The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔生物工学会誌　第71巻　第6号　397–400. 1993〕

ノ ー ト

紅色非硫黄細菌 *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 の生育と細胞内酵素活性に及ぼす C_2-化合物の酸化還元レベルと炭酸水素ナトリウムの影響

石田　桂子・篠山　浩文・藤井　貴明*

千葉大学園芸学部生物資源化学講座
〒271 松戸市松戸648

（平成5年6月14日受付　平成5年8月3日受理）

Effects of sodium bicarbonate and oxidation-reduction levels of C_2-compounds on growth and enzyme activities of a purple nonsulfur bacterium, *Rhodopseudomonas* sp. No. 7. —Note— KEIKO ISHIDA, HIROFUMI SHINOYAMA, and TAKAAKI FUJII* (*Department of Bioresources Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo-shi 271*) Seibutsu-kogaku **71:** 397–400, 1993.

Growth of *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 in a medium containing ethanol as an electron donor and NH_4^+ as a nitrogen source was dependent on the concentration of bicarbonate under anaerobic-light conditions. Under the optimum growth conditions, about 1.93 g of cells was obtained in the medium containing 1 g of ethanol and 2 g of sodium bicarbonate. However, the growth of the bacterium in a medium containing acetate was independent of the bicarbonate concentration. The level of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) in cells grown on ethanol was higher than that of cells grown on acetate, and the enzyme level was affected by the bicarbonate concentration. On the other hand, the levels of pyruvate carboxylase (EC 4.1.1.32) and isocitrate lyase (EC 4.1.3.1) were not affected by the above growth conditions.

紅色非硫黄細菌は，光嫌気下で各種の有機化合物を炭素ならびに電子供与体として利用して生育できる．これらの細菌は嫌気下にもかかわらず，細胞を構成するC, H, Oの平均的組成と比較して酸素不足であると考えられる有機化合物，たとえばアルコール類や低級脂肪酸類をも利用できる.[1] このような性質をもっている微生物は少なく，紅色非硫黄細菌の他には硫酸還元菌，脱窒菌などの限られた種である．

エタノール [C_2H_6O] と酢酸 [$(CH_2O)_2$] を比較してみると，エタノールはいちじるしく還元された状態にあり，酢酸の組成比は細胞の平均的な組成を $(CH_2O)_n$ と仮定するとそれと一致する．しかしながら，実際の培養系でこれらの定量的な関係は確かめられていない．紅色非硫黄細菌においてもエタノールは酢酸の単位を経て代謝されていくと考えられるが，光嫌気条件下ではこれら化合物の代謝は，二酸化炭素の固定による糖新生の有無とグリオキシル酸回路の駆動による糖新生が絡み合ってくるので，好気性の従属栄養微生物の場合と比較して，かなり複雑な様相を呈するものと予想される．また，紅色非硫黄細菌においては，グリオキシル酸回路そのものに関する情報も限られており,[2–7] エタノールと酢酸の利用に関して，これまでに上述のような観点からの検討はなされていない．一般に，紅色非硫黄細菌は，エタノールや酢酸を

* 連絡先，Corresponding author.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

電子供与体として利用できるとされているが,[1] 実際に代表的な多くのタイプ種を調べてみると，窒素源としてカザミノ酸や酵母エキスなどを用いた場合には生育できるものの，それらの菌株の中で，微量のビタミン類を除いてエタノールと酢酸以外には有機物を含まない培地で，両基質のいずれを用いても良好に生育できる種は限られてくる．しかしながら，自然界より無機塩類とわずかなビタミンにアルコール類を含む培地で光嫌気下で良好な生育を示す菌株は容易に分離でき，それらの中には酢酸を利用できる菌株も多数存在する.[2]

本報は，そのうちの一菌株 *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 を用いて，紅色非硫黄細菌のエタノールと酢酸利用時における生育と細胞内の酵素活性レベルに及ぼす二酸化炭素源（炭酸水素ナトリウム）の影響について検討したものである．

