

脱窒菌 *Pseudomonas denitrificans* の硝酸還元酵素 活性に対するトルエンの効果 (part 1)

山岡 邦雄*・加藤美都子*・兼安 気郎*

An effect of toluene on nitrate reductase activity in *Pseudomonase denitrificans* (part 1)

Kunio YAMAOKA, Mitsuko KATO, Kiro KANEYASU

Abstract

A study of denitrification by the cells is worth notice for its genetics and wastewater treatment. Nitrate reductase activity in the cells of *Pseudomonas denitrificans* grown under denitrifying conditions was markedly increased upon addition of monovalent cations to cell suspensions. This elevated nitrate reductase activity was retained in the membrane fraction.

In this report, an effect of toluene which has affinity for the membrane was examined.

細菌の膜処理に用いられるトルエンの効果を検討したので報告する。

1. 緒 論

生物のエネルギー獲得系の一つとして硝酸呼吸は非常に重要なものの一つである。この硝酸呼吸機構の解明及びその制御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もたれるものである。

従来、硝酸呼吸についてはその機構に関して多くの報告がなされているが、^{1),2),3),4)} 酵素活性そのものを上昇させることについての報告は殆どない。

我々は脱窒菌の一つである *Pseudomonas denitrificans* を硝酸呼吸条件下で生育させ、その硝酸呼吸に関与する硝酸還元酵素(NRase)の活性を1価カチオンを用いて上昇させることを報告している⁵⁾。

一方異化型の硝酸還元酵素は細胞の膜中に存在すると考えられるので1価カチオンと膜との関連が考えられた。そこで膜の疎水性基と親和力を持つと考えられ、一般に

2. 実験方法

(1) 使用菌株

Pseudomonas denitrificans ATCC 13867

(2) 培養方法

培養は基本的に Nishimura ら⁶⁾の方法に従った。

(3) 菌体のカチオン処理及びトルエン処理

カチオン処理は山岡ら⁵⁾の方法に従った。

トルエン処理は次のように行なった。硝酸呼吸条件下で培養した菌体を集菌洗浄後、33mM リン酸カリウム緩衝液(KPB), (pH7.0) に懸濁した(菌体濁度 OD_{580nm} ≒ 1.0)。この菌懸濁液に1% 相当のトルエンを添加し、ただちに20秒間激しく Mixer で攪拌後すぐに集菌、洗浄し菌懸濁液を得た。

この菌懸濁液をトルエン処理菌体とした。

*宇部工業高等専門学校工業化学科

(4) 硝酸還元酵素活性測定

生成する NO_2^- の量を Nishimura ら⁹⁾の方法により測定した。

なお、酵素活性は $\mu\text{molNO}_2^-(\text{g cells}\cdot\text{min})^{-1}$ で示した。また、菌体破碎液についての酵素活性値は基準を破碎前の菌体量とした。

(5) 菌体の破碎及び細胞膜の分離

対数増殖期の菌体を集菌、洗浄後 33mMKPB (pH7.0) に懸濁し、一定の菌体濃度 ($\text{OD}_{580\text{nm}} \approx 1.0$) で超音波破碎を行なった (0°C , 20K Hz, 1 min \times 5)。この破碎液を遠心分離 (4°C , 3×10^4 g, 3 h) し、沈殿物 (細胞膜) と上清 (細胞質) に分離した。

