

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291015

研究課題名(和文)次世代水質浄化を担うアナモックス菌による窒素除去の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular and Structural Basis of Nitrogen Removal by Anammox Bacteria

研究代表者

永野 真吾 (Nagano, Shingo)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60286440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：アナモックス菌は、嫌気条件下で亜硝酸とアンモニアから3段階の反応で分子状窒素を生産する窒素除去反応を担っている。この反応の中で一酸化窒素とアンモニアからヒドラジンを合成する触媒するヒドラジン合成酵素(HZS)が、アナモックス菌の窒素代謝の鍵酵素である。本研究では、アナモックス菌を連続大量培養する装置を作成し、アナモックス菌からHZSを大量に高純度精製した。また、HZSの反応メカニズムの解明にはHZSの異種発現系が必要であるので、大腸菌を用いたモノシストロン性、およびポリシストロン性発現ベクターを構築した。一部のサブユニットのヘムc含有率が低い、大腸菌によりHZSを発現するすることができた。

研究成果の概要(英文)：Anammox bacteria produce dinitrogen from nitrite and ammonium under anaerobic condition. The key enzyme of nitrogen metabolism of anammox is hydrazine synthase, which produces hydrazine from nitric oxide and ammonium. In this study, we have prepared 10-L scale membrane bioreactor for cultivation of anammox bacteria. Large amount of HZS was extracted from anammox bacteria and highly purified HZS are obtained by anion exchange and hydroxyapatite chromatography. We have also cloned HZS gene (hzsABC) from anammox bacteria genome and constructed monocistronic and polycistronic expression vector of HZS. Although some of HZS A subunit lost heme c, we have confirmed expression of HZS in *E. coli*.

研究分野：酵素化学

キーワード：アナモックス ヘム 脱窒 水質浄化 窒素循環

1. 研究開始当初の背景

生命に必須の窒素元素は、様々な窒素化合物として存在し、主に微生物が行う窒素循環(窒素固定・硝化・脱窒)により地球上を循環している。近年発見されたアナモックス菌は、亜硝酸とアンモニアから3段階の反応で嫌氣的に分子状窒素を産生する新しい窒素循環の経路(アナモックス)を担っている(図1)。また、アナモックスは、海洋の分子

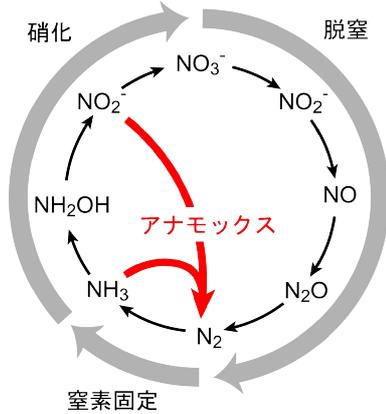


図1. 窒素循環とアナモックス

状窒素生産の約50%を担う地球上の重要な窒素循環経路であり、近年は省エネルギー水質浄化にアナモックス菌が活用されている。3段階反応のアナモックスの中で一酸化窒素とアンモニアからヒドラジン(H₂N-NH₂)を作る反応は、他の生物には見られないヘム酵素であるヒドラジン合成酵素(HZS)によって触媒されている(図2)。



図2. アナモックス反応

2. 研究の目的

ごく最近、HZSの結晶構造が報告され、2か所の活性部位と分子表面をつなぐトンネルの存在が明らかとされた。この構造に基づいて一酸化窒素がまずヒドロキシルアミンに還元され、この中間生成物が第二の活性部位へ移動し、そこでアンモニアと反応すること

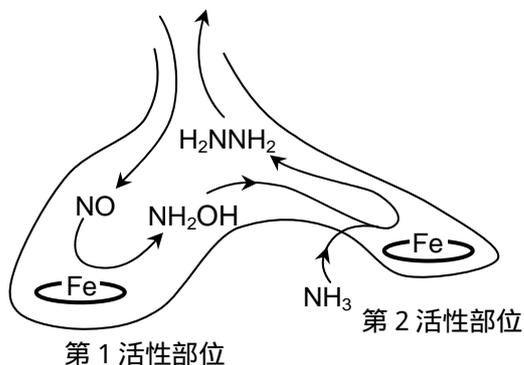


図3. 提案されているHZSのメカニズム

でヒドラジンが合成されるメカニズム(図3)が提案された。しかしこのメカニズムを直接支持するデータはなく、仮説の域を出ていない。このメカニズムを検証するためには、大腸菌などの異種発現系を構築し、変異体の機能解析を行うことが必須である。そこで本研究では、HZSの大腸菌での発現系の構築を行った。また、アナモックス菌の大量培養とアナモックス菌からのHZSの抽出・精製も行った。

