

広島大学学位請求論文

アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の  
アンモニア酸化系遺伝子群の分子生物学的解析

2002 年

広島大学大学院先端物質科学研究科  
分子生命機能科学専攻

廣田 隆一

# 目次

## 1. 主論文

アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の  
アンモニア酸化系遺伝子群の分子生物学的解析

廣田 隆一

## 2. 公表論文

- (1) Ryuichi Hirota, Akira Yamagata, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Physical map location of the multicopy genes coding for ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, 182: 825-828, 2000.
- (2) Ryuichi Hirota, Akira Yamagata, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Molecular analysis of the nitrification genes in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. Proceeding of *ISEB2000* Kyoto, Japan, p67-70, 2001.
- (3) Ryuichi Hirota, Junichi Kato, Hiromu Morita, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Isolation and characterization of *cbbL* and *cbbS* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large and small subunits in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press).

## 3. 参考論文

- (1) Akira Yamagata, Junichi Kato, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Isolation and characterization of two cryptic plasmids in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, 181: 3375-3381, 1999.
- (2) Akira Yamagata, Ryuichi Hirota, Junichi Kato, and Hisao Ohtake. Molecular characterization of the indigenous plasmids and genome in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. Proceeding of the 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, P-RM30(CD-ROM), 1999.
- (3) Akira Yamagata, Ryuichi Hirota, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Mutational analysis of the multicopy *hao* gene coding for hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (8): 1754-1757, 2000.

# 主論文

## 主論文目次

第一章 緒言	1
第1節 はじめに	2
第2節 アンモニア酸化系	4
第3節 アンモニア酸化細菌の分子生物学の現在	6
第4節 アンモニア酸化細菌の応用と問題点	9
第二章 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株の染色体物理地図の作成	11
序	12
第1節 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株について	14
第2節 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株の染色体物理地図の作製	16
第3節 考察	36
第三章 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株のヒドロキシルアミンオキシドレダクターゼ遺伝子の機能解析	38
序	39
第1節 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株の <i>amo</i> , <i>hao</i> 全コピーのクローニングと比較	41
第2節 ENI-11 株の <i>hao</i> 遺伝子の破壊実験	44
第3節 考察	51
第四章 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株のヒドロキシルアミンオキシドレダクターゼ遺伝子の転写制御機構の解析	54
序	55
第1節 <i>hao</i> 遺伝子のノーザンハイブリダイゼーション解析	57
第2節 レポータープラスミドを用いた <i>hao</i> の転写融合解析	61
第3節 <i>hao</i> プロモーターの応答解析	67
第4節 考察	70
第五章 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株の炭酸固定酵素遺伝子の解析	73
序	74
第1節 <i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11 株の Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase/carboxylase	

(RubisCO) 遺伝子の単離	76
第2節 ENI-11 株の <i>cbbL</i> , <i>cbbS</i> の大腸菌菌体内での発現	80
第3節 ENI-11 株の <i>cbbL</i> , <i>cbbS</i> の転写解析	82
第4節 考察	85
第六章 総括	88
参考文献	95
謝辞	100

# 第一章

## 緒言

## 第1節 はじめに

自然界におけるアンモニアの好氣的な酸化は、主に独立栄養性のアンモニア酸化細菌 (lithotrophic ammonia oxidizing bacteria) によって行われる (28, 56)。有機物の無機化などによって生じたアンモニアは、アンモニア酸化細菌によって亜硝酸へ酸化され、続いて亜硝酸は亜硝酸酸化細菌によって硝酸へと酸化される (Fig. 1-1)。この二つの連続した過程は硝化と呼ばれ、特にアンモニアの酸化過程はアンモニア態窒素の地球化学的変換における最初のステップとして重要である。一般にアンモニア酸化細菌とはこれらの独立栄養性のものを指すことが多く、従属栄養的にアンモニアの酸化を行うものは従属栄養性アンモニア酸化細菌 (heterotrophic ammonia oxidizing bacteria) とよばれ、明確に区別される。(以後、特に断りがなければ、本論文では「アンモニア酸化細菌」とは独立栄養性のものを指すこととする。) また近年 Anammox process とよばれる嫌氣的なアンモニア酸化を行う *Planctomyces* 属のバクテリアも発見されているが (49)、これらのバクテリアが地球規模のアンモニア酸化においてどれほど貢献しているかはいまのところ詳しくはわかっていない。

アンモニア酸化細菌は無機的な条件下において生育し、無機分子であるアンモニアの酸化によってエネルギーを獲得するだけでなく、このエネルギーを用いて二酸化炭素を固定し全ての細胞構成成分を合成する。この非常に特殊な生育様相を示すバクテリアは 1890 年にロシアの微生物学者 S. Winogradsky によって、土壤中より初めての化学独立栄養細菌として単離された。以来、数種類のアンモニア酸化細菌が単離されたが、これらを生理的性質により類別することは難しく、その形態に基づいた分類が行われてきた。当初、形態による分類ではアンモニア酸化細菌は 5 属に分けられていたが、近年 16S rRNA による分類では *Nitrosomonas* (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*) と *Nitrospira* (*Nitrospira*, *Nitrovibrio*, *Nitrosolobus*) の 2 属に大別されるようになった (26, 54, 55)。アンモニア酸化細菌はすべてグラム陰性で *Proteobacteria* の  $\beta$ -subdivision の中に分類されるが、

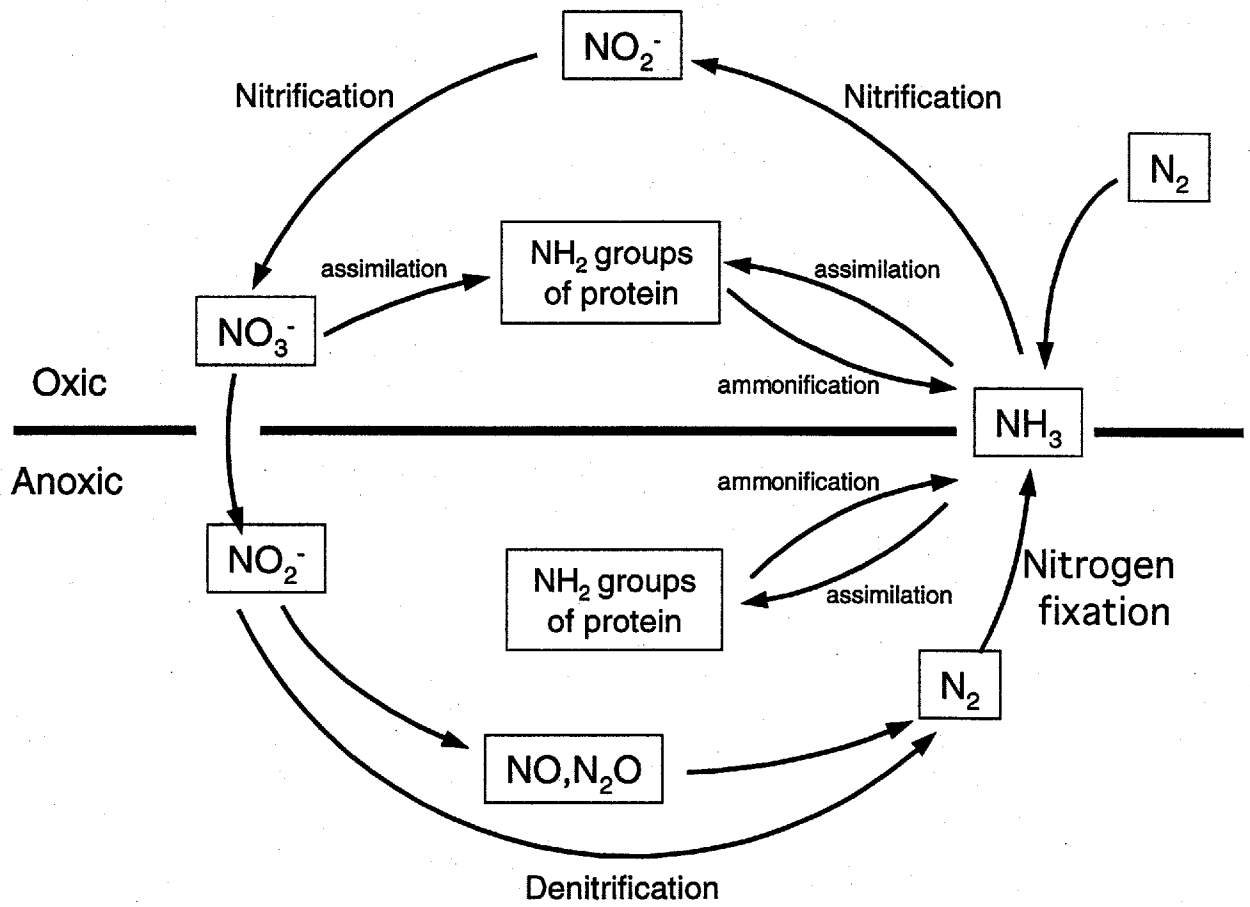


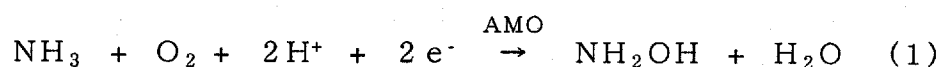
Fig. 1-1 The Nitrogen Cycle



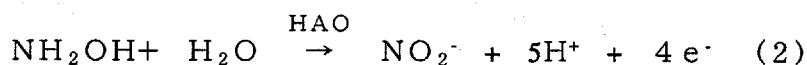
例外的にただ一つ *Nitrosococcus oceanus* のみが  $\gamma$ -subdivision に属する。これらいずれのアンモニア酸化細菌も土壌・淡水・海水中など生態系に広く分布し、それぞれの生物圏における窒素循環に大きく寄与している。

## 第2節 アンモニア酸化系

アンモニア酸化細菌のアンモニア酸化系は、主に *Nitrosomonas europaea* において研究が行われてきた。これまで得られている知見によると、アンモニアの酸化は次のようにしておこる (Fig. 1-2)。アンモニアはまずアンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) によってヒドロキシルアミンへ酸化される (1式)。



AMO は銅によって活性化される膜結合型タンパク質であり、アリルチオウレアやキサントゲン酸などの銅キレート剤、アセチレン( $\text{C}_2\text{H}_2$ )、光によって活性が阻害される (8, 16, 21, 22)。また AMO はメタン酸化細菌の膜結合型のメタンモノオキシゲナーゼ(MMO)と基質特異性や、阻害剤の効果など多くの類似した性質を持ち、進化的に関連した酵素であると考えられている (35, 38, 48)。AMO によって生じたヒドロキシルアミンは、続いてペリプラズムに存在するヒドロキシルアミンオキシドレダクターゼ (HAO) によって亜硝酸へ酸化される (2式)。



HAO は三量体構造をとっており、一分子の分子量が約 63kDa である。またそれぞれ一分子につき8分子のヘムを含む非常にユニークなタンパク質である (1, 23, 30)。HAO のアミノ酸配列と高い割合で相同性を示すタンパク質は今のところ知られておらず、アンモニア酸化細菌に特有の酵素であるといえる。HAO によるヒドロキシルアミンの酸化によって引き抜かれた4つの電子は、すべてが末端酸化酵素 (シトクロム  $\text{aa}_3$ ) に受け渡されエネルギー生成に使われるのではなく、このうち2つはAMOによるアンモニアの酸化に使

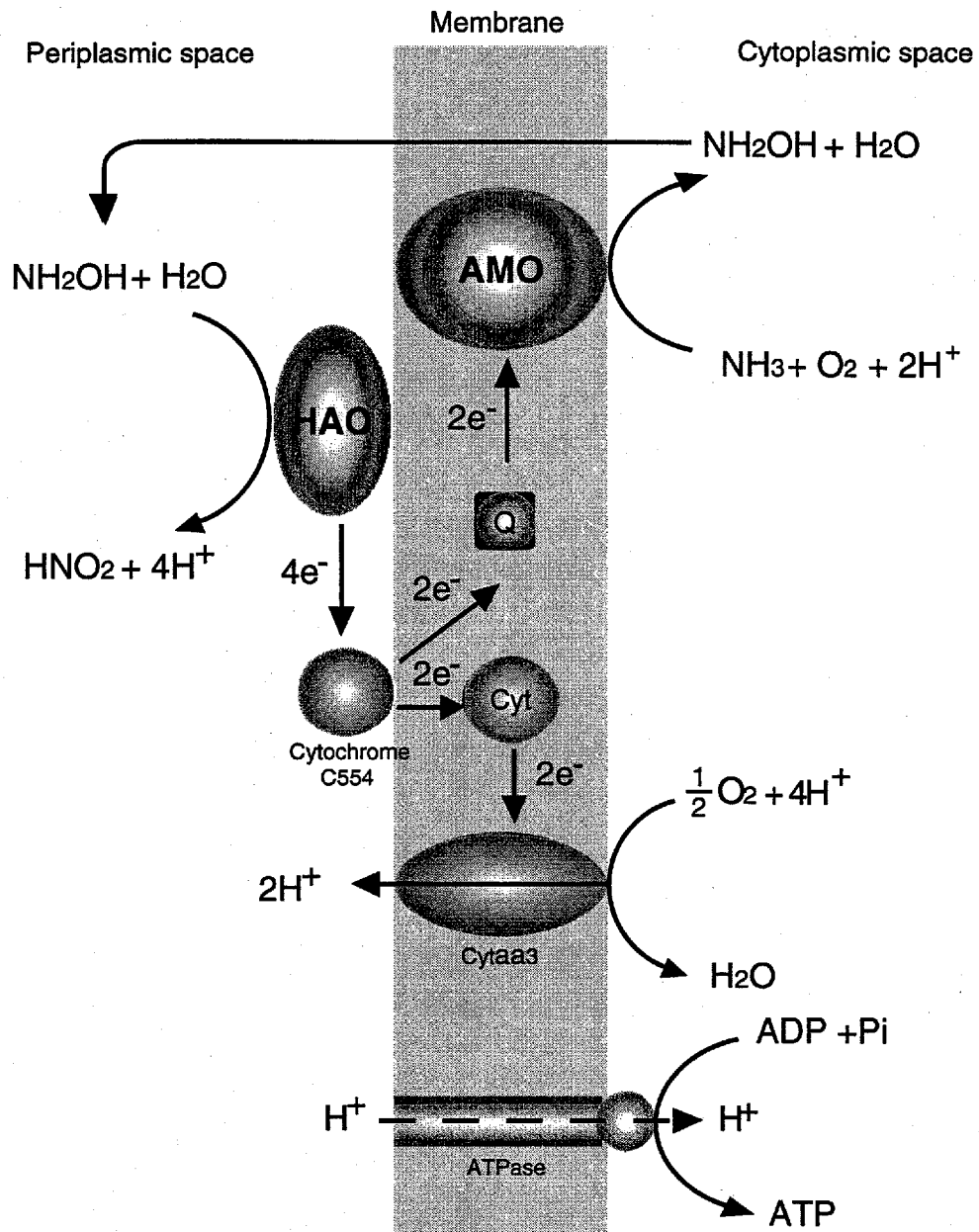


Fig. 1-2 Ammonia oxidation and electron flow in ammonia-oxidizing bacteria

AMO: ammonia monooxygenase, HAO: hydroxylamine oxidoreductase, Q: ubiquinone.

われる。さらに、 $\text{NAD(P)}^+$ の還元はATPを消費して逆行電子伝達系を駆動して行われる。これらの理由から、アンモニア酸化細菌はエネルギー効率が悪く、結果的に増殖速度が非常に遅くなる。

### 第3節 アンモニア酸化細菌の分子生物学の現在

これまでのアンモニア酸化細菌の研究は、培養の困難さゆえに他のバクテリアに比べるとあまり進展しておらず、遺伝学的情報・解析ツールともに乏しかった。それでもここ十年程で様々なアプローチによる研究が数多くなされ、いくつかの重要な知見が得られたり、有効な実験手法が開発されたりしている。しかしアンモニア酸化細菌の研究は、これによってようやくはじめの第一歩を踏み出したにすぎない。

現在アンモニア酸化細菌の分子生物学的な研究は、PCR や *in situ* hybridization を用いたアンモニア酸化細菌の生息分布の把握や分類を目的とした解析に偏っている傾向にある。これは、アンモニア酸化細菌の培養が困難であるために生化学的な研究が難しいことや、これまでに考えられているよりも多様なアンモニア酸化細菌が存在することが明らかにされ始めたことが主たる要因ではないかと思われる。しかし、分類学的な研究によって得られた情報は、そのままではあまり大きな意味を持つとは考えられず、分類されたそれぞれのアンモニア酸化細菌の性質や特徴、分離された環境におけるその細菌の役割など、それぞれの細菌の特性と結びつけられてはじめて有用な情報をもたらすと考えられる。そのためにも、アンモニア酸化細菌の生理面における分子レベルの研究は、平行して推し進められるべきである。以下に現在行われているアンモニア酸化細菌の分子レベルでの研究について概説する。

#### 3-1 アンモニア酸化系の分子生物学

アンモニア酸化系はアンモニア酸化細菌のエネルギー代謝の中核であり、生化学的な

解析とともに分子レベルでの理解が求められる。アンモニア酸化系の鍵酵素である AMO, HAO をコードする遺伝子は、まず *N. europaea* においてクローニングされた。このうち AMO をコードする *amoAB* はアンモニア酸化細菌のタンパク質をコードする遺伝子として初めてクローニングされた遺伝子であり (29)、これが 1993 年であることを考えると、いかにアンモニア酸化細菌の分子レベルでの研究が出遅れていたかが伺える。のちに *amoAB* の上流に機能未知の *amoC* が見いだされ (27, 43)、現在では *amoCAB* オペロンが AMO の構造遺伝子であると考えられている。続いて HAO をコードする *hao* がクローニングされ (41)、この下流にシトクロム *c554* をコードする *hcy* とシトクロム系の open reading frame (ORF) と考えられるものが見いだされた (41, 30)。さらに非常に興味深いことに *N. europaea* の染色体上に *amoCAB* は 2 コピー、*hao* は 3 コピー存在することが知られており (30, 41, 43)、*hao* 下流に存在するシトクロム遺伝子も *hcy* は 3 コピー、未知 ORF は 2 コピー存在している。また *amoC* には他の 2 つのコピーと 60% 程の相同性しか示さない少しタイプの違う 3 つ目のコピーが *amoAB* とは離れて存在する (43)。

この様にアンモニア酸化系の遺伝子が染色体上に複数コピー存在する特徴は、ほとんどの独立栄養性のアンモニア酸化細菌に共通してみられることから、アンモニア酸化細菌の生存上重要な意味を持つものと予想される。しかしながら、アンモニア酸化に関与する遺伝子がなぜ複数コピー存在するかという理由は不明である。

Hommes らは、*N. europaea* においてエレクトロポレーションによる形質転換法を確立し、*hao* 遺伝子において相同組換えによる遺伝子破壊が可能であることを示した (18)。さらにこの結果より 3 つの *hao* はすべて機能しているものの、どのコピーも必要不可欠ではないことを明らかとした。しかし破壊株と野性株の増殖速度の差は見出せず、なぜ 3 つの *hao* が必要であるかという点に疑問を残した。Hommes らは続いて *N. europaea* の *amo* 破壊を行い、*amo* の破壊株に関しては増殖に違いが生じることを見いだした。すなわち 2 コピーの *amo* のうち、*amoA1* と呼ばれるコピーの AMO 発現量が、もう一つのコピーの *amoA2* よりも高いことを示した (19)。

*amo*, *hao* については、転写レベルでの解析も進められており、それぞれのコピーの

発現調節機構の解明が試みられている。Luis らは  $C_2H_2$  によって AMO を失活させた菌体にアンモニアを添加すると、*amo*, *hao* の mRNA 量の増加が見られたことから、*amo* と *hao* の転写はアンモニアの添加によって活性化するということが報告されている (42)。また、このとき培養液の炭素源に  $^{14}CO_2$  を用いても、新規に合成された mRNA は  $^{14}C$  を含まないことから、この転写には *N. europaea* 菌体内に貯蔵されている内在的なエネルギー源が用いられたことが示唆された。しかしながらこの報告では、 $NH_3$  と  $NH_4^+$  のどちらが inducer であるかという点と、どの *amo* (または *hao*) コピーの転写が活性化されるのかという点については明らかにされていない。これには、ひとつの理由として複数コピーの *amo* と *hao* が、遺伝子レベルでどれほどの違いがあるか不明であったことと、なにを基準にしてそれぞれのコピーを区別すればよいかという点に問題があったためである。

この様に、*amo*, *hao* を中心とした分子生物学的解析によって、部分的には少しずつ新たな知見が得られつつあるが、分子レベルでのアンモニア酸化系の全体像やマルチコピー遺伝子の役割は未だによくわかっていない。今後はこれらの協調的な調節、さらにはいけばアンモニア酸化系全体の調節機構の解明が望まれる。

### 3-2 アンモニア酸化細菌の分子生態学

これまでに述べたように、硝化反応は主にアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌によって行われるが、自然界や排水処理系でのこれらのバクテリアの生態はあまり理解されていない。例えばアンモニアの供給量が制限されやすい土壌中において、供給されたアンモニアに対してアンモニア酸化細菌がどのように応答して硝化を始めるのか、そのメカニズムは未だよく知られていない。排水処理系においても硝化のメカニズムは不明な点が多く、結局のところブラックボックスとして扱われている。しかしシステムの効率化を目差すうえでは、アンモニア酸化細菌群の動態や生息分布などを理解することが重要であり、その一つの有効な手段として分子生物学的手法が用いられる。

環境中に生息するアンモニア酸化細菌のスクリーニングや、スクリーニングした菌体の分類を行うためには、16S rRNA や *amoA* をターゲットとした PCR 解析がよく用いられ

ている。*amoA* は 16S rRNA に次ぐアンモニア酸化細菌のマーカーとして新たに用いられるようになった。*amoA* をターゲットとした解析の利点は、 $\beta$ -、 $\gamma$ -subclass のアンモニア酸化細菌のどちらにも対応できることや、16S rRNA よりも塩基配列の違いに富むことから、系統解析による近縁種の特정에威力を発揮することなどがあげられる (26)。また、スクリーニングされているアンモニア酸化細菌の *amoA* と 16S rRNA それぞれの配列をもとに作成した系統樹は高いレベルで一致しており、*amoA* をプローブとして用いることの有用性を示唆している (39)。そしてこれらをプローブとした FISH (fluorescence in situ hybridization) や in situ PCR 法が、特定のアンモニア酸化細菌の分布や population を調べる方法として用いられている (25, 34, 44)。

### 3-3. その他の分子生物学的研究

アンモニア酸化系以外の分子生物学的データの蓄積も、アンモニア酸化細菌の理解に必要である。Yamagata らは廃水処理施設より単離された *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株から、2種類のプラスミドを単離した (58)。これはアンモニア酸化細菌において初めて発見されたプラスミドであり、興味深いことにこのプラスミドの複製開始点と思われる HHR と呼ばれる領域と非常に相同性の高い配列が、ENI-11 株と *N. europaea* の両方の染色体上に見つかっており、アンモニア酸化細菌がもつレプリコンの複製開始点ではないかと考えられている。

## 第4節 アンモニア酸化細菌の応用と問題点

アンモニア酸化細菌の特殊な生態を利用して、現在様々な面に応用が計られている。活性汚泥法による窒素処理は、生態系の窒素循環を巧妙に模した生物的硝化・脱窒を組み合わせたプロセスである。この活性汚泥においても硝化反応 (アンモニア酸化) を中心的に行っているのはアンモニア酸化細菌であり、この活性を高めることでシステム全体の処

理能力が向上すると考えられる。また、アンモニア酸化細菌がもつアンモニアモノオキシゲナーゼは幅広い基質特異性を持ち、トリクロロエチレン等のハロゲン化合物や芳香族化合物を分解することができるため(8)、バイオレメディエーションへの応用が期待されている。さらに、無機化合物であるアンモニアを酸化してエネルギーを生産するシステムや、そこに含まれる酵素の性質は生物学的見地から非常に興味深い。

こうした側面から、近年盛んにアンモニア酸化細菌の研究が行われるようになったが、現在のアンモニア酸化細菌に関する知見は非常に乏しい。これはアンモニア酸化細菌の増殖の遅さのために研究が困難であったことが原因の一つとして挙げられる。そのため、応用を目指した研究を行うにも、基本的な情報や実験手法に限りがあるのが現状であり、生化学的・分子生物学的なアンモニア酸化細菌に関する知識の拡充が求められている。その中でもアンモニア酸化細菌の本質であるアンモニア酸化系の理解は、アンモニア酸化細菌の研究において基軸となる部分であるが、これまでに述べた数々の問題のために理解が乏しく、研究を行っているグループも世界的にみても数グループに限られている。本博士論文では、こういったアンモニア酸化細菌の研究の問題点をふまえ、アンモニア酸化細菌の基礎的な知見の取得、特にアンモニア酸化系の分子生物学に関する解析を行った。

## 第二章

### *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株のゲノム解析



## 序

*Nitrosomonas* 属のアンモニア酸化細菌は、アンモニアを亜硝酸に酸化する際に得られるエネルギーのみに依存して増殖する。*Nitrosomonas* の唯一のエネルギー獲得系であるアンモニア酸化系は、数々のタンパク質の複合的な作用によって構成されている。その中で特に ammonia monooxygenase (AMO) と hydroxylamine oxidoreductase (HAO) は、アンモニア酸化系の中心的な役割を果たす鍵酵素として重要である。またこの他に、電子伝達に関与する数種類のシトクロムの存在が明らかにされている。興味深いことにアンモニア酸化系に関与する酵素をコードする遺伝子が、アンモニア酸化細菌のゲノム上にマルチコピーとして存在していることが知られている (29, 41)。*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株においても AMO をコードする *amoCAB* が 2 コピー、HAO をコードする *hao* が 3 コピー存在することが明らかとなっている (59)。特定のタンパク質をコードする遺伝子が、重複して存在する現象は遺伝子重複 (gene duplication) とよばれ、真核生物においては頻繁に見られるが、原核生物においては ribosome RNA オペロンを除いてさほど多く見られる性質ではない。ところが、アンモニア酸化系の遺伝子重複はアンモニア酸化細菌に共通して見られる性質であり、この分子的特徴がアンモニア酸化細菌の生存上何らかの重要な意味を持っていると考えられる。しかし、その理由は不明であり、またそれぞれの遺伝子が構造的・機能的にどの程度異なっているか (または類似しているか) は明らかにされていない。そこでこれらアンモニア酸化系の重複遺伝子について解析を行うために、まず *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株において染色体物理地図を作製し、これらの遺伝子の染色体上における構造を明らかにすることとした。これまでアンモニア酸化細菌においてゲノムマップが作製された例はなく、これが初めての例であった。そしてこれによってマルチコピー遺伝子を区別することで、それぞれのコピーの相違点を明確にすることとした。

TABLE 2-1. Bacterial strains and plasmids used in chapter 2

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
MV1184	<i>ara</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> ( $\Phi$ 80 <i>LacZ</i> $\Delta$ M15) $\Delta$ ( <i>srl</i> <i>recA</i> )306::Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) F[ <i>traD36 proAB<sup>r</sup> lacIq lacZ</i> $\Delta$ M15]	(53)
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>+</sup>m<sub>B</sub><sup>+</sup>) recA13 ara-14 proA2</i> <i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(10)
<i>N. europaea</i> IFO14298	Type strain, plasmidless	IFO <sup>a</sup>
<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11	Strain isolated from activated sludge	(58)
NAP1	ENI-11 derivative, <i>amo<sub>1</sub>::Kan<sup>r</sup></i>	This study
NHP1	ENI-11 derivative, <i>hao<sub>3</sub>::Kan<sup>r</sup></i>	This study
NHP2	ENI-11 derivative, <i>hao<sub>2</sub>::Kan<sup>r</sup></i>	This study
Plasmids		
pBR322	Cloning vector; Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	(3)
pCRII	Cloning vector; Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pUC118	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(53)
pUC119	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(53)
pUC4K	pUC4 containing 1.3-kb Kan <sup>r</sup> cassette; Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Pharmacia
pAYL	Cryptic plasmid isolated from ENI-11; ORF2; pAYL HHR	(58)
pAYS	Cryptic plasmid isolated from ENI-11; ORF1; pAYS HHR	(58)
pHP1	pCRII containing <i>KpnI-HindIII</i> fragment of pPMH	This study
pPM8	pUC118 containing <i>PmeI</i> site into <i>HincII</i> site	This study
pPMH	pPM8 containing <i>KpnI-XbaI</i> fragment of <i>hao</i>	This study

<sup>a</sup> IFO, Institute for Fermentation Osaka.

## 第1節 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株について

### 1-1 起源

ENI-11 株は、住友化学工業愛媛工場排水処理施設の活性汚泥より単離され、性状試験及び形態観察より *Nitrosomonas* 属と推定された。本菌は代表的なアンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* IFO14298 株よりも増殖が早いという特徴があり (Fig. 2-1A)、研究において大きな利点となる。また Yamagata らによりアンモニア酸化細菌において初めてプラスミドの存在が確認されており、大腸菌とのシャトルベクターも構築された (58)。つまりこれまで研究の対象とされてきた *N. europaea* よりも優れたアンモニア資化能や、進歩したアンモニア酸化機構を持っている可能性があり、また分子生物学的な解析ツールも備わっていることからこの株を対象として研究を行うこととした。

### 1-2 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の培養方法

*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の培養は以下のように行った。アンモニア酸化細菌は有機物による生育阻害を受けやすいことから完全に無機的な培地が望まれるが、アンモニアの消費とともに培養液の pH が低下するため、培地には 2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) をバッファーとして用いた改変アレクサンダー培地 (MA 培地) を使用した。MA 培地の組成は Table 2-2 に示す。通常の培養には坂口フラスコ (500ml) に 100ml の培地を入れ、往復振盪機にて 120rpm の速度で激しく通気を行い 28℃ で 3 日間程培養した。ジャーファーマンターを用いた場合は、2000ml のジャーに対し 1000ml の培地を入れ 350rpm, 28℃ で培養し、必要な場合は一定時間間隔でサンプリングを行い、OD<sub>600</sub> の値と亜硝酸濃度から増殖速度をモニタリングした。亜硝酸濃度の測定には比色測定法 (6) を用いて次のように行った。測定溶液に半量の 1% Sulfanilamide (6N HCl 25%) と N(1-naphthyl)ethylenediamide 0.2 g/l を添加し攪拌後、室温で 10 分間静置し、OD<sub>540</sub> の値により亜硝酸濃度を算出した。固形培地には MA 培地に 0.9% の Gellan gum を添加して固化させたものを用いた。*Nitrosomonas* はコロニー形成能が悪く、光によっても生育が阻害されることから (22)、プレート培養の場合は暗所で行った。

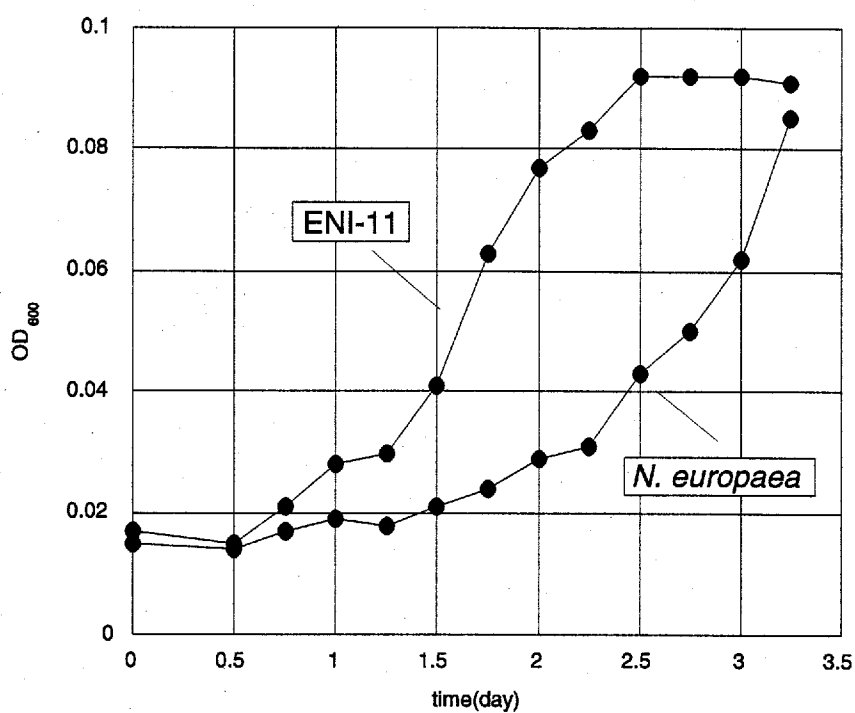


Fig. 2-1A Growth curves of *Nitrosomonas europaea* IFO14298 and *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 on MA medium

Table 2-2. Composition of MA medium

MA medium		Trace element	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2 mg
NaHCO <sub>3</sub>	0.5g	Fe-EDTA(III)	5 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05g	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.1 mg
HEPES	50 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05 mg
Trace element		CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.001 mg
up tp 1000ml [pH7.5~8.0]		ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 mg

### 1-3 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の性状

ENI-11 株はグラム陰性で *Proteobacteria* の  $\beta$ -subdivision に属する。16S rRNA 配列に基づいた相同性比較では、ENI-11 株は *Nitrosomonas europaea* IFO14298 株に非常に近縁の種である (Fig. 2-2A)。ENI-11 株の細胞形態は桿状であり、*N. europaea* とはほとんど違いがみられない。しかし *N. europaea* は運動性をもつが、ENI-11 株は運動性を示さない。アンモニア酸化細菌はその理由は不明であるが、種の近遠に関わらず運動性を持つものと持たないものが存在することが知られている (28)。

*N. europaea* をはじめとする代表的なアンモニア酸化細菌は、pH7.5~8.0 付近が増殖最適 pH であるとされているが、培養液の pH を変化させた増殖試験によると ENI-11 株は MA 培地においては pH8.0~8.5 付近での培養液の最終菌体濃度が高く、若干アルカリ条件を好む (Fig. 2-2B)。また、最適アンモニア( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )濃度はアンモニア酸化細菌の生理的分類においてひとつの重要な指標となるが、ENI-11 株は *N. europaea* とほぼ同様の 15~45mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  での増殖が最も良い (Fig. 2-2C)。この様に *N. europaea* と ENI-11 株は近縁種ではあるものの若干異なった生理的性質を持つ。

## 第2節 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の染色体物理地図の作製

### 2-1 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による ENI-11 株染色体の解析

#### 2-1-1 染色体解析を行うための低頻度認識制限酵素の探索

染色体物理地図の作製において効率的に実験を進めるためには、染色体を出来るだけ少ない数に切断する制限酵素を探し出すことが重要となる。そこで、様々な制限酵素を用いて染色体を切断し適当な数に切断するものを探索した。

#### 2-1-2 サンプル調製方法

巨大 DNA 分子は、水溶液中において物理的切断を受けるので、数百 kb 以上の DNA を無傷のまま取り扱うためには特別な方法が必要となる。本実験においてはゲル包埋法を用いた。すなわち、集菌した対数期後期の ENI-11 菌体を、NT buffer (1.0M NaCl, 10mM Tris-HCl[pH

A

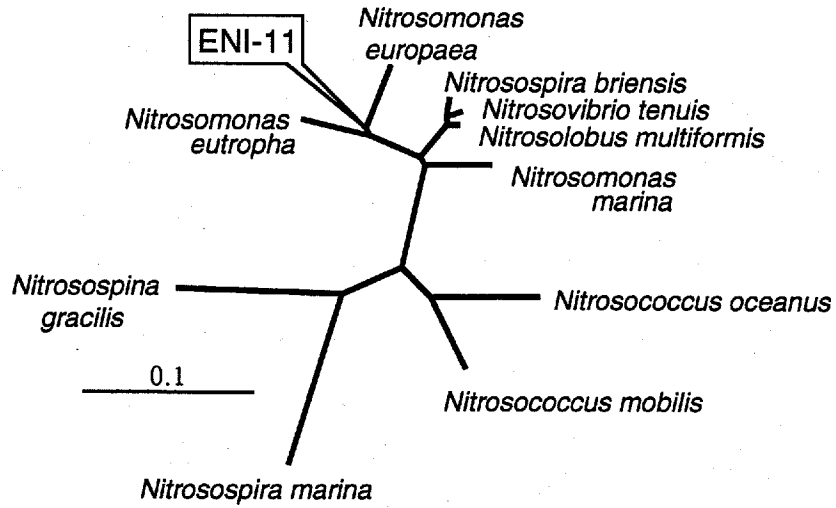


Fig. 2-2A Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of Ammonia-oxidizing bacteria

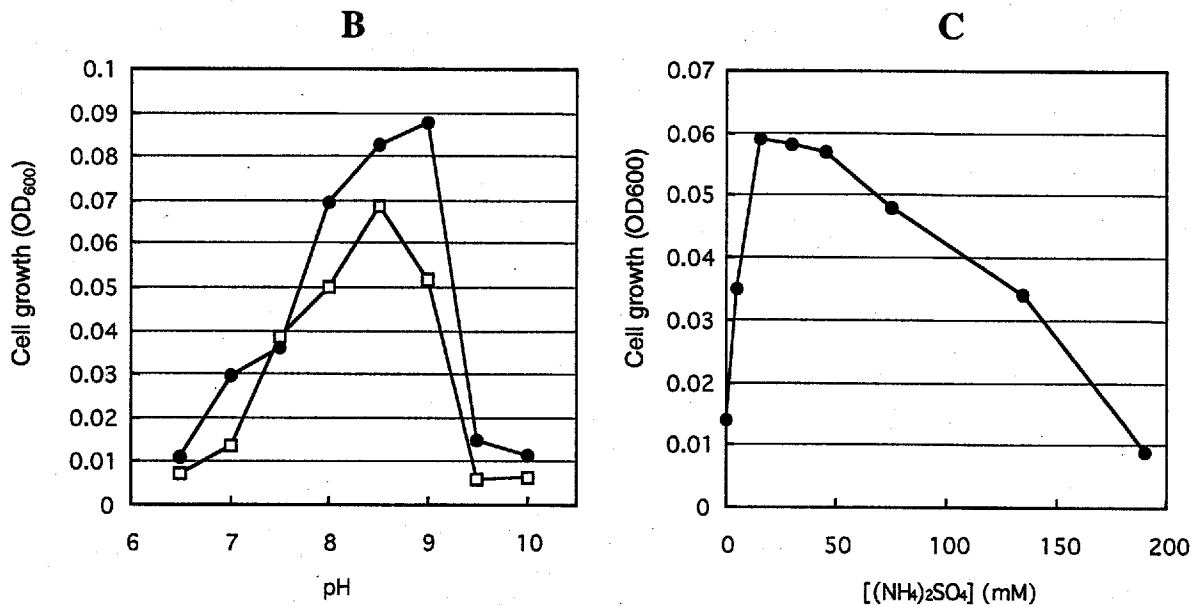


Fig. 2-2 (B)Effect of pH on growth of *N. europaea* (●) and ENI-11 (□) on MA medium. (C)Effect of ammonium sulfate concentration on growth of ENI-11.

