

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05805

研究課題名（和文）新規好気性アンモニア酸化反応の分子メカニズム解明に向けた触媒分子の分離と機能解明

研究課題名（英文）Biochemistry of aerobic ammonia-oxidizing archaea

研究代表者

押木 守 (oshiki, mamoru)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：90540865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では好気性アンモニア酸化古細菌*Nitrososphaera viennensis*からタンパク質を分離・発現・精製し、酵素学的特性を解明した。タンパク質の分離に先立ち、膜分離型リアクターを用いて好気性アンモニア酸化古細菌を高密度培養する技術を確立し、タンパク質の分離・精製を行った。精製したタンパク質について大腸菌を宿主とした異種発現系を構築し、タンパク質の発現を試みた。好気性アンモニア酸化古細菌は地球上で最も存在量の多い古細菌であり、本研究では本細菌の生態についてより深い洞察を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好気性アンモニア酸化反応は地球上の窒素循環を担う大動脈であり、本反応のメカニズムを分子レベルで理解することは学術的にきわめて重要である。本研究では培養が困難であり、限られた知見しか得られていない好気性アンモニア酸化古細菌*Nitrososphaera viennensis*について、触媒酵素を分離し、酵素レベルで反応を理解することを目指した。本研究では本細菌を高密度で大量培養する新規な培養技術の開発、タンパク質分離条件の検討、大腸菌を宿主としたタンパク質発現条件の検討を行っており、これらの成果は今後の生化学研究へのマイルストーンとなる成果といえる。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed to examine the biochemistry of aerobic ammonium oxidizing archaea, *Nitrososphaera viennensis*. First, mass cultivation of *Nitrososphaera viennensis* using a membrane bioreactor has been developed, and the biomass cultivated in the reactor was subjected to protein isolation by liquid chromatography. Some enzymes were successfully isolated from *N. viennensis* culture and subsequently identified by MALDI-TOF/MS analysis. We also developed a heterologous protein expression system for *N. viennensis* protein, whereas a functional expression of those was quite challenging. Our achievements should advance the understanding of biochemistry of *Nitrososphaera viennensis*, while more efforts are definitely required to underpin the biochemistry of aerobic ammonia oxidation reaction.

研究分野：環境工学

キーワード：アンモニア酸化古細菌 AOA 硝化 触媒分子 タンパク質工学

### 1. 研究開始当初の背景

好気性アンモニア酸化反応( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$ )は年間 100~2000 メгатンのアンモニアを酸化しており、地球上の窒素循環において、大動脈と言える反応である(図 1a)。好気性アンモニア酸化反応には細菌(バクテリア)および古細菌(アーキア)が関与し、それぞれをアンモニア酸化細菌(AOB)およびアンモニア酸化古細菌(AOA)と呼ぶ(図 1b)。微生物史上において、AOA は 2006 年に発見された比較的新規な微生物であるが、陸・水圏に広く分布し、アンモニア酸化反応に AOB よりも強く関与することから窒素循環におけるキープレイヤーと見なされている。

では、AOA はどのようにアンモニアを亜硝酸へ酸化し、エネルギーを生産しているのだろうか？この根源的な問いに対して、我々研究者の答えは未だ推測の域にある。AOA の遺伝子情報から AOA のアンモニア酸化反応モデルが推測されているが、特に以下の 2 つの反応について大きな謎が残されている。

1) 中間代謝物として生ずる  $\text{NH}_2\text{OH}$ (ヒドロキシルアミン)を酸化する既知の触媒分子(hydroxylamine oxidoreductase, Hao)を AOA は保持していない。触媒分子(酵素および金属イオンを含む補酵素)の正体は何か？どのようにヒドロキシルアミンを酸化するのか？

2) アンモニア酸化反応には電子を受け渡す電子キャリアが必要であるが、既知の鉄型触媒分子(シトクロム)を AOA は持たない。AOA が持つ電子キャリアの正体は何か？

