

総説

硝酸同化系遺伝子の発現制御機構

愛知 真木子

中部大学応用生物学部応用生物化学科

要 旨

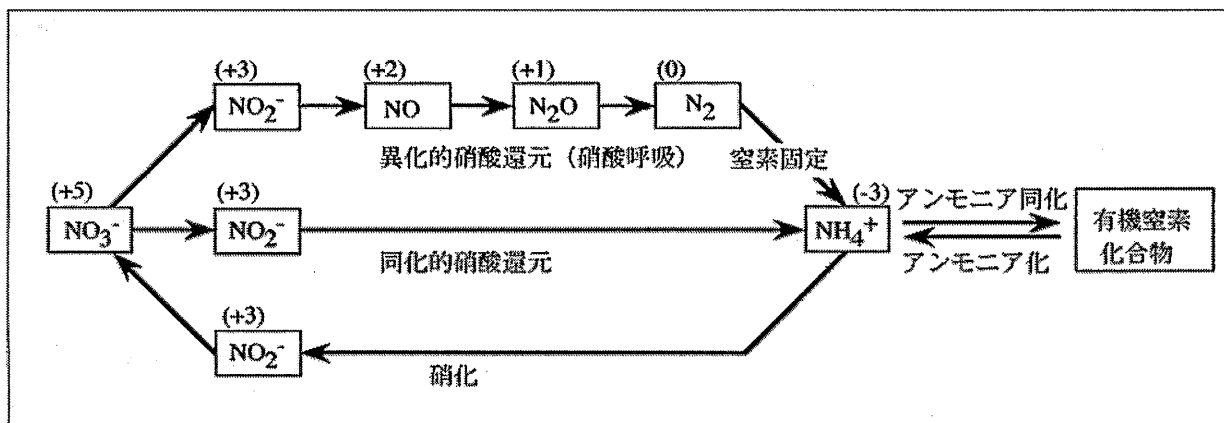
硝酸イオン（以下硝酸と略）は植物、藻類や菌類の主要な窒素源である。硝酸は、まず硝酸イオン能動輸送体（NRT）により細胞内へ輸送され、硝酸還元酵素（NR）によって亜硝酸イオン（以下亜硝酸と略）に還元され、さらに亜硝酸還元酵素（NiR）によってアンモニアイオン（以下アンモニアと略）に還元される。続いてアンモニアはグルタミン合成酵素とグルタミン酸合成酵素によってアミノ酸へと同化される。硝酸同化を行う生物はNRT, NR, NiRの3つを必ず備えていて、硝酸同化系の遺伝子群の発現は、一般に硝酸（または亜硝酸）により活性化され、窒素同化産物（グルタミンあるいはその代謝産物）により抑制されるが、正負の制御のいずれが優勢であるかは生物により異なる。ラン藻においては窒素同化産物によるカタボライト抑制が強いため、アンモニアの同化を阻害しないと硝酸による活性化効果を見ることができないが、その他の生物では、硝酸の添加によってNRT, NR, NiRの遺伝子の転写が誘導される。硫酸やリン酸など他の無機栄養物質の同化に関与する遺伝子はそれぞれの元素の欠乏によって誘導されるので、基質による硝酸同化系遺伝子の誘導は特異な発現様式である。本稿では、硝酸同化酵素の構造と性質および遺伝子発現制御機構について述べ、硝酸同化系遺伝子の発現における基質による誘導機構の必要性と近代農業における施肥（硝酸塩）が引き起こす環境と農産物に与える問題について考察している。

キーワード：カタボライト抑制，経路特異的制御，硝酸/亜硝酸誘導，硝酸同化

はじめに

植物、藻類、ラン藻、菌類の一部は、主要な窒素源として無機体窒素である硝酸を利用している。窒素はタンパク質や核酸、色素類をはじめとする生体成分に必須の元素であるが、環境中においては分子状窒素あるいは硝酸、アンモ

ニアのような無機化合物として存在していて、直接生体成分にはならない（第1図）。動物は、動植物由来のアミノ酸やタンパク質などの有機体窒素しか利用できないので、無機体窒素を同化することのできる植物や細菌に窒素の供給を依存している。アミノ酸やタンパク質に含まれ



第1図 自然界における窒素循環の概要 () 内の数字は、各窒素化合物における窒素の酸化数を表す。

る有機物中の窒素は還元された状態にあり、有機物が分解されるとアンモニア (NH_4^+) が生じる。これに対し、地球上での窒素の一番安定な状態は、最も酸化された状態の硝酸 (NO_3^-) である。この2つの無機体窒素化合物の間に生物による変換経路が3つ存在する。まず、硝酸からアンモニアへの経路には2通りあって、1つは「異化的硝酸還元」と「窒素固定」による経路で、もう1つが「同化的硝酸還元」による経路である。「異化的硝酸還元」は *Pseudomonas* 属細菌に見られるような、電子伝達系において硝酸が呼吸鎖の末端電子受容体として働く「硝酸呼吸」を示し、嫌気的狀態でエネルギーを獲得する。なかでも硝酸を窒素ガス (N_2) にまで還元し、大気中に放出する反応を、特に「脱窒」という。この分子状窒素をアンモニアに固定するのが、窒素固定菌であり、*Rhizobium* (根粒菌) のように共生的に窒素を固定する物と *Azotobacter* のように非共生的に分子状窒素を窒素源として利用する物がある。「同化的硝酸還元」は、異化的硝酸還元とは逆にエネルギーを投じて窒素源を得る反応である。植物や藻類、ラン藻 (シアノバクテリア) 等の光合成生物、および菌類、細菌類の一部は、硝酸を2電子還元して亜硝酸 (NO_2^-) にした後、亜硝酸を1度に6電子還元してアンモニアにまで還元し、同化する。実際、植物やバクテリアの持つ硝酸同化の働きによって、年間 2×10^4 メガトンの窒素が有機化されている (Campbell and Kinghorn, 1990)。これはニトロゲナーゼによる窒素固定量の100倍以上である (Campbell and Kinghorn, 1990)。従って量的には、同化型硝酸還元反応による有機体窒素の合成は地球上の窒素循環において、窒素固定に比べてはるかに重要であるといえる。一方、アンモニアから硝酸への「硝化」は、硝化細菌によって好気的条件下でおこなわれ、*Nitrosococcus* や *Nitrosospira* 等はアンモニアを亜硝酸に、*Nitrobacter* や *Nitrococcus* 等は亜硝酸を硝酸に酸化することによってエネルギーを獲得している。