7.6])で三回洗浄した後、等量の1%低融点アガロースに懸濁し4℃で固化した。その後10mlのEC buffer (6mM Tris-HCl[pH 7.6], 1.0M NaCl, 0.1M EDTA[pH 7.6], 0.5% Brij-58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sodium N-lauroylsarcosinate) に1mg/mlのリゾチウム、20mg/lのRNaseAを加え37℃で10時間ゆるやかに振盪し溶菌した。次にこのゲルをProteinase K (SIGMA)を1mg/mlになるように加えたES buffer (0.5M EDTA[pH 9.0], 1.0% N-lauroylsarcosine)に移し、50℃で10時間ゆるやかに振とうして除タンパクを行った。続いて1mMのPMSF (SIGMA)を加えたTE buffer (pH7.5)で43℃で2時間×2回振とうした。その後TE bufferで30分×3回振とうし、洗浄を行ったものをサンプルプラグとして用いた。

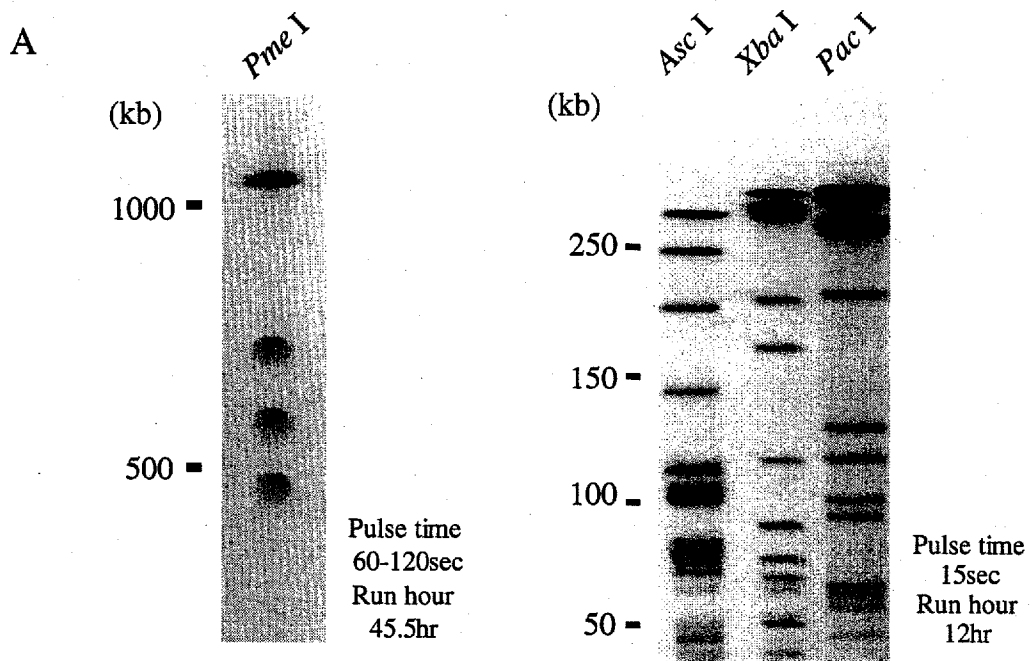
### 2-1-3 サンプルプラグの制限酵素処理

制限酵素処理はアルコール消毒したスパチュラを用いて1プラグ(約5mm×8mm×1mm)を1.5mlエプンドルフチューブに入れ、全量0.25mlの系で5unitの酵素を加え、それぞれの制限酵素の至適温度で12時間以上消化した。制限酵素は8塩基認識のものを中心に一般的に認識頻度が低いとされるものを用いた。

### 2-1-4 PFGEによるDNA断片の分離

酵素処理した染色体サンプルプラグを0.8~1.0%アガロースゲル(SeaKem GTG, FMC)にアプライし、隙間を1%低融点アガロースゲルで埋めた後、0.5xTBE buffer 1.5ℓを満たしたcontour-clamped homogeneous electric field (CHEF)タイプの染色体DNA電気泳動装置(Biocraft, Japan)にセットし電圧180V(6.0V/cm)、バッファー温度10℃で泳動した。Pulse timeとRun timeは目的とするDNA断片サイズに応じて変化させた。DNAサイズマーカーには、0~600kbまでのレンジにはlambda DNA ladder (FMC)を、600kb~2Mbのレンジには*Saccharomyces cerevisiae* chromosome DNA (FMC)を用いた。

PFGEによるDNA断片の分離の結果から、生じる断片数が少なく再現性よく分離できた制限酵素をTable2-3に示す。ENI-11染色体は*PmeI* (NEB)消化によって1193kb、600kb、550kb、487kbの4本のバンド(PmA, PmB, PmC, PmD)を、*XbaI*, *AscI*, *PacI* (NEB), *SwaI* (Roche)によって10~25本の鮮明なバンドを生じることがわかった(Fig. 2-3A)。*XbaI*, *AscI*, *SwaI*, *PacI*消化断片は、合計したサイズの違いやバンドの輝度から同じ泳動レンジでは分離できないものや、



**B**

Fragment size (kb)

<i>Pme I</i>	<i>Pac I</i>		<i>Xba I</i>		<i>Asc I</i>	
A 1193	A 500	J 100	A 431	J 63	A 275	J 76*
B 600	B 270	K 60	B 314	K 41	B 211	K 74
C 550	C 250		C 294	L 31*	C 179	L 71*
D 487	D 248*		D 277	M 28	D 153	M 67*
	E 235		E 189	N 26	E 116	N 60
	F 200		F 169	O 22	F 107*	O 41
	G 140		G 122	P 19	G 101	P -
	H 125		H 91	Q 18	H 100*	Q -
	I 110		I 75	R 16	I 79	R -
total	2830	2860	2818			

\* 2本以上のバンドが重なっているもの

Fig. 2-3 *Nitrosomonas* sp. ENI-11株染色体の各種制限酵素による切断パターン  
 (A) ENI-11染色体の *Pme I*, *Pac I*, *Xba I*, *Asc I*消化物のPFGE  
 (B) ENI-11染色体の *Pme I*, *Pac I*, *Xba I*, *Asc I*消化断片のサイズ



重なったものがあると思われる。また *PmeI* 消化断片のサイズから、ENI-11 の染色体のサイズは約 2830kb と見積もられた (Fig. 2-3B)。

Table 2-3. 染色体解析に用いた制限酵素と泳動条件

制限酵素 (認識配列) *	断片数	断片長合計 (kb)	泳動条件 (Pulse time, Run time)
<i>PmeI</i> (GTTT↓AAAC)	4	2830	60s, 24h
<i>XbaI</i> (T↓CTAGA)	21	2818	17s, 20h
<i>PacI</i> (TTAAT↓TAA)	12	2860	20s, 22h
<i>AscI</i> (GG↓CGGCC)	15 以上	—	17s, 20h
<i>SwaI</i> (ATTT↓AAAT)	17 以上	—	15s, 20h

\*矢印は切断位置

## 2-2 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の染色体物理地図の作製

### 2-2-1 既知遺伝子の *PmeI* 断片上の配座

これまでに *Nitrosomonas* 属のバクテリアにおいて知られている遺伝子が、4つの *PmeI* 断片 (PmA, PmB, PmC, PmD) のいずれに存在するかを調べた。*Nitrosomonas* において知られている遺伝子はデータベースより取得し、この配列をもとにプライマーを作製した。これらのプライマーを用いて ENI-11 株染色体をテンプレートとして PCR によりそれぞれの遺伝子断片を取得した。PCR には Takara *Ex Taq* DNA polymerase (Takara) を使用した。染色体の抽出など、基本的な遺伝子操作法に関しては Sambrook ら (40) の方法に従った。PFGE によって DNA 断片を分離したゲルは、メンブレンへの転写効率を上げるために 0.25N HCl で 15 分間処理した。このゲルを通常のプロットと同じ様に Biodyne™ ナイロンメンブレン (PALL) に転写し、ドライオープンにて 80℃ で 1 時間ベーキングしてメンブレンに DNA を固定した。これに対して PCR により得られた断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。DNA のラベリングと検出には Amersham fluorescein DNA labeling and detection kit (Amersham) を用いた。方法はキット添付のマニュアルに従った。

以下に対象とした遺伝子、ハイブリダイズした *PmeI* 断片、プライマーを示す (Table 2-4)。非常に興味深いことに、アンモニア酸化系の鍵酵素 AMO, HAO をコードする遺伝子である *amo*

と *hao* をプローブとした場合、いずれも PmD 断片(487kb)のみにハイブリダイズし、2コピーの *amo* と3コピーの *hao* がすべてこの領域に集中していることが明らかとなった (Fig. 2-4)。

Table 2-4. ENI-11 株の遺伝子配座 (*PmeI* fragment)

gene	function	locus	primers (forward, reverse)	Database accession number
HHR	highly homologous region of pAYS,L	PmA	5' -TACTGGAAGCTGATCAAACC 5' -GGTTTGTGATAGCGCATCAG	AB018483
<i>dnaK</i>	heat shock protein	PmA	5' -CACCAATCCGGAAAATACCC 5' -CTTCTCAGCCAGTTTATGCG	U15305
<i>cyp</i>	cytochrome P460	PmC	5' -TCAGGAAACAACCTGACAGGC 5' -CTTCGCATTTTCCTTGTGGC	U15305
<i>pyrG</i>	CTP synthase	PmC	5' -GCTGAAATTGACCATACGCC 5' -GAGATAAGCTTGTCAAAGCG	AF061753
<i>eno</i>	enolase	PmC	5' -TAACCCAACCATAGAAGCCG 5' -CCTGTTTTGATCTGCAAGGC	AF061753
<i>rrn</i>	16S ribosomal RNA	PmC	5' -AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG 5' -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	AB079053
<i>amo</i> (x3)	ammonia monooxygenase	PmD	5' -TATGTACTGCAGGCAGAAAGTTGCGCTTG 5' -CGAATTCGACAGGCTAATTGATGCTTCG	AF037107
<i>hao</i> (x3)	hydroxylamine oxidoreductase	PmD	5' - CTCTAGAAATATGGCAAATACGGCACAAGC 5' -CTCTAGATAACGATACGGCGCTGTGTC	U04053

### 2-2-2 ENI-11 株染色体の *PmeI* macro restriction map の作製

ENI-11 の染色体は *PmeI* 消化により4つの断片に分離されることがわかった。そこで、*PmeI* を用いて染色体物理地図の作製を行った。方法は *PmeI* による染色体の部分分解を用いた方法により行った。染色体サンプルプラグを1unitの *PmeI* で、10秒間処理し、0.5M EDTA で反応を止め、CHEF電気泳動でパルスタイム100秒、電圧4V/cmで10時間、400秒3.3V/cmで85時間泳動し分離した(Fig. 2-5A)。

*hao* は PmD 断片にのみ存在するので、*hao* をプローブとして PFGE で分離した *PmeI* 部分消化物に対してサザンハイブリダイゼーションをおこなった。シグナルが得られたバンドのサイズを測定し、*PmeI* 染色体物理地図を作製した (Fig. 2-5B)。PmD 断片の並びは、PmA-PmD-PmC-PmB(-PmA)の順序であった。この結果より、ENI-11 の染色体は環状であることがわかった。

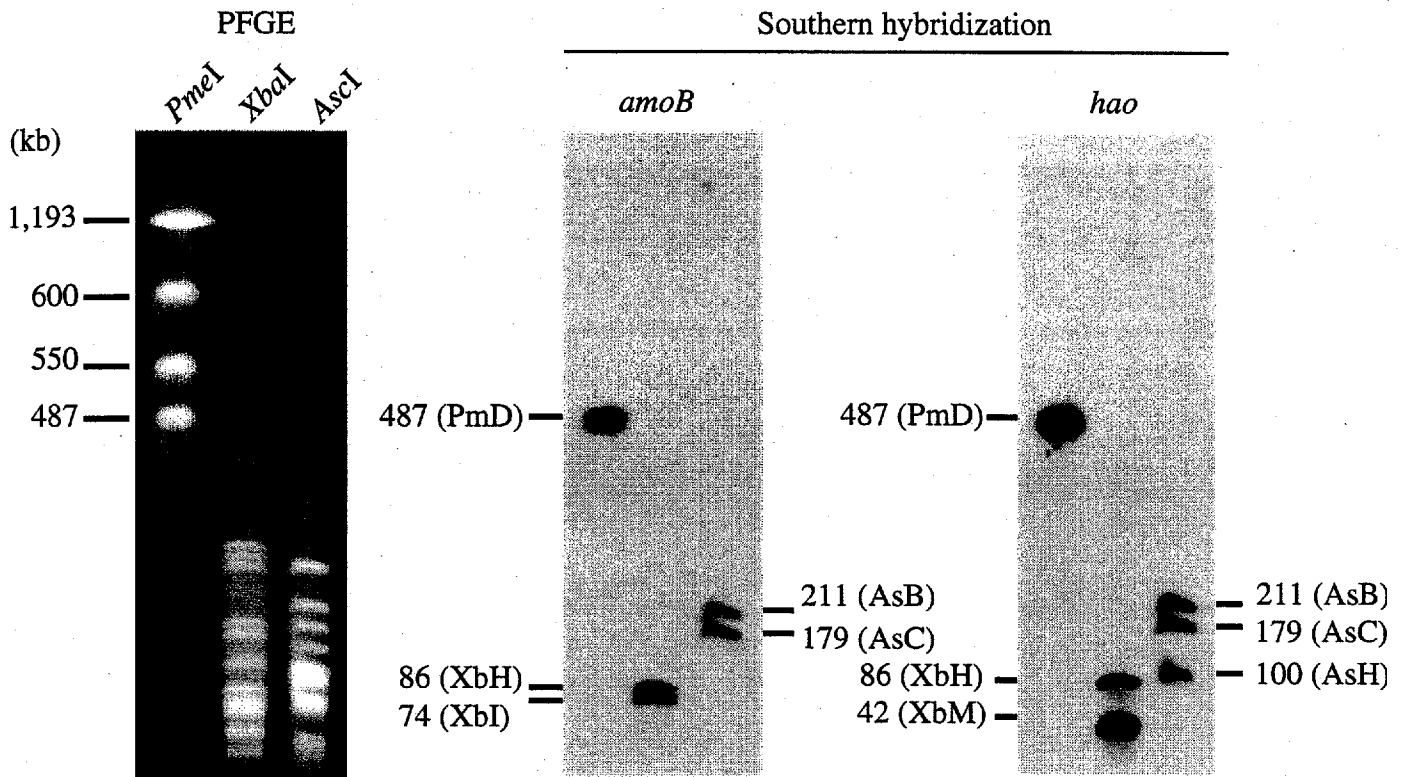


Fig. 2-4 PFGEで分離したDNA断片と*amo*, *hao*の配座

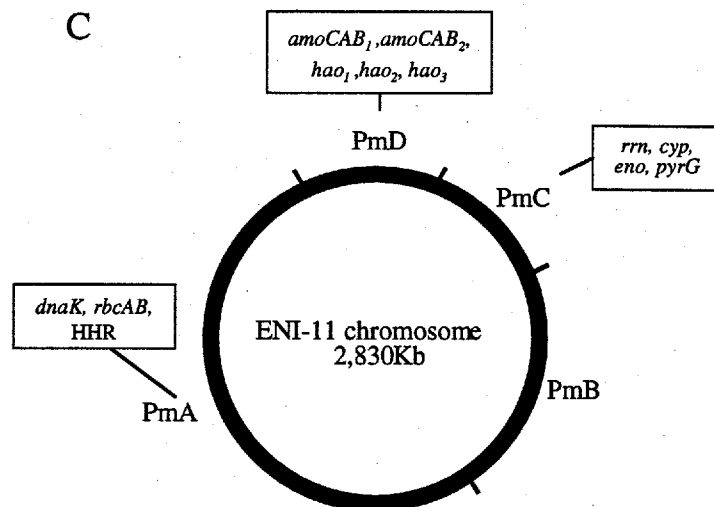
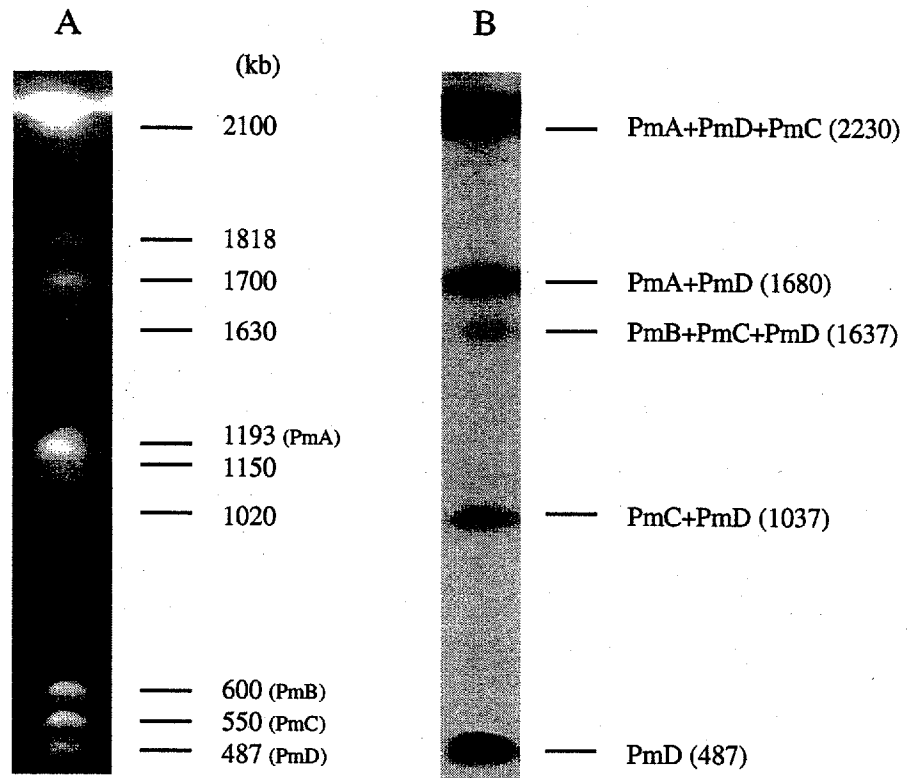


Fig. 2-5 *Nitrosomonas* sp. ENI-11株染色体のPmeI macro restriction mapの作製

(A) ENI-11株染色体のPmeI部分消化断片のPFGE (数値は測定値)

(B) (A)のサザンハイブリダイゼーション(Probe: hao) (数値は理論値)

(C) ENI-11株染色体のPmeI macro restriction map

## 2-3 ammonia monooxygenase 遺伝子 (*amo*)、hydroxylamine oxidoreductase 遺伝子 (*hao*) の染色体上における位置の決定

### 2-3-1 *amo* と *hao* の染色体上における局在性

PFGE によって分離した ENI-11 株染色体 DNA 断片に対して、*amo*、*hao* をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション解析を行った。*amo*、*hao* のプローブには、データベースに登録されている *N. europaea* の *amoB* の配列をもとに作製したプライマー Amo3 (5'-TATGTACTGCAGGCAGAAGTTGCGCTTG) と Amo4 (5'-CGAATTCGACAGGCTAATTGATGCTTCG) を用いて ENI-11 の染色体をテンプレートとして 98°C 5min (1 cycle), 95°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 120sec (x27 cycles) の条件で PCR を行い、得られた 2.3kb の DNA 断片を *Bam*HI-*Sph*I 消化して生じた 0.3kb のフラグメントを *amoB* プローブとして用いた。*hao* のプローブには同様に作製したプライマー Hao1 (5'-CTCTAGAAATATGGCAAATACGGCAC AAGC) と Hao2 (5'-CTCTAGATAACGATACGGCGCTGTGTC) を用いて、98°C 5min (1 cycle), 95°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 3min (x27 cycles) の条件の PCR で得られた 2.2kb の DNA 断片を用いた。

*amoB* プローブは、*Xba*I 消化物に対しては XbH (86kb) , XbI (74kb) フラグメントに、*Asc*I 消化物に対しては AsB (211kb), AsC (179kb) フラグメントにハイブリダイズした (Fig. 2-4)。*hao* プローブは、*Xba*I 消化物では XbH (86kb) , XbM (42kb) フラグメントに、*Asc*I 消化物では AsB (211kb) , AsC (179kb) , AsH (100kb) フラグメントにハイブリダイズした (Fig. 2-4)。このように XbH (86kb) , AsB (211kb) , AsC (179kb) フラグメントには *amo*、*hao* のどちらもハイブリダイズすることから、二つの *amo* と *hao* はそれぞれ近い位置に存在していることが示唆された。

### 2-3-2 PmD 断片の *Asc*I, *Xba*I map の作製

PmD 断片上に全ての *amo* と *hao* が存在していることがわかったので、PmD 領域の *Asc*I, *Xba*I map を作製し、この領域のさらに詳細な解析を行うこととした。PFGE により分離した PmD 断片をゲルから切り出し、TE buffer で3回洗浄後 buffer 置換した。これを *Asc*I, *Xba*I で消化し再び PFGE に供して分離したところ、*Asc*I で6本、*Xba*I で11本のバンドが確認できた (data not shown)。これらサブフラグメントをサイズの大きい順に AsA'-AsF', XbA'-XbK' と名付け

た。また、全ゲノムの *AscI*-*PmeI* の二重消化によって、*amo* と *hao* を1コピーずつ含む *AscI* 断片 *AsB*, *AsC* がシフトし、その大きさからシフトした断片の一方がそれぞれ *AsA'*, *AsC'* サブフラグメントのいずれかであることがわかった。このことから *AsA'*, *AsC'* がそれぞれ *PmD* 断片の両端に位置することと、*AsA'*, *AsC'* に1コピーずつの *amo* と *hao* が存在することが明らかとなった。*PmD* 断片の *AscI* 消化サブフラグメントに対して、*hao* をプローブとしてサザン解析を行うと、確かに *hao* が *AsA'*, *AsC'* にハイブリダイズすることが確認され、さらに残りのひとつの *hao* は *AsB'* サブフラグメントにハイブリダイズし、ここに位置していることがわかった (data not shown)。

### 2-3-3 *AscI* 部分消化による *PmD* 領域の制限酵素地図の作製

次に *AscI* による *PmD* 領域の制限酵素地図の作製を行った。上に述べた方法と同じように PFGE で分離した *PmD* 断片をゲルから切り出し、TE buffer で洗浄後 *AscI* により次の条件で部分消化した。*PmD* 断片プラグを入れた 1.0ml の反応液に 20U の酵素を加え 37°C でインキュベーションし、0min, 90min, 150min, 720min 後に 0.5M EDTA (pH 8.0) 50 $\mu$ l を加え反応を停止させた。これを PFGE により 5sec - 15hr, 30sec - 25hr (Pulse time- Run time), 6V/cm の条件で泳動した (Fig. 2-6)。このゲルを前述の方法でメンブレンにトランスファーした。

*PmD* 断片の端に位置する *AsA'* サブフラグメントを *XbaI* で消化すると、*PmD* 断片 *XbaI* サブフラグメント *XbB'*, *XbF'*, *XbK'* と、約 15kb のフラグメントが確認された。そこで *amo* あるいは *hao* を含まない *XbK'* 断片をプローブとして、先のメンブレンにハイブリダイズさせた。そして得られたシグナルのサイズを測定し、完全消化によって生じたフラグメントサイズと照らし合わせ、各断片の隣接関係を決定した (Fig. 2-6)。この結果サブフラグメントの並びは *AsC'* (98kb) - *AsE'* (76kb) - *AsF'* (15kb) - *AsD'* (65kb) - *AsB'* (100kb) - *AsA'* (142kb) であることがわかった。

### 2-3-4 *XbaI* 部分消化による *PmD* 領域の制限酵素地図の作製

*XbaI* による *PmD* 領域の制限酵素地図作製を *AscI* と同様に部分消化を用いて行った。PFGE で分離した *PmD* 断片の *XbaI* 部分消化断片に対し、*XbK'* をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、シグナルが得られたバンドのサイズを測定し、隣接関係を決定した (data not

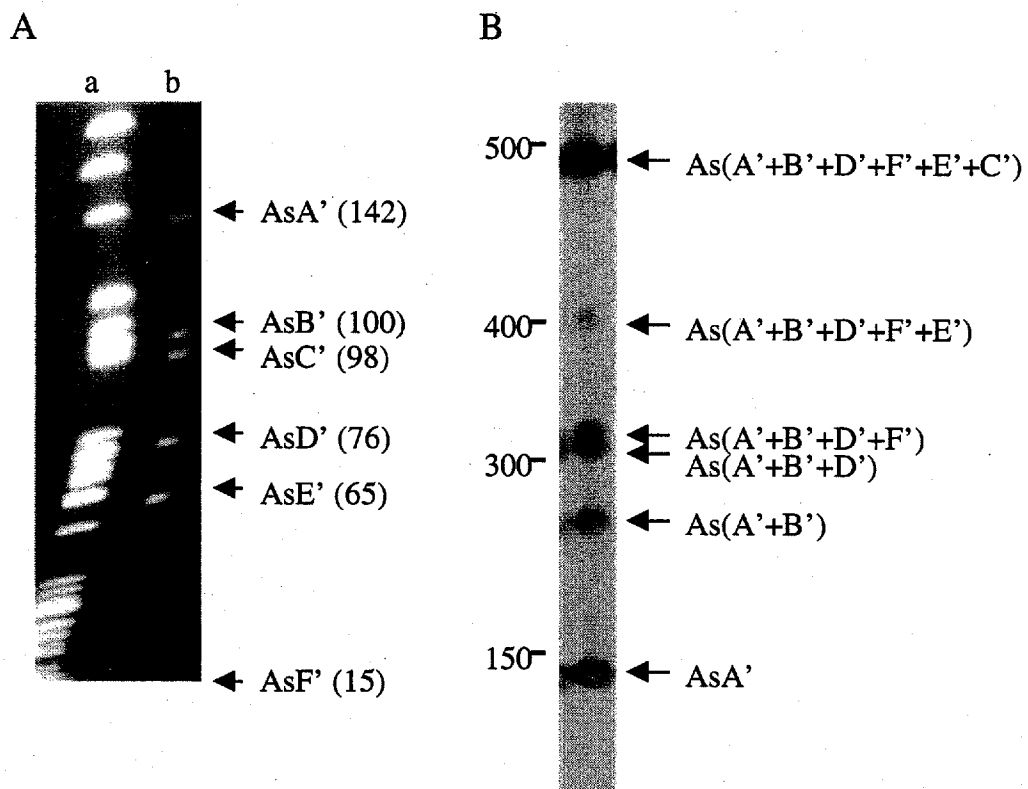


Fig. 2-6 PmD断片のAsclI部分消化による解析

(A)PFGE. a : ENI-11染色体AsclI消化、 b : PmD断片AsclI消化  
 (B)染色体のAsclI部分消化断片に対するAH57断片のSouthern hybridization

shown)。

### 2-3-5 近接した2つの *amo* と *hao* 間の相対的な距離の決定

サザンハイブリダイゼーションによる解析から2組の *amo* と *hao* は、かなり近い距離に位置していることが予想された。そこで *amo*, *hao* 内にプライマーを設計し、Long PCR によって両遺伝子間領域を取得することを試みた。*hao* 遺伝子内に転写方向と反対向きの Hao6 プライマー (5'- CGGCAAATTCTCTTAAGTGACAGGTTCCGC)、*hao* 下流に存在するシトクロム系のタンパクをコードする遺伝子 *cyt* 内に転写方向と順方向に Hao7 プライマー (5'- AGGATCGAT TGGTACTCTGTTGACAGGAGC)、同様に *amoA* 遺伝子内に逆方向に Amo5 (5'- CCGAA TGCGGTAACATCATTGCGATGTACG)、*amoB* 内に順方向に Amo6 (5'- GGTCATTTTCAGG TCCTCTGCAAATTGGCC)を作製した(Fig. 2-7A)。これらプライマーの4通りの組み合わせにより、ENI-11 染色体をテンプレートとして PCR を行った。反応は 98°C 5min (1 cycle), 98°C 30sec, 68°C 5min (x30 cycles), 72°C 15min (1 cycle), 98°C 5min - (30min gradient) - 50°C (1 cycle)で行った。耐熱性 DNA polymerase は Takara Z-Taq™ (Takara)を使用した。サーマルサイクラーは GeneAmp9600 (AP biotech)を用いた。

反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離したところ、Amo6 と Hao6 のプライマーの組み合わせで 23kb、Amo5 と Hao7 の組み合わせで 15kb の増幅産物が確認できた(Fig. 2-7B)。つまりそれぞれのプライマー間の距離が 23kb、15kb であることがわかった。この 23kb の増幅断片を AH66、15kb の断片を AH57 と名付けた。AH66, AH57 の内部領域をプローブとしてサザン解析を行い、AH66 は AsC'に、AH57 は AsA' にハイブリダイズしたことから、AH57 と AH66 の両端に位置する *amo* と *hao* は全て別のコピーであることが確認された(data not shown)。

### 2-3-6 *amo*, *hao* のマッピング

PmD 領域の *AscI*, *XbaI* マップとサザンハイブリダイゼーション、Long PCR による解析から、*amo* と *hao* の大まかな位置関係と *amo*, *hao* 間の物理的距離がわかった。しかしこれらの正確な位置関係と Long PCR で得られなかった残りひとつの *hao* の位置は不明である。そこで次にこれらの正確な位置を決定することとした。



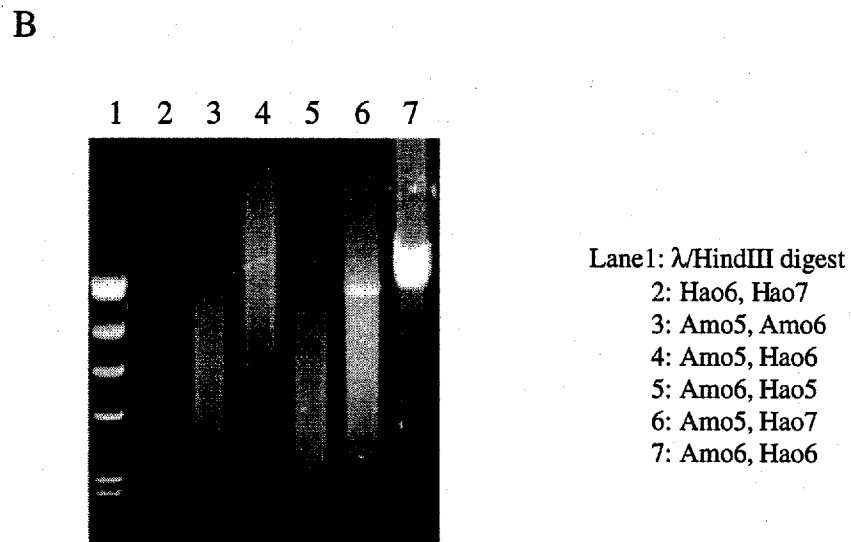
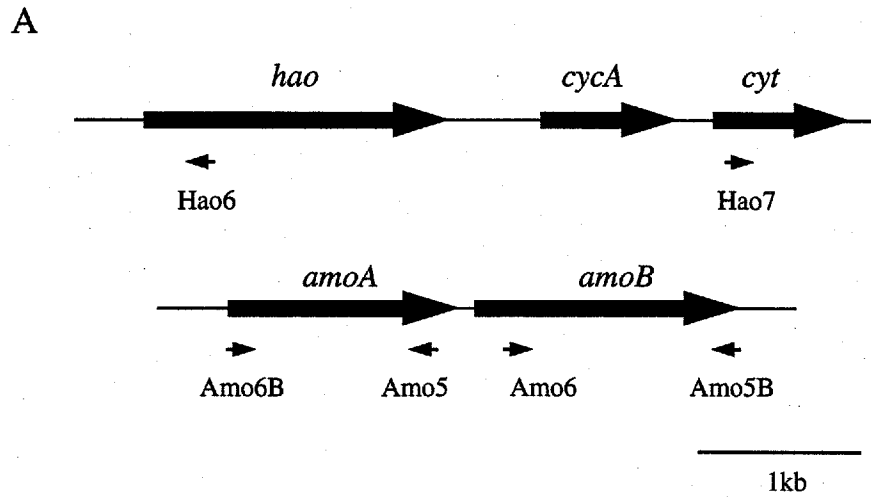


Fig. 2-7 Long PCRによる*amo-hao*間距離の解析  
 (A)Long PCRに用いたプライマーの位置  
 (B)PCR産物のアガロースゲル電気泳動とプライマーの組み合わせ

## a. マッピングのストラテジー

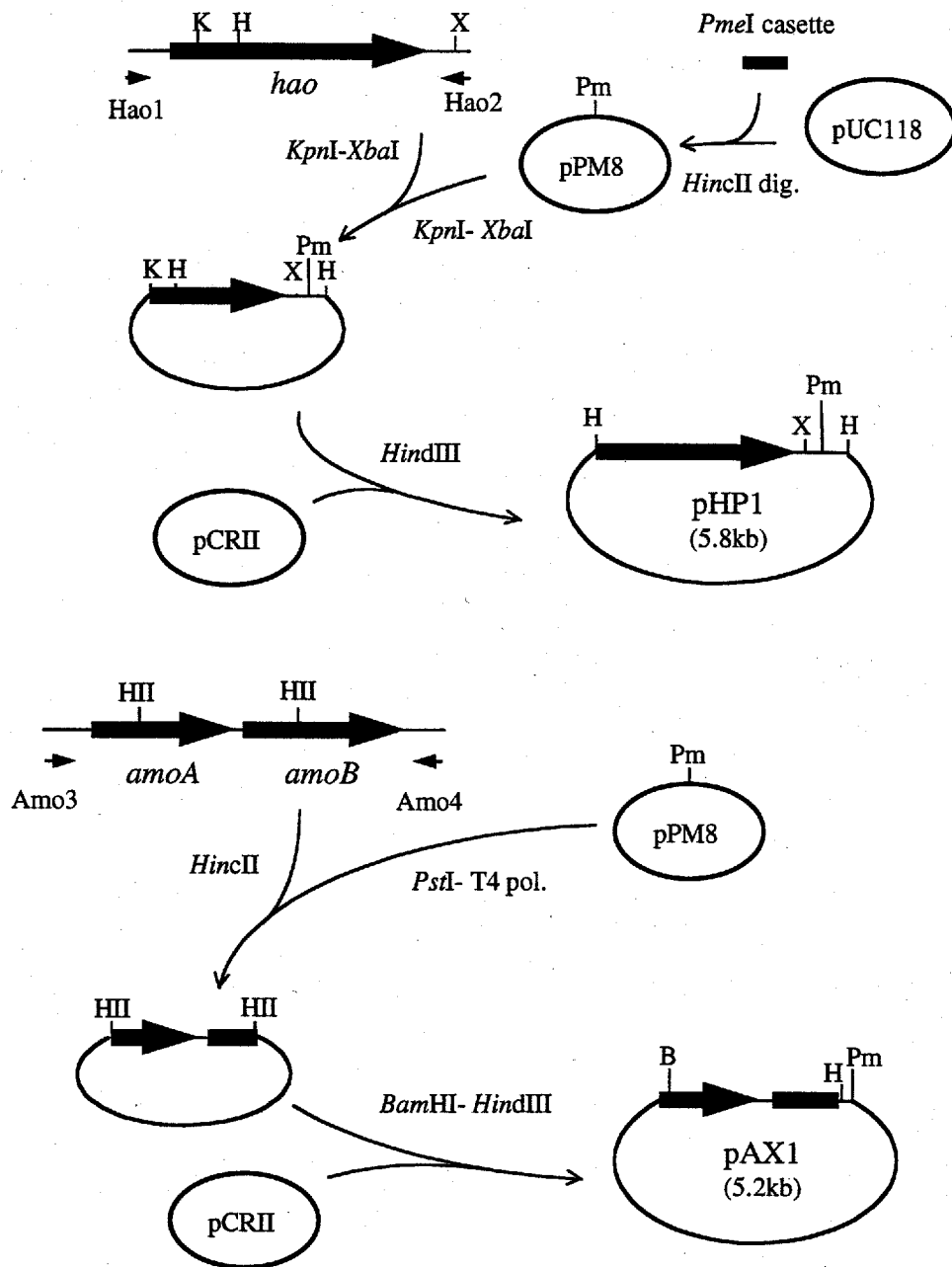
Hommes らは *Nitrosomonas europaea* においてカナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドとエレクトロポレーションを利用して、相同組換えを起こすことに成功した (18)。そこで組換えを利用して ENI-11 の *hao* (又は *amo*) に *PmeI* サイトを導入することができれば、組換え株の染色体を *PmeI* で切断して電気泳動で分離することで *hao* の *PmeI* サイトからの距離がわかり、*PmeI* サイトの距離で *hao* 間の距離を決定することができると考えられる。

## b. 組換え用プラスミドの作製

まず最初に pUC118 の *HincII* サイトに *EcoRI-PmeI-NotI* polylinker (5'-GAATTCGAC AATTCGTTTAAACTCGCGGCCGC-3')を挿入したプラスミド pPM8 を作製した。次いで *Hao1* と *Hao2* プライマーによって増幅した 2.2kb の DNA 断片を *XbaI-KpnI* 切断した 1.8kb のフラグメントを pPM8 にクローニングした。このプラスミドを *HindIII* 消化し、生じた 1.8kb 断片を *HindIII* 消化した pCRII(Invitrogen)にライゲーションした。このプラスミドを pHP1 とした (Fig. 2-7)。このプラスミドとは別に *amo* をターゲットとした組換え用プラスミドも次の様にして作製した。*Amo3* と *Amo4* プライマーを用いた PCR によって得られた 2.3kb の DNA 断片を *HincII* 消化し、生じた約 1.0kb の断片を pPM8 の *PstI* サイトに挿入した。このプラスミドを *HindIII-BamHI* 消化し、生じたフラグメントを *HindIII-BamHI* 消化した pCRII にライゲーションした。これを pAX1 とした (Fig. 2-8)。

