

# 硝酸還元酵素活性に対する pH の影響

加藤美都子\*・兼安気郎\*・中原重浩\*\*  
山岡邦雄\*

## An effect of pH on nitrate reductase activity

Kato Mitsuko, Kiro Kaneyasu, Sigehiro Nakahara  
Kunio Yamaoka

### Abstract

Control of dissimilatory nitrate reductase in denitrifying bacteria is important not only in regulating nitrate respiration or metabolism but also in preventing the accumulation of toxic nitrite in the environment.

We have previously reported the control of nitrate reductase activity by monovalent cations. This paper describes an effect of pH on nitrate reductase.

Nitrate reductase

*Pseudomonas denitrificans*

*Escherichia coli*

pH

### I. 緒 論

脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) は有害な窒素酸化物を無害な窒素ガスにまで還元し、大気中に放出する働きをもっている。このことから公害対策や遺伝学の面で興味を持たれている。

脱窒の初段階には硝酸還元酵素 (DNase) が関与している。従ってこの DNase 活性を制御することは単に酵素の作用を解明するという点だけでなく、応用面でも重要なものである。

これまで *Ps. denitrificans* において、NaCl などの 1 価カチオン処理により菌体内の硝酸還元酵素活性が大き

く増大することを報告してきた<sup>1),2)</sup>。この 1 価カチオンの作用機構については不明の点が多い。そこで菌体表面の荷電状況との関連を調べる目的でカチオン処理時における pH を変化させ、1 価カチオン効果がどのように影響を受けるか検討した。また、これまで pH7.0 でカチオン処理を行なった際、NRase 自体が活性化されていることを確認しているが<sup>1),2)</sup> pH 変化に対してもこの点について検討した。さらに、同じ条件で DNase を持つ大腸菌 (*Escherichia coli*) においても pH の影響を検討した。

### II. 実験方法

#### (1) 使用菌株

*Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867, *Escherichia coli* K 12 両菌はいずれも大阪発酵研究所より購入した。

\*宇部工業高等専門学校物質工学科

\*\*協和発酵工業株式会社

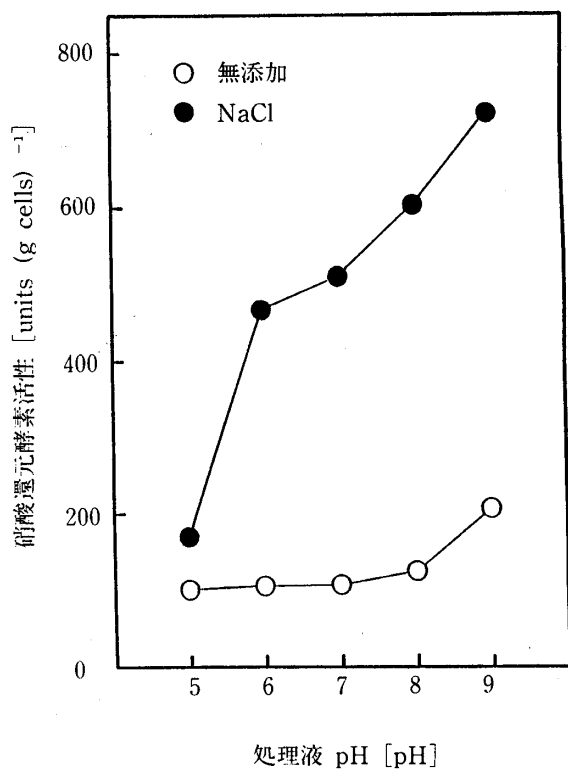


Fig. 1 NaCl 処理時の pH 変化と硝酸還元酵素活性 (*Ps. denitrificans*)

