

N-20

好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 における D-アミノ酸脱水素酵素の生理的役割 Physiological role of D-amino acid dehydrogenase in a piezophilic bacterium *Shewanella violacea* DSS12

○渡邊翔太¹, 白石泰雅², 鈴木浩一郎¹, 谷川実³, 為我井秀行⁴, 加藤千明⁵, 西村克史^{3,6}
*Shota Watanabe¹, Yasumasa Shiraishi², Koichiro Suzumoto¹,
Minoru Tanigawa³, Hideyuki Tamegai⁴, Chiaki Kato⁵, Katsushi Nishimura^{3,6}

Abstract: *Shewanella violacea* DSS12 (*S. violacea*) is a psychrophilic and facultatively piezophilic bacterium which was isolated from the mud of the Ryukyu Trench. A hypothetical gene encoding D-amino acid dehydrogenase (DAD) exists in the genome of *S. violacea*, and the activity of DAD has been detected. In this study, to gain a better understanding of the physiological role of D-amino acid dehydrogenase in *S. violacea*, we investigated effects of D-amino acids on the growth of the organism and characterized DAD. Only D-serine showed inhibitory effect on the growth. *S. violacea* contained, in order of abundance, Pro, Glu and Ala in both culture conditions. The cell-free extracts of aerobic and microaerobic conditions exhibited DAD activity for D-Pro and D-Ser, respectively. D-Ser in the culture medium induced DAD activity against D-Ser. In the case of addition of D-Pro, the reduction of cytochromes was observed indicating an electron transfer from DAD to cytochromes.

1. 目的

Shewanella violacea DSS12 (*S. violacea*) は琉球海溝低泥から単離された最適生育温度 8°C, 最適生育圧力 300 気圧の好圧性細菌である。本菌は、大気圧下で好気条件でも微好気条件でも生育が可能であり、生育時の圧力によって呼吸鎖構成成分が変化することが解明されている。また、本菌のゲノム上には、D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) をコードすると予想される遺伝子が存在する。DAD は D-アミノ酸を酸化的に分解し電子受容体を還元する働きがあり、多くの DAD が呼吸鎖電子伝達系に関与することが知られている。大腸菌では、DAD が引き抜いた電子はキノンを還元した後、末端酸化酵素であるチトクロム *bd*, またはチトクロム *bo* に伝達され、*Helicobacter pylori* では、キノンを還元した後、チトクロム *bc₁*, チトクロム *c₅₅₃*, チトクロム *cbb₃* の順に伝達されることが分かっている。これまで D-アミノ酸は、細菌の細胞壁のペプチドグリカンの構成成分など極めて限られた生体成分と考えられてきたが、微生物や植物をはじめ、哺乳動物にも様々な D-アミノ酸が含まれ、多様な生理機能を果たしていることが明らかになってきた。

本研究では、*S. violacea* における DAD の生理的役割を明らかにすることを目的として、遊離アミノ酸量と DAD の性質を調べた。

2. 実験操作

2-1. 培養条件

大気圧下 8°C で *S. violacea* を振盪 (好気条件) 培養または静置 (微好気条件) 培養し、それぞれの菌体を得た。また培地に 50 mM D-または L-アミノ酸 (Pro, Ser) を加え、4°C で培養し集菌した。

2-2. DAD の mRNA の発現量の測定

培養後、菌体約 50 mg より、RNeasy Plant Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。これを鋳型として ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit を用いたリアルタイム PCR によって、DAD の mRNA の発現量を調べた。

2-3. 酵素サンプル調製

菌体を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎 (30 W, 20 min) した後、遠心分離 (6,000 g, 20 min) し、無細胞抽出液を得た。これを 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) に対して透析し、酵素サンプルとした。

2-4. 遊離型アミノ酸量の測定

無細胞抽出液に 5% TCA を加えタンパク質を除去した後、アミノ酸分析計 L-8800 を用いて菌体 1 mg 中の遊離アミノ酸量を測定した。

2-5. DAD の活性測定

1.0 μg 酵素サンプル, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10 μM flavin adenine dinucleotide, 50 μM

1: 日大理工・院・応化, 2: 日大理工・学部・応化, 3: 日大理工・教員・応化, 4: 日大文理・教員・化学,
5: JAMSTEC, 6: 日大短大・教員・化学

2,6-dichlorophenolindophenol に、50 mM D-アミノ酸 (Pro, Ser) を加えた全量 200 μ L の反応液を 30°C で 30 min インキュベートした後、610 nm における吸光度を測定することにより、DAD 活性を求めた。

2-6. チトクロムへの電子伝達

180 μ g 酵素サンプル, 50 mM D-アミノ酸 (Pro, Ser), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM NaN_3 を含む全量 200 μ L の反応液を、10°C で 10 min インキュベートし、その前後に吸収スペクトルを測定した。

3. 結果および考察

S. violacea の生育に対する 4 種類のアミノ酸の影響を調べたところ、D-Pro, L-Pro, L-Ser は生育に影響を与えず、D-Ser のみが生育を阻害することが分かった (Fig. 1).

それぞれの培養菌体より酵素サンプルを調製し、DAD 活性を測定した結果、D-Ser を含む培地で培養した菌体サンプルの D-Ser に対する活性が上昇していた (Fig. 2).

