

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780066
 研究課題名（和文） 嫌気性アンモニア酸化（anammox）反応の電子伝達系と脱窒機構の解明
 研究課題名（英文） Electron transport system and mechanism for denitrification in the anaerobic ammonium oxidation (anammox).
 研究代表者
 西山 孝（NISHIYAMA TAKASHI）
 崇城大学・生物生命学部・助教
 研究者番号：00425331

研究成果の概要：嫌気性アンモニア酸化（anammox）を行う細菌 KSU-1 株から、anammox に関連するヘムタンパク質 3 種を精製した。その 1 つのヒドラジン酸化酵素（HZO）は本研究開始前に精製まで完了していたものであるが、本研究においてその酵素化学的性状の解析を行った。本研究で新たに得た他の 2 つのヘムタンパク質は、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素（HAO）と難還元性シトクロム *c* であった。これら酵素の性状から、HZO と HAO はどちらも anammox の最終段階のヒドラジンの脱窒を行うが、正常な細胞内環境では HZO が主に働き、HZO が機能できない環境で HAO が機能すると予想された。難還元性シトクロム *c* はその酸化還元電位の低さから HZO と HAO から電子を受け取ると推定され、anammox で発生した電子を膜に伝達する役割を担うと考えられた。また、これらタンパク質の遺伝子を同定し、プロモーター領域を解析したところ、これらの多量に発現しているヘムタンパク質は大腸菌プロモーター領域のコンセンサス配列によく似たプロモーター領域を持つことが判明した。anammox に関わると予想された別のヘムタンパク質である亜硝酸還元酵素（NIR）の精製も試みたが、活性のある酵素は得られなかった。また、HZO の X 線結晶構造解析を行うため、結晶化条件を検討したが、良質な結晶は得られなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

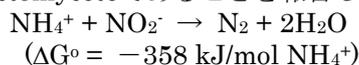
キーワード：嫌気性アンモニア酸化、anammox、脱窒

1. 研究開始当初の背景

生物による窒素循環は地球上の物質循環の中でも重要なものの一つであり、独立栄養性の硝化菌および他栄養性の脱窒菌がこの

窒素循環の担い手であると考えられてきた。しかし、1990年にデルフト工科大学のグループが脱窒流動床で嫌気性アンモニア酸化 (anaerobic ammonium oxidation, 以下

anammoxと略す)(下記反応式)を発見し、この反応に関わる微生物が独立栄養性の新規のPlanctomyceteであることを報告した。



現在では、anammox 菌は多属、多種からなる大きなグループを構成する一群のバクテリアであることが判明してきた。さらに、自然界に広く分布し、汽水域や低酸素海域の脱窒反応の3割程度を担っていることが報告され、地球の窒素循環の重要な地位を占めていることが明白となっている。

我々は、デルフト工科大学の菌株に対し16S rDNA塩基配列で92%の相同性しか示さない新規 anammox 菌を連続培養リアクタの優占種として集積することに成功し、KSU-1株と命名した。

KSU-1株からanammox反応の中心酵素と考えられるヘムタンパク質の一つを精製したところ、得られた酵素は菌体の全タンパク質の約8%を占め、ヒドラジン酸化活性を有していたことからヒドラジン酸化酵素(hydrazine oxidizing enzyme, HZO)であると思われた。本酵素の遺伝子がコードしているアミノ酸配列と最も相同性が高いタンパク質は硝化菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素であった。しかし、identityは30%以下と低く、本酵素は新規HZOであることが示唆された。さらに、KSU-1株にはHZO意外に複数の未知ヘムタンパク質が多量に発現していることも判明した。これらの未知酵素もanammoxに重要と予想されたが、HZOを含めたこれらヘムタンパク質がどのように電子を伝達し脱窒が起きているかは不明であった。

2. 研究の目的

KSU-1株のanammoxの電子伝達に関わるヘムタンパク質の機能を解明し、anammoxの反応機構を解明することを目的とした。そのため、1) KSU-1株から未知ヘムタンパク質を精製し、その酵素学的特性を解析する。2) 精製したHZOと未知ヘムタンパク質の相互作用を解析し、anammoxの機構を明らかにする。3) 各酵素遺伝子をクローニングし、遺伝子レベルで各酵素の関連を明白にする。

3. 研究の方法

(1) anammox 菌 KSU-1株のヘムタンパク質の精製と機能解析

HZO以外のKSU-1株の未知ヘムタンパク質を単一タンパク質として得る。得られた精製タンパク質を用いて、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、亜硝酸などanammox反応に関わる重要な基質に対する酵素活性を測定し、各活性の K_m 、 V_{max} を決定する。すでに精製

を完了しているHZOに関して同様の解析を行い、これらタンパク質のanammoxにおける機能を考察する。

(2) anammoxの電子伝達系酵素遺伝子の取得

KSU-1株のanammoxに関わるヘムタンパク質をコードする遺伝子をクローニングするため、各精製タンパク質のN末端およびペプチダーゼ消化断片のアミノ酸配列を決定する。このアミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計し、各遺伝子の内部領域を増幅する。増幅したDNA断片をプローブに用いゲノムDNAの制限酵素消化物から遺伝子を検出し、コロニーハイブリダイゼーション法により遺伝子を取得する。