3. 研究の方法

(1) アナモックス菌の大量培養

ヒドラジン合成酵素はアナモックス菌の全蛋白質の約20%を占めるため、アナモックス菌を大量培養し、この酵素を大量に精製することができる。図4のように培地を連続的に供給し、処理水を微生物が透過できないフィルターでろ過して排出させるメンブレンバイオリアクターを作成し、アナモックス菌の大量培養を行った。リアクターには、アナモックス菌が付着できる不織布を入れた。

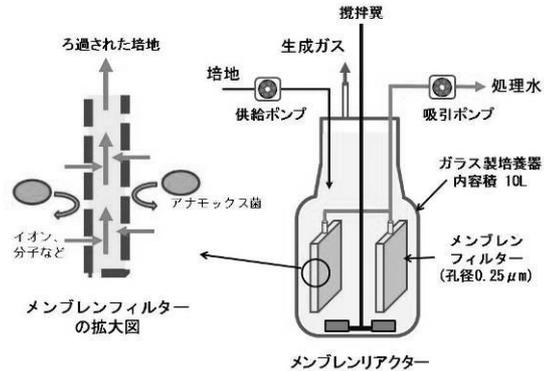


図4. アナモックス菌の大量培養装置

(2) アナモックス菌のHZSの大量精製

大量培養装置の培養液からアナモックス菌を集菌し、超音波破碎、陰イオン交換カラム(Q Sepharose)による粗精製の後、ヒドロキシアパタイトカラムによる精製を行った。

(3) HZS 遺伝子(hzsABC)のクローニングと発現ベクターの作製

大量培養したアナモックス菌からゲノムDNAを抽出し、degenerate PCRとinverse PCRにより hzsA, hzsB, hzsCをそれぞれ増幅した。pETベクターに組み込み、3つのサブユニット遺伝子をそれぞれ1本のmRNAに転写するモノシストロン性発現ベクターを構築した。また、hzsABCを一本のmRNAに転写するポリシストロン性発現ベクターも構築した。好熱性細菌由来の蛋白質は、一般的に安定性が高く、取扱いが比較的容易である。菱刈金山の熱水環境に存在するアナモックス菌から hzsABCを増幅し、常温性アナモックス菌の場合と同様に、モノシストロン性発現ベクターとポリシストロン性発現ベクターをそれぞれ構築した。

(4) HZS の発現条件の検討

培養温度、培養時間、発現誘導剤濃度などの条件を系統的に検討した。HZS A の C 末端側に His タグを付加しているため、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロットングにより HZS A を検出した。また、HZS A および HZS B は、それぞれヘム c を 2 分子ずつ有しているため、SDS-PAGE 後にヘム染色を行い、ヘム c を有する HZS A と HZS B を検出した。

4. 研究成果

(1) アナモックス菌の大量培養

メンブレンバイオリアクター(培地体積 10 L)の不織布に、大量のアナモックス菌が付着し赤褐色を呈していた。この不織布から湿重量約 100 g のアナモックス菌を集菌することができた。その後、約 4 か月おきに 100-200 g のアナモックス菌を得ることができた。



図 5 . アナモックス菌のセルペレット

(2) アナモックス菌の HZS の大量精製

アナモックス菌の無細胞抽出液から、Q sepharose カラムで HZS を粗精製した。この段階でヒドロキシルアミノオキシダーゼと思われる夾雑タンパク質が多く存在していたが、その後、ヒドロキシアパタイトカラムによる精製を行い、高純度な HZS を得ることができた(図 6)。

