

脱窒菌 *Pseudomonas denitrificans* の酸素呼吸に 関する研究 (part 1)

加藤美都子*・山岡邦雄*

A study of respiration of *Pseudomonas denitrificans* (part 1)

Mitsuko KATO, Kunio YAMAOKA

Abstract

A study of denitrification and respiration by the cells is worth notice for its genetics and water waste treatment. We studied the effects of cations on nitrate reductase in the cells. Moreover, the influences of cations on respiration by the cells were investigated.

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として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もたれるものである¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

我々は脱窒菌である *Pseudomonas denitrificans* を用いて、その硝酸還元機構の制御および活性化等を目的として実験を行っている。その結果 1 価カチオンにより *P. denitrificans* の硝酸還元能が著しく増大することを認め⁵⁾。また 1 価カチオンで処理した菌体内の 1 価カチオン分布について報告した⁶⁾。この菌のエネルギー獲得系としては嫌氣的条件下での硝酸呼吸系と好氣的条件下での酸素呼吸系がある。硝酸還元に対する 1 価カチオンの促進効果は認められたが、この菌が同時に保持している酸素呼吸能に対するカチオンの影響については不明のままである。そこで 1 価カチオン処理菌体を用いて 1 価カチオンの酸素呼吸に対する効果についても検討したので以下報告する。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

Pseudomonas denitrificans ATCC13867

(2) 菌体培養条件

基本的には山岡ら⁵⁾の方法に従った。菌体は対数増殖期にあるものを用いた。

(3) 酸素呼吸測定法

① 菌懸濁液の調整

硝酸呼吸条件下で培養した対数増殖期の菌体を $0.033 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ トリス緩衝液で集菌洗浄後 (PH 7.0) 同緩衝液に懸濁したものを菌懸濁液とした用いた。

② 菌体のカチオンによる前処理および硝酸還元酵素活性の測定

原則的に山岡ら⁵⁾の方法に従った。

③ 酸素呼吸測定用試薬および測定方法

基本的に基質として $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, NaCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, CaCl_2 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, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg を水で 1 l (pH 7.0) にした水溶液に菌体

*宇部工業高等専門学校工業化学科

および各種濃度の塩類を加えて呼吸測定に用いた。測定時に添加する塩類濃度は $\text{NaCl } 10^{-1} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$, $\text{MgCl}_2 \ 10^{-1} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$, $\text{AlCl}_3 \ 10^{-1} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$ になるように加えた。測定は大洋科学工業K.Kの生物呼吸測定用装置 (O_2 アップテターC型) を用いアクリル製の反応容器に、上記の基質0.2ml, 菌懸濁液1.0ml, 塩類等を添加する場合は、各濃度の溶液を0.2ml加え、水で全量を2.0mlとし、20%KOH溶液をしみ込ませた円型ろ紙 (直径1.9cm) を上ふたの内側に密着させ、攪はん子を入れてかたく栓をした。次に目盛り付き毛細管と接続し、30°Cの恒温槽へ入れた。攪はん開始約10分後に目盛り調整シリンダーを調節して、キャピラリー管内の0目盛りの位置に恒温水槽の水をセットし、他のキャピラリーについても一定時間後順次0セットを行った。すべてのキャピラリーが0に調節できた時点から測定を開始した。(およそ攪はん開始後10~13分後位で一定となる。) 5分置きに約40分間キャピラリーの目盛りを読んだ。キャピラリーの径は1.03mmであり、また菌の濁度が580nmでのOD=1.0の時菌懸濁液1mlを乾量にして1.64mgにあたるので、菌体の呼吸量は次式で表される。

$$\frac{\text{目盛りの読み} \times (1.03)^2}{\text{菌懸濁液の量}(\text{ml}) \times \text{濁度}(\text{OD at } 580\text{nm}) \times 1.64(\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})} = \text{酸素消費量}(\mu\ell) \cdot (\text{mg cells})^{-1}$$

