

脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) における硝酸還元活性について

山 岡 邦 雄*

Nitrate reduction by *Pseudomonas denitrificans*

KUNIO YAMAOKA

Abstract

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

In this study monovalent cation could activate nitrate reductase of *Pseudomonas denitrificans* which was grown under under dissimilatory condition.

1. 緒 論

硝酸呼吸は、ある種の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^{1),2),3)}。

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、この *P. denitrificans* は主として1価カチオンにより、その生菌での硝酸還元能力が著しく増大することを認めた⁴⁾。

我々は、ひき続きこの活性化が異化型条件で生育させた、菌及び同化型条件で生育させた菌の硝酸還元能と、どのように関連しているかを調べる目的で実験を行ったところ、異化型生育菌との関連が大きいことがわかったので、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

培養の基本的方法は Nishimura⁵⁾、山岡⁴⁾らの方法に従った。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_3 10g, NH_4Cl 1g, $\text{Na}_3\text{-Citrate}$ 6g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 1g, NaCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, CaCl_2 20mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1mg, CoCl_2 2mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2mg を水 1ℓにとかした培地を用いた。(PH7.0)

培養条件は、前々培養については30°C で振とうしながら16時間培養した。前培養、及び本培養は30°C で19時間静置培養を基本とした。

異化型生育菌を得る場合は、前培養、本培養とも培養フラスコ中の空気を He ガスで置換した。

同化型生育菌を得る場合は、上記培地成分から NH_4Cl を除き、好氣的にする為に、振とう培養した。

同化型、異化型両能力を持つ菌を得る場合は、上記培地成分から、 NH_4Cl を除き、且つ、嫌氣的にする為に空気を He で置換し、静置培養した。

同化型還元能、異化型還元能のいずれも必要としない菌の生育には、上記培地成分から KNO_3 を除き好氣的に振とう培養を行った。

* 宇部工業高等専門学校工業化学科

菌の濃度は、580nm での濁度で示した。

c) 硝酸還元酵素活生測定

Nishimura⁵⁾らの方法により NO_3^- イオンを還元して生じた NO_2^- イオンの量を測定した。

なお、還元剤としては、methylviologen を使用した。

使用する菌体量は、580nm における濁度 O.D. = 1 の菌体濃度で 1.64mg Cell/ml であるとした。

d) 菌のカチオンによる活性化

本培養後、集菌 (4,000rpm, 15min), 洗浄した菌体を、各種濃度のカチオン溶液に懸濁し、30°C で 1hr 振とうする。振とう後、集菌し、33mM リン酸緩衝溶液で洗浄し、懸濁液とした。この菌をカチオン処理菌体とした。

e) 菌体の破碎及び分離

対数増殖期にある菌体を、集菌洗浄後、0.033M リン酸カリ緩衝溶液に懸濁し、50W で 5 分間、0°C を保持しつつ超音波処理により、菌体を破碎した。破碎液は、遠心分離により、上清と洗殿に分離した。(4000rpm, 25分)

3. 結果と考察

a) 各種菌の生菌状態に於る硝酸還元能

異化型硝酸還元能を必要とする状態で生育した菌体と、同化型硝酸還元能を必要とする状態で生育した菌体、異化型、同化型両者の還元能を必要とする状態で生育した菌体、及び、そのいずれも必要としない状態で生育した菌体の以上 4 種の菌体の生菌状態における硝酸還元能を測定した。

結果は、Table 1 に示す。

異化型硝酸還元能を必要とする状態で生育した菌体が

異化型酵素のみを保持しているのか、あるいは同化型酵素をも保持しているかは不明であるが、Table 1 示すように、4 種類の菌体の硝酸還元には明確な差が出た。

即ち、異化型硝酸還元能を必要とする状態で生育した菌体と、同化、異化両硝酸還元能を必要とする状態で生育した菌体は、他の 2 種の菌に比し、著しく高い硝酸還元能を示した。

これは生菌状態で同化型の硝酸還元能は測定がむづかしいことを示していると考えられる。

異化型酵素、同化型酵素、同化型酵素の菌体内における存在場所の問題と合わせ、これからの検討課題であろう。

b) 1価カチオンによる硝酸還元能の活性化

前報⁶⁾に報告したように、異化型硝酸還元能の必要な状態で生育した菌体は、1価カチオンにより、その硝酸還元能が増大することがわかっている。

そこで、異化型硝酸還元能の必要な状態で生育した菌体、同化型硝酸還元能の必要な状態で生育した菌体の 2 種の生菌についてその 1 価カチオンによる硝酸還元能の活性化を比較してみた。

結果は Table 2 に示すように、同化型の菌体は硝酸還元能を 1 価カチオンにより殆んど増加させていないのに対し、異化型の菌体は著しくその還元能を増加させている。

この結果から、異化型の硝酸還元能のみが 1 価カチオンで活性化されることがわかったが、異化型酵素自体は活性化されるが同化型のそれは活性化されないのか、あるいは、酵素の存在場所が問題なのかは不明である。

c) 菌体内の硝酸還元能の分布

異化型硝酸還元能を必要とする培地で生育した菌体を超音波処理により破碎し、遠心分離した上清、洗殿の各々

Table 1 Reducing power of each cell

Type of Cell		Control	Assimilation type	Dissimilaton type	(Assimilation + Dissimilation) type
Growth condition	Gas phase	Air	Air	He	He
	N-source	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	NO_3^-	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	NO_3^-
Enzyme activity of nitrate reductase ※		0.012	0.043	0.179	0.178

※ NO_2 mmol/g-cell · min

Table 2. Increase in the activity of nitrate reduction by NaCl

Type of Cell	Assimilation type	Dissimilation type
Enzyme activity ※ of nitrate reductase	Control	0.131
	NaCl-treated	0.182
		0.159
		0.970

※ NO_2 mmol/g-Cell · min

Table 3. Nitrate reduction by whole cell and each component

	Whole cell	Precipitate	Supernatant
Enzyme activity of nitrate reductase (NO_2 mmol/g-cell · min)	0.159	0.090	0.543

につき硝酸還元能を測定した。結果は Table 3 に示す。

細胞膜を多く含むと考えられる沈殿部が示す硝酸還元活性は、ほぼ生菌の示す硝酸還元活性に等しい。しかしながら、細胞質に相当すると考えられる上清部に非常に強い酵素活性が認められた。

このようなことから、少くとも異化型の硝酸還元活性が必要な状態で生育した菌は、細胞膜部分に一部酵素活性を持ち、生菌体状態で 1 価カチオンにより活性化した場合、この膜系の酵素とどのような関係があるのか現在検討中である。

4. 要 約

異化型、同化型の硝酸還元能の保持する菌を 1 価カチオンにより活性化したところ、異化型の菌のみが活性を増大せしめた。

この異化型菌を破碎し、活性の分布を調べたところ、細胞膜系に於る酵素の活性が、異化型の硝酸還元能と関係があるのではないかと推定した。

5. 謝 辞

本研究にあたり菌を送って下さった京都大学工学部上原梯次郎教授に深謝する。また、実験に協力してくれた宇部高専加藤美都子助手、卒業生副島俊明君、城野孝二君、岡崎正行君、広本義孝君に深謝する。

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. 30, 241 (1976)
- 3) Julian Biotech. and Bioeng. 18 (1976)
- 4) 山岡邦雄, 宇部工業高等専門学校研究報告, 26 (1980)
- 5) Yushi Nimura et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 140 (1979)

(昭和56年9月16日受理)