

ヒドラジン合成酵素系の電子伝達複合体構造の解明

平 大輔

崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科

研究の目的

ある種の細菌が行う嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 菌を利用した廃水処理は、革新的窒素処理技術であり既に実用化が始まっている。anammox 反応では、アンモニアを電子供与体として亜硝酸イオンが還元され、反応中間体としてヒドラジン(N_2H_4)を経たのちに、窒素分子が生成される ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)。しかし、どのような生化学反応を経て N_2 が放出されるのか、その全容解明には至っていない。特に、anammox 菌以外には例のない N_2H_4 合成反応については、研究開始当初にはその詳細が全く不明であった。2011 年にオランダの研究グループから、 NH_3 と一酸化窒素 (NO) から N_2H_4 を合成する酵素としてヘテロ 3 量体ヘム蛋白質であるヒドラジン合成酵素 (HZS) に関する報告があったが¹⁾、反応生成物である N_2H_4 が直接検出されていない、反応速度が非常に低い、などの疑問点があった。一方、我々は別のヘテロ 2 量体ヘムタンパク質 NaxLS (NaxL と NaxS サブユニットから成るヘテロ 2 量体) について精製し²⁾、その立体構造を解明した。その立体構造から、NaxLS のヘム鉄は His と Cys により配位されていることが明らかとなり、NaxLS は anammox 菌に特有な電子伝達タンパク質であると推定された。そこで、HZS と NaxLS を用いてヒドラジン合成反応を試みたところ、 NH_3 と NO を基質として N_2H_4 が合成されること、その際に NaxLS から HZS への電子伝達反応が必須の反応段階となっていること、が見出された。これらから、HZS の反応過程では NaxLS が生理的電子伝達タンパク質として機能していると考え、HZS と NaxLS の電子伝達複合体構造を X 線結晶構造解析によって解明することを本研究の目的とした。

方法

HZS と NaxLS を anammox 菌優占汚泥より各種カラムクロマトグラフィにより精製した。精製した両蛋白質を再度混合した試料を用いて蒸気拡散法によって結晶化条件を探索した。市販のスクリーンキットを用い約 200 種類の結晶化条件を検討した。得られた結晶については SDS-PAGE を行い、HZS と NaxLS の複合体結晶であるかを調べた。得られた複合体結晶を液体窒素で凍結し、SPring-8 のビームライン 41XU, 44XU に持ち込み X 線回折実験を行った。得られた回折データについて HKL2000 や XDS で処理し、Fe-SAD 法および分子置換法による立体構造決定を試みた。

結果

HZS と NaxLS の両蛋白質を混合した条件で結晶化を行うことで、Pentaerythritol ethoxylate と Polyvinylpyrrolidone を沈殿剤に用いた条件で複合体の単結晶が得られた (図 1)。この結晶を用いて SPring-8 で X 線回折実験を実施し、分解能 2.8 Å のデータを取得することができた。HZS 単独での結晶構造³⁾を用いて分子置換法により、複合体の立体構造を決定することが出来た (図 2)。得られた複合体構造では、HZS はそのヘテロ 3 量体がさらに 2 量化した状態にあり、そのヘテロ 3 量体あたりに 1 分子の NaxLS が結合していた。また、HZS の γ サブユニットに存在する 6 配位のヘムと NaxLS の NaxL サブユニットのヘムが 12 Å の距離に位置していた。このことは両ヘム間を通した分子間電子伝達反応が可能であることを示していた。

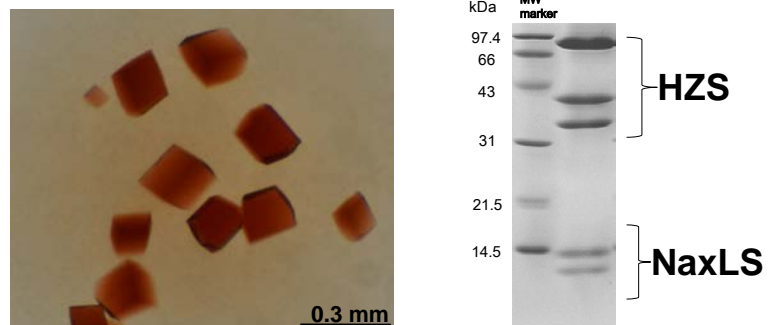


図 1 HZS と NaxLS の複合体結晶 (左) およびその SDS-PAGE (右)

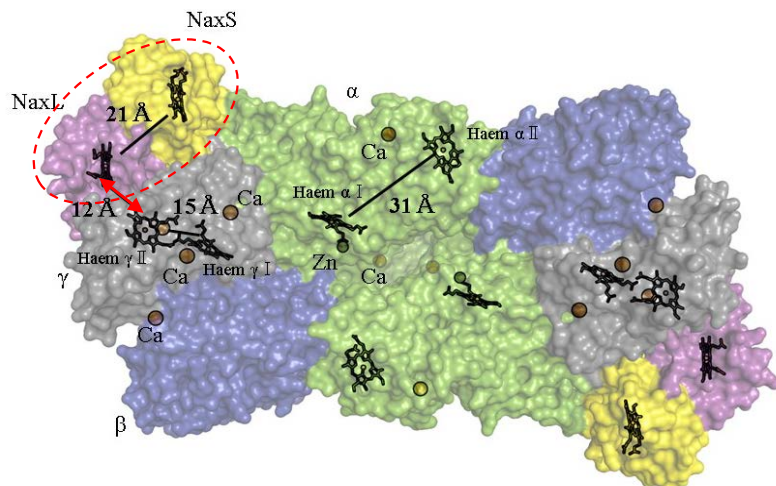


図 2 HZS-NaxLS 複合体の結晶構造 赤色破線で NaxLS を示す。

結論

NH_3 と NO から N_2H_4 が合成される反応では 3 電子が必要とされる。本研究で明らかとした HZS と NaxLS からなるヒドラジン合成酵素複合体の立体構造、及び別途実施した生化学的実験結果より、ヒドラジン合成反応過程において NaxLS から HZS への 2 電子伝達反応が必須であることが推定された。今後、立体構造を基盤として、 N_2H_4 合成反応への複合体形成の影響を解明したい。

文献

1) Kartal B et al., (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*. **479**: 127-130.

- 2) Ukita S et al., (2010) A heterodimeric cytochrome c complex with a very low redox potential from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *FEMS Microbiol Lett* **313**: 61-67.
- 3) Dietl A, et al., (2015) The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex. *Nature*. **527**: 394-397.