

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450105

研究課題名(和文)嫌気性アンモニア酸化(anammox)は温暖化ガス亜酸化窒素を生成するか

研究課題名(英文)Is nitrous oxide, a greenhouse gas, generated by anammox process?

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気性アンモニア酸化(anammox)が温暖化ガスの亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)を副生しにくい脱窒プロセスであるかどうかを明らかにすることを目的にした。

ヒドラジン合成酵素+NaxLS(HZS+NaxLS)、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素、亜硝酸還元酵素が触媒する各素反応について、通常の条件でN<sub>2</sub>Oが副生しないことが分かった。さらに、HZS+NaxLSは複合体を形成し、N<sub>2</sub>Oの副生を許さない迅速な電子伝達が可能であった。anammox培養系では生成窒素ガスと生成亜酸化窒素は相関しなかった。以上のことより、anammoxがN<sub>2</sub>Oを副生しにくい脱窒プロセスと確認した。

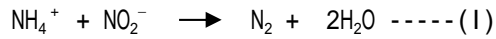
研究成果の概要(英文)：It was investigated whether nitrous oxide, a greenhouse gas, was generated by anaerobic ammonium oxidation. Experimental data showed the facts described below. Nitrous oxide was not ordinarily generated as a byproduct in the cases using hydrazine-synthesizing enzyme plus NaxLS (HZS+NaxLS), nitrite reductase, and hydroxylamine oxidoreductase. Furthermore, the structure analyses of HZS + NaxLS demonstrated that the two proteins formed a complex (HZS-NaxLS), which enabled rapid intermolecular electron transfer between NaxLS and an active site of HZS. The rapid electron transfer might cause HZS-NaxLS catalyzing denitrification without generation nitrous oxide. In an anammox reactor, the amounts of nitrous oxide gas formed did not correlate with those of nitrogen gas generated from anammox bacteria. Taken together, it was confirmed that anammox hardly generated nitrous oxide as a byproduct.

研究分野：微生物生化学

キーワード：嫌気性アンモニア酸化 anammox ヒムタンパク質 ヒドラジン合成 温暖化ガス生成 一酸化二窒素生成  
成 ヒドラジン合成酵素 NaxLS

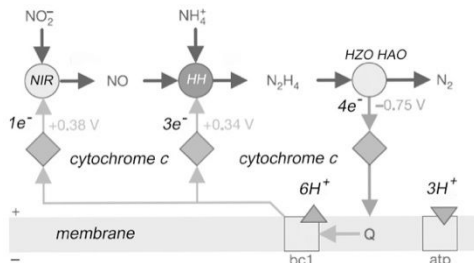
### 1. 研究開始当初の背景

嫌気性アンモニア酸化(以下anammoxと略する)は1990年代中盤に発見され、系統発生的に近縁な一群の細菌(anammox 菌)が触媒する新しい脱窒反応(1)である。



従来型の脱窒菌の反応では中間体に  $\text{N}_2\text{O}$  が生成することと anammox (1) 反応過程が異なるため、 $\text{N}_2\text{O}$  を全く生成しないと期待されている。

提案されている anammox 反応機構の仮説では、 $\text{NO}_2^-$  から中間体の  $\text{NO}$  が生成し、 $\text{NO}$  とアンモニアから中間体のヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) が生成する。最終的に  $\text{N}_2\text{H}_4$  から脱窒が起こる。我々は、anammox 菌 KSU-1 株で、



仮定されている酵素すべてを精製し、各反応を確認してきた。また、ゲノムの解析も終わった。仮説の HH ( $\text{N}_2\text{H}_4$  加水分解酵素) あるいは HZS ( $\text{N}_2\text{H}_4$  合成酵素) と呼ばれる酵素による  $\text{N}_2\text{H}_4$  合成も調べた。HH (HZS) だけでは、 $\text{N}_2\text{H}_4$  合成は起こらず、別のヘムタンパク質 NaxLS を加えて、初めて合成が起こった(論文作成中, 特許既出願)。

