

新 制
工
936
京大附図

細菌における硝酸還元の調節

—環境・人体への亜硝酸蓄積の制御—

山岡 邦雄

1993

細菌における硝酸還元の調節

——環境・人体への亜硝酸蓄積の制御——

山岡邦雄

1993

目 次

緒論	4
第1部 脱窒菌における硝酸還元の調節とその機構	12
第1章 1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性化	15
第2章 システインによる硝酸還元酵素の不活性化	42
第3章 硝酸還元酵素の活性変化に伴う酸素呼吸能の変化	60
第2部 大腸菌における硝酸還元の調節とその機構	69
第1章 静止菌体における硝酸還元酵素の活性化と不活性化	72
第2章 菌増殖時の硝酸還元酵素の調節：亜硝酸蓄積の制御	97

第3部 大腸菌の硝酸還元と酸素呼吸に及ぼす野菜抽出液の効果	110
第1章 野菜抽出液による硝酸還元抑制効果	112
第2章 酸素呼吸能の調節	123
結論	130
謝辞	132
発表論文	134

本論文で用いた略語

GSH ; glutathione

NRase ; nitrate reductase

DNRase ; dissimilatory nitrate reductase

ANRase ; assimilatory nitrate reductase

NiRase ; nitrite reductase

緒 論

地球規模の窒素化合物の循環に関して微生物の果たす役割は非常に大きい。この窒素循環は細菌が空気中の N_2 を固定し、それが植物に取り込まれることから始まる。固定された窒素はアンモニウム塩、亜硝酸塩を経て、硝酸塩に変化する。本来 NO_3^- はその酸化還元電位が O_2 に迫るほど高く、各種の有機物の酸化を行うことができる¹⁾。この硝酸塩はまた他の植物に取り込まれたのち、窒素源として利用されたり、ある種の細菌により還元され NO_2^- を経て再び N_2 となり空気中に放出される。このように、 NO_3^- が NO_2^- に還元されるプロセスは二つ存在する。一つは NO_3^- から生じた NO_2^- が NH_3 を経てアミノ酸合成などに用いられる同化過程と、他の一つはいわゆる硝酸呼吸を行う異化過程である。両プロセスに硝酸還元酵素 (nitrate reductase; NRase) が関与しており、異化型 NRase (dissimilatory NRase: DNRase) は膜に局在し、同化型 NRase (assimilatory NRase: ANRase) は細胞質に存在する^{2)~8)}。

これらの酵素を誘導合成しうる細菌として重要な脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) や腸内に存在する大腸菌 (*Escherichia coli*) を嫌氣的条件下で NO_3^- を培地に添加して培養するとそれらの菌体にはDNRaseが出現する。これらDNRaseは M_o 酵素であり、その構造、作用等についてはくわしく研究されている^{2)~4), 7)~9)}。

我々はこの両菌の保持するDNRaseの作用によって生ずる有害なNO₂の環境や人体への蓄積を防ぐための基礎的な知見を得ることを目的として、これら細菌のDNRase活性の制御について研究を進めてきた。まず脱窒菌を一価カチオンやシステインで一定条件下で処理すると菌体のDNRaseが一価カチオン（NaClなど）では活性化され^{10)~15)}、システインによる処理の場合には不活性化されることを見出し、これらの作用機構について検討を行った^{16)~18)}。さらにこの脱窒菌のDNRase活性制御機構の研究を基礎として、腸内のNO₂蓄積に関与するDNRaseをもつ腸内細菌のうち代表的なE. coliのDNRase活性を制御することを試みた。食品中に存在するNO₃は口腔内細菌や腸内細菌等のDNRaseの作用によりNO₂に変化する¹⁹⁾。これらの細菌は脱窒を行わないので生成したNO₂はその殆どが菌体外に放出され腸内に蓄積すると考えられる^{20), 21)}。NO₂はアミノ化合物と反応しニトロソ化合物となる。このニトロソ化合物が発ガン性を有することはよく知られた事実である²²⁾。ニトロソ化合物の生成はビタミンCの添加により抑制されることはすでに報告されているが^{23), 24)}、これはNO₂の酸化窒素への還元によるものであり、DNRaseによるNO₃からNO₂の生成を抑えるものではない。そこで我々はE. coliのDNRase活性を制御することにより体内におけるNO₂蓄積を抑制することを試みた。E. coliのDNRase活性制御には通常ヒトが摂取する物質を選び食塩やアミノ酸に加えて、野菜や果

物も対象とした。その結果、脱窒菌の場合と同様に E. coli の菌体を NaCl 水溶液で処理すると、その DNRase が著しく活性化され、逆にシステインで処理することにより不活性化されることを認めた。また、増殖中の菌体でもシステインは同様の効果を及ぼすことを見出した。多くの野菜抽出液は NaCl やシステインとは異なり菌体懸濁液に加えて処理しても全く効果を示さなかったが NaCl と共存した場合には NaCl による DNRase の活性化をほぼ完全に抑制することを認めた。さらに NaCl やシステインは酵素活性測定時に加えても全く影響を及ぼさなかったが、野菜抽出液はその条件で DNRase 活性を著しく阻害することがわかった²⁵⁾。

硝酸呼吸を行う菌は好氣的条件に移すと硝酸呼吸は抑制されるがその代わり酸素呼吸を行い得る。逆に酸素呼吸条件下で生育した菌は硝酸呼吸に関与する DNRase を保持しない。このように硝酸呼吸と酸素呼吸は相互に関連していることから、NaCl やシステイン及び野菜抽出液などが酸素呼吸に与える影響についても検討した²⁶⁾。その結果 NaCl で菌体を処理すると菌体の酸素呼吸能が大きく低下するが、野菜抽出液を NaCl と共存させて処理すると、その阻害が防がれることを認めた²⁷⁾。NaCl やシステイン、さらに野菜抽出液のこのような効果は、人体特に腸内の亜硝酸蓄積を抑制したり、細胞の酸素呼吸に影響を与える可能性があることから、腸内のガンの原因、及びその予防を検討する面からも、きわめて重要な意味

を持つものと考えられる。

文献

- 1) 石本 真 : 硝酸呼吸・硫酸呼吸と生物進化, 蛋白質
核酸酵素, (1985) 30, 293-303
- 2) W.J. Payne : Reduction of nitrogenous oxides
by microorganisms, *Bacteriol. Rev.*, (1973) 37,
409-452
- 3) I. Koike and A. Hattori : Growth yield of
a denitrifying bacterium, *Pseudomonas*
denitrificans, under aerobic and denitrifying
conditions, *J. Gen. Microbiol.*, (1975) 88, 1-10
- 4) C.H. MacGregor : Biosynthesis of membrane-bound
nitrate reductase in *E. coli*; Evidence for
soluble precursor, *J. Bact.*, (1976) 126
- 5) N. Minagawa and A. Yoshimoto : Purification and
characterization of the assimilatory NADPH-
nitrate reductase of *Aspergillus nidulans*,
J. Biochem., (1982) 91, 761-774
- 6) C.A. Carlson, L.P. Ferguson and J.L. Ingraham :
Properties of dissimilatory nitrate reductase
purified from the denitrifier *pseudomonas*
aeruginosa, *J. Bacteriol.*, (1982) 151, 162-171

- 7) R. Knowles : Denitrification, Microbiol. Rev. ,
(1982) 46, 43-70
- 8) W. John Ingledew and Robert K. Poole :
The respiratory chains of Escherichia coli,
Microbiol. Rev., (1984) Sept., 222-227
- 9) M.W. Adams and L.E. Mortenson : The effects of
cyanide and ferri cyanide on the activity of the
dissimilatory nitrate reductase of Escherichia
coli, J. Biol. Chem., (1982) 257, 1791-1799
- 10) 山岡邦雄 : 1 価カチオンによる硝酸還元酵素の活性
化, 宇部高専研究報告, (1980) 26, 61-64
- 11) 山岡邦雄, 加藤美都子 :
脱窒菌 (Pseudomonas denitrificans) における硝酸還
元能に対する 1 価および 2 価カチオンの効果, 宇部
高専研究報告, (1985) 31, 27-30
- 12) 山岡邦雄, 加藤美都子, 三戸留美 :
脱窒菌 (Pseudomonas denitrificans) における硝酸還
元酵素活性に対するアルキルアンモニウム塩の効果,
宇部高専研究報告, (1986) 32, 39-42
- 13) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Cation-
induced changes in the activity of dissimilatory
nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans,
1st China-Japan International Symposium on
Photosynthetic Bacteria,
Abstracts of scientific papers, (1987) 43

- 14) K.Yamaoka, M.Kato and T.kamihara : Activation by monovalent cations of dissimilatory nitrate reductase in the cells of Pseudomonas denitrificans. Biochem. Int., (1988) 16, 829-833
- 15) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Effects of alkylammonium ions on the activity of dissimilatory nitrate reductase in the cells of Pseudomonas denitrificans. Agric. Biol. Chem., (1989) 53, 1451-1452
- 16) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara: Control of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans. IUMS Congress, Bacteriology & Microbiology-Osaka, Japan, (1990)
- 17) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara: Control of dissimilatory nitrate reductase by cysteine and glutathione in bacteria, First International Congress on "Vitamins and Biofactors in Life Science", (1991)
- 18) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara: Effect of cysteine on cellular activity of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans. Biosci. Biotech. Biochem., (1992) 56, 1684-1685

- 19) 谷口茂彦：口腔内生態系を含めた人体における硝
塩の移行と代謝，岡山歯学会誌，(1986) 5, 129
- 20) 石本真：嫌気性呼吸と硫黄代謝，石本真教授業績集，
(1988)
- 21) M. Ishimoto and I. Yamamoto : Cell growth and
metabolic products of Escherichia coli in
nitrate respiration, Z. Allg. Mikrobiol. (1977)
17, 309-320
- 22) P. Fraser, C. Chilvers, V. Beral and M.J. Hill :
Nitrate and human cancer, A review of the
evidence. Int. J. Epidemiol (1980) 9, 3-11
- 23) S. S. Mirvish, L. Wallcave, M. Eagen and P. Shubic :
Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of
blocking the formation of carcinogenic N-nitroso
compounds, Science (1972) 177, 65-68
- 24) H. Ohshima and H. Bartsh : The influence of
vitamine C on the formation of nitrosoamines,
In: J. N. Counsell and D. Horning , Vitamin C,
Applied Science Publishers, (1981) 215-224
- 25) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Control of
nitrite formation by Escherichia coli: Effects
of sodium chloride, cysteine, glutathione and
vegetable extracts, Biosci. Biotech. Biochem.,
(revised)

26) 加藤美都子, 山岡邦雄 :

脱窒菌 (Pseudomonas denitrificans) の酸素呼吸に対する研究 (Part1), 宇部高専研究報告, (1988) 34, 79-82

27) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara: NaCl-induced depression of respiration and its prevention by vegetable extracts in Escherichia coli cells, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)

第1部 脱窒菌における硝酸還元調節とその機構

脱窒菌 *Ps. denitrificans* は、嫌気下で酸素の代りに NO_3^- が存在するいわゆる硝酸還元条件では NO_3^- を DNRase によって NO_2^- に還元した後、更に、 N_2 にまで変化させる。DNRase に関しては幾多の報告があるが、その多くは酵素タンパク質及び遺伝子レベルでの研究であり^{1)~3)}、硝酸呼吸や脱窒に関連した生理学的立場から酵素活性の調節を試みた研究は殆どない⁴⁾。

我々は生理学的観点から NO_2^- 蓄積に関与する DNRase 活性の制御を目的として研究を行い、生体関連物質のうち、1価カチオンがその活性を著しく上昇させ^{5), 6)}、アミノ酸であるシステインが逆に低下させることを認めた⁷⁾。各々の作用条件と、その機構について検討を加え、1価カチオンは菌体に取り込まれた後、膜の極性基に作用し、細胞膜を変化させることにより、不可逆的な DNRase の活性化を引き起こし、システインは逆に本酵素の不活性化をもたらすことを示す結果を得た。また、システインは菌体にとり込まれた後、少なくとも一部はグルタチオン (GSH) に変換されて作用することが示唆された。

DNRase 活性の変化すなわち硝酸呼吸の変化は同じエネルギー獲得系である酸素呼吸にも影響を及ぼすと考えられる。そこで NaCl やシステインで処理した菌体の酸素呼吸の変化量を測定し、両呼吸の関係を検討した⁸⁾。その

結果、NaCl処理によりDNRase活性の上昇した菌体の酸素呼吸能は著しく低下することがわかった。しかし、好氣的に増殖し、DNRaseを保持しない菌体をNaClで処理した場合、酸素呼吸能はやや抑制されたものの硝酸呼吸条件で増殖しDNRaseを保持した菌に比べて高い値を示した。このことは、NaClによってDNRase活性が上昇すると、それが原因となって酸素呼吸能が抑制されることを示唆している。

文献

- 1) W. J. Payne : Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms, *Bacteriol. Rev.*, (1973) 37, 409-452
- 2) C. H. MacGregor : Biosynthesis of membrane-bound nitrate reductase in E. coli; Evidence for soluble precursor, *J. Bact.*, (1976) 126
- 3) F. X. Steiner, R. J. Downey : Isoelectric focusing and two dimensional analysis of purified nitrate reductase from Aspergillus nidulans., *Biochim. Biophys. Acta.*, (1982) 706, 203-211

- 4) C.S.Ramarao, Srinivasan, and M.S.Naik :
Inactivation of nitrate reductase from wheat
and rice leaves, *Psytochemistry* (1981) 20,
1487-1491
- 5) K.Yamaoka, M.Kato, and T.Kamihara : Activation
by monovalent cations of dissimilatory nitrate
reductase in the cells of pseudomonas
denitrificans, *Biochem. Int.*, (1988) 16, 829-833
- 6) K.Yamaoka, M.Kato, and T.Kamihara : Effects of
alkylammonium ions on the activity of
dissimilatory nitrate reductase in the cells of
Pseudomonas denitrificans, *Agric. Biol. Chem.*,
(1989) 53, 1451-1452
- 7) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu, and T.Kamihara :
Effect of cysteine on cellular activity of
dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas
denitrificans, *Biosci. Biotech. Biochem.*,
(1992) 56, 1684-1685
- 8) 加藤美都子, 山岡邦雄 :
脱窒菌 (Pseudomonas denitrificans) の酸素呼吸に対
する研究 (Part 1), 宇部高専研究報告, (1988) 34,
79-82

第1章 1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性化

Ps. denitrificans を NO_3^- 添加培地で嫌氣的に培養すると DNRase が誘導される。DNRase は膜に局在し、好氣的な同化型条件下で誘導された ANRase は細胞質に存在するとされている¹⁾。嫌氣条件下でも ANRase は存在するが培地に、 NH_4^+ を加えるとその合成は抑制される。このように無酸素、 NO_3^- 、 NH_4^+ 存在下で増殖し、DNRase だけ保持した菌体を用いて本酵素の活性に及ぼす生理活性物質の効果を調べた。

まず菌体を各種塩類を含む溶液に懸濁し、 30°C で1時間インキュベートした後、洗浄して DNRase 活性を測定したところ、1価カチオンが DNRase 活性を促進することを見出した。NaCl で上昇した DNRase の活性の大部分が膜面に維持されていたので活性上昇は酵素の活性化によることが示された²⁾。また各種アルキルアンモニウム塩が NH_4^+ より大きな効果を示したことからカチオンは膜で作用し、おそらくは膜の変化を通じて DNRase の活性化をもたらすと考えた³⁾。一方、菌体破砕液に1価カチオンを加えても効果はなかったので本酵素の活性化には膜構造の維持と適切な変化が必要であることが支持された。

実験方法

菌の培養 *Ps. denitrificans* ATCC 13867 を用い、Nishimuraら⁴⁾の方法に従い合成培地 [KNO₃ 5g, NH₄Cl 1g, クエン酸三ナトリウム 6g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 1g, NaCl 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, FeSO₄·7H₂O 10mg, CaCl₂ 20mg, CuSO₄·5H₂O 1mg, ZnSO₄·7H₂O 1mg, MnCl₂·6H₂O 0.1mg, CoCl₂ 2mg, Na₂MoO₄·2H₂O 2.5mg 及び Na₂SeO₄·nH₂O 0.2mg を水で1Lに溶かしたもの (pH7.0)] で培養した。容器内の空気をHeで置換した嫌気条件下30°Cで16時間前培養を行い、同じ組成の新しい培地で同じ条件下30°Cで16時間本培養を行った。菌体の増殖度は580nmにおける濁度で表わした。

DNRase活性測定 原則的にNishimuraら⁴⁾の方法に従い、NO₃⁻ からDNRaseの作用により生成したNO₂⁻ 量をNicholasら⁵⁾の方法で測定してDNRase活性を求めた。酵素液としては、菌体の懸濁液、菌体破砕液、および菌体破砕液を30,000gで遠心分離した沈澱、上清等を用いた。電子供与体としてはメチルピオローゲンやギ酸ナトリウムを用い、10mM KNO₃存在下、pH7.0、30°Cで5分間反応を行った。酵素活性は1分間当たり1μmolのNO₂⁻を生成する酵素量を1unitとして表わした。乾燥菌体1g当たりのunit数を比活性とした。

—

亜硝酸還元酵素 (Nitrite reductase; NiRase) 活性測定

原則的にNishimuraら⁶⁾の方法に従い、 NO_2^- がNiRaseの作用で還元された後の残存 NO_2^- 量を測定してNiRase活性を求めた。酵素液はDNRase活性測定の場合と同様のものを用い、還元剤にはメチルピオローゲンとNADHを使用した。酵素活性は NO_2^- 減少量で表わし、酵素量は1分間当たり $1 \mu\text{mol NO}_2^-$ を消費する量を1 unitとした。乾燥菌体1g当たりのunit数を比活性とした。

静止菌体懸濁液のインキュベーション 対数増殖後期の菌体を集菌し33mMナトリウムカリウムリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄後同じ緩衝液に各種塩類、ビタミン、又はアミノ酸を加え、乾燥重量1.64mg/mlになるように菌体を懸濁した。この菌体懸濁液を指定した温度、時間でインキュベートし集菌後、同じ緩衝液で洗浄して得られた菌を処理菌とした。

菌体の膜画分の調製 上記緩衝液中に懸濁した菌体を20KC, 0°C, 5分間超音波破碎器で処理した。得られた菌体ホモジュネートを遠心分離(30,000g, 90分間)し、沈殿を膜画分とした。

膜の可溶化画分の調製 Cleggの方法⁷⁾に従い、16.5mgの菌体を10mLの上記緩衝液に懸濁し、20KCで0°C, 5分間, 20KCで超音波破碎を行った。得られた菌破碎液を

18000gで30min遠心分離し、沈澱と上清に分けた。この沈澱を同じ緩衝液10mLに懸濁し、0.1mLのTriton X-100を加えた後21℃で30分間保温した。この懸濁液を20,000gで30分間遠心分離し上清を膜の可溶化画分とした。

菌体のトルエン処理 菌体懸濁液に1%相当のトルエンを加え1分間激しく振とうし、素早く集菌、洗浄し、トルエン処理菌体を得た。

細胞内の金属イオンの定量 菌体破碎液に含まれる金属イオンは原子吸光光度計（島津ダブルビーム原子吸光光度計AA-650）を用いて測定した。測定条件は波長6,707Å, 電流値5mA, スリット巾5mm, アセチレン流量1.7L/min, 空気流量10L/min, バーナー高さ2mmとした。

結果と考察

1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性上昇

DNRaseに対する各種カチオンの効果を検討した。菌体懸濁液に各種塩類を加え、30℃で1時間インキュベートしたのち集菌洗浄し、菌体の酵素活性を測定した。結果をTable1-1に示す²⁾。アルカリ金属イオンとNH₄⁺はDNRase活性を大きく上昇させた。さらに、NaClは有効であったが、同じアニオンを持つMgCl₂は無効であったことから、この効果はカチオンに依るものであり、アニオ

Table 1-1

Effects of various salts and sugar alcohols on cellular activity of DNRase

Additions (0.5 M)	DNRase [units/g cells]	

	Methyl viologen	Sodium formate
None	62	27
NaCl	415	180
Na ₂ SO ₄	447	230
LiCl	376	202
KCl	306	170
RbCl	224	126
CsCl	308	144
NH ₄ Cl	260	143
MgCl ₂	62	41
MgSO ₄	56	14
Sorbitol	118	54
Mannitol	112	57

Cells grown to the late log phase in synthetic medium under denitrifying conditions were incubated at 30°C for 1 hr in 33 mM sodium potassium phosphate buffer (pH 7.0) in the presence or absence of the supplements. DNRase activity in the cells was determined using 10 mM methyl viologen or sodium formate as electron donor.