これらの問いに対する回答を我々が得るためには、触媒分子を AOA から取り出し、機能を解析する必要がある。しかし、AOA は独立栄養性(細胞濃度;  $10^7$  cells/ml)かつ難培養性(倍加時間; >2 日)であり、十分量の菌体量を確保することが困難であることから、AOA の生化学に関する理解が進んでこなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は AOA について生化学的知見を得ることを目的とし、AOA の触媒酵素(タンパク質)を分離・精製し、酵素学的特性を明らかにすることを目指した。この目的を達成するため、研究期間では以下の研究項目について逐次的に取り組んだ。

- ・膜分離型リアクターを用いた AOA の高密度大量培養技術の開発
- ・培養 AOA 菌体からのタンパク質の分離・精製
- ・大腸菌を宿主とした AOA 遺伝子の異種発現系の構築

本研究では AOA のモデル微生物として、*Nitrososphaera viennensis* (JCM19564)を用いた。

### 3. 研究の方法

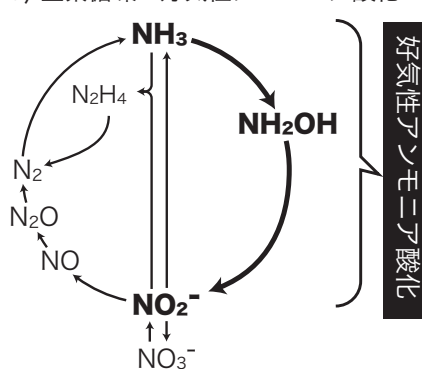
#### 3-1 膜分離型リアクターを用いた *Ns. viennensis* の培養

3L 容ジャーファーマンター(ABLE 製)に中空糸膜モジュールを設置した膜分離型リアクター(図 2)を運転した。膜分離型リアクター内では、膜分離によって菌体の流出を完全に抑制しつつ、培地を連続的に供給・排出しながら連続培養を行うことができる。バッチフラスコ培養した *Ns. viennensis* を植菌し、JCM1004 培地を供給しながら好氣的に 42°C で培養を行った。培養液について、アンモニア、亜硝酸濃度を比色分析法で定量し、OD<sub>600</sub> として菌体濃度を測定した。

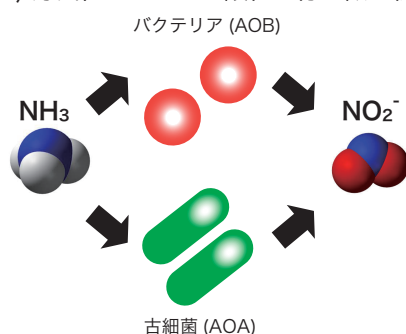
#### 3-2 培養 AOA 菌体からのタンパク質の分離・精製

膜分離型リアクターで培養した菌体を集菌、フレンチプレスで破碎し、超遠心分離によって可溶性タンパク質画分を得た。可溶性タンパク質画分を液体クロマトグラフィー(AKTA explorer 10S, GE ヘルスケア)へ供し、陰・陽イオン交換、疎水性相互作用、ゲル濾過クロマトグラフィーで逐次的に精製を行った。精製タンパク質画分について SDS-PAGE を行い、分

