

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580123

研究課題名(和文)嫌気性アンモニア酸化(A n a m m o x)細菌の無細胞反応系の構築

研究課題名(英文)Construction of cell-free anammox reaction system

研究代表者

藤井 隆夫(FUJII, Takao)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：80165331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気性アンモニア酸化(anammox)の無細胞反応系を構築するため、仮定されているモデルを参考に研究を行った。以下の知見を得た。(1) anammox菌KSU-1株から、反応中間体のヒドラジン合成するには、基質のNOとアンモニア、酵素のヒドラジン合成酵素、および機能未知であったNaxLS(ヘテロ2量体ヘムタンパク質)が必要なこと(2) 中間体のNOの生成には、従来言われて来たヘム型の亜硝酸還元酵素(Nir)ではなく、KSU-1株ではCu型のNirが行っていること(3) マルチヘムタンパク質のヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)はNOとヒドロキシルアミンの相互変換を行うこと、以上を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to construct cell-free anaerobic reaction system by reference to the previously described model for mechanism of anammox. The following important findings for construction of the system were obtained. (1) Hydrazine was synthesized from NO and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> catalyzed by hydrazine synthase with a heterodimer heme protein, NaxLS. (2) An intermediate, NO, was synthesized by Cu-type nitrite reductase (Cu-Nir) in strain KSU-1 although cytochrome cd1 Nir has only been known in other anammox bacteria. (3) A multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase (HAO), catalyzed inter-conversion of NO and hydroxylamine.

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 脱窒 アナモックス 亜硝酸還元酵素 ヘムタンパク質 ヒドラジン合成酵素  
ヒドロキシルアミン酸化還元酵素

### 1. 研究開始当初の背景

下記反応式で示した嫌気性アンモニア酸化(以下 anammox と略する)は 1990 年代に発見され、嫌気性独立栄養の anammox 細菌(anammox 菌)によって進む脱窒反応である。(Strous, M. *et al.* (1999) *Nature* **400**: 446-449)



この反応は、従来の従属栄養性の脱窒菌を使った生物処理と比べ、温室効果ガスの  $\text{N}_2\text{O}$  を発生しない、メタノール等の炭素源を必要としない、通気動力が必要ないなど革新的で経済的なプロセスとして窒素廃水の処理に利用されている。しかし、様々な窒素廃水に anammox を使うには培養制御が比較的難しい等の問題もある。anammox 細菌の代謝について、ほとんど解明されていないため、各種因子の変動による anammox 反応の応答は、anammox 菌をブラックボックスとして扱うしかない。anammox 菌の無細胞の反応系を構築できれば、影響因子と anammox の応答を解析する有効な手段を提供できる。

### 2. 研究の目的

anammox の各素反応を触媒する未知の酵素(系)について、それらの特徴を解明し、anammox 菌の既知の酵素系と組み合わせた無細胞の anammox 反応系の構築をめざす。

### 3. 研究の方法

(1)anammox 菌, *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis* のゲノム解析結果から、anammox の反応機構仮説が提出されている。この仮説にあるヒドラジン合成酵素(HZS)候補から、その一次構造が予想できる。それによると HZS は分子質量 180kDa のヘテロ 3 量体 c 型ヘムタンパク質である。我々の集積している anammox 菌 KSU-1 株でも、このタンパク質ホモログが多量に無細胞抽出液中にある。そこで、HZS を精製し、その性質とくにヘムタンパク質としての性質、吸光スペクトルを測定し、その特徴を調べた。

(2)無細胞抽出液中にヘテロ 2 量体ヘムタンパク質で、我々が NaxLS と名付けたタンパク質が多量に存在している。HZS の触媒反応に NaxLS が影響を与える可能性が考えられるので、HZS の活性発現に必要な因子の一つとして NaxLS を添加することによる、ヒドラジン生成活性への影響とを調べた。