ンには無関係であると結論された。また $MgSO_4$ や $MgCl_2$ の結果から2価カチオンは無効であり、また、菌体懸濁液の浸透圧の上昇が原因ではないこともわかった。このことはソルビトールやマンニトールなど本菌によって資化されない糖アルコールの効果が小さいことから支持された。 Ca^{2+} , Ba^{2+} など他の2価カチオンや3価カチオンは沈澱を生じたのでその効果は不明であった。電子供与体としてはメチルピオローゲンとギ酸を用い、いずれの場合も同様の傾向が得られたが活性は前者の方が高かった。これらのことから無機塩類によるこのDNRase活性の上昇は1価カチオンに特有のものと考えられた。

以下NaClを代表例として実験を行った。 Fig.1-1にNaClの濃度の効果を示す⁸⁾。対数増殖後期の菌体を用いたところ2MまでNaClの濃度に従って活性は上昇したが、その程度は、菌体の増殖期の微妙な差により多少上下した。次に、処理時間の影響を調べた。Fig1-2に見られるようにNaClの効果は時間と共に増加し約30分で最大に達した⁸⁾。NaCl無添加の対照ではDNRaseの活性はインキュベーションの時間に無関係にほぼ一定であった。また処理温度の効果を調べたところ、0℃に比べ30℃や37℃の方が明らかに高い活性を示した (Table1-2)⁸⁾。このことは1価カチオン効果には酵素が関与していることを示唆しているが0℃でもかなりの効果が見られるので非酵素的な反応の関与も否定できない。処理時のpHの効果を調べたところ、pH3~9の範囲でNaClの添加効果はpHの増

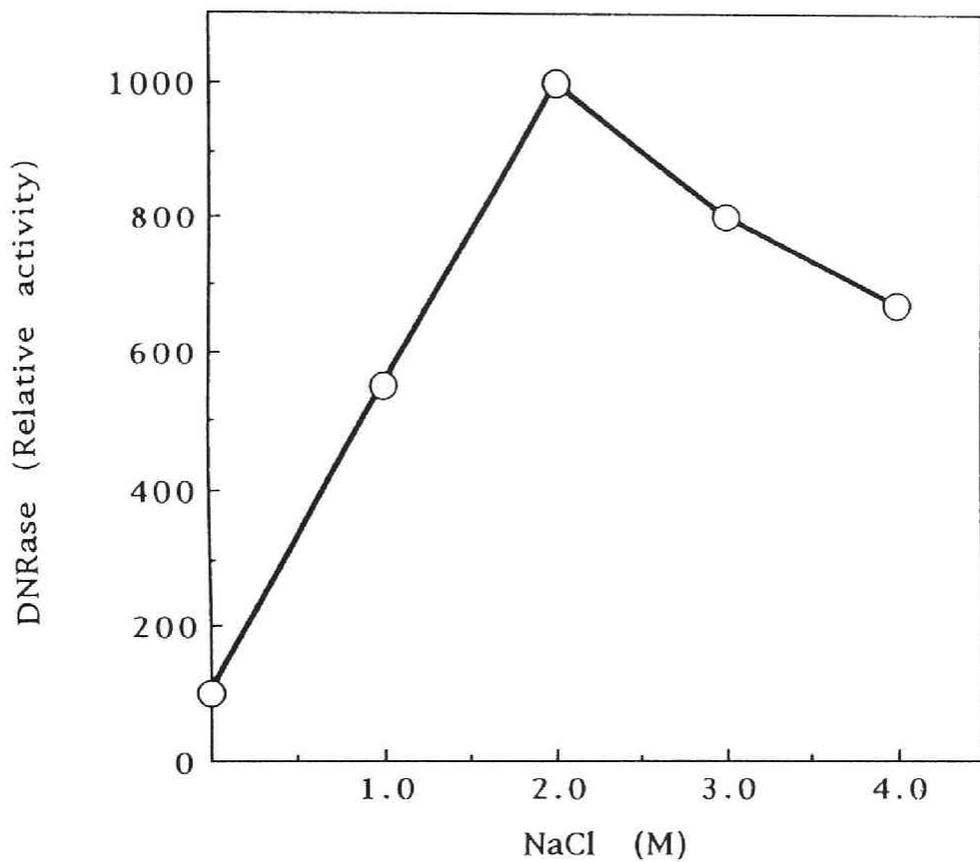


Fig. 1-1 Effect of NaCl concentration on DNRase activity

Incubation of cells with NaCl and enzyme assay were done as described in Table 1-1.

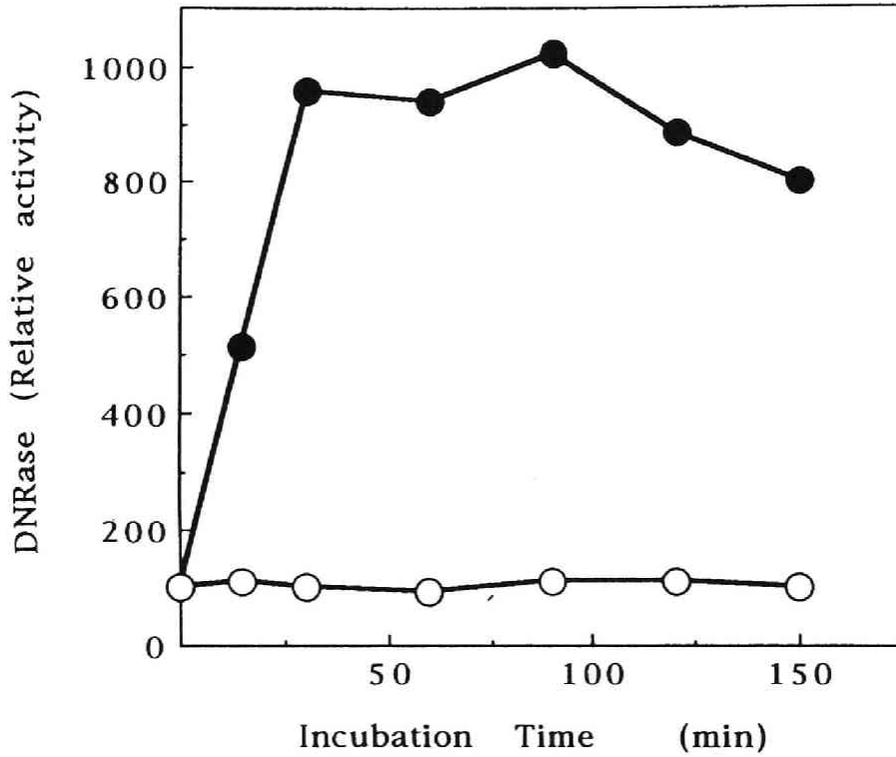


Fig. 1-2 Time course of NaCl-induced increase in DNRase activity

Incubation of cells with NaCl (0.5M) and enzyme assay were done as in Table 1-1.

—●— NaCl
 —○— Control

Table 1-2

Effect of temperature on DNase activity during incubation with NaCl

Temperature (°C)	DNase (units/g cells)	
	Control cells	NaCl-treated cells
0	242	583
30	174	776
37	157	695

加と共に増大した (Fig. 1-3)⁹⁾。データには示さなかったが pH を 9 以上に上げると活性は低下した。(pH 9 の場合については次の項で考察する。) 一方 NaCl 無添加の対照菌では pH の効果はほとんど認められなかった。

以上の事実から処理条件としては菌体 1.64mg を 0.5M NaCl 溶液 1mL に懸濁し、pH 7.0, 30°C で 60 分間静置することを原則とし、DNRase の電子供与体としてはメチルピオローゲンを用いることにした。

1 価カチオンによる硝酸還元酵素活性上昇の機構

1 価カチオンによる Ps. denitrificans の DNRase 活性上昇の機構を探るために、まずタンパク質合成に対する NaCl の影響を調べた。処理時に NaCl と共にクロラムフェニコール (0.1mg/ml) を加えても DNRase 活性上昇はほとんど影響を受けなかったので、NaCl は DNRase タンパク質の de novo 合成を促進したのではないと考えられる (Table 1-3)⁸⁾。

前記のように DNRase 活性の測定は、NO₃ からの NO₂ の生成量を指標としているので NO₂ は NiRase が存在すると更に還元される。したがって DNRase 活性の上昇の結果とみなしている NO₂ 生成 (蓄積) 量の増大は、NO₂ を還元する NiRase の活性低下が真の原因であるという可能性が存在する。そこで NaCl 処理の NiRase 活性への影響を調べてみたが全く認められなかった (Table 1-4)⁸⁾。従って、1 価カチオンの作用の対象は DNRase であると結論できる。

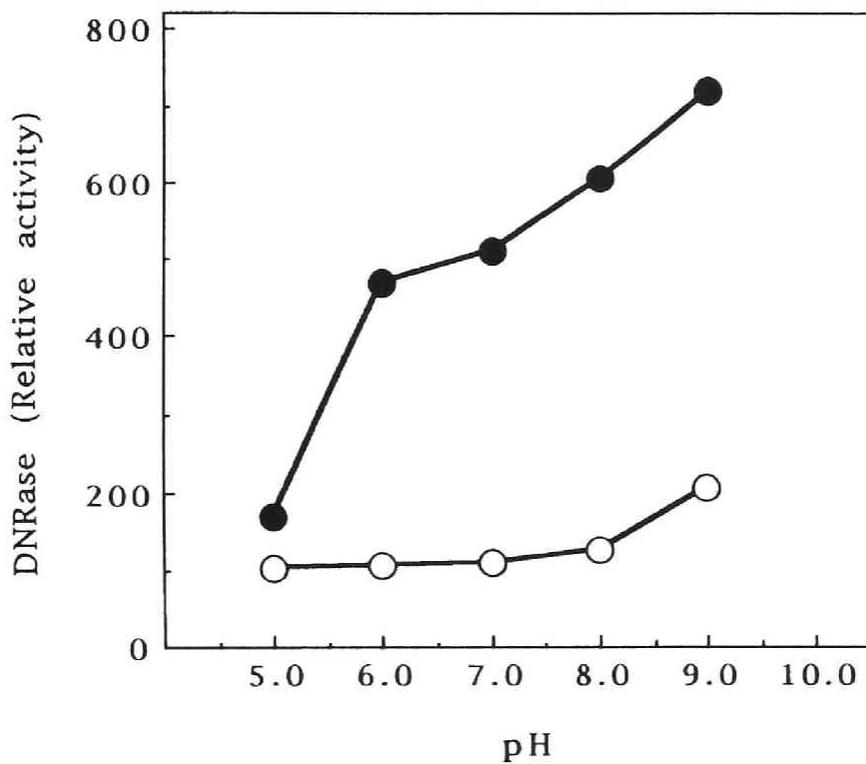


Fig. 1-3 pH dependence of DNRase activity in cells treated with (—●—) or without (—○—) NaCl (0.5M)

DNRase activity at pH7.0 without NaCl was defined as 100.

Table 1-3

Effect of chloramphenicol (CAP) on the NaCl-induced increase in the activity of DNRase

Additions	DNRase (units/g cells)		
	Electron donor		
	Methyl viologen	Formate	
None	67	29	
NaCl ^a	565	207	
NaCl+CAP ^a	580	233	

^a Final concentrations of NaCl and CAP were 0.5M and 0.1mg/ml, respectively.

Table 1-4

Change in the activities of DNRase and NiRase by
NaCl treatment of cells

Enzyme	Electron donor	DNRase (Relative activity)	
		Control cells	NaCl-treated cells
DNRase	Methyl viologen	100	368
	Formate	100	360
NiRase	Methyl viologen	100	91
	NADH	100	97

次に1価カチオンによるDNRase活性の上昇の可逆性を明らかにするために、NaCl処理後の菌体を破碎し、膜（細菌の場合は殆どすべて形質膜）と細胞質に分離し、各画分の酵素活性を調べた。Table 15に示すようにNaCl処理で上昇した活性の大部分はDNRaseが局在する膜画分に保持されていたので、この活性上昇は不可逆的な活性化に基づくことが示された²⁾。さらに1価カチオン処理を行わない対照菌体の破碎液や、トルエンで膜に変化を与えた菌をNaClで処理してもその効果は全く認められなかったことから1価カチオンの効果は少なくともDNRase周辺の膜構造の保持が前提となると推定された。

DNRaseは内在性の膜酵素であり、その活性化には膜への一定の作用が必要であることは膜とタンパク質との相互関係という新しい観点から興味深い現象である。1価カチオンによるDNRaseの活性化における膜構造の関与は1価カチオンが膜に作用することを示唆している。言うまでもなく、1価カチオンは膜への親和性は極めて乏しい。考えられることはリン脂質の極性基への作用である。極性基にはH₂Oが配位していると言われている。このH₂OのH⁺と1価カチオンが交換され、それが原因となって膜の流動性が微妙に変化してDNRaseが活性化されると考えることができるが、その実態は不明である。別に、1価カチオンの一部が細胞内に取り込まれ細胞質からDNRaseに作用してこれを活性化するという可能性もある。

いずれにしても、1価カチオンの細胞内取り込みや膜

Table 1-5

Activation of membrane-bound DNRase upon incubation of intact cells with NaCl

Samples	DNRase (units/g cells)	
	Control cells	NaCl-treated cells
Intact cells	87	267
30,000 g pellet	81	216
30,000 g supernatant	19	62

Cells incubated with 0.5 M NaCl were disrupted by sonication. The cell-free homogenate obtained was centrifuged at 30,000 g and the resulting pellet and supernatant were assayed for DNRase.

との結合が実証される必要がある。そこで、原子吸光法で定量しやすい Li^+ を用いて研究を行った¹⁰⁾。菌体の処理を LiCl で行ったところ菌体1g当たり細胞質では1.6mg、膜画分には0.045mgの Li^+ が検出され、 LiCl を加えない対照菌では、いずれの画分にも Li^+ は認められなかった。これらの結果は極めてわずかながら LiCl 処理によって Li^+ が菌体内に取り込まれ、その一部は膜に結合していることを示している。膜に検出された Li^+ は菌体を洗浄してもほとんど除かれず、トリトン-X-100で処理することによってはじめて除去されることから、膜結合 Li^+ として意味のある値であろう。また Li^+ 含量を膜重量当りに換算すれば、さらに高い値が得られるのは当然である。更に Li^+ と膜結合は強いものではなく菌体から膜を分離する際に膜から遊離したものも多いと考えられるので実際はもっと多量の Li^+ が結合している可能性が大きい。このようにして前述の処理条件下で細胞外に加えられた1価カチオンは菌体内にとり込まれ、膜画分に存在することは確かめられたが、これだけで膜を介する1価カチオンによるDNRase活性化の直接の証拠となるものではない。

そこで膜と1価カチオンとの関係を更に明らかにする目的で、 NH_4^+ の効果と比較するために膜の疎水性基と親和性の高いアルキルアンモニウム塩の効果を検討した³⁾。モノアルキル体では明らかに NH_4^+ よりも高い効果を示し、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ まで炭素鎖長に従ってその効果は高くなった

(Table1-6)。モノエチル体はジエチル体より活性が高く、トリ、テトラ誘導体はやや低い値を示した (Table1-7)。データは示さないがメチル誘導体ではジメチル体が有効であった。Table1-6, 1-7に示すように基準となる NH_4Cl の値がやや上下したが、これは利用した菌の増殖度の差によるものと思われる。しかし、対照菌、 NH_4Cl 処理菌、アルキルアンモニウム処理菌における酵素活性の相対的關係には常に再現性が見られた。これらのことは C_2 や C_3 のアルキル基が存在すると膜の疎水基と親和力が高くなるため、1価カチオンが膜系酵素などに作用しやすくなったことを示している。事実、モノエチルアンモニウム塩で処理してDNRase活性の上昇した菌体を破碎後、細胞質と細胞膜に分離してDNRase活性を測定すると膜の活性が NH_4Cl で処理した菌体のそれに比べて高くなっていた (Table1-8)。これは NaCl 処理した菌体の場合と同様の不可逆的活性化が膜への作用を介して起こることを示している。

1価カチオンが膜に働いて膜の変化を引き起こしたとすると1価カチオンと膜との間の親和性が問題となる。その場合先に述べた膜の荷電状態が大きな影響を示すと考えられる。事実、先にFig. 1 3で示したようにpHが高くなるに従い、 NaCl の添加効果は著しく上昇した。これは膜の極性基であるリン酸基が高いpHで解離するため Na^+ との親和性が大きくなり、極性基の相互作用に変化を生じ、更には脂質の疎水性部位の動きに影響が及んだ

Table 1-6

Effects of alkylammonium chlorides on cellular activity of DNRase

Additions (0.5M)	DNRase (Relative activity)
None	100
NH_4Cl	240
$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$	349
$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3\text{Cl}$	389
$\text{C}_3\text{H}_7\text{NH}_3\text{Cl}$	431
$\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_3\text{Cl}$	309

Table 1-7

Effects of ethylammonium chlorides on cellular activity of DNRase

Additions (0.5M)	DNRase (Relative activity)
None	100
NH_4Cl	144
$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3\text{Cl}$	349
$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}_2\text{Cl}$	157
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{NHCl}$	122
$(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NCl}$	154

Table 1-8

Activation of membrane-bound DNRase upon incubation of intact cells with NH_4Cl and monoethyl ammonium chloride

Cells	DNRase [units/g cells]	
	Cytoplasm	Membrane
Control	25	197
NH_4Cl -treated ^a	86	348
$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3\text{Cl}$ -treated ^a	188	558

^a Cells were incubated with 0.5M NH_4Cl and $\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3\text{Cl}$.

ためと考えられる。

一方、膜に作用しその透過性を高めるとされているトルエンで菌体を処理すると、DNRase活性はNaCl添加の場合よりも更に大きな値を示した (Table 1-9)。またトルエン以外のベンゼンやクロロホルムなど比較的極性の低い溶媒はトルエンと同様の効果を示したが極性の高いアルコール類は全く効果を示さなかった。また、トルエンで処理した菌では、上昇した活性の大部分は膜画分に検出された (Table 1-10)。このことはNaClやアルキルアンモニウム塩処理の場合と同様にDNRaseが不可逆的に活性化されたことを意味している。トルエンで処理した菌では細胞質にもかなり高いDNRase活性が認められたが、これはトルエン処理の際DNRaseの一部が膜から遊離したためと考えられる。

ここまでNaCl, アルキルアンモニウム塩, トルエンの効果及びpHの影響などから、膜構造の変化がDNRaseの活性化に影響を及ぼすと推定した。

膜の変化によるDNRase活性化をさらに明確にするため酵素反応測定時の反応液の温度を変え、その影響を調べた。完全な膜構造を持った菌体と比較するため、菌体を破砕し、膜部分を取り、更にトリトン-X-100で膜を可溶化した画分を分離した。この可溶化画分には菌体や破砕菌液などと比べ、はるかに膜の混在は少ないものと考えられる。それぞれの画分のDNRase活性を温度を変えて測定した。低温では膜の流動性が低下するが、高温になる

Table 1-9

Effects of various organic solvents on
cellular activity of DNRase

Additions ^a (1%)	DNRase (units/g cells)
None	90
NaCl (0.5M)	157
Toluene	580
Benzene	455
Chloroform	361
Butanol	90
Propanol	88
Ethanol	85
Methanol	83

^a Organic solvents were added to cell suspension and mixed vigorously for 1min. Cells were washed three times with buffer solution.

Tabele 1-10

Activation of membrane-bound DNRase upon
incubation of intact cells with toluene

Samples	DNRase (units/g cells)	
	Control	Toluene ^a -treated (1%)
Intact cells	110	741
30,000g pellet	102	613
30,000g supernatant	24	382

^a Toluene was added to cell suspension and mixed vigorously for 1min. Cells were washed three times with buffer solution.

Toluene-treated cells were disrupted by sonication. The cell-free homogenate obtained was centrifuged at 30,000g and the resulting pellet and supernatant were assayed for DNRase.

