

N-20

好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 の D-アミノ酸脱水素酵素の精製と性質Purification and Characterization of D-Amino Acid Dehydrogenase from the Psychrophilic and Piezophilic Bacterium *Shewanella violacea* DSS12川名 陽人¹, 小池 美弥², 徳久 真弓³, 加藤 千明⁴, 谷川 実², 西村 克史^{2,5}Youto Kawana¹, Miya Koike², Tokuhisa Mayumi², Tiaki Katou⁴, Minoru Tanigawa², Katsushi Nishimura^{2,3}

Abstract: *Shewanella violacea* DSS12 (*S. violacea*) is a psychrophilic and facultatively piezophilic bacterium which was isolated from the mud of the Ryukyu Trench. A hypothetical gene encoding D-amino acid dehydrogenase (DAD) exists in the genome of *S. violacea*, and the activity of DAD has been detected. In this study, to gain a better understanding of the physiological role of DAD in *S. violacea*, we investigated effects of D-amino acids on the growth of the organism and characterized the enzyme. Only D-serine showed inhibitory effect on the growth. *S. violacea* contained, in order of abundance, Pro, Glu and Ala. The cell-free extracts of aerobic and microaerobic conditions exhibited DAD activity for D-Pro and D-Ser, respectively. D-Ser in the culture medium induced DAD activity against D-Ser. In the case of addition of D-Pro, the reduction of cytochromes was observed indicating an electron transfer from DAD to cytochromes.

1. 緒言

Shewanella violacea DSS12 (*S. violacea*) は、深度 5,110 m の琉球海溝底泥から単離された好冷好圧性細菌であり、その最適生育環境は 8°C, 300 気圧である。本菌には D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) の存在が確認されている^[1]。DAD は、Flavin adenine dinucleotide (FAD) を補酵素として D-アミノ酸の α -位の水素を脱水素し、2-オキソ酸を生成する酵素である。先行研究により *S. violacea* は、D-Ser を加えた培地では D-Ser に対し、加えていない場合では D-Pro に対して高い活性を示す DAD が発現することが示されている^[1]。本研究では、DAD の耐圧機構を明らかにすること、また食品加工や洗剤添加等の工業的応用を目的として、DAD を精製しその性質を調べた。

2. 方法

2.1 培養

S. violacea を Marine Broth 2216 を用いて前培養 (180 rpm, 4°C, 3 days, 500 mL 坂口フラスコ) した後、50 mM D-Ser を添加した Marine Broth 2216 に植菌し本培養 (通気, 4°C, 3 days, 5 L メディウムビン) した。培養後、遠心分離 (8,000 g, 4°C, 5 min) により集菌し、-80°C で保存した。

2.2 DAD の精製

菌体を 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride を含む 5 倍量 (v/w) の 50 mM Na-Pi Buffer (pH 7.0) に懸濁し、フレンチプレス (100 MPa, on ice) を用いて破碎した。遠心分離 (5,900 g, 4°C, 10 min) により無細胞抽出液と未破碎細胞を得た。

無細胞抽出液を超遠心分離 (141,000 g, 4°C, 30 min) により膜画分と可溶性画分に分画し、膜画分を 1% Tween 20 を含む 50 mM Na-Pi Buffer (pH 7.0) で可溶化 (4°C, overnight) し、超遠心分離 (141,000 g, 4°C, 30 min) により膜残渣と Tween 20 可溶化膜画分を得た。さらに、膜残渣を 1% Triton X-100 を含む 50 mM Na-Pi Buffer (pH 7.0) で可溶化 (4°C, overnight) し、超遠心分離 (141,000 g, 4°C, 30 min) により Triton X-100 可溶化膜画分と膜残渣を得た。

Tween 20 可溶化膜画分と Triton X-100 可溶化膜画を混ぜ、CM-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーにサンプルを供し、0-1 M NaCl を用いて Linear gradient 溶出を行った。活性画分を限外濾過を用いて濃縮し、Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーに供した。Bradford 法に従ってタンパク質を定量した。

2.3 DAD の活性測定

2,6-Dichlorophenolindophenol ($A_{600\text{nm}}=0.80$), 1 μM FAD, 1% Tween 20 を含む 50 mM Na-Pi Buffer (pH 7.0) に、酵素サンプル (10 μL) と 50 mM D-Ser を加えた全量 200 μL の反応溶液を 30°C で 30 分間反応させ、600 nm における吸光度を測定し DAD 活性を算出した。