本実験には，0.1%(w/v) *n*-プロパノール，0.1%炭酸水素ナトリウムを含む培地を用いて，下水汚泥等を光嫌気条件下で集積培養して得られたものの中より単離された *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 を使用した.[2] No. 7 株は，*Rhodopseudomonas palustris* に類似しているが，そのタイプ種よりエタノール利用性にすぐれている.[2,8] No. 7 株の各種の培養には，前報[2]に示した基本塩類培地を用いた．菌株の保存には電子供与体ならびに炭素源として0.1% *n*-プロパノールを使用した．菌株の培養は0.1%(w/v) の各種培養基質を含む基本培地を 1.5 *l* のネジロルー型フラスコに口まで満たしたものを用いて，30°C, 3,000 lux の光嫌気下で行った．なお，エタノールを単独の基質として用いる場合には炭酸水素ナトリウムを0.1%(w/v) 添加した．エタノールと炭酸水素ナトリウムは基本培地をオートクレーブ処理したのち，メンブランフィルター (0.2 μm) を通して加えた．供試菌株の生育度は，培養液の 660 nm における吸光度を測定して求めた．なお，吸光度1.0 は供試菌株の菌体乾燥重量約 0.55 mg/ml に相当した．細胞抽出液の調製は，対数増殖期の細胞を 10,000×*g*, 10分間の遠心分離により集め，これを 50 mM リン酸ナトリウム—カリウム緩衝液 (pH 7.2) を用いて 3 回洗浄し，再び 20 ml の同上緩衝液に懸濁した．これを 20 kHz, 2 分間の超音波処理を 3 回行って破砕したのち，20,000×*g*, 30分間の遠心分離を行い，得られた上清液を細胞抽出液として以下の実験に使用した．イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICD, EC 1.1.1.42) の活性は，Cook と Sanwal の方法[9]に従って測定した．イソクエン酸リアーゼ (ICL, EC 4.1.3.1) の活性は，Dixon と Kornberg の方法[10]に従って測定した．ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC, EC 4.1.1.32) の活性は，Hatch の方法[11]に従って測定した．リブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ (RuBisCO, EC 4.1.1.39) の活性は，Lorimer らの方法[12]に従って測定した．細胞抽出液中のタンパク質は，牛血清アルブミンを標準として，Lowry らの方法[12]により測定した．培養液中のエタノールは，ガスクロマトグラフ（島津 GC-8A, 検出器 FID）によって定量した．Gasukuropack56（ガスクロ工業）を充填したガラスカラム (ϕ3 mm×2 m) とキャリアーガスに窒素 (20 ml/min) を用いて，175°C にて行った．培養液中の酢酸は，分析用キット（ベーリンガーマンハイム山之内）を用いて定量した．

炭素ならびに電子供与体として，0.1%のエタノールあるいは酢酸ナトリウム，窒素源として0.1%の塩化アンモニウムを用い，0～0.3%の濃度で炭酸水素ナトリウムを含む培地で *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 の生育経過を調べた．No. 7 株はエタノール培地において，炭酸水素ナトリウム無添加ではほとんど生育せず，また，その濃度が低い場合には，培地中にエタノールがまだ残存していても生育は停止した．最終細胞濃度は，添加された炭酸水素ナトリウムの濃度が0.01～0.2%の間で，その濃度に比例して増加した．細胞濃度は，0.1%のエタノール (21.7 mM) に対して炭酸水素ナトリウム濃度が0.2% (23.8 mM) の場合に最大に達した (Fig. 1)．この 1.00 g エタノールに対して 2.00 g の炭酸水素ナトリウム（二酸化炭素量として 1.05 g）を添加した培地における培養では，約100時間後の細胞濃度は 660 nm における吸光度にして3.5 に達し，これはおおよそ 1.93 g（乾物重量）/*l* に相当した．これらの添加した炭素源（エタノールと二酸化炭素，2.05 g）あたりの菌体収量は94.1%に達した．一方，0.1%酢酸ナトリウム（酢酸として 0.732 g/*l*）培地においては，本菌の生育は培地中の炭酸水素ナトリウムの存在の有無にほとんど影響されることはなく，いずれの濃度においても添加された酢酸はほぼ完全に消費された (Fig. 2)．この酢酸ナトリウムを用いた培養系では，いずれも最終細胞濃度が 660 nm における吸光度にて，おおよそ1.4(0.770 g/*l*, 乾物重量) 付近であった．以上の結果は，いずれの培養系においても，培地に添加した炭酸水素ナトリウム量をおさえてあるが炭酸ガスの消費量は定量していない点，細胞