につれて流動性が増すと考えられる。このことがDNRaseにどのような影響を与えるかを調べた。30°Cにおける酵素活性を100としてその相対値をFig. 1-4に示した。生菌体中のDNRase活性は温度に比例して著しく上昇したが、可溶化画分では温度による活性化の程度は低く、菌破碎液は両者の中間の値を示した。これは、生菌体では膜構造は完全に保持されており、高温になると膜の流動性が上昇すると考えられるが、可溶化画分ではDNRaseを取りかこむ膜脂質の大半が失われるのでDNRaseへの膜の影響が小さいためと考えた。以上のことから1価カチオンの効果は未だ不明の点はあるものの膜の脂質部位に影響を与え、その流動性等を変化させることにより、膜酵素であるDNRaseの活性を大きく上昇させたと考えられる。

膜流動性の変化がDNRase活性に影響を与えたと仮定すると、Fig. 1-3に示したpHが高くなるとNaClの効果が著しく増大するという結果は次のように考察できる。先に述べたように本来1価カチオンと膜との親和性は極めて乏しいが、リン脂質の極性基への1価カチオンの作用は可能であろう。高いpHになると極性基の電離が進み、1価カチオンが極性基により作用し易くなり、極性基の構造、荷電状態が大きく変化し、そのことが脂質のアシル基の挙動に影響を与えるものと考えられる。いずれにしても、1価カチオンの効果は更に検討を要する部分が多いが、先ず膜に作用し、それを通してDNRaseに影響を与えたと考えることができる。

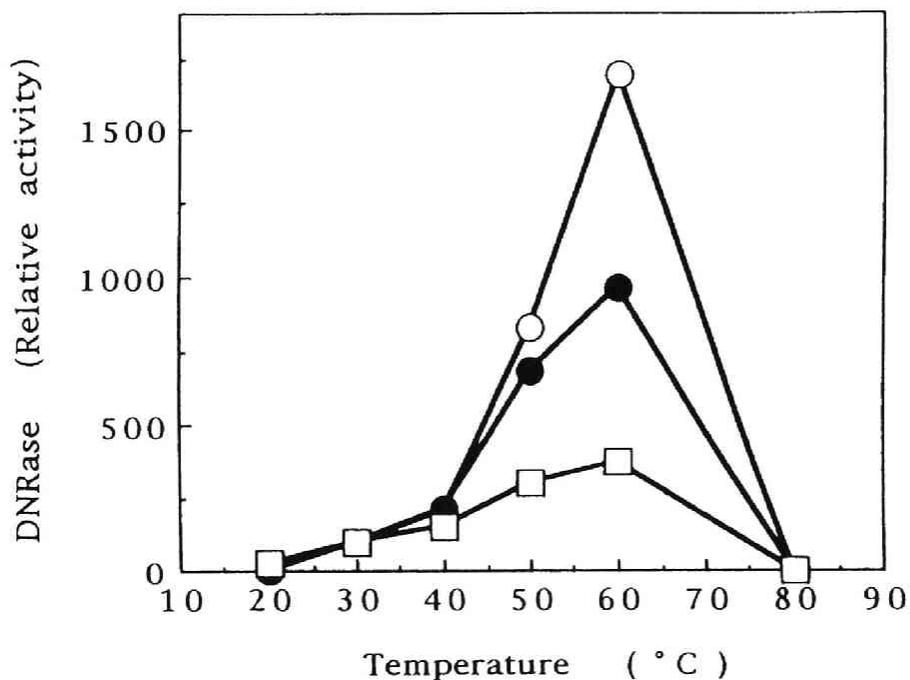


Fig. 1-4 Effect of temperature on DNRase activity in whole cells (—○—), cell-free homogenate (—●—) and solubilized membrane fraction (—□—)

Cell-free homogenate and solubilized membrane fraction were prepared as in Methods. DNRase activity at 30°C was defined as 100.

要旨

嫌気下、培地に NO_3^- を加えたいわゆる硝酸呼吸条件下で生育させた脱窒菌 (*Ps. denitrificans*) の菌体を pH 7.0 で 30°C 、1時間 1価カチオンを含む塩類溶液中で静置すると菌体の DNRase 活性は著しく上昇した。この効果は 1価カチオンに特有なものであることがわかった。増大した DNRase 活性の多くは膜画分に保持されていたことからこの酵素が不可逆的に活性化されたものと判断した。また、塩化アルキルアンモニウム塩や、トルエンで *Ps. denitrificans* を処理しても同様な効果が認められたことや、1価カチオンは菌体破砕液には全く影響しないことから、DNRase 活性上昇は膜構造の変化に結び付くと考えられた。そこで酵素活性を測定する際の温度を変化させ、膜の脂質の流動性を変化させたところ、菌体中の DNRase 活性は温度が高くなるにつれ大きく上昇したが、膜から可溶化した画分のそれはあまり上昇しなかった。これらのことは膜構造の変化が DNRase 活性を上昇させるという機構を支持するものである。

文献

- 1) W. J. Payne : Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms, *Bacteriol. Rev.*, (1973) 37, 409-452
- 2) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Activation by monovalent cations of dissimilatory nitrate reductase in the cells of *Pseudomonas denitrificans*, *Biochem. Int.*, (1988) 16, 829-833
- 3) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Effects of alkylammonium ions on the activity of dissimilatory nitrate reductase in the cells of *Pseudomonas denitrificans*, *Agric. Biol. Chem.*, (1989) 53, 1451-1452
- 4) Y. Nishimura, T. Kamihara and S. Fukui : Diverse effect of formate on the dissimilatory metabolism of nitrate in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 : Growth, nitrite accumulation in culture, cellular activities of nitrate and nitrite reductase, *Arch. Microbiol.*, (1980) 124, 191-195
- 5) D. J. D. Nicholas and A. Nason : In: *Methods in Enzymology*, (1957) 3, 981-984

- 6) Y. Nishimura, T. Kamihara and S. Fukui :
Nitrite reduction with formate in Pseudomonas denitrificans ATCC 13867, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1979) 87, 140-145
- 7) Roger A. Clegg : Purification and some properties of NRase (EC1.7.99.4) from Escherichia coli K12, Biochem. J., (1976) 153, 533-541
- 8) 山岡邦雄 : 1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性化, 宇部高専研究報告, (1980) 26, 61-64
- 9) 加藤美都子, 兼安気郎, 中原重浩, 山岡邦雄 :
硝酸還元酵素活性に対するpHの影響, 宇部高専研究報告, (1992) 38, 63-66
- 10) 山岡邦雄, 加藤美都子, 兼安気郎 :
脱窒菌 (Pseudomonas denitrificans) の硝酸還元能に対する1価および2価カチオンの効果, 宇部高専研究報告, (1985) 31, 27-30

第2章 システインによる硝酸還元酵素の不活性化

脱窒菌のDNRase活性を制御することは硝酸呼吸の機構を明らかにするだけでなく、環境における有害なNO₂蓄積を調整することにもつながる可能性がある。前章では脱窒条件下で生育したPs. denitrificansの菌体を1価カチオンを含む塩類溶液中で30°C, 1時間処理すると菌体のDNRase活性が著しく上昇し、その高い活性が菌体の膜画分に保持されていることから、活性上昇は酵素自身の活性化によることを示し、さらにこの活性化は膜の変化に起因するものと推定した^{1)~4)}。本章ではNO₂蓄積を防ぐためにDNRase活性を低下させる生体関連物質を検索し、その抑制条件と機構を検討した⁵⁾。その結果システインとGSHが1価カチオンとは逆にDNRase活性を低下させることを見出し、さらに添加したシステインの少なくとも一部はGSHに変換されたのちに作用することを示唆する結果を得た。

実験方法

菌体の培養、菌体の前処理および菌体膜画分の調製は前章の方法に準じて行った。

菌体内GSH含量の測定 菌体破碎液からのGSH抽出及

び高速液体クロマトグラフ (HPLC) による測定はReeve
ら⁶⁾の方法により行った。菌体懸濁液(328mg/10mL)を超
音波破碎(20KC, 5分間)した液を17,000gで20分間遠心分
離し、得られた上清の4mLに0.2M 5,5'-ジチオビス-2-ニ
トロ安息香酸0.4mLを加え、5分間静置後、0.32mLのギ酸
と8mLの酢酸エチルを加え激しく攪拌して水層をとり出
し、残った酢酸エチルを減圧下で除去し、その水層を濾
過し、得られた濾液をHPLC用の試料とした。HPLCの使用
条件はカラムとして Lichrosorb RP-select (5 μ m) RE-
8000を用い、移動相はギ酸とメタノールの9:1混合液
を用いた。カラム温度は30 $^{\circ}$ Cとし、検出器はUV-8000を
用い280nmで検出した。

結果と考察

システインによる硝酸還元酵素の活性低下⁵⁾ 第1
章で塩類の効果を調べた場合と同様の方法でL-アミノ酸
による菌体の処理効果を調べた。但し、使用したアミノ
酸の濃度は5mMとし、チロシンとアスパラギン酸はその
溶解度が低いので1mMとした。結果はTable 1-11に示す。
検討したすべてのアミノ酸のうちシステインのみが30 $^{\circ}$ C、
1時間静置で明確なDNRase活性抑制効果を示した。一方
これらのL-アミノ酸を酵素活性測定時に添加しても全く
影響は見られなかった。また、糖、脂肪酸、ビタミンな
ど生体関連物質についても検討したがシステインのよう

Table 1-11

Effects of incubation of cells with amino acids on cellular activity of DNRase

L-Amino acids (5 mM)	DNRase (Relative activity)
Control	100
Alanine	88
Valine	102
Leucine	93
Isoleucine	95
Glycine	108
Serine	99
Threonine	93
Methionine	101
Cysteine	44
Phenylalanine	101
Tyrosine ^a	101
Tryptophan	106
Aspartic acid ^a	91
Glutamic acid	85
Lysine	121
Arginine	106
Histidine	106
Proline	99

^a Tyrosine and Aspartic acid were added at a concentration of 1 mM because of their low solubility.

に際だった効果を示すものは見出せなかった。そこで、まず処理時におけるシステイン濃度のDNRase活性に対する効果を調べたところ、5mMでDNRase活性はほぼ最低の値に到達した（Fig.1-5）。5mM以上では酵素活性はほぼ一定の値を示したことはシステインがDNRase、あるいはその活性に影響を与えるタンパク質に結合し、5mMでシステインの結合部位が飽和に達したことを示唆している。システイン処理時の温度を0°C, 30°C, 37°Cと変化させたところ、その効果は30°Cで最も高かった（Table1-12）。このことは、システイン効果には、タンパク質や酵素の反応が関与していることを示唆している。そこで、菌体をシステイン溶液中30°Cで処理する時間と酵素活性との関係を調べた（Fig.1-6）。処理時間とともにDNRase活性は低下し約60分で最低の値に達し、その後ほぼ一定となった。このことはシステインが菌体内に取り込まれた後、何らかの変化を受けた可能性があることを示している。次に、システイン処理時のpHの影響を調べたところ、前章にも示したように、無添加の場合もpH上昇による活性化が起こったが、システインを加えるとその活性化が抑制されることがわかった。システインの効果はpH5~9ではpHの上昇と共に増大した（Fig.1-7）。これらのことから、*Ps. denitrificans*をシステインで処理する場合の条件としては、システイン濃度5mM, pH7.0（酵素反応条件）の溶液中で30°Cで60分間静置することとした。

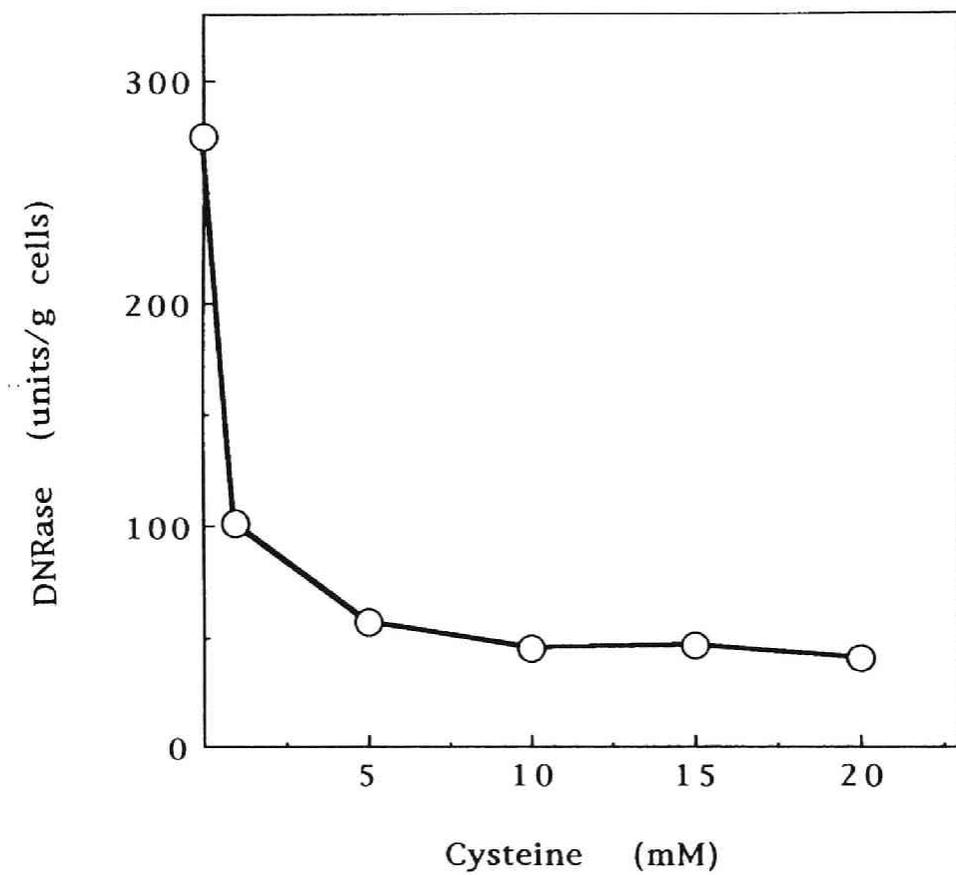


Fig. 1-5 Effect of cysteine concentration on cellular activity of DNRase

Table 1-12

Temperature dependence of Cysteine effect on cellular activity of DNRase

Temperature (°C)	DNRase (Relative activity)	
	Control cells	Cysteine-treated cells
0	100	76
30	100	17
37	100	28

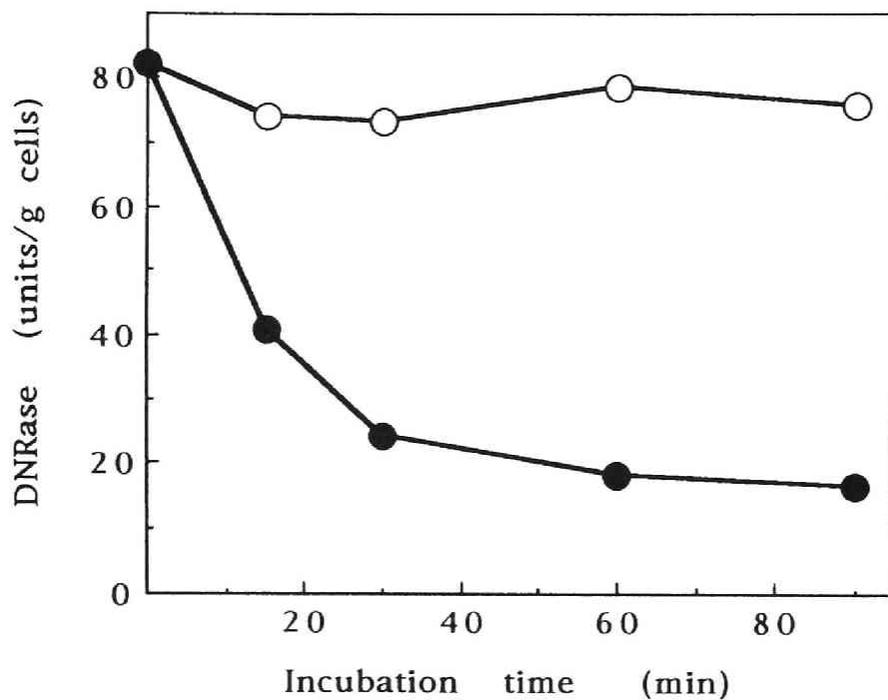


Fig. 1-6 Time course of cysteine effect on cellular activity of DNRase

—○— Control
—●— Cysteine (5mM)

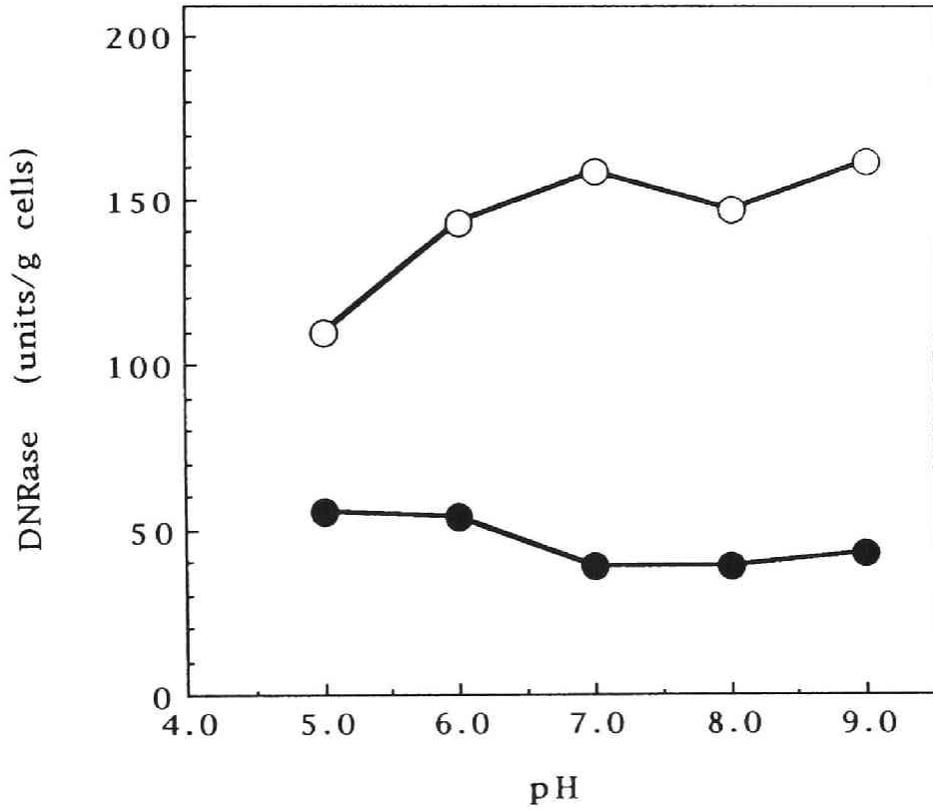


Fig. 1-7 pH dependence of cysteine - induced decrease in cellular activity of DNRase

—○— Control
—●— Cysteine (5mM)

システインによる硝酸還元酵素活性低下の機構

Fig. 1-5に示したように、Ps. denitrificans菌体をシステインと30°Cで1時間静置するとそのシステイン濃度に依存して菌体内DNRase活性は低下した。この菌体を超音波破碎後膜画分と上清に分け、各画分におけるDNRase活性を測定したところTable 1-13に示すようにシステイン処理菌体破碎液のDNRase活性が菌体の場合と同様低く保たれ、しかもそれが本酵素の局在する膜画分で顕著であったのでシステインの効果は酵素自身の不活性化によるものと考えられた。

DNRaseの不活性化をもたらすシステインの作用については次の3つが考えられる：(1)還元作用 (2)SH化合物としての作用 (3)GSHへの変換後の作用。Table 1-14に示すように還元力のあるアスコルビン酸と-SH基をもつ2-メルカプトエタノールのいずれも全くDNRase活性に影響を与えなかったので(1)、(2)の可能性は否定された。

一方、GSHを添加するとシステインには及ばないもののかなりのDNRaseの活性低下が認められた。このことは(3)の可能性が高いことを示唆している。アスコルビン酸はシステインの効果を促進したがGSHの効果には影響しなかった(Table 1-14)。これはシステインの酸化をアスコルビン酸が防ぎ、その結果システインからGSHへの合成が進むが、GSHはシステインよりも安定であることを反映している。GSH/GSSGの酸化還元電位はアスコルビン酸/デヒドロアスコルビン酸のそれよりも低いので

Table 1-13

Inactivation of membrane-bound DNRase upon incubation of cells with cysteine

Samples	DNRase (units/g cells)	
	Control cells	Cysteine-treated cells
Intact cells	117	49
Homogenized cells	114	41
30,000 <u>g</u> Pellet	76	19
30,000 <u>g</u> Supernatant	21	13

Cells incubated with 5 mM cysteine were disrupted by sonication. Cell-free homogenate was centrifuged at 30,000 g and the resulting pellet and supernatant were assayed for DNRase.

