

汽水湖光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の
窒素代謝と炭素代謝に及ぼす硝酸呼吸の影響

酒井 猛治・地阪 光生・横田 一成・滝波 弘一

Effects of Nitrate Respiration on Nitrogen and Carbon Metabolisms in Photosynthetic
Bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* Isolated from Brackish Water

Takeharu SAKAI, Mitsuo JISAKA, Kazushige YOKOTA and Koichi TAKINAMI

Abstract A denitrifying strain of phototrophic purple nonsulfur bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* NII2, which was isolated from, Lake Nakami, was characterized for nitrogen and carbon metabolisms. This strain grew well utilizing $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as nitrogen source, but was incapable of utilizing KNO_3 as nitrogen source under anaerobic condition. On the other hand, KNO_3 was reduced to N_2 through several intermediary metabolites under both light and dark culture conditions. The denitrification activities of dark-grown cells were 1.5-fold higher than those of light-grown cells, indicating that the denitrification of the strain NII2 might be repressed by light irradiation. In addition, light-grown cells produced large amounts of alanin derived from pyruvate, the final product of glycolytic pathway. The amounts of alanin decreased with increasing of KNO_3 added. In contrast, dark-grown cells produced large amounts of glutamate derived from 2-oxo-glutarate, an intermediate of TCA cycle. These results indicate that light irradiation and nitrate respiration have a close relation to nitrogen and carbon metabolisms in the bacterium.

Key word: nitrate respiration, *Rhodobacter sphaeroides*, denitrification

緒 言

光合成細菌の一種である紅色非硫黄細菌は、光合成系としてクロマトフォアを有し、光合成植物とは異なる酸素非発生の光合成を行っている。クロマトフォアは、細菌細胞内膜のくびれ込みから生じた細胞内膜系であって、植物クロロプラストの数万分の一の大きさの微粒子構造体である。

Rhodobacter sphaeroides は紅色非硫黄細菌の代表的なものであり、水の代わりに種々の有機化合物を電子供与体として利用し、また炭素源としても代謝して生育する。さらにこの細菌の窒素代謝に関連して Satoh らは、硝酸呼吸である脱窒代謝系を見出している^{1, 2)}。この反応は、硝酸還元酵素^{3, 4)}、亜硝酸還元酵素^{5, 6)}、一酸化窒素還元酵素⁷⁾、亜酸化窒素還元酵素⁸⁾による連鎖反応によって触媒され、最終的には NO_3^- を N_2 にまで還元して放出する^{2, 9)}。しかし、この硝酸呼吸と光照射あるいは炭素代謝との関係様式は明確でない。

以上述べたように *Rb. sphaeroides* による窒素原子を含む幅広い有機化合物と無機化合物の利用性は、現在問題とされている食品工業廃水等の水質汚染の改善¹⁰⁾、あるいは多様な物質代謝能を活用した有用物質の生合成にも役立つものと考えられる。

本研究に用いた *Rb. sphaeroides* NII2 は、塩分濃度約1.2%の汽水湖底泥より採取分離されたもので、光照射下で NH_4^+ と NO_3^- を同時に利用できることが既に確認されている¹¹⁾。*Rb. sphaeroides* では、取り込まれた NH_4^+ は炭素代謝に関連した解糖系と TCA サイクルの中間物質より誘導される経路によってアミノ酸へと代謝されると考えられている¹²⁾。最近酵母では培養中の酸素の有無によってアミノ酸代謝が影響を受けると報告されているので¹³⁾、*Rb. sphaeroides* でも培養中の硝酸呼吸の条件が光照射と関連して影響を与える可能性も考えられる。

本研究では、培養フラスコに注射筒を直結した培養器を考案し、硝酸呼吸に基づく発生 N_2 ガスを連続的に定

量した。この密閉培養器では培養終了後に生成 CO_2 量を測定することも可能である。さらに培養液中と細胞内に蓄積したアミノ酸量を分析し、*Rb. sphaeroides*の窒素代謝が嫌気条件下で炭素代謝とどのように関連しているのかを、光照射の影響と合わせて調べた。

