

大腸菌の硝酸還元に関与する還元剤についての研究

加藤美都子・花田祐策*・山岡邦雄・田中吉武**

A Study of Some Reductants Taking Part in Nitrate Reduction in *Escherichia coli*

Mitsuko Kato, Yuusaku Hanada*, Kunio Yamaoka, Yoshitake Tanaka**

Abstract

In *Escherichia coli*, nitrate reductase is induced when the cells are grown with nitrate under anaerobic conditions. This enzyme takes part in reduction of NO_3^- to NO_2^- with a reductant. As a reductant, formate acts only at the first half of logarithmic phase. Then, other reductants which are concerned in this reduction were studied.

Key words: *Escherichia coli*, Nitrate reductase, Formate, Lactate

1. 緒論

大腸菌 (*Escherichia coli* IFO 3301) は硝酸存在下、嫌氣的条件下で培養すると膜内に硝酸還元酵素 (DNRase) を生成する。この DNRase は 3 つのサブユニット α 、 β 、 γ からなっている。この酵素は膜に存在し、菌体に取り込まれた NO_3^- は NO_2^- に還元されて放出される。この NO_2^- はアミンと反応して発ガン性のニトロソアミンを生成することは良く知られている。従って、DNRase 活性を制御することはこの酵素の作用機構の解明や人体にとって有害な NO_2^- の蓄積を減少させるという意味において、極めて重要な研究課題である。 NO_3^- を NO_2^- に還元する際に還元剤が必要となるが、我々の研究室では従来、主にメチルピオロゲン (MV) を用いてきた。MV は人工色素であり、菌体内で実際に使用される還元剤はギ酸が知られている。しかし、菌体の増殖に伴う DNRase の経時変化を測定すると、MV を用いた場合が全期間でほぼ一定の高い活性を示すのに対して、ギ酸を用いた場合は対数増殖期のある限られた期間のみ活性を示すに留まった。しかし、菌体の増殖はその後も続くので、ギ酸以外の還元剤が作用して菌体が増殖していると思われた。そこで今回、MV などの人工色素ではなく主にギ酸や、他の菌体内に存在する 2~3 の還元剤について検

討したので報告する。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

Escherichia coli K12 IFO 3301

(2) 培地成分および培養方法

Guest ら¹⁾の方法に従った。

(3) 硝酸還元酵素活性の測定

硝酸還元酵素活性の測定は山岡ら²⁾の方法に従った。則ち NO_3^- を還元して生じた NO_2^- の量を測定した。還元剤として、MV、ギ酸、ピルビン酸、乳酸を使用した。

(4) 前処理法および菌体破砕法

山岡ら²⁾の方法に従った。

3. 結果と考察

I 菌体の増殖度変化に伴う硝酸還元酵素活性の経時変化

(1) 還元剤：メチルピオロゲン

大腸菌を硝酸還元条件下で生育させ、その菌体の DNRase 活性を人工色素である MV を用いて測定した。その結果菌体増殖の初期から定常期に至るほとんど全期間にわたって高い酵素活性が見られた。つまり全期間において DNRase が菌体に存在していることを示している (Fig.1)。

則ち、Fig.2 に示すように大腸菌の DNRase は α 、 β 、 γ の三つのサブユニットから成り γ はチトクローム b そのもので、MV はその γ に関与している。従って細胞内部の他の電子伝達系とは無関係に MV による酵素活性は DNRase の存在そのものを示すと考えられる。

(2) 還元剤：ギ酸

(1999年9月24日 受理)

宇部工業高等専門学校 物質工学科

* 宇部工業高等専門学校 理科教室

** 三菱ガス化学 (株)

そこで大腸菌で還元剤として作用しているとされる
 ギ酸について調べた。MV を用いた場合菌体増殖の
 全期間にわたり DNRase 活性が高い値を示したが、
 ギ酸を用いた場合は培養開始から約 3 時間という

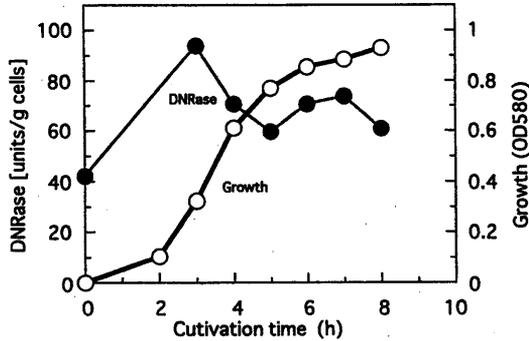


Fig.1 大腸菌の増殖度および硝酸還元酵素活性の経時変化 (還元剤: MV)