(3)  $\text{NO}_2^-$  から  $\text{NO}$  生成を触媒する酵素である亜硝酸還元酵素(Nir)が仮説ではシトクロム  $cd_1$  を補欠分子族とする、 $cd_1$ -Nir であると報告されている。しかし、KSU-1 株では、ゲノムに  $cd_1$ -Nir 遺伝子は見つからない。そこで、Nir をコードする候補遺伝子を幅広く KSU-1 株のゲノムに探索し、その遺伝

子産物のタンパク質の性質を調べた。

(4) anammox 菌で多量に発現しているマルチヘムタンパク質のヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)は、当初ヒドラジンを酸化し、脱窒を触媒する酵素と考えられたが、我々の研究によって、脱窒はヒドラジン酸化酵素(HZO)が触媒することが明らかになった。そこで、HAO の触媒活性について、とくに  $\text{NO}$  の還元生成物の同定とその速度定数を求めた。 $\text{NO}$  の発生試薬 NOC7 と還元剤に還元型ベンジルビオロゲン( $\text{BV}_{\text{red}}$ )を使った。 $\text{BV}_{\text{red}}$  の酸化を吸光度計で測定し、吸光度の時間的変化を記録した EXCEL ファイルの数値を解析して、反応速度定数を導きだした。

### 4. 研究成果

(1)HZS の吸光スペクトルから見た特徴  
anammox 菌 KSU-1 株優先汚泥から HZS 候補タンパク質を精製した。精製した HZS 候補タンパク質は、その可視紫外吸光スペクトルと SDS-PAGE の結果より、純度よく精製されていた。また、ヒドラジン( $\text{N}_2\text{H}_4$ )合成反応基質候補を添加し、可視・紫外吸光スペクトルを測定した(図 1-1、図 1-2 参照)。

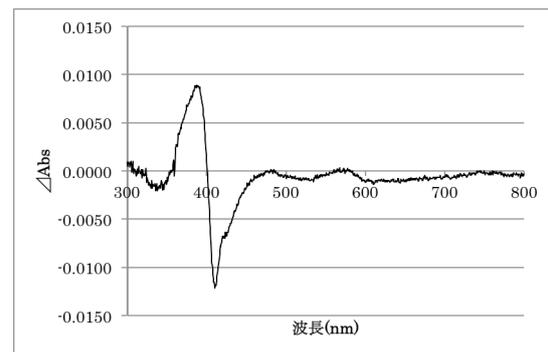


図 1-1 HZS 候補タンパク質に  $\text{NO}$  (0.1 mM) を添加した差スペクトル

アンモニアでは、スペクトル変化はほとんど無かったが、ヒドロキシルアミン( $\text{NH}_2\text{OH}$ )あるいは  $\text{NO}$  を添加した場合にのみソーレ帯のピークの移行が見られた。

