

# システインとグルタチオンによる大腸菌増殖培地中の 亜硝酸蓄積制御

加藤美都子\*・成瀬 淳\*\*・山岡邦雄\*

## A Control of Nitrite Accumulation in Growth Medium for *Escherichia coli* by Cysteine and Glutathione

Mitsuko KATO・Atsushi NARUSE・Kunio YAMAOKA

### Abstract

Dissimilatory nitrate reductase (DNrase) in *Escherichia coli* cells grown under anaerobic conditions with  $\text{KNO}_3$  was activated upon incubation of cells with NaCl and inactivated with cysteine or glutathione (GSH). Cysteine was shown to exert its effect, at least in part, after conversion to GSH. The above mentioned results were obtained on resting cells. In this report, cysteine effect that decreases the amount of  $\text{NO}_2^-$  in the growth medium, was studied.

*Key words* : *Escherichia coli* Nitrate reductase Nitrite Cysteine Glutathione

### 緒 論

腸内に存在する大腸菌 (*Escherichia coli*) を、嫌気的  
条件、 $\text{NO}_3^-$  の存在下で培養すると、菌体内に異化型硝  
酸還元酵素 (Dissimilatory Nitrate Reductase :  
DNrase) を合成する。この DNrase は  $\text{NO}_3^-$  を  $\text{NO}_2^-$   
に変化させる硝酸還元を行う。還元の結果生成する  $\text{NO}_2^-$   
は、アミンと反応して発癌性のニトロソアミンを生成す  
ることが良く知られている。従って、この  $\text{NO}_2^-$  の生成  
量を制御することは、生体にとって極めて重要なこと  
である。

これまで、*E. coli* や *Pseudomonas denitrificans* 等

を NaCl などの 1 価カチオンで前処理することにより、  
DNrase 活性が著しく増大することを報告した<sup>1)2)</sup>。ま  
た、各種アミノ酸や、ビタミン等についても同様に検討  
したところ、システイン (Cys) のみ DNrase 活性を低  
下させることを認め、これについてもすでに報告した<sup>3)</sup>。

以上のことは、*E. coli* の静止菌体についての結果であ  
り、実際の腸内における菌の増殖を伴った条件下での、  
NaCl や Cys と  $\text{NO}_2^-$  蓄積量との関係については不明で  
ある。

そこで、本研究では、*E. coli* の増殖条件下における Cys  
の効果について主として検討した。また Cys を構成アミ  
ノ酸の 1 つとする生理活性物質であるグルタチオン (GSH)  
についても調べた。

その結果、Cys と GSH が *E. coli* の増殖条件下での  
 $\text{NO}_2^-$  蓄積を減少させるというきわめて興味深い結果が  
得られた。

\* 宇部工業高等専門学校

\*\* 株式会社 ほんぼ

## 実験方法

**菌体の培養** *Escherichia coli* K12 IFO 3301は、 $\text{KNO}_3$ と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む合成培地中で、 $37^\circ\text{C}$ で嫌氣的に培養する。CysやGSHは、無菌水に常温下で溶解したものを接種前に滅菌済みの培地に添加しておく。

**菌体の前処理** 対数増殖後期の菌体を集菌・洗浄後、各種アミノ酸やNaClを含む0.033Mリン酸カリウム緩衝溶液(pH 7.0)に懸濁後、 $30^\circ\text{C}$ 、1h静置する。その後、集菌・洗浄し、DNRase活性を測定する。

**DNRaseの活性測定** 西村ら<sup>3)</sup>の方法に従い、 $\text{NO}_3^-$ からDNRaseの作用により生成する $\text{NO}_2^-$ を発色させ測定する。酵素の1単位は1分間あたり $1\mu\text{mol}$ の $\text{NO}_2^-$ 生成量を基準とした。

**Cys, GSHの測定** 増殖培地を遠心分離して得た上清を $0.45\mu\text{m}$ のクロマトディスクで濾過し、そのろ液をサンプルとした。分析には、高速液体クロマトグラフィー(TOSOH)を用いた。分析条件として、カラムにはRE8000(Licrosorb, RP-Select  $5\mu\text{m}$ )、移動相は乙酸(pH 4.0)とメタノール、流量は $0.6\text{mL}/\text{min}$ 、温度は $30^\circ\text{C}$ とした。検出器としてTOSOHのUV-8000を用い、 $280\text{nm}$ で検出した。

