

N-18

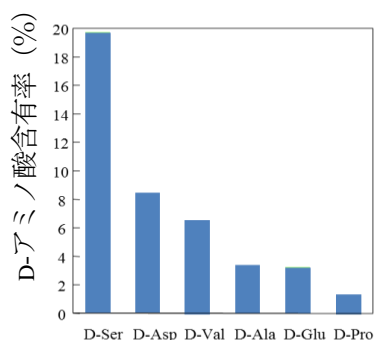
超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* の新奇 D-アミノ酸脱水素酵素Novel of D-amino acid dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaea *Pyrobaculum islandicum*○塚田祐史¹, 徳久真弓², 小池美弥³, 谷川実³, 西村克史^{3,4}*Yuji Tsukada¹, Mayumi Tokuhisa², Miya Koike³, Minoru Tanigawa³, Katsushi Nishimura^{3,4}

Abstract: *Pyrobaculum islandicum* is a strict anaerobic archaeon that grows optimally at 100°C. D-Amino acid dehydrogenase (DAD) is a membrane-bound enzyme that catalyzes dehydrogenation of D-amino acids without oxygen. In the present study, we purified and characterized a novel DAD from *P. islandicum*. Purified DAD showed high activity against D-Val, D-Asp and D-Glu.

1. 緒言

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* (*P. islandicum*) はアイスランドの地熱発電所の漏水から単離された絶対嫌気性菌であり、その最適生育温度は 100°C である。我々は、真正細菌のペプチドグリカン層以外にはほとんど存在しないとされていた D-アミノ酸が、ペプチドグリカンを持たない古細菌中に、遊離型として存在することを報告してきた (Fig. 1)。D-アミノ酸は生体内で様々な生理的役割を担っており¹⁾、食品と医療分野への応用が期待されているため、低コストで簡便な D-アミノ酸の測定法が求められている。D-アミノ酸を測定する方法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法や D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) とペルオキシダーゼとのカップリング法がある。前者では、高コストや長時間を要すること、後者では反応系が複雑であることや、二つの酵素を使わなければならないことなどの欠点がある。我々は低コストで簡便に測定できる D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) を用いて酸性 D-アミノ酸を定量することを検討している。

DAD は、D-アミノ酸の α 位の水素を引き抜き生じた電子を電子受容体に伝達する酵素である。本研究では、この酵素の性質を調べ酸性 D-アミノ酸の定量に利用できるか検討した。

Figure 1. *P. islandicum* の遊離型 D-アミノ酸含有率 (%)

2. 方法

2.1 培養

PYROBACULUM MEDIUM 4.5 L を 5 L 容耐熱ビンに入れ 95°C で一晚静置後 (酸素指示薬であるレザズリンが赤色から無色に)、*P. islandicum* を植え 24 h 培養した後、連続遠心分離機 (13,300 g) で集菌し 20°C で保存した。

2.2 DAD の精製

菌体を 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride を含む 50 mM Na-Pi buffer (pH 7.0) 中でホモジナイズし、フレンチプレス (150 MPa, 5 times) により破碎した。遠心分離 (20,000 g × 20 min, 4°C) し、上澄みは無細胞抽出液とした。無細胞抽出液を超遠心分離 (140,000 g × 60 min, 4°C) し、得られた沈澱を膜画分、上澄みを可溶性画分とした。

膜画分を、1% Tween 20 を含む 50 mM Na-Pi buffer (pH 7.0) で可溶化 (4°C, 14h) し、超遠心分離 (140,000 g × 60 min, 4°C) の後、上澄みを可溶化膜画分とした。

可溶化膜画分を 1 mM EDTA と 1% Tween 20 を含む 50 mM Na-Pi buffer (pH 7.0) に対して透析し、DEAE-Toyopearl カラムに通した。その非吸着画分を 1 mM EDTA と 1% Tween 20 を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して透析した後、DEAE Toyopearl カラムに吸着させ、NaCl を含む buffer でリニアグラジエント (0-500mM) 溶出した。