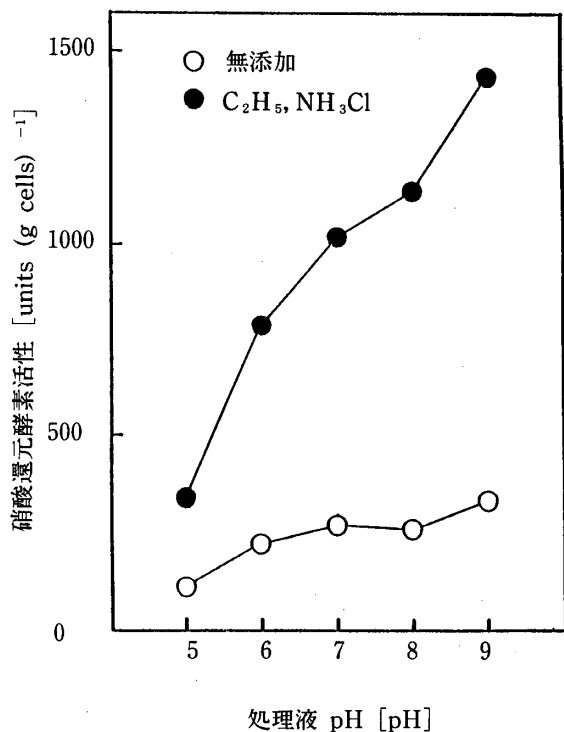


Fig. 2 塩酸エチルアミン処理時の pH 変化と硝酸還元酵素活性 (*Ps. denitrificans*)

## (2) 培養方法

- ① *Pseudomonas denitrificans* の培養方法は Yamaoka ら<sup>3)</sup>の方法に従った。即ち炭素源としてクエン酸ナトリウムを用い  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加培地で嫌氣的 (He 置換) 条件下で  $30^\circ\text{C}$ 、16h 培養した。
- ② *Escherichia coli* の培養方法は Guest ら<sup>4)</sup>の方法に従った。即ち、炭素源としてはグルコースを用い、 $\text{KNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  添加培地で嫌氣的 (He 置換) 条件下  $37^\circ\text{C}$ 、16h 培養した。

## (3) 菌体の各種 pH 溶液における前処理方法

菌体の前処理は原則的に Yamaoka ら<sup>3)</sup>の方法によった。即ち、集菌洗浄した菌体に試薬を溶解した各 pH 緩衝液を加えた。この菌懸濁液を  $30^\circ\text{C}$ 、1 h 静置後 pH7.0、0.033M リン酸カリウム緩衝液 (KPB) で 3 回集菌洗浄した。

## (4) 硝酸還元酵素活性測定法

DNRase 活性測定は原則的に Yamaoka ら<sup>3)</sup>の方法によった。即ち、加えられた  $\text{NO}_3^-$  から DNRase により生ずる  $\text{NO}_2^-$  量を比色法により測定した。

## (5) 菌体破砕液の調整法

前処理した菌体を集菌洗浄後、 $1.64\text{mg dry cells/mL}$  に調整した。この菌体懸濁液を超音波破砕した ( $20\text{KC}$ 、 $1\text{min} \times 5$ )

## III 結果と考察

*Ps. denitrificans* は硝酸還元条件下、即ち培地中に N 源として  $\text{NH}_4^+$ 、電子受容体として  $\text{NO}_3^-$  を加え嫌氣的に培養すると、その菌体は DNRase 活性を示す。この DNRase の至適 pH は  $7.0$  とされている<sup>3)</sup>。我々はこれまで、この菌体を 1 価カチオンで処理することにより

DNRase 活性を数倍に上昇させ得ることを報告している<sup>1),2)</sup>。

この菌の1価カチオン処理やDNRase活性の測定には従来pH7.0、0.033MKPBを用いてきた。そこで、まず1価カチオンでDNRase活性を上昇させた菌体のDNRase活性測定時における至適pHをしらべたところ、対照菌と同じpH7.0となった。次に1価カチオンの作用機構を探る目的でカチオン処理時におけるpHを同じKPBを用い5～9に変化させた。結果をFig. 1に示す。

NaClを加えない対照菌のDNRase活性は、くり返し実験でpH9.0でやや上昇する場合があったが、基本的にpH 5～9ではDNRaseに殆ど影響を与えなかった。

一方、NaClを0.5M添加した場合DNRase活性はpH5.0ではあまり上昇しないがpH8.0、9.0にすると著しい増加を示した。この傾向はKCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いた場合も同様であった。pHが7.0以上になると膜表面のリン酸基やカルボキシル基の解離が起きやすくなりNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>などが接近し易くなる為と考えられる。

前報<sup>2)</sup>で塩酸エチルアミンは膜の疎水性基との親和性が高いためによりDNRase活性に対し強い促進効果を示すことを報告している。そこでこの塩酸エチルアミンとpHとの関係を調べた。Fig. 2に結果を示すようにpHの影響はNaClの場合と全く同一であるが、pH8.0、9.0における効果はNaClの場合より更に大きなものとなった。

