

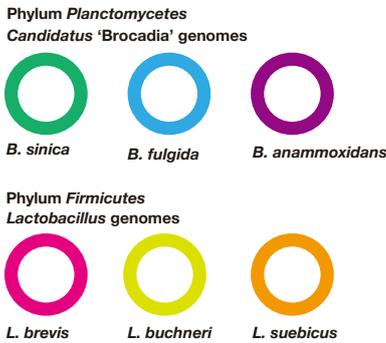
ゲノムマイニングおよび培養試験から存在が見いだされた新規な亜硝酸還元酵素の正体と機能をつきとめる

長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 押木 守



1. はじめに

ゲノムマイニング

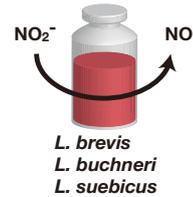


亜硝酸還元酵素 Nir

NO-forming Nir: *nirS* および *nirK*
 NH₄⁺-forming Nir: *nirA*, *nirB*, *nirD*, *nrfA*

亜硝酸還元酵素がゲノム上に無い

培養試験



亜硝酸を活発に還元

未知な亜硝酸還元酵素Nirの存在が示唆される

本研究の目的

Anammox細菌および乳酸菌の亜硝酸還元酵素(Nir)を分離・同定し、機能を解明する

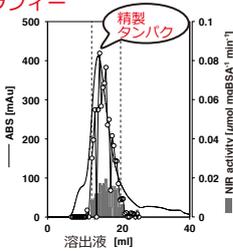
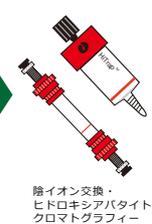
2. 方法 (anammox細菌のNirの精製)

◆ Anammox細菌由来Nirの調査

1. タンパク質精製

菌体破砕液

液体クロマトグラフィー



2. 可溶性Nirに対する変性処理

■ 可溶性Nirについて、1) 熱変性、2) 酸・アルカリ変性、3) 化学変性処理を行い、亜硝酸還元活性を測定する

熱変性：95℃・5min 酸・アルカリ変性：pH 4, 10, 12
 化学変性：8M 尿素, 1% SDS, プロテナーゼK

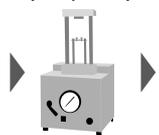
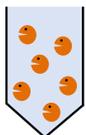
◆ 乳酸菌由来Nirの調査

1. 菌体破砕液を用いた活性測定

細菌と緩衝液の懸濁

フレンチプレス

遠心分離



可溶性画分 & 膜画分

2. 非生物学的なNir活性の測定



培地 pH を酸性条件に調整、菌体摂取無しで¹⁵NO₂⁻トレーサー試験を実施した。
 pH 5.5: 乳酸菌培養終了時の培養液 pH 相当

3. 結果及び考察

◆ 液体クロマトグラフィーによるanammox Nirの精製

精製工程	画分	比活性*	総活性*	精製度 (n-fold)
-	Soluble	0.01	7194	1.0
	素通り	0.02	7409	0.9
	F28	0.04	539	1.9
	F29	0.04	531	1.7
陰イオン交換	F30	0.050	519	2.2
	F31	0.05	441	2.0
	F29,30	0.07	21	4.9
ゲル濾過	F31,32	0.36	77	26.0
	F33,34	0.06	33	4.4

*(nmol μg-protein⁻¹ min⁻¹)

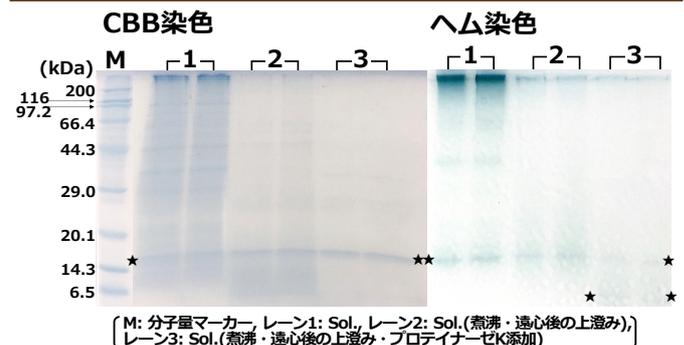
- 可溶性画分のNirを26倍まで精製した。質量分析法による同定作業を現在進めている
- Nirの大半は素通り画分で溶出しており、素通り画分のNirはいかなるクロマト担体にも吸着しなかった。正体はなにか？

◆ 可溶性Nirに対する変性処理および比活性の変化

	亜硝酸還元比活性 (pmol μg-protein ⁻¹ min ⁻¹)	精製度 (n-fold)	
-	19.5 ± 0.3	1.0	
Anammox (Sol.)	pH 4	18.1 ± 0.7	0.9
	pH 10	19.6 ± 0.7	1.0
	pH 12	19.3 ± 1.8	1.0
	8M 尿素	17.1 ± 0.5	0.9
	1% SDS	15.9 ± 1.7	0.8
熱変性	28.3 ± 0.4	1.5	

	亜硝酸還元比活性 (pmol μg-protein ⁻¹ min ⁻¹)	精製度 (n-fold)	
-	11.5 ± 0.8	1.0	
Anammox (Sol.)	煮沸・遠心後の上澄み	55.3 ± 1.3	4.8
	煮沸・遠心後の上澄み(プロテナーゼK添加)	74.1 ± 0.5	6.4

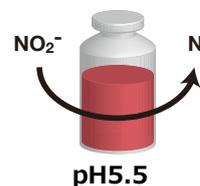
- 可溶性Nirは、pH変性及び変性剤(尿素, SDS)処理を行っても活性がほぼ低下せず、むしろ、熱変成では上昇する
- 熱変成に加えて、遠心分離とプロテナーゼ処理を行うと、著しく比活性が上昇(6.4倍)する



- 14.3 kDa付近のバンド(星印)がNirなのか？
- Nirの正体は酵素ではない可能性もありうる。金属触媒などに幅を広げ、引き続き検討が必要である。

◆ 乳酸菌による亜硝酸還元

Nir活性を示す培養液の菌体破砕物(可溶性・膜画分)について、いかなる条件でもNir活性が検出されなかった。



培地pHをpH5.5に調整すると、菌体摂取無しでも亜硝酸が消失した

乳酸菌培養過程における亜硝酸の消失メカニズムは、1) 増殖に伴う培地pHの低下、2) 酸性pH条件下での亜硝酸の化学的還元、である。

日本酒の生もと醸造において生ずる亜硝酸消失が同様のメカニズムで生じているのではないかと考えた。新たな生もと醸造法のアイデアを提案した。(読売新聞2018年11月17日掲載 地域26面)