

汽水湖光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の細胞内アミノ酸プール
とアラニンデヒドロゲナーゼ活性

宇野 徹・地阪 光生・長屋 敦・横田 一成・滝波 弘一
澤 嘉弘

Activity of Alanine Dehydrogenase and Pool of Intracellular Amino Acids in
Photosynthetic Bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* Isolated from Brackish Water

Toru UNO, Mitsuo JISAKA, Tsutomu NAGAYA,
Kazushige YOKOTA, and Kochi TAKINAMI
Yoshihiro SAWA

Abstract *Rhodobacter sphaeroides* NII2 was isolated near here from lake Nakaumi, and now is expected to exhibit some novel characteristics. Under heterophototrophic-anaerobic condition, the strain grows well assimilating NH_4^+ . In the intracellular amino acid pool of the grown cells, The particular amount of L-alanine was observed and no another amino acid. L-alanine was considered to be biosynthesized directly from NH_4^+ and pyruvate which was the end product of glycolytic pathway of glucose. This was confirmed in the obtained results that alanine dehydrogenase aminating activity was determined in the cell-free extract of *Rb. sphaeroides* grown anaerobically. The enzyme activity was remarkably higher in light-grown cells than in dark-grown cells. The light illumination seems to promote the formation of L-alanine dehydrogenase. For ammonia assimilation, L-alanine dehydrogenase could be apparently the primary enzyme in the phototrophic bacterium, *Rb. sphaeroides*.

Key word: *Rhodobacter sphaeroides*, alanine dehydrogenase,

緒 言

日本海に通じている中海と宍道湖はNaCl濃度0.02~3.0%の汽水湖である。その大部分の水深は3~7mであって、太陽光の到達する範囲にある。この底泥より、多数の微生物が採集分離され研究室に保存されている。この中に *Rhodobacter sphaeroides* と同定された細菌があり、光照射下で NO_3^- を還元して N_2 ガスを発生する特性を有していた。

光合成細菌は一般植物とは異なり、光照射下で CO_2 を同化固定することが出来ない。そのため、生育には炭素源として有機化合物を与えなければならない。しかしながら光エネルギーを利用することが出来るので、有機化合物の代謝分解は嫌気条件下で効率よく行われる。また一方では、*Rb. sphaeroides* の光脱窒に見られるように、光合成細菌は窒素化合物の多様な代謝分解能も持っている。

光合成細菌の NH_4^+ の取り込み機構についてはいくつかの報告があり、現在までのところGS-GOGAT ($\text{Glu} + \text{N} \text{H}_4^+ \rightarrow \text{Gln}$, $\text{Gln} + 2\text{-OG} \rightarrow 2\text{Glu}$)¹⁾系が普遍的であると考えられている。詳しく調べられている *Rhodobacter capsulatus* ではGDH ($2\text{OG} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Glu}$)活性はなく、GS-GOGATによって NH_4^+ は取り込まれるが、 NH_4^+ 濃度が高いときには、L-alanine dehydrogenase (AlaDH)活性を示すことが報告されている^{2), 3)}。この高濃度 NH_4^+ の作用は、光合成細菌ばかりでなく、*Arthrobacter fluorecens* でも見出されている⁴⁾。

ところが *Rb. sphaeroides* ではまだアンモニアがどのように取り込まれるのかは明らかにされていない。本研究室の *Rb. sphaeroides* NII2では、光・嫌気培養で細胞内アミノ酸プールのアラニンが特異的に高濃度となることが見出されている。このアラニン生成がAlaDHによるものかを確認し、さらに光の作用、硝酸呼吸との関係を調べた。

実験材料と方法

供試光合成細菌

当研究室で1989年に汽水湖（島根県・中海）の底泥より分離され、*Rhodobacter sphaeroids*と同定された分離株のうち、脱窒能を有すると報告されたNII 2⁵⁾株を使用した。