### 2. 研究の目的

anammox の  $\text{N}_2\text{H}_4$  生成機構の詳細を調べ、 $\text{N}_2\text{H}_4$  合成反応が温暖化ガスの  $\text{N}_2\text{O}$  を生成しないこと、その根拠を酵素の立体構造から考察すること、その他の関連反応についても  $\text{N}_2\text{O}$  を生成しないこと、さらに培養系を再検証し anammox が  $\text{N}_2\text{O}$  の生成を伴わないことを確認する。

### 3. 研究の方法

(1) anammox の素反応のなかで重要と考えられる HZS と NaxLS が触媒する  $\text{N}_2\text{H}_4$  合成で  $\text{N}_2\text{O}$  の生成が起こるか調べた。HZS は anammox 汚泥から精製し、NaxLS は大腸菌発現系で調製した組換えタンパク質を使用した。HZS

と NaxLS (NaxLS の野生型あるいは変異型) を同時に添加 (HZS+NaxLS) し  $\text{N}_2\text{H}_4$  を合成させた。基質には  $\text{NO}$  ( $\text{NO}$  を反応中徐々に発生させるため、 $133 \mu\text{M}$  の NOC7 (同仁化学)) と  $1 \text{ mM}$  の  $\text{NH}_4^+$  を、還元剤にジチオナイトを使った。反応は 30、30 分行った。 $\text{N}_2\text{O}$  の定量は、EVD 検出器付ガスクロマトグラフィーを使用し、ヘッドスペースガス分析の溶存亜酸化窒素計算式を用いて全生成  $\text{N}_2\text{O}$  を算出し、値を反応液  $\text{ml}$  あたりの濃度で表示した。

(2) HZS-NaxLS 複合体の結晶構造を解明し、その構造から  $\text{N}_2\text{H}_4$  の生成機構を考察し、 $\text{N}_2\text{O}$  の生成が起こらない理由を解明する。HZS-NaxLS 複合体の結晶を作成できる至適条件を探索した。結果的に、30% w/v Pentaerthritol-ethoxylate + 100 mM HEPES, pH 7.0 + 6% (w/v) Polyvinylpyrrolidone + 2.5% 1-propanol の溶媒を使い、蒸気拡散法によって、結晶を作成した。得られた結晶を用いて SPring-8 で回折実験を行ない、HZS 単独の構造データを鋳型に分子置換法による初期位相の決定および立体構造の構築を行なった。

(3) anammox の各種素反応で  $\text{N}_2\text{O}$  の生成が起こるか調べる。 $\text{N}_2\text{H}_4$  酸化酵素(HZO)の触媒反応は、定量的に  $\text{N}_2\text{H}_4$  を  $\text{N}_2$  と  $\text{H}_2\text{O}$  に酸化できることを既に報告している。そこで、HAO および KSU-1 特有の Cu-NIR の触媒反応で  $\text{N}_2\text{O}$  が生成するか調べた。HAO については、(1)と同様  $\text{NO}$  発生試薬 NOC7 を基質に、還元剤として還元型ベンジルビオロゲン(BV)を使い、Cu-NIR については、亜硝酸と還元型 BV を使い、いずれも BV の酸化と  $\text{N}_2\text{O}$  の生成を別々に定量し、同時に、 $\text{NH}_2\text{OH}$  生成量あるいは  $\text{NO}_2^-$  の消費量を測定した。

(4) anammox の培養レベルで、とくに脱窒(窒素ガス生成速度)と  $\text{N}_2\text{O}$  生成速度の相関を調べた。筒状の培養装置を用い、連続的に人工廃水を anammox 汚泥含有リアクタに供給した。培地の  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NH}_4^+$  濃度を 50~

100 mg-N/L の範囲で組み合わせ、それぞれの条件の定常状態になった時点で、N<sub>2</sub>O 生成量、N<sub>2</sub> 生成量を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) HZS+NaxLS による触媒反応

酵素添加なし（ブランク）の場合、N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> は検出濃度以下であり、N<sub>2</sub>O は 9 μM 程度。一方、HZS+NaxLS（野生型）の条件では N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> は 98 μM 合成され、N<sub>2</sub>O はブランクとほとんど同じレベルであった。つぎに、NaxLS はヘテロ 2 量体の電子伝達タンパク質で、各サブユニットに 1 分子のヘムがあり、非常に稀な Cys/His を配位子とする。この Cys 残基を Met に変換し、酸化還元電位を上昇させた変異型 NaxLS (NaxLStm と略称する) を大腸菌発現系で作成した。HZS+NaxLStm を使って、野生型と同様に実験を行った。