④ 菌の濃度変化と酸素呼吸量の関係について

測定容器内の菌の濁度を0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 (OD at 580nm)と変化させ、その時の酸素呼吸量を測定した。

⑤ 塩化ナトリウムで前処理した菌体の酸素呼吸量の測定

0.25, 0.5, 1.0 $\text{mol} \cdot \ell^{-1}$ NaClで前処理した菌体を洗浄後0.033 $\text{mol} \cdot \ell^{-1}$ トリス緩衝液に懸濁し酸素呼吸量を測定した。この時同時にこの菌体の硝酸還元酵素活性も測定した。

⑥ 酸素呼吸測定時における塩類の影響

測定容器中に菌懸濁液, 基質, 水を入れさらに $1 \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$ のNaCl, MgCl_2 , AlCl_3 を加えて各々その酸素呼吸量への影響を調べた。

3. 結果と考察

(1) 酸素呼吸量の測定を決定するため容器中の菌体の濃度を変化させて酸素呼吸量を測定した。結果はFig. 1に示す。菌体の量が増すほど酸素吸収量も比例して多くなるが、測定開始後30~40分間ぐらい測定しなければな

らないことおよびマンオメーターの測定限界が30~40 $\mu\ell$ であることなどから通常では菌の濁度 (OD at 580nm) を1.0~2.0に調節することが適当だと認められた。

(2) *Pseudomonas denitrificans*は硝酸呼吸条件下でも酸素呼吸条件下でも増殖しうる。即ち、前者においては培地中に KNO_3 , NH_4Cl を加え嫌氣的条件下で培養し、後者の場合は培地中に KNO_3 (または NH_4Cl)を加え好氣的に振とう培養する。酸素呼吸条件下で生育した菌体は当然酸素呼吸することは考えられるが嫌氣的に硝酸呼吸条件下で生育した菌の場合、硝酸還元能は保持するが酸素呼吸についてもFig. 1に示す如く呼吸系の酵素の存在を示した。我々は硝酸呼吸条件下で生育した菌の硝酸還元酵素活性が菌体をNaCl溶液中に懸濁し、30°Cで1時間 incubateすることにより上昇することを報告した⁵⁾。

そこでこのNaCl処理を行なって硝酸還元酵素活性の上昇した菌体について更に酸素呼吸能を測定した。結果をFig. 2に示す。NaClの濃度が増すほど硝酸還元能は高くなるが、一方酸素呼吸量は急激に減少している。このことは Na^+ により硝酸還元能が活性化されるため硝酸呼吸が促進されその結果として酸素呼吸が低くなるのか、あるいは Na^+ によって酸素呼吸が抑さえられるため、硝酸呼吸が促進されるのかは、まだ解明していないが、互いに何らかの相関があると思われる。硝酸呼吸能と酸素呼吸能の制御の可能性が考えられるので他のカチオン (Mg^{2+} , Al^{3+})についても Na^+ と同様に検討した。即ち、硝酸呼吸条件下で生育した菌に MgCl_2 を添加すると硝酸還元能はほとんど変化せず、 AlCl_3 を加えると完全に阻害する傾向があるところから (Table 1) これらの塩類を酸素吸収測定時に加えて酸素呼吸量を測定してみたところFig. 3のような結果を得た。すなわち、結果として硝酸還元能を完全に低下させる AlCl_3 を添加した場合は酸素呼吸量が高くなっており一方硝酸還元能にあまり影響を与えない MgCl_2 を添加した場合は対照とほとんど差がなかった。このことは、前記のNaClの場合と同じ傾向を示すものである。即ち1価カチオンによる硝酸還元能の著しい上昇はその菌体中の酸素呼吸能の減少と関連しており、逆に硝酸還元能を完全に阻害する Al^{3+} は酸素呼吸能を上昇させている。また Mg^{2+} は硝酸還元能にも酸素呼吸能にも大きな影響を与えなかった。これらの各カチオンの硝酸呼吸、酸素呼吸に対する作用機構については、まだ不明であるが、カチオンが硝酸還元作用するのと連動した形で酸素呼吸に何らかの影響を与えていることが考えられる。

