ORIGINAL PAPER

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2009), Vol. 8, 31-35

Tanigawa M, Seki S, Mohri M, Harigae A and Nagata Y

Purification of NADPH dehydrogenase from a hyperthermophile, *Pyrobaculum islandicum*

Department of Materials and Applied Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, 8-14-1
Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308, Japan

Corresponding author: Minoru Tanigawa, minoru@chem.cst.nihon-u.ac.jp

Phone: +81-3-3259-0813, FAX: +81-3-3293-7572

Received: March 28, 2009/ Revised: April 20, 2009/ Accepted: April 20, 2009

Abstract A NADPH dehydrogenase was purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*. The membrane protein was solubilized by treatment with 1% Tween 20, and purified 258-fold from the cell-free extract to homogeneity as judged by SDS-PAGE analysis. The molecular mass of the enzyme was revealed to be 41 kDa both by SDS-PAGE and gel filtration analyses. The optimal pH and temperature were 7.0 and above 80°C, respectively. The K_m and V_{max} values were 0.69 mM and 0.25 nmol/min, respectively. It was suggested that NADPH is an electron donor in the *P. islandicum* electron transfer system.

Key words: NADPH dehydrogenase, NADPH, *Pyrobaculum islandicum*, electron transfer system

Introduction

Pyrobaculum islandicum はアイスランド地熱発電所のバルブ漏水より単離された最適生育温度 100°C, 最適生育 pH 6.0 の絶対嫌気性の超好熱性古細菌である³⁾. 古細菌の電子伝達系に関しては, 好気性の古細菌では *Halobacterium salinarum*, *Sulfolobus acidocaldarius* などについて報告^{1,11)} があるが, 絶対嫌気性の超好熱性古細菌の電子伝達系についてはほとんど研究されていない. 本菌はクエン酸回路を有し, NADH, NADPH が生産されている⁷⁾. NADPH は植物では光合成の際に産生しており, 動物では肝臓に多く含まれている. NADPH 脱水素酵素は酵母やブタ肝臓などから精製されたという報告^{5,6)} があるが, 本報告の酵素が膜タンパク質であるのに対し, これらは可溶性のタンパク質である. また, Fe (III) や元素硫黄, チオ硫酸を電子受容体として硫化水素

を生成することが報告^{3,4)} されているが, エネルギー産生系である電子伝達系に関わる酵素については, ほとんど研究されていない.

本研究では NADPH 脱水素酵素を精製し諸性質を調べ, クエン酸回路のイソクエン酸脱水素酵素がイソクエン酸を 2-オキシグルタル酸に脱水素する際に生じる NADPH の脱水素を本酵素が触媒し, 電子伝達系にその電子を渡して, ミトコンドリアの複合体 I のような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的としている.

Materials and Methods

P. islandicum の培養

P. islandicum DSM 4189 (JCM 9189) を既報⁸⁾ の通り培養し, 使用時まで-20°Cで冷凍保存した.

NADPH 脱水素酵素の精製

P. islandicum 菌体 (湿重量 100 g) を 8) の通り処理し 1% Tween 20 および 1 mM EDTA を含む 50 mM Na-acetate buffer (pH 5.0) に平衡化した CM-Toyopearl (陽イオン交換体) カラムに吸着させた. 溶出 buffer 中の NaCl 濃度を 0 から 1 M に直線的に上昇させ 0.56 M NaCl により溶出された NADPH 脱水素酵素画分を, 同様の CM-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにより濃縮した. 濃縮液を 10 μ M FAD, 200 mM NaCl, 1% Tween 20, 1 mM EDTA を含む 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0) に平衡化した TSKgel G3000SW カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し, 得られた活性画分を NADPH 脱水素酵素とした.

タンパク質の定量および脱水素酵素活性の測定は Tanigawa *et. al.*⁸⁾ の方法で行った。ただし、フェリシアン化カリウム法では NADPH のミリモル吸光係数として $\epsilon_{340\text{ nm}} = 6.22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いた。native PAGE と活性染色, SDS-PAGE および分子質量測定は Tanigawa *et. al.*⁸⁾ に記述した方法で行った。*P. islandicum* の電子伝達系の検討は Tanigawa *et. al.*⁸⁾ に記述した方法で行った。ただし、基質を NADPH とした。

Results and Discussion

NADPH 脱水素酵素最終精製標品の比活性は 245 nmol/min/mg となり、無細胞抽出液から 258 倍精製

された (Table 1)。本酵素は Tween 20 による可溶化により膜から溶離されたので、表在性の膜タンパク質ではないかと考えられる。精製標品の native PAGE を行い、遊離した水素を検出する活性染色と微量タンパク質も検出可能な銀染色を施した。その結果、活性染色、銀染色双方において同じ位置に唯一のバンドが現れた (Fig. 1)。このことは、本酵素が高度に精製されたことを示している。また、精製標品が NADPH を脱水素する活性を有していることも表している。SDS-PAGE による分析の結果、41 kDa に 1 本のバンドが現れ (Fig. 2), TSKgel G3000SW を用いた分子質量測定によっても 41 kDa という結果が得られた (Fig. 3)。したがって本酵素の分子質量は 41 kDa で単量体あることが示された。

