

# 1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性化

山 岡 邦 雄\*

The activation of nitrate reductase by monovalent cation.

Kunio YAMAOKA

## Abstract

The study of denitrification by the cell is worth notice for its genetics and water waste treatment. Stimulation of denitrification ability is useful for these purpose.

In this study, monovalent cation could activate the nitrate reductase of *Pseudomonas denitrificans*.

## 1. 緒 論

硝酸呼吸は生物のエネルギー獲得系として非常に重要であり、その機構の解明はそれ自身意味があるばかりでなく生物進化の問題や公害対策の面からも大いに興味の持たれるものである<sup>1),2),3)</sup>。我々は脱窒菌である *Pseudomonas denitrificans* を用いその硝酸還元機構の制御及び酵素の活性化等を目的として研究を行っている。その結果主として一価カチオンにより *P.denitrificans* の硝酸還元活性が大きく増大することを認めた<sup>4)5)</sup>。この活性化の原因については①浸透圧による、②酵素量の増加による、③亜硝酸還元酵素活性阻害によるみかけ上の硝酸還元量の増大④ assay 時におけるカチオンの効果、⑤NO<sub>3</sub>-イオンのとり込み促進効果、⑥酵素の活性化、以上六つの点が考えられた。これらの点を検討した結果、①～⑤の点については全て否定された。又⑥の点については菌体を homogenate にして検討した結果活性化されていることを確認出来たので以下報告する。

## 2. 実験と方法

### a) 使用菌株

*Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867

### b) 増殖条件

培養条件の基本的方法は Nishimura らの方法に依った。即ち、菌の保存及び前々培養は Yeast Extract 0.5g

NaCl 0.6g を100gの水にとかした培地で行った。前培養、及び本培養には原則的に KNO<sub>3</sub> 10g, NH<sub>4</sub>Cl 1g, Na<sub>3</sub>-Citrate 6g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, NaCl 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10mg, CaCl<sub>2</sub> 20mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.1mg, MnCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1mg, CoCl<sub>2</sub> 2mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.5mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.2mg を水 1lにとかした培地を用いた。(PH7.0)

培養条件は前々培養は浸とうし、前培養及び本培養については好氣的培養の場合は空気を吹き込み、嫌氣的な場合は空気をのぞいた後 He ガスで置換した。温度は 30°C に保った。同化型酵素のみを持つ菌の増殖のためには培地成分から NH<sub>4</sub>Cl を除き好氣的にした。又異化型の酵素を持つ菌の増殖のためには上記培地のままで嫌氣的にした。増殖時間は19時間前後とした。菌の増殖度は 580 nm での濁度で示した。

対数増殖期の菌体は集菌後 (4000rpm 10min) 33mM のリン酸緩衝液 (KPB) で3回洗浄後、同緩衝液に懸たくさせた。

### C) 硝酸還元酵素活性測定

硝酸還元酵素活性の測定は菌懸濁液 0.2ml, KPB (1M) 0.2ml, KNO<sub>3</sub> (100mM) 0.2ml, Methyl violet (0.9mg/5ml) 0.4ml を試験管に加え、30°C で 5 min 加温した。その後 NaHCO<sub>3</sub> (50mg/5ml) と Dithionite (50mg/5ml) を合わせた液から 0.4ml 試験管に加え青色に発色せしめる。又最初の分注の段階で総液量が 2 ml になるように水を加えておく。

反応は 30°C, 5 min 行い、終了後直ちに浸とうし脱色

\* 宇部工業高等専門学校工業化学科

後1% Sulfanyl amide 1 ml と、0.02% Naphtyl ethylene diamine 1 ml を加える。氷冷20分後540nm 吸光度を測定する。

検量線は  $\text{KNO}_2$  の各濃度溶液に上記発色試薬を加えることにより作成した。

なお、菌体量は O.D. = 1 の懸濁液で1.64mg cell/ml とした。

#### d) 亜硝酸還元酵素活性測定

硝酸還元酵素活性測定のため添加した  $\text{KNO}_3$  の代わりに  $\text{KNO}_2$  を加え  $\text{NO}_2^-$  イオンの減少量で活性を表わした。

#### e) 菌のカチオンによる活性化

本培養後集菌、洗浄した菌懸液に各種濃度のカチオン溶液を加え、 $30^\circ\text{C}$  で1時間浸とうする。浸とう後、集菌し、33mMKPB 溶液で洗浄し懸濁液とした。この懸濁液をカチオン処理菌体とした。