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

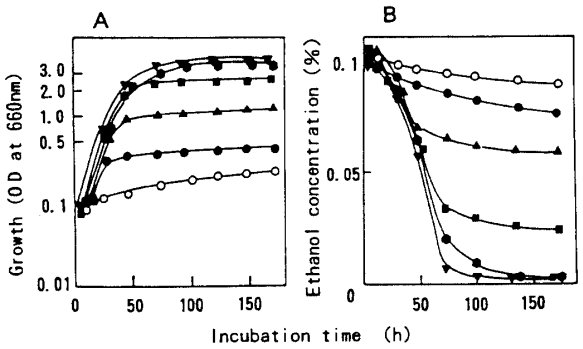

Fig. 1. Effects of bicarbonate on culture of *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 in a medium containing ethanol as an electron donor and ammonium chloride as a nitrogen source. Cells were incubated in the salt medium containing 0.1%(w/v, 21.7 mM) ethanol in the absence or presence of 0.01～0.3% (w/v) sodium bicarbonate. A: Growth. B: Consumption of ethanol. Concentrations (%) of sodium bicarbonate: ○, 0; ●, 0.01; ▲, 0.05; ■, 0.1; ▼, 0.2; ◆, 0.3.

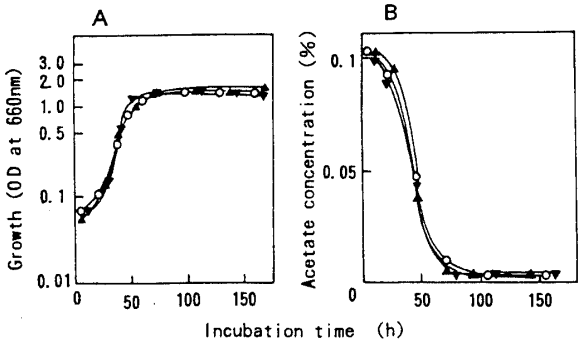

Fig. 2. Effects of bicarbonate on culture of *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 in a medium containing acetate as an electron donor and ammonium chloride as a nitrogen source. Cells were incubated in the salt medium containing 0.1%(w/v, 21.7 mM) sodium acetate in the absence or presence of 0.01～0.3%(w/v) sodium bicarbonate. A: Growth. B: Consumption of acetate. Concentrations (%) of sodium bicarbonate: ○, 0; ▲, 0.05; ▼, 0.2.

成分に培地中から取り込まれた，窒素，灰分等を考慮に入れていない点などから，系内のマスバランスをただちに考察するには問題がある．しかし，*Rhodopseudomonas* sp. No. 7 はエタノールを炭酸水素ナトリウムの存在下で，酢酸をその存在にかかわりなく，これら両化合物をいずれをも効率よく菌体成分へ転換していることを示唆しているものと思う．

Rhodopseudomonas sp. No. 7 は構成的なアルコール脱水素酵素，アルデヒド脱水素酵素，アシル-CoA 合成酵素，リンゴ酸合成酵素および ICD と誘導的な ICL を有することが報告されている．[5,6] エタノールならびに酢酸はいずれもアセチル-CoA を経て，グリオキシル酸回路を介して代謝されていくものと考えられている．しかしながら，上述したように，本菌はエタノール利用時には生育量との間でほぼ等モルに炭酸水素ナトリウムを必要とするのに，酢酸利用時には必要としないことが明らかにされている．したがって，本菌におけるエタノール利用時の代謝は，酢酸利用時のそれと比較してかなり複雑であることが予想される．そこで，エタノール，酢酸の他にも各種の有機酸類を炭素ならびに電子供与体として用いて培養した No. 7 株の細胞から抽出液を調製し，それぞれについて ICD, ICL, RuBisCO, PEPC の酵素活性レベル（酵素量）を調べた (Table 1)．なお，本菌によるリンゴ酸，コハク酸，乳酸，ピルビン酸を利用しての生育に関しては，酢酸の場合と同様に炭酸水素ナトリウムの存在の有無が影響することはなかった．これらの有機酸に生育した細胞については，炭酸水素ナトリウムの存在の有無が調べた 4 種の酵素の細胞内レベルにほとんど影響を与えることもなかった．各細胞間での酵素量のレベルを比較してみると，ICL は，エタノール，酢酸に生育した細胞の間ではほぼ同レベルであったが，これらを他の基質に生育した細胞と比較するとかなり高いレベルであった．これに対して，PEPC のレベルは対照に調べた ICD と同様に各細胞間でほとんど差が認められなかった．RuBisCO のレベルについては，全体的に比較的高いレベルにあり，各細胞間で大きな差が認められなかったが，基質の利用時に炭酸水素ナトリウムを絶対的に必要とするエタノール生育細胞で若干高い傾向を示した．さらに，エタノール利用時における RuBisCO のレベルについては，培地に添加した炭酸水素ナトリウムの濃度の影響を調べたところ，その濃度が0.1%，0.2%，0.3% において，97.6, 136, 156 nmol/min/mg protein と，それぞれ濃度の上昇によって細胞内の酵素のレベルも上昇した．なお，酢酸を用いた培養系においては，炭酸水素ナトリウムの存在の有無が細胞内の酵素のレベルに影響することはなかった．