Table 1-14

Effects of thiol compounds and ascorbic acid on cellular activity of DNRase

Additions (5 mM)	DNRase (Relative activity)
None	100
Cysteine(Cys)	44
GSH	53
2-Mercaptoethanol	95
Ascorbic acid	104
Cys + ascorbic acid	33
GSH + ascorbic acid	53

アスコルビン酸の影響を受けないのは当然である。そこでGSHの濃度を変化させて前処理を行いDNase活性への影響を調べた。Fig.1-8に示すように、GSH効果の濃度依存性はシステインの場合 (Fig.1-5) とほぼ同様であった。このことはシステインがGSHに変化したのち効力を発揮した可能性を示すので、この点を確認するため、GSHの構成アミノ酸であるグルタミン酸、システイン、グリシンの等モル混合物による処理を行った (Table1 15)。グルタミン酸、システイン、グリシン三種混合の場合と、システイン、グルタミン酸の二種を混合した場合は殆ど同じ効果を示し、システイン単独の効果を大きく上回ったが、システインとグリシンを混合した場合はシステイン単独と変わらなかった。このことはシステインが菌体に取り込まれた後少なくともその一部はGSHに変化することを強く支持しており、また菌体の中にはシステインを加えた場合GSH合成に利用されるグリシンは十分存在するがグルタミン酸は不足していることを示している。

システインがGSHに変化する直接的な証拠を得るためにシステイン処理菌のGSH含量を測定したが、システイン処理菌、対照菌いずれの菌体からも全くGSHは検出されなかった。比較のため、GSH処理菌に含まれるGSH量も測定したが検出できなかった。この一因として Ps. denitrificans ではGSH分解能が非常に高いためと考えられる。ともあれ、システインは少なくとも一部は菌体中でGSHに変化し作用することは事実と思われる。しかしシステ

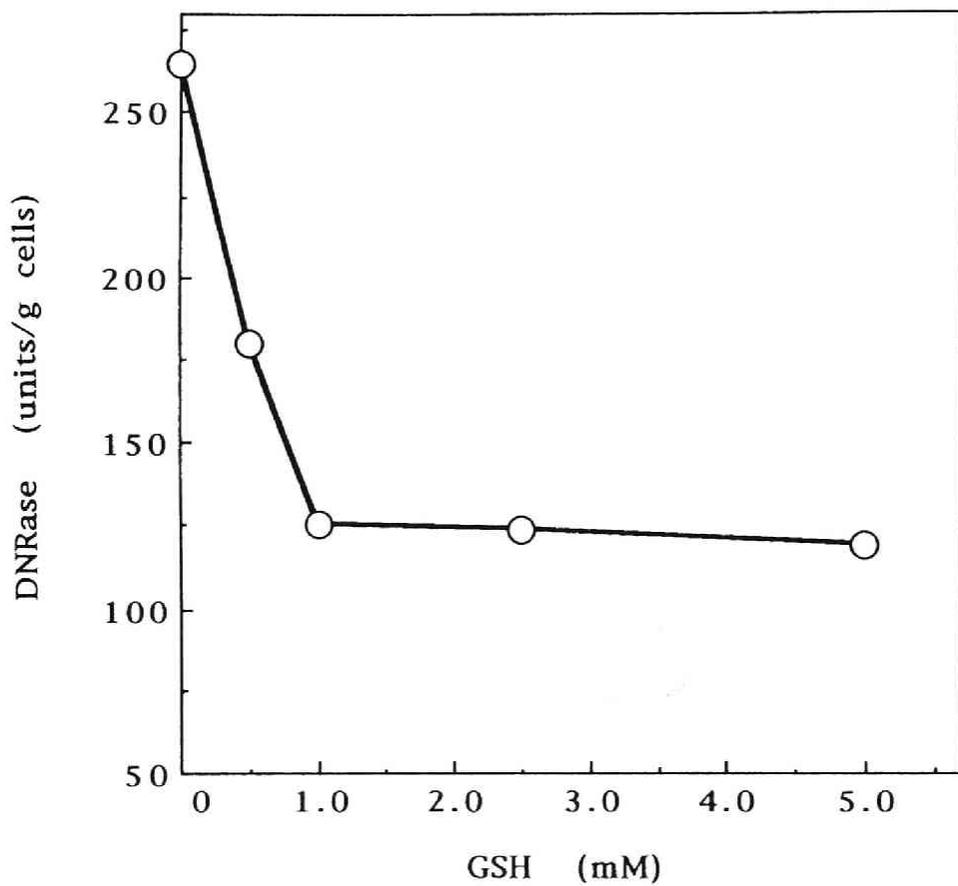


Fig. 1-8 Effect of GSH concentration on cellular activity of DNRase

Table 1-15

Effects of GSH and its amino acid constituents on cellular activity of DNRase

Additions (1mM)	DNRase (Relative activity)
None	100
GSH	77
Cysteine(Cys)	62
Glycine(Gly)	115
Glutamic acid(Glu)	101
Cys+Gly+Glu	35
Cys+Glu	34
Cys+Gly	60

イン自体が直接DNRaseの活性に影響する可能性も否定できない。

データは示していないがシステインもGSH (5mM) も菌体破碎液に添加した場合、DNRase活性にはほとんど変化を与えなかった。このことは1価カチオンの場合と同じようにシステインやGSHの作用には一定の膜構造が必要であることを意味している。なお、この濃度のシステインやGSHは、NO₂ 量の測定には全く影響しないことを確認した。

脱窒条件下で生育させたPs. denitrificansの膜画分にDNRaseは局在している。前章で1価カチオンによるDNRase活性の促進は膜構造の変化と結びついている可能性のあることを示した。Table1-13の結果はシステインの効果は1価カチオンによる促進効果と拮抗する可能性を示している。そこでNaClとシステインやGSHの双方の濃度を変化させた混合物のDNRase活性に対する影響を調べた。結果は示さないが、NaClとシステイン、あるいはNaClとGSHは共に拮抗する関係にあり、その拮抗比が約100:1であることがわかった。

また、DNRase活性に対するシステインやGSHの効果の特異性を検討するために、システインやGSHで処理した菌の酸素呼吸能を調べた。結果は示さないが、酸素呼吸量は繰り返し実験を行っても全く低下しなかった。このことからシステインやGSHの効果は単に菌全体の酵素反応を抑えたのではなく、DNRaseに特異的に働いた可能性

が高いと考えたが、この点については更に検討が必要である。なお、この菌の酸素呼吸については第1部第3章で述べる。

要目

硝酸呼吸条件下で生育させた Ps. denitrificans の菌体をシステインを含む水溶液中に懸濁し、pH7.0, 30℃で1時間静置すると菌体のDNRase活性は大きく低下した。この効果は20種のアミノ酸のうちシステインのみに特有なものであった。低下した酵素活性は菌体破碎後も膜に局在しており、従ってシステインの効果は酵素の不可逆的な不活性化によるものと判断した。他のSH化合物や還元剤はGSHを除いて効果を示さなかった。そこでGSHの構成アミノ酸であるグルタミン酸、システイン、グリシンの菌体処理時における添加効果を調べたところ、グルタミン酸がシステインの効果を増強したので添加システインの少なくとも一部はGSHに変化してから作用すると推定した。また、第1章に述べたようにNaClでの処理でDNRaseは活性化されたが、システインとNaClは互いに拮抗することが明らかとなった。

文献

- 1) 山岡邦雄：1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性化，宇部高専研究報告，(1980) 26, 61-64
- 2) 山岡邦雄，加藤美都子：脱窒菌(Pseudomonas denitrificans)における硝酸還元能に対する1価および2価カチオンの効果，宇部高専研究報告，(1985) 31, 27-30
- 3) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Activation by monovalent cations of dissimilatory nitrate reductase in the cells of Pseudomonas denitrificans, Biochem. Int., (1988) 16, 829-833
- 4) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Effects of alkylammonium ions on the activity of dissimilatory nitrate reductase in the cells of Pseudomonas denitrificans, Agric. Biol. Chem., (1989) 43, 1451-1452
- 5) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara : Effect of cysteine on cellular activity of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans, Biosci. Biotech. Biochem., (1992) 56, 1684-1685
- 6) J.Reeve, J.Kuhlenkamp and N.Kaplowitz : Estimation of glutathione in rat liver by

reversed-phase high-performance liquid
chromatography: Separation from cysteine and
 γ -glutamylcysteine, J. Chromatogr., (1980) 194,
424-428

第3章 硝酸還元酵素の活性変化に伴う酸素呼吸能の 変化

Ps. denitrificansは好気条件下で生育すると酸素呼吸を行い、硝酸呼吸に関する酵素の合成は抑制されるが硝酸呼吸条件下で生育した菌体は硝酸呼吸能を獲得するばかりでなく酸素呼吸能をも保持している。酸素呼吸酵素系は硝酸呼吸酵素系と同様菌体の膜に存在する。これまで酸素によるDNRase合成の抑制については報告されているが^{1)~3)}、逆にDNRase活性の変化が酸素呼吸にどのような影響を与えるかについては全く報告はない。

そこで、硝酸呼吸による酸素呼吸の制御という観点から1価カチオンによるDNRaseの活性化が酸素呼吸にどのような影響を与えるかについて検討した⁴⁾。

実験方法

菌体の酸素呼吸測定法 菌体の酸素呼吸を大洋科学工業K.Kの生物呼吸測定装置(0₂アップテスターC型)を用い、検圧法により測定した。Nishimuraら⁵⁾の用いた合成培地からKNO₃とNH₄Clを除いた溶液に菌体及び必要に応じてNaClやシステイン等を加え、ベッセル中の反応溶液を合計2mLとした。発生するCO₂はろ紙にしみ込ませ

た20% KOHでトラップし、菌の呼吸する O_2 量をマンメータの読みで測定した。

実験結果

塩化ナトリウム処理菌の酸素呼吸能 硝酸呼吸条件下で生育した菌体を種々の濃度のNaClと共に30℃,1時間処理し、その処理菌体のDNRase活性と酸素呼吸能を調べた(Fig. 1-9)。硝酸呼吸菌のDNRase活性はすでに述べたように、NaCl濃度が高くなるにしたがって上昇したが、一方、酸素呼吸能はNaCl濃度に応じて逆に低下した。NaClの代わりに同じ1価カチオンを含むKClや塩化エチルアンモニウム塩の場合でも同様の傾向を示した⁴⁾。

このことは、1価カチオン処理により直接酸素呼吸が低下したか、あるいは膜構造の変化がDNRase活性を高めた結果、間接的に酸素呼吸能が減少したのか、いずれかによると考えられる。前者の可能性を調べるために、次のような実験を行った。N源として NO_3^- のみ含む培地で好氣的に培養した菌はANRaseを持ち酸素呼吸を行う。そこで、このような条件下で生育した菌を同様に1価カチオンで処理したところFig. 1-10に示すように、酸素呼吸に対するNaClの効果は硝酸呼吸で成育した菌の場合に比べ小さく酸素呼吸はわずかしこ低下しなかった。なおこの条件ではANRase活性はほとんど検出されなかった。ANRaseは細胞質に存在するが酸素呼吸系酵素は膜に存在

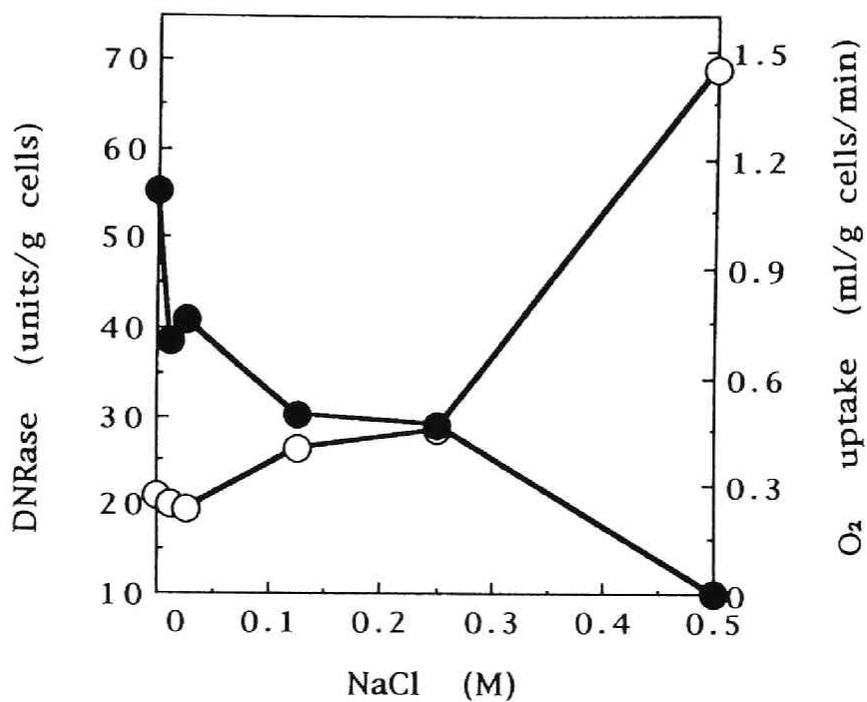


Fig. 1-9 Effect of NaCl on O₂ uptake (—●—) and DNRase activity (—○—) in nitrate - dissimilating cells

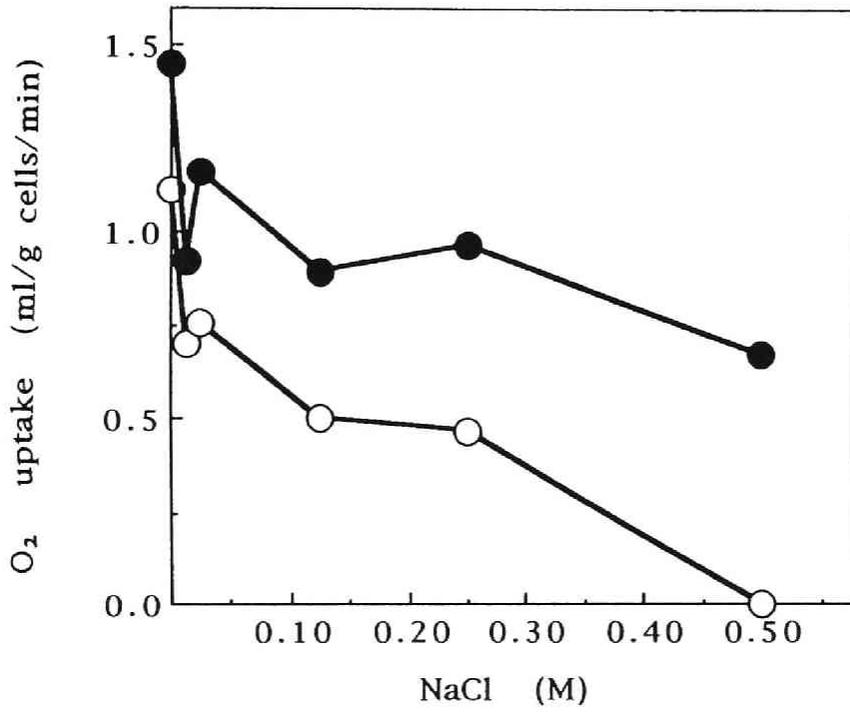


Fig. 1-10 Effect of NaCl on O₂ uptake by nitrate - dissimilating cells (—○—) and O₂ - respiring cells (—●—)

する。一方、異化型の条件ではDNRaseと酸素呼吸系酵素はいずれも膜中に存在する。酸素呼吸および硝酸呼吸条件下で生育した菌の酸素呼吸系酵素が同一のものであれば、1価カチオンが直接酸素呼吸系酵素に作用すると仮定すれば、異化型、同化型硝酸還元条件下で成育した菌における酸素呼吸は同程度の影響を受けるはずである。しかし両者には大きな差を認めた。このことはカチオンは直接酸素呼吸系酵素に作用し、その結果酸素呼吸を低下させたのではないことを示している。硝酸呼吸条件下で生育させた菌体のDNRaseは膜に存在し、ユビキノンを介して、呼吸系チトクローム酵素と接していると言われている (Fig. 1-11)^{6), 7)}。従ってカチオンが膜に作用し、膜構造に変化を与えた結果DNRase活性を高め、そのことが隣接する酸素呼吸系酵素に影響を与えて、酸素呼吸能を低下させたと考えられる。以上のことから、Ps. deitrificansにおいては、菌体をNaClで処理すると酸素呼吸系酵素と硝酸呼吸系酵素の2つの酵素系が互いに他を制御する機構が存在し得ることが示唆された。

システイン処理菌の酸素呼吸能 NaClとは逆にシステインはDNRaseを不活性化する。そこでシステインによりDNRase活性の低下した菌の酸素呼吸能を調べたところ、前章で述べたように酸素呼吸能はシステイン処理によりほとんど変化しなかった。このことはNaClの場合に生じたDNRase活性と酸素呼吸との逆相関はシステイン処理の

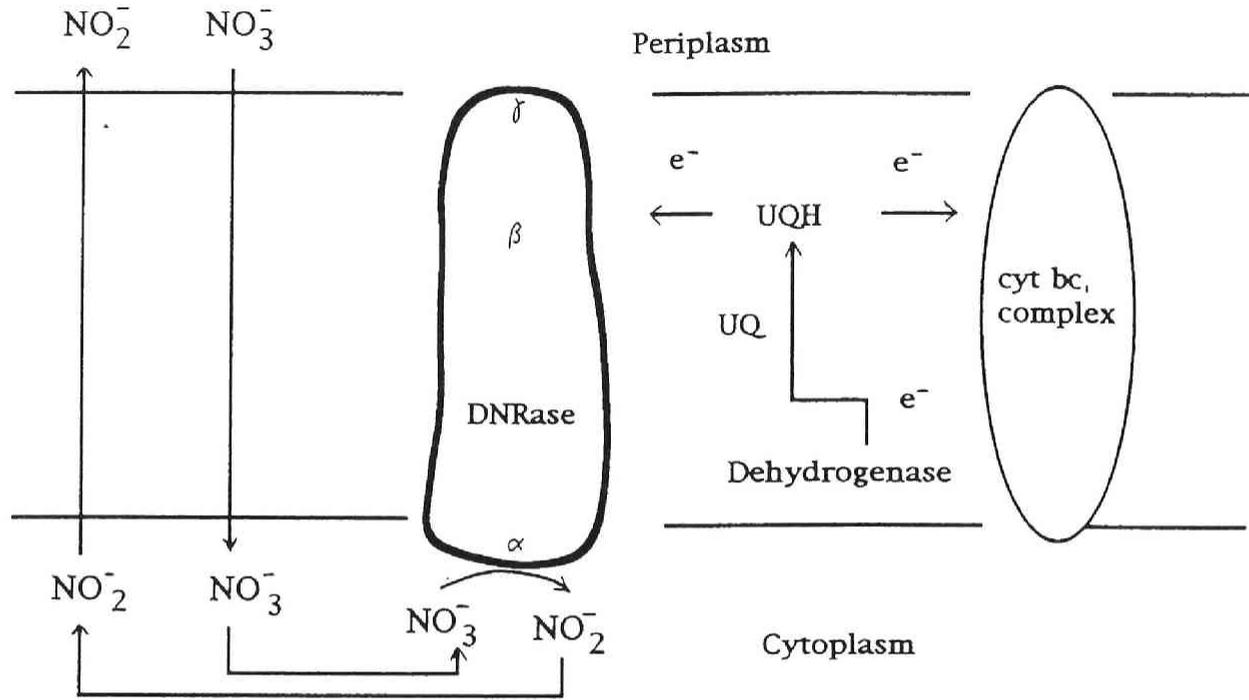


Fig. 1-11 The organization of the enzymes of denitrification with respect to the respiratory chain of Paracoccus denitrificans

UQH : Ubiquinone reduced
 UQ : Ubiquinone oxidized

Cyt : Cytochrome

Ferguson, S. J., Trends in Biochem. Sci. (1987) 12, 354 - 357

場合認められないことになるが、システインがDNRase活性を低下させるのは単に菌体全体の酵素活性を抑制するのではなく、DNRase活性を特異的に不活性化した可能性を示している。

要旨

Ps. denitrificansは培養条件により硝酸呼吸を行ったり酸素呼吸を行ったりする。NaClでの処理によりDNRase活性の上昇した菌体の酸素呼吸能は著しく低下したことから硝酸呼吸に関与するDNRase活性の変化が酸素呼吸に影響を与えることがわかった。。一方、好氣的に培養し、酸素呼吸を行いDNRaseを持たない菌体をNaClで処理したところ、酸素呼吸低下はDNRaseを保持する菌より小さかった。このことはNaClによる処理でまずDNRase活性が上昇し、そのことが酸素呼吸を抑制する作用を引き起こしたものと考えた。また、システインによりDNRase活性を低下させた菌体の酸素呼吸を測定したがほとんど変化は見られなかった。

文献

- 1) W. J. Payne : Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms, *Bacteriol. Rev.* (1973) 37, 409-542
- 2) C. A. Carlson, L. P. Ferguson and J. L. Ingraham : Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, (1982) 151, 162-171
- 3) R. Knowles : Denitrification, *Microbiol. Rev.*, (1982) 46, 43-70
- 4) 加藤美都子, 山岡邦雄 : 脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) の酸素呼吸に対する研究 (Part 1), 宇部高専研究報告, (1988) 34, 79-82
- 5) Y. Nishimura, T. Kamihara and S. Fukui : Diverse effect of formate in dissimilatory metabolism of nitrate in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 : Growth, nitrite accumulation in culture, cellular activities of nitrate and nitrite reductase, *Arch. Microbiol.*, (1980) 124, 191-195
- 6) S. J. Ferguson : Denitrifications : A question of the control and organization of electron and ion transport, *Trends in Biochem. Sci.*, (1987) 12

- 7) W. John Ingledew and Robert K. Poole :
The respiratory chains of Escherichia coli,
Microbiol. Rev., (1984) Sept., 222-227

第2部 大腸菌における硝酸還元調節とその機構

第1部において Ps. denitrificans を硝酸呼吸条件下で生育させ、その菌懸濁液を1価カチオンで処理するとそのDNRaseが活性化され¹⁾、システインやGSHで処理すると逆に不活性化されることを述べた²⁾。このような菌体処理ではNO₂を還元するNiRase活性はほとんど変化しないので、このDNRase活性の変化はNO₂蓄積量に大きく影響すると考えられる。たとえば、脱窒菌の存在する湖沼などではNO₂蓄積量に影響している可能性がある。