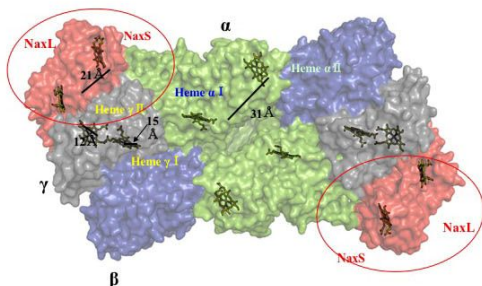
表 1 反応後の N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> と N<sub>2</sub>O の濃度

	生成 N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> 濃度	生成 N <sub>2</sub> O 濃度
酵素なし	Not detected	9.3 μM
HZS+NaxLS	98.2 μM	8.4 μM
HZS+NaxLStm	51.4 μM	20.7 μM

その結果 HZS+NaxLStm では、N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> の合成量が野生型に比べ減少し、同時に N<sub>2</sub>O の生成が増加した。これは、電子伝達タンパク質である NaxLS のヘムの配位環境、すなわち Cys/His 配位が N<sub>2</sub>O 生成を抑制する可能性を示唆した。

##### (2) HZS-NaxLS 複合体の立体構造解析

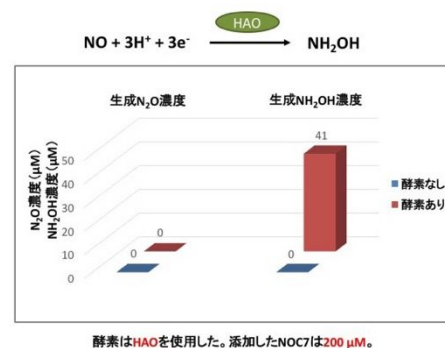
下図に示す複合体の立体構造を明らかにした。



HZS 部分はヘテロ 3 量体が更に 2 量化した 6 量体構造をとっていた。また NaxLS は HZS 部分のサブユニットに

またがるようにして結合し、HZS の 6 量体構造 1 分子につき 2 分子結合していた。とくに、5 配位の I ヘムと 6 配位の II ヘムの距離は 15 オングストローム、NaxLS の NaxL サブユニットと HZS の II ヘム間の距離は 14 オングストロームで、電子伝達が可能な距離にあり、NaxLS は自身の低い酸化還元電位に由来する高エネルギー電子を HZS の I ヘム活性中心へ迅速に伝達、あるいは、その逆方向の電子伝達に働いていると思われた。以上から、上記の生化学的実験で「NaxLS のヘムの Cys/His 配位が N<sub>2</sub>O 生成を抑制する」理由であることを強く支持した。

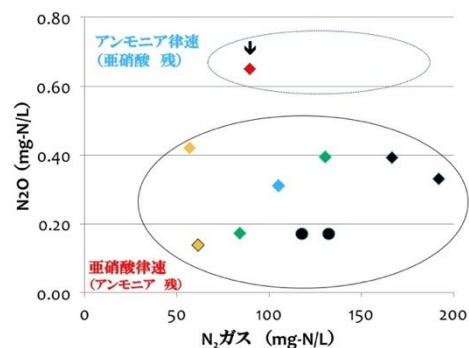
(3) anammox の各種反応での N<sub>2</sub>O 生成の有無 HAO の触媒反応の結果を下図に示す。



生成物の NH<sub>2</sub>OH は酵素 HAO 添加の場合のみ観察され、N<sub>2</sub>O の生成はいずれの場合も観察されなかった。Cu-NIR の触媒反応でも、還元剤に BV を使った場合、N<sub>2</sub>O の生成は観察されなかった。