実験材料と方法

光合成細菌

当研究室で1989年に気水湖（島根県，中海）の底泥より分離され、*Rhodobacter sphaeroides*と固定された菌株のうち、脱窒能を有することが確認された NII2株¹⁾を使用した。

培地組成と培養条件

基本培地は下記の成分を蒸留水に溶解し、1 Lの培地として調製した。

無機塩： KH_2PO_4 , 0.5g; K_2HPO_4 , 0.5g;
 $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05g;
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005g; NaCl , 0.4g
 微量元素： H_3BO_3 , 0.1mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0mg;
 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.2mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
 1.0mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01mg

成長因子：酵母エキス（和光純薬工業），0.4g

基本培地に炭素源としてグルコース，50mM，窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ，25mMを添加した。脱窒条件下で培養するときは，種々の濃度の KNO_3 をさらに添加した。基本培地，リン酸化合物，炭素源，窒素源は別々にオートクレープし，滅菌後あわせることによって培養培地を調製した。pHは NaOH で7.0に調製した。

前培養として，上述の脱窒培養培地（25mM KNO_3 ）と同じ組成の寒天培地を調製し，4,000lux，30°Cの条件下で48時間培養し，寒天培地上にシングルコロニーを得た。一枚のプレートから100個のシングルコロニーを集め，0.88%の生理的食塩水に懸濁した。その細胞懸濁液（ $\text{OD}=1.5$ ）1mlを，50ml容三角フラスコに満たした65mlの培養培地に接種した。明条件培養は4,000lux，30°Cで，暗条件培養は0lux，30°Cで行った（図1）。

細菌の生育の測定

15倍希釈培養液を波長660nmで濁度測定し，生育を表した。

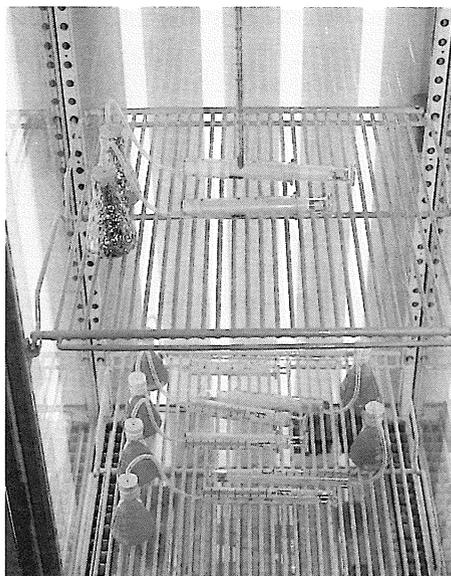


図1 光培養器（BIOPHOTOCHAMBER LX2200）
下：明培養条件 上：暗培養条件

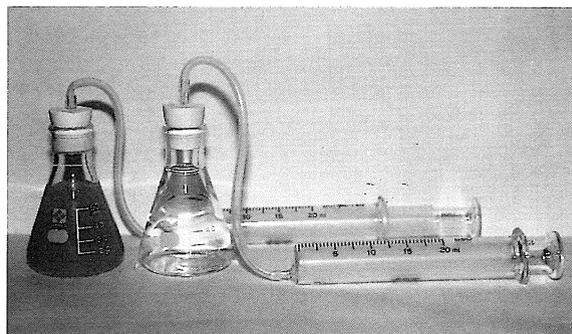


図2 ガストラップを備え付けた培養フラスコ
右：培養0時間
左：培養60時間

培養中の脱窒素量 (N_2) および培地中に生成した CO_2 量の測定

図2に示したように，50ml容三角フラスコにはガストラップ（20ml注射筒）が直結してある。発生した窒素ガス量を測定するときには，培養フラスコの底にあらかじめ入れておいた攪拌子をマグネチックスターラで攪拌し，培養液中の N_2 ガスをも気相に放出させ，ガストラップの目盛りで測定した。