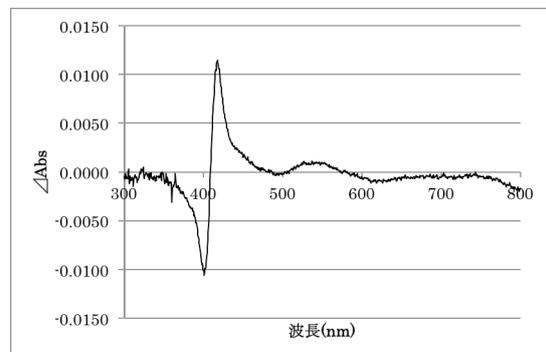


図 1-2 HZS 候補タンパク質に  $\text{NH}_2\text{OH}$  (0.1 mM) を添加した差スペクトル

以上の結果、HZS 候補タンパク質が  $\text{NO}$  や  $\text{NH}_2\text{OH}$

と付加体を形成し、ヘム鉄と相互作用している可能性が示唆された。言い換えると、NOやヒドロキシルアミンがHZSの基質である可能性が高まった。

(2) 精製した HZS 候補タンパク質に還元剤を添加し、アンモニアと NO から  $N_2H_4$  が合成されることを、 $N_2H_4$  を直接定量して調べた。とくに、難還元性 2 量体 c 型ヘムタンパク質である NaXLS を  $N_2H_4$  合成反応系に添加すると、アンモニアと NO から定量的にヒドラジンが合成された (図 2-1)。さらに  $^{15}NH_4^+$  と  $^{14}NO$  を基質とした場合、HZS の触媒作用によって生成される  $N_2H_4$  を *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (DMBA) と反応させて、生じる DMABA と  $N_2H_4$  のカップリング生成物を MALDI-TOF MASS によって質量分析した。市販の  $N_2H_4$  を同様の方法で測定した質量数と比べ、図 2-2 に示すように、質量数の一つ大きい生成物が得られた。

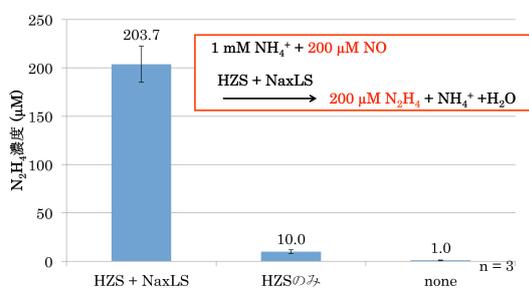


図 2-1 NO とアンモニアを基質にした HZS による  $N_2H_4$  合成

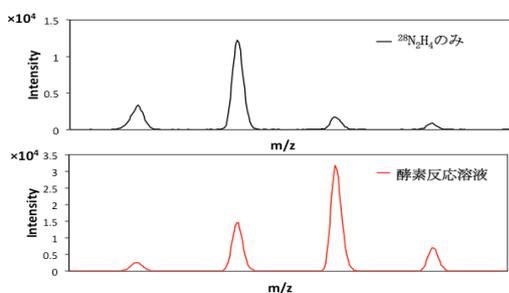


図 2-2 安定同位体を使った HZS+NaXLS による  $N_2H_4$  合成

以上の結果から、 $N_2H_4$  の合成は NO と  $NH_4^+$  を基質とし、N-N の結合の生成を確認した。さらに、酵素としては HZS だけでなく NaXLS を必要とすることが分かった。

(3) KSU-1 株のゲノム遺伝子から NO 還元酵素候補遺伝子を探索した。その結果、ORF として KSU1\_D0929 (登録番号) を見いだした。この ORF は、シグナルペプチドを含む 337 アミノ酸残基からなる Cu 型 Nir をコードしていた。His-tag 配列を付加するように設計したプライマーを使って、シグナル配列を除いた塩基配列部分を PCR により増幅した。これを発現用ベクターの

pET-28a (+) (Novagen) にライゲートした。このプラスミドにより大腸菌宿主 *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した。培養した大腸菌を破碎し、発現したタンパク質を精製した。このタンパク質を 1 mM  $CuSO_4$  溶液で透析して、Cu を発現タンパク質に取り込ませた後、活性を測定した。

発現タンパク質は亜硝酸に対する  $K_m$  は  $250 \pm 50 \mu M$ 、 $V_{max}$  は  $570 \pm 50 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$  となった。他の Cu 型 Nir と比べると  $K_m$  は高いが、 $V_{max}$  も大きく、anammox 菌が比較的高濃度の  $NO_2^-$  を代謝できることから考えると合理的なように思われた。KSU-1 株の Cu-Nir は他の Cu 型 Nir と相同性があり、H122, C159, H168, と M173 がタイプ 1 Cu の配位環境に、H158 と H321 がタイプ 2 Cu の配位環境に保存されていた。さらに、本タンパク質の EPR スペクトル (図 3-1) は、Cu-Nir に一般的なタイプ 1 とタイプ 2 銅の存在を確認できた。