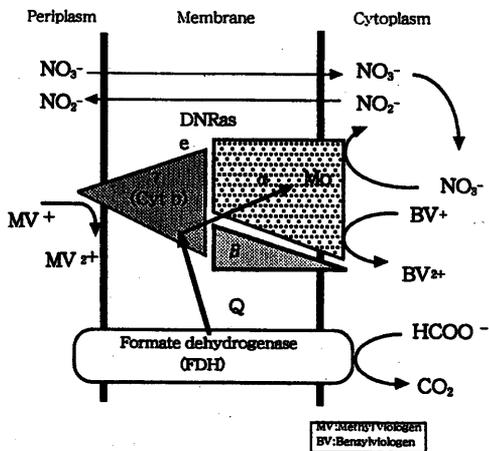


Fig.2 Spatial organization of the *Escherichia coli* nitrate reductase and its associated transport chain
 Ingledew, W. J. and Pool, R. K.: Microbiol.Reviews.1980

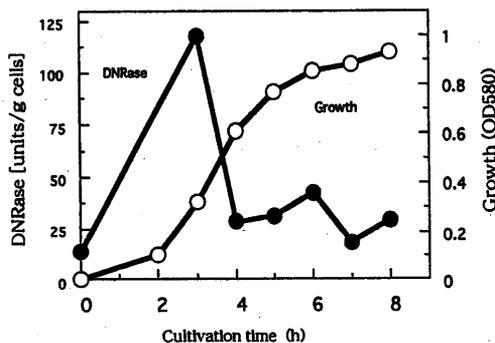


Fig.3 大腸菌の増殖度および硝酸還元酵素活性の経時変化 (還元剤: ギ酸)

対数増殖期前半のごく限られた時期でのみ高い活性が認められ、対数増殖期後半以降は低い活性しか認められなかった。つまりこの菌は対数増殖期後期には、硝酸還元に関してはギ酸系が十分作用していないことを示している。しかし、菌はこの後も増殖し続けているので菌体内ではギ酸以外の還元剤が作用しているという可能性が考えられた。なお、硝酸還元条件下でこのことがギ酸系の DNRase 活性測定を難しくしていると考えられる (Fig.3)。

(3) 還元剤: ビルビン酸

次に菌体内に存在する化合物で還元剤として作用する可能性のある物質としてビルビン酸について検討した。DNRase 活性の経時変化はギ酸より低い値ながらもギ酸と同じ培養後約 3 時間で DNRase 活性のピークを認めることができた (Fig.4)。

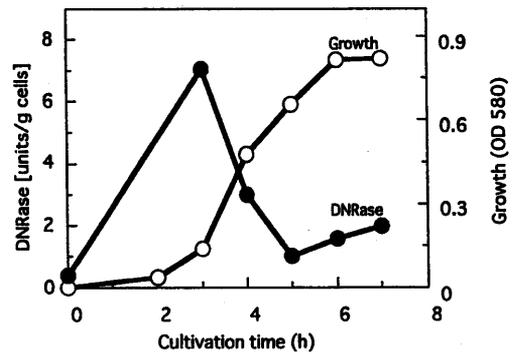


Fig.4 大腸菌の増殖度および硝酸還元酵素活性の経時変化 (還元剤: Pyruvate)

大腸菌の代謝系においてビルビン酸はアセチル CoA へ、ギ酸を遊離して進むとされている。よってビルビン酸がギ酸に変化して DNRase の還元剤として作用している可能性が考えられた (Fig.4)(Fig.5)。しかしながら、ギ酸を用いた場合と異なり、DNRase 活性の値そのものは極めて低く、確認するに至らなかった。

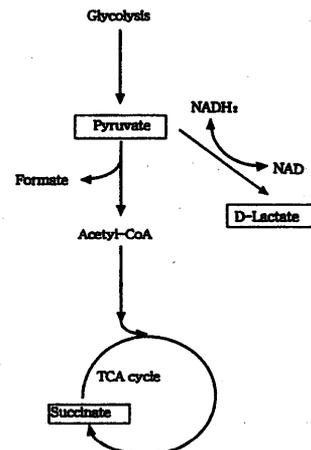


Fig.5 大腸菌の代謝系における各還元剤の関係

(4) NaCl での前処理菌の DNRase 活性と還元剤の関係

ピルビン酸を用いた場合 DNRase 活性が低く変化を明確に確認することが出来なかった。そこですでに報告したように菌体を NaCl で前処理することにより DNRase 活性を高めることができるという点に注目し、NaCl で前処理した菌体について還元

