

脱窒菌における酸素呼吸、硝酸呼吸および硝酸同化の相互関係

山岡邦雄*・加藤美都子*・福重哲也**・蔵藤 登***

A study of the correlation between oxygen respiration, nitrate respiration and nitrate assimilation in denitrifying bacteria

Kunio YAMAOKA, Mitsuko KATO, Tetsunari FUKUSIGE, Noboru KURAFUJI

Abstract

There are two metabolic pathways for nitrate reduction by denitrifying bacteria; one is nitrate dissimilation to nitrogen gas and the other is nitrate assimilation to amino acids via NH_4^+ .

Dissimilatory nitrate reductase which catalyzes the initial stage of the metabolism has been studied extensively not only on the structure and function but also on the control of gene expression and enzyme activity.

This communication describes that the formation of dissimilatory nitrate reductase in the four different culture conditions.

1. 緒論

生物の呼吸に関して酸素呼吸、硝酸呼吸は生理学的、遺伝学的にはもちろんのこと、酵素発現の仕組み等に関してもおおいに興味の持たれるものである。しかしながら、酸素呼吸、硝酸呼吸、硝酸同化各々について単独の研究は多いが、各酵素系の発現、分解等の相互作用についてはその報告は数少ない。^{1),2)}

脱窒菌 *Pseudomonas denitrificans* はその培養条件に応じて酸素呼吸、硝酸呼吸（硝酸異化）および硝酸同化を行い得る。従ってこの菌の培養条件を変化させることにより、酸素呼吸、硝酸呼吸および硝酸同化の相互関係を検討することが可能となる。そこでこれら呼吸や硝酸利用に関する代謝の相互関係を知るために、菌の増殖が酸素呼吸（O R）、硝酸呼吸（D N R）酸素呼吸

と硝酸同化（A N R）硝酸呼吸と硝酸同化（A D N R）に依存する4つの条件を設定し、それらの条件の相互変換に対する菌の増殖と上記代謝の応答を調べた。今回はまずO RとA N Rからの条件変化に伴う菌の増殖と異化型硝酸還元酵素（DNRase）活性に注目した。またD N Rから酸素呼吸に切り替えた場合の変化についても検討した。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

Pseudomonas denitrificans ATCC 13867

(2) 培養方法

培養の基本的方法はNishimuraらの方法に従った³⁾。ただし、各種菌体培養の方法は以下の方法を用いた。

- ① O R（酸素呼吸）N源として NH_4^+ を用い、培養は好氣的に行った。
- ② D N R（硝酸呼吸）N源として NH_4^+ を用い、空気をHeで置換後、嫌氣的に培養した。ただし電子受容

*宇部工業高等専門学校工業化学科

**豊橋科学技術大学

***日東電工株式会社

体としてNO₃⁻を用いた。

③ ANR (酸素呼吸、硝酸同化) N源として NO₃⁻を用い、培養は好气的に行った。

④ ADN R (硝酸呼吸、硝酸同化) N源としてNO₃⁻を用い、空気をHeで置換後、嫌氣的に培養した。ただし、NO₃⁻は電子受容体としても作用させた。OR, ANR, ADN R条件下で培養した対数増殖期の菌体を無菌的に素早く集菌洗浄後上記4つの培養条件に移して、再び培養した。一定時間後(0, 1, 3, 5, 7, 9 h) 好氣的培養菌からは一定量を無菌的に採取し、嫌氣的培養菌からはHe gasで置換しながら同じく無菌的に採取した。

(3) 硝酸還元酵素活性測定

NO₃⁻より生ずるNO₂⁻の量を Nishimuraらの方法により測定した³⁾。

3. 結果と考察

まずOR条件下で生育させた対数期の菌体をOR, ANR, DNR, ADN Rの4条件に移し替えて増殖させた場合の硝酸還元酵素活性、および増殖度の変化について検討した。結果は、Fig.1.に示す。OR→ORについては増殖についての lag time は認められず、移し替えの際の菌の集菌洗浄等が菌の増殖に影響を与えていないことがわかった。OR→DNRの場合は増殖の lag time は5 hでOR→ANRの場合の3 hと大きな差が認められた。またOR→ADNRの場合の増殖の lag time がDNRの場合と同じ5 hであることから、硝酸同化、硝酸異化を共に行うADNRにおいては硝酸呼吸系酵素の合成が律速であることがわかる。