培養終了後，培養液中に生成した CO_2 量を測定するために，2N H_2SO_4 を添加した。培養液を攪拌子で攪拌

し、培養フラスコの気相に放出された CO₂ 量をガストラップの目盛りで測定した。

培養液中および細胞内のアミノ酸の分析

培養液中に蓄積したアミノ酸を分析するために、培養液を10,000×g, 4℃で15分間遠心し、その上清を採取した。

細胞内に生成したアミノ酸を分析するために、培養液60mlを10,000×g, 4℃で15分間遠心して集菌し、5%食塩水で洗菌後、200μlの蒸留水に再懸濁した。その細胞懸濁液を120℃, 20分間加熱して細胞内アミノ酸を抽出した。抽出液を10,000×g, 4℃で10分間遠心し、その上清のアミノ酸を細胞内アミノ酸とした。

培養上清および細胞内アミノ酸の分析サンプル1μlをTLCプレートにスポットし、エタノール/25%アンモニア水(77:23, v/v)で展開し、個々のアミノ酸を分離した。0.02%ニンヒドリンを含むブタノール溶液を噴霧し、乾燥後、80℃で3分間加熱することによってアミノ酸のスポットを検出した。

結果と考察

1. *Rb. sphaeroides* NII2の窒素源利用性

1. 1. 窒素源による生育の差異

窒素源として(NH₄)₂HPO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄を添加してNII2を生育させた結果を図3に示した。生育はNH₄Clと(NH₄)₂SO₄を窒素源としたときに著しく阻害された。これは(NH₄)₂HPO₄に比べ両窒素源では、増殖につれてpHの著しい低下を引き起こすためと考えられる。また、(NH₄)₂HPO₄の濃度を検討したところ、25mMの時、至適生育を示したので、以後の実験では25mM(NH₄)₂HPO₄で培養を行った。

1. 2. KNO₃を窒素源としたときの生育

*Rb. sphaeroides*がKNO₃を同化的に還元して窒素源として利用する事ができるかどうかを調べるために、(NH₄)₂HPO₄の代わりにKNO₃を添加して培養したところ、*Rb. sphaeroides* NII2はKNO₃を窒素源として利用することができなかった(データは示していない)。このことは、本実験で行った条件下では、同化的硝酸還元酵素系を発現しないか、もしくは*Rb. sphaeroides* NII2が同化的硝酸還元酵素系をコードしている遺伝子を持っていないものと考えられる。

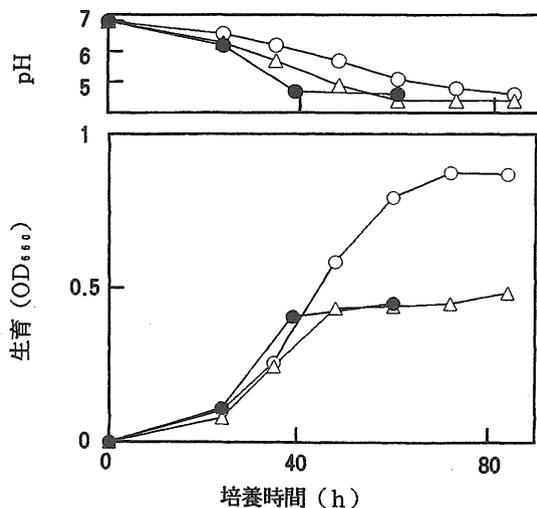


図3 種々の窒素源による *Rb. sphaeroides* NII2の生育
 △: NH₄Cl
 ○: (NH₄)₂HPO₄
 ●: (NH₄)₂SO₄

2. KNO₃存在下での *Rb. sphaeroides* NII2の生育と脱窒

2. 1. KNO₃存在下での生育と脱窒及び光の作用

明、暗両条件で種々の濃度で生育させた結果を図4に示した。

明条件下ではKNO₃無添加の場合、かなり高い生育を示すにも関わらず、当然のことではあるが、N₂の発生は全く認められなかった。しかし25mM以上のKNO₃を添加すると、KNO₃無添加と同様な生育を示し、その上、激しいN₂発生が認められた。

