

脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) の硝酸還元能に 対する 1 価および 2 価カチオンの効果

山岡邦雄*, 加藤美都子*, 兼安気郎*

The effect of monovalent and divalent cation on the nitrate reduction of
Pseudomonas denitrificans

K. Yamaoka, M. Kato, K. Kaneyasu

Abstract

The study of denitrification by the cells is worth notice for its genetics and water waste treatment.

The enhancement of denitrification ability is useful for these purpose. In this study, monovalent cation could activate the nitrate reduction of *Pseudomonas denitrificans*, whereas Mg^{2+} inhibited it.

Incorporation of Li^+ and Mg^{2+} into the cells were studied. The relations between the incorporation of cations and nitrate reduction were discussed.

1. 緒 論

Pseudomonas denitrificans は異化型条件下において硝酸還元酵素 (Nitrate Reductase) の作用により硝酸イオンを N_2 gas にまで還元し、放出する。この硝酸還元機構の解明はそれ自身興味があるばかりでなく生物進化や、公害対策の面からも大いに検討する価値があるものと考えられる。

我々はこの菌の硝酸還元能が1価カチオンにより促進されると報告した。¹⁾ さらにその促進の原因として、酵素自身の1価カチオンによる活性化を推定した。また2価のカチオンである Mg^{2+} は促進効果を示さないことも報告した。¹⁾ そこでカチオン処理によりカチオンが菌体のどの部分にとり込まれるかを検討するため、カチオンで処理した菌体の細胞質、膜、膜可溶画分についてその硝酸還元能の分布およびとり込まれたカチオン量について調べた。その結果、とり込まれた Li^+ はその細胞質にほとんど存在し、膜部分については非常に少ないことがわ

かった。また Mg^{2+} は1価カチオンとはまったく異なる効果を示したので以下報告する。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

Pseudomonas denitrificans ATCC 13867

(2) 培養条件

培養の基本的方法は Nishimura ら²⁾ の方法に依った。すなわち菌の保存および前々培養は Yeast Extract 0.5 g, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 0.6 g を水 100 ml に溶かした培地を用いた。前培養および本培養には原則的に KNO_3 10.0 g, NH_4Cl 1.0 g, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 6.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, $NaCl$ 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, $CaCl_2$ 20 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.0 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.1 mg, $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 mg, $CoCl_2$ 2.0 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5 mg, $Na_2SeO_4 \cdot nH_2O$ 0.2 mg を水でとかし1ℓにした培地を用いた(pH 7.0)。培養条件としては前々培養は 30°C, 16時間振とうし、前培養および本培養については培養フラスコ中の空気を He gas で置換

* 宇部工業高等専門学校工業化学科

後 30°C, 16時間培養し対数増殖期の菌体を得た。菌の増殖度は 580 nm での濁度で測定した。対数増殖期の菌体は集菌後 pH 7.0, 33 m mol/l のリン酸緩衝溶液(以下 KPB と略す)で 3 回洗浄後、同緩衝液に懸濁させた。

(3) 硝酸還元酵素活性測定

硝酸還元酵素活性の測定は NO₃⁻ を還元して生じる NO₂⁻ を発色定量する方法を用いた。方法は山岡らの方法¹⁾に従った。

(4) カチオン処理の方法

本培養後集菌洗浄した菌懸濁液に各種カチオン濃度溶液を加え、30°C で 1 時間静置した。静置後集菌、洗浄して菌懸濁液を得た。これを whole cell のカチオン処理とした。また菌体を本培養後集菌、洗浄し超音波処理(20 KHz, 5 分間)により破碎した液に各種カチオン溶液を加え、30°C で 1 時間静置した。これを菌破碎液のカチオン処理とした。

(5) 細胞膜蛋白質の可溶化方法

菌体を超音波で homogenize して遠心分離(30,000 G×90分)によって細胞質と細胞膜に分ける。この細胞膜に対し次のような計算量の可溶化剤 Triton X-100 を用いて 21°C, 30 分間かくはんしながら可溶化を行う。菌体の濁度 OD = 1 のときの湿重量を 7.55 mg/ml とし全タンパク量をその 15% として³⁾ Triton X-100 はそのタンパク量のさらに 2% を加える。⁴⁾

(6) 金属イオンの定量

Li⁺, Mg²⁺ とともに 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ppm の標準溶液を 33 m mol/l の KPB 溶液で作し、島津 W ビームデジタル原子吸光フレーム分光光度計 AA-650 で測定した。測定時の条件は次のとおりで、これから検量線を作成し

酵素液中の Mg²⁺ と Li⁺ の定量をな行った。

Mg²⁺ の測定は、波長 2852 Å, 電流 4 mA, スリット巾 6 Å, 助燃ガス(air) 10 l/min, 燃料ガス(アセチレン) 2.4 l/min, バーナー高さ 5 mm, また Li⁺ は波長 6707 Å, 電流 5 mA, スリット巾 5 Å, 助燃ガス(air) 10 l/min, 燃料ガス(アセチレン) 1.7 l/min, バーナー高さ 2 mm でそれぞれ行った。