1価カチオンによるDNRase活性促進効果は、その菌体を破碎後も保たれていることから酵素そのものが活性化されたと推定した<sup>1),2)</sup>。pH8.0、9.0におけるNaCl効果の増大が酵素自体の活性化と結びついているか確認のため、pH5.0、7.0、9.0で処理した菌体を破碎し活性の変化をしらべた (Fig. 3)。

対照菌に比べNaCl処理した菌体破碎液の活性はpH9.0の場合、最も高く保持された。このことはNaCl処理のさいpH効果は同じくDNRaseの活性化そのものを引き起こしたと考えられる。

次にNaClとpHの効果との関連をしらべるためNaCl処理とpH変化を順序を変えて別々に行なった。即ち、まずNaCl処理をpH7.0、30℃、30min行ない、洗浄後pHを5.0、7.0、9.0に変化させ30℃、30min静置した場合と、逆にまずpH変化を行ない、洗浄後NaCl処理をさせた場合のDNRase活性変化を比較検討した。NaCl処理後pH変化させた場合をTable 1に示す。

pH7.0でNaClにより約3倍に上昇したDNRase活性はpH5.0での処理により半減した。一方pH7.0、9.0で

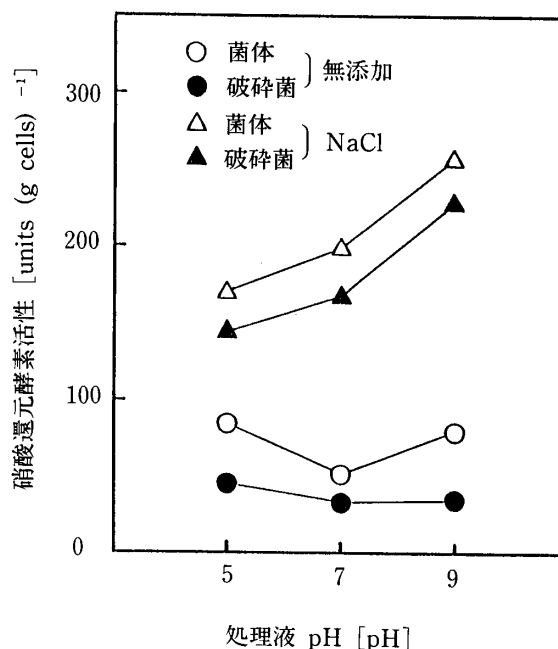


Fig. 3 各 pH での NaCl 処理菌体破碎液の硝酸還元酵素活性 (*Ps. denitrificans*)

Table 1 NaCl 処理後に pH 処理した時の硝酸還元酵素活性

添加物	酵素活性 [units(g cells) <sup>-1</sup> ]		
	pH 5	pH 7	pH 9
無添加	—	145	—
NaCl 処理	—	458	—
pH 処理	249	748	913

の処理では更に活性を増大させた。特にpH9.0の場合、約6倍までの活性上昇が認められた。逆の順序で処理した場合はNaClを後半に加えても、pH5.0、7.0、9.0に大きな差は認められなかった。

このことは、(NaCl → pH 変化)の場合は菌体内にNa<sup>+</sup>がとり込まれ、pH変化を行なった時Na<sup>+</sup>が共存している可能性が高く、pH効果はNa<sup>+</sup>との協同作用と考えられる。逆の場合pH変化のさいNa<sup>+</sup>が殆ど存在しないため、pH効果が認められないものと推定出来る。