2.3 タンパク質定量

Bradford 法を用いてタンパク質濃度を求めた。

2.4 DAD の活性測定

1 μ M Flavin adenine dinucleotide, 2 μ M Phenazine methosulfate, 50 mM Na-Pi buffer (pH 7.0), 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) を含む混合溶液、サンプル、50 mM D-アミノ酸 (基質) をマイクロプレートに入れ、反応 (80°C, 5 min) 後、600 nm における吸光度を測定し、DAD 活性を算出した。

3. 結果及び考察

1:日大理工・学部・応化 2:日大理工・研究員・応化 3:日大理工・教員・応化 4:日大短大・教員・応化

膜画分と可溶化膜画分の比活性を比較すると、可溶化膜画分の方が高い値を示したため、今回精製したDADは膜表在性タンパク質であることが分かった。可溶化膜画分をDEAE-Toyopearlに供し精製を行ったが、単一なタンパク質にはならなかった。

DADの性質を調べた結果、最適温度は80℃以上、最適pHは7.0であった。今回精製したDADの基質特異性をFig. 2、既報のD-Pro脱水素酵素の基質特異性をFig. 3に示す。Fig. 2とFig. 3の比較の結果、基質特異性が大きく異なるため、今回得られたDADは既報のDADとは異なる酵素であると考えられた。Fig. 2に示したように、D-Valに対して最も高い活性を示し、ついでD-Ala、D-Pro、D-Phe、D-Ile、D-Asp、D-Glu、D-Hisの順に高い活性を示し、D-Serに対してはほとんど触媒作用がないことが分かった。またL-アミノ酸に対しては活性を示さなかった。それに対して既報のD-Pro脱水素酵素は、D-Proに対して最も高い活性を示し、ついでD-Phe、D-Ala、D-Glu、D-Asp、D-Serの順に高い活性を示し、L-Proに対して活性を示さなかった (Fig. 3)。今回精製したDADはD-AspやD-Gluに対しても高い活性を示した。したがって、酸性D-アミノ酸の定量に利用できるのではないかと考えられる。

4. 参考文献

- [1] 資生堂 shiseido news release 2011
- [2] 2006年度卒業論文, 三浦 真由
- [3] T. Satomura *et al.*, J.B.C 2002

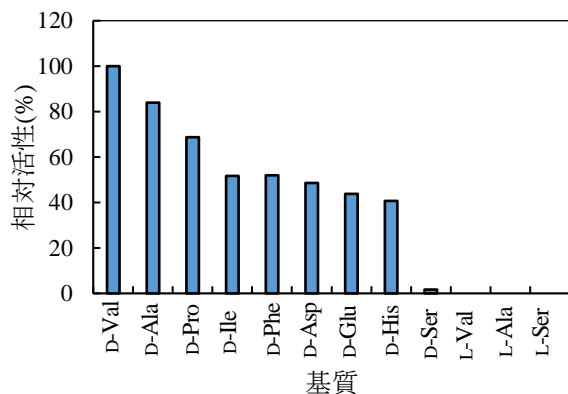


Figure 2. DADの基質特異性

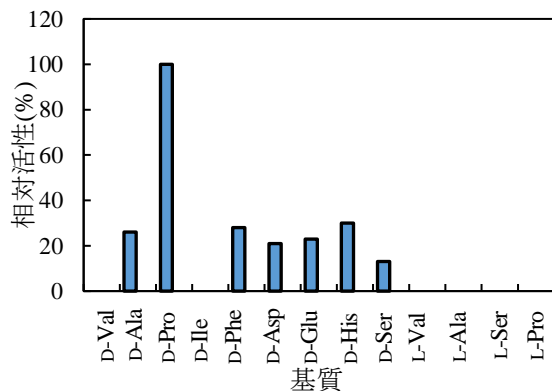


Figure 3. 既知のD-Pro脱水素酵素の基質特異性