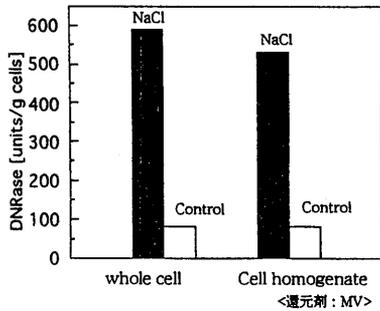


Fig. 6 大腸菌の硝酸還元酵素活性に対するNaCl前処理の効果と菌体破碎の影響

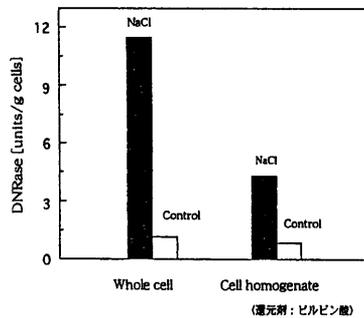


Fig. 7 大腸菌の硝酸還元酵素活性に対するNaCl前処理の効果と菌体破碎処理の影響

を用いて、ギ酸、ピルビン酸の還元剤としての効果を調べた。前処理をしなかった場合よりかなり高い活性が得られ、その活性のピークはギ酸のそれと殆ど対数増殖の同じ時期であった。このことからピルビン酸の還元剤としての作用は代謝された後、ギ酸を生成し、そのギ酸が還元剤として働き、ピルビン酸そのものの作用ではないと推定された。次に対数増殖後期の菌体内における還元剤を探るため、代謝に関連のある物質として乳酸とコハク酸について検討した。コハク酸はその効果を示さなかったが、乳酸は Fig. 8 に示すように、ギ酸の作用する以降の増殖時間帯に於いて活性が高くなることが認められた。しかしこの乳酸による測定値も低いいため、菌体を NaCl で前処理して測定したところ、明確な活性の上昇が確認された(Fig. 9)。

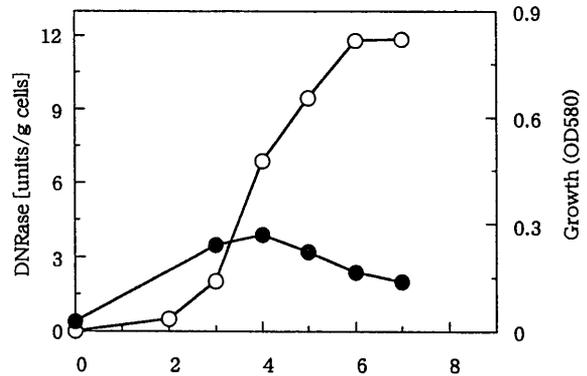


Fig. 8 大腸菌の増殖度および硝酸還元酵素活性の経時変化 (還元剤: 乳酸)

剤を MV とピルビン酸に変えた場合を行った。Fig. 6 は MV を還元剤として使用した場合、Fig. 7 はピルビン酸を使用した場合の DNRase 活性である。MV の場合、whole cell では前処理菌は Control 菌に対し、約 6 倍の活性を示し、その菌体を破碎しても活性はそのまま保持されていた。それに対しピルビン酸を使用した場合 whole cell では前処理菌は Control 菌に対し、約 10 倍の活性を示すが、MV の場合と違い破碎すると前処理菌の活性が約半分に低下した。これは前に述べた通り、MV の場合は DNRase 以外の電子伝達系を必要とせず直接 MV から DNRase に電子が伝達されるが、ピルビン酸の場合は生じたギ酸がギ酸脱水素酵素 (FDH) 系を通して電子を DNRase まで伝達する為と考えられる。また、菌体を破碎することによって活性の低下が見られたのは、ギ酸もピルビン酸も膜内構造を介して DNRase に作用するため破碎によって膜構造が壊れ活性が低下したと思われる。

NaCl で前処理し、DNRase 活性の上昇した菌体

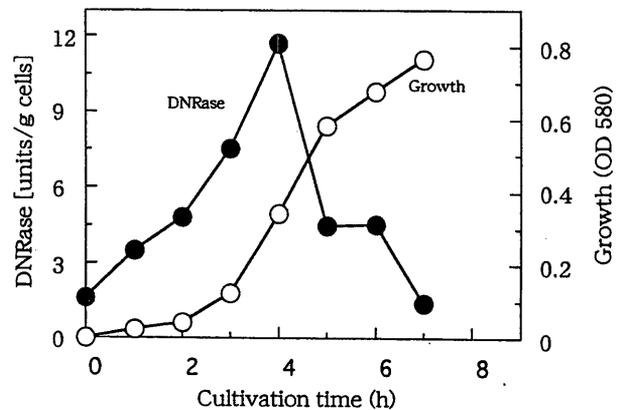


Fig. 9 大腸菌の増殖度およびNaCl前処理した硝酸還元酵素活性の経時変化 (還元剤: 乳酸)

以上のデータは大腸菌が硝酸還元条件下で生育すると硝酸還元を行うが、その際の還元剤として以前から知られているギ酸だけでなく、乳酸が少なくとも対数増殖期後半の一部を担っている可能性を示唆している。このことは石本ら³⁾が大腸菌培地において増殖の後半に乳酸が生成するとしていることと一致している。

4. 文献

- (1) P. R. Lambden, J. R. Guest: *J. Microbiol.*, **93**, 173-176 (1976).
- (2) K. Yamaoka, M. Kato, and T. Kamihara: *Biochem. Int.*, **16**, 829-834 (1988).
- (3) 石本真: 「嫌気性呼吸と硫黄代謝」, 114-116 (1988).