

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710078

研究課題名（和文）Anammox 菌特有蛋白質の機能解明とその遺伝子を利用した反応モニター手法の開発

研究課題名（英文）Functional analyses of an anammox protein and development of the monitoring method for anammox reaction by using its gene.

研究代表者

平 大輔 (HIRA DAISUKE)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：00569890

研究成果の概要（和文）：排水・環境水中からの効率的な窒素除去法として期待されている anammox 排水処理プロセスの安定管理法の構築を目指して、anammox 菌が特有にもつヘテロ 2 量体ヘム蛋白質を対象として anammox 反応の理解を進めた。種々の anammox 菌由来の本蛋白質遺伝子の塩基配列を比較することで構造に関する知見が得られた。さらに、本蛋白質が anammox 反応において最も重要な反応であるヒドラジン合成反応に関与しているとの知見が得られ、反応モニター手法の開発へと繋がる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Anaerobic ammonium oxidation (anammox) is a novel and promising process for the removal of inorganic nitrogen from wastewater treatment. In this study, I have characterized a heterodimeric heme-protein with a low molecular weight being specific for anammox bacteria to reveal the reaction mechanism of anammox. Biochemical analyses revealed that the heterodimeric heme-protein was involved in the hydrazine synthesis which is a key reaction in anammox process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：anammox, ヘム蛋白質, 嫌気性アンモニア酸化, 脱窒, 窒素除去

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、湖沼や内湾などの閉鎖性水域における富栄養化や地下水の硝酸塩汚染などが社会問題となっている。これらへの対策のために、排水・環境水中からの効率的な窒素除去法の確立が求められている。嫌気的アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation: anammox）は従来の窒素循環に加わる新たな窒素変換経路で、嫌気条件下でアンモニアが電子供与体、亜硝酸イオンが電子

受容体となって窒素ガスを生ずる独立栄養性の反応である。窒素除去プロセスの観点から、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いる。即ち、anammox は独立栄養性であるため、外部からの電子供与体の添加が不要である。また脱窒の過程で副産物の亜酸化窒素などの温室効果ガスが発生しない。これらの理由でその発見当初より、排水・環境水中からの効率的なアンモニアの除去法として注目され、国内外

で anammox 細菌の応用を目指した工学的研究が盛んに行われてきた。

(2) このような状況において、anammox 処理の実用化に向けてのさらなる課題は、anammox 処理の更なる向上と安定運転であると考えられる。anammox 細菌は独立栄養細菌で比増殖速度が極めて小さく、排水の成分や温度・pH などの条件によって生育阻害が生じた場合に、排水処理効率を維持するのが困難となってしまう。これに対処するためには、様々な排水状況、即ち生育条件において、anammox 菌の生育とその anammox 反応のどの過程が律速段階となっているのかをモニターする必要があると考えられる。しかし、anammox 菌がその細胞内でアンモニアと亜硝酸を用いて、どのようにエネルギー (ATP) を獲得しているのか、即ち、どのような化学反応を経てアンモニアと亜硝酸イオンから窒素分子が生じているのか、その化学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は世界的にほとんど研究が進んでいない。

(3) 研究代表者が所属するグループで集積した anammox 菌 KSU-1 株より anammox 菌に特有の蛋白質・酵素を単離・精製することを試み、近頃 anammox 菌が特有にもつヘテロ 2 量体ヘム蛋白質が高発現していることを確認した。このヘテロ 2 量体ヘム蛋白質は亜硝酸の代謝中間体の NO との相互作用を示唆するデータが得られている。

そこでこのヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の機能を解明し、さらに様々な排水状況、即ち生育条件において、その発現時期や発現量を測定することが出来れば、anammox 菌の生育と anammox 反応をモニターでき、安定した排水処理が達成できると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者が所属する研究グループでは、様々な生育条件で集積化した様々な anammox 菌汚泥を有しており、anammox 菌株は KSU-1 株以外にも数種類を保有している。

(1) 第一に、これら種々の anammox 菌より、ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の遺伝子を PCR により増幅・クローニングして取得し、塩基配列を解読することで、そのアミノ酸一次配列を決定することとした。こうして得られた種々の anammox 菌由来のヘテロ 2 量体ヘム蛋白質のアミノ酸配列同士を比較することで、どのアミノ酸が保存しているか、すなわちヘテロ 2 量体ヘム蛋白質が機能をもつために重要なアミノ酸を同定することができると考えた。さらにクローニングして得られた種々の anammox 菌由来のヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の遺伝子を大腸菌に組み込み、大量発現させ、得られたヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の分光学的・電気化学的性質を検討し、それぞれ

のデータを比較することで、ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の機能推定を試みることにした。

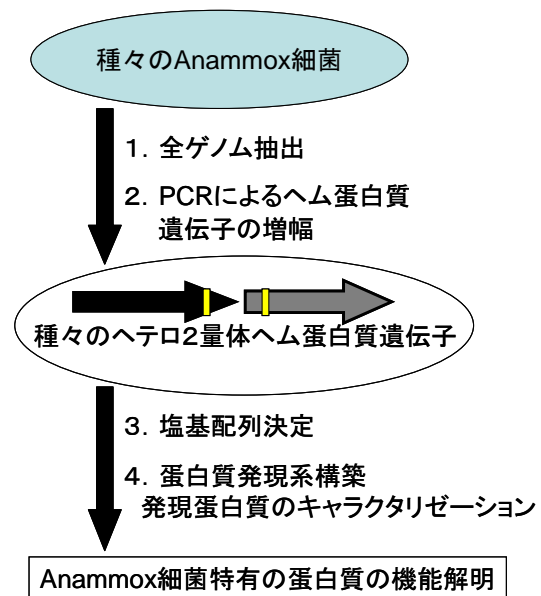
(2) 第二に、様々な生育条件において、ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の遺伝子の発現量を RT-PCR 法により測定することを目的とした。

(3) これら第一と第二の検討を総合することで、anammox 菌に特有のヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の働きを解明するとともに、この蛋白質を指標とした遺伝子レベルでの anammox 反応モニター法、すなわち、anammox 排水処理プロセスの安定管理法の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) まず当研究グループが蓄積してきた 5 種類の anammox 菌汚泥よりゲノム DNA を抽出し、PCR によりヘテロ 2 量体ヘム蛋白質遺伝子を増幅・クローニングし、その塩基配列解読を行う。

(2) (1) で取得した遺伝子を用いて、大腸菌による蛋白質発現系を構築するとともに、ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質のサブユニットそれぞれを別々に発現する系も構築し、精製して得られた発現蛋白質をキャラクターゼーションする。



(3) anammox 菌 KSU-1 株から精製される他の酵素 (ヒドラジン酸化酵素、ヒドロキシルアミン酸化酵素、ヒドラジン合成酵素候補蛋白質など) との反応について分光学的・生化学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 得られた複数の anammox 菌由来ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質遺伝子の塩基配列を比較するとヘム結合モチーフ、ヘムの第 6 配位アミノ酸と想定されるシステイン残基がすべての配列で保存しており、これらにより形成

されると推定される His/Cys 配位の c 型ヘムが本蛋白質の機能にとって重要であることが推定された。

(2) ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の酸化還元電位はヘムへのシステイン配位が大きな要因であること、さらにサブユニット間の相互作用によって酸化還元電位がより低下していることが推定された。

(3) ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の単結晶化に成功し、X 線結晶構造解析により、その新奇な立体構造の解明に至った。これにより、ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質のヘムへのシステイン配位が立証され、さらに両サブユニット間における強固な相互作用の要因が明らかとなった。

(4) ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質が anammox 反応において最も重要な反応であるヒドラジン合成反応に関与していることが判明した。即ち、ヒドラジン合成酵素候補蛋白質と本ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質が共存するときのみ、ヒドラジンの合成が観測された。