培地組成と培養条件

基本培地1 literは、次のような成分を含んでいる。

無機塩：KH₂PO₄, 0.5 g；K₂HPO₄, 0.5 g；
MgSO₄・7H₂O, 0.2 g；CaCl₂・2H₂O, 0.05 g；
FeSO₄・7H₂O, 0.005 g；NaCl, 0.4 g
微量元素：H₃BO₃, 0.1 mg；CoCl₂・6H₂O, 1.0 mg；
MnSO₄・5H₂O, 1.2 mg；Na₂MoO₄・2H₂O,
1.0 mg；
CuCl₂・2H₂O, 0.01 mg

成長因子：酵母エキス（和光純薬工業），0.4 g

基本培地に炭素源として50 mMグルコース(glc)，窒素源として25 mM (NH₄)₂ HPO₄ (N₅₀-Pと略記)を添加した。硝酸呼吸条件下で培養するときには、種々の濃度のKNO₃ (0, 50, 100 mM)をさらに添加した。基本培地、リン酸塩、炭素源、窒素源は別々にオートクレーブし、滅菌後、混合して培地を調製した。pHはNaOHで7.0に調整した。

前培養として、上述の液体培養培地と同じ組成のプレート培地で4000 lux, 30°Cの条件下で48時間培養し、シングルコロニーを得た。そのシングルコロニー約100個を採取し0.88%生理的食塩水に懸濁し、その細胞懸濁液(OD660=1.5) 10 mlを、800 mlルーフラスコに満たした液体培地に接種した。培養は、光照射の明条件は4,000 lux, 30°C, 暗条件は0 lux, 30°Cに設定した。

*Rhodobacter sphaeroides*の生育およびpHの測定

シリコライト栓をした培養フラスコから注射器(1 ml容)によって培養液を採取し15倍に希釈する。その希釈培養液を波長660 nmで濁度を測定することによって生育を測定し、また同時に培養液のpHを測定した。

培養中の生成窒素(N₂)の測定

培養フラスコにガストラップ(20 ml注射筒)を直結し、予めフラスコに入れておいた攪拌子をマグネチックスターラーで攪拌することによって溶存窒素を気相に放出させた。この生成窒素量をガストラップの目盛りで定量した。

細胞内アミノ酸プールの定量

細胞内アミノ酸プールと培養液上清のアミノ酸を分析するために、培養液60 mlを15,000×g, 4°Cで15分間遠心した。その上清を培養液上清アミノ酸分析サンプルとした。遠心分離して得た細胞は、その後の実験に用いた。細胞は5%食塩水10 mlで洗菌し、その一部の90倍希釈溶液を波長660nmで濁度を測定し、数式
{(mg D.C./5 ml) = (OD 660 - 0.0092628) / 0.0056923}
によって5ml中の細胞の乾燥重量(D.C.)を求めた。その結果を元にして細胞濃度が100 mg/300 mlとなるように蒸留水を加えた。その細胞懸濁液を100°Cで10分間煮沸して細胞内アミノ酸を蒸留水中に抽出した。抽出液を15,000×g, 4°Cで5分間遠心し、その上清を細胞内アミノ酸プール分析のサンプルとした。

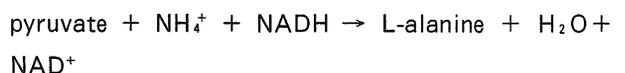
そのサンプルをそれぞれ1 μlをTLC(MERCK Silica gel60)プレートにスポットし、エタノール/25%アンモニア水(77:23, v/v)で展開し、個々のアミノ酸をTLC上に分離した。TLCプレートを20分間風乾後、80°Cで20分間乾熱した。冷却後、0.02%ニンヒドリンのブタノール溶液を噴霧し、風乾後、100°Cで3分間加熱することによって呈色させ、アミノ酸のスポットを検出した。

AlaDHの無細胞抽出液の調製 (Fig.1)^{4, 6, 7)}

細胞内の酵素を抽出するために48時間培養した*Rhodobacter sphaeroides* NII2を集菌し、生理的食塩水で洗菌した。遠心分離して得た細胞を50 mM Tris-HCl (pH 7.2) 5 mM EDTA, 0.05% (7 μM) 2-mercaptoethanolに懸濁し、フレンチプレス及び超音波破砕器で破砕した。16,000 rpm, 4°Cで遠心し、上清に酵素を抽出した。無細胞抽出液のタンパク質全量は、明条件培養細胞で22 mg protein/g wet cells, 暗条件培養細胞で20 mg protein/g wet cellsであり、ほぼ同程度のタンパク質が抽出されていた。その酵素抽出液を用いてAlaDHの活性測定を行った。

