

N-1

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum oguniense* における呼吸鎖電子伝達系の検討

The electron transport system in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum oguniense*

○佐藤 克哉¹, 栗山 麻子², 吉澤 大司², 富澤 文彦², 谷川 実³, 長田 洋子³*Katsuya Satoh¹, Asako Kuriyama², Daiji Yoshizawa², Fumihiko Tomizawa²,
Minoru Tanigawa³, Yoko Nagata³

Abstract: *Pyrobaculum oguniense* is a hyperthermophilic archaeon that grows aerobically, optimally at 90~94°C. Since its electron transfer system remains obscure, we searched for cytochromes in the cell-free extract by measuring the absorption spectra. The result showed the presence of new cytochromes of *b*-type and *c*-type, in addition to the known *a*-type one. In this study, we purified the *b*-type and *c*-type cytochromes from *P. oguniense* cell-free extract, and examined the electron transport pathway in order to compare the cytochromes with those of unaerobically grown *P. islandicum*.

1. 目的

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum oguniense* (*P. oguniense*) は最適生育温度 90~94°C の通性嫌気性の古細菌であり、その電子伝達系は明らかにされていない。私達は本菌中に遊離型 D-アミノ酸が含まれていること、および中性遊離型 D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸脱水素酵素が存在することを確認している。さらに、無細胞抽出液の吸収曲線を測定した結果、*a* 型、*b* 型、および *c* 型のシトクロムの存在を見出した。*b* 型、*c* 型シトクロムの存在は報告されておらず新しい発見である。

本研究では好気条件で培養した *P. oguniense* から *b* 型および *c* 型シトクロムの単離精製を行った。これらのシトクロムを用いて、D-アミノ酸脱水素酵素、NADH 脱水素酵素、NADPH 脱水素酵素の存在下で基質として D-アミノ酸、NADH、NADPH を添加した際、どのシトクロムに電子が伝達されるのかを解明し、嫌気下で培養した *P. islandicum* の電子伝達系と比較することを目的として以下の実験を行った。

2. 方法

<培養>

MS medium (Sako et al.,1996) を満たした 5 L 培養びんにポンプにより空気を送り、90°C、24時間、好氣的に培養を行った。

<無細胞抽出液の調製>

P. oguniense 菌体を 50 mM Na-リン酸 buffer (pH 7.0) に懸濁し超音波破碎を行い、遠心分離 (20,000 g × 20 min) した上澄みは無細胞抽出液として実験に用いた。

<D-アミノ酸、NADH、NADPH を基質とした電子伝達系の検討>

無細胞抽出液 2 mg に 100 μM NaCN を加え末端酸化酵素を阻害した後、基質 (200 mM D-アミノ酸、1 mM NADH、または 1 mM NADPH) を加え 500~600 nm の吸収スペクトルを測定した。

<脱水素酵素およびシトクロムの精製>

P. oguniense 菌体 100 g を 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)を含む 10 倍量の蒸留水に懸濁

1: 日大理工・院・応化 2: 日大理工・学部・応化 3: 日大理工・教員・応化

後、フレンチプレスを用いて破碎し、遠心分離 (20,000 g × 20 min) 後の上澄みを回収し無細胞抽出液を得た。これを超遠心分離 (140,000 g × 60 min) し、沈殿の膜画分を 1% Tween 20 さらに 5% Triton X-100 により可溶化した。この画分からカラムクロマトグラフィー等を用いて *b* 型および *c* 型シトクロムを精製し、部分精製した D-アミノ酸脱水素酵素, NADH 脱水素酵素, NADPH 脱水素酵素も得た。

3. 結果・考察

これらのシトクロム (酸化型) と上記酵素を含有する反応溶液に D-プロリン, D-バリン, NADH, または NADPH を添加すると, 還元型シトクロムの吸収曲線が得られた。このことより, *P. oguniense* は電子供与体としての D-アミノ酸, NADH または NADPH から, 脱水素酵素により放出された水素を用いて ATP の産生を行っている可能性が示された。*P. oguniense* は *P. islandicum* には無い *c* 型および *a* 型シトクロムを持っており, *P. islandicum* と同様の電子伝達系の基質を用いていながら ATP 産生の経路は異なるということが示唆された。

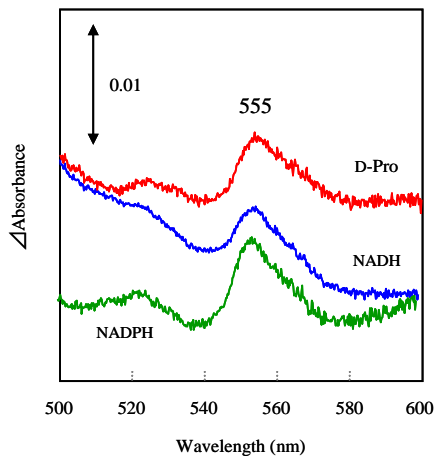


Figure 1. Reduction of *P. oguniense* cytochromes with D-proline, NADH or NADPH.

The reaction mixture contained cell-free extract, and either of 200 mM D-proline or 1 mM NAD(P)H. The reaction was carried out at 60°C for 10 min.

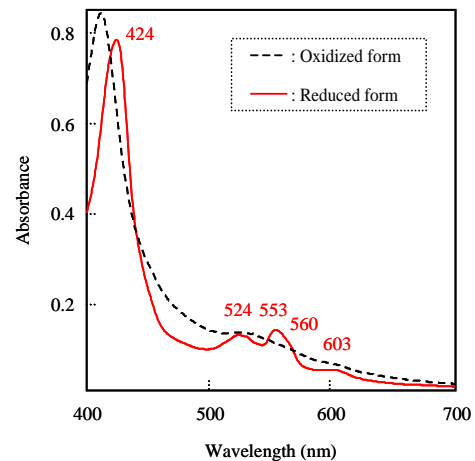


Figure 2. Absorption spectra of *P. oguniense* solubilized membrane-fraction.

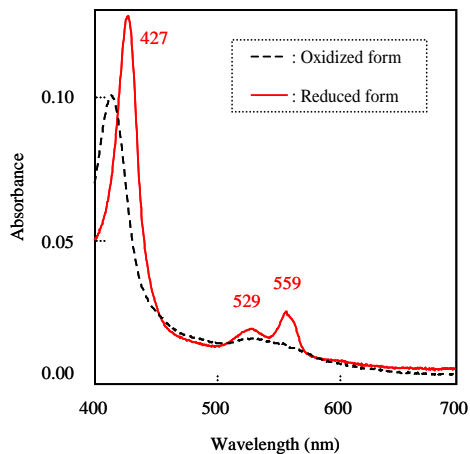


Figure 3. Absorption spectra of a *b*-type cytochrome from *P. oguniense*.

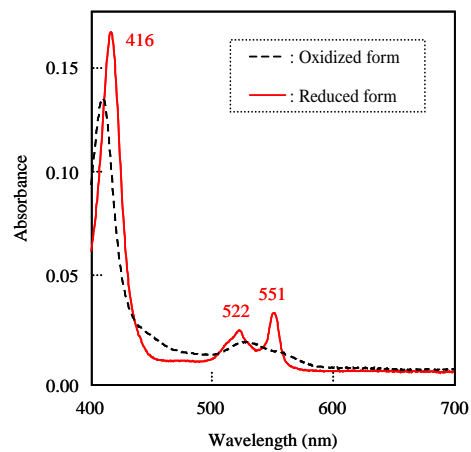


Figure 4. Absorption spectra of a *c*-type cytochrome from *P. oguniense*.