## 結果と考察

硝酸還元条件下で生育させた菌体を、NaClや各種アミノ酸水溶液中で $30^\circ\text{C}$ 、1h静置して前処理を行った。

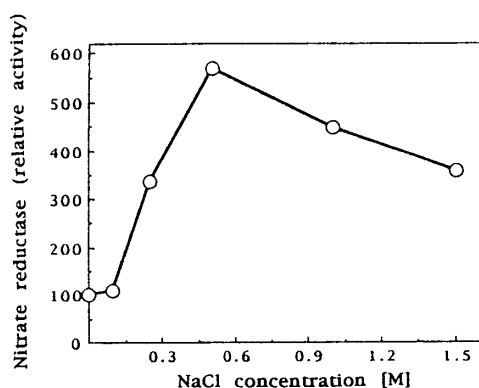


Fig. 1 Effects of NaCl concentration on cellular activity of DNRase

Cell grown under anaerobic condition was incubated with NaCl before enzyme assay. Cellular activity of DNRase was assayed as described in Methods.

NaClで前処理した場合、DNRase活性は大きく上昇し、 $0.5\text{M}$ で最大となった(Fig. 1)。一方、各種アミノ酸で前処理した場合、ほとんどのアミノ酸は、DNRase活性に大きな影響を与えなかったが、Cysのみ活性を低下させた(Table 1)。

Table 1 Effects of amino acids on cellular activity of DNRase

Amino acids (2mM)	Nitrate reductase [units / g cells]
None	18.9
Ala	16.6
Val	16.6
Leu	16.6
Ile	16.1
Gly	19.4
Ser	18.6
Thr	18.2
Met	18.6
Cys	11.0
Phe	17.6
Tyr	17.4
Try	18.3
Asp	18.7
Glu	19.6
Lys	18.6
Arg	17.0
His	17.8
Pro	18.2

Cells grown under anaerobic conditions were incubated with amino acids before enzyme assay. Cellular activity of DNRase was assayed as described in Methods.

NaClやCysで前処理した菌体を超音波処理により破砕し、膜構造をこわした菌体破砕液のDNRaseは、各々高活性、低活性を保持したことから、これらの前処理によりDNRase自身が各々活性化、不活性化されたと推定した。

一方、生理活性物質であるGSHは、その構成アミノ酸としてCysを含んでいる。そこでGSHをCysの場合と同様に検討したところ、Cysには及ばないものの、DNRase活性を低下させることを認めた。さらに菌体破砕液にNaClやCysを加えても、これらの活性化・不活性化は全く起こらなかったことから、これらの変化は膜の構造を介して生じるものと考えた。

しかしながら、ここまでの結果は、増殖を伴わない静止菌体で認められたものである。そこで実際、生育を伴った菌体に対するCysの効果について検討するため、増殖培地中にCysを $1\text{mM}$ 添加し、増殖と培地中への $\text{NO}_2^-$ 蓄積量についての経時変化を調べた(Fig. 2, 3)。

Cys  $1\text{mM}$ 添加では、増殖には全く影響を示さなかった。また、 $\text{NO}_2^-$ の培地中への蓄積量を調べたところ接種後9時間までは全く影響せず、10時間でCys添加の場合やや $\text{NO}_2^-$ 量を減少させるにとどまった。

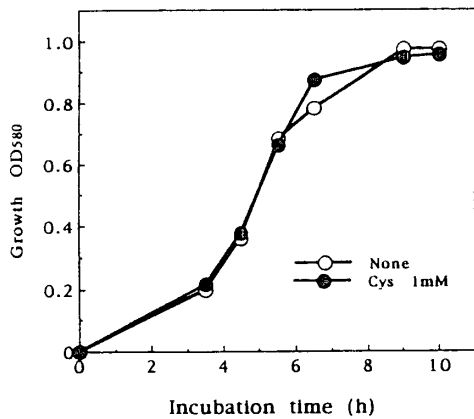


Fig. 2 Effects of cysteine (1 mM) on growth of *Escherichia coli*  
Cys (1 mM) was added to growth medium.

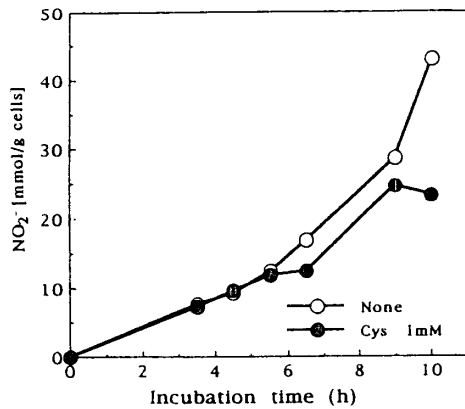


Fig. 3 Effects of cysteine (1 mM) on nitrite accumulation in growth medium  
Cys (1 mM) was added to growth medium. The amount of  $\text{NO}_2^-$  in the medium was measured.

次にGSHの添加効果を5 mMで検討したが、増殖、 $\text{NO}_2^-$ 蓄積量いずれに対しても全く効果を示さず、GSH無添加の対照と同じ傾向を示した (Fig. 4, 5).

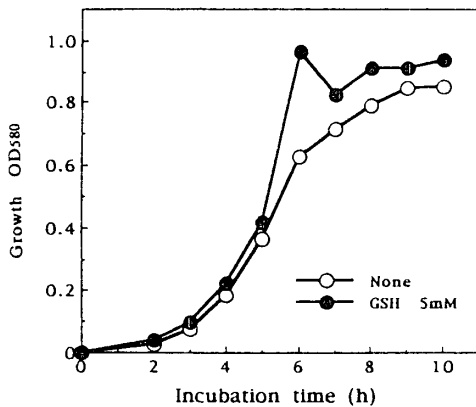


Fig. 4 Effects of glutathione (5 mM) on growth of *Escherichia coli*  
GSH (5 mM) was added to growth medium.

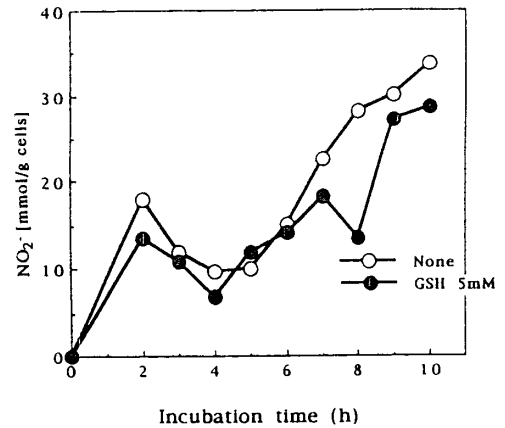


Fig. 5 Effects of glutathione (5 mM) on nitrite accumulation in growth medium  
GSH (5 mM) was added to growth medium. The amount of  $\text{NO}_2^-$  in the medium was measured.

CysとGSHが上記各濃度で効果を示さなかったので、CysとGSHの菌体への取込量を検討した (Fig. 6, 7).

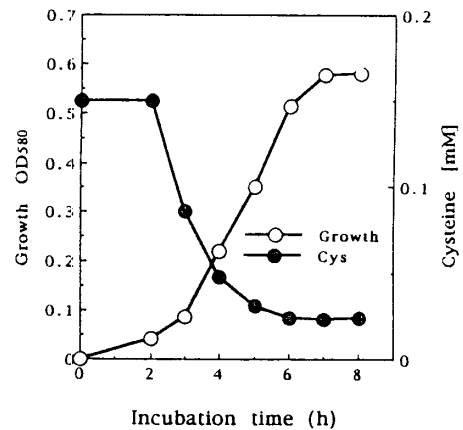


Fig. 6 Reduction of cysteine concentration in the growth medium  
Cys concentration was measured as described in Methods.

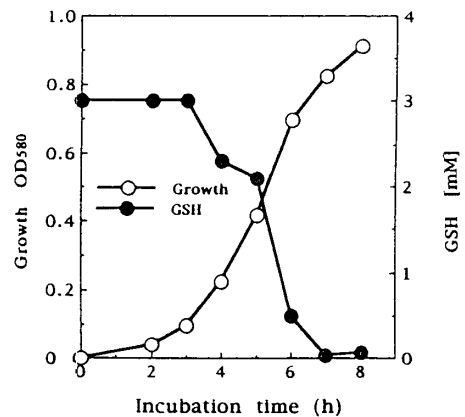


Fig. 7 Reduction of glutathione concentration in the growth medium  
GSH concentration was measured as described in Methods.

Cys, GSH 共に対数増殖後期までに、ほとんど菌体に取り込まれていることがわかった。このことは Cys も GSH もこの濃度では増殖や、 $\text{NO}_2^-$  蓄積量に影響しないものの、菌体で利用されている可能性を示している。そこで Cys をより高濃度の 5 mM 添加したところ、結果には示さないが、増殖度をやや低下させるものの、 $\text{NO}_2^-$  蓄積量を大きく減少させた。このことは、Cys が高濃度では増殖菌体に対しても影響をもつことを示している。

また、Cys を添加した培地中で生育させた菌体中の GSH 含量は、Cys を加えない対照菌のそれより高いことを、すでに報告している。これらのことは、Cys は菌体に取り込まれた後、少なくとも一部は、GSH に変化し、作用する可能性を示している。そこで、ともに低濃度の Cys 1 mM と GSH 1 mM を添加して菌体を培養した (Fig.

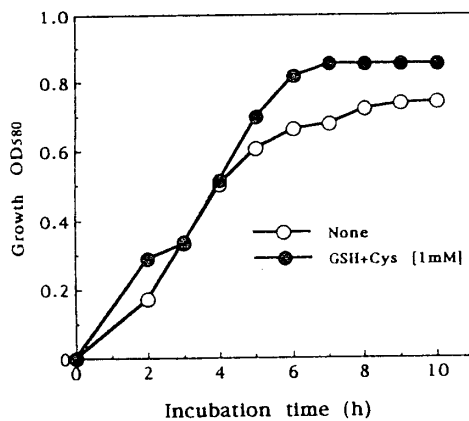


Fig. 8 Effects of cysteine (1 mM) and glutathione (1 mM) on growth of *Escherichia coli*

Cys (1 mM) and GSH (1 mM) were added to growth medium.

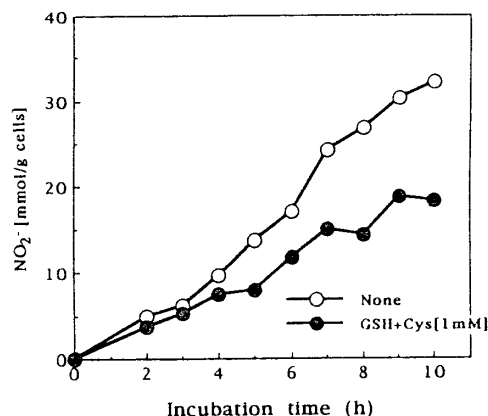


Fig. 9 Effects of cysteine (1 mM) and glutathione (1 mM) on nitrite accumulation in growth medium

GSH (1 mM) and cysteine (1 mM) were added to growth medium. The amount of  $\text{NO}_2^-$  in the medium was measured.

8, 9). 増殖度は Cys+GSH 添加培地の方が高く、逆に  $\text{NO}_2^-$  蓄積量は大きく低下した。このことは、増殖度を落とさず  $\text{NO}_2^-$  蓄積量を減少させる目的のためには、Cys と GSH が培地中に共存することが必要なのではないかと考えられる。

Fig. 2, 3 に示した様に Cys 1 mM の場合については接種後 10 時間後にはじめて  $\text{NO}_2^-$  蓄積量が下がっているが、これは Cys からの GSH 合成が一部完了したため Cys と GSH が共存し得たためと考えた。また Fig. 4, 5 の GSH 5 mM 添加の場合は GSH から Cys への分解が起こりにくいため、Cys が一定量存在せず、効果がなかったものと考えた。この点については、GSH の代わりに、GSH 合成経路の中間体である Glu-Cys を同様に検討したところ、全く効果を示さなかったことから裏付けられた。

Cys の添加により、 $\text{NO}_2^-$  蓄積量が減少したが、このことは硝酸還元そのものが抑制された可能性がある。実際 Cys 添加培地で増殖させた菌体の DNRase 活性は大きく抑制されていたが、一方、Fig. 8 に示す様に増殖度はむしろ増加している。このことはエネルギー獲得系として、硝酸還元には頼らない別の代謝系が、Cys 添加培地では機能した可能性があると考えられる。これらの点について更に検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) Kunio Yamaoka, M. kato and T. Kamihara. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (6) 995-997, 1994
- 2) Kunio Yamaoka, et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (10) 1601-1603, 1992
- 3) Y. Nishimura, T. Kamihara and S. Fukui. *Arch. Microbiol.* **124**, 191-195, 1980

(平成 7 年 9 月 25 日受理)