

# A D-amino acid dehydrogenase and an alanine racemase in a hyperthermophile *Pyrobaculum islandicum*

Yoko Nagata, Mika Ito, Shigeru Toizaki, Takashi Sugizaki and Takaya Yamada

Department of Materials and Applied Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University

1-8-14 Kanda, Surugadai, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-8308 Japan

Fax: 03-3293-7572E-mail: nagata@chem.cst.nihon-u.ac.jp

(Received 12 December 2002 Accepted 30 December 2002)

## Abstract

Of archaea, methane-producing organisms do not possess D-enantiomers of amino acids. However, other archaea contain D-serine and D-aspartic acid. In order to confirm the presence of D-amino acids in archaea, we cultivated the hyperthermophile cells at 95°C, and searched for enzyme activities of D-amino acid production. Since a D-amino acid-dehydrogenase activity and an alanine-racemase activity were detected, we partially purified these enzymes. The optimum temperature of D-amino acid dehydrogenase was found to be 80°C, and the optimum pH was between 6.5 to 9.0. The enzyme activity was higher with D-proline as the substrate than with D-alanine. Alanine racemase activity was shown with both of the D- and L-alanine. In addition, the racemase showed some activity with L-serine, although the activity was less than 40% of that with L-alanine. The optimum temperature of the racemase was 40°C with L-alanine as substrate, but no temperature dependency of the enzyme was observed with D-alanine.

Key words: D-amino acid; D-amino acid dehydrogenase; racemase; hyperthermophile; archaea

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* の D-アミノ酸脱水素酵素とアラニンラセマーゼ

長田 洋子、伊藤 美香、戸井崎 茂、杉崎 誉、山田 剛也

日本大学理工学部物質応用化学科

E-mail: nagata@chem.cst.nihon-u.ac.jp

Fax: 03-3293-7572

筆者（長田）は生物のホモキラリテーが進化のどの時点で成立したのかについて興味を持ち、系統樹においてたがいに異なった位置にあるいくつかの生物について D-アミノ酸含有量を調べてきた。その結果、D-アミノ酸、特に D-アラニン・D-グルタミン酸は真正細菌に高濃度に存在するが、多細胞生物（真核生物）である高等動物では特定の器官または組織を除いてほとんど検出されないことが示された。そこで生物界の残るもうひとつのグループである古細菌についても測定した。古細菌の細胞壁はペプチドグリカンを含まないの、D-アミノ酸の含量は低いと予想されていた。しかし筆者らの研究（1）では、メタン産生菌である *Methanosarcina barkeri* における D-アミノ酸濃度は Kandler らの結果（2）と一致して低かったが、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum*・超好熱性の *Pyrobaculum islandicum* では遊離型 D-セリンと D-アスパラギン酸の濃度が他の D-アミノ酸より高く検出された。この結果は高等動物の特定の器官・組織においても高濃度の D-セリンと D-アス

パラギン酸の存在が知られていることを考え合わせると興味深い。

筆者らは最適生育温度が 100℃ という嫌気性超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* (3) に D-アミノ酸の存在を確認する目的で、D-アミノ酸を基質とする酵素の存在を検索した。その結果、嫌気性条件下で働く脱水素酵素と L-アラニンを D-アラニンに変換するアラニンラセマーゼの活性を検出することができた。これらの酵素の部分的精製と二、三の酵素的諸性質について明らかになった点について報告する。

1. D-アミノ酸脱水素酵素

【培養】

Huber らにより記載された組成（表 1）の培養液を入れ密栓した耐熱びんに DSM 4184 を植菌し、嫌気性条件下 95℃ で 1～2 日間培養後、遠心分離機により集菌した。

表 1 *P. islandicum* 培地組成（1 リットル中）

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.32g	※ Micro elements
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25g	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.07g	
Yeast extract	0.20g	
Peptone	0.50g	
Conc.H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10ml	
※ Micro elements	1.00ml	
Rezasurine	1.00ml	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.27g	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2.00g	
L-Cystine	0.50g	
6M NaOH	0.70ml	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.8g	
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	4.5g	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22g	
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05g	
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.03g	
VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.03g	
CoSO <sub>4</sub>	0.01g	

【精製】

集菌した菌体約 30 g を 1 mM phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF) を含む 20 mM Na-リン酸バッファー(PH 6.1) に懸濁し、フレンチプレスで破碎、13,000 g\_20 min 遠心の上清を 180,000 g\_60 min 遠心し、生じた沈殿を膜画分とした。これを界面活性剤を用いて可溶化し、硫酸分画、DEAE Toyo-pearl イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex G-75 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。

【活性測定】

D-アミノ酸脱水素酵素の活性は、2,4-dichlorophenolindophenol (DCIP) 法にて測定した。これは、本酵素の働きによりアミノ酸から奪われた水素が DCIP を還元し脱色する反応を 600 nm における吸光度で測定する方法である (図 1)。

【結果】

図に示すように本酵素の最適温度は 80℃、最適 PH は 6.5 - 9.0 と幅広いことが明らかになった。基質として D-アラニンより D-プロリンの方により高い活性を持っていることも示された。

