

海洋性 anammox 細菌 “*Candidatus Scalindua sp.*” の タンパク質同定の試み

長岡工業高等専門学校 ○齋藤充 押木守 荒木信夫 永井孔明

1. はじめに

嫌気性アンモニウム酸化 (anammox) 細菌とはアンモニウムを電子供与体, 亜硝酸を電子受容体としてアンモニウムを窒素ガスに嫌氣的に酸化させる独立栄養性細菌である¹⁾. これらの微生物は, 酸素の代わりに酸化剤として亜硝酸を用いてアンモニウムを酸化し, 最終生成物として窒素を生成する²⁾. Anammox 細菌は系統分類学的には *Planctomycetes* 門に属し, “*Candidatus Kuenenia*”, “*Candidatus Brocadia*”, “*Candidatus Anammoxoglobus*”, “*Candidatus Jettenina*”, “*Candidatus Scalindua*” の 5 属が提案されている³⁾. Anammox 細菌は海洋, 河川, 湖沼, 土壌, 淡水および海洋の堆積物などの幅広い環境に生息していることがわかっている^{1,4)}. 海洋環境中から検出される anammox 細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の大半が “*Candidatus Scalindua*” に分類されることから, “*Candidatus Scalindua*” に属する anammox 細菌は, しばしば海洋性 anammox 細菌とみなされる⁵⁾.

“*Candidatus Scalindua*” を含む海洋性 anammox 細菌は, 海洋から発生する N_2 ガス生成の最大 67% に寄与するため, 海洋の窒素循環において重要な役割を果たしている⁶⁾. “*Candidatus Scalindua*” によって触媒される anammox 反応の分子メカニズムはこれまでのゲノムおよびプロテオーム研究のデータセットに基づいて仮定されてきたが, 反応機構の多くは未だ実証されていない. したがって, 本研究では “*Candidatus Scalindua sp.*” を培養し, 高純度の酵素を用いてタンパク質精製・同定を行い, 代謝メカニズムを解明することを目的とした.

2. 実験方法

(1) “*Ca. Scalindua sp.*” の大量培養

“*Ca. S. japonica*” を培養するために 30 L スケールの膜分離型リアクター (MBR) (図 1) を運転した. MBR 立ち上げ時には本研究室で運転する小型 MBR から引き抜いた “*Ca. S. japonica*” 培養液 3 L を植菌した. MBR へ供給した人工海水培地の組成を表 1 に示す. 亜硝酸・アンモニア濃度は 0.2 mM から徐々に引き上げ, 最終的に 3.5 mM とすることで窒素負荷を $5.6 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ から $98 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に設定した. MBR は温度 22 °C, pH

7.5-7.7 で運転し, N_2 : CO_2 混合ガスを 0.45 mL/min で供給することで嫌気状態を保った. また, フロー式の水位センサーを用いて水位を 30 L に保った. HRT と SRT はそれぞれ, 1 日と 100 日で運転を行った. MBR 内の亜硝酸濃度はナフチルエチレンジアミン法で測定した.

(2) “*Ca. Scalindua sp.*” のタンパク質精製

“*Ca. Scalindua sp.*” の培養液 12 L を膜ろ過装置で 1 L まで濃縮し, 遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 10 min) で集菌し, 50 mM PO_4 buffer (pH 7) で懸濁させた. フレンチプレスを行って細胞を破碎し, 粗抽出液 (Crude Extract) として回収した. 粗抽出液を超遠心分離 (45,000 rpm, 4°C, 1 h) にかけて, 上澄み部分を可溶性タンパク質 (Soluble protein) として回収した.

