

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850076

研究課題名(和文) 構造生物学的研究によるanammox菌特有ヒドラジン合成酵素系の反応機構解明

研究課題名(英文) Reaction mechanism of hydrazine synthesis system of anaerobic ammonium oxidation

研究代表者

平 大輔 (HIRA, Daisuke)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：00569890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、anammox菌のヒドラジン合成酵素(HZS)とヘテロ2量体シトクロムc(NaxLS)からなるヒドラジン合成酵素系について、分光学的測定・X線結晶構造解析などにより、その反応機構を解明することを目的とした。まず、NaxLSへの部位特異的変異導入によるヒドラジン合成反応への影響検討を行い、NaxLSの還元がヒドラジン合成に必須であることを明らかとし、反応過程においてNaxLSからHZSへの電子伝達が必須であることが強く示唆された。また、HZSのX線結晶構造解析を行い、HZSがプロペラ構造をもつことを明らかとした。さらにHZSとNaxLS複合体の結晶化条件を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we attempted to elucidate the reaction mechanism of hydrazine synthesis system consisting of hydrazine synthase (HZS) and heterodimer cytochrome c (NaxLS) of anammox bacteria by the spectroscopic measurement and X-ray crystal structure analysis. First, by site-specific mutagenesis to NaxLS, it was revealed that the reduction of NaxLS is essential for hydrazine synthesis and strongly suggested that the electron transfer from NaxLS to HZS is essential during the course of the reaction. Second, it was revealed that HZS has propeller like structure by the X-ray crystal structure analysis of HZS. Finally we revealed the crystallization conditions of HZS and NaxLS complex. We are now attempting the crystallographic analyses of the complex.

研究分野：金属蛋白質科学

キーワード：anammox ヘムタンパク質 ヒドラジン合成

## 1. 研究開始当初の背景

1995年にオランダのデルフト工科大学の研究グループより、ある種の細菌がアンモニア(NH<sub>3</sub>)を嫌氣的に窒素ガス(N<sub>2</sub>)まで酸化する嫌氣的アンモニア酸化(anaerobic ammonium oxidation:anammox)を行うことが報告された。anammox反応ではアンモニアを電子供与体として亜硝酸イオンが還元され、中間体としてヒドラジン(N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)を経たのちに、窒素分子が生成される(NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O)。

排水からの窒素除去法として、anammox反応は従来の硝化-脱窒プロセスと比べて多くの利点を持っており、国内外でanammox菌を利用した脱窒処理プロセスの研究が盛んに行われ、既に実用化が始まっている。

一方、anammox菌は上記反応により細胞膜内外にプロトン濃度勾配を形成し、ATPを獲得していると考えられるが、どのような生化学反応を経てN<sub>2</sub>が放出されるのか、その反応にどのような酵素が関わっているのかなど、anammox過程自体の詳細について全容解明には至っていない。anammoxの発見者であるオランダの研究グループから2006年に提唱されている仮説では、一方の基質であるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>が亜硝酸還元酵素(NIR)によって一酸化窒素(NO)へと還元され、生じたNOとNH<sub>3</sub>から中間体であるN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>が生成し、最終的にこのN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>がヒドラジン酸化酵素(HZO)によってN<sub>2</sub>へと酸化されると考えられている。この仮説はゲノム解析による遺伝子のアノテーションに基づいて提出されており、仮説が提唱された時点では、各素反応は確認できておらず、酵素も同定されていなかった。特に、N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>を合成するヒドラジン合成酵素(Hydrazine Synthase, 以下HZS)については生化学的に新規な酵素であり、2011年まで全く報告がなかった。

研究開始当初、オランダの研究グループからHZSに関する初の報告がなされた(Kartal B et al., Nature 479, P127-30. (2011))。しかし、この報告は2つの疑問点を含んでいた。第一に、論文著者らはHZSの活性測定において、N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>自体の検出を行わず、反応系にHZOを共存させることでN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>の酸化による最終生成物と考えられるN<sub>2</sub>を検出していた。第二に、生成したN<sub>2</sub>から計算したヒドラジン合成活性値(分子活性)は約0.08/minと算出され、酵素として非常に低い値であった。

## 2. 研究の目的

上記状況下、研究代表者が所属する崇城大学藤井隆夫研究室では、ヒドラジン生合成を研究する過程で、HZSに加えて、別のヘテロ2量体ヘム蛋白質(NaxLSと呼称)が必要であることを発見した。即ち、両者を酵素系として用い、反応基質として、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の還元中間体のヒドロキシルアミン(NH<sub>2</sub>OH)とNH<sub>3</sub>を与えることで、反応生成物N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>の蓄積を観測することができた。

そこで本研究では、このHZSとNaxLSによるヒドラジン合成酵素系の反応機構解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

