

〔醸酵工学 第66巻 第2号 103-107. 1988〕

## ノ ー ト

*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

徳山 龍明\*・富田 祐介・高橋 令二

日本大学農獣医学部農芸化学科

Cloning and expression of the hydroxylamine oxidase gene of *Nitrosomonas europaea* in *Pseudomonas putida*. —Note— TATSUAKI TOKUYAMA, YUSUKE TOMITA, and REIJI TAKAHASHI (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Setagaya, Tokyo 154, Japan) Hakkokogaku: 66: 103-107. 1988.

Gene controlling hydroxylamine oxidase (HAO) in *N. europaea* were cloned and expressed in *Pseudomonas putida*. *EcoRI* fragments of *Nitrosomonas* chromosomal DNA were inserted into RSF 1010 vector and introduced into *P. putida*. By screening 3,000 transformants, one clone expressing HAO activity was obtained.

The plasmid pTT54 maintained by this clone is a 13.6 kb plasmid containing a 4.7 kb insert. A clone containing pTT541, a plasmid reduced in size by removing a 1.0 kb fragment, also expressed HAO activity. The clone containing pTT45, a derivative of pTT54 containing the 4.7 kb DNA fragment in the opposite orientation also produced HAO. Thus the fragment apparently possesses the promoter region as well.

The activity of HAO produced by pTT54 was about 10% of that produced by *N. europaea*. The results of the present study suggest the possibility that genes of autotrophic bacteria such as *N. europaea* are expressed in heterotrophic bacteria such as *P. putida*.

自然界での窒素循環系における硝酸化成作用は、独立栄養細菌である亜硝酸菌および硝酸菌によって行われている。<sup>1)</sup>

亜硝酸菌 *Nitrosomonas europaea* はアンモニアを亜硝酸に酸化することによってエネルギーを獲得している。この酸化系の中間体であるヒドロキシルアミンから、亜硝酸への酸化に関与するヒドロキシルアミノオキシダーゼ [EC 1.7.3.4] (HAO と略記する) は、すでに精製されている。<sup>2)</sup> この酵素は、*N. europaea* のアンモニア酸化系に関与する酵素群のなかで、単離に

成功している数少ないものの一つである。

本報では、*N. europaea* の HAO 遺伝子のクローニングを目的として、*Pseudomonas* 菌を形質転換させ、発現株を取得したので報告する。

本実験において亜硝酸菌は、*Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 菌株を使用した。培地は、硫酸アンモニウムを唯一の窒素源とし、高濃度のリン酸塩で緩衝化させた Lewis & Pramer ら<sup>3)</sup> によって考案された無機塩培地を用いた。培養は既報<sup>4)</sup> どおり、30 ml から 2.2 l までの段階的にスケールアップした前培養を経た後、その 10% 量を接種し、1 l の通気本培養を 30°C で 7 日間行った。著者らは 25978 菌株がプラス

\* 連絡先, Corresponding author.

