

〔醸酵工学 第64巻 第2号 71-75. 1986〕

## ノ ー ト

*Rhodospseudomonas* sp. の生育ならびにグルタミン  
合成酵素に及ぼすグルタミン酸, エタノール,  
*n*-プロパノール, リンゴ酸の影響

藤井 貴明・樽澤 正昭・宮永 昌樹・安藤 昭一・矢吹 稔

千葉大学園芸学部農芸化学科

Effects of glutamate, ethanol, *n*-propanol, and malate on growth and glutamine synthetase activity of *Rhodospseudomonas* sp.—Note—TAKA AKI FUJII, MASA AKI TARUZAWA, MASA KI MIYANAGA, AKI KAZU ANDO, and MI NORU YABUKI (*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Matsudo-shi, Chiba 271, Japan*) *Hakkokogaku* 64: 71-75. 1986.

When *Rhodospseudomonas* sp. no. 7 was incubated in a salt medium containing ethanol or *n*-propanol as an electron donor and a carbon source under anaerobic conditions with light, its growth rate was higher in the presence of  $\text{NH}_4^+$  than glutamate as a nitrogen source. In contrast, the growth in a malate medium was favorable when glutamate was used as a nitrogen source. The bacterium showed no diauxic growth in the salt medium containing both alcohol and malate, and consumed these substrates simultaneously. In the mixed substrate medium, it grew at a greater rate than in the single substrate medium. The activity of glutamine synthetase of cells grown on alcohols was about 3 to 10 times higher than that of cells grown on malate. This difference became greater when glutamate was used as a nitrogen source. On the other hand, the activity of glutamate synthase was almost the same regardless of culture conditions. No activity of glutamate dehydrogenase was detected in the bacterium.

紅色非硫黄細菌は、一般に光嫌気条件下において乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸などの有機酸類を炭素源ならびに電子供与体として利用し生育することができる。<sup>1)</sup>したがって、これまでの紅色非硫黄細菌の代謝に関する研究は、これら有機酸を中心としたものが多く、<sup>2-4)</sup>有機酸より電子供与体としてすぐれた化学構造をもっていると考えられる直鎖アルコールに関するものは *Rhodospseudomonas acidophila* を除いて検討例が少ない。<sup>5-9)</sup> また、2種以上の組成の明らかな混合電子供与体を用いた場合の生理化学的検討はほとんどなされていない。<sup>9,10)</sup>

下水汚泥より分離した *Rhodospseudomonas* sp. no. 7 は、エタノール、*n*-プロパノールをよく利用して生育し、特定条件下では、これらのアルコールを電子供与

体として光水素発生を行うことができる。<sup>9,11)</sup> 本報では、no. 7 株のアルコールおよびリンゴ酸の利用性とそれに及ぼす窒素源の影響に関して、これらの基質を単独あるいは混合して検討し、生育経過ならびに細胞内のグルタミン酸の代謝に関連する酵素の変動現象について二、三の特徴ある結果を得たので報告する。