以上のように、窒素の同化は植物や細菌による「硝酸同化反応」と窒素固定菌による「窒素固定」に依存しており、特に人類は、光合成生物の硝酸同化反応の結果生じた有機化合物を効率よく回収するために農業生産を営んで、人口

を飛躍的に増加させてきた。本稿では、地球上の窒素循環において重要な役割を担っている硝酸同化反応に関わる酵素と遺伝子の発現制御機構について解説する。

1. 硝酸同化系各酵素の種類

硝酸同化はまず、基質である硝酸を硝酸イオン能動輸送体 (Nitrate transporter: NRT) で細胞内へ取り込むことから始まる。次に、細胞内に取り込まれた硝酸は硝酸還元酵素 (Nitrate reductase: NR) によって亜硝酸に、亜硝酸還元酵素 (Nitrite reductase: NiR) によってアンモニアにまで還元されて、有機体窒素として同化される。有機体窒素への同化の主な過程は、グルタミン合成酵素 (Glutamine synthetase: GS) により、アンモニアとグルタミン酸から窒素を2分子含むグルタミンを生成し、グルタミン酸合成酵素 (Glutamine-2-oxoglutarate transferase: GOGAT) により、グルタミンのアミド基を炭素骨格となる2-オキシグルタル酸 (α -ケトグルタル酸) に転移させて2分子のグルタミン酸を合成するという物である。以下にその反応を示す。



1-1. NRT (硝酸イオントランスポーター) の構造

自然界における硝酸濃度は一般に低い上、硝酸は陰イオンであるために膜電位に対して細胞膜を横断しなくてはならない。すなわち、硝酸を窒素源として生育するためには、濃度勾配と膜電位に逆らって硝酸を継続的に細胞内へ輸送する必要がある。これまでに、様々な生物の NRT が単離同定され、3種類の NRT の存在が明らかとなっている。一つは ABC (ATP-binding cassette) スーパーファミリーと呼ばれるトランスポーターの種類に属する物で、淡水性のラン藻 (*Synechococcus* sp. PCC7942: Omata et al. 1993) と一部の細菌 (*Klebsiella pneumoniae*: Wu and Stewart, 1998) が持つ。ABC トランスポーターはサブユニット構造を持っていて、2分子の膜貫通タンパク質と2分子の ATP 結合性

タンパク質から構成されているのが特徴である。一方、他の2つ (NRT1, NTRT2) は、MFS (major facilitator superfamily) というスーパーファミリーに属しており (Steiner et al., 1995)、共に12の膜貫通ドメインをもつ疎水性タンパク質で、プロトンの電気化学的勾配を利用して硝酸を細胞内へ輸送する (Pao et al., 1998)、これまで、NRT1は高等植物のみから見つかっていて、高等植物の低親和性硝酸イオン輸送体であると考えられているが (Tsay et al., 1993)、対称的にNRT2は、原核生物・真核生物、光合成生物・非光合成生物を問わず広く生物界に分布している高親和性硝酸イオン輸送体である。また、NRT2の一つである緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のNrt2;1 (Galvan et al., 1996) や海産性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7002のNitA (Sakamoto et al., 1999) は硝酸と亜硝酸の両方を輸送するという特徴を持つ。

1-2. NR (硝酸還元酵素) の種類

硝酸を亜硝酸に還元するNRは、要求する電子供与体によって大きくNAD (P) H依存型とフェレドキシン (Fdと略) 依存型に分けられ、これまでにNAD (P) H-NRの方が研究が進んでいる。その基本構造は約110kDaからなるホモ2量体で、大きく3つのドメインからなり、それぞれのドメインに1分子のFAD、ヘム (シトクロムb357) およびモリブデン-プテリン (Mo-co) が補欠分子として機能している (Campbell, 2001; Forde, 2000)。一般に、カビはNADPH-NR、高等植物はNADH-NRのみあるいはNAD (P) H-NRの両方の活性が認められているが、植物で種類が混在している生理学的な意味は、現在のところ分かっていない。しかし、電子供与対の特異性は、NADPH型とNADH型の立体構造の比較から鍵となるアミノ酸が推定され、それを一塩基置換した変異NRの電子供与体要求性について実験した結果、NADH-NRではピリミジンヌクレオチド結合部位のネガティブチャージが必要であることが明らかとなっている (Shiraishi et al., 1998)。このように、アミノ酸の1塩基置換により特異性が変化することから、NRの多様性が出てきたことが推察できる。

1-3. NiR (亜硝酸還元酵素) の種類

亜硝酸をアンモニアに還元するNiRも、NAD (P) H依存型とFd依存型に分けられる。ラン藻や植物に見られるFd-NiRは、分子量約60kDで、シロヘムと鉄硫黄 (4Fe-4S) クラスタを補酵素として持つ。 *Neurospora crassa* や *Escherichia coli* (大腸菌) はFAD、鉄硫黄クラスタ、シロヘムを含み、NAD (P) Hを電子供与体とする。亜硝酸還元酵素と同様に鉄硫黄クラスタとシロヘムを持つ亜硫酸還元酵素のX線構造解析の結果 (McRee et al., 1986) とENDORの結果 (Cline et al., 1985) から、SiRの483番目のシステイン残基が鉄硫黄クラスタのFeとシロヘムのFeを橋渡ししていると報告されていて、NiRの活性中心もほぼ同様の構造を持っていると考えられている。