ミドを保有していないことをすでに認めているので、HAO 遺伝子は染色体 DNA 上に存在すると考えた。そこで HAO 遺伝子のクローニングにあたっては、大腸菌を形質転換し、発現させることを試みた。しかし、大腸菌はアンモニア酸化系の逆である還元系を司る亜硝酸還元酵素を、かなり安定に保有しているため不可能であった。今回は、この還元系酵素を元来有していない *Pseudomonas* 属菌を受容菌として使用した。*Pseudomonas* は従属栄養細菌のなかでは、その分類学的諸性質は硝酸化成細菌と最も類似しているバクテリアである<sup>9)</sup> ことから、HAO 遺伝子を発現する可能性が期待される菌種である。そこで、*P. putida* ATCC 12633 菌株を受容菌とし、RSF 1010<sup>6)</sup> をベクターに用いてショットガンクローニングを試みた。*P. putida* 用の培地は、BY 培地 (肉エキス 0.5%, ポリペプトン 1.0%, 酵母エキス 0.1%, 塩化ナトリウム 0.2%, pH 7.2), あるいはアミノ酸要求物質 (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた M9 培地<sup>7)</sup> を使用した。培養は通常、培地 100 ml 入の 300 ml 容三角フラスコを用い、ロータリーシェーカー (150 rpm) により 30°C で一晩行った。なお、培地、緩衝液、反応液等に用いた試薬は、和光純薬工業製を、また DNA、制限酵素類、修飾酵素類は宝酒造製を、ストレプトマイシン塩酸塩は Sigma Chemical Co., Ltd. 製をそれぞれ使用した。*N. europaea* からの全 DNA の分離は、Marmur 法<sup>8)</sup> により行った。ベクタープラスミドや形質転換株のプラスミドの分離は、Marko ら<sup>9)</sup> によるアルカリ抽出ーグラスパウダー吸着処理法に準拠した。また、アガロースゲル上の DNA 断片は、Charles らの方法<sup>10)</sup> によって抽出精製した。*N. europaea* の染色体 DNA と RSF 1010 は、ともに制限酵素 *EcoRI* で分解処理した。RSF 1010 はあらかじめアルカリホスファターゼ処理を施し、付着末端のリン酸基を除去した。これら DNA はアニーリング後、T4DNA リガーゼにより連結処理を施し、組換えプラスミドを作製した。なお、プラスミド DNA の制限酵素による分解および連結法は、Maniatis ら<sup>11)</sup> による A Laboratory Manual に準じた。このプラスミドを Molholt ら<sup>12)</sup> の方法により *P. putida* へ導入した。第一次スクリーニングにおける形質転換株の取得は、RSF 1010 の薬剤耐性マーカーであるストレプトマイシン (Sm) を 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度で用いて行った。その結果、約 3,000 株の Sm<sup>R</sup> 株が得られた。これら全ての菌株について、第二次スクリーニングを行った。すなわち、組織培養用のマルチプレ

ートの各ウェルに 50  $\mu\text{l}$  の 20 mM リン酸緩衝液、pH 8.0 を入れ、滅菌ヨージでピックアップした平板培養上のコロニーを懸濁させた。次に、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度のヒドロキシルアミンを 50  $\mu\text{l}$  加え、30°C で 30 分間反応させた。反応後、Rider ら<sup>13)</sup> の方法によって亜硝酸発色用試薬を加え、1 分以内に赤色に発色した菌体懸濁液を HAO 活性を発現するクローンとして取得した。その結果、1 つのクローンを得ることに成功した。そこで、この形質転換株のプラスミド検出を 0.7% アガロースゲル電気泳動<sup>14)</sup> によって行った。泳動上のパターンから、RSF 1010 よりも分子量の大きいプラスミドのバンドが認められた。このプラスミドを pTT54 と呼称した。精製した pTT54 の *EcoRI* 処理により、pTT54 は 13.6 kb であり、挿入 DNA は 4.7 kb



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of pTT 54 and RSF 1010 digested with *EcoRI*.

Lanes 1 and 6,  $\lambda$  phage DNA-*Hind* III; 2, pTT 54/*EcoRI*; 3, pTT 54; 4, RSF 1010/*EcoRI*; 5, RSF 1010. Lanes 1 and 6 were used as molecular weight standards. The sizes of the fragments are (from the top in kb) 23.1, 9.8, 6.6, 4.4, 2.5 and 2.2. Electrophoresis was done on 0.7% agarose gel in 89 mM Tris-23 mM phosphate buffer, pH 8.3, 100 mA for 1 h.

の断片であることが明らかとなった。これらの電気泳動パターンを Fig. 1 に示した。

次に, pTT54 中の挿入 DNA 断片の由来を明らかにするため, Southern ハイブリダイゼーションを行った。RSF 1010 をプローブとするため, ニックトランスレーション<sup>15)</sup>により <sup>32</sup>P 標識を行って調製した。一方, pTT 54 の *Eco*RI 分解物をニトロセルロースフィルターにプロット<sup>16)</sup>した。プローブ DNA とフィルター上の DNA 断片とのハイブリダイゼーションは, Bernard<sup>17)</sup>による Laboratory Manual に準拠して行った。その結果, Fig. 2 に示した通り, 8.9 kb に相当する DNA 断片にハイブリッドが認められた。さらに, *N. europaea* の DNA を *Eco*RI 分解した分解物のフィルターに対しては, pTT54 プローブが 4.7 kb の断片に強くハイブリッドするのが認められた。