#### f) 菌のトルエン処理

赤堀ら<sup>7)</sup>の方法を改良して行った。菌懸濁液に1%相当のトルエンを加えよく混合し、冷凍した(1hr)。その後融解し酵素液として用いた。以上の操作はツンベルク管中で嫌氣的に行った。

#### g) 菌体内への $\text{NO}_3^-$ イオンのとり込み

培養菌体を  $\text{NO}_3^-$  イオンを含む溶液に懸濁し  $30^\circ\text{C}$  で1時間インキュベート後、集菌洗浄後超音波破碎装置で菌体を破碎した。

### 3. 結果と考察

A. 脱窒条件で増殖させた菌を集菌、洗浄後、各種塩類、及び非電解質溶液に懸濁し1時間浸とう後洗浄し、硝酸還元能の変化を調べた。(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3~8倍と飛躍的に増大していることがわかる。それに比べ2価カチオンである  $\text{Mg}^{2+}$  は殆んど活性を増大せしめなかった。また、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  は沈殿生成が起り、結果を数値化し得なかったがかなりな効果を示した。また、非電解質の例として Mannitol, Sorbitol を用いたがその効果は1価カチオンには遠く及ばなかった。この効果は電子供与体として Methyl viologen を用いた場合も Formate を用いた場合も全く同じ傾向を示した。以上の結果はこの効果はこの効果が単に浸透圧の変化によるものではないことを示している。そこでこのカチオン効果をくわしく調べるため NaCl を代表例と

Table 1 Increase in the in the nitrate reducing activity of cells in the presence of various salts

Additions*1 (0.5M)	Nitrate reducing activity (nmol of nitrite formed/min/mg-cells)	
	Electron donor	
	Methyl viologen	Formate
None	62	27
NaCl	415	180
KCl	306	170
RbCl	224	126
CsCl	308	144
$\text{NH}_4\text{Cl}$	260	143
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	477	208
$\text{KNO}_3$	198	122
$\text{MgSO}_4$	56	14
MgCl	62	41
Mannitol	112	57
Sorbitol	118	54

\*1 Cells grown under denitrifying conditions were suspended in 0.033M potassium phosphate buffer (PH7.0) and incubated with indicated additions at  $30^\circ\text{C}$  for 1 hour.

してとりあげ以下 NaCl を用いて活性化機構の解明を行った。

B. カチオンの活性化が活性化時のカチオン濃度とどう関係するかを調べた。(Fig. 1) 図に示すように活性化はカチオン濃度に完全に比例することが認められた。この傾向はまた、電子供与体の種類にはよらなかった。

C. このカチオン効果と酵素量の増減との関係を検討する目的で、カチオン処理時に chloramphenicol (CAP) を共存させたところ CAP による阻害は全く認められなかった。(Table 2) 従って活性時の懸濁液の組成と考え合わせても酵素合成が行われた可能性はないと考えられる。

D. in vivo では  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$  の還元反応が起ると考えられるが、途中に存在する亜硝酸還元酵素の活性がカチオンで阻害された為、見かけ上硝酸還元活性が増大する可能性がある。この点を検討した結果カチオン処理により亜硝酸還元酵素は殆んど影響をうけないことが確認された。(Table 3)

E. 硝酸還元能力の増大は菌の  $\text{NO}_3^-$  のとり込み促進と関係している可能性がある所以对照菌とカチオン処理菌体に対する  $\text{NO}_3^-$  イオンのとり込み量を検討した。(Table 4) カチオン処理菌体は対照菌に比べ  $\text{NO}_3^-$  の