Table 1. NADPH 脱水素酵素の精製

精製段階	総タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/min)	比活性 (nmol/min/mg)	回収率 (%)	精製倍率 (倍)
無細胞抽出液	9375	8906	0.95	100	1.0
DEAE-Toyopearl (pH 7.0)	585	4820	8.24	54.1	8.7
DEAE-Toyopearl (pH 8.0)	392	4743	12.1	53.3	12.7
CM-Toyopearl (pH 5.0)	66	1999	30.3	22.4	31.9
TSKgel G-3000SW	0.3	73.5	245	0.8	258

Fig. 1. *P. islandicum* NADPH 脱水素酵素の native PAGE.

(A), 銀染色; (B), 活性染色。精製 NADPH 脱水素酵素 1 μg を使用。5 mA で 4°C, 16 時間泳動を行った。銀染色には、銀染色 II キットワコー (和光純薬工業) を用いた。0.5 mM *p*-iodonitrotetrazolium violet および 0.5 mM NADPH を含む 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0) に泳動後のゲルを浸し、遮光下 80°C で 20 min 緩く振とうしながら NADPH 脱水素酵素活性のあるタンパク質を活性染色した。

Fig. 2. *P. islandicum* NADPH 脱水素酵素の SDS-PAGE.

(1), マーカータンパク質; (2), 精製 NADPH 脱水素酵素 (5 μg)。ゲル中のポリアクリルアミド濃度は、分離ゲル 13%, 濃縮ゲル 5%。CBB 染色。

Fig. 3. TSKgel G3000SW ゲルろ過カラムを用いた分子質量測定
MW-Marker (オリエンタル酵母工業)を流して検量線を作成し、精製 NADPH 脱水素酵素の溶出時間より分子質量を算出した。■は分子質量マーカーである。酵母グルタミン酸脱水素酵素；290 kDa, ブタ心筋乳酸脱水素酵素；142 kDa, 酵母エノラーゼ；67 kDa, 酵母ミオキナーゼ；32 kDa, ウマ心筋シトクロム；12.4 kDa.

NADPH 脱水素酵素活性の温度依存性を調べた結果、室温付近ではほとんど活性がみられず、温度の上昇に従って比活性は上昇した。最適温度は 80℃以上であった。これは、NADPH 脱水素酵素が熱に対して耐性があり、*P. islandicum* の生育温度付近でよく働くことを示している (Fig. 4)。NADPH の分解により、80℃より高温での活性測定は不可能であった。NADPH 脱水素酵素活性の pH 依存性について、pH 6.0 以下の酸性条件下では活性が著しく低下し最適 pH は 7.0 であった (Fig. 5)。Huber ら³⁾によると生育の最適 pH は 6.0 とあるが、筆者らの培養では pH 7.0~pH 8.0 のほうが生育がよい。このことは、本菌が NADPH 脱水素酵素を使って生育に必要なエネルギーを産生しているという仮説に矛盾しない。

本菌は絶対嫌気性菌であり、精製標品の比活性は嫌気条件下の測定では 640 ± 47 nmol/min/mg と好気条件下の測定値 (Table 1) の約 3 倍にも上昇した。

P. islandicum のクエン酸回路では NADPH と NADH の両方が産生されることが示されている¹²⁾。NADPH 脱水素酵素の基質特異性を調べた結果、NADPH に対する活性は 234 ± 17 nmol/min/mg であるのに対し、NADH に対する活性は 16 ± 10 nmol/min/mg となり、NADPH を基質としたときの 7% の活性しかなかった。NADPH 脱水素酵素は NADPH に対して非常に高い特異性を持っていることがわかった。また、本酵素の NADPH に対するミよく似たメナキノン 6 の側鎖飽和型のキノンが発見されており⁹⁾、生理的にはこのキノンが本酵素からの電子受容体になっているのではないかと考えられる。*P. islandicum* の膜画分を用いて NADPH が

カエリス定数 K_m 値と最大反応速度 V_{max} 値を調べた結果、それぞれ 0.69 mM と 0.25 nmol/min であった (Fig. 6)。したがって、本酵素の存在によりクエン酸回路で産生された NADPH を利用し電子伝達系に電子を供給できると考えられる。しかし、 V_{max} 値が非常に低いためエネルギー産生に占める割合は低いかもしれない。ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系の複合体 I や *Escherichia coli* を代表とする多くのバクテリアの呼吸鎖電子伝達系の複合体 I は、キノン酸化還元酵素またはシアノバクテリアのプラストキノ還元酵素が進化したものと考えられている²⁾。ミトコンドリアなどの複合体 I は NADH 脱水素酵素活性をもっており、シアノバクテリアの複合体 I は NADH 脱水素酵素活性とともに NADPH 脱水素酵素活性を有している。*P. islandicum* では NADPH 脱水素酵素と NADH 脱水素酵素⁸⁾ は別個の酵素として存在している。また、他の古細菌では *Halobacterium salinarum*, *Sulfolobus acidocaldarius* では NDH-I (複合体 I) は存在しないと考えられている^{1, 11)}。このことより、本菌の複合体 I に当たる部位は NADH 脱水素酵素活性をもつ酵素と NADPH 脱水素酵素活性をもつ酵素が別々に存在するため、シアノバクテリアの複合体 I¹⁰⁾ に進化する前の段階をあらわしており NDH-I の進化の重要な位置を占めているのではないかと考えられる。*P. islandicum* には *Sulfolobus* 属に存在するカルダリエラキノンに電子伝達系の電子供与体になるかどうか検討した結果、膜画分中のシトクロムは NADPH の添加により還元されることが明瞭に示された (Fig. 7)。このことより、今回精製した NADPH 脱水素酵素により