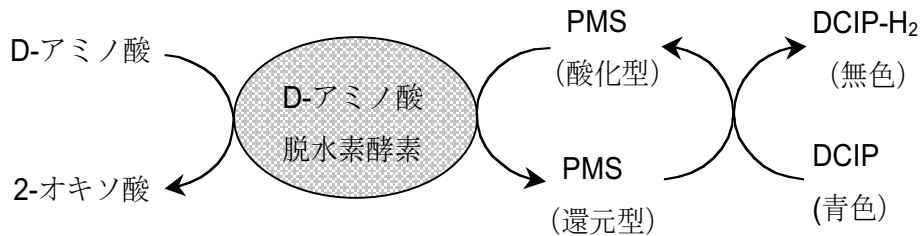


図1 DCIP 法

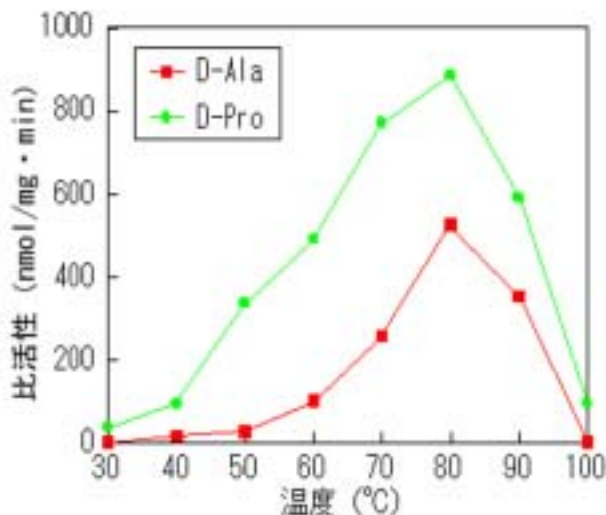


図2 反応温度によるDAD比活性変化  
 Sample 1% Newcol 1820 可溶性膜画分  
 Substrate D-Ala D-Pro  
 Buffer 20mM Na-Pi (pH 6.1)  
 Reaction time 10min

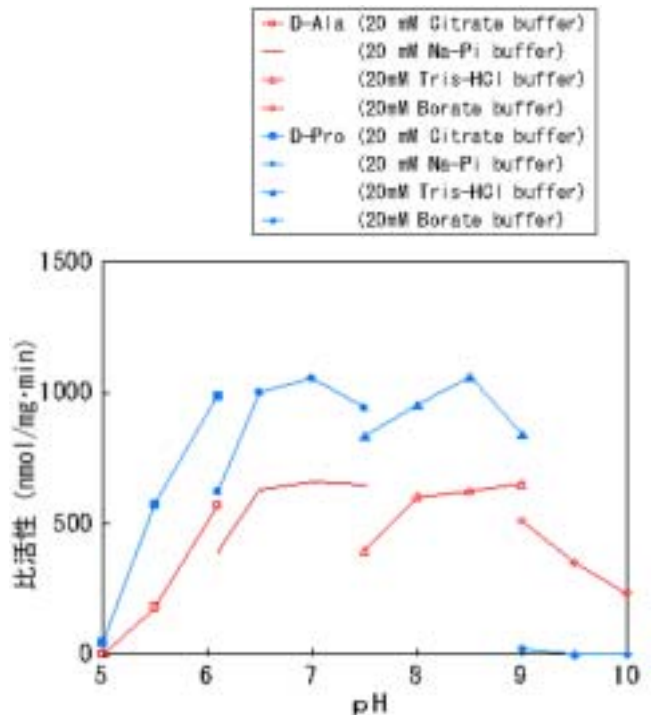


図3 pHによる比活性変化  
 Sample 1% Newcol 1820 可溶性膜画分  
 反応温度 80℃  
 反応時間 10 min

2. アラニンラセマーゼ

【培養】

D-アミノ酸脱水素酵素の場合と同様に行った。

【精製】

湿重量 5g の菌体に対し 5 倍量の 10mM Na-リン酸バッファー (pH 7.2)、1mM (PMSF)、10 μM pyridoxal 5'-phosphate (PLP)、1mM EDTA を加え、ホモジェナイザーで懸濁した。菌体を超音波破碎し、フレンチプレスをした後に 13,000 g\_30 min 遠心分離し、無細胞抽出液を得た。これを硫酸分画し、20~45%飽和の画分を透析により脱塩後サンプルとして用いた。

【活性測定】

調整した試料に 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.7)、10mM L 型アミノ酸、0.1mM PLP、1mM 安息香酸を加え、各温度にて 1 時間反応させた。反応を止めるために 5%になるように Trichloroacetic acid (TCA) を加え、生じたタンパク質の沈殿を遠心操作で取り除き、Dowex 50W-8X カラムにアミノ酸を吸着させ、4 N アンモニア水で溶出し遠心乾燥によりアンモニアを除いた。蒸留水に溶かしたアミノ酸に 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (FDAA)、NaHCO<sub>3</sub>を加え、40°Cで 1 時間反応させ、ジアステレオマー化した。薄層クロマトグラフィーにより FDAA-アミノ酸を回収し、50%メタノールで抽出・溶解した。これを Nova Pack C18 (Waters) 逆相カラムを用いた HPLC で 340 nm の吸光度を測定・解析し、D-,L-アミノ酸をそれぞれ定量した (4)。