2.4 DAD の最適温度と最適 pH

基質として D-Ala, D-Ser, D-Pro を用いて最適温度を調べた。反応液の pH を 8.0 として、4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100°C で活性を測定し最適温度を求めた。温度を 30°C とし、pH を 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に設定し、活性を測定して最適 pH を決定した。

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大理工・研究員 4: 海洋研究開発機構・シニアスタッフ
5: 日大短大・教員・応化

2.5 加圧下における DAD の活性測定

酵素反応溶液である DCIP 混合液 (2,6-Dichlorophenolindophenol, 1 μM FAD, 1% Tween 20 を含む 50 mM Na-Pi Buffer (pH 7.0)), 50 mM D-Ser or 50 mM D-Pro をハンドポンプにて加圧し, 8°C で 60 分間静置した. (0.1 MPa, 25 MPa, 50 MPa, 75 MPa, 100 MPa). 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

DAD の粗精製標本の精製倍率は 133 倍となった (Table 1). DAD の基質特異性を調べた結果, D-Pro に最も高い活性 (D-Ser の 1.87 倍, D-Ala の 1.57 倍) を示した. *Escherichia coli* の DAD は D-Ala に対して最も高い活性を示し, *Helicobacter pylori* では D-Pro に対して最も高い活性を示した. これは, 菌体中の Pro の含有量が多いため, D-Pro の分解が必要となるためであると考えられる.

最適 pH は 8.0 であった. 他の菌の DAD の最適 pH と類似した結果であった.

最適温度は 80°C であった. *Escherichia coli* の DAD の最適温度は 40°C であり, *Helicobacter pylori* の DAD の最適温度は 37°C である [1]. これらと比較すると, 最適温度は高かった.

可溶性画分と可溶化膜画分を比較した結果, 可溶化膜画分に高い DAD 活性が得られた. 3つのカラムクロマトグラフィーに供したが, 均一に精製することはできなかった.

3.1 DAD の耐圧性

Fig. 2 より, *S. livingstonensis* の DAD は 25 MPa 以上の圧力下では活性が著しく減少した. *S. violacea* の DAD は圧力耐性が高いことがわかった.

Table 1. DAD の精製

	全タンパク質 (mg)	回収率 (%)	比活性 (nmol/min/mg)	精製倍率 (fold)
無菌抽出液	1360	100	0.0711	1
可溶性画分	567	41	0.208	2.93
Tween 20 可溶化膜画分	50.8	3.7	3.41	47.9
Triton X-100 可溶化膜画分	461	33	5.74	80.7
CM-Toyopearl	0.649	0.05	3.19	84.8
Sephadex G-75	0.526	0.03	9.43	133

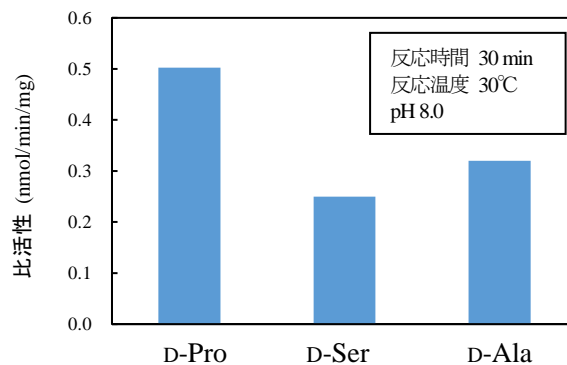


Fig. 1. 基質特異性

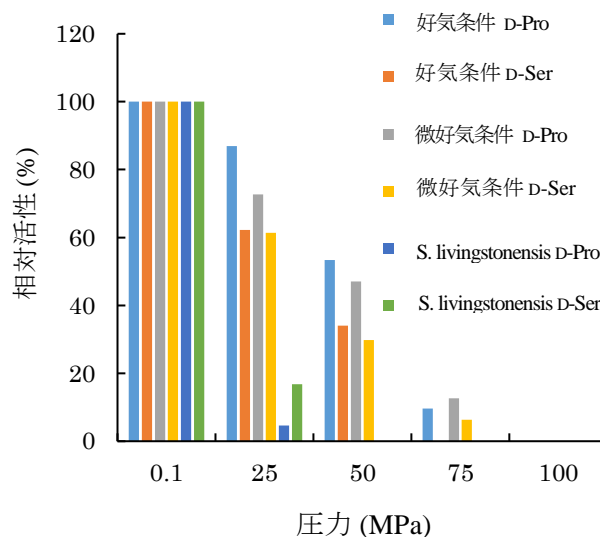


Fig. 2. DAD 耐圧性

参考文献

[1] 平田航生, 2014 年度卒業論文