

# 脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) の硝酸還元酵素 に対する $Al^{3+}$ の影響

山岡 邦雄\*

## An effect of aluminium ion on nitrate reductase in *Pseudomonas denitrificans*

Kunio YAMAOKA

### Abstract

The study of denitrification by the cells is worth notice for its genetics and water waste treatment. We studied the effects of cations on nitrate reductase. Under the denitrifying condition, aluminium ion inhibited the cell growth. This inhibition depended on the decrease of nitrate reductase activity.

### 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<sup>1),2),3),4)</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活性化等を目的として実験を行っている。その結果一価カチオンにより *P. denitrificans* の硝酸還元能が著しく増大することを認め<sup>5)</sup>。また一価カチオンで処理した菌体内の一価カチオン分布について報告した<sup>6)</sup>。更に一価カチオンと膜との関連を考察するため、各種アルキルアンモニウム塩の効果を検討し、ある種のアルキルアンモニウム塩が硝酸還元酵素を活性化させることを認め<sup>7)</sup>。

そこで引続き我々は3価カチオンである  $Al^{3+}$  の硝酸還元酵素に対する影響について検討した。その結果  $Al^{3+}$  を異化型硝酸還元を必要とする培養条件下で添加した場合と同化型硝酸還元を必要とする培養条件下で添加した場合と

ではその阻害効果に差があることが認められた。即ち、異化型培養条件下で添加した場合の方が菌の増殖及び硝酸還元に対し大きな阻害効果を示すことが認められたので以下報告する。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用菌株

*Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867

#### (2) 培養条件

培養の基本的方法はNishimuraら<sup>8)</sup>の方法に依った。すなわち菌の保存及び前々培養はYeast Extract 0.5 g,  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  0.6 g を水100mlに溶かした培地を用いた。前培養および本培養には原則的に  $KNO_3$  10.0g,  $NH_4Cl$  1.0 g,  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  6.0 g,  $KH_2PO_4$  0.5 g,  $K_2HPO_4$  1.0 g,  $NaCl$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  10mg,  $CaCl_2$  20mg,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1.0 mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1.1mg,  $MnCl_2 \cdot 6H_2O$  0.1mg,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  2.0mg,  $NaM_0O_4 \cdot 2H_2O$  2.5mg,  $Na_2SeO_4 \cdot nH_2O$  0.2mg を水で溶かし 1 l にした培地を用いた (pH7.0)。

培養条件としては前々培養は30°Cで16時間振とうし、

\*宇部工業高等専門学校工業化学科

Table 1 The effect of some cations on nitrate reduction

cations	none	NaCl*	MgCl <sub>2</sub>	AlCl <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub>
Nitrate reductase ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}(\text{g cells})^{-1}$ )	122	303	103	14	1

\*cells were suspended in each salt solution (0.5M)

異化型硝酸還元菌培養のための前培養および本培養については培養フラスコ中の空気を脱気後He gasで置換し30°Cで16時間嫌氣的に静置培養をした。また同化型硝酸還元菌培養のための前培養及び本培養は上記培地成分からNH<sub>4</sub>Clをのぞいた培地で好氣的に行った。なお酵素反応実験に用いた菌体は対数増殖期のもので増殖度は580 nmでの濁度で測定した。なお菌体は0.033Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.0)で3回洗浄後、同緩衝溶液に懸濁させた。