一方、人の体内において細菌が多く存在する場所は主として口腔内と腸内とされている³⁾。いずれにおいてもNRaseを保持する菌が存在し、生育条件によってはNO₃をNO₂に変化させる。体内にNO₂が存在するとアミンと反応することによりニトロソアミンを生じ、それが発ガン性を有することはよく知られた事実である⁴⁾。腸内ではビフィズス菌や乳酸菌のように整腸作用を持つ菌だけでなく、ウェルシュ菌やE. coliのようにそれが殖えると腸内腐敗や病原性にかかわる菌も存在している。これらのうちE. coliは幼年時から成年時にかけて、ほぼ一定量存在するが老年にかけてやや増加する傾向がある。E. coliは糞便1g中に約10⁷個も含まれており、ヒトの腸内に大量に存在していることがわかる。このE. coliは硝酸呼吸条件下、即ち嫌氣的にNO₃存在下で生育させるとDNRase

を菌体内に合成し、その作用により生じた NO_2 は腸内に排出される。従って、E. coliのDNRase活性を制御することは腸内 NO_2 の蓄積制御に影響すると考えられる。近年日本では欧米型の肉食が増加し、それとともに大腸ガンによる死者が急増している点からもE. coliのDNRase活性を制御し、腸内 NO_2 蓄積を抑制することはきわめて重要な課題といえる。そこでPs. denitrificansにおける知見を基礎として、E. coliにおけるDNRase活性の制御を検討した。その結果E. coliではPs. denitrificansの場合と同様に、NaClで菌体を処理するとDNRase活性が上昇し、システインやGSHでは逆に低下した。腸内には様々な状態のE. coliが存在している可能性があるので、培養時にNaCl, システイン, GSHを添加し、増殖中の菌体への効果を検討した。その結果NaClは対数増殖前期の菌体当たりの NO_2 生成量を高め、システインは対数増殖後期の生成量を抑えた。また、システインとGSHを共に加えた場合は全体的に抑制した⁵⁾。

これらの結果人間の腸内における NO_2 蓄積に関しシステインやGSHが抑制作用を示す可能生があるという重要な知見を得ることができた。

文献

- 1) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Activation by monovalent cations of dissimilatory nitrate reductase in the cells of Pseudomonas denitrificans, Biochem. Int., (1988) 16, 829-833
- 2) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara: Effect of cysteine on cellular activity of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans, Biosci. Biotech. Biochem., (1992) 56, 1684-1685
- 3) 谷口茂彦 : 口腔内生態系を含めた人体における硝酸塩の移行と代謝, 岡山歯学会誌, (1986) 5, 129
- 4) Mirvish, L.Wallcave, M.Eagen and P.Shubic : Ascorbate-nitrate reaction : Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. Science, (1972) 177, 65-68
- 5) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Control of nitrite accumulation in growing culture of Escherichia coli : Stimulation by NaCl and prevention by cysteine and glutathions, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)

第1章 静止菌体における硝酸還元酵素の活性化と 不活性化

E. coliは種々の観点から最もよく研究された微生物であり、その生育条件と硝酸還元の関係もくわしく知られている^{1)~4)}。好氣的に培養した場合E. coliは酸素呼吸によってエネルギーを獲得するが硝酸呼吸は行わない。好氣的条件下でも NO_3^- が存在し、 NH_4^+ 等窒素源となるものが存在しない場合は同化型の硝酸還元を行う可能性があるものの増殖はきわめて難しいとされている⁵⁾。また嫌氣的条件下で NO_3^- が存在しない場合はいわゆる発酵により生育するがその程度も低い。嫌氣的条件下で NO_3^- が存在するとDNRaseとリンクした硝酸呼吸を行い、その結果 NO_2^- を生成することはよく知られている。従って、E. coliによる NO_3^- からの NO_2^- 生成蓄積について研究するには、嫌氣状態で NO_3^- の存在する、いわゆる硝酸呼吸条件下でのDNRase活性を検討することが重要なことがわかる。そこで、第1部で述べたPs. denitrificansでのDNRase活性制御の結果を基礎としてE. coliのDNRase活性制御を試みた。人体に存在するE. coliのDNRase活性を制御する物質の検索にはヒトが日常経口摂取する食品の中に含まれる物質を中心にその効果を調べる必要がある。そこで、まず調味料としても、また生命を維持す

るためにも必要であるが、過剰摂取は様々な障害を引き起こすことが指摘されているNaClおよび比較のために他の塩類の効果を調べた。その結果Ps. denitrificansの場合と同じく1価カチオンがDNRaseを活性化させることを認めた⁶⁾。また各種ビタミン、糖、脂肪酸、アミノ酸などの効果も検討したところ、Ps. denitrificansの場合と同様システイン、GSHによるDNRaseの不活性化を認めた。この章では特にE. coliが腸内に存在することからシステイン、GSHによるDNRaseの不活性化を主として研究した。

実験方法

菌の培養 E. coli IFO 3301を用い、培養は、P. R. Lambdenらの方法⁷⁾に従った。保存培地はMgSO₄·7H₂O, 0.1g, 酵母抽出液0.2g, ポリペプトン1gを水100mLに溶かしたものをを用いた。前培養と本培養には同じ合成培地 [培地1L当たり KH₂PO₄, 5.44g; K₂HPO₄, 10.49g; (NH₄)₂SO₄, 2g; MgSO₄·7H₂O, 0.05g; MnSO₄·4H₂O, 5mg; FeSO₄·7H₂O, 0.125mg; CaCl₂, 0.5mg, KNO₃, 4g; カチオン性アミノ酸, 0.5g; L-トリプトファン30mg, ゲルコス; 7.21gを溶かしたものを]を用い、いずれも培養容器内の空気をH₂で置換した嫌気条件下30°Cで16時間培養を行った。菌体の増殖度は580nmでの濁度で測定した。

DNRase活性測定 Nishimuraらの方法⁸⁾を用いNO₃からDNRaseの作用により生ずるNO₂量を測定することにより行った⁹⁾。具体的には第1部第1章で述べた方法を用いた。

NiRase活性測定 Colemanら¹⁰⁾の方法を用いた。TEA緩衝液(50mM-トリス/1N-HCl PH8.0) 1.8mL, 10mM NAD⁺ 0.3mL, 20mM NaNO₂ 0.3mLを加え、次に2.5mM NADH 0.3mL, 酵素液0.3mLを添加し30°Cで5分間反応を行った。NADHの減少量を340nmの吸光度で測定した。酵素活性は菌体1g当たりのNADH減少量で示した。

静止菌体のインキュベーション、菌体の膜画分、膜可溶性画分の調製、菌体のトルエン処理方法は第1部第1章、また菌体中のGSH含量の測定方法は第1部第2章と同様に行った。

結果と考察

1価カチオンによる硝酸還元酵素の活性上昇

Ps. denitrificansの場合と同様の実験をE. coliについても行った(Table 2-1)。Ps. denitrificansの場合と同じく1価カチオンの塩、NaCl, KCl, Na₂SO₄はいずれもDNRase活性を著しく増大させ、2価カチオンの塩MgCl₂はあまり影響を与えなかった。またNaClは有効で、MgCl₂は無効であったことは、この効果はカチオンの種類に依るもの

Table 2-1

Effects of various salts on cellular activity of DNRase

Additions (0.5M)	DNRase (Relative activity)
None	100
NaCl	1194
Na ₂ SO ₄	996
KCl	1101
MgCl ₂	141

Cells grown to the late-log phase in semisynthetic medium under denitrifying conditions were incubated at 30°C for 1hr in 33mM sodium potassium phosphate buffer (pH7.0) in the presence or absence of the supplements. DNRase activity in the cells was determined using 10mM methyl viologen as electron donor.

でアニオンに依らないことも示している。なお、3価カチオンを含む FeCl_3 や AlCl_3 はこの濃度では沈澱を生じ、結果を得るにいたらなかった。これらのことはDNRase活性の上昇は1価カチオン特有のものであることを示している。

そこでNaClを用い、1価カチオンのDNRase活性に対する効果を検討した。まず菌体処理時におけるNaClの濃度を変化させ、その影響を調べた (Fig2-1)。NaCl濃度が高くなるに従いDNRase活性は著しく増大した。Ps. denitrificansの場合は2Mで最大値を示したが、E. coliの場合は0.5Mで最大値になった。

次に菌体処理時における温度を検討したところ、37°Cの場合最もDNRase活性を増大させた (Table2-2)。

さらに処理時間及びpHの影響を調べた。結果は示さないが、共にPs. denitrificansの場合と基本的に同一の傾向を示した。即ち処理時間と共にNaCl効果は増大し、pHが7から9と高くなるに従い、NaClの効果は著しく増大した。

以上の結果からE. coliのNaClによる処理条件はNaCl濃度を0.5Mとした菌懸濁液をpH7.0で30°C,1時間静置することとした。この条件はPs. denitrificansの場合と同一である。

1価カチオンによる硝酸還元酵素活性上昇の機構

1価カチオンによるE. coliのDNRase活性上昇の機構を探るために、Ps. denitrificansの場合と同様に以下に述べ

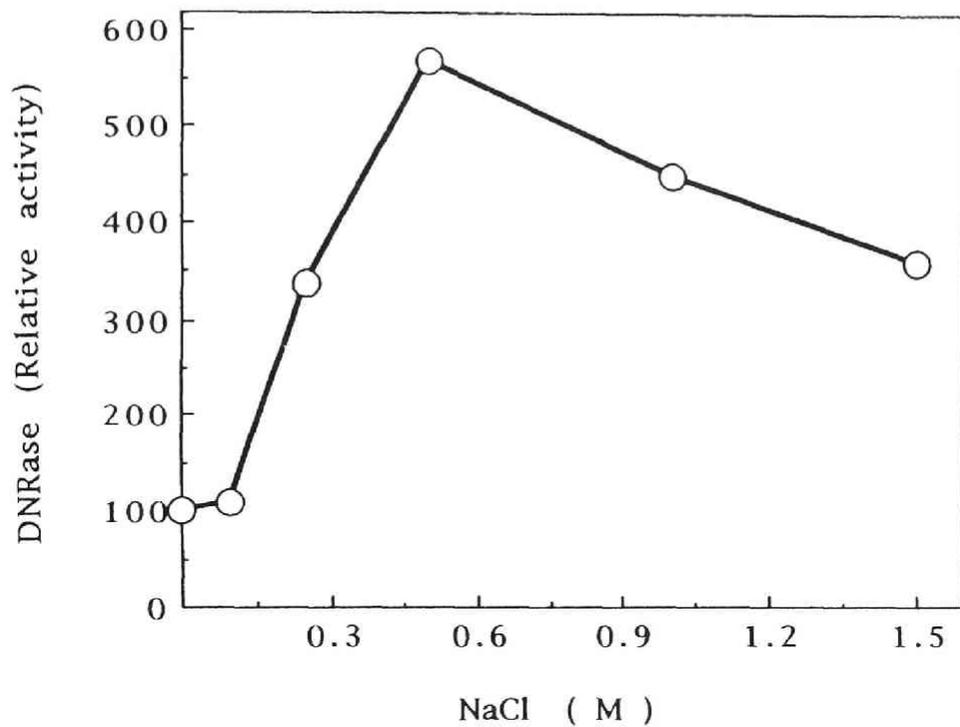


Fig. 2-1 Effect of NaCl concentration on cellular activity of DNRase

Incubation of cells with NaCl and enzyme assay were done as in Table 2-1.

Table 2-2

Effect of temperature during incubation with NaCl on DNRase activity

Temperature (°C)	DNRase (units/g cells)	
	Control cells	NaCl-treated cells
	0	58
30	52	359
37	62	562

Incubation of cells with NaCl was done at 0°C, 30°C and 37°C.

る実験を行い、同じ傾向の結果を得た。まず、タンパク質合成に対するNaClの効果を調べた(Table2-3)。菌体処理時にNaClと共にクロラムフェニコールを加えても、NaClによるDNRase活性上昇に影響を及ぼさなかったので、NaClの効果はDNRaseタンパク質の合成とは無関係であるといえる。

DNRase活性の測定はNO₃からのNO₂の生成量を指標としている。NO₂はNiRaseが存在すると更に還元される。そこでNaCl処理によるNiRase活性への影響を調べてみた。脱窒菌Ps. denitrificansの場合、NO₃はNO₂を経てN₂にまで還元され、この菌をNaClで処理してもNiRaseに影響はみられなかった(Table1-4)。一方、E. coliは脱窒を行わない。NaClで処理しDNRase活性を高めた菌のNiRase活性の変化は小さくPs. denitrificansの場合と同様DNRase活性測定に影響を与えるものではなかった(Table2-4)。

また結果には示さないがPs. denitrificansの場合と同様、NaClで処理してDNRase活性が増大した菌の破碎液も高いDNRase活性を示した。このことはE. coliの場合も1価カチオンによりDNRaseそのものが活性化された可能性を示す。またトルエンなどの有機溶媒での処理や塩化アルキルアンモニウム塩などでの処理により、DNRase活性は増大した。これらのこともPs. denitrificansの場合と同様で1価カチオンの作用が膜とかかわっていることを示唆している。

さらに菌体、菌体破碎液、膜可溶性画分の各DNRase活

Table 2-3

Effect of chloramphenicol (CAP) on the NaCl-induced increase in the activity of DNRase

Additions	DNRase (Relative activity)
None	100
NaCl(0.5M)	1670
NaCl+CAP(0.1mg/ml)	1488

Incubation of cells with NaCl and CAP was done as in Table 2-1.

Table 2-4

Changes in the activities of DNRase and NiRase during incubation with NaCl and Cysteine

Enzyme	Enzyme activity(Relative activity)		
	Control cells	NaCl-cells	Cysteine-cells
DNRase	100	502	42
NiRase	100	101	109

DNRase and NiRase activities were measured as in Methods.

性測定時の温度を変えると、60°CまではDNRase活性は温度と共に増大したが、膜可溶性画分のDNRase活性上昇率は菌体のそれよりもかなり低かった（Fig2-2）。この結果は、温度上昇による膜の脂質部分の流動性の増大がDNRase活性を促進したためと推定される。これらのことはPs. denitrificansの場合と同一傾向であり、第1部第1章で述べたように1価カチオンにより生じた菌体の膜構造の変化がDNRase活性を上昇させたものと推定した。

システインによる硝酸還元酵素の活性低下 菌体処理時及び酵素活性測定時における各種ビタミン、糖の効果を検討したが、いずれもDNRase活性には影響を与えなかった。また低級脂肪酸塩についても調べたところ、ナトリウム塩などの1価カチオン以外に、ややDNRase活性を変化させるものはあったがそれらの影響は顕著なものではなかった。

次に各種L-アミノ酸による処理効果を調べた（Table2-5）。使用したアミノ酸濃度はその溶解度のためTyr, Aspを1mMとした他はすべて5mMとした。Ps. denitrificansの場合と同様すべてのアミノ酸のうち、システインのみDNRase活性を低下させ反応液中のNO₂蓄積量を減少させた。またこれらのアミノ酸をDNRase活性測定時に加えてもなんら効果は示さなかった。

DNRase活性のシステイン処理時における濃度依存性はFig2-3に示すようにPs. denitrificansの場合と殆ど同じ

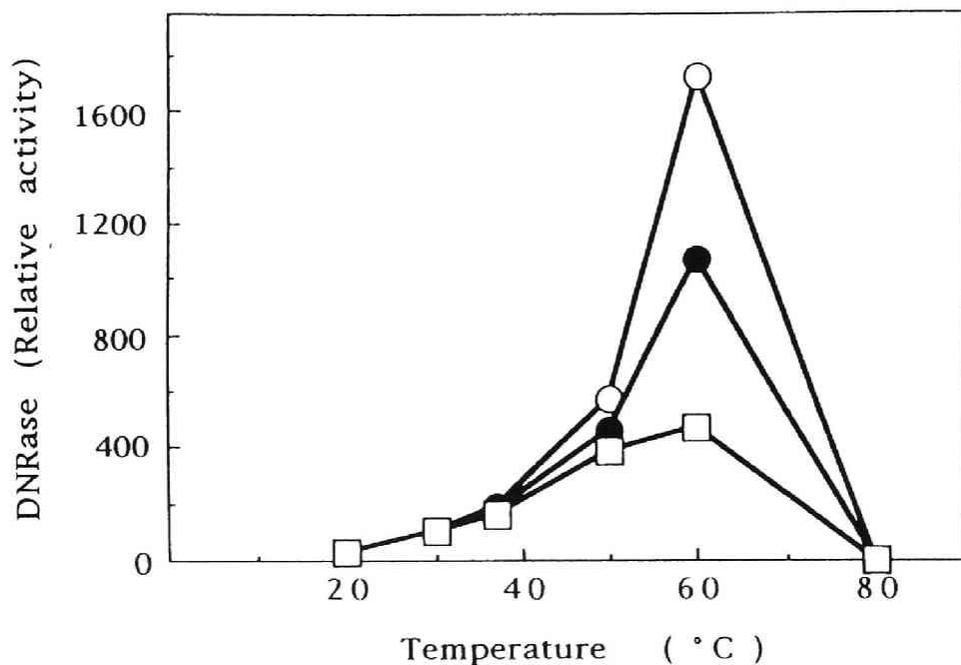


Fig. 2-2 Effect of temperature on DNRase activity in whole cells (—○—), cell-free homogenate (—●—) and solubilized membrane fraction (—□—)

Cell-free homogenate and solubilized membrane fraction were prepared as in Methods. DNRase activity at 30°C was defined as 100.

Table 2-5

Effects of amino acids on cellular activity of DNRase

L-Amino acids (5mM)	DNRase (Relative activity)
Control	100
Alanine	88
Valine	89
Leucine	88
Isoleucine	85
Glycine	103
Serine	98
Threonine	96
Methionine	98
Cysteine	58
Phenylalanine	93
Tyrosine ^a	92
Tryptophan	97
Aspartic acid ^a	99
Glutamic acid	104
Lysine	98
Arginine	90
Histidine	94
Proline	96

^a 1mM

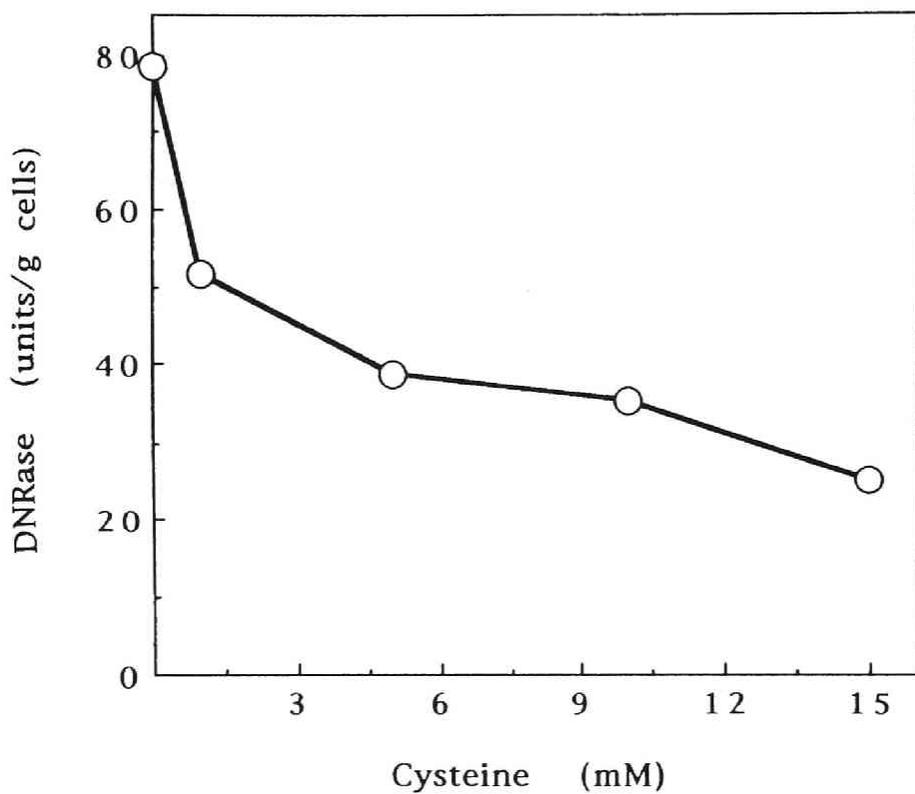


Fig. 2-3 Effect of cysteine concentration on cellular activity of DNRase

傾向を示した。

次にシステイン処理時の温度の影響を調べた (Table 2-6)。0°Cに比べて30°C, 37°Cで大きな効果を示したことはこのシステイン効果には酵素反応の関与が考えられたが、0°Cでもシステインの効果はやや認められたので非酵素的反応も一部考慮する必要がある。

