判明している。すなわち、 NO_2^- は dNir により NO に還元された後 P450nor により共脱窒基質と反応すると考えられる（下式）。この結果 P450nor は NAD(P)H 存在下では Nor 活性、共脱窒基質存在下では共脱窒活性を示す multi-functional 酵素であることが判明した¹⁴⁾。

6. 硝酸同化系の異化への関与とアンモニア非感受性

これまで硝酸の同化型還元と異化型還元は互いの接点がなく、それぞれ独立に働くと考えられていた。アンモニア発酵には異化型ではなく同化型の還元酵素（ aNar , aNir ）が

働く^{11), 15)}。さらに脱窒真菌 *C. tonkinense* は dNar をもたないようであるが、 aNar の関与により硝酸塩を脱窒できるようである¹⁶⁾。このような硝酸同化系の硝酸異化への関与は初めての例である。また NO_3^- による aNar , aNir の誘導が嫌気条件ではアンモニアで抑制されない結果も従来の大原則を破るものであり、その発現制御の問題など、新たな研究テーマを提供する。

7. 放線菌の脱窒と新規窒素代謝

カビと同様に好気的生物と考えられてきた放線菌にも脱窒菌の存在を見いだした^{17), 18)}。 *Streptomyces antibioticus* は硝酸塩から脱窒産物 N_2O とともに共脱窒産物 N_2 を生じる。*S. antibioticus*にはセルフリーの dNar , dNir , および Nor 活性を検出できた。さらにこの菌は有機態窒素を無機化し（亜硝酸とアンモニア生成）、その過程で NO を中間体とすることが示唆されている。この窒素無機化反応は他の放線菌にも見いだされる。その機構解明は今後の課題であるが、放線菌に独特のたいへんユニークな窒素代謝系の存在が明らかとなった。放線菌では2次代謝研究は盛んであるが、それに比べ1次代謝研究が極端に少ないように思われる。放線菌ゲノムも次々と解読されつつあり、放線菌の1次代謝研究は魅力的な研究分野と思える。

8. 好気脱窒と廃水処理への応用

N_2O 抑止のための新たな廃水処理技術開発を目的とし、好気条件でも N_2O を発生せずに N_2 を発生する完全な脱

窒を行える好気脱窒系構築の試みを行った。その結果、DO = 1.5 ppm 前後（曝気廃水処理時の DO レベル）という高濃度の溶存酸素下でも高速で完全な脱窒を行える好気脱窒細菌を数種見いだした¹⁹⁾。

おわりに

以上のように、微生物の窒素代謝に関連して新しい現象を見つけることができましたが、その過程には奇跡としか思えない幸運の連続がありました。面白い発見は予想などとてもできるものではないことを実感しています。しかしそれら発見の前には5年以上の空白期間がありました。このような長期にわたる成果のない状況は、現在では大学といえども許されなくなってきました。助手という身分でありながら、長い間、興味の赴くまま研究することを許してくださった研究室（東京大学発酵学教室）には、感謝の気持ちで一杯です。

カビ脱窒酵素遺伝子の解析や共脱窒の生理的意義など、今後の課題もたくさんあります。最近ヨーロッパの土壤微生物学者の中に、カビ脱窒に注目してくれる人たちが出てきています。カビの脱窒と共脱窒が自然界で有意に活動しているという報告が出ています²⁰⁾。近年、強力な温室効果をもつ N₂O の大気中濃度が急速に増加していますが、この増加にカビの脱窒がかなり貢献している可能性があります。窒素サイクルは農業や環境問題、ひいてはエネルギー問題に密接に関連する重要課題として、もっと注目されるべきです。

本研究は多数の方との共同による成果であります。筑波大学でのスタッフ、高谷直樹博士、中原和彦博士、張 力博士、中村 顕博士、および多くの院生・卒業生の皆さまに感謝申し上げます。理研の城 宜嗣博士、コンスタンツ大学 Ullrich 教授、千葉大学の山口正視助教授をはじめとする学外共同研究者の方々に感謝いたします。別府輝彦先生には東京大学発酵学教室時代にフサリウムの研究テーマをいただきました。このテーマに変更しなかったならこれら成果はなかったはずです。安井恒男先生は筆者を筑波大学へ呼んでくださり、そこでカビの脱窒の証明ができました。故有馬啓先生は最後の助手に私を採用してくださいまし

た。先生のご在任中、ほとんど何も成果を上げられなかったのに、暖かい目で見守ってくださいました。このように今回の受賞は、多数の恩師の先生方、同僚、学生、および共同研究者の方々のお陰です。

- 1) S. J. Ferguson: *Cur. Opinion Chem. Biol.*, **2**, 182-193 (1998).
- 2) H. Shoun, Y. Sudo, Y. Seto, and T. Beppu: *J. Biochem.*, **94**, 1219-1229 (1983).
- 3) H. Shoun, W. Suyama, and T. Yasui: *FEBS Lett.*, **244**, 11-14 (1989).
- 4) H. Shoun and T. Tanimoto: *J. Biol. Chem.*, **266**, 11078-11082 (1991).
- 5) M. Kobayashi, Y. Matsuo, A. Takimoto, S. Suzuki, F. Maruo, and H. Shoun: *J. Biol. Chem.*, **271**, 16263-16267 (1996).
- 6) A. G. M. Tielens, C. Rotte, J. J. van Hellemond, and W. Martin: *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 564-572 (2002).
- 7) T. M. Embley and W. Martin: *Nature*, **396**, 517-519 (1998).
- 8) B. J. Finlay, A. S. W. Span, and J. M. P. Harman: *Nature*, **303**, 333-336 (1983).
- 9) K. Kita: *Parasitol. Today*, **10**, 346-352 (1992).
- 10) K. Nakahara, T. Tanimoto, K. Hatano, K. Usuda, and H. Shoun: *J. Biol. Chem.*, **268**, 8350-8355 (1993).
- 11) Z. Zhou, N. Takaya, A. Nakamura, M. Yamaguchi, K. Takeo, and H. Shoun: *J. Biol. Chem.*, **277**, 1892-1896 (2002).
- 12) H. Shoun, D.-H. Kim, H. Uchiyama, and J. Sugiyama: *FEMS Microbiol. Lett.*, **94**, 277-282 (1992).
- 13) M. Strous, 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: *Nature*, **400**, 446-449 (1999).
- 14) F. Su, N. Takaya, and H. Shoun: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 473-475 (2004).
- 15) K. Takasaki, H. Shoun, M. Yamaguchi, K. Takeo, A. Nakamura, T. Hoshino, and N. Takaya: *J. Biol. Chem.*, **279**, 12414-12420 (2004).
- 16) T. Watsuji, N. Takaya, A. Nakamura, and H. Shoun: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1115-1120 (2003).
- 17) H. Shoun, M. Kano, I. Baba, N. Takaya, and M. Matsuo: *J. Bacteriol.*, **180**, 4413-4415 (1998).
- 18) Y. Kumon, Y. Sasaki, I. Kato, N. Takaya, H. Shoun, and T. Beppu: *J. Bacteriol.*, **184**, 2963-2968 (2002).
- 19) N. Takaya, M. A. B. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou, and H. Shoun: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3152-3157 (2003).
- 20) R. J. Laughlin and R. J. Stevens: *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **66**, 1540-1548 (2002).

プロフィール

祥雲弘文 しょううん・ひろふみ

東京大学大学院農学生命科学研究科教授

〈略歴〉 1945 年 11 月 26 日生まれ

1969 年東京大学農学部農芸化学科卒業

1971 年同大学大学院修士課程修了

1973 年同大学農学部助手

1987 年筑波大学応用生物化学系助教授

1993 年同教授

2001 年東京大学大学院農学生命科学研究科教授，現在に至る。

〈研究テーマと抱負〉 微生物の新規窒素呼吸，P450 の構造・新機能創出，生ゴミ迅速超高熱堆肥化にかかわる微生物

〈趣味〉 囲碁