

N-2

Pyrobaculum islandicum シトクロム b_{557} および b_{559} の
D-アミノ酸または NADH による還元Reduction of D-amino acid and NADH in *Pyrobaculum islandicum* cytochrome b_{557} and b_{559} ○天女目 勇太¹, 長田 洋子², 谷川 実²○Yuta Nabatame¹, Yoko Nagata², Minoru Tanigawa²

Pyrobaculum islandicum is a strictly anaerobic archaeon that grows optimally at 100°C. We purified two *b*-type cytochromes that showed α peaks at 557 nm and 559 nm, respectively. We tentatively named the protein cytochrome b_{557} and b_{559} . These cytochromes were highly purified to homogeneity by SDS-PAGE (electrophoresis) assay. The electrons generated from D-valine or NADH by the catalytic function of DAD or NADH dehydrogenase, respectively, were found to be transferred to both of cytochrome b_{557} and b_{559} because reduced type absorption spectra of these cytochromes were presented upon addition of D-valine or NADH.

1. 目的

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* はアイスランド地熱発電所から単離された最適生育温度 100°C の絶対嫌気性の古細菌である。本菌はエネルギー生産に必要な呼吸鎖において D-アミノ酸, NADH, NADPH などを電子供与体とし, 電子受容体としての元素硫黄やチオ硫酸を還元し硫化水素を生成していることが知られているが, その電子伝達系に関してはほとんど報告されていない。本菌中には遊離型 D-アミノ酸が含まれており, D-valine を基質とした時に高い活性を持つ D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) の存在が確認されている (Nagata et al., B.B.A., 1999)。また, 当研究室において二種類の *b* 型シトクロムを見出した。本研究では, これらのシトクロム b_{557} と b_{559} を精製し, 別に精製した DAD と NADH 脱水素酵素を用いて, 呼吸鎖電子伝達系の機能を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

サンプル調整

95°C で培養した菌体をフレンチプレスで破碎した後に遠心分離し, 無細胞抽出液と未破碎細胞とに分けた。無細胞抽出液を超遠心分離し, 沈渣に 1% Tween 20 (界面活性剤) を加えた。その結果, 溶解した可溶化膜画分と可溶化されずに残った膜画分が得られた。

シトクロム, DAD, NADH 脱水素酵素の精製

膜画分を 5% Triton X-100 (界面活性剤) で可溶化し, 硫酸アンモニウムを加え塩析した画分を, CM-Toyopearl を用いた弱陽イオン交換クロマトグラフィーにより吸着画分と非吸着画分に分画した。吸着画分からはシトクロム (Cyt) b_{557} , 非吸着画分からは Cyt b_{559} を得た。さらに種々のカラムクロマトグラフィーによりこれらのシトクロムを精製した。

可溶化膜画分を DEAE-Toyopearl を用いた弱陰イオン交換クロマトグラフィーにより吸着画分と非吸着画分とに分画した。非吸着画分を種々のカラムクロマトグラフィーにより分画し, DAD と NADH 脱水素酵素を精製した。

分光学的測定

吸収曲線の測定は, Ultrospec 4300 Pro 分光光度計 (Amersham) により測定を行った。嫌氣的測定は, ツンベルク型セルを用いて真空ポンプによる脱気後窒素ガスを充填して行った。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE により分子量に従って分画されたゲル中のタンパク質はクマシーブリリアントブルー (CBB) で染色し, シトクロムの補欠分子族であるヘムはヘム染色により可視化した。

3. 結果・考察

精製したシトクロムの吸収曲線 (Fig. 1) では α ピークがそれぞれ 557 nm と 559 nm に現れ, *b* 型シトクロムであることを示している。本菌のような超好熱性古細菌に *b* 型シトクロムが 2 種も存在するという報告は未だなく, 本研究ではそのことをこの図のように明瞭に証明できた。電気泳動 SDS-PAGE による分析結果 (Fig. 2) から, これらのシトクロ

¹: 日大理工・院・応化 ²: 日大理工・教員・応化

ムが高度に精製されたものであることが読み取れる。両シトクロムは DAD の存在下で D-valine により (Fig. 3), また NADH 脱水素酵素の存在下で NADH により (Fig. 4) 還元された。このことは, *P. islandicum* の DAD または NADH 脱水素酵素が働き, 生じた電子が, コエンザイム (Co) Q₀ を介しシトクロムにまで電子が伝達されたことを示している。したがって *P. islandicum* において D-valine または NADH を基質として ATP を合成し, エネルギーを獲得するための電子伝達系が機能している可能性が示唆された。

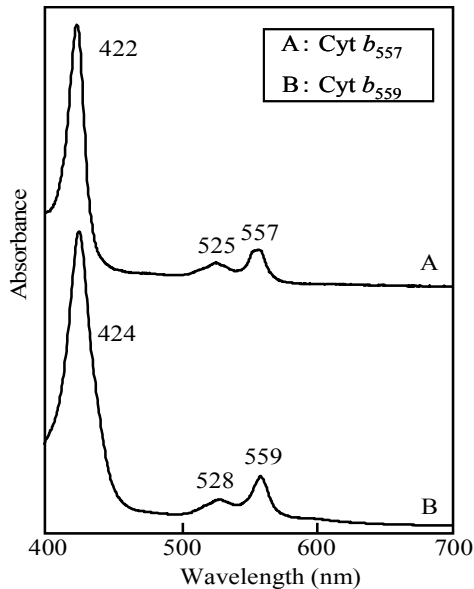


Fig. 1. Absorption spectra of *P. islandicum* cytochrome *b*₅₅₇ and *b*₅₅₉. Reduced forms prepared with Na₂S₂O₄ are shown.