### (3)硝酸還元酵素活性測定法

硝酸還元酵素活性の測定はNO<sub>3</sub>を還元して生じるNO<sub>2</sub>を発色させ比色定量する方法を用いた<sup>8)</sup>。

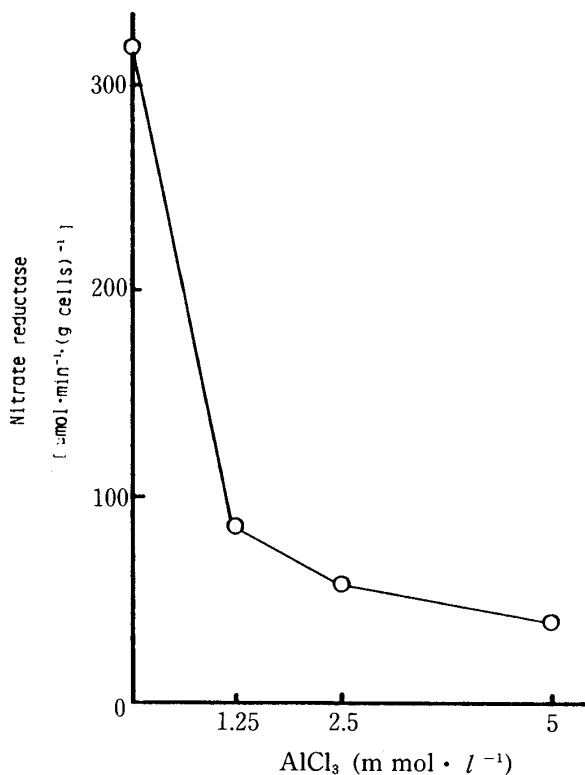


Fig. 1 The effects of Al<sup>3+</sup> on nitrate reductase in resting cells

### (4)菌体のカチオン処理方法

本培養後集菌洗浄した菌懸濁液に各種塩類水溶液を加え、30°Cで1時間静置した。その後集菌洗浄して得た菌懸濁液をカチオン処理菌体として用いた。なおカチオン処理に用いた塩類は全て塩化物を用いた。(NaCl, MgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>)

## 3. 結果と考察

### (1)各種カチオンの効果

すでに報告したように、異化型硝酸還元条件下で増殖させた*P. denitrificans*は一価カチオンで処理することにより、その硝酸還元能が著しく高まることが認められた<sup>9)</sup>。

そこで更に二価、三価カチオンの効果を同様に検討してみたところ、Table 1に示すように二価のMg<sup>2+</sup>は殆んど硝酸還元能に影響を与えなかったが三価カチオンであるAl<sup>3+</sup>やFe<sup>3+</sup>は著しく阻害した。この三価カチオンの効果は一価カチオンのそれと比べ対照的である。

このAl<sup>3+</sup>の効果はそれが基質などのとり込みに関与しているのか、酵素活性自体を阻害しているのかは不明である。しかしこのAl<sup>3+</sup>で処理した菌体を緩衝液でくり返し洗浄してもこの阻害効果は消えなかったことから少なくとも単に菌体周辺のイオン雰囲気を変化させたものではないと考えられる。

また、いずれの塩類もアニオンとしては塩化物イオンを含んでおり、アニオンの影響ではないと考えられる。そこでAlCl<sub>3</sub>の影響を各濃度別について検討した。(Fig. 1) この結果からAlCl<sub>3</sub>が低濃度でほぼ完全に硝酸還元を阻害していることが認められた。

### (2)Al<sup>3+</sup>の増殖に対する影響

Table 1の結果は菌懸濁液に各種塩類を加え処理した場合の硝酸還元酵素への影響を示したものである。そこで更に三価カチオンの菌の増殖度に対する効果を調べた。

Al<sup>3+</sup>の効果が膜系酵素と考えられる異化型の硝酸還元酵素とどのように結びつくかを検討するためにAlCl<sub>3</sub>を同

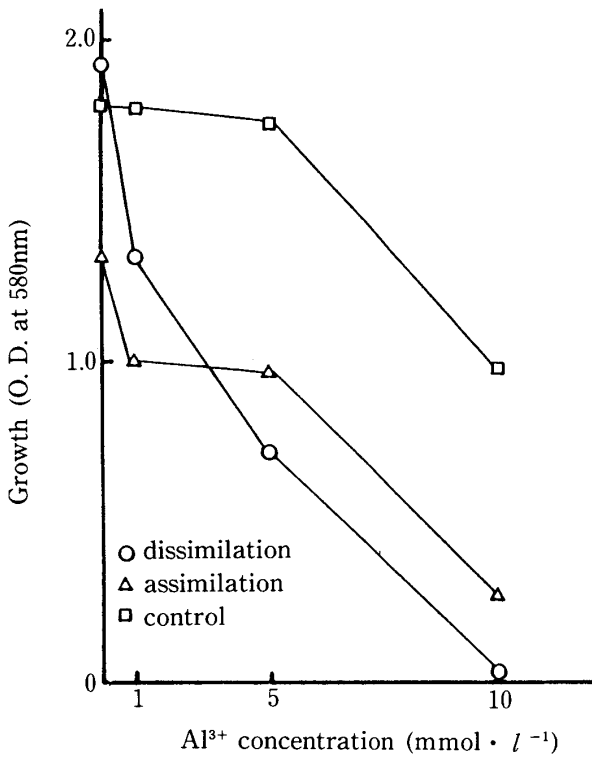


Fig. 2 The growth in the  $\text{Al}^{3+}$  medium

化型硝酸還元条件の培地と異化型硝酸還元条件の培地に加えその増殖度の差を調べた。結果をFig. 2に示す。Control菌は基本培地中から $\text{KNO}_3$ を除き好氣的に培養したものであり、増殖に際し異化、同化いずれの硝酸還元酵素をも必要としない培養条件である。同化型菌は基本培地から $\text{NH}_4\text{Cl}$ を除き好氣的に培養したものである。一方異化型菌は基本培地通り $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ を含み、嫌氣的に培養したものである。