菌株は下水汚泥より分離した *Rhodospseudomonas* sp. no. 7<sup>9)</sup> を用いた。その培養は、前報<sup>9)</sup>に従って、0.1%(w/v)の培養基質(電子供与体ならびに炭素源)を含む基本培地を1.5lまたは0.8lのネジロルー型フラスコに口まで満たしたものをを用いて、30°C, 3,000 lxの光嫌気下で行った。なお、アルコールを基質として用いる場合には炭酸水素ナトリウムを0.1%添加した。アルコ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  $\mu\text{m}$ ) を通して加えた。培養液中のアルコールはガスクロマトグラフ (島津 GC-3BF) によって定量した。測定はポラパック Q を充てんしたステンレスカラム (2 m,  $\phi$ 3 mm) 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。L-リンゴ酸は分析用キット (ベーリンガー・マンハイム社製 F-キット-リンゴ酸) を用いて定量した。供試菌株の増殖量は培養液の 660 nm における吸光度を測定して求めた。(吸光度 1.0  $\div$  0.6 mg  $\cdot$  乾燥菌体重/ml) 対数増殖期の菌体を 10,000 $\times g$ , 10分間の遠心分離を行って集菌したのち、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) にて洗浄し、この 400~500 mg (乾物重量相当) を 20 ml 同緩衝液に懸濁し、超音波細胞破砕器 (Ohtake, 5201, PZT) を用いて 20 KHz, 2分間の処理を3回行って破砕した。得られた破砕液を 20,000 $\times g$ , 20分間遠心分離し、その上澄液を細胞抽出液とした。グルタミン酸合成酵素活性は Alef ら<sup>12)</sup>の方法に従って 30°C にて測定した。酵素反応はイミダゾール塩酸緩衝液 (pH 5.0) 150  $\mu\text{mol}$ , EDTA $\cdot\text{Na}_2$  7.5  $\mu\text{mol}$ , 2-オキソグルタル酸ナトリウム 2.5  $\mu\text{mol}$ , NAD(P)H 0.5  $\mu\text{mol}$ , L-グルタミン 30  $\mu\text{mol}$ , 細胞抽出液 0.1~0.2 ml を含む反応液 3 ml を用いて行った。グルタミン合成酵素活性は Shapiro<sup>13)</sup>の方法に従って測定した。酵素反応はイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 40  $\mu\text{mol}$ , L-グルタミン 30  $\mu\text{mol}$ ,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  3  $\mu\text{mol}$ , ADP 0.4  $\mu\text{mol}$ , 亜ヒ酸カリウム 20  $\mu\text{mol}$ , ヒドロキシルアミン 60  $\mu$

mol, 細胞抽出液 0.02~0.05 ml を含む反応液 1 ml を用いて行った。これを 37°C にて10分間インキュベートしたのち、10% $\text{FeCl}_3$  4.3 ml, 24%トリクロル酢酸 1 ml, 1N $\text{HCl}$  0.5 ml, 水 6.5 ml からなる組成の停止液 2 ml を加えて反応を止め、生成したグルタミン酸のヒドロキサム酸を 540 nm の吸光度より定量し、活性を求めた。グルタミン酸脱水素酵素活性は 3 ml 中にトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 150  $\mu\text{mol}$ , 2-オキソグルタル酸 150  $\mu\text{mol}$ , NAD(P)H 0.75  $\mu\text{mol}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20  $\mu\text{mol}$ ,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  30  $\mu\text{mol}$ , 細胞抽出液 0.1~0.2 ml を含む反応液を用いて 30°C にて測定した。<sup>14)</sup>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<sup>15)</sup>の方法で測定した。

*Rhodospseudomonas* sp. no. 7 を、生育基質としてエタノール、*n*-プロパノールまたはリンゴ酸を、窒素源として塩化アンモニウムまたは L-グルタミン酸を加えた培地でそれぞれ培養し、これら基質の消費と生育経過を比較した (Fig. 1)。生育基質がエタノールおよび *n*-プロパノールの場合には、窒素源に塩化アンモニウムを用いると、グルタミン酸を用いたものよりも生育速度および基質消費速度が大きく、最終菌体濃度が高くなった。一方、生育基質がリンゴ酸の場合、グルタミン酸を窒素源とした培地でわずかではあるが生育速度が増大し、最終菌体濃度も高くなる傾向を認めた。また、リンゴ酸消費速度についても、グルタミン酸を窒素源とした培地で大きく、アルコールを生育基質とした場合とは異なる結果が得られた。なお、グルタミ

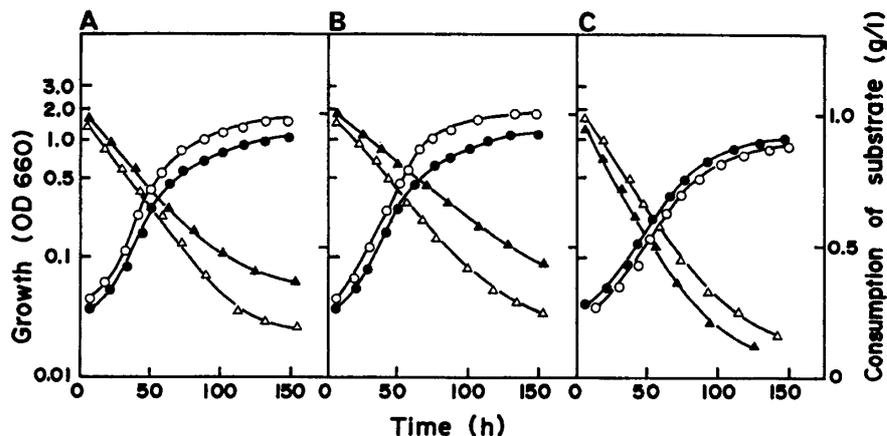


Fig. 1. Effects of nitrogen source on growth of *Rhodospseudomonas* sp. no. 7 in medium containing ethanol, *n*-propanol, or malate.