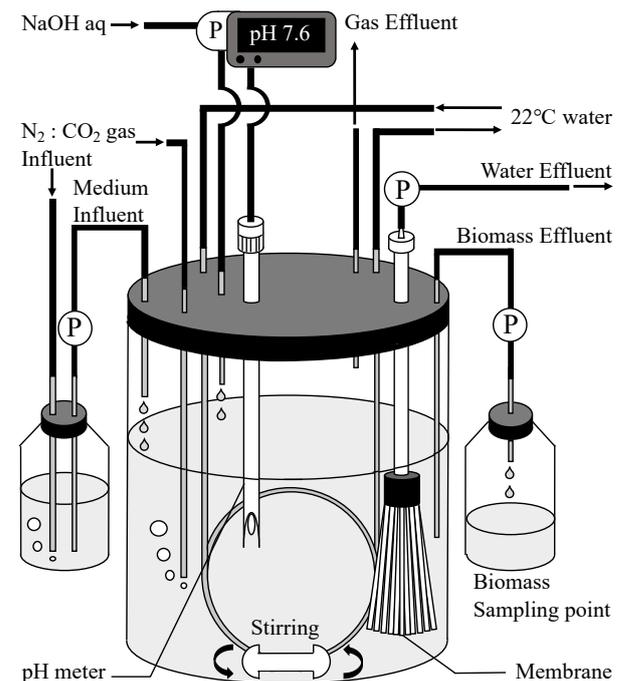


図 1. 30 L 容膜分離型リアクター概略図

表 1. MBR へ供給した人工海水培地組成⁷⁾

per 200 L			
$(NH_4)_2SO_4$	adjustable	$MgSO_4$	19.80 g
$NaNO_2$	adjustable	$CaCl_2$	25.27 g
KH_2PO_4	4.88 g	TES1*	100 ml
$KHCO_3$	100 g	TES2*	100 ml
yeast extract	0.2 g	Sealife	5000 g

*: Trace Element Solution

可溶性タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーにより、素通り画分と吸着画分に分画した。Hitrap QXL カラム (カラム容積: 1 mL) に供し、溶出バッファー (1 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl pH 7.5) を用いて吸着タンパク質を溶出させた。タンパク質濃度が高い画分を限外ろ過 (Vivaspin 20, MWCO 30 kDa) でバッファー交換 (500 mM PO_4^- pH 6.0) および濃縮を行い、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより素通り画分と吸着画分に分画した。Ceramic Hydroxyapatite type I カラム (カラム容積: 1 mL) に供し、溶出バッファー (500 mM PO_4^- pH 6.0) を用いて吸着タンパク質を溶出させた。溶出タンパク質のタンパク質濃度が高い画分を限外ろ過 (Vivaspin 500, MWCO 3kDa) でバッファー交換 (50 mM Tris pH 7.5) および濃縮を行った。

(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画分をポリアクリルアミドゲル泳動 (SDS-PAGE) に供した。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。泳動が終了したゲルを CBB 染色液で染色しゲル片の切り出しを行った。切り出したゲル片を脱色液 (25 mM NH_4HCO_3 , 30 % アセトニトリル) を用いて脱色した。タンパク質を酵素消化してペプチド断片にするためにトリプシンによるゲル内消化を、10 mM DTT, ABC 溶液 (51 mM NH_4HCO_3), アルキル化溶液 (50 mM 2-chloroacetanide, 100 % ABC 溶液), トリプシン溶液を用いて行った。生成したペプチド試料を ZipTipC18 で脱塩し、マトリクス化合物と混合させて質量分析 (MALDI-TOF /MS) に供した。質量分析で得られたデータから MASCOT を用いて、“*Candidatus Scalindua sp.*” 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し、タンパク質同定を行った。

(4) 菌叢解析

MBR 内において、目的の菌を培養できているかを確認するために運転開始から 370 日の時点で菌叢解析を行った。サンプルは MBR から採水した培養液 100 mL を遠心 (20°C, 10,000 g, 15 min) して集菌し、Power Soil DNA Isolation Kit で DNA を抽出した。その後 Qubit にて DNA 濃度測定を行って十分な量の DNA を抽出できていることを確認し、PCR にて DNA を増幅させた。サン