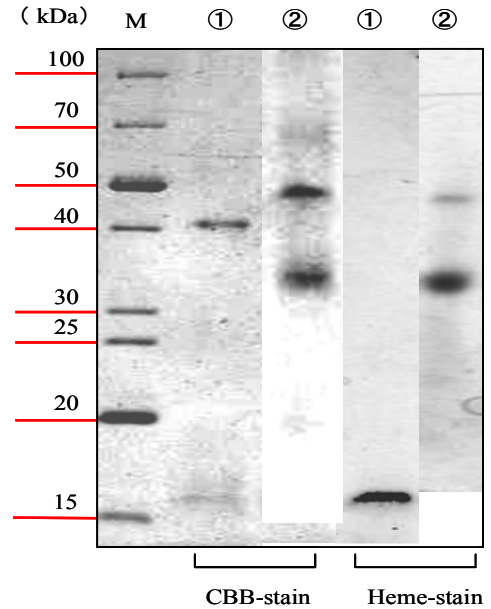


Fig. 2. SDS-PAGE (electrophoresis)
M, Molecular marker proteins
①, Cytochrome *b*₅₅₇
②, Cytochrome *b*₅₅₉

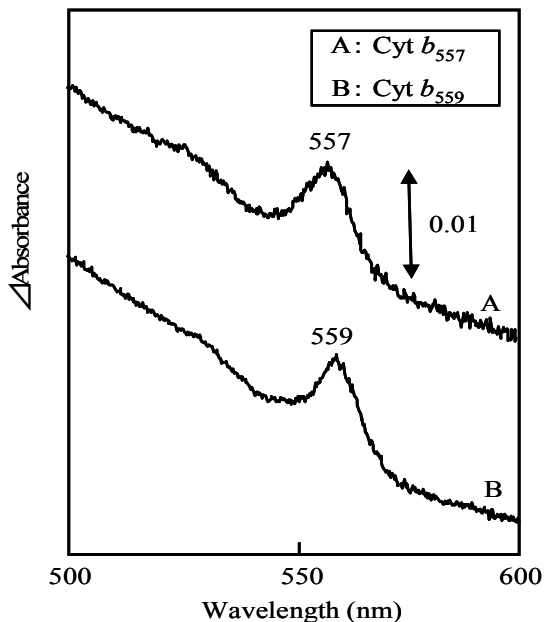


Fig. 3. Reduction of *P. islandicum* cytochrome *b*₅₅₇ and *b*₅₅₉ with D-valine. Difference absorption spectra with and without D-valine are shown. The reaction mixture contained either of cytochrome *b*₅₅₇ or *b*₅₅₉, 50 μg DAD, 100 mM D-valine, and 10 μM CoQ₀. The reaction was carried out at 50°C for 10 min.

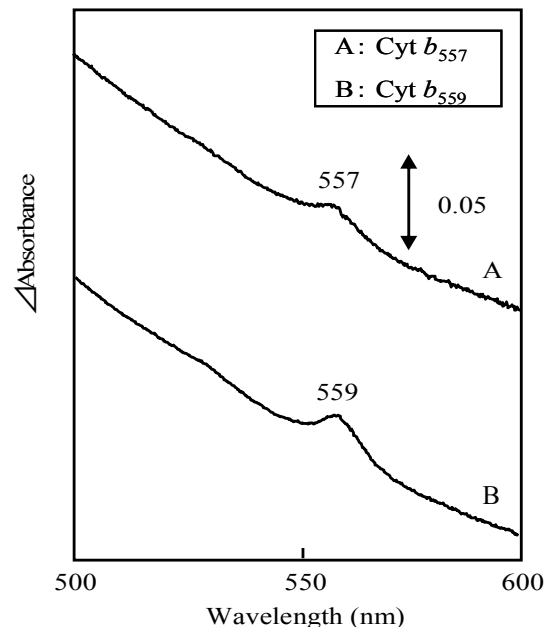


Fig. 4. Reduction of *P. islandicum* cytochrome *b*₅₅₇ and *b*₅₅₉ with NADH. Difference absorption spectra with and without NADH are shown. The reaction mixture contained either of cytochrome *b*₅₅₇ or *b*₅₅₉, 10 μg NADH dehydrogenase, 500 μM NADH, and 10 μM CoQ₀. The reaction was carried out at 50°C for 10 min.