一方、OR→DNRの場合異化型硝酸還元酵素(DNRase)の発現は3 hから認められ、ある程度の蓄積後増殖に結び付くものと考えられた。またOR→ADNRの場合も DNRase の発現は同じく3 h後であることはADNRの場合同化型硝酸還元酵素(ANRase)合成も必要であることと考え合わせてANRase 合成とDNRase 合成は全く独立の関係で行われていると推定された。このことが先に述べたDNR, ADN Rの場合の lag time が近いことと結び付くものであると考えられた。

次に、OR→DNR変換の際、DNR移し替えの後3 hの時点で好氣的条件に変換し増殖とDNRase の変化を検討した。結果をFig.2.に示す。嫌氣条件を続けた場合はDNRase 活性は低下せず増殖も微増にとどまったが好氣条件に切り替えるとDNRase活性は著しく低下す

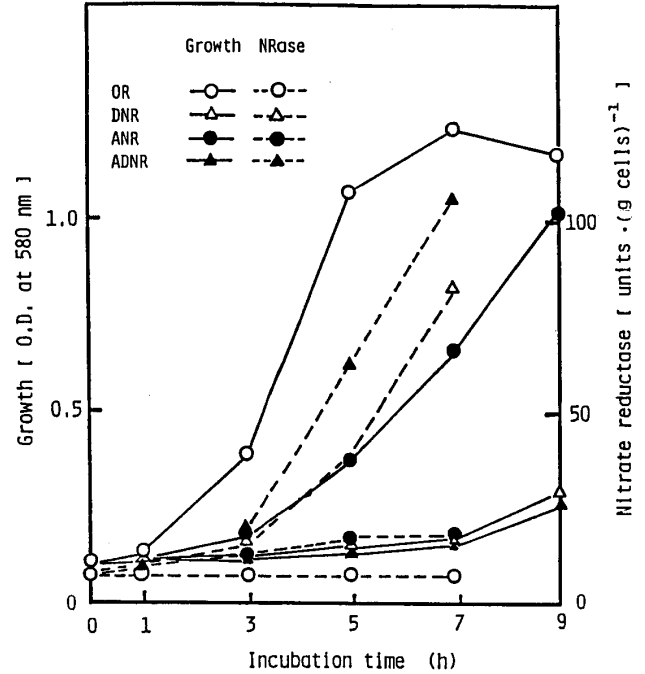


Fig.1. Time course of cell growth and nitrate reductase activity after the shift of culture conditions from OR to four different conditions indicated

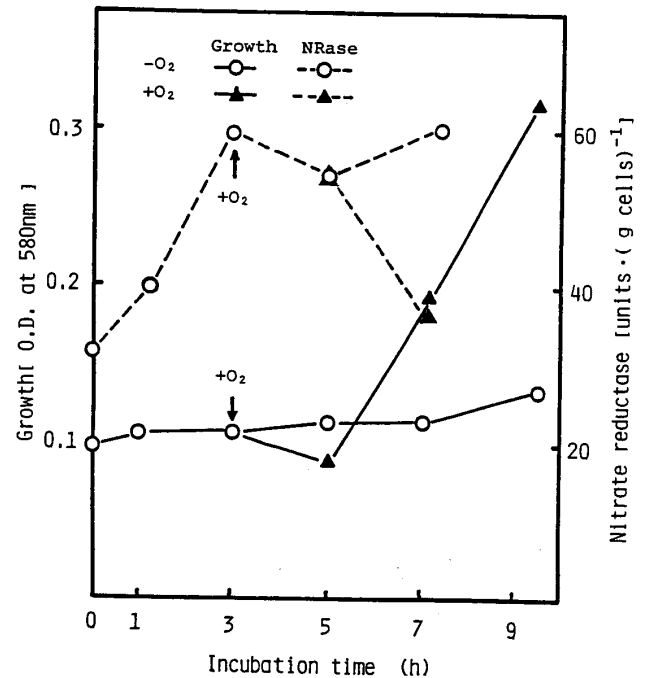


Fig.2. Changes in growth rate and nitrate reductase activity upon aeration in the course of adaptation to DNR from OR