2. 硝酸同化酵素の活性制御

はじめに触れたように、硝酸からアンモニアへの還元には8電子もの還元力が必要である。したがって、より還元された状態にあるアンモニアがあれば、エネルギーを節約するために、まずアンモニアを利用する。すなわち培地中にアンモニアがある場合には程度の差があるものの、全ての生物で硝酸同化系の酵素活性が低下する (第1表)。

酵素活性の制御は、i) 転写調節 (転写物合成量の調節)、ii) 転写後調節 (転写物の分解など)、iii) 翻訳調節および iv) 翻訳後調節 (酵素の修飾、分解による制御) に分けられる。硝酸同化酵素においては、転写調節と翻訳後調節によって主に制御されており、翻訳後の活性制御機構については、高等植物のNAD (P) H-NRにおいて特に研究が進んでいるが (Crawford, 1993; Kaiser and Huber, 2001)、硝酸同化系の酵素タンパク質は総じて半減期が短いために、転写量を調節することによる制御が中心になっている。硝酸同化に関わる遺伝子発現の調節はほとんどの種で i) 脱抑制によるグローバルな負の制御と ii) 硝酸同化系遺伝子に特異的な基質による正の制御の2つの方法 (dual-regulation) によって制御されている。しかし、正負の制御のいずれが優勢であるかは生物によって異なり、実際ラン藻においては、窒素同化産物による負の制御が重要で、アンモニアを添加して窒素充

第1表 様々な生物における硝酸同化系遺伝子の転写活性

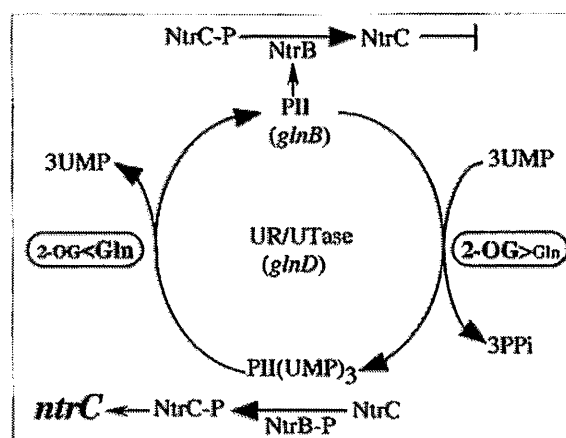
様々な生物における硝酸同化系遺伝子の基質に応答した転写活性について、ノーザン解析の結果、あるいはレポーター遺伝子を用いた実験の結果を、硝酸を窒素源とした時の活性を100として相対値で示した。ただし、*K. pneumoniae* の培地は全て5mMのGlnを含む、n.d. は該当データなしを示す。

生物名	遺伝子(酵素)	それぞれの基質における相対的な転写活性 (%)					文献
		None	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ +NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (グラム陰性細菌)	<i>nasF</i> (NRT)	8.0±0.5	0.6	n.d.	100	100±3.3	Lin et al., 1996
<i>Bacillus subtilis</i> (グラム陽性細菌)	<i>nasA</i> (NRT)	n.d.	22±1.1	3.5±0.2	100	n.d.	Nakano et al., 1995
	<i>nasB</i> (NR)	n.d.	<0.1	0.7±0.1	100	n.d.	
<i>Aspergillus nidulans</i> (糸状菌)	<i>nasD</i> (NR)	13±8	3±1	27±10	100	n.d.	Punt et al., 1995
	<i>nasA</i> (NRT)	24±8	10±3	49±14	100	n.d.	
<i>Hansenula polymorpha</i> (酵母)	YNT(NRT)	<0.1	<0.1	1	100	100	Perez et al., 1997
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (ラン藻)	<i>nirA</i> (NiR)	80	<0.1	<0.1	100	100	Suzuki et al., 1993
<i>Nicotianatabasum</i> L. (タバコ)	NR1(NR)	n.d.	36±21	100	n.d.	n.d.	Hwang et al., 1997
	NR2(NR)	n.d.	20±12	100	n.d.	n.d.	
<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)	NR1(NR)	37±7	n.d.	n.d.	100	n.d.	Cheng et al., 1991
	NR2(NR)	15±5	n.d.	n.d.	100	n.d.	

足にすると遺伝子発現は完全に抑制される(第1表)。一方、多くの生物では正の制御が重要で、一部の構成的に発現するNRT遺伝子以外、ほとんどの物が硝酸イオンによって誘導される(第1表)。制御システムについて転写因子やその認識配列の特徴など、これまでによく研究されている4つのタイプについて以下に述べる。

2-1. 細菌類

グラム陰性桿菌の*Klebsiella pneumoniae*(*oxytoca*)においては、硝酸同化系遺伝子(*nasFEDBCA*, Lin et al., 1993)の転写は窒素同化系にグローバルな転写因子NtrC(Cali et al., 1989)と硝酸/亜硝酸に特異的な経路特異的誘導因子NasR(Goldman et al., 1994)によって制御されている(第2表)。グローバルな窒素同化系遺伝子制御機構(Ntr-system: nitrogen regulatory system)は4つの酵素、脱ウリジリル化/ウリジリル化酵素(UR/UTaseと省略)、PII、2成分情報伝



第2図 C/N比に応答したNtrC転写制御モデル。UR/UTaseが2-OG、Gln濃度に依存してPIIの脱ウリジリル化/ウリジリル化を制御している。

達系ヒスチジン・プロテインキナーゼNtrB、そしてレスポンスレギュレーターNtrCから構成されていて(第2図)、2-oxoglutarate(2-OGと略)とglutamine(Glnと略)の存在比に依存してPIIのウリジリル化状態が変化し、NtrC