暗条件下ではKNO₃無添加の場合、全く生育することができず、KNO₃の添加によってのみ生育が可能であった。このことは、*Rb. sphaeroides*が暗-嫌気条件下で、硝酸呼吸によってエネルギーを生成していることを示している。一方明条件下では、硝酸呼吸なし(KNO₃無添加)の状態が高い生育を示したので、光は硝酸呼吸を代替する代謝作用を行っていることになる。

また表1に示すように生育速度は、明、暗条件ともに25mM以上のKNO₃濃度では少しずつ低下する傾向を示した。しかしながら明条件下では定常期まで生育させるとほぼ同じレベルの生育を示すのに対して、暗条件下ではKNO₃濃度が高い方が高いレベルまで生育した。これは、暗条件下では、硝酸呼吸でしかエネルギーを生成することができないために、KNO₃濃度が生育の律速

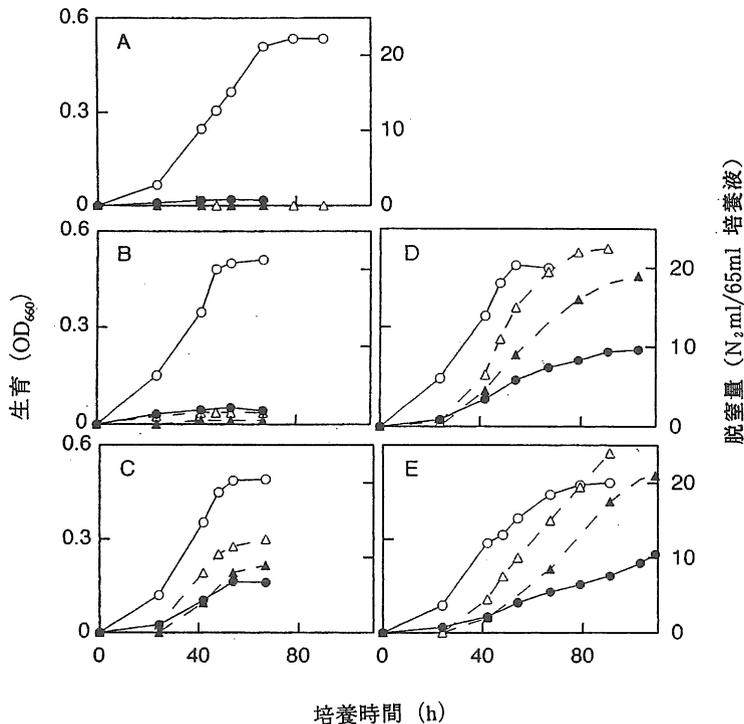


図4 KNO₃存在下での *Rb. sphaeroides* NII2の生育と脱窒
 ○：明条件下での生育 △：明条件下での脱窒
 ●：暗条件下での生育 ▲：暗条件下での脱窒
 A：KNO₃無添加 D：KNO₃ 50mM
 B：KNO₃ 5 mM E：KNO₃ 100mM
 C：KNO₃ 25mM

表1 *Rb. sphaeroides* NII2 の生育速度と最大生育レベル

KNO ₃ 濃度 (mM)	嫌気-明		嫌気-暗	
	生育速度	最大生育レベル	生育速度	最大生育レベル
0	0.009	0.535	0.000	0.017
5	0.012	0.511	0.001	0.042
25	0.012	0.491	0.005	0.160
50	0.011	0.480	0.004	0.230
100	0.009	0.481	0.003	0.250

生育速度は、1時間毎に増加したOD₆₆₀の値で表した。
 最大生育レベルは、定常期に達したときのOD₆₆₀の値で表した。

になることを示している。

2. 2. 光照射と脱窒の関係

図5に明、暗条件下で生育した細胞の細胞当たりの脱窒活性を示した。図5から分かるように、両条件下で生育した細胞とも同じ傾向を示したが、明-生育細胞よりも暗-生育細胞の方が約1.5倍の脱窒活性を示した。こ

のことは、光が存在すると脱窒活性と硝酸呼吸は低下することを示している。

3. 硝酸呼吸が *Rb. sphaeroides* NII2 の炭素代謝に及ぼす影響

培養液からのCO₂の発生の結果を図6に示した。図6から分かるように、KNO₃濃度が高くなると、CO₂発生量は増加した。また暗-培養液からのCO₂の発生量は、明-培養液の約3倍であった。この結果は、硝酸呼吸によりTCAサイクルの最終産物であるCO₂が多量に生成したことを示している。