する一方、増殖は逆に増大した。

このことは O₂による DNRase 合成の阻害を示していると同時に酸素呼吸系への切り替えの早さも認められ

た。また、このOR → DNRへの変化の後3 hで好気的条件下に変化させた場合におけるDNRaseのtotal activityの変化を調べたところFig.3.に示すような結果となった。すなわち、O₂によりDNRaseは阻害されないが合成は抑えられることが考えられた。

以上のことをORのかわりにANR条件から4条件への交換の場合について行ったが基本的には同じ傾向を示した(Fig.4.)。すなわちANR → ANR, ANR → ORの場合はいずれも酸素呼吸から酸素呼吸への変換であり、ANRは同化型硝酸還元酵素ANRaseも保持していると考えられるからlag timeがほとんどない状態で急速に増殖は増加した。一方、ANR → DNR, ANR → ADNRな場合はORからの交換と同じくかなりのlag timeを要している。この両者(DNR, ADNR)のlag timeに大きな差が認められないことは先に述べたDNRaseとANRaseが独立に出現するというを示唆するものである。

酸素呼吸条件から硝酸呼吸条件変化については以上の通りであるが、逆に硝酸呼吸条件から酸素呼吸条件への変換における各増殖、酵素活性変化について検討した。

DNRから4条件への変化をFig.5.に示す。DNR → ORへの変換が一番早く増殖を開始し、硝酸呼吸から酸素呼吸への変換はスムーズであることを示している。このことは前報の加藤ら⁴⁾による酸素呼吸能の測定結果とも一致している。即ち、前報ではこの菌をDNR条件下で生育させ、素早く集菌洗浄後O₂吸収を測定したところ、かなりのO₂吸収値を示した。これらのことからこの菌はOR, DNRいずれの条件において培養しても酸素呼吸系酵素は常に保持していると考えられる。

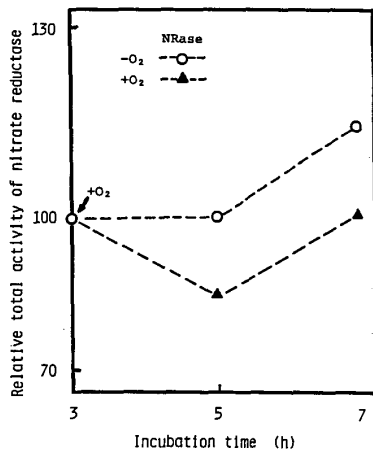


Fig. 3. Change in total activity of nitrate reductase upon aeration during adaptation to DNR from OR