第2表 様々な生物における硝酸同化系遺伝子の転写制御に関与する因子

参考文献については、本文を参照。

生物名	グローバルな転写制御に 直接関わる転写因子 (特徴)	グローバルな転写制御に 関わる因子 [基質]	経路特異的な転写制御に 直接関わる転写因子 (特徴)	経路特異的な転写制御に 関わる因子 [基質]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (グラム陰性細菌)	NtrC (Ntr system)	UR/UTase, PII, NtrB [2-OG, Gln]	NasR	[NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻]
<i>Azotobacter vinelandii</i> (グラム陰性細菌)	NtrC (Ntr system)	UR/UTase, PII, NtrB [2-OG, Gln]	NAST	NASS [NO ₃ ⁻]
<i>Bacillus subtilis</i> (グラム陽性細菌)	TurA (Mer family)	GS [Gln]	n.d.	n.d.
<i>Neurospora crassa</i> (糸状菌)	NIT2 (GATA family)	NMR	NIT4	NR [NO ₃ ⁻]
<i>Aspergillus nidulans</i> (糸状菌)	AreA (GATA family)	TamA, NMR	n.d.	[NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母)	GLN3 (GATA family)	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (ラン藻)	NtcA (CAP family)	[2-OG]	NtcB (LysR family)	[NO ₂ ⁻]

自身の発現量を制御している (Magasanik, 1988)。窒素欠乏条件では細胞内2-OG濃度が高くなり2-OGがPIIに結合すると、PII自身のウリジリル化が促進されNtrCの転写を誘導する。一方、窒素充足条件では細胞内Gln濃度が高くなっているため、UTaseはGlnによって活性が抑制され、その結果UR活性が高くなりPIIが脱ウリジリル化されて、NtrCの転写を抑制する (de Mel et al., 1994; Kamberov et al., 1994)。一方、硝酸/亜硝酸に反応するタンパク質はNasRで (第2表; Goldman et al., 1994; Wu et al. 1999)。nasFオペロン上流領域に転写制御に必要な配列が存在する。基質がない場合にはNasR等他の因子に寄らず、一度開始された転写はタンパク質コード領域に入る前に終結する仕組みになっており、逆に基質がある場合にはNasRが転写の終結を抑制することによって転写が完了する (Lin et al., 1996)。

同様にグローバルな制御機構としてNtr-systemを持つ*Azotobacter vinelandii* (グラム陰性好気性桿菌) においては、nasAB (NR, NiRの遺伝子) がNtrCと経路特異的因子のNASSおよびNASTによって制御されている (第2表)。NASSはラン藻の硝酸イオン能動輸送体であるNrtAと、NASTは二成分情報伝達系のレギュレーターのレシーバードメインに類似しており、硝酸非存在下でNASSがNASTのDNA結合活性を阻害している (第2表; Gutierrez et al., 1995)。

一方、グラム陽性細菌の*Bacillus subtilis* (枯草菌) においては、MerRファミリーに属するTnrAがグローバルに窒素同化系を制御しており (Belitsly et al. 2000)、TnrAはGln存在下で (窒素充足状態) GSと結合してDNA結合能を減じ、その結果、窒素同化系遺伝子を抑制するという報告がある (第2表; Wray et al., 2001)。経路特異的な誘導機構は嫌気条件で発現する異化型亜硝酸還元酵素についてのみ報告されていて (Nakano et al., 1998) 同化型硝酸還元遺伝子の発現系には硝酸あるいは亜硝酸による誘導機構は存在しないと考えられている (第1表; Nakano et al., 1995, 1998)。

2-2. 糸状菌および酵母

糸状菌*Neurospora crassa*においては、NIT2が

窒素同化系をグローバルに制御していて、NIT4が硝酸・亜硝酸特異的に転写を誘導している (第1, 2表)。NIT2はGATAファミリーに属する転写因子でDNA結合ドメインはCys2/Cys2-型フィンガーモチーフを持っている (Fu and Marzluf, 1987)。また、C末端領域にある12残基には窒素充足条件で発現するNMR (nitrogen metabolic repression) が結合して、NIT2のDNAへの結合を阻害する事が*in vitro*および酵母two-hybrid system において示されており (Pan et al., 1997; Xiao et al., 1995)、NMRが何らかのシグナルを感知してNIT2に結合し、NIT2を不活性化することによって窒素同化系遺伝子群が抑制されていると考えられている (Pan et al., 1997; Xiao et al., 1995)。また、*in vitro*の系において、NIT4と硝酸還元酵素が結合することが示されており (Feng and Marzluf, 1996)、硝酸がない場合にはNIT4を結合して不活性化させていた硝酸還元酵素が、硝酸イオンを感知してNIT4から離脱してNIT4の不活性化を解除し、硝酸同化系遺伝子の転写を誘導すると考えられている (第2表; Feng and Marzluf, 1996)。