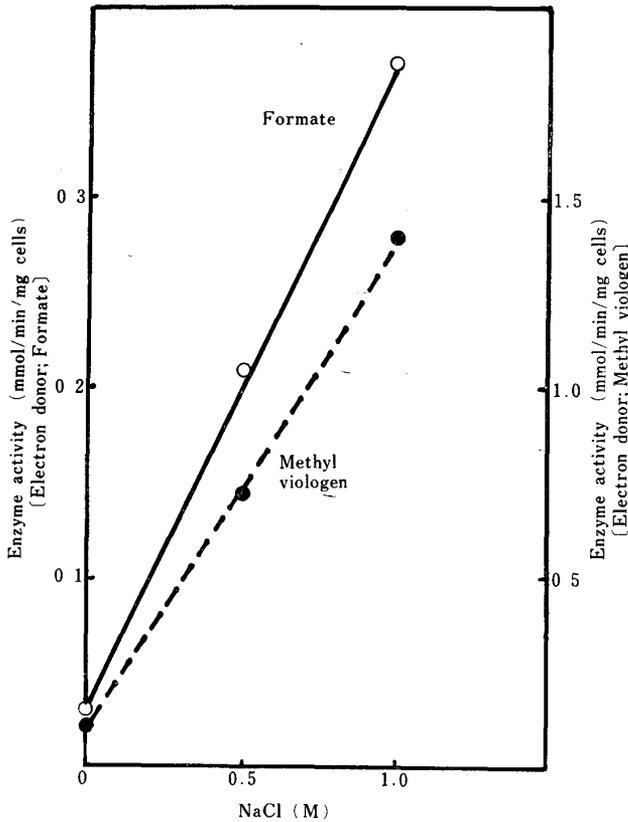


Fig. 1 Increase in nitrate reduction by NaCl

Table 2 Effect of chloramphenicol (CAP) on the NaCl-induced increase in the activity of nitrate reductase

Additions	Enzyme activity (mmol/min/mg cells)		
	Electron donor		Formate
	Methyl viologen		
None	0.067		0.029
NaCl	0.565		0.207
NaCl+CAP	0.580		0.233

とりこみ促進をしていないことがわかった。また、dataを示していないが、生成 NO<sub>2</sub> を定量するさいにカチオンは全く影響しないことも認められた。

F. 以上の実験結果からカチオンによる活性化は硝酸還元酵素自体が活性化されているのではないかと考えることが出来る。そこでカチオン処理して活性増大した菌をトルエン処理後凍結融解した菌破砕懸液の活性を測定した。(Table 5)

Table 3 Changes in the activities of nitrate reductase and nitrite reductase by NaCl treatment of cells

Enzyme	Electron donor	Enzyme activity (Relative activity)	
		Control cells	NaCl-treated cells
Nitrate reductase	Methyl viologen	100	368
	NADH	100	360
Nitrite reductase	Methyl viologen	100	91
	NADH	100	97

Table 4 Effect of NaCl on the incorporation of KNO<sub>3</sub>

Cells	Relative activity of nitrate reductase	NO <sub>3</sub> incorporated (nmol/mg cells)
Control	100	0.12
NaCl-treated	430	0.15

Table 5 Increase in the activity of nitrate reduction during incubation of cells with NaCl

Incubation (hour)	Assay	Nitrate reduction (Relative activity*1)	
		Methyl viologen	Formate
- NaCl	Intact cells	100	100
	Homogenate*2	321	205
+ NaCl	Intact cells	573	391
	Homogenate*2	793	424

\*1: For each electron donor, nitrate reducing activity of intact cells incubated without NaCl is defined as 100. Relative activity of cells before incubation was almost equal to 100.

\*2: Toluene-lysed cells.

Intact cell に比べ Homogenate にすると明らかに酵素活性は増大することがわかった。しかしカチオン処理菌の Homogenate は対照菌のそれに比べ約 2.5倍もの活性増大を示している。このことは酵素自体がカチオンにより活性化されていることを示すものである。カチ

オンにより活性化される機構については不明ではあるが、*P. denitrificans* を Toluene 処理後凍結融解した懸濁液を遠心分離した上清にカチオンを添加しても活性の増大はみられなかった。(実験条件のより細かな検討が必要。)このことから、カチオンによる活性化には intact cell の存在が必要なが考えられる。また、菌の age と活性化との関係も今後の課題の一つであろう。増殖条件を脱窒条件だけでなく硝酸同化、酵素吸収条件とくみ合わせ行い、この活性化が、硝酸還元酵素のうち同化異化のいずれの酵素に効果をもつのか検討したいと考えている。

#### 4. 謝 辞

本研究にあたり菌を送って下さり、終始御指導下さった京都大学工学部上原悌次郎助教授に深謝する。また実験に当り協力してくれた加藤美都子助手、豊永義宏君、

福本恭文君に深謝する。

#### 参 考 文 献

- 1) 山中健生 生化学 VOL 48 NO.5 (1976)
- 2) C.C. Delwiche et al. Ann. Rev. Microbiol. (1976) 30 241~62
- 3) Julian. (1976) Biotech. and Bioeng. 18
- 4) Bruria Heuer and Z. Plaut Physiol. plant. 43 (1978) (307~312)
- 5) F. Pichinoty Arch. Microbiol (1971) 76 (83~90)
- 6) Yushi Nishimura et al. (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 140-145
- 7) 赤堀四郎 酵素研究法

(昭和54年9月8日受理)