## c. エレクトロポレーションによるプラスミドの導入

対数増殖期中期の ENI-11 菌体を冷却遠心機で集菌し、あらかじめ冷やしておいた滅菌水で洗浄し、再び冷却遠心機で集菌する操作を 3 回繰り返した。菌体を OD<sub>600</sub> 値で約 5.0 になるように再び滅菌水で懸濁し氷上にて保存した。この菌体懸濁液 400 μl に組換え用プラスミド約 5 μg を入れ十分に混和させて 2mm gap のキューベット (BTX) に注入し再び氷上にて保冷した。Gene Pulse (BTX) を用いて 2.4kV, 50 μF, 720 Ω の条件でパルスした後、すぐに新しい MA 培地 100ml に移して、28℃で 24 時間振とうした。その後カナマイシンを終濃度 10 μg/ml になるように添加して、さらに 24 時間振とう培養した。この培養液を 15,000rpm, 10min, 4℃遠心して集菌したものを希釈系列を作って、カナマイシンを 10 μg/ml を含む MA 固形培地にスプレッド



B: BamHI, K: KpnI, HII: HincII, H: HindIII, Pm: PmeI, X: XbaI

Fig. 2-8 組換えプラスミドpHP1とpAX1の作製

した。これを 28℃で 2 週間ほど培養しカナマイシン耐性のコロニーを取得した。

#### d. 組換え株の解析

pHP1 又は pAX1 を形質転換して得られた組換え株の PFGE 用サンプルプラグを前述の方法により作製した。これを *PmeI* で消化し PFGE で分離した(Fig. 2-9A)。この結果 pHP1 の形質転換株では PmD 断片を 441kb と 52kb に分割する位置に *PmeI* サイトが導入された組換え株 (NHP1) と、339kb と 154kb に分割する位置に *PmeI* サイトが導入された株 (NHP2) の 2 種類の組換え株が得られたことが確認できた(Fig. 2-9A)。これらの組換え株は作製したプラスミドの構造からシングルクロスオーバーによる *hao* 遺伝子への組み込みが起こったと考えられた。そこで組換え株の *PmeI* 消化物に対して pCRII の一部をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うことで *hao* の向きを決定した(Fig. 2-9B,C)。また *AscI*、*XbaI* でも同様に酵素処理・電気泳動を行い、変異が起こった *hao* を確認した(data not shown)。これらの結果より、2つの *hao* の位置が明らかとなった。ひとつは PmD 断片の AsA'側の *PmeI* サイトから 52kb の位置に新たな *PmeI* サイトが挿入されており、組み込まれたベクターの断片長 (2 kb) を減じて AsA'側の *PmeI* サイトから 50kb の位置にマッピングされた。このコピーは AsA'サブフラグメント (AsC 断片) に存在することから、この *hao* は AH57 の *hao* と同一であり、このことから下流 15kb に *amo* がマッピングされた。

もうひとつの *hao* は AsB'サブフラグメント (AsH 断片) に存在し、AsA'側の *PmeI* サイトから 152kb の位置にマッピングされた (Fig. 2-9C)。残りひとつの *hao* に組換えが起こった株は取得することができなかったため、pAX1 を用いて *amo* に *PmeI* サイトを導入した組換え株の解析を行った。取得した組換え株 (NAP1) は PmD 断片を 39kb と 453kb に分割する位置に *PmeI* サイトが導入されていたことがわかった(Fig. 2-9A)。この *amo* の向きは *hao* 組換え株と同様にサザンハイブリダイゼーションによって行った。そして挿入されたベクターの長さ(5kb) を減じて、AsC'側の *PmeI* から 34kb の位置にマッピングされた。また *AscI*、*XbaI* でも同様に酵素処理・電気泳動を行ったところ、この *amo* は AsC'サブフラグメント (AsB 断片)、XbG'サブフラグメント (XbH 断片) に存在するコピーであることが明らかになったため、AH66 の *amo* と同一であることがわかった。そしてこの *amo* の下流 23kb に残りひとつの *hao* がマッピングされた。

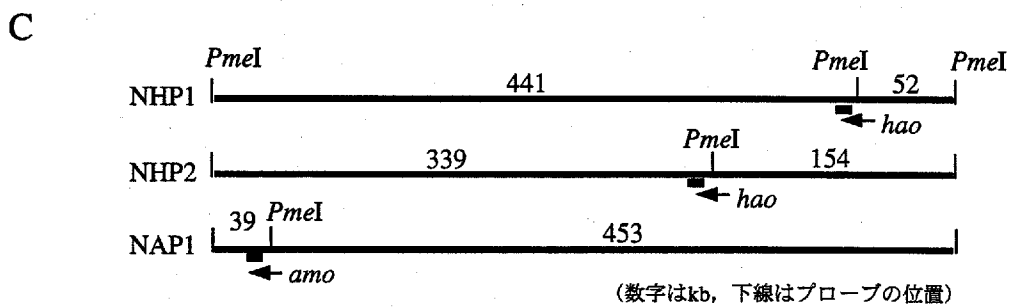
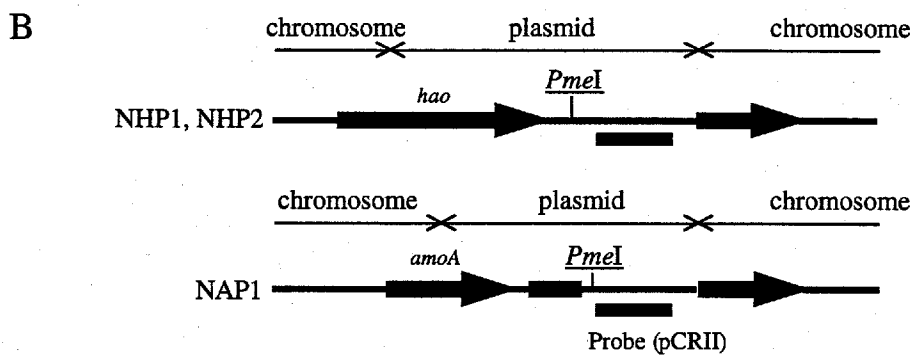
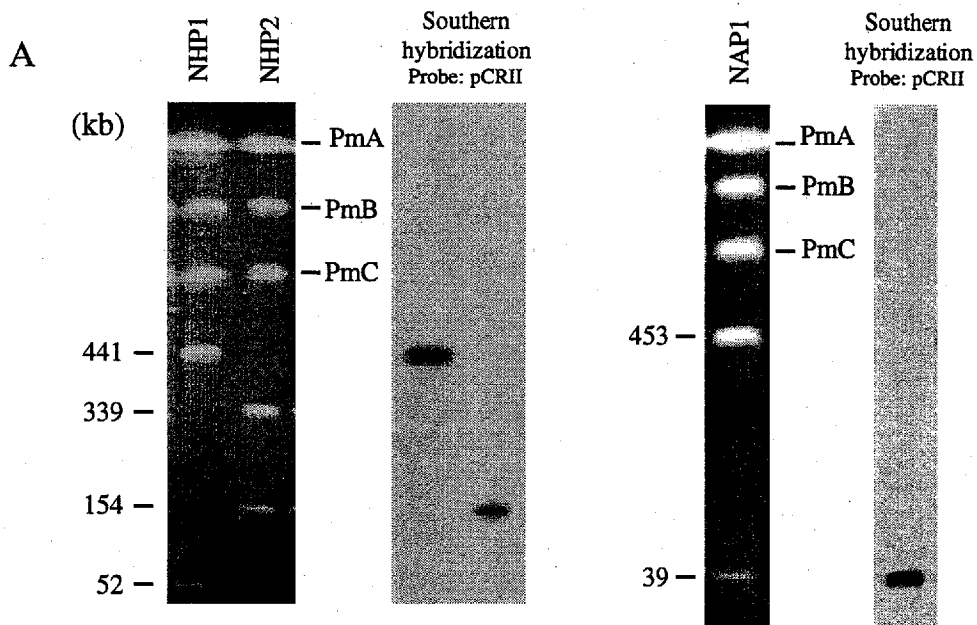


Fig. 2-9 pHP1, pAX1組換え株の解析

(A)NHP1, NHP2, NAP1染色体の *PmeI*消化断片のPFGE

(b)組換えが起こった部分の模式図とプローブの位置

(C)組換え株に付加された新たな *PmeI*サイトの位置と遺伝子の向き

以上のように、すべての *amo* と *hao* のマッピングが完了したため、それぞれのコピーを *amo*<sub>1</sub>, *amo*<sub>2</sub>, *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub> と名付けて区別することとした。*amo*<sub>1</sub> と *hao*<sub>1</sub> は 23kb、*amo*<sub>2</sub> と *hao*<sub>2</sub> は 15kb という近い距離に位置していたが、残りひとつの *hao*<sub>3</sub> はどちらの *amo* から少なくとも 87kb 以上離れていることが明らかとなった。さらに *cyt* 遺伝子が存在しない *hao* クラスターは *hao*<sub>1</sub> クラスターであることが判明した。また全ての *amo* と *hao* は転写の方向が同一であった (Fig. 2-10)。

#### 2-4 *amo*-*hao* 近接領域 (AH66, AH57) の解析

*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の染色体約 2.8Mb の 487kb 中 (PmD 領域) に、全ての *amo* と *hao* が集中して存在していた。さらに 2 コピーの *amo* と *hao* は近接して存在していることが明らかとなった。この様にアンモニア酸化系の鍵酵素の遺伝子が染色体の一部に集中しているならば、他のアンモニア酸化系に関与する遺伝子もこれらの近傍に存在しクラスターを形成している可能性がある。そこで Long PCR によって取得した AH66, AH57 (2-2-2 参照) の全塩基配列を決定して、これらの領域の解析を行った。

##### 2-4-1 AH66, AH57 の全 DNA 塩基配列の決定

PCR により増幅した AH66 DNA 断片 23kb、AH57 断片 15kb の制限酵素地図を作製し、制限酵素で適当なサイズに断片化させたフラグメントをサブクローニングした。次にこれらの DNA 塩基配列の決定を行った。サンプルの調製には Thermo sequenase kit (APbiotech.)、DNA シークエンシングは ALFred DNA sequencer (Pharmacia) を用いた。DNA の解析には DNASIS ver. 2.0 (HITACHI software engineering) を、相同性の検索には WEB 上での FASTA(37) または BLAST(2) プログラムを用いた。

##### 2-4-2 AH66 (23kb) の解析

AH66 は *amo*CAB<sub>1</sub> 下流から *hao*<sub>1</sub> 上流部分にかけての 23kb の領域である。この領域には、ribosomal protein や RNA polymerase 遺伝子などハウスキーピング系の遺伝子が多く見られた (Fig. 2-11)。しかし、*amo*CAB<sub>1</sub> 下流に既知の遺伝子とは相同性の見られない、いくつかの open reading frame (ORF) が存在した。このなかの約 2.1kb の ORF は、多数の重金属輸送系

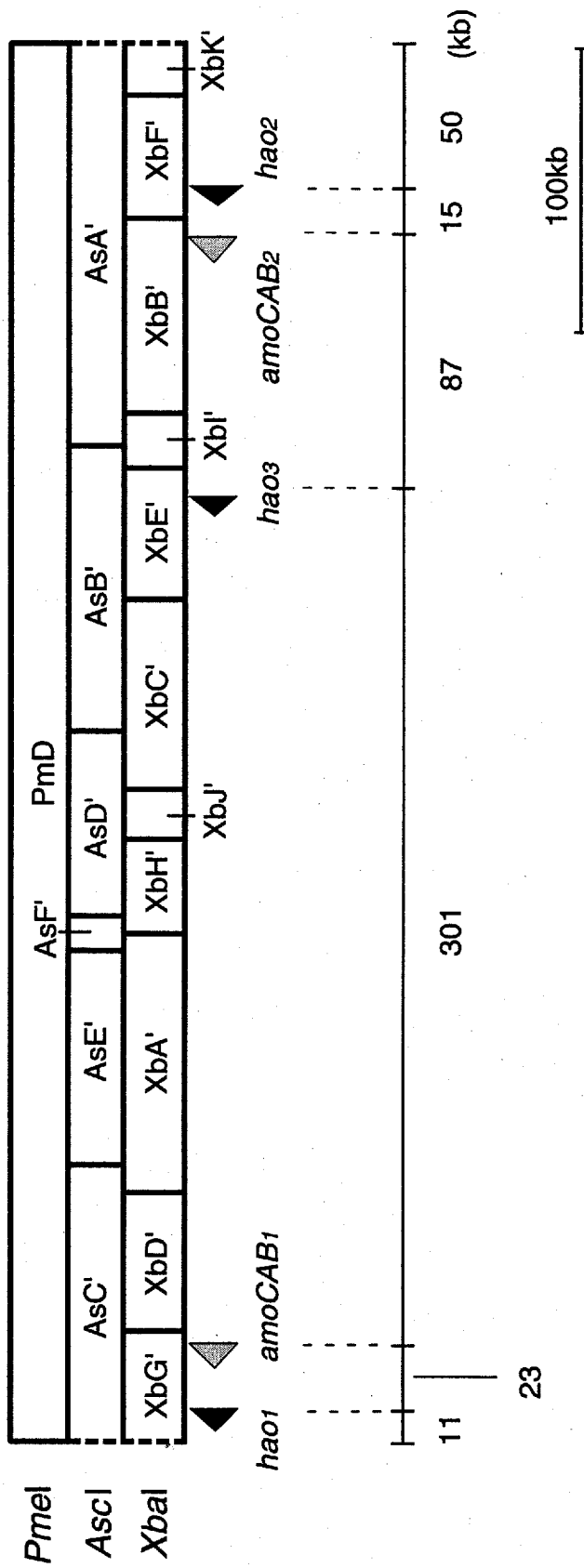
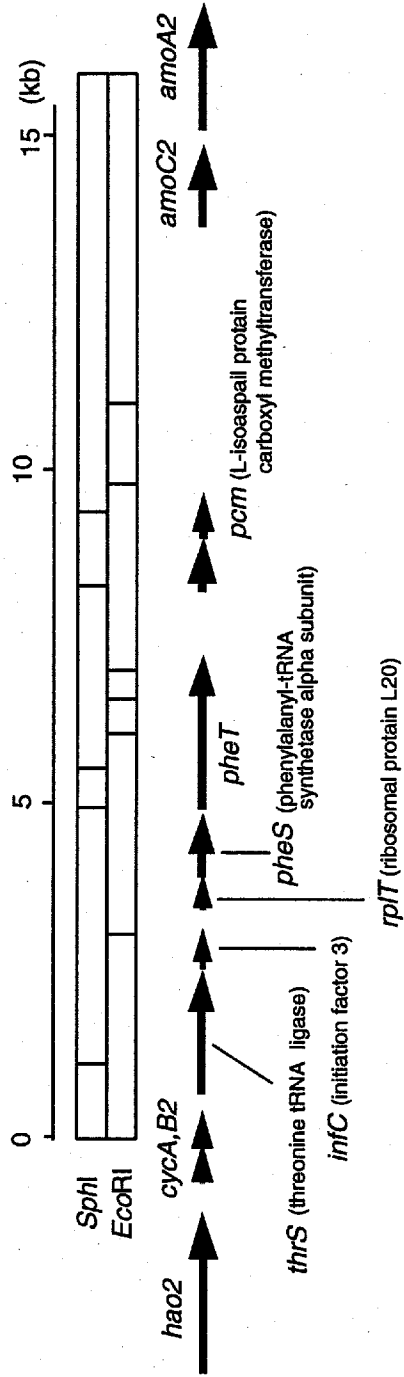


Fig. 2-10 ENI-11株染色体PmD領域の物理地図

### AH57



### AH66

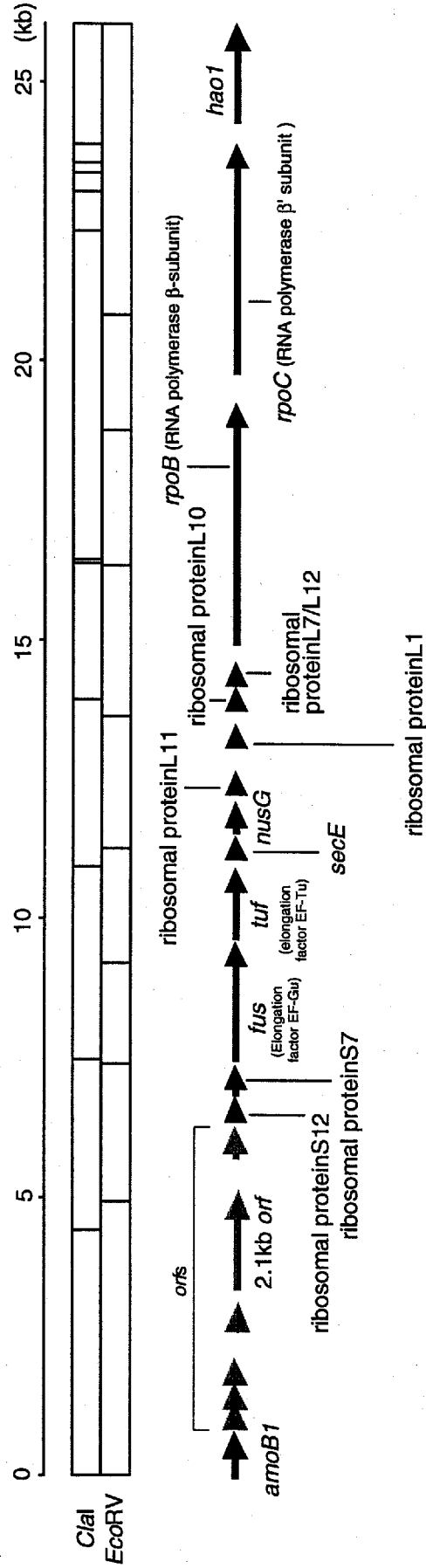


Fig. 2-11 AH57, AH66の制限酵素地図と存在する遺伝子



のたんぱく質との相同性が見られた。この ORF の予想されるアミノ酸配列の疎水プロットは、数回膜を貫通する輸送系のたんぱく質であることを示唆した。AMO は銅タンパク質であり、銅(II)イオンの添加によって活性化されることから (8)、この ORF は *amo* の機能と何らかの関係があるのかもしれない。サザンハイブリダイゼーションの解析では、この ORF はシングルコピーであった(data not shown)。

#### 2-4-3 AH57 (15kb)の解析

AH57 は *hao*<sub>2</sub> クラスター *cyt* 遺伝子下流から *amoCAB*<sub>2</sub> 上流にかけての 15kb の領域である。この領域も ribosomal protein, t-RNA synthetase などのハウスキーピング系の遺伝子がほとんどであり、ほかに特徴的な遺伝子は存在しなかった(Fig. 2-11)。

### 第3節 考察

*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株は廃水処理施設より単離されたアンモニア酸化細菌である。16S rRNA による分類では代表的なアンモニア酸化細菌 *N. europaea* と非常に近縁であるが、増殖速度は ENI-11 株の方が速く菌体収量も多い。また、*N. europaea* は運動性を示すが、ENI-11 株は運動性を持たないなど、若干異なった特性を持つ。

ENI-11 株はアンモニア酸化系の鍵酵素 AMO と HAO をコードする *amo* と *hao* を染色体上にそれぞれ 2 コピーと 3 コピー保持していることがわかっていて、*Nitrosomonas* 属の細菌では同じく *amo* が 2 コピー *hao* が 3 コピー存在しているものがほとんどであるが、*Nitrospira* 属のバクテリアでは *amo* も 3 コピー存在することが知られている (43)。若干の違いはあるにせよアンモニア酸化細菌は一般的に多重コピーのアンモニア酸化系の遺伝子を持つ。しかしながら、これまで *Nitrosomonas* の染色体レベルでの解析は行われておらず、知られていた *amo*, *hao* の DNA 塩基配列が他のコピーとどのように異なっているかということとは不明であった。そこで ENI-11 株においてゲノムマップの作製を行い、これらの遺伝子の染色体上における構成を明らかにした。

ENI-11 株の染色体は環状でサイズは約 2.8Mb であった。これはバクテリアの中ではやや小さい部類に入る。アメリカエネルギー省(DOE)のゲノムプロジェクトによれば *N. europaea*

の染色体のサイズは 2.3Mb であるといわれ (5)、近縁であると考えられている ENI-11 株よりもかなり小さい。また、IFO14298 株もゲノムサイズはおよそ 2 Mb であると見積もられた(data not shown)。このように近縁の種でありながらも、ゲノムのサイズに違いが見られるということは、一見奇妙なことのようにも思われるが、バクテリアにおいてはしばしば見られ、特にらん藻のゲノムでこのような現象がよく見られる様である (33)。このゲノムサイズの差が何を意味するのかは現在のところ不明であるが、ENI-11 株には存在して *N. europaea* には存在しない遺伝子があるのかもしれない。そしてこのことが増殖における差をはじめ、両菌株の性質の違いをもたらす原因と何らかの関係があるのかもしれない。

ENI-11 株染色体は制限酵素 *PmeI* によって 4 本に切断され、興味深いことにこのうち最小の 487kb の断片 (PmD) に全ての *amo* と *hao* が集中していた。この領域の詳細な解析を行い *amo*, *hao* がマッピングされた。このことによりそれぞれのコピーの物理的な位置関係を明らかにすることができ、区別することが可能となった(Fig. 2-10)。また、*amo*<sub>1</sub> と *hao*<sub>1</sub> は 23kb、*amo*<sub>2</sub> と *hao*<sub>2</sub> は 15kb の比較的近い距離にペアを組んで存在していた。遺伝子の重複が生じる機構としては、染色体の複製時に起こる相同性組換えやトランスポゾンあるいはファージによる非相対的な組み込みが知られている(33)。いずれもその機構から考えて、重複遺伝子の前後に挿入配列 (IS) や反復配列などが見られる場合が多い。また、他のアンモニア酸化系に関与する遺伝子が近隣に存在する可能性も考えられたため、この *amo-hao* 近接領域の全塩基配列の決定を行った。AH57 の *amo* 下流にはいくつかの ORF が見いだされたがその機能は不明であった。これらを除くとハウスキーピングに関する遺伝子が存在しているだけで、特徴的な遺伝子や DNA 塩基配列は見いだされなかった。現在のところ、この *amo* と *hao* の局在性に何らかの意味があるかどうかは不明である。この他にアンモニア酸化系に関与すると考えられる遺伝子は見いだされなかった。また、遺伝子重複が起こった痕跡と考えられる DNA 配列も見あたらなかった。これらについては、今回解析を行った近接領域の内部だけではなく、その外部に存在するという可能性もあると思われる。現在、アメリカの D. J. Arp 博士らのグループで *Nitrosomonas europaea* のゲノムプロジェクトが進行しており、これによって染色体の全塩基配列が明らかにされれば新たな見解が得られるかもしれない。

### 第三章

## *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株のヒドロキシルアミン オキシドレダクターゼ遺伝子の機能解析

## 序

アンモニア酸化細菌のアンモニア酸化系において中心的な役割を果たす ammonia monooxygenase と hydroxylamine oxidoreductase をコードする遺伝子 *amo*, *hao* は、染色体上に複数コピー存在する。*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株には *amoCAB* が 2 コピー、*hao* が 3 コピー存在する。しかしながら、なぜこの様に複数コピー必要であるかという理由や、これら複数コピー存在する遺伝子それぞれの機能や調節機構は不明である。*amo*、*hao* それぞれのコピーの機能が明らかにされていない理由のひとつは、これらの遺伝子のコピー間での区別ができておらず、全てのコピーがクローニングされていない事にある。サザンハイブリダイゼーションによる解析では、ひとつのコピーの DNA 配列をプローブとすると *amo*, *hao* のどちらにおいても同程度の強度のシグナルが検出され、一次構造におけるコピー間の類似性が示唆される。しかし機能面での解析を行うためにはコピー間での相違点を明確にする必要がある。また遺伝子の機能を調べる一般的な方法として、その遺伝子を欠失あるいは挿入によって不活性化させる遺伝子破壊実験があり、これらを遂行するためにサブクローニングという段階は欠くことができない。

本章では第 1 章でのマッピングにより区別した全ての *amo*、*hao* 遺伝子をクローニングし、構造面での相違点を明らかにした。続いて *hao* 遺伝子について遺伝子破壊実験を行い、それぞれの *hao* 遺伝子の機能を調べた。

TABLE 3-1. Bacterial strains and plasmids used in chapter 3

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i> MV1184	<i>ara</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> ( $\Phi$ 80 <i>LacZ</i> $\Delta$ M15) $\Delta$ ( <i>srl</i> <i>recA</i> )306::Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) F[ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacIq lacZ</i> $\Delta$ M15]	(53)
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20 (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) recA13 ara-14 proA2</i> <i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(10)
<i>N. europaea</i> IFO14298	Type strain, plasmidless	IFO <sup>a</sup>
<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11	Strain isolated from activated sludge	(58)
H1	ENI-11 derivative, <i>hao</i> <sub>1</sub> ::Kan <sup>r</sup>	This study
H2	ENI-11 derivative, <i>hao</i> <sub>2</sub> ::Kan <sup>r</sup>	This study
H3	ENI-11 derivative, <i>hao</i> <sub>3</sub> ::Kan <sup>r</sup>	
H13	ENI-11 derivative, <i>hao</i> <sub>1</sub> ::Kan <sup>r</sup> , <i>hao</i> <sub>3</sub> ::Ap <sup>r</sup>	This study
Plasmids		
pHSG396	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	Takara
pCRII	Cloning vector; Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pSTV29	Cloning vector; Cm <sup>r</sup>	Takara
pUC118	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(53)
pUC119	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(53)
pUC4K	pUC4 containing 1.3-kb Kan <sup>r</sup> cassette; Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Pharmacia
pAP29	pSTV29 containing 1.3-kb Ap <sup>r</sup> cassette; Cm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	This study
pHAO3K	pHSG396 containing <i>hao</i> <sub>3</sub> inserted 1.3-kb Kan <sup>r</sup> cassette	This study
pHAO3A	pHSG396 containing <i>hao</i> <sub>3</sub> inserted 1.3-kb Ap <sup>r</sup> cassette	This study

<sup>a</sup> IFO, Institute for Fermentation Osaka.

## 第1節 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の *amo*、*hao* 全コピーのクローニングと比較

### 1-1 ENI-11 株の *amo* 遺伝子のクローニング

第1章で取得した Long PCR 断片 AH57 (23kb) と AH66 (15kb) にはそれぞれ異なるコピーの *amo* と *hao* が両端に存在していた(Fig. 2-11, →P.35)。しかしながら、PCR に用いたプライマーが open reading frame の途中であったために、完全な ORF は含まれていなかった。そこで AH66 の場合は Amo6B と Hao6 を、AH57 の場合は Amo5B と Hao7 に変更し(Fig. 2-7, P.28)、染色体をテンプレートとして Long PCR を行った。そしてそれぞれの *amoAB* コピーを個別に取得することができた。PCR の条件は第2章 2-2-2 と同様に行った。これらそれぞれの *amo* をクローニングし、塩基配列を比較した結果、*amoAB* に関しては *amoCAB*<sub>1</sub> と *amoCAB*<sub>2</sub> の DNA 塩基配列は完全に一致していた (data not shown)。

### 1-2 ENI-11 株の *hao* 遺伝子のクローニング

#### 1-2-1 *hao* 遺伝子上流の取得

3コピーの *hao* はそれぞれの上流の異なる領域をターゲットとしたプライマーを作製して、PCR によって取得することを試みた。それぞれの *hao* 上流は、inverse PCR を用いて以下のようにして行った。ENI-11 染色体を *Pst*I で消化し、*hao* の *Bam*HI-*Hind*III 消化物 0.3kb をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うと、9.1, 4.0, 2.6kb のシグナルが検出された。つまり *hao* 上流の *Pst*I サイトはそれぞれ異なった位置に存在する(Fig. 3-1B,C)。そこで再び染色体を *Pst*I で完全消化しオーバーナイトでセルフライゲーションした。これを鋳型として、プライマーに HAO4 inv. (5'-GGTCGACAAAACAACCTGCGCTCGATGG) HAO5 inv. (5'-GGTCGACTTCCAGGCTCTTACCCATACC)を用いて(Fig. 3-1A)PCR を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約 9kb、4 kb、2.5kb の増幅 DNA 断片が取得できた。これらを pSTV29 (Takara)にサブクローニングして、シーケンシングを行った。

3コピーの *hao* は開始コドンより上流 15bp が全てのコピーで一致しており、ここに SD 配列と考えられる配列が見いだされた。このうち2つのコピーに関してはさらに上流 145bp が

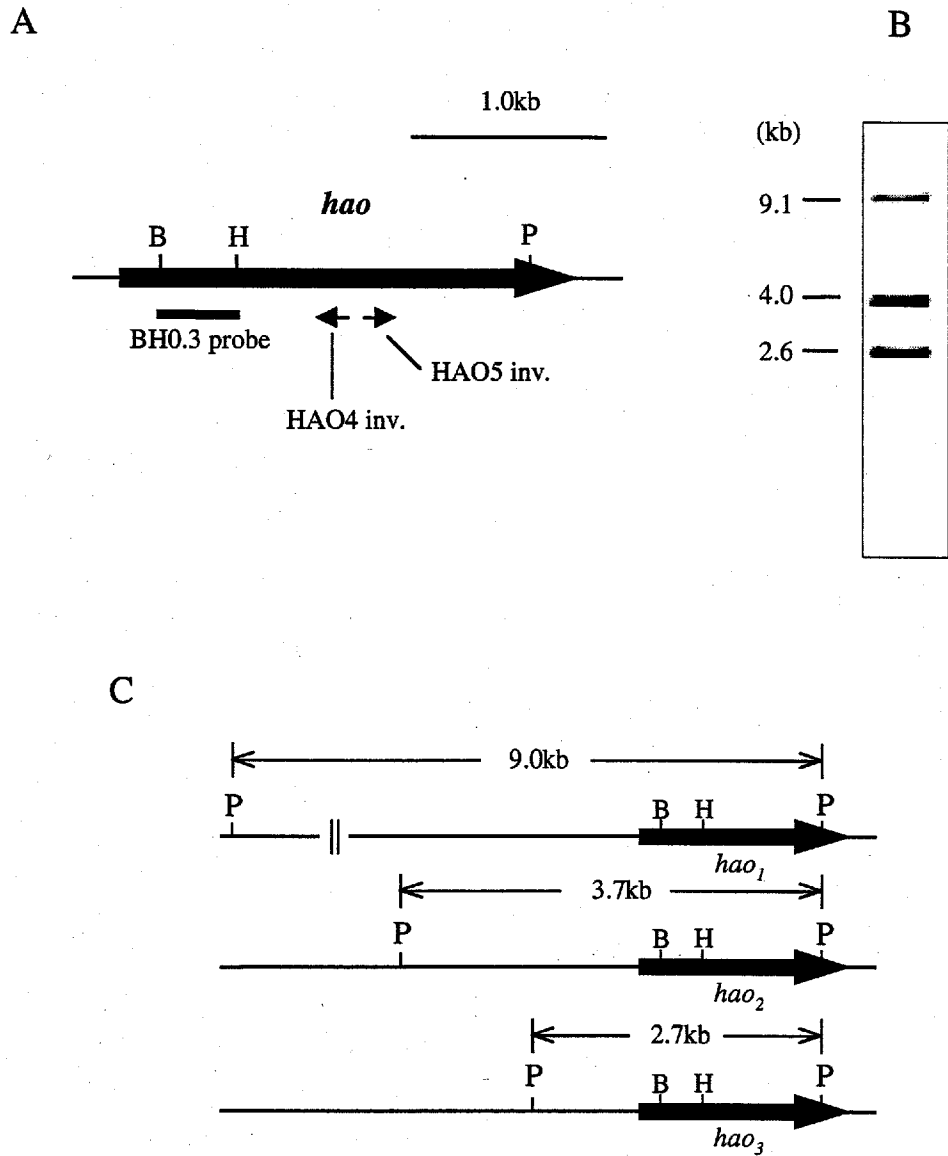


Fig. 3-1 *hao*上流配列の取得

(A) BH0.3プローブとHAO4 inv., HAO5 inv. Primerの位置

(B) ENI-11染色体 *Pst*I消化物に対するBH0.3プローブのサザンハイブリダイゼーション

(C) *hao*上流の構造

hao1	TGATTTACGTTGTTGAAAAGAAATGTGATTTGGGTAGATTAATACCGGCAGGAACCGGGCTGTCTTTTCACAATATCC	-290
hao2	CAAAGCGCAACGGATGAATCTACTCCCGCGACATACCAACAACACACGTGATTTATTCACTCATCGACCGAAAAAAA	-290
hao3	GAAATGAAAGTAAAAATCGCGGTTTCGAAATATTTGATGAGCAGCATATAAATTTTAAACGGAGAACTAGAGAAATATGGC	-290
	<b>ORF → M A</b>	
hao1	GGAAAAACAGAGATTATCGGAGAGCGCTGCTTACCTGGGTACTGATTTAAACGGAGAAATGAAGTGACGGAAATGATGGAAT	-210
hao2	CATATCTGGTAATTTTACCTTGTCTCAGGCATAACACTAATCATCTGATGCTGAAATTTGCTGCTTTTGTCCGGTGATTT	-210
hao3	AAATACGGCACAAAGCTAAAAAGCGGTAAAGACAAACCGCCACACGGCGTGAGCGGAACTTTGGATTGCGATCCCAAGCTGC	-210
	N T A Q A K R V R Q T A T R E R N F G L R S K L R	
hao1	AGTTTCTGAACGGATTTCATTTGGGGGGCGGTGATTTGGTTTCCAGCATTTGTTAAAAATCTTGAATTTAGCCCTGCTGAGGAAG	-130
hao2	CGGCTGATCATTAATAAGACCGGTAAAAGTTTGTCTTTATACGTAATTTTAAAAATCTTGAATTTAGCCCTGCTGAGGAAG	-130
hao3	GTACCGCGATTTAAAGGIGTCCGAAAAGCAGTAGCGGGGTGACAAAGAAATGTAGCAGAAAGTCGTTTCAGAAAAGCGGTG	-130
	T A I K G V R K A V A A G D K N V A E V V F R K A V	
hao1	<b>TAGTCTTGAGAAGATGAGTAGTAAGTGAATTAGGAGTAGATAAAGCTGGTTACCTGAGAGGGATCGGGTAAACCGGTTATTG</b>	-50
hao2	<b>TAGTCTTGAGAAGATGAGTAGTAAGTGAATTAGGAGTAGATAAAGCTGGTTACCTGAGAGGGATCGGGTAAACCGGTTATTG</b>	-50
hao3	AGTGTATCGACTCAATCGCAAGCAAAGGGATAATTACAAAAATAAGGCATCGAGGCATAAAAAGCCGTCCTTTCCCGGTGC	-50
	S V I D S I A S K G I I H K N K A S R H K S R L S G A	
hao1	<b>TTTTGTATCTGGTAAAGCCGACGAACAGGTAGATTACGGAGGAGAGAGATGAGAATAGGGAGTGGATGAGGGGTTTAT</b>	+31
hao2	<b>TTTTGTATCTGGTAAAGCCGACGAACAGGTAGATTACGGAGGAGAGAGATGAGAATAGGGAGTGGATGAGGGGTTTAT</b>	+31
hao3	AGTTAAAGCAATGGGTTGATTTGATCTGTACCCCGCATAATTTACGGAGGAGAGAGATGAGAATAGGGAGTGGATGAGGGGTTTAT	+31
	V K A M G * M R I G E W M R G L	
	<b>hao →</b>	

Fig. 3-2 hao上流配列の比較

太字は共通配列を示す。下線はhao1sp, hao2sp, hao3spプライマーを、下二重線はSD配列を示す。



完全に保存されていた(Fig. 3-2)。この領域に open reading frame (ORF)は見いだされなかった。そのさらに上流は相同性のほとんど見られない、それぞれ特異的な配列であった。また、それぞれ配列の異なっている *hao* 上流断片をプローブとして、PFGE により分離した *AscI* 断片に対してサザン解析を行うことで、どの *hao* の上流域であるかを決定した(data not shown)。その結果上流 145bp に共通配列を有していたのは *hao*<sub>1</sub>、*hao*<sub>2</sub> であり、共通配列を持たない *hao* コピーはゲノム上でも単独で離れて存在していた *hao*<sub>3</sub> であった。

### 1-2-2 *hao* 遺伝子の比較

配列が異なっている *hao* 上流領域に新たにプライマー *hao*1sp, *hao*2sp, *hao*3sp を設計し(Fig. 3-2)、PCR によってそれぞれの *hao* の ORF を含む DNA 断片を取得した。PCR によって取得したそれぞれのコピーの *hao* をサブクローニングし、シーケンシングを行った。これらの DNA 塩基配列を比較したところ3つのコピーの *hao* は、互いに 1713bp のうちわずかに1塩基または2塩基が異なるのみであった(Fig. 3-3)。*hao*<sub>2</sub> と比較して *hao*<sub>1</sub> の DNA 塩基配列は、T 521 C (V174A)、*hao*<sub>3</sub> は T290 C (V97A)、G445 A (E149K)と異なっていた(カッコ内はアミノ酸)。しかし、全体的に見て *hao* の一次構造はほとんど同じであり、機能面においてもそれほど大きな違いはないと思われる。*hao*<sub>1</sub>、*hao*<sub>2</sub>、*hao*<sub>3</sub> の DNA 塩基配列は DDBJ, EMBL, NCBI のデータベースに登録した。それぞれの Accession ナンバーは AB030385, AB030386, AB030387 である。

## 第2節 ENI-11 株のヒドロキシルアミノオキシドレダクターゼ遺伝子の破壊実験

### 2-1 *hao* 遺伝子破壊株の作製

#### 2-1-1 組換え用プラスミドの構築

*hao* の遺伝子破壊は、相同組換えによるカナマイシン耐性遺伝子の導入によって行った(18)。組換えのためのプラスミドは以下の様にして作製した。まずプライマー *Hao*1 と *Hao*2 を用いて *hao*<sub>3</sub> を増幅した。プライマーに設計した *Xba*I サイトを利用して pHSG396 の *Xba*I サイトに PCR 産物をクローニングした。これを pHAO3 とした。また、pUC4K を *Pst*I サイトで切断し、

██████████ : Heme binding motif

```

hao1 MRIGEMRGLLLCAGLMMCGVHADISTVPDETYDALKLDKDRGKATPKETYEALVKRYKDPAHGAGKGTMGDY 72
hao2 MRIGEMRGLLLCAGLMMCGVHADISTVPDETYDALKLDKDRGKATPKETYEALVKRYKDPAHGAGKGTMGDY 72
hao3 MRIGEMRGLLLCAGLMMCGVHADISTVPDETYDALKLDKDRGKATPKETYEALVKRYKDPAHGAGKGTMGDY 72

hao1 WEPIAISIMDPNTFYKPPVSPKEVAERKDCVCHSDETPVWVRAWKRSTHANLDKIRNLKSDDDPLYKKKGK 144
hao2 WEPIAISIMDPNTFYKPPVSPKEVAERKDCVCHSDETPVWVRAWKRSTHANLDKIRNLKSDDDPLYKKKGK 144
hao3 WEPIAISIMDPNTFYKPPVSPKEAAERKDCVCHSDETPVWVRAWKRSTHANLDKIRNLKSDDDPLYKKKGK 144

hao1 LEEVENNLRSMGKLGKETLKEVGCIDCHADVNKKDKADHTKDIRMPTADTCCGTCCHLREFAFERESERD(TM)VW 216
hao2 LEEVENNLRSMGKLGKETLKEVGCIDCHVDVNKKDKADHTKDIRMPTADTCCGTCCHLREFAFERESERD(TM)VW 216
hao3 LEEVKNNLRSMGKLGKETLKEVGCIDCHVDVNKKDKADHTKDIRMPTADTCCGTCCHLREFAFERESERD(TM)VW 216

hao1 PNGQWPAGRPSHALDYTANIEITVWAAMPQREVAEGCTMCHTNONKCDNCHTRHEFSAAESRKPEACATCHS 288
hao2 PNGQWPAGRPSHALDYTANIEITVWAAMPQREVAEGCTMCHTNONKCDNCHTRHEFSAAESRKPEACATCHS 288
hao3 PNGQWPAGRPSHALDYTANIEITVWAAMPQREVAEGCTMCHTNONKCDNCHTRHEFSAAESRKPEACATCHS 288

hao1 GVDHNNWEAYTMSKHGKLAEMNRDKWNWEVRLKDAFSKGGQNAPTCAACHMEYEGEYTHNITRKTTRWANYPF 360
hao2 GVDHNNWEAYTMSKHGKLAEMNRDKWNWEVRLKDAFSKGGQNAPTCAACHMEYEGEYTHNITRKTTRWANYPF 360
hao3 GVDHNNWEAYTMSKHGKLAEMNRDKWNWEVRLKDAFSKGGQNAPTCAACHMEYEGEYTHNITRKTTRWANYPF 360

hao1 VPGIAENITSDWSEARLDSWVLTCTOCHSERFARSYLDLMDKGTLEGLAKYOENAVIHKMYEDGTLTGQKT 432
hao2 VPGIAENITSDWSEARLDSWVLTCTOCHSERFARSYLDLMDKGTLEGLAKYOENAVIHKMYEDGTLTGQKT 432
hao3 VPGIAENITSDWSEARLDSWVLTCTOCHSERFARSYLDLMDKGTLEGLAKYOENAVIHKMYEDGTLTGQKT 432

hao1 NRPNPEPEKPGFGIFTQLFWSKGNPNPASLELKVLEMAENNLAKMHVGLAHVNPGGWTYTEGWGPMNRAYVE 504
hao2 NRPNPEPEKPGFGIFTQLFWSKGNPNPASLELKVLEMAENNLAKMHVGLAHVNPGGWTYTEGWGPMNRAYVE 504
hao3 NRPNPEPEKPGFGIFTQLFWSKGNPNPASLELKVLEMAENNLAKMHVGLAHVNPGGWTYTEGWGPMNRAYVE 504

hao1 IQDEYTKMQEELSALQARVNKLEGGKQTSLLDLKGTGEKISLGGGGMLLAGALALIGWRKRKQTRA* 570
hao2 IQDEYTKMQEELSALQARVNKLEGGKQTSLLDLKGTGEKISLGGGGMLLAGALALIGWRKRKQTRA* 570
hao3 IQDEYTKMQEELSALQARVNKLEGGKQTSLLDLKGTGEKISLGGGGMLLAGALALIGWRKRKQTRA* 570

```

Fig. 3-3 Alignment of amino acid sequences for HAO deduced from DNA sequences of each copy of *hao*

Arrow heads indicate substitutions of amino acid. Shaded rectangles indicate heme-binding motifs (C-X-X-C-H).