#### a) 窒素循環と好気性アンモニア酸化



#### b) 好気性アンモニア酸化を行う微生物



反応基質、生成物は AOB、AOA で共通しているが、反応メカニズムは大きく異なる。

図 1. 本研究の背景と中心命題

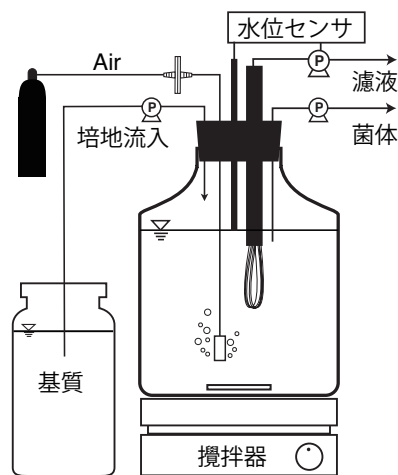


図2. 膜分離型培養装置

離タンパク質についてトリプシン消化後、質量分析法で同定を行った。

### 3-3 大腸菌を宿主とした AOA 遺伝子の異種発現系の構築

AOA 可溶性タンパク質画分から精製したタンパク質について大腸菌を宿主とするタンパク質発現系を構築した。タンパク質発現ベクター(pET、pCold シリーズ)へ *Ns. viennensis* ゲノムから増幅した遺伝子断片を in-fusion クローニングし、大腸菌(BL 株、C 株、origami 株)へ導入した。また、必要に応じて、シャペロンプラスミドなどの補助プラスミドを導入した。構築した発現株を適切な培養条件で培養、発現誘導し、得られた菌体からタンパク質を抽出した。

## 4. 研究成果

### 4-1 膜分離型リアクターを用いた *Ns. viennensis* の培養

*Ns. viennensis* を 3L 容膜分離型リアクターで半年間以上連続培養した。菌体密度で比較するとフラスコ内でバッチ培養した際と比べて、膜分離型リアクターでは *Ns. viennensis* の菌体密度を約 10 倍高い条件で維持・培養することができた。また、タンパク質精製の菌体として、リアクターから 350 mL/日の培養液を引き抜きながら安定して培養することができた。以上より、*Ns. viennensis* のタンパク質精製に必要な菌体を確保する体制を確立することができ、膜分離型リアクターでは世界で初めて *Ns. viennensis* の培養に成功した。

### 4-2 培養 AOA 菌体からのタンパク質の分離・精製

膜分離型リアクターで培養した *Ns. viennensis* 菌体(6 g-wet)をフレンチプレス、超遠心分離へ供し、17 mg の可溶性タンパク質画分を得た。液体クロマトグラフィーで精製を行ったところ、各種タンパク質を分離画分として得ることができ、それらの中でも AOA における主要な電子キャリアタンパク質と考えられるタンパク質を高純度で分離することに成功した。本精製タンパク質について、N 末アミノ酸シーケンスおよび MALDI-TOF/MS を行い、1)AOA 由来のタンパク質であること、2)本タンパク質が異なる AOA 種間で保存され、細胞内で高発現されていることを文献から確認した。本タンパク質(以下、AOA-E1e)は著者の知る限り AOA の天然タンパク質から分離・精製された世界初のタンパク質である。一方、液体クロマトグラフィーによって AOA-E1e を分離することに成功したものの、得られたタンパク質量は極めて少量であり(100  $\mu$ g 程度)、酵素学的特性、各種分析測定が困難だった。そこで、大腸菌を宿主とした AOA-E1e 発現系の構築を目指した。

### 4-3 大腸菌を宿主とした AOA 遺伝子の異種発現系の構築

上述のタンパク質の分離・精製によって得られた AOA-E1e について、大腸菌を宿主としたタンパク質発現系を構築した。各種発現ベクター(pET29, pColdI, pCold-TF)、大腸菌株(B21, Origami 株)、共発現プラスミド(シャペロンプラスミド、pRKISU)、発現条件(鉄硫黄含有培地)を検討したものの、AOA-E1e を可溶性タンパク質として発現させることはかなわなかった。これは、AOA-E1e が分子内に非常に豊富なシステイン残基を有しており、大腸菌ではジスルフィド結合を含むフォールディングが困難であったことが原因として考えられた。本課題を解決するため Origami 株を用いた発現も検討したが、改善は認められなかった。また、AOA-E1e は鉄-硫黄クラスター(Fe-S)を含むタンパク質であり、大腸菌の Fe-S クラスター挿入に関わる遺伝子群を共発現させることで AOA-E1e への Fe-S の挿入を試みたが、発現した AOA-E1e には Fe-S の挿入は認められなかった。AOA-E1e を機能性タンパク質として発現させるためには古細菌由来のシャペロンタンパク質、Fe-S 挿入マシナリーを共発現させることが必要であると考えられた。また、ホストとして大腸菌を用いることの限界が明らかであり、古細菌を発現ホストとした発現系の開発が必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okubo Tsutomu, Tagawa Tadashi, Takahashi Masanobu, Iguchi Akinori, Oshiki Mamoru, Araki Nobuo, Kubota Kengo, Tawfik Ahmed, Uemura Shigeki, Harada Hideki	4. 巻 45
2. 論文標題 Full-scale application of a down-flow hanging sponge reactor combined with a primary sedimentation basin for domestic sewage treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioprocess and Biosystems Engineering	6. 最初と最後の頁 701 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00449-022-02689-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 田中孝国, 岡悟史, 押木守, 金田一智規, 新田見匡	4. 巻 669
2. 論文標題 海洋性Anammox細菌の脱アンモニウム能に及ぼすpHの影響: 至適pH制御による脱アンモニウム能の回復	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 工業用水	6. 最初と最後の頁 51-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 田中孝国, 岡悟史, 田中昭雄, 押木守, 金田一智規, 新田見匡	4. 巻 667
2. 論文標題 異なるpH条件下における 海洋性Anammox細菌の脱アンモニウム能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 工業用水	6. 最初と最後の頁 76-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okabe Satoshi, Shafdar Amrini Amalia, Kobayashi Kanae, Zhang Lei, Oshiki Mamoru	4. 巻 15
2. 論文標題 Glycogen metabolism of the anammox bacterium "Candidatus Brocadia sinica"	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-020-00850-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oshiki Mamoru, Fukushima Toshikazu, Kawano Shuichi, Nakagawa Junichi	4. 巻 37
2. 論文標題 Endpoint Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Assay for Enumeration of Thiocyanate-degrading Bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME21073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.me21073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oshiki Mamoru, Nagai Komei, Ishii Satoshi, Suzuki Yoshiyuki, Saito Nobuo, Yamaguchi Takashi, Araki Nobuo, Okabe Satoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Determination of 15N/14N of Ammonium, Nitrite, Nitrate, Hydroxylamine, and Hydrazine Using Colorimetric Reagents and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0241621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.02416-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshiki Mamoru, Yamada Koshiro, Kato Itsuki, Okoshi Kento, Imai Toshiro, Yamaguchi Takashi, Araki Nobuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Biosynthesis of hydrazine from ammonium and hydroxylamine using an anaerobic ammonium oxidizing bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology Letters	6. 最初と最後の頁 979 - 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-020-02865-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshiki Mamoru, Aizuka Takashi, Netsu Hirotooshi, Omori Satoshi, Nagano Akihiro, Yamaguchi Takashi, Araki Nobuo	4. 巻 520