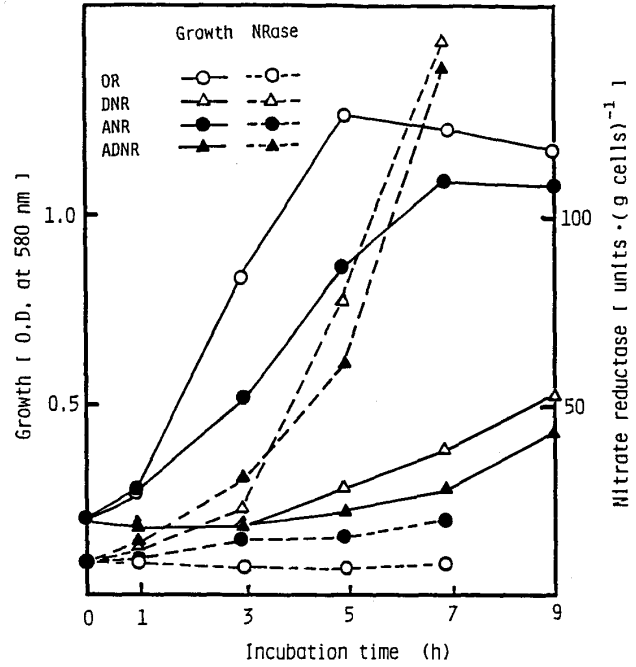


Fig. 4. Time course of cell growth and nitrate reductase activity after the shift of culture conditions from ANR to the four different conditions

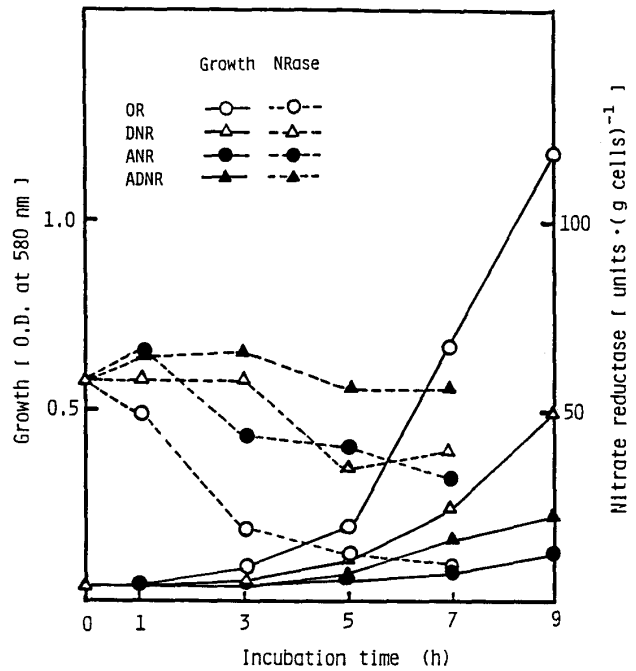


Fig. 5. Time course of cell growth and nitrate reductase activity after the shift of culture conditions from DNR to the four different conditions

またDNRが比較的早く増殖していることはDNRからの交換であることを考えれば十分うなずけることである。一方DNR → ANRへの変換においてANRの増殖が著しく遅れている。このことはANR条件下では酸素呼吸で硝酸同化を行うことを考えればANRaseの合成が大きく遅れている可能性を示している。この原因につ

いては検討中であるが DNRase 存在自体が ANRase 合成を阻害するのか、基質の NO_3^- が DNRase に取り込まれるために A N R の場合における増殖が遅れるのか不明である。

DNRase の発現、分解については DNRase と ANRase を酵素レベルで更に詳しく検討しなければならない。今回は DNRase を中心に述べたが、この菌における ANRase 活性測定を行い、相互関係についての解明を行いたい。

4. 要約

酸素呼吸、硝酸呼吸、硝酸同化を行い得る *P. denitrificans* の培養条件を 4 つに分け、その各々から 4 つの培養条件に切り替え、硝酸還元酵素活性と増殖との関連を調べた。その結果、酸素呼吸への変換はすぐ行われること、DNRase と ANRase は独立に出現する可能性のあることを認めた。

5. 謝辞

この研究に関し始終御指導頂いた京都大学上原悌次郎助教授に深謝致します。

6. 文献

- 1) Yushi Nishimura et al. Nitrite reduction with formate in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol. 87 (1979)
- 2) Florencio F. J. Vega J. M. Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* Vol. 21, No. 6
- 3) MacFARLANE G. T. Herbert R. A. Nitrate dissimilation by *Vibrio* spp. isolated from estuarine sediments *J. Gen. Microbiol* Vol. 128, No. 10
- 4) 加藤、山岡 脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) の酸素呼吸に関する研究 (part 1) 宇部高専研究報告 34 (1988)

(昭和63年9月20日受理)