NADPH が脱水素され、生じた電子が電子伝達系に伝達されていると考えられる。

以上の結果より、*P. islandicum* には NADPH 脱水

Fig. 4. *P. islandicum* NADPH 脱水素酵素活性の温度依存性。

1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ を含む反応溶液 (全量 200 μ l) をアルミブロック中 23°C, 50°C, 70°C または 80°C, 10 分間インキュベート後、フェリシアン化カリウムを用いた活性測定法にて比活性を算出した。精製 NADPH 脱水素酵素 1 μ g, 0.5 mM NADPH, 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0). mean $\pm$ S.D. (n=3).

素酵素が存在し電子供与体として機能している可能性が初めて示唆された。

Fig. 5. *P. islandicum* NADPH 脱水素酵素活性の pH 依存性。

1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ を含む反応溶液 (全量 200 μ l) をアルミブロック中 80°C で 10 分間インキュベート後、フェリシアン化カリウムを用いた活性測定法にて比活性を算出した。反応溶液は精製 NADPH 脱水素酵素 1 μ g, 0.5 mM NADPH, 各 pH の buffer (終濃度 50 mM) を含む。

○—○ : Na-acetate buffer, ●—● : MES buffer, □—□ : Na-phosphate buffer, ■—■ : Tris-HCl buffer. mean $\pm$ S.D. (n=3).

Fig. 6. *P. islandicum* NADPH 脱水素酵素の Lineweaver-Burk プロット

精製 NADPH 脱水素酵素 (1 μ g) と種々の濃度の基質 (NADPH), および 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ を含む 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0) を 80°C, 10 分間の保温により反応させ、反応速度を求めた。

Fig. 7. *P. islandicum* の電子伝達系の検討

(A) *P. islandicum* 膜画分の吸収スペクトル； (B) *P. islandicum* 膜画分の差スペクトル [NADPH による還元型－酸化型]。膜画分 (タンパク質量 200 μ g) と 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0) を含む反応液を全量 1 ml に調製し、ツンベルク型セル内に入れ真空ポンプで脱気後、窒素ガスを充填し嫌気条件にした。

(A) -----, 酸化型； ———, NADPH を加え 50°C, 10 min 間反応後の吸収スペクトル。

References

- 1) Cheah, K. S. 1970. Properties of the membrane-bound respiratory chain system of *Halobacterium salinarium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 216: 43~53.
- 2) Friedrich, T. and Weiss, H. 1997. Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *J. theor. Biol.* 187: 529~540
- 3) Huber, R., Kristjansson, K., J. and Stetter, O. K. 1987. *Pyrobaculum* gen. Nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100°C. *Arch Microbiol.* 149: 95~101.
- 4) Kashefi, K. and Lovely, D. R. 2000. Reduction of Fe (III), Mn (IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1050~1056
- 5) Koli, A. K., Yearby, C., Scott, W. and Donaldson, K. O. 1969. Purification and properties of three separate menadione reductases from hog liver. *J. Biol. Chem.* 244: 621~629.
- 6) Saito, K., Thiele, D. J., Davio, M., Lockridge, O. and Massey, V. 1991. The cloning and expression of a gene encoding old yellow enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* 266: 20720~20724.
- 7) Selig, M. and Schönheit, P. 1994. Oxidation of organic compounds to CO₂ with sulfur or thiosulfate as electron acceptor in the anaerobic hyperthermophilic archaea *Thermoproteus tenax* and *Pyrobaculum islandicum* proceeds via the citric acid cycle. *Arch Microbiol.* 162: 286~294.
- 8) Tanigawa, M., Seki, S., Uetake, R., and Nagata, Y. 2009. Purification of NADH dehydrogenase from a hyperthermophile, *Pyrobaculum islandicum*. *J. Jpn Extremophiles.* 8: 24~30.
- 9) Tindall, B. J. 1989. Fully saturated menaquinones in the archaeobacterium *Pyrobaculum islandicum*. *FEMS Microbiology Letters.* 60: 251~254.
- 10) Vermaas, FJ W. 2001. Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of life science.* 1~7
- 11) Wakagi, T. and Oshima, T. 1987. Energy metabolism of a thermoacidophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *Origins of Life.* 17: 391~399.