プルを A, B の 2 つに分け、サンプル A を pla46f-AMX820, サンプル B を SCJ447F-SCJ629R の 2 種類のプライマーを用いた。増幅させた DNA をアガロースゲル (1.5 %) 電気泳動に供し、バンドが精製されていることを確認しサンプル A, B それぞれの PCR 産物を精製した。その後、ユーロフィンジェノミクス株式会社に解析を外注し、blast n で塩基配列の検索を行い、菌種を特定した。

3. 結果および考察

(1) “*Ca. Scalindua sp.*” の大量培養

これまでに 569 日間運転を行った。MBR 内における亜硝酸濃度の推移を図 2 に示す。0~50 日目において、窒素負荷 $5.6 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ の条件で運転したところ、流入および流出水の亜硝酸濃度に差が認められなかった。この

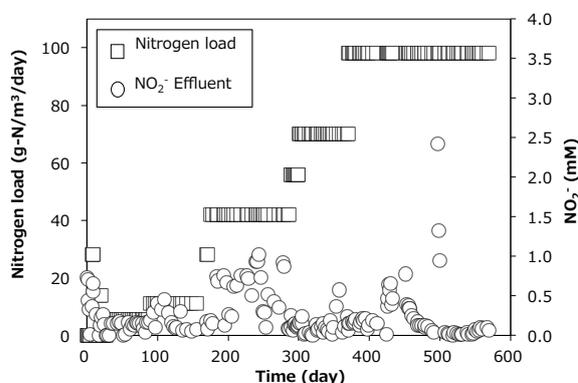


図 2. MBR 内における亜硝酸濃度と窒素負荷の推移

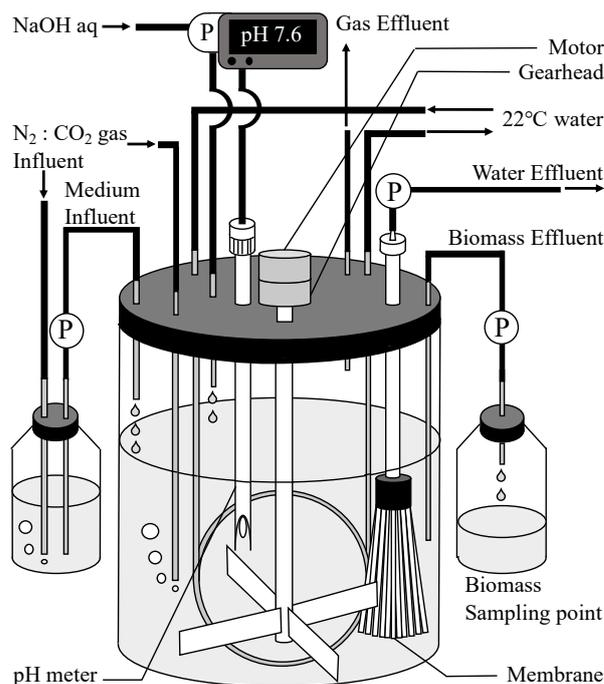


図 3. 改造後の膜分離型リアクター概略図

原因は流入基質の亜硝酸濃度が低い (0.5 mM) ために菌体の活性が増加しなかったためだと考え、50 日目以降から窒素負荷を $11.2 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に引き上げて運転を行った。その結果、80~120 日目において、流出水の亜硝酸濃度が低下し、菌体活性が上昇した。130 日目からは窒素負荷をさらに $28 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に引き上げたが、流出水の亜硝酸濃度は安定して低濃度であった。そこで140 日目から窒素負荷 $42 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ で運転を開始したが、流出水中の亜硝酸濃度が増加し、安定して運転を行うことができなかった。140 日目以降から亜硝酸消費が停滞した原因として、MBR 内における攪拌の不備が挙げられる。140 日目以降から槽内を攪拌するためのマグネットスターラーが度々停止してしまう現象が起きてしまい、流入した培地や pH 調整溶液が攪拌されずに濃度が局所的に高い箇所が生じてしまった。このため、高濃度の基質、NaOH 溶液に対して菌体が耐えきれずに死滅してしまい亜硝酸が消費されなかったと考えられる。この問題を解決するために、槽内を攪拌羽で攪拌する方式に変更することとし、図3のように改造を行った。改造を行った直後 (286 日目) から亜硝酸濃度が低下したため、290 日目から窒素負荷を $56 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に引き上げ、100 mL/day の条件でバイオマスの引き抜きを開始した。亜硝酸濃度の上昇が見られなかったため、300 日目から窒素負荷をさらに $70 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に引き上げ、引き抜き流量を 200 mL/day で運転した。引き抜き流量を上げても亜硝酸濃度の上昇は見られなかったため、318 日目に 300 mL/day に、371 日目に窒素負荷を $98 \text{ g-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ で運転を行った。

