

# 脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) における 硝酸還元活性について (その2)

山岡 邦雄\*

Nitrate reduction by *Pseudomonas denitrificans* (Part 2)

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.

Monovalent cation could activate nitrate reductase of *Pseudomonas denitrificans* which was grown under dissimilatory condition. In this study this activation was related to nitrate reductase which existed in membrane.

## 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。<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 *P. denitrificans* は異化型硝酸還元酵素を必要とする状態で増殖された生菌は主として1価カチオンで、その生菌状態での硝酸還元能が著しく増大することを認めた。<sup>4),5),6)</sup>

この硝酸還元能の増大が菌体中の酵素の存在部位とどのように関連しているかを調べたところ、細胞膜に存在する酵素が活性化されている可能性を認め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 Nishimura<sup>7)</sup>, 山岡<sup>9)</sup>らの方法に従った。即ち、菌の保存及び前々培養は Yeast Extract 0.5 g NaCl 0.6 g を 100 g 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> 10 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, Na<sub>3</sub>-Citrate 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg, CaCl<sub>2</sub> 20 mg, 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> 6 H<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。(PH 7.0)

培養は前々培養については振とうし、前培養及び本培養については、好氣的培養の場合は同様に振とうし、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30°Cで19 hr 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 (4000 rpm 10 min) 33 mM のリン酸緩衝液 (PH 7.0) で3回洗浄後、同緩衝液に懸た

\*宇部工業高等専門学校工業化学科

くさせた。

c) 硝酸還元酵素活性測定

Nishimura<sup>6)</sup>らの方法により  $\text{NO}_3^-$  イオンを還元して生じた  $\text{NO}_2^-$  イオンの量を測定した。なお、還元剤としては、methyl viologen を使用した。使用する菌体量は、580 nm における濁度 O.D.=1 の菌体濃度で 1.64 mg Cell/ml であるとした。

なお、酵素活性は (produced m mol  $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) で示した。菌体を Homogenate にした場合の酵素活性も基準を菌体重量とした。

d) 菌体の破碎及び細胞膜分離

対数増殖期にある菌体を、集菌洗浄後、33 mM リン酸緩衝溶液 (PH 7.0) に懸濁し O.D.=1 の菌体濃度で超音波破碎を行った。(0°C, 50W, 5 min) この破碎液を遠心分離 (5°C, 4000 rpm, 10 min) し沈殿の細胞膜と上清の細胞質に分離した。

e) 菌体及び菌体成分のカチオンによる活性化

本培養後集菌、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 1 hr 振とうする。振とう後集菌し、33 mM リン酸緩衝溶液で洗浄し懸濁液とする。この菌体をカチオン処理菌体とした。

又 d) の方法で得られた細胞膜と細胞質については各々を各種カチオン濃度に懸濁し、30°C で 1 hr 同様に振とうし懸濁液をカチオン処理細胞膜、カチオン処理細胞質とした。但しこの報告に於てはカチオンとしては  $\text{Na}^+$  を用いた。(NaCl を使用した)

### 3. 結果と考察

a) 一価カチオンによる硝酸還元能の活性化

異化型条件で増殖させた菌体を集菌、洗浄後各種濃度

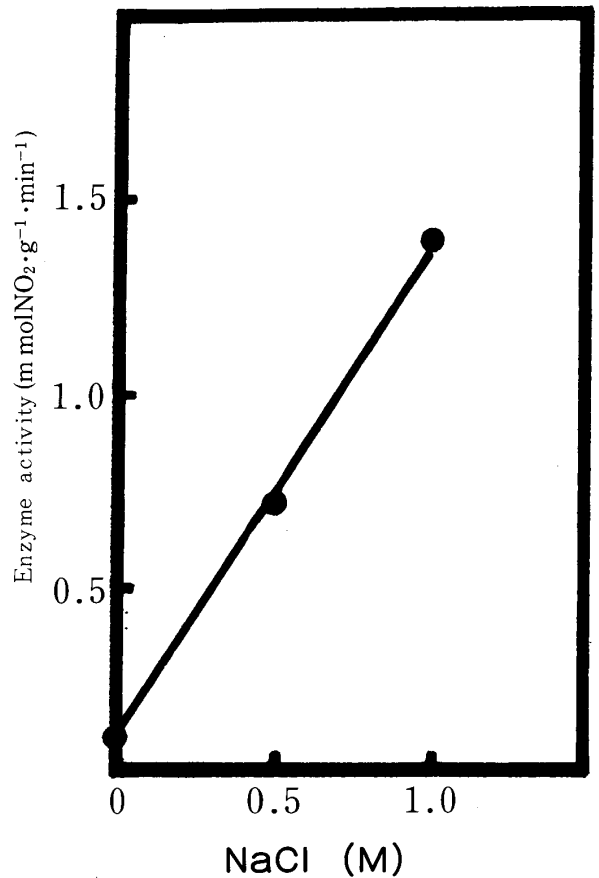


Fig. 1 Increase in nitrate reduction by NaCl

の NaCl 溶液に懸濁してカチオン処理菌体を得た。その処理菌体の硝酸還元能の変化を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 に示すように、硝酸還元能はカチオン濃度に比例して著しく上昇した。

b) 各種菌体の硝酸還元能の比較

*P.denitrificans* は、その培養条件により、異化型硝酸還元酵素のみを必要とする菌体、同化型硝酸還元酵素の

Table 1 The reducing activity of each cell

Growth condition	Nitrate reductase	Control	Assimilation type	Dissimilation type	Assimilation + Dissimilation type
	Gas phase	Air	Air	He	He
N-Source	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	$\text{NO}_3^-$	
Enzyme activity of nitrate reductase	0.012 *	0.043	0.179	0.178	