AlaDH活性の定量

AlaDHの反応は可逆的であると報告されていることが多いが^{8, 9)}, *Rb. sphaeroides* NII2の場合はアミノ酸プールのアラニンとの関係を調べるために、下に示すようなアミノ化反応の活性を定量した。



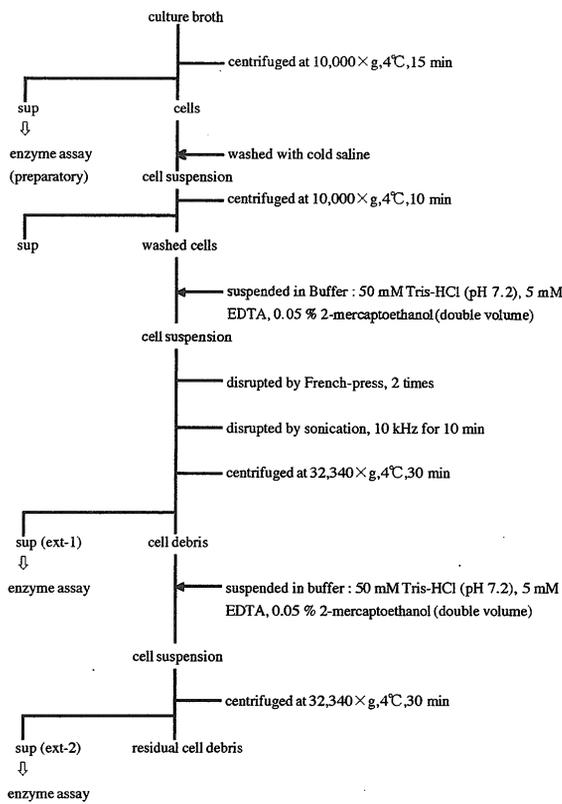


Fig.1 Preparation of crude enzyme extract and assay of AlaDH

反応液1 mlには100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4), 0.1 mM NADH in 10 mM Tris, 166.5 mM NH₄Cl, 2 mM sodiumpyruvate, 蒸留水, 無細胞抽出液を含む。30°C, 3 minの反応を行い, NADHの吸光度の変化(減少)をカイネティックモードによって測定した。

また, *Rb. sphaeroides*のAlaDHは細胞内酵素であることを確認するために, Fig.1の培養液遠心上清のAlaDH活性を定量した。上清には酵素活性が無かったので, AlaDHは細胞内酵素である。

酵素抽出液を遠心上清に分離し, 残渣 (Fig.1中の cell debris) に酵素活性が残っていないことをFig.1のext-2の活性を調べることによって確認した。

従って, Fig.1のext-1をAlaDHの無細胞抽出液として, 以下の実験に供した。

結果と考察

1、Rhodobacter sphaeroidesの細胞内アミノ酸プール

嫌気条件において, 光を当てて*Rb. sphaeroides*を培養した場合, 細胞内アミノ酸プールの大部分はアラニンである。光を当てない条件では, *Rb. sphaeroides*は全く生

育しないので, KNO₃を添加した硝酸呼吸に依存しなければならない。この場合, 細胞内アミノ酸プールはFig.2 [B] に示すように, アラニンが消失し殆どグルタミン酸である。25 mM以上のKNO₃存在下ではグルタミン酸プールは高い水準に維持される。

他方, 光照射の明条件でKNO₃を高濃度に添加すると, 弱い硝酸呼吸が行われ (実験結果は示してないがCO₂の生成を確認している), Fig.2 [A] に示すように僅かのグルタミン酸プールが認められるようになる。

アラニンは解糖系の終末にあるピルビン酸へのアミノ基導入により生成し, グルタミン酸はTCAサイクルの中間生成物である2-オキソグルタル酸から生成する。明条件下では, 硝酸呼吸よりも, 光の作用によって促進される嫌氣的代謝が優先的に行われるために, TCAサイクルが活発に作動することは無い。そのため, 解糖系の最終産物であるピルビン酸の生成が増加し, アラニンの細胞内プールが増大する。

また暗条件では, *Rb. sphaeroides*は硝酸呼吸によって生育しているので, 常にTCAサイクルへと代謝系が流れている。このために, 2-オキソグルタル酸のアミノ化によって生成するグルタミン酸が細胞内アミノ酸プールの

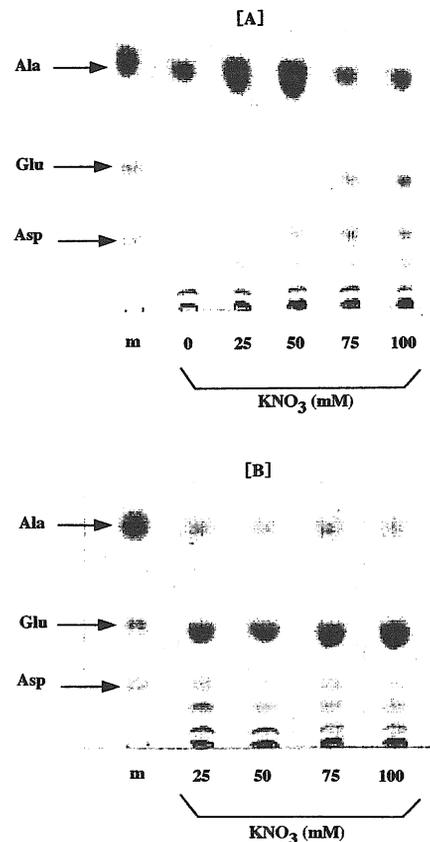


Fig.2 TLC of intracellular amino acid pool of *Rb. sphaeroides*
[A] : (light condition)
[B] : (dark condition)

大部分を占めている。

2、*Rb. sphaeroides*の細胞内AlaDH活性

実験方法で述べたように、Fig.1の無細胞抽出液ext-1を用いてAlaDHの活性を定量した。AlaDHのアミノ化活性をNADHの酸化に伴う吸光度の減少で定量したが、Fig.3に示すように、無細胞抽出液のタンパク質量との間に直線関係が得られた。光を照射しない暗条件で培養した場合には、AlaDHの活性は非常に低いレベルであったが、同様にタンパク質量との直線関係が認められた。この結果より得られたAlaDHの比活性は無細胞抽出液のタンパク質量に対して0.21 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteinであった (Table.1)。この値は、*Rb. capsulatus* の無細胞抽出液で高い活性があったと報告されている値の0.18¹⁰⁾を越えるものであって、AlaDHが*Rb. sphaeroides*の明条件下でのNH₄⁺取り込みのkey enzymeであることを強く示している。

3、*Rb. sphaeroides*の培養とAlaDHに及ぼす光の作用

*Rb. sphaeroides*のAlaDH活性は明条件下で培養した場合に高くなることが示されたので (Fig.3)、すでに報告した光の作用を加えて、Table.1に明条件と暗条件の対比を示した。表中の結果は、AlaDHの酵素抽出液を調製するために用いた培養を分析したものである。

嫌気条件においては、*Rb. sphaeroides*の生育は光によって促進され、暗条件では生育は認められない。しかし、KNO₃が存在すると硝酸呼吸が行われ、光照射が無くても*Rb. sphaeroides*は生育する。Table.1に示すように、暗条件では、NO₃⁻はほとんど消費し尽くされ、単位細胞当たりの生成N₂ガスは明条件の2倍にもなっている。活発な硝酸呼吸によるTCAサイクルの作動によって、細胞内アミノ酸プールはAlaからGluへ転換している。明条件下のAlaプールとAlaDH活性の関係はよく一致しており、グルコースの代謝が解糖系に傾いていることを示している。しかしながら、AlaDHの発現が光によって促進されるかどうかは明らかではない。

