

硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* における D-アミノ酸の役割 Role of D-amino acids in the sulfur oxidizing bacteria *Starkeya novella*

○旗谷惇¹, 鈴木浩一朗¹, 小田真弓², 谷川実², 西村克史^{2,3}*Jun Hataya¹, Koichiro Suzumoto¹, Mayumi Oda², Minoru Tanigawa², and Katsushi Nishimura^{2,3}

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*. *S. novella* was cultivated under autotrophic and heterotrophic conditions. In both culture condition, the cell-free extracts showed DAD activity against D-Pro and D-Ala, respectively, and addition of D-amino acids into the cell-free extracts caused a spectral change of cytochromes indicating reduction only in the heterotrophic condition. These results suggested that the DAD of *S. novella* may play different roles under autotrophic and heterotrophic conditions.

1. 目的

硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* (*S. novella*) は、水中や土壌中などに生息し、無機物 (チオ硫酸など) または有機物のどちらを用いても生育できる任意独立栄養化学合成細菌である。D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) はD-アミノ酸を分解して2-オキソ酸にする反応を触媒する酵素であり、*S. novella* には DAD の存在が確認されているがその役割は不明である。本研究では、*S. novella* における D-アミノ酸の役割を明らかにすることを目的として、*S. novella* を独立栄養条件下及び従属栄養条件下で培養し DAD の性質の違いを調べた。

2. 方法及び結果

2-1. D-アミノ酸の生育に与える影響

培地に D-アミノ酸 (50 mM) を加え、*S. novella* を独立栄養条件下及び従属栄養条件下で培養し生育曲線を作成した。

培地に D-Ala を加えた場合、*S. novella* の生育は独立栄養条件下及び従属栄養条件下で共に生育が阻害されたが、D-Pro を加えた場合には生育は阻害されなかった (Fig. 1, 2)。

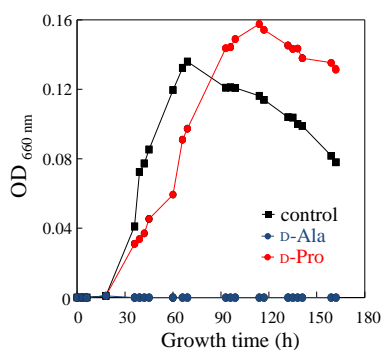


Fig. 1. 独立栄養条件下で D-Ala, D-Pro が生育に与える影響

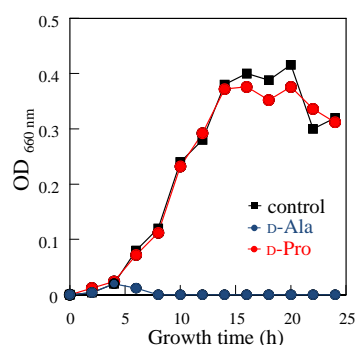


Fig. 2. 従属栄養条件下で D-Ala, D-Pro が生育に与える影響

2-2. 培養条件による基質特異性の違い

DAD の性質の違いを調べるため、独立栄養条件下及び従属栄養条件下で培養した *S. novella* 菌体を破碎した後、遠心分離し、その上清を無細胞抽出液として用いた。D-アミノ酸を基質とし、2,6-Dichlorophenolindophenol を電子受容体として、DAD 活性を測定した。