主として下記2つの研究項目を実施した。

### (1) HZSの生化学的性質の解明

#### HZSの精製

anammox菌KSU-1株優先汚泥を50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 20% グリセリン 0.5 mM PMSF 1 mM EDTA に懸濁後、超音波破碎しCell-free extractを調製した。Cell-free extractを硫酸分画し、40%飽和硫酸の上清を疎水カラムクロマトグラフィーにかけた。その後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにかけ、精製HZSを得た。

#### HZSと基質との相互作用の測定

精製したHZSと、反応基質候補化合物(NH<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>OH、HNO(各1 mM)、NO(200 μM))を添加し、誘導されるHZSのスペクトル変化を調べた。

#### HZSのヒドラジン合成活性測定

精製したHZSとNaxLS、さらに反応基質候補化合物(NH<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>OH、HNO(各1 mM)、NO(200 μM))を種々に組み合わせて混合し、生じたN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>をその検出試薬であるp-ジメチルアミノベンズアルデヒド(DMBA)とジアゾカップリングさせ比色定量した。

#### MALDI TOF-MSによる<sup>29</sup>N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>の検出

の結果より、HZSとともにNaxLSを加えた条件において、NH<sub>3</sub>とNH<sub>2</sub>OHを基質とした場合とNH<sub>3</sub>とNOを基質にした場合にヒドラジンの合成が認められた。そこで、酵素反応の確認のため、ヒドラジン合成反応の基質として<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Clと<sup>14</sup>NOもしくは、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Clと<sup>14</sup>NH<sub>2</sub>OHを用い、NOとNH<sub>3</sub>のカップリングによって合成されるN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>をさらにDMBAとカップリングさせ、その生成物N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-DMBAをMALDI TOF-MS(Bruker)により検出した。

### (2) X線結晶構造解析によるHZSの立体構造解明

HZSの一次構造はオランダの研究グループが報告したHZS蛋白質とのみ相同性を示し、一次構造上、全く新奇な蛋白質である。つまり、HZSは特有の立体構造を形成し、anammox菌に特有に見られるヒドラジン合成反応を触媒すると考えられた。即ち、立体構造解明は、ヒドラジン合成系の反応機構解明を進めるうえで、ヘムの構造と電子状態、NaxLSとの相互作用などを明らかにするための必要条件であると考えた。

HZSの結晶化条件の探索は複数種類の市販スクリーニングキットを用いて、蒸気拡散法によって行った。得られた結晶を用いてSPRing-8でのX線回折実験を実施した。

また、HZSとNaxLSを混合した状態での結晶化条件についても同様に検討した。

### (3) NaxLSへの部位特異的変異導入による

#### ヒドラジン合成反応への影響検討

NaxLS については、これまでの研究でその立体構造を明らかとしている。NaxLS は NaxL と NaxS のサブユニットからなるヘテロ 2 量体タンパク質であるが、各サブユニットに 1 個の *c* 型ヘムを有しており、NaxLS はそのヘム鉄のシステイン(Cys)配位により非常に低い酸化還元電位を有していることがわかっている。そこで、大腸菌による蛋白質発現系を利用して、NaxLS のヘム鉄配位 Cys をメチオニン(Met)に置換した部位特異的変異体を作成し、ヒドラジン合成反応への影響を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) HZS の生化学的性質の解明

##### HZS のヒドラジン合成活性測定

精製 HZS によるヒドラジン合成反応について、反応基質として種々の窒素化合物の組み合わせを検討したが、酵素として HZS のみを添加した場合には明確なヒドラジンの生成がなかった。HZS とともに NaxLS を加えた場合のみ、還元剤としてジチオナイトを用いて、 $\text{NH}_3$  (1 mM) と  $\text{NO}$  (200  $\mu\text{M}$ ) からほぼ定量的にヒドラジンが合成されることが明らかとなった(図 1)。研究開始当初に推定していた、 $\text{NH}_3$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  を基質にした場合では、定量性は劣ったが、HZS と NaxLS の両者を添加した場合にのみヒドラジンの合成が確認できた。

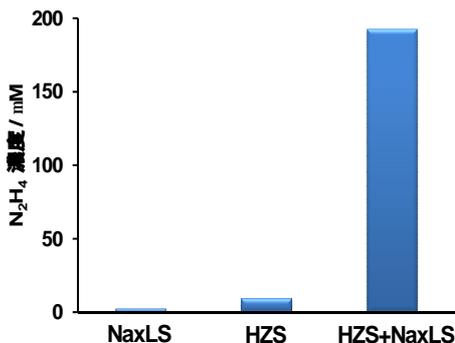


図1 HZSとNaxLSによるヒドラジン合成反応条件

0.5  $\mu\text{M}$  HZS, 5  $\mu\text{M}$  NaxLS, 200  $\mu\text{M}$   $\text{NO}$   
1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM dithionite 35

##### MALDI TOF-MS による $^{29}\text{N}_2\text{H}_4$ の検出

酵素として HZS とともに NaxLS を添加し、ヒドラジン合成反応の基質として  $^{15}\text{NH}_3$  と  $^{14}\text{NO}$  もしくは、 $^{15}\text{NH}_3$  と  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  を用い、生成した  $\text{N}_2\text{H}_4$  と DMBA の反応物を MALDI TOF-MS で分析した。標準物質として市販のヒドラジン  $^{28}\text{N}_2\text{H}_4$  を用いた場合、 $^{28}\text{N}_2\text{H}_4$ -DMBA に由来する 295 m/z にメインピークが検出された(図 2a)。 $^{15}\text{NH}_3$  と  $^{14}\text{NO}$  を用いてヒドラジンを合成した場合には、1 m/z 分だけ大きい 296 m/z にメインピークが検出され、 $^{29}\text{N}_2\text{H}_4$  が生成されていることが確認できた(図 2b)。また、 $^{15}\text{NH}_3$  と  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  を用いた場合では、296 m/z にメイ

ンピークが検出されたが、295 m/z にも約半分の強度でピークが検出され、おそらく  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  2 分子から  $\text{N}_2\text{H}_4$  が生成する副反応によって  $^{28}\text{N}_2\text{H}_4$ -DMBA も形成されていることが示唆された(図 2c)。

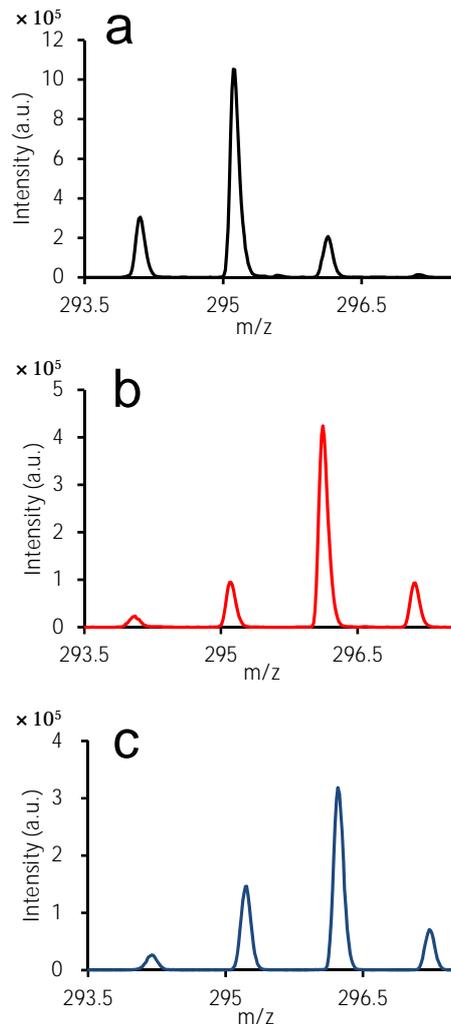


図2 MALDI-TOF MSによるヒドラジン誘導体の検出

a:  $^{28}\text{N}_2\text{H}_4$  (標準物質)

b:  $^{15}\text{NH}_3$  と  $^{14}\text{NO}$  による反応物

c:  $^{15}\text{NH}_3$  と  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  による反応物

これらのことから、ヒドラジン合成反応では NaxLS を要求し、HZS が反応基質として  $\text{NH}_3$  と  $\text{NO}$  の両分子の N-N 結合形成を、触媒することが明らかになった。

##### (2) X 線結晶構造解析による HZS の立体構造解明

種々の条件検討の結果、Sokalan CP42、PEG3350、K、Na-Tartrate を沈殿剤として使用した結晶化条件によって、再現よく HZS の単結晶を得ることができた。

得られた結晶を用いて、SPRing-8 bl44XU において X 線回折実験を行い、の回折能が上がり、波長 1.7 の X 線により分解能 4.0

の回折データを得ることができた。Fe-SAD 法により電子密度計算を行うと、その一部に -プロペラ構造と解釈できる電子密度が確認された。精製した HZS はヘテロ 3 量体であるが、そのうち少なくとも 1 つのサブユニットが -プロペラ構造を形成していることが明らかとなった。現在、立体構造モデルの構築を進めている。

上記の HZS の単結晶を用いた場合、回折データの分解能を向上させることが難しかった。そこで、HZS と NaxLS を混合した試料を用いて結晶化を試みた結果、Pentaerthritol ethoxylate、Polyvinylpyrrolidone を含む HZS の単結晶とは明らかに異なる新たな結晶化条件が判明した。現在、この HZS-NaxLS 複合体結晶の回折実験を計画中である。

( 3 ) NaxLS への部位特異的変異導入によるヒドラジン合成反応への影響検討

NaxS の配位子 Cys のみを Met に変異させた NaxLS\_C7M、NaxLS 両サブユニットの配位子 Cys を Met に変異させた NaxLS\_C7M\_C75M\_H67Q、また NaxL サブユニット単独での発現用プラスミドを構築し、それぞれを大腸菌発現後、各種カラムクロマトグラフィーで精製し、各変異体試料を調製した。

NaxLS の C7M、C7M\_C75M\_H67Q、NaxL サブユニットの各変異体を用いたヒドラジン合成反応を行うと、活性値はそれぞれ約 80 %、約 40 %、約 3 %に減少した。NaxLS 配位子への変異によって活性の減少は見られたが、完全には失われず、NaxLS の低い酸化還元電位は HZS のヒドラジン合成活性に必須ではないが、反応を促進していると考えられた。また、NaxLS が 2 量体であることがヒドラジン合成反応にはより重要であることが示唆された。

さらに、ヒドラジン合成の還元剤として、ジチオナイトの代わりに還元力の低いアスコルビン酸を用いたところ、野生型ではヒドラジン合成がみられず、C7M\_C75M\_H67Q 変異体のみにおいてヒドラジン合成が確認できた。酸化還元電位の低いアスコルビン酸では野生型 NaxLS は還元されずヒドラジンが合成されないが、C7M\_C75M\_H67Q はアスコルビン酸でも還元されるため、ヒドラジン合成が起きたと考えられた。

以上、ヒドラジン合成反応において、NaxLS は 2 量体として機能し、さらに還元状態をとることが必須であることが考えられた。

NH<sub>3</sub> と NO を基質とした場合、ヒドラジンの合成には 3 電子還元が必要であり、NaxLS は HZS へと高エネルギーの電子を供給する電子伝達反応を担っていることが示唆された。現在、HZS と NaxLS の相互作用、電子伝達機構を解明するべく ( 2 ) の研究を進めている。

## 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 5 件 )

Physiological Characterization of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacterium "*Candidatus* Jettenia caeni" Ali M, Oshiki M, Awata T, Isobe K, Kimura Z, Yoshikawa H, Hira D, Kindaichi T, Satoh H, Fujii T, Okabe S. Environmental microbiology, 17(6), 2172-2189 (2015) 査読有 DOI: 10.1111/1462-2920.12674

Reduction of nitric oxide catalyzed by hydroxylamine oxidoreductase from an anammox bacterium. Iriya T., Hira D., Furukawa K., Fujii T. J Biosci Bioeng, 118(6):616-21 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.018.

Re-characterization of hydroxylamine oxidoreductase of anammox bacteria. Fujii T., Hira D., Nishiyama T., Furukawa K. Proceedings of The Second International Anammox Symposium, pp61-62 (2013) 査読有

Hydrazine synthase from an Anammox Bacterium Strain KSU-1. Hira D., Furukawa K., Fujii T. Proceedings of The Second International Anammox Symposium, pp65-66 (2013) 査読有

高機能アナモックスリアクタに関する研究 岡本裕行, 平大輔, 西山孝, 藤井隆夫, 古川憲治, 化学工学論文集, 39(3), P197-205 (2013) 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

市川智美, 平大輔, 中村照也, 山縣ゆり子, 古川憲治, 藤井隆夫 anammox 菌特有ヒドラジン合成酵素の構造と機能の解明 第 21 回日本生物工学会九州支部熊本大会 平成 26 年 12 月 6 日 熊本大学 ( 熊本県・熊本市 )

平大輔, 入佐達也, 大田原起之, 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還元酵素によるヒドロキシルアミン酸化反応と一酸化窒素還元反応 第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月 16 日 京都国際会館 ( 京都府・京都市 )

大田原起之, 平大輔, 古川憲治, 藤井隆夫 anammox 菌のトリヘムシトクロム c の発現とその性質 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会 平成 26 年 9 月 19 日 佐賀大学 ( 佐賀県・佐賀市 )

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 平成 26 年 3 月 28

日 明治大学（神奈川県・川崎市）

平大輔、野元美樹、古川憲治、藤井隆夫 ア  
ナモックス菌 KSU-1 株で発現している 2 種  
類の可溶性シトクロム c の性質 第 20 回日  
本生物工学会九州支部佐賀大会 平成 25 年  
12 月 7 日 佐賀大学（佐賀県・佐賀市）

平大輔、入佐達也、中村照也、山縣ゆり子、  
古川憲治、藤井隆夫 嫌氣的アンモニア酸化  
の分子機構と電子伝達 第 86 回日本生化学  
会大会 平成 25 年 9 月 12 日 パシフィコ横  
浜（神奈川県・横浜市）

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構築 第 86  
回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 12 日  
パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

〔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：平成 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

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