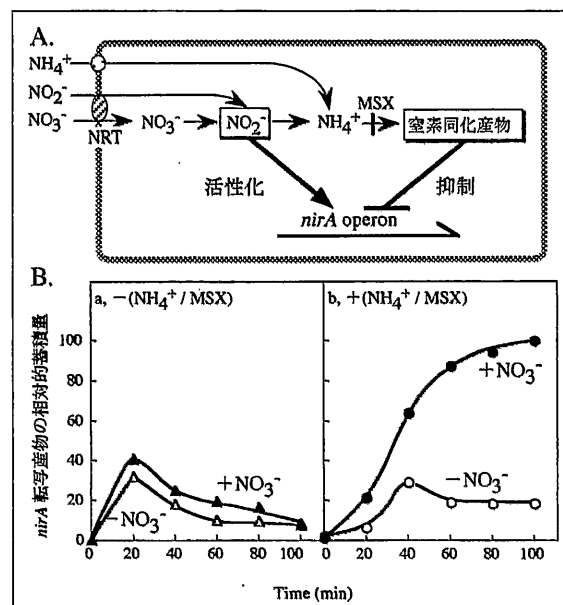
糸状菌*Aspergillus nidulans*でも、ほぼ同様の制御機構を持ち、GATAファミリーに属するAREAが窒素同化系をグローバルに制御していて (Caddick et al., 1986)、NIRAが硝酸・亜硝酸特異的に転写を誘導している (Kudla et al., 1990; Punt et al., 1995)。さらに最近、*A. nidulans* において窒素同化系遺伝子の最大活性に必要である事が示されていたTamA (Kingham and Pateman, 1975) はAREAに結合することが示され (Small et al., 1999, 2001)、NMRがAREAに結合する (Andrianopoulos et al., 1998) のを抑制していることが*in vitro*の系で示された (Small et al., 1999)。また同時に、AREAのC末端領域にある12残基へのTamAの結合も示されて、TamAとNMRが拮抗してAREAへ結合することによって、AREAの転写活性が制御されていると考えられている (Small et al., 1999)。

酵母*Saccharomyces cerevisiae*においてもGATAファミリーに属するGln3が窒素同化系をグローバルに制御している (第2表; Minehart and Magasanik, 1991)、酵母*Hansenula polymorpha*の硝酸同化系遺伝子YNT1, YNI1, YNR1の発現は、硝酸 (または亜硝酸) により誘導され、ア

ンモニアではほぼ完全に抑制される事が示されている (第1表; Brito et al., 1996; Perez et al., 1997)。

2-3. ラン藻 (シアノバクテリア)

ラン藻は高等植物と同じ酸素発生型の光合成をする原核生物で、葉緑体の起源と考えられている生物である。淡水性のラン藻 *Anabaena* sp. PCC7120をはじめ *Synechococcus* sp. PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803などにおいて、硝酸同化系遺伝子の転写はアンモニアがあると完全に抑制され、アンモニアの除去あるいはアンモニア同化の阻害によって誘導されるが (第1表; Cai and Wolk, 1997; Suzuki et al., 1993; Aichi and Omata, 2001; Aichi et al., 2001), このグローバルな制御を NtcA が担っている (第2表; Vega-Palas et al., 1990)。NtcA は CAP (catabolite gene activator または cyclic AMP receptor protein) ファミリーに属する転写因子で (Vega-Palas et al., 1990, 1992), 2量体を形成して窒素の利用に関わる遺伝子 [*nrtABCD* (NRT), *narB* (NR), *nirA* (NiR), *glnA* (GS), *glnB* (PII)] などの転写を制御しており, その認識配列は GTAN₈TAC で, よく保存されている (Luque et al., 1994)。他の生物と異なり, アンモニアの存在下で硝酸同化活性が完全に抑制されることから (Herrero et al., 1981; Suzuki et al., 1993), 硝酸同化系遺伝子の転写は NtcA の負の制御のみによって説明され, *B. subtilis* と同様, 硝酸/亜硝酸による転写誘導機構は存在しないと考えられてきた。これに対して, 我々は *Synechococcus* sp. PCC7942 と *Plectonema boryanum* において硝酸同化系遺伝子の転写を脱抑制したうえで硝酸/亜硝酸の効果が検出可能となることを示した。ここでは, *Synechococcus* sp. PCC7942 の結果を示す (第3図)。このラン藻では, 硝酸同化系遺伝子 (*nirA-nrtABCD-narB*) は一つのオペロン (*nirA* オペロン) を形成しているので最上流の *nirA* 遺伝子をプローブにして, アンモニアを窒素源とした培地から様々な条件の培地へ移した細胞の転写物の蓄積量を調べた。その結果, ラン藻細胞を硝酸を含む培地に移した場合には, 培地中の硝酸が還元同化されて生じた窒素同化産物によりカタボライト抑制がかかるために, 無窒素培地へ移した細胞とほとんど変わら



第3図 A. ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942における硝酸同化系遺伝子 (*nirA* オペロン) の制御モデル. B. ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942における *nirA* 転写産物の蓄積量の変化。

(a) アンモニアを窒素源として生育したラン藻細胞を無窒素培地 (Δ) あるいは硝酸培地 ($\blacktriangle$) に移した細胞における *nirA* 転写物の蓄積量. (b) アンモニアを窒素源として生育した細胞に MSX を添加して, 同時に硝酸を添加した細胞 ($\bullet$) と添加しなかった細胞 ($\circ$) における *nirA* 転写物の蓄積量. それぞれの細胞から RNA を抽出し, *nirA* 特異的のプロンプを用いたドットハイブリダイゼーションを行った。それぞれの結果を定量化し, MSX と硝酸を添加した細胞において蓄積した転写物の最大量を 100 とし相対値で示した。

ない転写物の蓄積量を示した。一方, GS の阻害剤 L-methionine-DL-sulfoximine (MSX と略) でアンモニアの同化を止めた場合には, 培地中に硝酸があっても同化されないためにカタボライト抑制が起きず (脱抑制状態), 硝酸による転写の活性化が検出できた (Kikuchi et al., 1996)。*Synechococcus* sp. PCC7942 NR 変異株について MSX と硝酸を添加した実験では亜硝酸が生じないため転写の活性化は起きず, 亜硝酸を添加した場合にのみ転写が活性化されたので, 経路特異的制御のシグナルは亜硝酸 (もしくは亜硝酸と反応した何らかの物質) である, と我々は考えている。*Synechococcus* sp. PCC7942 において *nirA* オペロンの上流逆向きに *nirB-ntcB* が位置している。NirB および NtcB は硝酸同化活性の最大活性の発現に必須の因子で, NtcB が LysR 型の転写因子に類似している

ことが示されていた (Suzuki et al., 1995). これに加えて, NtcB変異株において亜硝酸による硝酸同化系遺伝子発現の活性化が見られず, NtcBを再導入した株では活性化が見られたことから, NtcBが亜硝酸による硝酸同化系遺伝子の活性化に関与していることが示された (Aichi and Omata, 1997; Maeda et al., 1998). さらに我々は, MSXを添加しない無窒素条件で8時間培養した細胞に亜硝酸を添加すると転写が活性化されることを確認し (Aichi and Omata, 1997), 生理的な条件下においてもNtcBと亜硝酸による転写活性化機構が重要であることも示した.

これまでにゲノムプロジェクトにより全ゲノムの塩基配列が公開されたラン藻の中で, 硝酸を利用できる株の全てがNtcBを持っており, 逆に硝酸同化能のない株はNtcBを持っていない. このことは, NtcBが硝酸同化に必須の遺伝子であることを示している. *Anabaena* sp. PCC7120および*Synechocystis* sp. PCC6803でも, 亜硝酸による転写活性化機構があり (Frias et al., 2000; Aichi and Omata, 2001; Aichi et al., 2001) NtcBが関与しているが, NtcBの硝酸同化系遺伝子の転写活性化に対する関与の度合は株によって異なっている. 例えば, NtcB変異株の形質は, *Synechococcus* sp. PCC 7942においては硝酸同化活性が70-80%に減少するのに対して (Suzuki et al., 1995), *Synechocystis* sp. PCC6803においては40-50%に減少し (Aichi et al., 2001), *Anabaena* sp. PCC7120に至っては1%以下にまで減少するのである (Frias et al., 2000). この, 株特異的な性質はそれぞれの株の持つNtcAの機能に依存していて, NtcA単独で転写活性を発現できる株の場合にはNtcBの寄与は小さく, 単独で転写活性を発現できない場合にはNtcBの寄与が大きくなると考えられる (Aichi and Omata, 2001). このような基質による誘導機構の差は各々の株の環境条件に適応した結果生じた物であろう.

一方, ラン藻にもPIIが存在する. 大腸菌のタイプと一部類似していて, PIIは2-OG濃度に応じてリン酸化/脱リン酸化され, C/N比を検知しているものの (Irmiler et al., 1997; Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1994, 1995a, 1995b; Forchhammer and Hedler, 1997;

Garcia-Dominguez and Florencio, 1997), PIIと転写の活性制御との関連は明らかではない. 一方, NtcAの転写活性は2-OGを要求すると報告されているが (Tanigawa et al., 2002), 今後の詳細な研究が期待される.

2-4. 高等植物

高等植物においては, 培地にアンモニアがあっても硝酸を与えると根と葉で, ほぼ同時にNR遺伝子の転写が起こるので, 植物では一般に硝酸による正の制御が優勢で同化窒素による負の制御は弱いと考えられる (第1表). 硝酸同化系遺伝子の発現に関わる転写因子はまだ不明であるが, グローバルな負の制御に関しては, タバコのリーフディスクを用いた実験により2-OGが硝酸同化系遺伝子の転写を誘導することが示されている (Ferrario-Méry et al., 2001). これに対して, 硝酸による正の制御については, シス配列としてA (C/G) TCA が同定され, シロイヌナズナのNR1, NR2, NiRをはじめ16遺伝子に共通していることが示されている (Hwang et al. 1997).

3. 硝酸同化系遺伝子の発現制御と硝酸/

亜硝酸による誘導機構の意義

硝酸同化系遺伝子の発現に関して, すべての生物で共通していることは, ①他の無機栄養物質の同化に関与する遺伝子と同様に当該元素の欠乏によって誘導される点であり, ②窒素同化産物による負の制御 (カタボライト抑制) のシグナルになっているのは, 炭素骨格へ窒素を渡すGS/GOGATサイクルの基質および産物である2-OG, GluあるいはGlnである, という2点である. 実際, 多くのグラム陰性細菌においてはUR/UTaseとPIIが2-OGとGluの濃度比を検知しているし (Magasanik, 1988), グラム陽性細菌 *B. subtilis* ではTnrAがGSを介してGln濃度を検知しており (Wray et al., 2001), ラン藻ではNtcAによる転写活性が直接2-OGの濃度に依存している (Tanigawa et al., 2002). また, 高等植物のタバコに2-OGを与えると硝酸同化系遺伝子の転写が誘導され, Glnを与えると転写は抑制される. これに対して, 基質による転写活性化機構はほとんどの生物で共通であるが, 一部の細菌には存在しないと考えられている. し

かし、近年まで基質による転写活性化機構がないとされてきたラン藻について、恒常的に硝酸を同化している細胞では亜硝酸への応答は顕著ではないが、MSXによりアンモニア固定を阻害した細胞では顕著であるという事が示された。従って筆者は、適当な実験条件下では、硝酸同化系遺伝子の発現に対する基質による誘導機構は全ての生物で検出可能であり、窒素同化産物による負の制御機構だけでなく、基質による正の制御も硝酸同化を行う生物に共通の転写制御機構であると考えられる。