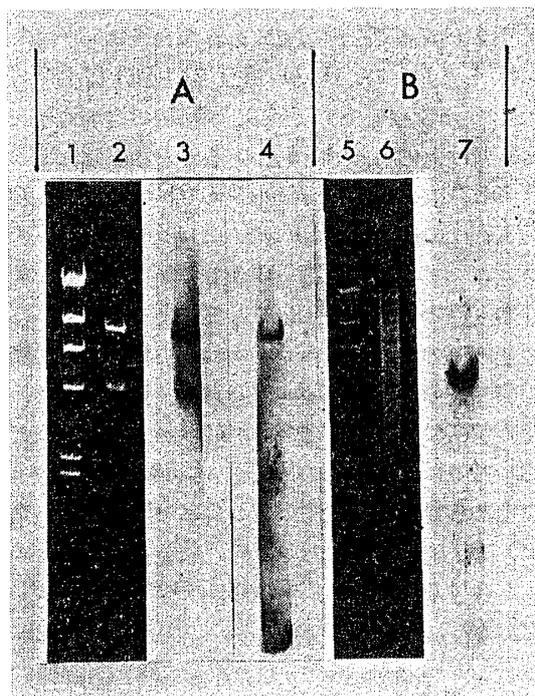


Fig. 2. Southern blot hybridization of pTT 54 and *N. europaea* chromosomal DNA digested with *Eco*RI.

Electrophoresis was done as in Fig. 1. Lane 1 and 5 ( $\lambda$  phage DNA/*Hind* III), 2 (pTT 54/*Eco*RI), 6 (*Nitrosomonas* DNA/*Eco*RI), Ethidium bromide staining; Lanes 3, 4 and 7, Southern blot hybridization with <sup>32</sup>P-labeled pTT 54(3, 7) or RSF 1010(4). Plasmid pTT 54(A) and chromosomal DNA of *N. europaea* (B) digested with *Eco*RI were transferred to a nitrocellulose filter after electrophoresis.

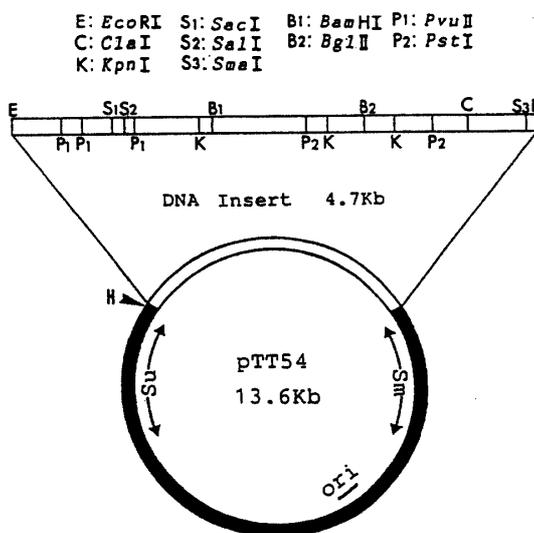


Fig. 3. Restriction map of pTT 54.

Open bar (□) represents *N. europaea* DNA and filled bar (■) represents RSF 1010 DNA. H▶: *Hap* I

このことは 8.9 kb 断片が RSF 1010 であり, 4.7 kb 断片が *N. europaea* 由来の挿入 DNA 断片であることを示唆していた。