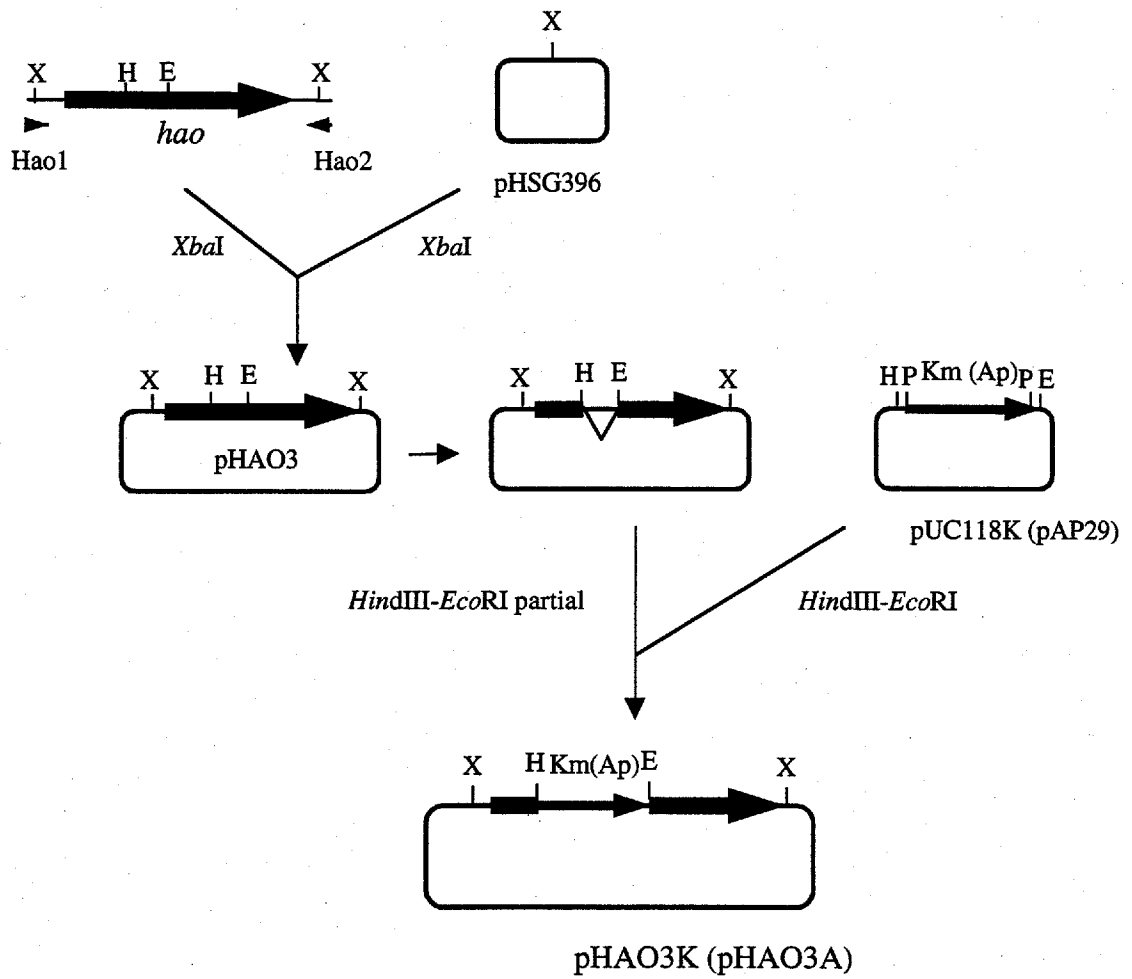


Fig. 3-4 *hao*組換え用プラスミドの作成

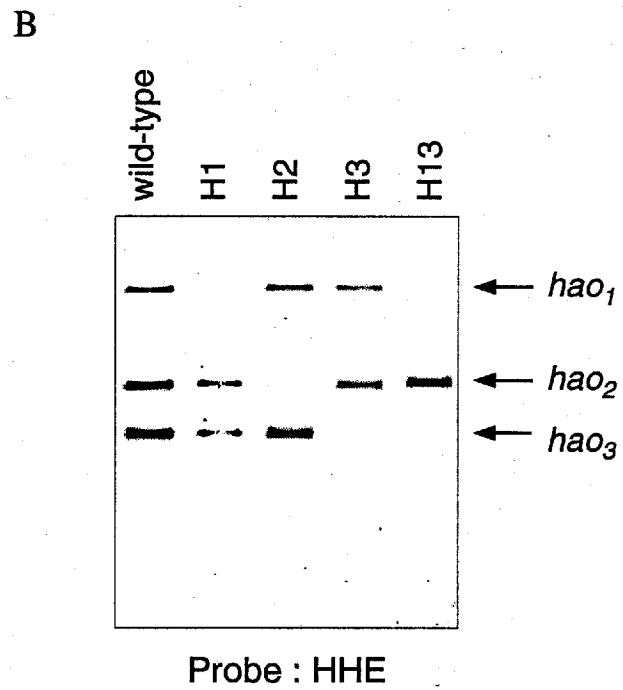
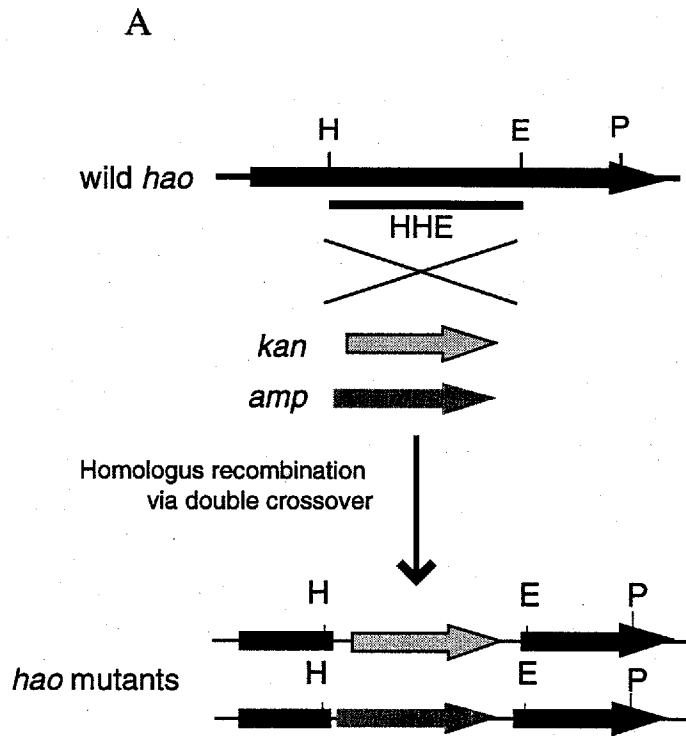


Fig. 3-5 *hao*破壊株の作製

(A) double cross overによる組換えの模式図

(B) *hao*破壊株染色体のサザン解析

カナマイシン耐性遺伝子カセットを取り出し、これを pUC118 の *Pst*I サイトに連結した pUC118K を構築した。pHAO3 を *Hind*III、*Eco*RI で部分消化し、*hao*<sub>3</sub> 内部の *Hind*III-*Eco*RI 0.3kb 部分を切除し、さらに pUC118K より *Hind*III と *Eco*RI で取り出した *Hind*III-*Eco*RI カナマイシンカセット断片を、pHAO3 の切除箇所に連結した。以上の操作により *hao*<sub>3</sub> の内部にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド pHAO3K を構築した(Fig. 3-4)。また、これとは別にアンピシリン耐性遺伝子をマーカー遺伝子とした組換えプラスミドも以下のように作製した。pBluescript KS(+)を鋳型としてプライマー AP1 と AP2 を用いて PCR を行い、アンピシリン耐性遺伝子を増幅した。この PCR 産物を pSTV29 の *Hinc*II サイトにクローニングし、これを pAP29 とした。pHAO3 を *Hind*III、*Eco*RI で部分消化し、*hao*<sub>3</sub> 遺伝子内部の *Hind*III-*Eco*RI 0.3kb 部分を切除し、さらに pAP29 より *Hind*III と *Eco*RI で取り出した *Hind*III-*Eco*RI アンピシリン耐性遺伝子を、pHAO3 の切除箇所に連結した。以上の操作によって *hao*<sub>3</sub> の内部にアンピシリン耐性遺伝子が置換されたプラスミド pHAO3A を構築した(Fig. 3-4)。

#### 2-1-2 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の形質転換

pHAO3K と pHAO3A による ENI-11 株の形質転換は、第 2 章 2-2-4 c と同様の方法で行った。

#### 2-1-3 形質転換株の解析

ENI-11 株に pHAO3K を形質転換し MA 培地プレートにスプレッドした後、2 週間ほどでカナマイシン耐性株が得られた。これらの耐性株が目的の *hao* 遺伝子変異株であるかを確認した。まず耐性株の染色体を取得しカナマイシンカセットをプローブとしたサザン解析により、*hao* 遺伝子にカナマイシンカセットが挿入されていることを確認した (data not shown)。次に変異が起こった *hao* を以下の方法によって確認した。破壊株の染色体を *Pst*I で切断後、電気泳動を行った。3 コピーの *hao* は遺伝子内の同じ位置に *Pst*I サイトを持つが、上流に存在する *Pst*I サイトの位置はそれぞれ異なる (Fig. 3-1C)。そこで組換えの際に欠失させた *hao* 遺伝子内部の *Hind*III-*Eco*RI 0.3kb 部分をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うことで、組換えが起こった *hao* 遺伝子を決定できると考えた。この方法により各 *hao* 遺伝子の変異株を区別できた(Fig. 3-5)。これらの結果より、2 回組み替えを起こした変異株が 3 種類取得できた

ことが確認できた。この様にそれぞれの hao を破壊した変異株を取得することができたことから、どのコピーの hao も増殖に必須ではないということが明らかとなった。これらの変異株を、変異した hao 遺伝子に対応してそれぞれ H1、H2、H3 と名付けた。

## 2-2 hao の機能解析

### 2-2-1 hao 遺伝子変異株の増殖比較

それぞれの hao コピーの機能を調べるために、hao 破壊株 H1、H2、H3 と野生株の培養を行い増殖における表現型の違いを調べた。培養は 2 L 卓上型ジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニアリング）に 1.0 l の MA 培地を入れ、27°C、350rpm、通気は 1.0 Air SL/min で培養した。サンプリングは経時的に行い、菌体濃度（OD<sub>600</sub> 値）・亜硝酸濃度の測定を行った。

培養実験の結果、全ての hao 破壊株は野生株と比べて低い増殖率を示した。その増殖率は、3 つの変異株でほとんど同じであった (Fig. 3-6)。つまり最大の増殖速度を得るためには 3 つの hao が必要であるということと、どの hao も機能しているということが明らかとなった。また、どの hao を破壊しても増殖速度の減少量は大きく変わらないことから、それぞれの hao の発現量も同じ位のレベルであることが予想された。

### 2-2-2 破壊株の HAO 活性測定

次に破壊株の HAO 活性を測定し比較した。HAO 活性の測定は次のような方法で行った。採取した培養液を 0.2 μm の MIXED CELLULOSE ESTER フィルター (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) を用いて吸引濾過器によって集菌した。20mM のリン酸緩衝液 (pH7.8) で菌体を 3 回洗浄した後、OD<sub>600</sub> で約 0.05 になるように懸濁した。この懸濁液 100 μl と 2g/l の塩酸ヒドロキシルアミンを 100 μl、さらにリン酸緩衝液で全量を 500 μl とし、30°C で 10 分間静置して生成した亜硝酸量を測定した。亜硝酸の測定は比色測定法 (第二章 1-2) により行った。HAO 活性は単位時間にヒドロキシルアミンから生成する亜硝酸の量を菌体濃度で割ったものを 1 unit として定義した。

菌体あたりの HAO 活性は、対数増殖期に入るにつれて上昇した。そして静止期にはいと低下した。このパターンは野生株、変異株ともに同じであった。HAO 活性が最大となる対数増殖期後期において HAO 活性を比較すると、破壊株の HAO 活性は野生株よりも低下していた

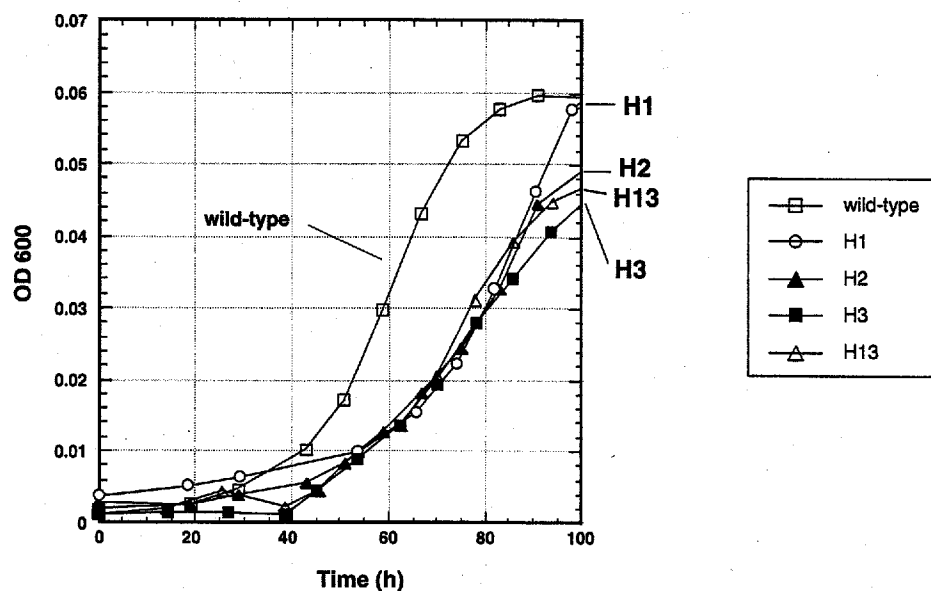


Fig. 3-6 Growth of the wild-type ENI-11 and mutant strains

Table 3-2 Growth rates and HAO activities in the wild-type ENI-11 and mutant strains

Strain	HAO specific activity (nmol/ml/min/OD600) (%)		Growth rate (1/day)
wild -type	191 ± 12	(100)	1.61 ± 0.067
H1	170 ± 32	(89)	1.11 ± 0.24
H2	110 ± 13	(65)	1.20 ± 0.091
H3	146 ± 11	(76)	1.13 ± 0.062
H13	70.7 ± 9.2	(37)	1.11 ± 0.13

(Table 3-2)。破壊株同士の活性を比較すると  $hao_1$  の破壊株である H1 と  $hao_3$  の破壊株である H3 の活性は大きく違わなかったが、 $hao_2$  の破壊株である H2 の活性はいずれよりも 40 ユニット以上低い値を示した。従って、 $hao_2$  による HAO 活性全体への影響がもっとも大きいということがこの事から考えられる。

### 2-2-3 hao 遺伝子の 2 重破壊株の構築

単独の hao 遺伝子の機能をさらに詳しく解析するために、3つの hao 遺伝子の 2つが破壊された 2重変異株の取得を試みた。pHAO3K のカナマイシン耐性遺伝子をアンピシリン耐性遺伝子に置換した pHAO3A を H1, H2, H3 に形質転換した。これをカナマイシンとアンピシリンを加えた MA 固形培地で選択したところ、約 2 週後 H1 に形質転換したものだけにコロニーが形成された。この耐性株を前述の方法 (2-3) により解析したところ、取得した変異株は  $hao_1$  遺伝子と  $hao_3$  遺伝子の 2重変異株であることが確認できた。この株を H13 と名付けた。つまり、ENI-11 株は  $hao_2$  のみでの生育が可能であることが明らかとなった。他の hao 二重破壊株は取得することができなかった。

H13 株の増殖速度を調べたところ、野性株のそれよりは劣るものの他の破壊株と同程度であった (Fig. 3-6)。しかしながら、対数増殖期後期の HAO 活性は他の破壊株よりも大幅に減少しており、野性株の 40%程度であった (Table 3-2)。

## 第 3 節 考察

本章ではマルチコピー存在する *amo*、*hao* 遺伝子の機能を調べるために、それぞれのコピーのクローニングをまず行った。2つの *amo* と 3つの *hao* をそれぞれ区別してクローニングし、その上流部分を含む塩基配列を決定し、第 2 章で作製した染色体物理地図上の  $amo_{1,2}$  と  $hao_{1,2,3}$  に一致させた。コピー間での DNA 塩基配列を比較すると、 $amo_{1,2}$  は完全に同一であり *hao* も互いにわずか 1 塩基か 2 塩基が異なるのみであった。これらはアミノ酸を変化させる非同義置換であったが、HAO の活性中心部位であるとされる 8 つの Heme binding motif (C-X-X-C-H) (41) 内には存在せず、また  $hao_1$  (174Val→Ala),  $hao_3$  (97Val→Ala) の置換は両アミノ酸の



性質が類似しているため、HAO の機能に関してさほど大きな変化はないのではないかと考えられる。ただ、*hao*<sub>3</sub> (E149K) のアミノ酸置換はグルタミン酸からリシンへの変換であり、電化が逆に変化することから部分的に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。しかしいずれにせよ全体的に見て HAO の一次構造は極めて高く保存されており、このアミノ酸置換が HAO の立体構造に大きく影響を及ぼすような点変異でない限り、機能的に大きな差は生じないと考えられる。

*N. europaea* においては *hao* の相違は 3 つのコピーでわずかに 1bp のみであり (20)、機能面に差が生じる可能性はさらに低いと考えられる。

各コピーの *hao* 遺伝子の機能を調べるために、それぞれのコピーを破壊した株の作製を試みた結果 *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub> それぞれのコピーを破壊した株を取得することができた。これらの破壊株の表現型を調べることで、それぞれのコピーの機能が明らかになることが期待された。HAO 活性を調べてみると、全ての破壊株の HAO 活性は野性株よりも低く、このことから全ての *hao* が機能しているという事がわかった。破壊株の中では *hao*<sub>2</sub> 破壊株の活性がもっとも低くなっており、このことから *hao*<sub>2</sub> の発現量がもっとも多いと考えられる。しかし、他の *hao* 破壊株とほとんど増殖速度は変わらず、さらに *hao*<sub>1</sub> と *hao*<sub>3</sub> の二重破壊株においては HAO 活性が著しく低下したにもかかわらず、増殖速度はすべての破壊株と同程度であった (Fig. 3-6)。つまりひとつ以上の *hao* 破壊株において *hao* のコピー数 (あるいは HAO 活性) と菌体の増殖速度との直接的な関係は成り立たなかったといえる。

アンモニア酸化系は複合的な酵素の作用によって成り立っており、AMO によるアンモニアの酸化は HAO によるヒドロキシルアミンの酸化によって生じた電子を利用して行われる。HAO にとって基質となるヒドロキシルアミンは、AMO によるアンモニアの酸化によって供給される (Fig. 1-2, →p.5)。つまりアンモニア酸化活性は AMO、HAO の活性のみに左右されるのではなく、これらを含む酵素群の協調的な作用によって活性が変化すると予想される。このように考えると、おそらくこれらの破壊株においても *hao* の破壊によって HAO 活性には変化が生じているが、全体的なアンモニア酸化活性 (エネルギー供給量) は AMO や他の酵素によって規定されているために破壊株の増殖速度に差が生じなかったのではないかと考えられる。

Hommes らは *N. europaea* において同様に *hao* の破壊株を作製したが、その変異株は増殖速度・最終到達菌体濃度ともに野性株と差が生じず、さらに AMO 活性と HAO 活性にも影響はなかったとして、これは失われた *hao* コピーによる HAO タンパクの合成を他のコピーが補った

結果であると論じている (18)。これは増殖・HAO 活性ともに野性株と破壊株の差が見られた本実験の結果と矛盾するところである。彼らの論文では実験方法が詳細に記載されていなかったため、比較することはできないが、本実験においても坂口フラスコを用いた系で培養を行い変化を調べると、野性株と変異株の増殖速度の差はほとんど生じなかった(data not shown)。しかし、ジャーファーマンターを用いた場合では明らかな違いを示した(Fig. 3-6)。これは、培養系を一定に保つという点において違いが生じたためではないかと考えている。また、*N. europaea* と ENI-11 株は近縁ではあるものの、増殖速度やゲノムのサイズなどを始め、いくつかの異なる特性をもつ。これらの相違点と同じように hao 破壊株の性質が *N. europaea* と ENI-11 株では異なっていたのかもしれない。しかし、エネルギー代謝の中核であるアンモニア酸化系のシステムが、近縁の株同士で異なっているという事は考えにくいから、実験操作の違いによって生じた相違点である可能性が高いと思われる。

*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub> のいずれを破壊しても菌体の生育は可能であり、*hao*<sub>1</sub> と *hao*<sub>3</sub> の 2 重破壊も可能であった。つまりどの hao も生育において必須ではなく、最大の増殖速度を得るためには 3 コピーの hao が必要であるが、2 コピーの hao または *hao*<sub>2</sub> 1 コピーのみでの生育も可能であった。それではなぜ ENI-11 株は、3 コピーの hao を保持しているのだろうか。ひとつの可能性として、3 つの機能は同じであるが、発現時期や発現が誘導される条件がそれぞれのコピーで異なっているということが考えられる。*hao* 上流の DNA 塩基配列を比較すると、開始コドンより上流 15bp は 3 コピー全てにおいて同じであり、*hao*<sub>1</sub> と *hao*<sub>2</sub> はさらに 145bp の共通配列を有していた。ところが *hao*<sub>3</sub> のこの領域には、これらの配列とほとんど相同性は見られなかった。これらのことはそれぞれの hao が転写レベルにおいて異なる制御を受けていることを示唆するものである。そこで、次章で 3 つの hao の発現調節を転写レベルで調べた。

## 第四章

*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株のヒドロキシルアミン  
オキシドレダクターゼ遺伝子の転写制御機構の解析

## 序

*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株にはヒドロキシルアミノキシドレダクターゼをコードする遺伝子 *hao* が3コピー存在する。これまでの解析により、これらの全ては機能しており、それぞれの DNA 塩基配列はわずかに一塩基または二塩基のみしか変わらないことが明らかとなった。*hao* の開始コドンより上流の配列は、*hao*<sub>1</sub>、*hao*<sub>2</sub> では 160bp が完全に同じであったが、*hao*<sub>3</sub> の同じ領域ではほとんど相同性は見られなかった。つまり少なくとも *hao*<sub>3</sub> は、他のコピーと異なる転写制御のもとに発現が調節されていると考えられる。*hao* の転写は *N. europaea* の休止菌体にアンモニアを添加することで誘導されるという事が報告されているが (42)、どのコピーの *hao* が転写されているかは不明であり、転写段階においてもそれぞれのコピーの役割は不明である。また *Nitrosomonas* において、転写機構が解析された遺伝子は、これまでにわずかに数例しか報告されておらず、そのプロモーターの構造や機能まで知られているものは殆どない。

アンモニア酸化系を理解するうえで、*hao* の発現メカニズムを知ることは非常に重要であり、また、*hao* コピーの役割を調べるという点においても、転写レベルでの解析を行うことで何らかの知見が得られると思われる。そこでこの章では、*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の HAO 遺伝子について転写解析を行い、3つのコピーの転写レベルでの違いと、応答メカニズムを調べることとした。そしてそれぞれのコピーの働きを探ることで、*hao* が3コピー存在することの意味を考察することとした。

TABLE 4-1. Bacterial strains and plasmids used in chapter 4

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i> MV1184	<i>ara</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL</i> <i>thi</i> (Φ80 <i>LacZ</i> ΔM15) Δ( <i>srl</i> <i>recA</i> )306::Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) F[ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacIq lacZ</i> ΔM15]	(53)
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>recA13 ara-14 proA2</i> <i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(10)
<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11	Strain isolated from activated sludge	(58)
Plasmids		
pKLUX	Broad-host-range transcriptional fusion vector; Km <sup>r</sup> , <i>luxAB</i>	(24)
pQF50	Cloning vector; Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pUC118	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(58)
pUC119	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(58)
pKZ27	Broad-host-range transcriptional fusion vector; Km <sup>r</sup> , <i>lacZ</i>	This study
pKZH1-2.0K	pKZ27 containing 2.0-kb <i>KpnI</i> fragment of upstream region of <i>hao<sub>1</sub></i>	This study
pKZH1-0.8K	pKZ27 containing 0.8-kb <i>ScaI-KpnI</i> fragment of upstream region of <i>hao<sub>1</sub></i>	This study
pKZH1-398	pKZ27 containing 398-bp upstream region of <i>hao<sub>1</sub></i>	This study
pKZH1-316	pKZ27 containing 316-bp upstream region of <i>hao<sub>1</sub></i>	This study
pKZH1ΔCR	pKZH1-398 deleted conserved sequence of <i>hao<sub>1</sub></i> and <i>hao<sub>2</sub></i>	This study
pKZH2-1.2k	pKZ27 containing 1.2-kb <i>KpnI</i> fragment of upstream region of <i>hao<sub>2</sub></i>	This study
pKZH2-428	pKZ27 containing 428-bp upstream region of <i>hao<sub>2</sub></i>	This study
pKZH2-205	pKZ27 containing 205-bp upstream region of <i>hao<sub>2</sub></i>	This study
pKZH2ΔCR	pKZH2-428 deleted conserved sequence of <i>hao<sub>1</sub></i> and <i>hao<sub>2</sub></i>	This study
pKZHCR	pKZ27 containing conserved sequence of <i>hao<sub>1</sub></i> and <i>hao<sub>2</sub></i>	This study
pKZH3-1.0k	pKZ27 containing 1.0-kb <i>PstI-KpnI</i> fragment of upstream region of <i>hao<sub>3</sub></i>	This study
pKZH3-389	pKZ27 containing 305-bp upstream region of <i>hao<sub>3</sub></i>	This study
pKZH3-305	pKZ27 containing 305-bp upstream region of <i>hao<sub>3</sub></i>	This study
pKZH3-205	pKZ27 containing 205-bp upstream region of <i>hao<sub>3</sub></i>	This study
pKZH3-73	pKZ27 containing 73-bp upstream region of <i>hao<sub>2</sub></i>	This study

<sup>a</sup> IFO, Institute for Fermentation Osaka.

## 第1節 *hao* 遺伝子のノーザンハイブリダイゼーション解析

### 1-1 *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub> 遺伝子近辺の構造

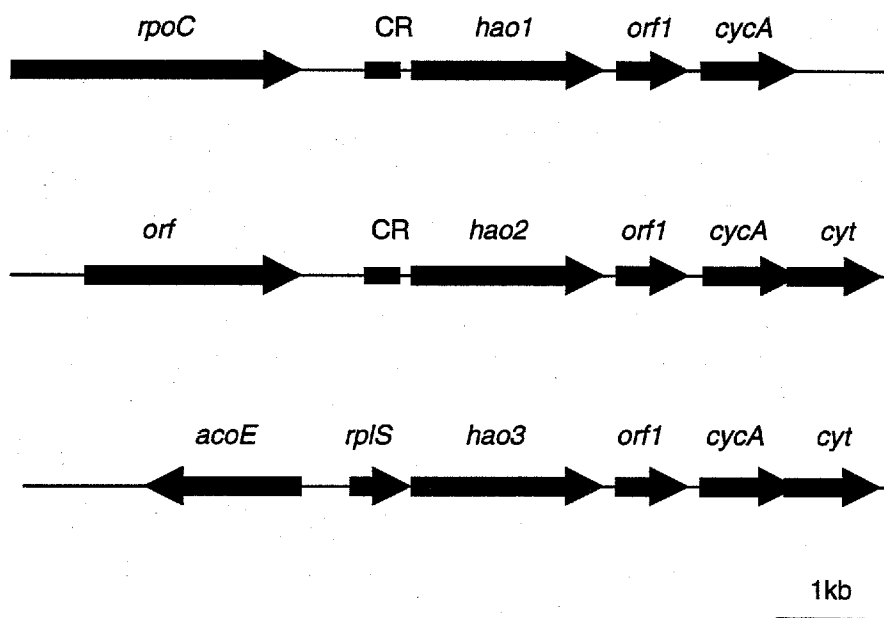
3章 1-2-1 において *hao* 上流の断片をクローニングし、開始コドンより数百 bp 上流の DNA 塩基配列を比較した (第三章 Fig. 3-1)。遺伝子の転写単位を調べるうえで、近隣の遺伝子構造を知ることは、非常に有用な情報となりうる。そこで、各 *hao* 遺伝子上流について FASTA、BLAST 等のデータベース検索システムを用いて、詳細な相同性検索を行った。必要であればさらに上流域のクローニングも行った。

*hao*<sub>1</sub> の上流には 160bp の *hao*<sub>2</sub> との相同配列が存在し、さらに上流 60bp 上流には RNA ポリメラーゼのβ'サブユニットをコードする *rpoC* が存在した (Fig. 4-1)。そのさらに上流には同じく RNA ポリメラーゼのβサブユニットをコードする *rpoB* が存在した。*hao*<sub>2</sub> の上流には *hao*<sub>1</sub> との相同配列が存在し、さらに上流約 50bp には 320bp の open reading frame (ORF) が存在したが、この ORF はデータベースに登録されている遺伝子と相同性をほとんど示さなかった。*hao*<sub>1,2</sub> の 160bp の共通配列には 18bp 以上の ORF は存在せず、特に相同性のある DNA 配列も見いだされなかった。しかし、この共通配列の中央部あたりに、結合自由エネルギー値が約 -25.7kcal/mol のステム&ループ構造の存在が示唆された。また、この近傍に 10 塩基の palindrome 配列が存在した。*hao*<sub>3</sub> の上流には 15bp の相同配列があり、そのわずか 15bp 上流には ribosomal protein S20 をコードすると思われる ORF が存在した (Fig. 4-1)。この領域にプロモーターまたはターミネーター様配列は見いだされなかった (第三章 Fig. 3-1)。

### 1-2 ノーザンハイブリダイゼーション解析

#### 1-2-1 Total RNA の調製

*hao* の近辺には数々の遺伝子が存在していた。そこで *hao* の転写単位や発現量を調べるために、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。RNA の調製は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて、実験操作は以下の点を除いて基本的に添付のマニュアルのプロトコールに従った。対数増殖期中期の ENI-11 菌体培養液 200ml を 15,000rpm、4℃で遠心分離して菌体を沈殿させた後、上清を完全に除いて直ちに ISOGEN 1ml を加え、ボルテックスで完全に懸濁して氷上に



Gene	Function (description)
<i>rpoC</i>	RNA polymerase $\beta'$ subunit
CR	conserved sequences of upstream of <i>hao<sub>1</sub></i> and <i>hao<sub>2</sub></i>
<i>cycA</i>	Cytochrome c-554
<i>cyt</i>	putative cytochrome protein
<i>acoE</i>	acetyl CoA synthetase
<i>rpsT</i>	ribosomal protein S20

Fig. 4-1 *hao<sub>1</sub>*, *hao<sub>2</sub>*, *hao<sub>3</sub>*周辺の遺伝子構造

5分放置した。その後、50℃で30分間インキュベートした。以降の操作は添付のマニュアルに従い total mRNA を取得した。

#### 1-2-2 RNA 電気泳動

取得した mRNA 量を OD<sub>260</sub> の値によって算出し、1.0μg/μl になるように調製した。RNA サンプルの変性及び電気泳動は、ホルムアミド法により行った。すなわち RNA 溶液 5μl に 10μl のホルムアミド、3.5μl ホルマリン、2.0μl 5xMOPS buffer (0.1M MOPS [pH 7.0], 40mM sodium acetate, 5mM EDTA) を加え、65℃で10分間インキュベートした。1xMOPS バッファーにホルマリンを 2.2M になるように加え、これを 0.9%アガロースで固化した。このゲルに、RNA サンプルにゲルローディングバッファーを加えたものをアプライし、1x MOPS バッファー中で 4V/cm で3時間泳動した。

#### 1-2-3 hao のノーザンハイブリダイゼーション

電気泳動後のゲルを、RNase free のイオン交換水で30分×3回振とうし、脱塩を行った。このゲルから、RNA を高速核酸転写装置 (日本エイドー) により、ナイロンメンブレン(PALL) にトランスファーし固定した。これに対し HHE プローブ(3章 2-1-3)を用いて 65℃, over night でハイブリダイゼーションを行った。プローブの作製には、Gene Images random prime labeling module (Amersham)を用いた。検出は Gene Images CDP-Star detection module (Amersham)を使用した。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果、約 2.0kb の位置に1本のバンドが確認できた (Fig. 4-2)。hao の coding region は 1713bp なので、周辺に構造遺伝子のない hao<sub>1</sub>, hao<sub>2</sub> についてはおそらく monocistron 性の mRNA として転写されていると考えられる。hao<sub>3</sub> については上流 30bp に 264bp の rpsT と考えられる ORF が存在し、そのサイズを考えると、polycistronic に転写されているとも考えられる。しかし、これを確かめるには hao<sub>3</sub> の mRNA の 5'領域を決める必要があり、ノーザン解析のみでは結論づけることはできない。検出された 2.0kb のシグナルは、各 hao コピーの相同性を考えると、3つの mRNA が同時に検出されたものだと考えられ、これらをコピー別に区別することはできなかった。



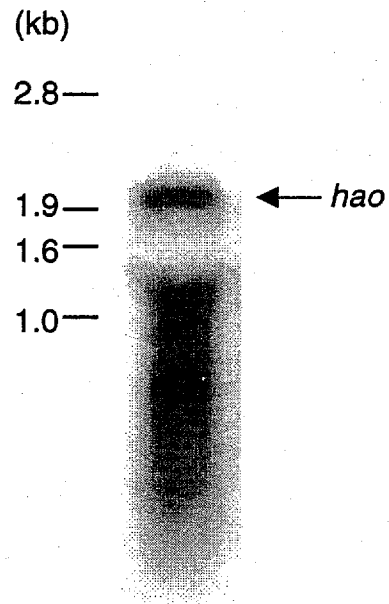


Fig. 4-2 *hao*のノーザンハイブリダイゼーション解析

矢印は*hao*の転写物を示す。レーンの左側にマーカーの位置を示した。

## 第2節 レポータープラスミドを用いた *hao* の転写融合解析

### 2-1 転写融合プラスミドを用いた *hao* の転写レベルの解析

#### 2-1-1 プロモーターレポーターベクターの作製

*hao* の転写レベルを個別に解析するためには、ノーザンハイブリダイゼーションでは不可能であったため、*hao* とレポーター遺伝子を転写融合させて、レポーター遺伝子の活性によって転写レベルを調べることにした。これまで、*Nitrosomonas* で安定して利用可能なプロモーターレポーターベクターがなかったために、まずこれを作製することとした。広宿主域ベクターである pKT240 をベースとして、大腸菌の 5S rRNA rho-independent terminator *Trrn* とカナマイシン耐性遺伝子を持ち、*luxAB* をレポーター遺伝子としたレポーターベクター pKLUX27 (24) を栗田工業株式会社の飯泉氏より分与していただき、このプラスミドの *luxAB* を pQF50 の *lacZ* と置換した。これを pKZ27 とした (Fig. 4-3)。