(2) “Ca. Scalindua sp” のタンパク質精製

可溶性タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した結果を図4に示す。精製したタンパク質は、UV 吸光度 (UV1 280 nm, UV2 408 nm の2種類の波長) を用いて濃度を測定した。Column volume (CV) 0-20 mL

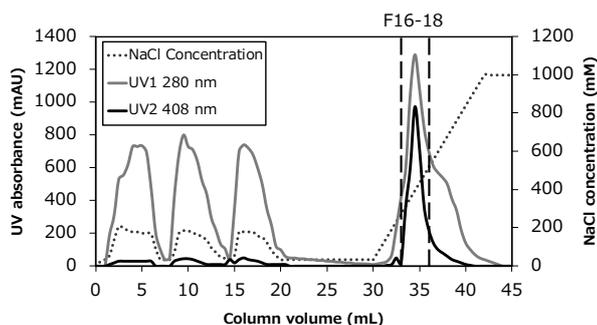


図4. 陰イオン交換クロマトグラフィーでのタンパク質の溶出パターン

において、溶出バッファーを吸着カラム内に流し込む操作は行わなかったにもかかわらず NaCl 濃度が上昇している。これは、ロードしたサンプル内に海水培地由来の塩分が残存していたためだと考えられる。その結果、本来カラムに吸着するはずのタンパク質が素通り画分として溶出してしまい、タンパク質を十分に精製することが出来なかった。これを防ぐためには、タンパク質の精製を行う前に何度かバッファー交換を行い、サンプル内の残存塩分を完全に取り除くことが必要である。

30 CV から吸着カラム内に溶出バッファーを徐々に流し込み、カラム内の NaCl 濃度を上昇させて吸着タンパク質を分画した。NaCl 濃度 200-500 mM で溶出したタンパク質 (Fraction 16-18) にピークが見られたため、さらに精製するためにヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供した。

ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製結果を図5に示す。PO₄濃度 200-320 mM で溶出したタンパク質 (Fraction 8-10) にピークが見られたため、回収し SDS-PAGE に供した。

(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から得られた溶出画分を SDS-PAGE に供した結果を図6に示す。5つの主要なバンドが得られた。この5本のバンドを質量分析に供し、MASCOT 検索によるタンパク質同定を