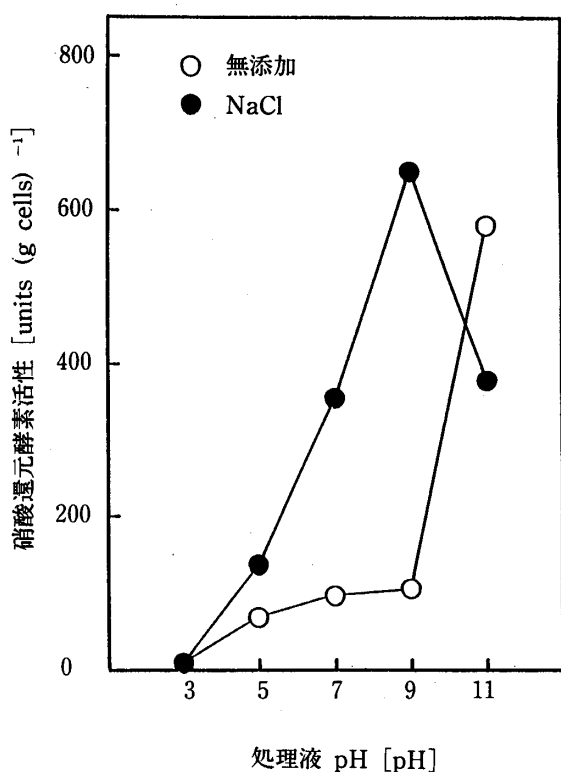


Fig. 4 Britton-Robinson 緩衝液の pH 変化と硝酸還元酵素活性 (*Ps. denitrificans*)

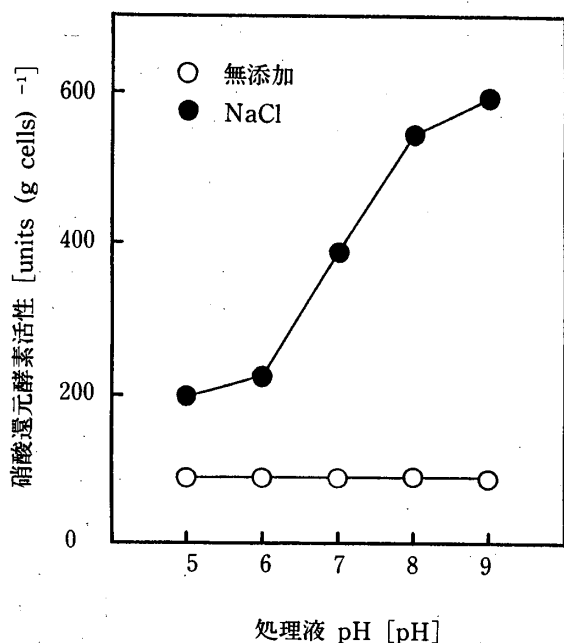


Fig. 5 リン酸緩衝液での NaCl 処理時の pH 変化と硝酸還元酵素活性処理液 pH (*E. coli*)

これまでの実験に於いて使用した緩衝液はすべて KPB であった。1価カチオン効果と緩衝液の関係を検討するため、他の緩衝液でその効果を調べた。トリス緩衝液 (pH5.0~7.0) Britton-Robinson 緩衝液 (BRB) (pH5.0~9.0) いずれの場合も KPB と殆ど同一の傾向を示した。ただし BRB の場合 pH3.0~pH11.0 の広い範囲で検討したところ、pH3.0 では酵素自体が活性を示さなかったが pH11.0 では対照菌の活性が著しく増大し NaCl 菌が逆に低下し、逆転するという大変興味ある結果が得られた。(Fig. 4)

以上の結果は、いずれも *Ps. denitrificans* について得られたものであるが、同じく DNRase を持った *Escherichia Coli* についても同様の検討を行なった。まず KPB を用いた場合の結果を Fig. 5 に示す。pH の効果は *Ps. denitrificans* の場合と殆ど同一傾向を示した。BRB を用いて pH3.0~11.0 の範囲で検討した場合も同様であった。

これらのことから、1価カチオンが塩基性条件下で存在するとき DNRase 活性を増大させ、環境における有害な  $\text{NO}_2^-$  蓄積させることがわかった。

このことは特に、腸内に存在する *E. coli* の場合  $\text{Na}^+$  により DNRase 活性が増大し、7.0 前後の腸内 pH で更に大きく活性化される可能性を示しておりその結果、腸内に有害な  $\text{NO}_2^-$  を蓄積させることになり、健康上非常に問題があると考えられる。

## 文 献

- 1) Kunio Yamaoka, Mitsuko Kato and Teijiro Kamihara (1988) Biochemistry international Vol.16, No.5.
- 2) Kunio Yamaoka, Mitsuko Kato and Teijiro Kamihara (1989) Agric. Biol. Chem. 53, 5.
- 3) Kunio Yamaoka (1980) 宇部高専研究報告 Vol.26
- 4) P. R. Lambden, J. R. Guest (1976) Journal of General Microbiology (93)

(平成 3 年 9 月 24 日受理)