光合成細菌に限らず、微生物のNH₄⁺取り込み機構において、AlaDHが主要な経路であるという報告は少ない。*Metylococcus*¹¹⁾と*Anabaena*¹²⁾では、NH₄⁺の取り込み経路の主体はAlaDHであると報告されており、また、*Thiobacillus*¹³⁾では制限された代謝条件下でのみAlaDHによる報告されている。しかしながら多くの報告では、*Rb. capsulatus*¹⁴⁾、*Beggiatoa*¹⁵⁾、*Clostridium*¹⁶⁾などの例に見

られるように、AlaDHはNH₄⁺取り込み機構のprimaryではないと考えられている。

*Rb. sphaeroides*については、GS-GOGATの存在を否定する結果を未だ得ていないが、嫌気明条件下ではAlaDHがNH₄⁺取り込みの主経路であることは確かである。

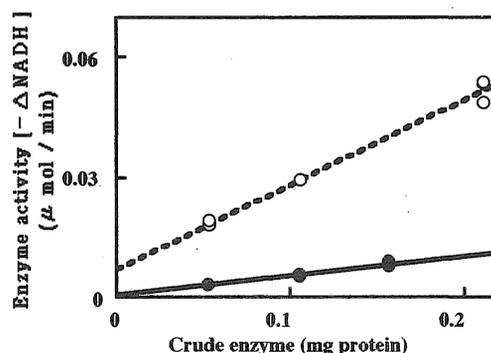


Fig.3 Specific activity of AlaDH of *Rb. sphaeroides* grown in the presence of KNO₃ (25 mM)

---○--- : cells grown under light condition
—●— : cells grown under dark condition

Table 1 Effect of light irradiation on *Rb. sphaeroides* culture and AlaDH activity

	Light	Dark
Bacterial growth (OD ₆₆₀)	0.267	0.148
Residual KNO ₃ in culture (mM)	4.0	0.4
N ₂ evolved in culture (ml/800 ml culture)	170	165
Denitrification per cells (ml/mg D.C.)	0.62	1.15
Intracellular amino acid pool (Glu)	-	+++
(Ala)	+++	+
AlaDH specific activity (μmol/min/mg protein)	0.21	0.05

25 mM KNO₃ was added to the culture.

参考文献

- 1) 佐藤 敏生, 光合成細菌の窒素代謝, 光合成細菌 (北村他編, 学会出版センター) 161-174, 1984.
- 2) Johansson, B.C., and H., Gest, Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*, J. Bacteriol., 08 : 083-688, 1976.
- 3) Moreno-Vivian, C., F. J. Cejudo, J. Cardenas, and F. Castill, Ammonia assimilation pathways in *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1. Arch. Microbiol., 136 : 147-151, 1983.
- 4) Cacciari, I., D. Lippi, and T. Pietrosanti,

- Regulation by ammonium and glucose of *Arthrobacter fluorescens* alanine dehydrogenase, Arch. Microbiol. **161**: 11-16, 1994.
- 5) Shen, J. and O. Hirayama, Hydrogen photoproduction and denitrification by photosynthetic bacteria isolated from Lake Nakaumi and its vicinity. J. Ferment. Bioeng., **72**: 338-342, 1991.
- 6) 緑川 義人, ラン藻 *Phormidium lapideum* のアラニン脱水素酵素の構造と機能解析, 島根大学大学院 農学研究科 修士論文, 1995.
- 7) Sawa, Y., Tani, M., Murata, K., Shibata, H., and Ochiai, H., Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a cyanobacterium, *Phormidium lapideum*. J. Biochem. **116**: 995-1000, 1994.
- 8) Bellion, E., and F. Tan, A NAD⁺-dependent alanine dehydrogenase from a methylotrophic bacterium. Biochem. J., **244**: 565-570, 1987.
- 9) Smith, M. T., and D. W. Emerich, Alanine dehydrogenase from soybean nodule bacteroides. J. Biol. Chem., **268**: 10746-10753, 1993.
- 10) Caballero, F.J. J. Cardenas, and F. Castillo, Purification of L-Alanine Dehydrogenase of the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter casulatus* EIF1, J. Bacteriol, **171**: 3205-3210, 1989.