pTT 54 の制限酵素切断地図の作成と HAO 遺伝子座位を明らかにするため, 次の通り行った。pTT54 における *N. europaea* の 4.7 kb 挿入 DNA 断片の切断点地図を作成し, Fig. 3 に示した。図から明らかなように, *Sac* I, *Sal* I, *Bam* HI, *Bgl* II, *Cla* I, *Sma* I によってそれぞれ 1ヶ所, *Pvu* II で 2ヶ所, *Pst* I, *Kpn* I で 3ヶ所切断されることが判明した。次に, HAO 遺伝子の発現に必要な最小領域を明らかにするため, 遺伝子座位を調べた。まず, それぞれの切断部位をもつ 2種類の制限酵素によって pTT54 を切断した。そしてそれぞれの付着末端を Mung Bean Nuclease<sup>18)</sup>によって処理した後, T4 リガーゼによってセルフライゲーションを行った。そして 2つの切断部位間を欠失させた種々の小型化プラスミドを構築した。Fig. 3 に示した切断点地図において, RSF 1010 の *Eco*RI 切断点より 0.1 kb 手前の *Hap* I と挿入断片中の *Sal*I 間の 1.0 kb 断片を欠失させた pTT541 を作製した。また挿入断片中の *Bgl*II と *Sma*I 間の 1.4 kb 断片を欠失させた pTT542 を作製した。さらに, 挿入 DNA 断片中のプロモーター部位を推定するため, この 4.7 kb 挿入 DNA 断片を逆向きに連結させた pTT 45 を作製した。

Table 1. Expression of hydroxylamine oxidase activity of *N. europaea* in transformants of *P. putida*.

Strain	HAO activity* (%)
<i>N. europaea</i> ATCC 25978	1.9 (100)
<i>P. putida</i> /pTT 54	0.145 (7.6)
<i>P. putida</i> /pTT 541	0.226 (12.0)
<i>P. putida</i> /pTT 542	0.012 (0.6)
<i>P. putida</i> /pTT 45	0.158 (8.3)

\*: HAO (Hydroxylamine oxidase) activity, NO<sub>2</sub>-N (μg/ml) produced

以上の通り作製した組換えプラスミド保有の各クローンが示す HAO 活性を測定した。その結果を Table 1 に示した。なお、HAO 活性の測定にあたって、*N. europaea* は 7 日間、*P. putida* の形質転換株は一晩それぞれ培養した。培養液は、7,000 rpm, 5 分遠心分離し、菌体を 0.02 M リン酸緩衝液, pH 8.0 で 2 回洗浄した。洗浄菌体から同緩衝液を用いて Klett 値 60 (Klett Summerson 分光光度計による) を示す菌体懸濁液を調製した。この懸濁液 1.9 ml に 1,000 μg/ml 濃度のヒドロキシルアミン溶液を 0.1 ml 加え、30°C で 30 分間反応させた。反応液に亜硝酸定量用試薬 (A), (B)<sup>19)</sup> をそれぞれ 1 ml 添加し、30°C, 30 分間保温し、安定化させた。この発色液を 0.02 μm のミリポアフィルターを通し、その除菌液の吸光度を測定した。以上の条件下で生成した亜硝酸量 (NO<sub>2</sub>-N μg/ml) を HAO 活性値として表示した。pTT54 のクローンは活性値 0.145, pTT541 のクローンは 0.226 であり、これらの値は *N. europaea* の示す活性値のそれぞれ 7.6%, および 12% であった。一方、pTT542 のクローンによる HAO 活性はほとんど認められなかった。pTT542 の活性は pTT54 の 10% 程度残存しているが、これは *Pseudomonas* 単独の活性値に等しかった。そして *SalI* と *EcoRI* 間 3.8 kb の DNA 上、*SalI*-*KpnI* 間の欠失、*Clal*-*SmaI* 間の欠失で完全失活が認められた。このことから、HAO 遺伝子は、ほぼこの 3.8 kb の DNA 断片上に情報化されているものと推定された。次に、pTT45 のクローンにおいて、HAO 活性の欠失は認められなかったことから、この挿入 DNA 断片上におけるプロモーターの存在が推察された。なお、RSF 1010 の *EcoRI* 部位に DNA 断片を挿入したことによって、Sm 耐性の測定し得る低下は認められなかった。