3. 結果と考察

(1) 各種カチオンの効果

異化型条件下で増殖させた菌体を各種電解質および非電解質水溶液に懸濁し、静置後洗浄した菌体の硝酸還元能を検討した。(Table 1) 表に示すように 1 価カチオンを用いた場合はいずれもその硝酸還元能が著しく増大していることが認められた。一方 2 価カチオン Mg²⁺ は、ほとんど硝酸還元能を増大させなかった。

(2) 菌体および菌破碎液に対するカチオンの効果

Table 1 には菌体を 0.5 M のカチオン溶液で処理した結果を示したが、菌破碎液に対する効果を更に検討した。カチオンとしては Na⁺, Li⁺, Mg²⁺ を用いた。結果を Fig. 1 に示す。Li⁺, Na⁺ は whole cell に対し硝酸還元能促進効果を示したが、菌体破碎液に Li⁺, Na⁺ を加えた場合は全く促進効果は示さず、むしろやや阻害傾向を示した。すなわち 1 価カチオンの効果は生体膜の構造そのものを必要としていると考えられる。一方 Mg²⁺ は whole cell に対して、その硝酸還元能を 1 mol/l までは変化させなかったが、それ以上の濃度では阻害効果を示した。また Mg²⁺ を菌体破碎液に加えた場合は Li⁺, Na⁺

Table 1 Stimulation of nitrate reducing activity in *Pseudomonas denitrificans* cells by monovalent cations

Incubation of cells with (0.5M) ^a	Nitrate reduction[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}(\text{mg cells})^{-1}$]	
	Metyl viologen ^b	Sodium formate ^b
None	0.062	0.027
NaCl	0.415	0.180
Na ₂ SO ₄	0.447	0.230
LiCl	0.376	0.202
KCl	0.306	0.170
KNO ₃	0.198	0.122
RbCl	0.224	0.126
CsCl	0.308	0.144
NH ₄ Cl	0.260	0.143
MgCl ₂	0.062	0.041
MgSO ₄	0.056	0.014
Mannitol	0.112	0.057
Sorbitol	0.118	0.054

* 30°C, 1h

** Electron donor

の場合と同じように阻害的傾向を示した。従って Mg^{2+} の阻害機構は1価カチオンの促進機構とは異なり、酵素に直接作用している可能性が考えられる。以上の現象がカチオン処理菌体を破碎した場合とどのように異なるかを検討する目的で次の実験を行った。

(3) カチオン処理菌体破碎液の硝酸還元能

Fig. 1 に示したように、菌体破碎液に対して1価カチオンは効果を示さないが、whole cell の状態でカチオン処理した菌体を破碎し、その硝酸還元能を検討したところ Table 2 のようになった。すなわち whole cell の状態で Li^+ , Mg^{2+} で処理した菌体は破碎後もその効果を持続した。このことはカチオンを whole cell の状態で接触させた時、酵素自身にカチオンが何らかの作用を起し、その菌体を破碎しても酵素に対する1価カチオンの影響が持続する可能性を示す。そこでこのカチオン処理菌体中における Li^+ , Mg^{2+} の分布について検討を行った。

(4) カチオン処理菌体の細胞質、細胞膜及び膜可溶画分の硝酸還元能とカチオン含量

Table 2 に示したように硝酸還元酵素とカチオンが結合している可能性が推定されたので、 Li^+ , Mg^{2+} で処理した菌体を破碎しその細胞質、細胞膜および膜可溶性画分についてその硝酸還元能およびカチオン含量を検討した。結果は Table 3, 4 に示す。この表に示すように $LiCl$ で処理した菌体中の細胞質部分に大部分の Li^+ は取り込まれていることがわかる。また膜画分の硝酸還元能は $LiCl$ 処理で上昇していることが認められたが Li^+ 含量は少く、定量法等により検討を必要とすることがわかった。また、その傾向は膜可溶化部分でも同一であった。従ってこの硝酸還元能の上昇と Li^+ 含量との相関を検討するためには電気泳動等で酵素をより精製し、その精製酵素中の Li^+ 含量を検討することも必要である。一方 Mg^{2+} で処理した菌体中の Mg^{2+} 分布は Li^+ と異なり、むしろ細胞膜に多く Mg^{2+} が存在しその濃度は対照菌のそれに比べやや高かった。しかし硝酸還元能は対照菌に

