

N-11

## 好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の D-アミノ酸脱水素酵素の生理的役割 Physiological Role of D-Amino Acid Dehydrogenase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○酒井辰徳<sup>1</sup>, 佐久間竜平<sup>1</sup>, 小池美弥<sup>2</sup> 谷川実<sup>2</sup>, 西村克史<sup>2,3</sup>\*Tatsunori Sakai<sup>1</sup>, Tappei Sakuma<sup>1</sup>, Miya Koike<sup>2</sup>, Minoru Tanigawa<sup>2</sup>, Katsushi Nishimura<sup>2,3</sup>

Abstract: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) is an acidophilic ion-oxidizing bacterium that grows at pH 2.0 by oxidizing ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) to ferric ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ). D-Amino acid dehydrogenase (DAD) is a membrane-bound enzyme that catalyzes dehydrogenation of D-amino acids without oxygen. In this study, to gain a better understanding of the physiological role of DAD in *A. ferrooxidans*, we investigated effects of D-amino acids on the growth of the organism and characterized the enzyme.

### 1. 目的

好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) は最適生育温度 28 °C, 最適生育 pH 2.0 で,  $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  に酸化して生育する好気性の独立栄養化学合成細菌である. 本菌には D-アミノ酸を 2-オキソ酸に変換する D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) の存在が確認されている. また先行研究において *A. ferrooxidans* の DAD は, D-Pro によって発現誘導されることを発見した.

本研究では, *A. ferrooxidans* における DAD の生理的役割の解明を目的とし, 基質特異性の確認と抗原抗体反応を用いて, D-Pro 含有培地で生育した *A. ferrooxidans* の DAD が発現誘導されているのか確認を行った.

### 2. 方法

#### 2.1 培養

前培養は坂口フラスコに Silverman 9K 培地 200 mL を作成し, *A. ferrooxidans* を植え継ぎ, 7 日間振盪培養 (115 rpm) を行った. 本培養は 10 L メディウム瓶に終濃度が 1 mM になるように D-Pro を加えた Silverman 9K 培地 7 L を作成し, 前培養の培養液 (200 mL) を加え, エアポンプ (50 L/min) を用いて好氣的に 7 日間培養した. 集菌には, 連続遠心分離機 (13, 300 rpm) を用い, 沈澱を 50 mM  $\beta$ -alanine  $\text{SO}_4^{2-}$  buffer (pH 3.0) で洗浄した後, 再度遠心分離 (8, 000 rpm, 10 min, 4°C) を行い, 沈澱に菌体を得た.

#### 2.2 アミノ酸含有培地の作製と培養

100 mL 三角フラスコに Silverman 9K 培地 40 mL を入れ, 終濃度が 50 mM になるように Gly と D-, L-, Pro, Lys, Arg, Asp, Glu, Asn, Val, His, Cys, Ala, Met, Trp, Ile, Ser, Leu, Thr, Phe, Gln, をそれぞれ

添加した.*A. ferrooxidans* を 1 mL 植え継ぎ, 好気条件にて振盪培養 (27°C, 108 rpm) した.

#### 2.3 *A. ferrooxidans* 培養液中の $\text{Fe}^{3+}$ 定量 (ロダン塩法)

滅菌した駒込ピペットを用いて培養液を 0.5 mL 採取し, そのうちの 50  $\mu\text{L}$  を希硫酸 (pH 2.0) で 500 倍に希釈した. この希釈した培養液 200  $\mu\text{L}$  に 10 mM チオシアン酸カリウムを 2000  $\mu\text{L}$  加え, 10 分間室温で反応させた. 生じたチオシアン酸鉄 (III) の 460 nm における吸光度を測定し, 検量線より  $\text{Fe}^{3+}$  の濃度を求め, 生育曲線のグラフを作成した.

#### 2.4 無細胞抽出液の調製

*A. ferrooxidans* を 5 倍量 50 mM  $\beta$ -alanine  $\text{SO}_4^{2-}$  buffer (pH 3.0) に懸濁した後, 超音波処理 (50 W, 60 min, on ice) と, フレンチプレス (100 MPa, 10 time, on ice) により破碎した. 遠心分離 (4,000 g, 10 min, 4°C) を行い, 上澄みに無細胞抽出液を得た.

#### 2.5 基質特異性の確認

2,6-dichlorophenolindophenol, 50 mM MES-NaOH (pH 6.5), 1  $\mu\text{M}$  phenazinemetosulfate, 1  $\mu\text{M}$  flavin adenine dinucleotide を含む混合溶液 150  $\mu\text{L}$  に, 無細胞抽出液 10  $\mu\text{L}$  と 250 mM D-アミノ酸 40  $\mu\text{L}$  を加え, 28°C で 30 分間反応させた後, 610 nm における吸光度を測定し, 比活性を算出した.

#### 2.6 ウェスタンブロッティング

*A. ferrooxidans* の DAD は D-Pro によって発現誘導されていると考えられたので, 通常の培地で生育した *A. ferrooxidans* と D-Pro 含有培地で生育した *A. ferrooxidans* の DAD 発現量を比較するために, ウェスタンブロッティングを行った.

