

氏名	やま おか くに お 山 岡 邦 雄
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	論 工 博 第 2788 号
学位授与の日付	平 成 5 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	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——

(主 査)
論文調査委員 教授 上原悌次郎 教授 一瀬光之尉 教授 齋藤 烈

論 文 内 容 の 要 旨

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占めているが、その反応生成物は有害な NO_2^- であり、環境や人体における NO_2^- の蓄積を防ぐには、それをさらに還元する脱窒、または同化を促進するか、あるいは硝酸還元自体を制御することが必要である。一方、異化型硝酸還元酵素 (dissimilatory nitrate reductase: DNRase) は無酸素下の呼吸の一つである硝酸呼吸に関わり、脱窒においてもその初発反応を触媒する。酸素呼吸下では硝酸呼吸は抑制されるが、その逆は全く知られていない。本論文は、それぞれ環境と人体において NO_2^- の蓄積をもたらすと考えられる脱窒菌 *Pseudomonas denitrificans* と腸内細胞 *Escherichia coli* を対象として、DNRase の調節と、それが酸素呼吸に及ぼす効果に関する研究の成果をまとめたもので、緒論、3部7章、および結論より成っている。

緒論では本研究の背景、目的および概要を記し、第一部第一章では NO_3^- 存在下、嫌氣的に培養した菌体の懸濁液を 1 価カチオンの塩と共にインキュベートすると DNRase の活性が著しく増大し、その高い値は単離した膜画分に保持されていたので酵素は活性化されたと判断している。また、2 価カチオンは無効で、非資化性の糖アルコールの効果はわずかであったので浸透圧の影響は無視され、また 1 価カチオンの効果はクロラムフェニコールで抑制されなかったので酵素蛋白質の de novo 合成の関与は否定されている。第二章ではシステインやグルタチオンが 1 価カチオンとは逆に DNRase を失活させることを示している。システインの効果はグルタミン酸で促進されたので、添加システインの少なくとも一部はグルタチオンに変換されてから作用すると推定しているが、本菌ではもともとグルタチオンの存在は認められず、システインを加えても検出されなかったのでこのことは証明されていない。また、アスコルビン酸や 2-メルカプトエタノールは無効であったので還元力や SH 化合物としての作用は無関係であるとされている。第三章では NaCl による DNRase の活性化が原因となって酸素呼吸能が低下すると述べている。これは、硝酸呼吸が酸素呼吸を制御することを初めて示した例である。

第二部第一章では *E. coli* でも同様に 1 価カチオンによる DNRase の活性化とシステイン、グルタチオンによる不活性化が起こることを明らかにしている。また、本菌では、システインの添加でグルタチオ

ンが増加することが実証されている。第二章では菌増殖時の DNRase の調節について述べている。培地に NaCl を加えて菌を培養すると、対数前期の NO_2^- 生成が高まり、その後の増殖が阻害された。システイン添加の場合は菌の増殖には影響がなく、対数後期でも NO_2^- 生成の低下が認められた。

第三部では *E. coli* における野菜抽出液の効果について述べている。*E. coli* には脱窒機構がなく、従って DNRase の作用で腸内に NO_2^- を蓄積する恐れがある。 NO_2^- はアミン類と反応して発癌性のニトロソアミンに変換されることが知られているので本菌の DNRase の制御は極めて重要な課題である。NaCl は本酵素を活性化するので、その大量摂取はこの点からも有害であると考えられる。システインやグルタチオンは DNRase を不活性化するが、それらが腸内に必要なだけ存在するとは考えにくいので、通常の食品に着目し、種々の野菜の抽出液の効果を調べた。第一章で DNRase に及ぼす効果を述べている。野菜抽出液を NaCl と共に加えると、NaCl による本酵素の活性化は完全に抑制された。さらに、野菜抽出液は酵素活性自体を阻害することが明らかになった。斯くして野菜の有用性が、 NO_2^- の腸内蓄積の防御の面からも裏づけられた。第二章では *E. coli* 菌体の呼吸に及ぼす野菜抽出液の効果が示されている。DNRase の場合と同様に、NaCl による酸素呼吸能の抑制が防がれた。

結論では、本研究を総括し、細菌の異化型硝酸還元と呼吸の調節について全く新しい知見が得られたことが示されている。

論文審査の結果の要旨

細菌には、硝酸塩を嫌氣的に還元する異化型硝酸還元酵素を持つものがある。生成物は有害な NO_2^- であり、環境や人体への蓄積を防ぐには、その代謝の促進、あるいは本酵素自体の制御が必要である。また、本酵素が営む硝酸呼吸と酸素呼吸との相互調節は興味深い研究課題である。

本論文は、脱窒菌と大腸菌における本酵素の制御、及び酸素呼吸への影響を研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. NO_3^- 存在下、嫌氣的に培養した菌体を NaCl のような 1 価カチオンの塩で処理すると本酵素の不逆的な活性上昇、すなわち活性化が起こった。

2. アルキルアンモニウムイオンは NH_4^+ よりも有効で、トルエンも酵素を活性化した。菌体破碎液や膜画分では 1 価カチオンは無効であった。これらの結果より 1 価カチオンは intact な膜に働いて本酵素を活性化すると推定した。

3. システインやグルタチオンは逆に本酵素を不活性化し、NaCl の効果を抑制した。他の還元剤や SH 化合物は無効で、大腸菌ではシステインの少なくとも一部はグルタチオンに変換された。2 と 3 の結果からグルタチオンは膜に作用して本酵素を不活性化することが示唆された。

4. 大腸菌では種々の野菜の抽出液が NaCl の効果を抑え、さらに酵素活性自体を阻害した。このことは、腸内で NaCl が NO_2^- の蓄積を促進し、野菜の成分がこれを防ぐことを示唆している。

5. NaCl による本酵素の活性化に伴い、酸素呼吸能が抑制された。この効果も野菜抽出液の添加で除かれた。この結果、硝酸呼吸による酸素呼吸の制御が初めて示された。

以上、本論文は、細菌の異化型硝酸還元（硝酸呼吸）の新しい調節機構と、それに伴う酸素呼吸の変化

を示すとともに、食塩と野菜について医学的、栄養学的に興味ある知見を得たものであり、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成5年10月19日、論文とそれに関連する事項について試問を行い、合格と認めた。