30°Cでのシステイン処理時間について検討したところ、DNRase活性は処理時間に依存して低下した (Fig 2-4)。これはシステインが菌体にとり込まれ、なんらかの酵素反応が起こるのに必要な時間と考えられる。

次に菌体処理時のpHを変化させた (Fig 2-5)。pH 5~9にかけ対照菌のDNRase活性は一定値を示したがシステインを加えた場合はpH 7~9でDNRase活性を抑制した。しかしpH 5ではシステインは抑制効果を全く示さなかった。これはシステインの等電点がpH 5であり、とり込みに影響があったものと考えた。なお、pH 11の場合におけるDNRase活性の急激な上昇の原因については官能基の電離による膜構造の変化が考えられる。これらのことからシステインによる E. coli のDNRase活性抑制条件としては、Ps. denitrificans の場合と同じくシステイン 5mMを含む菌懸濁液 (pH 7.0) を30°C, 1時間静置することとした。

システインによる硝酸還元酵素活性低下の機構

システインによるDNRase活性抑制機構を探るため、まずシステイン処理してDNRase活性の低下した菌体を破碎し、

Table 2-6

Temperature dependence of cysteine-induced change
in cellular activity of DNRase

Temperature (°C)	DNRase [units/g cells]	
	Without cysteine (Control)	With cysteine
0	71	48(68)
30	94	37(38)
37	72	28(39)

Values in parentheses: Per cent of the control values

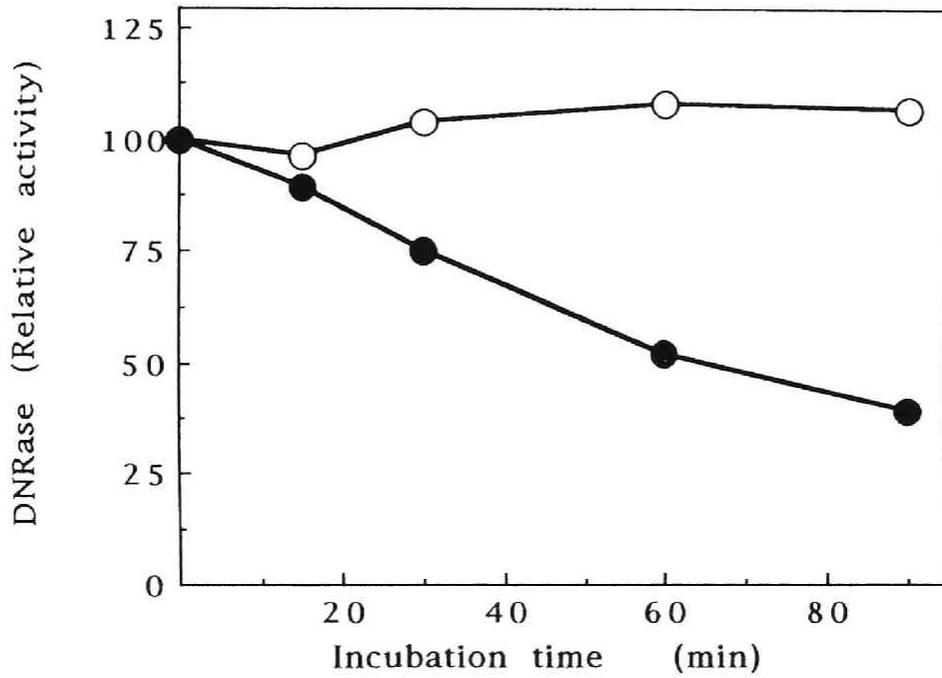


Fig. 2-4 Time course of cysteine - induced decrease in DNRase activity

○ Control
 ● Cysteine (5mM)

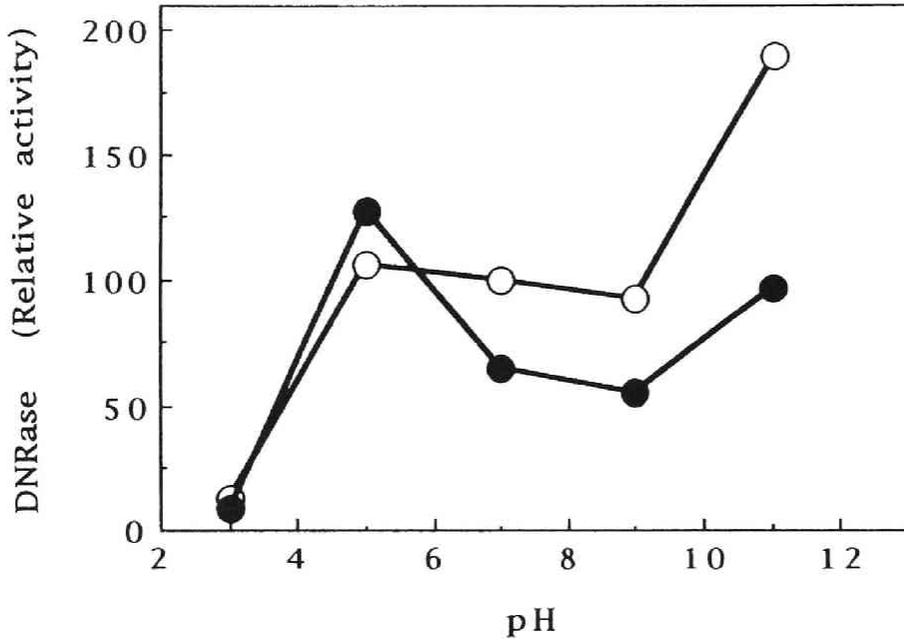


Fig. 2-5 pH dependence of DNRase activity of cells treated with (—●—) or without (—○—) cysteine (5mM)

DNRase activity at pH7.0 was defined as 100.

膜と上清に分けてその活性分布を調べたところ、膜部分のDNRaseが不活性化されていた (Table2-7)。また、システインの構造から考え、-SH基、還元力に注目して、メルカプトエタノールやアスコルビン酸の効果を検討したがいずれも効果を示さなかった。しかし、GSHはシステインに及ばないもののDNRase活性を抑制した (Table2-8)。以上の結果は Ps. denitrificans の場合とほぼ同じ傾向であった。システインとGSHが共に効果を示したことからシステインが菌体中にとり込まれ、GSHに変化した可能性を考え、システイン処理菌体中のGSH含量を測定した (Table2-9)。 Ps. denitrificans の場合GSHは全く検出されなかったが、E. coli では菌体内のGSH含量は明らかに増大していた。すなわち添加システインの少なくとも一部が菌体内でGSHに変化したことがわかった。このことはTable2-8に示したようにシステインの効果をアスコルビン酸が高めたことから支持される。即ち、アスコルビン酸の還元性がシステインの酸化を防ぎGSHへの変換を容易にしたためと考えられた。次にGSHの構成アミノ酸であるグリシン、システイン、グルタミン酸の各混合物による処理を行った (Table2-10)。 Ps. denitrificans の場合はグリシン、グルタミン酸、システインの3種を混合した場合と、グルタミン酸とシステインの2種を混合した場合いずれもシステインの効果を強めたが、E. coli ではシステイン単独の効果と同じであった。このことは E. coli の場合、菌体内にはGSH合成に利

Table 2-7

Inactivation of membrane-bound DNRase upon incubation of cells with cysteine

Samples	DNRase (units/g cells)	
	Control cells	Cysteine-treated cells
Intact cells	79	34
30,000 <u>g</u> Pellet	72	29
30,000 <u>g</u> Supernatant	9	7

Cells incubated with 5 mM cysteine were disrupted by sonication. The cell-free homogenate obtained was centrifuged at 30,000 g and the resulting pellet and supernatant were assayed for DNRase.

Table 2-8

Effects of thiol compounds and ascorbic acid on cellular activity of DNRase

Additions (5mM)	DNRase (Relative activity)
None	100
Cysteine(Cys)	51
GSH	71
Mercaptoethanol	98
Ascorbic acid	101
Ascorbic acid + Cys	39

Table 2-9

GSH content in cysteine-treated cells

Cells	DNRase activity ^a	GSH content ^b
Control cells	100	5.14
Cysteine-treated cells	70	7.91

^a relative activity

^b $\mu\text{mol/g}$ cells

Cells grown to the late log phase were incubated with or without cysteine and disrupted by sonication and GSH content was measured as in Methods.

Table 2-10

Effects of GSH and its constituent amino acids

Additions (1mM)	DNRase (Relative activity)
None	100
GSH	70
Cysteine(Cys)	46
Glycine(Gly)	93
Glutamic acid(Glu)	93
Cys+Gly+Glu	52

用できるグルタミン酸，グリシンが十分量存在しGSH合成量がシステイン量に依存していることを示している。

システインが菌体に取り込まれた後GSHに変化し、DNRase活性を低下させるとすると、GSHやシステインをDNRase活性測定時（5分間）に添加した場合、菌体処理時（60分間）における添加と異なり時間が短いためにシステインはGSHに変化できないが、GSHはそのまま作用する可能性があるのでGSHの効果がシステインのそれに比べ大きいことが期待される。結果は示さないが、膜画分のDNRase活性測定時にシステイン,GSHをそれぞれ添加した場合システインが無効なのに比べ、GSHはややDNRase活性を低下させた。また菌体のDNRase活性測定時にGSH,システインを添加した場合両者はほとんど効果を示さなかった。これは膜画分にGSHを加えた時はGSHが直接DNRaseに接近する可能性があるが、菌体にGSHを加えた時は、GSHの菌体へのとり込みに問題があると思われる。いずれにしてもGSHがDNRaseに直接作用する可能性を示すものと考えられる。

要目

硝酸呼吸条件下で生育させた E. coli の菌体を pH7.0, 30℃ で1時間 1 価カチオンを含む水溶液中で静置すると菌体の DNRase が活性化された。この効果は 1 価カチオンに特有のものであり、第 1 部第 1 章で述べた Ps. denitrificans における 1 価カチオン効果と基本的に同じ傾向を示した。すなわち、DNRase の不可逆的活性化が膜構造の変化によっておこることが E. coli においても確認された。

また、E. coli の DNRase に及ぼすシステインの効果調べたところ、Ps. denitrificans の場合と同様、酵素を不活性化することが認められた。更に、システイン処理した菌体中の GSH 含量が増加していることが確認されたのでシステインの少なくとも一部は GSH に変化後作用することが示された。一方、菌体破砕液にシステインや GSH を添加して DNRase 活性を測定したところ、GSH は活性をやや低下させたがシステインは影響しなかった。このことはシステインが GSH に変化して DNRase 活性を抑制するという考えを支持するものである。

文献

- 1) C.H. MacGregor : Biosynthesis of membrane-bound nitrate reductase in E. coli; Evidence for soluble precursor, J. Bact., (1976) 126
- 2) Roger A. Clegg : Purification and some properties of NRase (EC 1.7.99.4) from Escherichia coli K12, Biochem. J., (1976) 153, 533-541
- 3) M. Ishimoto and I. Yamamoto : Cell growth and Metabolic products of Escherichia coli in nitrate respiration, Z. Allg. Mikrobiol., (1977) 17, 309-320
- 4) W. John Ingledew and Robert K. Poole : The respiratory chains of Escherichia coli, Microbiol. Rev., (1984) Sept., 222-227
- 5) 石本真 : 嫌気性呼吸と硫黄代謝, 石本真教授業績集, (1988)
- 6) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Control of nitrite formation by Escherichia coli: Effects of sodium chloride, cysteine, glutathione and vegetable extracts, Biosci. Biotech. Biochem., (revised)

- 7) P.R.Lambden and J.R.Guest : A novel method for isolating chlorate-resistant mutants of Escherichia coli K12 by anaerobic selection on lactate plus formate medium, J.Gen.Microbiol, (1976) 93, 173-176
- 8) Y.Nishimura, T.Kamihara and S.Fukui : Diverse effect of formate on the dissimilatory metabolism of nitrate in Pseudomonas denitrificans ATCC 13867 : Growth, nitrite accumulation in culture, celluar activities of nitrate and nitrite reductase, Arch.Microbiol., (1980) 124, 191-195
- 9) D.J.D.Nicholas and A.Nason In : Methods in Enzymology, (1957) 3, 981-984
- 10) Kathleen J.Coleman, Athel Cornish-Bowden and Jeffrey A.Cole : Purification and properties of nitrite reductase from Escherichia coli K12, Biochem.J., (1978) 175, 483-493

第2章 菌増殖時の硝酸還元酵素の調節：

亜硝酸蓄積の制御

前章で、E. coliの静止菌体をNaClで処理すると、そのDNRaseが活性化され¹⁾、システイン、GSHで処理すると逆に不活性化されることを述べた²⁾。

これらのことを腸内に応用して考えると、高濃度のNaClと一定時間接触したE. coliは、そのDNRase活性が上昇し、その後NO₃と触れるとNaClと接触していない菌体に比べ多量のNO₂を生成することになり、逆にシステインやGSHと一定時間接触した菌体はその後生成するNO₂が著しく少ないものと推定される。これらの菌の状態は腸内において十分可能性のあるものであり、NaClやシステイン、GSHがE. coliの静止菌体に作用し、腸内NO₂蓄積量に大きな影響を与える可能性を示している。

一方、腸内のE. coliは様々な状態で存在しており、静止菌の状態もあれば対数増殖期の菌体も存在する。そこで、E. coliの増殖培地にNaCl、システイン、GSH等を加え、NO₂生成量や菌体の増殖への影響を検討した³⁾。

実験方法

増殖培地へのNaCl、システイン及びGSHの添加

P. R. Lambdenら⁴⁾の用いた培地に種々の濃度のNaCl, システイン, GSHを加えた。システインとGSHについては培地成分と別に滅菌した無菌水に溶解しその溶液を培地に加えて使用した。

菌体を接種後、嫌気的狀態で培養後一定時間後嫌気下で一定量サンプリングした。サンプリングした菌懸濁液について増殖度を測定し、Nicholasら⁵⁾の方法でNO₂量を求めた。

培地中のGSH, システイン量測定方法は第1部第2章の実験方法で述べた。

結果と考察

増殖培地への塩化ナトリウム添加効果 E. coliの静止菌体をNaClで処理するとDNRase活性が上昇することから、この効果が静止菌体だけでなく増殖している菌体にも及ぶ可能性を調べるために増殖培地中にNaClを添加し、菌体当たりのNO₂⁻生成量やDNRase活性の経時変化を調べた。対数増殖前期（培養4.5hr後）と後期（培養8.5hr後）における測定値をTable2-11に示した。対数増殖前期ではNaCl添加培地で生育した菌のDNRase活性は対照菌の活性に比べ高く、それに比例して菌体当たりのNO₂生成量も高かった。しかし対数増殖後期にかけてDNRase活性は対照菌のそれとほぼ等しくなり、NO₂生成量もそれに比例した。菌体の増殖度はNaCl添加培地の方が低かっ

Table 2-11

Effect of NaCl added to growth medium on nitrite production by cells and on cellular activity of DNRase

Culture	Incubation time(hr)	NO ₂ production (m mol/g cells)	DNRase activity (units/g Cells)
Control	4.5	37.7	137
	8.5	37.2	129
NaCl-added	4.5	75.8	247
	8.5	37.2	130

Cells were cultivated in semisynthetic medium supplemented with 0.25M NaCl under denitrifying conditions. An adequate amount of culture was withdrawn after 4.5 and 8.5h. NO₂ content in culture was measured as in Methods.

た。これらのことを NO_2 蓄積の点から考えると、増殖培地への NaCl 添加効果は NaCl 処理における効果には劣るものの、 NO_2 蓄積に影響を与えていることがわかった。

NO_2 蓄積と培地中の NaCl との関係について更に調べるため、酸素呼吸条件下、硝酸呼吸条件下で培地中に NaCl を加え各々の場合の増殖度を比較するとDNRaseをもたない酸素呼吸菌の場合ほとんど培地中の NaCl の影響を受けなかったのに対し、硝酸呼吸菌では NaCl 0.5Mでやや増殖度の低下を認めた (Fig2-6)。この点を更に確認するため、脱窒菌 Ps. denitrificans を用い同様に増殖に及ぼす NaCl の効果調べたところ酸素呼吸菌には全く影響は無く、硝酸呼吸菌の増殖は大きく低下した (Fig 2-7)。一方硝酸呼吸菌のDNRase活性は逆に著しく上昇しており、それに伴って NO_2 の濃度が菌体周辺で高まり、増殖を抑えたものと考えられる。酸素呼吸菌の場合はDNRaseを持たないためこのような影響がなかったものと考えた。E. coliの場合、Ps. denitrificansに示された結果ほど大きな差は認められなかったが同様な原因が考えられる。

いずれにしても、培地中に NaCl が存在すると菌体当たりの NO_2 生成量を対数増殖前期に増加させることがわかった。このことは腸内において NaCl は NO_2 生成量を増加させる可能性があり、その過剰摂取による害の一つとも考えられる。

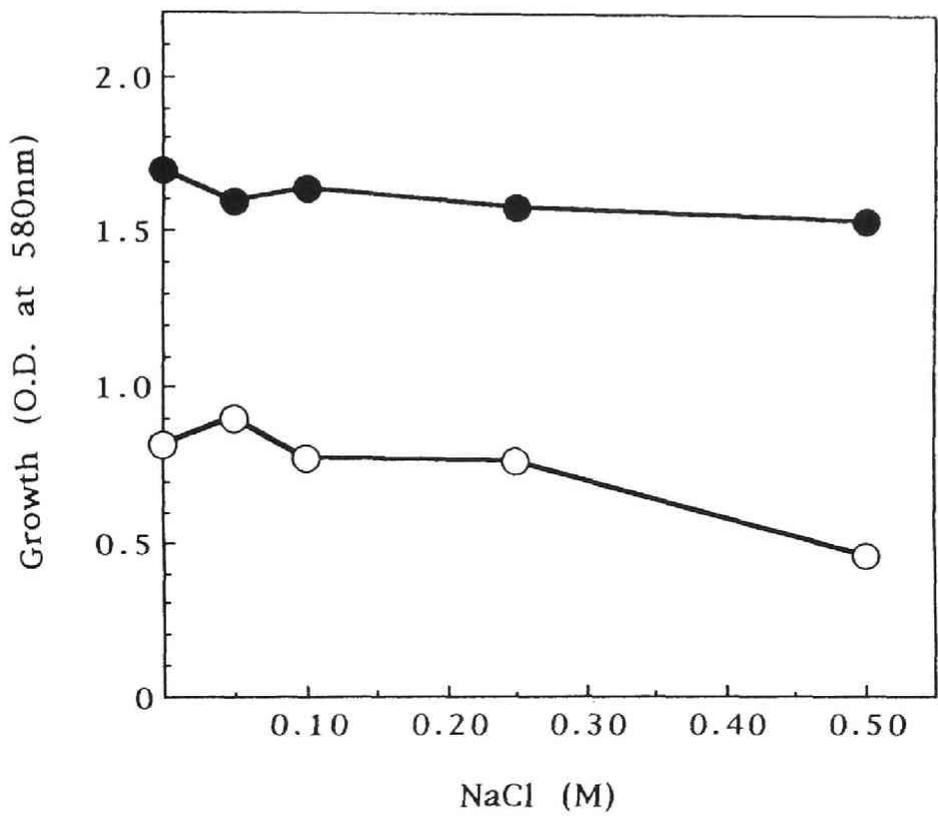


Fig. 2-6 Effect of NaCl on cell growth (*E.coli*)

- Cells grown with nitrate respiration
- Cells grown with oxygen respiration

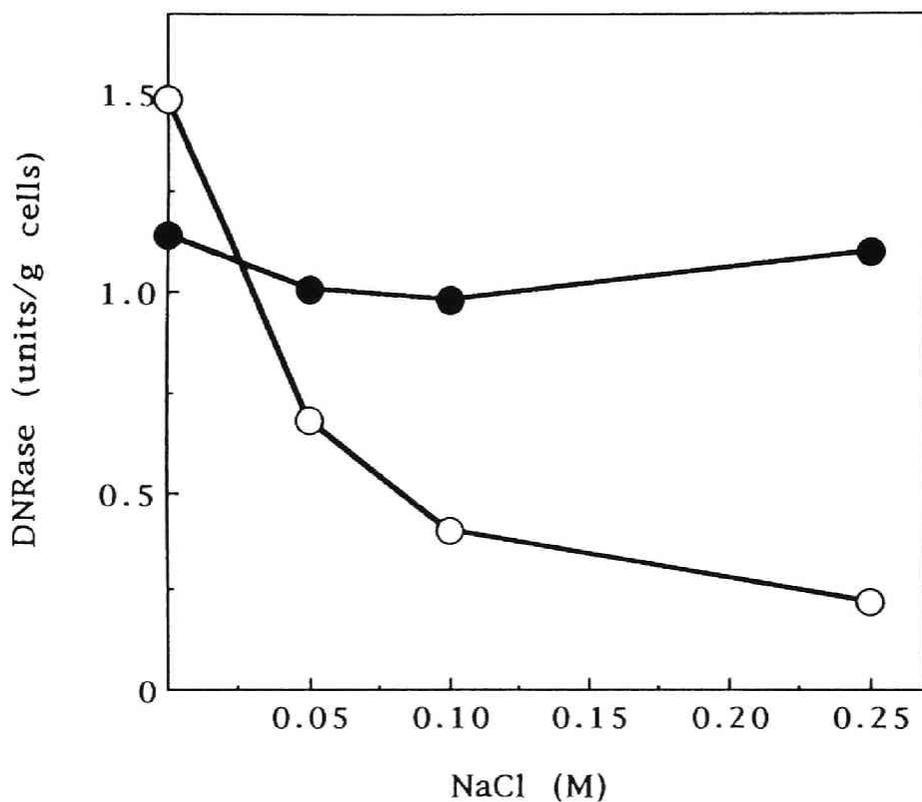


Fig. 2-7 Effect of NaCl on cell growth (Ps.denitrificans)

- Cells grown with nitrate respiration
- Cells grown with oxygen respiration

増殖培地へのシステイン添加効果 次に静止菌体でDNRaseを不活性化する効果をもつシステインを増殖培地に添加した。NaClの場合と同様に菌体当たりのNO₂生成量やDNRase活性の経時変化を測定した。システイン1mM添加では増殖度は全く影響を受けず対数増殖後期以後のNO₂生成量は抑制され、DNRase活性低下も確認された（Table2-12）。このことはシステインが、E.coliに対し増殖を伴った場合も伴わない場合でもNO₂蓄積量を低下させることを意味しており、体内におけるNO₂蓄積防止に関しシステインが有効であることがわかる。なお、システイン5mMを添加した場合NO₂生成量は大きく減少したものの菌の増殖度も低下した。

このシステイン添加とDNRaseとの関係が菌体の増殖度に与える影響を調べるため、NaClの場合と同様、酸素呼吸、硝酸呼吸条件下でシステインを培地中に添加した。DNRase誘導を行わない酸素呼吸条件下でシステイン1mMを添加した場合増殖度は全く変化しなかったが、DNRaseを誘導する硝酸呼吸条件下では約15%増殖度が高まった。この値は有意の差と考えるにはやや小さいものであったがシステインがDNRase活性を低下させ、NO₂蓄積を抑制し、増殖を促進させた可能性をうかがわせるものである。また、結果は示さないが培地中のシステイン残存量を調べたところ対数増殖後期までにシステインが完全に菌体に取り込まれていることがわかった。

Table 2-12

Effect of cysteine added to growth medium on nitrite production by cells and on cellular activity of DNRase

Addition	NO ₂ production [mmol/g cells]	DNRase activity [units/g cells]
None	33.6	113
Cysteine(1mM)	19.0	74

Cells were cultivated to the late log phase in semisynthetic medium with cysteine under denitrifying conditions. NO₂ content in culture medium was measured as in Methods.