各分画は各々遠心分離前の容量に希釈し、以後の実験に用いた。

3. 結果と考察

硝酸呼吸条件下で生育させた菌体を 1M 塩化ナトリウム溶液で処理すると同時にトルエン処理を行なった。

又、トルエン処理を行なった後、更にカチオン処理を行ない、NRase 活性に対する効果を検討した。

結果を Fig. 1 に示す。

1価カチオンによる NRase 活性の上昇率に比べ、トルエンによる上昇率ははるかに高く、くり返し実験を行なっ

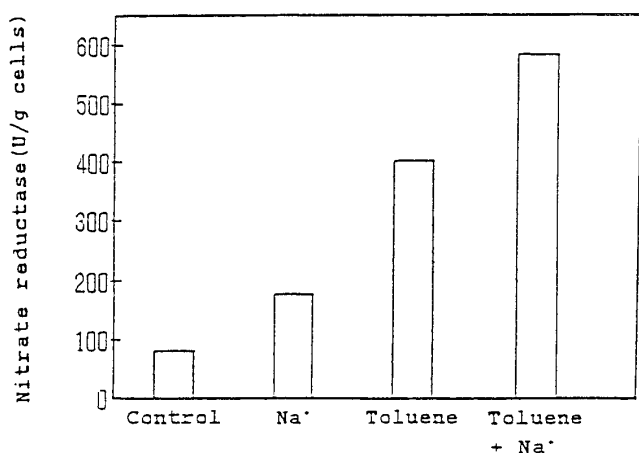


Fig. 1 Increase in nitrate reductase activity upon incubation of *Pseudomonas denitrificans* cells with NaCl or toluene
Toluene+Na⁺: incubated with NaCl after with toluene (Electron donor; methylviologen)

てもこの傾向は変わらなかった。1価カチオンは NRase 自身の活性を高めている事をすでに報告しているが⁹⁾, トルエンについてはその作用機構は不明である。

そこでカチオンの場合と同様に硝酸呼吸条件下で培養した菌体をトルエン処理し、NRase 活性を高めた菌体を破碎し、細胞膜と細胞質に分離した後、各分画の NRase 活性を測定した。結果を Table 1 に示す。

カチオン処理を行なった菌体の場合、その高められた NRase 活性は破碎後も高く保たれていることがわかっている。又、その活性の多くが細胞膜に局在していることも認められている⁹⁾。

トルエンで処理した菌体の場合もカチオンにおける場合と同様の傾向を示し、破碎後も NRase は高活性を保ち、その多くは細胞膜に存在していることが認められた。

このことはトルエンによる NRase 活性促進効果は1価カチオンの場合と同様に NRase 自身を活性化するものであると考えられる。又、異化型硝酸還元酵素は一般的に細胞膜に存在すると考えられていることからこのトルエンによる活性促進が細胞膜において著しいことを裏付けている。

NRase 活性を測定するさい、electron donor としては、Methyl viologen を用いている。Methyl viologen は細胞膜の中に入り NRase に直接作用していくものと考えられる⁷⁾。

Methyl viologen は細胞膜の疎水性基と親力があると考えられるので比較のため NRase の electron donor として用いられ、より親水性の高い formate を用いて同様の測定を行なった。結果を Table 2 に示す。

1価カチオンによる NRase の活性化とトルエンによるそれとの活性化倍率を比較すると Methyl viologen の場合は明らかに1価カチオンに比べトルエンの方が高い値を示しているが、Formate の場合は殆ど同じ倍率を示し

Table 1 Increase in the activity of membrane-bound nitrate reductase upon incubation of intact cells with toluene

| Samples | Nitrate reductase (U/ml culture) | |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | Control cells | Toluene-treated cells |
| Intact cells | 110 | 741 |
| 30000g pellet | 102 | 613 |
| 30000g supernatant | 24 | 382 |

Table 2 Effects of electron donors on the monovalent cation and toluene induced activation of nitrate reductase

| Electron donors | Nitrate reductase (U/g cells) | | | NaCl | Toluene |
|-----------------|-------------------------------|------|---------|---------|---------|
| | Conttol | NaCl | Toluene | Control | Control |
| Metylviologen | 75 | 216 | 483 | 2.9 | 6.4 |
| Formate | 12 | 38 | 43 | 3.2 | 3.6 |

た。このことは1価カチオンや Formate が共にトルエンに比べ親水性が高いことと考え合わせれば Formate が1価カチオンによる活性化レベルのみに関与したと推定できる。

このことはトルエンとカチオンの活性化機構の解明に糸口を与えるものと考えられる。

4. まとめ

硝酸還元条件下で生育させた脱窒菌 *Pseudomonas denitrificans* を1%トルエンで20秒間処理したところ、その硝酸還元酵素活性が著しく促進された。

又、その上昇した酵素活性の殆どは菌体の膜画分に存在することが認められた。

謝 辞

この実験にあたり、終始御指導していただいた京都大学工学部上原悌次郎助教授に深謝致します。

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) Yamaoka K, Kato M, Kamihara T. Activation by monovalent cations of dissimilatory nitrate reductase in the cells of *Pseudomonas denitrificans*. *Biochemistry International* Vol.16 No5 (1988)
- 6) Yushi Nishimura et al. Nitrite reduction with formate in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol.87 (1979)
- 7) S.T. Ferguson Denitrification: A question of the control and organization of electron and ion transport *TIBS* p354 (1987)

(平成元年9月25日受理)