【結果】

アラニン・セリン・プロリン・アスパラギン酸・グルタミン酸について酵素活性を測定したところ、アラニンが最良の基質であり、セリンに対してもアラニンの 40%弱の活性が検出された。アラニンについては L 型から D 型への変換率が D 型

から L 型の場合よりも高かった (40°Cにおいて)。プロリン・アスパラギン酸・グルタミン酸に対しては活性が無かった (図 4)。次にこの酵素活性の温度依存性を調べた。その結果、この菌の最適生育温度に近い 90°Cや D-アミノ酸脱水素酵素の最適温度 80°Cでラセマーゼ活性は低く、逆に温度が低くなると活性が高くなり、40°Cで最高になった (図 5)。

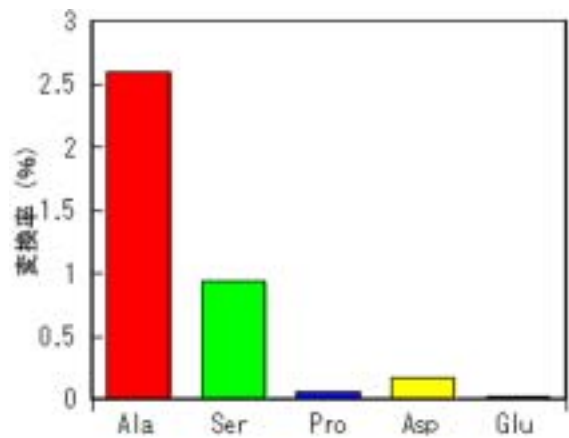


図4. 各アミノ酸に対するラセマーゼ活性 (L型→D型, 40°C, 60min)

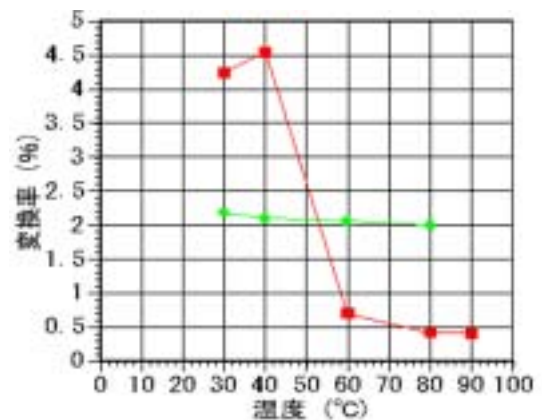


図5. 各反応温度におけるアラニンラセマーゼ活性 (● L型→D型, ○ D型→L型)

【考察】

既知の D-アミノ酸脱水素酵素はアミノ酸の種類に対する基質特異性は低く、*P. islandicum* の酵素も D 型のアラニン・プロリン・フェニルアラ

ニン・バリン・ロイシン・セリン・トレオニン・アスパラギン酸などを基質とする。しかし、立体異性に対する識別は厳しく、L-アミノ酸は基質にならない。一方、ラセマーゼはあるアミノ酸の両方の光学異性体を基質とするが、アミノ酸の種類に対する基質特異性は高く、1種類のアミノ酸にしか作用しない。*P. islandicum* のアラニンラセマーゼのように2種のアミノ酸を基質とするものは少数である。このラセマーゼは、L-アラニンを基質とする場合の温度依存性は顕著で40°Cが最適温度であった。この温度は生育温度より著しく低いがその理由は不明である。これに対し、D-アラニンを基質とする場合は温度依存性が見られなかった。この理由も興味深いが未知である。今後、このラセマーゼの精製が進み、立体構造が明らかになればこれらの点も明らかになるであろう。*P. islandicum* の遊離型 D-アミノ酸はセリン・アスパラギン酸に多いが、アスパラギン酸に対するラセマーゼ活性は検出されなかった。この菌におけるD-アスパラギン酸の由来も興味のある点である。

#### 【引用文献】

1. Nagata, Y., Tanaka, K., Iida, T., Kera, Y., Yamada, R., Nakajima, Y., Fujiwara, T., Fukumori, Y., Yamanaka, T., Koga, Y., Tsuji, S. and Kawaguchi-Nagata, K. Occurrence of D-amino acids in a few archaea and dehydrogenase activities in hyperthermophile *Pyrobaculum islandicum*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1435, 160-166 (1999).
2. Kandler, O. and König, H. *Arch. Microbiol.* 118, 141-152 (1978).
3. Huber, R., Kristjansson, K., J. and Stetter, O. K. *Pyrobaculum* gen. Nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100°C, *Arch Microbiol* 149, 95-101 (1987).
4. Nagata, Y., Yamamoto, K. and Shimojo, T. Determination of D- and L-amino acids in mouse kidney by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 575, 147-152 (1992).