1価カチオンがまず硝酸還元能を上昇させ、そのために

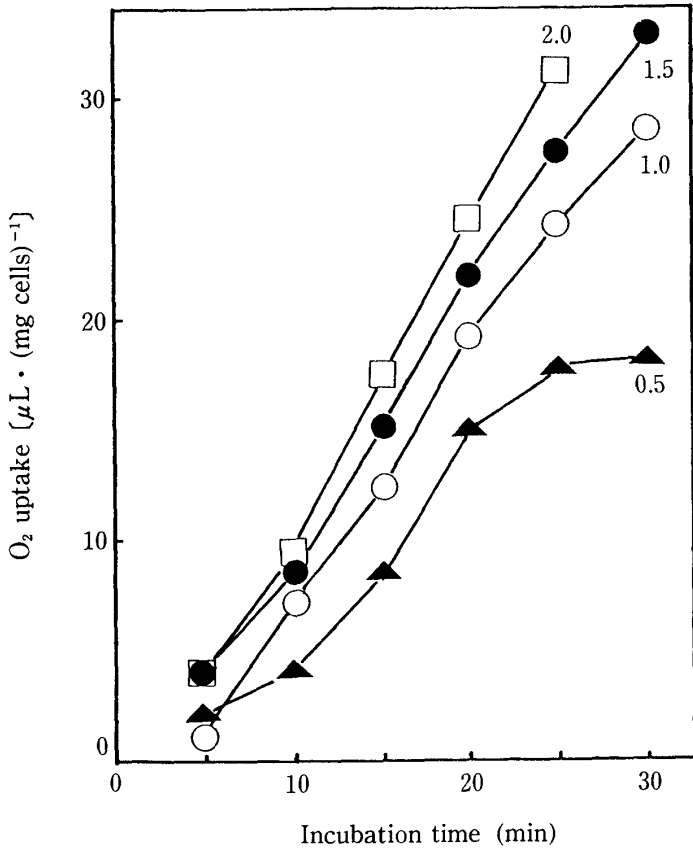


Fig. 1 The relation between O₂ uptake and cell concentration

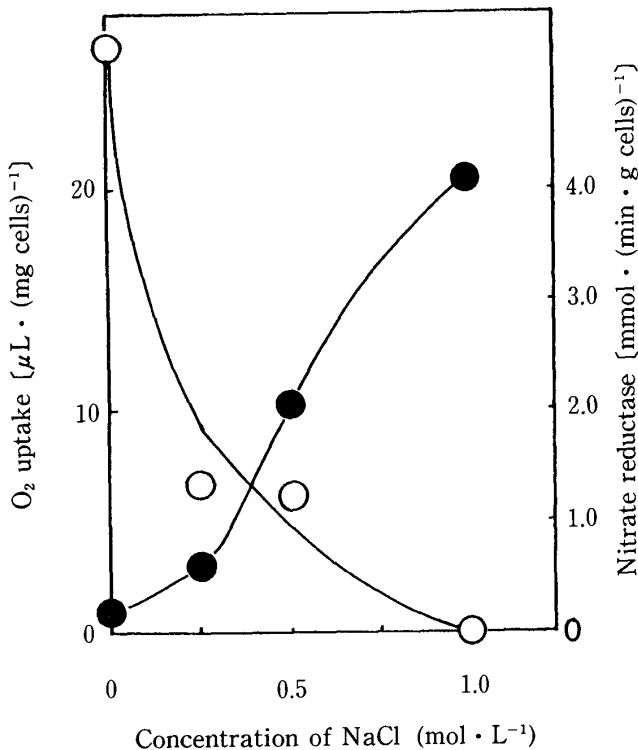


Fig. 2 Nitrate reductase activity and O₂ uptake by NaCl-treated cells

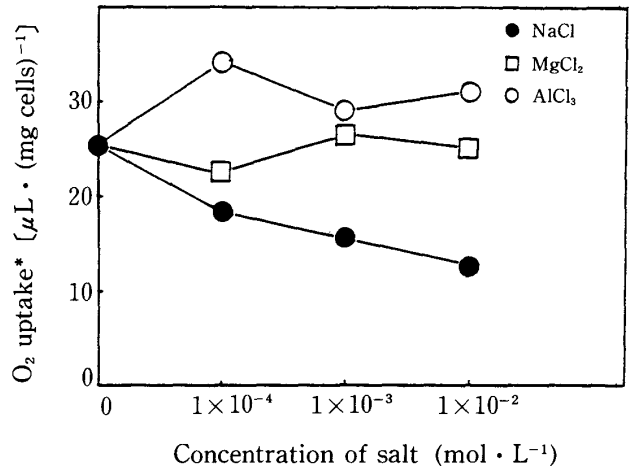


Fig. 3 The influence of salt on O₂ uptake by cells *incubated for 35 minutes

Table 1 Nitrate reductase activity in cation-treated cells

	Tris* ¹	NaCl* ²	MgCl ₂ * ²	AlCl ₃ * ²
Nitrate reductase [Relative activity]	100	316.3	96.5	2.2

*¹ Tris-HCl buffer (0.033 mol · L⁻¹ pH 7.0)

*² incubated in 0.5 mol · L⁻¹ solution

Table 2 O₂ uptake by the cells grown under aerobic condition

NaCl concentration (mol · L ⁻¹)	0	1 × 10 ⁻⁴	1 × 10 ⁻³	1 × 10 ⁻²
O ₂ uptake*	18.5	19.5	18.2	17.1

* incubated for 35 minutes

酸素呼吸を必要としなくなったのか、逆に酸素呼吸系を阻害したために硝酸還元能が上昇したのかその機構は不明である。そこで硝酸呼吸を必要とせず酸素呼吸だけを必要とする培地で菌体を培養し、その菌体の酸素呼吸測定条件下にNaClを添加した効果を検討してみた。この菌体は培養時にN源としてNH₄Clのみを与え、好氣的に培養しているので硝酸還元酵素活性は認められなかった。結果をTable 2に示す。硝酸呼吸を行なう菌体でNaCl効果を検討したFig. 3の結果と比べるとNaClの阻害効果は少ないことが認められた。このことはNaClの酸素呼吸に対する阻害効果というものは硝酸呼吸系が共存した時のみ起こり得る可能性を示している。