Fig. 2に示すように $\text{AlCl}_3$ は異化型条件下で生育させた場合に特に著しい阻害作用を示している。これに対し同化型菌、対照菌は $5 \text{ m mol} \cdot \text{l}^{-1}$ まで殆んど増殖度は影響を受けていない。この異化型菌の増殖に対する $\text{AlCl}_3$ の阻害効果はTable 1, Fig. 1で示した硝酸還元活性に対する $\text{AlCl}_3$ の効果とどう結びつくかを更に検討した。

(3) $\text{AlCl}_3$ 添加培地で増殖した菌体の硝酸還元酵素活性培地中の $\text{Al}^{3+}$ の効果を検討する為1, 5,  $10 \text{ m mol} \cdot \text{l}^{-1}$ の $\text{AlCl}_3$ を添加した培地で培養した菌体中の硝酸還元能を調べた。結果をFig. 3に示すように対照菌は異化、同化いずれの硝酸還元も行なわないため硝酸還元活性は全く認められなかった。それに対し同化型条件下で生育した菌体中の硝酸還元酵素活性は $5 \text{ m mol} \cdot \text{l}^{-1}$ の $\text{AlCl}_3$ 添加に

も拘らず殆んど影響を受けていない。しかしながら一方異化型条件下で培養した菌は $\text{AlCl}_3$ の添加によりその硝酸還元活性が著しく低下している。このことはFig. 2に示した $\text{AlCl}_3$ の増殖に対する影響とほぼ同一の傾向を示しており、異化型条件下で $\text{AlCl}_3$ が増殖阻害をすることはその要因の1つとして異化型硝酸還元酵素活性の阻害が考えられるのではないかと推定出来る。 $10 \text{ m mol} \cdot \text{l}^{-1}$ における増殖阻害はcontrol菌についても認められていることから高濃度では更に他の要因が作用したと考えられる。

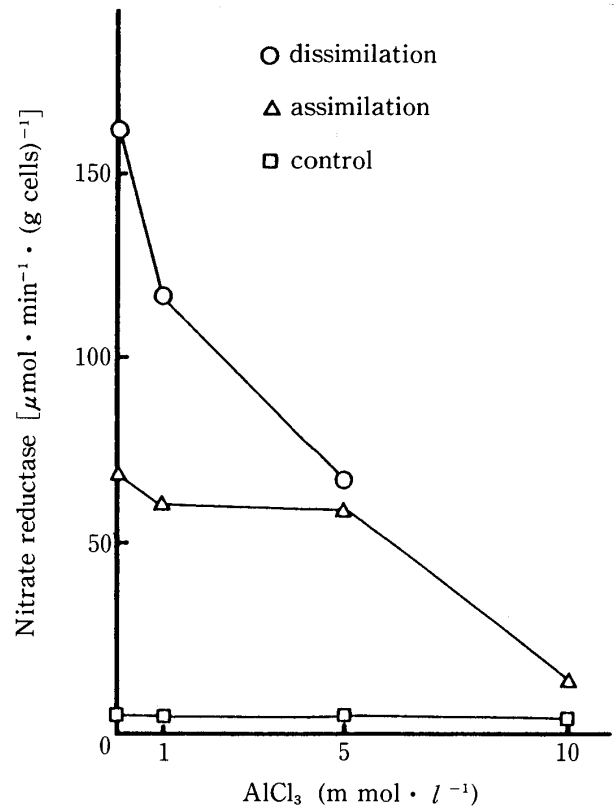


Fig. 3 Nitrate reductase activity in the cells which were grown in  $\text{Al}^{3+}$  medium