4. 硝酸呼吸が *Rb. sphaeroides* NII2 のアミノ酸代謝に及ぼす影響

4. 1. 明条件下でのアミノ酸代謝

図7にKNO₃存在下、すなわち硝酸呼吸の条件下で細胞内に蓄積したアミノ酸を分析した結果を示した。明-生育細胞では、50mM KNO₃までは多量のアラニンが

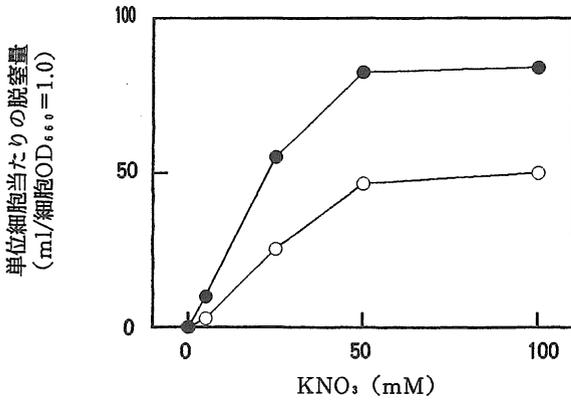


図5 *Rb. sphaeroides* NII2の明-, 暗-細胞当たりの脱窒活性
○：明-生育細胞 ●：暗-生育細胞

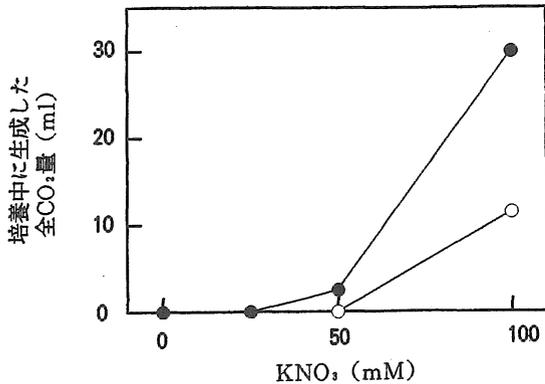


図6 *Rb. sphaeroides* NII2の硝酸呼吸によるCO₂の生成
○：明-培養 ●：暗-培養

細胞内に生成し、それ以上の濃度では著しく低下した。一方 KNO₃ の増加につれてグルタミン酸の細胞内生成は増加した (図7, レーン1~5)。

4. 2. 暗条件下でのアミノ酸代謝

暗-生育細胞では、アラニンの生成は明-生育細胞に比べてかなり少量であったが、グルタミン酸の生成は多量であった (図7, レーン6~8)。また培養上清のアミノ酸を分析した結果を図8に示した。明-培養では、培養上清にアラニンの生成が認められたが、暗-培養ではアラニンは検出されなかった。

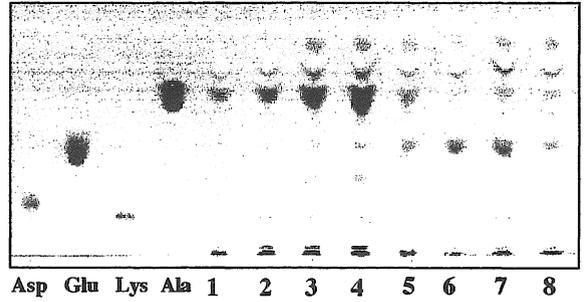


図7 *Rb. sphaeroides* NII2の細胞内アミノ酸のTLC
光照射：レーン1~5, 明-生育細胞
レーン6~8, 暗-生育細胞
KNO₃：レーン1, 0mM
レーン2, 5mM
レーン3と6, 25mM
レーン4と7, 50mM
レーン5と8, 100mM