以上のように，*Rhodopseudomonas* sp. No. 7 はエタノールと酢酸を基質とした場合には，一方は炭酸固定をして細胞内の酸化還元バランスを調節し，他方はその必要がなく，いずれも効率よく細胞成分に転換した．このようなエタノールと酢酸に生育した細胞の間で，細

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. Enzyme activities in *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 grown on various organic substrates.

Growth substrate	$NaHCO_3$	Enzyme activity in cells (nmol/min/mg protein)			
		Isocitrate dehydrogenase	Isocitrate lyase	Phosphoenolpyruvate carboxylase	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase
Ethanol	−*				
	+	337	28.4	3.90	97.6
Acetate	−	296	28.0	3.86	59.0
	+	353	28.0	3.51	58.5
Malate	−	225	5.67	2.08	55.8
	+	262	5.31	3.00	58.4
Succinate	−	295	6.29	2.46	73.8
	+	380	3.99	2.64	71.0
Lactate	−	216	6.89	2.70	42.2
	+	316	5.99	3.03	61.2
Pyruvate	−	386	10.8	3.59	60.9
	+	405	9.13	3.57	62.8

The organism was incubated in a basal salt medium containing 0.1% growth substrate without (−) or with (+) 0.1% sodium bicarbonate, and harvested in the mid-logarithmic growth phase (24–40 h).
* No growth.

胞内の RuBisCO は基質の酸化還元のレベルと二酸化炭素濃度によって酵素量が調節を受けているのに対して，ICL はエタノールと酢酸によって細胞内の活性レベルが上昇するものの，PEPC とともに基質の酸化還元レベルや二酸化炭素の濃度によって酵素量の調節を受けないことが示唆された．

要　　約

紅色非硫黄細菌 *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 の生育は，光嫌気条件下において窒素源として塩化アンモニウム，炭素ならびに電子供与体としてエタノールを用いた培地中では，添加された炭酸水素ナトリウムの濃度に依存した．最適培養条件下において，エタノール (1 g) と炭酸水素ナトリウム (2 g) から菌体約 1.93 g が得られた．一方，酢酸を用いた培地においては，本菌の生育は炭酸水素ナトリウムの有無に影響されなかった．これらの培養において，リブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ (EC 4.1.1.39) は，エタノールに生育した細胞で高く，この場合，そのレベルは炭酸水素ナトリウムの濃度によって影響を受けた．一方，ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (EC 4.1.1.32) とイソクエン酸リアーゼ (EC 4.1.3.1) の細胞内レベルはこれらの培養条件によって影響されなかった．

文　　献

1) Sojka, G. A.: *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, P. K., Sistrom, W. R.), p. 707–716, Plenum Press, New York (1978).
2) Fujii, T., Nakazawa, A., Sumi, N., Tani, H., Ando, A., Yabuki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2747–2753 (1983).
3) Albers, H., Gottschalk, G.: *Arch. Microbiol.*, **111**, 45–49 (1976).
4) Nielsen, A. M., Sojka, G. A.: *Arch. Microbiol.*, **120**, 43–46 (1979).
5) Fujii, T., Watanabe, T., Ohmura, N., Tahama, H., Ando, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1049–1051 (1990).
6) Tahama, H., Shinoyama, H., Ando, A., Fujii, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3177–3183 (1990).
7) Blasco, R., Cárdenas, J., Castillo, F.: *Cur. Microbiol.*, **22**, 73–76 (1991).
8) Fujii, T., Watanabe, T., Ohmura, N., Okuyama, K., Ishida, K., Shinoyama, H., Hiraishi, A.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 720–723 (1993).
9) Cook, R. A., Sanwal, B. D.: *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., Kaplan, N. O.), vol. 13, p. 42. Academic Press Inc., New York and London (1969).
10) Dixon, G. H., Konberg, H. L.: *Biochem. J.*, **72**, 3p (1959).
11) Hatch, M. D.: *Anal. Biochem.*, **52**, 280–285 (1973).
12) Lorimer, G. H., Badger, M. R., Andrews, T. J.: *Anal. Biochem.*, **78**, 66–75 (1977).
13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275 (1951).

NII-Electronic Library Service