Ethanol (A), *n*-propanol (B), or malate (C) was added to the culture medium as a carbon source at the final concentration of 0.1% (w/v).

(○) and (●), growth; (△) and (▲), consumption of substrates. Open symbols,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as a nitrogen source; closed symbols, sodium glutamate as a nitrogen source.

ン酸を窒素源とすると、0.1%アルコールからは水素が発生するが、0.1%リンゴ酸からはほとんど発生しない。<sup>11)</sup>

アルコールとリンゴ酸をそれぞれ0.1%の濃度で混合した培地を用いて生育特性を調べた (Fig. 2)。窒素源としては、前述と同様塩化アンモニウムまたはL-グルタミン酸を用いた。いずれの培地においても本菌はジオキシー増殖を示さず、培養開始とともにリンゴ酸とアルコールを同時に消費した。また、増殖速度は、単独基質の場合よりも、いずれの窒素源を用いても大きく、最終菌体濃度も塩化アンモニウムを窒素源とした培地では660 nmにおける吸光度が3以上に達し、添加基質をそれぞれ単独に用いた時の最終菌体濃度 (Fig. 1) の和にほぼ等しくなった。一方、グルタミン酸を窒素源とした場合では吸光度は1.5以上には達せず、単独基質で得られた結果の和 (2.0~2.5) よりかなり低くなった。また、Fig. 1と同様に、窒素源がグ

ルタミン酸であると、塩化アンモニウムの場合よりアルコールの消費速度が低下した。なお、混合基質の場合には、アルコールの単独培地で本菌が生育するために不可欠な二酸化炭素源 (炭酸水素ナトリウム)<sup>9)</sup> の添加は必要でなかった。

Pike と Sojka<sup>10)</sup> はL-リンゴ酸 (3.5 mM) とグリセロール (54 mM) を混合した培地で *Rhodopseudomonas sphaeroides* がジオキシー増殖を示すことを報告し、グリセロールによってグリセロキナーゼ、グリセロリン酸脱水素酵素が誘導されることを明らかにしている。一方、北村<sup>9)</sup> は *R. sphaeroides* が酢酸とプロピオン酸を同時に利用する事実について述べている。*Rhodopseudomonas* sp. no. 7では混合基質培地、すなわち、0.1%エタノール (21.7 mM)-0.1% L-リンゴ酸 (7.4 mM) および0.1% *n*-プロパノール (16.6 mM)-0.1% L-リンゴ酸 (7.4 mM) 培地中で両基質が同時に利用され、ジオキシー増殖が観察されない。その理由の一つとして、no. 7株がアルコールの初期代謝に関係するアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アシル CoA 合成酵素をいずれも構成的に生成<sup>9)</sup>することが考えられる。しかしながら、エタノールと *n*-プロパノールの中間代謝経路はかなり異なっていることも予想されるので、<sup>9)</sup> さらに検討を加える必要がある。なお、エタノールと *n*-プロパノールをそれぞれ2倍 (43.3 mM, 33.2 mM)、リンゴ酸を10倍 (74 mM) に高めた混合培地においても、本菌は基質を並行消費し、ジオキシー増殖は示さなかった。これ以上のアルコール濃度では生育阻害が著しかった。

以上、*Rhodopseudomonas* sp. no. 7のアルコールあるいはリンゴ酸を利用するの生育には、窒素源により顕著な差があることが観察された。また、本菌はグルタミン酸を唯一の炭素ならびに窒素源として生育できないことも明らかになっている<sup>9)</sup> ので、各種条件下で生育した細胞について、グルタミン酸の代謝関連酵素活性を調べた (Table 1)。グルタミン酸合成酵素活性はいずれの条件でも5.0 (nmol/min/mg・protein) 前後であった。NADPH 依存性グルタミン酸合成酵素活性は検出されなかった。一方、グルタミン合成酵素活性に関しては、培養条件によって著しい差が認められた。すなわち、窒素源にグルタミン酸を用いると、塩化アンモニウムの場合に比べ、いずれの生育基質においても活性が上昇した。これはすでに広く知られている事実であるが、<sup>20,21)</sup> 本菌の場合には、特にアルコールを生育基質に用いると、窒素源の種類にかかわら

