

大腸菌の硝酸還元酵素と酸素呼吸に対する野菜抽出液の効果

加藤美都子*、山岡邦雄*

Effects of Vegetable Extracts on Nitrate Reduction and Oxygen Respiration
in *Escherichia coli*

Mitsuko KATO, Kunio YAMAOKA

Abstract

In some bacteria such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas denitrificans*, dissimilatory nitrate reductase (DNRase) is induced when the cells are grown with nitrate under anaerobic conditions. We have reported that DNRase activities in *Escherichia coli* and *Pseudomonas denitrificans* were increased upon incubation of the resting cells with monovalent cations and in contrast, decreased with cysteine.

The conversion of nitrite to nitrosamine which is carcinogen is a serious problem. This fact promoted us to investigate the control of nitrite formation by *Escherichia coli* cells, since this bacteria has no activity of denitrification.

In this report, the effects of some vegetable extracts on monovalent cation effect on DNRase activity were investigated.

Furthermore, we recognized that monovalent cation affected oxygen respiration in *Escherichia coli*. Therefore, the effects of some vegetable extracts on oxygen respiration were studied, too.

Key word : *Escherichia coli* Nitrate reduction Oxygen respiration Vegetable extract

緒論

大腸菌 (*E.coli*) や脱窒菌などある種の細菌は、硝酸存在下嫌氣的に増殖すると菌体内に異化型硝酸還元酵素 (Dissimilatory Nitrate Reductase: DNRase) を生成する。

我々はこれまで *E.coli* や脱窒菌の静止菌体を NaCl など一価カチオンを含む水溶液中でインキュベートすると、菌体の DNRase 活性が著しく増大することを報告した¹⁾。また逆にシステインにより減少することも報告した²⁾。

この一価カチオンやシステインの効果は、環境に対する亜硝酸蓄積に対し、脱窒以外の新しいプロセスを提示

(1998年9月24日受理)

宇部工業高等専門学校 物質工学科

したことになる。また大腸菌は脱窒を行わないことから、*E.coli* による亜硝酸蓄積の面でもきわめて興味のある研究対象となる。

E.coli により腸内で亜硝酸が生成され、食物からアミンが摂取されると発癌性物質であるニトロソアミンが合成される可能性がある。つまり大腸菌の DNRase 活性が増大すると亜硝酸の蓄積増加を引き起こし、体内環境にとっては不利な状況となる。そこで我々は、昔から健康に良いとされている野菜に注目し、その効果を調べた。また DNRase がエネルギー獲得系である硝酸還元系の酵素であることから、同じくエネルギー獲得系である酸素呼吸系に対する一価カチオン、および野菜抽出液の効果を

調べた。

その結果、DNRase活性の上昇を抑え、酸素呼吸にも良好な結果をもたらすいくつかの種類の野菜抽出液を認めた。

1. 実験方法

(1) 使用菌株

Escherichia coli ATCC 3301

(2) 培養方法

培養の基本的方法はGuestら³⁾の方法に従った。

(3) 硝酸還元酵素活性測定法

硝酸より生じる亜硝酸をYamaokaら¹⁾の方法に従い比色法により測定した。

(4) 菌体の酸素呼吸測定法

測定は大洋科学工業K.K.の生物呼吸測定装置 (O₂アップテスターC型) を用い、検圧法により行った。菌体を窒素源を除いた*E.coli* 培養培地に懸濁し、炭素源としてはグルコースを加えた。発生するCO₂は20%KOHを浸み込ませたろ紙で吸収した。

(5) 菌体の前処理法

Yamaokaら¹⁾の方法に従った。すなわち培養した菌体を集菌・洗浄後、各種濃度のNaCl等を含む0.033Mリン酸カリウム緩衝溶液 (0.033M KPB : pH 7.0) に懸濁し、30℃で1h静置した。その後0.033MKPBで菌体を洗浄し、硝酸還元酵素活性や酸素呼吸の活性測定に用いた。

(6) 野菜および果実抽出液調整法

野菜および果実の可食部を100g取り、ミキサーで破碎後ガーゼでろ過した。得られたろ液を100℃で10分加熱し、 1.7×10^4 gで10分間遠心分離し、沈殿を取り除いた。上清を液体クロマトグラフィー用フィルターでろ過し、ろ液をpH7.0に調整した。この調整液に0.033M KPBを加え、全量100ml (1g/ml) とし野菜抽出液として以後用いた。