HAO はその分子中に 10 分子のヘム c を含む分子量が 175,000~180,000 の酵素タンパクであることがすでに、Yamanaka らにより明らかにされている。<sup>19)</sup> また、近年この酵素は分子量 220,000, α, β のサブユニット各 3 ケからなり、また P-460 を含んでいることが報告されている。<sup>20)</sup> 前述の結果から、小型化した pTT541 における 3.7 kb の挿入 DNA 断片でも発現可能であった。理論的には、この遺伝子は、約 1,230 ケのアミノ酸のコドンになり得る。アミノ酸の平均分子量を 135 とすると、約 166,000 の分子量からなるタンパク質の情報量を有することになる。この値は報告されている上述の HAO の分子量より小さいが、チトクロム c 等の電子受容体の一部の遺伝子のみがコードされていることを推定すると、活性の低い酵素が産生される可能性が考えられる。一方、Yamanaka ら<sup>21)</sup> は、*in vitro* での HAO 活性の発現のためには、最初の電子受容体であるチトクロム c-554 が必要であることを明らかにしている。したがって、HAO 遺伝子の十分な発現のためには、所要量のチトクロム c-554 の合成遺伝子が DNA 断片上にコードされていることが必須であると推察される。一方、*Pseudomonas* で 10% 程度の発現が認められたのは、*Pseudomonas* に *Nitrosomonas* のチトクロム c-554 の機能を補うものが存在する可能性も推察される。いずれにしてもこれまで著者らは、独立栄養細菌である *Nitrosomonas* の遺伝子を従属栄養細菌である *Pseudomonas* で発現させることは、菌種間の多様な生理的相違からかなり困難であることを予想していた。しかしながら、本実験の結果から、少なくとも発現の可能性があることを認めた。今後は、HAO 遺伝子の塩基配列の解析、効率のよいプロモーターからなる組換え体の構築等について検討していく予定である。

最後に、本研究にあたり、*P. putida* 菌の分与、並びにベクター RSF 1010 を提供された三菱化成生命科学研究所、長張健二博士に厚く御礼を申し上げます。

本報告の概要は、日本農芸化学会 62 年度大会 (東京) において発表した。

## 文 献

- 1) Hooper, A. B.: *Microbiol Chemoautotrophy*, The Ohio State University Press (Columbus), 133-167 (1984).
- 2) Hooper, A. B., Maxwell, P. C., Terry, K. R.: *Biochemistry*, 17, 2984-2989 (1978).
- 3) Lewis, R. F., Pramer, D.: *J. Bacteriol.*, 76, 524-528 (1958).

- 4) 徳山龍明, 浅野浩司: 醸酵工学, 56, 725-732 (1978).
- 5) 長谷川武治: 微生物の分類と同定(下), 学会出版センター(東京), 99-161 (1985).
- 6) Nagahari, K., Sakaguchi, K.: *J. Bacteriol.*, 133, 1527-1529 (1978).
- 7) Miller, J. H.: *Experiment in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, p 431 (1972).
- 8) Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218 (1961).
- 9) Marko, M. A., Chipperfield, R., Birnboim, H. C.: *Anal. Biochem.*, 121, 382-387 (1982).
- 10) Carton, W. C., Charles, A., Thomas, Jr.: *Anal. Biochem.*, 101, 339-341 (1980).
- 11) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 98-106 (1982).
- 12) Molholt, B., Doskocil, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 477-483 (1978).
- 13) Rider, B. F., Mellon, M. G.: *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 18, p96 (1946).
- 14) Davis, R. W., Bootstein, D., Roth, J. R.: *A Manual for Genetic Engineering*, Cold Spring Harbor Laboratory, 148-158 (1980).
- 15) Silhary, T. J., Berman, M., Enquist, L. W.: *Experiment with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, 199-200 (1984).
- 16) Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517 (1975).
- 17) Bernard, P.: *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, 311-316 (1984).
- 18) Sheflin, L. G., Kowalski, D.: *Nucleic Acids Res.*, 13, 6137-6154 (1985).
- 19) Yamanaka, T., Shinra, M., Takahashi, K., Shibasaki, M.: *J. Biochem.*, 86, 1101-1108 (1979).
- 20) Andersson, K. K., Kent, T. A., Lipscomb, J. D., Hooper, A. B., Munck, E.: *J. Biol. Chem.*, 259, 6833-6840 (1984).
- 21) Yamanaka, T., Shinra, M.: *J. Biochem.*, 75, 1265-1273 (1974).

(昭62.10.22受付)