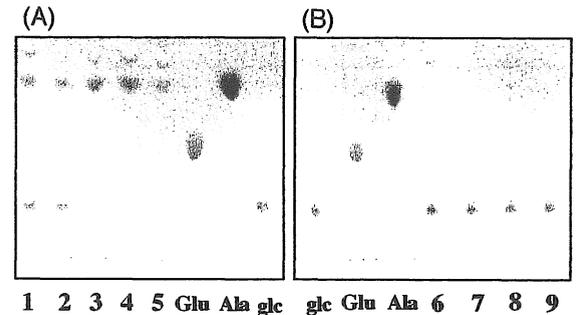


図8 培養液中に蓄積したアミノ酸のTLC
光照射：A, 明-培養
B, 暗-培養
KNO₃：レーン1, 0mM
レーン2と6, 5mM
レーン3と7, 25mM
レーン4と8, 50mM
レーン5と9, 100mM

4. 3. グルコースからアミノ酸に至る代謝系に及ぼす硝酸呼吸の影響

アラニンは解糖系の終末にあるピルビン酸から誘導され、グルタミン酸はTCAサイクルの中間物質である2-オキソグルタル酸より誘導される。明条件下では硝酸呼吸よりも光合成およびその後の嫌氣的代謝が優先的に行われるため、TCAサイクルが活発に作動することはない。したがって解糖系の終末物質であるピルビン酸の生成が増加し、アラニンの生成に至る。しかしながらNO₃⁻が存在すると硝酸呼吸によってTCAサイクルへと代謝系が流れ込み、2-オキソグルタル酸からグルタミン酸の生成に至る。さらに硝酸呼吸によって生育している暗条件下では、常にTCAサイクルへと代謝系が流れ込ん

でいるためにグルタミン酸を大量に生成する。以上の結果は、嫌気条件下では硝酸呼吸（脱窒）によって、グルコースからの炭素代謝系が解糖系に留まらず、TCA サイクルへと流れ込んだことを強く示唆している。

引用文献

- 1) Satoh, T., and T. Shimazaki, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Arch. Microbiol. **108**: 265-269, 1976.
- 2) Satoh, T., Light-activated, -inhibited and -independent denitrification by denitrifying phototrophic bacterium. Arch. Microbiol., **115**: 293-298, 1977.
- 3) Byrne, M. D., and D. J. D. Nicholas, A membrane-bound dissimilatory nitrate reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta, **915**: 120-124, 1987.
- 4) Sawada, E., and T. Satoh, Periplasmic location of dissimilatory nitrate and nitrite reductases in a denitrifying phototrophic bacterium, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. Plant Cell Physiol., **21**: 205-210, 1980.
- 5) Michalski, W. P., and D. J. D. Nicholas, Molecular characterization of a copper containing nitrite reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta, **828**: 130-137, 1985.
- 6) Urata, K., and T. Satoh, Mechanism of reduction to nitrous oxide in a photodenitrifier, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta, **841**: 201-207, 1985.
- 7) Itoh, M., K. Matsuura, and T. Satoh, Involvement of cytochrome bc₁ complex in the electron transfer pathway for N₂O reduction in a photodenitrifier, *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. FEB, **251**: 104-108, 1989.
- 8) Michalski, W. P., D. H. Hein, and D. J. D. Nicholas, Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta, **872**: 50-60, 1986.
- 9) Hiraishi, A., K. Muramatsu, and K. Urata, Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment. J. Ferment. Bioeng., **79**: 39-44, 1995.
- 10) Shen, J., and O. Hirayama, Denitrification of PVA-immobilized denitrifying photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides*. J. Ferment. Bioeng., **75**: 43-47, 1993.
- 11) Shen, J., and O. Hirayama, Hydrogen photoproduction and denitrification by photosynthetic bacteria isolated from Lake Nakaumi and its vicinity. J. Ferment. Bioeng., **72**: 338-342, 1991.
- 12) Datta, P., Biosynthesis of amino acids. In Clayton, R. K., and W. R. Sistrom (eds.). *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York and London, pp.779-792, 1978.
- 13) Martinez Force, E., and T. Benitez, Change in yeast amino acid pool with respiratory versus fermentative metabolism. Biotechnol. Bioeng. **40**: 643-649, 1992.