

212 脱窒菌 *Alcaligenes faecalis* の遺伝工学的改良のための基礎研究

(東大・農化) 渡辺 裕, O 魚住武司, 別府輝彦

1. 目的 当研究室では先に活性汚泥より強力な脱窒菌 *Alcaligenes faecalis* S-6 株を分離し, その異化的な亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase-2, NIR-2) とその電子供与体である blue protein を精製して, それらの反応機構の解析を行なってきた。¹⁻³⁾ NIR-2 の分子量は 120,000 であり, 分子量 30,000 の subunit 4 個より成り, 各 subunit が 1 個ずつの銅原子を有している。blue protein は銅原子 1 個を有する分子量 12,000 の蛋白であり, NIR-2 が亜硝酸を還元する際の電子供与体である。本研究では, 脱窒反応に必須の酵素である硝酸還元酵素 (nitrate reductase, NAR) と亜硝酸還元酵素並びに blue protein の活性を遺伝工学的に改良し強化するために, まずこれらの欠損変異株を作成するとともに, 使用可能なベクターについても検討を加えた。

2. 方法および結果 (1) 硝酸還元能欠損変異株の取得: 脱窒菌は嫌氣的条件下で硝酸塩が存在する場合, $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2 \uparrow$ の過程で硝酸塩を順次還元し, 各還元ステップに連絡する電子伝達系から生育のためのエネルギーを獲得する。硝酸還元能欠損変異株 (NAR⁻) の取得のためには, S-6 株を 150 μg/ml の N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) で変異処理したうち, KClO_3 0.1%, KNO_2 0.1% を含む nutrient broth (NB) 寒天平板に植菌し, ガスパック嫌気培養装置中, 30°C で 1 週間培養した。 KClO_3 は硝酸還元酵素の基質アナログであり, その還元生成物 KClO_2 は強い毒性を有するため硝酸還元能のある親株は生育できない。一方, 硝酸還元能の欠損した変異株 (NAR⁻) は KClO_3 を還元せず, 培地中の亜硝酸を還元してエネルギーを獲得することにより生育することができる。このようにして NAR⁻ 変異菌を 30 株分離することができた。

(2) 亜硝酸還元能欠損変異株の取得: 亜硝酸還元能が欠損した変異株 (NIR⁻) は嫌気条件下でも硝酸塩が存在すれば硝酸還元の段階でエネルギーを獲得して生育が可能である。しかし生成される亜硝酸が高濃度に蓄積するとその毒性のため生育はある程度で停止する。また硝酸のかわりに亜硝酸を含む培地中では, 嫌氣的には全く生育できない。従って次の様な方法で NIR⁻ 株を分離した。NTG で変異処理した S-6 株を NB 寒天平板上に生菌数 10^2 /平板程度に植菌し, 30°C で好気培養してコロニーを形成させた。その後, KNO_3 0.5% または KNO_2 0.5% を含む 2 種類の NB 平板にコロニーをレプリカし, ガスパック中で嫌氣的に 30°C 1 週間培養した。培養後, KNO_3 を含む培地で生育が悪く, KNO_2 を含む培地で全く生育しない株を選択し, 好気培養したマスタープレートから分離した。これらを KNO_3 を含む NB 液体培地中で静置培養し, ガス発生の無いことを確認した。この様にして NIR⁻ 株 34 株を取得した。

(3) 亜硝酸還元酵素 (NIR-2) および blue protein 欠損株の検出: 上記の亜硝酸還元能欠損株の中には, NIR-2 を欠損したもの以外にも, 電子伝達系としての blue protein を欠損したものが含まれていると考えられるので, これらの区別を試みた。NIR-2 および blue

proteinは硝酸あるいは亜硝酸を含む培地中で嫌気培養した場合に誘導合成されるが、NIR⁻株はこの条件では十分に生育することができない。そこで、嫌気条件で培養した培養液を同量の硝酸塩含有培地に全量植菌し、30°C 20時間静置培養して NIR⁻および blue protein の生合成を誘導したのち、菌体を破碎し可溶性画分を調製した。この条件で親株 (NIR⁺) の NIR⁻および blue protein は十分に誘導合成されていた。可溶性画分中の蛋白をホリアクリルアミドゲル電気泳動したのち、クマシーブリアントブルーによる蛋白染色および NIR の活性染色を行なった。活性染色はゲルを KNO₂, methylviologen および sodium hydrosulfite を含む溶液中で嫌氣的に incubate したのち, triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 溶液に移し、還元型 methylviologen と TTC の反応による発色によって行った。この結果 NIR⁻株中の少くとも4株において NIR⁻の活性が欠損していることがわかった。蛋白染色においては親株との間に差はみとめられなかった。blue protein の欠損株を、アクリルアミドゲル上の蛋白染色によって検出することを試みたが、親株と差のあるものは得られていない。

(4) ベクタープラスミドの検討: NIR⁻あるいは blue protein の遺伝子をクローニングするためのベクターとして自己伝達能を有し、宿主域の広い RP4 (Amp^r, Km^r, Tc^r) を検討した。RP4 が E. coli から A. faecalis S-6 株へ接合伝達できることを確かめるために、受容菌としての S-6 株にマーカーを付与した。まず S-6 株を NTG で変異処理し、イソロイシン・バリン要求性変異株 S-6 ilv⁻ を分離した。NB 液体培地中に, donor として E. coli C600 thr⁻, leu⁻, thi(RP4) 10⁷ cell/ml と recipient として S-6 ilv⁻ 10⁶ cell/ml を植菌し、34°C 3時間培養することによって接合を行なわせ、Amp 50 µg/ml, Km 25 µg/ml および Tc 5 µg/ml とイソロイシン・バリンを含む Davis 最少培地平板に塗布して培養することにより、RP4 の接合伝達された S-6 ilv⁻ (RP4) を得た。伝達の頻度は 10⁻⁵ ~ 10⁻⁷/donor であった。

3. 考察 A. faecalis S-6 株の脱窒能を強化するためには、脱窒過程において律速段階を占める亜硝酸還元能に関与する NIR⁻あるいはその電子伝達体 blue protein の遺伝子をクローニングし、遺伝子増中効果によって亜硝酸還元能を強化することが有効であろう。硝酸還元酵素および亜硝酸還元酵素の欠損株が得られ、自己伝達性のプラスミド RP4 が S-6 株に感染できることから、これらの遺伝子のクローンは in vivo の組み換えによって達成できる可能性がある。さらに高度な遺伝子増中のためには、非伝達性の高コピー数のプラスミドを用いた in vitro 組み換えが必要であろう。硝酸還元酵素 (NAR), 亜硝酸還元酵素 (NIR⁻), blue protein などの遺伝子をクローン化して増中し、その構造を解析することは、脱窒能の強化に直接的に役立つ可能性という点のみならず、蛋白の一次構造の決定等、生化学的な研究のためにも重要な手段となり得るであろう。

- 1) T. Kakutani, T. Beppu, K. Arima: Regulation of Nitrite Reductase in Denitrifying Bacterium A. faecalis S-6; Agric. Biol. Chem. 45, 23 (1981).
- 2) T. Kakutani, H. Watanabe, K. Arima, T. Beppu: Purification and Properties of a Copper-Containing Nitrite Reductase from a Denitrifying Bacterium, A. faecalis strain S-6; J. Biochem. 89, 453 (1981).
- 3) T. Kakutani, H. Watanabe, K. Arima, T. Beppu: A Blue Protein as an -----; J. Biochem. 89, 463 (1981).