増殖培地へのシステインとグルタチオン混合物添加効果

GSHでE. coli菌体を処理するとそのDNRase活性が低下したことからGSH5mMを増殖培地に添加したが増殖、NO₂蓄積量のいずれにも全く影響を与えなかった。GSHの培地中の残存量を調べたところ、システインの場合と同様に増殖と逆比例し、対数増殖後期まで減少することがわかった (Fig. 2-8)。一方、Table 2-9に示したように静止菌体に加えたシステインは少なくともその一部がGSHに変化する。このことは菌体のDNRase活性低下にはシステイン、GSHの共存が必要であることを示唆している可能性がある。そこで培地中にシステインとGSH各1mMを共に添加したところ、Fig. 2-9に示すように、菌体の増殖度は全く抑制しなかったが、NO₂蓄積量を対数増殖前期から大きく抑えた。これらのことはシステインとGSHの菌体内における作用についての新しい関係を示すものではあるが、いずれにしてもシステイン 1mM、GSH 1mM各々の効果とは大きく異なり、NO₂蓄積抑制に有効なものとなった。

またGSHはジペプチドのγ-グルタミン酸-システインを經由して合成されるのでその培地添加効果を検討したがNO₂蓄積防止効果を示さなかった。これらのことはシステインは単にGSHに変化するだけでなく、システイン、GSH各々が増殖時に共存することが必要であり、そのことがNO₂蓄積抑制につながると考えられる。

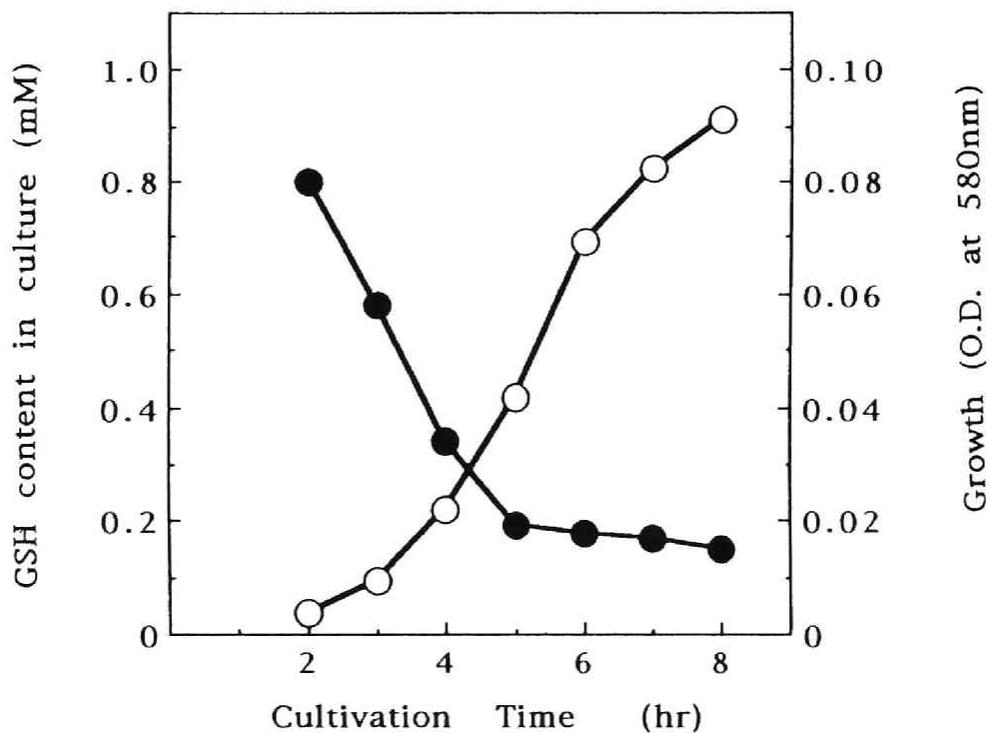


Fig. 2-8 Change in GSH content in GSH supplemented culture

—○— Growth
 —●— GSH content

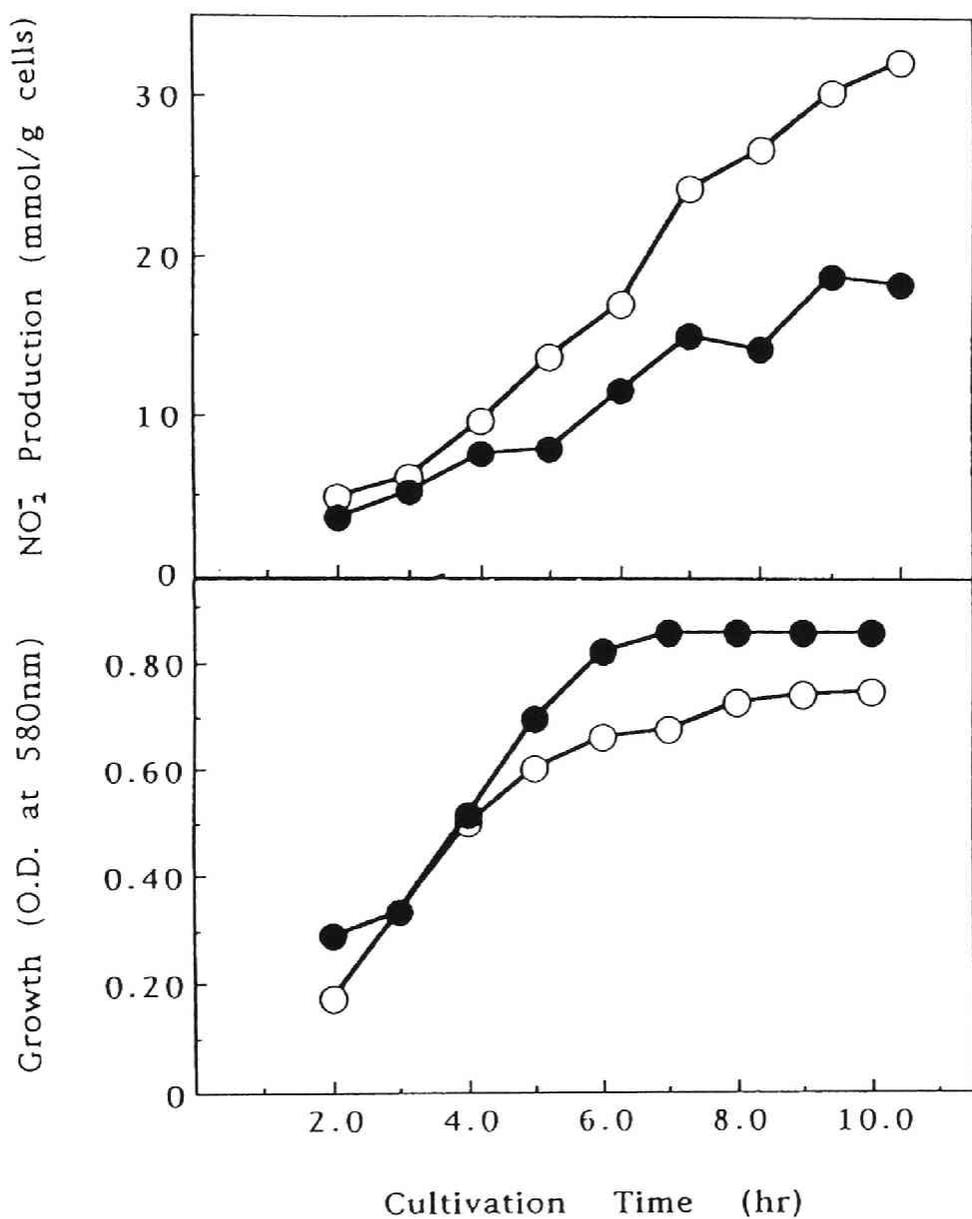


Fig. 2-9 Effects of cysteine and GSH on cell growth and NO₂⁻ production by cells

—○— Control
 —●— GSH(1mM) + Cysteine(1mM)

要旨

増殖培地中に0.25MのNaClを添加したところ対数増殖前期の菌体当たりのNO₂生成量を高め、以後の増殖を抑制した。システイン 1mMを添加した場合は対数増殖後期のNO₂生成量を抑制し、増殖度には影響を与えなかった。システインとGSHを1mMずつ添加した場合はNO₂生成量を対数増殖前期から以後減少させ菌の増殖度は低下させなかった。

文献

- 1) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Activation by monovalent cations of dissimilatory nitrate reductase in the cells of Pseudomonas denitrificans, Biochem. Int., (1988) 16, 829-833
- 2) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara : Effect of cysteine on cellular activity of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans, Biosci. Biotech. Biochem., (1992) 56, 1684-1685

- 3) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Control of nitrite accumulation in growing culture of Escherichia coli : Stimulation by NaCl and prevention by cystein and glutathions, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)
- 4) P.R.Lambden and J.R.Guest : A novel method for isolating chlorate-resistant mutants of Escherichia coli K12 by anaerobic selection on lactate plus formate medium, J. Gen. Microbiol., (1976) 93, 173-176
- 5) D.J.D.Nicholas and A.Nason : In : Methods in Enzymology, (1957) 3, 981-984

第3部 大腸菌の硝酸還元と酸素呼吸に及ぼす野菜抽出液の効果

これまでNaClでE. coliの菌体を処理するとDNRaseが活性化され、その結果NO₂生成量がきわめて大きくなるが、一方、システインやGSHで処理すると、DNRaseは不活性化され、NO₂生成も抑制されることを述べた¹⁾。

近年日本において大腸ガンによる死者は急増している。NO₂は体内でアミンと反応してニトロソアミンになりそれがガン生成の原因の一つであることはよく知られている事実である²⁾。従ってシステインやGSHによるNO₂生成抑制効果が期待されるが、ヒトがシステインやGSHを食品として単独で摂取することはない。そこでヒトが日常的に摂取する食品のうち、E. coliによるNO₂生成を抑制するものを検索した。特に一般的に健康に良いとされている野菜に注目した。野菜には各種ビタミンが含まれており栄養学のおよび予防医学的見地からよく研究されているが、野菜と、E. coliによるNO₂生成との関係についての報告はない。そこで、日常摂取する野菜のうちDNRase活性を抑制する品種を調べた。

また第1部第3章で脱窒菌をNaClで処理するとDNRase活性が上昇するのに伴い、同じエネルギー獲得系である酸素呼吸能が著しく低下することを述べた。そこで、

E. coliでも同様の点について調べると共に、システインや野菜抽出液の酸素呼吸に対する影響を調べた³⁾。

文献

- 1) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Control of nitrite formation by Escherichia coli; Effects of sodium chloride, cyseine, glutathione and vegetable extracts, Biosci. Biotech. Biochem., (revised)
- 2) Mirvish L.Wallcave, M.Eagen and P.Shubic : Ascorbate-nitrate reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds, Science, (1972) 177, 65-68
- 3) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara: NaCl-induced depresseion of respiration and its prevention by vegetable extracts in Escherichia coli cells, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)

第1章 野菜抽出液による硝酸還元抑制効果

E. coliの静止菌体をNaClで処理するとDNRaseが活性化され、システインやGSHで処理すると不活性化されることを第2部で述べたが、このうちNaClによる作用は腸内でのNO₂蓄積増大をもたらす可能性があるため、健康上悪影響が考えられる。そこでNaClの影響を除去するために種々の食品抽出液の効果を検討した。食品の代表例としての野菜抽出液をNaClと混合して菌体を処理したところDNRaseの活性化は完全に抑制された。またシステインやGSHはDNRase活性測定時に加えてもDNRase活性を阻害せず無効であったが、野菜抽出液を酵素活性測定時に添加した場合は、DNRase活性は大きく阻害された。このことは摂取した野菜はシステインやGSHの作用とは別の局面でE. coliのDNRase活性を低下させる可能性があることを示すものであり、生理的に有用な知見である。この章ではこの野菜の効果について調べた結果を示す¹⁾。

実験方法

野菜抽出液の調製 野菜の可食部分をよく洗浄し、その100gに0.033Mリン酸緩衝溶液(pH7.0)20mLを加えミキサーで細かく破碎した。得られたジュースを100°Cで

10分間加熱し、布で濾過後、濾液を17,000gで20分間遠心分離した上清に上記緩衝液を加え100mLとした。この液を-80°Cで保存し、使用直前に0.45μmの限外濾過膜で濾過した。抽出液1mLには野菜1g中の成分が含まれている。

酵素活性測定時における野菜抽出液の添加効果

第1部第1章で述べたDNase活性測定時に各種野菜抽出液を加えた。酵素液としては菌体懸濁液や菌体破砕液を用いた。

原子吸光法による金属イオンの定量 野菜抽出液中の金属イオンの定量は原子吸光/フレイム分光光度計AA-650（島津製作所KK）を用い常法に従って行った。Fe³⁺の定量条件は2482Åの波長でスリット幅2mm, 燃焼ガス2.5 L/min, バーナ高さ4mm, 電流値7mAとした。

野菜抽出液中の塩類除去 野菜抽出液を脱塩器IE-Labo(TOSOH)にかけ抽出液から塩類を除去した。

野菜抽出液による処理 菌体懸濁液に各種濃度の野菜抽出液を加え、30°C, 1時間静置後33mMリン酸緩衝液で集菌洗浄した。得られた菌を野菜抽出液による処理菌とした。

結果と考察

酵素活性測定時における各種野菜抽出液の添加効果

各種野菜抽出液のうち季節によらずほぼ一定の入手が可能なカイワレ大根の効果を中心に検討した。DNRase活性測定時にカイワレ大根抽出液を添加したところ、Fig. 3-1のような結果を得た。カイワレ大根抽出液の添加により急激にDNRase活性が低下していることがわかる。この効果は、菌体、菌体破砕液いずれの場合も同一の傾向であった。なお、DNRase活性の測定には NO_3^- より生成する NO_2^- をジアゾカップリング法により発色させ定量を行っているが、この発色を抽出液は妨げなかった。日常摂取する各種野菜の抽出液の効果を一覧表として示した（Table3-1）。ネギ、ニンニク、カボチャ等に非常に大きな効果が認められた。効果の大きいかぼちゃと中程度のにんじんおよびほとんど効果を示さなかったじゃがいもをDNRase活性測定時に添加し各々の濃度の影響をFig. 3-2に示した。ニンニク中には数種の硫化物や抗菌性物質が含まれているので多くの酵素を同時に阻害した可能性がある。又、ネギの中にも硫化物が存在しているのでニンニクとネギについては他の野菜とは別の作用の可能性があると考えられる。いずれにしてもE. coliによる NO_2^- 生成を多種類の野菜抽出液が大きく阻害した。また果物はメロンを除き野菜ほど大きな効果は示さなかった。カイワレ大根中の有効成分を分離するため、抽出液中の

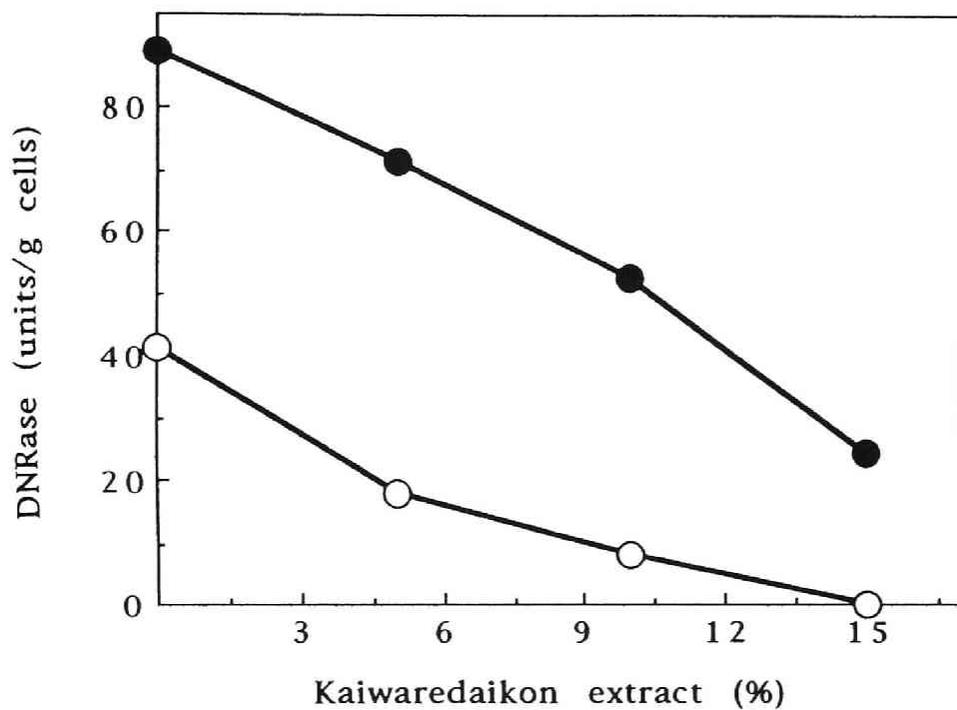


Fig. 3-1 Effect of kaiwaredaikon concentration on DNRase activity

Kaiwaredaikon extract was added to the reaction mixture for enzyme assay.