好気培養においては、対数増殖期の前後で DAD の mRNA 量と酵素活性は減少する傾向が見られた。微好気培養では、生育量は低く、生育に伴う DAD の mRNA 量と酵素活性に大きな変化はみられなかった (Fig. 3)

遊離アミノ酸量を測定したところ、振盪培養と静置培養のどちらの場合にも Pro, Glu, Ala の順に多く含まれており、Ser は極微量であった。

酵素サンプルに D-Pro を基質として加えると、振盪培養と静置培養のどちらの場合にもチトクロムへの電子の伝達が確認できたが、D-Ser を加えた場合には、電子の伝達が確認できなかった (Fig. 4).

以上の結果より、*S. violacea* の D-Pro に特異的な DAD は電子伝達系に電子を伝達し ATP を生産する役割を持ち、D-Ser に特異的な DAD は生育を阻害する D-Ser を分解する役割を担っていると考えられた (Fig. 5).

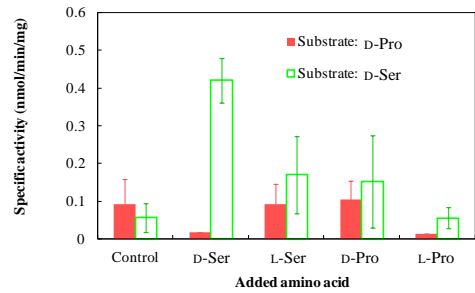


Fig. 2. Effect of Pro and Ser on DAD activity (mean \pm S.D., n=3)

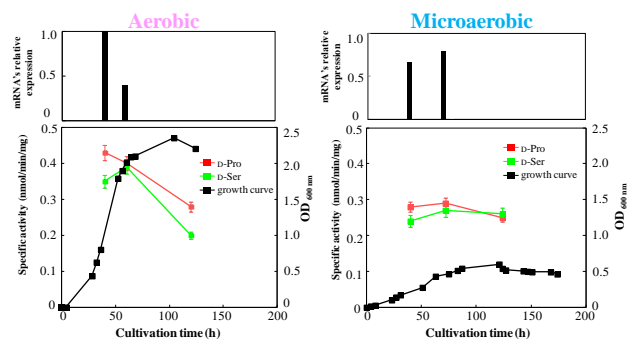


Fig. 3. DAD activity and expression of mRNA (mean \pm S.D., n=3)

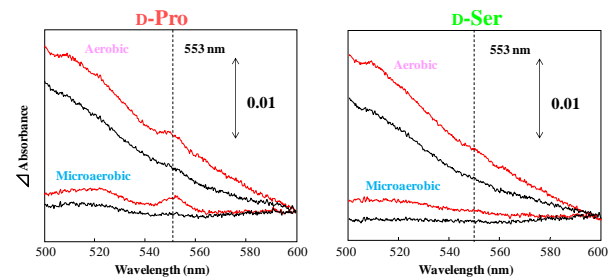


Fig. 4. Difference spectra of cytochromes upon addition of D-Pro or D-Ser

Reaction mixture	Reaction temperature	— 0 min
Cell-free extract	10°C	— 10 min
50 mM D-amino acid		
Cytochrome c oxidase inhibitor (1 mM NaN_3)		

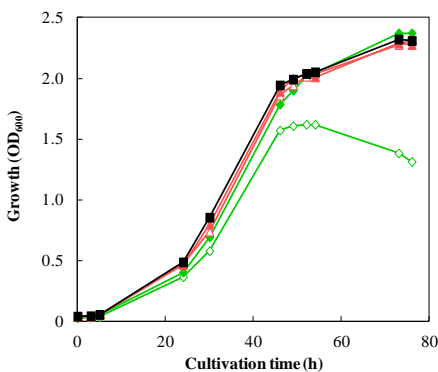


Fig. 1. Effect of Pro and Ser on the growth

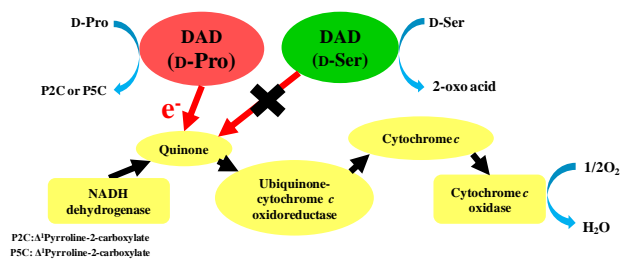


Fig. 5. Electron transfer system of *S. violacea*