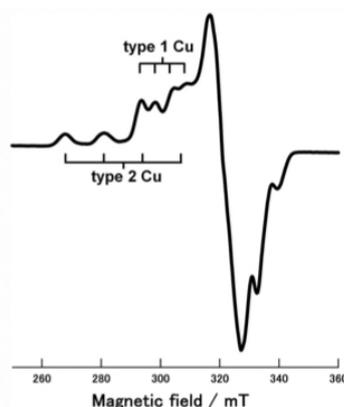


図 3-1 KSU-1 株の組換え Cu-Nir の EPR スペクトル

ホモロジーモデリングによって図 3-2 の立体構造が予想された。この構造から、タイプ 1 銅周辺に多数の酸性アミノ酸、Asp や Glu、が存在していた。今のところ Cu-Nir への電子伝達タンパク質 (ET) は同定されていないが、ET との相互作用にこれら酸性アミノ酸が関係する可能性が考えられた。

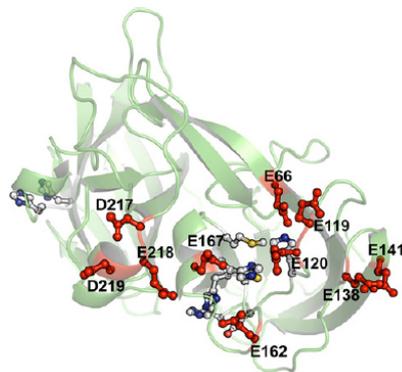


図 3-2 KSU-1 株の組換え Cu-Nir の立体構造モデル

(4) HAO による NO の還元について、NO の代わりに NO 発生試薬の NOC7 を使い 35°C で反応させた。その反応生成物を同定し、反応時間ご

との  $BV_{red}$  濃度の EXCEL データから反応速度定数を計算した。反応生成物は  $NH_2OH$  であることが分かった。さらに、 $BV_{red}$  の減少速度が  $BV_{red}$  の残量と直線関係のある擬定常状態があることが分かった。この状態で、下記の式が成り立つ。酵素 HAO 無添加では I 式が、HAO 添加時では II 式が成立する。

$$-\Delta[BV_{red}] / \Delta t = k_0 [NO]_s \cdot [BV_{red}] + C \quad \text{--I}$$

$$-\Delta[BV_{red}] / \Delta t = k_0 [NO]_s \cdot [BV_{red}] + 3k_1[HAO] \cdot [NO]_s + C \quad \text{--II}$$

$[NO]_s$  : 擬定常状態の時の NO 濃度

EXCEL データから、上記 I および II 式の各係数が表 4-1 に示す値で得られた。

表 4-1 擬定常状態での各計算値

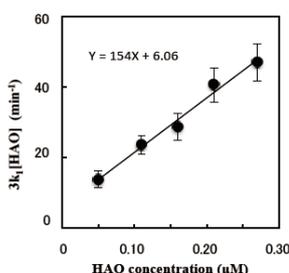
The concentration of HAO ( $\mu M$ )	a	b	c	d
	Slope ( $\text{min}^{-1}$ )	Intercept ( $\mu M \cdot \text{min}^{-1}$ )	b - C ( $\mu M \cdot \text{min}^{-1}$ )	c/a ( $\mu M$ )
	$k_0 [NO]$	$3k_1[HAO] \cdot [NO]_s + C$	$3k_1[HAO] \cdot [NO]_s$	$3k_1[HAO]/k_0$
0	$0.48 \pm 0.041$	$42.4 \pm 3.7^*$	-	-
0.05	$0.49 \pm 0.012$	$84.9 \pm 4.9$	$42.5 \pm 6.1$	$87.6 \pm 14$
0.11	$0.49 \pm 0.014$	$117 \pm 3.7$	$74.1 \pm 5.2$	$150 \pm 25$
0.16	$0.59 \pm 0.013$	$151 \pm 11$	$108 \pm 11$	$183 \pm 19$
0.21	$0.63 \pm 0.053$	$206 \pm 2.8$	$164 \pm 4.6$	$259 \pm 23$
0.27	$0.56 \pm 0.032$	$211 \pm 7.3$	$169 \pm 8.2$	$299 \pm 22$

$\pm$ : standard error (n=3); Values in column c were obtained by subtracting the C value\* of  $42.4 \pm 3.7$  from the values in column b. Values in column d were obtained by dividing the values in column c by those in column a.