##### (4) 培養レベルの N<sub>2</sub>O 生成の検証

anammox 培養の各定常状態で、N<sub>2</sub> 生成量に



対して N<sub>2</sub>O 生成量をプロットした。

いずれも培養液流量あたりに換算した。以下の図の同色同形のプロットは同じ培養条件で得られた結果である。N<sub>2</sub> 生成に対して 0.2%~0.6%の N<sub>2</sub>O 生成があった。プロットに多少ばらつきがあるものの、N<sub>2</sub> 生成量の変化に対して、N<sub>2</sub>O 生成量はほとんど変化しなかった。N<sub>2</sub> 生成の大部分が anammox に由来するとすると、anammox の副産物として N<sub>2</sub>O が生成するとは考えにくく、共存する別の脱窒菌からわずかの N<sub>2</sub>O が生成すると思われた。

以上を総合し、anammox が N<sub>2</sub>O の生成を伴わない環境に優しい脱窒プロセスであると確認した。

<引用文献>

Strous, M., *et al.*, Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome, *Nature* 440, 2006, 790-794

Hira, D., *et al.*, Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome cd<sub>1</sub>, *FEBS Lett.*, 586, 2012, 1658-1663  
Ukita, S., *et al.*, A heterodimeric cytochrome c complex with a very low redox-potential from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture, *FEMS Lett.* 313, 2010, 61-67

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tatsuya Irisa, Daisuke Hira, Kenji Kenji Furukawa, Takao Fujii, Reduction of nitric oxide catalyzed by hydroxylamine oxidoreductase from an anammox bacterium, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読あり, 118 巻, 2014, 616-621  
DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.05.018

〔学会発表〕(計28件)

北村 龍史、平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、藤井 隆夫、ヒドラジン合成反応を触媒するマルチヘムタンパク質複合体の結晶構造、日本生化学会 2017 年度大会、平成 29 年 3 月 19 日、京都女子大学、京都府京都市  
平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、藤井 隆夫、anammox 菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素とモノヘムシトクロム c の電子伝達反応、日本生化学会 2017 年度大会、平成 29 年 3 月 19 日、京都女子大学、京都府京都市

西山 孝、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌による培地中のヒドラジンの代謝、第 51 回日本水環境学会年会、平成 29 年 3 月 16 日、熊本大学黒髪キャンパス、熊本県熊本市

北村 龍史、平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌のヒドラジン合成酵素複合体の立体構造解明、第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会、平成 28 年 12 月 3 日、九州工業大学飯塚キャンパス、福岡県飯塚市

西山 孝、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 汚泥による人工ヒドラジン排水処理の分子機構の解明、第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会、平成 28 年 12 月 3 日、九州工業大学飯塚キャンパス、福岡県飯塚市

北村 龍史、平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌のヒドラジン合成酵素複合体の立体構造解析、日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会、平成 28 年 9 月 16 日、長崎大学文教キャンパス、長崎県長崎市

平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、藤井 隆夫、anammox 菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素と電子受容体シトクロム c の電子伝達、日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会、平成 28 年 9 月 16 日、長崎大学文教キャンパス、長崎県長崎市

藤川 陽子、古川 憲治、Phan Do Huang、平 大輔、藤井 隆夫、尾崎 博明、超低負荷での部分亜硝酸化-アナモックス一槽型リアクターの長期運転-地下水中アンモニア処理への適用、環境技術会第 16 回大会、平成 28 年 9 月 2 日、イーグレひめじ、兵庫県姫路市

松村 光紗、北村 龍史、平 大輔、藤井 隆夫、anammox 菌の銅型亜硝酸還元酵素の立体構造解析とシトクロム c の電子伝達反応、日本農芸化学会 2016 年度大会、平成 28 年 3 月 27 日-30 日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

平 大輔、藤井 隆夫、古川 憲治、アナモックス菌のヘムタンパク質発現系構築、日本農芸化学会 2016 年度大会、平成 28 年 3 月 27 日-30 日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市  
廣岡 琢也、宮副 雅士、西山 孝、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 汚泥を利用した人工ヒドラジン排水の処理、第 22 回日本生物工学会九州支部宮崎大会、平成 27 年 12 月 5 日、宮崎大学、宮崎県宮崎市