2. 論文標題 Total ammonia nitrogen (TAN) removal performance of a recirculating down-hanging sponge (DHS) reactor operated at 10 to 20 °C with activated carbon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 734963 - 734963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquaculture.2020.734963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshiki Mamoru, Ishimaru Miho, Hatamoto Masashi, Yamaguchi Takashi, Araki Nobuo, Okabe Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 N2O production using native nos-deficient denitrifying bacterial strains screened by a genome mining approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioresource Technology Reports	6. 最初と最後の頁 100529 ~ 100529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biteb.2020.100529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshiki Mamoru, Hiraizumi Haruna, Satoh Hisashi, Okabe Satoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Cell Density-dependent Anammox Activity of Candidatus Brocadia sinica Regulated by N-acyl Homoserine Lactone-mediated Quorum Sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME20086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME20086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kanae Kobayashi, Keitaro Fukushima, Yuji Onishi, Kazuya Nishina, Akiko Makabe, Mamoru Oshiki, Keisuke Koba, Satoshi Okabe
2. 発表標題 Oxygen isotopic fractionation and exchange during anaerobic ammonium oxidation (anammox)
3. 学会等名 7th International Conference on Nitrification and Related Processes (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mamoru Oshiki, Komei Nagai, Satoshi Ishii, Yoshiyuki Suzuki, Nobuo Saito, Takashi Yamaguchi, Nobuo Araki, Satoshi Okabe
2. 発表標題 Colorimetric MALDI-TOF/MS; a simple and high-throughput method for determining 15N atom % of NH3, NO2-, NO3-, NH2OH and N2H4
3. 学会等名 7th International Conference on Nitrification and Related Processes (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morimoto, E, Kamizono, A, Kobayashi, K, Oshiki, M, Okabe, S
2. 発表標題 Metabolic pathways of urea and cyanate in an enrichment culture of a marine anammox bacterium <i>Ca. Scalindua</i> sp. "
3. 学会等名 7th International Conference on Nitrification and Related Processes (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Baku Tsukada, Kanae Kobayashi, Keitaro Fukushima, Yuji Onishi, Mamoru Oshiki, Keisuke Koba, Satoshi Okabe
2. 発表標題 Dual nitrogen and oxygen isotope fractionation during complete ammonia oxidation by comammox bacteria " <i>Nitrospira inopinata</i> "
3. 学会等名 7th International Conference on Nitrification and Related Processes (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本衣美, 上園亮達, 小林香苗, 押木守, 岡部聡
2. 発表標題 海洋性アナモックス細菌 " <i>Ca. Scalindua</i> sp. " 集積培養系における尿素及びシアン酸の代謝経路の解析
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本衿花, 森本衣美, 上園亮達, Shaoyu YE, 小林香苗, 押木守, 岡部聡
2. 発表標題 海洋性アナモックス細菌とAOAは相利共生するか？
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根津 拓福, 黒田 恭平, 成廣 隆, 金田一 智規, 藤井 直樹, 荒木 信夫, 山口 隆司, 幡本 将史, 鈴木 義之, 岡部 聡, 押木 守
2. 発表標題 なぜ低温硝化リアクター内で亜硝酸酸化細菌Nitrospira は優占できたのか~ Nitrospira とNitrosomonas の炭素固定経路の違い~
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永井 孔明, 荒木 信夫, 鈴木 義之, 斉藤 信雄, 山口 隆司, 石井 聡, 押木 守
2. 発表標題 比色分析と質量分析法を組み合わせた溶存無機態窒素の 15N/14N 比の新たな測定手法
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市原りえ, KOFFI Joel, 押木 守, 岡部 聡
2. 発表標題 AOB は電極呼吸によるアンモニア酸化が可能か?
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本衣美, 小林香苗, 押木 守, 岡部 聡
2. 発表標題 海洋性アナモックス細菌 "Ca. Scalindua sp." 集積培養系における尿素及びシアン酸の代謝経路の解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 塚田 麦, 小林香苗, 押木 守, 岡部 聡
2. 発表標題 公開 完全なアンモニア酸化(COMAMMOX)細菌“ <i>Nitrospira inopinata</i> ”の窒素・酸素同位体分別の解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口宏介, 北島正章, 岡部 聡, 押木 守
2. 発表標題 公開 フローサイトメトリーとアンプリコンシーケンス解析による活性汚泥における多剤耐性プラスミドの伝播頻度・宿主域の調査
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中林豊博, 荒木信夫, 山口隆司, 岡部聡, 押木守
2. 発表標題 煮沸・プロテアーゼK処理で失活しないanammox細菌の亜硝酸還元酵素の諸特性～anammox代謝機構の解明をめざして～
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永井孔明, 荒木信夫, 鈴木義之, 斎藤信雄, 山口隆司, 石井聡, 押木守
2. 発表標題 MALDI-TOF/MSを用いた溶存無機態窒素の安定同位体比の測定～複合系内の窒素動態を簡便かつ迅速に評価する革新技術の開発～
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根津拓福, 荒木信夫, 鈴木義之, 山口隆司, 幡本将史, 藤井直樹, 金田一智規, 黒田恭平, 成廣隆, 岡部聡, 押木守
2. 発表標題 海洋性NitrospiralはなぜAOBより優占度が大きいのか
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関