- Intact cells
- Cell-free homogenate

Table 3-1

Effects of vegetable and fruit extracts on DNRase activity

Additions (50mg/ml)	DNRase activity (Relative activity)
None	100
Garlic	3
Pumpkin	10
Welsh onion	12
Kaiwaredaikon	43
Broccoli	49
Bean sprouts	67
Carrot	79
Chinese cabbage	80
Pimento	80
Chingentsuai	82
Parsley	84
Celery	88
Lettuce	100
Eggplant	107
Potato	107
Melon	55
Kiwifruit	88
Apple	90
Banana	92
Satsuma mandarin	117

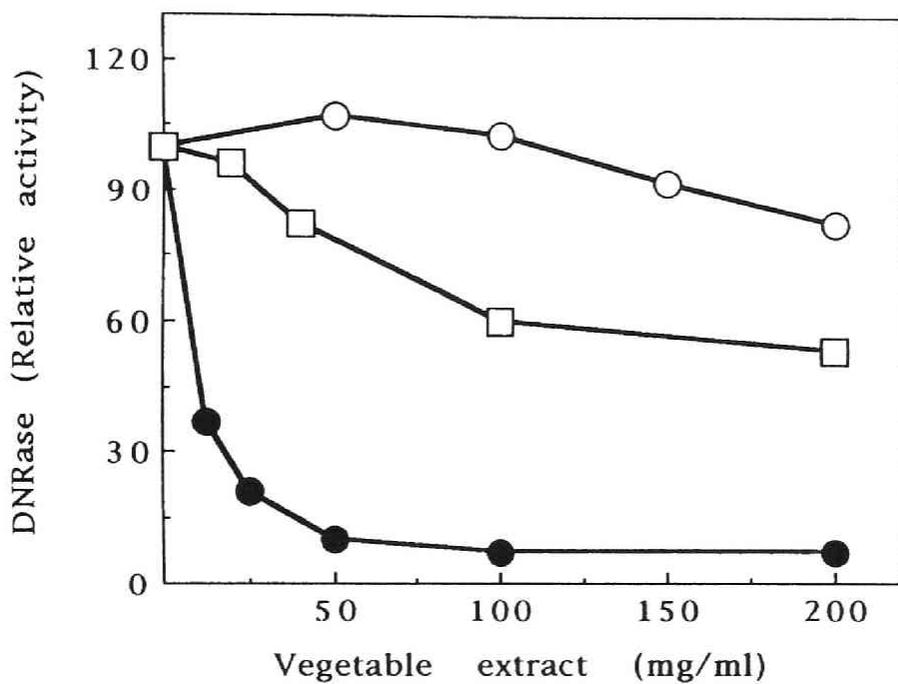


Fig. 3-2 Effects of vegetable extracts on DNRase activity

- Potato
- Pumpkin
- Carrot

塩類について検討したが明確な結論は得られなかった。

塩化ナトリウムでの菌体処理によるDNRase活性化に対する各種野菜抽出液の抑制効果 カイワレ大根抽出液で菌体を処理したところ、DNRase活性は殆ど影響をうけなかった。NaClによるDNRaseの活性化に対する野菜抽出液の効果を調べるため、NaClとカイワレ大根抽出液の混合液で菌体を処理した。NaCl処理菌は処理時間が長くなるに従い、DNRase活性は上昇したがカイワレ大根抽出液とNaClを混合したものではNaClの上昇効果は完全に抑制された(Fig3-3)。このことは野菜を摂取することによりNaClによるDNRase活性化が防止できることを示している。

そこで、各種野菜および果物抽出液による菌体処理の効果と、抽出液とNaClを同時に添加した場合の効果をTable 3-2にまとめた。ほとんどの野菜抽出液は単独ではDNRase活性に与える影響は小さかったが、NaClによるDNRase活性化をニンニクなどを除いてほぼ完全に抑制した。

菌体処理の際、菌体は野菜抽出液やNaClと共存しているが、その後洗浄され、DNRase活性を測定する時には野菜抽出液やNaClは除かれ、菌体のみとなる。従って野菜抽出液によるNaCl効果抑制の作用機構については次の二点が考えられる。

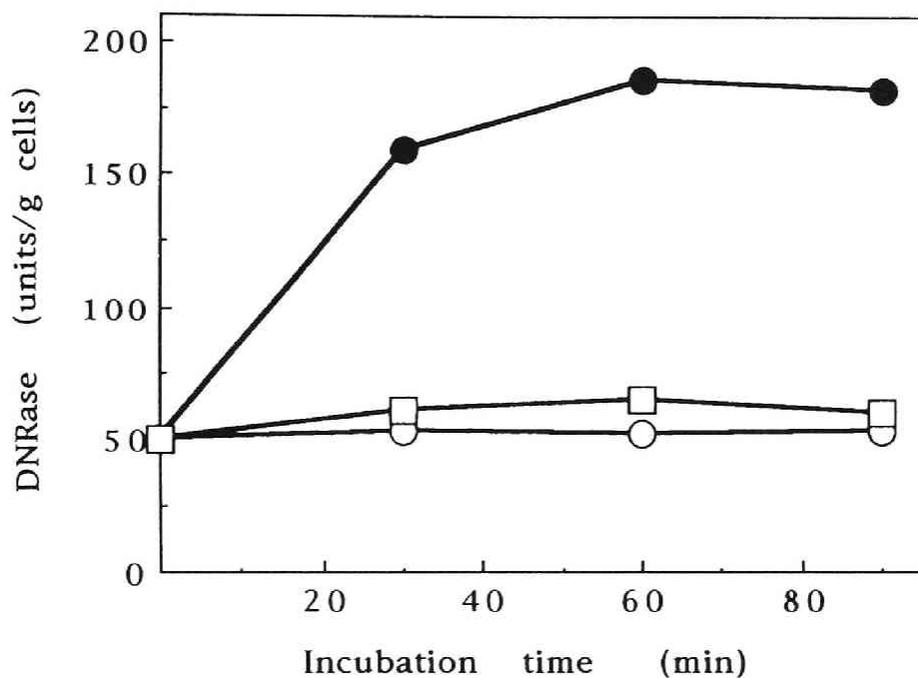


Fig. 3-3 Suppressive effect of kaiwaredaikon extract on NaCl - induced activation of DNRase

- Control
- NaCl
- Kaiwaredaikon + NaCl

Table 3-2

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

Additions (0.25g/ml)	DNRase activity ^a in cells preincubated	
	Without NaCl	With NaCl [0.5M]
None	100	502
Garlic	86	436
Pumpkin	105	66
Welsh onion	81	100
Kaiwardaikon	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

^a Relative activity

① 処理中に野菜抽出液が Na^+ をキレートしてマスクする。

② Na^+ の作用そのものを野菜抽出液が抑制する。

①の点については NaCl が0.5Mという高濃度であることと、1価カチオンのキレートは一般に少ないことから可能性は小さいと考えた。一方、野菜抽出液と NaCl を混ぜた場合、確かに NaCl による活性化はほぼ完全に抑制されるものの、DNRase活性は野菜抽出液や NaCl を加えない対照菌のレベル以下にはなりにくい。このことは②の可能性の高いことを示している。酵素活性測定時に NaCl を添加してもDNRaseは活性化されないこと、および菌体破砕液を NaCl で処理してもDNRaseは活性化されないことはすでに述べた。これらのことから NaCl の作用発現のためには一定の膜構造が必要で Na^+ は酵素に直接作用するのではなく、膜の構造変化を介して、DNRase活性を高めると考えられた(第2部第1章)。それに対して野菜抽出液は酵素活性測定時において菌体や菌体破砕液に対しても阻害効果を示しており、 Na^+ の作用と異なりDNRaseそのものに作用していると考えられる。すなわち、菌体処理時においては野菜抽出液は Na^+ の作用を抑え、酵素活性測定時にはDNRase活性そのものを阻害すると考えられる。

これまで述べたE. coliのDNRase活性がそのまま腸内におけるE. coliのDNRase活性と結びつくか不明であるため生理的意義ははっきりしない点もあるが、一つの大きな指標となるであろう。

要旨

E. coli 菌体の DNRase 活性を測定する際、反応液に各種野菜抽出液を添加したところ、そのうちの多くが DNRase を阻害した。特に、ニンニク、かぼちゃ、ねぎ等の効果は大きかった。この阻害効果は菌体および菌体破碎液のいずれに対しても認められた。また NaCl と野菜抽出液で菌体を処理すると、NaCl による DNRase の活性化は完全に抑えられた。このことは NaCl の過剰摂取による害を野菜抽出液が防ぐ可能性を示している。

文献

- 1) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Control of nitrite formation by Escherichia coli; Effects of sodium chloride, cysteine, glutathione and vegetable extracts, Biosci. Biotech. Biochem., (revised)

第2章 酸素呼吸能の調節

前章で E. coli 菌体を NaCl で処理すると DNRase の活性化がおこり、NaCl と野菜抽出液を混合して処理した場合は、NaCl による DNRase の活性化は抑制されることを述べた¹⁾。一方、第1部第3章で Ps. denitrificans を NaCl で処理した場合、菌体の DNRase の活性化がおこると共に酸素呼吸能が著しく低下することを述べた²⁾。細胞の酸素呼吸能が低下することは好氣的な細胞の生命維持にとってはきわめて大きな障害となると考えられる。そこで、E. coli を NaCl および NaCl と野菜抽出液の混合物で処理し E. coli の酸素呼吸に対する各々の効果を検討した³⁾。これらの研究の結果、野菜抽出液は NaCl による酸素呼吸阻害を防止するという生理的にきわめて重要な知見を得た。

実験方法

E. coli 菌体の酸素呼吸測定法 対数増殖後期の菌体を集菌洗浄後、その酸素呼吸能を大洋科学工業 K.K の生物呼吸測定装置 (O₂ アップテスター C 型) を用い、検圧法により測定した。P. R. Lambden ら⁴⁾ の用いた培地から KNO₃ と (NH₄)₂SO₄ を除いた溶液に菌体および野菜抽出液等を加え容器中の反応溶液を合計 2mL とした。発生する CO₂ はろ紙に染み込ませた 20% KOH でトラップし、菌の吸

収する O_2 量をマノメータの読みで測定した。

結果と考察

大腸菌の硝酸還元酵素活性と酸素呼吸能に対する塩化ナトリウムおよび野菜抽出液の効果 カイワレ大根と同程度DNRase活性を阻害し、季節によらず入手可能なブロッコリーの抽出液について検討した。まず0.5M NaClとブロッコリー抽出液(0.5mL抽出液/mL)で処理した菌体のDNRase活性と酸素呼吸量を調べた。Table3-3に示すようにDNRase活性はNaClにより著しく上昇するが、ブロッコリー抽出液とNaClを混合して処理した場合には全く上昇しなかった。各々の菌体の酸素呼吸量は、NaCl処理菌では完全に阻害されているが、NaClとブロッコリー抽出液の混合による処理ではほとんど対照のそれと変わらなかった。海水の食塩濃度は約0.5Mで、この濃度で30°C、1時間菌体を処理しただけでE.coli菌体の酸素呼吸能は失われた。このことからブロッコリー抽出液がNaClによる酸素呼吸阻害を防ぐことがわかった。また、この結果は第3部第1章で述べたNaClによる NO_2^- 生成促進を野菜抽出液が防ぐことと似ており、抽出液中の有効成分が1価カチオンの作用を抑えたためと考えられる。

この酸素呼吸の変化とDNRase活性変化との関係を調べるため、酸素呼吸条件下で生育して、DNRase活性を示さ

Table 3-3

Effects 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 + Broccoli Extract (0.5g/mL)	78	114

ない菌体をNaClで処理し、その酸素呼吸能を調べた。Table3-4に示すように、酸素呼吸菌ではNaCl処理でやや酸素呼吸能は下がるものの、硝酸呼吸菌に比べかなりの酸素呼吸量が認められた。また、NaClをブロッコリー抽出液と混合し、菌体を処理すると、菌体の酸素呼吸能は完全に保持された。Fig.1 10に示したように、Ps. denitrificansにおいてもNaClで菌体を処理すると、そのDNRase活性と酸素呼吸の間に逆相関があり、DNRase活性上昇が酸素呼吸を低下させる原因となっていると推定された。従って、E. coliの場合も酸素呼吸菌の酸素呼吸能が0.5M NaClで完全に抑制されないのは菌体がDNRase活性を保持しないためと考えられる。以上のことから、野菜抽出液はNaClによるDNRaseの活性化を抑えるだけでなく、酸素呼吸の低下を防ぐというきわめて興味ある効果を示すことがわかった。

大腸菌の酸素呼吸に対するシステイン、グルタチオンの効果 システインでの処理により、E. coliのDNRaseは不活性化されることはすでに述べたが、そのことが菌の酸素呼吸にどのように影響を与えるか検討した。結果は示さないがシステインでの処理により菌体の酸素呼吸は全く阻害されず、むしろ微増した。またGSHの場合も同じような傾向を示した。これらの結果は野菜抽出液の効果がシステインやGSHのそれとはかなり異っていることを示している。

Table 3-4

Effects of NaCl and broccoli extract on O₂ uptake by cells grown with nitrate respiration or oxygen respiration

Preincubated with	O ₂ uptake (Relative activity)	
	DNR-cells ^a	OR-cells ^b
None	100	100
NaCl(0.5M)	1	39
NaCl + Broccoli extract (0.5g/mL)	78	105

^a Cells grown with nitrate respiration.

^b Cells grown with oxygen respiration.

要旨

E. coli 菌体を NaCl で処理すると、DNRase が活性化されると共に酸素呼吸は完全に抑制された。NaCl で菌体を処理する際、ブロッコリー抽出液を共存させたところ、DNRase は活性化されず、酸素吸収量もあまり減少しなかった。野菜抽出液には、NaCl による DNRase 活性化を介して起こる酸素呼吸抑制を防止する興味ある働きのあることがわかった。

文献

- 1) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Control of nitrite formation by Escherichia coli; Effects of sodium chloride, cysteine, glutathione and vegetable extracts, Biosci. Biotech. Biochem., (revised)
- 2) 加藤美都子, 山岡邦雄 : 脱窒菌 (Pseudomonas denitrificans) の酸素呼吸に対する研究 (Part 1), 宇部高専研究報告, (1988) 34, 79-82

- 3) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara: NaCl-induced depression of respiration and its prevention by vegetable extracts in Escherichia coli cells, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)
- 4) P.R.Lambden and J.R.Guest : A novel method for isolating chlorate-resistant mutants of Escherichia coli K12 by anaerobic selection on lactate plus formate medium, J. Gen. Microbiol., (1976) 93, 173-176

結 論

細菌による硝酸還元は地球規模の窒素循環の中で重要な位置をしめている。

我々は細菌のDNRaseの作用により生ずる NO_2 の環境や人体への蓄積に直接関与するDNRase活性の制御を目的として研究を行った。対象とした細菌は*Ps. denitrificans*と*E. coli*で、それぞれ環境及び腸内への、 NO_2 蓄積に関与するものと考えられる。腸内の NO_2 はアミンと反応して発ガン性のあるニトロソアミンに変化する。従って、 NO_2 の腸内蓄積に関与する*E. coli*のDNRase活性制御はきわめて重要な問題である。

まず、 NO_3 から NO_2 をへて N_2 へ変化させる脱窒を行う*Ps. denitrificans*のDNRaseについて調べた。菌体を1価カチオンで処理すると、そのDNRaseが活性化された。アミノ酸の1つであるシステインで同様に処理したところ、DNRaseは不活性化された。

1価カチオンの作用機構解明のために、塩化アルキルアンモニウム塩で処理したり、トルエン処理を行ったところDNRaseはさらに大きく活性化された。また、菌体破砕液に対しては1価カチオンによる処理は無効であったことから、1価カチオンはDNRaseに直接作用するのではなく膜に作用し、たとえば膜の流動性を変化させることにより膜酵素であるDNRaseを不可逆的に活性化したもの

と判断した。また、システインは菌体に取り込まれた後、少なくともその一部はGSHに変化し、作用することを認めた。

E. coliの場合も1価カチオン、およびシステインの作用はPs. denitrificansの場合とほとんど同一傾向を示した。このことからNaClの過剰摂取による害の少なくとも一部はE. coliのDNRase活性化によるNO₂蓄積増大が引き起こしているのではないかと考えた。そこで、このNaClによる害を防ぐ目的で、食品のうち野菜に注目し、その抽出液とNaClを共存させてE. coliを処理したところ、NaClによるDNRaseの活性化は完全に抑制された。また、野菜抽出液は酵素活性測定時に直接加えられるとDNRaseを大きく阻害するというきわめて重要な役割を果たすことも認めた。

これらのことを、E. coliのDNRase活性調節という面でまとめてみると次のような点が明らかとなった。

- ① NaClは菌体に一定時間以上接触することによりその菌のDNRaseを活性化する。
- ② システインやGSHは同じく菌体と一定時間以上接触することにより、その菌のDNRaseを不活性化する。ただし、GSHはDNRaseに直接作用する可能性もある。
- ③ 野菜抽出液はE. coliのDNRaseに直接作用し、その活性を阻害する。また、野菜抽出液は①のNaClによるDNRase活性化を抑制する。

このように動物体内のいろいろな局面においてシステ

イン、GSHおよび野菜抽出液がE. coliのDNRase活性を抑制していることがわかった。

DNRaseは細菌の硝酸呼吸系において重要な酵素である。Ps. denitrificansもE. coliもNaClで処理するとDNRaseは活性化され、同じエネルギー獲得系である酸素呼吸は大きく阻害された。一方、野菜抽出液とNaClでE. coliを処理したところNaClによる酸素呼吸阻害は防がれた。この面からも野菜抽出液が生理的に興味ある役割を果たすことがわかった。

謝 辞

昭和40年京都大学工学部工業化学科工業生化学講座の学生であった私は京都大学工学部教授上原悌次郎博士（当時助手）から乳酸菌の代謝について学びました。更に昭和52年同講座に1年間内地留学して脱窒菌の硝酸還元酵素について学びました。それ以後研究の対象は脱窒菌から大腸菌、環境から人体のガン抑制までその範囲は広がってきました。その間約15年、上原先生から実験の各段階においてきわめて示唆に富んだ御意見をいただいたことに感謝します。更に、このたび本論文を作成するにあたり、適切な助言をいただいたことにお礼申し上げます。

日常的研究活動は宇部高専工業化学科（現物質工学科）にて行いました。同学科の諸先生方の御協力に感謝しております。特に、加藤美都子助手、兼安気郎元技官には共同研究者として実験、討論など御協力に感謝致します。また、原田利男技官には機器分析等で協力していただいたことに感謝します。学科は異なるものの増原操元教授、花田祐策、金田昭久両助教授には実験の便宜をはかっていただきありがたく思っています。更に、終始一貫私に学位取得をすすめ、常に精神的に励まし続けて下さった中山克彦教授に感謝します。

最後に私の研究室で卒業研究を行い、日夜よく頑張ってくれた100余名の本校卒業生諸君に厚くお礼を述べたいと思います。皆様どうも有難うございました。

発表論文

関係論文

原著

- (1) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara :
Activation by monovalent cations of
dissimilatory nitrate reductase in the cells
of Pseudomonas denitrificans, Biochem. Int.
(1988) 16, 829-833
- (2) K. Yamaoka, M. Kato and T. Kamihara : Effects
of alkylammonium ions on the activity of
dissimilatory nitrate reductase in the cells
of Pseudomonas denitrificans, Agric. and
Biol. Chem., (1989) 53, 1451-1452
- (3) K. Yamaoka, M. Kato, K. Kaneyasu and
T. Kamihara : Effect of cysteine on cellular
activity of dissimilatory nitrate reductase
in Pseudomonas denitrificans, Biosci.
Biotech. Biochem., (1992) 56, 1601-1603

- (4) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Control of nitrite formation by Escherichia coli: Effects of sodium chloride, cysteine, glutathione and vegetable extracts, Biosci. Biotech. Biochem., (revised)
- (5) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Control of nitrite accumulation in growing culture of Escherichia coli : Stimulation by NaCl and prevention by cysteine and glutathione, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)
- (6) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : NaCl-induced depression of respiration and its prevention by vegetable extracts in Escherichia coli cells, Biosci. Biotech. Biochem., (to be submitted)

学会発表

国内学会 日本農芸化学会など 多数

国際学会

- (1) K.Yamaoka, M.Kato and T.Kamihara : Cation induced changes in the activity of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans, 1st China-Japan International Symposium on Photosynthetic Bacteria, (1987)
- (2) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara : Control of dissimilatory nitrate reductase in Pseudomonas denitrificans, IUMS Congress: Bacteriology & Microbiology-Osaka, Japan-1990, (1990)
- (3) K.Yamaoka, M.Kato, K.Kaneyasu and T.Kamihara : Control of dissimilatory nitrate reductase by cysteine and glutathione in bacteria; The First International Congress on "Vitamins and Biofactors in Life Science" (1991)

その他の発表論文

原著

- (1) 上原 悌次郎, 山岡 邦雄, 福井 三郎 :
Streptococcus faecalisにおけるピルビン酸酸化とそれに関連する代謝に関する研究 (第2報),
日本農芸化学会誌, (1968) 42, 222-227
- (2) 上原 悌次郎, 山崎 哲雄, 山岡 邦雄, 福井 三郎 :
Streptococcus faecalisにおけるピルビン酸酸化とそれに関連する代謝に関する研究 (第3報),
日本農芸化学会誌, (1969) 43, 159-164
- (3) Y. Shigeri, K. Yamaoka and T. Kamihara :
Formation of acetate upon heating glucose solution in alkali: Identification of one of the growth-promoting factors for Streptococcus faecalis in thermal degradation products of glucose, Biosci Biotech. Biochem., (1992) 56, 1684-1685

宇部工業高等専門学校研究報告 6報

山口県工業技術センター研究報告 1報

