

N-16

## 硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* における D-アミノ酸脱水素酵素の電子伝達系への関与 Involvement of D-amino acid dehydrogenase in sulfur oxidizing bacteria *Starkeya novella* in electron transport system

○吉田あかり<sup>1</sup>, 角田充, 小池美弥<sup>2</sup>, 谷川実<sup>2</sup>, 西村克史<sup>3</sup>Akari Yoshida<sup>1</sup>, Mitsuru Kakuta, Miya Koike<sup>2</sup>, Minoru Tanigawa<sup>2</sup>, Katsushi Nishimura<sup>3</sup>

Abstract: The sulfur-oxidizing bacterium *Starkeya novella* (*S. novella*) is a facultative chemoautotroph. We have previously found an activity of D-Amino acid dehydrogenase (DAD) in *S. novella*. It was cultivated under autotrophic and heterotrophic conditions.

In this study, we investigated DAD of *S. novella* cultured under autotrophic and heterotrophic conditions about the electron transport system.

### 1. 緒言

硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* (*S. novella*) は、土壌または水中に生息している任意独立栄養化学合成細菌であり、その最適生育環境は 27°C, 中性 pH である<sup>1)</sup>。我々は、本菌に D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) が存在することを見出した。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 D-アミノ酸を酸化して 2-オキソ酸に変換する酵素である。本菌に存在する DAD は、独立栄養的に培養した場合には D-Pro に対し高い活性を示し、従属栄養的に培養した時には D-Ala に対して高い活性を示した。本研究では、*S. novella* における DAD の役割を明らかにすることを目的として、従属栄養および独立栄養条件で培養した本菌の DAD と電子伝達系との関係を調べた。

### 2. 方法

#### 2.1. 培養

独立栄養時には、Santer らの培地を用いて 27°C で 7 日間、従属栄養時には Nutrient Broth を用いて 27°C で 1 日間培養を行い、遠心分離 (8,000 g, 10 min, 4°C) によって菌体を集めた。

#### 2.2. 無細胞抽出液の調整

菌体を、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む、5 倍量 (v/w) の 50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁した。懸濁した菌体を超音波処理 (80 W, 45 min, on ice) とフレンチプレス (100 MPa, 10 times, on ice) にて破碎した。遠心分離 (4,000 g × 20 min, 4°C) 後、得られた上澄みを無細胞抽出液とした。

#### 2.3. DAD からチトクロムへの電子伝達

無細胞抽出液、基質 (1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 50 mM D-Pro, 50 mM D-Ala), 10 mM NaN<sub>3</sub> を含む反応液 300 μL を

石英セルに入れ、チトクロムの吸収スペクトルを経時的に測定した<sup>2)</sup>。

#### 2.4. 酸素消費活性

無細胞抽出液、基質 (20 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 100 mM D-Pro, 100 mM D-Ala), 50 mM K-Phosphate buffer (pH 7.0) からなる反応溶液 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<sup>2)</sup>。

#### 2.5.1. NAD<sup>+</sup>還元活性測定

50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) に無細胞抽出液と基質 (50 mM D-Pro または D-Ala), 電子受容体として 10 μM NAD<sup>+</sup> を加え (total 200 μL), 27°C で 10 min 反応させた。NAD<sup>+</sup> が還元されたときに生じる NADH の最大吸光波長である 340 nm を分光光度計で測定し NADH のミリモル吸光係数  $\epsilon_{340\text{ nm}} = 6.3\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いて NAD<sup>+</sup>還元活性を算出した。

#### 2.5.2. NAD<sup>+</sup>への電子伝達の阻害

阻害剤として 1 μM HQNO (ユビキノロン-チトクロム *c* 酸化還元酵素を阻害), 10 μM シアン化ナトリウム, 10 μM アジ化ナトリウム (チトクロム酸化酵素を阻害) を反応溶液にそれぞれ加え、2.5.1 の方法に従って NAD<sup>+</sup>還元活性を測定し電子伝達物質や電子伝達酵素の関与を調べた。

### 3. 結果と考察

DAD により生じた電子の電子伝達系への伝達を測定した結果、従属栄養培養時では、D-Ala または D-Pro を添加した場合、チトクロム *c* の還元型のピークが現れたことから、DAD からチトクロム系に電子が伝達されることが分かった。

独立栄養の場合、D-Ala または D-Pro が DAD によ

り酸化され生じた電子は、チトクロム系に伝達されなかった (Fig. 1).