(3) プロモーター構造の解明

KSU-1株からtotal RNAを抽出し、プライマー伸長法で各遺伝子の転写開始点を決定し、プロモーター構造を明らかにする。

(4) HZOの立体構造解析

HZOの反応機構をより詳細に解析するため、X線結晶構造解析を行う。得られた構造から、基質であるヒドラジンや脱窒で発生した電子を受け渡すシトクロムcなどの相互作用の様式を考察する。

4. 研究成果

(1) anammox 菌 KSU-1株で大量発現するヘムタンパク質の精製と機能解析

anammox 菌 KSU-1株が約70%を占めるanammoxリアクタの汚泥から、ヒドラジン酸化活性を持つ未知ヘム酵素を単一タンパク質として精製した。この酵素はホモダイマーで、サブユニットの大きさ(62 kDa)と構造(1サブユニットに8個のc型ヘムが結合)は既知のヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)と類似していたが、ヒドロキシルアミンを全く酸化せず、ヒドロキシルアミン存在下ではヒドラジン酸化も阻害されるなど、HAOとは酵素化学的性質が全く異なっていた(表1)。そのため、我々はこの酵素をhydrazine-oxidizing enzyme (HZO)と命名した。

HZO精製の過程で、HZO以外にもヒドラジン酸化活性を持つヘムタンパク質がKSU-1株に大量に発現していることが判明した。このヘムタンパク質を精製し、その酵素化学的性質を解析したところ、HAOであることが判明した。HAOのヒドラジン酸化活性はHZOよりかなり弱く、anammoxの最終段階のヒドラジン酸化は主にHZOが担っていると推察された(表1)。このHAOはHZOに匹敵するほど大量に存在しており、また、他のanammox菌のゲノム中にはhao

遺伝子が複数存在することから HAO も anammox に重要であると推定された。KSU-1 株の HAO は HZO と同様にホモダイマーで、ホモトリマーである他の HAO と分子構成が異なっていた。この違いは、KSU-1 株では HAO が HZO の代替としてヒドラジン酸化を行い他の分子種と相互作用するので、同様の分子構成を取る必要があることに由来すると考察された。

表1. anammox菌と硝化菌(*Nitrosomonas europaea*)のHAOとHZOの特徴

	anammox bacteria			
	strain KSU-1		B. anammoxidans	<i>N. europaea</i>
	HAO	HZO	HAO	HAO
Molecular mass (kDa)	118 ± 10	130 ± 10	183 ± 12	189
Subunit (kDa)	53	62	58	63
Composition	α_2	α_2	α_3	α_3
Heme c content	16	16	26 ± 4	24
Cytochrome	P468	P472	P468	P460
Oxidizing activity				
NH ₂ OH				
V_{max}	9.6	ND	21	75
K_m, K_i	33 (K_m)	2.4 (K_i)	26 (K_m)	NR
N ₂ H ₄				
V_{max}	0.54	6.2	1.1	NR
K_m	25	5.5	18	NR

PMS + MTT was used as the electron acceptor. V_{max} are given in $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. K_m and K_i are given in μM .

ND: Not detected; NR: Not reported

また、HZO、HAO とは異なるヘムタンパク質であるシトクロム *c* の精製も行った。このシトクロム *c* は KSU-1 株の cell free extract の約 5% 程度を占める程多量に存在していた。このタンパク質は、分子質量 12 kDa と 14 kDa のサブユニットから構成される 25 kDa のヘテロダイマーで、還元剤ジチオナイト (標準酸化還元電位 -600 mV) ではほとんど還元されないという特異な性質を持つ難還元性シトクロムであった。別種の anammox 菌である *K. stuttgartiensis* のゲノム解析により、HZO から電子を受け取るシトクロムの酸化還元電位が -650 mV 以下であることが予想されている。そのため、このシトクロム *c* はその発現量と酸化還元電位の両特性から見て HZO (cell free extract の約 10% 程度を占める) と相互作用する可能性が高いと推察され、anammox で生じた電子を膜に伝達する役割を担っていると考えられた。

さらに、KSU-1 株の膜画分を調製し、種々の界面活性剤を使用して亜硝酸還元酵素 (NIR) の可溶化条件を検討した。膜をリパーゼによって分解し、膜タンパク質を遊離させる方法も試みたが、いずれの方法でも NIR は可溶化できず、精製過程に進むことができなかった。これは NIR の結合している膜が anammox 菌特有の ladderane 脂質で構成されていることが原因と考えられ、NIR の可溶化には特殊な可溶化法の開発が必要と考察