植物においては、環境中に利用しやすいアンモニア体窒素が存在しても、硝酸を検知して細胞内へ取り込み、液胞に100mM以上も蓄積する。この機構は、窒素栄養が不足しやすい環境に適応して、窒素飢餓状態に備え、できる限り多くの硝酸を細胞内に蓄積しようとした結果であろう。土壌中において最も不足している栄養素はしばしば窒素源で、土壌中に存在する窒素源の多くは高分子の有機体窒素であり、植物は直接それを利用することができず、また利用可能な窒素源である硝酸は、容易に土壌中から溶脱してしまう。近代農業において、窒素施肥は単位面積あたりの収穫量を増すという点で大きな役割を担ってきたが、1990年頃から、過剰の施肥により農作物中に多量の硝酸塩が含まれていることおよび土壌中から溶脱して河川や地下水に大量に流出した硝酸は、アオコなどの異常発生や飲料水の汚染という深刻な環境問題も引き起こしている。人や動物に摂取された硝酸塩は、体内で亜硝酸塩に還元され、これが肉や魚に含まれるアミン類と結合すると、発ガン性物質のニトロソアミンなど、ニトロソ化合物を生成する。また、硝酸塩や亜硝酸塩は血液中の正常なヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化し、これが血液中の酸素を組織に送ることを妨げてチアノーゼを引き起こす（メトヘモグロビン血症）。そこで植物の硝酸利用効率の改善が大きな課題となってきた。農作物の成長を促すための窒素肥料を与えつつ、硝酸塩濃度の低い農作物を作るには、硝酸を効率よく吸収、同化する植物の育種が求められる。このためには、窒素代謝、基質による硝酸同化系遺伝子の発現調節機構について、関連遺伝子を明らかにして、養分利用効率の高い作物（すなわち低肥料でも

よく育ち、収量性も大きい）に必要な遺伝子に迫ることが我々の目標であり、急務である。

引用文献

- Aichi, M., Omata, T. 1997. Involvement of NtcB, a LysR family transcription factor, in nitrite activation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 179: 4671-4675.
- Aichi, M., Omata, T. 2001. Roles of NtcB in regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. VIIth Cyanobacterial workshop. Pacific Grove, CA, USA.
- Aichi, M., Takatani, N., Omata, T. 2001. Role of NtcB in activation of nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183: 5840-5847.
- Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A., Hynes, M. J., 1998. Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* 180: 1973-1997.
- Belitsky, B. R., Wray, L. V. Jr., Fisher, S. H., Bohannon, D. E., Sonenshein, A. L. 2000. Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. *J. Bacteriol.* 182: 5939-5947.
- Brito, N., Avila, J. M., Perez, D., Gonzalez, C., Sivero, J. N. 1996. The genes YNI1 and YNR1, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha*, are clustered and coordinately regulated. *Biochem. J.* 317: 89-95.
- Caddick, M. X., Arst, H. N. Jr., Taylor, L. H., Johnson, R. I., Brownlee, A. G. 1986. Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 5: 1087-1090.
- Cai, Y., Wolk, C. P. 1997. Nitrogen deprivation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 elicits rapid

- activation of a gene cluster that is essential for uptake and utilization of nitrate. *J. Bacteriol.* 179: 258-266.
- Cali, B. M., Micca, J. L., Stewart, V. 1989. Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Bacteriol.* 171: 2666-2672.
- Campbell, W. H. 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. *Cell Mol. Life Sci.* 58:194-204.
- Campbell, W. H., Kinghorn, J. R. 1990. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends. Biochem. Sci.* 15: 315-319.
- Cheng, C.-L., Acedo, G. N., Dewdney, J., Goodman, H. M., Conkling, M. A. 1991. Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.* 96: 275-279.
- Cline, J. F., Hoffman, B. M., Mims, W. B., LaHaie, E., Ballou, D. P., Fee, J. A. 1985. Evidence for N coordination to Fe in the [2Fe-2S] clusters of *Thermus* Rieske protein and phthalate dioxygenase from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 260: 3251-3254.
- Crawford, N. M. 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* 27: 115-146.
- de Mel, V. S., Kamberov, E. S., Martin, P. D., Zhang, J., Ninfa, A. J., Edwards, B. F. 1994. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 243: 796-798.
- Feng, B., Marzluf, G. A. 1996. The regulatory protein NIT4 that mediates nitrate induction in *Neurospora crassa* contains a complex tripartite activation domain with a novel leucine-rich, acidic motif. *Curr. Genet.* 29: 537-548.
- Forde, B. G. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys. Acta.* 1465:219-235.
- Ferrario-Méry, S., Masclaux, C., Suzuki, A., Valadier, M.-H., Hirel, B., Foyer, C. H. 2001. Glutamine and α -ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Planta*, 213: 265-271.
- Forchhammer, K., Hedler, A. 1997. Phosphoprotein PII from cyanobacteria-analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 244: 869-875.
- Forchhammer, K., Tandeau de Marsac, N. 1994. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.* 176: 84-91.
- Forchhammer, K., Tandeau de Marsac, N. 1995a. Phosphorylation of the PII protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of *in vitro* kinase activity. *J. Bacteriol.* 177: 5812-5817.
- Forchhammer, K., Tandeau de Marsac, N. 1995b. Functional analysis of the phosphoprotein PII (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 177: 2033-2040.
- Frias, J. E., Flores, E., Herrero, A. 2000. Activation of the *Anabaena nif* operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Mol. Microbiol.* 38: 613-625.
- Fu, Y. H., Marzluf, G. A. 1987. Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1691-1696.
- Galvan, A., Quesada, A., Fernandez, E. 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 271: 2088-2092.
- Garcia-Dominguez, M., Florencio, F. J. 1997. Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.*

