

硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* D-アミノ酸脱水素酵素の役割

Role of D-Amino Acid Dehydrogenase in the Sulfur Oxidizing Bacterium *Starkeya novella*

○長谷川修也¹, 滝澤咲紀¹, 碓井仁美¹, 旗谷惇², 小田真弓³, 谷川実³, 西村克史^{3,4}

Shuya Hasegawa¹, Saki Takizawa¹, Hitomi Usui¹, Jun Hataya², Mayumi Oda³, Minoru Tanigawa³, Katsushi Nishimura^{3,4}

Abstract: The sulfur-oxidizing bacterium *Starkeya novella* is a facultative chemoautotroph. When the bacterium was cultured under autotrophic and heterotrophic conditions, D-amino acid dehydrogenase showed a high activity against D-proline and D-alanine, respectively. The activity against D-proline was higher than that against D-alanine. We examined the electron transfer from the enzyme to cytochromes. It was revealed that when the bacterium was cultured under heterotrophic conditions, no electron transfer was detected from either D-alanine or D-proline. These results suggested that the D-amino acid dehydrogenase of *S. novella* might play different roles under autotrophic and heterotrophic conditions.

1. 目的

硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* (*S. novella*) は、土壌または水中に生息しており、その最適生育温度 27°C は、最適生育 pH は中性付近である。無機物 (チオ硫酸), または有機物をエネルギー源として生育可能な任意独立栄養化学合成細菌である。*S. novella* には、D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) が存在していることが判明している。DAD は、膜表在性のタンパク質であり、Flavin adenine dinucleotide (FAD) を補酵素として、D-アミノ酸の α 位を脱水素し 2-オキソ酸とアンモニアに変換する酵素である。*Pyrobaculum islandicum* のような絶対嫌気性生物や *Helicobacter pylori* のような微好気環境に住む生物に存在している。*Escherichia coli* や *Helicobacter pylori* においては、DAD の反応に伴って遊離した電子は電子伝達系に伝達される、すなわち DAD がエネルギー代謝に関与していることが報告されている (H24 碓井仁美 卒業論文)。しかし、本菌における DAD の役割の詳細は分かっていない。

本研究では、DAD の発現や性質を調べ生理的役割を明らかにすることを目的とし、従属栄養条件下で培養した *S. novella* から本酵素を精製した。

2. 方法

2-1. 培養

独立栄養培養の場合には、Santer らの培地を用いて 27°C で 5 日間、従属栄養の場合には、NUTRIENT BROTH を用いて 27°C で 1 日間、振盪培養した。培養後、遠心分離 (4,000 g, 10 min, 4°C) によって菌体を集め、得られた菌体を 50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁し洗浄後、遠心分離 (4,000 g, 10 min, 4°C) を行い -20°C で保存した。

2-2. DAD の活性測定

酵素サンプル, 50 mM アミノ酸 (D-Ala, D-Pro), 2 μ M Phenazine methosulfate, 1 μ M FAD, 2,6-Dichlorophenolindophenol ($A_{610nm}=0.8$), 50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.0) を含む反応溶液 (200 μ L) を、27°C でインキュベートし、610 nm における吸光度を測定した。

DAD の最適温度の測定のため、酵素サンプル 10 μ g, 50 mM K-Phosphate buffer (pH 6.5), 1 μ M FAD, 2 μ M PMS, 0.75 mM DCIP を含む反応溶液を 180 μ L に 500 mM アミノ酸を基質として 20 μ L 入れ、10, 20, 27, 30, 40, 50°C で 10 分間反応させた。

DAD の最適 pH の測定のため、酵素サンプル 10 μ g, 50 mM Britton Robinson buffer (pH 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0), 1 μ M FAD, 2 μ M PMS, 0.75 mM DCIP を含む反応溶液を 180 μ L に 500 mM アミノ酸を基質として 20 μ L 入れ、27°C, 10 分間反応させた。

2-3. DAD の精製

従属栄養的に培養した *S. novella* 菌体を、5 倍量 (v/w) の 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride を含む 50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.0) 中に懸濁し、フレンチプレス (100 MPa, 10 Times on ice) を用いて破碎した。破碎液を遠心分離 (16,500 g, 20 min, 4°C) し、無細胞抽出液 (上澄み) を得た。無細胞抽出液を超遠心分離 (140,000 g, 1 h, 4°C) し、得られた膜画分 (沈殿) を 5% Triton X-100 を含む 50 mM Na-Phosphate buffer (pH 7.0) を用いて可溶化 (3 h, 4°C) した。超遠心分離後、得られた上澄みを可溶化膜画分とした。可溶化膜画分を CM-Toyopearl カラムと Sephadex G-75 カラムの順に通し DAD の部分精製酵素標品を得た。

2-4. 酵素消費活性

無細胞抽出液 (独立栄養時 0.55 mg-protein/mL, 従属栄

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・院・応化 3: 日大理工・教員・応化 4: 日大短大・教員・化学

養時 2.1 mg-protein/mL), 基質 (20 mM Na₂SO₃, 100 mM D-Pro, 100 mM D-Ala), 50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.0) からの反応溶液 2 mL をチャンバーに入れ, 酸素電極を用いて溶存酸素量を測定し, 酸素消費活性を求めた。