\* m mol  $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

みを必要とする菌体、同化、異化いずれの硝酸還元酵素も必要としない菌体、及び同化、異化酵素両者を必要とする菌体の4種を培養することが可能である。

この4種の菌体の硝酸還元酵素活性を調べたところ、**Table 1** のようになった。

異化型、及び同化型、異化型両者を必要とする菌の硝酸還元活性が著しく高く、同化型、及びいずれの酵素も必要としない菌体の硝酸還元活性は殆んど測定されなかった。即ち、異化型の酵素を必要とする菌体の酵素活性のみが高いことが認められた。

#### c) 同化型、異化型菌のカチオンによる活性化

異化型菌における硝酸還元能が一価カチオンにより活性化されることを認めたので同化型菌における硝酸還元能に対する一価カチオンの影響を調べ **Table 2** に示した。

異化型菌が著しくその硝酸還元能を増大させているのに比べ、同化型菌のそれは、殆んど影響をうけなかった。

このことは同化型菌の場合その酵素系が異化型菌とは異った部位に存在する為か、あるいは活性化されにくい機構にくみ込まれている可能性を示している。

#### d) 菌体中の硝酸還元酵素の分布

菌体中における硝酸還元酵素の分布を調べる目的で菌体を集菌、洗浄後、超音波処理により破碎し、細胞膜と細胞質に分離した。同化型菌、異化型菌について調べた

ところ **Table 3** に示すような結果を得た。

異化型、同化型菌は共に whole cell 状態での測定値が、細胞膜のそれに近似している。又細胞質における活性は異化型菌に於て著しく高く、異化型菌の場合どのような作用をしているのか興味のあるところである。

#### e) カチオン処理菌体中の硝酸還元能の分布

異化型菌をカチオン処理後、超音波処理により破碎し細胞質と細胞膜に分離した。各部に於ける硝酸還元能は **Table 4** に示す。

whole cell での活性化倍率には及ばないが、細胞膜はかなりの酵素活性の増加を示した。一方、細胞質の方は、やや上昇したものの細胞膜の活性上昇には及ばなかった。

**Table 3** の結果と合わせて考えれば、whole cell における硝酸還元能はほぼ細胞膜の硝酸還元能に等しく、whole cell 状態でのカチオンによる硝酸還元能の上昇は、細胞膜に存在する硝酸還元能の上昇と結びついている可能性が考えられる。

#### f) 細胞膜、細胞質のカチオン処理

**Table 3,4** の結果からこの菌体の一価カチオンによる硝酸還元能が細胞膜の硝酸還元能と結びついている可能性を認めたので、異化型菌を超音波処理により破碎し、細胞膜と細胞質に分離後、各部をカチオンで処理し、硝酸還元能の増減を調べた。結果は **Table 5** に示す。

**Table 2** Activation of the dissimilation and assimilation type cell

Nitrate reductase	Control	Activated	$\frac{\text{Activated}}{\text{Control}}$
Dissimilation type	0.116*	0.604	5.2
Assimilation type	0.081	0.140	1.7

\* m mol NO<sub>2</sub> · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>

**Table 3.** The reducing activity of the cell, membrane and cytoplasm

Nitrate reductase	Whole Cell	Membrane	Cytoplasm
Dissimilation type	0.071*	0.064	0.209
Assimilation type	0.035	0.023	0.047

\* m mol NO<sub>2</sub> · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>

破碎した菌は酸化等変化をうけやすいため、カチオンによる上昇は大きいものではなかったが、細胞膜における上昇は細胞質における上昇をやや上廻った。

この結果は、異化型菌における硝酸還元能のカチオンによる活性化が細胞膜に存在する硝酸還元酵素の活性化と結びついている可能性も示している。

一方、細胞質に存在する酵素活性が高いこと、及びその酵素活性が一価カチオンにより活性化されないことは異化型菌の生理との関係において、これからの興味ある研究対象である。

#### 4. 要 約

*P.denitrificans* は硝酸還元を異化型条件にして増殖せしめるとその菌はカチオンにより硝酸還元能を活性化し得る。この活性化は菌体の膜に存在する硝酸還元酵素と何らかの関連があることを示した。

#### 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悌次郎助教授に深謝する。又実験に協力してくれた宇

部高専助手加藤美都子助手、卒業生赤岸賢治君、江見和浩君に深謝する。

#### 参 考 文 献

- 1) 山中健生 生化学 VOI 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 Hever and z. Plaut Physiol. plant. 43 (1978) (307~312)
- 5) 山岡邦雄 宇部工業高等専門学校研究報告 26 (1980)
- 6) 山岡邦雄 宇部工業高等専門学校研究報告 28 (1982)
- 7) Yushi Nishimura Biochem, Biophys. Res. Comm. 87, 140 (1979)

(昭和57年9月6日受理)

**Table 4.** Reducing activity of membrane and Cytoplasm which were obtained from activated cell

	Control Cell	Activated Cell	$\frac{\text{Activated Cell}}{\text{Control Cell}}$
Whde Cell	0.095*	0.396	4.2
Membrane	0.072	0.198	2.8
Cytoplasm	0.216	0.392	1.8

\* m mol NO<sub>2</sub> · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>

**Table 5.** Reducing activity of activated membrane and Cytoplasm

	Control	Activation by NaCl	$\frac{\text{Activation}}{\text{Control}}$
Whole Cell	0.081*	0.111	1.4
Membrane	0.075	0.104	1.4
Cytoplasm	0.190	0.203	1.1

\* m mol NO<sub>2</sub> · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>