2. 結果と考察

(1) NaClによる硝酸還元酵素の活性化

硝酸還元条件下で生育させた*E.coli*菌体を、NaCl等の一価カチオンを含む塩類水溶液中で30℃、1h静置後、菌

体を0.033M KPBで洗浄すると、その菌体のDNRase活性が著しく増大することは、これまでに報告してきた¹⁾。

結果は示さないが、NaClの濃度を変化させると1MまではそのDNRaseへの効果が増加し、1Mで最大となった。1M以上の濃度では菌体の性状が変化するので以後のNaCl前処理は0.5Mで行うこととした。

(2) 硝酸還元酵素に対するカイワレダイコン抽出液の効果

次にNaClで菌体を前処理するさいの経時変化を調べた。またその際野菜抽出液も懸濁液に加え、その効果を検討した (Fig.1)。野菜としてはカイワレダイコンを用いた。

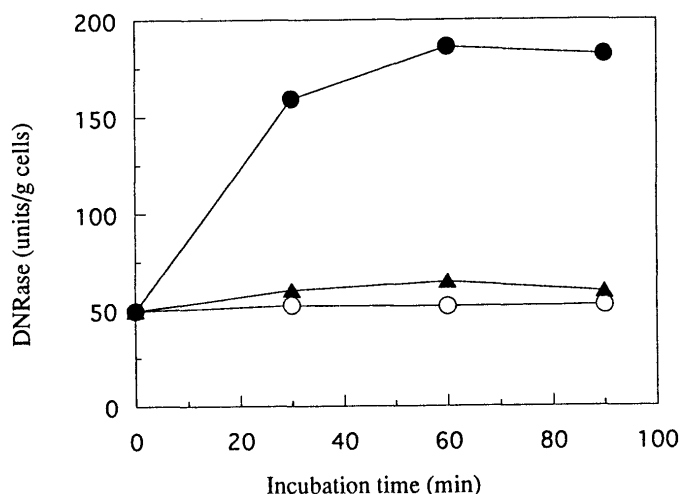


Fig.1 Suppressive effect of kaiwaredaikon extract on NaCl-induced activation of DNRase: None(○), 0.5M NaCl(●) 0.5M NaCl+kaiware(▲)

NaClも野菜抽出液も加えない対照菌では前処理時間が変化しても、そのDNRase活性は一定だが、NaClを加えた前処理では30分までは処理時間と共にDNRase活性は上昇した。一方、NaClと共に野菜抽出液を同時に加えて前処理すると、処理時間が経過してもDNRaseの活性は対照菌以上には上がらなかった。このことは、野菜抽出液がNaClによるDNRase活性化を抑制したと考えられる。結果には示さなかったが、カイワレダイコンのみで前処理してもDNRase活性に大きな変化を与えなかった。このことはカイワレダイコン抽出液はキレートのような作用でNaClの働きを抑制したと考えた。

(3) 各種野菜および果実抽出液の硝酸還元酵素活性に

対する効果

Fig.1の結果よりカイワレダイコンに、NaCl前処理によるDNRase 活性上昇を抑制する効果のあることがわかったので、日常的に摂取する各種野菜および果実抽出液の効果を同様に検討した。

Table 1 Effects of vegetable and fruit extracts on NaCl-induced activation of DNRase activity

Additions (0.25g/mL)	DNRase activity* in preincubated cells	
	Without NaCl	With NaCl (0.5M)
None	100	502
Garlic	86	436
Pumpkin	105	66
Welsh onion	81	100
Kaiwaredaikon	112	107
Broccoli	69	103
Bean sprouts	160	146
Carrot	98	226
Chinese cabbage	162	106
Pimento	118	130
Chingentsuai	105	77
Parsley	160	142
Celery	92	172
Lettuce	103	84
Eggplant	96	122
Potato	96	56
Melon	88	153
Kiwifruit	214	195
Apple	123	429
Banana	140	125
Satsuma mandarin	87	184

* Relative activity

Table 1 に示す様に、すべての野菜および果実抽出液が有効なわけではなく、その効果には種類により差が認められた。抑制効果の大きいものとしてはジャガイモ、カボチャ、チンゲンサイなどがあり、逆に効果の小さいものはニンニク、ニンジン、セロリーであった。果実には野菜ほどの抑制効果は認められなかった。それらの原因については検討中である。

(4) 菌体酸素呼吸に対するNaClの影響

E.coli は酸素呼吸によってもエネルギーを獲得することができ、DNRaseを持つ*E.coli* の場合でも酸素がある条件下へ置くと酸素呼吸を行う。NaCl で処理しDNRase活性の増大した硝酸還元菌の場合の酸素呼吸変化を調べて見ると、NaCl の濃度が高くなるのに逆比例して酸素呼吸が低下し、0.5Mではほぼ完全になくなってい