2-5. DAD からチトクロムへの電子伝達

無細胞抽出液 (独立栄養時 0.26 mg-protein/mL, 従属栄養時 1.33 mg-protein/mL), 基質 (1 mM Na₂SO₃, 50 mM D-Pro, 100 mM D-Ala), 10 μM NaN₃ を含む反応溶液 300 μL を石英セルに入れ, 分光器 (27°C) を用いてチトクロムの吸収スペクトルを経時的に測定した。

3. 結果及び考察

3-1. DAD の精製 (Table.1)

D-Ala と D-Pro を基質として活性測定を行った。無細胞抽出液以外では, D-Pro を基質として用いた場合に DAD の比活性が D-Ala を基質とした時よりも高かった。

3-2. DAD の最適温度と最適 pH

温度依存性を測定した結果, 独立栄養と従属栄養のどちらの場合においても 27°C で最も高い活性を示すことが分かった (Fig. 1)。pH 依存性を測定した結果, 独立栄養時・従属栄養時共に pH=6.5 で最も高い活性を示すことが分かった (Fig. 2)。この最適 pH は *E. coli* 由来 DAD (pH=8.9), *H. pylori* 由来 DAD (pH=8.0), *P. islandicum* 由来 DAD (pH=6.5-9.0) とは異なっていた。

3-3. 酸素消費活性

酸素消費活性を測定した結果, 独立栄養の場合チオ硫酸ナトリウムを基質として加えたとき酸素消費活性が見られたが, D-Ala または D-Pro を加えても酸素の消費は検出されなかった。一方, 従属栄養の場合, D-Ala が基質の時 0.74 ± 0.07 nmol/min/mg, D-Pro が基質の時 0.62 ± 0.14 nmol/min/mg の酸素消費活性が見られた。

3-4. DAD からチトクロムへの電子伝達 (Fig. 3)

DAD により電子が電子伝達系に伝達されるかどうかを調べるために独立栄養培養, 従属栄養培養の無細胞抽出液の吸収スペクトルを測定した。独立栄養の場合, チオ硫酸を基質として加えた場合にはチトクロムへの電子伝達が観測されたが, D-Ala や D-Pro を加えてもチトクロムのピークは観察されなかった。一方, 従属栄養の場合, D-Ala と D-Pro のどちらを加えたときにもチトクロムのピークが見られた。独立栄養の場合, *S. novella* の電子伝達系ではチオ硫酸から引き抜かれた電子は, 亜硫酸チトクロ

ム c 酸化還元酵素, チトクロム c, チトクロム c 酸化酵素, 酸素の順に伝達される。この経路にはキノンが関与しない。従って D-アミノ酸が脱水素される時に生じた電子はキノンに伝達されるがチトクロム系には伝達されないと考えられた。しかし, 従属栄養の場合は DAD によって引き抜かれた電子がキノンに伝達されたのちチトクロム bc₁ に伝達され電子伝達系を流れると考えられた。

Table 1. DAD の精製

	全タンパク量 (mg)	比活性: D-Ala (nmol/min/mg)	比活性: D-Pro (nmol/min/mg)
無細胞抽出液	1630	0.370	0.270
可溶性画分	1250	0.650	0.880
可溶化膜画分	270	3.50	4.70
CM-Toyopearl	0.400	0.0180	0.0200

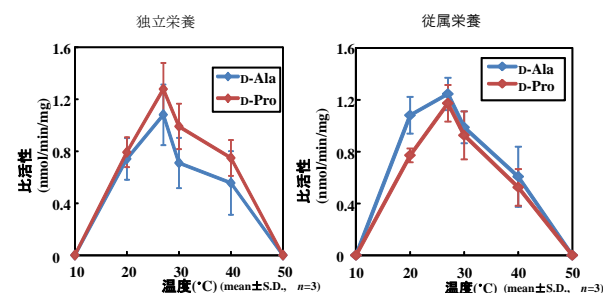


Fig. 1. 最適温度

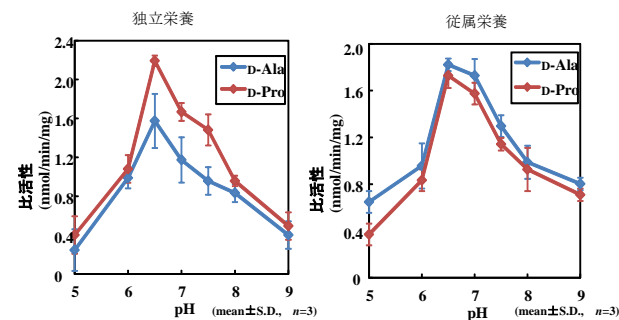


Fig. 2. 最適 pH

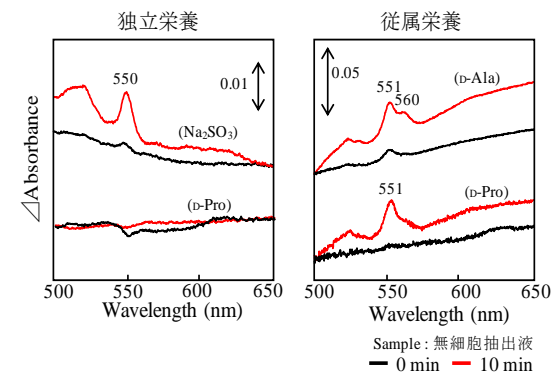


Fig. 3. DAD からチトクロムへの電子伝達