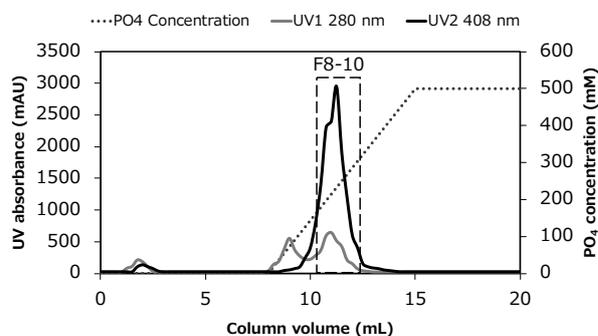


図5. ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーでのタンパク質の溶出パターン

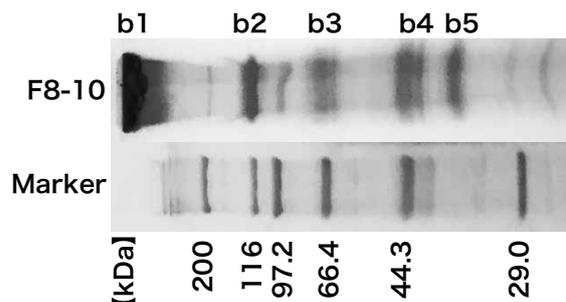


図6. F8-10の SDS-PAGE (10%ゲル) 解析結果

行った。その結果、b5 のバンドが “*Candidatus Scalindua sp.*” の scalin_C34_0101 タンパク質と有意に一致した。Scalin_C34_0101 タンパク質の機能は解明されていないため、細胞内でどのような働きをしているかは不明である。また、他の4つのバンドからはタンパク質を同定することが出来なかった。この原因は、(1) タンパク質の精製不足によってバンド内に複数のタンパク質が混同していた。(2) 実験中にケラチンに代表される環境中のタンパク質が混入し、バンドが汚染されてしまった。(3) MBR 内に別の細菌が侵入し、“*Ca. Scalindua sp.*” を純粋培養できておらず、“*Ca. Scalindua sp.*” が保有するタンパク質と一致しなかった、この3つが考えられる。解決策として、(1) はクロマトグラフィーで精製する際に、異なる吸着カラムを用いて追加精製を行い、さらに細かくタンパク質を精製する。(2) はサンプルの汚染に細心の注意をはらいながら再実験を行う。(3) は MBR 内の菌叢を特定する、などが考えられる。しかし、(1) と (2) については再実験を行うために必要な量の菌体が確保できていないため、すぐに行うことが出来ない。そこで (3) について検証実験を行った。

(4) 菌叢解析

MBR から採水した培養液から DNA を抽出して解析を行い、菌種を特定した結果、pla46f-AMX820, SCJ447F-SCJ629R の両方のプライマーともに、“*Ca. Scalindua sp.*” の塩基配列と一致し、他の細菌の塩基配列は検出されなかった。この結果から、MBR 内では“*Ca. Scalindua sp.*” を培養できていることが証明された。

4. まとめ

- 1) 膜分離型リアクターを 569 日運転し、窒素負荷 98 g-N m³ day⁻¹、バイオマス引き抜き流量 300 mL/day の条件で安定して運転を行うことに成功した。
- 2) 陰イオン交換とヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーでタンパク質を精製し質量分析を行った結果、scalin_C34_0101 タンパク質を同定した。
- 3) 別種の anammox 細菌において anammox 反応に関与することが知られているタンパク質を同定することができず、“*Candidatus Scalindua*” の代謝メカニズムの解明には至らなかった。

文献

- 1) 野村太一ら (2009), 海洋性 anammox 細菌の集積培

養条件に関する研究, 土木学会西部支部研究発表会, VII-058:997-998.

- 2) B. Kartal and J. T. Keltjens (2016), Anammox biochemistry; a tale of heme c proteins. Trends Biochem. Sci., 41:998-1011.
- 3) 栗田貴宣ら (2014), 海洋性 anammox 細菌の重金属および硫酸塩代謝活性, 土木学会論文集 G (環境), 70:III_251-III_256.
- 4) B. Kartal et al. (2013), How to make a living from anaerobic ammonium oxidation, FEMS Microbiol., Rev., 37:428-461.
- 5) M. Oshiki et al. (2015), Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, Environ. Microbiol., 18:2784-2796.
- 6) G. Qian et al. (2018), Diversity and distribution of anammox bacteria in water column and sediments of the Eastern Indian Ocean, Int. Biodeterior. Biodegradation, 133:52-62.
- 7) 増間智郎 (2018), 機能解析を目的とした海洋性 anammox 細菌の連続大量培養. 長岡高専環境都市工学科卒業論文.