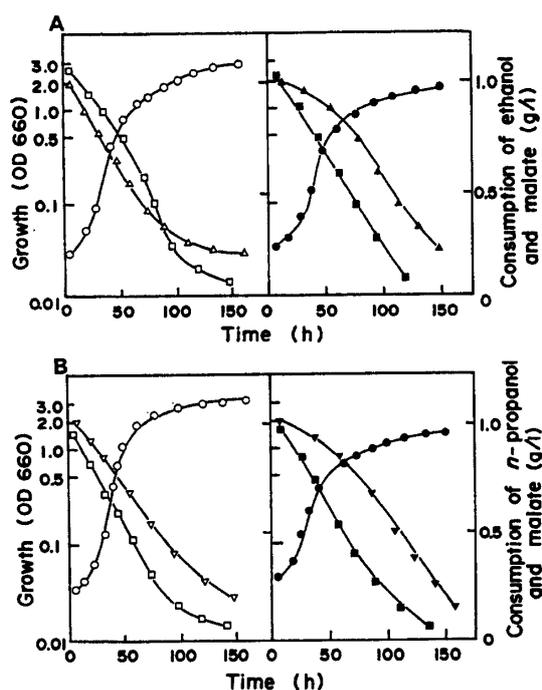


Fig. 2. Growth of *Rhodopseudomonas* sp. no. 7 in medium containing both alcohol and malate. The bacterium was incubated in a mixed medium containing ethanol and malate (A) or a medium containing *n*-propanol and malate (B). Alcohol and malate were added to the medium at the final concentration of 0.1% (w/v). (○) and (●), growth; (△) and (▲), consumption of ethanol; (▽) and (▼), *n*-propanol; (□) and (■), malate. Open symbols,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as a nitrogen source; closed symbols, sodium glutamate as a nitrogen source.

Table 1. Enzyme activity of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Rhodospseudomonas* sp. no. 7 grown on alcohol and malate.

Nitrogen source	Growth substrate	Enzyme activity of (nmol/min/mg protein)	
		glutamate synthase	glutamine synthetase
NH <sub>4</sub> Cl	Ethanol	5.80	322.0
	n-Propanol	5.81	377.1
	Malate	4.47	94.0
Glutamate	Ethanol	5.31	1057.4
	n-Propanol	5.40	1538.8
	Malate	5.10	167.7

Culture conditions were the same as in Fig. 1. The bacterium was incubated for 48 h in an alcohol medium and for 78 h in a malate medium.

ず活性が上昇する傾向を示した。この傾向はグルタミン酸を窒素源とすると著しくなり、リンゴ酸を基質に用いた場合の活性の約10倍の高さに達した。なお、Table 1には示していないが、アルコール-リンゴ酸混合培地に生育した細胞中にもアルコール単独培地生育細胞とほぼ同程度のグルタミン合成酵素活性が検出された。グルタミン酸脱水素酵素活性は、前述の方法で測定したかぎり検出されなかった。

一般に、紅色非硫黄細菌は有機物からの電子を利用して、ニトロゲナーゼの作用によって水素を発生する。<sup>16-19)</sup> ニトロゲナーゼ遺伝子の発現調節に、グルタミン合成酵素とそのアデニル化が関係していることは、すでに知られているところである。<sup>20,21)</sup> 本菌は、リンゴ酸に比較してアルコールから水素を多量に発生するが、<sup>9,10)</sup> その理由として、アルコールが化学構造上すぐれた電子供与体であるだけでなく、細胞内のグルタミン合成酵素レベルを上昇させ、それを通してニトロゲナーゼ生成の調節になんらかの影響を与えていることも考えられる。グルタミン合成酵素の細胞内レベルの調節に及ぼす窒素源の影響に関する研究は多数みられるが、<sup>20,21)</sup> アルコール類がこの調節に影響を与えるという報告例はこれまでにないので、現在、この点を中心に検討を加えている。