るのがわかる (Fig.2)。

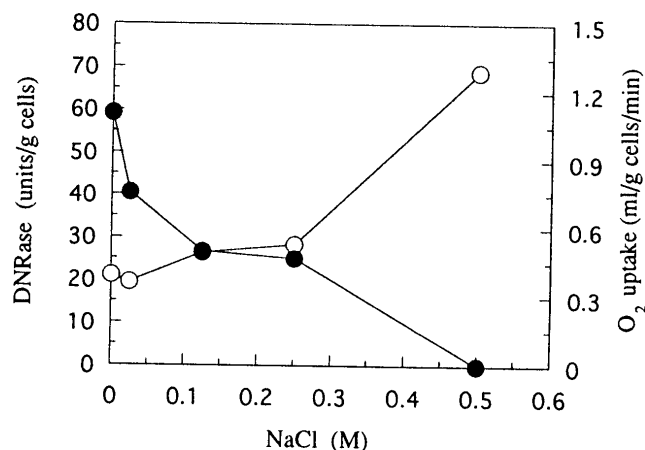


Fig. 2 Effect of NaCl on O₂ uptake (●) and DNRase activity (○) in nitrate dissimilating cells

このことから、NaCl処理はDNRaseを活性化すると同時に酸素呼吸を阻害していると思われる。これはNaCl がDNRase活性を上昇させたため、酸素呼吸が低下したのか、DNRase活性変化とは無関係に酸素呼吸能が低下したのかは不明である。

(5) ブロccoli抽出液の酸素呼吸に対する効果

NaCl処理により、*E.coli* 菌体のDNRase活性は上昇するが、酸素呼吸能は低下することがわかった。一方Table 1 に示した様に野菜抽出液の中にはこのDNRase活性上昇を抑制するものがあるので、野菜抽出液の酸素呼吸への影響を同時に調べた。野菜抽出液としてはブロッコリーを用いた。

即ち、NaClで前処理する際ブロッコリー抽出液も加えDNRase活性と共に菌体の酸素呼吸を測定してみると、ブロッコリー抽出液はNaCl による酸素呼吸の低下を防いで、対照菌と同程度まで酸素呼吸のレベルを保持していることがわかった(Table 2)。DNRase活性、酸素呼吸とNaCl、野菜抽出液の効果をより詳しく調べるために、酸素呼吸条件下で生育させたDNRaseを含まない酸素呼吸菌に対するNaCl、野菜抽出液の効果を検討した。野菜抽出液としてはブロッコリーを用いた、その結果をTable 3に示す。

酸素呼吸菌の場合、その酸素呼吸は硝酸還元菌のようにNaCl により完全には抑制されず、NaCl と野菜抽出液

Table 2 Effect of NaCl and broccoli extract on O₂ uptake by *E. coli* cells grown with nitrate respiration

Preincubated with	O ₂ uptake (Relative activity)	DNRase (Relative activity)
None	100	100
NaCl (0.5M)	1	501
NaCl (0.5M) + Broccoli Extract (0.5g/mL)	78	114

Table 3 Effect of NaCl and broccoli extract on O₂ uptake by *E. coli* cells grown with nitrate respiration or oxygen respiration

Preincubated with	O ₂ uptake (Relative activity)	
	DNR-Cells*	OR-Cells**
None	100	100
NaCl (0.5M)	1	39
NaCl (0.5M) + Broccoli Extract (0.5g/mL)	78	105

* Cells grown with nitrate respiration

** Cells grown with oxygen respiration

を共存させると硝酸還元菌の場合と同じく酸素呼吸能の低下を防いだ。このことはNaClの酸素呼吸に対する効果はDNRaseの存在と密接に関連していることを予想させた。

以上のことから、*E. coli*は嫌気的で硝酸の存在するいわゆる硝酸還元条件下で生育するとDNRaseの作用により亜硝酸を生成する。このDNRaseの活性はNaClとの前処理により著しく増大し、有害なニトロソアミンの原料となる亜硝酸の蓄積を増加させ、さらに*E. coli*の酸素呼吸能を著しく低下させる。しかし、ある種の野菜抽出液が共存するとNaClによる効果はほぼ完全に抑制されることがこの研究により明らかとなった。

3. 参考文献

- 1) K. Yamaoka, M. Kato, and T. Kamihara, *Biochem. Int.*, 16, 829-834 (1988)
- 2) K. Yamaoka, M. Kato, and T. Kamihara, *Biosci. Biotec. Biochem.*, 56, 1601-1603 (1992)
- 3) P. R. Lambden, and J. R. Guest., *J. Geb. Microbiol.*, 93 173-176, 1976