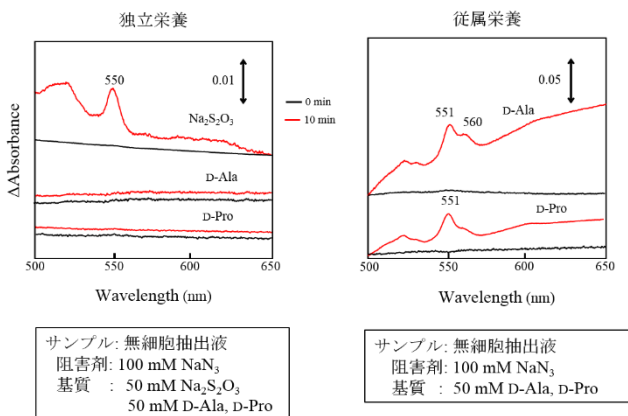


Fig. 1. *S. novella* の電子伝達系の検討

酸素消費活性を測定した結果、独立栄養の場合、D-Ala や D-Pro を加えても酸素の消費は見られなかった。一方、従属栄養の場合、D-Ala が基質の時 0.74 nmol/min/mg, D-Pro が基質の時 0.62 nmol/min/mg の酸素消費活性が見られた。

Table 1. 酵素消費活性

培養方法	基質	比活性 (nmol/min/mg)
独立栄養	20 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.91 ± 0.02
	100 mM D-Pro	0
従属栄養	100 mM D-Ala	0.74 ± 0.07
	100 mM D-Pro	0.62 ± 0.14

(mean ± S.D., n=3)

基質 D-Pro のとき独立栄養培養では活性が確認できたが、従属栄養培養ではほとんど活性が見られなかった。このことから、独立栄養培養では D-アミノ酸を脱水素した際に生じた電子により NAD<sup>+</sup> の還元が確認された (Fig. 2).

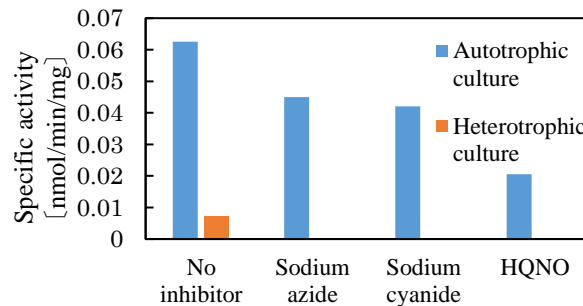


Fig. 2. NAD<sup>+</sup> 還元活性 (基質 D-Pro)

独立栄養時では DAD により生じた電子は、チトクロム系には電子は伝達されず、キノン→ユビキノ-チトクロム c 酸化還元酵素→NADH 脱水素酵素の順に伝達され NAD<sup>+</sup> を還元した。得られた NADH は炭素源である CO<sub>2</sub> を炭酸固定するためにカルビン回路で用いられ、従属栄養時では DAD により生じた電子はチトクロムへ伝達され ATP 生産に関与していると考えられる。

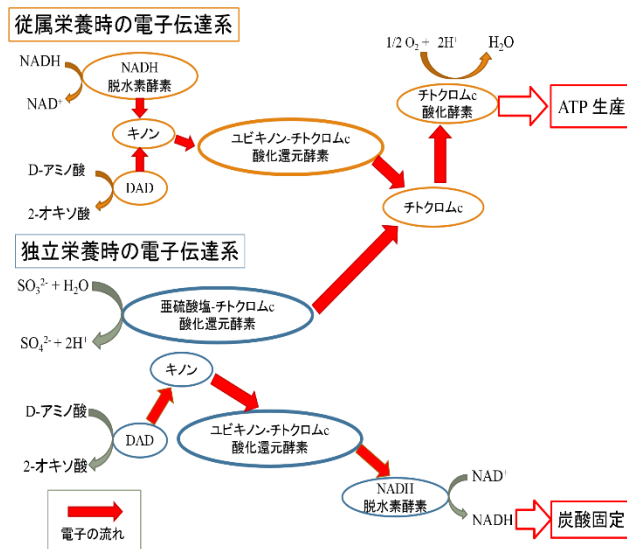


Fig. 3. 電子伝達経路

#### 4. 参考文献

1) Starkey *et al*, *Soli Sci.*, 39, 197~219(1935)