さらに、表 4-1 の d カラムの値に別の実験で得られた  $k_0$  の値 ( $0.157 \pm 0.013 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) を掛け、得られた値を HAO 濃度に対してプロットしたのが、下の図 4-1 である。

図 4-1 HAO 濃度と  $3k_1[HAO]$

この回帰直線の傾きから  $k_1 = 51.3 \pm 3.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  と計算された。これを 3 量体の HAO のサブユニットあたりに変換し、さらに次元を換えた値が以下ようになった。 $(2.85 \pm 0.19) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  この値は、アンモニア酸化菌の HAO の NO から  $NH_2OH$  への還元速度定数に匹敵した。



最近、anammox の HAO が  $NH_2OH$  から NO への酸化を触媒することが報告された。しかし、今回の結果を総合すると、anammox の HAO は、NO と  $NH_2OH$  の相互変換 (酸化還元) を触媒し、酸化還元電位の変化に対応し、anammox の中間体である NO 濃度を微調節していると推定できる。

(5) 無細胞の anammox 反応系の総ては、未だ明らかにはできなかったが、各素反応の性質をほとんど解明できた。現在まで還元剤に非生理的なジチオナイトや還元型 BV などを用いたが、生理的還元剤を同定することが、今後の残された重要な課題と思われる。

## 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 Tatsuya Irida, Daisuke Hira, Kenji Furukawa, Takao Fujii, Reduction of nitric oxide catalyzed by hydroxylamine oxidoreductase from an anammox bacterium, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有、2014、in press
- ② Daisuke Hira, Hidehiro Toh, Taiko C. Migita, Hiroki Okubo, Takashi Nishiyama, Masahiro Hattori, Kenji Furukawa, Takao Fujii, Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome  $cd_1$ , FEBS Letters, 査読有、586 巻、2012、1658-1663、<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.041>
- ③ Hiroyuki Okamoto, Kimito Kawamura, Takashi Nishiyama, Takao Fujii, Kenji Furukawa, Development of a fixed-bed anammox reactor with high treatment potential, Biodegradation, 査読有、24 巻、2013、99-110、DOI 10.1007/s10532-012-9561-x

[学会発表] (計 18 件)

- ① 大久保寛幹、市川智美、平大輔、古川憲治、藤井隆夫、anammox 菌 KSU-1 株由来ヘテロ 2 量体シトクロム c (NaxLS) の軸配位子置換とそのヒドラジン合成反応への影響、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、神奈川県川崎市、明治大学生田キャンパス
- ② 前道誠也、市川智美、上岡正太、平大輔、藤井隆夫、anammox 菌 KSU-1 株由来ヒドラジン合成酵素の大腸菌発現系の構築、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜
- ③ 市川智美、平大輔、大久保寛幹、藤井隆夫、anammox 菌のヘテロ 2 量体シトクロム c (NaxLS) の部位特異的変異導入とそのヒドラジン合成反応への影響、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜、

