

嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 菌特有のヒドラジン合成酵素

平 大輔

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の対策として、排水・環境水中からの効率的な窒素除去法が求められている。従来の窒素除去法として、アンモニア (NH₃) が硝酸イオン (NO₃⁻) まで酸化される硝化反応を行う硝化菌と、生じたNO₃⁻が嫌氣的に還元され最終的に窒素ガス (N₂) が放出される脱窒反応を行う脱窒菌とを組み合わせる、硝化-脱窒プロセスが一般的である。

このような状況下、1995年に窒素除去法を革新する大発見があった¹⁾。すなわち、ある種の細菌がNH₃を嫌氣的にN₂まで酸化する嫌氣的アンモニア酸化 (anaerobic ammonium oxidation: anammox) である。anammox反応では、亜硝酸イオン (NO₂⁻) を電子受容体としてNH₃が酸化され、中間体としてヒドラジン (N₂H₄) を経たのちに、N₂が生成される (NH₄⁺ + NO₂⁻ → N₂ + 2H₂O)。この反応は従来の硝化-脱窒プロセスと比べて多くの利点を持っている。すなわち、anammox菌は独立栄養性で、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が発生しない。これらの理由で、anammox菌を利用した処理プロセスの研究が盛んに行われ、すでに一部実用化されている。

一方、anammox反応の詳細はいまだ全容解明されていない。本稿では、anammox反応機構に関して、これまでに報告されたおもな知見と、中間体N₂H₄の合成を担うヒドラジン合成酵素について紹介する。

研究の初期に行われた反応中間体の推定実験と、*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*の部分ゲノム解析によって、以下の3つの酸化還元反応からなる反応機構が2006年に提唱されている²⁾。



この仮説では、まず、一方の基質であるNO₂⁻がNOへと還元される(式1)。次に、生じた反応中間体NOともう一方の基質であるNH₃の間でN-N結合が形成され、2つ目の反応中間体N₂H₄が合成される(式2)。最終的にN₂H₄がN₂へと酸化される(式3)。

(式1)は、脱窒菌がNO₃⁻をN₂まで還元する脱窒反応 (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂) 過程におけるNO₂⁻からNOへの還元反応と同一の反応である。脱窒菌には、活性中心にヘムを有する鉄型亜硝酸還元酵素をもつ菌、もしくは銅を有する銅型亜硝酸還元酵素をもつ菌が知られており、*Ca. K. stuttgartiensis*ゲノム中に鉄型

酵素の遺伝子が見つかったことから、(式1)が推定された。その後、銅型酵素を有するanammox菌も報告され^{3,4)}、anammox菌においても属種の違いによって、鉄型もしくは銅型のどちらかが機能していることがわかってきた。

次に、(式3)であるが、こちらは2007年に崇城大学・熊本大学の研究グループによってanammox菌KSU-1株から単量体あたり8個のヘムをもつマルチヘム酵素であるヒドラジン酸化酵素が精製され、その性質が報告された⁵⁾。本酵素は細胞中で全タンパク質の10%に及ぶほど多量に発現しており、硝化菌がもつヒドロキシルアミン酸化酵素と相同性を有するにもかかわらずヒドロキシルアミンを基質とせず、ヒドラジン酸化に特異化した酵素であることが判明している。

最後に、(式2)について、2011年にNOとNH₃からN₂H₄を合成するヒドラジン合成酵素反応の検出ならびに酵素の精製が報告されている⁶⁾。しかし、この報告では、精製酵素を用いたヒドラジン合成活性測定において、N₂H₄そのものは検出できず、活性測定系にヒドラジン酸化酵素を共存させることでN₂H₄を酸化させ、最終生成物であるN₂が検出された。また、生成したN₂から求めた酵素の分子活性値は約0.08 min⁻¹と非常に低い値である。この反応についてはさらなる検証が必要と思われる。また、本酵素は既知のタンパク質との相同性が低く、一次構造からの機能推定は困難であるが、3つのサブユニットからなるヘテロ3量体を形成し、少なくとも4つのヘムを有するマルチヘム酵素である。おそらくNO結合性のヘムを有しており、そのヘム上で反応が進むと思われるが、反応機構の詳細を知るためには立体構造の解明が必要であろう。

以上のように、ゲノム解析や生化学的解析などを基礎に、anammox反応の全容が徐々に解明されつつある。(式2)のヒドラジン合成反応についてはまったく新奇な生化学反応であり、本酵素に関する研究の進展が期待される。膜タンパク質をも含む電子伝達系についてはいまだほとんど知見がなく、今後の課題である。

- 1) Mulder, A. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**, 177 (1995).
- 2) Strous, M. et al.: *Nature*, **440**, 790 (2006).
- 3) Hira, D. et al.: *FEBS Lett.*, **586**, 1658 (2012).
- 4) Hu, Z. et al.: *Front. Microbiol.*, **3**, 366 (2012).
- 5) Shimamura, M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1065 (2007).
- 6) Kartal, B. et al.: *Nature*, **479**, 127 (2011).