#### 2-1-2 *hao-lacZ* 転写融合プラスミドの作製

pKZ27 の *lacZ* の上流に、*hao*<sub>1</sub>、*hao*<sub>2</sub>、*hao*<sub>3</sub> の *KpnI* サイトからそれぞれ上流 0.8kb, 1.2kb, 1.0kb の DNA 断片を挿入したプラスミド pKZH1-0.8, pKZH2-1.2, pKZH3-1.0 を作製した (Fig. 4-4)。これらのプラスミドを、第2章 2-2-4 と同じ方法で ENI-11 株に形質転換した。これらの形質転換株をそれぞれ HZ1, HZ2, HZ3 とした。コントロールとしてベクターのみを形質転換したものも作製した。

#### 2-1-3 $\beta$ -Galactosidase 活性の測定

形質転換株を培養し、定常期の菌体を用いて  $\beta$ -Galactosidase 活性の測定を行った。方法は Miller の方法 (31) に従った。ENI-11 の培養液を 3 章 2-2-2 と同様にフィルターにより集菌し、OD<sub>600</sub> が約 0.1 になるように 20mM phosphate buffer (pH7.8) に懸濁した。この菌体懸濁液 400 $\mu$ l に、400 $\mu$ l の Z buffer (19g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 6.2g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.75g KCl, 0.246g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.7ml  $\beta$ -mercaptoethanol, per 1000ml H<sub>2</sub>O [pH 7.0]) と 20 $\mu$ l のクロロホルム、10 $\mu$ l の 10%SDS を加え、ボルテックスで 30 秒間混合した。これを 28°C で 5 分間イ

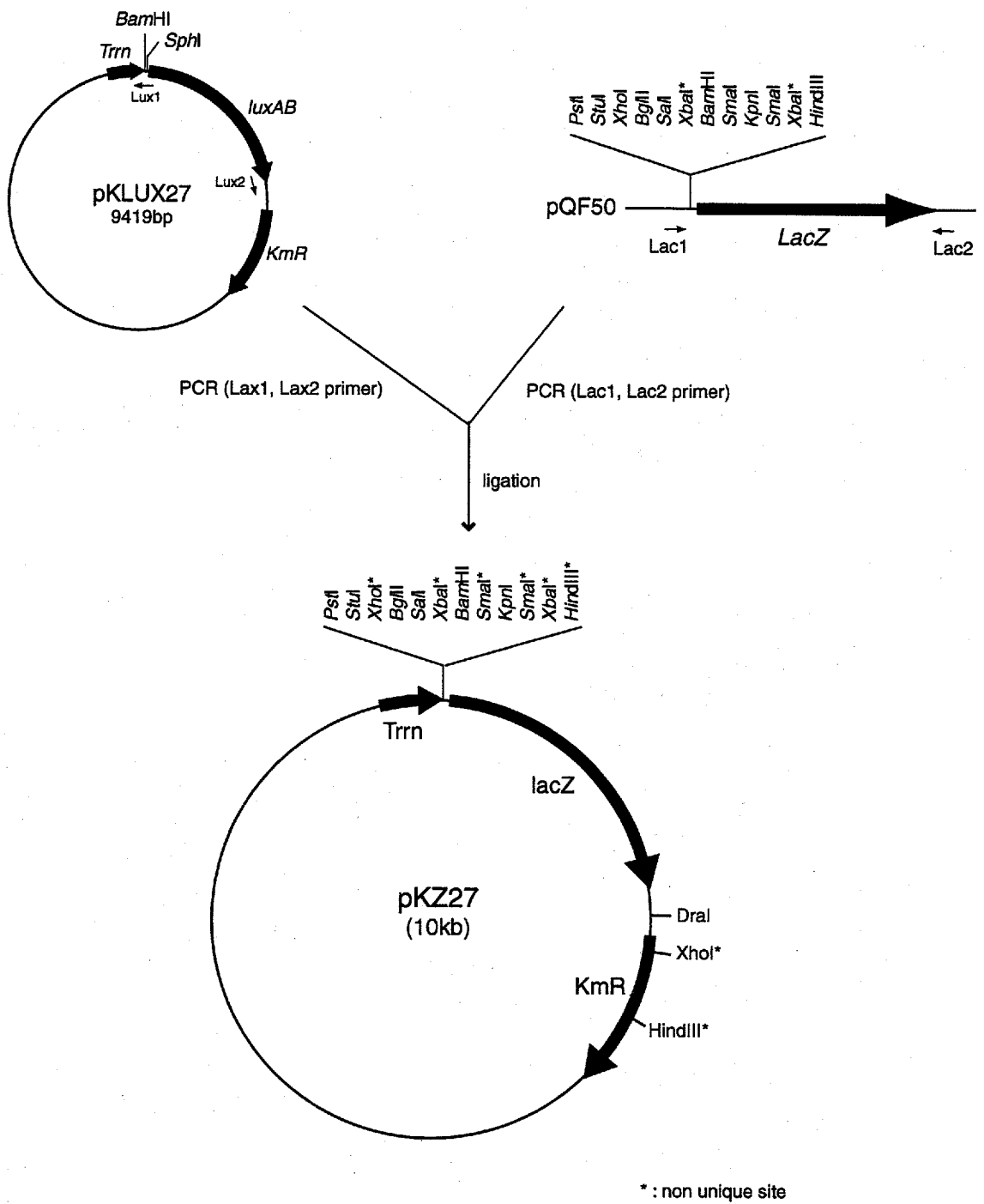


Fig. 4-3 Construction of promoter-reporter-vector pKZ27

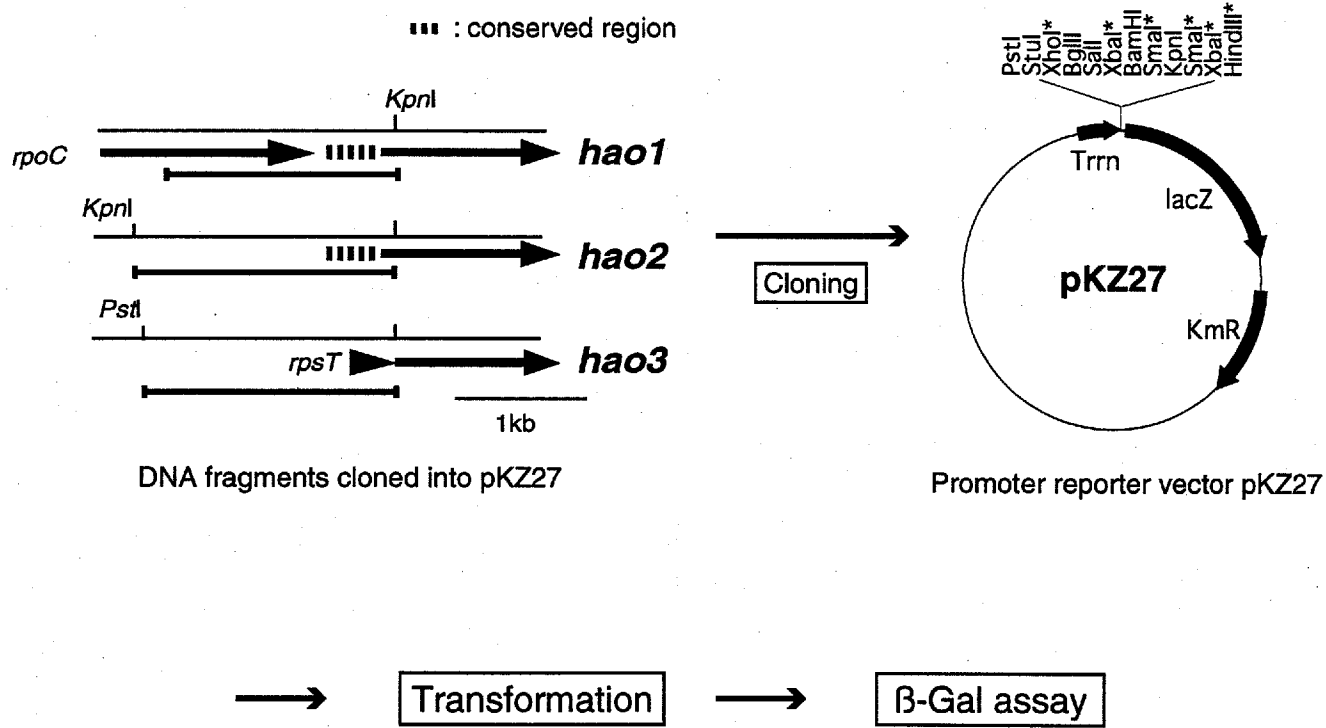


Fig. 4-4 Construction of *hao-lacZ* transcriptional fusions

ンキュベーションした後、あらかじめ 28°C に保温しておいた 4mg/ml の ONPG (O-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) を 160 $\mu$ l 加えて反応をスタートした。十分黄色を帯びてきた時点で 400 $\mu$ l の 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて十分混合し反応を停止した。同時に反応時間を記録した。反応液を 5 分間遠心し、上清の OD<sub>420</sub> と OD<sub>550</sub>, OD<sub>600</sub> を測定して、下式に従って  $\beta$ -Galactosidase 活性を算出した。

$$\text{units of } \beta\text{-gal activity} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550})}{1.25 \times t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t: time [min], v: cell suspension [ $\mu$ l]

*hao-lacZ* 転写融合プラスミドを形質転換した株は明らかな  $\beta$ -Galactosidase 活性を示し、またコントロールの株では、バックグラウンドはほとんど生じず、pKZ27 が ENI-11 株のプロモーター解析に有効なレポーターベクターであることが確認できた。

#### 2-1-4 *hao* 転写レベルの比較

3つの *hao* の転写レベルを比較するために、3種のレポーター株を培養し  $\beta$ -Galactosidase 活性の測定を行った。転写時期の検討も行うために、培養はジャーフェーマンターで行い、経時的にサンプリングして測定を行った。培養にはカナマイシンを 50 $\mu$ l/ml になるように加えた MA 培地 (pH8.0) を用いて、坂口フラスコで前培養した培養液 5% を植菌して培養を開始した。

レポーター株の  $\beta$ -Gal 活性は、菌体の増殖とともに増加し続け、対数増殖期が終わる時点で  $\beta$ -Gal 活性は最大となった。増殖が定常期にはいると  $\beta$ -Gal 活性は一定であった (Fig. 4-5)。この傾向は 3つのレポーター株全てに共通してみられた。  $\beta$ -Gal 活性が最大となる対数期後期の HZ1, HZ2, HZ3 全ての  $\beta$ -Gal 活性は、それぞれ 965 $\pm$ 52、1448 $\pm$ 73、2017 $\pm$ 113 [miller units] であった。この結果からレポーター遺伝子の活性でみた場合、通常の培養条件において *hao* の転写活性は三者で異なっており、*hao*<sub>3</sub> が最も強く、次いで *hao*<sub>2</sub> が強く、そして *hao*<sub>1</sub> が最も弱いということがわかった。

#### 2-2 *hao* プロモーター領域の特定

*hao* のプロモーター領域を調べるために、2-1-2 で述べた方法と同様に pKZ27 に *hao* 上流の様々な長さの断片を挿入したプラスミドを作製-Gal 活性の値はおよそ 800unit で HZ1 とほと

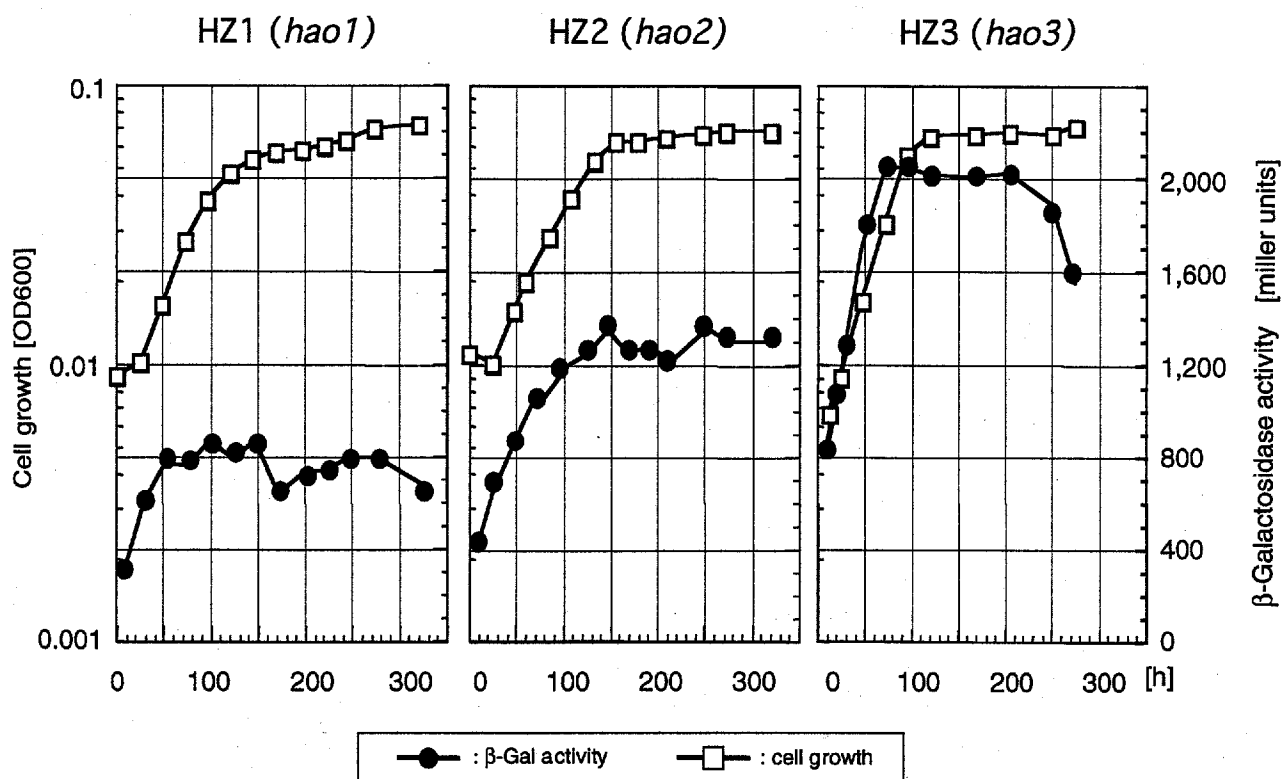


Fig. 4-5 HZ1, HZ2, HZ3の $\beta$ -Galactosidase活性の変化

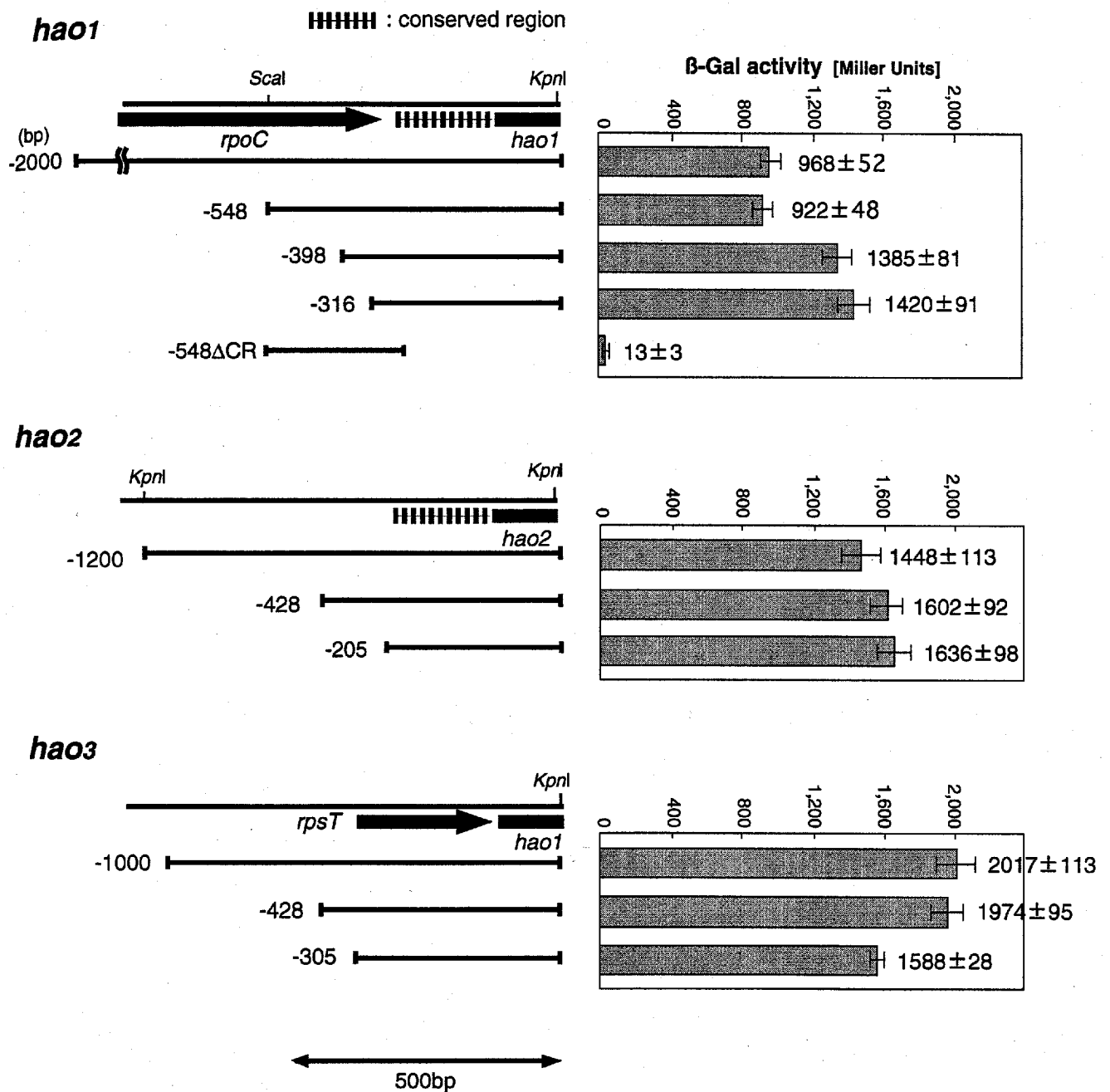


Fig. 4-6 *hao*のプロモーター領域の解析

左の棒線はプラスミドに挿入した断片の領域を示す。グラフの $\beta$ -Galactosidase活性値は少なくとも3回以上の独立した実験による平均値と標準偏差を示した。

んど同じであったが、約 300bp から上流を欠失させた HZ1(-398)と HZ1(-316)では、 $\beta$ -Gal 活性がおよそ 1300unit に上昇した(Fig. 4-6)。つまり *hao*<sub>1</sub> の上流 400~550bp には負の制御に関係する DNA 配列が存在すると考えられた。

*hao*<sub>2</sub> については、上流 428bp, 205bp より下流の DNA 断片と *lacZ* を融合させた HZ2(-428) と HZ2(-205)において $\beta$ -Gal 活性を調べたが、上流部分を欠失させることによって *hao*<sub>1</sub> の様に活性が増加するような現象は見られなかった。*hao*<sub>1</sub> と *hao*<sub>2</sub> に存在した共通配列を除くと $\beta$ -Gal 活性はほとんど見られなくなった。このことから、*hao*<sub>1</sub> と *hao*<sub>2</sub> のプロモーター領域は共通配列内に存在し、さらに上流の配列によってその差は生じていると考えられる。

*hao*<sub>3</sub> の上流 305bp より上流部分を除いた HZ3(-305)では、HZ3 と比べて $\beta$ -Gal 活性が 500unit ほど低下した。*hao*<sub>3</sub> のわずか 30bp 上流には ribosomal protein をコードする *rpsT* が存在しているが(Fig. 4-1, 4-6)、予想される *rpsT* のプロモーター配列は-305bp よりもさらに上流の-316~-345bp に存在する。HZ3 のレポータープラスミドに挿入された約 1.0kb の DNA 断片にはこの領域も含まれ、また *hao*<sub>3</sub> のプロモーターは開始コドンより上流 54bp と考えられているため (20)、おそらく *hao*<sub>3</sub> は *rpsT* と *hao*<sub>3</sub> の両方のプロモーターによって転写されると考えられる。そうすると、-305bp より上流を除いたプラスミドを持つ株が HZ3 よりも低い $\beta$ -Gal 活性を示したのは、おそらく *rpsT* のプロモーターが欠落したためであると考えられる。

### 第3節 *hao* プロモーターの応答解析

#### 3-1 レポーター株の培養と転写活性の比較

これまでの結果から、通常の培養条件における *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub> の転写活性は、三者とも異なっているということが判明した。しかし、通常の培養条件とは、あくまで実験室レベルの特殊な状態であり、*Nitrosomonas* の自然界における生育環境は非常に多様なものである。そして、そういった生育条件ではそれぞれのコピーの *hao* は、異なる役割を果たしているのではないかと考えられる。そこでそれぞれのレポーター株を様々な条件で培養し、転写レベルの変化を解析することで3つの *hao* の役割を調べることにした。変化を見る要素としては、*Nitrosomonas* の増殖にとって重要な因子であると考えられる、ヒドロキシルアミン濃度・亜硝酸濃度・酸素濃



度について、さらに菌体の状態による転写活性の変化も調べるため、菌体の保存期間についての検討も行った。

### 3-2 ヒドロキシルアミン濃度・亜硝酸濃度・酸素濃度による hao 転写活性の変化

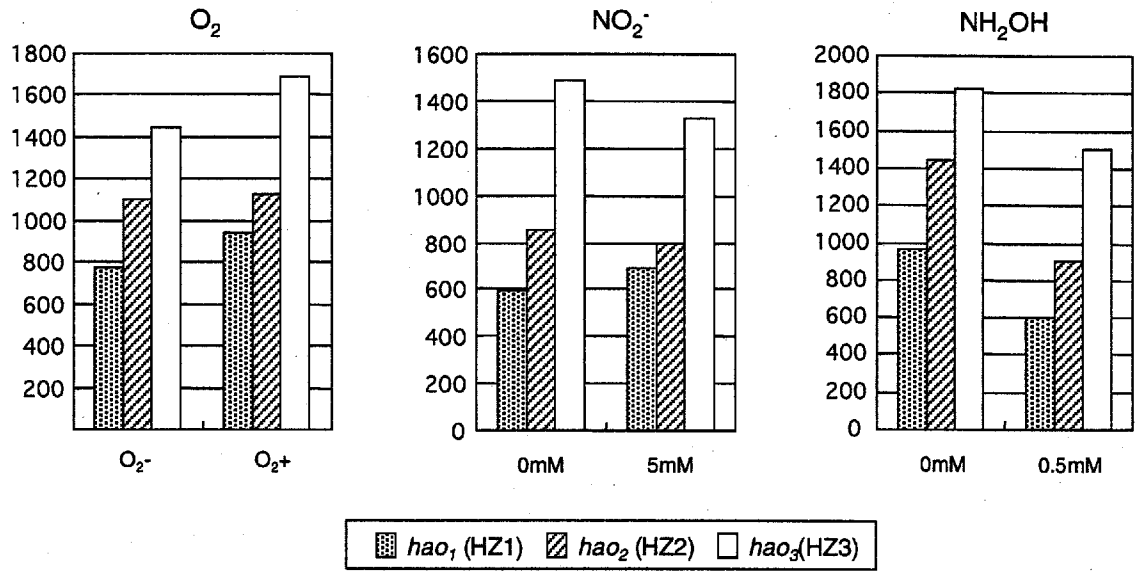
前培養は通常の MA 培地 100ml で坂口フラスコを用いて行い、3日間培養した。これを冷却遠心機で集菌し、滅菌水で3回洗浄した後、菌体の OD<sub>600</sub> が 0.01 になるように目的の培地に植菌した。培地は以下のように調製した。ヒドロキシルアミン濃度による影響を調べる場合は、0~0.5mM の塩酸ヒドロキシルアミン（関東化学）を加えた MA 培地を作製し、亜硝酸濃度に関しては MA 培地に 0~5mM の亜硝酸ナトリウムを加えたものを使用した。酸素濃度変化は培養を嫌気で行うか好気で行うかで比較した。好気培養は通常の坂口フラスコを用いた培養を行い、嫌気培養には 50ml キャップ付きバイアル瓶に MA 培地を満たし、窒素ガスで置換したものを用いた。これらの培地にレポーター株を植菌し、28℃で36時間培養後にβ-Gal 活性を測定した。

β-Gal 活性測定の結果を Fig. 4-7A に示す。レポーター株を好気で培養したものは、嫌気に培養したものと比べて、β-Gal 活性の全体的な増加がみられ、5mM の亜硝酸を培地に加えた場合は、全体的にβ-Gal 活性が減少していた。つまり通気によって hao の転写が若干活性化され、亜硝酸濃度が 5mM 以上になると hao の転写は弱まることがわかった。しかし、全ての場合においてそれぞれのコピーの転写量が特異的に大きく変わるということはなく、3つの転写量はほぼ同調して変化した。

### 3-3 菌体の保存状態による hao 転写活性の変化

Arp らはアンモニアの添加によって、増殖休止状態にある *N. europaea* の hao の転写が活性化されることを報告している (42)。そこでこの転写の活性化がどのコピーによって引き起こされているかを調べた。方法は Arp らの方法に従って、前培養時の hao の mRNA によるバックグラウンドを下げるために、レポーター株の前培養菌体を冷却遠心分離機で集菌後3回滅菌水で洗浄し、アンモニアを入れない MA 培地(N-)中にて4℃で3日間保存した。そしてこのレポーター株菌体を、新鮮な MA 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように植菌した。これを 28℃で6時間培養

A



B

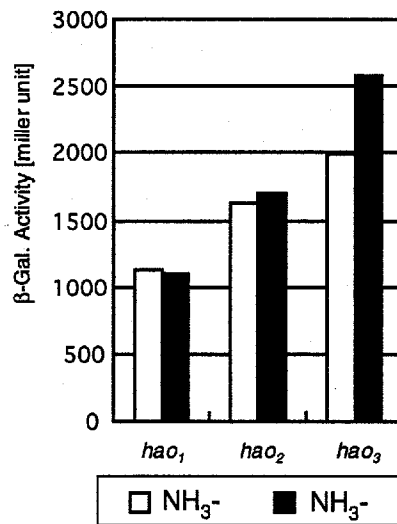


Fig. 4-7 *hao*レポーター株HZ1, HZ2, HZ3の環境応答

(A) レポーター株の酸素・亜硝酸・ヒドロキシルアミンへの応答  
 (B) 4℃で3日間保存したレポーター株のMA培地 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH<sub>3</sub><sup>-</sup>)中での転写量変化

し、 $\beta$ -Gal 活性を測定した。その結果、HZ1, HZ2 では $\beta$ -Gal 活性の変化はほとんど見られなかったが、HZ2 に関しては4℃で3日間保存したレポーター株の $\beta$ -Gal 活性の上昇が見られた(Fig. 4-7B)。コントロールとして前培養直後のレポーター株を用いたが、 $\beta$ -Gal 活性の上昇は認められなかった。つまり菌体の増殖が休止した後、増殖を再開する時には *hao*<sub>3</sub> の転写の活性化が最も早く起こるとということが示唆された。

#### 第4節 考察

*hao* の上流領域の配列は3コピーで同じではなく、各 *hao* 破壊株の HAO 活性もそれぞれ異なっている。これらのことは、それぞれのコピーの転写レベルでの違いを示唆するものであると考え、本章では *hao* の転写解析を行った。解析を行うにあたり、まず最初にそれぞれの *hao* の転写量の違いを知ることと、その検出方法の確立が望まれた。*hao* のノーザンハイブリダイゼーション解析では、転写長の区別がつかない一本のバンドが検出され、*hao* 全体の転写量を知ることができたが、3つの転写物(量)を区別することはできなかった。これまでの研究で *hao* のプロモーター領域は全てクローニングされており、形質転換法も確立していた。そこでレポーター遺伝子を用いた転写解析を試みた。*N.europaea* において、*luxAB* をレポーター遺伝子とした pKLUX プロモーターレポーターベクターが作製されていた(24)。しかし、*luxAB* により発現したルシフェラーゼの活性測定には、フラビンモノヌクレオチド(FMN)を還元するための NAD(P)H が必要である。*Nitrosomonas* は還元型基質の酸化に伴い NAD(P)<sup>+</sup>を還元することはできず、ATP を消費して逆行電子伝達系を駆動して NAD(P)<sup>+</sup>の還元を行う(46)。このことは *Nitrosomonas* のエネルギー効率の悪さのひとつの原因であり、増殖時に多量の ATP を必要とする時にはルシフェラーゼ活性の測定は、安定したデータを得ることが困難であるとされていた。この問題のために、pKLUX を改変して一般的に用いられる *lacZ* をレポーター遺伝子とした pKZ27 を構築した。*lacZ* によって生産される $\beta$ -Galactosidase は、ENI-11 菌体内において安定であり、比較的再現性よくデータを取ることができた。このプラスミドは ENI-11 菌体で複製可能であり、バックグラウンドも低く、解析に非常に有効であった。

この pKZ27 を用いて、*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub> のプロモーターを十分に含むと思われる DNA 領域

を挿入したレポータープラスミドを作製し、これを形質転換したレポーター株 HZ1, HZ2, HZ3 を作製した。通常の培養条件においてそれぞれのレポーター株は異なる $\beta$ -Gal 活性を示し、転写強度は  $hao_3 > hao_2 > hao_1$  であり 3 つの転写量は違っていることが判明した。 $hao_1$  と  $hao_2$  は上流に 160 塩基の共通した配列を持っているにもかかわらず、転写活性は異なっていた。このことから共通配列よりもさらに上流部分に、転写に関与する領域が存在するということが考えられる。

次にこのレポーター株をヒドロキシルアミン、亜硝酸、酸素濃度に変化をつけた培地で培養し、レポーター株の $\beta$ -Gal 活性を調べることで、それぞれの *hao* プロモーターに特異的な応答条件を調べた。その結果、培養条件を変化させることによって全体的な *hao* 転写量の増減は見られたが、いずれかの *hao* が特異的に応答するような例は見られなかった。しかし、レポーター株を 4℃、ammonia free の状態で 3 日間保存したものについて、短時間で HZ3 ( $hao_3$ ) においてのみ $\beta$ -Gal 活性の上昇が認められた。このことから  $hao_3$  のひとつの役割として、菌体が増殖を停止した休止状態にある時に、アンモニアの存在に反応して増殖を再開するために主に使われるということが予想される。本研究の結果のみでは予想の域を脱しないが、 $hao_3$  が増殖の再開時に主要な働きをするとすれば、これを検証するために例えば  $hao_3$  の破壊株 (H3) を用いて、増殖休止状態から培養を行い、Lag phase の長さを野生株または H1, H2 と H3 とで比較することで明らかになるかもしれない。

*hao* のプロモーターに関しては、これまであまり詳しく調べられていなかったが、レポーターベクターを用いた解析はプロモーター解析にも有効であった。プラスミドに挿入した *hao* 上流の断片を短くしたプラスミドを作製して、これを ENI-11 株に形質転換して $\beta$ -Gal 活性を測定した。その結果、 $hao_1$  については上流 400~550bp を欠失させることで、 $\beta$ -Gal 活性が  $hao_2$  と近いレベルにまで上昇したため、 $hao_1$  には何らかの負の制御がかかっていると考えられた。この領域について相同性検索などを行ったが、転写機構に関連するような配列は見いだされなかった。 $hao_1$  に関して共通領域を除いたプラスミドを持つ株は、 $\beta$ -Gal 活性がほとんど無くなることから、共通領域にプロモーターが存在することが示唆される。共通配列は、転写因子のターゲットとなるステム&ループ構造や回文配列が見られ、転写に深い関係があると考えられる。従ってこれらのことからやはり共通領域の上流域が  $hao_1$  と  $hao_2$  の転写レベルの違いに関係していると考えられる。 $hao_3$  上流の *rpsT* のプロモーターを欠失させると、レポーター株の $\beta$ -Gal 活性が低下した。このことから  $hao_3$  は *rpsT* と  $hao_3$  の両方のプロモーターによって転写されていることが

示唆された。また *rpsT* と *hao<sub>3</sub>* の間はわずかに 30bp であり、ターミネーター構造も見られないことから *hao<sub>3</sub>* が *rpsT* と polycistronic に転写されている可能性が考えられる。*rpsT* をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションを行うと、*hao* とほぼ同じ位置にシグナルが検出された (data not shown)。この転写物が *rpsT* の全長をカバーしているかどうかは、この mRNA の 5'末端を調べなければわからないが、このことは *hao<sub>3</sub>* と *rpsT* が polycistronic に転写されるといふ可能性を支持する。これまで、*hao* は全て monocistronic に転写されていると言われてきたが (41)、リボソームタンパクと *hao* の機能を考えると、これらはいずれも細胞が増殖する同じ様な時期に必要とされることから、この二つが単一の転写単位で調節されることはむしろ合理的なことかもしれない。

この研究では、プロモーターと考えられる DNA 領域を *lacZ* に融合し、 $\beta$ -Gal 活性の増減を見ることでプロモーター領域を予測した。予想されたプロモーター領域には、大腸菌のプロモーターとのコンセンサス配列はあまり見られず、*Nitrosomonas* 独自のプロモーターによって機能していると考えられた。そこでプロモーターを明らかにするために、*hao* mRNA の 5'末端の決定を Primer extension 法や 5'-RACE 法によって試みたが、決定には至らなかった。*hao* のノーザン解析の結果 (Fig. 4-2) にあるように、*hao* mRNA の分解物と思われるものが多量に *hao* のシグナルの下部に見られる。このことから *hao* mRNA の分解は非常に早く 5'末端部分が非常に不安定であったために、転写開始点を定めることができなかつたのではないかと考えているが、今後 *hao* の転写機構をさらに明らかにするためにはプロモーターの特定は必要であろう。

本実験は *hao-lacZ* の転写融合株を用いることで、*hao* の転写における応答を調べることができるひとつの例となった。本研究では、この他にいずれかのコピーに特異的な応答をもたらす要素は見つけることができなかつた。しかし、今後もこのようなレポーター株を用いた解析を行うことで、新しい応答因子が発見されるであろう。そして各コピーの *hao* の役割が解明されれば、*hao* がマルチコピー存在する意味の解釈に新たな着想をもたらすかもしれない。

## 第五章

### アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の 炭酸固定酵素遺伝子の解析

## 序

化学独立栄養細菌をはじめ、植物、藻類、光合成細菌は、主にカルビン・ベンソン回路によって  $\text{CO}_2$  を同化し、細胞構成成分をつくる (56)。アンモニア酸化細菌も炭酸固定系によって全ての細胞構成成分を合成する。つまりエネルギーの獲得と同等に細胞の増殖において重要な機構であるといえる。カルビン回路に特有の反応は、Phosphoribulokinase (PPK) 反応と Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) 反応の 2 つであり、他の酵素反応の多くは他の代謝経路に共通である (12,51)。このうち実際に炭酸ガスを取り込む反応を触媒するのは RubisCO である。このため、環境保全の点からも活性の高い RubisCO を活用して、大気中の  $\text{CO}_2$  を固定しようという研究もなされている。

RubisCO には 2 つの形状があり、高等生物とほとんどの原核生物の RubisCO は Form I と呼ばれる、8 分子の大サブユニットと 8 分子の小サブユニットからなる ( $\text{L}_8\text{S}_8$ )。もう一つは Form II と呼ばれる大サブユニットのみから構成されるもので、一部の光合成紅色細菌や化学独立栄養細菌に見られる (4,50)。これらの遺伝学的情報は、多くのバクテリアにおいて得られており、RubisCO Form I 大小サブユニット、Form II サブユニットの遺伝子はそれぞれ *cbbL*, *cbbS*, *cbbM* としてクローニングされている (45)。近年、高濃度アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas* sp. K1 株から、Form I の RubisCO が精製された (13)。化学独立栄養性のアンモニア酸化細菌は、電子供与体であるアンモニアの酸化により、生存に必要なエネルギーと還元力 ( $\text{NAD(P)H}$ ) を獲得し、この還元力とカルビン経路によって取り込んだ  $\text{CO}_2$  により、細胞構成成分の生合成を行う (51)。

アンモニア酸化細菌のアンモニア酸化系路に関する酵素の遺伝学的情報はここ数年で数多く得られるようになったが、一方で炭酸固定に関与する遺伝学的情報はほとんど皆無であった。そこで ENI-11 株において炭酸固定酵素遺伝子の取得を行い、アンモニア酸化細菌における炭酸固定系に関与する遺伝子の解析を行った。

TABLE 5-1. Bacterial strains and plasmids used in chapter 5

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
MV1184	<i>ara</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> (Φ80 <i>LacZ</i> Δ <i>M15</i> ) Δ( <i>srl</i> <i>recA</i> )306::Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) F' <i>[traD36 proAB<sup>+</sup>lacIq lacZ</i> Δ <i>M15]</i>	(53)
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) <i>recA13 ara-14 proA2</i> <i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mil-1 leuB6 thi-1</i>	(10)
SURE <sup>®</sup>	<i>e14</i> (McrA), Δ( <i>mcrCB- hsdSMR- mrr</i> )171, <i>endA1, supE44,</i> <i>thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC, :: Tn5</i> (Kan <sup>r</sup> ), <i>uvrC</i> [F <sup>r</sup> , <i>proAB, lac<sup>r</sup> ZΔM15, Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene
<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11	Strain isolated from activated sludge	(58)
Plasmids		
pUC118	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(53)
pUC119	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(53)
pMW119	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	Nippon gene Co.
pBluescript II KS (+)	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pCB01	pMW119 with 3.4-kb <i>Bam</i> HI fragment containing <i>cbbL</i> and <i>cbbS</i> of <i>Nitrosomonas</i> sp. strain ENI-11	This study
pCSL1	pBluescript II KS (+) with <i>Clal-NotI</i> fragment of pCB01	This study

<sup>®</sup> IFO, Institute for Fermentation Osaka.



## 第1節 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株の Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase/carboxylase (RubisCO) 遺伝子の単離

### 1-1 縮重プライマーの設計

RubisCO 遺伝子をクローニングするために、GenBank データベースに登録されている既知のバクテリア CbbL アミノ酸配列を Clustal W (52) を用いて整列化し、全てのバクテリアにおいて最も高く保存されている領域 2ヶ所を対象とした縮重プライマーを設計した (Fig. 5-1)。cbbL 遺伝子の整列化に引用した遺伝子の塩基配列の accession number は以下の通りである。

*Anabaena* sp. strain PCC7120, L02522; *Bradyrhizobium japonicum*, AF04820; *Chromatium vinosum*, D90204; *Hydrogenophilus thermoluteolus*, D30704; Manganese-oxidizing bacterium SI85-9A1, L32182; *Prochlorothrix hollandica*, P27568; *Prochlorococcus marinus*, U93857; *Prochlorococcus* sp., U93858; *Rhodobacter capsulatus*, L820 00; *Rhodospirillum rubrum*, X00286; *Rhodobacter sphaeroides*, M64624; *Synechococcus* sp., U93859; *Synechococcus* PCC6301, P04716; *Synechocystis* PCC6803, P54205; *Thiobacillus denitrificans*, L42940; *Thiobacillus ferrooxidans*, AF129925; *Thiobacillus intermedius* K12, AF046933; *Thiobacillus neapolitanus*, AF038430; unidentified cyanobacterium, U93856; unidentified alpha proteobacterium, U93861

Forward primer には *Rhodobacter capsulatus* CbbL の position 58-65 に相当するアミノ酸配列 (TWTTVWTD) より RBC1 (ACNTGGACNACNGTNTGGACNGAY) を、Reverse primer には *R. capsulatus* の CbbL の position 190-198 に相当するアミノ酸配列 (DFTKDDEN) より RBC2 (5'-RTTYTCRTCRTCYTTCNGIRAARTC) を設計した (Fig. 5-1)。

### 1-2 PCR による ENI-11 株 cbbL の DNA 断片の取得

1-1 で作製したプライマーを用いて ENI-11 株より cbb 遺伝子の取得を試みた。Genomic DNA, plasmid DNA の調製、制限酵素処理は Sambrook ら(40)の方法に従った。耐熱性 DNA polymerase は Takara *Ex Taq* (Takara) を用いた。サーマルサイクラーは GeneAmp 9600 DNA Thermal cycler (Perkin Elmer) を用いた。反応は以下の条件で行った。(98°C for 3min; 30cycles of 30 sec at 94°C, 30sec at 52°C, 1min at 72°C; followed by a final 10min at 72°C) この反応による増幅産物約 400bp

```

a H.marinus -----MAKTYNAGVKEYRET-YWMPEYEPKDSDFLACFKVVPQPG 50
b T.denitrificans -----MAVKTYSAQVKEYRQT-YWMPEYTELDTBILACFKITPCAG 50
c Synechococcus sp. --MAYTQSKSQKVGQAGVKDYRLT-YTTPDYTPKDTBILAAFVRTPCPG 50
d R.eutropha MNAPESVQAKPRKRYDAGVMKYKEMGWDGDYEPKDTBLLALFRITPCDG 50
e R.sphaeroides -MDTKTTEIKGKERVKAGVLKYAQMGWDGDYEPKDTBLLALFRITPCDG 50

a VPREEIAAAVAESSTGTTTWTVDLLTDLDYKGRAYRIEDVPGDSSAFYAFIAYPIDLFEEGSIVSVM 120
b VDREFAAAVAESSTGTTTWTVDLLTDLDYKGRAYAIEDVPGDDTCFYAFIAYPIDLFEEGSVNVNF 120
c VPFEFAAAVAESSTGTTTWTVDLLTDLDRYKGRCYDIEPLPGEDNQFIAYIAYPLDFEEGSVTNML 120
d VDPVEFAAAVAGESSTATWTVVATDRLTACDMYRAKAYRVDVFPNNPEQFFCYVAYDLSLFEEGSIANLT 120
e VDPVEFAAAVAGESSTATWTVVATDRLTACDSYRAKAYRVEVPVPTPGQYFCYVAYDLIFEEGSIANLT 120

a TSLVGNVFGFKALRSIRLEDIRFLAYVMTCGGPHGIQVERDKMDKYGRFLLGCTIKPKLGLSAKNYGR 190
b TSLVGNVFGFKAVRALRLEDVRFPIAYVKTCGGPHGIQVERDVMNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGR 190
c TSVGNVFGFKALKALRLEDLRFVAYLKTFCGPHGIQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGR 190
d ASIIGNVFSFKPIKAARLEDMRFVAVYKTFAGPSTGIIVERERLDFKGRPLLGATTKPKLGLSGRNYGR 190
e ASIIGNVFSFKPLKAARLEDMRFVAVYKTYKGPPTGIVGERERLDFKGRPLLGATTKPKLGLSGKNYGR 190

a AVYECLRGGIDETKDDENVTSOPFMRWRDRFLFCODAEKAQDETGERTGHYLNATAGTPEEMYRAEFA 260
b AVYECLRGGIDETKDDENVNSOPFMRWRQREFDVMEAIQKSERETGERKGHYLNVTAPTPEEMYKRAEYA 260
c AVYECLRGGIDETKDDENINSOPFQRWRDRFLVADAIHKAQETGEIKGHYLNVTAPTCEEMLKRAEFA 260
d VVYEGLRKGLDEMDDENINSOPFMHWRDRFLVMDAVNKASAATGEVKGSYLNVTAGTMEEMYRAEFA 260
e VVYEGLRKGLDEMDDENINSOPFMHWRDRFLVMEAVNLSAQTGEVKGHYLNITAGTMEEMYRAEFA 260

a KEIGSPIVMHDFLTGGLTANTGLANYCRKNGLLLHIHRAMHGVIDRNPLHGIHFRVLSKVLRLSGGDHLH 330
b KEIGAPIIMHDFYITGGFCANTGLANWRDNGMLLHIHRAMHAVLDRNPHGIHFRVLTNLRRLSGGDHLH 330
c KDOWN-AIIMHDFLTAGFTANTTLSKGDNDGMLLHIHRAMHAVMDRQKNHGIHFRVLAKCLRMSSGGDHLH 330
d KSLGSVVMIDLIVG-WTCIQSMSNWCQNDMLLHLHRAGHGTYTRQKNHGVSRVIAKWLRLAGVDHMH 330
e KSLGSVVMVLLIIG-YTAIQSISEWCQNDMLLHMHRAGHGTYTRQKNHGISFRVIAKWLRLAGVDHLH 330

a SGTIVGKLEGRGSDLGWIDIMRDSFIAEDRSRGIMFDQDFGEMPGVIPVASGGIHVWHMPALVAIFGDD 400
b SGTIVGKLEGRREATLGWIDIMRDSFVKEDRSGIFFDQDWGSMPGVFPVASGGIHVWHMPALVTIFGDD 400
c TGTIVGKLEGDKAVTLGFVDLLRENYIEQDRSGIYFTQDWASMPGVMAVASGGIHVWHMPALVDIFGDD 400
d TGTAVGKLEGDPLTVQGYYNVCRDAYTHDTLTRLGFFDQDWASLRKMPVASGGIHAGQMHQLIHLFGDD 400
e CGTAVGKLEGDPLTVQGYYNVCREPNTVDLPRGIFFEQDWADLRKMPVASGGIHAGQMHQLLSLFGDD 400

a SVLQFGGGTIGHWPWNAVGAAVNVALEACVQARNEGQIEKNGKEILTNDGKHSPELKIAMETWKEIKF 470
b SVLQFGGGTLGHPWNAAGAAANVALEACVEARNKGVAIKEGKTVLTEAAKNSPELKIAMETWKEIKF 470
c AVLQFGGGTLGHPWGNAPGATANVALEACIQARNEGRDLMREGGDIIEAARWSPELAAACELWKEIKF 470
d VVLQFGGGTIGHPQGIQAGATANVALEAMVLARNEGRDILNEGPEILRDAARWCGPLRAALDWTGDESF 470
e VVLQFGGGTIGHPMGIQAGATANVALEAMVLARNEGRNIDVEGPEILRAAAKWCKPLEAALDWTGNTEF 470

a EFDTVDKLDLSHK----- 488
b EFDTVDKLDVAHK----- 488
c EFEAQDTI----- 488
d NYTPDTSDFAPTASVA- 488
e NYTSTDTSDFVPTASVAM 488

```

ここには代表的な5種のバクテリアの CbbL の整列を示した。  
網掛け (■) は共通しているアミノ酸、下線は縮重プライマーの位置を示す。

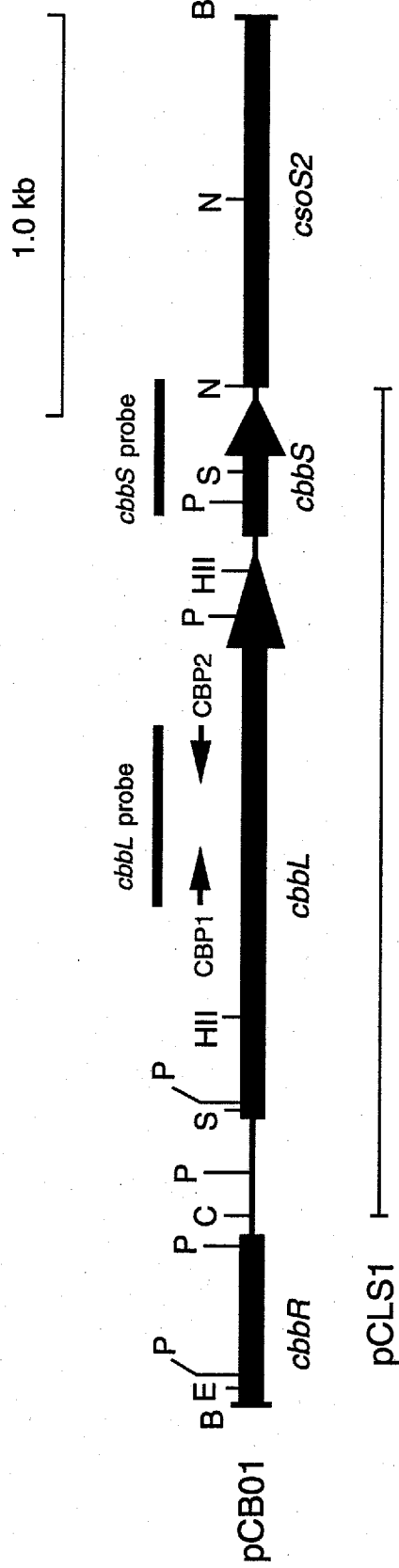
Fig. 5-1 Alignment of amino acid sequences of bacterial CbbL

を sequence した結果、*Thiobacillus denitrificans* の RubisCO large subunit をコードする *cbbL* と 83.5% の高い相同性を示した。DNA sequencing には DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (AP Biotech) を用いて反応を行い、ABI PRISM 310 capillary DNA sequencer (Perkin Elmer) により解析した。

### 1-3 ショットガンクローニングによる *cbbL*, *cbbS* 遺伝子の取得

PCR によって取得した 400bp の断片を DIG DNA Labeling Kit (Roche) を用いてラベルし、これをプローブとして *cbbL*, *cbbS* 遺伝子の全長を含むクローンの取得を試みた。Hybridization は 65°C で行い、それ以外の操作は DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) のプロトコールに従った。染色体の *AccI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *PstI*, *SacI* 消化物に対して Southern Hybridization を行ったところ、*BamHI* 消化物の 3.4kb 付近にシグナルが得られた。*Thiobacillus denitrificans* の *cbbL,S* がそれぞれ約 1.4kb, 0.3kb であることから、この断片が *cbbL,S* 全長を含むのに十分であると考え、*BamHI* 消化の 3.4kb 付近の DNA 断片を pMW119 (Nippon Gene Co.) に ligation し、gene library を構築した。ホストに *Epiculian coli SURE*<sup>®</sup> (Stratagene) を用いた。約 1500 個のコロニーを対象に前述のプローブを用いて colony hybridization を行い、目的の断片を含むプラスミドを取得した。このプラスミドを pCB01 とした。pCB01 にクローニングされた 3.4kb *BamHI* 断片の制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定した (Fig. 5-2)。

解析の結果 1422bp と 327bp の完全な open reading frame (ORF) が見出され、これらの DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、ホモロジー検索の結果それぞれ *Thiobacillus intermedius* の *CbbL* と 92.8%、*Nitrobacter winogradskyi* の *CbbS* と 87.0% の高い相同性を示した。このことからこの 2 つの ORF は ENI-11 株の *cbbL,S* 遺伝子である可能性が高いと考えられた。また、*cbbS* 下流には *Thiobacillus intermedius* の Carboxysome polypeptide (7) をコードする *csoS2* と相同性のある配列が見出され、*cbbL* の上流には 199bp をはさんで *cbbL* とは逆向きの転写方向に *Thiobacillus denitrificans* の *cbb* gene の正の制御因子である *cbbR* と相同性のある ORF が見出された (Fig. 5-2)。*Nitrosomonas europaea* のゲノムプロジェクトデータベース (5) に登録してある *cbbL,S* と予想される配列と比較した結果、アミノ酸レベルでの相同性は *cbbL* が 85.2%、*cbbS* が 52.5% であった。これは両菌株の極めて高い 16S rRNA の相同性を考えると意外なことであり、近縁種にもかかわらず、なぜ炭酸固定酵素遺伝子の相同性が低いのか非常に興味が持たれる。



B: *Bam*HI, C: *Cla*I, E: *Eco*RI, HIII: *Hinc*II, N: *Not*I, P: *Pst*I, S: *Sal*I

Fig. 5-2 *Bam*HI3.4kb断片の制限酵素地図

#### 1-4 CbbL の系統樹の作製

ENI-11 株の *cbbL* の DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、1-1 でプライマーの作製に使用したものを中心に、他のバクテリアの CbbL アミノ酸配列のデータから、系統樹の作製を行った (Fig. 5-3)。ソフトウェアは ClustalW を用いた。ENI-11 と *N. europaea* は異なるブランチに位置し、それぞれ *T. intermedius* K-12、*Hydrogenophaga pseudoflava* と近い距離に位置した。

### 第2節 ENI-11 株の *cbbL*, *cbbS* の大腸菌菌体内での発現

#### 2-1 ENI-11 株の *cbbL*, *cbbS* 発現用プラスミドの作製

pCB01 に含まれる *Bam*HI 3.4kb DNA 断片に *cbbL* と *cbbS* と考えられる2つの ORF が見いだされた。そこでこれらが CbbL, CbbS をコードする遺伝子であるかどうか確かめるため、大腸菌菌体内でこれらの遺伝子を発現させ炭酸固定活性を調べることにした。2つの ORF を完全に含む pCB01 の *Cl*aI-*Not*I 2.1kb 断片を *Ban*III-*Not*I で切断した pBluescript II KS(+) に挿入し、pCSL1 を作成した。

#### 2-2 *E. coli* MV1184 (pCSL1) の炭酸固定活性の測定

pCSL を *E. coli* MV1184 に形質転換し、0.1mM IPTG 存在下・非存在下で 14 時間培養した。この菌体を集菌後、BEMD buffer (Bicine 50mM, EDTA 0.1mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10mM, DTT 1mM; pH7.8) で洗浄し、再び BEMD buffer に懸濁したものを 0°C で超音波破碎し、この菌体破碎液を用いて RubisCO 活性を測定した。RubisCO 活性の測定方法は矢口ら (57) の方法に従い、一定時間に取り込まれる <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の量を液体シンチレーションカウンターにより測定して求めた。RubisCO 活性は、単位時間に取り込まれた RuBP 量によって定義した。酵素反応におけるコントロールは菌体破碎液の代わりに BEMD buffer を加えたものを用いた。

IPTG 存在下で培養した *E. coli* MV1184 (pCSL) は、コントロール株 *E. coli* MV1184 (pBluescript) に対して有意な RubisCO 活性の差を示した (Table 5-2)。従ってクローニングした2つの ORF は ENI-11 株における炭酸固定に関与する *cbbL* と *cbbS* であることが示された。しかし、IPTG 非存在下では活性の上昇は見られなかった。

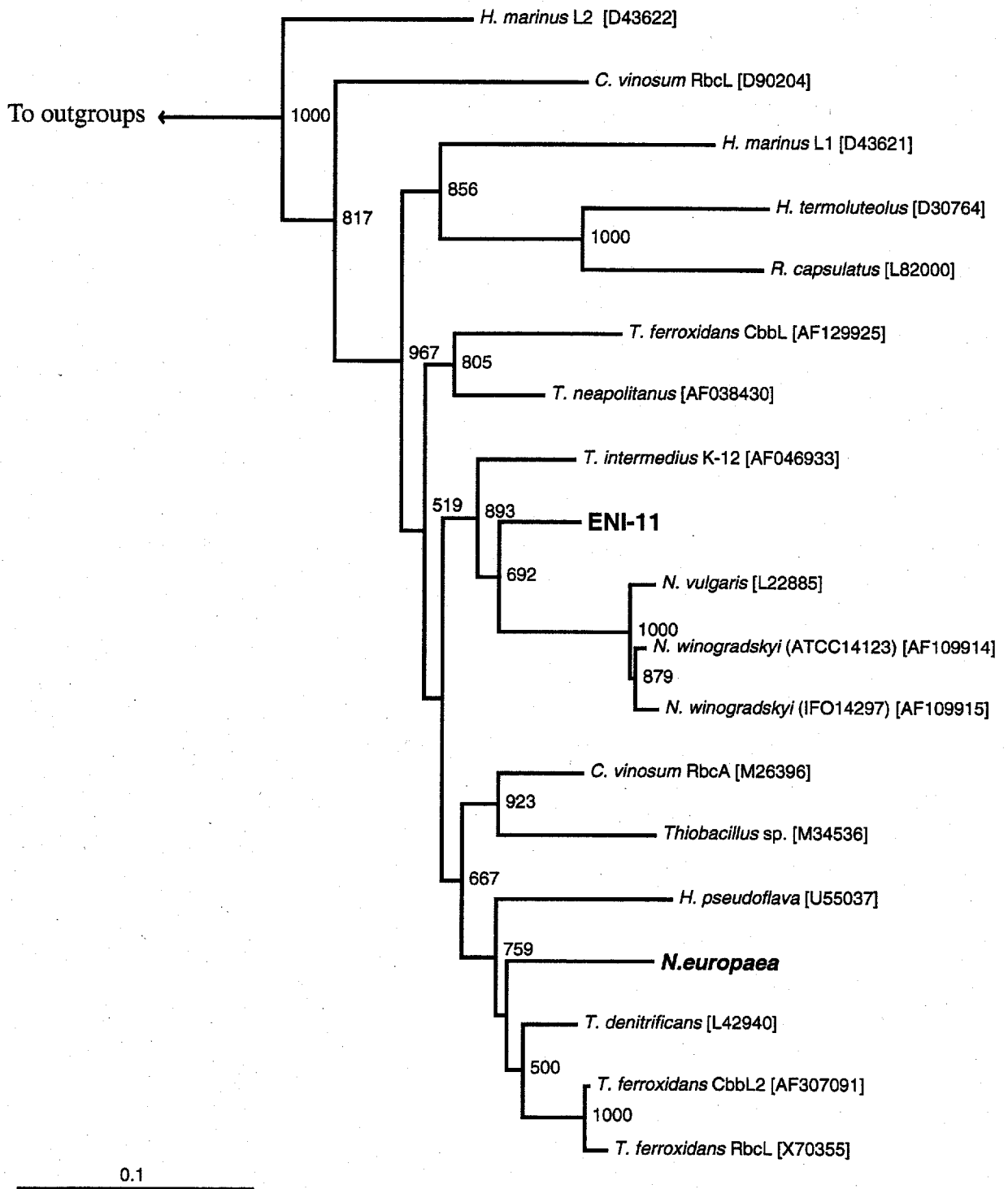


Fig. 5-3 CbbLアミノ酸配列の系統樹  
 数値はbootstrap値を示す。[カギカッコ]はGenBank accession number

Table5-2 RubisCO activities in *E. coli* strains

Strain	Specific RubisCO activity [pmol min <sup>-1</sup> mg of protein <sup>-1</sup> ]	
	-IPTG	+IPTG
<i>E. coli</i> MV1184 (pBluescriptII KS(+))	ND <sup>a</sup>	ND
<i>E. coli</i> MV1184 (pCSL)	ND	1112

<sup>a</sup>ND: not detected

### 第3節 ENI-11 株の CbbL, CbbS 遺伝子の転写解析

#### 3-1 *cbbL*, *cbbS* のノーザンハイブリダイゼーション解析

*cbbL*, *S* 遺伝子の転写機構を調べるために、ノーザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。対数増殖期後期の ENI-11 株菌体から、ISOGEN (Nippon Gene) を用いて total RNA を取得した。OD<sub>260</sub> 値によって概算した RNA 10μg を MOPS buffer による RNA 電気泳動に供した。電気泳動及びメンブレンへのトランスファー、ハイブリダイゼーションの方法は第4章 1-2 の方法に従った。*cbbL* のプローブには 1-3 で用いた PCR 断片 400bp を、*cbbS* のプローブには pCB01 の *Pst*I-*Not*I 断片約 300bp (Fig. 5-2) を用いた。ハイブリダイゼーションの結果、*cbbL*, *cbbS* のどちらをプローブとしても、2.1kb の同じ位置に強いシグナルが検出された(Fig. 5-4)。

#### 3-2 *cbbL* の primer extension

*cbbL* の転写開始点は CBPX1 プライマーを用いた Primer extension analysis によって決定した。対数期後期の ENI-11 株菌体を 12,000rpm x 5min, 4°C で集菌し、ISOGEN kit (Nippon Gene Co.) を用いて total RNA を抽出した。転写開始点は *cbbL* の開始コドンより-1~24 の配列に相補的なプライマーの 5'末端を Cy5 ラベルした Oligonucleotide 5'-GGCCTGATAGGTTTTGCTTGCCATG (CBPX1) (Fig. 5-5B) を用いて Primer extension 反応を行った (40)。逆転写産物の検出には ALFred DNA sequencer を用いた方法 (11,32) に従った。ALFred DNA sequencer によって検出された大きなピークは2つあり (Fig. 5-5A)、それぞれのピークの Retention time から転写開始点を決定した。

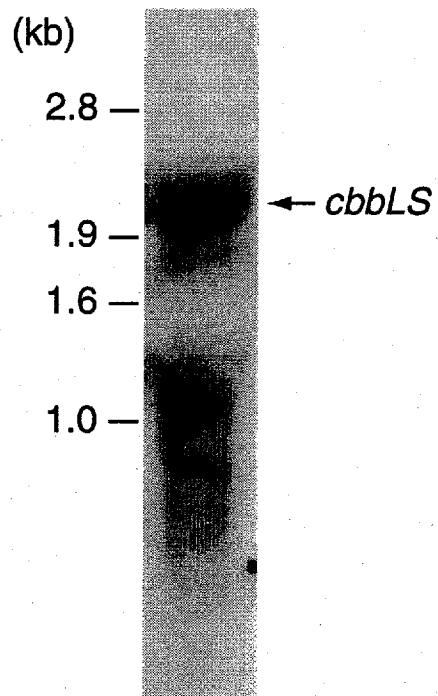
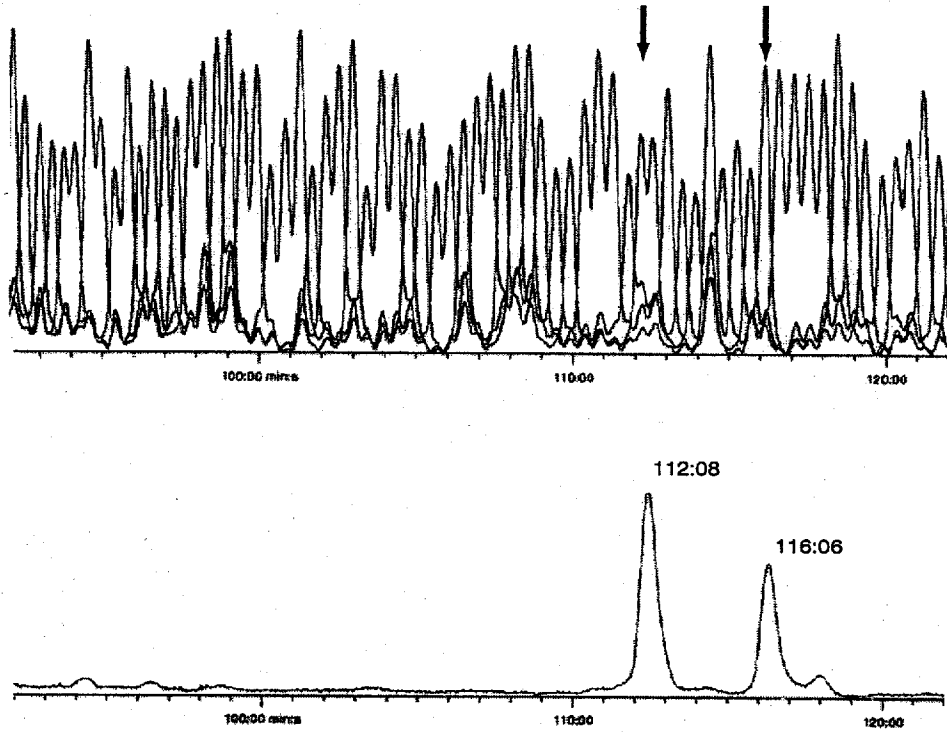


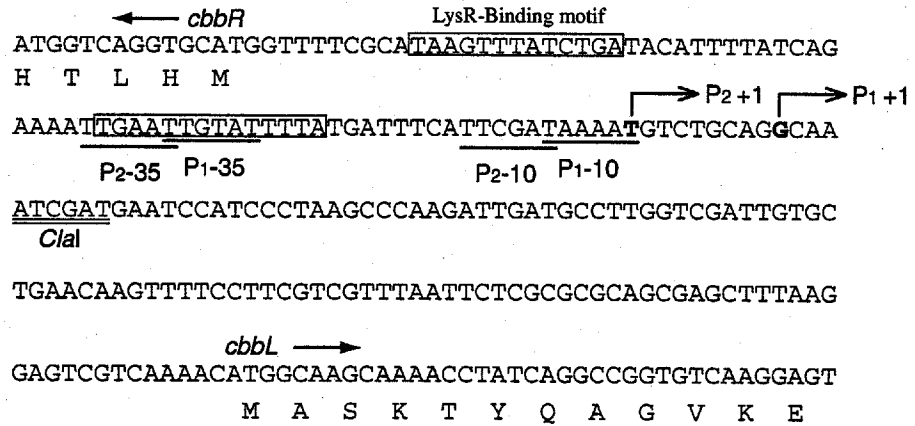
Fig. 5-4 *cbbL*, *cbbS*のノーザンハイブリダイゼーション



A



B



C

	-35	Gap (bp)	-10
<i>E. coli</i> $\sigma 70$	<b>TTGACA</b>	-17-	<b>TATAAT</b>
Promoter 1	<b>TTGAAT</b>	-17-	<b>TTCGAT</b>
Promoter 2	<b>TTGTAT</b>	-17-	<b>TAAAAT</b>

Fig. 5-5 *cbbL*の転写開始点の決定

- (A) ALFred DNA sequencerによる逆転写産物の検出
- (B) *cbbL*プロモーター領域のDNA塩基配列と*cbbL*の転写開始点
- (C) *cbbL*プロモーターと大腸菌の $\sigma 70$ プロモーター配列

他の逆転写産物によるピークは検出されなかった。*cbbL* の転写開始点は *cbbL* と *cbbR* の間の領域にあり、*cbbL* 開始コドンより上流 117bp の G(P1) と、上流 126bp の T(P2)であることが示唆された。これら 2 つの転写開始点は他の位置に設計したプライマーを用いた実験によっても確認された。予想されるプロモーター配列は P1; TTGTAT -17bp- TAAAAT, P2; TTGAAT -17bp- TTCGAT で、どちらも大腸菌の  $\sigma 70$  consensus sequence と類似していた。さらにこのプロモーター領域には、CbbR の結合領域とされている 2 つの連続した TNA-N<sub>7</sub>-TNA の配列 (45) が確認された (Fig. 5-5B, C)。

#### 第 4 節 考察

ここでは *Nitrosomonas* sp. ENI-11 から Form I の RubisCO をコードする *cbbL*, *cbbS* 遺伝子を単離し、その解析を行った。これはアンモニア酸化細菌において初めて単離された炭酸固定系に関する遺伝子であった。*cbbL*, *cbbS* はそれぞれ 483 塩基と 109 塩基のアミノ酸をコードしており、その下流には Carboxysome polypeptide をコードする *csoS2* の配列が存在した。Carboxysome は多数の RubisCO 分子が顆粒状に包まれたアンモニア酸化細菌のオルガネラとして菌体内に多数存在し、*N. europaea* においても観察されている。*cbbL* S 遺伝子の上流には逆向きの転写方向に *cbbR* と相同性のある ORF が見出された。CbbR は LysR タイプの *cbb* 遺伝子のレギュレーターであり、Carboxysome を持つ通性独立栄養細菌にはほとんど存在する (45)。しかし偏性独立栄養細菌である *Nitrosomonas* 属細菌で *cbbR* がどのような役割を果たしているかは明らかにされておらず、興味を持たれる。

ENI-11 の *cbbL*, S を含む DNA 断片を *lac* system で誘導可能なベクターにクローニングし、このプラスミドを持つ *E. coli* MV1184 菌体で RubisCO 活性を確認した。このことからクローニングした 2 つの ORF は ENI-11 株の *cbbL* と *cbbS* であると結論づけられた。しかし、ENI-11 株の RubisCO 活性は、他に知られているバクテリアのものよりもやや低く、*Nitrosomonas* は炭酸固定を RubisCO によってのみ行うと考えられただけに、意外な結果であった。しかし、これは大腸菌による遺伝子の発現を通して活性を調べているため、発現系に問題があったという可能性も考えられる。また、酵素反応の至適条件にも検討の余地があったと思われる。

Primer extension の結果から二つのプロモーター領域が予想された。これらのプロモーター配

列は大腸菌の  $\sigma 70$  プロモーターのコンセンサス配列と類似していた (Fig. 5-5C)。この二つのプロモーターの役割は不明であるが、検出されたピークの強度から、本実験の条件では Promoter1 の方がメインのプロモーターとして使われていると考えられる。大腸菌による *cbbL,S* の発現実験において、*E. coli* MV1184 (pCSL) は 0.1mM IPTG 存在下では活性を示したが、非存在下では活性を示さなかった。pCSL1 にクローニングされた DNA 断片は、このふたつのプロモーター領域を含んでいなかったため、大腸菌による発現では IPTG による誘導を行わなければ活性が検出できるほど十分な転写が行われなかったと思われる。また、CbbL, S の転写は CbbR によって活性化されるといことが知られている (9)。*cbbL* プロモーター領域には LysR タイプの転写活性化因子の結合領域に共通の LysR-motif TNA-N<sub>7</sub>-TNA 配列(45)がみられることから、ENI-11 の *cbb* 遺伝子も CbbR によってコントロールされている可能性がある。従って CbbR による転写の活性化がなかったことも、原因のひとつとして考えられる。

ENI-11 株と *N. europaea* は 16S rDNA の相同性が 98%以上であることから非常に近縁の種であることがわかる。アンモニア酸化経路の二つの鍵酵素 AMO, HAO をコードする遺伝子についても両菌は 95%以上の相同性を示し (15) その近傍に存在する遺伝子の構成も非常に類似している。これは両者が近縁であることと、アンモニア酸化系が唯一のエネルギー獲得系であることを考えると理解できることである。しかし大変興味深いことに、予想される CbbLS アミノ酸の配列は、近縁種である *Nitrosomonas europaea* よりも、*Nitrobacter* や *Thiobacillus* 属のバクテリアに高い相同性を示した。また、CbbL のアミノ酸配列をもとに作製した系統樹においても、やや離れた位置に branching した (Fig. 5-5)。これに似た例として *Rhodobacter sphaeroides* は *Rhodobacter capsulatus* に近縁でありながら、Form I の RubisCO の系統的距離が非常に遠い。これは、進化時期の後期に水平伝播により獲得されたものであるといわれている (36)。従って、ENI-11 と *N. europaea* の RubisCO 遺伝子も水平伝播によって獲得された可能性が高いと考えられる。つまり非常に近縁なアンモニア酸化細菌でも RubisCO に多様性があるということが考えられる。

本章では、アンモニア酸化細菌の炭酸固定系において極めて重要な、炭酸固定酵素遺伝子のクローニングとその解析を行った。アンモニア酸化細菌において炭酸固定系の遺伝子は、これまで知られておらず、今後の研究において重要な情報となりうる。また、近縁であると思われる *Nitrosomonas* 属の細菌において、炭酸固定系の遺伝子には多様性が見られることを発見し、アンモニア酸化細菌の進化、炭酸固定系の獲得に関して新たな知見をもたらしたといえる。今後、炭

酸固定系の機能解析や調節機構の解明とともに、エネルギー代謝系との関連を調べる研究が行われるであろう。そしてこれらによって、アンモニア酸化細菌の生理・生体面での理解が深まることが求められる。

## 第六章

### 総括

*Nitrosomonas* 属を中心とする絶対独立栄養性のアンモニア酸化細菌は、好氣的なアンモニアの酸化を行い、地球化学的な物質循環に大きく貢献する。生態系における重要性もさることながら、現在ではアンモニア酸化細菌の生育特性を生かした廃水処理や、ハロゲン化合物の除去など多方面への応用が試みられている。つまりアンモニア酸化細菌の研究における究極的な目標のひとつは、アンモニア酸化細菌を理解することであり、そしてこれらの特長を生かした環境浄化への応用にあるといえよう。しかし、アンモニア酸化細菌の研究はその培養が隘路であり、現在の分子生物学の盛期にあっても、その生理的・分子生物学的な知識はともに非常に乏しい。そのため、この研究分野ではアンモニア酸化細菌の基礎的な知識の拡充が求められる。我々はこの問題点に対し、分子生物学的なアプローチによって取り組み、*Nitrosomonas* sp. ENI-11 株における分子生物学の基礎的知見の集約や、解析ツールの開発に取り組んできた。本博士論文では、そのなかで明らかとなった、ENI-11 株のアンモニア酸化系遺伝子の重複という際立った分子的特徴に着目し、その機能と意味を明らかにするために研究を行った。またこれに伴い、ゲノムやエネルギー代謝に関する遺伝子の機能解析や分子レベルでの情報の取得も行った。

アンモニア酸化細菌における遺伝子重複の意味と各遺伝子の機能を調べるために、第二章では *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株のゲノムマップを作製し、これらの遺伝子の染色体上における構成を調べ、それぞれの遺伝子を区別する物理的な解析を行った。これはアンモニア酸化細菌のゲノムに関するはじめての知見となった。ENI-11 株の環状の染色体 2830kb の PmD 断片 487kb 中に 2 コピーの *amo* (*amo*<sub>1</sub>, *amo*<sub>2</sub>) と 3 コピーの *hao* (*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>3</sub>) は集中しており、さらに *amo*<sub>1</sub>-*hao*<sub>1</sub>, *amo*<sub>2</sub>-*hao*<sub>2</sub> は近接して存在していることが明らかとなった(Fig. 2-11)。

第三章では *hao* を区別してサブクローニングし、その構造・機能を調べた。3 つの *hao* の DNA 塩基配列はほとんど同じであり、*amo* に関しては完全に同一であった。従って、その機能にもほとんど違いがないと考えられた。そこで *hao* の機能解析を相同組換えを用いた遺伝子破壊により行った。全ての *hao* は破壊可能であり、その増殖は野性株よりも劣

っていた。つまりこのことから、最大の増殖速度を得るためには3コピーの *hao* が必要であり、どの *hao* も生育に必須ではないが、機能している遺伝子であることがわかった。また、*hao*<sub>1</sub> と *hao*<sub>3</sub> の二重破壊株も取得できたことから、*hao*<sub>2</sub> のみでの生育も可能であることが明らかとなった。

では、このように2コピーや1コピーの *hao* でも増殖が可能であるにもかかわらず、なぜ *Nitrosomonas* は3つの *hao* を保持しているのでしょうか。遺伝子重複という現象は、高等生物においては一般的に見られる性質であるが、バクテリアにおいてはあまり多くは知られていない。重複機構の意義（役割）として考えられているのは、次のふたつである。ひとつは、新しい遺伝子の獲得のための機構である。ある遺伝子に重複があれば、その遺伝子が細胞の生存に必須の機能を持つものであったとしても、余分な遺伝子は細胞が機能するうえで必要不可欠ではなく、その生物の生存を脅かすことなく変異を受け入れられる。そのために機能的な制約が働くことなく遺伝子に変異が入ることが許され、その変異が個体に対して有利に働けば、新しい機能を持つ遺伝子として集団に固定すると考えられている(33)。こうしてひとつの遺伝子から派生したと考えられる遺伝子群は、遺伝子ファミリーまたは多重遺伝子族と呼ばれ、真核生物のグロビン遺伝子ファミリーやアルドラーゼ遺伝子ファミリーが代表的なものとして知られている。遺伝子重複のもうひとつの役割は、物質代謝に必要な遺伝子産物が一定の時期に多量に要求されるために、その遺伝子の数を増やして要求を満たすための機構である。その代表的なものとして、rRNA 遺伝子に例を見ることができる。通常細胞内で1分子の mRNA の翻訳は数個のリボソームと会合して起こるのが普通であり、1つの細胞は異なる mRNA 分子それぞれを数百~千コピー作っている。そのため rRNA は代謝が活発な細胞においては多量に要求され、真核生物からバクテリアまで染色体に数多いコピー数存在していることが知られている。

以上の2点について考えると、ENI-11 株の *hao* 遺伝子重複の役割は、後者の“遺伝子産物の要求量を満たすための遺伝子重複”である可能性が高いと推測される。もし *hao* 遺伝子の重複が、遺伝子の進化を求めるためのものであるとすれば、余剰の *hao* 遺伝子の機能的制約は解除され変異は蓄積されるはずである。しかし、*hao* は3つとも極めて高く

保存されており、進化の過程で変異を受け入れてきた痕跡がほとんど見られない。これはおそらく3つ全ての *hao* に対して機能的制約が働き続けてきた結果ではないかと思われる。*hao* の高度な保存性は、他に相同性のあるタンパク質が存在しないことにも鑑みることができる。また、アンモニアは土壌中においては制限物質であるので、*Nitrosomonas* は十分量のアンモニアを常に獲得できることはほとんどなく、むしろ飢餓的な状態にある方が多いと考えられる。そうすると、生物の死骸の分解や排泄物によって一時的に生じたアンモニアをいかに効率よく取り込み、エネルギー源として利用できるかが生存にとって重要なポイントとなる。つまりこうした一過性のアンモニアの供給に対して、*HAO* はおそらく短時間で大量に合成される必要があると考えられる。*hao* の遺伝子重複はこの理由のために必要であり、進化の過程で排除されることなく受け継がれてきたと予想される。本実験で作製した *hao* の破壊株は、あくまで *Nitrosomonas* にとって理想的な状態での培養条件において生育が可能であっただけで、環境中におけるアンモニアの獲得競争にさらされた場合は淘汰されていくのかもしれない。

第四章では *hao* の転写解析を行い、それぞれの *hao* がどのような条件において発現しているかを転写レベルで解析し、その役割を調べた。*lacZ* をレポーター遺伝子とした *hao-lacZ* 転写融合プラスミドを用いて解析を行ったところ、3つの転写レベルは全て異なっており、*hao<sub>3</sub>* の転写活性が最も強いことが明らかとなった。*hao<sub>3</sub>* はゲノム上においても *amo* あるいは他の *hao* コピーと少なくとも 87kb 以上離れて位置しており (Fig. 2-11)、この点においても *hao<sub>3</sub>* の特殊性が伺える。*hao<sub>1</sub>* と *hao<sub>2</sub>* は上流部分に 160bp の共通した配列が存在しており、この領域には stem & loop 構造や palindrome 配列などプロモーターによく見られるような構造がみられた。さらに、この領域を欠失させた *hao<sub>1</sub>-lacZ* 転写融合レポーター株はほとんど活性を示さなかったことから、おそらくこの 160bp に *hao<sub>1</sub>*、*hao<sub>2</sub>* のプロモーター領域が含まれると考えられる。しかし、*hao<sub>1</sub>* のさらに上流 (開始コドンから 550bp 以上上流) の DNA 領域を含むレポーター株は、転写量が減少するということが確認された。*hao<sub>2</sub>* に関してはこのような現象は確認されなかった。このことは、*hao<sub>1</sub>* の上流部分に負の制御に関与する配列が存在することを示唆するものである。しかしこの負の制御と考えられる



機構が、生理的にどのような役割を果たしているのかは不明である。

3つの *hao* のプロモーターを十分に含むであろうと考えられる DNA 領域を *lacZ* と転写融合させたレポーター株を使って、それぞれのプロモーターが特異的に応答するような条件をヒドロキシルアミン・亜硝酸・酸素について調べた。いずれに関しても全体的な転写量の増減は見られたものの、各 *hao* の転写量が大きく変わるという条件は探し出すことができなかった。しかしながら、菌体を一旦休止状態にして、再びアンモニアを含む培地で培養すると *hao<sub>3</sub>* の転写の立ち上がりが最も早く、休止状態からの再増殖において重要な働きを持つと考えられた。このように *hao-lacZ* 転写融合を用いた解析によって *hao* の役割に関して、ひとつの可能性が示唆された。今後さらなる解析により、*hao* の転写における役割がさらに明確になり、マルチコピーの機能を議論するうえでも有用な情報が得られることを期待したい。

第五章では、アンモニア酸化細菌の炭酸固定系に関する遺伝子の取得と解析を行った。アンモニア酸化細菌の炭酸固定系の分子生物学的解析は、未だにほとんど行われておらずこれがアンモニア酸化細菌においてはじめてクローニングされた炭酸固定酵素遺伝子であった。さらに取得した遺伝子の*E. coli*での発現を行い、その活性を確認した。*N. europaea* ゲノムプロジェクトのドラフトシーケンスから、*cbbL<sub>S</sub>* 遺伝子であると思われるシーケンスを取得し、ENI-11 株の炭酸固定遺伝子と比較したところ、驚くべき事に *CbbL* の相同性は 85.2%で *CbbS* に至ってはさらに低く 52.5%であった。ENI-11 株と *N. europaea* の 16S rRNA の相同性は互いに 99%以上であり(第二章 1 - 3)、アンモニア酸化系の遺伝子も 95%以上の相同性を示すことから、この2種のアンモニア酸化細菌は非常に近縁の種であると考えられていただけに、この結果は意外なことであった。*CbbL* の配列を元に作製した系統樹からは、ENI-11 株の *CbbL* は *Thiobacillus intermedius* K-12 株に系統が近く、*N. europaea* の *CbbL* は *Thiobacillus denitrificans* に近かった(Fig. 5-3)。これらの結果と *R. sphaeroides* と *R. capsulatus* の炭酸固定酵素の遺伝子が水平伝播により獲得された可能性が高いといわれている事実より、*Nitrosomonas* もその例に当てはまるのかもしれないが、この二株のみの比較ではなく他の様々なアンモニア酸化細菌の情報によって、この点は論議されるべきで

あろう。

これまで“*Nitrosomonas*”というバクテリアの名前は“アンモニア酸化細菌”の代名詞として使われてきたが、これは従来の微生物学的手法による培養法に *Nitrosomonas* 属のバクテリアが適しているために数多くスクリーニングされ、優先的な菌株として認識されたためであろう。しかし近年になり、この認識に疑問を投げかけるいくつかの事実が明らかにされている。例えば、Hiorns ら (14) は、土壌や活性汚泥からアンモニア酸化細菌をスクリーニングする場合、集積培養では *Nitrosomonas* が優先的に見られるが、培養を介さない PCR 法によってアンモニア酸化細菌の生息を調べると *Nitrosomonas* よりも *Nitrosospira* の方が普遍的に検出されたことを報告している。また Stefan ら (47) は、FISH によると *Nitrosococcus mobilis* と *Nitrosospira* 属のバクテリアが活性汚泥から優先的に検出されたと報告している。Holben ら (17) はアンモニア濃度・亜硝酸濃度など環境の異なる 3 つの連続した硝化リアクターの微生物叢を調べ、それぞれのリアクターにおいて支配的なアンモニア細菌集団が異なることを見だし、それぞれの環境に適したアンモニア酸化細菌が存在するという、アンモニア酸化細菌の多様性を示唆した。これらの事実は、アンモニア酸化細菌を理解するうえで、アンモニア酸化細菌の研究は *Nitrosomonas* のみにとどまらず、様々な種類のアンモニア酸化細菌で行われるべきであることを意味すると考える。しかし、未だに代表的な *Nitrosomonas europaea* についても満足な知見が得られていないのが現状であり、アンモニア酸化細菌のモデル生物として理解されるためにも、*Nitrosomonas* に関するさらなる研究の推進が求められる。その中で、*N. europaea* のゲノムプロジェクトの占める位置は極めて重要なものであり、これによってもたらされる情報には多大なる恩恵を受けるであろう。

本研究では *Nitrosomonas* sp. ENI-11 株において、分子生物学的な手法によってアンモニア酸化系を中心とした様々な新規の知見を得ることができた。現時点では培養が困難であり、生態に不明な点が多いアンモニア酸化細菌では、物質そのものに関する情報を得ることの方が、生理面での生化学的な現象を捉えることよりも比較的容易かもしれない。特に現在のめざましい発展を遂げる分子生物学的手法を用いれば、アンモニア酸化細菌につ

いての物質面での解明は格段に進歩するであろう。しかし、生理面の理解がいまでもあまり深まらないことから、物質面での解明が進めば進むほどその隔たりを大きく感じざるを得ない。

ともあれ、全ゲノム配列の解読など様々な分子生物学的情報をはじめとする情報は、アンモニア酸化細菌を理解する上で非常に有用であることには間違いなく、これによって得られた情報をもとに、物質から生理機能が解明されることが期待される。そして物質と生理面の現象、あるいはその物質の生体内での役割を結びつけて理解することが、今後のアンモニア酸化細菌の研究のひとつの大きな課題となると思われる。

## 参考文献

- 1) Arciero, D. M., C. Balny, and A. B. Hooper. 1993. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* is a multimer of an octa-heme subunit. *J. Biol. Chem.*, **268**:14645-14654.
- 2) Altschul, S. F., L. M. Thomas, A. S. Alejandro, Z. Z. Jinghui Zhang, M. Webb, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**:3389-3402.
- 3) Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**:95-113.
- 4) Chung, S. Y., T. Yaguchi., H. Nishihara, Y. Igarashi., and T. Kodama. 1993. Purification of form L<sub>2</sub> RubisCO from a marine obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. *FEMS Microbiol. Lett.*, **109**:49-54.
- 5) DOE Joint Genome Institute homepage,  
[http://www.jgi.doe.gov/JGI\\_microbial/html/nitrosomonas/nitro\\_content.html](http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/nitrosomonas/nitro_content.html)
- 6) Eaton, A. D., L. S. Clesceli, and A. E. Greenberg (ed.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater 19th ed., p. 4·83-4·84. American Public Health Association, Washington D.C.
- 7) English, R. S., S. C. Lorbach, X. Qin, J. M. Shively. 1995. Isolation and characterization of a carboxysome shell gene from *Thiobacillus neapolitanus*. *Mol. Microbiol.*, **12**:647-54.
- 8) Ensign, S. A., M. R. Hyman, and D. J. Arp. 1993. In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.*, **175**:1971-1980.
- 9) Gibson, J. L., and F. R. Tabita. 1993. Nucleotide sequence and functional analysis of CbbR, a positive regulator of the Calvin cycle operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, **175**:5778-5784.
- 10) Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**:557-580.
- 11) Happe, T., K. Schütz., and H. Böhme. 2000. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.*, **182**:1624-1631.
- 12) Hartman, F. C., and M. R. Harpel. 1994. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**:197-234

- 13) Hatayama, R., R. Takahashi, M. Ohshima, R. Shibasaki, and T. Tokuyama. 2000. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from an ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas* sp. K1: Purification and properties. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**: 426-430.
- 14) Hiorns, W. D., R. C. Hastings, I. M. Head, A. J. Carthy, J. R. Saunders, et al. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrospiras* in the environment. *Microbiol.*, **141**:2793-2800.
- 15) Hirota, R., A. Yamagata, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2000. Physical map location of the multicopy genes coding for ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, **182**:825-828.
- 16) Hoffman, T., and H. Lees. 1952. The biochemistry of the nitrifying organisms. 2. The free-energy efficiency of *Nitrosomonas*. *Biochem. J.*, **52**:140-142.
- 17) Holben, W. E., K. Noto, T. Sumino, and Y. Suwa. 1998. Molecular analysis of bacterial communities in a three-compartment granular activated sludge system indicates community-level control by incompatible nitrification processes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:2528-2532.
- 18) Hommes, N. G., L. A. Sayavedra-Soto, and D. J. Arp. 1996. Mutagenesis of hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea* by transformation and recombination. *J. Bacteriol.*, **178**:3710-3714.
- 19) Hommes, N. G., L. A. Sayavedra-Soto, and D. J. Arp. 1998. Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, **180**:3353-3359.
- 20) Hommes, N. G., L. A. Sayavedra-Soto, and D. J. Arp. 2001. Transcript analysis of multiple copies of *amo* (encoding ammonia monooxygenase) and *hao* (encoding hydroxylamine oxidoreductase) in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, **183**:1096-1100.
- 21) Hooper, A. B., and K. R. Terry. 1973. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.*, **115**: 480-485.
- 22) Hooper, A. B., and K. R. Terry. 1974. Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.*, **119**:899-906.
- 23) Igarashi, N., H. Moriyama, T. Fujikawa, Y. Fukumori, and N. Tanaka. 1997. The 2.8 Å structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Nature Struct. Biol.*, **4**:276-284.
- 24) Iizumi, T., M. Mizumoto, and K. Nakamura. 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:3656-3662.
- 25) Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops, and M. Wagner. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying

- bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:3042-3051.
- 26) Kawalchuk, G. A., and J. R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**:485-529.
- 27) Klotz, M. G., J. Alzerreca, and J. M. Norton. 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.*, **150**:65-73.
- 28) Koops, H.-P., and U. C. Möller. 1992. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In "The Prokaryotes, 2nd ed.", eds. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H., Springer, Berlin, pp. 2625-2637.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- 32) Myöhänen, S., and J. Wahlfors. 1993. Automated fluorescent primer extension. *BioTechniques*, **14**:16-17.
- 33) Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag New York Inc.
- 34) Okabe, S., H. Satoh, and Y. Watanabe. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:3182-3191.
- 35) O'Neill, J. G., and J. F. Wilkinson. 1977. Oxidation of ammonia by methane-oxidizing bacteria and the effects of ammonia on methane oxidation. *J. Gen. Microbiol.*, **100**:407-412.
- 36) Paoli, G. C., F. Soyer, J. Shively, and F. R. Tabita. 1998. *Rhodobacter capsulatus* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*cbbLS*) and neighbor genes were acquired by a horizontal gene transfer. *Microbiol.*, **144**:219-227.
- 37) Pearson, W. R., and D. J. Lipman. 1988. Imported tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:2444-2448.
- 38) Prior, S. D., and H. Dalton. 1985. Acetylene as a suicide substrate and active site probe for methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol. Lett.*, **78**:103-108.
- 39) Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H.-P. Koops, and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammoniaoxidizer based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl.*

- Environ. Microbiol.*, **66**:5368-5382.
- 40) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  - 41) Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, and D. J. Arp. 1994. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, **176**:504-510.
  - 42) Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, S. A. Russell, and D. J. Arp. 1996. Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. *Mol. Microbiol.*, **20**:541-548.
  - 43) Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, J. J. Alzerreca, D. J. Arp, J. M. Norton, M. G. Klotz. 1998. Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**:81-88.
  - 44) Schramm, A., D. De Beer, M. Wagner, and R. Amann. 1998 Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3480-3485.
  - 45) Shively, J. M., G. Keulen., and W. G. Meijer. 1998. Something from almost nothing: Carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:191-230.
  - 46) Stanier, R., A. Edward, and J. Ingraham. 1976. The Microbial World. (4th edition). Prentice-Hall Inc., U.S.A.
  - 47) Stefan, J., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops, and M. Wagner. 1998. Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:3042-3051.
  - 48) Stirling, D. I., and H. Dalton. 1977. Effect of metal-binding agents and other compounds on methane oxidation by two strains of *Methylococcus capsulatus*. *Arch. Microbiol.*, **114**:71-76.
  - 49) Strous, M., J. A. Fuerst, E. H. M. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. T. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J. G. Koonen, and M. S. M. Jetten. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, **400**: 446-449.
  - 50) Tabita, F. R., and B. A. McFadden. 1974. D-Ribulose 1,5-diphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum*. I. Levels, purification, and effect of metallic ions. *J. Biol. Chem.*, **249**: 3453-3458.
  - 51) Tabita, F. R. 1995. The biochemistry and molecular regulation of carbon metabolism and CO<sub>2</sub> fixation in purple bacteria. In "Anoxygenic photosynthetic bacteria", eds. Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., Kluwer, Dordrecht, pp. 885-914.
  - 52) Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

- 53) Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **153**:3-11.
- 54) Woese, C. R., J. B. Weisburg, B. J. Paster, C. M. Hahn, R. S. Tanner, N. R. Krieg, H.-P. Koops, H. Harms, and E. Stackebrandt. 1984. The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.*, **5**:323-336.
- 55) Woese, C. R., W. G. Weisburg, C. M. Hahn, B. J. Paster, L. B. Zablen, B. J. Lewis, T. J. Macke, W. Ludwig, and E. Stackebrandt. 1985. The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**:25-33.
- 56) Wood, P. M. 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In "Nitrification. Society for General Microbiology", ed. Prosser, J. L., IRL Press, Oxford, pp. 39-62.
- 57) Yaguchi, T., S. Y. Chung, Y. Igarashi, and T. Kodama, T., Purification of RubisCO from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain a-1. 1992. *J. Ferment. Bioeng.*, **73**:348-351 (1992).
- 58) Yamagata, A., J. Kato, R. Hirota, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 1999. Isolation and characterization of two cryptic plasmids in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, **181**:3375-3381.
- 59) 山縣彰、広島大学博士学位論文、2000.



## 謝辞

本学位論文は細胞分子機能学研究室の先生方、スタッフ、研究室所属の学生の皆様並びに関係者の方々の協力があって作成することができました。

論文の作成や研究の遂行にあたり数々の貴重な御助言を賜り、また一人前の研究者となるべく教育をしていただいた大竹久夫教授に深く感謝いたします。数々の実験や論文作成、ディスカッションなど常に懇切に御指導していただきました加藤純一教授に深く感謝いたします。

黒田章夫助教授には、実験や研究の進め方について御指導していただき、また先生ご自身の研究にも大変刺激を受け、励まされました。池田宰助教授には、私の研究について異なる視点から数々の御助言をいただき、研究に深みを持たせることができました。また、研究以外の様々な面からも私をサポートしていただきました。滝口昇助手には、実験や論文の作成について指導していただき、またコンピューターの扱いやトラブル解決に大変お世話になりました。先生方に深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、適切かつ丁寧なご指導・御助言をいただいた、木梨陽康教授、西尾尚道教授に深く感謝いたします。

日夜研究を共にし、互いに励まし合った田中正太郎氏、李宣沃氏、研究室のメンバーの皆様に深く感謝いたします。

最後に、私の研究は両親の理解と経済面での援助なしには為しえることはできませんでした。今日までの長きにわたって、あらゆる面から私を支えてくれた家族に心から感謝します。

平成14年3月 廣田 隆一

## 公表論文

- (1) Ryuichi Hirota, Akira Yamagata, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Physical map location of the multicopy genes coding for ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, 182: 825-828, 2000.
- (2) Ryuichi Hirota, Akira Yamagata, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Molecular analysis of the nitrification genes in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. Proceeding of *ISEB2000* Kyoto, Japan, p67-70, 2001.
- (3) Ryuichi Hirota, Junichi Kato, Hiromu Morita, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Isolation and characterization of *cbbL* and *cbbS* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large and small subunits in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press).

## Physical Map Location of the Multicopy Genes Coding for Ammonia Monooxygenase and Hydroxylamine Oxidoreductase in the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas* sp. Strain ENI-11

RYUICHI HIROTA, AKIRA YAMAGATA, JUNICHI KATO, AKIO KURODA, TSUKASA IKEDA, NOBORU TAKIGUCHI, AND HISAO OHTAKE\*

Department of Fermentation Technology, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan

Received 27 August 1999/Accepted 3 November 1999

Pulsed-field gel electrophoresis of *PmeI* digests of the *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 chromosome produced four bands ranging from 1,200 to 480 kb in size. Southern hybridizations suggested that a 487-kb *PmeI* fragment contained two copies of the *amoCAB* genes, coding for ammonia monooxygenase (designated *amoCAB*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>2</sub>), and three copies of the *hao* gene, coding for hydroxylamine oxidoreductase (*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub>). In this DNA fragment, *amoCAB*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>2</sub> were about 390 kb apart, while *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub> were separated by at least about 100 kb from each other. Interestingly, *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> were located relatively close to *amoCAB*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>2</sub>, respectively. DNA sequence analysis revealed that *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> shared 160 identical nucleotides immediately upstream of each translation initiation codon. However, *hao*<sub>3</sub> showed only 30% nucleotide identity in the 160-bp corresponding region.

The ammonia-oxidizing autotrophic bacteria derive their carbon for growth from CO<sub>2</sub> and their energy for metabolism by the oxidation of ammonia (NH<sub>3</sub>) to nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) in the process of nitrification (3, 12, 17). In *Nitrosomonas europaea*, ammonia is initially oxidized to hydroxylamine by the integral membrane enzyme ammonia monooxygenase (AMO) (7, 8, 11), and the subsequent oxidation of hydroxylamine to nitrite is catalyzed by the multiheme hydroxylamine oxidoreductase (HAO) (2, 5, 15). One unusual genetic feature of *N. europaea* is that at least five of the nitrification genes are present in more than one copy in the genome. For example, the genes encoding AMO (*amoC*, *amoA*, and *amoB*) are adjacent to each other and are present in two copies (1, 6, 8). The genes encoding HAO (*hao*) and the genes encoding cytochrome *c*-554 (*cycA*), which are in proximity to the HAO genes, are found in three copies (2, 10). However, the locations of these multicopy genes in the genome of *N. europaea* have not yet been determined. In the present study, we determined the locations of two copies of the AMO-encoding genes (designated *amoCAB*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>2</sub>) and three copies of the HAO-encoding gene (*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub>) in the genome of *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11, which was isolated from an activated sludge system designed for nitrogen removal.

**PFGE and probe characterization.** *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11, which was obtained from the Process and Production Technology Center, Sumitomo Chemical Co., Ehime, Japan, was grown aerobically at 28°C in modified Alexander medium (18). The genomic DNA from strain ENI-11 was digested with the rare-cutting endonucleases *PmeI*, *XbaI*, and *AscI* and subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Fig. 1A). PFGE was performed in the contour-clamped homogeneous electric field mode with the Chromosome DNA Electrophoresis System (Biocraft, Tokyo, Japan) (4, 13, 16). The *PmeI* fragments of the ENI-11 genome were separated in a 1% agarose gel in 0.5× Tris-borate-EDTA buffer (14) at 5 V/cm

with pulses of 60 to 120 s for 45.5 h. The *AscI* and *XbaI* digests were separated in 1% agarose at 6 V/cm with pulses of 15 s for 20 h. For DNA fragments in the size range up to 600 kb, the concatemers of lambda DNA (FMC) were used as molecular size standards. For fragments ranging from 600 kb to 2 Mb, chromosomes isolated from *Saccharomyces cerevisiae* (FMC) were used as molecular size markers. PFGE of the *PmeI* digests of the ENI-11 chromosome produced four bands ranging from 1,200 to 480 kb. PFGE of the *XbaI* and *AscI* digests of the ENI-11 genomic DNA produced at least 31 and 22 fragments ranging from 430 to 10 kb, respectively. Obviously, the DNA bands formed by either *XbaI* or *AscI* digests contained unresolved bands under the PFGE conditions used in these experiments.

Southern hybridizations to the ENI-11 genomic DNA digested with *PmeI*, *XbaI*, and *AscI* were performed with the *amoB* and *hao* probes (Fig. 1B and C). The *amoB* probe was amplified by PCR with primers A3 (5'-TATGTACTGCAGG CAGAAGTTGCGCTTG) and A4 (5'-CGAATTCGACAGG CTAATTGATGCTTCG) from the ENI-11 genome. PCR was performed with respective sets of oligonucleotide primers and a Takara Z *Taq* DNA polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) on a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer). The 2.3-kb PCR product was digested with *Bam*HI and *Sph*I, and the resulting 0.3-kb fragment was labeled by a nonisotopic method (fluorescein DNA labeling and detection kit; Amersham). Similarly, the *hao* probe was prepared from a 2.2-kb PCR product which was amplified with primers H3 (5'-CTCTAGAAATAT GGCAAATACGGCACAAGC) and H4 (5'-CTCTAGATAA CGATACGGCGCTGTGTC) from the ENI-11 genome. The *amoB* probe hybridized to only a single fragment, designated PmD, in the *PmeI* digests and to two fragments in the *XbaI* and *AscI* digests. The *hao* probe also hybridized to the PmD fragment in the *PmeI* digests, while it hybridized to two and three fragments in the *XbaI* and *AscI* digests, respectively. These results suggest that the genes coding for AMO and HAO are present in at least two and three copies in the ENI-11 genome, respectively, as also seen in *N. europaea* (11, 15). More importantly, the PmD fragment, which is 487 kb in size, contains all

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Fermentation Technology, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan. Phone: 81-824-24-7756. Fax: 81-824-22-3758. E-mail: hohtake@ipc.hiroshima-u.ac.jp.

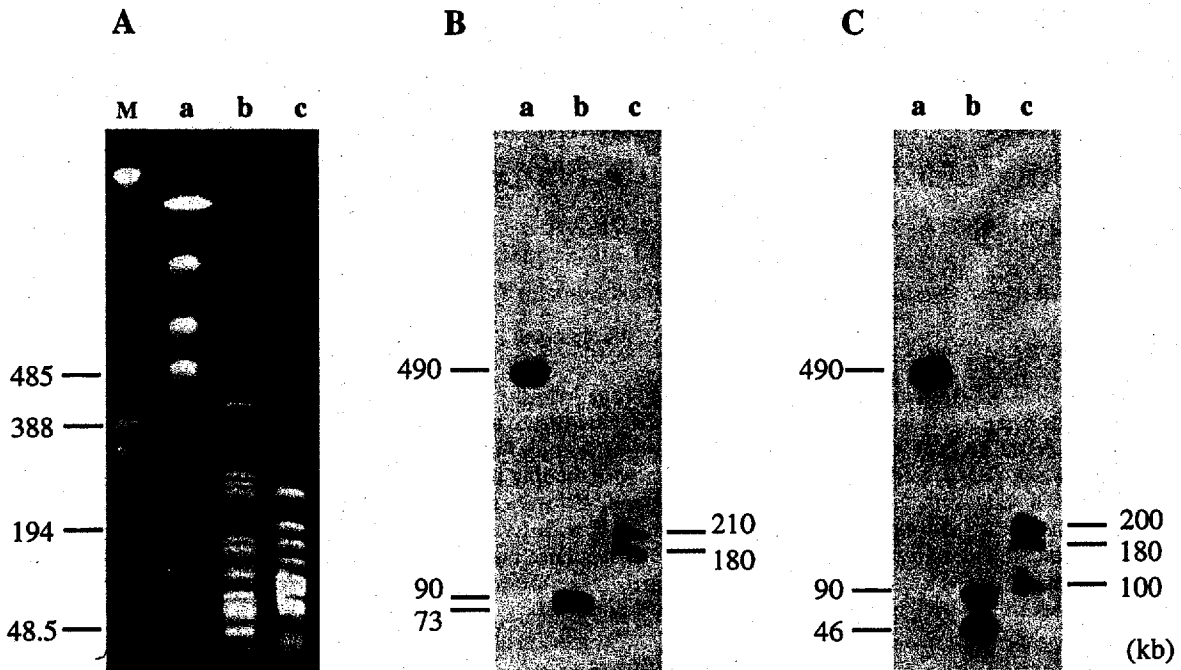


FIG. 1. PFGE of *PmeI*, *XbaI*, and *AscI* digests of *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 genomic DNA (A) and Southern hybridization analysis of the digested genomic DNA with the *amoB* (B) and *hao* (C) probes. Lanes: a, *PmeI* digestion; b, *XbaI* digestion; c, *AscI* digestion. The size markers (lane M in panel A) are the concatemers of lambda DNA (FMC).

of the multiple copies of *amoCAB* and *hao* in the ENI-11 genome.

**Locations of the *amo* and *hao* genes.** To precisely locate the multiple copies of *amoCAB* and *hao*, we first constructed an *AscI* and *XbaI* map of PmD (Fig. 2). In the PmD fragment, there existed 5 and 10 restriction sites for *AscI* and *XbaI*, respectively (Fig. 2). Southern hybridizations to the *AscI* digests of PmD were performed with the *amoB* and *hao* probes. The *amoB* probe hybridized to two *AscI* subfragments, AsA

(142 kb) and AsC (96 kb), while the *hao* probe hybridized to three subfragments, AsA, AsB (100 kb), and AsC (data not shown). These results confirmed the presence of the genes for AMO and HAO in multiple copies in the PmD fragment.

We then constructed two mutants, designated NH1 and NH2, by inserting a kanamycin resistance (*Kan<sup>r</sup>*) gene cassette into wild-type *hao*. First, the *EcoRI-PmeI-NotI* polylinker (5'-GAATTCGACAATTCGTTTAAACTCGCGGCCGC-3') was inserted into the *HincII* site of pUC119 to make pPM9. The

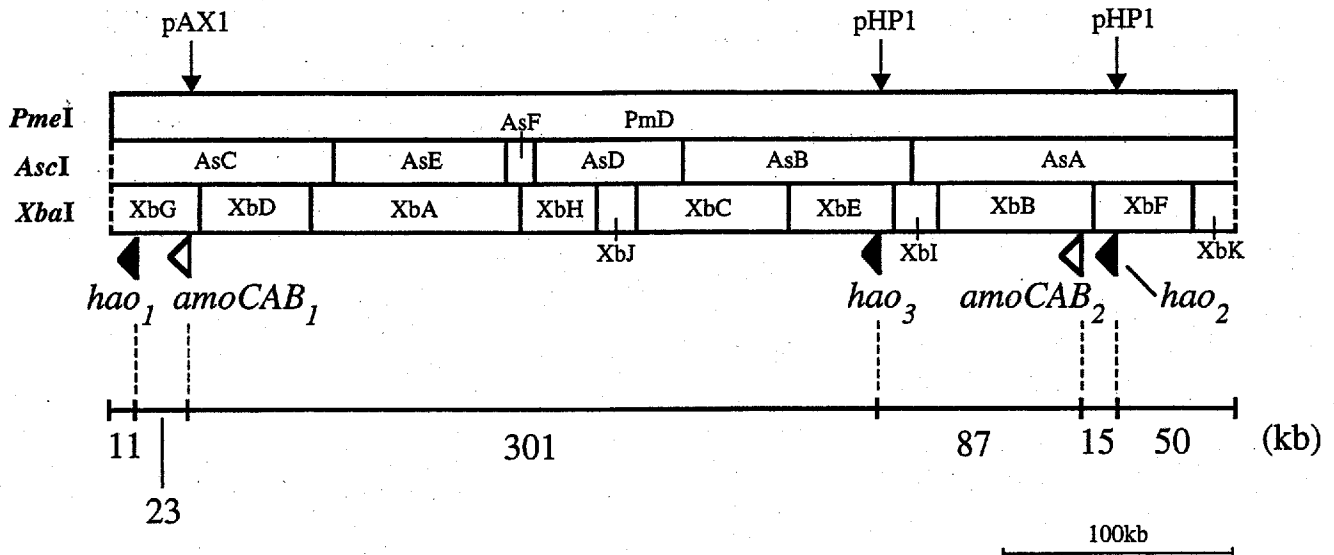


FIG. 2. *AscI* and *XbaI* restriction map of the PmD fragment from the ENI-11 genome. The locations and directions of the multiple copies of *amoCAB* and *hao* are shown by white and black arrowheads, respectively. Plasmids pHP1 and pAX1 were used for constructing additional *PmeI* sites in the PmD fragment. The locations of the pHP1 and pAX1 insertions are indicated by arrows.

2.2-kb PCR fragment, which was used for constructing the *hao* probe, was digested with *Xba*I and *Kpn*I and ligated to *Xba*I- and *Kpn*I-cut pPM9. The resulting plasmid was then digested with *Hind*III and ligated to *Hind*III-cut pCRII (Kan<sup>r</sup>) to make pHP1. pHP1, which carries *hao*, a *Pme*I site, and a Kan<sup>r</sup> marker, was introduced into ENI-11 cells by electroporation. Southern blot analysis revealed that NH1 and NH2 had the pHP1 insertion (5.9 kb) in AsA and AsB, respectively (data not shown). Since pHP1 contained a *Pme*I site, the PmD fragment from each mutant was split into two new subfragments upon *Pme*I cleavage. By the *Pme*I cleavage, the PmD fragment of NH1 was split into subfragments of 443 and 50 kb, while that of NH2 was cut into subfragments of 341 and 152 kb. This result, together with the fact that pHP1 was inserted into either AsA or AsB, indicated that two of three copies of *hao*, designated *hao*<sub>2</sub> and *hao*<sub>3</sub>, were located about 50 and 152 kb from the right end of PmD (Fig. 2). The remaining copy of *hao* in AsC was designated *hao*<sub>1</sub>.

Similarly, another mutant, designated NA1, was constructed by inserting a Kan<sup>r</sup> gene cassette into wild-type *amoB*. The 2.3-kb PCR fragment, which was used for constructing the *amoB* probe, was digested with *Bam*HI and *Eco*RI and subcloned into pPM9. The resulting plasmid was fused with pCRII to make pAX1. pAX1, which carries *amoB*, a *Pme*I site, and a Kan<sup>r</sup> marker, was also introduced into ENI-11 cells by electroporation. Southern blot analysis revealed that NA1 had the pAX1 insertion (5.1 kb) in AsC (data not shown). By the *Pme*I cleavage, the PmD fragment of NA1 was split into subfragments of 457 and 34 kb. Thus, one of two copies of *amoCAB*, designated *amoCAB*<sub>1</sub>, was located about 34 kb from the left end of PmD (Fig. 2). The remaining copy of *amoCAB* in AsA was designated *amoCAB*<sub>2</sub>.

The sizes of the regions flanked by *amoCAB*<sub>1</sub> and *hao*<sub>1</sub>, and by *amoCAB*<sub>2</sub> and *hao*<sub>2</sub> were determined by using the long-PCR technique. PCR primers A1 (5'-GGTTCATTCAGGTCTC TGCAAATTGGCC) and H1 (5'-CGGCAAATTCTCTTAA GTGACAGGTTCCGC) were used for amplifying the DNA fragment between *amoCAB*<sub>1</sub> and *hao*<sub>1</sub>, while A2 (5'-CCGAA TGCGGTAACATCATTGCGATGTACG) and H2 (5'-AGG ATCGATTGGTACTCTGTTGACAGGAGC) were used for the amplification of the DNA region between *amoCAB*<sub>2</sub> and *hao*<sub>2</sub>. PCR with primers A1 and H1 amplified a 23-kb product, indicating that *hao*<sub>1</sub> is about 23 kb from *amoCAB*<sub>1</sub>. Likewise, PCR with primers A2 and H2 amplified a 15-kb product, indicating that *amoCAB*<sub>2</sub> is about 15 kb from *hao*<sub>2</sub>. Interestingly, as shown in Fig. 2, *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> were located relatively close to *amoCAB*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>2</sub>, respectively. Only *hao*<sub>3</sub> was at least 75 kb from the duplicated *amoCAB*. The direction of each copy of *amoCAB* and *hao* was suggested by determining the DNA sequences of both ends of the PCR products as well as that of the *hao*<sub>3</sub> region of AsB (Fig. 2).

**Characterization of the *hao* regions.** Localization of the three copies of *hao* allowed us to determine the copy-specific DNA sequences. Nucleotide sequences were determined by the dideoxy chain termination method using an Auto Cycle kit (Pharmacia) and an ALFred DNA sequencer (Pharmacia). The three copies of *hao* differed from each other by only 1 or 2 bp in the 1,713-bp sequence (data not shown). Compared with the nucleotide sequence of *hao*<sub>2</sub>, *hao*<sub>1</sub> had C instead of T at position 521 and *hao*<sub>3</sub> had C instead of T at position 290 and A instead of G at position 445. In addition, the *cycA* gene, encoding cytochrome *c*-554, and the *cycB* gene, encoding the integral membrane tetraheme cytochrome (1), were also present in three and two copies, respectively (data not shown). Each copy of *cycA* and *cycB* existed downstream of *hao*<sub>2</sub> and *hao*<sub>3</sub>, while *hao*<sub>1</sub> was followed by only *cycA*. The nucleotide sequence

of *hao*<sub>3</sub> was identical to the *hao* sequence determined by Sayavedra-Soto et al. (15).

We expected that the intergenic regions between *amoCAB* and *hao* might contain additional genes required for ammonia oxidation in this organism. Thus, we partially determined the DNA sequences in these intergenic regions by using the long-PCR technique (data not shown). In the 15-kb DNA region between *amoCAB*<sub>2</sub> and *hao*<sub>2</sub>, we found genes which were predicted to encode threonine-tRNA ligase (*thrS*), initiation factor 3 (*infC*), ribosomal protein L20 (*rplT*), the phenylalanyl-tRNA synthetase  $\alpha$ -subunit (*pheS*), and the phenylalanyl-tRNA synthetase  $\alpha$ -subunit (*pheT*). Concerning the 23-kb region between *amoCAB*<sub>1</sub> and *hao*<sub>1</sub>, the *rpoB* and *rpoC* genes, encoding the  $\beta$ -subunit and  $\beta'$ -subunit of RNA polymerase, were found to exist closely upstream of *hao*<sub>1</sub>. However, we could not find any genes that are required for ammonia oxidation in the partial DNA sequencing.

Analysis of the upstream region of each copy of *hao* revealed that the three copies of *hao* shared 15 identical nucleotides immediately upstream of each translation initiation codon. A candidate Shine-Dalgarno sequence, GGAGG, was located in this conserved region (7 bp upstream of each start codon). Furthermore, *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> had a perfect match in the 160 bp of DNA sequence immediately upstream of each translation initiation codon. However, *hao*<sub>3</sub> showed only 30% nucleotide identity in the 160-bp corresponding region. The 350 bp of DNA sequence immediately upstream of the *hao*<sub>3</sub> start codon was identical to that reported previously for *N. europaea hao* (15). A short open reading frame, of 261 bp, was also detected 30 bp upstream of the *hao*<sub>3</sub> start codon. The 261-bp open reading frame encoded a possible polypeptide which had 43% amino acid identity with *E. coli* ribosomal protein S20 (9). Conversely, a number of stop codons were present in the 160-bp DNA sequence conserved between *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub>, and no significant structural features or homologies were detected in this region. These results suggest that *hao*<sub>3</sub>, which was located apart from the duplicated *amoCAB*, may also differ from *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> with respect to transcriptional regulation.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The *hao* region sequences reported here have been deposited in the GSDDB, DDBJ, EMBL and NCBI nucleotide sequence databases under accession numbers AB030385, AB030386, and AB030387.

#### REFERENCES

- Bergmann, D. J., and A. B. Hooper. 1994. Sequence of the gene, *amoB*, for the 43-kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:759-762.
- Bergmann, D. J., D. M. Arciero, and A. B. Hooper. 1994. Organization of the *hao* gene cluster of *Nitrosomonas europaea*: genes for two tetraheme *c* cytochromes. *J. Bacteriol.* 176:3148-3153.
- Bock, E., H.-P. Kooops, B. Ahlers, and H. Harms. 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source, p. 414-430. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Chu, G., D. Vollrath, and R. W. Davis. 1986. Separation of large DNA molecules by contour clamped homogeneous electric fields. *Science* 234:1582-1585.
- Hommel, N. G., L. A. Sayavedra-Soto, and D. J. Arp. 1996. Mutagenesis of hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea* by transformation and recombination. *J. Bacteriol.* 178:3710-3714.
- Hommel, N. G., L. A. Sayavedra-Soto, and D. J. Arp. 1998. Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 180:3353-3359.
- Hyman, M. R., and P. M. Wood. 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* 227:719-725.
- Klots, M. G., J. Alzerreca, and J. M. Norton. 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* 150:65-73.
- Mackie, G. A. 1981. Nucleotide sequence of the gene for ribosomal protein S20 and its flanking regions. *J. Biol. Chem.* 256:8177-8182.
- 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.
11. 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.
  12. Olson, T. C., and A. B. Hooper. 1983. Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: an extracytoplasmic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 19:47-50.
  13. Röming, U., G. Dietmar, B. Wilfred, and T. Burkhard. 1989. A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *EMBO J.* 8:4081-4089.
  14. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  15. Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, and D. J. Arp. 1994. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 176:504-510.
  16. Schwartz, D. C., and C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75.
  17. 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.
  18. Wood, P. M. 1986. Nitrification as a bacterial energy source, p. 39-62. In J. I. Prosser (ed.), *Nitrification*. Society for General Microbiology and IRL Press, Oxford, England.
  19. Yamagata, A., J. Kato, R. Hirota, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 1999. Isolation and characterization of two cryptic plasmids in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.* 181:3375-3381.

## Molecular Analysis of the Nitrification Genes in *Nitrosomonas* sp. Strain ENI-11

Ryuichi Hirota, Akira Yamagata, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi,  
and Hisao Ohtake

Dept. of Molecular Biotechnology, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8527, Japan

### ABSTRACT

The ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 has three copies of the *hao* gene coding for hydroxylamine oxidoreductase (HAO) and two copies of the *amoCAB* genes encoding ammonia monooxygenase (AMO) on its genome. We constructed the physical map of the ENI-11 genome using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Southern hybridization. The size of the genome was estimated to be 2.83Mb. Southern blot analysis revealed that all copies of *amoCAB* and *hao* were located in a 487-kb of *PmeI* fragment. Sequence analysis revealed that the three copies of *hao* (*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub>) differed from each other by only one or two nucleotides. Fifteen-bp DNA sequences immediately upstream of translational start codon of each *hao* were identical. Furthermore, *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> shared 145bp identical nucleotides upstream of this conserved region. Three single mutants (*hao*<sub>1</sub>::*kan*, *hao*<sub>2</sub>::*kan*, and *hao*<sub>3</sub>::*kan*), and one double mutant (*hao*<sub>1</sub>::*kan hao*<sub>3</sub>::*amp*) were constructed by gene replacement technique. These *hao* mutants exhibited 68 to 75% of the wild-type growth rate, suggesting that none of the three copies of *hao* are essential to ENI-11 cells. In addition, one intact copy of *hao* (*hao*<sub>2</sub>) is likely sufficient to support cell growth.

### INTRODUCTION

The chemolithotroph ammonia-oxidizing bacteria are confined to the gram-negative  $\beta$  and  $\lambda$  subdivisions of the class proteobacteria (1). They obtain all their energy from the oxidation of ammonia to nitrite (2). Ammonia is oxidized to hydroxylamine by the ammonia monooxygenase (AMO), and subsequently hydroxylamine is oxidized to nitrite by the hydroxylamine oxidoreductase (HAO) (3,4). One unusual genetic feature of ammonia-oxidizing bacteria is that the nitrification genes, *amoCAB* and *hao*, are present in more than one copy in their genome (5). However, the reasons why they have multiple copies of *amoCAB* and *hao* remain unclear.

The ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11, which was isolated from activated sludge, also has two copies of *amoCAB* (*amoCAB*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>2</sub>) and three copies of *hao* (*hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub>) on its genome (7). In this study, we first constructed the physical map of the ENI-11 genome and localized all of the *amoCAB* and *hao* genes on the genome to facilitate genetical analysis of ammonia-oxidizing bacterium. Then we determined the DNA sequences upstream of each *hao* and constructed single and double *hao* mutants to investigate the specific functions of each copy of *hao*.

### MATERIAL AND METHODS

*Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 was obtained from the Process and Production Technology Center, Sumitomo Chemical Co., Ehime, Japan. ENI-11 was grown aerobically at 28°C in modified Alexander

(MA) medium (5). Genomic and plasmid DNA preparations, Southern hybridizations, and DNA restriction digestions were carried out as described previously (8). ENI-11 cells were transformed by electroporation. Kanamycin resistant ( $Km^r$ ) transformants were selected on MA solid medium supplemented with kanamycin ( $25\mu\text{g/ml}$ ). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed in the counter-clamped homogeneous electric field mode (CHEF) with the Chromosome DNA Electrophoresis System (Biocraft Co., Japan). The concatemers of lambda DNA (FMC) and chromosomes isolated from *Saccharomyces cerevisiae* (FMC) were used as standard size markers. PCR was performed as described previously (7). Nucleotide sequences were determined by dideoxy chain-termination method using an Auto Cycle Kit (Pharmacia) and an ALFred DNA sequencer (Pharmacia).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Construction of the physical map of the *Nitrosomonas* sp. ENI-11 genome

The genomic DNA of ENI-11 was digested with the rare-cutting endonuclease *PmeI*. PFGE of the *PmeI* digests of the ENI-11 chromosome produced four fragments, termed PmA (1193 kb), PmB (600 kb), PmC (550 kb), and PmD (487 kb). *PmeI* restriction map of the ENI-11 chromosome was established by partial digestion of the ENI-11 genome with *PmeI*, followed by PFGE (Fig. 1A). These results showed that ENI-11 had a relatively small circular genome of 2.83Mb. We also performed PFGE of the *PmeI* digests of *N. europaea* IFO 14298 and estimated the size of the IFO 14298 genome as 1.48Mb. Southern blot analysis showed that all copies of *amoCAB* and *hao* were contained in PmD fragments.

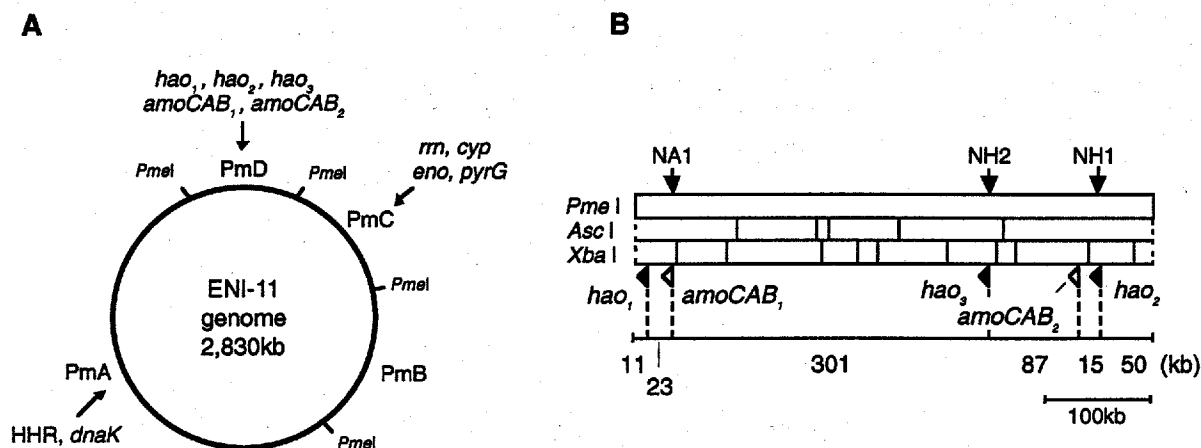


Fig. 1 Physical map of the *Nitrosomonas* sp. ENI-11 chromosome (A), and *AscI* and *XbaI* restriction map of the PmD fragment (B). Locations and directions of the multiple copies of *amoCAB* and *hao* are shown by white and black arrowheads, respectively. Locations of pHP1 and pAX1 insertions in NH1, NH2, and NA1 are indicated by vertical arrows.



The loci of *rrn* (9), *cyp* (10), *eno*, *pyrG* (11), *dnaK* (12) and HHR (6) were also localized on the EN11 genome by Southern hybridization. This is the first genome map of the ammonia-oxidizing bacterium.

#### Localization of multiple copy genes *amoCAB* and *hao*

In order to locate two copies of *amoCAB* and three copies of *hao*, we constructed the *AscI* and *XbaI* physical map of the PmD fragment (Fig. 1B). We then constructed three mutants (NH1, NH2, and NA1) by integrating either pHP1 (carrying *hao* and a *PmeI* site) or pAX1 (carrying *amoB* and a *PmeI* site) into the wild-type genes. PFGE and Southern blot analysis revealed that two copies of *hao* (*hao*<sub>2</sub> and *hao*<sub>3</sub>) were located about 50 and 152 kb from the right end of PmD, respectively. One copy of *amo* (*amoCAB*<sub>1</sub>) was localized 34 kb apart from the left end of PmD (Fig. 1B). The locations of *amoCAB*<sub>2</sub> and *hao*<sub>1</sub> were determined by long PCR technique. Sequence analysis of long PCR products suggested that *hao*<sub>1</sub> was about 23 kb apart from *amoCAB*<sub>1</sub>, while *amoCAB*<sub>2</sub> was about 15 kb apart from *hao*<sub>2</sub>. Interestingly, each copy of *amoCAB* were located relatively close to one copy of *hao*. Only *hao*<sub>3</sub> was at least 75 kb apart from the two copies of *amoCAB*. We expected that the intergenic regions between *amoCAB* and *hao* might contain additional genes required for ammonia oxidation in this organism. In the 15-kb DNA region between *amoCAB*<sub>2</sub> and *hao*<sub>2</sub>, we found the presence of the genes which were predicted to encode threonine-tRNA ligase, initiation factor 3, ribosomal protein L20, and phenylalanyl-tRNA synthetase. The genes encoding ribosomal proteins S12, S7, L1, L7, L10, L11, elongation factor, and RNA polymerase  $\beta$  and  $\beta'$  subunits were likely to exist in the 23-kb intergenic region between *hao*<sub>1</sub> and *amoCAB*<sub>1</sub>. Thus, it seems unlikely additional genes involved in ammonia oxidation are present in these DNA regions.

#### Characterization of *amoCAB* and *hao* genes

Localization of two copies of *amoCAB* and three copies of *hao* allowed us to determine the copy specific DNA sequences. Nucleotide sequence of two copies of *amoCAB* was identical, whereas three copies of *hao* differed from each other by only one or two bp in the 1713-bp sequence. DNA sequence analysis of the upstream region of each copy of *hao* revealed that they shared 15 identical nucleotides

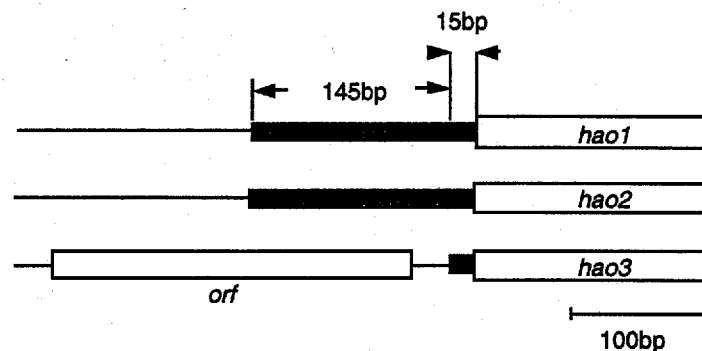


Fig.2. The upstream regions of *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub>. The 15-bp conserved sequence immediately upstream of each *hao* is shown black. The 145-bp identical sequence between *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> is shadowed.

immediately upstream of each translational initiation codon. Furthermore, *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> shared a 145-bp identical sequence immediately upstream of the 15-bp conserved region. A short open reading frame (ORF) of 261bp was found 30 bp upstream of the *hao*<sub>3</sub> start codon (Fig.2). This ORF likely encoded a possible polypeptide which had 43% amino acid identity with the *E.coli* ribosomal protein S20. These results suggested that *hao*<sub>3</sub> may differ from *hao*<sub>1</sub> and *hao*<sub>2</sub> with respect to transcriptional regulation. We are currently investigating the transcription of each copy of *hao* by using the transcriptional fusion genes between fragments of *hao* and the promoterless *lacZ*.

#### *Mutational analysis of hao*

Each copy of *hao* was individually disrupted by inserting a kanamycin resistant gene cassette (kan) into the wild-type gene. The resulting *hao*<sub>1</sub>, *hao*<sub>2</sub>, and *hao*<sub>3</sub> mutants were designated as H1, H2, and H3, respectively. To investigate whether ENI-11 can grow with only one copy of *hao*, a double mutant, designated H13, was also constructed by inserting an ampicillin resistant gene cassette (amp) into the *hao*<sub>3</sub> gene of H1. All of these mutants grew slower than did the wild-type strain (data not shown). The specific growth rates of these mutants at the logarithmic phase of growth were approximately 70-80% of that of the wild-type strain. However, the final cell densities of these mutants were comparable to that of the wild-type strain. These results demonstrate that no single copy of *hao* is essential to ENI-11 cells. In addition, one intact copy of *hao* (*hao*<sub>2</sub>) was likely sufficient to support growth when other two copies were disrupted.

#### REFERENCES

1. Worce, C. R., et al. Syst. Appl. Microbiol. 6, 25-33, 1985
2. Olson, T. C. & A. B. Hooper. FEMS Microbiol. Lett. 19, 47-50, 1983
3. Mctavish, H., et al. J. Biotechnol. 175, 2445-2447, 1993
4. Sayavedra-Soto, L. A., et al. J. Bacteriol. 176, 504-510, 1994
5. Klots, M. G., et al. FEMS Microbiol. Lett. 150, 65-73, 1997
6. Yamagata, A., et al. J. Bacteriol. 181, 3375-3381, 1999
7. Hirota, R., et al. J. Bacteriol. 182, 825-828, 2000
8. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
9. Head, L.M., et al. J. Gen. Microbiol. 139, 1147-1153, 1993
10. Bergmann, D.J., et al. FEBS Lett. 353, 324-326, 1994
11. Mahony, T.J & Miller, D.J. FEMS Microbiol. Lett. 165, 153-157, 1998
12. Iizumi, T. & Nakamura, K. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1777-1784, 1997
13. Hommes, N.G., et al. J. Bacteriol. 178, 3710-3714, 1996

Running title: cbbL and cbbS Genes in Nitrosomonas SP. ENI-11

Isolation and Characterization of cbbL and cbbS Genes Encoding  
Form I Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large and Small  
Subunits in Nitrosomonas sp. Strain ENI-11

Ryuichi HIROTA, Junichi KATO, Hiromu MORITA, Akio KURODA, Tsukasa IKEDA,  
Noboru TAKIGUCHI, and Hisao OHTAKE

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of  
Matter, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan

Received July 30, 2001; Accepted November 7, 2001

To whom correspondence should be addressed. Junichi KATO,  
Tel: +81-824-24-7757; Fax: +81-824-24-7047;  
E-mail: jun@hiroshima-u.ac.jp

Abbreviations: RubisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; cbbS, gene coding for RubisCO small subunit; cbbL, gene coding for RubisCO large subunit; PCR, polymerase chain reaction; ORF(s), open reading frame(s); IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

The cbbL and cbbS genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (RubisCO) large and small subunits in the ammonia-oxidizing bacterium Nitrosomonas sp. strain ENI-11 were cloned and sequenced. The deduced gene products, CbbL and CbbS, had 93 and 87% identity with Thiobacillus intermedius CbbL and Nitrobacter winogradskyi CbbS, respectively. Expression of cbbL and cbbS in Escherichia coli led to the detection of RubisCO activity in the presence of 0.1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). To our knowledge, this is the first paper to report the genes involved in the carbon fixation reaction in chemolithotrophic ammonia-oxidizing bacteria.

Key words: Nitrosomonas; nitrification; CO<sub>2</sub> fixation; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

The ammonia-oxidizing autotrophic bacteria derive their carbon for growth from CO<sub>2</sub> and their energy for metabolism by the oxidation of ammonia to nitrite in the process of nitrification.<sup>1)</sup> They use the Calvin-Benson-Bassham (CBB) reductive pentose phosphate pathway to assimilate CO<sub>2</sub>.<sup>2,4)</sup> Three enzymatic activities are unique to the Calvin cycle: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO), phosphoribulokinase, and sedoheptulose biphosphatase.<sup>3)</sup> The remainder of the cycle is driven by a series of enzymes that are generally present in both autotrophs and heterotrophs. The CBB enzyme responsible for the actual fixation of CO<sub>2</sub> is RubisCO.<sup>5-7)</sup> There are two distinct forms of RubisCO, form I and form II, in prokaryotic autotrophs. The form I RubisCO is a large hexadecameric enzyme (L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>) composed of eight large subunits (50-55 kDa) and eight small subunits (12-18 kDa), while form II has only large subunits (L<sub>x</sub>).<sup>8,9)</sup> Little is known about the genes involved in the CBB pathway in the chemolithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In this study, we cloned and sequenced the cbbL and cbbS genes encoding form I RubisCO large and small subunits of the ammonia-oxidizing bacterium Nitrosomonas sp. strain ENI-11.<sup>10,11)</sup>

Nitrosomonas sp. strain ENI-11 was grown aerobically at 28°C in modified Alexander medium.<sup>11)</sup> To clone the cbbL gene, a degenerate oligonucleotide primers were designed on the basis of the bacterial cbbL gene sequences available from GenBank. The alignment of cbbL nucleotide sequences was done by using the CLUSTAL W program.<sup>12)</sup> The forward primer CBP1 (5'-ACNTGGACNACNGTNTGGACNGAY) and the reverse primer CBP2 (5'-RTTYTCRTRTCYTTNGTRAARTC) targeted the stretches corresponding to positions 58-65 and 190-198 of the amino acid sequence of Rhodobacter capsulatus CbbL,<sup>13)</sup> respectively. PCR was done with the oligonucleotide primers and an ExTaq DNA polymerase (Takara Shuzo Co. Ltd., Shiga, Japan) on a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer). The PCR cycle included denaturation for 30 s at 94°C, primer annealing for 30 s at 55°C, and extension for 1 min at 72°C (30 cycles). Standard

procedures were used for DNA manipulation, Southern hybridization, and Northern hybridization.<sup>14)</sup>

PCR generated a 0.4-kb DNA fragment when genomic DNA of Nitrosomonas sp. strain ENI-11 was used as a template (data not shown). The nucleotide sequence of the 0.4-kb PCR product showed 83% similarity to the Thiobacillus denitrificans cbbL gene.<sup>15)</sup> Consequently, this PCR product was used as a DNA probe for Southern hybridization. Total genomic DNA from Nitrosomonas sp. strain ENI-11 was digested with various restriction enzymes and electrophoresed on a 1.0% agarose gel. The probe strongly hybridized to a 3.4-kb BamHI fragment. A size-fractionated library of BamHI fragments of Nitrosomonas sp. strain ENI-11 genomic DNA (3.0 to 4.0 kb in size) was created with a pMW119 vector (Nippon Gene Co., Toyama, Japan) and Epicurian Coli SURE (Stratagene). Plasmid DNAs, isolated from recombinant colonies, were screened with the 0.4-kb PCR product as a probe. One positive plasmid, designated as pCB01, was obtained.

Restriction endonuclease analysis showed that pCB01 contained a 3.4-kb BamHI fragment of the Nitrosomonas sp. strain ENI-11 chromosomal DNA. Nucleotide sequence analysis showed that the 3.4-kb BamHI fragment contained part of two open reading frames (ORFs) (cbbR and csoS2) and two whole ORFs (cbbL and cbbS) (Fig. 1). The predicted product of cbbL had 93% amino acid identity with Thiobacillus intermedius K12 CbbL (GenBank accession number AF046933), while that of cbbS showed 87% identity with Nitrobacter winogradskyi CbbS (GenBank accession number AF109914), respectively. A 401-bp truncated cbbR was located 200 bp upstream of cbbL. The truncated cbbR showed 62% nucleotide sequence identity with the 5'-portion of Chromatium vinosum rbcR<sup>16)</sup> which encodes a LysR-type transcriptional regulator.<sup>17)</sup> The cbbR gene was divergently transcribed from cbbL. The 5'-portion of csoS2 was also located 77 bp downstream of cbbS. The truncated csoS2 showed 70% nucleotide sequence identity with the 5'-portion of T. intermedius K12 csoS2 (GenBank accession number AF046933) which encodes a carboxysome

polypeptide.

To investigate expression of cbbL and cbbS in Escherichia coli, a 2.1-kb ClaI-NotI fragment, which contained the entire cbbL and cbbS, was excised from pCB01 and ligated to ClaI- and NotI-digested pBluescript II KS(+) (Stratagene). The resulting plasmid, designated pCLS1, was introduced into E. coli MV1184 by transformation. The E. coli transformants were grown at 37°C with shaking for 10 h in 2x YT<sup>14)</sup> with or without 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were harvested by centrifugation, washed twice with BEMD buffer (50 mM N,N-bis (2-hydroxyethyl) glycine (Bicine), 0.1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 1 mM dithiothreitol [pH7.8]), and disrupted by sonication at 0°C. The crude extract was used for enzyme assays. RubisCO activity was assessed by the method described previously.<sup>18)</sup> One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which catalyzed the fixation of 1 pmol of CO<sub>2</sub> per min at 37°C. RubisCO activity was 1112 units per mg protein in E. coli MV1184(pCLS1) grown in the presence of 0.1 mM IPTG and undetectable in the same strain grown in the absence of IPTG. The control strain E. coli MV1184 (pBluescript II KS(+)) showed no significant RubisCO, regardless of the presence or absence of IPTG.

The 2.1-kb ClaI-NotI fragment of pCLS1 contained the 113-bp upstream region of cbbL (Fig. 1). To find whether the indigenous cbbL promoter exists in this region, we did a primer extension analysis of RNA from Nitrosomonas sp. strain ENI-11. The synthetic fluorescence-labeled oligonucleotide CBBL1(5'-Cy5-GGCCTGATAGGTTTTGCTTGCCATG-3') was used as a primer and the product of primer extension experiments was analyzed by the method described previously.<sup>19,20)</sup> Thus, two transcriptional initiation sites of cbbL were found 117 and 126 bp upstream of cbbL, respectively (Fig. 2). E. coli σ<sup>70</sup>-like promoter sequences were found 125 to 158 bp upstream from the translation initiation codon of cbbL (Fig. 2B). It has been shown that CbbR activates transcription of both cbbL and cbbS in Rhodobacter sphaeroides.<sup>21)</sup> A potential CbbR binding motif, TNA-N<sub>7,8</sub>-TNA,<sup>3)</sup> was also found

immediately upstream of the transcription initiation sites of *cbbL* of *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. RubisCO activity was detected with *E. coli* MV1184 (pCLS1) only when it was grown in the presence of 0.1 mM IPTG. This result is likely due to the lack of the *cbbL* promoters in the 2.1-kb *ClaI-NotI* fragment of pCLS1. Northern hybridization was done with RNA from *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 by using the 0.4-kb PCR product as a probe. Only a 2.1-kb transcript was observed (Fig. 3). The results of the Northern hybridization and primer extension experiment led us to conclude that *cbbL* and *cbbS* form an operon.

The amino acid sequence of *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 CbbL was compared with those reported previously with other bacteria. The putative amino acid sequences of *Nitrosomonas europaea* CbbL and CbbS were also obtained from JGI Microbial Sequencing Homepage ([http://spider.jgi-psf.org/JGI\\_microbial/html/nitrosomonas\\_homepage.html](http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/nitrosomonas_homepage.html)). The ENI-11 CbbL protein was closely related to those from *T. intermedius* K12 (93% identity) in the  $\beta$  subclass of the *Proteobacteria* and *Nitrobacter winogradskyi* (91% identity) in the  $\alpha$  subclass of the *Proteobacteria*. However, the ENI-11 CbbL was less related to the putative *N. europaea* CbbL protein (85% identity). This was unexpected because their close relationship had been shown based on 16S rRNA and the genes involved in nitrification.<sup>10, 22)</sup> The putative *N. europaea* CbbL protein was closely related to *Hydrogenophaga pseudoflava* CbbL<sup>23)</sup> and *Chromatium vinosum* RbcA.<sup>24)</sup> The difference in the amino acid sequence of CbbS was more striking between the two *Nitrosomonas* species (53% identity). In addition, the gene organization of the ENI-11 *cbbLS* region was more similar to that of *Thiobacillus ferrooxidans* (GenBank accession number AF129925) in the  $\gamma$  subclass of the *Proteobacteria* than that of *N. europaea* (data not shown). All known chemolithotrophic ammonia-oxidizing bacteria are obligate chemoautotrophs, which are completely dependent on CO<sub>2</sub> fixation.<sup>25)</sup> Since they obtain all of their energy for growth from the oxidation of ammonia to nitrite, it is not surprising that the genes involved in the ammonia



oxidation are highly conserved between Nitrosomonas sp. strain ENI-11 and N. europaea. RubisCO, the key enzyme of the CBB cycle, is also essential for their growth, however, the amino acid sequences of CbbL and CbbS are less conserved. Taken together, it seems possible that ENI-11 and N. europaea cbb genes were acquired from different ancestral organisms via horizontal gene transfer.

### References

- 1) Wood, P. M., Nitrification as a bacterial energy source. In "Nitrification. Society for General Microbiology", ed. Prosser, J. L., IRL Press, Oxford, pp. 39-62 (1986).
- 2) Hatayama, R., Takahashi, R., Ohshima, M., Shibasaki, R., and Tokuyama, T., Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from an ammonia-oxidizing bacterium, Nitrosomonas sp. K1: Purification and properties. J. Biosci. Bioeng., 90, 426-430 (2000).
- 3) Shively, J. M., Keulen, G., and Meijer, W. G., Something from almost nothing: Carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. Annu. Rev. Microbiol., 52, 191-230 (1998).
- 4) Tabita, F. R., Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. Microbiol. Rev., 52, 155-189 (1988).
- 5) Hartman, F. C. and Harpel, M. R., Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Annu. Rev. Biochem., 63, 197-234 (1994).
- 6) Tabita, F. R., The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria. In "The molecular biology of cyanobacteria", ed. Bryant, D. A., Kluwer, Dordrecht, pp. 437-467(1994).
- 7) Tabita, F. R., The biochemistry and molecular regulation of carbon metabolism and CO<sub>2</sub> fixation in purple bacteria. In "Anoxygenic photosynthetic bacteria", eds. Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., Kluwer, Dordrecht, pp. 885-914(1995).

- 8) Chung, S. Y., Yaguchi, T., Nishihara, H., Igarashi, Y., and Kodama, T., Purification of form L<sub>2</sub> RubisCO from a marine obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, Hydrogenovibrio marinus strain MH-110. FEMS Microbiol. Lett., 109, 49-54 (1993).
- 9) Tabita F. R. and McFadden, B. A., D-Ribulose 1,5-diphosphate carboxylase from Rhodospirillum rubrum. I. Levels, purification, and effect of metallic ions. J. Biol. Chem., 249, 3453-3458 (1974).
- 10) Hirota, R., Yamagata, A., Kato, J., Akio, K., Ikeda, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H., Physical map location of the multicopy genes coding for ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase in the ammonia-oxidizing bacterium Nitrosomonas sp. strain ENI-11. J. Bacteriol., 182, 825-828 (2000).
- 11) Yamagata, A., Kato, J., Hirota, R., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H., Isolation and characterization of two cryptic plasmids in the ammonia-oxidizing bacterium Nitrosomonas sp. strain ENI-11. J. Bacteriol., 181, 3375-3381 (1999).
- 12) Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680 (1994).
- 13) Paoli, G. C., Soyer, F., Shively, J., and Tabita, F. R., Rhodobacter capsulatus genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (cbbLS) and neighbouring genes were acquired by a horizontal gene transfer. Microbiol., 144, 219-227 (1997).
- 14) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).
- 15) Hernandez, J.M., Baker, S. H., Lorbach, S. C., Shively, J. M., and Tabita, F. R., Deduced amino acid sequence, functional expression, and unique enzymatic

- properties of the form I and form II ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from the chemoautotrophic bacterium Thiobacillus denitrificans. J. Bacteriol., 178, 347-356 (1996).
- 16) Viale, A. M., Kobayashi, H., Akazawa, T., and Henikoff, S., rcbR, a gene coding for a member of the LysR family of transcriptional regulators, is located upstream of the expressed set of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in the photosynthetic bacterium Chromatium vinosum. J. Bacteriol., 173, 5224-5229 (1991).
  - 17) Schell, M. A., Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol., 47, 597-626 (1993).
  - 18) Yaguchi, T., Chung, S. Y., Igarashi, Y., and Kodama, T., Purification of RubisCO from thermophilic cyanobacterium Synechococcus sp. strain a-1. J. Ferment. Bioeng., 73, 348-351 (1992).
  - 19) Myöhänen, S. and Wahlfors, J., Automated fluorescent primer extension. BioTechniques, 14, 16-17 (1993).
  - 20) Happe, T., Schütz, K., and Böhme, H., Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium Anabaena variabilis ATCC 29413. J. Bacteriol., 182, 1624-1631 (2000).
  - 21) Gibson, J. L. and Tabita, F. R., Nucleotide sequence and functional analysis of CbbR, a positive regulator of the Calvin cycle operons of Rhodobacter sphaeroides. J. Bacteriol., 175, 5778-5784 (1993).
  - 22) McTavish, H., Fuchs, J. A., and Hooper, A. B., Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in Nitrosomonas europaea. J. Bacteriol., 175, 2436-2444 (1993).
  - 23) Lee, S. N. and Kim, Y. M., Cloning and characterization of ribulose biphosphate carboxylase gene of a carboxydobacterium, Hydrogenophaga pseudoflava DSM1084. Mol. Cells., 8, 524-529 (1998).
  - 24) Viale, A. M., Kobayashi, H., and Akazawa, T., Expressed genes for plant-type

ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the photosynthetic bacterium Chromatium vinosum, which possesses two complete sets of the genes. J. Bacteriol., 171, 2391-2400 (1989).

- 25) Koops, H.-P. and Möller, U. C., The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In "The Prokaryotes, 2nd ed.", eds. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H., Springer, Berlin, pp. 2625-2637(1992).

## Legends of Figures

**Fig. 1.** Restriction Map of pCB01 Containing the 3.4-kb BamHI Fragment from the Nitrosomonas sp. Strain ENI-11 Chromosomal DNA and the Subclone of pCLS1.

Thick arrows indicate the ORFs and the direction of transcription. The approximate location and orientation of primers CBP1 and CBP2 are indicated by thin arrows. The hybridization probe is shown by a horizontal bar. Abbreviations for restriction sites: B, BamHI; C, ClaI; E, EcoRI; HII, HincII; N, NotI; S, SalI; P, PstI. The nucleotide sequence of the Nitrosomonas sp. strain ENI-11 cbbLS region reported here has been deposited in GSDB, DDBJ, EMBL, and NCBL nucleotide sequence databases under accession number AB061373.

**Fig. 2.** Primer Extension Analysis (A) and Nucleotide Sequence of the cbbLS Promoter Region (B).

(A) The upper panel shows the electropherogram of the upstream region of cbbL. The DNA sequencing reaction was done by using the fluorescence-labeled oligonucleotide CBBL1 and pCB1. The lower panel shows the electropherogram of primer extension products obtained with RNA isolated from Nitrosomonas sp. strain ENI-11 as the template and the oligonucleotide CBBL1 as the primer. The retention times of the major extension products are shown. (B) Transcriptional initiation sites of cbbL are shown in boldface. The cbbLS promoter regions (-35 and -10) are underlined. The putative CbbR binding sites (TNA-N7,8-TNA)<sup>3</sup> are boxed. The location of the ClaI restriction site used for construction of pCLS1 is double underlined.

**Fig. 3.** Northern Blot Analysis of RNA Isolated from Nitrosomonas sp. Strain ENI-11.

The blot was hybridized with the DNA probe specific for cbbL. The locations of the RNA size marker are indicated on the left.

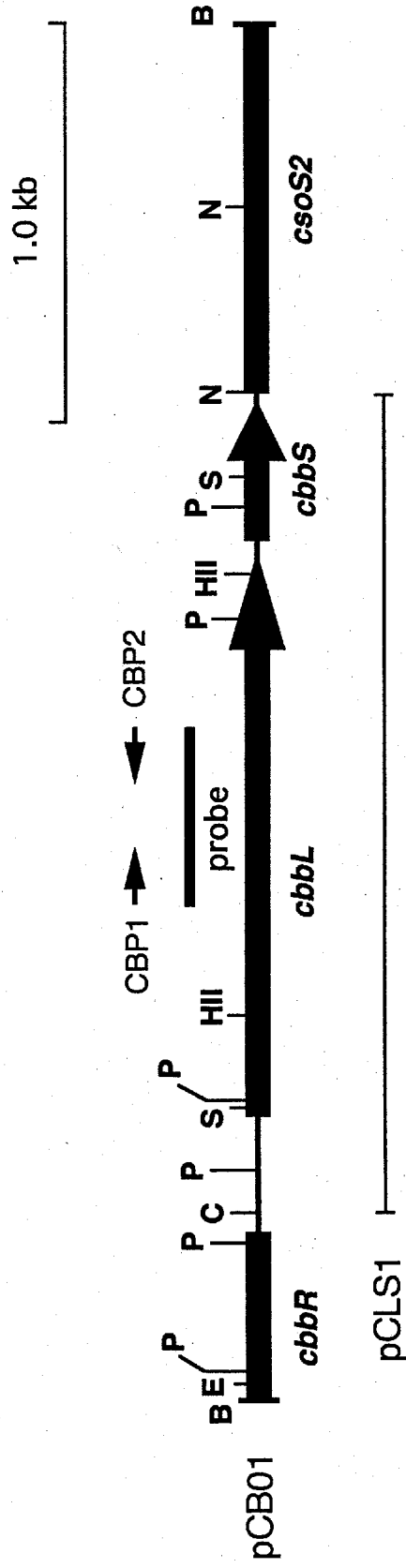
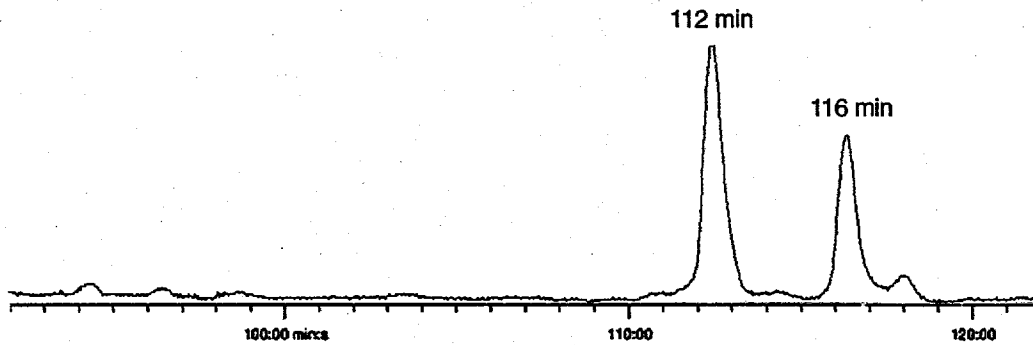
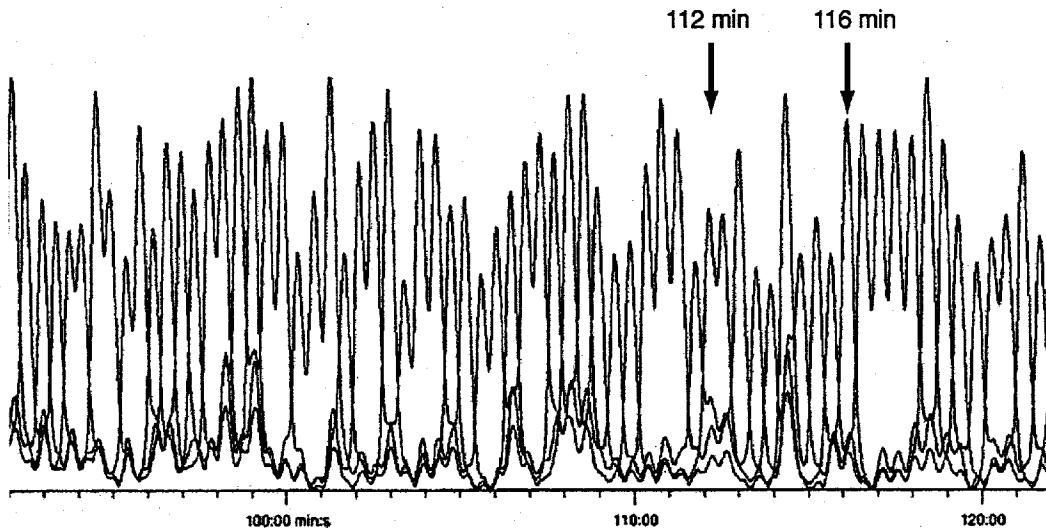


Fig. 1 Hirota et al.

**A**



**B**

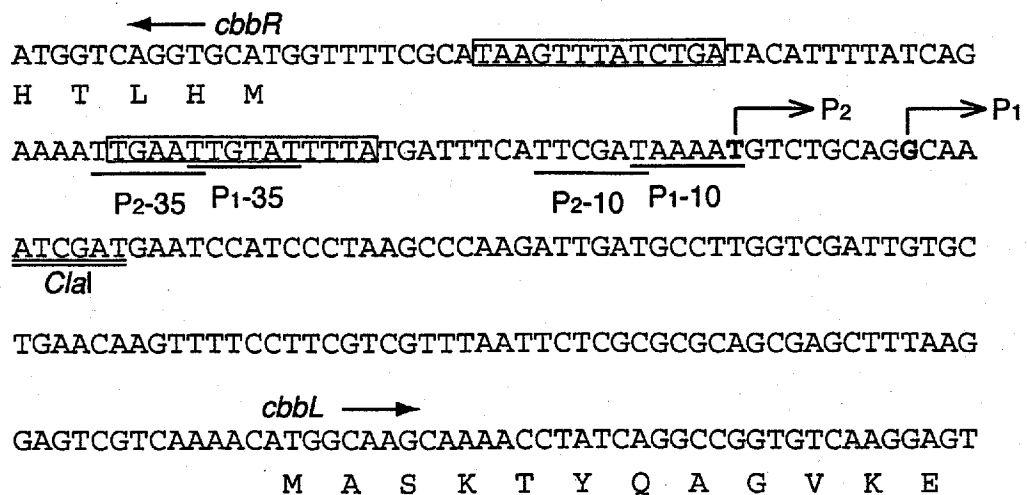


Fig. 2 Hirota et al.

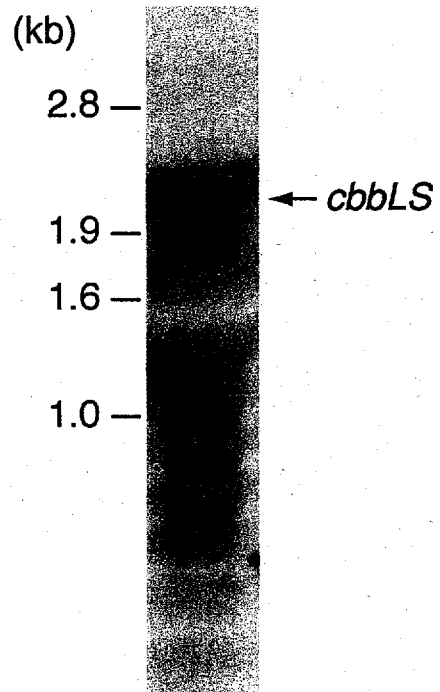


Fig. 3 Hirota et al.



## 参考論文

- (1) Akira Yamagata, Junichi Kato, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Isolation and characterization of two cryptic plasmids in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, 181: 3375-3381, 1999.
- (2) Akira Yamagata, Ryuichi Hirota, Junichi Kato, and Hisao Ohtake. Molecular characterization of the indigenous plasmids and genome in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. Strain ENI-11. Proceeding of the 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, P-RM30(CD-ROM), 1999.
- (3) Akira Yamagata, Ryuichi Hirota, Junichi Kato, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Mutational analysis of the multicopy *hao* gene coding for hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (8): 1754-1757, 2000.