- ④ 平大輔、入佐達也、中村照也、山縣ゆり子、古川憲治、藤井隆夫、嫌気的アンモニア酸化の分子機構と電子伝達、第86回日本生化学会大会シンポジウム、神奈川県横浜市、2013年9月12日、パシフィコ横浜
- ⑤ 入佐達也、平大輔、古川憲治、藤井隆夫、嫌気性アンモニア酸化菌のヘム酵素による一酸化窒素還元反応、2013年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会、2013年9月6日、広島県広島市、広島県立大学
- ⑥ Tkakao Fujii、Daisuke Hira、Takashi Nishiyama、Kenji Furukawa、Re-characterization of hydroxylamine oxidoreductase of anammox bacteria, The Second International Anammox Symposium, 2013年6月12日、Seoul city, Korea, COEX Seoul
- ⑦ Daisuke Hira、Hiroki Okubo、Satomi Ichikawa、Kenji Furukawa、Takao Fujii、Hydrazine synthase from an Anammox Bacterium Strain KSU-1, The Second International Anammox Symposium, 2013年6月12日、Seoul city, Korea, COEX Seoul
- ⑧ 平大輔、大久保寛幹、古川憲治、藤井隆夫、嫌気性アンモニア酸化菌のヒドラジン合成、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月26日、宮城県仙台市、東北大学
- ⑨ 藤井隆夫、入佐達也、平大輔、古川憲治、嫌気性アンモニア酸化菌のHAOが触媒するヒドロキシルアミン生成、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月26日、宮城県仙台市、東北大学
- ⑩ 平大輔、入佐達也、中村照也、山縣ゆり子、古川憲治、藤井隆夫、anammox菌KSU-1株由来のヒドロキシルアミン酸化還元酵素の構造と機能、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡県福岡市、福岡国際会議場
- ⑪ 大久保寛幹、平大輔、藤井隆夫、anammox菌KSU-1株由来のヒドラジン合成酵素タンパク質の精製と性質、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡県福岡市、福岡国際会議場
- ⑫ 平大輔、中村照也、山縣ゆり子、古川憲治、藤井隆夫、anammox菌のヒドロキシルアミン酸化酵素のX線結晶構造解析、第64回日本生物工学会大会、2012年10月25日、兵庫県神戸市、神戸国際会議場
- ⑬ 大久保寛幹、木戸理保子、平大輔、古川憲治、藤井隆夫、嫌気性アンモニア酸化(anammox)菌由来の銅型亜

硝酸還元酵素の性質、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都府京都市、京都女子大学

- ⑭ 大久保寛幹、木戸理保子、平大輔、古川憲治、藤井隆夫、嫌気性アンモニア酸化(anammox)菌由来の銅型亜硝酸還元酵素の性質、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都府京都市、京都女子大学
- ⑮ 平大輔、中村照也、山縣ゆり子、古川憲治、藤井隆夫、嫌気性アンモニア酸化(anammox)菌由来NaxLS複合体の結晶構造、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都府京都市、京都女子大学
- ⑯ 平大輔、中村照也、山縣ゆり子、古川憲治、藤井隆夫、嫌気性アンモニア酸化細菌のヘテロ2量体シトクロムcの構造と電子伝達系における機能、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、京都府京都市、京都国際会館
- ⑰ Takao Fujii、Daisuke Hira、Takashi Nishiyama、Kenji Furukawa、Heme-proteins expressed in soluble fraction in cells of anammox bacteria, First International Anammox Symposium, 2011年5月19日、熊本県熊本市、熊本大学
- ⑱ Daisuke Hira、Teruya Nakamura、Yuriko Yamagata、Takao Fujii、Kenji Furukawa、Structural analyses of a heterodimeric cytochrome c complex from an anammox bacterium Strain KSU-1, First International Anammox Symposium, 2011年5月19日、熊本県熊本市、熊本大学

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：ヒドラジン合成法

発明者：藤井隆夫、平大輔、大久保寛幹

権利者：学校法人君が淵学園、藤井隆夫、平大輔

種類：特許

番号：特願2013-237127号

出願年月日：25年11月15日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/environ/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井隆夫 (FUJII, Takao)

崇城大学・生物生命学部・教授  
研究者番号：80165331

(2)研究分担者

西山 孝 (NISHIYAMA, Takashi)  
崇城大学・生物生命学部・准教授  
研究者番号：00425331

平 大輔 (HIRA, Daisuke)  
崇城大学・生物生命学部・助教  
研究者番号：00569890