- 35: 723-734.
- Goldman, B. S., Lin, J. T., Stewart, V. 1994. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Bacteriol. 176: 5077-5085.
- Gutierrez, J.-C., Ramos, F., Ortner L., Tortolero, M. 1995. *nasST*, two genes involved in the induction of the assimilatory nitrite-nitrate reductase operon (*nasAB*) of *Azotobacter vinelandii*. Mol. Biol. 18: 579-591.
- Herrero, A., Flores, E., Guerrero, M. G. 1981. Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. J. Bacteriol. 145: 175-180.
- Hwang, C.-F., Lin, Y., D'Souza, T., Cheng, C.-L. 1997. Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of *Arabidopsis* nitrate reductase genes. Plant Physiol. 113: 853-862.
- Irmeler, A., Sanner, S., Dierks, H., Forchhammer, K. 1997. Dephosphorylation of the phosphoprotein P(II) in *Synechococcus* PCC 7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate-regulated phosphatase activity. Mol. Microbiol. 26: 81-90.
- Kaiser, W. M., Huber, S. C. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. J. Exp. Bot. 52: 1981-1989.
- Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Chandran, P., Ninfa, A. J. 1994. Effect of mutations in *Escherichia coli glnL* (*ntrB*), encoding nitrogen regulatorII (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. J. Biol. Chem. 26: 28294-28299.
- Kinghorn, J. R., Pateman, J. A. 1975. Studies of partially repressed mutants at the *tamA* and *areA* loci in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 140: 137-147.
- Kikuchi, H., Aichi, M., Omata, T. 1996. Positive regulation by nitrite of the nitrate assimilation operon in the cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 and *Plectonema boryanum*. J. Bacteriol. 178: 5822-5825.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez, N. M., Bennet C. F., Sibley, S., Davis R. W., Arst, H. N. 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBOJ, 9: 1355-1364.
- Lin J. T., Goldman B. S., And Stewart V. 1993. Structures of Genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductase in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Bacteriol. 175: 2370-2378.
- Lin J. T., Stewart, V. 1996. Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Mol. Biol. 256: 423-435.
- Luque, I., Flores, E., Herrero, A. 1994. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. EMBO J. 13: 2862-2869.
- Maeda, S., Kawaguchi, Y., Ohe, T., Omata, T. 1998. *cis*-Acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. J. Bacteriol. 180: 4080-4088.
- Magasanik, B. 1988. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. Trends Biol. Sci. 13: 475-479.
- McRee, D. E., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Siegel, L. M. 1986. The heme and Fe₄S₄ cluster in the crystallographic structure of *Escherichia coli* sulfite reductase. J. Biol. Chem. 261: 10277-10281.
- Minehart, P. L., Magasanik, B. 1991. Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. Mol. Cell. Biol.

- 11: 6216-6228.
- Nakano, M. M., Hoffmann, T., Zhu, Y. Jahn, D. 1998. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. J. Bacteriol. 180: 5344-5350.
- Nakano, M. M., Yang, F., Hardin, P., Zuber, P. 1995. Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 177: 573-579.
- Omata, T., Andriesse, X., Hirano, A. 1993. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. Mol. Gen. Genet. 236: 193-202
- Pan, H., Feng, B., Marzluf, G. A. 1997. Two distinct protein-protein interactions between the NIT2 and NMR regulatory proteins are required to establish nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. Mol. Microbiol. 26: 721-729.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., Saier M. H. Jr. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1-34
- Perez, M. D., Gonzalez, C., Avila, J., Brito, N., Siverio, J. M. 1997. The *YNT1* gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes *YNI1* and *YNR1* encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. Biochem. J. 321: 397-403.
- Punt, P. J., Strauss, J., Smit, R., Kinghorn, J.R., van den Hondel, C.A., Scazzocchio, C. 1995. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. Mol Cell Biol. 1995 15: 5688-5699.
- Sakamoto, T., Inoue, S., K., Bryant, D. A. 1999. A Novel nitrate/nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. J. Bacteriol., 181: 7363-7372.
- Shiraishi, N., Croy, C., Kaur, J., Campbell, W. H. 1998. Engineering of pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase: mutagenesis of recombinant cytochrome b reductase fragment of *Neurospora crassa* NADPH: Nitrate reductase. Arch. Biochem. Biophys. 358: 104-115.
- Small, A. J., Hynes, M. J., Davis, M. A. 1999. The TamA protein fused to a DNA-binding domain can recruit AreA, the major nitrogen regulatory protein, to activate gene expression in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 153: 95-105.
- Small, A. J., Todd, R. B., Zanker, M. C., Delimitrou, S., Hynes, M. J., Davis, M. A. 2001. Functional analysis of TamA, a coactivator of nitrogen-regulated gene expression in *Aspergillus nidulans*. Mol. Genet. Genomics, 265: 636-646.
- Steiner, H. Y., Naider, F., Becker, J. M. 1995. The PTR family: a new group of peptide transporters. Mol. Microbiol. 16: 825-834.
- Suzuki, I., Sugiyama, T., Omata, T. 1993. Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. Plant Cell Physiol. 34: 1311-1320
- Suzuki, I., Horie, N., Sugiyama, T., Omata, T. 1995. Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. J. Bacteriol. 177: 290-296.
- Tanigawa R., Shirokane M., Maeda S., Omata T., Tanaka K., Takahashi H. 2002. Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 4251-4255.
- Tsay, Y.-F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A., Crawford, N. M. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell, 72: 705-713.

- Vega-Palas, M., Madueño, F., Herrero, A., Flores, E. 1990. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 172: 643-647
- Vega-Palas, M. A., Flores, E., Herrero, A. 1992. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* 6: 1853-1859
- Wray, L. V., Jr, Zalieckas, J. M., Fisher, S. H. 2001. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell*, 107: 427-435.
- Wu, S. Q., Chai, W., Lin, J. T., Stewart, V. 1999. General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. *J. Bacteriol.* 181: 7274-7284.
- Wu, Q., Stewart, V. 1998. NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca* (*pneumoniae*) M5a1. *J. Bacteriol.* 180: 1311-1322.
- Xiao, X., Fu, Y. H., Marzluf, G. A. 1995. The negative-acting NMR regulatory protein of *Neurospora crassa* binding to and inhibits the DNA-binding activity of the positive-acting nitrogen regulatory protein NIT2. *Biochemistry*, 34: 8861-8868.

Title : Regulation of nitrate assimilation

Author : Aichi Makiko (Department of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)

Key words : catabolite repression, induction by nitrate/nitrite, nitrate assimilation, pathway-specific regulation