

1Dp-12

脱窒菌 *Alcaligenes* sp. の亜硝酸塩還元酵素活性化に対する Cl^- の影響

増子正行, 岩崎秀一 (名大・理・生物)

硝酸塩を含む複合培地で静置培養した *Alcaligenes* sp. NCIB 11015 より調製した soluble fraction (SF) を凍結-融解処理すると, 亜硝酸塩還元酵素 (NiR) の活性化が起こる。この酵素反応の生成物の検討から, 被活性化酵素は異化型 NiR であることが判明した。

SF を透析して得た高分子量成分 (HMC) では, 凍結-融解処理しても NiR の活性化が起こらず, SF より限外ろ過で得たる液 (低分子量成分, LMC) の添加で活性化能が回復した。従って, 活性化には低分子量活性化因子の存在が必要となる。(以上, 日本植物学会第45・47回大会報告)

今回, この NiR 活性化についてさらに検討し, 以下の結果を得たので報告する。

〈方法〉

HMC の調製——細胞を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaP), pH 7.2 に懸濁させ, 9 Kc, 10 または 20 分間音波破碎する。遠心分離で未破碎物を除いたのち, 107,000 $\times g$ で 1 時間遠心分離を行ない, 上清 (SF) をとる。この SF を同一緩衝液に透析し, 内液を HMC とする。NiR 活性—— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -methyl viologen を電子供与系として, 30°C, 50 mM NaP, pH 7.0 中で反応させる。基質 NO_2^- の減少を diazo-coupling 法で測定し, NiR 活性を求める。 Cl^- の分析——ナオシアン酸第二水銀比色法により定量する。NiR の活性化 (凍結-融解処理)——HMC を -20°C で 12 ~ 72 時間凍結し, 室温で融解させる。

〈結果・考察〉

低分子量活性化因子を同定するため, HMC に種々の無機塩を添加し, 凍結-融解処理後の NiR 活性を比較した。その結果, NaCl の場合にのみ活性化が認められた。同様の実験を種々のハロゲン化物イオンについて検討したところ, Br^- と Cl^- と同様の効果を有していた。 Cl^- は 1 mM でも有意に NiR 活性化を誘起するが, 最大レベルの活性化には 5 ~ 10 mM 必要だった。また, LMC を 0.1 M NaP, pH 7.2 で平衡化した Sephadex G-15 でゲルろ過すると, HMC に対して活性化能を有する分画と Cl^- の分画が一致した。従って, 低分子量活性化因子は Cl^- であることが判明した。

HMC を 0.1 M NaP, pH 7.2 で平衡化した Sephadex G-150 でゲルろ過すると, NiR は低活性レベルで分画され, Cl^- 添加, 凍結-融解処理で活性化する。 Cl^- 添加, 凍結-融解処理を前にとって NiR を活性化しておいた HMC を, 同一カラムでゲルろ過した場合も同一分画に NiR 活性が現われる。ゆえに, NiR の活性化は分子量変化を伴わない, 酵素の conformation change によるものと考えられる。