

Anammox 細菌”*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*”が保有する 亜硝酸還元酵素の精製及び生化学的性状

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り^{1,2)}、窒素含有排水の新たな処理技術として注目されている²⁾。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属の系統分類が提案されている^{1,2)}。現在、Anammox 反応の過程で行われる亜硝酸還元反応は NirS(シトクロム *cd* 型亜硝酸還元酵素)または NirK(銅含有型亜硝酸還元酵素)の関与があるとされているが、未だに解明されていない。例えば、Anammox 細菌 “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” はゲノム上に *nirS* を保有するものの、*nirS* は細胞内でほとんど発現していないことが明らかとなっている³⁾。また、NirS, 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⁾も近年報告されている。そこで本研究では “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” の亜硝酸還元酵素(Nir)を解明する為に、“*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” のタンパク質精製及び同定を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプルの調製

“*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” 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、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(サンプル)として回収した。

2.2 亜硝酸還元酵素の精製

可溶性画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより、吸着成分と素通り成分に分画した。Hitrap QXL カ

ラム(GE ヘルスケア)に供し、溶出バッファー(1 M NaCl を含む 20 mM Tris pH 7.5)を用いて吸着タンパク質の溶出を行った。分画した吸着成分と素通り成分についてタンパク質濃度および亜硝酸還元活性を測定した。最も亜硝酸還元活性が高い画分を限外ろ過(Vivaspin 20, MWCO 30 kDa)で濃縮した。続いて、濃縮を行った画分をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより、吸着成分と素通り成分に分画した。Ceramic Hydroxyapatite type I カラム(Bio-rad)に供し、溶出バッファー(500 mM PO₄ pH 6.0)を用いて吸着タンパク質の溶出を行った。各画分を限外ろ過(Vivaspin 500, MWCO 3 kDa)でバッファー交換(20 mM Tris pH 7.5)および濃縮を行った。限外ろ過後、各画分についてタンパク質濃度および亜硝酸還元活性を測定した。

2.3 精製タンパク質の同定

ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによって得られた亜硝酸還元活性が高い画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供し、検出されたタンパク質を質量分析へ供することでタンパク質の同定を試みた。SDS-PAGE では、平板ゲル(分離ゲル濃度 10%, 濃縮ゲル濃度 4%)を用いて、電気泳動を 70 分間(50 V, 400 mA, 30 min → 200 V, 400 mA, 40 min)行った。泳動終了後、クマシーブリリアントブルー(CBB)溶液を用いてゲル染色を行った。染色後のゲルからゲル片を切り出し、脱色液(25 mM NH₄HCO₃, 30% アセトニトリル)を用いて脱色した。脱色後、精製タンパク質を分解しペプチド生成を行う目的で、トリプシンによるゲル内消化を行った。試薬は 10 mM DDT, ABC 溶液(51 mM NH₄HCO₃), アルキル化溶液(50 mM 2-chloroacetamide, 100% ABC 溶液), トリプシン溶液を用いて行った。トリプシンによるゲル内消化後、生成したペプチドはトリフルオロ酢酸溶液を用いて回収し、ZipTip_{c18} による脱塩後、質量分析(MALDI-TOF /MS)に供した。タンパク質の同定は MASCOT を用いて行い、“*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” が保有する全遺伝子のアミノ酸配列をデータベースとして検索を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 目的タンパク質の分離

可溶性画分の亜硝酸還元活性は $0.012 \text{ nmol } \mu\text{g-BSA-1 min}^{-1}$ であり、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したところ、 0.36 M NaCl で $0.029\sim 0.031 \text{ nmol } \mu\text{g-BSA-1 min}^{-1}$ (可溶性画分の 2.4~2.6 倍)の亜硝酸還元活性を示す溶出画分(F11, F12)(表 1)を得た。これら画分を混合し、さらにヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーで精製した結果を図 1 に示す。また、精製した画分の亜硝酸還元活性を表 1 に示す。F10 で溶出した画分が最も亜硝酸還元活性が見られ、 $0.417 \text{ nmol } \mu\text{g-BSA-1 min}^{-1}$ (可溶性画分の 34.8 倍)だった。以上より、液体クロマトグラフィーを用いることで可溶性画分に存在した Nir が部分的に精製されたと考えられた。

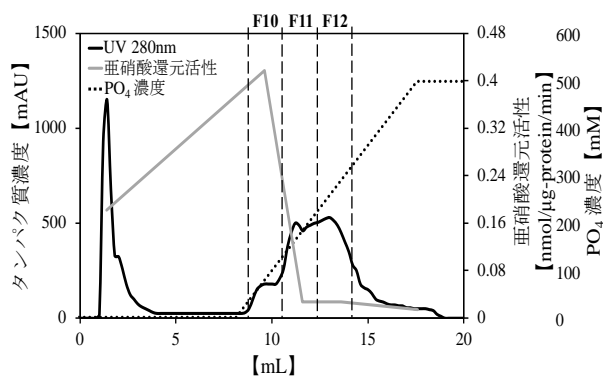


図 1 ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーでのタンパク質の溶出パターン

表 1 ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより精製された各画分の亜硝酸還元活性

	タンパク質量 (mg)	比活性 (nmol/μg-protein/min)	総活性 (nmol/fraction/min)	精製度 (n-fold)
可溶性画分	126.1	0.012	1506	1.0
F 31,32	2.5	0.039	98	3.3
F 10	0.2	0.417	83	34.8
F 11	0.4	0.027	11	2.3
F 12	0.3	0.027	8	2.3

3.2 精製タンパク質の同定

ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから得られた溶出画分を SDS-PAGE へ供した結果を図 2 に示す。亜硝酸還元活性が高い溶出画分(lane 1)と活性を示さなかった他の溶出画分(lane 2, 3)を比較すると、lane 1 から 6 本のユニークなバンドが確認された。これらのバンドに相当するタンパク質が亜硝酸還元に参加していたことが期待できる。Lane 1 から切り出した 6 本のバ

ンドを質量分析に供し、MASCOT 検索によるタンパク質種の同定を行った。いずれのバンドも“*Candidatus Kueneia stuttgartiensis*”の既知タンパク質と有意に一致しなかった。SDS-PAGE において観察されるバンドが単一のタンパク質に由来するものであれば、MALDI-TOF/MS 分析・MASCOT 検索を用いてタンパク質種の同定は可能である。しかし、バンドに複数のタンパク質が混雑しているとタンパク質種の同定が困難である。このことから、同定できなかった原因は可溶性画分に存在する Nir の精製不足だと考えられる。

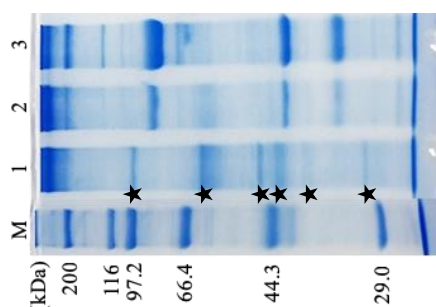


図 2 ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから得られた溶出画分の SDS-PAGE; M: 分子量マーカー, lane 1: F10, lane 2,3: F11,12.各フラクションの亜硝酸還元活性は表 1 の通りである。

4. 結論

本研究では、可溶性 Nir に着目し、可溶性画分から Nir を部分的に精製した。6 本のユニークなバンドが得られたがいずれのバンドも精製不足により同定できなかった。今後は、可溶性画分に含まれる Nir をさらに精製するため、異なる吸着担体を用いた追加精製及び活性染色を行う予定である。

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.
- 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所紀要, **35**:27-37.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M. et al., (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**: 127-130.