S. novella の DAD は、独立栄養条件下では D-Pro に対して、従属栄養培養時には D-Ala に対して最も高い DAD 活性を示した (Fig. 3)。

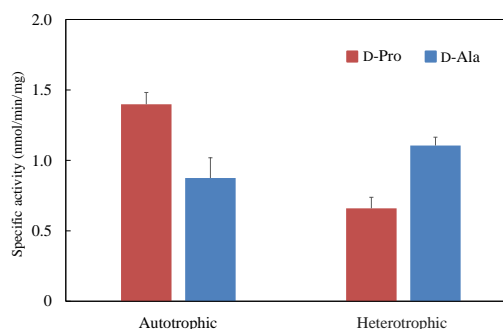


Fig. 3. 培養条件による基質特異性の違い

2-3. 生育と DAD 遺伝子の発現

S. novella を独立栄養条件下及び従属栄養条件下で培養し、菌体より抽出した total RNA を鋳型にして合成した cDNA を試料としてリアルタイム PCR を用いて DAD 遺伝子の mRNA の発現量を測定した。

独立栄養条件下では対数増殖期後期に、従属栄養条件下では定常期に、DAD 遺伝子の mRNA 発現量が最大となった(Fig. 4, 5)。

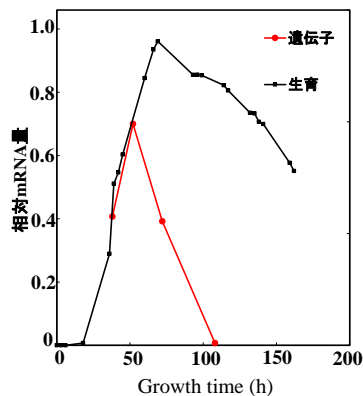


Fig. 4. 独立栄養条件下での生育と DAD 遺伝子の発現

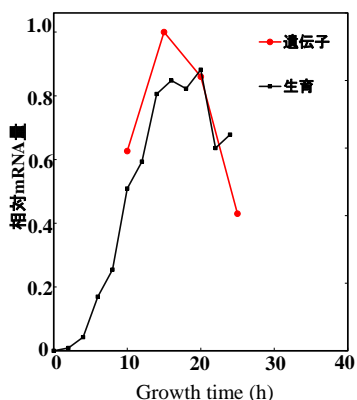


Fig. 5. 従属栄養条件下での生育と DAD 遺伝子の発現

2-4. DAD からチトクロムへの電子伝達

DAD からチトクロムへの電子伝達を調べるため無細胞抽出液に基質 (Na_2SO_3 , D-Pro, D-Ala) を加え、吸収スペクトルの変化を分光光度計を用いて測定した。

D-アミノ酸の添加によってチトクロムの還元を示すスペクトル変化が、従属栄養条件下で生育した場合にのみ観測された(Fig. 6, 7)。

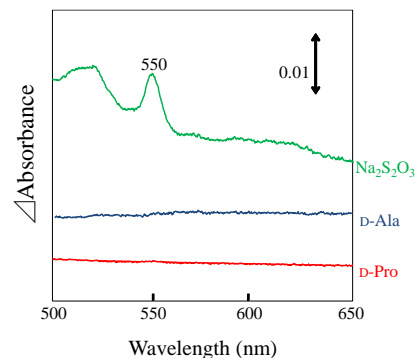


Fig. 6. 独立栄養条件下での DAD からチトクロムへの電子伝達

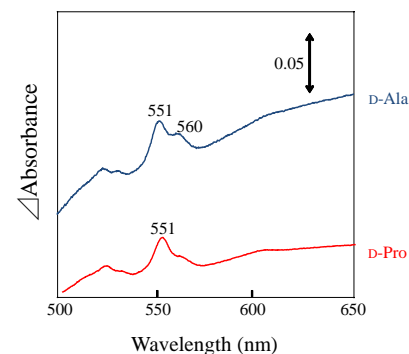


Fig. 7. 従属栄養条件下での DAD からチトクロムへの電子伝達

3. 考察

培養方法により基質特異性が変化することから、少なくとも 2 種類の DAD が本菌に存在すると考えられた。

独立栄養条件下では対数増殖期後期に、従属栄養条件下では定常期に、DAD 遺伝子の mRNA 発現量が最大となった。

D-アミノ酸の添加によってチトクロムの還元を示すスペクトル変化が、従属栄養条件下で生育した場合にのみ観測された。この結果は、従属栄養条件下では DAD が D-アミノ酸から引き抜いた電子がチトクロム系に伝達されることを示しており、D-アミノ酸も ATP 生産の基質となることが示唆された。しかし、独立栄養時では、チトクロムの還元を示すスペクトル変化が見られなかったため DAD によって D-アミノ酸から引き抜いた電子はチトクロムへ伝達されず別の経路に伝達されているのではないかと考えられた。

以上の結果より、生育の進行に伴って、ペプチドグリカンの材料である D-Ala が蓄積すると生育阻害を引き起こすため、D-Ala を DAD によって分解していると考えられた。