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

無細胞抽出液 3  $\mu$ g を SDS-PAGE に供し, PVDF 膜に転写後 5% スキムミルクを用いてブロッキングを行った. その後, 一次抗体 (抗 DAD ウサギ抗体), 二次抗体 (HRP 標識抗ウサギ-ヤギ抗体) を反応させた. TBST buffer で洗浄を行った後, ルミノール反応を用いた化学発光により目的のバンドを検出した.

### 3. 結果・考察

#### 3.1 *A. ferrooxidans* 生育に対するアミノ酸の影響

50 mM の D-Ala と D-Val, Asn, Cys, Glu, Gln, His, Met, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp それぞれの両エナンチオマーは *A. ferrooxidans* の生育を約 60% 阻害し, D-, L-Asp, L-Val, L-Ala は生育を 30% 阻害し, D-Pro, Gly, D-, L-Lys は生育を促進した (Fig. 1). このことから *A. ferrooxidans* は D-Pro, Gly, D-, L-Lys を代謝し, 生育に利用できる酵素を持つと考えられた. また, D 体と L 体での阻害の差が少ないことから, *A. ferrooxidans* ではアミノ酸の細胞内への取り込みに D 体と L 体に差が少なくと考えられた.

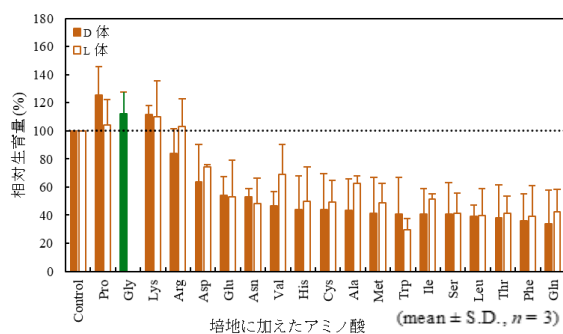


Fig. 1. 50 mM アミノ酸に対する *A. ferrooxidans* の生育の影響

#### 3.2 *A. ferrooxidans* の無細胞抽出液の基質特異性

D-Pro 含有培地で生育した *A. ferrooxidans* と通常の Silverman 9K 培地で生育した *A. ferrooxidans* のそれぞれの無細胞抽出液の基質特異性を詳細に調べると以下のようなになった (Fig. 2). どちらにおいても D-Pro に対して高い活性が得られた.

D-Pro 含有培地で生育した *A. ferrooxidans* の無細胞抽出液の比活性はどの基質でも上昇していた. このことから, 培地に D-Pro を加えることで DAD が発現誘導されると考えられた.

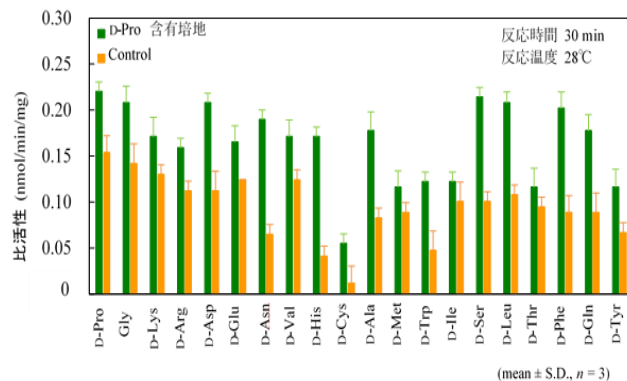


Fig. 2. *A. ferrooxidans* の無細胞抽出液の DAD 活性の比較

#### 3.3 ウェスタンブロッティング

D-Pro 含有培地で生育した *A. ferrooxidans* の DAD は, 通常の Silverman 9K 培地で生育した *A. ferrooxidans* より約 2 倍量の DAD を発現していることが確認された (Fig. 3). このことから *A. ferrooxidans* の DAD は D-Pro によって発現誘導されていることが確認された.

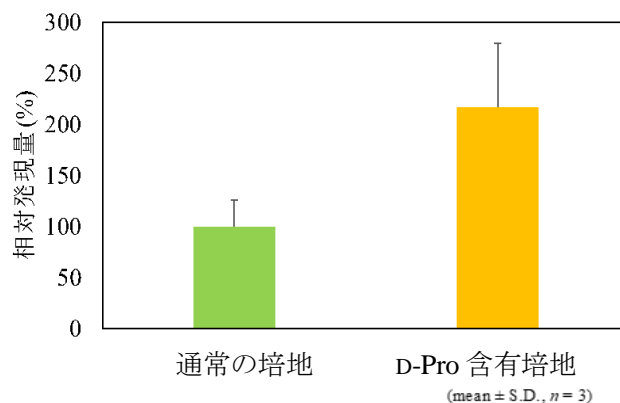


Fig. 3. *A. ferrooxidans* の無細胞抽出液の DAD 発現量の比較