以上のことから、硝酸呼吸条件下で生育した菌も、酸素呼吸系酵素を保持していること、1価カチオンにより硝酸還元活性の増大した菌は酸素呼吸量が低下すること、Al³⁺についても硝酸還元能との負の相関があることが認められた。

4. まとめ

硝酸呼吸条件下で生育させた *P. denitrificans* を 1 価カチオンで処理し硝酸還元能を増大させた菌は酸素呼吸量が低下し、硝酸還元能が阻害された菌は酸素呼吸量が高まることが認められた。

謝 辞

本実験に当たり始終ご指導頂きました京都大学工学部上原助教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 山中健生：生化学，Vol 48, No5, (1976).
- 2) C. C. Delwiche and Barbara A Bryan Ann. Rev. Microbiol. 30, 241-62 (1976).
- 3) Nishio T., Koike I., Hattori A. Estimates of denitrification and in coastal and estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol 45, 444-450 (1983).
- 4) Storch T. A., Dunham V. L. Impact of iron discharges from wastewater treatments plants on algal growth and species composition. PB Rep. No. PB-81-120602, 107, (1980),
- 5) 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).
- 6) 山岡邦雄, 加藤美都子, 兼安気郎：宇部工業高等専門学校研究報告, 31 (1985).
- 7) 山岡邦雄, 加藤美都子：宇部工業高等専門学校研究報告, 33 (1987).

(昭和62年9月20日受理)