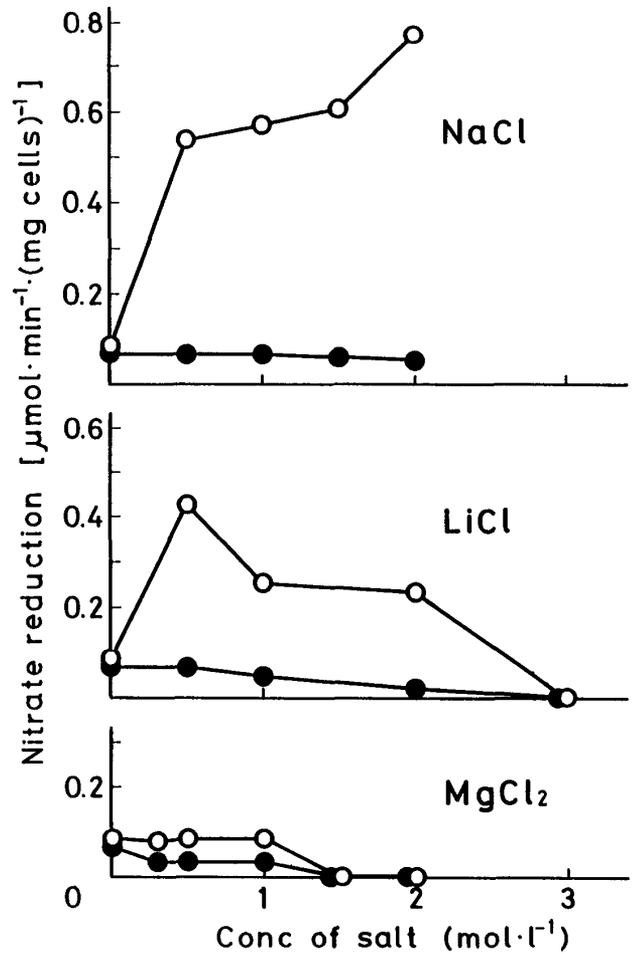


Fig. 1 Effect of some salts on whole cells and cell homogenates
○ : whole cells ● : homogenate

比べほとんど認められなかった。また細胞質における Mg^{2+} 含量は対照菌とはほぼ等しく、硝酸還元能は全く認められなかった。

このことより Mg^{2+} の場合、膜に結合した Mg^{2+} は硝酸還元能に直接影響を与えた可能性が考えられる。以上の結果から菌に対する Li^+ と Mg^{2+} の作用部位および機構については、まだ未解決の部分が多いが、 Li^+ の膜

Table. 2 Nitrate reducing activity in the precipitate and supernatant of the Li^+ , Mg^{2+} treated cells

	Nitrate reduction [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg cells})^{-1}$]		
	control cells	Li^+ treated cells*	Mg^{2+} treated cells*
whole cells	0.086	0.230	0
supernatant	0.003	0.057	0
precipitate	0.178	0.517	0

* 1M $LiCl$ and 2M $MgCl_2$ were used.

Table. 3 Distribution of nitrate reducing activity and Li^+ in the Li^+ treated cells

		control cells	Li^+ treated cells
Nitrate reduction*	whole cells	0.086	0.230
	supernatant	0.003	0.057
	precipitate	0.178	0.463
	soluble fraction of precipitate	0.035	0.120
Li^+ content**	supernatant	0	1.6
	precipitate	0	trace
	soluble fraction of precipitate	0	trace

* $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg cells})^{-1}$
** $\text{mg} \cdot (\text{mg cells})^{-1}$

Table. 4 Distribution of nitrate reducing activity and Mg^{2+} in the Mg^{2+} treated cells

		control cells	Mg^{2+} treated cells
Nitrate reduction*	whole cells	0.119	0
	supernatant	0.012	0
	precipitate	0.132	0
	soluble fraction of precipitate	0.068	0
Mg^{2+} content**	supernatant	0.391	0.424
	precipitate	2.85	8.35
	soluble fraction of precipitate	0.481	1.21

* $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg cells})^{-1}$
** $\text{mg} \cdot (\text{mg cells})^{-1}$

部分における含量を定量することにより、1価カチオンの作用機構の解明が可能となるものと考えられる。

4. 要 約

P. denitrificans は1価カチオンでその硝酸還元能が促進されたが、2価カチオン Mg^{2+} で処理すると逆に阻害作用を示した。両カチオンについてそれぞれ処理した菌体の Li^+ , Mg^{2+} 分布を検討したところ、 Mg^{2+} は対照に比べ、膜部分に多く含まれており、膜酵素との関連を推定したが、 Li^+ については明確な結論は得られなかった。

5. 謝 辞

本研究にあたり御指導いただきました京都大学工学部上原悌次郎助教授に深く感謝いたします。また実験その他で協力して下さった本校柿並孝明技官、卒業生の辻田久敏君、藤原裕隆君に厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 山岡邦雄, 加藤美都子 宇部工業高等専門学校研究報告 30 (1984)
- 2) Yushi Nishimura Biochem. Biophys. Res. Comm.87, 140 (1979)
- 3) 日本生化学会 生化学データブック I, P.1536 (1979)
- 4) 堀尾武一, 山下仁平 蛋白質・酵素の基礎実験法, P. 54

(昭和59年9月17日受理)