

S-1

Bacillus polymyxa における窒素固定、硝酸還元の酸素による調節

日野精一 (広島大・理・植物)

Bacillus polymyxa は共生関係でなく、単独で窒素固定を行う胞子形成細菌である。この菌は通性嫌気性であり、一般的には酸素の有無によらず生長するが、分子状窒素を利用する生長は無酸素条件下でのみ、硝酸塩を利用する生長は酸素の存在下でのみおこる(右表)。亜硝酸塩、アンモニウム塩等を利用する生長は酸素の有無によらないので、この菌においては、窒素固定の過程にとり酸素は抑制的であり、硝酸塩→亜硝酸塩の過程には酸素が特異的に必要である、といえる。

Growth condition		Cell yields
N-source	Gas phase	($\mu\text{g Cell-N/ml}$)
NO_3^-	Air	45
NO_3^-	Ar	4
NO_2^-	Air	37
NO_2^-	Ar	80
NH_4^+	Air	31
NH_4^+	Ar	99
None	Air	4
None	Ar	4
None	N_2	62

分子状窒素を活性化する酵素、即ちニトロゲナーゼは、現在多くの研究者により各種の窒素固定微生物から抽出されており、*Azotobacter* や *Rhizobium* のような好氣的固定菌から抽出された酵素の場合にも、酸素により極めて速かに失活することが報告されている。このような事実もあって、酸素の存在下で活性を失うのはニトロゲナーゼの本質的なものであり、好氣的窒素固定菌の生細胞内には、ニトロゲナーゼの失活に対する防御機構が存在するものと考えられている(Postgate等)。その防御のための一つの方法として、*Azotobacter* では、高い活性を持つ呼吸による酸素吸収があげられている。*B. polymyxa* と並んで通性嫌気性細菌であり、通常無酸素条件下でのみ窒素固定を行う *Klebsiella pneumoniae* は、酵母エキス等が存在すれば、低分圧の酸素の存在下で窒素固定を行うが、*B. polymyxa* ではそのような現象は見られない。

B. polymyxa のニトロゲナーゼ系のこのような酸素感受性の原因として、(1) 粗抽出液中のニトロゲナーゼで実測されたように、この菌のニトロゲナーゼ自身が *Azotobacter* や *Klebsiella* の酵素系に比べて酸素感受性が高い(Kelly, 1969)。(2) 生細胞中で *B. polymyxa* はニトロゲナーゼの酸素失活に対する防御機構を持たない。実際呼吸活性も、一般に *Azotobacter* や *Klebsiella* に比べて1/3以下である。といったこと以外に、(3) *B. polymyxa* では、ニトロゲナーゼ系に N_2 還元のために電子を供給する系、即ちピルビン酸→ギ酸→ H_2 の代謝系が酸素により極めて速かに失活する(30°C で空気で5分間振盪すると完全に失活する)という事実をあげることができる。

一般に微生物と、いわゆる高等植物とに共通にみられる多くの代謝系の場合と異なり、細菌における同化型硝酸塩還元酵素の性質、酵素生成の調節に関する知見は極めて乏しい。このことの原因の一つは、細菌では無酸素条件下で硝酸塩を末端電子受容体として用いてこれを亜硝酸塩に還元する、いわゆる呼吸型硝酸塩還元酵素が広く分布している、この二つの型の硝酸塩還元酵素を分けることが困難であることであろう。*B. polymyxa* の場合は、他に窒素源を与えて培養した場合でも、無酸素条件下では硝酸塩からの亜硝酸塩の生成は認められず、また好氣的に硝酸塩を与

えて培養すると硝酸塩は消費されるが、亜硝酸塩は殆んど蓄積しない、といったことから、この菌の硝酸塩還元酵素は専ら同化型であると思われる。この菌の硝酸塩還元酵素活性は、生菌の場合はグルコースを電子供与体として測定できる。菌抽出液の場合は、電子供与体として NADH は用いられず、NADPH が使われる。菌抽出液を超遠心法により分画すると、殆んどの活性は可溶性分画に回収される。

この菌では、生育中硝酸塩を亜硝酸塩に変化する過程に酸素を必要とするわけであるが、既に酸素の存在下で硝酸塩を利用して生育した菌体につき硝酸塩還元酵素活性を測定すると、反応速度そのものには酸素は影響を示さない。このことから、この菌では硝酸塩還元酵素系の生成に酸素を必要とするものと推定される。なお、生菌による硝酸塩還元反応も酸素により影響を受けないので、酸素は硝酸塩の透過に必要なものとは考えられない。この菌の場合、亜硝酸塩で好氣的に生育した細胞でも微弱乍ら硝酸塩還元酵素活性を示すが、このような菌を集菌・洗浄後、硝酸塩の存在下で4時間振盪 (induction) すると、振盪を空気中で行なった場合に酵素活性は上昇する。この活性上昇には、振盪中に硝酸塩と酸素とが存在することを必要とし、また活性上昇は蛋白合成を伴っていて、アンモニウム塩により抑制される。分子状窒素で嫌氣的に生育した細胞では硝酸塩還元酵素活性は全く認められず、これを上記の方法で induction しても活性の上昇は認められない。しかし予めアミノ酸混液 (カザミノ酸) を含む培養液中で2時間振盪し (preincubation), 一度集菌洗浄後上記の induction の処理をすれば、酵素活性の増大が認められる (下表)。

Preincubation 中にも蛋白合成がおこることが、クロラムフェニコール阻害により示される。

以上の結果より、*B. polymyxa* では NADPH - 硝酸塩還元酵素系の成分である酵素蛋白質の合成、またはこの酵素系の成分である低分子物質の合成・細胞内透過 (これ等の過程に必要な蛋白質の合成も含む)、に酸素を特に必要とするものと思われる。

当研究室における研究は、小村昌三、貞本英章、前田義治、長沼和夫および新谷良雄 (現在近畿大学工学部にて継続中) の諸氏の協力により行なわれた。

Growth condition		Preincubation (Gas phase)	Induction (Gas phase)	Enzyme activity	
Medium	Gas phase			Cells	Extracts
NO_2^-	Air	-	-	0.8	0.02
NO_2	Air	-	+ (Air)	8.0	0.19
N-free	N_2	-	-	0.0	0.00
N-free	N_2	-	+ (Air)	0.0	0.00
N-free	N_2	+ (Air)	-	0.0	0.00
N-free	N_2	+ (Air)	+ (Air)	8.0	0.47
N-free	N_2	+ (Ar)	-	0.1	0.02
N-free	N_2	+ (Ar)	+ (Air)	3.2	0.24
N-free	N_2	+ (Air)	+ (Ar)	0.1	0.04

Enzyme activity = $-\text{NO}_3^-$ $\mu\text{mole}/20 \text{ min}/\text{mg N}$