

Anammox 細菌による亜硝酸還元反応

長岡工業高等専門学校 中林豊博 押木守 荒木信夫
長岡技術科学大学 山口隆司

1. はじめに

嫌気性アンモニウム酸化(anammox)反応とは無酸素条件下において、亜硝酸を電子受容体としてアンモニウムを酸化し、窒素ガスに変換するプロセスである^{1,2,3}。Anammox 反応を行う細菌(anammox 細菌)は系統分類学的に *Planctomycetes* 門に属し、現在までに *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Jettenia*, *Candidatus Scalindua* の 5 属の系統分類が報告されている^{1,3}。Anammox 細菌は地球上の淡水・海水域の無酸素領域に幅広く分布しており、窒素循環に大きく寄与していることが知られている^{1,2,3}。また、anammox 反応は排水処理におけるは新規な窒素除去法として注目されている³。従来の窒素除去法である硝化・脱窒法と比較すると、anammox 反応は曝気及び外来電子供与体の供給により発生する費用を大幅に削減することが可能である³。

Anammox 反応は以下の通り 3 段階で進むと考えられている¹；1) NirS(シトクロム *cd₁* 型亜硝酸還元酵素)または NirK(銅含有亜硝酸還元酵素)による亜硝酸(NO_2^-)の NO への還元反応、2) ヒドラジンシンターゼ(Hzs)による NO の NH_2OH への還元および NH_2OH および NH_3 からのヒドラジン(N_2H_4)合成、3) ヒドラジンデヒドロゲナーゼ(Hdh)によるヒドラジンの酸化および窒素ガスの生成。上述の各反応について、反応 2) および 3) は anammox 細菌から分離された Hzs および Hdh を用いて実証されている^{4,5}。一方、反応 1) の亜硝酸還元反応は NirS または NirK の関与が十分に解明されていない。例えば、anammox 細菌 *Candidatus Kuenenia* のゲノムからは *nirS* 遺伝子が見出されているが、*nirS* は転写およびタンパク質レベルではほとんど発現していないことが明らかとなっている⁴。また、NirS または NirK とは異なる亜硝酸還元酵素(オクタヘムタンパク質)が関与することを推測する論文¹も近年報告されており、anammox 細菌の

亜硝酸還元反応を触媒する酵素は未だ明らかになっていない。

本研究は、*Candidatus Kuenenia* の亜硝酸還元酵素(Nir)を同定することを最終目標とするものであり、本発表では *Candidatus Kuenenia* の Nir が膜画分と可溶性画分のどちらに存在するか、さらに、Nir が酸素感受性であるかを調査した結果を報告する。

2. 実験方法

本研究では、淡水性 anammox 細菌の *Candidatus Kuenenia* を用いて以下の実験を実施した。

2.1 粗抽出液, 可溶性画分, 膜画分の調製

菌体を緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10%グリセリン, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF)に懸濁(0.15 g-wet/ml)させ、氷上で冷却した。ホモジナイザーで菌体塊をすり潰し、フレンチプレス(1,100 psi × 3 回)で細胞を破碎した。フレンチプレス後の破碎液を粗抽出液とし、超遠心分離(45,000 rpm, 1h, 4°C)へ供した。遠心分離後、上清を可溶性画分として回収した。沈殿物は再度緩衝液に懸濁させ、膜画分として回収した。

Candidatus Kuenenia の NIR が酸素感受性であるかを調べるため、緩衝液へ還元剤としてジチオトール(DTT)を終濃度 1 mM で加え、上述と同様の方法で粗抽出液、可溶性画分、膜画分を調整した。

タンパク質濃度の定量は、DC Protein assay キット(Bio-Rad)を用いて行ない、牛血清アルブミンを用いて検量線を作成した。

2.2 亜硝酸還元試験

15 mL ガラスバイアルに反応バッファー(0.5 mM $\text{Na}^{14}\text{NO}_2^-$, 20 mM PO_4^- (pH6.5), methyl viologen dichloride hydrate 1.29 mg, ジチオナイト 8.71 mg)を 10 mL 作成し、アルゴンガスでバイアル内をバージした。96well プレートへ反応バッファー 200 μL を分注し、試料 20 μL を加えて、室温で 30 分間培養した。

定期的に反応液を採取し、亜硝酸濃度をナフチルエチレンジアミン法で定量した。

3. 実験結果及び考察

DDT 添加有りとなしとの各試料の NO_2^- 還元速度を表 1 に示した。DDT の添加が亜硝酸還元活性に及ぼす影響を比較すると、いずれの画分についても DDT を添加することによって亜硝酸還元活性が低下した。*Candidatus Kuenenia* の Nir が酸素感受性であれば、DDT の添加によって亜硝酸還元活性が上昇するはずであり、表 1 の結果は Nir が酸素感受性ではないことを示している。

粗抽出液、可溶性画分、膜画分の亜硝酸還元活性を表 2 に示した。単位タンパク質量当たりの比活性を比べると、粗抽出液に対して可溶性画分は 1.86 倍、膜画分は 3.14 倍の比活性が見られた。また粗抽出液中の総活性を 100% とすると、可溶性画分、膜画分それぞれ 56%、63% の活性が回収された。このことから可溶性画分、膜画分の両方に Nir が存在していたことが明らかとなった。

表 1 還元剤 DDT が NO_2^- 還元速度へ及ぼす影響

	NO_2^- 還元速度(mM/30min)	
	DDTなし	DDTあり
粗抽出液	0.16±0.012	0.11±0.025
可溶性画分	0.09±0.008	0.06±0.012
膜画分	0.1±0.01	0.07±0.015

表 2 各画分の亜硝酸還元活性と収率

	タンパク質量 (mg)	総活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	収率 (%)
粗抽出液	134.1	0.88	0.007	100
可溶性画分	38.4	0.497	0.013	56
膜画分	24.6	0.55	0.022	63

4. 結論

本実験において、*Candidatus Kuenenia* の Nir が酸素感受性ではないことが明らかになった。従って、*Candidatus Kuenenia* の Nir は嫌気条件下での精製作

業を必要とせず、大気条件下で精製を行うことができると考えられる。亜硝酸還元活性を測定した結果、可溶性画分、膜画分の両方から活性が検出され、*Candidatus Kuenenia* は可溶性 Nir および膜結合型 Nir を発現していることが示唆された。可溶性 Nir および膜結合型 Nir がどのようなタンパク質であるかを明らかにするためには、それぞれの Nir を精製する必要がある。現在、可溶性 Nir に着目し、精製を進めている。

5. 参考文献

- Oshiki, M., M. Ali, K. Shinyako-Hata, H. Satoh and S. Okabe, (2016), Hydroxylamine-dependent anaerobic ammonium oxidation (anammox) by "*Candidatus Brocadia sinica*, *Environ. Microbiol.*, **18**:3133-3143.
- Kartal, B. and J.T. Keltjens, (2016), Anammox biochemistry: a tale of heme *c* proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **41**:998-1011.
- Nakazima, J., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K., (2008), 嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌の生態と生理, 三重大学大学院生物資源学研究科紀要, **35**:27-37.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.J., Stunnenberg, H.G., Keltjens, J.T. and Jetten, M.S.M. (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**: 127-130.
- Dietl, A., Ferousi, C., Maalcke, W.J., Menzel, A., de Vries, S., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Kartal, B. and Barends, T.R.M. (2015) The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex. *Nature* **527**: 394-397.