以上より、本ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質はどちらのサブユニットにおいてもシステインが配位したヘムを有しており、非常に低い酸化還元電位をもつことが明らかとなった。また、強固なヘテロ 2 量体を形成していることが明らかになった。加えて、ヒドラジン合成酵素候補蛋白質とともに機能し、ヒドラジン合成反応に重要な役割を担っていると考えられた。即ち、これまでに前例のない anammox 菌に特有の性質・構造を有することで、anammox 菌に特有のヒドラジン合成反応において働いていると考えられた。研究の目的 (1) ヘテロ 2 量体ヘム蛋白質の機能推定について、大きな進展が得られた。現在、研究成果 (1) で得られた知見をもとに、種々の anammox リアクタ条件における発現定量を進めている。また、本蛋白質の発現系を用いて、配位システインの部位特異的変異体の作成など、今後さらに機能解明を進めることができると期待される。

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 6 件)

- ① Hira D, Toh H, Migita CT, Okubo H, Nishiyama T, Hattori M, Furukawa K, Fujii T 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,

2012, 1658-1663

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.041>

- ② Li Z, Ma Y, Hira D, Fujii T, Furukawa K. Factors affecting the treatment of reject water by the anammox process Bioresour. Technol., 査読有, 102, 2011, 5702-5708
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.001>
- ③ Quan LM, Khanh do P, Hira D, Fujii T, Furukawa K. Reject water treatment by improvement of whole cell anammox entrapment using polyvinyl alcohol/alginate gel Biodegradation, 査読有, 22, 2011, 1155-1167
<http://dx.doi.org/10.1007/s10532-011-9471-3>
- ④ Khanh D, Quan L, Zhang, Hira D, Furukawa K. Effect of temperature on low-strength wastewater treatment by UASB reactor using poly(vinyl alcohol)-gel carrier Bioresour. Technol. 査読有, 102 2011 11147-11154
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.108>
- ⑤ Ma Y, Hira D, Li Z, Chen C, Furukawa K. Nitrogen removal performance of a hybrid anammox reactor Bioresour. Technol. 査読有, 102 2011 6650-6656
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.081>
- ⑥ Ukita S, Fujii T, Hira D, Nishiyama T, Kawase T, Migita CT, Furukawa K. A heterodimeric cytochrome *c* complex with a very low redox potential from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture FEMS Microbiol. Lett. 査読有, 313 2010 61-67
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02122.x

[学会発表] (計 6 件)

- ① 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 日本農芸化学会大会 2012 年度大会 2012 年 3 月 24 日 京都女子大学
- ② 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 8 4 回日

本生化学会大会 2011年9月22日 国立
京都国際会館

③Hira D, Nakamura T, Yamagata Y, Fujii T,
Furukawa K Structural Analyses of a
Heterodimeric Cytochrome *c* Complex from
an Anammox Bactrium Strain KSU-1
First International Anammox Symposium
2011年5月20日 熊本大学

④平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古
川 憲治、藤井 隆夫 Anammox菌の生産する
ヘテロ 2 量体*c*型ヘムタンパク質の構造と
機能 日本農芸化学会 2011 年度大会
2011年3月26日 京都女子大学

⑤藤井 隆夫、平 大輔、古川 憲治
Anammox 汚泥からのヘテロ 2 量体シトクロ
ム *c* (NaxLS) 遺伝子の検出とその一次構造
の特徴 第 62 回 日本生物工学会大会
2010年10月28日 ワールドコンベンショ
ンセンターサミット(宮崎県)

⑥平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古
川 憲治、藤井 隆夫 Anammox菌のヘテロ
2 量体シトクロム *c* (NaxLS) のX線結晶構造
解析 第 62 回 日本生物工学会大会 2010
年 10 月 28 日 ワールドコンベンションセ
ンターサミット(宮崎県)

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・助教
研究者番号：00569890

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし