

大腸菌硝酸還元酵素の一価カチオンによる活性化：生理的電子供与体（蟻酸塩）で認められる顕著な効果

加藤美都子*、成瀬 淳**、山岡 邦雄*

An activation of dissimilatory nitrate reductase in *Escherichia coli* by monovalent cation : remarkable effect with physiological electron donor (formate)

Mitsuko KATO, Atsushi NARUSE and Kunio YAMAOKA

Abstract

Dissimilatory nitrate reductase (DNRase) in *Escherichia coli* cells, grown under anaerobic conditions with KNO_3 , is activated with NaCl. Its activation ratio is determined after washing of cells treated with NaCl. Enzyme assay is usually carried out by using methyl viologen (MV) as a reductant. However, from a practical point of view, formate should be used instead as a reductant because MV is an artificial dye. In this report, we use formate as a reductant at an enzyme assay and discuss its mechanism.

Key word: *Escherichia coli* Nitrate reductase Formate

緒論

*Pseudomonas denitrificans*や *Escherichia coli* は、嫌氣的で培地中に NO_3^- を含む、いわゆる硝酸還元条件下で増殖すると、菌体中に異化型硝酸還元酵素 (Dissimilatory nitrate reductase) を合成する。

DNRase は膜系酵素で、 NO_3^- を NO_2^- に還元する反応を触媒し、その際エネルギーを生ずる。 NO_2^- はアミンと反応し、発がん性のニトロソアミンを生成する。従って特に腸内に成育する *E.coli* の場合、その DNRase 活性を抑制することは、予防医学的にきわめて意義のあることである。

これまで、硝酸還元条件下で成育させた両菌を、NaCl など 1 価カチオンを含む水溶液中で静置する

とその DNRase 活性が数倍に上昇すること、またシステイン (Cys) を含む水溶液中に静置した場合 DNRase 活性は逆に低下することを報告した。この DNRase 活性の上昇や低下は、その処理菌体を破砕しても、それぞれ非可逆的に保持されていることから、DNRase 自身が活性化および不活性化されているものと推定した。

DNRase 活性の測定については、電子供与体としてメチルビオロゲン (MV) を用いることが一般的である。MV は DNRase に直接作用することにより還元作用を行うが、あくまで人工色素であり、菌体の代謝系に本来的に属するものではない。実際、菌体中における DNRase による NO_3^- の還元には、Formate が関与していると考えられる。Formate は Formate dehydrogenase (FDH) に結合し、さらに水素が膜系酵素を経由し、DNRase による NO_3^- 還元

* 宇部工業高等専門学校物質工学科

** 株式会社ほんぼ

関与する。

これまで報告してきた NaCl や Cys の効果は、いずれも還元剤として MV を用い、検討したものである。そこで、菌体内における DNRase 活性の実体を明らかにするために、還元剤として Formate を用い、まず NaCl の効果を検討した。

実験方法

菌体の培養 *Escherichia coli* K12 IFO 3301 の培養については、Guest ら¹⁾ の方法に従った。即ち炭素源としてグルコースを用い、 KNO_3 と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む合成培地中、 37°C で嫌氣的に培養した。

異化型硝酸還元条件下における経時変化測定 37°C で嫌氣的 (He ガス置換) 条件下で菌体を大量に培養し、接種後4時間~15時間まで、時間毎嫌氣的に培養液の一部を取り出し、その増殖度と NO_2^- 量および DNRase 活性を測定した。

菌体の前処理 各培養段階の菌体を集菌・洗浄後、NaCl を含む 0.033 M リン酸カリウム緩衝溶液 (pH 7.0) (以後 0.033 M KPb) に懸濁し、 30°C で 1 h 静置した。その後 0.033 M KPb で集菌・洗浄し、DNRase 活性を測定した。なお、無洗浄の前処理菌の場合は静置後の集菌・洗浄をせず、菌体懸濁液のまま DNRase 活性を測定した。

菌体の破砕法 0.033 M KPb の菌体懸濁液を OD_{580} で正確に調整し、氷水で周囲を冷却しながら超音波破砕装置で1分間、20 KC で処理した。その後、1分間冷却し、この操作を5回繰り返す、計5分間破砕した。また、細胞膜と細胞質の分離は、この菌体破砕液を、 $30,000\text{g}$ で2時間、超遠心分離にかけ、それぞれを分取した。

DNRase の活性測定法 測定は原則的に、Yamaoka ら²⁾ の方法に従い、加えられた NO_3^- から DNRase の作用により生成する NO_2^- 量を比色法により測定した。還元剤として MV と Formate を使用した。なお Formate の場合、反応液中の Formate 濃度は 50 mM である。酵素の単位は1分間当り $1\mu\text{mol}$ の NO_2^- 生成量を基準とした。

結果と考察

1. MV, Formate 系の経時変化 従来 DNRase 活性測定のための還元剤として用いてきた MV に替えて、Formate を用いるに際し、菌体の各増殖段階で、両還元剤を使用した場合の DNRase 活性の変化を調べ

た。Fig. 1 に MV 系、Fig. 2 に Formate 系の DNRase 活性変化と、菌の増殖変化を示す。

MV 系は、増殖の初期から中期、後期にかけて、やや上下に変動するものの、かなり高い活性を保持している。このことは、少なくとも DNRase 自体は、硝酸還元条件下での増殖の全域にわたって、菌体に常に一定量存在している可能性を示している。一方 Formate を用いた場合、その活性は対数増殖初期において著しく増大し、その前後で急激に低下している。活性値は、MV の場合に比べると低く、もっとも活性が高い対数増殖初期の値も、MV のそれに及ばなかった。

Ingledeew ら³⁾ は *E. coli* の DNRase に対する MV, Formate の関与について報告している (Fig. 3)。

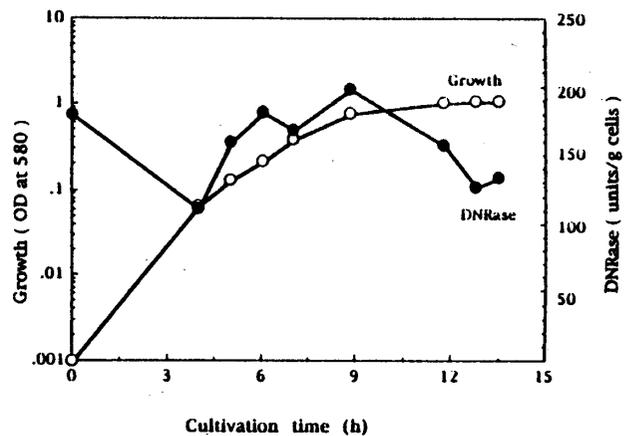


Fig. 1 Time-course of DNRase activity during cultivation depending on the electron donor; MV

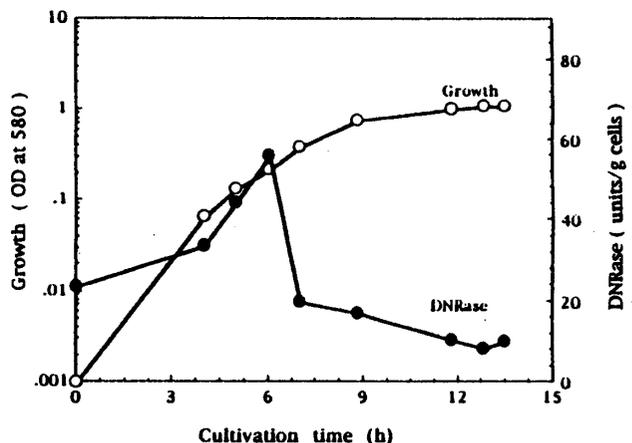


Fig. 2 Time-course of DNRase activity during cultivation depending on the electron donor; Formate

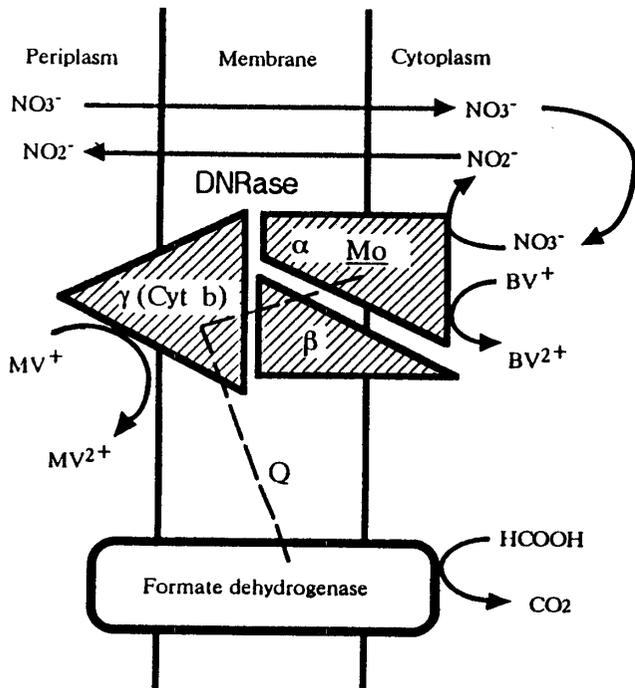


Fig. 3 Spatial organization of the *E. coli* DNRase and its associated electron transport chain

Ingledeu W., J. and Poole R., K. : *Microbiol. Rev.* (1984)

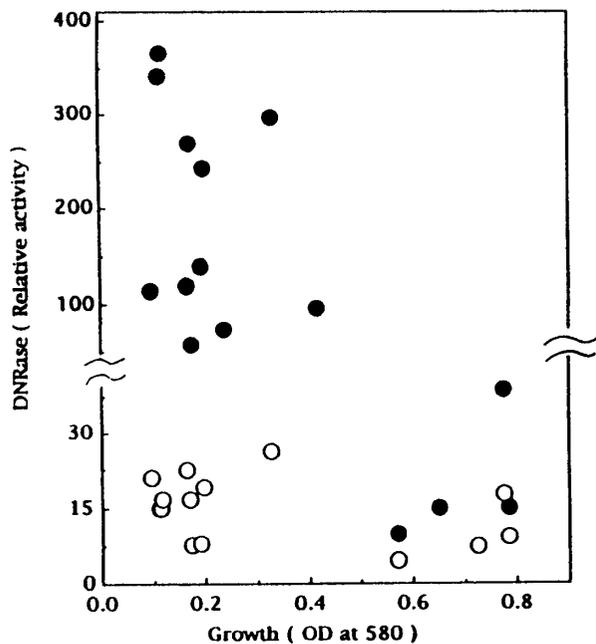


Fig. 4 NaCl-induced activation of DNRase in the course of growth : Difference in its extent depending on electron donors, MV (○) and formate (●). NaCl-treated cells were washed with 0.033M KPB before enzyme assay.

Table 1 NaCl-induced increase in DNRase activity assayed with formate as electron donor and the retention of the increased activity in the membrane fraction

Enzyme sources	DNRase (units/g cells)	
	Control cells	NaCl-treated cells
Intact cells	2.6	873.7
30,000g Pellet	16.0	255.3
30,000g Sup.	1.6	42.0

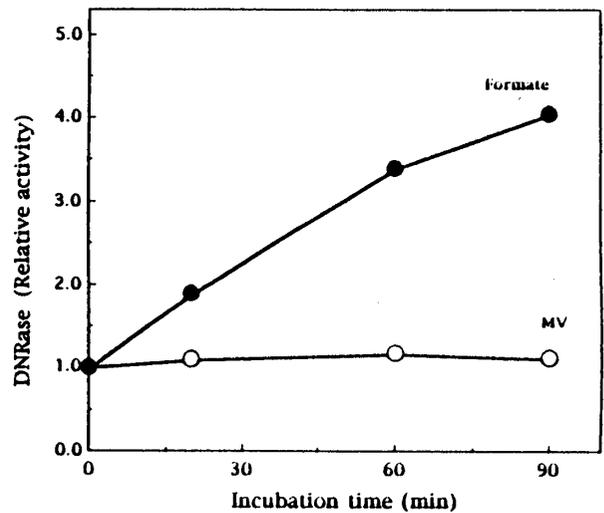
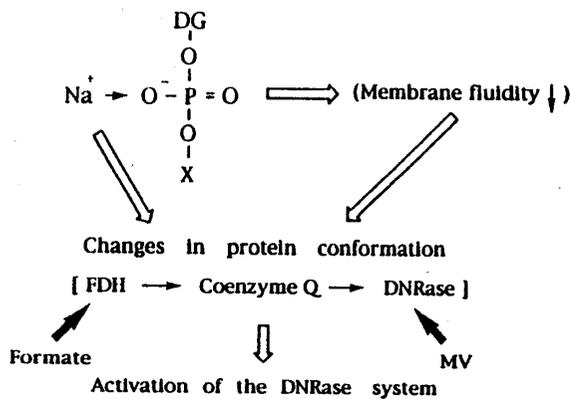


Fig. 5 DNRase activity in the cells that were not washed after incubation with NaCl

Table 2 Effect of washing of NaCl-treated cells on DNRase activity assayed with formate as electron donor

Treatment of Cells	DNRase activity (units/g cells)	
	Control cells	NaCl-treated cells
Washing in KPB by centrifugation as usual	3.0	140
Washing in KPB by filtration	3.6	155
Washing in Water by centrifugation	2.5	129
No washing	3.5	28.8
No washing (resuspended after centrifugation)	1.8	31.3

1 NaCl-induced DNRase activation



2 Lower effect of NaCl-treatment observed in unwashed cells

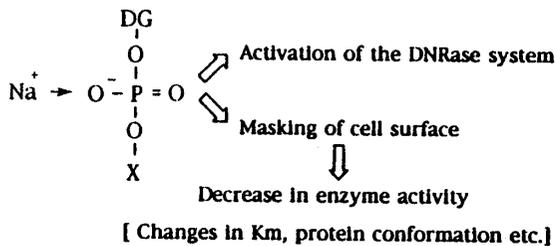


Fig. 6 Possible mechanism of NaCl-induced DNRase activation and of the apparent reduction of the activation in unwashed cells

MVがDNRase自体に直接関与するのに比べ、FormateはFDHに結合し、さらに膜内の酵素を経由し、DNRaseに作用する。このことと、Fig. 1, 2の結果を合わせて考えれば、DNRaseは常に存在することから、対数増殖初期においてのみ、FDHとDNRase間の酵素が合成、あるいは作用する可能性が考えられる。

いずれにしても、Formate系が実際の菌体内代謝において作用していると考えられることから、Formate系の測定方法を含めて、より詳しい検討が必要である。

2. NaClによるDNRaseの活性化 これまで、硝酸還元条件下で育成させた *E.coli* や *Ps.denitrificans* をNaClなど1価カチオンを含む水溶液中で、30°C, 1h静置後、菌体を0.033 M KPБ; (pH 7.0) で洗浄したところ、菌体のDNRase活性が著しく増大することを報告した。これらの結果は、すべてDNRase活性測定の際、還元剤としてMVを用いたものである。

そこで、菌体の代謝に実際関与すると考えられる

Formateを用いて、以下比較した。まず、NaCl水溶液中での前処理によるDNRase活性の変化を調べた。各種増殖度の菌体を用いMVとFormateで比較したところ、Fig. 4に示す結果を得た。MVの場合は、増殖の各段階において、10倍前後の値を示しているのに対し、Formateは、対数増殖の初期においてのみ、更に10倍程度高い活性値を示した。MVの結果が、DNRase自体の活性値を示すと考えるなら、Formateのそれは、更にFDHや他の膜酵素の活性変化と関連して考える必要がある。いずれにしても、NaClによるDNRaseの異常な活性化は、*E.coli*が腸内で育成することから、NO₂⁻の腸内高濃度蓄積を推定させるものであり、予防医学的にきわめて大きな問題を提起している。

3. NaCl処理菌体破砕液のDNRase活性 NaClによるDNRase活性上昇が、酵素自体の活性化と、どの様に関連しているかを確認するため、NaClで処理した菌体を超音波処理により破砕し、更に30,000 gで2時間遠心分離した上清と沈殿各々について、DNRase活性を測定した。結果をTable 1に示す。NaCl処理菌体の高いDNRase活性は、菌体破砕後、沈殿部に存在するものの、活性値はかなり低下した。表には示さなかったが、MVを用いた場合は、沈殿部に活性の殆どが保持されていた。

このことは、Formateの場合、菌体破砕によりFDHからDNRaseへの系がかなり破壊されるため、活性保持率が低いものと考えられる。一方、NaClで処理しない菌体を破砕し、その破砕液にNaClを加えてもDNRase活性は、全く上昇しなかった。このことは、NaClの効果発現のためには菌体の膜構造そのものが必要であることを示している。

4. 未洗浄菌のDNRase活性 NaClによる菌体の前処理は、菌懸濁液 (OD=1.0) に等量の1 M NaCl (in 0.033 M KPБ; pH 7.0) を加え、30°C, 60分静置後、0.033 M KPБ (pH 7.0) で2回洗浄し、菌体を0.033 M KPБに懸濁するものである。この懸濁液のDNRase活性が非常に高いことから、この活性化が60分の静置後、および菌体洗浄後の、どの段階で引き起こされているのか調べた。まず静置後、未洗浄状態菌のDNRase活性を菌懸濁状態のまま測定したところ、Formate系の活性は静置時間とともに上昇しているが、MV系は殆ど上昇が、認められなかつ

た。しかし、Formate 系の場合も洗浄菌のそれには遠く及ばなかった。この未洗浄状態では、溶媒の 0.033 M KPB 中には、0.5 M NaCl や、菌体からの溶出物が存在する。このことは NaCl はそれ単独か、溶出物と共に作用し、DNRase 活性の発現を、酵素活性測定時では抑制していることになる。しかし、NaCl を酵素活性測定時に加えても影響が見られないことから、NaCl が単独で抑制しているとは考え難い。次に、洗浄の際の遠心分離や、溶媒の効果を調べるため、前処理菌体洗浄を遠心分離、あるいは濾過を用いて行い、溶媒も KPB の他に純水を用いて調べた。結果を Table 2 に示す。遠心分離と濾過による活性化の差は、殆ど認められなかった。また、遠心分離した状態の上清と菌体をそのまま再懸濁しても、未洗浄菌の活性と差はなかったことから、遠心分離操作自体は、影響を示さないことが分かった。更に、洗浄後再懸濁する際の溶媒として、KPB と純水を用いたところ、純水の場合、やや活性は低いものの活性化そのものは、十分に高い値を示した。Fig. 5, Table 2 の結果を合わせて考えると、*E. coli* は、30 °C で 0.5 M NaCl に接触すると、その DNRase 活性を、数倍上昇させるが、周辺の溶媒を新しい KPB に置き換えると、更にその活性を十数倍増大させる。これは、静置中の溶液中への溶出物と NaCl が、菌体の DNRase 活性を抑制しているものと推定される。即ち NaCl は、Fig. 6 に示すように、菌体膜のリン酸基等に作用し、その膜の流動性を変化させ、DNRase 活性を上昇させるが、菌体からの溶出液と共に膜表面の masking 作用を行い、一方では DNRase 活性上昇を抑制しているものと考えられる。これらの点については更に溶出物の検討を含め、研究が必要である。

参考文献

- 1) P. R. Lambden, and J. R. Guest., *J. Gen. Microbiol.*, 93 173-176, 1976
- 2) Kunio Yamaoka et al. 宇部高専研究報告 26 61-64 1980
- 3) S. J. Ferguson., *Trends Biochem. Sci.*, 12 354 1987

(平成 8 年 9 月 24 日受理)