平 大輔、藤井 隆夫、古川 憲治、anammox 菌の銅型亜硝酸還元酵素の構造と機能、第 38 回日本生化学会大会、

平成27年12月1日-4日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市  
藤井 隆夫、平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、anammox 菌 KSU-1由来の2種類のモノヘムシトクロムcの構造と機能、第67回日本生物工学会大会、平成27年10月27日、城山ホテル、鹿児島県鹿児島市  
北村 龍史、平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌のヒドラジン合成酵素のX線結晶構造解析、第43回日本農芸化学会西日本中国合同支部大会、平成27年9月18日、愛媛大学、愛媛県松山市  
平 大輔、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌の銅型亜硝酸還元酵素の立体構造解析、第43回日本農芸化学会西日本中国合同支部大会、平成27年9月18日、愛媛大学、愛媛県松山市  
Takao Fujii、Daisuke Hira、Kenji Furukawa, Identification and characterization of two c-type cytochromes from anammox bacterium strain KSU-1, Third International Anammox Symposium 2015, August 8-9th 2015, CBEAD, Liaoning Province, Dalian, (China)  
Daisuke Hira、Misa Matsumura、Takao Fujii、Kenji Furukawa, Structure and function of copper-containing nitrite reductase and its electron donor protein from the anammox bacterium KSU-1, Third International Anammox Symposium 2015, August 8-9th 2015, CBEAD, Liaoning Province, Dalian, (China)  
Takashi Nishiyama、Kenji Furukawa、Takao Fujii, Application of anammox sludge to hydrazine removal, Third International Anammox Symposium 2015, CBEAD, August 8-9th 2015, CBEAD, Liaoning Province, Dalian, (China)  
Yoko Fujikawa、Phan Do Huang、Daisuke Hira、Takao Fujii、Hiroaki Ozaki、Kenji Furukawa, Potable water treatment of groundwater in Vietnam by a single stage ammonium removal using anammox process, Third International Anammox Symposium 2015, August 8-9th 2015, CBEAD, Liaoning Province, Dalian, (China)  
Tatsuo Kaiho、Nobuyuki Yokota、Takao Fujii、Takashi Nishiyama, Application of SNAP process for underground brine treatment, Third International Anammox Symposium 2015, August 8-9th 2015, CBEAD, Liaoning Province, Dalian, (China)

- 21 平 大輔、能登原 暁穂、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、藤井 隆夫、化学修飾されたチロシンが配位したヘムを有する anammox 菌由来のシトクロムc、日本農芸化学会 2015 年度大会、平成27年3月27日-3月29日、岡山大学、岡山県岡山市
- 22 藤井 隆夫、嫌気性アンモニア酸化 (anammox)のエネルギー代謝と窒素含有廃水の処理、日本生体エネルギー研究会 第40回討論会、平成26年12月12日、愛媛大学、愛媛県松山市
- 23 平 大輔、藤井 隆夫、矢吹 芳教、相子 伸之、廃棄物最終処分場の浸出水調整池における窒素除去と微生物群集構造、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
- 24 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
- 25 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15日-18日、国立京都国際会館、京都府京都市
- 26 能登原 暁穂、平 大輔、中村 照也、山縣 ゆり子、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌で発現している化学修飾チロシン配位ヘムを有するシトクロムcの構造と機能、第87回日本生化学会大会、平成26年10月15日-18日、国立京都国際会館、京都府京都市
- 27 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、日本農芸化学会 2014 年度西日本支部大会、平成26年9月18日-19日、佐賀大学、佐賀県佐賀市
- 28 西山 孝、藤 英博、服部 正平、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌のオルガネラ様構造体に存在する活性酸素除去系、2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会、平成26年9月18日-19日、佐賀大学、佐賀県佐賀市

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1件)

名称：ヒドラジンの処理方法および処理装置  
発明者：藤井 隆夫、西山 孝  
権利者：藤井 隆夫、西山 孝  
種類：特許

番号：特願 2015-130070  
出願年月日：平成 28 年 6 月 29 日  
国内外の別： 国内

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：8 0 1 6 5 3 3 1

(2)研究分担者

平 大輔 (HIRA, Daisuke)  
崇城大学・生物生命学部・准教授  
研究者番号：0 0 5 6 9 8 9 0

西山 孝 (NISHIYAMA, Takashi)  
崇城大学・生物生命学部・准教授  
研究者番号：0 0 4 2 5 3 3 1