

嫌気性アンモニウム酸化細菌のnirS遺伝子の機能解析

小林 駿¹, 押木 守¹, 蝶名林 郁也², 荒木 信夫¹, 吉田 圭太郎³, 豊福 雅典³

¹長岡工業高等専門学校, ²長岡技術科学大学, ³筑波大学

背景および目的：嫌気性アンモニウム酸化(anammox)反応ではアンモニウムが嫌氣的に窒素ガスまで酸化され、亜硝酸が電子受容体として用いられる。このanammox反応は以下3種の酵素反応で進行すると考えられており、亜硝酸還元反応が初発反応である；1) 亜硝酸還元反応、2) ヒドラジン合成反応、3) ヒドラジン酸化反応。亜硝酸還元反応において、チトクロムcd1含有型亜硝酸還元酵素NirSの関与が示唆されているものの、未だ実証されていない。本研究では '*Ca. Scalindua japonica*' および '*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*' のnirS遺伝子の機能解析を行った。

方法：脱窒菌 *Pseudomonas aeruginosa* の染色体上に存在するnirS遺伝子を欠損させた遺伝子組換え体(*_nirS*株)を作成した。続いて、'*Ca. Scalindua japonica*' および '*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*' のnirS遺伝子(それぞれSnirSおよびKnirSと呼ぶ。)をPCR増幅し、シャトルベクターpUCP24へ組み込んだ。作成したプラスミドを*_nirS*株へ挿入し、*_nirS* pUCP24-SnirSおよび*_nirS* pUCP24-KnirS株を得た。遺伝子組換え体の亜硝酸還元活性は15Nトレーサー法で調査した。菌体懸濁液2mLを5mLガラスバイアルへ分注し、15NO₂⁻を濃度2.5mMで添加した。37℃で24時間嫌気培養した後、ヘッドスペースガス(15-15N₂, m/z=30)をGC/MSで分析した。

結果：*_nirS* pUCP24-SnirSおよび*_nirS* pUCP24-KnirS株、いずれも亜硝酸還元活性が認められなかった。この原因として、SnirSおよびKnirSのシグナルペプチド配列が*P. aeruginosa*で認識されず、不完全な状態で発現していた可能性が考えられる。つまり、NirSはペリプラズムタンパクであるが、シグナルペプチド配列が認識されなかったため、ペリプラズムに局在できず、matureなタンパク質として機能しなかった可能性がある。現在、SnirSおよびKnirSへの*P. aeruginosa*由来のシグナルペプチド配列の付加、組換え体の作成および亜硝酸還元活性の測定を行っている。

keywords:嫌気性アンモニウム酸化(anammox),亜硝酸還元酵素(NirS), '*Ca. Scalindua japonica*', '*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*', 異種タンパク質発現