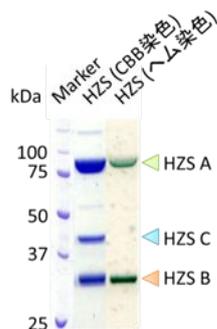


図 6 . 精製後の HZS の SDS-PAGE

(3) HZS 発現ベクターの構築と発現条件の検討

HZS の各サブユニットを単独で発現した場合は、全て不溶性画分に発現し、HZS A と B にヘム c は結合しなかった。そこで、全てのサブユニットを同時に発現するモノシストロン性ベクターにより発現したところ、HZS B にヘム c が結合したホロ型の発現が確認され

た。また、別途 HZS C に His タグを付加した発現ベクターも構築し、HZS C も発現していることが確認された。しかし、HZS A の部分的な切断が顕著であり、HZS A にはほとんどヘム c が結合しなかった。次に、ポリシストロン性発現ベクターで発現させると、HZS A の切断が抑制され、ヘム c が結合した HZS A の発現も確認された。HZS A の多くはアポ型となっており、ホロ型 HZS の発現にはさらに発現系の改良が必要であるが、このベクターに基づいて活性を持つ HZS の発現系を確立すれば、HZS の構造機能相関に関する研究が大きく前進すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Arima, J., Shimone, K., Miyatani, K., Tsunehara, Y., Isoda, Y., Hino, T., and **Nagano, S.**, (2016) Crystal structure of D-stereospecific amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 82F2: insight into the structural factors for substrate specificity. **FEBS J.** 283, 337-349. 査読有
DOI: 10.1111/febs.13579

Kanadani, M., Sato, T., Hino, T., **Nagano, S.**, Ozaki, S.-I. (2015) "The crystal structure of heme acquisition system A from *Yersinia pseudotuberculosis* (HasA_{Ypt}): Roles of the axial ligand Tyr75 and two distal arginines in heme binding" **J. Inorg. Biochem.** 151, 26-33. 査読有
doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.07.007

Takahashi, S., **Nagano, S.**, (他 8 名 2 番目) (2014) Structure-Function Analyses of Cytochrome P450revI Involved in Reveromycin A Biosynthesis and Evaluation of the Biological Activity of Its Substrate, Reveromycin T. **J. Biol. Chem.** 289, 32446-32458. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M114.598391

永野真吾、ビスインドールアルカロイドの分子骨格構築に見いだされる有機化学のロジック、化学工業、査読無総説、65巻、2014、48-55
<http://www.kako-sha.co.jp/2014contentskagaku.html>

〔学会発表〕(計 19 件)

BMB2015、神戸市・ポートアイランド、平成 27 年 12 月 1 日-4 日、○蜂谷将吾、岡本義明、西本一希、福岡三喜、日野智也、**永野真吾**、好熱性アナモックス菌由来ヒドラジン合成酵素の大腸菌を用いた発現系の構築

BMB2015、神戸市・ポートアイランド、平成 27 年 12 月 1 日-4 日、○新出のぞみ、島田順平、**永野真吾**、福岡三喜、日野智也、好熱

性アナモックス菌由来のラダラン脂質生合成推定鍵酵素の発現系の構築

BMB2015、神戸市・ポートアイランド、平成 27 年 12 月 1 日-4 日、○島田順平、新出のぞみ、福間三喜、日野智也、永野真吾、アナモックス細菌のラダラン脂質を生合成する推定鍵酵素の発現、精製条件の検討

BMB2015、神戸市・ポートアイランド、平成 27 年 12 月 1 日-4 日、○岡本義明、蜂谷将吾、西本一希、福間三喜、日野智也、永野真吾、嫌氣的にアンモニアを酸化するアナモックス菌の集積培養とアナモックス菌による窒素代謝の鍵酵素「ヒドラジン合成酵素」の精製

第 15 回 日本蛋白質科学会年会、徳島市・あわぎんホール、平成 27 年 6 月 24 日-26 日、○西本一希、蜂谷将吾、福間三喜、日野智也、永野真吾、アナモックス菌による窒素代謝の鍵酵素 HZS のポリシストロン性発現系の構築

〔図書〕(計 1 件)

Shingo Nagano “Structural and Functional Diversity of Cytochrome P450” Hiroshi Yamazaki ed., Fifty Years of Cytochrome P450 Research, Springer, 2014, pp. 95-106

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~bioeng/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 真吾 (Nagano, Shingo)

鳥取大学大学院工学研究科・教授

研究者番号：60286440