これに対して同化型条件下では加えられた $\text{AlCl}_3$ は $5 \text{ m mol} \cdot \text{l}^{-1}$ の濃度までは増殖度も硝酸還元酵素活性のいずれも大きな影響を受けていない。即ちこの濃度段階では同化型硝酸還元酵素活性は $\text{Al}^{3+}$ により大きな影響を受けないと考えられる。従来異化型の硝酸還元酵素は菌体の膜部分に存在し、同化型のそれは細胞質に存在すると考えられているが、 $\text{Al}^{3+}$ が膜に付着し異化型硝酸還元酵素活性を阻害したと推定出来る。

(4) $\text{AlCl}_3$ の酵素反応への影響

$\text{Al}^{3+}$ が異化型の硝酸還元酵素活性を阻害することが推

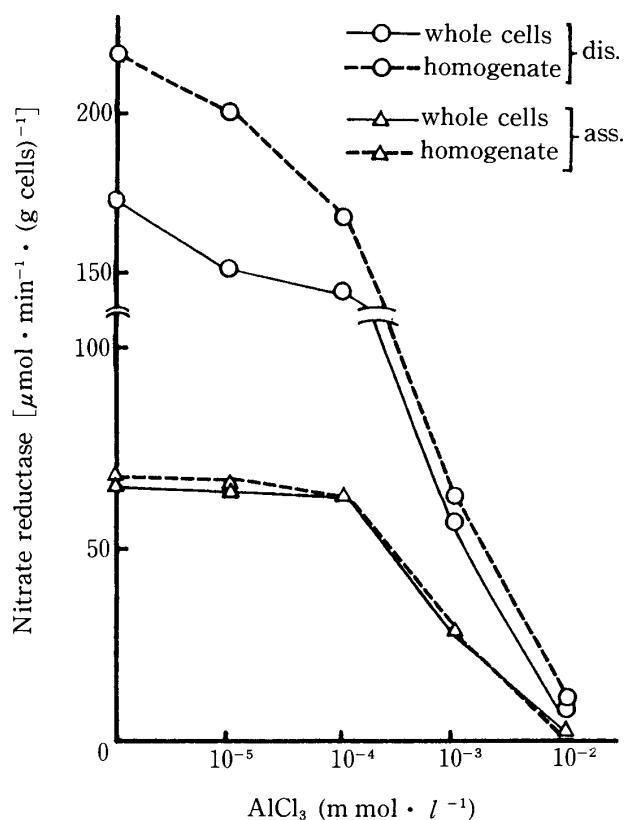


Fig. 4 The effects of Al<sup>3+</sup> on nitrate reductase

定されたので異化型条件下及び同化型条件下で培養した菌体での酵素活性測定時にAlCl<sub>3</sub>を加えてその影響を検討した。結果をFig. 4に示す。

同化型の酵素活性に対してはFig. 2, Fig. 3の場合と全く同様の傾向を示した。異化型の酵素活性に対しても傾きはやや鈍いものの同様であった。即ちAlCl<sub>3</sub>は異化型の硝酸還元酵素活性を同化型のそれより阻害し易く、そのことが異化型条件下での菌体の増殖を抑制する大きな要因の一つとなっていると考えられる。

#### 4. 要約

*P. denitrificans*をAlCl<sub>3</sub>を添加した異化型、同化型硝酸還元条件下で培養すると、その増殖が異化型の場合著しく阻害される。その培養菌体中の硝酸還元活性は異化型培養菌の場合に著しく阻害されており、このことが増殖を阻害する要因の一つとなったと推定出来る。

#### 謝 辞

実験にあたり、終始御指導して頂いた京都大学工学部上原悌次郎助教授に感謝致します。又研究を手伝ってくれた本校卒業生吉本賢志君、有意義な示唆を与えてくれた本校加藤美都子助手に感謝致します。

#### 文 献

- 1) 山中健生：生化学，Vol.48, No5, (1986).
- 2) C. C. Delwiche and Barbara A Bryan Ann. Rev. Microbiol. Vol.30, (1976).
- 3) Nishio T. et al. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 45, No2, (1983).
- 4) Storch T. A., Dunham V. L. PB Rep No.PB-81-120602 (1980).
- 5) 山岡邦雄：宇部工業高等専門学校研究報告，Vol. 26 (1980).
- 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，Vol.31 (1985).
- 7) 山岡邦雄，加藤美都子，三戸留美：宇部工業高等専門学校研究報告，Vol.32 (1986).
- 8) Yushi Nishimura et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol.87 (1979).

(昭和62年9月20日受理)