#### 要 約

*Rhodospseudomonas* sp. no. 7 のエタノールおよびn-プロパノール培地での生育は、窒素源にL-グルタミン酸を用いるより塩化アンモニウムを用いた方がす

ぐれており、アルコールの消費速度も大きかった。これに対して、L-リンゴ酸培地での生育経過は逆の傾向を示した。アルコールとリンゴ酸を混合した培地中で本菌はジオキシー増殖を示さず、基質を同時に利用した。本菌の細胞抽出液中にはグルタミン酸脱水素酵素の活性は検出されず、グルタミン酸合成酵素とグルタミン合成酵素の活性が認められた。グルタミン合成酵素活性はリンゴ酸で培養した細胞に比較して、アルコールで培養したものが3~10倍高く、特に窒素源を塩化アンモニウムからグルタミン酸に変えた場合にこの差は拡大した。一方、グルタミン酸合成酵素活性は培養条件にかかわらずほぼ一定であった。

本研究の遂行にあたり、有益な助言をいただいた工業技術院微生物工業技術研究所川村杉生博士ならびに三宅 淳博士に深く感謝します。なお、本研究の一部は昭和58年度科学技術庁科学技術振興調整費で行われた。

#### 文 献

- 1) Trüper, H. G., Pfennig, N.: *The Photosynthetic Bacteria*, (Clayton, R. K., Sistrom, W. R.), p. 19, Plenum Press, New York (1978).
- 2) Sojka, G. A.: *The Photosynthetic Bacteria*, (Clayton, R. K., Sistrom, W. R.), p. 707, Plenum Press, New York (1978).
- 3) 北村 博: 発酵と工業, 36, 659 (1978).
- 4) 北村 博, 丸山厚吉: 光合成細菌 (北村 博, 森田茂廣, 山下仁平), p. 47, 学会出版センター, 東京 (1984).
- 5) Sandu, G. R., Carr, N. G.: *Arch. Mikrobiol.*, 70, 340 (1970).
- 6) Sahm, H., Cox, R. B., Quayle, J. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 94, 313 (1976).
- 7) Bamforth, C. W., Quayle, J. R.: *Biochem. J.*, 169, 677 (1976).
- 8) Bamforth, C. W., Quayle, J. R.: *Biochem. J.*, 181, 517 (1979).
- 9) Fujii, T., Nakazawa, A., Sumi, N., Tani, H., Ando, A., Yabuki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2747 (1983).
- 10) Pike, L., Sojka, G. A.: *J. Bacteriol.*, 124, 1101 (1975).
- 11) 樽澤正昭, 宮永昌樹, 藤井貴明, 矢吹 稔: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 225 (1984).
- 12) Alef, K., Burkhardt, H. J., Horstman, H. J., Zumft, W. G.: *Naturforsch.*, 36C, 246 (1981).
- 13) Shapiro, B., Stadtman, E. R.: *Methods in Enzymology*, (Tabor, H., Tabor, C. W.), Vol. XVII A, p. 910, Academic Press Inc., New York, (1970).
- 14) Bchofen, R., Neeracher, H.: *Arch. Mikrobiol.*, 60, 235 (1968).
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L.,

- Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 16) Gest, H., Kamen, M. D.: *Science*, **109**, 558 (1949).
- 17) Hillmer, P., Gest, H.: *J. Bacteriol.*, **129**, 724 (1977).
- 18) Kim, J. S., Ito, K., Takahashi, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 827 (1980).
- 19) 高橋 甫 : 光合成細菌 (北村 博, 森田茂廣, 山下仁平), p. 196, 学会出版センター, 東京(1984).
- 20) 中村道徳 : 生物窒素固定 (中村道徳), p. 133, 学会出版センター, 東京 (1980).
- 21) 佐藤敏生 : 光合成細菌 (北村 博, 森田茂廣, 山下仁平), p. 161, 学会出版センター, 東京(1984).
- 19) 高橋 甫 : 光合成細菌 (北村 博, 森田茂廣, 山下仁平), p. 196, 学会出版センター, 東京(1984).
- (昭60. 7. 24受付)