された。

(2) HZO、HAO、シトクロム *c* をコードする遺伝子

KSU-1 株のゲノム上には HZO をコードする遺伝子が 2 つ存在しており (*hzoA*, *hzoB*) (accession 番号 AB257585 および AB255375)、これら遺伝子は塩基レベルで 99.6% と非常に高い同一性を示した。これら遺伝子に高い相同性を示す遺伝子が *K. stuttgartiensis* のゲノム上にも 2 個存在していたが、酵素化学的検証はされていなかった。相同性検索でその他に高い相同性を示す遺伝子は検出出来なかったことから、この HZO は全く新規の酵素であると考えられた。

また、*hzo* 遺伝子の周辺領域を決定したところ、*hzoB* の約 4 kb 上流に *hao* 遺伝子が存在した (accession 番号 AB365070)。そこで、*hzoB* の周辺領域約 20 kb を決定したがシトクロム *c* をコードする遺伝子は存在しなかった。

シトクロム *c* の両サブユニットの N 末端アミノ酸配列、およびペプチダーゼ消化した内部配列を決定した。これら配列を基に遺伝子を取得したところ、両サブユニットの遺伝子は隣接していた。

(3) HZO、HAO の発現解析とプロモーター構造の解明

hzo と *hao* の転写量を比較したところ、*hzo* の mRNA 量は *hao* のその約 1.5 倍であった。また、HzoA と HzoB の量を MS 解析で比較したところ、HzoB の翻訳量は HzoA の約 4 倍であった。この発現量の差異は遺伝子のプロモーターが異なることが原因と考えられたため、二つの *hzo* 遺伝子 (*hzoA*, *hzoB*) と *hao* 遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法で決定し、プロモーター領域を予測した。その結果、転写量の多い *hzoB* と *hao* のプロモーター領域が大腸菌のコンセンサス配列に類似 (*hao* のそれは一致) していることが判明した。

また、RT-PCR による解析により、シトクロム *c* の両サブユニットをコードする隣接した遺伝子がポリシストロニックに転写されていることを確認した。

(4) HZO の結晶構造解析

KSU-1 株が優占菌である anammox リアクタ汚泥から HZO を精製し、X 線結晶構造解析用の結晶調製を試みた。Emerald Biosystems 社の Wizard III キットを用いて結晶化条件検討を行ったところ、いくつかの条件で結晶は得られたが構造解析可能な品質ではなかった。そのため、HZO の精製条件と結晶化条件検索キットを再検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Qiao S, Kawakubo Y, Cheng Y, Nishiyama T, Fujii T, Furukawa K. Anammox process for synthetic and practical wastewater treatment using a novel kind of biomass carriers. *Water Science and Technology*, 58, 1335-1341, (2008) 査読有
- ② Shimamura M, Nishiyama T, Shinya K, Kawahara Y, Furukawa K, Fujii T. Another multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase, abundantly produced in an anammox bacterium besides the hydrazine-oxidizing enzyme. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 243-248, (2008) 査読有
- ③ Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, Toyomoto T, Kawahara Y, Furukawa K, Fujii T. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1065-1072, (2007) 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 浮田早貴, 河瀬達志, 西山孝, 古川憲治, 藤井隆夫, anammox菌KSU-1株の難還元性 cytochrome *c* の特性、日本農芸化学会大会、(2009)
- ② 西山孝, 佐田恵里佳, 藤井隆夫, 古川憲治、hzo遺伝子配列を用いたanammox菌の分類法、日本水環境学会九州支部研究発表会、(2009)
- ③ T. Fujii, T. Nishiyama, K. Furukawa, Members of anammox bacteria detected in two kinds of sludge acclimated in Hanoi and hydrazine-oxidizing enzyme gene available for a functional gene of anammox bacteria, The 8th General Seminar of the Core University Program, (2008)
- ④ 藤井隆夫, 河瀬達志, 西山孝, 古川憲治, anammox菌KSU-1株で多量発現している低分子量c型ヘムタンパク質、日本生物工学会大会、(2008)
- ⑤ 島村宗孝, 河瀬達志, 新屋寿崇, 西山孝, 古川憲治, 藤井隆夫, Anammox菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素とその一次構

造、日本生物工学会大会、(2008)

- ⑥ 西山孝, 川原優香, 古川憲治, 藤井隆夫, Anammox菌で大量発現しているヘムタンパク質遺伝子のプロモーター領域、日本生物工学会大会、(2008)
- ⑦ 河瀬達志, 島村宗孝, 西山孝, 古川憲治, 藤井隆夫, anammox菌のcytochrome *c*552の精製と性質、日本農芸化学会西日本支部大会、(2007)
- ⑧ 西山孝, 川原優香, 古川憲治, 藤井隆夫, Anammox菌で大量発現しているヘムタンパク質遺伝子のプロモーター領域、日本生物工学会大会、(2007)
- ⑨ 島村宗孝, 河瀬達志, 新屋寿崇, 西山孝, 古川憲治, 藤井隆夫, Anammox菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素とその一次構造、日本生物工学会大会、(2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 孝 (NISHIYAMA TAKASHI)
崇城大学・生物生命学部・助教
研究者番号：00425331

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし